



UNIVERZITET U NOVOM SADU

TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD
NAUČNA OBLAST · Tehnološko inženjstvo
STUDIJSKI PROGRAM · Biotehnologija



Mikrobiološka precipitacija karbonata – od odabira induktora do ispitivanja bioprocenih parametara

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
dr Siniša Markov, red. prof.

Kandidat:
Olja Šovljanski, mast. inž. tehnol.

Novi Sad, 2021

UNIVERZITET U NOVOM SADU

OBRAZAC – 5a

TEHNOLOŠKI FAKULET NOVI SAD

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA¹

Vrsta rada:	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora:	Olja Šovljanski
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	dr Siniša Markov, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad
Naslov rada:	Mikrobiološka precipitacija karbonata – od odabira induktora do ispitivanja bioprocenih parametara
Jezik publikacije (pismo):	Srpski (latinica)
Fizički opis rada:	Uneti broj: 207 Stranica 8 Poglavlja 255 Referenci 29 Tabela 54 Slika 21 Priloga
Naučna oblast:	Tehnološko inženjestvo
Uža naučna oblast (naučna disciplina):	Tehnološka mikrobiologija
Ključne reči / predmetna odrednica:	bakterijski indukovana precipitacija kalcijum karbonata; matematičko modelovanje; bakterije sa biokalcifikujućim potencijalom; <i>Sporosarcina pasteurii</i> ; <i>Bacillus licheniformis</i> ;
Rezime na jeziku rada:	
U okviru ove doktorske disertacije prikazan je postupak izolovanja i selekcije bakterija sa biokalcifikujućim potencijalom, definisanih kao spirogeni i alkalorezistentni/alkalofilni predstavnici mikrobne populacije kalcitnih zemljišta iz okoline grada Novog Sada. U okviru istraživanja koja su obuhvaćena ovom disertacijom, izolovano je pet ureolitičkih bakterija koji su	

¹ Autor doktorske disertacije potpisao je i priložio sledeće Obrasce:

5b – Izjava o autorstvu;

5b – Izjava o istovetsnosti štampane i elektronske verzije i o ličnim podacima;

5r – Izjava o korišćenju.

Ove izjave se čuvaju na fakultetu u štampanom i elektronskom obliku i ne koriče se sa tezom.

<p>pomoću metode MALDI-TOF masene spektroskopije identifikovani kao <i>Bacillus muralis</i>, <i>B. lentus</i>, <i>B. simplex</i>, <i>B. firmus</i> i <i>B. licheniformis</i> (prethodno označenih po mestu uzorkovanja kao II₈, II₁₀, III₁₁, III₁₅, IV₅, redom). U svim eksperimentima, karakteristike i performanse novoizolovanih sojeva su poređene sa referentnom kulturom <i>Sporosarina pasteurii</i> DSM 33. Primenom PCR metode amplifikovan je glavni strukturni ureolitički gen (<i>ureC</i>) u genomu svih <i>Bacillus</i> izolata i referentnog soja, čime je dokazano da ispitivani sojevi imaju genetsku predispoziciju za efikasnu hidrolizu uree kao supstrata u hranljivom medijumu. Za opisane izolate dokazano je da su efikasni induktori precipitacije kalcijum karbonata (CaCO₃), te da poseduju fiziološke i morfološke predispozicije za proces bakterijski indukovane precipitacije CaCO₃ (BIPK). Ispitivanjem fizičkih karakteristika ćelije i njenih površinskih struktura (zida i membrane), uticaja ćelijske aktivnosti na pH promene tokom BIPK, kao i praćenje uloge kalcijuma u toku ciljanog procesa, konstantovano je da je uloga štapićastih bakterija višestruka, te da su, pored metaboličke aktivnosti, značajne i testirane karakteristike pojedinačnih vijabilnih ćelija. Takođe, uz praćenje kinetike ureolitičke aktivnosti i nusprocesa (pH promene i koncentracija bakterija), kao i kinetike BIPK i nusprocesa (pH promene i koncentracija kalcijumovih jona), urađeno je kinetičko modelovanje sistema sa dobrim prediktivnim kapacitetom. Strukturna karakterizacija precipitata dobijenih tokom kinetičkih studija ukazala je na visoku kristaličnost CaCO₃, sa različitom raspodelom kalcitne i vateritne faze, zavisno od vremena inkubacije i bakterijskog soja. Dodatno, izvršena je analiza 11 parametara sredine i sastava hranjive podloge u toku procesa BIPK u cilju procene robusnosti sistema, efikasnosti ciljanog procesa i odabira bakterijskog izolata sa najvećim potencijalom sa efikasan proces precipitacije. Sumarno, u okviru doktorske disertacije izolovanjem i karakterizacijom visokoefikasnih ureolitičkih bakterija sa biokalcifikujućim potencijalom i detaljnim prikazom eksperimentalnih koraka od izolovanja i selekcije do izbora najpogodnije bakterije za BIPK proces, načinjeni su dobri temelji i prvi koraci ka definisanju idejnog rešenja upotrebe BIPK procesa u inženjerske svrhe.</p>	
Datum prihvatanja teme od strane nadležnog veća:	17.07.2020.
Datum odbrane: (Popunjavanje odgovarajuća služba)	
Članovi komisije: (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	<p>Predsednik: dr Tatjana Vulić, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>Mentor: dr Siniša Markov, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>Član: dr Lato Pezo, naučni savetnik, Institut za opštu i fizičku hemiju</p> <p>Član: dr Jovana Grahovac, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>Član: dr Ana Tomić, naučni saradnik, Tehnološki fakultet Novi Sad</p>
Napomena:	/

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OF TECHNOLOGY NOVI SAD

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Olja Šovljanski
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	dr Siniša Markov, full professor, Faculty of Technology Novi Sad
Thesis title:	Microbiologically precipitation of carbonates – from isolation of inductors to investigation of bioprocess parameters
Language of text (script):	Serbian language (latin script)
Physical description:	Number of: 207 Pages 8 Chapters 255 References 29 Tables 54 Illustrations 21 Appendices
Scientific field:	Technological Engineering
Scientific subfield (scientific discipline):	Technological Microbiology
Subject, Key words:	bacterially induced calcium carbonate precipitation; mathematical modelling; bacteria with biocalcifying potential; <i>Sporosarcina pasteurii</i>; <i>Bacillus licheniformis</i>;
Abstract in English language:	Within the research involved in this PhD thesis, the procedure of isolation and selection of bacteria with biocalcifying potential, defined as sporogenic and alkaloresistant/alkalophilic representatives of the microbial population of calcite soils near Novi Sad, Serbia is presented. Five ureolytic bacteria were isolated as a potential good choice for bacterially induced precipitation of

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

5b – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

<p>CaCO₃ (BIPK) and identified by the MALDI-TOF mass spectroscopy method as <i>Bacillus muralis</i>, <i>B. lentus</i>, <i>B. simplex</i>, <i>B. firmus</i>, and <i>B. licheniformis</i> (previously marked by the sampling site as II₈, II₁₀, III₁₁, III₁₅, IV₅, respectively). In all experiments, the characteristics and performance of newly isolated strains were compared with the reference culture <i>Sporosarina pasteurii</i> DSM 33. The main structural ureolytic gene (<i>ureC</i>) in the genome of all <i>Bacillus</i> isolates and the reference strain was amplified using the PCR method, which suggest that the tested strains have a genetic predisposition for hydrolysis of urea as a substrate in a nutrient media. The selected isolates have been proven to be effective inducers of calcium carbonate (CaCO₃) precipitation and to have physiological and morphological predispositions for the BIPK process. The results of validation of the physical characteristics of the cell and its surface structures (wall and membrane), the influence of cellular activity on pH changes during BIPK, as well as monitoring the role of calcium during the target process, showed that the role of rod bacteria is not only in terms of metabolic activity but also in terms of the contribution of individual, viable cells. Furthermore, by monitoring the kinetics of ureolytic activity and by-processes (pH change and bacterial concentration), as well as the kinetics of BIPK and by-processes (pH change and calcium ion concentration), kinetic modeling of systems with good predictive capacity was performed. Structural characterization of the precipitates obtained during the kinetic studies indicated high crystallinity of CaCO₃, with different distribution of calcite and vaterite phases, depending on the incubation time and the bacterial strain. Additionally, an analysis of 11 environmental parameters and nutrient medium composition for BIPK effectivity was performed to assess the robustness of the system, the efficiency of the target process, and the selection of the bacterial isolate with the greatest potential with an efficient BIPK process. In summary, the results obtained in this PhD thesis, by isolating and characterizing highly efficient ureolytic bacteria with biocalcifying potential and detailed presentation of experimental steps from isolation to the selection of the most suitable bacteria with BIPK process, good foundations and first steps towards defining the conceptual solution of using BIPK process in engineering fields were made.</p>	
Accepted on Scientific Board on:	17.07.2020.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>President: dr Tatjana Vulić, full professor, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>Mentor: dr Siniša Markov, full professor, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>Member: dr Lato Pezo, research fellow, Insitute for General and Physical Chemistry</p> <p>Member: dr Jovana Grahovac, associate professor, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>Member: dr Ana Tomić, research associate, Faculty of Technology Novi Sad</p>
Note:	/

Zahvalnica

Spisak tabela

Tabela 1. Kristalografske karakteristike kalcijum karbonata	7
Tabela 2. Bakterije sa biokalcifikujućim potencijalom kroz različite metaboličke putanje	18
Tabela 3. Karakteristike enzima ureaze amidohidrolaze na osnovu EC broja.....	28
Tabela 4. Izolati ureolitičkih bakterija iz sedimenata i cementnih materijala	36
Tabela 5. Referentni sojevi ureolitičkih bakterija koji su korišćeni u procesima BIPK	37
Tabela 6. Klasifikacija <i>Sporosarcina pasterii</i>	38
Tabela 7. Primeri setova prajmera za detekciju ureC gena	44
Tabela 8. Primeri primene procesa BIPK	45
Tabela 9. Terminologija u matematičkom modelovanju	54
Tabela 10. Vrednosti ispitivanih faktora u Plackett-Burmanovom eksperimentalnom planu .	92
Tabela 11. Deskriptivna statistika mikromorfoloških i fizioloških osobina odabranih izolata..	98
Tabela 12. Deskriptivna statistika temperaturnih i pH profila prirodnih izolata.....	100
Tabela 13. Karakteristike ANN modela predviđanja temperaturnog i pH profila.....	104
Tabela 14. Verifikacija ANN modela temperaturnog i pH profila rasta bakterijskih izolata....	107
Tabela 15. Deskriptivna statistika procesa denitrifikacije	108
Tabela 16. Karakteristike ANN modela za proces denitrifikacije.....	109
Tabela 17. Eksperimentalna verifikacija ANN modela za proces denitrifikacije	111
Tabela 18. Identifikacija odabranih bakterijskih izolata	114
Tabela 19. Morfološke i ekološke osobine odabranih izolata	117
Tabela 20. ANN modelovanje za doprinos osobina ćelijskih ovojnica procesu BIPK.....	121
Tabela 21. Karakteristike ANN mreže za promene pH vrednosti i uloge kalcijuma u formiranju biofilma tokom BIPK.....	126
Tabela 22. Numerička verifikacija ANN modela	128

Tabela 23. Cena koštanja test i referentne hranljive podloge za produkciju biomase ureolita	135
Tabela 24. Verifikacija ANN modela	139
Tabela 25. Regresioni koeficijenti odabranih parametara u trodnevnom ureolitičkom procesu	142
Tabela 26. Regresioni koeficijenti odabranih parametara u dvonedeljnom BIPK procesu	145
Tabela 27. Karakteristike ANN mreže za skrining uslova sredine i sastava hranljive podloge	157
Tabela 28. Efikasnost precipitacije kalcijum karbonata	164
Tabela 29. Unapređene vrednosti ulaznih parametara za testirane bakterije	166

Spisak slika

Slika 1. Proces bakterijski indukovane precipitacije CaCO_3	13
Slika 2. Pojednostavljeni prikaz metaboličkih putanja koje indukuju biokalcifikaciju kod heterotrofnih bakterija	15
Slika 3. Zastupljenost metaboličkih putanja u biokalcifikaciji	16
Slika 4. Precipitati bakterija sa biokalcifikujućim potencijalom	17
Slika 5. Proces sporulacije kod bakterija	20
Slika 6. Odnos prosečnog dijametra pora i bakterijske ćelije po tipu bacilusa	23
Slika 7. BIPK posredstvom slobodnoplivajuće i biofilmske ćelije.....	26
Slika 8. Trakasti dijagram ureazne subjedinice (levo) i celog kompleksa sa aktivnim kofaktorskim centrom (desno) kod <i>S. pasteurii</i>	29
Slika 9. Predstavnici ureolitičkih bakterija sa biokalcifikujućim potencijalom iz okruženja i laboratorijskih manipulativnih tehnika	34
Slika 10. SEM snimak ćelija <i>S. pasteurii</i>	39
Slika 11. Sistem ATP generisanja kod ureolita <i>S. pasteurii</i>	41
Slika 12. Organizacija ureaznih gena kod <i>Sporosarcina</i> i <i>Bacillus</i> vrsta.....	42
Slika 13. Prikaz sukcesivnih koraka u biotehnološkom pristupu procesa BIPK	49
Slika 14. Šematski prikaz BIPK procesa posredstvom slobodnoplivajuće i biofilmske bakterijske ćelije.....	50
Slika 15. Pretraga sajta ScienceDirect po ključnim rečima za period januar 1999-avgust 2021.....	53
Slika 16. Ciklus matematičkog modelovanja	56
Slika 17. Koncept veštačke neuronske mreže	59
Slika 18. Faze eksperimentalnog rada	63
Slika 19. Izolovanje i primarna selekcija bakterija sa biokalcifikujućim potencijalom	64
Slika 20. Uzorkovanje na odabranim lokalitetima i opis mesta uzorkovanja.....	65

Slika 21. Šematski prikaz izolacije i selekcije sporogenih, alkalorezistentnih/alkalofilnih bakterija.....	66
Slika 22. Šematski prikaz koraka selekcije bakterijskih izolata.....	69
Slika 23. Prikaz metoda za ispitivanje uloge bakterijske ćelije u BIPK procesu.....	72
Slika 24. Ispitivanje stabilnosti i održivosti bakterijskih kultura.....	76
Slika 25. Korak praćenja ureolitičke aktivnosti bakterija	78
Slika 26. Praćenje BIPK procesa	79
Slika 27. Karakterizacija precipitata	81
Slika 28. Dendogram klaster analize za temperaturni profil rasta bakterijskih izolata	102
Slika 29. Dendogram klaster analize za pH profil rasta prirodnih bakterijskih izolata	102
Slika 30. Eksperimentalno dobijene i ANN predviđene vrednosti temperaturnih profila rasta bakterijskih izolata: a) I ₁ ; b) II ₁ ; c) III ₁ ; d) IV ₁	105
Slika 31. Eksperimentalno dobijene i ANN predviđene vrednosti pH profila rasta bakterijskih izolata: a) I ₁ ; b) II ₁ ; c) III ₁ ; d) IV ₁	105
Slika 32. Eksperimentalne i ANN predviđene vrednosti denitrifikujućih indikatora	110
Slika 33. Optička mikroskopija bakterijskih kolonija na Urea-CaCl ₂ agaru (uvećanje 400x; bar 2 mm; crvene strelice označavaju čvrst depozit).....	113
Slika 34. PCR amplifikacija ureC gena na lab-on-chip elektroforezi (L – standard; 1 – S. pasteurii DSM 33; 2 – Bacillus muralis; 3 – B. lentus; 4 – B. simplex; 5 – B. firmus; 6 – B. licheniformis; 7 – B. pseudofirmus DSM 8715; 8 – kontrola prajmera)	115
Slika 35. Ćelijski oblik snimljen skenirajućom elektronskom mikroskopijom a) S. pasteurii DSM 33; b) B. muralis; c) B. lentus; d) B. simplex; e) B. firmus; f) B. licheniformis	119
Slika 36. Prosečna veličina ćelija odabranih bakterijskih sojeva	120
Slika 37. ANN modelovanje: a) adhezionog potencijala; b) elektronegativnosti ćelija	123
Slika 38. ANN modelovanje za a) hidrofobnost ćelijske površine; b) permeabilnost ćelijske membrane	125
Slika 39. Eksperimentalno dobijene vrednosti uloge funkcije kalcijuma u formiranju biofilma	129

Slika 40. Vrednosti pH promena tokom inkubacije	131
Slika 41. Stepen sporulacije u TSB podlozi sa različitim pH vrednostima	133
Slika 42. Produktivnost Urea-CaCl ₂ hranljive podloge	134
Slika 43. Održivost vijabilnosti bakterijskih suspenzija (tačke označavaju eksperimentalno dobijene vrednosti; linije označavaju kinetičku predikciju sistema)	137
Slika 44. Kinetička studija: a) proces ureolize; b) pH promene; c) koncentracije bakterija (tačke označavaju ekperimentalno dobijene podatke, a linije prediktivne rezultate)	141
Slika 45. Kinetička studija: a) količine precipitata; b) pH promena; c) koncentracije kalcijuma (za b) i c) tačke označavaju eksperimentalno dobijene podatke, a linije označavaju rezultate predikcije	144
Slika 46. FT-IR analiza precipitata	146
Slika 47. XRD spektri precipitata (a – prvi dan inkubacije; b – 14. dan inkubacije).....	148
Slika 48. RAMAN spektroskopija precipitata	150
Slika 49. DTA/TGA analiza precipitata.....	151
Slika 50. SEM snimak (1000x) i uvećanje dobijenog vidnog polja (5000x) u gornjem levom uglu za precipitate nakon prvog dana inkubacije	153
Slika 51. SEM snimak (1000x) i uvećanje dobijenog vidnog polja (5000x) u gornjem levom uglu za precipitate nakon 14. dana inkubacije.....	155
Slika 52. Relativni uticaj na odziv pH vrednosti sistema	158
Slika 53. Relativni uticaj na odzive broja spora i količine uree	160
Slika 54. Relativni uticaj na odzive broja vijabilnih ćelija i količine taloga CaCO ₃	162

Sadržaj

1. UVOD	1
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	3
3. PREGLED LITERATURE	5
3.1. Kalcijum karbonat	6
3.2. Pojava kalcijum karbonata u prirodi	8
3.2.1. Abiotički faktori od značaja za stvaranje kalcijum karbonata.....	9
3.2.2. Biotički faktori od značaja za stvaranje kalcijum karbonata.....	10
3.3. Biokalcifikacija	11
3.3.1. Pojam biokalcifikacije	11
3.3.2. Bakterijski indukovana precipitaciju karbonata	12
3.3.3. Bakterije sa biokalcifikujućim potencijalom	16
3.3.4. Uloga ćelije i ekstracelularne polimerne matrice u BIPK.....	22
3.4. Ureolitička aktivnost bakterija	27
3.4.1. Urea.....	27
3.4.2. Ureaza amidohidrolaza	28
3.4.3. Ureazna metabolička aktivnost.....	29
3.4.4. Faktori koji utiču na bakterijski indukovanu precipitaciju karbonata.....	31
3.4.5. Ureolitičke bakterije sa biokalcifikujućim potencijalom.....	33
3.4.6. <i>Sporosarcina pasteurii</i> - model organizam efikasne biokalcifikacije.....	38
3.4.7. Genetička priroda ureazne aktivnosti	41
3.4.7. Biološka bezbednost upotrebe ureolitičkih bakterija u procesu BIPK	44
3.4.8. Kinetika ureolitičke aktivnosti i procesa BIPK kroz ureolizu.....	45

3.5. Biotehnološki izazovi primene procesa BIPK	49
3.6. Prediktivno modelovanje u ekološkoj mikrobiologiji.....	52
4. MATERIJALI I METODE	62
4.1. Izolovanje i primarna selekcija bakterija sa biokalcifikujućim potencijalom	64
4.1.1. Uzorkovanje.....	64
4.1.2. Izolovanje i primarna selekcija.....	65
4.1.3. Ispitivanje mikromorfoloških i fizioloških osobina izolata.....	67
4.1.4. Temperaturni i pH profil rasta izolata.....	67
4.1.5. Potencijal denitrifikacije izolata	68
4.2. Odabir bakterijskih izolata sa biokalcifikujućim potencijalom.....	69
4.2.1. Selekcija izolata	69
4.2.2. Identifikacija odabranih bakterijskih izolata	70
4.2.3. Amplifikacije <i>ureC</i> gena kod odabranih bakterijskih izolata	71
4.2.4. Ispitivanje morfoloških i ekoloških karakteristika relevantnih za BIPK proces	72
4.3. Ispitivanje uloge bakterijske ćelije odabranih izolata u procesu BIPK.....	72
4.3.1. Pokretljivost, oblik i veličina ćelije.....	73
4.3.2. Elektronegativnost bakterijskih ćelija	73
4.3.3. Hidrofobnost ćelijske površine	74
4.3.4. Permeabilnost ćelijske membrane	74
4.3.5. Potencijal adhezije ćelija i uloga kalcijuma u formiranju biofilma.....	75
4.3.6. Određivanje pH promena usled aktivnosti bakterijskih ćelija.....	76
4.4. Održivost i stabilnost bakterijskih kultura.....	76
4.4.1. Stepen sporulacije.....	77
4.4.2. Održivost bakterijskih suspenzija	77

4.4.3. Produktivnost Urea-CaCl ₂ hranljive podloge	77
4.5. Praćenje procesa ureolize i definisanje kinetičkih modela	78
4.5.1. Kinetika ureolitičke reakcije.....	78
4.5.2. Promene pH vrednosti i koncentracije bakterija u toku ureolitičke aktivnosti.....	79
4.6. Praćenje BIPK procesa i definisanje kinetičkih modela.....	79
4.6.1. Kinetika procesa bakterijski indukovane precipitacije.....	80
4.6.2. Promene koncentracije kalcijuma i pH vrednosti	80
4.7. Karakterizacija precipitata	81
4.7.1. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom.....	81
4.7.2. Rendgenska strukturna analiza	82
4.7.3. Ramanova spektroskopija.....	82
4.7.4. Diferencijalna termička i termogravimetrijska analiza.....	82
4.7.5. Skenirajuća elektronska mikroskopija.....	82
4.8. Skrining uslova sredine i sadržaja hranljive podloge u toku BIPK procesa.....	83
4.9. Matematička obrada rezultata.....	84
4.9.1. Matematička obrada rezultata izolovanja i primarne selekcija bakterija	84
4.9.2. Matematička obrada rezultata temperaturnog i pH profila rasta.....	84
4.9.3. Matematička obrada rezultata ispitivanja denitrifikujućeg potencijala bakterija ..	86
4.9.4. Matematička obrada rezultata odabira bakterija sa biokalcifikujućim potencijalom	87
4.9.5. Matematička obrada rezultata ispitivanja uloge bakterijske ćelije u BIPK procesu	88
4.9.6. Matematička obrada rezultata optimizacije MATH metode.....	89
4.9.7. Matematička obrada rezultata održivosti i stabilnosti bakterijskih suspenzija.....	90
4.9.8. Matematička obrada rezultata praćenja ureolize	90

4.9.9. Matematička obrada rezultata praćenja BIPK procesa	91
4.9.10. Matematička obrada rezultata skrininga uslova sredine i sadržaja hranljive podloge u toku BIPK procesa	91
5. REZULTATI I DISKUSIJA	95
5.1. Izolovanje i primarna selekcija bakterijskih izolata	97
5.1.1. Rezultati izolovanja.....	97
5.1.2. Rezultati temperaturnog i pH profila rasta.....	99
5.1.3. Ispitivanje potencijala denitrifikacije.....	107
5.2. Odabir bakterijskih izolata sa biokalcifikujućim potencijalom	112
5.2.1. Selekcija prirodnih izolata	112
5.2.2. Identifikacija odabranih bakterijskih izolata.....	113
5.2.3. Amplifikacije ureC gena kod odabranih bakterijskih izolata	115
5.2.4. Ispitivanje morfoloških i ekoloških karakteristika relevantnih za proces BIPK.....	116
5.3. Ispitivanje uloge bakterijske ćelije odabranih izolata u procesu BIPK	118
5.3.1. Oblik i veličina ćelije.....	118
5.3.2. Doprinosa karakteristika ćelijske površine (zida i membrane)	121
5.3.3. Uloga kalcijuma u formiranju biofilma i doprinosa pH promena tokom BIPK	126
5.4. Održivost i stabilnost bakterijske kulture odabranih izolata	132
5.4.1. Stepenu sporulacije.....	132
5.4.3. Produktivnost hranljivih medijuma.....	133
5.4.3. Održivost bakterijskih suspenzija	136
5.5. Praćenje procesa ureolize i definisanje kinetičkih modela	140
5.5.1. Kinetika hidrolize uree	140
5.5.2. Kinetika pH promena i koncentracije bakterija u toku ureolitičke aktivnosti	142
5.6. Praćenje procesa BIPK i definisanje kinetičkih modela.....	143

5.6.1. Kinetika procesa bakterijski indukovane precipitacije.....	143
5.6.2. Kinetika pH promena i koncentracije kalcijuma.....	143
5.7. Karakterizacija precipitata	146
5.8. Skrining uslova sredine i sadržaja hranljive podloge u toku BIPK.....	156
6. ZAKLJUČCI.....	167
7. LITERATURA	172
8. PRILOZI.....	186
Prilog 1. Box-Behnkenov eksperimentalni plan na tri nivoa varijacije	187
Prilog 2. Placket- Burmanov ekperimentalni plan sa 12 eksperimenata	187
Prilog 3. Fiziološke i metaboličke osobine odabranih bakterijskih izolata.....	188
Prilog 4. Elementi matrice W_1 i W_2 i vektora B_1 i B_2 za temperaturni profil rasta	189
Prilog 5. Elementi matrice W_1 i vektora B_1 za pH profil rasta bakterijskih izolata	190
Prilog 6. Elementi matrice W_1 i vektora B_1 za ANN model denitrifikujućeg potencijala .	191
Prilog 7. Elementi matrice W_2 i vektora B_2 za ANN model denitrifikujućeg potencijala.	192
Prilog 8. Baza podataka za analizu standarnih ocena	193
Prilog 9. SEM mikrografije bakterijskih grupa izolata	194
Prilog 10. Veličine bakterijske ćelije i proračun površine i zapremine	195
Prilog 11. Elementi matrice W_1 i vektora B_1 za testove doprinosa ćelijskih ovojnica	196
Prilog 12. Elementi matrice W_2 i vektora B_2 za testove doprinosa ćelijskih ovojnica.....	197
Prilog 13. Rezultati optimizacije testa hidrofobnosti ćelijske površine	198
Prilog 14. ANOVA proračun za optimizaciju MATH metode.....	199
Prilog 15. Efekat MATH operativnih parametara na hidrofobnost ćelijske površine (a) <i>S. pasteurii</i> DSM33; b) <i>B. muralis</i> ; c) <i>B. lentus</i> ; d) <i>B. simplex</i> ; e) <i>B. firmus</i> ; f) <i>B. licheniformis</i>	200
Prilog 16. Elementi matrice W_1 i vektora B_1 za ispitivanje pH promena i uloge kalcijuma u formiranju biofilma tokom BIPK.....	201

Prilog 17. Elementri matrice W_2 i vektora B_2 za ispitivanje pH promena i uloge kalcijuma u formiranju biofilma tokom BIPK.....	202
Prilog 18. Vrednosti promene pH kontrolnog uzorka (neinokulisane hranljive podloge)	203
Prilog 19. Kvalitet uklapanja i rezidualna analiza za proces ureolize	204
Prilog 20. Kvalitet uklapanja i rezidualna analiza za proces BIPK.....	205
Prilog 21. Dobijeni rezultati Plackett-Burmanovog eksperimentanog dizajna.....	206
Prilog 21. Kvalitet uklapanja i rezidualna analiza razvijene mreže	207

Rezime

U odigravanju biokalcifikacije, procesa stvaranja karbonatnog depozita u prirodi, jednu od najznačajnijih uloga imaju bakterije sa biokalcifikujućim potencijalom. Sporogene, alkalofilne ili alkalorezistentne bakterije, kroz različite metaboličke putanje, imaju priliku da u gotovo svim ekosistemima izazovu proces nazvan bakterijski indukovana precipitacija karbonata (BIPK). Značaj ovog procesa se ogleda u potencijalu inženjerske primene u različitim oblastima biotehnologije. Iz tog razloga, u ovoj doktorskoj disertaciji prikazan je specifičan postupak izolovanja i selekcije sporogenih i alkalorezistentnih/alkalofilnih predstavnika mikrobne populacije kalcitnih zemljišta iz okoline grada Novog Sada. Ukupno je izdvojeno pet ureolitičkih bakterija koji su identifikovani kao *Bacillus muralis*, *B. lentus*, *B. simplex*, *B. firmus* i *B. licheniformis*. U svim eksperimentima, karakteristike i performanse izolata su poređene sa visokoefikasnom referentnom kulturom *Sporosarina pasteurii* DSM 33. Ispitivanjem fizičkih karakteristika ćelije i njenih površinskih struktura, uticaja ćelijske aktivnosti na pH promene, kao i praćenje uloge kalcijuma u toku biofilmskog BIPK, dokazano je da je uloga štapićastih bakterija višestruka, te da su, pored metaboličke aktivnosti, značajne fiziološke i morfološke osobine pojedinačnih, vijabilnih ćelija. Kinetičkim modelovanjem ureolize i BIPK, kao i merljivih nusprocesa, dobijeni su odgovori sistema sa dobrim prediktivnim kapacitetom. Strukturna karakterizacija precipitata, dobijenih tokom kinetičkih studija, ukazala je na visoku kristaličnost CaCO_3 , sa različitom raspodelom kalcitne i vateritne faze, zavisno od vremena inkubacije i bakterijskog soja. Dodatno, izvršena je analiza 11 parametara sredine i sastava hranljive podloge u toku BIPK u cilju procene robusnosti sistema, efikasnosti ciljanog procesa i odabira bakterijskog izolata sa najvećim potencijalom za efikasan proces precipitacije. Sumarno, u okviru disertacije načinjeni su dobri temelji i prvi koraci ka definisanju idejnog rešenja upotrebe BIPK u inženjerske svrhe zahvaljujući izolovanju i karakterizacijom visokoefikasnih ureolitičkih bakterija sa biokalcifikujućim potencijalom i detaljnim prikazom eksperimentalnih koraka od izolovanja i selekcije do izbora najpogodnije bakterije za proces bakterijski indukovane precipitacije karbonata.

Summary

Bacteria with biocalcifying potential play one of the most important roles in biocalcification, the process of creating a carbonate deposit in nature. Alkalophilic/alkaloresistant, sporogenic bacteria, through different metabolic pathways, have the opportunity to cause a process called bacterially induced carbonate precipitation (BIPK) in almost all ecosystems. The importance of this process is reflected in the potential of engineering applications in various fields of biotechnology. For that reason, in this doctoral dissertation, a specific procedure for isolation and selection of sporogenic and alkaloresistant/alkalophilic representatives of the microbial population of calcite soils near Novi Sad, Republic of Serbia, is presented. A total of five ureolytic bacteria were selected and identified as *Bacillus muralis*, *B. lentus*, *B. simplex*, *B. firmus*, and *B. licheniformis*. The characteristics and performance of the isolates were compared with the highly efficient reference culture *Sporosarina pasteurii* DSM 33. By examining the physical characteristics of cells and its surface structures, the influence of cell activity on pH changes, as well as monitoring calcium role during the biofilm-based BIPK, it can be concluded that rod-shaped bacteria have multiple roles. Briefly, in addition to metabolic activity, the physiological and morphological properties of individual, viable cells are significant during the initiation and maturation of carbonate crystals. Furthermore, system responses with good predictive capacity were obtained for kinetic modeling of ureolysis and BIPK, as well as measurable by-processes. The structural characterization of precipitates obtained during kinetic studies indicated high crystallinity of CaCO_3 , with different distribution of calcite and vaterite phases, depending on incubation time and bacterial strain. Additionally, an analysis of 11 environmental parameters and nutrient medium composition was performed to assess the robustness and efficiency of the system, and the selection of the bacterial isolate with the greatest potential for an efficient precipitation. The dissertation provides good foundations and first steps towards defining a conceptual solution for the use of BIPK for engineering purposes based on comprehensive assessment of biocalcifying potential of natural bioagents.

1. UVOD

U poslednjih nekoliko decenija je proučavanje procesa biokalcifikacije, kao rešenja za akumulaciju neorganskih jedinjenja u prirodi, otvorilo mogućnost razvoja specifičnih bioremedijacionih procesa u oblastima biotehnologije i zaštite životne sredine. Uz odabir efikasnih biokatalizatora, ovaj proces može biti održiva alternativa konvencionalnim tehnikama u konsolidaciji zemljišta, peska, kamena i cementa, poboljšanju karakteristika tla, remedijaciji zagađivača u zemljištima, vodama i otpadnim vodama, itd. Neizostavna je i činjenica da se proces biokalcifikacije pre svega odnosi na bakterijski indukovanu precipitaciju kalcijum karbonata (BIPK) koja se ogleda u reorganizaciji jona prisutnih u sistemu i produkovanih od strane ubikvitarnih bakterija.

Po svojoj ulozi u procesu biokalcifikacije, bakterije se izdvajaju po efikasnosti precipitacije u odnosu na ostale mikroorganizme. Međutim, među brojnim bakterijama zemljišta, mulja, sedimenata, pećina i alkalnih jezera, uočene su razlike u mehanizmu BIPK, metaboličkoj putanji koja doprinosi stvaranju ekstracelularnih karbonatnih jona, te mogućnosti da formiraju biofilmove. Među najefikasnijim grupama, čiji biokalcifikujući potencijal daleko prevazilazi abiotički doprinos stvaranju karbonata, u većini okruženja na Zemlji izdvajaju se ureolitičke bakterije. Sposobnost ovih bakterija da veoma brzo produkuju karbonatne jone, prežive naglo povećanje pH vrednosti mikrookruženja te utiču na reaktivnost nastalog metabolita prema kalcijumovim jonima, za posledicu ima precipitat mineralnih kristala različite morfologije. Celokupan proces biokalcifikacije i uloge bakterijske ćelije u BIPK kroz ureolitičku aktivnost proučavan je na alkalorezistentnoj, sporogenoj vrsti *Sporosarcina pasteurii* koj ima visok potencijal ureolize u različitim uslovima sredine.

Uzimajući u obzir mogućnost višestruke primene efikasne biokalcifikacije sa ciljem smanjenja neorganskih jona u prirodi, neophodno je izolovanje ureolitičkih bakterija sa visokim biokalcifikujućim potencijalom i stepenom preživljavanja u nepovoljnim uslovima sredine. Kako bi proces BIPK trebalo prilagoditi sredini koja se tretira, javlja se potreba da se umesto referentnih kultura bakterija koriste sojevi izolovani iz prirodnog okruženja. Na ovaj način bi se kreiralo ekološko, ekonomsko i nedestruktivno rešenje akumulacije neorganskih jedinjenja u životnoj sredini kroz inženjersku upotrebu prirodnog fenomena.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj doktorske disertacije jeste ispitivanje potencijala primene ureolitičkih bakterijskih izolata iz alkalnih, kalcitnih zemljišta u procesu bakterijski indukovane precipitacije kalcijum karbonata. Da bi se realizovala osnovna hipoteza ovog naučno-istraživačkog rada, postavljeni su sukcesivni koraci nužni za ostvarivanje primarnog cilja:

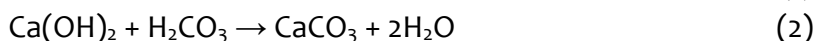
- ⇒ Formiranje specifične šeme za izolovanje alkalorezistentnih/alkalofilnih i sporogenih bakterija čije će se ureolitička aktivnost utvrditi u toku primarne selekcije;
- ⇒ Izolovanje, selekcija i identifikacija bakterijskih sojeva iz zemljišnih sistema;
- ⇒ Ispitivanje biokalcifikujućeg potencijala odabranih ureolitičkih sojeva;
- ⇒ Procenu doprinosa ćelija kao centara nukleacije karbonatne precipitacije;
- ⇒ Praćenje kinetike ureolize i bakterijski indukovane precipitacije kalcijum karbonata;
- ⇒ Ispitivanje uticaja odabranih parametara kultivacije na produkciju biomase ureolita, kao i na konačni proizvod – precipitat (količina, morfologija i specifičnost proizvoda);
- ⇒ Definisane relativnih uticaja operativnih i ekoloških parametara koji su neophodni kako bi se ostvarili preduslovi za efikasan proces biokalcifikacije;
- ⇒ Ispitivanje održivosti i stabilnosti bakterijskih suspenzija u cilju zadržavanja zadovoljavajuće vijabilnosti na odabranim temperaturama;

Očekivani rezultati realizacije ovih koraka će imati značajan doprinos u oblastima razvoja procesa bioremedijacije prilagođenih odabranim supstratima. Kao osnova definisanja efikasne biokalcifikacije posredstvom alkalofilnih/alkalozistentnih, sporogenih i ureaza pozitivnih bakterijskih izolata poslužiće praćenje ponašanja sojeva od momenta izolovanja do optimizacije odabranih procesnih parametara i produkcije ciljanog metabolita. Pored toga, praćenje kinetike ureolitičke reakcije i BIPK za odabrane bakterijske izolate ukazaće na specifičnosti indukcije bakteriogenih karbonatnih kristala specifične morfologije.

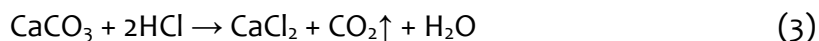
3. PREGLED LITERATURE

3.1. Kalcijum karbonat

Kalcijum karbonat (CaCO_3) je sastavljen od tri elementa koji su od posebnog značaja za sve organske i neorganske materijale na Zemlji: ugljenik, kiseonik i kalcijum (Geysant, 2011). Ova jednostavna so se neretko javlja u prirodi u obliku krečnjaka, krede i mermera (Patnaik, 2003). Čineći 4% Zemljine kore, smatra se jednom od najrasprostranjenijih mineralnih materija u morskim, slatkovodnim i kopnenim sistemima (Siddique i Chahal, 2011). Takođe, CaCO_3 je jedna od najčešće korišćenih sirovina u hemijskoj industriji sa brojnim primenama, prvenstveno za proizvodnju cementa, hidriranog kreča, tekstila, plastike i lepiva, ali i u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Patnaik, 2003). Sa hemijskog aspekta, ova so nastaje u reakciji ugljene kiseline sa živim ili gašenim krečom (jednačine (1) i (2)).



Kao i svi karbonati, CaCO_3 je osetljiv na prisustvo kiseline (jednačina 3), što će neretko biti način prepoznavanja ove soli. Naime, dodatak veoma male količine hlorovodonične kiseline u supstrat koji sadrži CaCO_3 dovodi do oslobađanja ugljen dioksida (CO_2), uz naglu pojavu belih mehurića (Geysant, 2011).



U prirodi, kalcijum karbonat se javlja gotovo uvek u obliku minerala čiji se kristali razlikuju po morfologiji, načinu i dužini sazrevanja (Geysant, 2011). U tom smislu se značajno razlikuju kalcit, aragonit i vaterit, čije su kristalografske karakteristike prikazane u tabeli 1. Kako je specifična gustina ovog jedinjenja skoro tri puta veća od vode, gotovo uvek dolazi do precipitacije (taloženja) kristala u vodenim sistemima. Kao najmanje termodinamički stabilan, amorfni oblik CaCO_3 se javlja na visokim nivoima prezasićenosti zbog čega veoma brzo prelazi u stabilnije mineralne faze, poput navedenih kalcita, aragonita ili vaterita.

Tabela 1. Kristalografske karakteristike kalcijum karbonata (Geysant, 2011)

Osobina	Morfološki oblik kalcijum karbonata		
	Kalcit	Aragonit	Vaterit
Kristalni sistem	trigonalni	romboidni	heksagonalni
Kristalografska forma	heksagonalna prizma romboedar skalenohedron	heksagonalna prizma	heksagonalna prizma
Indeks duple refleksije	0,172	0,156	0,172
Karakter duple refleksije	optički negativan	biaksialni negativan	optički negativan
Specifična gustina (g/cm³)	2,72	2,94	2,72
Čvrstoća	3	3,5-4	3

Vaterit je najmanje termodinamički stabilan bezvodni kristalni oblik CaCO₃, heksaedarske strukture koja je neretko prisutna u školjkama, sedimentima, stenama i cementima (Brečevuć i Kralj, 2007). Karakteristično za vaterit je da mnogo češće nastaje u prisustvu organskih makromolekula u laboratorijskim uslovima u odnosu na kalcit, iako mehanizam stabilizacije još uvek nije poznat (Rodriguez-Navarro i sar., 2007). Nuklearnost vaterita je veoma heterogena tj. prvi kristali se formiraju i pravilno orijentišu na čvrstoj površini, ali se mogu spontano transformisati u termodinamički stabilniju formu – aragonit ili kalcit (Brečević i Kralj, 2007). Ortorombični CaCO₃, poznatiji kao aragonit, široko je rasprostranjena kristalna struktura. Smatra se da ovi igličasti kristali nastaju u biološkim sistemima, te da će retko biti rezultat abiotskih faktora. Kao i vaterit, aragonit ima tendenciju da pređe u kalcit, ali daleko sporije (Rodriguez-Navarro i sar., 2007). U skladu sa tim je i činjenica da je za formiranje kalcita potrebna daleko sporija difuzija jona u odnosu na sazrevanje vaterita i aragonita. Pri standardnim uslovima temperature i pritiska na Zemlji, sve termodinamički nestabilne forme istaloženog CaCO₃ na kraju se transformišu u kalcit – najstabilniju kristalnu fazu CaCO₃ (Lin i Singer, 2005).

3.2. Pojava kalcijum karbonata u prirodi

Dosadašnje naučne studije ukazuju da na godišnjem nivou dolazi do stvaranja oko pet milijardi tona CaCO_3 u prirodi, od čega se oko 60% akumulira u sedimentima, dok je ostatak u rastvorenom obliku³. Akumulirani karbonati, uglavnom kao kalcit i aragonit, nalaze se u sedimentnim stenovitim masama (Milliman, 1993). To ne znači da u drugim ekosistemima, poput vode i podzemnih voda ili zemljišta, ne dolazi do nakupljanja značajne količine CaCO_3 . Kako su kalcijum i karbonati jedni od najčešćih jona u većini (podzemnih) voda, nastajanjem ovog minerala dolazi do smanjenja poroznosti podzemnih formacija. Dokaz ovome je značajna količina očvrslulih naslaga na dnu mora i okeana koja predstavlja stabilne krečnjačke formacije (Siddique i Chahal, 2011). Zbog svoje reaktivnosti⁴ karbonatna jedinjenja predstavljaju bitan rezervoar ugljenika koji ima vitalnu funkciju u transportu brojnih elemenata između atmosfere i ostalih ekosistema (Lin i Singer, 2005). Kruženje karbonata u prirodi je deo kompleksnog biogeohemijskog ciklusa koji se povezuje sa najbitnijim neorganskim jedinjenjem – ugljen dioksidom (Ridgwell i Zeebe, 2005). U kontaktu sa vodom, gasoviti CO_2 formira ugljenu kiselinu koja disosuje i dovodi do stvaranja bikarbonatnih i karbonatnih jona. Ove reakcije su spontane i brze, a dovode do nakupljanja spomenutih jona u velikoj količini. Smatra se da ravnoteža između različitih oblika ugljenika nastaje kada je oko 90% neorganskog ugljenika u obliku bikarbonata, oko 10% karbonata i samo 0,5% ugljene kiseline (Dickson, 2010).

Nastajanje CaCO_3 u prirodi može biti posledica simultanih procesa u kojima su uključeni mnogobrojni abiotički i biotički faktori. Iako je teško razdvojiti ove faktore, smatra se da biotički uticaj daleko prevazilazi abiotičke faktore u gotovo svim ekosistemima na Zemlji (Siddique i Chahal, 2011).

³ Proizvod rastvorljivosti CaCO_3 iznosi $3,8 \cdot 10^{-9}$;

⁴ Ovo se posebno odnosi na ugljen-dioksid, kao i karbonatne soli metala čija reaktivnost je direktno proporcionalna sa temperaturom sredine;

3.2.1. Abiotički faktori od značaja za stvaranje kalcijum karbonata

Precipitacija CaCO_3 može biti abiotičkog karaktera u prirodi, kada je posledica niza promena u fizičko-hemijskim karakteristikama okruženja (Zhu i Dittrich, 2016). Objašnjenje uticaja abiotičkih faktora je dato na primeru taloženja CaCO_3 u zemljištu, s obzirom da je ovaj proces neretko usmeren ovim faktorima u sušnim i polusušnim regionima (Clarke i sar., 2006).

Jedan od najznačajnijih abiotičkih faktora jeste tip zemljišta, pri čemu je dokazano da se CaCO_3 u jednakoj meri može naći u površinskim i dubljim slojevima, ali i u širokom rasponu različitih tipova tla (peskovitom, glinenom, aluvijalnom, itd.). Razlika se uočava u morfologiji nastalih kristala koja će zavisiti od teksture i poroznosti zemljišta, količine vlage, dostupnosti i difuzije kalcijumovih jona, kao i značajnih temperaturnih promena (Clarke i sar., 2006). Niz hemijskih reakcija koje se dešavaju u zemljištu i iznad njega rezultat su evaporacije (isparavanja) vode, a usled promena u pritisku i količini vlage dolazi do saturacije karbonata i precipitacije mineralnih kristala u zemljištu. Ovom, mada sporom procesu, značajno mogu da doprinesu i promene u temperaturi, pH vrednosti i količini kiseonika (Santoyo i sar., 2017). U zemljištu je neizbežna pojava naizmeničnih vlažnih i sušnih perioda koji doprinose zasićenju tla sa jonima kalcijuma i karbonata (Lin i Singer, 2005). Santoyo i sar. (2017) naglašavaju da pored spomenutih abiotičkih faktora značajan uticaj na odigravanje biogeochemijskih ciklusa imaju klimatske promene, nagle i neočekivane promene temperature, povećanje UV zračenja i CO_2 u atmosferi. Na precipitaciju CaCO_3 mogu da utiču i različiti katalizatori, koji će ubrzati akumulaciju ovog jedinjenja, i inhibitori koji će usporiti istu. Inhibicija nastaje zbog konkurentnosti za adsorpciju na mestu kristalizacije i pretežno zavisi od hidrofobnosti molekula, molekulske mase, itd. (Lin i Singer, 2005). Sa aspekta stvaranja CaCO_3 , mnogo su važniji katalizatori ovog procesa, koji po svojoj prirodi, pre svega, predstavljaju biokatalizatore – žive organizme, koji svojom metaboličkom aktivnošću utiču na brzo i efikasno stvaranje minerala.

3.2.2. Biotički faktori od značaja za stvaranje kalcijum karbonata

Uloga biotičkih faktora u formiranju i precipitaciji kristala CaCO_3 se sve više proučava u oblasti inženjerstva. Na osnovu strukture i morfologije karbonatnih depozita u ekosistemima može se pretpostaviti značajan biogeni uticaj viših oblika života (biljke) i mikroorganizama (bakterije, gljive i alge) (Gadd, 2007). Biološki doprinos se ogleda u aktivnoj i pasivnoj ulozi u taloženju CaCO_3 , u kojem dolazi do direktnog stvaranja karbonata (npr. aktivnost školjki) ili preduslova za odigravanje dalje hemijske precipitacije ovog jedinjenja (npr. fotosinteza) (Anbu i sar., 2016). Iako biljke imaju značaj uticaj na formiranje CaCO_3 , mnogo veći i efikasniji biotički faktor predstavlja aktivnost mikroorganizma, posebno bakterija (Zhu i Dittrich, 2016). Smatra se da bakterije imaju potencijal ka precipitaciji CaCO_3 koji daleko prevazilazi abiotički doprinos depozitu ovog jedinjenja u većini okruženja na Zemlji (Siddique i Chahal, 2011). Bakterijski doprinos je posledica niza različitih metaboličkih aktivnosti kojima dolazi do indukcije precipitacije kristala CaCO_3 (Zhu i Dittrich, 2016).

Teorijski, do precipitacije karbonata može doći u okruženjima sa povećanom koncentracijom jona kalcijuma uz metaboličku aktivnost bakterija koja će obezbediti karbonatne jone i omogućiti supersaturaciju sistema. Sem metaboličke aktivnosti koja će uticati na promenu u koncentraciji jona i pH vrednosti sredine, aktivne ćelije imaju potencijal da budu efikasni centri nukleacije tokom formiranja kristala CaCO_3 . Ipak, morfologija kristala će i dalje biti uslovljena sredinom u kojoj se dešava proces precipitacije (Gadd, 2007). Zamani i sar. (2017) naglašavaju da je biohemijska reakcija formiranja karbonatnih kristala daleko specifičnija od hemijske sinteze što za posledicu ima kristalne forme pravilnih heksaedarskih struktura veće čvrstoće. Upravo ova činjenica je otvorila mnogobrojna pitanja o primeni mikrobioloških sistema u različitim oblastima inženjerstva i zaštite životne sredine.

3.3. Biokalcifikacija

3.3.1. Pojam biokalcifikacije

Učestvujući u precipitaciji CaCO_3 kroz različite metaboličke reakcije, bakterije dovode do povećanja koncentracije neorganskog ugljenika i pH vrednosti sredine, čime je obezbeđena supersaturacija jonima (Zhu i Dittrich, 2016). Ovaj proces, u kojem aktivnost bakterija doprinosi pojavi precipitacije karbonatnih minerala, naziva se biokalcifikacija. Određen broj ubikvitarnih bakterija ima mogućnost biokalcifikacije u širokom opsegu različitih uslova sredine, te se takve bakterije nazivaju induktorima karbonatne precipitacije ili bakterije sa biokalcifikujućim potencijalom. Na primer, fotosintetske bakterije su odgovorne za formiranje karbonatnih kristala u vodenim sredinama, dok u ostalim okruženjima ovaj proces vrše i fototrofni i heterotrofni oblici (Gadd, 2007).

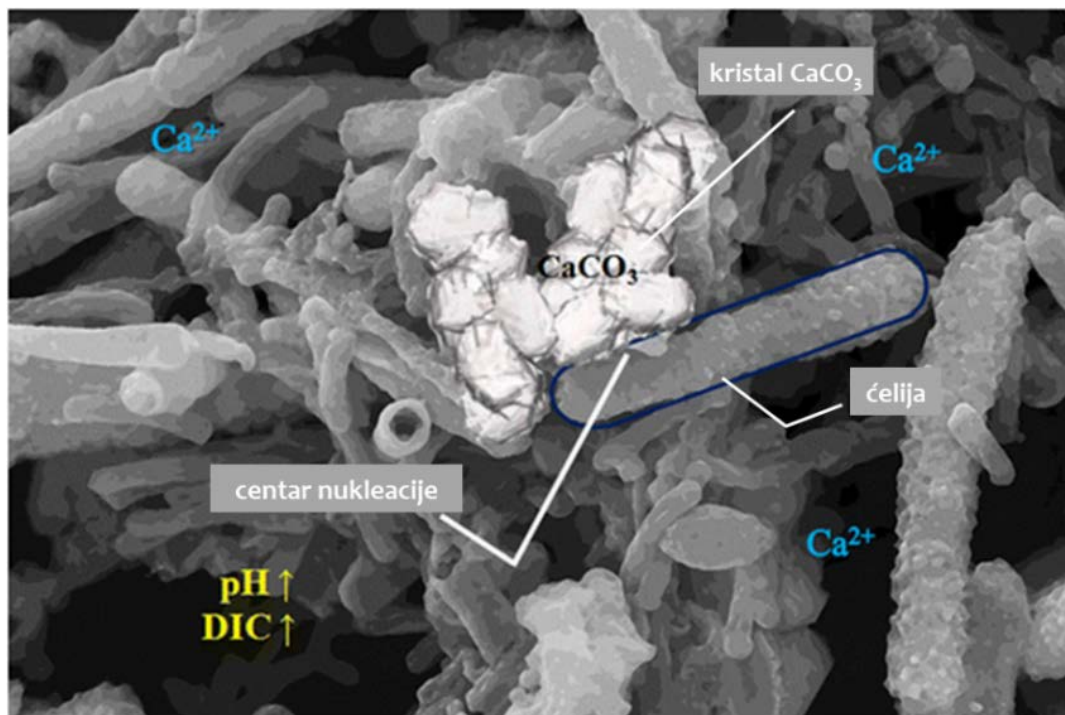
Biokalcifikaciju odlikuju dva mehanizma regulacije. Naime, kada je formiranje minerala intracelularno lokalizovano i usmereno aktivnostima unutar same ćelije mehanizam odgovara biološki kontrolisanom procesu (Provencio i Poliak, 2001). Ćelije mikroorganizama kontrolišu sintezu minerala isključivo unutarćelijski, te je morfologija kristala jedinstvena za tu vrstu, nezavisno od uslova životne sredine (De Muynck i sar., 2010). Upravo kroz metaboličku kontrolu i unutarćelijsko zadržavanje formiranih kristala, fotosintetski mikroorganizmi, najpre cijanobakterije i pikocijanobakterije, imaju najznačajniji doprinos pri stvaranju karbonatnih naslaga od nastanka planete Zemlje. Takođe, najčešći oblik biokalcifikacije u otvorenim vodenim sredinama uzrokovan je unutarćelijskom produkcijom CaCO_3 kod fotosintetičkih organizama. Fotosinteza dovodi do biokalcifikacije tokom razmene $\text{HCO}_3^-/\text{OH}^-$ jona kroz ćelijsku membranu, što rezultira povećanjem pH vrednosti mikrookruženja. Difuzija CO_2 iz atmosfere u hloroplast omogućava formiranje organske materije kroz proces fotosinteze, a bikarbonatni joni se transformišu u CO_2 i OH^- jone. Fotosintetska aktivnost dovodi do povećanja koncentracije karbonata. Zanimljivo je da je fototrofnim ćelijama taloženje CaCO_3 ustvari način za skladištenje viška kalcijuma koji se u suprotnom transportuju van ćelijskog zida i inhibiraju aktivnost ćelija (Waditee i sar., 2004).

Iz inženjerskog ugla, važniji je biološki indukovani proces koji se odigrava u mikrookruženju ćelija zahvaljujući ekstracelularnim karbonatnim jonima, a na osnovu metaboličke aktivnosti i posledičnih hemijskih reakcija (Zamani i sar., 2017). Ukoliko su ćelije indukovale ekstracelularno formiranje CaCO_3 , morfologija kristala nije usmerena procesima unutar ćelija već u potpunosti zavisi od abiotičkih faktora i procesa van ćelije. Takođe, postoji značajna korelacija sa koncentracijom aktivnih bakterija i karakteristikama površine ćelije (Zamani i sar., 2017). Ovaj proces se naziva bakterijski indukovana precipitacija karbonata (BIPK).

3.3.2. Bakterijski indukovana precipitaciju karbonata

Biokalcifikacija kojoj posreduje BIPK u većini prirodnih sistema odvija se kroz metaboličku aktivnost u kojoj nastaju ekstracelularni karbonatni joni. Posledica ove aktivnosti je trenutno povećanje alkalnosti sistema (Seifan i Berenjjan, 2019). Međutim, ovaj korak ne predstavlja nužno jedinu ulogu koju bakterije mogu odigrati u formiranju CaCO_3 . Posledično, BIPK je rezultat i nukleacije kristala oko ćelija (slika 1), pa tako vijabilne ćelije, negativnih ćelijskih zidova, mogu predstavljati centre nukleacije (Siddique i Chanal, 2011). Određenu ulogu u bakteriogenim kristalnim formacijama može imati i ekstracelularna polimerna supstanca (EPS), akumulirajući pozitivno naelektrisane jone oko ćelija (Zamani i sar., 2017). Suštinski, bakterijski indukovana precipitacija CaCO_3 predstavlja reorganizaciju katjona prisutnih u mikrookruženju ćelija i ekstracelularno produkovanih anjona koji su posledica metaboličke aktivnosti. Rezultat je hemijska reakcija između kalcijumovih i karbonatnih jona u neposrednoj blizini bakterijske ćelije, na čijoj se površini formiraju i sazrevaju kristalne forme CaCO_3 (Anbu i sar., 2016). To bi potvrdilo prethodno iznetu činjenicu da se bakterijama pripisuje višestruka uloga u procesu BIPK koja se odnosi na:

- ekstracelularnu produkciju karbonatnih jona;
- povećanje pH vrednosti mikrookruženja;
- povećanje reaktivnosti nastalog metabolita prema kalcijumovim jonima;
- neizbežno prisustvo aktivnih centara nukleacije;
- akumulacija jona unutar polimerne matrice biofilma, itd. (Anbu i sar., 2016).



Slika 1. Proces bakterijski indukovane precipitacije CaCO_3 ⁵ (Lee i Park, 2018)

Indukovanje precipitacije CaCO_3 je nuspojava procesa ureolize, denitrifikacije, amonifikacije, sulfat-redukcije, oksidacije metana, tj. svih metaboličkih reakcija u kojima dolazi do ekstracelularnog izdvanja karbonatnih jona u mikrookruženje biokalcifikujuće ćelije. Povezujući se s brojnim bakterijskim vrstama proces BIPK je daleko intenzivniji kod heterotrofnih bakterija u poređenju s autotrofima (Vijay i sar., 2017).

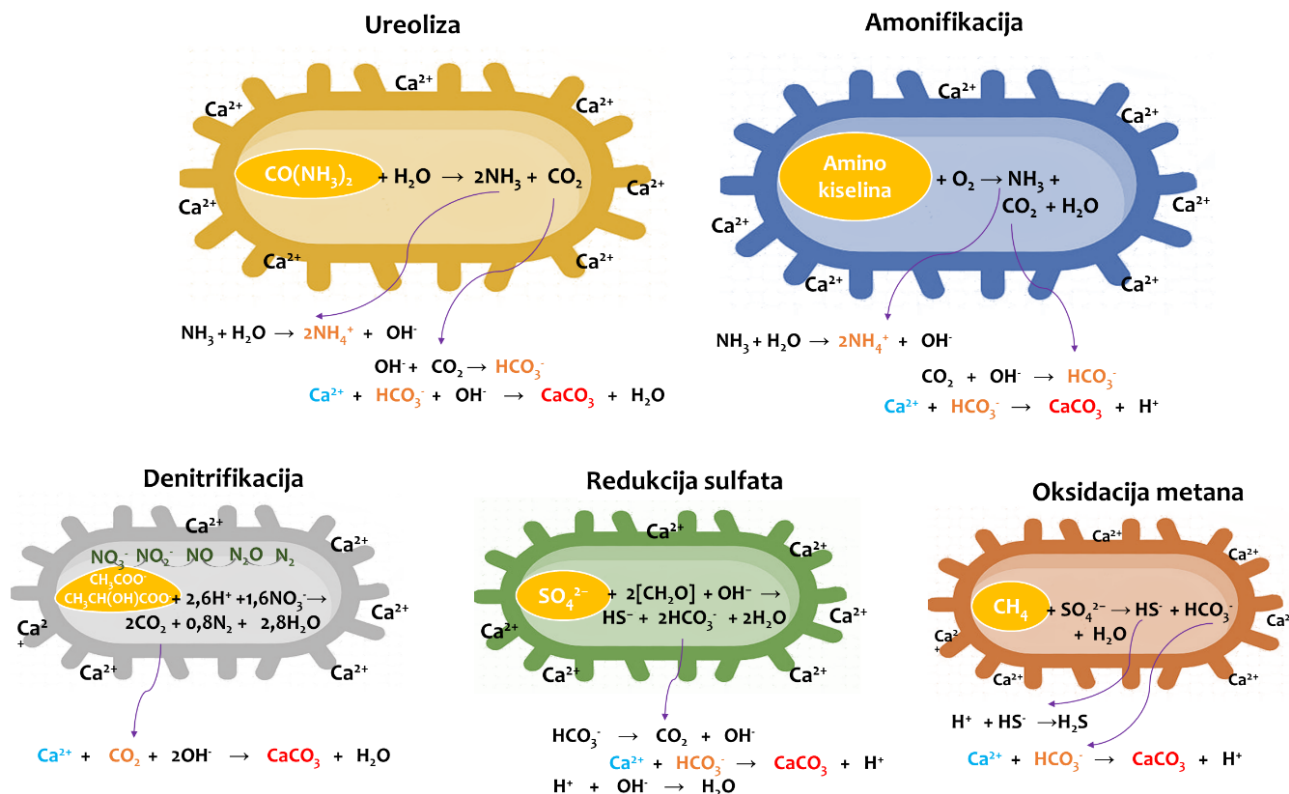
Na slici 2 prikazane su metaboličke putanje bakterija s biokalcifikujućim potencijalom, koje imaju inženjerski potencijal ka efikasnoj precipitaciji CaCO_3 . Ekstracelularna produkcija karbonata može se odigravati u anaerobnim uslovima kada se najčešće pripisuje oksidaciji metana, redukciji sulfata i denitrifikaciji. Kod anaerobne oksidacije metana favorizuje se taloženje CaCO_3 jer se veliki deo metana, u odsustvu molekularnog kiseonika, transformiše do CO_2 , posebno u morskim sedimentima (Zhu i Dittrich, 2016). Nadalje, abiotičko rastvaranje gipsa ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) obezbediće sredinu bogatu sulfatnim i kalcijumovim jonima, pri čemu će sulfat-redukujuće anaerobne bakterije efikasno stvarati H_2S i oslobađati bikarbonatne i karbonatne jone. Denitrifikacija, u kojoj dolazi do redukcije nitrata pri ograničenoj

⁵ DIC – rastvoreni neorganski ugljenik (eng., dissolved inorganic carbon)

koncentraciji kiseonika, najefikasnija je metabolička aktivnost koja indukuje precipitaciju CaCO_3 među anaerobnim procesima. Usvajajući izvor kalcijuma u obliku acetata ili laktata, denitrifikujuće bakterije (denitrifikatori) pokreću povećanje pH vrednost sredine zbog utroška vodonikovih jona i stvaranja karbonata (Zhu i Dittrich, 2016). Nusprodukt potpune denitrifikacije je molekularni azot, koji nije štetan i ne utiče na dalji bakterijski rast i precipitaciju nastalih kristalnih formi. Međutim, ukoliko proces denitrifikacije nije potpun, moguća je akumulacija toksičnih azotnih oksida i amonijaka (Vidaković i sar., 2019).

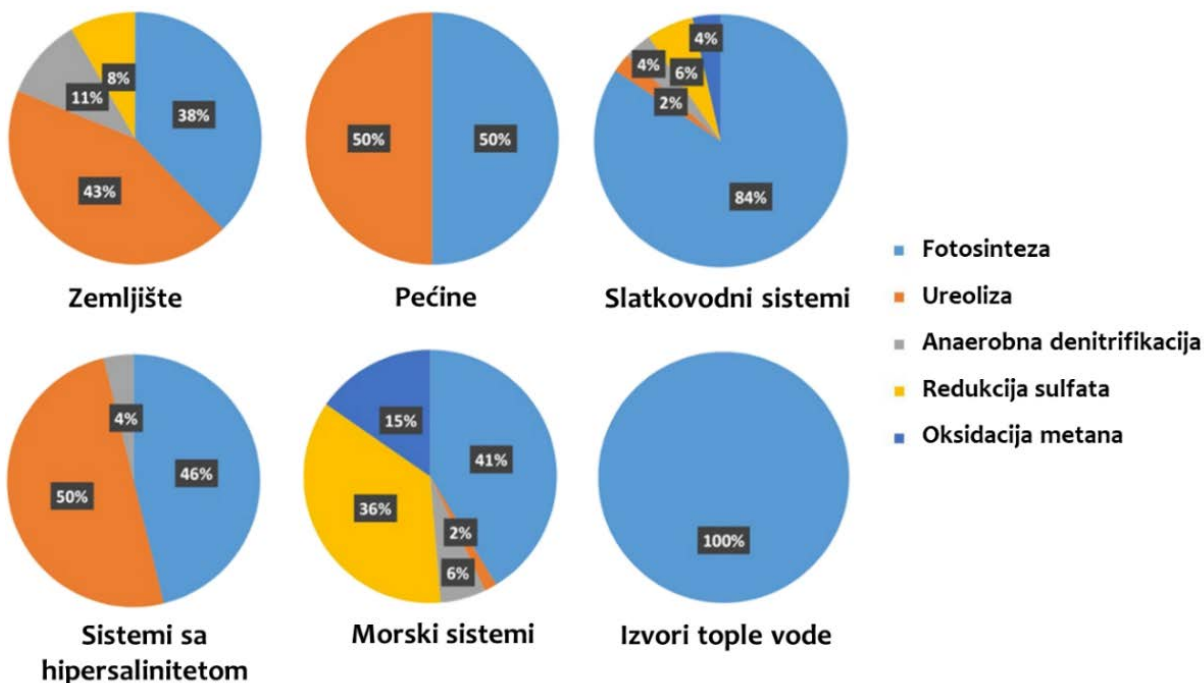
Iz ugla jednostavnije primene u procesima bioremedijacije, daleko su poželjniji aerobni procesi poput amonifikacije aminokiselina i ureolize. Sem što su jednostavniji, ovi procesi daju i daleko veću šansu za izolovanje, selekciju i proučavanje biokatalizatora iz prirode. Amonifikacija aminokiselina podrazumeva najpre razgradnju aminokiselina, koje sadrže organski azot (R-NH_2), do karbonatnih i bikarbonatnih jona. Naknadnom hidrolizom amonijaka akumuliraju se hidroksilni joni, a povećana alkalnost izaziva supersaturaciju (Zhu i Dittrich, 2016). Ureoliza, odnosno enzimaska hidroliza uree, spada u najefikasnije metaboličke reakcije koje posreduju BIPK (Chu i sar., 2012, Sarayu i sar., 2014, Zhu i Dittrich, 2016). U prisustvu uree i kalcijumovih jona, ureolitičke bakterije predstavljaju visokoefikasne induktore precipitacije CaCO_3 jer veoma brzo produkuju amonijumove i karbonatne jone, vrše alkalizaciju sredine i omogućavaju hemijsku precipitaciju kristala (Ambus i Zechmeister-Boltenstern, 2007, Garcia-Teijeiro i sar., 2009).

Najviše proučavan proces u inženjerskim oblastima je ureoliza, mada je posebna pažnja usmerena i ka drugim putanja u biogeochemijskom ciklusu azota. Kako proces biokalcifikacije kroz ove metaboličke aktivnosti bakterija igra važnu ulogu u kalcifikaciji pećina, zemljišta, sedimenata, ali i u vodenim sistemima, postoji realna mogućnost inženjerske primene u bioremedijaciji, biokonsolidaciji i/ili biocementaciji. Do sada su razvijene biotehnološke metode u čijoj osnovi je proces BIPK posredstvom različitih metaboličkih putanja, ali sa ograničenim brojem komercijalno dostupnih sojeva (Whiffin i sar., 2007, DeBelie i DeMuynck, 2009, Bang i sar, 2010, Jonkers i sar, 2010).



Slika 2. Pojednostavljeni prikaz metaboličkih putanja koje indukuju biokalcifikaciju kod heterotrofnih bakterija

Kada se govori o različitim metaboličkim putanjama bakterija sa biokalcifikujućim potencijalom od značaja je i njihov biodiverzitet u širokom spektru geoloških sistema. Primetno je da se ekosistemi razlikuju po prisustvu i broju određenih grupa bakterija sa biokalcifikujućem potencijalom (slika 3). Na primer, u zemljišnim sistemima, 43% svih metaboličkih aktivnosti čini ureoliza, koja značajnu ulogu ima i u pećinskom i hipersalinitetnom okruženju. U slatkovodnim i morskim sistemima se, uz ureolizu, izdvaja i redukcija sulfata. U biokalcifikaciji, u gotovo svim ekosistemima, važnu ulogu igra i fotosinteza koja po mehanizmu spada u biološki kontrolisan sistem, pa nema direkne veze sa akumulacijom kristala u okruženju ćelije (Zhu i Dittrich, 2016).

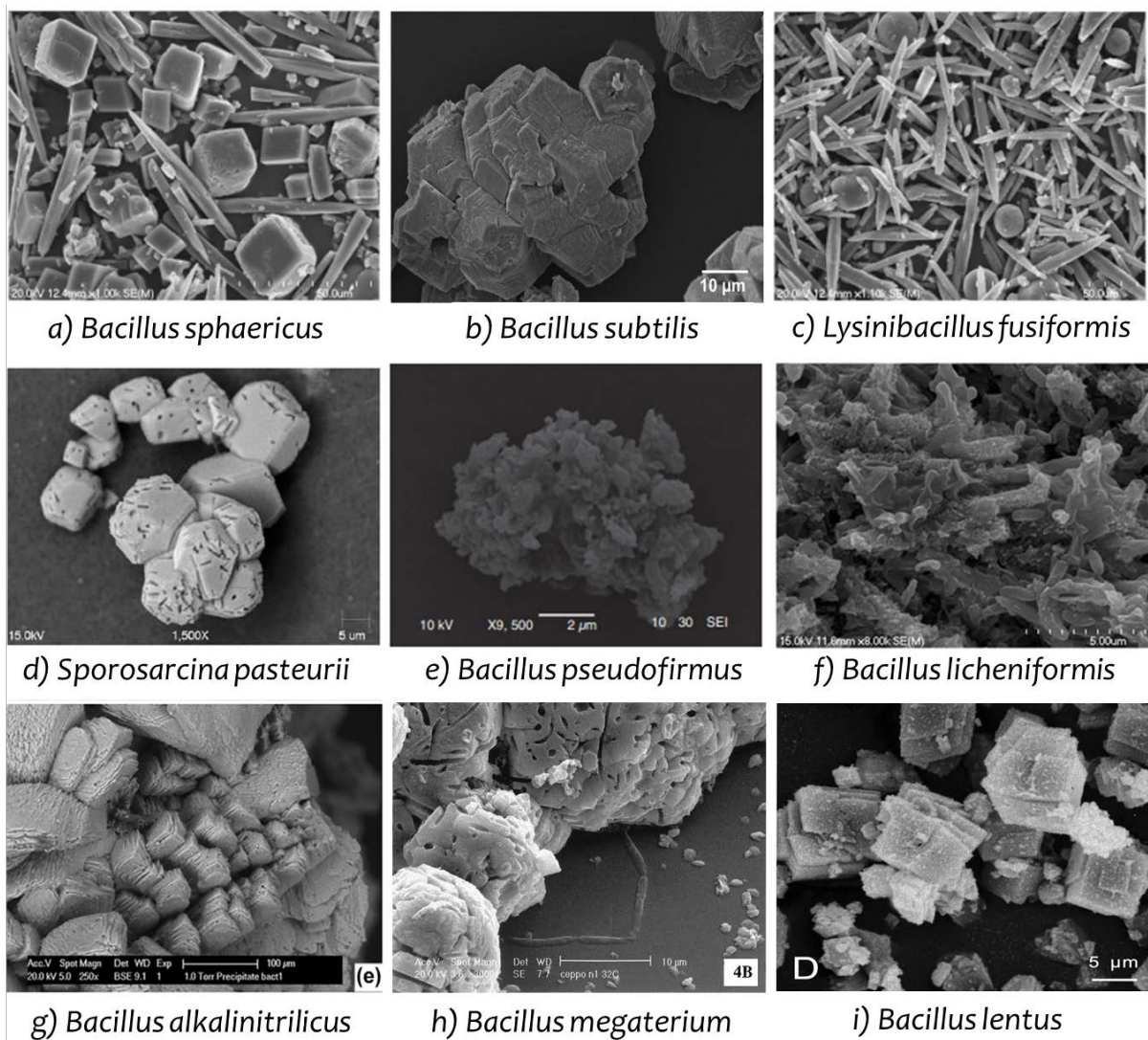


Slika 3. Zastupljenost metaboličkih putanja u biokalifikaciji (Zhu i Dittrich, 2016)

3.3.3. Bakterije sa biokalifikujućim potencijalom

Bakterije sa biokalifikujućim potencijalom mogu da indukuju precipitaciju pod aerobnim, mikroaerofilnim ili anaerobnim uslovima u ekosistemima u kojima je pojava CaCO_3 neizbežna. Izučavanjem ponašanja bakterijskih ćelija sa biokalifikujućim potencijalom i njihovog okruženja u toku BIPK, uočavaju se razlike u sakupljanju karbonatnih kristala i formiranja precipitata određene morfologije (Zhu i Dittrich, 2016). Na slici 4 su prikazani SEM mikrografi kristala CaCO_3 koji su indukovale vrste iz rodova *Bacillus* i *Sporosarcina* pod istim ili sličnim uslovima inkubacije. Raznolikost dobijenih precipitata se ogleda u relativnoj brzini rasta kristala, pa su formirani kristali u istom vremenu uzorkovanja veličina od mikrometra do nekoliko desetina mikrometra. Takođe, značajna razlika jeste u morfološkoj strukturi i stepenu kristalnosti dobijenih uzoraka. Kod *Sporosarcina pasteurii* je izražena romboedrična morfologija kalcita, koja je uporediva sa jednom od faza koje indukuje *Bacillus sphaericus*. Međutim, i ovde se primećuju razlike jer produkovani sitniji kristali *Bacillus* vrste imaju jasnije, oštrije ivice i izražene uglove pojedinih kristala. Druga, igličasta faza primećena kod *B.*

sphaericus odgovara obrascu kristala koji se javlja i kod bakterije *Lysinibacillus fusiformis*, a koja je karakteristična za aragonit. Kod ostalih prikazanih *Bacillus* vrsta se uočava napredna struktura sfernih ili romboedričnih agregata, sastavljenih od niza heksaedarskih slojeva, ali sa različitom distribucijom veličine kristala. Pojava neravnomerne veličine kristala odgovara različitom stepenu sazrevanja morfoloških oblika što zavisi od broja centara nukleacije i stepena aktivnosti bakterijskih ćelija (Cacchio i sar., 2003, Mitchell i Ferris, 2005, Wiktor i Jonkers, 2011, Wei i sar., 2015, Seifan i sar., 2016a, Seifan i sar., 2016b, Sharma i sar., 2019, Reeksting i sar., 2020).



Slika 4. Precipitati bakterija sa biokalifikujućim potencijalom ((a) i (c) Seifan i sar., 2016a, (b) Sharma i sar., 2017, (d) Mitchell i Ferris, 2005, (e) Seifan i sar., 2016b, (f) Reeksting i sar., 2020, (g) Wiktor i Jonkers, 2011, (h) Cacchio i sar., 2003, (i) Wei i sar., 2015)

Upravo razlike koje se uočavaju u morfološkim strukturama, kao i količina produkovanog precipitata, predstavljaju osnovu za odabir biokatalizatora koji će biti efikasni agens u procesu BIPK. Zavisno od odabrane metaboličke putanje, u tabeli 2 su prikazani predstavnici različitih bakterijskih rodova koje su uključeni u efikasan BIPK proces.

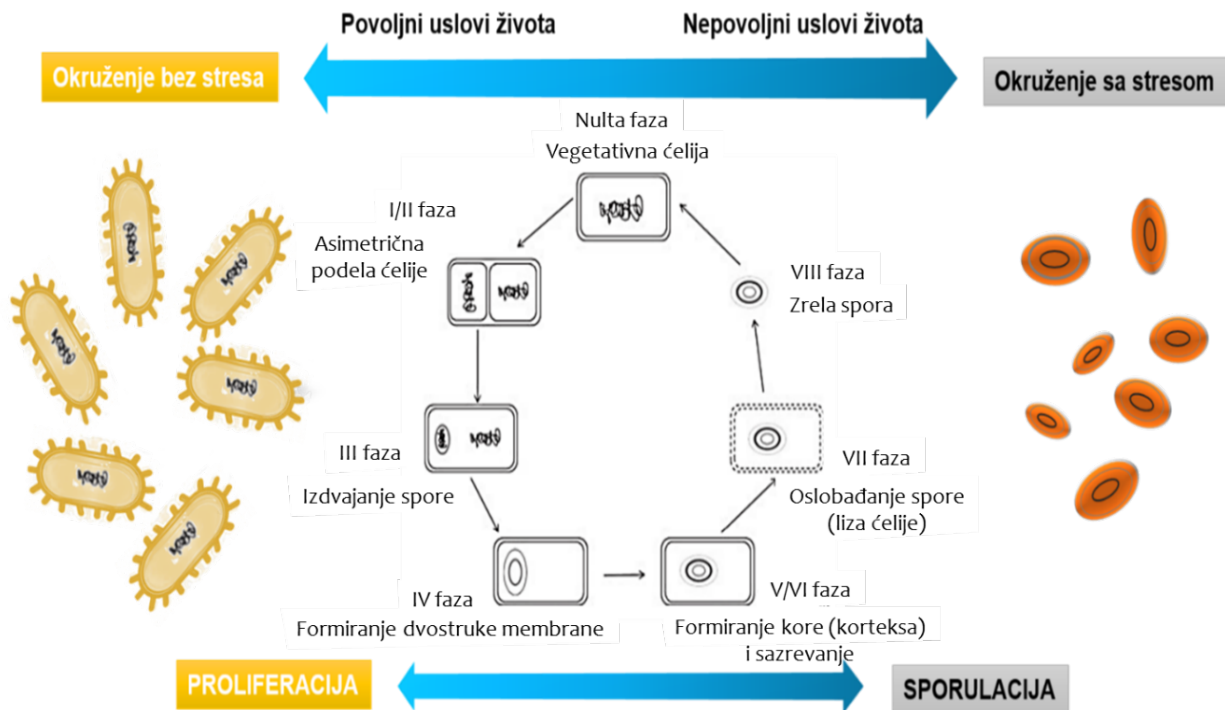
Tabela 2. Bakterije sa biokalcifikujućim potencijalom kroz različite metaboličke putanje

Anaerobni procesi		Aerobni procesi	
Metabolička putanja	Bakterijski rod	Metabolička putanja	Bakterijski rod
Oksidacija metana	<i>Methanobacillus</i> <i>Beggiatoa</i>	Amonifikacija	<i>Myxococcus</i>
Redukcija sulfata	<i>Desulfitibacter</i> <i>Desulfobulbus</i> <i>Desulfovibrio</i>	Ureoliza	<i>Sporosarcina</i> <i>Bacillus</i>
	<i>Pseudomonas</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Bacillus</i> <i>Denitrobacillus</i> <i>Thiobacillus</i>		<i>Lisinibacillus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Nitrosomonas</i>

Nakon izbora metaboličke putanje koja će posredovati efikasnoj ekstracelularnoj produkciji karbonata, veoma je bitan i potencijal preživljavanja u nepovoljnih uslovima sredine (npr. smanjenje koncentracije vodonikovih jona, redukcija aktivnosti ATP-sintaze). Potrebno je odabrati one bakterije čija aktivnost nije ugrožena u sredinama sa visokim alkalitetom, te po mogućnosti sa sposobnošću formiranja otpornijih oblika ćelije tokom nepovoljnih uslova sredine. To bi značilo da su u procesu BIPK poželjne alkalorezistentne ili alkalofilne, sporogene bakterijske vrste. Alkalofilne bakterije imaju optimum rasta na pH vrednostima oko 10, pokazujući minimalan ili nikakav rast pri neutralnim i nižim pH vrednostima (Rampelotto, 2010). Alkalna okruženja, koja favorizuju rast alkalofilnih i alkalorezistentnih bakterija, neretko su mesta sa visokim količinama kalcijuma i/ili visokim salinitetom (npr. alkalna jezera, pećine, podzemne vode u polusušnim i pustinjskim oblastima). Zbog toga sporogene bakterije iz alkalnih okruženja predstavljaju bioagense čiji je biokalcifikujući potencijal izražen i u spomenutim, nepovoljnim uslovima sredine (Rampelotto, 2010, Tomczyk-Žak i Zielenkiewicz, 2015).

Još jedna bitna činjenica sa aspekta bakterijskog prilagođavanja na visoku pH vrednost jeste da se alkalna okruženja mogu okarakterisati kao sistemi sa stabilnom i prolaznom alkalnošću. Stabilno alkalno okruženje (alkalna jezera, kalcitna zemljišta, podzemne vode i pustinje) je prouzrokovano kombinacijom klimatskih, geoloških i geografskih uslova sredine. Suprotno ovome, prolazna alkalnost, prisutna u poljoprivrednim i urbanim regijama, može da nastane usled povećane upotrebe bioloških i drugih tipova đubriva, kao i visoke industrijske aktivnosti. Obe vrste alkalnosti podržavaju rast alkalofilnih mikrobiota, s obzirom da aktivnost bakterija čiji optimum rasta pri ekstremnim pH vrednostima prati prilagođavanje kako na ćelijskom tako i na molekulskom nivou. Ove promene nazivaju se pH homeostaze i omogućavaju alkalofilima da stabilizuju unutarćelijski pH u odnosu na visoku spoljašnju pH vrednost i neometano vrše sve metaboličke aktivnosti (Kulkarni i sar., 2019).

Kada su izložene drastičnim promenama u okruženju, prepoznajući spoljašnji stres, neke bakterije mogu da povećaju nivo preživljavanja. Različite vrste nepovoljnih uticaja smanjuju bakterijsku aktivnost indukujući zaustavljanje proliferacije (rast, razviće i replikaciju) i tada ćelije otpočinju proces sporulacije tj. formiranje zaštitne, rezistentne forme života nazvane spora (Heinrich i sar., 2015). Iako je poznato da brojni faktori spoljašnje sredine (temperatura, pH vrednost, količina kiseonika, prisustvo i koncentracija minerala) utiču na sporulaciju, ipak najznačajniji induktori sporulacije jesu nedostatak nutrijenata, gustina mikrobne populacije, kao i nakupljanje „štetnih“ metabolita (Logan i Vos, 2011). Prelaskom sa proliferativnog načina života u latentnu fazu tj. stanje primirenja (slika 5), bakterijama je omogućeno ograničenje metaboličkih aktivnosti i čuvanje genetičkog materijala sve dok se ponovo ne stvore povoljni uslovi života (Logan i Halket, 2011). Metaboličko mirovanje, uz druge faktore poput broja i hemijskog sastava omotača, predstavlja izvrsnu otpornost bakterija na mnogobrojne agense uključujući toplotu, zračenje, hemikalije. Očekivana posledica je njihov opstanak duži vremenski period (Logan, 2011). Iako su latentne, spore su i dalje u interakciji sa spoljašnjom sredinom, što im omogućava prelazak u vegetativnu ćeliju već posle nekoliko sekundi povoljnih uslova života (Leggett i sar., 2012). Taj pokretački metabolizam može biti indukovano pojavom minimalne količine nutrijenata neophodne za rast i razviće, kao i nizom drugih činilaca (Logan, 2010).



Slika 5. Proces sporulacije kod bakterija (prilagođeno iz Leggett i sar., 2012)

Kada bi iz raznovrsne grupe spороgenih bakterija trebalo izdvojiti one vrste koje se definišu kao aerobne i sporogene, to bi svakako bili predstavnici roda *Bacillus* i njemu bliski rodovi (Logan, 2010). Najveći broj vrsta ovog roda su gram-pozitivni, aerobni štapići dužine između 1 i 10 μm (Martin i sar., 2012). Iako se sagledavaju kao aerobne i sporogene vrste, među *Bacillus* vrstama ima i fakultativnih anaeroba, te se razlike ovog roda nadalje ogledaju i u gram varijabilnosti i metaboličkom potencijalu u ekstremnim uslovima života (Logan i Vos, 2011). Većina spороgenih aeroba su ubikvitarne bakterije, najčešće saprotrofi koji žive u svim tipovima ekosistema (Logan i Vos, 2011). Kao i adaptiranost na visoku pH vrednost sredine, i spороgenost pojedinih bakterijskih vrsta ukazuje na visoku otpornost i relativnu rasprostranjenost u značajnim i raznovrsnim mikrobnim zajednicama u zemljištu, mulju, sedimentima, itd. (Mandić-Mulec i Prosser, 2011).

Alkalofine i sporogene bakterije imaju nezamenjivu ulogu u ciklusu ugljenika, azota i sumpora u ekstremnim ekosistemima koji čine više od 80% Zemljine površine (Jorquera i sar., 2019). Naime, one su deo mikrobnih zajednica u kojima je uočena široka paleta strategija i

mehanizama za opstanak i nesmetano funkcionisanje u toku biokalcifikacije (Mandic-Mullec i Prosser, 2011, Jorquera i sar., 2019). Ove specifičnosti su praćene nizom razlika u ponašanju ovih bakterija, stepenu i diverzitetu metaboličkih aktivnosti, ali i nivou prilagođavanja u ekstremnim uslovima sredine. Uz to, mikrobne zajednice su aktivni učesnici u biogeochemijskim ciklusima, pri čemu imaju značajan uticaj na ekosisteme, baš kao što abiotički faktori utiču na mikrobnu raznovrsnost i strukturu metaboličkih reakcija (Santoyo i sar., 2017). Praćenje i izučavanje biodiverziteta u ekstremnim uslovima različitih ekosistema otvara mogućnost za izolovanje i primenu ovih mikrobiota u različitim biotehnološkim oblastima (Jorquera i sar., 2019). Takođe, primenom alkalofilnih, sporogenih bakterija u procesima BIPK je ukazano na ekonomski opravdaniji tehnološki proces u odnosu na upotrebu asporogenih ćelija koje zahtevaju daleko kompleksniju i vremenski zahtevniju kultivaciju (Jorquera i sar., 2019). Na osnovu dosadašnjih biotehnoloških procesa, nameću se sledeće prednosti idealnog bioagensa sa biokalcifikujućim potencijalom:

1. ureoliza kao najefikasnija metabolička putanja;
2. alkalorezistentnost/alkalofilnost zbog specifičnosti sredine u kojima se odigrava BIPK;
3. sporogenost zbog mogućnosti preživljavanja u ekstremnoj sredini (potrebna sporulacija, ali i brze reakcije klijanja nakon što se steknu uslovi za proliferaciju);
4. halotolerantnost do halofilnost zbog činjenice da su neretko alkalne sredine ujedno lokaliteti sa hipersalinitetom;
5. ispitivanjem odnosa prema kiseoniku bi se dobio odgovor na pitanje da li bi izabrana ureolitička bakterija imala jednaku biokalcifikujuću aktivnost na površini, subpovršinski i u dubini matriksa koji se tretira.

U idealnim okolnostima, odabrani biokatalizator je ureolitička, sporogena i alkalofilna bakterija sa visokim biokalcifikujućim potencijalom u aerobnim i hipersalinitetnim uslovima sredine. Takođe, izabrana bakterija treba da bude tolerantna na visoku koncentraciju uree i kalcijuma u okruženju, te da ureazna aktivnost predstavlja konstitutivnu ili bar indukovanu osobinu čak i u ekstremnim uslovima sredine (Whiffin, 2004).

3.3.4. Uloga ćelije i ekstracelularne polimerne matrice u BIPK

Metabolička aktivnost bakterija ne predstavlja nužno jedinu ulogu koju bakterije mogu odigrati kako bi se formirali kristali CaCO_3 u toku procesa BIPK. Naime, stvaranje precipitata je rezultat nukleacije i formiranja kristala oko aktivnih bakterijskih ćelija koje na taj način predstavljaju centre nukleacije (Soon i sar., 2016). Uzimajući ovu činjenicu u obzir, uloga vegetativne bakterijske ćelije se sagledava kroz sledeće karakteristike:

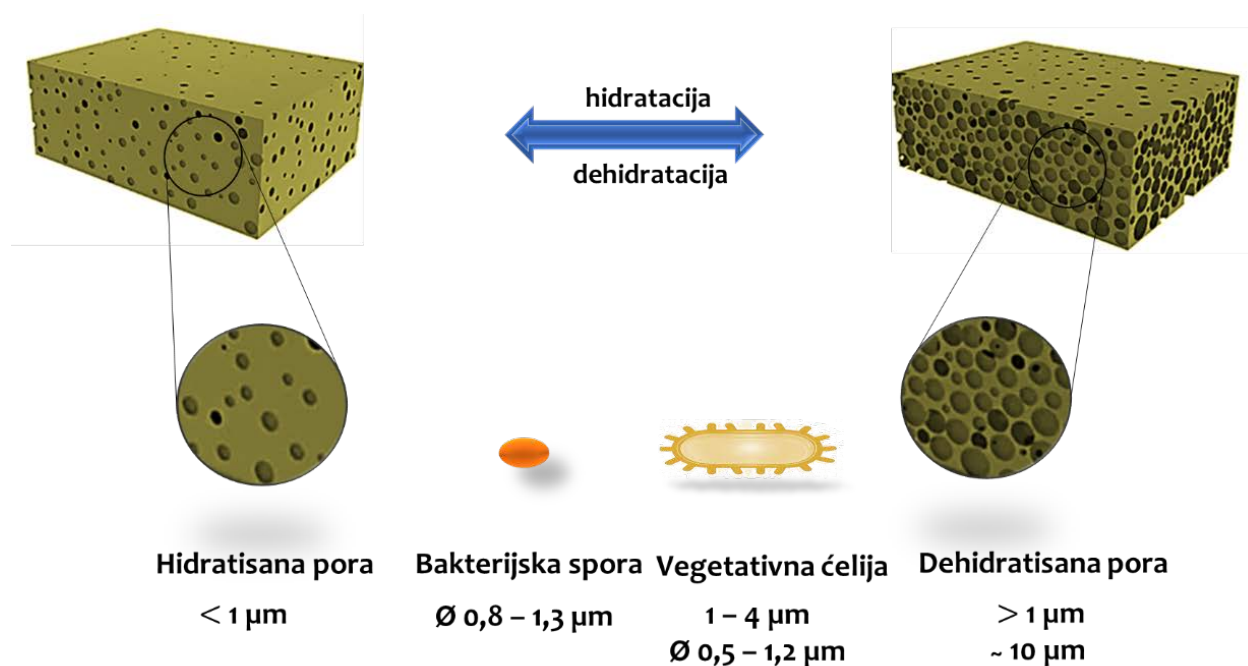
1. geometrijska kompatibilnost i pokretljivost ćelije;
2. elektronegativnost i hidrofobnost ćelijskih zidova;
3. propustljivost ćelijske membrane;
4. mogućnost formiranja biofilma.

Geometrijska dostupnost tokom formiranja i rasta karbonatnih kristala je jednako bitna kao i postojanje centara nukleacije. Nepoželjno je da bakterijske ćelije budu u potpunosti prostorno ograničene jer bi to ometalo difuziju jona u sistemu i otežalo pravilan rast kristala. Takođe, slobodan prostor omogućava pokretljivost ćelije i difuziju jona iz/u ćeliju (Jonkers i sar., 2010, Soon i sar., 2016). Jonkers i sar. (2010) ističu da je geometrijska kompatibilnost ćelije u funkciji poroznosti cementnih materijala jer je prosečan dijametar pora ovog matriksa veoma promenljiv (slika 6). Hidratacijom se smanjuje stepen poroznosti matriksa, tako da veliki deo pora ima dijametar manji od prosečnog prečnika bakterijske spore. Promenljivost poroznosti materijala uticaće i na mogućnost aktiviranja spora, proliferaciju vegetativnih ćelija i otpočinjanje metaboličkih aktivnosti značajnih za proces BIPK. To bi praktično značilo da broj prisutnih bakterijskih ćelija nije i stvaran broj aktivnih centara nukleacije (Jonkers i sar., 2010).

Nadalje, oblik i pokretljivost bakterijske ćelije predstavlja značajan faktor za odigravanje precipitacije, s obzirom da će od površine bakterije, kao i mogućnosti da se pokreće, zavisiti stepen akumulacije kalcijumovih jona na ćelijski zid (Whifin, 2004). Najveći broj bakterija sa biokalcifikujućim potencijalom su štapići po tipu bacilusa (Whifin, 2004, Jonkers i sar., 2010, Farrugia i sar., 2019). Međutim, i koki bakterije poput *Staphylococcus saprophyticus* i

Micrococcus sp. mogu doprineti procesu precipitacije kalcijum karbonata (Kim i sar., 2018, Imran i sar., 2019). U novijoj naučnoj literaturi, *Bacillus* i slični rodovi (npr. *Lysinibacillus*) predstavljeni su kao dobar izbor gram-pozitivnih bakterija za *in situ* BIPK procese (Davies i sar., 2018; Mors i Jonkers, 2019; van Mullem i sar., 2020).

Kako deo sporogenih oblika ostaje zadržan u porama materijala i nema mogućnost za aktiviranje, bitno je obezbediti dovoljan broj spora za postizanje efikasnosti procesa BIPK posredstvom aktivnih, vegetativnih oblika (Zhang i sar., 2019). U tom smislu, Zhang i sar. (2019) su utvrdili da je optimalan broj spora inicijalno unetih u odabrani čvrsti, porozni sistem oko $8 \log \text{CFU}^6/\text{mL}^7$, a da će broj vegetativnih oblika koji ostvaruju BIPK zavistiti od faktora sredine, kao što su koncentracija kalcijumovih jona, stepen vlage i pH vrednost sredine.



Slika 6. Odnos prosečnog dijametra pora i bakterijske ćelije po tipu bacilusa

Površina ćelije predstavlja mesto za aktivnu nukleaciju karbonatnih kristala (slika 1) i to zbog elektronegativnosti ćelijskog zida koji potiče od mnoštva reaktivnih grupa (karboksilna, fosfatna, amino, itd.). Zbog elektronegativnosti ćelija, biomasa bakterija se ponaša kao

⁶ CFU – eng., colony-forming unit; broj formiranih kolonija je jedinica koja se koristi u mikrobiologiji za procenu broja vijabilnih (kulturabilnih) ćelija mikroorganizama;

⁷ odnosi se na zapreminu bakterijske suspenzije (zamena za česmensku vodu) sa kojom je izvršeno umešavanje cementa i formiranje cementne paste

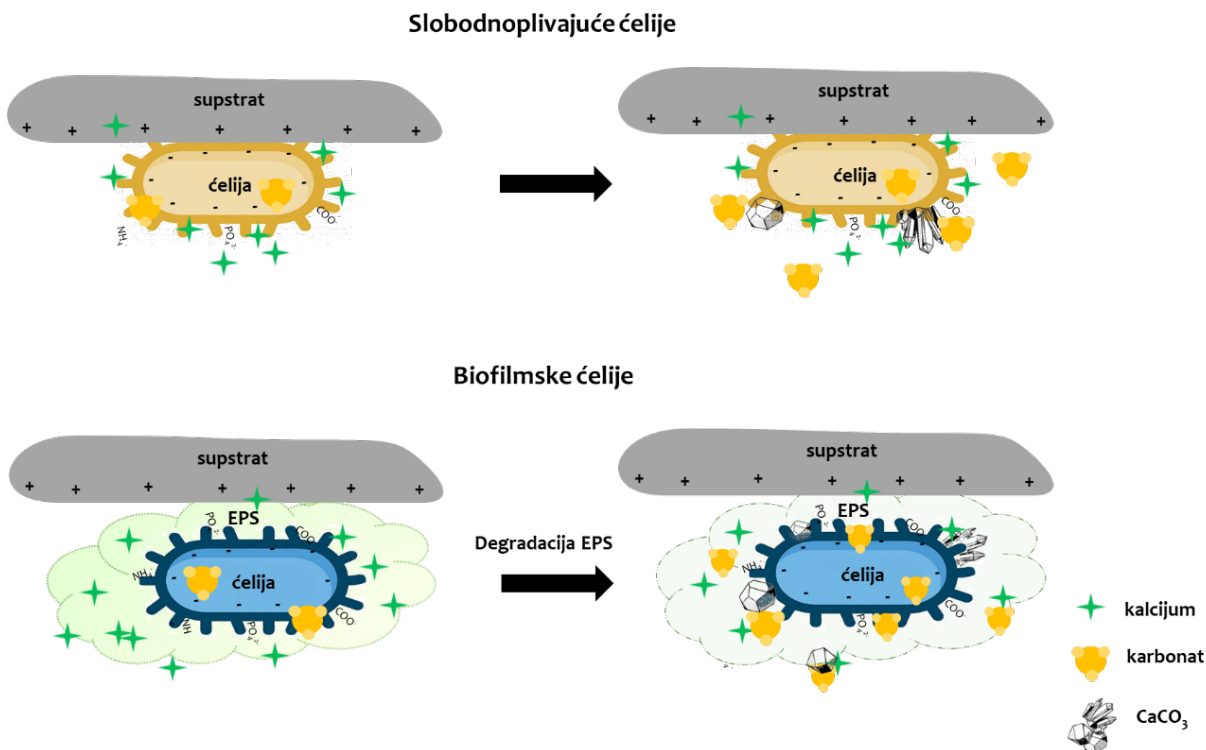
umreženi elektronegativni punjač koji favorizuje akumulaciju i kompleksiranje pozitivnih jona metala. Na taj način ostvario se jedan od preduslova za otpočinjanje procesa BIPK te je omogućena stehiometrijska interakcija jona metala i ekstracelularno produkovanih karbonatnih jona (Zhu i Dittrich, 2016). Mesta na kojima je došlo do stvaranja depozita kalcijuma ujedno predstavljaju mesta buduće nukleacije i stvaranja kristala. Neretko, kristali se formiraju sukcesivnim nagomilavanjem i ćelije bakterija mogu biti potpuno okružene nastalim kristalima (Zhu i Dittrich, 2016). Nagomilavanjem kristala na površini ćelije smanjuje se mogućnost ekstracelularne produkcije karbonata, uz promene u funkcionisanju mehanizama za transport jona i smanjenje permeabilnosti ćelijske membrane (Castanier i sar., 2000). Na osnovu razlika u strukturi ćelijskog zida utvrđeno je da su gram-pozitivne bakterije daleko češći bioagensi u efikasnoj precipitaciji CaCO_3 (Knorre i Krumbein, 2000).

Bakterijska precipitacija CaCO_3 je svakako rezultat pasivne i aktivne nukleacije. Pasivna karbonatna nukleacija se javlja promenom uslova sredine bakterijske ćelije (Soon i sar., 2014). Povećanje zasićenosti sredine jonima izaziva nukleaciju kristala, pa se samim tim promena pH vrednosti sredine nameće kao fizički induktor procesa BIPK (Knorre i Krumbein, 2000). Iz tog razloga, važno je sagledati i ulogu bakterijskih ćelija u odnosu na pH homeostazu. Iako dolazi do nagle promene alkalnosti sistema, mnogobrojne alkalofilne ili alkalorezistentne bakterije uspevaju da ostanu aktivne i indukuju precipitaciju. Drugim rečima, ćelije alkalofila održavaju svoj citoplazmatični pH ispod 8,5 pri nagloj promeni alkalnosti, održavajući ga na tom nivou (Krulwich, 2005). Alkalna pH homeostaza se smatra centralnim bioenergetskim izazovom za alkalofilnu ili alkalorestistentnu bakteriju, s obzirom da omogućava postavljanje visoke gornje granice pH vrednosti za rast i razviće. Ovaj fenomen je, neretko, proučavan na *Bacillus* vrstama, pa je tako dokazano da se mutacije i promene površinskih molekula, u cilju održavanja vijabilnosti pri visokim pH vrednostima značajno razlikuju na nivou vrste (Krulwich, 2005). Primera radi, iako je izraženi alkalofil, biokalcifikujuća bakterija *Bacillus pseudofirmus* pokazuje fakultativnu alkalofilnost jer može da raste i blizu neutralne pH vrednosti zahvaljujući pokretanju pH homeostaznog efekta (Gilmour i sar., 2000). Konkretno, na pH vrednosti između 7 i 8, *B. pseudofirmus* udvostruči broj ćelija za 54 minuta, dok joj je na pH vrednosti između 8,5 i 10,5 potrebno svega 38

minuta. Razlike u toku kultivacije *B. pseudofirmus* na različitim pH vrednostima su uočljive i na sledeći način: kada je spoljašnja pH vrednost do 9,5, citoplazmatična pH vrednost je oko 7,5 što je optimalna vrednost za većinu neutrofila. Međutim, povećanjem pH vrednosti sredine na 10,2, unutrašnja pH vrednost se povećava na oko 8,2 što je daleko od podnošljivog za većinu bakterija. Krulwich (2005) takođe sugerise da, pored adaptacija koje olakšavaju pH homeostazu, alkalofilne bakterije imaju sposobnost da prilagode ključne citoplazmatične procese i strukture ćelijske membrane obezbeđujući dalju metaboličku aktivnost i ekstracelularnu produkciju jona.

Primarna adhezija bakterija na supstrat se vrši generičkim fizičko-hemijskim silama kao što su Van der Valsove i elektrostatičke sile, i/ili pomoću specifičnih površinskih struktura na ćeliji (pili, fimbrije i sl.). Na ovaj način se postiže interakcija sa površinskim strukturama na različite načine i različitom dužinom (Zhu i Dittrich, 2016). Takođe, ekstracelularna polimerna supstanca (EPS) ima određen uticaj na bakteriogene kristalne formacije. Smatra se da mogućnost adhezije i formiranja biofilma mogu značajno da utiču na smer procesa BIPK jer produkcija EPS-a značajno modifikuje mikrokruženje biofilmskih ćelije. Suštinski se obezbeđuje dodatni izvor jona i njihove interakcije među EPS slojevima (Tourney i Ngwenya, 2009). U istom istraživanju je napomenuto da prisustvo biofilma može biti razlog različite i promenljive kinetike BIPK i nukleacije kristala jer prisustvo biofilmskih ćelija povećava šanse za efikasno vezivanje jona iz okoline (slika 7).

Biogena polimerna matrica omogućava velikom broju bakterijskih ćelija pričvršćivanje za supstrat i/ili površinu prirodnog i veštačkog materijala (Zhu i Dittrich, 2016). Uz to, EPS se sastoji od naelektrisanih i neutralnih polisaharidnih grupa koje ne samo da ostvaruju vezivanje za površine već služe kao jonoizmenjivački sistem za „hvatanje“ i akumulaciju jona iz okoline. Posledično, EPS matrica ima visok ukupni elektronegativni naboj i akumulacija jona kalcijuma će biti pojednostavljena i lokalizovana u blizini biofilmskih ćelija (Zhu i Dittrich, 2016). Međutim, ova struktura može i da inhibira stvaranje depozita kalcita, te je potrebno da dođe do narušavanja strukture polisaharidne matrice da bi otpočeo proces aktivne precipitacije (Tourney i Ngwenya, 2009).



Slika 7. BIPK posredstvom slobodnoplivajuće i biofilmske ćelije (prilagođeno od Zhu i Dittrich, 2016)

Po ovoj teoriji, u matrici biofilma mogu biti sadržane različite rezidue kiselina i ugljenih hidrata za koje se lako apsorbuje velika količina dvovalentnih katjona kao što su Ca²⁺ i Mg²⁺. Privlačeći slobodne katjone, EPS matrica ih vezuje za negativno naelektrisane grupe, čime se primarno redukuje saturacija jona i inhibira karbonatna precipitacija. Međutim, nakon degradacije EPS-a, lokalna koncentracija Ca²⁺ je visoka i postaje dostupna, te otpočinje nagla reakcija sa ekstracelularnim karbonatnim jonima (Tourney i Ngwenya, 2009). Druga mogućnost je da CaCO₃ precipitira i u koherentnom EPS matriksu kroz kontinualno snabdevanje jonima i lokalnu promenu alkaliteta. Pored toga, EPS poboljšava koheziju sedimenata lepljenjem kristala na sličan način kao što pomaže formiranju biofilмова, te se morfologija kristala nastalih u biofilmu značajno razlikuje od kristala slobodnoplivajućih bakterija (Zhu i Dittrich, 2006).

3.4. Ureolitička aktivnost bakterija

3.4.1. Urea

Uloga azotnih jedinjenja u biogeohemijskom ciklusu kruženja neorganskih i organskih materija je veoma značajna (Vidaković, 2019). Od organskih jedinjenja na bazi azota posebno se izdvaja urea, koju mikroorganizmi potencijalno mogu da iskoriste kao izvor energije, C- i N-atoma. Urea (karbamid) je organski molekul, koji je prvobitno izolovan iz humanog urina, da bi tek pola veka kasnije postao prvi organski molekul sintetisan iz neorganske osnove (Kappaun i sar., 2018). Kao i amonijak i derivati amina, urea predstavlja reaktivan azot, lako dostupan većini živih bića. Mikroorganizmi, pre svega bakterije koje imaju sposobnost da usvajaju ureu kao izvor energije, imaju složeni enzimski aparat, koji omogućava hidrolizu uree na amonijum i karbonatne jone (Zhu i Dittrich, 2016). Enzimska priroda ove reakcije je konstitutivna osobina, s obzirom da je kodirana strukturnim genima čija ekspresija ne zavisi od prisustva supstrata u mikrokruženju ćelije. Karakteristično za ureazni enzim jeste činjenica da je on gotovo uvek intracelularno lokalizovan kod bakterija (Zhu i Dittrich, 2016), te se za određivanje ureolitičke aktivnosti najčešće primenjuju indirektno merenje promene koncentracije uree ili amonijaka (Mitchell i Ferris, 2005).

Međutim, jedan od osnovnih nedostataka primene ureolitičkih bakterija u bioremedijacijskim tehnikama jeste činjenica da u toku ureolitičke aktivnosti nastaju amonijum joni koji zaostaju u sistemu. Ureolitičke bakterije nemaju sposobnost da vrše amonifikaciju nastalih jona već dolazi do transporta u vanćelijski prostor gde se dešava adicija vodonikovim jonom i izdvajanje gasovitog amonijaka. Iz ugla životne sredine, nagomilavanje amonijaka u bilo kom prirodnom okruženju nije dobrodošlo (Lee i sar., 2018).

3.4.2. Ureaza amidohidrolaza

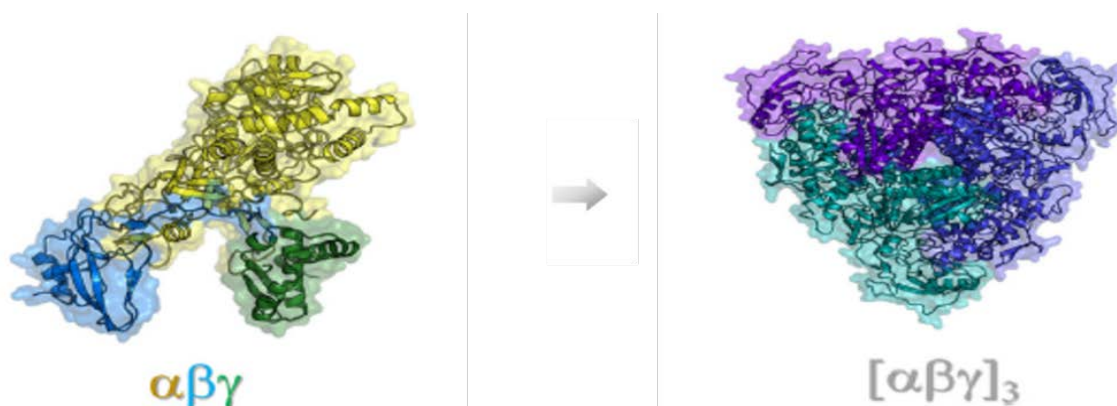
Naučnik Van Tieghem je 1864. godine uspešno izolovao prvu ureolitičku bakteriju *Micrococcus ureae* iz urina, a nakon 10 godina je izdvajanjem ureaznog enzima iz pasulja *Canavalia ensiformis* utvrđeno da je metabolička aktivnost koja dovodi do hidrolize uree enzimskog karaktera (Sumner, 1926). Tek krajem XXI veka ovaj enzim dobija naziv ureaza amidohidrolaza i svoj broj enzimske komisije EC 3.5.1.5. čime su definisane osnovne karakteristike enzima (tabela 3). Ovo je ujedno prvi enzim za koji je otkriveno da može da kristalizuje, te da za kofaktor ima dvovalentne jone nikla (Andrews i sar., 1989). Smatra se da je prosečna izoelektrična tačka za većinu bakterijskih ureaza oko 4,5, dok je optimalna pH vrednost za punu ureaznu aktivnost oko 8.

Tabela 3. Karakteristike enzima ureaze amidohidrolaze na osnovu EC broja

EC broj	Karakteristike na osnovu EC broja
3.	formiranje dva proizvoda od jednog supstrata putem hidrolize (hidrolaze)
5.	hidrolaze koje deluju na ugljenik-azotne veze koje nisu peptidne veze
1.	linearni amidi
5.	redni broj u grupi lineranih amida

Prvi trodimenzionalni strukturni model dobijen je na osnovu ureaze bakterije *Klebsiella aerogenes*. Po ovom modelu, ureaza se sastoji od jedne velike (α , 60-76 kDa) i dve manje podjedinice (β , 8-21 kDa i γ , 6-14 kDa), koje formiraju trimere sa aktivnim bimetalnim centrom za jone nikla (slika 8). Kasnije je ustanovljeno da ovakvu primarnu strukturu poseduje i istorodni enzim bakterije *Sporosarcina pasteurii* (Kappaun i sar., 2018).

Ureolitička aktivnost je široko rasprostranjena među prokariotima, ali i eukariotima poput gljiva i biljaka. Do sada je najznačajnija analitička primena ureaze bila u medicini za kvantifikaciju uree u krvi ili urinu. U početku se smatralo da je ureazni enzim potencijalni faktor virulencije kod patogenih bakterija kao što su *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis* i *Staphylococcus saprophyticus*. Međutim, utvrđeno je da ureazu proizvode taksonomski raznovrsne bakterijske vrste, uključujući nepatogene mikrobiote zemljišta i vodenih sistema (Kumari i sar., 2016).

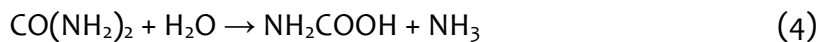


Slika 8. Trakasti dijagram ureazne subjedinice (levo) i celog kompleksa sa aktivnim kofaktorskim centrom (desno) kod *S. pasteurii* (Kappaun i sar., 2018)

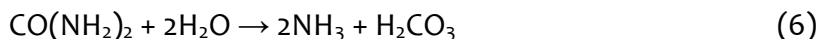
3.4.3. Ureazna metabolička aktivnost

Ureolitička hidroliza je jednostavan proces, ukoliko se posmatra kao niz hemijskih reakcija. U prvom koraku (4-6), urea hidrolizuje do amonijaka (NH_3) i ugljene kiseline (H_2CO_3). Drugi korak podrazumeva uravnoteženje amonijaka i ugljene kiseline u vodi kako bi se formirali bikarbonatni (HCO_3^-), amonijum (NH_4^+) i hidroksilni (OH^-) joni (7-8). Tokom ove reakcije dolazi do povećanja pH vrednosti sredine, što je neophodno da se indukuje precipitacija karbonata. Porast pH vrednosti menja ravnotežu karbonatnih jona (9), da bi u prisustvu Ca^{2+} jona (10) došlo do supersaturacije i formiranja precipitata CaCO_3 . Time otpočinje proces bakterijski indukovane precipitacije karbonata posredstvom ureolize (11).

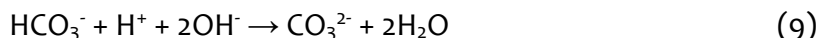
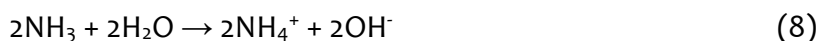
I korak:



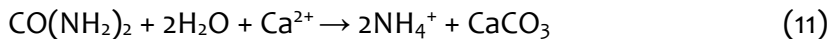
Sumarno za I korak:



II korak:



Sumarno za proces:



Sumarno, iz jednog mola uree intracelularno nastaje jedan mol amonijaka i jedan mol karbamata, koji spontano hidrolizuje u jedan mol ugljene kiseline i dodatni mol amonijaka. Hidroliza uree je najlakše kontrolisana reakcija stvaranja karbonata, sa potencijalom za proizvodnju visokih koncentracija CaCO_3 u relativno kratkom vremenu (Mitchell i Farris, 2005). Pre više od pola decenije smatralo se da ureolitičke bakterije mogu da rastu samo u prisustvu uree kao izvora energije (Zhu i Dittrich, 2016). Međutim, dokazano je da ove vrste rastu i u prisustvu visoke koncentracije amonijaka u alkalnim uslovima sredine. To je otvorilo pitanje da li kod vrsta iz roda *Sporosarcina* i *Bacillus* formiranje ureaze nije potisnuto prisustvom amonijaka, kao što je to slučaj kod *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes eutrophus* i *Klebsiella aerogenes*, kod kojih u tim situacijama dolazi do inhibicije ureazne aktivnosti (Miirsdorf i Kaltwasser, 1989). Od tada se bakterije koje produkuju ureazni enzim mogu podeliti na dve različite grupe na osnovu njihovog odgovora na prisustvo amonijaka.

Prvu grupu čine one bakterije čija ureazna aktivnost nije potisnuta prisustvom amonijaka, kao što su vrste iz roda *Sporosarcina* i *Bacillus*. Druga grupa obuhvata spomenute bakterije iz rodova *Pseudomonas*, *Alcaligenes* i *Klebsiella* kod kojih u prisustvu amonijaka dolazi do proizvodnje glutamina što sprečava dalju hidrolitičku reakciju (Mulroonie i sar., 2001). Kod ove grupe bakterija, ureaza kao i ostali enzimi povezani sa metabolizmom azota regulisani su aktivnošću glutamin sintetaze i složenim mehanizmom regulacije transkripcije. Sa druge strane, *S. pasteurii* dozvoljava ekspresiju ureolitičke aktivnosti nezavisno od dostupnosti azota ili promene pH vrednosti (Ma i sar., 2020). Budući da se u toku indukovane precipitacije kalcijum karbonata dešava hidroliza velike količine uree i produkcija amonijaka, od posebnog interesa su samo bakterije poput *S. pasteurii* čija ureazna aktivnost nije potisnuta prisustvom amonijum jona (Whiffin, 2004). Međutim, aktivnost ove bakterije je inhibirana u anaerobnim uslovima, što može biti ograničavajući faktor u toku primene procesa BIPK (Ma i sar., 2020). Na kraju, hidrolizom uree ispunjavaju se dva preduslova kalcitne precipitacije: povećanje pH sredine i koncentracije karbonatnih jona. U laboratorijskim uslovima, favorizovanje procesa precipitacije CaCO_3 postiže se dodatkom jona kalcijuma u hranljivu podlogu u vidu organskih ili neorganskih soli (Zhu i Dittrich, 2016).

3.4.4. Faktori koji utiču na bakterijski indukovanu precipitaciju karbonata

Osim aktivnosti enzimskog sistema, koji pokreće metaboličke reakcije koja su osnova procesa BIPK, promenljivi uslovi sredine imaju značajan uticaj na efikasnost precipitacije. Veliki broj faktora utiče kako na efikasnost procesa BIPK, tako i na morfologiju i sazrevanje kristala CaCO_3 (Soon i sar., 2014). Potencijal BIPK će zavisiti od sledećih faktora:

1. Temperatura i pH vrednost;
2. Prisustvo i koncentracija osnovnog supstrata (uree);
3. Prisustvo i koncentracija kalcijumovih jona;
4. Koncentracija bakterijskih ćelija;
5. Prisustvo mikroelemenata i kofaktora enzimske reakcije.

Presudni faktor za postizanje željenog potencijala biokalcifikacije jeste metabolička putanja (Anbu i sar., 2016). Na osnovu sagledane naučne literature, najveća efikasnost procesa BIPK postignuta je ureolitičkom aktivnošću bakterijskih vrsta iz rodova *Sporosarcina*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Lysinibacillus*, itd. (Jonkers i sar., 2010, Siddique i Chahal, 2011, Son i sar., 2018, Pang i sar., 2019, Farrugia i sar., 2019).

Metabolička aktivnost bakterija, koja je najčešće enzimskog karaktera, zavisice od pH vrednosti sredine i njenih promena (Soon i sar., 2014). Alkalnost sistema favorizuje stvaranje i generisanje karbonatnih i bikarbonatnih jona (Arunachalam i sar., 2010). Metabolička aktivnost, poput ureolize, dovodi do zasićenja sistema alkalnim nusproduktima, tako da je optimalna vrednost metaboličke aktivnosti i procesa BIPK često ista (Soon i sar., 2014). Postizanjem pH vrednosti između 9 i 9,5 obezbeđuju se optimalni uslovi za uspešno sazrevanje stabilnih kristalnih formi poput kalcita i aragonita (Anbu i sar., 2016). Posledica precipitacije CaCO_3 može da bude smanjenje pH vrednosti, s obzirom da dolazi do stvaranja stabilnih produkata (Arunachalam i sar., 2010). Gat i sar. (2014) su dokazali da ureoliti menjaju pH vrednost sredine za gotovo 2 pH jedinice, pri čemu se na samom početku uočava brza i nagla promena pH vrednosti ka alkalnoj sredini. Kako je temperatura veoma promenljiv abiotički faktor u ekosistemima, bakterije koje učestvuju u procesu BIPK neretko

imaju široku biokinetičku zonu (Okwadha i Li, 2010). Optimalne vrednosti za metaboličku aktivnost i indukciju precipitacije preklapaju na vrednostima između 28 i 30 °C. Na temperaturama nižim od 20 °C sve metaboličke aktivnosti se usporavaju, a ispod 10 °C i zaustavljaju. Te promene u temperaturnim profilima mogu da utiču na dužinu sazrevanja karbonatnih kristala (Whiffin, 2004).

Za efikasan BIPK proces ključno je prisustvo glavnih supstrata koji pokreću ciljane metaboličke reakcije. Optimizacija koncentracije supstrata, koji je izvor ugljenika, energije i/ili azota, biće ključni faktor u postizanju maksimalne precipitacije kalcita. DeJong i sar. (2009) su dokazali da optimizacijom sadržaja uree, kao esencijalnog supstrata u procesu ureolize, dolazi do uniformne precipitacije CaCO_3 u kratkom vremenskom periodu. Takođe, određen broj naučnih radova se bavi optimalnim odnosom koncentracija između glavnog supstrata i kalcijumovih jona za postizanje indukovane precipitacije. Naime, određivanje vrednosti odnosa uree i kalcijumovih jona, kao esencijalnih supstrata za BIPK, veoma je individualno od sistema u kojem se vrši proces. Zbog toga, Al Qabany i sar. (2012) utvrđuju najpre potrebu za dodatkom ovih komponenti, a zatim i njihov optimalni odnos u laboratorijskim uslovima. Smatra se da ukoliko dođe do nagomilavanja uree u sistemu, dolazi do inhibicije enzimske reakcije, a da će, ukoliko postoji manjak kalcijumovih jona, supersaturacija izostati (De Muynck i sar., 2010). Vrednosti odnosa uree i kalcijumovih jona u obliku hlorida varira od 2 do 20, mada se vrednost od 11 spominje kao optimalna u većini slučajeva. Konkretno, u većini istraživanja u kojima se ispituju visokoefikasni sojevi *S. pasteurii*, koristi se 0,33 mol/L urea i 0,03 mol/L CaCl_2 (20 g/L uree i 3,14 g/L CaCl_2) (Yasuhara i sar., 2011, Nemati i sar., 2015). Takođe, primetno je da uglavnom varira koncentracija CaCl_2 (1,4-5,6 g/L), a da je koncentracija uree (20 g/L) konstantna vrednost u većini ispitivanja.

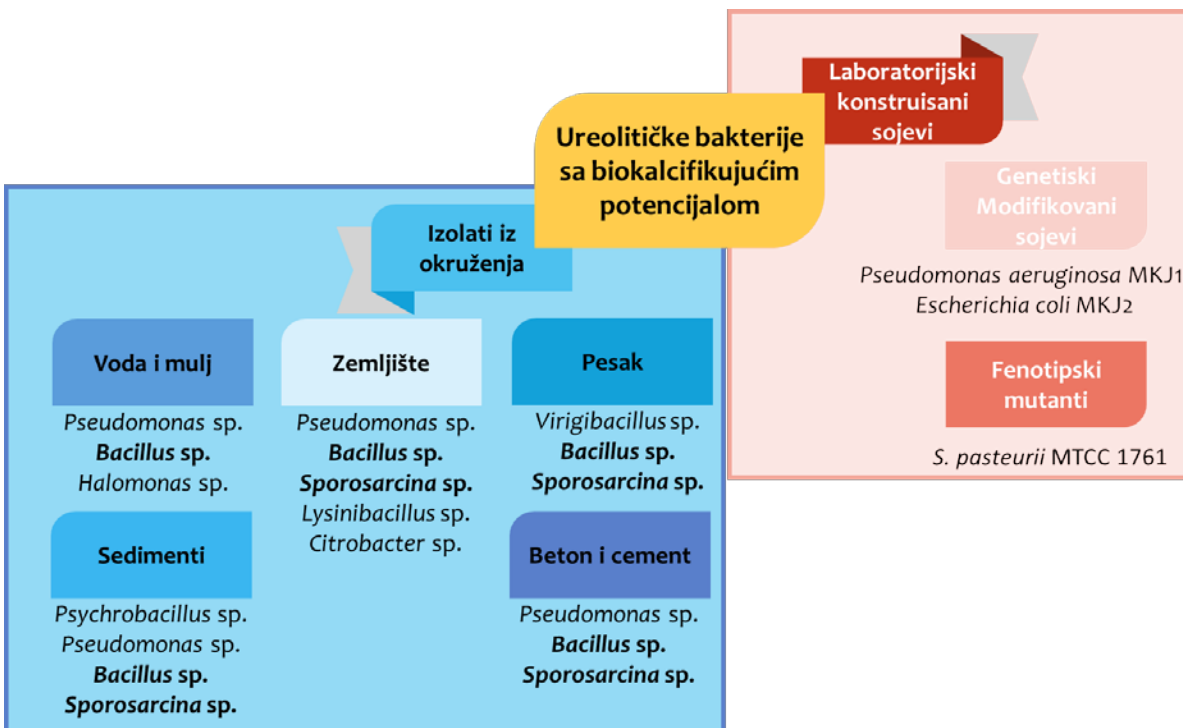
Akumulacija kalcijumovih i ekstracelularno produkovanih karbonatnih jona oko aktivnih ćelija dovodi do supersaturacije, precipitacije, grupisanja i sazrevanja kristala CaCO_3 . Kalcijumovi joni se u prirodi najčešće nalaze u obliku neorganskih ili organskih soli, te se isti izvori koriste i u bioprocesima (Soon i sar., 2014). Međutim, visoka koncentracija kalcijuma izaziva inhibiciju supstratom, pa se vrednosti do 0,25M smatraju najboljim izborom za efikasnu biokalcifikaciju

(Hammes i sar., 2003). Kroz taloženje čvrste, kristalne faze, omogućava se uklanjanje povećane, neretko inhibitorne koncentracije kalcijuma, dalja aktivnost bakterija, kao i stvaranje i sazrevanje kristalnih oblika CaCO_3 oko ćelija (Rodriguez-Navarro i sar., 2012).

Uticao mikroelemenata može da bude dvojak. Primera radi, prisustvo niklovih (Ni^{2+}) jona na aktivnom mestu ureaze je od suštinskog značaja za funkcionalnost i strukturni integritet enzima. Takođe je dokazano da se efikasnost BIPK povećava dodavanjem nikla u hranljivu podlogu. Dodatkom Ni^{2+} jona u koncentraciji 5-100 μM značajno se povećava stepen precipitacije (Bachmeier i sar., 2002). Slično tome, Al-Thawadi (2008) je dokazao da je produkcija ureaze optimizovana dodavanjem 10 μM Ni^{2+} (u obliku NiCl_2). Svi prečišćeni oblici ovog enzima zahtevaju prisustvo nikla kao kofaktora zbog stabilnosti strukture (Moble i sar., 1995). Nasuprot tome, prisustvo dodatnih jona nikla nije ukazalo na povećanje precipitacije CaCO_3 kod ureolita *Sporosarcina pasteurii* (Bachmeier i sar., 2002). Aktivnost ureaze je poboljšana, ali nije u potpunosti zavisna od prisustva Na_2EDTA , DL-ditiotreitola (0,1-5 μM), Ba^{2+} jona ili citrata (2-20 μM) (Smith i sar., 1993). Prisustvo Na^+ , K^+ , Cl^- , Br^- , acetata ili nitrata (2-20 mM) ne utiču na aktivnost ureaze, dok prisustvo Li^+ , Zn^{2+} ili I^- može izazvati smanjenje ureazne aktivnosti (Smith i sar., 1993).

3.4.5. Ureolitičke bakterije sa biokalcifikujućim potencijalom

Ureolitičke bakterije su ubikvitarni mikroorganizmi, koji uspešno modifikuju geohemijske uslova svog okruženja. Mikrobna zajednica ureolita posreduje formiranju karbonatnih formacija, kruženju azota u prirodi, a utiče i na permeabilnost i alkalnost sistema (Zhu i Dittrich, 2016). Prisutne u zemljištu i drugim ekosistemima odakle su neretko izolovane (slika 9), ureolitičke bakterije omogućavaju biokalcifikaciju kroz biološku indukciju precipitacije. Naučno interesovanje za izolovanje prirodnih sojeva ureolitičkih bakterija prošireno je poslednjih decenija. Sa druge strane, primetno je da gotovo nikada nije praćen identični protokol za izdvajanje i selekciju. Šeme izolovanja ureolitičkih bakterija variraju od krajnjeg cilja selekcije, sa razlikama u početnim koracima obrade uzorka, ali i u daljoj manipulaciji.



Slika 9. Predstavnici ureolitičkih bakterija sa biokalcifikujućim potencijalom iz okruženja i laboratorijskih manipulativnih tehnika

Mesta izolovanja ureolitičkih bakterija sa biokalcifikujućim potencijalom su usko povezana sa ekosistemima u kojima se očekuje poseban doprinos ovih bakterija u procesu biokalcifikacije. Naime, najveći broj izolata izdvojeno je iz alkalnih i kalcifikujućih zemljišta. Primetno je da izolati pripadaju rodovima *Bacillus* (Chattrejee i sar., 2007, Li i sar., 2013, Achal i Pan, 2014, Schwantes-Cezario i sar., 2017) i *Sporosarcina* (Achal i sar., 2013, Burbank i sar., 2012, Li i sar., 2013). Posebno se izdvajaju vrste *B. lentus*, *B. subtilis*, *B. megaterium* i *B. thuringiensis*, kao i *S. pasteurii*, *S. globispora*, *S. ginsengisoli* i *S. korensis*. Takođe, neretko su izolovane ureaza pozitivni sojevi iz roda *Lysinibacillus* (Burbank i sar., 2012, Vahani i sar., 2013, Lee i sar., 2017, Vashisht i sar., 2018). Ostale ureolitičke bakterije, čija je efikasnost biokalcifikacije potvrđena, pojedinačne su vrste rodova *Flavobacterium* i *Acinetobacter* (Ferrari i sar., 1998), *Brevibacterium* (Burbank i sar., 2012), *Staphylococcus* (Ilhan i sar., 2014), kao i *Pseudomonas* (Rajasekar, 2018).

Od bakterijskih izolata iz vodenih sistema i kalcitnog mulja izdvajaju se *Bacillus* vrste, međutim, neretko izolovane sa bakterijama iz rodova *Pseudomonas*, *Salinivibrio* i *Halomonas* (Arias i sar., 2019), *Paenibacillus* (Seifert i sar., 2000), *Acinetobacter* i *Pseudomonas* (Lopez-Garcia i sar., 2005). Sa druge strane, Al-Thawadi i Cord-Ruwisch (2012) su izolovali samo *Bacillus* sojeve iz sedimentnog mulja. Usko povezano sa vodenim sistemima jeste izolovanje ureolitičkih bakterija iz peska, pa je tako potvrđeno prisustvo predstavnika iz rodova *Bacillus*, *Paenibacillus* i *Sporosarcina* u ovom tipu matriksa (Stabilnikov i sar., 2011, Hu i Dai, 2015, Bibi i sar., 2015, Nayanthara i sar., 2019). Primetan je značajan broj ureolita sa biokalcifikujućom potencijalom iz sedimenata, kao i materijala na bazi cementa (tabela 4).

Sedimenti iz kojih su izolovane ove bakterije izdvojeni su iz pećina, kalcitnih kamenoloma, rudnika i kopova, ali i morskog dna i površine kamenja prisutnih u kalcitnom zemljištu. Posebno se izdvajaju *Bacillus* vrste poput *B. licheniformis*, *B. pumilis* i *B. lentus*, ali i pojedini predstavnici rodova *Sporosarcina* i *Brevundimonas*. U uzorcima cementa, maltera, krečnjaka i betona dominantno su prisutne *Bacillus* vrste, koje su izolati i iz uzoraka uzetih sa površine istorijskih spomenika, krečnjaka, maltera i bojanih slojeva murala.

Izolovanjem prirodnih sojeva ureolita otvara se mogućnost i genetske modifikacije u cilju što veće produkcije ureaznog enzima, a samim tim i indukcije veće količine karbonata. Ovim se postiže snažna, brza i efikasna precipitacija CaCO_3 , pa su tako Bergdale i sar. (2012) iskoristili ureolitičke gene izolata *S. pasteurii* da bi stvorili genetski modifikovane bakterije *P. aeruginosa* MKJ1 i *Escherichia coli* MKJ2. Sa druge strane, Achal i sar. (2013) su izvršili fenotipsku mutaciju *S. pasteurii* MTCC 1761 pomoću UV zračenja, i na taj način poboljšali karakteristike od značaja za ciljani proces - alkalofilnost i ureolitičku aktivnost.

Tabela 4. Izolati ureolitičkih bakterija iz sedimenata i cementnih materijala

Mesto izolacije			
Sedimenti		Cementni materijali	
Izolovane vrste	Referenca	Izolovane vrste	Referenca
<i>Sporosarcina pasteurii</i> <i>S. luteola</i> <i>Bacillus lentus</i>	Omoregie i sar., 2011	<i>Micrococcus</i> sp.	Tiano i sar., 1999
<i>Brevundimonas dimitiuda</i>	Rodriguez-Navaro i sar., 2012	<i>B. sphaericus</i>	Hammes i sar., 2002
<i>Arthrobactersp.</i> <i>Flavobacterium</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	Rusznyak i sar., 2012	<i>B. lentus</i> <i>B. sphaericus</i>	Dick i sar., 2006
<i>B. pumilis</i> <i>P. grimonti</i> <i>Halomonas</i> sp.	Silva-Castro i sar., 2013	<i>B. thuringiensis</i> <i>B. pumilis</i>	Baskar i sar., 2006
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	Kang i sar., 2014	<i>Bacillus</i> sp. <i>Brevibacillus</i> sp.	Ettenaver i sar., 2011
<i>Enterobacter calcerogenus</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i>	Lopez-Moreno i sar., 2014	<i>Bacillus</i> sp. <i>Paenibacillus</i> sp.	Liu i sar., 2011
<i>Sporosarcina</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Brevundimonas</i> sp.	Wei i sar., 2015	<i>P. azotoformis</i>	Nonakaran i sar., 2015
<i>B. lentus</i> <i>B. fortis</i> <i>Sporosarcina</i> sp. <i>Pseudogracibacillus</i> sp.	Omoregie i sar., 2018	<i>B. licheniformis</i>	Helmi i sar., 2016
<i>B. licheniformis</i> <i>B. muralis</i>	Reeksting i sar., 2019	<i>Bacillus</i> sp. <i>Sporosarcina</i> sp.	Kim i sar., 2016

Takođe, u naučno relevantnim radovima sreću se referentni sojevi ureolitičkih bakterija koji predstavljaju ili radni mikroorganizam ili relevantni soj za poređenje dobijenih rezultata. Najčešće korišćeni referentni sojevi su prikazani u tabeli 5.

Tabela 5. Referentni sojevi ureolitičkih bakterija koji su korišćeni u procesima BIPK

Referentni soj	Zbirka kultura	Referenca
<i>Sporosarcina pasteurii</i> DSM 33	DSM ¹	Jonkers i Schlangen, 2007 Chen i sar., 2018
<i>S. pasteurii</i> ATCC 11859	ATCC ²	Bang i sar., 2001 Ramachandran i sar., 2001
<i>S. pasteurii</i> NCIM 2477	NCIM ³	Sarda i sar., 2009
<i>S. pasteurii</i> KCTC 3558	KCTC ⁴	Gorospe i sar., 2013
<i>Bacillus sphaericus</i> LMG 22257	BCCM/LMG ⁵	Wang i sar., 2017
<i>B. lentus</i> NCIB 8773	NCIB ⁶	Sarda i sar., 2009
<i>Myxococcus xanthus</i> CECT 422T	CEST ⁷	Rodriguez-Navaro i sar., 2003 Jroundi i sar., 2010
<i>Bacillus mucilaginosus</i> L3	CICC ⁸	Zheng i Qian, 2019

¹ DSM – Nemačka zbirka mikroorganizama; ²ATCC- Američka zbirka mikrobioloških kultura; ³NCIM – Indijska nacionalna kolekcija industrijskih mikroorganizama; ⁴KCTC – Koreanska kolekcija kultura; ⁵BCCM/LMG – Belgijska kolekcija mikroorganizama; ⁶NCIB – Britanska nacionalna kolekcija bakterija poreklom iz industrije, hrane i mora; ⁷CEST- Francuska nacionalna kolekcija mikrobioloških kultura; ⁸CICC – Kolekcija kineskog centra industrijskih kultura;

Sumarno, vrste iz roda *Bacillus* su najčešće ureolitičke bakterije koje se primenjuju za proces bakterijski indukovane precipitacije CaCO₃. Takođe, njihova otpornost se ogleda i u mogućnosti sporulacije u nepovoljnim uslovima okruženja (Zhu i Dittrich, 2016). *S. pasteurii*, koja se označava za model organizam ureolitičke bakterije sa biokalcifikujućim potencijalom, upravo je izdvojena iz roda *Bacillus* (Yoon i sar., 2001). Smatra se da je njen kapacitet za produkciju karbonatnih i biokarbonatnih jona kroz ureolizu dovoljno visok da u kontinuitetu vrši BIPK. Ovu bakteriju odlikuje izražena ureolitička aktivnost, a svi sojevi formiraju spore koje se odlikuju rezistentnošću u alkalnoj sredini (Zhu i Dittrich, 2016).

3.4.6. *Sporosarcina pasteurii* - model organizam efikasne biokalcifikacije

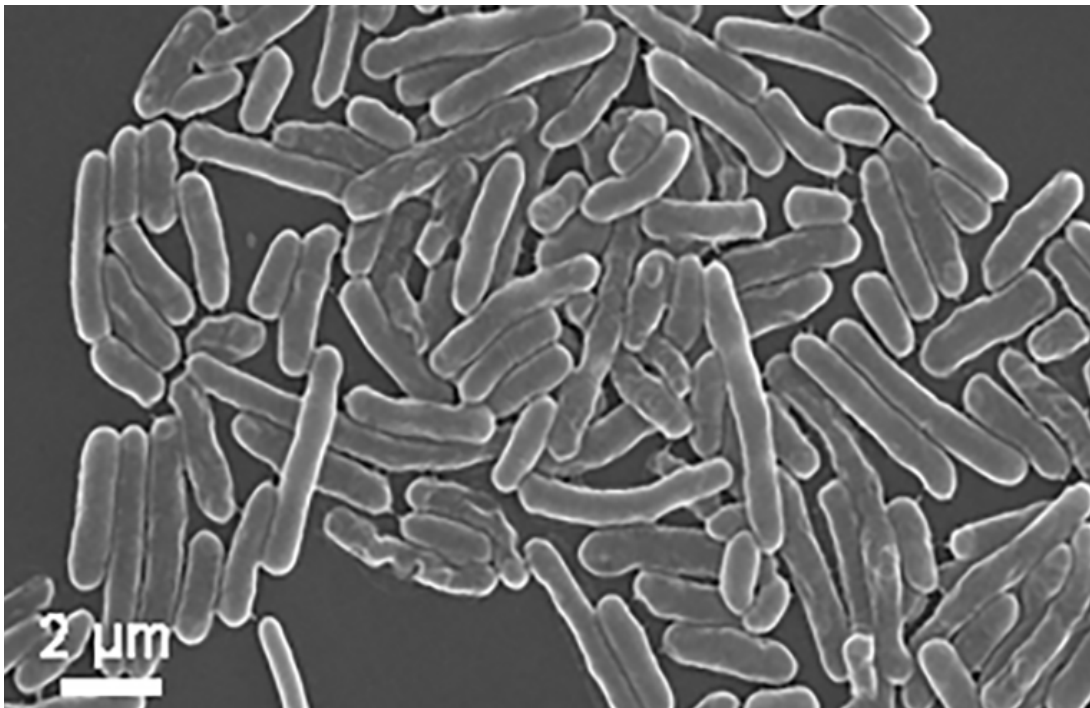
Sporosarcina pasteurii je bakterija sa najširoom inženjerskom aplikacijom u BIPK procesima (Bhaduri sar., 2016). Nekada poznata kao *Bacillus pasteurii*, ova ureolitička vrsta je nakon reklasifikacije pripala rodu *Sporosarcina*, kao što je prikazano u tabeli 6.

Tabela 6. Klasifikacija *Sporosarcina pasterii*

Taksonomija	
Carstvo	<i>Bacteria</i>
Razdeo	<i>Firmicutes</i>
Klasa	<i>Bacilli</i>
Red	<i>Bacillales</i>
Familija	<i>Caryophanaceae</i>
Rod	<i>Sporosarcina</i>
Vrsta	<i>Sporosarcina pasteurii</i> <i>S. globispora</i>
	<i>S. soli</i> <i>S. psychrophila</i>
	<i>S. ureae</i> <i>S. thermotolerans</i>

S. pasteurii je štapićasta, gram-pozitivna bakterija, sa ćelijama dužine između 1,3 i 4 µm, a dijametrom od 0,5 do 1,2 µm (slika 10). Kolonije ove bakterije su obično blede žute, gotovo bele, kružne, sjajne, promenljivom opalescencijom i veličinom, zavisno od hranljive podloge. U tečnim podlogama za rast, biomasa stvara uniformnu zamućenost, neretko praćenu sluzavim tankim filmom na površini. Ćelije ove nepatogene bakterije su aktivno pokretne zahvaljajući polarnoj flageli, dok je položaj spore (sub)terminalan. Svi poznati sojevi su sporogeni, sa ovalnim sporama dijametra između 0,8 i 1,3 µm. Ovi fakultativni anerobi su katalaza i ureaza pozitivni, a oksidaza varijabilni (Wei i sar., 2015). Imaju izuzetnu sposobnost da opstanu i rastu na mineralnim supstratima, čak i pri oskudnim izvorima ugljenika, pri čemu indukuju precipitaciju CaCO₃ (Stocks-Fischer i sar., 1999, Yoon i sar., 2001). Ova bakterija izrazito hidrolize ureu, posebno u prirodnim sredinama, a ta aktivnost se često smanjuje na sintetičkim hranljivim podlogama (Yoon i sar., 2001). Za optimalni rast i metaboličku aktivnost zahteva alkalni medijum, koji sadrži udeo amonijaka, najčešće u vidu 1% NH₄Cl.

Takođe, asimiluje fenilacetatnu, ali ne i limunsku, jabučnu i adipinsku kiselinu. Lako usvaja glukozu, fruktozu i fukozu, dok ne asimiluje glicerol, arabinozu, manitol, ribozu, ksilozu i trehalozu (Sun i sar., 2017). Svi sojevi daju pozitivan rezultat Voges-Proskauer testa.



Slika 10. SEM snimak ćelija *S. pasteurii* (Ghosh i sar., 2019)

Ova vrsta je izuzetno otporna na prisustvo soli, te iskazuje toleranciju i rast u podlogama koje sadrže do 10% NaCl. Redukcija nitrata, hidroliza kazeina i skroba, kao i likvefakcija želatina su varijabilne osobine kod *S. pasteurii* (Yoon i sar., 2001). Temperaturna biokinetička zona *S. pasteurii* je od 10 do 45 °C, sa optimumom rasta na oko 30 °C. Kod svih poznatih sojeva dolazi do supresije enzimske aktivnosti na pH vrednostima ispod 5 (Sun i sar., 2017).

Ova heterotrofna bakterija je izolovana iz različitih tipova alkalnih zemljišta i jezera (Burbank i sar., 2012, Vincent i sar., 2020), ali i iz morske vode (Yoon i sar., 2001), morskih sedimenata (Wei i sar., 2015), krečnjačkih pećina (Omoregie i sar., 2017) i sedimentnih muljeva (Skorupa i sar., 2019). Takođe, izolati ove ureolitičke bakterije pronađeni su i u različitim peskovitim sistemima (Bibi i sar., 2018, Stabnikov i sar., 2013). Ipak, ono zbog čega je *S. pasteurii* u naučnom fokusu jeste činjenica što ova bakterija, koristeći ureu kao izvor energije, uspeva da produkuje amonijum i karbonatne jone, čime povećava alkalnost sistema i indukuje

precipitaciju CaCO_3 u prisustvu jona kalcijuma (Chahal i sar., 2011). Primarna proizvodnja adenozin trifosfata (ATP) kroz hidrolizu uree vezana je za nekoliko bakterijskih vrsta kao što je *S. pasteurii*. Kod ove bakterije je stvaranje ATP-a u funkciji proizvodnje amonijum jona, pa samim tim i sa hidrolizom uree (slika 11). Elektrohemijski potencijal kontroliše generisanje ATP-a kod *S. pasteurii*, što se može prikazati jednačinom (12).

$$\Delta p = \Delta \text{pH} + \Delta \psi \quad (12)$$

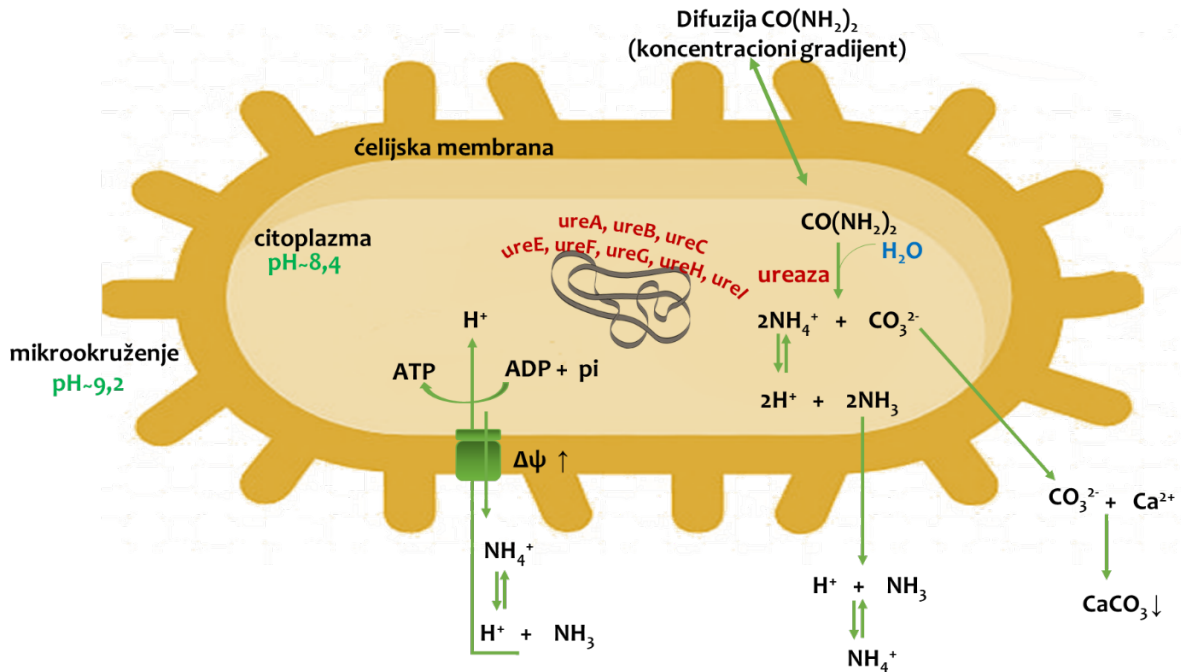
gde je:

Δp – elektrohemijski potencijal

ΔpH – gradijent pH (razlika između pH unutar i van ćelije)

$\Delta \psi$ – membranski potencijal (gradijent napunjenosti);

Sistem generisanja ATP-a tokom hidrolize uree kod *S. pasteurii*, (slika 11), obuhvata najpre difuziju uree u ćeliju zahvaljujući gradijentu koncentracije. Dejstvom ureaze, prisutne u citoplazmi, dolazi do hidrolize uree i povećanja alkaliteta citoplazme ($\text{NH}_3 / \text{NH}_4^+$), što dovodi do smanjenja pH gradijenta. Amonijum joni difunduju van ćelije (gradijent koncentracije) što povećava potencijal membrane i dovodi do povećanja ukupnog membranskog potencijala (Whiffin, 2004). Generisanje ATP-a kod neutrofilnih bakterija zavisi od gradijenta koncentracije protona. Ćelije „izbacuju“ nastale protone iz transportnog lanca elektrona, čime se prouzrokuje povećanje koncentracije protona (unutar ćelije niska koncentracija/ van ćelije visoka koncentracija). Protoni, zatim, difunduju u ćeliju preko gradijenta koncentracije u procesu sinteze ATP-a, što rezultira stvaranju molekula energije. Kod alkalofila, pH vrednost izvan ćelije je visoka (nizak sadržaj protona), te protoni difunduju iz unutrašnjosti ćelije u mikrokruženje radi uspostavljanja ravnoteže. Da bi rešili ovaj problem, alkalofilni organizmi su razvili već spomenutu alkalnu pH homeostazu za “vraćanje” protona u ćeliju kako bi nesmetano dolazilo do sinteze ATP-a (Aono i sar., 1999).



Slika 11. Sistem ATP generisanja kod ureolita *S. pasteurii* (prilagođeno od Whiffin, 2004)

Ovim mehanizmom se povećava pH vrednost citoplazme i smanjuje pH gradijent. Zbog toga se u toku hidrolize uree kod alkalofila povećava transport kroz membranu (povećanje $\Delta\psi$), te protoni nesmetano cirkulišu preko gradijenta koncentracije (Whiffin, 2004).

3.4.7. Genetička priroda ureazne aktivnosti

Svaka enzimska aktivnost, pa tako i razgradnja uree posredstvom bakterija iz roda *Bacillus* i njemu sličnih bakterijskih rodova, kodirana je genima koji su odgovorni i specifični za tu metaboličku aktivnost. Produkcija i aktivnost ureaze je kontrolisana strukturnim (osnovnim) genima *ureA*, *ureB* i *ureC*, koji kodiraju po jednu podjedinicu enzima (γ , β , α). Pored ovih gena, postoje i dodatni, funkcionalni geni (*ureD*, *ureE*, *ureF*, *ureG*) potrebni za kodiranje proteina koji aktivno utiču u sazrevanju podjedinica enzima. Ovi proteini imaju striktno određene lokacije u okviru ureaznog enzima kako bi omogućile vezivanje kofaktora (jona Ni^{2+}) u metalocentar enzima. Kod svih bakterijskih sistema enzimske regulacije, pa tako i kod ureolitičke aktivnosti, geni, koji kodiraju podjedinice, formiraju aktivni centar i omogućavaju ekspresiju, organizovani su u operonima sadržanim u jednom lokusu (Ma i sar., 2020).

Kod prethodno opisane bakterije *Sporosarcina pasteurii*, kao i kod *Bacillus* vrsta, postoji sledeći niz gena koji su neophodni za sintezu i aktivnost enzima ureaze:

1. tri strukturalna gena označena kao *ureA*, *ureB*, *ureC*;
2. četiri dodatna (funkcionalna) gena *ureD*, *ureE*, *ureF* i *ureG* (Ernst i sar., 2007).

Na slici 12 je prikazan šematski prikaz *UreABC* operona, u kojem su sadržani susedni ureazni geni *ureA*, *ureB* i *ureC*. Kodirajući tri osnovne strukturne subjedinice enzima, pri čemu su poređani po rastućim veličinama, formiraju (*UreABC*)₃ kompleks. Funkcionalni geni *ureD*, *ureF* i *ureG* čine drugi kompleks, nazvan *UreDFG*, potreban za sazrevanje i aktivnost ureaze. Gen *ureE* omogućava povezivanje kofaktora i aktivnog mesta, čime se zaokružuje funkcija dodatnih gena ovog enzima. Iz tog razloga su svi funkcionalni geni poređani uzastopno oko (*UreABC*)₃ kompleksa. Zajedničkim interakcijama funkcionalnih gena kod *Sporosarcina* i *Bacillus* vrsta, uz izuzetak *B. subtilis*, omogućeno je sazrevanje enzima (Ma i sar., 2020).



Slika 12. Organizacija ureaznih gena kod *Sporosarcina* i *Bacillus* vrsta (Zambeli i sar., 2011)

Maksimalna ureazna aktivnost postiže se samo ugradnjom jona nikla u metalocentar ureaznog enzima, ali je on funkcionalan i bez kofaktora (Kappaun i sar., 2018). Zanimljivo je da je regulatorni gen, nazvan *ureR*, pronađen samo u ureaznom operonu *Proteus mirabilis*, dok kod drugih ureolitičkih bakterija nije identifikovan do sada. Ureaza kod ove bakterije inducirana je prisustvom uree, te je dokazano da *ureR* predstavlja pozitivan aktivator koji se vezuje za promotor *ureD* gena (Ma i sar., 2020). S obzirom da kod drugih bakterija nije nađen regulatorni sistem na genetičkom nivou, smatra se da je ureoliza isključivo konsitutivnog ili inducibilnog karaktera (Mörsdorf i Kaltwasser, 1989, Burbank i sar, 2012, Kumari i sar., 2016). To znači da će do stvaranja ureaznih gena dolaziti tokom celog životnog ciklusa bakterije, ali da će ureolitička aktivnost biti pokrenuta samo uz prisustvo uree (Kumari i sar., 2016).

Kod *S. pasteurii*, geni *ureE*, *ureF*, *ureG* i *ureH* šifriraju proteine, koji doprinose strukturi enzima i učestvuju u formiranju aktivnog centra. Gen *ureD* kodira regulaciju pH vrednosti i omogućava uspostavljanje ravnoteže difuzijom uree kroz ćelijsku membranu. Ovaj gen, u interakciji sa genom *ureA*, omogućava i brzu difuziju amonijaka i CO₂ izvan ćelije kada otpočne hidroliza uree (Volland i sar., 2003).

Regulacija enzimske aktivnosti biće od vitalnog značaja za energetska efikasnost ćelije, pa ureolitičke bakterije neretko definiše induktivni ili represivni oblik enzimske aktivnosti. Ovakva vrsta genetske kontrole odigrava se na nivou transkripcije, gde se mRNK proizvodi iz DNK šablona (Ratledge, 2001). Enzimi, kao što je ureaza, mogu se kontrolisati na nivou transkripcije, gde je u normalnim uslovima aktivnost enzima represovana. U prisustvu induktora, stepen ureazne aktivnosti se povećava i do 1 000 puta (Lowe, 2001). Pokazalo se da promene pH vrednosti regulišu ekspresiju ureazne aktivnosti, te su Huang i sar. (2014) definisali model regulacije transkripcije ureaze, u kojima regulator nazvan *codI* potiskuje transkripciju ureaznih gena pri neutralnim pH vrednostima, a povećava pri višim vrednostima.

Smatra se da je najbolja potvrda ureazne aktivnosti kod bakterija detekcija prisustva sva tri strukturalna gena *ureA*, *ureB* i *ureC*. Međutim, u mnogim naučnim radovima je, na osnovu detekcije *ureC* gena tj. α subjedinice, definisano postojanje genetske strukture ureaznog kompleksa. Razlog odabira *ureC* gena, kao genskog indikatora, jeste činjenica da se u toku ureolitičke aktivnosti njegova ekspresija značajno povećava, dok se aktivnosti *ureA* i *ureB* gena ne menja (Ma i sar., 2020). Detekcijom gena *ureC* dobijaju se bazne informacije o postojanju potpuno funkcionalnog operona, koji nosi informacije o sintezi ureaznog enzima (Jin i sar., 2018). Takođe, Gresham i sar. (2007) naglašavaju da među strukturnim genima *ureC* gen predstavlja najveću kodirajuću strukturnu podjedinicu ureaze. Još važnije, postoji veliki broj visoko očuvanih regiona na *ureC* genu, koji su pogodni za vezivanje PCR prajmera, čiji primeri su dati u tabeli 7. Upravo zbog ovih činjenica, *ureC* gen predstavlja idealni gen za PCR amplifikaciju i dalju analizu prisustva ureaze. Služeći kao funkcionalni marker, *ureC* može poslužiti za detekciju ureolitičkih bakterija (Gresham, 2007).

Tabela 7. Primeri setova prajmera za detekciju ureC gena (Gresham, 2007)

Naziv prajmera	Smer	Sekvenca prajmera	Veličina DNK sekvence (bp)
SF	Forward	CAYGARGAYTGGGGWKCAC	277
SR	Reverse	TCWCCDACDCGBCCATBGC	
SF-3	Forward	GGYGGBGGMCAYGCHCCNGA	278
SR-2	Reverse	GCHGGRTRATBGTRTAYTT	
L2F	Forward	ATHGGYAARGCNGGNAAYCC	394
L2R	Reverse	GTBSHNCCCCARTCYTCRTG	
ureC-F	Forward	TGGGCCTTAAATHCAYGARGAYTGGG	323
ureC-R	Reverse	GGTGGTGGCACACCATNANCATRTC	
UCF	Forward	AAGSTSCACGAGGACTGGGG	316
UCR	Reverse	AGGTGGTGGCASACCATSAGCAT	

3.4.7. Biološka bezbednost upotrebe ureolitičkih bakterija u procesu BIPK

Proces bakterijski indukovane precipitacije CaCO_3 se uveliko koristi u različitim tehnikama bioremedijacije (tabela 8). Upravo zbog te činjenice, upotrebljena ureolitička bakterijska kultura, sem što treba da zadovolji preduslove efikasnog procesa BIPK, mora da bude sigurna za primenu u životnoj sredini. Vidaković (2019) naglašava da odabrana bakterija ne sme biti patogena, tj. ni u jednom trenutku pre, u toku i nakon procesa bioremedijacije ne sme da ugrozi zdravlje ljudi i životinja. Pored toga, Ivanov i sar. (2019) preporučuju da odabrana bakterija mora proći sledeći protokol kako bi se dokazalo da je pogodna za upotrebu u bioremedijaciji:

- 1) taksonomska identifikacija, istorija vrste/soja u smislu prepoznate patogenosti, genetskih promena, ekoloških karakteristika;
- 2) način umnožavanja i primena odabrane bakterije mora biti u skladu sa zakonima o biološkoj sigurnosti (otpornost prema antibiotiku, genetske mutacije, itd.);
- 3) definisanje stabilnosti, aktivnosti, pakovanja i skladištenja biološkog agensa poštujući pravilnike i zakonske regulative države u kojoj se upotrebljava;
- 4) iako je upotreba genetski modifikovanih organizama veoma aktuelna, potrebna je veoma opširna procena nepredvidljivih ekoloških i zdravstvenih rizika za oslobađanje genetski modifikovanih bakterija u prirodno okruženje;

- 5) ispitivanje uticaja na autohtone zajednice mikroorganizama, biljaka i životinja u sredini koja treba da prođe remedijacijski proces je preporučljivo.

Tabela 8. Primeri primene procesa BIPK

Bioremedijacijska tehnika	Bioagens	Referenca
Uklanjanje kalcijuma iz otpadnih voda	<i>Bacillus sphaericus</i>	Hammes i Versraete, 2002
Uklanjanje teških metala iz podzemnih voda i zemljišta	UMC*	Kurmac, 2009 Achal i sar., 2012
Formiranje biobetona i biocementa	<i>Bacillus cohnii</i> <i>B. pseudofirmus</i>	Jonkers, 2011
Biokonsolidacija peska	<i>Sporosarcina pasteurii</i> DSM 33	Whiffin i sar., 2007
Restauracija i zaštita cementnih spomenika kulture	<i>Micrococcus</i> sp.	Tiano i sar., 1999
Biocementacija zemljišta	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	Burbank i sar., 2011
Spoljašnji biosistemi za popunjavanje pukotina cementnih materijala	<i>B. mucilaginous</i> L3	Zheng i Qian, 2019

*UMC – mešovita ureolitička kultura (eng., ureolytic mixed culture) dobijena iz sistema za obradu otpadnih voda

3.4.8. Kinetika ureolitičke aktivnosti i procesa BIPK kroz ureolizu

U toku bakterijske ureolize nivo ureazne aktivnosti može uticati na hemijske uslove okruženja i podstaći interakciju između sredine i aktivnih bakterijskih ćelija. Stoga, ponašanje bakterije u toku ureolize, kao i brzina ureolitičke aktivnosti, mogu biti presudni za efikasnost procesa biokalcifikacije (Tepe i sar., 2019). To znači da postoji direktna korelacija između brzine ureolitičke reakcije i odigravanja procesa BIPK (Fujita i sar., 2000). Nadalje, varijacije u brzini promene pH vrednosti sredine i količine hidrolizovane uree ukazuju na razlike u kinetičkom modelu procesa između bakterijskih sojeva (Mitchel i sar., 2019).

Kinetički modeli ureolitičke reakcije, koji su definisani u naučnim studijama, uglavnom su korišćeni za predviđanje i dalju optimizaciju procesa ureolize. Takođe, opisivanje kinetičkih parametara je doprinelo boljem razumevanju procesa BIPK posredstvom različitih

ureolitičkih sojeva (Lauchnor i sar., 2015). Proces katalizovan bakterijskom ureazom sledi Michaelis-Mentenov model koji se često opisuje maksimalnom brzinom enzimske reakcije (v_{max}) i koeficijentom poluzasićenja tj. Mihaelisovom konstantom (K_m). Primećeno je da aktivnost ureaznog enzima kod efikasnih ureolitičkih bakterija gotovo uvek prati spomenuti model (Krajewska, 2009), iako se kinetika ove reakcije značajno može razlikovati na nivou bakterijske vrste (Bibi i sar., 2018).

Za jednostavne enzimske reakcije, poput ureolize, predložena je kinetička reakcija bez inhibicije. Brzina ureolitičke reakcije (v) se definiše kao brzina nestajanja supstrata S (urea) ili brzina nastajanja proizvoda P (amonijak) u toku vremena (t), što je prikazano jednačinom (13). Brzina reakcije ujedino predstavlja nivo hidrolize uree (tj. molova uree) u toku vremena (Kim i sar, 2012).

$$v = -\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} \quad (13)$$

Po predloženom Mihaelis-Mentenovom modelu reakcije, ureazna aktivnost može da se prikaže jednačinom (14), a ako se uzme u obzir da je početna koncentracija supstrata S_0 mnogo veća od početne koncentracije enzima E_0 , brzina ureolitičke reakcije se može prikazati i jednačinom (15).



$$v = -\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (15)$$

Sumarno, nivo ureolitičke aktivnosti u nekompetativnom mehanizmu se može preračunati jednačinom (16), u kojoj figuriše i maksimalna brzina enzimske reakcije (v_{max}), i konstanta nastajanja proizvoda (K_p) izražena u recipročnoj vrednosti jedinice vremena (Kim i sar., 2011).

$$v = \frac{v_{max} [S]}{(K_m + [S]) \cdot (1 + [P])}$$

Ako se ovo približi samom procesu hidrolize uree, kao što je prikazano u jednačini (7), od jednog mola uree kao supstrata, u toku ureazne aktivnosti bakterija, nastaju dva mola amonijaka kao proizvod, te bi jednačinama (17-21) mogla da se opiše opšta kinetika ureolitičke reakcije (Tobler i sar., 2011).

$$\frac{d[\text{urea}]}{dt} = -K_{\text{urea}} \cdot [\text{urea}] \quad (17)$$

$$[\text{urea}]_t = [\text{urea}]_0 \cdot e^{-K_{\text{urea}} \cdot t} \quad (18)$$

$$[\text{urea}]_t = [\text{urea}]_0 - \frac{1}{2}[\text{NH}_4^+]_t \quad (19)$$

$$[\text{NH}_4^+]_t = 2 \cdot [\text{urea}]_0 \cdot (1 - e^{-K_{\text{urea}} \cdot t}) \quad (20)$$

$$\Delta[\text{urea}]_t = -0,5 \cdot \Delta[\text{NH}_4^+]_t \quad (21)$$

gde je:

$[\text{urea}]_0$ - koncentracija uree na početku ureolitičke reakcije (mol);

$[\text{urea}]_t$ - koncentracija uree u bilo kom momentu ureolitičke reakcije (mol);

K_{urea} - konstanta nivoa ureolitičke aktivnosti ($\frac{1}{\text{min}}$);

$[\text{NH}_4^+]_t$ - količina nastalog amonijaka u bilo kom momentu ureolitičke reakcije (mol);

Prikazane jednačine ukazuju da nivo ureolitičke aktivnosti prati jednačinu prvog reda i uzima u obzir da je koncentracija biomase (X) konstantna u toku hidrolize uree. Uvođenjem koncentracije biomase u reakciju, dobijaju se jednačine (22) i (23) (Mitchell i Ferris, 2005).

$$\frac{d[\text{urea}]}{dt} = -K_{\text{urea}} \cdot [\text{urea}] \cdot [X] \quad (22)$$

$$[\text{urea}]_t = [\text{urea}]_0 \cdot e^{-K_{\text{urea}} \cdot X \cdot t} \quad (23)$$

Nivo ureolitičke aktivnosti može da se preračuna na dva načina. Ako se pretpostavi reakcija nultog reda u odnosu na biomasu ($X=0$), konstanta ureolitičke aktivnosti nije normalizovana u odnosu na biomasu, i izuzima se iz proračuna (Mitchel i Ferris, 2005). Druga situacija uzima u obzir da se konstanta normalizuje na koncentraciju biomase na početku procesa tj. normalizacija se vrši u odnosu na početnu koncentraciju biomase ($X=X_0$) (Tobler i sar., 2011).

Na osnovu ovih jednačina, omogućeno je eksperimentalno određivanje konstante nivoa ureolitičke aktivnosti (K_{urea}), i to kroz merenje koncentracije uree i/ili amonijaka u toku vremena (Tobler i sar., 2011). U proučavanju kinetike procesa ureolize potrebno je prevazilaženje nekoliko osnovnih problema koji mogu da se jave tokom odigravanja biotehnološkog procesa. Procena stope hidrolize uree je u funkciji brzine transformacije N-atoma, promene pH vrednosti i vijabilnosti bakterije. Iako hidroliza uree prati kinetiku prvog reda, visoka pH vrednost i stopa odumiranja i sporulacije bakterija mogu uticati na brzinu hidrolize zbog smanjene aktivnosti ureaze. Stoga, maksimalna brzina enzimske reakcije

(v_{max}) se može definisati i kao referentna aktivnost enzima koja predstavlja koncentraciju ureaze koja je indikativna za proces (Kim i sar., 2012).

Slično ureolitičkoj reakciji, precipitacija CaCO_3 posredstvom ureolitičkih bakterija, može da se opiše Mihaelis-Mentenovim modelom. Najčešće se primenjuje jednačina prvog reda koja adekvatno opisuje stanje sistema uzimajući u proračun da iz jednog mola Ca^{2+} koji je uklonjen iz sistema nastaje jedan mol CaCO_3 (Dupraz i sar., 2009, Teng i sar., 2011). Sa druge strane, Mitchell i Ferris (2005) prikazuju nivo precipitacije kao jednačinu drugog reda. Kao jedina komponenta sistema čija je promena merljiva, jednačinama (24) i (25) je opisana promena koncentracije kalcijumovih jona $[\text{Ca}^{2+}]$ u toku vremena (Teng i sar., 2000).

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]}{dt} = -K_{\text{precip}} \cdot [\text{Ca}^{2+}] \quad (24)$$

$$[\text{Ca}^{2+}]_t = [\text{Ca}^{2+}]_0 \cdot e^{-K_{\text{precip}} \cdot t} \quad (25)$$

gde je:

K_{precip} – konstanta precipitacije ($\frac{\text{mol} \cdot \text{L}}{\text{min}}$);

Precipitacija CaCO_3 će uvek zavisiti od stepena saturacije sistema (S), kao i od mehanizma rasta kristala (Mitchell i Ferris, 2005), pa se sistem može opisati pomoću jednačina (26) i (27).

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]}{dt} = -K_{\text{precip}} \cdot (S-1)^n \quad (26)$$

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]}{dS} = \frac{K_{\text{precip}} \cdot (S-1)^n}{K_s \cdot S} \quad (27)$$

gde je:

n – red reakcije;

K_s – konstanta saturacije ($\frac{1}{\text{min}}$);

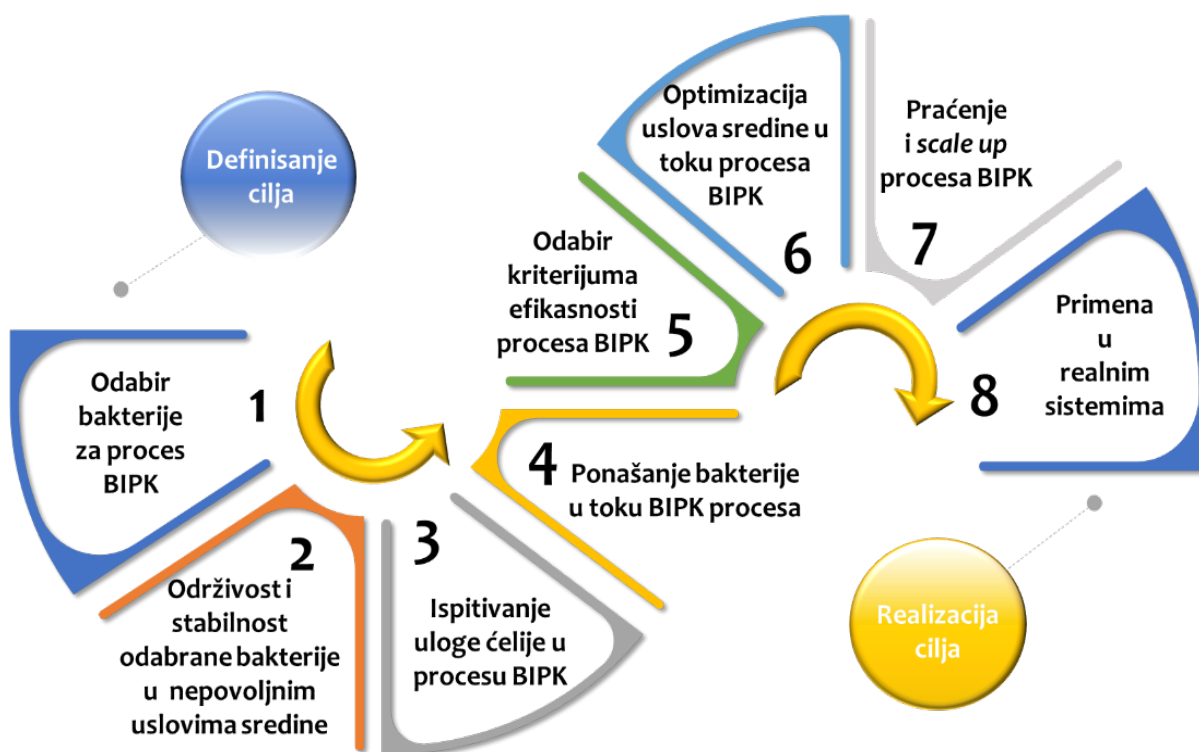
Teorijski, u toku procesa BIPK, ukupni nerastvorljivi neorganski ugljenik (C_T) se povećava tokom vremena, prateći maseni bilans prikazan jednačinama (28) i (29).

$$[\text{CaCO}_3 \downarrow]_t = [\text{CaCO}_3 \downarrow]_0 + [\text{Ca}^{2+}]_t, [\text{CaCO}_3 \downarrow]_0 \rightarrow 0 \quad (28)$$

$$[\text{CaCO}_3 \downarrow]_t = [\text{urea}]_0 - [\text{urea}]_t \quad (29)$$

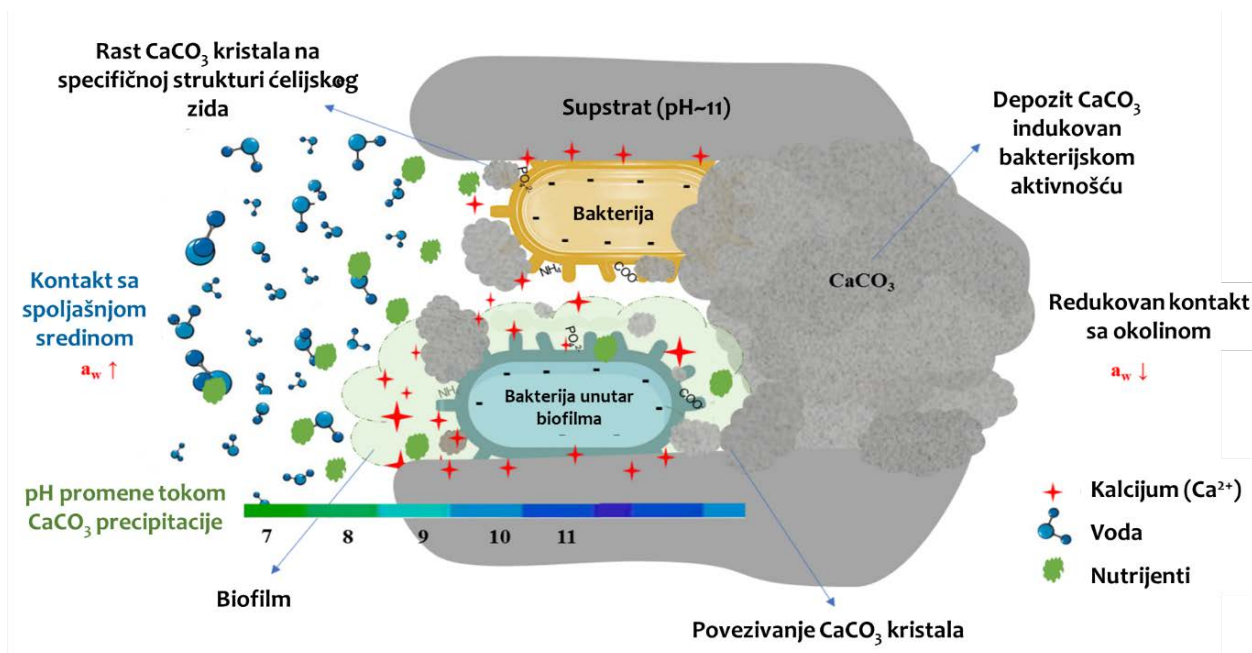
3.5. Biotehnoški izazovi primene procesa BIPK

Bakterijski indukovana precipitacija karbonata uspešno je sprovedena i dokazana u laboratorijskim uslovima, ali su brojni izazovi na koje je neophodno odgovoriti prilikom biotehnoške postavke ovog procesa (slika 13). Smatra se da BIPK ima značajan potencijal u tehnikama bioremedijacije u ekološkom, geotehničkom i građevinskom inženjerstvu, a koje se mogu upotrebljavati *in situ*, nakon rešavanja laboratorijskih poteškoća (Krajewska, 2018).



Slika 13. Prikaz sukcesivnih koraka u biotehnoškom pristupu procesa BIPK

Osnovni izazov jeste odabir bakterije koja će indukovati proces BIPK kroz svoju metaboličku aktivnost i alkalizaciju okruženja. Iako su najefikasniji induktori procesa biokalcifikacije, ureolitičke bakterije moraju imati visok nivo negativnog potencijala ćelijskog zida, te prisutnu otpornost u uslovima visoke alkalnosti i saliniteta (Dick i sar., 2006, de Muynck, 2007). Uopšteno, to se može šematski predstaviti slikom 14. Iz biotehnoškog ugla, jednako je značajno i ponašanje bakterija i stepen prilagođavanja na promenljivu alkalnost sistema koja je prouzrokovana metaboličkom aktivnošću i CaCO_3 precipitacijom (Kulkarni i sar., 2019).



Slika 14. Šematski prikaz BIPK procesa posredstvom slobodnoplivajuće i biofilmske bakterijske ćelije

Budući da uslovi realne primene ne mogu biti kontrolisani kao u laboratoriji, u toku procesa BIPK bakterije neretko trpe nepovoljno i promenljivo okruženje. Zbog toga je definisanje stope sporulacije i stepena odumiranja od posebnog značaja, kako bi se sagledao broj aktivno prisutnih ćelija, koje mogu da doprinesu biotehnološkom procesu. Takođe, prilikom skladištenja i potencijalne zaštite mikrobiološkog agensa, potrebno je definisati stabilnost biomase kroz duži vremenski period na različitim temperaturama (Timmis i sar., 2017).

Kako samo aktivne ćelije, negativno naelektrisanih zidova, predstavljaju centre nukleacije, značajan segment jeste definisanje uloge bakterijske ćelije u procesu BIPK. Ovaj proces obuhvata razumevanje geometrijske kompatibilnosti, elektronegativnosti i hidrofobnosti ćelijskog zida, kao i propustljivosti ćelijskih membrana, potencijala formiranja biofilmskih ćelija te njihove adhezivnosti na abiotičke i biotičke površine. Ovaj segment biotehnološkog izazova je posebno značajan zbog činjenice da u formiranom glikokaliksu biofilma može da dođe do akumulacije daleko veće količine jona iz okoline. Kao posledica nakupljanja (ne)organskog materijala u blizini ćelija, kinetika precipitacije može biti izmenjena ili potpuno drugačija u odnosu na kinetiku reakcije slobodnoplivajućih ćelija (Tepe i sar., 2019).

Pored toga, praćenje ponašanja bakterijske kulture u toku procesa ureolize i BIPK trebalo bi da odgovori na pitanja o kinetici odigravanja ciljanih (metaboličkih) reakcija, fizičko-hemijskim promenama okruženja, interakciji između okruženja i bakterijskih ćelija, bakterijske otpornosti, ali i da ukaže na raznolikost ureolita u toku procesa BIPK (Tepe i sar., 2019). Ukoliko je ovaj korak uspešno urađen, odabir kriterijuma efikasne precipitacije ne mora da bude najveći problem ovog kompleksnog sistema. Naime, na ovaj način bi moglo da se smanji generisanje neželjenih nusproizvoda i nekontrolisanog rasta ili odumiranja ćelija. Dodatno, optimizacija hranljivog medijuma za produkciju biomase i odigravanje ciljanog procesa bila bi posebno značajna za dalju primenu i *scale up* procesa (Tepe i sar., 2019).

Na kraju, možda i najveći potencijalni problemi u toku procesa BIPK jesu dobijanje homogenog tretmana, injektovanje ćelija u složene sisteme, kao i kontrola i praćenje bioremedijacije, biokonsolidacije i/ili biocementacije u realnim uslovima. Uspešna primena procesa BIPK zahteva nadogradnju sistema postavljenog na laboratorijskom nivou. Biomasa odabranog katalizatora mora biti proizvedena u velikoj količini što najčešće znači i nastanak velike količine neželjenih nusprodukata. Takođe, zbog specifičnih lokacija i heterogenih matriksa potrebno je postići jednolik tretman bioremedijacijskog sistema. Za razliku od laboratorijskih uslova gde se većina parametara može kontrolisati, potrebno je pratiti više promenljivih u *in situ* tretmanu kako tokom aplikacije, tako i nakon tretmana. Ove promenljive uključuju i praćenje mikrobiološke aktivnosti. Dizajn u kojem je moguće nadgledati mikrobiološku aktivnost u velikom sistemu i uticati na istu je težak zadatak, ne samo zbog geološke pristupačnosti već i zbog heterogene raspodele unutar sistema. Važno je naglasiti da će za laboratorijska ispitivanja i *scale up* procesa bakterijski indukovane precipitacije karbonata, sledeći faktori takođe imati značaja: vreme kultivacije, zapremina kultivacione tečnosti, mešanje, aeracija, itd. (Soon i sar., 2014).

Iako se neretko naglašava da su bioprocesi ekološki prihvatljivi, postoji mogućnost da u toku istih dolazi do akumuliranja štetnih oblika jedinjenja nekih metabolita. U procesu BIPK posredstvom ureolize, dolazi do deponovanja amonijaka i ugljen dioksida koji mogu biti otrovni i opasni za ljudsko zdravlje. Sa druge strane, akumulacija ovih proizvoda može

negativno da utiče i na aktivnost mikroorganizama. Zbog toga je neophodno ispitati potencijal radne kulture da asimiluje neki od nusprodukata, ili pak naći rešenje za smanjenje i kontrolu produkcije neželjenih proizvoda. Još jedan nedostatak BIPK je činjenica da ovaj biološki indukovani proces može u potpunosti da se zaustavi tokom vremena zbog gubitka aktivnosti mikroorganizama. Razlog ovome jeste zavisnost mikrobne aktivnosti od velikog broja faktora životne sredine (pH, temperatura, aktivnost vode, koncentracija centara nukleacije) i stope difuzije hranljivih materija i metabolita unutar sistema (Anbu i sar., 2016).

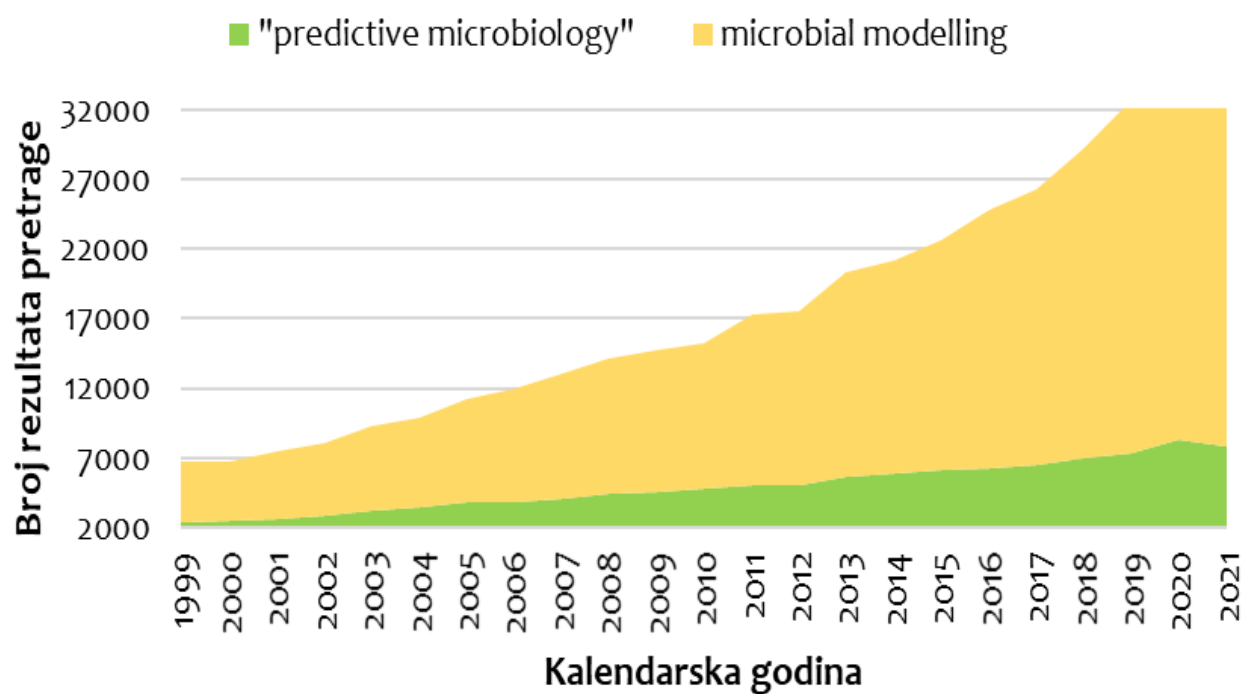
3.6. Prediktivno modelovanje u ekološkoj mikrobiologiji

Ekologija mikroorganizama predstavlja oblast koja se intenzivno razvija zahvaljujući savremenim molekularnim alatima i mnogobrojnim dostignućima na nivou gena i ćelije. Mikrobiolozi su dugo sagledavali perspektivu koju određuju samo mikrobiološki principi i bili nespremni da se u potpunosti prepuste matematičkim okvirima istraživanja. Primena matematike je neretko predstavljala previše složen sistem, koji se udaljavao od „stvarnog sveta mikroba“. Međutim, krajem prošlog veka razvija se nova oblast, nazvana prediktivna mikrobiologija, koja od tada uzima maha u mnogobrojnim naučnim i praktičnim mikrobiološkim disciplinama (Wade i sar., 2016). Na slici 15 je prikazan eksponencijalni broj rezultata naučnih publikacija selektovanih na osnovu dve ključne reči „predictive microbiology“ (prediktivna mikrobiologija) i „microbial modelling“ (mikrobiološko modelovanje) na sajtu ScienceDirect.com.

Prediktivna mikrobiologija predstavlja metodu za kompleksne odgovore mikroorganizama na uslove i promene sredine, omogućavajući definisanje problema uz minimalan broj eksperimenata u laboratorijskim uslovima. Razlog korišćenja naprednih matematičkih alata zasnovan je na ideji da su tradicionalne mikrobiološke metode za praćenje rasta ili preživljavanja mikroorganizama radno intenzivne i skupe, a stečeno znanje nije kumulativno. Uz to, veoma često dolazi do nemogućnosti izvođenja velikog broja oglada ili kultivisanja

određenih mikrobioloških vrsta u laboratorijskim uslovima (McMeekin i sar., 2008, Wade i sar., 2016).

Matematičko modelovanje u prediktivnoj mikrobiologiji ima za cilj kvantifikaciju efekata unutrašnjih, spoljašnjih i/ili procesnih faktora na rezultirajuću mikrobnu proliferaciju. Formirajući matematički model ponašanja, mikrobiološka ispitivanja se oslanjaju na mogućnosti optimizacije testiranih parametara ili otkrivanje faktora koji izvorno nisu analizani u opsegu eksperimentalnog dizajna. Kao takva, prediktivna istraživanja su napravila sinergiju između mikrobiologije i matematike, što je unapredilo praktičnu primenu ekološke mikrobiologije u inženjerskim biološkim sistemima (Widder i sar., 2016).



Slika 15. Pretraga sajta ScienceDirect po ključnim rečima za period januar 1999.-avgust 2021.

Matematičko opisivanje sistema je proces formulisanja apstraktnog modela za opis složenog ponašanja u kojem je glavni katalizator ustvari mikroorganizam. Matematički modeli predstavljaju kvantitativni obrasci i često se izražavaju kroz obične diferencijalne jednačine i jednačine parcijalnih diferencijala. Svaki opis modela koji koristi matematički izražene relacije se može nazvati matematičkim modelom.

U ekološkoj mikrobiologiji matematičko modelovanje može biti usmereno na sledeće koncepte:

- studija o proceni mikrobnog ponašanja;
- projektovanje i optimizacija bioprocesa;
- razvoj sistema za procenu složenosti;
- integracija pristupa modelovanja u sistemsku, industrijsku primenu mikroorganizama;
- kinetičko modelovanje (Widder i sar., 2016).

Bez obzira na ciljani izlaz, prilikom modelovanja se koristi opšta terminologija, čije objašnjenje je dato u tabeli 9.

Tabela 9. Terminologija u matematičkom modelovanju

Pojam	Objašnjenje
promenljive	podeljene na zavisne i nezavisne promenljive; Zavisne promenljive opisuju mikrobiološki parametar (npr. mikrobnu populaciju) u odnosu na neke nezavisne promenljive (npr. temperaturu i pH); Nezavisne promenljive se takođe mogu nazvati faktorima;
regresiona analiza	statistički postupak za procenu odnosa između nezavisnih promenljivih i zavisnih promenljivih i procenu parametara modela; U prediktivnoj mikrobiologiji ovo može uključivati spoljašnje i unutrašnje promenljive i njihov odnos;
predikcija	korišćenje matematičkog modela za predviđanje mikrobiološkog parametra;
parametri testiranja	skup merljivih vrednosti koje se procenjuju kada se model reši; oni pružaju konačnu strukturu modelovanja;
simulacija	korišćenje modela za opisivanje mikrobiološkog parametra za skup unapred definisanih promenljivih/faktora tokom vremena korišćenjem nominalnih vrednosti; Simulacije se mogu koristiti za izvođenje predviđanja;
validacija	ispitivanje da li su numerički rezultati kvantifikovanja pretpostavljenih odnosa između promenljivih, dobijenih regresijskom analizom, prihvatljivi za opis podataka;
kinetičko modelovanje	matematički opis toka reakcije za svaki korak reakcije u zavisnosti od komponenti u sistemu;

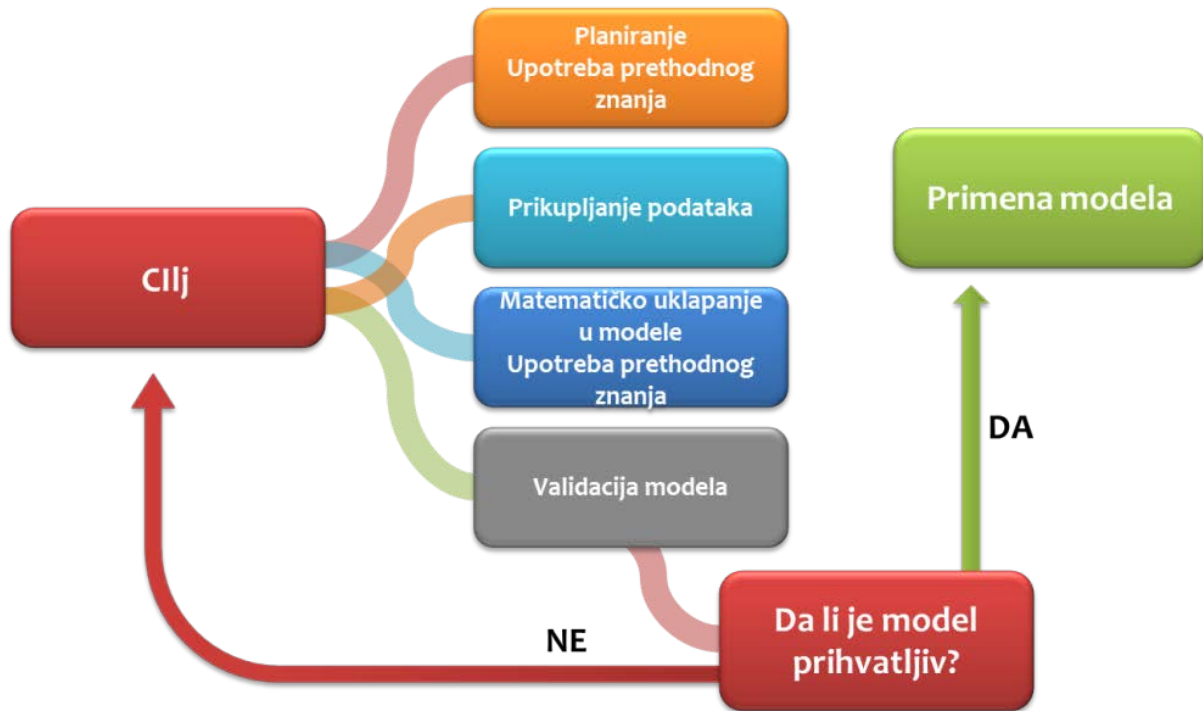
Mikrobiološki parametri prilikom matematičkog modelovanja mogu biti različiti. Međutim, za mikrobiologiju se gotovo uvek vezuju kinetički i kategorički odgovori. Kinetički modeli opisuju ponašanje mikroorganizama (rast, inaktivacija, preživljavanje) kao funkciju vremena, a dodatno mogu da prate ove primarne parametre kroz promene u sistemu. Kategorički pristup modelovanju se razvija u slučaju definisanja granica rasta, kvantifikovanja šanse za preživljavanje, oporavak ili gubitak vijabilnosti ćelija (Wade i sar., 2016).

Kinetičko modelovanje je presudno za opisivanje, projektovanje i kontrolu biotehnoloških procesa. Prediktivne kinetičke studije su zasnovane na pretpostavci da su odgovori mikrobne populacije na faktore životne sredine ponovljivi. Daljim razmatranjem okruženja u smislu prepoznavanja dominantnih ograničenja moguće je predvideti odgovore ispitivanih bakterija. Generalno, usvaja se tzv. redukcionistički pristup i odzivi bakterija se mere u definisanim i kontrolisanim uslovima. Rezultati se sumiraju u obliku kinetičkih modela koji mogu predvideti odgovore na nove skupove uslova pri vrednostima koje (ni)su testirane (de Jong i sar., 2017). Upotrebom kinetičkog modelovanja za procenu obima i brzine rasta bakterija ili neke ciljane metaboličke aktivnosti postižu se četiri krajnja rezultata:

1. predviđa se ishod, kontrola i bezbednost bioprocesa;
2. definišu se potencijalne promene aktivnosti bakterija;
3. pruža se objektivna procena reproduktivnosti;
4. omogućava racionalno, unapređeno projektovanje bioprocesa.

Odnos koji definiše bilo koji matematički model u mikrobiologiji zasnovan je i direktno zavisi od specifičnih uslova okoline. Zbog toga je izvesno formiranje modela koji povezuje verovatnoću predikcije sa tim uslovima i njihovom promenljivošću. Validnost modelovanja se ogleda u višestrukim posmatranjima istih tačaka, pri čemu se definiše verovatnoća dobijanja istog ili sličnog odgovora u toku vremena. Wade i sar. (2016) takođe preporučuju da u toku posmatranja bilo kog bakterijskog odgovora kao glavnog procesa, kinetičko modelovanje treba da bude ispraćeno sa svim drugim merljivim, sporednim odgovorima sistema.

Svako matematičko modelovanje sastoji se od nekoliko povezanih koraka, kao što je prikazano na slici 16. Važnost prve faze se ogleda u definisanju specifičnosti cilja i shvatanju problema. Planiranje eksperimenta uključuje sumiranje postojećeg znanja, koje može objasniti i/ili pojednostaviti posmatranje ponašanja mikroorganizama. Preciziranje cilja pre modelovanja u velikoj meri doprinosi boljem dizajnu i matematičkom odgovoru u predstojećim koracima (Zhou, 2009).



Slika 16. Ciklus matematičkog modelovanja

Nakon definisanja faktora, koji će se pratiti tokom ispitivanja, sledi izvođenje eksperimenata i sakupljanje eksperimentalnih rezultata. Postoje različiti pristupi kako bi se minimizirali nekontrolisani uticaji na faktorske efekte, a praktično najjednostavniji je ponavljanje nominalnih eksperimenata i izračunavanje korigovanih efekata. U nekim slučajevima vrši se normalizacija efekata, tj. računaju se u odnosu na prosečnu nominalnu vrednost odgovora sistema. Normalizovani efekti omogućavaju procenu značajnosti faktorskih efekata, čak i bez statističke potvrde. To znači da je u ovom koraku ključno odabrati pogodan eksperimentalni dizajn. U slučajevima kinetičkog modelovanja, potrebno je generisati podatke za određenu

kombinaciju uslova u najmanje 10 tačaka. Odabir tačaka treba da bude postavljen tako da najveći broj njih bude na mestu pregiba krive, gde je brzina promene mikrobne kinetike najveća. Sa druge strane, u mikrobiološkim studijama, koje obuhvataju veći broj faktora sredine, neophodno je upotrebiti i višefaktorijalne eksperimentalne dizajne, kao što su:

- **Box-Behnkenov dizajn** – tip nepotpunog (skraćenog) faktorijalnog dizajna sa uravnoteženim nekompletnim blokovskim sistemom. Ovaj dizajn zahteva istovremeno variranje svakog faktora na tri nivoa, koja sadrži samo kombinaciju u centru i na sredini ivica prostora dizajna (-1,0,1);

Dobijeni rezultati se prikazuju metodom odzivne površine, čiji je cilj određivanje optimalnih parametara za opisivanje procesa. Ukoliko ima više odziva koje je potrebno optimizovati, neophodno je naći optimalne uslove za koje će posmatrani odzivi biti u definisanom opsegu. Površine odziva se dobijaju tako što je jedan od faktora u nultom položaju eksperimentalnog dizajna (0), dok vrednosti ostala dva faktora variraju (Ferreira i sar., 2007);

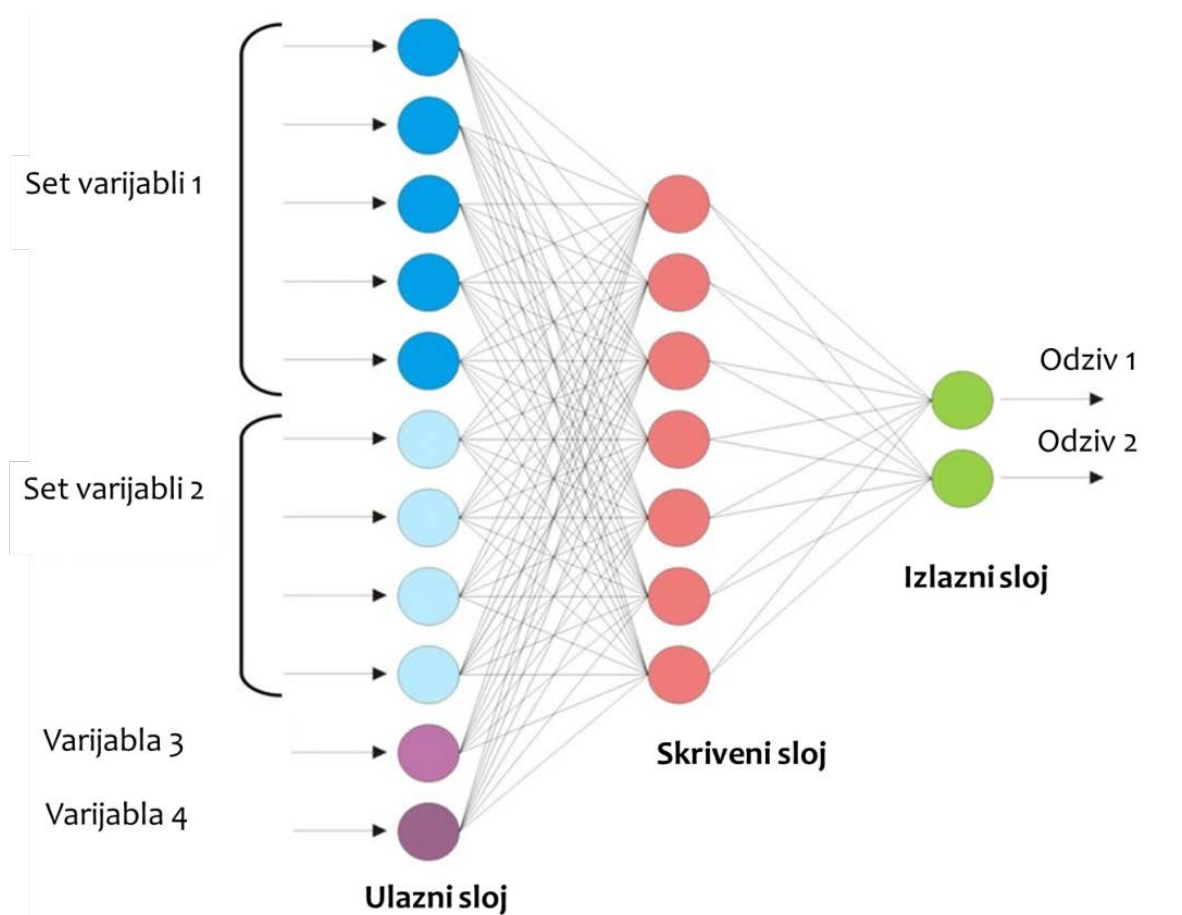
- **Plackett-Burman dizajn** – tip tzv. zasićenog faktorijalnog dizajna sa velikim brojem ispitivanih faktora (n) kroz relativno mali broj eksperimenata (n+1); ovaj dizajn omogućava procenu uticaja faktora, tj. najviši uticaj na zadati odziv, ne ostavljajući prostora za procenu greške (Granato i de Araujo Calado, 2014).

Ovaj plan se koristi u cilju procene robusnosti, kao konačne potvrde pogodnosti postavljene ili optimizovane metode analize. Najčešće se vrši u poslednjoj fazi razvoja, odnosno optimizaciji metode, ili u početnoj fazi postupka njene validacije (Dejaegher i sar., 2007a). Odgovori koji se prate tokom ispitivanja robusnosti mogu se podeliti na kvantitativne i kvalitativne. Kvantitativni odgovori koriste se za kvantitativnu proveru analitičke metode. Sa druge strane, odgovori koji definišu kvalitet procesa omogućavaju definisanje testa za procenu pogodnosti sistema (Dejaegher i sar., 2007b).

Nakon eksperimentalnog prikupljanja podataka sledi faza matematičkog modelovanja kako bi se formulisali odzivi. Razmatranja koja treba uzeti u obzir pri razvoju modela uključuju sledeće: tačnost uklapanja, sposobnost predviđanja neproverenih kombinacija faktora, uključivanje svih relevantnih faktora, posedovanje minimalnog broja parametara, niska korelacija između parametara, reparametrizacija za poboljšanje statističkih svojstava. U većini slučajeva, odgovarajući model mora biti izabran iz unapred određenog skupa modela koji su selektovani na osnovu prethodnog znanja. Ovo je od ključnog značaja kada se očekuje visoka nelinearnost procesa, koja je neizbežna u mikrobiološkim sistemima. Jedno od glavnih razmatranja za matematički izbor je tačnost uklapanja. Stoga, postoji niz različitih statističkih pokazatelja koji procenjuju kvalitet modelovanja: redukovani hi-kvadrat (χ^2), srednja greška odstupanja (MBE), koren kvadrata srednje greške (RMSE), srednja procentualna greška (MPE), koeficijent determinacije (R^2), suma kvadrata grešaka (SSE), prosečna apsolutna relativna devijacija (AARD), „nazubljenost“ krive raspodele (engl. skewness, Skew), „zakrivljenost“ krive raspodele (engl. kurtosis, Kurt), srednja vrednost odstupanja (Mean), standardna devijacija (SD) i varijansa odstupanja (Var). Ovi parametri ukazuju na stepen odstupanja dobijenih vrednosti od željenih, a samim tim opisuju kvalitet modela (Pezo i sar., 2013).

Poslednji korak ciklusa modeliranja je validacija modela. Primena matematičkog modela u složenijim sistemima povlači za sobom povećanje greške predviđanja koja je posledica različitih uslova okoline ili mikrobne raznolikosti. U ekološkoj mikrobiologiji prepoznaje se primarna greška zbog razlike između predviđenih i dobijenih mikrobnih odgovora pod istim laboratorijskim uslovima. Za smanjenje ili izbegavanje grešaka u predviđanju neophodno je generisanje što većeg broja eksperimenata. Određivanje parametara modela od suštinske je važnosti i mora biti praćeno testiranjem tačnosti modela sa novim podacima, koristeći kombinacije ispitivanih faktora sredine. Korak validacije funkcioniše kao pomoćna metodologija za procenu kvaliteta uklapanja. Na osnovu ovog koraka se vrši procena uspešnosti predikcije i modelovanja. Ukoliko model zadovoljava potrebe sistema, može biti primenjen u daljim istraživanjima. U suprotnom, potrebno je ponoviti ciklus modelovanja od prvog koraka (slika 15) (Wade i sar., 2016).

Među predikcionim modelima koji imaju široku upotrebu u ekološkoj mikrobiologiji se posebno izdvajaju sistemi veštačkih neuronskih mreža (eng., artificial neural network, ANN). Koncept neuronskih mreža pruža visok potencijal predviđanja, ali i prilagodljivost modela, koja će biti od ključnog značaja za analizu nelinearnih odnosa mikrobioloških sistema. Konkretno, veštačke neuronske mreže se koriste u svrhu aproksimacije funkcija koje mogu zavisiti od velike količine ulaznih podataka. Sistemi međusobno povezanih neurona šalju poruke jedni drugima i veze između njih imaju numeričke težine, koje mogu biti podložne promenama u zavisnosti od iskustva. Ovo čini neuronske mreže adaptivnim i sposobnim za učenje. ANN mreža se uvek sastoji od neurona grupisanih u slojeve (slika 17). Pored ulaznog i izlaznog sloja, mreže veoma često mogu imati jedan ili više skrivenih slojeva (Widder i sar., 2016).



Slika 17. Koncept veštačke neuronske mreže

Topologija veštačke neuronske mreže može biti kompleksna i veoma različita zavisno od problema koji se rešava, vrste ulaznih i izlaznih podataka, itd. Osnovni principi veštačkih neuronskih mreža su:

- ulazi, koji moraju biti u numeričkom obliku, pri čemu oblik i vrsta ulaznih podataka određuje karakteristike mreže;
- izlazi, koji predstavljaju rešenje problema, pri čemu mreža može imati jedan ili više izlaza, zavisno od konkretnog problema;
- težinski koeficijenti, koji su ključni elementi neuronske mreže jer se učenjem podešava težina prema prethodnim podacima, izražavajući relativnu značajnost svakog ulaza u neuron i sposobnost ulaza da probudi neuron;
- funkcija sumiranja, koja množi svaki ulaz odgovarajućom težinom, a zatim sumira dobijene umnoške;
- funkcija transformacije, koja određuje da li rezultat funkcije sumiranja može da proizvede izlaz (Lojanica, 2001).

Neuronska mreža uči iz iskustva. Proces učenja sastoji se iz četiri zadatka: računanje izlaza, upoređivanje predviđene sa eksperimentalnom vrednosti, podešavanje težina i vraćanje na prvi korak (Lojanica, 2001). Pre početka procesa učenja postavljaju se inicijalne vrednosti težinskih koeficijenata, slučajno ili po određenom pravilu. Sa svakim novim setom podataka težina se podešava tako da se smanjuje razlika između stvarnog i željenog ulaza. U najboljem slučaju, ta razlika treba da se svede na nulu. Međutim, u praksi je obično slučaj da se zadaje nivo greške (npr. 5%), koji treba postići da bi se okončao proces učenja ili se unapred zadaje broj iteracija pri učenju. Ključ je da promene težina idu u pravom smeru (da konvergiraju), jer se samo tako opisana razlika smanjuje (Lojanica, 2001).

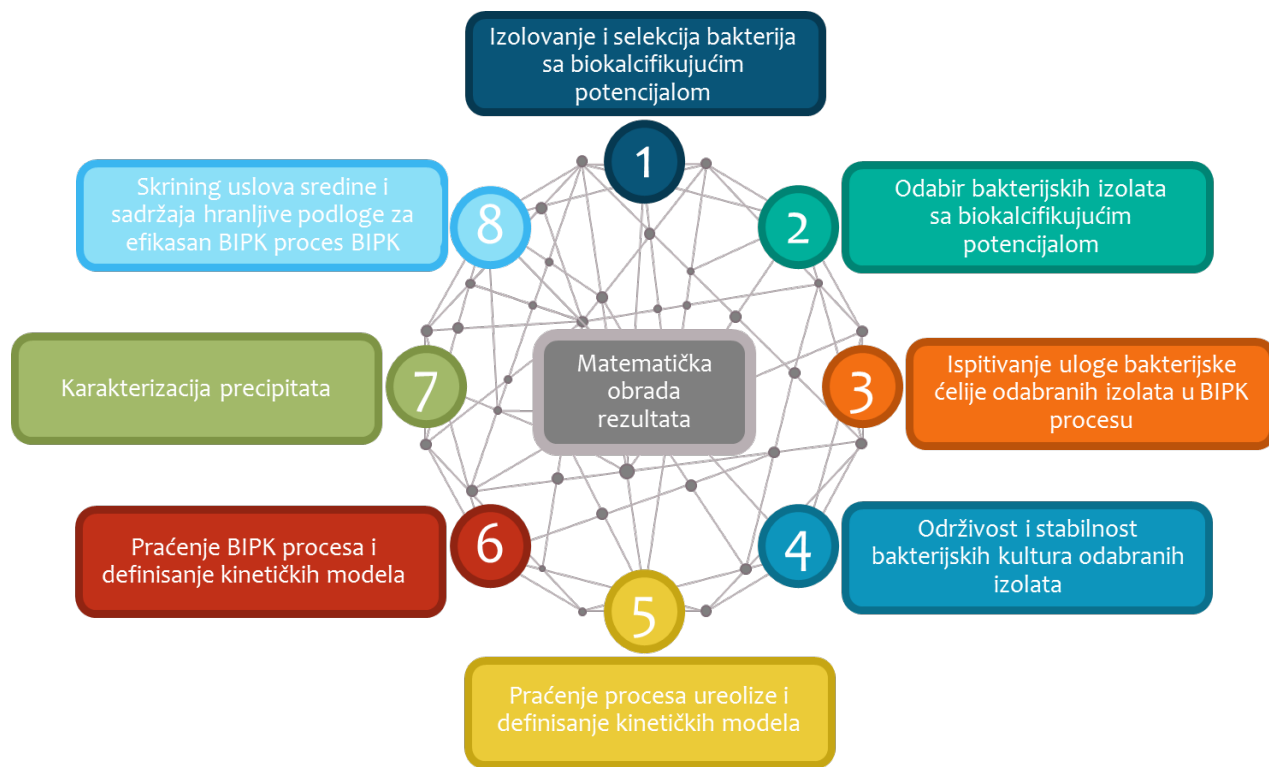
Dobijena baza podataka iz ciklusa modelovanja treba slučajno da bude podeljena na podatke za učenje, proveru i testiranje pre računanja mreže. Najveći procenat podataka koji služi za testiranje performansi mreže se dodeljuje učenju, a ostatak se raspoređuje na proveru i testiranje, sa ukupnim izlazom od 100% (npr. učenje 60%, provera i testiranje po 20%). Faza testiranja mreže služi za ispitivanje sposobnosti generalizacije mreže i procenu završetka

procesa. Prvi od zadataka koji se nameće prilikom ANN modelovanja jeste odabir broja skrivenih slojeva i broja neurona u njima. Da bi se izbegla pojava tzv. lokalnih minimuma i sporije konvergencije, najčešće se koristi samo jedan skriveni sloj. Jedan od takvih modela, koji ima samo jedan skriveni sloj, je višeslojni perceptron model (eng., Multi-Layer Perceptron, MLP). Ovakvi MLP modeli se najčešće primenjuju u kreiranju mikrobioloških modela jer predstavljaju najfleksibilniju opciju koja se prilagođava velikom boju problema nelinearnih sistema. Najčešće nelinearne aktivacione funkcije koje se upotrebljavaju u ovom slučaju su: logaritamska, sigmoidalna, hiperbolična i tangens hiperbolikus. MLP neuronske mreže se formiraju na osnovu algoritma povratnog prostiranja (eng., backpropagation algorithm). Naime, srednja kvadratna greška predviđenog rezultata izlaza se šalje unazad kroz sistem neurona, menjajući proporcionalno težinske koeficijente i netačnosti računanja. Ove promene zavise od pravca greške predviđanja u odnosu na eksperimentalnu vrednost. Cilj je da što veći broj uzoraka bude uključen u fazu učenja, kako bi razvijeni ANN model imao najniže sume kvadrata grešaka (eng., sum of squares, SOS) i najviše koeficijente determinacije (R^2). Ovaj proces ujedino predstavlja i postupak optimizacije ANN mreže (Pezo i sar., 2013).

4. MATERIJALI I METODE

Najveći deo istraživanja je realizovan na Odeljenju za mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta Novi Sad, Univerziteta u Novom Sadu. Genetička ispitivanja su realizovana na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, dok su mikroskopska ispitivanja urađena na Odeljenju za kristalografiju Rudarsko-geološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Takođe, na Univerzitetu u Novom Sadu, u Laboratoriji za nano i mikroelektroniku Naučnog insituta Biosense, Laboratoriji za rendgenostrukturnu analizu Katedre za opštu fiziku i metodiku nastave fizike Prirodno-matematičkog fakulteta, Laboratoriji za ispitivanje materijala u kulturnom nasleđu i Laboratoriji za polimerne materijale na Tehnološkom fakultetu Novi Sad je izvršena karakterizacija dobijenih precipitata.

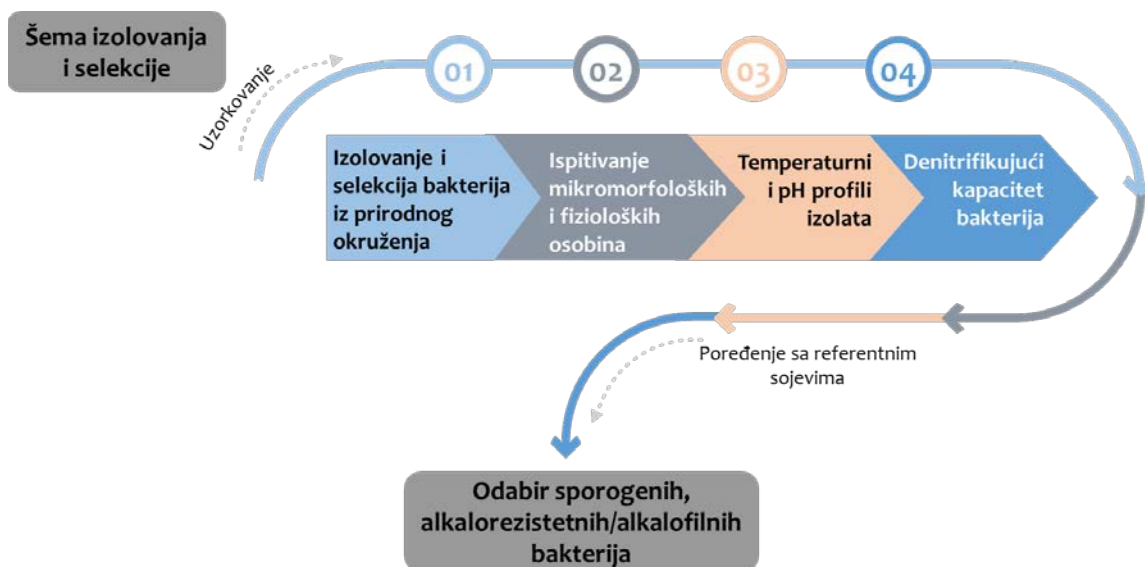
Eksperimentalni rad u okviru doktorske disertacije sastojao se u nekoliko povezanih faza, kao što je prikazano na slici 18. Kroz sve eksperimentalne korake izvršena je uporedna analiza sa ureolitičkim referentnim sojem *Sporosarcina pasteurii* DSM 33. Jedini izuzetak je test denitrifikacije, u kojem je pozitivna reakcija praćena kroz aktivnost *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588. Kao negativna kontrola ureazne aktivnosti korišćeni su *Bacillus cohnii* DSM 6307 ili *Bacillus pseudofirmus* DSM 8715.



Slika 18. Faze eksperimentalnog rada

4.1. Izolovanje i primarna selekcija bakterija sa biokalcifikujućim potencijalom

Prvi eksperimentalni korak je šematski prikazan na slici 19. Izolovanje bakterija iz prirodnog okruženja izvršeno je na lokalitetima na kojima se pretpostavlja postojanje BIPK procesa. Ova faza je zahtevala formiranje specifične šeme za selekciju ciljanih bakterija, kroz ispitivanje morfoloških, fizioloških i ekoloških osobina.



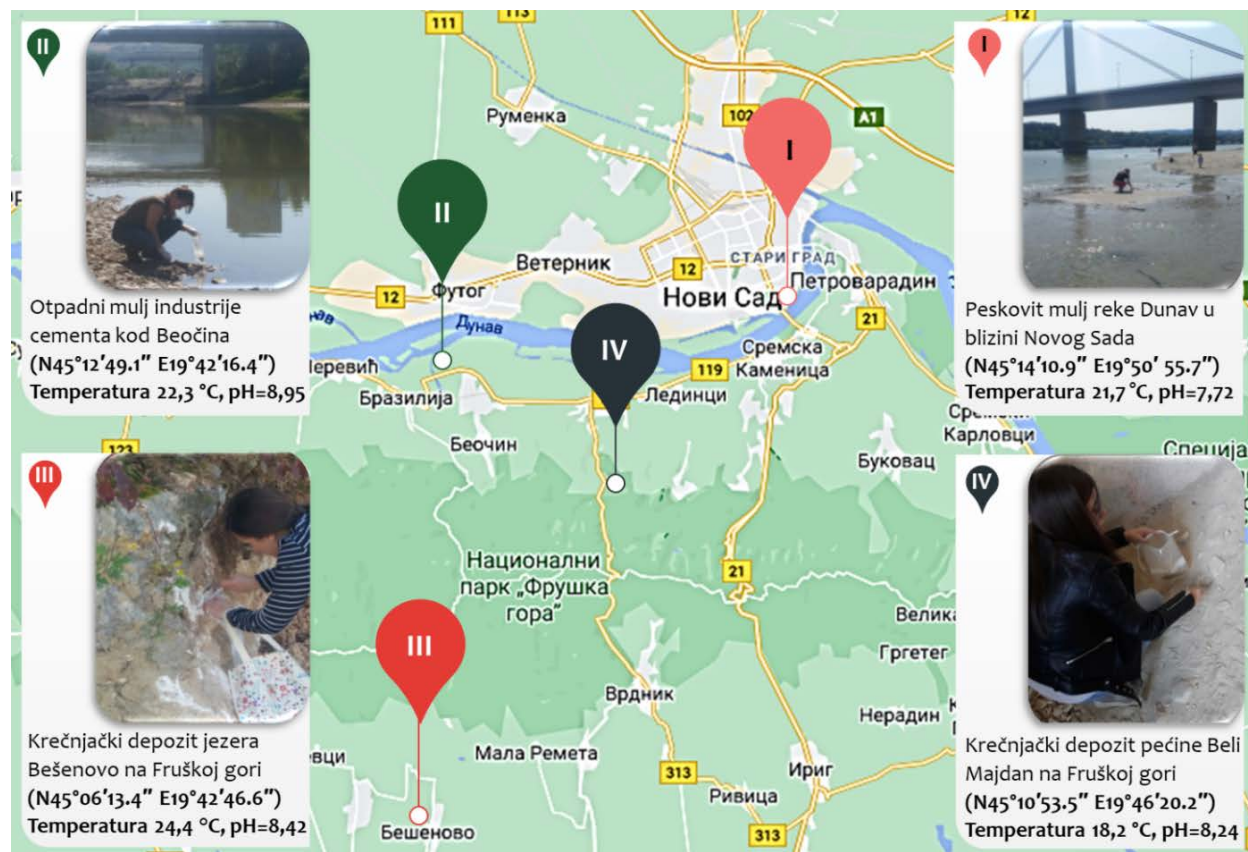
Slika 19. Izolovanje i primarna selekcija bakterija sa biokalcifikujućim potencijalom

Na osnovu primarnog odabira određenog broja izolata, dalja ispitivanja su obuhvatila testiranje biokinetičkih zona rasta na različitim temperaturama i pH vrednostima. Dodatno, testiran je denitrifikujući kapacitet odabranih izolata.

4.1.1. Uzorkovanje

Uzorci kalcitnih i alkalnih zemljišta su sakupljeni u toku proleća 2018. godine (slika 20) na odabranim lokalitetima koji su numerisani rimskim brojevima od I do IV. Sa lokaliteta I i II uzet je vlažan uzorak u vidu mulja, dok su na mestima uzorkovanja III i IV uzorci bili suvo kalcitno zemljište u vidu krečnjaka. Određena masa uzorka je uzeta u sterilnu plastičnu kesu i transportovana do Laboratorije za mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta Novi Sad u hladnom lancu (do 4 °C). Temperatura i pH vrednost uzorka su merene uređajem HANNA

99161 (HANNA Instrument, Woonsocket, Rhode Island, SAD). Isti uređaj korišćen je u celokupnom radu kada god je bilo potrebno odrediti pH vrednost.



Slika 20. Uzorkovanje na odabranim lokalitetima i opis mesta uzorkovanja

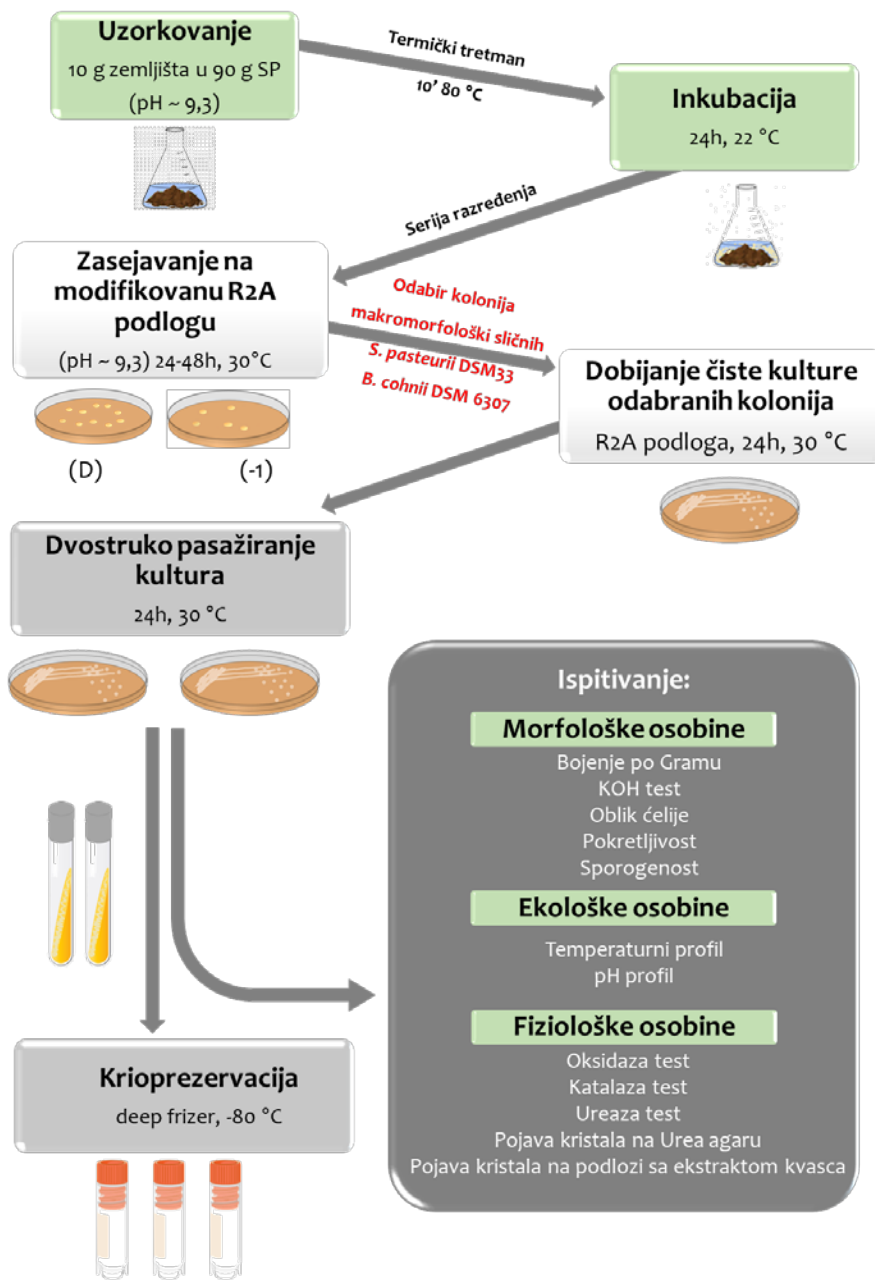
4.1.2. Izolovanje i primarna selekcija

Formirana šema za izdvajanje alkalofilnih, sporogenih bakterija iz zemljišta je prikazana na slici 21. Naime, 10 grama uzorka zemljišta je pomešano sa 90 mL slanog peptona⁸. Inicijalna pH vrednost sredstva za razblaženje je iznosila 9,3 zbog dodatka 1M natrijum seskvikarbonata ($C_2HNa_3O_6$)⁹. Nakon homogenizacije, uzorci su podvrgnuti termičkom tretmanu (80 °C, 10 min), a zatim inkubirani na 22 °C tokom 24h. Pripremljena je serija desetostrukih razređenja i alikvoti (100 μ L) su metodom iscrpljenja zasejavani na pH

⁸ Sastav: 0,1% BioPeptona (HiMedia, Mumbai, Indija) sa dodatkom 0,85% NaCl (Alkaloid, Skoplje, Severna Makedonija);

⁹ Sastav: 4,2 g $NaHCO_3$, 5,3 g Na_2CO_3 , 100 mL destilovane vode;

modifikovan R2A agar¹⁰ (HiMedia, Mumbai, Indija), te inkubirani na 30 °C tokom 48h. Promena pH vrednosti R2A agara je izvršena sterilnim rastvorom 1M C₂HNa₃O₆ u toku pripreme podloga (nakon autoklaviranja).



Slika 21. Šematski prikaz izolacije i selekcije sporogenih, alkalorezistentnih/alkalofilnih bakterija

¹⁰ Sastav: 0,25 g enzimski digestiv kazeina, 0,25 g enzimski digestiv animalnog tkiva, 0,3 g kiselinski hidrolizat kazeina, 0,5 ekstrakt kvasca, 0,3 g natrijum piruvat, 0,5 g glukoza, 0,3 rastvorljivi skrob, 0,05 g MgSO₄ x 7H₂O, 0,3 g K₂HPO₄, 12g agar, 1000 mL voda (inicijalna pH vrednost podloge ~7,2);

U prvom koraku selekcije izrasle kolonije, čije su makromorfološke karakteristike bile iste ili slične sa karakteristikama referentnih sojeva *Sporosarcina pasteurii* DSM 33 i *Bacillus cohnii* DSM 6307 na navedenoj podlozi, izabrane su za dalje korake selekcije bakterija. Za dobijanje čistih kultura odabranih kolonija postupkom dvostrukog pasažiranja pod istih uslovima inkubacije (20h, 30 °C) korišćena je R2A podloga. Istovremeno je proveravana sličnost opisa kolonije sa referentnim sojevima. Svi sojevi su čuvani u Hranljivom bujonu (HiMedia, Mumbai, Indija) sa dodatkom glicerola (Lach-ner, Neratovice, Češka) kao krioprotektanta u frižideru za ultraniske temperature (Snijders Labs, Tilburg, Norveška) na -80 °C.

4.1.3. Ispitivanje mikromorfoloških i fizioloških osobina izolata

Za ispitivanje mikromorfoloških osobina i pokretljivosti ćelija odabrani izolati su posmatrani svetlosnim mikroskopom (Zeiss Primo Star Binocular Microscope, Jena, Nemačka), dok je bojenje po Gramu, bojenje spora po Schaeffer-Fulton tehnici, i KOH test pomoću 3% rastvora kalijum hidroksida urađeno standardnim procedurama (Coico, 2005, Schaeffer i Fulton, 1933, Buck, 1982). Osim toga, ispitane su dve fiziološke osobine izolata: katalaza i oksidaza test. Katalaza test je urađen 3% rastvorom vodonik peroksida (Sani-hem, Novi Bečej, Srbija), dok su za oksidaza test korišćeni oksidaza celulozni diskovi (Mikrobiologie Bactident Oxidase, Merck, Darmštat, Nemačka). Za sve pomenute testove su korišćene bakterijske kulture inkubirane na Trypton soja agaru (TSA, HiMedia, Mumbai, Indija) u toku noći na 30 °C. Za detekciju ureazne reakcije korišćen je Urea agar po Christensen-u (HiMedia, Mumbai, Indija). Promena boje ove hranljive podloge (iz žute u rozu) koje su zasejane metodom iscrpljenja ezom je vizualno posmatrana tokom 3 dana na temperaturi od 30 °C.

4.1.4. Temperaturni i pH profil rasta izolata

Orijentaciona, optimalna temperatura za rast bakterijskih izolata, kao i njihova biokinetička zona, praćeni su intenzitetom rasta na kosom pH modifikovanom R2A agaru tokom pet dana inkubacije na različitim temperaturama (20, 30, 37 i 44 °C). Da bi se odredila orijentaciona, optimalna pH vrednost za rast, sa alikvotom (300 µL) sveže pripremljene bakterijske suspenzije je inokulisano 9 mL R2A bujona (HiMedia, Mumbai, Indija) sa različitim pH vrednostima (5, 7, 9 i 11), koje su postignute dodatkom 0,1 M i 1M HCl, odnosno 1M C₂HNa₃O₆.

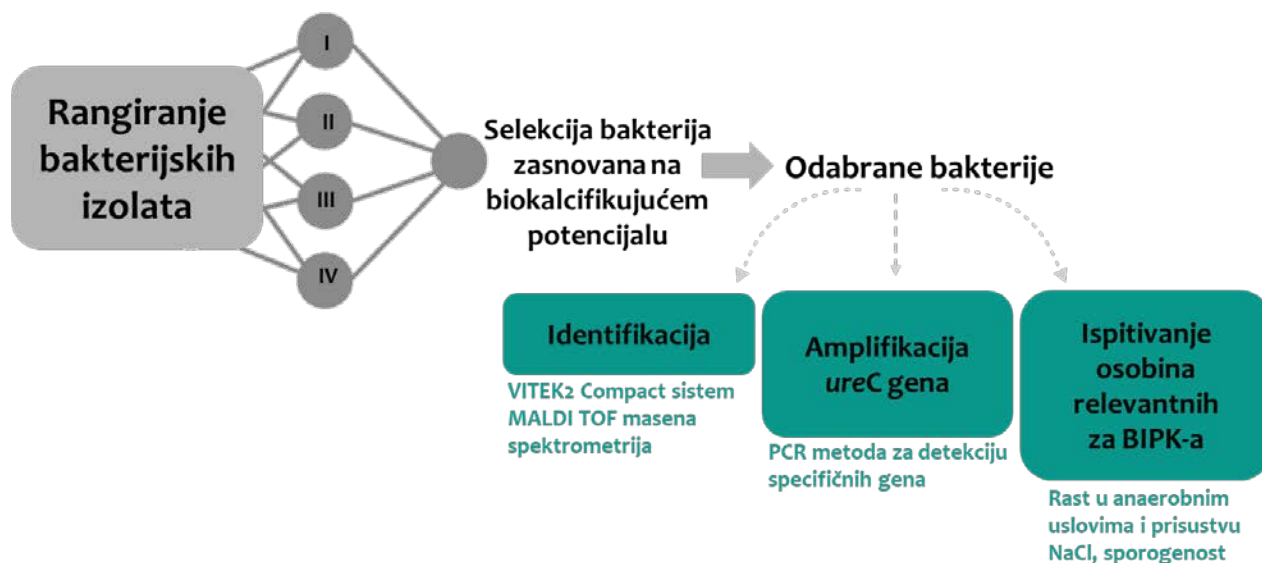
Pojava i nivo zamućenosti usled bakterijskog rasta je praćena 5 dana na 30 °C. Za posmatrane ekološke faktore, interpretacija rezultata je iskazana opisnim ocenama: nema rasta (0), slab intenzitet (1), srednji intenzitet (2) i visok intenzitet rasta (3).

4.1.5. Potencijal denitrifikacije izolata

Proces denitrifikacije je praćen tokom 72 sata na 30 °C u Nitratnom bujonu (Difco™ Nitrate Broth, Becton, Dickinson and Company, France). Za potrebe eksperimenta, kulture su preko noći osvežene na temperaturi od 30 °C upotrebom TSA podloge. Inokulacija 3 mL Nitratnog bujona je urađena sa 0,2 mL inokuluma suspenzija 43 bakterijska izolata i referentnog soja *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588 (pozitivna kontrola). Koncentracija suspenzija je bila oko 6,5 log CFU/mL. Denitrifikujući indikatori (produkcija biomase, koncentracija nitrata i nitrita, formiranje N₂ gasa, nitrita i amonijaka), ustanovljeni u radu Vidakovićeve (2019), praćeni su kao odgovori sistema na svaka 24h inkubacionog perioda. Produkcija biomase je praćena kroz zamućenost inokulisanih bujona pomoću McFarland standarda, dok je produkcija gasovitog azota praćena kroz nakupljanje gasa u Durhamovim cevčicama. Detekcija prisustva nitratnog jona u inokulisanim podlogama je izvršena Grisovim testom, dok su Nitrate and Nitrite Test Strip Kit tračice (Quantofix® Nitrate Nitrite, Macherey-Nagel, Duren, Germany) upotrebljene za polukvanitativno određivanje koncentracije nitrata i nitrita. Formiranje amonijaka je utvrđeno Neslerovim reagensom. Granica detekcije za Grisov reagens je 1-2 μM nitratnog jona (Bellavia i sar., 2015), dok je ta vrednost za Neslerov reagens 1,17 μM amonijaka (Zeng i sar., 2014).

4.2. Odabir bakterijskih izolata sa biokalcifikujućim potencijalom

Odabir bakterijskih izolata sa visokim potencijalom biokalcifikacije je obuhvatila ispitivanja morfoloških i ekoloških karakteristika, identifikaciju vrsta i PCR¹¹ amplifikaciju ciljanog gena za detekciju ureazne aktivnosti, kao što je prikazano na slici 22.



Slika 22. Šematski prikaz koraka selekcije bakterijskih izolata

4.2.1. Selekcija izolata

Bakterijski izolati, izdvojeni tokom primarne selekcije (videti 4.1.), koji su definisani kao sporogene bakterije sa pH optimumom rasta između 9 i 11, podvrgnute su daljoj selekciji. Izolati su ispitivani kroz različite metaboličke i biohemijske aktivnosti radi procene metaboličkog i biokalcifikujućeg potencijala. Korišćene podloge u ogledu su:

- Baza za Urea agar i bujon, UBA/UBB (HiMedia, Mumbai, Indija);
- Urea-CaCl₂ agar i bujon¹², UA-CaCl₂/UB-CaCl₂ (Shukla i Cameotra, 2016);
- Ekstrakt kvasca-CaCl₂ agar i bujon, EKA-CaCl₂/EKB-CaCl₂¹³.

¹¹ Lančana reakcija polimeraze (eng. polymerase chain reaction, PCR) je metoda amplifikacije molekula DNK u cilju stvaranja velikog broja kopija ciljane DNK sekvence koristeći malu početnu količinu genskog materijala;

¹² Sastav: 3 g hranjivi bujon, 10g NH₄Cl, 3,12 g CaCl₂, 20 g urea, (12 g agar), 1000 ml sterilna destilovana voda;

¹³ Predstavlja modifikovanu Urea-CaCl₂ podloga; umesto uree dodat je ekstrakt kvasca 4 g/L;

Alikvotom bakterijske suspenzije (300 µL) osveženih kultura (TSA, 24h, 30 °C) su inokulisane tečne podloge, dok je za zasejavanje čvrstih podloga korišćena metoda iscrpljena ezom. Produkcija biomase, promena pH vrednosti usled stvaranja alkalnih proizvoda i trenutna¹⁴ precipitacija karbonata su praćeni kroz замуćenost, promenu boje i dodatak 1 mL 3,2 g/L CaCl₂ u inokulisani UBB. Stvaranje kristalnog depozita oko kolonija je praćen na komplementarnim agarizovanim podlogama. Nakon 24h, ukupni volumen UBB podloge je centrifugiran (13 600 o/min, 7 minuta) pomoću Hettich Rotina 380P centrifuge (Tittlingen, Nemačka). Dobijen precipitat je trostruko ispiran sterilnom destilovanom vodom i osušen do konstantne mase. Polukvalitativna karakterizacija nastalog precipitata je obuhvatila FTIR-ATR analizu na FTIR spektrometru (ALPHA Bruker, Nemačka). Takođe, prisustvo CaCO₃ u dobijenim precipitatima je ispitano dodatkom koncentrovane hlorovodonične kiseline, a pozitivna reakcija je zabeležena kao pojava belih mehurića (jednačina (3)). Bakterijski rast i promena boje UBA podloge su posmatrani tokom 7 dana na 30 °C, dok je neorgansko taloženje na čvrstim podlogama detektovano svetlosnim mikroskopom (Zeiss Primo Star Binocular Microscope, Jena, Nemačka).

4.2.2. Identifikacija odabranih bakterijskih izolata

Bakterijski izolati su podvrgnuti različitim metodama identifikacije bakterijskih sojeva. Pre postupka identifikacije, izolati su osveženi na krvnom agaru (Columbia Agar with 5% Sheep Blood, BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska) i inkubirani na 30 °C tokom 24h.

Bakterijski izolati su identifikovani pomoću VITEK®2 Compact sistema (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska) prateći standardni postupak pripreme uzorka, koristeći VITEK®2 BCL kartice (BioMérieux, Karpone, Francuska). Bakterijska suspenzija je pripremljena u rastvoru 0,9% natrijum hlorida, pri čemu je ciljana koncentracija (0,55-0,62 McFarlandove skale) određena pomoću DensiCheck uređaja (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska).

Pored toga, izvršena je identifikacija MALDI-TOF masenim spektrometrijskim sistemom za identifikaciju (Bruker Daltonics, Bermen, Nemačka). Nakon što je biomasa pojedinačne

¹⁴ dodatkom visoke koncentracije reaktivnog kalcijuma dolazi do nagle, gotovo trenutne hemijske reakcije jona kalcijuma i karbonata i stvaranja belog, rastresitog produkta čija je gustina značajno veća od vode i dovodi do brzog taloženja;

kolonije prenete na MALDI matricu sa 96 polja, prema standardnom Brukerovom postupku direktnog prenosa uzorka, usledilo je sušenje i prekrivanje uzorka sa 1 μ L rastvorom α -ciano-4-hidroksicinaminske kiseline (Bruker Matrix HCCA, Bermen, Nemačka). MALDI-TOF maseni spektri su dobijeni korišćenjem MicroflexLT/SHBioTyper spektrometra (Bruker Daltonics, Bermen, Nemačka) sa azotnim laserom ($\lambda = 337$ nm), čije dejstvo je kontrolisano pomoću softvera FlexControl verzija 3.3. (Bruker Daltonics, Bermen, Nemačka). Prikupljanje spektra u rasponu masa od 2 do 20 kDa je sprovedeno pomoću opcije Auto Execute i akumulacijom 240 laserskih snimaka (frekvencija lasera 60 Hz; napon jona I 19,9 kV, napon jona II 18,53 kV, napon sočiva 6 kV), pri čemu se ostvaruje od 30 do 40% maksimalne snage lasera.

4.2.3. Amplifikacije *ureC* gena kod odabranih bakterijskih izolata

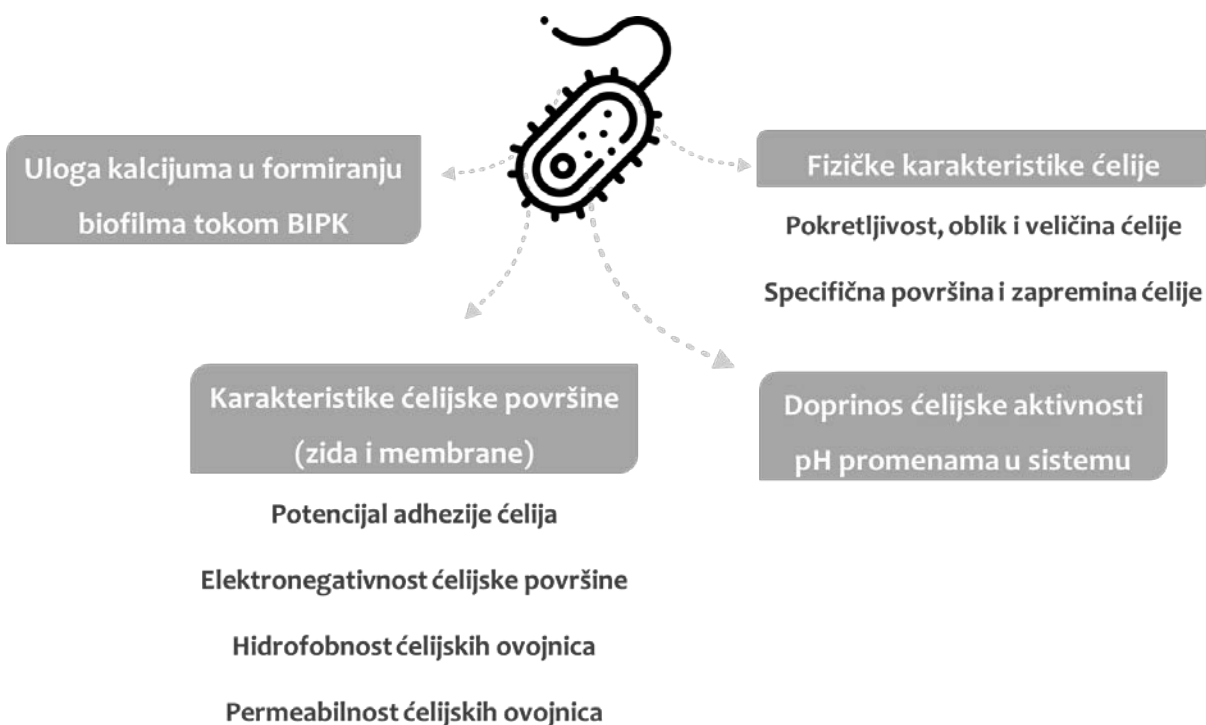
Za potrebe amplifikacije cljanog gena svi odabrani sojevi bakterija inkubirani na 30 °C na krvnom agaru tokom 18 sati. Genomska DNK je ekstrahovana pomoću DNK izolacionog kompleta prateći postupak za gram-pozitivne bakterije, dok je količina ekstrahovane DNK određena NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis spektrofotometrom. Za PCR amplifikaciju *ureC* gena u genomu testiranih bakterija, postupak je uključivao gensko specifične L2F (59-ATHGGIAARGCNGGNAAIACC-39) i L2R (59-GTBSHNCCCCARTCITCRTG-39) prajmere preporučene od strane Gresham i sar. (2007). Finalna PCR smeša (ukupna zapremina 20 mL) uključivala je DNK matricu (100 ng), PCR Master Mix (10 mL), prajmere (0,5 mmol po prajmeru), DNK polimerazu (0,5 mL) i H₂O. Gen *ureC* je amplifikovan pod sledećim uslovima: 5 min na 94,5 °C (početna denaturacija), 30 ciklusa od 1 min na 94 °C (denaturacija), 1,5 min na 55,7 °C (aniling), 2 min na 72 °C (ekstenzija), i 10 min na 72 °C (završna ekstenzija). Sve hemikalije, kao i korišćeni spektrofotometar, proizvodi su Thermo Fisher Scientific (Valtham, USA). Vizualizacija PCR proizvoda (očekivane dužine 330-400 bp) urađena je kapilarnom Lab-on-a-Chip elektroforezom na 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). Za pozitivnu kontrolu korišćena je DNK matrica *S. pasteurii* DSM 33, koja sadrži *ureC* gen, dok je negativna kontrola podrazumevala DNK ekstrahovanu iz neureolitčkog soja *B. pseudofirmus* DSM 8715.

4.2.4. Ispitivanje morfoloških i ekoloških karakteristika relevantnih za BIPK proces

Bakterijski rast u anaerobnim uslovima je ispitan pomoću Anaerocult A (Merck, New Jersey, SAD), koristeći metodu iscrpljenja bakterijske kulture na TSA sa dodatkom 2% uree (TSAU) i inkubacijom na 30 °C tokom 5 dana. Efekat različitih koncentracija natrijum je ispitana praćenjem bakterijskog rasta u tečnim podlogama sa različitim koncentracijama soli (3, 5, 7, 10 i 15%), kroz pojavu zamućenosti inokulisanog TSBU bujona tokom 48 sati na 30 °C. Nivo sporulacije kod bakterija je ispitan na 30 °C upotrebom TSBU sa dve različite pH vrednosti podloge (7,3 i 9,3). Kao i u prethodnim koracima, povećanje alkalnosti podloge je izvršeno upotrebom 1M $C_2HNa_3O_6$. Broj spora je određivan periodično tokom 7 dana, nakon termičkog tretmana (80 °C, 10 min), zasejavanja na TSAU podlogu i inkubiranja 24h na 30 °C.

4.3. Ispitivanje uloge bakterijske ćelije odabranih izolata u procesu BIPK

Dodatna uloga bakterijskih ćelija, pored osnovne metaboličke funkcije u produkciji karbonata, ispitana je kroz niz analiza prikazanih na slici 23.



Slika 23. Prikaz metoda za ispitivanje uloge bakterijske ćelije u BIPK procesu

4.3.1. Pokretljivost, oblik i veličina ćelije

Za elektronsku mikroskopiju su pripremljene bakterijske suspenzije ($\sim 3 \log$ CFU/mL) prekonoćnih kultura bakterijskih sojeva u TSB podlozi. Pripremljena suspenzija je centrifugirana (13 600 o/min, 7 min) i dobijeni pelet je trostruko ispran sterilnom destilovanom vodom kako bi se otklonili ostaci hranljive podloge. Procedura fiksiranja bakterijskih ćelija pomoću glutaraldehida, kao i postupak postepene dehidratacije etanolom je prethodno opisan u radu Das Murtey i Ramasamy (2005). Uzorak je prekriven zlatom pomoću uređaja Leybold Heraus L560Q (Leybold GmbH, Keln, Nemačka). Mikroskopiranje pod visokim vakuumom (napon ubrzanja 15 kV) je urađeno pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa Hitachi TM3030 (Hitachi Global, Tokio, Japan). Dimenzije ćelije su proračunate na osnovu veličina deset ćelija sa SEM snimaka. Specifična površina i zapremina ćelije su dobijene proračunom iz vrednosti širine i dužine ćelija na SEM snimcima, uzimajući u obzir da štapićasta bakterijska ćelija predstavlja cilindar sa dve polusferne polarne kape.

Bakterijski sojevi su podvrgnuti inokulaciji u Motility Indole Urea (MIU) podlogu. Konkretno, epruvete sa MIU polučvrstom podlogom (HiMedia, Mumbai, India) su inokulisane osveženom kulturom ubodom u stub podloge do dna epruvete i inkubirane na 30 °C tokom 24h. Ukoliko je testirani bakterijski soj pokretan, pojaviće se difuzni rast ili zamućenost koji se proteže dalje od linije uboda.

4.3.2. Elektronegativnost bakterijskih ćelija

Odabrane bakterije su osvežene preko noći u TSBU na 30 °C. Nakon postupka razblaživanja, bakterijska suspenzija ($\sim 3 \log$ CFU/mL), je centrifugirana (13 600 o/min, 7 minuta) i pelet ćelija je trostruko ispran rastvorom fosfatnog pufera (eng. phosphate-buffered saline, PBS, pH $\sim 7,2$), a uzorci su pripremljeni prema preporuci Ma i sar. (2020). Ukratko, ćelije su resuspendovane u PBS, 0,2 mol/L i 2 mol/L rastvora CaCl₂ i pripremljene za merenje pomoću Litesizer 500 uređaja (Anton Paar GmbH, Graz, Austrija).

4.3.3. Hidrofobnost ćelijske površine

Tokom pregleda naučno-relevantne literature, nije pronađena adekvatna metoda za test mikrobne adhezije za ureolitičke bakterije. Stoga je najpre izvršena optimizacija odabrane metode mikrobne adhezije pomoću ugljovodonika (eng. Microbial Adhesion to Hydrocarbons, MATH), a zatim izvršena finalna merenja. Optimizacija je izvršena na osnovu Box-Benhenov eksperimentalnog plana na tri nivoa (-1,0,1), a varirani su sledeći operativni parametri MATH testa: vreme homogenizacije, zapremina ugljovodonične faze i vreme separacije faza. Hidrofobnost ćelijske površine (eng. cell surface hidrophobicity, CSH) odabranih izolata je određena primenom optimizovanih MATH operativnih parametara.

Bakterijske kulture su inkubirane aerobno u TSB i TSBU tokom noći na 30 °C, a zatim centrifugirane (13600 o/min, 7 min). Istaložena biomasa je isprana i resuspendovana u istim hranljivim podlogama. Kao kontrole korišćene su apsorbance pripremljenih bakterijskih suspenzija snimljene na UV-1800 UV/VIS spektrofotometru (Shimadzu, Kyoto, Japan). U 4 mL bakterijske suspenzije (~ 6 log CFU/mL) je dodat heksadekan, nakon čega je uzorak homogenizovan i ostavljen odabrani vremenski period kako bi došlo do razdvajanja ugljovodonične i vodene faze. Izdvojena vodena faza je snimljena na talasnoj dužini od 600 nm. Neinkulisana hranljiva podloga je korišćena kao blank za kalibraciju spektrofotometra. Promena u vrednosti apsorbance vodene faze usled dodatka heksadekana predstavlja procenat bakterija koje su se izdvojile u hidrokarbonsku fazu. Posledično, hidrofobnost ćelijske površine računata je primenom jednačine 30.

$$CSH = \frac{A_{control} - A_{MATH}}{A_{control}} \times 100 \quad (30)$$

gde su:

$A_{control}$ – apsorbance bakterijske suspenzije;

A_{MATH} –apsorbance uzorka nakon dodatka heksadekana i vorteksiranja.

4.3.4. Permeabilnost ćelijske membrane

Modifikovana kristal-violet (eng. cristal-violet, CV) metoda je primenjena za određivanje permeabilnosti ćelijske membrane (Halder i sar., 2015), pri čemu je dobijeni rezultat iskazan

kao procenat usvajanja boje. Nakon inkubacije u TSB i TSBU, bakterijske suspenzije su razređene do približno 3 log CFU/mL, a zatim centrifugirane (13 600 o/min, 7 minuta). Dobijeni peleti ćelija su trostruko isprani u PBS puferu i resuspendovani u 0,9% natrijum hloridu, kao i rastvoru uree ili rastvoru uree i CaCl₂. Uzorci su inkubirani 4 sata na 37 ° C i centrifugirani pod istim uslovima. Svi uzorci su resuspendovani u PBS uz dodatak 5 µg/mL kristal-violeta i ostavljeni 10 minuta u mraku. Centrifugiranje je ponovljeno i u supernatantu je merena apsorbancija uzoraka (A , $\lambda=590$ nm, UV-1800 UV/VIS spektrofotometru (Shimadzu, Kyoto, Japan)). Apsorbancija čistog rastvora kristal-violeta je korišćena kao A_0 , a procenat usvajanja kristal-violeta (eng. crystal-violet uptake, CVU) je izračunat jednačinom (31).

$$CVU = \frac{A}{A_0} \cdot 100 \quad (31)$$

Kao blank je korišćen uzorak pripremljen u 0,9% rastvoru natrijum hlorida. U cilju normalizacije rezultata, u slučaju dodatka kalcijum hlorida u sistem (što može da dovede do izdvajanja CaCO₃), od dobijene vrednosti procenta usvajanja boje je oduzeta vrednost usvajanja boje na kristale čistog CaCO₃ (Matijaković i sar., 2018).

4.3.5. Potencijal adhezije ćelija i uloga kalcijuma u formiranju biofilma

Prema proceduri Vidakovićeve (2019) urađen je polukvantitativni adhezioni test i mogućnost formiranja biofilma. Procedura je ponovljena uz primenu TSBU, pored preporučene TSB podloge. Merenjem optičke gustine na talasnoj dužini od 620 nm, definisanje potencijala adhezije bez i u prisustvu uree prikazano je na sledeći način: visok ($OD_{620} \geq 1$), srednji ($0,1 \geq OD_{620} \geq 1$) i nizak potencijal adhezije ($OD_{620} < 0,1$).

Dodatno je rađen specifičan test formiranja biofilma, u kojem posebnu ulogu ima dodatak kalcijumovih jona. Alikvot (10 µL) prekonoćne kulture (TSB, na 30 °C, ~8 log CFU/mL) je aplikovan u 50 mL TSBU i u 50 mL TSBU podloge sa dodatkom 2 mol/L CaCl₂, te je inkubacija vršena 7 dana na 30 °C. Nakon inkubacije, pripremljena je serija razređenja, te je po 200 µL odgovarajućeg razređenja (~ 6 log CFU/mL) preneto u mikrotitar ploču (Dickinson and Compani, Franklin Lakes, Nev Jork, USA) u 9 ponavljanja. Nakon inkubacije na 30 °C tokom 24, 48 i 72 sata pri konstantnoj vlažnosti (~95%), planktonske ćelije su isprane 0,9% rastvorom

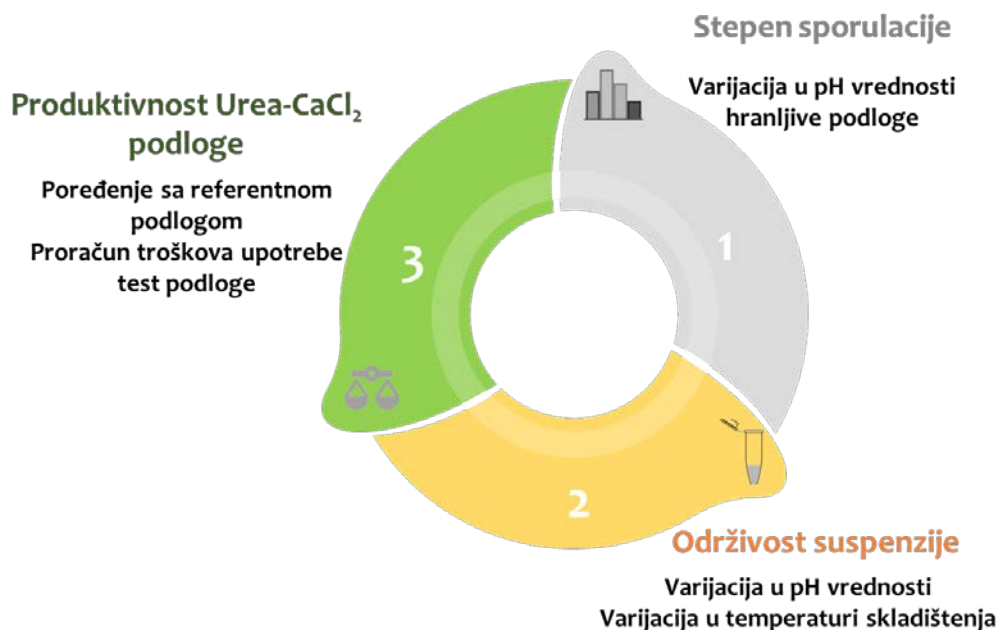
NaCl. Vezane ćelije su obojene u bunarićima mikrotitar ploče, korišćenjem 1% rastvora boje kristal-violet tokom 20 minuta. Sledeći koraci su uključivali ispiranje fiziološkim rastvorom i dodavanje 98% etanola u bunariće tokom 15 minuta na sobnoj temperaturi. Prisustvo biofilma je detektovano merenjem apsorbancije na 590 nm. Neinkulisane hranljive podloge su poslužile kao slepa proba metode.

4.3.6. Određivanje pH promena usled aktivnosti bakterijskih ćelija

Do postizanja konstantne vrednosti, pH kultivacionih medijuma je praćena tokom inkubacije na 30 °C. Posle stabilizacije, merenje pH vrednosti je izvršeno periodično do kraja trodnevnog perioda inkubacije. Hranljive podloge koje su obuhvaćene ovim testom su: TSB, TSBU, kao i TSBU sa dodatkom 2 mol/L CaCl₂. Kao blank uzorci za merenje pH vrednosti u odabranim vremenskim tačkama korišćeni su neinkulisane hranljive podloge.

4.4. Održivost i stabilnost bakterijskih kultura

Šema ispitivanja održivosti i stabilnosti bakterijskih kultura je prikazana na slici 24. Ovaj korak je obuhvatio procenu stepena sporulacije i održivosti bakterijskih suspenzija na različitim pH vrednostima. Dodatno, određena je produktivnost Urea-CaCl₂ podloge.



Slika 24. Ispitivanje stabilnosti i održivosti bakterijskih kultura

4.4.1. Stepen sporulacije

Stepen sporulacije odabranih bakterija je ispitivan na 30 °C u TSB sa pH vrednostima od 7,3 i 9,3. Povećanje pH vrednosti sa inicijalne, približno neutralne vrednosti TSB (pH ~7,3) je urađeno dodatkom 1M rastvora $C_2HNa_3O_6$. Prikupljanje uzoraka je rađeno periodično tokom 7 dana na 30 °C, a uzorci su podvrgnuti termičkom tretmanu (80 °C, 10 min) i određivanju broja spora zasejavanjem adekvatnih razređenja na TSAU metodom iscrpljenja (30 °C, 24h).

4.4.2. Održivost bakterijskih suspenzija

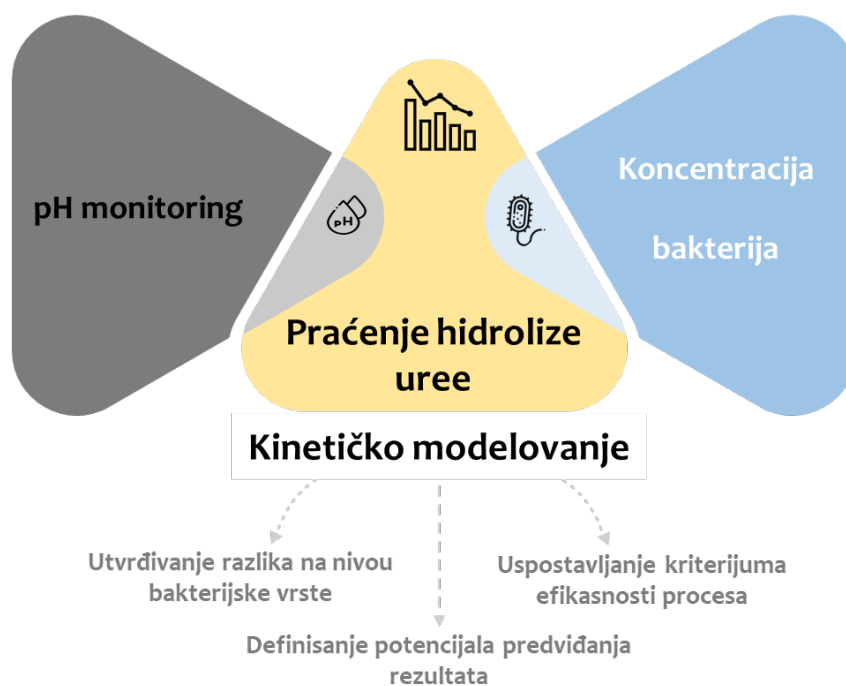
Održivost bakterijskih suspenzija je ispitana u destilovanoj i alkalnoj destilovanoj vodi, čije pH vrednosti su iznosile oko 6,8 i 9,3, redom. Povećanje pH vrednosti destilovane vode je postignuto dodatkom 1M rastvora $C_2HNa_3O_6$. Kultivaciona tečnost (TSB, 30 °C, 72h) je centrifugirana i isprana destilovanom vodom na kraju inkubacionog procesa i podeljena tako da je jedan deo dobijene biomase resuspendovan u sterilnu destilovanu vodu, a drugi deo u sterilnu alkalnu destilovanu vodu. Nakon homogenizacije, suspenzije su podeljene u sterilne vijale (radna zapremina 1,5 mL) i čuvane na sobnoj temperaturi (22 °C), temperaturi frižidera (4 °C) i temperaturi zamrzivača (-20 °C). Koncentracija bakterija je određivana u definisanim vremenskim intervalima (0, 1, 7, 14, 28, 56, 70 dana) zasejavanjem na TSA (24h, 30°C).

4.4.3. Produktivnost Urea-CaCl₂ hranljive podloge

Produktivnost i selektivnost UA-CaCl₂ hranljive podloge (Shukla i Cameotra, 2016) je testirana u odnosu na TSAU, koja je preporučena referetna podloga Zbirke mikrobioloških kultura DSMZ. Bakterijske kulture su ispitivane u deset nezavisnih šarži pripremljene podloge prema standardu SRPS EN ISO 11133:2015/A1:2018. Svako zasejavanje je urađeno u tri ponavljanja.

4.5. Praćenje procesa ureolize i definisanje kinetičkih modela

Na slici 25 je prikazana primenjena šema za praćenje metaboličke reakcije, koja posreduje procesu BIPK. Kinetičko modelovanje je izvršeno za praćenje hidrolize uree, promena u pH vrednosti kultivacione tečnosti, kao i koncentracije bakterija.



Slika 25. Korak praćenja ureolitičke aktivnosti bakterija

4.5.1. Kinetika ureolitičke reakcije

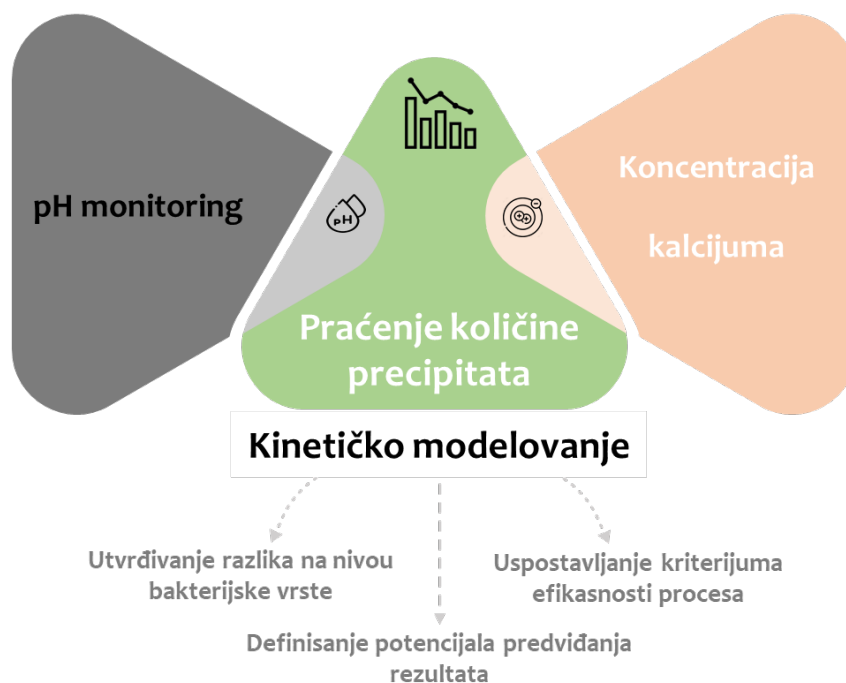
Stepen ureolitičke aktivnosti bakterija je određen na osnovu utroška uree pomoću Urea/Ammonia (Rapid) Assay kita (Megazyme, Vienna, Austria) sledeći uputstva proizvođača. UBB podloga je inokulisana sa 10% v/v sveže pripremljene bakterijske suspenzije (~6 log CFU/mL). Koncentracija uree je praćena tokom 72h na 30 °C. Kao blank, korišćena je neinokulisana UBB podloga. Za tačke uzorkovanja odabrane su sledeća vremena inkubacije: 0, 1, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60 i 72h. Svaki uzorak je sterilno filtriran, a po potrebi i razređen pre merenja apsorbanci na talasnoj dužini od 340 nm na UV-1800 UV-VIS spektrofotometru (Shimadzu, Japan).

4.5.2. Promene pH vrednosti i koncentracije bakterija u toku ureolitičke aktivnosti

U prethodno navedenim tačkama uzorkovanja merena je pH vrednost i određivan broj bakterija primenom metode iscrpljenja na TSAU podlozi (inkubacija 24h, 30 °C). Sva merenja su rađena u tri ponavljanja.

4.6. Praćenje BIPK procesa i definisanje kinetičkih modela

Praćenje bakterijski indukovane precipitacije CaCO_3 za odabrane bakterije je urađeno na sličan način kao i za proces ureolize. Naime, sem osnovnog procesa, koji je praćen kvantitativnim određivanjem količine precipitata, praćeni su i nusprocesi (slika 26). Promene u pH vrednosti i količini slobodnog kalcijuma u kultivacionoj tečnosti su uzeti kao značajni parametri koji mogu dodatno da pojašne tok BIPK procesa.



Slika 26. Praćenje BIPK procesa

4.6.1. Kinetika procesa bakterijski indukovane precipitacije

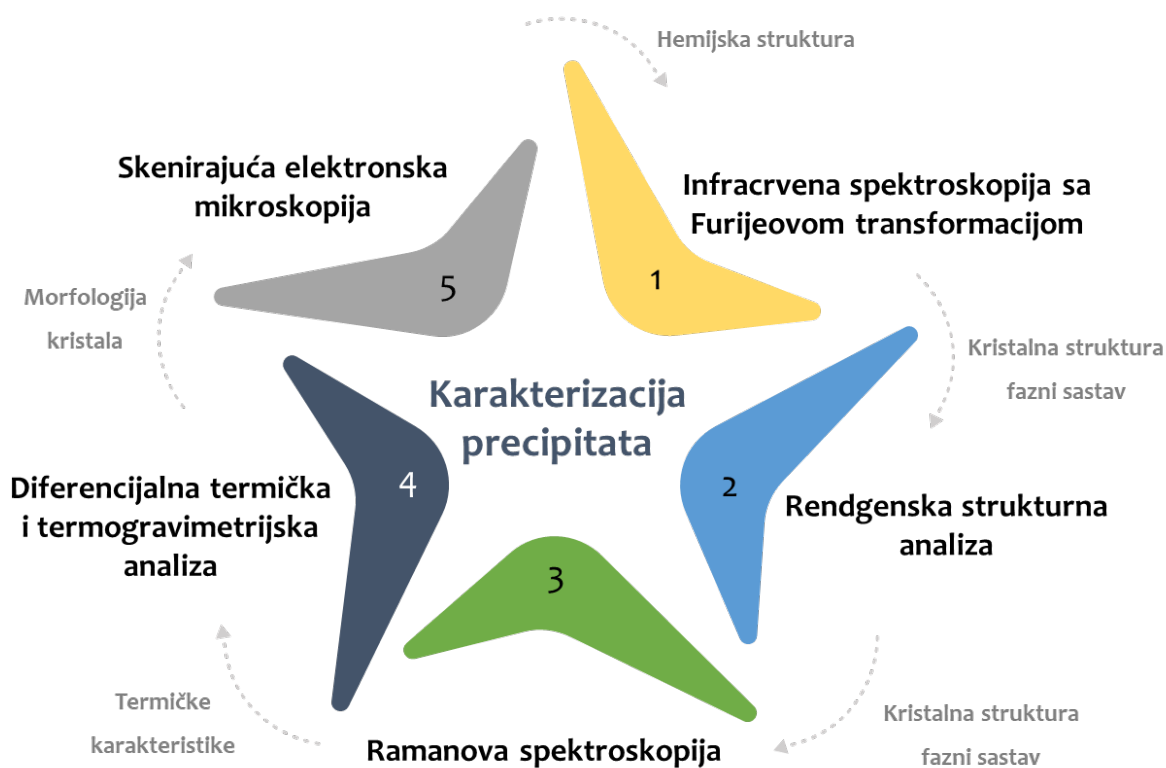
Proces precipitacije je indukovan inokulacijom UB-CaCl₂ bakterijskom suspenzijom prekonoćnih bakterijskih kultura (UA-CaCl₂, 30 °C). Proces je praćen dve nedelje na 30 °C. Količina nastalog neorganskog depozita, pH vrednost i koncentracija kalcijumovih jona su određeni na početku inkubacije, a zatim i 1, 3, 7, 10 i 14. dana. Celokupna kultivaciona zapremina (100 mL) je centrifugirana (13 600 o/min, 7 min). Takođe, mineralni depozit zalepljen na zidove inkubacionog suda je skinut pomoću sterilne eze. Centrifugirani precipitat je trostruko ispran sterilnom destilovanom vodom (uklanjanje biomase i preostalih nutrijenata). Količina precipitata je određena nakon sušenja do konstantne mase.

4.6.2. Promene koncentracije kalcijuma i pH vrednosti

U svakoj tački uzorkovanja za određivanje količine precipitata, određena je i koncentracija slobodnih kalcijumovih jona. U okviru pripreme uzorka za snimanje, uzorak je sterilno filtriran pomoću filtera sa porama dijametra 0,22 µm. Koncentracija slobodnog kalcijuma u supernatantu je analizirana atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom (SpectrAA 220FS, Varian, Palo Alto, USA) sa direktnim usisavanjem uzorka. Merenje pH vrednosti je urađeno u istim tačkama uzorkovanja pomoću pH metra.

4.7. Karakterizacija precipitata

Strukturna karakterizacija precipitata dobijenih nakon prvog i poslednjeg dana inkubacije u prethodnom eksperimentalnom koraku (poglavlje 4.6.1.) je urađena kroz niz analiza (slika 27) za sve testirane ureolitičke bakterije.



Slika 27. Karakterizacija precipitata

4.7.1. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

Za potvrdu hemijske strukture dobijenih precipitata snimljeni su spektri u infracrvenom području (eng. Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) primenom spektrofotometra s Furierovom transformacijom Bomem FT-IR (Hartmann & Braun MB-series). Kako bi se pripremili u vidu pločica za uzorkovanje, uzorci su pomešani sa KBr, a zatim snimljeni na sobnoj temperaturi u opsegu talasnih dužina između 4 000 i 400 cm^{-1} .

4.7.2. Rendgenska strukturna analiza

Kristalna struktura uzoraka je proverena pomoću rendgenske difrakcione analize (eng. X-ray powder diffraction, XRD) na XRD difraktometru (Rigaku SmartLab with CuK α radiation). Svi XRD obrasci su obrađeni u Rigaku PDXL 2: Integrated powder X-ray diffraction software, verzija 2.8.3.0. (Rigaku Corporation, Tokyo, Japan), kao i uz pomoć standardnih obrazaca za kalcit (COD ref. kod 96-450-2444) i vaterit (COD ref. kod 96-300-0001).

4.7.3. Ramanova spektroskopija

U cilju potvrđivanja rezultata dobijenih XRD metodom urađena je Ramanska spektroskopija (eng. Raman spectroscopy, RAMAN), koja predstavlja komplementarnu analizu FT-IR metodi, ali značajno veće osetljivosti za određivanje hemijskog i faznog sastava uzorka¹⁵. Ramanski spektri su snimljeni u opsegu 100-1500 cm⁻¹ koristeći DXR Raman uređaj (ThermoScientific, Massachusetts, USA) na sobnoj temperaturi.

4.7.4. Diferencijalna termička i termogravimetrijska analiza

Termičke karakteristike uzoraka precipitata su istražene upotrebom diferencijalne termičke i termogravimetrijske analize (eng. Differential Thermal Analysis/Thermal Gravimetric Analysis, DTA/TGA) koja je urađena do temperaturne vrednosti od 1000 °C sa stepenom zagrevanja 20 °C/min u atmosferi azota (30 mL/min) koristeći TGA-DSC/DTA kuplovani sistem STA 449 F5 Jupiter kombinovan sa DSC 204 F1 Phoenix (NETZSCH-Gerätebau GmbH, Selb, Nemačka).

4.7.5. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Morfologija precipitata je analizirana skenirajućom elektronskom mikroskopijom (eng. Scanning Electron Microscopy, SEM) pomoću uređaja Hitachi TM3030 pod visokim vakuumom (napon 15 kV, strujni snop 20 nA), dok je Leybold Heraeus L560Q uređaj poslužio za nanošenje čestica zlata na uzorak pre mikroskopskog snimanja.

¹⁵ Pored toga, koristi se za određivanje stepena naprezanja u hemijskim vezama, veličine kristalnih zrna, prisustva nečistoća, defekata rešetke i uređenja kristalne strukture uzoraka na tzv. kratkom dometu;

4.8. Skrining uslova sredine i sadržaja hranljive podloge u toku BIPK procesa

Kako bi se proces BIPK odvijao najefikasnije, bilo je potrebno uraditi skrining uslova sredine i sadržaja hranljive podloge, uz postavljanje pogodnog eksperimentalnog dizajna, a zatim dobijene rezultate matematički obraditi i izvršiti optimizaciju. Za potrebe analize velikog broja faktora, koji potencijalno utiču na BIPK, odabran je Plackett-Burmanov eksperimentalni dizajn, koji je zahtevao neke varijacije i specifičnosti u realizaciji pojedinih oglada.

Kako bi se ispunili uslovi eksperimentalnog dizajna, komponente UB-CaCl₂ hranljive podloge su podeljene na konstatne i varijabilne. Konkretno, varirane su koncentracije uree, Ni²⁺ joni u obliku neorganske soli (NiCl₂) i kalcijum hlorida. Koncentracije hranljivog bujona (3 g/L), NH₄Cl (10 g/L), NaHCO₃ (2,15 g/L) su bile konstante u svim ogledima. Inicijalna pH vrednost podloge je korigovana rastvorom 1M C₂HNa₃O₆ na željenu vrednost od 9,3 u ogledima u kojima je zahtevana alkalna sredina. Bakterije su inkubirane na TSAU na 30 °C tokom 5 dana. Osnovna bakterijska suspenzija (~8 log CFU/mL) je poslužila za pripremu serije razređenja tako da koncentracija inokuluma bude varirana u skladu sa potrebama eksperimenta (4 i 8 log CFU/mL).

Kvantifikacija hidrolize uree urađena je prema prethodno opisanom protokolu upotrebom komercijalnog kita (poglavlje 4.5.1.). Za snimanje apsorbance korišćen je UV-1800 UV-VIS spektrofotometar (Shimadzu, Japan). Inicijalna i finalna pH vrednost je merena pH metrom HI 99181 (Hanna Instruments, Vunsakat, USA). Koncentracija ćelija na početku i kraju oglada utvrđena je zasejavanjem alikvota adekvatnog razređenja suspenzije (100 µL) na TSAU (30 °C, 48h), dok je nivo sporulacije određen nakon termičkog tretmana (80 °C, 10 min) istom metodom. Za kvantifikaciju precipitata, celokupna kultivaciona zapremina je centrifugirana (13600 o/min, 7 min), a zatim je dobijeni talog dvostruko resuspendovan u destilovanoj vodi u ukupnoj zapremini ependorf suda od 2 mL i podvrgnut postupku centrifugiranja pomoću mini centrifuge (CarlRoth, Frankfurt, Germany) na 6000 obrtaja tokom 3 min. Količina precipitata je merena nakon sušenja do konstatne mase.

4.9. Matematička obrada rezultata

Za potrebe obrade eksperimentalno dobijenih rezultata matematičko modelovanje je izvedeno pomoću softvera Statistica 10.0 (StatSoft Inc., 2010). Dodatno, za pojedine analize korišćene su odabrane funkcije u okviru programskog paketa Microsoft Excel 2019.

4.9.1. Matematička obrada rezultata izolovanja i primarne selekcija bakterija

Dobijeni rezultati u okviru ovog segmenta istraživanje su predstavljeni višeparametarskom matematičkom metodom koja se naziva deskriptivna statistika. Za prikaz rezultata odabrane su brojčane i procentualne vrednosti raspodele ispitivane grupe bakterija. Deskriptivna statistika je upotrebljena za početno kvantitativno opisivanje bakterija, kao i sagledavanje međusobnog odnosa proučavanih parametara. Analizom je utvrđena raspodela promenljivih opisana srednjom vrednošću i njenim odstupanjem (standardne devijacije i varijanse).

4.9.2. Matematička obrada rezultata temperaturnog i pH profila rasta

Deskriptivna statistika

Za raspodelu bakterija na osnovu temperature i pH vrednosti rasta primenjena je deskriptivna statistika, na isti način kao za opisivanje primarno određenih karakteristika odabranih izolata (poglavlje 4.9.1.).

Klasterska analiza

Grupisanje bakterija na osnovu najveće sličnosti u ponašanju na različitim temperaturama i pH vrednostima rasta je izvršeno pomoću klusterske analize, a pomoću rezultata koji se izračunava na osnovu vrednosti obeležja po svim promenljivama, za svaku jedinicu posmatranja posebno. Rezultati su predstavljeni pomoću dendograma koji prikazuje hijerarhijsku raspodelu ispitivanih bakterija.

ANN modelovanje

Nezavisne promenljive za ANN modelovanje su bile vreme, kao i vrednost temperaturnog i pH profila rasta bakterija. Za matematičko modelovanje je korišćen MLP model mreže sa tri sloja (ulazni, skriveni, izlazni sloj) za rešavanje nelinearnih funkcija. Pri izračunavanju, svi ulazni i izlazni podaci su normalizovani da bi se poboljšalo ponašanje ANN mreže. Tokom ovog više puta ponovljenog procesa računanja, ulazni podaci su više puta predstavljeni mreži. Algoritam Broyden–Fletcher–Goldfarb–Shannov (BFGS) je korišćen kao iterativna metoda za rešavanje neograničenih, nelinearnih problema koji se javljaju pri optimizaciji u ANN modelovanju.

Eksperimentalna baza podataka za ANN modelovanje je stohastički podeljena na učenje, unakrsnu validaciju i testiranje podataka (sa 70, 15 i 15% eksperimentalnih podataka, respektivno). Takozvani „proces učenja“ je korišćen za ciklus učenja ANN mreže, ali i za procenu optimalnog broja neurona u skrivenom sloju i dobijanje težinskog koeficijenta svakog neurona u mreži. Pretpostavka je da se uspešno učenje postiže kada se kriva učenja i unakrsne validacije približi nuli. Koeficijenti povezani sa skrivenim neuronskim slojevima su grupisani u matricu W_1 i vektor B_1 . Slično tome, koeficijenti povezani sa izlaznim slojem su grupisani u matricu W_2 i vektor B_2 . Neuronsku mrežu je moguće predstaviti koristeći matričnu notaciju iskazanu jednačinom (32), u kojoj je Y matrica izlaznih promenljivih, f_1 i f_2 funkcije prenosa u skrivenom i izlaznom sloju, respektivno, a X konstanta matrice ulaznih promenljivih.

$$Y = f_1(W_2 \cdot f_2(W_1 \cdot X + B_1) + B_2) \quad (32)$$

Elementi W_1 , W_2 , B_1 i B_2 su određeni tokom ANN ciklusa učenja ANN, a poboljšani korišćenjem optimizovane procedure kako bi se smanjila greška između neuronske mreže i eksperimentalnih izlaza. Ovaj proces je urađen radi ubrzanja i stabilizacije konvergencije.

Tačnost modela tj. numerička verifikacija razvijenog modela je testirana upotrebom statističkih indikatora, kao što su koeficijent determinacije (R^2), redukovani hi-kvadrat (χ^2), srednja greška odstupanja (MBE), koren kvadrata srednje greške (RMSE) i srednja

procentualna greška (MPE) (Pavlič i sar., 2020). Ovi parametri se mogu izračunati korišćenjem jednačina (33) i (34), gde $x_{exp,i}$ predstavlja eksperimentalne vrednosti, a $x_{pre,i}$ su predviđene vrednosti dobijene iz modela. N i n su brojevi posmatranja, odnosno konstante.

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (x_{exp,i} - x_{pre,i})^2}{N - n}, \quad RMSE = \left[\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N (x_{pre,i} - x_{exp,i})^2 \right]^{1/2} \quad (33)$$

$$MBE = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N (x_{pre,i} - x_{exp,i}), \quad MPE = \frac{100}{N} \cdot \sum_{i=1}^N \left(\frac{|x_{pre,i} - x_{exp,i}|}{x_{exp,i}} \right) \quad (34)$$

Eksperimentalna verifikacija ANN modela

Tačnost ANN modela za predviđanje temperaturnog i pH profila rasta odabranih bakterija utvrđena je eksperimentalnom verifikacijom u laboratorijskim ispitivanjima. Rast izolata je testiran na dve vrednosti pH (10 i 11,5) i temperature (15 i 25 °C), pri čemu je jedna vrednost u testiranom opsegu, a druga van njega. Za eksperimentalnu verifikaciju ANN odabran je po jedan soj svakog mesta uzorkovanja (I-IV), a procena ANN modela je urađena prema prethodno navedenom postupku za određivanje temperaturnog i pH profila izolata u Poglavlju 4.1.

4.9.3. Matematička obrada rezultata ispitivanja denitrifikujućeg potencijala bakterija

ANN modelovanje

Nezavisne promenljive za ANN modelovanje za predviđanje denitrifikujućeg potencijala bakterija su bile bakterijski izolat i vreme inkubacije, dok su definisani izlazi predstavljali denitrifikujuće indikatore (produkcija biomase, koncentracija nitrata i nitrita, formiranje N_2 gasa, nitrita i amonijaka). ANN modelovanje i provera kvaliteta modela je urađeno na prethodno opisan način (poglavlje 4.9.2.).

Eksperimentalna verifikacija ANN modela

Tačnost ANN modela za predviđanje denitrifikujućeg potencijala bakterija je utvrđena eksperimentalnom verifikacijom u laboratorijskim ispitivanjima. Denitrifikujući indikatori su analizirani na odabrana, prethodno netestirana vremena inkubacije (36 i 60h). Za potrebe

verifikacije, izvršen je slučajni odabir jednog bakterijskog izolata sa svakog od četiri mesta uzorkovanja (I-IV). Analize su urađene na identičan način kao i u primarnom ogledu ispitivanja denitrifikujućeg potencijala (poglavlje 4.1.5.).

4.9.4. Matematička obrada rezultata odabira bakterija sa biokalcifikujućim potencijalom

Rangiranje izolata na osnovu biokalcifikujućeg potencijala je urađeno metodom za određivanje standardne ocene (eng. Standard Score, SS). Upotrebom ove analize je izvršena procena sojeva zasnovana na dobijenim rezultatima eksperimenata i definisanjem ekstremnih vrednosti za svaku pojedinačnu ispitivanu aktivnost (Brlek i sar., 2013) prema jednačini (35). Dobijeni rezultati su normalizovani upotrebom ekstremnih vrednosti odabranih metoda, dok su bezdimenzionalni rezultati vrednovani oduzimanjem minimalnih vrednosti od sirovih podataka i deljenjem sa dobijenim opsegom za svaki test.

$$\bar{x}_i = \frac{x_i - \min_i x_i}{\max_i x_i - \min_i x_i}, \forall i \quad (35)$$

Standardna ocena je matematička funkcija čiji je maksimum određen procenom ocena za sve promenljive, prema jednačini (36). Svaka izlazna promenljiva ima svoju težinu (w_i) prilikom izračunavanja funkcije SS.

$$SS = w_1 \cdot \overline{SR} + w_2 \cdot \overline{pH} + w_3 \cdot \overline{UAG} + w_4 \cdot \overline{UAC} + w_5 \cdot \overline{UBT} \\ + w_6 \cdot \overline{UBC} + w_7 \cdot \overline{UBCA} + w_8 \cdot \overline{MUC} + w_9 \cdot \overline{MEC} \quad (36)$$

Nivo sporulacije (\overline{SR}), optimalna pH vrednost (\overline{pH}), rast na UBA (\overline{UAG}), promena boje UBA (\overline{UAC}), zamućenost UBB (\overline{UBT}), promena boje UBB (\overline{UBC}), dodatak CaCl_2 u inokulisani UBB (\overline{UBCA}), formiranje CaCO_3 na/u Urea- CaCl_2 podlozi (\overline{MUC}), formiranje CaCO_3 na/u EK- CaCl_2 podlozi (\overline{MEC}) predstavljaju normalizovane vrednosti eksperimentalnih podataka koje su dobijene pomoću jednačine (36). Maksimum SS funkcije predstavlja ujedno optimum ispitivanih parametara. Ako je vrednost optimalne funkcije blizu 1, onda se može zaključiti da postoji tendencija da testirani parametri budu optimalni.

4.9.5. Matematička obrada rezultata ispitivanja uloge bakterijske ćelije u BIPK procesu

ANN modelovanje

Nezavisne promenljive korišćene za matematičko modelovanje pH promena tokom BIPK procesa su vreme inkubacije i hranljiva podloga, dok su dodatne promenljive u slučaju ispitivanja uloge kalcijuma u formiranju biofilma bile dobijene apsorbance merenja. ANN modelovanje je urađeno na identičan način kao za prvu eksperimentalnu celinu (poglavlje 4.9.1). Prilikom modelovanja, korišćena je serija različitih ANN topologija, u kojima je broj skrivenih neurona varirao od 3 do 15, a proces obuke mreže je pokrenut 100 000 puta sa slučajnim početnim vrednostima težinskih koeficijenata i nultih vrednosti. Baza podataka je stohastički podeljena na skupove podataka o učenju, unakrsnoj validaciji i testiranju (70, 15, odnosno 15% eksperimentalnih podataka). Algoritam BFGS je korišćen kao iterativna metoda za rešavanje nelinearnih problema i ubrzanje konvergencije.

Kinetičko modelovanje

Za praćenje pH promena je urađeno kinetičko modelovanje. Četvoroparametarska logistička regresiona funkcija (eng. Four-parameter sigmoidal mathematical model/ Four-Parameter Logistic Regression function), prikazana jednačinom (37) se smatra pogodnom za biološke sisteme (Romano i sar., 2007) jer podatke uklapa u S-krivu modela promena tokom metaboličke aktivnosti bakterija. Regresioni koeficijenti koji učestvuju u ovoj funkciji mogu da se objasne na sledeći način: a – minimalna dobijena vrednost ($t=0$), d – maksimalna vrednost koja se može dobiti ($t = \infty$), c – tačka pregiba krive (tačka na S-krivi između a i d), b - Hill-ov nagib krive (nagib krive u tački c). Sigmoidalni matematički modeli uklopljeni su u eksperimentalne podatke, kako bi se razvio model uticaja pH promena koji obuhvata ispitivanje 3 hranljive podloge (TSB, TSBU i TSBU sa dodatkom CaCl_2). Adekvatnost razvijenih modela ispitana je korišćenjem jednačina (33) i (34).

$$y(t) = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{t}{c}\right)^b} \quad (37)$$

Obrada dobijenih rezultata pH promena tokom BIPK procesa urađena je korišćenjem funkcije grafičkog prikaza rezultata, pri čemu su na graficima sumirane eksperimentalno dobijene i predviđene vrednosti kinetičkih modela.

4.9.6. Matematička obrada rezultata optimizacije MATH metode

Tri operativna parametra (X_1 – vreme mešanja; X_2 – zapremina ugljovodonične faze; X_3 – vreme separacije faza) bili su nezavisni faktori u odabranom Box-Behnkenovom eksperimentalnom dizajnu. Hidrofobnost ćelijske površine izabrana je kao zavisni faktor tj. odgovor sistema (Y_k). Prilog 1 predstavlja eksperimentalni plan sa tri nivoa variranja svakog nezavisnog faktora kodiranih kao -1, 0, 1 koji odgovaraju nižem, srednjem i višem nivou. Metoda odzivne površine je korišćena za procenu uticaja operativnih parametara na hidrofobnost ćelijske površine. Odnosi između nezavisnih faktora i odgovora sistema izračunati su polinomskom jednačinom drugog reda (38), u kojoj figurišu b_0 kao odsečak, b_i , b_{ii} , and b_{ij} kao linearni, kvadratni i regresioni koeficijenti, redom. X_i i X_j predstavljaju varirane nezavisne faktore sistema.

$$Y_k = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i \cdot X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} \cdot X_i^2 + \sum_{i=1, j=i+1}^3 b_{ij} \cdot X_i \cdot X_j, k=10 \quad (38)$$

Standardne ocene su računane za svaki set rezultata i korišćene za kompleksno poređenje uzoraka, bez obzira na dobijene vrednosti hidrofobnosti. Postupak rangiranja između različitih uzoraka je izveden na osnovu odnosa sirovih podataka i ekstremnih vrednosti za svaki primenjeni test (Prior i sar., 2005) prema jednačinama (39) u slučaju kriterijuma „što veći, to bolje“ (koristi se za parametre hidrofobnosti adhezije ćelije) ili (40) u slučaju kriterijuma „što niže, to bolje“ (koristi se za faktorske rezultate), gde x_i predstavlja neobrađene podatke.

$$\bar{x}_i = \frac{x_i - \min_i x_i}{\max_i x_i - \min_i x_i}, \quad \forall i \quad (39)$$

$$\bar{x}_i = 1 - \frac{x_i - \min_i x_i}{\max_i x_i - \min_i x_i}, \quad \forall i \quad (40)$$

Što veća vrednost hidrofobnosti i niža vrednost nezavisnih faktora je smatrana pozitivnom ocenom optimizacije. Uticaj ispitivanih faktora, kao i njihova interakcija, proučavan je poređenjem zbira vrednosti kvadrata za svaki od koeficijenata u modelu polinoma drugog reda (eng. second-order polynomial, SOP). Za grafičke prikaze površine odziva odabrane su konstantne vrednosti zapremine ugljovodonika (2,25 mL) i različite vrednosti druga dva nezavisna faktora.

4.9.7. Matematička obrada rezultata održivosti i stabilnosti bakterijskih suspenzija

Za praćenje održivosti i stabilnosti bakterijskih suspenzija primenjeno je kinetičko modelovanje (poglavlje 4.9.5.). Sigmoidalni matematički modeli uklopljeni su u eksperimentalne podatke kako bi se razvio model uticaja na održivost vijabilnosti ćelija. Ispitivanje je obuhvatilo ispitivanje vijabilnosti bakterijskih suspenzija u destilovanoj i alkalnoj destilovanoj vodi na tri temperature skladištenja (-18, 4, 22 °C), tokom 70 dana.

Za rezultate ispitivanja sporogenosti i produktivnosti Urea-CaCl₂ podloge korišćeno je grafičko prikazivanje rezultata.

4.9.8. Matematička obrada rezultata praćenja ureolize

Analiza koeficijenta stope hidrolize uree je izvedena integraljenjem diferencijalne jednačine prvog reda, u kojoj je pretpostavljena konstantna koncentracija biomase tokom ureazne aktivnosti, što je prikazano jednačinom (41) (Mitchell i Farris, 2005).

$$\frac{dc_{Urea}(t)}{dt} = -k_{Urea} \cdot c_{Urea}(t) \cdot c_X \Rightarrow c_{Urea}(t) = c_{Urea}(0) \cdot \exp(-k_{Urea} \cdot t \cdot c_X) \quad (41)$$

gde su:

k_{Urea} - koeficijent ureolize prvog reda ($\frac{1}{h}$);

t – vreme inkubacije (h);

c_X – koncentracija biomase (log CFU/mL)

Jednačina prvog reda se uspešno primenjuje za procenu ureolize posredstvom mikroorganizama (Connolly i sar., 2015; Mitchell i sar., 2019). Kinetičko modelovanje je

urađeno pomoću četvoroparametarskog sigmoidnog matematičkog modela na način prikazan u poglavlju 4.9.5. Kinetika pH vrednosti i broja vijabilnih ćelija tokom ureolitičke aktivnosti je ispitana na identičan način, pri čemu u jednačini (41) izlaz, u funkciji vremena, predstavlja pH vrednost ili broj vijabilnih ćelija tokom ureolitičke aktivnosti.

4.9.9. Matematička obrada rezultata praćenja BIPK procesa

Mitchell i sar. (2019) su definisali protokol za adekvatno opisivanje podataka sistema na koje može da se primenjuje zakon prvog reda zasnovan na odsustvu afiniteta. Drugim rečima, u obzir se uzima da jedan mol CaCO_3 nastaje nakon što se se jedan mol kalcijum karbida (Ca_2C) ukloni iz sistema. Nakon integraljenja, jednačina (42) prikazuje kinetiku BIPK procesa.

$$\frac{dc_{\text{Ca}^{2+}}(t)}{dt} = -k_{\text{precipitate}} \cdot c_{\text{Ca}^{2+}}(t) \Rightarrow c_{\text{Ca}^{2+}}(t) = c_{\text{Ca}^{2+}}(0) \cdot \exp(-k_{\text{precipitate}} \cdot t) \quad (42)$$

gde je:

$k_{\text{precipitate}}$ – koeficijent prvog reda ($\frac{g \cdot L}{dan}$).

Analiza i modelovanje kinetičkih modela za BIPK proces urađeni su na isti način kao u prethodnom poglavlju za ureolitičku aktivnost i prateće procese koristeći četvoroparametarski sigmoidni matematički model (poglavlje 4.9.8.). Konstante neophodne za evaluaciju kinetike BIPK procesa, pH vrednosti, kao i koncentracije kalcijuma u sistemu su prikazane nelinearnom regresionom metodom koristeći tzv. Solver funkciju u okviru programskog paketa Microsoft Excel 2019. Izlazi, u funkciji vremena, predstavljaju količinu precipitata, pH vrednost ili koncentraciju kalcijuma.

4.9.10. Matematička obrada rezultata skrininga uslova sredine i sadržaja hranjive podloge u toku BIPK procesa

Plackett-Burmanov eksperimentalni plan

Plackett-Burmanov dizajn je poslužio sa ispitivanje velikog broja faktora koji potencijalno utiču na BIPK proces. Prikaz odabranog eksperimentalnog plana je dat u Prilogu 2. Ispitivani faktori su sledeći: temperatura (A), pH vrednost (B), koncentracija inokuluma (C),

koncentracija uree (D), koncentracija Ca^{2+} jona (E), koncentracija Ni^{2+} jona (F), koncentracija hranljivog bujona (G), vreme inkubacije (H), brzina mešanja (I), zapremina podloge (J), veštački faktor - pojava taloga (K). Kako bi se pravilno postavio ekperimentalni plan, odabrane vrednosti za minimalne i maksimalne vrednosti ispitivanih parametara su definisane na osnovu dostupne naučno-relevantne literature (tabela 10).

Definisani odzivi sistema su sledeći: kvantifikacija hidrolize uree, finalna pH vrednost, finalna koncentracija bakterijskih ćelija, nivo sporulacije i količina precipitata.

Tabela 10. Vrednosti ispitivanih faktora u Plackett-Burmanovom eksperimentalnom planu

Ispitivani faktor	Kodirane vrednosti		Varirane vrednosti	
	min	max	min	max
A (°C)	-1	+1	20	45
B (l)	-1	+1	7	11
C (log/mL)	-1	+1	4	8
D (g/L)	-1	+1	2	20
E (mM)	-1	+1	50	250
F (µg/L)	-1	+1	0	20
G (g/L)	-1	+1	0	3
H (h)	-1	+1	24	168
I (obr/min)	-1	+1	0	150
J (mL)	-1	+1	15	150
K (l)	-1	+1	ima	nema

ANN modelovanje

ANN model za dobijene rezultate Plackett-Burmanov eksperimentalnog dizajna je urađen radi povezivanja glavnih efekata odabranih promenljivih u laboratorijskim uslovima, a u cilju predviđanja bakterijskog izolata sa najboljim karakteristikama za BIPK proces. Upotrebljeni MLP model od tri sloja je korišten za ANN modelovanje koje je urađeno u skladu sa svim drugim ogledima u ovom istraživanju (poglavlje 4.9.1.). Serije različitih ANN topologija su

istražene tokom računanja, broj skrivenih neurona variran je od pet do 20, a proces učenja mreže ponovljen 100 000 puta sa slučajnim početnim vrednostima težinskih koeficijenata i pristrasnosti nultog člana.

Analiza globalne osetljivosti

Yoon-ova jednačina globalne osetljivosti (jednačina (43)) je odabrana za izračunavanje relativnih uticaja ulaznih promenljivih na izlazne promenljive, a na osnovu težinskih koeficijenata ANN modela (Yoon i sar., 2017) za rezultate dobijene kroz Plackett-Burmanov dizajn.

$$RI_{ij}(\%) = \frac{\sum_{k=0}^n (w_{ik} \cdot w_{kj})}{\sum_{i=0}^m \left| \sum_{k=0}^n (w_{ik} \cdot w_{kj}) \right|} \cdot 100\% \quad (43)$$

U jednačini (43), w predstavljaju težinske koeficijente ANN modela, i i j su ulazna i izlazna promenljiva, dok k , n i m predstavljaju neuron u skrivenom sloju, broj neurona u skrivenom sloju i broj ulaza, redom.

Efikasnosti precipitacije

Stehiometrija BIPK procesa kroz ureolitičku aktivnost, prikazana jednačinom (11), može poslužiti za izračunavanje teorijskog (maksimalnog) prinosa CaCO_3 , Y_t , u odnosu na supstrat, S . Na osnovu jednačine (11), ova teorijska vrednost iznosi 1,66 g/g (Wong, 2015). Nadalje, ista jednačina je upotrebljiva za izračunavanje eksperimentalno dobijenih vrednosti prinosa, Y_e , upotrebom inicijalne i finalne koncentracije produkta i supstrata (indeksirano sa „i“ za inicijalno, odnosno „f“ za finalno u jednačini (44)). Posledično, izračunavanje efikasnosti precipitacije, E , je moguće korišćenjem jednačine (45).

$$Y_e = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (44)$$

$$E = \frac{Y_e}{Y_t} \times 100 \quad (45)$$

Višekriterijumska optimizacija

Razvijen ANN model za skrining uslova sredine i sadržaja hranljive podloge u toku procesa BIPK je iskorišćen za višekriterijumsku optimizaciju sa ciljem selekcije u pogledu efikasnosti precipitacije. Definisani su sledeći kriterijumi izlaza sistema:

- optimalna pH vrednosti oko 9;
- maksimalan broj vijabilnih ćelija;
- maksimalna količina precipitata;
- minimalan broj spora;
- minimalna količina uree na kraju BIPK procesa.

Rešenje ovog optimizacionog problema je grafički rešeno u vidu Pareto fronta, koristeći genetički algoritam (GA), upotrebom mutacije, selekcije, inherencije i povezivanja (Goldberg, 1989). Inicijalna populacija je slučajno generisana, dok je sledeća generacija računata na osnovu merenja distance i nedominatnog rangiranja individualnih tačaka postojeće generacije (Kojić i sar., 2018; Silitonga i sar., 2019).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati istraživanja su predstavljeni kao niz sukcesivnih koraka eksperimentalnog koncepta predstavljenog na slici 18. Alkalno, kalcitno zemljište predstavlja izvor specifičnih mikrobiota, i prva faza istraživanja podrazumevala je uzorkovanje sa takvih lokaliteta. Kako tok daljeg eksperimentalnog rada zavisi od kvaliteta primarnog izolovanja i selekcije, formirana je procedura koja je obuhvatila izdvajanje sporogenih, alkalorezistentnih/alkalofilnih bakterija sa širokom biokinetičkom zonom i mogućnosti ispoljavanja ciljanih metaboličkih aktivnosti. Nadalje je ispitivanje usmereno ka ureolitičkim sojevima čiji je visok biokalcifikujući potencijal utvrđen u toku selekcije, a dodatno ispitan poseban doprinos pojedinačnih ćelija procesu bakterijski indukovane precipitacije karbonata. Takođe, istraživanje je obuhvatilo kinetičko modelovanje ureolitičke aktivnosti i BIPK procesa, uključujući odabrane, merljive nusprocese ovih aktivnosti. Kao finalni koraci u istraživačkom konceptu, postavljena je kompletna strukturna karakterizacija dobijenih CaCO_3 precipitata, kao i skrining faktora sredine i sastava hranjive podloge za efikasan BIPK, a u cilju optimizacije i izdvajanja najefikasnijih bakterijskih izolata sa biokalcifikujućeg potencijala. Kroz sve korake istraživanja urađena je uporedna analiza sa odgovarajućim referentnim sojevima:

- *Sporosarcina pasteurii* DSM 33 (pozitivna kontrola za ureolitičku aktivnost);
- *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17785 (pozitivna kontrola za denitrifikaciju);
- *Bacillus pseudofirmus* DSM 8715 (negativna kontrola za ureolitičku aktivnost);
- *Bacillus cohnii* DSM 6307 (negativna kontrola za ureolitičku aktivnost).

5.1. Izolovanje i primarna selekcija bakterijskih izolata

5.1.1. Rezultati izolovanja

Izolovanje bakterija sa biokalcifikujućim potencijalom je izvršeno na četiri različita lokaliteta u blizini grada Novog Sada. Prosečan broj sporogenih bakterija u uzorcima alkalnih, kalcitnih zemljišta je iznosila 113 CFU/g, pri čemu je najmanji broj izraslih kolonija bilo na lokalitetu I (peskoviti mulj reke Dunav), svega 21 CFU/g. Praćenjem specifične šeme za izolovanje i selekciju sporogenih i alkalorezistentnih/alkalofilnih bakterija ukupno je izdvojeno 43 bakterijska izolata. Za primarni medijum u toku izolovanja odabran je R2A agar sa niskim sadržajem hranljivih materija. Ova podloga u kombinaciji sa nižim temperaturama i dužim vremenom inkubacije, stimuliše rast halofilnih bakterija i bakterija koje su izložene velikom stresu ekstremnih uslova sredine iz koje se izoluju. Upotrebom ovakve podloge izbegnut je rast isključivo brzorastućih bakterija i suzbijanje spororastućih ili bakterija pod uticajem stresa, što se neretko dešava kod nutritivno bogatih podloga (Van der Linde i sar., 1999).

Odabrani izolati su imali iste ili slične makromorfološke karakteristike kao referentni sojevi *Sporosarcina pasteurii* DSM 33 (svetložuta, sjajna, glatka, okrugla kolonija sa pravilnim ivicama) i *Bacillus cohnii* DSM 6307 (kremasto svetložuta, sjajna, glatka, okrugla kolonija sa pravilnim ivicama) na pH modifikovanom R2A agaru. Obe referentne bakterije su gram-pozitivne štapićaste bakterije sa sposobnošću da formiraju spore, a takođe imaju pozitivne reakcije oksidaza i katalaza testa. Međutim, *S. pasteurii* je bakterija sa sposobnošću preživljavanja u alkalnim medijima (pH~10) (Bhaduri i sar., 2016), dok *B. cohnii* odlikuje alkalofilnost (Spanka i Fritze, 1993). Proces BIPK indukovan je različitim metaboličkim aktivnostima, tj. usmeren je ureolizom ili oksidacijom organskih kiselina kod *S. pasteurii* i *B. cohnii*, redom. Dobijeni rezultati tokom procesa izolovanja za 43 bakterijska soja, označenih kao I₁₋₁₃, II_{1-II₁₀}, III_{1-III₂₀} i IV_{1-IV₁₀}¹⁶, prikazani su tabelarno u Prilogu 3. Da bi se uočile međusobne razlike bakterijskih izolata urađena je deskriptivna statistička analiza (tabela 11).

¹⁶ Oznaka I,II,III ili IV označava mesto uzorkovanja, dok indeksni broj označava broj obeležene kolonije prilikom selekcije;

Niska vrednost varijanse¹⁷ za bojenje po Gramu i KOH test, kao i mogućnost formiranja endospora i katalaza reakcija ukazuju na sličnosti u izdvojenoj grupi bakterija. Pored toga, identične vrednosti rezultata za bojenje po Gramu i KOH testa ukazuju na mogućnost upotrebe brzog KOH testa za gram-diferencijaciju. Da Silva i Nahas (2002) su definisali da su u mikrobnim populacijama kalcitnog zemljišta dominantno prisutne gram-pozitivne bakterije, što je u skladu sa rezultatima za ispitivane uzorke. Od ukupnog broja izolata, 90,7% odabranih sojeva je sposobno da formira endospore, što je bio i jedan od osnovnih ciljeva sprovedenog postupka izolovanja (slika 21). Samo četiri izolata su nesporogene bakterije koje su preživele termički tretman (80 °C, 10 min) što može da ukaže na njihovu termootpornost.

Tabela 11. Deskriptivna statistika mikromorfoloških i fizioloških osobina odabranih izolata

Broj izolata	Ispitivanje					
	Bojenje po Gramu	KOH test	Pokretljivost	Formiranje spora	Oksidaza test	Katalaza test
sa negativnim rezultatom	10	10	22	4	23	1
sa pozitivnim rezultatom	33	33	21	39	20	42
sa negativnim rezultatom (%)	23,3	23,3	51,2	9,3	53,5	2,3
sa pozitivnim rezultatom (%)	76,7	76,7	48,8	90,7	46,5	97,7
Srednja vrednost	0,767	0,77	0,488	0,907	0,465	0,977
Standardna devijacija	0,427	0,25	0,506	0,294	0,505	0,152
Varijansa	0,183	0,18	0,256	0,086	0,255	0,023

* rezultat je iskazan kao reakcija po Gramu (gram-pozitivan/gram-negativan)

Broj ureaza pozitivnih sojeva iznosila je 37, odnosno više od 85%. Udeo ureaznih predstavnika u tipovima testiranih zemljišta je veoma varijabilan, sa rasponom od 17 do 100% što je suštinski posledica primene različitih šema izolovanja bakterija (Mekonnen i sar., 2021). Pokretljivost bakterija bi mogla da doprinese preživljavanju u zemljištu i pokrene prvu fazu kolonizacije biofilma (Turnbull i sar., 2001). Dobijeni rezultati testa pokretljivosti imaju visoku vrednost standardne devijacije ukazujući na velike razlike u ispitivanoj osobini mikrobne populacije. Nadalje, dobija se sličan rezultat varijabilnosti za test oksidaze, pri čemu je skoro polovina izolata pokazalo pozitivnu reakciju. Omoregie i sar. (2015) su sa lokaliteta koji

¹⁷ Varijansa je prosečna mera raspršivanja rezultata; što je varijansa manja, to se ispitivani uzorci manje razlikuju, i obrnuto;

opisom odgovaraju mestima uzorkovanja ovog istraživanja uspešno izdvojili 31 ureolitički izolat sa sličnim rezultatima bojenja po Gramu, katalaza reakciji i formiranju endospora. Međutim, razlike se uočavaju u manjoj varijabilnosti rezultata pokretljivosti (27 izolata pokretno) i oksidaza reakciji (27 izolata pozitivno) nego u ovom istraživanju.

5.1.2. Rezultati temperaturnog i pH profila rasta

Tolerancija na temperaturu sredine je veoma važan parametar za *in situ* bioremedijaciju zbog značajnih i nekontrolisanih promena ovog faktora tokom dana i noći (Abatenh i sar., 2017). Iz tog razloga, izuzetno je značajno istražiti ponašanje prirodnih izolata na različitim vrednostima temperature inkubacije. Sumarna statistička analiza tolerancije rasta na različitim temperaturama inkubacije je data u tabeli 12. Da bi se utvrdio optimalni stepen rasta, produkcija biomase praćena je tokom 5 dana na 20, 30, 37 i 44 °C. Iako je produkcija biomase zabeležena i na 20 °C, za najveći broj izabranih sojeva optimalna temperatura rasta je između 30 i 37 °C. Rast bakterija na 20 °C nije primećen u slučaju samo jednog izolata (II₁₀). S druge strane, temperatura od 44 °C je van biokinetičke zone za više od polovine izolata. Rast opisane mikrobne populacije se javlja na istom ili sličnom rasponu temperatura kao i za obe referentne bakterije, pri čemu je njihova optimalna temperatura za rast 30 °C (Pietikainen i sar., 2005; Maier i sar., 2009).

S obzirom da je pH vrednost zemljišta jedan od primarnih faktora oblikovanja strukture bakterijske zajednice u alkalnim zemljištima (Liu i sar., 2018), od prvog koraka postupka izolovanja iniciran je rast alkalofilnih i/ili alkalorezistentnih bakterija. Prema dobijenim rezultatima (tabela 12), 27 izolata nema sposobnost rasta na pH vrednosti 5, dok je ostalih 16 izolata pokazalo smanjenu brzinu rasta pri ovoj pH vrednosti. Izuzev II₄, IV₃ i IV₈, svi ostali izolati su rasli u hranljivoj podlozi sa pH vrednošću 7. Optimalna pH vrednost rasta za sve odabrane sojeve je između 9 i 11. Pri pH vrednosti od 9 svi izolati pokazuju veći intenzitet rasta nakon prvog dana inkubacionog perioda u odnosu na neutralnu i kiselu sredinu. Slično ponašanje primećeno je u R2A bujonu sa pH vrednošću od 11, sa izuzetkom tri izolata (II₉, IV₅ i IV₆), čiji je rast u ovom visokoalkalnom okruženju primećen nakon 48h.

Tabela 12. Deskriptivna statistika temperaturnih i pH profila prirodnih izolata

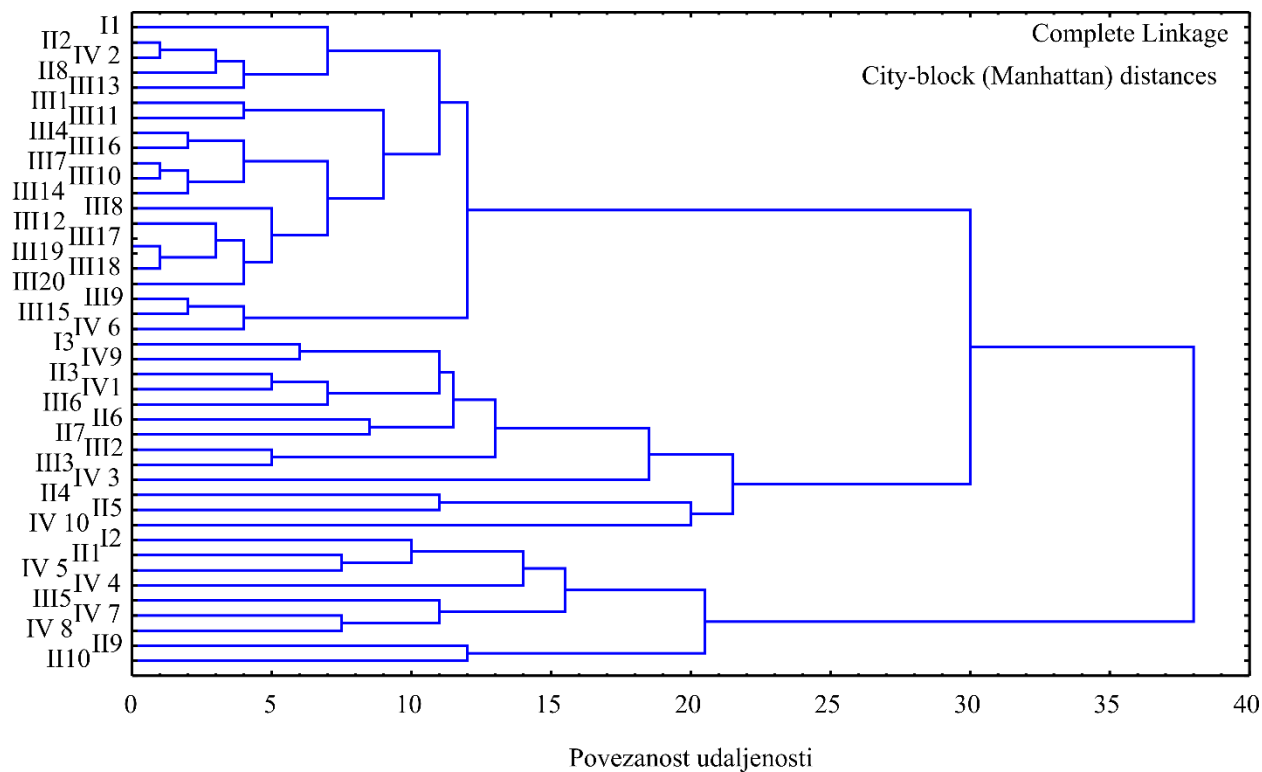
Vreme inkubiranja (h)		24				48				72				96				120			
Temperatura (°C)	Oцена ¹⁸	20	30	37	44	20	30	37	44	20	30	37	44	20	30	37	44	20	30	37	44
		0		4	2	2	25	1	0	0	26	2	1	0	25	1	0	0	25	2	0
0,5		6	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1		33	16	9	8	37	13	10	5	20	6	5	9	10	2	2	6	8	2	1	5
1,5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2		0	22	21	6	4	22	17	5	18	22	17	7	27	17	12	8	11	7	7	7
2,5		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3		0	3	10	2	1	7	16	5	3	14	21	2	5	24	29	4	22	34	35	6
Srednja vrednost		0,84	1,60	1,94	0,71	1,12	1,91	2,14	0,80	1,51	2,14	2,37	0,67	1,84	2,51	2,63	0,79	2,23	2,74	2,79	0,86
Standardna devijacija		0,32	0,69	0,80	1,03	0,45	0,75	0,77	1,18	0,70	0,74	0,69	0,92	0,65	0,59	0,58	1,06	0,92	0,54	0,47	1,15
Varijansa		0,10	0,48	0,65	1,06	0,20	0,56	0,60	1,39	0,49	0,55	0,48	0,84	0,43	0,35	0,33	1,12	0,85	0,29	0,22	1,31
pH		5	7	9	11	5	7	9	11	5	7	9	11	5	7	9	11	5	7	9	11
0		25	6	0	3	24	5	0	0	19	3	0	0	18	3	0	0	18	3	0	0
0,5		3	5	1	0	1	2	0	0	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1		15	17	6	11	17	15	3	9	18	10	2	1	20	10	0	1	21	9	0	0
1,5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2		0	9	21	23	1	17	15	18	3	14	9	9	3	17	6	5	2	17	2	2
2,5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3		0	6	15	6	0	4	25	16	1	14	32	33	1	13	37	37	2	14	41	41
Srednja vrednost		0,38	1,29	2,17	1,74	0,45	1,44	2,51	2,16	0,65	1,88	2,70	2,74	0,69	1,93	2,86	2,84	0,72	1,98	2,95	2,95
Standardna devijacija		0,47	0,93	0,72	0,79	0,54	0,85	0,63	0,75	0,71	0,97	0,56	0,49	0,71	0,91	0,35	0,43	0,77	0,91	0,21	0,21
Varijansa		0,22	0,87	0,52	0,62	0,3	0,72	0,40	0,57	0,51	0,95	0,31	0,24	0,5	0,83	0,12	0,19	0,59	0,8	0,05	0,05

Da bi se izvršilo grupisanje bakterijskih izolata u funkciji pH vrednosti ili temperature, izvršena je klaster analiza na osnovu vrednosti intenziteta rasta na odabranim vrednostima promenljivih. Grupisanje dominantnih bakterijskih izolata za definisane uslove okoline je važna za dalju manipulaciju odabranim sojevima u *in vitro* uslovima (Kim i sar., 2018). Algoritam potpune povezanosti (eng., The Complete linkage algorithm) i metoda udaljenosti po sistemu City block (Manhattan) korišćeni su za objašnjenje razlika u temperaturnom

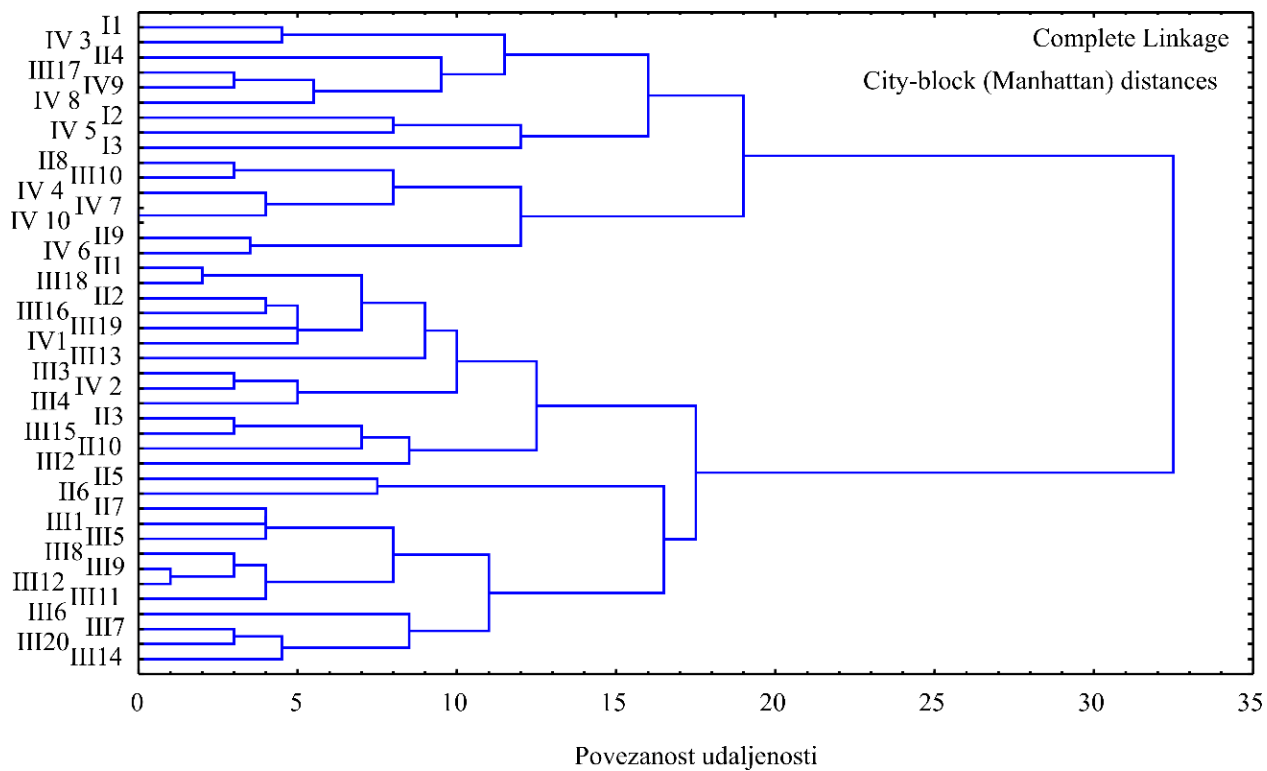
¹⁸ Ocena se odnosi na intenzitet rasta na kosom agaru/bujonu pri čemu se ocena (1 do 3) davala u odnosu na blank (0);

profilu izolata grupisanih u tri klastera (slika 28). Izolati bakterija sa sva četiri mesta uzorkovanja predstavljeni su u svakom dobijenom klasteru. Konkretno, u prvom klasteru, sačinjenom od 21 izolata, dominiraju sojevi bakterija sa mesta uzorkovanja III. Optimalna temperatura rasta ovih izolata je 37 °C, ali nakon pet dana inkubacije nije bilo značajnih razlika između rasta bakterija na 30 i 37 °C. Svi izolati koji pripadaju prvom skupu nisu ispoljili rast na 44 °C, dok su pojedini imali zadovoljavajuću brzinu rasta na 20 °C. U drugom i trećem klasteru dominantni sojevi bakterija su sa mesta uzorkovanja II odnosno IV. Sojevi grupisani u drugi klaster rastu na 44 °C, ali ne i na 20 °C. Optimalna temperatura rasta za bakterijsku zajednicu koja pripada drugom klasteru je između 37 i 44 °C. Svih 8 izolata iz trećeg klastera se međusobno razlikuju, te nisu svrstani u prethodno opisane grupe. Međutim, može se primetiti da je intenzitet rasta ovih izolata značajno niži za sve ispitivane temperature inkubacije.

Ista metodologija je korišćena za objašnjenje pH profila prirodnih izolata koji su na osnovu sličnosti grupisani u dva klastera (slika 29). Svi izolati sa I mesta uzorkovanja nalaze se u klasteru zajedno sa 70% svih bakterija IV mesta uzorkovanja, kao i sa po dva izolata II i III mesta uzorkovanja. U ovoj grupi izolati ne rastu pri pH vrednosti od 5, ali imaju dominantnu brzinu rasta pri pH vrednosti između 9 i 11. S druge strane, ostali izolati II i III mesta uzorkovanja su grupisani u odvojen klaster jer ih odlikuje rast i na pH vrednosti od 5.



Slika 28. Dendrogram klaster analize za temperaturni profil rasta prirodnih bakterijskih izolata



Slika 29. Dendrogram klaster analize za pH profil rasta prirodnih bakterijskih izolata

Da bi se postupak od izolovanja do primarne selekcije prirodnih izolata pojednostavio, usvojen je alternativni pristup predviđanja rasta bakterija na različitim pH vrednostima i temperaturama inkubacije primenom veštačke neuronske mreže (ANN). ANN modeli imaju potencijal univerzalnog modela mapiranja tokom rešavanja problema predviđanja mikrobnog ponašanja. Prednost ovog pristupa je sposobnost predviđanja intenziteta rasta za razne mikroorganizme i promenljive uslove životne sredine (Abatenh i sar., 2017). Takođe, ANN mreže se široko koriste i prihvataju kao dobar alat za modelovanje koji može pružiti brzo, empirijsko rešenje velikog skupa eksperimentalnih podataka (Montgomery, 1987). Prediktivni pristup u mikrobiologiji može da doprinese odgovorima kako bakterija reaguje na uslove sredine i pojavu stresa, kao i kvantifikaciji promena karakteristika i sposobnosti prilagođavanja ćelija. Primenom ANN u mikrobiologiji se omogućava sagledavanje odstupanja između eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti ciljanih karakteristika, u smislu matematičkih modela (Yu i sar., 2006). Nadalje, Jeyamkondan i sar. (2001) ističu da ovaj vid predikcije nudi alternativnu i značajnu tehniku za precizno modelovanje mikrobnog ponašanja, koja se može nositi sa promenljivošću i nesigurnošću koje su prirodno povezane sa aktivnostima mikroorganizama.

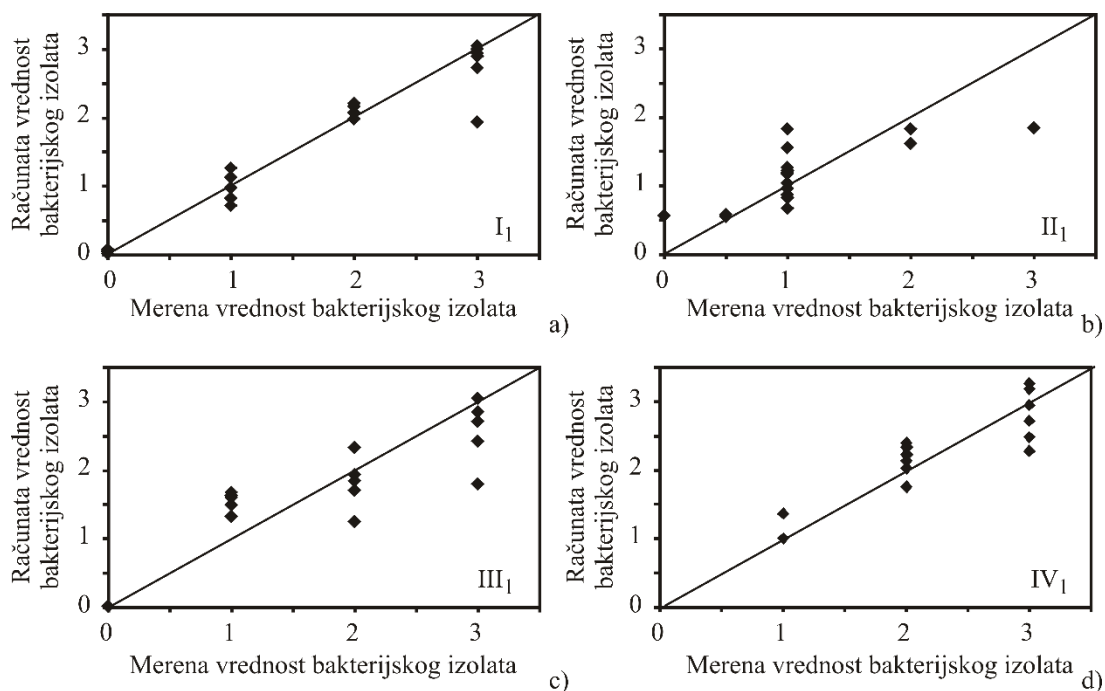
Formiran optimalni ANN model za predviđanje temperaturnog i pH profila bakterijskih izolata pokazao je dobru sposobnost simplifikacije eksperimentalnih podataka. Iz navedenog razloga, dobijeni modeli (MLP 2-6-43 i MLP 2-8-43) se mogu koristiti za predviđanje preciznih rezultata za širok spektar ulaznih parametara. Na osnovu performansi modela (tabela 13), primećeno je da je optimalni broj neurona u skrivenom sloju za pH i temperaturne profile prirodnih izolata iznosio 6 i 8, respektivno. Primenom ovog broja neurona u skrivenom sloju dobijene su željene visoke vrednosti koeficijenta determinacije (ukupni R^2 za temperaturni profil iznosi 0,727, dok je ukupni R^2 za pH profil 0,906) i niske vrednosti sume kvadrata grešaka (eng. sum of squares, SOS).

Tabela 13. Karakteristike ANN modela predviđanja temperaturnog i pH profila

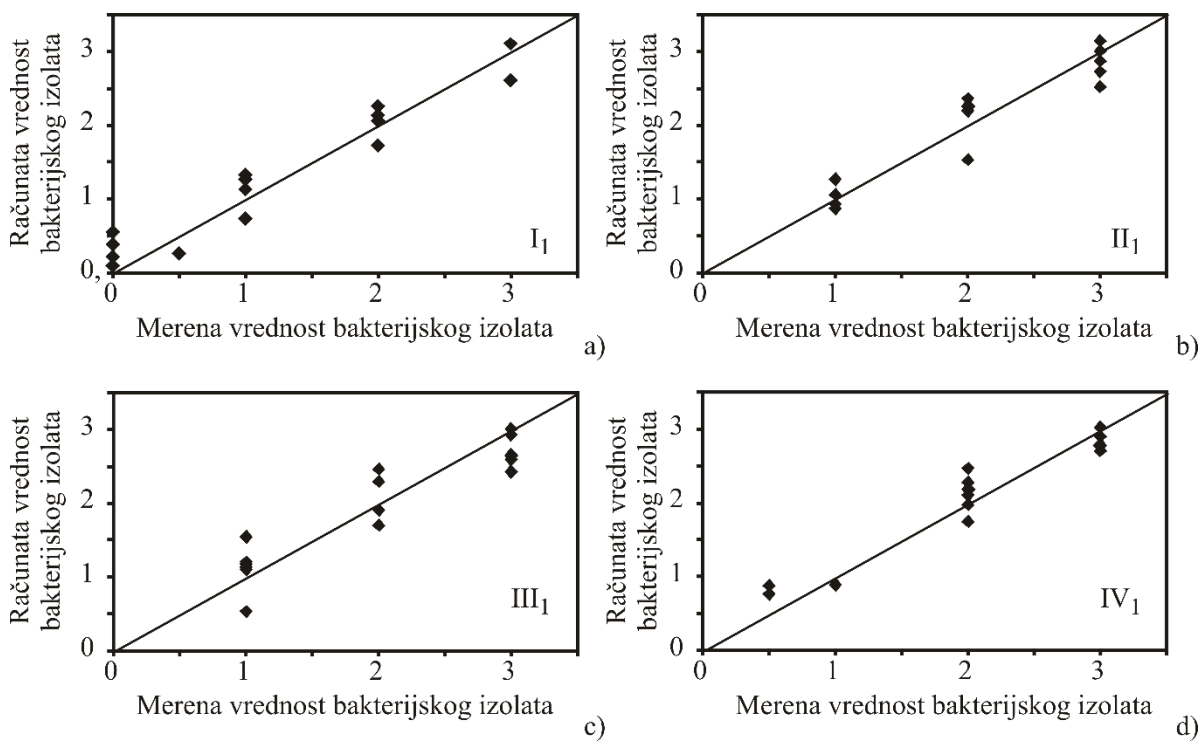
Naziv mreže	Performanse ciklusa (R^2)			Greška ciklusa			Algoritam učenja			
	učenja	testiranja	validacije	učenja	testiranja	validacije				
MLP 2-8-43	0,84	0,15	0,80	2,06	6,003	4,77	BFGS 47			
MLP 2-6-43	0,91	0,88	0,91	1,57	2,57	3,7	BFGS 61			
	Funkcija greške	Aktivaciona funkcija skrivenog sloja		Aktivaciona funkcija izlaza						
MLP 2-8-43	SOS ¹⁹	Logistička		Identična						
MLP 2-6-43	SOS	Tangens hiperbolikus		Identična						
Koeficijenti determinacije (R^2) između eksperimentalno dobijenih vrednosti i ANN izlaza tokom ciklusa učenja										
Bakterijski izolat	Temprturni profil rasta					pH profil rasta				
	I	II	III ₁₋₁₀	III ₁₁₋₂₀	IV	I	II	III	III+10	IV
1	0,99	0,82	0,92	0,97	0,88	0,98	0,98	0,93	0,88	0,97
2	0,97	0,99	1	0,96	0,99	0,84	0,97	0,94	0,99	0,97
3	0,95	0,97	0,99	0,98	0,88	0,96	0,934	0,97	0,94	0,98
4		0,9	0,95	0,98	0,77		0,95	0,98	0,97	0,99
5		0,81	0,77	0,97	0,97		0,90	0,95	0,94	0,96
6		0,81	0,94	0,97	0,98		0,77	0,98	0,98	0,96
7		0,96	0,97	0,98	0,77		0,90	0,97	0,98	0,98
8		0,98	0,94	0,96	0,74		0,98	0,94	0,97	0,98
9		0,74	0,97	0,98	0,84		0,95	0,99	0,95	0,98
10		0,93	0,98	0,97	0,89		0,95	0,97	0,99	0,98

Predviđene vrednosti za temperaturni i pH profil su bile vrlo bliske željenim vrednostima u većini slučajeva. Kvalitet dobijenih modela se ogleda i u dobijenim niskim SOS vrednostima, koje su istog reda veličine kao i eksperimentalne greške, što je jedan od parametara kvaliteta modelovanja mreže (Pezo i sar., 2013). Kao što se može videti na slikama 30 i 31, ANN modeli su predvideli eksperimentalne pH i temperaturne profile prirodnih izolata I₁-I₃, II₁-II₁₀, III₁-III₂₀ i IV₁-IV₁₀ prilično dobro za širok spektar procesnih varijabli. Tačnost ANN modela mogla bi se vizuelno proceniti raspršivanjem tačaka sa dijagonalne linije na graficima predstavljenim na spomenutim slikama.

¹⁹ SOS – suma kvadrata grešaka (eng. Sum of Squares)



Slika 30. Eksperimentalno dobijene i ANN predviđene vrednosti temperaturnih profila rasta bakterijskih izolata: a) I₁; b) II₁; c) III₁; d) IV₁



Slika 31. Eksperimentalno dobijene i ANN predviđene vrednosti pH profila rasta bakterijskih izolata: a) I₁; b) II₁; c) III₁; d) IV₁

Tabelarno prikazani rezultati u Prilogu 3-6 predstavljaju elemente matrica W_1 i W_2 , kao i vektora B_1 i B_2 , koji su korišćeni za proračun temperaturnih i pH profila. Zbog očekivane visoke nelinearnosti razvijenih sistema (Chattopadhyay i sar., 2014; Gok i sar., 2015), dobijeni ANN modeli su bili složeni, sa 411 težinskih koeficijenata i nultih članova za temperaturni profil rasta, odnosno 319 za pH profil rasta izolata. Koeficijenti determinacije između rezultata eksperimentalnog rada i ANN modela bili su 0,835 i 0,912 za temperaturne i pH profile rasta izolata tokom perioda učenja, redom (tabela 13). Takođe, testiran je kvalitet poklapanja vrednosti razvijenih modela, a rezidualna analiza predstavljena je u tabelama Priloga 5 i 6. Prilikom ove analize, koeficijenti determinacije treba da budu što bliže 1, dok vrednosti ostalih statističkih pokazatelja (npr. srednja i relativna apsolutna greška, koren relativne kvadratne greške) treba da bude što niži. Razvijeni modeli su imali neznatnu grešku testova prilagođavanja, što znači da je model na zadovoljavajući način predvideo profile rasta pH i temperature za posmatrane sojeve. Visok R^2 ukazuje na to da je predloženi model na zadovoljavajući način objasnio eksperimentalne rezultate.

Da bi se ispitala tačnost razvijenih ANN modela u *in vitro* uslovima izvršena je eksperimentalna verifikacija modela. Za ovaj korak izabrana je jedna vrednost temperature i pH van ispitnog opsega ANN modela, kao i ona prethodno neproverena vrednost u ispitivanom opsegu modela. Rast slučajno izabranih izolata I₃, II₅, III₆ i IV₁₀ posmatran je na 15 i 25 °C za ANN model temperaturnog profila, dok su izolati I₃, II₆, III₁₁ i IV₁ ispitani za procenu predviđanja profila rasta pri pH vrednostima od 10 i 11,5. Za većinu alkalofilnih bakterija, pH vrednost oko 10 je optimalna vrednost za rast, dok 11,5 predstavlja najčešću pH vrednost za optimalnu proizvodnju alkalnih enzima (Horikoshi i sar., 1998). Da bi se ispitala donja granica temperature za rast bakterija, odabrana je vrednost od 15 °C. Nadalje, u cilju smanjenja energetske resursa tokom proizvodnje biomase testirana je temperatura okoline u laboratoriji (25 °C). Prema dobijenim rezultatima (tabela 14), primećeno je samo nekoliko značajnijih odstupanja između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti za pH i temperaturne profile (obeleženo zvezdicom).

Tabela 14. Verifikacija ANN modela temperaturnog i pH profila rasta bakterijskih izolata

Testirana vrednost	Bakterijski izolat	Ocena ²⁰				
		Vreme inkubiranja (h)				
		24	48	72	96	120
pH=10	I ₃	2	2	2	2	2/3*
	II ₆	3	3	3	3	3
	III ₁	2/3*	3	3	3	3
	IV ₁	3	3	3	3	3
pH=11,5	I ₃	2	2	2	2	2
	II ₆	3	3	3	3	3
	III ₁	2	3	3	3	3
	IV ₁	3	3	3	3	3
T=15°C	I ₃	1	1	1/2*	2	2
	II ₅	0/1*	1	1/2*	2	2
	III ₆	2	2	2	3	3
	IV ₁₀	3	3	3	3	3
T=25°C	I ₃	0/1*	1	2	2	2
	II ₅	2	2	3/2*	3	3
	III ₆	1	2	2	2	3
	IV ₁₀	3	3	3	3	3

* E/P - E (eksperimentalni) vs. P (predviđeni) rezultat

5.1.3. Ispitivanje potencijala denitrifikacije

Ciklus azota se spontano javlja u prirodi kao bitan sled aktivnosti u biološki aktivnim sistemima. Međutim, azot je često ograničavajući faktor i funkcionalni odnosi unutar azotnog ciklusa su se tokom vremena značajno menjali (Zhu i sar., 2015). Česta primena pesticida i đubriva na bazi azota, kao i nekontrolisano ispuštanje nedovoljno prečišćenih otpadnih voda povećali su koncentraciju azota u ekosistemima. Antropogeni uticaj je prevazišao biogeni efekat mikroorganizama u ciklusu azota, a taloženje azotne komponente u prirodi postalo je veliki ekološki problem (Vidaković i sar., 2019). Da bi se azotni oksidi uklonili, jedno od održivih rešenja može biti tehnika bioremedijacije zasnovana na denitrifikaciji koja je visoko specifičan i efikasan bioproces za uklanjanje nitrata i nitrita (Yan i

²⁰ Ocena se odnosi na intenzitet rasta u bujonu pri čemu se ocena (1 do 3) davala u odnosu na blank (0);

sar., 2019). Za procese bioremedijacije je veoma važno pronaći grupu bakterija sa sposobnošću da u potpunosti uklone nitrat bez akumulacije drugih azotnih oksida kao međuprodukata (Vidaković i sar., 2019). Denitrifikacija se može definisati kao metabolička aktivnost heterotrofnih, aerobnih bakterija koja može smanjiti kompletnu količinu prisutnih nitrata u sistemu (Zhu i sar., 2015). Između 10 i 15% mikrobiološke populacije u zemljištu, vodi i sedimentima može se definisati kao grupa (ne)potpunih denitrifikatora. Prema kapacitetu denitrifikacije izdvajaju se pripadnici roda *Pseudomonas* i *Bacillus*. *Pseudomonas stutzeri* označen je kao model organizam aerobne denitrifikacije (Lalacut i sar., 2006).

Kada bi grupa izdvojenih bakterija, među kojima su i (ne)ureoliti, imala mogućnost da indukuje precipitaciju CaCO_3 kroz denitrifikaciju, još jedan od važnih procesa azotnog ciklusa, izdvojeni predstavnici bi mogli da se definišu kao multifunkcionalni bioagensi čije delovanje je zasnovano da doprinosu azotnom ciklusu. Da bi se utvrdio denitrifikacioni kapacitet svih odabranih sojeva bakterija iz zemljišta, sprovedeno je ispitivanje kapaciteta usvajanja nitrata iz hranljive podloge. Vidaković (2019) je definisala šest značajnih parametara procesa kao denitrifikacione indikatore: produkcija biomase, koncentracija nitrata i nitrita, formiranje gasovitog N_2 , nitrita i amonijaka. Shodno tome, ovi indikatori su analizirani kao odgovori tokom procesa denitrifikacije i dobijeni rezultati su upoređeni sa referentnim sojem *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588. Sumarna deskriptivna statistika za testirane sojeve data je u tabeli 15.

Tabela 15. Deskriptivna statistika procesa denitrifikacije

Statistički parametar	Denitrifikacioni indikatori					
	Produkcija biomase (McFarland br.)	Koncentracija (mg/L)		Formiranje (+/-)		
		Nitrat	Nitrit	N_2	Nitrit	Amonijak
Minimum	0	50	0	0	0	0
Maksimum	3	500	80	1	1	1
Srednja vrednost	1,61	340	42,92	0,71	0,68	0,02
Standardna devijacija	0,88	136,74	30,78	0,46	0,47	0,15

Referentni soj *P. stutzeri* ima značaj kapacitet denitrifikacije, s obzirom da je u potpunosti uklonio nitrat tokom perioda inkubiranja. Sa druge strane, nakon prvih 24h ova bakterija imala je samo jedan pozitivan denitrifikujući indikator - formiranje nitrita. Nakon početne usporene faze u procesu redukcije nitrata, *P. stutzeri* je pokazao visoku efikasnost u produkciji gasovitog molekularnog azota. Za bakterijske izolate iz zemljišta je primećen različit obrazac ponašanja tokom denitrifikacije, te su dobijeni rezultati denitrifikujućih indikatora za 43 alkalofilna/alkalozistentna bakterijska soja poslužili za ANN modelovanje.

Dobijeni modeli predviđanja denitrifikacionog potencijala bakterijskih izolata (tabela 16, slika 32) ukazuju na precizan predikcioni kapacitet uklapanja eksperimentalnih podataka sa predviđenim vrednostima za širok spektar ulaznih podataka. Za dobijanje visokih vrednosti koeficijenta determinacije i niskih vrednosti grešaka, optimalan broj neurona u skrivenom sloju za izlazne promeljive je 9 (mreža MLP 45-9-6). Tabele u Prilogu 7-8 predstavljaju elemente matrica W_1 i W_2 , kao i vektora B_1 i B_2 koje opisuju skriveni neuronski sloj.

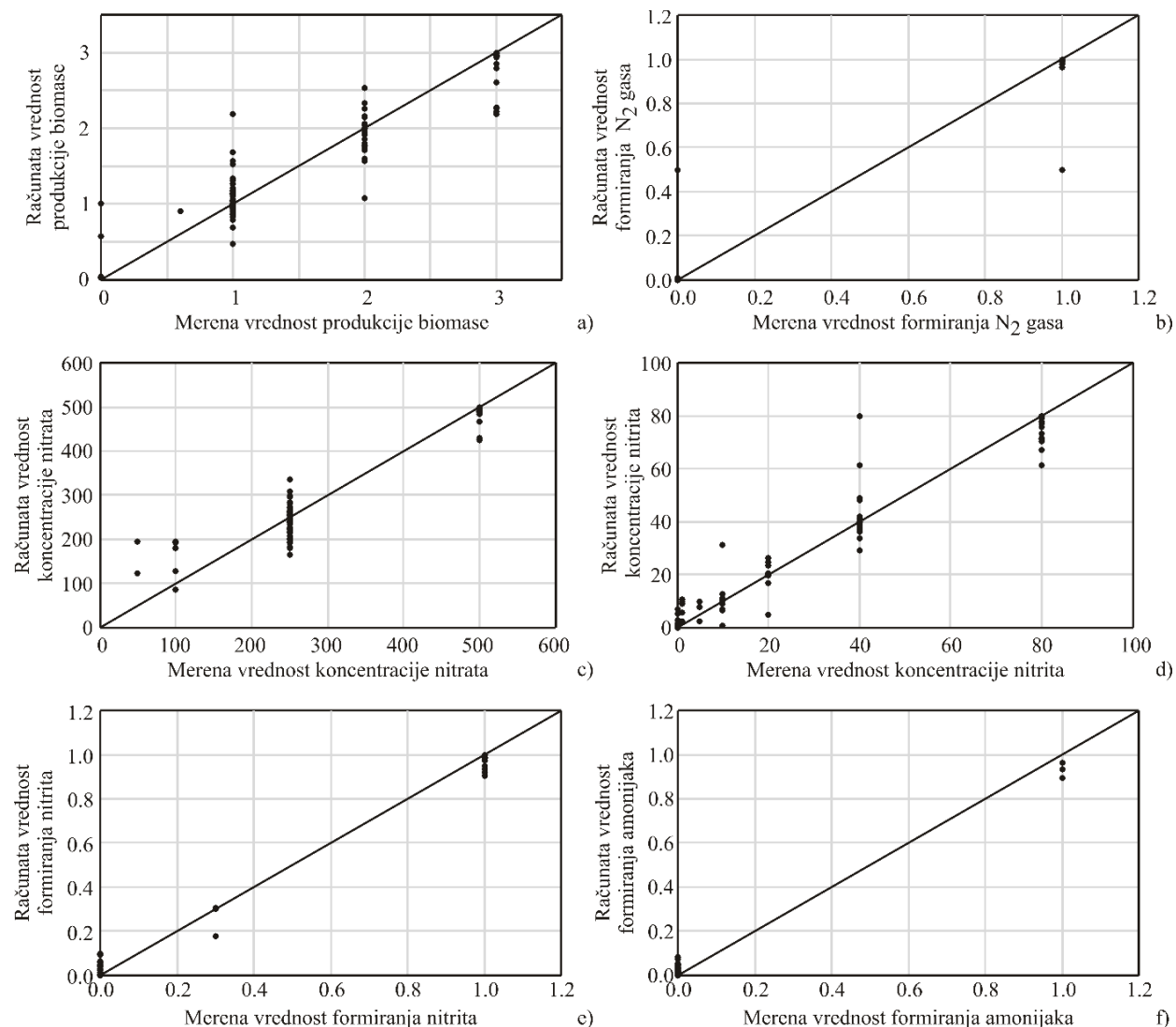
Tabela 16. Karakteristike ANN modela za proces denitrifikacije

Naziv mreže	Performanse ciklusa (R^2)			Greška ciklusa						
	učenja	testiranja	validacije	učenja	testiranja	validacije				
	0,96	0,85	0,90	532,99	663,02	497,71				
MLP 45-9-6	Algoritam učenja		Funkcija greške	Skrivena aktivacija		Izlazna aktivacija				
	BFGS 10000		SOS	Logistička		Tangens hiperbolikus				
Numerička verifikacija ANN modela										
Denitrifikujući indikator	χ^2	RMSE	MBE	MPE	R^2	Skew	Kurt	Mean	SD	Var
Produkcija biomase	0,088	0,29	0,01	11,17	0,89	-0,23	4,02	0,009	0,293	0,09
Produkcija N_2 gasa	0,004	0,06	0,001	0,45	0,98	-0,03	63,97	0,001	0,062	0,004
Koncentracija nitrata	1060,23	32,06	0,99	11,39	0,95	-1,03	4,41	0,99	32,165	1034,57
Koncentracija nitrita	39,49	6,19	0,07	46,76	0,96	-2,23	15,13	0,07	6,210	38,56
Formiranje nitrita	0,001	0,03	0,003	0,65	0,99	0,23	4,69	0,003	0,031	0,001
Formiranje amonijaka	0,001	0,02	0,001	0,16	0,98	0,14	5,11	0,001	0,022	0,001

χ^2 – redukovan hi-kvadrat; MBE – srednje greške odstupanja; RMSE – koren kvadrata srednje greške; MPE – srednja procentualna greška; R^2 – koeficijent determinacije; Skew – "nazubljenost" krive raspodele; Kurt – "zakrivljenost" krive raspodele; Mean – srednja vrednost odstupanja; SD – standardna devijacija; Var – varijansa odstupanja.

Dobijeni ANN model je predvideo denitrifikacioni kapacitet sojeva na osnovu indikatora denitrifikacije relativno dobro za širok spektar procesnih promenljivih (slika 32). Takođe, SOS vrednosti su istog reda veličine kao i eksperimentalne greške svih šest indikatora za 43

bakterijska izolata tokom vremena inkubacije u nitratnom bujonu. Zbog visoke nelinearnosti razvijenog sistema, dobijeni ANN modeli su veoma složeni (474 težinskih koeficijenata i nultnih članova). Vrednosti R^2 između rezultata eksperimentalnog i ANN rezultata bile su: 0,889, 0,945, 0,959, 0,981, 0,995 i 0,98 za produkciju biomase, koncentraciju nitrata i nitrita, kao i formiranje N_2 gasa, nitrita i amonijaka, redom.



Slika 32. Eksperimentalne i ANN predviđene vrednosti denitrifikujućih indikatora

Kvalitet poklapanja vrednosti i rezidualna analiza razvijenog modela pomoću statističkih pokazatelja (R^2 , χ^2 , MBE, RMSE i MPE) predstavljena je u tabeli 16. ANN model imao je zanemaljivu grešku testova prilagođavanja, što znači da je modelovanjem na zadovoljavajući način predviđen denitrifikacioni kapacitet za testirane sojeve tokom denitrifikacije.

U cilju ispitivanja tačnosti razvijenih ANN modela izvršena je eksperimentalna verifikacija modela. Za verifikaciju modela korišćene su dve prethodno neproverene vremenske tačke inkubacije (36 i 60 sati), u kojima je urađeno merenje denitrifikujućih indikatora. Dobijeni eksperimentalni rezultati za odabrane bakterijske izolate I₃, II₆, III₁₁ i IV₁ upoređeni su sa predviđenim rezultatima ANN modelovanja. Tokom postupka izolacije i selekcije, ovi bakterijski izolati, uzeti kao predstavnici mesta uzorkovanja, definisani su kao alkalorezistentnih/alkalofilni i sporogeni sojevi sa širokom biokinetičkom zonom za temperaturu i pH vrednost. Uočeno je nekoliko manjih razlika između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti, što je prikazano u tabeli 17 (označeno zvezdicom). Kod izolata II₆ i III₁₁ su primećena samo tri odstupanja u roku od 36 sati inkubacije, dok su druga dva izolata sledila predviđene obrasce u datom vremenu. Svi izolati su pokazali očekivani kapacitet denitrifikacije u drugom ispitivanom vremenu (60 sati). Upoređujući rezultate eksperimentalnog rada i matematičkog modelovanja može se zaključiti da dobijene ANN mreže mogu da predvide denitrifikujući kapacitet bakterija izolovanih iz zemljišta u ispitivanom opsegu vremena inkubacije.

Tabela 17. Eksperimentalna verifikacija ANN modela za proces denitrifikacije

Vreme inkubiranja (h)	Bakterijski izolat	Denitrifikujući indikatori					
		Produkcija biomase (McFarland br.)	Produkcija N ₂ gasa (+/-)	Koncentracija (mg/L)		Formiranje (+/-)	
				Nitrat	Nitrit	Nitrit	Amonijak
36	I ₃	3	1	500	80/79,54	1	0/0,009
	II ₆	0/0,298	1	250/329,21*	40/46,55	0/0,59*	0/0,008
	III ₁₁	2/3*	1	500	80/79,83	1	0
	IV ₁	3	1	500	80/79,99	0/0,13	0/0,005
60	I ₃	3	1	500	80	1	0/0,01
	II ₆	0/0,02	1/0,83	50/64,53	1/1,85	0/0,01	0
	III ₁₁	3	1	500/489,41	80/71,66	1	0/0,006
	IV ₁	3	1	500	80/79,48	1	0/0,26

* E/P - E (eksperimentalni) vs. P (predviđeni) rezultat

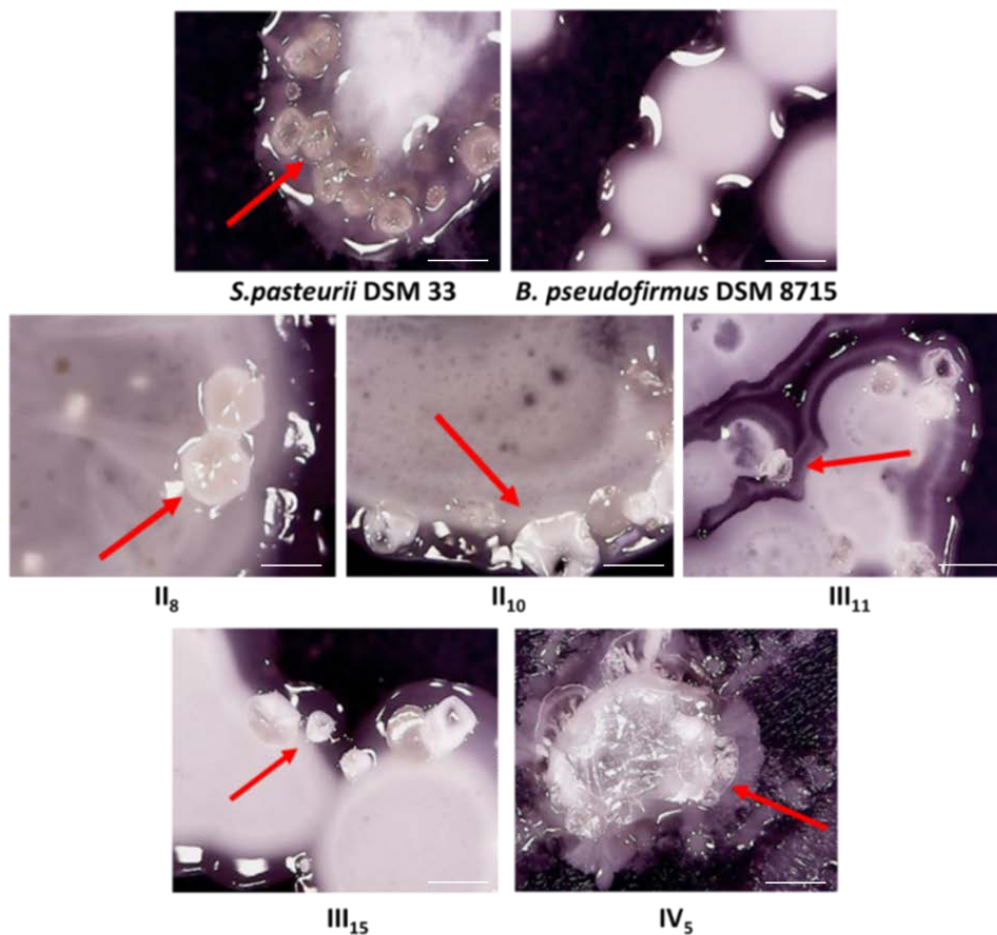
Sumarno, odabrani bakterijski izolati pokazali su metabolički potencijal da budu bioagensi u procesu bakterijski indukovane precipitacije CaCO₃. Zbog toga je neophodno napraviti dalju selekciju manjeg broja sojeva čija efikasnost u ciljanom procesu mora biti dokazana.

5.2. Odabir bakterijskih izolata sa biokalcifikujućim potencijalom

5.2.1. Selekcija prirodnih izolata

U cilju izdvajanja bakterija sa biokalcifikujućim potencijalom, za početni korak selekcije je odabrano matematičko rangiranje 43 bakterijska izolata na osnovu sposobnosti da indukuju formiranje neorganskog depozita. Koristeći dobijene rezultate rasta i ponašanja na različitim hranljivim podlogama za biokalcifikaciju, sporogenost i alkalorezistentnost/alkalofilnost, izvršena je analiza centralne tendencije tj. standardnih ocena. U Prilogu 9 su dati rezultati rangiranja, sa optimalnim opsezima izlaznih parametara. Maksimumi definisani za eksperimentalno dobijene vrednosti smatrani su ujedino i optimalnim (sve vrednosti polariteta bile su pozitivne).

Od ukupnog broja bakterijskih izolata izabrano je pet sojeva kao potencijalno dobar izbor za BIPK proces. Prilikom rangiranja odabrani sojevi su imali najvišu standardnu ocenu, koja je iznosila 0,996. Sa druge strane, ova vrednost za *S. pasteurii* DSM 33 i *B. pseudofirmus* DSM 8715 bila je niža i iznosila 0,775 i 0,726, redom. Razlog veće standardne ocene za bakterijske izolate je u efikasnoj indukciji precipitacije na hranljivim podlogama sa i bez uree, dok su referentni sojevi ispoljili ovu osobinu samo na jednoj vrsti podloge. Dobijen precipitat je okarakterisan pomoću FTIR-ATR analize, detekcijom 1, 2 ili 3 karakteristična pika na dobijenim graficima. Potvrda detekcije CaCO_3 je urađena dodatkom hlorovodonične kiseline u uzorak i pojavom penušanja. Osim statističke sličnosti, približno ponašanje odabranih sojeva i ureolitičkog referentnog soja primećeno je na čvrstoj hranljivoj podlozi uz dodatak uree. Kristalni oblici, označeni crvenim strelicama na slici 33, posmatrani su kao odraz čvrstih struktura sa različitim položajima u odnosu na centar rasta kolonije. Dodatno, oblik i veličina kristalnih oblika bili su specifični na nivou bakterijskog soja. Kao što se očekivalo, neorganski precipitat na podlozi sa ureom nije detektovan samo u slučaju negativne kontrole tj. *B. pseudofirmus* DSM 8715.



Slika 33. Optička mikroskopija bakterijskih kolonija na Urea-CaCl₂ agaru (uvećanje 400x; bar 2 mm; crvene strelice označavaju čvrst depozit)

5.2.2. Identifikacija odabranih bakterijskih izolata

Nakon završenog postupka selekcije, pet odabranih izolata (prethodno nazvanih II₈, II₁₀, III₁₁, III₁₅ i IV₅) je identifikovano do nivoa vrste (tabela 18). Prvobitno odabran način identifikacije pomoću VITEK2 Compact sistema nije precizno identifikovao sve izolate. Konkretno, jedino je bakterijski izolat II₈ identifikovan kao *Brevibacillus chosinensis* sa verovatnoćom identifikacije od 91 %. VITEK identifikacija za ostatak izolata je predstavljena sa dve ili više identifikacione opcije, što se ne može smatrati pouzdanim rezultatom. Iz tog razloga, odabrani sojevi su podvrgnuti MALDI-TOF spektroskopskoj analizi, koja je pružila kompletnu identifikaciju vrsta. Ocena identifikacije je bila visoka i ukazala na stepen podudaranja sa bazom podataka.

Tabela 18. Identifikacija odabranih bakterijskih izolata

Bakterijski izolat	Sistem identifikacije	
	VITEK2 Compact	MALDI-TOF
II ₈	<i>Brevibacillus chosinensis</i> (91%) *	<i>Bacillus muralis</i> (2.76) **
II ₁₀	<i>Bacillus fordii</i>	<i>Bacillus lentus</i> (2.28)
	<i>Geobacillus toebii</i>	
III ₁₁	<i>Bacillus badius</i>	<i>Bacillus simplex</i> (2.04)
	<i>Bacillus simplex</i>	
	<i>Bacillus chosinensis</i>	
III ₁₅	<i>Bacillus badius</i>	<i>Bacillus firmus</i> (2.81)
	<i>Bacillus simplex</i>	
	<i>Bacillus chosinensis</i>	
IV ₅	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> (2.43)
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	

* VITEK Compact identifikacija pruža informaciju o vjerojatnosti podudaranja (>90% predstavlja visoko podudaranje)

** MALDI-TOF identifikacija pruža ocenu rezultata (0-1.69 nije moguća identifikacija; 1.70-1.99 nizak nivo identifikacije; 2.00-3.00 visok nivo identifikacije)

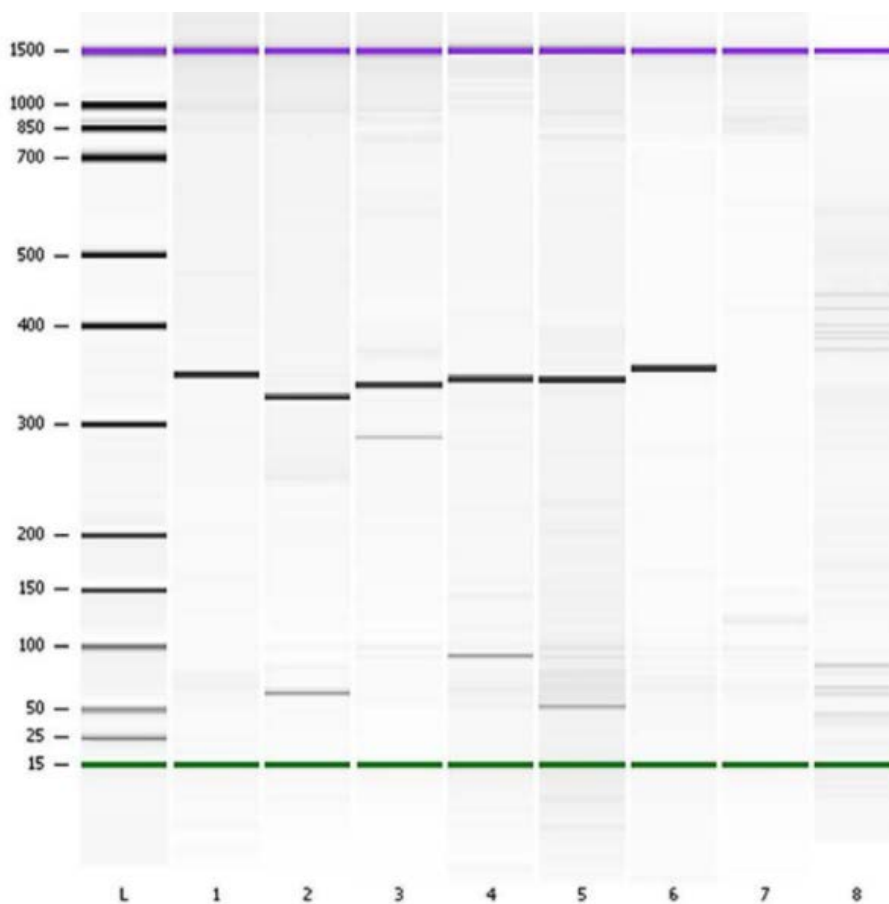
Sve testirane bakterije pripadaju rodovima *Bacillus*, za koje je prethodno definisano da su bakterije sa sposobnošću formiranja spora i visokim nivoom preživljavanja u alkalnom okruženju (Jonkers i sar., 2010). Bakterijski sojevi II₈ i II₁₀ identifikovani su kao *B. muralis*, odnosno *B. lentus*. S druge strane, izolati III₁₁, III₁₅ i IV₅ su *B. simplex*, *B. firmus* i *B. licheniformis*. Prethodno opisane karakteristike ovih *Bacillus* vrsta (Heirman i sar., 2005; Vahabi i sar., 2013; Enyedi i sar., 2020) su u korelaciji sa dobijenim osobinama u toku postupka selekcije. Prema Timperio i sar. (2017), MALDI-TOF analiza pokazuje prilično visoku sličnost sa analizama 16S rDNA, sugerirajući primenljivost ove brze metode za pojednostavljenu i relativno jeftinu analizu identifikacije bakterija izolovanih iz ekstremnih sredina²¹. U određenoj meri su bila očekivana neslaganja između dobijenih rezultata primenjenih metoda jer je MALDI-TOF sistem dobro usklađen sa velikim brojem podloga, uslova kultivacije i bazom velikog broja bakterija iz različitih izvora (Timperio i sar., 2017). Takođe, Guo i sar. (2014) naglašavaju da MALDI-TOF sistem nudi veću tačnost identifikacije i niži stepen greške na nivou vrste divljih izolata u poređenju sa VITEK2 Compact sistemom, što rezultati dobijeni u ovom istraživanju nedvosmisleno potvrđuju.

²¹ Pod ekstremnim sredinama obuhvaćene su ekološke niše sa veoma visokim ili niskim vrednostima faktora sredine (pH vrednost, temperatura, a_w vrednost, itd.), a koje značajno utiču na oblikovanje mikrobne zajednice;

5.2.3. Amplifikacije ureC gena kod odabranih bakterijskih izolata

U okviru ovog koraka je izvršena amplifikacija ključnog gena za detekciju potencijala ureolitički aktivnih bakterija. Naime, iako je najbolja potvrda aktivnosti ureaze kod bakterija prisustvo sva tri strukturalna *ureA*, *ureB* i *ureC* gena, mnoga istraživanja se zasnivaju na detekciji isključivo *ureC* gena, koji je odgovoran za glavnu strukturalnu jedinicu enzima. Razlog za odabir *ureC* gena kao genetskog indikatora je činjenica da se tokom ureolitičke aktivnosti ekspresija *ureC* gena značajno povećava, a nivo aktivnosti *ureA* i *ureB* gena se ne menja (Ma i sar., 2020). Amplifikacija *ureC* gena daje osnovne informacije o postojanju potpuno funkcionalnog operona koji nosi informacije o sintezi ureaze (Jin i sar., 2017).

Na osnovu dobijenih rezultata PCR amplifikacije *ureC* gena (slika 34), jasno se može uočiti da je ključni gen za proces ureolize uspešno amplifikovan iz genoma odabranih *Bacillus* sojeva.



Slika 34. PCR amplifikacija *ureC* gena na lab-on-chip elektroforezi (L – standard; 1 – *S. pasteurii* DSM 33; 2 – *Bacillus muralis*; 3 – *B. lentus*; 4 – *B. simplex*; 5 – *B. firmus*; 6 – *B. licheniformis*; 7 – *B. pseudofirmus* DSM 8715; 8 – kontrola prajmera)

Očekivani PCR fragment za *ureC* gen ima prosečnu baznu dužinu od oko 340 bp (Zulaika i sar., 2019). U slučaju referentnog soja veličina amplifikovanog fragmenta *ureC* gena je iznosila 342 bp, dok je veličina fragmenta istog gena iznosila 334, 341, 343, 341 i 344 bp za *B. muralis*, *B. lentus*, *B. simplex*, *B. firmus* i *B. licheniformis*, redom. Dobijene veličine gena *ureC* se poklapaju sa veličinom fragmenta od 344 bp istog gena amplifikovanog iz genoma *S. pasteurii* (Reed, 2001) i 340 bp amplifikovanog iz DNK matrice izolata, koji pripadaju rodovima *Bacillus*, *Virgibacillus* i *Lysinibacillus* (Zulaika i sar., 2019).

Na osnovu amplifikacije osnovnog strukturnog gena ureaznog procesa iz genoma ispitivanih bakterijskih izolata može se zaključiti da svih pet odabranih sojeva poseduju gen, koji nedvosmisleno ukazuje na prisustvo funkcionalnog aparata za produkciju ureaznog enzima. Zahvaljujući uspešnoj amplifikaciji *ureC* gena, može se pretpostaviti da se odabrane bakterije mogu okarakterisati kao predstavnici ureolitičke grupe, te da je neophodno dalje ispitivanje fizioloških i metaboličkih karakteristika koje doprinose efikasnosti procesa BIPK.

5.2.3. Ispitivanje morfoloških i ekoloških karakteristika relevantnih za proces BIPK

Različiti fiziološki i metabolički testovi mogu biti važni za razumevanje ponašanja bakterija tokom BIPK procesa. Zbog ove hipoteze, morfologija i pokretljivost ćelija su ispitivani kao važni faktori koji utiču na proces precipitacije i efikasnost adsorpcije kalcijumovih jona na negativno naelektrisani ćelijski zid (Whiffin, 2004). Kao što je prikazano u tabeli 19, sve testirane bakterije su štapićastog oblika. Budući da se bakterije po tipu bacilusa neretko koriste u inženjerskim BIPK procesima (Whiffin, 2004; Jonkers i sar., 2010; Farrugia i sar., 2019), svi izolati svojom morfologijom predstavljaju ciljanu grupu bakterija. Sa izuzetkom *B. muralis*, kod svih testiranih bakterija je potvrđena pokretljivost. Dostupnost hranljivih sastojaka i jona za pokretne bakterije može biti veća u odnosu na nepokretne, jer pokretljivost obezbeđuje prostranije okruženje za svaku ćeliju (Jonkers i sar., 2010).

Rast svih testiranih bakterija u odsustvu kiseonika se nije pojavio tokom pet dana inkubacionog perioda što bi moglo ograničiti potencijalnu upotrebu ovih sojeva u anaerobnim i mikroaerofilnim procesima. Prema Nakbanpote i sar. (2014), tolerancija na

prisustvo soli može biti u korelaciji sa bakterijskom sposobnošću stvaranja biofilmova zemljišnih bakterija. Adaptacijom na hipersalinitet, bakterije smanjuju nivo stresa koji se javlja u ekstremnim sredinama (Orhan i Gulluce, 2014). Štaviše, zbog velikog udela obradivog zemljišta sa povećanim salinitetom u svetu, mnoge gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, izolovane iz poljoprivrednih zemljišta, označene su kao sojevi prilagodljivi na prisustvo do 10% NaCl u okruženju (Nakbanpote i sar., 2014, Orhan i Gulluce, 2014).

Tabela 19. Morfološke i ekološke osobine odabranih izolata

Bakterija	Oblik ćelije	Pokretljivost	Detekcija flagele	Rast u anaerobnim uslovima	Rast u prisustvu NaCl (%)				
					3	5	7	10	15
<i>B. muralis</i>	štapićast	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. lentus</i>	štapićast	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>B. simplex</i>	štapićast	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>B. firmus</i>	štapićast	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>B. licheniformis</i>	štapićast	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>S. pasteurii</i> DSM 33	štapićast	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>B. pseudofirmus</i> DSM 8715	štapićast	+	+	-	+	+	+	+	-

Prema dobijenim rezultatima tolerancije na prisustvo soli (tabela 19), *B. muralis* i *B. simplex* imaju mogućnost rasta u prisustvu do 10% NaCl. *B. lentus* i *B. licheniformis* tolerišu do 7% NaCl u hranljivoj podlozi. *B. simplex* se može definisati kao izolat sa najnižom tolerancijom na prisustvo soli (do 5%). Zanimljivo je da *S. pasteurii* DSM 33 raste u prisustvu do 3% NaCl, što je suprotno visokom nivou tolerancije (do 10%) neureolitičkog soja *B. pseudofirmus* DSM 8715. Rezultati izvedenih eksperimenata ukazuju na potencijalnu raznovrsnost odabranih bakterijskih vrsta, ali i mogućnost da svaka pojedinačna ćelija predstavnika ureolitičkih bakterija može da doprinese procesu BIPK na jedinstven način. Zbog navedenog je od velikog značaja ispitivanje fizičkih karakteristika pojedinačnih ćelija da budu aktivni centri nukleacije.

5.3. Ispitivanje uloge bakterijske ćelije odabranih izolata u procesu BIPK

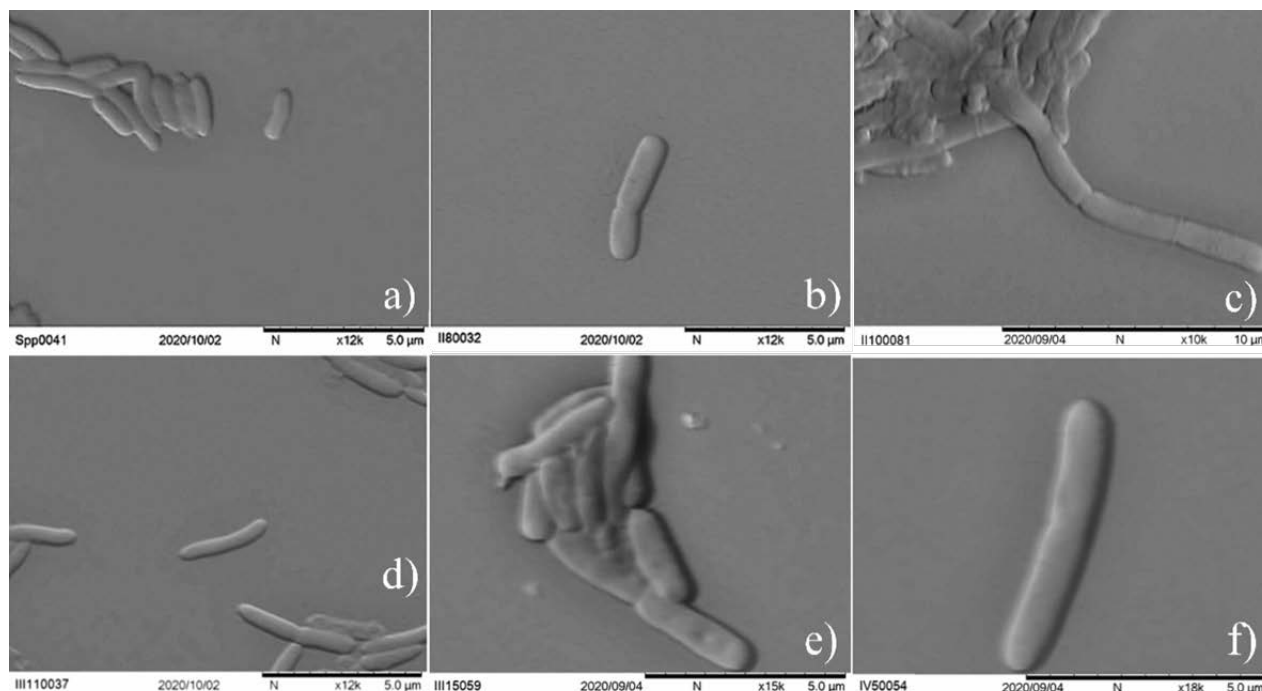
Sa aspekta primene, ureoliza je jednostavna i efikasna, te su zbog toga ureolitičke bakterije trenutno u fokusu brojnih istraživanja. Međutim, do danas je ostala nejasna potpuna uloga koju ćelije ureolitičkih bakterija imaju u procesu BIPK. Razlog ovome je doprinos fizičkih karakteristika vijabilnih bakterijskih ćelija. Naime, da bi ispoljile svoju metaboličku aktivnost, bakterijske ćelije ne bi trebalo da budu prostorno ograničene jer bi to ometalo difuziju jona u sistemu i pravilan rast kristala. Dobar primer za to je odnos dimenzija ćelija u određenim poroznim supstratima, kao što su cement ili zemljište. Slobodan prostor u porama supstrata će omogućiti mobilnost ćelije i difuziju jona iz/u svaku ćeliju koja će posledično vršiti efikasnu ureolitičku aktivnost i biti centar nukleacije (Jonkers i sar., 2010; Zhang i sar., 2019). Takođe, svaka promena u stepenu poroznosti, izazvaće promene u toku BIPK. U cilju ispitivanja uloge pojedinačnih ćelija u BIPK procesu, istraživanje je podeljeno u 4 koraka:

1. fizičke karakteristike ćelije;
2. karakteristike ćelijske površine (zida i membrane);
3. uloga kalcijuma u formiranju biofilma tokom BIPK;
4. doprinos ćelijske aktivnosti pH promenama u sistemu.

5.3.1. Oblik i veličina ćelije

Na osnovu snimaka elektronske skenirajuće mikroskopije (slika 35), potvrđeno je da su ćelije svih posmatranih sojeva štapićastog oblika po tipu bacilusa. Konkretno, *B. lentus* može da formira lance i poprima oblik streptobacila, dok *B. muralis* formira diplobacile. Kod ostalih sojeva, bakterije su pojedinačne ćelije. Oblik svih odabranih bakterija u korelaciji je sa oblikom najčešće korišćenih vrsta bakterija u BIPK sistemima (Wang i sar., 2017; Farrugia i sar., 2019). Jonkers i sar. (2010) naglašavaju da pore matrice u kojima se odigrava BIPK moraju da imaju prosečan prečnik veći od prosečne veličine bakterijskih ćelija da bi se ispoljila aktivna uloga pojedinačnih bakterija. Iz tog razloga, urađeno je merenje prosečne veličine ćelije (dužina i širina), a posledično je izračunata vrednost specifične površine i

zapremine pojedinačnih ćelija. Veličina ćelija je određena na osnovu deset ćelija na SEM slikama Priloga 10, a dobijene vrednosti merenja su prikazane u Prilogu 11.

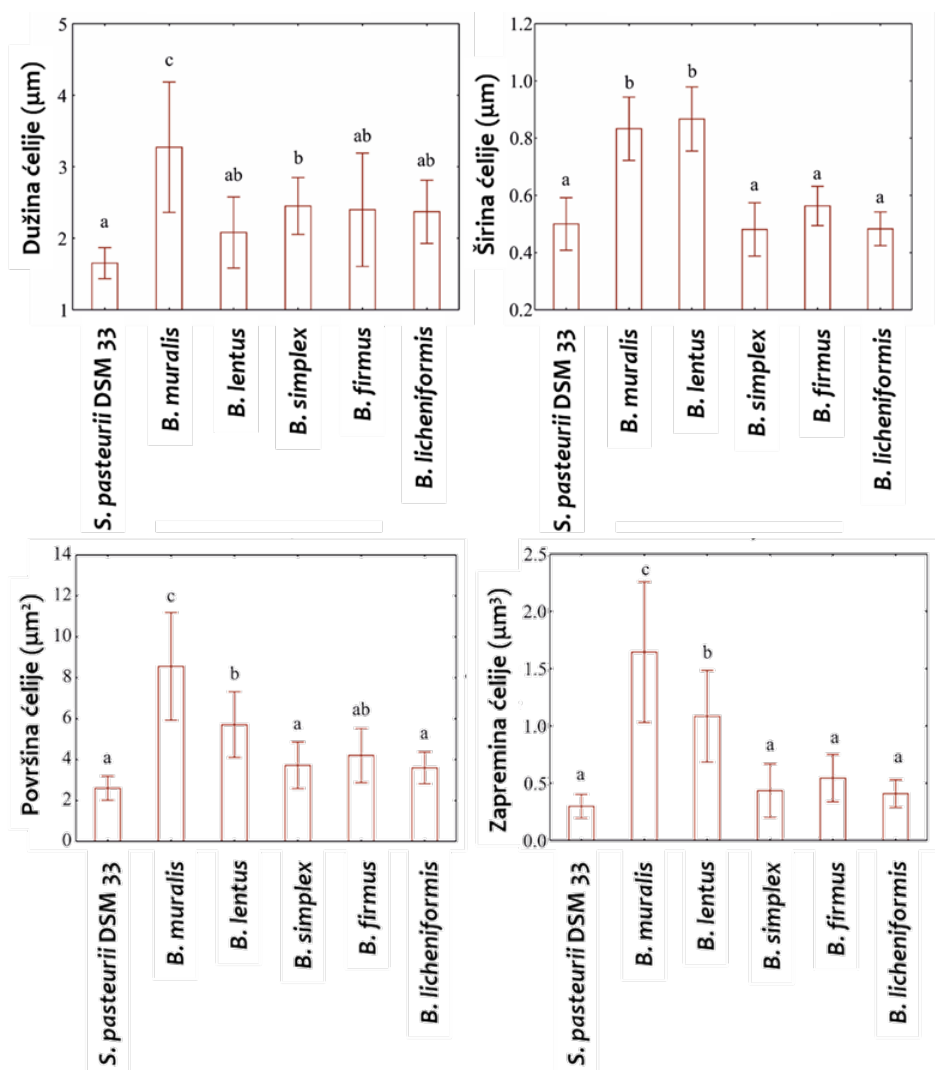


Slika 35. Ćelijski oblik snimljen skenirajućom elektronskom mikroskopijom a) *S. pasteurii* DSM 33; b) *B. muralis*; c) *B. lentus*; d) *B. simplex*; e) *B. firmus*; f) *B. licheniformis*

Na slici 36a-b su grafički prikazane raspodele prosečne veličine ćelija odabranih bakterijskih vrsta. Može se uočiti da se prosečna veličina *Bacillus* sojeva razlikuje od veličine referentnog soja. *S. pasteurii* DSM 33 ima prosečnu dužinu od 1,65 μm i širinu od 0,5 μm . U poređenju sa ovim rezultatom, svi divlji sojevi imaju duže ćelije u istoj fazi proliferacije. Ćelija *B. muralis* je prosečnih dimenzija 3,27 \times 0,83 μm , dok je za *B. lentus* 2,08 \times 0,50 μm . Veličina prosečne ćelije *B. simplex*, *B. firmus* i *B. licheniformis* je 2,45 \times 0,48, 2,40 \times 0,56 i 2,37 \times 0,48 μm , redom.

Razlike u veličini ćelije sugerišu da površina ćelije koja je izložena procesu taloženja CaCO_3 nije ista za testirane bakterije. Površina i zapremina bakterijskih ćelija izračunate su na osnovu dobijenih vrednosti veličine ćelije, pretpostavljajući sferno-cilindričnu geometriju ćelije. Prema dobijenim rezultatima (slika 36c-d), svi *Bacillus* sojevi imaju veću prosečnu specifičnu površinu, kao i zapreminu pojedinačnih ćelija u odnosu na referentni soj. Različite vrednosti specifične površine i zapremine bakterijskih ćelija ukazuju na različite nivoe

karbonatne produktivnosti u sistemu. Iz te perspektive, moguće je da ćelije sa manjom specifičnom površinom i zapreminom zahtevaju niži nivo akumulacije kalcijuma i bržu saturaciju jona u okolini ćelije u odnosu na veću ćeliju sa istim nivoom ureolitičke aktivnosti. Kao stalna karakteristika u fiziološkim uslovima, ćelijska morfologija može biti u funkciji karakteristika matriksa u kojem se vrši BIPK proces, kao što su stopa poroznosti, hidratacija i raspoloživost jona kalcijuma (Jonkers i sar., 2011). Na osnovu obrazloženog se može zaključiti da neizbežne promene u matriksu mogu ograničiti aktivnost ćelija i mogućnost indukovanja CaCO_3 precipitacije.



Slika 36. Prosečna veličina ćelija odabranih bakterijskih sojeva²²

²² vrednosti označene slovima od a do c statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju na osnovu Tukey-evog HSD testa;

5.3.2. Doprinos karakteristika ćelijske površine (zida i membrane)

Za bolje razumevanje bakterijskih predispozicija za BIPK proces ispitivane su osobine ćelijskih ovojnica: potencijal adhezije ćelija i formiranja biofilma, hidrofobnost ćelijske površine, permeabilnost membrane i elektronegativnost ćelijskog zida. Dobijeni rezultati su poslužili za ANN modelovanje primenom višeslojnog perceptron modela. Dobijeni optimalni ANN modeli pokazali su dobru prediktivnu sposobnost za dati set eksperimentalnih podataka (tabela 20). Da bi se dobile ovako visoke vrednosti koeficijenta determinacije (koje su u ovom slučaju iznosile 1), optimalan broj neurona u skrivenom sloju za predviđanje ćelijske adhezije bio je 5 (mreža MLP 3-5-6), za hidrofobnost ćelijske površine 7 (mreža MLP 4-7-6), za propustljivosti ćelijske membrane 8 (mreža MLP 4-8-6), a za ćelijsku elektronegativnost bio jednak 9 (mreža MLP 8-9-6). Prilozi 13 i 14 predstavljaju elemente matrice W_1 i vektora B_1 , odnosno W_2 i B_2 za predviđanje doprinosa ispitivanih osobina.

Tabela 20. ANN modelovanje za doprinosa osobina ćelijskih ovojnica procesu BIPK

Analiza	Ime mreže	Performanse učenja	Greška učenja	Algoritam	Funkcija greške	Skrivena aktivacija	Izlazna aktivacija
Adhezija ćelija	MLP 3-5-6	1	0	BFGS 342	SOS	Eksponecijalna	Identična
Hidrofobnost ćelijske površine	MLP 4-7-6	1	0	BFGS 758	SOS	Logistička	Identična
Permeabilnost ćelijske membrane	MLP 4-8-6	1	0	BFGS 1477	SOS	Eksponecijalna	Identična
Elektronegativnost ćelijskog zida	MLP 8-9-6	1	0	BFGS 143	SOS	Tangens hiperbolikus	Identična

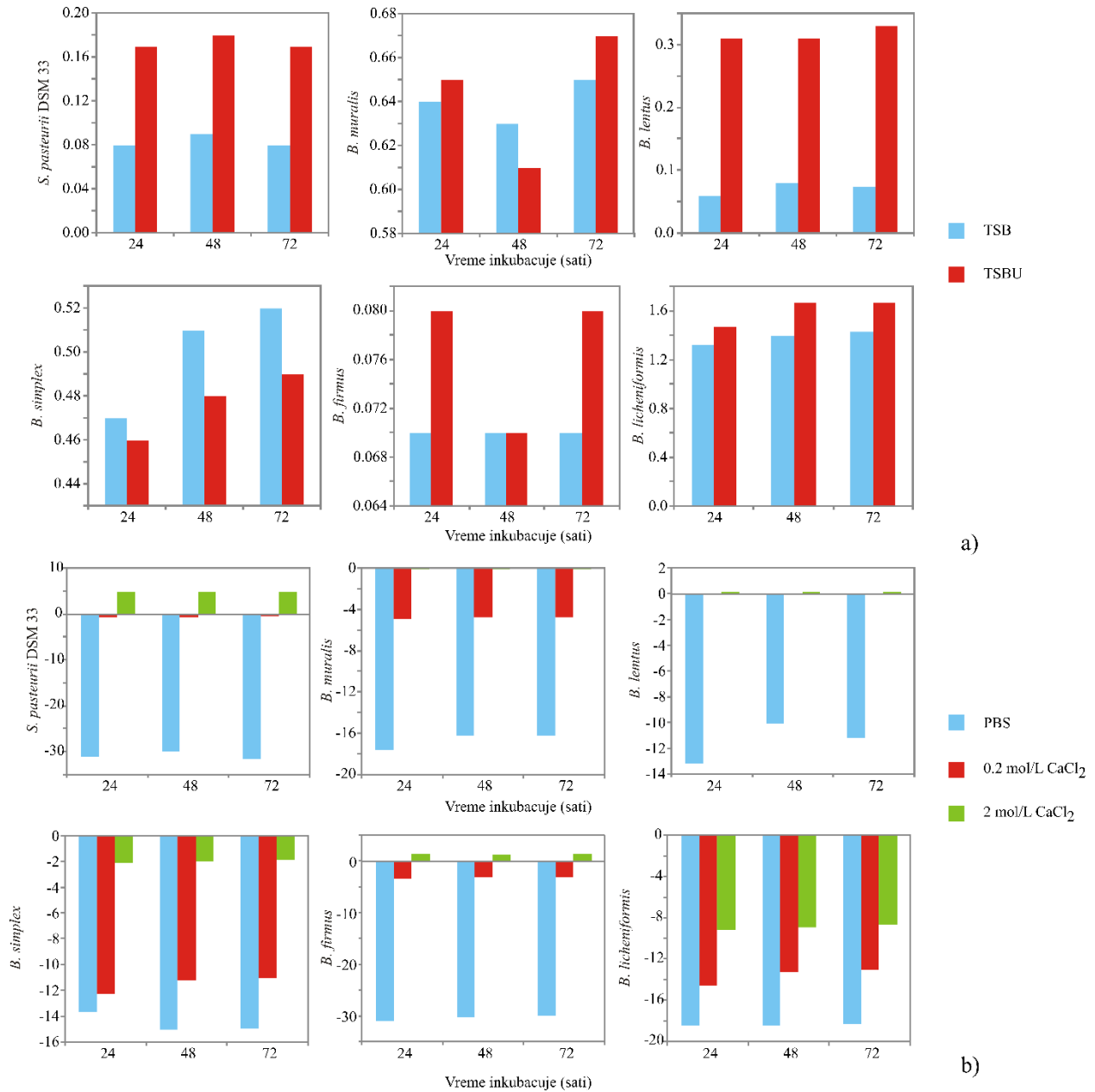
Shodno postavljenom cilju ispitivanja doprinosa bakterija procesu BIPK, bilo je neophodno ispitati mogućnost adhezije ćelija i formiranje biofilma. Proizvodnja ekstracelularne polimerne supstance (EPS) snažno modifikuje okruženje ćelije pružajući dodatni izvor organskog ugljenika i interakciju jona između slojeva (Tourney i Ngwenya, 2009). Štaviše, prisustvo EPS slojeva može biti uzrok razlika kinetičkih puteva BIPK i rasta kristala (Tourney i Ngwenya, 2009). Dobijeni rezultati polukvantitativnog testa adhezije (slika 37a) ukazuju na raznolikost ispitivanih sojeva. *B. muralis*, *B. simplex* i *B. pseudofirmus* DSM 8715 su imali srednju mogućnost adhezije, dok je *B. firmus* ukazao na najmanji potencijal stvaranja biofilma. *B. licheniformis* je jedini visokoadhezivan, sa potencijalom primarne kolonizacije i

stvaranja biofilma u testiranim uslovima sredine. Poređenjem potencijala adhezije se može zaključiti da dodatak uree nije uticao na ispitivanu sposobnost. Samo je u slučaju *B. lentus* i *S. pasteurii* DSM 33 primećeno blago povećanje prijanjanja na površine u prisustvu uree.

U cilju uočavanja razlika u elektronegativnosti bakterijskih ćelija kada su suspendovane u rastvoru bez dodatka kalcijumu (0 mol/L CaCl_2) i rastvorima različite koncentracije ovog jona (0,2 mol/L i 2 mol/L CaCl_2), izvršeno je merenje zeta potencijala (slika 37b). Magnituda zeta potencijala ukazuje na stepen elektrostatske odbojnosti između susednih, slično nabijenih ćelija u suspenziji. Prema dobijenim rezultatima, zeta potencijali bakterijskih ćelija resuspendovanih u rastvoru bez kalcijuma imaju najnegativnije vrednosti (-31,23 do -13,73 mV) što je u korelaciji sa činjenicom da bakterijske ćelije zadržavaju negativan elektrostatički površinski naboj kada se inkubiraju na fiziološkim pH vrednostima (Knorre i Krumbein, 2000). Zbog prisutne elektronegativnosti, ćelije deluju kao umreženi elektronegativni punjač koji favorizuje akumulaciju i kompleksiranje pozitivnih jona metala prisutnih u okruženju. Na ovaj način postignut je jedan od zahteva za indukovanje BIPK, podržavajući stehiometrijsku interakciju kalcijuma sa ekstracelularno produkovanim karbonatima (Zhu i Dittrich, 2016).

U prisustvu 0,2 mol/L CaCl_2 , sve testirane bakterije su pokazale značajno manju vrednost negativnog naboja. Procenat smanjenja elektronegativnosti za referentni soj bio je 97,95% u odnosu na vrednost merenja bez dodatka kalcijuma. Samo je *B. lentus* imao veću razliku elektronegativnosti u rastvoru bez kalcijuma i sa 0,2 mol/L CaCl_2 (99,95%), dok su te vrednosti iznosile 72,62, 10,44, 89,04 i 20,74 % za *B. muralis*, *B. simpex*, *B. firmus* i *B. licheniformis*, redom. Dodatno smanjenje elektronegativnosti svih testiranih bakterija je uočeno dodatkom 2 mol/L CaCl_2 (slika 27). Konkretno, uočene su pozitivne vrednosti površinskog naboja za referentni soj i *B. firmus* sa dodatkom veće količine kalcijuma u sistem. Slični rezultati promene elektronegativnosti su dobijeni u radu Ma i sar. (2020), koji su ovakav ishod ogleda povezali sa akumulacijom svih pozitivnih jona u sistemu na ćelijski zid bakterija, čime se obezbedio uslov za lokalnu hemijsku reakciju između jona prisutnih u sistemu. Međutim, nagomilavanjem pozitivnih jona oko ćelije i indukcija CaCO_3 precipitacije u mikrookruženju

zmanjuje dalji bakterijski doprinos BIPK procesu, zbog smanjenja aktivnosti i vijabilnosti pojedinačnih ćelija zarobljenih nastalim kristalima.



Slika 37. ANN modelovanje: a) adhezivnog potencijala; b) elektronegativnosti ćelija

Razumevanje hidrofobnosti ćelijske površine je od suštinskog značaja za primenu bakterija u procesu BIPK. Ova karakteristika ćelijskih zidova ima specifičnu ulogu u potencijalu adhezije bakterija na različite neorganske površine (Krasowska i Singler, 2014). Kako u naučno-relevantnoj literaturi nisu postojali podaci o ispitivanju ove osobine kod ureolitičkih bakterija,

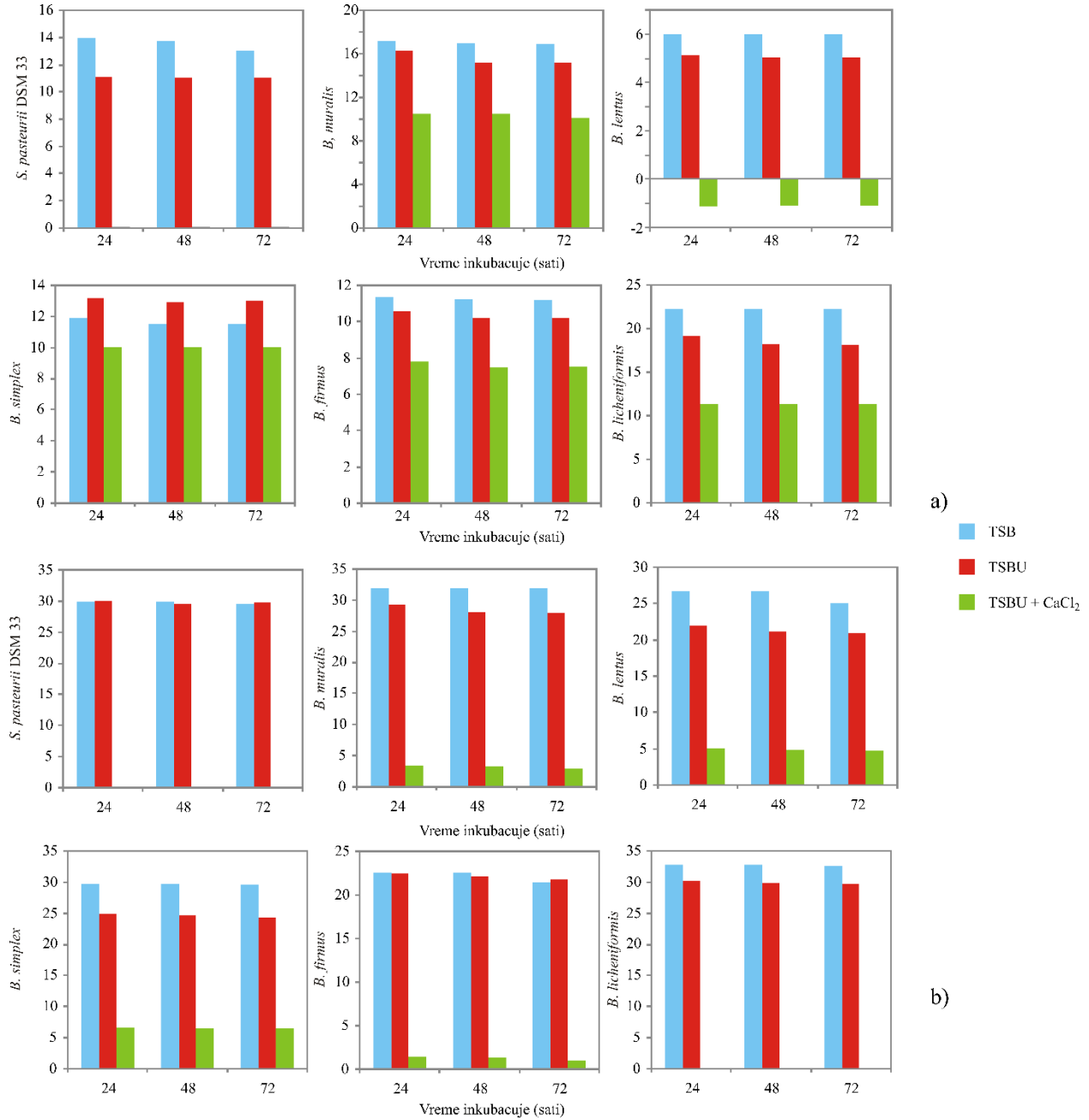
pre postavke glavnog eksperimenta sa pet odabranih bakterijskih sojeva, izvršena je optimizacija MATH (eng. microbial adhesion to hydrocarbons test) metode za ispitivanje hidrofobnosti. Kroz Box-Benken eksperimentalni plan ispitivani su glavni parametri procesa, a analize su urađene za sve izdvojene *Bacillus* vrste, kao i ureolitičkog referentnog soja. Dobijeni rezultati optimizacije su prikazani u Prilozima 15-17. Optimalne vrednosti testiranih parametara su sledeći:

- vreme homogenizacije: 2 minuta;
- zapremina ugljovodonične faze: 0,5 mL
- vreme separacije faza: 15 minuta.

U cilju ispitivanja uticaja dodatka uree, kao i uree i kalcijuma u hranljivu podlogu na hidrofobnost ćelijskih ovojnica, korišćeni su optimizovani parametri MATH testa. Opadajuće vrednosti hidrofobnosti između medijuma bez i sa dodatkom uree primećuju se kod svih testiranih bakterija, osim kod *B. simplex* (slika 38a). S obzirom na to da je urea esencijalni supstrat za ureolitičku aktivnost sa snažanim uticajem na hidrofobnu interakciju (Hammad i sar., 2013), smanjenje hidrofobnosti se moglo očekivati. Dodatno smanjenje procenta hidrofobnosti kada se i kalcijum nalazi u hranljivoj podlozi ukazuje da formiranje kristala CaCO_3 smanjuje slobodni prostor oko ćelija za fiziološku aktivnost.

Dobijeni rezultati hidrofobnosti ćelijske površine su u korelaciji sa rezultatima permeabilnosti ćelijske membrane (slika 38b). Bakterijska ćelijska membrana je selektivna barijera koja vrši razmenu željenih i neželjenih komponenti mikrokruženja i ćelija (Dorr i sar., 2019). Ova struktura ima specifičnu površinu koja se može smanjiti stvaranjem kristala CaCO_3 na/oko ćelija (Zhu i Dittrich, 2016). Akumulacija specifičnog supstrata, jona i/ili kristala može uticati na stopu propustljivosti ćelijske membrane i prouzrokovati delimični ili potpuni poremećaj ekstracelularne produkcije karbonatnih jona. U korelaciji sa iznetom hipotezom su rezultati ovog rada. Smanjenje permeabilnosti membrane svih testiranih bakterija se javlja prilikom indukcije BIPK procesa. U poređenju sa hranljivom podlogom sa i bez jona kalcijuma, smanjenje stepena permeabilnosti ćelijske membrane je iznad 80% za sve testirane bakterije. U slučaju *S. pasteurii* DSM 33 i *B. licheniformis*, permeabilnost ćelijske membrane nije mogla

da se detektuje kada se joni kalcijuma nalaze u medijumu. Ovaj rezultat potvrđuje da formirani kristali oko svake ćelije ometaju propusnost ćelija, a posledično utiču i na smanjenje sekundarnog doprinosa ćelija kao centara nukleacije.



Slika 38. ANN modelovanje za a) hidrofobnost ćelijske površine; b) permeabilnost ćelijske membrane

5.3.3. Uloga kalcijuma u formiranju biofilma i doprinos pH promena tokom BIPK

Formiranjem biofilma bakterije postižu primarnu adheziju za određenu podlogu generičkim fizičko-hemijskim interakcijama kao što su Van der Valsove i elektrostatičke sile ili specifičnim površinskim strukturama na ćelijama kao što su pili i fimbrije (Zhu i Dittrich, 2016). Kao što je već obrazloženo, proizvodnja biofilma može uticati na putanju BIPK kroz obezbeđivanje dodatnog izvora jona za ćelije i intenziviranje međusobnih interakcija (Tourney and Ngwenya, 2009). Upotrebom hranljive podloge bez i sa dodatkom kalcijuma u toku ispitivanja formiranja biofilma postojala bi mogućnost da se objasni posebna uloga kalcijuma u toku biofilmske BIPK. Nadalje, posmatranje promena u pH vrednostima sredine tokom bakteriogene precipitacije može pružiti objašnjenje na koji način bakterije utiču na nivo alkalnosti sistema i da li olakšavaju postizanje uslova za saturaciju jona i precipitaciju kristala.

Da bi se istražili definisani parametri, ali i otkrili složeni, nelinearni odnosi u multivarijantnim podacima, razvijeni su sistemi predviđanja pomoću ANN mreža (Almeida , 2002; Merma i sar., 2019; Abrougui i sar., 2019). Dobijeni optimalni modeli za pH promene (mreža MLP 4-5-7) i uloge kalcijuma u toku formiranja biofilma (mreža MLP 4-4-6) pokazali su dobru prediktivnu sposobnost da tačno odgovaraju eksperimentalnim podacima i mogu se koristiti za predviđanje rezultata širokog spektra ulaznih podataka (tabela 21).

Tabela 21. Karakteristike ANN mreže za promene pH vrednosti i uloge kalcijuma u formiranju biofilma tokom BIPK

Naziv mreže	Performanse ciklusa (R^2)			Greška ciklusa			Algoritam učenja
	učenja	testiranja	validacije	učenja	testiranja	validacije	
MLP 4-5-7	0,99	0,99	1	0,004	0,006	0,005	BFGS 154
MLP 4-4-6	0,97	0,98	0,99	0,001	0,001	0,001	BFGS 153
	Funkcija greške učenja		Aktivaciona funkcija skrivenog sloja testiranja		Aktivaciona funkcija izlaza validacije		
MLP 4-5-7	SOS		Tangens hiperbolikus		Tangens hiperbolikus		
MLP 4-4-6	SOS		Logistička		Tangens hiperbolikus		

Optimalan broj neurona u skrivenom sloju za predviđanje pH promena je 5, dok je za ispitivanje uloge kalcijuma u formiranju biofilma tokom BIPK jednak 4. Za spomenute mreže dobijene su visoke vrednosti koeficijenta determinacije (tokom ciklusa učenja R^2 za promene pH bio je 0,981, a za ispitivanje uloge kalcijuma 0,973) (tabela 21). U Prilogu 18 predstavljeni su elementi matrice W_1 i vektora B_1 za ispitivane karakteristike, dok su u Prilogu 19 prikazani elementi matrice W_2 i vektora B_2 . SOS vrednosti ANN modela su istog reda veličine kao eksperimentalne greške. To znači da je matematičko modelovanje omogućilo veoma dobro predviđanje testiranih osobina na osnovu vremena inkubiranja, vrednosti apsorbance i koncentracije hranljivih sastojaka. Kvalitet uklapanja modela je verifikovan i rezidualna analiza razvijenog modela je testirana odabranim statističkim pokazateljima (tabela 22). Kod razvijenih modela se uočava visoka nelinearnost, što opravdava i složenost modela: 67 težinskih koeficijenata i nultih članova za prediktivni model pH promena i 50 težinskih koeficijenata i nultih članova za model predviđanja uloge kalcijuma tokom biofilmskog BIPK. Vrednosti koeficijenta determinacije između rezultata eksperimentalnog i ANN modela za pH promene su bile: 0,987, 0,969, 0,989, 0,975, 0,985 i 0,99, dok su za ispitivanje uloge kalcijuma iznosile 0,946, 0,873, 0,954, 0,965, 0,974 i 0,979 za *S. pasteurii* DSM33, *B. muralis*, *B. lentus*, *B. simplex*, *B. firmus* i *B. licheniformis*, redom.

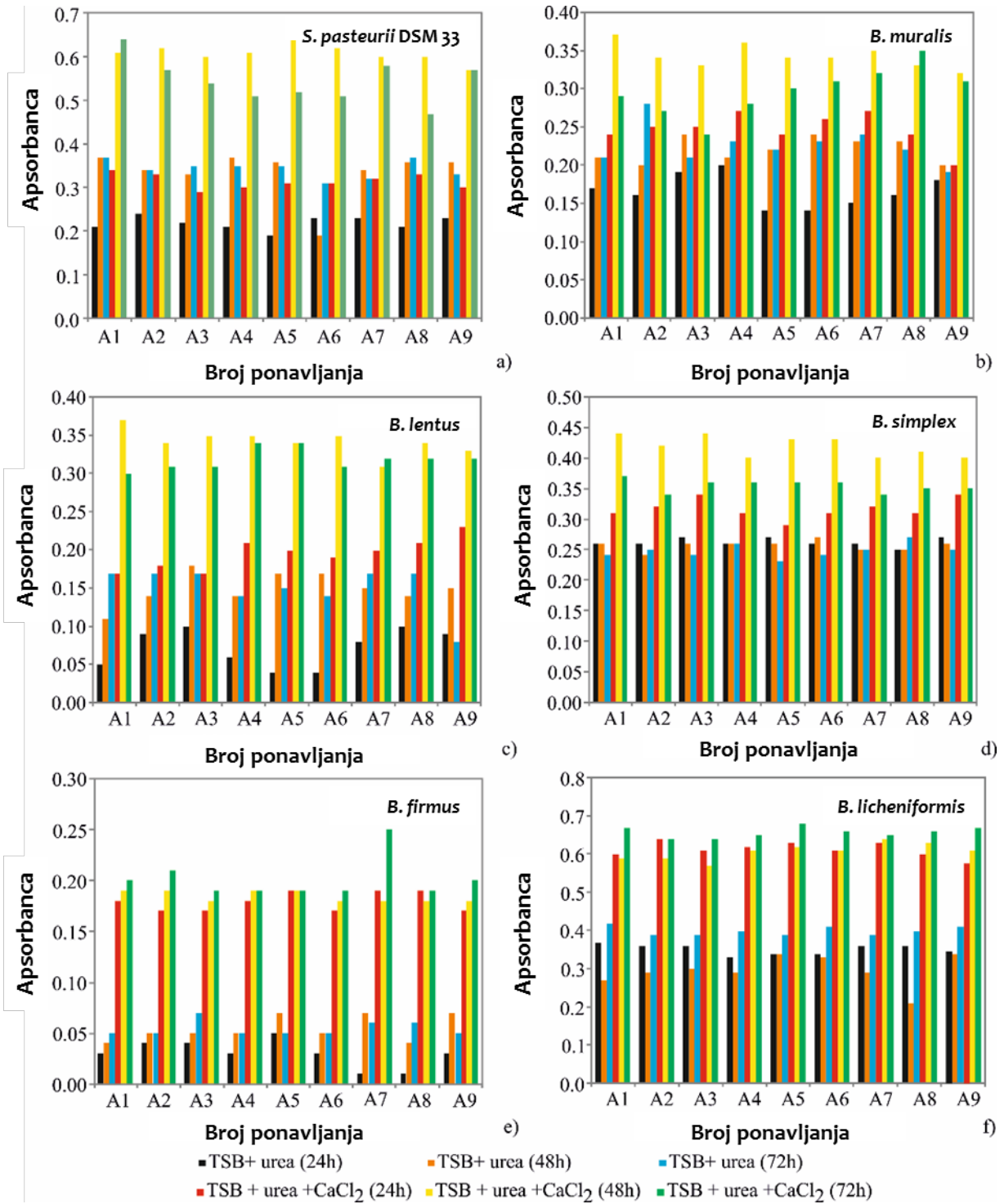
Kao što je prikazano na slici 39, *B. licheniformis* je imao najveći potencijal za stvaranje biofilma nakon 24 sata inkubacije, posebno u slučaju kada je kalcijum deo hranljive podloge. Tokom precipitacije CaCO_3 , kompleksiranje jona kalcijuma omogućava bolja svojstva adhezije i formiranje biofilma za ovaj soj. To može biti veoma važno jer biofilmske ćelije imaju veće šanse da poboljšaju i ubrzaju kompletan proces stvaranja CaCO_3 (Tourney and Ngwenya, 2009). Niže vrednosti potencijala formiranja uočene su u slučaju kultivacije *B. muralis* sa relativno sličnim razlikama sa i bez dodavanja kalcijuma u poređenju sa *B. licheniformis*. Slično ponašanje primećeno je i kod referentnog soja *S. pasteurii* DSM 33 i *B. simplex* sa srednjim potencijalom formiranja biofilma, dok su drugi *Bacillus* sojevi imali značajno manju sposobnost adhezije tokom BIPK procesa.

Tabela 22. Numerička verifikacija ANN modela

Ispitivanje uloge kalcijuma za formiranje biofilma tokom BIPK										
Promenljiva	χ^2	RMSE	MBE	MPE	R ²	Skew	Kurt	Mean	SD	Var
<i>S. pasteurii</i> DSM 33	0,001	0,03	0	6,57	0,94	-1,52	6,42	0	0,033	0,001
<i>B. muralis</i>	0,001	0,02	0	7,01	0,873	-0,24	1,17	0	0,022	0
<i>B. lentus</i>	0	0,02	-0,001	13,77	0,954	-0,76	1,27	-0,001	0,021	0
<i>B. simplex</i>	0	0,01	-0,002	2,98	0,965	-0,30	-0,19	-0,002	0,012	0
<i>B. firmus</i>	0	0,01	0	15,95	0,974	1,07	2,15	0	0,012	0
<i>B. licheniformis</i>	0,001	0,02	-0,001	3,87	0,979	-1,42	6,11	-0,001	0,021	0
pH promene tokom BIPK										
Promenljiva	χ^2	RMSE	MBE	MPE	R ²	Skew	Kurt	Mean	SD	Var
<i>S. pasteurii</i> DSM 33	0,008	0,08	0,001	0,75	0,987	0,54	0,96	0,001	0,08	0,007
<i>B. muralis</i>	0,008	0,08	-0,003	0,65	0,969	0,98	4,112	-0,003	0,08	0,006
<i>B. lentus</i>	0,007	0,07	-0,002	0,59	0,989	0,20	1,1	-0,002	0,07	0,006
<i>B. simplex</i>	0,010	0,09	-0,005	0,75	0,975	0,31	3,34	-0,005	0,09	0,008
<i>B. firmus</i>	0,003	0,05	0	0,45	0,985	-0,756	1,04	0,000	0,05	0,002
<i>B. licheniformis</i>	0,006	0,07	0,002	0,61	0,990	-0,72	2,81	0,002	0,07	0,005
blank*	0	0,01	0,003	0,09	0,865	2,74	8,28	0,003	0,01	0

χ^2 – redukovan hi-kvadrat; MBE – srednje greške odstupanja; RMSE – koren kvadrata srednje greške; MPE – srednja procentualna greška; R² – koeficijent determinacije; SSE - suma kvadrata grešaka; AARD - prosečna apsolutna relativna devijacija; Skew – "nazubljenost" krive raspodele; Kurt – "zakrivljenost" krive raspodele; Mean – srednja vrednost odstupanja; SD – standardna devijacija; Var – varijansa odstupanja.

Potencijal stvaranja biofilma se povećao za sve testirane sojeve nakon 48 i 72 sata perioda inkubacije. Prisustvo kalcijuma poboljšalo je adhezijski potencijal i stvaranje biofilma. Dobijeni rezultati za *B. licheniformis* u slučaju hranljive podloge bez jona kalcijuma (dodatak samo uree) u korelaciji su sa dobijenim rezultatima polukvantitativnog testa adhezije (slika 37a, tabela 20). Sa druge strane, dobijeni rezultati dve metode za analizu adhezionog i biofilmskog potencijala u prisustvu uree za sve ostale sojeve su različiti što sugeriše da polukvantitativni test adhezije ne može biti jedina analiza od značaja za ispitivanu sposobnost.

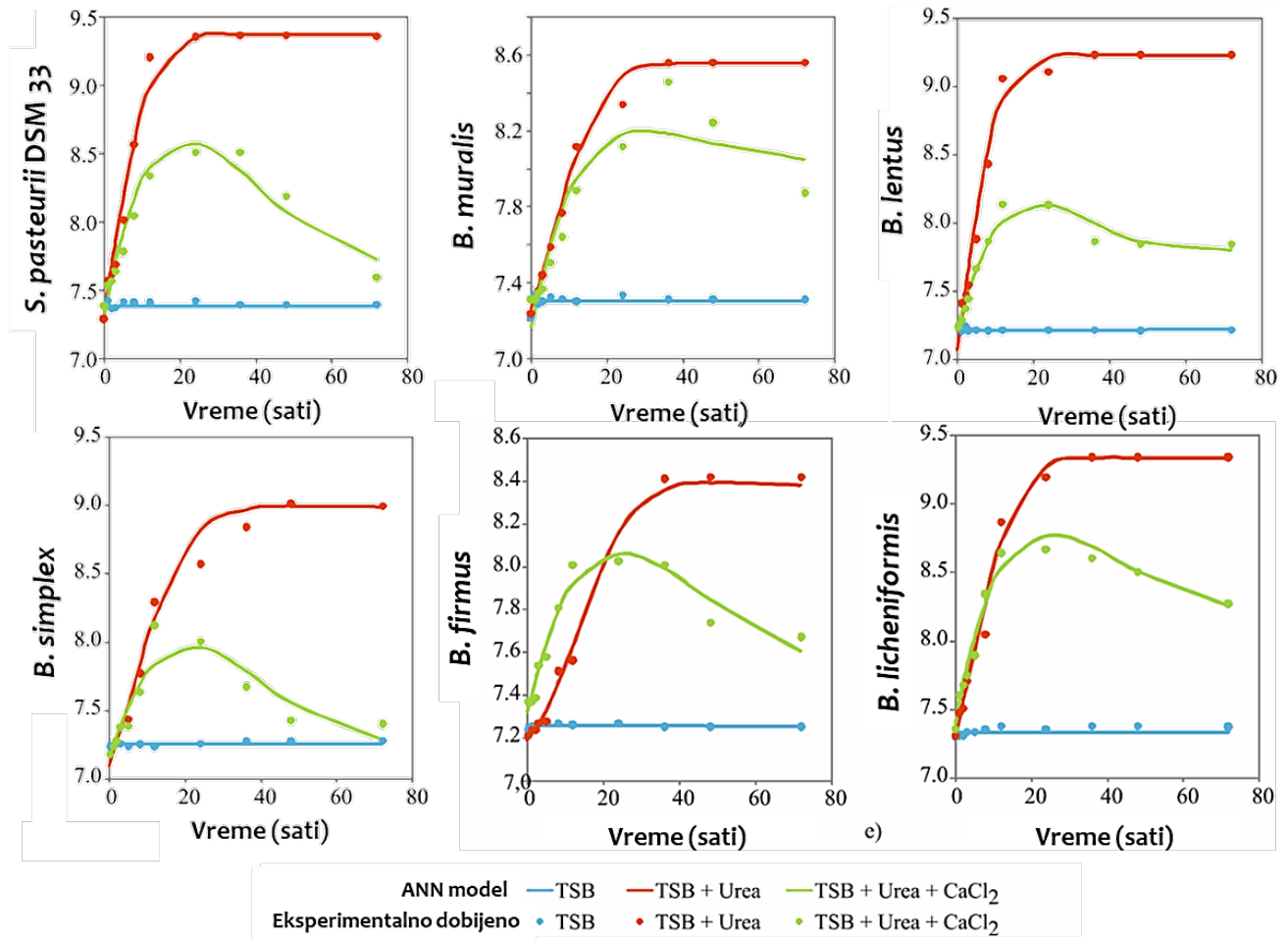


Slika 39. Eksperimentalno dobijene vrednosti uloge funkcije kalcijuma u formiranju biofilma

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 40, tokom inkubacije u TSB podlozi su primećene minimalne promene pH vrednosti kod svih testiranih bakterija. Ovaj trend je ukazao na prisustvo bakterijske aktivnosti, ali bez značajnih varijacija pH vrednosti, koje bi mogle uticati na BIPK proces i saturaciju sistema. Svi dobijeni rezultati ovog testa su upoređeni sa rezultatom blank uzorka (neinokulisana hranljiva podloga) koji je prikazan u Prilogu 20.

Sa druge strane, prisustvo uree izazvalo je brz i nagli porast pH vrednosti zbog produkcije amonijuma i karbonata za sve testirane sojeve. Na ovaj način postignuta je alkalizacija hranljivih podloga vrlo brzo, što obezbeđuje fizičke preduslove za efikasan BIPK proces (Zhu i Dittrich. 2016). Vrednosti pH su bile između 8,5 i 9,5 za sve bakterije nakon 36 sati inkubacionog perioda. Nadalje, samo sojevi *B. licheniformis* i *B. lentus* su postigli sličnu pH vrednost (skoro 9,5) kao referentni soj. Drugi testirani sojevi nisu prešli prag pH vrednosti od 9. Kako su sve pH vrednosti na kraju inkubacije bile između 7,5 i 9, može se zaključiti da je dostignut optimalni pH opseg za aktivnost enzima ureaze u sistemu (Kim i sar., 2018). Uočene razlike između testiranih bakterija su rezultat različitih nivoa ureolitičke aktivnosti usled naglih pH promena u sistemu.

U slučaju inkubacije odabranih bakterija u hranljivim podlogama sa ureom i kalcijumovim jonima početni brzi porast pH vrednosti prekinut je formiranjem CaCO_3 nakon 36 sati za referentni soj, *B. muralis* i *B. firmus*. Isti proces se dešava nakon 48 sati za ostatak sojeva. Uočeno je da su bakterijski sojevi *B. firmus* i *B. licheniformis* pratili slične trendove kao referentni soj (slika 40a, e-f), ali je *B. firmus* imao niži nivo pH promena. Ostali testirani sojevi su pokazali drugačije putanje tokom pH promena izazvanih BIPK procesom. U slučaju *B. simplex*, finalna pH vrednost je bila najbližnja početnoj pH vrednosti, dok ovaj parametar nije bio niži od 7,5 za sve ostale testirane bakterije. Kako je BIPK uslovljen pH vrednostima iznad 8 (Taylor, 2006), odigravanje ureolitičke aktivnosti i povećanje alkalnosti utiču pozitivno na zasićenje sistema potrebnim jonima i posledično odigravanje precipitacije u prisustvu aktivnih ureolitičkih ćelija.



Slika 40. Vrednosti pH promena tokom inkubacije

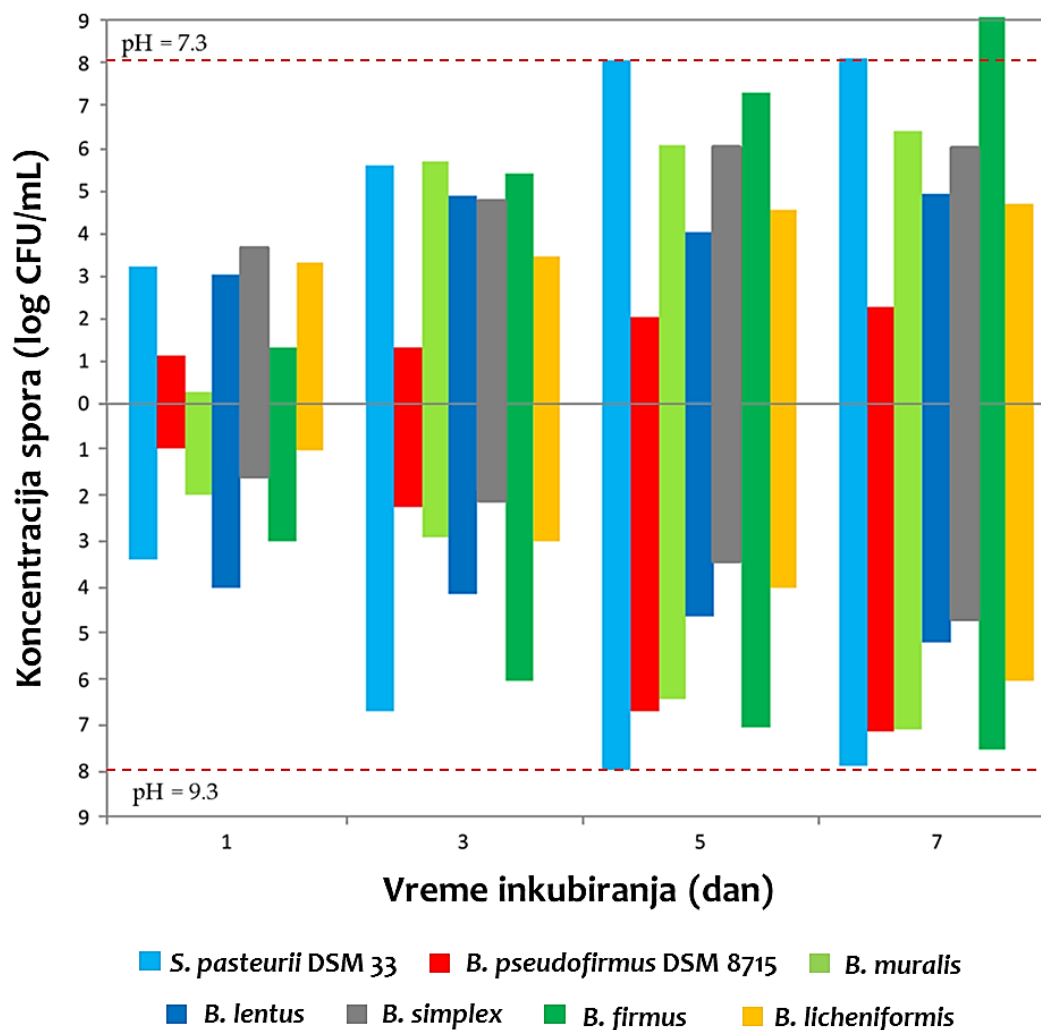
Dobijeni rezultati ispitivanja uloge ćelija alkalorezistentnih/alkalofilnih, ureolitičkih *Bacillus* sojeva pokazali su da svaka biokalcifikujuća bakterija može na različite načine doprineti produktivnosti CaCO₃. Proces BIPK zavisiće od fizičkih karakteristika i površinskih karakteristika ćelija, potencijala formiranja biofilma i prisustva kalcijuma, ali i promenama pH vrednosti u sistemu. Pored toga, dobijeni rezultati su, takođe, obuhvatili uporednu analizu ispitivanih izolata sa ureolitičkom bakterijom *S. pasteurii* DSM33 koja se neretko koristi u inženjerskim sistema na bazi bakteriogene precipitacije. Na osnovu sličnosti u dobijenim rezultatima između bakterija može se zaključiti da neke od njih, poput *B. simplex* i *B. licheniformis*, mogu da doprinesu BIPK procesu više od referentnog soja. Osim metaboličkih reakcija, koje osiguravaju izvor karbonatnih jona tokom BIPK, ćelije potencijalno deluju kao centri nukleacije CaCO₃.

5.4. Održivost i stabilnost bakterijske kulture odabranih izolata

5.4.1. Stepen sporulacije

Inženjerska primena procesa BIPK zahteva visoku brojnost spora jer ovi otporni oblici života bakterijama omogućavaju preživljavanje ekstremnih uslova, koji prethode indukciji precipitacije karbonata (Zhu i Dittrich, 2016). U slučaju postizanja saturacije sistema, dolazi do značajnih promena za bakterijsku ćeliju oko koje dolazi do stvaranja kristalnog depozita. Primarno visoka pH vrednost, nagle pH promene, smanjenje dostupnosti vode, kao i nagomilavanje kalcijuma na ćelijsku površinu tokom BIPK, može da dovede do stvaranja nepovoljnih uslova sredine i signalizacije bakteriji da otpočne formiranje spore (Zhang i sar., 2019). U tom smislu, inokulacija dovoljnom koncentracijom spora treba da bude jedan od prvih, esencijalnih koraka ka efikasnom procesu. Zhang i sar. (2019) su naglasili da optimalna koncentracija spora nije manja od 8 log CFU/mL. U cilju ispitivanja stepena sporulacije odabranih bakterijskih vrsta, koncentracija spora je praćena 7 dana pri inicijalnim pH vrednostima hranjive podloge TSB od 7,3 i 9,3, koje predstavljaju optimalne vrednosti za rast i ureolitičku aktivnost *S. pasteurii* (Kim i sar., 2018).

Kao što je prikazano na slici 41, samo *S. pasteurii* DSM 33 i *B. simplex* su dostigli 8 log CFU/mL pri pH vrednosti od 7,3. Druge ispitivane bakterije nisu prešle granicu od 6 log CFU/mL nakon 7 dana inkubacije. Pri pH vrednosti od 9,3, samo je kod *S. pasteurii* DSM 33 uočen stepen sporulacije od 8 log CFU/mL, dok su koncentracije spora ostalih bakterijskih vrsta bile između 4 i 7 log CFU/mL. Dobijene koncentracije spora postignute su smanjenjem koncentracije hranjivih sastojaka i nagomilavanjem ekstracelularnih produkata tokom duge inkubacije. Takođe, ova vrednost je postignuta bez dodavanja bilo koje supstance za ubrzavanje sporulacije (npr. Mn^{2+}) što može biti rešenje za efikasnije postizanje dovoljne koncentracije spora u daljim eksperimentima za sve testirane bakterije (Sharma i sar., 2017).

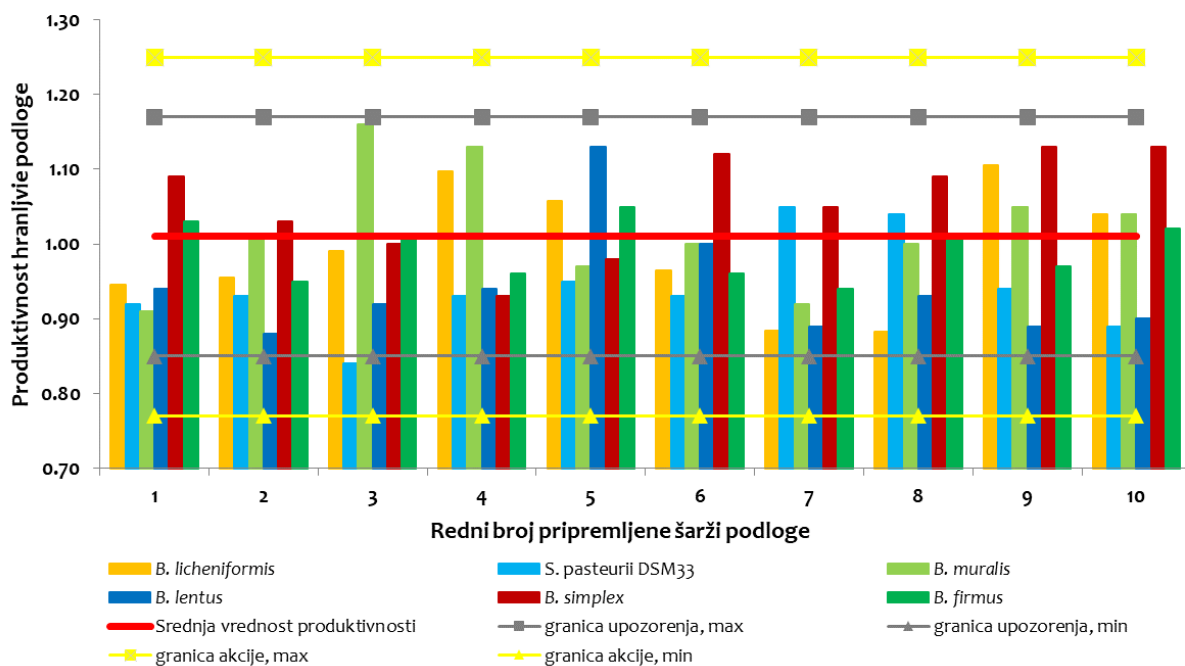


Slika 41. Stepen sporulacije u TSB podlozi sa različitim pH vrednostima

5.4.3. Produktivnost hranljivih medijuma

Kako su hranjive podloge osnova rada mikrobiološke laboratorije, kvalitet podloga može biti presudan za postizanje zadovoljavajućih rezultata. Iz toga sledi neophodnost uspostavljanja kontrole kvaliteta podloge i ispitavanje njene produktivnosti (Pepper i Gerba, 2015). Sa druge strane, biotehnoški procesi neretko zahtevaju primenu alternativnih podloga čiji sastav odgovara ciljanoj metaboličkoj putanji koja se u takvim uslovima vrši efikasnije (Chistia i Moo-Young, 2003).

U cilju analize produktivnosti alternativnog hranljivog medijuma za biokalifikaciju, urađeno je poređenje UA-CaCl₂ (test podloga) u odnosu na TSAU (referentna podloga). U istraživačkom radu Shukla i Karma (2016), Urea-CaCl₂ podloga je navedena kao optimalna podloga za maksimalan prinos CaCO₃ precipitata indukovanog ureolitima. U cilju produkcije biomase i izbegavanja precipitacije u ovom koraku, iz sastava hranljivog medijuma UA-CaCl₂ je izuzet izvor kalcijuma. Dobijeni rezultati produktivnosti 10 ispitivanih šarži pripremljene podloge za ureolitičke bakterije su dati na slici 42.



Slika 42. Produktivnost Urea-CaCl₂ hranljive podloge

Kvalitet testirane podloge je bez izuzetka bio zadovoljavajući, sa prosečnom produktivnošću od 0,94, 1,03, 0,94, 1,06, 0,99 i 0,99 za *S. pasteurii* DSM 33, *B. muralis*, *B. lentus*, *B. simplex*, *B. firmus* i *B. licheniformis*, redom. Dobijene vrednosti su u prihvatljivom opsegu (>0,7), preporučenom standardom SRPS EN ISO 11133:2015/A1:2018 (2015). Rezultat ukazuje da ova podloga predstavlja pogodnu alternativnu hranljivu podlogu za proizvodnju biomase ureolita. Značaj rezultata se ogleda u primeni Urea-CaCl₂ podloge koja može da se upotrebi za produkciju biomase (bez jona kalcijuma), ali i za sam BIPK proces (sa jonima kalcijuma),

čime se obezbeđuje kraća faza adaptiranja kultura na radne uslove. Sumarno, Urea-CaCl₂ podloga zadovoljava osnovne i specifične zahteve biotehnološkog postupka jer svojim sastavom obezbeđuje adekvatnu brzinu i prinos biomase. To znači da ova podloga ima zadovoljavajući odnos i oblik neophodnih makro- (C, N, O, P) i mikroelemenata za postizanje specifičnih efekata rasta mikroorganizama u laboratorijskim uslovima.

Kako hranljivi medijum može značajno da utiče i na ekonomske troškove bioprocasa, urađen je proračun troškova test medijuma u poređenju sa referentnom podlogom (tabela 23). Na osnovu dobijenih rezultata, cena koštanja test podloge je za 40% niža od referentne podloge. S obzirom da je urea najskuplja stavka obe podloge, u budućoj primeni BIPK trebalo bi razmisliti o njenoj zameni alternativnim, sekundarnim sirovinama koje imaju zadovoljavajući procenat ove komponente (npr. otpadna voda sistema đubrenja zasada u plastenicima i primarne proizvodnje mesne industrije).

Tabela 23. Cena koštanja* test i referentne hranljive podloge za produkciju biomase ureolita

Trypton soja podloga sa dodatkom uree			Urea-CaCl ₂ podloga		
Komponenta	Količina (g/L)	Cena (RSD)	Komponenta	Količina (g/L)	Cena (RSD)
• Pepton pankreasne digestije kazeina	15	307,94	• Pepton	0,015	0,2
• Peptični digestiv sojine sačme	5	177,01	• mesni ekstrakt	0,0045	0,0427
• NaCl	5	14,41	• ekstrakt kvasca	0,0045	0,07
• Urea	20	613,81	• NH ₄ Cl	10	46,89
• Destilovana voda	1 L	21,8	• NaCl	0,015	0,043
			• Urea	20	613,81
			• Destilovana voda	1 L	21,8
		Σ 1135,0			Σ 682,86

* cena koštanja formirana je na osnovnu pojedinačnih komponenti laboratorijske čistoće (sve cene su preuzete sa sajta proizvođača HiMedia, Mumbai, Indija);

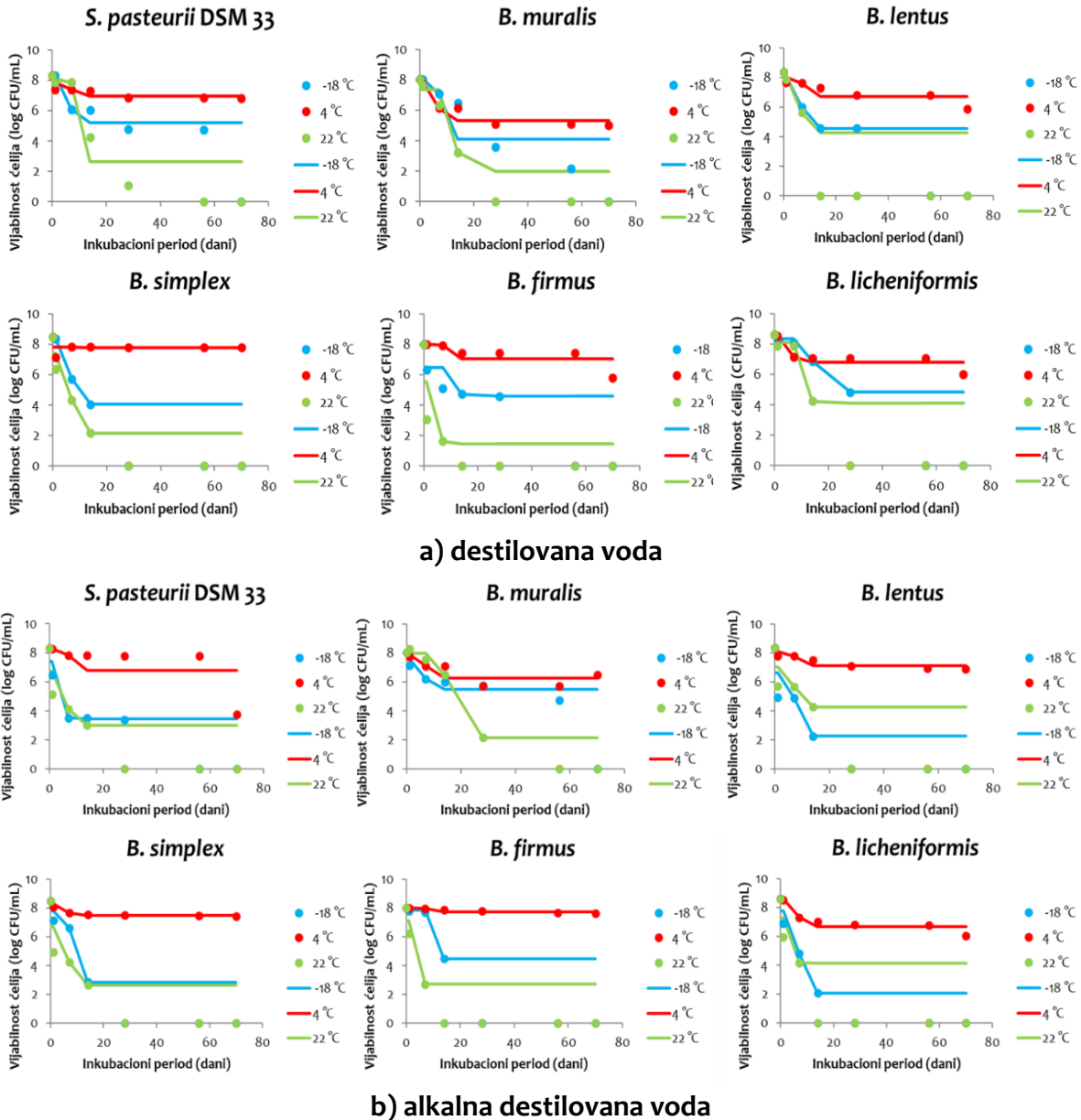
5.4.3. Održivost bakterijskih suspenzija

Rast bakterija i odigravanje metabolizma je rezultat niza enzimskih reakcija zavisnih od temperature spoljašnje sredine. Temperatura je jedan od najznačajnijih faktora koji određuju tok i intenzitet bakterijskog metabolizma. Razlog ovome je nepostojanje termoregulacije prokariotskih organizama. Dodatno, opšte je poznato da temperatura bitno utiče na brzinu hemijskih reakcija, pa se može očekivati i značajan uticaj na održivost bakterijskih ćelija u tečnim efluentima. Odnos „temperatura-vreme“ može značajno uticati na preživljavanje ćelija. Upravo manipulacija ovim odnosom smatra se rešenjem za redukovanje vijabilnosti kod bakterija. Upotreba ovakvog vida fizičkog stresa je efikasna metoda za indukovanje ćelijske inaktivacije i sprečavanje proliferacije u uzorku (Cabello-Olmo i sar., 2020).

U cilju ispitivanja održivosti bakterijskih kultura inkubiranih tokom 3 dana u TSB, testirana je vijabilnost bakterijskih suspenzija pripremljenih u sterilnoj destilovanoj vodi. Konkretno, održivost je praćena u destilovanoj (pH~7) i alkalnoj destilovanoj vodi (pH~9) tokom 70 dana na različitim temperaturama (-18, 4 i 22 °C). Rezultati prikazani na slici 43a-b ukazuju na slične uticaje temperature na održivost bakterijskih suspenzija, bez obzira na pH vrednost sredine. Naime, prilikom skladištenja bakterijskih suspenzija u neutralnoj i alkalnoj destilovanoj vodi na temperaturi od 22 °C došlo je do naglog opadanja vijabilnosti svih testiranih bakterija u početnim fazama ispitivanja. Najduža vijabilnost na ovoj temperaturi primećena je u slučaju ćelija referentnog soja suspendovanih u destilovanoj vodi i *B. muralis* u alkalnoj destilovanoj vodi. Kod ostalih sojeva uočen je potpuni gubitak vijabilnosti značajno ranije, nakon 14 ili 28 dana. Dobijeni rezultati sugerišu da vijabilnost bakterija na sobnoj temperaturi nije održiva nezavisno od soja.

Opšte je prihvaćeno da se održivost bakterijskih kultura povećava kada se temperatura skladištenja smanjuje. Iz tog razloga, preostale dve testirane temperature bile su vrednosti frižidera (4 °C) i zamrzivača (-18 °C). Na osnovu dobijenih rezultata uočljivo je da se održivost suspenzija u datim uslovima razlikuje na nivou soja, a da je u primenjenim uslovima bolji efekat imala temperatura frižidera. Konkretno, na temperaturi od 4 °C uočeno je samo početno smanjenje broja za oko jednu log jedinicu. Uzrok ovog smanjenja je inicijalni stres

izazvan niskom temperaturom. Daljim smanjenjem temperature, ispod tačke zamrzavanja vode došlo je do smanjenja stabilnosti i održivosti kultura, bez obzira na druge promenljive sistema. Održivost na temperaturama ispod tačke zamrzavanja vode je moguća uz dodatak krioprotektanta, što je od suštinskog značaja za očuvanje ćelijskog integriteta (Vidaković, 2019). Kako u vijale, koje su čuvane na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, nije dodato ovakvo sredstvo koje bi štitilo ćelije od nastalih kristala leda (npr. glicerol), smrt ćelije je bila skoro pa neizbežna.



Slika 43. Održivost vijabilnosti bakterijskih suspenzija (tačke označavaju eksperimentalno dobijene vrednosti; linije označavaju kinetičku predikciju sistema)

Verifikacija ANN modela, koja je definisala kinetičku predikciju održivosti bakerijskih suspenzija, sumirana je u tabeli 24. Na slici 43 uočava se odstupanje predviđene kinetike u odnosu na dobijene eksperimentalne rezultate za temperaturu 22 °C za većinu rezultata, što se ogleda i u širokom rasponu koeficijenta determinacije (0,45-0,99). Za vrednosti ispitivanja na temperaturi od 4 i -18 °C rezultati predikcije su bili značajno bolji, jer je postignut koeficijent determinacije između 0,8 i 0,99, uz nekoliko izuzetaka.

Ukoliko bi se bakterijske kulture redovno koristile (svakodnevno, nedeljno, i sl.), održavanje na temperaturama frižidera je ekonomski i energetski opravdan i manje zahtevan proces. Sa druge strane, neophodno je razmotriti i dugoročne načine skladištenja radi postizanja maksimalne održivosti i stabilnosti, poput odlaganja na temperature od -80 °C sa dodatkom krioprotektanta ili proces liofilizacije²³ (Miyamoto-Shinohara i sar., 2000).

²³ liofilizacija predstavlja postupak sušenja pri visokom vakuumu i pri vrlo niskim temperaturama, a u toku postupka sušenja je neophodan dodatak i krioprotektanta za maksimalno očuvanje vijabilnosti ćelija;

Tabela 24. Verifikacija ANN modela

Destilovana voda													
Bakterija	T (°C)	χ^2	RMSE	MBE	MPE	SSE	AARD	R ²	Skew	Kurt	Mean	SD	Var
S. pasteurii DSM 33	-18	0,28	0,399	1,2E-06	4,67	1,12	1,75	0,91	1,4	2,99	1,2E-06	0,43	0,19
	4	0,15	0,296	6,1E-07	3,17	0,61	1,66	0,65	0,29	-0,26	6,1E-07	0,32	0,10
	22	1,3	0,862	5,8E-05	28,09	5,2	3,66	0,87	0,00	2,65	5,8E-05	0,93	0,87
B. muralis	-18	2,43	1,177	2,6E-06	19,88	9,70	4,85	0,68	0,8	3,00	2,6E-06	1,27	1,62
	4	0,23	0,366	7,2E-07	4,77	0,94	1,95	0,90	1,81	3,38	7,2E-07	0,39	0,16
	22	0,41	0,481	-2,2E-06	4,12	1,62	2,03	0,89	-1,1	3,00	-2,2E-06	0,52	0,27
B. lentus	-18	0,04	0,149	1,5E-06	1,06	0,16	0,58	0,99	0,00	2,97	1,5E-06	0,16	0,03
	4	0,33	0,434	2,3E-06	4,89	1,32	2,33	0,66	-0,76	0,85	2,3E-06	0,47	0,22
	22	0,03	0,131	-2,1E-07	0,87	0,12	0,49	0,97	0,00	3,00	-2,1E-07	0,14	0,02
B. simplex	-18	0,003	0,038	-1,0E-06	0,24	0,01	0,14	0,99	0,00	3,00	-1,0E-06	0,04	0,002
	4	0,22	0,358	1,8E-06	2,54	0,9	1,38	0,90	0,00	2,99	1,8E-06	0,4	0,15
	22	0,57	0,572	-9,4E-07	4,22	2,29	2,14	0,9	0,00	3,00	-9,4E-07	0,62	0,38
B. firmus	-18	1,08	0,784	1,7E-06	6,99	4,30	3,08	0,48	0,39	3,00	1,7E-06	0,85	0,72
	4	0,49	0,529	3,3E-06	5,32	1,96	2,42	0,45	-1,98	4,40	3,3E-06	0,57	0,33
	22	3,07	1,325	1,8E-07	16,07	12,29	4,96	0,45	0,00	3,00	1,8E-07	1,43	2,05
B. licheniformis	-18	0,04	0,142	9,4E-07	0,95	0,14	0,56	0,99	0,38	3,00	9,4E-07	0,15	0,02
	4	0,20	0,341	2,0E-06	3,57	0,82	1,64	0,84	-1,97	4,33	2,0E-06	0,37	0,14
	22	0,09	0,233	3,2E-06	1,75	0,38	1,01	0,97	1,40	3,00	3,2E-06	0,25	0,06
Alkalna destilovana voda													
S. pasteurii DSM 33	-18	0,42	0,49	1,9E-06	4,05	1,68	1,94	0,92	0,00	2,94	1,9E-06	0,53	0,28
	4	3,06	1,32	3,4E-06	17,14	12,22	6,1	0,21	-1,98	4,4	3,4E-06	1,43	2,04
	22	1,26	0,85	1,4E-06	7,13	5,04	3,18	0,68	0,00	3,00	1,4E-06	0,92	0,84
B. muralis	-18	0,32	0,43	-1,4E-07	5,81	1,29	2,41	0,80	-0,68	-0,59	-1,4E-07	0,46	0,22
	4	0,34	0,44	2,6E-06	5,43	1,37	2,45	0,73	0,63	0,47	2,6E-06	0,48	0,23
	22	0,07	0,2	5,7E-07	1,46	0,27	0,81	0,99	-0,78	3,00	5,7E-07	0,21	0,05
B. lentus	-18	1,46	0,91	-1,1E-06	7,89	5,84	3,42	0,69	0,00	3,00	-1,1E-06	0,99	0,97
	4	0,09	0,23	4,4E-07	2,51	0,37	1,32	0,79	0,70	-0,91	4,4E-07	0,25	0,06
	22	0,87	0,71	1,9E-06	5,58	3,49	2,64	0,6	0,00	3,00	1,9E-06	0,76	0,58
B. simplex	-18	0,24	0,37	1,5E-06	2,53	0,94	1,37	0,95	0,00	3,00	1,5E-06	0,4	0,16
	4	0,02	0,12	1,7E-06	0,96	0,09	0,54	0,90	0,01	2,25	1,7E-06	0,13	0,02
	22	1,58	0,95	2,1E-06	8,14	6,32	3,56	0,65	0,00	3,00	2,1E-06	1,03	1,05
B. firmus	-18	0,01	0,08	-1,9E-04	0,63	0,05	0,34	0,99	1,13	3,06	-1,9E-04	0,09	0,01
	4	0,01	0,07	1,7E-06	0,7	0,04	0,38	0,76	0,15	-0,33	1,7E-06	0,08	0,01
	22	0,39	0,47	1,1E-06	3,61	1,57	1,77	0,89	0,00	3,00	1,1E-06	0,51	0,26
B. licheniformis	-18	0,36	0,46	-1,7E-06	3,17	1,45	1,70	0,94	0,00	3,00	-1,7E-06	0,49	0,24
	4	0,14	0,28	2,5E-06	2,89	0,55	1,33	0,9	-1,52	3,63	2,5E-06	0,30	0,09
	22	0,9	0,72	1,3E-06	5,45	3,59	2,68	0,64	0,00	3,00	1,3E-06	0,77	0,6

χ^2 – redukovani hi-kvadrat; MBE – srednje greške odstupanja; RMSE – koren kvadrata srednje greške; MPE – srednja procentualna greška; R² – koeficijent determinacije; SSE – suma kvadrata grešaka; AARD – prosečna apsolutna relativna devijacija; Skew – "nazubljenost" krive raspodele; Kurt – "zakrivljenost" krive raspodele; Mean – srednja vrednost odstupanja; SD – standardna devijacija; Var – varijansa odstupanja.

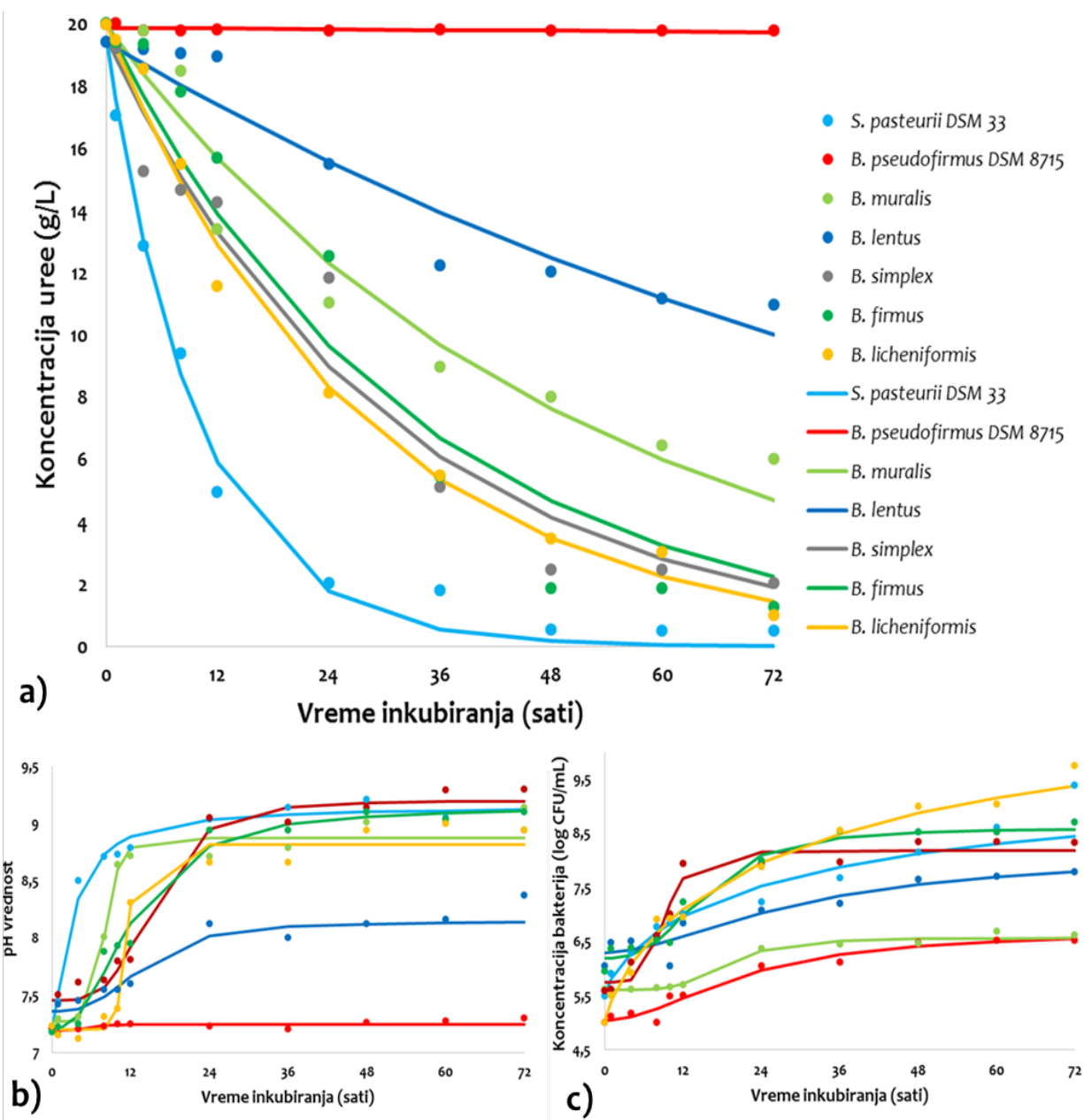
5.5. Praćenje procesa ureolize i definisanje kinetičkih modela

Ureolitičke bakterije mogu da indukuju alkalizaciju okoline ekstracelularnom produkcijom NH_4^+ i CO_3^{2-} jona obezbeđujući supersaturaciju sistema. Teorijski, to znači direktnu korelaciju između brzine hidrolizovane uree i efikasnosti precipitacije (Fujita i sar., 2000). Posledično, varijabilnost u brzini promene pH vrednosti i količine hidrolizovane uree između sojeva bakterija ukazuju na razlike u kinetičkom profilu ureolitičkih reakcija (Mitchell i sar., 2019).

Praćenje procesa ureolize je podrazumevalo inkubaciju odabranih bakterija u UB- CaCl_2 podlozi tokom 72h. Kao pozitivna kontrola ureolitičke aktivnosti primenjena je *S. pasteurii* DSM 33, dok je negativna kontrola bila bakterija *B. pseudofirmus* DSM 8715. Dobijeni rezultati su poslužili za definisanje matematičkih parametara procesa i uklapanje u kinetičke modele. Identičan postupak je ponovljen za praćenje hidrolize uree, promene pH vrednosti i prinos biomase tokom ureolitičke aktivnosti (slika 44).

5.5.1. Kinetika hidrolize uree

Praćenjem hidrolize uree, uočen je negativni eksponencijalni trend od momenta inokulacije. Prema kinetičkim modelima (slika 44a, tabela 25), prediktivne vrednosti u tačkama uzorkovanja su se veoma dobro uklapale u eksperimentalno dobijene podatke. Za predložene kinetičke modele svi koeficijenti determinacije su bili veći od 0,88. Koeficijenti regresije ovih modela sumirani su u tabeli 25 na osnovu trendova (brzina i intenzitet) procesa ureolize ispitivanih bakterija. U Prilogu 19 su prikazani stepeni prilagođavanja eksperimentalnih i prediktivnih rezultata, kao i rezidualna analiza kvaliteta uklapanja modela. Neznatna greška testova prilagođavanja znači da predloženi modeli predstavljaju proces na zadovoljavajući način. Na kraju perioda inkubacije je količina preostale uree bila između 2,5 i 54,9% početne koncentracije, zavisno od soja bakterije. Najveća sličnost u kinetici ureolize zapaža se između *B. simplex*, *B. firmus* i *B. licheniformis* (slika 44a), ali sa različitim koncentracijama preostale uree na kraju inkubacije: 10,06, 6,23 odnosno 5,01%, redom.



Slika 44. Kinetička studija: a) proces ureolize; b) pH promene; c) koncentracije bakterija (tačke označavaju ekperimentalno dobijene podatke, a linije prediktivne rezultate)

5.5.2. Kinetika pH promena i koncentracije bakterija u toku ureolitičke aktivnosti

Promene pH vrednosti hranljivih podloga tokom perioda inkubiranja prikazane su na slici 44b. Vrednost pH se vremenom povećavala prateći sigmoidalan oblik krive. Konstantna vrednost kod svih bakterije postignuta je tokom 36 sati inkubiranja. Kod negativne kontrole neureolitičkog soja *B. pseudofirmus* DSM 8715 nije uočen metabolički odgovor na prisustvo uree i promene pH vrednosti, ali je detektovana bakterijska aktivnost. Dobijene vrednosti koeficijenta determinacije za ureolitičke sojeve je bila iznad 0,82, te se može zaključiti da je matematičko modelovanje urađeno na adekvatan način. Dobijeni modeli se mogu opisati kao jednostavniji i robusni, sa visokim predikcionim potencijalom za dati set parametara.

Tabela 25. Regresioni koeficijenti odabranih parametara u trodnevnom ureolitičkom procesu

Koeficijent		S.	B.	B.	B.	B.	B.	B.
		<i>pasteurii</i>	<i>pseudofirmus</i>	<i>muralis</i>	<i>lentus</i>	<i>simplex</i>	<i>firmus</i>	<i>licheniformis</i>
Koncentracija uree	k_{Urea}	0,10	0,00	0,02	0,01	0,03	0,03	0,04
	C_{Urea}	19,45	19,878	19,95	19,42	19,55	19,99	19,99
	d	9,15	7,24	8,87	8,14	9,2	9,14	8,812
pH promene	a	7,19	7,19	7,27	7,36	7,45	7,19	7,2
	c	3,07	5,54	8,13	13,85	15,35	12,33	11,40
	b	1,37	5,28	7,43	2,99	4,01	2,37	15,30
	d	9,90	6,68	6,567	8,11	8,18	8,6	11,66
Koncentracija bakterija	a	5,55	5,05	5,61	6,3	5,75	6,2	5,03
	c	30,00	20,89	18,71	30,00	9,16	15,20	32,15
	b	0,79	1,96	4,49	1,78	4,93	2,95	0,8

a - minimalna vrednost koja je eksperimentalno određena (blizu početke vrednosti $t=0$), d - maksimalna vrednost koja je očekivana, c - prevojna tačka (tačka na S-krivoj između tača a i d) i b - Hill-ov nagib krive (nagib krive u tački c).

U toku procesa ureolize, biomasa se intenzivno umnožavala za sve ureolitičke sojeve (slika 44c), prateći sigmoidalni oblik krive. Faza prilagođavanja rasta (lag faza) pri hidrolizi uree je primećena u toku prvog sata kod *B. muralis*, *B. lentus* i *B. simplex*. Takođe, može se uočiti trenutak prelaska iz eksponencijalne faze (log faza) u stacionarnu fazu rasta za sve sojeve bakterija nakon 36 sati, što odgovara završetku intenzivnog smanjenja uree. Koeficijenti determinacije veći od 0,88, kao i vrednosti koeficijenata regresije, ukazuju na visok stepen poklapanja kinetičkih modela. Adekvatnost dobijenih modela se ogleda u visokom stepenu predikcije, kao i kod procesa hidrolize uree i promene pH vrednosti.

5.6. Praćenje procesa BIPK i definisanje kinetičkih modela

U prisustvu jona kalcijuma ureolitičke bakterije, koje proizvode ekstraselularne karbonatne jone, indukuju precipitaciju kristala CaCO_3 . Morfologija i količina nastalog precipitata je u korelaciji sa koncentracijom supstrata, faktorima okoline, kao i nivoom inokulacije ciljane bakterije (Okwadha i Li, 2010). Da bi se procenila efikasnost BIPK i uočile razlike u ponašanju bakterija, precipitacija je praćena tokom 14 dana inkubacije na $30\text{ }^\circ\text{C}$ za sve odabrane bakterije (slika 45). Uz glavni proces, u istim vremenskim tačkama, definisani su uticaji pH promena i koncentracije slobodnog kalcijuma u sistemu.

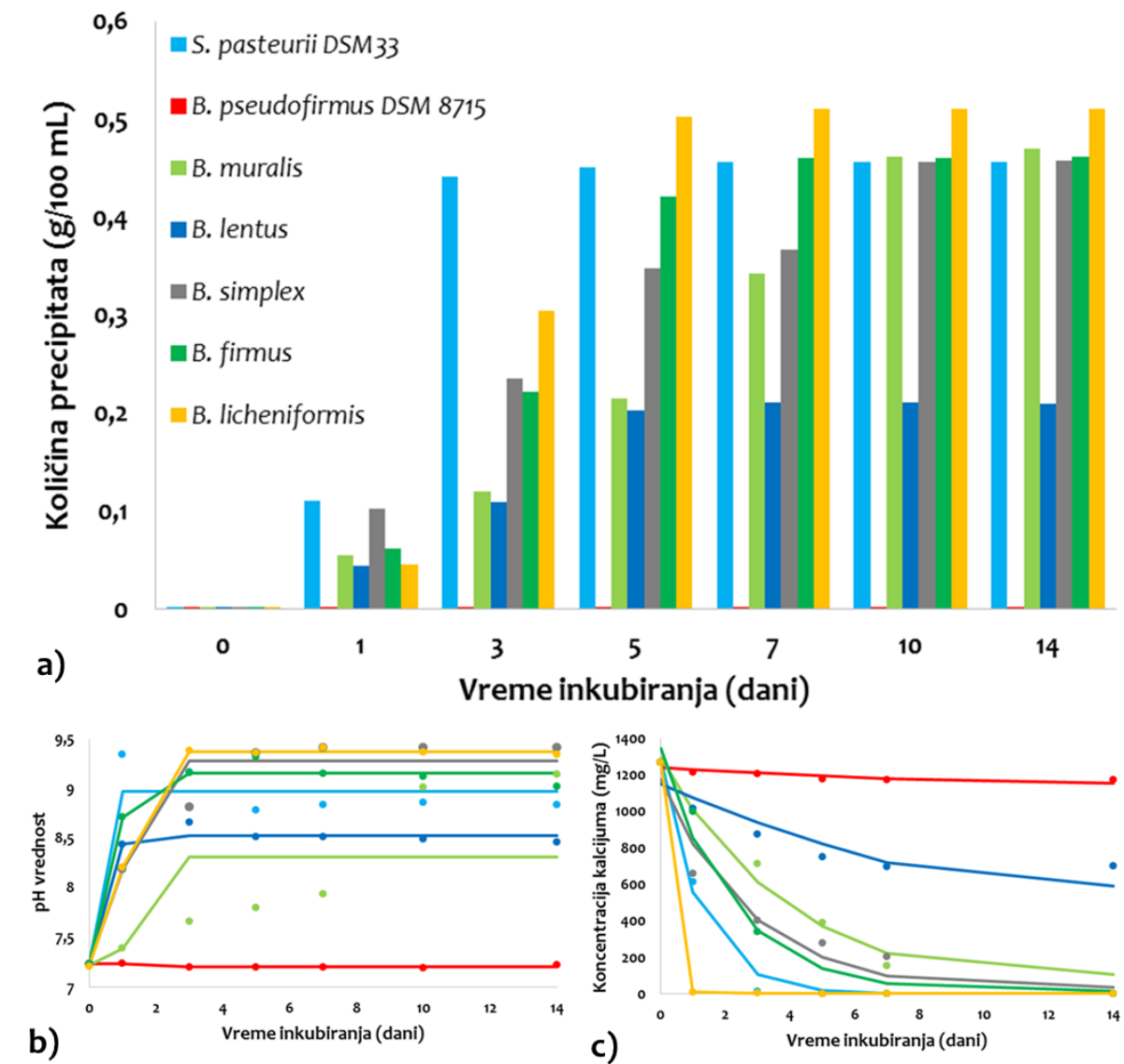
5.6.1. Kinetika procesa bakterijski indukovane precipitacije

Kao jedan od glavnih odgovora sistema u proceni BIPK efikasnosti odabrana je količina nastalog precipitata. Precipitat je vizuelno uočen ubrzo nakon inokulacije UB- CaCl_2 medijuma, za svega 6 sati inkubacionog perioda. Jedini izuzetak je bila inkubacija bakterije *B. lentus* kod koje je pojava taloga primećena tek za 24 sati. Primetno je da je kod svih ostalih bakterijskih izolata indukovana veća količina taloga nego u ogledu sa referentnom *S. pasteurii* DSM 33 (slika 45a). Jedini bakterijski soj koji se istakao brzinom indukovanja precipitacije, kao i količinom precipitata, bio je *B. licheniformis*. Upoređujući druge izolate sa ureolitičkim referentom, može se uočiti sličnost u količini precipitata, ali i sporija brzina precipitacije. Takođe, primetna je manja količina taloga kod *B. lentus*, što je u korelaciji sa dobijenim rezultatima kinetike ureolize (slika 45a).

5.6.2. Kinetika pH promena i koncentracije kalcijuma

Svih pet ureolitičkih izolata bilo je sposobno da promeni alkalnost sistema kroz indukciju BIPK procesa. Povećanje pH vrednosti je iznosilo približno dve pH jedinice (slika 45b). Maksimalne pH vrednosti postignute su nakon tri dana inkubacije u slučaju *B. lentus* i *S. pasteurii* DSM 33, dok je najviša alkalnost za ostale izolate primećena nakon petog dana inkubacije. Dobijeni rezultati su u korelaciji sa kinetikom pH promena, koja je prikazana na slici 40, gde je takođe uočeno intenzivno povećanje alkalnosti u početnim fazama BIPK

procesa. Međutim, u toku inkubacije u UB-CaCl₂ podlozi je uočena stabilizacija pH vrednosti na oko 9 i održavanje alkalnosti tokom precipitacije (slika 45b), dok se inkubacijom u TSBU sa dodatkom CaCl₂, postignuta alkalnost u inicijalnim fazama smanjila na pH vrednosti između 7,5 i 8 u momentima otpočinjanja procesa BIPK.



Slika 45. Kinetička studija: a) količine precipitata; b) pH promena; c) koncentracije kalcijuma (za b) i c) tačke označavaju eksperimentalno dobijene podatke, a linije označavaju rezultate predikcije

U svim eksperimentima sa ureolitičkim bakterijama koncentracija kalcijuma smanjila se blizu granice detekcije nakon približno pet dana (slika 45c). *B. licheniformis* može u potpunosti mineralizovati slobodni kalcijum iz tečne hranljive podloge, smanjujući koncentraciju ovog jona za 99% u prva 24 sata. S druge strane, kalcifikacija kalcijuma indukovana prisustvom *S. pasteurii* DSM 33 i *B. simplex* bila je primetno sporija, te se završila u toku prve inkubacione nedelje. U slučaju *B. muralis* i *B. lentus*, koncentracija slobodnih jona kalcijuma se postepeno smanjivala tokom inkubacionog perioda. Ovi rezultati mogu biti u korelaciji sa fizičkim predispozicijama pojedinačnih ćelija (slika 36), te opravdavaju pretpostavku da ćelije manje specifične površine i zapremine mogu više da doprinesu procesu BIPK kroz bržu saturaciju jona od većih ćelija sa istim nivoom ureolitičke aktivnosti.

Sumarno, stope redukcije koncentracije slobodnih jona kalcijuma prate proces precipitacije neorganskog depozita i promene pH vrednosti. Uzimajući u obzir činjenicu da negativno naelektrisani bakterijski zidovi deluju kao apsorberi pozitivnih jona i posreduju u stvaranju kristala kao centri nukleacije, vijabilnost održivih i dostupnih bakterijskih ćelija nije uzeta u obzir kao merljiv odziv sistema, kao što je to bio slučaj kod procesa ureolize. Tabela 26 i Prilog 20 sumiraju kvalitet i rezidualnu analizu dobijenih kinetičkih modela za BIPK proces. Stepenn uklapanja između eksperimentalnih merenja i rezultata izračunatih modela je veoma dobar, sa minimalnom vrednošću koeficijenta determinacije od 0,85.

Tabela 26. Regresioni koeficijenti odabranih parametara u dvonedeljnom BIPK procesu

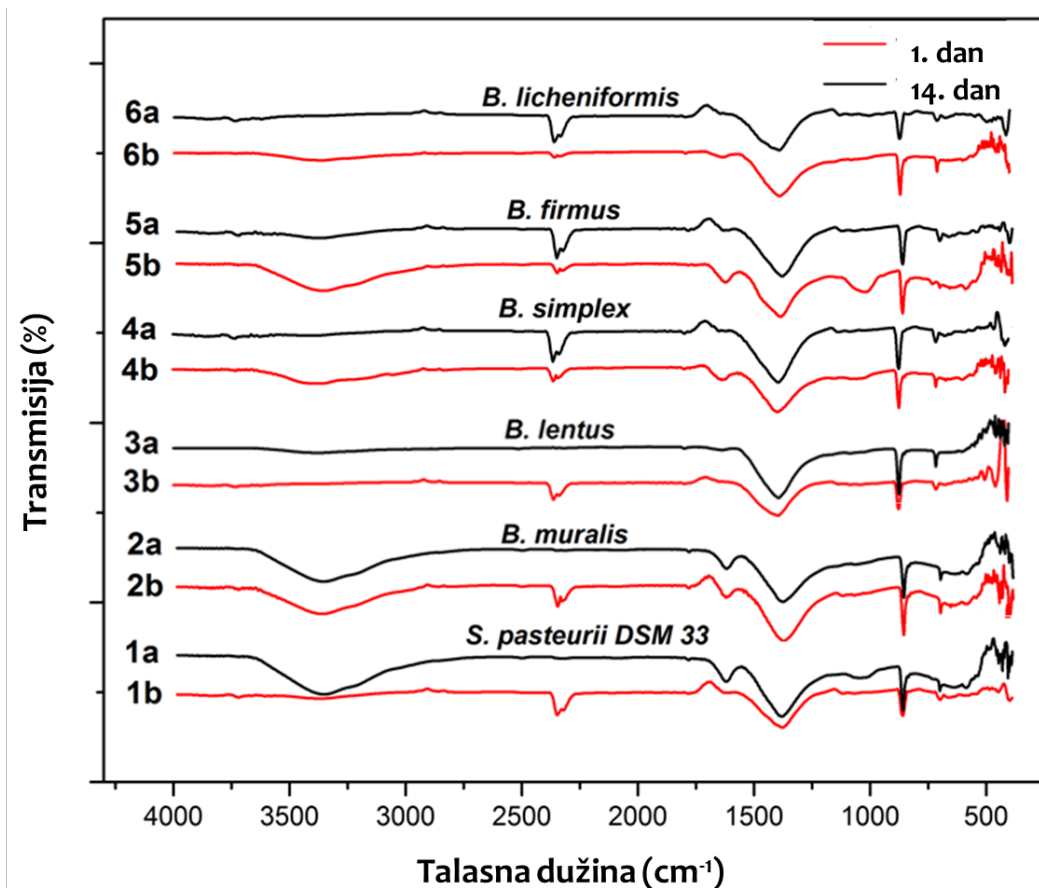
	Koeficijent	<i>S. pasteurii</i>	<i>B. pseudofirmus</i>	<i>B. muralis</i>	<i>B. lentus</i>	<i>B. simplex</i>	<i>B. firmus</i>	<i>B. licheniformis</i>
Količina precipitata	d	0,46	0,001	0,57	0,21	0,56	0,47	0,51
	a	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	c	1,32	5,78	5,88	2,98	3,69	3,04	2,82
	b	4,09	2,56	2,06	5,97	1,22	3,75	6,00
pH promene	d	8,97	7,20	8,31	8,53	9,28	9,15	9,37
	a	7,23	7,23	7,22	7,23	7,23	7,23	7,21
	c	0,50	1,78	1,07	0,89	1,01	0,95	1,01
	b	19,17	19,06	24,99	22,89	19,00	25,00	24,55
Koncentracija kalcijuma	$k_{\text{precipitat}}$	0,84	0,01	0,251	0,07	0,36	0,45	4,84
	$c_{\text{Ca}^{2+}}$	1282,34	1237,18	1294,89	1146,27	1171,96	1340,89	1266,00

a - minimalna vrednost koja je eksperimentalno određena (blizu početne vrednosti $t=0$), d - maksimalna vrednost koja je očekivana, c - prevojna tačka (tačka na S-krivoj između tača a i d) i b - Hill-ov nagib krive (nagib krive u tački c).

5.7. Karakterizacija precipitata

Uzimajući u obzir da sve testirane ureolitičke bakterije izazivaju precipitaciju neorganskog depozita, urađena je strukturna karakterizacija dobijenih precipitata iz prethodnog oglada (posle prvog i poslednjeg dana inkubacije). Ovaj korak je urađen i radi definisanja uticaja vremena inkubacije na nastajanje, sazrevanje i morfologiju kristala.

Precipitati su prvo analizirani upotrebom FT-IR spektroskopije i XRD difrakcije (slike 46 i 47). Prema naučnim podacima, karakteristični FT-IR signali za karbonate su na: $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ (ν_3 – dvostruko degenerisana asimetrična vibracija istezanja), $\sim 870\text{ cm}^{-1}$ (ν_2 – vibracija savijanja) i između 700 i 746 cm^{-1} (ν_4 – dvostruko degenerisana vibracija savijanja). Takođe se može detektovati apsorpcioni pojas na talasnoj dužini $1100\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ (ν_1 - simetrična vibracija sa višom frekvencijom), ali je manje primetan i ne mora se uzeti u obzir tokom identifikacije karbonatne faze (Henry i sar., 2017).



Slika 46. FT-IR analiza precipitata

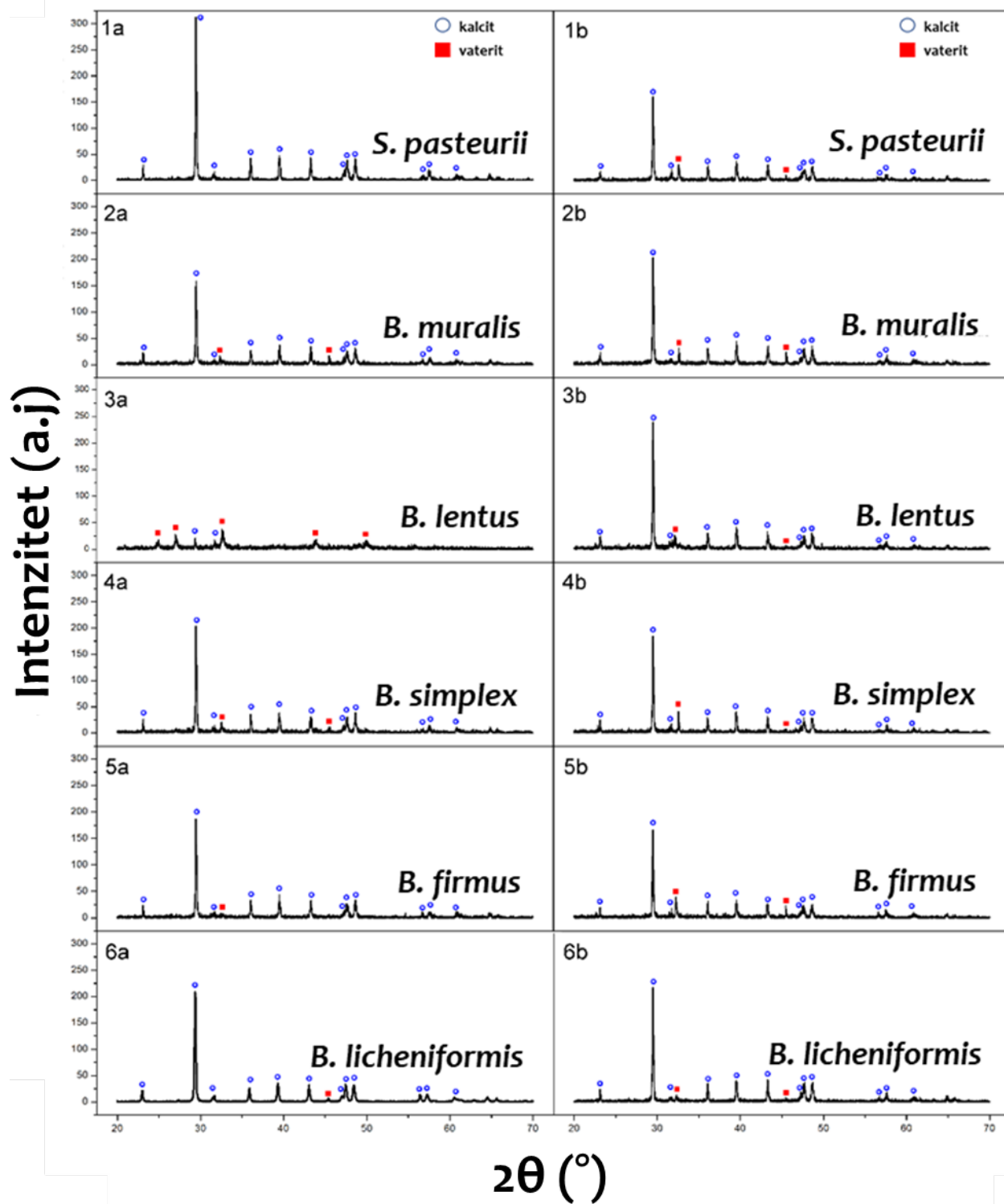
Na dobijenim FT-IR spektrima precipitata je uočljivo prisustvo karbonata u svim ispitivanim uzorcima. Kod svakog od precipitata su se javila bar 3 osnovna pika (ν_2 , ν_3 , ν_4) prilikom snimanja. Za sve prekonoćne precipitate može se primetiti pojava dodatnih pikova na talasnim dužinama 3650-3250, 1600, 1550-1480 i oko 600 cm^{-1} koji predstavljaju pikove povezane sa amino i organskim grupama. To sugerise da upotrebljeni UB- CaCl_2 medijum nije u potpunosti iskorišćen nakon 24 sata. Međutim, isti ti pikovi su bili značajno manje primetni kod uzoraka na kraju inkubacionog perioda.

Dobijeni XRD obrasci su stavljeni na istu skalu radi boljeg vizuelnog poređenja intenziteta difrakcionih pikova koji su identifikovani na osnovu standardnih obrazaca kalcita²⁴ i vaterita²⁵ (slika 47). Precipitati *B. muralis*, *B. firmus* i *B. simplex* su sadržali faze kalcita i vaterita prvog dana inkubacije. Pikovi karakteristični za kalcit su bili mnogo izraženiji u odnosu na pikove vaterita. Intenzitet pikova vaterita blago se povećava nakon 14 dana inkubacije što ukazuje na unapređenu ortorombičnu fazu kristalizacije na kraju inkubacionog perioda. U ova tri uzorka sadržaj vaterita je najveći u talogu indukovanom aktivnošću *B. firmus*. Izuzetak u pogledu dinamike formiranja karbonatnih faze može se uočiti u talogu koji je *B. lentus* indukovao tokom prvog dana inkubacije. Konkretno, identifikovana faza je pretežno bila sastavljena od vaterita. Nasuprot tome, talog ove bakterije, koji je sakupljen poslednjeg dana inkubacije, sastojao se uglavnom od kalcitne faze, sa vrlo niskim intenzitetom vateritne faze. Talog indukovao aktivnošću *B. licheniformis* je imao sličnu strukturu kao talog referentnog soja *S. pasteurii*, ogledajući se u visokokristalnoj kalcitnoj fazi prvog dana i sa tragovima vaterita u talogu posle 14 dana inkubacije.

Sumarno, primenjeni eksperimentalni uslovi u procesu BIPK su bili dovoljni za postizanje indukcije kristala kalcijum karbonata koje su se sastojale od dve faze na startu procesa, vaterita i kalcita, odnosno monofaze, pretežno kalcita, na kraju inkubacije. Jedina značajnija razlika se ogleda u precipitatima nakon prvog dana. Naime, *B. lentus* indukuje dominantno vaterit, dok precipitati *S. pasteurii* i *B. licheniformis* predstavljaju monofazu kalcita.

²⁴ COD ref. kod 96-450-2444

²⁵ COD ref. kod 96-300-0001

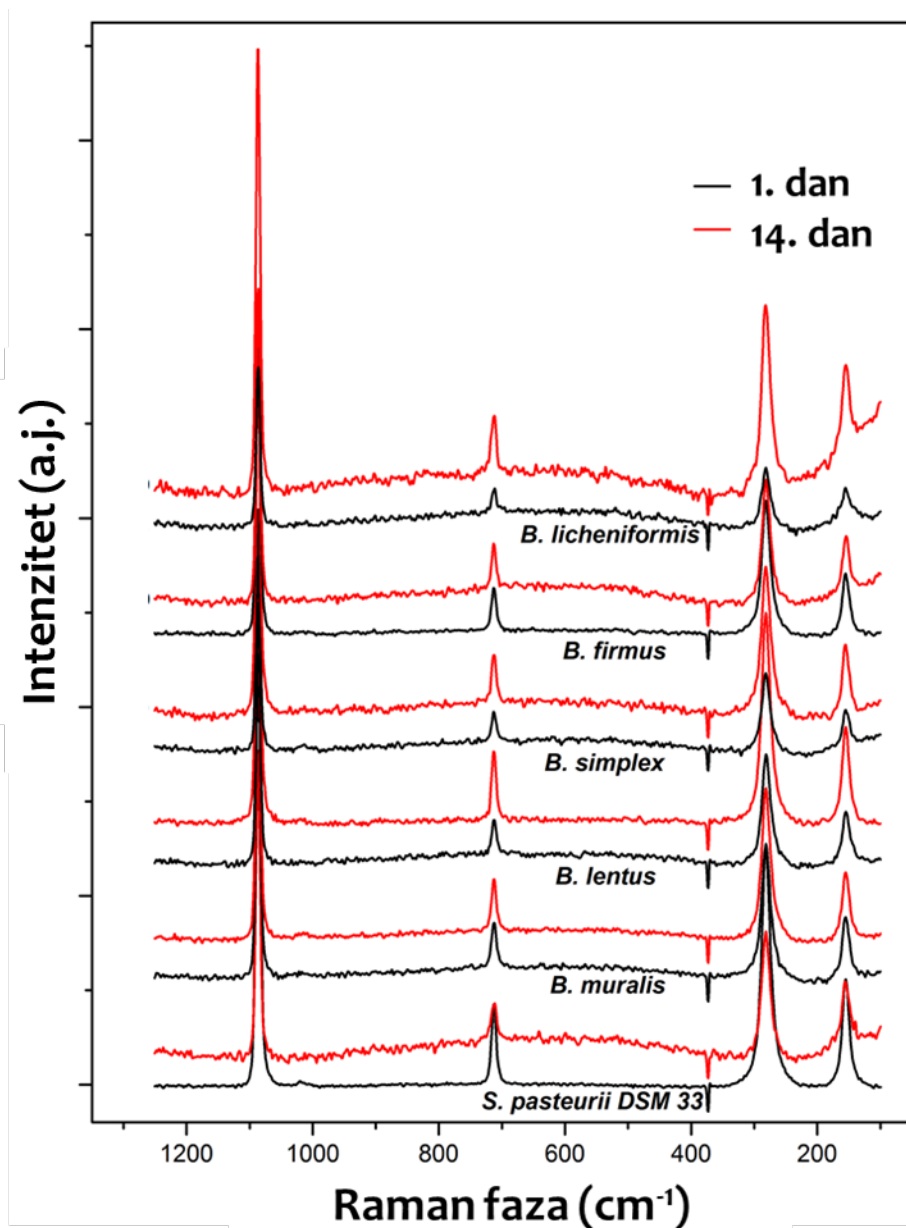


Slika 47. XRD spektri precipitata (a – prvi dan inkubacije; b – 14. dan inkubacije)

Dobijeni rezultati XRD identifikacije karbonatnih faza se slažu sa istraživanjem Tepe i sar. (2019) u kojem je utvrđeno da *Bacillus* sojevi indukuju precipitaciju mešavine kalcita i vaterita. U zavisnosti od eksperimentalnih uslova, *S. pasteurii* DSM 33 ima tendenciju da utiče na sazrevanje isključivo kalcitne faze (Hsu i sar., 2018, Peng i sar., 2019) ili smeše kalcita i vaterita (Heveren i sar., 2019). Wei i sar. (2015) su dokazali indukciju kalcita ćelijama *B. lentus*, dok su različite naučne grupe izvestile da *B. licheniformis* može indukovati formiranje taloga čistog kalcita (Vahabi i sar., 2013, Golovkina i sar., 2020). U saglasnosti sa dobijenim rezultatima ovog istraživanja su i rezultati Ivanove i sar. (2020), koji primećuju da *B. licheniformis*, izolovan iz sedimenata, indukuje formiranje monofaznog vaterita na početku, odnosno kalcita nakon dvonedeljnog perioda.

Prema Saracho i sar. (2020), morfologija CaCO_3 zavisi od spregnutog efekta različitih nivoa ureolitičkih aktivnosti, a shodno tome, i kinetičkoj putanji samog BIPK procesa. Interakcija između strukturne vode i funkcionalnih grupa specifičnih za ćelijski zid bakterija ključna je za stabilizaciju morfologije kristala. Zanimljivo je da se kalcit i aragonit smatraju najčešćim bakterijskim karbonatima (Donnelly i sar., 2017), dok rezultati ovog istraživanja ukazuju da je precipitacija vaterita češća nego što se očekuje ili da ova faza podleže brzim strukturnim promenama tokom sazrevanja kristala, te da nije uočljiva u svim periodima inkubiranja.

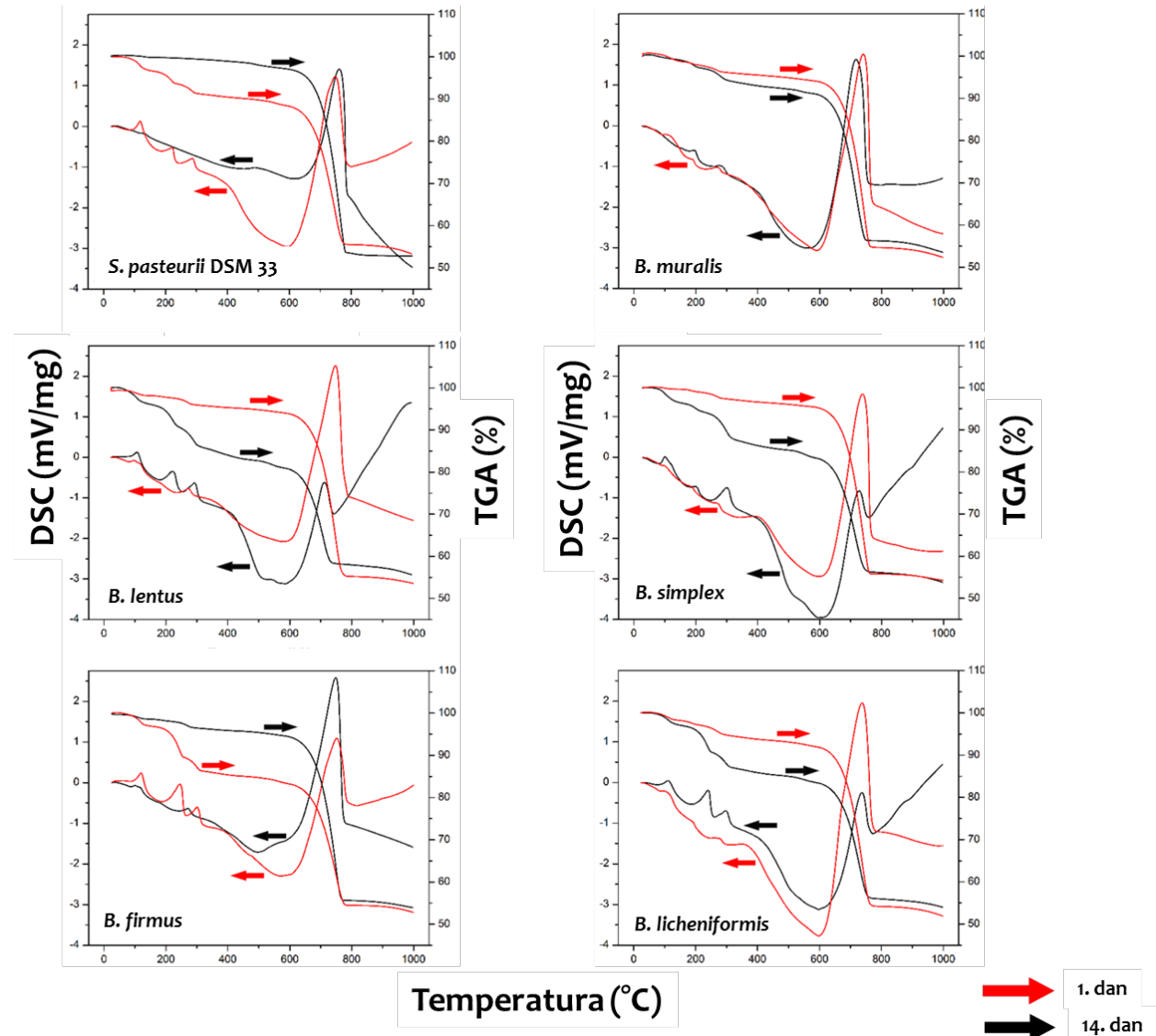
Da bi se detaljnije ispitale potencijalne razlike dobijenih precipitata u pogledu fazne karakterizacije, svi uzorci su analizirani i Ramanovom spektroskopijom. Dobijeni rezultati ukazuju da su kalcitne trake generalno dominantno prisutne u svim uzorcima (slika 48). Dokaz ovoga je postojanje pobude u vidu visokointenzivnog pika na talasnoj dužini od 1086 cm^{-1} . Dva bliska pika, karakteristična za vaterit, nalaze se na talasnim dužinama od 1080 cm^{-1} i 1090 cm^{-1} (Qian i sar., 2019), ali su verovatno u superpoziciji sa pikom kalcita i ne mogu se razlikovati na dobijenim spektrima. Takođe, uočen je i Raman aktivni mod heksagonalne kristalne rešetke kalcita na 284 i 157 cm^{-1} . Kalcit je dodatno potvrđen pikom na 712 cm^{-1} , dok karakteristični pik za vaterit nije jasno uočen. Može se pretpostaviti da je proširenje pika kalcita na 284 cm^{-1} u njegovoj osnovi uzrokovano vateritnim modusima koji se nalaze na 299 i 365 cm^{-1} (Qian i sar., 2019), što je uočljivije kod precipitata na kraju inkubacionog perioda.



Slika 48. RAMAN spektroskopija precipitata

Rezultati prikazani na slici 49 predstavljaju termičku karakterizaciju precipitata DTA/TGA analizom. Ujedno predstavljaju potvrdu doslednih rezultata prethodne strukturne karakterizacije. Da bi se izvela ova analiza, svaki uzorak je zagrevan do 1000 °C, a uočene su dve faze: ispod i iznad 400 °C. Ispod ove vrednosti temperature, primećuju se tri pika praćena blagim gubitkom težine. Prvi pik na oko 115 °C je posledica isparavanja vlage, a

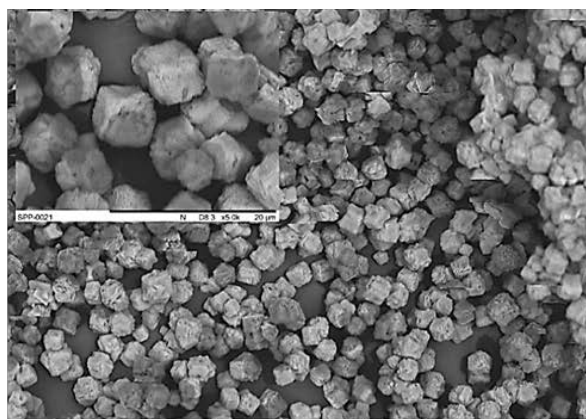
preostala dva pika na oko 220 i 290 °C predstavljaju razgradnju zaostale hranljive podloge i/ili zarobljenih bakterijskih oblika koji su ranije bili centri nukleacije CaCO₃ kristala.



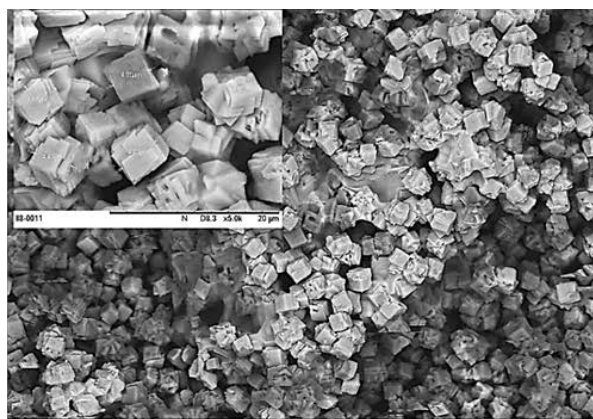
Slika 49. DTA/TGA analiza precipitata

Ovakav profil se može uporediti sa FT-IR rezultatima, na kojima je takođe primećeno postojanje frakcije amino i organskih grupa koje se povezuju za neutrošenom hranljivom podlogom. Dinamika gubitka težine ispod 400 °C varira u određenoj meri zbog razlike u mikrostrukturi precipitata (gustina i veličina čestica) i stepenu vezane vode. Na drugom delu dijagrama je primećen brz gubitak težine na temperaturi iznad 600 °C, što je praćeno izraženim pikom u DTA signalu, a usled razgradnje karbonata.

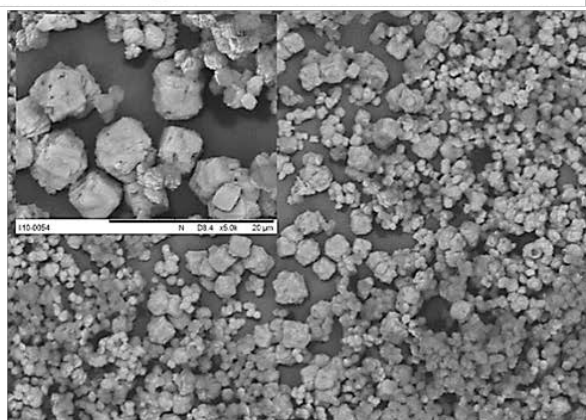
Morfologija i veličina kristala CaCO_3 indukovanih bakterijskom aktivnošću uglavnom zavisi od relativne brzine rasta kristala u svim pravcima. Štaviše, brzina rasta zavisi od procesa na površini ćelije i veoma je osetljiva na promene faktora sredine (Qian i sar., 2019). Kristalnost dobijenih precipitata koja je detektovana XRD i RAMAN analizom, vizualizovana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom. SEM mikrografije (slika 50 i 51) potvrđuju visok stepen kristalnosti u većini uzoraka, što je definisano dobro razvijenim kristalnim oblicima karakterističnim za CaCO_3 (Tang i sar., 2019). Primetno je da je većina kristala prosečne veličine u opsegu mikrometra. Nakon prvog dana inkubacije, kristali CaCO_3 indukovani ćelijama *S. pasteurii* DSM 33 predstavljaju romboedričnu morfologiju kalcita, sa sličnim morfološkim obrascem na kraju perioda inkubacije. Precipitat koji je indukovao prisustvom ćelija *B. muralis* manifestuje topografiju sfernih agregata kalcita, dok je uočljivo da ivice i uglovi ovih kristala sa vremenom postaju zaobljeniji. Sa druge strane, kristali indukovani ćelijama *B. lentus* imaju evidentno različitu raspodelu veličine čestica, sa najvećom varijacijom u veličini u odnosu na druge sojeve. Ovaj rezultat je nezavisan od vremena inkubiranja. Morfologija kristala CaCO_3 tokom inkubacije *B. simplex* podseća na složene romboedrične oblike slojevitog kalcita (tzv. oblik cveta) sa konstantnom raspodelom veličine čestica. Slični sferni agregati primećeni su kod *B. firmus*. Pravilna romboedrična morfologija primećena je za kristale indukovane *B. licheniformis*, gde se kristali vidljivo formiraju iz heksaedarskih slojeva od početka perioda inkubacije.



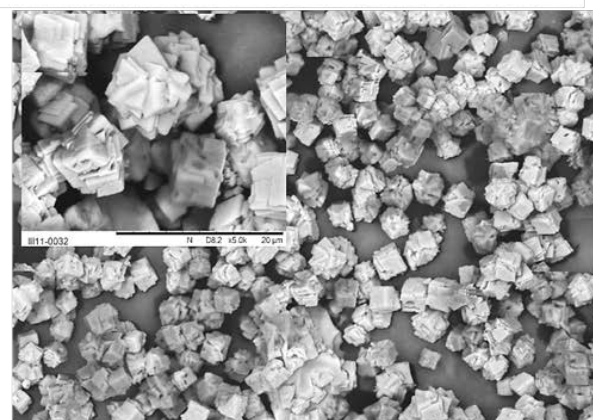
***S. pasteurii* DSM 33**



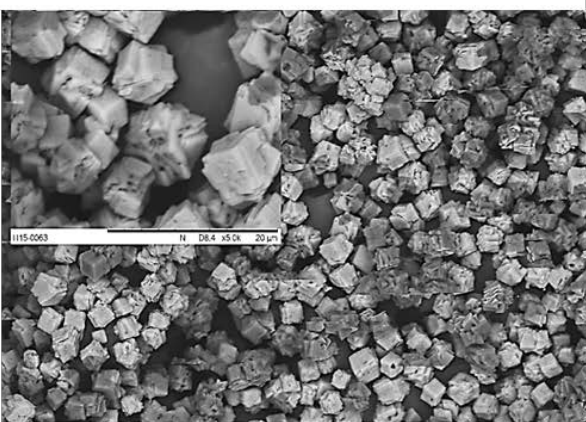
B. muralis



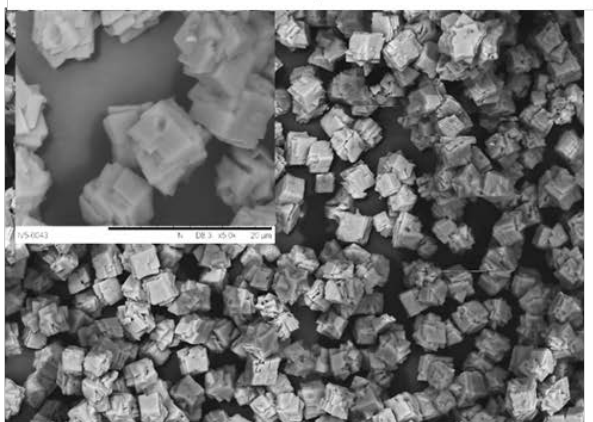
B. lentus



B. simplex



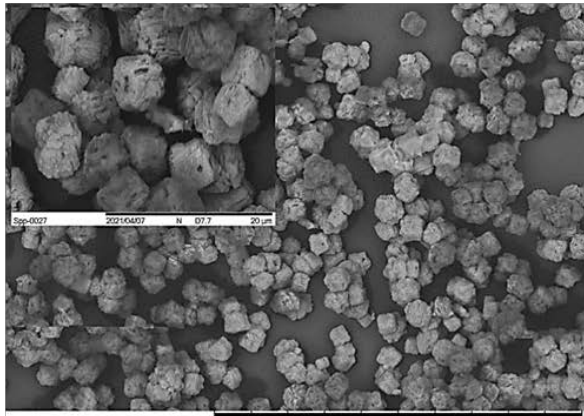
B. firmus



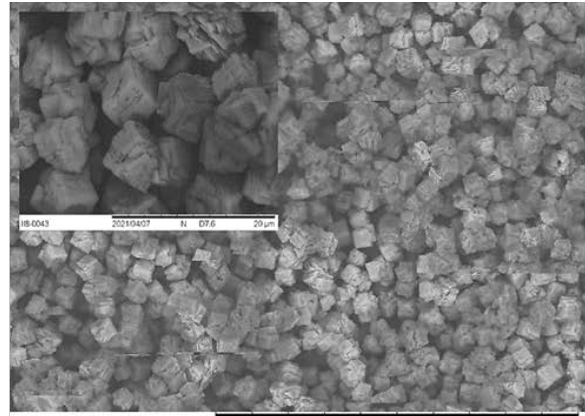
B. licheniformis

Slika 50. SEM snimak (1000x) i uvećanje dobijenog vidnog polja (5000x) u gornjem levom uglu za precipitate nakon prvog dana inkubacije

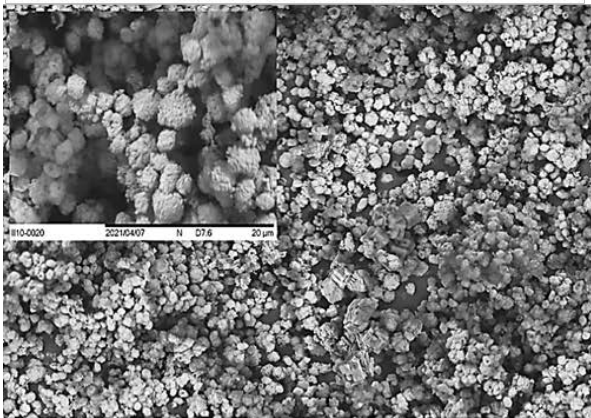
Distribucija veličine kristala bila je uska za precipitat referentnog soja, sa veličinama u rasponu od 3 do 5 μm . U slučaju precipitata *B. muralis*, *B. simplex* i *B. firmus*, na SEM mikroskopima se vidi slična morfologija, oblik i veličina kristala, što je takođe u skladu sa XRD obrascima. *B. lentus* indukuje dvofaznu strukturu kristala, naročito nakon prvog dana inkubacije. Niža kristalnost za ovu bakteriju je otkrivena nakon prvog dana inkubiranja (slika 47 i 48), što ukazuje da je u datim uslovima relativno sporija kristalizacija obe faze (kalcit i vaterit) u poređenju sa drugim ispitanim sojevima. Vateritna faza je tokom dalje inkubacije transformisana većim delom u kristale kalcita većih dimenzija i kristalnosti. *B. licheniformis* odlikuje primarna indukcija čiste kalcitne faze i dobro razvijenih kristala romboedričnog oblika. Ovi rezultati su uporedivi sa referentnim sojem *S. pasteurii* DSM 33. Jedina razlika se ogleda u precipitatu sakupljenom nakon 14 dana inkubacije, s obzirom da su veće dimenzije kristala kod *B. licheniformis*. Dobijeni rezultat se može povezati i sa količinom precipitata na kraju inkubacionog perioda (slika 45). Rezultat kinetike nastajanja precipitata ukazuje na ključnu razliku u količini produkovanog depozita. Jasno se uočava da, nakon sporije inicijalne faze, *B. licheniformis* ima sposobnost da indukuje veću količinu precipitata u poređenju sa *S. pasteurii* DSM 33. Ova razlika počinje da se uočava nakon petog dana indukcije, a zadržava do kraja inkubacionog perioda od 14 dana.



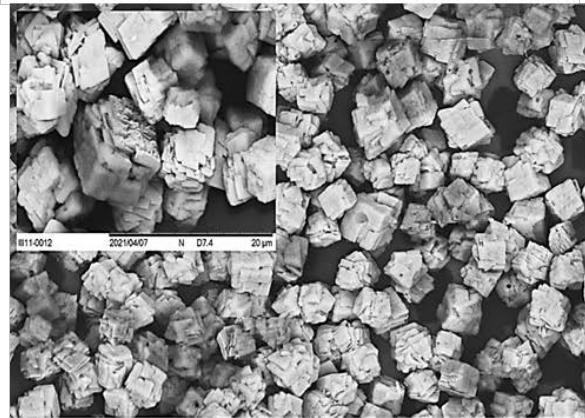
***S. pasteurii* DSM 33**



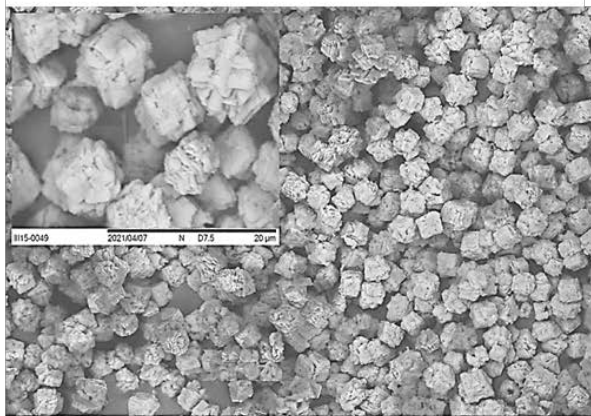
B. muralis



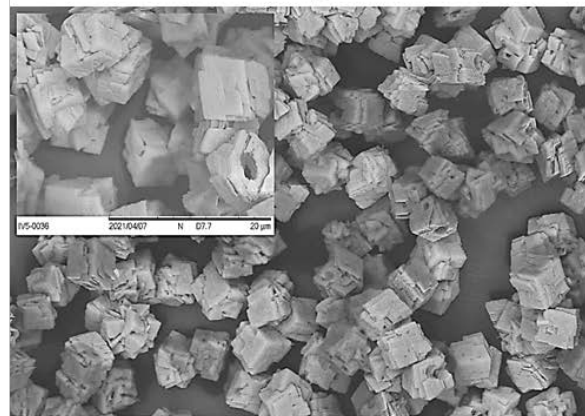
B. lentus



B. simplex



B. firmus



B. licheniformis

Slika 51. SEM snimak (1000x) i uvećanje dobijenog vidnog polja (5000x) u gornjem levom uglu za precipitate nakon 14. dana inkubacije

5.8. Skrining uslova sredine i sadržaja hranljive podloge u toku BIPK

U ovom delu istraživanja, Plackett-Burmanov dizajn je iskorićen kako bi se ispitalo deset stvarnih i jedan veštački faktor sistema. Kao krajnji cilj postavljeno je dobijanje što efikasnijeg procesa BIPK, pri optimizovanim odgovorima sistema. Ovakav pristup ima dvojako značenje jer ukazuje na posmatranje relativnih uticaja i redukciju ispitivanih faktora koji deluju na sistem, ali i mogućnost da se izvrši selekcija najbolje bakterije po pitanju efikasnosti procesa. Nakon što je sproveden Plackett-Burmanov plan za BIPK procesa kroz 12 nezavisnih eksperimenata (Prilog 21), izvedeno je ANN modelovanje za dobijene rezultate u cilju definisanja relativnih uticaja svih ispitivanih faktora na različite promenljive i njihovih nivoa značajnosti u odnosu na bakterijske sojeve. Gurunathan i Sahadevan (2011) naglasili su da algoritam učenja sa unutrašnjim rasprostiranjem (eng., back propagation), višeslojne ANN mreže sa upravljanjem predviđanja (eng., feed forward), trenira i proverava performanse ANN modela koristeći metodu adaptivnog podešavanja gradijenta, što ima presudan uticaj u obradi bioloških informacija ili modeliranju podataka pa su korisni u ovakvom skriningu i optimizaciji bioprocesa.

Razvijeni optimalni ANN model pokazao je dobru sposobnost generalizacije eksperimentalnih podataka sa potencijalom za tačno predviđanje proračuna najboljih bakterija za BIPK proces. Na osnovu promenljivih testiranih u eksperimentalnom dizajnu, dobijena je mreža MLP 11-14-30 (tabela 27). Koeficijenti determinacije za izlazne promenljive su imali vrednosti između 0,697 i 1, dok je dobijeni model za predviđanje 30 izlaznih promenljivih bio veoma složen (618 težinskih koeficijenata i nultih članova). Dobijeni rezultati visoke nelinearnosti posmatranog sistema su bili u skladu sa očekivanjima, s obzirom na kompleksnost ispitivanog sistema.

Kvalitet uklapanja između eksperimentalnih merenja i modela izračunatih rezultata predstavljen je u Prilogu 22. Vrednosti sume kvadrata grešaka (SSE) za dobijeni ANN su bile istog reda veličine kao eksperimentalne greške za izlazne promenljive koje su definisali Doumpos i Zopounidis (2011). Model je imao neznatnu grešku testova prilagođavanja, što

znači da je na zadovoljavajući način predvideo izlazne promenljive. Visok koeficijent determinacije ukazuje da su eksperimentalni podaci na zadovoljavajući način odgovarali predloženom modelu (Turanyi i Tomlin, 2014).

Tabela 27. Karakteristike ANN mreže za skrining uslova sredine i sastava hranljive podloge

Naziv mreže	Performanse ciklusa (R^2)			Greška ciklusa			Algoritam učenja
	učenja	testiranja	validacije	učenja	testiranja	validacije	
MLP 11-14-30	0,964	0,947	0,949	1,698	1,670	1,688	BFGS 47
	Funkcija greške učenja	Aktivaciona funkcija skrivenog sloja testiranja		Aktivaciona funkcija izlaza validacije			
MLP 11-14-30	SOS	Logistička		Identična			

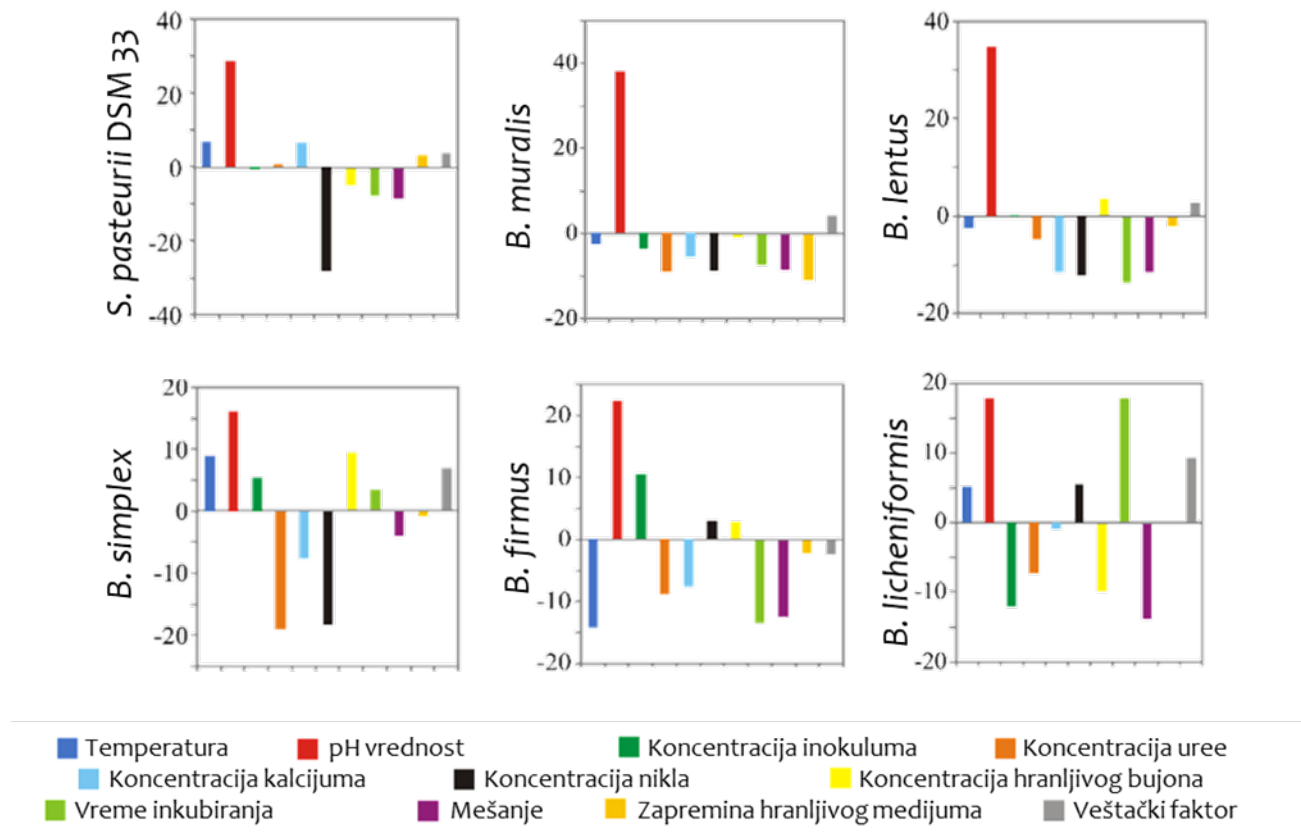
Uticaji ulaznih promenljivih (temperatura, pH vrednost, nivo inokuluma, koncentracije uree, kalcijuma, nikla i hranljivog bujona, vreme inkubacije, mešanje, zapremina hranljive podloge i veštački faktor) na određivanje bakterije sa najboljim učinkom za BIPK su proučavani na osnovu eksperimentalnog plana i Yoon-ove metode interpretacije ANN modela (slika 52-54).

Za efikasan BIPK proces definisane su vrednosti rezultata u vidu “ciljanih nivoa izlaza”:

- pH vrednost od približno 9;
- minimalna količina uree;
- minimalan broj spora;
- maksimalan broj vijabilnih ćelija;
- maksimalna količina CaCO_3 taloga.

Ciljani nivo izlaza: pH vrednost približno 9

Chuong Chuo i sar. (2020) su definisali da je optimalna pH vrednost za ureolitičku aktivnost *Bacillus sojeva* između 7 i 8, dok je za rod *Sporosarcina* ova vrednost veća (8,5-9). Pored toga, pH vrednost tokom BIPK procesa neizbežno varira između 8,2 i 11 (Ortega-Villamagua i sar., 2020, Yi i sar., 2021). U tom slučaju, bakterije moraju da održavaju pH vrednost između 9 i 9,5 uspostavljanjem pH homeostaze, a u cilju efikasne enzimske aktivnosti (Chuong Chuo i sar., 2020). Kao što je prikazano u Prilogu 21, finalna pH vrednost za sve bakterije bila je između 8,2 i 10,4, što upućuje da su sve vrednosti u opsegu za odigravanje BIPK procesa. Konkretno, povećavanjem alkalnosti sa inicijalne pH vrednosti od oko 7,3 izbegnuta je inhibicija ciljnog procesa, koji se može dogoditi u neutralnoj sredini (Ortega-Villamagua i sar., 2020).



Slika 52. Relativni uticaj na odziv pH vrednosti sistema

Najširi opseg odstupanja finalne pH vrednosti primećen je za referentni soj (8,21-10,37), a najuži u slučaju *B. simplex* (9,02-9,65). *B. simplex* ima najbolju mogućnost održavanja pH vrednosti i najmanje zavisi od spoljašnje pH vrednosti. Nakon početnog razmatranja

rezultata, uticaj testiranih ulaznih promenljivih na finalnu pH vrednost sproveden je putem ANN modela (slika 52). Testirane bakterije pokazale su pozitivan relativni uticaj početne pH vrednosti. Vrednost uticaja na referentni soj bila je 28,8%, a za ispitivane *Bacillus* vrste u rasponu od 16 do 38,2%. Ostali pozitivni ulazi imaju različit nivo uticaja na finalnu pH vrednost na nivou soja.

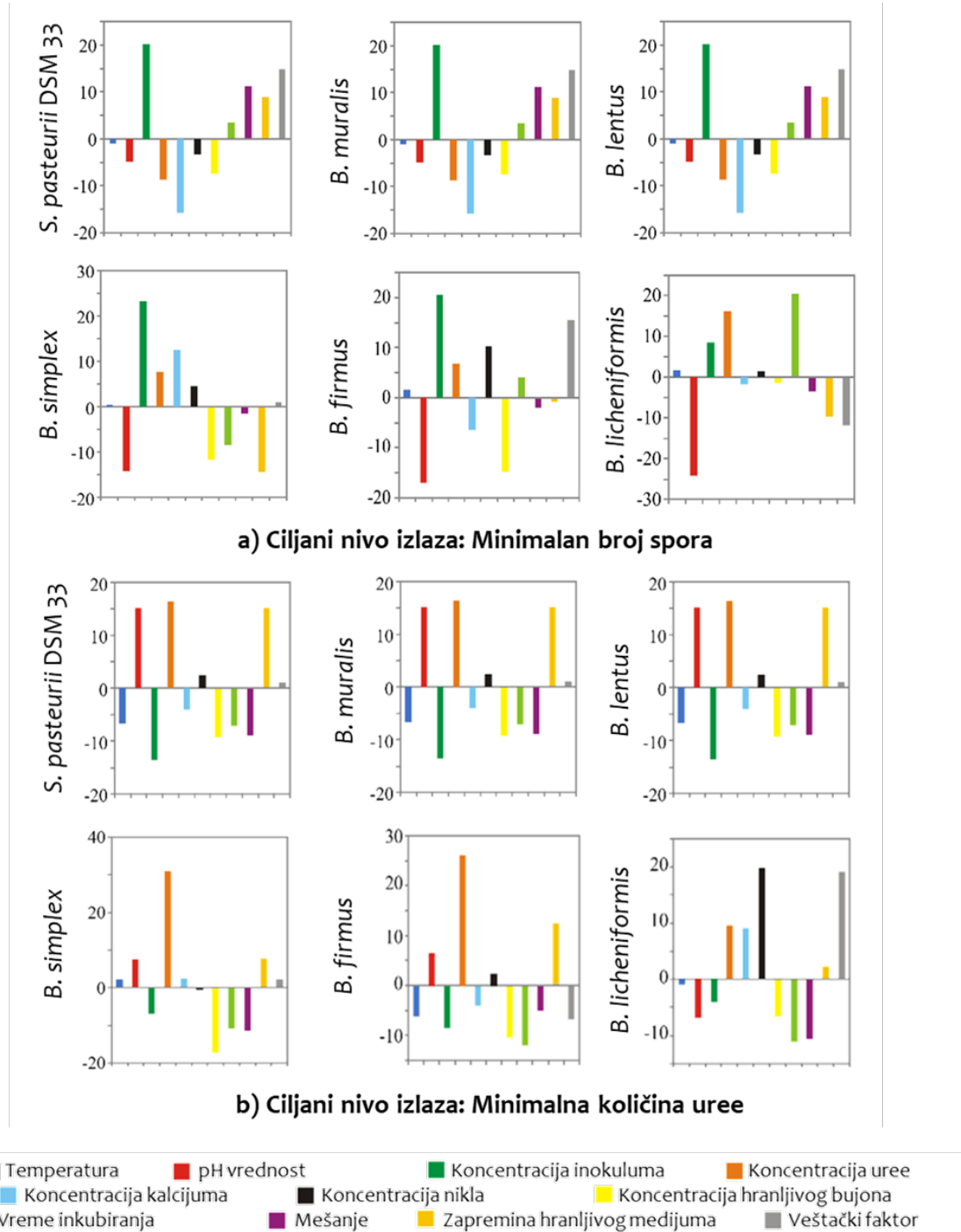
Ciljani nivo izlaza: Minimalan broj spora

Budući da su svi ispitivani bakterijski izolati u ovom istraživanju izolovani kao sporogene bakterije, to bi praktično značilo da broj bakterijskih ćelija u sistemu ne mora biti i stvarni broj aktivnih centara za nukleaciju kristala (Jonkers i sar., 2010). Ako neke spore nemaju mogućnost za aktivaciju, još je važnije obezbediti dovoljan broj bakterija da bi se postigla željena BIPK efikasnost kroz aktivnost vijabilnih ćelija (Zhang i sar., 2019). Kao što je prikazano na slici 53a, koncentracija inokuluma ima pozitivan relativni značaj na koncentraciju spora za sve testirane bakterije. Zhang i sar. (2019) zabeležili su da na stvaranje spora mogu uticati smanjenje slobodnih jona kalcijuma i brze promene pH. Ovo razmatranje može se povezati sa dobijenim negativnim uticajem pH vrednosti u ovoj studiji, kao i promenljivim odgovorom na koncentraciju kalcijuma. Takođe, koncentracija uree i zapremina podloge imaju negativni relativni uticaj na broj spora za *Bacillus* izolate, ali ne i za *S. pasteurii*.

Ciljani nivo izlaza: Minimalna količina uree

Posmatranjem koncentracije uree kao odgovorom sistema, može se uočiti pozitivan relativni uticaj početne koncentracije uree, kao i prisustvo nikla (slika 53b). Ovi rezultati su u korelaciji sa radom Bortoletto-Santos i sar. (2020) koji su utvrdili da stopa hidrolize uree može biti direktno proporcionalna početnom nivou uree. Mazzei i sar. (2020) usmerili su razumevanje odnosa između strukture i funkcije ureaze na biološku ulogu jona nikla. Pored toga, rodovi *Sporosarcina* i *Bacillus* imaju slične strukture enzima ureaze koja zavisi od prisustva nikla kao kofaktora. Na aktivnom mestu ove vrste ureaze kompleksirani su joni nikla, povezani sa hidroksilnom grupom i karbamiliranom lizinom (Svane i sar., 2020). Sa druge strane, slobodni

joni nikla, koji se javljaju pri pH vrednosti od oko 9 mogu biti toksični za mikroorganizme, dok bi se specifični hidroksilovani oblici (npr. NiOH, Ni(OH)₂) mogli pojaviti pri nižoj pH vrednosti (van Nostrand i sar., 2005).

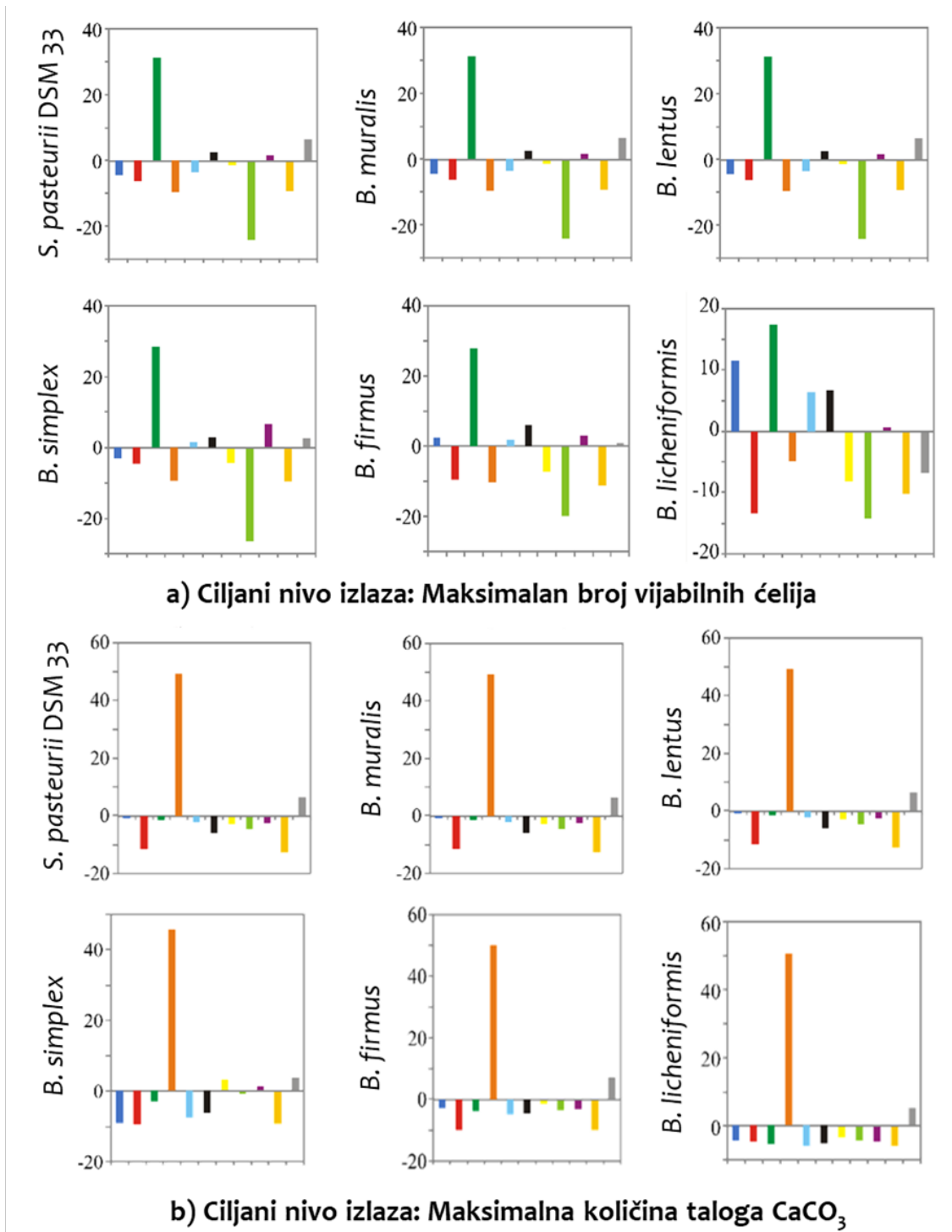


Slika 53. Relativni uticaj na odzive broja spora i količine uree

Ove činjenice mogu biti povezane sa različitim uticajem jona nikla na broj vijabilnih ćelija i spora. Budući da je pH vrednost presudna za dostupnost nikla u prirodnim staništima (de Macedo i sar., 2016), a da povećanje koncentracije nikla može biti rešenje za efikasnu ureolitičku aktivnost (Svane i sar., 2020), zaključak o uticaju nikla na BIPK sistem se ne može objasniti bez posmatranja promene pH vrednosti tokom perioda inkubacije. Pozitivan uticaj se primećuje za zapreminu hranljivog medijuma, dok je negativni uticaj pripisan vremenu inkubacije, veličini inokuluma i koncentraciji hranljivog bujona za opisani ciljani nivo izlaza.

Ciljani nivo izlaza: maksimalan broj vijabilnih ćelija

Vidaković i sar. (2019) su naglasili da je za bioremedijacijski proces potrebna efikasna i stalna proliferacija. Zbog toga je jedan od izlaza sistema bio broj vijabilnih bakterija kao ciljnih ćelijskih oblika kojima se pripisuje ureolitička aktivnost. Dobijeni podaci za vijabilne ćelije ukazuju na veliki uticaj primenjene eksperimentalne postavke, jer je opseg ovog izlaza varirao od 1,21 log CFU/mL za *B. muralis* do 7,85 log CFU/mL za *S. pasteurii* DSM 33. Posmatrajući uticaj na vijabilne ćelije, najveći pozitivan uticaj na sve bakterije ima koncentracija inokuluma. Dobijeni uticaji imaju vrednost 31,1, 28,5, 27,95, 17,43, 27,17 i 18,03% za *S. pasteurii* DSM 33, *B. muralis*, *B. lentus*, *B. simplex*, *B. firmus* i *B. licheniformis*, redom (slika 54a). Takođe, može se primetiti da mešanje ima pozitivan uticaj. Mešanje u biotehnološkim procesima osigurava da se u homogenoj hranljivoj podlozi postigne uniformna raspodela ćelija i rastvorenog kiseonika (Tian i sar., 2016). Sa druge strane, otkriveni su sledeći negativni uticaji na sve bakterije: zapremina podloge, pH vrednost, koncentracija uree i hranljivog bujona. Uticaj jona nikla ima pozitivan trend, dok vreme inkubacije negativno utiče na sve bakterije, osim na *B. firmus* kod kojeg je primećen obrnut uticaj.



Slika 54. Relativni uticaj na odzive broja vijabilnih ćelija i količine taloga CaCO₃

Ciljani nivo izlaza: Maksimalna količina taloga CaCO_3

Prikazani rezultati na slici 54b ukazuju da je koncentracija uree glavni pozitivan uticaj na stvaranje maksimalne količine taloga CaCO_3 za sve bakterije. Sa relativnim uticajem u rasponu od 43,4 do 50,7%, koncentracija uree ima dominantan uticaj na ovaj izlaz. Dobijeni rezultat sugerše da ovaj faktor može da usmeri BIPK proces, posmatrano kroz stehiometrijsku zavisnost između supstrata (urea) i proizvoda (talog CaCO_3). Još jedan uzajamni pozitivan uticaj primećen je za veštački faktor sa relativnim uticajem manjim od 14%. Za *S. pasteurii* DSM 33, *B. lentus* i *B. simplex* nije primećen drugi pozitivan uticaj na količinu precipitata. U slučaju *B. muralis*, pozitivan uticaj ima prisustvo hranljivog bujona i mešanje, dok vreme inkubacije pozitivno utiče na količinu precipitata kod *B. firmus* i *B. licheniformis*.

Teoretski, 1 g uree može se transformisati u 1,66 g CaCO_3 , ako se svi nastali joni karbonata u ovoj reakciji iskoriste za formiranje kalcijumove soli (Wong, 2015). To znači da vrednost od 1,66 g/g predstavlja maksimalni ili teoretski prinos ciljanog proizvoda, koji je u ovom istraživanju korišćen za izračunavanje efikasnosti sistema povezanog sa potrošnjom supstrata (tabela 28).

U slučaju *S. pasteurii* DSM 33, efikasnost precipitacije je između 82,4 i 98,7%. Za *Bacillus* izolate postignuta efikasnost se razlikuje na nivou soja. Najmanja i najveća efikasnost za *B. muralis* imaju vrednost od 63 i 98,8%, dok su ove vrednosti za *B. lentus* 82,6 i 98,9%. Uočena efikasnost za *B. simplex* i *B. firmus* ima vrednost u opsegu 66,4-98,6%, odnosno 39,7-99,3%. *B. licheniformis* ima najnižu efikasnost 86,5%, a najvišu 99,9%. Uski raspon efikasnosti u ispitivanim uslovima je uočen za *S. pasteurii* DSM 33 i *B. lentus*, dok je najveća razlika u efikasnosti precipitacije primećena kod *B. firmus*.

Tabela 28. Efikasnost precipitacije kalcijum karbonata

Bakterija	Plackett-Burmanov eksperimentalni dizajn											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Dobijena količina CaCO₃ precipitata, X_f-X_i (g/100 mL)											
<i>S. pasteurii</i> DSM 33	1,97	0,213	3,14	2,79	0,274	2,48	0,25	0,14	0,16	2,17	3,24	2,73
<i>B. muralis</i>	1,81	0,12	2,48	2,57	0,18	2,53	0,12	0,09	0,15	2,04	2,21	1,02
<i>B. lentus</i>	2,13	0,15	3,17	2,85	0,25	2,68	0,23	0,17	0,20	2,33	2,89	2,74
<i>B. simplex</i>	2,87	0,25	3,17	3,16	0,15	3,07	0,26	0,32	0,31	3,02	3,03	3,13
<i>B. firmus</i>	2,12	0,175	3,27	3,07	0,24	2,07	0,27	0,15	0,14	2,54	2,81	1,24
<i>B. licheniformis</i>	2,81	0,12	3,21	3,3	0,31	2,91	0,27	0,2	0,31	3,0	3,05	2,97
	Količina hidrolizovane uree, S_i-S_f (g/100 mL)											
<i>S. pasteurii</i> DSM 33	1,22	0,13	2,00	1,81	0,18	1,69	0,15	0,09	0,11	1,60	2,00	1,71
<i>B. muralis</i>	1,19	0,08	1,68	1,63	0,12	1,54	0,10	0,06	0,10	1,28	1,44	0,70
<i>B. lentus</i>	1,53	0,12	1,92	1,86	0,16	1,66	0,15	0,12	0,14	1,67	1,81	1,73
<i>B. simplex</i>	1,83	0,16	1,93	1,97	0,13	1,95	0,19	0,20	0,19	2,00	1,97	1,92
<i>B. firmus</i>	1,69	0,13	2,00	1,88	0,17	1,33	0,17	0,10	0,10	1,66	1,73	1,89
<i>B. licheniformis</i>	1,70	0,08	2,00	2,00	0,20	1,80	0,19	0,13	0,19	1,81	1,92	1,86
	Teorijski prinos precipitacije, Y_t (g/g)											
	1,6											
	Eksperimentalno dobijeni prinos precipitacije, Y_e (g/g)											
<i>S. pasteurii</i> DSM 33	1,62	1,81	1,58	1,55	1,44	1,47	1,59	1,56	1,51	1,36	1,62	1,60
<i>B. muralis</i>	1,52	1,69	1,49	1,59	1,43	1,64	1,2	1,53	1,52	1,59	1,54	1,47
<i>B. lentus</i>	1,40	1,46	1,66	1,54	1,50	1,61	1,46	1,48	1,46	1,40	1,60	1,58
<i>B. simplex</i>	1,57	1,75	1,66	1,61	1,1	1,57	1,32	1,62	1,60	1,51	1,54	1,63
<i>B. firmus</i>	1,25	1,48	1,65	1,64	1,36	1,56	1,59	1,53	1,46	1,53	1,62	0,66
<i>B. licheniformis</i>	1,65	1,76	1,62	1,66	1,5	1,62	1,41	1,53	1,61	1,59	1,59	1,60
	Efikasnost precipitacije, E (%)											
<i>S. pasteurii</i> DSM 33	97,5	98,7	95,4	93,3	86,9	88,4	95,9	90,7	93,6	82,4	97,6	96,3
<i>B. muralis</i>	91,9	96,6	89,6	95,5	86,1	98,8	72,3	63,0	94,1	96,7	92,7	88,7
<i>B. lentus</i>	84,3	87,7	98,9	92,8	90,2	97,1	87,7	82,6	89,9	84,6	96,1	95,4
<i>B. simplex</i>	94,6	97,2	96,9	96,9	66,4	94,8	79,1	91,8	97,8	91,4	92,5	98,6
<i>B. firmus</i>	75,7	89,3	99,3	98,9	82,2	93,8	95,7	82,2	90,7	92,5	97,8	39,7
<i>B. licheniformis</i>	99,9	80,3	97,5	99,9	90,7	97,4	84,7	67,1	98,3	99,4	95,9	96,4

Jedan od glavnih ciljeva u ovom istraživanju bio je višekriterijumska optimizacija izlaznih parametara, koja je obuhvatila prethodno definisane „ciljane nivoe izlaza“. Korišćenjem ANN modela, željena funkcija je izračunata istovremeno za sve ciljane nivoe izlaza promenom ulaznih promenljivih. Ovo je urađeno primenom težinskog koeficijenta na svaku promenljivu: 0,20 za pH vrednost, 0,05 za broj spora, 0,15 za količinu uree, 0,45 za količinu CaCO_3 precipitata i 0,15 za broj vijabilnih ćelija). Postavljene vrednosti u proračunu optimizacije izvedene su iz eksperimentalnog skupa podataka dobijenog Plackett-Brumanovog eksperimentalnog dizajna. Ovaj zadatak je rešen pomoću ANN modela korišćenjem proračuna višekriterijumske optimizacije. Broj generacija je dostigao 373 za ANN model, dok je veličina populacije postavljena na 100 za svaku ulaznu promenljivu. Broj kategorija na Pareto dijagramu je iznosio 36.

Na osnovu dobijenih rezultata optimizacije, *B. licheniformis* se izdvojio kao najbolji bakterijski soj, pri čemu su izračunate vrednosti ulaznih parametara dati u tabeli 29. U tom slučaju dobijeni su optimalni odgovori sistema: pH vrednost bila 9,34, minimalan broj spora 3,41 log CFU/mL, količina uree 0,01 g/L, dok su maksimalne količine CaCO_3 precipitata i broja vijabilnih ćelija imale vrednosti od 3,14 g/100 mL, odnosno 7,12 log CFU/mL. Slični rezultati optimizacije su dobijeni za *S. pasteurii* DSM 33, pri čemu su izračunata pH vrednost i minimalan broj spora bili 9,55 i 2,1 log CFU/mL redom, a količina uree svedena na nulu. Maksimalne količine CaCO_3 precipitata i broja vijabilnih ćelija definisani su na vrednostima od 3,24 g/100 mL, odnosno 7,15 log CFU/mL. Za *B. simplex* je izračunata pH vrednost bila 9,49, minimum broja sporogenih ćelija bio je 1,73 log CFU/mL, a količine uree 1,43 g /L. Maksimalna količina precipitata je 3,03 g/100 mL, dok je ta vrednost za vijabilne ćelije iznosila 7,58 log CFU/mL.

Tabela 29. Unapređene vrednosti ulaznih parametara za testirane bakterije

Bakterija	Ulazni parametar										
	Temperatura (°C)	pH vrednost	Koncentracija					Vreme inkubacije (h)	Brzina mešanja (min ⁻¹)	Zapremina podloge (mL)	Pojava taloga (+/-)
			inokulum (log CFU/mL)	uree (g/L)	Ca ²⁺ jona (mM)	Ni ²⁺ jona (µg/L)	hranjivog bujona (g/L)				
<i>S. pasteurii</i>	45	7	8	20	250	0	0	24	150	15	-
<i>B. muralis</i>	45	7	8	20	50	20	3	168	0	15	+
<i>B. lentus</i>	45	7	8	20	50	20	3	168	0	15	+
<i>B. simplex</i>	45	7	8	20	250	0	0	24	150	15	-
<i>B. firmus</i>	45	7	8	20	50	20	3	168	0	15	+
<i>B. licheniformis</i>	20	7	8	2	250	20	0	168	150	150	+

Dobijeni optimalni izlazi sistema za *B. muralis*, *B. lentus* i *B. firmus* iznose, redom:

- pH vrednosti: 8,82, 9,87 i 10,08;
- minimalni broj sporogenih ćelija 1,78, 1,42 i 0,78 log CFU/mL;
- minimalna količina uree 10,68, 4,36 i 6,71 g/L;
- maksimalna količina precipitata je 2,48, 3,17 i 3,27 g/100 mL;
- maksimalan broj vijabilnih ćelija iznosi 3,56, 5,31 i 4,78 log CFU/mL.

Sumarno, *B. licheniformis* može biti najbolji izbor za izvođenje BIPK procesa, u poređenju sa ispitanim referentnim ureolitičkim sojem *Sporosarcina pasteurii* DSM 33 i drugim *Bacillus* vrstama iz zemljišta. Dobijeni rezultati istraživanja otkrivaju nove mogućnosti za razvoj visokoefikasnog procesa bakterijski indukovane precipitacije CaCO₃ korišćenjem bakterijskog soja izolovanog iz prirodnog okruženja.

6. ZAKLJUČCI

Ovo istraživanje je proisteklo iz potrebe za novim, efikasnim bioagensima sa biokalcifikujućim potencijalom, a u cilju primene u procesima bakterijski indukovane precipitacije kalcijum karbonata. Od primarnog koraka izolovanja i karakterizacije bakterija sa biokalcifikujućim potencijalom, procene njihovog kapaciteta i uloge u ciljanom procesu do višekriterijumske optimizacije najboljeg izolata, ova doktorska disertacija nudi sveobuhvatni istraživački koncept eksperimentalnih koraka za odabir efikasnih bioagenasa za dalju inženjersku primenu u procesima bioremedijacije, građevinskog, geotehničkog i ekološkog inženjerstva. U okviru istraživanja uspešno ispitana je uloge bakterija u BIPK u laboratorijskim uslovima, što predstavlja dobru osnovu za istraživanje u realnim uslovima sredine u kojoj će se vršiti proces bioremedijacije.

Dobijeni rezultati su sumirani u okviru sledećih zaključaka:

- ⇒ Kao prvi korak ove doktorske disertacije formirana je specifična šema za izolovanje i selekciju alkalorezistentnih/alkalofilnih, sporogenih bakterija sa potencijalom formiranja neorganskog precipitata;
- ⇒ Tokom postupka izolovanja ciljanih bakterija iz zemljišnih sistema izdvojeno je 43 izolata koja su na osnovu makromorfoloških osobina bili uporedivi sa referentnim sojevima *Sporosarcina pasteurii* DSM 33 i *Bacillus cohnii* DSM 6307;
- ⇒ Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja temperaturnog i pH profila izabranih bakterijskih izolata ustanovljeno je da je optimalna temperatura rasta za većinu sojeva između 30 i 37 °C, iako je produkcija biomase zabeležena i na 20 °C. Za optimum rasta, pH vrednosti između 9 i 11 su definisane kao najpogodnije za većinu ispitivanih bakterija;
- ⇒ Verifikacija dobijenih rezultata predviđanja ANN modela ponašanja temperaturnog i pH profila, koja je urađena i kao numerička (računata) i eksperimentalna (u laboratorijskim uslovima) je potvrdila mogućnost predviđanja biokinetičke zone rasta za testirane bakterije u širokom rasponu testiranih uslova sredine. Parametri kvaliteta uklapanja ANN mreže su definisali visok predikcioni kapacitet modelovanja temperaturnog i pH profila rasta bakterijskih sojeva;

- ⇒ Dobijeni predikcioni modeli denitrifikujućeg potencijala bakterijskih izolata, kao i verifikacija modela u laboratorijskim uslovima, ukazuju da postoji mogućnost definisanja ponašanja svih testiranih bakterijskih izolata pomoću 6 indikatora (produkcija biomase, koncentracija nitrata i nitrita, formiranje gasovitog azota, amonijaka i nitrita) u toku procesa denitrifikacije;
- ⇒ Na osnovu analize standardnih ocena, baziranih na ispitivanju niza ekoloških i morfološkim odlika izolovanih bakterija, od ukupnog broja testiranih izolata izdvojeno je pet najboljih. Ovih 5 bakterija je pokazalo potencijal biokalcifikacije posredstvom dve metaboličke putanje, za razliku od referentnih sojeva *S. pasteurii* DSM 33 i *B. cohnii* DSM 8715 koji su indukovali ciljani proces posredstvom ureolize ili oksidacije organskih kiselina;
- ⇒ Odabranih pet bakterija su identifikovane pomoću Vitek 2® Compact System uređaja i MALDI-TOF MS spektrometra, pri čemu je druga odabrana metoda uspešno identifikovala izolate kao *B. muralis*, *B. lentus*, *B. simplex*, *B. firmus* i *B. licheniformis*, pružajući visoku ocenu podudaranja za bazom podataka;
- ⇒ Amplifikacijom ključnog strukturnog gena, *ureC*, na oko 340 bp dužine genskog fragmenta, dokazano je postojanje funkcionalnog enzimskog aparata za ureolitičku aktivnost na genetičkom nivou kod svih identifikovanih ureolitičkih bakterija;
- ⇒ Ispitivanjem morfoloških i ekoloških karakteristika od značaja za proces BIPK (oblik ćelije, pokretljivost, rast u anaerobnim uslovima i pri različitim koncentracijama NaCl) utvrđena je raznovrsnost odabranih *Bacillus* vrsta koja ukazuje na potencijalnu efikanost izabranih sojeva u procesu biokalcifikacije;
- ⇒ Ispitivanjem uloge bakterijskih ćelija odabranih *Bacillus* vrsta utvrđen je doprinos fizičkih karakteristika vijabilnih oblika, kao i karakteristika ćelijskih površina zida i membrane. Doprinos aktivnih ćelija nakon otpočinjanja CaCO₃ precipitacije se značajno smanjuje zbog nagomilavanja kalcijumovih jona i stvaranja kristala u neposrednoj blizini ćelije. Ovi rezultati potvrđeni su ispitivanjem uloge kalcijuma u toku biofilmskog BIPK, kao i definisanju doprinosa ćelijske aktivnosti pH promenama u sistemu u kojem se odigrava biokalcifikacija;

- ⇒ Ispitivanjem stepena sporulacije bakterijskih izolata pri pH vrednostima od 7,3 utvrđeno je da samo referentni soj *S. pasteurii* DSM 33 i *B. simplex* mogu da pređu željenu granicu od 8 log CFU/mL, dok u slučaju inkubacije pri pH vrednosti od 9,3 ovu mogućnost ima samo referentni soj;
- ⇒ Na osnovu rezultata dobijenih prilikom ispitivanja produktivnosti Urea-CaCl₂ podloge može se zaključiti da testirana podloga zadovoljava opšte i specifične uslove upotrebe umesto referentne TSA podloge sa dodatkom uree. Značaj ovog rezultata se ogleda i u činjenici da je ista podloga jeftinija, ali i da se može koristiti za produkciju biomase (bez dodatka kalcijuma), kao i za ciljani BIPK proces (sa dodatkom kalcijuma), čime se smanjuje vreme prilagođavanja bakterije na uslove sredine;
- ⇒ Rezultati ispitivanja uticaja temperature (-18, 4, 22 °C) i tečnog medijuma (destilovana i alkalna destilovana voda) na vijabilnost *Bacillus* vrsta ukazuju na mogućnost čuvanja sveže pripremljenih bakterijskih suspenzija na temperaturi frižidera. Sa druge strane, vijabilnost bakterija se naglo i značajno smanjuje prilikom inkubacije na sobnoj temperaturi i tokom skladištenja u zamrzivač bez dodatka krioprotektanta;
- ⇒ Praćenjem hidrolize uree, kao i nusprocesa ove metaboličke putanje (pH vrednost i koncentracija bakterija), utvrđeni su kinetički modeli sa visokim prediktivnim kapacitetom za sve testirane bakterije. Hidrolizom uree došlo je do značajnog smanjenja koncentracije uree u toku trodnevne inkubacije, a negativni eksponencijalni trend je uočen od momenta inokulacije. Sa druge strane, kinetike pH promena i koncentracije bakterija pratile su sigmoidalni oblik krive, a adekvatnost dobijenih modela predviđanja ponašanja za ove nusprocese ogleda se u visokom stepenu predikcije i uočavanju razlika u ponašanju testiranih bakterija;
- ⇒ Količina nastalog precipitata, kao jedan od parametara efikasnosti BIPK, praćena je tokom 14 dana inkubacije, a dobijeni rezultati su iskorišćeni za kinetičko modelovanje i uklapanje eksperimentalnih rezultata u matematičke modele sa visokim prediktivnim kapacitetom. Isti postupak je urađen i za praćenje pH promene i koncentracije kalcijuma, a kao krajnji cilj su definisane razlike na nivou bakterijskih vrsta. Jedini bakterijski soj koji je indukovao veću količinu precipitata od referentnoj soja je *B. licheniformis*. Maksimalne

- pH vrednosti za sve testirane sojeve su postignute za najmanje tri dana inkubacije, dok se koncentracija slobodnog kalcijuma smanjila blizu granice detekcije nakon pet dana;
- ⇒ Strukturna karakterizacija precipitata nastalih tokom praćenja kinetike BIPK procesa je analizirana pomoću FT-IR, XRD, RAMAN, DTA/TGA analiza, kao i SEM mikrofografije. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su formirani precipitati kalcijum karbonata visoke kristalnosti, a da se veličina i fazni udeo kalcitne i vateritne faze razlikuje na nivou bakterijske vrste, kao i vremena inkubiranja;
- ⇒ Na osnovu Plackett-Burmanovog eksperimentalnog plana za skrining uslova sredine i sadržaja hranljive podloge urađeno je predikciono modelovanje izlaza za koje su postavljeni ciljani nivoi odabrani za odigravanje što efikasnijeg BIPK procesa (pH vrednost oko 9, minimalna količina uree i broj spora, maksimalan broj vijabilnih ćelija i količina CaCO_3 taloga). Iako postoji zavisnost od različitih faktora sredine i sadržaja hranljive podloge za postavljene ciljane nivoe izlaza, može da se zaključi da su najznačajniji uticaji sistema koncentracija uree, pH vrednost i koncentracija inokuluma, dok su uticaji ostalih ispitivanih faktora zavisni od pojedinačnih ciljeva kultivacije. Kako bi se dobio konkretniji odgovor postavljenog istraživanja unapređenja BIPK procesa, urađena je višekriterijumska optimizacija izlaznih parametra na osnovu koje se *B. licheniformis* izdvojio kao najbolji bakterijski soj. Pri definisanim optimalnim faktorima sredine, izlazni parametri za ovu bakteriju su pH vrednost 9,34, broj spora i vijabilnih ćelija 3,41 i 7,12 log CFU/mL, količina uree 0,01 g/L kao i količina CaCO_3 precipitata od 3,14 g/100 mL. Prikazani rezultati za *B. licheniformis* su uporedivi sa dobijenim vrednostima za referentni soj, dok se za ostale testirane *Bacillus* vrste može zaključiti da nisu sposobne za jednako efikasan BIPK u ispitivanim uslovima sredine i sastava hranljive podloge;
- ⇒ Dobijeni rezultati istraživanja omogućavaju razvoj visokoefikasnih sistema bioremedijacije na bazi bakterijski indukovane precipitacije CaCO_3 . Odabirom i korišćenjem okarakterisanog prirodnog izolata, koji je definisan kao alkalorezistentna/alkalofilna, sporogena ureolitička bakterija otvara mogućnost formiranja specifičnog procesa BIPK, čija će se *in situ* efikasnost ispitati u budućim istraživačkim koracima.

7. LITERATURA

- [1] Abatenh E., Gizaw B., Tsegaye Z., Wassie M. (2017): Application of microorganisms in bioremediation-review. *Journal of Environmental Microbiology*, 2(1), 038-046. 10.17352/ojeb.000007
- [2] Abrougui K., Gabsi K., Mercatoris B., Khemis C., Amami R., Chehaibi S. (2019): Prediction of organic potato yield using tillage systems and soil properties by artificial neural network (ANN) and multiple linear regressions (MLR). *Soil and Tillage Research*, 190, 202-208. 10.1016/j.still.2019.01.011
- [3] Achal V., Mukerjee A., Reddy M.S. (2012): Biogenic treatment improves the durability and remediates the cracks of concrete structures. *Construction and Building Materials*, 48, 1-5. 10.1016/j.conbuildmat.2013.06.061
- [4] Achal V., Pan X. (2014): Influence of calcium sources on microbially induced calcium carbonate precipitation by *Bacillus* sp. CR2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(1), 307-317. 10.1007/s12010-014-0842-1
- [5] Achal V., Pan X., Lee D.J., Kumari D., Zhang D. (2013): Remediation of Cr(VI) from chromium slag by biocementation. *Chemosphere*, 93(7), 1352-1358. 10.1016/j.chemosphere.2013.08.008
- [6] Al Qabany A., Soga K., Santamarina C. (2012): Factors Affecting Efficiency of Microbially Induced Calcite Precipitation. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 138(8), 992-1001. 10.1061/(asce)gt.1943-5606.0000666
- [7] Almeida J.S. (2002): Predictive non-linear modeling of complex data by artificial neural networks. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(1), 72-76. 10.1016/S0958-1669(02)00288-4
- [8] Al-Thawadi S., Cord-Ruwisch R. (2012): Calcium Carbonate Crystals Formation by Ureolytic Bacteria Isolated from Australian Soil and Sludge. *Journal of Advanced Science and Engineering Research*, 2, 12-26. ISSN 2231-8844
- [9] Al-Thawadi, S. (2008): High strength *in-situ* biocementation of soil by calcite precipitating locally isolated ureolytic bacteria. PhD thesis, Murdoch Univerzitet, Murdoch, Australija.
- [10] Ambus P., Zechmeister-Boltenstern, S. (2007): Denitrification and N-Cycling in Forest Ecosystems. *Biology of the Nitrogen Cycle*, 343-358. 10.1016/B978-044452857-5.50023-0
- [11] Anbu P., Kang C.H., Shin Y.J., So J.S. (2016): Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *SpringerPlus*, 5, 250-276. 10.1186/s40064-016-1869-2
- [12] Andrews R.K., Dexter A., Blakeley R.L., Zerner B. (1986): Jack bean urease (EC 3.5.1.5). 8. On the inhibition of urease by amides and esters of phosphoric acid. *Journal of the American Chemical Society*, 108, 7124-7125. 10.1021/ja00282a059
- [13] Aono R., Ito M., Machida T. (1999): Contribution of the Cell Wall Component Teichuronopeptide to pH Homeostasis and Alkaliphily in the Alkaliphile *Bacillus lentus* C-125. *Journal of Bacteriology*, 181(21), 6600-6666. 10.1128/JB.181.21.6600-6606.1999
- [14] Arias D., Cisternas L.A., Miranda C., Rivas M. (2019): Bioprospecting of Ureolytic Bacteria From Laguna Salada for Biomineralization Applications. *Frontier in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 209. 10.3389/fbioe.2018.00209
- [15] Arunachalam K.D., Sathyanarayanan K. S., Darshan B. S., Balaji Raja R., India T. (2010): Studies on the characterisation of Biosealant properties of *Bacillus sphaericus*. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 2(3), 270-277. ISSN: 0975-5462
- [16] Bachmann D., Weichert F., Rinkenauer, G. (2018): Review of Three-Dimensional Human-Computer Interaction with Focus on the Leap Motion Controller. *Sensors*, 18(7), 2194. 10.3390/s18072194
- [17] Bachmeier K.L., Williams A.E., Warming J.R., Bang S.S. (2002): Urease activity in microbially-induced calcite precipitation. *Journal of Biotechnology*, 93(2), 171-181. 10.1016/S0168-1656(01)00393-5
- [18] Bang S.S., Galinat J.K., Ramakrishnan V. (2001): Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(4-5), 404-409. 10.1016/S0141-0229(00)00348-3
- [19] Baskar R., Baskar S., Mauclaire L., McKenzie J.A. (2006): Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: Possible origin for stalactites in Sahastradhara caves, Dehradun, India. *Current Science*, 90(1), 58-64. Corpus ID: 89348937
- [20] Bellavia, L., Kim-Shapiro, D. B., King, S. B. (2015): Detecting and monitoring NO, SNO and nitrite in vivo. *Future Science OA*, 1(1). 10.4155/fso.15.36

- [21] Bergdale, T. E., Pinkelman, R. J., Hughes, S. R., Zambelli, B., Ciurli, S., & Bang, S. S. (2012): Engineered biosealant strains producing inorganic and organic biopolymers. *Journal of Biotechnology*, 161(3), 181–189. 10.1016/j.jbiotec.2012.07.001
- [22] Bhaduri S., Debnath N., Mitra S., Liu Y., Kumar A. (2016): Microbiologically Induced Calcite Precipitation Mediated by *Sporosarcina pasteurii*. *Journal of Visualized Experiments*, 110. 10.3791/53253
- [23] Bibi S., Oualha M., Ashfaq M. Y., Suleiman M. T., Zouari N. (2018): Isolation, differentiation and biodiversity of ureolytic bacteria of Qatari soil and their potential in microbially induced calcite precipitation (MICP) for soil stabilization. *RSC Advances*, 8(11), 5854–5863. 10.1039/c7ra12758h
- [24] Bortoletto-Santos R., Guimarães G.G.F., Roncato Junior V., Cruz D.F. da Polito W.L., Ribeiro C. (2020): Biodegradable oil-based polymeric coatings on urea fertilizer: N release kinetic transformations of urea in soil. *Scientia Agricola*, 77(1). 10.1590/1678-992x-2018-0033
- [25] Brečević Lj., Kralj D. (2007): On Calcium Carbonates: from Fundamental Research to Application. *Croatica Chemica Acta*, 80(3-4), 467-484.
- [26] Brlek, T., Pezo, L., Voća, N., Krička, T., Vukmirović, Đ., Čolović, R., Bodroža-Solarov, M. (2013). Chemometric approach for assessing the quality of olive cake pellets. *Fuel Processing Technology*, 116, 250–256. 10.1016/j.fuproc.2013.07.006
- [27] Buck J.D. (1982): Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4), 992-993. 10.1128/aem.44.4.992-993.1982
- [28] Burbank M.B., Weaver T.J., Williams B.C., Crawford R.L. (2012): Urease Activity of Ureolytic Bacteria Isolated from Six Soils in which Calcite was Precipitated by Indigenous Bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 29(4), 389–395. 10.1080/01490451.2011.575913
- [29] Cabello-Olmo M., Oneca M., Torre P., Díaz J.V., Encio I.J., Barajas M., Araña M. (2020): Influence of Storage Temperature and Packaging on Bacteria and Yeast Viability in a Plant-Based Fermented Food. *Foods*, 9(3), 302. 10.3390/foods9030302
- [30] Cacchio, P., Ercole, C., Cappuccio, G., & Lepidi, A. (2003): Calcium Carbonate Precipitation by Bacterial Strains Isolated from a Limestone Cave and from a Loamy Soil. *Geomicrobiology Journal*, 20(2), 85–98. 10.1080/01490450303883
- [31] Castanier S., Métayer-Levrel G.L., Perthuisot J.P. (2000): Bacterial Roles in the Precipitation of Carbonate Minerals. U knjizi: *Microbial Sediments* (urednici Riding R.E., Awramik S.M.) Springer, Berlin, Heidelberg. 10.1007/978-3-662-04036-2_5
- [32] Chahal N., Rajor A., Siddique R. (2011): Calcium carbonate precipitation by different bacterial strains. *African Journal of Biotechnology*, 10(42), 8359–8372. 10.5897/ajb11.345
- [33] Chatterjee S.N., Bhattacharya T., Dangar T.K. Chandra G. (2007): Ecology and diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil environment. *African Journal of Biotechnology*, 6(13), 1587-1591.
- [34] Chattopadhyay P. B., Rangarajan, R. (2014): Application of ANN in sketching spatial nonlinearity of unconfined aquifer in agricultural basin. *Agricultural Water Management*, 133, 81–91. 10.1016/j.agwat.2013.11.007
- [35] Chen H.J., Huang Y.H., Chen C.C., Maity J.P., Chen C.Y. (2018): Microbial Induced Calcium Carbonate Precipitation (MICP) Using Pig Urine as an Alternative to Industrial Urea. *Waste and Biomass Valorization*, 10, 2887–2895. doi:10.1007/s12649-018-0324-8
- [36] Chisti, Y., Moo-Young, M. (2003): Bioreactors. *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, 247–271. 10.1016/b0-12-227410-5/00067-3
- [37] Chu J., Stabnikov V., Ivanov V. (2012): Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation on Surface or in the Bulk of Soil. *Geomicrobiology Journal*, 29(6), 544–549. 10.1080/01490451.2011.592929
- [38] Chuo S.C., Mohamed S.F., Mohd Setapar S.H., Ahmad A., Jawaid M., Wani W.A., Yaqoob A.A., Mohamad Ibrahim M.N. (2020): Insights into the Current Trends in the Utilization of Bacteria for Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation. *Materials*, 21, 4993. 10.3390/ma13214993
- [39] Clarke A., Gaston K.J. (2006): Climate, energy and diversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1599), 2257–2266. 10.1098/rspb.2006.3545
- [40] Coico R. (2005): Gram Staining. *Current Protocols in Microbiology*, A.3C.1-A.3C.2. 10.1002/9780471729259.mca03cs00

- [41] Connolly J., Kaufman M., Rothman A., Gupta R., Redden G., Schuster M., Gerlach R. (2013): Construction of two ureolytic model organisms for the study of microbially induced calcium carbonate precipitation. *Journal of Microbiological Methods*, 94(3), 290–299. 10.1016/j.mimet.2013.06.028
- [42] Das Murtey M., Ramasamy P.I. (2016): Sample Preparations for Scanning Electron Microscopy – Life Sciences. U knjizi: *Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences* (urednici Janecek M., Kral R.), IntechOpen, 2. 10.5772/61720.
- [43] Davies R., Teall O., Pilegis M., Kanellopoulos A., Sharma T., Jefferson A. (2018): Large scale application of self-healing concrete: design, construction, and testing. *Frontier in Materials*, 5, 51. 10.3389/fmats.2018.00051
- [44] De Belie N., De Muynck, W. (2008): Crack repair in concrete using biodeposition. *Concrete Repair, Rehabilitation and Retrofitting II*, 291–292. 10.1201/9781439828403.ch107
- [45] De Macedo F.G., Bresolin J.D., Santos E.F., Furlan F., Lopes da Silva W.T., Polacco J.C., Lavres J. (2016): Nickel Availability in Soil as Influenced by Liming and Its Role in Soybean Nitrogen Metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 7. 10.3389/fpls.2016.01358
- [46] De Muynck W., De Belie N., Verstraete W. (2010): Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Ecological Engineering*, 36(2), 118–136. 10.1016/j.ecoleng.2009.02.006
- [47] Dejaegher B., Dumarey M., Capron X., Bloomfield M. S., Vander Heyden Y. (2007): Comparison of Plackett–Burman and supersaturated designs in robustness testing. *Analytica Chimica Acta*, 595(1-2), 59–71. 10.1016/j.aca.2006.11.077
- [48] Dejaegher B., Vander Heyden Y. (2007): Supersaturated designs: set-ups, data interpretation, and analytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(5), 1227–1240. 10.1007/s00216-007-1641-0
- [49] DeJong J.T., Mortensen B.M., Martinez B.C., Nelson D.C. (2009): Bio-mediated soil improvement. *Ecological Engineering*, 36(2), 197–210. 10.1016/j.ecoleng.2008.12.029
- [50] Dick J., De Wind W., De Graef B., Saveyn H., Van der Meeren P., De Belie N., Verstraete W. (2006): Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation*, 17(4), 357–367. 10.1007/s10532-005-9006-x
- [51] Dickson A. (2010): The carbon dioxide system in seawater: Equilibrium chemistry and measurements. U knjizi: *Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting* (urednici Riebesell U., Fabry V.J., Hansson L., Gattuso J.P.), Luksemburg, Zvanična kancelarija Evropske unije.
- [52] Donnelly, F. C., Purcell-Milton, F., Framont, V., Cleary, O., Dunne, P. W., & Gun'ko, Y. K. (2017): Synthesis of CaCO₃ nano- and micro-particles by dry ice carbonation. *Chemical Communications*, 53(49), 6657–6660. 10.1039/c7cc01420a
- [53] Dörr, T., Moynihan, P.J., Mayer, C. (2019): Editorial: Bacterial Cell Wall Structure and Dynamics. *Frontiers in Microbiology*, 10. 10.3389/fmicb.2019.02051
- [54] Doumpos M., Zopounidis C. (2011): Preference disaggregation and statistical learning for multicriteria decision support: A review. *European Journal of Operational Research*, 209(3), 203–214. 10.1016/j.ejor.2010.05.029
- [55] Dupraz S., Ménez B., Gouze P., Leprovost R., Bénézech P., Pokrovsky O.S., Guyot, F. (2009): Experimental approach of CO₂ biomineralization in deep saline aquifers. *Chemical Geology*, 265(1-2), 54–62. 10.1016/j.chemgeo.2008.12.012
- [56] Enyedi N.T., Makk J., Kótai L., Berényi B., Klébert S., Sebestyén Z., Németh P. (2020): Cave bacteria-induced amorphous calcium carbonate formation. *Scientific Reports*, 10(1). 10.1038/s41598-020-65667-w
- [57] Ernst F.D., van Vliet A.H.M., Kist M., Kusters J.G., Bereswill S. (2007): The role of nickel in environmental adaptation of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. U knjizi: *Nickel and its surprising impact in nature* (urednici Sigel A., Sigel H., Sigel R.K.O.), John Wiley & Sons, Ltd, 545-579.
- [58] Ettenauer J., Piñar G., Sterflinger K., Gonzalez-Muñoz M.T., Jroundi F. (2011): Molecular monitoring of the microbial dynamics occurring on historical limestone buildings during and after the *in-situ* application of different bio-consolidation treatments. *Science of The Total Environment*, 409(24), 5337–5352. 10.1016/j.scitotenv.2011.08.063
- [59] Farrugia C., Borg R.P., Ferrara L., Buhagiar J. (2019): The Application of *Lysinibacillus sphaericus* for surface treatment and crack healing in mortar. *Frontiers in Built Environment*, 5. 10.3389/fbuil.2019.00062

- [60] Ferrari M.D., Neirotti E., Albornoz C. (1998): Occurrence of heterotrophic bacteria and fungi in an aviation fuel handling system and its relationship with fuel fouling. *Revista Argentina de Microbiología*, 30(3), 105-14. PMID: 9793139
- [61] Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., dos Santos, W. N. L. (2007): Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179–186. 10.1016/j.aca.2007.07.011
- [62] Fujita F., Grant Ferris R., Daniel Y. (2000): Calcium Carbonate Precipitation by Ureolytic Subsurface Bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 17(4), 305–318. 10.1080/01490450050193360
- [63] Gadd G.M. (2007): Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*, 111(1), 3–49. 10.1016/j.mycres.2006.12.001
- [64] Garcia-Teijeiro R., Lightfoot D. A., Hernandez J. D. (2009): Effect of a Chemical Modified Urea Fertilizer on Soil Quality: Soil Microbial Populations Around Corn Roots. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 40(13-14), 2152–2168. 10.1080/00103620902960641
- [65] Gat D., Tsesarsky M., Shamir D., Ronen Z. (2014): Accelerated microbial-induced CaCO₃ precipitation in a defined coculture of ureolytic and non-ureolytic bacteria. *Biogeosciences*, 11(10), 2561–2569. 10.5194/bg-11-2561-2014
- [66] Geysant J., Huwald E., Strauch D. (2001): Calcium carbonate: from the Cretaceous period into the 21st century, F. Wolfgang Tegethoff Birkhäuser Verlag, Basel, Boston.
- [67] Ghosh T., Bhaduri S., Montemagno C., Kumar A. (2019): *Sporosarcina pasteurii* can form nanoscale calcium carbonate crystals on cell surface. *PLOS ONE*, 14(1), e0210339. 10.1371/journal.pone.0210339
- [68] Gilmour R., Messner P., Guffanti A.A., Kent R., Scheberl A., Kendrick N., Krulwich T.A. (2000): Two-Dimensional Gel Electrophoresis Analyses of pH-Dependent Protein Expression in Facultatively Alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 Lead to Characterization of an S-Layer Protein with a Role in Alkaliphily. *Journal of Bacteriology*, 182(21), 5969–5981. 10.1128/jb.182.21.5969-5981.200
- [69] Gok S., Severcan M., Goormaghtigh E., Kandemir I., Severcan F. (2015): Differentiation of Anatolian honey samples from different botanical origins by ATR-FTIR spectroscopy using multivariate analysis. *Food Chemistry*, 170, 234–240. 10.1016/j.foodchem.2014.08.040
- [70] Goldberg D.E. (1989): Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning. 1st ed. Boston, MA, USA: Addison-Wesley Longman Publishing Co., Inc.
- [71] Golovkina, D.A., Zhurishkina, E.V., Ivanova, L.A., Baranchikov, A.E., Sokolov, A.Y., Bobrov, K.S., Kulminskaya, A.A. (2020): Calcifying Bacteria Flexibility in Induction of CaCO₃ Mineralization. *Life*, 10(12), 317. 10.3390/life10120317
- [72] Gorospe C.M., Han S.H., Kim S.G., Park J.Y., Kang, C.H., Jeong J.H., So J.S. (2013): Effects of different calcium salts on calcium carbonate crystal formation by *Sporosarcina pasteurii* KCTC 3558. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(5), 903–908. 10.1007/s12257-013-0030-0
- [73] Granato, D., de Araújo Calado, V. M. (2013): The use and importance of design of experiments (DOE) in process modelling in food science and technology. *Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology*, 1–18. 10.1002/9781118434635.ch1
- [74] Gresham T.L.T., Sheridan P.P., Watwood M.E., Fujita Y., Colwell F.S. (2007): Design and Validation of ureC-based Primers for Groundwater Detection of Urea-Hydrolyzing Bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 24(3-4), 353–364. 10.1080/01490450701459283
- [75] Guo L., Ye L., Zhao Q., Ma Y., Yang J., Luo Y. (2014): Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. *Journal of Thoracic Disease*, 6(5), 534-538. 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.02.18
- [76] Gurunathan B., Sahadevan R. (2011): Statistical and evolutionary optimisation of operating conditions for enhanced production of fungal l-asparaginase. *Chemical Papers*, 65(6). 10.2478/s11696-011-0072-8
- [77] Halder S., Yadav K.K., Sarkar R., Mukherjee S., Saha P., Haldar S., Sen T. (2015): Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *SpringerPlus*, 4(1). 10.1186/s40064-015-1476-7
- [78] Hammad I.A., Talkhan F.N., Zoheir A.E. (2013): Urease activity and induction of calcium carbonate precipitation by *Sporosarcina pasteurii* NCIMB 8841, *Journal of Applied Science and Research*, 9(3), 1525-1533. ISSN 1819-544X

- [79] Hammes F., Boon N., de Villiers J., Verstraete W., Siciliano S.D. (2003): Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4901-4909. 10.1128/AEM.69.8.4901-4909.2003
- [80] Hammes F., Verstraete W. (2002): Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 1(1), 3-7. 10.1023/a:1015135629155
- [81] Heinrich K., Leslie D.J., Jonas K. (2015): Modulation of Bacterial Proliferation as a Survival Strategy. *Advances in Applied Microbiology*, 127-171. 10.1016/bs.aambs.2015.02.004
- [82] Heirman G., De Graef B., De Windt W., Herremans T., Vangheel T., Van Gemert D., De Belie N., Verstraete W. (2005): Biological repair of damaged concrete and mortar surfaces: Biomineralisation. 6th Int. Conf. on Materials Science and Restoration (MSR VI), Karlsruhe, Nemačka.
- [83] Helmi F.M., Elmitwalli H.R., Elnagdy S.M., El-Hagrassy A.F. (2016): Calcium carbonate precipitation induced by ureolytic bacteria *Bacillus licheniformis*. *Ecological Engineering*, 90, 367-371. 10.1016/j.ecoleng.2016.01.044
- [84] Henry D.G., Watson J.S., John C.M. (2017): Assessing and calibrating the ATR-FTIR approach as a carbonate rock characterization tool. *Sedimentary Geology*, 347, 36-52. 10.1016/j.sedgeo.2016.07.003
- [85] Heveran C.M., Liang L., Nagarajan A., Hubler M., Gill R., Cameron J.C., Cook S.M., Srubar W. (2019): Engineered Ureolytic Microorganisms Can Tailor the Morphology and Nanomechanical Properties of Microbial-Precipitated Calcium Carbonate. *Scientific Report*, 9, 14721. 10.1038/s41598-019-51133-9
- [86] Horikoshi K., William D.G. (1998): *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments*, Wiley-Liss Inc. New York, United States of America.
- [87] Hsu C.M., Huang Y.H., Nimje V., Lee W.C., Chen H.-J., Kuo Y.H., Chen C.Y. (2018): Comparative Study on the Sand Bioconsolidation through Calcium Carbonate Precipitation by *Sporosarcina pasteurii* and *Bacillus subtilis*. *Crystals*, 8(5), 189, 10.3390/cryst8050189
- [88] Hu, W., Dai, D. (2015): Investigation of the Properties of Sand Tubules, a Biomineralization Product, and their Microbial Community. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(2): 364-372. 10.4014/jmb.1508.08033
- [89] Huang S.C., Burne R.A., Chen Y.Y.M. (2014): The pH-Dependent Expression of the Urease Operon in *Streptococcus salivarius* Is Mediated by CodY. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5386-5393. 10.1128/aem.00755-14
- [90] İlhan E., Karahaliloglu Z., Kilicay E., Hazer B., Denkbaz E.B. (2019): Potent bioactive bone cements impregnated with polystyrene-g-soybean oil-AgNPs for advanced bone tissue applications. *Materials Technology*, 1-16. 10.1080/10667857.2019.1661157
- [91] Imran M.A., Kimura S., Nakashima K., Evelpidou N., Kawasaki S. (2019): Feasibility Study of Native Ureolytic Bacteria for Biocementation Towards Coastal Erosion Protection by MICP Method. *Applied Sciences*, 9(20), 4462. 10.3390/app9204462
- [92] Ivanov V., Stabnikov V. (2016): Optimization and Design of Construction Biotechnology Processes. *Green Energy and Technology*, 235-260. 10.1007/978-981-10-1445-1_12
- [93] Ivanov V., Stabnikov V., Stabnikova O., Kawasaki S. (2019): Environmental safety and biosafety in construction biotechnology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35. 10.1007/s11274-019-2598-9
- [94] Ivanova L., Golovkina D., Zhurishkina E., Garmay Y., Baranchikov A., Tsvigun N., Zabrodskaya Y., Yaprntsev A., Gorshkov A., Lebedev K., Shadzhyan A., Kopitsa G., Egorov V., Kulminskaya A. (2020): The matrix is everywhere: CaCO₃ biomineralization by the *Bacillus licheniformis* planktonic cells. *BioRxiv*, in press
- [95] Jeyamkondan, S., Jayas, D. ., Holley, R. . (2001): Microbial growth modelling with artificial neural networks. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 343-354. 10.1016/s0168-1605(00)00483-9
- [96] Jin D., Zhao S., Zheng N., Bu D., Beckers Y., Denman S. E., McSweeney C., Wang, J. (2017): Differences in Ureolytic Bacterial Composition between the Rumen Digesta and Rumen Wall Based on ureC Gene Classification. *Frontiers in Microbiology*, 8. 10.3389/fmicb.2017.00385
- [97] Jonkers H., Schlangen E. (2008): Development of a bacteria-based self-healing concrete. U knjizi: *Tailor Made Concrete Structures* (Walraven, Stoelhorst, editori), Taylor and Francis Group.
- [98] Jonkers H.M., Thijssen A., Muyzer G., Copuroglu O., Schlangen E. (2010): Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecological Engineering*, 36(2), 230-235. 10.1016/j.ecoleng.2008.12.036

- [99] Jonkers, H. (2011): Bacteria-based self-healing concrete, *HERON*, 56, 1/2.
- [100] Jorquera G., Thiel M., Portflitt-Toro M., Dewitte B. (2019): Marine protected areas invaded by floating anthropogenic litter: an example from the South Pacific. *Aquatic Conservatio: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29, 245-259, 10.1002/aqc.3095
- [101] Jroundi F., Schiro M., Ruiz-Agudo E., Elert K., Martín-Sánchez I., González-Muñoz M. T., Rodríguez-Navarro C. (2017): Protection and consolidation of stone heritage by self-inoculation with indigenous carbonatogenic bacterial communities. *Nature Communications*, 8(1). 10.1038/s41467-017-00372-3
- [102] Kang C.H., Kwon Y.J., So J.S. (2015): Soil Bioconsolidation Through Microbially Induced Calcite Precipitation by *Lysinibacillus sphaericus* WJ-8. *Geomicrobiology Journal*, 33(6), 473-478. 10.1080/01490451.2015.1053581
- [103] Kappaun K., Piovesan A.R., Carlini C.R., Ligabue-Braun R. (2018): Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. *Journal of Advanced Research*, 13, 3-17. 10.1016/j.jare.2018.05.010
- [104] Kim G., Kim J., Youn H. (2016): Effect of Temperature, pH, and Reaction Duration on Microbially Induced Calcite Precipitation. *Applied Sciences*, 8(8), 1277. 10.3390/app8081277
- [105] Kim H.J., Eom H.J., Park C., Jung J., Shin B., Kim W., Chung N., Choi I.G., Park W. (2018): Calcium Carbonate Precipitation by *Bacillus* and *Sporosarcina* Strains Isolated from Concrete and Analysis of the Bacterial Community of Concrete. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 540-548. 10.4014/jmb.1511.11008
- [106] Kim I.G., Jo B.H., Kang D.G., Kim C.S., Choi Y.S., Cha H.J. (2012): Biomineralization-based conversion of carbon dioxide to calcium carbonate using recombinant carbonic anhydrase. *Chemosphere*, 87:1091-1096. 10.1016/j.chemosphere.2012.02.003.
- [107] Knorre H., Krumbein W. E. (2000): Bacterial Calcification. *Microbial Sediments*, 25-31. 10.1007/978-3-662-04036-2_4
- [108] Kojić J.S., Ilić N.M., Kojić P.S., Pezo L.L., Banjac V.V., Krulj J.A., Bodroža Solarov M.I. (2018): Multiobjective process optimization for betaine enriched spelt flour based extrudates. *Journal of Food Process Engineering*, 42(1), e12942. 10.1111/jfpe.12942
- [109] Krajewska B. (2009): Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59(1-3), 9-21. 10.1016/j.molcatb.2009.01.003
- [110] Krajewska B. (2018): Urease-aided calcium carbonate mineralization for engineering applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 13, 59-67. 10.1016/j.jare.2017.10.009
- [111] Krasowska, A., Sigler, K. (2014): How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4. 10.3389/fcimb.2014.00112
- [112] Krulwich T. (2005): Extreme Alkaliphilis: Experts at Alkaline pH homeostasis and able to grow when cytoplasmic pH rises above the limit for growth of non-alkaliphiles. *International Symposium on Extremophiles and Their Applications*, 220-227.
- [113] Kulkarni P.B., Nemade P.D., Wagh M.P. (2019): Healing of Generated Cracks in Cement Mortar Using MICP. *Civil Engineering Journal*, 6(4), 679-692. 10.28991/cej-2020-03091500
- [114] Kumari D., Qian X.Y., Pan X., Achal V., Li Q., Gadd G.M. (2016): Microbially-induced Carbonate Precipitation for Immobilization of Toxic Metals. *Advances in Applied Microbiology*, 79-108. 10.1016/bs.aambs.2015.12.002
- [115] Kurmaç Y. (2009). The impact of toxicity of metals on the activity of ureolytic mixed culture during the precipitation of calcium. *Journal of Hazardous Materials*, 163(2-3), 1063-1067. 10.1016/j.jhazmat.2008.07.061
- [116] Lalucat, J., Bennisar, A., Bosch, R., Garcia-Valdes, E., Palleroni, N. J. (2006): Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 510-547. 10.1128/mmbr.00047-05
- [117] Lauchnor E.G., Topp D.M., Parker A. E., Gerlach. R. (2015): Whole cell kinetics of ureolysis by *Sporosarcina pasteurii*. *Journal of Applied Microbiology*, 118, 6, 1321-1332. 10.1111/jam.12804
- [118] Lee Y.S., Park W. (2018): Current challenges and future directions for bacterial self-healing concrete. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 3059-3070. 10.1007/s00253-018-8830-y
- [119] Leggett M.J., McDonnell G., Denyer S.P., Setlow P., Maillard, J.Y. (2012): Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 113(3), 485-498. 10.1111/j.1365-2672.2012.05336.x

- [120] Li M., Cheng X., Guo H. (2013): Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 76, 81–85. doi:10.1016/j.ibiod.2012.06.016
- [121] Lin Y.P., Singer P.C. (2005): Inhibition of calcite crystal growth by polyphosphates. *Water Research*, 39(19), 4835–4843. 10.1016/j.watres.2005.10.003
- [122] Liu J., Li C., Jing J., Zhao P., Luo Z., Cao M., Chai, B. (2018): Ecological patterns and adaptability of bacterial communities in alkaline copper mine drainage. *Water Research*, 133, 99–109. 10.1016/j.watres.2018.01.014
- [123] Liu, D., Lian, B., Dong, H. (2012): Isolation of *Paenibacillus* sp. and Assessment of its Potential for Enhancing Mineral Weathering. *Geomicrobiology Journal*, 29(5), 413–421. 10.1080/01490451.2011.576602
- [124] Logan N.A. (2010): *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and Other Aerobic Endospore-Forming Bacteria. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 10.1002/9780470688618.taw0036
- [125] Logan N.A., Halket G. (2011): Developments in the Taxonomy of Aerobic, Endospore-forming Bacteria. *Endospore-Forming Soil Bacteria*, 1–29. 10.1007/978-3-642-19577-8_1
- [126] Logan N.A., Vos P. (2011): Endospore-forming Soil Bacteria. *Soil Biology*. 10.1007/978-3-642-19577-8
- [127] Lojanica, V. (2001): Uloga veštačkih neuronskih mreža u predviđanju, Arhitektonski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- [128] López-García P., Kazmierczak J., Benzerara K., Kempe S., Guyot F., Moreira D. (2005): Bacterial diversity and carbonate precipitation in the giant microbialites from the highly alkaline Lake Van, Turkey. *Extremophiles*, 9(4), 263–274. 10.1007/s00792-005-0457-0
- [129] López-Moreno A., Sepúlveda-Sánchez J.D., Mercedes Alonso Guzmán E.M., Le Borgne, S. (2014): Calcium carbonate precipitation by heterotrophic bacteria isolated from biofilms formed on deteriorated ignimbrite stones: influence of calcium on EPS production and biofilm formation by these isolates. *Biofouling*, 30(5), 547–560. 10.1080/08927014.2014.888715
- [130] Lowe D.A. (2001): Production of Enzymes. U knjizi: *Basic Biotechnology* (urednici Ratledge C., Kristiansen B.), Cambridge University Press, Cambridge, 391-408.
- [131] Ma L., Pang A.P., Luo Y., Lu X., Lin F. (2020): Beneficial factors for biomineralization by ureolytic bacterium *Sporosarcina pasteurii*. *Microbial Cell Factories*, 19(1). 10.1186/s12934-020-1281-z
- [132] Maier R.M., Pepper I.L., Gerba C.P. (2009): *Environmental Microbiology*, Elsevier Inc. Amsterdam, Holandija, 38–54.
- [133] Mandic-Mulec I., Prosser J.I. (2011): Diversity of Endospore-forming Bacteria in Soil: Characterization and Driving Mechanisms. *Endospore-Forming Soil Bacteria*, 31–59. 10.1007/978-3-642-19577-8_2
- [134] Martin D., Dodds K., Ngwenya B.T., Butler I.B., Elphick S.C. (2012): Inhibition of *Sporosarcina pasteurii* under anoxic conditions: implications for subsurface carbonate precipitation and remediation via ureolysis. *Environmental Science and Technology*, 46, 8351–8355. 10.1021/es3015875
- [135] Matijaković N., Magnabosco G., Scarpino F., Fermani S., Falini G., Kralj, D. (2018): Synthesis and Adsorbing Properties of Tabular {001} Calcite Crystals. *Crystals*, 9(1), 16. 10.3390/cryst9010016
- [136] Mazzei L., Musiani F. Ciurli S. (2020): The structure-based reaction mechanism of urease, a nickel dependent enzyme: tale of a long debate. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 25, 829–845. 10.1007/s00775-020-01808-w
- [137] McMeekin, T., Olley, J., Ratkowsky, D., Corkrey, R., & Ross, T. (2013): Predictive microbiology theory and application: Is it all about rates? *Food Control*, 29(2), 290–299. 10.1016/j.foodcont.2012.06.001
- [138] Mekonnen, E., Kebede, A., Nigussie, A., Kebede, G., Tafesse, M. (2021): Isolation and Characterization of Urease-Producing Soil Bacteria. *International Journal of Microbiology*, 8888641. 10.1155/2021/8888641
- [139] Merma A.G., Castañeda Olivera C.A., Hacha R.R., Torem M.L., dos Santos B.F. (2019): Optimization of hematite and quartz BIOFLOTATION by AN artificial neural network (ANN). *Journal of Materials Research and Technology*, 8(3), 3076–3087. 10.1016/j.jmrt.2019.02.022.
- [140] Milliman J.D. (1993): Production and accumulation of calcium carbonate in the ocean: Budget of a nonsteady state. *Global Biogeochemical Cycles*, 7(4), 927–957. 10.1029/93gb02524
- [141] Mitchell A.C., Espinosa-Ortiz E.J., Parks S.L., Phillips A.J., Cunningham A.B., Gerlach R. (2019): Kinetics of calcite precipitation by ureolytic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Biogeosciences*, 16(10), 2147–2161. 10.5194/bg-16-2147-2019

- [142] Mitchell A.C., Ferris, F.G. (2005): The coprecipitation of Sr into calcite precipitates induced by bacterial ureolysis in artificial groundwater: Temperature and kinetic dependence. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(17), 4199–4210. 10.1016/j.gca.2005.03.014
- [143] Miyamoto-Shinohara Y., Imaizumi T., Sukenobe J., Murakami Y., Kawamura S., Komatsu Y. (2000): Survival Rate of Microbes after Freeze-Drying and Long-Term Storage. *Cryobiology*, 41(3), 251–255. 10.1006/cryo.2000.2282
- [144] Mobley H.L., Island M.D., Hausinger R.P. (1995): Molecular biology of microbial ureases. *Microbiological Review*, 59(3), 451-480. PMID: 7565414.
- [145] Montgomery D. (1987): Design and analysis of experiments, John Wiley and Sons, New York, Sjedinjene Američke Države.
- [146] Mors R., Jonker H. (2019): Bacteria-based self-healing concrete: evaluation of full-scale demonstrator projects. *RILEM Technical Letters*, 4, 138-144. 10.21809/rilemtechlett.2019.93
- [147] Morsdorf G., Kaltwasser H. (1989): Ammonium assimilation in *Proteus vulgaris*, *Bacillus pasteurii*, and *Sporosarcina ureae*. *Archives of Microbiology*, 152(2), 125–131. 10.1007/bf00456089
- [148] Morsdorf, G., Kaltwasser, H. (1989): Ammonium assimilation in *Proteus vulgaris*, *Bacillus pasteurii*, and *Sporosarcina ureae*. *Archives of Microbiology*, 152(2), 125–131. 10.1007/bf00456089
- [149] Mulrooney S., Zakharian T., Schaller A., Hausinger R.P. (2001): Dual effect of ionic strength on *Klebsiella aerogenes* urease: pH-dependent activation and inhibition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 394, 280-282. 10.1006/abbi.2001.2536
- [150] Nakbanpote W., Panitlurtumpai N., Sangdee A., Sakulpone N., Sirisom P., Pimthong A. (2013): Salt-tolerant and plant growth-promoting bacteria isolated from Zn/Cd contaminated soil: identification and effect on rice under saline conditions. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 379–387. 10.1080/17429145.2013.842000
- [151] Nayanthara P.G.N., Dassanayake A.B.N., Nakashima K., Kawasaki S. (2019): Microbial Induced Carbonate Precipitation Using a Native Inland Bacterium for Beach Sand Stabilization in Nearshore Areas. *Applied Sciences*, 9(15), 3201. 10.3390/app9153201
- [152] Nemati M., Green E. A., Voordouw G. (2015). Permeability profile modification using bacterially formed calcium carbonate: comparison with enzymic option. *Process Biochemistry*, 40(2), 925–933. 10.1016/j.procbio.2004.02.019
- [153] Nonakaran H.S., Pazhouhandeh M., Keyvani A., Abdollahipour F.Z., Shirza A. (2015): Isolation and identification of *Pseudomonas azotoformans* for induced calcite precipitation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(12), 1993–2001. 10.1007/s11274-015-1948-5
- [154] Okwadha G.D.O., Li J. (2010): Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. *Chemosphere*, 81(9), 1143–1148. 10.1016/j.chemosphere.2010.09.066
- [155] Omoregie A., Gaza K., Ong D., Nissom P. (2017): Microbial-induced carbonate precipitation using a sustainable treatment technique. *International Journal of Service Management and Sustainability* 2(1):17-31. 10.24191/ijSMS.v2i1.6045
- [156] Omoregie A., Senian N., Li P.Y., Ngu L.H., Ong D., Ginjom I.R.H., Nissom P. (2015): Isolation and characterisation of urease producing bacteria from Sarawak caves and their role in calcite precipitation. *International Congress of the Malaysian Society for Microbiology (ICMSM2015)*, Bayview Beach Resort, Penang, Malaysia.
- [157] Omoregie A.I., Ong D.E.L., Nissom P.M. (2018): Assessing ureolytic bacteria with calcifying abilities isolated from limestone caves for biocalcification. *Letters in Applied Microbiology*, 68(2), 173-181. 10.1111/lam.13103
- [158] Orhan F., Gulluce M. (2015): Isolation and Characterization of Salt-Tolerant Bacterial Strains in Salt-Affected Soils of Erzurum, Turkey. *Geomicrobiology Journal*, 32(6), 521–529. 10.1080/01490451.2014.962674
- [159] Ortega-Villamagua E., Gudiño-Gomezjurado M., Palma-Cando A. (2020): Microbiologically Induced Carbonate Precipitation in the Restoration and Conservation of Cultural Heritage Materials. *Molecules*, 25, 5499. 10.3390/molecules25235499
- [160] Pang B., Qian J., Zhang Y., Jia Y., Ni H., Pan, S.D., Liu, Z. (2019): 5S multifunctional intelligent coating with super-durable, superhydrophobic, self-monitoring, self-heating, and self-healing properties for existing construction application. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 10.1021/acsami.9b08303
- [161] Patnaik P. (2003): Handbook of Inorganic Chemicals. New York: McGraw-Hill, 1086.

- [162] Pavlić B., Pezo L., Marić B., Tukuljac L.P., Zeković Z., Solarov M.B., Teslić N. (2020): Supercritical fluid extraction of raspberry seed oil: Experiments and modelling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 104687. 10.1016/j.supflu.2019.104687
- [163] Peng J., Liu Z. (2019): Influence of temperature on microbially induced calcium carbonate precipitation for soil treatment. *PLOS ONE*, 14(6), e0218396. 10.1371/journal.pone.0218396
- [164] Pepper, I.L., Gerba, C.P. (2014): Cultural methods, u knjizi *Environmental Microbiology: Third Edition*. Elsevier Inc.
- [165] Pezo L., Ćurčić B., Filipović V., Nićetin M., Koprivica G., Mišljenović N., Lević Lj. (2013): Artificial neural network model of pork meat cubes osmotic dehydration. *Hemijska Industrija*, 67(3), 465–475. 10.2298/HEMIND120529082P
- [166] Pietikainen J., Pettersson M., Baath E. (2005): Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(1), 49–58. 10.1016/j.femsec.2004.10.002
- [167] Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005): Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. 10.1021/jfo502698
- [168] Provencio P., Polyak V. (2001): Iron Oxide-Rich Filaments: Possible Fossil Bacteria in Lechuguilla Cave, New Mexico. *Geomicrobiology Journal*, 18(3), 297–309. 10.1080/01490450152467804
- [169] Qian M., Zuo Y., Chen Z., Yin X., Liu Y., Yang W., Chen Y. (2019): Crystallization of CaCO₃ in Aqueous Solutions with Extremely High Concentrations of NaCl. *Crystals*, 9(12), 647. 10.3390/cryst9120647
- [170] Rajasekar A., Wilkinson S., Sekar R., Bridge J., Medina-Roldan E., Moy, C.K. (2018): Biomineralisation performance of bacteria isolated from a landfill in China. *Canadian Journal of Microbiology*. 10.1139/cjm-2018-0254
- [171] Ramachandran S.K., Ramakrishnan V., Bang S.S. (2001): Remediation of concrete using microorganisms. *Materials Journal*, 98(1), 3-9. 10.14359/10154
- [172] Rampelotto P.H. (2010): Resistance of Microorganisms to Extreme Environmental Conditions and Its Contribution to Astrobiology. *Sustainability*, 2(6), 1602–1623. 10.3390/su2061602
- [173] Ratledge C. (2001): Biochemistry and physiology of growth and metabolism. U knjizi: *Basic Biotechnology* (urednici Ratledge C., Kristiansen B.), Cambridge University Press, Cambridge, Velika Britanija, 17-44.
- [174] Reed K.E. (2001): Restriction enzyme mapping of bacterial urease genes: using degenerate primers to expand experimental outcomes. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 29(6), 239–244. 10.1111/j.1539-3429.2001.tb00131.x
- [175] Reeksting B.J., Hoffmann T.D., Tan L., Paine K., Gebhard S. (2020): In-depth profiling of calcite precipitation by environmental bacteria reveals fundamental mechanistic differences with relevance to application. *Applied and Environmental Microbiology*, 86, e02739-19. 10.1128/AEM.02739-19.
- [176] Ridgwell A., Zeebe R. (2005): The role of the global carbonate cycle in the regulation and evolution of the Earth system. *Earth and Planetary Science Letters*, 234(3-4), 299–315. 10.1016/j.epsl.2005.03.006
- [177] Rodriguez-Navarro C., Jimenez-Lopez C., Rodriguez-Navarro A., González-Munoz M. T., Rodriguez-Gallego M. (2007): Bacterially mediated mineralization of vaterite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71, 1197–1213. 10.1016/j.gca.2006.11.031
- [178] Rodriguez-Navarro C., Jroundi F., Schiro M., Ruiz-Agudo E., González –Muñoz M. T. (2012): Influence of substrate mineralogy on bacterial mineralization of calcium carbonate: Implications in stone conservation. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 4017–4029. 10.1128/AEM.07044-11
- [179] Rodriguez-Navarro C., Rodriguez-Gallego M., Chekroun K. B., Gonzalez-Muñoz M. T. (2003): Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralisation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2182–2193. 10.1128/AEM.69.4.2182-2193.2003
- [180] Romano A., Toraldo G., Cavella S., Masi P. (2007): Description of leavening of bread dough with mathematical modelling. *Journal of Food Processing*, 83, 142–148. 10.1016/j.jfoodeng.2007.02.014
- [181] Rusznyák A., Akob D.M., Nietzsche S., Eusterhues K., Totsche K.U., Neu T. R., Küsel K. (2011): Calcite Biomineralization by Bacterial Isolates from the Recently Discovered Pristine Karstic Herrenberg Cave. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1157–1167. 10.1128/aem.06568-11

- [182] Santoyo G., Hernandez-Pacheco C., Hernandez-Salmeron J., Hernandez-Leon R. (2017): The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: Toward sustainable agriculture. A review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15(1), e03R01. 10.5424/sjar/2017151-9990
- [183] Saracho C.A., Haigh S. K., Hata T., Soga K., Farsang S., Redfern S.A.T., Marek E. (2020): Characterisation of CaCO₃ phases during strain-specific ureolytic precipitation. *Scientific Reports*, 10(1). 10.1038/s41598-020-66831-y
- [184] Sarayu K., Iyer N.R., Murthy A.R. (2014): Exploration on the Biotechnological Aspect of the Ureolytic Bacteria for the Production of the Cementitious Materials—a Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5), 2308–2323. 10.1007/s12010-013-0686-0
- [185] Sarda D., Choonia H.S., Sarode D.D., Lele S.S. (2009): Biocalcification by *Bacillus pasteurii* urease: a novel application. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(8), 1111–1115. 10.1007/s10295-009-0581-4
- [186] Schaeffer A.B., Fulton M.D. (1933): A simplified method of straining endospores. *Science*, 77(1990), 194–194. 10.1126/science.77.1990.194
- [187] Schwantes-Cezario N., Medeiros L.P., De Oliveira A.G., Nakazato G., Katsuko Takayama Kobayashi R., Toralles B.M. (2017): Bioprecipitation of calcium carbonate induced by *Bacillus subtilis* isolated in Brazil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 123, 200–205. 10.1016/j.ibiod.2017.06.021
- [188] Seifan M., Berenjian A. (2019): Microbially induced calcium carbonate precipitation: a widespread phenomenon in the biological world. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103:4693–4708. 10.1007/s00253-019-09861-5
- [189] Seifan, M., Samani, A. K., & Berenjian, A. (2016a): Bioconcrete: next generation of self-healing concrete. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(6), 2591–2602. 10.1007/s00253-016-7316-z
- [190] Seifan, M., Samani, A. K., & Berenjian, A. (2016b): Induced calcium carbonate precipitation using *Bacillus* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(23), 9895–9906. 10.1007/s00253-016-7701-7
- [191] Sharma M., Satyam N., Reddy K.R. (2019): Investigation of various gram-positive bacteria for MICP in Narmada Sand, India, *International Journal of Geotechnical Engineering*, 15(2), 10.1080/19386362.2019.1691322
- [192] Shukla A., Cameotra S.S. (2016): A New Method for the Screening of Ureolytic Bacteria Inducing Calcium Carbonate Precipitation. *Journal of Biotechnology & Biomaterials*, 06(04). 10.4172/2155-952x.1000248
- [193] Siddique R., Chahal N.K. (2011): Effect of ureolytic bacteria on concrete properties. *Construction and Building Materials*, 25(10), 3791–3801. 10.1016/j.conbuildmat.2011.04.010
- [194] Siefert J.L., Larios-Sanz M., Nakamura L.K., Slepecky R.A., Paul J.H., Moore E.R. (2000): Phylogeny of marine *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico. *Current Microbiology*, 41, 84–88. 10.1007/s002840010098
- [195] Silitonga A.S., Mahlia T.M.I., Shamsuddin A.H., Ong H.C., Milano J., Kusumo F., Sebayang A.H., Dharma S., Ibrahim H., Husin H., Mofijur M., Ashrafur Rahman S.M. (2019): Optimization of *Cerbera manghas* biodiesel production using artificial neural networks integrated with ant colony optimization. *Energies*. 12, 3811. 10.3390/en12203811
- [196] Silva, P. da, Nahas, E. (2002): Bacterial diversity in soil in response to different plans, phosphate fertilizers and liming. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(4). 10.1590/s1517-83822002000400005
- [197] Silva-Castro G.A., Uad I., Rivadeneyra A., Vilchez J.I., Martin-Ramos D., González-López J., Rivadeneyra M.A. (2013): Carbonate Precipitation of Bacterial Strains Isolated from Sediments and Seawater: Formation Mechanisms. *Geomicrobiology Journal*, 30(9), 840–850. 10.1080/01490451.2013.777492
- [198] Skorupa D.J., Akyel A., Fields M.W., Gerlach R. (2019): Facultative and anaerobic consortia of haloalkaliphilic ureolytic microorganisms capable of precipitating calcium carbonate. *Journal of Applied Microbiology*, 127, 1479—1489. 10.1111/jam.14384
- [199] Smith P.T., King A.D., Goodman N. (1993): Isolation and characterization of urease from *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology*, 139(5), 957–962. 10.1099/00221287-139-5-957
- [200] Son H., Kim H., Park S., Lee H. (2018): Ureolytic/Non-Ureolytic Bacteria Co-Cultured Self-Healing Agent for Cementitious Materials Crack Repair. *Materials*, 11(5), 782. 10.3390/ma11050782
- [201] Soon N.W., Lee L.M., Khun T.C., Ling H.S. (2014): Factors Affecting Improvement in Engineering Properties of Residual Soil through Microbial-Induced Calcite Precipitation. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 140(5), 04014006. 10.1061/(asce)gt.1943-5606.0001089

- [202] Spanka R., Fritze D. (1993): *Bacillus cohnii* sp. nov., a New, Obligately Alkaliphilic, Oval-Spore-Forming Bacillus Species with Ornithine and Aspartic Acid Instead of Diaminopimelic Acid in the Cell Wall. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(1), 150–156. 10.1099/00207713-43-1-150
- [203] SRPS EN ISO 11133:2015/A1:2018: Mikrobiologija hrane, hrane za životinje i vode – Pripremanje, proizvodnja, čuvanje i ispitivanje performansi podloga za kulturu – Izmena 1. Institut za standardizaciju Srbije.
- [204] Stabnikov V., Jian C., Ivanov V., Li Y. (2013): Halotolerant, alkaliphilic urease-producing bacteria from different climate zones and their application for biocementation of sand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 1453–1460. 10.1007/s11274-013-1309-1
- [205] Stocks-Fischer S., Galinat J.K., Bang, S.S. (1999): Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(11), 1563–1571. 10.1016/S0038-0717(99)00082-6
- [206] Sumner J. (1926): The isolation and crystallization of the enzyme urease: Preliminary paper. *Journal of Biological Chemistry*, 69(2), 435–441. 10.1016/S0021-9258(18)84560-4
- [207] Sun X., Miao L., Tong T., Wang C. (2019): Study of the effect of temperature on microbially induced carbonate precipitation. *Acta Geotechnica*, 14, 627–638. 10.1007/s11440-018-0758-y
- [208] Svane S., Sigurdarson J.J., Finkenwirth F., Eitinger T., Karring H. (2020): Inhibition of urease activity by different compounds provides insight into the modulation and association of bacterial nickel import and ureolysis. *Scientific Reports*, 10, 8503. 10.1038/s41598-020-65107-9
- [209] Tang, H., Yu, J., & Zhao, X. (2009): Controlled synthesis of crystalline calcium carbonate aggregates with unusual morphologies involving the phase transformation from amorphous calcium carbonate. *Materials Research Bulletin*, 44(4), 831–835. 10.1016/j.materresbull.2008.002
- [210] Taylor B. (2006): *Methods and Procedures for the Verification and Validation of Artificial Neural Networks*, Springer, Berlin, Germany.
- [211] Teng H.H., Dove P.M., De Yoreo J.J. (2000): Kinetics of calcite growth: surface processes and relationships to macroscopic rate laws. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64(13), 2255–2266. 10.1016/S0016-7037(00)00341-0
- [212] Tepe M., Arslan S., Koralay T., Mercan Dogan N. (2019): Precipitation and characterization of CaCO₃ of *Bacillus amyloliquefaciens* U17 strain producing urease and carbonic anhydrase. *Turkish Journal of Biology*, 43, 198–208. 10.3906/biy-1901-56
- [213] Tian Y., Fan Y., Liu J., Zhao X., Chen W. (2016): Effect of nitrogen, carbon sources and agitation speed on acetoin production of *Bacillus subtilis* SF4-3, *Electronic Journal of Biotechnology*, 19, 41-49. 10.1016/j.ejbt.2015.11.005
- [214] Tiano P., Biagiotti L., Mastromei G. (1999): Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 36(1-2), 139–145. 10.1016/S0167-7012(99)00019-6
- [215] Timmis K., de Lorenzo V., Verstraete W., Ramos J.L., Danchin A., Brüssow H., Singh B., Timmis J.K. (2017): The contribution of microbial biotechnology to economic growth and employment creation. *Microbial Biotechnology*, 10(5), 1137–1144. 10.1111/1751-7915.12845
- [216] Timperio A.M., Gorrasi S., Zolla L., Fenice M. (2017): Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and MALDI BioTyper in comparison to 16S rDNA sequencing for the identification of bacteria isolated from Arctic sea water. *PLOS ONE*, 12(7), e0181860. 10.1371/journal.pone.0181860
- [217] Tobler D.J., Cuthbert M.O., Greswell R.B., Riley M.S., Renshaw J.C., Handley-Sidhu S., Phoenix V.R. (2011): Comparison of rates of ureolysis between *Sporosarcina pasteurii* and an indigenous groundwater community under conditions required to precipitate large volumes of calcite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(11), 3290–3301. 10.1016/j.gca.2011.03.023
- [218] Tomczyk-Żak K., Zielenkiewicz U. (2015): Microbial Diversity in Caves. *Geomicrobiology Journal*, 33(1), 20–38. 10.1080/01490451.2014.1003341
- [219] Tourney J., Ngwenya B.T. (2009): Bacterial extracellular polymeric substances (EPS) mediate CaCO₃ morphology and polymorphism. *Chemical Geology*, 262(3-4), 138–146. 10.1016/j.chemgeo.2009.01.006
- [220] Turanyi T., Tomlin A.S. (2014): *Analysis of Kinetics Reaction Mechanisms*. Springer, Berlin Heidelberg, Nemačka

- [221] Turnbull L., Toyofuku M., Hynen A.L., Kurosawa M., Pessi G., Petty N.K., Whitchurch C. B. (2016): Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nature Communications*, 7, 11220. 10.1038/ncomms11220
- [222] Vahabi A., Ramezani-pour A.A., Akbari Noghabi K. (2014): A preliminary insight into the revolutionary new line in improving concrete properties using an indigenous bacterial strain *Bacillus licheniformis* AK01, as a healing agent. *European Journal of Environmental and Civil Engineering*, 19(5), 614–627. 10.1080/19648189.2014.960951
- [223] Van der Linde, K., Lim, B. T., Rondeel, J. M. M., Antonissen, L. P. M. T., de Jong, G. M. T. (1999): Improved bacteriological surveillance of haemodialysis fluids: a comparison between Tryptic soy agar and Reasoner's 2A media. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 14(10), 2433–2437. 10.1093/ndt/14.10.2433
- [224] Van Mullem T., Gruyaert E., Caspeepele R., De Belie N. (2020): First Large-Scale Application with Self-Healing Concrete in Belgium: Analysis of the Laboratory Control Test, *Materials*, 13(997), 1-20. 10.3390/ma13040997
- [225] van Nostrand J.D., Sowder A.G., Bertsch P.M., Moriss P.J. (2005): Effect of pH on the toxicity of nickel and other divalent metals to *Burkholderia cepacia* PR1310. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(11), 2742–2750. 10.1897/04-335r.1
- [226] Vashisht R., Attri S., Sharma D., Shukla A., Goel G. (2018). Monitoring biocalcification potential of *Lysinibacillus* sp. isolated from alluvial soils for improved compressive strength of concrete. *Microbiological Research*, 207, 226–231. 10.1016/j.micres.2017.12.010
- [227] Vidaković A. (2019): Denitrifikator *Pseudomonas stutzeri* – izolovanje, optimizacija bioprocenih parametara i primena. doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, Novi Sad, Srbija.
- [228] Vidaković A., Šovljanski O., Vučurović D., Racić G., Đilas M., Ćurčić N., Markov S. (2019): Novel denitrifying bacteria *Pseudomonas stutzeri* strain D1 - from isolation to the biomass production. *CICEQ*, 25(4), 403-415. 10.2298/CICEQ190111018V
- [229] Vijay K., Murmu M., Deo S. V. (2017): Bacteria based self healing concrete – A review. *Construction and Building Materials*, 152, 1008–1014. 10.1016/j.conbuildmat.2017.07.040
- [230] Vincent, J., Sabot, R., Lanneluc, I., Refait, P., Turcry, P., Mahieux, P., Jeannin, M., Sable, S. (2020): Biomineralization of calcium carbonate by marine bacterial strains isolated from calcareous deposits. *Matériaux & Techniques*, 108(3), 13. 10.1051/mattech/2020027
- [231] Volland P., Weeks D.L., Marcus E.A., Prinz C., Sachs G., Scott D. (2003): Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene cluster. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 284(1), G96–G106. 10.1152/ajpgi.00160.2002
- [232] Wade, M. J., Harmand, J., Benyahia, B., Bouchez, T., Chaillou, S., Cloez, B., Lobry, C. (2016): Perspectives in mathematical modelling for microbial ecology. *Ecological Modelling*, 321, 64–74. 10.1016/j.ecolmodel.2015.11.002
- [233] Waditee, R., Bhuiyan, M.N.H., Rai, V., Aoki, K., Tanaka, Y., Hibino, T., Takabe, T. (2005): Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(5), 1318–1323. 10.1073/pnas.0409017102
- [234] Wang J., Jonkers H., de Belie N. (2017): *Bacillus sphaericus* LMG 22257 is physiologically suitable for self-healing concrete, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 5101–5114. 10.1007/s00253-017-8260-2.
- [235] Wei S., Cui H., Jiang Z., Liu H., He H., Fang N. (2015): Biomineralization processes of calcite induced by bacteria isolated from marine sediments. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 455–464. 10.1590/s1517-838246220140533
- [236] Whiffin V.S. (2004): Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement. PhD thesis, Murdoch University, Murdoch, Australija.
- [237] Whiffin V.S., van Paassen L.A., Harkes M.P. (2007): Microbial Carbonate Precipitation as a Soil Improvement Technique. *Geomicrobiology Journal*, 24(5), 417–423. 10.1080/01490450701436505
- [238] Widder, S., Allen, R. J., Pfeiffer, T., Curtis, T. P., Wiuf, C., Soyer, O. S. (2016): Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics. *The ISME Journal*, 10(11), 2557–2568. 10.1038/ismej.2016.45

- [239] Wiktor, V., & Jonkers, H. M. (2011): Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. *Cement and Concrete Composites*, 33(7), 763–770. 10.1016/j.cemconcomp.2011.03.012
- [240] Wong L.S. (2015): Microbial cementation of ureolytic bacteria from the genus *Bacillus*: A review of the bacterial application on cement-based materials for cleaner production. *Journal of Cleaner Production*, 93, 5-17. 10.1016/j.jclepro.2015.01.019
- [241] Yan, Y., Fu, D., Shi, J. (2019): Screening and Immobilizing the Denitrifying Microbes in Sediment for Bioremediation. *Water*, 11(3), 614. 10.3390/w11030614
- [242] Yasuhara H., Neupane D., Hayashi K., Okamura M. (2012): Experiments and predictions of physical properties of sand cemented by enzymatically-induced carbonate precipitation. *Soils and Foundations*, 52(3), 539–549. 10.1016/j.sandf.2012.05.011
- [243] Yi H., Zheng T., Jia Z., Su T., Wang C. (2021): Study on the influencing factors and mechanism of calcium carbonate precipitation induced by urease bacteria. *Journal of Crystal Growth*, 564, 126113. 10.1016/j.jcrysgro.2021.126113
- [244] Yoon J.H., Lee K.C., Weiss N., Kho Y.H., Kang K.H., Park Y.H. (2001): *Sporosarcina aquimarina* sp. nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes 1967), *Bacillus psychrophilus* (Nakamura 1984) and *Bacillus pasteurii* (Chester 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporosarcina globispora* comb. nov., *Sporosarcina psychrophila* comb. nov. and *Sporosarcina pasteurii* comb. nov., and emended description of the genus *Sporosarcina*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(3), 1079–1086. 10.1099/00207713-51-3-1079
- [245] Yoon S.H., Ha S., Lim J., Kwon S., Chun J. (2017): A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(10), 1281–1286. 10.1007/s10482-017-0844-4
- [246] Yu, C., Davidson, V. J., Yang, S. X. (2006): A neural network approach to predict survival/death and growth/no-growth interfaces for *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 23(6), 552–560. 10.1016/j.fm.2005.09.008
- [247] Zamani N., Ghezelsoufa M., Ahadi A., Zamani M. (2017): Application of Microbial Biotechnology in Conservation and Restoration of Stone Monument. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 4(2): 587-592. 10.1061/9780784480489.029
- [248] Zambelli B., Musiani F., Benini S., Ciurli S. (2011): Chemistry of Ni²⁺ in Urease: Sensing, Trafficking, and Catalysis. *Accounts of Chemical Research*, 44(7), 520–530. 10.1021/ar200041k
- [249] Zeng, Y. G., Chen, L., Li, H. X., Huang, J., Yu, B. (2014): Comparison Study on Measuring Ammonia and Nitrogen in Surface Water by Flow Injection and Nessler's Reagent. *Advanced Materials Research*, 884-885, 46–50. 10.4028/www.scientific.net/amr.884-885.46
- [250] Zhang D., Lin Q., Xue N., Zhu P., Wang Z., Wang W., Pan X. (2019): The kinetics, thermodynamics and mineral crystallography of CaCO₃ precipitation by dissolved organic matter and salinity. *Science of The Total Environment*, 673, 546–552. 10.1016/j.scitotenv.2019.04.138
- [251] Zheng T., Qian C. (2019): Influencing factors and formation mechanism of CaCO₃ precipitation induced by microbial carbonic anhydrase. *Process Biochemistry*. 10.1016/j.procbio.2019.12.018
- [252] Zhou, K., Fu, P., Li, P., Cheng, W., Liang, Z. (2009): Predictive modeling and validation of growth at different temperatures of *Brochnotrix termosphaeta*. *Journal of Food Safety*, 29(3), 460–473. 10.1111/j.1745-4565.2009.00169.x
- [253] Zhu T., Dittrich M. (2016): Carbonate Precipitation through Microbial Activities in Natural Environment, and Their Potential in Biotechnology: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4. 10.3389/fbioe.2016.00004
- [254] Zhu, S., Zheng, M., Li, C., Gui, M., Chen, Q., Ni, J. (2015): Special role of corn flour as an ideal carbon source for aerobic denitrification with minimized nitrous oxide emission. *Bioresource Technology*, 186, 44–51. 10.1016/j.biortech.2015.03.046
- [255] Zulaika E., Utomo M.A.P, Alami N.H., Kuswytasari N.D., Shovitri M., Bayuaji R., Prasetyo E.N. (2019): The diversity of ureolytic bacteria isolated from limestone in East Java, Indonesia based on amino acid sequences encoded by ureC. *Biodiversitas*, 20, 2316-2320. 10.13057/biodiv/d200829

8. PRILOZI

Prilog 1. Box-Behnkenov eksperimentalni plan na tri nivoa varijacije

Broj ekperimenta	Kodirane vrednosti			Varirani operativni parametri		
	X ₁	X ₂	X ₃	Homogenizacija (min)	Zapremina heksadekana (mL)	Vreme separacije faza (min)
1	-1	-1	0	0,5	0,5	30
2	1	-1	0	4	0,5	30
3	-1	1	0	0,5	4	30
4	1	1	0	4	4	30
5	-1	0	-1	0,5	2	15
6	1	0	-1	4	2	15
7	-1	0	1	0,5	2	45
8	1	0	1	4	2	45
9	0	-1	-1	2	0,5	15
10	0	1	-1	2	4	15
11	0	-1	1	2	0,5	45
12	0	1	1	2	4	45
13	0	0	0	2	2	30
14	0	0	0	2	2	30
15	0	0	0	2	2	30

Prilog 2. Placket- Burmanov eksperimentalni plan sa 12 eksperimenata

Broj ekperimenta	Faktori										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1

A – temperatura; B - pH vrednost; C - koncentracija inokuluma; D - koncentracija uree; E - koncentracija Ca²⁺ jona; F - koncentracija Ni²⁺ jona; G - koncentracija hranljivog bujona; H - vreme inkubacije; I - brzina mešanja; J - zapremina podloge; K - veštački faktor - pojava taloga;

Prilog 3. Fiziološke i metaboličke osobine odabranih bakterijskih izolata

Izolat	Bojenje po Gramu	KOH test*	Pokretljivost	Formiranje spore	Oksidaza test	Katalaza test	Ureaza test
<i>S. pasteurii</i> DSM 33	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. cohnii</i> DSM 6307	+	+	+	+	+	+	-
I1	+	+	+	+	+	+	+
I2	-	-	+	+	+	+	-
I3	+	+	-	+	+	+	+
II1	-	+	+	+	+	+	+
II2	+	+	+	+	+	+	+
II3	+	+	+	+	+	+	+
II4	+	+	+	+	-	+	+
II5	+	-	+	+	-	+	+
II6	+	+	+	+	+	+	+
II7	+	+	+	+	+	+	+
II8	-	+	-	+	+	+	+
II9	-	-	-	+	+	+	+
II10	+	+	+	+	+	+	+
III1	-	+	+	+	+	+	+
III2	+	-	+	+	+	+	+
III3	+	+	-	+	+	+	-
III4	-	+	+	+	+	+	-
III5	+	-	+	+	+	+	-
III6	-	+	-	+	-	+	+
III7	+	-	+	+	+	+	+
III8	+	+	-	+	-	+	+
III9	+	+	-	+	-	+	+
III10	+	+	-	+	-	+	+
III11	+	+	-	+	-	+	+
III12	+	+	-	+	-	+	+
III13	+	+	-	+	-	+	-
III14	+	+	-	+	-	+	-
III15	+	+	-	+	-	+	+
III16	+	+	-	+	-	+	+
III17	+	+	-	+	-	+	+
III18	+	+	-	+	-	+	+
III19	+	+	-	+	-	+	+
III20	-	-	-	-	+	+	+
IV1	-	-	+	+	-	+	+
IV 2	+	+	+	+	+	+	+
IV 3	+	+	+	+	-	-	+
IV 4	+	+	+	+	-	+	+
IV 5	+	+	-	+	-	+	+
IV 6	+	+	-	+	-	+	+
IV 7	+	+	-	-	-	+	+
IV 8	+	+	-	-	-	+	+
IV9	+	-	-	-	-	+	-
IV 10	-	-	+	+	+	+	+

Prilog 4. Elementi matrice W1 i W2 i vektora B1 i B2 za temperaturni profil rasta

Parametar	Skriveni neuronski sloj								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Vreme	3,77	4,95	-1,39	3,97	3,51	-0,39	3,42	2,10	
Temperatura	-3,75	-0,82	-4,06	-3,56	-4,88	-10,32	-6,10	-6,46	
Nulti član	0,85	4,48	1,78	1,86	-1,71	10,58	1,37	2,23	
Izolati									Nulti član
I1	0,06	-1,36	-0,4	0,32	0,15	2,55	0,07	-1,03	-0,1
I2	-0,43	-0,26	-0,5	0,21	0,91	1,02	0,16	0,36	-0,25
I3	0,86	-1,36	-0,4	0,22	0,82	2,54	-0,49	-1,58	-0,15
II1	0,39	-0,30	-0,63	-0,26	-0,68	0,52	0,55	0,18	0,36
II2	-0,2	-1,52	-0,78	0,35	0,66	2,48	0,16	-0,61	0,16
II3	0,23	-1,16	-0,58	0,14	1,06	1,39	-0,46	-0,82	0,88
II4	-0,06	-1,27	-0,68	-0,53	-0,45	-0,09	-0,002	0,29	2,44
II5	-0,06	-0,47	-0,86	0,14	0,35	0,4	-0,34	0,2	1,01
II6	1,05	0,47	-1,19	-0,51	0,24	-0,07	-0,05	-0,33	0,44
II7	0,19	-0,59	-1,7	-0,24	-0,14	0,99	0,49	-0,1	0,79
II8	-0,05	-0,96	-0,35	0,54	0,71	2,25	-0,14	-0,76	-0,43
II9	0,16	0,11	-1,49	0,22	0,17	1,73	0,39	-0,13	-1,18
II10	0,39	0,75	-0,95	0,65	-0,51	0,77	0,2	-0,48	-1,26
III1	-0,06	-0,38	-0,94	0,05	-0,35	1,45	0,51	0,3	-0,4
III2	-0,06	-0,36	-1,37	-0,35	0,32	0,36	0,24	0,4	0,91
III3	0,8	-0,13	-0,62	-0,41	0,8	-0,17	-0,13	-0,55	0,86
III4	0,21	-0,89	-0,81	0,04	0,43	1,91	0,37	-0,63	-0,16
III5	0,06	-0,63	-0,89	-0,44	-0,22	0,89	0,91	-0,22	0,58
III6	0,99	0,28	0,03	0,72	0,63	0,91	-0,53	-1,34	-0,95
III7	0,14	-0,53	-1,09	-0,16	0,43	1,84	0,69	-0,39	-0,37
III8	0,09	-1,59	-0,72	0,13	0,07	2,51	0,23	-0,57	0,24
III9	-0,03	-0,32	-0,73	0,34	0,72	2,11	0,08	-0,18	-0,94
III10	0,08	-0,58	-1,02	0,01	0,31	1,92	0,5	-0,28	-0,44
III11	0,3	-0,23	-1,05	-0,16	-0,05	1,5	0,81	-0,15	-0,56
III12	-0,06	-1,1	-1,01	0,29	-0,12	2,25	0,29	-0,14	-0,19
III13	-0,13	-0,78	-0,95	0,34	0,29	2,34	0,35	-0,39	-0,55
III14	0,09	-0,48	-1,13	-0,07	0,98	1,87	0,38	-0,25	-0,46
III15	-0,14	-0,75	-0,85	0,42	0,56	2,19	0,09	-0,14	-0,56
III16	0,13	-0,7	-1,23	-0,12	0,24	1,97	0,69	-0,39	-0,27
III17	0,12	-0,79	-0,9	0,06	0,06	2,1	0,48	-0,33	-0,35
III18	0,10	-0,9	-1,19	0,15	0,47	2,35	0,3	-0,36	-0,41
III19	0,06	-0,74	-0,92	0,1	0,07	2,1	0,54	-0,35	-0,41
III20	0,12	-0,99	-0,9	0,1	0,2	2,14	0,24	-0,35	-0,19
IV1	0,93	-0,23	-0,43	0,16	0,71	1,01	-0,6	-1,09	0,16
IV2	-0,07	-1,31	-0,79	0,21	0,68	2,52	0,18	-0,68	-0,04
IV3	-0,11	-1,36	-1,22	-0,39	0,03	1,21	0,31	0,04	1,34
IV4	-0,12	-0,12	-1,07	0,19	-0,26	0,92	0,34	0,58	-0,25
IV5	-0,04	-0,57	-1,27	0,19	0,02	2,27	0,63	-0,37	-0,68
IV6	-0,2	-0,75	-0,72	0,46	1,04	2,57	-0,13	-0,38	-0,72
IV7	0,58	-0,29	-0,44	-0,07	0,36	0,77	0,03	-0,72	0,11
IV8	1,10	-0,05	-0,5	-0,47	0,24	0,68	0,15	-1,07	0,15
I9	0,22	-0,3	-0,24	0,89	0,78	1,53	-0,91	-0,73	-0,75
IV10	0,41	-0,04	-0,37	1	1,19	2,15	-0,84	-0,72	-1,48

Prilog 5. Elementi matrice W1 i vektora B1 za pH profil rasta bakterijskih izolata

Parametar	Neuroni u skrivenom sloju						Nulti član
	1	2	3	4	5	6	
Vreme	-0,46	0,29	4,09	-0,51	-1,23	0,54	
pH vrednost	-2,36	-4,88	-0,98	-1,24	0,13	6,58	
Nulti član	1,51	0,13	-0,05	1,57	2,14	-3,03	
Izolat							Nulti član
I ₁	-0,21	-0,02	-0,09	-0,53	-1,03	0,01	1,61
I ₂	1,10	-0,19	0,10	-0,89	-0,6	0,65	0,96
I ₃	0,49	-0,14	-0,1	-0,67	-1,19	0,34	1,79
II ₁	-0,42	0,2	-0,05	-0,12	-0,43	0,23	1,05
II ₂	-0,26	-0,167	0,20	0,28	-0,39	0,14	0,62
II ₃	1,07	-0,49	0,1	-0,93	-0,58	0,58	1,04
II ₄	0,25	0,10	0,17	-0,48	-0,2	0,52	0,74
II ₅	0,69	-0,21	0,43	-0,18	0,45	0,65	-0,06
II ₆	-1,16	0,02	0,27	1,05	-0,15	-0,36	0,39
II ₇	0,64	-0,78	0,14	-0,47	-1,09	0,16	1,1
II ₈	1,32	-0,44	0,05	-1,06	-0,41	0,79	1,03
II ₉	1,27	-0,7	0,28	-1,06	0,18	0,6	0,23
II ₁₀	0,26	-0,29	0,46	0,09	0,83	0,36	-0,58
III ₁	-0,63	-0,53	0,4	0,69	-0,15	-0,11	-0,17
III ₂	0,14	-0,49	0,17	-0,13	0,03	0,15	0,29
III ₃	0,86	-0,23	0,31	-0,72	0,33	0,61	0,28
III ₄	-0,41	-0,15	0,44	0,31	0,34	0,04	-0,22
III ₅	0,65	-0,76	0,46	-0,34	0,26	0,35	-0,28
III ₆	-0,24	-0,59	0,5	0,54	0,21	0,05	-0,45
III ₇	-0,11	-0,64	0,32	0,37	0,16	0,14	-0,29
III ₈	1,84	-0,92	-0,003	-1,6	-0,8	0,66	1,42
III ₉	0,91	-0,99	0,12	-0,75	-0,19	0,28	0,48
III ₁₀	1,75	-0,38	-0,03	-1,42	-0,67	0,99	1,45
III ₁₁	0,97	-0,65	0,09	-0,85	-0,56	0,4	1,11
III ₁₂	0,89	-0,98	0,12	-0,73	-0,13	0,28	0,42
III ₁₃	0,42	0,12	0,44	-0,38	0,1	0,51	0,41
III ₁₄	0,56	-0,85	0,03	-0,4	-0,5	0,21	0,73
III ₁₅	2,17	-0,6	0,17	-1,75	-0,52	0,98	1,13
III ₁₆	1,07	-0,29	0,19	-0,73	0,16	0,84	0,37
III ₁₇	-0,47	-0,15	0,16	0,21	-0,29	0,08	0,47
III ₁₈	-1,05	0,09	-0,1	0,25	-0,72	-0,21	1,13
III ₁₉	-0,69	-0,40	0,03	0,1	-0,58	-0,33	0,75
III ₂₀	0,06	-0,94	0,16	-0,04	-0,08	-0,07	0,1
IV ₁	-0,34	-0,32	0,08	0,28	-0,20	0,06	0,46
IV ₂	0,71	-0,18	0,16	-0,47	-0,09	0,63	0,69
IV ₃	-0,89	0,17	-0,01	0,18	-0,64	-0,09	1,03
IV ₄	0,61	0,03	-0,02	-0,56	-0,07	0,78	0,83
IV ₅	2,05	-0,26	0,22	-1,42	0,34	1,21	0,31
IV ₆	1,82	-0,46	0,31	-1,45	0,34	1,03	0,33
IV ₇	1,47	-0,28	0,09	-1,26	0,001	0,95	0,79
IV ₈	-0,41	0,14	0,01	0,16	-0,23	0,31	0,68
IV ₉	-0,18	-0,07	-0,02	-0,18	-0,54	0,19	1
IV ₁₀	1,59	-0,29	0,1	-1,46	0,14	0,98	0,74

Prilog 6. Elementi matrice W1 i vektora B1 za ANN model denitrifikujućeg potencijala

Bakterija	Neuroni u skrivenom sloju								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vreme	-8,06	-3,06	-8,08	-240,45	-6,44	-2,89	9,58	-151,8	-61,98
P. stutzeri	-19,96	60,39	-1,857	-56,16	-25,19	-14,68	16,99	16,21	-43,9
I₁	76,77	-17,44	-2,98	79,02	-1,77	-125,22	105,23	-20,92	39,28
I₂	-162,68	-10,15	-153,95	-102,58	0,12	-11,51	-76,77	52,12	-131,42
I₃	74,3	-13,04	19	72,21	84,48	56,61	83,42	108,84	-0,72
II₁	15,22	-13,6	41,6	26,25	-41,95	95,37	8,11	50,49	31,20
II₂	52,4	-14	17,73	37,87	72,05	61,50	15,42	112,23	62,96
II₃	-117,95	-18,56	-16,74	-40,12	-2,99	-117,07	-97,5	-26,39	-156,56
II₄	52,76	-13,97	19,04	37,95	71,87	60,9	15,46	112,20	61,31
II₅	52,81	-13,97	18,81	37,89	71,76	61	15,45	112,33	61,34
II₆	-27,58	-139,41	-12,36	-38,78	-1,55	-135,30	-60,98	-56	-143,76
II₇	-24,66	-15,01	-9,69	-110,54	-3,76	-132,80	-95,15	-61,99	31,221
II₈	-14,33	-11,84	65,96	-40,97	4,68	93,60	25,62	115,89	-93,81
II₉	-31,59	-12,35	-33,66	-133,96	-94,74	-14,17	7,55	-17,18	-28,94
II₁₀	-83,9	23,64	-16,69	-39,72	-1,51	-10,07	-55,43	-24,63	-80,25
III₁	-25	77,18	-9,8	5,42	10,60	70,63	65,93	-21,69	-27,07
III₂	-124,82	-12,89	-164,93	-43,94	-31,74	-13,87	2,64	-120,72	-33,12
III₃	-18,35	-17,69	-3,12	48,19	-1,65	-50,95	115,02	-21,06	32,30
III₄	-18,15	-13,17	-2,96	-39,69	-73,1	-14,23	91,61	-23,75	32,18
III₅	-26	43,59	-10,82	36,29	1,45	67,26	-79,36	-22,12	1,76
III₆	-22,14	-14,38	-6,94	29,39	-2,14	-15,16	-74,23	-21,69	15,48
III₇	-27,92	-14,03	-12,70	-38,99	-1,96	-15,23	6,04	-102,74	-32,13
III₈	86,50	-19,5	-3,07	-87,15	-0,40	-31,74	10,42	3,10	-30,4
III₉	-25,4	-17,16	-10,1	-36,78	0,43	-17,26	2,26	-129,68	-31,2
III₁₀	-22,32	5,57	-7,14	-74,94	-1,69	-4,95	-51,73	16,02	-84,16
III₁₁	101,21	-14,36	95,14	-94,96	-1,02	69,6	-33,55	-36,72	-96,03
III₁₂	-18,16	-13,26	-2,94	-39,69	-56,78	-14,3	84,8	-23,75	32,2
III₁₃	38,73	75,19	13,71	83,75	0,58	36,84	14,53	55,08	112,46
III₁₄	76,03	89,7	64,99	-12,20	-1,99	-11,88	14,04	8,87	32,89
III₁₅	89,8	36,33	-3,43	-38,57	-1,55	-14,92	18,73	-77,95	76,47
III₁₆	71,59	-14,49	74,82	81,63	1,78	-16,96	19,70	-59,71	-29,91
III₁₇	-19,77	35,9	-4,7	40,25	-0,70	-15,08	10,34	-22,89	-5,51
III₁₈	12,18	34,41	3,83	-39,8	-1,76	-9,82	12,52	-22,78	107,99
III₁₉	-18,75	-14,98	-3,55	82,93	2,96	-16,94	-104,48	-49,99	74,83
III₂₀	-24,78	-9,28	-9,58	-17,2	-93,54	-10,83	-98,79	-20,58	1,22
IV₁	64,24	46,46	-2,86	110,35	1,77	-13,18	9,67	53,7	79,58
IV₂	24,95	-72,26	64,17	94,13	94,41	47,76	7,8	114,62	101,87
IV₃	-20,17	61,94	-5,04	81,58	73,19	47,19	83,18	-21,69	34,17
IV₄	-146,3	-14,98	-111,95	-129,79	-4,07	-15,84	-39,80	-24,6	-121,21
IV₅	-30,64	-16,75	-83,53	-105,43	-36,73	-75,45	-90,58	53,53	0,29
IV₆	47,46	-14,42	69,79	114,05	89,69	63,43	14,11	55,21	35,09
IV₇	42,87	33,91	1,77	78,45	-48,02	29	16,47	-20,45	36,31
IV₈	-14,04	-13,60	69,95	59,43	-62,02	-13,34	14,84	-20,45	33,75
IV₉	65,22	6,96	0,32	78,27	-85,98	68	17,38	-20,44	63,52
IV₁₀	67,13	-14,42	77,97	84,89	99,67	40,96	14,57	74,78	7,04
Nulti član	26,65	16,188	11,476	38,27	1,17	16,97	-18,28	22,03	28,51

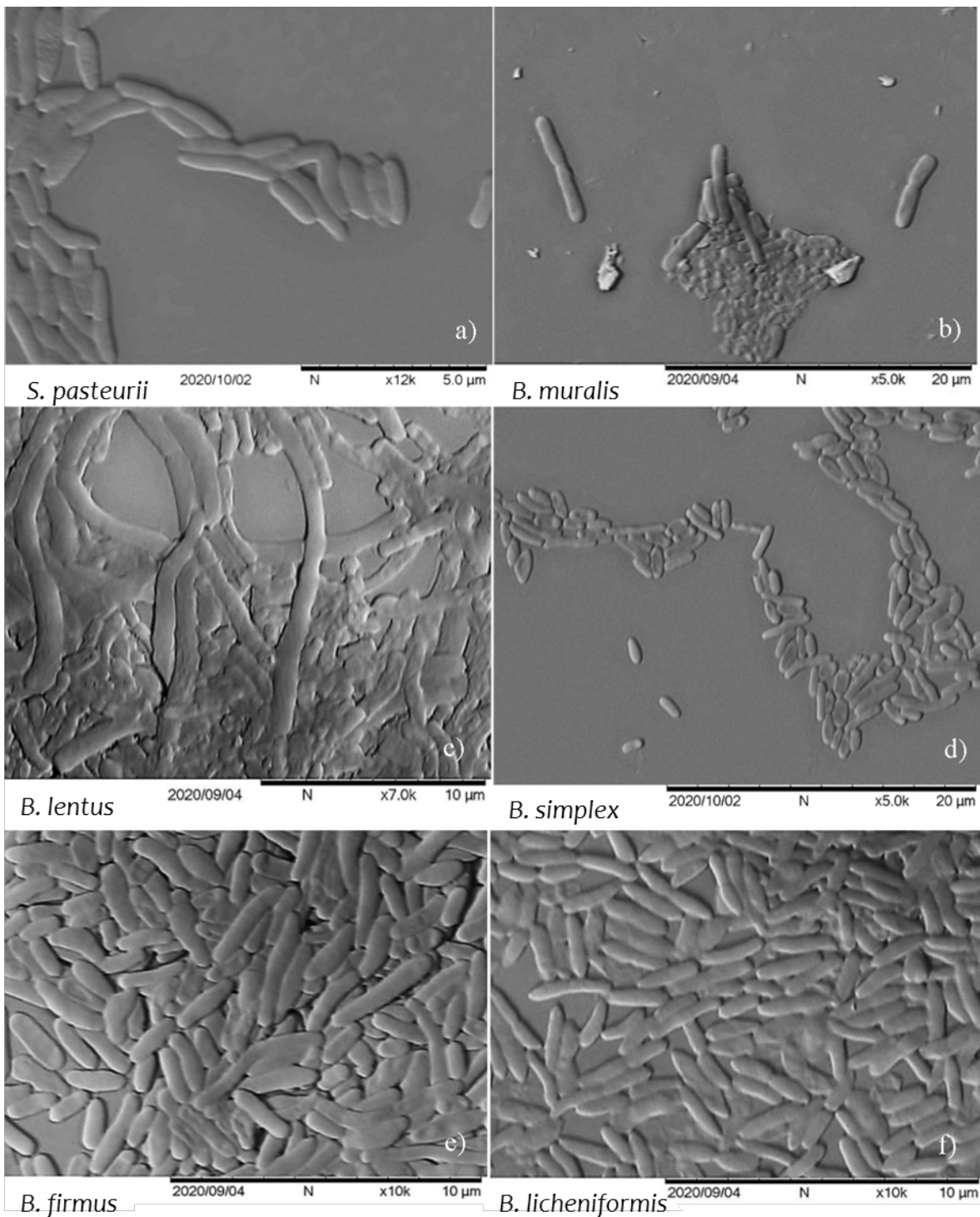
Prilog 7. Elementi matrice W2 i vektora B2 za ANN model denitrifikujućeg potencijala

Parameter	Neuroni u skrivenom sloju									Nulti član
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Produkcija biomae	80,78	-3,23	-80,30	0,44	0,013	2,63	-0,11	-0,52	-0,44	0,99
Formiranje N ₂ gasa	126,66	210,13	39,66	-337,40	186,35	-217,92	-181,65	-142,57	345,99	3,71
Koncentracija nitrata	-0,63	-0,03	0,37	-5,18	5,59	0,23	0,22	6,5	0,07	0,3
Koncentracija nitrita	-1,42	4,72	6,28	-7,08	3,39	-4,73	-2,01	6,51	-2,4	0,01
Formiranje nitrita	-263,74	-2,95	266,22	-8,67	0,52	2,98	128,98	-0,52	6,37	0
Formiranje amonijaka	3,99	-0,03	-3,99	0,03	-0,01	0,04	0,01	-0,01	-0,02	0,001

Prilog 8. Baza podataka za analizu standardnih ocena

Parametar	Formiranje spore	Optimalna pH vrednost za rast	Baza za Urea agar		Baza za Urea bujon			Formiranje CaCO ₃				Standardna ocena
			rast	promena boje	zamućenost	promena boje	dodatak CaCl ₂	na čvrstoj hranljivoj podlozi		u tečnoj hranljivoj podlozi		
								Urea-CaCl ₂	EK-CaCl ₂	Urea-CaCl ₂	EK-CaCl ₂	
Min	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Max	1	11	1	1	2	3	3	1	1	1	1	SUM
Težinski koeficijent	0,05	0,45	0,001	0,014	0,001	0,014	0,02	0,075	0,075	0,15	0,15	1
Polarnost	+	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Bakterijski soj												
<i>S. pasteurii</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0,77
<i>B. pseudofirmus</i>	1	1	0	0	0,5	0	0	0	1	0	1	0,73
I ₁	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0,36
I ₂	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,50
I ₃	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0,66
II ₁	1	0	1	1	0,5	0	0	1	1	1	0	0,37
II ₂	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0,36
II ₃	1	1	1	1	0,5	0	0	0	0	0	0	0,52
II ₄	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0,81
II ₅	1	1	1	1	0,5	0	0	0	1	1	0	0,74
II ₆	1	0	1	1	0,5	0	0	0	1	1	0	0,29
II ₇	1	1	1	1	0,5	0	0	1	1	0	1	0,82
II ₈	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0,966
II ₉	1	1	1	1	0,5	0	0	1	0	1	1	0,891
II ₁₀	1	1	1	1	0,5	0	0	1	1	1	1	0,97
III ₁	1	0	1	1	0,5	0	0	1	1	1	1	0,52
III ₂	1	1	1	1	0,5	0	0	0	1	0	1	0,74
III ₃	1	1	1	0	0,5	0	0	0	0	0	1	0,65
III ₄	1	1	1	0	0,5	0	0	0	1	1	1	0,88
III ₅	1	1	1	0	0,5	0	0	1	1	0	1	0,80
III ₆	1	1	1	1	0,5	0	0	1	1	0	1	0,82
III ₇	1	1	1	1	0,5	0	0	1	1	0	1	0,82
III ₈	1	1	1	1	0,5	0	0	1	0	0	1	0,74
III ₉	1	1	1	1	0,5	0	0	1	1	0	1	0,82
III ₁₀	1	1	1	1	0,5	0	0	1	1	0	1	0,82
III ₁₁	1	1	1	1	0,5	0	0	1	1	1	1	0,97
III ₁₂	1	1	1	1	0,5	0	0	0	1	0	1	0,74
III ₁₃	1	0	1	0	0,5	0	0	0	0	0	1	0,20
III ₁₄	1	1	1	0	0,5	0	0	0	1	1	1	0,88
III ₁₅	1	1	1	1	0,5	0	0	1	1	1	1	0,97
III ₁₆	1	1	1	1	0,5	0,33	0	1	1	0	1	0,82
III ₁₇	1	0	1	1	0,5	0	0	1	1	0	1	0,37
III ₁₈	1	0	1	1	0,5	0	0	1	1	0	1	0,37
III ₁₉	1	0	1	1	0,5	0	0	1	1	1	1	0,52
III ₂₀	0	0	1	1	0,5	0,33	0,33	1	0	1	1	0,40
IV ₁	1	0	1	1	0,5	0	0	0	0	1	1	0,37
IV ₂	1	1	1	1	0,5	0	0	0	1	0	0	0,59
IV ₃	1	0	1	1	0,5	0	0	0	1	0	1	0,29
IV ₄	1	0	1	1	0,5	0	0	1	1	0	1	0,37
IV ₅	1	1	1	1	0,5	0	0	1	1	1	1	0,97
IV ₆	1	1	1	1	0,5	0	0	0	1	0	0	0,59
IV ₇	0	1	1	1	0,5	0,33	0	0	1	0	0	0,54
IV ₈	0	0	1	1	0,5	0,33	0	0	1	0	1	0,24
IV ₉	0	0	1	0	0,5	0,08	0	0	1	1	1	0,38
IV ₁₀	1	1	1	1	0,5	0,33	0,17	1	1	1	0	0,82

Prilog 9. SEM mikrografije bakterijskih grupa izolata



Prilog 10. Veličine bakterijske ćelije i proračun površine i zapremine

		Mere																	
		X	R	r	h	A	V							X	R	r	h	A	V
		(μm)	(μm)	(μm)	(μm)	(μm^2)	(μm^3)							(μm)	(μm)	(μm)	(μm)	(μm^2)	(μm^3)
<i>S. pasteurii</i> DSM 33		2	0,47	0,235	1,53	2,95	0,32	<i>Bacillus muralis</i>		3,59	0,79	0,395	2,8	8,91	1,63				
		1,81	0,59	0,295	1,22	3,35	0,44			3,07	0,92	0,46	2,15	8,87	1,84				
		1,92	0,47	0,235	1,45	2,83	0,31			5,13	0,83	0,415	4,3	13,38	2,63				
		1,81	0,5	0,25	1,31	2,84	0,32			4,25	0,88	0,44	3,37	11,75	2,41				
		1,54	0,43	0,215	1,11	2,08	0,20			2,94	0,66	0,33	2,28	6,10	0,93				
		1,49	0,43	0,215	1,06	2,01	0,20			2,67	0,66	0,33	2,01	5,54	0,84				
		1,38	0,33	0,165	1,05	1,43	0,11			1,97	1,01	0,505	0,96	6,25	1,31				
		1,62	0,62	0,31	1	3,16	0,43			3,64	0,92	0,46	2,72	10,52	2,22				
		1,49	0,57	0,285	0,92	2,67	0,33			2,59	0,83	0,415	1,76	6,75	1,25				
		1,46	0,59	0,295	0,87	2,71	0,35			2,87	0,83	0,415	2,04	7,48	1,40				
<i>Bacillus lentus</i>		1,75	0,81	0,405	0,94	4,45	0,76	<i>Bacillus simplex</i>		2,78	0,42	0,21	2,36	3,67	0,37				
		2,37	1,01	0,505	1,36	7,52	1,63			1,8	0,53	0,265	1,27	3,00	0,36				
		1,85	0,88	0,44	0,97	5,11	0,95			2,17	0,42	0,21	1,75	2,86	0,28				
		3,15	0,78	0,39	2,37	7,72	1,38			2,85	0,42	0,21	2,43	3,76	0,38				
		2,11	0,88	0,44	1,23	5,83	1,10			2,22	0,53	0,265	1,69	3,70	0,45				
		1,95	0,97	0,485	0,98	5,94	1,20			2,7	0,42	0,21	2,28	3,56	0,35				
		2,6	0,97	0,485	1,63	7,92	1,68			2,27	0,37	0,185	1,9	2,64	0,23				
		1,82	0,78	0,39	1,04	4,46	0,75			2,11	0,48	0,24	1,63	3,18	0,35				
		1,72	0,94	0,47	0,78	5,08	0,98			2,54	0,53	0,265	2,01	4,23	0,52				
		1,49	0,65	0,325	0,84	3,04	0,42			3,07	0,69	0,345	2,38	6,65	1,06				
<i>Bacillus firmus</i>		1,74	0,55	0,275	1,19	3,01	0,37	<i>Bacillus licheniformis</i>		2,31	0,49	0,245	1,82	3,56	0,40				
		3,07	0,67	0,335	2,4	6,46	1,00			2,57	0,54	0,27	2,03	4,36	0,55				
		1,62	0,5	0,25	1,12	2,54	0,29			1,94	0,44	0,22	1,5	2,68	0,27				
		2,5	0,55	0,275	1,95	4,32	0,55			2,71	0,54	0,27	2,17	4,60	0,58				
		3,28	0,5	0,25	2,78	5,15	0,61			3,13	0,44	0,22	2,69	4,33	0,45				
		3,85	0,5	0,25	3,35	6,05	0,72			2,41	0,51	0,255	1,9	3,86	0,46				
		1,66	0,57	0,285	1,09	2,97	0,38			2,8	0,4	0,2	2,4	3,52	0,34				
		1,76	0,62	0,31	1,14	3,43	0,47			1,91	0,51	0,255	1,4	3,06	0,36				
		2,62	0,5	0,25	2,12	4,12	0,48			1,73	0,4	0,2	1,33	2,17	0,20				
		1,88	0,67	0,335	1,21	3,96	0,58			2,19	0,56	0,28	1,63	3,85	0,49				

X – dužina; R – širina (dijametar); r – radijus (R/2); h – dužina bez sfernog radijusa (X-2r); A – površina; V – zapremina;

Prilog 11. Elementi matrice W1 i vektora B1 za testove doprinosa ćelijskih ovojnica

Promenljiva	Broj skrivenih neurona								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Test adhezije									
Vreme	-4,36	0,23	1,36	0,23	2,01				
TSB	-5,93	2,66	-2,85	2	-1,22				
TSBU	2,71	-2,53	2,11	-1,2	1,61				
Nulti član	-3,22	0,17	-0,75	1	0,37				
Hidrofobnost ćelijske površine									
Vreme	1,11	-2,19	-1,33	-1,73	-2,43	-1,34	-1,8		
TSB	2,33	0,77	1,72	1,48	2,11	2,10	2,71		
TSBU	1,04	1,30	2,8	1,83	2,25	1,14	0,26		
TSBU+ CaCl ₂	-3,73	-3,92	-3,46	-3	-3,14	-3,41	-3,02		
Nulti član	-0,32	-1,83	1,05	0,30	1,1	-0,23	-0,05		
Permeabilnost ćelijske membrane									
Vreme	0,76	0,06	-0,29	0,13	0,48	-0,56	0,38	0,12	
TSB	0,78	0,76	-0,01	-0,2	0,66	-0,02	0,82	1,01	
TSBU	-0,14	0,32	0,86	0,51	0,14	0,82	0,11	0,92	
TSBU+ CaCl ₂	-0,91	-1,39	-1,09	-0,69	-0,89	-1,52	-1,24	-2,65	
Nulti član	-0,16	-0,45	-0,40	-0,33	0,06	-0,7	-0,2	-0,81	
Elektronegativnost ćelijskog zida									
Vreme	0,17	-0,26	-0,03	-0,25	-0,26	-1,61	-0,13	0,56	0,14
0,2 mol/L CaCl ₂	-0,12	0,33	-0,07	-0,05	0,18	-0,23	0,23	-0,3	0,52
0,2 mol/L CaCl ₂	-0,18	0,01	0,21	0,16	0,17	-0,27	0,14	0,19	0,31
0,2 mol/L CaCl ₂	-0,29	0,03	0,22	0,33	0,18	-0,25	0,19	0,15	0,16
2 mol/L CaCl ₂	0,34	0,09	0,47	0,37	0,26	0,07	0,36	-0,05	0,29
2 mol/L CaCl ₂	0,45	-0,05	0,52	0,28	0,18	0,41	0,32	0,06	0,30
2 mol/L CaCl ₂	0,56	-0,16	0,47	0,23	0,13	0,67	0,32	0,16	0,26
PBS	-1,01	0,04	-1,67	-1,2	-1,05	-0,38	-1,36	-0,33	-1,64
Nulti član	-0,2	0,14	0,004	0,1	0,01	0,01	0,11	-0,01	0,31

Prilog 12. Elementi matrice W2 i vektora B2 za testove doprinosa ćelijskih ovojnica

Bakterija	Broj skrivenih neurona									Nulti član	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Test adhezije											
<i>S. pasteurii</i> DSM 33	1,54	0,74	0,9	-0,54	-0,2						-1,74
<i>Bacillus muralis</i>	-1,98	-4,68	-2,12	3,8	0,49						4
<i>Bacillus lentus</i>	1,01	-0,57	0,44	0,54	-0,09						-1,09
<i>Bacillus simplex</i>	4,57	1,94	2,53	-1,24	-0,54						-7,87
<i>Bacillus firmus</i>	2,9	2,76	0,21	-2,36	-0,01						0,14
<i>Bacillus licheniformis</i>	0,48	-2,03	0,69	1,86	-0,16						-2,75
Hidrofobnost ćelijske površine											
<i>S. pasteurii</i> DSM 33	0,39	-0,20	0,63	0,27	-0,48	0,11	0,3				-0,04
<i>B. muralis</i>	-1,13	-0,52	2,9	-1,17	-1,37	1,71	0,25				0,01
<i>B. lentus</i>	0,28	0,04	0,81	-0,97	-0,02	1,42	-0,41				-0,03
<i>B. simplex</i>	0,29	1,25	0,93	-0,46	0,01	0,58	-0,99				-0,03
<i>B. firmus</i>	1,32	1,8	-0,58	-1,74	2,34	-1,85	0,86				-0,05
<i>B. licheniformis</i>	0,32	0,29	0,67	-1,21	0,13	0,81	0,26				-0,03
Permeabilnost ćelijske membrane											
<i>S. pasteurii</i> DSM 33	-0,12	0,29	-0,03	-0,05	0,28	0,27	-0,2	0,51			-0,11
<i>B. muralis</i>	-0,10	-0,27	-0,95	0,19	-0,06	1,16	0,3	0,84			0,04
<i>B. lentus</i>	-0,67	-0,24	0,56	-1,27	1,50	0,08	-0,5	0,55			0,04
<i>B. simplex</i>	0,01	1,03	1,11	-0,78	0,46	-0,91	-0,8	0,26			-0,05
<i>B. firmus</i>	-0,21	0,71	-0,48	1,28	-0,52	0,66	1,26	-0,91			-0,49
<i>B. licheniformis</i>	-0,02	0,77	0,11	0,15	0,04	0,04	-0,09	0,07			-0,2
Elektronegativnost ćelijskog zida											
<i>S. pasteurii</i> DSM 33	0,01	-0,63	0,21	0,14	0,10	-0,23	0,43	-0,51	0,09		0,71
<i>B. muralis</i>	0,57	1,06	0,14	0,16	-0,11	-0,25	0,46	0,36	-0,34		0,59
<i>B. lentus</i>	0,39	0,73	0,24	0,3	0,21	-0,96	0,50	-0,38	-0,34		0,5
<i>B. simplex</i>	0,72	0,15	0,37	0,17	-0,30	0,32	0,28	0,21	-0,55		0,85
<i>B. firmus</i>	0,07	-0,26	0,02	0,10	0,13	-0,06	0,43	-0,08	0,11		0,72
<i>B. licheniformis</i>	0,45	-0,18	0,26	0,17	0,10	0,04	0,33	0,03	-0,43		0,80

Prilog 13. Rezultati optimizacije testa hidrofobnosti čelijske površine

Bakterija	<i>S. pasteurii</i> DSM33		<i>Bacillus muralis</i>		<i>Bacillus lentus</i>		<i>Bacillus simplex</i>		<i>Bacillus firmus</i>		<i>Bacillus licheniformis</i>		
	-urea*	+urea**	-urea	+urea	-urea	+urea	-urea	+urea	-urea	+urea	-urea	+urea	
Box Behnken eksperimentalni dizajn	1	8,2	3,7	9,1	9,2	2,4	1,6	11,1	8,0	1,9	4,5	21,0	18,3
	2	23,1	15,2	27,1	26,7	11,2	10,5	21,4	18,4	5,6	21,1	18,3	15,9
	3	7,6	5,1	8,3	7,7	1,9	1,3	12,3	9,4	0,7	14,2	22,2	19,4
	4	25,0	17,1	31,2	30,7	7,0	-0,2	19,4	19,5	2,6	-0,5	19,3	16,0
	5	3,4	1,9	10,2	11,4	1,2	6,9	5,6	5,7	-0,3	10,9	17,6	15,4
	6	17,1	13,7	19,4	18,8	10,1	2,2	17,0	17,8	1,2	8,8	18,7	15,9
	7	9,2	4,9	11,1	11,7	3,3	8,7	15,2	11,1	4,7	15,3	24,7	21,6
	8	20,2	13,3	26,7	25	12,6	2,8	14,7	10,1	2,8	5,6	21,8	19,1
	9	10,1	7,1	17,7	16,6	4,0	5,2	15,2	13,3	1,5	10,7	22,4	19,6
	10	14,1	7,7	17,2	16,9	7,5	5,6	19,2	14,4	3,0	11,7	19,2	16,6
	11	14,9	5,9	22,1	19,0	8,2	6,4	22,4	16,9	3,3	13,8	23,1	16,7
	12	16,2	9,0	23,0	24,5	9,5	6,5	21,4	17,0	4,1	14,1	25,0	20,2
	13	16,5	9,85	23,9	24,7	9,1	6,0	22,0	17,4	4,4	13,8	20,0	16,8
	14	16,35	9,71	24,0	24,5	8,9	5,9	23,1	16,8	3,9	13,3	18,5	17,8
	15	16,2	9,9	23,9	23,8	8,8	6,0	22,7	17,2	4,05	13,4	19,6	16,2

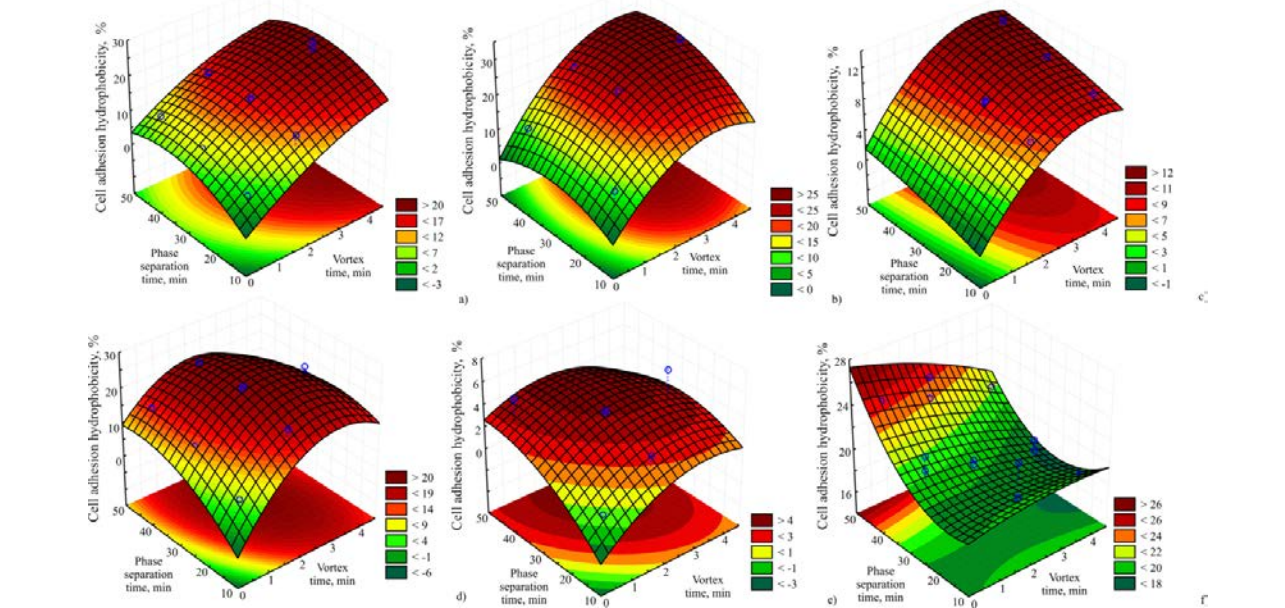
* podloga bez uree; ** podloga za dodatkom uree;

Prilog 14. ANOVA proračun za optimizaciju MATH metode

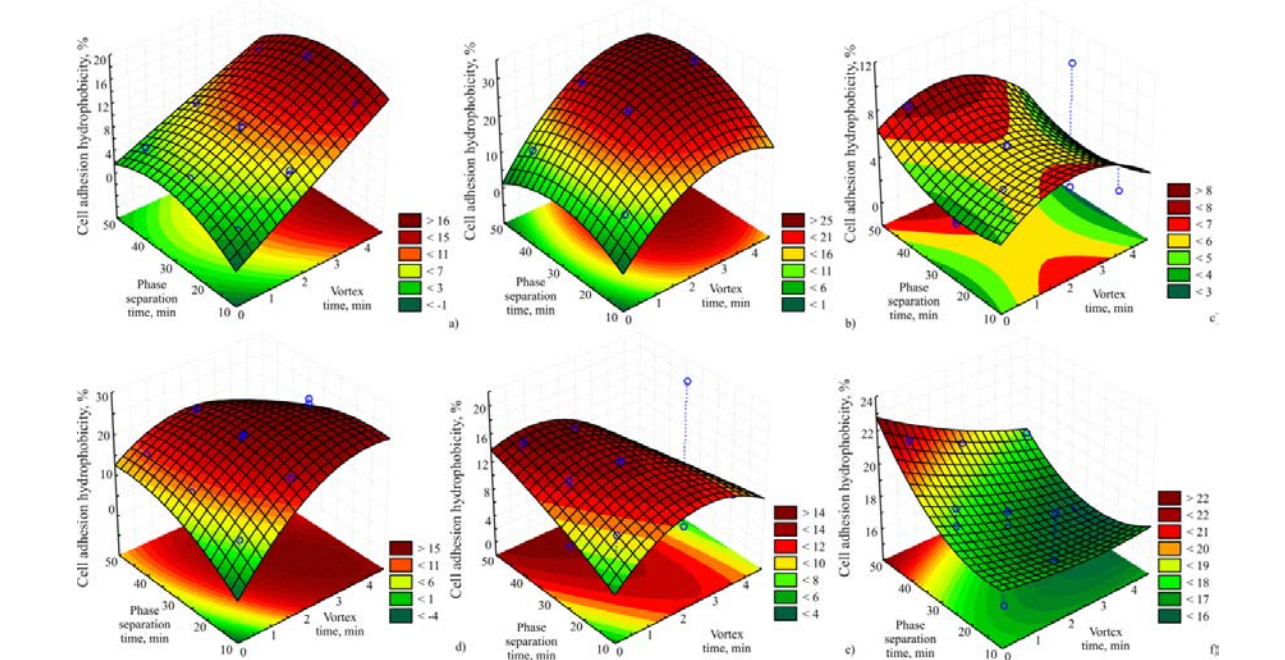
		Suma kvadrata					
		Hranljiva podloga bez uree					
Stepen slobode		<i>S. pasteurii</i> DSM33	<i>B. muralis</i>	<i>B. lentus</i>	<i>B. simplex</i>	<i>B. firmus</i>	<i>B. licheniformis</i>
X_1	1	407,57 ⁺	548,56 ⁺	122,37 ⁺	96,19 ⁺	3,02	6,83 ^{**}
X_1^2	1	12,93 [*]	100,91 ⁺	22,45 [*]	178,87 ⁺	5,61	0,36
X_2	1	6,04	2,59	0,04	0,39	0,58	0,09
X_2^2	1	0,5	3,62	7,23	0,04	0,21	5,84
X_3	1	27,67 [*]	46,65 [*]	13,62 ^{**}	25 [*]	9,73 ^{**}	34,81 ⁺
X_3^2	1	33,35 ⁺	32,97 ^{**}	0,21	33,12 [*]	2,83	11,68 [*]
$X_1 \times X_2$	1	1,86	9,59	5,38	2,22	0,83	0,01
$X_1 \times X_3$	1	1,66	9,74	0,02	36,23 ⁺	2,45	3,36
$X_2 \times X_3$	1	2,04	0,64	1,07	6,12	0,25	5,7
Error	5	9,46	30,77	12,16	8,20	11,94	7,60
R^2		0,98	0,96	0,93	0,98	0,68	0,90
		Hranljiva podloga sa ureeom					
X_1	1	237,42 ⁺	477,82 ⁺	2,61	124,09 ⁺	25,23	7,86
X_1^2	1	0,01	100,23 [*]	10,12	68,61 ⁺	30,2	0,20
X_2	1	6,24 [*]	10,56	17,5	1,75	27,76	0,29
X_2^2	1	0,62	11,39	2,10	0,56	0,69	0,42
X_3	1	0,81	40,07 ^{**}	2,25	0,44	3,72	13,76 ^{**}
X_3^2	1	16,41 ⁺	43,94 ^{**}	2,86	17,72 ^{**}	0,53	3,46
$X_1 \times X_2$	1	0,12	10,93	24,19	0,05	239,48 ⁺	0,37
$X_1 \times X_3$	1	2,53 ^{**}	8,06	0,35	46,53	15,49	1,33
$X_2 \times X_3$	1	1,3	7,51	0,03	0,07	0,06	8,48
Error	5	2,71	49,04	59,91	17,03	52,17	15,45
R^2		0,99	0,93	0,50	0,94	0,86	0,69

⁺ statistički značajno pri $p < 0,01$ nivou; ^{*} $p < 0,05$ nivou; ^{**} $p < 0,10$ nivou

Prilog 15. Efekat MATH operativnih parametera na hidrofobnost ćelijske površine (a) *S. pasteurii* DSM33; b) *B. muralis*; c) *B. lentus*; d) *B. simplex*; e) *B. firmus*; f) *B. licheniformis*)



Hranljiva podloga bez uree



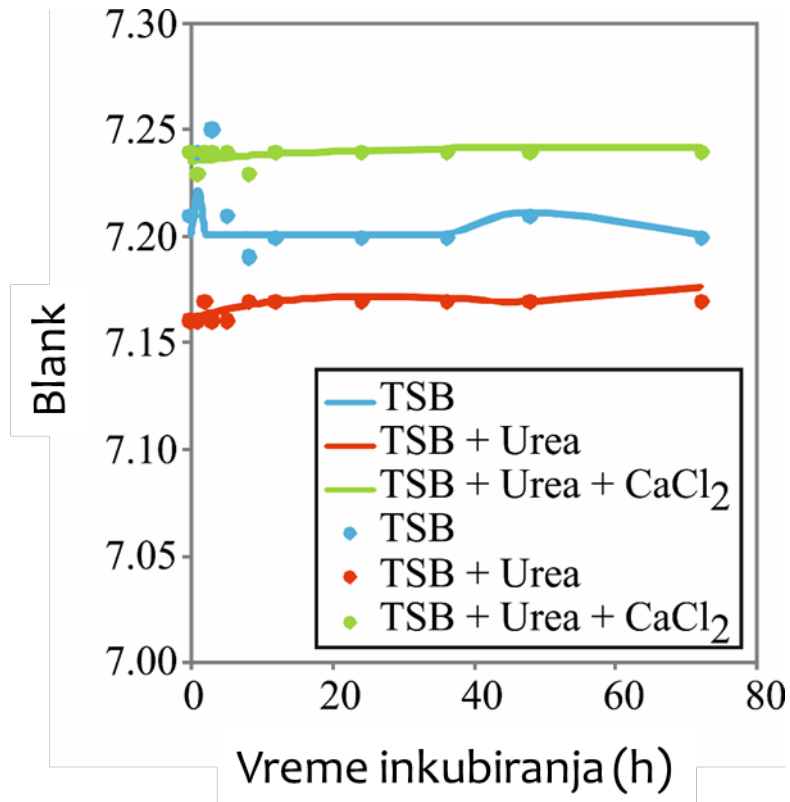
Hranljiva podloga sa ureom

Prilog 16. Elementi matrice W_1 i vektora B_1 za ispitivanje pH promena i uloge kalcijuma u formiranju biofilma tokom BIPK

Parametar	Broj skrivenih neurona				
	1	2	3	4	5
pH promene					
Time (h)	-2,185	-2,688	-2,591	-1,642	1,186
TSB	3,199	4,400	-3,252	-2,341	4,783
TSB + Urea	-0,152	-0,715	2,671	1,006	-0,561
TSB + Urea + CaCl ₂	-1,260	-1,770	0,586	-0,055	-3,734
Nulti član	1,943	1,736	-0,095	-1,359	0,505
Uloga kalcijuma u formiranju biofilma tokom BIPK					
Vreme	17,12	3,09	4,60	-0,05	
Apsorbanca	0,10	0,15	-0,27	-0,47	
Bez dodatka CaCl ₂	-14,5	-3,98	-3,41	-5,21	
Sa dodatkom CaCl ₂	7,28	1,56	7,45	5,36	
Nulti član	-7,26	-2,42	4,12	0,05	

Prilog 17. Elementi matrice W_2 i vektora B_2 za ispitivanje pH promena i uloge kalcijuma u formiranju biofilma tokom BIPK

Parametar	Broj skrivenih neurona					Nulti član
	1	2	3	4	5	
pH promene						
TSB blank	0,18	0,06	-0,37	-1,02	-0,59	-0,21
<i>S. pasteurii</i> DSM 33	0,91	-2,75	0,82	-0,48	1,83	0,40
<i>B. muralis</i>	0,75	-2,39	0,27	0,55	1,36	1,16
<i>B. lentus</i>	0,01	-2,09	1,37	-1,79	1,97	-0,31
<i>B. simplex</i>	0,76	-1,8	0,4	-0,17	1,08	0,23
<i>B. firmus</i>	1,49	-2,3	-0,27	1,21	0,73	1,04
<i>B. licheniformis</i>	1,02	-2,66	0,41	0,24	1,47	0,84
Uloga kalcijuma u formiranju biofilma tokom BIPK						
<i>S. pasteurii</i> DSM 33	4,72	-2,42	0,91	-1,83		-0,51
<i>B. muralis</i>	3,13	-1,85	0,98	-0,98		-0,54
<i>B. lentus</i>	4,48	-2,57	0,9	-1,42		-0,47
<i>B. simplex</i>	5,40	-4,05	0,09	-1,23		0,06
<i>B. firmus</i>	-0,69	1,03	0,27	0,74		-0,1
<i>B. licheniformis</i>	-9,35	12	-0,59	2,42		0,65

Prilog 18. Vrednosti promene pH kontrolnog uzorka (neinokulisane hranljive podloge)

Prilog 19. Kvalitet uklapanja i rezidualna analiza za proces ureolize

	χ^2	RMSE	MBE	MPE	R ²	Skew	Kurt	Mean	SD	Var
Koncentracija uree										
<i>S. pasteurii</i> DSM33	0,22	0,36	0,1	28,09	1	-0,37	-1,11	0,1	0,37	0,14
<i>B. pseudofirmus</i>	0,003	0,05	-0,02	0,17	0,88	-0,24	-1,31	-0,02	0,04	0,002
<i>B. muralis</i>	2,28	1,17	0,06	8,74	0,96	-0,61	-0,24	0,06	1,23	1,52
<i>B. lentus</i>	1,31	0,89	0,17	4,4	0,94	-0,62	1,24	0,17	0,92	0,84
<i>B. simpex</i>	2,84	1,31	-0,07	15,7	0,96	0,78	1,24	-0,07	1,37	1,89
<i>B. firmus</i>	5,18	1,76	0,21	38,32	0,96	-0,05	-1,12	0,21	1,85	3,41
<i>B. licheniformis</i>	0,76	0,68	0,1	9,75	0,99	-0,2	1,28	0,1	0,71	0,5
pH vrednost										
<i>S. pasteurii</i> DSM33	0,02	0,1	-0,02	0,97	0,98	0,21	-0,62	-0,02	0,1	0,01
<i>B. pseudofirmus</i>	0,001	0,02	0,004	0,23	0,82	0,41	2,08	0,00	0,03	0,001
<i>B. muralis</i>	0,02	0,12	0,02	1,08	0,97	0,54	0,18	0,02	0,12	0,02
<i>B. lentus</i>	0,02	0,10	0,02	1,06	0,93	0,34	0,5	0,02	0,11	0,01
<i>B. simpex</i>	0,02	0,12	0,01	1,32	0,98	-0,96	-0,14	0,01	0,13	0,02
<i>B. firmus</i>	0,01	0,09	-0,001	0,84	0,99	0,16	0,78	-0,001	0,1	0,009
<i>B. licheniformis</i>	0,02	0,11	0,01	1,11	0,98	-0,10	-1,11	0,01	0,12	0,01
Koncentracija ćelija										
<i>S. pasteurii</i> DSM33	0,16	0,32	0,09	2,30	0,94	1,96	5,25	0,09	0,32	0,10
<i>B. pseudofirmus</i>	0,02	0,11	-0,003	1,57	0,97	-1,36	1,59	-0,003	0,12	0,01
<i>B. muralis</i>	0,01	0,06	0,005	0,61	0,99	0,54	1,55	0,005	0,06	0,003
<i>B. lentus</i>	0,07	0,21	-0,001	2,49	0,88	-1,19	1,13	-0,001	0,22	0,05
<i>B. simpex</i>	0,06	0,2	0,01	2,61	0,96	0,13	-1,82	0,01	0,21	0,04
<i>B. firmus</i>	0,04	0,16	0,01	1,9	0,98	-0,55	-0,70	0,01	0,16	0,03
<i>B. licheniformis</i>	0,04	0,16	0,03	1,73	0,99	0,75	0,09	0,03	0,17	0,03

χ^2 – redukovan hi-kvadrat; MBE – srednje greške odstupanja; RMSE – koren kvadrata srednje greške; MPE – srednja procentualna greška; R² – koeficijent determinacije; Skew – "nazubljenost" krive raspodele; Kurt – "zakrivljenost" krive raspodele; Mean – srednja vrednost odstupanja; SD – standardna devijacija; Var – varijansa odstupanja.

Prilog 20. Kvalitet uklapanja i rezidualna analiza za proces BIPK

	χ^2	RMSE	MBE	MPE	R ²	Skew	Kurt	Mean	SD	Var
Količina precipitata										
<i>S. pasteurii</i> DSM33	0	0,001	0	0,39	1	-2,19	5,2	0	0,001	0
<i>B. pseudofirmus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>B. muralis</i>	0,001	0,02	0,005	14,28	0,98	0,26	-1,07	0,005	0,02	0,001
<i>B. lentus</i>	0,001	0,02	0,01	14,04	0,98	2,64	6,97	0,01	0,02	0
<i>B. simpex</i>	0	0,01	0,001	4,02	0,99	0,32	-1,37	0,001	0,02	0
<i>B. firmus</i>	0,001	0,02	0,01	14,11	0,99	1,94	4,09	0,01	0,02	0
<i>B. licheniformis</i>	0,001	0,02	0,01	13,95	1	2,53	6,48	0,01	0,02	0
pH vrednost										
<i>S. pasteurii</i> DSM33	0,09	0,19	0	1,79	0,91	1,17	0,13	0	0,21	0,04
<i>B. pseudofirmus</i>	0	0,01	0	0,09	0,85	1,15	2,2	0	0,01	0
<i>B. muralis</i>	0,02	0,09	-0,05	0,61	0,98	-1,72	2,21	-0,05	0,08	0,01
<i>B. lentus</i>	0,01	0,06	0	0,45	0,98	1,89	4,51	0	0,06	0,004
<i>B. simpex</i>	0,09	0,2	0	1,48	0,94	-2,26	5,40	0	0,22	0,05
<i>B. firmus</i>	0,02	0,08	0	0,54	0,99	0,72	2,94	0	0,09	0,01
<i>B. licheniformis</i>	0,001	0,02	0	0,14	0,99	0,52	1,99	0	0,02	0
Koncentracija kalcijuma										
<i>S. pasteurii</i> DSM33	6216	45,52	-12,8	166850	0,99	-0,52	2,26	-12,8	47,85	2289,75
<i>B. pseudofirmus</i>	920	17,51	0,005	1,3	0,73	0,81	-1,15	0,005	19,18	367,9
<i>B. muralis</i>	13964	68,23	-14,48	4372163	0,98	0,56	0,33	-14,48	73,03	5333,8
<i>B. lentus</i>	20593	82,85	1,67	8,70	0,84	0,81	-1,93	1,67	90,7	8233,7
<i>B. simpex</i>	26567	94,11	12,73	1402613	0,95	-1,11	0,71	12,73	102,1	10432,5
<i>B. firmus</i>	24784	90,89	-23,68	3173533	0,97	1,07	2,03	-23,68	96,13	9240,7
<i>B. licheniformis</i>	3,12	1,02	0,42	66,66	1	2,45	6	0,42	1,02	1,04

χ^2 – redukovan hi-kvadrat; MBE – srednje greške odstupanja; RMSE – koren kvadrata srednje greške; MPE – srednja procentualna greška; R² – koeficijent determinacije; Skew – "nazubljenost" krive raspodele; Kurt – "zakrivljenost" krive raspodele; Mean – srednja vrednost odstupanja; SD – standardna devijacija; Var – varijansa odstupanja.

Prilog 21. Dobijeni rezultati Plackett-Burmanovog eksperimentanog dizajna

Uzorak	Izlaz	Broj eksperimenta											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kontrola	A	10,97	10,89	7,03	11,03	7,02	7,05	7,01	11,01	11,04	11,02	6,99	11,02
	B	nd*	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	D	19,97	1,88	19,84	19,91	2,07	20,01	2,04	1,76	1,87	19,92	20,01	19,97
	E	0,004	0,003	nd	0,01	0,002	nd	nd	0,01	0,008	0,001	0,002	0,003
<i>S. pasteurii</i> DSM 33	A	9,78	9,45	8,45	9,97	8,41	8,21	9,51	9,12	10,28	10,15	9,55	10,37
	B	3,85	7,85	5,74	2,06	6,15	4,1	1,47	2,65	7,45	3,9	7,15	2,75
	C	0,75	0,62	3,15	0,95	5,0	1,64	0,55	2,05	5,2	3,25	2,1	0,7
	D	7,8	0,58	0,01	1,9	0,17	3,1	0,47	1,1	0,94	4,05	0,001	2,9
	E	1,97	0,22	3,14	2,8	0,28	2,48	0,25	0,15	0,17	2,17	3,24	2,73
<i>B. muralis</i>	A	9,47	10,22	8,31	9,87	7,81	7,89	8,34	9,87	10,07	9,71	8,27	9,84
	B	3,78	5,98	3,56	1,79	4,68	3,24	1,21	2,46	5,41	2,68	5,98	1,87
	C	1,74	2,33	2,45	0,78	2,47	0,74	0,41	0,54	0,65	1,24	3,82	1,1
	D	8,1	1,18	3,17	3,7	0,81	4,58	1,04	1,41	1,01	7,21	5,65	13,04
	E	1,81	0,12	2,48	2,58	0,18	2,53	0,12	0,1	0,16	2,04	2,21	1,02
<i>B. lenuts</i>	A	9,28	9,76	9,05	9,5	8,68	9,04	9,06	9,42	9,94	9,76	8,99	9,89
	B	4,05	6,53	5,31	2,7	5,88	4,06	3,16	4,19	5,74	3,89	6,91	4,13
	C	1,42	1,82	3,45	1,61	3,36	2,04	1,53	1,95	2,15	2,48	2,7	3,32
	D	4,74	0,88	0,54	1,41	0,4	3,38	0,46	0,85	0,63	3,32	1,89	2,67
	E	2,13	0,15	3,17	2,86	0,25	2,68	0,23	0,18	0,21	2,33	2,89	2,74
<i>B. simplex</i>	A	9,03	9,34	9,27	9,34	9,17	9,02	9,41	9,35	9,65	9,34	9,16	9,33
	B	4,21	6,15	5,69	3,01	5,59	4,58	4,65	5,03	5,03	3,98	7,58	5,62
	C	1,21	2,05	4,01	2,48	2,84	2,81	3,04	2,54	1,2	3,11	3,48	2,1
	D	1,7	0,28	0,14	0,27	0,71	0,51	0,07	0,34	0,06	0,01	0,28	0,84
	E	2,87	0,25	3,17	3,17	0,15	3,07	0,26	0,33	0,32	3,02	3,03	3,13
<i>B. firmus</i>	A	8,91	10,3	9,21	9,27	9,17	9,31	8,97	9,37	9,76	9,84	9,01	10,03
	B	3,35	6,1	4,78	2,78	5,87	3,7	3,78	4,54	6,8	3,7	6,85	3,2
	C	1,7	1,4	3,27	1,71	3,07	2,1	1,78	1,87	1,05	0,78	1,95	0,95
	D	3,1	0,68	0,001	1,21	0,31	6,71	0,34	1,02	0,77	3,37	2,7	1,13
	E	2,12	0,18	3,27	3,08	0,24	2,07	0,27	0,16	0,15	2,54	2,81	1,24
<i>B. licheniformis</i>	A	9,71	9,2	9,41	9,52	9,34	8,53	9,51	10,03	9,1	9,62	8,44	10,21
	B	5,1	6,6	6,79	3,87	7,12	5,6	4,71	6,27	6,8	5,19	7,0	7,2
	C	1,7	2,7	4,82	2,12	3,41	2,9	1,87	2,74	2,65	4,02	2,15	1,8
	D	3,02	0,98	0,01	0,001	0,01	2,02	0,12	0,71	0,1	1,94	0,84	1,4
	E	2,81	0,12	3,21	3,3	3,14	2,91	0,27	0,21	0,31	3,0	3,05	2,97

A – pH vrednost; B – broj vijabilnih ćelija (log CFU/mL); C – broj spora (log CFU/mL); D – količina uree (g/L); E – količina CaCO₃ precipitata (g/100 mL); nd – nije detektovano

Prilog 21. Kvalitet uklapanja i rezidualna analiza razvijene mreže

Izlazna promeljiva	χ^2	RMSE	MBE	MPE	SSE	AARD	r^2
<i>S. pasteurii</i> _{pH}	0,03	0,12	-1,0E-09	0,49	0,17	0,59	0,97
<i>S. pasteurii</i> _{vijabil.ćelije}	0,10	0,23	-2,6E-09	2,86	0,61	1,1	0,99
<i>S. pasteurii</i> _{spore}	0	0,01	2,8E-09	0,58	0,001	0,05	1
<i>S. pasteurii</i> _{urea}	2	1	1,0E-11	9,66	12	4,9	0,79
<i>S. pasteurii</i> _{precipitat}	0,05	0,16	2,2E-09	2,77	0,29	0,76	0,98
<i>B. muralis</i> _{pH}	0,01	0,08	6,0E-10	0,32	0,07	0,37	0,99
<i>B. muralis</i> _{vijabil.ćelije}	0,30	0,39	-5,7E-10	6,36	1,82	1,91	0,94
<i>B. muralis</i> _{spore}	0,03	0,13	-4,1E-10	3,96	0,21	0,64	0,98
<i>B. muralis</i> _{urea}	2,03	1,01	-2,9E-09	4,12	12,20	4,94	0,92
<i>B. muralis</i> _{precipitat}	0,05	0,16	-9,4E-10	5,08	0,32	0,79	0,98
<i>B. lentus</i> _{pH}	0,03	0,13	-6,1E-10	0,53	0,19	0,61	0,9
<i>B. lentus</i> _{vijabil.ćelije}	0,001	0,02	-1,1E-10	0,16	0,003	0,08	1
<i>B. lentus</i> _{spore}	0,3	0,39	-5,3E-10	7,96	1,81	1,9	0,7
<i>B. lentus</i> _{urea}	0,36	0,42	1,9E-09	5,05	2,14	2,07	0,90
<i>B. lentus</i> _{precipitat}	0,03	0,12	-9,6E-10	2,12	0,19	0,61	0,99
<i>B. simplex</i> _{pH}	0,01	0,06	2,1E-10	0,27	0,05	0,3	0,86
<i>B. simplex</i> _{vijabil.ćelije}	0,17	0,29	1,6E-09	2,43	1	1,41	0,93
<i>B. simplex</i> _{spore}	0,07	0,18	1,3E-09	4,83	0,4	0,89	0,95
<i>B. simplex</i> _{urea}	0,06	0,18	5,5E-10	6,37	0,37	0,86	0,86
<i>B. simplex</i> _{precipitat}	0,01	0,05	8,7E-10	0,72	0,03	0,26	1
<i>B. firmus</i> _{pH}	0,11	0,23	5,7E-10	0,99	0,63	1,12	0,72
<i>B. firmus</i> _{vijabil.ćelije}	0,002	0,03	-1,3E-09	0,38	0,01	0,15	1
<i>B. firmus</i> _{spore}	0,05	0,15	-1,2E-10	5,13	0,28	0,75	0,96
<i>B. firmus</i> _{urea}	0,32	0,4	-3,0E-09	9,91	1,94	1,97	0,95
<i>B. firmus</i> _{precipitat}	0,07	0,180	-6,4E-10	4,687	0,39	0,88	0,98
<i>B. licheniformis</i> _{pH}	0,02	0,102	-6,8E-10	0,419	0,13	0,5	0,96
<i>B. licheniformis</i> _{vijabil.ćelije}	0,37	0,429	-1,0E-10	2,931	2,21	2,1	0,83
<i>B. licheniformis</i> _{spore}	0,001	0,020	-9,6E-10	0,477	0,005	0,1	1
<i>B. licheniformis</i> _{urea}	0,22	0,331	-2,3E-10	7,057	1,31	1,62	0,88
<i>B. licheniformis</i> _{precipitat}	0,002	0,033	-3,1E-09	0,462	0,01	0,16	1

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Микробиолошка преципитација карбоната – од одабира индуктора до испитивања биопроцесних параметра
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду б) Рударско-геолошки факултет, Универзитет у Београду в) Биолошки факултет, Универзитет у Београду г) Научни институт БиоСенс, Универзитет у Новом Саду д) Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају: Докторске студије</i></p> <p>1.2 Врсте података</p> <p>а) квантитативни</p> <p>б) квалитативни</p> <p>1.3. Начин прикупљања података</p> <p>а) анкете, упитници, тестови</p> <p>б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи</p> <p>в) генотипови: навести врсту _____</p> <p>г) административни подаци: навести врсту _____</p> <p>д) узорци ткива: навести врсту _____</p> <p>ђ) снимци, фотографије: фотографије узорака током рада, микрофотографије оптичком и скенирајућом електронском микроскопијом</p> <p>е) текст: научно-релевантна литература, дискусија резултата</p> <p>ж) мапа, навести врсту _____</p> <p>з) остало: експериментални резултати добијени у лабораторијским условима</p> <p>1.3 Формат података, употребљене скале, количина података</p> <p>1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:</p> <p>а) Excel фајл, датотека .xlsx</p> <p>б) SPSS фајл, датотека _____</p> <p>с) PDF фајл, датотека .pdf</p>

- d) Текст фајл, датотека .docx
 e) JPG фајл, датотека .jpg, .jpeg, .tiff
 f) Остало, датотека _____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- a) број варијабли зависно од експерименталне поставке, уз константном б испитиваних бактеријских сојева у свим корацима докторске дисертације
 б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) _____

1.3.3. Поновљена мерења

a) **да**

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

a) **временски размак између поновљених мера је од неколико минута до неколико дана**

б) варијабле које се више пута мере односе се **на све експерименталне анализе**

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

a) **Да**

б) **Не**

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

a) **експеримент: микробиолошке анализе, структурна карактеризација материјала, кинетичка испитивања, биотехнолошка оптимизација**

б) **корелационо истраживање: анализа стандардне оцене, кинетичко моделовање, моделовање вештачких неуронских мрежа, вишекритеријска оптимизација, итд.**

ц) **анализа текста: прикупљање литературних података и упоређивање са експерименталним резултатим**

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

a) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
 б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не
 в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података
-

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података контролисан је одређивањем поновљивости добијених резултата.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података је извршена упоређивањем са експерименталним резултатима и литературним подацима.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у: **НарДУс – Националном репозиторијуму дисертација у Србији и у репозиторијуму Информационог система научне делатности Универзитета у Новом Саду**

3.1.2. URL адреса: <https://nardus.mpn.gov.rs/>;

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) **Да**

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? **Неограничено**

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Оља Шовљански, oljasovljanski@uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Оља Шовљански, oljasovljanski@uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Оља Шовљански, oljasovljanski@uns.ac.rs