



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD



NAUČNA OBLAST • TEHNOLOŠKO INŽENJERSTVO
STUDIJSKI PROGRAM • BIOTEHNOLOGIJA

Ivana Pajčin, mast. inž.

Optimizacija uslova umnožavanja i primarnog izdvajanja biomase *Bacillus* sp. za primenu u fitomedicini

doktorska disertacija

Novi Sad • 2019

SADRŽAJ

SPISAK OZNAKA, SIMBOLA I SKRAĆENICA.....	i
SPISAK TABELA	v
SPISAK SLIKA.....	viii
1. UVOD	1
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	3
3. PREGLED LITERATURE.....	4
3.1. Biološka kontrola i biopesticidi	4
3.1.1. Globalni trendovi tržišta biopesticida.....	5
3.1.2. Tržište biopesticida u Republici Srbiji.....	6
3.1.3. Mehanizmi biološke kontrole primenom mikrobioloških biopesticida	6
3.2. Primena bakterija roda <i>Bacillus</i> u biološkoj kontroli.....	8
3.2.1. <i>Bacillus velezensis</i> kao agens biološke kontrole	9
3.3. Bakterije roda <i>Xanthomonas</i> kao patogeni biljaka.....	16
3.3.1. Crna trulež kupusnjača – <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	16
3.3.2. Bakteriozna pegavost paprike i paradajza – <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	17
3.3.3. Biološka kontrola fitopatogena roda <i>Xanthomonas</i> primenom bakterija roda <i>Bacillus</i>	18
3.4. Razvoj biotehnoloških procesa proizvodnje biokontrolnih agenasa	19
3.5. Sirovi glicerol iz proizvodnje biodizela kao sirovina u biotehnološkoj proizvodnji ...	22
3.6. Mikrofiltracija kao tehnika separacije biomase mikroorganizama	23
3.6.1. Opšta razmatranja membranskih separacionih procesa.....	24
3.6.2. Unapređenje procesa unakrsne mikrofiltracije primenom hidrodinamičkih metoda za poboljšanje fluksa permeata	28
3.6.3. Procedure čišćenja membrane nakon procesa membranske filtracije	40
3.6.4. Izdvajanje biomase bakterija roda <i>Bacillus</i> primenom mikrofiltracije	41
4. MATERIJAL I METODE	44
4.1. Mikroorganizmi	44
4.1.1. Skringing potencijalnih proizvodnih mikroorganizama	44
4.1.2. Proizvodni mikroorganizam.....	44
4.1.3. Test mikroorganizmi.....	45
4.1.4. Čuvanje mikroorganizama	45
4.1.5. Osvežavanje mikroorganizama	46
4.2. Hranljive podloge	46
4.2.1. Hranljive podloge za pripremu inokuluma	47

4.2.2.	Hranljive podloge za kultivaciju	47
4.3.	Priprema inokuluma i inokulacija.....	51
4.4.	Procesni uslovi.....	51
4.5.	Analitičke metode	53
4.5.1.	Određivanje sadržaja biomase.....	53
4.5.2.	Određivanje rezidualnih koncentracija nutrijenata	53
4.5.3.	Testiranje antimikrobne aktivnosti <i>IN VITRO</i>	54
4.5.4.	Identifikacija antimikrobnih jedinjenja	54
4.6.	Unapređenje Procesu unakrsne (<i>cross-flow</i>) mikrofiltracije kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma.....	55
4.6.1.	Unakrsna mikrofiltracija kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma sa i bez prisustva statičkog mešača	56
4.6.2.	Unakrsna mikrofiltracija kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma uz uduvanje vazduha u tok napojne smeše, sa i bez prisustva statičkog mešača	58
4.7.	Testiranje antimikrobne aktivnosti kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma <i>in planta</i>	59
4.8.	Testiranje šireg spektra antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i>	60
4.9.	Statistička obrada eksperimentalnih podataka	61
4.9.1.	Statistička obrada eksperimentalnih podataka u fazi skrininga potencijalnih proizvodnih mikroorganizama i odabira optimalnog izvora ugljenika i organskog izvora azota za proizvodnju biokontrolnih agenasa.....	61
4.9.2.	Statistička obrada eksperimentalnih podataka u fazi modelovanja sastava hranljivih podloga na bazi komercijalnog i sirovog glicerola.....	61
4.9.3.	Statistička obrada eksperimentalnih podataka u fazi optimizacije sastava hranljivih podloga na bazi komercijalnog i sirovog glicerola.....	62
4.9.4.	Statistička obrada eksperimentalnih podataka u fazi unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma.....	62
5.	REZULTATI I DISKUSIJA	64
5.1.	Skrining potencijalnih proizvodnih mikroorganizama	64
5.2.	Molekularna identifikacija odabranog proizvodnog mikroorganizma	68
5.3.	Odabir optimalnog izvora ugljenika i organskog izvora azota	69
5.4.	Modelovanje i optimizacija sastava hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola.....	75
5.4.1.	Matematički modeli uticaja koncentracije komponenti hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola na antimikrobnu aktivnost i rezidualne koncentracije nutrijenata	75
5.4.2.	Optimizacija sastava hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola	81
5.4.3.	Validacija rešenja hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola.....	83
5.5.	Identifikacija antimikrobnih jedinjenja proizvedenih od strane proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru	92

5.6.	Modelovanje i optimizacija sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola.....	96
5.6.1.	Matematički modeli uticaja koncentracije komponenti hranljive podloge na bazi sirovog glicerola na antimikrobnu aktivnost i rezidualne koncentracije nutrijenata.....	97
5.6.2.	Optimizacija sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola	102
5.6.3.	Validacija rešenja hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola	104
5.7.	Unapređenje procesa unakrsne mikrofiltracije za izdvajanje biomase proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i>	112
5.7.1.	Unakrsna mikrofiltracija bez primene hidrodinamičkih metoda za povećanje fluksa permeata	112
5.7.2.	Unakrsna mikrofiltracija uz primenu Kenics statičkog mešača	119
5.7.3.	Unakrsna mikrofiltracija uz primenu uduvanja vazduha	128
5.7.4.	Unakrsna mikrofiltracija uz primenu kombinacije Kenics statičkog mešača i uduvanja vazduha	139
5.8.	Ispitivanje aktivnosti proizvedenih biokontrolnih agenasa protiv fitopatogena paprike <i>in planta</i>	148
5.9.	Ispitivanje šireg spektra antimikrobnog delovanja proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i>	151
5.9.1.	<i>In vitro</i> testiranje šireg spektra delovanja proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i>	151
5.9.2.	<i>In vivo</i> testiranje šireg spektra delovanja proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i>	153
6.	ZAKLJUČCI	158
7.	LITERATURA	161

SPISAK OZNAKA, SIMBOLA I SKRAĆENICA

A	adenin
ANN	<i>Artificial Neural Network</i> (eng.) – veštačka neuronska mreža
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (eng.)
C	citozin
CCD	<i>Central Composite Design</i> (eng.) – centralni kompozitni dizajn
CFU	<i>Colony Forming Unit</i> (eng.) – jedinica koja formira koloniju
CIP	<i>Cleaning-In-Place</i> (eng.) – čišćenje na mestu rada
COP	<i>Cleaning-Out-of-Place</i> (eng.) – čišćenje van mesta rada
DCA	<i>Dynamic Controlled Atmosphere</i> (eng.) – skladište sa dinamički kontrolisanom atmosferom
DF	<i>Degree of Freedom</i> (eng.) – broj stepeni slobode
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (eng.) – etilendiamintetrasirćetna kiselina
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (eng.) – Evropska agencija za bezbednost hrane
EPPO	<i>European and Mediterranean Plant Protection Organization</i> (eng.) – Evropska i mediteranska organizacija za zaštitu biljaka
ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i> (eng.) – masena spektrometrija sa elektrosprej jonizacijom
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (eng.) - infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom
G	guanin
G+C (%)	ukupni sadržaj guanina i citozina u DNK
GA	<i>Genetic Algorithms</i> (eng.) – genetički algoritam
GRAS	<i>Generally Regarded As Safe</i> (eng.) – oznaka statusa za organizme koji se generalno smatraju bezbednim od strane Američke organizacije za hranu i lekove (FDA – <i>Food and Drug Administration</i>)
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> (eng.) – tečna hromatografija pod visokim pritiskom
ISR	<i>Induced Systemic Resistance</i> (eng.) – indukovana sistemska rezistencija
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i> (eng.) – molekularna analiza evolucione genetike
MRS	<i>de Man, Rogosa and Sharpe</i> bujon
MS	<i>Mean Squares</i> (eng.) – suma srednjih kvadrata
MWCO (Da)	<i>Molecular Weight Cut Off</i> (eng.) – molekulska masa jedinjenja koja zaostaju u retentatu tokom procesa membranske filtracije
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (eng.) – Nacionalni centar za biotehnoške podatke

NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (eng.) - nuklearna magnetna rezonanca
OPNG	<i>Ortho-nitrophenyl-β-galactoside</i> (eng.) – orto-nitrofenil-β-galaktozid
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (eng.) – lančana reakcija polimeraze
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i> (eng.) – krompir dekstrozni agar
PGPB	<i>Plant Growth Promoting Bacteria</i> (eng.) – bakterije koje podstiču rast biljaka
PGPR	<i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i> (eng.) – rizobakterije koje podstiču rast biljaka
RNK	ribonukleinska kiselina
rRNK	ribosomalna ribonukleinska kiselina
RSM	<i>Response Surface Methodology</i> (eng.) – metodologija odzivne površine
SAR	<i>Systemic Acquired Resistance</i> (eng.) – stečena sistemska rezistencija
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> (eng.) – natrijum dodecil sulfat
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> (eng.) – skenirajuća elektronska mikroskopija
SMA	<i>Sabouraud Maltose Agar</i> (eng.) – Saburo-maltozni agar
SS	<i>Sum of Squares</i> (eng.) – suma kvadrata
T	timin
tRNK	transportna ribonukleinska kiselina
TSA	<i>Tryptone Soy Agar</i> (eng.) – tripton soja agar
TSB	<i>Tryptone Soy Bouillon</i> – tripton soja bujon
ULO	<i>Ultra Low Oxygen</i> (eng.) – skladište sa niskim sadržajem kiseonika
YMA	<i>Yeast Maltose Agar</i> (eng.) – hranljiva podloga za kultivaciju bakterija roda <i>Xanthomonas</i> na bazi ekstrakta kvasca i maltoze
A (m ²)	površina membrane
A_{600}	vrednost apsorbance dobijena spektrofotometrijskim određivanjem optičke gustine uzorka na talasnoj dužini 600 nm
b_0	odsečak polinomske jednačine drugog reda
b_1, b_2, b_3, b_4	linearni koeficijenti polinomske jednačine drugog reda
$b_{11}, b_{22}, b_{33}, b_{44}$	kvadratni koeficijenti polinomske jednačine drugog reda
$b_{12}, b_{13}, b_{14}, b_{23}, b_{24}, b_{34}$	koeficijenti interakcije polinomske jednačine drugog reda
d/D_i (m/m)	odnos prečnika mešača i prečnika suda bioreaktora
D_h (m)	hidraulički prečnik kanala membrane za membransku filtraciju
E (kW·h/m ³)	specifična potrošnja energije tokom mikrofiltracije uz primenu uduvavanja vazduha
E_{NSM} (kW·h/m ³)	specifična potrošnja energije prilikom mikrofiltracije bez statičkog mešača
ER (%)	smanjenje specifične potrošnje energije
E_S (kW·h/m ³)	specifična potrošnja energije
E_{SM} (kW·h/m ³)	specifična potrošnja energije prilikom mikrofiltracije uz prisustvo statičkog mešača
FI (%)	relativno povećanje fluksa permeata

J_P (l/(m ² ·h))	fluks permeata u stacionarnom stanju
$J_{P, NSM}$ (l/(m ² ·h))	fluks permeata prilikom mikrofiltracije bez statičkog mešača
$J_{P, SM}$ (l/(m ² ·h))	fluks permeata prilikom mikrofiltracije uz prisustvo statičkog mešača
K	oznaka za komercijalne diskove sa streptomycinom
M 1	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
M 12	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> soj izolovan iz zemljišta
M 13	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
M 14	<i>Trichoderma reesei</i> QM 9414
M 2	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876
M 3, M 4, M 5	tri izolata roda <i>Bacillus</i> izolovana iz mladog sira
M 6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
M 7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> soj izolovan iz vode
M 8	<i>Pseudomonas putida</i> izolovan iz okruženja
M 9, M 10, M 11	tri izolata roda <i>Lactobacillus</i> izolovana iz okruženja
m/z	odnos molekulske mase i naelektrisanja jona u masenoj spektrometriji
$P(W)$	gubitak hidrauličke snage usled otpora proticanju napojne smeše
P_D (Pa)	pritisak iza membranskog modula
P_S (Pa)	pritisak ispred membranskog modula
Q_g (l/h)	protok gasa
$Q_{G,D}$ (m ³ /h)	protok vazduha pri vrednosti pritiska na izlazu iz membranskog modula
Q_L (m ³ /h)	protok napojne smeše
Q_P (l/h)	protok permeata
R^2	koeficijent determinacije
Re	Rejnoldsov broj
TMP (bar)	transmembranski pritisak
U (μmol/min)	internacionalna jedinica za aktivnost enzima
u_g (m/s)	superkrična brzina proticanja gasa
u_l (m/s)	superkrična brzina proticanja tečnosti
V_G (m/s)	prividna brzina proticanja vazduha
V_L (m/s)	prividna brzina proticanja napojne smeše
vvm (l/(l·min))	<i>volume of air/volume of liquid/min</i> (eng.) – jedinica za brzinu aeracije
X_1 (g/l)	inicijalna koncentracija glicerola
X_2 (g/l)	inicijalna koncentracija ekstrakta kvasca
X_3 (g/l)	inicijalna koncentracija (NH ₄) ₂ SO ₄
X_4 (g/l)	inicijalna koncentracija K ₂ HPO ₄
Y_1 (mm)	prečnik zona inhibicije
Y_2 (g/l)	rezidualna koncentracija glicerola

Y_3 (g/l)	rezidualna koncentracija ukupnog azota
Y_4 (g/l)	rezidualna koncentracija ukupnog fosfora
γ	specifični odnos toplote za vazduh
ΔP (Pa)	pad pritiska
ϵ	faktor injektovanja gasa
1492r	univerzalni prajmer (<i>reverse</i>) za sekvencu bakterijske 16s rRNK
27f	univerzalni prajmer (<i>forward</i>) za sekvencu bakterijske 16s rRNK

SPIŠAK TABELA

Tabela 3.1. Mehanizmi biološke kontrole fitopatogena primenom mikrobioloških biopesticida (Pal i McSpadden Gardener, 2006).....	6
Tabela 3.2. Primena <i>Bacillus velezensis</i> u biološkoj kontroli fitopatogena – pregled literature	14
Tabela 3.3. Uticaj procesnih parametara na mikrofiltraciju (Williams i Wakeman, 2002)	28
Tabela 3.4. Metodi prevencije smanjenja fluksa permeata (Williams i Wakeman, 2002)	29
Tabela 3.5. Primeri sredstava za čišćenje membrana i njihova primena (Williams i Wakeman, 2002).....	41
Tabela 4.1. Sastav hranljive podloge YMA.....	46
Tabela 4.2. Hranljive podloge korišćene za kultivaciju u fazi skrininga potencijalnih proizvodnih mikroorganizama	47
Tabela 4.3. Sastav polusintetičke tečne hranljive podloge za kultivaciju izolata <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (M 12).....	47
Tabela 4.4. Sastav polusintetičke tečne hranljive podloge za kultivaciju izolata <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (M 13)	47
Tabela 4.5. Sastav hranljivih podloga za kultivaciju u fazi odabira optimalnog izvora ugljenika i organskog izvora azota za proizvodnju biokontrolnih agenasa	48
Tabela 4.6. Eksperimentalni plan u fazi modelovanja i optimizacije sastava hranljivih podloga na bazi komercijalnog i sirovog glicerola za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma: nezavisne promenljive i njihovi nivoi.....	49
Tabela 4.7. Optimizovan sastav hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola	50
Tabela 4.8. Optimizovan sastav hranljive podloge na bazi sirovog glicerola.....	50
Tabela 4.9. Procesni uslovi tokom kultivacije mikroorganizama u različitim fazama istraživanja.....	52
Tabela 4.10. Eksperimentalni plan u fazi unakrsne mikrofiltracije kultivacionih tečnosti sa i bez prisustva statičkog mešača: nezavisne promenljive i njihovi nivoi.....	58
Tabela 4.11. Eksperimentalni plan u fazi unakrsne mikrofiltracije kultivacionih tečnosti uz uduvavanje vazduha u tok napojne smeše bez prisustva statičkog mešača: nezavisne promenljive i njihovi nivoi	59
Tabela 4.12. Eksperimentalni plan u fazi unakrsne mikrofiltracije kultivacionih tečnosti uz uduvavanje vazduha u tok napojne smeše uz prisustvo statičkog mešača: nezavisne promenljive i njihovi nivoi	59
Tabela 4.13. Eksperimentalni plan u fazi <i>in planta</i> testiranja antimikrobne aktivnosti kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma	60
Tabela 5.1. Jednofaktorijalna analiza varijanse prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti potencijalnih proizvodnih mikroorganizama protiv fitopatogenih izolata roda <i>Xanthomonas</i>	67
Tabela 5.2. Srednje vrednosti prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti potencijalnih proizvodnih mikroorganizama protiv fitopatogenih izolata roda <i>Xanthomonas</i>	67

Tabela 5.3. Rezultati poravnanja sekvenci primenom BLAST softvera preko NCBI servera prilikom molekularne identifikacije proizvodnog mikroorganizma.....	68
Tabela 5.4. Dvofaktorijalna analiza varijanse prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> protiv fitopatogenih izolata roda <i>Xanthomonas</i>	71
Tabela 5.5. Srednje vrednosti prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> koje sadrže različite kombinacije izvora ugljenika i organskog izvora azota protiv fitopatogenih izolata roda <i>Xanthomonas</i>	74
Tabela 5.6. Analiza varijanse odabranih odziva u fazi modelovanja sastava hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola	76
Tabela 5.7. Koeficijenti regresionih jednačina i njihove <i>p</i> -vrednosti za odabrane odzive u fazi modelovanja sastava hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola	77
Tabela 5.8. Optimizovane vrednosti variranih faktora i predviđene vrednosti odziva dobijene kao rezultat optimizacije sastava hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola.....	82
Tabela 5.9. Rezultati analize supernatanta kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> u pogledu identifikacije prisutnih lipopeptidnih jedinjenja primenom LC-MS.....	95
Tabela 5.10. Parametri kvaliteta sirovog glicerola iz proizvodnje biodizela iz otpadnih ulja i masti	97
Tabela 5.11. Analiza varijanse odabranih odziva u fazi modelovanja sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola	98
Tabela 5.12. Koeficijenti regresionih jednačina i njihove <i>p</i> -vrednosti za odabrane odzive u fazi modelovanja sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola	99
Tabela 5.13. Optimizovane vrednosti variranih faktora i predviđene vrednosti odziva dobijene kao rezultat optimizacije sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola	104
Tabela 5.14. Vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju pri različitim uslovima transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i>	114
Tabela 5.15. Analiza varijanse za fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i>	117
Tabela 5.16. Koeficijenti regresione jednačine i njihove <i>p</i> -vrednosti za fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i>	117
Tabela 5.17. Vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju, relativnog povećanja fluksa permeata i smanjenja specifične potrošnje energije pri različitim uslovima transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> bez statičkog mešača i sa statičkim mešačem ...	120
Tabela 5.18. Analiza varijanse odabranih odziva prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz primenu statičkog mešača	123
Tabela 5.19. Koeficijenti regresionih jednačina i njihove <i>p</i> -vrednosti za odabrane odzive prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz primenu statičkog mešača	124
Tabela 5.20. Optimizovane vrednosti variranih faktora i predviđene vrednosti odziva dobijene kao rezultat optimizacije procesnih uslova unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz primenu statičkog mešača	128

Tabela 5.21. Vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju i specifične potrošnje energije pri različitim uslovima transmembranskog pritiska, prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz primenu uduvavanja vazduha	129
Tabela 5.22. Analiza varijanse odabranih odziva prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz primenu uduvavanja vazduha	130
Tabela 5.23. Koeficijenti regresionih jednačina i njihove <i>p</i> -vrednosti za odabrane odzive prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz primenu uduvavanja vazduha	130
Tabela 5.24. Optimizovane vrednosti variranih faktora i predviđene vrednosti odziva dobijene kao rezultat optimizacije procesnih uslova unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz primenu uduvavanja vazduha	139
Tabela 5.25. Vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju i specifične potrošnje energije pri različitim uslovima transmembranskog pritiska, prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvavanja vazduha.....	140
Tabela 5.26. Analiza varijanse odabranih odziva prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvavanja vazduha	141
Tabela 5.27. Koeficijenti regresionih jednačina i njihove <i>p</i> -vrednosti za odabrane odzive prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvavanja vazduha.....	141
Tabela 5.28. Optimizovane vrednosti variranih faktora i predviđene vrednosti odziva dobijene kao rezultat optimizacije procesnih uslova unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvavanja vazduha.....	148
Tabela 5.29. Rezultati <i>in planta</i> testiranja antimikrobne aktivnosti proizvedenih biokontrolnih agenasa na bazi <i>Bacillus velezensis</i> protiv fitopatogena paprike <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> , uzročnika bakterijske pegavosti	149

SPISAK SLIKA

Slika 3.1. Promena fluksa i formiranje filtracione pogače tokom procesa mikrofiltracije (Jokić, 2010).....	29
Slika 3.2. Hidrodinamički metodi za smanjenje koncentracione polarizacije i prljanja membrane (Belfort, 1989).....	31
Slika 3.3. Režimi proticanja dvofaznog toka gas-tečnost (Brennen, 2005).....	34
Slika 4.1. Šematski prikaz aparature korišćene za eksperimente mikrofiltracije.....	55
Slika 4.2. Kenics statički mešač.....	57
Slika 5.1. Srednja vrednost prečnika zona inhibicije dobijeni testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti i filtrata kultivacionih tečnosti 14 potencijalnih proizvodnih mikroorganizama protiv fitopatogenih izolata roda <i>Xanthomonas</i>	65
Slika 5.2. Filogenetsko stablo proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i>	69
Slika 5.3. Srednja vrednost prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> koje sadrže različite izvore ugljenika protiv fitopatogenih izolata roda <i>Xanthomonas</i>	72
Slika 5.4. Srednja vrednost prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> koje sadrže različite organske izvore azota protiv fitopatogenih izolata roda <i>Xanthomonas</i>	73
Slika 5.5. Odzivne površine koje opisuju uticaj inicijalnih koncentracija odabranih nutrijenata na prečnik zona inhibicije tokom modelovanja sastava hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola za sledeće kombinacije nezavisnih promenljivih: A – glicerol i ekstrakt kvasca; B – glicerol i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; C – glicerol i K_2HPO_4 ; D – ekstrakt kvasca i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; E – ekstrakt kvasca i K_2HPO_4 ; F – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i K_2HPO_4	80
Slika 5.6. Praćenje toka kultivacije u pogledu sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> tokom kultivacije u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola.....	85
Slika 5.7. Praćenje toka kultivacije u pogledu rezidualnih koncentracija nutrijenata tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola.....	86
Slika 5.8. Praćenje toka kultivacije u pogledu antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> protiv fitopatogenih izolata roda <i>Xanthomonas</i> tokom kultivacije u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola.....	87
Slika 5.9. Zone inhibicije dobijene testiranjem antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti (96 h) proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> protiv fitopatogenih izolata roda <i>Xanthomonas</i> tokom kultivacije u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola.....	87
Slika 5.10. Praćenje toka kultivacije u pogledu sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola.....	89
Slika 5.11. Praćenje toka kultivacije u pogledu vrednosti pH kultivacione tečnosti tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola.....	89

Slika 5.12. Praćenje toka kultivacije u pogledu rezidualnih koncentracija nutrijenata tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola.....	90
Slika 5.13. Praćenje toka kultivacije u pogledu antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> protiv fitopatogenih izolata roda <i>Xanthomonas</i> tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola.....	91
Slika 5.14. Zone inhibicije dobijene testiranjem antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti (96 h) proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> protiv fitopatogenih izolata roda <i>Xanthomonas</i> tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola.....	92
Slika 5.15. Odzivne površine koje opisuju uticaj inicijalnih koncentracija odabranih nutrijenata na prečnik zona inhibicije tokom modelovanja sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola za sledeće kombinacije nezavisnih promenljivih: A – glicerol i ekstrakt kvasca; B – glicerol i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; C – glicerol i K_2HPO_4 ; D – ekstrakt kvasca i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; E – ekstrakt kvasca i K_2HPO_4 ; F – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i K_2HPO_4	101
Slika 5.16. Praćenje toka kultivacije u pogledu sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> tokom kultivacije u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola.....	105
Slika 5.17. Praćenje toka kultivacije u pogledu rezidualnih koncentracija nutrijenata tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola.....	106
Slika 5.18. Praćenje toka kultivacije u pogledu antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> protiv fitopatogenih izolata roda <i>Xanthomonas</i> tokom kultivacije u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola.....	107
Slika 5.19. Zone inhibicije dobijene testiranjem antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti (96 h) proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> protiv fitopatogenih izolata roda <i>Xanthomonas</i> tokom kultivacije u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola.....	107
Slika 5.20. Praćenje toka kultivacije u pogledu sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola.....	108
Slika 5.21. Praćenje toka kultivacije u pogledu vrednosti pH kultivacione tečnosti tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola.....	109
Slika 5.22. Praćenje toka kultivacije u pogledu rezidualnih koncentracija nutrijenata tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola.....	110
Slika 5.23. Praćenje toka kultivacije u pogledu antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> protiv fitopatogenih izolata roda <i>Xanthomonas</i> tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola.....	111
Slika 5.24. Zone inhibicije dobijene testiranjem antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti (96 h) proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> protiv fitopatogenih izolata roda <i>Xanthomonas</i> tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola.....	111

Slika 5.25. Praćenje toka procesa unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> u pogledu fluksa permeata pri različitim vrednostima transmembranskog pritiska (0,2 bar, 0,6 bar i 1 bar) i protoka napojne smeše (60 l/h, 120 l/h i 180 l/h).....	116
Slika 5.26. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i>	119
Slika 5.27. Praćenje toka procesa mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz primenu statičkog mešača u pogledu fluksa permeata pri različitim vrednostima transmembranskog pritiska (0,2 bar, 0,6 bar i 1 bar) i protoka napojne smeše (60 l/h, 120 l/h i 180 l/h).....	122
Slika 5.28. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz prisustvo statičkog mešača.....	125
Slika 5.29. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše na relativno povećanje fluksa permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz prisustvo statičkog mešača.....	126
Slika 5.30. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše na smanjenje specifične potrošnje energije prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz prisustvo statičkog mešača.....	127
Slika 5.31. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja napojne smeše na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz uduvavanje vazduha.....	131
Slika 5.32. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja vazduha na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz uduvavanje vazduha.....	133
Slika 5.33. Odzivna površina koja opisuje uticaj prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz uduvavanje vazduha.....	134
Slika 5.34. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja napojne smeše na specifičnu potrošnju energije prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz uduvavanje vazduha.....	136
Slika 5.35. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja vazduha na specifičnu potrošnju energije prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz uduvavanje vazduha.....	137
Slika 5.36. Odzivna površina koja opisuje uticaj prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha na specifičnu potrošnju energije prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz uduvavanje vazduha.....	138
Slika 5.37. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja napojne smeše na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvavanja vazduha.....	142
Slika 5.38. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja vazduha na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvavanja vazduha.....	143
Slika 5.39. Odzivna površina koja opisuje uticaj prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom	

unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvavanja vazduha.....	144
Slika 5.40. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja napojne smeše na specifičnu potrošnju energije prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvavanja vazduha.....	145
Slika 5.41. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja vazduha na specifičnu potrošnju energije prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvavanja vazduha.....	146
Slika 5.42. Odzivna površina koja opisuje uticaj prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha na specifičnu potrošnju energije prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti <i>Bacillus velezensis</i> uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvavanja vazduha.....	147
Slika 5.43. Simptomi bakterijske pegavosti na sadnicama paprike prilikom <i>in planta</i> testiranja antimikrobne aktivnosti proizvedenih biokontrolnih agenasa na bazi <i>Bacillus velezensis</i>	150
Slika 5.44. Rezultati <i>in vitro</i> testiranja antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> protiv fitopatogenih izolata roda <i>Fusarium</i>	152
Slika 5.45. Rezultati <i>in vitro</i> testiranja antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> protiv fitopatogenih izolata roda <i>Colletotrichum</i>	153
Slika 5.46. Rezultati <i>in vivo</i> testiranja antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> protiv fitopatogenog izolata <i>Fusarium avenaceum</i> TAB12.....	154
Slika 5.47. <i>In vivo</i> testiranje antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> protiv fitopatogenog izolata <i>Fusarium avenaceum</i> TAB12 na sortama jabuka Greni Smit (gornja slika) i Zlatni delišes (donja slika).....	155
Slika 5.48. <i>In vivo</i> testiranje antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> na sorti jabuke Zlatni delišes protiv fitopatogenih izolata <i>Colletotrichum acutatum</i> 314 (gornja slika) i <i>Colletotrichum acutatum</i> 107 (donja slika).....	156
Slika 5.49. Rezultati <i>in vivo</i> testiranja antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> protiv fitopatogenih izolata roda <i>Colletotrichum</i>	156
Slika 5.50. <i>In vivo</i> testiranje antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i> na sorti jabuke Greni Smit protiv fitopatogenih izolata <i>Colletotrichum acutatum</i> 314 (gornja slika) i <i>Colletotrichum acutatum</i> 107 (donja slika).....	157

1. UVOD

Sve veća potreba za hranom kao posledica dramatičnog povećanja broja ljudi i pojave prenaseljenosti širom sveta dovela je do intenzifikacije poljoprivrednih aktivnosti usmerenih na direktnu proizvodnju hrane i hrane za životinje, kao i sirovina za industriju prehrambenih proizvoda. U poslednjih nekoliko decenija sve više se govori o problemu prekomerne upotrebe pesticida, odnosno različitih hemijskih sredstava u poljoprivrednoj proizvodnji, kako za prevenciju, tako i za tretman oboljenja ili suzbijanje štetočina biljaka. Prekomerna upotreba pesticida je posledica ne samo povećanog obima proizvodnje poljoprivrednih useva, već i vremenom stečene rezistentnosti biljnih štetočina prema hemijskim komponentama pesticida. Uvođenje velikih količina hemijskih supstanci u prirodne ekosisteme rezultovalo je pre svega degradacijom kvaliteta zemljišta i njegovim hemijskim zagađenjem usled prisustva rezidualnih količina pesticida, kao i sve većim zagađenjem podzemnih i površinskih voda. Osim toga, nedovoljno naučnih podataka o uticaju hemijskih jedinjenja koja se koriste kao komponente pesticida na zdravlje ljudi izaziva još veći stepen zabrinutosti usled sve većeg broja naučnih dokaza o prisustvu rezidualnih koncentracija ovih jedinjenja u proizvodima poljoprivrednog porekla namenjenim za ishranu ljudi i životinja. Stoga se redukovanje upotrebe pesticida i iznalaženje novih načina za kontrolu biljnih štetočina i prevenciju i tretman bolesti biljaka postavlja kao imperativ održive poljoprivredne proizvodnje, a samim tim i održivog razvoja.

Među najznačajnijim oboljenjima povrća koje se u našoj zemlji koristi u ishrani u velikim količinama jesu bakterioze paradajza, paprike i biljaka iz porodice kupusnjača. Najčešći uzročnici bolesti navedenih biljaka jesu fitopatogene bakterije roda *Xanthomonas*, koje osim gubitaka u prinosu biljaka, takođe predstavljaju problem u smislu veoma komplikovanog suzbijanja i kontrole oboljenja biljaka nakon njegove pojave u polju. Izostanak efikasnosti preparata na bazi bakra, zabrana upotrebe antibiotika u suzbijanju fitopatogenih bakterija i pojava rezistentnih populacija fitopatogena doveli su do potrebe za pronalaženjem zdravstveno bezbednih, efikasnih preparata za zaštitu bilja koji bi se mogli ponuditi na tržištu. Jedna od alternativa koje su pokazale najveći potencijal za rešavanje ovog problema jeste primena biopesticida, koji po svojoj najširoj definiciji predstavljaju žive organizme ili njihove proizvode koji pokazuju sposobnost suzbijanja štetočina. Ovi organizmi mogu da budu biljke, nematode ili mikroorganizmi: bakterije, plesni, kvasci ili virusi. Osnovne prednosti primene mikrobioloških biopesticida u poređenju sa hemijskim pesticidima uključuju njihovu bezbedniju primenu, selektivnost, odnosno smanjenu toksičnost prema organizmima koji nisu ciljni za njihovo delovanje, kraće zadržavanje u životnoj sredini i mogućnost primene u organskoj poljoprivredi. Stoga se u poslednjoj deceniji beleži rast tržišta mikrobioloških pesticida, kao i pojava sve većeg broja komercijalno dostupnih proizvoda na bazi mikroorganizama za biološku kontrolu biljnih bolesti i štetočina.

Kada je u pitanju primena mikroorganizama ili njihovih metabolita u biološkoj kontroli biljnih štetočina, bakterije roda *Bacillus* predstavljaju najzastupljenije mikroorganizme koji se mogu sresti u komercijalno dostupnim proizvodima. Osobine koje ih čine pogodnim za ovu primenu uključuju njihovu prilagodljivost na različite ekološke uslove, kratko generaciono vreme, sposobnost formiranja endospora i sposobnost proizvodnje širokog spektra bioaktivnih metabolita, među kojima najznačajnije mesto zauzimaju antibiotici, enzimi i biosurfaktanti. Takođe, primarno stanište većine bakterija roda *Bacillus* je zemljište, što većinu sojeva čini unapred dobro prilagođenim na uslove u kojima bi trebalo da budu primenjeni. Osim toga, neki sojevi pokazuju sposobnost indukovanja sistemske rezistencije prema štetočinama kod biljaka, kao i sposobnost kolonizacije vaskularnih tkiva biljaka, što je od naročitog značaja za biološku kontrolu vaskularnih patogena. Sve navedene osobine čine bakterije roda *Bacillus* pogodnim kandidatima za biološku kontrolu različitih biljnih štetočina.

Proizvodnja preparata za biološku kontrolu biljnih štetočina na bazi mikroorganizama predstavlja kompleksan i skup biotehnološki postupak, koji treba da obuhvata faze osvežavanja mikroorganizma i pripreme inokuluma, umnožavanja mikroorganizma i/ili biosinteze željenog metabolita, opcionu fazu izdvajanja i prečišćavanja željenog proizvoda, kao i njegovu formulaciju i stabilizaciju. Smanjenje troškova proizvodnje može se postići optimizacijom samog bioprocasa i faze izdvajanja i prečišćavanja željenog proizvoda. Kada je u pitanju biotehnološki aspekt postupka proizvodnje, odnosno optimizacija bioprocasa, osnovni koraci obuhvataju optimizaciju sastava kultivacionog medijuma koji se koristi za produkciju željenog proizvoda, kao i optimizaciju procesnih uslova sa ciljem dobijanja željenog proizvoda u što većoj količini, uz minimizaciju količina otpadnih efluenta, što podrazumeva smanjenje troškova u pogledu prečišćavanja nastalih otpadnih tokova bioprocasa.

Opšti trend koji za cilj ima smanjenje troškova bioprocasa ukazuje na potrebu sve šire primene kompleksnih kultivacionih medijuma sa različitim izvorima nutrijenata čija je cena manja u poređenju sa konvencionalnim izvorima nutrijenata visokog stepena čistoće. Dodatna vrednost ovakvih bioprocasa postiže se primenom različitih otpadnih materijala, čije je prečišćavanje neisplativo ili čije odlaganje predstavlja problem ili opasnost za životnu sredinu. Jedan od trenutno najšire dostupnih otpadnih tokova jeste sirovi ili otpadni glicerol, koji nastaje kao sporedni proizvod tokom proizvodnje biodizela. Njegovo jednostavno odlaganje nije moguće zbog potencijalne opasnosti za životnu sredinu, a usled prisustva velikih količina različitih kontaminanata postupak njegovog prečišćavanja je skup i kompleksan. Jedan od predloga za iskorišćenje sirovog glicerola jeste upravo njegova mikrobiološka konverzija u različite proizvode sa dodatom vrednošću, odnosno njegova primena kao izvora ugljenika - jedne od osnovnih komponenti kultivacionog medijuma.

Proizvodnja mikrobioloških biopesticida, iako u konstantnom porastu, i dalje čini samo mali deo ukupnog svetskog tržišta sredstava za zaštitu bilja. Dominantni preparati su i dalje hemijski pesticidi, iako se poslednjih godina sve više pažnje poklanja konceptu integralne zaštite biljaka, koji podrazumeva zajedničku primenu hemijskih i bioloških preparata. Takođe, primena mikrobioloških biopesticida je ograničena i zbog visokih troškova njihove proizvodnje. Navedene činjenice ukazuju na potrebu iznalaženja novih sojeva koji pokazuju aktivnost protiv različitih štetočina biljaka, kao i na neophodnost usavršavanja i smanjenja troškova postupaka njihove proizvodnje.

Optimizacija uslova umnožavanja biomase *Bacillus* sp. podrazumeva optimizaciju sastava hranljive podloge sa ciljem ostvarivanja maksimalnog prinosa uz minimalne troškove, te je u te svrhe ispitana mogućnost primene sirovog glicerola iz proizvodnje biodizela kao izvora ugljenika koji je osnovna komponenta medijuma za umnožavanje mikrobiološke biomase, čime bi se potencijalno bi doprinelo smanjenju dostupnih količina sirovog glicerola, čije će se količine i dalje povećavati usled porasta potražnje za biodizelom i njegove sve veće potrošnje. Takođe, poznavanje matematičkih modela bioprocasa, koji se dobijaju primenom savremenih tehnika modelovanja i koji opisuju uticaj različitih koncentracija odabranih izvora ugljenika, azota i fosfora u hranljivoj podlozi doprinose boljem razumevanju uticaja pojedinačnih faktora (koncentracija osnovnih komponenata kultivacionog medijuma) i njihovih međusobnih interakcija na efikasnost proizvodnog postupka. Razvoj bioprocasa proizvodnje antimikrobnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* primenom proizvodnog soja roda *Bacillus* na nivou laboratorijskog bioreaktora predstavlja osnovu za razvoj i projektovanje procesa pilot i industrijskih razmera. Unapređenje procesa mikrofiltracije kultivacionih tečnosti izolata roda *Bacillus*, kao koraka primarnog izdvajanja biomase, treba da doprinese povećanju efikasnosti i smanjenju troškova ovog procesnog koraka. Definisane optimalnih uslova za izvođenje ovog bioprocasa, uz potvrdu efikasnosti proizvedenog preparata protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, ali i ispitivanje šireg spektra njegove antimikrobne aktivnosti, predstavljaju osnovu za razvoj komercijalnog proizvoda za biološku kontrolu biljnih bolesti izazvanih mikrobiološkim patogenima.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj istraživanja ove doktorske disertacije je optimizacija uslova umnožavanja i primarnog izdvajanja biomase soja *Bacillus* sp. sa primenom za sprečavanje pojave i širenja bakterioza povrtarskih useva koje izazivaju fitopatogene vrste roda *Xanthomonas*. Optimizacija bioprocesa treba da obuhvati optimizaciju sastava hranljive podloge na bazi komercijalnog i sirovog glicerola, kako bi se smanjili troškovi bioprocesa u pogledu pripreme hranljive podloge, prečišćavanja efluenta bioprocesa i kako bi se potencijalno doprinelo rešavanju problema prisutnog viška sirovog glicerola iz proizvodnje biodizela, pri čemu osnovni cilj optimizacije sastava hranljivih podloga za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma predstavlja maksimizacija antimikrobne aktivnosti protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*. Takođe, jedan od ciljeva predstavlja i definisanje optimalnih uslova izvođenja procesa mikrofiltracije dobijenih kultivacionih tečnosti uz primenu različitih hidrodinamičkih metoda za unapređenje procesa unakrsne mikrofiltracije, odnosno za poboljšanje fluksa permeata. Dodatni cilj predstavlja procena potencijala biomase soja *Bacillus* sp. za biološku kontrolu šireg spektra različitih biljnih patogena.

Kako bi se ispunio navedeni osnovni cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, definisani su i sledeći specifični ciljevi istraživanja:

- Poređenje proizvodnog soja *Bacillus* sp. sa drugim potencijalnim proizvodnim mikroorganizmima sa ciljem ispitivanja antagonističkog delovanja protiv fitopatogenih sojeva roda *Xanthomonas*.
- Molekularna identifikacija proizvodnog mikroorganizma primenom sekvenciranja gena za 16S rRNK uz primenu metode lančane reakcije polimeraze (*Polymerase Chain Reaction* - PCR).
- Odabir optimalnih izvora ugljenika i azota kao osnovnih komponenti hranljive podloge za proizvodnju bioaktivnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih sojeva roda *Xanthomonas*.
- Modelovanje sastava hranljive podloge za proizvodnju bioaktivnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih sojeva roda *Xanthomonas* u pogledu procene uticaja koncentracija osnovnih nutrijenata (ugljenika – komercijalnog i sirovog glicerola, azota i fosfora) na antimikrobnu aktivnost primenom metodologije odzivne površine.
- Optimizacija sastava hranljivih podloga na bazi komercijalnog i sirovog glicerola za proizvodnju bioaktivnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih sojeva roda *Xanthomonas* u pogledu koncentracija osnovnih nutrijenata (ugljenika, azota i fosfora) primenom metode željene funkcije.
- Validacija dobijenih modela sastava hranljivih podloga na bazi komercijalnog i sirovog glicerola za proizvodnju bioaktivnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih sojeva roda *Xanthomonas* primenom hranljivih podloga optimizovanog sastava i izvođenjem bioprocesa u Vulfvim bocama ukupne zapremine 2 L i u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 3 L, uz praćenje toka kultivacije.
- Unapređenje procesa unakrsne mikrofiltracije kultivacionih tečnosti dobijenih nakon kultivacije proizvodnog mikroorganizma uz primenu hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola primenom različitih hidrodinamičkih metoda.
- *In vitro* i *in planta* ispitivanje antimikrobne aktivnosti preparata na bazi *Bacillus* sp. protiv fitopatogenih sojeva roda *Xanthomonas*.
- Ispitivanje šireg spektra delovanja preparata na bazi *Bacillus* sp. protiv definisanih fitopatogenih sojeva.

3. PREGLED LITERATURE

3.1. BIOLOŠKA KONTROLA I BIOPESTICIDI

U poslednjih nekoliko decenija postoji globalni problem koji se odnosi na zadovoljenje potreba za hranom rastuće ljudske populacije, uz izazove kao što su povećanje troškova korišćenja energije, sve veći pritisak i iscrpljenje prirodnih resursa, kao i zabrinutost oko problema globalnog zagrevanja (Chakraborty i Newton, 2011). Pojava prenaseljenosti i sve većeg broja ljudi širom sveta dovela je do intenzifikacije poljoprivrednih aktivnosti usmerenih na direktnu proizvodnju hrane i hrane za životinje, kao i sirovina za industriju prehrambenih proizvoda. Intenzifikacija poljoprivredne proizvodnje podrazumeva sve širu primenu različitih agrotehničkih mera koje obezbeđuju brzu i efikasnu proizvodnju poljoprivrednih useva što boljeg kvaliteta i u što većim količinama (Emmert i Handelsman, 1999). Jedna od osnovnih mera za poboljšanje kvaliteta i prinosa useva jeste primena hemijskih sredstava (pesticida) sa ciljem smanjenja negativnih uticaja različitih štetočina koje mogu da izazovu probleme u poljoprivrednoj proizvodnji. Povećana potreba za hranom dovela je do povećane upotrebe hemijskih pesticida i veštačkih đubriva (Carvalho, 2017), kao i do razvoja genetički rezistentnih sorti biljaka (Boyd i sar., 2013; Nelson i sar., 2018), čije gajenje još uvek nije zakonom regulisano u svim državama. Kao posledica toga, u poslednjih nekoliko decenija sve više se govori o problemu prekomerne upotrebe pesticida, odnosno različitih hemijskih sredstava u poljoprivrednoj proizvodnji, kako za prevenciju, tako i za tretman oboljenja ili suzbijanje štetočina biljaka (Spadaro i Gullino, 2004). Agrohemikalije nisu efikasne protiv svih oboljenja biljaka i mogu da predstavljaju rizik za životnu sredinu i zdravlje ljudi usled akumulacije toksičnih rezidua hemikalija u zemljištu i vodi, čime dolazi do njihovog dospevanja i u lanac ishrane. Prekomerna upotreba pesticida je posledica ne samo povećanog obima proizvodnje poljoprivrednih useva, već i vremenom stečene rezistentnosti biljnih štetočina prema hemijskim komponentama pesticida, koja dovodi do potrebe za primenom pesticida u sve većim koncentracijama kako bi se postiglo efikasno suzbijanje štetočina i sprečili gubici u prinosu i kvalitetu poljoprivrednih proizvoda (Gerhardson, 2002). Proizvodnja konvencionalnih đubriva na bazi azotnih jedinjenja zavisi od energetskih resursa koji se baziraju na potrošnji fosilnih goriva. Kada su u pitanju genetički modifikovane biljke, njihova rezistentnost na različite bolesti biljaka uglavnom biva prevaziđena od strane fitopatogena (prouzrokovala bolesti) u roku od nekoliko godina, a osim toga, postoji i značajan problem neprihvatanja primene genetički modifikovanih biljaka u ishrani od strane velikog broja ljudi kao krajnjih konzumenata (McHughen i Wager, 2010).

Uvođenje velikih količina hemijskih supstanci u prirodne ekosisteme rezultovalo je pre svega degradacijom kvaliteta zemljišta i njegovim hemijskim zagađenjem usled prisustva rezidualnih količina pesticida, koje se ili ne razgrađuju ili je potreban dug vremenski period za njihovu razgradnju. Takođe, prisutno je i sve veće zagađenje podzemnih i površinskih voda usled neprestanog kruženja vode u prirodi, kao jednog od osnovnih elemenata zemljišta. Osim toga, širok spektar hemijskih jedinjenja koja se koriste kao komponente pesticida čini nemogućim praćenje i ispitivanje uticaja svakog od ovih jedinjenja na zdravlje ljudi, što izaziva još veći stepen zabrinutosti usled sve većeg broja naučnih dokaza o prisustvu rezidualnih koncentracija ovih jedinjenja u proizvodima poljoprivrednog porekla namenjenim za ishranu ljudi i životinja (Wilson i Wisniewski, 1994; Spadaro i Gullino, 2004). U ishrani ljudi koriste se delovi i organi biljaka koji se neposredno štite od bolesti, odnosno na koje se nanose sredstva za zaštitu bilja. Na taj način čovek ishranom rizikuje da u organizam neželjeno unese pesticide i njihove rezidue, a štetno dejstvo ovih sintetičkih preparata za zaštitu bilja može da se ispolji u kraćem ili dužem vremenskom periodu. S druge strane, sigurna povrtarska proizvodnja sa visokim prinosima ne može se ostvariti bez zaštite od biljnih bolesti. Stoga se redukovanje upotrebe pesticida i iznalaženje novih načina

za kontrolu biljnih štetočina i prevenciju i tretman bolesti biljaka postavlja kao imperativ održive poljoprivredne proizvodnje, a samim tim i održivog razvoja.

Jedna od prihvatljivih alternativa primeni hemijskih sredstava za zaštitu bilja i suzbijanje oboljenja biljaka izazvanih različitim mikrobiološkim fitopatogenima jeste biološka kontrola (Jiang i sar., 2015). Biološka kontrola, prema jednoj od najšire prihvaćenih definicija, predstavlja svrsishodnu primenu živih organizama i njihovih metabolita za suzbijanje aktivnosti i smanjenje populacije jednog ili više fitopatogena (Pal i McSpadden Gardener, 2006), stoga se zasniva na antagonističkom delovanju agensa biološke kontrole protiv fitopatogena. Direktni antagonizam podrazumeva fizički kontakt biokontrolnog agensa i fitopatogena, uz visoku selektivnost biokontrolnog agensa prema fitopatogenu. Sa druge strane, indirektni antagonizam je posledica aktivnosti biokontrolnog agensa koje ne zahtevaju targetiranje fitopatogena.

Biopesticidi predstavljaju biokontrolne agense za suzbijanje biljnih štetočina (Chandler i sar., 2008). Najopštija podela biopesticida, prema vrsti aktivne komponente, obuhvata sledeće kategorije (Copping i Menn, 2000):

- Živi organizmi – insekti, nematode ili mikroorganizmi (bakterije, plesni, kvasci ili virusi);
- Biohemijski biopesticidi – ekstrakti biljaka, feromoni insekata;
- Genetički modifikovane biljke kod kojih se odvija ekspresija inkorporiranih gena koja obezbeđuje zaštitu od biljnih štetočina.

Osim toga, podela biopesticida može da se izvrši i prema tipu targetiranog fitopatogena za čije se suzbijanje koriste, i to na sledeće kategorije:

- Biofungicidi
- Biobaktericidi
- Bionematocidi
- Bioinsekticidi
- Bioakaricidi
- Repelenti.

3.1.1. GLOBALNI TRENDVI TRŽIŠTA BIOPESTICIDA

Iako je interesovanje naučne javnosti za istraživanje mogućnosti primene biopesticida veoma značajno, što se može zaključiti po velikom broju naučnih radova objavljenih u ovoj oblasti u prethodnoj deceniji, komercijalizacija biopesticida još uvek nije dostigla zadovoljavajući nivo, uzimajući u obzir da tržište biopesticida trenutno čini samo oko 5% ukupnog svetskog tržišta sredstava za zaštitu biljaka. Vrednost globalnog tržišta biopesticida trenutno iznosi oko 3 milijarde američkih dolara (Damalas i Koutroubas, 2018). Tržište biopesticida u SAD trenutno čini nešto više od 200 proizvoda, dok je na tržištu Evropske Unije broj komercijalno dostupnih proizvoda znatno manji – oko 60 proizvoda (Kumar i Singh, 2015). Oko 90% biopesticida koji su trenutno komercijalno dostupni kao osnovnu aktivnu komponentu sadrži bakteriju *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Kumar i Singh, 2015). Iako se potrošnja biopesticida na globalnom nivou povećava za oko 10% svake godine, potrebno je da porast tržišta biopesticida bude intenzivniji kako bi se uočile stvarne promene u zameni hemijskih sredstava u zaštiti bilja biopesticidima. Projektovani godišnji rast vrednosti tržišta biopesticida iznosi oko 15% godišnje, a smatra se da će se vrednost tržišta biopesticida i hemijskih pesticida izjednačiti u periodu između 2040. i 2050. godine (Czaja i sar., 2015).

Proizvodnja mikrobioloških biopesticida, iako u konstantnom porastu, i dalje čini samo mali deo ukupnog svetskog tržišta sredstava za zaštitu bilja. Dominantni preparati su i dalje hemijski pesticidi, iako se poslednjih godina sve više pažnje poklanja konceptu integralne zaštite biljaka, koji podrazumeva zajedničku primenu hemijskih i bioloških preparata. Takođe, primena mikrobioloških biopesticida je ograničena i zbog visokih troškova njihove

proizvodnje. Navedene činjenice ukazuju na potrebu iznalaženja novih sojeva koji pokazuju aktivnost protiv različitih štetočina biljaka, kao i na neophodnost usavršavanja i smanjenja troškova postupaka njihove proizvodnje.

3.1.2. TRŽIŠTE BIOPESTICIDA U REPUBLICI SRBIJI

Na tržištu Republike Srbije trenutno je registrovano 25 biopesticida sledećih kategorija: biohemijski regulatori rasta (11 proizvoda), biofungicidi (7 proizvoda, od čega su 6 mikrobiološki biofungicidi i jedan biohemijski biofungicid), bioinsekticidi (6 proizvoda, od čega su 5 mikrobiološki bioinsekticidi i jedan biohemijski insekticid), bioakaricidi (jedan proizvod – mikrobiološki bioakaricid) i repelenti (jedan proizvod – biohemijski repelent). Dakle, na tržištu Republike Srbije je trenutno registrovano 12 proizvoda u kategoriji mikrobioloških biopesticida. Od navedenih mikrobioloških biopesticida, pet proizvoda pripadaju kategoriji mikrobioloških bioinsekticida na bazi sojeva *Bacillus thuringiensis*, od čega je jedan proizveden u Srbiji (D stop, Bioekološki centar, Zrenjanin), a četiri od šest proizvoda koja pripadaju kategoriji mikrobioloških biofungicida proizvedena su u Republici Srbiji i kao aktivnu komponentu sadrže sojeve *Bacillus subtilis* Č13 (Ekstrasol F, BioGenesis, Bačka Topola u saradnji sa Jugo Hem, Leskovac), *Bacillus subtilis* STI/III (F stop, Bioekološki centar, Zrenjanin) i *Bacillus subtilis* BS10 (Bacillomix aurum B, Amaks, Novi Sad; Erwix, Agrounik, Beograd). Trenutno ne postoje mikrobiološki biobaktericidi registrovani na tržištu Republike Srbije (Ministarstvo poljoprivrede, Uprava za zaštitu bilja – Lista registrovanih proizvoda za zaštitu bilja, oktobar 2017. godine).

3.1.3. MEHANIZMI BIOLOŠKE KONTROLE PRIMENOM MIKROBIOLOŠKIH BIOPESTICIDA

Uzimajući u obzir tematiku ove doktorske disertacije, dalja teorijska razmatranja biokontrolnih agenasa biće ograničena na mikrobiološke biopesticide.

Potencijalni mikrobiološki biokontrolni agensi treba da poseduju određene karakteristike kako bi uopšte mogli da budu razmotreni za primenu u biološkoj kontroli: da budu genetički stabilni, da ispoljavaju efikasnost u niskim koncentracijama, da nemaju veoma specifične nutritivne zahteve, da poseduju sposobnost preživljavanja u različitim ekološkim uslovima, da ispoljavaju antagonističko dejstvo prema širem opsegu fitopatogena, da budu rezistentni na dejstvo hemijskih pesticida, da ne proizvode metabolite opasne po zdravlje ljudi, da budu nepatogeni za biljku domaćina, da mogu biti jednostavno formulisani u formulaciji koja je jednostavna za skladištenje i primenu, kao i da budu kompatibilni sa fizičkim i hemijskim tretmanima neophodnim u postupku formulacije. Osim toga, trebalo bi da poseduju i adaptivnu prednost u odnosu na targetirane fitopatogene (Barkai-Golan, 2001).

U biološkoj kontroli biljnih patogena primenom mikroorganizama kao biokontrolnih agenasa zastupljeno je nekoliko mehanizama delovanja (tabela 3.1.).

Tabela 3.1. Mehanizmi biološke kontrole fitopatogena primenom mikrobioloških biopesticida (Pal i McSpadden Gardener, 2006)

Tip interakcije	Mehanizam
Direktni antagonizam	Hiperparazitizam/predatorstvo
Mixed-path antagonizam	Antibiotici
	Enzimi
	Neregulisani otpadni produkti metabolizma
Indirektni antagonizam	Fizička/hemijska interferencija
	Kompeticija
	Indukcija rezistentnosti biljke domaćina

Kod hiperparazitizma, fitopatogen biva direktno napadnut od strane biokontrolnog agensa koji ga ubija ili parazitira na njemu. Postoje četiri osnovne klase hiperparazita: obligatni bakterijski patogeni, hipovirusi, fakultativni paraziti i predatori (Pal i McSpadden Gardener, 2006).

Sposobnost proizvodnje jednog ili više antibiotika, kao mikrobioloških toksina koji u veoma niskim koncentracijama dovode do letalnog ili inhibitornog dejstva, predstavlja značajnu karakteristiku velikog broja mikroorganizama. Za primenu mehanizma antibioze u biološkoj kontroli, antibiotici treba da suzbijaju rast fitopatogena *in vitro* i *in situ*, odnosno moraju biti proizvedeni u dovoljnoj količini u neposrednoj blizini fitopatogena kako bi se ostvarilo biokontrolno dejstvo (Whipps, 2001), obezbeđujući mikroorganizmima producerima evolutivnu prednost u specifičnim ekološkim nišama (Mukherjee i Das, 2005).

Mnogi mikroorganizmi poseduju sposobnost proizvodnje različitih enzima, pre svega litičkih enzima, koji učestvuju u hidrolizi različitih polimernih jedinjenja (hitin, proteini, celuloza, hemiceluloza, DNK), kao i određenih ćelijskih komponenata, čime se ispoljava njihovo antagonističko delovanje protiv patogena (Chernin i Chet, 2002). Ekspresija gena za ove enzime i njihova sekrecija može da rezultuje direktnim suzbijanjem aktivnosti fitopatogena.

Osim navedenih jedinjenja, postoje još neki mikrobiološki metaboliti koji doprinose suzbijanju fitopatogena. Cijanovodonik (HCN) efikasno blokira metabolički put citohrom oksidaze i visoko je toksičan za sve aerobne mikroorganizme u pikomolarnim koncentracijama (Pal i McSpadden Gardener, 2006).

Zemljište i površina živih biljaka su za mikroorganizme okruženje koje je generalno siromašno nutrijentima. Da bi uspešno kolonizovali fitosferu, mikroorganizmi moraju da se takmiče za prostor za rast i dostupne nutrijente. Jedan od osnovnih tipova indirektnog antagonizma je kompeticija između biokontrolnih agenasa i fitopatogena za izvore nutrijenata, što može da rezultuje smanjenjem populacije fitopatogena i smanjenjem incidence pojave bolesti biljaka, kao i smanjenjem obima bolesti (Spadaro i sar., 2002). Generalno se smatra da biokontrolni agensi sa najvećim potencijalom za zaštitu biljaka brzo kolonizuju prostore na površini biljaka i u njihovoj neposrednoj blizini, pri čemu uglavnom iscrpljuju dostupnu ograničenu količinu nutrijenata ne ostavljajući dovoljno nutrijenata za rast fitopatogena (Spadaro i Droby, 2016). Dakle, biokontrolni agensi treba da budu bolje prilagođeni ekološkim i nutritivnim uslovima na mestu primene u poređenju sa fitopatogenima kako bi doveli do njihovog suzbijanja (Sharma i sar., 2009). Osim toga, biokontrolni agensi treba da poseduju veću specifičnu brzinu rasta u poređenju sa fitopatogenima, kao i sposobnost preživljavanja u uslovima koji su nepogodni za fitopatogene (Droby i sar., 1992). Takođe, nivo biološke kontrole koji obezbeđuju biokontrolni agensi zavisi od njihove inicijalne koncentracije na mestu primene, stoga se smatra da su dovoljne koncentracije biokontrolnih agenasa u opsegu 10^7 - 10^8 CFU/ml (McLaughlin i sar., 1990).

Biokontrola koja se zasniva na kompeticiji za nutrijente koji su prisutni u malim količinama, ali su esencijalni za rast u umnožavanje biomase mikroorganizama, kao što je gvožđe, takođe je ispitana. Količina gvožđa u rizosferi je veoma limitirana i zavisi od vrednosti pH zemljišta. U zemljištima koja sadrže veliku količinu kiseonika gvožđe je prisutno u obliku Fe^{3+} jona (Lindsay, 1979), odnosno u vidu jedinjenja nerastvornih u vodi, i njegova koncentracija je veoma niska (do 10^{-18} M). Ova koncentracija je nedovoljna da bi omogućila rast mikroorganizama, kojima su generalno neophodne koncentracije gvožđa oko 10^{-6} M. Da bi preživeli u takvom okruženju, mikroorganizmi proizvode ligande koji vezuju gvožđe – siderofore, koje izdvajaju gvožđe iz okruženja (Whipps, 2001). Smatra se da povećana efikasnost usvajanja gvožđa od strane komensalnih mikroorganizama predstavlja odlučujući faktor za njihovu sposobnost agresivne kolonizacije korena biljaka i suzbijanja štetnih mikroorganizama sa mesta potencijalne infekcije biljaka (Pal i McSpadden Gardener, 2006).

Biljke aktivno odgovaraju na stimulse iz okruženja, kao što su gravitacija, svetlost, temperatura, fizički stres, količina vode i dostupnost nutrijenata. Osim toga, biljke takođe

odgovaraju i na hemijske stimulse koji nastaju od strane mikroorganizama koji su direktno ili putem zemljišta povezani sa biljkama. Ovi hemijski stimulasi uslovljavaju ili indukuju odbrambene mehanizme biljaka kroz biohemijske promene koje pojačavaju rezistentnost biljaka protiv različitih fitopatogena (Ippolito i sar., 2000). Indukcija odbrambenog mehanizma domaćina može po prirodi biti lokalna ili sistemska, u zavisnosti od vrste, izvora i količine hemijskog stimulusa (Compant i sar., 2005). Stečena sistemska rezistencija (SAR - *Systemic Acquired Resistance*) nastaje usled prisustva salicilne kiseline, jedinjenja čija proizvodnja obično prati pojavu infekcije biljke fitopatogenima i dovodi do ekspresije proteina povezanih sa patogenezom. Ovi proteini uključuju i veliki broj enzima od kojih neki direktno liziraju ćelije fitopatogena, ojačavaju ćelijski zid kako bi se biljka oduprla infekciji, ili indukuju lokalnu smrt ćelija biljke sa ciljem odstranjivanja fitopatogena, što rezultuje vidljivim lezijama na samoj biljci i predstavlja jednu od osnovnih razlika između stečene i indukovane sistemske rezistencije (Van Loon i sar., 1998). Indukovana sistemska rezistentnost (ISR - *Induced Systemic Resistance*) nastaje usled prisustva jasmonske kiseline i/ili etilena, koje proizvode uglavnom nepatogene rizobakterije, od kojih se neke upravo zbog ovog svojstva mogu koristiti kao biokontrolni agensi za suzbijanje fitopatogena (Pal i McSpadden Gardener, 2006).

Osnovne prednosti primene mikrobioloških pesticida u poređenju sa hemijskim pesticidima uključuju njihovu bezbedniju primenu, selektivnost, odnosno smanjenu toksičnost prema organizmima koji nisu ciljni za njihovo delovanje, kraće zadržavanje u životnoj sredini i mogućnost primene u organskoj poljoprivredi. Stoga se u poslednjoj deceniji beleži rast tržišta mikrobioloških pesticida, kao i pojava sve većeg broja komercijalno dostupnih proizvoda na bazi mikroorganizama za biološku kontrolu biljnih bolesti i štetočina, što je rezultat intenzivnih naučnih istraživanja u ovoj oblasti usmerenih na rešavanje problema koje različite štetočine izazivaju u poljoprivrednoj proizvodnji.

3.2. PRIMENA BAKTERIJA RODA *Bacillus* U BIOLOŠKOJ KONTROLI

Kada je u pitanju primena mikroorganizama ili njihovih metabolita u biološkoj kontroli biljnih štetočina, bakterije roda *Bacillus* predstavljaju najzastupljenije mikroorganizme koji se mogu sresti u komercijalno dostupnim proizvodima. Osobine koje ih čine pogodnim za ovu primenu uključuju njihovu prilagodljivost na različite ekološke uslove, kratko generaciono vreme, sposobnost formiranja endospora i sposobnost proizvodnje širokog spektra bioaktivnih metabolita, među kojima najznačajnije mesto zauzimaju antibiotici, enzimi i biosurfaktanti. Osim toga, neki sojevi pokazuju sposobnost indukovanja sistemske rezistencije prema štetočinama kod biljaka, kao i sposobnost kolonizacije vaskularnih tkiva biljaka, što je od naročitog značaja za biološku kontrolu vaskularnih patogena. Takođe, primarno stanište većine bakterija roda *Bacillus* je zemljište, što većinu sojeva čini unapred dobro prilagođenim na uslove u kojima bi trebalo da budu primenjeni. Takođe, s obzirom da iz zemljišta može biti izolovan značajan broj sojeva koji pokazuju biokontrolnu aktivnost prema različitim fitopatogenima, a pripadaju rodu *Bacillus*, još jedna prednost jeste mogućnost korišćenja autohtonih sojeva sa područja gde se javljaju značajna oboljenja biljaka koji će u industrijskim uslovima biti umnoženi i vraćeni na mesto primene u vidu agenasa biološke kontrole. Veliki broj naučnih radova potvrđuje da biokontrolni agensi pokazuju bolje rezultate kada je u pitanju suzbijanje fitopatogena u njihovim nativnim geografskim regionima usled bolje prilagođenosti i preživljavanja u poređenju sa uvoznim komercijalnim preparatima koji sadrže biokontrolne agense (Abiala i sar., 2015; Bardin i sar., 2015).

Patogene vrste roda *Bacillus* su *Bacillus anthracis* i određeni sojevi vrste *Bacillus cereus*, stoga se ove vrste roda *Bacillus* ne razmatraju za primenu u biološkoj kontroli. Nepatogenost ostalih vrsta roda *Bacillus* prema ljudima i životinjama, kao i činjenica da su ovi mikroorganizmi već prisutni u zemljištu u velikom broju, čini ih pogodnim kandidatima za biološku kontrolu različitih biljnih štetočina.

Primena bakterija roda *Bacillus* u biološkoj kontroli različitih biljnih štetočina je dosta detaljno ispitana i može se naći veliki broj literaturnih navoda iz ove oblasti. Najveći deo ovih istraživanja zasniva se na ispitivanju potencijala različitih sojeva roda *Bacillus* za biološku kontrolu različitih fitopatogena, kao i na karakterizaciji mehanizama njihovog antimikrobnog delovanja, prvenstveno karakterizaciji širokog spektra metabolita koji pokazuju antimikrobnu aktivnost (Palazzini i sar., 2016). Jedan od osnovnih mehanizama antimikrobne aktivnosti bakterija roda *Bacillus* jeste proizvodnja metabolita u koje spadaju pre svih antibiotici (Stein, 2005; Zhao i sar., 2018), biosurfaktanti (Płaza i sar., 2013; Gomaa, 2013), lipopeptidi (Zhao i sar., 2012; Torres i sar., 2017), enzimi (Shafi i sar., 2017) i isparljiva organska jedinjenja (Arrebola i sar., 2010; Gotor-Vila i sar., 2017). Među pomenutim jedinjenjima sa antimikrobnom aktivnošću za primenu u biološkoj kontroli naročito se ističu ciklični lipopeptidi iz familija surfaktina, iturina i fengicina (Chen i sar., 2007; Arguelles-Arias i sar., 2009; Dunlap i sar., 2013; Fira i sar., 2018). Osim toga, dokazano je da ovi lipopeptidi indukuju rezistentnost biljaka prema fitopatogenima (Kloepper i sar., 2004; Yamamoto i sar., 2015). Lipopeptidi koje proizvode bakterije roda *Bacillus* su neribozomalno sintetisana jedinjenja čija se sinteza odvija uz pomoć velikih multienzimskih kompleksa (neribozomalne peptidne sintetaze) (Palazzini i sar., 2016). Osim toga, mnoge vrste roda *Bacillus* sintetisuje nekoliko jedinjenja iz familije poliketida, kao što su bacilaen, dificidin i makrolaktin. Poliketidi predstavljaju familiju sekundarnih metabolita koja uključuje veliki broj bioaktivnih jedinjenja sa antibakterijskim, imunosupresivnim i antitumorskim delovanjem (Chen i sar., 2009).

Još jedan mehanizam antimikrobnog delovanja bakterija roda *Bacillus* jeste kompeticija sa fitopatogenima kada su u pitanju faktori koji utiču na rast, odnosno prostor i nutrijenti (Shafi i sar., 2017). Sposobnost sporulacije većine sojeva roda *Bacillus* (Paredes-Sabja i sar., 2011) predstavlja njihovu evolutivnu prednost u poređenju sa većinom drugih mikroorganizama, uzimajući u obzir da su njihove spore otporne na visoke temperature, isušivanje, UV zračenje i dejstvo različitih hemikalija, što ih čini značajno otpornijim u poređenju sa vegetativnim formama rasta i pogodnim za formulaciju. Još neke osobine bakterija roda *Bacillus* koje ih čine pogodnim za primenu u biološkoj kontroli biljnih patogena obuhvataju činjenicu da je njihovo osnovno stanište zemljište (Hong i sar., 2009), sposobnost kolonizacije korena biljaka, kao i činjenica da se svrstavaju u grupu bakterija koje podstiču rast biljaka (PGPB – *Plant Growth Promoting Bacteria*) (Kumar i sar., 2012), sposobnost indukovanja sistemske rezistencije kod biljaka (Kloepper i sar., 2004; Choudhary i Johri, 2009), kao i sposobnost endofitne kolonizacije unutrašnjih tkiva biljaka (Santoyo i sar., 2016), što je naročito značajno za biološku kontrolu vaskularnih patogena, među kojima su veoma značajne bakterije roda *Xanthomonas*. Utvrđeno je da su uspešna kolonizacija rizosfere i proizvodnja lipopeptida dva najznačajnija mehanizma za suzbijanje fitopatogena prisutnih u zemljištu od strane *Bacillus* spp. (Yang i sar., 2014b). Osim svoje supresivne funkcije prema fitopatogenima, surfaktin, kao predstavnik familije lipopeptida koje proizvode bakterije roda *Bacillus*, takođe olakšava formiranje biofilma na korenu biljke prilikom inicijalne kolonizacije od strane biokontrolnih agenasa (Raaijmakers i sar., 2010).

3.2.1. *Bacillus velezensis* KAO AGENS BIOLOŠKE KONTROLE

3.2.1.1. Opšte osobine vrste *Bacillus velezensis*

Vrsta *Bacillus velezensis* je prvi put izolovana iz reke Velez (Malaga, Španija) (Ruiz-García i sar., 2005). U pitanju je Gram-pozitivna bakterija čije su ćelije štapićastog oblika, širine 0,5 µm i dužine 1,5-3,5 µm. Ćelije se javljaju pojedinačno, u parovima ili u vidu kratkih lanaca. Endospore su elipsoidnog oblika i zauzimaju paracentalnu ili subterminalnu poziciju, pri čemu nisu šire od prečnika ćelije. Endospore takođe ne sadrže parasporalne kristale i ne akumuliraju poli-β-hidroksibuternu kiselinu. Ćelije su pokretne i kreću se pomoću peritrihnih flagela.

Na polučvrstoj hranljivoj podlozi TSA (*Tryptone Soy Agar* – tripton soja agar) kolonije *Bacillus velezensis* su kremasto bele boje, naborane površine i nepravilnih ivica. U tačnoj hranljivoj

podlozi TSB (*Tryptone Soy Bouillon* – tripton soja bujon) na površini dolazi do formiranja tankog filma bakterija, dok je ostatak kultivacione tečnosti uniformno zamućen, bez niti ili gromuljica.

Bacillus velezensis raste u opsegu temperatura 15-45°C i u opsegu vrednosti pH 5-10. Njihov metabolizam je respiratoran, sa kiseonikom kao terminalnim akceptorom elektrona. Ne rastu pod anaerobnim uslovima u prisustvu nitrata ili fumarata.

Bacillus velezensis toleriše NaCl do koncentracije 12% (w/v). Ove bakterije su hemoorganotrofi. Produkuju katalazu i oksidazu. Produkuju kiseline (bez gasa) iz eskulina, amigdalina, L-arabinoze, arbutina, celobioze, D-fruktoze, glicerola, D-glukoze, glikogena, inozitola, laktoze, maltoze, manitola, D-manoze, metil- α -D-glikozida, D-rafinoze, D-riboze, salicina, sorbitola, saharoze, trehaloze i D-ksiloze. Ne proizvode kiseline iz adonitola, D-arabinoze, D-arabitolata, L-arabitolata, 2-ketoglukonata, 5-ketoglukonata, dulcitolata, eritriolata, D-fukoze, L-fukoze, galaktoze, β -gentiobioze, glukonata, inulina, D-luksoze, D-melezitoze, melibioze, metil- α -D-manozida, metil- β -D-ksilozida, N-acetilglukozamina, ramnoze, L-sorboze, D-tagatoze, D-turanoze, ksilitola i L-ksiloze. Redukuju nitrata i proizvode H₂S iz L-cisteina. Voges-Proskauerova (*Voges-Proskauer*) reakcija i OPNG (*ortho-nitrophenyl- β -galactoside*) test su pozitivni i potvrđuju prisustvo acetoina i β -galaktozidaze, redom. Hidrolizuju krv, škrob, želatin i kazein. Rastu i u hranljivim podlogama bez ekstrakta kvasca. Testovi usvajanja indola, lizin dekarboksilaze, ornitin dekarboksilaze, ureaze, arginin dihidrolaze, triptofan deaminaze, fenilalanina, deaminaze i lizozima (0,001%, w/v) su negativni. Ne hidrolizuju Tween 20, Tween 80, DNK i tirozin.

Bakterije ove vrste su osetljive na amoksisilin, amoksisilin/klavulansku kiselinu, cefalotin, hloramfenikol, kolistin, doksiciklin, eritromicin, kanamicin, nalidiksinsku kiselinu, nitrofurantoin, norfloksacin, novobiocin, rifamicin, trimetoprim/sulfametoksazol i vankomicin. Rezistentne su na aztreonam.

Količina G+C u DNK iznosi 46,1-46,4% (mol) (Ruiz-García i sar., 2005).

3.2.1.2. Primena *Bacillus velezensis* u biološkoj kontroli fitopatogena

Zbog promena u taksonomskoj klasifikaciji vrste *Bacillus velezensis* literaturni podaci koji se mogu pronaći o antimikrobnom delovanju sojeva ove vrste i njihovoj potencijalnoj primeni u biološkoj kontroli različitih fitopatogena sežu uglavnom do desetak godina unazad (tabela 3.2.). U skorije vreme nekoliko vrsta roda *Bacillus*, uključujući *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* i *Bacillus oryzicola* je reklasifikovano u okviru vrste *Bacillus velezensis* na osnovu komparativne genomike (Dunlap i sar., 2016). Distinktivne karakteristike vrste *Bacillus velezensis* uključuju podsticanje rasta biljaka, proizvodnju antimikrobnih metabolita i efikasnu kolonizaciju biljaka (Madhaiyan i sar., 2010; Cai i sar., 2016). Mnogi sojevi vrste *Bacillus velezensis* se koriste kao antagonisti biljnih patogena (Yao i sar., 2006; Chen i sar., 2007; Dunlap i sar., 2015). Jedan od glavnih faktora koji su povezani sa biokontrolnom aktivnošću vrste *Bacillus velezensis* jeste proizvodnja lipopeptida iz familije surfaktina – surfaktin i lihenizin (Ongena i sar., 2007; Ongena i Jacques, 2008), iturina - iturin A, C, D, i E, bacilomicin D,F i L, i mikosubtilin (Hiradate i sar., 2002; Romero i sar., 2007), i fengicina – fengicini i plipastatini (Ongena i sar., 2007; Chen i sar., 2009; Alvarez i sar., 2012), koji bivaju sintetisani metaboličkim putevima u kojima učestvuju neribozomalne peptidne sintetaze i/ili poliketid sintaze. Drugi metaboliti vrste *Bacillus velezensis*, kao što su lantipeptidi i terpeni, takođe predstavljaju potencijalne biokontrolne agense za suzbijanje fitopatogena (Arnison i sar., 2012).

Bacillus velezensis FZB42 predstavlja prototip Gram-pozitivnih bakterija sa fitostimulatornim i biokontrolnim delovanjem (Fan i sar., 2018). Genom ove bakterije sekvenciran je od strane Chen i sar. (2007). Od momenta izolovanja ovog soja iz rizosfere (Krebs i sar., 1998), objavljeno je preko 140 naučnih radova povezanih sa ovim sojem. Soj *Bacillus velezensis* FZB42 i njemu blizak soj *Bacillus velezensis* FZB24 se uspešno koriste kao komponente

mikrobioloških đubriva i biokontrolni agensi protiv fungalnih i bakterijskih fitopatogena. Podsticanje rasta biljaka i suzbijanje bolesti od strane ova dva soja dokazani su eksperimentima u polju za sledeće biljke: krompir (Schmiedeknecht i sar., 1998), pamuk (Yao i sar., 2006), jagodu (Sylla i sar., 2013), pšenicu (Talboys i sar., 2014), zelenu salatu (Chowdhury i sar., 2013) i paradajz (Elanchezhiyan i sar., 2018). Biokontrolne osobine *Bacillus velezensis* FZB42 počivaju na nekoliko mehanizama: osim direktne antibioze i kompeticije zahvaljujući proizvodnji spektra sekundarnih metabolita (Borriss, 2011), od velike važnosti su i benefitan uticaj na mikrobiom biljke domaćina u rizosferi (Erlacher i sar., 2014), kao i stimulacija indukovanе sistemske rezistentnosti (Chowdhury i sar., 2015a). Takođe je značajno da, nasuprot primeni Gram-negativnih bakterija sa biokontrolnim delovanjem, primena soja *Bacillus velezensis* FZB42 nije dovela do trajnih promena u sastavu mikrobioma rizosfere (Kröber i sar., 2014), već je primena ovog soja uspela da kompenzuje negativne promene sastava mikrobioma izazvane prisustvom fitopatogena (Erlacher i sar., 2014). Soj *Bacillus velezensis* FZB42 pokazuje značajnu sposobnost kolonizacije biljaka, stoga je korišćen kao biokontrolni agens za bolesti paradajza, krastavca, pamuka, duvana i zelene salate (Yao i sar., 2006; Wang i sar., 2009; Chowdhury i sar., 2013; Chowdhury i sar., 2015b). Al-Ali i sar. (2018) su pokazali da kolonizacija rizosfere paradajza od strane soja *Bacillus velezensis* FZB42 zavisi od produkcije surfaktina i sastava eksudata korena paradajza, ali glavni faktor koji utiče na uspešnost kolonizacije rizosfere jeste sposobnost obrazovanja biofilma, koja je uslovljena proizvodnjom egzopolisaharida od strane *Bacillus velezensis* FZB42.

Okidače za indukciju sistemske rezistentnosti kod biljaka predstavljaju različiti sekundarni metaboliti – elicitori. Prilikom indukcije rezistentnosti kod biljaka se aktiviraju različiti signalni metabolički putevi koji sadrže jasmonsku kiselinu, etilen i salicilnu kiselinu. Dokazano je da je proizvodnja surfaktina, ali i drugih sekundarnih metabolita, kod soja *Bacillus velezensis* FZB42 povezana sa indukcijom sistemske rezistentnosti kod zelene salate suočene sa fitopatogenom *Rhizoctonia solani*, za koju su odgovorni signalni metabolički putevi koji uključuju jasmonsku kiselinu i etilen (Chowdhury i sar., 2015b).

Kada su u pitanju jedinjenja koja podstiču rast biljaka, dokazano je da soj *Bacillus velezensis* FZB42 produkuje indol-3-sirćetnu kiselinu (Dunlap i sar., 2015). Arkhipova i sar. (2007) su pokazali da ovaj soj proizvodi i citokinin. Osim toga, isparljiva organska jedinjenja koja proizvodi *Bacillus velezensis* predstavljaju okidač za podsticanje rasta biljaka roda *Arabidopsis* regulisanjem homeostaze auksina (Zhang i sar., 2007).

Lipopeptid bacilomicin D, koji proizvodi soj *Bacillus velezensis* FZB42, predstavlja efikasnu antifungalnu komponentu. Utvrđeno je da koncentracija ovog jedinjenja od 30 mg/ml inhibira *Fusarium graminearum* sa efikasnošću od 50%. Ovo jedinjenje izaziva morfološke promene membrane i ćelijskog zida hifa i konidija fitopatogena *Fusarium graminearum*. Osim toga, ovo jedinjenje dovodi do akumulacije reaktivnih kiseoničnih radikala, što uzrokuje smrt hifa i konidija ovog fitopatogena. Dokazano je da bacilomicin D suzbija *Fusarium graminearum* na kukuruzu i pšenici (Gu i sar., 2017). Takođe, pokazano je da *Bacillus velezensis* FZB42 produkuje fengicin i bacilomicin D, koji ispoljavaju sinergističko antimikrobno delovanje protiv fungalnog fitopatogena *Fusarium oxysporum* (Koumoutsis i sar., 2004), dok *Bacillus velezensis* SQR9 proizvodi bacilomicin D sa antifungalnim delovanjem protiv istog fitopatogena (Xu i sar., 2013).

Palazzini i sar. (2007) su dokazali antagonističku aktivnost *Bacillus velezensis* RC 218 protiv fitopatogena *Fusarium graminearum*, izazivača pšenične glavnice, u *in vitro* i uslovima staklenika. Istraživanje istih autora (Palazzini i sar., 2016) prošireno je na eksperimente u polju. Rezultati istraživanja su pokazali da ispitivani izolat može značajno da smanji ozbiljnost pšenične glavnice u uslovima polja, kao i akumulaciju mikotoksina (deoksinivalenola) povezanu sa ovim oboljenjem pšenice. Sekvenciranje genoma proizvodnog mikroorganizma otkrilo je gene za proizvodnju devet bioaktivnih sekundarnih metabolita (surfaktin, iturin A, fengicin, bacilibaktin (siderofora), bacilizin, bacilaen, difucidin,

makrolaktin, amilociklicin), kao i lantibiotika ericina, čija je proizvodnja jedinstvena za ispitivani soj.

U istraživanju koje su sproveli Cai i sar. (2016) objavljena je sekvenca celog genoma *Bacillus velezensis* CC09, soja koji je pokazao širok spektar antifungalne aktivnosti protiv nekoliko fitopatogena, kao što su *Glomerella glycines*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata* i *Blumeria graminis* (Cai i sar., 2013; Yang i sar., 2014a). *In vitro* testiranje antifungalne aktivnosti soja CC09, koji proizvodi iturin A (koncentracija 0,66 mg/mg uzorka za testiranje antifungalne aktivnosti), pokazalo je značajnu inhibiciju rasta test mikroorganizama *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger*, *Phytophthora capsici* i *Mycosphaerella pomi*, što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima (Cai i sar., 2013).

Dokazano je da fengicini i iturini ispoljavaju antifungalnu aktivnost *in vivo* i da inhibiraju rast nekoliko fitopatogena (Al-Ali i sar., 2018). Surfaktini ne pokazuju toliko izraženo antifungalno dejstvo, ali pokazuju sinergistički uticaj na biološku aktivnost iturina (Deravel i sar., 2014) i fengicina (Ongena i Jacques, 2008). Dokazano je da surfaktini, iturini i fengicini kao elicitori indukuju sistemsku rezistentnost kod biljnih vrsta kao što su pasulj, paradajz, dinja i vinova loza (Ongena i sar., 2007; Garcia-Gutierrez i sar., 2013; Farace i sar., 2015). Ekspresija gena koji su uključeni u sintezu ovih lipopeptidnih jedinjenja je povećana u prisustvu eksudata korena biljaka u rizosferi (Fan i sar., 2012). Zahvaljujući aktivnosti biosurfaktanata i svojstvu smanjivanja površinskog napona, predloženo je da ovi lipopeptidi, naročito surfaktin, doprinose procesu kolonizacije korena od strane biokontrolnih mikroorganizama. Ova hipoteza je potkrepljena rezultatima *in vitro* eksperimenata (Leclere i sar., 2006; Ongena i Jacques, 2008), ali i *in planta* eksperimentima (Fan i sar., 2011; Dietel i sar., 2013).

Adeniji i sar. (2018) su ispitivali antimikrobni potencijal liofilizovanog ekstrakta sekundarnih metabolita proizvedenih od strane *Bacillus velezensis* NWUMFkBS10.5 protiv fitopatogena *Fusarium graminearum* primenom masene spektrometrije sa elektro-sprej jonizacijom (ESI-Q-TOF MS), FTIR i NMR tehnike. U poslednjih nekoliko godina postale su dostupne genomske informacije o nekoliko sojeva vrste *Bacillus velezensis* koji pokazuju veliki potencijal za biološku kontrolu fitopatogena *Fusarium graminearum* (Dunlap i sar., 2013; Dunlap i sar., 2015; Lee i sar., 2015; Palazzini i sar., 2016; Pan i sar., 2017). Rezultati testiranja antifungalne aktivnosti u okviru istraživanja koje su sproveli Adeniji i sar. (2018) ukazuju na potencijal ispitivanog biokontrolnog agensa za primenu pre sadnje ili nakon žetve ciljane biljne kulture. Primena biokontrolnih agenasa za tretman semena pre sadnje biljaka je proučena u prethodnim istraživanjima (Yang i sar., 2015). Antimikrobna aktivnost supernatanta oslobođenog ćelija dobijenog kultivacijom soja *Bacillus velezensis* NWUMFkBS10.5 ukazuje na prisustvo sekundarnih metabolita od potencijalnog industrijskog značaja nakon prečišćavanja dovoljnog stepena i proizvodnje u dovoljnim količinama. Lipopeptidni ekstrakt pokazao je odličnu antifungalnu aktivnost u poređenju sa komercijalnim fungicidima čije je dejstvo na ispitivani patogen takođe utvrđeno. Ovi rezultati su u korelaciji sa prethodno objavljenim studijama koje ističu antipatogeno dejstvo sirovih, parcijalno prečišćenih ili prečišćenih ekstrakata bakterijskih antagonista (Chen i sar., 2010; Mousa i sar., 2015). Primenom ESI-MS (*Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*) detektovano je prisustvo lipopeptidnih jedinjenja, a primenom PCR utvrđeno je prisustvo gena za biosintezu surfaktina, bacilomicina, iturina D i fengicina kod ispitivanog soja *Bacillus velezensis* NWUMFkBS10.5.

Bacillus velezensis B006 predstavlja biokontrolni agens čiji mehanizmi delovanja protiv fitopatogena se uglavnom ogledaju u efikasnoj kolonizaciji biljaka i proizvodnji surfaktina (Wang i sar., 2018). U ovom istraživanju ispitani su metabolički putevi proizvodnje surfaktina sa ciljem doprinosa ovog istraživanja formulaciji sastava komercijalnog medijuma za dobijanje većih prinosa ovog metabolita. U prethodnim istraživanjima utvrđeno je da kultivacioni medijumi različitog sastava favorizuju formiranje spora (Guo i sar., 2018) i proizvodnju surfaktina (Wang i sar., 2017) od strane soja *Bacillus velezensis* B006. Utvrđeno

je da biosinteza aminoacil-tRNK, metabolizam glicerolipida i biosinteza pantotenata/koenzima A doprinose proizvodnji surfaktina.

Skorašnje istraživanje koje su sproveli Wu i sar. (2018) pokazalo je da neribozomalno sintetisani lipopeptidi (fengicin i bacilomicin) i neribozomalno sintetisani poliketidi (makrolaktin, dificidin i bacilaen), dipeptid bacilizin, egzopolisaharidi i isparljiva organska jedinjenja soja *Bacillus velezensis* SQR9 doprinose indukciji sistemske rezistentnosti prema fitopatogenima *Botrytis cinerea* i *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* kod biljaka roda *Arabidopsis*.

Jiang i sar. (2018) su pokazali da dva soja vrste *Bacillus velezensis*, *B. velezensis* 5YN8 i *B. velezensis* DSN012, pokazuju visoku aktivnost hidrolaze, kao i biokontrolnu aktivnost sive truleži paprike, a takođe je dokazano da podstiču rast paprike. U istom istraživanju pokazano je da sekundarni metaboliti oba ispitivana soja efikasno suzbijaju rast micelijuma *Botrytis cinerea*, kao i da oba soja proizvode isparljiva organska jedinjenja koja inhibiraju sporulaciju pomenutog fitopatogena paprike. Takođe je otkriveno da oba soja vrste *Bacillus velezensis* mogu da aktiviraju imunitet paprike i da pojačaju imuni odgovor biljke prema fitopatogenu *Botrytis cinerea* aktiviranjem signalnog metaboličkog puta salicilne kiseline. Osim toga, oba ispitivana soja poboljšavaju aktivnost ćelijskog odbrambenog odgovora, akumulaciju vodonik peroksida i aktivnost enzima koji su povezani sa odbranom biljke od fitopatogena *Botrytis cinerea*.

U istraživanju koje su sproveli Cao i sar. (2018) ispitana je antagonistička aktivnost dva soja (*Bacillus velezensis* Y6 i *Bacillus velezensis* F7) protiv fitopatogena *Ralstonia solanacearum* i *Fusarium oxysporum* u laboratorijskim i uslovima staklenika. Identifikovana su tri lipopeptidna jedinjenja (surfaktin, iturin i fengicin) odgovorna za antimikrobnu aktivnost protiv ispitivanih fitopatogena. Osim toga, ispitana je uloga ovih lipopeptidnih jedinjenja u biološkim procesima važnim za kolonizaciju rizosfere. Dokazano je da iturin i fengicin, pored ispoljavanja antibakterijskog delovanja, takođe utiču na pokretljivost ćelija i formiranje biofilma, a samo iturin igra glavnu ulogu u zaštiti biljke od fitopatogena *Fusarium oxysporum*. Osim toga, otkriveno je da dolazi do značajne stimulacije produkcije ovih lipopeptidnih jedinjenja prilikom interakcije sa fitopatogenom *Ralstonia solanacearum*.

Chen i sar. (2019) su ispitivali potencijal endofitne bakterije kikirikija *Bacillus velezensis* LDO2 za biološku kontrolu fitopatogena i podsticanje rasta ove biljke. Soj *Bacillus velezensis* LDO2 ispoljio je značajnu antimikrobnu aktivnost protiv fitopatogenih gljiva i bakterija koje napadaju kikiriki, sa naglaskom na inhibiciju rasta i izazivanje deformacija micelijuma fitopatogene gljive *Aspergillus flavus*. Takođe, u ovom istraživanju su identifikovani klasteri gena odgovorni za proizvodnju antifungalnih metabolita (fengicin, surfaktin, bacilizin) i antibakterijskih metabolita (butirozin, bacilaen, dificidin, makrolaktin, surfaktin, bacilizin). Soj *Bacillus velezensis* LDO2 takođe karakteriše sposobnost podsticanja rasta biljaka posredstvom nekoliko mehanizama: solubilizacija fosfata, proizvodnja siderofora i podsticanje rasta korena biljke.

Meng i sar. (2016) su ispitivali uticaj soja *Bacillus velezensis* BAC03 na podsticanje rasta sledećih biljaka: šećerna repa, šargarepa, krastavac, paprika, krompir, rotkvica, tikvica, krompir i cvekla. Količina inokuluma biokontrolnog agensa iznosila je 10^5 CFU/cm³ zemlje u skasijama u kojima je vršeno ispitivanje u uslovima staklenika. Rezultati istraživanja su pokazali da soj *Bacillus velezensis* BAC03 podstiče rast testiranih biljaka, sa primetnim razlikama u podsticanju rasta različitih delova biljaka. Primena inokuluma 10 dana nakon sadnje dala je najbolji rezultat u pogledu mase rotkvica u poređenju sa primenom biokontrolnog agensa u drugim fazama rasta biljke. Ovi autori su takođe objavili da *Bacillus velezensis* BAC03 produkuje indol-3-sirćetnu kiselinu i amonijak, kao i 1-aminociklopropan-1-karboksilat deaminazu, koji podstiču rast biljaka. Acetoin i 2,3-butandiol su detektovani kao glavna isparljiva organska jedinjenja koja takođe pokazuju uticaj na rast biljaka. Prethodno, Meng i sar. (2012) su dokazali antimikrobno dejstvo soja *Bacillus velezensis* BAC03 *in vitro*,

dok su Meng i sar. (2013) dokazali i biokontrolna svojstva istog soja u uslovima staklenika i polja.

Gao i sar. (2017) su ispitivali antifungalnu aktivnost isparljivih organskih jedinjenja koja proizvodi soj *Bacillus velezensis* ZSY-1, čime je utvrđeno antifungalno delovanje ovih jedinjenja protiv fitopatogena *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Valsa mali*, *Monilinia fructicola*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsicum* i *Colletotrichum lindemuthianum*. Gasno hromatografska analiza uz primenu masene spektrometrije otkrila je sposobnost za proizvodnju 29 isparljivih organskih jedinjenja od strane soja *Bacillus velezensis* ZSY-1. Među ispitivanim jedinjenjima najviše pripada grupi ketona (sedam jedinjenja), alkohola (šest jedinjenja) i alkana (šest jedinjenja). Uočena je najveća koncentracija sledećih jedinjenja: 2-tridekanon, pirazin (2,5-dimetil), benzotiazol i fenol (4-hloro-3-metil). Značanju antifungalnu aktivnost protiv fitopatogena *Alternaria solani* i *Botrytis cinerea* ispoljila su sledeća jedinjenja: pirazin (2,5-dimetil), benzotiazol, fenol (4-hloro-3-metil) i fenol-2,4-bis (1,1-dimetiletil), što ukazuje na značajan potencijal ovih jedinjenja za primenu u biološkoj kontroli fungalnih oboljenja paradajza.

Objavljeno je da isparljiva organska jedinjenja koja produkuje *Bacillus velezensis* GB03 predstavljaju okidač za pokretanje signalnih metaboličkih puteva etilena i jasmonske kiseline (Sharifi i Ryu, 2016). Identifikovano je 13 isparljivih organskih jedinjenja primenom gasne hromatografije kuplovane sa masenom spektrometrijom. Benzaldehid i 1,3-butadien su značajno inhibirali rast kolonija, vijabilnost i pokretljivost ćelija fitopatogena *Ralstonia solanacearum*, izazivača bakterijskog uvenuća kod velikog broja biljaka (Tahir i sar., 2017). U istom istraživanju je utvrđeno da je indukcija sistemske rezistentnosti povezana sa signalnim metaboličkim putem salicilne kiseline, čiji elicitor je surfaktin.

Tabela 3.2. Primena *Bacillus velezensis* u biološkoj kontroli fitopatogena – pregled literature

Fitopatogen - biljka	Soj	Delovanje	Referenca
<i>Fusarium graminearum</i> - pšenica	<i>B. velezensis</i> RC 218	Biofungicidno	Palazzini i sar., 2007 Palazzini i sar., 2016 Palazzini i sar., 2018
<i>Fusarium graminearum</i> - pšenica	<i>B. velezensis</i> LM2303	Biofungicidno	Chen i sar., 2018
<i>Fusarium graminearum</i> - kukuruz <i>Fusarium culmorum</i> - kukuruz	<i>B. velezensis</i> NWUMFkBS10.5	Biofungicidno	Adeniji i sar., 2018
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i> - jagoda	<i>B. velezensis</i> BS87	Biofungicidno	Nam i sar., 2009
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>physicali</i> - ogrozd	<i>B. velezensis</i> Bs006	Biofungicidno	Moreno-Velandia i sar., 2018
<i>Fusarium oxysporum</i> - neven <i>Botrytis cinerea</i> - neven	<i>B. velezensis</i> 26SETS	Biofungicidno	Kaki i sar., 2013
<i>Botrytis cinerea</i> - paprika	<i>B. velezensis</i> 5YN8 <i>B. velezensis</i> DSN012	Biofungicidno	Jiang i sar., 2018
<i>Alternaria solani</i> - paradajz <i>Botrytis cinerea</i> - paradajz <i>Valsa mali</i> <i>Monilinia fructicola</i> <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>capsicum</i>	<i>B. velezensis</i> ZSY-1	Biofungicidno	Gao i sar., 2017
<i>Alternaria panax</i> - ginseng <i>Botrytis cinerea</i> - paradajz <i>Colletotrichum coccodes</i> – crvena paprika <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> - paradajz <i>Magnaporthe oryzae</i> - pirinač <i>Pythium infestans</i> - paradajz <i>Pythium ultimum</i> - krastavac	<i>B. velezensis</i> 6341	Biofungicidno	Lim i sar., 2017

<i>Rhizoctonia solani</i> - pirinač <i>Sclerotinia sclerotium</i> - krstavac			
<i>Ralstonia solanacearum</i> – paradajz <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> - banana	<i>B. velezensis</i> Y6 <i>B. velezensis</i> F7	Biobaktericidno Biofungicidno	Cao i sar., 2018
<i>Phytophthora capsici</i> – čili paprika <i>Phytophthora citricola</i> - <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Phytophthora palmivora</i> - <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Phytophthora cinnamom</i> - <i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>B. velezensis</i>	Biofungicidno	Syed-Ab-Rahman i sar., 2018
<i>Aspergillus niger</i> <i>Mucor</i> sp.	<i>B. velezensis</i> KLP2016	Biofungicidno	Meena i sar., 2018
<i>Aspergillus tenuissima</i> - kikiriki <i>Aspergillus niger</i> - kikiriki <i>Aspergillus flavus</i> - kikiriki <i>Fusarium oxysporum</i> - kikiriki <i>Fusarium moniliforme</i> - kikiriki <i>Rhizoctonia solani</i> - kikiriki <i>Rhizopus</i> sp. - kikiriki <i>Ralstonia solanacearum</i> - kikiriki	<i>B. velezensis</i> LDO2	Biofungicidno Biobaktericidno	Chen i sar., 2019
<i>Bacillus cereus</i> <i>Clavibacter michiganensis</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Ralstonia solanacearum</i> <i>Xanthomonas campestris</i> <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> <i>Cochliobolus carbonum</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Giberella pulicanis</i> <i>Giberella zeae</i> <i>Monilinia fructicola</i> <i>Pyrenochaeta terrestris</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Alternaria solani</i>	<i>B. velezensis</i> 9D-6	Biofungicidno Biobaktericidno	Grady i sar., 2019
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> - kupus		Biobaktericidno	Lui i sar., 2016
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> - kupus	<i>B. velezensis</i> AP 136 <i>B. velezensis</i> AP 188 <i>B. velezensis</i> AP 213 <i>B. velezensis</i> AP 218 <i>B. velezensis</i> AP 219 <i>B. velezensis</i> AP 295 <i>B. velezensis</i> AP 305	Biobaktericidno	Liu i sar., 2016
<i>Streptomyces scabies</i> - rotkvica	<i>B. velezensis</i> BAC03	Biobaktericidno	Meng i Hao, 2017
<i>Pythium aphanidermatum</i> – zelena salata	<i>B. velezensis</i>	Biofungicidno	Kanjanamaneesathian i sar., 2013
<i>Blumeria graminis</i> - pšenica	<i>B. velezensis</i> CC09	Biofungicidno	Cai i sar., 2016

3.3. BAKTERIJE RODA *Xanthomonas* KAO PATOGENI BILJAKA

Među najznačajnijim oboljenjima povrća koje se u našoj zemlji koristi u ishrani u velikim količinama jesu bakterioze paradajza, paprike i biljaka iz porodice kupusnjača, kao što su kupus, karfiol, kelj i brokoli. Najčešći uzročnici bolesti navedenih biljaka jesu fitopatogene bakterije roda *Xanthomonas*, koje osim gubitaka u prinosu biljaka, a samim tim i velikih ekonomskih gubitaka, takođe predstavljaju problem u smislu veoma komplikovanog suzbijanja i kontrole oboljenja biljaka nakon njegove pojave u polju. Kontrolu bakterijskih oboljenja biljaka dodatno komplikuje diverzitet bakterijskih fitopatogena, poteškoće u dobijanju rezistentnih sorti biljaka, sposobnost bakterijskih fitopatogena da u kratkom vremenskom periodu dostignu veliku gustinu populacije usled brzog umnožavanja i nedostatak efikasnih hemijskih sredstava za njihovu kontrolu (Jones i sar., 2012). Nasuprot velikom broju hemijskih preparata za kontrolu fungalnih fitopatogena, na tržištu je dostupno samo nekoliko baktericida sa ograničenom efikasnošću u zaštiti biljaka (Milijašević-Marčić i sar., 2018). Izostanak efikasnosti preparata na bazi bakra, zabrana upotrebe antibiotika u suzbijanju fitopatogenih bakterija i pojava rezistentnih populacija fitopatogena doveli su do potrebe za pronalaženjem zdravstveno bezbednih, efikasnih preparata za zaštitu bilja koji bi se mogli ponuditi na tržištu.

Najznačajnije fitopatogene bakterije koje pripadaju rodu *Xanthomonas* i izazivaju značajne ekonomske gubitke, pre svega u pogledu prinosa, jesu *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, izazivač crne truleži biljaka iz porodice kupusnjača, i *Xanthomonas euvesicatoria*, izazivač bakterijske pegavosti listova i plodova paprike i paradajza.

3.3.1. CRNA TRULEŽ KUPUSNJAČA – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Crna trulež je jedna od ekonomski najznačajnijih bolesti biljaka familije *Brassicaceae* i divljih vrsta reda *Capparales* (Aires i sar., 2011). Kao što je prethodno pomenuto, uzročnik ove bolesti je mikrobiološki fitopatogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Gram-negativna aerobna bakterija poznata po sposobnosti proizvodnje ksantana, ekstracelularnog polisaharida. Najvažniji poljoprivredni usevi koje napada ovaj fitopatogen su kupus, kelj, prokelj, brokoli i karfiol, kod kojih ovaj fitopatogen uzrokuje značajne gubitke prinosa (Vicente i Holub, 2013) jer obolele biljke nemaju tržišnu vrednost i trunu brzo nakon branja (Massomo i sar., 2004a). Crna trulež je bolest koja uglavnom potiče iz semena biljaka, ali inficirane sadnice, zemljište (Dane i Shaw, 1996) i ostaci inficiranih useva (Kocks i Zadocks, 1996) takođe mogu predstavljati rezervoar kontaminacije. Fitopatogeni se mogu preneti sa biljke na biljku putem vetra, vode za navodnjavanje, aerosola, kiše, insekata, poljoprivredne mehanizacije i ljudi. Pljuskovi ili navodnjavanje useva prskanjem mogu doprineti širenju fitopatogena sa obolelih biljaka na biljke koje se nalaze u blizini (Hugouvieux i sar., 1998).

Xanthomonas campestris pv. *campestris* ulazi u biljku kroz hidatode na ivicama listova reapsorcijom kapljica koje nastaju gutacijom u listove (Vicente i Holub, 2013). Neki sojevi mogu da inficiraju biljke ulaskom kroz stome i kolonizacijom apoplastičnog prostora pre ulaska u vaskularno tkivo, ali je ovaj mehanizam infekcije redak jer zahteva redukovanu hidrofobnost površine listova, odnosno modifikaciju sastava kutikularnog voska oko stoma. Druga mesta na kojima može da dođe do infekcije ovim fitopatogenom uključuju povrede na biljci ili koren, ali u svakom slučaju finalna destinacija fitopatogena je vaskularno tkivo (Aires i sar., 2011). Infekcija je obično latentna na niskim temperaturama, pri čemu fitopatogeni opstaju u vaskularnom sistemu bez vidljivih simptoma, ali čim temperatura pređe 25°C fitopatogeni počinju da se kreću kroz vaskularni sistem, uz simultanu proizvodnju ksantana koji začepkuje ksilemske sudove i ograničava protok vode, što rezultuje hlorotičnim žutim lezijama na listovima i korenju. Ime bolesti, to jest, crna trulež, potiče od tamne boje vena na listovima koja se javlja usled kretanja patogena kroz vaskularni sistem (Williams, 1980).

Tkiva pogođena infekcijom postaju nekrotična, a dolazi i do preranog opadanja listova. Sekundarna infekcija izazvana drugim bakterijama, kao što su *Erwinia carotowora* ili *Pseudomonas marginalis*, odgovorna je za truljenje obolelih biljaka (Vicente i Holub, 2013).

Prevenција crne truleži kupusnjača postiže se korišćenjem sertifikovanih sadnica i semena bez fitopatogena, rotacijom useva, eliminacijom potencijalnih izvora infekcije (ostaci inficiranih useva i korovi) i korišćenjem rezistentnih sorti, ali ovi metodi su pokazali samo ograničen uspeh u poljoprivrednoj praksi (Taylor i sar., 2002). Suzbijanje širenja bolesti postiže se izbegavanjem navodnjavanja prskanjem i primenom hlor dioksida u vodi za navodnjavanje useva. Takođe se primenjuju fizički i hemijski tretmani semena, kao što su tretman toplom vodom (Nega i sar., 2003), natrijum hipohloritom, cink sulfatom, bakar acetatom, vodonik peroksidom ili antibioticima (Mew i Natural, 1993), ali ovi tretmani nisu u potpunosti efikasni. Usled toga, istraživači širom sveta ispituju alternativne načine za kontrolu crne truleži, među kojima biološka kontrolna primenom mikrobioloških biokontrolnih agenasa predstavlja obećavajuće rešenje.

3.3.2. BAKTERIOZNA PEGAVOST PAPRIKE I PARADAJZA – *Xanthomonas euvesicatoria*

Xanthomonas euvesicatoria je fitopatogen rasprostranjen širom sveta koji napada paprike i paradajz prilikom gajenja u polju, najčešće u zemljama sa kontinentalnom, tropskom i suptropskom klimom. Osim navedenih biljaka, kao biljke domaćini ovog fitopatogena javljaju se i čeri paradajz i čili paprika (Potnis i sar., 2015). Ovaj fitopatogen se nalazi na A2 listi u EPPO (*European and Mediterranean Plant Protection Organization* – Evropska i mediteranska organizacija za zaštitu biljaka) regionu usled razornih posledica bakterijske pegavosti, koja izaziva gubitke prinosa paradajza (EPPO, 2018). Gubici u prinosu useva su veoma veliki ukoliko rano u toku rasta dođe do infekcije. Oštećenja listova nastala usled dejstva fitopatogena povećavaju izloženost plodova suncu, što obično rezultuje sunčanicom plodova. Iako su lezije plodova uglavnom samo površinske, ipak doprinose smanjenju kvaliteta za prodaju svežih plodova, kao i za njihovu preradu. *Xanthomonas euvesicatoria* se prenosi sa jedne na drugu biljku uglavnom putem semena, ali i putem ostataka inficiranih biljaka, na primer stabala. Takođe može da preživi u zemljištu, uglavnom u rizosferi biljaka koje nisu domaćini ovog fitopatogena (Bashan i sar., 1982a). U staklenicima se infekcija ovim patogenom dešava usled primene zaraženog semena. Širenje fitopatogena se odvija putem kiše ili navodnjavanja prskanjem. Vijabilne bakterije su takođe detektovane u aerosolu u polju, što ukazuje na mogućnost prenošenja fitopatogena i ovim putem (McInnes i sar., 1988). Širenju bolesti pogoduju pljuskovi, visoka vlažnost vazduha i temperatura 30-35°C (Diab i sar., 1982a; Diab i sar., 1982b). Fitopatogeni mogu da prežive na semenu paradajza i paprike i do 10 godina (Bashan i sar., 1982b). Uz relativno ograničenu sposobnost preživljavanja fitopatogena u zemljištu i kontrolisanim uslovima plastenika, smatra se da se isključenje infekcije tokom gajenja u plastenicima postiže striktnom upotrebom sertifikovanog semena bez prisustva fitopatogena (EPPO, 1996).

Infekcija listova se dešava ulaskom fitopatogena kroz stome, a infekcija plodova povrća na mestima povreda, kao što su abrazije ili ubodi insekata. Uglavnom dolazi do infekcije samo mladih plodova povrća. Fitopatogen može da se epifitno umnožava na mladim biljkama bez ispoljavanja simptoma bolesti (Zhang i sar., 2009). Umnožavanje fitopatogena na paprici se obično dešava na mladim plodovima, u vidu sluzi, bez ispoljavanja simptoma (Bashan i sar., 1982a). Dokazano je da proređivanje listova na sadnicama paradajza doprinosi širenju bolesti, stoga je preporučeno da se kidanje listova vrši u popodnevnim časovima kada je biljka suva i da se pri tome koriste sredstva za dezinfekciju ruku (Pohronezny i sar., 1990).

Simptomi bakterijske pegavosti na plodovima paradajza uključuju površinske fleke ili kraste nalik na plutu, sa vodenastim ivicama, ovalnog ili nepravilnog oblika i prečnika 2-10 mm. Na plodovima paprike se retko uočavaju simptomi jer mladi inficirani plodovi uglavnom otpadnu. Ukoliko dođe do pojave simptoma na plodovima paprike, javljaju se krastave, ispučene i

beličaste lezije (EPPO, 2013). Na listovima paprike i paradajza simptomi bakteriozne pegavosti se uočavaju kao vlažne lezije nepravilnog oblika, koje vremenom poprimaju braon boju i postaju nekrotične (EPPO, 1996; Hassan i Zyton, 2017). Lezije su obično okružene velikim hlorotičnim zonama (EPPO, 2013). Vrlo često dolazi do spajanja fleka, nekroze i preranog opadanja listova. Osim na listovima, simptomi se najčešće ispoljavaju na stablu, a infekcija plodova uzrokuje značajne gubitke u prinosu, naročito kada su ekološki uslovi pogodni za razvoj patogena (Obradović i sar., 2004).

Kontrola bakteriozne pegavosti se uglavnom sprovodi pre svega korišćenjem zdravog i tretiranog semena, kao i sadnica bez prisustva fitopatogena, odstranjivanjem ostataka inficiranih biljaka (Balaž i Delibašić, 2005), a takođe i posebnom pažnjom prilikom rukovanja mladim sadnicama kako bi se sprečilo širenje bolesti u ranoj fazi rasta biljaka (Goode i Sasser, 1980). Suzbijanje bolesti je moguće tretmanom različitim hemijskim jedinjenjima, uglavnom na bazi bakra (Azaizeh i Bashan, 1984), ili kombinacijom jedinjenja bakra sa etilenbisditiokarbamatima, kao što su maneb i mankozeb. Česta primena ovih preparata dovela je do pojave sojeva *Xanthomonas euvesicatoria* otpornih na dejstvo ovih jedinjenja (Griffin i sar., 2017). Osim toga, primena etilenbisditiokarbamata je ograničena usled negativnog uticaja na životnu sredinu i pooštavanja kriterijuma Evropske agencija za bezbednost hrane (EFSA – *European Food Safety Authority*) (Mercer i Latorse, 2003). Takođe, prisutna je i upotreba antibiotika, pre svega streptomicina i kasugamicina (Vallad i sar., 2010), u zemljama gde je dozvoljena primena antibiotika za suzbijanje bakterioza biljaka. Međutim, *Xanthomonas euvesicatoria* veoma brzo razvija rezistentnost i prema streptomycinu (Minsavage i sar., 1990). Za dezinfekciju zemljišta može se koristiti fumigacija metil bromidom. Za iskorenjavanje infekcije semena može se primeniti nekoliko tretmana: 0,8% sirćetna kiselina tokom 24 h, 5% HCl tokom 5-10 h, 1,05% natrijum hipohlorit tokom 30 min, 0,05% HgCl₂ tokom 5 min i tretman toplom vodom (56°C) tokom 30 min (Dempsey i Chandler, 1963). Takođe se preporučuje korišćenje rezistentnih sorti paprike i paradajza. Međutim, neki sojevi fitopatogena *Xanthomonas euvesicatoria* mogu da prevladaju gene rezistentnosti i izazovu oboljenje i kod rezistentnih biljaka (Milijašević i sar., 2006).

Alternativne strategije kontrole fitopatogena *Xanthomonas euvesicatoria* obuhvataju primenu aktivatora otpornosti biljaka (na primer, acibenzolar-S-metil) (Buonaurio i sar., 2002), kao i primenu bioloških agenasa kao što su bakteriofagi (Flaherty i sar., 2000) i bakterijski biokontrolni agensi (Byrne i sar., 2005).

3.3.3. BIOLOŠKA KONTROLA FITOPATOGENA RODA *Xanthomonas* PRIMENOM BAKTERIJA RODA *Bacillus*

Kada je u pitanju biološka kontrola fitopatogenih bakterija roda *Xanthomonas* primenom bakterija roda *Bacillus*, može se zaključiti da se mali broj istraživanja bavio ovom tematikom. Luna i sar. (2002) su testirali antimikrobnu aktivnost nekoliko izolata roda *Bacillus* protiv *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Monteiro i sar. (2005) i Issazadeh i sar. (2012) dokazali su sličnu antimikrobnu aktivnost kultivacionih tečnosti sojeva *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus*, redom, protiv fitopatogenih sojeva *Xanthomonas campestris*, dok u istraživanju koje su sproveli Földes i sar. (2000) soj *Bacillus subtilis* IFS-01 nije pokazao antimikrobnu aktivnost protiv fitopatogenih izolata ove vrste. de Carvalho i sar. (2010) i Deivamany i Muthamilan (2015) su dokazali *in vitro* antimikrobnu aktivnost sojeva *Bacillus subtilis* R14 i *Bacillus subtilis* protiv fitopatogenih sojeva *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Mali broj istraživanja usmeren je ka optimizaciji procesa proizvodnje antimikrobnih agenasa, kao i samog postupka formulacije gotovog proizvoda. Takođe, rezultati najvećeg broja istraživanja zasnivaju se na testiranju antimikrobne aktivnosti *in vitro*, dok se manji broj istraživanja temelji na ispitivanju delovanja preparata *in vivo* ili na samom mestu primene, dakle u polju. Mali broj eksperimentalnih istraživanja *in vivo* ukazuje na potrebu ispitivanja dejstva proizvedenih preparata protiv definisanih fitopatogena na mestu primene, jer su istraživanja pokazala da često ne postoji korelacija između aktivnosti preparata *in vitro* i *in vivo*, pre svega zbog različitosti uslova u kojima se preparat primenjuje.

Wulff i sar. (2002a, 2002b) testirali su efikasnost soja *Bacillus subtilis* BB na sadnicama kupusa i u eksperimentima u polju sa ciljem suzbijanja crne truleži, dok su Massomo i sar. (2004b) testirali izolat roda *Bacillus* protiv crne truleži kupusa u kontrolisanim uslovima (u stakleniku) i u polju.

Lui i sar. (2016) su ispitivali uticaj PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) sojeva i njihovih kombinacija na indukovanje sistemske rezistentnosti i podsticanje rasta kupusa, sa ciljem suzbijanja crne truleži (fitopatogena *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*). U preliminarnim testiranjima dokazano je da sojevi vrste *Bacillus velezensis* označeni kao AP136, AP188, AP213, AP218, AP219, AP295 i AP305 redukuju broj folijarnih lezija uzrokovanih prisustvom fitopatogena. Ovi sojevi su takođe ispitani i u uslovima staklenika i polja, u kombinaciji sa sojevima *Bacillus safensis* AP7, *Bacillus altitudinis* AP18, *Bacillus mojavensis* AP209, *Fictibacillus solisalsi* AP217 i *Lysinibacillus macrolides* AP282. Rezultati ukazuju na sinergističko dejstvo ispitanih sojeva u pogledu smanjenja učestalosti pojave crne truleži, kao i u pogledu povećanja suve materije izdanaka i korena, što ukazuje na sposobnost podsticanja rasta kupusa od strane kombinacije ispitivanih PGPR sojeva.

Ji i sar. (2006) su ispitivali suzbijanje bakterijske pegavosti paradajza u eksperimentima u polju u Alabami i Floridi primenom biokontrolnog agensa *Bacillus pumilus* SE34, koji istovremeno podstiče i rast biljaka. Primećeno je značajno suzbijanje ovog oboljenja paradajza primenom ispitivanog soja u dva eksperimenta izvedena u uslovima polja.

Roberts i sar. (2008) ispitivali su efikasnost biokontrolnog agensa *Bacillus subtilis* QST 713 u kombinaciji sa bakarnim jedinjenjima za biološku kontrolu *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* u eksperimentima u polju. Tretman biljaka sprej formulacijom koja sadrži biokontrolni agens i bakar hidroksid nije pokazao statistički značajnu razliku u poređenju sa tretmanom primenom bakar-mankoze standarda.

Suárez-Estrella i sar. (2014) su ispitivali supresivna svojstva agroindustrijskog komposta inokulisanog biokontrolnim agensom, sojem *Bacillus pumilus* MSW231, protiv fitopatogena paradajza *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Stepem izolacije fitopatogena iz inficiranih biljaka je redukovan za 95% primenom komposta inokulisanog biokontrolnim agensom.

Milijašević-Marčić i sar. (2018) su ispitivali *in vitro* antimikrobnu aktivnost nekoliko sojeva vrste *Bacillus subtilis* protiv fitopatogena *Xanthomonas vesicatoria* NCPPB 422, izolovanog sa paradajza. Najveći prečnici zona inhibicije protiv ispitivanog fitopatogena dobijeni su primenom sojeva *Bacillus subtilis* B-319, *Bacillus subtilis* B-325 i *Bacillus subtilis* B-358.

3.4. RAZVOJ BIOTEHNOLOŠKIH PROCESA PROIZVODNJE BOKONTROLNIH AGENASA

Proizvodnja preparata za biološku kontrolu biljnih štetočina na bazi mikroorganizama predstavlja kompleksan i skup biotehnološki postupak, koji treba da obuhvata faze osvežavanja mikroorganizma i pripreme inokuluma, umnožavanja mikroorganizma i/ili biosinteze željenog metabolita, opcionu fazu izdvajanja i prečišćavanja željenog proizvoda, kao i njegovu formulaciju i stabilizaciju. Ukoliko sami mikroorganizmi predstavljaju aktivnu komponentu proizvoda koja treba da ispolji dejstvo na mestu primene, osnovni zadatak kompletnog postupka proizvodnje predstavlja njihovo umnožavanje i održavanje vijabilnosti u dužem vremenskom periodu, što dodatno komplikuje već zahtevan postupak proizvodnje. Efikasnost velikog broja biokontrolnih agenasa zavisi od broja ćelija antagonističkog mikroorganizma primenjenih na ciljanom mestu delovanja (Hofstein i sar., 1994), stoga je najjednostavniji način povećanja efikasnosti biokontrolnog preparata optimizacija bioprocesa u pogledu povećanja broja ćelija biokontrolnog agensa po jedinici primenjenog preparata (Spadaro i Gullino, 2004).

Masovna proizvodnja biokontrolnih agenasa treba da bude brza, efikasna i jeftina i podrazumeva postojanje bioprocenog rešenja koje obezbeđuje zadovoljenje svih

navedenih zahteva. Smanjenje troškova proizvodnje ovakvih preparata sa tehnološkog aspekta moguće je optimizacijom svake od navedenih proizvodnih faza. Najveće uštede mogu se postići optimizacijom samog bioprocasa i faze izdvajanja i prečišćavanja željenog proizvoda. Kada je u pitanju biotehnoški aspekt postupka proizvodnje, odnosno optimizacija bioprocasa, osnovni koraci obuhvataju optimizaciju sastava kultivacionog medijuma koji se koristi za produkciju željenog proizvoda, kao i optimizaciju procesnih uslova sa ciljem dobijanja željenog proizvoda u što većoj količini, uz minimizaciju količina otpadnih efluenata, što podrazumeva smanjenje troškova u pogledu prečišćavanja nastalih otpadnih tokova bioprocasa.

Razvoj odovarajućeg bioprocenog rešenja za komercijalnu proizvodnju preparata za primenu u biološkoj kontroli fitopatogena mora da uključuje testove na nivou pilot postrojenja. Smisao uvećanja razmera bioprocasa jeste selekcija uslova bioprocasa i operativnih procedura koje osiguravaju da uticaj različitih promenljivih na ishode bioprocasa bude jednak u proizvodnim jedinicama različite veličine. Finalni cilj uvećanja razmera bioprocasa jeste komercijalna eksploatacija ekonomski isplativog bioprocenog rešenja, stoga se u ovoj fazi posmatraju svi tehnološki aspekti bioprocasa koji utiču na ekonomske pokazatelje isplativosti bioprocenog rešenja, kao što su prinos željenog proizvoda, produktivnost, kapitalne investicije, troškovi potrošnog materijala i energije i troškovi proizvodnje po jedinici finalnog proizvoda, jer kombinacija navedenih faktora odlučuje o ekonomskoj vijabilnosti bioprocenog rešenja (Yezza i sar., 2004). Uvećanje razmera biotehnoških procesa sa laboratorijskog na industrijski nivo je problematično zbog teškoća u proceni faktora koji značajno utiču na uvećanje razmera procesa kultivacije biokontrolnog agensa. Dobro je poznato da su mikroorganizmi veoma osetljivi na promene uslova u okruženju u pogledu temperature, vrednosti pH, koncentracije rastvorenog kiseonika, ali i prisustva ili odsustva određenih nutrijenata u određenom opsegu koncentracija, jer ove promenljive pokazuju značajan uticaj na rast i umnožavanje ćelija mikroorganizama, ali i na produkciju željenih metabolita (Hsu i Wu, 2002). Stoga su najčešće ispitivani parametri prilikom uvećanja razmera bioprocasa temperatura, brzina mešanja i tip mešača (koji utiču na kvalitet mešanja, sile smicanja, prenos mase i prenos toplote), brzina i raspodela vazduha ili kiseonika tokom aeracije, način i uslovi sterilizacije hranljive podloge, uslovi pripreme inokuluma, kao i sastav hranljive podloge u pogledu odabira odgovarajućih nutrijenata i njihovo prisustvo u odgovarajućim koncentracijama (Humphrey, 1998).

Za uvećanje razmera (*scale-up*) bioprocasa sa laboratorijskog na industrijski nivo proizvodnje fundamentalno je ispitati i pronaći optimalne izvore ugljenika i azota čija primena maksimizuje umnožavanje biomase proizvodnog mikroorganizma ili sintezu ciljanog metabolita (Spadaro i Gullino, 2004), nakon čega je potrebno izvršiti optimizaciju sastava hranljive podloge u pogledu njihovih koncentracija, pri čemu je osnovni cilj maksimizacija antimikrobnog delovanja biokontrolnog agensa, uz simultanu minimizaciju troškova hranljive podloge za kultivaciju. Mikrobiološki bioprocasi podrazumevaju upotrebu sintetičkih, polusintetičkih ili kompleksnih hranljivih podloga, koje sadrže nutrijente potrebne proizvodnom mikroorganizmu za umnožavanje biomase ili biosintezu željenog proizvoda. Opšti trend koji za cilj ima smanjenje troškova bioprocasa ukazuje na potrebu sve šire primene kompleksnih kultivacionih medijuma sa različitim izvorima nutrijenata čija je cena manja u poređenju sa konvencionalnim izvorima nutrijenata visokog stepena čistoće. Dodatna vrednost ovakvih bioprocasa postiže se primenom različitih otpadnih materijala, čije je prečišćavanje neisplativo ili čije odlaganje predstavlja problem ili opasnost za životnu sredinu, uz dobijanje proizvoda sa dodatom vrednošću, koji potiču od iskorišćenja otpadnih materijala.

Prilikom optimizacije bioprocenog rešenja u pogledu sastava hranljive podloge za kultivaciju biokontrolnog agensa i uslova kultivacije potrebno je izvesti veliki broj eksperimenata sa ciljem procene uticaja različitih promenljivih na odabrane ishode bioprocasa. U ovom koraku razvoja bioprocasa, umesto analize uticaja jednog po jednog faktora (*one factor at a time*), što zahteva značajnu količinu vremena, rada i resursa, mnogo

je korisnije uključiti eksperimentalni dizajn (Singh i sar., 2017). Eksperimentalni dizajn podrazumeva planiranje i izvođenje eksperimenata u skladu sa prethodno definisanim eksperimentalnim planom. Eksperimentalni plan obuhvata nezavisne promenljive (ulaze bioprocesa), za koje je procenjeno da značajno utiču na zavisne promenljive (izlaze bioprocesa) i kombinacije njihovih vrednosti u odgovarajućim opsezima. Primenom statističkog planiranja eksperimenata, odnosno eksperimentalnog dizajna, kao što su Boks-Benkenov, Plaket-Burmanov ili centralni kompozitni dizajn, značajno se smanjuje broj eksperimenata koje je potrebno izvesti sa ciljem dobijanja odgovarajuće količine podataka zadovoljavajućeg kvaliteta o izlazima bioprocesa i uticaju nezavisnih promenljivih na njih (Singh i sar., 2017). Stoga primena eksperimentalnog dizajna ubrzava i pojeftinjuje ovaj korak unapređenja bioprocesa, a u isto vreme predstavlja osnovu za dalje korake razvoja bioprocenog rešenja. Međutim, veoma je značajno napraviti odgovarajući izbor eksperimentalnog plana koji na adekvatan način predstavlja eksperimentalni prostor, a takođe je veoma bitno izdvojiti nezavisne promenljive koje značajno utiču na ciljne ishode bioprocesa, pri čemu je definisanje opsega vrednosti nezavisnih promenljivih takođe veoma važan korak u dizajnu eksperimenata (Mandenius i Brundin, 2008).

Na osnovu eksperimentalnih podataka dobijenih iz statistički planiranih i izvedenih eksperimenata moguće je izvršiti modelovanje bioprocesa u pogledu odabranih odziva (izlaza bioprocesa). Modelovanje bioprocesa podrazumeva definisanje matematičkih modela koji preko vrednosti i statističke značajnosti koeficijenata modela određuju značajnost uticaja nezavisnih promenljivih na odabrane zavisne promenljive (odzive) bioprocesa. Matematički modeli, dakle, opisuju ponašanje zavisnih promenljivih u odnosu na definisane nezavisne promenljive, ali u isto vreme mogu da se koriste i za predviđanje ishoda bioprocesa prilikom variranja vrednosti nezavisnih promenljivih. Najčešće primenjivane metode za modelovanje bioprocesa jesu metodologija odzivne površine (RSM – *Response Surface Methodology*) i veštačke neuronske mreže (ANN – *Artificial Neural Networks*) (Baş i Boyacı, 2007a; Baş i Boyacı, 2007b; Singh i sar., 2017). Matematički modeli dobijeni primenom savremenih metoda modelovanja bioprocesa predstavljaju osnovu za optimizaciju bioprocesa u pogledu određivanja optimalnih vrednosti ispitivanih nezavisnih promenljivih kako bi se zadovoljili definisani ciljevi optimizacije – maksimizacija, minimizacija ili održavanje vrednosti zavisnih promenljivih u željenom opsegu vrednosti. U ovu svrhu najčešće se koriste metoda željene funkcije (*Desirability Function Method*) i genetički algoritmi (GA – *Genetic Algorithms*) (Baş i Boyacı, 2007a; Baş i Boyacı, 2007b; Singh i sar., 2017). Dobijeni matematički modeli mogu dalje da se primene za simulaciju bioprocesa primenom različitih softverskih paketa, što je jedan od narednih koraka razvoja bioprocenog rešenja. Osim toga, matematički modeli su korisni za uvećanje razmera bioprocesa, jer prema teorijski definisanim pravilima uvećanja razmera mogu da posluže kao osnova za korigovane modele bioprocenih promenljivih u uvećanim razmerama.

Iz navedenog pregleda literature može se zaključiti da je potencijal bakterija roda *Bacillus* za biološku kontrolu fitopatogena značajan, na šta ukazuje i postojanje komercijalnih preparata na bazi ovih bakterija. Međutim, ispitivanje potencijala novih izolata roda *Bacillus* uglavnom je svedeno na testiranje antimikrobne aktivnosti *in vitro* i rasvetljavanje mehanizama njihovog delovanja protiv fitopatogena, dok se vrlo malo podataka može pronaći o optimizaciji uslova izvođenja bioprocesa i unapređenju medijuma za proizvodnju biokontrolnih agenasa, kao i o izvođenju bioprocesa ovog tipa na nivou laboratorijskog bioreaktora ili bioreaktora većih zapremina. Kada je u pitanju izdvajanje biomase bakterija roda *Bacillus*, takođe se može uočiti nedostatak literaturnih podataka o mikrofiltraciji napojnih smeša dobijenih kultivacijom bakterija roda *Bacillus*, naročito u pogledu unapređenja procesa mikrofiltracije primenom različitih hidrodinamičkih metoda. Osim toga, podaci o *in vivo* testiranju antimikrobnih agenasa bakterija roda *Bacillus* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* su veoma ograničeni. Interesovanje svetske naučne javnosti za potencijalnu primenu novih izolata koji ispoljavaju antimikrobnu aktivnost protiv različitih fitopatogena je sve veće, stoga je razvoj bioprocesa za proizvodnju agenasa biološke kontrole na bazi sojeva roda *Bacillus* od velikog značaja za unapređenje ove naučne oblasti.

3.5. SIROVI GLICEROL IZ PROIZVODNJE BIODIZELA KAO SIROVINA U BIOTEHNOLOŠKOJ PROIZVODNJI

Primena fosilnih goriva u svim granama industrije i saobraćaja, kao i za proizvodnju električne i toplotne energije u domaćinstvima i javnim objektima već duži vremenski period predstavlja neodrživ sistem, sa jedne strane zbog iscrpljenja rezervi fosilnih goriva, a sa druge strane zbog negativnih uticaja njihove primene na životnu sredinu i zdravlje ljudi. Zbog toga se kao alternativa javlja proizvodnja i primena biogoriva, koja se uglavnom dobijaju iz prirodnih sirovina ili otpadnih materijala (Garlapati i sar., 2016). Najviše se potencira primena biogoriva proizvedenih iz različitih vrsta biomase, pre svega zbog dostupnosti sirovina, a samim tim i obezbeđenja koncepta obnovljivosti ovih izvora energije, ali i zbog činjenice da iskorišćenje biomase za proizvodnju biogoriva ne dovodi do oslobađanja dodatnih količina CO₂ u atmosferu (de Castro i sar., 2014). Najzastupljenija biogoriva koja su trenutno u upotrebi su bioetanol, biogas i biodizel.

Biodizel predstavlja jedno od biogoriva čija je proizvodnja i potrošnja u poslednjoj deceniji doživela ekspanziju i koje može da se koristi kao zamena za dizel gorivo proizvedeno iz nafte u konvencionalnim dizel motorima. Ovo gorivo spada u biogoriva četvrte generacije, za koje strategija proizvodnje predviđa generisanje minimalnih količina otpadnih tokova tokom proizvodnog procesa (Garlapati i sar., 2016). Biodizel predstavlja smešu alkil estara koji nastaju reakcijom transesterifikacije triglicerida alkoholom, pri čemu se kao sporedni proizvod reakcije javlja glicerol u količini od oko 10% (w/w) (Milazzo i sar., 2013). Kao izvori triglicerida, odnosno sirovine za proizvodnju biodizela, koriste se različita biljna ulja i masti životinjskog porekla (Garlapati i sar., 2016). Najčešće se koriste ulja dobijena ceđenjem različitih uljarica, kao što je na primer uljana repica, suncokret ili soja (Zhou i sar., 2008). Sa druge strane, u poslednjih nekoliko godina primetan je trend sve veće upotrebe otpadnih ulja i masti, koja potiču iz procesa pripreme hrane u restoranima ili domaćinstvima, kao sirovine za proizvodnju biodizela. Za reakciju transesterifikacije triglicerida najčešće se koristi metanol zbog svoje niske cene. Osim toga, za odvijanje ove reakcije potrebno je i prisustvo baznog katalizatora (KOH ili NaOH). Prilikom reakcije transesterifikacije takođe može da dođe do nastanka neželjenih proizvoda, pre svega sapuna (Tan i sar., 2013). Sve ove nečistoće, uključujući neželjene proizvode reakcije transesterifikacije, ostatke metanola i katalizatora, soli, masnih kiselina, kao i ostatke sirovine i nečistoće koje potiču iz samih sirovina, zaostaju u sirovom glicerolu kao nusproizvodu koji preostaje u najvećoj količini nakon izdvajanja biodizela (Yang i sar., 2012).

Sirovi glicerol iz proizvodnje biodizela prema elementarnom sastavu sadrži oko 25% ugljenika, metale kao što su natrijum, kalijum, kalcijum, magnezijum, a od nemetala fosfor i sumpor. Natrijum je uglavnom prisutan u količini većoj od 1% (w/w), dok je sadržaj ostalih metala obično u opsegu 4-163 ppm. Sirovi glicerol takođe može da sadrži proteine (0,06–0,44%, w/w), masti (1-13%, w/w) i ugljene hidrate (75-83%) (Thompson i He, 2006). Sadržaj glicerola u sirovom glicerolu kreće se u opsegu 65-85% (w/w) (Gonzalez-Pajuelo i sar., 2005; Mu i sar., 2006).

Zbog velike količine prisutnih nečistoća, jednostavno odlaganje sirovog glicerola u životnu sredinu nije moguće, a postupak njegovog prečišćavanja je skup, kompleksan i ekonomski neisplativ kada se uzme u obzir cena proizvodnje glicerola kao komercijalne hemikalije (Ayoub i Abdullah, 2012). Stoga će rešavanje problema prisutnog viška sirovog glicerola značajano uticati na budućnost svetskog tržišta biodizela. Usled dostupnosti sve veće količine sirovog glicerola na globalnom nivou dolazi do stalnog smanjivanja njegove cene. Procena je da se cena proizvodnje biodizela povećava za 0,021 \$/l za svako smanjenje cene sirovog glicerola od 0,22 \$/kg (da Silva i sar., 2009; Li i Lesnik, 2013). Svetsko tržište biodizela se povećava iz godine u godinu, uz procenu da će do 2026. godine dostići proizvodnju od 40,5 milijardi litara biodizela (OECD/FAO, 2017). Globalni lider u proizvodnji biodizela je i dalje Evropska Unija, a osnovna sirovina za proizvodnju biodizela na ovom području je ulje uljane repice (da Silva i sar., 2009). Rešavanje problema prisutnog viška

sirovog glicerola, čije će se količine u budućnosti i dalje povećavati usled sve veće potražnje za biodizelom i njegove sve veće potrošnje, predstavlja jedan od problema u čije je rešavanje uključena naučna zajednica na globalnom nivou. Jedan od predloga za iskorišćenje sirovog glicerola jeste upravo njegova mikrobiološka konverzija u različite proizvode sa dodatom vrednošću, odnosno njegova primena kao izvora ugljenika - jedne od osnovnih komponenti kultivacionog medijuma.

Primena sirovog glicerola kao izvora ugljenika i energije u različitim tipovima mikrobioloških konverzija predstavlja novo polje interesovanja svetske naučne javnosti. Prisutan višak sirovog glicerola iz proizvodnje biodizela čini upotrebu glukoze kao izvora ugljenika skupljom u poređenju sa ovim efluentom. Osim toga, glukoza se primenjuje u proizvodnji hrane i hrane za životinje, što nije slučaj sa sirovim glicerolom (Nakamura i Whited, 2003). Glicerol takođe pokazuje veći stepen redukcije u poređenju sa šećerima (Dharmadi i sar., 2006). Prilikom fermentacije glicerola dobija se duplo veći prinos etanola i mravlje kiseline (ili etanola i vodonika) u poređenju sa fermentacijom glukoze, jer polovina količine dostupnog šećera biva izgubljena tokom fermentacije u vidu ugljen-dioksida (da Silva i sar., 2009). Značajan broj mikroorganizama može da metaboliše glicerol aerobnim putem, dok postoje i mikroorganizmi koji anaerobno metabolišu glicerol (Yazdani i Gonzalez, 2007). Bakterija *Escherichia coli*, kao i pripadnici rodova *Klebsiella*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconobacter*, *Citrobacter*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Candida*, *Aspergillus* itd. mogu da konvertuju glicerol u proizvode sa dodatom vrednošću (Amaral i sar., 2009; Leoneti i sar., 2012; Garlapati i sar., 2016). Najčešće se primenom sirovog glicerola kao sirovine za biotehnošku konverziju dobijaju sledeći proizvodi: 1,2-propandiol, 1,3-propandiol, 2,3-butandiol, etanol, butanol, vodonik, dihidroxiaceton, propionska kiselina, limunska kiselina, ćilibarna kiselina, mlečna kiselina, polihidroksibutirat, polihidroksialkanoati, pigmenti i biosurfaktanti (da Silva i sar., 2009; Posada i sar., 2012; Li i Lesnik., 2013; Garlapati i sar., 2016)

Primena bakterija roda *Bacillus* za mikrobiološku konverziju sirovog glicerola delimično je proučena u oblasti proizvodnje fengicina (de Faria i sar., 2011a), biosurfaktanata (de Faria i sar., 2011b; Seimmai i sar., 2012; Sousa i sar., 2012; de Sousa i sar., 2014), 2,3-butandiola (Yang i sar., 2013), polihidroksibutirata (Moreno i sar., 2015) i polihidroksialkanoata (Ribeiro i sar., 2016).

3.6. MIKROFILTRACIJA KAO TEHNIKA SEPARACIJE BIOMASE MIKROORGANIZAMA

Membranski separacioni procesi danas nalaze široku primenu u velikom broju grana industrije. Mikrofiltracija se najčešće koristi u izdvajanju i prečišćavanju bioproizvoda, kao što su mikrobne ćelije, proteini i ekstracelularne polimerne supstance. Glavno ograničenje primene membranskih separacionih procesa, pre svega mikrofiltracije i ultrafiltracije, predstavljaju fenomeni koncentracione polarizacije i prljanja membrane. Koncentraciona polarizacija predstavlja pojavu graničnog sloja čestica ili molekula deponovanih na membrani, čija je koncentracija u blizini površine membrane znatno veća u poređenju sa koncentracijom napojne smeše. Ovaj gel-sloj se ponaša kao sekundarna membrana i predstavlja dodatni otpor proticanju permeata. Zaprljanost membrane predstavlja taloženje ili akumulaciju suspendovanih, odnosno koloidnih čestica, na površini membrane, ali i kristalizaciju, taloženje ili adsorpciju rastvoraka na površini i/ili u porama membrane. Akumulacija ćelija, ćelijskih ostataka ili drugih čestica na površini membrane predstavlja površinsko prljanje membrane ili formiranje pogače i obično predstavlja reverzibilan proces. Sa druge strane, deponovanje i adsorpcija čestica malih dimenzija ili makromolekula na unutrašnjoj strani pora membrane (unutrašnje prljanje membrane) je obično ireverzibilan proces. Najuočljivija posledica navedenih fenomena je opadanje fluksa permeata u toku filtracije, što stvara potrebu za češćim čišćenjem membrane ili primenom agresivnih

sredstava za čišćenje sa ciljem uklanjanja deponovanih i/ili adsorbovanih materija sa membrane.

U prethodne tri decenije uloženi su značajni naponi u rešavanje problema prljanja membrane, a samim tim i smanjenja fluksa permeata. Predloženi metodi obuhvataju pre svega modifikacije membrana primenjenih u konkretnom slučaju, različite predtretmane napojne smeše koji imaju za cilj smanjenje udela materija koje mogu da izazovu prljanje membrane, kao i primenu dodatnih polja sile, kao što su električna i ultrazvučna polja ili njihove kombinacije. Takođe je ispitivana primena različitih hidrodinamičkih metoda, koji pre svega imaju za cilj manipulaciju proticanja napojne smeše kroz membranski modul i podsticanje turbulencije i povećanog smicanja u blizini površine membrane, čime se sprečava deponovanje i adsorpcija čestica ili molekula na površinu membrane, ili uklanjanje već nastale filtracione pogače. Pregled literature vezan za mikrofiltraciju sa ciljem izdvajanja biomase mikroorganizama fokusiran je pregled metoda za povećanje fluksa permeata i redukciju prljanja membrane tokom izvođenja različitih membranskih separacionih procesa, sa posebnim osvrtom na primenu različitih promotora turbulencije i tehnike uduvanja gasa tokom izvođenja procesa membranske filtracije.

3.6.1. OPŠTA RAZMATRANJA MEMBRANSKIH SEPARACIONIH PROCESA

3.6.1.1. Klasifikacija membranskih separacionih procesa

Membranski separacioni procesi mogu se klasifikovati prema vrsti pogonske sile, prema veličini čestica koje se zadržavaju na membrani, prema mehanizmu separacije i prema tome da li su željeni proizvodi jedinjenja koja se zadržavaju na membrani ili jedinjenja koja prolaze kroz nju (Jokić, 2010). Najopštiji kriterijum podele membranskih separacionih procesa je prema načinu separacije (Van den Berg i Smolders, 1992):

- separacija zasnovana na propuštanju (efekat sita),
- separacija zasnovana na različitoj difuzivnosti kroz membranu i na različitom afinitetu komponenata prema membrani i
- separacija zasnovana na razlici u naelektrisanju molekula.

Kada se posmatraju procesi separacije zasnovani na principu propuštanja, u ove procese spadaju mikrofiltracija, ultrafiltracija i nanofiltracija, kod kojih je pogonska sila procesa razlika pritisaka. Separacije zasnovane na različitoj difuzivnosti kroz membranu i na različitom afinitetu komponenata prema membrani obuhvataju reverznu osmozu, separaciju gasova, dijalizu i perisparavanje. Pogonska sila za reversnu osmozu i separaciju gasova je razlika pritisaka, dok je za dijalizu i perisparavanje pogonska sila razlika koncentracija. Kada su u pitanju procesi separacije usled razlike u naelektrisanju značajno je izdvojiti elektrodijalizu, gde se transport odvija difuzionim mehanizmom, a pogonska sila je razlika električnih potencijala.

Mikrofiltracija, ultrafiltracija, nanofiltracija i reversna osmoza su slični procesi i razlikuju se samo po veličini separisanih čestica, kao i po vrsti upotrebljenih membrana.

Mikrofiltracione membrane se tipično koriste za uklanjanje čestica opsega dimenzija 0,1-10 μm iz suspenzije. Membrane za mikrofiltraciju imaju pore dimenzija prečnika od 50 do 10^3 nm i zadržavaju suspendovane čestice molekulske mase 100-1000 kDa. Pogonska sila procesa mikrofiltracije je razlika pritisaka u opsegu vrednosti 10-500 kPa (0,1-5 bar) (Koseoglu i sar., 1991). Unakrsna (*cross-flow*) mikrofiltracija predstavlja separacioni proces kod koga se proticanje napojne smeše koja se filtrira odvija paralelno u odnosu na površinu membrane, za razliku od *dead-end* mikrofiltracije, kod koje je proticanje napojne smeše normalno (pod pravim uglom) u odnosu na površinu membrane. Unakrsna mikrofiltracija pronašla je široku primenu u koncentrovanju, prečišćavanju ili separaciji makromolekula, koloidnih čestica i suspendovanih čestica od rastvora (Williams i Wakeman, 2002). Osim toga, unakrsna mikrofiltracija se sve više koristi u izdvajanju i prečišćavanju proizvoda

različitih biotehnoloških procesa, kao što su mikrobné ćelije, proteini i ekstracelularne polimerne supstance (Hwang i Chen, 2010).

Membrane za ultrafiltraciju razdvajaju ćelije mikroorganizama, koloidno rastvorene komponente i makromolekule molekulske mase veće od 500 Da, jer su propustljive za vodu i za jedinjenja manjih molekulskih masa, dok su nepropustljive za većinu makromolekula. Dimenzije pora membrana za ultrafiltraciju se kreću u opsegu 10-100 nm (Van den Berg i Smolders, 1992; Singh i Cheryan, 1997). Pogonska sila procesa ultrafiltracije je razlika pritisaka u opsegu vrednosti 100-1000 kPa. Ultrafiltracija se sve više primenjuje u industriji, na primer za koncentrisanje proteinskih proizvoda (Cheryan, 1986), bistrenje sokova, pravljenje sira (Jönsson i Trägårdh, 1990) i naročito za tretman vode, gde predstavlja treći stepen procesa i zamenjuje koagulaciju, flokulaciju i filtraciju kroz pesak (Laborie i Cabassud, 1996). Osim toga, ultrafiltracione membrane zadržavaju bakterije i viruse, što omogućava minimizaciju dodavanja hemijskih sredstava za dezinfekciju (Derradji i sar., 2000).

Nanofiltracija je proces koji ima karakteristike ultrafiltracije i reversne osmoze. Pore membrana za nanofiltraciju su prečnika 1-10 nm, usled čega zadržavaju divalentne soli, a propuštaju monovalentne soli i nedisocirane kiseline. Opseg razdvajanja (*Molecular Weight Cut Off* – MWCO) je karakteristična veličina za određenu membranu i definiše se kao molekulska masa onih jedinjenja koja se na datoj membrani zadržavaju u količini većoj od 90% (Cheryan, 1986). Kod membrana za nanofiltraciju opseg razdvajanja se nalazi između 150 i 1000 Da. Membrane za nanofiltraciju i reverznu osmozu se, osim opsega razdvajanja, definišu i preko zadržavanja natrijum-hlorida na membrani, koje se izražava u masenim procentima ove soli koja zaostaje na membrani, pri čemu se kod membrana za nanofiltraciju ta vrednost kreće između 30 i 70% (Koseoglu i sar., 1991).

Reverzna osmoza se naziva i hiperfiltracija. Ovom vrstom separacije se čestice, makromolekuli, i jedinjenja male molekulske mase (soli, joni) odvajaju od rastvarača, najčešće vode, pri čemu opseg razdvajanja membrana za reverznu osmozu iznosi do 200 Da. Dimenzije pora kod membrana za reverznu osmozu se kreću u opsegu 0,1-1 nm, a zadržavanje natrijum-hlorida je 99-99,9% (Jokić, 2010).

3.6.1.2. Prljanje membrane tokom procesa membranske filtracije

Najvažniji fenomeni koji dovode do prljanja membrane tokom procesa filtracije su fenomeni koncentracione polarizacije i zaprljanosti membrane. Ovi fenomeni dovode do opadanja fluksa permeata, odnosno protoka permeata po jedinici površine membrane, kao i smanjenja selektivnosti membrane, usled smanjenja pogonske sile i/ili povećanja otpora prenosu mase.

Koncentraciona polarizacija (*concentration polarization*) se dešava u graničnom sloju u blizini membrane u slučaju različite permeabilnosti rastvorka i rastvarača. Akumulacija rastvorka na površini membrane se dešava usled zadržavanja rastvorka od strane membrane i usled propuštanja rastvarača. Stoga koncentracija rastvorka u sloju koji je najbliži površini membrane postaje veća u odnosu na rastvor, usled čega dolazi do difuzije rastvorka od površine membrane ka rastvoru, odnosno iz prostora sa većom koncentracijom u prostor sa manjom koncentracijom zbog težnje za izjednačavanjem koncentracija rastvorka u različitim delovima sistema. Međutim, niska vrednost koeficijenta difuzije makromolekula dovodi do toga da koncentracija rastvorka na površini membrane postaje sve veća. Kada je primenjena vrednost transmembranskog pritiska dovoljno velika, makromolekuli na površini membrane dostižu limit rastvorljivosti i formiraju sloj gela koji se ponaša kao dodatna membrana i stvara dodatni otpor transmembranskom proticanju, što se naziva gel-polarizacija (Derradji i sar., 2000). Na koncentracionu polarizaciju utiču operativni parametri procesa filtracije, kao što su transmembranski pritisak, protok, temperatura i koncentracija napojne smeše. Razvijeno je nekoliko modela, kojima se opisuju koncentraciona polarizacija (Jokić, 2010):

- model gel-polarizacije – ovaj model pretpostavlja da je koncentracija rastvorka u sloju gela konstantna, kao i da se povećanjem razlike pritisaka povećava debljina sloja gela, a ne fluks permeata prilikom proticanja kroz membranu. Ovaj model se najviše primenjuje prilikom ultrafiltracije rastvora makromolekula, obzirom da je njihovo zadržavanje od strane membrane veoma veliko, usled čega dolazi do stvaranja sloja gela na membrani, a razlog tome je mali koeficijent prenosa mase makromolekula;
- model osmotskog pritiska - ovaj model pretpostavlja da usled zadržavanja rastvorka od strane membrane dolazi do koncentrovanja rastvora u blizini membrane. Osmotski pritisak koncentrovanog rastvora u blizini membrane može biti veoma veliki, što dovodi do smanjivanja pogonske sile za prenos mase.
- model otpora graničnog sloja - ovaj model se primenjuje u slučaju odsustva sloja gela na površini membrane i fenomena zaprljanosti membrane. Wijmans i sar. (1985) su, postavljanjem bilansa sila za granični sloj, pokazali da u graničnom sloju ne dolazi do pada transmembranskog pritiska i da su kod većine procesa ultrafiltracije model osmotskog pritiska i model graničnog sloja ekvivalentni.

Zaprljanost membrane (*fouling*), drugi fenomen koji utiče na prljanje membrane tokom procesa filtracije, predstavlja taloženje ili akumulaciju suspendovanih, odnosno koloidnih čestica, na površini membrane, ali i kristalizaciju, taloženje ili adsorpciju rastvoraka (organskih molekula) na površini i/ili u porama membrane. Površinsko prljanje membrane ili formiranje pogače dešava se usled akumulacija ćelije, ostataka ćelija ili drugih čestica na površini membrane obično predstavlja reverzibilan proces. Sa druge strane, unutrašnje prljanje membrane dešava se usled deponovanja i adsorpcije čestica malih dimenzija ili makromolekula na unutrašnjoj strani pora membrane i obično predstavlja ireverzibilan proces. Pojava zaprljanosti membrane, usled unutrašnjeg ili spoljašnjeg prljanja membrane, dovodi do smanjenja fluksa permeata i/ili do povećanja zadržavanja rastvorka na membrani (Jokić, 2010).

Kod membranskih separacionih procesa teško je proceniti relativni uticaj koncentracione polarizacije i zaprljanosti membrane, obzirom da oba fenomena dovode do smanjenja fluksa permeata. Opadanje fluksa permeata na početku procesa mikrofiltracije i ultrafiltracije obično se dešava usled brzog adsorbovanja i taloženja rastvorka i čestica (zaprljanost membrane), a nakon određenog vremena vrednost fluksa permeata postaje konstantna. Opadanje fluksa permeata u toku mikrofiltracije i ultrafiltracije može trajati od nekoliko minuta do nekoliko sati, u zavisnosti od materijala membrane, sastava napojne smeše i operativnih parametara procesa filtracije. Osim toga, fenomen zaprljanosti membrane izaziva dodatni otpor prenosu mase, naročito prilikom mikrofiltracije, kada može doći do blokiranja pora membrane usled prisustva čestica većih dimenzija u napojnoj smeši, a dolazi i do formiranja filtracione pogače suspendovanih čestica, što predstavlja dodatni otpor proticanju permeata, odnosno dolazi do pada fluksa permeata (Williams i Wakeman, 2002). Uticaj adsorpcije rastvoraka na unutrašnjoj površini pora membrane na ukupan prenos mase se ispituje potapanjem membrane u napojnu smešu, nakon čega se određuje fluks čiste vode.

3.6.1.2.1. Prljanje membrane proteinima i drugim biološkim materijalom

Odmah pri dolasku u kontakt površine membrane sa napojnom smešom dolazi do adsorpcije molekula rastvorka na površini membrane usled fizičko-hemijskih interakcija. Iako su molekuli proteina znatno manjih dimenzija u odnosu na pore mikrofiltracionih membrana, ipak može doći do ozbiljnog prljanja membrane pod dinamičkim uslovima. Prljanje membrane može biti značajno smanjeno prefiltracijom, kojom se uklanjaju agregati proteina.

Prljanje mikrofiltracionih membrana albuminom goveđeg seruma počinje deponovanjem agregata proteina na površini membrane, usled čega dolazi do blokiranja jednog dela pora membrane. U nastavku filtracije dolazi do hemijskog vezivanja neagregiranih molekula proteina za agregate proteina disulfidnim vezama, van der Valsovim silama, elektrostatičkim interakcijama, hidrofobnim interakcijama i vodoničnim vezama (Williams i Wakeman, 2002).

Eksperimenti i SEM (*Scanning Electron Microscopy*) potvrđuju predloženi mehanizam prljanja membrane i ulogu proteinskih agregata. Prljanje membrane proteinima se odvija u dva koraka: adsorpcija ili deponovanje proteina, koje se odvija uglavnom na zidovima i otvorima pora, i akumulacija pogače na površini membrane usled deponovanja i rasta agregata.

Istraživanja agregacije proteina obezbeđuju mehanističku bazu za razumevanje inicijalnih stadijuma prljanja membrane proteinima tokom mikrofiltracije. Mnogo manje istraživanja je sprovedeno na temu dugoročnog prljanja membrane i fluksa permeata u stacionarnom stanju pri veoma dugim vremenima filtracije. Vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju za širok opseg proteina mogu biti identične kao i prilikom filtracije proteina pri njihovim individualnim izoelektričnim vrednostima pH. Vrednosti fluksa permeata su veće pri vrednostima pH višim i nižim od vrednosti pH izoelektrične tačke (pI).

Osim proteina i rastvorenih makromolekula, postoji širok opseg drugih koloidnih i supstanci u obliku čestica koje mogu da dovedu do prljanja mikrofiltracionih membrana. Neželjena akumulacija mikroorganizama, ćelijskih ostataka i makromolekula na površini membrane se generalno označava kao biološko prljanje membrane (*biofouling*). Prljanje ovim materijama se događa usled njihove uloge u sužavanju i začepljivanju pora membrane, kao i usled njihovog deponovanja na površini membrane. Nekoliko istraživačkih grupa je proučavalo formiranje i uticaje dinamičkih ili sekundarnih membrana u biološkim i primenama membranskih separacija u industriji hrane i zaključili su da se komponente napojne smeše većih dimenzija, kao što su mikroorganizmi, λ -globulin i drugi polimeri, vezuju tako što formiraju strukture slične rešetci na površini membrane, koje mogu da zarobe proteine malih dimenzija. Slojevi pogače formirani na površini membrane ponašaju se kao prefilter za rastvore proteina, koji odvaja agregate proteina koji bi inače doveli do prljanja membrane. U slučaju akumulacije mikroorganizama, otkriveno je da ekstracelularni polisaharidi izlučeni od strane ćelija doprinose rastu sloja nečistoća na membrani.

Uklanjanje akumuliranog biofilma na površini mikrofiltracione membrane se retko postiže primenom standardnih tehnika čišćenja. Pобољшanja efikasnosti i fluksa permeata nakon čišćenja mogu se pripisati povećanoj permeabilnosti sekundarne membrane, kao i redistribuciji ćelijskog materijala uzrokovanoj čišćenjem, ali u mnogo manjoj meri. Dodatak određenih agenasa za čišćenje, kao što je formaldehid, smanjuje permeabilnost biofilma (Williams i Wakeman, 2002).

3.6.1.2.2. Prljanje membrane česticama

Uticaj prljanja membrane kod unakrsne mikrofiltracije i ultrafiltracije je povezan sa sastavom napojne smeše, karakteristikama membrane i operativnim parametrima procesa filtracije (Wakeman, 1996). Među važnijim od navedenih uticaja su distribucija dimenzija čestica napojne smeše i dimenzije pora membrane. Pre svega, bitno je sprečiti ulazak sitnih čestica u unutrašnju strukturu pora membrane, što ukazuje na važnost odabira odgovarajućih dimenzija pora membrane.

Opšti uticaji procesnih parametara su sumirani u tabeli 3.3., iz koje se može videti da uticaj procesnih parametara uglavnom zavisi od svojstava napojne suspenzije. Ovo je važno pre svega zbog nelogičnosti primećenih u eksperimentalnim podacima, koje čine praćenje uticaja procesnih parametara na odabrane promenljive gotovo nemogućim. Na primer, povećanje brzine unakrsne filtracije ne dovodi uvek do povećanja fluksa permeata, jer stanje disperzije čestica i raspodela njihovih dimenzija takođe utiču na fluks permeata. Međutim, unakrsna mikrofiltracija treba da se izvodi pri vrednostima pH istim ili bliskim izoelektričnoj tački čestica napojne suspenzije. Ovo se postiže izmenom vrednosti pH i/ili jonske jačine rastvora, što se može izvesti hemijskim predtretmanom (tabela 3.3.) (Williams i Wakeman, 2002).

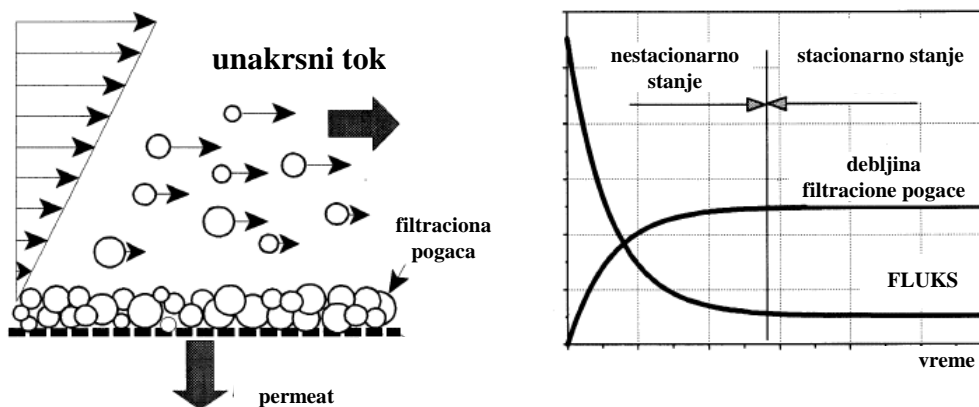
Tabela 3.3. Uticaj procesnih parametara na mikrofiltraciju (Williams i Wakeman, 2002)

Parametar	Uticaj na mikrofiltraciju
Vrednost pH napojne suspenzije	Kada su čestice napojne suspenzije velikih dimenzija dominiraju hidrodinamičke sile i vrednost pH/jonska jačina suspenzije ima zanemarljiv uticaj na opadanje vrednosti fluksa permeata. Ukoliko su čestice manjih dimenzija dominantnije su površinske sile, a pri velikim vrednostima zeta potencijala vrednosti fluksa permeata su manje nego na onima bliskim ili pri vrednostima izoelektrične tačke. Razlike u vrednostima fluksa permeata su naglašene pri velikim koncentracijama napojne smeše. Kvalitet filtrata (i zadržavanje čvrstih čestica) se generalno poboljšava pri vrednostima pH bliskim izoelektričnoj tački.
Koncentracija napojne suspenzije	Pri velikim koncentracijama napojne suspenzije vrednosti fluksa permeata su najčešće manje i brže dolazi do uspostavljanja ravnoteže. Pri dužim vremenima filtracije vrednosti fluksa permeata su obično slične u širokom opsegu koncentracija, naročito kada su čestice napojne smeše manjih dimenzija i kada su pljosnatog oblika.
Brzina unakrsne filtracije	Kada sitne čestice čine veliki deo napojne smeše, povećana brzina unakrsne filtracije dovodi do formiranja tanje pogače i većih vrednosti fluksa permeata. Povećanje fluksa permeata je veće pri vrednostima pH bliskim izoelektričnoj tački napojne smeše, a manje pri vrednostima pH koje su bliže maksimalnom naelektrisanju površine čestica. Fluks permeata u stacionarnom stanju se brže uspostavlja pri manjim protocima, dok se čistoća filtrata generalno poboljšava pri većim protocima. Redukovanjem udela sitnih i čestica velikih dimenzija u napojnoj smeši povećanje protoka dovodi do veće zaprljanosti membrane i manjih vrednosti fluksa permeata. Dimenzije čestica odgovorne za prelaz između povećanja ili smanjenja fluksa permeata, uz brzinu unakrsne filtracije, zavise i od koncentracije napojne smeše.
Transmembranski pritisak	Kod suspenzija sa česticama većih dimenzija javlja se značajno poboljšanje fluksa permeata sa povećanjem pritiska, naročito pri manjim koncentracijama napojne suspenzije. Uticaj pritiska na fluks permeata je redukovan kod napojnih smeša sa manjim srednjim dimenzijama čestica i većim koncentracijama, a takođe neke napojne smeše sadrže čestice nepravilnog oblika.

Kada se sitne čestice i makromolekuli nalaze u istoj suspenziji, filtraciona pogača koju formiraju sitne čestice može da spreči prljanje membrane uzrokovano adsorpcijom makromolekula i da dovede do pojave velike vrednosti fluksa permeata (Arora i Davis, 1994; Guell i sar., 1999; Hwang i sar., 2003; Hwang i Lin, 2005; Hwang i Hwang, 2006). U ovim istraživanjima unakrsne mikrofiltracije binarnih suspenzija bez uduvavanja vazduha, Hwang i sar. (2003) i Hwang i Lin (2005) su dokazali da je filtraciona pogača koju su formirale čestice odredila stepen zadržavanja makromolekula. Oni su koristili standardnu jednačinu filtracije kroz porozni sloj za modelovanje penetracije makromolekula kroz filtracionu pogaču, a primenili su model bilansa sila za deponovanje čestica za procenu fluksa filtracije i debljine pogače.

3.6.2. UNAPREĐENJE PROCESA UNAKRSNE MIKROFILTRACIJE PRIMENOM HIDRODINAMIČKIH METODA ZA POBOLJŠANJE FLUKSA PERMEATA

Tokom izvođenja procesa filtracije vrednost fluksa permeata opada sa vremenom usled nakupljanja zadržanih čestica na površini membrane i u unutrašnjim porama membrane. Pad fluksa permeata tokom izvođenja procesa stoga predstavlja posledicu povećanog otpora proticanju permeata usled prljanja površine i porozne strukture membrane. Nakon određenog vremenskog perioda dolazi do uspostavljanja stacionarnog stanja, odnosno do ustaljivanja vrednosti fluksa permeata, kao i debljine filtracione pogače (slika 3.1.).



Slika 3.1. Promena fluksa i formiranje filtracione pogače tokom procesa mikrofiltracije (Jokić, 2010)

Uspešno funkcionisanje membranskog postrojenja zahteva pažljivo upravljanje prljanjem membrane. Izbegavanje prljanja nije moguće, ali njegov uticaj može biti ograničen primenom različitih tehnika. Izbor membrane i modula, konfiguracija procesa i predtretman su veoma važni u različitoj meri ukoliko je potrebno postići visok stepen separacije bez neprihvatljivog smanjenja produktivnosti usled prljanja membrane. Osim poboljšanja brzine filtracije, izbegavanje prljanja membrane olakšava njeno čišćenje, čime se ograničava potreba za oštrim tretmanima čišćenja i produžava rok trajanja membrana (Williams i Wakeman, 2002). Ove metode moguće je primeniti bez obzira da li se radi o filtraciji organskih ili neorganskih smeša, budući da su fenomeni prljanja membrane u oba slučaja slični.

Strategija upravljanja prljanjem membrane za novo postrojenje može da uključuje dizajn sistema za predtretman napojne smeše, pažljiv odabir membranskog modula i njegovo održavanje, dizajn sistema i određivanje specifikacija operativnih uslova, kao i procedure čišćenja. Za postrojenje koje je već u upotrebi opcije za smanjenje prljanja membrane su ograničene i fokusirane na fizičke i hemijske metode sumirane u tabeli 3.4. (Williams i Wakeman, 2002).

Tabela 3.4. Metodi prevencije smanjenja fluksa permeata (Williams i Wakeman, 2002)

	Fizički metodi	Hemijski metodi
Predtretman	Prefiltracija Centrifugiranje Toplotni tretman	Podešavanje vrednosti pH Jonska izmena Precipitacija Koagulacija/flokulacija Primena sredstava za dezinfekciju Primena sredstava za sprečavanje prljanja membrane neorganskim supstancama Adsorpcija
Dizajn	Primena promotora turbulencije Pulsni/obrnuti tok Rotacione/vibracione membrane Dodatna polja (električno, elektromagnetno)	Izbor materijala membrane Modifikacija površine membrane
Rad postrojenja	Ograničenje transmembranskog pritiska Održavanje visokog protoka Periodično hidrauličko čišćenje Periodično mehaničko čišćenje	Izbor hemikalija za čišćenje Učestalost čišćenja

3.6.2.1. Predtretman napojne smeše

Prljanje membrane tokom procesa membranse filtracije može biti smanjeno predtretmanom napojne smeše. Ova tehnika se uobičajeno koristi ili za uklanjanje čestica koje mogu izazvati zapušanje modula, ili radi sprečavanja akumulacije čestica ili makromolekula na površini membrane, ili radi smanjenja ukupne količine kontaminanata u membranskim modulima.

Predtretman može da uključuje fizičke ili hemijske procese. Fizički procesi obično podrazumevaju prefiltraciju ili centrifugiranje sa ciljem uklanjanja suspendovanih čvrstih čestica koje mogu da zapuše modul ili da blokiraju pore membrane. Toplotni tretman praćen podešavanjem vrednosti pH se primenjuje za uklanjanje imunoglobulina i masti iz surutke sira pre ultrafiltracije (Williams i Wakeman, 2002).

Hemijski procesi uključuju podešavanje vrednosti pH napojne smeše tako da molekularne ili koloidne nečistoće budu daleko od svoje izoelektrične tačke, čime se smanjuje tendencija formiranja sloja gela. Divalentni joni (na primer Ca^{2+} ili Mg^{2+}) u rastvorima proteina mogu da uzrokuju precipitaciju putem formiranja mostova između makromolekularnih lanaca, ali monovalentni joni (na primer Na^+ ili K^+) mogu sprečiti precipitaciju i prljanje membrane. Stoga bi bilo poželjno uklanjanje divalentnih jona iz napojne smeše primenom jonske izmene. Hemijski procesi takođe mogu da uključuju precipitaciju, koagulaciju ili flokulaciju, ili primenu odgovarajućih hemikalija, kao što su anti-skalanti ili dezinfekciona sredstva (Williams i Wakeman, 2002).

3.6.2.2. Izbor materijala membrane

Materijal membrane utiče na prljanje membrane u većoj meri kod ultrafiltracije i nanofiltracije, uglavnom zbog tendencije nekih materijala da adsorbuju rastvorke. Kod mikrofiltracije uticaji adsorbovanja rastvoraka uglavnom nisu toliko ozbiljni, ali postoje slučajevi gde molekuli rastvorka značajno doprinose smanjenju fluksa permeata smanjenjem efektivne veličine pora membrane. Dok osobine materijala membrane utiču na inicijalne brzine adsorpcije ili deponovanja, nakon formiranja sloja nečistoća svaki uticaj materijala membrane je eliminisan dok se membrana ne očisti.

Izbor materijala od koga je napravljena membrana utiče na adsorpciju rastvoraka na njenu površinu. Odgovarajući izbor materijala membrane dovodi do slabijeg vezivanja rastvorka na površinu membrane, što može uticati na smanjenje bilo koje interakcije membrane i rastvorka (kao što je penetracija molekula ili čestice u površinske pore). Ovo dovodi do smanjenja permeabilnosti membrane, a takođe čini lakšim uklanjanje rastvorka tokom čišćenja (Williams i Wakeman, 2002).

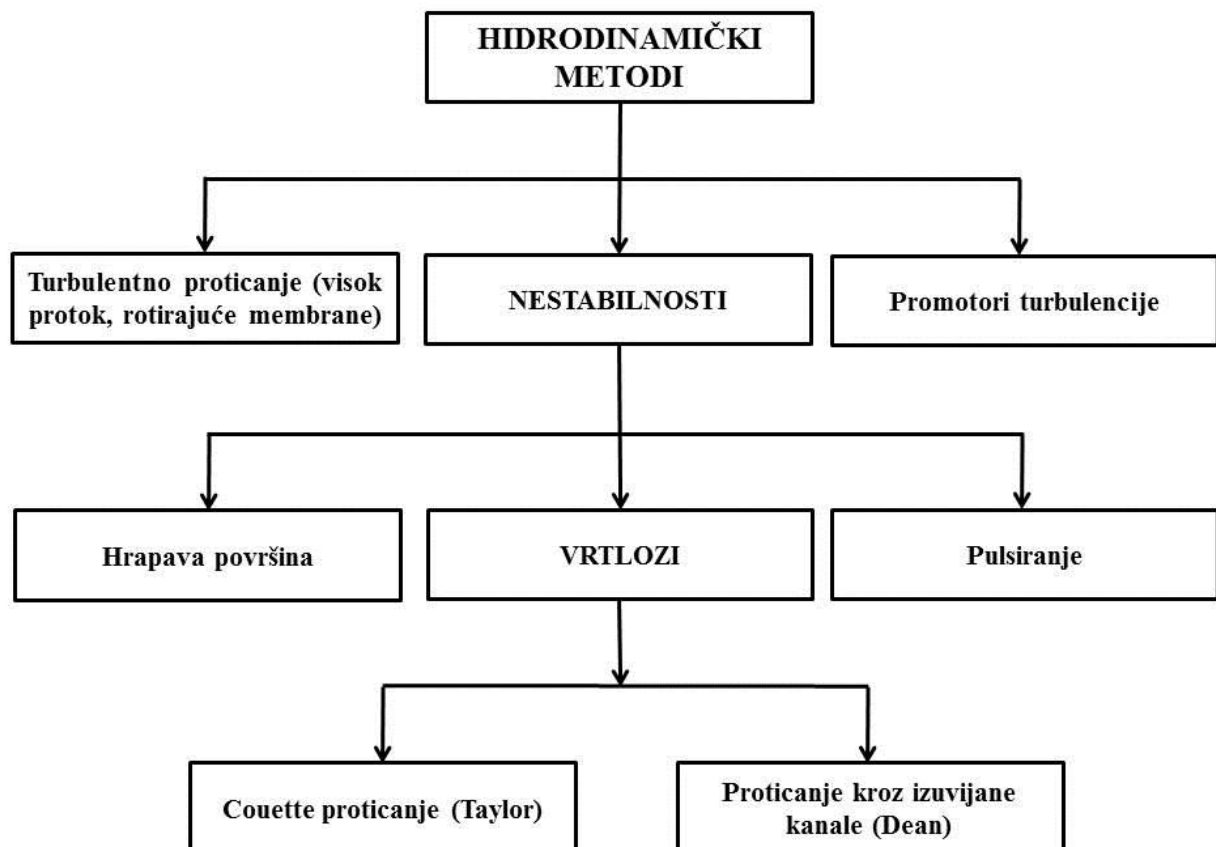
3.6.2.3. Manipulacija proticanja

Veliki broj istraživanja postupaka povećanja fluksa permeata usmeren je na razvoj hidrodinamičkih metoda kojima se poboljšava prenos mase na površini membrane, kao i povratni transport zadržanih rastvoraka i čestica od površine membrane ka masi rastvora (suspenzije). Koncentraciona polarizacija i formiranje pogače u komercijalnim membranskim modulima kontrolišu se povećanjem smicanja na površini membrane ili promotorima turbulencije. Povećano smicanje se ostvaruje pumpanjem napojne smeše višim protocima ili primenom tankih kanala proticanja iznad površine membrane. Turbulencija se podstiče odbojnicima ili statičkim mešačima odgovarajućeg dizajna (Williams i Wakeman, 2002). U ove metode spadaju i metode kojima se izaziva turbulentno proticanje i nestabilnosti u proticanju napojne smeše kroz modul.

Turbulentno proticanje se može postići povećanjem prividne brzine proticanja napojne smeše kroz modul ili korišćenjem promotora turbulencije. Od svih hidrodinamičkih metoda daleko najveću primenu za povećanje fluksa imaju povećanje protoka napojne smeše i upotreba promotora turbulencije. Ostale hidrodinamičke metode imaju niz nedostataka od

kojih su najznačajniji veliki utrošak energije, složenost i mogući problemi sa vibracijama. Najjednostavniji način za izazivanje turbulencije je povećanje protoka napojne smeše, ali je uticaj povećanog protoka napojne smeše ograničen. Povećanje protoka napojne smeše može dovesti do velikog pada pritiska duž modula, što za posledicu ima značajan gubitak energije i promenu transmembranskog pritiska. Kao posledica toga može doći do značajnog pada fluksa permeata (Jokić, 2010).

Efikasnost membranskih procesa može biti poboljšana podsticanjem nestabilnosti nestacionarnog protoka fluida. Dok stacionarno proticanje uglavnom zahteva brzine unakrsne filtracije iz turbulentnog režima proticanja, nestacionarno proticanje može biti efikasno i u laminarnom i u turbulentnom režimu. Ove nestabilnosti fluida se koriste radi pokretanja nečistoća (Chung i sar., 1993), a naborani kanali se koriste za indukovanje mešanja fluida na međupovršini membrana-rastvor (Jeffree i sar., 1981). Različiti pristupi za indukovanje nestabilnosti u proticanju preko površine membrane su sumirani na slici 3.2.



Slika 3.2. Hidrodinamički metodi za smanjenje koncentracione polarizacije i prljanja membrane (Belfort, 1989)

3.6.2.3.1. Promotori turbulencije – lokalno podsticanje vrtloženja

Svi promotori turbulencije koji su ispitivani u cilju povećanja fluksa permeata mogu se podeliti u dve osnovne grupe: dinamičke (slobodne) i statičke (fiksirane) promotore turbulencije. Dinamički promotori turbulencije mogu da se kreću unutar kanala membrane. Statički promotori turbulencije su fiksirani u odnosu na površinu membrane. Statički promotori turbulencije su mnogo više ispitivani u procesima unakrsne mikrofiltracije zbog niza prednosti koje ispoljavaju u odnosu na dinamičke promotore turbulencije: mogu se

koristiti u širokom opsegu vrednosti protoka i viskoziteta napojne smeše, jednostavno se instaliraju, zahtevaju manja investiciona ulaganja, njihovo habanje je zanemarljivo, a manji su i troškovi izvođenja procesa (Krstić, 2003; Krstić i sar., 2004).

Statički promotori turbulencije mogu biti raznih oblika: namotane žice, metalne rešetke, fiksirane šipke sa i bez pregrada, umeci u obliku diska i prstena, Kenics statički mešači, umeci konusnog oblika i drugi (Jokić, 2010). Pregrade i umeci unutar zone proticanja dovode do povećanja srednje brzine proticanja fluida, kao i brzine smicanja na površini membrane. Efikasnost statičkog promotora turbulencije zavisi od oblika strujanja koje nastaje usled njegovog oblika i položaja unutar membrane. Pregrada ili umetak mora da zadovolji osnovne zahteve da bi se mogao koristiti kao statički promotor turbulencije: da se lako izrađuje, da se lako instalira čak i u membranama manjeg prečnika, da ne izaziva nikakva oštećenja membrane, da ne izaziva zone stagnacije fluida, kao i da mu je cena opravdana u poređenju sa povećanom potrošnjom energije zbog povećanog pada pritiska duž membrane (Jokić, 2010).

Koncentraciona polarizacija i prljanje membrane mogu biti smanjeni podsticanjem mešanja i turbulencije prilikom proticanja korišćenjem umetaka za membranu (Finnigan i Howell, 1989). Umeći redukuju vreme zadržavanja napojne smeše u kanalu membrane, povećavaju brzinu proticanja napojne smeše i brzinu smicanja u blizini membrane i dovode do nastanka sekundarnih tokova ili nestabilnosti. Objavljene vrednosti fluksa permeata bile su 50-300% veće u poređenju sa konvencionalnim sistemima za unakrsnu mikrofiltraciju (Williams i Wakeman, 2002).

Drugi istraživači su konstruisali spiralne umetke koristeći cevi sa žicom omotanom oko njih, koji su postavljeni koncentrično unutar kanala tubularnih membrana. Glavna razlika između ovih umetaka i prethodno opisanog dizajna leži u obliku poprečnog preseka spiralne putanje, za koji se može očekivati da izazove velike razlike u obliku i veličini spiralnih vrtloga. Holdich i Zhang (1992) su koristili spiralnu traku koja je navijena oko tubularne cev sa ciljem podsticanja rotacionog proticanja. Primenom njihovog sistema bila je moguća ušteda energije od 20% u poređenju sa eksperimentom u kome nije postojalo rotaciono proticanje.

Bellhouse (1994) je opisao dizajne tubularnih membrana unutar kojih su postavljeni koncentrični navoji. Ovi umeci imaju slobodan prostor za kretanje unutar kanala membrane kako bi se omogućilo propuštanje napojne smeše kroz rezultujućim anularni međuprostor. Spiralni navoj je polukružnog oblika kako bi omogućio prolazak otprilike polovine toka uz spiralnu putanju. Spiralni vrtlog se nadovezuje na spiralno proticanje. Ovo uzrokuje radijalno mešanje u polju proticanja. Postignuta je brzina filtracije čija je vrednost iznosila 75% izmerene vrednosti fluksa čiste vode (oba merenja su izvršena pri transmembranskom pritisku od 2 bara) prilikom filtracije rastvora albumina goveđeg seruma koncentracije 60 g/l.

Nekoliko autora je primenjivalo različite tehnike sa ciljem redukovanja koncentracione polarizacije i prljanja membrane, kao što su primena žljebova (Gupta i sar., 1995) i preusmerivača toka (Vitor i sar., 2003). Različite tehnike se primenjuju sa ciljem smanjenja formiranja pogače, a jedna od njih je primena spiralnih žljebova unutar membranskog elementa. Izbor odgovarajućeg spiralnog žljeba je najvažnija stavka za poboljšanje fluksa permeata, uz minimalan pad pritiska kod unakrsne filtracije. Broj spiralnih navoja po jedinici dužine ima značajan uticaj na efikasnost izabranog spiralnog žljeba.

Gupta i sar. (1995) su objavili povećanje fluksa permeata sa povećanjem broja spiralnih navoja po jedinici dužine žljeba. Osim toga, vizualizacija primenom video-kamere je otkrila da je proticanje oko ose žljeba bilo rotacionog oblika, usled čega dolazi do poboljšanog mešanja koje dovodi do migracije suspendovanih čvrstih čestica dalje od površine membrane. Sebbane (1989) je takođe koristio spiralne žljebove tipa metalne rešetke (tip mreže nabranih rombova). On je otkrio da dolazi do smanjenja brzine protoka permeata sa povećanjem prečnika toka. Takođe je pokazao da otpor sloja gela opada sa smanjenjem hidrauličkog prečnika. Smicanje može da utiče istovremeno na interno prljanje i na gel sloj, što dovodi do značajnijeg povećanja fluksa permeata. Takođe se može smatrati da

koncentracija gela varira sa hidrauličkim prečnikom. Drugi istraživači, na primer Maubois i Mocquot (1971), koji su koristili slične spiralne žljebove, otkrili su da je ultrafiltracija mleka davala bolje rezultate kada je hidraulički prečnik, D_h , bio manji. Maubois i Mocquot (1971) smatraju da D_h ima esencijalnu ulogu u formiranju sloja na površini membrane i u njenom unutrašnjem prljanju.

Eksperimenti koje su izveli Ghaffour i sar. (2004) su izvedeni sa tubularnom membranom za filtriranje supernatanta iz postrojenja sa aktivnim muljem, koji se sastoji od suspendovanih i bioloških čvrstih čestica. U ovom radu je istraživana uticaj operativnih parametara. Temperatura i koncentracija napojne smeše su bile konstantne i industrijskih vrednosti. Otkriveno je da je vrednost transmembranskog pritiska od 1 bar optimalna, a iznad ove vrednosti dolazi do opadanja fluksa permeata, što je u suprotnosti sa rezultatima nekoliko objavljenih radova, u kojima se primećuje plato iznad određene vrednosti transmembranskog pritiska. Progresivno prljanje membrane može biti ograničeno upotrebom spiralnih žljebova u filtracionom elementu koji radi pri maloj vrednosti transmembranskog pritiska, a takođe dolazi do smanjenja flokulacije čestica. Sa druge strane, otkriveno je da su uticaji Reynoldsovog broja unutar membranske cevi i brzine protoka napojne smeše slični kao kod drugih istraživanja u kojima su korišćeni različiti spiralni žljebovi.

Jokić i sar. (2010) su ispitivali uticaj Kenics statičkog mešača na fluks permeata prilikom unakrsne mikrofiltracije suspenzije pekarskog kvasca. Primećeno je povećanje fluksa permeata u stacionarnom stanju u opsegu 89,32-258,86%, u zavisnosti od primenjenih operativnih uslova.

3.6.2.3.2. Uduvavanje gasa

Veliki napon smicanja i mala i konstantna vrednost transmembranskog pritiska predstavljaju hidrodinamičke uslove na kojima se postiže poboljšanje karakteristika filtracije. Pošto je ove uslove teško postići u slučaju jednofaznog toka u cevima i ravnim membranama, potencijalno rešenje je primena promotora turbulencije, rotirajućih membrana, Dinovih vrtloga itd. Pored ovih tehnika, mnoga istraživanja predlažu kontinualno uvođenje gasa u membranski modul sa ciljem stvaranja dvofaznog toka gas-tečnost. Dvofazni tok je efikasan, jednostavan i jeftin metod za poboljšanje karakteristika filtracije (fluksa permeata i potrošnje energije). Dvofazni tok je za sada našao primenu u biološkoj obradi i proizvodnji pijaće vode, kao i u separaciji makromolekula.

Za razliku od jednofaznog toka, dvofazni tok često izaziva nestabilnosti proticanja, što i predstavlja glavnu osobenost primene dvofaznog toka u membranskim procesima. Nestabilnost proticanja napojne smeše je posledica geometrije membrane, procesnih parametara (pritisak, temperatura, protok napojne smeše) i graničnih uslova (napon smicanja). Razlog primene dvofaznog toka u membranskim sistemima je težnja za postizanjem hidrodinamičkih nestabilnosti unutar kanala membrane. Nestabilnosti proizvedene na ovaj način utiču na koncentracionu polarizaciju, uklanjajući formiranu filtracionu pogaču.

Nestabilnost dvofaznog toka zavisi od veličine mehurića gasa i načina raspodele faza. Stoga, način proticanja dvofaznog toka, odnosno odnos protoka gasa i tečne faze, predstavlja važan parametar efikasnosti primene toka gas-tečnost. Pored toga, imajući u vidu da se membranski procesi uglavnom koriste za uklanjanje koloidnih nečistoća iz vodenih rastvora, treba uzeti u obzir i uticaj rastvorenih površinski aktivnih materija na oblik, veličinu i pokretljivost mehurića. U međusobnom kontaktu gasa i tečnosti granični sloj između faza je uslovljen različitim fizičkim uticajima, kao što su inercija, kapilarne sile i napon smicanja (Brennen, 2005).

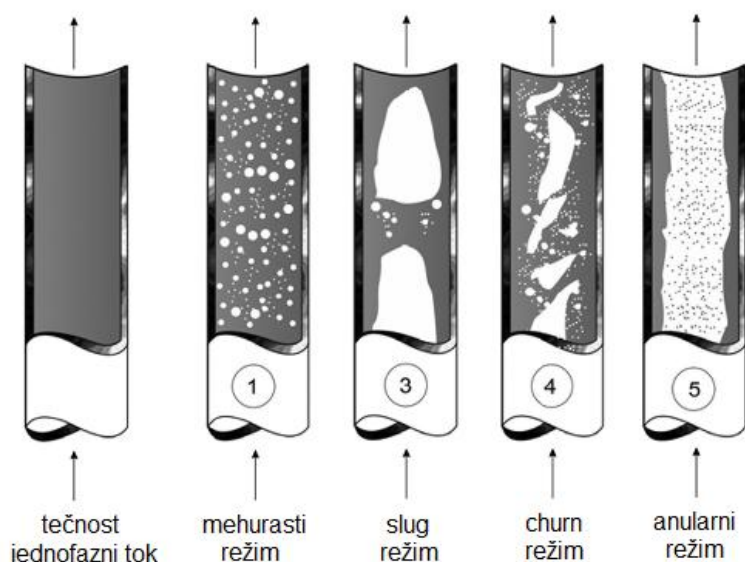
Procesi prenosa mase, impulsa i energije, a samim tim i učinkovitost dvofaznog toka, u velikoj meri zavise od geometrijske raspodele faza ili topologije komponenta unutar toka. Geometrijska raspodela faza zavisi od zapreminskog odnosa tečnosti i gasa, razlike brzina

između faza, osobina fluida itd. Na osnovu smera međusobnog proticanja tečnosti i gasa može se izvršiti sledeća podela (Brennen, 2005):

1. Istostrujno proticanje – tečnost i gas protiču u istom smeru (primena: aeracija u membranskim bioreaktorima, dvofazni tok nagore i nadole u mikrofiltraciji i ultrafiltraciji);
2. Suprotnostrujno proticanje – gas protiče u suprotnom smeru u odnosu na tečnost (primena: membranska destilacija, membranski kontaktori).

Za istostrujno proticanje nagore u vertikalnim cevima, mogu se definisati sledeći režimi proticanja za potpuno razvijen dvofazni tok tečnost-gas (Brennen, 2005; slika 3.3.):

1. Mehurasti režim – gasna faza je uniformno raspoređena u obliku izolovanih mehurića u kontinualnoj tečnoj fazi, sa težnjom da se koncentriše u centru cevi;
2. Režim proticanja u obliku velikih mehurova - čepovito proticanje (*slug*) – gasna faza predstavlja kretanje naizmeničnih mehurova u obliku čepa, sa manje izraženom granicom faza;
3. Prelazni režim (*churn*) – predstavlja neuređen režim proticanja u obliku velikih mehurova, gde su čepasti Tejlorovi mehurići uži i zakrivljeni;
4. Anularni režim – tečna faza kontinualno protiče kao gust sloj uz zidove membrane, dok gasna faza zauzima jezgro kanala membrane; mogu da postoje poneki manji mehurići.



Slika 3.3. Režimi proticanja dvofaznog toka gas-tečnost (Brennen, 2005)

Usled relativno velikog prečnika pora, mikrofiltracija je podložna svim mehanizmima prljanja membrane, od formiranja pogače do začepjenja pora. Primena dvofaznog toka značajno poboljšava fluks permeata, o čemu svedoče uglavnom sve sprovedene studije na ovu temu. Zaključeno je da dvofazni tok sa velikom efikasnošću uklanja filtracionu pogaču. Međutim, kada je u pitanju unutrašnje prljanje membrane, izazvano začepljenjem pora, dvofazni tok nije pokazao istu efikasnost, stoga je potrebno primeniti neku drugu tehniku, na primer povratno ispiranje.

Vrednost fluksa permeata može biti povećana uduvavanjem mehurića vazduha u filtracioni kanal (Mercier-Bonin i sar., 2000; Mikulášek i sar., 2002; Pospíšil i sar., 2004; Hwang i Wu, 2008). To se dešava usled smanjenja mase filtracione pogače povećanjem smicanja na površini membrane. Brzina smicanja na površini membrane zavisi ne samo od brzina fluida, već i od režima proticanja gas-tečno. Faktor injektovanja gasa, ϵ , je definisan radi prikazivanja režima proticanja gas-tečno (jednačina 3.1.; Cabassud i sar., 2001):

$$\varepsilon = \frac{u_g}{u_g + u_l} \quad (3.1.)$$

gde su u_g i u_s superkritične brzine proticanja gasa i tečnosti, redom. Proticanje je mehurasto kada je $\varepsilon < 0,2$, u obliku velikih mehurova kada je $0,2 < \varepsilon < 0,9$, a postaje anularno kada je $\varepsilon > 0,9$. Cabassud i sar. (2001) su diskutovali uticaje hidrodinamičkih parametara proticanja gas-tečno na karakteristike filtracione pogače prilikom filtracije kroz membrane oblika šupljih vlakana. Zaključili su da su povećanje fluksa permeata i struktura filtracione pogače kontrolisani turbulencijom koja se dešava u blizini površine membrane. Mercier-Bonin i Fonade (2002) su proučavali unakrsnu filtraciju smeše enzima i kvasca. Otkrili su da su fluks permeata i prenos mase enzima neznatno poboljšani prilikom mehurastog proticanja. Iako vrednost fluksa permeata može biti povećana za oko 140% tokom proticanja u obliku velikih mehurova, prenos mase enzima je u takvom režimu dramatično smanjen. Yu i sar. (2003) su proučavali poboljšanje fluksa permeata prilikom unakrsne mikrofiltracije uz uduvanje vazduha. Kritična vrednost flukse permeata se značajno povećala usled povećanja brzine protoka vazduha, što je podstaklo turbulenciju i što može biti objašnjeno povećanjem sile koja podiže čestice. Mikulášek i sar. (2002) i Pospíšil i sar. (2004) su izveli empirijsku jednačinu koja povezuje fluks permeata i hidrodinamičke uslove, koja se zasniva na bilansu mase i jednačini filtracije. Korišćeni parametri, na primer, faktor proticanja gasa, treba da budu određeni primenom eksperimentalnih podataka. U istraživanjima koja su sprovedi Hwang i Wu (2008) i Hwang i Hsu (2009) napon smicanja u blizini zida kanala membrane prilikom mehurastog proticanja je procenjen primenom dvofaznog modela proticanja gas-tečno, dok je napon smicanja prilikom proticanja u obliku velikih mehurova izračunat sumiranjem sila smicanja u filmu tečnosti oko mehurića gasa i velikih mehurova u tečnosti nastalih usled naizmenične pojave mehurića. Potom je uspostavljena korelacija između mase filtracione pogače i njenog prosečnog specifičnog otpora i napona smicanja za svaki režim proticanja.

Pokazalo se da tehnika dvofazne gas-tečne unakrsne filtracije, koja se postiže injektovanjem mehurića u napojni tok, predstavlja efikasan način za smanjenje koncentracione polarizacije i zaprljanosti membrane (Cui i Wright, 1994; Cui i Wright, 1996; Bellara i sar., 1996; Mercier i Delorme, 1996; Cui i sar., 1997; Cabassud i sar., 1997; Mercier i sar., 1997). Uduvanje gasa podstiče turbulenciju na površini membrane, što rezultuje povećanjem prenosa mase u graničnom sloju. Može se pretpostaviti da uduvanje gasa efikasno pomera slabo vezane koloidne čestice i makromolekule sa površine membrane, a takođe može da dovede do kidanja sloja adsorbovanih čestica ili makromolekula usled turbulencije izazvane pucanjem i koalescencijom mehurića gasa.

Istraživanja u radu koji su objavili Imasaka i sar. (1989) predstavljaju prvi pokušaj primene dvofaznog toka u procesu mikrofiltracije. Uticaj dvofaznog toka je ispitivan na pet vertikalno povezanih membranskih modula sa 200 mikroporoznih membrana. Prividna brzina proticanja tečne faze je varirana između 0,26 i 2,01 m/s, dok je opseg vrednosti protoka gasa od $7,8 \cdot 10^{-4}$ do $7,6 \cdot 10^{-3}$ Nm³/s. Najveće vrednosti fluksa permeata su dobijene pri brzini gasa od $7,6 \cdot 10^{-3}$ Nm³/s, dok su najniže vrednosti fluksa permeata dobijene pri brzini $7,8 \cdot 10^{-4}$ Nm³/s. Povećanje brzine gasa povećalo je vrednost fluksa permeata za 460%.

Ispitivanja u radu koji su objavili Imasaka i sar. (1989a) su posvećena mikrofiltraciji fermentacione tečnosti, dobijene prilikom proizvodnje metana, primenom četiri različite aluminijum-oksidge keramičke membrane, tri simetrične sa srednjim prečnicima pora od 0,2, 0,48, 0,57 μ m i jednoj asimetričnoj prečnika pora 0,2 μ m. Uticaj dvofaznog toka na tok mikrofiltracije je procenjen na osnovu promene fluksa permeata. Na osnovu rezultata dobijenih na asimetričnoj membrani (0,2 μ m) pri transmembranskom pritisku 1 bar, može se zaključiti da povećanje brzine gasa uslovljava veći krajnji fluks permeata. Vrednost fluksa permeata pri brzini gasa od 5,12 l/min je oko 500% veća nego pri brzini gasa od 0,12 l/min, pri istoj vrednosti brzine tečne faze. Međutim, veće brzine gasa pokazuju veću sklonost ka smanjenju vrednosti fluksa permeata sa vremenom.

Cui (1993) je koristio tehniku uduvavanja gasa za narušavanje sloja koncentracione polarizacije i otkrio je da injektovanje veoma male količine gasa u napojnu smešu može značajno da poboljša fluks permeata i da promeni prividni stepen zadržavanja od strane membrane. Značajnije povećanje fluksa permeata je primećeno pri ozbiljnijoj koncentracionalnoj polarizaciji, na primer, pri malim vrednostima brzine proticanja napojne smeše, pri velikim vrednostima transmembranskog pritiska i pri velikim koncentracijama napojne smeše, a u poređenju sa konvencionalnom unakrsnom filtracijom postignuto je povećanje fluksa permeata za 60% i 270% pri ultrafiltraciji albumina goveđeg seruma i rastvora dekstrana i mikrofiltraciji suspenzije kvasca, redom.

Cilj rada koji su objavili Mercier i sar. (1997) bio je poboljšanje fluksa permeata tokom filtracije bentonita i kvasca (*Saccharomyces bayanus*) primenom dvofaznog toka gas-tečnost. Filtracija je izvedena na cirkonijum aluminijumskoj membrani sa srednjim prečnikom pora od 20 nm. Primenjene vrednosti protoka tečne faze bile su u opsegu 0,2-1 m³/h, dok je vrednost protoka vazduha bila u opsegu 0,1-1,5 m³/h (pri atmosferskom pritisku). Na osnovu rezultata dobijenih prilikom filtracije bentonita, uočava se da povećanje vrednosti protoka vazduha pri istoj vrednosti protoka tečne faze izaziva povećanje fluksa permeata od 50% za mehurasti režim ($\epsilon=0,2$) i 100% za režim proticanja u obliku velikih mehurova ($\epsilon=0,7$), pri konstantnoj vrednosti transmembranskog pritiska od 1,05 bar. Povećanje vrednosti protoka tečne faze uslovljava povećanje fluksa permeata za sve primenjene vrednosti protoka vazduha. Najveći krajnji fluks permeata dobijen je pri vrednosti protoka tečne faze od 0,75 m³/h i $\epsilon=0,7$, i iznosi 90 l/m²h. Rezultati dobijeni za potrošnju energije pokazuju smanjenje potrebne količine energije u sistemu sa dvofaznim tokom, pa je tako srednja vrednost potrošnje energije za sve eksperimente oko 10 kWh/m³, u poređenju sa 30 kWh/m³ u sistemu bez vazduha. Eksperimenti sa pekarskim kvascem su izvedeni primenom 2% (w/v) suspenzije kvasca pri vrednosti transmembranskog pritiska od 1,05 bar. Optimalne vrednosti protoka tečne faze i vazduha za mikrofiltraciju kvasca iznose 0,5 m³/h i 0,38 m³/h, redom. Povećanje vrednosti fluksa permeata u ovom slučaju iznosi 170%.

Studija koju su objavili Mercier-Bonin i sar. (2000) bavi se definisanjem uticaja dvofaznog toka na mikrofiltraciju pekarskog kvasca na ravnoj keramičkoj membrani prečnika pora 140 nm i aktivnom površinom od 0,06 m². Uticaj različitih faktora (protok gasa i tečne faze, koncentracija napojne suspenzije) na filtraciju je ispitivan sa horizontalno i vertikalno postavljenim membranskim modulom. Brzine proticanja tečne faze su varirane u opsegu 0,3-1,4 m/s, dok je opseg brzine proticanja gasa bio od 0-0,8 m/s. Pri malim brzinama proticanja tečne faze, prostorna orijentacija membrane ima veliki uticaj i bolji rezultati su dobijeni sa horizontalno postavljenom membranom. U slučaju horizontalno postavljene membrane, porast vrednosti fluksa permeata za koncentraciju od 2% (w/v) varira od 350% do 380%, za različite odnose ϵ pri vrednosti transmembranskog pritiska 1 bar i protoka napojne smeše 200 l/h, i oko 200% pri koncentraciji 0,5% (w/v). Što se tiče potrošnje energije, utvrđeno je da primena dvofaznog toka zahteva duplo manju količinu energije za postizanje vrednosti fluksa permeata jednofaznog toka.

Studija koji su sprovedli Mikulašek i sar. (2002) bavi se poređenjem uticaja dvofaznog toka i ponovnog ispiranja membrane (*backflushing*) na mikrofiltraciju rastvora titanijum-oksida na keramičkoj membrani sa srednjim prečnikom pora od 91 nm, za eksperimente sa dvofaznim tokom, i 100 nm, za povratno ispiranje. Pri konstantnim vrednostima brzine proticanja tečne faze (1 m/s) i transmembranskog pritiska (1 bar), za različite vrednosti brzine proticanja gasa (0,25-2,5 m/s) dobijene su vrednosti porasta fluksa permeata i do 90%. Pored toga, veće brzine proticanja vazduha doprinose većoj poroznosti, ali i većoj debljini filtracione pogače. U poređenju sa povratnim ispiranjem, dvofazni tok pokazuje bolje rezultate povećanja fluksa permeata za oko 30%, ali u slučaju unutrašnjeg prljanja membrane, povratno ispiranje predstavlja prihvatljiviju tehniku, s obzirom na to da gasna faza ne prodire u pore membrane.

U istraživanju koje su sprovedli Mercier-Bonin i sar. (2003) ispitivan je uticaj dvofaznog toka gas-tečnost na separaciju micela kazeina od rastvorljivih proteina obranog mleka, na višekanalnoj cevnoj keramičkoj membrani sa srednjim prečnikom pora 0,1 μ m i aktivnom

površinom od 0,0383 m². Protok tečne faze je bio 1220 l/h, dok je protok gasa variran od 100 l/h do 1390 l/h, ostvarujući na taj način napon smicanja od 43 do 80 Pa. Dvofazni tok nije pokazao veliku uspešnost u narušavanju strukture pogače formirane od strane micela, pre svega zbog kompaktne strukture filtracione pogače, što se dešava usled velikog povećanja pritiska. Pri konstantnoj vrednosti napona smicanja za jednofazni (61 Pa) i dvofazni tok (55 Pa) maksimalna vrednost fluksa permeata je oko 100 l/m²h pri ispitivanim vrednostima transmembranskog pritiska od 0,3 do 1 bar. Poređenjem fluksa permeata jednofaznog i dvofaznog toka u zavisnosti od napona smicanja izvode se sledeći zaključci: do vrednosti napona smicanja od 60 Pa, fluks permeata za jednofazni i dvofazni tok ima rastući trend; iznad vrednosti napona smicanja od 60 Pa, fluks permeata dvofaznog toka nastavlja rast, dok za jednofazni tok postepeno opada. Razlog opadanja može biti heterogenost transmembranskog pritiska, koja je izraženija kod jednofaznog toka, pa je tako pri velikim vrednostima protoka tečne faze pritisak na izlazu iz membrane 0,01 bar. Sa porastom utrošene energije za proces, raste i fluks permeata. Za vrednost utrošene energije od 4 kWh/m³, fluks permeata dvofaznog toka je 20% veći od fluksa permeata jednofaznog toka.

Gupta i sar. (2005) su ispitivali unakrsnu filtraciju fermentacione tečnosti koja sadrži 2,3-butandiol dobijen iz crne melase primenom proizvodnog mikroorganizma *Klebsiella oxytoca* (NRRL B-199). Za ove svrhe korišćena je laboratorijska mikrofiltraciona jedinica tanjirastog tipa za unakrsnu mikrofiltraciju sa celuloza-acetatnom membranom čiji prečnik pora iznosi 0,2 µm. Preliminarni rezultati su pokazali brzo opadanje fluksa permeata usled prljanja membrane uzrokovanog prirodnim nečistoćama iz crne melase, tako da je modifikacija konvencionalne unakrsne mikrofiltracije bila neophodna radi postizanja brzine filtracije odgovarajuće za praktičnu primenu. Fluks permeata je poboljšan uduvavanjem vazduha, koji je čistio površinu membrane uklanjanjem deponovanih koloidnih materija i omogućavao održavanje praktične brzine filtracije. Prosečan fluks permeata se povećao za 39% i 54% pri brzinama uduvavanja vazduha od 0,5 l/min i 1 l/min, redom, u slučaju kada je inicijalna koncentracija biomase bila 4,66 g/l. Za inicijalnu koncentraciju biomase od 14,2 g/l fluks se povećao za 105% i 146% za brzinu protoka gasa od 0,5 l/min i 1 l/min, redom. Može se zaključiti da je uduvavanje gasa pokazalo pozitivan uticaj na unakrsnu filtraciju gustih suspenzija, kao što je fermentaciona tečnost.

Rad koji su objavili Gupta i sar. (2005) ispituje mogućnost održavanja prihvatljivog fluksa permeata uduvavanjem gasa u napojnu smešu pri unakrsnoj mikrofiltraciji pekarskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*), čime se uklanjaju koloidni depoziti i smanjuje koncentraciona polarizacija. Ispitivane su suspenzije opranog i neopranog kvasca radi ispitivanja uticaja pranja na smanjenje proteinskog prljanja membrane. Otkriveno je da je fluks permeata povećan za 45% pri protoku napojne smeše od 75 kg/h i koncentraciji 2 kg/m³ opranog kvasca, u poređenju sa filtracijom neopranog kvasca bez uduvavanja gasa. Prilikom filtracije suspenzije opranog kvasca povećanje brzine protoka gasa od 30 l/h do 90 l/h imalo je pozitivan uticaj na povećanje fluksa permeata. Zaključeno je da u ovom slučaju protok gasa treba da bude manji ili jednak protoku tečne faze (napojne smeše) kako bi se postiglo poboljšanje fluksa permeata.

Sur i Cui (2005) su vršili eksperimente unakrsne mikrofiltracije sa uduvavanjem gasa primenom multitubularnog mikrofiltera srednjeg prečnika pora 0,15 µm, pri čemu su kao test suspenzije filtrirane suspenzije opranog i neopranog kvasca, kao i smeša suspenzije kvasca i bentonita. Suspenzija opranog kvasca pripremljena je primenom diafiltracije radi uklanjanja molekula proteina iz suspenzije. Dodatak čestica bentonita simulirao je uticaj prisustva drugih mikročestica na mikrofiltraciju kvasca. U eksperimentima su ispitani uticaji koncentracije i vrednosti pH napojne smeše prilikom jednofazne i dvofazne filtracije, pri različitim protocima i transmembranskim pritiscima. Cilj rada je bio određivanje optimalnog odnosa koncentracije kvasca, transmembranskog pritiska, brzine proticanja tečne faze i brzine proticanja gasa, pri kojima se dobijaju najviše vrednosti fluksa permeata. Opsezi izabranih parametara bili su: koncentracija suspenzije kvasca 0,01-10% (w/v),

transmembranski pritisak 0,5-4 bar, brzina proticanja tečne faze 0,36-1,8 m/s i brzina proticanja gasa 0,18-1,02 m/s. Sa povećanjem koncentracije kvasca dobijaju se manje vrednosti fluksa permeata, dok se za iste koncentracije vrednosti fluksa za jednofazni i dvofazni tok značajno razlikuju. Eksperimentalni rezultati su pokazali da uduvavanje gasa značajno povećava fluks permeata prilikom mikrofiltracije kvasca. Efekat dvofaznog toka je izraženiji za veće koncentracije suspenzije kvasca, i iznosi oko 100% za koncentraciju 0,01% (w/v). Što se tiče uticaja brzine proticanja tečne faze, najveće vrednosti fluksa permeata se dobijaju pri najvećoj vrednosti brzine proticanja tečne faze, za sve ispitivane vrednosti koncentracije i transmembranskog pritiska. Međutim, veće relativno povećanje fluksa permeata je dobijeno pri manjim vrednostima brzine proticanja tečne faze i većim koncentracijama kvasca, pa tako za brzinu proticanja tečne faze od 0,36 m/s i koncentraciju 10% (w/v) relativno povećanje fluksa permeata iznosi oko 70% pri transmembranskom pritisku 0,5 bara i oko 130% pri transmembranskom pritisku 4 bara. Fluks permeata za različite vrednosti transmembranskog pritiska zavisi od koncentracije napojne suspenzije. Pri manjim koncentracijama napojne smeše vrednost fluksa permeata raste sa porastom transmembranskog pritiska, dok se pri većim koncentracijama primećuje smanjenje vrednosti fluksa permeata sa povećanjem transmembranskog pritiska. Takođe, vrednost pH napojne smeše ima značajan uticaj na fluks permeata. Poređenje fluksa permeata suspenzija opranog i neopranog kvasca je vršeno sa ciljem ispitivanja uticaja proteina na prljanje mikrofiltracione membrane. Uklanjanje ekstracelularnih supstanci rezultuje znatno većim fluksom permeata (prilikom filtracije suspenzije opranog kvasca), što potvrđuje pretpostavku da su proteini glavni uzrok prljanja membrane. Dodavanje čestica utiče na fluks permeata, pri čemu dolazi do smanjenja fluksa permeata usled dodatka čestica bentonita prilikom mikrofiltracije kvasca.

Hwang i Hsu (2009) su istraživali uticaj režima proticanja gas-tečnost na unakrsnu mikrofiltraciju suspenzije pekarskog kvasca (0,2% (w/v)). Za istraživanje je upotrebljena ravna celulozna membrana sa prečnikom pora od 100 nm i aktivnom površinom od 0,11 m². Privedne brzine proticanja tečne faze bile su u opsegu 0,1-0,5 m/s, a brzine proticanja gasa u opsegu 0,02-0,08 m/s, ostvarujući odnos ϵ od 0,039 do 0,444. Rezultati pokazuju da režim proticanja ima veći uticaj od pojedinačnih brzina proticanja, pa je tako režim proticanja u obliku velikih mehurova efikasniji od mehurastog režima. Na kraju eksperimenta, suva materija formirane filtracione pogače je dalje analizirana i utvrđeno je da više od 40% mase filtracione pogače može biti smanjeno primenom dvofaznog toka. Tokom mikrofiltracije pri malim brzinama proticanja tečne faze (0,1 m/s) masa filtracione pogače kontinualno opada sa povećanjem brzine proticanja gasa. Međutim, sa povećanjem brzine proticanja tečne faze masa filtracione pogače opada do određene vrednosti, kada dalje povećanje brzine proticanja gasa ne doprinosi smanjenju mase filtracione pogače. Struktura filtracione pogače pri većim brzinama proticanja tečne faze postaje kompaktnija zahvaljujući dvofaznom toku, i ovaj uticaj je sve veći sa povećanjem brzine proticanja tečne faze. Najveći porast fluksa permeata je dobijen za vrednosti ϵ u opsegu 0,3-0,5 (mehurasti režim).

U istraživanju koje su sprovedeli Hwang i Chen (2010) filtrirana je binarna suspenzija kvasac/albumin goveđeg seruma primenom dve paralelne unakrsne mikrofiltracione ploče, pri čemu su mereni i diskutovani vrednost fluksa permeata u stacionarnom stanju, svojstva filtracione pogače i zadržavanje albumina goveđeg seruma pod različitim operativnim uslovima. Vrednost fluksa permeata se povećava sa povećanjem vrednosti transmembranskog pritiska, kao i sa povećanjem vrednosti brzina proticanja napojne suspenzije i vazduha. Masa filtracione pogače je značajno smanjena uduvavanjem mehurića vazduha usled povećanja smicanja u blizini zida membrane; međutim, ovaj uticaj postaje beznačajan kada brzina proticanja vazduha pređe 0,04 m/s. Prosečan specifičan otpor filtracione pogače se povećava sa povećanjem brzine proticanja vazduha koji protiče u obliku mehurića, dok naglo opada kada se režim proticanja promeni u proticanje u obliku velikih mehurova. Primećuje se drastičan porast stepena zadržavanja albumina goveđeg seruma prilikom uduvavanja mehurića vazduha u filtracioni kanal. Povećanje brzine proticanja vazduha dovodi do većeg zadržavanja albumina, naročito u režimu proticanja u

obliku velikih mehurova. Kada se uzmu u obzir fluks permeata i zadržavanje albumina, fluks prenosa mase albumina u filtrat opada sa povećanjem brzine proticanja vazduha. Iako uduvavanje mehurića vazduha može efikasno da poveća fluks permeata, ono nema uticaja na razdvajanje ćelija kvasca i albumina goveđeg seruma. Rezultati takođe ukazuju da režim proticanja fluida ima važan uticaj na efikasnost filtracije.

RSM (*Response Surface Methodology* – metodologija odzivne površine) i CCD (*Central Composite Design* – centralni kompozitni dizajn) su primenjeni za modelovanje i optimizaciju unakrsne mikrofiltracije suspenzije *Chlorella* sp. (Javadi i sar., 2014). Određeni su uticaji operativnih uslova, transmembranskog pritiska, protoka napojne smeše i optičke gustine napojne suspenzije, na fluks permeata, kao i njihove interakcije. Takođe su ispitivani uticaji tehnike uduvavanja gasa i različitih režima proticanja dvofaznog toka gas-tečnost na fluks permeata. Maksimalno povećanje fluksa permeata iznosilo je 61% i 15% za napojne suspenzije optičkih gustina 1 i 3, redom. Ovi rezultati ukazuju da je tehnika uduvavanja gasa efikasnija pri manjim koncentracijama mikroalgi tokom mikrofiltracije, pri čemu je poboljšanje fluksa permeata od 60% postignuto u režimu proticanja u obliku velikih mehurova.

U istraživanju koje su sproveli Fouladitajar i sar. (2014) proučavani su uticaji različitih režima proticanja dvofaznog toka na fluks permeata tokom procesa mikrofiltracije surutke. Fluks permeata se povećao u režimu proticanja u obliku velikih mehurova uglavnom usled smanjenja mase filtracione pogače i narušavanja sloja koncentracione polarizacije. U zavisnosti od brzine proticanja napojne smeše, režim proticanja u obliku velikih mehurova doveo je do poboljšanja permeabilnosti čak i pri ozbiljnim problemima prljanja membrane. Međutim, suprotni rezultati su dobijeni za mehurasti režim proticanja, gde uvođenje gasa nije doprinelo poboljšanju ni pri većim brzinama proticanja napojne smeše.

3.6.2.3.3. Kombinacija promotora turbulencije i uduvavanja gasa

Derradji i sar. (2000) su razvili poseban proces koji smanjuje prljanje membrane usled deponovanja čestica tokom ultrafiltracije. Ovaj proces se sastoji od injektovanja gasa radi dobijanja dvofaznog gas-tečno toka koji prolazi kroz promotor turbulencije (statički mešač Sulzer), koji sadrži fiksne pune delove i prazne sekcije i koji je postavljen ispred membrane, usled čega dolazi do jakog smicanja na površini membrane. Eksperimenti su vršeni primenom polimera, natrijum-alginata. Ispitane su različite vrednosti prividne brzine gasa, koncentracije tečnosti i polimera, kao i uticaj veličine pora membrane. Sa porastom transmembranskog pritiska fluks permeata kontinualno raste u slučaju primene statičkog mešača, dok bez statičkog mešača vrednost fluksa permeata postaje konstantna iznad vrednosti transmembranskog pritiska 2 bar ($C=0,5$ g/l; $Q_g=270$ l/h). Pored toga, primena statičkog mešača pojačava uticaj koncentracije alginata na fluks permeata. Međutim, pri transmembranskom pritisku iznad 2 bar vrednost fluksa permeata kontinualno raste, i veće vrednosti se dobijaju za manje koncentracije alginata. Proces injektovanja vazduha u prisustvu promotora turbulencije vodi do povećanja vrednosti fluksa permeata za 180%. Smicanje koji vrši turbulentna smeša tečnosti i gasa, kao i dodatna lokalna turbulencija, sprečavaju deponovanje čestica na površini membrane i/ili olakšavaju odvajanje deponovanog polimera, čime se postiže prevencija formiranja sloja polarizacije ili bar odlaganje njegove pojave i time poboljšava prenos mase. Što se tiče uticaja protoka gasa na fluks permeata, ovaj uticaj je izraženiji pri manjim vrednostima protoka gasa (do 800 l/h), nakon čega vrednost fluksa stagnira (TMP=2 bar i $C=0,5$ g/l).

U istraživanju koje su sproveli Vatai i sar. (2007) proučavana je istovremena primena statičkog mešača i tehnike uduvavanja vazduha tokom unakrsne ultrafiltracije emulzije ulje/voda. Otkriveno je da upotreba statičkog mešača dovodi do značajnog povećanja vrednosti fluksa permeata. Međutim, prisustvo statičkog mešača redukuje vreme zadržavanja u kanalu napojne smeše, što dovodi do visokog pada pritiska duž membrane i stoga do povećanja potrošnje energije. Kombinacija uduvavanja vazduha i statičkog mešača pokazala je da velika vrednost fluksa permeata može biti dobijena pri relativno malom

utrošku energije. Korišćena je ZrO_2 jednokanalna membrana, sa srednjim prečnikom pora od 20 nm, i Kenics statički mešač. Eksperimenti su izvedeni pri vrednostima protoka tečnosti od 100 l/h i 150 l/h i vrednostima protoka vazduha 20-100 l/h. Ultrafiltracija je izvedena u uslovima recirkulacije napojne suspenzije na sledeći način: fluks permeata je meren u uslovima bez uvođenja vazduha, do postizanja pseudostacionarnog fluksa, kada je postepeno u sistem uvođen dvofazni tok, najpre sa niskim protokom vazduha, da bi se fluks permeata ponovno merio u trenutku postizanja konstantne vrednosti protoka vazduha. Porast vrednosti fluksa permeata u mehurovom režimu iznosio je oko 6% ($Q_g=20$ l/h, $\epsilon=0,16$), dok je za režim proticanja u obliku velikih mehurova ($Q_g=80$ l/h, $\epsilon=0,44$) vrednost fluksa permeata smanjena za oko 13% u odnosu na jednofazni tok. Iz dobijenih rezultata se izvodi zaključak da dvofazni tok ne pruža očekivani efekat, jer je porast fluksa suviše mali u poređenju sa povećanjem od 270% koje izaziva primena statičkog mešača. Međutim, primena dvofaznog toka može biti opravdana ukoliko se postigne smanjenje energije potrebne za postizanje takvog porasta vrednosti fluksa permeata u sistemu sa statičkim mešačem, na račun smanjenja pada pritiska duž membrane. Iako sa povećanjem protoka vazduha vrednost fluksa permeata opada, kombinovanjem dvofaznog toka i statičkog mešača potrebna energija se smanjuje za dva puta u odnosu na slučaj jednofaznog toka. Pored toga, na osnovu rezultata se može zaključiti da postoji kritična vrednost protoka vazduha, preko koje dalje povećanje protoka vazduha ne doprinosi promeni utrošene energije. Rezultati ukazuju da istovremena primena ove dve tehnike može biti interesantna za membranske procese u kojima se već koristi injektovanje gasa, kao što su aerobni membranski bioreaktori.

3.6.3. PROCEDURE ČIŠĆENJA MEMBRANE NAKON PROCESA MEMBRANSKE FILTRACIJE

Zaprljane membrane se obično čiste primenom CIP (*Cleaning-In-Place*) procedura. Ove procedure zahtevaju manje vremena nego COP (*Cleaning-Out-of-Place*) procedure, a takođe mnogi proizvođači membrana preporučuju CIP protokole za čišćenje svojih membrana. One mogu, ali i ne moraju, da uključuju primenu eksternih hemikalija. Na primer, tehnike koje se mogu koristiti uključuju periodično obrtanje smeru proticanja (da bi se sprečilo začepljavanje ulaza modula česticama), periodično povratno ispiranje membrane obrnutim proticanjem permeata (što može biti efikasno za uklanjanje površinskih nečistoća sa membrane) i periodično smanjenje pritiska napojne smeše, pri čemu se održava veliki protok (što pomaže kontroli rasta sloja gela). Tubularne membrane velikog prečnika mogu se čistiti mehanički primenom sunđera.

Rešenja za čišćenje su obično povezana sa nešto manjim pritiskom u odnosu na pritisak koji se primenjuje tokom filtracije kako bi se sprečilo prodiranje nečistoća u membranu. Ne postoji *a priori* pravilo kojim se predviđa koja tehnika čišćenja bi bila najuspešnija u svakom pojedinačnom slučaju (Williams i Wakeman, 2002).

Dostupna su takođe i odgovarajuća sredstva za čišćenje. Neke informacije o tipovima sredstava za čišćenje su date u tabeli 3.5. Izbor sredstva za čišćenje nije određen samo tipom nečistoća, već i kompatibilnošću membrane sa odabranim sredstvom na datoj temperaturi čišćenja. Mnoga sredstva za čišćenje imaju privremeni negativni uticaj na zadržavanje određene komponente napojne smeše od strane membrane, osim traženog efekta povećanja fluksa permeata. Smanjeno zadržavanje može se pripisati bubrenju membrane tokom kontakta sa sredstvom za čišćenje; bubrenje polisulfonskih membrana je objavljeno prilikom korišćenja Ultrasil-10 sredstva za čišćenje (Jonsson i Johansen, 1989).

Tabela 3.5. Primeri sredstava za čišćenje membrana i njihova primena (Williams i Wakeman, 2002)

Sredstvo za čišćenje	Tipične nečistoće
Mineralne kiseline, natrijum heksametafosfat, poliakrilati, etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA - <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)	Precipitati soli, mineralni skalanti
Sredstva na bazi natrijum hidroksida, sa ili bez hipohlorita	Rastvorljive masti, proteini
Enzimska sredstva na bazi proteaza, amilaza i glukanaza	Koriste se u specifičnim slučajevima pri odgovarajućoj vrednosti pH

3.6.4. IZDVAJANJE BIOMASE BAKTERIJA RODA *Bacillus* PRIMENOM MIKROFILTRACIJE

Nagata i sar. (1989) su ispitivali mikrofiltraciju mikroorganizma *Bacillus polymyxa* ATCC 12321 kultivisanog na hranljivoj podlozi koja je sadržala pepton i mineralne soli primenom keramičke membrane (prečnika pora 0,2 μm) i polipropilenske membrane (prečnika pora 0,8 μm) pri malim vrednostima protoka napojne smeše ($Re < 4000$), kao i primenom membrane od nerđajućeg čelika (prečnika pora 0,2 μm) pri velikim vrednostima protoka napojne smeše ($Re > 2 \cdot 10^4$). U zavisnosti od Rejnoldsovog broja, smanjenje vrednosti fluksa permeata iznosilo je 54,6-67,5% za keramičku membranu i 66,2-80,5% za polipropilensku membranu, dok je za membranu od nerđajućeg čelika pri vrednosti Rejnoldsovog broja od 25000 smanjenje fluksa permeata iznosilo 73,3%.

Tanaka i sar. (1994) su ispitivali mikrofiltraciju suspenzija ćelija mikroorganizama *Bacillus subtilis* IFO 3009, *Bacillus brevis* IFO 3321 i *Bacillus cereus* IFO 13494 u fiziološkom rastvoru, pri čemu su ovi mikroorganizmi prethodno kultivisani primenom hranljive podloge koja je sadržala ekstrakt kvasca, pepton, NaCl i glukozu, a biomasa mikroorganizama je od ostatka kultivacione tečnosti odvojena centrifugiranjem. Unakrsna mikrofiltracija je izvedena primenom celuloza-acetatne mebrane sa prosečnim dimenzijama prečnika pora od 0,45 μm . Pod definisanim eksperimentalnim uslovima i pri koncentraciji ćelija od 5 kg/m^3 vrednosti fluksa permeata nakon 15 minuta procesa mikrofiltracije iznosile su $8 \cdot 10^{-6}$ m/s, $0,5 \cdot 10^{-5}$ m/s i $1 \cdot 10^{-5}$ m/s za *Bacillus subtilis* IFO 3009, *Bacillus brevis* IFO 3321 i *Bacillus cereus* IFO 13494, redom. Promena operativnih uslova prilikom mikrofiltracije suspenzije koja sadrži ćelije *Bacillus subtilis* IFO 3009, odnosno primenom šest puta veće vrednosti protoka napojne smeše i četiri puta veće vrednosti transmembranskog pritiska, dovela je do povećanja vrednosti fluksa permeata za 32% i 19%, redom, ukazujući na veći uticaj povećanja protoka napojne smeše na fluks permeata u poređenju sa uticajem povećanja transmembranskog pritiska. Sa druge strane, primena suspenzije sa deset puta većom koncentracijom ćelija dovela je smanjenja vrednosti fluksa permeata za 70%.

Tanaka i sar. (1996) su istraživali uticaj povratnog ispiranja, odnosno primene periodičnog povratnog toka permeata (1,2 ml tokom 5 s) na fluks permeata tokom mikrofiltracije kultivacione tečnosti mikroorganizma *Bacillus subtilis* IFO 3009, pri čemu je koncentracija ćelija iznosila 9-10 kg/m^3 . U ovom istraživanju korišćena je ista membrana i hranljiva podloga kao i u istraživanju koje su sprovedi Tanaka i sar. (1994). Rezultati su pokazali da dužina perioda između povratnih ispiranja ima značajan uticaj na vrednost fluksa permeata nakon 15 minuta mikrofiltracije. Produženje vremena između povratnih ispiranja na 20 s, 50 s i 230 s dovela je do povećanja vrednosti fluksa permeata za 280%, 360% i 140%, redom, ukazujući na ograničen uticaj ovog parametra na povećanje vrednosti fluksa permeata.

Guerra i sar. (1997) su filtrirali pasterizovano obrano mleko sa ciljem uklanjanja spora mikroorganizma *Bacillus cereus* NRRL 569 primenom keramičke membrane prosečnog prečnika pora od 1 μm . Istraživači su primenili tehniku povratnog šok ispiranja: protok permeata je pod pritiskom menjao smer tokom veoma kratkih vremenskih intervala (kraćih od 1 s) frekvencijom u opsegu 0.2-1 1/s, sa ciljem povećanja vrednosti fluksa permeata.

Rezultati su pokazali da je primena ove tehnike dovela do povećanja vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju za 70%.

Aspelund i sar. (2008) su proučavali uticaj cik-cak statičkog mešača (dužine 65 mm i širine 1,6 mm) koji je korišćen kao promotor turbulencije i koji je bio postavljen unutar kanala membrane kroz koji protiče napojna smeša tokom mikrofiltracije industrijske kultivacione tečnosti mikroorganizma *Bacillus subtilis*, sa ciljem poređenja vrednosti fluksa permeata sa vrednošću koja se dobija primenom *dead-end* mikrofiltracije. Unakrsna mikrofiltracija je izvedena primenom polietarsulfonske ravne membrane sa prosečnim dimenzijama prečnika oko od 0.2 μm i specifičnom površinom od 140 cm^2 , dok je *dead-end* mikrofiltracija izvršena primenom sistema za filtraciju sa membranom specifične površine 13.4 cm^2 . Primećeno je značajno povećanje vrednosti fluksa permeata tokom unakrsne mikrofiltracije u poređenju sa *dead-end* mikrofiltracijom: 310% pri prividnoj brzini proticanja napojne smeše od 1,75 m/s i 665% pri prividnoj brzini proticanja napojne smeše od 2,4 m/s, čime je potvrđen značajan uticaj povećanja protoka napojne smeše na povećanje fluksa permeata.

Blanpain-Avet i sar. (2009) su filtrirali spore mikroorganizma *Bacillus cereus* CUETM 98/4 suspendovane u fosfatnom puferu primenom tubularne keramičke membrane sa jednim kanalom i prosečnim prečnikom pora od 0,45 μm . Primenom iste membrane, Blanpain-Avet i sar. (2011) su filtrirali suspenziju istog sastava i primetili značajne razlike u vrednostima fluksa permeata u stacionarnom stanju pod različitim uslovima izvođenja procesa mikrofiltracije.

Tomasula i sar. (2011) su filtrirali mleko sa ciljem uklanjanja spora mikroorganizma *Bacillus anthracis* (Sterne). Takođe su ispitivali uticaj prečnika pora membrane na fluks permeata primenom dve membrane: multikanalne membrane sa 37 kanala (prečnik kanala 3 mm, specifična površina membrane 0.35 m^2 , dužina 1,020 m, prečnik pora 0,8 μm) i multikanalne membrane sa 19 kanala (prečnik kanala 4 mm, specifična površina membrane 0.24 m^2 , dužina 1,020 m, prečnik pora 1,4 μm). Veće vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju, pod definisanim operativnim uslovima mikrofiltracije, dobijene su primenom membrane sa prečnikom pora od 0,8 μm .

Mukhopadhyay i sar. (2011) su filtrirali komercijalno nepasterizovano tečno belance jajeta inokulisano mikroorganizmom *Bacillus anthracis* primenom keramičke membrane sa 19 kanala i tehnike povratnog pulsiranja za poboljšanje fluksa permeata. Povratno pulsiranje podrazumeva obrnuti tok permeata u membranski modul sa ciljem pokretanja filtracione pogače sa površine membrane i korišćeno je svaki put kada je primećeno značajno opadanje vrednosti fluksa permeata. Osim toga, ispitani su i različiti tretmani belanca jajeta, uključujući promenu vrednosti pH (u opsegu 6-9) i zagrevanje u opsegu temperatura 25-40°C. Veće vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju dobijene su primenom više temperature (40°C) za predtretman napojne smeše, kao i napojne smeše čija je vrednost pH podešena na 6.

Hwang i Wang (2012) su filtrirali suspenziju komercijalnog praha koji sadrži ćelije mikroorganizma *Bacillus subtilis* (koncentracije 6 g/l) i kultivacionu tečnost dobijenu kultivacijom istog mikroorganizma primenom hranljive podloge koja je sadržala ekstrakt kvasca, tripton i NaCl. *Dead-end* mikrofiltracija sa ciljem izdvajanja ćelija i ekstracelularnih polimera izvršena je primenom membrane napravljene od poliviniliden fluorida, sa prosečnim dimenzijama prečnika pora od 0,22 μm . Cilj istraživanja bio je utvrđivanje uticaja transmembranskog pritiska na otpor proticanju tokom mikrofiltracije. Nakon toga, Hwang i Tsai (2014) su ispitivali uticaj transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja napojne smeše tokom unakrsne filtracije kultivacione tečnosti istog mikroorganizma dobijene primenom hranljive podloge čiji je sastav definisan u prethodno navedenom istraživanju, kao i iste membrane za mikrofiltraciju. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da povećanje vrednosti transmembranskog pritiska sa 20 kPa na 120 kPa rezultuje povećanjem vrednosti fluksa permeata od 40%. Sa druge strane, povećanje prividne brzine proticanja napojne

smeše sa 0,1 m/s na 0,3 m/s rezultovalo je povećanjem vrednosti fluksa permeata za 110%, čime su još jednom potvrđeni rezultati istraživanja koje su sprovedi Tanaka i sar. (1994).

Chang i Lee (2012) su ispitivali uticaj materijala membrane na proces mikrofiltracije mikroorganizma *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 130-1 (Btk 130-1). Membrane su bile napravljene od celuloze, celuloza acetata i polietarsulfona, sa prosečnim prečnicima pora od 1,0 μm , 0,8 μm i 0,45 μm . Pošto je primena membrane od celuloza acetata rezultovala najvećom vrednošću fluksa permeata u stacionarnom stanju, ova membrana je dalje korišćena sa ciljem istraživanja procesa mikrofiltracije pod različitim operativnim uslovima, pri čemu su najveće vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju dobijene primenom membrane sa prosečnim prečnikom pora od 0,8 μm .

Bechervaise i sar. (2016) su filtrirali spore mikroorganizma *Bacillus mycoides* suspendovane u rastvoru koji sadrži 15% (w/v) gum arabike primenom tubularne keramičke sa prosečnim prečnikom pora od 0,8 μm . Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je tokom deset ciklusa prljanja i čišćenja membrane relativno smanjenje vrednosti fluksa permeata bilo u opsegu 94-99%.

Marzban i sar. (2016) su primenjivali membrane napravljene od celuloza acetata (sa prosečnim prečnikom pora od 0,22 μm) i poliviniliden fluorida (sa istom vrednošću prosečnog prečnika pora) prilikom unakrsne mikrofiltracije komercijalne kultivacione tečnosti mikroorganizma *Bacillus thuringiensis* pod različitim uslovima u pogledu vrednosti transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše. Najveće vrednosti fluksa permeata nakon 20 minuta mikrofiltracije dobijene su pri vrednostima transmembranskog pritiska od 2,07 bar i protoka napojne smeše od 120 l/h, pri čemu su bolji rezultati postignuti primenom membrane napravljene od poliviniliden fluorida.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. MIKROORGANIZMI

4.1.1. SKRINING POTENCIJALNIH PROIZVODNIH MIKROORGANIZAMA

Potencijalni proizvodni mikroorganizmi za suzbijanje fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* ispitani u ovom delu istraživanja bili su: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (M 1), *Bacillus cereus* ATCC 10876 (M 2), tri izolata roda *Bacillus* izolovana iz mladog sira (M 3, M 4, M 5), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (M 6), *Pseudomonas aeruginosa* soj izolovan iz vode (M 7), *Pseudomonas putida* izolovan iz okruženja (M 8), tri izolata roda *Lactobacillus* izolovana iz okruženja (M 9, M 10, M 11), *Streptomyces hygrosopicus* soj izolovan iz zemljišta (M 12), *Saccharomyces cerevisiae* (M 13) i *Trichoderma reesei* QM 9414 (M 14).

4.1.2. PROIZVODNI MIKROORGANIZAM

Kao proizvodni mikroorganizam u eksperimentalnom delu ove doktorske disertacije, izuzev faze skrininga potencijalnih proizvodnih mikroorganizama, korišćen je izolat *Bacillus* sp., izolovan iz mladog sira. Molekularna identifikacija ovog mikroorganizma pokazala je da u pitanju vrsta *Bacillus velezensis*.

Prvi korak u molekularnoj identifikaciji proizvodnog mikroorganizma predstavlja izolaciju genomske DNK iz ćelije proizvodnog mikroorganizma. Proizvodni mikroorganizam je kultivisan na temperaturi 30°C tokom 96 h uz eksterno mešanje (150 o/min) i spontanu aeraciju primenom tečne sintetičke hranjive podloge tripton soja bujon (20 ml, Difco, Detroit, Mičigen, SAD). Ćelije proizvodnog mikroorganizma su odvojene od tečnog dela kultivacione tečnosti primenom centrifugiranja (5000 o/min, 15 min), nakon čega su resuspendovane u 10 ml rastvora za liziranje, koji se sastoji od 0,3 M saharoze, 25 mM EDTA i 25 mM Tris-HCl vrednosti pH 7,5, i koji sadrži 2 U RNaze A, u sterilnoj Falcon tubi zapremine 50 ml (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nju Džerzi, SAD). Suspenziji bakterijskih ćelija je dodato 10 mg lizozima (do postizanja koncentracije lizozima 1 mg/ml), nakon čega je vršena inkubacija na temperaturi 37°C tokom 30 min. Nakon toga je dodat 1 ml natrijum dodecil sulfata (SDS – *Sodium Dodecyl Sulphate*, 10% (w/v)) i 5 mg proteinaze K (Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, SAD) uz dalju inkubaciju na 55°C tokom 1,5 h uz povremeno okretanje epruvete sa uzorkom. Nakon dodatka 3,6 ml rastvora NaCl (5 M) i 15 ml hloroforma, uzorak je inkubiran tokom 20 min na temperaturi 25°C uz česte inverzije. Posle mešanja, izvršeno je centrifugiranje uzorka (5000 o/min, 15 min), a gornja tečna faza koja sadrži DNK je prenetu u čistu tubu. Precipitacija DNK je izvršena dodatkom jednake zapremine izopropanola zapremini prenete tečne faze, nakon čega je precipitirana DNK namotana na vrh zatopljene Pasterove pipete i prebačena u tubu za mikrocentrifugu (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Nakon toga je DNK isprana primenom 1 ml rastvora etanola (70% v/v). Posle sušenja na vazduhu i uklanjanja etanola, DNK je resuspendovana u minimalnoj zapremini pufera koji sadrži 10 mM Tris-HCl, vrednosti pH 7,4, i 10 mM EDTA, koji je prethodno zagrejan na temperaturu 60°C (Nikodinovic i sar., 2003).

Nakon izolacije genomske DNK, ista je iskorišćena za amplifikaciju sekvence gena za 16S rRNK primenom univerzalnih bakterijskih prajmera 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') i 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Reysenbach i sar., 1994). PCR (*Polymerase Chain Reaction* – lančana reakcija polimeraze) amplifikacija je izvršena primenom uređaja *2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Masačusets, SAD) i komercijalnog kita *FASTA Gene TAQ PCR kit* (New England Biolabs, Ipswich, Masačusets, SAD) prema uputstvu proizvođača. Produkti PCR reakcije su prečišćeni primenom komercijalnog kita *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen, Hilden, Nemačka). Sekvenciranje je izvršeno primenom komercijalnog kita *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle*

Sequencing Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) i uređaja *3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Sekvenca gena za 16s rRNA je preklopljena primenom *Lasergene SeqMan Pro* softvera (DNASTAR, Madison, Viskonsin, SAD) i identifikovana primenom BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) programa preko NCBI servera (*National Center for Biotechnology Information*) (Altschul i sar., 1997). Dobijena sekvenca je korišćena za pronalaženje sličnih sekvenci u *Gen Bank* bazi podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Na osnovu BLAST analize, sekvence najbližije dobijenoj sekvenci su odabrane za kreiranje filogenetskog stabla primenom softvera MEGA 7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, Penn State University, State College, Pensilvanija, SAD) (Kumar i sar., 2016). Prilikom konstrukcije filogenetskog stabla korišćena je *Maximum Likelihood* metoda sa *bootstrap* analizom u 1000 ponavljanja. Osim toga, za konstrukciju filogenetskog stabla uzeta je i sekvenca 16s rRNA *Streptomyces coelicolor* NR 112305.1 kao *outgroup* mikroorganizma.

4.1.3. TEST MIKROORGANIZMI

U okviru faza istraživanja koje su se odnosile na skrining potencijalnih proizvodnih mikroorganizama i odabir optimalnog izvora ugljenika i organskog izvora azota za proizvodnju biokontrolnih agenasa kao test mikroorganizmi korišćeni su sledeći fitopatogeni izolati: *Xanthomonas campestris* sojevi (kupus, xp 3-1, xp 7-2, 12-2, Mn 7-2) izolovani sa kupusa, *Xanthomonas campestris* soj izolovan sa kelja, *Xanthomonas campestris* soj izolovan sa karfiola, i *Xanthomonas euvesicatoria* sojevi (PAP LIST 1, PAP LIST 2, PAP LIST 3, PAP LIST 4, PAP LIST 5) izolovani sa lista paprike. *Xanthomonas euvesicatoria* sojevi identifikovani su primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR) sa ciljem sekvenciranja gena za 16S rRNA (Grahovac i sar., 2016).

U ostalim fazama istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, izuzev testiranja antimikrobne aktivnosti proizvedenih biokontrolnih agenasa *in planta*, kao test mikroorganizmi korišćeni su sledeći fitopatogeni izolati: *Xanthomonas campestris* Mn 7-2, izolovan sa kupusa, i dva soja izolovana sa lista paprike, *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 1 i *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 2.

Uzimajući u obzir da je testiranje antimikrobne aktivnosti proizvedenih biokontrolnih agenasa *in planta* vršeno na sadnicama paprike, kao test mikroorganizmi u ovoj eksperimentalnoj fazi korišćeni su fitopatogeni izolati izolovani sa lista paprike: *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 1 i *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 2.

Prilikom ispitivanja šireg spektra antimikrobnog delovanja odabranog proizvodnog mikroorganizma, kao test mikroorganizmi korišćeni su sledeći fitopatogeni: tri izolata vrste *Fusarium avenaceum* (TAB12, KA13, JGS3²) i jedan izolat vrste *Fusarium graminearum* (TAB10²), kao i tri izolata vrste *Colletotrichum acutatum* (314, 107 i KA 7), koji su deo trajne kolekcije mikrobioloških kultura Laboratorije za detekciju patogena štetočina i korova na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu. Izolati su poreklom iz plodova jabuke koji su uzorkovani u periodu od 2012. do 2016. godine na teritoriji AP Vojvodine.

4.1.4. ČUVANJE MIKROORGANIZAMA

Potencijalni proizvodni mikroorganizmi (poglavlje 4.1.1.) čuvaju se na polučvrstim hranljivim podlogama odgovarajućeg sastava (tabele 4.2., 4.3., 4.4.), koje sadrže 20 g/l agara, na temperaturi 4°C u zbirci kultura Laboratorije za biohemijско inženjerstvo Tehnološkog fakulteta Novi Sad.

Proizvodni mikroorganizam *Bacillus velezensis* čuva se na polučvrstoj sintetičkoj podlozi hranljivi agar (HiMedia, Nashik, Indija), na temperaturi 4°C u zbirci kultura Laboratorije za biohemijско inženjerstvo Tehnološkog fakulteta Novi Sad.

Test mikroorganizmi koji pripadaju rodu *Xanthomonas* čuvaju se na polučvrstoj hranljivoj podlozi YMA (*Yeast Maltose Agar*, tabela 4.1.), na temperaturi 4°C u zbirci kultura Laboratorije za biohemijsko inženjerstvo Tehnološkog fakulteta Novi Sad.

Tabela 4.1. Sastav hranljive podloge YMA

Komponenta	Količina (g/l)
glukoza	15
ekstrakt kvasca	3
Maltes®	3
pepton	5
agar	20
destilovana voda	ostatak do 1 l
pH 7,0±0,2 (podešavanje primenom 1 M H ₂ SO ₄ i 1 M NaOH)	

Test mikroorganizmi koji pripadaju rodovima *Fusarium* i *Colletotrichum* čuvaju se na polučvrstoj sintetičkog podlozi SMA (*Sabouraud Maltose Agar*, HiMedia, Nashik, Indija), na temperaturi 4°C u zbirci kultura Laboratorije za detekciju patogenih štetočina i korova na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu.

4.1.5. OSVEŽAVANJE MIKROORGANIZAMA

Potencijalni proizvodni mikroorganizmi osveženi su presejavanjem na polučvrste hranljive podloge odgovarajućeg sastava (tabele 4.2., 4.3., 4.4.), koje su sadržale 20 g/l agara, i inkubacijom na temperaturi 28°C u toku 48 h, izuzev izolata roda *Pseudomonas*, koji su inkubirani na temperaturi 37°C.

Proizvodni mikroorganizam *Bacillus velezensis* osvežen je presejavanjem na polučvrstu sintetičku podlogu hranljivi agar (HiMedia, Nashik, Indija) i inkubacijom na 28°C u toku 48 h.

Radne kulture test mikroorganizama roda *Xanthomonas* pripremljene su presejavanjem fitopatogenih izolata na polučvrstu hranljivu podlogu YMA (tabela 4.1.) i inkubacijom na temperaturi 26°C tokom 48 h.

Radne kulture test mikroorganizama rodova *Fusarium* i *Colletotrichum* pripremljene su presejavanjem fitopatogenih izolata na polučvrstu hranljivu podlogu PDA (*Potato Dextrose Agar* – krompir dekstrozni agar), koja sadrži 4 g/l ekstrakta krompira, 20 g/l dekstroze i 20 g/l agara, i inkubacijom na temperaturi 25°C, u mraku, tokom sedam dana.

4.2. HRANLJIVE PODLOGE

U zavisnosti od faze eksperimentalnog istraživanja, u okviru ove doktorske disertacije korišćene su različite hranljive podloge (polučvrste i tečne, sintetičke i polusintetičke) odgovarajućeg sastava. Vrednost pH polusintetičkih podloga podešavana je u okviru zadatih vrednosti primenom odgovarajućih kiselina i baza. Kod polučvrstih polusintetičkih podloga vrednost pH podešavana je pre dodatka agara i njegovog rastvaranja kuvanjem na temperaturi 100°C u toku 35 min, nakon čega sledi sterilizacija hranljive podloge, dok je kod tečnih polusintetičkih podloga vrednost pH podešavana neposredno pre sterilizacije. Sterilizacija svih hranljivih podloga vršena je autoklaviranjem na temperaturi 121°C i pritisku 2,1 bar u toku 20 min.

4.2.1. HRANLJIVE PODLOGE ZA PRIPREMU INOKULUMA

U svim eksperimentalnim fazama u okviru ove doktorske disertacije za pripremu inokuluma korišćena je tečna sintetička hranljiva podloga – hranljivi bujon (HiMedia, Nashik, Indija).

4.2.2. HRANLJIVE PODLOGE ZA KULTIVACIJU

4.2.2.1. Eksperimentalna faza skrininga potencijalnih proizvodnih mikroorganizama

Za kultivaciju potencijalnih proizvodnih mikroorganizama korišćene su tečne hranljive podloge prikazane u tabelama 4.2., 4.3. i 4.4.

Tabela 4.2. Hranljive podloge korišćene za kultivaciju u fazi skrininga potencijalnih proizvodnih mikroorganizama

Rod	Izolati	Tip hranljive podloge	Hranljiva podloga
<i>Bacillus</i>	M 1, M 2, M 3, M 4, M 5	sintetička	hranljivi bujon (HiMedia, Nashik, Indija)
<i>Pseudomonas</i>	M 6, M 7, M 8	sintetička	hranljivi bujon (HiMedia, Nashik, Indija)
<i>Lactobacillus</i>	M 9, M 10, M 11	sintetička	MRS (<i>de Man, Rogosa and Sharpe</i>) bujon (HiMedia, Nashik, Indija)
<i>Trichoderma reesei</i>	M 14	sintetička	SM (<i>Sabouraud maltose</i>) bujon (HiMedia, Nashik, Indija)
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	M 12	polusintetička	Tabela 4.3.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	M 13	polusintetička	Tabela 4.4.

Tabela 4.3. Sastav polusintetičke tečne hranljive podloge za kultivaciju izolata *Streptomyces hygroscopicus* (M 12)

Komponenta	Količina (g/l)
glukoza	5
obezmašćeno sojino brašno	10
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5
K ₂ HPO ₄	1
CaCO ₃	3
NaCl	3
MgSO ₄	0,5
destilovana voda	ostatak do 1 l
pH 7,2±0,1 (podešavanje primenom 1 M H ₂ SO ₄ i 1 M NaOH)	

Tabela 4.4. Sastav polusintetičke tečne hranljive podloge za kultivaciju izolata *Saccharomyces cerevisiae* (M 13)

Komponenta	Količina (g/l)
glukoza	2
Maltex®	14
pepton	0,1
česmenska voda	ostatak do 1 l
pH 7,0±0,2 (podešavanje primenom 1 M H ₂ SO ₄ i 1 M NaOH)	

4.2.2.2. Eksperimentalna faza odabira optimalnog izvora ugljenika i organskog izvora azota za proizvodnju biokontrolnih agenasa

Kultivacija proizvodnog mikroorganizma u ovoj fazi istraživanja vršena je primenom tečnih polusintetičkih hranljivih podloga, koje su sadržale različite kombinacije izvora ugljenika (glukoza, saharoza, laktoza, škrob i glicerol) i organskog izvora azota (ekstrakt kvasca, pepton, sojino brašno, L-glutaminska kiselina i urea). Sastav tečnih polusintetičkih hranljivih podloga korišćenih za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma dat je u tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Sastav hranljivih podloga za kultivaciju u fazi odabira optimalnog izvora ugljenika i organskog izvora azota za proizvodnju biokontrolnih agenasa

Komponenta	Količina (g/l)
izvor ugljenika	15
organski izvor azota	3
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5
K ₂ HPO ₄	3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3
destilovana voda	ostatak do 1 l
pH 7,0±0,2 (podešavanje primenom 1 M H ₂ SO ₄ i 1 M NaOH)	

4.2.2.3. Eksperimentalna faza modelovanja i optimizacije sastava hranljive podloge na bazi komercijalnog i sirovog glicerola

Za dobijanje eksperimentalnih podataka potrebnih za modelovanje i optimizaciju sastava hranljivih podloga na bazi komercijalnog i sirovog glicerola glicerola za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma primenjen je Boks-Benkenov (Box-Behnken) redukovani eksperimentalni dizajn sa 4 nezavisne promenljive varirane na 3 nivoa i sa 3 ponavljanja u centralnoj tački. Nezavisne promenljive i njihove varirane vrednosti bile su: inicijalna koncentracija glicerola (10-35-60 g/l), inicijalna koncentracija ekstrakta kvasca (0-2,5-5 g/l), inicijalna koncentracija (NH₄)₂SO₄ (0-1,5-3 g/l) i inicijalna koncentracija K₂HPO₄ (1-5,5-10 g/l) (tabela 4.6.). Prema definisanom eksperimentalnom planu pripremljene su tečne polusintetičke hranljive podloge koje su korišćene za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma. Osim komponenata navedenih u eksperimentalnom planu, svaka hranljiva podloga sadržala je i 0,3 g/l MgSO₄·7H₂O.

Sirovi glicerol korišćen u eksperimentima iz okvira ove doktorske disertacije dobijen je iz proizvodnje biodizela, gde su kao sirovine korišćeni otpadna ulja i masti, od kompanije BIODIZEL CO d.o.o. (Beograd, Srbija). Takođe, prilikom pripreme hranljivih podloga uzeto je u obzir da sirovi glicerol sadrži 60% (w/w) glicerola (tabela 5.10., poglavlje 5.6.), dok ostatak čine nečistoće, stoga su hranljive podloge pripremljene tako da finalna koncentracija glicerola u hranljivim podlogama odgovara zadatim vrednostima iz eksperimentalnog plana.

Tabela 4.6. Eksperimentalni plan u fazi modelovanja i optimizacije sastava hranljivih podloga na bazi komercijalnog i sirovog glicerola za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma: nezavisne promenljive i njihovi nivoi

Redni broj eksperimenta	Glicerol (g/l)	Ekstrakt kvasca (g/l)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)	K ₂ HPO ₄ (g/l)
1	10	0	1,5	5,5
2	60	0	1,5	5,5
3	10	5	1,5	5,5
4	60	5	1,5	5,5
5	35	2,5	0	1
6	35	2,5	3	1
7	35	2,5	0	10
8	35	2,5	3	10
9	10	2,5	1,5	1
10	60	2,5	1,5	1
11	10	2,5	1,5	10
12	60	2,5	1,5	10
13	35	0	0	5,5
14	35	5	0	5,5
15	35	0	3	5,5
16	35	5	3	5,5
17	10	2,5	0	5,5
18	60	2,5	0	5,5
19	10	2,5	3	5,5
20	60	2,5	3	5,5
21	35	0	1,5	1
22	35	5	1,5	1
23	35	0	1,5	10
24	35	5	1,5	10
25	35	2,5	1,5	5,5
26	35	2,5	1,5	5,5
27	35	2,5	1,5	5,5
28	10	0	1,5	5,5
29	60	0	1,5	5,5
30	10	5	1,5	5,5
pH 7,0±0,2 (podešavanje primenom 1 M H ₂ SO ₄ i 1 M NaOH)				

4.2.2.4. Eksperimentalna faza validacije optimizovanog sastava hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola

U ovoj fazi istraživanja za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma u Vulfovima bocama i laboratorijskom bioreaktoru korišćena je hranljiva podloga prethodno optimizovanog sastava (poglavlje 5.4.2.) na bazi komercijalnog glicerola (tabela 4.7.).

Tabela 4.7. Optimizovan sastav hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola

Komponenta	Količina (g/l)
Komercijalni glicerol	10,00
Ekstrakt kvasca	2,83
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,00
K ₂ HPO ₄	1,07
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,30
destilovana voda	ostatak do 1 l
pH 7,0±0,2 (podešavanje primenom 1 M H ₂ SO ₄ i 1 M NaOH)	

4.2.2.5. Eksperimentalna faza validacije optimizovanog sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola

U ovoj fazi istraživanja za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma u Vulfovima bocama i laboratorijskom bioreaktoru korišćena je hranljiva podloga prethodno optimizovanog sastava (poglavlje 5.6.2.) na bazi sirovog glicerola (tabela 4.8.).

Tabela 4.8. Optimizovan sastav hranljive podloge na bazi sirovog glicerola

Komponenta	Količina (g/l)
Glicerol	10,00
K ₂ HPO ₄	4,66
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,30
destilovana voda	ostatak do 1 l
pH 7,0±0,2 (podešavanje primenom 1 M H ₂ SO ₄ i 1 M NaOH)	

4.2.2.6. Eksperimentalna faza mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma

Za pripremu kultivacione tečnosti koja je korišćena u toku procesa mikrofiltracije korišćena je hranljiva podloga optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola (tabela 4.7.).

4.2.2.7. Eksperimentalna faza testiranja antimikrobne aktivnosti kultivacione tečnosti *in vitro*

U fazi testiranja antimikrobne aktivnosti *in vitro* za pripremu suspenzija test mikroorganizama korišćen je sterilan fiziološki rastvor (0,9% (w/v) NaCl u destilovanoj vodi).

Za testiranje antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacionih tečnosti *in vitro* korišćena je polučvrsta hranljiva podloga optimalnog sastava za podsticanje rasta fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* – YMA (tabela 4.1.).

4.2.2.8. Eksperimentalna faza testiranja antimikrobne aktivnosti kultivacione tečnosti *in planta*

Za pripremu kultivacione tečnosti koja je korišćena za testiranje antimikrobne aktivnosti *in planta* korišćene su hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola (tabela 4.7.) i sirovog glicerola (tabela 4.8.).

U fazi testiranja antimikrobne aktivnosti *in planta* za pripremu suspenzija test mikroorganizama korišćen je sterilan fiziološki rastvor (0,9% (w/w) NaCl u destilovanoj vodi).

4.2.2.9. Eksperimentalna faza ispitivanja šireg spektra antimikrobnog delovanja proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*

Tokom faze ispitivanja šireg spektra antimikrobnog delovanja za pripremu kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* korišćena je hranljiva podloga optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola (tabela 4.7.).

U eksperimentalnoj fazi *in vitro* testiranja antimikrobne aktivnosti kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* korišćena je polučvrsta hranljiva podloga PDA (*Potato Dextrose Agar*) (poglavlje 4.1.5.).

4.3. PRIPREMA INOKULUMA I INOKULACIJA

U svim eksperimentalnim faza u okviru ove doktorske disertacije u kojima je kao proizvodni mikroorganizam korišćen *Bacillus velezensis* inokulum je pripremljen na isti način. Priprema inokuluma sastojala se iz dve faze. Prva faza podrazumevala je prenošenje biomase prethodno osveženog proizvodnog mikroorganizma u erlenmajer zapremine 100 ml koji je sadržao tečnu hranljivu podlogu (hranljivi bujon, 50 ml) i inkubaciju na temperaturi 28°C na laboratorijskoj tresilici (KS 4000i control, IKA® Werke, Staufen, Nemačka) uz eksterno mešanje (150 o/min) i spontanu aeraciju tokom 24 h. Druga faza podrazumevala je prenošenje inokuluma iz prve faze u erlenmajer zapremine 500 ml koji je sadržao 150 ml tečne hranljive podloge (hranljivi bujon) i inkubaciju pod identičnim uslovima kao u prvoj fazi. Inokulacija hranljivih podloga za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* izvršena je dodavanjem 10% (v/v) inokuluma u odnosu na zapreminu hranljive podloge u fazi kultivacije.

Inokulacija hranljivih podloga za kultivaciju potencijalnih proizvodnih mikroorganizama u fazi skrininga izvršena je direktnim prenošenjem biomase prethodno osveženih mikroorganizama u erlenmajere sa pripremljenim hranljivim podlogama za kultivaciju.

4.4. PROCESNI USLOVI

U različitim fazama istraživanja u okviru ove doktorske disertacije kultivacije potencijalnih proizvodnih mikroorganizama (u fazi skrininga) i proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* vršene su u različitim razmerama i pod različitim procesnim uslovima, koji su sumirani u tabeli 4.9.

Tabela 4.9. Procesni uslovi tokom kultivacije mikroorganizama u različitim fazama istraživanja

Faza istraživanja	Temperatura (°C)	Tip mešanja Brzina mešanja (o/min)	Tip aeracije Brzina aeracije (vvm)	Trajanje bioprocesa (h)	Razmera Zapremina hranljive podloge (ml)
Skrining potencijalnih proizvodnih mikroorganizama	30	Eksterno 150	Spontana	96	Erlenmajer tikvica 50
Odabir optimalnog izvora ugljenika i organskog izvora azota	28	Eksterno 150	Spontana	96	Erlenmajer tikvica 50
Modelovanje i optimizacija sastava hranljivih podloga na bazi komercijalnog i sirovog glicerola	28	Eksterno 150	Spontana	96	Erlenmajer tikvica 50
Validacija optimizovanog sastava hranljivih podloga – Vulfove boce	28	Eksterno 150	Interna 0,75	96	Vulfove boce 1300
Validacija optimizovanog sastava hranljivih podloga – laboratorijski bioreaktor	28	Interno 250	Interna 1	96	Laboratorijski bioreaktor 2000
Priprema kultivacione tečnosti za proces mikrofiltracije	28	Eksterno 150	Interna 0,75	96	Vulfove boce 1300
Priprema kultivacione tečnosti za testiranje antimikrobne aktivnosti <i>in planta</i>	28	Interno 250	Interna 1	96	Laboratorijski bioreaktor 2000
Priprema kultivacione tečnosti za ispitivanje šireg spektra antimikrobnog delovanja	28	Interno 250	Interna 1	96	Laboratorijski bioreaktor 2000

Prilikom kultivacije u Erlenmajer tikvicama, zapremina tikvice u kojoj se vrši kultivacija bila je tri puta veća u odnosu na zapreminu hranljive podloge primenjene za kultivaciju. Kultivacije u Erlenmajer tikvicama izvedene su uz eksterno mešanje na laboratorijskoj tresilici (KS 4000i control, IKA® Werke, Staufen, Nemačka) i spontanu aeraciju.

Ukupna zapremina Vulfovih boca koje su korišćene kao sudovi za kultivaciju iznosila je 2 l, dok je zapremina hranljive podloge primenjene za kultivaciju iznosila 2/3 ukupne zapremine Vulfove boce. Tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma u Vulfovim bocama na svakih 12 sati uzimani su uzorci kultivacione tečnosti sa ciljem određivanja sadržaja biomase

proizvodnog mikroorganizma, rezidualnih koncentracija nutrijenata (glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora) i testiranja antimikrobne aktivnosti protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*.

U fazi pripreme kultivacione tečnosti za proces mikrofiltracije, zbog potrebe za velikom zapreminom kultivacione tečnosti, kultivacija je vršena u istovremeno u četiri Vulfove boce, nakon čega su dobijene kultivacione tečnosti spojene u napojnu smešu koja je korišćena u procesu mikrofiltracije.

Kultivacija proizvodnog mikroorganizma takođe je vršena u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 3 l (Biostat® Aplus, Sartorius AG, Göttingen, Nemačka), pri čemu je zapremina hranljive podloge primenjene za kultivaciju iznosila 2/3 u odnosu na ukupnu zapreminu bioreaktora. Interno mešanje kultivacione tečnosti vršeno je pomoću mešalice sa dve paralelno postavljene Ruštonove turbine, u staklenom sudu bez odbojnika, dok je aeracija vršena vazduhom sterilisanim pomoću filtera zadržavajući brzinom izraženo u jedinicama vvm (*volume of air/volume of liquid/min* – zapremina vazduha/zapremina tečnosti/min). Odnos prečnika mešača i prečnika suda (d/D) iznosi 0,38. U toku kultivacije praćena je vrednost pH kultivacione tečnosti pomoću pH elektrode (Easyferm plus K8 200, Hamilton, Gräfelfing, Nemačka). Tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma u laboratorijskom bioreaktoru na svakih 12 sati uzimani su uzorci kultivacione tečnosti sa ciljem određivanja sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma, rezidualnih koncentracija nutrijenata (glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora) i testiranja antimikrobne aktivnosti protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*.

4.5. ANALITIČKE METODE

4.5.1. ODREĐIVANJE SADRŽAJA BIOMASE

Optička gustina uzoraka kultivacionih tečnosti i suspenzija test mikroorganizama određena je spektrofotometrijski merenjem apsorbance na talasnoj dužini 600 nm primenom dvoznačnog spektrofotometra (UV-1800 UV-Vis Spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan). Kao slepe probe za merenje optičke gustine uzoraka kultivacione tečnosti korišćene su hranljive podloge primenjene tokom kultivacije, dok je kao slepa proba za merenje optičke gustine suspenzija test mikroorganizama korišćen sterilan fiziološki rastvor. Prilikom eksperimenata testiranja antimikrobne aktivnosti *in vitro* i *in planta* suspenzije test mikroorganizama napravljene su tako da vrednost optičke gustine suspenzija iznosi 0,3.

Sadržaj suve materije biomase proizvodnog mikroorganizma iz uzoraka kultivacionih tečnosti određen je modifikovanom gravimetrijskom metodom. Nakon centrifugiranja 20 ml uzorka (10000 o/min, 20 min; Rotina 380R, Hettich, Tuttlingen, Nemačka), talog biomase je resuspendovan u 10 ml destilovane vode radi kvantitativnog prenošenja na sahatno staklo, nakon čega je sušen na temperaturi 105°C do postizanja konstantne mase.

4.5.2. ODREĐIVANJE REZIDUALNIH KONCENTRACIJA NUTRIJENATA

Rezidualni sadržaji nutrijenata (glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora) određeni su iz supernatanta dobijenog centrifugiranjem 20 ml kultivacione tečnosti (10000 o/min, 10 min; Rotina 380R, Hettich, Tuttlingen, Nemačka).

Sadržaj glicerola određen je HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) instrumentalnom metodom. Supernatanti kultivacione tečnosti su pre analize propušteni kroz najlonske filtere prečnika pora 0,2 μm (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemačka). HPLC uređaj (Dionex UltiMate 3000 series, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Masačusets, SAD) opremljen je pumpom (HPG-3200SD/RS), autosemplerom (WPS-3000(T)SL) i refraktometrijskim detektorom (ERC RefractoMax520, Riemerling, Nemačka). Primenjena je kolona ZORBAX NH2 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm , Agilent Technologies, Waldbronn, Nemačka). Kao mobilna faza korišćena je smeša acetonitrila i bidestilovane vode u odnosu 70:30 (v/v), a protok

mobilne faze iznosio je 1 ml/min. Zapremina injektovanog uzorka iznosila je 10 µl, vreme elucije uzorka bilo je podešeno na 15 min, a temperatura kolone održavana je na 30±1°C.

Sadržaj ukupnog azota određen je metodom po Kjeldalu (Kjeldahl) (Herlich, 1990).

Sadržaj ukupnog fosfora određen je spektrofotometrijskom metodom (Gales i sar., 1966).

4.5.3. TESTIRANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI *IN VITRO*

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti uzoraka vršeno je disk-difuzionom metodom (Bauer i sar., 1966). Za testiranje antimikrobne aktivnosti disk-difuzionom metodom protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* korišćeni su uzorci dobijenih kultivacionih tečnosti, dok su u eksperimentalnoj fazi skrininga potencijalnih proizvodnih mikroorganizama korišćeni i uzorci filtrata kultivacione tečnosti dobijenih nakon filtriranja kultivacionih tečnosti kroz filtere prečnika pora 0,22 µm (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemačka). Osim toga, u eksperimentalnoj fazi skrininga potencijalnih proizvodnih mikroorganizama testirana je i antimikrobna aktivnost komercijalnih antibiogram diskova sa streptomycinom (30 µg) (Torlak, Beograd, Srbija) (K). U svim eksperimentima je kao negativna kontrola korišćena sterilna destilovana voda.

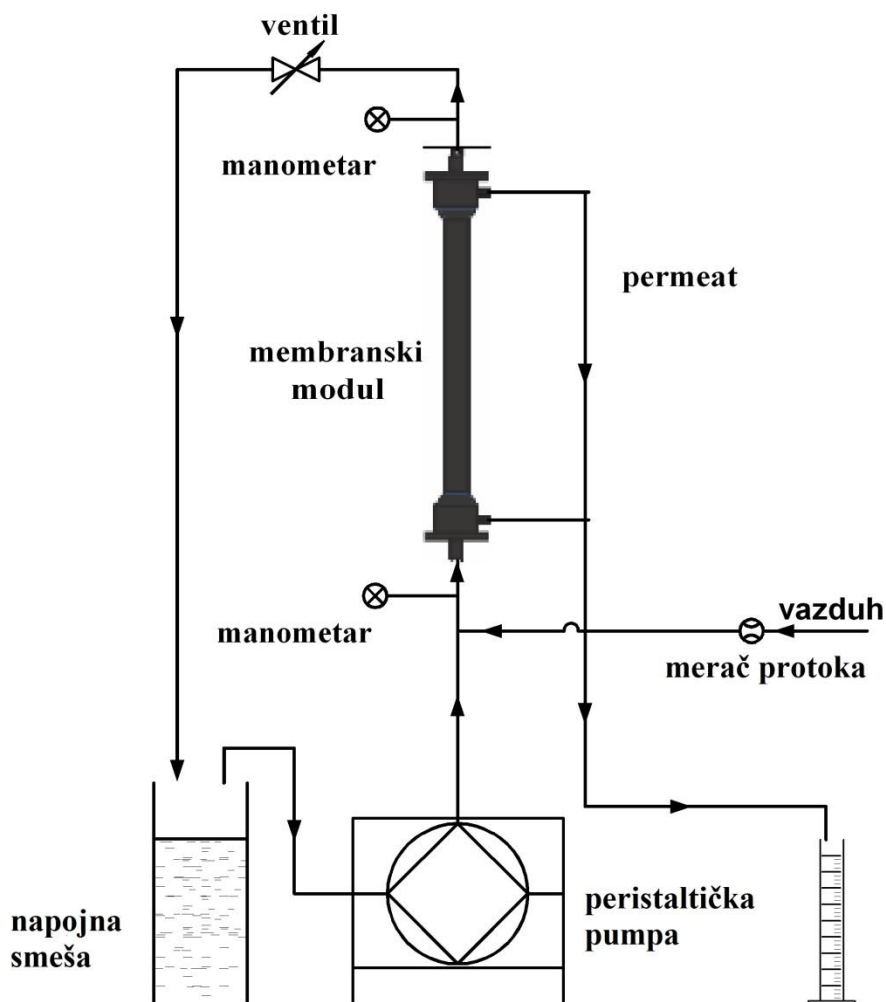
Suspenzije test mikroorganizama roda *Xanthomonas* koje su korišćene za testiranje antimikrobne aktivnosti pripremljene su suspendovanjem biomase prethodno osveženih test mikroorganizama u sterilnom fiziološkom rastvoru do postizanja koncentracije ćelija 10⁸ CFU/ml. Otopljene i temperirane (50±1°C) hranljive podloge za testiranje antimikrobne aktivnosti (YMA) zasejane su prenošenjem po 1 ml suspenzija test mikroorganizama. Nakon homogenizacije na vorteksu, zasejane hranljive podloge izliveno su u sterilnu Petri ploču. Po očvršćavanju hranljivih podloga, na svaku hranljivu podlogu postavljeno je po tri sterilna papirna diska za testiranje antimikrobne aktivnosti (HiMedia, Nashik, Indija). Zapremina uzorka za testiranje antimikrobne aktivnosti iznosila je 15 µl po jednom disku. Inkubacija je vršena tokom 72 h na temperaturi 26°C, nakon čega je vršeno merenje prečnika dobijenih zona inhibicije.

4.5.4. IDENTIFIKACIJA ANTIMIKROBNIH JEDINJENJA

Identifikacija antimikrobnih jedinjenja koja sintetiše proizvodni mikroorganizam *Bacillus velezensis* izvršena je primenom supernatanta kultivacione tečnosti dobijene kultivacijom proizvodnog mikroorganizma u laboratorijskom bioreaktoru (poglavlje 4.4) primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola. Za analizu supernatanta kultivacione tečnosti primenjena je visoko efikasna tečna hromatografija kuplovana sa masenom spektrometrijom (HPLC-MS – *High Pressure Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*). HPLC sistem (Nexera, Shimadzu, Tokyo, Japan) kuplovan je sa masenim spektrometrom (LCMS-8040, Shimadzu, Tokyo, Japan) sa izvorom elektrosprej jonizacije (ESI – *ElectroSpray Ionization*). Karakteristike HPLC kolone (XDB-C18, Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD) bile su sledeće: dužina 100 mm, unutrašnji prečnik 4,6 mm, prečnik čestica punjenja 3 µm. Analiza je vrešna pri temperaturi kolone od 40°C. Kao mobilna faza korišćen je rastvor amonijum acetata (5 mmol/l) koji je sadržao 0,1% (v/v) mravlje kiseline (A) i metanol (B). Elucija sa linearnim gradijentom vršena je na sledeći način: A:B=90:10 tokom 1. minuta, povećavanje protoka faze B na 90% između 1. i 7. minuta, A:B=10:90 od 7. do 12. minuta, smanjivanje protoka faze B na 10% između 12 i 13,5 minuta, A:B=90:10 do 16. minuta. Protok mobilne faze iznosio je 0,5 ml/min. Prilikom detekcije korišćeni su i pozitivni i negativni mod jonizacije. Tehnički parametri merenja primenom masenog spektrometra bili su sledeći: napon sprej kapilare 3 kV, napon detektora 2,04 kV, napon komore pod atmosferskim pritiskom (interfejsa) 4,5 kV, temperatura desolvacije 250°C, temperatura grejnog bloka 450°C, protok gasa korišćenog za raspršivanje 3 ml/min, protok gasa korišćenog za sušenje 15 ml/min. Signal u pogledu vrednosti m/z je detektovan u vremenskim razmacima od 0,2 s.

4.6. UNAPREĐENJE PROCESA UNAKRSNE (CROSS-FLOW) MIKROFILTRACIJE KULTIVACIONIH TEČNOSTI PROIZVODNOG MIKROORGANIZMA

Unapređenja procesa unakrsne mikrofiltracije u okviru istraživanja obuhvaćenih ovom doktorskom disertacijom podrazumevala su primenu različitih hidrodinamičkih metoda za povećanje fluksa permeata – primenu statičkog promotora turbulencije (Kenics statičkog mešača), uduvavanje vazduha u tok napojne smeše i primenu kombinacije Kenics statičkog mešača i uduvavanja vazduha u tok napojne smeše. Ispitan je uticaj različitih procesnih parametara (protoka napojne smeše, transmembranskog pritiska, prisustva/odsustva Kenics statičkog mešača i protoka vazduha) na tok unakrsne mikrofiltracije kultivacionih tečnosti dobijenih kultivacijom proizvodnog mikroorganizma primenom podloge na bazi komercijalnog glicerola. U toku svih eksperimenata mikrofiltracije korišćena je tubularna *Pall* keramička membrana sa jednim kanalom (*Pall Corporation*, Port Washington, Njujork, SAD) nominalnog prečnika pora 200 nm, dužine 250 mm, unutrašnjeg prečnika 7 mm, spoljašnjeg prečnika 10 mm i specifične površine 0,00462 m². Za sve eksperimente mikrofiltracije korišćena je aparatura prikazana na slici 4.1. Svi eksperimenti mikrofiltracije su izvedeni na temperaturi 25°C.



Slika 4.1. Šematski prikaz aparature korišćene za eksperimente mikrofiltracije

Protok napojne smeše iz rezervoara za napojnu smešu kroz membranski modul u kome je smeštena keramička membrana obezbeđen je pomoću peristaltičke pumpe. Promena protoka napojne smeše vršena je pomoću prekidača na peristaltičkoj pumpi. Takođe, protok napojne smeše bio je unakrsan u odnosu na površinu membrane. Permeat se, nakon prolaska kroz membranu, kontinualno sakuplja i odvodi iz membranskog modula. Nakon prikupljanja definisane zapremine permeata sa ciljem merenja fluksa u menzuri, permeat se vraća u sud sa napojnom smešom radi obezbeđivanja konstantnog sastava napojne smeše. Retentat se takođe recirkuliše u sud sa napojnom smešom. Vrednosti pritiska pre i posle membrane očitavane su pomoću manometara, a srednja vrednost ove dve vrednosti predstavlja transmembranski pritisak, koji se reguliše otvaranjem i zatvaranjem ventila iza membranskog modula. Protok vazduha je meren i regulisan pomoću elektronskog masenog merača i regulatora protoka (EL FLOW® F 201AV, Bronkhorst, Ruurlo, Holandija)).

Fluks stacionarnog stanja (J_P , l/(m²·h)), koji predstavlja protok permeata (Q_P , l/h) po jedinici površine membrane (A , m²), izračunat je kao srednja vrednost poslednjih 10 merenja u toku filtracije (jednačina 4.1). Protok permeata izražen je kao vreme potrebno da se prikupi 10 ml permeata.

$$J_P = \frac{Q_P}{A} \quad (4.1.)$$

Nakon svakog eksperimenta mikrofiltracije membrana je čišćena prema sledećem protokolu:

- ispiranje destilovanom vodom (25°C) protokom 120 l/h pri transmembranskom pritisku 0 bar tokom 15 min;
- pranje membrane rastvorom deterdženta (50°C, 1% (w/v), P3-ultrasil® 110, Lenntech, Delfgauw, Holandija) protokom 120 l/h: 15 min pri transmembranskom pritisku 0 bar i 15 min pri transmembranskom pritisku 1 bar uz uklanjanje permeata;
- ispiranje toplom destilovanom vodom (50°C) protokom 120 l/h tokom 15 min pri transmembranskom pritisku 1 bar uz uklanjanje permeata;
- ispiranje destilovanom vodom (25°C) protokom 120 l/h pri transmembranskom pritisku 0 bar tokom 15 min.

Efikasnost čišćenja membrane nakon svakog pranja određena je merenjem fluksa čiste vode, čija bi vrednost trebala da bude približno ista nakon svakog pranja membrane.

4.6.1. UNAKRSNA MIKROFILTRACIJA KULTIVACIONE TEČNOSTI PROIZVODNOG MIKROORGANIZMA SA I BEZ PRISUSTVA STATIČKOG MEŠAČA

U ovoj fazi istraživanja izvršena su dva seta eksperimenata prema istom eksperimentalnom planu: unakrsna mikrofiltracija bez prisustva statičkog mešača i unakrsna mikrofiltracija uz prisustvo Kenics statičkog mešača. Kenics statički mešač izrađen je od nerđajućeg čelika i sastoji se od 30 helikoidnih elemenata prečnika 6 mm, dok ukupna dužina mešača iznosi 250 mm (slika 4.2.).



Slika 4.2. Kenics statički mešač

U oba seta eksperimenata praćen je uticaj dve nezavisne promenljive – protoka napojne smeše (60-120-180 l/h) i transmembranskog pritiska (0,2-0,6-1 bar) (tabela 4.10.) na zavisnu promenljivu – fluks stacionarnog stanja. Osim toga, prilikom mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma uz prisustvo statičkog mešača, pored fluksa permeata u stacionarnom stanju praćena su još dva odziva - relativno povećanje fluksa permeata (FI (%), jednačina 4.2.) i smanjenje specifične potrošnje energije (ER (%), jednačina 4.5.), čija vrednost se računa pomoću vrednosti gubitka hidrauličke snage usled otpora proticanju napojne smeše (P (W), jednačina 4.3.) i vrednosti specifične potrošnje energije (E_S (kW·h/m³), jednačina 4.4.) (Jokić i sar., 2010):

$$FI = \frac{J_{P,SM} - J_{P,NSM}}{J_{P,NSM}} \cdot 100\% \quad (4.2.)$$

$$P = Q_L \cdot \Delta P \quad (4.3.)$$

$$E_S = \frac{P}{J_P \cdot A} \quad (4.4.)$$

$$ER = \frac{E_{NSM} - E_{SM}}{E_{NSM}} \cdot 100\% \quad (4.5.)$$

gde $J_{P,NSM}$ predstavlja fluks permeata prilikom mikrofiltracije bez statičkog mešača (l/(m²·h)), $J_{P,SM}$ fluks permeata prilikom mikrofiltracije uz prisustvo statičkog mešača (l/(m²·h)), Q_L protok napojne smeše (m³/s), ΔP pad pritiska (Pa), A površinu membrane (m²), E_{NSM} specifičnu potrošnju energije prilikom mikrofiltracije bez statičkog mešača (kW·h/m³) i E_{SM} specifičnu potrošnju energije prilikom mikrofiltracije uz prisustvo statičkog mešača (kW·h/m³).

Vrednosti protoka napojne smeše pri mikrofiltraciji kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma bez prisustva statičkog mešača odgovaraju vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše od 0,43 m/s, 0,86 m/s i 1,30 m/s, redom, sa Rejnoldsovim brojevima (Re) 1990, 3980 i 5971, redom, čime su obuhvaćeni laminarni, prelazni i turbulentni režim proticanja. Prilikom mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma uz prisustvo statičkog mešača, vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše su veće za oko 20% i iznose 0,53 m/s, 1,06 m/s i 1,59 m/s, redom, zahvaljujući manjem poprečnom preseku kanala membrane usled prisustva statičkog mešača. Ovim vrednostima pr brzine proticanja odgovaraju vrednosti Rejnoldsovog broja 2433, 4866 i 7300, redom.

Tabela 4.10. Eksperimentalni plan u fazi unakrsne mikrofiltracije kultivacionih tečnosti sa i bez prisustva statičkog mešača: nezavisne promenljive i njihovi nivoi

Redni broj eksperimenta	Transmembranski pritisak (bar)	Protok napojne smeše (l/h)
1	0,2	60
2	0,2	120
3	0,2	180
4	0,6	60
5	0,6	120
6	0,6	180
7	1	60
8	1	120
9	1	180

4.6.2. UNAKRSNA MIKROFILTRACIJA KULTIVACIONE TEČNOSTI PROIZVODNOG MIKROORGANIZMA UZ UDUVAVANJE VAZDUHA U TOK NAPOJNE SMEŠE, SA I BEZ PRISUSTVA STATIČKOG MEŠAČA

U ovoj fazi istraživanja izvršena su dva seta eksperimenata prema istom eksperimentalnom planu: unakrsna mikrofiltracija uz uduvavanje vazduha u tok napojne smeše bez prisustva statičkog mešača i unakrsna mikrofiltracija uz uduvavanje vazduha u tok napojne smeše uz prisustvo Kenics® statičkog mešača. U oba seta eksperimenata praćen je uticaj tri nezavisne promenljive – prividne brzine proticanja napojne smeše V_L , transmembranskog pritiska (0,2-0,6-1 bar) i prividne brzine proticanja vazduha V_G (tabele 4.11. i 4.12) na odabrane zavisne promenljive – fluks pseudostacionarnog stanja i specifičnu potrošnju energije (E), prema Boks-Benkenovom eksperimentalnom planu (3^3 – tri faktora varirana na tri nivoa, uz tri ponavljanja u centralnoj tački). U eksperimentima mikrofiltracije sa uduvavanjem vazduha i bez prisustva statičkog mešača vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše iznosile su 0,43 m/s, 0,87 m/s i 1,30 m/s), dok su vrednosti prividne brzine proticanja vazduha iznosile 0 m/s, 0,2 m/s i 0,4 m/s (tabela 4.11.). Sa druge strane, prilikom izvođenja eksperimenata mikrofiltracije uz uduvavanje vazduha i uz prisustvo statičkog mešača vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše iznosile su 0,53 m/s, 1,06 m/s i 1,59 m/s), dok su vrednosti prividne brzine proticanja vazduha iznosile 0 m/s, 0,23 m/s i 0,46 m/s (tabela 4.12.), zahvaljujući manjem poprečnom preseku kanala membrane usled prisustva statičkog mešača. Specifična potrošnja energije E (kW·h/m³) računata je prema jednačini 4.6.:

$$E = \frac{Q_L \cdot (P_U - P_D) + \frac{\gamma}{\gamma - 1} P_D \cdot Q_{G,D} \left[\left(\frac{P_U}{P_D} \right)^{\frac{\gamma - 1}{\gamma}} - 1 \right]}{J_P \cdot A} \quad (4.6.)$$

gde Q_L predstavlja protok napojne smeše (m³/h), $Q_{G,D}$ protok vazduha pri vrednosti pritiska na izlazu iz membranskog modula (m³/h), P_S pritisak ispred membranskog modula (Pa), P_D pritisak iza membranskog modula (Pa), γ specifični odnos toplote za vazduh (vrednosti 1,4), J_P fluks permeata (l/(m²·h)) i A površinu membrane (m²).

Tabela 4.11. Eksperimentalni plan u fazi unakrsne mikrofiltracije kultivacionih tečnosti uz uduvanje vazduha u tok napojne smeše bez prisustva statičkog mešača: nezavisne promenljive i njihovi nivoi

Redni broj eksperimenta	Transmembranski pritisak (bar)	Prividna brzina proticanja napojne smeše V_L (m/s)	Prividna brzina proticanja vazduha V_G (m/s)
1	0,2	0,43	0,2
2	1	0,43	0,2
3	0,2	1,30	0,2
4	1	1,30	0,2
5	0,2	0,87	0
6	1	0,87	0
7	0,2	0,87	0,4
8	1	0,87	0,4
9	0,6	0,43	0
10	0,6	1,30	0
11	0,6	0,43	0,4
12	0,6	1,30	0,4
13	0,6	0,87	0,2
14	0,6	0,87	0,2
15	0,6	0,87	0,2

Tabela 4.12. Eksperimentalni plan u fazi unakrsne mikrofiltracije kultivacionih tečnosti uz uduvanje vazduha u tok napojne smeše uz prisustvo statičkog mešača: nezavisne promenljive i njihovi nivoi

Redni broj eksperimenta	Transmembranski pritisak (bar)	Prividna brzina proticanja napojne smeše V_L (m/s)	Prividna brzina proticanja vazduha V_G (m/s)
1	0,2	0,53	0,23
2	1	0,53	0,23
3	0,2	1,59	0,23
4	1	1,59	0,23
5	0,2	1,06	0
6	1	1,06	0
7	0,2	1,06	0,46
8	1	1,06	0,46
9	0,6	0,53	0
10	0,6	1,59	0
11	0,6	0,53	0,46
12	0,6	1,59	0,46
13	0,6	1,06	0,23
14	0,6	1,06	0,23
15	0,6	1,06	0,23

4.7. TESTIRANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI KULTIVACIONIH TEČNOSTI PROIZVODNOG MIKROORGANIZMA *IN PLANTA*

Za *in planta* testiranje antimikrobne aktivnosti kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma korišćene su sadnice paprike sorte Blankina dobijene od kompanije Grow rasad d.o.o. (Irig, Srbija), koja se bavi proizvodnjom sadnica različitih biljnih vrsta. Sadnice su imale po 11 pravih listova u momentu izvođenja eksperimenta.

Kao test mikroorganizmi u ovoj fazi istraživanja primenjeni su fitopatogeni izolati izolovani sa lista paprike: *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 1 i *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 2.

Proizvodnja kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma vršena je primenom hranljivih podloga optimizovanog sastava na bazi komercijalnog i sirovog glicerola, pod uslovima definisanim u tabeli 4.9. Testiranje antimikrobne aktivnosti vršeno je prema eksperimentalnom planu datom u tabeli 4.13.

Tabela 4.13. Eksperimentalni plan u fazi *in planta* testiranja antimikrobne aktivnosti kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma

Tip	Izolat <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	Tretman	Oznaka	Broj ponavljanja
Neinokulisana netretirana kontrola	-	-	1	dve sadnice
Inokulisana netretirana kontrola	PAP LIST 1	-	2a	dve sadnice
Inokulisana netretirana kontrola	PAP LIST 2	-	2b	dve sadnice
Inokulisana tretirana sadnica	PAP LIST 1	kultivaciona tečnost na bazi komercijalnog glicerola	3a	dve sadnice
Inokulisana tretirana sadnica	PAP LIST 2	kultivaciona tečnost na bazi komercijalnog glicerola	3b	dve sadnice
Inokulisana tretirana sadnica	PAP LIST 1	kultivaciona tečnost na bazi sirovog glicerola	4a	dve sadnice
Inokulisana tretirana sadnica	PAP LIST 2	kultivaciona tečnost na bazi sirovog glicerola	4b	dve sadnice

Tretman sadnica izvršen je potapanjem sadnica u kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma na bazi komercijalnog i sirovog glicerola 24 časa pre inokulacije sadnica fitopatogenim izolatima (preventivni tretman). Inokulacija sadnica fitopatogenim izolatima izvršena je primenom sterilnog šprica zapremine 5 ml pomoću koga je izvršeno nanošenje suspenzije fitopatogenih izolata na petom i šestom pravom listu sadnica, na prostoru između lisnih nerava. Sadnice su inkubirane odvojeno (prema eksperimentalnom planu) u prozirnim plastičnim kutijama na sobnoj temperaturi (25°C) tokom pet nedelja uz prisustvo sunčeve svetlosti i svakodnevno zalivanje i praćenje razvoja simptoma bakterijske pegavosti. Nakon pet nedelja, očitani su rezultati i izraženi kao procenat listova sa simptomima bakterijske pegavosti i pokrivenost površine listova nekrozom kao posledicom dejstva fitopatogena.

4.8. TESTIRANJE ŠIREG SPEKTRA ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI PROIZVODNOG MIKROORGANIZMA *Bacillus velezensis*

In vitro testiranje antimikrobne aktivnosti protiv fungalnih fitopatogena rodova *Fusarium* i *Colletotrichum* sprovedeno je metodom inkorporacije uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma u hranljivu podlogu PDA. Kultivaciona tečnost, dobijena po završetku kultivacije proizvodnog mikroorganizma pod definisanim uslovima (tabela 4.9.) primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola (tabela 4.7.), uneta je u prohladenu hranljivu podlogu (50±1°C) do konačne koncentracije u hranljivoj podlozi od 1%, (B1%), 2% (B2%), 5% (B5%) i 10% (B10%). Hranljiva podloga i uzorak kultivacione tečnosti su homogenizovani na magnetnoj mešalici, nakon čega je hranljiva podloga sa inkorporiranim agensom razlivena u Petri ploče. Po očvršćavanju hranljive podloge, u centar Petri ploče su zasejani kružni isečci micelijuma osveženih fitopatogenih

gljiva (poglavlje 4.1.5.) prečnika 3 mm. U kontrolnoj varijanti kultivaciona tečnost nije inkorporirana u hranljivu podlogu zasejanu fitopatogenim izolatima. Svaka kombinacija razblaženja uzorka kultivacione tečnosti i fitopatogenih izolata ispitivana je u tri ponavljanja. Nakon inkubacije na 25°C tokom sedam dana, izvršeno je merenje prečnika micelijuma fitopatogenih izolata.

Za *in vivo* testiranje šireg spektra delovanja protiv fitopatogenih gljiva korišćena je kultivaciona tečnost dobijena po završetku kultivacije proizvodnog mikroorganizma pod definisanim uslovima (tabela 4.9.) primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola (tabela 4.7.). Za potrebe ispitivanja antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma protiv fitopatogena roda *Colletotrichum in vivo* izabrana su dva izolata vrste *Colletotrichum acutatum* (314 i 107) izraženijih patogenih osobina na plodu jabuke. Kada je u pitanju *in vivo* testiranje antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma protiv fitopatogena roda *Fusarium*, testirana je antimikrobna aktivnost uzoraka kultivacione tečnosti protiv fitopatogenog izolata *Fusarium avenaceum* TAB12. Prilikom *in vivo* testiranja kultivaciona tečnost je razblažena u sterilnoj destilovanoj vodi do koncentracija koje su ispoljile najizraženiju antifungalnu aktivnost u oglecima *in vitro*, za sve testirane fitopatogene izolate. U ogledu su korišćeni plodovi jabuke sorti Greni Smit i Zlatni Delišes. Plodovi su površinski dezinfikovani, a zatim su na njima aseptično napravljeni ujednačeni otvori - prečnika 4 mm i dubine 3 mm. U svaki otvor je uneto po 10 µl uzorka kultivacione tečnosti odgovarajućeg razblaženja, a nakon 10 minuta unet je isečak micelijuma ispitivanih fitopatogenih izolata. Kao negativna kontrola korišćeni su netretirani plodovi jabuke inokulisani fitopatogenim izolatima. Nakon veštačke inokulacije, plodovi su stavljani u vlažnu komoru na inkubaciju u trajanju od 14 dana. Očitavanja su vršena nakon 14 dana, mernjem prečnika i dubine razvijene nekroze na plodovima. Ogled je postavljen u tri ponavljanja za svaku sortu, fitopatogeni izolat i koncentraciju uzorka kultivacione tečnosti.

4.9. STATISTIČKA OBRADA EKSPERIMENTALNIH PODATAKA

4.9.1. STATISTIČKA OBRADA EKSPERIMENTALNIH PODATAKA U FAZI SKRININGA POTENCIJALNIH PROIZVODNIH MIKROORGANIZAMA I ODABIRA OPTIMALNOG IZVORA UGLJENIKA I ORGANSKOG IZVORA AZOTA ZA PROIZVODNJU BOKONTROLNIH AGENASA

Testiranje hipoteze o homogenosti varijansi izvršeno je primenom Levenovog testa (*Levene's Test*), pri čemu ne bi trebalo da postoji statistički značajna razlika između varijansi testiranih parametara ($p > 0,05$). Nakon potvrde hipoteze o homogenosti varijansi, izvršena je jednofaktorijska analiza varijanse (*One-Way ANOVA*), kao i *post-hoc* testiranje primenom Dankanovog testa višestrukih poređenja (*Duncan's Multiple Range Test*). Na taj način su utvrđene homogene grupe srednjih vrednosti i nivoi značajnosti ispitivanih parametara. Sve statističke analize izvršene su pri nivou značajnosti od 0,05 primenom softverskog paketa Statistica 13.1 (Dell Inc., Round Rock, Teksas, SAD). Srednje vrednosti i standardne devijacije ispitivanih parametara izračunate su primenom softverskog paketa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, Vašington, SAD).

4.9.2. STATISTIČKA OBRADA EKSPERIMENTALNIH PODATAKA U FAZI MODELOVANJA SASTAVA HRANLJIVIH PODLOGA NA BAZI KOMERCIJALNOG I SIROVOG GLICEROLA

Modelovanje eksperimentalnih podataka u ovoj fazi istraživanja izvršeno je primenom metodologije odzivne površine (RSM – *Response Surface Methodology*). Dobijeni eksperimentalni podaci fitovani su polinomima drugog reda (jednačina 4.7.) sa ciljem dobijanja modela koji opisuju uticaj četiri nezavisne promenljive (inicijalna koncentracija glicerola – X_1 , inicijalna koncentracija ekstrakta kvasca – X_2 , inicijalna koncentracija

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - X_3$ i inicijalna koncentracija $\text{K}_2\text{HPO}_4 - X_4$) na zavisne promenljive (prečnik zona inhibicije – Y_1 , rezidualna koncentracija glicerola – Y_2 , rezidualna koncentracija ukupnog azota – Y_3 i rezidualna koncentracija ukupnog fosfora – Y_4). U datoj jednačini b_0 predstavlja odsečak, b_1, b_2, b_3 i b_4 linearne koeficijente, $b_{12}, b_{13}, b_{14}, b_{23}, b_{24}$ i b_{34} koeficijente interakcije, a b_{11}, b_{22}, b_{33} i b_{44} kvadratne koeficijente regresionog modela. Modelovanje je izvršeno zasebno za eksperimentalne podatke dobijene kultivacijom prozvodnog mikroorganizma primenom hranljivih podloga na bazi komercijalnog i sirovog glicerola.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{34}X_3X_4 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{44}X_4^2 \quad (4.7.)$$

Statistička značajnost koeficijenata regresionih modela procenjena je primenom njihovih p -vrednosti. Takođe je izvršena analiza varijanse dobijenih modela, sa ciljem procene kvaliteta fitovanja eksperimentalnih podataka dobijenim matematičkim jednačinama (primenom koeficijenta determinacije, R^2), kao i statističke značajnosti dobijenih modela primenom p -vrednosti i F-vrednosti. Svi statistički testovi vršeni su pri nivou značajnosti od 0,05 primenom softverskog paketa Statistica 13.1 (Dell Inc., Round Rock, Teksas, SAD). Osim toga, radi detaljnijeg ispitivanja uticaja interakcije nezavisnih promenljivih na prečnik zona inhibicije kao odziv koji neposredno ukazuje na stepen antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*, primenom istog softverskog paketa konstruisane su i odzivne površine, odnosno grafički prikazi uticaja dve nezavisne promenljive na jednu zavisnu promenljivu, pri čemu su vrednosti preostale dve nezavisne promenljive bile konstantne i uzimale su vrednosti iz centralne tačke eksperimentalnog dizajna.

4.9.3. STATISTIČKA OBRADA EKSPERIMENTALNIH PODATAKA U FAZI OPTIMIZACIJE SASTAVA HRANLJIVIH PODLOGA NA BAZI KOMERCIJALNOG I SIROVOG GLICEROLA

Nakon dobijanja matematičkih modela koji opisuju uticaj nezavisnih promenljivih (inicijalnih koncentracija glicerola, ekstrakta kvasca, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i K_2HPO_4) na zavisne promenljive (prečnike zona inhibicije i rezidualne koncentracije osnovnih nutrijenata – glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora), sledeći korak bila je optimizacija sastava hranljivih podloga na bazi komercijalnog i sirovog glicerola za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma, koja je izvršena primenom metode željene funkcije. Primena metoda željene funkcije podrazumeva dodeljivanje težinskih koeficijenata svakoj nezavisnoj i zavisnoj promenljivoj koja figuriše u matematičkom modelu, kao i postavljanje ciljeva optimizacije u smislu maksimizacije ili minimizacije određene nezavisne ili zavisne promenljive, ili održavanje njene vrednosti u zadatom opsegu. Prilikom optimizacije sastava hranljivih podloga na bazi komercijalnog i sirovog glicerola svim zavisnim i nezavisnim promenljivim dodeljeni su isti težinski koeficijenti, čime je osigurana podjednaka važnost svih ispitivanih promenljivih. U oba slučaja (prilikom optimizacije sastava hranljivih podloga na bazi komercijalnog i sirovog glicerola) izvršena su dva seta optimizacije, gde je prvi set imao za cilj maksimizaciju prečnika zona inhibicije, dok je drugi set pored tog cilja imao i dodatni cilj – minimizaciju rezidualnih koncentracija nutrijenata (glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora). Optimizacija sastava hranljivih podloga na bazi komercijalnog i sirovog glicerola za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma izvršena je primenom softverskog paketa Design-Expert 8.1 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, Minesota, SAD).

4.9.4. STATISTIČKA OBRADA EKSPERIMENTALNIH PODATAKA U FAZI UNAKRSNE MIKROFILTRACIJE KULTIVACIONE TEČNOSTI PROIZVODNOG MIKROORGANIZMA

Modelovanje prikupljenih eksperimentalnih podataka u fazi istraživanja koja se odnosi na eksperimente mikrofiltracije sa i bez prisustva Kenics statičkog mešača izvršeno je primenom metodologije odzivne površine nakon izvođenja eksperimenata mikrofiltracije

prema eksperimentalnom planu datom u tabeli 4.10. Kao nezavisne promenljive posmatrani su transmembranski pritisak i protok napojne smeše. Prilikom mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma bez prisustva statičkog mešača modelovan je samo jedan odziv – fluks permeata u stacionarnom stanju. Sa druge strane, prilikom mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma uz prisustvo statičkog mešača, pored fluksa permeata u stacionarnom stanju modelovana su još dva odziva - relativno povećanje fluksa permeata (FI (%), jednačina 4.2.) i smanjenje specifične potrošnje energije (ER (%), jednačina 4.5.). Dobijeni eksperimentalni podaci fitovani su polinomom drugog reda (jednačina 4.8.), gde b_0 predstavlja odsečak, b_1 i b_2 linearne koeficijente, b_{12} koeficijent interakcije, a b_{11} i b_{22} kvadratne koeficijente regresionog modela:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 \quad (4.8.)$$

Kada su u pitanju eksperimenti mikrofiltracije uz uduvavanje vazduha u tok napojne smeše sa i bez prisustva Kenics statičkog mešača, kao nezavisne promenljive posmatrani su transmembranski pritisak, prividna brzina proticanja napojne smeše (V_L) i prividna brzina proticanja vazduha (V_G) (tabela 4.11., 4.12.). U ovim eksperimentima modelovana su dva odziva - fluks permeata u stacionarnom stanju i specifična potrošnja energije. Dobijeni podaci takođe su fitovani polinomom drugog reda (jednačina 4.9.), gde b_0 predstavlja odsečak, b_1 , b_2 i b_3 linearne koeficijente, b_{12} , b_{13} i b_{23} koeficijente interakcije, a b_{11} , b_{22} i b_{33} kvadratne koeficijente regresionog modela:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 \quad (4.9.)$$

Kvalitet fitovanja eksperimentalnih podataka odabranim polinomskim jednačinama drugog reda procenjen je na osnovu koeficijenta determinacije, dok je statistička značajnost dobijenih modela procenjena na osnovu p -vrednosti. Statistička značajnost koeficijenata regresionih modela takođe je procenjena na osnovu p -vrednosti.

Prilikom optimizacije uslova unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma uz prisustvo statičkog mešača ciljevi optimizacije bili su maksimizacija fluksa permeata u stacionarnom stanju i maksimizacija smanjenja specifične potrošnje energije. Sa druge strane, prilikom optimizacije uslova unakrsne mikrofiltracije uz uduvavanje vazduha u tok napojne smeše sa i bez prisustva Kenics statičkog mešača kao ciljevi optimizacije postavljeni su maksimizacija fluksa permeata u stacionarnom stanju i minimizacija specifične potrošnje energije. Optimizacija je izvršena primenom metode željene funkcije u softverskom paketu Design-Expert 8.1 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, Minesota, SAD).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

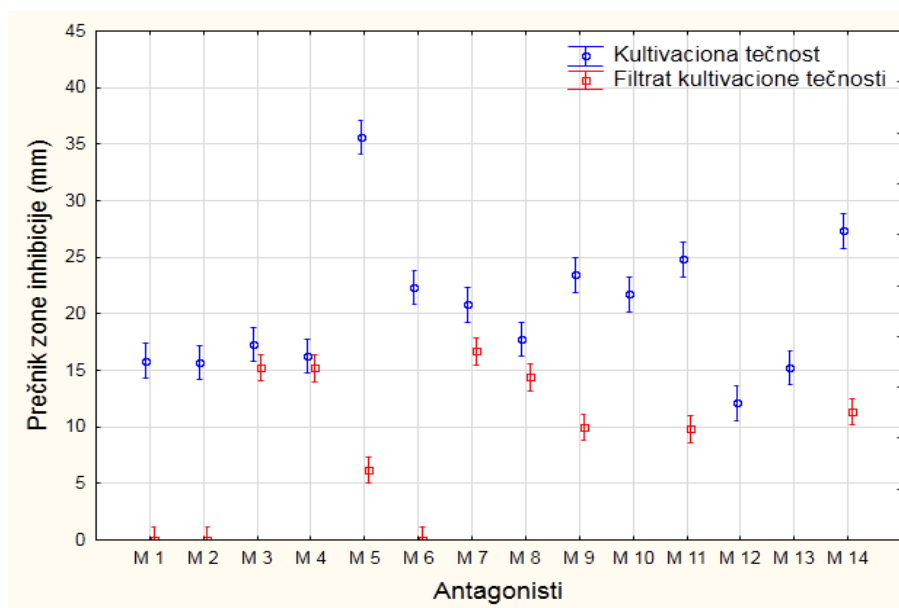
5.1. SKRINING POTENCIJALNIH PROIZVODNIH MIKROORGANIZAMA

Proizvodnja preparata za zaštitu bilja na bazi različitih mikroorganizama i njihovih metabolita privlači sve veću pažnju naučne i stručne javnosti u poslednjoj deceniji. Pošto mikroorganizmi predstavljaju gotovo neiscrpan izvor različitih bioaktivnih jedinjenja, ulažu se značajni napor u razvoj novih, efikasnijih preparata. Stoga se jedan deo istraživanja iz okvira ove doktorske disertacije bavi ispitivanjem mogućnosti primene različitih mikrobioloških agenasa za suzbijanje fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*. Sa ciljem odabira proizvodnog mikroorganizma koji pokazuje najizraženiju antagonističku aktivnost usmerenu ka mikrobiološkim izazivačima crne truleži kupusnjača i bakterijske pegavosti paradajza i paprike, kultivisano je ukupno 14 mikroorganizama iz grupe bakterija (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 - M 1, *Bacillus cereus* ATCC 10876 - M 2, *Bacillus amyloliquefaciens* - M 3, *Bacillus* sp. - M 4, *Bacillus velezensis* - M 5, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 - M 6, *Pseudomonas aeruginosa* - M 7, *Pseudomonas putida* - M 8, tri izolata roda *Lactobacillus* (M 9, M 10, M 11), *Streptomyces hygroscopicus* - M 12), kvasaca (*Saccharomyces cerevisiae* - M 13) i plesni (*Trichoderma reesei* QM 9414 - M 14) primenom tečnih hranljivih podloga odgovarajućeg sastava za podsticanje rasta ovih mikroorganizama (poglavlje 4.2.2.1.). Odabir potencijalnih antagonista vršen je na osnovu dostupnih literaturnih podataka o njihovoj antimikrobnoj aktivnosti i osobinama pogodnim za primenu u biološkoj kontroli. Bakterije roda *Bacillus* pokazuju najveći potencijal za primenu u poljoprivrednoj proizvodnji u svojstvu biokontrolnih agenasa, naročito kada je u pitanju biološka kontrola crne truleži kupusnjača (Földes i sar., 2000; Luna i sar., 2002; Wulff i sar., 2003; Massomo i sar., 2004b; Monteiro i sar., 2005). Sposobnost obrazovanja endospora predstavlja jednu od poželjnih karakteristika za ovaj tip primene zbog njihove visoke otpornosti prema visokim temperaturama, isušivanju, UV zračenju i organskim rastvaračima, koja takođe obezbeđuje bolje preživljavanje i viši stepen vijabilnosti u poređenju sa vegetativnim ćelijama, što umnogome olakšava formulaciju preparata za primenu u poljoprivredi (Monteiro i sar., 2005). Jedna od najvažnijih karakteristika bakterija ovog roda je sposobnost proizvodnje širokog spektra antibiotika i drugih metabolita sa izraženom antimikrobnom aktivnošću protiv fungalnih i bakterijskih fitopatogena (Wulff i sar., 2002a). Vrste roda *Bacillus* najčešće se mogu pronaći u zemljištu, rizosferi i filosferi, što ukazuje na njihovu prilagođenost uslovima u kojima bi trebalo da budu primenjene kao biokontrolni agensi (Nikolić i sar., 2013). Bakterije ovog roda su takođe poznate po sposobnosti podsticanja rasta biljaka i sposobnosti endofitne kolonizacije biljaka, što predstavlja važnu osobinu biokontrolnih agenasa kada je u pitanju biološka kontrola vaskularnih biljnih patogena (Wulff i sar., 2002a). Među vrstama roda *Bacillus* kao biokontrolni agensi najčešće su korišćene vrste *Bacillus subtilis* (Wulff i sar., 2002b; Etcheagaray i sar., 2008), *Bacillus amyloliquefaciens* i *Bacillus pumilis* (Wulff i sar., 2002a). Vrste roda *Pseudomonas* takođe predstavljaju pogodne kandidate za biološku kontrolu (Mishra i Arora, 2012). Bakterije ovog roda proizvode nekolicinu bioaktivnih metabolita, među kojima su antibiotici, siderofore i isparljiva jedinjenja (Spago i sar., 2014). Predloženo je nekoliko mehanizama kojima bakterije roda *Pseudomonas* podstiču rast biljaka: stimulacija usvajanja nutrijenata, proizvodnja fitohormona, antagonistička aktivnost protiv fitopatogena i indukcija systemske rezistencije (Shivalingaiah i Umeha, 2013). Vrste roda *Lactobacillus* razmatrane su kao biokontrolni agensi zahvaljujući sposobnosti produkcije različitih antimikrobnih jedinjenja, kao što su peptidi sa antimikrobnim delovanjem, među kojima se nalaze i bakteriocini, organske kiseline i vodonik peroksid (Pia Arena i sar., 2016). Zahvaljujući GRAS (*Generally Regarded As Safe*) statusu, bakterije ovog roda zadovoljavaju sve zahteve koji se postavljaju pred mikroorganizme namenjene primeni u prehrambenoj industriji i poljoprivredi (Trias i sar., 2008). Nekoliko mlečnokiselinskih

bakterija je ispitano za primenu u biološkoj kontroli fitopatogena *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Trias i sar., 2008; Visser i sar., 2008). Streptomicete takođe predstavljaju značajne kandidate za biološku kontrolu fitopatogenih bakterija (Deivamani i Muthamilan, 2015), pre svega zbog sposobnosti proizvodnje velikog broja različitih metabolita, enzima i antibiotika sa antagonističkim delovanjem protiv različitih mikrobioloških patogena (Sadhasivam i sar., 2010; Atta i Reyad, 2013). Kada je u pitanju biološka kontrola crne truleži kupusnjača, takođe su i neke vrste kvasaca ispitane kao potencijalni biokontrolni agensi (Assis i sar., 1999). Rod *Trichoderma* čine hemibiotrofne plesni, čije osnovne osobine pogodne za primenu u biološkoj kontroli čine antagonizam ili mikoparazitizam protiv različitih fitopatogena, kao i indukcija sistemske ili lokalne rezistentnosti kod biljaka (Fontanelle i sar., 2011). Osim toga, plesni roda *Trichoderma* proizvode preko 40 metabolita koji učestvuju u interakciji biljaka i mikroorganizama, kao i u suzbijanju fitopatogena (Ortuño i sar., 2016). *Trichoderma viride* (Deivamani i Muthamilan, 2015) i *Trichoderma harzianum* (Nikolić i sar., 2013) su ispitane kao biokontrolni agensi protiv fitopatogena *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Nakon završetka kultivacije, dobijene kultivacione tečnosti 14 mikroorganizama i njihovi filtrati, kao i komercijalni antibiogram diskovi koji sadrže streptomycin, testirani su protiv 12 fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*. Eksperimentalni podaci su analizirani primenom nekoliko statističkih testova sa ciljem odabira najefikasnijeg agensa za biološku kontrolu fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*. Rezultati Levenovog testa za prečnike zona inhibicije dobijene testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti, kao i filtrata, pokazali su da ne postoje statistički značajne razlike između ponovljenih merenja ($p=0,9971$).

Uzimajući u obzir da antagonistički efekat može da potiče i od ćelija mikroorganizama i od njihovih metabolita, vršeno je poređenje prečnika zona inhibicije koji nastaju testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti i filtrata kultivacionih tečnosti ispitivanih mikroorganizama (slika 5.1.). Filtracija je vršena primenom filtera od najlona prečnika pora 0,22 μm , sa ciljem uklanjanja biomase proizvodnih mikroorganizama i dobijanja filtrata koji sadrže ostatke hranljive podloge i proizvedene ekstracelularne metabolite, kako bi se ispitala razlika između antimikrobnog delovanja ovih jedinjenja i delovanja uzoraka kultivacionih tečnosti, koje osim ostataka podloge i ekstracelularnih metabolita sadrže i biomasu proizvodnih mikroorganizama.



Slika 5.1. Prečnici zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti i filtrata kultivacionih tečnosti 14 potencijalnih proizvodnih mikroorganizama protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*

Filtrati dobijeni filtracijom kultivacionih tečnosti proizvodnih mikroorganizama *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (M 1), *Bacillus cereus* (M 2), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (M 6), *Lactobacillus* sp. (M 10), *Streptomyces hygroscopicus* (M 12) i *Saccharomyces cerevisiae* (M 13) nisu pokazali antimikrobnu aktivnost protiv testiranih fitopatogenih izolata, što ukazuje da je aktivna komponenta koja deluje protiv fitopatogena biomasa proizvodnih mikroorganizama. Monteiro i sar. (2005) i Issazadeh i sar. (2012) su dokazali antimikrobnu aktivnost kultivacionih tečnosti mikroorganizama *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus*, redom, protiv fitopatogenih sojeva *Xanthomonas campestris*, dok u istraživanju koje su sproveli Földes i sar. (2000) proizvodni mikroorganizam *Bacillus subtilis* IFS-01 nije pokazao antimikrobnu aktivnost protiv izolata *Xanthomonas campestris*. Istraživanje antimikrobne aktivnosti sojeva *Pseudomonas aeruginosa* pokazalo je da su bioaktivni agensi efikasni protiv *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Mishra i Arora, 2012), *Xanthomonas citri* pv. *citri* (de Oliveira i sar., 2011; de Oliveira i sar., 2016) i *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (da Silva Vasconcellos i sar., 2014) metaboliti sadržani u filtratu oslobođenom biomase ili supernatantu kultivacione tečnosti, što je u suprotnosti sa rezultatima ovog istraživanja. Takođe, ispitivana je i antimikrobna aktivnosti različitih sojeva roda *Lactobacillus* protiv fitopatogenih sojeva roda *Xanthomonas*. Rezultati koje su dobili Visser i sar. (2008) ukazuju na antagonističko delovanje kultivacionih tečnosti različitih vrsta roda *Lactobacillus* protiv *Xanthomonas campestris* i *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. Sa druge strane, Kannan i sar. (2014) i Emerenini i sar. (2014) su dokazali antimikrobnu aktivnost ekstracelularnih bioaktivnih jedinjenja sojeva roda *Lactobacillus* i vrste *Lactobacillus plantarum*, redom, protiv sojeva *Xanthomonas campestris*. Encheva-Malinova i sar. (2014) i Hata i sar. (2015) su dokazali antimikrobnu aktivnost kultivacionih tečnosti različitih izolata roda *Streptomyces* protiv nekoliko vrsta roda *Xanthomonas*, dok su Encheva-Malinova i sar. (2015) dokazali antimikrobnu aktivnost bioaktivnih metabolita dobijenih filtracijom različitih izolata roda *Streptomyces* protiv sojeva *Xanthomonas euvesicatoria* i *Xanthomonas gardneri*. Takođe je dokazano da biomasa plesni *Trichoderma harzianum* suzbija rast *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Nikolić i sar., 2013), dok su Deivamani i Muthamilan (2015) dokazali antagonističko delovanje spora različitih vrsta roda *Trichoderma* protiv fitopatogena koji izazivaju crnu trulež kupusnjača. Isti autori su dokazali antagonističko delovanje mikroorganizma *Saccharomyces cerevisiae* protiv *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Deivamani i Muthamilan, 2015).

Filtrati kultivacionih tečnosti dobijenih filtracijom preostalih antagonista u ovom istraživanju pokazali su određeni nivo antimikrobne aktivnosti protiv testiranih fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, ali u slučaju svakog ispitanog mikroorganizma prečnici zona inhibicije dobijeni testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti bili su veći od onih dobijenih testiranjem filtrata kultivacionih tečnosti. Statistička analiza prikazanih rezultata pokazala je da samo kod proizvodnog mikroorganizma M 4 (*Bacillus* sp.) ne postoji statistički značajna razlika između prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem antimikrobne aktivnosti uzorka kultivacione tečnosti i filtrata ($p=0,2919$). Ovi rezultati ukazuju da je bioaktivni agens u ovom slučaju antimikrobni metabolit sintetisan od strane proizvodnog mikroorganizma *Bacillus* sp. Sa druge strane, proizvodni mikroorganizmi *Bacillus* spp. (M 3, M 5), *Pseudomonas aeruginosa* izolovan iz vode (M 7), *Pseudomonas putida* (M 8), *Lactobacillus* spp. (M 9, M 11) i *Trichoderma reesei* QM 9414 (M 14) pokazali su znatno veće prečnike zona inhibicije kada su primenjeni u vidu nefiltrirane kultivacione tečnosti, što je potvrđeno sledećim p -vrednostima u poređenju sa uzorcima filtrata kultivacionih tečnosti: 0.0023, 0.0956, 0.0051, 0.0182, 0.0000, 0.0000 i 0.0039, redom. Veći prečnici zona inhibicije dobijeni testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti ukazuju da najveći deo antimikrobne aktivnosti protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* potiče od biomase proizvodnih mikroorganizama.

Nakon što je dokazano da je antimikrobna aktivnost uzoraka kultivacionih tečnosti znatno viša u poređenju sa aktivnošću filtrata kultivacionih tečnosti kod svakog proizvodnog mikroorganizma, primenjena je jednofaktorijalna analiza varijanse sa ciljem procene statističke značajnosti razlika u dobijenim prečnicima zona inhibicije među ispitivanim antagonistima. Dobijena p -vrednost (tabela 5.1.) ukazuje da između ispitivanih proizvodnih

mikroorganizama postoji statistički značajna razlika kada su u pitanju dobijeni prečnici zona inhibicije protiv testiranih izolata roda *Xanthomonas*.

Tabela 5.1. Jednofaktorijalna analiza varijanse prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti potencijalnih proizvodnih mikroorganizama protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*

Izvor varijabilnosti	SS	DF	MS	F-vrednost	p-vrednost
Odsečak	145458,29	1	145458,29	11714,01	0,0000
Antagonist	15009,47	14	1072,11	86,34	0,0000
Greška	3725,24	300	12,42	-	-

Homogene grupe proizvodnih mikroorganizama na osnovu statističke značajnosti razlika u dobijenim prečnicima zona inhibicije ustanovljeni su primenom Dankanovog testa višestrukog poređenja (tabela 5.2.).

Tabela 5.2. Srednje vrednosti prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti potencijalnih proizvodnih mikroorganizama protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*

Antagonist	Prečnik zone inhibicije (mm)
M 12	12,10±3,28 ^a
M 13	15,24±3,40 ^b
M 2	15,67±3,32 ^{bc}
M 1	15,86±3,31 ^{bc}
M 4	16,29±3,49 ^{bc}
M 3	17,29±3,36 ^{bc}
M 8	17,76±3,85 ^c
M 7	20,81±3,72 ^d
M 10	21,71±3,48 ^{de}
M 6	22,33±3,29 ^{de}
M 9	23,43±3,44 ^{ef}
M 11	24,81±3,72 ^f
M 14	27,33±3,80 ^g
M 5	35,62±3,76 ^h
K	36,10±3,53 ^h

Vrednosti označene istim slovima nalaze se na istom nivou statističke značajnosti sa intervalom poverenja od 95% (Dankanov test); K – komercijalni diskovi sa streptomycinom

Rezultati prikazani u tabeli 5.2. ukazuju da kultivacione tečnosti svih prikazanih antagonista pokazuju antimikrobnu aktivnost protiv testiranih fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* i da se uočava statistički značajna razlika među njihovim antimikrobnim aktivnostima. Proizvodni mikroorganizam koji je pokazao najslabiju antimikrobnu aktivnost (najmanji prečnik zone inhibicije) protiv testiranih fitopatogena bio je izolat *Streptomyces hygroscopicus* (M 12), dok se kao najbolji proizvodni mikroorganizam u ovom testiranju pokazao soj *Bacillus* sp. (M 5), koji je ispoljio najveći potencijal za suzbijanje infekcija biljaka izazvanih fitopatogenim sojevima roda *Xanthomonas*. Osim toga, prikazani rezultati ukazuju da ne postoji statistički značajna razlika između antimikrobne aktivnosti ovog mikroorganizma i baktericidne aktivnosti antibiogram diskova sa streptomycinom (K), koji su korišćeni kao kontrola ($p=0,6615$). Ova činjenica ukazuje na veoma značajan potencijal izolata *Bacillus* sp. za primenu u biološkoj kontroli bolesti biljaka izazvanih fitopatogenim sojevima roda *Xanthomonas*.

5.2. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA ODABRANOG PROIZVODNOG MIKROORGANIZMA

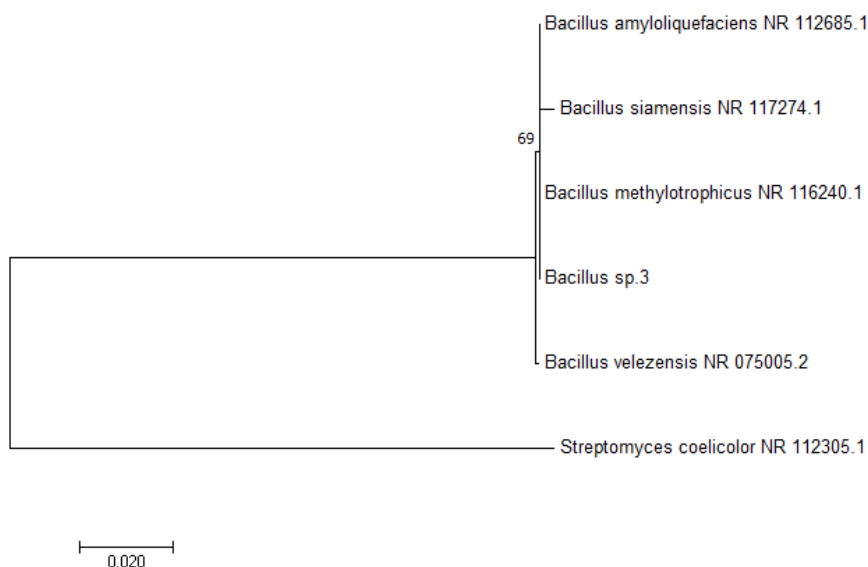
Molekularna identifikacija proizvodnog mikroorganizma izvršena je umnožavanjem gena za 16S rRNK primenom lančane reakcije polimeraze (PCR) i njegovim sekvenciranjem. Dobijena sekvenca gena za 16S rRNK sastojala se od 1336 nukleotida i prvo je izvršeno njeno poravnanje sa najbližim deponovanim sekvencama primenom BLAST softvera uz pretragu dostupnih sekvenci u bazi podataka NCBI servera. Poravnanje ispitivane sekvence gena za 16S rRNK proizvodnog mikroorganizma otkrilo je najveći stepen sličnosti sa vrstom *Bacillus velezensis* (100% pokrivenost upita, 99% homologije) (tabela 5.3.).

Tabela 5.3. Rezultati poravnanja sekvenci primenom BLAST softvera preko NCBI servera prilikom molekularne identifikacije proizvodnog mikroorganizma

Sekvenca	Broj nukleotida	Broj poklapanja nukleotida	Pokrivenost upita (%)	Homologija (%)	Pristupni broj sekvence
<i>Bacillus velezensis</i> FZB42, 16S rRNK, kompletna sekvenca	1336	1336	100	99	NR075005.2
<i>Bacillus methylotrophicus</i> CBMB205, 16S rRNK, parcijalna sekvenca	1332	1332	100	99	NR116240.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NBRC 15535, 16S rRNK, parcijalna sekvenca	1332	1332	100	99	NR112685.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MPA 1034, 16S rRNK, parcijalna sekvenca	1330	1330	100	99	NR117946.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BCRC 11601, 16S rRNK, parcijalna sekvenca	1330	1330	100	99	NR116022.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NBRC 15535, 16S rRNK, parcijalna sekvenca	1330	1330	100	99	NR041455.1
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168, 16S rRNK, kompletna sekvenca	1325	1325	100	99	NR102783.2
<i>Bacillus siamensis</i> PD-A10, 16S rRNK, parcijalna sekvenca	1325	1325	100	99	NR117274.1
<i>Bacillus atrophaeus</i> NRRL NRS-213, 16S rRNK, parcijalna sekvenca	1325	1325	100	99	NR116190.1
<i>Bacillus atrophaeus</i> NBRC 15539, 16S rRNK, parcijalna sekvenca	1325	1325	100	99	NR112723.1
<i>Bacillus atrophaeus</i> JCM 9070, 16S rRNK, parcijalna sekvenca	1325	1325	100	99	NR024589.1
<i>Bacillus nakamurai</i> NRLLB-41091, 16S rRNK, parcijalna sekvenca	1319	1319	100	99	NR151897.1

Evoluciona istorija je izvedena primenom *Maximum Likelihood* metoda, koji predstavlja uobičajeni statistički metod za procenu nepoznatih parametara modela verovatnoće i koji se zasniva na Tamura-Nei modelu (Tamura i Nei, 1993). Na slici 5.2. prikazano je filogenetsko

stablo sa najvećom log vrednošću verovatnoće. Inicijalna filogenetska stabla za heurističku pretragu su dobijena automatski, primenom *Neighbor-Join* i *BioNJ* algoritama na matricu parova distanci korišćenjem *Maximum Composite Likelihood* pristupa, nakon čega je odabrana topologija stabla sa superiornom log vrednošću verovatnoće. Evolucionarna distanca, odnosno dužina grana na prikazanoj slici, merena je brojem razlika u redosledu nukleotida po nukleotidnom mestu u odnosu na ukupan broj nukleotida, kada se posmatraju poravnate sekvence. Analiza je uključivala šest sekvenci nukleotida. Ispitivana sekvenca gena za 16S rRNK proizvodnog mikroorganizma sadržala je 661 poziciju, nakon isključivanja praznina i podataka koji nedostaju. Evolucionarna analiza izvedena je primenom softvera MEGA 7 (Kumar i sar., 2016). Rezultati filogenetske analize su potvrdili da je proizvodni mikroorganizam korišćen u okviru ove doktorske disertaciji po filogenetskoj sličnosti najrodniji soju *Bacillus velezensis* NR 075005.2, čime je potvrđena pripadnost proizvodnog mikroorganizma vrsti *Bacillus velezensis*.



Slika 5.2. Filogenetsko stablo proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*

5.3. ODABIR OPTIMALNOG IZVORA UGLJENIKA I ORGANSKOG IZVORA AZOTA

Nakon odabira proizvodnog mikroorganizma sa najizraženijim antagonističkim delovanjem protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* i njegove identifikacije kao *Bacillus velezensis*, naredni korak u razvoju bioprocasa predstavlja formulacija sastava hranjive podloge za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma sa ciljem proizvodnje biokontrolnih agenasa, odnosno umožavanja biomase proizvodnog mikroorganizma u ovom slučaju. Početni korak formulacije sastava hranljivih podloga u biotehnoškim procesima prestavlja odabir izvora ugljenika, azota i fosfora kao osnovnih nutrijenata neophodnih mikroorganizmima za rast i umnožavanje biomase, kao i sintezu primarnih i sekundarnih metabolita. Pošto je na samom početku neophodno definisati osnovu za formulaciju sastava hranjive podloge, s obzirom na cilj suzbijanja fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* u ovom slučaju kao osnova hranjive podloge uzeta je hranljiva podloga koja favorizuje rast bakterija roda *Xanthomonas* sledećeg sastava: izvor ugljenika 15 g/l, organski izvor azota 3 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 g/l, K_2HPO_4 3 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g/l (Dodić i Grahovac, 2013). S obzirom na to da su $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kao neorganski izvor azota i K_2HPO_4 kao izvor fosfora, kao i $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, često korišćene komponente (neorganske soli) u hranljivim podlogama za kultivaciju mikroorganizama, između ostalih i bakterija roda *Bacillus* (Moghannem i sar.,

2018; Zhu i sar., 2018; Ye i sar., 2018), kao cilj ovog dela istraživanja postavljena je formulacija sastava hranljive podloge za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u pogledu odabira izvora ugljenika i organskog izvora azota koji favorizuju rast proizvodnog mikroorganizma, kao i povećanje antimikrobne aktivnosti protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*. Prilikom odabira izvora ovih nutrijenata kao drugi parametar razmatrana je i mogućnost smanjenja troškova pripreme hranljive podloge. Stoga je izbor izvora ugljenika sveden na nutrijente koji se najčešće mogu sresti kao dominantne organske komponente različitih industrijskih otpadnih tokova (glukoza – otpadne tokovi prerade voća i povrća, kao i proizvodnje vina; saharoza – otpadni tokovi prerade šećerne repe i konditorske industrije; laktoza – otpadni tokovi industrije mleka i mlečnih proizvoda; skrob – otpadni tokovi industrije brašna i pekarskih proizvoda, kao i prerade krompira; glicerol – otpadni tok proizvodnje biodizela), sa ciljem procene potencijala primene različitih industrijskih otpadnih tokova u proizvodnji biokontrolnih agenasa.

Industrijski otpadni tokovi sa visokim sadržajem glukoze korišćeni su za proizvodnju biosurfaktanata primenom proizvodnog mikroorganizma *Bacillus subtilis* (Secato i sar., 2016). Saharozu predstavlja osnovnu komponentu melase, koja nastaje kao sporedni proizvod industrije šećera nastalog preradom šećerne repe ili šećerne trske. Kaleem i sar. (2000) su koristili melasu kao izvor ugljenika za proizvodnju antimikrobnih agenasa od strane proizvodnog mikroorganizma *Bacillus subtilis*. Melasa nastala preradom šećerne trske korišćena je u proizvodnji polihidroksibutirata (PHB) od strane proizvodnog mikroorganizma *Bacillus megaterium* (Gouda i sar., 2001), dok je otpadna voda iz industrije šećera takođe korišćena kao supstrat za proizvodnju poli- β -hidroksibutirata od strane *Bacillus subtilis* NG220 (Singh i sar., 2013). Melasa je korišćena kao komponenta kultivacionog medijuma za proizvodnju biosurfaktanata primenom različitih sojeva roda *Bacillus* (Saimmai i sar., 2011; Al-Bahry i sar., 2013). Peighami-Ashnaei i sar. (2009) su ispitivali potencijal za biološku kontrolu soja *Bacillus subtilis* B-3 kultivisanog primenom hranljive podloge koja sadrži melasu. Płaza i sar. (2012) su istraživali antifungalnu aktivnost različitih sojeva roda *Bacillus* kultivisanih na hranljivim podlogama koje sadrže različite vrste agro-industrijskog otpada, uključujući i melasu. Sa druge strane, Sousa i sar. (2014) su ispitivali potencijal melase, među nekoliko drugih izvora ugljenika, za umnožavanje biomase *Bacillus* sp. RAB9. Moraes i sar. (2012) su koristili hranljivu podlogu na bazi melase za proizvodnju poli- γ -glutaminske kiseline primenom *Bacillus velezensis*. Laktoza se uglavnom može pronaći u otpadnim tokovima industrije mleka i mlečnih proizvoda. Gomaa (2013) je ispitivao antimikrobnu aktivnost biosurfaktanta proizvedenog od strane proizvodnog mikroorganizma *Bacillus licheniformis* M104 primenom surutke kao osnove kultivacionog medijuma. Skrob čini osnovnu komponentu otpadnih tokova prerade žitarica, kasave i krompira. Otpadna voda iz prerade kasave se pokazala kao pogodan kultivacioni medijum za proizvodnju biosurfaktanata od strane proizvodnog mikroorganizma *Bacillus subtilis* (Nitschke i Pastore, 2006), dok je sporedni proizvod prerade kasave korišćen za proizvodnju polihidroksialkanoata od strane *Bacillus* sp. (Krueger i sar., 2012). Kukuruzni skrob je korišćen kao izvor ugljenika za proizvodnju β -amilaze od strane nekoliko sojeva roda *Bacillus* (Ajayi i Fagade, 2003), dok je otpadna voda iz proizvodnje skroba korišćena za proizvodnju Bt (*Bacillus thuringiensis*) biopesticida (Chang i sar., 2008). Otpadna voda koja sadrži skrob iz prerade slatkog krompira se takođe pokazala kao pogodan supstrat za proizvodnju mikrobiološkog đubriva na bazi *Bacillus amyloliquefaciens* (Zhou i sar., 2012). Sirovi glicerol nastaje u značajnim količinama kao dominantni nusproizvod rastuće industrije biodizela, zbog čega se javlja potreba za njegovom mikrobiološkom konverzijom u različite proizvode sa dodatom vrednošću primenom različitih mikroorganizama (Li i Lesnik, 2013). Sirovi glicerol iz proizvodnje biodizela je do sada ispitan kao izvor ugljenika u hranljivim podlogama za proizvodnju biosurfaktanata od strane *Bacillus subtilis* TD4 (Saimmai i sar., 2012), *Bacillus* sp. (Sousa i sar., 2012) i *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (de Sousa i sar., 2014).

Sa druge strane, na osnovu literaturnih podataka o sastavu hranljivih podloga za kultivaciju bakterija roda *Bacillus*, kao potencijalni organski izvori azota odabrani su ekstrakt kvasca (Moghannem i sar., 2018; Ye i sar., 2018; Zhu i sar., 2018), pepton (Liu i sar., 2010;

Moghannem i sar., 2018; Zhu i sar., 2018), sojino brašno (Liu i sar., 2010), urea (Moraes i sar., 2012) i L-glutaminska kiselina (Al-Ali i sar., 2018; Chen i sar., 2018).

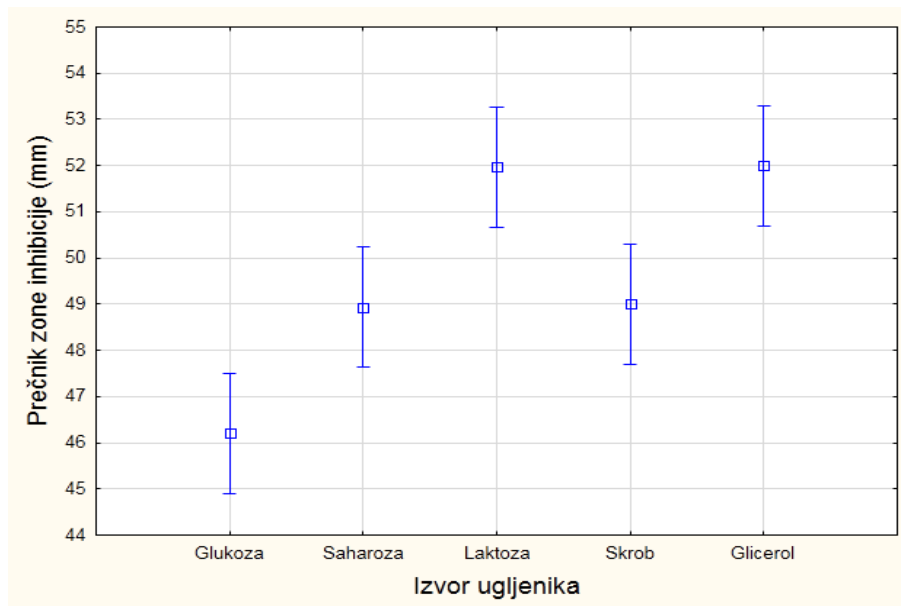
Kultivacija proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* izvršena je primenom 25 hranljivih podloga koje su sadržale različite kombinacije izvora ugljenika i organskog izvora azota, pri čemu je u svakoj hranljivoj podlozi bila prisutna ista koncentracija izvora ugljenika i organskog izvora azota, kao i ostalih komponenata ((NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄ i MgSO₄·7H₂O) (poglavlje 4.2.2.2.). Nakon završetka kultivacije, antimikrobna aktivnost uzoraka kultivacionih tečnosti testirana je primenom disk-difuzione metode protiv 12 fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* korišćenih i u prethodnoj fazi istraživanja. Kao i u prethodnoj fazi istraživanja, kao odziv koji reprezentuje antimikrobnu aktivnost proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* korišćen je prečnik dobijenih zona inhibicije.

Dvofaktorijalna analiza varijanse prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* izvršena je ciljem utvrđivanja statističke značajnosti uticaja primenjenih izvora ugljenika, organskih izvora azota, kao i njihove kombinacije u hranljivim podlogama na antimikrobnu aktivnost proizvodnog mikroorganizma (tabela 5.4.). Analiza je vršena pri nivou značajnosti od 95%. Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse pokazali su da izvor ugljenika, organski izvor azota, kao i njihova kombinacija imaju statistički značajan uticaj na prečnik zone inhibicije, odnosno antimikrobnu aktivnost proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, uz *p*-vrednosti manje od 0,05 u sva tri slučaja (tabela 5.4.).

Tabela 5.4. Dvofaktorijalna analiza varijanse prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*

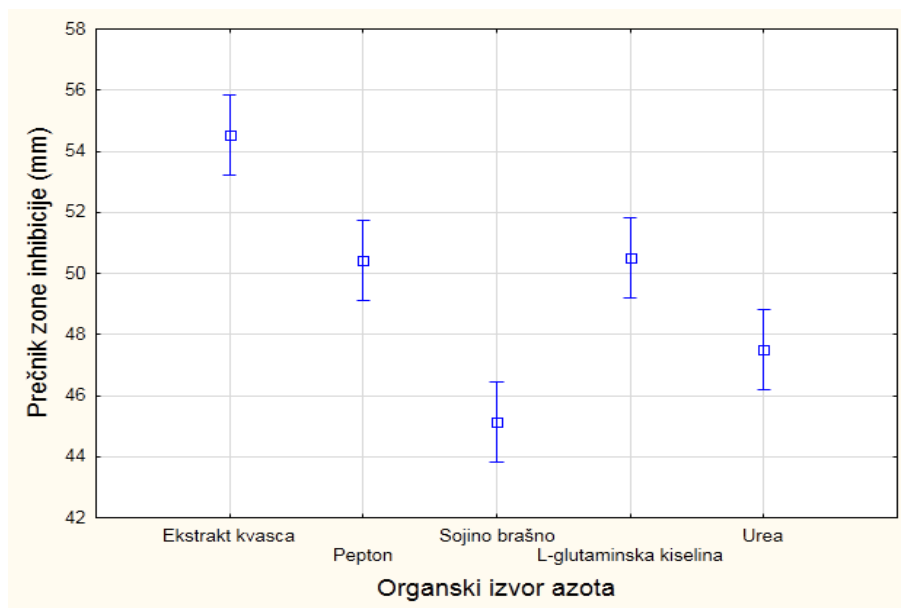
Izvor varijabilnosti	SS	DF	MS	F-vrednost	<i>p</i> -vrednost
Odsečak	216223,05	1	52883,08	75426,65	0,0000
Izvor ugljenika	813,81	4	203,45	70,97	0,0000
Organski izvor azota	970,21	4	242,55	84,61	0,0000
Izvor ugljenika*Organski izvor azota	964,59	16	60,29	21,03	0,0000
Greška	143,33	50	2,87	-	-

Nakon dvofaktorijalne analize, primenom softverskog paketa Statistica 13.1 (Dell Inc., Round Rock, Teksas, SAD) generisani su grafici na kojima su prikazane srednje vrednosti prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* koje sadrže različite izvore ugljenika (slika 5.3.) i organske izvore azota (slika 5.4.) protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*. Najveći prečnici zona inhibicije protiv testiranih fitopatogenih izolata dobijeni su kada su kao izvori ugljenika korišćeni laktoza i glicerol (slika 5.3.). Sa druge strane, primena glukoze kao izvora ugljenika u hranljivoj podlozi, kao najšire primenjivanog nutrijenta čije usvajanje preferira najveći broj mikroorganizama, rezultovala je najmanjim prečnicima zona inhibicije.



Slika 5.3. Srednja vrednost prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* koje sadrže različite izvore ugljenika protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*

Kada su u pitanju ispitivani organski izvori azota u hranljivim podlogama, najveći prečnici zona inhibicije dobijeni su primenom ekstrakta kvasca, koga prate pepton i L-glutaminska kiselina, dok je najbolji rezultat u pogledu antimikrobne aktivnosti dobijen kada je kao organski izvor azota u hranljivoj podlozi korišćeno sojino brašno (slika 5.4.). Uzimajući u obzir da su aminokiselina poželjan organski izvor azota za većinu vrsta roda *Bacillus*, ekstrakt kvasca, koji sadrži značajnu količinu različitih aminokiselina, kao i pepton, koji pored aminokiselina sadrži i peptide (Harwood i Stephenson, 1999), i u ovom slučaju su se pokazali pogodnim za primenu u hranljivoj podlozi za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*. Iako se ekstrakt kvasca smatra relativno skupim nutrijentom za primenu u mikrobiološkim procesima, dalja optimizacija sastava hranljive podloge u pogledu sadržaja nutrijenata trebala bi da utvrdi zahtevanu količinu ovog nutrijenta, kao i isplativost njegove primene kao komponente kultivacionog medijuma. Osim toga, primena kompleksnih izvora ugljenika, kao što su otpadne vode industrije mleka i mlečnih proizvoda i melasa, potencijalno bi mogla da zadovolji nutritivne zahteve proizvodnog mikroorganizma u pogledu aminokiselina, stoga bi rezultati optimizacije sastava ovakvog medijuma mogli da ukažu na potrebu za primenom ekstrakta kvasca u veoma niskim koncentracijama. Sojino brašno, iako ekonomski najisplativiji organski izvor azota za primenu u mikrobiološkim procesima, se u ovom slučaju pokazalo kao najmanje pogodno rešenje za proizvodnju biokontrolnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, ukazujući na nizak afinitet proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* ka metabolisanju ovog izvora azota.



Slika 5.4. Srednja vrednost prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* koje sadrže različite organske izvore azota protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*

Sa ciljem ispitivanja uticaja interakcije izvora ugljenika i organskog izvora azota u hranljivoj podlozi na antimikrobnu aktivnost, izvršen je Dankanov test višestrukih poređenja, gde su formirane homogene grupe istih nivoa statističke značajnosti (tabela 5.5.). Poređenjem različitih kombinacija izvora ugljenika i organskog izvora azota u hranljivim podlogama može se zaključiti da su najveći prečnici zona inhibicije dobijeni pri korišćenju sledećih kombinacija: glicerol - ekstrakt kvasca, laktoza - pepton i saharoza – ekstrakt kvasca, pri čemu se sve tri kombinacije nalaze na istom nivou statističke značajnosti, što ukazuje da se bilo koja od ove tri kombinacije nutrijenata može iskoristiti za proizvodnju biokontrolnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* primenom proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*. Ovi rezultati takođe ukazuju na potencijal otpadnih tokova proizvodnje šećera i konditorske industrije, otpadnih tokova industrije mleka i mlečnih proizvoda, kao i sirovog glicerola koji potiče iz proizvodnje biodizela za proizvodnju biokontrolnih agenasa kao proizvoda sa dodatom vrednošću. S obzirom na to da sposobnost metabolisanja laktoze kao izvora ugljenika nije uobičajena karakteristika među mikroorganizmima usled odsustva enzimskog aparata za raskidanje β -1 \rightarrow 4 glikozidne veze (Sumithra i sar., 2016), mogućnost iskorišćenja otpadnih tokova industrije mleka i mlečnih proizvoda je stoga limitirana kada je u pitanju biotehnoška proizvodnja. Uzimajući u obzir da se tokom proizvodnje mleka generiše jedan litar otpadne vode po jednom litru proizvedenog mleka (Priyadharshini i Kumar, 2016), sposobnost proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* da metaboliše laktozu kao izvor ugljenika otvara novo poglavlje mogućnosti iskorišćenja otpadnih tokova industrije mleka i mlečnih proizvoda u mikrobiološkoj proizvodnji proizvoda sa dodatom vrednošću. Sa druge strane, sposobnost proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* da metaboliše glicerol predstavlja osnovu za iskorišćenje sirovog glicerola iz proizvodnje biodizela. Ovaj efluent proizvodnje biodizela predstavlja veliki problem pre svega zbog činjenice da nastaje u velikoj količini (10% (w/w) u poređenju sa količinom proizvedenog biodizela) (Garlapati i sar., 2016), kao i zbog prisustva različitih primesa koje potiču iz sirovina korišćenih za proizvodnju biodizela (naročito kada su u pitanju otpadna ulja i masti) i samog procesa proizvodnje biodizela (Ayoub i Abdullah, 2012). Već nekoliko godina unazad istraživanje mogućih načina za iskorišćenje sirovog glicerola predstavlja značajan izazov za naučnike širom sveta, pri čemu mikrobiološka konverzija sirovog glicerola u različite proizvode predstavlja jedno od obećavajućih rešenja

(Garlapati i sar., 2016). Stoga su naredne faze istraživanja sprovedene uz primenu hranljivih podloga na bazi komercijalnog i sirovog glicerola iz proizvodnje biodizela, kako bi se procenio potencijal ovog efluenta u proizvodnji biokontrolnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* primenom proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*.

Tabela 5.5. Srednje vrednosti prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* koje sadrže različite kombinacije izvora ugljenika i organskog izvora azota protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*

Izvor ugljenika	Izvor azota	Prečnik zone inhibicije (mm)
Saharoza	L-glutaminska kiselina	40,83±0,41 ^a
Glukoza	Sojino brašno	41,33±2,66 ^{ab}
Laktoza	Urea	44,00±1,26 ^{abc}
Skrob	Sojino brašno	44,83±0,75 ^{abc}
Saharoza	Sojino brašno	44,83±0,98 ^{abc}
Glukoza	Ekstrakt kvasca	45,83±1,33 ^{bcd}
Glicerol	Pepton	45,83±1,33 ^{bcd}
Glukoza	Pepton	46,5±3,08 ^{cde}
Skrob	Urea	46,67±2,25 ^{cde}
Laktoza	Sojino brašno	46,83±4,31 ^{cde}
Glukoza	Urea	47,50±0,84 ^{cdef}
Glicerol	Sojino brašno	47,83±5,31 ^{cdef}
Skrob	Pepton	48,67±1,21 ^{cdef}
Saharoza	Urea	48,83±0,98 ^{cdef}
Glukoza	L-glutaminska kiselina	49,83±4,75 ^{defg}
Glicerol	Urea	50,50±3,56 ^{defgh}
Skrob	L-glutaminska kiselina	51,33±5,20 ^{efghi}
Saharoza	Pepton	51,67±0,52 ^{ighi}
Starch	Ekstrakt kvasca	53,50±6,32 ^{ghi}
Laktoza	Ekstrakt kvasca	54,00±5,50 ^{ghi}
Glicerol	L-glutaminska kiselina	55,00±2,61 ^{hij}
Laktoza	L-glutaminska kiselina	55,50±1,76 ^{ijk}
Saharoza	Ekstrakt kvasca	58,50±3,89 ^{kl}
Laktoza	Pepton	59,50±7,15 ^{kl}
Glicerol	Ekstrakt kvasca	60,83±6,21 ^l

Vrednosti označene istim slovima nalaze se na istom nivou statističke značajnosti sa intervalom poverenja od 95% (Duncanov test)

5.4. MODELOVANJE I OPTIMIZACIJA SASTAVA HRANLJIVE PODLOGE NA BAZI KOMERCIJALNOG GLICEROLA

5.4.1. MATEMATIČKI MODELI UTICAJA KONCENTRACIJE KOMPONENTI HRANLJIVE PODLOGE NA BAZI KOMERCIJALNOG GLICEROLA NA ANTIMIKROBNU AKTIVNOST I REZIDUALNE KONCENTRACIJE NUTRIJENATA

Nakon odabira izvora ugljenika i organskog izvora azota kao komponenti hranljive podloge koje favorizuju rast i antimikrobnu aktivnost proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, naredni korak u optimizaciji sastava hranljive podloge za biotehnološku proizvodnju biokontrolnih agenasa predstavlja modelovanje uticaja koncentracija odabranih komponenti hranljive podloge na odabrane izlazne parametre bioprocasa, sa ciljem dobijanja matematičkih modela koji opisuju ponašanje odabranih izlaznih parametara bioprocasa sa promenom nezavisnih promenljivih, u ovom slučaju koncentracija odabranih nutrijenata u hranljivoj podlozi. Matematički model, odnosno polinomska jednačina drugog reda (poglavlje 4.9.2), opisuje ponašanje jedne zavisne promenljive u zavisnosti od odabranog broja nezavisnih promenljivih (faktora). U ovom slučaju, s obzirom na to da je cilj ovog dela istraživanja bio modelovanje sastava hranljive podloge za proizvodnju biokontrolnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, kao nezavisne promenljive (faktori) odabrane su inicijalne koncentracije osnovnih komponenti hranljive podloge u sledećim opsezima: izvora ugljenika (glicerol) 10-35-60 g/l, organskog izvora azota (ekstrakt kvasca) 0-2,5-5 g/l, neorganskog izvora azota ((NH₄)₂SO₄) 0-1,5-3 g/l i izvora fosfora (K₂HPO₄) 1-5,5-10 g/l. Pored ovih komponenti, svaka hranljiva podloga sadržala je 0,3 g/l MgSO₄·7H₂O. Kao značajni izlazi bioprocasa, odnosno zavisne promenljive (odzivi), praćeni su prečnik zona inhibicije, kao zavisna promenljiva koja neposredno ukazuje na stepen antimikrobne aktivnosti, kao i rezidualne koncentracije osnovnih nutrijenata: izvora ugljenika (glicerola), ukupnog azota i ukupnog fosfora. Zadatak modelovanja primenom metodologije odzivne površine jeste određivanje odsečka, kao i linearnih, kvadratnih i koeficijenata interakcije koji određuju uticaj svake od nezavisnih promenljivih na odabranu zavisnu promenljivu, uzimajući u obzir da je za fitovanje eksperimentalnih podataka korišćena polinomska jednačina drugog reda.

U cilju prikupljanja dovoljne količine eksperimentalnih podataka za izvođenje modelovanja, primenjen je Boks-Benkenov redukovani eksperimentalni dizajn u kome su varirane četiri nezavisne promenljive na tri nivoa u okviru 30 eksperimenata sa unapred zadatim vrednostima nezavisnih promenljivih (tabela 4.6., poglavlje 4.2.2.3.). Nivoi vrednosti nezavisnih promenljivih (koncentracija odabranih izvora nutrijenata) određeni su tako da budu ekvidistantni u odnosu na zadatak vrednost iz centralne tačke eksperimentalnog plana za svaku nezavisnu promenljivu. S obzirom na ispitivanje uticaja četiri nezavisne promenljive čije su vrednosti varirane na tri nivoa, primenom ovog tipa eksperimentalnog dizajna broj potrebnih eksperimenata za dobijanje dovoljne količine podataka potrebne za modelovanje odabranih odziva se značajno smanjuje, čime se postiže veoma značajna ušteda materijalnih resursa i vremena. Osim toga, eksperimentalni plan je sadržao i tri eksperimenta u kojima su zadate vrednosti sve četiri nezavisne promenljive odgovarale vrednostima iz centralne tačke radi utvrđivanja ponovljivosti eksperimenta pod istim uslovima i dalje statističke analize značajnosti dobijenih rezultata.

Kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* pod unapred definisanim uslovima (poglavlje 4.4.) izvedene su primenom hranljivih podloga čiji su sastavi definisani Boks-Benkenovim eksperimentalnim planom. Po završetku kultivacija, izvršeno je testiranje antimikrobne aktivnosti dobijenih uzoraka kultivacionih tečnosti protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, sa ciljem određivanja prečnika zona inhibicije kao odziva koji predstavlja direktan pokazatelj stepena antimikrobne aktivnosti. Osim toga, po završetku kultivacije izvršeno je odvajanje tečne faze kultivacionih tečnosti od biomase proizvodnog

mikroorganizma *Bacillus velezensis* centrifugiranjem, sa ciljem dobijanja supernatanta oslobođenog ćelija koji je dalje korišćen za određivanje rezidualnih sadržaja osnovnih nutrijenata (glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora), primenom odgovarajućih analitičkih metoda.

Nakon prikupljanja dovoljne količine eksperimentalnih podataka u pogledu odabranih izlaza bioprocasa, to jest odziva (prečnika zona inhibicije i rezidualnih koncentracija glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora), izvršena je statistička analiza dobijenih eksperimentalnih podataka. Analiza varijanse izvršena je sa ciljem utvrđivanja statističke značajnosti dobijenih modela za odabrane odzive, odnosno kvaliteta fitovanja eksperimentalnih podataka odabranim polinomskim jednačinama drugog reda. Na osnovu dobijenih *p*-vrednosti za sve modele (0,0000), može se utvrditi da su sva četiri modela statistički značajna pri nivou značajnosti od 95% (tabela 5.6.). Adekvatnost dobijenih matematičkih modela takođe je procenjena na osnovu *F*-vrednosti (Fišerovog testa). Uzimajući u obzir da su dobijene *F*-vrednosti manje od tabličnih vrednosti za odgovarajući stepen slobode primenjenog eksperimentalnog plana, može se zaključiti da su dobijeni modeli pogodni za opisivanje uticaja ispitivanih nezavisnih promenljivih na odabrane odzive. Osim toga, koeficijenti determinacije za sva četiri modela veći od 90% ukazuju na zadovoljavajuće fitovanje eksperimentalnih podataka odabranim polinomskim jednačinama drugog reda (tabela 5.6.).

Tabela 5.6. Analiza varijanse odabranih odziva u fazi modelovanja sastava hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola

Odziv	SS	DF	MS	F-vrednost	<i>p</i> -vrednost	R ²
Prečnik zone inhibicije (mm)	39076,79 ^a 7,57 ^b	15 ^a 12 ^b	2605,12 ^a 0,63 ^b	4127,72	0,0000	0,949
Rezidualni sadržaj glicerola (g/l)	17270,84 ^a 218,02 ^b	15 ^a 12 ^b	1151,39 ^a 18,17 ^b	63,37	0,0000	0,949
Rezidualni sadržaj ukupnog azota (g/l)	27,56 ^a 0,12 ^b	15 ^a 12 ^b	1,84 ^a 0,01 ^b	191,00	0,0000	0,957
Rezidualni sadržaj ukupnog fosfora (g/l)	89,67 ^a 2,18 ^b	15 ^a 12 ^b	5,98 ^a 0,18 ^b	32,91	0,0000	0,904

^a model, ^b reziduali

Matematički modeli generisani za odabrane odzive prikazani su u vidu vrednosti odsečka, linearnih, kvadratnih i koeficijenata interakcije između nezavisnih promenljivih, dok je statička značajnost uticaja ovih nezavisnih promenljivih prikazana u vidu *p*-vrednosti za odgovarajuće koeficijente (tabela 5.7.). Statistički značajni koeficijenti matematičkih modela za odabrane odzive, kao i njihove *p*-vrednosti, boldovani su u tabeli 5.7. Pozitivan predznak ispred linearnih i kvadratnih koeficijenata ukazuje na direktnu vezu ispitivane nezavisne i zavisne promenljive, dok negativan predznak ukazuje na reverznu povezanost ovih promenljivih (Ilić i Mijailović, 2014). Sa druge strane, kada su u pitanju koeficijenti interakcije koji opisuju istovremeni uticaj dve nezavisne promenljive, u ovom slučaju pozitivna predznak ukazuje na njihovo sinergističko dejstvo, dok negativan predznak ukazuje na antagonističko dejstvo ispitivanih nezavisnih promenljivih (Ilić i Mijailović, 2014).

Kada je u pitanju matematički model za rezidualni sadržaj glicerola, može se primetiti statistički značaj uticaj linearnog koeficijenta inicijalne koncentracije glicerola, sa pozitivnim predznakom, kao i negativni predznak statistički značajnog kvadratnog koeficijenta inicijalne koncentracije glicerola u hranljivoj podlozi. Osim toga, može se uočiti i statistički značajan sinergistički uticaj interakcije organskog i neorganskog izvora azota, što implicira da dinamika potrošnje izvora azota statistički značajno utiče na rezidualnu koncentraciju glicerola kao izvora ugljenika u kultivacionoj tečnosti po završetku kultivacije. Posmatrajući matematički model za rezidualni sadržaj ukupnog azota, može se uočiti da statistički značajan uticaj imaju linerani koeficijent incijalne koncentracije izvora fosfora, kao i koeficijenti interakcije inicijalne koncentracije organskog izvora azota i neorganskog izvora

azota sa inicijalnom koncentracijom izvora fosfora. Ovakvi rezultati impliciraju značajan uticaj dinamike potrošnje izvora fosfora na rezidualni sadržaj ukupnog azota u kultivacionoj tečnosti. Kod matematičkog modela za rezidualni sadržaj ukupnog fosfora, može se primetiti statistički značajan uticaj linearnih koeficijenata inicijalne koncentracije organskog izvora azota i izvora fosfora, antagonistički uticaj inicijalnih koncentracija izvora ugljenika i organskog izvora azota, kao i statistički značajan uticaj kvadratnog koeficijenta inicijalne koncentracije izvora fosfora.

Najvažniji odziv bioprocesa kada je u pitanju antimikrobna aktivnost proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* je svakako prečnik zona inhibicije. Posmatrajući matematički model ovog odziva, uočava se statistički značajan uticaj linearnog koeficijenta inicijalne koncentracije neorganskog izvora azota, kvadratnih koeficijenata inicijalnih koncentracija izvora ugljenika i neorganskog izvora azota, kao i antagonistički uticaj interakcije inicijalne koncentracije izvora ugljenika sa inicijalnom koncentracijom preostalih nutrijenata (neorganskog i organskog izvora azota i izvora fosfora), uz sinergističko uticaj interakcije inicijalne koncentracije organskog izvora azota i izvora fosfora.

Tabela 5.7. Koeficijenti regresionih jednačina i njihove *p*-vrednosti za odabrane odzive u fazi modelovanja sastava hranjive podloge na bazi komercijalnog glicerola

Koeficijent	Prečnik zone inhibicije (mm)		Rezidualni sadržaj glicerola (g/l)		Rezidualni sadržaj ukupnog azota (g/l)		Rezidualni sadržaj ukupnog fosfora (g/l)	
	Vrednost	<i>p</i> -vrednost	Vrednost	<i>p</i> -vrednost	Vrednost	<i>p</i> -vrednost	Vrednost	<i>p</i> -vrednost
Odsečak								
b ₀	30,625	0,0000	-14,892	0,1273	0,906	0,0010	-0,987	0,2989
Linearni								
b ₁	0,032	0,5254	1,335	0,0003	0,011	0,0946	0,027	0,3237
b ₂	0,526	0,2584	0,530	0,8274	-0,036	0,5264	0,527	0,0467
b ₃	3,852	0,0002	5,053	0,2266	0,108	0,2609	-0,126	0,7560
b ₄	0,380	0,1716	1,741	0,2383	-0,142	0,0009	0,482	0,0049
Interakcija								
b ₁₂	-0,020	0,0084	-0,006	0,8623	-0,001	0,2521	-0,009	0,0238
b ₁₃	-0,043	0,0015	-0,055	0,3549	-0,003	0,0629	0,005	0,3885
b ₁₄	-0,008	0,0479	0,003	0,8733	-0,000	0,8263	-0,000	0,8852
b ₂₃	0,150	0,1822	1,244	0,0490	-0,019	0,1761	0,011	0,8540
b ₂₄	0,089	0,0270	-0,327	0,1099	0,030	0,0000	-0,018	0,3724
b ₃₄	-0,102	0,1091	-0,356	0,2815	0,037	0,0002	0,043	0,1988
Kvadratni								
b ₁₁	0,001	0,0269	-0,008	0,0180	-0,000	0,2623	-0,000	0,3971
b ₂₂	0,064	0,2699	-0,308	0,3171	0,014	0,0646	-0,039	0,2245
b ₃₃	-0,448	0,0126	-1,740	0,0553	-0,024	0,2300	-0,057	0,5021
b ₄₄	0,010	0,5522	-0,052	0,5804	0,001	0,5954	-0,021	0,0392

1 – glicerol, 2 – ekstrakt kvasca, 3 - (NH₄)₂SO₄, 4 - K₂HPO₄

U cilju boljeg razumevanja uticaja inicijalnih koncentracija nutrijenata na prečnik dobijenih zona inhibicije prilikom testiranja antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, konstruisane su odzivne površine, odnosno trodimenzionalni grafički prikazi interakcije dve nezavisne promenljive (inicijalne koncentracije dva nutrijenta) i njihovog uticaja na zavisnu promenljivu (prečnik zona inhibicije) u ispitivanom opsegu vrednosti

nezavisnih promenljivih, pri čemu su vrednosti preostale dve nezavisne promenljive jednake vrednostima iz centralne tačke Boks-Benkenovog eksperimentalnog dizajna.

Posmatrajući prvu odzivnu površinu koja prikazuje uticaj inicijalne koncentracije izvora ugljenika (glicerol) i inicijalne koncentracije organskog izvora azota (ekstrakt kvasca) (slika 5.5.A), pri čemu su inicijalne koncentracije neorganskog izvora azota ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) i izvora fosfora (K_2HPO_4) jednake vrednostima iz centralne tačke eksperimentalnog plana (1,5 g/l i 5,5 g/l, redom) može se uočiti da se minimalni prečnici zona inhibicije dobijaju pri inicijalnoj koncentraciji glicerola u opsegu 15-45 g/l i pri inicijalnoj koncentraciji ekstrakta kvasa koja je blizu minimalne vrednosti ispitivanog opsega (0-0,25 g/l). Sa druge strane, maksimalni prečnici zona inhibicije dobijaju se pri inicijalnoj koncentraciji glicerola bliskoj minimalnoj vrednosti ispitivanog opsega (10-15 g/l) i gotovo maksimalnoj vrednosti inicijalne koncentracije ekstrakta kvasca u opsegu 4,5-5 g/l. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da maksimizaciju prečnika zona inhibicije favorizuje minimalna inicijalna koncentracija izvora ugljenika i maksimalna inicijalna koncentracija organskog izvora azota iz ispitivanih opsega.

Naredna odzivna površina prikazuje uticaj inicijalnih koncentracija izvora ugljenika (glicerol) i neorganskog izvora azota ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) na prečnik zona inhibicije (slika 5.5.B), pri čemu vrednosti preostale dve nezavisne promenljive (inicijalne koncentracije organskog izvora azota (ekstrakt kvasca) i izvora fosfora (K_2HPO_4)) iznose 2,5 g/l i 5,5 g/l, redom. Minimalni prečnik zona inhibicije dobija se pri inicijalnoj koncentraciji glicerola u opsegu 10-35 g/l i inicijalnoj koncentraciji $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u opsegu 0-0,25 g/l. Sa druge strane, maksimalna prečnik zona inhibicije dobija se kada je inicijalna koncentracija glicerola u opsegu 10-15 g/l, a inicijalna koncentracija $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u opsegu 2-3 g/l. Stoga se može zaključiti da kada je u pitanju interakcija inicijalne koncentracije izvora ugljenika i neorganskog izvora azota, veći uticaj na prečnik zona inhibicije pokazuje inicijalna koncentracija neorganskog izvora azota, jer opseg koncentracija ovog nutrijenta pri istom ispitivanom opsegu koncentracija izvora ugljenika određuje maksimalan ili minimalan prečnik zone inhibicije dobijen kao rezultat testiranja antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*. Takođe, može se zaključiti da maksimalna vrednost inicijalne koncentracije neorganskog izvora azota zajedno sa maksimalnom inicijalnom koncentracijom organskog izvora azota iz ispitivanog opsega vrednosti favorizuje maksimizaciju prečnika zona inhibicije, što ukazuje na visoku potrebu proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* za azotom kao jednim od osnovnih nutrijenata. Ova činjenica ukazuje da je antimikrobna aktivnost proizvodnog mikroorganizma posledica ili dejstva biomase proizvodnog mikroorganizma, za čije je umnožavanje neophodna velika količina azota, ili određenih azotnih jedinjenja čijom sposobnošću produkcije se karakteriše *Bacillus velezensis*, kao što su peptidna jedinjenja sa antimikrobnim delovanjem (Singh i sar., 2017).

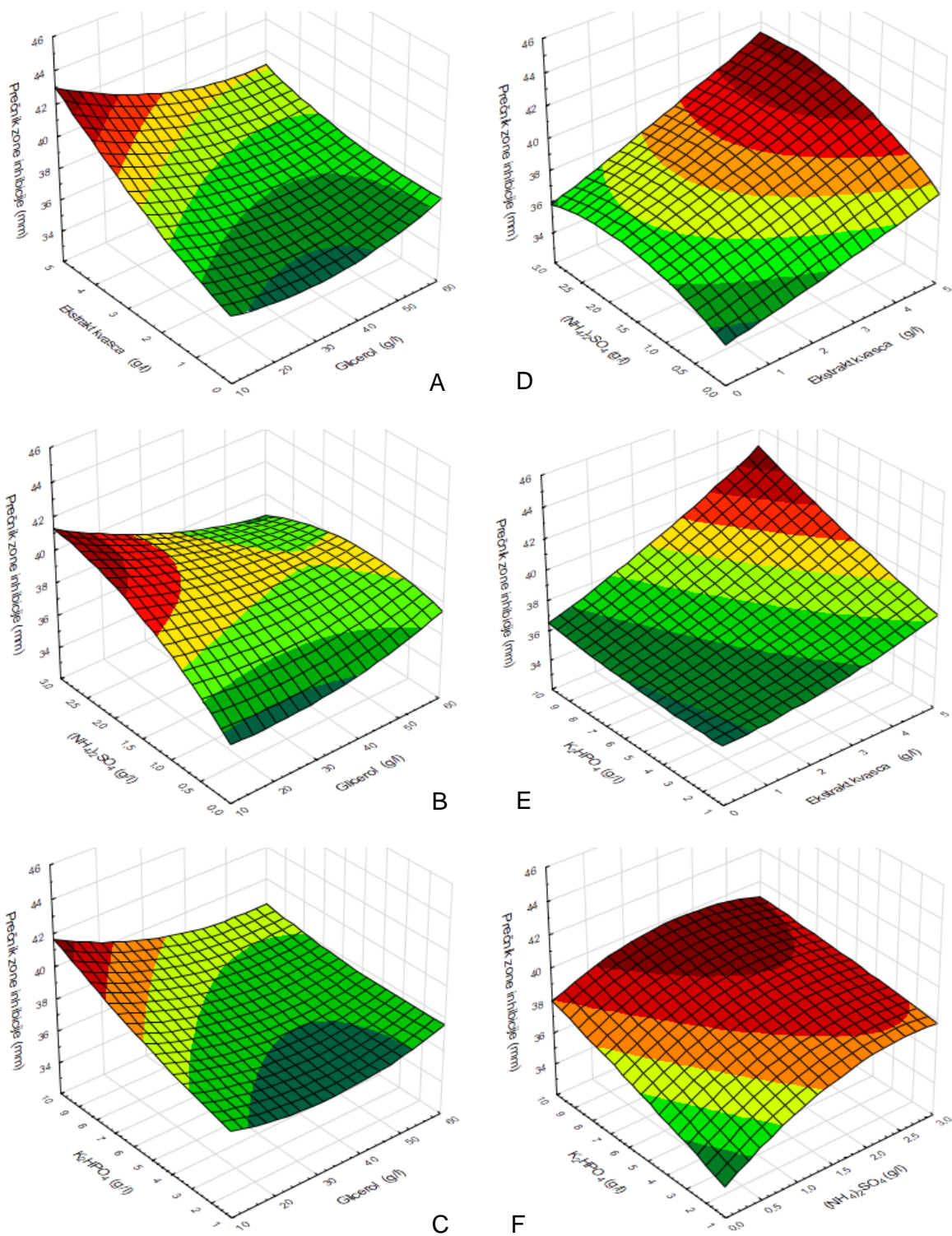
Interakcija inicijalne koncentracije izvora ugljenika (glicerol) i inicijalne koncentracije izvora fosfora (K_2HPO_4), kao i njihov uticaj na prečnik zone inhibicije, prikazani su na slici 5.5.C, pri čemu inicijalne koncentracije organskog (ekstrakt kvasca) i neorganskog izvora azota ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) odgovaraju vrednostima iz centralne tačke eksperimentalnog dizajna (2,5 g/l i 1,5 g/l, redom). Minimalan prečnik zona inhibicije očekuje se pri inicijalnoj koncentraciji glicerola u opsegu 15-55 g/l i inicijalnoj koncentraciji K_2HPO_4 u opsegu 1-3,5 g/l. Maksimalan prečnik zone inhibicije očekuje se pri inicijalnoj koncentraciji glicerola 10-15 g/l i inicijalnoj koncentraciji K_2HPO_4 u opsegu 9-10 g/l. Može se zaključiti da minimalna vrednost inicijalne koncentracije izvora ugljenika i maksimalna vrednost inicijalne koncentracije izvora fosfora iz ispitivanog opsega favorizuju povećanje antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*. Posmatrajući prethodne tri odzivne površine, jasno je da maksimizaciji prečnika zona inhibicije pogoduje najmanja vrednost inicijalne koncentracije izvora ugljenika iz ispitivanog opsega, što može ukazati i na inhibiciju proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* glicerolom u slučaju primene visokih inicijalnih koncentracija ovog jedinjenja u hranljivoj

podlozi za proizvodnju biokontrolnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*.

Uticaj inicijalne koncentracije organskog izvora azota (ekstrakt kvasca) i neorganskog izvora azota ((NH₄)₂SO₄) na prečnik zona inhibicije prikazan je na slici 5.5.D, pri čemu inicijalne koncentracije izvora ugljenika (glicerol) i izvora fosfora (K₂HPO₄) iznose 35 g/l i 5,5 g/l, redom. Minimalan prečnik zona inhibicije dobija se pri minimalnim vrednostima inicijalnih koncentracija oba nutrijenta iz ispitivanih opsega: 0-1 g/l za ekstrakt kvasca i 0-0,25 g/l za (NH₄)₂SO₄. Maksimalne vrednosti prečnika zona inhibicije dobijaju se pri maksimalnim vrednostima inicijalnih koncentracija oba nutrijenta u ispitivanim opsezima: 4,5-5 g/l za ekstrakt kvasca i 2-3 g/l za (NH₄)₂SO₄, što potvrđuje prethodno diskutovane rezultate gde je zaključeno da visoka inicijalna koncentracija i organskog i neorganskog izvora azota favorizuje maksimizaciju antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*.

Na slici 5.5.E prikazan je uticaj inicijalne koncentracije organskog izvora azota (ekstrakt kvasca) i inicijalne koncentracije izvora fosfora (K₂HPO₄) na prečnik zona inhibicije, pri čemu vrednosti inicijalnih koncentracija izvora ugljenika (glicerol) i neorganskog izvora azota ((NH₄)₂SO₄) odgovaraju vrednostima iz centralne tačke eksperimentalnog plana (35 g/l i 1,5 g/l, redom). Minimalan prečnik zona inhibicije očekuje se pri minimalnim vrednostima inicijalne koncentracije ekstrakta kvasca iz ispitivanog opsega (0-0,5 g/l) pri inicijalnoj koncentraciji izvora fosfora u opsegu 1-5 g/l. Maksimalan prečnik zona inhibicije očekuje se pri maksimalnim inicijalnim koncentracijama oba nutrijenta iz ispitivanog opsega (4,5-5 g/l za glicerol i 9-10 g/l za K₂HPO₄), čime su još jednom potvrđeni visoki nutritivni zahtevi proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* za organskim izvorom azota izvorom fosfora kako bi se postigla maksimalna antimikrobna aktivnost protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*.

Poslednja odzivna površina prikazuje uticaj inicijalne koncentracije neorganskog izvora azota ((NH₄)₂SO₄) i izvora fosfora (K₂HPO₄) na prečnik zona inhibicije (slika 5.5.F), pri čemu inicijalne koncentracije preostala dva nutrijenta (glicerola i ekstrakta kvasca kao izvora ugljenika i organskog izvora azota) odgovaraju vrednostima iz centralne tačke eksperimentalnog dizajna (35 g/l i 2,5 g/l, redom). Minimalan prečnik zona inhibicije dobija se pri minimalnim vrednostima inicijalnih koncentracija (NH₄)₂SO₄ i K₂HPO₄ iz ispitivanih opsega (0-0,5 g/l i 1-3 g/l, redom). Sa druge strane, maksimalan prečnik zona inhibicije dobija se pri inicijalnoj koncentraciji (NH₄)₂SO₄ u opsegu 0,5-3 g/l i pri inicijalnoj koncentraciji K₂HPO₄ u opsegu 6-10 g/l, čime je još jednom potvrđeno da pored visokih nutritivnih zahteva u pogledu organskog izvora azota i izvora fosfora, proizvodni mikroorganizam *Bacillus velezensis* takođe pokazuje visoke zahteve i u pogledu neorganskog izvora azota, u ovom slučaju (NH₄)₂SO₄, radi postizanja maksimalne antimikrobne aktivnosti protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*.



Slika 5.5. Odzivne površine koje opisuju uticaj inicijalnih koncentracija odabranih nutrijenata na prečnik zona inhibicije tokom modelovanja sastava hranjive podloge na bazi komercijalnog glicerola za sledeće kombinacije nezavisnih promenljivih: A – glicerol i ekstrakt kvasca; B – glicerol i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; C – glicerol i K_2HPO_4 ; D – ekstrakt kvasca i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; E – ekstrakt kvasca i K_2HPO_4 ; F – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i K_2HPO_4

Iako metodologija odzivnih površina predstavlja dobru osnovu za ispitivanje uticaja nezavisnih promenljivih, kao i njihovih interakcija, na odabrane zavisne promenljive, i iako se dobijene odzivne površine mogu iskoristiti za procenu optimalnih vrednosti nezavisnih promenljivih kada se kao cilj postavi minimizacija ili maksimizacija zavisne promenljive, za potpunu kvantitativnu optimizaciju, u ovom slučaju sastava hranljive podloge u pogledu inicijalnih koncentracija odabranih nutrijenata, neophodna je primena dodatnih metoda odlučivanja zasnovanih na kvantitativnim pokazateljima, kao što je metoda željene funkcije.

5.4.2. OPTIMIZACIJA SASTAVA HRANLJIVE PODLOGE NA BAZI KOMERCIJALNOG GLICEROLA

Nakon izvršenog modelovanja odabranih odziva bioprocesa značajnih za sastav hranljive podloge za biotehnošku proizvodnju biokontrolnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* primenom proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*, i nakon dobijanja matematičkih modela za koje je utvrđeno da su statistički značajni i da na adekvatan način opisuju uticaj četiri nezavisne promenljive (inicijalne koncentracije glicerola, ekstrakta kvasca, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i K_2HPO_4) na odabrane odzive (prečnik zona inhibicije i rezidualne koncentracije glicerola, ukupnog azota u ukupnog fosfora), naredni korak predstavlja optimizacija sastava hranljive podloge u pogledu inicijalnih koncentracija odabranih nutrijenata kako bi se zadovoljili određeni pokazatelji uspešnosti bioprocesa. Kada je u pitanju modelovanje biotehnoških procesa, matematički modeli dobijeni u prethodnom koraku istraživanja predstavljaju osnovu za ispitivanje uticaja nezavisnih promenljivih na odabrane odzive, odnosno zavisne promenljive, gde se jednostavnim ubacivanjem željenih vrednosti nezavisnih promenljivih u zadatom opsegu može izračunati predviđena vrednost zavisnih promenljivih na osnovu dobijenih matematičkih jednačina koje predstavljaju modele. Stoga ovi matematički modeli predstavljaju osnovu za simulaciju bioprocesa, kao i njegovu dalju optimizaciju u smislu određivanja optimizovanih vrednosti nezavisnih promenljivih pri kojima se postižu optimalne vrednosti zavisnih promenljivih, odnosno odziva.

Jedna od najčešće primenjivanih metoda za optimizaciju biotehnoških procesa jeste metoda željene funkcije (Lee i sar., 2018), koja predstavlja softversko rešenje primene niza nelinearnih algoritama u cilju pronalaženja optimalnog rešenja u skladu sa zadatim ciljem ili ciljevima optimizacije. Pri primeni metode željene funkcije neophodno je pre svega odrediti ciljeve optimizacije u pogledu maksimizacije ili minimizacije vrednosti posmatranih odziva. Osim toga, svakoj nezavisnoj promenljivoj dodeljuju se težinski koeficijenti, koji određuju značajnost uticaja te nezavisne promenljive na ispitivani odziv, a takođe je moguće kao cilj optimizacije postaviti i minimizaciju ili maksimizaciju vrednosti određenih nezavisnih promenljivih. Nakon toga, vrednosti odziva dobijene ubacivanjem pojedinačnih vrednosti nezavisnih promenljivih u dobijene matematičke modele se konvertuju u individualne željene funkcije koje mogu imati vrednosti u opsegu od 0 do 1, pri čemu vrednost 0 predstavlja najmanje poželjno rešenje, dok vrednost 1 predstavlja najpoželjnije rešenje u skladu sa definisanim ciljem optimizacije. Vrednost ukupne željene funkcije jednaka je geometrijskoj sredini vrednosti pojedinačnih željenih funkcija (Ferreira i sar., 2007).

Prilikom procedure optimizacije sastava hranljive podloge u okviru ove doktorske disertacije, svim nezavisnim i zavisnim promenljivim dodeljena je vrednost težinskog koeficijenta 3 (iz opsega 1-5), čime je svakoj promenljivoj dodeljena ista značajnost uticaja na rezultat optimizacije. Sprovedena su dva seta optimizacije sa različitim definisanim ciljevima.

Prvi set optimizacije sastava hranljive podloge u pogledu definisanja inicijalnih koncentracija nutrijenata imao je samo jedan cilj: maksimizaciju prečnika zona inhibicije kao odziva koji direktno reprezentuje antimikrobnu aktivnost proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*. Posmatrajući rezultate prvog seta optimizacije (tabela 5.8.), može se uočiti da je postizanje maksimalnog prečnika zone inhibicije testiranih uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus*

velezensis protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* potreban sledeći sastav hranljive podloge za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma: glicerol 12,01 g/l, ekstrakt kvasca 4,06 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,69 g/l, K_2HPO_4 8,1 g/l i $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g/l. Vrednost dobijene ukupne željene funkcije iznosi 1, s obzirom na to da je procedura optimizacije imala samo jedan zadati cilj: maksimizaciju prečnika zona inhibicije. Iz prikazanih rezultata optimizacije sastava hranljive podloge može se zaključiti da su u značajnoj korelaciji sa rezultatim dobijenim primenom metodologije odzivne površine, gde je zaključeno da se maksimalan prečnik zona inhibicije postiže primenom hranljive podloge za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma koja sadrži inicijalnu koncentraciju glicerola blisku nanižoj vrednosti ispitivanog opsega (10-60 g/l), kao i da su potrebne inicijalne koncentracije preostalih ispitivanih nutrijenata (ekstrakta kvasca, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i K_2HPO_4) bliske maksimalnim vrednostima ispitivanih opsega za ove nutrijente (0-5 g/l za ekstrakt kvasca, 0-3 g/l za $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i 1-10 g/l za K_2HPO_4), što ponovo ukazuje na visoke nutritivne zahteve proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u pogledu izvora azota i fosfora.

Na osnovu dobijenih optimizovanih vrednosti nezavisnih promenljivih, njihovim uključivanjem u matematičke modele dobijene u prethodnom koraku modelovanja mogu se izračunati predviđene vrednosti odabranih odziva. Iz prikazanih rezultata prvog seta optimizacije može se videti da je pri optimizovanom sastavu hranljive podloge predviđen prečnik zona inhibicije od 66,75 mm. Međutim, ovakav sastav hranljive podloge za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* rezultovao bi po završetku bioprocesa kultivacionom tečnošću koja sadrži prilično visoke rezidualne koncentracije nutrijenata: 2,05 g/l za glicerol, 1,60 g/l za ukupni azot i 2,78 g/l za ukupni fosfor, što ukazuje na nepotpuno iskorišćenje prisutnih nutrijenata i potencijalni problem koji bi predstavljalo odlaganje rezultujućeg efluenta bioprocesa. Visoke koncentracije organskih komponenti, azotnih jedinjenja, kao i jedinjenja fosfora, koji predstavlja osnovni uzrok eutrofikacije prirodnih recipijenata industrijskih otpadnih tokova (Ngatia i Taylor, 2018), predstavljaju veliki problem za odlaganje efluenta bioprocesa u životnu sredinu. Sa druge strane, prisustvo većih rezidualnih količina nutrijenata u efluentima bioprocesa povećava ukupne troškove bioprocesa u pogledu smanjene iskorišćenosti tih nutrijenata i povećanja troškova obavezne obrade efluenta pre njihovog odlaganja u životnu sredinu. Stoga je u okviru ovog istraživanja sproveden još jedan set optimizacije sastava hranljive podloge sa ciljem ispitivanja mogućnosti redukovanja, odnosno minimizacije rezidualnih koncentracija nutrijenata u kultivacionoj tečnosti po završetku bioprocesa proizvodnje biokontrolnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* primenom proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*.

Tabela 5.8. Optimizovane vrednosti variranih faktora i predviđene vrednosti odziva dobijene kao rezultat optimizacije sastava hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola

Faktori	Prvi set optimizacije		Drugi set optimizacije	
	Cilj	Optimizovana vrednost	Cilj	Optimizovana vrednost
Glicerol (g/l)	u opsegu	12,01	u opsegu	10,00
Ekstrakt kvasca (g/l)	u opsegu	4,06	u opsegu	2,83
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/l)	u opsegu	2,69	u opsegu	3,00
K_2HPO_4 (g/l)	u opsegu	8,11	u opsegu	1,07
Odzivi	Cilj	Predviđena vrednost	Cilj	Predviđena vrednost
Prečnik zone inhibicije (mm)	maksimalan	66,75	maksimalan	60,43
Rezidualni sadržaj glicerola (g/l)	u opsegu	2,05	minimalan	1,41
Rezidualni sadržaj ukupnog azota (g/l)	u opsegu	1,60	minimalan	0,92
Rezidualni sadržaj ukupnog fosfora (g/l)	u opsegu	2,78	minimalan	0,13
Vrednost željene funkcije		1,00		0,77

Posmatrajući rezultate drugog seta optimizacije sastava hranljive podloge (tabela 5.8.), može se zaključiti da je primenom dodatnog kriterijuma optimizacije (minimizacije rezidualnih koncentracija glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora) postignuto smanjenje predviđenih rezidualnih koncentracija nutrijenata u kultivacionoj tečnosti po završetku bioprocasa za 31,22% kada je u pitanju glicerol, 42,50% kada je u pitanju ukupni azot i čak 95,32% kada je u pitanju ukupni fosfor, u poređenju sa rezultatima prvog seta optimizacije. Najznačajnije smanjenje postignuto je svakako u slučaju rezidualnog sadržaja ukupnog fosfora, što predstavlja najveći doprinos pre svega zbog prethodno pomenute mogućnosti eutrofikacije prirodnih recipijenata zahvaljujući prisustvu fosfora u industrijskim otpadnim vodama koje se u njih ispuštaju. Kao rezultat definisanja dodatnog cilja optimizacije, vrednost željene funkcije je sa vrednosti 1 u prvom setu optimizacije opala na 0,77 u drugom setu optimizacije, što i dalje predstavlja zadovoljavajuću vrednost u pogledu ispunjenosti ciljeva optimizacije. Osim toga, primetan je i pad predviđene vrednosti prečnika zona inhibicije sa 66,75 mm u prvom setu optimizacije na 60,43 mm u drugom setu optimizacije, što predstavlja smanjenje od 9,47%. Sa druge strane, kada se posmatraju zahtevane inicijalne koncentracije nutrijenata u prvom i drugom setu optimizacije, može se zaključiti da je smanjenje rezidualnih koncentracija nutrijenata u drugom setu optimizacije dovelo i do smanjene potrebe za nutrijentima inicijalno prilikom pripreme hranljive podloge za kultivaciju, stoga se može uočiti smanjenje potrebnih inicijalnih količina nutrijenata od 16,74% za glicerol, 30,30% za ekstrakt kvasca i 86,81% za K_2HPO_4 u poređenju sa prvim setom optimizacije. Jedino se u slučaju neorganskog izvora azota ($(NH_4)_2SO_4$) može primetiti potreba za povećanjem inicijalne koncentracije u poređenju sa prvim setom optimizacije za 11,52%. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost smanjenja troškova bioprocasa smanjenjem troškova pripreme hranljive podloge za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* redukcijom potrebnih inicijalnih koncentracija nutrijenata u drugom setu optimizacije, kao i smanjenjem troškova prerade i odlaganja otpadnih tokova bioprocasa redukcijom rezidualnih koncentracija nutrijenata u kultivacionoj tečnosti po završetku kultivacije. Stoga bi dalja tehno-ekonomska analiza bioprocasa na osnovu dobijenih rezultata trebala da generiše procenu isplativosti rezultujućeg smanjenja antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* od oko 10% u poređenju sa benefitima koji se postižu navedenim smanjenjem troškova bioprocasa.

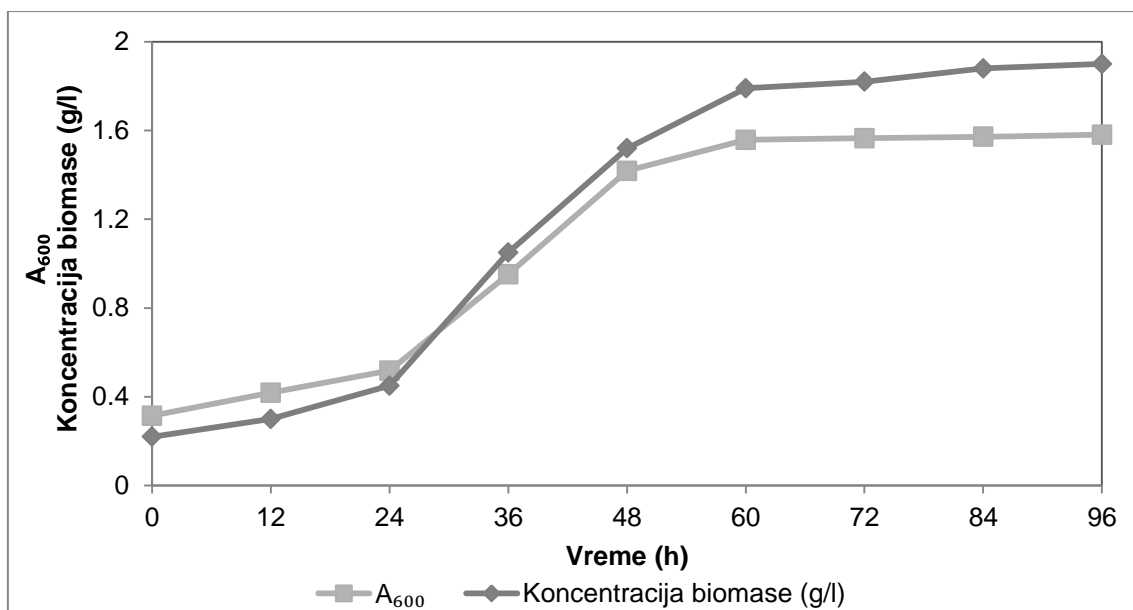
5.4.3. VALIDACIJA REŠENJA HRANLJIVE PODLOGE OPTIMIZOVANOG SASTAVA NA BAZI KOMERCIJALNOG GLICEROLA

Sa ciljem ispitivanja toka bioprocasa uz primenu optimizovanog sastava hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola iz prethodne faze istraživanja, izvedene su kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u uvećanim razmerama, odnosno u Vulfovim bocama ukupne zapremine 2 l i laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 3 l, pod tačno definisanim procesnim uslovima (poglavlje 4.4.). Razlika između ova dva načina izvođenja bioprocasa ogleda se, osim u zapremini hranljive podloge, i u uslovima aeracije i mešanja tokom izvođenja bioprocasa: pri kultivaciji u Vulfovim bocama primenjuje se eksterno mešanje na laboratorijskoj tresilici (150 o/min) i interna aeracija (0,75 vvm) manjom brzinom usled odsustva internog mešanja, dok se u laboratorijskom bioreaktoru primenjuje interno mešanje posredstvom Ruštonove turbine sa dva impelera (250 o/min) i interna aeracija (1 vvm).

5.4.3.1. Praćenje toka kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola

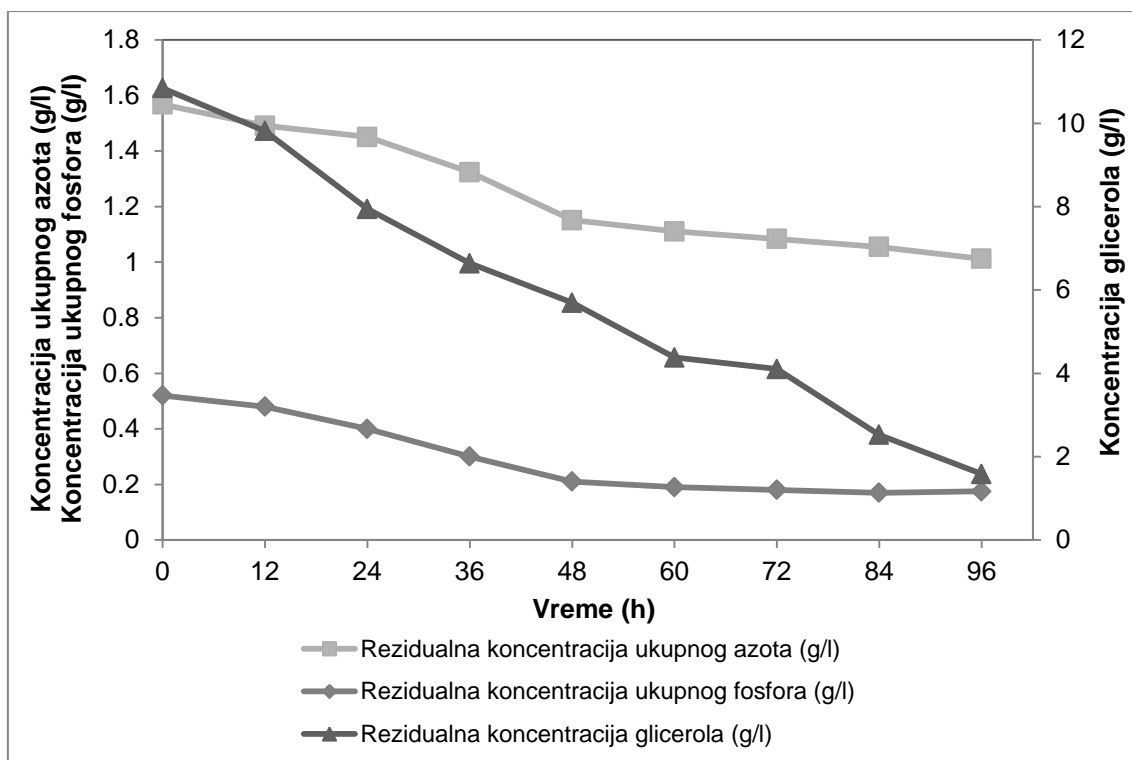
Prilikom kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u Vulfovim bocama sa ciljem proizvodnje biokontrolnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* praćeni su sledeći parametri bioprocesa: sadržaj biomase proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*, rezidualne koncentracije nutrijenata (glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora) u kultivacionoj tečnosti, kao i antimikrobna aktivnost uzoraka kultivacione tečnosti protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*. U cilju prikupljanja navedenih eksperimentalnih podataka vršena su uzorkovanja kultivacione tečnosti u tačno definisanim vremenskim intervalima (12 h) tokom bioprocesa u trajanju od 96 h. Rezultati prikazani u okviru ovog poglavlja predstavljaju srednje vrednosti iz četiri kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola.

Sadržaj biomase proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u toku kultivacije u Vulfovim bocama praćen je primenom spektrofotometrijske metode određivanja optičke gustine kultivacione tečnosti merenje apsorbance uzorka kultivacione tečnosti na talasnoj dužini 600 nm, uz primenu hranljive podloge korišćene za kultivaciju kao slepe probe. Druga metoda za određivanje sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* predstavlja gravimetrijsko određivanje sadržaja suve materije biomase proizvodnog mikroorganizma izdvojene centrifugiranjem (10000 o/min, 20 min) nakon sušenja (105°C) do postizanja konstantne mase, na osnovu koga može biti izračunata koncentracija biomase proizvodnog mikroorganizma u kultivacionoj tečnosti uzimajući u obzir zapreminu uzorka koja je centrifugirana. Na osnovu rezultata prikazanih na slici 5.6. može se očekivati uočiti sličan trend promene sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* određen primenom obe metode, koji odgovara standardnoj krivi rasta bakterija. Na početku kultivacije, do 24. časa kultivacije, uočava se mali porast sadržaja biomase usled odvijanja lag faze, odnosno faze prilagođavanja proizvodnog mikroorganizma uslovima kultivacije i primenjenoj hranljivoj podlozi. Nakon toga, u periodu između 24. i 48. časa kultivacije, uočava se log faza intenzivnog rasta i umnožavanja biomase proizvodnog mikroorganizma. Nešto sporije umnožavanje proizvodnog mikroorganizma može se uočiti u periodu između 48. i 60. časa kultivacije, nakon čega nastupa stacionarna faza rasta u kojoj se uočava približno konstantan sadržaj biomase proizvodnog mikroorganizma usled ravnoteže između umnožavanja i odumiranja bakterijskih ćelija. Može se uočiti da je tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u Vulfovim bocama postignuta maksimalna koncentracija biomase proizvodnog mikroorganizma od 1,9 g/l, što u odnosu na početnu koncentraciju biomase (0,22 g/l) predstavlja povećanje sadržaja biomase za oko osam puta.



Slika 5.6. Praćenje toka kultivacije u pogledu sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* tokom kultivacije u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola

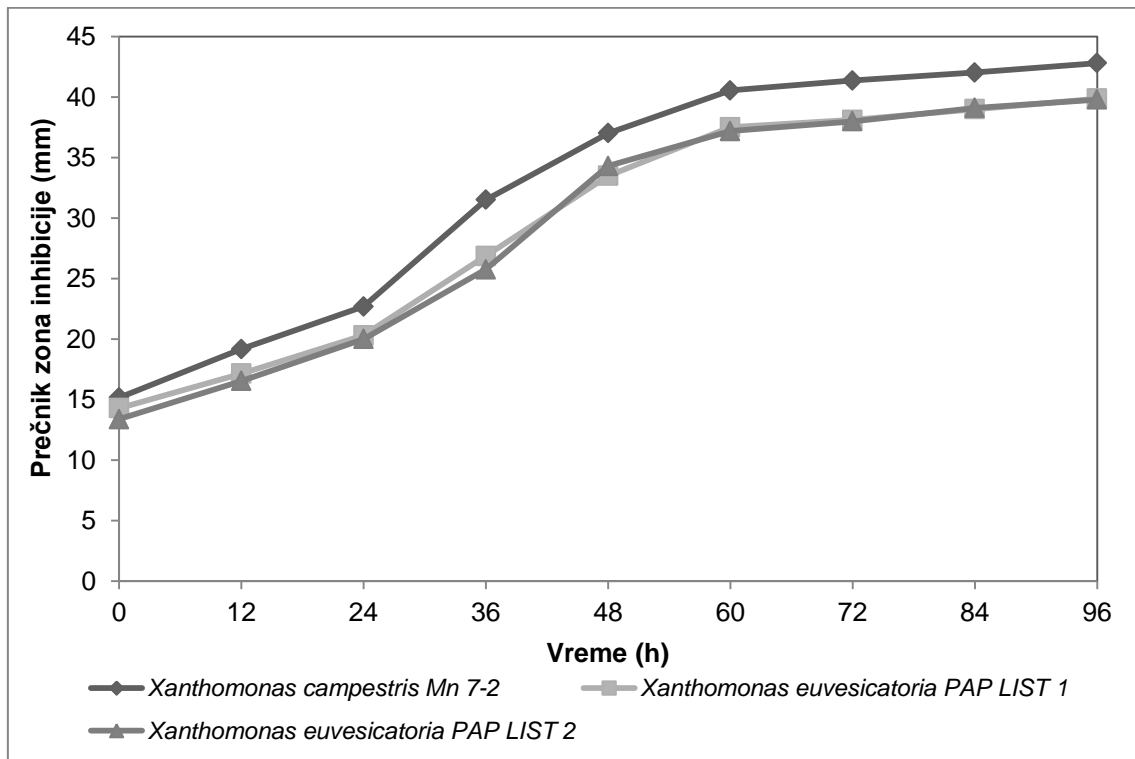
Rezidualne koncentracije nutrijenata (glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora) u kultivacionoj tečnosti tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u Vulfovim bocama određene su primenom odgovarajućih analitičkih metoda (poglavlje 4.5.2.) u definisanim vremenskim intervalima tokom kultivacije u kojima su uzimani uzorci kultivacione tečnosti. Uzorci kultivacione tečnosti su centrifugirani (10000 o/min, 20 min) sa ciljem uklanjanja biomase proizvodnog organizma i dobijanja supernatanta oslobođenog ćelija koji je dalje korišćen za određivanje rezidualnih koncentracija nutrijenata. Rezultati ovih određivanja prikazani su na slici 5.7. U toku kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* došlo je do značajnog smanjenja koncentracije svih ispitivanih nutrijenata usled njihovog usvajanja od strane proizvodnog mikroorganizma i potrošnje za sintezu ćelijskih komponenti (umnožavanja biomase proizvodnog mikroorganizma) i za sintezu primarnih i sekundarnih proizvoda metabolizma. Najveće smanjenje zabeleženo je u slučaju koncentracije glicerola sa početnih 10,84 g/l na finalnih 1,58 g/l, što ukazuje na činjenicu da je 85,42% inicijalne količine glicerola utrošeno u toku bioprocesa od strane proizvodnog mikroorganizma. Takođe, tokom čitavog bioprocesa može se uočiti gotovo ravnomerna potrošnja glicerola. Kada je u pitanju potrošnja ukupnog azota, na samom početku kultivacije može se uočiti slabija potrošnja ovog nutrijenta u skladu sa odvijanjem lag faze prilagođavanja proizvodnog mikroorganizma uslovima kultivacije. U periodu između 24. i 48. časa kultivacije uočava se intenzivnija potrošnja ovog nutrijenta usled faze intenzivnog rasta i umnožavanja biomase proizvodnog mikroorganizma. Nakon toga, primetna je sporija potrošnja izvora azota do kraja kultivacije. Sličan trend može se uočiti i kada je u pitanju potrošnja fosfora od strane proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* tokom kultivacije u Vulfovim bocama (slika 5.7.).



Slika 5.7. Praćenje toka kultivacije u pogledu rezidualnih koncentracija nutrijenata tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola

Tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u Vulfovim bocama praćena je i antimikrobna aktivnost uzoraka kultivacione tečnosti, uzimanih u tačno definisanim vremenskim intervalima tokom kultivacije, protiv tri fitopatogena izolata: *Xanthomonas campestris* Mn 7-2, izolovanog iz kupusa sa simptomima crne truleži, i dva izolata vrste *Xanthomonas euvesicatoria* označena kao PAP LIST 1 i PAP LIST 3, izolovana sa lista paprike sa simptomima bakterijske pegavosti. Testiranje antimikrobne aktivnosti vršeno je disk-difuzionom metodom. Nakon inkubacije Petri ploča sa zasejanim fitopatogenim izolatima i diskovima na koje su naneti uzorci kultivacione tečnosti koja je trajala 72 h vršeno je merenje prečnika dobijenih zona inhibicije, odnosno područja oko diskova u kojima se ne uočava rast fitopatogenih izolata (slika 5.9.). Na slici 5.8. su prikazane srednje vrednosti prečnika zona inhibicije dobijenih za svaki fitopatogeni izolat testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti iz definisanih vremenskih intervala kultivacije. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da proizvodni mikroorganizam *Bacillus velezensis* ispoljava veću antimikrobnu aktivnost prema izolatu sa kupusa *Xanthomonas campestris* Mn 7-2, s obzirom na to da su kod ovog izolata izmereni veći prečnici zona inhibicije, odnosno izvodi se zaključak da je ovaj izolat osetljiviji na delovanje biokontrolnih agenasa *Bacillus velezensis* u poređenju sa izolatima sa lista paprike, *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 1 i PAP LIST 3. Kod sva tri testirana fitopatogena izolata može se uočiti sličan trend promene srednje vrednosti prečnika zona inhibicije, koji prati promenu sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* prikazanu na slici 5.6. Na slici 5.9. prikazane su zone inhibicije dobijene testiranjem antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti (96 h) proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*. Sa prikazanih slika dobijenih zona inhibicije može se zaključiti da najveći deo antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* potiče od kompeticije za prostor i nutrijente sa fitopatogenim izolatima, dok se prisustvo zone prosvetljenja oko rasta proizvodnog mikroorganizma može protumačiti proizvodnjom proizvoda metabolizma sa sposobnošću difuzije kroz hranljivu podlogu za

testiranje antimikrobne aktivnosti i inhibicije rasta testiranih fitopatogenih izolata. Stoga je kao jedan od ciljeva ove doktorske disertacije postavljena i identifikacija antimikrobnih jedinjenja čiju sposobnost produkcije ispoljava proizvodni mikroorganizam *Bacillus velezensis*, uzimajući u obzir široku lepezu metabolita sa antimikrobnom aktivnošću koju proizvode bakterije roda *Bacillus* (Stein i sar., 2005; Fira i sar., 2018; Zhao i sar., 2018).



Slika 5.8. Praćenje toka kultivacije u pogledu antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* tokom kultivacije u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola

Xanthomonas campestris
Mn 7-2



Xanthomonas euvesicatoria
PAP LIST 1



Xanthomonas euvesicatoria
PAP LIST 2

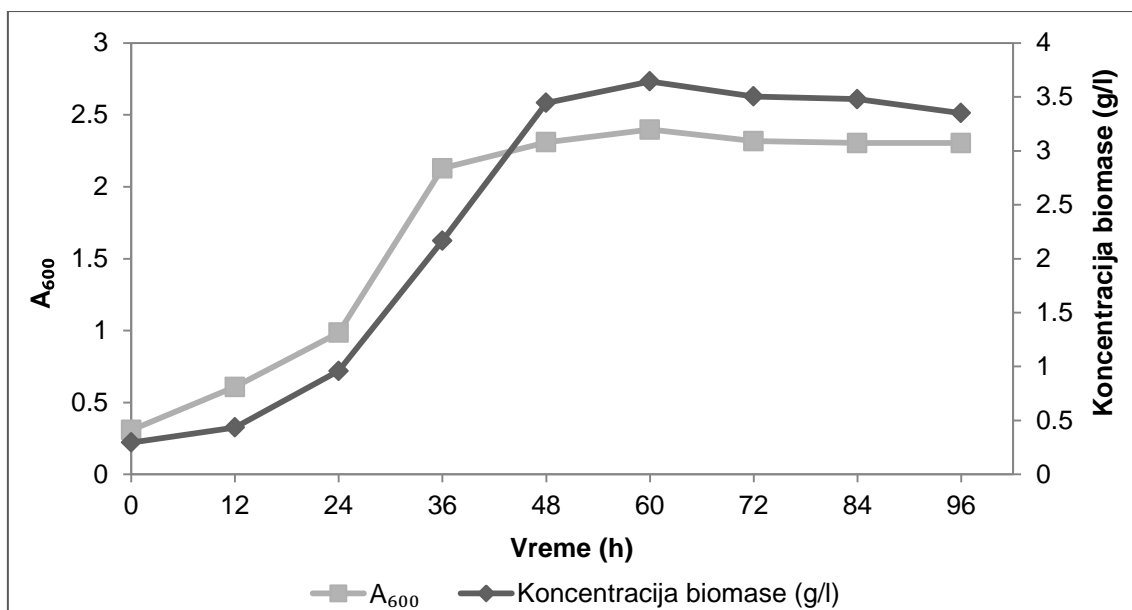


Slika 5.9. Zone inhibicije dobijene testiranjem antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti (96 h) proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* tokom kultivacije u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola

5.4.3.2. Praćenje toka kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola

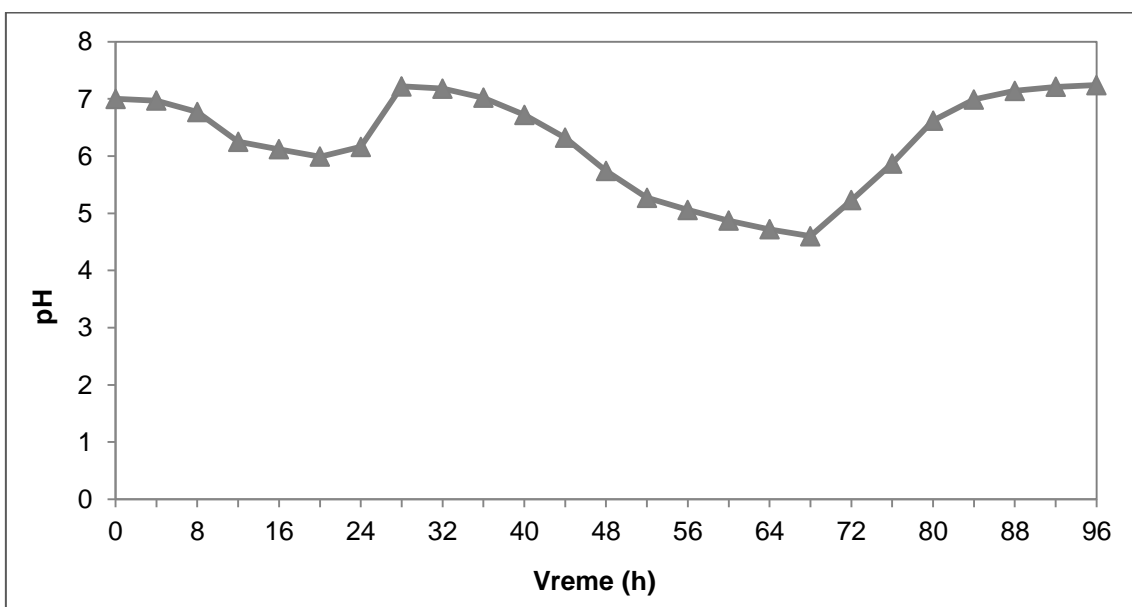
Prilikom kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 3 l (radna zapremina 2 l) sa ciljem proizvodnje biokontrolnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* praćeni su sledeći parametri bioprocesa: temperatura, vrednost pH, sadržaj biomase proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*, rezidualne koncentracije nutrijenata (glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora) u kultivacionoj tečnosti, kao i antimikrobna aktivnost uzoraka kultivacione tečnosti protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*. S obzirom da je tokom bioprocesa vršena termoregulacija grejanjem bioreaktora spoljašnjom oblogom i hlađenjem kultivacione tečnosti promenom protoka hladne vode kroz hladnjak uronjen u kultivacionu tečnost, u toku trajanja bioprocesa temperatura je odgovarala zadatoj vrednosti temperature (28°C), koja je optimalna za rast proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*. U toku bioprocesa vršeno je kontinualno merenje vrednosti pH kultivacione tečnosti primenom staklene pH elektrode. U cilju prikupljanja preostalih navedenih eksperimentalnih podataka vršena su uzorkovanja kultivacione tečnosti u tačno definisanim vremenskim intervalima (12 h) tokom bioprocesa u trajanju od 96 h. Tokom bioprocesa vršeno je interno mešanje kultivacione tečnosti primenom Ruštonove turbine sa dva impelera brzinom 250 o/min, kao i interna aeracija sterilnim vazduhom brzinom od 1 vvm. Rezultati prikazani u okviru ovog poglavlja predstavljaju srednje vrednosti iz tri kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola.

Prilikom praćenja sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru (slika 5.10.) primenjene su iste analitičke metode kao u slučaju kultivacije proizvodnog mikroorganizma u Vulfovima (spektrofotometrija i gravimetrija). Kao i prilikom kultivacije proizvodnog mikroorganizma u Vulfovima, i prilikom kultivacije u bioreaktoru zapaža se karakterističan trend promene sadržaja biomase u toku kultivacije koji odgovara tipičnoj bakterijskoj krivi rasta. Međutim, velika razlika u odnosu na kultivaciju proizvodnog mikroorganizma u Vulfovima jeste postignuta maksimalna koncentracija biomase proizvodnog mikroorganizma u bioreaktoru, koja je iznosila 3,64 g/l. U odnosu na početak kultivacije u bioreaktoru postignuto je povećanje sadržaja biomase za više od 12 puta. Sa druge strane, u poređenju sa maksimalnim sadržajem biomase proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* tokom kultivacije u Vulfovima (1,9 g/l), tokom kultivacije u bioreaktoru postignuto je povećanje sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma za 91,84%, odnosno skoro dva puta veća koncentracija biomase proizvodnog mikroorganizma. Ovakav rezultat kultivacije proizvodnog mikroorganizma u bioreaktoru može se objasniti boljim uslovima za rast proizvodnog mikroorganizma u pogledu temperature, prenosa mase nutrijenata zahvaljujući internom mešanju, ali i boljem prenosu mase kiseonika zahvaljujući većoj brzini aeracije i boljem dispergovanju gasa (zahvaljujući specifičnoj konstrukciji aeratora kojom se obezbeđuje dobijanje sitnih mehurića vazduha, čime se povećava kontaktna površina gas-tečnost i obezbeđuje bolji prenos mase kiseonika, čemu doprinosi i interno mešanje).



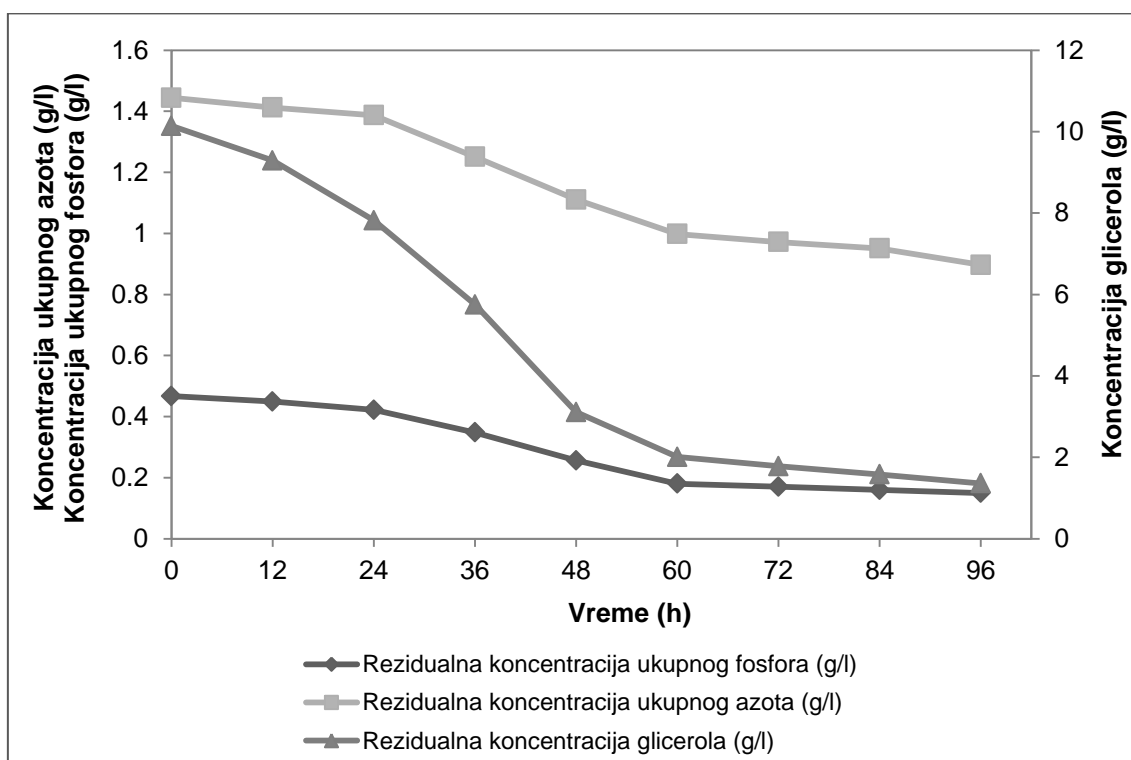
Slika 5.10. Praćenje toka kultivacije u pogledu sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola

Iako je promena vrednosti pH tokom kultivacije praćena kontinualno, na slici 5.11. su prikazani rezultati merenja zabeleženi na svaka četiri časa tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u laboratorijskom bioreaktoru. Iz prikazanih rezultata mogu se videti periodi kultivacije i faze rasta proizvodnog mikroorganizma u toku kojih je dolazilo do produkcije kiselih ili baznih proizvoda metabolizma. Može se zaključiti da je intenzivna faza rasta proizvodnog mikroorganizma praćena sintezom kiselih proizvoda metabolizma i snižavanjem vrednosti pH kultivacione tečnosti.



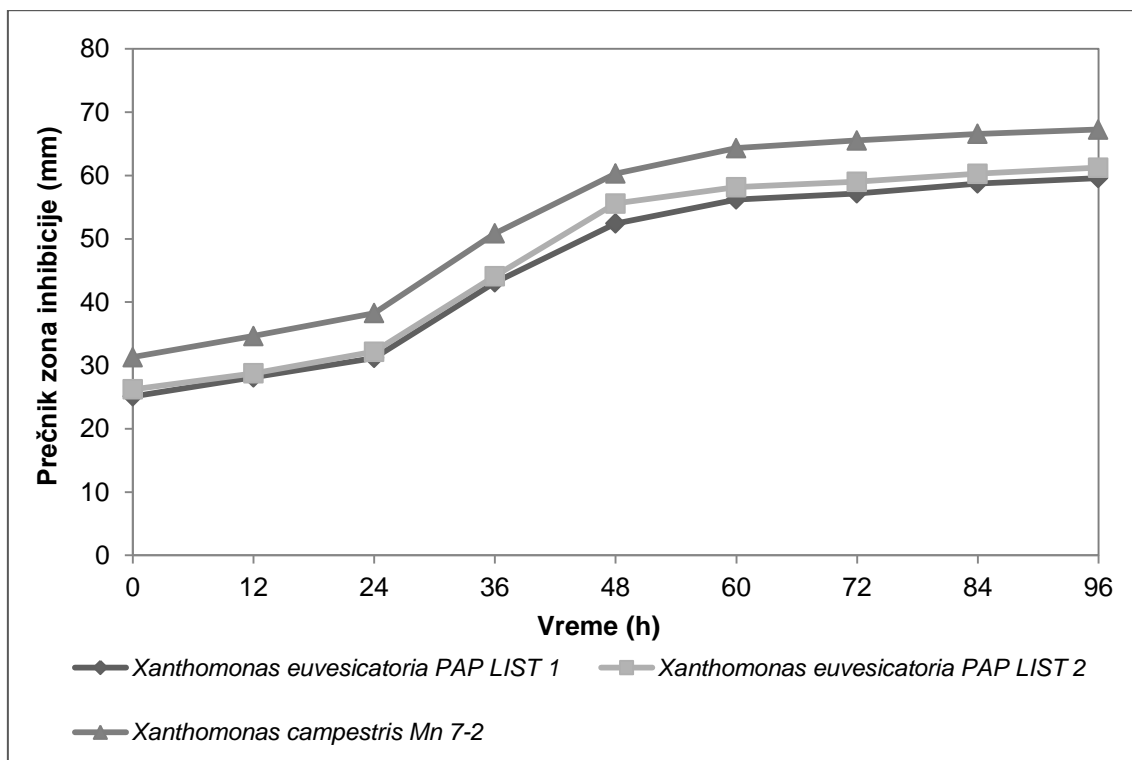
Slika 5.11. Praćenje toka kultivacije u pogledu vrednosti pH kultivacione tečnosti tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola

Rezultati određivanja rezidualnih koncentracija nutrijenata tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u laboratorijskom bioreaktoru prikazani su na slici 5.12. Sličan trend promene koncentracija nutrijenata zapaža se i tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma u Vulfovim bocama i tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru, kao i povezanost potrošnje nutrijenata sa rastom i umnožavanjem biomase proizvodnog mikroorganizma. Eksponencijalna faza rasta proizvodnog mikroorganizma okarakterisana bržom potrošnjom nutrijenata uočava se u periodu između 24. i 48. časa. Uočljivo je da nakon 60. časa kultivacije brzina potrošnje svih nutrijenata opada i postaje gotovo konstantna, što odgovara stacionarnoj fazi rasta proizvodnog mikroorganizma. Može se zapaziti smanjenje koncentracije glicerola sa inicijalne vrednosti od 10,14 g/l na finalnu koncentraciju od 1,36 g/l, odnosno potrošnju glicerola (stepen konverzije) od 86,59% u toku kultivacije proizvodnog mikroorganizma. Sa druge strane, stepeni konverzije izvora azota i fosfora u toku kultivacije proizvodnog mikroorganizma bili su manji: 37,88% za azot i 67,88% za fosfor. Manja iskorišćenost ova dva nutrijenta u toku kultivacije proizvodnog mikroorganizma može se pripisati rezultatima optimizacije sastava hranjive podloge na bazi komercijalnog glicerola, gde je bilo neophodno napraviti kompromis između zadatih ciljeva optimizacije: minimizacije rezidualnih koncentracija nutrijenata i maksimizacije antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, odnosno maksimizacije prečnika zona inhibicije. Vrednosti rezidualnih koncentracija svih nutrijenata iz 96. časa kultivacije u saglasnosti su sa vrednostima koje su predvidele regresione jednačine za rezidualni sadržaj glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora dobijene u fazi modelovanja. Rezidualna koncentracija glicerola iznosi 1,36 g/l u poređenju sa predviđenom vrednošću od 1,41 g/l, dok rezidualne koncentracije ukupnog azota i ukupnog fosfora iznose 0,897 g/l i 0,15 g/l, redom, u poređenju sa modelima predviđenim vrednostima od 0,92 g/l za rezidualni sadržaj ukupnog azota i 0,13 g/l za rezidualni sadržaj ukupnog fosfora.



Slika 5.12. Praćenje toka kultivacije u pogledu rezidualnih koncentracija nutrijenata tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranjive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola

Rezultati praćenja antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv tri fitopatogena izolata roda *Xanthomonas* (*Xanthomonas campestris* Mn 7-2, izolovanog iz kupusa sa simptomima crne truleži, i dva izolata vrste *Xanthomonas euvesicatoria* označena kao PAP LIST 1 i PAP LIST 3, izolovana sa lista paprike sa simptomima bakteriozne pegavosti) tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru prikazani su na slici 5.13. Kao i prilikom kultivacije proizvodnog mikroorganizma u Vulfovima bocama, trend promene prečnika zona inhibicije prati rast i umnožavanje biomase proizvodnog mikroorganizma. Na slici 5.14. prikazane su zone inhibicije dobijene testiranjem antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti (96 h) proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*. Antagonističko dejstvo biomase proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv testiranih fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* potvrđeno je i slikama na kojima su prikazane dobijene zone inhibicije, na kojima se može uočiti suzbijanje rasta fitopatogenih izolata mehanizmima kompeticije i produkcije antimikrobnih jedinjenja (slika 5.14.). Maksimalne vrednosti prečnika zona inhibicije iznosile su 67,25 mm za izolat *Xanthomonas campestris* Mn 7-2, 59,61 mm za izolat *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 1 i 61,26 mm za izolat *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 2. Dobijene vrednosti prečnika zona inhibicije su mnogo veće u poređenju sa vrednostima prečnika zona inhibicije dobijenim tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma u Vulfovima bocama, što se opet može povezati sa boljim uslovima kultivacije koje obezbeđuje laboratorijski bioreaktor u poređenju sa Vulfovima bocama, kao i rezultujućim većim sadržajem biomase proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru, koji neminovno implicira i veći stepen antimikrobne aktivnosti protiv testiranih fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*.



Slika 5.13. Praćenje toka kultivacije u pogledu antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranjive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola

Xanthomonas campestris Mn
7-2

Xanthomonas euvesicatoria
PAP LIST 1

Xanthomonas euvesicatoria
PAP LIST 2



Slika 5.14. Zone inhibicije dobijene testiranjem antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti (96 h) proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranjive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola

5.5. IDENTIFIKACIJA ANTIMIKROBNIH JEDINJENJA PROIZVEDENIH OD STRANE PROIZVODNOG MIKROORGANIZMA *Bacillus velezensis* TOKOM KULTIVACIJE U LABORATORIJSKOM BIOREAKTORU

Pripadnici roda *Bacillus* ispoljavaju izvanrednu biokontrolnu aktivnost prema fitopatogenima zahvaljujući sposobnosti produkcije lipopeptidnih antibiotika (surfaktin, fengicin, iturin, bacilomicin) (Guo i sar., 2014). Amfilna struktura lipopeptida, koja podrazumeva hidrofilni peptidni deo i hidrofobni deo koji predstavlja masna kiselina, pokazuje značajne prednosti u odnosu na isključivo peptidnu prirodu jedinjenja sa antimikrobnim delovanjem. Lipopeptidi su najčešće ciklične prirode zbog uspostavljanja ili indirektno veze između C-kraja peptidnog ostatka i β -hidroksi masne kiseline ili direktne veze sa α -amino kiselinom (Mnif i Ghribi, 2015). Osim toga, veliki broj sojeva roda *Bacillus* proizvodi biosurfaktante (Plaza i sar., 2015; Chen i sar., 2016). Biosurfaktanti predstavljaju površinski bioaktivne agense koji sadrže lipofilne i hidrofilne delove (Kosarić i sar., 1987). Njihovo delovanje se ogleda u smanjenju površinskog i interfacijalnog napona između individualnih molekula koji su u kontaktu, kao i u formiranju selektivnih jonskih pora u membranskom dvosloju. Pokazano je da veliki broj biosurfaktanata poseduje antiviralna, antibakterijska, antifungalna, antiinsekticidna i hemolitička svojstva (Mnif i Ghribi, 2015).

Lipopeptidi predstavljaju jedinjenja ciklične strukture koja proizvode bakterije rodova *Bacillus* i *Pseudomonas*. Ova jedinjenja se sastoje od hidrofilnog peptidnog dela, dužine 7-10 aminokiselina, koji je povezan sa hidrofobnim delom koji čini masna kiselina (Smith i sar., 2010). Ciklični lipopeptidi bakterija roda *Bacillus* uglavnom se svrstavaju u tri familije: surfaktini, iturini i fengicini. Fengicin sadrži peptidni niz od 10 aminokiselina i masnu kiselinu sa 14-18 ugljenikovih atoma.

Familija iturina obuhvata heptapeptide sa hiralnom sekvencom koja predstavlja kombinaciju aminokiselina L-konfiguracije i D-konfiguracije u redosledu LDDLLDL. Iturini, dakle, sadrže peptidnu sekvencu od sedam aminokiselina koja je povezana sa masnom kiselinom koja sadrži 14-17 ugljenikovih atoma. Ciklična struktura iturina se uspostavlja amidnom vezom između N-kraja β -amino masne kiseline i C-kraja peptidnog lanca (Cochrane i Vederas, 2016). U familiju iturina spadaju iturini, miksirini (Zhang i sar., 2004), subtulen (Thasana i

sar., 2010), mikosubtilin (Peypoux i sar., 1986), mojavensin (Ma i sar., 2012) i bacilomicini. Lipopeptidi iz familije iturina ispoljavaju prvenstveno antifungalnu aktivnost, uz ograničenu antibakterijsku aktivnost (Eshita i sar., 1995). Predloženi mehanizam fungicidnog delovanja ogleda se interakciji sa sterolnim komponentama membrane gljiva, čime dolazi do povećanja permeabilnosti membrane za K^+ jone (Maget-Dana i sar., 1989). Iturin A ispoljava širok spektar antifungalne aktivnosti, uključujući delovanje protiv gljiva rodova *Rhizoctonia*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* i *Colletotrichum* (Yu i sar., 2002; Gong i sar., 2006; Pyoung i sar., 2010). Bacilomicin D inhibira rast gljiva *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* i *Kluyveromyces bulgaris* (Moyne i sar., 2001). Takođe, bacilomicin F i bacilomicin L ispoljavaju snažno antifungalno dejstvo protiv različitih fungalnih patogena (Eshita i sar., 1995).

Surfaktini se nalaze među najvažnijim lipopeptidima detektovanim u rizosferi i biljkama, koga proizvode bakterije roda *Bacillus* (Nihorimbere i sar., 2012). Surfaktini su najbolje proučeni ciklični lipopeptidi koji se sastoje od peptidne sekvence od sedam aminokiselina (LLDLLDL), koja je povezana sa masnom kiselinom koja može da sadrži 13-16 ugljenikovitih atoma. Za razliku od iturina, kod surfaktina se ciklizacija molekula odvija uspostavljanjem estarske veze. Surfaktini se intenzivno proučavaju zbog izuzetno snažne biosurfaktantske aktivnosti, sposobnosti suzbijanja fitopatogena – izazivača bioleste biljaka, kao i zbog niske toksičnosti prema ljudima i životnoj sredini (Cawoy i sar., 2014). Uzimajući u obzir njihovu amfifilnu prirodu, jasno je zbog čega surfaktini predstavljaju odličnu grupu surfaktanata. Njihovo antimikrobno dejstvo se uglavnom ogleda u narušavanju strukture membrane. Za razliku od fungicida koji suzbijaju rast gljiva targetiranjem sinteze proteina ili replikacije DNK, surfaktin inhibira rast bakterija narušavanjem strukture membrane ili njenom dezintegracijom putem fizičko-hemijske interakcije (Deleu i sar., 2013) ili suzbija rast gljiva podsticanjem kolonizacije bakterija koje ispoljavaju benefita svojstva prema biljkama (Jia i sar., 2015) ili indukuju sistemsku rezistentnost biljaka (Ongena i Jacques, 2008; Jourdan i sar., 2009; Cawoy i sar., 2014). Pri velikim koncentracijama surfaktin ispoljava dejstvo slično deterdžentu, dok pri umerenim vrednostima koncentracija formira pore koje mogu da propuštaju jone na ćelijskoj membrani (Heerklotz i Seelig, 2007). Vezivanje surfaktina za Ca^{2+} jon olakšava njegovu penetraciju u membranu. Surfaktin takođe može da doprinese prenosu drugih monovalentnih i divalentnih jona kroz ćelijsku membranu, što rezultuje inhibicijom aktivnosti ciklične AMP (adenozin monofosfat) fosfodiesteraze (Thimon i sar., 1992).

Međutim, visoki troškovi biotehnoške proizvodnje surfaktina ograničavaju njegovu komercijalnu primenu u poljoprivredi. Postoji nekoliko strategija za povećanje prinosa surfaktina, kao i za redukciju troškova njegove proizvodnje, kao što su genetičke izmene proizvodnih sojeva roda *Bacillus* za komercijalnu primenu (Ohno i sar., 1995), primena agro-industrijskog otpada kao izvora ugljenika (Zhu i sar., 2013; Gurjar i Sengupta., 2015), optimizacija sastava kultivacionog medijuma (Ghribi i Ellouze-Chaabouni, 2011; Liu i sar., 2012; Zhao i sar., 2013; Willenbacher i sar., 2015) i uslova kultivacije (Sameh i sar., 2013), dizajniranjem specifičnih bioreaktora i primenom tehnika koje sprečavaju stvaranje pene (Willenbacher i sar., 2015; Najmi i sar., 2018) itd. Coutte i sar. (2015) su uspeli da povećaju prinos surfaktina 20,9 puta optimizacijom sastava kultivacionog medijuma. Dhali i sar. (2017) su uspeli da povećaju prinos surfaktina, kao i udeo aktivnih izoformi surfaktina, naročito izoforme C14 sa linearnim lancem masne kiseline, primenom genetičkog inženjeringa metaboličkog puta razgranatih masnih kiselina. U ovom istraživanju je otkriveno da je acetoin ključni metabolit povezan sa proizvodnjom ove izoforme surfaktina sa linearnim masnokiselinskim lancem. Međutim, fiziološki mehanizam proizvodnje surfaktina još uvek nije otkriven (Henkel i sar., 2017). Surfaktin je važan predstavnik familije mikrobioloških lipopeptida sa značajnom primenom u polju medicine, poljoprivrede i različitih grana industrije. Sa ciljem unapređenja njegove proizvodnje u industrijskim uslovima, izvršen je veliki broj istraživanja koja su uspela da poboljšaju prinos, čistoću i antagonističku aktivnost surfaktina (Nihorimbere i sar., 2012).

Familija fengicina uključuje fengicine (Pathak i sar., 2012; Villegas-Escobar i sar., 2013) i plipastatine (Honma i sar., 2012). Fengicini sadrže peptidni niz od 10 aminokiselina i masnu kiselinu sa 14-18 ugljenikovih atoma. Po svojoj strukturi, to su dekaeptidi acilovani β -hidroksi masnom kiselinom, kod kojih se ciklizacija odvija zahvaljujući uspostavljanju veze između fenolne strane lanca aminokiseline tirozin na trećoj poziciji u peptidnom lancu i C-kraja peptidnog lanca. Kod fengicina se takođe javlja varijacija u strukturi lipidnog dela, koji može da uključuje linearne, anteizo ili izo masne kiseline, koje mogu da sadrže dvostruku vezu između drugog i trećeg, trećeg i četvrtog i trinasetog i četrnaestog ugljenikovog atoma (Ongena i Jacques, 2008). Ova klasa lipopeptida ispoljava širok spektar antifungalnog dejstva, uglavnom protiv filamentoznih gljiva (Koumoutsi i sar., 2004; Hofemeister i sar., 2004). Takođe ispoljavaju antagonističko dejstvo prema gljivama koje izazivaju oboljenja uljane repice i pšenice, stoga je predložena njihova primena u poljoprivredi (Ramarathnam, 2007). Istraživanja ukazuju da se mehanizam antifungalnog dejstva fengicina ogleda u narušavanju strukture membrane (Deleu i sar., 2008; Patel i sar., 2011).

Locilomicini predstavljaju novu familiju lipopeptida koje proizvode bakterije roda *Bacillus*. Ova jedinjenja sadrže ciklični peptid sa devet aminokiselinskih ostataka i β -hidroksi masnu kiselinu koja može da sadrži 13-15 ugljenikovih atoma (Luo i sar., 2015a). Peptidni niz od devet aminokiselina formira cikličnu strukturu laktona. Takođe, za razliku od ostalih lipopeptidnih jedinjenja, locilomicini sadrže samo jednu aminokiselinu D konfiguracije (D-glutamin na drugoj poziciji u peptidnom lancu) (Luo i sar., 2015b). Takođe, uočeno je da ispoljavaju ograničeno antifungalno delovanje i izraženu antibakterijsku i antivirusnu aktivnost, kao i da utiču na fenotipske karakteristike bakterija roda *Bacillus* (Luo i sar., 2015a).

Lipopeptidi sa antimikrobnim delovanjem su do sada izolovani, prečišćeni, kvantifikovani i okarakterisani primenom različitih metoda i analitičkih tehnika, kako bi se bolje razumela uloga hemijskih komponenti odgovornih za njihovu biološku aktivnost. Trenutni pristupi uglavnom podrazumevaju kombinaciju hromatografskih tehnika, masenu spektrometriju, nuklearnu magnetnu rezonancu (NMR – *Nuclear Magnetic Resonance*) i infracrvenu spektroskopiju sa Furijeovom transformacijom (FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) (Jasim i sar., 2016; Biniarz i sar., 2017).

Identifikacija antimikrobnih jedinjenja na osnovu rezultata analize supernatanta kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* primenom LC-MS izvršena je primenom dostupnih literaturnih podataka o identifikovanim jedinjenjima primenom iste analitičke tehnike, na osnovu vrednosti m/z , koja predstavlja odnos molekulske mase jedinjenja i njegovog naelektrisanja. Deng i sar. (2017) su identifikovali jedinjenja iz familije surfaktina sa vrednostima m/z u opsegu 995,2-1058,2. Slični opsezi vrednosti m/z za familiju surfaktina dobijeni su u istraživanjima koja su izveli Mejri i sar. (2018) (994,6-1058,7), Toral i sar. (2018) (994,6-1036,7), Chen i sar. (2017) (994,4-1036,5) i de Fillippi i sar. (2018) (994-1036). Sa druge strane, Arguelles-Arias i sar. (2009) identifikovali su proizvode reakcije adicije između jedinjenja iz familije surfaktina i jona natrijuma u opsegu vrednosti m/z 1030,8-1058,8. Adukti navedene reakcije takođe su identifikovani u istom opsegu vrednosti m/z od strane Jha i sar. (2018), dok su se vrednosti m/z u istraživanju koje su sproveli Adeniji i sar. (2018) kretale u opsegu 1030,8-1074,8.

Deng i sar. (2017) su jedinjenja iz familije iturina u opsegu vrednosti m/z 1044,3-1057,3. U istraživanju koje su sproveli Han i sar. (2018) identifikovali su dva jedinjenja iz familije iturina: iturin A sa 14 ugljenikovih atoma u masnokiselinskom lancu (m/z 1057,5 [$M+H^+$]) i iturin A sa 16 ugljenikovih atoma u masnokiselinskom lancu (m/z 1071,5 [$M+H^+$]). Iturin A sa 14 ugljenikovih atoma u masnokiselinskom lancu takođe je identifikovan pri vrednosti m/z 1066,1 [$M+Na^+$]), dok je iturin A sa 15 ugljenikovih atoma u masnokiselinskom lancu identifikovan pri vrednosti m/z 1079,7 [$M+Na^+$]) (Arguelles-Arias i sar., 2009).

Jedinjenja iz familije fengicina sa zasićenim lancem masne kiseline su identifikovana u opsegu vrednosti m/z 1435,8-1505,8, dok su jedinjenja koja sadrže nezasićenu masnu

kiselinu sa jednom dvostrukom vezom identifikovana u opsegu vrednosti m/z 1433,8-1489,8 (Mejri i sar., 2018). Toral i sar. (2018) su identifikovali fengicin A sa 15 ugljenikovih atoma u masnokiselinskom lancu pri vrednosti m/z 1477,8 [M+H⁺], dok je fengicin B sa 16 ugljenikovih atoma u masnokiselinskom lancu identifikovan pri vrednosti m/z 1491,8 [M+H⁺]. Fengicin sa 16 ugljenikovih atoma u masnokiselinskom lancu identifikovan je pri vrednosti m/z 1463,8 [M+H⁺], dok je fengicin sa 17 ugljenikovih atoma u masnokiselinskom lancu identifikovan pri vrednosti m/z 1477,9 [M+H⁺] (Han i sar., 2018). Fengicini koji sadrže aminokiselinu alanin na šestoj poziciji u peptidnom lancu identifikovani su pri vrednostima m/z 1471,9 [M+Na⁺], 1485,9 [M+Na⁺] i 1499,9 [M+Na⁺], za jedinjenja koja sadrže 15, 16 i 17 ugljenikovih atoma u masnokiselinskom lancu, redom (Arguelles-Arias i sar., 2009). Sa druge strane, i istom istraživanju identifikovani su fengicini koji sadrže aminokiselinu valin na šestoj poziciji u peptidnom lancu pri vrednostima m/z 15131,9 [M+Na⁺] i 1527,8 [M+Na, za jedinjenja koja sadrže 16 i 17 ugljenikovih atoma u masnokiselinskom lancu, redom. Prema rezultatima istraživanja koje su sproveli de Fillippi i sar. (2018), fengicini A su identifikovani u opsegu vrednosti m/z 1464-1506 [M+H⁺], dok su fengicini B identifikovani u opsegu vrednosti m/z 1462-1490 [M+H⁺]. Osim toga, Adeniji i sar. (2018) su identifikovali fengicine u opsegu vrednosti m/z 1449,9-1515,9.

Toral i sar. (2018) su identifikovali jedinjenja koja pripadaju grupi bacilomicina D sa različitim brojem ugljenikovih atoma u masnokiselinskom lancu (14, 15 i 16 ugljenikovih atoma) u opsegu vrednosti m/z 1031,5-1059,6. Jedinjenja iz familije bacilomicina D su takođe identifikovana u opsegu vrednosti m/z 1031,6-1103,4 (Han i sar., 2018). Liu i sar. (2011) su identifikovali bacilomicin D sa 14 (m/z 1032 [M+H⁺]), 15 (m/z 1046 [M+H⁺]) i 16 ugljenikovih atoma u masnokiselinskom lancu (m/z 1060 [M+H⁺]). Adeniji i sar. (2018) si identifikovali jedinjenja iz grupe bacilomicina dD u opsegu vrednosti m/z 1031,7-1543,8.

Tabela 5.9. Rezultati analize supernatanta kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u pogledu identifikacije prisutnih lipopeptidnih jedinjenja primenom LC-MS

Jedinjenje	Retenciono vreme (min)	Površina pika	m/z
Surfaktin	15.378	235467	996.9
Surfaktin	1.546	53263	1008.5
Surfaktin	9.291	534349	1029.5
Surfaktin	9.454	274956	1043.5
Surfaktin	11.245	27196	1043.5
Iturin	9.451	549604	1045.6
Iturin	11.24	131479	1045.6
Iturin	9.226	33779	1045.6
Iturin	11.426	53206	1057.3
Iturin	9.734	42329	1057.5
Iturin	11.428	204768	1057.5
Fengicin	8.883	62897	1461.8
Fengicin	1.603	12026	1489.7
Fengicin	8.96	60938	1490.9
Bacilomicin	11.243	121623	1020.6
Bacilomicin	11.427	887446	1034.6
Locilomicin	1.574	44514	1146.8
Locilomicin	15.368	160620	1146.8

Luo i sar. (2015) su identifikovali nekoliko jedinjenja iz grupe locilomicina sa različitim brojem ugljenikovih atoma u masnokiselinskom lancu (13, 14 i 15 ugljenikovih atoma), čije molekulske mase iznose 1145,6 Da, 1159,6 Da i 1173,6 Da, redom.

Prilikom potrage za potencijalnim biokontrolnim agensima za komercijalnu primenu identifikovan je skrining pristup koji se sastoji od nekoliko koraka koji dovodi do izbora robusnih i efikasnih kandidata (Köhl i sar., 2011): opsežna *in vitro* analiza koja započinje kultivacijom sojeva i molekularna identifikacija mehanizama delovanja, uz *in silico* istraživanje genoma potencijalnih kandidata obezbeđuju izbor biokontrolnog agensa sa boljom vijabilnošću i efikasnošću *in planta* (Adeniji i Babalola, 2018). Rezultati naučnih istraživanja pokazuju da se ekspresija gena za biosintezu i sekreciju sekundarnih metabolita teže odvija tokom kultivacije biokontrolnih agenasa u laboratorijskim uslovima usled neodgovarajućih uslova za rast i umnožavanje biomase, kao i za proizvodnju metabolita od strane ovih mikroorganizama (Laureti i sar., 2011). Izostanak ekspresije gena i proizvodnje sekundarnih metabolita može da dovede do netačnog zaključka da nije identifikovan ili detektovan gen ili metabolit odgovoran za antimikrobnu aktivnost biokontrolnog agensa (Michelsen i sar., 2015). Stoga, da bi se u potpunosti razumeo potencijal biokontrolnih agenasa, neophodno je poređenje velikog broja sekvenci genoma nezavisnih izolata (Tettelin i sar., 2005). Poređenje celokupnog repertoara gena za grupu genoma srodnih bakterijskih vrsta predstavlja instrumentalni pristup za razvoj novih jedinjenja sa antimikrobnom aktivnošću i za funkcionalnu karakterizaciju važnih genetičkih odrednica značajnih sojeva mikroorganizama (Medini i sar., 2005). Bakterijski pangenom može se definisati kao kompletan repozitorijum gena lociranih u genomima srodnih bakterijskih vrsta. On uključuje „obavezni genom“ (*“core genome”*), odnosno gene identifikovane kod dva ili više sojeva, i „neobavezni genom“ (*“dispensable genome”*), koji uključuje gene jedinstvene a pojedinačne sojeve (Rouli i sar., 2015). Obavezni i neobavezni geni predstavljaju ključne komponente za razpoznavanje diverziteta na nivou vrste. Istraživači trenutno koriste kombinatorni pristup koji podrazumeva primenu rudarenja genoma (*genome mining*), analizu pangenoma, razjašnjenje strukturalnih podataka i metabolomičku karakterizaciju, sa ciljem identifikacije metabolita proizvedenih od strane mikroorganizama (Dunlap i sar., 2013;). Najčešće genomske podaci omogućavaju predviđanja koja dovode do detekcije novih metaboličkih puteva sinteze, gena i enzima koji potom omogućavaju eksperimentalnu izolaciju, razjašnjenje strukture i hemijsku karakterizaciju novih jedinjenja (Challis, 2008). Kombinatorni pristup obezbeđuje korelaciju između *in silico* ili teorijski predviđenih metabolita sa strukturno i hemijski identifikovanim proizvodima metabolizma (Ziemert i sar., 2016).

5.6. MODELOVANJE I OPTIMIZACIJA SASTAVA HRANLJIVE PODLOGE NA BAZI SIROVOG GLICEROLA

Sirovi glicerol iz proizvodnje biodizela predstavlja jedan od najšire dostupnih industrijskih efluenata. Uzimajući u obzir porast proizvodnje biodizela usled sve veće potražnje za biogorivima kao alternativom fosilnim gorivima, i činjenice da sirovi glicerol tokom proizvodnje biodizela nastaje u količini od 10% (w/w) u odnosu na količinu proizvedenog biodizela, jasno je da rastuća količina dostupnog sirovog glicerola predstavlja problem sa ekološke tačke gledišta, jer ovaj efluent, koji sadrži veliku količinu različitih nečistoća, nije moguće jednostavno odložiti u životnu sredinu. Zbog toga, paralelno sa rastom proizvodnje biodizela, dolazi i do sve većeg interesovanja naučne javnosti za ispitivanje mogućih rešenja kada je u pitanju iskorišćenje sirovog glicerola. Kao jedno od obećavajućih rešenja javlja se mogućnost njegove mikrobiološke konverzije u različite proizvode sa dodatom vrednošću.

U okviru ove doktorske disertacije sirovi glicerol iz proizvodnje biodizela korišćen je kao izvor ugljenika tokom biotehnoške proizvodnje biokontrolnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* primenom proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*. Sirovi glicerol korišćen u fazi istraživanja koja se odnosi na modelovanje i

optimizaciju sastava hranljive podloge za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* potiče iz proizvodnje biodizela primenom otpadnih ulja i masti kao sirovine i dobijen je od kompanije BIODIZEL CO d.o.o. (Beograd, Srbija). Njegov sastav i parametri kvaliteta analizirani su posredstvom kompanije Mol d.o.o. (Beograd, Srbija), a rezultati analiza su prikazani u tabeli 5.10.

Tabela 5.10. Parametri kvaliteta sirovog glicerola iz proizvodnje biodizela iz otpadnih ulja i masti

Parametar	Jedinica	Vrednost
Gustina	g/cm ³	1,12
Sadržaj glicerola	% (w/w)	60,88
Kinematska viskoznost	mm ² /s	74,97
Sadržaj sumpora	mg/kg	1,58
Sadržaj fosfora	% (w/w)	0,015
Sadržaj natrijuma	mg/kg	199,83
Sadržaj kalijuma	% (w/w)	3,73
Sadržaj kalcijuma	mg/kg	6,76
Sadržaj magnezijuma	mg/kg	2,31
Sadržaj organskih materija	% (w/w)	95,12
Sadržaj metanola	% (w/w)	0,45
Sadržaj vode	% (w/w)	4,84
Sadržaj mehaničkih nečistoća	% (w/w)	0,03

5.6.1. MATEMATIČKI MODELI UTICAJA KONCENTRACIJE KOMPONENTI HRANLJIVE PODLOGE NA BAZI SIROVOG GLICEROLA NA ANTIMIKROBNU AKTIVNOST I REZIDUALNE KONCENTRACIJE NUTRIJENATA

Prilikom modelovanja sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* primenom metodologije odzivne površine korišćen je isti eksperimentalni plan u pogledu sastava korišćenih hranljivih podloga (tabela 4.6., poglavlje 4.2.2.3.) i uslovi kultivacije kao u eksperimentalnoj fazi modelovanja sastava hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola. Ispitivane nezavisne promenljive (faktori) i njihovi nivoi bili su: inicijalna koncentracija izvora ugljenika (glicerol) 10-35-60 g/l, inicijalna koncentracija organskog izvora azota (ekstrakt kvasca) 0-2,5-5 g/l, inicijalna koncentracija neorganskog izvora azota ((NH₄)₂SO₄) 0-1,5-3 g/l i inicijalna koncentracija izvora fosfora (K₂HPO₄) 1-5,5-10 g/l. Osim ovih komponenata, svaka hranljiva podloga sadržala je i 0,3 g/l MgSO₄·7H₂O. Nakon završetka kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* kao odzivi, odnosno zavisne promenljive bioprocesa, praćeni su prečnik zona inhibicije dobijenih testiranjem antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, kao i rezidualne koncentracije osnovnih nutrijenata: rezidualna koncentracija glicerola, rezidualna koncentracija ukupnog azota i rezidualna koncentracija ukupnog fosfora. Fitovanje dobijenih eksperimentalnih podataka izvršeno je polinomskim jednačinama drugog reda (jednačina 4.7., poglavlje 4.9.2.).

Rezultati analize varijanse odabranih odziva prikazani su u tabeli 5.11. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da su dobijeni matematički modeli za sve ispitivane odzive statistički značajni na nivou značajnosti od 95%, s obzirom da su dobijene *p*-vrednosti za sve odzive manje od 0,05. Adekvatnost dobijenih matematičkih modela takođe je procenjena na osnovu *F*-vrednosti (Fišerovog testa). Uzimajući u obzir da su dobijene *F*-vrednosti manje od tabličnih vrednosti za odgovarajući stepen slobode primenjenog eksperimentalnog plana, može se zaključiti da su dobijeni modeli pogodni za opisivanje uticaja ispitivanih nezavisnih promenljivih na odabrane odzive. Osim toga, na osnovu vrednosti koeficijenata

determinacije može se zaključiti da je postignuto zadovoljavajuće fitovanje eksperimentalnih podataka primenjenim polinomskim jednačinama drugog reda.

Tabela 5.11. Analiza varijanse odabranih odziva u fazi modelovanja sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola

Odziv	SS	DF	MS	F-vrednost	p-vrednost	R ²
Prečnik zone inhibicije (mm)	49502,05 ^a 7,68 ^b	15 ^a 12 ^b	3300,14 ^a 0,64 ^b	5156,05	0,0000	0,925
Rezidualni sadržaj glicerola (g/l)	21839,08 ^a 105,55 ^b	15 ^a 12 ^b	1455,94 ^a 8,80 ^b	165,52	0,0000	0,977
Rezidualni sadržaj ukupnog azota (g/l)	22,38 ^a 0,03 ^b	15 ^a 12 ^b	1,49 ^a 0,00 ^b	532,26	0,0000	0,974
Rezidualni sadržaj ukupnog fosfora (g/l)	66,85 ^a 0,93 ^b	15 ^a 12 ^b	4,46 ^a 0,08 ^b	57,25	0,0000	0,943

^a model, ^b reziduali

Koeficijenti modela dobijeni regresionom analizom nakon fitovanja eksperimentalnih podataka polinomskim jednačinama drugog reda prikazani su u tabeli 5.12. Statistička značajnost koeficijenata regresionih modela, na nivou značajnosti od 95%, procenjena je na osnovu odgovarajućih *p*-vrednosti. Statistički značajni koeficijenti matematičkih modela za odabrane odzive, kao i njihove *p*-vrednosti, boldovani su u tabeli 5.12.

Kada je u pitanju matematički model za prečnik zona inhibicije, iz prikazanih rezultata može se zaključiti da statistički značajan uticaj na odabrani odziv pokazuju linearni uticaj inicijalne koncentracije glicerola, inicijalne koncentracije ekstrakta kvasca i inicijalne koncentracije K₂HPO₄, kao i interakcije inicijalne koncentracije glicerola i ekstrakta kvasca i glicerola i K₂HPO₄. Osim toga, primetan je i statistički značajan uticaj kvadratnih koeficijenata za inicijalnu koncentraciju (NH₄)₂SO₄ i K₂HPO₄. Kod matematičkog modela za rezidualni sadržaj glicerola statistički je značajan samo linearni uticaj inicijalne koncentracije ovog nutrijenta. Slična situacija je prisutna i kod matematičkog modela za rezidualni sadržaj ukupnog azota, gde se primećuje statistički značajan linearni uticaj inicijalnih koncentracija organskog i neorganskog izvora azota, kao i statistički značajan kvadratni uticaj inicijalne koncentracije glicerola. Kada je u pitanju matematički model za rezidualni sadržaj ukupnog fosfora, uočava se statistički značajan uticaj linearnog koeficijenta inicijalne koncentracije izvora fosfora, kao i kvadratnog koeficijenta inicijalne koncentracije neorganskog izvora azota.

Tabela 5.12. Koeficijenti regresionih jednačina i njihove *p*-vrednosti za odabrane odzive u fazi modelovanja sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola

Koeficijent	Prečnik zone inhibicije (mm)		Rezidualni sadržaj glicerola (g/l)		Rezidualni sadržaj ukupnog azota (g/l)		Rezidualni sadržaj ukupnog fosfora (g/l)	
	Vrednost	<i>p</i> -vrednost	Vrednost	<i>p</i> -vrednost	Vrednost	<i>p</i> -vrednost	Vrednost	<i>p</i> -vrednost
Odsečak								
b ₀	31,515	0,0000	-7,732	0,2450	0,313	0,0168	-0,791	0,2084
Linearni								
b ₁	0,112	0,0447	1,086	0,0001	0,005	0,1605	0,028	0,1286
b ₂	-1,325	0,0118	0,424	0,8022	0,119	0,0017	0,197	0,2297
b ₃	-0,832	0,2852	1,865	0,5119	0,263	0,0002	0,212	0,4300
b ₄	1,432	0,0002	-0,254	0,7995	-0,011	0,5402	0,332	0,0035
Interakcija								
b ₁₂	0,032	0,0003	-0,006	0,7873	0,000	0,3111	-0,001	0,6297
b ₁₃	-0,005	0,6134	-0,041	0,3249	-0,000	0,4811	0,002	0,6326
b ₁₄	-0,017	0,0004	-0,025	0,0765	0,000	0,3111	-0,000	0,6662
b ₂₃	0,067	0,5397	-0,013	0,9743	-0,011	0,1543	0,005	0,9005
b ₂₄	0,030	0,4221	-0,020	0,8794	-0,000	0,8970	-0,002	0,8496
b ₃₄	-0,024	0,6873	-0,112	0,6194	-0,004	0,3111	0,030	0,1779
Kvadratni								
b ₁₁	-0,001	0,2105	-0,001	0,4858	-0,000	0,0240	-0,000	0,0919
b ₂₂	0,097	0,1060	-0,009	0,9673	-0,007	0,0939	-0,028	0,1716
b ₃₃	0,371	0,0330	0,041	0,9432	-0,013	0,2363	-0,128	0,0342
b ₄₄	-0,067	0,0021	0,093	0,1693	0,001	0,5208	-0,010	0,1292

1 – glicerol, 2 – ekstrakt kvasca, 3 - (NH₄)₂SO₄, 4 - K₂HPO₄

Kao i u slučaju modelovanja sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*, prečnik zona inhibicije je odabran kao najznačajniji odziv koji direktno ukazuje na stepen antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, stoga su za ovaj odziv konstruisane odzivne površine sa ciljem detaljnijeg ispitivanja uticaja interakcije ispitivanih nezavisnih promenljivih na ovaj odziv. Slika 5.15. prikazuje odzivne površine dobijene tokom modelovanja sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*. Prikazane odzivne površine opisuju uticaj dve nezavisne promenljive na prečnik zona inhibicije, dok su preostalim dvema nezavisnim promenljivama dodeljene vrednosti iz centralne tačke eksperimentalnog plana.

Slika 5.15.A prikazuje uticaj inicijalne koncentracije glicerola i inicijalne koncentracije ekstrakta kvasca na prečnik zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, pri čemu su vrednosti inicijalnih koncentracija (NH₄)₂SO₄ i K₂HPO₄ jednake vrednostima iz centralne tačke eksperimentalnog plana (1,5 g/l i 5,5 g/l, redom). Maksimalan prečnik zona inhibicije dobija se pri maksimalnim vrednostima obe nezavisne promenljive (4-5 g/l za inicijalnu koncentraciju ekstrakta kvasca i 45-60 g/l za inicijalnu koncentraciju glicerola), dok se minimalan prečnik zona inhibicije dobija u slučaju kada je inicijalna koncentracija ekstrakta kvasca minimalna, a inicijalna koncentracija glicerola maksimalna.

Uticaj inicijalne koncentracije glicerola i inicijalne koncentracije (NH₄)₂SO₄ na prečnik zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* prikazan je na slici 5.15.B,

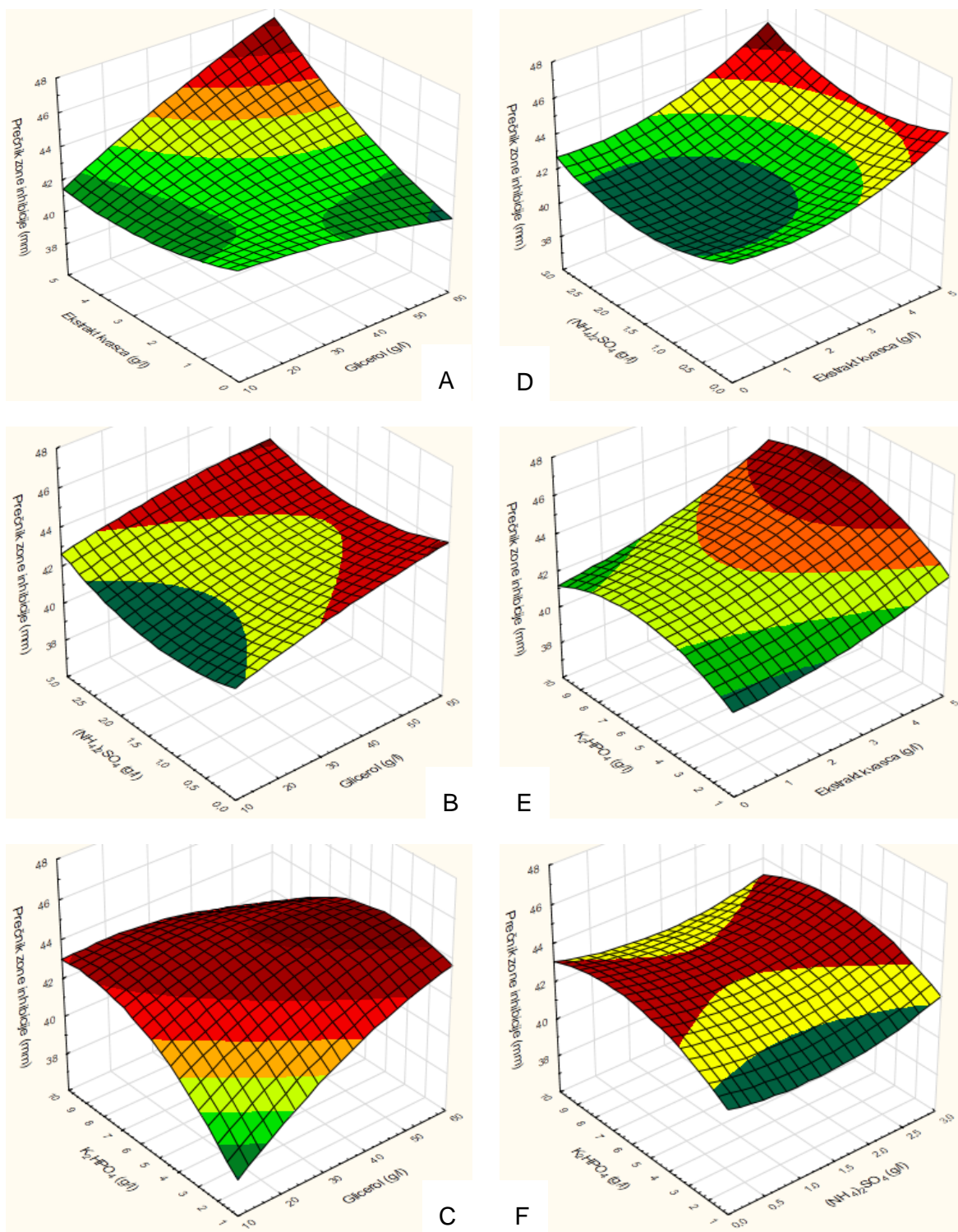
pri čemu su vrednosti inicijalnih koncentracija ekstrakta kvasca i K_2HPO_4 jednake vrednostima iz centralne tačke eksperimentalnog plana (2,5 g/l i 5,5 g/l, redom). Sa prikazane slike može se zaključiti da se minimalne vrednosti prečnika zona inhibicije dobijaju pri vrednostima inicijalne koncentracije glicerola bliskim minimalnoj vrednosti (10-25 g/l) u širokom osegu vrednosti inicijalne koncentracije $(NH_4)_2SO_4$ (0-2,5 g/l). Sa druge strane, dobijanje maksimalnih vrednosti prečnika zona inhibicije dešava se u dva slučaja: pri maksimalnoj vrednosti inicijalne koncentracije glicerola (55-60 g/l) i minimalnoj vrednosti inicijalne koncentracije $(NH_4)_2SO_4$, kao i pri maksimalnoj vrednosti inicijalne koncentracije glicerola (55-60 g/l) i maksimalnoj vrednosti inicijalne koncentracije $(NH_4)_2SO_4$.

Odzivna površina 5.15.C prikazuje uticaj inicijalne koncentracije glicerola i inicijalne koncentracije K_2HPO_4 na prečnik zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, pri čemu su vrednosti inicijalnih koncentracija ekstrakta kvasca i $(NH_4)_2SO_4$ jednake vrednostima iz centralne tačke eksperimentalnog plana (2,5 g/l i 1,5 g/l, redom). Može se zaključiti da se minimalna vrednost prečnika zona inhibicije dobija pri minimalnim vrednostima obe nezavisne promenljive (1-2 g/l za inicijalnu koncentraciju K_2HPO_4 i 10-17 g/l za inicijalnu koncentraciju glicerola). Sa druge strane, maksimalna vrednost prečnika zona inhibicije dobija se pri vrednostima inicijalne koncentracije glicerola u opsegu 35-60 g/l i pri vrednostima inicijalne koncentracije K_2HPO_4 u opsegu 2,5-7,5 g/l. Iz prikazanih odzivnih površina može se zaključiti da maksimizaciju prečnika zona inhibicije podiče velika inicijalna koncentracija glicerola kao izvora ugljenika.

Na slici 5.15.D prikazan je uticaj inicijalne koncentracije ekstrakta kvasca i inicijalne koncentracije $(NH_4)_2SO_4$ na prečnik zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, pri čemu su vrednosti inicijalnih koncentracija glicerola i K_2HPO_4 jednake vrednostima iz centralne tačke eksperimentalnog plana (35 g/l i 5,5 g/l, redom). Minimalni prečnik zona inhibicije očekuje se pri vrednostima inicijalne koncentracije ekstrakta kvasca u opsegu 0-2 g/l i pri vrednostima inicijalne koncentracije $(NH_4)_2SO_4$ u opsegu 0,5-2,5 g/l. Sa druge strane, maksimalni prečnik zona inhibicije je favorizovan maksimalnom inicijalnom koncentracijom oba nutrijenta (inicijalna koncentracija ekstrakta kvasca 4,5-5 g/l i inicijalna koncentracija $(NH_4)_2SO_4$ 2,5-3 g/l).

Uticaj inicijalne koncentracije ekstrakta kvasca i inicijalne koncentracije K_2HPO_4 na prečnik zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, pri čemu su vrednosti inicijalnih koncentracija glicerola i $(NH_4)_2SO_4$ jednake vrednostima iz centralne tačke eksperimentalnog plana (35 g/l i 1,5 g/l, redom), prikazan je na slici 5.15.E. Minimalne vrednosti prečnika zona inhibicije postižu se pri minimalnoj vrednosti inicijalne koncentracije K_2HPO_4 (1-1,5 g/l) i vrednostima inicijalne koncentracije ekstrakta kvasca u opsegu 0-2 g/l. Maksimalne vrednosti prečnika zona inhibicije postižu se pri maksimalnoj vrednosti inicijalne koncentracije ekstrakta kvasca (4,5-5 g/l) i vrednostima inicijalne koncentracije K_2HPO_4 u opsegu 6-8,5 g/l.

Odzivna površina 5.15.F prikazuje uticaj inicijalne koncentracije $(NH_4)_2SO_4$ i inicijalne koncentracije K_2HPO_4 na prečnik zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, pri čemu su vrednosti inicijalnih koncentracija glicerola i ekstrakta kvasca jednake vrednostima iz centralne tačke eksperimentalnog plana (35 g/l i 2,5 g/l, redom). Minimalne vrednosti prečnika zona inhibicije postižu se u širokom opsegu vrednosti inicijalne koncentracije $(NH_4)_2SO_4$ (0-2,75 g/l) i pri vrednostima inicijalne koncentracije K_2HPO_4 u opsegu 1-2,5 g/l. Sa druge strane, maksimalne vrednosti prečnika zona inhibicije postižu se u čitavom opsegu vrednosti inicijalne koncentracije $(NH_4)_2SO_4$, ali pri vrednostima inicijalne koncentracije K_2HPO_4 u opsegu 3-10 g/l.



Slika 5.15. Odzivne površine koje opisuju uticaj inicijalnih koncentracija odabranih nutrijenata na prečnik zona inhibicije tokom modelovanja sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola za sledeće kombinacije nezavisnih promenljivih: A – glicerol i ekstrakt kvasca; B – glicerol i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; C – glicerol i K_2HPO_4 ; D – ekstrakt kvasca i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; E – ekstrakt kvasca i K_2HPO_4 ; F – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i K_2HPO_4

5.6.2. OPTIMIZACIJA SASTAVA HRANLJIVE PODLOGE NA BAZI SIROVOG GLICEROLA

Nakon faze modelovanja i dobijanja matematičkih modela koji opisuju uticaj ispitivanih nezavisnih promenljivih (inicijalnih koncentracija glicerola, ekstrakta kvasca, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i K_2HPO_4) na odabrane zavisne promenljive (prečnik zona inhibicije i rezidualne koncentracije glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora), sledeća faza istraživanja podrazumevala je optimizaciju sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola za proizvodnju biokontrolnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* primenom proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*. Optimizacija sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola podrazumevala je primenu metode željene funkcije. Svim nezavisnim i zavisnim promenljivama dodeljeni su isti težinski koeficijenti, odnosno svaka od njih je u toku postupka optimizacija imala istu značajnost. Optimizacija je, kao i kod optimizacije sastava hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola, izvršena u dva seta. Prvi set imao je samo jedan cilj: maksimizaciju antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, odnosno maksimizaciju prečnika zone inhibicije kao direktnog pokazatelja antimikrobne aktivnosti. Drugi set je, pored prethodno navedenog cilja, imao za cilj i minimizaciju rezidualnih koncentracija osnovnih nutrijenata (glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora) u kultivacionoj tečnosti po završetku kultivacije, sa ciljem smanjenja troškova bioprocasa koji se odnose na prečišćavanje i odlaganje efluenta bioprocasa.

Rezultati postupka optimizacije sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola za proizvodnju biokontrolnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* primenom proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* prikazani su u tabeli 5.13. U prvom setu optimizacije, koji je imao za cilj maksimizaciju prečnika zona inhibicije, odnosno antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, predložena je optimizovan sastav hranljive podloge na bazi sirovog glicerola koji podrazumeva sledeće koncentracije komponenata podloge: glicerol 59,46 g/l, ekstrakt kvasca 4,76 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,05 g/l, K_2HPO_4 5,96 g/l i $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g/l. Može se primetiti da su optimizovane vrednosti inicijalnih koncentracija izvora ugljenika i organskog izvora azota bliske maksimalnim vrednostima ispitivanog opsega (glicerol 10-60 g/l, ekstrakt kvasca 0-5 g/l), dok je optimizovana vrednost inicijalne koncentracije $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bliska minimalnoj vrednosti ispitivanog opsega (0-3 g/l), a optimizovana vrednost inicijalne koncentracije K_2HPO_4 približno odgovara srednjoj vrednosti ispitivanog opsega koncentracija (1-10 g/l). Rezultati dobijeni primenom metode željene funkcije su u skladu sa rezultatima dobijenim primenom metodologije odzivne površine kada se posmatraju inicijalne koncentracije nutrijenata koje pozitivno utiču na maksimizaciju prečnika zona inhibicije (poglavlje 5.6.2.). Primenom regresionih modela dobijenih u koraku modelovanja izračunate su predviđene vrednosti zavisnih promenljivih na osnovu predloženih optimizovanih vrednosti nezavisnih promenljivih. Predviđena vrednost prečnika zona inhibicije pri navedenom optimizovanom sastavu podloge na bazi sirovog glicerola iznosi 47,43 mm, dok predviđene vrednosti rezidualnih koncentracija glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora iznose 43,70 g/l, 0,86 g/l i 1,03 g/l, uz vrednost funkcije koja iznosi 1. Može se zaključiti da dobijeni matematički modeli predviđaju da se primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola kao rezultat dobija kultivaciona tečnost sa visokim rezidualnim sadržajem nutrijenata, naročito glicerola. Primenom hranljive podloge na bazi sirovog glicerola optimizovanog sastava previđa se stepen konverzije glicerola od samo 20,23%, što implicira veliku količinu ovog nutrijenta koja ostaje neiskorišćena nakon kultivacije proizvodnog mikroorganizma i predstavlja potencijalni problem za odlaganje efluenta ovog bioprocasa. Zbog toga je izveden i drugi set optimizacije, u kome je kao dodatni cilj, pored maksimizacije prečnika zona inhibicije protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*, postavljena i minimizacija rezidualnih koncentracija osnovnih nutrijenata – glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora. Optimizovan sastav hranljive podloge na bazi sirovog glicerola, koji je proistekao iz drugog seta optimizacije, je sledeći: glicerol 10 g/l,

K_2HPO_4 4,66 g/l i $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,3 g/l. Primetna razlika u odnosu na prvi set optimizacije je potpuno odsustvo organskog i neorganskog izvora azota u hranljivoj podlozi optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola, čime je značajno smanjen trošak pripreme hranljive podloge. Uzimajući u obzir potpuno izostavljanje izvora azota prilikom pripreme hranljive podloge, postavlja se pitanje na koji način mikroorganizam zadovoljava nutritivne potrebe za azotom, kao jednim od osnovnih nutrijenata koji je neophodan u sintezi ćelijskih komponenata i jedinjenja, pre svega enzima, koja su uključena u različite vitalne metaboličke procese. Primena sirovog glicerola iz proizvodnje biodizela u kojoj su kao sirovine korišćeni otpadna ulja i masti, uglavnom iz procesa prženja namirnica, podrazumeva da je u hranljivoj podlozi na bazi sirovog glicerola prisutna određena količina azotnih jedinjenja. S obzirom da proces proizvodnje sirovog glicerola podrazumeva transesterifikaciju triglicerida primenom alkohola i baznog katalizatora (Garlapati i sar., 2016), jasno je da nečistoće prisutne u sirovinama za proizvodnju biodizela, kao što su otpadna ulja i masti iz procesa prženja, takođe zaostaju kao nusproizvodi procesa proizvodnje biodizela, stoga je očekivano i njihovo prisustvo u sirovom glicerolu kao osnovnom nusproizvodu proizvodnje biodizela. Prilikom prženja različitih vrsta prehrambenih proizvoda u uljima i mastima, koja se nakon prženja koriste za proizvodnju biodizela, zaostaje značajna količina ostataka hrane, od kojih su neki proteinskog porekla, mahom zahvaljujući prženju mesa ili ribe (Thompson i He, 2006; Quispe i sar., 2013). Stoga se može napraviti veza između mogućnosti izostavljanja izvora azota prilikom pripreme hranljive podloge na bazi sirovog glicerola sa prisutvom azotnih jedinjenja kao nusproizvoda proizvodnje biodizela, koja mogu da zadovolje nutritivne potrebe proizvodnog mikroorganizma za ovim nutrijentom. Prisustvo azotnih jedinjenja u hranljivoj podlozi optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola potvrđuje i modelom predviđena vrednost rezidualne koncentracije ukupnog azota od 0,33 g/l. Kada su u pitanju optimizovane vrednosti inicijalnih koncentracija glicerola i K_2HPO_4 , može se zaključiti da je u drugom setu optimizacije postignuto njihovo značajno smanjenje u odnosu na prvi set optimizacije (83,18% kada je u pitanju inicijalna koncentracija glicerola i 21,81% kada je u pitanju inicijalna koncentracija K_2HPO_4), čime se takođe postiže značajno smanjenje cene hranljive podloge na bazi sirovog glicerola. Osim toga, takođe se može zaključiti da primena hranljive podloge na bazi sirovog glicerola optimizovanog sastava iz drugog seta optimizacije rezultuje manjim vrednostima rezidualnih koncentracija nutrijenata u kultivacionoj tečnosti nakon kultivacije proizvodnog mikroorganizma, u poređenju sa prvim setom optimizacije. Rezidualna koncentracija ukupnog azota smanjena je za 65,12%, rezidualna koncentracija ukupnog fosfora za 25,24%, a rezidualna koncentracija glicerola za čak 94%, čime je postignuto ispunjenje drugog cilja optimizacije sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola, što potvrđuje i vrednost željene funkcije od 0,81. Kada je u pitanju modelom predviđen vrednost prečnika zona inhibicije, u drugom setu optimizacije može se primetiti smanjenje ove vrednosti za 9,38% u poređenju sa prvim setom optimizacije. S obzirom na veoma značajno smanjenje troškova pripreme hranljive podloge smanjenjem inicijalnih koncentracija nutrijenata i potpunim isključenjem organskog i neorganskog izvora azota iz sastava hranljive podloge, kao i smanjenjem troškova prečišćavanja efluenta bioprocasa usled smanjenja rezidualnih koncentracija nutrijenata nakon kultivacije proizvodnog mikroorganizma, značaj stepen smanjenja antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* trebao bi da bude procenjen daljom tehno-ekonomskom analizom bioprocasa.

Tabela 5.13. Optimizovane vrednosti variranih faktora i predviđene vrednosti odziva dobijene kao rezultat optimizacije sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola

Faktori	Prvi set optimizacije		Drugi set optimizacije	
	Cilj	Optimizovana vrednost	Cilj	Optimizovana vrednost
Glicerol (g/l)	u opsegu	59,46	u opsegu	10,00
Ekstrakt kvasca (g/l)	u opsegu	4,76	u opsegu	0,00
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)	u opsegu	0,05	u opsegu	0,00
K ₂ HPO ₄ (g/l)	u opsegu	5,96	u opsegu	4,66
Odzivi	Cilj	Predviđena vrednost	Cilj	Predviđena vrednost
Prečnik zone inhibicije (mm)	maksimalan	47,43	maksimalan	42,98
Rezidualni sadržaj glicerola (g/l)	u opsegu	43,70	minimalan	2,62
Rezidualni sadržaj ukupnog azota (g/l)	u opsegu	0,86	minimalan	0,33
Rezidualni sadržaj ukupnog fosfora (g/l)	u opsegu	1,03	minimalan	0,77
Vrednost željene funkcije		1,00		0,81

5.6.3. VALIDACIJA REŠENJA HRANLJIVE PODLOGE OPTIMIZOVANOG SASTAVA NA BAZI SIROVOG GLICEROLA

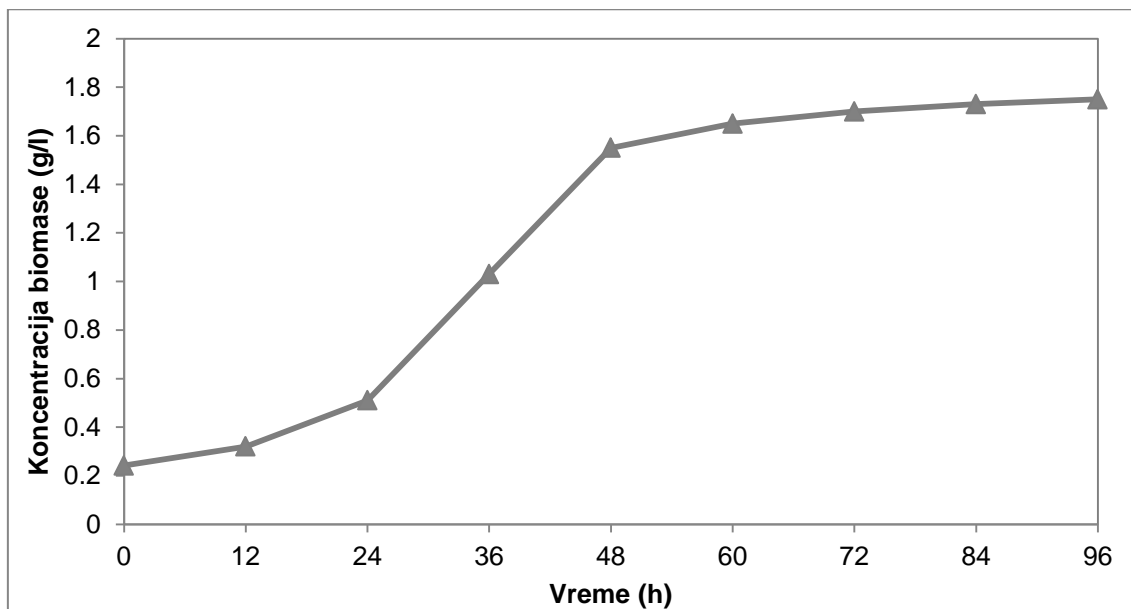
U cilju validacije optimizovanog sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola izvršena je kultivacija proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u Vulfovim bocama ukupne zapremine 2 l i laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 3 l. Prilikom izvođenja bioprocasa u Vulfovim bocama, na svakih 12 časova uzimani su uzorci kultivacione tečnosti sa ciljem praćenja toka kultivacije u pogledu sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma, rezidualnih koncentracija osnovnih nutrijenata (glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora), kao i antimikrobne aktivnosti protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* (*Xanthomonas campestris* Mn 7-2, *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 1 i *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 2). Tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma u laboratorijskom bioreaktoru, u istim vremenskim intervalima su praćeni isti parametri bioprocasa, uz dodatak u vidu kontinualnog praćenja temperature i vrednosti pH kultivacione tečnosti.

5.6.3.1. Praćenje toka kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola

Rezultati prikazani u okviru ovog poglavlja predstavljaju srednje vrednosti iz četiri kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola.

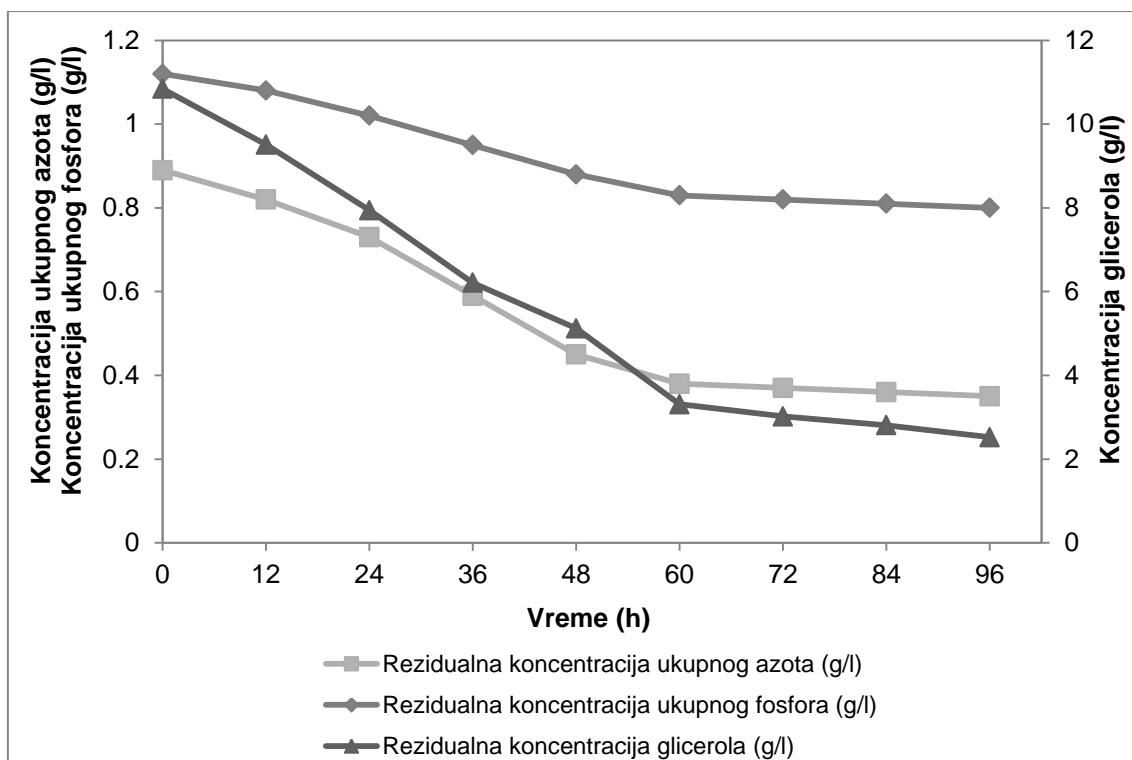
Praćenje toka kultivacije u pogledu sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* tokom kultivacije u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola prikazano je na slici 5.16. Za razliku od procesa kultivacije koji je vršen primenom hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola, tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma primenom hranljive podloge na bazi sirovog glicerola praćenje sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma vršeno je samo primenom gravimetrijske metode, zbog mutnoće hranljive podloge, koja se koristi kao slepa proba, koja onemogućava spektrofotometrijsko određivanje optičke gustine kultivacione tečnosti. Prikazan trend promene sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma odgovara tipičnoj krivi rasta bakterija, sa lag fazom adaptacije proizvodnog mikroorganizma na uslove kultivacije u

periodu do 24. časa kultivacije, nakon čega sledi log faza intenzivnog umnožavanja biomase do 60. časa kultivacije, praćena stacionarnom fazom rasta u kojoj se uočavaju veoma male promene sadržaja biomase do kraja kultivacije. Maksimalna koncentracija biomase proizvodnog mikroorganizma postignuta na kraju kultivacije koja je trajala 96 h iznosi 1,75 g/l, što je manja vrednost u poređenju sa finalnim sadržajem biomase proizvodnog mikroorganizma po završetku kultivacije u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola (1,9 g/l).



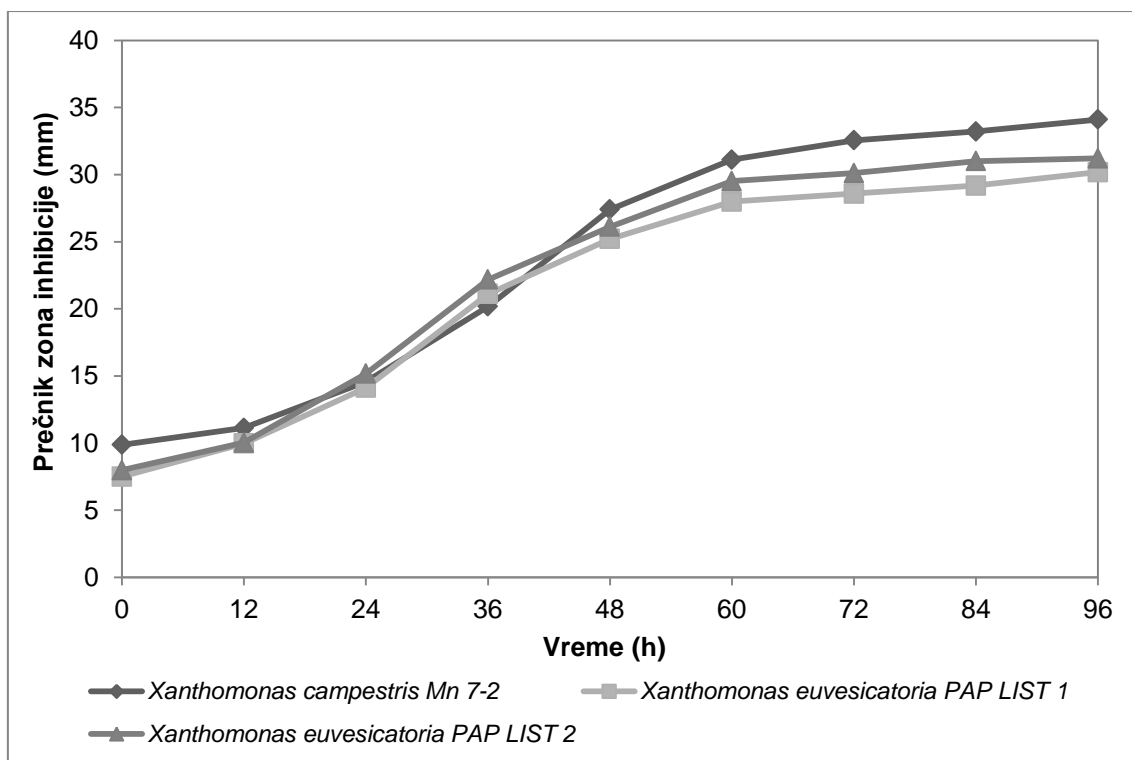
Slika 5.16. Praćenje toka kultivacije u pogledu sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* tokom kultivacije u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola

Praćenje rezidualnih koncentracija osnovnih nutrijenata (glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora) tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola vršeno je primenom odgovarajućih analitičkih metoda (poglavlje 4.5.2.) iz supernatanta kultivacione tečnosti dobijenog centrifugiranjem. Iz prikazanih rezultata (slika 5.17.) može se zaključiti da promena rezidualnih koncentracija nutrijenata prati promenu sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma. Može se primetiti intenzivnija potrošnja glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora u toku prvih 60 časova kultivacije, nakon čega potrošnja nutrijenata postaje manje intenzivna usled nastupanja stacionarne faze rasta. Najveći stepen konverzije uočava se kod glicerola kao izvora ugljenika (76,73%). Kada je u pitanju konverzija azota i fosfora, mogu se primetiti manje vrednosti stepena konverzija ova dva nutrijenta (60,67% i 28,57%, redom), pre svega zbog manje pogodnih uslova za rast i umnožavanje biomase proizvodnog mikroorganizma, koji uključuju odsustvo termoregulacije, eksterno mešanje i odsustvo raspodeljivača vazduha u toku interne aeracije.



Slika 5.17. Praćenje toka kultivacije u pogledu rezidualnih koncentracija nutrijenata tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u Vulfovim bocama primenom hranjive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola

Antimikrobna aktivnost uzoraka kultivacione tečnosti testirana je na svakih 12 časova tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u Vulfovim bocama primenom hranjive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola. Kao test mikroorganizmi u ovoj fazi istraživanja korišćeni su sledeći fitopatogeni izolati: *Xanthomonas campestris* Mn 7-2, *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 1 i *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 2. Antimikrobna aktivnost je praćena merenjem prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma protiv ispitivanih fitopatogenih izolata. Iz prikazanih rezultata (slika 5.18.) može se uočiti sličan trend promene antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti za sva tri testirana fitopatogena izolata. Osim toga, trend promene antimikrobne aktivnosti takođe prati trend promene sadržaja biomase i potrošnje nutrijenata u toku kultivacije u Vulfovim bocama. Na slici 5.19. prikazane su zone inhibicije dobijene testiranjem antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti (96 h) proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*. Maksimalne vrednosti prečnika zona inhibicije iznosile su 34,11 mm za izolat *Xanthomonas campestris* Mn 7-2, 30,18 mm za izolat *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 1 i 31,21 mm za izolat *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 2



Slika 5.18. Praćenje toka kultivacije u pogledu antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* tokom kultivacije u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola

Xanthomonas campestris Mn
7-2

Xanthomonas euvesicatoria
PAP LIST 1

Xanthomonas euvesicatoria
PAP LIST 2

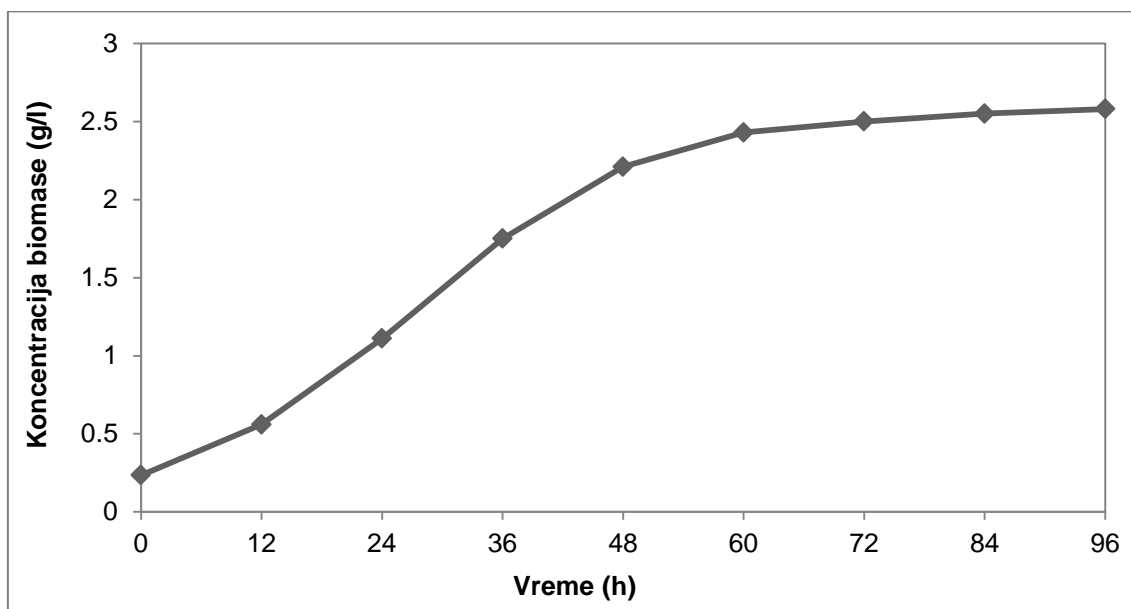


Slika 5.19. Zone inhibicije dobijene testiranjem antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti (96 h) proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* tokom kultivacije u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola

5.6.3.2. Praćenje toka kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola

Tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola vršena je regulacija temperature kultivacione tečnosti, kao i interno mešanje primenom Ruštonove turbine sa dva impelera i interna aeracija primenom raspodeljivača vazduha. Praćenje parametara kultivacije vršeno je na svakih 12 časova uzimanjem uzoraka kultivacione tečnosti. Osim toga, vršeno je kontinualno praćenje vrednosti pH i temperature kultivacione tečnosti, čija je vrednost, zahvaljujući termoregulaciji, iznosila 28°C tokom čitavog bioprocasa. Rezultati prikazani u okviru ovog poglavlja predstavljaju srednje vrednosti iz tri kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola.

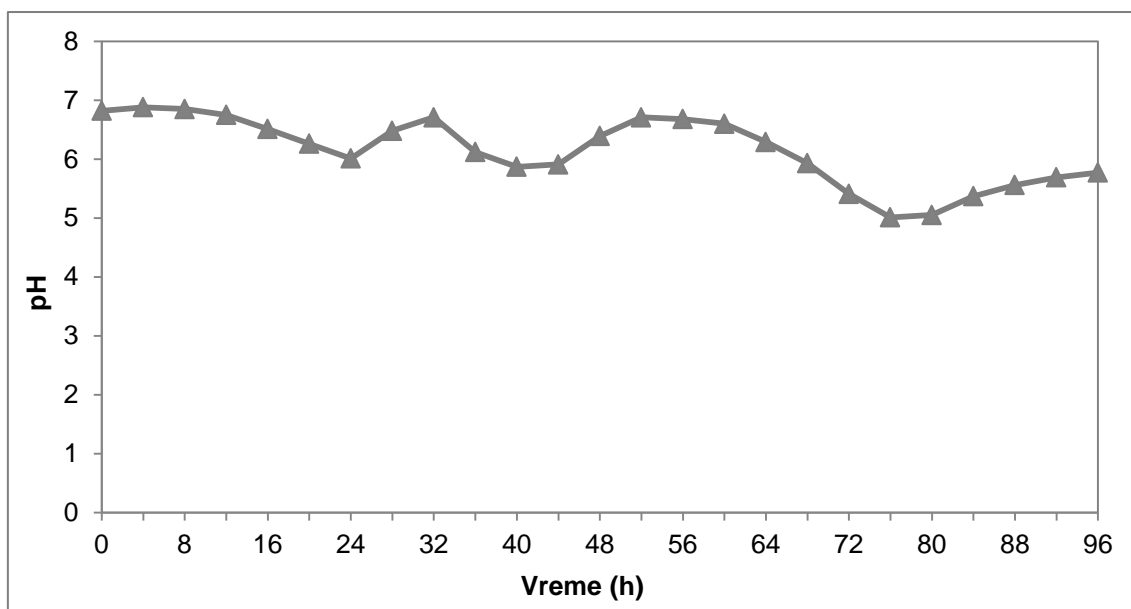
Promena sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola prikazana je na slici 5.20. U poređenju sa kultivacijom proizvodnog mikroorganizma uočava se kraće trajanje lag faze prilagođavanja proizvodnog mikroorganizma uslovima kultivacije u bioreaktoru (12 h). Log faza intenzivnog rasta uočava se u periodu između 12. i 60. časa kultivacije, nakon čega nastupa stacionarna faza rasta. Maksimalan sadržaj biomase proizvodnog mikroorganizma postignut je na kraju kultivacije i iznosi 2,58 g/l, što je za 47,43% veća vrednost u poređenju sa vrednošću maksimalnog sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma koja je postignuta u toku kultivacije u Vulfovim bocama (1,75 g/l). Ova činjenica ukazuje na bolju prilagođenost proizvodnog mikroorganizma uslovima kultivacije u bioreaktoru, koja u poređenju sa kultivacijom u Vulfovim bocama obezbeđuje konstantnu vrednost zadate temperature, kao i bolje uslove mešanja i aeracije, koji doprinose boljem prenosu mase nutrijenata i kiseonika do ćelija proizvodnog mikroorganizma.



Slika 5.20. Praćenje toka kultivacije u pogledu sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola

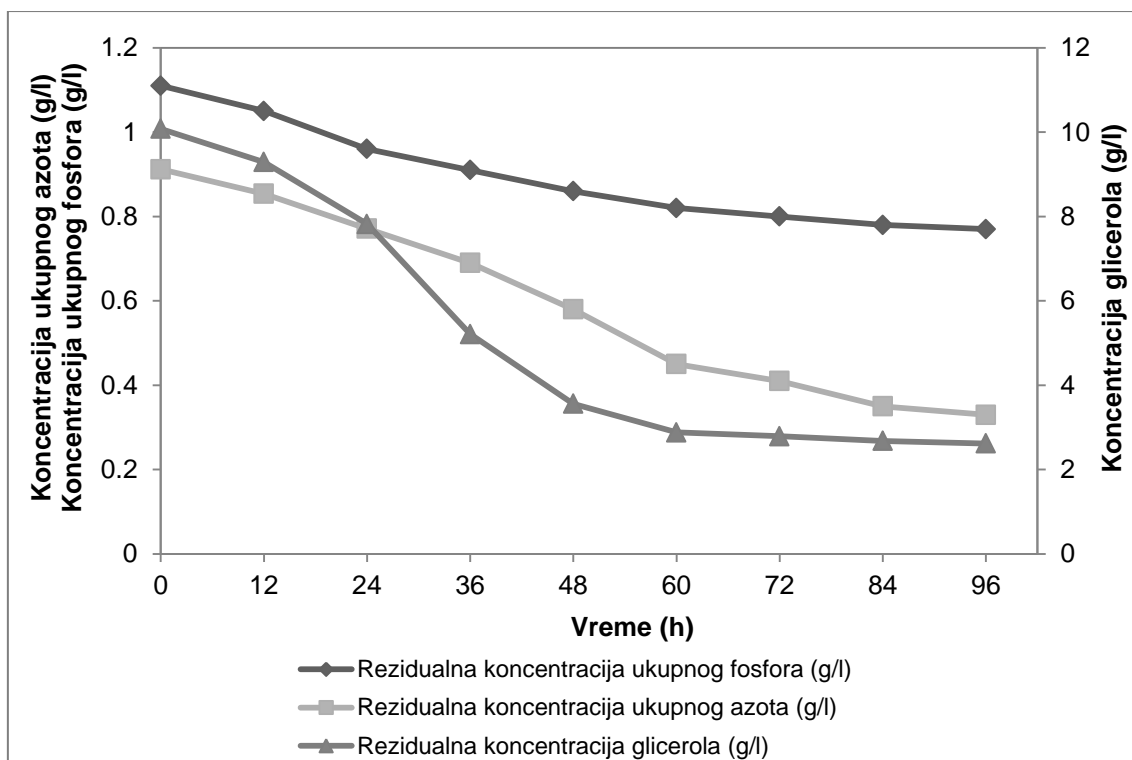
Promena vrednosti pH kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog

sastava na bazi sirovog glicerola prikazana je na slici 5.21. Vrednost pH kultivacione tečnosti praćena je kontinualno, ali su prikazane vrednosti pH zabeležene na svaka četiri časa tokom kultivacije u bioreaktoru. Trend promene vrednosti pH kultivacione tečnosti oslikava promenu metaboličke aktivnosti proizvodnog mikroorganizma u pogledu sinteze kiselih i baznih proizvoda metabolizma. Može se uočiti da prilikom kultivacije proizvodnog mikroorganizma u laboratorijskom bioreaktoru nije dolazilo do drastičnih promena vrednosti pH kultivacione tečnosti, pri čemu je minimalna vrednost pH iznosila 5,01, u poređenju sa maksimalnom inicijalnom vrednošću pH koja je iznosila 6,82.



Slika 5.21. Praćenje toka kultivacije u pogledu vrednosti pH kultivacione tečnosti tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola

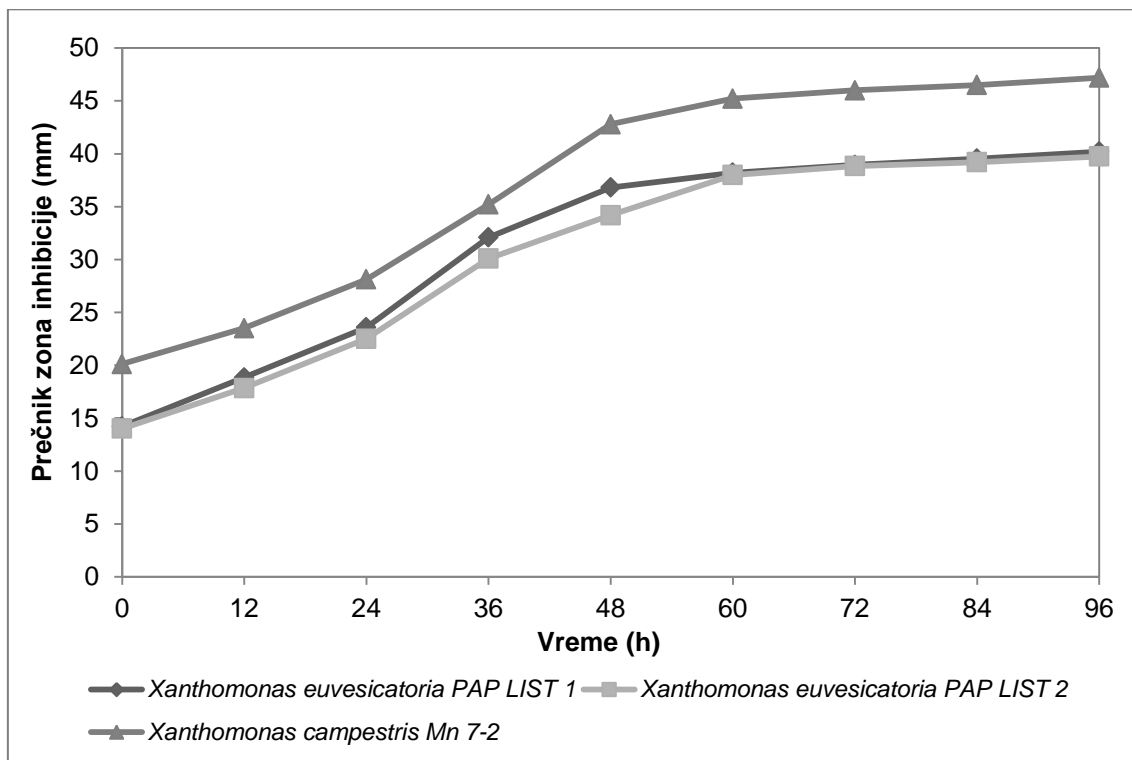
Praćenje toka kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola u pogledu rezidualnih koncentracija nutrijenata (glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora) prikazano je na slici 5.22. Slično kao i prilikom kultivacije proizvodnog mikroorganizma u Vulfovim bocama primenom hranljive podloge istog sastava, prilikom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru uočava se sličan trend potrošnje nutrijenata od strane proizvodnog mikroorganizma, sa intenzivnijom potrošnjom svih nutrijenata do 60. časa kultivacije, nakon čega nastupa stacionarna faza rasta u kojoj se uočava manja brzina potrošnje nutrijenata. Finalne koncentracije nutrijenata (glicerol 2,62 g/l, ukupni azot 0,33 g/l i ukupni fosfor 0,72 g/l) su u saglasnosti sa vrednostima rezidualnih koncentracija nutrijenata po završetku kultivacije proizvodnog mikroorganizma koje su predviđene drugim setom optimizacije sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola (tabela 5.13., poglavlje 5.6.2.).



Slika 5.22. Praćenje toka kultivacije u pogledu rezidualnih koncentracija nutrijenata tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola

Rezultati testiranja antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti protiv ispitivanih fitopatogenih izolata (*Xanthomonas campestris* Mn 7-2, *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 1 i *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 2) na svakih 12 časova tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola prikazani su na slici 5.23. Uočava se sličan trend promene prečnika zona inhibicije za sva tri ispitivana fitopatogena izolata, a osim toga, uočava se da trend promene antimikrobne aktivnosti takođe prati trend promene sadržaja biomase i potrošnje nutrijenata. Na slici 5.24 prikazane su zone inhibicije dobijene testiranjem antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti (96 h) proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*. Maksimalne vrednosti prečnika zona inhibicije za sva tri ispitivana fitopatogena izolata veće su u slučaju kultivacije proizvodnog mikroorganizma u laboratorijskom bioreaktoru u poređenju sa kultivacijom proizvodnog mikroorganizma u Vulfovim bocama. Dobijene maksimalne vrednosti prečnika zona inhibicije iznose 47,2 mm za izolat *Xanthomonas campestris* Mn 7-2, 40,21 mm za izolat *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 1 i 39,75 mm za izolat *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 2. Može se uočiti da su dobijene vrednosti prečnika zona inhibicije u saglasnosti sa predviđenim vrednostima dobijenim drugim setom optimizacije sastava hranljive podloge na bazi sirovog glicerola (tabela 5.13., poglavlje 5.6.2.). Osim toga, uočava se manja vrednost prečnika zona inhibicije protiv sva tri fitopatogena izolata kao rezultat primene hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola u poređenju sa primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola. Ovakav rezultat je i očekivan uzimajući u obzir veliku količinu nečistoća prisutnih u sirovom glicerolu iz proizvodnje biodizela (Yang i sar., 2012). Ipak, i pored smanjenja stepena antimikrobne aktivnosti od 29,81% za izolat *Xanthomonas campestris* Mn 7-2, 32,54% za izolat *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 1 i 35,11% za izolat *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 2, dobijeni rezultati u vidu veoma velikih vrednosti prečnika zona inhibicije ukazuju na veoma

značajan potencijal primene sirovog glicerola iz proizvodnje biodizela kao izvora ugljenika za biotehnošku proizvodnju biokontrolnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* primenom proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*.



Slika 5.23. Praćenje toka kultivacije u pogledu antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranjive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola

Xanthomonas campestris Mn 7-2

Xanthomonas euvesicatoria PAP LIST 1

Xanthomonas euvesicatoria PAP LIST 2



Slika 5.24. Zone inhibicije dobijene testiranjem antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti (96 h) proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas* tokom kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranjive podloge optimizovanog sastava na bazi sirovog glicerola

5.7. UNAPREĐENJE PROCESA UNAKRSNE MIKROFILTRACIJE ZA IZDVAJANJE BIOMASE PROIZVODNOG MIKROORGANIZMA *Bacillus velezensis*

Unakrsna mikrofiltracija predstavlja jednu od najčešće korišćenih tehnika za izdvajanje biomase mikroorganizama. Prilikom izvođenja unakrsne procesa mikrofiltracije mnogi faktori utiču na efikasnost ovog procesa, kao što su tip i karakteristike membrane (materijal, dimenzije pora, specifična površina), karakteristike kultivacione tečnosti ili suspenzije mikroorganizama (koncentracija ćelija, gustina, viskozitet), kao i operativni uslovi (protok napojne smeše, transmembranski pritisak, temperatura). U eksperimentima u okviru ove doktorske disertacije ispitan je uticaj operativnih uslova (transmembranski pritisak i protok napojne smeše) na efikasnost mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u pogledu fluksa permeata u stacionarnom stanju. Kultivaciona tečnost korišćena u svim eksperimentima mikrofiltracije dobijena je kultivacijom proizvodnog mikroorganizma u Vulfovim bocama (poglavlje 4.4.) primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola (poglavlje 5.4.2.). Svi eksperimenti mikrofiltracije izvedeni su pri temperaturi 25°C, kako bi se eliminisao uticaj ovog operativnog faktora na fluks permeata. Osim toga, u svim eksperimentima je potvrđena vijabilnost ćelija proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u retentatu nakon mikrofiltracije, pri čemu je koncentracija vijabilnih ćelija u retentatu bila uporediva sa koncentracijom ćelija u napojnoj smeši (kultivacionoj tečnosti) koja je korišćena za eksperimente mikrofiltracije. Osim toga, ispitan je uticaj primene različitih hidrodinamičkih metoda (Kenics statički mešač, uduvavanje vazduha i kombinacija Kenics statičkog mešača i uduvavanja vazduha) na povećanje fluksa permeata tokom procesa mikrofiltracije. Metodologija odzivne površine je primenjena sa ciljem dobijanja matematičkih modela koji opisuju uticaj operativnih uslova mikrofiltracije (transmembranski pritisak i protok napojne smeše) na fluks permeata, kao relativno povećanje fluksa permeata i smanjenje specifične potrošnje energije tokom eksperimenata u kojima su primenjeni Kenics statički mešač i/ili uduvavanje vazduha. Optimizacija operativnih uslova mikrofiltracije izvršena je primenom metode željene funkcije na osnovu matematičkih modela dobijenih primenom metodologije odzivne površine.

5.7.1. UNAKRSNA MIKROFILTRACIJA BEZ PRIMENE HIDRODINAMIČKIH METODA ZA POVEĆANJE FLUKSA PERMEATA

Eksperimenti mikrofiltracije u ovoj fazi istraživanja vršeni su sa ciljem ispitivanja uticaja operativnih uslova procesa mikrofiltracije (transmembranski pritisak – 0,2 bar, 0,6 bar i 1 bar; protok napojne smeše – 60 l/h, 120 l/h i 180 l/h) na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*, bez primene hidrodinamičkih metoda za povećanje fluksa permeata u stacionarnom stanju. Uticaj ispitivanih nezavisnih promenljivih, kao i njihove interakcije, detaljnije je ispitan primenom metodologije odzivne površine.

Na slici 5.25. prikazana je promena fluksa permeata u toku mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* pri različitim vrednostima transmembranskog pritiska (0,2 bar, 0,6 bar i 1 bar) i vrednostima protoka napojne smeše od 60 l/h, 120 l/h i 180 l/h. Kao što se može uočiti sa priloženih grafika, na početku procesa mikrofiltracije pri transmembranskom pritisku od 0,2 bar dobijaju se približno iste inicijalne vrednosti fluksa permeata nezavisno od vrednosti protoka napojne smeše. Na deponovanje ćelija proizvodnog mikroorganizma koje formiraju filtracionu pogaču na površini membrane utiču dva toka fluida: tok permeata, koji se u odnosu na površinu membrane odvija pod pravim uglom, i tok napojne smeše, koji je paralelan sa površinom membrane. Na samom početku procesa mikrofiltracije pri manjim protocima napojne smeše ćelije bivaju deponovane na površinu membrane nasumično usled činjenice da do formiranja filtracione pogače dolazi dominantno usled permeacije, stoga su na početku procesa mikrofiltracije

vrednosti fluksa permeata više. Sa druge strane, pri većem protoku napojne smeše na raspored ćelija na površini membrane utiču i veće sile smicanja usled većeg protoka napojne smeše, usled čega je specifični otpor filtracione pogače veći nego pri manjim protocima napojne smeše (Tanaka i sar., 1996). Stoga na početku procesa mikrofiltracije pri transmembranskom pritisku od 0,2 bar nije došlo do povećanja fluksa permeata sa povećanjem protoka napojne smeše. Sa druge strane, pri većim vrednostima protoka napojne smeše (120 l/h i 180 l/h) dobija se viši inicijalni fluks permeata zbog kretanja većeg broja čestica (ćelija proizvodnog mikroorganizma) u suprotnom smeru od smera toka napojne smeše, usled turbulentnog režima proticanja pri većim protocima napojne smeše (Tanaka i sar., 1994c), što je naročito izraženo kod eksperimenata u kojima je mikrofiltracija vršena pri većim vrednostima transmembranskog pritiska (0,6 bar i 1 bar). U ovim slučajevima, pogonska sila procesa mikrofiltracije je znatno veća u poređenju sa eksperimentima vršenim pri transmembranskom pritisku od 0,2 bar, stoga se na početku procesa mikrofiltracije dobijaju znatno više inicijalne vrednosti fluksa permeata.

Vrednost fluksa permeata u toku mikrofiltracije koja je vršena pri transmembranskom pritisku od 0,2 bar i protoku napojne smeše od 60 l/h se veoma brzo smanjila uz dostizanje stacionarnog stanja nakon 1 h. Sa druge strane, u eksperimentima vršenim pri istoj vrednosti transmembranskog pritiska sa povećanjem protoka napojne smeše na 120 l/h i 180 l/h došlo je do smanjenja vremena potrebnog za postizanje stacionarnog stanja (15 min i 10 min, redom). Sličan trend može se uočiti i u eksperimentima mikrofiltracije vršenim pri višim vrednostima transmembranskog pritiska (slika 5.25.). U eksperimentima mikrofiltracije vršenim pri transmembranskom pritisku od 0,6 bar uočava se postizanje stacionarnog stanja za 30 min, 25 min i 15 min pri protoku napojne smeše od 60 l/h, 120 l/h i 180 l/h, redom. Kada je proces mikrofiltracije vršen pri vrednosti transmembranskog pritiska od 1 bar, do uspostavljanja stacionarnog stanja došlo je nakon 25 min, 20 min i 10 min za protoke napojne smeše od 60 l/h, 120 l/h i 180 l/h, redom. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da povećanje transmembranskog pritiska i povećanje protoka napojne smeše u ispitivanim opsezima dovode do smanjenja vremena potrebnog za uspostavljanje stacionarnog stanja, odnosno do bržeg postizanja konstantne debljine filtracione pogače.

Kada se posmatra promena fluksa permeata u stacionarnom stanju pri protoku napojne smeše od 120 l/h i različitim vrednostima transmembranskog pritiska (0,2 bar, 0,6 bar i 1 bar), može se uočiti da je u sva tri slučaja vrednost fluksa permeata u stacionarnom stanju približno ista. Slične rezultate dobili su i Tanaka i sar. (1994a) tokom unakrsne mikrofiltracije mikroorganizma *Bacillus subtilis* primenom membrane sa pravougaonim kanalom kroz koji protiče napojna smeša.

Nakon dostizanja stacionarnog stanja filtraciona pogača je već formirana. Povećanje sila smicanja na površini filtracione pogače, do kojeg dolazi zahvaljujući povećanju protoka napojne smeše, rezultuje smanjenjem mase filtracione pogače usled skidanja određene količine čestica (ćelija proizvodnog mikroorganizma) sa površine pogače. Kao posledica toga dolazi do povećanja vrednosti fluksa stacionarnog stanja u ispitivanom opsegu protoka napojne smeše i taj trend se može uočiti pri svim ispitivanim vrednostima transmembranskog pritiska (tabela 5.25.).

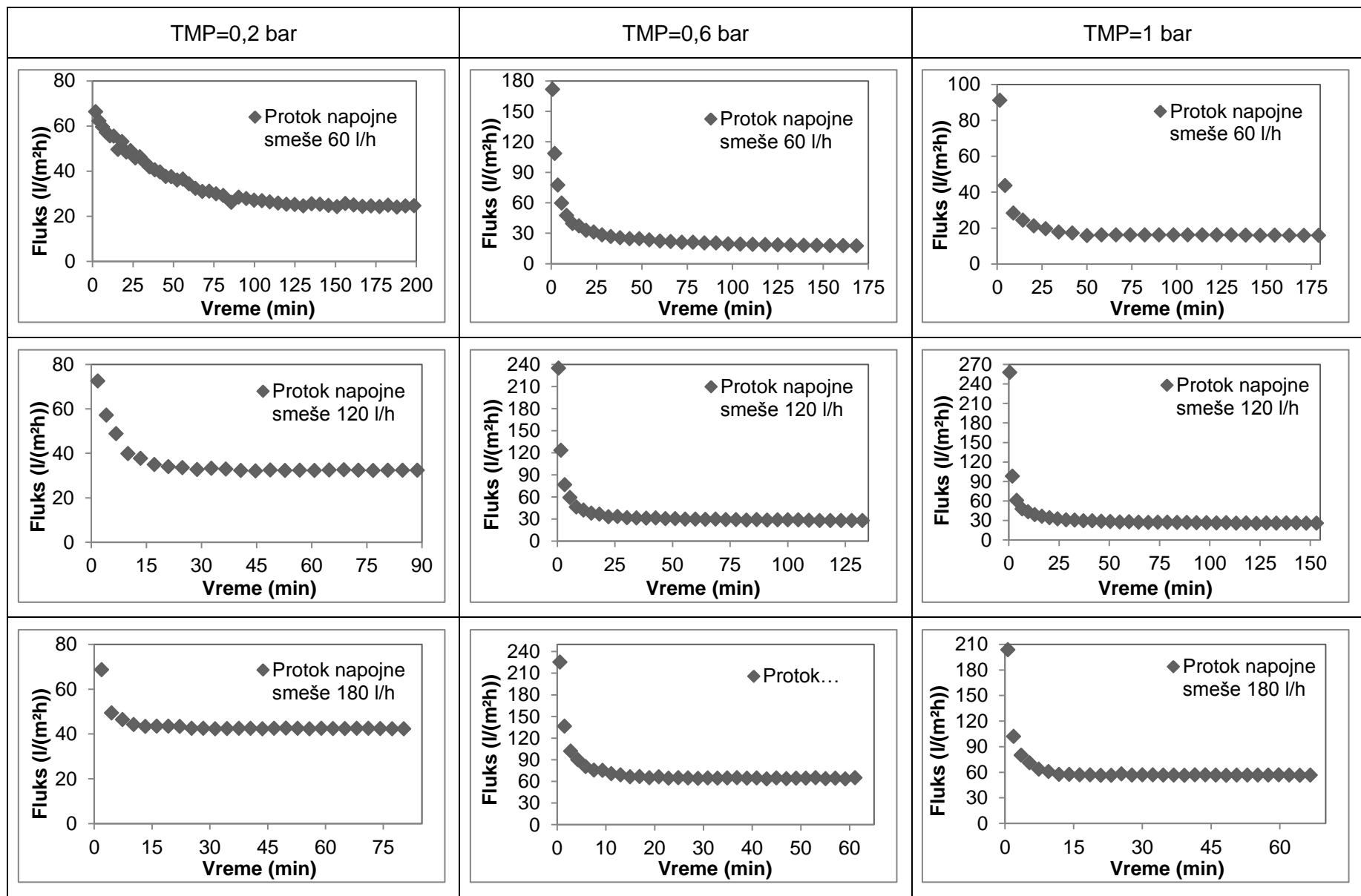
Tabela 5.14. Vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju pri različitim uslovima transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis*

Transmembranski pritisak (bar)	Protok napojne smeše (l/h)	Stacionarni fluks permeata (l/(m ² ·h))
0,2	60	24,87
0,2	120	30,57
0,2	180	44,04
0,6	60	19,44
0,6	120	29,04
0,6	180	53,87
1,0	60	14,82
1,0	120	27,30
1,0	180	56,70

Pri transmembranskom pritisku od 0,2 bar, ostvaruje se povećanje fluksa permeata u stacionarnom stanju za 22,92% pri povećanju protoka napojne smeše sa 60 l/h na 120 l/h i za 77,08% pri povećanju protoka napojne smeše sa 60 l/h na 180 l/h. Kada je proces mikrofiltracije vršen pri transmembranskom pritisku od 0,6 bar, povećanje protoka napojne smeše sa 60 l/h na 120 l/h dovelo je povećanja stacionarnog fluksa permeata za 49,38%, dok je povećanje protoka napojne smeše sa 60 l/h na 180 l/h dovelo je povećanja stacionarnog fluksa permeata za 177,11%. Pri izvođenju procesa mikrofiltracije primenom transmembranskog pritiska od 1 bar, povećanja stacionarnog fluksa permeata prilikom povećanja protoka napojne smeše sa 60 l/h na 120 l/h i sa 60 l/h na 180 l/h iznosila su 84,21% i 282,59%, redom (tabela 5.14.). Može se uočiti da je povećanje fluksa permeata u stacionarnom stanju sa povećanjem protoka napojne smeše izraženije pri višim vrednostima transmembranskog pritiska. Slični rezultati dobijeni su i kada su u pitanju varijacije fluksa permeata u stacionarnom stanju u zavisnosti od protoka napojne smeše tokom unakrsne mikrofiltracije mikroorganizama *Bacillus subtilis* (Hwang i Tsai, 2014) i *Bacillus coagulans* (Fan i sar., 2015).

Sa druge strane, kada se posmatra vrednost fluksa permeata u stacionarnom stanju pri istim vrednostima protoka napojne smeše, može se uočiti da za eksperimente koji su vršeni pri protocima napojne smeše od 60 l/h i 120 l/h sa povećanjem transmembranskog pritiska dolazi do smanjenja fluksa permeata u stacionarnom stanju. Pri protoku napojne smeše od 60 l/h, povećanje transmembranskog pritiska sa 0,2 bar na 0,6 bar dovodi do smanjenja stacionarnog fluksa permeata za 21,83%, dok povećanje transmembranskog pritiska sa 0,2 bar na 1 bar dovodi do smanjenja stacionarnog fluksa permeata za 40,41%. Pri većem protoku napojne smeše od 120 l/h uticaj povećanja transmembranskog pritiska na smanjenje fluksa permeata u stacionarnom stanju je manje izražen, pa se može uočiti smanjenje od 5% za povećanje transmembranskog pritiska sa 0,2 bar na 0,6 bar i smanjenje od 10,7% za povećanje transmembranskog pritiska sa 0,2 bar na 1 bar. Razlog za ovakav trend fluksa permeata u stacionarnom stanju može se pronaći u promenama strukture filtracione pogače od nasumičnog rasporeda štapićastih ćelija proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* na početku procesa mikrofiltracije ka horizontalnoj orijentaciji ćelija u strukturu nalik ciglama u zidu, koja ispoljava viši specifični otpor proticanju permeata i stoga dovodi do smanjenja fluksa permeata (Tanaka i sar., 1994a; Mota i sar., 2002; Fan i sar., 2015). Nasuprot tome, povećanje transmembranskog pritiska sa 0,2 bar na 0,6 bar i sa 0,2 bar na 1 bar pri protoku napojne smeše od 180 l/h dovodi do povećanja fluksa permeata u stacionarnom stanju. Ovakvo ponašanje može se objasniti turbulentnim režimom proticanja napojne smeše pri protoku od 180 l/h (Re=5971), koji delimično narušava strukturu filtracione pogače usled čega dolazi do smanjenja otpora proticanju i većeg rezultujućeg fluksa permeata u stacionarnom stanju (Huisman i Trägårdh, 1999). Iz svega navedenog može se zaključiti da se efikasnije povećanje fluksa permeata može postići povećanjem protoka napojne smeše,

odnosno prividne brzine proticanja, nego povećanjem transmembranskog pritiska tokom mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* bez primene hidrodinamičkih metoda za povećanje fluksa permeata.



Slika 5.25. Praćenje toka procesa unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* u pogledu fluksa permeata pri različitim vrednostima transmembranskog pritiska (0,2 bar, 0,6 bar i 1 bar) i protoka napojne smeše (60 l/h, 120 l/h i 180 l/h)

5.7.1.1. Modelovanje uticaja parametara mikrofiltracije na fluks permeata prilikom unakrsne mikrofiltracije bez primene hidrodinamičkih metoda za povećanje fluksa permeata

Metodologija odzivne površine je primenjena sa ciljem modelovanja fluksa permeata i detaljnijeg uticaja ispitivanja dve nezavisne promenljive (transmembranski pritisak i protok napojne smeše) na odabrani odziv prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*. Primenjene kombinacije odabranih promenljivih u eksperimentalnom planu date su u tabeli 4.10. (poglavlje 4.6.1.). Rezultati fitovanja eksperimentalnih podataka kvadratnom polinomskom jednačinom (analiza varijanse odabranog odziva) dati su u tabeli 5.15. Vrednost koeficijenta determinacije ukazuje da manje od 1% varijabilnosti ne može biti objašnjeno polinomskom jednačinom drugog reda. Osim toga, visoka vrednost koeficijenta determinacije ukazuje na zadovoljavajuću aproksimaciju eksperimentalnih podataka iz procesa mikrofiltracije polinomom drugog reda, dok p -vrednost manja od 0,05 dokazuje statističku značajnost dobijenog modela pri nivou značajnosti od 95%.

Tabela 5.15. Analiza varijanse za fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis*

Izvor varijabilnosti	SS	DF	MS	F-vrednost	p -vrednost	R ²
Model	11783,07	6	1963,85	452,73	0,0002	0,993
Rezidual	13,01	3	4,34	-	-	-

Matematički modeli odzivnih površina (polinomske jednačine drugog reda) predstavljaju odgovarajući način za prikazivanje i fitovanje eksperimentalnih podataka dobijenih u procesu mikrofiltracije. Koeficijenti modela za stacionarni fluks permeata u toku mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*, kao i njihove p -vrednosti, prikazani su u tabeli 5.16., pri čemu su značajni koeficijenti regresione jednačine, kao i njihove p -vrednosti manje od 0,05, boldovani.

Tabela 5.16. Koeficijenti regresione jednačine i njihove p -vrednosti za fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis*

	Odsečak	Linearni koeficijenti		Koeficijent interakcije	Kvadratni koeficijenti	
	b_0	b_1	b_2	b_{12}	b_{11}	b_{22}
Vrednost koeficijenta	39,276	-20,666	-0,320	0,237	-6,668	0,002
p -vrednost	0,0097	0,9050	0,0003	0,0121	0,5212	0,0203

1 – TMP, 2 – protok napojne smeše

Posmatrajući rezultate date u tabeli 5.16., zaključuje se da p -vrednost kvadratnog koeficijenta regresione jednačine ukazuje na statistički značajan uticak protoka napojne smeše na fluks permeata u stacionarnom stanju. Linearni koeficijent ove promenljive je takođe statistički značajan pri nivou značajnosti od 95%. Linearni i kvadratni koeficijent transmembranskog pritiska nisu statistički značajni, ali je zato statistički značajan koeficijent interakcije ove promenljive sa protokom napojne smeše.

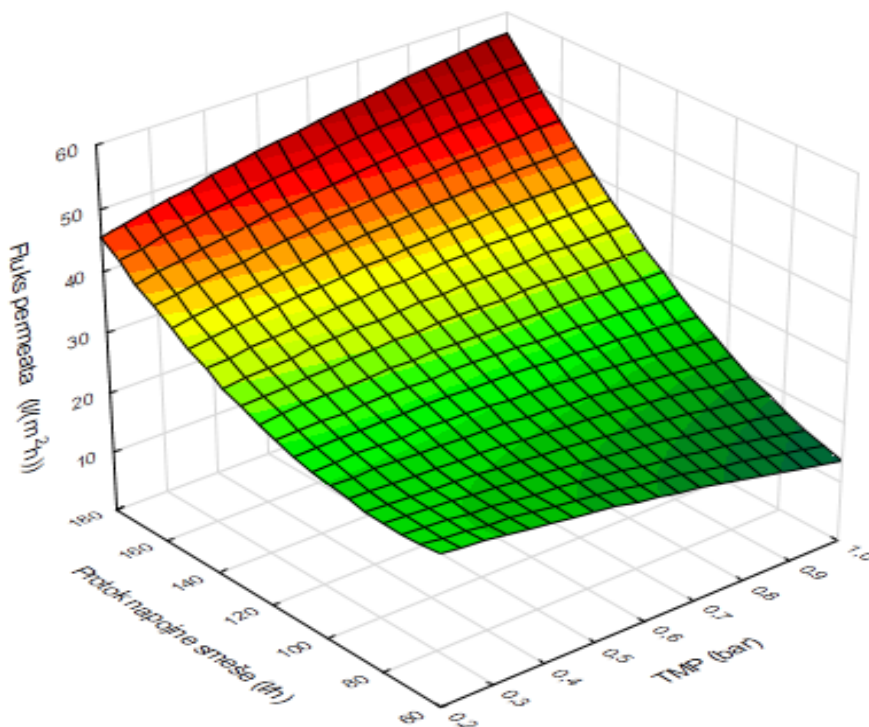
Odzivna površina koja prikazuje uticaj transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* data je na slici 5.26. Minimalan fluks permeata u stacionarnom stanju dobija se pri minimalnoj vrednosti protoka napojne smeše i maksimalnoj vrednosti transmembranskog pritiska iz posmatranih opsega. Sa druge strane, maksimalan fluks permeata u stacionarnom stanju dobija se pri maksimalnoj vrednosti protoka napojne smeše u veoma širokom opsegu vrednosti transmembranskog pritiska, pri

čemu se najveća vrednost fluksa permeata takođe dobija pri maksimalnoj vrednosti transmembranskog pritiska. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da promena protoka napojne smeše ima veći uticaj na promenu fluksa permeata u stacionarnom stanju u poređenju sa uticajem transmembranskog pritiska. Povećanjem protoka napojne smeše dolazi do smanjenja debljine filtracione pogače, a samim tim i do smanjenja otpora filtracione pogače protoku permeata, stoga dolazi do povećanja vrednosti fluksa permeata. Ovo povećanje je manje značajno pri manjim vrednostima transmembranskog pritiska u poređenju sa većim vrednostima ove promenljive. Ovakvo ponašanje može biti objašnjeno promenama u rasporedu ćelija u filtracionoj pogači (Tanaka i sar., 1994a). Pri većim vrednostima transmembranskog pritiska, formiranje filtracione pogače na početku procesa mikrofiltracije uslovljeno je permeacijom, stoga struktura filtracione pogače biva manje uređena tokom napojne smeše, što rezultuje većim fluksom permeata. Tokom procesa mikrofiltracije, povećanje debljine filtracione pogače dovodi do smanjenja fluksa permeata, stoga sile smicanja toka napojna smeše uređuju deponovanje ćelija u pravcu koji je paralelan toku napojne smeše. U stacionarnom stanju, povećanje protoka napojne smeše smanjuje debljinu filtracione pogače, stoga se smanjuje i debljina sloja filtracione pogače uređenog tokom napojne smeše i dolazi do povećanja fluksa permeata, pri čemu je ovo povećanje značajno veće nego pri manjim vrednostima transmembranskog pritiska.

Nasuprot tome, pri manjim vrednostima transmembranskog pritiska uređivanje deponovanja ćelija dejstvom sila smicanja se dešava ranije u toku procesa mikrofiltracije zbog malih vrednosti fluksa permeata (slabije pogonske sile izvođenja procesa). Stoga je otpor filtracione pogače proticanju permeata znatno veći (Tanaka i sar., 1994a; Mota i sar., 2002). U stacionarnom stanju, povećanje protoka napojne smeše ne deluje toliko efikasno na smanjenje otpora filtracione pogače proticanju permeata kao pri većim vrednostima transmembranskog pritiska, što rezultuje manjim vrednostima fluksa permeata.

Uticaj transmembranskog pritiska na fluks permeata u stacionarnom stanju u slučaju mikrofiltracije bez primene hidrodinamičkih metoda za povećanje fluksa permeata je veoma složen, što se može videti i na slici 5.26. Pri manjim vrednostima protoka napojne smeše (pri laminarnom ili prelaznom režimu strujanja), povećanje vrednosti transmembranskog pritiska rezultuje smanjenjem fluksa permeata u stacionarnom stanju. U literaturi su objavljeni slični rezultati za procese mikrofiltracije štapićastih čestica ili ćelija, kao što su čestice grafen oksida (Li i sar., 2019) ili mikroorganizmi poput *Escherichia coli* (Tanaka i sar., 1994b), bakterija roda *Pseudomonas* (Hwang i sar., 2001) i *Bacillus coagulans* (Fan i sar., 2015). Objašnjenje ovog fenomena može se pronaći u uređivanju rasporeda ćelija pod dejstvom sila smicanja koje rezultuje formiranjem strukture nalik ciglama u zidu na površini filtracione pogače (Mota i sar., 2002; Fan i sar., 2015). Otpor ovog sloja proticanju permeata postaje sve veći sa povećanjem kompaktnosti filtracione pogače do koga dolazi usled povećanja transmembranskog pritiska. Do smanjenja fluksa permeata dolazi i zbog povećanja tortuoznosti (vijugavosti toka permeata kroz filtracionu pogaču) (Mota i sar., 2002).

Povećanjem transmembranskog pritiska pri većim vrednostima protoka napojne smeše može se uočiti umereno povećanje fluksa permeata u stacionarnom stanju. Povećanje prividne brzine proticanja napojne smeše kroz kanal membrane rezultuje turbulentnim režimom proticanja napojne smeše. Njegov uticaj redukuje otpor filtracione pogače proticanju permeata i stoga dovodi do povećanja fluksa permeata. Uticaj turbulentnom režima proticanja napojne smeše na odvijanje procesa unakrsne mikrofiltracije može biti objašnjen na dva načina: promenom režima proticanja fluida u kanalu membrane i povećanjem kratanja čestica u suprotnom smeru u odnosu na tok napojne smeše zahvaljujući turbulentnoj difiziji (Huisman i Trägårdh, 1999).



Slika 5.26. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis*

5.7.2. UNAKRSNA MIKROFILTRACIJA UZ PRIMENU KENICS STATIČKOG MEŠAČA

Eksperimenti mikrofiltracije u ovoj fazi istraživanja vršeni su sa ciljem ispitivanja uticaja primene Kenics statičkog mešača na promenu fluksa permeata tokom mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*, u odnosu na izvođenje procesa mikrofiltracije bez statičkog promotora turbulencije. Takođe je ispitan uticaj operativnih uslova (transmembranski pritisak – 0,2 bar, 0,6 bar i 1 bar; protok napojne smeše – 60 l/h, 120 l/h i 180 l/h) na fluks permeata modelovanjem primenom metodologije odzivne površine. Dobijeni matematički modeli iskorišćeni su za optimizaciju operativnih uslova primenom metode željene funkcije, koja je imala za cilj maksimizaciju fluksa permeata u stacionarnom stanju i maksimizaciju smanjenja specifične potrošnje energije u poređenju sa izvođenjem procesa mikrofiltracije bez Kenics statičkog mešača.

Rezultati praćenja fluksa permeata u eksperimentima mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* uz primenu Kenics statičkog mešača kao promotora turbulencije, pri čemu su ispitivani uticaji različitih vrednosti transmembranskog pritiska (0,2 bar, 0,6 bar i 1 bar) i protoka napojne smeše (60 l/h, 120 l/h i 180 l/h), prikazani su na slici 5.27. Trend promene fluksa permeata u toku procesa mikrofiltracije uz primenu statičkog mešača je nešto drugačiji u poređenju sa procesom mikrofiltracije bez primene hidrodinamičkih metoda za povećanje fluksa permeata. Može se uočiti da je u svim prikazanim eksperimentima na početku procesa mikrofiltracije došlo do naglog opadanja vrednosti fluksa permeata, kao i da je ubrzo nakon toga došlo do uspostavljanja stacionarnog stanja. Za postizanje stacionarnog stanja u pogledu fluksa permeata potrebno je znatno kraće vreme u procesu mikrofiltracije sa statičkim mešačem (5-15 min) u poređenju sa procesom mikrofiltracije bez statičkog mešača (10-60 min). Kao što je i očekivano, vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju su znatno veće u eksperimentima mikrofiltracije uz prisustvo statičkog mešača kao promotora turbulencije, što sugerise da je prisustvo Kenics statičkog mešača sprečilo uređivanje ćelija na površini filtracione pogače pod dejstvom sila smicanja. Stoga se dobijaju veće vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju sa povećanjem protoka napojne smeše. Pri

transmembranskom pritisku od 0,2 bar, ovo povećanje je iznosilo 58,56% za povećanje protoka napojne smeše sa 60 l/h na 120 l/h i 90,22% za povećanje za povećanje protoka napojne smeše sa 60 l/h na 180 l/h. Kada je proces mikrofiltracije vršen pri transmembranskom pritisku od 0,6 bar, za povećanje protoka napojne smeše sa 60 l/h na 120 l/h povećanje stacionarnog fluksa permeata iznosilo je 48,16%, dok je za za povećanje protoka napojne smeše sa 60 l/h na 180 l/h povećanje stacionarnog fluksa permeata iznosilo 97,03%. Slično procesu mikrofiltracije bez primene hidrodinamičkih metoda za povećanje fluksa permeata, kada je vršena mikrofiltracija kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* pri vrednosti transmembranskog pritiska od 1 bar, uočeno je najveće povećanje stacionarnog fluksa permeata sa povećanjem protoka napojne smeše: 91,17% za povećanje sa 60 l/h na 120 l/h i 147,25% za povećanje sa 60 l/h na 180 l/h (tabela 5.17.).

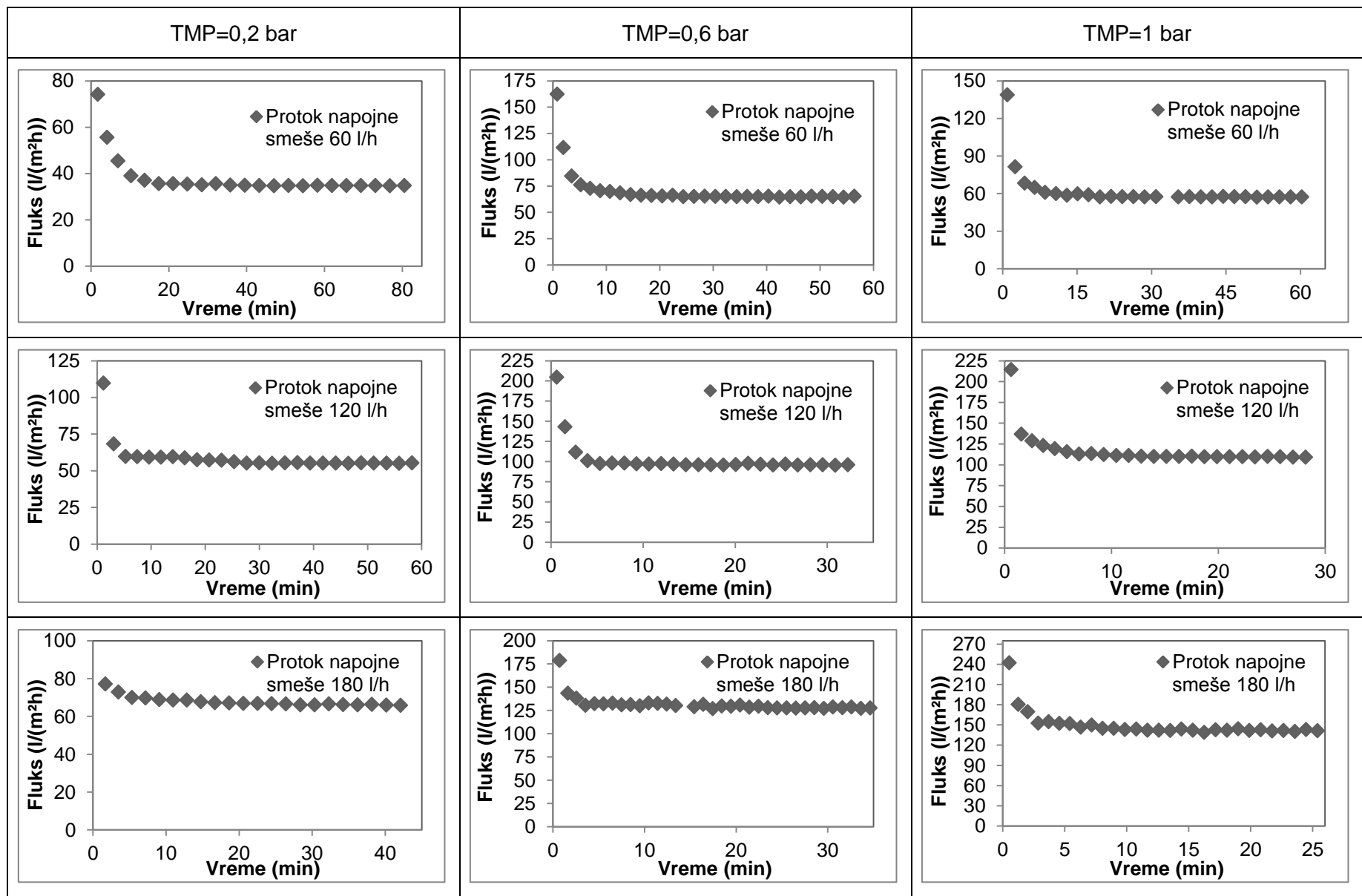
Tabela 5.17. Vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju, relativnog povećanja fluksa permeata i smanjenja specifične potrošnje energije pri različitim uslovima transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* bez statičkog mešača i sa statičkim mešačem

Transmembranski pritisak (bar)	Protok napojne smeše (l/h)	Stacionarni fluks permeata – bez mešača (l/(m ² ·h))	Stacionarni fluks permeata – sa mešačem (l/(m ² ·h))	FI (%)	ER (%)
0,2	60	24,87	34,81	39,92	-7,20
0,2	120	30,57	55,29	80,86	-10,58
0,2	180	44,04	66,33	50,62	-32,79
0,6	60	19,44	64,91	233,81	60,06
0,6	120	29,04	96,17	231,21	39,62
0,6	180	53,87	127,89	137,38	15,75
1,0	60	14,82	57,40	287,30	48,36
1,0	120	27,30	109,73	301,89	25,35
1,0	180	56,70	141,92	150,31	20,10

Sa druge strane, uticaj promene transmembranskog pritiska na promenu fluksa permeata u stacionarnom stanju je mnogo izraženiji u sistemu sa statičkim mešačem kao promotorom turbulencije u poređenju sa sistemom u kome je vršena mikrofiltracija bez primene hidrodinamičkih metoda za povećanje fluksa permeata. Pri protoku napojne smeše od 60 l/h, povećanje transmembranskog pritiska sa 0,2 bar na 0,6 bar dovelo je do povećanja stacionarnog fluksa permeata za 86,47%, dok je povećanje transmembranskog pritiska sa 0,2 bar na 1 bar dovelo je do povećanja stacionarnog fluksa permeata za 64,90%. Kada je proces mikrofiltracije uz prisustvo statičkog mešača vršen pri protoku napojne smeše od 120 l/h, povećanje stacionarnog fluksa permeata pri povećanju transmembranskog pritiska sa 0,2 bar na 0,6 bar iznosilo je 73,94%, dok je povećanje stacionarnog fluksa permeata pri povećanju transmembranskog pritiska sa 0,2 bar na 1 bar iznosilo 98,46%. Pri izvođenju procesa mikrofiltracije uz najveću vrednost protoka napojne smeše iz ispitivanog opsega (180 l/h), povećanje fluksa permeata iznosilo je 92,81% za povećanje transmembranskog pritiska sa 0,2 bar na 0,6 bar, dok je povećanje fluksa permeata iznosilo 113,96% za povećanje transmembranskog pritiska sa 0,2 bar na 1 bar. Može se uočiti da je uticaj povećanja transmembranskog pritiska na povećanje stacionarnog fluksa permeata izraženiji pri većim vrednostima protoka napojne smeše. Razlog ovakvog ponašanja može se pronaći u činjenici da prisustvo statičkog mešača utiče na promenu strukture i osobina filtracione pogače, stoga je uticaj transmembranskog pritiska kao pogonske sile procesa mikrofiltracije znatno izraženiji u sistemima sa promotorom turbulencije (Jokić i sar., 2010).

Nasuprot izvedenom zaključku da u sistemu za mikrofiltraciju kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* bez primene hidrodinamičkih metoda za poboljšanje fluksa permeata efikasnije povećanje stacionarnog fluksa permeata može biti postignuto povećanjem prividne brzine unakrsnog proticanja napojne smeše (protoka napojne smeše) u poređenju sa povećanjem transmembranskog pritiska, u sistemu u kome se koristi Kenics statički mešač kao promotor turbulencije povećanje transmembranskog

pritiska takođe može da se koristi kao način za efikasno povećanje fluksa permeata u stacionarnom stanju.



Slika 5.27. Praćenje toka procesa mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz primenu statičkog mešača u pogledu fluksa permeata pri različitim vrednostima transmembranskog pritiska (0,2 bar, 0,6 bar i 1 bar) i protoka napojne smeše (60 l/h, 120 l/h i 180 l/h)

5.7.2.1. Modelovanje parametara mikrofiltracije prilikom unakrsne mikrofiltracije uz primenu Kenics statičkog mešača

U cilju modelovanja fluksa permeata u stacionarnom stanju, relativnog povećanje fluksa permeata i smanjenje specifične potrošnje energije u odnosu na mikrofiltraciju bez statičkog mešača, kao i detaljnijeg uticaja ispitivanja dve nezavisne promenljive (transmembranski pritisak i protok napojne smeše) na odabrane odzive prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* uz prisustvo Kenics statičkog mešača primenjena je metodologija odzivne površine. Primenjene kombinacije odabranih promenljivih u eksperimentalnom planu date su u tabeli 4.10. (poglavlje 4.6.1.).

Rezultati analize varijanse za odabrane odzive (fluks permeata u stacionarnom stanju, relativno povećanje fluksa permeata i smanjenje specifične potrošnje energije u odnosu na mikrofiltraciju bez statičkog mešača) prilikom mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* uz prisustvo statičkog mešača kao promotora turbulencije prikazani su u tabeli 5.18. Statistička značajnost dobijenih matematičkih modela procenjena je na osnovu dobijenih *p*-vrednosti. S obzirom da su za sva tri modela *p*-vrednosti manje od 0,05, dobijeni matematički modeli su statistički značajni pri nivou značajnosti od 95%. Visoke vrednosti koeficijenata determinacije ukazuju na zadovoljavajuću aproksimaciju eksperimentalnih rezultata procesa mikrofiltracije uz prisustvo statičkog mešača odabranim regresionim jednačinama, odnosno polinomima drugog reda. Osim toga, vrednosti dobijenih koeficijenata determinacije ukazuju da dobijeni model za fluks permeata u stacionarnom stanju ne može da objasni manje od 1% varijacija, dok modeli za relativno povećanje fluksa permeata i smanjenje specifične potrošnje energije u odnosu na mikrofiltraciju bez statičkog mešača ne mogu da objasne manje od 2% i 3% varijacija, redom.

Tabela 5.18. Analiza varijanse odabranih odziva prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz primenu statičkog mešača

Odziv	SS	DF	MS	F-vrednost	<i>p</i> -vrednost	R ²
Stacionarni fluks permeata (l/(m ² ·h))	73918,20 ^a 43,55 ^b	6 ^a 3 ^b	12319,70 ^a 14,52 ^b	848,71	0,0001	0,996
<i>FI</i> (%)	332756,80 ^a 1205,00 ^b	6 ^a 3 ^b	55459,47 ^a 401,66 ^b	138,07	0,0009	0,985
<i>ER</i> (%)	9835,33 ^a 213,15 ^b	6 ^a 3 ^b	1639,22 ^a 71,05 ^b	23,07	0,0132	0,971

^a model, ^b reziduali

Koeficijenti dobijenih matematičkih modela, kao i njihove *p*-vrednosti, za odabrane odzive (fluks permeata u stacionarnom stanju, relativno povećanje fluksa permeata i smanjenje specifične potrošnje energije u odnosu na mikrofiltraciju bez statičkog mešača) prilikom mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* uz prisustvo statičkog mešača kao promotora turbulencije prikazani su u tabeli 5.19. Statistički značajni koeficijenti matematičkih modela za odabrane odzive, kao i njihove *p*-vrednosti, boldovani su u tabeli 5.19. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da statistički značajan uticaj (*p*-vrednost < 0,05) na fluks permeata u stacionarnom stanju imaju oba linearna koeficijenta (za uticaj transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše), koeficijent interakcije transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše, kao i kvadratni član transmembranskog pritiska, čime se potvrđuje prethodno iznet zaključak da se povećanje stacionarnog fluksa permeata prilikom mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* uz prisustvo statičkog mešača kao promotora turbulencije može postići i promenom, odnosno povećanjem vrednosti transmembranskog pritiska u ispitivanom opsegu vrednosti, što je takođe potvrđeno razlikom u statističkoj značajnosti koeficijenata modela koji opisuju uticaj transmembranskog pritiska prilikom mikrofiltracije sa i bez statičkog mešača. Kod matematičkog modela za relativno povećanje

fluksa permeata u odnosu na mikrofiltraciju bez statičkog mešača može se uočiti da svi dobijeni koeficijenti ispoljavaju statistički značajan uticaj na ovaj odziv. Međutim, statistička značajnost linearnih koeficijenata regresione jednačine je veća nego statistička značajnost kvadratnih koeficijenata. Najveći uticaj na stacionarni fluks permeata ima linearni koeficijent transmembranskog pritiska. Među kvadratnim koeficijentima, statistički najznačajniji uticaj ima kvadratni koeficijent protoka napojne smeše. Kada je u pitanju smanjenje specifične potrošnje energije u odnosu na mikrofiltraciju bez statičkog mešača, uočava se statistički značajan uticaj oba linearna koeficijenta (za uticaj transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše) i kvadratnog koeficijenta za transmembranski pritisak.

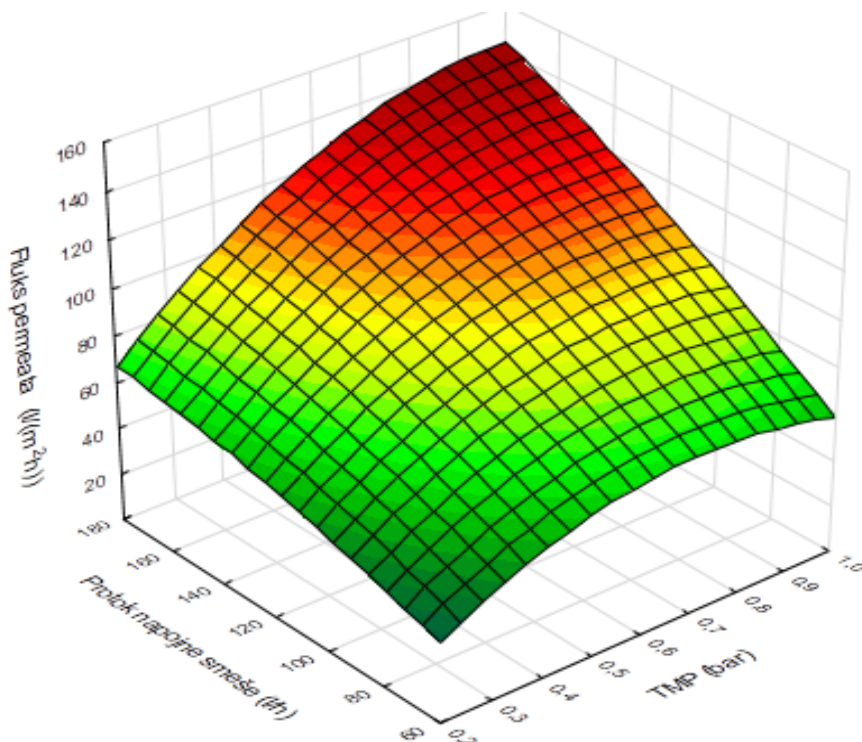
Tabela 5.19. Koeficijenti regresionih jednačina i njihove *p*-vrednosti za odabrane odzive prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz primenu statičkog mešača

Koeficijent	Stacionarni fluks permeata (l/(m ² ·h))		FI (%)		ER (%)	
	Vrednost	<i>p</i> -vrednost	Vrednost	<i>p</i> -vrednost	Vrednost	<i>p</i> -vrednost
Odsečak						
b ₀	-20,120	0,1970	-270,504	0,0243	-39,757	0,2364
Linearni						
b ₁	137,918	0,0005	788,711	0,0014	298,009	0,0060
b ₂	0,490	0,0003	3,955	0,0200	-0,206	0,0177
Interakcija						
b ₁₂	0,552	0,0061	-1,538	0,0347	-0,028	0,8840
Kvadratni						
b ₁₁	-117,138	0,0061	-306,170	0,0407	-195,420	0,0135
b ₂₂	-0,001	0,1692	-0,015	0,0307	-0,001	0,9080

1 – TMP, 2 – protok napojne smeše

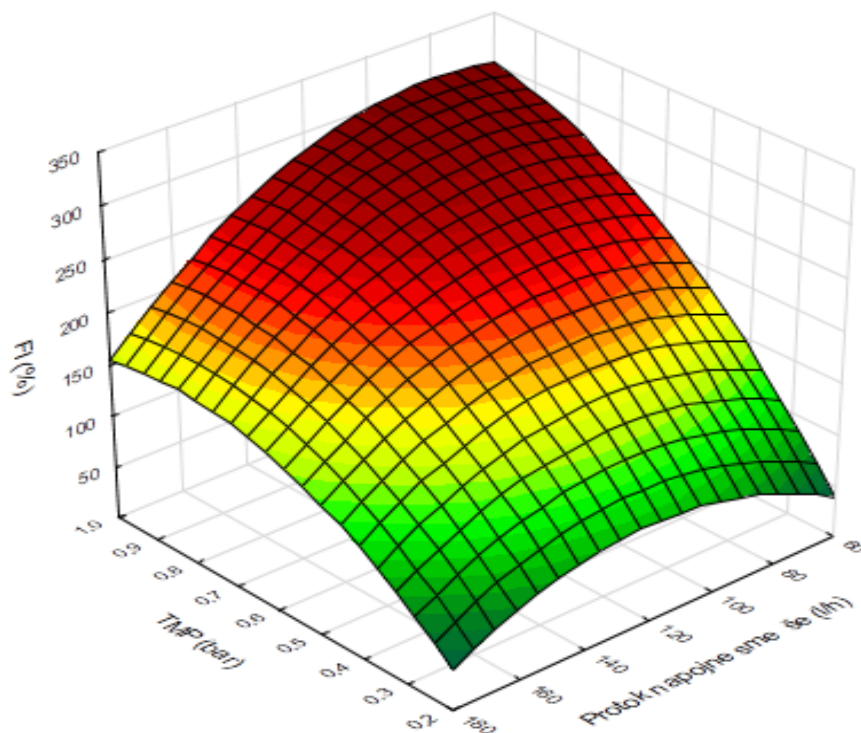
Na slici 5.28 prikazana je odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz prisustvo statičkog mešača. Minimalne vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju dobijene su pri minimalnim vrednostima transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše, dok se, sa druge strane, intenzifikacija stacionarnog fluksa permeata može uočiti pri suprotnim uslovima mikrofiltracije – pri maksimalnim vrednostima transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše, odnosno uočava se porast stacionarnog fluksa permeata sa povećanjem obe nezavisne promenljive. Ovakav trend promene fluksa permeata u stacionarnom stanju sa promenom transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše sličan je trendu prisutnom prilikom mikrofiltracije ovalnih ili globularnih ćelija mikroorganizama (Tanaka i sar., 1994c; Jokić i sar., 2010), gde je povećanje transmembranskog pritiska u sistemima sa promotorom turbulencije dovelo do povećanja fluksa permeata u stacionarnom stanju pri svim ispitivanim vrednostima protoka napojne smeše. Razlog ovakvog ponašanja sistema sa promotorom turbulencije može se pronaći u izmeni strukture filtracione pogače. Prividna brzina unakrsnog proticanja napojne smeše se povećava u prisustvu Kenics statičkog mešača za oko 20% zahvaljujući manjoj dostupnoj površini poprečnog preseka kanala membrane kroz koji protiče napojna smeša. Veće vrednosti prividne brzine proticanja dovode do veće vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju, kao što je opisano za sisteme bez promotora turbulencije (Huisman i Trägårdh, 1999). Još jedna značajna karakteristika za primenu Kenics statičkog mešača je njegov geometrijski dizajn, koji simultano indukuje jedinstven obrazac podele toka napojne smeše i radialno mešanje (Jokić i sar., 2010). Opravdana je pretpostavka da radialno mešanje uzrokovano prisustvom promotora turbulencije doprinosi narušavanju strukture sloja ćelija na površini filtracione pogače koji je prethodno uređen dejstvom sila smicanja. Usled toga dolazi do nasumične raspodele ćelija koja izaziva smanjenje specifičnog otpora filtracione pogače proticanju permeata, što rezultuje većom vrednošću stacionarnog fluksa permeata u poređenju sa sistemom bez promotora turbulencije. Povećanje vrednosti

transmembranskog pritiska do 0,7 bar dovodi do značajno većih vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju, dok dalje povećanje vrednosti transmembranskog pritiska iznad 0,7 bar dovodi do umerenog povećanja fluksa permeata u stacionarnom stanju. Razlog ovakvog ponašanja predstavlja prljanje membrane drugim organskim komponentama kultivacione tečnosti (Hwang i Tsai, 2014).



Slika 5.28. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz prisustvo statičkog mešača

Uticaj transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše na relativno povećanje fluksa permeata u stacionarnom stanju prilikom mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz prisustvo statičkog mešača prikazan je na slici 5.29. Relativno povećanje fluksa permeata u stacionarnom stanju kretalo se od 50% do 300%, u zavisnosti od uslova mikrofiltracije. Povećanje fluksa permeata u praksi znači da se dobija veća količina permeata primenom iste filtracione površine ili da investicioni troškovi mogu biti značajno smanjeni pošto je za dobijanje iste količine permeata potrebna manja površina membrane za mikrofiltraciju (Armbruster i sar., 2018). Značajno povećanje fluksa permeata u stacionarnom stanju uzrokovano je turbulentnim režimom proticanja napojne smeše u kanalu membrane, ali i jedinstvenim radijalnim obrascem kretanja fluida, koji nastaje usled karakteristične geometrije i načina povezivanja helikoidnih elemenata Kenics statičkog miksera. Relativno povećanje fluksa permeata u stacionarnom stanju se dešava sa povećanjem transmembranskog pritiska pri svim ispitivanim vrednostima protoka napojne smeše. Pri manjim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše, odnosno pri manjim vrednostima protoka napojne smeše, povećanje transmembranskog pritiska dovelo je do veće vrednosti relativnog povećanja fluksa permeata u stacionarnom stanju. Sa druge strane, pri većim vrednostima protoka napojne smeše može se primetiti rast vrednosti relativnog povećanja fluksa permeata sa povećanjem transmembranskog pritiska do vrednosti od 0,8 bar, nakon čega rast relativnog povećanja fluksa permeata postaje manje očigledan.

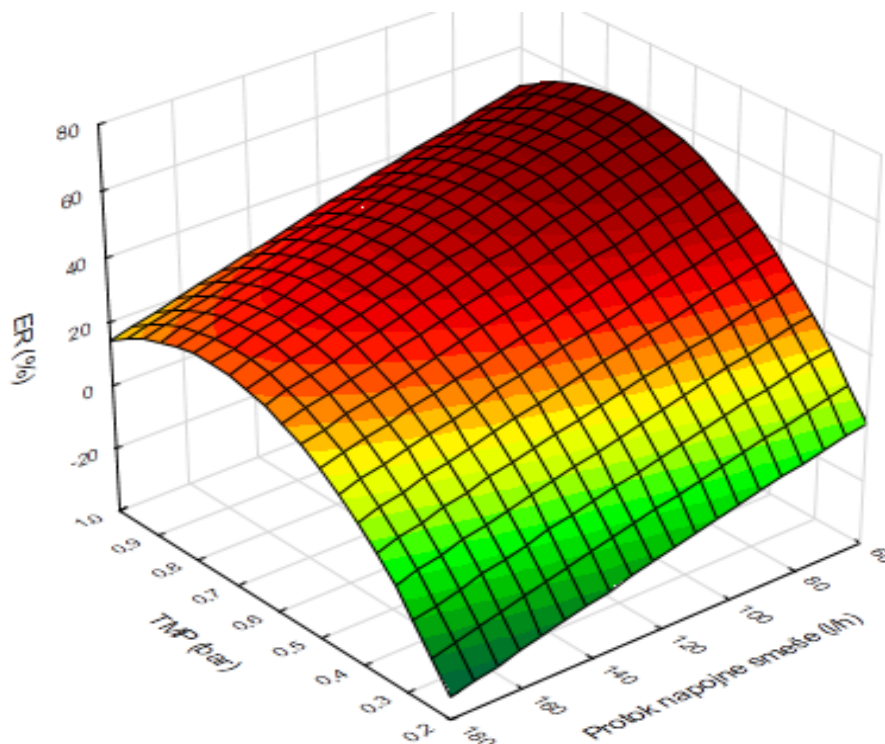


Slika 5.29. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše na relativno povećanje fluksa permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz prisustvo statičkog mešača

Posmatrajući uticaj protoka napojne smeše pri fiksnoj vrednosti transmembranskog pritiska, može se zaključiti da povećanje protoka napojne smeše dovodi do smanjenja vrednosti relativnog povećanja fluksa permeata, odnosno da je povećanje fluksa permeata manje izraženo pri većim vrednostima protoka napojne smeše u ispitivanom opsegu vrednosti. Uzrok ovakvog trenda može se pronaći u činjenici da je turbulentni režim proticanja napojne smeše već bio uspostavljen u kanalu membrane pri većim vrednostima protoka napojne smeše i bez prisustva statičkog mešača, stoga dolazi do manje intenzifikacije turbulentnog režima proticanja usled postavljanja statičkog miksera. Može se zaključiti da je relativno povećanje fluksa permeata u stacionarnom stanju bilo izraženije pri laminarnom i prelaznom režimu proticanja napojne smeše, dok je pri turbulentnom režimu proticanja napojne smeše vrednost relativnog povećanja fluksa permeata u stacionarnom stanju bila manja. Pri većim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše, odnosno pri turbulentnom režimu proticanja, statički mešači podstiču turbulenciju i dovode do intenzivnog radijalnog mešanja, čak i u blizini zidova membrane. Slični zaključci, gde je poboljšanje fluksa permeata u stacionarnom stanju izraženije pri laminarnom režimu proticanja napojne smeše, dok je u turbulentnom režimu intenzifikacija povećanja fluksa stacionarnog stanja manje očigledna, mogu se pronaći i u literaturi (Ghanem i sar., 2014).

Specifična potrošnja energije tokom procesa membranske mikrofiltracije zavisi od pada pritiska duž membranskog modula i fluksa permeata. Iako primenom statičkog mešača dolazi do povećanja fluksa permeata u stacionarnom stanju, u isto vreme dolazi i do pada pritiska duž membranskog modula. Ova dva suprotstavljena trenda definišu energetska efikasnost primene promotora turbulencije. Specifična potrošnja energije (po jedinici zapremine permeata) je niža tokom mikrofiltracije uz primenu promotora turbulencije u odnosu na proces mikrofiltracije bez promotora turbulencije samo u slučajevima kada je vrednost fluksa permeata dovoljno velika da kompenzuje povećanje potrošnje energije usled povećanog otpora toku napojne smeše. Smanjenje specifične potrošnje energije predstavlja relativni stepen smanjenja potrošnje energije usled primene promotora turbulencije.

Uticaj transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše na promenu smanjenja specifične potrošnje energije tokom mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz prisustvo statičkog mešača prikazan je na slici 5.30. Negativne vrednosti smanjenja specifične potrošnje energije predstavljaju eksperimentalne uslove u kojima vrednost relativnog povećanja fluksa permeata u stacionarnom stanju nije dovoljno velika da kompenzuje povećan otpor toku napojne smeše usled prisustva promotora turbulencije. U ovom istraživanju, negativne vrednosti smanjenja specifične potrošnje energije dobijene su pri vrednostima transmembranskog pritiska oko 0,2 bar pri manjim vrednostima protoka napojne smeše, dok se pri većim vrednostima protoka napojne smeše (oko 180 l/h) negativne vrednosti smanjenja specifične potrošnje energije mogu uočiti pri vrednostima transmembranskog pritiska i do 0,4 bar, pri čemu u se primenom ovih uslova mikrofiltracije sa statičkim mešačem postiže relativno povećanje stacionarnog fluksa permeata od oko 100% u odnosu na proces mikrofiltracije bez promotora turbulencije.



Slika 5.30. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše na smanjenje specifične potrošnje energije prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz prisustvo statičkog mešača

Povećanje protoka napojne smeše dovodi do povećanja gubitka hidrauličke snage, ali, sa druge strane, vrednost relativnog povećanja fluksa permeata u stacionarnom stanju nije dovoljno velika da obezbedi porast vrednosti smanjenja specifične potrošnje energije. Najveće vrednosti smanjenja specifične potrošnje energije su dobijene pri manjim vrednostima protoka napojne smeše, pri svim vrednostima transmembranskog pritiska u ispitivanom opsegu. Sa druge strane, promena transmembranskog pritiska je pokazala sličan uticaj na smanjenje specifične potrošnje energije pri svim vrednostima protoka napojne smeše iz ispitivanog opsega. Povećanje vrednosti smanjenja specifične potrošnje energije uočava se pri vrednostima transmembranskog pritiska do 0,8 bar, nakon čega se uočava blagi pad vrednosti smanjenja specifične potrošnje energije. Uzrok ovakvog trenda je prljanje membrane drugim organskim komponentama kultivacione tečnosti pri većim vrednostima transmembranskog pritiska (Tanaka i sar., 1994c; Hwang i Wang, 2012).

5.7.2.2. Optimizacija uslova unakrsne mikrofiltracije uz primenu Kenics statičkog mešača

Nakon razvoja matematičkih modela za fluks permeata u stacionarnom stanju, relativno povećanje fluksa permeata i smanjenje specifične potrošnje energije u odnosu na mikrofiltraciju bez statičkog mešača, naredni korak u razvoju procesa mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* predstavlja optimizacija operativnih parametara mikrofiltracije (transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše), kako bi se postigli željeni ciljevi, odnosno ishodi procesa mikrofiltracije: maksimizacija fluksa permeata u stacionarnom stanju i maksimizacija smanjenja specifične potrošnje energije. Iako oba odziva treba da budu maksimizovana, ova dva cilja su međusobno suprotstavljena. Maksimalne vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju prilikom mikrofiltracije uz primenu statičkog mešača postižu se pri većim vrednostima transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše. Sa druge strane, maksimalna vrednost smanjenja specifične potrošnje energije postiže se pri velikim vrednostima transmembranskog pritiska i malim vrednostima protoka napojne smeše. Ispunjenje oba zadata cilja u pogledu definisanja optimalne vrednosti protoka napojne smeše može biti postignuto primenom numeričke optimizacije, odnosno metode željene funkcije, u kombinaciji sa dobijenim modelima odzivnih površina.

Rezultati numeričke optimizacije zadatog problema primenom metode željene funkcije daju optimizovane vrednosti transmembranskog pritiska i protoka napojne smeše od 0,79 bar i 137,7 l/h, redom (tabela 5.20). Pri ovim vrednostima nezavisnih promenljivih, dobijeni matematički modeli predviđaju vrednost fluksa permeata u stacionarnom stanju od 120 l/(m²·h), dok predviđena vrednost smanjenja specifične potrošnje energije iznosi 38%. Može se zaključiti da je pri zadatim uslovima procesa mikrofiltracije uz primenu statičkog mešača dobijena oko 3,5 puta veća vrednost stacionarnog fluksa permeata u odnosu na proces mikrofiltracije izveden bez promotora turbulencije (oko 35 l/(m²·h)).

Tabela 5.20. Optimizovane vrednosti variranih faktora i predviđene vrednosti odziva dobijene kao rezultat optimizacije procesnih uslova unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz primenu statičkog mešača

Faktori	Cilj	Optimizovana vrednost
Transmembranski pritisak (bar)	u opsegu	0,79
Protok napojne smeše (l/h)	u opsegu	137,70
Odzivi	Cilj	Predviđena vrednost
Fluks permeata u stacionarnom stanju (l/(m ² ·h))	maksimalan	120,00
ER (%)	maksimalan	38,00
Vrednost željene funkcije		0,77

5.7.3. UNAKRSNA MIKROFILTRACIJA UZ PRIMENU UDUVAVANJA VAZDUHA

Uduvavanje gasa u tok napojne smeše je jedna od hidrodinamičkih metoda za poboljšanje fluksa permeata. U okviru ove doktorske disertacije izvršeni su eksperimenti mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* uz uduvavanje vazduha u tok napojne smeše prema eksperimentalnom planu definisanom u tabeli 4.11. (poglavlje 4.6.2.). Kao nezavisne promenljive, odnosno operativni uslovi, definisani su transmembranski pritisak, prividna brzina proticanja napojne smeše i prividna brzina proticanja vazduha. Kao odzivi mikrofiltracije, odnosno zavisne promenljive, praćeni su fluks permeata u stacionarnom stanju i specifična potrošnja energije izražena po jedinici zapremine permeata. Rezultati eksperimenata mikrofiltracije sa uduvavanjem vazduha prikazani su u tabeli 5.21. Detaljnije ispitivanje uticaja nezavisnih promenljivih, kao i njihovih interakcija, na odabrane odzive omogućeno je primenom metodologije odzivne površine, dok je optimizacija operativnih uslova mikrofiltracije u pogledu maksimizacije fluksa permeata u

stacionarnom stanju i minimizacije specifične potrošnje permeata izvršena primenom metode željene funkcije.

Tabela 5.21. Vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju i specifične potrošnje energije pri različitim uslovima transmembranskog pritiska, prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz primenu uduvavanja vazduha

Transmembranski pritisak (bar)	Prividna brzina proticanja tečnosti V_L (m/s)	Prividna brzina proticanja gasa V_G (m/s)	Fluks permeata ($l/m^2 \cdot h$)	Specifična potrošnja energije ($kW \cdot h/m^3$)
0,2	0,43	0,2	31,06	1,1
1	0,43	0,2	22,95	2,3
0,2	1,3	0,2	55,89	4,4
1	1,3	0,2	70,00	3,9
0,2	0,87	0	30,57	2,4
1	0,87	0	29,00	4,7
0,2	0,87	0,4	36,67	3,8
1	0,87	0,4	41,47	2,5
0,6	0,43	0	17,50	2,3
0,6	1,3	0	53,87	4,0
0,6	0,43	0,4	32,64	1,1
0,6	1,3	0,4	58,05	4,6
0,6	0,87	0,2	43,45	2,1
0,6	0,87	0,2	42,80	2,1
0,6	0,87	0,2	45,00	2,0

5.7.3.1. Modelovanje uticaja parametara mikrofiltracije prilikom unakrsne mikrofiltracije uz primenu uduvavanja vazduha

U cilju modelovanja fluksa permeata u stacionarnom stanju i specifične potrošnje energije u kao i detaljnijeg uticaja ispitivanja tri nezavisne promenljive (transmembranski pritisak, prividna brzina proticanja napojne smeše i prividna brzina proticanja vazduha) na odabrane odzive prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* uz uduvavanje vazduha primenjena je metodologija odzivne površine. Primenjene kombinacije odabranih promenljivih u Boks-Benkenovom eksperimentalnom planu date su u tabeli 4.11. (poglavlje 4.6.2.).

Rezultati analize varijanse za odabrane odzive (fluks permeata u stacionarnom stanju i specifičnu potrošnju energije) prilikom mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* uz uduvavanje prikazani su u tabeli 5.22. Statistička značajnost dobijenih matematičkih modela procenjena je na osnovu dobijenih p -vrednosti. S obzirom na prikazane p -vrednosti koje za sva tri modela iznose manje od 0,05, može se zaključiti da su dobijeni matematički modeli statistički značajni pri nivou značajnosti od 95%. Visoke vrednosti koeficijenata determinacije ukazuju na zadovoljavajuću aproksimaciju eksperimentalnih rezultata procesa mikrofiltracije uz uduvavanje odabranim regresionim jednačinama, odnosno polinomima drugog reda. Vrednosti dobijenih koeficijenata determinacije ukazuju da dobijeni model za fluks permeata u stacionarnom stanju ne može da objasni manje od 2% varijacija, dok se modelom za specifičnu potrošnje energije ne može objasniti manje od 1% varijacija.

Tabela 5.22. Analiza varijanse odabranih odziva prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz primenu uduvanja vazduha

Odziv	SS	DF	MS	F-vrednost	p-vrednost	R ²
Stacionarni fluks permeata (l/(m ² ·h))	2845,19 ^a 16,50 ^b	9 ^a 5 ^b	316,13 ^a 3,30 ^b	95,80	0,0000	0,984
E (kW·h/m ³)	21,06 ^a 0,04 ^b	9 ^a 5 ^b	2,34 ^a 0,01 ^b	318,23	0,0000	0,995

^a model, ^b reziduali

Koeficijenti dobijenih matematičkih modela, kao i njihove *p*-vrednosti, za odabrane odzive (fluks permeata u stacionarnom stanju i specifičnu potrošnju energije) prilikom mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* uz uduvanje vazduha prikazani su u tabeli 5.23. Statistički značajni koeficijenti matematičkih modela za odabrane odzive, kao i njihove *p*-vrednosti, boldovani su u tabeli 5.23. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da statistički značajan uticaj (*p*-vrednost < 0,05) na fluks permeata u stacionarnom stanju imaju linearni koeficijenti za uticaj prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha, koeficijenti interakcije transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja napojne smeše, kao i prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha, i kvadratni članovi sve tri ispitivane promenljive. Kada je u pitanju model za specifičnu potrošnju energije, uočava se statistički značajan uticaj svih koeficijenata modela.

Tabela 5.23. Koeficijenti regresionih jednačina i njihove *p*-vrednosti za odabrane odzive prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz primenu uduvanja vazduha

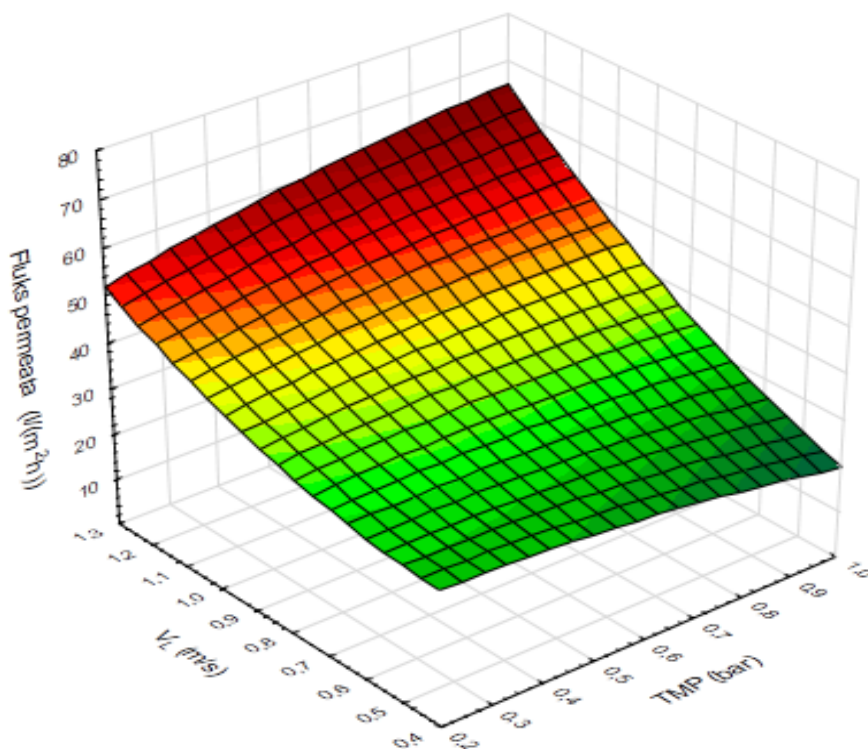
Koeficijent	Stacionarni fluks permeata (l/(m ² ·h))		E (kW·h/m ³)	
	Vrednost	<i>p</i> -vrednost	Vrednost	<i>p</i> -vrednost
Odsečak				
b ₀	20,25	0,0141	0,78	0,0302
Linearni				
b ₁	-10,54	0,1410	0,37	0,0009
b ₂	-9,62	0,0000	0,88	0,0000
b ₃	107,98	0,0007	-5,40	0,0021
Interakcija				
b ₁₂	31,90	0,0499	3,78	0,0002
b ₁₃	19,91	0,1400	1,42	0,0000
b ₂₃	-31,51	0,0008	16,98	0,0001
Kvadratni				
b ₁₁	-15,20	0,0017	0,60	0,0000
b ₂₂	20,34	0,0096	0,27	0,0018
b ₃₃	-172,28	0,0295	0,68	0,0001

1 – TMP, 2 – *V_L*, 3 - *V_G*

Odzivne površine su konstruisane tako da prikazuju uticaj dve nezavisne promenljive na odabrane odzive (fluks permeata u stacionarnom stanju i specifičnu potrošnju energije), pri čemu je vrednost treće nezavisne promenljive jednaka vrednosti iz centralne tačke eksperimentalnog plana.

Uticaji transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja napojne smeše na fluks permeata u stacionarnom stanju prikazani su na slici 5.31. Može se primetiti da povećanje vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše dovodi do povećanja vrednosti fluksa permeata u čitavom opsegu ispitivanih vrednosti transmembranskog pritiska. Maksimalne vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju dobijaju se pri vrednostima prividne brzine

proticanja napojne smeše koje su bliske maksimalnoj vrednosti ispitivanog opsega, iako ovim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše odgovara mehurasti režim proticanja, koji se u literaturi obično povezuje sa manjim vrednostima povećanja fluksa permeata (Mercier i sar., 1995; Mercier i sar., 1997; Hwang i Wu, 2008). Vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše od 0,43 m/s, 0,86 m/s i 1,30 m/s odgovaraju vrednosti Reynoldsovog broja od 1990, 3980 i 5971, redom. Dakle, pri većim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše javlja se turbulentni režim proticanja i bez uduvavanja vazduha. Zbog toga dolazi smanjenja debljine filtracione pogače sa povećanjem vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše, usled čega se javlja manji otpor proticanju permeata i povećanje vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju.



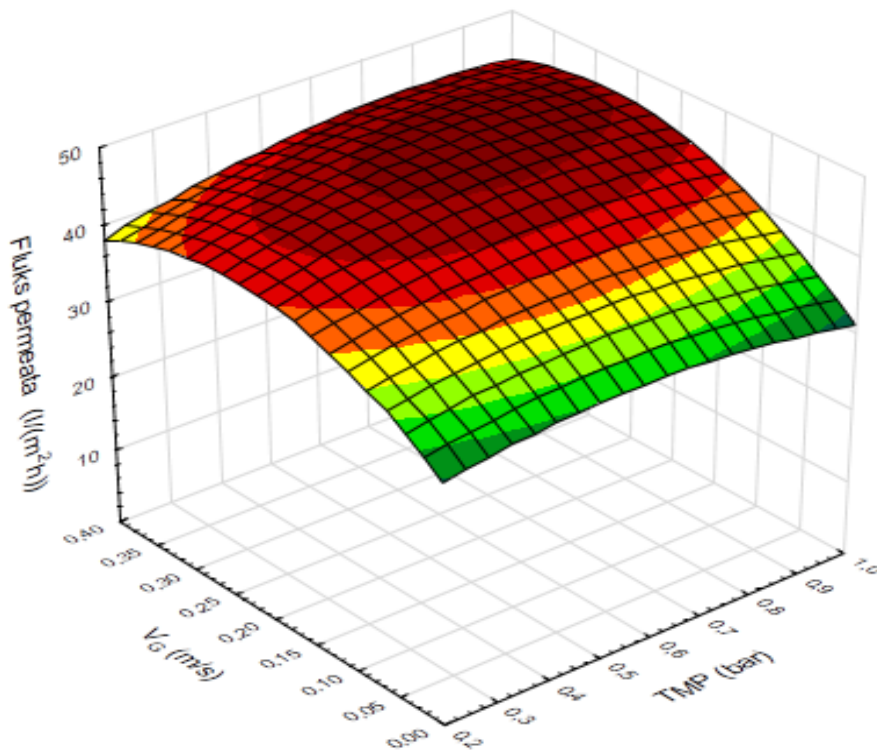
Slika 5.31. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja napojne smeše na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz uduvavanje vazduha

Usled različite prostorne organizacije bakterijskih ćelija u sloju filtracione pogače povećanje vrednosti fluksa permeata je manje uočljivo pri manjim vrednostima transmembranskog pritiska, u poređenju sa većim vrednostima transmembranskog pritiska (Huisman i Trägårdh, 1999). Povećanje vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše sa 0,43 m/s na 1,30 m/s dovodi do povećanja vrednosti fluksa permeata za oko 180% pri vrednosti transmembranskog pritiska od 1 bar, dok povećanje vrednosti fluksa permeata za isti opseg povećanja vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše pri transmembranskom pritisku od 0,2 bar iznosi samo 67%. Pri većim vrednostima transmembranskog pritiska na početku mikrofiltracije prostorna organizacija ćelija je nasumična jer do formiranja filtracione pogače dominantno dolazi usled proticanja permeata koje se odvija pod pravim uglom u odnosu na površinu membrane. Nasuprot tome, sa odmicanjem procesa mikrofiltracije dolazi do smanjenja vrednosti fluksa permeata, stoga na prostornu organizaciju bakterijskih ćelija više utiče tok napojne smeše, koji se odvija paralelno sa površinom membrane. Povećanje vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše rezultuje smanjenjem debljine filtracione pogače, odnosno do odnošenja površinskog sloja filtracione pogače tokom napojne smeše, što rezultuje manjim otporom filtracione pogače proticanju permeata. Drugim rečima, uticaj povećanja prividne brzine proticanja napojne smeše na povećanje fluksa permeata izraženiji je pri većim vrednostima transmembranskog pritiska. Suprotno tome, pri manjim vrednostima transmembranskog pritiska javljaju se manje vrednosti fluksa permeata, usled čega ranije dolazi do uređenja prostorne organizacije ćelija u filtracionoj pogači tokom

permeata (Huisman i Trägårdh, 1999; Hwang i Wang, 2012), stoga povećanje vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše nije toliko efikasno u smanjenju otpora filtracione pogače proticanju permeata kao pri većim vrednostima transmembranskog pritiska.

Uticaj transmembranskog pritiska na fluks permeata u stacionarnom stanju je manje izražen i donekle dvoznačan. Pri većim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše povećanje vrednosti transmembranskog pritiska rezultuje umerenim povećanjem vrednosti fluksa permeata od oko 24%. Povećanje prividne brzine proticanja napojne smeše u kanalu membrane dovodi do turbulencije, koja dovodi do smanjenja otpora filtracione pogače proticanju permeata promenom polja proticanja fluida i turbulentnom difuzijom, koja izaziva kretanje čestica u smeru suprotnom smeru toka napojne smeše (Nakanish i sar., 1987). Sa druge strane, može se primetiti smanjenje vrednosti fluksa permeata (za oko 38%) sa povećanjem vrednosti transmembranskog pritiska pri manjim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše. Objašnjenje ove pojave može se pronaći u prostornoj organizaciji štapićastih ćelija proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* usled dejstva sila smicanja, što rezultuje formiranjem strukture sloja ćelija nalik ciglama u zidu na površini filtracione pogače (Guan i sar., 2017; Balyan i Sarkar, 2018). U literaturi su objavljeni slični rezultati za unakrsnu filtraciju štapićastih čestica grafen oksida (Jana i sar., 2018) ili štapićastih ćelija mikroorganizama *Bacillus coagulans* (Guan i sar., 2017), *Escherichia coli* (Mota i sar., 2002) i *Pseudomonas* sp. (Mororó i sar., 2018). Pri manjim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše turbulencija izazvana protokom vazduha i napojne smeše nije dovoljna da izazove povećanje vrednosti fluksa permeata sa povećanjem vrednosti transmembranskog pritiska. Takođe postoje literaturni podaci u kojima se navodi da uduvavanje vazduha može da izazove kompresiju filtracione pogače, čime se uspostavlja kompaktnija struktura filtracione pogače koja pruža veći otpor proticanju permeata, a ovaj efekat je još izraženiji sa povećanjem transmembranskog pritiska i stoga dolazi do opadanja vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju (Hwang i Wu, 2008; Hwang i Hsu, 2009; Hwang i Wu, 2009).

Uticaji transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja vazduha na fluks permeata u stacionarnom stanju su prikazani na slici 5.32. Povećanje vrednosti prividne brzine proticanja vazduha sa 0,25 m/s na 0,30 m/s rezultuje povećanjem vrednosti fluksa permeata pri svim vrednostima transmembranskog pritiska u ispitivanom opsegu. Međutim, povećanje vrednosti prividne brzine proticanja vazduha preko navedenog opsega dovodi do umerenog opadanja vrednosti fluksa permeata pri manjim vrednostima transmembranskog pritiska. Slični rezultati su objavljeni prilikom mikrofiltracije ćelija kvasca (Hwang i Hsu, 2009) i suspenzije gline (Cabassud i sar., 2001). U slučaju mikrofiltracije suspenzije gline objavljeno je da je maksimalna vrednost fluksa permeata dobijena pri specifičnoj vrednosti prividne brzine proticanja vazduha, što ukazuje na značajan uticaj uduvavanja vazduha na karakteristike filtracione pogače (Cabassud i sar., 2001). Uticaj povećanja vrednosti prividne brzine proticanja vazduha je očigledniji pri većim vrednostima transmembranskog pritiska zbog činjenice da pri većim vrednostima transmembranskog pritiska dolazi do ozbiljnijeg prljanja membrane u poređenju sa manjim vrednostima transmembranskog pritiska. Slični rezultati dobijeni su i prilikom mikrofiltracije surutke uz uduvavanje vazduha (Fouladitajar i sar., 2014). Povećanje vrednosti prividne brzine proticanja vazduha sa 0 m/s na 0,4 m/s pri vrednosti transmembranskog pritiska od 1 bar rezultuje povećanjem vrednosti fluksa permeata od 45%, dok povećanje vrednosti fluksa permeata u istom opsegu prividne brzine proticanja vazduha, ali pri vrednosti transmembranskog pritiska od 0,2 bar iznosi 23%.

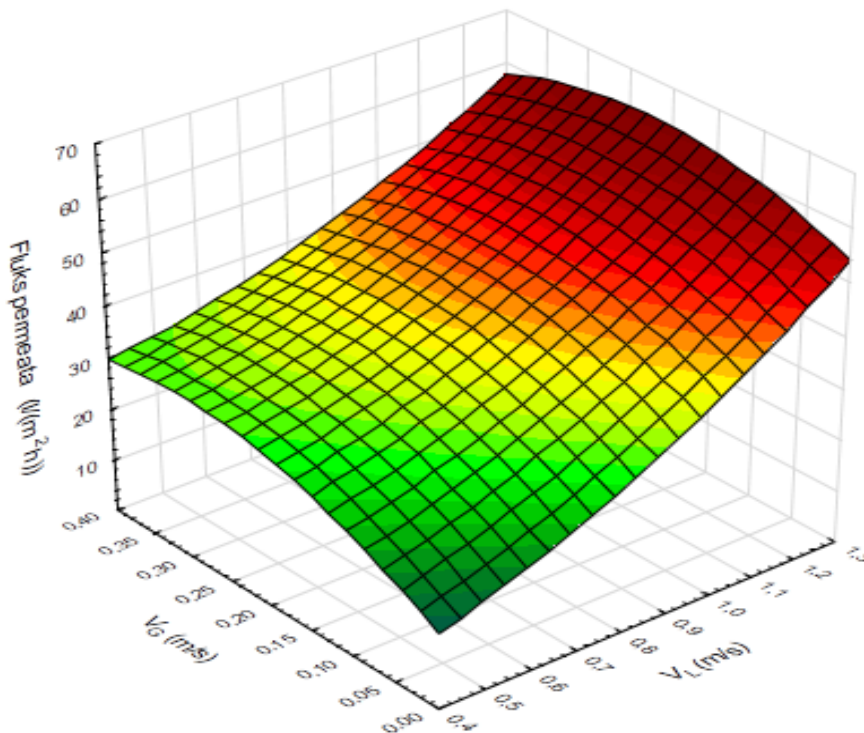


Slika 5.32. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja vazduha na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kulture tečnosti *Bacillus velezensis* uz uduvavanje vazduha

Kao što je prethodno navedeno, još jedan razlog ovakvog ponašanja sistema može se pronaći u činjenici da uduvavanje vazduha može da dovede do komprimovanja filtracione pogače. U istraživanju koje su sproveli Hwang i Hsu (2009) objavljeno je da tokom mikrofiltracije ćelija kvasca uz uduvavanje vazduha na karakteristike filtracione pogače najviše utiče prostorna organizacija ćelija kvasca. Uticaj oblika ćelija na strukturu filtracione pogače je još izraženiji prilikom mikrofiltracije štapićastih ćelija proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u poređenju sa ovalnim ćelijama kvasca, jer štapićaste ćelije pokazuju tendenciju paralelne orijentacije u odnosu na tok napojne smeše (Tanaka i sar., 1994c; Mota, i sar., 2002). Osim toga, povećanje vrednosti transmembranskog pritiska izaziva formiranje filtracione pogače koja pruža veći otpor proticanju permeata, stoga se prilikom mikrofiltracije bez uduvavanja vazduha ne uočava uticaj povećanja vrednosti transmembranskog pritiska na povećanje vrednosti fluksa permeata. Sa druge strane, pri vrednostima prividne brzine proticanja vazduha koje su bliske maksimalnim vrednostima iz ispitivanog opsega (gde je izraženija turbulencija) dolazi do povećanja vrednosti fluksa permeata od oko 14% sa povećanjem vrednosti transmembranskog pritiska (slika 5.32.). S obzirom da je odzivna površina 5.32. konstruisana pri srednjoj vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše iz ispitivanog opsega (0,86 m/s), logično je pretpostaviti da bi povećanje vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše rezultovalo umerenim povećanjem vrednosti fluksa permeata sa povećanjem vrednosti transmembranskog pritiska usled izraženije turbulencije u kanalu membrane.

Slika 5.33. prikazuje uticaje prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha na fluks permeata u stacionarnom stanju. Povećanje vrednosti prividne brzine proticanja vazduha na 0,40 m/s pri većim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše (1,30 m/s) dovelo je do neznatnog povećanja vrednosti fluksa permeata od oko 6%. Pri ovim operativnim uslovima nije postignuto značajno povećanje vrednosti fluksa permeata jer velike vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše odgovaraju turbulentnom režimu proticanja (Rejnoldsov broj je veći od 5900). Stoga injektovanje vazduha nije pokazalo dovoljnu efikasnost u povećanju turbulencije toka napojne smeše (Fouladitajar i sar., 2014). Sa druge strane, pri manjim vrednostima prividne brzine

proticanja napojne smeše, povećanje vrednosti prividne brzine proticanja vazduha dovelo je do značajnog povećanja vrednosti fluksa permeata. Na primer, pri vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše od 0,43 m/s povećanje vrednosti prividne brzine proticanja vazduha do 0,40 m/s rezultuje povećanjem vrednosti fluksa permeata za 78% u režimu proticanja gas-tečnost u obliku velikih mehurova. Ovakav režim proticanja indukuje dovoljnu turbulenciju za sprečavanje formiranja filtracione pogače (Mercier i sar., 1995; Mercier i sar., 1997; Hwang i Wu, 2008; Fouladitajar i sar., 2014). Pri vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše od 0,43 m/s može se primetiti plato vrednosti fluksa permeata pri povećanju vrednosti prividne brzine proticanja vazduha sa 0,25 m/s na 0,40 m/s. Sa povećanjem vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše ovaj plato postaje kraći, dok pri maksimalnoj vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše i maksimalnoj vrednosti prividne brzine proticanja vazduha dolazi do smanjenja vrednosti fluksa permeata. Uduvavanje gasa redukuje spoljašnje (površinsko) prljanje membrane smanjenjem debljine filtracione pogače. Filtraciona pogača se ponaša kao odbojna dinamička membrana koja štiti membranu od unutrašnjeg prljanja. Sinergistički uticaj povećanja vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše i vrednosti prividne brzine proticanja vazduha može dovesti do toga da filtraciona pogača postane suviše tanka, čime je omogućena penetracija komponenti kultivacione tečnosti manjih dimenzija u pore membrane, usled čega dolazi do smanjenja vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju (Mercier i sar., 1997).



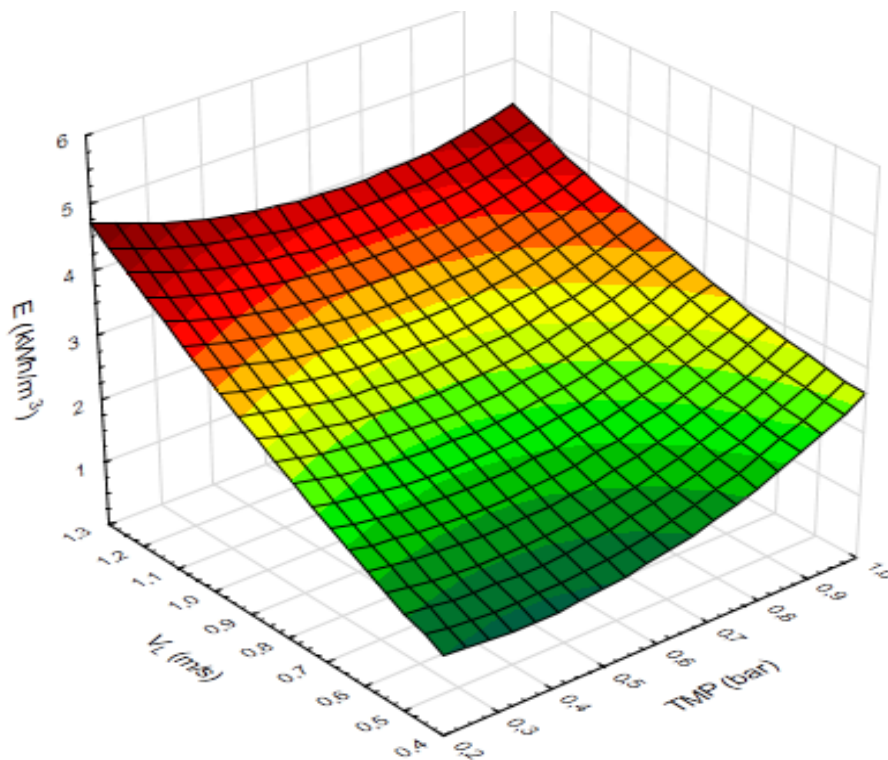
Slika 5.33. Odzivna površina koja opisuje uticaj prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz uduvavanje vazduha

Kao što se može predvideti, bez uduvavanja vazduha do povećanja vrednosti fluksa permeata dolazi sa povećanjem vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše, jer veće sile smicanja dovode do smanjenja debljine filtracione pogače. Ipak, povećanje vrednosti fluksa permeata koje se postiže povećanjem vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše je manje značajno pri većim vrednostima prividne brzine proticanja vazduha, usled povećane turbulencije u kanalu membrane. U situaciji bez uduvavanja vazduha, povećanje vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše sa 0,43 m/s na 1,30 m/s dovodi do povećanja vrednosti fluksa permeata od 200%, dok povećanje vrednosti fluksa permeata iznosi oko 80% u istom opsegu vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše, ali pri vrednosti prividne brzine proticanja vazduha od 0,40 m/s.

Rezultati mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* uz uduvavanje vazduha ukazuju da je moguće postići značajno povećanje vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju primenom dvofaznog toka gas-tečnost. Povećanje vrednosti fluksa permeata nije rezultat samo povećanja vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše, već i povećanja vrednosti prividne brzine proticanja vazduha, koja dovodi do stvaranja nestabilnosti u proticanju napojne smeše (Mercier i sar., 1995). Ova činjenica je potvrđena poređenjem vrednosti fluksa permeata u eksperimentima mikrofiltracije sa i bez uduvavanja vazduha, pri čemu su vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha podešene tako da bude postignuta ista srednja vrednost prividne brzine proticanja u kanalu membrane. U eksperimentu mikrofiltracije bez uduvavanja vazduha (TMP=0.6 bar, $V_L=0,60$ m/s, $V_G=0,00$ m/s) vrednost fluksa permeata iznosila je $21,5 \text{ l}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$. Sa druge strane, u eksperimentu mikrofiltracije u kome je primenjen dvofazni tok gas-tečnost iste prividne brzine proticanja (TMP=0,6 bar, $V_L=0,43$ m/s, $V_G=0,18$ m/s), vrednost fluksa permeata iznosila je $29,4 \text{ l}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$, što predstavlja povećanje vrednosti fluksa permeata od 37%. Sa ekonomske tačke gledišta, prilikom odabira optimalnih operativnih uslova neophodno je razmotriti i specifičnu potrošnju energije. U slučaju prethodno pomenutih eksperimenata, specifična potrošnja energije iznosila je $1,2 \text{ kW} \cdot \text{h}/\text{m}^3$ i $2,5 \text{ kW} \cdot \text{h}/\text{m}^3$ za eksperimente sa uduvavanjem vazduha i bez uduvavanja vazduha, redom. Uvođenje vazduha u kanal membrane doprinelo je smanjenju specifične potrošnje energije za 108%.

Na efikasnost primene uduvavanja vazduha prilikom mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* takođe utiče specifična potrošnja energije, koja predstavlja utrošak energije po jedinici zapremine dobijenog permeata. Stoga je analiziran uticaj interakcije nezavisnih promenljivih (transmembranski pritisak, prividna brzina proticanja napojne smeše i prividna brzina proticanja vazduha) na ovaj odziv primenom metodologije odzivne površine.

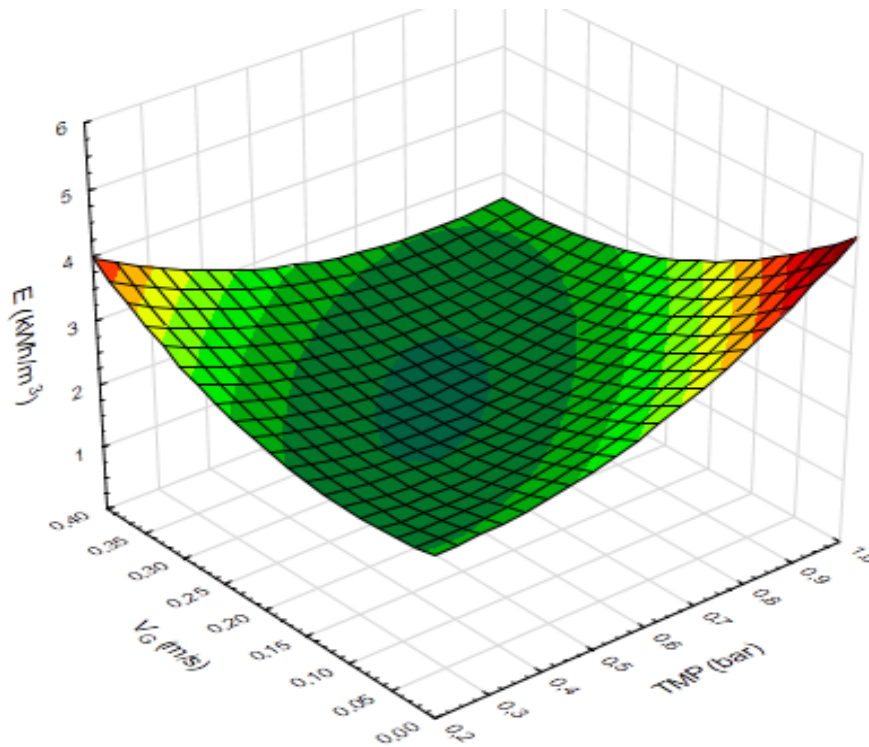
Slika 5.34 prikazuje uticaje transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja napojne smeše na specifičnu potrošnju energije. Može se primetiti da do povećanja vrednosti specifične potrošnje energije dolazi sa povećanjem vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše pri svim ispitivanim vrednostima transmembranskog pritiska. Kako je energija potrebna za rad pumpe kojim se obezbeđuje tok napojne smeše direktno proporcionalna protoku napojne smeše, povećanje prividne brzine proticanja napojne smeše dovodi do veće potrošnje energije. Sa druge strane, povećanje vrednosti fluksa permeata u ovom opsegu vrednosti nije dovoljno da kompenzuje povećanu potrebu za energijom, jer je specifična potrošnja energije povezana sa protokom permeata. Kako je povećanje vrednosti fluksa permeata izraženije pri većim vrednostima transmembranskog pritiska, jasno je da dolazi do umerenog povećanja potrošnje energije po jedinici zapremine permeata od oko 74% pri ovim operativnim uslovima, u poređenju sa povećanjem vrednosti specifične potrošnje energije od 300% pri vrednosti transmembranskog pritiska od 0,2 bar.



Slika 5.34. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja napojne smeše na specifičnu potrošnju energije prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz uduvavanje vazduha

Pri većim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše, povećanje vrednosti transmembranskog pritiska rezultuje povećanjem vrednosti fluksa permeata, usled čega dolazi do smanjenja vrednosti specifične potrošnje energije za oko 10% u ovom opsegu operativnih uslova. Sa druge strane, prostorna orijentacija štapićastih ćelija proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u kombinaciji sa povećanjem vrednosti transmembranskog pritiska dovodi do povećanja otpora filtracione pogače proticanju permeata (Guan i sar., 2017; Balyan i Sarkar, 2018). Stoga, pri rezultujućim manjim vrednostima fluksa permeata dolazi do povećanja vrednosti specifične potrošnje energije sa 1 kW·h/m³ na 2,3 kW·h/m³ (za oko 130%).

Uticaji transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja vazduha na specifičnu potrošnju energije prikazani su na slici 5.35. Odzivna površina konkavnog oblika ukazuje na to da su minimalne vrednosti specifične potrošnje energije (oko 2 kW·h/m³) postignute pri srednjim vrednostima transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja vazduha iz ispitivanog opsega. Povećanje prividne brzine proticanja vazduha sa 0,20 m/s na 0,30 m/s rezultuje malim vrednošću smanjenja specifične potrošnje energije pri manjim (0,2 bar) i srednjim (0,7 bar) vrednostima transmembranskog pritiska. Dalje povećanje prividne brzine proticanja vazduha dovodi do povećanja vrednosti specifične potrošnje energije u ispitivanom opsegu vrednosti transmembranskog pritiska. Najveće povećanje vrednosti specifične potrošnje energije (58%) zabeleženo je pri vrednosti transmembranskog pritiska od 0,2 bar. Međutim, pri vrednostima transmembranskog pritiska većim od 0,7 bar javlja se trend smanjenja vrednosti specifične potrošnje energije sa povećanjem vrednosti prividne brzine proticanja vazduha. Najveće smanjenje vrednosti specifične potrošnje energije (84%) zabeleženo je pri vrednosti transmembranskog pritiska od 1 bar.

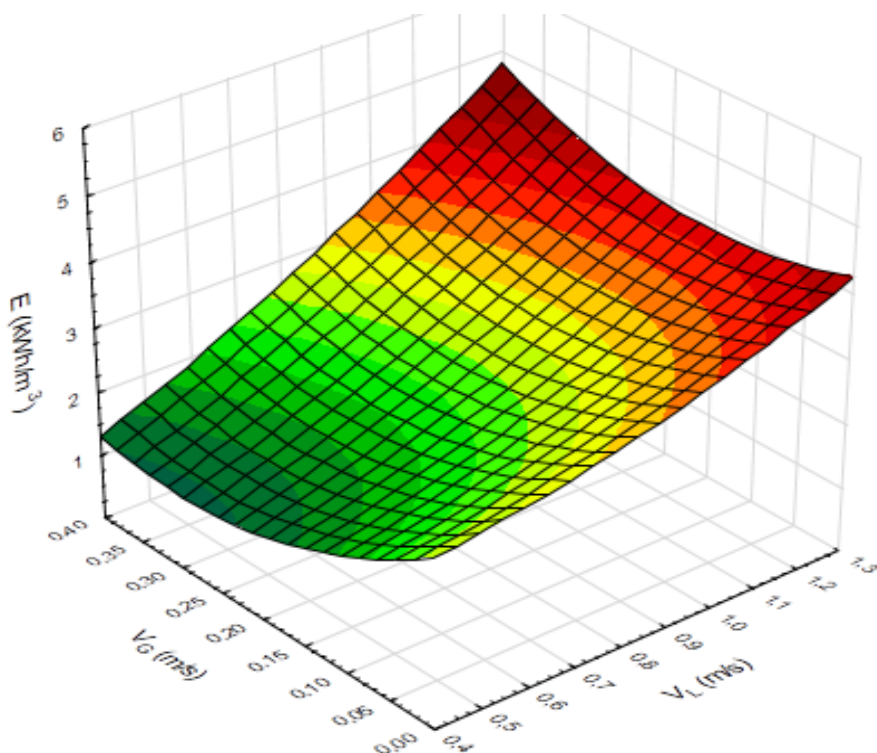


Slika 5.35. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja vazduha na specifičnu potrošnju energije prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz uduvavanje vazduha

Povećanje turbulencije do kojeg dolazi usled primene većih vrednosti prividne brzine proticanja vazduha (0,40 m/s) rezultuje smanjenjem vrednosti specifične potrošnje energije za 52% pri povećanju vrednosti transmembranskog pritiska sa 0,2 bar na 1 bar. Nasuprot tome, u slučaju mikrofiltracije bez uduvavanja gasa, sa povećanjem vrednosti transmembranskog pritiska dolazi do povećanja vrednosti specifične potrošnje energije za 92% (slika 5.35.). Pri ovim eksperimentalnim uslovima, bez uduvavanja vazduha ili pri malim vrednostima prividne brzine proticanja vazduha, povećanje vrednosti transmembranskog pritiska nije rezultovalo povećanjem vrednosti fluksa permeata. Razlog se može pronaći u marginalnom uticaju mehurića vazduha na filtracionu pogaču, do čije kompresije dolazi sa povećanjem vrednosti transmembranskog pritiska (Javadi i sar., 2014). Da bi se postigla veća vrednost transmembranskog pritiska neophodan je veći pritisak napojne smeše, stoga veoma mala promena vrednosti fluksa permeata rezultuje mnogo većom vrednošću specifične potrošnje energije.

Slika 5.36. prikazuje uticaje prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha na specifičnu potrošnju energije. Do povećanja vrednosti specifične potrošnje energije dolazi sa povećanjem vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše pri svim vrednostima prividne brzine proticanja vazduha iz ispitivanog opsega, usled povećanja potrebe za energijom neophodnom za pumpanje napojne smeše. Usled značajnog povećanja vrednosti fluksa permeata sa povećanjem vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše u slučaju mikrofiltracije bez uduvavanja vazduha, povećanje vrednosti specifične potrošnje energije je sprečeno i iznosi oko 66%. Pri maksimalnim vrednostima prividne brzine proticanja vazduha dolazi do povećanja vrednosti specifične potrošnje energije sa $1,1 \text{ kW}\cdot\text{h/m}^3$ na $4,5 \text{ kW}\cdot\text{h/m}^3$ (oko 310%). Nasuprot uticaju prividne brzine proticanja napojne smeše, povećanje vrednosti prividne brzine proticanja vazduha do 0,25 m/s rezultuje smanjenjem vrednosti specifične potrošnje energije sa $2,4 \text{ kW}\cdot\text{h/m}^3$ na $1,1 \text{ kW}\cdot\text{h/m}^3$ (oko 120%). Dalje povećanje vrednosti prividne brzine proticanja vazduha ne dovodi do velikih promena vrednosti specifične potrošnje energije pri malim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše. Sa druge strane, pri velikim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše (1,30 m/s) povećanje vrednosti prividne brzine proticanja

vazduha iznad 0,25 m/s rezultuje umerenim povećanjem vrednosti specifične potrošnje energije od 12,5%. Ovo ponašanje može biti objašnjeno unutrašnjim prljanjem membrane do koga dolazi usled značajnog smanjenja debljine filtracione pogače pri velikim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha.



Slika 5.36. Odzivna površina koja opisuje uticaj prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha na specifičnu potrošnju energije prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz uduvavanje vazduha

5.7.3.2. Optimizacija uslova unakrsne mikrofiltracije uz primenu uduvavanja vazduha

Nakon ispitivanja uticaja transmembranskog pritiska, prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha na fluks permeata u stacionarnom stanju i specifičnu potrošnju energije tokom mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* uz uduvavanje vazduha, naredni korak jeste optimizacija operativnih uslova mikrofiltracije. Ciljevi optimizacije procesa mikrofiltracije uz uduvavanje vazduha u tok napojne smeše odnose se na maksimizaciju fluksa permeata u stacionarnom stanju, odnosno na postizanje maksimalne efikasnosti procesa mikrofiltracije, a sa druge strane tu je minimizacija specifične potrošnje energije po jedinici zapremine dobijenog permeata, kako bi se maksimizovala i energetska efikasnost procesa mikrofiltracije i postigla ušteta kada su u pitanju troškovi izvođenja procesa u pogledu energetskih zahteva. Rezultati numeričke optimizacije operativnih uslova prikazani su u tabeli 5.24. Osim toga, primenom matematičkih modela dobijenih prethodnim korakom modelovanja, izračunate su predviđene vrednosti zavisnih promenljivih (fluks permeata u stacionarnom stanju i specifična potrošnja energije) na osnovu optimizovanih vrednosti operativnih uslova.

Tabela 5.24. Optimizovane vrednosti variranih faktora i predviđene vrednosti odziva dobijene kao rezultat optimizacije procesnih uslova unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz primenu uduvavanja vazduha

Faktori	Cilj	Optimizovana vrednost
Transmembranski pritisak (bar)	u opsegu	0,68
Prividna brzina proticanja napojne smeše (m/s)	u opsegu	0,96
Prividna brzina proticanja vazduha (m/s)	u opsegu	0,25
Odzivi	Cilj	Predviđena vrednost
Fluks permeata u stacionarnom stanju ($l/(m^2 \cdot h)$)	maksimalan	48,57
Specifična potrošnja energije ($kW \cdot h/m^3$)	minimalan	2,37
Vrednost željene funkcije		0,62

Iz prikazanih rezultata optimizacije može se zaključiti da se optimalni rezultati u pogledu fluksa permeata u stacionarnom stanju i specifične potrošnje energije dobijaju pri vrednosti transmembranskog pritiska od 0,68 bar, prividne brzine proticanja napojne smeše od 0,96 m/s, i prividne brzine proticanja vazduha od 0,25 m/s. Optimizovane vrednosti sve tri nezavisne promenljive bliske su srednjim vrednostima ispitivanog opsega (0,2-1 bar za transmembranski pritisak, 0,43-1,3 m/s za prividnu brzinu proticanja napojne smeše i 0-0,4 m/s za prividnu brzinu proticanja vazduha). Vrednost željene funkcije od 0,62 ukazuje na suprotstavljenost ciljeva optimizacije, odnosno antagonistički odnos ispitivanih zavisnih promenljivih. Optimizovana vrednost prividne brzine proticanja vazduha u korelaciji je sa rezultatima dobijenim primenom odzivne površine. Kada su u pitanju prividna brzina proticanja napojne smeše i transmembranski pritisak, vrednosti ove dve nezavisne promenljive bliske maksimalnim vrednostima ispitivanih opsega pogoduju maksimizaciji fluksa permeata, ali sa druge strane rezultuju povećanjem specifične potrošnje energije. Stoga je zadovoljenje oba cilja optimizacije postignuto u okviru optimizovanih vrednosti nezavisnih promenljivih koje su bliske srednjim vrednostima ispitivanih opsega.

5.7.4. UNAKRSNA MIKROFILTRACIJA UZ PRIMENU KOMBINACIJE KENICS STATIČKOG MEŠAČA I UDUVAVANJA VAZDUHA

U okviru ove doktorske disertacije, sa ciljem poboljšanja fluksa permeata, pored primene Kenics statičkog mešača i uduvavanja vazduha u tok napojne smeše, izvršeni su eksperimenti mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* uz primenu ove dve tehnike prema eksperimentalnom planu definisanom u tabeli 4.12. (poglavlje 4.6.2.). Kao nezavisne promenljive, odnosno operativni uslovi, definisani su isti faktori kao i u eksperimentima mikrofiltracije uz uduvavanje vazduha u tok napojne smeše: transmembranski pritisak (0,2-1 bar), prividna brzina proticanja napojne smeše (0,53-1,59 m/s) i prividna brzina proticanja vazduha (0-0,46 m/s). Može se primetiti da su vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha nešto veće u poređenju sa eksperimentima mikrofiltracije u kojima je primenjeno samo uduvavanje vazduha u tok napojne smeše, što je posledica manjeg efektivnog poprečnog preseka kanala membrane usled prisustva statičkog mešača. Kao odzivi mikrofiltracije, odnosno zavisne promenljive, praćeni su fluks permeata u stacionarnom stanju i specifična potrošnja energije izražena po jedinici zapremine permeata. Rezultati eksperimenata mikrofiltracije uz primenu kombinacije Kenics statičkog mešača i uduvavanja vazduha prikazani su u tabeli 5.25. Detaljnije ispitivanje uticaja nezavisnih promenljivih, kao i njihovih interakcija, na odabrane odzive omogućeno je primenom metodologije odzivne površine, dok je optimizacija operativnih uslova mikrofiltracije u pogledu maksimizacije fluksa permeata u stacionarnom stanju i minimizacije specifične potrošnje permeata izvršena primenom metode željene funkcije.

Tabela 5.25. Vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju i specifične potrošnje energije pri različitim uslovima transmembranskog pritiska, prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvanja vazduha

Transmembranski pritisak (bar)	Prividna brzina proticanja tečnosti V_L (m/s)	Prividna brzina proticanja gasa V_G (m/s)	Fluks permeata ($l/m^2 \cdot h$)	Specifična potrošnja energije ($kW \cdot h/m^3$)
0,2	0,53	0,23	31,06	1,1
1	0,53	0,23	22,95	2,3
0,2	1,59	0,23	55,89	4,4
1	1,59	0,23	70,00	3,9
0,2	1,06	0,00	30,57	2,4
1	1,06	0,00	29,00	4,7
0,2	1,06	0,46	36,67	3,8
1	1,06	0,46	41,47	2,5
0,6	0,53	0,00	17,50	2,3
0,6	1,59	0,00	53,87	4,0
0,6	0,53	0,46	32,64	1,1
0,6	1,59	0,46	58,05	4,6
0,6	1,06	0,23	43,45	2,1
0,6	1,06	0,23	42,80	2,1
0,6	1,06	0,23	45,00	2,0

5.7.4.1. Modelovanje uticaja parametara mikrofiltracije na fluks permeata prilikom unakrsne mikrofiltracije uz primenu kombinacije Kenics statičkog mešača i uduvanja vazduha

Sa ciljem modelovanja fluksa permeata u stacionarnom stanju i specifične potrošnje energije u kao i detaljnijeg uticaja ispitivanja tri nezavisne promenljive (transmembranski pritisak, prividna brzina proticanja napojne smeše i prividna brzina proticanja vazduha) na odabrane odzive prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvanja vazduha primenjena je metodologija odzivne površine. Primenjene kombinacije odabranih promenljivih u Boks-Benkenovom eksperimentalnom planu date su u tabeli 4.12. (poglavlje 4.6.2.).

Rezultati analize varijanse za odabrane odzive (fluks permeata u stacionarnom stanju i specifičnu potrošnju energije) prilikom mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvanja vazduha prikazani su u tabeli 5.26. Statistička značajnost dobijenih matematičkih modela procenjena je na osnovu dobijenih p -vrednosti. S obzirom na prikazane p -vrednosti koje za sva tri modela iznose manje od 0,05, može se zaključiti da su dobijeni matematički modeli statistički značajni pri nivou značajnosti od 95%. Visoke vrednosti koeficijenata determinacije ukazuju na zadovoljavajuću aproksimaciju eksperimentalnih rezultata procesa mikrofiltracije uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvanja vazduha odabranim regresionim jednačinama, odnosno polinomima drugog reda. Vrednosti dobijenih koeficijenata determinacije ukazuju da dobijeni model za fluks permeata u stacionarnom stanju ne može da objasni manje od 1% varijacija, dok se modelom za specifičnu potrošnje energije ne može objasniti manje od 2% varijacija.

Tabela 5.26. Analiza varijanse odabranih odziva prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvanja vazduha

Odziv	SS	DF	MS	F-vrednost	p-vrednost	R ²
Stacionarni fluks permeata (l/(m ² ·h))	17364,60 ^a 82,93 ^b	9 ^a 5 ^b	1929,40 ^a 16,59 ^b	116,33	0,0000	0,995
E (kW·h/m ³)	22,66 ^a 0,26 ^b	9 ^a 5 ^b	2,52 ^a 0,05 ^b	48,81	0,0002	0,989

^a model, ^b reziduali

Koeficijenti dobijenih matematičkih modela, kao i njihove *p*-vrednosti, za odabrane odzive (fluks permeata u stacionarnom stanju i specifičnu potrošnju energije) prilikom mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvanja vazduha prikazani su u tabeli 5.27. Statistički značajni koeficijenti matematičkih modela za odabrane odzive, kao i njihove *p*-vrednosti, boldovani su u tabeli 5.27. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da statistički značajan uticaj (*p*-vrednost < 0,05) na fluks permeata u stacionarnom stanju imaju linearni koeficijenti za sve tri nezavisne promenljive, koeficijent interakcije transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja napojne smeše, i kvadratni članovi sve tri ispitivane promenljive. Kada je u pitanju model za specifičnu potrošnju energije, uočava se statistički značajan uticaj svih linearnog koeficijenata za prividnu brzinu proticanja napojne smeše, koeficijenta interakcije transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja napojne smeše i kvadratnih članova sve tri ispitivane nezavisne promenljive.

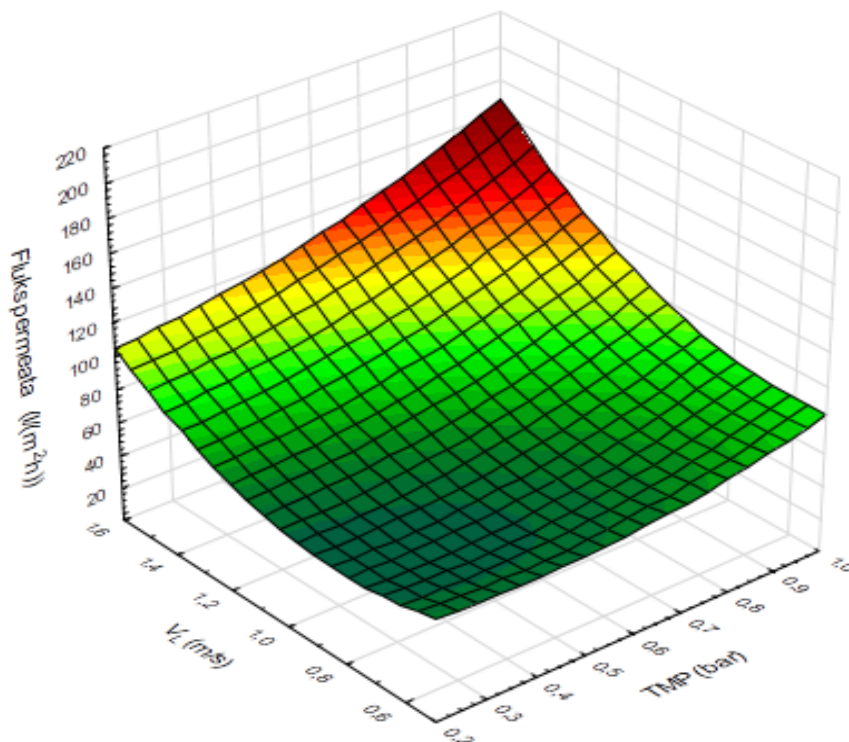
Tabela 5.27. Koeficijenti regresionih jednačina i njihove *p*-vrednosti za odabrane odzive prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvanja vazduha

Koeficijent	Stacionarni fluks permeata (l/(m ² ·h))		E (kW·h/m ³)	
	Vrednost	<i>p</i> -vrednost	Vrednost	<i>p</i> -vrednost
Odsečak				
b ₀	126,20	0,0001	-6,49	0,0031
Linearni				
b ₁	-81,22	0,0000	6,45	0,2202
b ₂	-157,30	0,0000	11,87	0,0000
b ₃	-141,21	0,0024	15,98	0,0812
Interakcija				
b ₁₂	47,41	0,0043	-0,71	0,2438
b ₁₃	-34,51	0,1797	-11,14	0,0003
b ₂₃	-13,74	0,4482	0,62	0,5382
Kvadratni				
b ₁₁	77,86	0,0020	-2,85	0,0118
b ₂₂	90,45	0,0000	-4,65	0,0001
b ₃₃	460,93	0,0000	-23,28	0,0001

1 – TMP, 2 – *V_L*, 3 - *V_G*

Uticaji transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja napojne smeše na fluks permeata u stacionarnom stanju prikazani su na slici 5.37. Maksimalne vrednosti fluksa permeata dobijaju se pri maksimalnim vrednostima oba ispitivana faktora. Za razliku od sistema u kome se primenjuje samo uduvanje vazduha ili samo statički mešač, vrednost fluksa permeata se povećava i pri malim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše, što ukazuje na činjenicu da je turbulencija dobijena kombinovanjem ove dve metode dovoljna da u potpunosti promeni strukturu filtracione pogače. Naime, povišeni nivo turbulencije narušava formiranje sloja ćelija koje bivaju prostorno raspoređene (orijentisane)

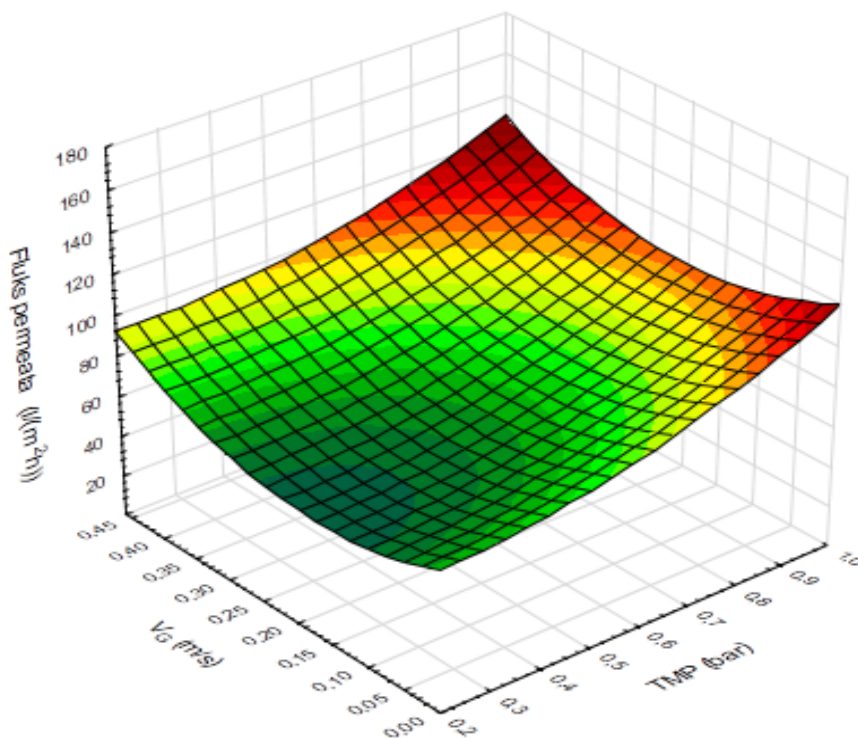
tokom napojne smeše i vazduha. Pri maksimalnim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše povećanje vrednosti transmembranskog pritiska dovodi do povećanja vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju za oko 70%. Sa druge strane, pri malim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše, povećanje vrednosti fluksa permeata sa povećanjem vrednosti transmembranskog pritiska je nešto manje i iznosi 47%. Pri povećanju vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše dolazi do povećanja vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju za oko 100% oko pri svim vrednostima transmembranskog pritiska iz ispitivanog opsega.



Slika 5.37. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja napojne smeše na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvanja vazduha

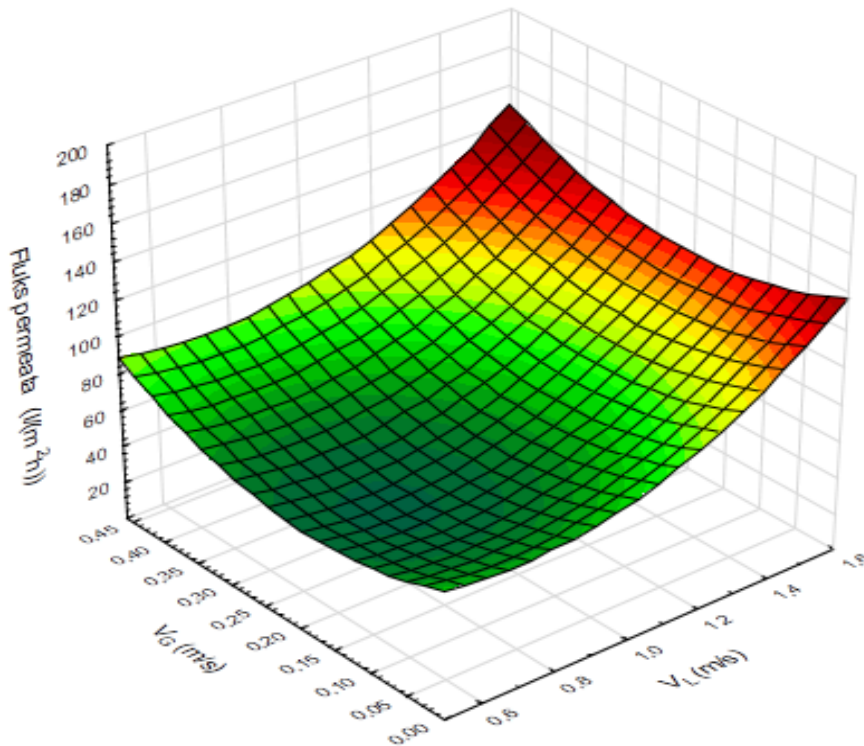
Uticaji transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja vazduha na fluks permeata u stacionarnom stanju prikazani su na slici 5.38. U poređenju sa sistemima gde se primenjuje samo uduvanje vazduha, uočava se da prisustvo statičkog mešača mešača značajno doprinosi turbulenciji u kanalu membrane, te se sa povećanjem vrednosti transmembranskog pritiska vrednost fluksa permeata udvostručuje i bez primene uduvanja vazduha. Sa druge strane, pri maksimalnoj vrednosti prividne brzine proticanja vazduha uočava se i značajniji porast vrednosti fluksa permeata od oko 40%, u poređenju sa porastom vrednosti fluksa permeata od 14% kod sistema u kome se primenjuje samo uduvanje vazduha. Povećanje vrednosti prividne brzine proticanja vazduha takođe doprinosi značajnijem povećanju vrednosti fluksa permeata u poređenju sa sistemom u kome se primenjuje samo uduvanje vazduha. Za razliku od pomenutog sistema, prisustvo statičkog mešača onemogućava formiranje većih mehura vazduha u kanalu membrane, stoga dolazi do povećanja vrednosti fluksa permeata i po dostizanju režima proticanja u vidu velikih mehurova u dvofaznom sistemu gas-tečnost kada se posmatra vrednost faktora injektovanja gasa ϵ (poglavlje 3.6.2.3.2.). Pri manjim vrednostima transmembranskog pritiska povećanje vrednosti fluksa permeata iznosi oko 60%, dok pri manjim vrednostima transmembranskog pritiska povećanje vrednosti fluksa permeata iznosi svega oko 10%. Razlog ovakvog ponašanja može se pronaći u otporu filtracione pogače proticanju manjih komponenti kultivacione tečnosti. Kako usled primene statičkog mešača i uduvanja vazduha dolazi do smanjenja debljine filtracione pogače, istovremeno dolazi i do smanjenja

spoljašnjeg prljanja membrane. Međutim, veći obim smanjenja debljine filtracione pogače dovodi do intenzivnijeg unutrašnjeg prljanja membrane, što doprinosi smanjenju vrednosti fluksa permeata (Mercier i sar., 1997). Unutrašnje prljanje membrane je izraženije pri većim vrednostima transmembranskog pritiska, zbog izraženijeg dejstva pogonske sile procesa mikrofiltracije, a istovremeno dolazi do smanjenja vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju.



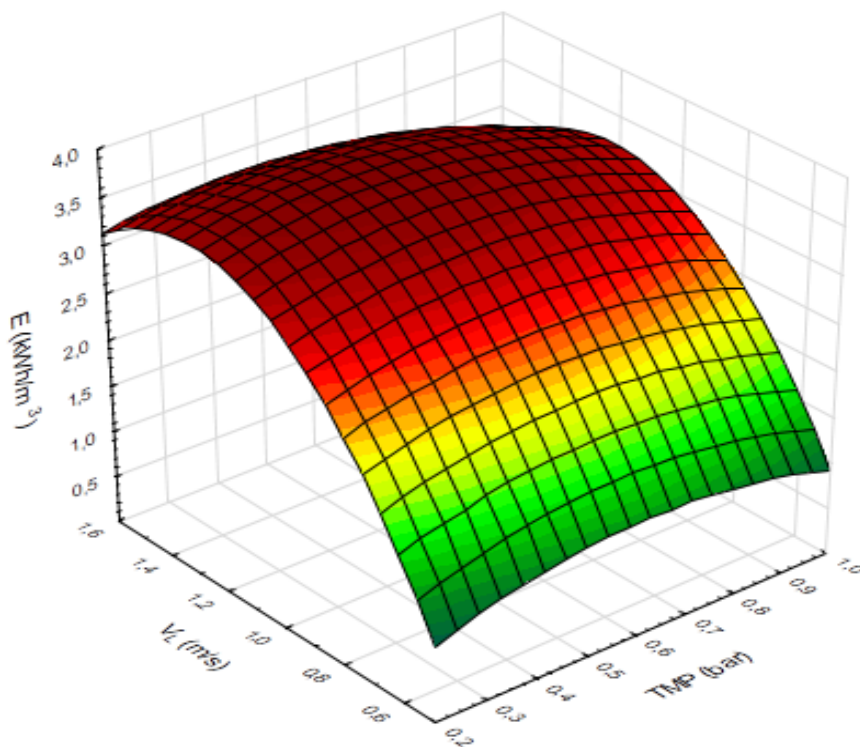
Slika 5.38. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja vazduha na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvavanja vazduha

Istovremeni uticaj prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha na fluks permeata u stacionarnom stanju prikazan je na slici 5.39. Može se uočiti sinergistički uticaj oba ispitivana faktora na fluks permeata u stacionarnom stanju. Pri povećanju vrednosti prividne brzine proticanja vazduha ne dostiže se maksimalno povećanje vrednosti fluksa permeata, koje je očekivano u režimu proticanja u obliku velikih mehurova. Umetanje promotora turbulencije u kanal membrane utiče na formiranje mehurova vazduha u kanalu. Naime, prisustvo statičkog mešača sprečava formiranje većih vazdušnih čepova. Pored toga, usmeravanje toka napojne smeše karakterističnim dizajnom Kenics statičkog mešača doprinosi tome da manji mehurovi vazduha prolaze kroz kanal membrane bliže površini membrane. Na taj način manji mehurovi vazduha, koji inače bivaju grupisani u središnjem delu kanala membrane, dodatno doprinose odnošenju površinskog sloja filtracione pogače, ali i manjih komponenti kultivacione tečnosti koje bi inače dovele do unutrašnjeg prljanja membrane. Ipak, veća vrednost porasta fluksa permeata u stacionarnom stanju uočena je pri manjim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše (oko 25%), u poređenju sa vrednošću porasta fluksa permeata u stacionarnom stanju pri većim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše (oko 7%).



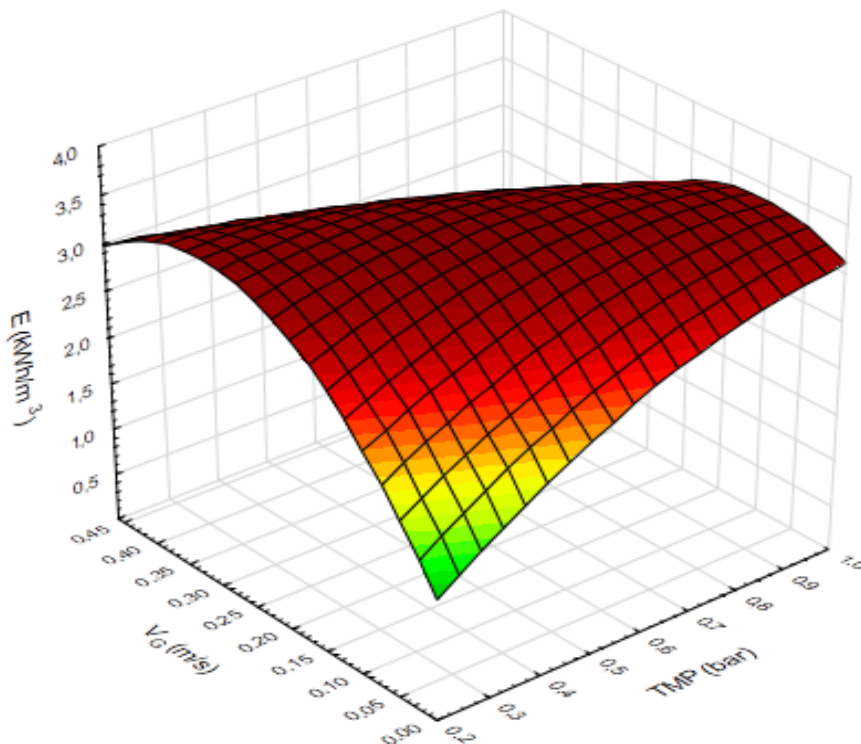
Slika 5.39. Odzivna površina koja opisuje uticaj prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha na fluks permeata u stacionarnom stanju prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvanja vazduha

Uticaji transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja napojne smeše na specifičnu potrošnju energije prikazani su na slici 5.40. Promena vrednosti transmembranskog pritiska ne utiče na promenu vrednosti specifične potrošnje energije pri malim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše. Sa druge strane, pri maksimalnim vrednostima prividne brzine proticanja napojne smeše uočava se smanjenje vrednosti specifične potrošnje energije sa porastom vrednosti transmembranskog pritiska, što upravo odgovara sinergističkom uticaju ove dve promenljive na fluks permeata u stacionarnom stanju. Pri povećanju vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše, očekivano, dolazi do povećanja vrednosti specifične potrošnje energije (do 140%) pri svim vrednostima transmembranskog pritiska iz ispitivanog opsega.



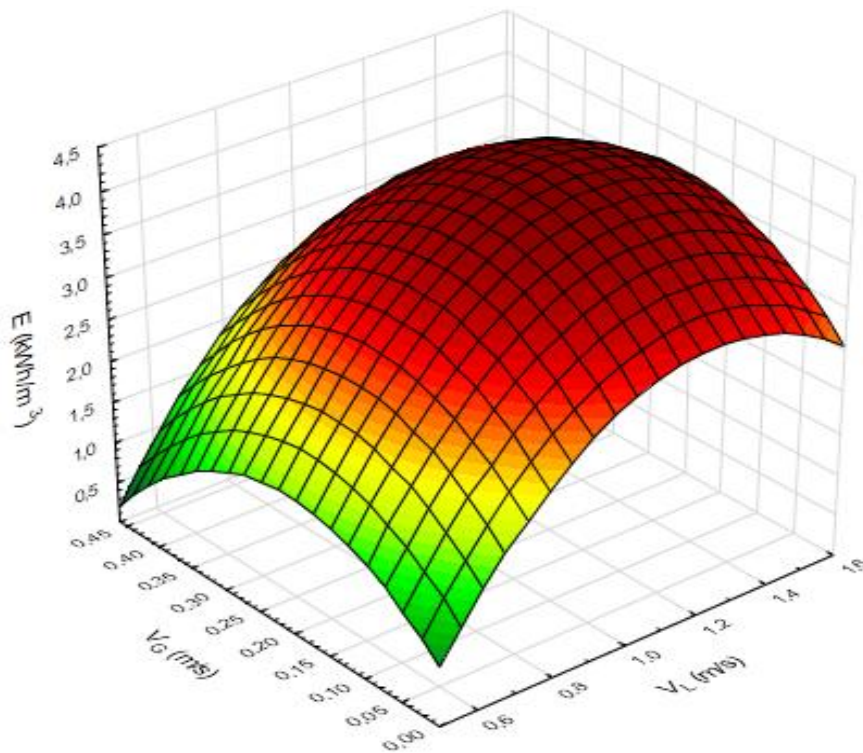
Slika 5.40. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja napojne smeše na specifičnu potrošnju energije prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvavanja vazduha

Uticaji transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja vazduha na specifičnu potrošnju energije prikazani su na slici 5.41. Minimalna vrednost specifične potrošnje energije dobijena je u opsegu maksimalnih vrednosti prividne brzine proticanja vazduha i pri velikim vrednostima transmembranskog pritiska. U ovoj oblasti eksperimentalnih uslova specifična potrošnja energije iznosi oko $1,3 \text{ kW}\cdot\text{h}/\text{m}^3$. Obzirom na promenjenu hidrodinamiku proticanja, konveksan oblik odzivne površine dobijen u eksperimentima mikrofiltracije u kojima je primenjeno samo uduvavanje vazduha kao tehnika poboljšanja fluksa, prilikom mikrofiltracije uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvavanja vazduha prelazi u konkavan oblik sa maksimalnim vrednostima specifične potrošnje energije raspoređenim dijagonalno, kada se posmatra odzivna površina. Pri povećanju vrednosti prividne brzine proticanja vazduha vrednost specifične potrošnje energije raste za oko 100%. Nasuprot tome, pri maksimalnim vrednostima prividne brzine proticanja vazduha dolazi do smanjenja vrednosti specifične potrošnje energije zbog većeg uticaja dvofaznog toka gas-tečnost na čišćenje površine membrane uklanjanjem dela filtracione pogače. U poređenju sa sistemom kod koga se primenjuje samo uduvavanje gasa i kod koga je smanjenje vrednosti specifične potrošnje energije pri navedenim operativnim uslovima iznosilo 52%, smanjenje vrednosti specifične potrošnje energije prilikom mikrofiltracije uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvavanja je značajnije i iznosi oko 100%.



Slika 5.41. Odzivna površina koja opisuje uticaj transmembranskog pritiska i prividne brzine proticanja vazduha na specifičnu potrošnju energije prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvavanja vazduha

Istovremeni uticaj prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha na specifičnu potrošnju energije prikazan je na slici 5.42. Očekivano, najveći porast vrednosti specifične potrošnje energije (150%) uočen je u eksperimentima bez primene uduvavanja gasa, obzirom da prisustvo statičkog mešača pruža dodatni opor proticanju napojne smeše, usled čega se troši veća količina energije. Sa druge strane, pri malim vrednostima prividne brzine proticanja vazduha dolazi do povećanja vrednosti specifične potrošnje energije. Obzirom da se u ovoj oblasti javlja mehurasto proticanje dvofaznog toka gas-tečnost, usmereno kretanje mehurića vazduha (usled specifične konstrukcije Kenics statičkog mešača) ne doprinosi značajno promenama u strukturi filtracione pogače, stoga je vrednost specifične potrošnja energije uvećana za vrednost energije potrebnu za komprimovanje gasa za uslove u kanalu membrane. U režimu proticanja dvofaznog sistema gas-tečnost u obliku velikih mehurova uočava se drugačije ponašanje sistema. Kretanje velikih mehurova bliže površine membrane usled usmeravanja od strane Kenics statičkog mešača dovodi do značajnog povećanja vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju, usled čega dolazi do smanjenja vrednosti specifične potrošnje energije.



Slika 5.42. Odzivna površina koja opisuje uticaj prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha na specifičnu potrošnju energije prilikom unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvanja vazduha

Iz prikazanih rezultata mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvanja vazduha može se zaključiti da glavni doprinos izazivanju turbulencije u kanalu membrane potiče od promotora turbulencije, dok je doprinos uduvanja vazduha manji. Ipak, zaključak je i da uduvanje vazduha u kombinaciji sa primenom statičkog mešača doprinosi poboljšanju procesa mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*.

5.7.4.2. Optimizacija uslova unakrsne mikrofiltracije uz primenu kombinacije Kenics statičkog mešača i uduvanja vazduha

Nakon ispitivanja uticaja transmembranskog pritiska, prividne brzine proticanja napojne smeše i prividne brzine proticanja vazduha na fluks permeata u stacionarnom stanju i specifičnu potrošnju energije tokom mikrofiltracije kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvanja vazduha, naredni korak bila optimizacija operativnih uslova mikrofiltracije u pogledu dobijanja optimizovanih vrednosti navedenih nezavisnih promenljivih. Ciljevi optimizacije procesa mikrofiltracije uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvanja vazduha u tok napojne smeše odnose se na maksimizaciju fluksa permeata u stacionarnom stanju, odnosno na postizanje maksimalne efikasnosti procesa mikrofiltracije, a sa druge strane tu je minimizacija specifične potrošnje energije po jedinici zapremine dobijenog permeata, kako bi se maksimizovala i energetska efikasnost procesa mikrofiltracije i postigla ušteta kada su u pitanju troškovi izvođenja procesa u pogledu energetskih zahteva. Rezultati numeričke optimizacije operativnih uslova prikazani su u tabeli 5.28. Osim toga, primenom matematičkih modela dobijenih prethodnim korakom modelovanja, izračunate su predviđene vrednosti zavisnih promenljivih (fluks permeata u stacionarnom stanju i specifična potrošnja energije) na osnovu optimizovanih vrednosti operativnih uslova.

Tabela 5.28. Optimizovane vrednosti variranih faktora i predviđene vrednosti odziva dobijene kao rezultat optimizacije procesnih uslova unakrsne mikrofiltracije kultivacione tečnosti *Bacillus velezensis* uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvavanja vazduha

Faktori	Cilj	Optimizovana vrednost
Transmembranski pritisak (bar)	u opsegu	1,00
Prividna brzina proticanja napojne smeše (m/s)	u opsegu	1,59
Prividna brzina proticanja vazduha (m/s)	u opsegu	0,46
Odzivi	Cilj	Predviđena vrednost
Fluks permeata u stacionarnom stanju ($l/(m^2 \cdot h)$)	maksimalan	183,43
Specifična potrošnja energije ($kW \cdot h/m^3$)	minimalan	0,84
Vrednost željene funkcije		0,99

Iz prikazanih rezultata optimizacije može se zaključiti da se optimalni rezultati u pogledu fluksa permeata u stacionarnom stanju i specifične potrošnje energije dobijaju pri vrednosti maksimalnoj transmembranskog pritiska iz ispitivanog opsega (1 bar), maksimalnoj vrednosti prividne brzine proticanja napojne smeše iz ispitivanog opsega (1,59 m/s), i maksimalnoj vrednosti prividne brzine proticanja vazduha od 0,46 m/s. Vrednost željene funkcije od 0,99 ukazuje na visok stepen ispunjenosti oba zadata cilja optimizacije. Može se zaključiti da u slučaju izvođenja procesa mikrofiltracije uz primenu kombinacije statičkog mešača i uduvavanja vazduha, u odnosu na proces mikrofiltracije kod koga se primenjuje samo uduvavanje vazduha, prisustvo statičkog mešača umnogome doprinosi povećanju fluksa permeata i smanjenju specifične potrošnje energije.

5.8. ISPITIVANJE AKTIVNOSTI PROIZVEDENIH BOKONTROLNIH AGENASA PROTIV FITOPATOGENA PAPRIKE IN PLANTA

Sa ciljem ispitivanja *in planta* antimikrobnog delovanja proizvedenih biokontrolnih agenasa, odnosno kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* dobijene kultivacijom proizvodnog mikroorganizma u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljivih podloga optimizovanog sastava na bazi komercijalnog (poglavlje 5.4.2.) i sirovog glicerola (poglavlje 5.6.2.), izvedeni su eksperimenti primenom sadnica paprike, kao biljke kod koje su uočeni veoma veliki gubici prinosa izazvani bakterioznog pegavošću uzrokovanom fitopatogenima vrste *Xanthomonas euvesicatoria* (Obradović i sar., 2004). Tretman sadnica kultivacionim tečnostima na bazi komercijalnog (sadnice označene brojem 3) i sirovog glicerola (sadnice označene brojem 4) vršen je potapanjem sadnica u kultivacione tečnosti 24 časa pre inokulacije sadnica fitopatogenim izolatima. Za inokulisanje netretiranih kontrola (sadnice označene brojem 2), kao i sadnica tretiranih kultivacionim tečnostima na bazi komercijalnog (sadnice označene brojem 3) i sirovog glicerola (sadnice označene brojem 4), korišćene su suspenzije biomase fitopatogenih izolata *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 1 i *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 2. Inokulacija je vršena na petom i šestom pravom listu sadnica, na tri mesta na svakom listu u međuvenskom prostoru. Kao kontrola su korišćene sadnice koje nisu tretirane kultivacionim tečnostima na bazi komercijalnog i sirovog glicerola, a takođe nisu inokulisane fitopatogenim izolatima (sadnice označene brojem 1). Nakon pet nedelja gajenja sadnica paprike na sobnoj temperaturi, u vlažnoj sredini i uz prisustvo sunčeve svetlosti, očitani su simptomi razvoja bakteriozne pegavosti na sadnicama, u pogledu broja zaraženih listova u odnosu na ukupan broj listova, kao i procenat pokrivenosti površine lista nekrozom izazvanom razvojem ispitivanih fitopatogena. Rezultati *in vivo* testiranja prikazani su u tabeli 5.29, dok se izgled sadnica i simptoma bakteriozne pegavosti može videti na slici 5.43.

Tabela 5.29. Rezultati *in planta* testiranja antimikrobne aktivnosti proizvedenih biokontrolnih agenasa na bazi *Bacillus velezensis* protiv fitopatogena paprike *Xanthomonas euvesicatoria*, uzročnika bakteriozne pegavosti

Sadnica	Zaraženi listovi (%)	Pokrivenost lista nekrozom (%)
1	0,00±0,00	0,00±0,00
2a	68,33±1,67	31,97±0,14
2b	80,95±2,38	44,43±3,34
3a	14,84±0,55	7,51±1,76
3b	14,84±0,55	5,09±0,09
4a	16,03±0,64	8,22±1,85
4b	28,57±0,00	8,78±1,40

a – *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 1

b – *Xanthomonas euvesicatoria* PAP LIST 2

Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da su se kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* dobijene primenom hranljivih podloga optimizovanog sastava na bazi komercijalnog i sirovog glicerola pokazale kao zadovoljavajući biokontrolni agensi kada je u pitanju suzbijanje bakteriozne pegavosti paprike. Kod sadnica tretiranih kultivacionim tečnostima na bazi komercijalnog i sirovog glicerola mogu se uočiti simptomi oboljenja samo na mestima inokulacije listova fitopatogenim izolatima, pri čemu nije dolazilo do širenja simptoma bakteriozne pegavosti po ostatku površine inokulisanih listova, što se može zaključiti po veoma malim vrednostima procentualne pokrivenosti listova nekrozom. Osim toga, nije došlo do širenja oboljenja na druge listove sadnica koji nisu inokulisani fitopatogenima. Nasuprot tome, kod kontrola koje nisu tretirane i inokulisane su fitopatogenim izolatima, uočava se tri do četiri puta veća pokrivenost površine listova nekrozom, odnosno širenje simptoma bakteriozne pegavosti i van mesta inokulacije fitopatogenima. Takođe se uočava da je došlo do širenja oboljenja i na listove sadnica koji nisu inicijalno inokulisani fitopatogenim izolatima. Stoga se zaključuje da je preventivni tretman sadnica paprike kultivacionim tečnostima proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* na bazi komercijalnog i sirovog glicerola u velikoj meri doprineo suzbijanju fitopatogena *Xanthomonas euvesicatoria* i sprečavanju širenja simptoma bakteriozne pegavosti na ispitivanim sadnicama paprike.

Dobijeni rezultati ukazuju na veoma visok potencijal primene biokontrolnih agenasa na bazi vrste *Bacillus velezensis* koji su proizvedeni pod uslovima optimizovanim i definisanim u okviru ove doktorske disertacije za suzbijanje fitopatogena *Xanthomonas euvesicatoria* koji izazivaju bakterioznu pegavost paprike. Buduća istraživanja trebala bi da budu usmerena na ispitivanje delovanja proizvedenih biokontrolnih agenasa u realnim uslovima primene, odnosno u polju, kao i na definisanje optimalnog vremena i načina primene. Takođe, postoji mogućnost unapređenja formulacije na bazi kultivacione tečnosti sa ciljem povećanja njene efikasnosti na mestu delovanja, održavanja vijabilnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*, kao i produžetka roka trajanja u kome se ostvaruje definisana aktivnost biokontrolnog preparata protiv ispitivanih fitopatogena. Takođe, u okviru ove doktorske disertacije ispitan je i potencijalno širi opseg antimikrobnog delovanja proizvedenih biokontrolnih agenasa, sa ciljem procene potencijala za primenu u suzbijanju drugih oboljenja biljaka izazvanih mikrobiološkim fitopatogenima.

Neinokulisana
netretirana
kontrola

Inokulusana netretirana kontrola

Sadnice tretirane kultivacionom
tečnošću na bazi komercijalnog
glicerola

Sadnice tretirane kultivacionom
tečnošću na bazi sirovog glicerola



Slika 5.43. Simptomi bakteriozne pegavosti na sadnicama paprike prilikom *in planta* testiranja antimikrobne aktivnosti proizvedenih biokontrolnih agenasa na bazi *Bacillus velezensis*

5.9. ISPITIVANJE ŠIREG SPEKTRA ANTIMIKROBNOG DELOVANJA PROIZVODNOG MIKROORGANIZMA *Bacillus velezensis*

Sa ciljem ispitivanja potencijalno šireg spektra antimikrobnog delovanja proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* vršeno je *in vitro* i *in vivo* testiranje antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti dobijene nakon kultivacije proizvodnog mikroorganizma u laboratorijskom bioreaktoru (poglavlje 4.4.) primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola (poglavlje 5.4.2.). Kao test mikroorganizmi u ovoj fazi istraživanja korišćeni su fitopatogeni izolati gljiva koje prouzrokuju gorku trulež jabuke (tri izolata vrste *Colletotrichum acutatum* - 314, 107 i KA 7), kao i fitopatogeni izolati gljiva koje izazivaju truljenje jabuka u toku skladištenja (tri izolata vrste *Fusarium avenaceum* - TAB12, KA13, JGS3², i jedan izolat vrste *Fusarium graminearum* - TAB10²).

Gljive roda *Fusarium* su najčešće patogeni ratarskih biljaka, ali se često javljaju i na povrću, voću, šumskom, ukrasnom i industrijskom bilju. Kada se posmatraju gljive roda *Fusarium* kao fitopatogeni jabuka, vrste *Fusarium solani* i *Fusarium equiseti* najčešće parazitiraju korenov vrat jabuke, dok se vrste *Fusarium avenaceum* i *Fusarium lactis* uglavnom javljaju kao izazivači truljenja plodova jabuke u toku skladištenja (Lević, 2008), pogotovo u novijim skladištima kao što su *Ultra Low Oxygen* (ULO) i *Dynamic Controlled Atmosphere* (DCA) (Sever i sar., 2012; Petreš i sar., 2018a). Na uskladištenim plodovima jabuke u našoj zemlji detektovane su vrste *Fusarium avenaceum* i *Fusarium graminearum* (Petreš i sar., 2017). Pored ekonomskih gubitaka, gljive roda *Fusarium* predstavljaju problem za plodove jabuke koji se koriste u ishrani ljudi jer sintetišu i mikotoksine: zearalenon, T-2 toksin, fumonizine, deoksivalenol, moniliformin itd. Mikotoksini mogu značajno da naruše zdravlje ljudi i životinja, prouzrokujući različite mikotoksikoze (Kocić-Tanackov i sar., 2013).

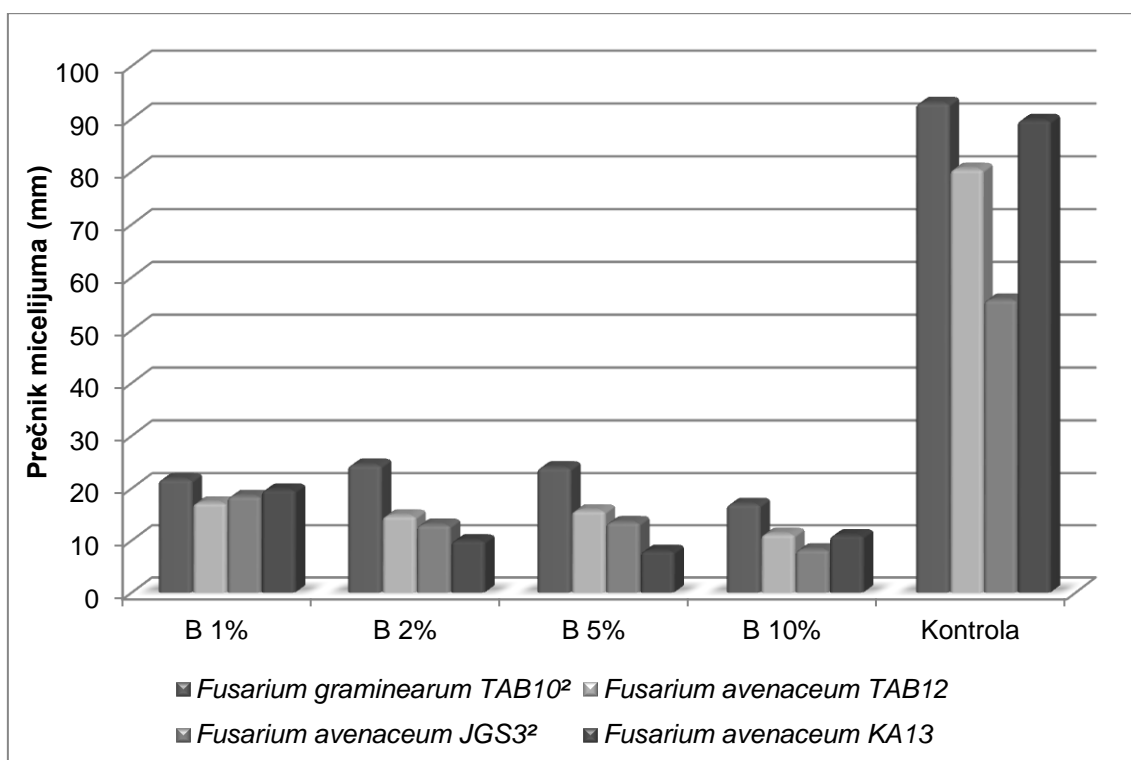
Fitopatogene gljive roda *Colletotrichum* spadaju u veoma značajne patogene plodova jabuke i drugog voća, širokog spektra domaćina. Primarni prouzrokovajući gorke truleži jabučastog i koštičavog voća su vrste *Colletotrichum gloeosporioides* i *Colletotrichum acutatum* (Stojanović i sar., 2002; Grahovac, 2014). Smanjenje prinosa plodova jabuke kao posledica oboljenja izazvanog fitopatogenom *Colletotrichum acutatum* u odsustvu mera zaštite može se kretati u opsegu 30-80% (Zhang i sar., 2008).

U Republici Srbiji nema registrovanih preparata za zaštitu plodova jabuke od prouzrokovajuća truleži posle berbe, pa se zaštita od ovih patogena vrši primenom različitih sintetičkih fungicida u polju pre berbe (Grahovac i sar., 2011), iako rizik od infekcije postoji i u periodu tokom berbe, čuvanja, transporta i plasiranja plodova na tržište. Imajući u vidu značaj jabuke u ljudskoj ishrani, kao i sve veću zabrinutost potrošača oko toksičnosti sintetičkih preparata, interesovanje za mogućnosti biološke zaštite neprekidno raste. Brojna naučna istraživanja ukazuju da bakterije roda *Bacillus* predstavljaju potencijalno veoma efikasne biokontrolne agense za suzbijanje fitopatogenih mikroorganizama (Grahovac, 2014). Takođe, vrsta *Bacillus velezensis* se sve češće navodi kao potencijalno veoma efikasan agens za kontrolu gljiva iz roda *Colletotrichum* (Huang i sar., 2017), ali i roda *Fusarium* (Palazzini i sar., 2016).

5.9.1. IN VITRO TESTIRANJE ŠIREG SPEKTRA DELOVANJA PROIZVODNOG MIKROORGANIZMA *Bacillus velezensis*

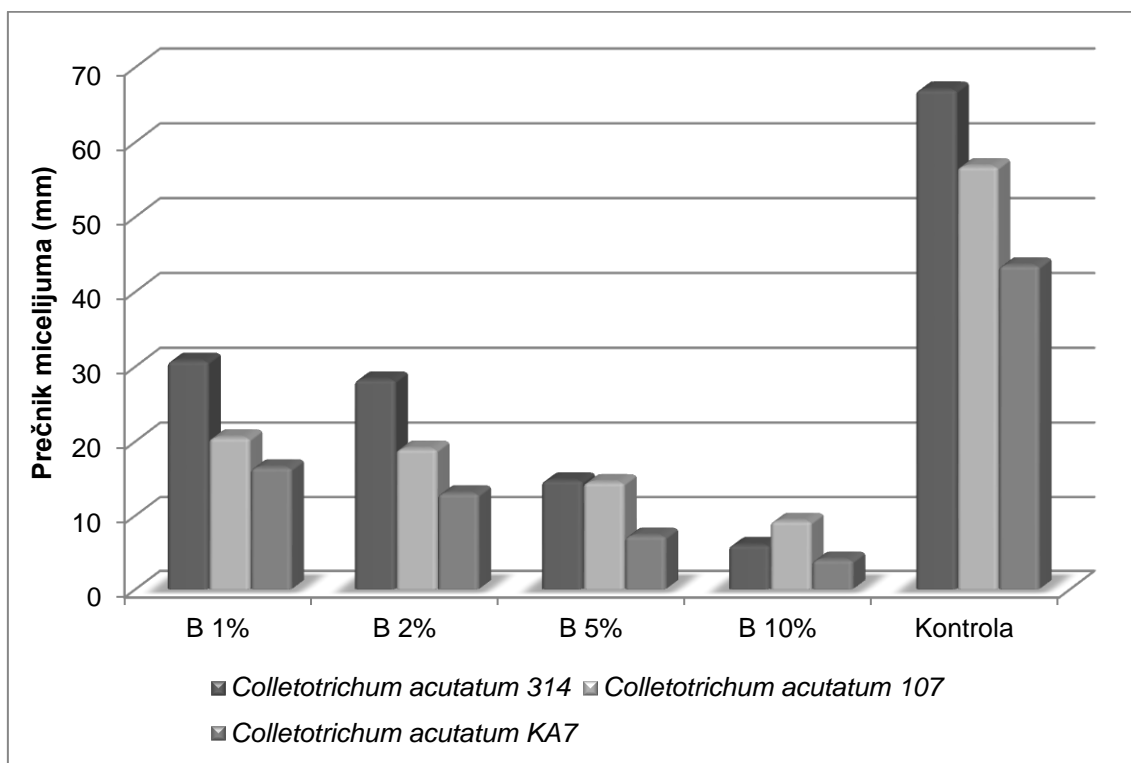
Rezultati *in vitro* testiranja antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv četiri fitopatogena izolata roda *Fusarium* prikazani su na slici 5.44. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da su uzorci kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma svih ispitivanih koncentracija uspeli da inhibiraju rast sva četiri fitopatogena izolata roda *Fusarium*, uzimajući u obzir da su prečnici micelijuma fitopatogenih gljiva značajno manji u poređenju sa kontrolama. Kada je u pitanju inhibicija rasta micelijuma izolata *Fusarium graminearum* TAB10², najbolji rezultati postignuti su primenom

uzorka kultivacione tečnosti koncentracije 10%, dok je približno isti prečnik micelijuma dobijen delovanjem uzoraka kultivacione tečnosti koncentracija 2% i 5%. Najveći stepen inhibicije rasta micelijuma izolata *Fusarium avenaceum* TAB12 postiže se takođe delovanjem uzorka kultivacione tečnosti koncentracije 10%, dok se najmanji stepen inhibicije rasta micelijuma izolata *Fusarium avenaceum* TAB12 postiže delovanjem uzorka kultivacione tečnosti koncentracije 1%. Kod izolata *Fusarium avenaceum* JGS3² najmanji prečnik micelijuma dobijen je pri delovanju uzorka kultivacione tečnosti koncentracije 10%, dok je slično kao kod fitopatogenog izolata *Fusarium graminearum* TAB10² primena uzoraka kultivacione tečnosti koncentracija 2% i 5% rezultovala približno istom vrednošću prečnika micelijuma. Uzorak kultivacione tečnosti koncentracije 5% ispoljio je najveći stepen inhibicije rasta micelijuma fitopatogenog izolata *Fusarium avenaceum* KA13. Na osnovu prikazanih rezultata, za *in vivo* ispitivanje antimikrobne aktivnosti kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenog izolata *Fusarium avenaceum* TAB12 odabrane su koncentracije uzoraka kultivacione tečnosti od 5% i 10%.



Slika 5.44. Rezultati *in vitro* testiranja antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Fusarium*

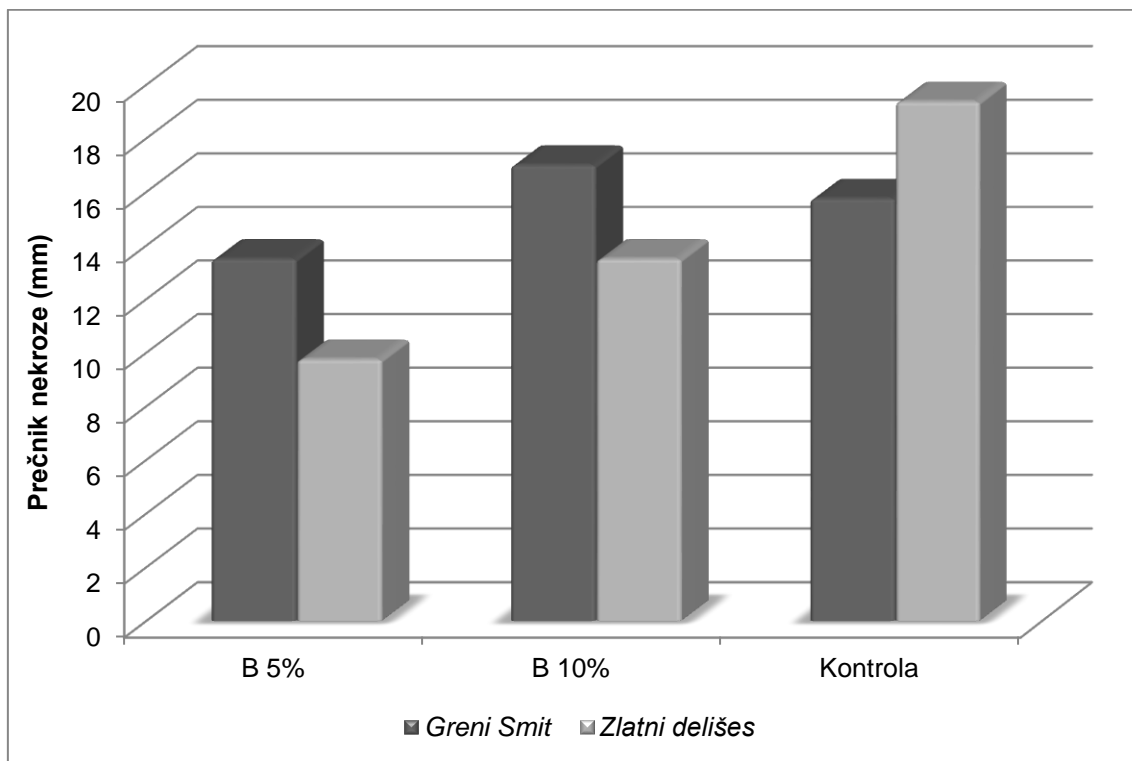
Rezultati *in vitro* testiranja antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv tri fitopatogena izolata roda *Colletotrichum* prikazani su na slici 5.45. Značajno manji prečnici micelijuma ispitivanih fitopatogenih izolata u poređenju sa kontrolom dobijeni testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti za sve vrednosti ispitivanih koncentracija ukazuju na uspešno *in vitro* suzbijanje ispitivanih fitopatogenih izolata primenom uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis*. Takođe, rezultati prikazani na slici 5.45. ukazuju na smanjenje prečnika micelijuma svih fitopatogenih izolata sa povećanjem koncentracije uzorka kultivacione tečnosti. Stoga su najbolji rezultati za suzbijanje fitopatogenih izolata dobijeni primenom uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* koncentracija 5% i 10%, koje su takođe primenjene i prilikom *in vivo* eksperimenata.



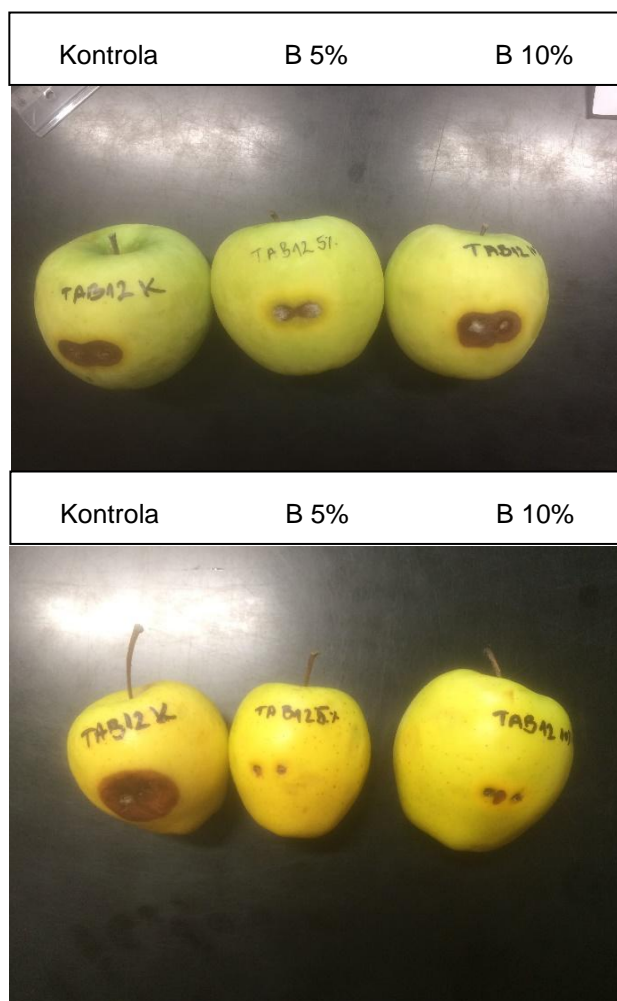
Slika 5.45. Rezultati *in vitro* testiranja antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Colletotrichum*

5.9.2. *IN VIVO* TESTIRANJE ŠIREG SPEKTRA DELOVANJA PROIZVODNOG MIKROORGANIZMA *Bacillus velezensis*

In vivo testiranje antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* koncentracija 5% i 10% vršeno je protiv fitopatogenog izolata *Fusarium avenaceum* TAB12 na jabukama sorti Greni Smit i Zlatni delišes (slika 5.46., slika 5.47.). Može se zaključiti da je na obe ispitivane sorte jabuka veći stepen suzbijanja infekcije izazvane fitopatogenim izolatom *Fusarium avenaceum* TAB12 postignut primenom uzorka kultivacione tečnosti koncentracije 5%, jer su primenom ovog uzorka dobijeni manji prečnici nekroze na jabukama u poređenju sa primenom uzorka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma koncentracije 10%. Takođe, primenom uzorka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma koncentracije 5% postignuto je značajno smanjenje prečnika nekroze na obe ispitivane sorte jabuka u poređenju sa kontrolom, čime je potvrđena sposobnost proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* da suzbije fitopatogeni izolat *Fusarium avenaceum* TAB12 u uslovima *in vivo* testiranja. Primena uzorka kultivacione tečnosti koncentracije 10% nije rezultovala suzbijanjem fitopatogena *Fusarium avenaceum* TAB12 na sorti jabuke Greni Smit, jer su dobijene veće vrednosti prečnika nekroze u poređenju sa kontrolom. Prilikom *in vivo* testiranja takođe je uočeno bolje suzbijanje fitopatogenog izolata *Fusarium avenaceum* TAB12 na sorti jabuke Zlatni delišes (slika 5.46.). Različite sorte biljnih vrsta takođe predstavljaju različite medijume za rast mikroorganizama, jer se sorte svakako razlikuju i po hemijskom sastavu ploda (Campeanu i sar., 2009). Ovi rezultati ukazuju na značajan potencijal proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* za primenu u biološkoj kontroli fitopatogenih gljiva koje uzrokuju truljenje jabuka u toku skladištenja, odnosno mogućnost primene ovog biokontrolnog agensa za zaštitu jabuka i produženje roka trajanja svežeg voća nakon berbe u uslovima skladištenja.



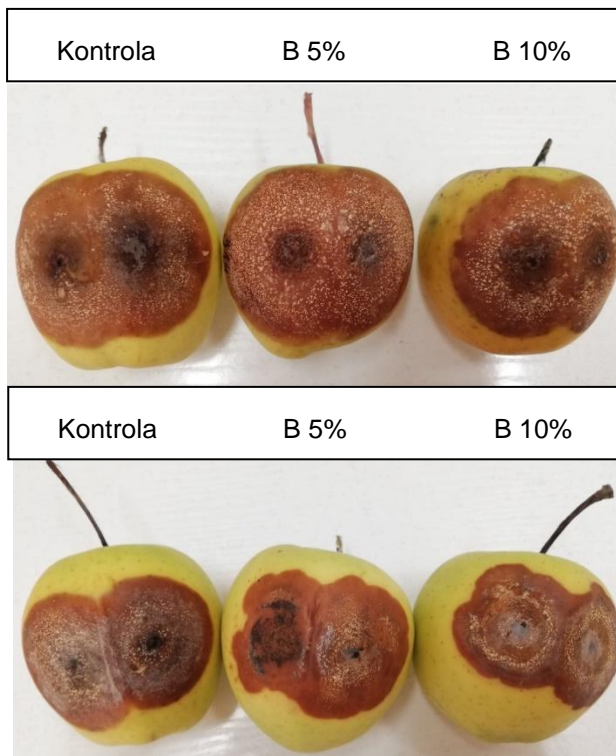
Slika 5.46. Rezultati *in vivo* testiranja antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenog izolata *Fusarium avenaceum* TAB12



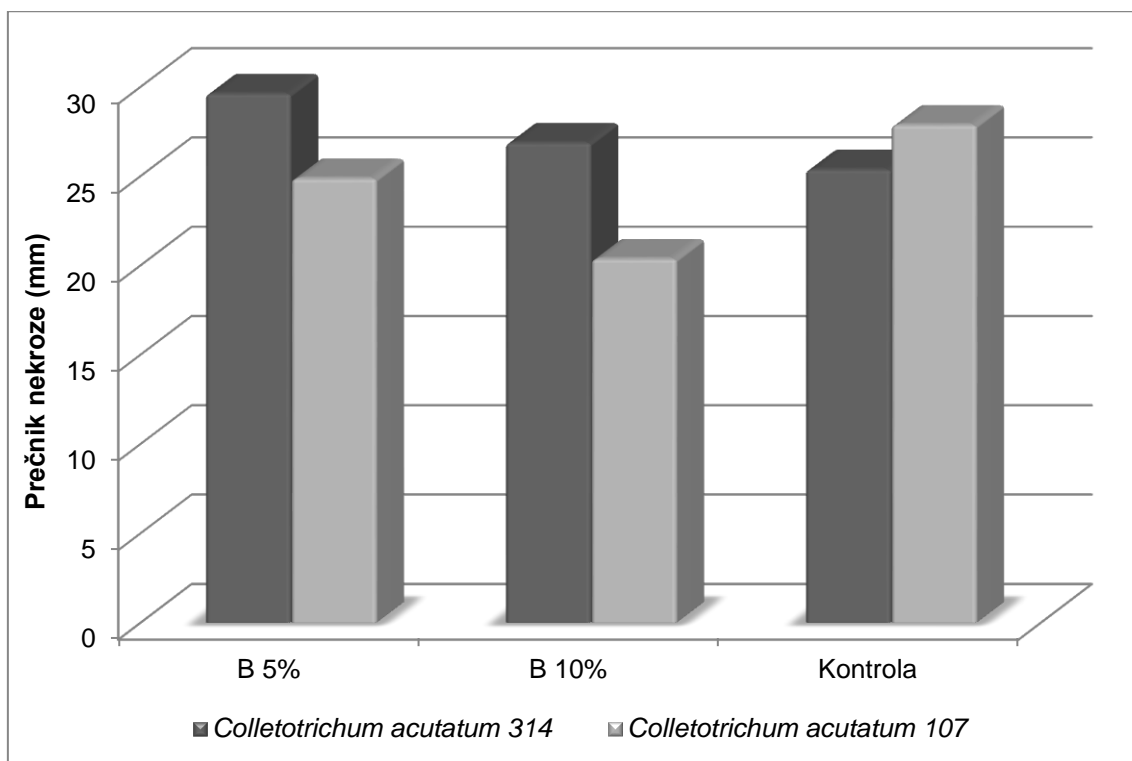
Slika 5.47. *In vivo* testiranje antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenog izolata *Fusarium avenaceum* TAB12 na sortama jabuka Greni Smit (gornja slika) i Zlatni delišes (donja slika)

Prilikom *in vivo* ispitivanja antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* koncentracija 5% i 10% korišćena su dva fitopatogena izolata: *Colletotrichum acutatum* 314 i *Colletotrichum acutatum* 107. Prilikom *in vivo* testiranja uzoraka kultivacione tečnosti protiv ispitivanih fitopatogenih izolata na jabukama sorte Zlatni delišes, uočeno je da primena uzoraka kultivacione tečnosti doprinosi nastanku nekroza većih dimenzija na jabukama u poređenju sa kontrolom (slika 5.48.), što ukazuje na neuspešno suzbijanje gorke truleži jabuke primenom ovog biokontrolnog agensa. Stoga su rezultati prečnika nekroze izazvanih ispitivanim fitopatogenim izolatima prikazani samo za *in vivo* testiranje uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma na sorti jabuke Greni Smit (slika 5.49). Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da su primenjeni uzorci kultivacione tečnosti obe koncentracije uspeli da delimično inhibiraju rast fitopatogenog izolata *Colletotrichum acutatum* 107, na šta ukazuju manji prečnici nekroze na jabukama inokulisanim ovim fitopatogenim izolatima u poređenju sa kontrolom. Veći stepen inhibicije rasta fitopatogenog izolata *Colletotrichum acutatum* 107 dobijen je primenom uzorka kultivacione tečnosti koncentracije 10%. Sa druge strane, primenjeni uzorci kultivacione tečnosti u ispitivanim koncentracijama ne suzbijaju rast fitopatogenog izolata *Colletotrichum acutatum* 314 *in vivo*. S obzirom na činjenicu da je i prilikom suzbijanja rasta fitopatogenog izolata *Colletotrichum acutatum* 107 uočljiva veoma mala razlika između prečnika nekroze na jabukama tretiranim uzorcima kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma i kontrole (slika 5.50.), može se zaključiti da je za efikasno suzbijanje rasta oba ispitivana fitopatogena izolata vrste *Colletotrichum acutatum* i razvoja gorke truleži jabuka potrebno ili primeniti ispitivani biokontrolni agens u većoj koncentraciji, ili razmotriti dalju optimizaciju

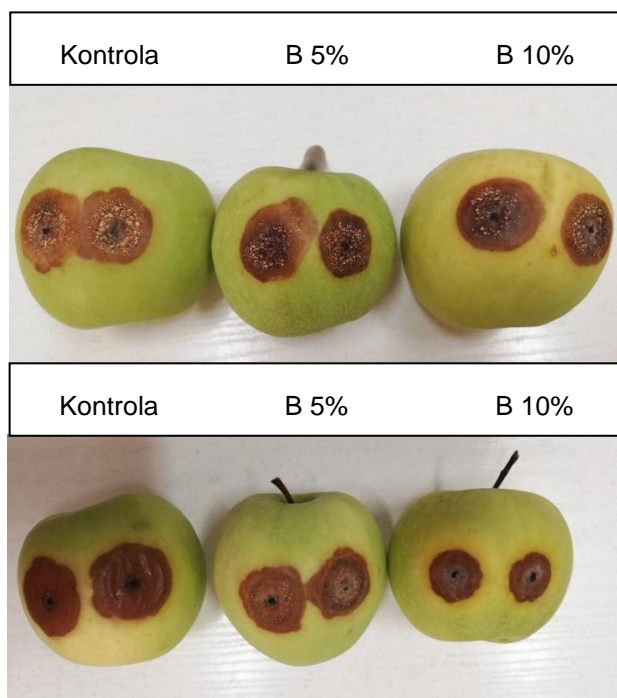
uslova proizvodnje sa ciljem dobijanja agensa koji pokazuje veći potencijal za primenu u biološkoj kontroli gorke truleži jabuke.



Slika 5.48. *In vivo* testiranje antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* na sorti jabuke Zlatni delišes protiv fitopatogenih izolata *Colletotrichum acutatum* 314 (gornja slika) i *Colletotrichum acutatum* 107 (donja slika)



Slika 5.49. Rezultati *in vivo* testiranja antimikrobne aktivnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Colletotrichum*



Slika 5.50. *In vivo* testiranje antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* na sorti jabuke Greni Smit protiv fitopatogenih izolata *Colletotrichum acutatum* 314 (gornja slika) i *Colletotrichum acutatum* 107 (donja slika)

6. ZAKLJUČCI

Osnovni cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bila je optimizacija uslova umnožavanja i primarnog izdvajanja biomase soja *Bacillus* sp. sa primenom za sprečavanje pojave i širenja bakterioza povrtarskih useva koje izazivaju fitopatogene vrste roda *Xanthomonas*. Optimizacija bioprocesa obuhvatala je optimizaciju sastava hranljive podloge na bazi komercijalnog i sirovog glicerola, kako bi se smanjili troškovi bioprocesa u pogledu pripreme hranljive podloge, prečišćavanja efluenta bioprocesa i kako bi se potencijalno doprinelo rešavanju problema prisutnog viška sirovog glicerola iz proizvodnje biodizela, pri čemu je osnovni cilj optimizacije sastava hranljivih podloga za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma bila maksimizacija antimikrobne aktivnosti protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*. Takođe, jedan od ciljeva istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je i definisanje optimalnih uslova izvođenja procesa mikrofiltracije dobijenih kultivacionih tečnosti uz primenu različitih hidrodinamičkih metoda za unapređenje procesa unakrsne mikrofiltracije, odnosno za poboljšanje fluksa permeata (Kenics statičkog mešača, uduvavanja vazduha i kombinacije ovih metoda). Dodatni cilj predstavljala je procena potencijala biomase soja *Bacillus* sp. za biološku kontrolu šireg spektra različitih biljnih patogena.

Uzmajući u obzir prethodno definisane specifične ciljeve istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, izvedeni su sledeći specifični zaključci:

- Rezultati istraživanja iz faze skrininga potencijalnih proizvodnih mikroorganizama pokazali su da je najveći antagonistički potencijal za suzbijanje fitopatogenih uzolata roda *Xanthomonas* pokazao izolat *Bacillus* sp., pri čemu je uočena antimikrobna aktivnost uzoraka kultivacione tečnosti, ali i filtrata kultivacione tečnosti oslobođenih biomase proizvodnog mikroorganizma, što ukazuje na antimikrobnu aktivnost i biomase proizvodnog mikroorganizma, ali i proizvedenih sekundarnih metabolita. Rezultati molekularne identifikacije primenom metode lančane reakcije polimeraze (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) i sekvenciranja gena za 16S rRNK pokazali su pripadnost odabranog proizvodnog mikroorganizma vrsti *Bacillus velezensis*.
- Prilikom odabira optimalnog izvora ugljenika i organskog izvora azota kao osnovnih komponenti hranljive podloge za proizvodnju bioaktivnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih sojeva roda *Xanthomonas*, pokazalo se da glicerol kao izvor ugljenika i ekstrakt kvasca kao organski izvor azota favorizuju antimikrobnu aktivnost proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih izolata roda *Xanthomonas*.
- Modelovanje sastava hranljive podloge za proizvodnju bioaktivnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih sojeva roda *Xanthomonas* primenom proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u pogledu procene uticaja inicijalnih koncentracija osnovnih nutrijenata (ugljenika – komercijalnog i sirovog glicerola, azota i fosfora) na odabrane odzive bioprocesa izvršeno je primenom metodologije odzivne površine. Dobijeni matematički modeli za odabrane odzive, odnosno prečnik zona inhibicije, kao osnovni pokazatelj antimikrobne aktivnosti, i rezidualne koncentracije osnovnih nutrijenata (glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora), statistički su značajni pri nivou značajnosti od 95%, što predstavlja osnovu za njihovu dalju primenu u optimizaciji sastava hranljive podloge, simulaciji i povećanju razmera bioprocesa.
- Optimizacija sastava hranljivih podloga na bazi komercijalnog i sirovog glicerola za proizvodnju bioaktivnih agenasa na bazi *Bacillus velezensis* efikasnih protiv fitopatogenih sojeva roda *Xanthomonas* u pogledu inicijalnih koncentracija osnovnih nutrijenata (ugljenika, azota i fosfora) izvršena je primenom metode željene funkcije. Rezultati optimizacije sastava hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola pokazali su da optimizovane koncentracije nutrijenata u ovoj hranljivoj podlozi iznose: glicerol 10 g/l, ekstrakt kvasca 2,83 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g/l, K_2HPO_4 1,07 g/l i $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g/l. Sa druge strane, optimizovan sastav hranljive podloge na bazi

sirovog glicerola dobija se primenom sledećih koncentracija nutrijenata: glicerol 10 g/l, K_2HPO_4 4,66 g/l i $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,3 g/l, čime je postignuta ušteda u delu bioprocesa koji se odnosi na troškove pripreme hranljive podloge na bazi sirovog glicerola, jer je dokazano da u podlozi optimizovanog sastava nije potrebno primeniti organski i neorganski izvor azota, zbog dovoljne količine izvora ovog nutrijenta u sirovom glicerolu iz proizvodnje biodizela. Takođe, predviđene vrednosti odziva bioprocesa (prečnik zona inhibicije i rezidualne koncentracije nutrijenata) dobijene primenom matematičkih modela generisanih u koraku modelovanja sastava hranljivih podloga na bazi komercijalnog i sirovog glicerola pokazale su značajno smanjenje rezidualnih koncentracija nutrijenata u kultivacionoj tečnosti primenom hranljivih podloga optimizovanog sastava, uz dobijanje zadovoljavajućih vrednosti prečnika zona inhibicije, što implicira bolje iskorišćenje nutrijenata i smanjenje troškova bioprocesa u pogledu prečišćavanja i odlaganja efluenta bioprocesa.

- Validacija dobijenih modela sastava hranljivih podloga na bazi komercijalnog i sirovog glicerola za proizvodnju bioaktivnih agenasa efikasnih protiv fitopatogenih sojeva roda *Xanthomonas* primenom proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* i hranljivih podloga optimizovanog sastava izvršena je izvođenjem bioprocesa u Vulfovima bocama ukupne zapremine 2 L i u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 3 L, uz praćenje toka kultivacije. Rezultati eksperimenata validacije pokazali su zadovoljavajući stepen korelacije između vrednosti odziva bioprocesa (prečnik zona inhibicije i rezidualne koncentracije nutrijenata) predviđenih modelom i vrednosti dobijenih kultivacijom proizvodnog mikroorganizma u Vulfovima bocama i laboratorijskom bioreaktoru. Bolji rezultati svih ispitivanih odziva bioprocesa dobijeni su primenom hranljive podloge optimizovanog sastava na bazi komercijalnog glicerola, što je i bilo očekivano uzimajući u obzir veliku količinu nečistoća prisutnu u sirovom glicerolu iz proizvodnje biodizela. I pored toga, potvrđena je mogućnost primene sirovog glicerola iz proizvodnje biodizela kao izvora ugljenika u biotehnološkom procesu proizvodnje biokontrolnih agenasa. Takođe, rezultati bioprocesa ukazuju na bolju prilagođenost proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* uslovima kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru u poređenju sa Vulfovima bocama.
- Unapređenje procesa unakrsne mikrofiltracije kultivacionih tečnosti dobijenih nakon kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* na hranljivoj podlozi na bazi komercijalnog glicerola primenom različitih hidrodinamičkih metoda pokazalo je značajan potencijal primene Kenics statičkog mešača, uduvavanja vazduha i kombinacije ovih metoda za poboljšanje fluksa permeata u stacionarnom stanju. Primena Kenics statičkog mešača kao promotora turbulencije pri optimizovanim operativnim uslovima unakrsne mikrofiltracije (transmembranski pritisak 0,79 bar, protok napojne smeše 137,70 l/h) omogućava povećanje vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju za oko 350% u poređenju sa unakrsnom mikrofiltracijom bez promotora turbulencije. Uduvavanjem vazduha u tok napojne smeše pri optimizovanim uslovima unakrsne mikrofiltracije (transmembranski pritisak 0,68 bar, prividna brzina proticanja napojne smeše 0,96 m/s i prividna brzina proticanja vazduha 0,25 m/s) postiže se povećanje vrednosti fluksa permeata u stacionarnom stanju za oko 47%. Značajno veća vrednost povećanja fluksa permeata u stacionarnom stanju uočava se prilikom mikrofiltracije uz primenu kombinacije Kenics statičkog mešača i uduvavanja vazduha (oko 224%) pri optimizovanim operativnim uslovima mikrofiltracije (transmembranski pritisak 1 bar, prividna brzina proticanja napojne smeše 1,59 m/s i prividna brzina proticanja vazduha 0,46 m/s) u poređenju sa unakrsnom mikrofiltracijom bez primene hidrodinamičkih metoda za poboljšanje fluksa permeata.
- *In planta* ispitivanje antimikrobne aktivnosti preparata na bazi *Bacillus velezensis* (kultivacione tečnosti dobijene kultivacijom proizvodnog mikroorganizma u laboratorijskom bioreaktoru primenom hranljivih podloga optimizovanog sastava na bazi komercijalnog i sirovog glicerola) protiv fitopatogenih sojeva vrste *Xanthomonas euvesicatoria*, koji izazivaju bakterioznu pegavost paprike, pokazalo je značajan

potencijal primene bikontrolnih agenasa na bazi *Bacillus velezensis* za suzbijanje ovog oboljenja paprike, uz rezultate koji pokazuju značajno manje prečnike nekroze listova i širenja oboljenja u poređenju sa kontrolom koja je podrazumevala inokulaciju sadnica fitopatogenim izolatima, bez tretmana kultivacionim tečnostima na bazi komercijalnog i sirovog glicerola.

- Ispitivanje šireg spektra delovanja preparata na bazi *Bacillus velezensis* protiv fitopatogenih sojeva roda *Fusarium*, koji izazivaju truljenje jabuka u toku skladištenja, i roda *Colletotrichum*, kome pripadaju uzročnici gorke truleži jabuke, pokazalo je značajan potencijal kultivacione tečnosti na bazi komercijalnog glicerola dobijene kultivacijom proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* u laboratorijskom bioreaktoru, za suzbijanje oboljenja izazvanih fitopatogenim sojevima roda *Fusarium*. Sa druge strane, za suzbijanje gorke truleži jabuka *in vivo* potrebno je dodatno optimizovati proces proizvodnje biokontrolnih agenasa, s obzirom na to da rezultati *in vitro* testiranja antifungalnog delovanja ukazuju na visok potencijal proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* za suzbijanje fitopatogena roda *Colletotrichum*.

7. LITERATURA

- Abiala, M., Odebode, A., Hsu, S., Blackwood, C. (2015). Phytobeneficial properties of bacteria isolated from the rhizosphere of maize in southwestern Nigerian soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 4736–4743. doi:10.1128/AEM.00570-15
- Adeniji, A.A., Aremu, O.S., Babalola, O.O. (2018). Selecting lipopeptide-producing, *Fusarium*-suppressing *Bacillus* spp.: Metabolomic and genomic probing of *Bacillus velezensis* NWUMFkBS10.5. *Microbiology Open*, e742. doi:10.1002/mbo3.742
- Adeniji, A.A., Babalola, O.O. (2018). Tackling maize fusariosis: In search of *Fusarium graminearum* biosuppressors. *Archives of Microbiology*, 200, 1239–1255. doi:10.1007/s00203-018-1542-y
- Aires, A., Dias, C.S.P., Carvalho, R., Oliveira, M.H., Monteiro, A.A., Simoes, M.V., Rosa, E.A.S., Bennett, R.N., Saavedra, M.J. (2011). Correlations between disease severity, glucosinolate profiles and total phenolics and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* inoculation of different *Brassicaceae*. *Scientia Horticulturae*, 129, 503–510. doi:10.1016/j.scienta.2011.04.009
- Ajayi, A.O., Fagade, O.E. (2003). Utilization of corn starch as substrate for β -amylase by *Bacillus* spp. *African Journal of Biomedical Research*, 6, 37–42. doi:10.4314/ajbr.v6i1.54021
- Al-Ali, A., Deravel, J., Krier, F., Béchet, M., Ongena, M., Jacques, P. (2018). Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 29910–29920. doi:10.1007/s11356-017-0469-1
- Al-Bahry, S.N., Al-Wahaibi, Y.M., Elshafie, A.E., Al-Bemani, A.S., Joshi, S.J., Al-Makhmari, H.S., Al-Sulaimani, H.S. (2013). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 81, 141–146. doi:10.1016/j.ibiod.2012.01.006
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389–3402.
- Alvarez, F., Castro, M., Principe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., Jofre, E. (2012). The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP2 18 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), 159–174. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05182.x
- Amaral, P.F.F., Ferreira, T.F., Fontes, G.C., Coelho, M.A.Z. (2009). Glycerol valorization: New biotechnological routes. *Food and Bioproducts Processing*, 87, 179–186. doi:10.1016/j.fbp.2009.03.008
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., Fickers, P. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, 8, 63. doi:10.1186/1475-2859-8-63
- Arkipova, T.N., Prinsen, E., Veselov, S.U., Martinenko, E.V., Melentiev, A.I., Kudoyarova, G.R. (2007). Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant and Soil*, 292, 305–315. doi:10.1007/s11104-007-9233-5
- Armbruster, S., Cheong, O., Lölsberg, J., Popovic, S., Yüce, S., Wessling, M. (2018). Fouling mitigation in tubular membranes by 3D-printed turbulence promoters. *Journal of Membrane Science*, 554, 156–163. doi:10.1016/j.memsci.2018.02.015
- Arnison, P.G., Bibb, M.J., Bierbaum, G., Bowers, A.A., Bugni, T.S., Bulaj, G., Camarero, J.A., Campopiano, D.J., Challis, G.L., Clardy, J. (2012). Ribosomally synthesized and post-

- translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural Product Reports*, 30(1), 108–160. doi:10.1039/c2np20085f
- Arora, N., Davis, R.H. (1994). Yeast cake layers as secondary membranes in dead-end microfiltration of bovine serum albumin. *Journal of Membrane Sciences*, 92(3), 247-256. doi:10.1016/0376-7388(94)00075-1
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Korsten, L. (2010). Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biological Control*, 53, 122-128. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.11.010
- Aspelund, M.T., Rozeboom, G., Heng, M., Glatz, C.E. (2008). Improving permeate flux and product transmission in the microfiltration of a bacterial cell suspension by flocculation with cationic polyelectrolytes. *Journal of Membrane Sciences*, 324, 198–208. doi:10.1016/j.memsci.2008.07.021
- Assis, S.M.P., Mariano, R.L.R., Michereff, S.J., Silva, G., Maranhão, E.A.A. (1999). Antagonism of yeasts to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage phylloplane in field. *Revista de Microbiologia*, 30, 191-195. doi:10.1590/S0001-37141999000300002
- Atta, H.M., Reyad, A.M. (2013). Antifungal agent from *Streptomyces* sp: Taxonomy, fermentation, purification and biological activities. *Nature and Science*, 11, 164-176.
- Ayoub, M., Abdullah, A.Z. (2012). Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 2671–2686. doi:10.1016/j.rser.2012.01.054
- Azaizeh, M., Bashan, Y. (1984). Chemical control of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in inoculated pepper fields in Israel. *Annals of Applied Biology*, 104, Supplement on Tests of Agrochemicals and Cultivars No. 5, str. 60-61.
- Balaž, J., Delibašić, T. (2005). Iznalaženje metoda za izolaciju *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* sa semena paprike. *Pesticidi i fitomedicina*, 20, 51-60.
- Balyan, U., Sarkar, B. (2018). Analysis of flux decline using sequential fouling mechanisms during concentration of *Syzygium cumini* (L.) leaf extract. *Chemical Engineering Research and Design*, 130, 167–183. doi:10.1016/j.cherd.2017.12.015
- Bardin, M., Ajouz, S., Comby, M., Lopez-Ferber, M., Graillot, B., Siegwart, M., Nicot, P.C. (2015). Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Frontiers in Plant Science*, 6, 566. doi:10.3389/fpls.2015.00566
- Barkai-Golan, R. (2001). *Postharvest diseases of fruit and vegetables: development and control*. Elsevier Sciences, Amsterdam, The Netherlands.
- Baş, D., Boyacı, İ.H. (2007a). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78, 836–845. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024
- Baş, D., Boyacı, İ.H. (2007b). Modeling and optimization II: Comparison of estimation capabilities of response surface methodology with artificial neural networks in a biochemical reaction. *Journal of Food Engineering*, 78, 846–854. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.11.025
- Bashan, Y., Diab, S., Okon, Y. (1982a). Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper seeds and roots, in symptomless and dry leaves in non-host plants and in the soil. *Plant and Soil*, 68, 161-170.
- Bashan, Y., Okon, Y., Henis, Y. (1982b). Long-term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper seeds. *Phytopathology*, 72, 1143-1144.
- Bauer, A.W.W., Kirby, M.M., Sherris, J.C., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496.

- Bellara, S.R., Cui, Z.F., Pepper, D.S. (1996). Flux enhancements with gas sparging in downwards crossflow ultrafiltration: performance and mechanism. *Journal of Membrane Sciences*, 117(1-2), 109-116. doi:10.1016/0376-7388(96)00040-3
- Bellhouse, B.J. (1994). Membrane filters. International Patent Application, WO 94121362.
- Biniarz, P., Łukaszewicz, M., Janek, T. (2017). Screening concepts, characterization and structural analysis of microbial-derived bioactive lipopeptides: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37, 393–410. doi:10.3109/07388551.2016.1163324
- Blanpain Avet, P., Faille, C., Delaplace, G., Benezech, T. (2011). Cell adhesion and related fouling mechanism on a tubular ceramic microfiltration membrane using *Bacillus cereus* spores. *Journal of Membrane Science*, 385-386, 200-216. doi:10.1016/j.memsci.2011.09.041
- Blanpain-Avet, P., Faille, C., Bénézech, T. (2009). Cleaning kinetics and related mechanisms of *Bacillus cereus* spore removal during an alkaline cleaning of a tubular ceramic microfiltration membrane. *Desalination and Water Treatment*, 5, 235–251. doi:10.5004/dwt.2009.252
- Borriss, R. (2011). Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents. U: Maheshwari, D.K. (editor), *Bacteria in agrobiolgy: plant growth responses*, str: 41–76. Springer, Berlin, Nemačka. doi:10.1007/978-3-642-20332-9
- Boyd, L.A., Ridout, C., O’Sullivan, D.M., Leach, J.E., Leung, H. (2013). Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics*, 29, 233–240. doi:10.1016/j.tig.2012.10.011
- Brennen, C.E. (2005). *Fundamentals of multiphase flows*. Cambridge University Press, California Institute of Technology, Pasadena, Kalifornija, SAD.
- Buonaurio, R., Scarponi, L., Ferrara, M., Sidoti, P., Bertona, A. (2002). Induction of systemic acquired resistance in pepper plants by acibenzolar-S-methyl against bacterial spot disease. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 41-49.
- Byrne, J.M., Dianese, A.C., Ji, P., Campbell, H.L., Cuppels, D.A., Louws, F.J., Miller, S.A., Jones, J.B., Wilson, M. (2005). Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. *Biological Control*, 32, 408-418. doi:10.1016/j.biocontrol.2004.12.001
- Cabassud, C., Laborie, S., Durand-Bourlier, L., Lainé, J. M. (2001). Air sparging in ultrafiltration hollow fibers: relationship between flux enhancement, cake characteristics and hydrodynamic parameters. *Journal of Membrane Sciences*, 181(1), 57-69. doi:10.1016/S0376-7388(00)00538-X
- Cabassud, C., Laborie, S., Laine, J.M. (1997). How slug can improve ultrafiltration flux in organic hollow fibers. *Journal of Membrane Sciences*, 128, 93-101. doi:10.1016/S0376-7388(96)00316-X
- Cai, X., Li, H., Xue, Y., Liu, C. (2013). Study of endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* CC09 and its antifungal cyclic lipopeptides. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 1(1), 1–5. doi:10.7324/JABB.2013.1101
- Cai, X.-C., Liu, C.-H., Wang, B.-T., Xue, Y.-R. (2017). Genomic and metabolic traits endow *Bacillus velezensis* CC09 with a potential biocontrol agent in control of wheat powdery mildew disease. *Microbiological Research*, 196, 89–94. doi:10.1016/j.micres.2016.12.007
- Campeanu, G., Neata, G., Darjanschi, G. (2009). Chemical composition of the fruits of several apple cultivars growth as biological crop. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj*, 37(2), 161-164. doi:10.15835/nbha3723465
- Cao, Y., Pi, H., Chandrangsu, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H., Xiong, H., Helmann, J.D., Cai, Y. (2018). Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Nature Scientific Reports*, 8, 4360. doi:10.1038/s41598-018-22782-z

- Carvalho, F.P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6, 48–60. doi:10.1002/fes3.108
- Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P. (2014). Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27, 87–100. doi:10.1094/MPMI-09-13-0262-R
- Chakraborty, S., Newton, A.C. (2011). Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathology*, 60, 2–14. doi:10.1111/j.1365-3059.2010.02411.x
- Challis, G.L. (2008). Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology*, 154, 1555–1569. doi:10.1099/mic.0.2008/018523-0
- Chandler, D., Davidson, G., Grant, W.P., Greaves, J., Tatchell, G.M. (2008). Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 275–283. doi:10.1016/j.tifs.2007.12.009
- Chang, Y.-R., Lee, D.J. (2012). Coagulation–membrane filtration of *Chlorella vulgaris* at different growth phases. *Drying Technology*, 30(11-12), 1317–1322. doi:10.1080/07373937.2012.662710
- Chen, H., Chen, Z., Zhang, Y., Zhu, W. (2014). Identification of antifungal peptides from *Bacillus subtilis* BS-918. *Analytical Letters*, 47, 2891–2899. doi:10.1080/00032719.2014.928882
- Chen, L., Heng, J., Qin, S., Bian, K. (2018). A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight. *PLoS ONE*, 13(6), e0198560. doi:10.1371/journal.pone.0198560
- Chen, L., Shi, H., Heng, J., Wang, D., Bian, K. (2019). Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2. *Microbiological Research*, 218, 41–48. doi:10.1016/j.micres.2018.10.002
- Chen, L., Wang, N., Wang, X., Hu, J., Wang, S. (2010). Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10. *Bioresource Technology*, 101, 8822–8827. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.054
- Chen, X., Zhang, Y., Fu, X., Li, Y., Wang, Q. (2016). Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. *Postharvest Biology and Technology*, 115, 113–121. doi:10.1016/j.postharvbio.2015.12.021
- Chen, X.H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W.R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P.R., Vater, J., Süßmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., Borriss, R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, 25(9), 1007–1014. doi:10.1038/nbt1325
- Chen, Y., Liu, S.A., Mou, H., Ma, Y., Li, M., Hu, X. (2017). Characterization of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus licheniformis* MB01 from marine sediments. *Frontiers in Microbiology*, 8, 871. doi:10.3389/fmicb.2017.00871
- Chernin, L., Chet, I. (2002). Microbial enzymes in biocontrol of plant pathogens and pests. U: Burns, R.G., Dick, R.P. (editori), *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*, str. 171–225. Marcel Dekker, New York, SAD.
- Cheryan, M. (1986). *Ultrafiltration Handbook*. Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Basel, Švajcarska.
- Choudhary, D.K., Johri, B.N. (2009). Interactions of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, 164, 493–513. doi:10.1016/j.micres.2008.08.007

- Chowdhury, S.P., Hartmann, A., Gao, X., Borriss, R. (2015a). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–11. doi:10.3389/fmicb.2015.00780
- Chowdhury, S.P., Dietel, K., Rändler, M., Schmid, M., Junge, H., Borriss, R., Hartmann, A., Grosch, R. (2013). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community. *PLoS One* 8(7), e68818. doi:10.1371/journal.pone.0068818
- Chowdhury, S.P., Uhl, J., Grosch, R., Alquéres, S., Pittroff, S., Dietel, K., Schmitt-Kopplin, P., Borriss, R., Hartmann, A. (2015b). Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 subsp. *plantarum* colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defence responses towards the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28, 984–995. doi:10.1094/MPMI-03-15-0066-R
- Chung, K.Y., Brewster, M.A., Belfort, G. (1993). Dean vortices with wall flux in a curved channel membrane system. 4. Effect of vortices on permeation fluxes of suspensions in microporous membranes. *Journal of Membrane Sciences*, 81(1-2), 139-150.
- Cochrane, S.A., Vederas, J.C. (2016). Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates. *Medicinal Research Reviews*, 36(1), 4–31. doi:10.1002/med.21321
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka, E.A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951–4959. doi:10.1128/AEM.71.9.4951–4959.2005
- Copping, L.G., Menn, J.J. (2000). Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56, 651-676. doi:10.1002/1526-4998(200008)56:8<651::AID-PS201>3.0.CO;2-U
- Coutte, F., Niehren, J., Dhali, D., John, M., Versari, C., Jacques, P. (2015). Modeling leucine's metabolic pathway and knockout prediction improving the production of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Journal*, 10, 1216–1234. doi:10.1002/biot.201400541
- Cui, Z.F. (1993). Experimental investigation on enhancement of crossflow ultrafiltration with air sparging. U: Patterson, R. (editor), *Proceedings of 3rd international conference on effective membrane processes - new perspectives*, 237-246. Mech. Eng. Pub. Ltd, London, Velika Britanija.
- Cui, Z.F., Bellara, S.R., Homewood, P. (1997). Airlift cross-flow membrane filtration – a feasibility study with dextran ultrafiltration. *Journal of Membrane Sciences*, 128, 83-91. doi:10.1016/S0376-7388(96)00280-3
- Cui, Z.F., Wright, K.I.T. (1994). Gas–liquid two phase flow ultrafiltration of BSA and dextran solutions. *Journal of Membrane Sciences*, 90(1-2), 183-189. doi:10.1016/0376-7388(94)80045-6
- Cui, Z.F., Wright, K.I.T. (1996). Flux enhancements with gas sparging in downwards crossflow ultrafiltration: performances and mechanisms. *Journal of Membrane Sciences*, 117(1-2), 109-116. doi:10.1016/0376-7388(96)00040-3
- Czaja, K., Góralczyk, K., Struciński, P., Hernik, A., Korcz, W., Minorczyk, M., Łyczewska, M., Ludwicki, J.K. (2015). Biopesticides - towards increased consumer safety in the European Union. *Pest Management Science*, 71, 3-6. doi:10.1002/ps.3829
- da Silva Vasconcellos, F.C., de Oliveira, A.G., Lopes-Santos, L., de Oliveira Beranger, a.P., Torres Cely, M.V., Simionato, A.S., Pistori, J.F., Spago, F.R., de Mello, J.C.P., San Martin, J.A.B., de Jesus Andrade, C.G.T., Andrade, G. (2014). Evaluation of antibiotic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Agricultural Sciences*, 5, 71-76. doi:10.4236/as.2014.51008

- da Silva, G.P., Mack, M., Contiero, J. (2009). Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27, 30-39. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.07.006
- Damalas, C.A., Koutroubas, S.D. (2018). Current status and recent developments in biopesticide use. *Agriculture*, 8(13), 1-6. doi:10.3390/agriculture8010013
- Dane, F., Shaw, J.J. (1996). Survival and persistence of bioluminescent *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on host and non-host plants in the field environment. *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 73–80.
- de Castro, J.S., Nguyen, L.D., Seppala, J. (2014). Bioconversion of commercial and waste glycerol into value-added polyhydroxyalkanoates by bacterial strains. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 6(6), 337-345. doi:10.4172/1948-5948.1000165
- de Faria, A.F., Stéfani, D., Vaz, B.G., Silva, Í.S., Garcia, J.S., Eberlin, M.N., Grossman, M.J., Alves, O.L., Durrant, L.R. (2011a). Purification and structural characterization of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis* LSFM-05 grown on raw glycerol. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38, 863-871. doi:10.1007/s10295-011-0980-1
- de Faria, A.F., Teodoro-Martinez, D.S., de Oliveira Barbosa, G.N., Vaz, B.G., Silva, Í.S., Garcia, J.S., Tótola, M.R., Eberlin, M.N., Grossman, M., Alves, O.L., Durrant, L.R. (2011b). Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. *Process Biochemistry*, 46, 1951-1957. doi:10.1016/j.procbio.2011.07.001
- De Filippi, S., Groulx, E., Megalla, M., Mohamed, R., Avis, T.J. (2018). Fungal competitors affect production of antimicrobial lipopeptides in *Bacillus subtilis* strain B9–5. *Journal of Chemical Ecology*, 44, 374–383. doi:10.1007/s10886-018-0938-0
- de Oliveira, A.G., Murate, L.S., Spago, F.R., de Paula Lopes, L., de Oliveira Beranger, J.P., Martin, J.A.B.S., Nogueira, M.A., de Mello, J.C.P., de Jesus Andrade, C.G.T., Andrade, G. (2011). Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biological Control*, 56, 125–131. doi:10.1016/j.biocontrol.2010.10.008
- de Oliveira, A.G., Spago, F.R., Simionato, A.S., Navarro, M.O., da Silva, C.S., Barazetti, A.R., Cely, M.V., Tischer, C.A., San Martin, J.A., de Jesus Andrade, C.G., Novello, C.R., Mello, J.C., Andrade, G. (2016). Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 113. doi:10.3389/fmicb.2016.00113
- de Sousa, M., Dantas, I.T., Felix, A.K.N., de Sant'Ana, H.B., Melo, V.M.M., Gonçalves, L.R.B. (2014). Crude glycerol from biodiesel industry as substrate for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(2), 295-301. doi:10.1590/S1516-89132014000200019
- Deng, Q., Wang, W., Sun, L., Wang, Y., Liao, J., Xu, D., Liu, Y., Ye, R., Gooneratne, R. (2017). A sensitive method for simultaneous quantitative determination of surfactin and iturin by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 179–191. doi:10.1007/s00216-016-9984-z
- Deivamani, M., Muthamilan, M. (2015). Efficacy of biocontrol agents, plant extracts and organic amendments against black rot of cabbage caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Journal of Innovative Agriculture*, 2, 1-9.
- Deleu, M., Lorent, J., Lins, L., Basseur, R., Braun, N., El Kirat, K., Nylander, T., Dufrêne, Y.F., Mingeot-Leclercq, M.P. (2013). Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1828, 801–815. doi:10.1016/j.bbame.2012.11.007
- Deleu, M., Paquot, M., Nylander, T. (2008). Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophysical Journal*, 94(7), 2667–2679. doi:10.1529/biophysj.107.114090

- Dempsey, A.H., Chandler, W.A. (1963). Disinfectant treatments for freshly harvested pepper seeds. *Plant Disease Reporter*, 47, 325-327.
- Deravel, J., Lemiere, S., Coutte, F., Krier, F., Van Hese, N., Bechet, M., Jacques, P. (2014). Mycosubtilin and surfactin are efficient, low ecotoxicity molecules for the biocontrol of lettuce downy mildew. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 6255–6264. doi:10.1007/s00253-014-5663-1
- Derradji, A.F., Bernabeu-Madico, A., Taha, S., Dorange, G. (2000). The effect of a static mixer on the ultrafiltration of a two-phase flow. *Desalination*, 128, 223-230. doi:10.1016/S0011-9164(00)00037-0
- Dhali, D., Coutte, F., Arias, A.A., Auger, S., Bidnenko, V., Chataigné, G., Lalk, M., Niehren, J., de Sousa, J., Versari, C., Jacques, P. (2017). Genetic engineering of the branched fatty acid metabolic pathway of *Bacillus subtilis* for the overproduction of surfactin C14 isoform. *Biotechnology Journal*, 12(7), 1600574. doi:10.1002/biot.201600574
- Dharmadi, Y., Murarka, A., Gonzalez, R. (2006). Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, 94, 821–829. doi:10.1002/bit.21025
- Diab, S., Bashan, Y., Okon, Y. (1982b). Studies on infection with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial scab of pepper in Israel. *Phytoparasitica*, 10, 183-191.
- Diab, S., Bashan, Y., Okon, Y., Henis, Y. (1982a). Effects of relative humidity on bacterial scab caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper. *Phytopathology*, 72, 1257-1260.
- Dietel, K., Beator, B., Budiharjo, A., Fan, B., Borris, R. (2013). Bacterial traits involved in colonization of *Arabidopsis thaliana* roots by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *The Plant Pathology Journal*, 29, 59–66. doi:10.5423/PPJ.OA.10.2012.0155
- Dodić, J., Grahovac, J. (2013). *Industrijska mikrobiologija: praktikum*. Tehnološki fakultet Novi Sad, Novi Sad, Srbija.
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C.L., Wisniewski, M.E. (1992). Biological control of postharvest diseases: a promising alternative to the use of synthetic fungicides. *Phytoparasitica*, 20, 1495–1503.
- Dunlap, A.C., Kim, S., Kwon, S., Rooney, P.A. (2015). Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 2104–2109. doi:10.1099/ijs.0.000226
- Dunlap, C.A., Bowman, M.J., Schisler, D.A. (2013). Genomic analysis and secondary metabolite production in *Bacillus amyloliquefaciens* AS 43.3: A biocontrol antagonist of *Fusarium* head blight. *Biological Control*, 64, 166–175. doi:10.1016/j.biocontrol.2012.11.002
- Dunlap, C.A., Kim, S.J., Kwon, S.W., Rooney, A.P. (2015). Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(7), 2104–2109. doi:10.1099/ijs.0.000226
- Dunlap, C.A., Kim, S.J., Kwon, S.W., Rooney, A.P. (2016). *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzaicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3), 1212–1217. doi:10.1099/ijssem.0.000858
- Dunlap, C.A., Schisler, D.A., Bowman, M.J., Rooney, A.P. (2015). Genomic analysis of *Bacillus subtilis* OH 131.1 and co-culturing with *Cryptococcus flavescens* for control of *Fusarium* head blight. *Plant Gene*, 2, 1–9. doi:10.1016/j.plgene.2015.03.002

- Elanchezhiyan, K., Keerthana, U., Nagendran, K., Prabhukarthikeyan, S.R., Prabakar, K., Raguchander, T., Karthikeyan, G. (2018). Multifaceted benefits of *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB24 in the management of wilt disease in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 103, 92–101. doi:10.1016/j.pmpp.2018.05.008
- Emerenini, E.C., Afolabi, O.R., Okolie, P.I., Akintokun, A.K. (2014). *In vitro* studies on antimicrobial activities of lactic acid bacteria isolated from fresh vegetables for biocontrol of tomato pathogens. *British Microbiology Research Journal*, 4, 351-359.
- Emmert, E.A.B., Handelsman, J. (1999). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 171, 1-9.
- Encheva-Malinova, M., Stoyanova, M., Avramova, H., Pavlova, Y., Gocheva, B., Ivanova, I., Moncheva, P. (2014). Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28, 721-727. doi:10.1080/13102818.2014.947066
- Encheva-Malinova, M., Vancheva, T., Badzhinerov, N., Koleva, V., Tishkov, S., Bogatzevska, N., Moncheva, P. (2015). Antimicrobial activity of Antarctic streptomycetes against pepper bacterial spot causing agents. First National Conference of Biotechnology, Annuaire de l'Université de Sofia "St. Kliment Ohridski", Faculte de Biologie, Sofia, Bugarska, str. 216-222.
- EPPO (1996). Data Sheets on Quarantine Pests - *Xanthomonas vesicatoria*. Prepared by CABI and EPPO for the EU under contract 90/399003.
- EPPO (2013). PM 7/110 (1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 43(1), 7–20. doi:10.1111/epp.12018
- EPPO (2018). Data sheets on quarantine pests *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. (<https://gd.eppo.int/datasheets/>)
- Erlacher, A., Cardinale, M., Grosch, R., Grube, M., Berg, G. (2014). The impact of the pathogen *Rhizoctonia solani* and its beneficial counterpart *Bacillus amyloliquefaciens* on the indigenous lettuce microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 5, 175. doi:10.3389/fmicb.2014.00175
- Eshita, S.M., Roberto, N.H., Beale, J.M., Mamiya, B.M., Workman, R.F. (1995). Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: Isolations, structures, and antifungal activities of the congeners. *The Journal of Antibiotics*, 48(11), 1240–1247.
- Etchegaray, A., de Castro Bueno, C., de Melo, I.S., Tsai, S.M., Fiore, M.F., Silva-Stenico, M.E., de Moraes, L.A., Teschke, O. (2008). Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. *Archives of Microbiology*, 190, 611–622. doi:10.1007/s00203-008-0409-z
- Fan, B., Carvalhais, L.C., Becker, A., Fedoseyenko, D., von Wirén, N., Borriss, R. (2012). Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *BMC Microbiology*, 12, 116. doi:10.1186/1471-2180-12-116
- Fan, B., Chen, X.H., Budiharjo, A., Bleiss, W., Vater, J., Borriss, R. (2011). Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*, 151, 303–311. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.12.022
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2491. doi:10.3389/fmicb.2018.02491
- Fan, R., Ebrahimi, M., Quitmann, H., Czermak, P. (2015). Lactic acid production in a membrane bioreactor system with thermophilic *Bacillus coagulans*: Fouling analysis of the

- used ceramic membranes. *Separation Science and Technology*, 50, 2177–2189. doi:10.1080/01496395.2015.1031401
- Farace, G., Fernandez, O., Jacquens, L., Coutte, F., Krier, F., Jacques, P., Clément, C., Ait Barka, E., Jacquard, C., Dorey, S. (2015). Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Molecular Plant Pathology*, 16(2), 177–187. doi:10.1111/mpp.12170
- Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., Brandão, G.C., da Silva, E.G.P., Portugal, L.A., dos Reis, P.S., Souza, A.S., dos Santos, W.N.L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597, 179-186. doi:10.1016/j.aca.2007.07.011
- Finnigan, S.M., Howell, J.A. (1989). The effect of pulsatile flow on ultrafiltration fluxes in a baffled tubular membrane system. *Chemical Engineering Research and Design*, 67(3), 278-282.
- Fira, Dj., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44-55. doi:10.1016/j.jbiotec.2018.07.044
- Flaherty, J.E., Jones, J.B., Harbaugh, B.K., Somodi, G.C., Jackson, L.E. (2000). Control of bacterial spot of tomato in the greenhouse and field with H-mutant bacteriophages. *HortScience*, 35, 882-884. doi:10.21273/HORTSCI.35.5.882
- Földes, T., Bánhegyi, I., Herpai, Z., Varga, L., Szigeti, J. (2000). Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and *in vitro* screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 840-846.
- Fontenelle, A.D.B., Guzzo, S.D., Lucon, C.M.M., Harakava, R. (2011). Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. *Crop Protection*, 30, 1492-1500. doi:10.1016/j.cropro.2011.07.019
- Fouladitajar, A., Ashtiani, F.Z., Rezaei, H., Haghmoradi, A., Kargari, A. (2014). Gas sparging to enhance permeate flux and reduce fouling resistances in cross flow microfiltration. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(2), 624-632. doi:10.1016/j.jiec.2013.05.025.
- Gales, M.E.J., Julian, E.C., Kroner, R.C. (1966). Method for quantitative determination of total phosphorus in water. *Journal of the American Water Works Association*, 58(10), 1363-1368.
- Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J., Zhang, Y. (2017). Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 105, 27–39. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.11.007
- Garcia-Gutierrez, L., Zerrouh, H., Romero, D., Cubero, J., Vicente, A., Perez- Garcia, A. (2013). The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate and salicylic acid dependent defence responses. *Microbial Biotechnology*, 6, 264–274. doi:10.1111/1751-7915.12028
- Garlapati, V.K., Shankar, U., Budhiraja, A. (2016). Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. *Biotechnology Reports*, 9, 9-14. doi:10.1016/j.btre.2015.11.002
- Gerhardson, B. (2002). Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*, 20, 338–343. doi:10.1016/S0167-7799(02)02021-8
- Ghaffour, N., Jassim, R., Khir, T. (2004). Flux enhancement by using helical baffles in ultrafiltration of suspended solids. *Desalination*, 167, 201-207. doi:10.1016/j.desal.2004.06.129

- Ghanem, A., Lemenand, T., Della Valle, D., Peerhossaini, H. (2014). Static mixers: Mechanisms, applications, and characterization methods – A review. *Chemical Engineering Research and Design*, 92, 205–228. doi:10.1016/j.cherd.2013.07.013
- Ghribi, D., Ellouze-Chaabouni, S. (2011). Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. *Biotechnology Research International*, 2011, 653–654. doi:10.4061/2011/653654
- Gomaa, E.Z. (2013). Antimicrobial activity of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain M104 grown on whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(2), 259-268. doi:10.1590/S1516-89132013000200011
- Gong, M., Wang, J., Zhang, J., Yang, H., Lu, X., Pei, Y., Cheng, J. (2006). Study of the antifungal ability of *Bacillus subtilis* strain PY-1 *in vitro* and identification of its antifungal substance (iturin A). *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 38(4), 233–240. doi:10.1111/j.1745-7270.2006.00157.x
- Gonzalez-Pajuelo, M., Meynial-Salles, I., Mendes, F., Andrade, J.C., Vasconcelos, I., Soucaille, P. (2005). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. *Metabolic Engineering*, 7, 329–336. doi:10.1016/j.ymben.2005.06.001
- Goode, M.J., Sasser, M. (1980). Prevention - the key to controlling bacterial speck and bacterial speck of tomato. *Plant Disease*, 64, 831-834.
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., Mari, M. (2017). Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiology*, 64, 219-225. doi:10.1016/j.fm.2017.01.006
- Gouda, M.K., Swellam, A.E., Omar, S.H. (2001). Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, 156, 201–207. doi:10.1078/0944-5013-00104
- Grady, E.N., MacDonald, J., Ho, M.T., Weselowski, B., McDowell, T., Solomon, O., Renaud, J., Yuan, Z.-C. (2019). Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. *BMC Microbiology*, 19, 5. doi:10.1186/s12866-018-1380-8
- Grahovac, M. (2014). Biološko suzbijanje *Colletotrichum* spp. parazita uskladištenih plodova jabuke. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Srbija.
- Grahovac, M., Inđić, D., Tanović, B., Lazić, S., Vuković, S., Hrustić, J., Gvozdenac, S. (2011). Integralna zaštita jabuka od prouzrokovala truleži u skladištima. *Pesticidi i fitomedicina*, 26(4), 289-299.
- Grahovac, M., Budakov, B., Stojšin, V., Bagi, F., Tanović, B. (2016). Antibakterijska aktivnost etarskih ulja na *Xanthomonas euvesicatoria*. XV simpozijum o zaštiti bilja, 28. novembar – 2. decembar 2016., Zlatibor, Srbija, str. 93.
- Griffin, K., Gambley, C., Brown, P., Li, Y. (2017). Copper-tolerance in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas* spp. and the control of diseases associated with these pathogens in tomato and pepper. A systematic literature review. *Crop Protection*, 96, 144-150. doi:10.1016/j.cropro.2017.02.008
- Gu, Q., Yang, Y., Yuan, Q., Shi, G., Wu, L., Lou, Z., Huo, R., Wu, H., Borriss, R., Gao, X. (2017). Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant-pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83, e01075-17. doi:10.1128/AEM.01075-17
- Guan, K., Liu, Y., Yin, X., Zhu, W., Chu, Y., Peng, C., Lv, M., Sun, Q., Rao, P., Wu, J. (2017). Influence of operation conditions on cake structure in dead-end membrane filtration: Monte Carlo simulations and a force model. *Chemical Engineering Research and Design*, 124, 124–133. doi:10.1016/j.cherd.2017.06.008

- Guell, C., Czekaj, P., Davis, R.H. (1999). Microfiltration of protein mixtures and the effects of yeast on membrane fouling. *Journal of Membrane Sciences*, 155(1), 113-122. doi:10.1016/S0376-7388(98)00305-6
- Guerra, A., Jonsson, G., Rasmussen, A., Waagner Nielsen, E., Edelsten, D. (1997). Low cross-flow velocity microfiltration of skim milk for removal of bacterial spores. *International Dairy Journal*, 7(12), 849-861. doi:10.1016/S0958-6946(98)00009-0
- Guo, Q., Dong, W., Li, S., Lu, X., Wang, P., Zhang, X., Wang, Y., Ma, P. (2014). Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. *Microbiological Research*, 169, 533–540. doi:10.1016/j.micres.2013.12.001
- Guo, R.J., Wang, J.Q., Li, S.D., Jing, Y.L., Gao, Y.H., Sun, R.L. (2018). A *Bacillus velezensis* strain and its application with multifunctions in suppressing disease occurrence, promoting plant growth and drought resistance. Patent application number CH201810017581.8
- Gupta, B.B., Howell, J.A., Wu, D., Field, R.W. (1995). A helical baffle for cross-flow microfiltration. *Journal of Membrane Science*, 102, 31-42. doi:10.1016/0376-7388(94)00241
- Gupta, B.S., Hasan, S., Hashim, M.A., Cui, Z.F. (2005). Effects of colloidal fouling and gas sparging on microfiltration of yeast suspension. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 27, 407-413. doi:10.1007/s00449-005-0012-5
- Gurjar, J., Sengupta, B. (2015). Production of surfactin from rice mill polishing residue by submerged fermentation using *Bacillus subtilis* MTCC 2423. *Bioresource Technology*, 189, 243–249. doi:10.1016/j.biortech.2015.04.013
- Han, Y., Li, X., Guo, Y., Sun, W., Zhang, Q. (2018). Co-production of multiple antimicrobial compounds by *Bacillus amyloliquefaciens* WY047, a strain with broad-spectrum activity. *Transactions of Tianjin University*, 24, 160–171. doi:10.1007/s12209-017-0097-3
- Harwood, C.R., Stephenson, K. (1999). *Bacillus*. U: Flickinger, M.C., Drew, S.W. (editors), *Encyclopedia of bioprocess technology: Fermentation, biocatalysis, and bioseparation*, str. 244-260. John Wiley & Sons, Inc, New York, SAD.
- Hassan, E.O., Zyton, M.A. (2017). Management of bacterial spot of pepper caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *American Journal of Bioscience and Bioengineering*, 5(1), 41-49. doi:10.11648/j.bio.20170501.17
- Hata, E.M., Sijam, K., Ahmad, Z.A.M., Yusof, M.T., Azman, N.A. (2015). *In vitro* antimicrobial assay of actinomycetes in rice against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* and as potential plant growth promoter. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58, 821-832. doi:10.1590/S1516-89132015060263
- Heerklotz, H., Seelig, J. (2007). Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *European Biophysics Journal*, 36(4–5), 305–314. doi:10.1007/s00249-006-0091-5
- Henkel, M., Geissler, M., Weggenmann, F., Hausmann, R. (2017). Production of microbial biosurfactants: status quo of rhamnolipid and surfactin towards large-scale production. *Biotechnology Journal*, 12, 1600561. doi:10.1002/biot.201600561
- Henry, G., Deleu, M., Jourdan, E., Thonart, P., Ongena, M. (2011). The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses. *Cellular Microbiology*, 13, 1824–1837. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01664.x
- Herlich, K. (1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virdžinija, SAD.
- Hiradate, S., Yoshida, S., Sugie, H., Yada, H., Fujii, Y. (2002). Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry*, 61(6), 693–698. doi:10.1016/S0031-9422(02)00365-5

- Hofemeister, J., Conrad, B., Adler, B., Hofemeister, B., Feesche, J., Kucheryava, N., Steinborn, G., Franke, P., Grammel, N., Zwintscher, A. (2004). Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide-and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. *Molecular Genetics and Genomics*, 272(4), 363–378. doi:10.1007/s00438-004-1056-y
- Hofstein, R., Friedlander, B., Chalutz, E., Droby, S. (1994). Large scale production and pilot testing of biocontrol agents of postharvest diseases. U: Wilson, C.L., Wisniewski, M. (ediori), *Biological control of postharvest diseases - theory and practice*, str. 89-100. CRC Press, Boca Raton, FL, SAD,
- Holdich, R.G., Zhang, G.M. (1992). Crossflow microfiltration incorporating rotational fluid flow. *Chemical Engineering Research and Design*, 70, 527-536.
- Hong, H.A., To, E., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Ricca, E., Cutting, S.M. (2009). Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. *Research in Microbiology*, 160, 375-379. doi:10.1016/j.resmic.2009.06.006
- Honma, M., Tanaka, K., Konno, K., Tsuge, K., Okuno, T., Hashimoto, M. (2012). Termination of the structural confusion between plipastatin A1 and fengycin IX. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(12), 3793–3798. doi:10.1016/j.bmc.2012.04.040
- Hsu, Y.L., Wu, W.T. (2002). A novel approach for scaling-up a fermentation system. *Biochemical Engineering Journal*, 11, 123–130. doi:10.1016/s1369-703x(02)00016-5
- Huang, L., Qiu-Cheng, L., Hou, Y., Li, G-Q., Yang, J., Li, D., Ye, J.R. (2017). *Bacillus velezensis* strain HYEB5-6 as a potential biocontrol agent against anthracnose on *Euonymus japonicas*. *Biocontrol Science and Technology*, 27(5), 636-653. doi:10.1080/09583157.2017.1319910
- Hugouvieux, V., Barber, C.E., Daniels, M.J. (1998). Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: a system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 537–543.
- Huisman, I.H., Trägårdh, C. (1999). Particle transport in crossflow microfiltration – I. Effects of hydrodynamics and diffusion. *Chemical Engineering Science*, 54, 271–280. doi:10.1016/S0009-2509(98)00222-X
- Humphrey, A. (1998). Shake flasks to fermentor: what have we learned? *Biotechnology Progress*, 14, 3–7.
- Hwang, K.-J., Chen, L. (2010). Effect of air-sparging on the cross-flow microfiltration of microbe/protein bio-suspension. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 41, 564–569. doi:10.1016/j.jtice.2009.12.005
- Hwang, K.-J., Cheng, Y.-H., Tung, K.-L. (2003). Modeling of cross-flow microfiltration of fine particle/macromolecule binary suspension. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 36(12), 1488-1497.
- Hwang, K.-J., Hsu, C.-E. (2009). Effect of gas–liquid flow pattern on air-sparged cross-flow microfiltration of yeast suspension. *Chemical Engineering Journal*, 151(1–3), 160-167. doi:10.1016/j.cej.2009.02.009
- Hwang, K.-J., Hwang, S.-J. (2006). The purification of protein in cross-flow microfiltration of microbe/protein mixtures. *Separation and Purification Technology*, 51(3), 416-423. doi:10.1016/j.seppur.2006.03.008
- Hwang, K.-J., Lin, L.-W. (2005). Separation of protein from microbe/protein binary suspension using a cross-flow microfiltration. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 38(11), 894-902. doi:10.1252/jcej.38.894
- Hwang, K.-J., Tsai, M.-H. (2014). Cross-flow microfiltration of *Bacillus subtilis* broths under various culture times. *Separation Science and Technology*, 49, 803–810. doi:10.1080/01496395.2013.871037

- Hwang, K.-J., Wang, C.-Y. (2012). Microfiltration characteristics of *Bacillus subtilis* fermentation broths. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43, 347–353. doi:10.1016/j.jtice.2011.12.009
- Hwang, K.J., Wu, S.F. (2009). Effects of air-sparging on the filtration flux and cake properties in cross-flow microfiltration of size-distributed fine particles. *Separation Science and Technology*, 44(15), 3485-3505. doi:10.1080/01496390903183345
- Hwang, K.J., Wu, Y.J. (2008). Flux enhancement and cake formation in air-sparged cross-flow microfiltration. *Chemical Engineering Journal*, 139(2), 296-303. doi:10.1016/j.cej.2007.08.006
- Hwang, K.J., Wu, Y.J. (2008). Flux enhancement and cake formation in air-sparged cross-flow microfiltration. *Chemical Engineering Journal*, 139(2), 296-303. doi:10.1016/j.cej.2007.08.006
- Hwang, K.-J., Yu, Y.-H., Lu, W.-M. (2001). Cross-flow microfiltration of submicron microbial suspension. *Journal of Membrane Science*, 194, 229–243. doi:10.1016/S0376-7388(01)00547-6
- Ilić, Đ., Mijailović, S. (2014). Regresiona analiza parametara u procesu unapređenja odlučivanja. *Trendovi u poslovanju*, 2, 25-32. doi:10.5937/TrendPos1402025I
- Imasaka, T., Kanekuni, N., So, H., Yoshino, S. (1989a). Gas–liquid two-phase cross-flow filtration by ceramic membrane modules. *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, 15, 638-644.
- Imasaka, T., Kanekuni, N., So, H., Yoshino, S. (1989b). Cross-flow filtration of methane fermentation broth by ceramic membranes. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 68(3), 200-206.
- Ippolito, A., El-Ghaouth, A., Wilson, C.L., Wisniewski, M.A. (2000). Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology*, 19, 265–272.
- Issazadeh, K., Rad, S.K., Zarrabi, S., Rahimibashar, M.R. (2012). Antagonism of *Bacillus* species against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 1615-1620. doi:10.5897/AJMR12.075
- Jana, A., Ghosh, S., Majumdar, S. (2018). Energy efficient harvesting of *Arthrospira* sp. using ceramic membranes: analyzing the effect of membrane pore size and incorporation of flocculant as fouling control strategy. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93, 1085–1096. doi:10.1002/jctb.5466
- Jasim, B., Sreelakshmi, K., Mathew, J., Radhakrishnan, E. (2016). Surfactin, iturin, and fengycin biosynthesis by endophytic *Bacillus* sp. from *Bacopa monnieri*. *Microbial Ecology*, 72, 106–119. doi:10.1007/s00248-016-0753-5
- Javadi, N., Ashtiani, F.Z., Fouladitajar, A., Zenooz, A.M. (2014). Experimental studies and statistical analysis of membrane fouling behavior and performance in microfiltration of microalgae by a gas sparging assisted process. *Bioresource Technology*, 162, 350-357. doi:10.1016/j.biortech.2014.03.160
- Jeffrey, M.A., Peakock, J.A., Sobey, I.J., Bellhouse, B.J. (1981). Gel layer-limited hemofiltration rates can be increased by vortex mixing. *Clinical and Experimental Dialysis and Apheresis*, 5(4), 373-380.
- Jha, S.S., Joshia, S.J., Geetha, S.J. (2016). Lipopeptide production by *Bacillus subtilis* R1 and its possible applications. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 955–964. doi:10.1016/j.bjm.2016.07.006
- Ji, P., Campbell, H.L., Kloepper, J.W., Jones, J.B., Suslow, T.V., Wilson, M. (2006). Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control*, 36, 358–367. doi:10.1016/j.biocontrol.2005.09.003

- Jia, K., Gao, Y.H., Huang, X.Q., Guo, R.J., Li, S.D. (2015). Rhizosphere inhibition of cucumber fusarium wilt by different surfactin excreting strains of *Bacillus subtilis*. The Plant Pathology Journal, 31, 140–151. doi:10.5423/PPJ.OA.10.2014.0113
- Jiang, C.-H., Liao, M.-J., Wang, H.-K., Zheng, M.-Z., Xu, J.-J., Guo, J.-H. (2018). *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea*. Biological Control, 126, 147–157. doi:10.1016/j.biocontrol.2018.07.017
- Jiang, C.-H., Wu, F., Yu, Z.-Y., Xie, P., Ke, H.-J., Li, H.-W., Yu, Y.-Y., Guo, J.-H. (2015). Study on screening and antagonistic mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* 54 against bacterial fruit blotch (BFB) caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Microbiological Research, 170, 95–104. doi:10.1016/j.micres.2014.08.009
- Jokić, A. (2010). Modelovanje "cross-flow" mikrofiltracije suspenzija kvasca primenom koncepta neuronskih mreža i postupka odzivne površine. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Novi Sad, Novi Sad, Srbija.
- Jokić, A., Zavargo, Z., Šereš, Z., Tekić, M. (2010). The effect of turbulence promoter on cross-flow microfiltration of yeast suspensions: A response surface methodology approach. Journal of Membrane Science, 350(1–2), 269-278. doi:10.1016/j.memsci.2009.12.037
- Jokić, A., Zavargo, Z., Šereš, Z., Tekić, M. (2010). The effect of turbulence promoter on cross-flow microfiltration of yeast suspensions: A response surface methodology approach. Journal of Membrane Science, 350(1-2), 269-278. doi:10.1016/j.memsci.2009.12.037
- Jones, J.B., Vallad, G.E., Iriarte, F.B., Obradović, A., Wernsing, M.H., Jackson, L.E., Balogh, B., Hong, J.C., Momol, M.T. (2012). Considerations for using bacteriophages for plant disease control. Bacteriophage, 2(4), 208-214. doi:10.4161/bact.23857
- Jönsson, A.S., Trägårdh, G. (1990). Ultrafiltration applications. Desalination, 77, 135-179.
- Jonsson, G., Johansen, P.L. (1989). Selectivity of ultrafiltration membranes. Indo-ECC Membrane Workshop, Department of Science & Technology, New Delhi, Indija.
- Kaki, A.A., Chaouche, N.K., Dehimat, L., Milet, A., Youcef-Ali, M., Ongena, M., Thonart, P. (2013). Biocontrol and plant growth promotion characterization of *Bacillus* species isolated from *Calendula officinalis* rhizosphere. Indian Journal of Microbiology, 53(4), 447–452. doi:10.1007/s12088-013-0395-y
- Kaleem, N., Iqbal, M., Jamil, A. (2000). Production of antimicrobial agents by *Bacillus subtilis* through fermentation of molasses. Pakistan Journal of Biological Sciences, 3, 1326-1329. doi:10.3923/pjbs.2000.1326.1329
- Kannan, N.M., Abhiramy, Rajvanshi, P. (2014). Efficacy of a probiotic *Lactobacillus* as a biocontrol agent and plant growth promoting bacteria by controlling *Xanthomonas campestris* infection in chilli plant. International Journal of advances in Pharmacy, Biology and Chemistry, 3, 1016-1027.
- Kanjanamaneesathian, M., Wiwattanapatapee, R., Rotniam, W., Pengnoo, A., Wongpetkhiew, W., Tanmala, V. (2013). Application of a suspension concentrate formulation of *Bacillus velezensis* to control root rot of hydroponically-grown vegetables. New Zealand Plant Protection, 66, 229–234. doi:10.5176/2251-2489_BioTech13.83
- Kloepper, J., Ryu, C., Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology, 94, 1259–1266. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259
- Kocić-Tanackov, S., Dimić, G. (2013). Gljive i mikotoksini – kontaminanti hrane. Hemijska industrija, 67(4), 639–653. doi:10.2298/HEMIND120927108K
- Kocks, C.G., Zadocks, J.C. (1996). Cabbage refuse piles as sources of inoculum for black rot epidemics. Plant Disease, 80, 789-792.
- Köhl, J., Postma, J., Nicot, P., Ruocco, M., Blum, B. (2011). Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. Biological Control, 57, 1–12. doi:10.1016/j.biocontrol.2010.12.004

- Kosaric, N., Gray, N., Cairns, W. (1987). Biotechnology and the surfactant industry. *Biosurfactants and Biotechnology*, 25, 1–19.
- Koseoglu, S.S., Rhee, K.C., Lusas, E.W. (1991). Membrane separations and application in cereal processing. *Cereales Foods World*, 36, 376-382.
- Koumoutsis, A., Chen, X.-H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., Borriss, R. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, 186(4), 1084–1096. doi:10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004
- Krebs, B., Höding, B., Kübart, S. Workie, M.A., Junge, H., Schmiedeknecht, G., Grosch, R., Bochow, H., Hevesi, M. (1998). Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 105, 181–197.
- Kröber, M., Wibberg, D., Grosch, R., Eikmeyer, F., Verwaaijen, B., Chowdhury, S.P., Hartmann, A., Pühler, A., Schlüter, A. (2014). Effect of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the microbial community in the rhizosphere of lettuce under field conditions analyzed by whole metagenome sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 5, 252. doi:10.3389/fmicb.2014.00252
- Krstić, D. M., Tekić, M. N., Carić, M. D., Milanović, S. D. (2004). Static turbulence promoter in cross-flow microfiltration of skim milk. *Desalination*, 163(1-3), 297-309. doi:10.1016/S0011-9164(04)90203-2
- Krstić, D.M. (2003). Poboljšanje „cross-flow“ mikrofiltracije upotrebom statičkog mešača kao promotora turbulencije. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Novi Sad, Novi Sad, Srbija.
- Krueger, C.L., Radetski, C.M., Bendia, A.G., Oliveira, I.M., Castro-Silva, M.A., Rambo, C.R., Antonio, R.V., Lima, A.O.S. (2012). Bioconversion of cassava starch by-product into *Bacillus* and related bacteria polyhydroxyalkanoates. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15. doi:10.2225/vol15-issue3-fulltext-6
- Kumar, P., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K. (2012). *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, 167, 493-499. doi:10.1016/j.micres.2012.05.002
- Kumar, S., Singh, A. (2015). Biopesticides: present status and the future prospects. *Journal of Fertilizers & Pesticides*, 6(2), 1-2. doi:10.4172/2471-2728.1000e129
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870-1874. doi:10.1093/molbev/msw054
- Laborie, S., Cabassud, C. (1996). Influence d'un cisaillement à l'air sur le transfert de matière dans les fibres creuses d'ultrafiltration pour la production d'eau potable. Colloque Université Industrie, Toulouse, France.
- Laureti, L., Song, L., Huang, S., Corre, C., Leblond, P., Challis, G.L., Aigle, B. (2011). Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108, 6258–6263. doi:10.1073/pnas.1019077108
- Leclère, V., Béchet, M., Adam, A., Guez, J.-S., Wathélet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., Jacques, P. (2005). Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4577–4584. doi:10.1128/AEM.71.8.4577-4584.2005
- Leclère, V., Marti, R., Béchet, M., Fickers, P., Jacques, P. (2006). The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface active properties. *Archives of Microbiology*, 186, 475–483. doi:10.1007/s00203-006-0163-z

- Lee, D.-H., Jeong, I.-J., Kim, K.-J.. (2018). A desirability function method for optimizing mean and variability of multiple responses using a posterior preference articulation approach. *Quality and Reliability Engineering International*, 34(3), 360-376. doi:10.1002/qre.2258
- Lee, H.H., Park, J., Lim, J.Y., Kim, H., Choi, G.J., Kim, J.-C., Seo, Y.-S. (2015). Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* G341, a strain with a broad inhibitory spectrum against plant pathogens. *Journal of Biotechnology*, 211, 97–98. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.07.005
- Leoneti, A.B., Aragão-Leoneti, V., de Oliveira, S.V.W.G. (2012). Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable Energy*, 45, 138-145. doi:10.1016/j.renene.2012.02.032
- Lević, J. (2008). Vrste roda *Fusarium* u oblasti poljoprivrede, veterinarske i humane medicine. Institut za kukuruz „Zemun Polje“ i Društvo genetičara Srbije, Beograd, Srbija.
- Li, C., Lesnik, K.L., Liu, H. (2013). Microbial conversion of waste glycerol from biodiesel production into value-added products. *Energies*, 6, 4739-4768. doi:10.3390/en6094739
- Lim, S.M., Yoon, M.-Y., Choi, G.J., Choi, Y.H., Jang, K.S., Shin, T.S., Park, H.W., Yu, N.H., Kim, Y.H., Kim, J.-C. (2017). Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. *The Plant Pathology Journal*, 33(5), 488-498. doi:10.5423/PPJ.OA.04.2017.0073
- Lindsay, W.L. (1979). Chemical equilibria in soils. John Wiley & Sons, Inc., New York, SAD.
- Liu, J., Zhou, T. He, D., Li, X.-Z., Wu, H., Liu, W., Gao, X. (2011). Functions of lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 20, 43–52. doi:10.1159/000323501
- Liu, J.F., Yang, J., Yang, S.Z., Ye, R.Q., Mu, B.Z. (2012). Effects of different amino acids in culture media on surfactin variants produced by *Bacillus subtilis* TD7. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 2091–2100. doi:10.1007/s1201 0-012-9636-5
- Liu, K., Garrett, C., Fadamiro, H., Kloepper, J.W. (2016). Induction of systemic resistance in Chinese cabbage against black rot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control*, 99, 8–13. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.04.007
- Liu, X., Ren, B., Chen, M., Wang, H., Kokare, C.R., Zhou, X., Wang, J., Dai, H., Song, F., Liu, M., Wang, J., Wang, S., Zhang, L. (2010). Production and characterization of a group of bioemulsifiers from the marine *Bacillus velezensis* strain H3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 1881–1893. doi:10.1007/s00253-010-2653-9
- Luo, C., Liu, X., Zhou, X., Guo, J., Truong, J., Wang, X., Zhou, H., Li, X., Chen, Z. (2015b). Unusual biosynthesis and structure of locillomycins from *Bacillus subtilis* 916. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 6601–6609. doi:10.1128/AEM.01639-15.
- Luo, C., Liu, X., Zhou, H., Wang, X., Chen, Z. (2015a). Nonribosomal peptide synthase gene clusters for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* 916 and their phenotypic functions. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 422– 431. doi:10.1128/AEM.02921-14.
- Ma, Z., Wang, N., Hu, J., Wang, S. (2012). Isolation and characterization of a new iturinic lipopeptide, mojavensin a produced by a marine-derived bacterium *Bacillus mojavensis* B0621A. *The Journal of Antibiotics*, 65(6), 317–322. doi:10.1038/ja.2012.19
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kwon, S.W., Sa, T.M. (2010). *Bacillus methylotrophicus* sp. nov, a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(10), 2490–2495. doi:10.1099/ijs.0.015487-0
- Maget-Dana, R., Harnois, I., Ptak, M. (1989). Interactions of the lipopeptide antifungal iturin A with lipids in mixed monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 981(2), 309–314.
- Mandenius, C.-F., Brundin, A. (2008). Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnology Progress*, 24, 1191-1203. doi:10.1021/bp.67

- Marzban, R., Saberi, F., Shirazi, M.M.A. (2016). Microfiltration and ultrafiltration of *Bacillus thuringiensis* fermentation broth: membrane performance and spore crystal recovery approaches. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33(4), 783–791. doi:10.1590/0104-6632.20160334s20140215
- Massomo, S.M.S., Mabagala, R.B., Swai, I.S., Hockenhull, J., Mortensen, C.N. (2004a). Evaluation of varietal resistance in cabbage against the black rot pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Tanzania. *Crop Protection*, 23, 315–325. doi:10.1016/j.cropro.2003.09.001
- Massomo, S.M.S., Mortensen, C.N., Mabagala, R.B., Newman, M.A., Hockenhull, J. (2004b). Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. *Journal of Phytopathology*, 152(2), 98–105. doi:10.1111/j.1439-0434.2003.00808.x
- Maubois, J.L., Mocquot, G. (1971). Préparation de fromage à partir de “pré-fromage liquid” obtenu par ultrafiltration du lait. *Le lait*, 50(508), 495-533.
- McHughen, A., Wager, R. (2010). Popular misconceptions: agricultural biotechnology. *New Biotechnology*, 27, 724–728. doi:10.1016/j.nbt.2010.03.006
- McInnes, T.B., Gitaitis, R.D., McCarter, S.M., Jaworski, C.A., Phatak, S.C. (1988). Airborne dispersal of bacteria in tomato and pepper transplant fields. *Plant Disease*, 72, 575-579.
- McLaughlin, R.J., Wilson, C.L., Chalutz, E., Kurtzman, W.F., Osman, S.F. (1990). Characterization and reclassification of yeasts used for biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3583–3586.
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15, 589–594. doi:10.1016/j.gde.2005.09.006
- Meena, K.R., Tandon, T., Sharma, A., Kanwar, S.S. (2018). Lipopeptide antibiotic production by *Bacillus velezensis* KLP2016. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(03), 91-98. doi:10.7324/JAPS.2018.8313
- Mejri, S., Siah, A., Coutte, F., Magnin-Robert, M., Randoux, B., Tisserant, B., Krier, F., Jacques, P., Reignault, P., Halama, P. (2018). Biocontrol of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 29822–29833. doi:10.1007/s11356-017-9241-9
- Meng, Q., Hao, J.J. (2017). Optimizing the application of *Bacillus velezensis* BAC03 in controlling the disease caused by *Streptomyces scabies*. *BioControl*, 62, 535–544. doi:10.1007/s10526-017-9799-7
- Meng, Q., Jiang, H., Hao, J.J. (2016). Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth. *Biological Control*, 98, 18–26. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.03.010
- Meng, Q.X., Hanson, L.E., Douches, D., Hao, J.J. (2013). Managing scab diseases of potato and radish caused by *Streptomyces* spp. using *Bacillus amyloliquefaciens* BAC03 and other biomaterials. *Biological Control*, 67, 373–379. doi:10.1016/j.biocontrol.2013.09.009
- Meng, Q.X., Jiang, H.H., Hanson, L.E., Hao, J.J. (2012). Characterizing a novel strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BAC03 for potential biological control application. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 1165–1175. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05420.x
- Mercer, R.T., Latorse M.P. (2003). Fungicidal properties of the active ingredient – fenamidone. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 56(3), 465-476.
- Mercier, M., Delorme, C. (1996). Influence d'un écoulement diphasique gaz/liquide sur les performances de la filtration tangentielle. *Colloque Université Industrie, Toulouse, Francuska*.
- Mercier, M., Fonade, C., Lafforgue-Delorme, C. (1995). Influence of the flow regime on the efficiency of a gas-liquid two-phase medium filtration. *Biotechnology Techniques*, 9(12), 853–858. doi:10.1007/BF00158535

Mercier, M., Fonade, C., Lafforque-Delorme, C. (1997). How slug flow can enhance the ultrafiltration flux in mineral tubular membranes. *Journal of Membrane Sciences*, 128(1), 103-113. doi:10.1016/S0376-7388(96)00317-1

Mercier-Bonin, M., Fonade, C. (2002). Air-sparged microfiltration of enzyme/yeast mixtures: determination of optimal conditions for enzyme recovery. *Desalination*, 148(1-3), 171-176. doi:10.1016/S0011-9164(02)00673-2

Mercier-Bonin, M., Gésan-Guiziu, G., Fonade, C. (2003). Application of gas/liquid two-phase flows during cross flow microfiltration of skimmed milk under constant transmembrane pressure conditions. *Journal of Membrane Sciences*, 218(1-2), 93-105.

Mercier-Bonin, M., Lagane, C., Fonade, C. (2000). Influence of a gas/liquid two-phase flow on the ultrafiltration and microfiltration performances: case of a ceramic flat sheet membrane. *Journal of Membrane Sciences*, 180(1), 93-102. doi:10.1016/S0376-7388(00)00520-2

Mew, T., Natural, M. (1993). Management of *Xanthomonas* diseases. U: Swings, J.G., Civerolo, E.L. (editori), *Xanthomonas*, str. 341–362. Chapman & Hall, London, Velika Britanija.

Michelsen, C.F., Watrous, J., Glaring, M.A., Kersten, R., Koyama, N., Dorrestein, P.C., Stougaard, P. (2015). Nonribosomal peptides, key biocontrol components for *Pseudomonas fluorescens* In5, isolated from a greenlandic suppressive soil. *mBio*, 6(2), e00079–15. doi:10.1128/mBio.00079-15

Mikulášek, P., Pospíšil, P., Dolecek, P., Cakl, J. (2002). Gas–liquid two-phase flow in microfiltration mineral tubular membranes: relationship between flux enhancement and hydrodynamic parameters. *Desalination*, 146(1-3), 103-109. doi:10.1016/S0011-9164(02)00498-8

Milazzo, M.F., Spina, F., Vinci, A., Espro, C., Bart, J.C.J. (2013). *Brassica* biodiesels: past, present and future. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 18, 350–389. doi:10.1016/j.rser.2012.09.033. as

Milijašević, S., Rekanović, E., Todorović, B., Stepanović, M. (2006). Efikasnost bakarnih preparata u suzbijanju *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, prouzrokovaca bakterijske pegavosti lišća paprika. *Pesticidi i fitomedicina*, 21, 305-310.

Milijašević-Marčić, S., Todorović, V., Stanojević, O., Berić, T., Stanković, S., Todorović, B., Potočnik, I. (2018). Antagonistic potential of *Bacillus* spp. isolates against bacterial pathogens of tomato and fungal pathogen of pepper. *Pesticides and Phytomedicine*, 33(1), 9–18. doi:10.2298/PIF1801009M

Ministarstvo poljoprivrede, Uprava za zaštitu bilja – Lista registrovanih proizvoda za zaštitu bilja, oktobar 2017. godine

https://www.uzb.minpolj.gov.rs/attachments/252_Lista_SZZB_01maj2019.pdf

Minsavage, G.V., Canteros, B.I., Stall, R.E. (1990). Plasmid-mediated resistance to streptomycin in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 80, 719-723.

Mishra, S., Arora, N.K. (2012). Evaluation of rhizospheric *Pseudomonas* and *Bacillus* as biocontrol tool for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 28, 693–702. doi:10.1007/s11274-011-0865-5

Mnif, I., Ghribi, D. (2015). Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Peptide Science*, 104, 129–147. doi:10.1002/bip.22630

Moghannem, S.A.M., Farag, M.M.S., Shehab, A.M., Azab, M.S. (2018). Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 452–462. doi:10.1016/j.bjm.2017.05.012

- Monteiro, L., Mariano, R.D.R., Souto-Maior, A.M. (2005). Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 48, 23-29. .doi:10.1590/S1516-89132005000100004
- Moraes, L.P., Alegre, R.M., Brito, P.N. (2012). Optimisation of poly(γ -glutamic acid) production by *Bacillus velezensis* NRRL B – 23189 in liquid fermentation with molasses as the carbon source without addition of glutamic acid. International Review of Chemical Engineering, 4(6), 618-623.
- Moreno, P., Yañez, C., Cardozo, N.S.M., Escalante, H., Combariza, M.Y., Guzman, C. (2015). Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. New Biotechnology, 32(6), 682-689. doi:10.1016/j.nbt.2015.04.003
- Moreno-Velandia, C.A., Izquierdo-García, L.F., Ongena, M., Kloepper, J.W., Cotes, A.M. (2019). Soil sterilization, pathogen and antagonist concentration affect biological control of *Fusarium* wilt of cape gooseberry by *Bacillus velezensis* Bs006. Plant and Soil, 435, 39–55. doi:10.1007/s11104-018-3866-4
- Mororó, R.R., Borges, C.P., Kronemberger, de Araujo Kronemberger, F. (2018). New modules for membrane bioreactors: Improving fouling control. Chemical Engineering Research and Design, 136, 295–303. doi:10.1016/j.cherd.2018.05.035
- Mota, M., Teixeira, J.A., Yelshin, A. (2002). Influence of cell-shape on the cake resistance in dead-end and cross-flow filtrations. Separation and Purification Technology, 27, 137–144. doi:10.1016/S1383-5866(01)00202-7
- Mousa, W.K., Shearer, C.R., Limay-Rios, V., Zhou, T., Raizada, M.N. (2015). Bacterial endophytes from wild maize suppress *Fusarium graminearum* in modern maize and inhibit mycotoxin accumulation. Frontiers in Plant Science, 6, 805. doi:10.3389/fpls.2015.00805
- Moyne, A., Shelby, R., Cleveland, T.E., Tuzun, S. (2001). Bacillomycin D: An iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. Journal of Applied Microbiology, 90(4), 622–629. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01290.x
- Mu, Y., Tend, H., Zhang, D., Wang, W., Xiu, Z. (2006). Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. Biotechnology Letters, 28, 1755–1759. doi:10.1007/s10529-006-9154-z
- Mukherjee, A., Das, K. (2005). Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. FEMS Microbiology Ecology, 54, 479–489. doi:10.1016/j.femsec.2005.06.003
- Nagata, N., Herouvis, K.J., Dziejwski, D.M., Belfort, G. (1989). Cross-flow membrane microfiltration of a bacterial fermentation broth. Biotechnology and Bioengineering, 34(4), 447-466. doi:10.1002/bit.260340405
- Najmi, Z., Ebrahimipour, G., Franzetti, A., Banat, I.M. (2018). *In situ* downstream strategies for cost-effective bio/surfactant recovery. Biotechnology and Applied Biochemistry, 65(4), 523-532. doi:10.1002/bab.1641
- Nakamura, C.E., Whited, G.M. (2003). Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. Current Opinion in Biotechnology, 14, 454–459. doi:10.1016/j.copbio.2003.08.005
- Nakanish, K., Tadokoro, T., Matsuno, R. (1987). On the specific resistance of cakes of microorganisms. Chemical Engineering Communications, 62, 187–201. doi:10.1080/00986448708912059
- Nam, M.H., Park, M.S., Kim, H.G., Yoo, S.J. (2009). Biological control of strawberry *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* using *Bacillus velezensis* BS87 and RK1 formulation. Journal of Microbiology and Biotechnology, 19, 520–524. doi:10.4014/jmb.0805.333

- Nega, E., Ulrich, R., Werner, S., Jahn, M. (2003). Hot water treatment of vegetable seed—an alternative seed treatment method to control seed borne pathogens in organic farming. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 110(3), 220–234.
- Nelson, R., Wiesner-Hanks, T., Wisser, R., Balint-Kurti, P. (2018). Navigating complexity to breed disease-resistant crops. *Nature reviews Genetics*, 19, 21–33. doi:10.1038/nrg.2017.82
- Ngatia, L., Taylor, R. (2018). Phosphorus eutrophication and mitigation strategies. U: Zhang, T. (editor), *Phosphorus - recovery and recycling*, str. 45-61. InTech Open, London, Velika Britanija. doi:10.5772/intechopen.79173
- Nihorimbere, V., Cawoy, H., Seyer, A., Brunelle, A., Thonart, P., Ongena, M. (2012). Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiology Ecology*, 29, 176–191. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01208.x
- Nikodinovic, J., Barrow, K.D., Chuck, J.A. (2003). High yield preparation of genomic DNA from *Streptomyces*. *BioTechniques*, 35, 932-934. doi:10.2144/03355bm05
- Nikolić, I., Ivanović, Ž., Blagojević, J., Živković, S., Popović, T. (2013). Antibacterial activities of some *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic bacteria. *Zaštita Bilja*, 64, 189-197.
- Nitschke, M., Pastore, G.M. (2006). Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, 97, 336–341. doi:10.1016/j.biortech.2005.02.044
- Obradovic, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Janse, J.D., Arsenijevic, M., Jones, J.B., Minsavage, G.V., Wang, J.F. (2004). Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 110(3), 285-292. doi:10.1023/B:EJPP.0000019797.27952.1d
- OECD/FAO (2017). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2017-2026*. OECD Publishing, Paris, Francuska.
- Ohno, A., Ano, T., Shoda, M. (1995). Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 47, 209–214.
- Ongena, M., Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115–125. doi:10.1016/j.tim.2007.12.009
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.L., Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4), 1084–1090. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x
- Ortuño, N., Castillo, J.A., Miranda, C., Claros, M., Soto, X. (2016). The use of secondary metabolites extracted from *Trichoderma* for plant growth promotion in the Andean highlands. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 32, 366–375. doi:10.1017/S1742170516000302
- Pal, K.K., McSpadden Gardener, B. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. doi:10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Palazzini, J., Ramirez, M., Torres, A., Chulze, S. (2007). Potential biocontrol agents for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Crop Protection*, 26, 1702–1710. doi:10.1016/j.cropro.2007.03.004
- Palazzini, J.M., Dunlap, C.A., Bowman, M.J., Chulze, S.N. (2016). *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiological Research*, 192, 30–36. doi:10.1016/j.micres.2016.06.002
- Pan, H.Q., Li, Q.L., Hu, J.C. (2017). The complete genome sequence of *Bacillus velezensis* 9912D reveals its biocontrol mechanism as a novel commercial biological fungicide agent. *Journal of Biotechnology*, 247, 25–28. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.02.022

- Paredes-Sabja, D., Setlow, P., Sarker, M.R. (2011). Germination of spores of *Bacillales* and *Clostridiales* species: mechanisms and proteins involved. *Trends in Microbiology*, 19(2), 85-94. doi:10.1016/j.tim.2010.10.004
- Patel, H., Tscheka, C., Edwards, K., Karlsson, G., Heerklotz, H. (2011). All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from *Bacillus subtilis* QST713. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808(8), 2000–2008. doi:10.1016/j.bbamem.2011.04.008
- Pathak, K.V., Keharia, H., Gupta, K., Thakur, S.S., Balaram, P. (2012). Lipopeptides from the banyan endophyte, *Bacillus subtilis* K1: Mass spectrometric characterization of a library of fengycins. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 23(10), 1716–1728. doi:10.1007/s13361-012-0437-4
- Peighami-Ashnaei, S., Sharifi-Tehrani, A., Ahmadzadeh, M., Behboudi, K. (2009). Interaction of different media on production and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* P-35 and *Bacillus subtilis* B-3 against grey mould of apple. *Journal of Plant Pathology*, 91, 65-70.
- Petreš, M., Grahovac, M., Hrustić, J., Mihajlović, M., Đanić, S., Budakov, D., Tanović, B. (2017). Identifikacija *Fusarium* spp. – patogena uskalištenih plodova jabuke. Zbornik rezimea radova XIV savetovanja o zaštiti bilja, 27. novembar – 13. decembar 2017., Zlatibor, Srbija, str. 31.
- Petreš, M., Grahovac, M., Obradović, A., Stanković, S., Hrustić, J., Buljovčić, M., Mihajlović, M. (2018). *Fusarium avenaceum* and *Fusarium graminearum* – capacity for mycotoxin production in rotten apple fruits. Book of abstracts of the IV International Congress “Food Technology, Quality and Safety”, 23-25. oktobar 2018., Novi Sad, Srbija, str. 161-162.
- Peypoux, F., Pommier, M.T., Marion, D., Ptak, M., Das, B.C., Michel, G. (1986). Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *The Journal of Antibiotics*, 39(5), 636–641.
- Pia Arena, M., Silvain, A., Normanno, G., Grieco, F., Drider, D., Spano, G., Fiocco, D. (2016). Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 7, 464. doi:10.3389/fmicb.2016.00464
- Plaza, G., Chojniak, J., Rudnicka, K., Paraszkiwicz, K., Bernat, P. (2015). Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: Genes and products identification. *Journal of Applied Microbiology*, 119, 1023–1034. doi:10.1111/jam.12893
- Plaza, G.A., Król, E., Pacwa-Płociniczak, M., Piotrowska-Seget, Z., Brigmon, L.R. (2012). Study of antifungal activity of Bacilli species cultured on agro-industrial wastes. *Acta Scientiarum Polonorum: Hortorum Cultus*, 11, 169-182.
- Plaza, G.A., Turek, A., Król, E., Szczygłowska, R. (2013). Antifungal and antibacterial properties of surfactin isolated from *Bacillus subtilis* growing on molasses. *African Journal of Microbiology Research*, 7(25), 3165-3170. doi:10.5897/AJMR2013.5565
- Pohronezny, K., Moss, M.A., Dankers, W., Schenk, J. (1990). Dispersal and management of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* during thinning of direct-seeded tomato. *Plant Disease*, 74, 800-805.
- Posada, J.A., Rincón, L.E., Cardona, C.A. (2012). Design and analysis of biorefineries based on raw glycerol: Addressing the glycerol problem. *Bioresource Technology*, 111, 282–293. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.151
- Pospišil, P., Wakeman, R.J., Hodgson, I.O.A., Mikulášek, P. (2004). Shear stress-based modelling of steady state permeate flux in microfiltration enhanced by two-phase flows. *Chemical Engineering Journal*, 97(2-3), 257-263. doi:10.1016/j.cej.2003.05.001
- Potnis, N., Timilsina, S., Strayer, A., Shantharaj, D., Barak, J.D., Paret, M.L., Vallad, G.E., Jones, J.B. (2015). Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. *Molecular Plant Pathology*, 16(9), 907–920. doi:10.1111/mpp.12244

- Priyadharshini, M., Kumar, R.S. (2016). Biodegradation of dairy wastewater using bacterial isolates. *International Journal of Modern Trends in Engineering and Science*, 3, 133-138. doi:10.2166/wst.2017.481
- Pyoung, K., Ryu, J., Kim, Y.H., Chi, Y.-T. (2010). Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin a from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 138-145. doi:10.4014/jmb.0905.05007
- Quispe, C.A.G., Coronado, C.J.R., Carvalho Jr, J.A. (2013). Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 475-493. doi:10.1016/j.rser.2013.06.017
- Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 1037-1062. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x
- Ramarathnam, R., Bo, S., Chen, Y., Fernando, W.G.D., Xuwen, G., De Kievit, T. (2007). Molecular and biochemical detection of fengycin- and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(7), 901-911. doi:10.1139/W07-049
- Reysenbach, A.L., Wickham, G.S., Pace, N.R. (1994). Phylogenetic analysis of the hyperthermophilic pink filament community in Octopus Spring, Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2113-2119.
- Ribeiro, P.L.L., Silva, G.S., Druzian, J.I. (2016). Evaluation of the effects of crude glycerol on the production and properties of novel polyhydroxyalkanoate copolymers containing high 11-hydroxyoctadecanoate by *Cupriavidus necator* IPT 029 and *Bacillus megaterium* IPT 429. *Polymers for Advanced Technologies*, 27, 542-549. doi:10.1002/pat.3725
- Roberts, P.D., Momol, M.T., Ritchie, L., Olson, S.M., Jones, J.B., Balogh, B. (2008). Evaluation of spray programs containing famoxadone plus cymoxanil, acibenzolar-S-methyl, and *Bacillus subtilis* compared to copper sprays for management of bacterial spot on tomato. *Crop Protection*, 27, 1519-1526. doi:10.1016/j.cropro.2008.06.007
- Romero, D., De, V.A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M., Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podospheera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 430-440. doi:10.1094/MPMI-20-4-0430
- Rouli, L., Merhej, V., Fournier, P.E., Raoult, D. (2015). The bacterial pangenome as a new tool for analysing pathogenic bacteria. *New Microbes and New Infections*, 7, 72-85. doi:10.1016/j.nmni.2015.06.005
- Ruiz-García, C., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I., Quesada, E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 191-195. doi:10.1099/ijs.0.63310-0
- Sadhasivam, S., Shanmugam, P., Yun, K. (2010). Biosynthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces hygroscopicus* and antimicrobial activity against medically important pathogenic microorganisms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81, 358-362. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.07.036
- Saimmai, A., Rukadee, O., Sobhon, V., Maneerat, S. (2012). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* TD4 and *Pseudomonas aeruginosa* SU7 grown on crude glycerol obtained from biodiesel production plant as sole carbon source. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 71, 396-406.
- Saimmai, A., Sobhon, V., Maneerat, S. (2011). Molasses as a whole medium for biosurfactants production by *Bacillus* strains and their application. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165, 315-335. doi:10.1007/s12010-011-9253-8

- Sameh, F., Krasimir, D., Peggy, V., Frédérique, G., Guillaume, D., Philippe, J., Iordan, N. (2013). Oxygen transfer in three phase inverse fluidized bed bioreactor during biosurfactant production by *Bacillus subtilis*. *Biochemical Engineering Journal*, 76, 70–76. doi:10.1016/j.bej.2013.04.004
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M.C., Glick, B.R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92-99. doi:10.1016/j.micres.2015.11.008
- Schmiedeknecht, G., Bochow, H., Junge, H. (1998). Use of *Bacillus subtilis* biocontrol agent. II. Biological control of potato diseases. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 1998, 376–386.
- Sebbane, O. (1989). Etude de l'utilisation de promoteurs de turbulence en ultrafiltration d'huilesolubles. Ph.D. Thesis, ENSM, Nantes, Francuska.
- Secato, J.F.F., Coelho, D.F., Rosa, N.G.J., Costa, L.D.L., Tambourgi, E.B. (2016). Biosurfactant production using *Bacillus subtilis* and industrial waste as substrate. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 103-108. doi:10.3303/CET1649018
- Sever, Z., Ivić, D., Kos, T., Miličević, T. (2012). Identification of *Fusarium* species isolated from stored apple fruit in Croatia. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 63, 463-470. doi:10.2478/10004-1254-63-2012-2227
- Shafi, J., Tian, H., Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3), 446-459. doi:10.1080/13102818.2017.1286950
- Sharifi, R., Ryu, C.M. (2016). Are bacterial volatile compounds poisonous odors to a fungal pathogen *Botrytis cinerea*, alarm signals to *Arabidopsis* seedlings for eliciting induced resistance, or both? *Frontiers in Microbiology*, 7, 196. doi:10.3389/fmicb.2016.00196
- Sharma, R.R., Singh, D., Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50, 205–221. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.05.001
- Shivalingaiah, Umesh, S. (2013). *Pseudomonas fluorescens* inhibits the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen in rice. *Canadian Journal of Plant Protection*, 1, 147-153.
- Singh, G., Kumari, A., Mittal, A., Yadav, A., Aggarwal, N.K. (2013). Poly β -hydroxybutyrate production by *Bacillus subtilis* NG220 using sugar industry waste water. *BioMed Research International*, 2013. doi:10.1155/2013/952641
- Singh, N., Cheryan, M. (1997). Membrane technology in corn wet milling. *Cereals Foods World*, 42, 520-530.
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., Tripathi, C.K.M. (2017). Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2087. doi:10.3389/fmicb.2016.02087
- Smyth, T.J.P., Perfumo, A., McClean, S., Marchant, R., Banat, I.M. (2010). Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants. U: Timmis, K.N. (editor), *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, str. 3689-3704. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg, Nemačka. doi:10.1007/978-3-540-77587-4_290
- Sousa, C., Klainer, B., Lima, K., Pinto, G. (2014). Biomass production from *Bacillus* sp. RAB9 using several carbon sources. 5th Congress of the Brazilian Biotechnology Society (SBBIOTEC) 10-14th November 2013, Florianópolis, Brazil. *BMC Proceedings*, str. 172. doi:10.1186/1753-6561-8-s4-i1
- Sousa, M., Melo, V.M.M., Rodrigues, S., Sant'ana, H.B., Gonçalves, L.R.B. (2012). Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(6), 897-906. doi:10.1007/s00449-011-0674-0.

- Spadaro, D., Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 47, 39–49. doi:10.1016/j.tifs.2015.11.003
- Spadaro, D., Gullino, M.L. (2004). State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 185–194. doi:10.1016/S0168-1605(03)00380-5
- Spadaro, D., Vola, R., Piano, S., Gullino, M.L. (2002). Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 123–134. doi:10.1016/S0925-5214(01)00172-7
- Spago, F.R., Mauro, C.S.I., Oliveira, A.G., Beranger, J.P.O., Cely, M.V.T., Stanganelli, M.M., Simionato, A.S., San Martin, J.A.B., Andrade, C.G.T.J., Mello, J.C.P., Andrade, G. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas* species. *Crop Protection*, 62, 46-54. doi:10.1016/j.cropro.2014.04.011
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845-857. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x
- Stojanović, S., Gavrilović, V., Starović, M., Pavlović, S., Živković, S. (2002). Novi domaćini gljiva iz roda *Colletotrichum* u Srbiji. *Zaštita bilja*, 243, 171-179.
- Suárez-Estrella, F., Ros, M., Vargas-García, M.C., López, M.J., Moreno, J. (2014). Control of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* using agroindustrial waste-based compost. *Journal of Plant Pathology*, 96(2), 243-248. doi:10.4454/JPP.V96I2.028
- Sumithra, Swamy, A.V.N., Basava Rao, V.V. (2016). Experimental studies on lactose biodegradation of dairy effluent by *K. lactis*. *International Journal of Advanced Research*, 4, 2196-2200. doi:10.21474/IJAR01
- Sur, H.W., Cui, Z.F. (2005). Enhancement of microfiltration of yeast suspensions using gas sparging - effect of feed conditions. *Separation and Purification Technology*, 41, 313-319.
- Syed-Ab-Rahman, S.F., Carvalhais, L.C., Chua, E., Xiao, Y., Wass, T.J., Schenk, P.M. (2018). Identification of soil bacterial isolates suppressing different *Phytophthora* spp. and promoting plant growth. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1502. doi:10.3389/fpls.2018.01502.2018
- Sylla, J., Alsanius, B.W., Krüger, E., Reineke, A., Strohmeier, S., Wohanka, W. (2013). Leaf microbiota of strawberries as affected by biological control agents. *Phytopathology*, 103, 1001–1011. doi:10.1094/PHYTO-01-13-0014-R
- Tahir, H.A.S., Gu, Q., Wu, H., Niu, Y., Huo, R., Gao, X. (2017). *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. *Scientific Reports*, 7, 40481. doi:10.1038/srep40481
- Talboys, P.J., Owen, D.W., Healey, J.R., Withers, P.J., Jones, D.L. (2014). Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum*. *BMC Plant Biology*, 14, 51. doi:10.1186/1471-2229-14-51
- Tamura, K., Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526.
- Tan, H.W., Abdul Aziz, A.R., Aroua, M.K. (2013). Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 118–127. doi:10.1016/j.rser.2013.06.035
- Tanaka, T., Abe, K.-I., Asakawa, H., Yoshida, H., Nakanishi, K. (1994a). Filtration characteristics and structure of cake in crossflow filtration of bacterial suspension. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 78, 455–461. doi:10.1016/0922-338X(94)90046-9

- Tanaka, T., Abe, K.-I., Nakanishi, K. (1994b). Shear-induced arrangement of cells in cake during crossflow filtration of *Escherichia coli* cells. *Biotechnology Techniques*, 8, 57–60. doi:10.1007/BF00207634
- Tanaka, T., Kamimura, R., Fujiwara, R., Nakanishi, K. (1994c). Crossflow filtration of yeast broth cultivated in molasses. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 1094–1101. doi:10.1002/bit.260431113
- Tanaka, T., Usui, K., Kouda, K., Nakanishi, K. (1996). Filtration behaviors of rod-shaped bacterial broths in unsteady-state phase of cross-flow filtration. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 29, 973–981. doi:10.1252/jcej.29.973
- Taylor, J.D., Conway, J., Roberts, S.J., Astley, D., Vicente, J.G. (2002). Sources and origin of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica* genomes. *Phytopathology*, 92, 105–111. doi:10.1094/PHYTO.2002.92.1.105
- Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M.J., Donati, C., Medini, D., Ward, N.L., Angiuoli, S.V., Crabtree, J., Jones, A.L., Durkin, A.S., Deboy, R.T., Davidsen, T.M., Mora, M., Scarselli, M., Margarit y Ros, I., Peterson, J.D., Hauser, C.R., Sundaram, J.P., Nelson, W.C., Madupu, R., Brinkac, L.M., Dodson, R.J., Rosovitz, M.J., Sullivan, S.A., Daugherty, S.C., Haft, D.H., Selengut, J., Gwinn, M.L., Zhou, L., Zafar, N., Khouri, H., Radune, D., Dimitrov, G., Watkins, K., O'Connor, K.J., Smith, S., Utterback, T.R., White, O., Rubens, C.E., Grandi, G., Madoff, L.C., Kasper, D.L., Telford, J.L., Wessels, M.R., Rappuoli, R., Fraser, C.M. (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial "pan-genome". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 13950–13955. doi:10.1073/pnas.0506758102
- Thasana, N., Prapagdee, B., Rangkadilok, N., Sallabhan, R., Aye, S.L., Ruchirawat, S., Loprasert, S. (2010). *Bacillus subtilis* SSE4 produces subtilene a, a new lipopeptide antibiotic possessing an unusual C15 unsaturated beta-amino acid. *FEBS Letters*, 584(14), 3209–3214. doi:10.1016/j.febslet.2010.06.005
- Thimon, L., Peypoux, F., Dana Maget, R., Roux, B., Michel, G. (1992). Interactions of bioactive lipopeptides, iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 16(2), 144–151. doi:10.1111/j.1470-8744.1992.tb00218.x
- Thompson, J.C., He, B.B. (2006). Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feed stocks. *Applied Engineering in Agriculture*, 22(2), 261–265. doi:10.13031/2013.20272
- Tomasula, P.M., Mukhopadhyay, S., Datta, N., Porto-Fett, A., Call, J.E., Luchansky, J.B., Renye, J., Tunick, M. (2011). Pilot-scale crossflow-microfiltration and pasteurization to remove spores of *Bacillus anthracis* (Sterne) from milk. *Journal of Dairy Science*, 94(9), 4277–4291. doi:10.3168/jds.2010-3879.
- Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., Sampedro, I. (2018). Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1315. doi: 0.3389/fmicb.2018.01315
- Torres, M.J., Brandan, C.P., Sabaté, D.C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Audisio, M.C. (2017). Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. *Biological Control*, 105, 93–99. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.12.001
- Trias, R., Baneras, L., Montesinos, E., Badosa, E. (2008). Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology*, 11, 231–236. doi:10.2436/20.1501.01.66
- Vallad, G.E., Pernezny, K.L., Balogh, B., Wen, A., Figueiredo, J.F.L., Jones, J.B., Momol, T., Muchovej, R.M., Havranek, N., Abdallah, N., Olson, S., Roberts, P.D. (2010). Comparison of kasugamycin to traditional bactericides for the management of bacterial spot on tomato. *HortScience*, 45, 1834–1840. doi:10.21273/HORTSCI.45.12.1834

- Van den Berg, G.B., Smolders, C.A. (1992). Diffusional phenomena in membrane separation processes. *Journal of Membrane Science*, 73(2-3), 103-118. doi:10.1016/0376-7388(92)80121-Y
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse. C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 453–483.
- Vatai, G.N., Krstić, D.M., Höflinger, W., Koris, A.K., Tekić, M.N. (2007). Combining air sparging and the use of a static mixer incross-flow ultrafiltration of oil/water emulsion. *Desalination*, 204, 255-264. doi:10.1016/j.desal.2006.02.034
- Vicente, J.G., Holub, E.B. (2013). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology*, 14, 2-18. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00833.x
- Villegas-Escobar, V., Ceballos, I., Mira, J.J., Argel, L.E., Orduz Peralta, S., Romero-Tabarez, M. (2013). Fengycin C produced by *Bacillus subtilis* EA-CB0015. *Journal of Natural Products*, 76(4), 503–509. doi:10.1021/np300574v
- Visser, R., Holzapfel, W.H., Bezuidenhout, J.J., Kotze, J.M. (1986). Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 552-555.
- Vitor, G., Viriato S., Maria Pinho, N. (2003). Hydrodynamics and concentration polarization in NF/RO spiral-wound modules with ladder-type spacers. *Desalination*, 157, 395-402. doi:10.1016/S0011-9164(03)00422-3
- Wakeman, R.J. (1996). Fouling in crossflow ultra- and micro filtration. *Membrane Technology*, 70, 5-8.
- Wang, J., Guo, R., Wang, W., Ma, G., Li, S. (2018). Insight into the surfactin production of *Bacillus velezensis* B006 through metabolomics analysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 45, 1033–1044. doi:10.1007/s10295-018-2076-7
- Wang, J.Q., Wang, L.G., Guo, R.J., Ma, G.Z., Li, S.D. (2017). Optimization of culture conditions for the enhancement of surfactin production from *Bacillus subtilis* B006. *Biotechnology Bulletin*, 33, 214–221. doi:10.13560 /j.cnki.biotech.bull.1985.2017.04.028
- Wang, S., Wu, H., Qiao, J., Ma, L., Liu, J., Xia, Y., Gao, X. (2009). Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to tobacco mosaic virus by *Bacillus* spp. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(10), 1250–1258. doi:10.4014/jmb.0901.008
- Whipps, J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52, 487–511. doi:10.1093/jexbot/52.suppl_1.487
- Wijmans, J.G., Nakao, S., Van Den Berg, J.W.A., Troelstra, F.R., Smolders, C.A. (1985). Hydrodynamic resistance of concentration polarization boundary layers in ultrafiltration. *Journal of Membrane Science*, 22(1), 117-135.
- Willenbacher, J., Yeremchuk, W., Mohr, T., Syldatk, C., Hausmann, R. (2015). Enhancement of surfactin yield by improving the medium composition and fermentation process. *AMB Express*, 5, 145. doi:10.1186/s1356 8-015-0145-0
- Williams, C.J., Wakeman, R.J. (2002). Additional techniques to improve microfiltration. *Separation and Purification Technology*, 26(1), 3-18. doi:10.1016/S1383-5866(01)00112-5
- Williams, P.H. (1980). Black rot: a continuing threat to world crucifers. *Plant Disease*, 64, 736-742.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M.E. (1994). Biological control of postharvest diseases. Theory and practice. CRC Press, Boca Raton, Florida, SAD.
- Wu, G., Liu, Y., Xu, Y., Zhang, G., Shen, Q., Zhang, R. (2018). Exploring elicitors of the beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to induce plant systemic

- resistance and their interactions with plant signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5, 560–567. doi:10.1094/MPMI-11-17-0273-R
- Wulff, E.G., Mguni, C.M., Mansfeld-Giese, K., Fels, J., Lubeck, M., Hockenhull, J. (2002a). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology*, 51, 574–584. doi:10.1046/j.1365-3059.2002.00753.x
- Wulff, E.G., Mguni, C.M., Mortensen, C.N., Keswani, C.L., Hockenhull, J. (2002b). Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 317–325. doi:10.1023/A:1015671031906
- Wulff, E.G., van Vuurde, J.W.L., Hockenhull, J. (2003). The ability of the biological control agent *Bacillus subtilis*, strain BB, to colonise vegetable brassicas endophytically following seed inoculation. *Plant and Soil*, 255, 463–474.
- Xu, Z., Shao, J., Li, B., Yan, X., Shen, Q., Zhang, R. (2013). Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 808–815. doi:10.1128/AEM.02645-12
- Yamamoto, S., Shiraishi, S., Suzuki, S. (2015). Are cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 responsible for the plant defence response in strawberry against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Letters in Applied Microbiology*, 60, 379–386. doi:10.1111/lam.12382
- Yang, F., Hanna, M.A., Sun, R. (2012). Value-added uses for crude glycerol – a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*, 5(13), 1–10. doi:10.1186/1754-6834-5-13
- Yang, H., Xue, Y., Yu, X., Liu, C. (2014a). Colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* CC09 in wheat leaf and its biocontrol effect on powdery mildew disease. *Microbiology China*, 30(4), 481–488.
- Yang, L., Quan, X., Xue, B., Goodwin, P.H., Lu, S., Wang, J., Wei, D., Wu, C. (2015). Isolation and identification of *Bacillus subtilis* strain YB-05 and its antifungal substances showing antagonism against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Biological Control*, 85, 52–58. doi:10.1016/j.biocontrol.2014.12.010
- Yang, Q.Y., Jia, K., Geng, W.Y., Guo, R.J., Li, S.D. (2014b). Management of cucumber wilt disease by *Bacillus subtilis* B006 through suppression of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* in rhizosphere. *The Plant Pathology Journal*, 13, 160–166. doi:10.3923/ppj.2014.160.166
- Yang, T.W., Rao, Z.M., Zhang, X., Xu, M.J., Xu, Z.H., Yang, S.T. (2013) Fermentation of biodiesel-derived glycerol by *Bacillus amyloliquefaciens*: effects of co-substrates on 2,3-butanediol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 7651–7658. doi:10.1007/s00253-013-5048-x
- Yao, A.V., Bochow, H., Karimov, S., Boturov, U., Sanginboy, S., Sharipov, A.K. (2006). Effect of FZB 24 *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 39(4), 323–328. doi:10.1080/03235400600655347
- Yazdani, S.S., Gonzalez, R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 213–219. doi:10.1016/j.copbio.2007.05.002
- Ye, M., Tang, X., Yang, R., Zhang, H., Li, F., Tao, F., Li, F., Wang, Z. (2018). Characteristics and application of a novel species of *Bacillus*: *Bacillus velezensis*. *ACS Chemical Biology*, 13, 500–505. doi:10.1021/acscchembio.7b00874
- Yezza, A., Tyagi, R.D., Valèro, J.R., Surampalli, R.Y., Smith, J. (2004). Scale-up of biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 31, 545–552. doi:10.1007/s10295-004-0176-z

- Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L., Bertagnolli, B.L. (2002). Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(7), 955–963. doi:10.1016/S0038-0717(02)00027-5
- Yu, K., Wen, X., Bu, Q., Xia, H. (2003). Critical flux enhancements with air sparging in axial hollow fibers cross-flow microfiltration of biologically treated wastewater. *Journal of Membrane Science*, 224(1-2), 69-79. doi:10.1016/j.memsci.2003.07.001
- Zhang, H., Kim, M.S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., Farag, M.A., Ryu, C.M., Allen, R., Melo, I.S., Pare, P.W. (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*, 226, 839–851. doi:10.1007/s00425-007-0530-2
- Zhang, H.L., Hua, H.M., Pei, Y.H., Yao, X.S. (2004). Three new cytotoxic cyclic acylpeptides from marine *Bacillus* sp. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(8), 1029–1030. doi:10.1248/cpb.52.1029
- Zhang, R., Wang, S., Cui, J., Sun, G. (2008). First report of bitter rot caused by *Colletotrichum acutatum* on apple in China. *Plant Disease*, 92, 10. doi:10.1094/PDIS-92-10-1474B
- Zhang, Y., Callaway, E., Jones, J.B., Wilson, M. (2009). Visualisation of hrp gene expression in *Xanthomonas euvesicatoria* in the tomato phyllosphere. *European Journal of Plant Pathology*, 124, 379–390. doi:10.1007/s10658-008-9423-x
- Zhao, J., Li, Y., Zhang, C., Yao, Z., Zhang, L., Bie, X., Lu, F., Lu, Z. (2012). Genome shuffling of *Bacillus amyloliquefaciens* for improving antimicrobial lipopeptide production and an analysis of relative gene expression using FQ RT-PCR. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39, 889-896. doi:10.1007/s10295-012-1098-9
- Zhao, P., Xue, Y., Gao, W., Li, J., Zu, X., Fu, D., Bai, X., Zuo, Y., Hu, Z., Zhang, F. (2018). *Bacillaceae*-derived peptide antibiotics since 2000. *Peptides*, 101, 10-16. doi:10.1016/j.peptides.2017.12.018
- Zhao, P.C., Quan, C.S., Jin, L.M., Wang, L.N., Wang, J.H., Fan, S.D. (2013). Effects of critical medium components on the production of antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 exhibiting excellent biosurfactant properties. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 401–409. doi:10.1007/s11274-012-1180-5
- Zhou, C., Xu, S., Zhang, M., Chen, Y., Guan, X., Wu, S., Bai, Z. (2012). Utilization of sweet potato starch wastewater for biofertilizer production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, 168, 237-242. doi:10.2495/SI120201
- Zhou, C.H., Beltramini, J.N., Fan, Y.X., Lu, G.Q. (2008). Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. *Chemical Society Reviews*, 37, 527–549. doi:10.1039/b707343g
- Zhu, R., Ma, X., Liu, J. (2018). Optimization of γ -polyglutamic acid synthesis using response surface methodology of a newly isolated glutamate dependent *Bacillus velezensis* Z3. *International Microbiology*, 21, 143–152. doi:10.1007/s10123-018-0011-4
- Zhu, Z., Zhang, F.G., Wei, Z., Ran, W., Shen, Q.R. (2013). The usage of rice straw as a major substrate for the production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid-state fermentation. *Journal of Environmental Management*, 127, 96–102. doi:10.1016/j.jenvman.2013.04.017
- Ziemert, N., Alanjary, M., Weber, T. (2016). The evolution of genome mining in microbes – A review. *Natural Product Reports*, 33, 988–1005. doi:10.1039/C6NP00025H

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Ivana S. Pajčin
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Jovana Grahovac, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad
Naslov rada: NR	Optimizacija uslova umnožavanja i primarnog izdvajanja biomase <i>Bacillus</i> sp. za primenu u fitomedicini
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2019.
Izdavač:	autorski reprint

IZ	
Mesto i adresa: MA	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
Fizički opis rada: FO	poglavlja 7; stranica 188; slika 55; tabela 47; referenci 432; priloga 0
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Biotehnologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>Bacillus velezensis</i> , biološka kontrola, <i>Xanthomonas</i> , biotehnološka proizvodnja, optimizacija, mikrofiltracija
UDK	632.937:579.24(043.3)
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
Važna napomena: VN	-
Izvod: IZ	<p>Sve veća potreba za hranom kao posledica povećanja broja ljudi širom sveta dovela je do intenzifikacije poljoprivrednih aktivnosti usmerenih na direktnu proizvodnju hrane i hrane za životinje. U poslednjih nekoliko decenija sve više se govori o problemu prekomerne upotrebe hemijskih pesticida, što je rezultovalo degradacijom kvaliteta zemljišta, kao i sve većim zagađenjem podzemnih i površinskih voda. Osim toga, nedovoljno naučnih podataka o uticaju hemijskih jedinjenja koja ulaze u sastav pesticida na zdravlje ljudi izaziva još veći stepen zabrinutosti. Stoga se iznalaženje novih načina za kontrolu biljnih štetočina i prevenciju i tretman bolesti biljaka postavlja kao imperativ održive poljoprivredne proizvodnje, a samim tim i održivog razvoja. Jedna od alternativa koje su pokazale najveći potencijal jeste primena biopesticida, koji po svojoj najširoj definiciji predstavljaju žive organizme ili njihove proizvode koji pokazuju sposobnost suzbijanja štetočina. Kada su u pitanju mikrobiološki biopesticidi, bakterije roda <i>Bacillus</i> predstavljaju najzastupljenije mikroorganizme koji se mogu sresti u komercijalno dostupnim proizvodima. Proizvodnja mikrobioloških biopesticida, iako u konstantnom porastu, i dalje čini samo mali deo ukupnog svetskog tržišta sredstava za zaštitu</p>

bilja, najviše zbog visokih troškova i komplikovanog procesa proizvodnje ovog tipa biokontrolnih agenasa. Stoga je kao osnovni cilj istraživanja ove doktorske disertacije postavljena optimizacija uslova umnožavanja i primarnog izdvajanja biomase soja *Bacillus velezensis* sa primenom za sprečavanje pojave i širenja bakterioza povrtarskih useva koje izazivaju fitopatogene vrste roda *Xanthomonas*, koji u Republici Srbiji izazivaju velike ekonomske gubitke u proizvodnji kupusa, paprike i paradajza. Prvi korak optimizacije bioprocesa podrazumevao je odabir optimalnog izvora ugljenika i organskog izvora azota za biotehnošku proizvodnju biokontrolnih agenasa, pri čemu su najbolji rezultati dobijeni primenom glicerola i ekstrakta kvasca, što je otvorilo mogućnost ispitivanja primene sirovog glicerola iz proizvodnje biodizela kao izvora ugljenika. Nakon toga je usledilo modelovanje sastava hranljive podloge na bazi komercijalnog i sirovog glicerola u pogledu ispitivanja uticaja komponenata podloge (glicerola, ekstrakta kvasca, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i K_2HPO_4) na odabrane odzive (prečnik zona inhibicije i rezidualne koncentracije nutrijenata – glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora). Dobijeni matematički modeli posmatranih odziva, za koje je dokazano da su statistički značajni na nivou značajnosti od 95%, dalje su korišćeni za optimizaciju sastava hranljivih podloga. Optimizovan sastav hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola je sledeći: glicerol 10 g/l, ekstrakt kvasca 2,83 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g/l, K_2HPO_4 1,07 g/l i $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g/l. Sa druge strane, optimizovan sastav hranljive podloge na bazi sirovog glicerola dobija se primenom sledećih koncentracija nutrijenata: glicerol 10 g/l, K_2HPO_4 4,66 g/l i $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g/l, što ukazuje na mogućnost smanjenja troškova pripreme ove hranljive podloge zbog izostavljanja izvora azota. Validacija dobijenih matematičkih modela izvršena je eksperimentima kultivacije proizvodnog mikroorganizma u uvećanim razmerama - u Vulfovim bocama (2 l) i laboratorijskom bioreктору (3 l), čiji su rezultati pokazali zadovoljavajuću korelaciju sa modelima predviđenim vrednostima odziva bioprocesa, pri čemu su bolji rezultati dobijeni primenom hranljive podloge na bazi komercijalnog glicerola i kultivacijom proizvodnog mikroorganizma u laboratorijskom bioreктору. Unapređenje procesa unakrsne mikrofiltracije kultivacionih tečnosti dobijenih nakon kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus velezensis* na hranljivoj podlozi na bazi komercijalnog glicerola primenom različitih hidrodinamičkih metoda pokazalo je značajan potencijal primene Kenics statičkog mešača, uduvavanja vazduha i kombinacije ovih metoda za poboljšanje fluksa permeata u stacionarnom stanju. *In planta* ispitivanje

	<p>antimikrobne aktivnosti preparata na bazi <i>Bacillus velezensis</i> protiv fitopatogenih sojeva vrste <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>, koji izazivaju bakterijsku pegavost paprike, pokazalo je značajan potencijal primene bikontrolnih agenasa na bazi <i>Bacillus velezensis</i> za suzbijanje ovog oboljenja paprike. Ispitivanje šireg spektra delovanja preparata na bazi <i>Bacillus velezensis</i> pokazalo je značajan potencijal za suzbijanje oboljenja izazvanih fitopatogenim sojevima roda <i>Fusarium</i>, koji izazivaju truljenje jabuka u toku skladištenja. Rezultati proistekli iz okvira ove doktorske disertacije predstavljaju osnovu za dalje unapređenje i povećanje razmera biotehnološkog postupka proizvodnje biokontrolnih agenasa na bazi proizvodnog mikroorganizma <i>Bacillus velezensis</i>, uz predlog rešenja za iskorišćenje sirovog glicerola iz proizvodnje biodizela u biotehnološkom postupku dobijanja proizvoda sa dodatom vrednošću.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP</p>	<p>21.6.2018.</p>
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>Predsednik: dr Jelena Dodić, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>Mentor: dr Jovana Grahovac, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>Član: dr Aleksandar Jokić, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>Član: dr Mila Grahovac, docent, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p>

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Ivana S. Pajčin
Mentor: MN	Jovana Grahovac, PhD, Associate Professor, Faculty of Technology Novi Sad
Title: TI	Optimization of cultivation and separation processes for production of <i>Bacillus</i> sp. biomass intended for application in phytomedicine
Language of text: LT	Serbian (Latinic)
Language of abstract: LA	English / Serbian
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2019
Publisher: PU	Author's reprint

Publication place: PP	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia
Physical description: PD	chapters 7; pages 188; figures 55; tables 47; references 432
Scientific field SF	Technological Engineering
Scientific discipline SD	Biotechnology
Subject, Key words SKW	<i>Bacillus velezensis</i> , biological control, <i>Xanthomonas</i> , biotechnological production, optimization, microfiltration
UC	632.937:579.24(043.3)
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia
Note: N	-
Abstract: AB	<p>The raise of human population worldwide requires higher amount of available groceries, which has led to intensification of agricultural activities directed at production of food and feed. In the last few decades the problem of chemical pesticides' overuse has resulted in soil deterioration and contamination of surface and underground water reservoirs. Furthermore, insufficient scientific data concerning the chronic effect of chemicals used in pesticides on human health contribute to the global concern when it comes to pesticides' usage. Therefore finding new ways to control plant pests and to prevent or suppress plant diseases has become an imperative for sustainable agricultural production and consequently for sustainable development. One of the alternatives showing great potential is usage of biopesticides, comprising of living organisms or their products able to suppress plant pathogens. When it comes to microbial biopesticides, bacteria of the genus <i>Bacillus</i> are the most often used in commercial biocontrol products. Microbial biopesticides, although being a raising alternative, still represent only small share of the global pesticides' market, mostly due to expensive and complicated production process. Hence the main</p>

goal of the research in the framework of this PhD thesis was to optimize conditions of cultivation and separation processes for production of *Bacillus velezensis* biomass intended for application in prevention and suppression of plant diseases caused by phytopathogenic species of the genus *Xanthomonas*, which cause significant economic losses during agricultural production of cabbage, pepper and tomato in the Republic of Serbia. The first step of bioprocess optimization was to choose optimal carbon and organic nitrogen sources for biocontrol agents' production, where the best results have been achieved by using glycerol and yeast extract, which opened a new chapter of possibilities to utilize raw glycerol from biodiesel production as carbon source. After that, modeling of cultivation medium composition based on commercial and raw glycerol was performed in order to investigate the effect of cultivation medium components (glycerol, yeast extract, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and K_2HPO_4) on the selected responses (inhibition zone diameter and residual concentration of nutrients – glycerol, total nitrogen and total phosphorus). The obtained mathematical models for the selected responses, proved to be statistically significant at the significance level of 95%, were further used for optimization of cultivation media composition. Optimized composition of the cultivation medium based on commercial glycerol was: glycerol 10 g/L, yeast extract 2.83 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g/L, K_2HPO_4 1.07 g/L and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L. On the other hand, optimized composition of the cultivation medium based on raw glycerol was: glycerol 10 g/L, K_2HPO_4 4.66 g/L and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L, which has opened a possibility to reduce cost of cultivation medium preparation by excluding nitrogen sources. Validation of the obtained mathematical models was carried out by cultivating the producing microorganism at a larger scale – in Woulff bottles (2 L) and in a laboratory-scale bioreactor (3 L). Validation results were in good correlation with the model predicted values of the selected responses, where better results were achieved by using cultivation medium based on commercial glycerol and cultivation of the producing microorganism in the laboratory-scale bioreactor. Application of different hydrodynamic methods, such as Kenics static mixer, air sparging and their combination, has showed a significant potential for improvement of cross flow microfiltration of *Bacillus velezensis* cultivation broth based on commercial glycerol in terms of permeate flux enhancement. Also, significant potential of the *Bacillus velezensis* cultivation broth for suppression of phytopathogenic *Xanthomonas euvesicatoria* strains, which cause bacterial spot of pepper, has been proven during in planta experiments. Investigation of wider spectra of

	<p>antimicrobial activity expressed by preparation based on <i>Bacillus velezensis</i> cultivation broth has revealed a significant potential for suppression of <i>Fusarium</i> phytopathogenic species responsible for apple rot during storage. The results arising from the research performed in the framework of this PhD thesis represent solid basis for further improvement and scale-up of biotechnological process for production of biocontrol agents based on <i>Bacillus velezensis</i>, with a proposal for utilization of raw glycerol from biodiesel production in biotechnological production of value-added products.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>21.6.2018.</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>President: Jelena Dodić, PhD, Full Professor, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>Mentor: Jovana Grahovac, PhD, Associate Professor, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>Member: Aleksandar Jokić, PhD, Associate professor, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>Member: Mila Grahovac, PhD, Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad</p>

BIOGRAFIJA

Mast. inž. Ivana Pajčin, istraživač saradnik

Ivana Pajčin je rođena 13.11.1990. godine u Novom Sadu. Osnovnu školu „Jovan Jovanović Zmaj“, kao i Mitrovačku gimnaziju, opšti smer, završila je u Sremskoj Mitrovici sa odličnim uspehom. Tehnološki fakultet Novi Sad je upisala 2009. godine na studijskom programu Biotehnologija i studijskom području Biohemijsko inženjerstvo. Osnovne akademske studije završila je 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,88, a odbranom završnog rada pod nazivom „Bioseparacioni niz u dobijanju proizvoda najvećeg stepena čistoće“ stekla je zvanje diplomirani inženjer tehnologije. Iste godine upisala je master akademske studije, studijski program Biotehnologija, studijsko područje Biohemijsko inženjerstvo, koje je završila 2014. godine odbranom master rada pod nazivom „Adsorpcija amoksicilina na nanoporoznim česticama“, sa prosečnom ocenom 10,00, stekavši zvanje master inženjer tehnologije. Tokom osnovnih i master studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, fonda „Atanasije Stojković“ iz Sremske Mitrovice, Fonda za stipendiranje i podsticanje napredovanja darovitih studenata i mladih naučnih radnika i umetnika Univerziteta u Novom Sadu, kao i Fonda za mlade talente „Dositej Obradović“. Dobitnica je nagrada Univerziteta u Novom Sadu i nagrada Tehnološkog fakulteta Novi Sad za postignut uspeh u toku studiranja. U periodu decembar 2014. godine – novembar 2015. godine bila je angažovana u kompaniji „Koteks *Viscofan*“ radi obavljanja pripravničkog staža i osposobljavanja za samostalni rad u struci. Doktorske studije upisala je 2014. godine na Tehnološkom fakultetu Novi Sad, na studijskom programu Biotehnologija. Godine 2015. izabrana je u zvanje istraživač pripravnik, a od novembra 2015. godine počinje da radi na Tehnološkom fakultetu Novi Sad. Kao istraživač angažovana je na aktuelnom projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (TR-31002). Godine 2018. izabrana je u zvanje istraživač saradnik. U toku doktorskih studija položila je sve ispite predviđene nastavnim planom i programom sa prosečnom ocenom 10,00, i to iz sledećih predmeta: Metodologija naučno-istraživačkog rada, Odabrana poglavlja biohemije, Biomasa kao izvor energije, Bioremedijacija, Odabrana poglavlja modelovanja bioprocasa, Odabrana poglavlja optimizacije bioprocasa i Odabrana poglavlja prenosa toplote i mase.

Tokom doktorskih studija pohađala je obuku „Primena tehnika upravljanja u velikim proizvodnim sistemima“ (Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, 2015. godine) i učestvovala je u TRAIN (*Training & Research for Academic Newcomers*) programu obuke usmerenom na razvoj akademskih veština zaposlenih na fakultetima i institutima Univerziteta u Novom Sadu u okviru kog je slušala kurseve Metodologija istraživanja, naučno pisanje i prezentacija rezultata - prirodne i tehničke nauke, Preduzetničke veštine, Priprema projektnih aplikacija i menadžment projekata i Umrežavanje i timski rad (Univerzitet u Novom Sadu, 2016. godine). Takođe je bila učesnik treninga za razvoj ličnog i timskog liderstva, efektivnosti i komunikacionih veština pod nazivom „*7 Habits of Highly Effective People*“ u Bačkoj Palanci 2017. godine. Pohađala je seminar „Javno zdravstveni značaj kontrole ostataka mikotoksina u hrani“ (Društvo za ishranu Srbije, Beograd, 2018. godine). U okviru Takmičenja za najbolju studentsku ideju u okviru Erasmus+ projekta IF4TM (*Institutional framework for Development of the Third Mission of Universities in Serbia*) na nivou Univerziteta u Novom Sadu osvojila je prvu nagradu sa idejom *BioHydroFertilizer* u okviru tima *Supergirls of Science*, dok je na istom takmičenju na nacionalnom nivou osvojila treću nagradu (Beograd, 2019. godine). U sklopu Takmičenja za najbolju studentsku ideju pohađala je obuke u okviru četiri modula: Razvoj poslovnog modela, Validacija poslovnog modela, Finansiranje startapa i *Pitch* prezentacija. Osim toga, učesnik je dve COST (*European Cooperation in Science and Technology*) akcije: CA18101 SOURDOMICS (*Sourdough Biotechnology Network Towards Novel, Healthier and Sustainable Food and Bioprocesses*) i CA15110 CHARME (*Harmonising Standardisation Strategies to Increase*

Efficiency and Competitiveness of European Life-Science Research). U okviru COST akcije CA15110 CHARME učestvovala je u letnjoj trening školi CCISTS2019 – *Microbiome, Metagenome Standards, Analysis Pipelines and Reproducibility* (Istanbul, Turska, 2019. godine).

Učestvovala je u Otvorenim danima Tehnološkog fakulteta Novi Sad 2016. godine u okviru radionice „Svi za jednog, biotehnolog za sve“ i u interaktivnim radionicama „Tajna moći biotehnologa“ na 5. Festivalu nauke i obrazovanja u Novom Sadu 2013. godine, „Biotehnologija svuda... i trista čuda“ na 8. Festivalu nauke i obrazovanja u Novom Sadu 2016. godine i „Izazovi biotehnologije: od ideje do proizvoda“ na 9. Festivalu nauke i obrazovanja u Novom Sadu 2017. godine. Angažovana je u izvođenju vežbi na predmetima Tehnologija mikrobiološke biomase na osnovnim akademskim studijama, Odabrana poglavlja biotehnološke proizvodnje lekova na master akademskim studijama studijskog programa Farmaceutsko inženjerstvo i Odabrana poglavlja industrijske mikrobiologije na master akademskim studijama studijskog programa Biotehnologija. Kroz mentorski rad ostvarila je saradnju sa studentima nižih godina osnovnih akademskih studija.

U sklopu naučno-istraživačkog angažovanja prezentovanjem ili objavom radova učestvovala je na međunarodnim skupovima: *43rd International Conference of the Slovak Society of Chemical Engineering* u Tatranskoj Lomnici, Slovačka, 2016. godine, *11th Conference on Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems* u Lisabonu, Portugal, 2016. godine, *8th PSU-UNS International Conference on Engineering and Technology (ICET-2017)* u Novom Sadu, Srbija, 2017. godine, *4th International Congress "Food Technology, Quality and Safety"* u Novom Sadu, Srbija, 2018. godine, *6th International Conference "Sustainable Postharvest and Food Technologies – INOPTEP 2019"* u Kladovu, Srbija, 2019. godine i *4th International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases (Biocontrol 2019)* u Viterbu, Italija, 2019. godine. Takođe je učestvovala na skupovima nacionalnog značaja: *XII Meeting of Young Chemical Engineers* u Zagrebu, Hrvatska, 2018. godine, VI Memorijalni naučni skup iz zaštite životne sredine „Docent dr Milena Dalmacija“ u Novom Sadu, Srbija, 2018. godine, i HHH Jubilarna konferencija Procesna tehnika i energetika u poljoprivredi (RTER 2018) u Brzeću (Kopaonik), Srbija, 2018. godine. Takođe je jedan od autora radova objavljenih ili prihvaćenih za objavljivanje u časopisima *Chemical Engineering Research and Design* (kategorija M21), *Journal of Phytopathology* (kategorija M23), *Pesticides & Phytomedicine* (kategorija M24), *Food and Feed Research* (kategorija M24) i *Journal on Processing and Energy in Agriculture* (kategorija M51). Član je Udruženja za hemijsku industriju, Društva za ishranu Srbije i Udruženja mikrobiologa Srbije.