



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD



Razvoj tehnologije proizvodnje agenasa biološke kontrole toksigenih izolata roda *Aspergillus*

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

prof. dr Jovana Grahovac

Kandidat:.

mast. inž. Vanja Vlajkov

Novi Sad, 2021. godine

*Istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije realizovana su uz podršku Fonda za nauku Republike Srbije i projekta BioSolAfla (6064541) "Bioprocess solution for the production of biocontrol agent against aflatoxigenic *Aspergillus* species".*

Inicijativa za uključivanje rodnog aspekta u istraživanja koja se tiču analize stavova poljoprivrednih proizvođača prema primeni (bio)pesticida, pokrenuta je pod pokroviteljstvom projekta HORIZON 2020 Co-CreatE Change in Research Funding and Performing (Project No. 873112), #COCHANGE2020

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Vrsta rada:	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora:	Vanja Vlajkov
Mentor:	Prof. dr Jovana Grahovac, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad
Naslov rada:	Razvoj tehnologije proizvodnje agenasa biološke kontrole toksigenih izolata roda <i>Aspergillus</i>
Jezik publikacije (pismo):	Srpski (latinica)
Fizički opis rada:	Poglavlja 8; stranica 251; tabela 59; slika 57; referenci 379; priloga 9
Naučna oblast:	Tehnološko inženjerstvo
Uža naučna oblast (naučna disciplina):	Biotehnologija
Ključne reči/ predmetna odrednica:	<i>Bacillus</i> , biološka kontrola, <i>Aspergillus flavus</i> , aflatoksin, CAP, lipopeptidi, modelovanje, optimizacija, bioprocen, tržište biopesticida
Rezime na jeziku rada:	Kukuruz je jedan od vodećih izvoznih proizvoda u Republici Srbiji i usev od strategijskog značaja za državnu ekonomiju. Tokom 2012. godine, Republika Srbija se našla se na listi zemalja koje su pretrpele velike ekonomske gubitke od posledica pojave aflatoksigenih gljiva na poljima kukuruza i ulaska aflatoksina u lanac ishrane. Analizom predstavnika gljiva vrste <i>Aspergillus flavus</i> uzorkovanih sa kukuruza uzgajanog na različitim lokalitetima u Republici Srbiji, ustanovljen je visok nivo distribucije izolata sa značajnim genetskim potencijalom za produkciju aflatoksina. Rešenje postojećeg problema, ogleda se u primeni mikrobioloških biopesticida, kao efikasne alternative sintetski dobijenim preparatima, koji i uprkos brojnim negativnim efektima, i dalje zauzimaju vodeću poziciju u trenutno aktuelnoj poljoprivrednoj praksi. Razvoj tehnologije proizvodnje agenasa biološke kontrole toksigenih izolata <i>Aspergillus flavus</i> iniciran je izolacijom i odabirom potentnog biokatalizatora kao nosioca bioprocena. Među 76 novoizolovanih sojeva <i>Bacillus</i> spp. definisan proizvodni

	<p>mikroorganizam okarakterisan je najvećim genetskim potencijalom za produkciju antimikrobnih komponenti i najizraženijim supresivnim delovanjem prema ispitivanim sojeva. Dalje faze razvoja bioprocenog rešenja obuhvatale su optimizaciju kvalitativnog i kvantitativnog sastava hranljivog medijuma za produkciju biokontrolnih agenasa primenom odabranog proizvodnog mikroorganizma. Proizvodnja je skalirana na nivo laboratorijskog bioreaktora ukupne zapremine 16 l radi validacije definisanog optimalnog sastava kultivacionog medijuma (celuloza, 5 g/l, (NH₄)₂SO₄ 3,77 g/l, K₂HPO₄ 0,3 g/l i MgSO₄·7H₂O 0,3 g/l) i optimizacije procesnih parametara proizvodnje. Maksimizacija efikasnosti proizvedenih agenasa biološke kontrole definisana je pri uslovima koji podrazumevaju, dužinu trajanja kultivacije 96 h, brzinu mešanja 300 o/min i intenzitet aeracije 1,5 vvm. Dizajn bioprocenog rešenja zaokružen je ispitivanjem mogućnosti formulacije krajnjeg proizvoda primenom čestica biokompatibilnog čvrstog nosača. Poslednja faza istraživanja usmerena je na sagledavanje stanja lokalnog tržišta i ispitivanje stavova poljoprivrednih proizvođača o primeni (bio)pesticida u Republici Srbiji</p>
Datum prihvatanja teme od strane nadležnog veća:	7.6.2019
Datum odbrane:	
Članovi komisije (titula, ime i prezime, zvanje, institucija):	<p>Predsednik: dr Jelena Dodić, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad Mentor: dr Jovana Grahovac, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad Član: dr Snežana Vučetić, docent, Tehnološki fakultet Novi Sad Član: dr Mila Grahovac, vanredni profesor, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad Član: Dragan Milić, vanredni profesor, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p>
Napomena:	

KEY WORD DOCUMENTATION

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Vanja Vlajkov
Supervisor:	Jovana Grahovac, PhD, Associate Professor, Faculty of Technology Novi Sad
Thesis title:	The development of technology for the production of biocontrol agents against toxigenic isolates of the <i>Aspergillus</i> genus
Language of text (script):	Serbian (latin)
Physical description:	Chapters 8; pages 251; tables 59; figures 57; references 379; appendix 9
Scientific field:	Technological Engineering
Scientific subfield (scientific discipline):	Biotechnology
Subject, Key words:	<i>Bacillus</i> , biocontrol, <i>Aspergillus flavus</i> , aflatoxin, CAP, lipopeptides, modelling, optimization, bioprocess, biopesticides market
Abstract in English language:	Maize is one of the leading export products in the Republic of Serbia and a crop of strategic importance for the country economy. In 2012. the Republic of Serbia faced an aflatoxin outbreak in maize fields, resulting in significant economic losses and aflatoxin entrance into the food chain. The analysis of the <i>Aspergillus flavus</i> isolates sampled from maize grown in different localities in the Republic of Serbia revealed the high distribution of strains with the genetic potential to produce aflatoxins. The solution to the existing problem was recognized in microbial biopesticides application, as effective alternative to the synthetically derived products. Besides the numerous hazardous effects, chemical pesticides still take the leading position in current agricultural practice. The development of the production technology of biocontrol agents against toxigenic <i>Aspergillus</i> isolates, was initiated by isolation and selection of potent biocatalyst as the central point of the bioprocess. Among 76 newly isolated strains of <i>Bacillus</i> spp., the producing microorganism was selected based on its highest antagonistic activity against tested phytopathogens

	<p>and genetic potential for producing antimicrobial components. Further stages of the bioprocess solution development included optimizing the qualitative and quantitative composition of the cultivation medium for the production of biocontrol agents using the selected producing microorganism. Production was scaled to the level of a laboratory bioreactor with a total volume of 16 l to validate the previously defined optimal composition of the cultivation medium (cellulose, 5 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.77 g/l, K_2HPO_4 0.3 g/l and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/l) and perform optimization of process production parameters. The optimized conditions for the production of the biocontrol agents included the cultivation time of 96 h, the agitation rate of 300 rpm and the aeration intensity of 1.5 vvm. The bioprocess design was completed by investigating the possibility of the final product formulation using the biocompatible carriers. The final research step included the current state of the local market review and exploring agricultural producers' attitudes towards the use of (bio) pesticides in the Republic of Serbia.</p>
Accepted on Scientific Board on:	7/6/2019
Defended:	
Thesis Defend Board:	<p>President: Jelena Dodić, PhD, Full Professor, Faculty of Technology Novi Sad Supervisor: Jovana Grahovac, PhD, Associate Professor, Faculty of Technology Novi Sad Member: Snežana Vučetić, PhD, Assistant Profesor, Faculty of Technology Novi Sad Member: Mila Grahovac, PhD, Associate Professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad Member: Dragan Milić, PhD, Associate Professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad</p>
Note:	

Sadržaj

1. Uvod.....	2
2. Ciljevi istraživanja.....	5
3. Pregled literature.....	8
3.1. <i>Aspergillus flavus</i> kao fitopatogena gljiva.....	8
3.1.1. Ekonomski značaj kukuruza i uticaj kontaminacije aflatoksinima	9
3.1.2. Uticaj klimatskih uslova na proizvodnju kukuruza i razvoj aflatoksina.....	11
3.1.3. Opšte karakteristike vrste <i>Aspergillus flavus</i>	12
3.2. <i>Aspergillus flavus</i> kao producer aflatoksina	14
3.2.1. Opšta svojstva aflatoksina.....	15
3.3. Opšti aspekti biološke kontrole	19
3.3.1. Komercijalizacija i svetsko tržište biopesticida	19
3.3.2. Mikrobiološki biopesticidi	21
3.3.3. Mehanizam delovanja bakterijskih biopesticida	22
3.4. Razvoj tehnologije proizvodnje mikrobioloških biopesticida.....	30
3.4.1. Odabir odgovarajućeg biokatalizatora	30
3.4.2. Optimizacija uslova proizvodnje mikrobioloških biopesticida.....	32
3.4.3. Formulacija mikrobioloških biopesticida.....	36
3.4.4. Proizvodnja mikrobioloških biopesticida na industrijskom nivou.....	38
4. Materijal i metode.....	42
4.1. Izolacija i identifikacija test mikroorganizama.....	43
4.1.1. Izolacija <i>Aspergillus flavus</i> iz uzoraka kukuruza	43
4.1.2. Monosporijalna izolacija <i>Aspergillus flavus</i>	44
4.1.3. Identifikacija <i>Aspergillus flavus</i> na osnovu morfoloških karakteristika.....	44
4.2. Izolacija genomske DNK i molekularne analize primenom test mikroorganizama	45
4.2.1. Izolacija genomske DNK <i>Aspergillus flavus</i>	45
4.2.2. Detekcija delecija u okviru klastera gena za biosintezu aflatoksina - CAP (<i>Cluster Amplification Patterns</i>)	46
4.3. Procena aflatoksigenog potencijala <i>Aspergillus flavus</i> veštačkom inokulacijom.....	48
4.4. Izolati <i>Aspergillus flavus</i> kroz faze istraživanja.....	48
4.5. Izolacija potencijalnih proizvodnih sojeva	49
4.6. Potencijalni proizvodni mikroorganizmi <i>Bacillus</i> spp.....	49
4.7. Izolacija genomske DNK i molekularne analize <i>Bacillus</i> spp.....	50
4.7.1. Detekcija gena za produkciju lipopeptidnih komponenti sa antimikrobnim delovanjem.....	50
4.7.2. Analiza sekvence 16 S rRNK regiona proizvodnog soja <i>Bacillus</i> sp.	51
4.7.3. Horizontalna gel elektroforeza amplifikovanih produkata PCR reakcija	52
4.8. Čuvanje i osvežavanje proizvodnih i test mikroorganizama	53
4.8.1. Čuvanje mikroorganizama	53
4.8.2. Osvežavanje mikroorganizama	53
4.9. Hranljive podloge	53
4.9.1. Hranljive podloge u fazi pripreme inokuluma.....	53
4.9.2. Hranljive podloge u fazama izvođenja kultivacije.....	54
4.10. Priprema inokuluma i inokulacija.....	57
4.11. Procesni uslovi tokom izvođenja kultivacije	59
4.12. Imobilizacija ćelija proizvodnog mikroorganizma na biougaj.....	60
4.12.1. SEM analiza	62
4.13. Analitičke metode	62
4.13.1. Određivanje sadržaja aflatoksina ELISA metodom.....	62
4.13.2. Određivanje sadržaja aflatoksina HPLC metodom	62
4.13.3. Određivanje koncentracije ćelija proizvodnog mikroorganizma	63
4.13.4. Određivanje rezidualnih koncentracija nutrijenata	63

4.13.5.	<i>In vitro</i> testiranje antimikrobne aktivnosti	63
4.13.6.	Identifikacija lipopetidnih komponenti HPLC-MS metodom.....	64
4.13.7.	Identifikacija lipopetidnih komponenti MALDI-TOF MS metodom	65
4.14.	Statistička obrada podataka	66
4.14.1.	Skrining potencijalnih proizvodnih izolata i optimizacija hranljive podloge – odabir izvora ugljenika i organskog izvora azota.....	66
4.14.2.	Modelovanje sastava hranljivog medijuma primenom metodologije odzivne površine	66
4.14.3.	Modelovanje sastava hranljivog medijuma primenom metodologije veštačkih neuronskih mreža.....	67
4.14.4.	Optimizacija sastava hranljivog medijuma	68
4.14.5.	Optimizacija procesnih parametara proizvodnje	69
4.14.6.	Imobilizacija ćelija proizvodnog mikroorganizma na čestice biouglja kao čvrstog nosača	70
4.14.7.	Analiza stanja tržišta biopesticida u Republici Srbiji.....	70
4.14.8.	Istraživanje stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida	70
5.	Rezultati i diskusija	73
5.1.	Izolacija, identifikacija i procena potencijala <i>Aspergillus flavus</i> za produkciju aflatoksina.....	73
5.1.1.	Uzorci za izolaciju <i>Aspergillus flavus</i>	73
5.1.2.	Analiza sadržaja aflatoksina primenom ELISA i HPLC metode	73
5.1.3.	Makromorfološka i mikromorfološka karakterizacija izolata <i>Aspergillus flavus</i> ...	76
5.1.4.	Analiza genetskog profila izolata <i>Aspergillus flavus</i> za produkciju aflatoksina	77
5.1.5.	Procena potencijala izolata <i>Aspergillus flavus</i> za produkciju aflatoksina veštačkom inokulacijom	81
5.2.	Potencijal antagonističkog delovanja <i>Bacillus</i> spp. protiv <i>Aspergillus flavus</i>	83
5.2.1.	Izolati <i>Bacillus</i> spp. iz rizosfere različitih biljnih vrsta	83
5.2.2.	Preliminarni skrining antagonističkog potencijala <i>Bacillus</i> spp.....	84
5.2.3.	Skrining antagonističkog potencijala <i>Bacillus</i> spp.	87
5.2.4.	Skrining genetskog potencijala <i>Bacillus</i> spp. za produkciju antimikrobnih komponenti	89
5.3.	Odabir optimalnih izvora osnovnih komponenti hranljivog medijuma	94
5.3.1.	Odabir optimalnog izvora ugljenika.....	94
5.3.2.	Odabir optimalnog izvora organskog azota.....	98
5.4.	Odabir i filogenetska analiza 16S rRNK sekvence proizvodnog izolata <i>Bacillus</i> sp...	101
5.5.	Modelovanje i optimizacija sastava hranljivog medijuma.....	105
5.5.1.	Eksplorativna analiza eksperimentalnih podataka	107
5.5.2.	Modelovanje sastava hranljivog medijuma primenom metodologije odzivne površine	108
5.5.3.	Modelovanje sastava hranljivog medijuma primenom metodologije veštačkih neuronskih mreža.....	111
5.5.4.	Poređenje modela generisanih metodologijom odzivne površine i metodologije veštačkih neuronskih mreža	114
5.5.5.	Optimizacija sastava hranljivog medijuma primenom metodologije željene funkcije	120
5.6.	Analiza toka bioprocasa u laboratorijskom bioreaktoru	122
5.6.1.	Analiza toka bioprocasa u laboratorijskom bioreaktoru pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min	123
5.6.2.	Analiza toka bioprocasa u laboratorijskom bioreaktoru pri uslovima aeracije 0,5 vvm i mešanja 300 o/min	128
5.6.3.	Analiza toka bioprocasa u laboratorijskom bioreaktoru pri uslovima aeracije 1,5 vvm i mešanja 100 o/min.	133
5.6.4.	Analiza toka bioprocasa u laboratorijskom bioreaktoru pri uslovima aeracije 1,5 vvm i mešanja 300 o/min.	138

5.7.	Optimizacija procesnih parametara	143
5.8.	Identifikacija antimikrobnih komponenti dobijenih izvođenjem bioprocasa u laboratorijskom bioreaktoru.....	147
5.9.	Formulacija preparata za biološku kontrolu	155
5.10.	Analiza stanja tržišta biopesticida u Republici Srbiji.....	160
5.10.1.	Istraživanje stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida	162
6.	Zaključci.....	178
7.	Reference	183
8.	Prilozi	217
8.1.	Prilog 1.....	217
8.2.	Prilog 2.....	218
8.3.	Prilog 3.....	220
8.4.	Prilog 4.....	222
8.5.	Prilog 5.....	224
8.6.	Prilog 6.....	226
8.7.	Prilog 7.....	230
8.8.	Prilog 8.....	233
8.9.	Prilog 9.....	236
	План третмана података	245

Spisak oznaka, simobola i skraćenica

ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i> – adrenokortikotropni hormon
AFB1	Aflatoksin B1
Ala	<i>Alanine</i> (engl.) – Alanin
ANN	<i>Artificial Neural Network</i> (engl.) – veštačka neuronska mreža
Asn	<i>Asparagine</i> (engl.) – asparagin
Asp	<i>Aspartic acid</i> (engl.) – asparaginska kiselina
a_w	<i>Water activity</i> (engl.) – aktivnost vode
BDP	Bruto domaći proizvod
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (engl.)
b_0	Odsečak polinomske jednačine drugog reda
b_1, b_2, b_3, b_4	Linearni koeficijenti polinomske jednačine drugog reda
$b_{11}, b_{22}, b_{33}, b_{44}$	Kvadratni koeficijenti polinomske jednačine drugog reda
$b_{12}, b_{13}, b_{14}, b_{23}, b_{24}, b_{34}$	Koeficijenti interakcije polinomske jednačine drugog reda
CAP	<i>Cluster amplification pattern markers</i> (engl.)
CTAB	<i>Cetyl trimethylammonium bromide</i> (engl.) – cetil-3-metil-Amonijum-bromid
DAD	<i>Diode-Array Detector</i> (engl.) – detektor umreženih dioda
DF	<i>Degree of Freedom</i> (engl.) – broj stepeni slobode
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
DoE	<i>Design of experiments</i> (engl.) – dizajn eksperimenata
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> (engl.) – tečna hromatografija pod visokim pritiskom
EC	<i>European Commission</i> (engl.) – Evropska komisija
EDS	The Energy Dispersive X-Ray detector (engl.)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunoassay</i> (engl.) – imunoenzimski test
EPA	<i>The U.S. Environmental Protection Agency</i> (engl.) – Američka agencija za zaštitu životne sredine
ESI	<i>ElectroSpray Ionization</i> (engl.) – izvor elektrosprej jonizacije
ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i> (engl.) – masena spektrometrija sa elektrosprej jonizacijom
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (engl.) – Agencija za hranu i lekove
FLD	<i>Fluorescence Detector</i> (engl.) – fluorescentni detektor
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (engl.) – Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom
G+C (%)	Ukupni sadržaj guanina i citozina u DNK
Gln	<i>Glutamine</i> (engl.) – glutamin

GRAS	<i>Generally Regarded As Safe</i> (engl.) – oznaka statusa za organizme koji se generalno smatraju bezbednim od strane Američke organizacije za hranu i lekove (FDA – <i>Food and Drug Administration</i>)
Glu	<i>Glutamic acid</i> (engl.) – glutaminska kiselina
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (engl.) – Međunarodne agencije za istraživanje raka
Ile	<i>Isoleucine</i> (engl.) – izoleucin
ISR	<i>Induced Systemic Resistance</i> (engl.) – indukovana sistemska otpornost biljaka
Leu	<i>Leucine</i> (engl.) – Leucin
LSD	<i>Least Significant Difference test</i> (engl.) – test najmanje značajne razlike
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry</i> (engl.) – Masena spektrometrija zasnovana na jonizaciji potpomognutoj laserskom desorpcijom iz matriksa/ analizator sa vremenom preleta
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i> (engl.) – molekularna analiza evolucione genetike
MS	<i>Mean square</i> (engl.) – srednji kvadrat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (engl.) – Nacionalni centar za biotehnoške podatke
NCAIM	<i>National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms</i> (engl.) – Međunarodna zbirka poljoprivrednih i industrijskih mikroorganizama
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (engl.) – nuklearna magnetna rezonanca
NOR	<i>Norsolorinic acid</i> (engl.) – norsolorinska kiselina
NPRS	<i>Non-Ribosomal Peptide Synthetase</i> (engl.) – neribozomalna peptid sintetaza
OFAT	<i>One factor at a time</i> (engl.) – jedan faktor u vremenu
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (engl.) – lančana reakcija polimeraze
PEG	<i>Polyethylene glyco</i> (engl.) – polietilen glikol
PPG	<i>Polypropylene glycol</i> (engl.) – polipropilen glikol
PGPR	<i>Plant Growth-Promoting Rhizobacteria</i> (engl.) – rizobakterije promotori rasta
Pro	<i>Proline</i> (engl.) – prolin
PSSS	Poljoprivredne stručne i savetodavne službe
R ²	Koeficijent determinacije
RASFF	<i>Rapid Alert System for Food and Feed</i> (engl.) – Sistem brzog obaveštavanja i uzbunjivanja
rRNK	ribozomalna ribonukleinska kiselina
RSM	<i>Response Surface Methodology</i> (engl.) – metodologija odzivne površine

S/N	<i>Signal to Noise</i> (engl.) – signal/šum
SAR	<i>Systemic Acquired Resistance</i> (engl.) – sistemski stečena otpornost
SB	<i>Sodium Borate Buffer</i> (engl.) – pufer natrijum-borata
SCADA	<i>Supervisory control and data acquisition</i> (engl.)
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> (engl.) – skenirajuća elektronska mikroskopija
SEM/EDS	<i>Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive spectrometry</i> (engl.) – skenirajuća elektronska mikroskopija sa energo-disperzivnom spektrometrijom
Ser	<i>Serine</i> (engl.) – Serin
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (engl.) – polimorfizam pojedinačnih nukleotida
SMA	<i>Sabouraud Maltose Agar</i> (engl.) – Saburo maltozni agar
SS	<i>Single spore</i> (engl.) – monosporijalno
SS	<i>Sum of squares</i> (engl.) – suma kvadrata
ST	<i>Sterigmatocystin</i> (engl.) – sterigmatocistin
Thr	<i>Threonine</i> (engl.) – treonin
vvm	<i>Volume of air per volume of liquid per min</i> (engl.) – zapremina vazduha po zapremini tečnosti u min
VERA	<i>Versicolorin A</i> (engl.) – versikolorin A
XRD	<i>X-ray diffraction analysis</i> (engl.) – rendgenostrukturna analiza
XRF	<i>X-ray fluorescence spectrometry</i> (engl.) – rendgenska fluorescentna spektrometrija

Spisak tabela

Tabela 3.1.1. Apsolutne vrednosti (izražene u milionima evra, u tekućim cenama) i učešće (izraženo u %) vrednosti proizvodnje kukuruza u ukupnoj vrednosti i vrednosti biljne proizvodnje u Republici Srbiji za period 2007-2018. godine.	10
Tabela 3.1.2. Apsolutne vrednosti (izražene u milionima evra, u tekućim cenama) i učešće (izraženo u %) vrednosti izvezenog kukuruza u vrednosti izvezenih poljoprivrednih proizvoda, prehrambenih proizvoda i ukupnog izvoza u Republici Srbiji za period 2007-2018. godine.....	11
Tabela 3.2.1. Maksimalno dozvoljene količine za AFB1 i ukupne aflatoksine u kukuruzu prema odredbama zakonske regulative u Republici Srbiji, zemljama Evropske unije i SAD.	18
Tabela 3.4.1. Pregled uslova proizvodnje antimikrobnih agenasa primenom predstavnika roda <i>Bacillus</i> kao proizvodnih izolata.	35
Tabela 3.4.2. Vrste pomoćnih sredstava i primeri materijala korišćenih u formulaciji preparata mikrobioloških biopesticida na bazi biomase <i>Bacillus</i> vrsta (Schisler i sar., 2004).	37
Tabela 3.4.3. Komercijalno dostupni preparati za zaštitu bilja na svetskom tržištu, na bazi <i>Bacillus</i> spp. (Cawoy i sar., 2011).....	39
Tabela 4.2.1. Uslovi izvođenja multipleks PCR reakcija za CAP (engl. <i>Cluster amplification pattern markers</i> , CAP) analizu.	46
Tabela 4.2.2. Lista prajmera korišćenih u četiri multipleks PCR reakcije CAP (<i>Cluster amplification pattern markers</i>) analize.	47
Tabela 4.7.1. Lista prajmera korišćenih za detekciju gena odgovornih za sintezu lipopeptidnih komponenti sa antimikrobnim delovanjem.	50
Tabela 4.7.2. Uslovi izvođenja PCR reakcija za amplifikaciju gena odgovornih za produkciju lipopeptidnih komponenti sa antimikrobnim delovanjem.	51
Tabela 4.7.3. Uslovi izvođenja PCR reakcije za amplifikaciju 16 S rRNK regiona.....	51
Tabela 4.9.1. Sastav hranljivih podloga za kultivaciju u eksperimentalnoj fazi odabira optimalnog izvora ugljenika za proizvodnju agenasa biološke kontrole.....	54
Tabela 4.9.2. Sastav hranljivih podloga za kultivaciju u eksperimentalnoj fazi odabira optimalnog izvora organskog azota za proizvodnju agenasa biološke kontrole.	55
Tabela 4.9.3. Nezavisne promenljive i njihove varirane vrednosti u okviru Boks-Benkenovog eksperimentalnog plana u fazi modelovanja i optimizacije sastava hranljivih podloga na bazi odabranog optimalnog izvora ugljenika i organskog azota za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma.	56
Tabela 4.9.4. Sastav hranljivih podloga za kultivaciju u eksperimentalnoj fazi validacije optimizovanog kvalitativnog i kvantitativnog sastava hranljivog medijuma izvođenjem kultivacije na nivou laboratorijskog bioreaktora.	57
Tabela 4.11.1. Procesni uslovi tokom izvođenja kultivacije u različitim eksperimentalnim fazama istraživanja.	59
Tabela 4.12.1. Eksperimentalni plan izvođenja faze formulacije prepata za biološku kontrolu imobilizacijom ćelija proizvodnog mikroorganizma na biougalj.	61

Tabela 5.1.1. Analiza prisustva aflatoksina B1 u uzorcima kukuruza proizvedenog tokom 2019. godine na 10 različitih lokaliteta u Republici Srbiji primenom ELISA metode.....	74
Tabela 5.1.2. Analiza prisustva aflatoksina B1 u uzorcima kukuruza proizvedenog tokom 2020. godine na 10 različitih lokaliteta u Republici Srbiji primenom ELISA metode.....	74
Tabela 5.1.3. Analiza prisustva ukupnih aflatoksina i aflatoksina B1 u uzorcima kukuruza proizvedenog tokom 2019. godine na 10 različitih lokaliteta u Republici Srbiji primenom HPLC metode.....	75
Tabela 5.1.4. Analiza prisustva ukupnih aflatoksina i aflatoksina B1 u uzorcima kukuruza proizvedenog tokom 2020. godine na 10 različitih lokaliteta u Republici Srbiji primenom HPLC metode.....	75
Tabela 5.1.5. Nivo kontaminacije aflatoksinima u veštački inokulisanom semenu kukuruza primenom HPLC metode kao procena aflatoksigenog potencijala deset izolata <i>Aspergillus flavus</i>	82
Tabela 5.2.1. Jednofaktorijalna analiza varijanse prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata protiv fitopatogenog predstavnika vrste <i>Aspergillus flavus</i> SA2BSS.....	86
Tabela 5.2.2. Jednofaktorijalna analiza varijanse prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata protiv fitopatogenih predstavnika vrste <i>Aspergillus flavus</i>	88
Tabela 5.2.3. Srednje vrednosti prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata protiv fitopatogenih predstavnika vrste <i>Aspergillus flavus</i>	88
Tabela 5.3.1. Jednofaktorijalna analiza varijanse prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata protiv fitopatogenih predstavnika vrste <i>Aspergillus flavus</i>	96
Tabela 5.3.2. Srednje vrednosti prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata sa različitim izvorima ugljenika protiv fitopatogenih predstavnika vrste <i>Aspergillus flavus</i>	97
Tabela 5.3.3. Jednofaktorijalna analiza varijanse prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata sa različitim izvorima organskog azota protiv fitopatogenih predstavnika vrste <i>Aspergillus flavus</i>	99
Tabela 5.3.4. Srednje vrednosti prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata sa različitim izvorima organskog azota protiv fitopatogenih predstavnika vrste <i>Aspergillus flavus</i>	99
Tabela 5.5.1. Analiza varijanse prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog delovanja na izolat <i>Aspergillus flavus</i> SA2DSS u fazi modelovanja sastava hranljivog medijuma.	108
Tabela 5.5.2. Analiza varijanse prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog delovanja na izolat <i>Aspergillus flavus</i> PA2DSS u fazi modelovanja sastava hranljivog medijuma.	108

Tabela 5.5.3. Koeficijenti regresione jednačine i njihove p -vrednosti za prečnik zone inhibicije u slučaju fitopatogenog izolata <i>Aspergillus flavus</i> SA2BSS u fazi modelovanja sastava hranljivog medijuma.	110
Tabela 5.5.4. Koeficijenti regresione jednačine i njihove p -vrednosti za prečnik zone inhibicije u slučaju fitopatogenog izolata <i>Aspergillus flavus</i> PA2DSS u fazi modelovanja sastava hranljivog medijuma.	111
Tabela 5.5.5. Opsezi za normalizaciju vrednosti u fazi augmentacije podataka za modelovanje primenom veštačkih neuronskih mreža.	112
Tabela 5.5.6. Rezultat obučavanja veštačke neuronske mreže u fazi modelovanja sastava hranljivog medijuma primenom odabrane arhitekture.	112
Tabela 5.5.7. Hiperparametri i rezultati obučavanja modela metodologijom veštačkih neuronskih mreža.	113
Tabela 5.5.8. Optimizovane vrednosti variranih faktora i predviđene vrednosti prečnika zone inhibicije kao rezultat optimizacije sastava hranljivog medijuma.	121
Tabela 5.8.1. Sadržaj lipopeptida iz familije surfaktina u supernatantima kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma (HPLC–MS analiza).	149
Tabela 5.8.2. Sadržaj lipopeptida iz familije iturina u supernatantima kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma (HPLC–MS analiza).	150
Tabela 5.8.3. Sadržaj lipopeptida iz familije iturina, grupe bacilomicina u supernatantima kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma (HPLC–MS analiza).	151
Tabela 5.8.4. Sadržaj lipopeptida iz familije fengicina u supernatantima kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma (HPLC–MS analiza).	152
Tabela 5.9.1. Dvofaktorijalna analiza varijanse dobijenih koncentracija ćelija proizvodnog mikroorganizma vezanih na biougalj variranjem koncentracije dodatog biuglja i vremena adhezije.	156
Tabela 5.9.2. Srednje vrednosti dobijenih koncentracija ćelija proizvodnog mikroorganizma vezanih na biougalj.	157
Tabela 5.10.1. Podaci o količinama biopesticida uvezenim u Republiku Srbiju za period 2015–2020. godine.	161
Tabela 5.10.2. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na znanje o pesticidima.	168
Tabela 5.10.3. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na znanje o biopesticidima.	169
Tabela 5.10.4. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na posledice smanjenja upotrebe pesticida.	170
Tabela 5.10.5. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na izbor pesticida.	171
Tabela 5.10.6. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na izvor informisanja.	171
Tabela 5.10.7. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na spremnost na povećanje troškova za zaštitu bilja.	172

Tabela 5.10.8. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na kvalitet prodaje.	173
Tabela 5.10.9. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na poverenje u prodaju.	174
Tabela 5.10.10. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na rad zvaničnih institucija.	174
Tabela 5.10.11. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na poverenje u zvanične institucije.	175
Tabela 8.1.1. Uzorci kukuruza uzgajanog tokom 2019. i 2020. na različitim lokalitetima u Republici Srbiji.	217
Tabela 8.4.1. Spisak novoizolovanih sojeva <i>Bacillus</i> spp. sa istaknutim biljnim vrstama i lokalitetima na kojima je vršeno uzorkovanje rizosfere.	222
Tabela 8.5.1. Srednje vrednosti prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata protiv izolata <i>Aspergillus flavus</i> SA2BSS.	224
Tabela 8.8.1. Hemijsko-mineraloška analiza sojinog pepela	235
Tabela 8.8.2. Vrednost pH u vodenoj sredini po frakcijama sojinog pepela	235

Spisak slika

Slika 3.1.1. Mape rizika kontaminacije kukuruza aflatoksinima u slučaju 3 različita klimatska scenarija a) trenutno; b) +2 °C; c) +5 °C. Skala od 0–200% predstavlja indeks rizika pojave aflatoksina definisanog predikcionim modelom (Battilani i sar., 2016). ..	12
Slika 3.3.1. Projekcije rasta svetskog tržišta biopesticida po regionima izraženo u milijardama američkih dolara (https://www.marketsandmarkets.com).....	21
Slika 3.3.2. Pregled faktora koji definišu aktivnost agenasa biološke kontrole (prilagođena šema) (Legein i sar., 2020).....	23
Slika 3.3.3. Pregled bitnih interakcija sa aspekta biološke kontrole koje ostvaruju lipopeptidi produkovani od strane bakterija roda <i>Bacillus</i> (prilagođena šema) (Ongena i Jacques, 2008). ..	27
Slika 3.4.1. Osnovni koraci razvoja tehnologije proizvodnje agenasa biološke kontrole (Montesinos, 2003).....	30
Slika 4.1.1. Šematski prikaz plana izvođenja eksperimenata u okviru doktorske disertacije.....	42
Slika 5.1.1. Produkti multipleks PCR reakcije– CAP analiza genetskih profila deset izolata <i>Aspergillus flavus</i> . S - DNK merdevine - GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), 1 – VA1BSS, 2 – LO1ASS, 3 – RO2BSS, 4 – BČ1CSS, 5 – SO1ASS, 6 – SA2BSS, 7 – SU1ASS, 8 – PA2DSS, 9 – ŠT2BSS, 10 – NA2BSS. Prajmeri korišćeni za multipleks PCR: SC01, IC01, AC01, AC02, AC03, AC04, AC05, AC06, AC07, AC08, AC09, AC10, AC11, AC12, AC13, IC02, Iac, CC01, CC02, CC03, CC04, ST01, ST02, ST03, ST04, ST05, ST06, ST07, ST08, ST09, ST10, ST11, ST12 (Callicott i Cotty, 2015). ..	80
Slika 5.2.1. Uzorkovanje rizosfere zemljišta.....	84
Slika 5.2.2. Zone inhibicije dobijene testiranjem uzorka kultivacione tečnosti proizvodnog izolata Mahunarke 1a protiv aflatoksigenog fitopatogenog izolata <i>Aspergillus flavus</i> SA2BSS.....	87
Slika 5.2.3. Srednje vrednosti prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata protiv fitopatogenih predstavnika vrste <i>Aspergillus flavus</i> . ..	89
Slika 5.2.4. Produkti PCR reakcija za detekciju gena odgovornih za produkciju lipopeptidnih komponenti: GeneRuler DNA Ladder 100 bp, 1 - Mahunarke 1a; 2 – Mahunarke 1b; 3 - Paprika 3; 4 – Šargarepa 3a; 5 – Krompir 4a.....	93
Slika 5.3.1. Srednje vrednosti prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata sa različitim izvorima ugljenika protiv fitopatogenih predstavnika vrste <i>Aspergillus flavus</i> . ..	97
Slika 5.3.2. Srednje vrednosti prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata sa različitim izvorima azota protiv fitopatogenih predstavnika vrste <i>Aspergillus flavus</i> . ..	100
Slika 5.4.1. Filogenetsko stablo konstruisano primenom metode maksimalne verovatnoće (<i>Maximum likelihood</i>) sa sekvencom gena za 16S rRNK proizvodnog izolata <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 ..	102

Slika 5.5.1. Matrica korelacije eksperimentalnih vrednosti korišćenih u fazi modelovanja sastava hranljivog medijuma.	107
Slika 5.6.1. Trend promene sadržaja biomase tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.	124
Slika 5.6.2. Trend promene vrednosti pH tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.	125
Slika 5.6.3. Trend promene sadržaja kiseonika tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.	126
Slika 5.6.4. Trend promene rezidualnih koncentracija nutrijenata tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.	127
Slika 5.6.5. Trend promene prečnika zone inhibicije testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti i supernatanta dobijenih tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.	128
Slika 5.6.6. Trend promene sadržaja biomase tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.	129
Slika 5.6.7. Trend promene vrednosti pH tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.	130
Slika 5.6.8. Trend promene sadržaja kiseonika tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.	131
Slika 5.6.9. Trend promene rezidualnih koncentracija nutrijenata tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.	132
Slika 5.6.10. Trend promene prečnika zone inhibicije testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti i supernatanta dobijenih tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.	133
Slika 5.6.11. Trend promene sadržaja biomase tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.	134
Slika 5.6.12. Trend promene vrednosti pH tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.	135
Slika 5.6.13. Trend promene sadržaja kiseonika tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.	136

Slika 5.6.14. Trend promene rezidualnih koncentracija nutrijenata tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.....	137
Slika 5.6.15. Trend promene prečnika zone inhibicije testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti i supernatanta dobijenih tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.	138
Slika 5.6.16. Trend promene sadržaja biomase tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.	139
Slika 5.6.17. Trend promene vrednosti pH tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.....	140
Slika 5.6.18. Trend promene sadržaja kiseonika tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.	141
Slika 5.6.19. Trend promene rezidualnih koncentracija nutrijenata tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.....	142
Slika 5.6.20. Trend promene prečnika zone inhibicije testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti i supernatanta dobijenih tokom trajanja kultivacije primenom <i>Bacillus</i> sp. BioSol021 pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.	143
Slika 5.7.1. Uticaj faktora na vrednost S/N za prečnik zone inhibicije za testirane fitopatogene izolate: a) <i>Aspergillus flavus</i> SA2BSS i b) <i>Aspergillus flavus</i> PA2DSS. C1 – intenzitet aeracije; C2 – brzina mešanja; C3 – kultivaciono vreme.	144
Slika 5.7.2. Uticaj interakcije faktora na vrednost S/N za prečnik zone inhibicije za testirane fitopatogene izolate: a) <i>Aspergillus flavus</i> SA2BSS i b) <i>Aspergillus flavus</i> PA2DSS. C1 – intenzitet aeracije; C2 – brzina mešanja; C3 – kultivaciono vreme.....	145
Slika 5.9.1. SEM snimci ćelija proizvodnog mikroorganizma – slobodne, uvećanje: a)5000 b)1000; – imobilisane na biougalj, uvećanje: c) 5000; d),e) 10000; f) 20000...158	
Slika 5.10.1. Struktura registrovanih pesticida u Republici Srbiji u 2020. godini.	161
Slika 5.10.2. Teritorijalna raspodela ispitanika koji su učestvovali u istraživanju stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida.....	163
Slika 5.10.3. Proizvodna struktura gazdinstava u vlasništvu ispitanika koji su učestvovali u istraživanju stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida.	164
Slika 5.10.4. Polna struktura ispitanika koji su učestvovali u istraživanju stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida.....	164
Slika 5.10.5. Obrazovna struktura ispitanika koji su učestvovali u istraživanju stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida.....	165
Slika 5.10.6. Struktura radnog iskustva u poljoprivrednoj proizvodnji ispitanika koji su učestvovali u istraživanju stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida.....	166

Slika 5.10.7. Starosna struktura ispitanika koji su učestvovali u istraživanju stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida.....	166
Slika 8.2.1. Makromorfološke karakteristike izolata <i>Aspergillus flavus</i> izolovanih iz kukuruza uzorkovanog na različitim lokalitetima u Republici Srbiji.	219
Slika 8.3.1. Mikromorfološke karakteristike izolata <i>Aspergillus flavus</i> izolovanih iz kukuruza uzorkovanog na različitim lokalitetima u Republici Srbiji.	221
Slika 8.6.1. Odzivne površine koje opisuju uticaj inicijalnih koncentracija odabranih nutrijenata na prečnik zona inhibicije za izolat <i>Aspergillus flavus</i> SA2BSS tokom faze modelovanja sastava hranljivog medijuma (RSM): A – celuloza i urea; B – celuloza i (NH ₄) ₂ SO ₄ ; C – celuloza i K ₂ HPO ₄ ; D – urea i (NH ₄) ₂ SO ₄ ; E – urea i K ₂ HPO ₄ ; F – (NH ₄) ₂ SO ₄ i K ₂ HPO ₄	226
Slika 8.6.2. Odzivne površine koje opisuju uticaj inicijalnih koncentracija odabranih nutrijenata na prečnik zona inhibicije za izolat <i>Aspergillus flavus</i> PA2DSS tokom faze modelovanja sastava hranljivog medijuma (RSM): A – celuloza i urea; B – celuloza i (NH ₄) ₂ SO ₄ ; C – celuloza i K ₂ HPO ₄ ; D – urea i (NH ₄) ₂ SO ₄ ; E – urea i K ₂ HPO ₄ ; F – (NH ₄) ₂ SO ₄ i K ₂ HPO ₄	227
Slika 8.6.3. Odzivne površine koje opisuju uticaj inicijalnih koncentracija odabranih nutrijenata na prečnik zona inhibicije za izolat <i>Aspergillus flavus</i> SA2BSS tokom faze modelovanja sastava hranljivog medijuma (ANN): A – celuloza i urea; B – celuloza i (NH ₄) ₂ SO ₄ ; C – celuloza i K ₂ HPO ₄ ; D – urea i (NH ₄) ₂ SO ₄ ; E – urea i K ₂ HPO ₄ ; F – (NH ₄) ₂ SO ₄ i K ₂ HPO ₄	228
Slika 8.6.4. Odzivne površine koje opisuju uticaj inicijalnih koncentracija odabranih nutrijenata na prečnik zona inhibicije za izolat <i>Aspergillus flavus</i> PA2DSS tokom faze modelovanja sastava hranljivog medijuma (ANN): A – celuloza i urea; B – celuloza i (NH ₄) ₂ SO ₄ ; C – celuloza i K ₂ HPO ₄ ; D – urea i (NH ₄) ₂ SO ₄ ; E – urea i K ₂ HPO ₄ ; F – (NH ₄) ₂ SO ₄ i K ₂ HPO ₄	229
Slika 8.7.1. MALDI-TOF maseni spektar supernatanta kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma nakon kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.	230
Slika 8.7.2. MALDI-TOF maseni spektar supernatanta kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma nakon kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.	230
Slika 8.7.3. MALDI-TOF maseni spektar supernatanta kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma nakon kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.	231
Slika 8.7.4. MALDI-TOF maseni spektar (opseg 1010–1090 m/z) supernatanta kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma nakon kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.	231
Slika 8.7.5. MALDI-TOF maseni spektar (opseg 1480–1540 m/z) supernatanta kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma nakon kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.	232

Slika 8.8.1. SEM/EDS ispitivanja tri frakcije pepela nakon spaljivanja biomase na bazi soje.....	234
--	-----



Uvod

1. Uvod

Konstantni rast svetske populacije za koju se očekuje da će do 2050. godine dostići broj od gotovo 10 milijardi ljudi, dovodi u rizik zadovoljavanje potreba za hranom i održavanje stabilnosti sistema poljoprivredne proizvodnje. Činjenica da su agrarni resursi ograničeni i dodatno eksploatisani u druge svrhe, govori u prilog izazovima postizanja odgovarajućeg nivoa prehrambene sigurnosti u skladu s raspoloživim svetskim kapacitetima proizvodnje. Urbanizacija i stanje svetske ekonomije takođe diktiraju tempo proizvodnje stavljajući pred poljoprivredne proizvođače visoke zahteve u smislu dobijanja zadovoljavajućih prinosa u što je moguće kraćem vremenskom periodu. Izazovi savremene poljoprivrede odnose se i na borbu sa štetočinama koje ugrožavaju proizvodnju i neophodnost primene različitih vidova agrotehničkih mera, ne bi li se minimizovao njihov negativni uticaj. Poseban akcenat već dugi niz godina stavlja se na sve opsežniju upotrebu hemijskih pesticida, što se manifestuje nizom sporednih efekata, koji mogu izazvati dodatne probleme značajnih razmera. Rezistencija prema aktivnim komponentama pesticida je pojam koji datira od početka prošlog veka, a do današnjeg dana razvio se do, gotovo, nerešivog problema. Ovaj fenomen nastaje kao rezultat evolucije štetnih vrsta u pogledu osetljivosti prema sredstvima za zaštitu bilja, a jedan od glavnih uzroka pronalazi se u njihovoj neadekvatnoj i prekomernoj upotrebi. Dramatični efekti prekomerne upotrebe hemijskih sredstava na biodiverzitet biljnih i životinjskih vrsta kao i na celokupan ekosistem, i alarmantni podaci o prisustvu njihovih rezidualnih količina u hrani, prouzrokovali su potrebu za pronalaskom rešenja koja će omogućiti redukciju primene pesticida.

Pored velikog broja patogenih vrsta gljiva i bakterija koje dovode do opsežnih gubitaka u poljoprivrednoj proizvodnji i problema sa aspekta bezbednosti hrane, vodeću poziciju zauzimaju aflatoksigeni predstavnici vrste *Aspergillus flavus*. Distribucija aflatoksigenih gljiva u pogledu ekoloških niša vezuje se za tropske regione u temperaturnom opsegu 28 °C do 37 °C i visoke vrednosti relativne vlažnosti, oko 95%. Međutim, klimatske promene koje se dešavaju na globalnom nivou, uslovile su pojavu aflatoksigenih vrsta u regionima za koje je važila niska incidenca njihovog razvoja. Među zemljama koje su pretrpele velike ekonomske gubitke od posledica pojave aflatoksigenih gljiva na poljima i ulazak aflatoksina u lanac ishrane, nalazi se i Republika Srbija. Tokom 2012. godine, vremenske prilike koje pogoduju razvoju aflatoksigenih sojeva vrste *Aspergillus flavus* dovele su do masovnog zaražavanja useva kukuruza i štete do tada nezabeleženih razmera. Procene Prognozno-izveštajne

službe zaštite bilja, govore u prilog tome da i tokom 2021. proizvodne sezone postoji visok rizik od pojave aflatoksina.

Odgovor naučne javnosti na ovakve slučajeve zasniva se na upotrebi agenasa biološke kontrole, kao alternativnog i ekološki prihvatljivog pristupa u borbi sa postojećim problemom. Poseban fokus stavlja se na značaj nacionalnih i međunarodnih istraživačkih projekata, kao i edukaciju poljoprivrednih proizvođača i podizanje opšte svesti javnosti o ekonomskom i socijalnom aspektu upotrebe agenasa biološke kontrole. Kao vodeći kandidati na polju benefitnih mikroorganizama sa potencijalom primene u poljoprivrednoj praksi, izdvajaju se pripadnici roda *Bacillus*.

I pored brojnih istraživačkih projekata, objavljenih naučnih radova i studija o efikasnosti bioloških agenasa na bazi *Bacillus* spp, potpuni potencijal njihove komercijalne primene i dalje nije dosegnut. Strogo akademski pristup istraživačkih timova, stavlja u drugi plan razmatranja koja se tiču razvoja biotehnološkog proizvodnog postupka koji će odgovoriti na potrebe industrijskog nivoa proizvodnje, formulacije proizvoda i na kraju njegove komercijalizacije. U stručnoj literaturi, navode se brojni primeri agenasa biološke kontrole visoke efikasnosti, koji nikada nisu pronašli put do tržišta i praktične primene. Istraživanja koja se tiču selekcije proizvodnih mikroorganizama i definisanja uslova proizvodnje, ograničena su na izvođenje kultivacije u malim zapreminama, isključivo na laboratorijskom nivou. Skaliranje proizvodnje sa nivoa erlenmajera, koje karakteriše eksterno mešanje i spontana aeracija, na nivo laboratorijskog bioreaktora, s internim mešanjem i kontrolisanom aeracijom, je limitirajući faktor razvoja tehnologije proizvodnje agenasa biološke kontrole.

Istraživanja u okviru doktorske disertacije obuhvatila su celokupan tok razvoja bioprocenog rešenja, od detaljnog postupka selekcije proizvodnog izolata, preko optimizacije uslova proizvodnje u pogledu sastava kultivacionog medijuma i procesnih parametara, do definisanja finalne forme preparata i ispitivanja mogućnosti komercijalizacije. Ključna razlika i originalni doprinos dizajniranog bioprocenog rešenja leži u mogućnosti njegove primene na višim skalama proizvodnje i potencijalu koji izlazi iz okvira akademskog dostignuća.



Ciljevi istraživanja

2. Ciljevi istraživanja

Osnovni cilj istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije odnosi se na definisanje idejnog rešenja razvoja tehnologije proizvodnje agenasa biološke kontrole efikasnih u suzbijanju aflatoksigenih gljiva iz roda *Aspergillus*. Motiv za bavljenje ovom tematikom temelji se na težnji za pronalaskom biotehnološkog odgovora na jedan od vodećih izazova današnjice u domenu poljoprivredne delatnosti i bezbednosti hrane. Alarmantni podaci o kontaminaciji useva aflatoksigenim gljivama, koja posledično vodi drastičnim ekonomskim gubicima i predstavlja ozbiljan rizik za zdravlje ljudi kao krajnjih potrošača, nameću potrebu za iznalaženjem efikasnog rešenja primenljivog u sistemu održive poljoprivredne proizvodnje. Definisanje ključnih elemenata biotehnološkog postupka dobijanja proizvoda efikasnog u suzbijanju aflatoksigenih izolata je neophodan preduslov za implementaciju rešenja u uslovima industrijske proizvodnje i komercijalizacije preparata.

U skladu sa osnovnim ciljem istraživanja iz okvira doktorske disertacije, definisani su sledeći specifični ciljevi:

Analiza zastupljenosti aflatoksigenih sojeva vrste *Aspergillus flavus* na poljima kukuruza u Republici Srbiji, formiranje kolekcije izolata, identifikacija izolata na osnovu makroforfoloških i mikromorfoloških karakteristika;

Definisanje genetskog potencijala aflatoksigenih sojeva vrste *Aspergillus flavus* prisutnih na poljima kukuruza u Republici Srbiji, određivanje ekspresije gena u uslovima koji favorizuju razvoj ciljanih fitopatogena;

Izolacija novih sojeva *Bacillus* spp. kao potencijalnih proizvodnih mikroorganizama iz rizosfere poljoprivrednih kultura uzgajanih na teritoriji Republike Srbije;

Evaluacija antagonističke aktivnosti novoizolovanih sojeva *Bacillus* spp. prema odabranim predstavnicima fitopatogene vrste *Aspergillus flavus*;

Definisanje genetskog potencijala odabranih sojeva *Bacillus* spp. u pogledu produkcije antimikrobnih komponenti značajnih za supresivno delovanje protiv fitopatogenih sojeva vrste *Aspergillus flavus*;

Odabir proizvodnog izolata *Bacillus* sp. sa najvećim potencijalom primene u biološkoj kontroli aflatoksigenih sojeva *Aspergillus flavus* i njegova molekularna identifikacija sekvenciranjem regiona 16S rRNK;

Odabir optimalnih izvora ugljenika i azota kao komponenti hranljivog medijuma za proizvodnju agenasa biološke kontrole, *Bacillus* sp, efikasnih u suzbijanju fitopatogenih sojeva vrste *Aspergillus flavus*;

Modelovanje uticaja koncentracija odabranih komponenti hranljivog medijuma za proizvodnju agenasa biološke kontrole efikasnih u suzbijanju fitopatogenih sojeva vrste *Aspergillus flavus* na antimikrobnu aktivnost primenom metodologije odzivne površine kao i metodologije veštačkih neuronskih mreža;

Optimizacija sastava hranljivog medijuma za proizvodnju agenasa biološke kontrole efikasnih u suzbijanju fitopatogenih sojeva vrste *Aspergillus flavus* primenom metode željene funkcije;

Analiza toka kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru sa ciljem validacije definisanog optimalnog sastava hranljivog medijuma i ispitivanja uticaja intenziteta aeracije i brzine mešanja na proizvodnju agenasa biološke kontrole;

Optimizacija procesnih parametara za proizvodnju agenasa biološke kontrole efikasnih u suzbijanju fitopatogenih sojeva vrste *Aspergillus flavus*.

Definisanje mehanizma delovanja agenasa biološke kontrole efikasnih u suzbijanju fitopatogenih sojeva vrste *Aspergillus flavus* i identifikacija antimikrobnih komponenti odgovornih za supresivno delovanje primenom analitičkih metoda HPLC–MS i MALDI–TOF MS;

Ispitivanje mogućnosti formulacije agenasa biološke kontrole na bazi proizvodnog soja *Bacillus* sp. BioSol021 za suzbijanje aflatoksigenih sojeva vrste *Aspergillus flavus* primenom tehnike imobilizacije na čvrste nosače;

Analiza stanja tržišta (bio)pesticida u Republici Srbiji i stavova poljoprivrednih proizvođača u pogledu njihove primene.



Pregled literature

3. Pregled literature

3.1. *Aspergillus flavus* kao fitopatogena gljiva

Oboljenja biljaka i smanjenje kvaliteta poljoprivrednih proizvoda uzrokovani fungalnim patogenima, dovode do značajnih materijalnih gubitaka koji se mere milijardama američkih dolara (Shuping i Eloff, 2017).

Za relativno mali broj gljiva se može reći da poseduju ekonomski uticaj uporedivih razmera kao vrsta *Aspergillus flavus* (Klich, 2007). Ipak, u kontekstu destruktivnog delovanja na biljke i smanjenja prinosa useva, *Aspergillus flavus* pokazuje daleko manji negativni uticaj u poređenju sa efektima koje ispoljava usled kontaminacije aflatoksinima (Savić i sar., 2020).

Kao humani patogen, dovodi do pojave akutnih oboljenja usled unošenja veće količine kontaminirane hrane jednokratno, ili pak uzastopnih manjih doza, u kratkom vremenskom periodu (Massomo, 2020). Imunokompromitovane osobe pokazuju izraženu osetljivost prema infekcijama izazvanim ovim gljivama, koje vode čak i letalnom ishodu, a značajne probleme izazivaju i kao alergeni i uzročnici alergijske bronhopulmonalne aspergiloze (Klich, 2007). Važno je istaći da, pored akutnih oboljenja, hronične subletalne doze toksigenih agenasa koje proizvode *Aspergillus* vrste, su takođe veoma štetne, i dugoročno mogu da rezultiraju pojavom malignih oboljenja i skraćanju životnog veka (Massomo, 2020).

S druge strane, činjenica da pojava *Aspergillus flavus* na usevima ne vodi nužno velikim gubicima, ukoliko nije reč o toksigenim izolatima, iskorišćena je s aspekta biološke kontrole. Reč je o inovativnoj strategiji u čijoj osnovi se nalazi kompetitivna aktivnost atoksigenih izolata kao ubiokontrolnih agenasa, čime se obezbeđuje njihova dominacija nad toksigenom populacijom i istovremeno smanjuje mogućnost kontaminacije aflatoksinima (Savić i sar., 2020).

3.1.1. Ekonomski značaj kukuruza i uticaj kontaminacije aflatoksinima

Kao rezultat klimatskih promena zabeleženih poslednjih godina, i posledično češće pojave uslova koji pogoduju razvoju vrsta *Aspergillus*, a to su dugi sušni periodi i visoke temperature, aspergiloze predstavljaju rastući problem poljoprivredne proizvodnje kukuruza u Republici Srbiji (Kos i sar., 2014).

Učešće poljoprivredne proizvodnje u BDP-u Republike Srbije iznosi u proseku 10%. Značaj poljoprivrede za ekonomiju i privredni razvoj zemlje je utoliko veći ako se uzme u obzir da poljoprivredni proizvodi ujedno predstavljaju i predmet trgovine i sirovinu za prehrambenu industriju (Novaković, 2019).

Tokom 2020. godine drugi izvozni artikal u Republici Srbiji bio je kukuruz, što neminovno potvrđuje strateški značaj ove kulture za koju se vezuje duga tradicija uzgajanja na našim prostorima. Govoreći na globalnom nivou, kao tri vodeće poljoprivredne kulture navode se pšenica, pirinač i kukuruz. Objašnjenje zašto se kukuruz ovako visoko pozicionira, leži u samim karakteristikama biljke i činjenici da su gotovi svi delovi upotrebljivi za preradu, kao i raznovrsnosti upotrebe koja prevazilazi okvire prehrambene industrije (Novaković, 2019).

Ako se posmatra vrednost biljne proizvodnje u Republici Srbiji, žitarice beleže najviši procenat učešća sa prosečnom vrednošću od 42,5% za period 2007–2018. godine. Dominantnu poziciju među žitaricama zauzima kukuruz sa 60% učešća, što dodatno potvrđuje njegov ekonomski značaj. U tabeli 3.1.1 navedeni su podaci koji upućuju na učešće vrednosti proizvodnje kukuruza u odnosu na biljnu proizvodnju, i ukupnu poljoprivrednu proizvodnju u Republici Srbiji (Statistički godišnjaci, 2000–2019; Milić i sar, 2020).

Tabela 3.1.1. Apsolutne vrednosti (izražene u milionima evra, u tekućim cenama) i učešće (izraženo u %) vrednosti proizvodnje kukuruza u ukupnoj vrednosti i vrednosti biljne proizvodnje u Republici Srbiji za period 2007-2018. godine.

Godina	Ukupno (million evra)	Biljna (million evra)	Kukuruz (million evra)	Udeo vrednosti kukuruz u ukupnoj (%)	Udeo vrednosti kukuruz u biljnoj (%)
2007.	4011,3	2717,1	604,9	15,1	22,3
2008.	5002,5	3423,7	752,7	15,0	22,0
2009.	4217,3	2821,7	622,1	14,8	22,0
2010.	4422,9	3192,7	970,3	21,9	30,4
2011.	4993,9	3522,3	1100,0	22,0	31,2
2012.	4345,5	2868,0	687,0	15,8	24,0
2013.	4879,7	3348,4	857,9	17,6	25,6
2014.	4852,9	3331,0	972,2	20,0	29,2
2015.	4315,0	2914,9	704,4	16,3	24,2
2016.	4668,8	3406,5	926,8	19,9	27,2
2017.	4367,1	2942,7	552,8	12,7	18,8
2018.	4859,2	3369,5	873,5	18,0	25,9
Prosek	4578,0	3154,9	802,1	17,4	25,2

Oscilacije u pogledu proizvodnje kukuruza na teritoriji Srbije su indirektan pokazatelj značaja pravovremene i adekvatne primene agrotehničkih mera, posebno sa aspekta zaštite bilja. Prema podacima izveštaja Departmana za poljoprivredu Sjedinjenih Američkih Država (engl. *United States Department of Agriculture, USDA*) iz 2013. godine, opsežni ekonomski gubici u proizvodnji kukuruza vezuju se za period kada je detektovana značajna kontaminacija useva aflatoksinima. U prilog tome govore podaci da je samo u 2012. godini vrednost proizvodnje kukuruza redukovana za oko 520 miliona evra, što je rezultovalo i smanjenjem izvoza tokom 2013. godine za čak oko 50% u odnosu na prosečne vrednosti za posmatrani period. Tabela 3.1.2 ukazuje na podatke koji se odnose na učešće vrednosti izvezenog kukuruza u vrednosti izvezenih poljoprivrednih proizvoda, prehrambenih proizvoda i ukupnog izvoza (Milić i sar., 2020).

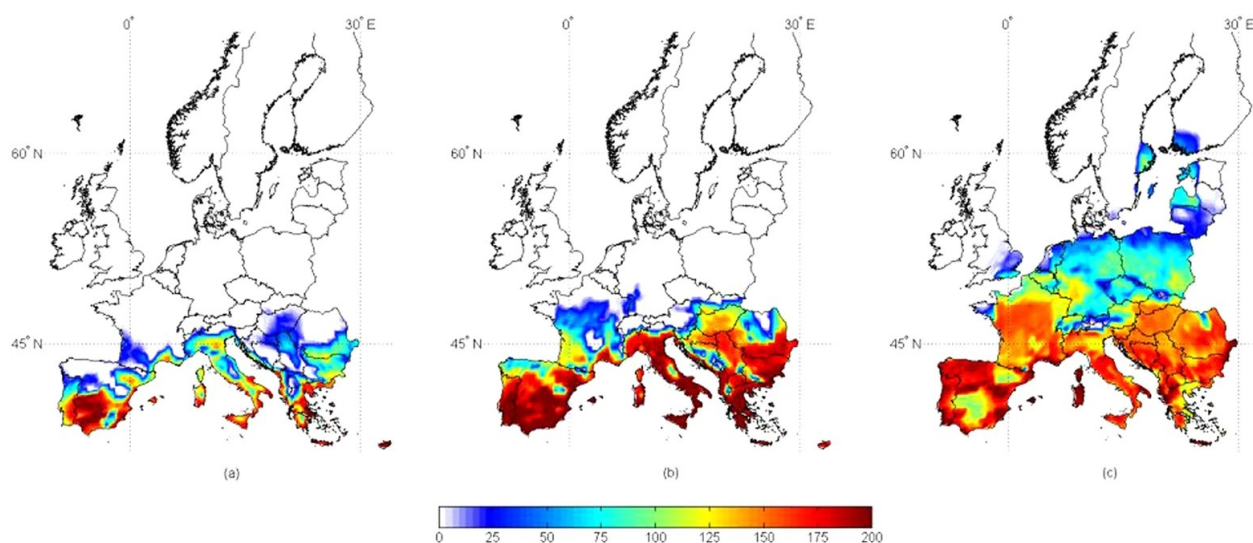
Tabela 3.1.2. Apsolutne vrednosti (izražene u milionima evra, u tekućim cenama) i učešće (izraženo u %) vrednosti izvezenog kukuruza u vrednosti izvezenih poljoprivrednih proizvoda, prehrambenih proizvoda i ukupnog izvoza u Republici Srbiji za period 2007-2018. godine.

Godina	Ukupan izvoz (million evra)	Izvoz hrane (million evra)	Izvoz poljoprivrednih proizvoda (million evra)	Izvoz kukuruza (million evra)	Udeo vrednosti izvoza kukuruza u hrani (%)	Udeo vrednosti izvoza kukuruza u hrani (%)	Udeo vrednosti izvoza kukuruza u poljoprivrednim proizvodima (%)
2007.	6439,1	988,0	259,7	62,1	1,0	6,3	23,9
2008.	7410,9	1016,2	266,4	88,7	1,2	8,7	33,3
2009.	5958,9	1076,0	384,2	206,9	3,5	19,2	53,9
2010.	7404,4	1338,0	549,7	245,7	3,3	18,4	44,7
2011.	8436,3	1504,0	675,1	327,7	3,9	21,8	48,5
2012.	8756,8	1636,1	751,4	442,2	5,0	27,0	58,8
2013.	11001,0	1579,1	651,1	158,4	1,4	10,0	24,3
2014.	11149,1	1789,1	741,6	383,1	3,4	21,4	51,7
2015.	12038,8	1877,7	851,4	351,3	2,9	18,7	41,3
2016.	13432,3	2048,2	850,8	346,7	2,6	16,9	40,8
2017.	15064,6	2039,9	892,6	278,7	1,9	13,7	31,2
2018.	16283,2	2052,1	999,9	226,2	1,4	11,0	22,6
Prosek	10281,3	1578,7	656,2	259,8	2,6	16,1	39,6

Ekonomski značaj kukuruza posmatra se i sa aspekta spoljne trgovine. Učešće vrednosti izvezenih količina kukuruza za posmatrani period 2007–2018. godine, iznosi 39,6% (Milić i sar., 2020).

3.1.2. Uticaj klimatskih uslova na proizvodnju kukuruza i razvoj aflatoksina

Tokom 2013. godine zemlje balkanskog regiona, naročito Republika Srbija, suočile su se sa velikim problemom kontaminacije mleka i mlečnih proizvoda aflatoksinom. Ovakav ishod navodi se kao direktna posledica nepovoljnih klimatskih uslova koji su uslovlili rast toksigenih *Aspergillus* vrsta na poljima kukuruza (Kerschke-Risch, 2014). Iako geografski položaj Republike Srbije određuje umereno kontinentalnu klimu, očekuje se da će globalne promene vremenskih prilika usloviti rast temperature i sušnih perioda. Ovakav scenario povećava mogućnost pojave aflatoksigenih gljiva na kukuruzu i ponovni nastanak problema koji je obeležio 2012. godinu. Iz svega navedenog jasna je potreba za intenziviranjem aktivnosti na polju razvoja strategije kontrole useva kukuruza kao preduslova za unapređenje kvaliteta i bezbednosti hrane za animalnu i humanu upotrebu (Kos i sar., 2018).



Slika 3.1.1. Mape rizika kontaminacije kukuruza aflatoksinima u slučaju 3 različita klimatska scenarija a) trenutno; b) +2 °C; c) +5 °C. Skala od 0–200% predstavlja indeks rizika pojave aflatoksina definisanog predikcionim modelom (Battilani i sar., 2016).

Klimatske promene na globalnom nivou ispostavile su se kao uzročnik brojnih problema u oblasti bezbednosti hrane, a jedan od vodećih se odnosi na pojavu mikotoksina u usevima. Ovakvi izgledi zahtevaju dodatna razmatranja u pogledu preduzimanja preventivnih mera. Oko devet miliona hektara kukuruza i 26 miliona hektara pšenice se uzgaja godišnje u Evropi. Imajući u vidu da žitarice doprinose prosečno 30% ljudskoj i 50% animalnoj ishrani, razmere problema do kojih bi promene klimatskih prilika mogle da dovedu su gotovo nemerljive, kako sa ekonomskog tako i sa zdravstvenog aspekta (Battilani i sar., 2016). Na slici 3.1.1 data su predviđanja rizika pojave mikotoksina u tri verzije scenarija koji podrazumevaju održavanje trenutne temperature, porast temperature za 2 °C, i porast temperature za 5 °C na području Evrope. Rezultati istraživanja ukazuju da se u oba slučaja temperaturnih promena, najveće posledice očekuju na teritoriji Istočne Evrope, Balkanskog poluostrva i mediteranskog regiona (Battilani i sar., 2016).

3.1.3. Opšte karakteristike vrste *Aspergillus flavus*

Diverzitet u pogledu morfoloških karakteristika pripadnika roda *Aspergillus* odražava se na složenu klasifikaciju koja je i dalje predmet istraživanja naučne zajednice. Prema poslednjim podacima, rod *Aspergillus* broji preko 200 vrsta (Amaiike i Keller, 2011). Sekcija *Flavi* je važna grupa roda *Aspergillus*, u okviru koje čak 18 sojeva pokazuje sposobnost proizvodnje aflatoksina (Massomo, 2020). S druge strane, varijabilnost je evidentna i unutar sekcije budući da su određeni sojevi atoksigeni, nasuprot pojedinim sa

izraženim proizvodnim kapacitetom koji prevazilazi 10 mg/kg. Objašnjenje postojeće razlike pronalazi se u aberativnim promjenama gena odgovornih za biosintezu aflatoksina (Massomo, 2020).

Najistaknutiji predstavnik roda *Aspergillus* je vrsta *Aspergillus flavus* koju čine saprofiti zemljišta prisutni širom sveta, takođe poznati kao uzročnici oboljenja nekoliko važnih poljoprivrednih useva, pre svega kukuruza, kikirikija i semena pamuka (Amaike i Keller, 2011; Abd El-Aziz, 2021). Invazija ovim patogenima dešava se u različitim fazama poljoprivredne proizvodnje, tokom rasta useva, žetve, sušenja nakon žetve, transporta i skladištenja (Abd El-Aziz, 2021).

U pogledu rasprostranjenosti vrste *Aspergillus flavus*, može se reći da nastanjuju različite ekološke niše, sa optimalnim rastom u uslovima visoke temperature između 27 °C i 38 °C, i visoke relativne vlažnosti, oko 95%. Poput ostalih gljiva, pripadnici vrste *Aspergillus flavus* sintetišu širok spektar sekundarnih metabolita, a pored aflatoksina, to su aspergilična kiselina, nitropropionična kiselina i kojična kiselina. Produkovani metaboliti imaju ulogu virulentnih faktora patogenosti ovih sojeva, služe kao komunikacioni signali i omogućavaju prilagođavanje uslovima sredine kako bi obezbedili opstanak vrste (Okayo, 2020).

Aspergillus flavus je morfološki kompleksna grupa gljiva čiji se pripadnici dele u dve grupe na osnovu veličine sklerocija: L sojeve sa veličinom sklerocija preko 400 mm u prečniku, i S sojeve sa veličinom prečnika sklerocija ispod 400 mm. I za jednu i za drugu grupu se vezuje produkcija aflatoksina B1 i B2, ali ono što dodatno karakteriše predstavnike S grupe je takođe sinteza aflatoksina G1 i G2 (Amaike i Keller, 2011). Četiri grupe aflatoksina su nazvane prema boji koju emituju nakon izlaganja ultravioletnim zracima, plava (*blue*) odnosno zelena (*green*), dok brojevi ukazuju na relativne distance kretanja u tankoslojnoj hromatografiji (Klich, 2007). Važno je napomenuti da su aflatoksini supstance bez boje, ukusa i mirisa, što onemogućava i poljoprivrednim proizvođačima i potrošačima da primete njihovo prisustvo na proizvodima (Massomo, 2020).

3.2. *Aspergillus flavus* kao producer aflatoksina

Iako se za produkciju mikotoksina vezuje širok opseg temperatura i vlažnosti, odnosno a_w vrednosti, idealna temperatura pri kojoj dolazi do sinteze aflatoksina je 28–30 °C. Produktivnost značajno opada ispod 25 °C i približavanjem vrednosti koja iznosi 37 °C. Intenzivniji rast, kao i proizvodnja toksina vezuje se za više a_w vrednosti, dok se značajniji pad beleži pri vrednostima ispod 0,85 (Casquete i sar., 2019).

Procenjena veličina genoma *Aspergillus flavus* iznosi 36,8 Mb sa aproksimativno 12000 funkcionalnih gena. Genetskom potencijalu produkcije sekundarnih metabolita svedoči prisustvo 56 klastera gena predodređenih za obavljanje ove funkcije (Amare i Keller, 2014).

Proizvodnja aflatoksina nastaje kao rezultat ekspresije gena uključenih u njihov biosintetički put (Casquete i sar., 2019). Aflatoksin klaster sačinjava ukupno 25 gena u okviru sekcije DNK veličine 70 kb, među kojima su geni odgovorni za biosintezu kao i specifični regulatorni geni koji diktiraju put sinteze jedinjenja (engl. *pathway-specific regulatory genes*). Klaster je smešten blizu telomere hromozoma i okružen sa četiri gena koji su odgovorni za usvajanje šećera na distalnom kraju i klasterom ciklopiazonične kiseline na proksimalnom kraju. Najvažniji strukturni geni koji kodiraju ključne enzime za produkciju aflatoksina su *aflD*, *aflO*, *aflQ*, *aflM* i *aflP* (Okayo i sar., 2020). Biosinteza aflatoksina zahteva složen regulatorni mehanizam kojim diriguju ključni geni ovog procesa, *aflR* i *aflS*. Dva regulatorna gena su odvojena malim intergenskim regionom, sa nezavisnim promotorima ali zajedničkom regulacijom transkripcionih faktora i drugih regulatornih elemenata. Prvi gen, *aflR* kodira protein koji je odgovoran za transkripcionu aktivaciju većine strukturnih gena biosintetičkog puta aflatoksina, na šta ukazuje i činjenica da bi delecija ovog gena uslovlila kompletan gubitak sposobnosti sinteze aflatoksina. S druge strane, funkcija *aflS* gena je još uvek nedovoljno razjašnjena budući da ne utiče na ekspresiju gena za sintezu, a opet, *Aspergillus flavus* nema mogućnost produkcije aflatoksina u njegovom odsustvu (Casquete i sar., 2019; Amare i Keller, 2014). Potencijalno, *aflS* gen utiče na biosintezu aflatoksina ponašajući se kao transkripcioni pojačivač ili koaktivator *aflR* gena, s obzirom na to da je dokazana njihova međusobna interakcija (Amare i Keller, 2014).

Na ekspresiju gena koji su odgovorni za sintezu aflatoksina utiču i određeni faktori sredine. Konkretno, međusobni uticaj uslova u pogledu a_w vrednosti i temperature odražava se na nivo ekspresije ključnih regulatornih

gena, *aflS* i *aflR*, što direktno upućuje na intenzitet produkcije aflatoksina (Tai i sar., 2020).

3.2.1. Opšta svojstva aflatoksina

U širem smislu reči, mikotoksini predstavljaju sekundarne proizvode metaboličke aktivnosti filamentoznih gljiva (Zain, 2011). S aspekta producera, osnovna funkcija ovih komponenti vezuje se za sticanje kompetitivne prednosti u odnosu na konkurentne organizme ekosistema koji nastanjuju, bez značajnog biohemijskog uticaja na rast i razvoj samih gljiva (Krulj, 2018). Okarakterisani su kao jedinjenja male molekulske mase, izrazito termostabilna, sa značajnim razlikama u pogledu hemijske strukture i toksigenosti koju ispoljavaju. Trenutne procene govore o postojanju nekoliko hiljada mikotoksina, dok je broj identifikovanih vrsta negde oko 400 (Krulj, 2018). Iz potpuno jasnih razloga, u fokusu naučne javnosti, najznačajnije mesto zauzimaju mikotoksini sa izraženim toksigenim i kancerogenim efektom (Zain, 2011).

Prema klasifikaciji Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC), aflatoksin B1 (AF B1) raspoređen je u 1a grupu kancerogenih jedinjenja za ljude i životinje (Ostry i sar., 2017; Savić i sar., 2020; Khan i sar., 2021). Aflatoksin B1 se definiše kao najpotentniji prirodni kancerogen i jedan od svega nekoliko mikotoksina koji su korišćeni za proizvodnju biološkog oružja (Amare i Keller, 2014).

Prema hemijskom sastavu, aflatoksini su difuranokumarinski derivati nastali kao proizvodi polketidnog puta sinteze (Klich, 2007). Proces dobijanja alfatoksina zahteva formiranje heksaonat jedinica (acetil-CoA i malonil-CoA) kako bi došlo do inicijacije kaskadne reakcije u čije odvijanje je uključeno najmanje 27 enzima. Prvi stabilni prekursor metaboličkog puta je norsolorinska kiselina (NOR) koja nastaje transformacijom početnih jedinica. Sledeći koraci podrazumevaju transformaciju intermedijera u versikolorin A (VERA) koji se dalje konvertuje u sterigmatocistin (ST), dok je finalni proizvod reakcije aflatoksin B1 (Caceres i sar., 2020; Yu, 2012).

Aflatoksini se najčešće javljaju na usevima koji su bogati uljima kao što su kukuruz, pamuk, kikiriki i orašasti plodovi. Razlozi za ovo su delom biogeografski, imajući u vidu da se upravo ovi usevi uzgajaju na geografskim širinama gde je incidenca pojave vrste *Aspergillus flavus* najveća. S druge strane, objašnjenje se pronalazi u nutritivnim aspektima, budući da *Aspergillus flavus* usvaja najpre proste saharide, nakon toga ulja, pa tek onda skrob (Klich, 2007).

Dostupnost i vrsta izvora ugljenika u velikoj meri utiču na produkciju sekundarnih metabolita. Prosti šećeri kao što su saharoza, glukoza, fruktoza, sorbitol favorizuju sintezu aflatoksina kod vrste *Aspergillus flavus*. Izvor azota je takođe bitan faktor koji se odražava na produkciju aflatoksina, imajući u vidu da neki supstrati pogoduju sintezi, uključujući asparagin, amonijumove soli i glutamat, za razliku od natrijum-nitrata i triptofana koji ispoljavaju suprotan efekat (Caceres i sar., 2020).

Kontaminacija aflatoksinima je složen i sistematski proces koji započinje na polju zaražavanjem useva toksigenim vrstama, nastavlja se tokom njihovog rasta i sazrevanja, a potom produžava i u periodu skladištenja, pogotovo u uslovima koji favorizuju razvoj gljiva (Massomo, 2020). Pored neminovnih zdravstvenih posledica, kontaminacija useva za proizvodnju hrane za ljude i životinje ugrožava bezbednost hrane i međunarodnu trgovinu (Focker i sar., 2021).

Podaci Globalnog monitoringa zaštite životne sredine – monitoring kontaminacije hrane i program procene rizika od mikotoksina (FAO/WHO – *Global Environment Monitoring System – Food Contamination Monitoring and Assessment Programme – GEMS/Food, Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization*) kao i nacionalnih agencija, mikotoksini se po učestalosti pojavljivanja, zdravstvenim i reproduktivnim poremećajima i ekonomskim posledicama, kategorišu kao jedan od vodećih problema u sistemu snabdevanja hranom, naročito kada je reč o zemljama u razvoju (Milićević, 2014).

Procene Evropske komisije ukazuju da gubici nastali kontaminacijom useva iznose 5–10%. Otuda proizilazi ocena da su gubici prihoda žitarica na nivou Evropske unije 1,2–2,4 milijardi evra, na osnovu godišnje proizvodnje pšenice koja iznosi 133 miliona tona, kukuruza 68 miliona tona i ovsa 8 miliona tona (Focker i sar., 2021).

3.2.1.1. Zakonska regulativa u pogledu kontrole sadržaja aflatoksina

Evropska unija definiše striktnu kontrolu sirovina za proizvodnju hrane kao i gotovih proizvoda koji se koriste u animalnoj i humanoj ishrani (Focker i sar., 2021). Mikotoksini zauzimaju prvo mesto po prioritetu u okviru mreže za izveštavanje o direktnom odnosno indirektnom riziku po zdravlje, gde se kao uzrok definiše hrana za ljude i životinje - Sistem brzog obaveštavanja i uzbunjivanja (engl. *Rapid Alert System for Food and Feed*, RASFF) (Milićević, 2014; Focker i sar., 2021). Prema podacima godišnjeg izveštaja Evropske komisije iz 2011. godine, upravo se mikotoksini navode kao najzastupljeniji razlog za obaveštavanje o odbijanju na graničnim prelazima i aktivaciji Sistema brzog obaveštavanja i uzbunjivanja.

Potentnost aflatoksina kao humanog kancerogena i toksina, uz činjenicu o visokoj incidenci pojave u lancu ishrane, prepoznata je u zemljama širom sveta. U skladu s tim, regulacija dozvoljenih količina u hrani namenjenoj ishrani ljudi i životinja je striktno definisana. Maksimalno dozvoljene količine koje propisuje Agencija za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) u usevima iznose 20 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) odnosno 0,5 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) u mleku za ljudsku upotrebu, s tim da je za primenu u animalnoj ishrani nešto viša granična vrednost. U pojedinim evropskim zemljama važi čak i striktnija regulativa, dok u slučaju zemalja u razvoju često postoji slabija ili gotovo nikakva kontrola (Amare i Keller, 2014). Legislativa Evropske unije jedinstvenim pravilnikom (*European Commission*, EU/574/2011, 2006/1881/EC i amandmani) determiniše dozvoljene koncentracije (Battilani i sar., 2016), dok je u našoj zemlji propisani dokument delimično usklađen sa evropskim normama 2011. godine uz izmene u verzijama koje su nakon toga usledile („Službeni glasnik RS”, 28/2011, 20/13, 29/14, 37/14, 39/14, 37/14-ispravka, 39/14, 72/14, 80/15, 84/15, 35/16, 81/16, 21/17, 81/17) (Nikolić i sar, 2018). Maksimalno dozvoljene količine za aflatoksin B1 i ukupne aflatoksine u kukuruzu, prema odredbama zakonske regulative u Republici Srbiji, zemljama Evropske unije i Sjedinjenim Američkim Državama, date su u tabeli 3.2.1.

Tabela 3.2.1. Maksimalno dozvoljene količine za AFB1 i ukupne aflatoksine u kukuruzu prema odredbama zakonske regulative u Republici Srbiji, zemljama Evropske unije i SAD.

Država	Kukuruz namenjen za humanu ishranu		Kukuruz namenjen za animalnu ishranu	
	AFB1 (µg/kg)	Ukupni AFLA (µg/kg)	AFB1 (µg/kg)	Ukupni AFLA (µg/kg)
Srbija	5	10		50
EU	5	10	20	
SAD		20		20-300

3.3. Opšti aspekti biološke kontrole

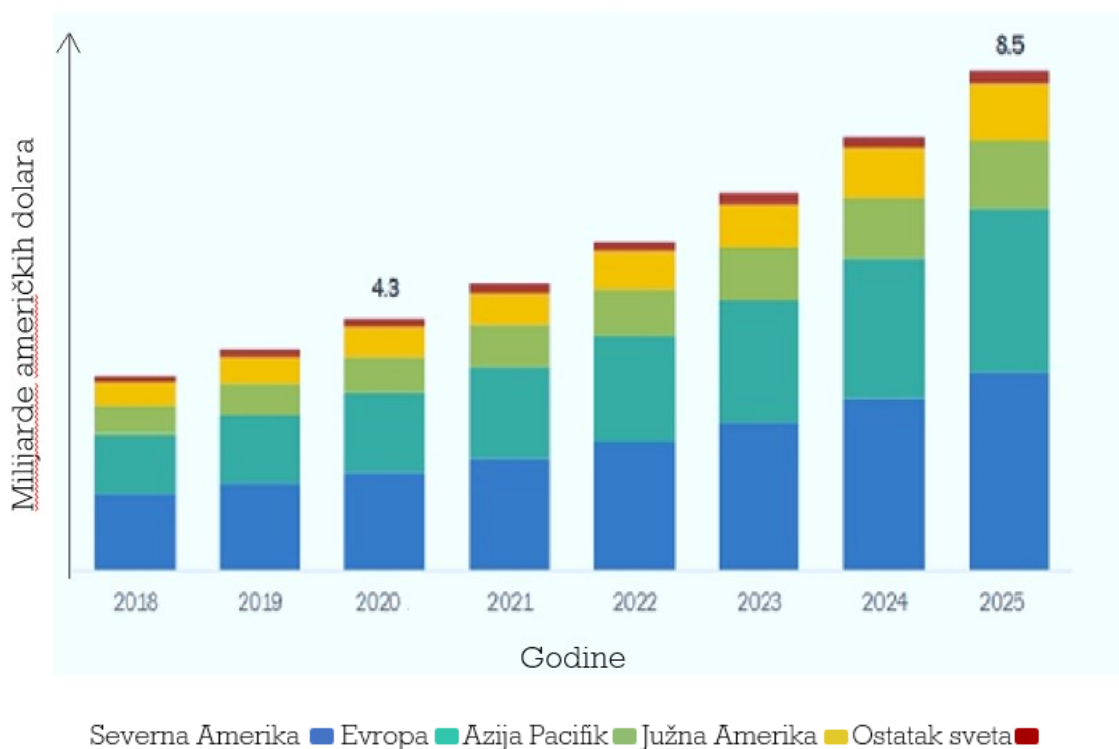
Porast globalne svesti o negativnim posledicama primene sintetski dobijenih preparata za zaštitu bilja uslovio je rastući trend interesovanja za biopesticide kako poljoprivrednih proizvođača tako i šire javnosti. Dodatni pritisci potiču od promena na polju legislative koja se menja u smeru favorizovanja primene ekoloških alternativa, a jedan od dobrih primera je direktiva Evropske unije koja određuje okvire održive primene sredstava za zaštitu bilja (EU Directive 2009/128/EC) (Damalas i Koutroubas, 2018). Upotreba biopesticida u zaštiti bilja rezutovala bi nizom pozitivnih ishoda, a među prioritetnim se smatra smanjenje količina rezidualnih ostataka pesticida u hrani, čime se smanjuje rizik od njihovog negativnog uticaja na ljude kao krajnje konzumente (Czaja i sar., 2015). Iako ne postoji uniformna definicija, opšteprihvaćen pojam biopesticida podrazumeva žive organizme i komponente prirodnog porekla koje imaju funkciju sredstva za zaštitu bilja. Američka agencija za zaštitu životne sredine (engl. EPA – *The U.S. Environmental Protection Agency*) prepoznaje tri kategorije biopesticida, uključujući biohemijske biopesticide, transgene biljke koje poseduju inkorporirane gene za zaštitu od štetnih vrsta i žive organizme kao biokontrolne agense (Seiber i sar., 2014). Kategorizacija prema ciljanim fitopatogenim vrstama za čije suzbijanje se koriste, podrazumeva podelu na biofungicide, biobaktericide, bionematocide, bioinsekticide, biokaricide i repelente. Određeni biopesticid može imati višestruko delovanje koje se odnosi na organizme koji pripadaju različitim targetnim grupama. Biološki aktivne komponente koje se klasifikuju kao biopestici odlikuju se naročito izraženim varijetetom. U praksi to dovodi do komplikacija prilikom provere bezbednosti upotrebe sredstava kako sa ekološkog aspekta tako i u pogledu zaštite zdravlja konzumenata, te se kao rešenje nameće potreba da se svaki pojedinačni slučaj razmatra zasebno (Czaja i sar., 2015).

3.3.1. Komercijalizacija i svetsko tržište biopesticida

Ulaganje kompanija u komercijalizaciju novih bioloških preparata direktno je vezano za mogućnost ostvarivanja profita, odnosno uslovljeno je rezultatima analiza ekonomske isplativosti njihove primene ali i zainteresovanosti potrošača da prednost daju novim u odnosu na konvencionalne tehnologije. Često je averzija od, uslovno rečeno, nepoznatog, u oblasti poljoprivredne proizvodnje odlučujući faktor koji iznova osnažuje ustaljeni pristup zaštiti bilja, oslanjajući na sredstva dobijena hemijskim putem. Biopesticidi obuhvataju širok spektar živih organizama dijametralno različitih

karakteristika i delovanja u konkretnim ekosistemima, što potvrđuje potrebu za opsežnim naučnim istraživanjima kako bi se stvorili uslovi za prelazak u fazu komercijalizacije i šire upotrebe ovakvih preparata (<https://www.fortunebusinessinsights.com>, Damalas i Koutroubas, 2018). Usko grlo komercijalizacije biopesticida jesu striktni regulatorni propisi koji se tiču plasmana na tržište. Dugotrajne i finansijski zahtevne procedure sa nedovoljno definisanim odnosno neprilagođenim načelima su osnovna prepreka ozbiljnijem razvoju industrije bioloških preparata za zaštitu bilja. Imperativ je pronaći optimlano rešenje koje bi omogućilo što brži izlazak prepatata na tržište sa konkurentnom cenom prihvatljivom poljoprivrednim proizvođačima (Damalas i Koutroubas, 2018).

Vrednost svetskog tržišta biopesticida procenjuje se na oko 3,36 milijardi američkih dolara prema podacima iz 2017. godine a projekcije rasta do 2025. godine dostižu brojku od gotovo 10,19 milijardi, uz složenu godišnju stopu rasta koja se procenjuje na oko 14,3%. Slični podaci objavljeni su u junu 2020. godine sa predviđenim maksimumom vrednosti tržišta u iznosu od 8,5 milijardi američkih dolara (slika 3.3.1). (<https://www.marketsandmarkets.com>). Prema podacima Naučnog instituta organske poljoprivrede (engl. *Research Institute of Organic Agriculture*), gotovo 50,9 miliona hektara obradive površine koristi se za potrebe organske poljoprivredne proizvodnje, uz složenu godišnju stopu rasta u periodu od 2010. do 2015. godine koja iznosi 7,4%. Sve veći udeo obradivih površina na kojima se uzgajaju organski proizvodi odraziće se direktno i na porast tržišne vrednosti biopesticida. Drugi ključni faktor koji favorizuje rast svetskog tržišta preparata za zaštitu bilja jeste sve intenzivniji angažman startup kompanija u razvojnom sektoru njihove proizvodnje (<https://www.startus-insights.com>).



Slika 3.3.1. Projekcije rasta svetskog tržišta biopesticida po regionima izraženo u milijardama američkih dolara (<https://www.marketsandmarkets.com>).

Projektovani rast udela biopesticida na tržištu govori o njihovoj izvesnoj dominaciji u odnosu na hemijska sredstva za zaštitu bilja u budućnosti. To potvrđuju i procene da će u kasnim četrdesetim ili ranim pedesetim godinama ovog veka udeli bioloških i sintetički dobijenih preparata na globalnom tržištu postati ekvivalentni (Damalas i Koutroubas, 2018).

3.3.2. Mikrobiološki biopesticidi

Mikrobiološki biopesticidi predstavljaju biološka sredstva efikasna u suzbijanju biljnih patogena čiju osnovu čine bakterije, plesni, protozoe, kvasci i virusi uobičajeno prisutni u prirodi. Ovi preparati ujedno sačinjavaju bitan segment industrije biopesticida sa najvećem stopom rasta na svetskom tržištu u oblasti biokontrolne (Arthurs i Dara, 2019). Ukupno posmatrano, biopesticidi još uvek imaju mali udeo na globalnom tržištu sredstava za zaštitu bilja sa svega 5%, što je procenjeno na oko tri milijarde američkih dolara (Damalas i Koutroubas, 2018).

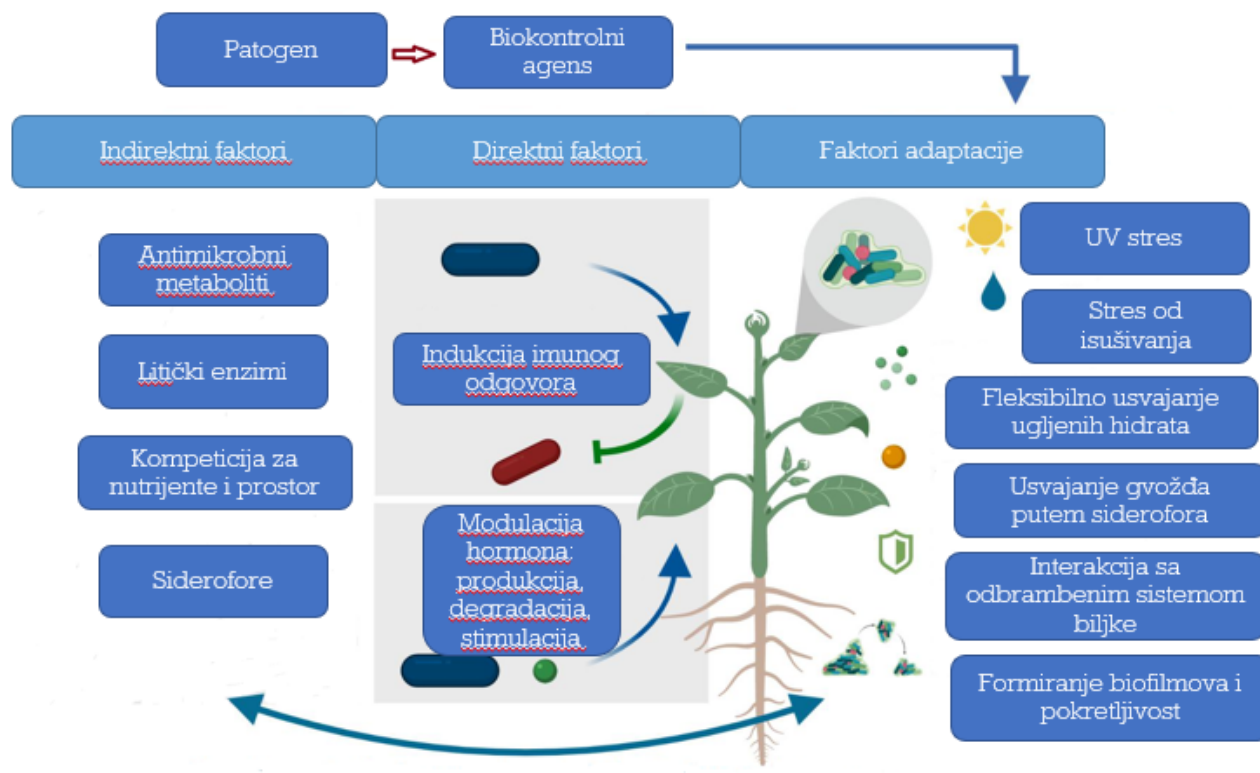
Biopesticidi mikrobiološkog porekla pokazali su veliki potencijal u borbi protiv štetočina i bolesti biljaka, imajući u vidu činjenicu da su visoko efikasni, selektivnog delovanja i ekološki povoljni za životnu sredinu u kojoj se primenjuju (Glare i sar., 2012; Kumar i Singh, 2015). Čak oko 90% tržišta biopesticida čine preparati na bazi mikroorganizama (Koul, 2011). Razvoj mikrobioloških

preparata direktno je uslovljen dostupnošću adekvatnog izolata kao kandidata za primenu u zaštiti određenih biljnih vrsta, što se smatra daleko specifičnijim pristupom u odnosu na sredstva hemijskog porekla iste namene. Izolacijom sojeva iz definisanog okruženja ili sa zaraženih domaćina vrši se preliminarni skrining za odabir izolata. Od velikog broja izololovanih mikroorganizama koji se nakon preliminarnog skrininga odaberu za dalja ispitivanja, manje od 1% preraste u uspešan krajnji proizvod (Glare i sar., 2012).

Pored primarnog efekta suzbijanja štetočina i bolesti biljaka, veliki broj mikroorganizama pokazuje dodatna svojstva koja se pozitivno odražavaju na biljne vrste, kao što su promocija rasta i poboljšana ishrana koja je obezbeđena stimulacijom usvajanja mikro i makro elemenata dostupnih u zemljištu (Glare i sar., 2012). Bakterijski biopesticidi mogu se podeliti u četiri kategorije: sojeve koji poseduju sposobnost sporulacije, obligatne patogene, potencijalne patogene, fakultativne patogene. Predstavnici prve grupe su ujedno i najzastupljeniji u komercijalnoj upotrebi uzimajući u obzir sigurnost i efikasnost njihove primene, među kojim su najčešće primenjivani izolati roda *Bacillus* (Chen i sar., 2020^a; Rong i sar., 2020; Aliye i sar., 2008; Kumar i sar., 2012; Rajkumar i sar., 2018; Bharose i Gajera, 2018; Siahmoshteh i sar., 2018). Genetske modifikacije sojeva koji su se pokazali kao uspešni u biološkoj kontroli, usmerene su ka poboljšanju njihove efikasnosti podizanjem stope reprodukcije, brzine transmisije, infektivne sposobnosti i veće produktivnosti metabolita od značaja (Koul, 2011).

3.3.3. Mehanizam delovanja bakterijskih biopesticida

Ozbiljnost oštećenja uzrokovanog biljnim patogenima posmatra se kroz sinergistički efekat faktora koji čine takozvani trougao oboljenja: osetljivost domaćina, virulentnost patogena i uslove orkuženja. Bakterijski biopesticidi, sa naglaskom na pripadnike roda *Bacillus*, pokazuju intenzivnu aktivnost na relaciji biljka-okruženje-patogen, kroz višestruki mehanizam delovanja uključujući promociju rasta, indukovanje sistemske otpornosti biljaka, formiranje biofilmova, kompeticiju za nutrijente i prostor, litički efekat i produkciju antibiotika (Cawoy i sar., 2011) (slika 3.3.2)



Slika 3.3.2. Pregled faktora koji definišu aktivnost agenasa biološke kontrole (prilagođena šema) (Legein i sar., 2020).

3.3.3.1. Kompeticija za nutrijente i prostor

U uslovima nutritivno siromašnog okruženja, efikasnost u pogledu usvajanja hranljivih materija i katabolizma mikroorganizama, je ključni faktor sa aspekta kompeticije (Cawoy i sar., 2011). U tom pogledu bakterijski sojevi u ulozi agenasa biološke kontrole pokazuju dominaciju u odnosu na patogene vrste, bolju adaptaciju uslovima okruženja, brže usvajanje dostupnih nutrijenata i rast (Sharma i sar., 2009). Epilog ove aktivnosti je nedostatak esencijalnih faktora rasta, osnovnih nutrijenata, kao što je ugljenik, mineralnih materija kao što je gvožđe i prostora, čime se stvaraju uslovi nepogodni za razvoj patogenih mikroorganizama (Prashar i sar., 2013).

3.3.3.2. Antibioza

Posmatrano sa stanovišta biotehnološke proizvodnje, najbitnije karakteristike sojeva roda *Bacillus* odnose se na visok stepen diverziteta metaboličke aktivnosti i sposobnost produkcije niza komponenti sa antagonističkim delovanjem. Gotovo 4-5% genoma predstavnika vrste *Bacillus subtilis*, odnosno preko 8% u slučaju *Bacillus amyloliquefaciens*, uključeno je u sintezu sekundarnih metabolita (Caulier i sar., 2019; Chen i sar., 2008).

Ribozomalno sintetisani peptidi se uglavnom dobijaju iz kratkih prekursora koji se prevode u aktivna jedinjenja nakon post-translacionih modifikacija (Caulier i sar., 2019), dok neribozomalno sintetisani peptidi čine važnu grupu bioaktivnih jedinjenja koja se dobijaju aktivnošću velikog multienzimskog kompleksa, neribozomalne peptid sintetaze (engl. *Non-Ribosomal Peptide Synthetase*, NPRS) (Luo i sar., 2015). Osnovna klasifikacija jedinjenja podrazumeva podelu na ciklične i linearne peptide, dok se dalja diferencijacija vrši na osnovu gradivnih jedinica koje se razlikuju u smislu vrste i sekvence aminokiselinskih jedinica, kao i prirode peptidne ciklizacije, prirode, dužine i načina grananja lanaca masnih kiselina. Visok diverzitet u pogledu strukturnih karakteristika, rezultuje dobijanjem čitavog niza bioaktivnih jedinjenja koje odlikuje različiti kapacitet antagonističke aktivnosti (Biniarz i sar., 2017; Penha i sar., 2020).

U kontekstu biološke kontrole, kao najznačajnije, izdvajaju se tri klase lipopeptida: surfaktin, iturin i fengicin (slika 3.3.3). Primena lipopeptidnih komponenti u borbi protiv fitopatogenih sojeva razmatra se kao potencijalno rešenje problema rastuće rezistencije prema konvencionalnim antibioticima. U konkurenciji ostalih lipopeptidnih komponenti, pripadnici familije surfaktina se izdvajaju kao najviše usmereni ka komercijalnoj eksploataciji za potrebe prehrambene i kozmetičke industrije, u oblasti biomedicine i zaštite životne sredine, kao i poljoprivrede (Hazarika i sar., 2019; Meena i sar., 2021).

Struktura lipopeptida sastoji iz peptidnog fragmenta koji čini sedam u slučaju surfaktina i iturina, odnosno deset α -aminokiselina kada je reč o fengicinima. Lipidni deo molekula iturina čini β -amino, tj. β -hidroksi masna kiselina u slučaju surfaktina i fengicina. Strukturne razlike takođe upućuju na diverzitet u pogledu antimikrobne aktivnosti molekula. Baktericidna aktivnost lipopeptida raste s povećanjem veličine lipidnog fragmenta, obično između 10 i 12 atoma ugljenika, dok se antifungalno delovanje ispoljava kada lipopeptidne komponente u strukturi lipidnog dela poseduju niz atoma ugljenika u opsegu 14–16 (Hmidet i sar., 2017).

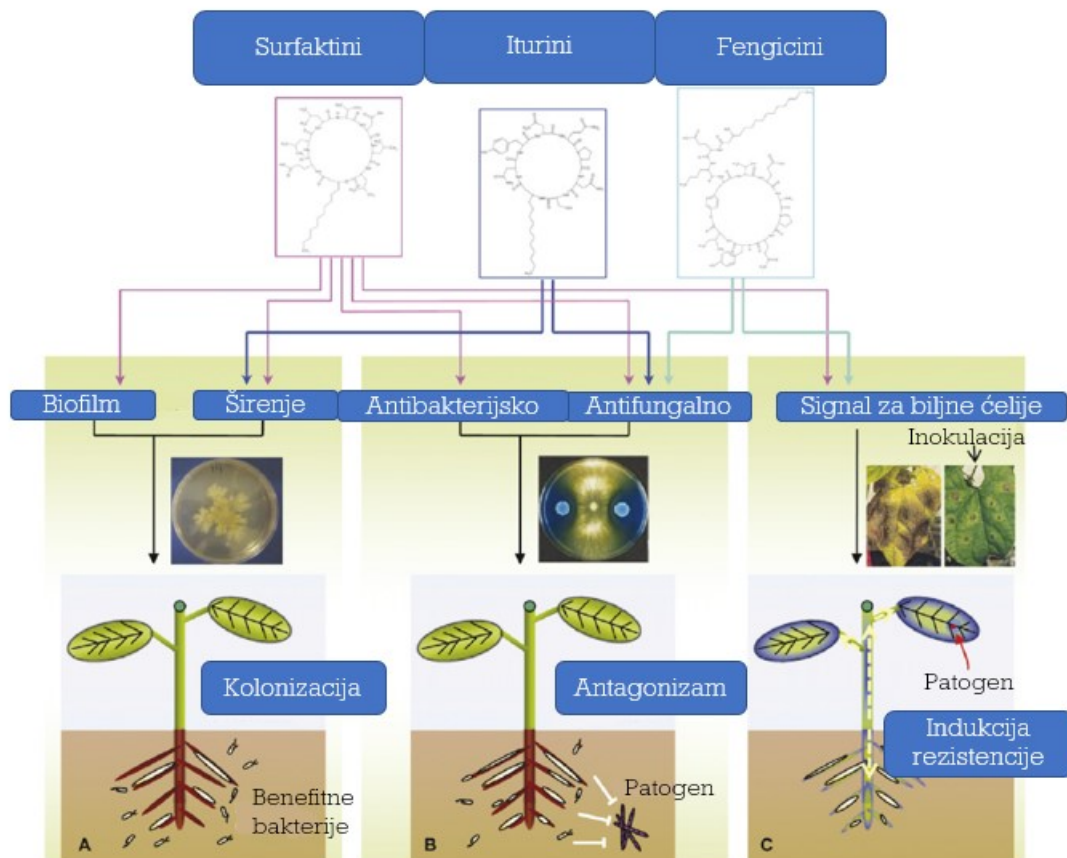
U poređenju s ostalim predstavnicima lipopeptida, familiju iturina čine molekuli male molekulske mase koja iznosi oko 1,1 kDa. Ističu se kao biomolekuli od velikog značaja usled izražene farmakološke aktivnosti koja se vezuje za antibakterijsko, antifungalno i antitumorsko delovanje. Po prirodi su ciklični lipopeptidi koji sadrže β -amino masnu kiselinu sa u proseku od 14 do 17 ugljenikovih atoma i heptapeptidni segment sa D-Tyr kao drugom aminokiselinom u nizu, i dve dodatne D-aminokiseline koje se nalaze na

pozicijama tri i šest. Ovakva struktura jasno ukazuje na amfifilni karakter jedinjenja, što se odražava i na mehanizam delovanja ovih biomolekula. U grupu iturina uvrštavaju se iturini A, C, D i E, bacilomicini D, F i L, bacilopeptin, mikosubtilin, miksirin, subtulen, i mohavenzin (Dimkić, 2015). U strukturi iturina A razlikuje se peptidni segment koji čini sedam aminokiselinskih ostataka i ugljenični hidrofobni rep od 11 do 12 C atoma. Iturin operon je veličine od 38–40 kb i sastoji se od četiri otvorena okvira čitanja *ItuA*, *ItuB*, *ItuC*, *ItuD* (Meena i Kanwar, 2015).

Familiju surfaktina čine ciklični lipopeptidi koje se sastoje iz sedam aminokiselina (Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu) vezanih za karboksilne i hidroksilne grupe lanca β -hidroksi masne kiseline koji čini od 12 do 16 ugljenikovih atoma. Različiti oblici surfaktina variraju u smislu redosleda amino kiselina i veličine lipidne frakcije prisutne u molekulu. Dokazano je da uticaj na oblik sintetisanog molekula pokazuje, ne samo odabir proizvodnog soja, već i uslovi kultivacije. Na osnovu aminokiselinske sekvence, molekuli surfaktina se klasifikuju u četiri izoforme: surfaktin A, B, C i D (Meena i Kanwar, 2015; Romero i sar., 2007). Surfaktin se svrstava među najefikasnije biosurfaktante sa značajnim potencijalom primene kao zamena za ekološki nepovoljnije hemijski sintetisane surfaktante. U koncentraciji od 20 μ M, surfaktin smanjuje površinski napon vode sa 72 na 27 mN/m, što u velikoj meri premašuje mogućnosti ostalih biosurfaktanata. Surfaktin je, takođe, ključni faktor u pogledu formiranja stabilnih biofilmova. S druge strane, protektivnoj aktivnosti ove grupe lipopeptida upravo doprinosi inhibicija stvaranja biofilmova drugih sojeva. Predstavnici familije surfaktina odlikuju se antiviralnom, antibakterijskom, umerenom antifungalnom aktivnošću i snažnim sinergističkim delovanjem u kombinaciji sa iturinom A (Romero i sar., 2007).

Fengicini su bioaktivni lipopeptidi sa izraženim antifungalnim delovanjem protiv filamentoznih gljiva. Molekul fengicina formira peptidni segment koji sačinjava deset aminokiselina, od kojih osam (Tyr, Thr, Glu, Ala, Pro, Gln, Tyr, Ile) formira ciklični prsten vezan za lanac masne kiseline, čija dužina varira od 14 do 17 ugljenikovih atoma (Deleu i sar., 2008). U strukturi ovih biomolekula nalazi se laktonski prsten u lancu β -hidroksi masne kiseline koji može biti i zasićen i nezasićen. Pored broja ugljenikovih atoma lipidnog dela molekula, heterogenost predstavnika familije fengicina ogleda se u aminokiselini smeštenoj na šestoj poziciji u peptidnom prstenu, na osnovu čega se klasifikuju u dve grupe: fengicin A i B. Dalji diverzitet molekula fengicina odnosi se na varijabilnost dužine lanca β -hidroksi masne kiseline (Meena i Kanwar, 2015; Fan i sar., 2017^b).

Mehanizam delovanja lipopetidnih komponenti definisan je amfifilnom prirodom njihove strukture i sposobnošću da interaguju sa ćelijskom membranom ciljanih organizama. Lipopeptidi iz familije surfaktina su veoma efikasni biosurfaktanti koji vrlo lako interaguju sa lipidnim dvoslojem i posledično interferiraju sa strukturom membrane. Krajnji ishod ove interakcije uslovljen je koncentracijom surfaktina. Tako će, na primer, visoke koncentracije dovesti do stvaranja ireverzibilnih formacija u vidu pora, ili čak, izazvati potpuni prekid lipidnog dvosloja membrane ciljanih organizama. Integracija surfaktina u ćelijsku membranu započinje hidrofobnim interakcijama između masnih kiselina i ugljovodoničnih lanaca fosfolipida membrane, što dovodi do destabilizacije njene strukture. Korak koji prethodi intergaciji u samu strukturu membrane ispraćen je konformacijskim promenama cikličnog peptidnog regiona surfaktina. Rezultati još jedne studije ukazuju da proces destabilizacije membrane uključuje integraciju dimera surfaktina u dvosloj membrane. Ovakav mehanizam delovanja dovodi do strukturnih promena u vidu dehidracije polarnih glava membrane fosfolipida, propraćenu dezintegracijom membrane i izlivanjem ćelijskog sadržaja. Antagonistička aktivnost lipopetida iz familije iturina ostvaruje se na nešto drugačiji način, i zasniva se na formiranju jonskih kanala i promena u permeabilnosti membrane (Fira i sar., 2018). Mehanizam delovanja fengicina nije detaljno razjašnjen kao što je to slučaj sa ostalim lipopeptidnim komponentama, ali se takođe vezuje za interakcije sa membranom ciljanih patogena (Ongena i Jacques, 2008).



Slika 3.3.3. Pregled bitnih interakcija sa aspekta biološke kontrole koje ostvaruju lipopeptidi produkovani od strane bakterija roda *Bacillus* (prilagođena šema) (Ongena i Jacques, 2008).

3.3.3.3. Indukovana sistemska otpornost

Biljke poseduju razvijen sofisticiran imuni sistem za detekciju i formiranje odgovora prema potencijalnim neprijateljima (Yu i sar., 2019). Odbrambeni mehanizam biljke se definiše kao pasivan, odnosno aktivan, u zavisnosti od prirode odgovora u smislu toga da li je standardno prisutan ili indukovano abiotским i biotским faktorima. Značajnu ulogu u definisanju drugog tipa odgovora imaju benefitne rizosferne bakterije koje dovode do aktivacije indukovane sistemske otpornosti (engl. *Induced Systemic Resistance*, ISR). U poređenju sa sistemski stečenom otpornošću (engl. *Systemic Acquired Resistance*, SAR), sličnost postoji sa fenotipskog aspekta, budući da se i jedan i drugi mehanizam ispoljava nespecifično prema širokom spektru patogenih vrsta. Indukovanje sistemske otpornosti uslovljeno je odnosom same biljke i benefitnog soja i koncentracijom bakterija koja mora preći definisani prag kako bi došlo do aktivacije odgovora (Gašić i Obradović, 2012; Wang i sar., 2009).

3.3.3.4. Rizobakterije promotori rasta biljaka – PGPR

Rizobakterije promotori rasta biljaka (engl. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*, PGPR) su pripadnici mikrobne zajednice sloja rizosfere zemljišta koje karakteriše sposobnost kolonizacije korena i benefitno delovanje na razvoj biljnih vrsta. Region rizosfere je bogat nutritivnim materijama kao rezultat ekskrecije korenova biljaka što se direktno odražava na visok stepen aktivnosti i diverzitet populacije mikroorganizama u okruženju (Singh i sar., 2018; Grover i sar., 2021). Sastav mikrobne zajednice rizosfere je specifičan za biljku, što je u direktnoj vezi sa količinom i vrstom materija koje koren ekskretuje u različitim fazama rasta. Populacije mikroorganizama izolovane iz rizosfere različitih biljnih vrsta, a da pri tome pripadaju istom rodu, u velikoj meri divergiraju u pogledu fenotipskih i genotipskih karakteristika (Mrkovački, 2012).

Na osnovu tipa interakcije, PGPR bakterije se mogu podeliti na simbiotske i slobodne. Prvu čini grupa organizama koja nastanjuje unutrašnjost biljaka i ostvaruje neposredan kontakt, dok se u drugoj nalaze organizmi slobodni u zemljištu. Rizobakterije ostvaruju ulogu promotora rasta biljaka na direktan ili indirektan način kroz nekoliko mehanizama delovanja uključujući fiksaciju azota, solubilizaciju nutrijenata i biosintezu fitohormona, antibiotika, hidrolitičkih enzima, siderofora kao i kroz indukciju sistemske otpornosti biljaka (Aloo i sar., 2019).

3.3.3.5. Fiksacija azota

Više od 80% ukupne količine azota na Zemlji nalazi se u molekulskom obliku kao inertni gas u atmosferi (Aloo i sar., 2019). Kao bitan aspekt i ujedno limitirajući faktor poljoprivredne proizvodnje, navodi se dostupnost azota u obliku koji omogućava asimilaciju od strane biljaka (Mantelin i Touraine, 2004). Kako bi se obezbedile dovoljne količine nutrijenta, esencijalnog za razvoj biljnih vrsta, uobičajena praksa podrazumeva primenu veštačkih azotnih đubriva. Nedostatak ovakvog pristupa je što biljke usvajaju svega 50% dodatog azota. Preostalih 50% je gubitak usled isparavanja ili ispiranja iz zemljišta, što predstavlja ekološki rizik. Ključnu ulogu u snabdevanju biljaka azotom igraju biološki azotofiskatori. Njihova uloga ogleda se u sposobnosti vezivanja atmosferskog azota, odnosno omogućavanju njegove redukcije do amonijaka, koji potom biljke usvajaju. Biološka fiksacija molekulskog azota se ujedno smatra najvažnijom karikom u ciklusu kruženja azota u prirodi, naročito sa aspekta poljoprivredne delatnosti (Di Benedetto i sar., 2017).

3.3.3.6. Fiksacija fosfora

Fosfor je jedan od glavnih konstituenata energetskog metabolizma, biosinteze nukleinskih kiselina i ćelijskih membrana, sa bitnom ulogom u regulaciji funkcije niza enzima (Singh i sar., 2011). Iako je ključni makronutrijent za rast i razvoj biljaka, veliki udeo ukupnog sadržaja fosfora je nedostupan usled brze imobilizacije organskih i neorganskih komponenti zemljišta. Fosfor predstavlja limitirajući faktor u biljnoj proizvodnji i trenutne procene govore u prilog tome da će se zalihe fosfatnog kamena kao prirodnog resursa u potpunosti iscrpeti do 2050. godine. Ovakav scenario prepoznaje se kao potencijalni uzročnik krize u budućnosti poljoprivredne proizvodnje (Hakim i sar., 2021; Singh i sar., 2011; Mogollón i sar., 2018; Oleńska i sar., 2020).

Organski fosfor čini oko 30 do 80% ukupnog sadržaja fosfora prisutnog u zemljištu, i kao takav, ima bitnu ulogu u ciklusu fosfora (Singh i sar., 2011). Dominantne forme organskog fosfora, sa zastupljenošću od čak 60%, odnose se na fitate (inozitol heksa- i penta-fosfate), koji su ujedno oblik koji biljke teško usvajaju. Solubilizacija fitata je bitan faktor za mobilizaciju fosfora a aktivnost fosfataza (fitaze, fosfataze) ključni korak koji prethodi asimilaciji od strane biljaka (Singh i sar., 2011).

3.3.3.7. Proizvodnja litičkih enzima

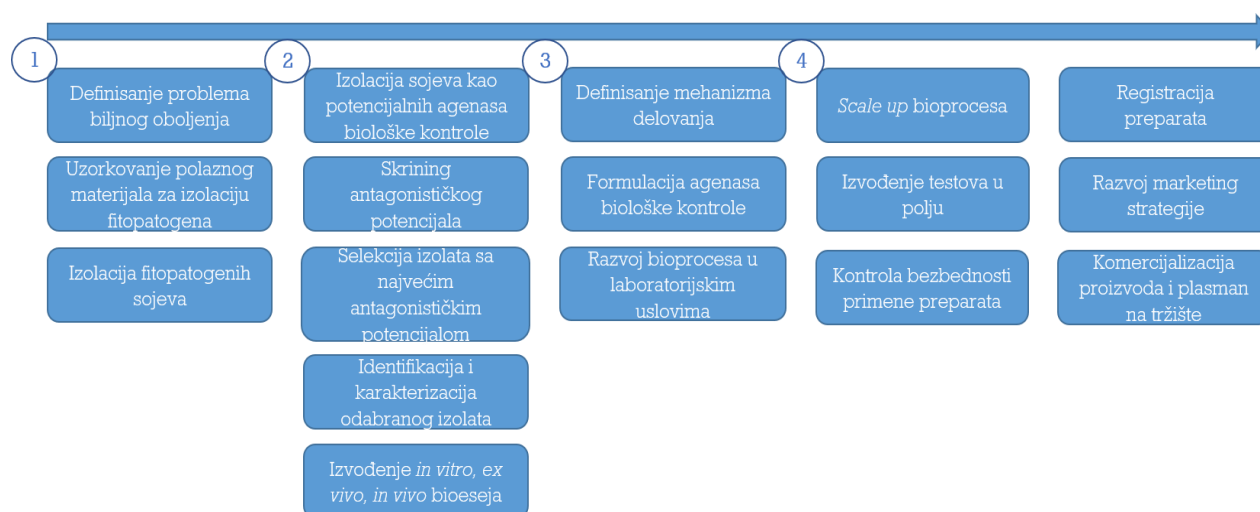
Pored eksploatacije enzima od industrijskog značaja dobijenih primenom bakterijskih sojeva, značaj ove metaboličke aktivnosti ogleda se u mogućnosti hidrolize i iskorišćenja nutrijenata sadržanih u složenim supstratima, što dodatno upućuje na dominaciju ovih organizama u odnosu na ostale članove mikrobne zajednice datog okruženja. Rizobakterije roda *Bacillus* najčešće se javljaju kao produceri hitanaza, glukanaza i hitozanaza (Miljaković i sar., 2020). Proizvodnja litičkih enzima doprinosi mogućnosti primene ovih organizama u borbi protiv biljnih bolesti, imajući u vidu da učestvuju u dezintegraciji građivnih komponenti ćelijskog zida patogenih vrsta (Aloo i sar., 2019). Sadržaj hitina u fungalnim ćelijama iznosi 22-44%, te njegov biološki značaj kao strukturne komponente rezultuje interesovanjem naučne zajednice za načine kako sinteze, tako i degradacije ovog polisaharida (Manjula i Podile, 2005). Enzim β -1,4-glukanaza je još jedan važan činilac iz aspekta biološke kontrole fitopatogenih gljiva imajući u vidu ulogu u razlaganju glukana, dok su proteaze uključene u dezintegraciju proteina ćelijskog zida (Ab Rahman i sar., 2018).

3.3.3.8. Proizvodnja siderofora

Siderofore su helatna jedinjenja gvožđa male molekulske mase koja nastaju u uslovima njegovog limitiranog sadržaja u okruženju. Mehanizam antagonističke aktivnosti siderofora zasniva se na kompeticiji i ograničavanju količina dostupnog gvožđa potrebnog za razvoj patogenih vrsta. Takođe, mikrobiološke siderofore ostvaruju bitnu ulogu u transportu potrebnih količina gvožđa do biljaka čime se favorizuje njihov rast (Maksimov i sar., 2018; Miljaković i sar., 2020).

3.4. Razvoj tehnologije proizvodnje mikrobioloških biopesticida

Na slici 3.4.1 prikazana je šema koja ukazuje na osnovne korake razvoja tehnologije proizvodnje agenasa biološke kontrole. U nastavku pregleda literature istaknuti su najvažniji aspekti svake od pojedinačnih faza, sa posebnim osvrtom na predstavnike roda *Bacillus* u ulozi proizvodnih mikroorganizama.



Slika 3.4.1. Osnovni koraci razvoja tehnologije proizvodnje agenasa biološke kontrole (Montesinos, 2003).

3.4.1. Odabir odgovarajućeg biokatalizatora

Razvoj proizvodnje novog mikrobiološkog biopesticida, od definisanja koncepta do komercijalne proizvodnje, obuhvata niz koraka. Pored fokusa na biološke aspekte potencijalnog biokontrolnog agenasa, strukturirana šema razvoja proizvoda podrazumeva evaluaciju tehničkih aspekata proizvodnje industrijskih razmera, mogućnosti formulacije i komercijalnih kriterijuma plasmana preparata na tržište. Centralnu ulogu u odvijanju bioprocasa i polaznu tačku razvoja tehnologije proizvodnje agenasa biološke kontrole, nosi proizvodni soj, koji se na osnovu svojih bioloških svojstava identifikuje kao

kandidat pogodan za rešavanje problema određenog biljnog oboljenja (Pajčin i sar., 2020).

Predstavnici rizobakterija višestrukim mehanizmom delovanja, direktno i indirektno, dokazano ispoljavaju pozitivna svojstva na biljke, što ih ujedno kvalifikuje za vodeće kandidate pri odabiru potencijalnih proizvodnih sojeva (Mota i sar., 2017).

Izolacija sa odabranih područja i formiranje zbirke novoizolovanih sojeva predstavljaju prvi korak istraživanja. Primena izolata iz zbirke kultura se generalno smatra neodgovarajućom imajući u vidu da su ovi mikroorganizmi daleko zahtevniji u nutritivnom pogledu i značajno osetljiviji na promene i prilagođavanje nepovoljnim uslovima sredine, čime se definišu kao nepogodni za komercijalizaciju. Odabir polaznog materijala za izolaciju sojeva vezuje se za regije gde postoji veliki rizik od pojave oboljenja a biljke ne pokazuju simptome bolesti. Upravo takvo okruženje smatra se prirodnim izvorom potencijalnih mikroorganizama efikasni u biološkoj kontroli. Kao dobar pristup pronalasku odgovarajućeg rešenja, navodi se izolacija mikroorganizama iz agroekosistema koje karakteriše primena različitih agrotehničkih mera pri uzgoju istih useva. Na ovaj način, obezbeđuje se dodatna pomoć pri odabiru mikroorganizama koji su kompatibilni primenivanoj poljoprivrednoj praksi i adaptirani uslovima sredine u koji će se kasnije vršiti aplikacija preparata (Pliego i sar., 2011).

Selekcija biokontrolnih agenasa u *in vivo* uslovima je kompleksan zadatak imajući u vidu diverzitet samih agenasa i interakcije koje ostvaruju sa biljkama. Nephodno je definisati efikasnu strategiju selekcije organizama koji se mogu koristiti za industrijski nivo proizvodnje na ekonomski prihvatljiv način. Postupak selekcije može se podeliti u tri osnovne faze, koje podrazumevaju odabir patosistema, opredeljivanje za odgovarajuće metode selekcije, karakterizaciju izolata i procenu njihove efikasnosti (Mota i sar., 2017).

Skrining antagonističke aktivnosti protiv ciljanih patogena je kritičan korak na kome se bazira odabir najpotentnijeg soja za dalji razvoj bioprocesa. Inicijalni skrining podrazumeva *in vitro* testove i smatra se optimalnim pristupom kojim se ostvaruje mogućnost evaluacije potencijala većeg broja mikroorganizama (Mota i sar., 2017). Efikasnost izolata određuje se izvođenjem bioeseja u malim razmerama, u strogo kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Odabir načina evaluacije antagonističkog potencijala izolata, odnosno izvođenje nekog od mogućih testova, dovodi se u vezu sa mehanizmom delovanja biokontrolnog agensa: antiboza, kompeticija, indukcija imunog odgovora biljaka. Noviji pristup

skrininga obuhvata sagledavanje genetskog profila odabranog soja primenom molekularnih markera (Frikha-Gargouri i sar., 2017). Analizom sekvenci odgovarajućih gena i identifikacijom mehanizma delovanja novoizolovanih sojeva, dobija se jasnija slika njihovog potencijala kao biokontrolnih agenasa i bolja efikasnost faze skrininga.

Tokom postupka selekcije izolata uzimaju se u obzir i dodatni kriterijumi, koji nisu u direktnoj vezi sa efikasnošću i konzistentnošću rezultata bioeseja, a tiču se određivanja najmanje inhibitorne koncentracije, proizvodnje specifičnih antimikrobnih metabolita protiv ciljanih patogena i tolerancije na uobičajeno primenjivane pesticide u poljoprivredi. Ukupno gledano, manje od 1% sojeva zadovoljava sve pomenute kriterijume usled činjenice da je kapacitet biološke kontrole subspecifična, karakteristika vrste. Očekivano je da svega nekoliko sojeva unutar vrste poseduje ovakvu prirodno razvijenu sposobnost (Montesinos, 2003).

Radi boljeg sagledavanja potencijala primene određenog soja u biološkoj kontroli višestruke kriterijume koji ga determinišu nije dovoljno sagledavati kao pojedinačne faktore. Odsustvo *in planta* ogleđa u inicijalnim fazama istraživanja onemogućava determinaciju sposobnosti stimulativnog dejstva na rast delovanjem odabranog biokontrolnog agensa i ispoljavanje protektivnog delovanja u realnim uslovima aplikacije (Pliego i sar., 2011; Besset-Manzoni i sar., 2019). Izvođenje *in planta* testova je neophodan korak razvoja tehnologije proizvodnje agenasa biološke kontrole koji omogućava eliminaciju uticaja kontrolisanih uslova okruženja i adekvatnu procenu efikasnosti preparata (Parikh i sar., 2018).

Ključni zadatak biotehnoške proizvodnje odnosi se na dobijanje visokog prinosa krajnjeg proizvoda standardnih karakteristika (Yezza i sar., 2004). Detaljno razmatranje i optimizacija pojedinačnih faza proizvodnog postupka imaju za cilj definisanje parametara okruženja, koji će omogućiti ispoljavanje maksimalne efikasnosti proizvodnog soja (Stamenković-Stojanović i sar., 2019).

3.4.2. Optimizacija uslova proizvodnje mikrobioloških biopesticida

Osnovu optimizacije bioprocasa čini statistički eksperimentalni dizajn, faktorijalni dizajn, odnosno dizajn eksperimenata (engl. *Design of experiments*, DoE), što su sve izrazi koji se odnose na koncept ispitivanja matematičke relacije između ulaznih i izlaznih varijabli posmatranog sistema. Inicijalni korak podrazumeva odabir ključnih varijabli sistema od interesa, koji će doprineti

njegovom boljem sagledavanju iz definisanog ugla eksperimentalnog prostora (Mandenić i Brundin, 2008).

Ako se govori o kreiranju optimalnih uslova koji ispunjavaju potrebe definisanog soja, prvi korak podrazumeva zadovoljavanje njegovih nutritivnih zahteva. Sinteza sekundarnih metabolita uslovljena je proizvodnim sposobnostima određenog soja, ali neminovno i uslovima u kojima se odvija kultivacija. Nutritivni aspekt, uzimajući u obzir i minimalne promene u sastavu kultivacionog medijuma, rezultuje značajnim promenama u pogledu kvalitativnih i kvantitativnih svojstava sekundarnih metabolita i opšteg metaboličkog profila mikroorganizma (Yan i sar., 2018). Vrsta i koncentracija nutrijenata koji ulaze u sastav kultivacionog medijuma, igraju bitnu ulogu u inicijaciji proizvodnje primarnih i sekundarnih metabolita. Limitirana dostupnost esencijalnih nutrijenata ograničava rast i ćelija i formiranje proizvoda (Sun i sar., 2019).

Ugljenik je najbitnija komponenta hranljive podloge, kao osnovni izvor energije i ujedno faktor odgovoran za rast ćelija i metaboličku aktivnost. U procesima fermentacije, gde komponente medijuma pokrivaju značajan deo troškova, koji iznosi čak i 70%, izbor izvora ugljenika postaje kritičan parametar proizvodnje. Pored nivoa asimilacije ugljenika, priroda izvora takođe determiniše vrstu i količinu proizvoda (Singh, 2017). Takođe, selekcija izvora azota i njegove koncentracije u medijumu je bitan faktor bioprocasa. Mikroorganizmi poseduju sposobnost usvajanja i organskih i neorganskih izvora azota. Upotreba specifičnih aminokiselina često povećava produktivnost, dok sasvim suprotno tome, nepogodan odabir aminokiseline rezultira inhibicijom sinteze sekundarnih metabolita (Singh, 2017). Fosfor je još jedna bazična komponenta kultivacionog medijuma čija se uloga vezuje za sintezu osnovnih ćelijskih konstituenata, uključujući fosfolipide membrane i nukleinske kiseline, kao i kofaktora enzima oksidativnog (energetskog) metabolizma (ATP, NADP). Potrebna količina fosfora zavisi od zahteva proizvodnog soja i prirode željenog proizvoda. Veliki broj bioprocasa karakteriše potreba za niskom koncentracijom izvora fosfora kako bi se inicirala sinteza metabolita, dok sve koncentracije iznad granične vrednosti dovode do supresije sekundarnog metabolizma (Singh, 2017).

Skaliranje proizvodnje do industrijskog nivoa zahteva značajnu redukciju proizvodnih troškova u vidu primene kompleksnih hranljivih podloga kao adekvatne zamene za komercijalne medijume čija primena nije ekonomski opravdana. Primena alternativnih supstrata bogatih ugljenim hidratima je

perspektivno rešenje koje omogućava proizvodnju željenih preparata na održiv i ekonomski prihvatljiv način (Lima i sar., 2020). U centru interesovanja nalazi se ispitivanje mogućnosti primene otpadnih tokova industrije, u cilju valorzacije u proizvode sa jedne strane, uz istovremeno rešavanje pitanja njihovog osiromašenja i zbrinjavanja na ekološki podoban način (Banat i sar., 2014).

Adekvatna kontrola vanćelijskog okruženja, pored sadržaja nutritivnih materija, uključuje i nivo rastvorenog kiseonika, neophodnog za usmeravanje bioprocasa ka dobijanju željenog proizvoda ili povećanju njegovog prinosa. Dostupnost kiseonika se navodi kao kritični parametar za rast, sporulaciju i produkciju sekundarnih metabolita (Mounsef i sar., 2015). Za razliku od striktnih aeroba i anaeroba koji opstaju isključivo u prisustvu, odnosno odsustvu kiseonika, fakultativni anaerobi odolevaju promenama u pogledu dostupnosti kiseonika adaptacijom ćelijskog metabolizma. Kao odgovor na promenu nivoa dostupnog kiseonika, dolazi do modulacija u pogledu proteinske aktivnosti regulacijom ekspresije gena odgovornih za odvijanje određenih biosintetičkih reakcija (Nakano i Zuber, 1998). Prenos kiseonika je direktno uslovljen procesnim parametrima koji uključuju mešanje i aeraciju. Specifičnost uslova potrebnih za odvijanje određenih metaboličkih puteva i sintezu proizvoda od interesa varira od minimalnih, do okruženja sa maksimalnim vrednostima zasićenosti kiseonikom (Rangarajan i Clarke, 2015). Iz navedenog proizilazi neophodnost optimizacije uslova aeracije i mešanja u laboratorijskoj fazi razvoja tehnologije konkretnog biotehnološkog rešenja (Ghribi i Ellouze-Chaabouni, 2011). U tabeli 3.4.1 dat je pregled primera optimizovanih uslova u pogledu intenziteta aeracije i brzine mešanja za proizvodnju antimikrobnih komponenti primenom predstavnika roda *Bacillus* kao proizvodnih izolata.

Tabela 3.4.1. Pregled uslova proizvodnje antimikrobnih agenasa primenom predstavnika roda *Bacillus* kao proizvodnih izolata.

Proizvod	Izvor ugljenika (g/l)	Tehnika kultivacije	Radna V (ml)	T (°C)	pH	Mešanje (o/min)	Aeracija (vvm)	Referenca
Iturin, fengicin i surfaktin	20	Submerzno – erlenmajer*	100 ml	30	7	130		Akpa i sar., 2001.
Surfaktin	0,25–2	Submerzno – kontinualni bioreaktor	1000	30	7	200	0,4	Chen i sar., 2006.
Surfaktin	2	Submerzno – šaržni bioreaktor	1000	30	7	200		Chen i sar., 2006.
Mikosubtilin	10	Submerzno – dolivno šaržni reaktor	5000	30	6,5	200–500	0,75 l/min	Chenikher i sar., 2010.
Lipopeptid biosurfaktant	40	Submerzno – erlenmajer*	225	30		150		Fernandes i sar., 2007.
Surfaktin	10	Submerzno – šaržni bioreaktor	1000	32	7	300	1	Davis i sar., 1999.
Lipopetid biosurfaktant	40	Submerzno – šaržni bioreaktor	1500	30	6,8	300	0,1, 1	Kim i sar., 1997.
Nedefinisani biosurfaktant	5–25	Submerzno – šaržni bioreaktor	1000	30		200	1	Suwansukho i sar., 2008.
Nedefinisani biosurfaktant	20	Submerzno – šaržni bioreaktor	3000	30	6,8–7,2	300	1	Joshi i sar., 2008.
Mikosubtilin	40	Submerzno – šaržni bioreaktor	5000	30	6,5	200–400	0,25	Guez i sar., 2007.
Surfaktin	40	Submerzno – erlenmajer*	200	30		200		Wei i sar., 1998.
Surfaktin	40	Submerzno – šaržni bioreaktor	2000	30		200–350	0,5–1,5	Yeh i sar., 2006.
Subtilizin	5	Submerzno – dolivno šaržni bioreaktor	2000	37	6,8	Saturacija kiseonika iznad 20%		Oh i sar., 2002.
Iturin A i surfaktin		<i>Solid state</i> – erlenmajer		23–48		0		Ohno i sar., 1995.
Komponenta sa antagonističkim delovanjem	10	Submerzno – dolivno šaržni bioreaktor	1900	30	7	150–900	0,5–1,0	Matar i sar., 2009.

*eksterno mešanje i aeracija

3.4.3. Formulacija mikrobioloških biopesticida

Naučna literatura obiluje podacima o mikroorganizmima koji poseduju značajan potencijal primene u biološkoj kontroli. S druge strane broj komercijalnih preparata na tržištu ne prati ovaj trend. Veliki broj preparata ne postiže podjednako dobru efikasnost u laboratorijskim i kontrolisanim uslovima (plastenici) i na polju, a razlog tome nalazi se u neadekvatnim pristupima formulaciji preparata. Uloga formulacije u biotehnološkom postupku proizvodnje mikrobioloških pesticida odnosi se na stvaranje pogodnog mikro okruženja za aktivne komponente, odnosno ćelije mikroorganizma, uključujući njihovu fizičku ili hemijsku zaštitu tokom vremena. Bitna funkcija podrazumeva i favorizaciju aktivnosti proizvoda i kompetitivnost mikroorganizma u odnosu na druge prirodne sojeve bolje adaptirane uslovima u kojima se preparat aplikuje (Stamenković-Stojanović i sar., 2019; Vassilev i sar., 2020; Schisler i sar., 2004).

Karakteristike proizvodnog soja u velikoj meri diktiraju potencijalne pristupe u formulaciji krajnjeg proizvoda, pri čemu posebno mesto zauzimaju predstavnici roda *Bacillus*. Usled svojih specifičnih svojstava definišu se kao pogodniji kandidati u poređenju sa velikim brojem konkurentnih sojeva. To se pre svega odnosi na sposobnost produkcije endospora koje se odlikuju izuzetnom stabilnošću, samim tim i mogućnošću primene hemijskih i fizičkih tehnika koje bi bile neprihvatljive u slučaju nestabilnijih oblika mikroorganizama (Stamenković-Stojanović i sar., 2019).

Mogući tipovi formulacija se dele na tečne i čvrste. Kao komponente gotovih proizvoda navode se različita pomoćna sredstva (tabela 3.4.2) kao i tečni ili čvrsti nosači neorganskog odnosno organskog porekla (Vassilev i sar., 2020; Schisler i sar., 2004). Najčešći čvrsti oblici proizvoda podrazumevaju praškastu konzistenciju, preparate u formi mikro granula i kvašljivog praška. Tečni oblici proizvoda obuhvataju emulzije, uljane disperzije, koncentrate suspenzija i hidrosulubilnih granula (Gašić i Tanović, 2013, Grahovac i sar., 2009). Posebnu grupu proizvoda čine preparati koji podrazumevaju besćelijske formulacije, odnosno filtrat kultivacionih tečnosti. U oblasti razvoja tehnologije čvrstih formi preparata, sve veće interesovanje privlače tehnike imobilizacije ćelija primenom polisaharida, ali i preparati dobijeni izvođenjem *solid state* kultivacije primenom agroindustrijskog otpada. Ovakav vid proizvodnje otvara mogućnost primene ko-kultivacije više benefičnih sojeva kao i mogućnost primene čvrstih supstrata samostalno ili u kombinaciji sa tečnim otpadom (Vassilev i sar., 2020).

Tabela 3.4.2. Vrste pomoćnih sredstava i primeri materijala korišćenih u formulaciji preparata mikrobioloških biopesticida na bazi biomase *Bacillus* vrsta (Schisler i sar., 2004).

Pomoćno sredstvo	Materijal
Tečni nosači	Biljna ulja
Mineralni nosači	Dijatomejska zemlja, kaolin
Organski nosači	Brašno
Stabilizatori	Laktoza, natrijum benzoat
Nutrijenti	Melasa, pepton
Veziva	Guma arabika, karboksimetil celuloza
Desikanti	Silika gel, anhidrovane soli
Ugušćivači	Ksantan guma
Surfaktanti	Tween 80
Disperzanti	Mikrokristalna celuloza
UV protektanti	Oksibenzon, blankofor BBH, lignin
Lepiva	Preželatinizirano kukuruzno brašno

Kako je formulacija agenasa biološke kontrole kritični faktor u pogledu njihove komercijalne upotrebe, osnovni zahtevi koji moraju biti zadovoljeni, pre svega, odnose se na obezbeđivanje vijabilnosti ćelija i visoke koncentracije aktivnih komponenti po jedinici proizvoda. S druge strane, kao bitan faktor navodi se i ekonomski aspekt postupka formulacije (Vassilev i sar., 2020). Dodatni izazovi iz ugla komercijalizacije, odnose se na rok trajanja bioloških preparata i definisanje postupka formulacije koji će obezbediti stabilnost proizvoda u što dužem vremenskom periodu (Yáñez-Mendizabal i sar., 2012; Schisler i sar., 2004). Rok trajanja bioloških preparata na bazi spora u proseku iznosi od 1–3 godine (Kumar i sar., 2012).

3.4.4. Proizvodnja mikrobioloških biopesticida na industrijskom nivou

Uvećanje razmera proizvodnje obuhvata sukcesivno izvođenje setova optimizacije na laboratorijskom nivou i definisanje kriterijuma na osnovu kojih će se omogućiti uspešno skaliranje i odvijanje bioprocasa u proizvodnim razmerama (Rangarajan i Clarke, 2015). Korak koji tome prethodi je testiranje na nivou pilot postrojenja koje ima za cilj približavanje komercijalnim uslovima i simulaciju industrijske proizvodnje bazirane na bioprocenom rešenju definisanom u prethodnim koracima optimizacije (Montesinos, 2003). Skaliranje tehnologije proizvodnje agenasa biološke kontrole do industrijskog nivoa je jedan od vodećih izazova kreiranja bioprocenog rešenja. Uspešan transfer tehnologije sa laboratorijske na višu skalu koja će omogućiti komercijalizaciju preparata je odlučujući aspekt proizvodnje koji će definisati budućnost tržišta mikrobioloških biopesticida. Pored pomenutih istraživačkih faza, masovnoj proizvodnji agenasa biološke kontrole prethode dodatna ispitivanja u pogledu toksikoloških studija i biološke bezbednosti manipulacije preparatom (Montesinos, 2003).

Većina bakterijskih biokontrolnih agenasa, koji su dostupni na svetskom tržištu, kao aktivne komponente sadrže ćelije ili proizvode metabolizma predstavnika roda *Bacillus*. Trenutno dominantnu ulogu bakterijskog biopesticida zauzima soj *Bacillus thuringensis*, sa gotovo 90% učešća u ukupnom broju dostupnih preparata (Kumar i Singh, 2015). Uspešna aplikacija proizvoda na bazi drugih predstavnika ovog roda potvrđuje značaj njihovog potencijala za antagonističko delovanje prema širokom spektru fitopatogenih izolata. Pored *Bacillus* spp., drugi sojevi bakterija od značaja za biološku kontrolu predstavljaju određene vrste rodova *Streptomyces* i *Pseudomonas* (Alizadeh i sar., 2020). U tabeli 3.4.3 nalazi se lista trenutno dostupnih komercijalnih preparata za zaštitu bilja baziranih na *Bacillus* vrstama.

Tabela 3.4.3. Komercijalno dostupni preparati za zaštitu bilja na svetskom tržištu, na bazi *Bacillus* spp. (Cawoy i sar., 2011).

Komercijalni naziv proizvođača	Aktivna materija	Mehanizam delovanja	Spektar delovanja	Usev/zasad	Kompanija
Avogreen®	<i>Bacillus subtilis</i>	antibioza®	<i>Colletotrichum gloeosporoides</i> ®	Avokado	Ocean Agriculture
Bacillus SPP®	<i>Bacillus</i> spp.	antibioza	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> ., <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> , <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Više useva	Bio Insumos Nativa Ltd.
Ballad®	<i>Bacillus pumilus</i>	antibioza, kompeticija, promocija rasta, indukcija sistemske rezistencije	<i>Rhizoctonia oryzae</i> , <i>Puccinia</i> spp., <i>Uromyces betae</i> , <i>Puccinia sorghii</i> , <i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Peronospora manshurica</i> , <i>Erysiphe graminis</i> , <i>Erysiphe betae</i> , <i>Erysiphe polygoni</i> , <i>Cercospora</i> , <i>Cercospora beticola</i> , <i>Entyloma</i> , <i>Dreschlera</i> , <i>Exserohilum turcicum</i> , <i>Helminthosporium</i> , <i>Bipolaris maydis</i> , <i>Cochliobolus heterostrophus</i> , <i>Ceratobasidium</i> , <i>Ramularia</i> , <i>Xanthomonas</i> spp., <i>Phakopsora</i> , <i>pachyrhizi</i> , <i>Septoria glycines</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Žitarice, uljarice, šećerna repa	AgraQuest Inc
Bio safe®	<i>Bacillus subtilis</i>	antibioza	Lisna pegavost	Soja, pamuk, pasulj	Lab. Biocontrol Farroupilha
Biosubtilin	<i>Bacillus subtilis</i>	antibioza, kompeticija	<i>Fusarium</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Cercospora</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Ascochyta</i> , <i>Macrophomina</i> , <i>Myrothecium</i> , <i>Ramularia</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Erysiphe polygoni</i>	Pamuk, žitarice, povrtarski usevi, ukrasne biljke	Biotech International Ltd.
Botrybel	<i>Bacillus velezensis</i>		<i>Botrytis cinerea</i>	Paradajz, kupus, paprika, grejp, jagode, povrtarske kulture	Agricaldes
Cease®	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Xanthomonas</i>	Veći broj useva	BioWorks Inc
Companion®	<i>Bacillus subtilis</i>	Antibioza, kompeticija, promocija rasta, indukcija sistemske rezistencije	<i>Aspergillus</i> , <i>Golovinomyces cichoracearum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium nivale</i> , <i>Magnaporthe poae</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerospora graminicola</i> , <i>Sclerotinia minor</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Colletotrichum orbicularis</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Didymella bryoniae</i> , <i>Erwinia carotovora</i> , <i>Erwinia tracheiphila</i> , <i>Plasmiodiophorabraceae</i> , <i>Podosphaera xanthi</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Xanthomonas campestris</i>	Pamuk, pasulj, grašak, soja, kukuruz i druge	Growth Products Ltd

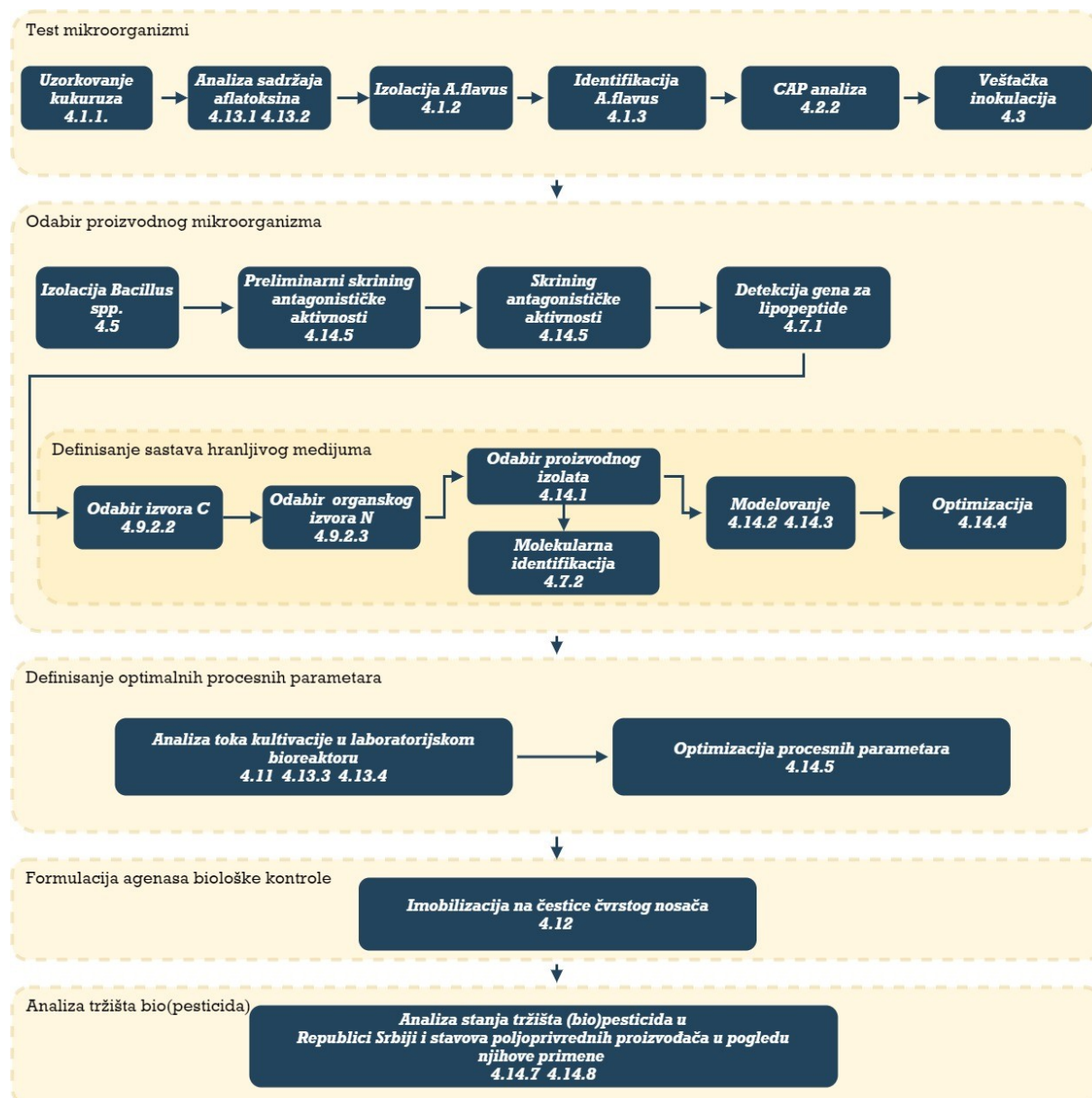
Komercialni naziv proizvoda	Aktivna materija	Mehanizam delovanja	Spektar delovanja	Usev/zasad	Kompanija
EcoGuard™ Biofungicide	<i>Bacillus licheniformis</i>	antibioza, enzimi	<i>Colletotrichum, Graminicola, Sclerotinia homeocarpa</i>	Trave	Novozymes A/S, Novozymes
EcoShot	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>B. cinerea</i>	Grejfrut, citrusi, povrtnarske kulture, leguminoze i druge	Kumiai Chemical Industry
FZB24® WG, li, TB	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Rhizoctonia, Fusarium</i>	Pamuk	Gustafson Inc.
Rhapsody®	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Colletotrichum spp, Erwinia, Pseudomonas, Xanthomonas, Cercospora, Entomospodium, Helminthosporium, Myrothecium septoria, Diplocarpon rosea, B. cinerea, Peronospora spp, Alternaria, Erysiphe, Oidium, Podosphaera, Sphaerotheca, V. inaequalis, R. solani, Pythium, Fusarium, Phytophthora, Sclerotinia homeocarpa, Pyricularia grisea, Rhizoctonia, Pythium, Fusarium, Phytophthora</i>	Trave, ukrasne biljke	AgraQuest Inc
Rhizo Plus®	<i>Bacillus subtilis</i> FZB24		Zemljišni patogeni	Baštenske biljke	ABITEP GmbH
Rhizo Vital® 42 li, Rhizo Vital 42 TB	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		Zemljišni patogeni	Paradajz, kukuruz, jagode, krompir, krastavac, ukrasne biljke	ABITEP GmbH
Serenade®	<i>Bacillus subtilis</i>	antibioza	<i>B. cinerea, Botrytis, cinerea, Mycosphaeraella fijiensis, Alternaria solani, Phytophthora infestans, Leveillula taurica, Oidiopsis taurica, Erysiphe chichoracearum, Erysiphe spp., Sphaerothecamacularis, Sphaerotheca spp, Podosphaera clandestina, Podosphaera leucotricha, Uncinula necator, Bremia lactucae, Peronospora spp, Cercospora spp, Botrytis spp, Venturia spp, Sclerotinia spp, Xanthomonas spp, Xanthomonas campestris, Erwinia amylovora, Colletotrichum, Sclerotinia sclerotiorum</i>	Grejfrut, jabuka, kruška, banana, višnja, kikiriki, orah, paradajz, paprika, mango, pasulj, beli luk, crni luk, brokoli, šargarepa, krompir	AgraQuest Inc
Sonata®	<i>Bacillus pumilus</i>		<i>Oidiopsis taurica, Erysiphe spp, Erysiphe cichoracearum, Uncinula necator, Sphaerotheca spp, Sphaerothecamacularis, Podosphaera leucotricha, Alternaria solani, Phytophthora infestans, Peronosporaspa, Pseudoperonospora spp, Bremia lactucae</i>	Paradajz, krompir, grejp, jagoda, paprika, jabuka, kruška	AgraQuest Inc
Sublic®	<i>Bacillus sp</i>		<i>Botrytis, Rhizoctonia, Colletotrichum, Sclerotinia, Macrophomina, Phomopsis, Pythium</i>	Nekoliko useva	ELLEP Biotechnologies
Yield Shield®	<i>Bacillus pumilus</i>		<i>R. solani, Fusarium</i>	Soja	Bayer CropScience



Materijal i metode

4. Materijal i metode

Na slici 4.1.1 prikazan je šematski prikaz plana izvođenja eksperimenata u okviru doktorske disertacije, definisan u skladu s osnovnim i specifičnim ciljevima istraživanja. Na šemi su prikazane ključne eksperimentalne faze sa istaknutim potpoglavljima koja opisuju osnovne metode neophodne za njihovo izvođenje. Detaljna objašnjenja primenjenih materijala i metoda u okviru doktorske disertacije, nalaze se u nastavku ovog poglavlja.



Slika 4.1.1. Šematski prikaz plana izvođenja eksperimenata u okviru doktorske disertacije.

4.1. Izolacija i identifikacija test mikroorganizama

4.1.1. Izolacija *Aspergillus flavus* iz uzoraka kukuruza

Izolacija fitopatogenih sojeva vrste *Aspergillus flavus* vršena je iz uzoraka kukuruza uzgajanog tokom proizvodne 2019. godine na 18 različitih lokaliteta na teritoriji Republike Srbije (Pančevo, Užice, Loznica, Subotica, Valjevo, Sirig, Novi Sad, Bečej, Sombor, Maglič, Karavukovo, Nadalj, Kulpin, Sivac, Sabanta, Štitar, Lepojević, Rogojevac), odnosno 2020. godine na 10 različitih lokaliteta na teritoriji Republike Srbije (Rumenka, Oparić, Kuzmin, Lepojević, Martinci, Krušedol, Valjevo, Beška, Bečej, Sombor). Uzorkovanje je vršeno na uskladištenom kukuruzu, u silosima ili u skladištima u okviru domaćinstava, pomoću sonde za uzorkovanje. Prilikom uzorkovanja, formirani su prosečni uzorci koji oslikavaju stanje čitave količine uskladištenog kukuruza. Uzorci su po dospevanju u laboratoriju samleveni, spakovani u papirne kese i uskladišteni na 4 °C do momenta izolacije.

Postupak izolacije je podrazumevao suspedovanje 5 g uzorka mlevenog kukuruza u 25 ml sterilne destilovane vode. Pripremljena suspenzija inkubirana je na horizontalnoj tresilici (Benchtop Shaking Incubator 222DS, Labnet International, Inc, Edison, SAD) pri 175 o/min u trajanju od 20 minuta. Usledilo je zasejavanje 100 µl supernatanta na specijalnu podlogu za izolaciju vrste *Aspergillus flavus*, *Clean up* medijum sledećeg sastava: 3,0 g saharoze, 3,0 g NaNO₃, 0,75 g KH₂PO₄, 0,3 g K₂HPO₄, 0,5 g MgSO₄·7H₂O, 0,5 g KCl, 10,0 g NaCl, 20 g *Bacto* agara, rastvor mikronutrijenata (1 ml A&M), 5 mg/ml *Rose Bengal* ekstrakta, 1 mg/ml dihlorana, 10 mg/ml hloramfenikola i 10 mg/ml streptomicina (Cotty, 1994)^b. Supernatant je ravnomerno dispergovan po površini podloge pomoću sterilne Drigalski špatule. Izolacija je vršena u tri ponavljanja, a inkubacija je trajala tri dana na 31 °C.

Nakon perioda inkubacije izvršen je pregled i utvrđen ukupan broj formiranih kolonija vrste *Aspergillus flavus*. U slučaju da je broj formiranih kolonija bio deset ili manji, izvršeno je presejavanje nežnim dodiranjem konidiofore, pojedinačne diskretne kolonije, pomoću sterilne bakteriološke igle, i prenošenjem na središte prethodno pripremljene 5-2 podloge (5% soka paradajza, 2% agara na 1000 ml destilovane vode, pH 5,2) (Cotty, 1989). Inkubacija je trajala od sedam do deset dana na 31 °C. Iz razvijenih kolonija gljiva, pripremljena je vodena kultura izolata, sačinjena od pet do šest isečaka podloge prečnika 3 mm na kojoj je plesan sporulisala i 1,5 ml sterilne destilovane vode u Ependorf kiveti.

Vodene kulture izolata su uskladištene na temperaturi 20–22 °C i deo su trajne kolekcije Laboratorije za detekciju patogena, štetočina i korova Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu.

Spisak izolata formirane kolekcije sa istaknutim lokalitetima na kojima je vršeno uzorkovanje, prikazan je u tabeli 8.1.1 koja se nalazi u Prilogu 1.

4.1.2. Monosporijalna izolacija *Aspergillus flavus*

Monosporijalni izolati korišćeni u daljem radu, dobijeni su pripremom serije razređenja susenzije spora izolata kultivisanih na 5-2 podlozi u trajanju od sedam do deset dana na 31 °C. Suspenzije razblaženja od 10^{-5} to 10^{-8} zasejavane su (100 µl) na podlogu 1% maltozni agar (HiMedia Laboratories, Mumbai, Indija) i inkubirane u trajanju 24–48 h. Pri pojavi prvih diskretnih zvezdastih kolonija (do deset) izvršeno je presejavanje pojedinačnih kolonija metodom uboda na 5-2 podlogu. Nakon inkubacije u trajanju od sedam do deset dana na 31 °C, i razvoja pravilnih pojedinačnih kolonija, pripremljena je vodena kultura monosporijalnih izolata po istom postupku opisanom u potpoglavlju 4.1.1.

4.1.3. Identifikacija *Aspergillus flavus* na osnovu morfoloških karakteristika

Identifikacija sojeva *Aspergillus* spp. izolovanih iz odabranih uzoraka kukuruza sakupljenih tokom proizvodne 2019. godine do nivoa vrste, vršena je na osnovu makromorfoloških i mikromorfoloških svojstava izolata. Observacija morfoloških svojstva monosporijalnih izolata vršena je nakon zasejavanja sojeva na 5-2 podlogu.

Od makromorfoloških svojstava posmatrane su boja, izgled i struktura kolonija, pigmentacija podloge i brzina rasta micelije. U pogledu mikromorfoloških karakteristika proučavani su izgled i oblik konidiofora, konidija, vezikula i fialida, prisustvo ili odsustvo metula, nazubljenost površinskog zida i oblik spora, obrazovanje i rast sklerocija.

4.2. Izolacija genomske DNK i molekularne analize primenom test mikroorganizama

4.2.1. Izolacija genomske DNK *Aspergillus flavus*

Monosporijalni izolati starosti osam do deset dana, kultivisani na 31 °C upotrebljeni su za sprovođenje dalje molekularne analize. Ispitivanju genetskog potencijala izolovanih sojeva za produkciju aflatoksina prethodila je izolacija genomske DNK. Prečišćeni uzorci DNK korišćeni su kao matrica za amplifikaciju u multipleks PCR reakcijama prilikom izvođenja analize CAP (engl. *Cluster Amplification Patterns, CAP*).

Genomska DNK je izolovana po modifikovanom protokulu cetil-3-metil-amonijum-bromid (CTAB) metode (Padmalatha i Prasad, 2006):

- U rashlađene avane (avani su držani u ledenom kupatilu) stavljeno je po 1,5 µl CTAB ekstrakcionog pufera, zatim dodati 20 µl proteinaze K i dodata micelija koja je skinuta sa podloge;
- Macerirano je dok nije dobijena homogena smeša;
- Maceriran materijal prebačen je u sterilne kivete od 1,5 µl;
- Izmešano je na vorteksu i inkubirano 45 min na 65 °C (i tokom inkubiranja izmešano 1–2 puta);
- Dodato je 20 µl RnazeA (10 mg/ml), izmešano na vorteksu i inkubirano 10 min na 65 °C;
- Centrifugirano 15 minuta na 14000 o/min;
- Supernatant (650 µl) je prenet u novu kivetu i dodata je ista zapremina hloroforma (650 µl), mešano je 30 sekundi na vorteksu;
- Centrifugirano je 15 min na 14000 o/min dok nije došlo do razdvajanja faza;
- Prebačeno je 500 µl supernatanta (gornji bistri sloj) u novu kivetu i dodato 500 µl hloroforma, izmešano na vorteksu 30 s, centrifugirano 10 min na 14000 o/min;
- Supernatant (350 µl) je prenet u novu kivetu i dodato je 2 volumena (700 µl) CTAB pufera za precipitaciju, blago izmešano (okretanjem gore-dole);
- Inkubirano je 60 min na sobnoj temperaturi;
- Centrifugirano je 10 min na 14000 o/min;
- Odbačen je supernatant (odlivanjem, skoro do kraja, ostavljeno malo tečnosti), talog rastvoren u 350 µl NaCl (1,2 M);
- Dodato je 350 µl hloroforma i mešano 30 sekundi na vorteksu, a potom centrifugirano 10 min na 14000 o/min;

- Prenet je gornji sloj u novu kivetu (ako ima 300 μl) i dodato 60% prenete zapremine izopropanola (180 μl), izmešano okretanjem kivete gore-dole nekoliko puta);
- Centrifugirano 10 min na 14000 o/min;
- Odbačen je gornji sloj (izlivanjem iz kivetice, ali ne u potpunosti, ostavljeno malo tečnosti na dnu), talog ispran dodavanjem 500 μl 70% etanola (uočena DNK u vidu pahulje nakon što je kivetica promućkana i okrenuta ka svetlosti);
- Pažljivo je izrotirano nekoliko puta i centrifugirano 10 min na 14000 o/min;
- Odličen je supernatant (DNK je istaložena na dnu kivete), talog ostavljen da se osuši na sobnoj temperaturi najmanje 30 min;
- Talog je rastvoren u 15–20 μl vode;
- Izolovana DNK čuvana je na temperaturi na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ duži period.

4.2.2. Detekcija delecija u okviru klastera gena za biosintezu aflatoksina - CAP (*Cluster Amplification Patterns*)

CAP analiza (engl. *Cluster amplification pattern markers*, CAP) bazirana je na izvođenju četiri multipleks PCR reakcije. Program izvođenja multipleks PCR reakcija prikazan je u tabeli 4.2.1. PCR reakcije su izvedene u reakcionoj smeši zapremine 10 μl , upotrebom 6 ng DNK, 0,08 μmol svakog od prajmera (tabela 4.2.2) i master miks (SuperHot MasterMix 2x, Bioron, Nemačka) na PCR uređaju (Surecycler 8800 Thermocycler, Agilent Technologies, Santa Klara, Kalifornija, SAD).

Tabela 4.2.1. Uslovi izvođenja multipleks PCR reakcija za CAP (engl. *Cluster amplification pattern markers*, CAP) analizu.

Inicijalna denaturacija		94 $^{\circ}\text{C}$, 1 min
30 ciklusa	Denaturacija	94 $^{\circ}\text{C}$, 1 min
	Hibridizacija prajmera	62 $^{\circ}\text{C}$, 90 s
	Elongacija	72 $^{\circ}\text{C}$, 90 s
Finalna elongacija		72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min

Tabela 4.2.2. Lista prajmera korišćenih u četiri multipleks PCR reakcije CAP (*Cluster amplification pattern markers*) analize.

	Prajmer	Sekvenca <i>forward</i> prajmera (5'-3')	Sekvenca <i>reverse</i> prajmera (5'-3')	Veličina produkta
1	SC01	ATACCTCATGATCTGGTGCACGG	CCTTCGCAGCGACAATGATACGTC	883
	IC01	GTCCCCAGGTACGATAGGTCTCT	GCTGGATATTCCAAGGAGTGGCT	742
	AC01	GACTGCCACCCTATCACTCTTCC	TGGCTCGACTGGGTATGAAATCC	613
	AC02	GCATTGCCAGCATCGGTTTCATA	AGGCAGACCGTACTAAGTGATGC	487
	AC03	CATGATGGAGCATGACATTCGGC	GCGCCACCATATCTTCTCAGTCT	387
	AC04	TTTAACCCCTTCAYGCCTCGAACT	TGCGTARCTAATCTCATCGGGTT	297
	AC05	TGCTGAGCGAGTAGGTAGTAGGT	CCGGATCATCCCTCCAAATCTGT	194
	iac	GCTAGGGCGGGTTCACGTTTTGCG	GGCGTTGTTTAAGGGGAACCGACCC	115
2	AC06	CCTGTGAGGGACACAAAGACACT	AAGAATAGCGGTGACATCCAGCA	1427
	AC07	GAGGACAGGTTGTGTTGCTGTTG	GTTACGAGCTATCCTCAGCCAT	1092
	AC08	GAAGTGAAGCCATTTCCATCAGCG	GTCTTGTACAGGGAACGTGGTGA	897
	AC09	AACGCTTCAACGTGGAGGACATA	AATAGCGTTGGCGTTGAAGTCAC	736
	AC10	CCCGCATTTTTCTCGATCCCTTG	GCGACGACCAGTCATTATGAAGC	633
	AC11	CCCGCATTTTTCTCGATCCCTTG	GCGACGACCAGTCATTATGAAGC	536
	AC12	CCCCTCAACTTCTGTCTGTCCTAC	GCTGGGTAGCGAACAATCCAATG	425
	AC13	GCACACAGCAGAGGCATTTCTAC	AATCTATCTAGCCATCGCCACCG	330
	iac	GCTAGGGCGGGTTCACGTTTTGCG	GGCGTTGTTTAAGGGGAACCGACCC	115
	3	CC01	GACACTCGTACCATCTATGCACC	GATCCCTGATCCATTCCACCTTG
CC02		ACGATACGAGCTTTAGTGCAAGG	GATATAGACCTCAGGGTCGAGCA	925
CC03		AGAGCTGCGCACTCCATTT	TGCCCAGGCAATAGGAAGTA	821
CC04		ACCTCAACAATTACACCGGATGG	GTTGTAGCTCAACGTCACTAGCA	648
ST01		TATCTATCTGGGATACGGGCTGG	TATGCCGTTGCTATCCAATGAGG	521
ST02		AAGTCAGATTCCGCGGTATGAAG	TCATCGCATTAAATCGAGGCAGTT	416
ST03		CCTCCTGCACAAAATACTCCCA	GATCAGATCTTTGAGCGTAGCGT	320
ST04		TCATGTTTTCGGATCGGAGATTGG	TCATGTTTTCGGATCGGAGATTGG	234
iac		GCTAGGGCGGGTTCACGTTTTGCG	GGCGTTGTTTAAGGGGAACCGACCC	115
4		ST05	ACTGGTGTGGATAGAGCTCAGA	TGGAAGGTTCTCCGGATACTTGA
	ST06	TACTCCGTTGCTGTCATTGGATG	CGAATTCTTGTTGAGCAGCTTG	782
	ST07	TGCTGAATAACAACCTCGACCAG	CAGGCTGGTATAGCACCAATGTT	684
	ST08	GTTTTCGTCTTGCCCTTCTTCTCA	AGCAAAGTGATGCCGTTCAAATG	584
	ST09	CGTACTTTGTTACGGCGTACATC	GCTGTTTTCGCGTTAGTTGGTAAC	512
	ST10	GCCCGTAAATGAGGTGCAGATAA	TTTGGGTGTGCTTCTTCATGCTA	404
	ST11	GGGGACTTAGTCGCGAATGGTTA	TATGAAGGCCACCAACTGAGGAC	285
	ST12	AATGACGACACTTGAGGCACAG	TCGGCTCCGTGACACCATATTA	185
	iac	GCTAGGGCGGGTTCACGTTTTGCG	GGCGTTGTTTAAGGGGAACCGACCC	115

4.3. Procena aflatoksigenog potencijala *Aspergillus flavus* veštačkom inokulacijom

Veštačka inokulacija zdravih, neoštećenih, sterilnih zrna kukuruza je izvršena prema delimično modifikovanoj metodi autora Probst i Cotty, 2012. Ukupno 100 g zrna kukuruza je smešteno u staklene posude zapremine 1 l sa perforiranim poklopcem. Vlažnost zrna je izmerena i podešena na 25% dodavanjem destilovane vode. Zrna su prilikom ovog postupka energično protresana kako bi upila vlagu, a potom su sterilisana autoklaviranjem u trajanju od 20 min na 121 °C i pritisku 2,1 bar. Za pripremu inokuluma upotrebljene su kulture vrste *Aspergillus flavus* stare šest dana, kultivisane na 5-2 podlozi. Sterilisan, prohladen kukuruz je inokulisan primenom 2 ml suspenzije koncentracije 10^5 spora/ml i inkubiran pet do sedam dana na 30 °C.

4.4. Izolati *Aspergillus flavus* kroz faze istraživanja

Tokom inicijalne faze skrininga antagonističke aktivnosti 76 novoizolovanih sojeva *Bacillus* spp. iz rizosfere povrtarskih biljnih vrsta korišćen je aflatoksigeni soj *Aspergillus flavus* SA2BSS izolovan sa kukuruza uzgajanog tokom 2019. godine na lokaciji Sabanta.

Sledeća faza skrininga potencijala novoizolovanih sojeva *Bacillus* spp. za antimikrobno delovanje podrazumevala je primenu ukupno 36 sojeva izolovanih sa kukuruza uzgajanog na teritoriji Republike Srbije, uzorkovanog na 18 lokaliteta tokom 2019. godine. Spisak lokacija na kojima je vršeno uzorkovanje dat je u tabeli 8.1.1 u Prilogu 1.

U narednim fazama istraživanja, uključujući optimizaciju sastava hranljivog medijuma, kao i izvođenje kultivacije na nivou laboratorijskog bioreaktora, odnosno optimizaciju procesnih uslova, ispitivanje mogućnosti formulacije preparata imobilizacijom na čvrste nosače korišćena su dva, dokazano aflatoksigena soja, *Aspergillus flavus* SA2BSS i *Aspergillus flavus* PA2DSS, izolovana sa kukuruza uzgajanog tokom 2019. godine na lokacijama Sabanta i Pančevo, redom.

4.5. Izolacija potencijalnih proizvodnih sojeva

Tokom 2020. godine izvršeno je uzorkovanje zemljišta iz sloja rizosfere različitih biljnih vrsta sa nekoliko lokaliteta na teritoriji Autonomne Pokrajine Vojvodine. Uzorci zemljišta čuvani su u sterilnim uslovima na +4 °C do upotrebe.

Ukupno 76 proizvodnih sojeva bakterija izolovano je iz rizosfere 12 biljnih vrsta: luk, pasulj, grašak, boranija, paradajz, cvekla, krompir, kupus, paprika, šargarepa, paštrnak i krastavac. Postupak selektivne izolacije sojeva podrazumevao je predtretman u pogledu definisanja selektivnih uslova inkubacije. Prvi korak obuhvatao je resuspendovanje 1 g uzorkovanog zemljišta u 9 ml sterilnog fiziološkog rastvora i inkubaciju na 28 °C 15 min uz eksterno mešanje na laboratorijskoj tresilici (KS 4000i control, IKA® Werke, Staufen, Nemačka), 150 o/min. Nakon homogenizacije, sa ciljem izdvajanja sporogenih vrsta, usledio je termički tretman na temperaturi 100 °C, u trajanju od 7 min. Pripremljena je serija razblaženja od 10^{-1} do 10^{-3} , od kojih je po 500 μ l zasejavano na ploče sa Hranljivim agarom i inkubirano na 28 °C tokom 48 h. Uzastopno presejavanje na nove ploče sa hranljivim agarom, morfološki različitih sojeva koji ukazuju na pripadnost rodu *Bacillus*, vršeno je do dobijanja čistih kultura.

4.6. Potencijalni proizvodni mikroorganizmi *Bacillus* spp.

Tokom faze inicijalnog skrininga antagonističke aktivnosti, korišćeno je ukupno 76 novoizolovanih sojeva *Bacillus* spp. Za potrebe izvođenja genetske karakterizacije potencijalnih proizvodnih sojeva korišćeno je pet izolata: Mahunarke 1a i Mahunarke 1b, Krompir 4a, Šargarepa 3a i Paradajz 3, dok je tokom početnih koraka optimizacije sastava hranljivog medijuma ispitivanje vršeno primenom tri izolata: Mahunarke 1a i Mahunarke 1b, Krompir 4a. U daljem toku istraživanja kao proizvodni mikroorganizam primenjivan je izolat koji je na osnovu rezultata prethodnih koraka selekcije okarakterisan kao soj sa najvećim potencijalom, Mahunarke 1a. Odabrani proizvodni mikroorganizam, *Bacillus* sp. BioSol021, izolovan je iz rizosfere biljne vrste *Phaseolus vulgaris* na lokaciji Tovariševo, Autonomna Pokrajina Vojvodina. Proizvodni mikroorganizam je deponovan u Međunarodnoj zbirci poljoprivrednih i industrijskih mikroorganizama (engl. *National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms*, NCAIM), Institut za prehrambene tehnologije, Mađarski univerzitet za poljoprivredu i prirodne nauke, Budimpešta, Mađarska.

4.7. Izolacija genomske DNK i molekularne analize *Bacillus* spp.

Fazi genetske karakterizacije potencijalnih proizvodnih izolata i molekularnoj identifikaciji odabranog soja prethodila je izolacija genomske DNK primenom komercijalnog kita (PureLink Genomic DNA kit, Thermo Fisher Scientific, Valtam, Masačusets, SAD) koja je izvedena po uputstvima proizvođača.

4.7.1. Detekcija gena za produkciju lipopeptidnih komponenti sa antimikrobnim delovanjem

Izolovana genomska DNK korišćena je kao matrica za amplifikaciju sekvenci gena koji kodiraju sintezu lipopeptidnih komponenti primenom specifičnih parova prajmera navedenih u tabeli 4.7.1.

Tabela 4.7.1. Lista prajmera korišćenih za detekciju gena odgovornih za sintezu lipopeptidnih komponenti sa antimikrobnim delovanjem.

Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera (5'-3')	Gen	Očekivana veličina produkta (bp)
SRFAF	TCGGGACAGGAAGACATCAT	<i>srfAA</i>	201
SRFAR	CCACTCAAACGGATAATCCTGA		
FENDF	GGCCCGTTCTCTAAATCCAT	<i>fenD</i>	269
FENDR	GTCATGCTGACGAGAGCAAA		
ITUD-F1	TTGAAYGTCAGYGCSCCTTT	<i>ituD</i>	1203
ITUD-R1	TGCGMAAATAATGGSGTCGT		
ITUD1F	GATGCGATCTCCTTGGATGT		
ITUD1R	ATCGTCATGTGCTGCTTGAG	<i>ituA</i>	647
BACA-F	TGAAACAAAGGCATATGCTC	<i>bacA</i>	482
BACA-R	AAAAATGCATCTGCCGTTCC		
BACD-F1	TTGAAYGTCAGYGCSCCTTT	<i>bacD</i>	875
BACD-R1	TGCGMAAATAATGGSGTCGT		

Metoda lančane reakcije polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) izvedena je primenom PCR uređaja (Surecycler 8800 Thermocycler, Agilent Technologies, Santa Klara, Kalifornija, SAD) i sledećeg sastava PCR smeše ukupne zapremine 50 μ l: 2 μ l genomske DNK, 1 μ l *forward* prajmera, 1 μ l *reverse* prajmera, 25 μ l master miksa (AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix - Thermo Fisher Scientific, Valtam, Masačusets, SAD), 21 μ l vode (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen, Valtam, Masačusets, SAD). Program izvođenja PCR reakcija definisan je u tabeli 4.7.2.

Tabela 4.7.2. Uslovi izvođenja PCR reakcija za amplifikaciju gena odgovornih za produkciju lipopeptidnih komponenti sa antimikrobnim delovanjem.

Prajmeri	Uslovi PCR reakcije			
	Denaturacija	Hibridizacija prajmera	Elongacija	Broj ciklusa
SRFAF SRFAR	95 °C, 30 s	46,8–58,8 °C, 30 s	72 °C, 1min	30
FENDF FENDR	95 °C, 30 s	46,3–58,3 °C, 30 s	72 °C, 1min	30
ITUD-F1 ITUD-R1	95 °C, 1 min	52 °C, 1 min	72 °C, 1,5 min	40
ITUD1F ITUD1R	95 °C, 30 s	46,3–58,3 °C, 30 s	72 °C, 1min	30
BACA-F BACA-R	95 °C, 30 s	43,2–55,2 °C, 30 s	72 °C, 1min	30
BACD-F1 BACD-R1	95 °C, 1 min	52 °C, 1 min	72 °C, 1,5 min	40

Inicijalna denaturacija odvijala se na 95 °C u trajanju od 2 min.

Finalna elongacija odvijala se na 72 °C. u trajanju od 8 min.

4.7.2. Analiza sekvence 16 S rRNK regiona proizvodnog soja *Bacillus sp.*

Izolovana genomska DNK korišćena je kao matrica za amplifikaciju sekvence 16 S rRNK regiona primenom univerzalnog para prajmera 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') i 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

PCR metoda izvedena je primenom PCR uređaja (Surecycler 8800 Thermocycler, Agilent Technologies, Santa Klara, Kalifornija, SAD) i sledećeg sastava PCR smeše ukupne zapremine 50 µl: 2 µl genomske DNK, 1 µl *forward* prajmera, 1 µl *reverse* prajmera, 25 µl Master miksa (AmpliTaQ Gold™ 360 Master Mix - Thermo Fisher Scientific, Valtam, Masačusets, SAD), 21 µl vode (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen, Valtam, Masačusets, SAD).. Program izvođenja reakcije definisan je u tabeli 4.7.3

Tabela 4.7.3. Uslovi izvođenja PCR reakcije za amplifikaciju 16 S rRNK regiona.

Inicijalna denaturacija		95 °C, 2 min
30 ciklusa	Denaturacija	95 °C, 30 s
	Hibridizacija prajmera	38,5–50,5 °C, 30 s
	Elongacija	72 °C, 1 min, 24 s
Finalna elongacija		72 °C, 8 min

Amplifikovani fragmenti DNK sekvencirani su u oba smera (Macrogen Europe, Amsterdam, Holandija) korišćenjem istih prajmera koji su upotrebljeni u fazi umnožavanja. Dobijeni hromatogrami su vizualizovani korišćenjem softvera FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Inc., Sijetl, Vašington, SAD; <http://www.geospiza.com>). Sekvence (*forward* i *reverse*) su potom obrađene primenom softverskog paketa MEGA 7 (Kumar i sar., 2016), i određena je konsenzus sekvenca ukupne dužine 1416 bp.

Primenom programa BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*, BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) dobijena sekvenca je upoređivana sa deponovanim sekvencama dostupnim u bazi podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

Filogenetska analiza izvršena je korišćenjem dobijene sekvence proizvodnog mikroorganizma i 16S rRNK regiona srodnih *Bacillus* sojeva primenom softvera MEGA 7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, Penn State University, State College, Pensilvanija, SAD) (Kumar i sar., 2016). Prilikom konstrukcije filogenetskog stabla korišćena je metoda maksimalne verovatnoće (*Maximum Likelihood*) sa *bootstrap* analizom u 1000 ponavljanja. Pored toga, za konstrukciju filogenetskog stabla korišćena je i sekvenca 16s rRNK *Streptomyces albidoflavus* kao *outgroup* mikroorganizam.

4.7.3. Horizontalna gel elektroforeza amplifikovanih produkata PCR reakcija

Analiza amplifikovanih produkata PCR reakcije uključujući genomsku DNK, region 16S rRNK, fragmente gena odgovornih za produkciju lipopeptidnih komponenti, fragmente gena u okviru klastera za biosintezu aflatoksina, vršena je primenom horizontalne gel elektroforeze. Agarozni gel pripremljen je rastvaranjem agaroze (Sigma-Aldrich, Misuri, SAD) u puferu natrijum-borata, 1 x SB (engl. *Sodium Borate Buffer*) (Brody i Kern, 2004). Koncentracija gela u slučaju elektroforetskog razdvajanja uzoraka genomske DNK i amplikona 16S rRNK regiona iznosila je 1%, dok je za gene odgovorne za produkciju lipopeptida, odnosno biosintezu aflatoksina iznosila 1,5% i 1,4%, redom. Vizualizacija fragmenata DNK omogućena je dodatkom 10 µl etidijum-bromida koncentracije 0,5 µg/ml. Elektroforeza je vršena u puferu natrijum-borata, 1 x SB puferu, pri konstantnom naponu 10 V/cm, na sobnoj temperaturi. Veličina amplifikovanih fragmenata DNK definisana je upoređivanjem sa DNK standardima GeneRuler DNA Ladder 100 bp i GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (ThermoFisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD).

4.8. Čuvanje i osvežavanje proizvodnih i test mikroorganizama

4.8.1. Čuvanje mikroorganizama

Potencijalni proizvodni i odabrani proizvodni mikroorganizam *Bacillus* spp. čuvaju se na komercijalnoj sintetičkoj polučvrstoj hranljivoj podlozi Hranljivi agar (HiMedia Laboratories, Mumbai, Indija). Izolovani sojevi čuvaju se na 4 °C u zbirci kultura Laboratorije za biohemijsko inženjerstvo Tehnološkog fakulteta Novi Sad, Univerziteta u Novom Sadu.

Test mikroorganizmi vrste *Aspergillus flavus* čuvaju se u formi vodene kulture izolata na temperaturi 20–22 °C kao deo trajne kolekcije Laboratorije za detekciju patogena, štetočina i korova Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu.

4.8.2. Osvežavanje mikroorganizama

Potencijalni proizvodni i odabrani proizvodni mikroorganizam osvežavani su presejavanjem na komercijalnu sintetičku polučvrstu hranljivu podlogu Hranljivi agar (HiMedia, Laboratories, Mumbai, Indija) i inkubacijom na temperaturi 28 °C u toku 48 h.

Radne kulture test mikroorganizama vrste *Aspergillus flavus* pripremljene su presejavanjem fitopatogenih izolata na polučvrstu 5-2 hranljivu podlogu (Cotty, 1989) i inkubacijom na temperaturi 30 °C, u mraku, tokom sedam dana.

4.9. Hranljive podloge

U okviru doktorske disertacije korišćene su različite hranljive podloge, uključujući sintetičke i polusintetičke, polučvrste i tečne odgovarajućeg sastava, u zavisnosti od faze eksperimentalnog istraživanja. Korekcija vrednosti pH polusintetičkih podloga vršena je dodatkom odgovarajućih kiselina i baza. Polučvrste hranljive podloge pripremane su kuvanjem na 100 °C u trajanju od 40 min radi potpunog rastvaranja agara. Hranljive podloge sterilisane su u autoklavu na 121 °C, pri pritisku 2,1 bar tokom 20 min.

4.9.1. Hranljive podloge u fazi pripreme inokuluma

U svim eskperimentalnim fazama istraživanja obuhvaćenim ovom doktorskom disertacijom, za pripremu inokuluma korišćena je tečna komercijalna sintetička hranljiva podloga, Hranljivi bujon (HiMedia Laboratories, Mumbai, Indija).

4.9.2. Hranljive podloge u fazama izvođenja kultivacije

4.9.2.1. Skrining potencijalnih proizvodnih izolata *Bacillus* spp.

Kultivacija potencijalnih proizvodnih izolata *Bacillus* spp. izvedena je primenom tečne komercijalne sintetičke podloge, Hranljivi bujon (HiMedia Laboratories, Mumbai, Indija).

4.9.2.2. Optimizacija hranljivog medijuma - odabir izvora ugljenika

Za izvođenje kultivacije proizvodnih izolata u eksperimentalnoj fazi odabira optimalnog izvora ugljenika korišćena je polusintetička hranljiva podloga sa različitim izvorima ugljenika:

- glicerol,
- skrob,
- maltoza,
- glukozna,
- laktoza,
- fruktoza,
- celuloza.

Sastav tečnih polusintetičkih podloga korišćenih u ovoj fazi istraživanja prikazan je u tabeli 4.9.1.

Tabela 4.9.1. Sastav hranljivih podloga za kultivaciju u eksperimentalnoj fazi odabira optimalnog izvora ugljenika za proizvodnju agenasa biološke kontrole.

Komponenta	Sadržaj [g/l]
Izvor ugljenika	10
Ekstrakt kvasca	3
(NH ₄) ₂ SO ₄	3
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3
Destilovana voda	do 1 l
pH 7,0±0,2	

4.9.2.3. Optimizacija hranljivog medijuma – odabir izvora azota

Za izvođenje kultivacije proizvodnih izolata u eksperimentalnoj fazi odabira optimalnog izvora azota korišćena je polusintetička hranljiva podloga sa celulozom odnosno fruktozom kao izvorom ugljenika i sledećim izvorima organskog azota:

- tripton,
- urea,
- glutaminska kiselina,
- pepton,
- ekstrakt kvasca.

Sastav tečnih polusintetičkih podloga korišćenih u ovoj fazi istraživanja prikazan je u tabeli 4.9.2.

Tabela 4.9.2. Sastav hranljivih podloga za kultivaciju u eksperimentalnoj fazi odabira optimalnog izvora organskog azota za proizvodnju agenasa biološke kontrole.

Komponenta	Sadržaj [g/l]
Izvor ugljenika (celuloza i fruktoza)	10
Izvor azota	3
(NH ₄) ₂ SO ₄	3
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3
Destilovana voda	do 1 l
pH 7,0±0,2	

4.9.2.4. Modelovanje i optimizacija kvantitativnog sastava hranljivog medijuma

Za generisanje eksperimentalnih podataka neophodnih za izvođenje faze modelovanja i optimizacije hranljive podloge na bazi odabranih optimalnih izvora ugljenika i organskog azota za kultivaciju determinisanog proizvodnog mikroorganizma korišćen je Boks-Benkenov (engl. *Box-Behnken*) eksperimentalni plan sa 4 nezavisne promenljive varirane na 3 nivoa, sa 3 ponavljanja u centralnoj tački (tabela 4.9.3).

Nezavisne promenljive i opsezi variranih vrednosti njihovih inicijalnih koncentracija su:

- celuloza (*Avicell*[®]): 5–35 g/l;
- urea: 0–5 g/l;
- amonijum-sulfat: 0 g/l–5 g/l;
- kalijum-hidrogenfosfat: 0,5–4,5 g/l.

Hranljive podloge za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma pripremljene su u skladu sa postavkom eksperimentalnog plana. U sastav svake podloge, pored navedenih komponenti obuhvaćenih eksperimentalnim planom, ulazila je jednaka količina MgSO₄·7H₂O koja je iznosila 0, 3 g/l.

Tabela 4.9.3. Nezavisne promenljive i njihove varirane vrednosti u okviru Boks-Benkenovog eksperimentalnog plana u fazi modelovanja i optimizacije sastava hranljivih podloga na bazi odabranog optimalnog izvora ugljenika i organskog azota za kultivaciju proizvodnog mikroorganizma.

Sadržaj celuloze (g/l)	Sadržaj uree (g/l)	Sadržaj (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)	Sadržaj K ₂ HPO ₄ (g/l)
5	0	2,5	2,5
35	0	2,5	2,5
5	5	2,5	2,5
35	5	2,5	2,5
20	2,5	0	0,5
20	2,5	5	0,5
20	2,5	0	4,5
20	2,5	5	4,5
5	2,5	2,5	0,5
35	2,5	2,5	0,5
5	2,5	2,5	4,5
35	2,5	2,5	4,5
20	0	0	2,5
20	5	0	2,5
20	0	5	2,5
20	5	5	2,5
5	2,5	0	2,5
35	2,5	0	2,5
5	2,5	5	2,5
35	2,5	5	2,5
20	0	2,5	0,5
20	5	2,5	0,5
20	0	2,5	4,5
20	5	2,5	4,5
20	2,5	2,5	2,5
20	2,5	2,5	2,5
20	2,5	2,5	2,5

4.9.2.5. Validacija optimizovanog sastava hranljivog medijuma

U fazi validacije optimizovanog kvalitativnog i kvantitativnog sastava hranljivog medijuma (tabela 4.9.4), izvođena je kultivacija u uvećanim razmerama, na nivou laboratorijskog bioreaktora ukupne zapremine 16 l (EDF – 15.4_1, A/S Biotehniskais centrs, Riga, Letonija).

Tabela 4.9.4. Sastav hranljivih podloga za kultivaciju u eskperimentalnoj fazi validacije optimizovanog kvalitativnog i kvantitativnog sastava hranljivog medijuma izvođenjem kultivacije na nivou laboratorijskog bioreaktora.

Komponenta	Sadržaj [g/l]
Celuloza	5
Urea	0
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,77
K ₂ HPO ₄	0,3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3
Destilovana voda	do 1 l
pH 7,0±0,2	

4.9.2.6. Optimizacija procesnih parametara proizvodnje u laboratorijskom bioreaktoru

U fazi istraživanja koja se odnosi na optimizaciju procesnih parametara, aeracije i mešanja, za proizvodnju agenasa biološke kontrole na nivou laboratorijskog bioreaktora ukupne zapremine 16 l (EDF – 15.4_1, A/S Biotehniskais centrs, Riga, Letonija) korišćena je hranljiva podloga optimalnog sastava definisanog u prethodnom koraku razvoja biotehnološkog rešenja.

4.9.2.7. Formulacija finalnog preparata imobilizacijom na čvrste nosače

U fazi istraživanja koja se odnosi na formulaciju finalnog preparata primenom čvrstog nosača, korišćena je hranljiva podloga optimalnog sastava definisanog u prethodnom koraku razvoja biotehnološkog rešenja.

4.10. Priprema inokuluma i inokulacija

Postupak inokulacije hranljivih podloga za kultivaciju u okviru eksperimentalnih faza istraživanja ove doktorske disertacije, podrazumevao je pripremu inokuluma u količini koja će omogućiti dodatak 10% (v/v) u odnosu na zapreminu hranljivog medijuma.

Tokom skrininga potencijalnih proizvodnih izolata *Bacillus* spp. kao i tokom faza odabira optimalnog izvora ugljenika i organskog azota inokulum je

pripreman u jednoj pasaži, zasejavanjem biomase osveženih mikroorganizama u 50 ml tečne komercijalne sintetičke podloge Hranljivi bujon (HiMedia Laboratories, Mumbaj, Indija) i inkubacijom tokom 48 h na 28 °C uz eksterno mešanje (150 o/min) na laboratorijskoj tresilici (KS 4000i control, IKA® Werke, Staufen, Nemačka) i spontanu aeraciju.

U daljim eksperimentalnim fazama gde je korišćen odabrani proizvodni izolat *Bacillus* sp. BioSol021 priprema inokuluma je tekla u dve faze, odnosno postupkom dvostrukog pasažiranja, radi generisanja dovoljne količine inokuluma za odvijanje bioprocasa u definisanim razmerama. Prvi korak podrazumevao je prenošenje biomase osveženog proizvodnog mikroorganizma u 50 ml tečne hranljive podloge hranljivi bujon (HiMedia Laboratories, Mumbaj, Indija) i inkubaciju tokom 24 h na 28 °C uz eksterno mešanje (150 o/min) na laboratorijskoj tresilici (KS 4000i control, IKA® Werke, Staufen, Nemačka) i spontanu aeraciju. Drugi korak je obuhvatao prenošenje inokuluma iz prve faze, u erlenmajer zapremine 500 ml sa 150 ml hranljive podloge Hranljivi bujon (HiMedia Laboratories, Mumbaj, Indija) i inkubaciju pod istim uslovima kao u prethodnom koraku. Inokulacija hranljivih podloga za kultivaciju odabranog proizvodnog izolata *Bacillus* sp. BioSol021 izvedena je dodatkom 10% (v/v) inokuluma u odnosu na ukupnu zapreminu hranljive podloge u fazi kultivacije.

4.1.1.1. Procesni uslovi tokom izvođenja kultivacije

U okviru eksperimentalnih faza istraživanja doktorske disertacije, kultivacija potencijalnih proizvodnih mikroorganizama i odabranog proizvodnog izolata, je izvođena pod različitim procesnim uslovima i razmerama proizvodnje. Uslovi pod kojima se odvijao bioproces u pojedinačnim eksperimentalnim fazama definisani su u tabeli 4.1.1.1.

Tabela 4.1.1.1. Procesni uslovi tokom izvođenja kultivacije u različitim eksperimentalnim fazama istraživanja.

Faza istraživanja	Temperatura (°C)	Mešanje (o/min)	Aeracija (vvm)	Trajanje bioprocasa (h)	Zapremina hranljive podloge (ml)
Skining potencijalnih proizvodnih izolata <i>Bacillus</i> spp.	28	180*	spontana	96	50
Optimizacija hranljive podloge - odabir izvora ugljenika i azota	28	180*	spontana	96	50
Optimizacija procesnih uslova - kultivacija u laboratorijskom bioreaktoru 16 l	28	interno 100–300	prinudna 0,5–1,5	96	10000
Priprema smeše kultivacione tečnosti i čvrstog nosača u fazi formulacije preparata	28	180*	spontana	96	30

*eksterno mešanje na laboratorijskoj tresilici (KS 4000i control, IKA® Werke, Staufen, Nemačka).

Kultivacija odabranog proizvodnog mikroorganizma *Bacillus* sp. BioSol021 u fazama optimizacije procesnih uslova, validacije optimizovane hranljive podloge i optimizacije procesnih uslova, kao i pripreme kultivacione tečnosti za fazu formulacije agenasa biološke kontrole vršena je u laboratorijskom bioreaktoru standardnih geometrijskih odnosa ukupne zapremine 16 l (EDF – 15.4_1, A/S Biotehniskais centrs, Riga, Letonija). Radna zapremina je maksimalnih 70% u odnosu na ukupnu zapreminu suda, a za potrebe istraživanja u okviru ove doktorske disertacije iznosila je 1 l. Interno mešanje je vršeno primenom tri koaksijalno postavljene Ruštonove turbine sa šest propelera, u staklenom sudu sa tri odbojnika. Odnos prečnika mešača i prečnika suda iznosi 0,30. Aeracija je vršena vazduhom koji je sterilisan neposredno pred uvođenje u sud bioreaktora primenom filtera prečnika pora 0,22 µm brzinom izraženom u vvm (*volume of air per volume of liquid per min* –

zapremina vazduha po zapremini tečnosti u min) jedinicama, zadatom vrednošću protoka na rotametu upravljačke jedinice uređaja.

Tokom kultivacije praćena je temperatura primenom senzora (TP-206-CF-H1141-L450, Hans Turck GmbH & Co., Milhajn, Nemaćka), nivo saturacije kiseonika primenom elektrode (OxyFerm FDA 425 Hamilton, Grefelfing, Nemaćka) i vrednost pH primenom elektrode (EasyFerm Bio HB K8 425, Hamilton, Grefelfing, Nemaćka). Detekcija nivoa kultivacione tečnosti i pojave pene u bioreaktorskom sudu vršena je pomoću konduktometrijskih senzora. Kontrola bioprocesa vršena je pomoću BioRe SCADA (engl. *supervisory control and data acquisition*, SCADA) softverskog paketa.

Pored *in-line* mernih instrumenata za praćenje bioprocesa korišćene su i *off-line* metode za koje je bilo potrebno vršiti uzorkovanje u definisanim vremenskim intervalima. Tokom prvog dana kultivacije (do 24 h), uzorkovanje je vršeno na svaka 3 h, dok su uzorci nakon toga pa sve do kraja trajanja bioprocesa, uzimani u vremenskim intervalima od 6 h.

4.1.2. Imobilizacija ćelija proizvodnog mikroorganizma na biougalj

U finalnoj fazi eskperimentalnog istraživanja u okviru doktorske disertacije, ispitivana je mogućnost formulacije finalnog preparata za biološku kontrolu primenom ćvrstih nosaća.

Kao ćvrst nosać za imobilizaciju ćelija proizvodnog mikroorganizma *Bacillus* sp. BioSol021, korišćen je (sojin pepeo) biougalj. Preliminarna ispitivanja biougolja obuhvatila su sledeća ispitivanja:

- Hemijsko-mineralošku analizu: rendgenostrukturalna analiza (XRD) i rendgenska fluorescentna spektroskopija (XRF);
- Merenje vrednosti pH u vodenoj sredini (10 g pepela/100 ml demineralizovane vode);
- Infracrvenu spektroskopiju sa Furijeovom transformacijom (FTIR);
- Jonsku hromatografiju (10 g pepela/100 ml demineralizovane vode).

Ispitivanja koje se odnose na karakterizaciju biougolja sprovedene su u saradnji sa Laboratorijom za ispitivanje materijala u kulturnom nasleđu, Tehnološkog fakulteta Novi Sad, Univerziteta u Novom Sadu.

Postupak imobilizacije uključivao je namešavanje kultivacione tečnosti dobijene nakon izvođenja bioprocesa na nivou bioreaktora pri vrednostima procesnih parametara, brzina mešanja 300 o/min i intenzitet aeracije 1,5 vvm, i

biouglja u definisanoj razmeri. Uslovi izvođenja ove faze eksperimentalnog istraživanja definisani su eksperimentalnim planom koji je podrazumevao varijaciju dužine trajanja namešavanja ćelija proizvodnog mikroorganizma i biouglja, i količinu dodatog biouglja u odnosu na zapreminu kultivacione tečnosti (koncentracija ćelija proizvodnog mikroorganizma 8,31 log CFU/ml). Inkubacija je vršena u Erlenmayer sudovima sa 30 ml kultivacione tečnosti i eksperimentalnim planom definisanom količinom biouglja na laboratorijskoj tresilici (KS 4000i control, IKA® Werke, Staufen, Nemačka) uz eksterno mešanje 150 o/min na 28 °C.

Predviđeni eksperimentalni plan podrazumevao je pun eksperimentalni dizajn sa dve nezavisno promenljive, dužina trajanja namešavanja kultivacione tečnosti i biouglja i količina biouglja u odnosu na zapreminu kultivacione tečnosti, koje su varirane na tri nivoa (tabela 4.12.1).

Tabela 4.12.1. Eksperimentalni plan izvođenja faze formulacije prepata za biološku kontrolu imobilizacijom ćelija proizvodnog mikroorganizma na biougalj.

Broj eksperimenta	Inkubacija (h)	Količina biouglja (%)
1	24	1
2	24	3
3	24	5
4	48	1
5	48	3
6	48	5
7	72	1
8	72	3
9	72	5

Nakon predviđenog vremena inkubacije, biougalj sa imobilisanim ćelijama proizvodnog mikroorganizma je odvajan od ostatka kultivacione tečnosti *dead end* filtracijom kroz filter-hartiju (Whatman #1, Whatman, UK) u gravitacionom polju i sušen na 40 °C tokom 24 h.

Sledeći korak podrazumevao je resuspendovanje 0,1 g biouglja u 10 ml sterilnog fiziološkog rastvora i inkubaciju tokom 24 h na laboratorijskoj tresilici (KS 4000i control, IKA® Werke, Staufen, Nemačka) uz intenzivno eksterno mešanje 200 o/min.

Usledila je provera vijabilnosti ćelija oslobođenih iz biouglja metodom poseva i procena antagonističke aktivnosti prema ispitivanim fitopatogenim

aflatoksigenim predstavnicima vrste *Aspergillus flavus* izvođenjem difuzione metode bunara.

4.12.1. SEM analiza

Skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. *Scanning Electron Microscopy*, SEM) korišćena je za snimanje uzoraka ćelija proizvodnog mikroorganizma, slobodnih i vezanih na čestice biougla (sojin pepeo) kao čvrstog nosača. Snimanje je izvedeno primenom skenirajućeg mikroskopa (JEOL JSM 6460 LV) sa EDS detektorom (engl. *The Energy Dispersive X-Ray detector*, EDS) (Oxford INCA) pri naponu 20 kV na radnoj udaljenosti 13 mm. Pre snimanja, uzorak je fiksiran na SEM nosač pomoću ugljenične trake i naparen zlatom radi formiranja elektroprovodljivog sloja.

4.13. Analitičke metode

4.13.1. Određivanje sadržaja aflatoksina ELISA metodom

Detekcija prisustva aflatoksina B1 u uzorcima kukuruza je izvršena primenom ELISA (engl. *Enzyme-linked Immunoassay*, ELISA) metode pomoću komercijalnog seta AgraQuant® Aflatoxin B1 ELISA Test Kit (Romer Labs, GmbH, Tuhn, Austrija).

Ekstrakcija iz 20 g mlevenog uzorka kukuruza sa 100 ml 70% metanola, izvršena je uz energično mešanje na horizontalnoj tresilici (Benchtop Shaking Incubator 222DS, Labnet International, Inc, Edison, SAD) pri 200 o/min u trajanju od 5 min. Iz pripremljenih uzoraka je, nakon sedimentacije, supernatant profiltriran kroz Whatman #1 filter papir. Filtrat (100 µl), je potom, rastvoren primenom esej pufera (engl. *assay buffer*), a potom je 100 µl ovako pripremljenog rastvora pomešano sa 200 µl konjugata u bunarima, i zatim 100 µl sadržaja bunara preneto u mikrobunare sa antitelima (engl. *antibody-coated microwell*). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta, ploča je isprana destilovanom vodom, a potom je 100 µl rastvora supstrata (*substrate solution*) dodato u svaki bunar i inkubirano u trajanju od 5 minuta. Po završetku trajanja inkubacije, 100 µl stop rastvora (engl. *stop solution*) je dodatno u svaki bunar. Apsorbancija svetlosti talasne dužine 450 nm merena je deset minuta nakon dodavanja stop rastvora, pomoću uređaja za fotometrijsko određivanja sadržaja aflatoksina (Microplate Photometer HiPo MPP-96, BioSan, Letonija).

4.13.2. Određivanje sadržaja aflatoksina HPLC metodom

Hromatografsko određivanje sadržaja aflatoksina izvedeno je uređajem HPLC sistem serije 1260 (Agilent Technologies, Santa Klara, Kalifornija, SAD),

primenom detektora umreženih dioda DAD (engl. *Diode-Array Detector*, DAD), fluorescentnog detektora FLD (engl. *Fluorescence Detector*, FLD) (Agilent Technologies, Santa Klara, Kalifornija, SAD) i kolone Hypersil ODS (150 x 4,6 mm, veličina čestica 5 µm) (Agilent Technologies, USA). Tačno 12,500 g uzorka je ekstrahovano primenom 50 ml smeše (84:16 v/v) acetonitrila (Sent Luis, Misuri, SAD) i vode. Ekstrakti su prečišćeni primenom kolone Mycosep™ 224 (Romer Labs. Inc., Union, Misuri, SAD), a potom je 3 ml upareno do suva na 60 °C pod parom azota. Ostatak je rastvoren u 300 µl mobilne faze. Uslovi hromatografskog određivanja definisani su prema uputstvima autora Oliveira i saradnici (2009).

4.13.3. **Određivanje koncentracije ćelija proizvodnog mikroorganizma**

Određivanje sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma, odnosno broja vijabilnih ćelija vršeno je indirektno – metodom poseva. Hranljiva podloga korišćena za zasejavanje uzastopnih razređenja uzoraka kultivacione tečnosti je Hranljivi agar (HiMedia Laboratories, Mumbaj, Indija). Inkubacije je vršena 48 h na 28 °C, nakon čega su brojane formirane kolonije i određen broj vijabilnih ćelija po ml ispitivane tečnosti. Rezultat je izražen u jedincama log CFU/ml, (engl. *Colony Forming Unit*, CFU), a sve analize vršene su u tri ponavljanja.

4.13.4. **Određivanje rezidualnih koncentracija nutrijenata**

Određivanje sadržaja celuloze vršeno je gravimetrijskom metodom (Malbaša i sar., 2021).

Sadržaj ukupnog azota u supernatantu kultivacione tečnosti određivan je metodom po Kjeldalu (Buchu K-314 Kjeldahl Line Digestion Unit) (Herlich, 1990).

4.13.5. ***In vitro* testiranje antimikrobne aktivnosti**

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti i supernatanta, vršeno je difuzionom metodom bunara. U inicijalnim fazama skrininga potencijalnih proizvodnih mikroorganizama i optimizacije kvalitativnog i kvantitativnog sastava hranljive podloge za kultivaciju, korišćeni su uzorci kultivacione tečnosti. U fazi izvođenja bioprocesa u uvećanim razmerama, na nivou laboratorijskog bioreaktora pored uzoraka kultivacione tečnosti ispitivano je i antimikrobno delovanje supernatanta. Besćelijski uzorci dobijeni su centrifugiranjem kultivacione tečnosti na 12000 o/min, 10 min (Z 326 K, Hermle LaborTechnik GmbH, Vehingen, Nemačka). Kao negativna kontrola korišćena je hranljiva podloga iz iste faze istraživanja.

Priprema suspenzije test mikroorganizama podrazumevala je resuspendovanje biomase osveženih ispitivanih izolata u sterilnom fiziološkom rastvoru do postizanja koncentracije spora 10^5 CFU/ml. Zasejavanju ispitivanih izolata prethodilo je otapanje i temperiranje ranije pripremljenih komercijalnih hranljivih podloga (engl. *Sabouraud Maltose Agar* – SMA) (HiMedia Laboratories, Mumbai, Indija) u trajanju od 30 min na 50 ± 1 °C. Nakon toga, usledilo je unošenje po 1 ml suspenzije ispitivanog izolata u otopljene i temperirane hranjive podloge, homogenizacija na vorteksu (IKA Vortex 1 Shaker, IKA® Werke, Staufen, Nemačka) i izlivanje pripremljenih smeša na Petri ploče. Nakon očvršćavanja hranljivih podloga, napravljeni su bunari prečnika 8 mm, u koje je unošeno 100 μ l ispitivanih uzoraka. Inkubacija je vršena 5 dana na temperaturi 30 °C, nakon čega je izvedena evaluacija antagonističke aktivnosti merenjem prečnika zone inhibicije.

4.13.6. Identifikacija lipopetidnih komponenti HPLC-MS metodom

Identifikacija komponenti koje nastaju metaboličkom aktivnošću proizvodnog izolata *Bacillus* sp. BioSol021 izvedena je u Laboratoriji za funkcionalnu genomiku i molekularnu biotehnologiju na Tehničkom univerzitetu primenjenih nauka Vildau, Nemačka, analiziranjem supernatanta kultivacionih tečnosti dobijenih tokom izvođenja kultivacija na nivou laboratorijskog bioreaktora zapremine 16 l (EDF – 15.4_1, A/S Biotehniskais centrs, Riga, Letonija). Primenjena analitička metoda podrazumevala je visoko efikasnu tečnu hromatografiju kuplovanu sa masenom spektrometrijom (engl. *High Pressure Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, HPLC-MS). Korišćen je HPLC sistem (Nexera, Shimadzu, Tokio, Japan) kuplovan sa masenim spektrometrom (LCMS-8040, Shimadzu, Tokio, Japan) i izvorom elektrosprej jonizacije (engl. *ElectroSpray Ionization*, ESI). Primenjena je HPLC kolona (EC 128/3 Nucleodur-C18, Macherey - Nagel, Nemačka) (Shimadzu, Tokio, Japan) sledećih karakteristika: dužina 125 mm, unutrašnji prečnik 4,6 mm, prečnik čestica punjenja 3 μ M. Uslovi izvođenja analize podrazumevaju temperaturu kolone od 40 °C. Kao mobilna faza korišćen je rastvor amonijum-acetata (5 mmol/l) koji je sadržao 0,1% (v/v) mravlje kiseline (A) i metanola (B). Elucija sa linearnim gradijentom izvedena je na sledeći način: A:B=95:5 tokom prvog minuta, povećavanje protoka faze B na 90% između prvog i sedmog minuta, A:B=10:90 od sedmog do 16. minuta, smanjivanje protoka faze B na 5% između 16. i 17. minuta, A:B=95:5 do 20. minuta. Protok mobilne faze iznosio je 0,5 ml/min sve vreme. Masena kalibracija uređaja rađena je primenom standarda za automatsku kalibraciju – *autotune* (smeša koju čine PEG, PPG, i rafinoza: m/z 65,05, 168,10, 256,15, 344,20, 652,40, 1004,60, i 1224,75). Detekcija je vršena i u

pozitivnom i negativnom modu jonizacije. Tehnički parametri analize primenom masenog spektrometra bili su sledeći: napon sprej kapilare 3 kV, napon detektora 2,04 kV, napon komore pod atmosferskim pritiskom (interfejsa) 4,5 kV, temperatura desolvacije 250 °C, temperatura grejnog bloka 450 °C, protok gasa za raspršivanje 3 ml/min, protok gasa za sušenje 15 ml/min. Signal u pogledu vrednosti m/z je detektovan u vremenskim razmacima od 0,2 s.

4.13.7. Identifikacija lipopetidnih komponenti MALDI-TOF MS metodom

Masena spektrometrija zasnovana na jonizaciji potpomognutoj laserskom desorpcijom iz matriksa/analizator sa vremenom preleta (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*, MALDI-TOF MS) korišćena je kao druga analitička metoda za identifikaciju komponenti koje nastaju metaboličkom aktivnošću proizvodnog izolata *Bacillus* sp. BioSol021 analiziranjem supernatanta kultivacionih tečnosti dobijenih tokom izvođenja kultivacija na nivou laboratorijskog bioreaktora zapremine 16 l (EDF – 15.4_1, A/S Biotehniskais centrss, Riga, Letonija). Analiza je izvedena u Laboratoriji za funkcionalnu genomiku i molekularnu biotehnologiju na Tehničkom univerzitetu primenjenih nauka Vildau, Nemačka. Korišćen je maseni spektrometar (Axima Confidence, Shimadzu Biotech, Mančester, UK). Postupak pripreme za izvođenje analize je podrazumevao mešanje jednakih zapremine uzoraka (1 µl) i rastvora matriksa (10 µg/ml α-cijano-4-hidroksicimetna kiselina u 0,1% rastvoru trifluorosirćetne kiseline, 50% acetonitril) i nanošenje smeše na ploče od nerđajućeg čelika, gde se ostavljaju do sušenja. Desorpcija i jonizacija su vršene primenom azotnog lasera koji emituje zračenje talasne dužine 337 nm. Maseni spektar je sniman u pozitivnom modu refleksije visoke rezolucije pri maksimalnoj brzini ponavljanja od 50 Hz u okviru masenog opsega 700–3000 Da. Kako bi se generisali reprezentativni profili, akumulirano je ukupno 250 laserskih snimaka na osnovu kojih je definisan proseka za svaki uzorak. MALDI-TOF maseni spektrometar je kalibrisan eksterno primenom smeše standarda peptida: bradikininski fragment 1–7 (757,40 Da), angiotenzin II (humani, 1 046,54 Da), P14R (sintetski peptid), 1533,86 Da i ACTH fragment 18–39 (humani, 2465,20 Da) iz kalibracionog kita (ProteoMass Peptide&Protein MALDI-MS Calibration Kit, Merck, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD). Obrada podataka dobijenih nakon izvođenja MALDI-TOF MS analize vršena je primenom softverskog paketa Launchpad™ Software 2.9 (Shimadzu Biotech, Tokio, Japan).

4.14. Statistička obrada podataka

4.14.1. Skrining potencijalnih proizvodnih izolata i optimizacija hranljive podloge – odabir izvora ugljenika i organskog izvora azota

Eksperimentalni podaci su najpre podvrgnuti jednofaktorijalnoj analizi varijanse (engl. *One-Way ANOVA*), kao statističkom alatu za ispitivanje uticaja jednog faktora, odnosno nezavisne promenljive, na zavisno promenljivu. Nakon toga, vršena je *post-hoc* analiza Dankanovim testom višestrukih poređenja (engl. *Duncan's Multiple Range Test*) radi definisanja homogenih grupa srednjih vrednosti i nivoa značajnosti ispitivanih faktora. Statističke analize vršene su primenom softverskog paketa Statistica 13.1 (Dell Inc., Round Rock, Teksas, SAD) pri nivou značajnosti od 0,05. Srednje vrednosti i standardne devijacije ispitivanih faktora izračunate su primenom softverskog paketa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, Vašington, SAD).

4.14.2. Modelovanje sastava hranljivog medijuma primenom metodologije odzivne površine

Modelovanje eksperimentalnih podataka koji su dobijeni u skladu sa eksperimentalnim planom datim u potpoglavlju 4.9.2.4, tabela 4.9.3, vršeno je primenom metodologije odzivne površine (engl. RSM – *Response Surface Methodology*).

Dobijeni podaci eksperimentalnih istraživanja u fazi definisanja kvantitativnog sastava hranljivog medijuma modelovani su polinomom drugog reda koji opisuje ponašanje sistema u smislu uticaja četiri nezavisne promenljive (inicijalna kocentracija celuloze – X_1 , inicijalna koncentracija uree – X_2 , inicijalna koncentracija $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – X_3 i inicijalna koncentracija K_2HPO_4 – X_4) na zavisnu promenljivu – prečnik zone inhibicije. U definisanoj jednačini (1) b_0 je odsečak, b_1 , b_2 , b_3 i b_4 su linearni koeficijenti, b_{12} , b_{13} , b_{14} , b_{23} , b_{24} i b_{34} su koeficijenti interakcije, a b_{11} , b_{22} , b_{33} i b_{44} su kvadratni koeficijenti regresionog modela.

$$Y = b_0 + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_3 \cdot X_3 + b_4 \cdot X_4 + b_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + b_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + b_{14} \cdot X_1 \cdot X_4 + b_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 + b_{24} \cdot X_2 \cdot X_4 + b_{34} \cdot X_3 \cdot X_4 + b_{11} \cdot X_1^2 + b_{22} \cdot X_2^2 + b_{33} \cdot X_3^2 + b_{44} \cdot X_4^2 \quad (1)$$

Statistička značajnost koeficijenata regresionih modela procenjena je primenom njihovih p -vrednosti. Analiza varijanse dobijenih modela izvršena je kako bi se procenio kvalitet fitovanja eksperimentalnih podataka dobijenim matematičkim jednačinama (na osnovu koeficijenta determinacije, R^2), kao i statističke značajnosti dobijenih modela primenom p -vrednosti i F -vrednosti. Statističke analize vršene su pri nivou značajnosti 0,05 a za potrebe obrade podataka korišćen je softverski paket Statistica 13.1 (Dell Inc., Round Rock,

Teksas, SAD). Sagledavanje uticaja interakcije nezavisnih promenljivih na definisani odziv, omogućeno je i iz grafičkog prikaza odzivnih površina (uticaj dve nezavisne promenljive na zavisnu promenljivu, pri čemu su vrednosti preostale dve nezavisne promenljive konstantne, i definisane kao vrednosti centralne tačke eksperimentalnog dizajna).

4.14.3. Modelovanje sastava hranljivog medijuma primenom metodologije veštačkih neuronskih mreža

Eksperimentalni podaci koji su dobijeni u skladu sa eskperimentalnim planom datim u potpoglavlju 4.9.2.4, tabela 4.9.3, modelovani su primenom metodologije veštačkih neuronskih mreža (engl. *Artificial Neural Netwok*, ANN). Veštačke neuronske mreže su dizajnirane tako da nelinearno mapiraju određeni skup ulaza na skup izlaza (Karray i de Silva, 2004).

Princip primene veštačkih neuronskih mreža temelji se na činjenici da predstavljaju skup međusobno povezanih procesnih elemenata čija funkcionalnost se zasniva na modelu biološkog neurona (Bagheri i sar., 2019). Osnovna prednost veštačkih neuronskih mreža je u vezama između pojedinih neurona, do kojih se dolazi kroz postupak obučavanja mreže. Kako se neuronske mreže sastoje iz velikog broja povezanih elemenata, pri čemu svaki od njih vrši određenu obradu ulaznih podataka, smatraju se izuzetno efikasnim i moćnim računarskim alatom, dominantnim u odnosu na konvencionalne metode (Abiodun i sar., 2018).

Faza koja prethodi početku obučavanja neuronske mreže podrazumeva pripremu eskperimentalnih podataka u smislu njihove normalizacije prema sledećoj jednačini:

$$J_{normal} = (1 - \Delta^L - \Delta^U) \frac{J_p - J_{min}}{J_{max} - J_{min}} + \Delta^L \quad (2)$$

gde su:

J_{normal}, J_p – normalizovana vrednost odabranog odziva i izmerena vrednost odabranog odziva;

J_{max}, J_{min} – maksimalna i minimalna vrednost odabranog odziva u seriji eksperimentalnih podataka;

Δ^U i Δ^L – gornja i donja vrednost granice normalizacije koje daju ograničenu ekstrapolacionu sposobnost mreže.

Kao merilo tačnosti predikcije odnosno reprodukovanja eksperimentalnih podataka, svaki izlazni skup predikcija modela veštačke neuronske mreže, upoređen je sa odgovarajućom eksperimentalno određenom vrednošću, primenom koeficijenta determinacije (R^2) i srednje kvadratne greške (MSE):

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (J_{exp,i} - J_{pred,i})^2}{\sum_{i=1}^n (J_{exp,i} - J_{avg,i})^2} \quad (3)$$

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (J_{exp,i} - J_{pred,i})^2 \quad (4)$$

gde su:

n – broj podataka,

$J_{exp,i}$ i $J_{pred,i}$ – i -ta eksperimentalna vrednost posmatranog odziva i vrednost predikcije posmatranog odziva.

Primena metode veštačkih neuronskih mreža u oblasti biotehnoloških istraživanja često nailazi na problem nedovoljne količine podataka za manipulaciju (Unni i sar., 2017; Rafigh i sar., 2014; Yang i sar., 2015). Efikasan način za prevazilaženje ovog ograničenja, primenjen u konkretnom slučaju, podrazumevao je prethodnu augmentaciju podataka pomoću autoenkodera. Autoenkoder mreža podrazumeva dve povezane mreže koje uključuju enkoder i dekoder. Postupak je iniciran komprimovanjem originalnih podataka u kratak kod ignorišući pozadinske signale pomoću enkodera. Nakon toga, dekoder dekomprimuje dati kod, kako bi se generisali podaci što bliži ulaznim podacima.

Ovako istreniran autoenkoder, se zatim može upotrebiti za generisanje novih podataka koji prate statističke trendove originalnog skupa podataka, tako što se na ulaz istreniranog dekodera dovode nasumične vrednosti. Vrednosti izlaza iz enkoder sloja, odnosno ulaza u sloj dekodera, koji se simuliraju, se ni u kom obliku ne moraju pronaći u originalnom skupu. Upotreba autoenkodera mreže predstavlja i robustan način eliminacije šuma koji se može naći u podacima.

Modelovanje u kontekstu neuronskih mreža je izvršeno primenom programskih paketa ScikitLearn 0.24.2 (<https://scikit-learn.org/stable/>) i Tensorflow 2.5.0 (<https://www.tensorflow.org/>) u Python 3.8. okruženju.

4.14.4. Optimizacija sastava hranljivog medijuma

Faza optimizacije hranljivog medijuma na bazi optimalnog izvora ugljenika i organskog izvora azota primenom metode željene funkcije usledila je nakon prethodnog utvrđivanja uticaja nezavisnih promenljivih, u vidu inicijalnih koncentracija celuloze, uree, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i K_2HPO_4 na zavisnu promenljivu, odnosno prečnik zone inhibicije. Metoda željene funkcije podrazumeva dodeljivanje težinskih koeficijenata svakoj nezavisnoj i zavisnoj promenljivoj koja figuriše u matematičkom modelu, uz postavljanje ciljeva optimizacije u pogledu maksimizacije ili minimizacije vrednosti definisane nezavisne ili zavisne promenljive, ili pak održavanje u zadatom opsegu. U

konkretnom slučaju optimizacije sastava hranljivog medijuma, svim zavisnim i nezavisnim promenljivim, dodeljeni su isti težinski koeficijenti, odnosno data jednaka važnost svih ispitivanih promenljivih. Postavljeni optimizacioni set imao je za cilj maksimizaciju zona inhibicija za oba ispitivana fitopatogena soja *Aspergillus flavus* SA2BSS i *Aspergillus flavus* PA2DSS i minimizaciju inicijalne koncentracije izvora ugljenika i organskog izvora azota. Optimizacija sastava hranljivog medijuma vršena je primenom softverskog paketa Design-Expert 8.1 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, Minesota, SAD) (Singh i sar., 2017).

4.14.5. Optimizacija procesnih parametara proizvodnje

Nakon izvođenja četiri seta eksperimenata u uslovima laboratorijskog bioreaktora, usledila je faza optimizacije ključnih procesnih parametara proizvodnje agenasa biološke kontrole – intentizeta aeracije, brzine mešanja i dužine trajanja kultivacije. Za pronalaženje optimalnih vrednosti i analizu uticaja datih parametara na efikasnost bioprocesa, primenjena je Tagučići metodologija (Singh i sar., 2017). Princip metode zasniva se na definisanju zbirne statističke ocene koja obuhvata srednje vrednosti i varijanse jedinstvenom merom performanse koja se definiše kao odnos signal/šum S/N (engl. *Signal to Noise*, S/N). Primena TM (engl. *Taguchi method*, TM) podrazumeva transformaciju eksperimentalnih podataka u odnose signal/šum, i definisanje tri funkcije cilja koje se kategorišu u tri grupe: „što je manje, to je bolje” (engl. *smaller is better*) ; „što je veće to je bolje” (engl. *larger is better*); „nominalno je najbolje” (engl. *nominal is the best*) (Taguchi, 2005).

Postavljeni cilj optimizacije je postizanje maksimalnog nivoa antimikrobne aktivnosti na koju direktno upućuje veličina zone prečnika inhibicije, koja je samim tim i odabrana kao posmatrani odziv. Budući da je kao cilj optimzacije postavljena maksimizacija zona prečnika inhibicije, odnos signal/šum je definisan formulom:

$$\frac{S}{N} = -10 \log \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right) \quad (5)$$

gde su:

n – broj ponavljanja u eksperimentu

y_i – i -ta izmerena vrednost odziva u posmatranom eksperimentu (Taguchi, 2005).

Statističke analize vršene su primenom softverskog paketa Minitab v17.1. (Minitab, LLC, State College, Pensilvanija, SAD).

4.14.6. Imobilizacija ćelija proizvodnog mikroorganizma na čestice biouglja kao čvrstog nosača

Eksperimentalni podaci su najpre podvrgnuti dvofaktorijalnoj analizi varijanse (*Two-Way ANOVA*) kao statističkom alatu za ispitivanje uticaja dva faktora, odnosno nezavisno promenljivih, na zavisnu promenljivu. Nakon toga, urađena je *post-hoc* analiza Dankanovim testom višestrukih poređenja (*Duncan's Multiple Range Test*) radi definisanja homogenih grupa srednjih vrednosti i nivoa značajnosti ispitivanih faktora. Statističke analize vršene su primenom softverskog paketa Statistica 13.1 (Dell Inc., Round Rock, Teksas, SAD) pri nivou značajnosti 0,05. Srednje vrednosti i standardne devijacije ispitivanih faktora izračunate su primenom softverskog paketa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, Vašington, SAD).

4.14.7. Analiza stanja tržišta biopesticida u Republici Srbiji

Kao osnovni izvor podataka za analizu stanja tržišta biopesticida u Republici Srbiji, korišćeni su zvanični podaci Uprave za zaštitu bilja, dobijeni na upit od strane autora, a odnose se na period od 2015. do 2020. godine. Imajući u vidu da za pojedine godine dobijeni podaci nisu kompletni, rezultati analize su prilagođavani u skladu s raspoloživom vremenskom serijom. Podaci su analizirani osnovnim statističkim instrumentarijumom deskriptivne statistike.

4.14.8. Istraživanje stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida

Istraživanje stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida podrazumevalo je sprovođenje ankete koja obuhvata 101 poljoprivrednog proizvođača. Anketa je realizovana u saradnji sa Ministarstvom poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva, odnosno Poljoprivrednim stručnim i savetodavnim službama (PSSS). Svaka PSSS na teritoriji Republike Srbije je u saradnji sa poljoprivrednim proizvođačima realizovala od pet do deset upitnika, čime je obezbeđena reprezentativnost uzorka. U prvoj fazi analize, ispitani su opšti podaci o ispitanicima oslanjajući se na osnovne pokazatelje deskriptivne statistike. U nastavku, su predstavljeni uprosečeni odgovori sa Likertove skale (Likert, 1932), odnosno odstupanje dobijenih odgovora od proseka u pripadajućoj grupi. Metodom analize varijanse, *post-hoc* LSD testom (engl. *Least Significant Difference test*, LSD), utvrđeno je da li postoje statistički značajne razlike među konkretnim grupama. Izračunavanje srednjih vrednosti i standardnih devijacija, vršeno je primenom softverskog paketa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, Vašington, SAD). Postupak

analiza varijanse, odnosno izvođenje LSD testa, sprovedeno je primenom softverskog paketa SPSS (IBM, Njujork, SAD).



Rezultati i diskusija

5. Rezultati i diskusija

5.1. Izolacija, identifikacija i procena potencijala *Aspergillus flavus* za produkciju aflatoksina

Izrada ove doktorske disertacije zasniva se na definisanju osnovnih principa razvoja tehnologije za proizvodnju agenasa biološke kontrole. Početak rada na ovom zadatku obeležilo je prepoznavanje konkretnog problema u uslovima poljoprivredne proizvodnje na lokalnom području, a odnosi se na potrebu za suzbijanjem dominantne vrste aflatoksigenih izolata prisutnih u poljima kukuruza na teritoriji Republike Srbije.

5.1.1. Uzorci za izolaciju *Aspergillus flavus*

Prvi korak istraživanja u okviru doktorske disertacije obuhvatao je prikupljanje uzoraka kukuruza uzgajanog tokom 2019. i 2020. u Republici Srbiji. Uzorkovanje je vršeno na 18 odnosno 10 lokaliteta iz proizvodne 2019. i 2020. godine.

Spisak lokaliteta na kojima je vršeno uzorkovanje kukuruza prikazan je u tabeli 8.1.1 koja se nalazi u Prilogu 1.

5.1.2. Analiza sadržaja aflatoksina primenom ELISA i HPLC metode

Prisustvo aflatoksina B1 (AF B1) u nasumično odabranim uzorcima kukuruza uzgajanog tokom 2019. i 2020. godine na različitim lokalitetima u Republici Srbiji (tabela 8.1.1, Prilog 1) najpre je vršeno primenom metode ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA). Rezultati analize prikazani u tabeli 5.1.1 ukazuju na prisustvo aflatoksina B1 u samo jednom uzorku iz proizvodne 2019. godine sa lokaliteta Loznica (LO) (0,0046 mg/kg), odnosno potpuno odsustvo kontaminacije uzoraka u slučaju 2020. godine (tabela 5.1.2).

Tabela 5.1.1. Analiza prisustva aflatoksina B1 u uzorcima kukuruza proizvedenog tokom 2019. godine na 10 različitih lokaliteta u Republici Srbiji primenom ELISA metode.

Lokalitet	Šifra izolata	AF B1 (mg/kg)
Štitar	ŠT	0,0000
Valjevo	VA	0,0000
Pančevo	PA	0,0000
Sabanta	SA	0,0000
Subotica	SU	0,0000
Vršac	NA	0,0000
Loznica	LO	0,0046
Bečej	BČ	0,0000
Sombor	SO	0,0000
Rogojevac	RO	0,0000

Tabela 5.1.2. Analiza prisustva aflatoksina B1 u uzorcima kukuruza proizvedenog tokom 2020. godine na 10 različitih lokaliteta u Republici Srbiji primenom ELISA metode.

Lokalitet	Šifra izolata	AF B1 (mg/kg)
Rumenka	RU	0,0000
Oparić	OP	0,0000
Kuzmin	KU	0,0000
Lepojević	LE	0,0000
Martinci	MC	0,0000
Krušedol	KŠ	0,0000
Valjevo	VA	0,0000
Beška	BŠ	0,0000
Bečej	BČ	0,0000
Sombor	SO	0,0000

Određivanje sadržaja ukupnih i AF B1 aflatoksina u nasumično odabranim uzorcima kukuruza uzgajanog tokom 2019. i 2020 godine na različitim lokalitetima u Republici Srbiji (tabela 8.1.1, Prilog 1) takođe je izvršeno i primenom HPLC metode. Dobijeni rezultati prikazani u tabelama 5.1.3 i 5.1.4, upućuju na izostanak prisustva aflatoksina u čak 95% ispitivanih uzoraka i u potpunoj saglasnosti su sa rezultatima prethodno izvedenih analiza metodom ELISA. Kontaminacija uzorka sa lokaliteta Loznica detektovana ELISA metodom potvrđena je i HPLC analizom (0,002 mg/kg).

Tabela 5.1.3. Analiza prisustva ukupnih aflatoksina i aflatoksina B1 u uzorcima kukuruza proizvedenog tokom 2019. godine na 10 različitih lokaliteta u Republici Srbiji primenom HPLC metode.

Lokalitet	Šifra izolata	AF B1 (mg/kg)	Ukupni (mg/kg)
Loznica	LO	0,002	0,002
Sombor	SO	<0,001	<0,001
Subotica	SU	<0,001	<0,001
Pančevo	PA	<0,001	<0,001
Bečej	BČ	<0,001	<0,001
Sabanta	SA	<0,001	<0,001
Nadalj	NA	<0,001	<0,001
Valjevo	VA	<0,001	<0,001
Radojevac	RO	<0,001	<0,001
Štitar	ŠT	<0,001	<0,001

Tabela 5.1.4. Analiza prisustva ukupnih aflatoksina i aflatoksina B1 u uzorcima kukuruza proizvedenog tokom 2020. godine na 10 različitih lokaliteta u Republici Srbiji primenom HPLC metode.

Lokalitet	Šifra izolata	AF B1 (mg/kg)	Ukupni (mg/kg)
Rumenka	RU	<0,001	<0,001
Oparić	OP	<0,001	<0,001
Kuzmin	KU	<0,001	<0,001
Lepojević	LE	<0,001	<0,001
Martinci	MC	<0,001	<0,001
Krušedol	KŠ	<0,001	<0,001
Valjevo	VA	<0,001	<0,001
Beška	BŠ	<0,001	<0,001
Bečej	BČ	<0,001	<0,001
Sombor	SO	<0,001	<0,001

Analizom nivoa kontaminacije prikupljenih uzoraka izvedenom primenom dve standardne metode za određivanje sadržaja ukupnih aflatoksina odnosno aflatoksina B1, ustanovljeno je da nije bilo kontaminacije kukuruza uzgajanog tokom proizvodnih sezona 2019 i 2020, sa izuzetkom jednog uzorka sa lokaliteta Loznica. Ipak, nivo kontaminacije i tog uzorka je bio ispod dozvoljenog limita definisanog legislativom Republike Srbije, te se i on smatra ispravnim sa aspekta zdravstvene bezbednosti hrane. Opšti zaključak je da su obe proizvodne sezone, koje su karakterisale slične meteorološke prilike, toplo vreme sa prosečnim nivoom padavina i izrazito kišovitim prolećnim danima tokom maja i juna 2019. odnosno juna 2020. godine, pogodovale uzgoju

zdravstveno bezbednog kukuruza na poljima širom Republike Srbije (RHMZ, Godišnji bilten za Srbiju, 2019; RHMZ, Godišnji bilten za Srbiju, 2020; RHMZ, Godišnja agrometeorološka analiza).

Veliki broj naučnih studija usmeren je ka ispitivanju uticaja vremenskih prilika na razvoj aflatoksigenih gljiva i produkciju aflatoksina. Podaci za Republiku Srbiju u periodu 2009–2011. godine ukazuju na odsustvo kontaminacije kukuruza, dok je scenario samo godinu dana kasnije, bio bitno drugačiji (Kos i sar., 2013). Promene vremenskih prilika tokom 2012. godine u pogledu uslova okarakterisanih visokim temperaturama i ispodprosečnim količinama padavina sa izraženim sušnim periodom koji je trajao od juna do septembra, uslovile su intenzivniji razvoj aflatoksigenih gljiva (Papić i sar., 2013). Nivo kontaminacije kukuruza kretao se u opsegu od 1,01 µg/kg do čak 86,10 µg/kg (Kos i sar., 2013). Slični vremenski uslovi, ali uz odsustvo dugotrajnog perioda suše, ponovili su se i u narednoj proizvodnoj sezoni. Ishod ovakvih prilika bio je značajno niži nivo kontaminacije proizvodnog kukuruza (24,7%) u poređenju sa prethodnom sezonom (72,2%) (Kos i sar., 2018). Nasuprot uslovima tokom 2012. i 2013. proizvodne godine, tokom 2014. dolazi do pojave prekomernih padavina što rezultuje odsustvom aflatoksina na poljima kukuruza, Godinu dana kasnije, opet se ostvaruju uslovi za razvoj aflatoksigenih gljiva (36,5 %), dok tokom proizvodne sezone 2016. velika količina padavina limitira njihovu pojavu (5%) (Kos i sar., 2018). Toplija i sušnija sezona usledila je 2017. godine i rezultati analiza kukuruza proizvedenog na teritoriji Autonomne Pokrajine Vojvodine, ukazuju na ponovni porast nivoa kontaminacije (67%) (Glamočić i sar., 2018). Prema navodima Pognozno-izveštajne službe zaštite bilja, 2021. proizvodna godina se smatra visoko rizičnom u pogledu pojave aflatoksina na poljima kukuruza. Odsustvo padavina tokom letnjih meseci kao i izrazito visoke temperature sa maskimalnom dnevnom temperaturom iznad 30 °C, smatraju se idealnim uslovima za razvoj aflatoksigenih gljiva.

5.1.3. Makromorfološka i mikromorfološka karakterizacija izolata *Aspergillus flavus*

Nakon adekvatne pripreme, odabrani uzorci kukuruza iz proizvodne 2019. godine iskorišćeni su za izolaciju gljiva *Aspergillus flavus* primenom selektivnog medijuma za datu vrstu (Cotty i sar., 1989). Dobijeni izolati korišćeni za formiranje kolekcije izolata koji su primenjivani u daljem toku istraživanja. Identifikacija izolovanih sojeva *Aspergillus* spp. do nivoa vrste vršena je analizom makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika (Mangal i sar., 2014; Khan i sar., 2020).

Karakterističan izgled kolonija za predstavnike vrste *Aspergillus flavus*, uočava se na slici 8.2.1 u Prilogu 2. Svi izolati zasejani na 5-2 medijumu nakon 24 h inkubacije obrazuju beličasti začetak micelije vazdušaste forme prečnika oko 3 mm. Promene konzistencije i boje micelije dešavaju se nakon trećeg dana inkubacije, sa početkom sporulacije, koju karakteriše radijalno širenje. Bele, baršunaste kolonije prelaze u žute do finalnog formiranja zelene guste vazdušaste micelije beličasto-žučkastog oboda. Kolonije su ravnih ivica i izdignute na sredini, a prečnik varira u opsegu 3,5–4 cm nakon petodnevne inkubacije. Naličje podloge je blago žučkaste do braonkaste boje, a eksudati koje proizvode izolati su braonkasti ili bezbojni.

Mikroskopskim pregledom kolonija novoizolovanih sojeva detektovane su bezbojne glatke ili blago hrapave nerazgranate i neseptirane konidiofore debelih zidova, u čijem nastavku su obrazovana proširenja sferičnog ili eliptičnog tipa – vezikule. Na vezikule se nadovezuju metule i fialide na kojima su formirane egzospore - konidije sferičnog, ovalnog do eliptičnog oblika tankih zidova, blago nazubljene površine (slika 8.3.1, Prilog 3).

Izolacijom *Aspergillus* spp. iz odabranih uzoraka kukuruza primenom selektivne podloge 5-2 (Cotty i sar., 1989) koja se u prethodnim studijama pokazala kao pouzdan metod za izdvajanje predstavnika ove vrste, i na osnovu definisanih morfoloških karakteristika, izolati su identifikovani kao predstavnici vrste *Aspergillus flavus*.

5.1.4. Analiza genetskog profila izolata *Aspergillus flavus* za produkciju aflatoksina

Deset monosporijalnih izolata *Aspergillus flavus* (u daljem toku označenih kao SS (engl. *single spore*, SS) korišćeno je za određivanje genetskog potencijala za produkciju aflatoksina primenom molekularne karakterizacije koja se zasniva na izvođenju CAP analize (engl. *Cluster Amplification Patterns*, CAP).

Primenjena molekularna tehnika podrazumeva skrining delecija unutar klastera gena za biosintezu aflatoksina (Savić i sar., 2020). Ukupan broj od 32 markera koji su udaljeni u proseku 5 kb duž regiona subtelomere veličine 157 kb, amplifikuje se u okviru četiri multipleks PCR reakcije (Callicott i Cotty, 2015). Na slici 5.1.1 su prikazani dobijeni paneli genetskih profila za deset monosporijalnih izolata *Aspergillus flavus* izolovanih sa kukuruza uzorkovanog na različitim lokalitetima u Republici Srbiji.

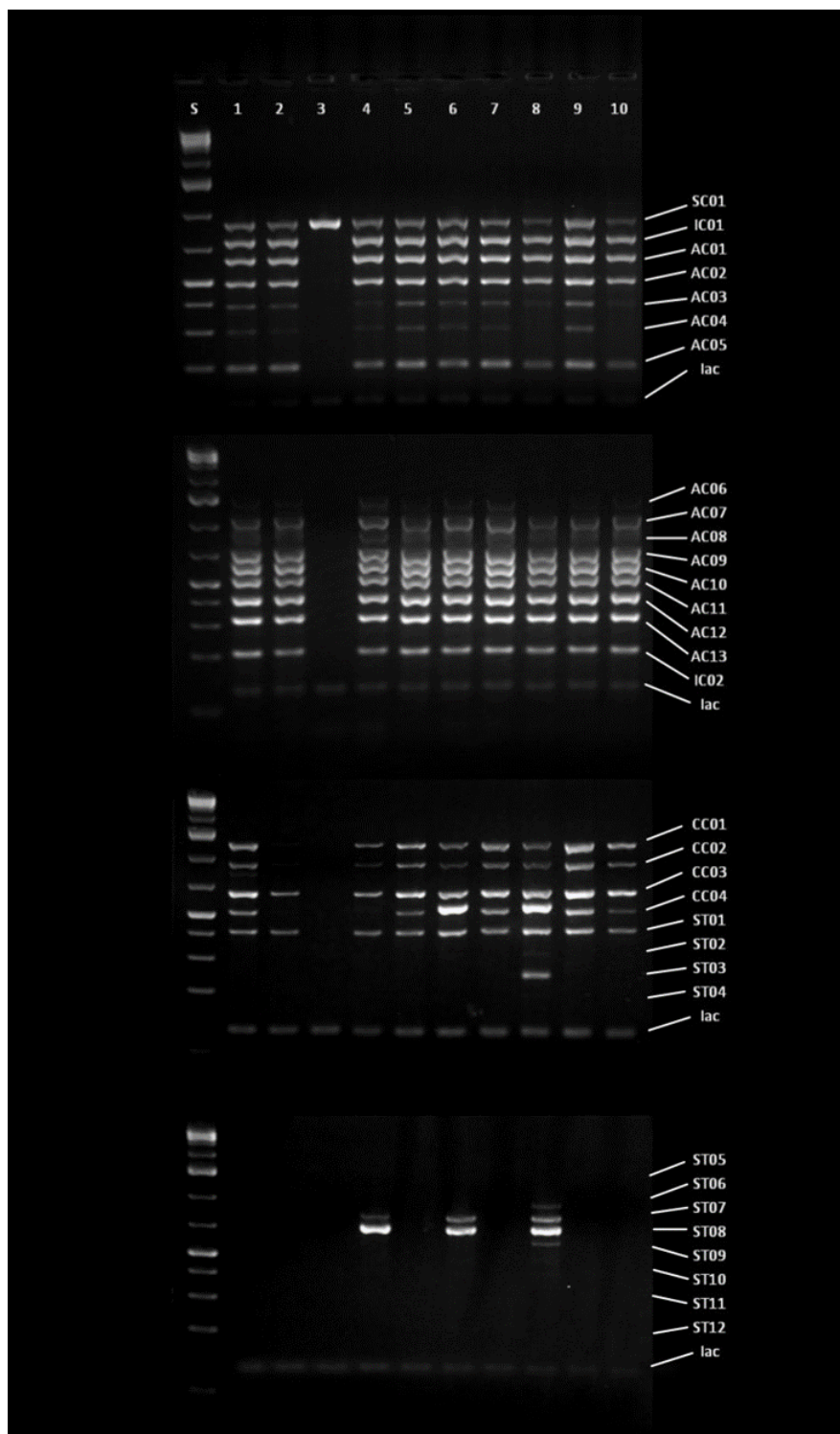
Metode za monitoring insercija i delecija u okviru klastera gena za biosintezu aflatoksina i ciklopiazonične kiseline (engl. *Cyclopiazonic Acid*, CPA) obično se koriste za detekciju varijeteta među vrstama *Aspergillus flavus*, kao i selekciju atoksigenih izolata koji se definišu kao potencijalni biokontrolni agensi (Savić i sar., 2020; Cotty i sar., 1994^a; Grubisha i sar., 2015; Dorner i sar., 2010). Dostupni literaturni podaci ukazuju na sinergistički efekat klastera gena za biosintezu aflatoksina i ciklopiazonične kiseline na sintezu toksigenih metabolita. Otuda proizilazi činjenica da se odsustvo delecija u okviru ova dva klastera gena smatra kriterijumom za selekciju toksigenih izolata (Smith i sar., 1992; Kumar i sar., 2009; Ostry i sar., 2018).

Kako bi se identifikovali izolati sa najvećim kapacitetom sinteze aflatoksina koji će se u daljem toku istraživanja koristiti kao test mikroorganizmi, izvršena je analiza usmerena prvenstveno na monitoring gena koji se nalaze u okviru dva, prethodno pomenuta, ključna klastera. S druge strane klastera gena za biosintezu aflatoksina nalazi se šećerni klaster, koji prema literaturnim podacima nema direktan uticaj na ekspresiju gena odgovornih za produkciju aflatoksina. Kako dosadašnja istraživanja ipak pokazuju posredno učešće ovih gena u definisanju aflatoksigenog potencijala izolata (Yu, 2012), izvršen je monitoring i gena u okviru šećernog klastera. Biosinteza aflatoksina uslovljena je izvorom ugljenika u tom smeru da je prosti šećeri favorizuju (glukoza, saharoza, fruktoza i maltoza) dok s druge strane pepton, sorboza i laktoza pokazuju suprotan efekat. Takođe, istraživanja su pokazala da je gen koji se definiše kao deo šećernog klastera, *nadA*, uključen u metabolički put sinteze aflatoksina. Nova saznanja bazirana na genskom profilisanju primenom mikroereja (engl. *microarray*) dokazuju da ovaj gen ipak pripada klasteru za biosintezu aflatoksina i ima ulogu u dobijanju aflatoksina G1 i G2 (Ostry i sar., 2018; Price i sar., 2006).

Dobijeni rezultati ukazuju da čak devet od deset izolata poseduje genetski potencijal za sintezu aflatoksina. Varijacije u profilima dobijenim CAP analizom potvrdile su postojanje razlika i u pogledu stabilnosti potencijala biosinteze aflatoksina, kasnije dokazane veštačkom inokulacijom uzoraka. Samo jedan izolat, poreklom sa lokaliteta Rogojevac (RO2BSS), karakteriše prisustvo značajnih delecija u targetiranom regionu i odsustvo sposobnosti sinteze aflatoksina. Izolati koji ispoljavaju visok proizvodni potencijal aflatoksina (VA1BSS, SA2BSS, PA2DSS) i oni sa detektovanim nižim nivoima aflatoksina (LO1ASS, SO1ASS, SU1ASS, NA2BSS) imaju slične profile. Takođe, sličnost u CAP profilima (AC01-AC13) pronalazi se kod izolata kod kojih nije detektovana kontaminacija u uzorcima kukuruza (BČ1CSS, ŠT2BSS). Ovakav rezultat može se objasniti činjenicom da sinteza aflatoksina zavisi od različitih faktora koji

učestvuju u modulaciji ekspresije gena odgovornih za kodiranje enzima koji kontrolišu put biosinteze (Caceres i sar., 2020).

Nemogućnost produkcije aflatoksina dovodi se u vezu sa delecijama koje su uobičajene za gene odgovorne za odigravanje inicijalnih faza sinteze. S druge strane, gene odgovorne za odvijanje kasnijih faza sinteze aflatoksina karakteriše pojava polimorfizma pojedinačnih nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) (Adhikari i sar., 2016). Generisani genetski profili upućuju na postojanje razlika na nivou vrsta ispitanih izolata u okviru klastera gena za sintezu aflatoksina, na osnovu kojih se izolati mogu diferencirati u četiri grupe. Genetski diverzitet među predstavnicima vrsta *Aspergillus flavus* može se objasniti sa nekoliko aspekata. Jedan od njih jesu razlike u proizvodnoj praksi primenjivanoj na određenom polju, zatim uticaj transfera gena usled humane aktivnosti ali takođe i postojeće razlike u strategiji pojedinačnih izolata u pogledu kompetitivnih svojstava u okruženju u kom se nalaze (Acur i sar., 2020).



Slika 5.1.1. Produkti multipleks PCR reakcije– CAP analiza genetsikih profila deset izolata *Aspergillus flavus*. S - DNK merdevine - GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (ThermoFisher Scientific, Waltham, Masačusets, SAD), 1 – VA1BSS, 2 – LO1ASS, 3 – RO2BSS, 4 – BČ1CSS, 5 – SO1ASS, 6 – SA2BSS, 7 – SU1ASS, 8 – PA2DSS, 9 – ŠT2BSS, 10 – NA2BSS. Prajmeri korišćeni za multipleks PCR: SC01, IC01, AC01, AC02, AC03, AC04, AC05, AC06, AC07, AC08, AC09, AC10, AC11, AC12, AC13, IC02, lac, CC01, CC02, CC03, CC04, ST01, ST02, ST03, ST04, ST05, ST06, ST07, ST08, ST09, ST10, ST11, ST12 (Callicott i Cotty, 2015).

Dobijeni rezultati ukazuju na visok stepen distribucije pripadnika vrste *Aspergillus flavus* (90% ispitanih uzoraka) izolovanih iz uzoraka kukuruza uzgajanih na području Republike Srbije, za koje je molekularnim tehnikama utvrđen kapacitet za sintezu aflatoksina.

5.1.5. Procena potencijala izolata *Aspergillus flavus* za produkciju aflatoksina veštačkom inokulacijom

Kako bi se dokazala toksigenost izolata koji po izrađenim genetskim profilima ukazuju na prisustvo gena zaduženih za sintezu aflatoksina, izvršena je veštačka inokulacija uzoraka semena kukuruza navedenim izolatima. Nakon sedmodnevne inkubacije, HPLC metodom izvršeno je merenje prisustva ukupnih aflatoksina i aflatoksina B1.

Na osnovu rezultata analiza nakon veštačke inokulacije utvrđeno je da, pod simuliranim povoljnim uslovima za ispoljavanje potencijala za produkciju aflatoksina, dolazi do ekspresije gena odgovornih za biosintezu aflatoksina i aktivacije odgovarajućih metaboličkih puteva. Sadržaj aflatoksina određen HPLC metodom prikazan je u tabeli 5.1.5 gde se može uočiti da je kod čak sedam od deset ispitanih sojeva detektovano prisustvo aflatoksina: VA1BSS, LO1ASS, SO1ASS, SA2BSS, SU1ASS, PA2DSS, NA2BSS. S druge strane, kada je reč o izolatima BČ1CSS, ŠT2BSS i RO2BSS, usled odsustva kontaminacije aflatoksinima može se izvesti zaključak da nije došlo do ekspresije gena odgovornih za biosintezu aflatoksina. U prethodnom koraku istraživanja, izolat RO2BSS je okarakterisan kao atoksigeni usled detekcije značajnih delecija u okviru klastera gena za biosintezu aflatoksina. Takođe, ukazano je na visok nivo poklapanja genetskih profila izolata BČ1CSS i ŠT2BSS. Sličnost ovih izolata potvrđena je i na osnovu rezultata veštačke inokulacije gde je dokazan evidentni nedostatak genetskog potencijala za produkciju aflatoksina.

Tabela 5.1.5. Nivo kontaminacije aflatoksinima u veštački inokulisanom semenu kukuruza primenom HPLC metode kao procena aflatoksigenog potencijala deset izolata *Aspergillus flavus*.

Lokalitet	Izolat	AF B1 (mg/kg)	Total (mg/kg)
Štitar	ŠT2BSS	<0,001	<0,001
Valjevo	VA1BSS	989,4	2217,6
Pančevo	PA2DSS	1281,3	1891,0
Sabanta	SA2BSS	1354,4	2147,0
Subotica	SU1ASS	445,7	838,8
Vršac	NA2BSS	102,7	321,8
Loznica	LO1ASS	347,9	962,4
Bečej	BČ1CSS	<0,001	<0,001
Sombor	SO1ASS	330,4	564,6
Rogojevac	RO2BSS	<0,001	<0,001

Prema tvrdnjama drugih autora, klimatski uslovi ispostavili su se kao presudan faktor za razvoj vrste *Aspergillus flavus* i za biosintezu aflatoksina (Medina i sar., 2014). Proizvodna sezona 2019. godine u Republici Srbiji je okarakterisana kao nepovoljna u pogledu vremenskih prilika za razvoj aflatoksigenih gljiva, čemu u prilog govori i podatak da je samo 10% ispitanih uzoraka kukuruza ukazivalo na kontaminaciju. S druge strane, dokazani genetski potencijal i potvrda ekspresije gena u veštački inokulisanom kukuruzu potvrđuju značajan kapacitet sojeva *Aspergillus flavus* prisutnih na poljima Republike Srbije za produkciju aflatoksina.

Navedeni razlozi govore u prilog potrebi za kontrolom vrsta *Aspergillus flavus* na lokalnom području. Povoljni uslovi sredine, koji se pre svega odnose na sušne sezone, favorizuju razvoj toksigenih sojeva i produkciju aflatoksina u maksimalnom kapacitetu, što rezultuje visokim stepenom kontaminacije kukuruza. Gledajući na kukuruz kao usev od strategijskog značaja za državnu ekonomiju, posledice ovakvog scenarija donele bi velike ekonomske gubitke ali i značajan zdravstveni rizik u čitavom lancu ishrane. Potencijalni gubici usled pojave masovne zaraze kukuruza na poljima u Republici Srbiji podsetili bi na 2012. godinu kada su povoljne klimatske prilike, ali i izostanak preventivnih mera u pogledu suzbijanja aflatoksigenih gljiva dovele do dramatičnog ishoda sa ekonomskog, ali i aspekta zdravstvene bezbednosti hrane za animalnu i humanu primenu (Kos i sar., 2014).

Ukoliko bi trend promena klimatskih uslova išao u smeru frekventnih pojava kontaminacije kukuruza, procene za Sjedinjene Američke države, kao

lidera na globalnom tržištu, govore o gubicima u industriji kukuruza u opsegu od 52,1 miliona, pa sve do 1,86 milijardi američkih dolara (Mitchell i sar., 2016). Pored kontaminacija useva aflatoksinima kao dramatične posledice prisustva *Aspergillus flavus*, treba se osvrnuti i na neizbežne gubitke prinosa koji se javljaju usled razvoja fitopatogenih gljiva na poljima. Procene su da fungalna oboljenja žitarica dovode do redukcije prinosa u proseku 15-20%, a u ekstremnim slučajevima i daleko više, do 60 % (Różewicz i sar., 2021).

5.2. Potencijal antagonističkog delovanja *Bacillus* spp. protiv *Aspergillus flavus*

5.2.1. Izolati *Bacillus* spp. iz rizosfere različitih biljnih vrsta

Prvi korak razvoja tehnologije proizvodnje agenasa biološke kontrole podrazumevao je izolaciju potencijalnog proizvodnog mikroorganizma. Pronalazak potentnog izolata koji rešava problem određenog biljnog oboljenja je ujedno i kritična tačka dizajna bioprocesnog rešenja za proizvodnju mikrobioloških biopesticida. Iz ove činjenice proizilazi potreba za sagledavanjem velikog broja kriterijuma koji definišu mogućnost primene datog biokatalizatora za konkretan bioproces. Uspešnost realizacije ove faze u velikoj meri definiše adekvatan odabir polaznog materijala za izolaciju potencijalnog proizvodnog soja, za koji se vezuje velika verovatnoća prisustva prirodnih benefitnih mikroorganizama (Pliego i sar., 2011; Mota i sar., 2017; Besset-Manzoni i sar., 2019).

Rizosfera podrazumeva zonu zemljišta koja se nalazi u neposrednom okruženju korenovog sistema biljaka (Zhou i sar., 2021). Mikrobiom rizosfere se ujedno navodi kao bogat izvor različitih mikroorganizama sa bakterijskim vrstama kao predominantnom grupom (Sehrawat i Sindhu, 2019). Biološka aktivnost ovog zemljišnog regiona ogleda se u intenzivnim interakcijama na relaciji korenskih sistema okolnih biljaka, insekata prisutnih u datom okruženju i mikrobne zajednice koju odlikuje visok diverzitet (Mrkovački, 2012).

Predstavnici roda *Bacillus* su uobičajeno članovi kompleksnog ekosistema rizosfere i ujedno jedan od najčešćih predmeta ispitivanja kada je reč o njihovom benefitnom delovanju na biljke (Zhou i sar., 2021). Izolacija novih sojeva iz regiona rizosfere vezuje se za lokalitete gde postoji dokazano prisustvo benefitnih mikroorganizama. Ovakva struktura članova mikrobne zajednice, obično se prepoznaje u područjima gde dolazi do razvoja zdravih biljaka a pri tome se nalaze u epidemiološkim regijama (Pliego i sar., 2011).

U okviru inicijalne faze istraživanja obuhvaćene ovom doktorskom disertacijom, iz uzoraka rizosfere (slika 5.2.1) 12 povrtarskih biljaka, izvršena je izolacija i dobijanje čistih kultura ukupno 76 potencijalnih proizvodnih sojeva koji su na osnovu morfoloških svojstava svrstani u predstavnike roda *Bacillus* (Vos i sar., 2009).



Slika 5.2.1. Uzorkovanje rizosfere zemljišta.

Lista novoizolovanih sojeva vrste *Bacillus* spp. sa istaknutim lokacijama na kojima je vršena izolacija iz rizosfere naznačenih biljnih kultura, data je u tabeli 8.4.1 u Prilogu 4.

5.2.2. Preliminarni skrining antagonističkog potencijala *Bacillus* spp.

Kontrola fitopatogenih gljiva delovanjem antagonističkih sojeva bakterija smatra se neizostavnim segmentom održive strategije kontrole biljnih oboljenja. Kako bi se uzeli u razmatranje, potencijalni antagonisti moraju da ispunjavaju određene zahteve u pogledu genetske stabilnosti, netoksičnosti, niskih nutritivnih zahteva, sposobnosti opstanka u nepovoljnim uslovima sredine i rasta na ekonomski pristupačnim supstratima (Siahmoshteh i sar., 2018).

Bacillus vrste zauzimaju vodeće mesto u pogledu opsežnosti ispitivanja i karakterizacije među predstavnicima Gram pozitivnih bakterija. Objašnjenje zašto predstavljaju prvi izbor kao potencijalni agensi biološke kontrole, pronalazi se u nizu karakteristika koje ih čine pogodnim za ovakav vid primene (Mora i sar., 2015). Produkcija rezistentnih endospora koje su metabolički aktivne i u nepovoljnim uslovima okruženja, predstavlja važnu prednost ove grupe bakterija u odnosu na nesporogene oblike bioloških agenasa. Termička i otpornost na isušivanje sporogenih formi otvara mogućnost implementacije novih energetski efikasnih tehnika za formulaciju proizvoda koje će obezbediti visoku vijabilnost koja je neophodna za dobijanje stabilnog komercijalnog proizvoda (Yáñez-Mendizabal i sar., 2012).

Prirodno stanište ovih izolata, koje se u velikoj meri vezuje za sloj rizosfere zemljišta, dodatno upućuje na adaptiranost uslovima sredine u kojoj se kasnije dešava aplikacija u vidu proizvoda. U proseku 2-5% bakterija rizosfere poseduje svojstva promocije rasta biljaka (Kumar i sar., 2012). *Bacillus* vrste višestrukim mehanizmom delovanja, uključujući produkciju katalitičkih enzima i lipopetidnih antimikrobnih komponenti, indukciju sistemske otpornosti, solubilizaciju nutrijenata i proizvodnju siderofora, pokazuju visoko benefitno delovanje u funkciji agenasa biološke kontrole (Milijašević-Marčić, 2018, Chowdhury, 2015; Wu i sar., 2017; Chen i sar., 2018).

O aktuelnosti i značaju teme, u prilog govori veliki broj istraživačkih grupa širom sveta koji je usmerio svoj naučni rad ka evaluaciji biokontrolnih agenasa baziranih na *Bacillus* vrstama za suzbijanje uzročnika širokog spektra biljnih oboljenja. Aspekti istraživanja pokrivaju kompletan tok razvoja biopesticida, od izolacije novih potentnih sojeva do iznalaženja rešenja formulacije proizvoda i testiranja na oglednim poljima (Pane i sar., 2012; Meng i sar., 2012; Siahmoshteh i sar., 2018). O efikasnosti njihove primene u biološkoj kontroli govori i rastući broj komercijalnih preparata koji kao aktivne komponente poseduju ćelije odnosno proizvode metabolizma *Bacillus* vrsta (Cawoy i sar., 2011).

Preliminarni skrining potencijala antagonističkog delovanja na aflatoksigene gljive vrste *Aspergillus flavus*, podrazumevao je kultivaciju ukupno 76 novoizolovanih sojeva koji su na osnovu morfoloških karakteristika u prethodnoj fazi istraživanja okarakterisani kao pripadnici roda *Bacillus*. Kultivacija je vođena pod definisanim eksperimentalnim uslovima istaknutim u prethodnom poglavlju doktorske disertacije (4.9.2.1 i 4.11). Nakon završetka inkubacije, uzorci kultivacione tečnosti testirani su protiv odabranog fitopatogena, *Aspergillus flavus* SA2BSS, koji je prethodno okarakterisan kao izolat sa najizraženijim potencijalom produkcije aflatoksina B1. Statistička obrada podataka vršena je u cilju identifikacije proizvodnih sojeva sa najvećim potencijalom primene za suzbijanje predstavnika fitopatogenih gljiva.

Kako bi se definisala statistička značajnost odabira izolata na antagonističko delovanje prema odabranom test mikroorganizmu, dobijeni rezultati prečnika zone inhibicije obrađeni su jednofaktorijalnom analizom varijanse, pri nivou značajnosti od 95%. Rezultati izvršene analize ukazali su da postoji statistički značajan uticaj izolata na vrednosti prečnika zone inhibicije, tj. na antimikrobnu aktivnost koju ispoljavaju proizvodni sojevi prema ispitivanim fitopatogenim vrstama, pri p -vrednosti koja je bila manja od granične, 0,05.

Dankanovim testom višestrukih poređenja, definisane su homogene grupe proizvodnih izolata na osnovu statističke značajnosti razlike u stepenu supresije test mikroorganizma odnosno prečnika zone inhibicije (tabela 5.2.1).

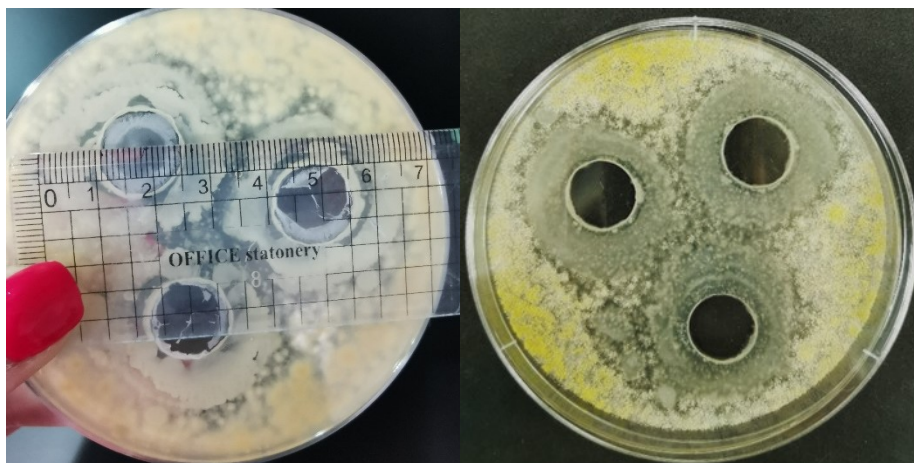
Tabela 5.2.1. Jednofaktorijalna analiza varijanse prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata protiv fitopatogenog predstavnika vrste *Aspergillus flavus* SA2BSS.

	SS	DF	MS	F-vrednost	p-vrednost
Odsečak	13678,75	1	13678,75	5142,219	0,00
Izolat	31264,41	75	416,86	156,09	0,00
Greška	404,33	152	2.66		

SS – suma kvadrata; DF – broj stepeni slobode; MS – suma srednjih kvadrata

Rezultati prikazani u tabeli 8.5.1 u Prilogu 5 ukazuju na intenzitet supresivnog delovanja ispitivanih uzoraka kultivacione tečnosti novoizolovanih sojeva protiv odabranog test mikroorganizma. Od ukupnog broja potencijalnih proizvodnih sojeva, čak 51, odnosno 67%, nije ispoljilo inhibitorni efekat prema testiranom fitopatogenom izolatu. Rezultati skrininga antagonističkog potencijala novoizolovanih sojeva takođe su ukazali da je antimikrobno delovanje na ispitivane fitopatogene ispoljilo 83,33% izolata iz rizosfere šargarepe, 75% paradajza, 60% pastrnaka, 42,86% krompira, 33,33% boranije, 28,57% krastavca, 28,57% paprike, 25% pasulja, 20% kupusa, 16,67% luka, dok izolati rizosfere graška i cvekle nisu pokazali inhibitorni efekat.

Nivo supresije fitopatogena među izolatima koji su pokazali antimikrobno delovanje značajno varira, što potvrđuje i rezultat Dankanovog testa višestrukih poređenja i klasifikacija potencijalnih izolata u grupe sa istom statističkom značajnošću. Izolati dobijeni iz rizosfere boranije, soj Mahunarke 1a (slika 5.2.2) i rizosfere krompira, soj Krompir 4a, pokazali su najintenzivniji inhibitorni efekat prema testiranom predstavniku fitopatogenih gljiva, odnosno izmereni su najveći prečnici zona inhibicije koji se nalaze na istom nivou statističke značajnosti. Primetni potencijal zabeležen je kod još nekoliko izolata, izolovanih iz rizosfere šargarepe, Šargarepa 1, Šargarepa 3a, Šargarepa 3b, boranije, Mahunarke 1b, paprike, Paprika 2a, Paprika 3, pastrnaka, Pastrnak 1b, paradajza, Paradajz 3, kupusa, Kupus 4. Navedeni izolati izdvojeni su za naredni korak skrininga antagonističkog potencijala protiv fitopatogenih sojeva vrste *Aspergillus flavus* uzorkovanih sa kukuruza tokom 2019. godine.



Slika 5.2.2. Zone inhibicije dobijene testiranjem uzorka kultivacione tečnosti proizvodnog izolata Mahunarke 1a protiv aflatoksigenog fitopatogenog izolata *Aspergillus flavus* SA2BSS.

5.2.3. Skrining antagonističkog potencijala *Bacillus* spp.

U nastavku istraživanja ispitano je antagonističko delovanje deset odabranih novoizolovanih sojeva prema 36 izolata *Aspergillus flavus* uzorkovanih tokom 2019. godine sa kururuza uzgajanog na teritoriji Republike Srbije. U ovom koraku istraživanja, u obzir su uzeti i toksigeni i atoksigeni izolati kako bi se dobio sveobuhvatan skrining i uvidelo eventualno postojanje razlika u antagonističkoj aktivnosti novoizolovanih sojeva *Bacillus* spp. prema predstavnicima populacije *Aspergillus flavus*. Uzorci kukuruza sakupljeni su na 18 lokacija u Republici Srbiji: Pančevo, Užice, Loznica, Subotica, Valjevo, Sirig, Novi Sad, Bečej, Sombor, Maglič, Karavukovo, Nadalj, Kulpin, Sivac, Sabanta, Štitar, Lepojević, Rogojevac. Sa svake lokacije korišćena su po dva izolata kao test mikroorganizmi.

Kako bi se definisala statistička značajnost odabira izolata na antagonističko delovanje prema 36 fitopatogenih sojeva vrste *Aspergillus flavus*, dobijeni rezultati prečnika zone inhibicije obrađeni su jednofaktorijalnom analizom varijanse, pri nivou značajnosti od 95%. Rezultati izvršene analize (tabela 5.2.2) ukazali su da postoji statistički značajan uticaj izolata na vrednosti prečnika zone inhibicije, tj. antimikrobnu aktivnost koju ispoljavaju proizvodni sojevi prema ispitivanim fitopatogenim vrstama, pri p -vrednosti koja je bila manja od granične, 0,05.

Tabela 5.2.2. Jednofaktorijalna analiza varijanse prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata protiv fitopatogenih predstavnika vrste *Aspergillus flavus*.

	SS	DF	MS	F-vrednost	p-vrednost
Odsečak	174074,1	1	174074,1	1422,828	0,00
Izolat	200611,7	9	22290,2	182,193	0,00
Greška	123567,2	1010	122,3		

SS – suma kvadrata; DF – broj stepeni slobode; MS – suma srednjih kvadrata

Dankanovim testom višestrukih poređenja definisane su homogene grupe proizvodnih izolata na osnovu statističke značajnosti razlike u stepenu supresije test mikroorganizma odnosno prečnika zone inhibicije (tabela 5.2.3).

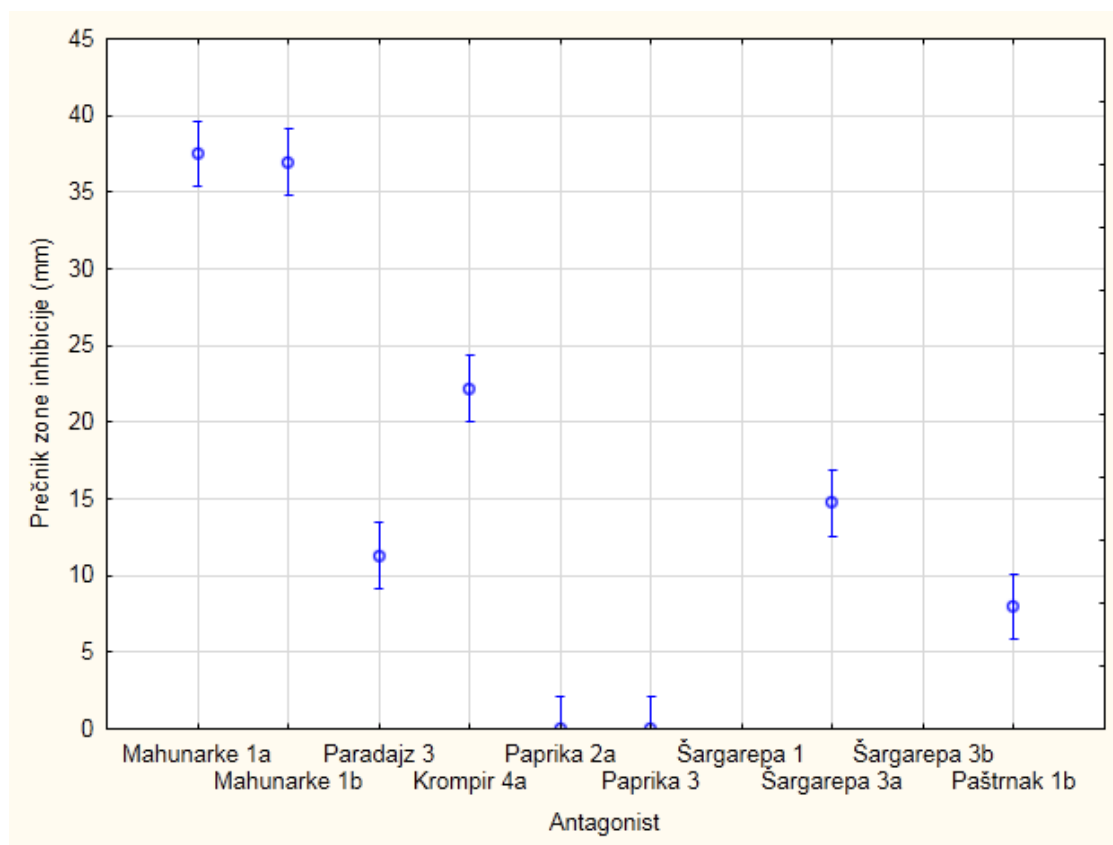
Tabela 5.2.3. Srednje vrednosti prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata protiv fitopatogenih predstavnika vrste *Aspergillus flavus*.

Antagonist	Prečnik zone inhibicije (mm)
Šargarepa 3b	0,00±0,00 ^a
Šargarepa 1	0,00±0,00 ^a
Paprika 2a	0,00±0,00 ^a
Paprika 3	0,00±0,00 ^a
Paštrnak 1b	7,97±12,75 ^b
Paradajz 3	11,27±16,74 ^c
Šargarepa 3a	14,74±16,50 ^d
Krompir 4a	22,18±18,49 ^e
Mahunarke 1b	36,96±9,81 ^f
Mahunarke 1a	37,52±8,82 ^f

Vrednosti označene istim slovima u tabeli nalaze se na istom nivou statističke značajnosti sa intervalom poverenja od 95%.

Radi boljeg vizuelnog prikaza razlika u ispoljenom antagonističkom efektu prema ispitivanim fitopatogenim izolatima, generisani su grafici (slika 5.2.3) sa prikazanim srednjim vrednostima prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti deset različitih proizvodnih izolata primenom softverskog paketa Statistica 13.1 (Dell Inc., Round Rock, Teksas, SAD). Najintenzivnije supresivno delovanje prema ukupnom broju od 36 fitopatogenih sojeva vrste *Aspergillus flavus* zabeleženo je kod sojeva izolovanih iz rizosfere boranije, Mahunarke 1a i Mahunarke 1b, praćeno izolatima Krompir 4a, Šargarepa 3a i Paradajz 3. Ostali izolati nisu ispoljili antimikrobno delovanje prema ispitivanim test mikroorganizmima. Ako se uporede rezultati prethodnog i ovog koraka skrininga sojeva koji ispoljavaju antimikrobnu aktivnost, uviđa se sličnost u poretku i potvrda potencijala najboljih izolata u oba slučaja.

Na osnovu dobijenih rezultata definisano je pet proizvodnih sojeva koji su uzeti u razmatranje pri narednim koracima skrininga, dok su ostali isključeni iz daljeg toka istraživanja. Objašnjenje zašto već u ovoj fazi istraživanja nije definisan proizvodni mikroorganizam, pronalazi se u činjenici da izolat koji je ispoljio najveći potencijal pod primenjenim eksperimentalnim uslovima, ne mora nužno pokazati ista svojstva pri drugačijoj postavci eksperimenta. Promena uslova kultivacije se pre svega odnosi na sastav hranljivog medijuma koji je predmet ispitivanja narednih koraka razvoja tehnologije proizvodnje agenasa biološke kontrole. Uzimanjem u razmatranje većeg broja izolata u narednim faza, ostavljena je mogućnost detekcije drugog proizvodnog mikroorganizma sa još izraženijim potencijalom antagonističke aktivnosti prema fitopatogenim gljivama vrste *Aspergillus flavus*.



Slika 5.2.3. Srednje vrednosti prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata protiv fitopatogenih predstavnika vrste *Aspergillus flavus*.

5.2.4. Skrining genetskog potencijala *Bacillus* spp. za produkciju antimikrobnih komponenti

Značajna uloga u supresiji fitopatogena pripisuje se aktivnosti cikličnih lipopeptida koji pripadaju familiji surfaktina, iturina i fengicina, a nastaju kao proizvodi sekundarnog metabolizma *Bacillus* vrsta. U skladu s tim, dodatni

kriterijum pri odabiru potentnog soja za dalji razvoj bioprocesa podrazumevao je analizu genetskog profila izolata u pogledu potencijala produkcije antimikrobnih komponenti.

Molekularna karakterizacija potencijalnih proizvodnih sojeva vršena je na osnovu detekcije prisustva gena odgovornih za biosintezu lipopeptidnih komponenti primenom specifičnih genetskih markera. Amplifikacijom gena od interesa, identifikovani su sojevi koji poseduju genetski potencijal sinteze komponenti koje odlikuje antagonistička aktivnost prema fitopatogenim izolatima. Na osnovu rezultata prethodnih koraka selekcije, za dalju evaluaciju odabrano je ukupno 5 izolata.

Genetski potencijal izolata za produkciju surfaktina ispitan je amplifikacijom gena *srfAA* koji pripada *srfA* operonu. Nakon izvođenja PCR reakcije pod uslovima definisanim u potpoglavlju 4.6.1. doktorske disertacije, u slučaju prisustva targetiranog gena, generišu se fragmenti veličine 201 bp. Rezultati horizontalne elektroforeze za svih 5 sojeva prikazani su na slici 5.2.4.

Za produkciju surfaktina zaslužna su tri esencijalna genska lokusa, *srfA* operon, *comA* (prethodno *srfB*) i *sfp*. Biosinteza lipopeptida iz familije surfaktina uključuje multienzimski tiokalup (engl. *thiotemplate*) mehanizam. Uloga *comA* i *sfp* odnosi se na kodiranje 4' – fosfopanteteinil transferaze (aktivacijom enzima *srfA* multienzimskog kompleksa) i transkripcionalnog aktivatora *srfA* gena.

Neribozomalnu biosintezu surfaktina diktira *srfAA* operon veličine 25 kb koji se sastoji iz 4 okvira otvorenog čitanja. Funkcija gena *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* vezuje se za kodiranje kondenzacije i adenilacije domena velike peptidne sintetaze odgovorne za sintezu peptidnog lanca, dok *srfAD* kodira domen tioesteraze koji stimuliše inicijaciju procesa (Kim i sar., 2017; Zhao i sar., 2012). Pored produkcije surfaktina, funkcija *srfA* operona se takođe vezuje za sposobnost sporulacije vrsta (Hsieh i sar., 2004). Uloga *sfp* gena vezuje se za regulaciju ekspresije gena za biosintezu surfaktina i kodiranje 4' – fosfopanteteinil transferaze kao aktivirajućeg enzima multienzimskog kompleksa. Gen *sfp* konvertuje neaktivan protein koji transformiše surfaktin sintetaza u aktivan oblik (Plaza i sar., 2015).

Prvi okvir otvorenog čitanja *srfAA* operona *srfA*, kodira enzim koji ima sposobnost da aktivira prvu amino kiselinu, glutamat, i takođe sadrži domen koji aktivira amino kiseline Leu i d-Leu peptidnog segmenta surfaktina. Preostala dva otvorena okvira čitanja *srfA* sadrže domene koji aktiviraju različite amino kiseline: *srfAB* Val, Asp i d-Leu; *srfAC* l-Leu'Ile (Irshad i sar., 2016.).

Genetski potencijal izolata za produkciju lipopeptida koji pripadaju porodici fengicina, definisan je ispitivanjem prisustva gena *fenD* kao jednog od ključnih u okviru klastera odgovornog za njegovu sintezu. U slučaju prisustva ciljanog gena, PCR reakcija rezultira amplifikacijom fragmenata veličine 269 bp. Rezultati horizontalne elektroforeze za svih pet sojeva prikazani su na slici 5.2.4.

Predstavnici porodice fengicina su antifungalni antibiotici u čiju sintezu je uključeno pet neribozomalnih sintetaza koje kodira operon sačinjen iz pet okvira otvorenog čitanja, *fenA*, *fenB*, *fenC*, *fenD* i *fenE* gena (Plaza i sar., 2015). Prvi gen sadrži jedan modul, drugi tri, a poslednja tri dva modula (Tapi i sar., 2010). Gen *fenD* kodira fengicin sintetazu koja aktivira treću i četvrtu amino kiselinu fengicina (Lin i sar., 2005). Region veličine 7,7 kb gena *fenD* koji je uključen u biosintezu dva modula fengicin sintetaze, iskorišćen je za dizajn specifičnog para prajmera FEND1F i FEND1R (Ramarathnam i sar., 2007). Fengicinima se pripisuje primarna uloga u suzbijanju širokog spektra pre svega filamentoznih gljiva (He i sar., 2017).

Genetski potencijal izolata za produkciju lipopeptida kao predstavnika iturina ispitan je amplifikacijom gena *ituD* i *ituA*, i gena *bacD* i *bacA* koji su karakteristični za produkciju bacilomicina kao posebne grupe u okviru porodice. Veličine ampikona za ispitivane gene *ituD*, *ituA*, *bacD* i *bacA* su 1203 bp, 647 bp, 875 bp, 482 bp, redom. Rezultati horizontalne elektroforeze za svih pet sojeva, prikazani su na slici 5.2.4.

Nasuprot surfaktinima i fengicinima, derivati iturina sintetisani su aktivnošću hibridnog kompleksa poliketid sintetaza i neribozomalnih peptid sintetaza (Shi i sar., 2018). Operon iturina je dugačak preko 38 kb i sastoji se iz četiri okvira otvorenog čitanja *ituA*, *ituB*, *ituC* i *ituD* (Plaza i sar., 2015). Gen *ituD* kodira malonil-CoA transacilazu, dok preostala tri gena imaju funkciju kodiranja neribozomalnih peptid sintetaza odgovornih za inkorporaciju prve aminokiseline, *ituA* (Asn) naredne četiri *ituB* (Tyr, Asn, Gln, Pro) i poslednje dve, *ItuC* (Asn, Ser). Pored antimikrobnog delovanja, iturin A pokazuje visoki stepen termostabilnosti. O tome svedoči podatak da se gotovo stoprocentna biološka aktivnost zadržava nakon zagrevanja na 100 °C u trajanju od 30 min. *Bacillus* vrste koje poseduju sposobnost produkcije iturina pokazale su značajan potencijal primene u biološkoj kontroli (Stanković i sar., 2012; Knight i sar., 2018; Arguelles-Arias i sar., 2009; Pusey, 1989; Gong i sar., 2015; Ye i sar., 2012).

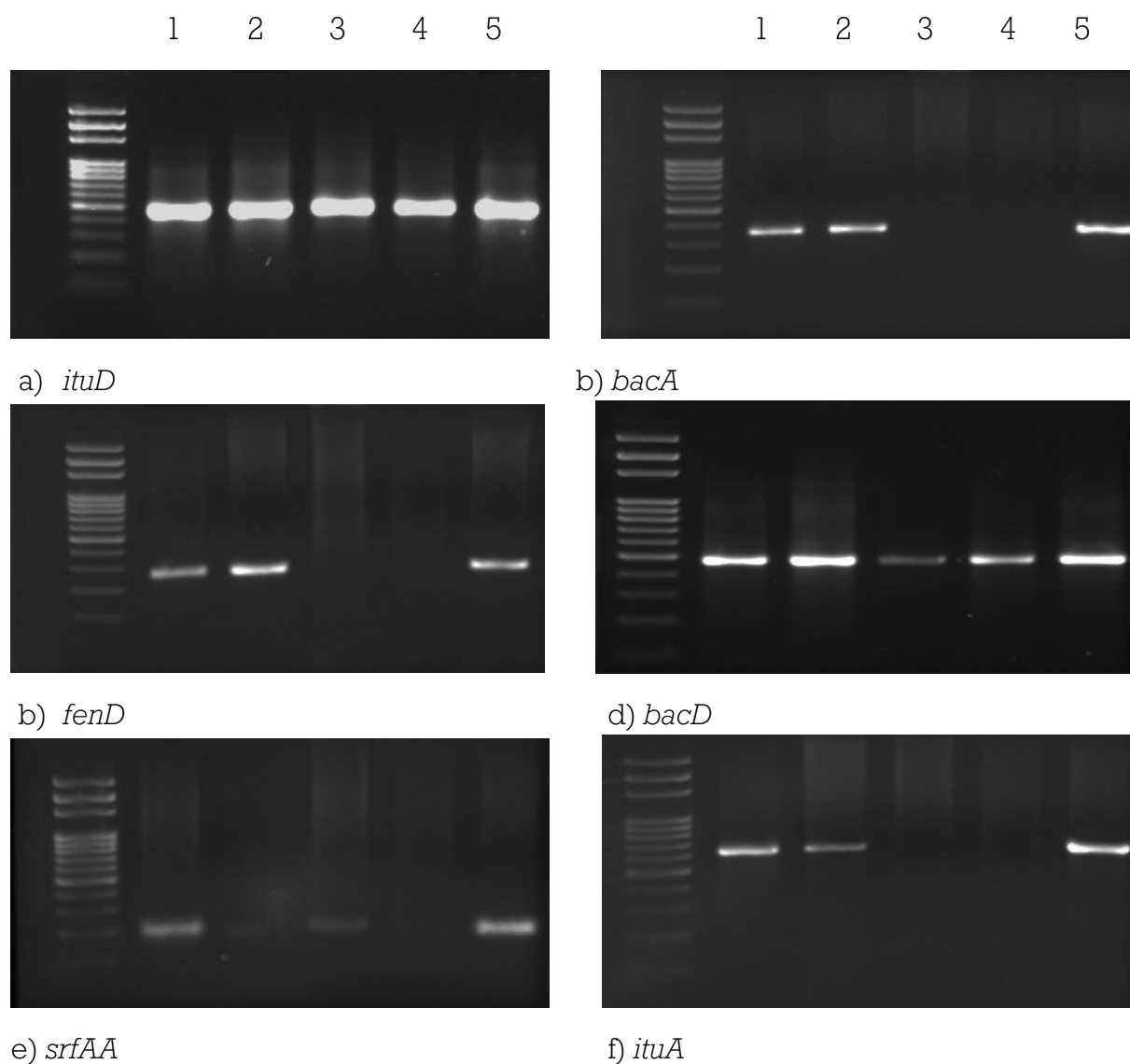
Posebnu grupu lipopeptida u okviru porodice iturina, čine predstavnici bacilomicina. Pored izražene antifungalne aktivnosti, bacilomicini pokazuju

značajan uticaj na sposobnost *Bacillus* vrsta za produkciju biofilmova i kolonizaciju biljaka, što se smatra velikim doprinosom sa aspekta primene datih izolata kao agenasa biološke kontrole (Xu i sar., 2013). Ispitivanja mehanizma delovanja bacilomicina D kao antimikrobnog agensa u suzbijanju gljiva, pokazuju značajne morfološke promene u plazmatičnoj membrani i ćelijskom zidu fitopatogenih vrsta (Gu i sar., 2017). Poređenjem sekvenci bacilomicina D sa ostalim predstavnicima iturina, ustanovljeno je da varijacije počinju sa četvrtom aminokiselinom. Ono što je dodatno karakteristično za bacilomicin D, je potvrđeno sinergističko delovanje u kombinaciji sa fengicinima (Koumoutsis i sar., 2004).

Skrining prisustva gena odgovornih za produkciju lipopeptidnih komponenti je značajan kao metoda brze identifikacije organizama koji poseduju potencijal biosinteze i takođe definisanja komponenti koje su odgovorne za biološku aktivnost. Spoznaja o prisustvu određenih gena je korak koji prethodi identifikaciji aktivnih komponenti i njihovoj daljoj karakterizaciji primenom analitičkih metoda (Jasim i sar., 2016; Plaza i sar., 2015). Genetski profil u pogledu kapaciteta produkcije lipopeptidnih komponenti, ispitan je kod pet potencijalnih proizvodnih izolata, koji su selektovani na osnovu rezultata prethodnih koraka istraživanja u okviru ove doktorske disertacije. Kod izolata Mahunarke 1a dokazano je prisustvo svih šest ispitivanih gena (*ituD*, *bacA*, *fenD*, *bacD*, *srfAA*, *itudA*) Mahunarke 1b pet (*ituD*, *bacA*, *fenD*, *bacD*, *itudA*), Paprika 3 tri (*ituD*, *bacD*, *srfAA*), Šargarepa 3a dva (*ituD*, *bacD*) i kod poslednjeg soja Krompir 4a takođe svih šest (*ituD*, *bacA*, *fenD*, *bacD*, *srfAA*, *itudA*).

Literaturni podaci ukazuju na to da je otkriven limitiran broj sojeva koji poseduju sposobnost koprodukcije većeg broja različitih lipopeptida (Plaza i sar., 2015). Dok se komponente klasifikovane kao pripadnici familije iturina i fengicina svrstavaju u snažne biokontrolne agense aktivne protiv širokog spektra fitopatogena, surfaktini ostvaruju ulogu pojačavača antifungalne aktivnosti lipopeptida iturin A (Li i sar., 2019; Guo i sar., 2014; Fan i sar., 2017^b; Arrebola i sar., 2010). Sojevi *Bacillus* vrsta koji pokazuju simultanu produkciju različitih lipopeptidnih komponenti su od velikog interesa za polje biološke kontrole, imajući u vidu da pored antimikrobnog delovanja ispoljavaju dodatne benefitne aktivnosti. U tom kontekstu navode se sposobnost indukcije sistemske otpornosti, kolonizacija korena biljaka i perzistentnost u sloju rizosfere zemljišta sa direktnim uticajem na međusobne interakcije na relaciji bakterije-biljke (Plaza i sar., 2015; Shahid i sar., 2021; Lam i sar., 2021).

U daljem toku istraživanja u razmatranje su uzeta tri soja sa najizraženijim genetskim potencijalom za produkciju antimikrobnih komponenti. Rezultati dobijeni u ovom koraku istraživanja potvrdili su prethodno generisane podatke o nivou antagonističke aktivnosti ispitivanih sojeva prema fitopatogenim predstavnicima *Aspergillus flavus*, gde vodeće pozicije zauzimaju izolati Mahunarke 1a, Mahunarke 1b i Krompir 4a.



Slika 5.2.4. Produkti PCR reakcija za detekciju gena odgovornih za produkciju lipopeptidnih komponenti: GeneRuler DNA Ladder 100 bp, 1 - Mahunarke 1a; 2 - Mahunarke 1b; 3 - Paprika 3; 4 - Šargarepa 3a; 5 - Krompir 4a.

5.3. Odabir optimalnih izvora osnovnih komponenti hranljivog medijuma

Nakon izvršene molekularne karakterizacije ispitivanih izolata, usledila je naredna faza razvoja bioprocenog rešenja koja se odnosi na optimizaciju sastava hranljive podloge. Razmatrajući rezultate prethodno izvedenih eksperimenata, izbor potencijalnog proizvodnog izolata sužen je na tri soja koja su se izdvojila na osnovu nivoa supresivnog delovanja na testirane fitopatogene i genetskog potencijala za produkciju komponenti sa antimikrobnim delovanjem.

Komercijalna sintetička podloga korišćena u inicijalnim fazama istraživanja smatra se nepogodnim odabirom medijuma za faze skaliranja bioprocena. Objašnjenje se nalazi u nepristupačnoj ceni koja samim tim limitira mogućnost prelaska u razmere industrijske proizvodnje i komercijalizaciju preparata. Otuda proizilazi potreba za ulaganjem dodatnih napora za pronalaskom alternativnih izvora nutritivnih materija koje će obezbediti uslove za rast i odvijanje metaboličke aktivnosti odabranih izolata. Korak dalje u formulaciji kompleksnih medijuma na bazi prirodnih komponenti predstavlja identifikacija otpadnih tokova bogatih odgovarajućim hranljivim materijama (Lima i sar., 2020; Posada-Urbe i sar., 2015; Andrade i sar., 2016; Abdul Razack, 2013; Pajčin i sar., 2019; Soccol i sar., 2009). Važno je istaći da se nutritivni zahtevi mikroorganizama usko vezuju za određeni soj. Sposobnost asimilacije nutrijenata u kvalitativnom i kvantitativnom smislu, prisutnih u hranljivoj podlozi, je jedna od glavnih odrednica prirode ispitivanog soja i njegove metaboličke aktivnosti (Singh i sar., 2017).

Na osnovu dostupnih literaturnih podataka, definisana je osnova za formulaciju hranljive podloge. Prvi korak optimizacije podloge podrazumevao je klasičan pristup (engl. *One factor at a time*, OFAT), odnosno varijaciju jednog faktora, u ovom slučaju izvora ugljenika, dok su ostale komponente podloge bile nepromenjene (Singh i sar., 2017).

5.3.1. Odabir optimalnog izvora ugljenika

Odabir izvora ugljenika kao ključnog makronutrijenta za rast i razmnožavanje proizvodnog mikroorganizma i njegovu metaboličku aktivnost, podrazumevana je faza optimizacije hranljivog medijuma. Nivo asimilacije izvora ugljenika i njegova priroda utiču na vrstu i prinos proizvoda metabolizma, sa mogućnošću kako represivnog uticaja tako i favorizacije intenziteta produkcije (Singh, 2017).

Generalno govoreći, bakterije roda *Bacillus* karakteriše sposobnost usvajanja velikog broja ugljenih hidrata kao glavnog izvora ugljenika i izvora energije (Stülke i Hillen, 2000). Kao kriterijum za odabir potencijalnih izvora ugljenika u razmatranje je uzet i ekonomski aspekt proizvodnje, te su nutrijenti od izbora sagledani i iz ugla njihove zastupljenosti u otpadnim tokovima različitih grana industrijske proizvodnje.

Glukoza je uobičajeno preferabilni izvor ugljenika većine bakterijskih vrsta (Stülke i Hillen, 2000). Istraživanja koja se tiču procene uticaja različitih izvora ugljenika na efikasnost antimikrobne aktivnosti sojeva gotovo po pravilu uključuju glukozu kao potencijalni izvor (Eswari i sar., 2016; Zhang i sar., 2020; Abdel-Mawgoud i sar., 2008; El-Banna, 2005). Glukoza je ujedno sastavna komponenta otpadnih tokova prehrambene industrije sa akcentom na preradu vina, voća i povrća. Navedeni otpadni tokovi su takođe značajan izvor fruktoze, koja se pored glukoze najčešće uvrštava u ispitivanja optimizacije sastava hranljive podloge za kultivaciju *Bacillus* vrsta (Hmidet i sar., 2017).

Predstavnicima roda *Bacillus* pripisuje se izražena sposobnost enzimske aktivnosti i usvajanje nutrijenata iz različitih supstrata (Latorre i sar., 2016; Danilova i Sharipova, 2020). U razmatranje kao potencijalni izvori ugljenika, uzeti su u obzir celuloza (Amore i sar., 2013; Ahmad i sar., 2013), skrob, maltoza i laktoza. Celuloza je najrasprostranjeniji ugljeni hidrat u prirodi i istovremeno najvažniji obnovljivi izvor. Od ekonomskog interesa je iznalaženje rešenja u pogledu valorizacije značajnih količina celuloze kao komponente agroceluloznog otpada u proizvode sa dodatom tržišnom vrednošću, kakvim se, među ostalim, smatraju i mikrobiološki biopesticidi (Ventorino i sar., 2015; Théâtre i sar., 2021; Siu-Rodas i sar., 2018). Maltoza je bitna komponenta otpadnih tokova proizvodnje piva (Moshtagh i sar., 2019) dok laktoza ulazi u sastav otpadnih tokova mlečne industrije. Ujedno su maltaze i laktaze bitne grupe ekstracelularnih hidrolitičkih enzima koje proizvode izolati roda *Bacillus* (Nawaz i sar., 2019; Venkateswarulu i sar., 2020) koje omogućavaju usvajanje ugljenika iz ovih supstrata. Analogno tome, otpadni tokovi proizvodnje brašna i pekarskih proizvoda obiluju skrobom, koji se takođe može uvrstiti kao potencijalni izvor ugljenika izimajući u obzir izraženu amilolitičku aktivnost predstavnika roda *Bacillus* (Kumar i sar., 2019). Sirovi glicerol je nusproizvod industrije biodizela koju karakteriše trend ekspanzije proizvodnje što dodatno govori o potrebi pronalaska rešenja za njegovu konverziju u vredne proizvode (Saimmai i sar., 2012; Sousa i sar., 2014).

Kultivacija proizvodnih sojeva vršena je primenom sedam različitih medijuma na bazi odabranih izvora ugljenika: glukoza, fruktoza, maltoza, laktoza, celuloza, skrob i glicerol. Za svih sedam kombinacija, definisane su identične vrednosti koncentracije izvora ugljenika i ostalih komponenti hranljive podloge. Nakon izvedene kultivacije, evaluacija antimikrobne aktivnosti vršena je na isti način kao u prethodnim fazama istraživanja, odnosno određivanjem prečnika zone inhibicije testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti difuzionom metodom bunara.

Inicijalna faza optimizacije sastava hranljivog medijuma je ujedno predstavljala i dodatni korak skrininga potencijala odabranih izolata za antagonističko delovanje prema ciljanim fitopatogenima. Odabir najpotentnijeg soja sužen je na tri izolata koja su u prethodnim fazama pokazali najveći potencijal antagonističkog delovanja.

Kako bi se definisala statistička značajnost uticaja izvora ugljenika na antimikrobnu aktivnost proizvodnih izolata, dobijeni rezultati prečnika zone inhibicije obrađeni su jednofaktorijalnom analizom varijanse, pri nivou značajnosti od 95% (tabela 5.3.1). Rezultati izvršene analize ukazali su da postoji statistički značajan uticaj izvora ugljenika na vrednosti prečnika zone inhibicije, tj. antimikrobnu aktivnost koju ispoljavaju proizvodni sojevi prema ispitivanim fitopatogenim vrstama, pri p -vrednosti koja je bila manja od granične, 0,05.

Tabela 5.3.1. Jednofaktorijalna analiza varijanse prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata protiv fitopatogenih predstavnika vrste *Aspergillus flavus*.

	SS	DF	MS	F-vrednost	p -vrednost
Odsečak	114660,2	1	114660,2	15857,40	0,000000
Izvor ugljenika	304,9	6	50,8	7,03	0,000001
Greška	1467,8	203	7,2		

SS – suma kvadrata; DF – broj stepeni slobode; MS – suma srednjih kvadrata

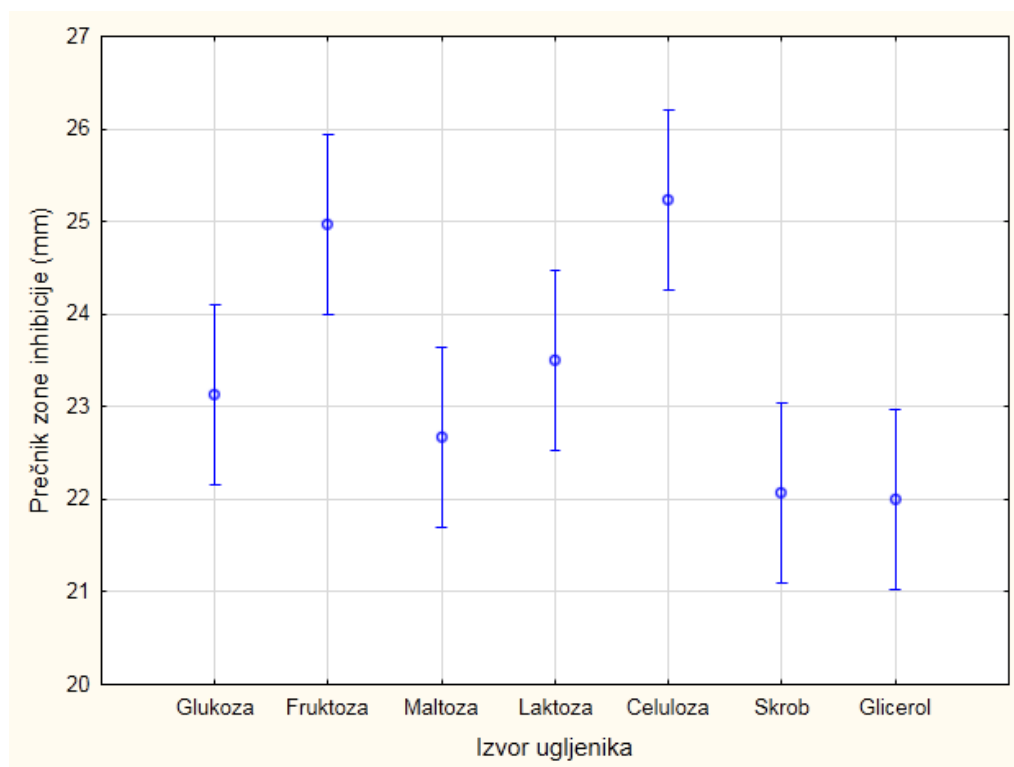
Dankanovim testom višestrukih poređenja definisane su homogene grupe različitih izvora ugljenika na osnovu statističke značajnosti razlike u stepenu supresije test mikroorganizma odnosno prečnika zone inhibicije (tabela 5.3.2).

Tabela 5.3.2. Srednje vrednosti prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata sa različitim izvorima ugljenika protiv fitopatogenih predstavnika vrste *Aspergillus flavus*.

Izvor ugljenika	Prečnik zone inhibicije (mm)
Glicerol	22,00000 ^a
Skrob	22,06667 ^a
Maltoza	22,66667 ^a
Glukoza	23,13333 ^a
Laktoza	23,50000 ^a
Fruktoza	24,96667 ^b
Celuloza	25,23333 ^b

Vrednosti označene istim slovima u tabeli nalaze se na istom nivou statističke značajnosti sa intervalom poverenja od 95%.

Radi boljeg vizuelnog prikaza razlika u ispoljenom anatagonističkom efektu prema ispitivanim fitopatogenim izolatima, generisani su grafici sa prikazanim srednjim vrednostima prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti sa različitim izvorima ugljenika primenom softverskog paketa Statistica 13.1 (Dell Inc., Round Rock, Teksas, SAD). Sa slike 5.3.1 se jasno uočava da se najjače antagonističko deovanje beleži u uzorcima gde su kao izvori ugljenika primenjeni fruktoza i celuloza.



Slika 5.3.1. Srednje vrednosti prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata sa različitim izvorima ugljenika protiv fitopatogenih predstavnika vrste *Aspergillus flavus*.

Objedinjeni rezultati za sva tri ispitivana soja u pogledu odabira optimalnog izvora ugljenika, ukazali su na najveći potencijal antagonističkog delovanja uzoraka dobijenih nakon kultivacije na hranljivom medijumu sa celulozom i fruktozom.

5.3.2. Odabir optimalnog izvora organskog azota

Kao što je to slučaj sa izvorom ugljenika, odabir izvora azota predstavlja bazalni korak optimizacije hranljivog medijuma. Mikroorganizmi poseduju sposobnost usvajanja i organskih i neorganskih izvora azota, što pruža osnovu ispitivanja mogućnosti primene komponenti i jednog i drugog porekla pri formulaciji medijuma. Kako su u prethodnom koraku optimizacije sastava kultivacionog medijuma definisani najpogodniji izvori ugljenika, u narednoj fazi ispitivanja uzeto je u obzir ukupno pet različitih organskih izvora azota, dok je kao neorganski izvor ugljenika korišćen amonijum-sulfat.

Kao najčešći neorganski izvor azota navode se nitrati i amonijumove soli, ili kombinacija jednog i drugog u opsegu koncentracija od 2–12 g/l. Odabir soli koja sadrži azot igra odlučujuću ulogu u definisanju respiratorne aktivnosti fakultativnih anaeroba u koje se klasifikuju i predstavnici roda *Bacillus* (Rangarajan i Clarke, 2016).

Kao potencijalni izvori azota, u skladu sa literaturnim podacima sličnih istraživanja, uzeti su obzir pepton, tripton, ekstrakt kvasca, urea, L-glutaminska kiselina (Moghannem i sar., 2018; Zhu i sar., 2018; Liu i sar., 2012; Al-Ali i sar., 2018; Chen i sar., 2018, Lal i sar., 2016).

Kultivacija proizvodnog soja, *Bacillus* sp. BioSol021, vršena je primenom deset različitih medijuma koje čine kombinacije dva odarana izvora ugljenika, fruktoza i celuloza, i pet, prethodno navedenih, organskih izvora azota. Za svih deset kombinacija, definisane su identične vrednosti koncentracije izvora ugljenika, neorganskog izvora azota i ostalih komponenti hranljive podloge. Nakon izvedene kultivacije, evaluacija antimikrobne aktivnosti vršena je na isti način kao u prethodnim koracima istraživanja, određivanjem prečnika zone inhibicije testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti difuzionom metodom bunara.

Kako bi se definisala statistička značajnost uticaja izvora azota na antimikrobnu aktivnost proizvodnog izolata, dobijeni rezultati prečnika zone inhibicije obrađeni su jednofaktorijalnom analizom varijanse, pri nivou značajnosti od 95% (tabela 5.3.3). Rezultati izvršene analize ukazali su da postoji statistički značajan uticaj izvora azota na vrednosti prečnika zone inhibicije, tj. antimikrobnu aktivnost koju ispoljava proizvodni soj prema ispitivanim fitopatogenim vrstama, pri p -vrednosti koja je bila manja od granične, 0,05.

Tabela 5.3.3. Jednofaktorijalna analiza varijanse prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata sa različitim izvorima organskog azota protiv fitopatogenih predstavnika vrste *Aspergillus flavus*.

	SS	DF	MS	F-vrednost	p -vrednost
Odsečak	20 698,13	1	2 069,13	3 110,942	0,000000
Izvor azota	15,53	4	3,88	0,584	0,677330
Greška	166,33	25	6,65		

SS – suma kvadrata; DF – broj stepeni slobode; MS – suma srednjih kvadrata

Dankanovim testom višestrukih poređenja definisane su homogene grupe različitih izvora azota na osnovu statističke značajnosti razlike u stepenu supresije test mikroorganizma, odnosno prečnika zone inhibicije (tabela 5.3.4).

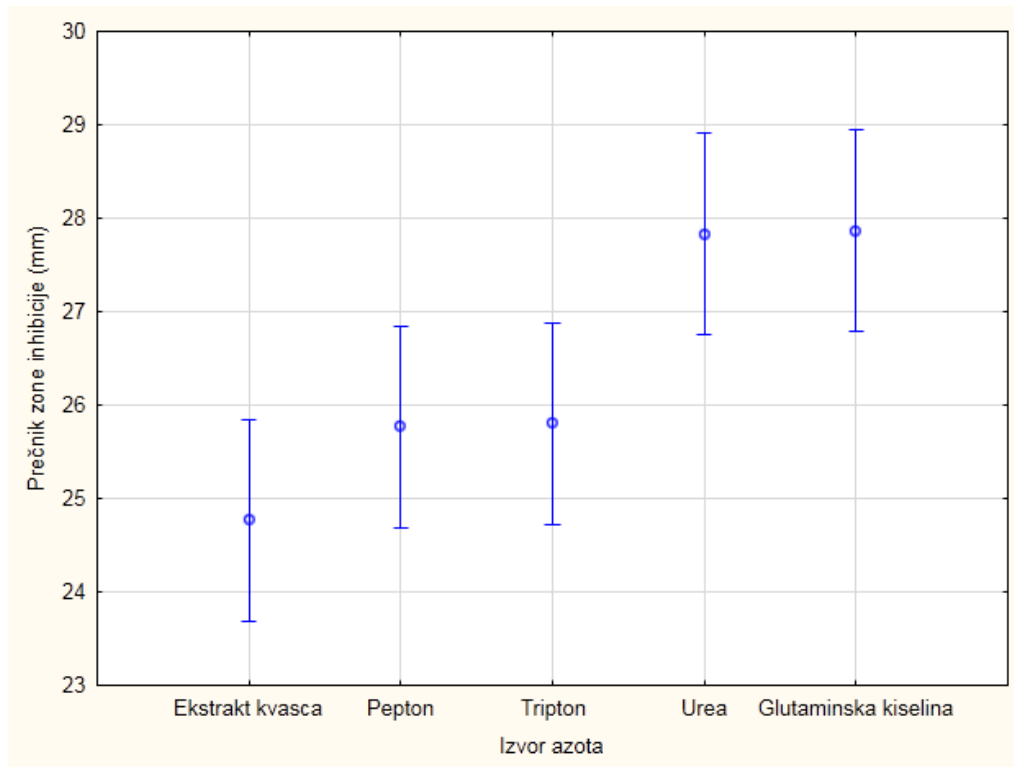
Tabela 5.3.4. Srednje vrednosti prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata sa različitim izvorima organskog azota protiv fitopatogenih predstavnika vrste *Aspergillus flavus*.

Izvor azota	Prečnik zone inhibicije (mm)
Ekstrakt kvasca	25,33333 ^a
Pepton	25,50000 ^a
Tripton	26,50000 ^a
Urea	27,00000 ^b
Glutaminska kiselina	27,00000 ^b

Vrednosti označene istim slovima u tabeli nalaze se na istom nivou statističke značajnosti sa intervalom poverenja od 95%.

Radi boljeg vizuelnog prikaza razlika u ispoljenom antagonističkom efektu prema ispitivanim fitopatogenim izolatima, generisani su grafici (slika 5.3.2) sa prikazanim srednjim vrednostima prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti sa različitim kombinacijama izvora azota i ugljenika, odnosno fruktoze i celuloze, primenom softverskog paketa Statistica 13.1 (Dell Inc., Round Rock, Teksas, SAD). Objedinjeni rezultati koji obuhvataju kombinacije i sa celulozom i fruktozom kao izvorom ugljenika, ukazuju da je najintenzivnije antagonističko delovanje zabeleženo u uzorcima gde su kao izvori azota primenjeni urea i glutaminska kiselina. I pored dokazane

statističke značajnosti, važno je napomenuti da su dobijene vrednosti zona inhibicije vrlo bliske, te da ovakve razlike imaju manji uticaj u praktičnom smislu.



Slika 5.3.2. Srednje vrednosti prečnika zona inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata sa različitim izvorima azota protiv fitopatogenih predstavnika vrste *Aspergillus flavus*.

Poređem maksimalnih vrednosti prečnika zone inhibicije u setovima eksperimenata izvedenih na podlozi sa celulozom i fruktozom, za dalje faze optimizacije hranljive podloge, odabrana je kombinacija gde se kao izvor ugljenika koristi celuloza, a izvor azota urea.

Ovakav odabir predstavlja dobru polaznu osnovu kreiranja skalabilnog bioprocenog rešenja primenljivog u uslovima proizvodnje koja nadmašuje laboratorijske kapacitete. Biokonverzija celuloznog materijala i uloga celulitičkih mikroorganizama u recirkulaciji celuloze kao važnog biopolimera, okarakterisani su kao fenomen od izrazitog ekološkog i ekonomskog značaja (Das i Singh, 2004; Kim i sar., 2012; Ma i sar, 2020). Uzimajući u obzir udeo cene hranljivog medijuma u strukturi troškova biotehnološke proizvodnje, alternativni i finansijski pristupačni izvori ugljenika i azota su preduslov stvaranja efikasnog bioprocenog rešenja i sa ekonomske tačke gledišta. Celuloza je razmatrana kao izvor ugljenika za produkciju različitih bioproizvoda primenom proizvodnih izolata koji pripadaju rodu *Bacillus*. Zhang i sar. su ispitali mogućnost proizvodnje laktata gde je kao proizvodni mikroorganizam korišćen genetski modifikovan celulitički soj *Bacillus subtilis* (Zhang i sar., 2011). Celulozni otpadni

materijal takođe je korišćen za dobijanje enzima celulaze primenom izolata roda *Bacillus* (Orji i sar., 2013; Lee i sar., 2008; Rathnan i sar., 2013; Ahmad i sar., 2013). Pored toga, urea je definisana kao lako dostupan i jedan od ekonomski najisplativijih izvora azota. U nekoliko istraživanja gde se kao proizvodni izolati koriste pripadnici roda *Bacillus*, dokazano je da urea favorizuje kako rast ćelija tako i metaboličku aktivnost mikroorganizama usmerenu ka proizvodnji biosurfaktanata i biopolimera (Kulpreecha i sar., 2008; Ghribi i sar., 2011; Zhang i sar., 2016).

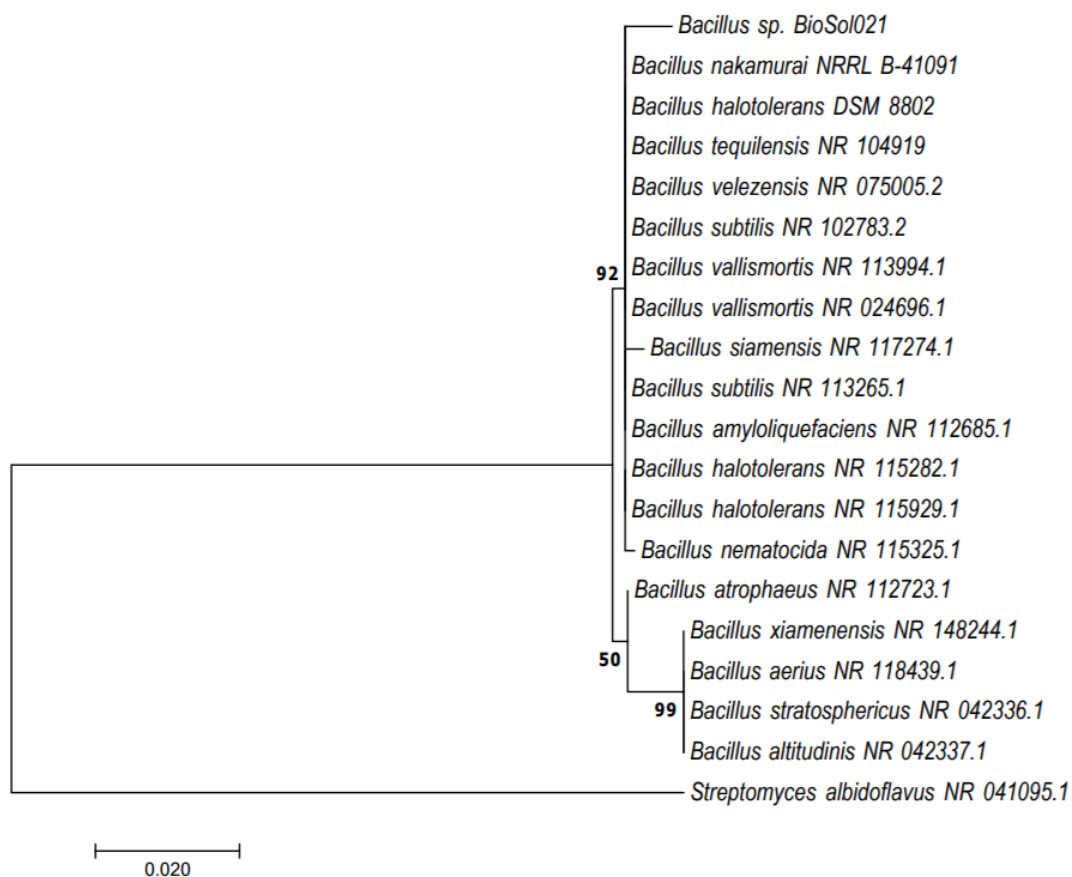
5.4. Odabir i filogenetska analiza 16S rRNK sekvence proizvodnog izolata *Bacillus* sp.

Na osnovu rezultata prethodnih koraka istraživanja kao proizvodni mikroorganizam odabran je soj Mahunarke 1a, izolovan iz uzorka rizosfere biljne vrste *Phaseolus vulgaris*, na lokaciji Tovariševo, Republika Srbija. Izolati roda *Bacillus* izolovani iz rizosfere mahunarki, prvenstveno pasulja i boranije, su u nekoliko naučnih studija okarakterisani kao sojevi od velikog značaja sa aspekta poljoprivrede u pogledu, kako benefiitnih svojstava koje ispoljavaju prema biljkama, tako i izražene antagonističke aktivnosti prema fitopatogenim izolatima (Shafi i sar., 2017; Pérez-García i sar., 2011; Santoyo i sar., 2012). Ujedno su predstavnici roda *Bacillus* definisani kao ključni članovi mikrobioma rizosfere *Phaseolus vulgaris* (Stopnisek i Shade, 2021). U odnosu na ostale pripadnike mikrobne zajednice izdvajaju se po svom superioronom efektu promotora rasta biljaka i potencijalu produkcije antimikrobnih metabolita (Nabti i sar., 2018; Sendi i sar., 2020).

Identifikacija odabranog proizvodnog izolata molekularnim tehnikama podrazumevala je amplifikaciju gena za 16S rRNK primenom PCR metode, i potom sekvenciranje umnoženog DNK fragmenta. Poravnavanje dobijene parcijalne sekvence za 16S rRNK gen, koja se sastojala iz 1416 bp, izvedeno je primenom BLAST softvera za pretraživanje homologe nukleotidne sekvence upoređivanjem sa bazom podataka banke gena (engl. *GenBank*) NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI).

Radi definisanja genetske srodnosti ispitivanog izolata sa referentnim sojevima dostupnim u bazi podataka, izvršena je filogenetska analiza generisanjem filogenetskog stabla (slika 5.4.1). Za konstrukciju filogenetskog stabla primenjena je metoda maksimalne verovatnoće (engl. *Maximum Likelihood*), kao uobičajeni statistički pristup za procenu nepoznatih parametara modela verovatnoće koji se zasniva na Tamura-Nei modelu (Tamura i Nei, 1993).

Kao *outgroup* izolat koji ne pripada rodu *Bacillus* korišćen je soj *Streptomyces albidoflavus*.



Slika 5.4.1. Filogenetsko stablo konstruisano primenom metode maksimalne verovatnoće (*Maximum likelihood*) sa sekvencom gena za 16S rRNK proizvodnog izolata *Bacillus* sp. BioSol021.

Rezultati filogenetske analize ukazali su na najveću bliskost ispitivanog soja sa izolatima koji pripadaju operativnoj grupi *Bacillus amyloliquefaciens* i još nekoliko predstavnika srodnih vrsta. Japanski naučnik Juičiro Fukumoto prvi put je izolovao *Bacillus amyloliquefaciens* iz uzorka zemljišta 1943. godine. Zasnvano na filogenetskim i fenetičkim analizama, ova vrsta je, zajedno sa usko srodnim *Bacillus subtilis* i *Bacillus licheniformis*, svrstana u kompleks vrsta *Bacillus subtilis*. Dalje podgrupisanje podrazumeva postojanje operativne grupe *Bacillus amyloliquefaciens* koja obuhvata četiri bakterijske vrste: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus velezensis*, i *Bacillus nakamurai* (Ngalimat i sar., 2021; Fan i sar., 2017^a). Vrsta *Bacillus atrophaeus* koja se takođe uočava na generisanom filogenetskom stablu je gotovo identična vrsti *Bacillus subtilis* uz jedinu razliku koja se odnosi na produkciju pigmenta na medijumu sa organskim izvorom azota (Burke i sar., 2004). Kao bliski srodnici *Bacillus subtilis* pojavljuju se vrste *Bacillus vallismorits* (Roberts i sar., 1996) i zemljišni izolat

Bacillus nematocida, za koji je dokazano da poseduje nematocidnu aktivnost (Lin i sar., 2005). *Bacillus tequilensis* je još jedan soj blizak članovima operativne grupe *Bacillus amyloliquefacines* sa izraženom celulitičkom aktivnošću i antifungalnim delovanjem (Fachrial i sar., 2020; Li i sar., 2019).

Predstavnici operativne grupe *Bacillus amyloliquefaciens* prisutni su u različitim ekološkim nišama, prevashodno zemljištu, biljkama, hrani, akvatičnim sredinama i digestivnom traktu životinja i insekata. Ispitivanja na nivou genoma ukazala su na veliki potencijal njihove primene sa biotehnološkog aspekta. Odatle proizilazi širok asortiman aplikacija ovih sojeva kao promotora rasta biljaka, biokontrolnih agenasa, probiotika, agenasa za bioremedijaciju i producera komercijalnih enzima i antibiotika (Ngalimat i sar., 2021; Fan i sar., 2017^a; Chen i sar., 2020^b; Palazzini sar., 2016; Kim i sar., 2021; Liu i sar., 2019; Jiao i sar., 2020; Dong i sar., 2019; Xie i sar., 2021; Santoso i sar., 2021).

Bakterije vrsta koje sačinjavaju operativnu grupu *Bacillus amzloliquefaciens* su Gram pozitivne, pokretljive pomoću peritrihnih flagela, sa izraženom sposobnošću formiranja endospora. Prosečna veličina ćelija iznosi $0,7\text{--}0,9 \times 1,8\text{--}3,0 \mu\text{m}$, spore su ovalnog oblika termički rezistentne, takođe otporne na delovanje UV zračenja. Prosečan G + C sadržaj (mol%) je oko 45%. Optimalni uslovi rasta u pogledu temperature su 28–40 °C, sa potpunom inhibicijom ispod 15 °C, odnosno iznad 50 °C. Toleranti su na prisustvo natrijum-hlorida u koncentraciji do 10%, dok je otpimalni opseg vrednosti pH 6–9. U pogledu metaboličke aktivnosti i sposobnosti usvajanja supstrata, ne usvajaju tirozin, dok citrate, laktozu, trehalozu, kazein, želatin, skrob, fruktozu, celobiozu, glukozu, glicerol, maltozu, manitol, rafinozu, salicin i saharozu metabolišu. Produkuju acetoin i fosfataze, redukuju nitrate do nitrita (Priest i sar., 1987; Ngalimat i sar., 2021).

Značaj ovih važnih predstavnika roda *Bacillus* kao biokontrolnih agenasa leži u višestrukome mehanizmu delovanja u svojstvu benefitnih mikroorganizma sa aspekta poljoprivredne proizvodnje. Usled izražene sposobnosti kolonizacije rizosfere, promocije rasta biljaka i efikasnosti u pogledu supresije fitopatogenih vrsta nalaze primenu u ulozi biopesticida i biođubriva. Kompetitivna aktivnost vrsta pripisuje se sposobnosti produkcije sekundarnih metabolita koji poseduju širok spektar antimikrobne aktivnosti prema predstavnicima Gram pozitivnih, Gram negativnih bakterija (Medeot i sar., 2020) i gljiva (Alvarez i sar., 2012). Primena proizvoda koji nastaju kao rezultat metaboličke aktivnosti članova operativne grupe *Bacillus amyloliquefaciens* susreće se u oblasti prehrambene, farmaceutske industrije, poljoprivredne proizvodnje i oblasti zaštite životne

sredine. Pripadnici datih sojeva su agensi biološke kontrole od značaja u suzbijanju zemljišnih patogena, patogenih vrsta koje ugrožavaju biljne vrste nakon faze berbe i u skladištima, insekata, nematoda i vaši.

Antagonističko delovanje pripisuje se kompeticiji za esencijalne nutrijente i prostor, sintezi antimikrobnih komponenti i indukciji stečene systemske rezistencije, gde značajan doprinos potiče od isparljivih jedinjenja, kao što je acetoin. Sposobnost kolonizacije biljaka formiranjem stabilnih biofilmova dodatno uvećava značaj u borbi protiv zemljišnih fitopatogena. Dodatni aspekt primene ovih mikroorganizama u poljoprivrednom sektoru odnosi se na činjenicu da ne ispoljavaju negativna svojstva na netargetirane organizme i karakterišu se kao bezbedni agensi za optimizaciju uslova ekosistema (Mullins i sar., 2020; Putri i sar., 2020; Dunlap i sar., 2019; Masum i sar., 2018).

Takođe, za navedene predstavnike roda *Bacillus* važi da su vredan izvor komercijalnih enzima, kao što su α -amilaze, proteaze i lipaze. Američka agencija za hranu i lekove (FDA) je 1999. godine iznela odluku o GRAS (engl. *Generally Regarded As Safe*, GRAS) standardu α -amilaza i proteaza koje nastaju metaboličkom aktivnošću vrste *Bacillus subtilis*. Pored navedenih enzima, predstavnici operativne grupe *Bacillus amyloliquefaciens* poseduju sposobnost produkcije celulaza, ksilanaza, pektinaza, aminotransferaza, amilaza, peroksidaza i lakaza (Ngalimat i sar., 2021; Abd-Elhalem i sar., 2015; Devaraj i sar., 2019; Deb i sar., 2013; Mazeed i sar., 2012; Ghosh i sar., 2020).

Primena pripadnika operativne grupe *Bacillus amyloliquefaciens* kao bakterija koje promovišu rast biljaka (*PGPR*) sa širokim spektrom metaboličke aktivnosti, nalazi se bitnom i sa aspekta degradacije kontaminanata sa područja visoko zagađenog zemljišta. Ove vrste su široko korišćene i za ekstrakciju lipaza iz produkcije biodizela, kao biosorbent za uklanjanje i degradaciju polutanata. Rezultati istraživanja ukazali su na združeno delovanje izolata *Bacillus amyloliquefaciens* YP6, kao agensa koji promoviše rast biljaka ali istovremeno ima ulogu u uklanjanju širokog spektra organofosfornih pesticida (Ngalimat i sar., 2021; Cao i sar., 2018; Balderas-Ruiz i sar., 2020; Jiao i sar., 2021).

Poseban značaj sa komercijalnog aspekta ističe se na polju primene biosurfaktanata, antimikrobnih lipopeptida, probiotika i sredstava za prezervaciju hrane (Abdallah i sar., 2019; Liu i sar., 2010). Specifičan kapacitet sporulacije omogućava visok stepen rezistencije, sveprisutnost u različitim staništima i stabilnost u fomulisanim finalnim preparatima (Toral i sar., 2018). I pored evidentnog potencijala za različite vidove primene, komercijalizacija

preparata još uvek nije podjednako aktuelna u ostalim sferama kao što je to slučaj sa proizvodima namenjenim primeni u oblasti poljoprivrede (Ngalimat i sar., 2021). Komercijalno dostupan soj *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (FZB42; RhizoVital®42, Abitep GmbH) je prepoznat kao tip podvrste *plantarum*. Takođe mesto na tržištu pronašao je i izolat *Bacillus amyloliquefaciens* QST73 (Serenade, Bayer Crop Science) (Kulimushi i sar., 2018). *Bacillus amyloliquefaciens* se navodi kao dominantni producer lipopeptidnih komponenti familije fengicina, koji imaju značajnu ulogu u supresiji filamentoznih gljiva (Kulimushi i sar., 2018). Efekat biološke kontrole se u slučaju fengicina postiže antibiozom ali i indukovanjem imunog sistema biljke. Kao i ostali ciklični lipopeptidi i fengicine karakteriše niska toksičnost, visok stepen biodegradabilnosti, visoka rezistetnost na ekstremne temperature, pH, salinitet, što ih čini idealnom zamenom za hemijska sredstva (Kaki i sar., 2020). S druge strane lipopeptidima iz familije surfaktina se pripisuje limitirano delovanje kada je reč o antagonističkoj aktivnosti prema fitoptaogenim gljivama. Značaj surfaktina sa aspekta biološke kontrole se pripisuje intenzivnom delovanju kao biosurfaktanta, formiranju biofilmova, i sinergističkom antimikrobnom delovanju koje ispoljava u kombinaciji sa iturinima. Nasuprot tome, iturini pokazuju značajan efekat kao antifungalni agensi (Alvarez i sar., 2012).

5.5. Modelovanje i optimizacija sastava hranljivog medijuma

Nakon faza odabira optimalnih izvora ugljenika i azota i definisanja kvalitativnog sastava hranljivog medijuma, sledi naredni korak optimizacije koji podrazumeva određivanje kvantitativnog sadržaja hranljivog medijuma na bazi odabranih komponenti. Modelovanje uticaja koncentracija definisanih komponenti hranljivog medijuma na odabrane odzive, vrši se sa ciljem generisanja matematičkih modela koji opisuju ponašanje izlaznih parametara bioprocasa sa promenom nezavisno promenljivih faktora. U konkretnom slučaju radi se o inicijalnim koncentracijama odabranih izvora nutrijenata hranljivog medijuma kao nezavisno promenljivim, dok je kao odziv odnosno zavisno promenljiva, praćena vrednost prečnika zone inhibicije koja direktno upućuje na nivo antagonističkog delovanja prema testiranim fitopatogenim izolatima. Kao nezavisno promenljive definisane su inicijalne koncentracije osnovnih komponenti hranljivog medijuma u opsezima: izvora ugljenika (celuloza) 5–35 g/l, organskog izvora azota (urea) 0–5 g/l, neorganskog izvora azota ((NH₄)₂SO₄) 0–5 g/l i izvora fosfora (K₂HPO₄) 0,5–4,5 g/l. Pored ovih komponenti, u svakoj kombinaciji hranljivi medijum je sadržao i 0,3 g/l MgSO₄·7H₂O.

Modelovanje je izvršeno primenom metodologija odzivne površine i veštačkih neuronskih mreža. Modelovanjem primenom metodologije odzivne površine definišu se vrednosti odsečka, linearnih, kvadratnih i koeficijenata interakcije koji određuju uticaj svake od nezavisnih promenljivih na definisani odziv. Generisani matematički model u obliku jednačine polinoma drugog reda opisuje ponašanje jedne zavisne promenljive u zavisnosti od odabranog broja nezavisnih promenljivih. Za razliku od ovog pristupa, veštačke neuronske mreže, imaju sposobnost modelovanja podataka kompleksnijim krivama, dok se sam model i njegovi unutrašnji parametri posmatraju kao crna kutija (Krogh, 2008). Značaj primene metodologije odzivne površine, kada je reč o biotehnološkoj proizvodnji u opštem slučaju, leži u definisanju uticaja pojedinačnih faktora i njihovih međusobnih interakcija na posmatrani odziv i bolje razumevanje složenih odnosa unutar posmatranog sistema. S druge strane, glavni nedostatak ove metode odnosi se na nemogućnost ekstrapolacije dobijenih zavisnosti za vrednosti faktora izvan prethodno definisanog opsega. Navedena limitacija, prevazilazi se generisanjem modela primenom metodologije veštačkih neuronskih mreža koja dolazi do podataka o dubokoj statičkoj zavisnosti podjednako dobro kao i o generalizovanoj zavisnosti. Ovakav pristup je od naročitog značaja kada je reč o ispitivanju mogućnosti valorizacije otpadnih tokova kao alternativnih komponenti kultivacionog medijuma, koji bi potencijalno sadržali nutrijente u koncentracijama koje prevazilaze okvire definisane RSM modelom. Dvostrukim pristupom modelovanja posmatranog sistema, generišu se podaci neophodni za njegovo bolje razumevanje i manipulaciju u daljim fazama istraživanja koje uključuju optimizaciju i skaliranje bioprocesa (Lan i sar., 2015; Mohamed i sar., 2013; Yadav i sar., 2013; Mukherjee i sar., 2019).

Eksperimentalni podaci korišćeni za izvođenje modelovanja generisani su kroz 27 eksperimenata sa zadatim vrednostima nezavisnih promenljivih. Eksperimentalni plan po kom su definisane kombinacije vrednosti nezavisnih promenljivih podrazumevao je Boks-Benkenov eksperimentalni dizajn u kome su varirana četiri faktora na tri nivoa (tabela 4.9.3, Poglavlje 4.9.2.4). Nivoi vrednosti nezavisnih promenljivih definisani su tako da poseduju ekvidistantne vrednosti u odnosu na zadata iz centralne tačke eksperimentalnog plana za svaki faktor. Značaj primene redukovanog eksperimentalnog plana ogleda se u osetnoj uštedi resursa uz istovremeno generisanje potrebnih podataka za dobijanje statistički validnog matematičkog modela. U okviru eksperimentalnog plana, izvedeno je i trostruko ponavljanje eskperimenta gde su sva četiri faktora imala vrednosti koje odgovaraju centralnoj tački radi utvrđivanja ponovljivosti

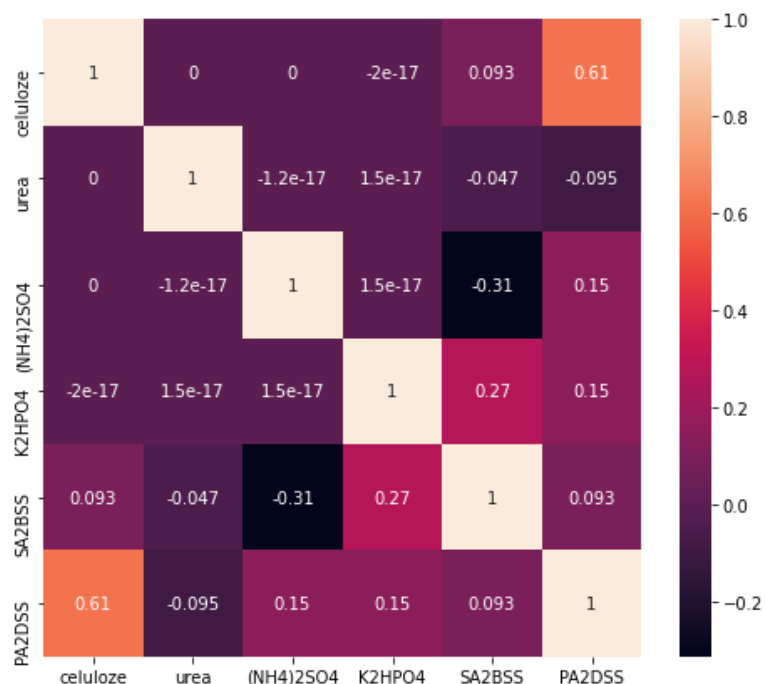
eksperimenata pod istim eskeprimentalnim uslovima i dalje statističke analize značajnosti dobijenih rezultata.

Odabrani proizvodni mikroorganizam *Bacillus* sp. BioSol021, kultivisan je pod prethodno definisanim uslovima u 27 hranljivih medijuma sastava određenog datim Boks-Benkenovim eksperimentalnim planom. Nakon završetka kultivacije, evaluacija antagonističke aktivnosti dobijenih uzoraka kultivacione tečnosti prema aflatoksigenim fitopatogenim izolatima *Aspergillus flavus* vršena je određivanjem prečnika zone inhibicije.

5.5.1. Eksplorativna analiza eksperimentalnih podataka

Kao preduslov za dalje statističko modelovanje, izvršena je analiza dobijenih eksperimentalnih vrednosti, radi utvrđivanja mogućih nedoslednosti, eliminacije šuma i određivanja konkretnih pristupa u modelovanju.

Prvi korak analize predstavlja određivanje međusobne korelacije svih atributa skupa podataka (slika 5.5.1).



Slika 5.5.1. Matrica korelacije eksperimentalnih vrednosti korišćenih u fazi modelovanja sastava hranljivog medijuma.

Dobijeni rezultati ukazuju na zanemarljivu korelaciju koncentracija komponenti hranljivog medijuma, osim u slučaju međusobne zavisnosti između odziva za izolat *Aspergillus flavus* PA2DSS i celuloze. Ovaj koeficijent korelacije implicira srednju statističku zavisnost, i ukazuje na izvor ugljenika kao potencijalno umereno važan faktor za kultivaciju ovog izolata. Analiza korelacije,

ne ukazuje na potrebu ignorisanja vrednosti iz skupa podataka, i svi mereni atributi su korišćeni u budućem modelovanju.

5.5.2. Modelovanje sastava hranljivog medijuma primenom metodologije odzivne površine

U narednom koraku istraživanja, usledila je statistička analiza dobijenih eksperimentalnih podataka, odnosno izmerenih vrednosti prečnika zone inhibicije. Radi utvrđivanja statističke značajnosti dobijenih modela, odnosno kvaliteta fitovanja eksperimentalnih podataka polinomskom jednačinom drugog reda izvršena je analiza varijanse (tabela 5.5.1 i tabela 5.5.2). Dobijene p -vrednosti upućuju na statističku značajnost modela (pri nivou značajnosti od 95%). Takođe, adekvatnost generisanih matematičkih modela procenjena je na osnovu Fišerovog testa (F-vrednosti). Poređenjem sa tabličnim vrednostima za odgovarajući stepen slobode primenjenog eksperimentalnog plana, uočava se da su dobijene F-vrednosti više, što ukazuje da su definisani modeli adekvatni za ponašanje posmatranog sistema, odnosno uticaja nezavisnih promenljivih na odabrani odziv.

Tabela 5.5.1. Analiza varijanse prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog delovanja na izolat *Aspergillus flavus* SA2DSS u fazi modelovanja sastava hranljivog medijuma.

Odziv	SS	DF	MS	F-vrednost	p -vrednost	R ²
Prečnik zone inhibicije	23139,19 ^a	15,00 ^a	1542,613	3525,972	0,00	0,96
	5,25 ^b	12,00 ^b	0,483 ^b			

a – model; b – rezidual. SS – suma kvadrata; DF – broj stepeni slobode; MS – suma srednjih kvadrata

Tabela 5.5.2. Analiza varijanse prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog delovanja na izolat *Aspergillus flavus* PA2DSS u fazi modelovanja sastava hranljivog medijuma.

Odziv	SS	DF	MS	F-vrednost	p -vrednost	R ²
Prečnik zone inhibicije	20035,22 ^a	15,00 ^a	1335,681 ^a	3518,380	0,00	0,95
	4,56 ^b	12,00 ^b	0,38 ^b			

a – model; b – rezidual. SS – suma kvadrata; DF – broj stepeni slobode; MS – suma srednjih kvadrata

Generisani matematički modeli za odabrani odziv u slučaju oba fitopatogena, *Aspergillus flavus* SA22BSS i *Aspergillus flavus* PA2DSS, prikazani su u vidu vrednosti odsečka, linearnih, kvadratnih i koeficijenata interakcije između nezavisnih promenljivih. Statistička značajnost uticaja nezavisnih promenljivih prikazana je u vidu p -vrednosti za odgovarajuće koeficijente. Statistički značajni koeficijenti definisanih matematičkih modela i njihove p -

vrednosti osenčeni su u tabelama 5.5.3 i 5.5.4. Pozitivan predznak kod linearnih i kvadratnih koeficijenata upućuje na direktnu vezu ispitivane nezavisne i zavisne promenljive, dok suprotno tome, negativan predznak govori o reverznoj korelaciji promenljive i odziva. Kada je reč o koeficijentima interakcije koji opisuju uticaj interakcije dve nezavisne promenljive, pozitivan predznak kod koeficijenata interakcije govori o sinergističkom delovanju, dok negativan predznak ukazuje na antagonističko delovanje nezavisnih promenljivih.

Matematički model za zone inhibicije u slučaju fitopatogenog izolata *Aspergillus flavus* SA2BSS (tabela 5.5.3) govori o statistički značajnom uticaju linearnih koeficijenata inicijalnih koncentracija nutrijenata. Linearni efekat početne koncentracije svih komponenti definiše se kao reverzan uticaj usled postojanja negativnog predznaka ispred koeficijenata. Statističku značajnost pokazuju i koeficijenti interakcije među inicijalnim koncentracijama celuloze i kalijum-hidrogenfosfata, uree kao organskog i amonijum-sulfata kao neroganskog izvora azota, i amonijum-sulfata i kalijum-hidrogenfosfata. U sva tri slučaja radi se o direktnom uticaju interakcije među nezavisno promenljivim, odnosno njihovom sinergističkom delovanju. Statističku značajnost, sa takođe pozitivnim predznakom, odnosno direktnim uticajem, pokazuju i kvadratni koeficijenti inicijalnih koncentracija celuloze, uree i kalijum-hidrogenfosfata.

Tabela 5.5.3. Koeficijenti regresione jednačine i njihove p -vrednosti za prečnik zone inhibicije u slučaju fitopatogenog izolata *Aspergillus flavus* SA2BSS u fazi modelovanja sastava hranljivog medijuma.

Koeficijent	Vrednost	p -vrednost
b^0	38,98960	0,000000
b^1	-0,33876	0,000287
b^2	-1,49165	0,001542
b^3	-1,59720	0,000931
b^4	-3,70852	0,000007
b^{12}	0,00000	0,999989
b^{13}	0,00667	0,464301
b^{14}	0,05278	0,000442
b^{23}	0,25333	0,000443
b^{24}	-0,01667	0,805301
b^{34}	0,15000	0,042610
b^{11}	0,00512	0,001688
b^{22}	0,17111	0,002853
b^{33}	0,03111	0,510096
b^{44}	0,52779	0,000009

1 – celuloza; 2 – urea; 3 – amonijum-sulfat; 4 – kalijum-hidrogenfosfat.

Matematički model za zone inhibicije u slučaju fitopatogenog izolata *Aspergillus flavus* PA2DSS (tabela 5.5.4) govori o statistički značajnom direktnom uticaju linearnog koeficijenta koji se odnosi na inicijalnu koncentraciju izvora neorganskog azota. Statističku značajnost pokazuje i antagonistički efekat interakcije inicijalnih koncentracija celuloze i uree, kao i interakcije izvora azota, odnosno uree i amonijum-sulfata. Takođe antagonistički efekat ispoljava interakcija početnih koncentracija amonijum-sulfata i kalijum-hidrogenfosfata, dok suprotno tome sinergistički efekat ostvaruje interakcija celuloze i kalijum-hidrogenfosfata. Efekat kvadratnih koeficijenata modela ukazuje na direktan uticaj izvora ugljenika i reverzibilan uticaj amonijum-sulfata.

Tabela 5.5.4. Koeficijenti regresione jednačine i njihove p -vrednosti za prečnik zone inhibicije u slučaju fitopatogenog izolata *Aspergillus flavus* PA2DSS u fazi modelovanja sastava hranljivog medijuma.

Koeficijent	Vrednost	p -vrednost
b^0	24,21942	0,000000
b^1	-0,10015	0,134429
b^2	0,48611	0,179911
b^3	1,52500	0,000769
b^4	0,23958	0,609578
b^{12}	-0,02000	0,031472
b^{13}	0,00222	0,791376
b^{14}	0,02500	0,031472
b^{23}	-0,12000	0,031472
b^{24}	0,05000	0,432879
b^{34}	-0,25000	0,001589
b^{11}	0,00414	0,004481
b^{22}	0,00222	0,959338
b^{33}	-0,10444	0,030777
b^{44}	-0,01736	0,799053

1 – celuloza; 2 – urea; 3 – amonijum-sulfat; 4 – kalijum-hidrogenfosfat.

5.5.3. Modelovanje sastava hranljivog medijuma primenom metodologije veštačkih neuronskih mreža

Glavni nedostatak veštačkih neuronskih mreža, tokom obučavanja, je zavisnost naspram kvantiteta raspoloživih podataka. U opštem slučaju za pokušaj dubokog učenja, neophodan je velik skup podataka, u čiju svrhu se pre obučavanja prediktivnog modela, dobijeni eksperimentalni podaci augmentuju za nekoliko redova veličine (Cui i sar., 2014)

Proces augmentacije podataka započinje normalizacijom podataka na opseg $[0, 1]$ na osnovu predodređenih eksperimentalnih ograničenja koncentracije komponenti hranljivog medijuma kao i mogućih vrednosti odzivne površine u instrumentima (tabela 5.5.5). Uvođenje normalizacije donosi ekstrapolativno ograničenje modela, ali takođe i značajno smanjuje mogućnost pojave pristrasnosti modela ka većim vrednostima atributa (engl. *bias*) kao i problema eksplodirajućih i nestajućih gradijenata tokom optimizacije.

Tabela 5.5.5. Opsezi za normalizaciju vrednosti u fazi augmentacije podataka za modelovanje primenom veštačkih neuronskih mreža.

Atribut	Opseg vrednosti za normalizaciju
celuloza	0 – 50 (g/l)
urea	0 – 10 (g/l)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0 – 10 (g/l)
K ₂ HPO ₄	0 – 10 (g/l)
<i>Aspergillus flavus</i> SA2BSS	10 – 40 (mm)
<i>Aspergillus flavus</i> PA2DSS	10 – 40 (mm)

Optimalna arhitektura mreže autoenkodera je dobijena pretragom prostora parametara za broj neurona u izlaznom sloju enkodera, odnosno sloju ugradnje (engl. *embedding layer*) [2-5], odabira aktivacione funkcije u skrivenim slojevima enkodera i dekodera [elu, relu, sigmoid], brzine učenja [0,01-0,03] i stope degradacije brzine učenja [0,5-0,95]. Broj epoha je postavljan na maksimalno 50000 iteracija, uz omogućeno prevremeno zaustavljanje za slučaj izuzetno malog variranja greške.

Odabrana arhitektura predstavlja model višeslojnog perceptrona za enkoder i dekoder, sa slojem ugradnje od četiri neurona. Mere performanse odabranog modela su određene srednjom kvadratnom greškom i koeficijentom determinacije (tabela 5.5.6). Optimalne vrednosti parametara obučavanja, određene u prethodnom koraku su 0,03 za brzinu obučavanja sa stopom degradacije od 0,8, elu (engl. *Exponential Linear Unit*) aktivaciona funkcija u svim slojevima osim izlaznog, na kojem je postavljen sigmoid.

Tabela 5.5.6. Rezultat obučavanja veštačke neuronske mreže u fazi modelovanja sastava hranljivog medijuma primenom odabrane arhitekture.

Izolat	Metrika	Vrednost
<i>Aspergillus flavus</i> SA2BSS	MSE	0,0016
	R ²	0,969
<i>Aspergillus flavus</i> PA2DSS	MSE	0,0015
	R ²	0,974

Tokom obučavanja je korišćena značajnija regularizacija podataka, u vidu odustajanja od veza u slojevima (engl. *dropout*) sa verovatnoćom od 5% kao i l2 regularizacijom sa jačinom koeficijenta 0,01. Upotrebom jače regularizacije je pospešena sposobnost generalizovanja modela i smanjena mogućnost preteranog uklapanja (engl. *overfitting*), što predstavlja značajan rizik pogotovo u slučaju malog broja podataka.

Obučavanje je sprovedeno nad čitavim skupom podataka, dovođenjem istih podataka na ulaz i izlaz autoenkodera, za oba izolata zasebno. Nakon što je model obučen, dekoderska mreža se izdvaja iz arhitekture i uz pomoć nasumičnog uzorkovanja brojeva iz opsega $(-1, 2,5]$, koji odgovara malo proširenom opsegu koji se vidi na sloju ugradnje u originalnom skupu podataka. Na ovaj način, skup podataka na izlazu iz dekodera nosi statističke karakteristike originalnog skupa podataka, ali uz mogućnost da se generiše proizvoljan broj novih podataka. Za potrebe obučavanja daljeg prediktora, generisano je 10000 novih uzoraka za svaki izolat. Nakon dobijanja novih uzoraka, postavljeni su uslovi za obučavanje prediktivnog modela zasnovanog na neuronskim mrežama. Definisan je eksperiment za pronalaženje optimalne arhitekture ovog modela, nalik na onaj iz prethodnog koraka.

Za ahitekturu neuronske mreže prediktivnog modela uzet je višeslojni perceptron sa tri skrivena sloja. Radi optimizacije modela za oba izolata, upotrebljena je metodologija unakrsne validacije (Mosier, 1951) [5-10], aktivacione funkcije u skrivenim slojevima [elu, relu, sigmoid], brzine učenja [0,01-0,04] i stope degradacije brzine učenja [0,3-0,95]. Kao skup za konačnu validaciju, upotrebljen je originalni skup eksperimentalnih vrednosti, koji postoji samo u implicitnom obliku u podacima za obučavanje. Na ovaj način, validacija prediktivnog modela, ujedno validira i uspešnost augmentacije podataka.

Rezultati obučavanja najboljih modela, kao i njihovi hiperparametri prikazani su u tabeli 5.5.7. Performanse modela koje se uzimaju u obzir su izračunate nad validacionim skupom.

Tabela 5.5.7. Hiperparametri i rezultati obučavanja modela metodologijom veštačkih neuronskih mreža.

Izolat	Broj neurona	Aktivaciona funkcija	Brzina učenja	Degradacija brzine učenja	MSE	R^2
<i>Aspergillus flavus</i> SA2BSS	7	elu	0,02	0,85	0,00092	0,86
<i>Aspergillus flavus</i> PA2DSS	10	elu	0,035	0,7	0,00073	0,84

Iako su koeficijent determinacije i srednja kvadratna greška nad skupom za obučavanje reda 0,98 i 10^{-5} respektivno, visoka tačnost nad validacionim skupom pokazuje da je model uspeo dobro da predstavi originalne podatke. Malo odstupanje od originalnog skupa, ukazuje na moguće poboljšanje u generalizaciji modela, te ostaje za budući eksperimentalni dokaz.

5.5.4. Poređenje modela generisanih metodologijom odzivne površine i metodologije veštačkih neuronskih mreža

Eksperimentalni podaci generisani po Boks-Benkenovom eksperimentalnom dizajnu u kome su varirana četiri faktora na tri nivoa (27 eksperimenata) (tabela 4.9.3, Poglavlje 4.9.2.4), iskorišćeni su za definisanje modela primenom metodologije odzivne površine i metodologije veštačkih neuronskih mreža. Primenom metodologije odzivne površine, modeli koji opisuju ponašanje sistema dobijeni su fitovanjem eksperimentalnih podataka polinomom drugog reda. S druge strane, veštačke neuronske mreže koriste se kao alternativa metodologijama koja podrazumeva generisanje modela bazirano na polinomskoj regresiji, i omogućava modelovanje kompleksnih nelinearnih odnosa (Rafiqh i sar., 2014; Yang i sar., 2015).

Sagledavanje uticaja interakcije nezavisnih promenljivih (inicijalne koncentracije celuloze, uree, amonijum-sulfata i kalijum-hidrogenfosfata) na prečnik zone inhibicije, na osnovu prethodno generisanih modela primenom dve metodologije modelovanja, omogućeno je kontruisanjem odzivnih površina koje ilustriraju ponašanje posmatranog sistema (slike 8.6.1 – 8.6.4).

Prvi set prikazan na slici 8.6.1 A i slici 8.6.3 A u Prilogu 6 ukazuje na uticaj inicijalne koncentracije izvora ugljenika (celuloza) i inicijalne koncentracije organskog izvora azota (urea) na prečnik zone inhibicije izolata *Aspergillus flavus* SA2BSS, pri srednjoj vrednosti iz ispitivanog opsega inicijalnih koncentracija izvora neorganskog azota, amonijum-sulfat, i fosfora, kalijum-hidrogenfosfat (tabela 4.9.3, Poglavlje 4.9.2.4). Model dobijen metodologijom odzivne površine predviđa visoke vrednosti prečnika zone inhibicije u kombinaciji maksimalnih ispitivanih inicijalnih koncentracija izvora ugljenika i organskog azota, kao i u slučaju potpunog odsustva uree i vrednostima bliskim minimalnim odnosno maksimalnim inicijalnim koncentracija celuloze u okviru definisanog opsega. Model dobijen metodologijom veštačkih neuronskih mreža ukazuje da se maksimizacija prečnika zone inhibicije beleži u slučaju poslednje navedene kombinacije predviđene modelom dobijenim primenom metodologije odzivne površine, odnosno maksimalne inicijalne koncentracije celuloze i niske vrednosti koncentracije uree (0–0,5 g/l).

Drugi set prikazan na slici 8.6.1 B i slici 8.6.3 B u Prilogu 6 ukazuje na uticaj inicijalne koncentracije izvora ugljenika (celuloza) i inicijalne koncentracije neorganskog izvora azota (amonijum-sulfat) na prečnik zone inhibicije izolata *Aspergillus flavus* SA2BSS, pri srednjoj vrednosti iz ispitivanog opsega inicijalnih koncentracija izvora organskog azota, urea, i izvora fosfora, kalijum-

hidrogenfosfat (tabela 4.9.3, Poglavlje 4.9.2.4). Modeli dobijeni metodologijom odzivne površine i metodologijom veštačkih neuronskih mreža ukazuju na gotovo identičnu zavisnost. Predviđena maksimizacija vrednosti prečnika inhibicije postiže se u opsegu inicijalne koncentracije amonijum-sulfata 0–1 g/l u kombinaciji sa minimalnim, odnosno 0–2 g/l sa maksimalnim koncentracijama celuloze u okviru ispitivanog opsega. Posmatrajući odzive dobijene u prethodna dva seta, zaključuje se da je odlučujući faktor za dobijanje efikasnog agensa biološke kontrole, adekvatno definisan odnos količina osnovnih komponenti hranljivog medijuma, izvora ugljenika i azota. Kako se antagonistička aktivnost proizvodnog mikroorganizma pripisuje dvostrukom mehanizmu delovanja, koji uključuje i biomasu i sekundarne metabolite, pored izvora ugljenika, neophodno je prisustvo izvora azota kao ključnog nutrijenta za ostvarivanje obe funkcije. Sa jedne strane se nalazi potreba za generisanjem velike količine biomase za čiji rast je potreban azot, a s druge, sinteza jedinjenja koja ispoljavaju antimikrobno delovanje a pri tome su peptidne prirode (Singh i sar., 2017; Medeot i sar., 2017; Fonseca i sar., 2007).

Treći set prikazan na slici 8.6.1 C i slici 8.6.3 C u Prilogu 6 ukazuju na uticaj inicijalne koncentracije izvora ugljenika (celuloza) i inicijalne koncentracije izvora fosfora (kalijum-hidrogenfosfat) na prečnik zone inhibicije izolata *Aspergillus flavus* SA2BSS, pri srednjoj vrednosti iz ispitivanog opsega inicijalnih koncentracija izvora organskog i neorganskog azota, urea i amonijum-sulfat (tabela 4.9.3, Poglavlje 4.9.2.4). Model dobijen metodologijom odzivne površine ukazuje da se maksimalna vrednost prečnika inhibicije postiže u opsegu koncentracija celuloze 30–35 g/l i kalijum-hidrogenfosfata 4–4,5 g/l. Pored definisane relacije, u slučaju modela generisanog metodologijom veštačkih neuronskih mreža, maksimizacija prečnika inhibicije dobija se i kombinacijom minimalnih koncentracija i izvora ugljenika i izvora fosfora.

Četvrti set prikazan na slici 8.6.1 D i slici 8.6.3 D u Prilogu 6 ukazuje na uticaj inicijalne koncentracije izvora neorganskog azota (amonijum-sulfat) i inicijalne koncentracije izvora organskog azota (urea) na prečnik zone inhibicije izolata *Aspergillus flavus* SA2BSS, pri srednjoj vrednosti iz ispitivanog opsega inicijalnih koncentracija izvora ugljenika, celuloza i fosfora, kalijum-hidrogenfosfat (tabela 4.9.3, Poglavlje 4.9.2.4). Maksimalan prečnik inhibicije predviđen modelima generisanim primenom i metodologije odzivne površine i metodologije veštačkih neuronskih mreža, postiže se pri minimalnim vrednostima i organskog i neorganskog izvora azota u okviru ispitivanih opsega. Ovakav rezultat potvrđuje prethodno definisanu tvrdnju o značaju odnosa dostupnih količina osnovnih komponenti podloge, i ukazuju na negativan uticaj

prisustva maksimalnih koncentracija i organskog i neorganskog izvora azota (Rangarajan i Clarke, 2016).

Peti set prikazan na slici 8.6.1 E i slici 8.6.3 E u Prilogu 6 ukazuje na uticaj inicijalne koncentracije izvora organskog azota (urea) i inicijalne koncentracije izvora fosfata (kalijum-hidrogenfosfat) na prečnik zone inhibicije izolata *Aspergillus flavus* SA2BSS, pri srednjoj vrednosti iz ispitivanog opsega inicijalnih koncentracija izvora ugljenika, celuloza, i neorganskog azota, amonijum-sulfat (tabela 4.9.3, Poglavlje 4.9.2.4). Model generisan primenom metodologije odzivne površine ukazuje da se maksimizacija vrednosti prečnika zone inhibicije postiže pri maksimalnoj inicijalnoj koncentraciji kalijum-hidrogenfosfata i minimalnoj i maksimalnoj koncentraciji uree u okviru ispitivanog opsega. S druge strane, model veštačkih neuronskih mreža predviđa maksimizaciju prečnika zone inhibicije u slučaju maksimalne odnosno minimalne koncentracije kalijum-hidrogenfosfata u kombinaciji sa čitavim ispitivanim opsegom inicijalne koncentracije uree. Dostupnost fosfora u kultivacionom medijumu definiše trajanje eksponencijalne faze rasta. Limitiranje niskom koncentracijom izvora fosfora rezultuje bržim ulaskom u stacionarnu fazu rasta tokom koje nastaju sekundarni metaboliti. Odatle proizilazi pretpostavka da su zone u tom slučaju bile veće kao posledica intenzivnije produkcije lipopeptidnih jedinjenja. S druge strane, u slučaju viših koncentracija izvora fosfora favorizuje se generisanje biomase proizvodnog mikroorganizma, a samim tim i drugi mehanizam antagonističkog delovanja (Cai i sar., 2019).

Šesti set prikazan na slici 8.6.1 F i slici 8.6.3 F u Prilogu 6 ukazuje na uticaj inicijalne koncentracije izvora neorganskog azota (amonijum-sulfat) i inicijalne koncentracije izvora fosfata (kalijum-hidrogen fosfat) na prečnik zone inhibicije izolata *Aspergillus flavus* SA2BSS, pri srednjoj vrednosti iz ispitivanog opsega inicijalnih koncentracija izvora ugljenika, celuloza i organskog azota, urea (tabela 4.9.3, Poglavlje 4.9.2.4).

Maksimalna vrednost prečnika inhibicije prema modelu dobijenim metodologijom odzivne površine postiže se u čitavom ispitivanom opsegu koncentracija amonijum-sulfata u kombinaciji sa maksimalnom koncentracijom kalijum-hidrogenfosfata kao i u opsegu koncentracija amonijum-sulfata 0–1 g/l u kombinaciji sa minimalnom koncentracijom kalijum-hidrogenfosfata. Model veštačkih neuronskih mreža predviđa maksimizaciju prečnika zone inhibicije kombinacijom minimalnih koncentracija i izvora neorganskog azota i fosfora.

Prvi set prikazan na slici 8.6.2 A i slici 8.6.4 A u Prilogu 6 ukazuje na uticaj inicijalne koncentracije izvora ugljenika (celuloza) i inicijalne koncentracije organskog izvora azota (urea) na prečnik zone inhibicije izolata *Aspergillus flavus* PA2DSS, pri srednjoj vrednosti iz ispitivanog opsega inicijalnih koncentracija izvora neorganskog azota, amonijum-sulfat, i fosfora, kalijum-hidrogenfosfat (tabela 4.9.3, Poglavlje 4.9.2.4). Prema predviđanjima modela dobijenih primenom metodologije odzivne površine i metodologije veštačkih neuronskih mreža visoke vrednosti prečnika zone inhibicije beleže se u opsegu inicijalnih koncentracija izvora ugljenika 30–35 g/l i organskog azota 0–2 g/l. Dobijanje maksimalnih zona inhibicije pri minimalnim koncentracijama organskog azota ukazuju da je neorganski izvor azota u prisutnoj količini dovoljan za rast i metaboličku aktivnost primenjenog proizvodnog mikroorganizma. Takođe, ovakav rezultat potvrđuje neophodnost definisanja odgovarajućeg odnosa izvora ugljenika i izvora azota (Heryani i Putra, 2017).

Drugi set prikazan na slici 8.6.2 B i slici 8.6.4 B u Prilogu 6 ukazuje na uticaj inicijalne koncentracije izvora ugljenika (celuloza) i inicijalne koncentracije neorganskog izvora azota (amonijum-sulfat) na prečnik zone inhibicije izolata *Aspergillus flavus* PA2DSS, pri srednjoj vrednosti iz ispitivanog opsega inicijalnih koncentracija izvora organskog azota, urea, i izvora fosfora, kalijum-hidrogenfosfat (tabela 4.9.3, Poglavlje 4.9.2.4). Oba modela, dobijena primenom metodologije odzivne površine i metodologije neuronskih mreža, ukazuju na maksimizaciju vrednosti prečnika zone inhibicije u gotovo čitavom opsegu ispitivanih koncentracija amonijum-sulfata u kombinaciji sa maksimalnim koncentracijama celuloze.

Treći set prikazan na slici 8.6.2 C i slici 8.6.4 C u Prilogu 6 ukazuje na uticaj inicijalne koncentracije izvora ugljenika (celuloza) i inicijalne koncentracije izvora fosfora (kalijum-hidrogenfosfat) na prečnik zone inhibicije izolata *Aspergillus flavus* PA2DSS, pri srednjoj vrednosti iz ispitivanog opsega inicijalnih koncentracija izvora organskog i neorganskog azota, urea i amonijum-sulfat (tabela 4.9.3, Poglavlje 4.9.2.4). Prema predviđanju modela dobijenih primenom metodologije odzivne površine, maksimalna vrednost prečnika inhibicije postiže se u opsegu koncentracija celuloze 30–35 g/l i kalijum-hidrogenfosfata 4–4,5 g/l, dok je u slučaju modela veštačkih neuronskih mreža definisan isti opseg koncentracija celuloze i nešto širi opseg inicijalnih koncentracija izvora fosfata 2–4,5 g/l.

Četvrti set prikazan na slici 8.6.2 D i slici 8.6.4 D u Prilogu 6 ukazuje na uticaj inicijalne koncentracije izvora neorganskog azota (amonijum-sulfat) i

inicijalne koncentracije izvora organskog azota (urea) na prečnik zone inhibicije izolata *Aspergillus flavus* PA2DSS, pri srednjoj vrednosti iz ispitivanog opsega inicijalnih koncentracija izvora ugljenika, celuloza, i fosfora, kalijum-hidrogenfosfat (tabela 4.9.3, Poglavlje 4.9.2.4). Maksimalan prečnik zone inhibicije, prema predviđanju modela generisanog primenom metodologije odzivne površine, dobijen je u opsegu koncentracija organskog izvora azota 0–2 g/l i neorganskog izvora azota 3–5 g/l. Drugi model, zasnovan na metodologiji veštačkih neuronskih mreža, podrazumeva isti opseg za neorganski izvor azota ali u kombinaciji sa minimalnim koncentracijama organskog izvora azota.

Peti set prikazan na slici 8.6.2 E i slici 8.6.4 E u Prilogu 6 ukazuje na uticaj inicijalne koncentracije izvora organskog azota (urea) i inicijalne koncentracije izvora fosfora (kalijum-hidrogenfosfat) na prečnik zone inhibicije izolata *Aspergillus flavus* PA2DSS, pri srednjoj vrednosti iz ispitivanog opsega inicijalnih koncentracija izvora ugljenika, celuloza i neorganskog azota, amonijum-sulfat (tabela 4.9.3, Poglavlje 4.9.2.4). Model generisan primenom metodologije odzivne površine predviđa maksimizaciju vrednosti prečnika zone inhibicije u čitavom opsegu inicijalnih koncentracija uree u kombinaciji sa odgovarajućim vrednostima inicijalne koncentracije kalijum-hidrogenfosfata. Adekvatne kombinacije podrazumevaju maksimalne inicijalne koncentracije uree i inicijalne koncentracije kalijum-hidrogenfosfata u opsegu 3,5–4,5 g/l. Opseg optimalnih vrednosti se širi sve do kombinacije koja podrazumeva minimalne inicijalne koncentracije uree i čitav ispitivani opseg koncentracija kalijum-hidrogenfosfata. U slučaju modela veštačkih neuronskih mreža, maksimalan prečnik zone inhibicije postiže se pri kombinacijama maksimalne inicijalne koncentracije organskog izvora azota i kalijum-hidrogenfosfata u opsegu 3–5 g/l. Dobijeni rezultati upućuju na visoke nutritivne zahteve proizvodnog mikroorganizma u pogledu i organskog izvora azota i izvora fosfata, za ostvarivanje prvenstveno rasta i razmnožavanja ćelija, a nakon toga i njihove metaboličke aktivnosti, što zajedno rezultuje intenzivnim supresivnim delovanjem (Chiang i sar., 2012).

Šesti set prikazan na slici 8.6.2 F i slici 8.6.4 F u Prilogu 6 ukazuje na uticaj inicijalne koncentracije izvora neorganskog azota (amonijum-sulfat) i inicijalne koncentracije izvora fosfata (kalijum-hidrogen fosfat) na prečnik zone inhibicije izolata *Aspergillus flavus* PA2DSS, pri srednjoj vrednosti iz ispitivanog opsega inicijalnih koncentracija izvora organskog azota, urea, i izvora ugljenika, celuloza (tabela 4.9.3, Poglavlje 4.9.2.4). Maksimalna vrednost prečnika inhibicije prema modelu dobijenom metodologijom odzivne površine postiže se

pri inicijalnim vrednostima koncentracije bliskim centralnoj tački eksperimenta, kao i u kombinaciji minimalnih inicijalnih koncentracija kalijum-hidrogenfosfata i opsegu amonijum-sulfata 4-5 g/l, i kombinaciji maksimalnih inicijalnih koncentracija kalijum-hidrogenfosfata i opsegu amonijum-sulfata 0–2 g/l. Kada je reč o modelu koji je generisan primenom metodologije veštačkih neuronskih mreža, predviđanja ukazuju da je optimalan opseg pomeren ka kombinaciji maksimalnih vrednosti inicijalnih koncentracija izvora fosfata i minimalnih koncentracija izvora neorganskog azota.

Poređenjem rezultata za modele generisane primenom metodologije odzivne površine i metodologije veštačkih neuronskih mreža, gde su vrednosti koeficijenta determinacije iznosile za testirani izolat *Aspergillus flavus* SA2BSS 0,96 (RSM), i 0,86 (ANN) odnosno izolat *Aspergillus flavus* PA2DSS 0,95 (RSM) i 0,84 (ANN), zaključeno je da se u konkretnom slučaju eksperimentalni podaci bolje fituju polinomom drugog reda. Na osnovu dobijenih rezultata, odlučeno je da se u daljoj fazi optimizacije bioprocasa koristi model generisan metodologijom odzivne površine. Dobijeni RSM model bolje opisuje postojeće eksperimentalne podatke i to matematičkim relacijama koje omogućavaju dublje razumevanje uticaja definisanih promenljivih i njihovih međusobnih interakcija na posmatrane odzive. Negativan aspekt primene metodologije odzivne površine koji se odnosi na ograničen eksperimentalni prostor i variranje promenljivih u isključivo zadatom opsegu uz nemogućnost ekstrapolacije. Analiza posmatranog sistema upotpunjena je generisanjem modela primenom metodologije veštačkih neuronskih mreža koji pruža informacije o uticaju vrednosti faktora koji izlaze van opsega vrednosti zadatih eksperimentalnim planom (Nor i sar., 2017; Lan i sar., 2015).

5.5.5. Optimizacija sastava hranljivog medijuma primenom metodologije željene funkcije

Nakon modelovanja prečnika zone inhibicije kao ključnog odziva posmatranog sistema, usledila je faza optimizacije sastava hranljivog medijuma u pogledu određivanja inicijalnih koncentracija nutrijenata. Definisane uticaja nezavisnih promenljivih odnosno inicijalnih koncentracija nutrijenata na posmatrani sistem generisanjem matematičkih modela predstavlja osnov za simulaciju bioprocesa. Dobijenim matematičkim relacijama moguće je odrediti potrebne vrednosti nezavisnih promenljivih u ispitivanom opsegu kako bi se kao krajnji rezultat dobio željeni odziv. Na datom principu se zasniva optimizacija bioprocesa kroz definisanje optimalnih vrednosti ulaznih parametara sa ciljem postizanja optimalnih vrednosti zavisnih promenljivih od značaja.

Kao jedno od najučestalijih rešenja nameće se primena metode željene funkcije kao softverskog rešenja koje podrazumeva primenu niza nelinearnih algoritama radi pronalaženja optimalnog rešenja definisanog postavljenim ciljevima optimizacije (Costa i sar., 2011). Prvi korak podrazumeva određivanje željenih ciljeva optimizacije koji se odnose na ciljani opseg vrednosti posmatranih odziva. Pored toga, nezavisno promenljivim se dodeljuju težinski koeficijenti koji definišu značajnost uticaja određenog ulaznog parametra na posmatrani odziv. Kao cilj optimizacije može se takođe postaviti i ciljana vrednost određenih nezavisno promenljivih. Naredni korak je konvertovanje vrednosti odziva koje su dobijene unošenjem pojedinačnih vrednosti nezavisno promenljivih u definisane matematičke modele generisane metodologijom odzivne površine u individualne željene funkcije. Vrednosti željenih funkcija kreću se u opsegu od 0 do 1. U skladu sa određenim ciljem optimizacije, minimalna vrednost (0) podrazumeva najmanje poželjno, a nasuprot tome maksimalna vrednost (1) označava najpoželjnije rešenje. Vrednost željene funkcije predstavlja geometrijsku sredinu vrednosti pojedinačnih željenih funkcija (Costa i sar., 2011; Ferreira i sar., 2007).

Optimalno rešenje u pogledu sastava hranljive podloge za produkciju agensa biološke kontrole, definisano je setom optimizacije koji je podrazumevao maksimizaciju prečnika zona inhibicije za oba ispitivana fitopatogena soja *Aspergillus flavus* SA2BSS i *Aspergillus flavus* PA2DSS i minimizaciju inicijalne koncentracije izvora ugljenika i organskog izvora azota. Maksimizacija prečnika zona inhibicije dovodi se u vezu sa maksimalnom efikasnošću agensa biološke kontrole u pogledu supresivnog delovanja na ispitivane fitopatogene. S druge strane, minimizacija koncentracija osnovnih

komponenti kultivacionog medijuma doprinosi snižavanju troškova proizvodnje i ekonomskoj isplativosti celokupnog bioprocesa. Istovremeno svim nezavisnim i zavisnim promenljivim je dodeljen jednak težinski koeficijent 3 (raspon 1–5).

Tabela 5.5.8. Optimizovane vrednosti variranih faktora i predviđene vrednosti prečnika zone inhibicije kao rezultat optimizacije sastava hranljivog medijuma.

Faktor	Cilj	Optimizovana vrednost
Celuloza	minimalan	5
Urea	minimalan	0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)	u opsegu	3,77
K ₂ HPO ₄ (g/l)	u opsegu	0,5
Odziv	Cilj	Predviđena vrednost
Prečnik zone inhibicije (mm) <i>Aspergillus flavus</i> SA2BSS	maksimalan	30,66
Prečnik zone inhibicije (mm) <i>Aspergillus flavus</i> PA2DSS	maksimalan	27,84

Oslanjajući se na dobijene rezultate prikazane u tabeli 5.5.8 postavljeni ciljevi optimizacionog seta ostvaruju se definisanjem sledećeg sastava hranljivog medijuma: celuloza 5 g/l, urea 0 g/l, amonijum-sulfat 3,77 g/l, kalijum-hidrogen fosfat 0,3 g/l i magnezijum-sulfat heptahidrat 0,3 g/l. Vrednost dobijene ukupne željene funkcije iznosi 0,75. Rezultati optimizacije sastava hranljivog medijuma potvrđuju prethodno ustanovljenu relaciju između nezavisno promenljivih varijabli i njihov uticaj na odabrani odziv zasnovanu na rezultatima dobijenim primenom metodologije odzivne površine. Uključivanjem dobijenih vrednosti nezavisnih promenljivih u matematičke modele dobijene u fazi modelovanja definišu se predviđene vrednosti odziva. Pri rezultatima optimizacionog seta predviđaju se vrednosti odziva u vidu prečnika zone inhibicije za soj *Aspergillus flavus* SA2BSS 30,66 mm, odnosno 27,84 mm za soj *Aspergillus flavus* PA2DSS.

Osnovni preduslov za komercijalizaciju agenasa biološke kontrole je definisanje ekonomski pristupačnog medijuma koji će omogućiti proizvodnju dovoljne količine proizvoda na industrijskom nivou uz minimalne troškove i istovremeno obezbeđivanje maksimalnog nivoa antagonističke aktivnosti. Konstituenti medijuma moraju da zadovoljavaju zahteve u pogledu podmirivanja nutritivnih potreba proizvodnog izolata za umnožavanje biomase, snabdevanje energijom i obavljanje metaboličke aktivnosti. Predstavnici roda *Bacillus* pokazali su se kao pogodni kandidati za skaliranje proizvodnog postupka do industrijskih razmera uzevši u obzir sposobnost usvajanja nutrijenata iz alternativnih i ekonomski podobnih supstrata (Yáñez-Mendizábal i sar., 2012).

Pripadnici roda *Bacillus* sa akcentom na vrste *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* i *Bacillus subtilis* izdvajaju se po izraženoj celulitičkoj aktivnosti (Siu-Rodas i sar., 2018; Ye i sar., 2018; Olanbiwoninu i Fasiku, 2015). Ovakvo svojstvo proizvodnog izolata, koje se pripisuje i soju primenjivanom u okviru doktorske disertacije pruža odličnu osnovu za razmatranje primene različitih izvora lignoceluloznog materijala kao sastavne komponente medijuma za kultivaciju pogodnog za upotrebu i uvećanim razmerama proizvodnje (Jo i sar., 2008; Kim i sar., 2012; Lin i sar., 2012; Manhar i sar., 2016).

5.6. Analiza toka bioprocasa u laboratorijskom bioreaktoru

Nakon definisanja optimalnih uslova proizvodnje agenasa biološke kontrole primenom *Bacillus* sp. BioSol021 u pogledu kvalitativnog i kvantitativnog sastava hranljivog medijuma za kultivaciju, usledila je faza izvođenja bioprocasa u uvećanim razmerama, na nivou laboratorijskog bioreaktora. U okviru ove faze istraživanja izvršena je validacija prethodno definisanog optimalnog sastava kultivacionog medijuma ali i ispitivanje uticaja intenziteta aeracije i brzine mešanja kao ključnih parametara bioprocasa. Eksperimentalni plan je podrazumevao varijaciju dve nezavisne promenljive, intenziteta aeracije i intenziteta mešanja, na dva nivoa u definisanim opsezima 05 – 1,5 vvm i 100 – 300 o/min.

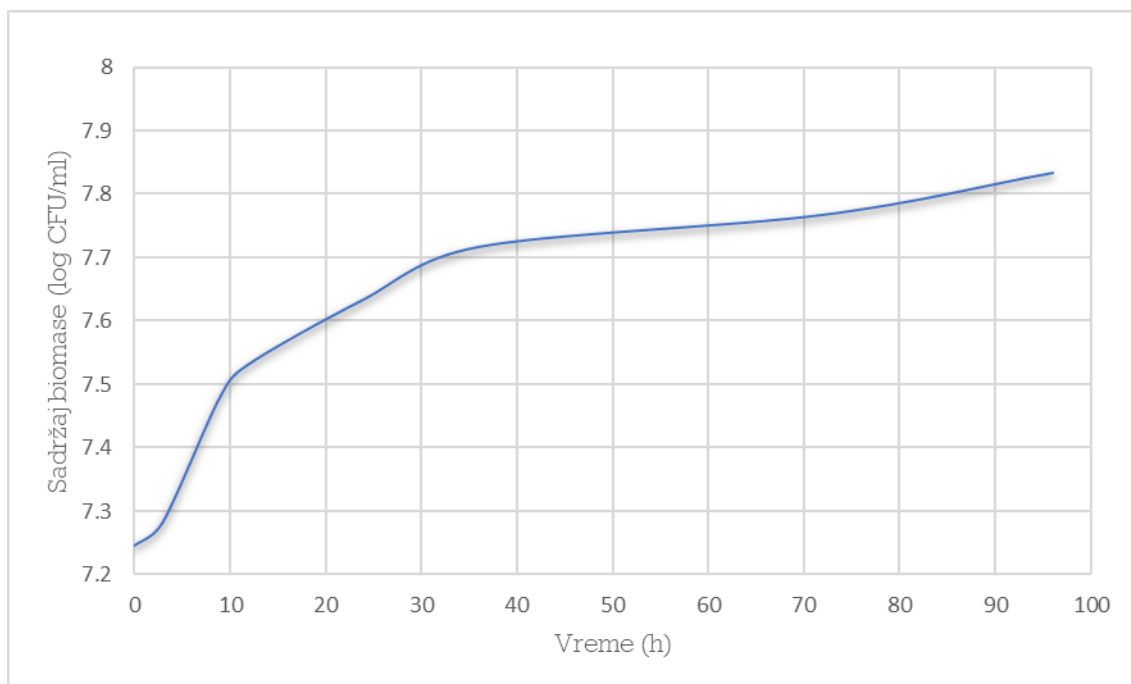
Izvođenje bioprocasa na nivou laboratorijskog bioreaktora je važan korak razvoja tehnologije proizvodnje agenasa biološke kontrole koji omogućava simulaciju produkcije u uslovima što približnijim polu-industrijskim i industrijskim razmerama. Transfer tehnologije sa laboratorijske na višu skalu proizvodnje koja će omogućiti komercijalizaciju preparata, oslanja se na prethodno definisanje optimalnih uslova procesnih parametara koji favorizuju rast i metaboličku aktivnost odabranog proizvodnog mikroorganizma (Pajčin i sar., 2020; Grahovac i sar., 2020; Montesinos, 2003). Mešanje je ključan parametar izvođenja mikrobioloških procesa u opštem slučaju, čija se uloga ogleda u obezbeđivanju homogene sredine sa odlučujućim uticajem na stepen promena hidrodinamičkih uslova, razmenu toplote i prenos mase. S druge strane, aeracija definiše nivo oksigenacije bioprocasa i dodatno doprinosi homogenizaciji kultivacionog medijuma (Zhou i sar., 2018, Baras i sar., 2009).

Kultivacija proizvodnog mikroorganizma *Bacillus* sp. BioSol021 vršena je u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 16 l, odnosno radne zapremine 11 l, primenom hranljive podloge optimalnog sastava definisanog u prethodnom koraku istraživanja. Tokom kultivacije primenom *in-line* mernih

instrumenata praćeni su sledeći parametri bioprocesa: temperatura, pH vrednost, sadržaj kiseonika. Korišćenjem *off-line* metoda za koje je bilo potrebno vršiti uzorkovanje u definisanim vremenskim intervalima tokom trajanja kultivacije praćene su promene: sadržaja biomase, sadržaja celuloze, sadržaja ukupnog azota, antimikrobna aktivnost uzoraka kultivacione tećnosti i supernatanta protiv aflatoksigenih fitopatogenih izolata *Aspergillus flavus* SA2BSS i *Aspergillus flavus* PA2DSS.

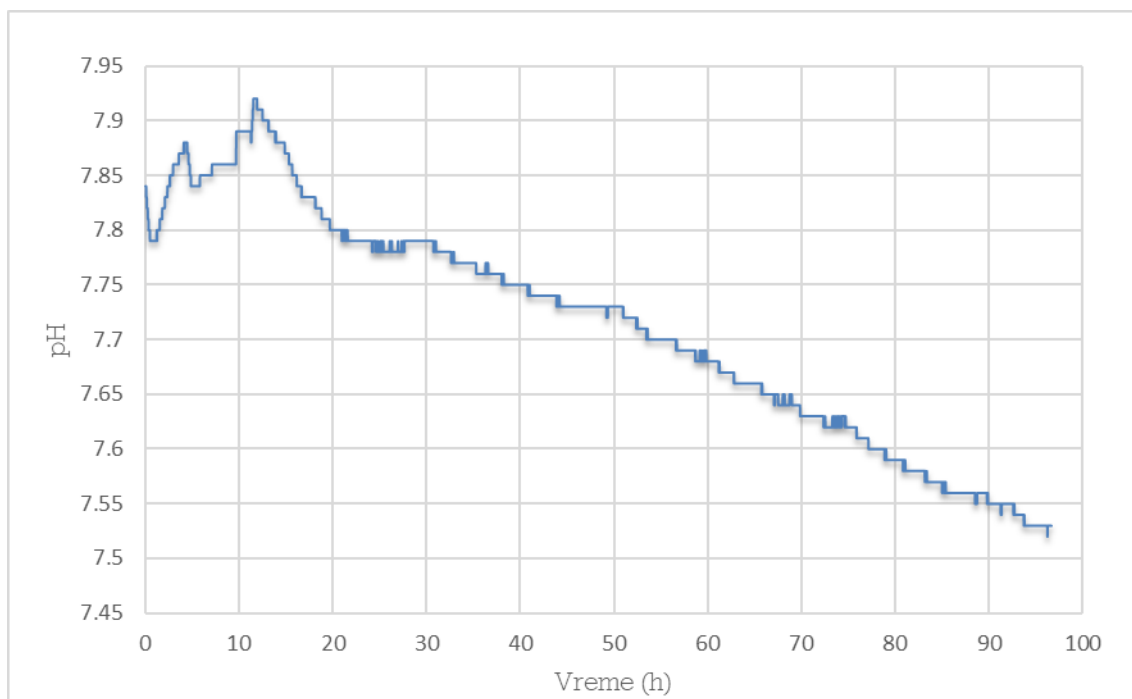
5.6.1. Analiza toka bioprocesa u laboratorijskom bioreaktoru pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min

Praćenje promene sadržaja biomase tokom trajanja kultivacije proizvodnog mikroorganizma *Bacillus* sp. BioSol021 vršeno je određivanjem broja vijabilnih ćelija indirektno, metodom poseva. Trend prikazan na slici 5.6.1 je tipičan izgled krive rasta ćelija proizvodnog mikroorganizma koju karakteriše prisustvo tri faze. Prva se odnosi na period adaptacije ćelija uslovima kultivacije – lag faza, koja se u konkretnom slučaju dešava tokom prva 2 h izvođenja bioprocesa. Ovako kratka i minimalno izražena lag faza ukazuje na dobru prilagođenost ćelija proizvodnog mikroorganizma uslovima u bioreaktoru. Oćigledno je da višestruko pasažiranje koje je odabrano kao tehnika pripreme inokuluma rezultuje ne samo uvećanjem zapremine inokuluma koje je kod skaliranja neophodno, već i postizanjem vrhunskog kvaliteta. Nakon toga, dolazi do intenzivnog umnožavanja biomase odnosno eksponencijalne faze rasta koja se odigrava do 30. ćasa kultivacije. Ipak, i tokom trajanja eksponencijalne faze, uvića se razlika u brzini umnožavanja, pri ćemu je ono intenzivnije tokom prvih 10 h kultivacije. Zakrivljenje krive i faza umnožavanja ćelija umerenijeg intenziteta oznaćava ulazak u stacionarnu fazu rasta koja se odrćava sve do kraja trajanja kultivacije. Maksimalna koncentracija ćelija proizvodnog mikroorganizma *Bacillus* sp. BioSol021 7,83 log CFU/ml dostiće se nakon 96 h kultivacije.



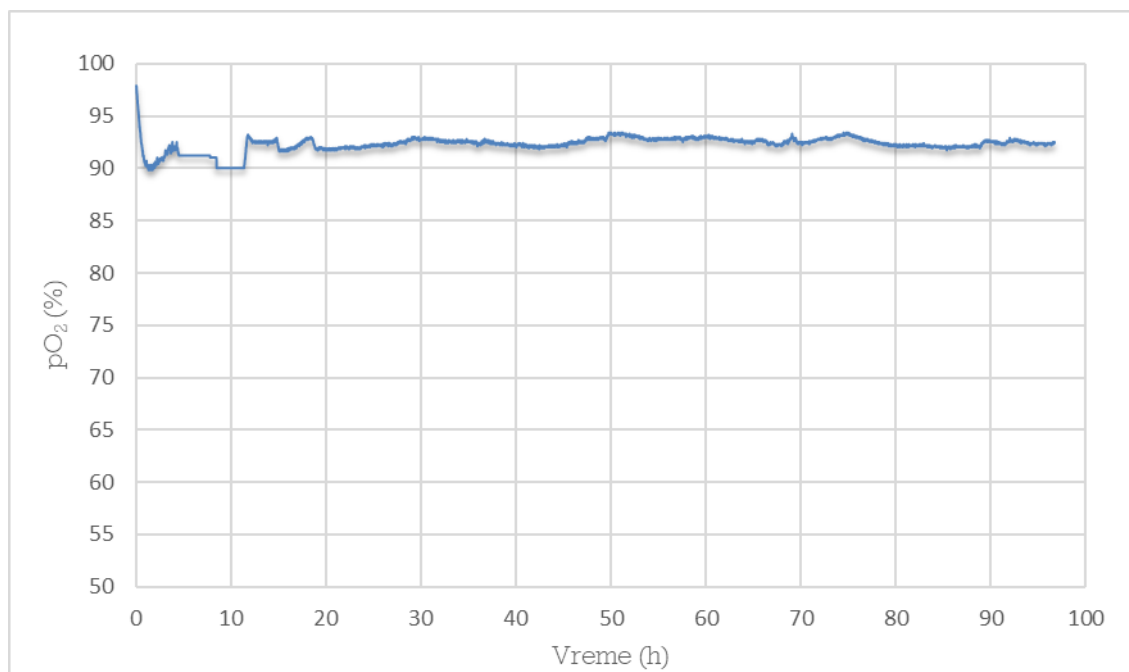
Slika 5.6.1. Trend promene sadržaja biomase tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.

Promena vrednosti pH tokom trajanja kultivacije praćena je kontinualno, a odziv je detektovan na svakih 60 sekundi. Na slici 5.6.2 je prikazan trend promene vrednosti pH, gde se uočavaju varijacije u pogledu povećanja i smanjenja vrednosti pH tokom prvih 12 h kultivacije. Nakon dostizanja maksimalne vrednosti pH koja je iznosila 7,92, sledi kontinuirani pad do kraja trajanja bioprocasa. Promene vrednosti pH objašnjavaju se metaboličkom aktivnošću proizvodnog mikroorganizma i produkcijom baznih i kiselih metabolita. Tokom izvođenja kultivacije nije ukazana potreba za korekcijom vrednosti pH, budući da su nekorigovane vrednosti sve vreme bile u optimalnom opsegu. (Pajčin i sar., 2020; Okaiyeto i sar., 2016)



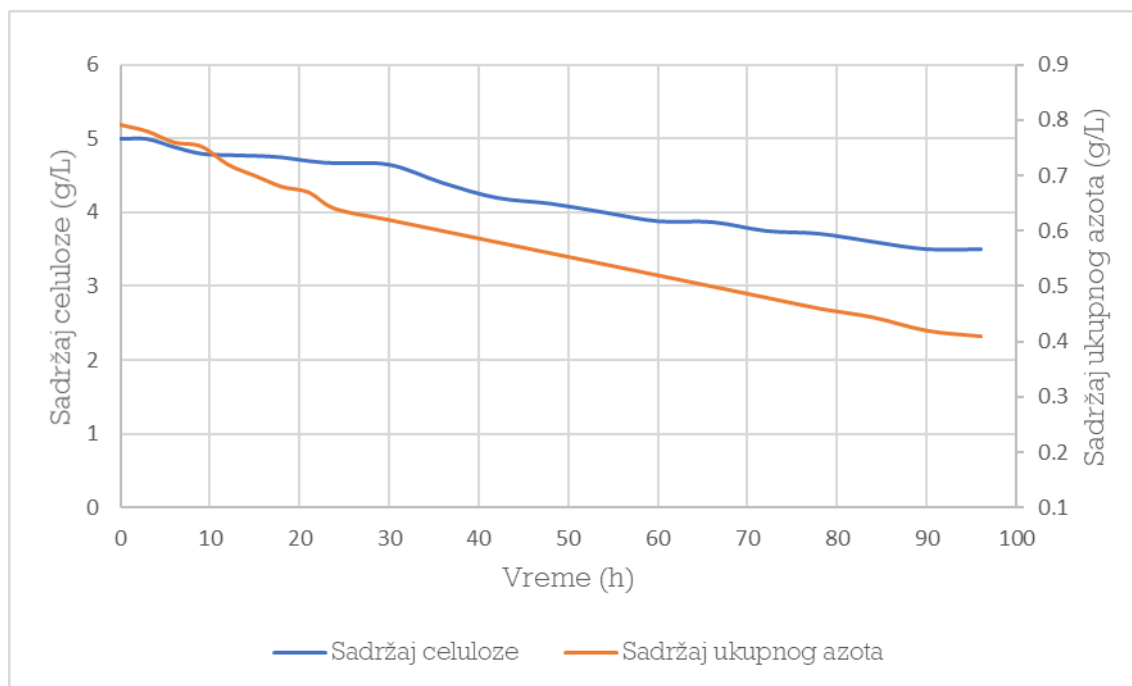
Slika 5.6.2. Trend promene vrednosti pH tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.

Promena sadržaja kiseonika tokom trajanja kultivacije praćena je kontinualno, a odziv je detektovan na svakih 60 sekundi. Promene uslova odvijanja bioprocesa u pogledu intenziteta aeracije i brzine mešanja se u najvećoj meri odražavaju na sadržaj kiseonika rastvorenog u kultivacionom medijumu. Prva postavka eksperimenta u seriji izvođenja bioprocesa u uvećanim razmerama, odnosno na nivou laboratorijskog bioreaktora, podrazumevala je minimalne uslove intenziteta aeracije i brzine mešanja, 0,5 vvm i 100 o/min. Na slici 5.6.3 je prikazan trend promene sadržaja rastvorenog kiseonika tokom trajanja kultivacije, koji ne ukazuje na značajnije promene u količini dostupnog kiseonika. Razlika u maksimalnoj vrednosti količine dostupnog kiseonika u početnoj tački bioprocesa i minimalnoj vrednosti koja se beleži na kraju izvođenja kultivacije je manja od 8%.



Slika 5.6.3. Trend promene sadržaja kiseonika tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.

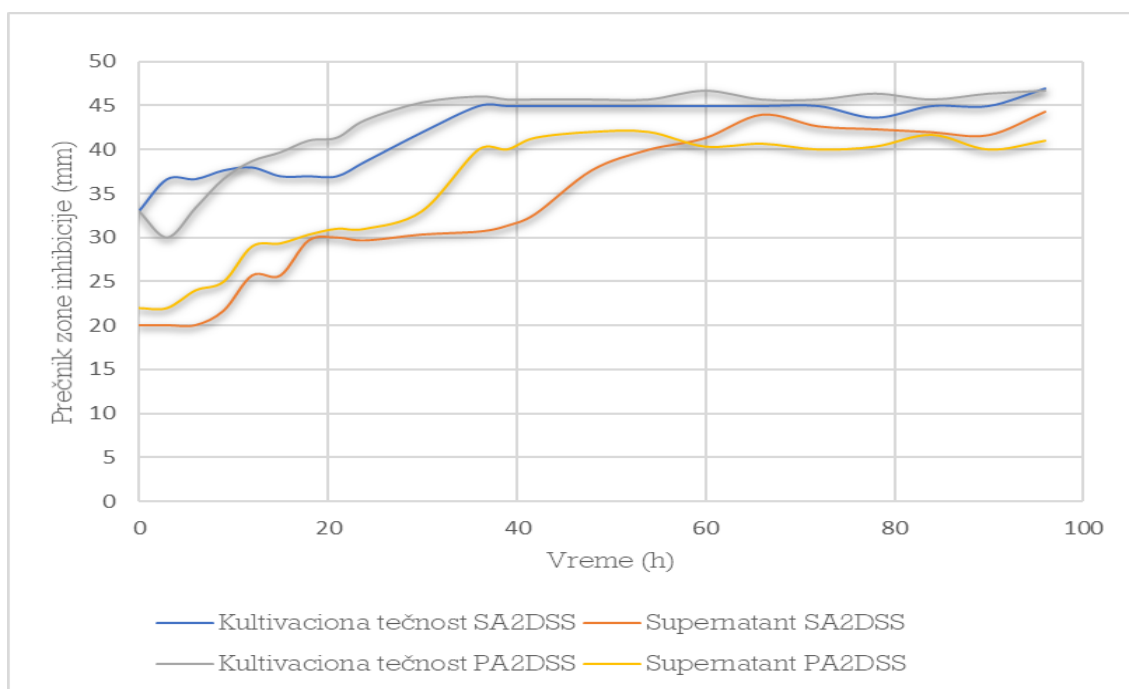
Promene koncentracije nutrijenata (izvor ugljenika i izvor azota) tokom trajanja bioprocasa primenom proizvodnog izolata *Bacillus* sp. BioSol021 praćene su određivanjem sadržaja celuloze i ukupnog azota izvođenjem standardnih analitičkih metoda. Usled potrošnje nutrijenata na rast i razmnožavanje kao i metaboličku aktivnost, beleži se kontinuirani pad rezidualnih koncentracija tokom čitavog trajanja kultivacije (slika 5.6.4). Ukupna potrošnja celuloze, odnosno ukupnog azota, iznosi 30% i 49%. Visoke rezidualne koncentracije ukazuju na potrebu daljeg poboljšanja parametara bioprocasa kako bi se obezbedila bolja potrošnja nutrijenata primenom istog inicijalnog sastava hranljive podloge.



Slika 5.6.4. Trend promene rezidualnih koncentracija nutrijenata tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.

Procena nivoa antagonističke aktivnosti agenasa biološke kontrole tokom trajanja kultivacije praćena je testiranjem antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti i supernatanta protiv fitopatogenih izolata *Aspergillus flavus* SA2DSS i *Aspergillus flavus* PA2DSS. Testiranje je vršeno difuzionom metodom bunara, dok je inkubacija Petri ploča sa zasejanim test mikroorganizmima i nanetim uzorcima trajala 96 h. Srednje vrednosti prečnika zone inhibicije (područja gde nije došlo do rasta fitopatogenih gljiva) dobijenih testiranjem antagonističke aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti i supernatanta na fitopatogene izolate *Aspergillus flavus* SA2DSS i *Aspergillus flavus* PA2DSS tokom trajanja kultivacije prikazane su na slici 5.6.1. Dobijeni rezultati ukazuju na dvostruki mehanizam delovanja agenasa biološke kontrole, imajući u vidu da antagonističko delovanje ispoljavaju i uzorci kultivacione tečnosti gde su aktivne komponente prevashodno ćelije proizvodnog soja ali i supernatant gde se antimikrobno dejstvo pripisuje sintetisanim ekstracelularnim metabolitima. Promena nivoa antagonističkog delovanja uzoraka kultivacione tečnosti tokom trajanja kultivacije može se dovesti u vezu sa intenzitetom umnožavanja proizvodnog izolata, prikazanim na slici 5.6.1, gde se evidentni porast zona inhibicije beleži tokom eksponencijalne faze rasta. S druge strane ulazak proizvodnog mikroorganizma u stacionarnu fazu rasta tokom koje dolazi do izražaja metabolička aktivnost soja označava i porast zona inhibicije koje nastaju delovanjem supernatanta. Osetljivost oba ispitivana fitopatogena prema

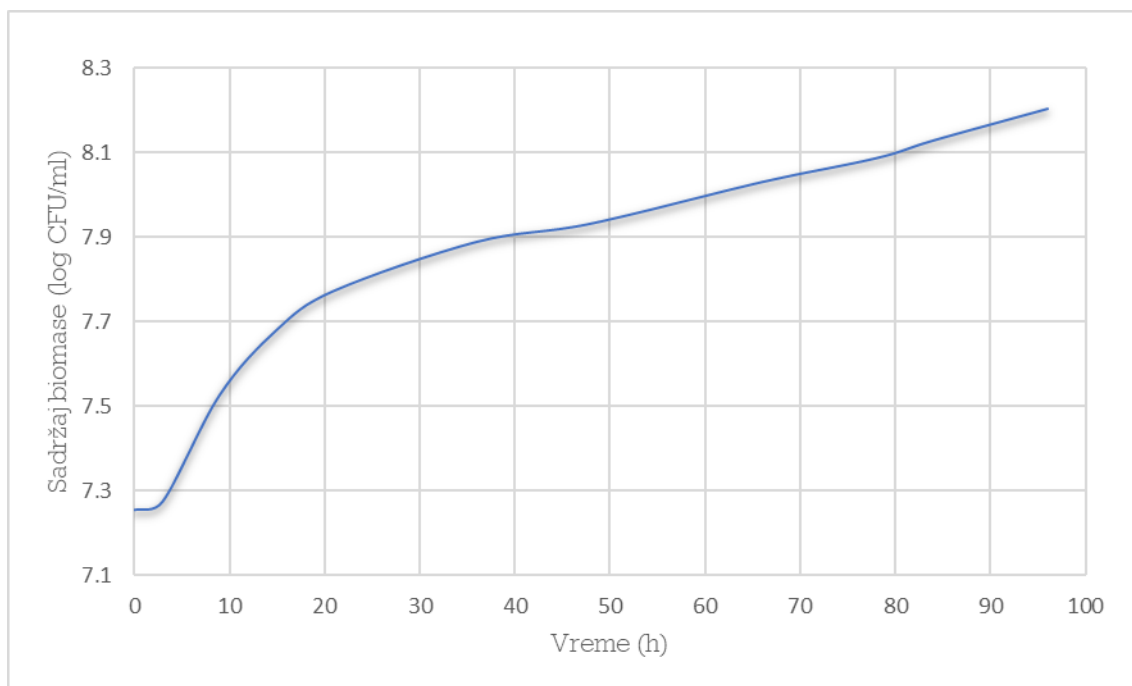
primenjenim agensima biološke kontrole je približna, s tim da su ipak nešto veće zone inhibicije dobijene u slučaju izolata *Aspergillus flavus* SA2DSS, za kultivacionu tečnost 47 mm dok je za supernatant maksimalna vrednost 44 mm. U slučaju drugog fitopatogenog izolata, *Aspergillus flavus* PA2DSS, maksimalna zona inhibicije za uzorak kultivacione tečnosti je 47 mm, a za supernatant 41 mm.



Slika 5.6.5. Trend promene prečnika zone inhibicije testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti i supernatanta dobijenih tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.

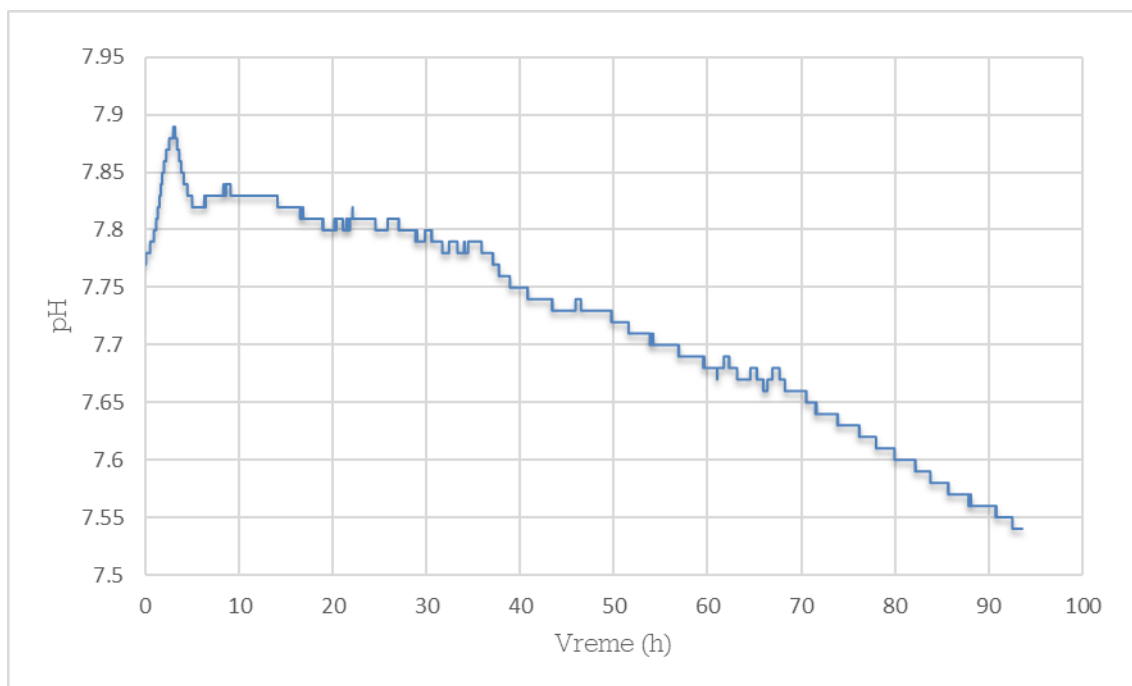
5.6.2. Analiza toka bioprocesa u laboratorijskom bioreaktoru pri uslovima aeracije 0,5 vvm i mešanja 300 o/min

Trend prikazan na slici 5.6.6 ukazuje na dinamiku rasta proizvodnog mikroorganizma karakterističnu za bakterijske ćelije. Period adaptacije proizvodnog mikroorganizma, pri definisanim eksperimentalnim uslovima, odigrava se tokom prvih 5 časova izvođenja bioprocesa. Ukoliko se vrši poređenje sa prethodnom postavkom eskperimenta gde je primenjivan trostruko manji intenzitet mešanja, lag faza u ovom slučaju ima nešto duže trajanje, što se može objasniti većim stresom ćelija usled intenzivnijeg mešanja (Wu i sar., 2019). Nakon lag faze, dolazi do perioda intenzivnog umnožavanja biomase koji se odigrava do gotovo 20. časa kultivacije. Na eksponencijalnu, nastavlja se faza umerenijeg rasta ćelija bez izražene stacionarne faze, kao posledica primene uslova koji pogoduju umnožavanju proizvodnog mikroorganizma. Maksimalna koncentracija ćelija proizvodnog mikroorganizma *Bacillus* sp. BioSol021 8,20 log CFU/ml dostiže se nakon 96 h kultivacije.



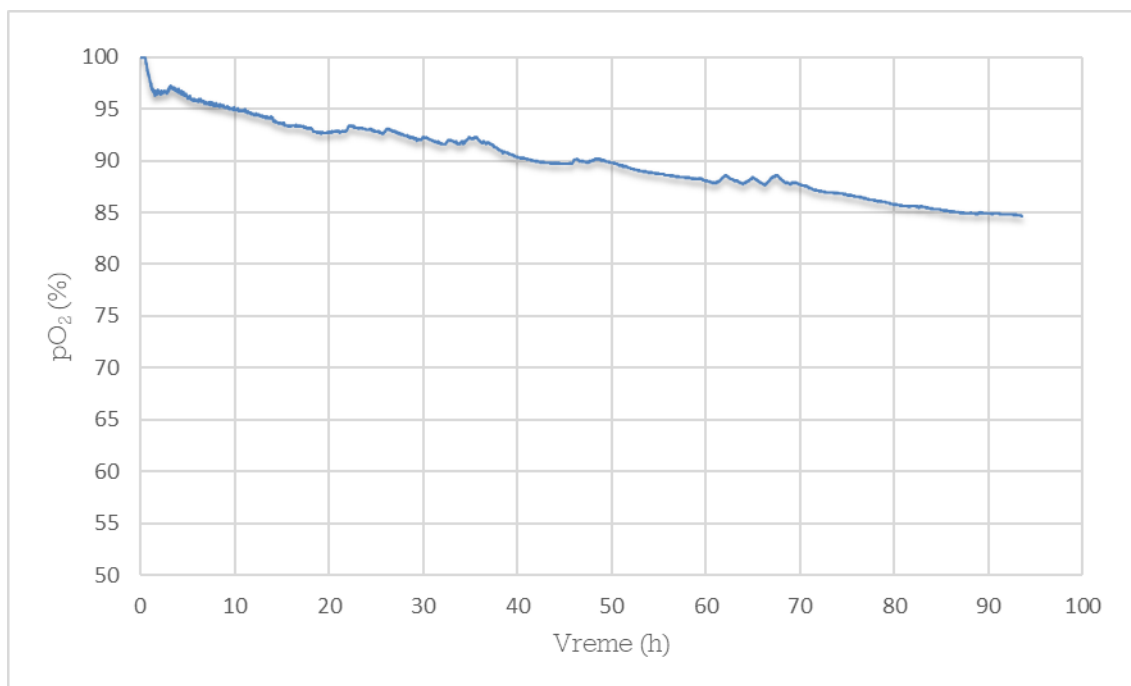
Slika 5.6.6. Trend promene sadržaja biomase tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri uslovima intenzitetu 0,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.

Promena vrednosti pH tokom trajanja kultivacije praćena je kontinualno, a odziv je detektovan na svakih 60 sekundi. Na slici 5.6.7 je prikazan trend promene vrednosti pH, gde se uočava porast u početnim časovima kultivacije koji ukazuje na metaboličku aktivnost proizvodnog soja koja rezultuje dobijanjem proizvoda baznog karaktera. Nakon 3. časa kultivacije započinje kontinuirani pad vrednosti pH koji se nastavlja sve do kraja trajanja bioprocasa. Finalna vrednost koja iznosi 7,54, i dalje se nalazi u okviru optimalnog opsega za izvođenje kultivacije.



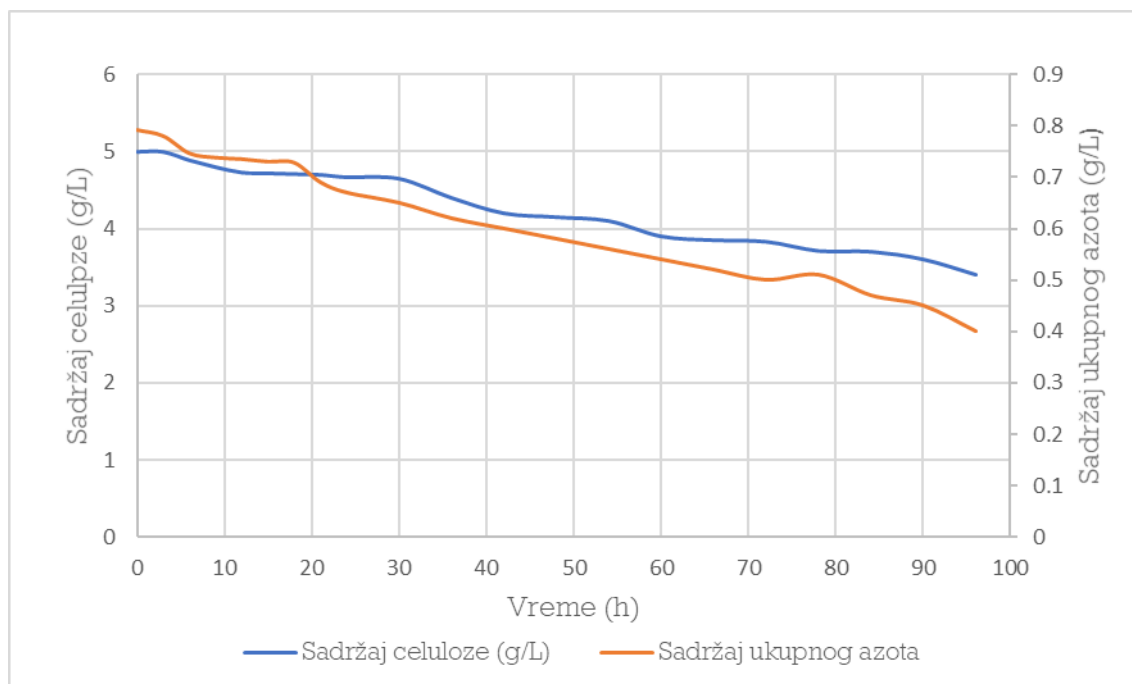
Slika 5.6.7. Trend promene vrednosti pH tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.

Promena sadržaja rastvorenog kiseonika tokom trajanja kultivacije praćena je kontinualno, a odziv je detektovan na svakih 60 sekundi. Druga postavka eksperimenta u seriji izvođenja bioprocesa u uvećanim razmerama, u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 16 l, podrazumevala je minimalne uslove intenziteta aeracije 0,5 vvm i maksimalnu vrednost brzine mešanja prethodno definisanu eksperimentalnim planom, 300 o/min. Na slici 5.6.8 je prikazan trend promene sadržaja kiseonika tokom trajanja kultivacije, pri čemu se uočava kontinuirani pad količine dostupnog kiseonika tokom čitavog trajanja bioprocesa. Razlika u maksimalnoj vrednosti količine dostupnog kiseonika u početnoj tački bioprocesa i minimalnoj vrednosti koja se beleži na kraju izvođenja kultivacije iznosi 15%. U poređenju sa prethodnom postavkom eksperimenta sa trostruko manjim intenzitetom mešanja beleži se gotovo duplirana potrošnja kiseonika što je u skladu sa činjenicom da je u ovom eksperimentu i količina umnožene biomase veća (Shih i sar., 2009).



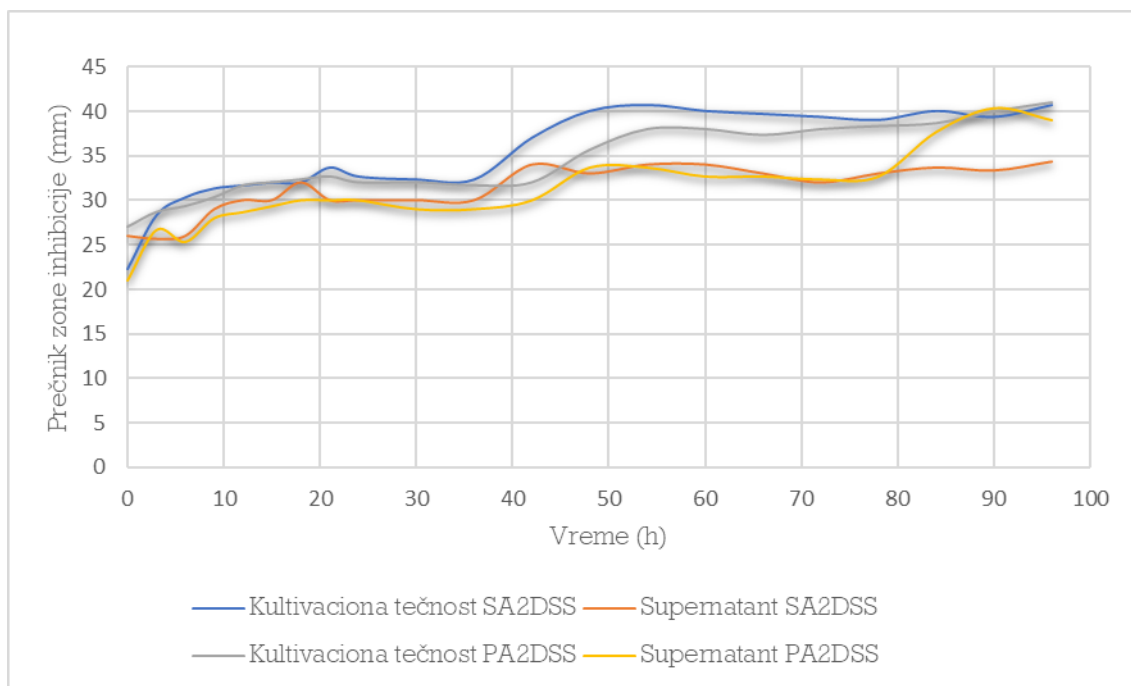
Slika 5.6.8. Trend promene sadržaja kiseonika tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.

Promene koncentracije nutrijenata (izvor ugljenika i izvor azota) praćene su tokom ukupnog trajanja bioprocasa. Početne faze odvijanja kultivacije proizvodnog mikroorganizma vezuju se za intenzivan rast i razmnožavanje odakle potiče neophodnost za usvajanjem hranljivih materija. Dalji utrošak nutrijenata vezuje se za ostvarivanje metaboličke aktivnosti i sintezu proizvoda. Pri definisanim uslovima bioprocasa zabeležen je kontinuirani pad rezidualnih koncentracija tokom čitavog trajanja kultivacije (slika 5.6.9). Porast ukupne potrošnje nutrijenata javlja se kao direktna posledica intenzivnijeg umnožavanja biomase, što se može objasniti pozitivnim uticajem mešanja na snabdevanje ćelija proizvodnog mikroorganizma nutrijentima (Tian i sar., 2016).



Slika 5.6.9. Trend promene rezidualnih koncentracija nutrijenata tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri uslovima aeracije 0,5 vvm i inteziteta mešanja 300 o/min.

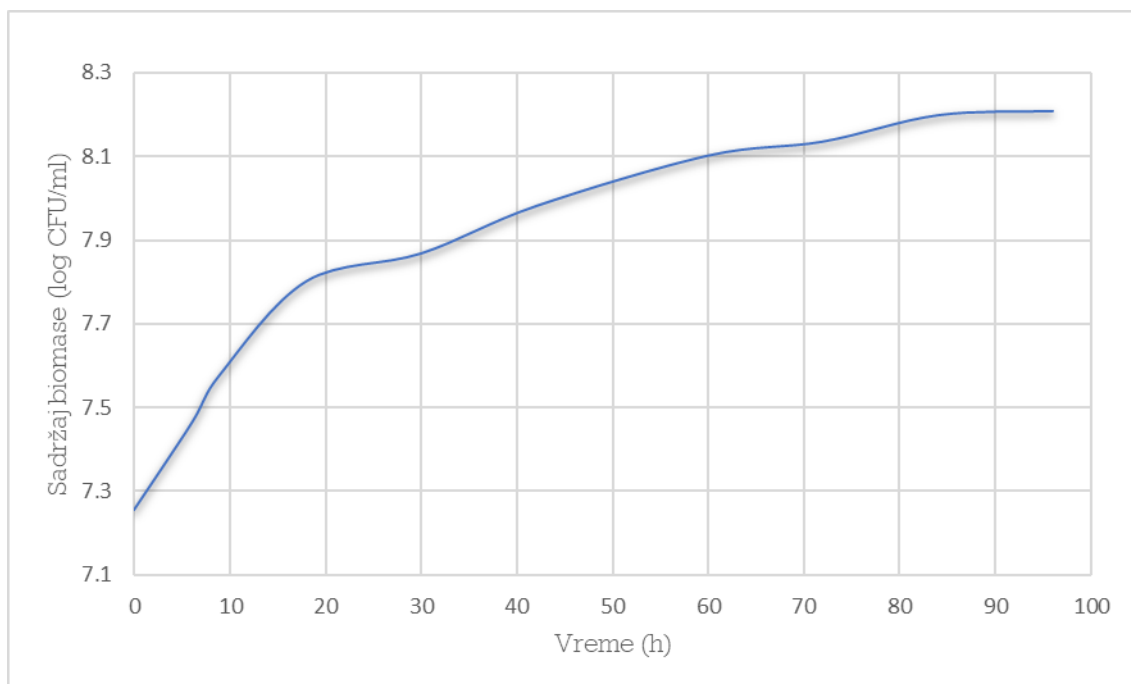
Procena nivoa antagonističke aktivnosti agenasa biološke kontrole tokom trajanja kultivacije praćena je testiranjem antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti i supernatanta protiv fitopatogenih izolata *Aspergillus flavus* SA2DSS i *Aspergillus flavus* PA2DSS (slika 5.6.10). Testiranje je vršeno na istovetan način kao u prethodnom setu eskperimenta, i u ovom slučaju dobijeni rezultati ukazali su na dvostruki mehanizam delovanja agenasa biološke kontrole, budući da antagonističkoj aktivnosti doprinosi i kompetitivna sposobnost ćelija proizvodnog soja ali i antibioza. Porast zona inhibicije kao pokazatelja supresivnog delovanja dešava se nakon 40. časa kultivacije što je u direktnoj vezi sa fazom rasta i nivoom metaboličke aktivnosti. Nivo inhibitorne aktivnosti prema ispitivanim fitopatogenima se ne menja bitno do kraja trajanja kultivacije kada se dostižu i maksimalne zone inhibicije u slučaju oba izolata. Vrednosti za izolat *Aspergillus flavus* SA2DSS u slučaju uzoraka kultivacione tečnosti i supernatanta iznose 41 mm i 34 mm. Kada je reč o izolatu *Aspergillus flavus* PA2DSS, prečnik zone inhibicije dobijen testiranjem kultivacione tečnosti je 41 mm, odnosno supernatanta 35 mm. Pri definisanju eksperimentalnim uslovima ne postoji značajna razlika u osetljivosti testiranih fitopatogenima prema primenjenim agensima biološke kontrole.



Slika 5.6.10. Trend promene prečnika zone inhibicije testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti i supernatanta dobijenih tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.

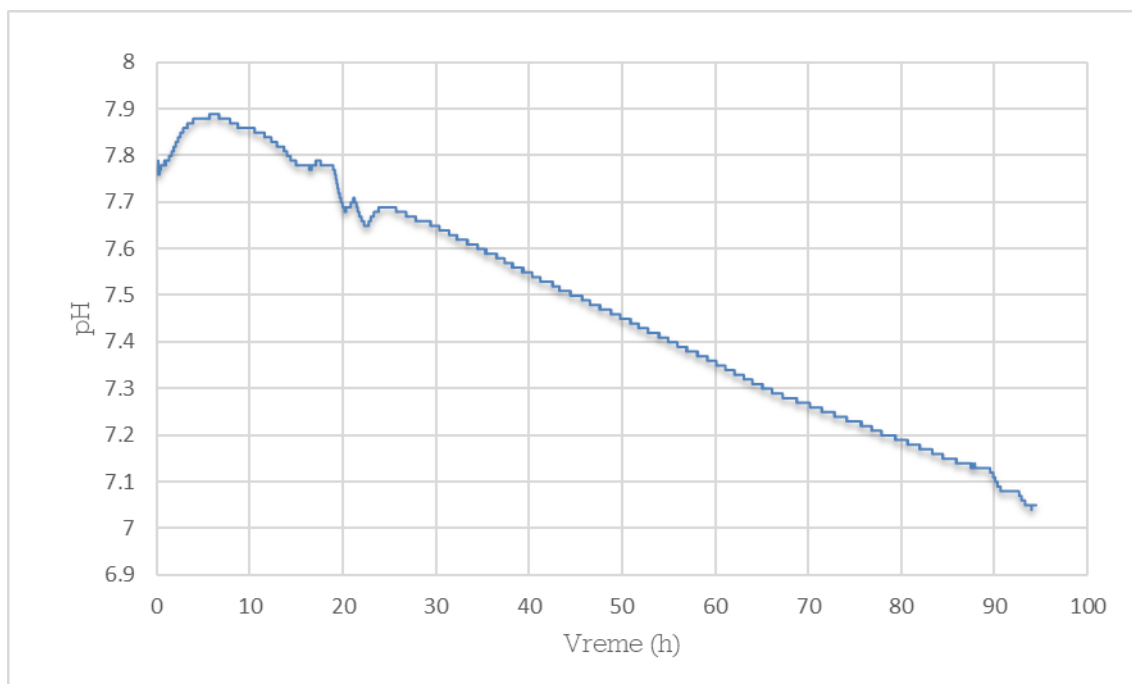
5.6.3. Analiza toka bioprocesa u laboratorijskom bioreaktoru pri uslovima aeracije 1,5 vvm i mešanja 100 o/min.

Trend prikazan na slici 5.6.11 ukazuje na promenu koncentracije ćelija proizvodnog mikroorganizma tokom izvođenja bioprocesa. Pri definisanim eksperimentalnim uslovima, uočava se gotovo potpuni izostanak lag faze, odnosno perioda prilagođavanja ćelija. Kao što je slučaj u prethodnom eksperimentalnom setu, eskponencijalna faza rasta se uočava tokom prvih 20 h kultivacije, bez izražene stacionarne faze. Pozitivan trend rasta nastavlja se sve do kraja trajanja bioprocesa, a maksimalna koncentracija ćelija proizvodnog mikroorganizma *Bacillus* sp. BioSol021 8,21 log CFU/ml, bliska vrednosti prethodnog eksperimentalnog seta, dostiže se nakon 96 h kultivacije. Finalna vrednost koncentracije proizvodnog mikroorganizma je veća u odnosu na inicijalnu za red veličine.



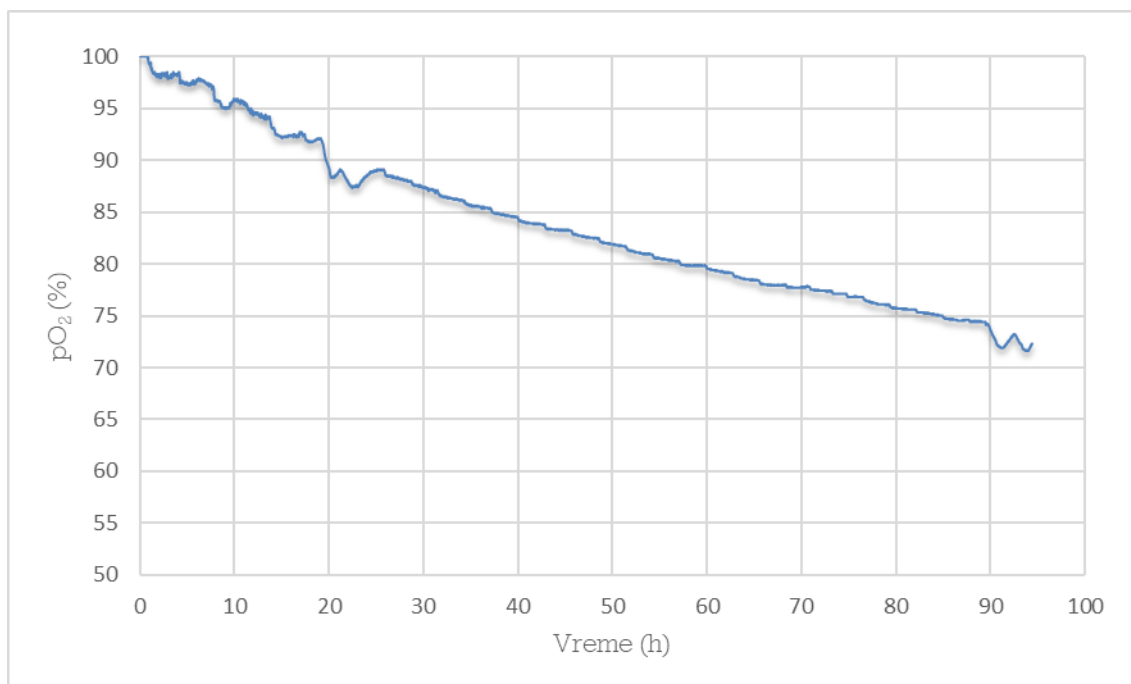
Slika 5.6.11. Trend promene sadržaja biomase tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.

Promena vrednosti pH tokom trajanja kultivacije praćena je kontinualno, a odziv je detektovan na svakih 60 sekundi. Na slici 5.6.12 je prikazana trend promene vrednosti pH, pri čemu se je uočljiv inicijalni porast vrednosti pH tokom prvih 8 h kultivacije. Dalje promene vrednosti pH prati kontinuirani pad sa nešto izraženijim varijacama oko 20. časa kultivacije. Ovakva dinamika promene vrednosti pH dovodi se u vezu s rastom proizvodnog mikroorganizma i metaboličkom aktivnošću koja vodi produkciji komponenti pretežno kiselog karaktera, karakterističnim za energetski metabolizam. Finalna vrednost pH na kraju kultivacije iznosila je 7,04, što predstavlja optimalnu vrednost za odabrani proizvodni mikroorganizam.



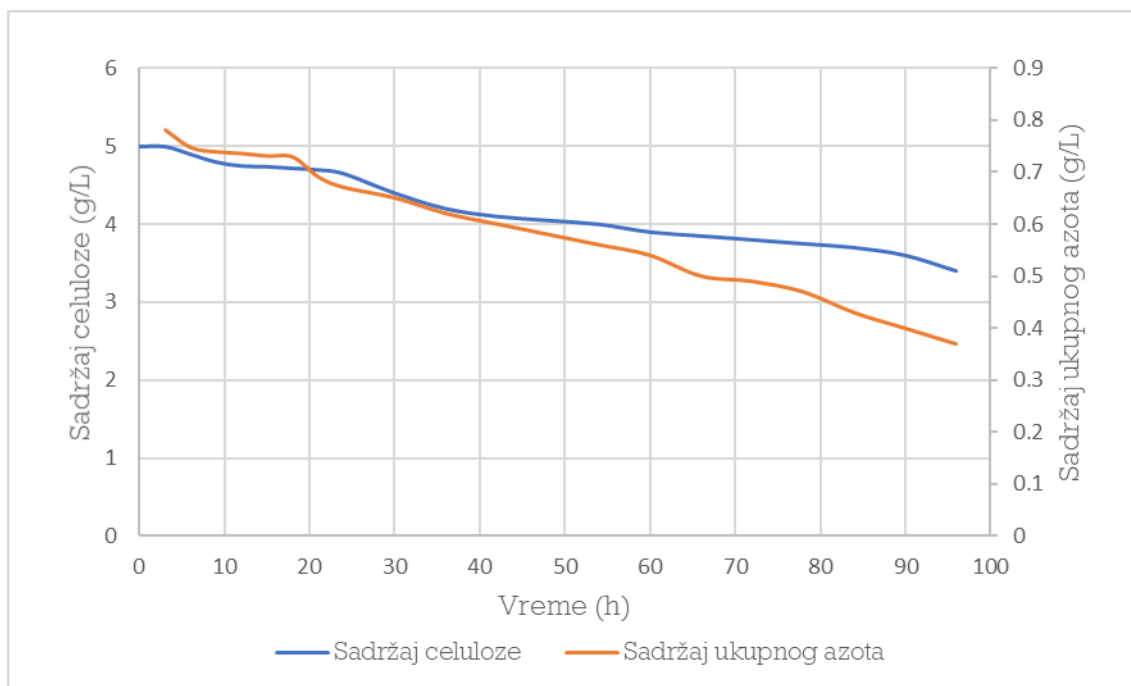
Slika 5.6.12. Trend promene vrednosti pH tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.

Promena sadržaja rastvorenog kiseonika tokom trajanja kultivacije praćena je kontinualno, a odziv je detektovan na svakih 60 sekundi. Uslovi definisani u okviru trećeg seta eskperimenta koji je izveden u laboratorijskom bioreaktoru podrazumeva maksimalan intenziteta aeracije 1,5 vvm i minimalnu vrednost brzine mešanja 100 o/min. Na slici 5.6.13 je prikazana je promena sadržaja kiseonika tokom trajanja kultivacije, pri čemu se uočava osetniji pad količine dostupnog kiseonika u poređenju sa rezultatima za prethodno izvedene kultivacije u okviru eksperimentalnog plana. Drastičniji pad vrednosti sadržaja kiseonika dešava se oko 20. časa kultivacije što se povezuje sa većim potrebama proizvodnog mikroorganizma usled ulaska u fazu rasta koju karakteriše intenzivnija metabolička aktivnost. Razlika u maksimalnoj vrednosti količine dostupnog kiseonika u početnoj tački bioprocesa i minimalnoj vrednosti koja se beleži na kraju izvođenja kultivacije iznosi nešto manje od 30%. U poređenju sa prethodnom postavkom eskperimenta gde su uslovi odgovarali minimalnoj vrednosti intenziteta areacije i maksimalnoj vrednosti intenziteta mešanja gotovo je udvostručena potrošnja kiseonika, što je omogućilo i generisanje veće količine biomase.



Slika 5.6.13. Trend promene sadržaja kiseonika tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.

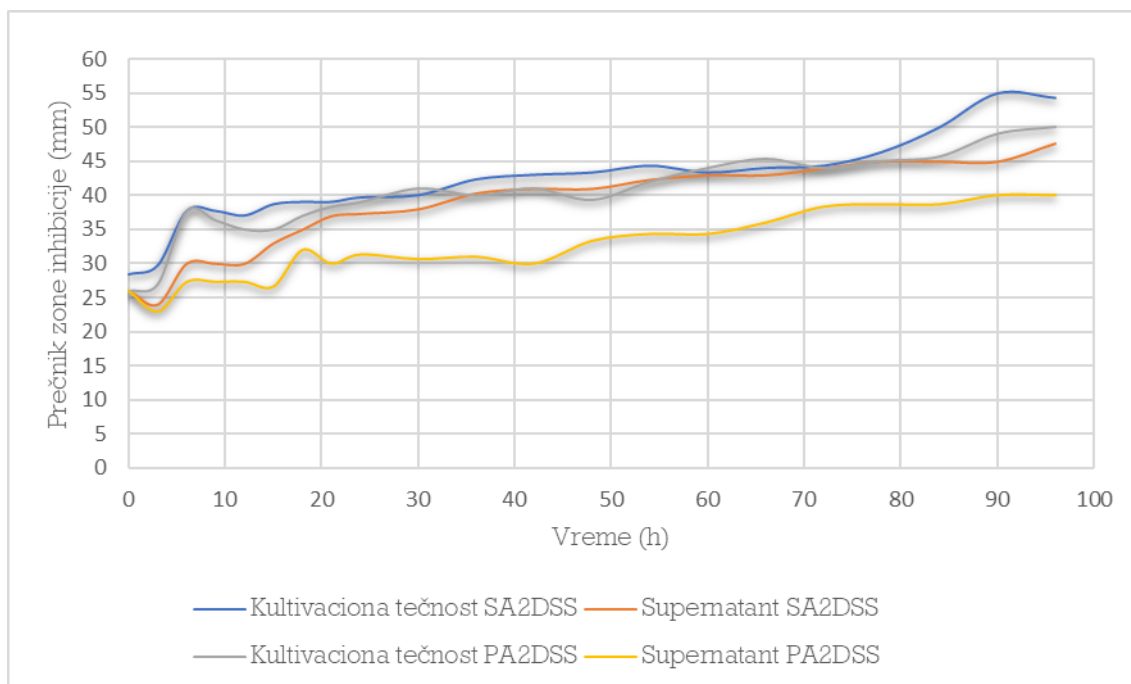
Promene koncentracije nutrijenata (izvor ugljenika i izvor azota) tokom trajanja bioprocasa primenom proizvodnog izolata *Bacillus* sp. BioSol021 praćene su određivanjem sadržaja celuloze i ukupnog azota izvođenjem standardnih analitičkih metoda. Kao što je slučaj u prethodna dva eksperimentalna seta, tokom čitavog trajanja kultivacije zabeležen je kontinuirani pad rezidualnih koncentracija celuloze i ukupnog azota (slika 5.6.14). Uslovi intenzivnog mešanja uslovljavaju bolju distribuciju hranljivih materija u zapremini kultivacione tečnosti što rezultuje i njihovom većom ukupnom potrošnjom (Dey i sar., 2017). Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima za količinu generisane biomase i izmerenim zonama prečnika zone inhibicije. Intenzivnije supresivno delovanje nastaje kao rezultat kompetitivne aktivnosti visoke koncentracije ćelija proizvodnog mikroorganizma i produkcije viših prinosa antimikrobnih komponenti (Stamenković-Stojanović i sar., 2019).



Slika 5.6.14. Trend promene rezidualnih koncentracija nutrijenata tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.

Procena nivoa antagonističke aktivnosti agenasa biološke kontrole tokom trajanja kultivacije praćena je testiranjem antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti i supernatanta protiv fitopatogenih izolata *Aspergillus flavus* SA2DSS i *Aspergillus flavus* PA2DSS. Testiranje supresivnog delovanja proizvedenih agenasa biološke kontrole ponovljeno je na isti način kao u slučaju prethodne dve postavke eksperimenta. Trend promene vrednosti izmerenih prečnika zone inhibicije za uzorke kultivacione tečnosti ukazuje na kontinuirani porast antagonističke aktivnosti (slika 5.6.15). Supresivno delovanje zasniva se na delovanju ćelija proizvodnog mikroorganizma ali i aktivnosti proizvoda metabolizma. Višestruki mehanizam delovanja u svojstvu agenasa biološke kontrole je uobičajena karakteristika pripadnika roda *Bacillus* što ih ujedno čini i jednim od vodećih kandidata za ovakav vid primene (Shafi i sar., 2017; Ongena i Jacques, 2008). U konkretnoj eksperimentalnoj postavci, rezultati merenja zona inhibicije dobijeni testiranjem antagonističke aktivnosti na oba predstavnika aflatoksigenih *Aspergillus flavus* gljiva, upućuju na veću osetljivost izolata u odnosu na prethodne setove eksperimenata. Ovakav ishod upućuje na pozitivan uticaj intenzivne aeracije tokom izvođenja kultivacije, kako na rast ćelija proizvodnog soja tako i njegovu metaboličku aktivnost. Maksimalne zone inhibicije dobijene nakon 96 h kultivacije su iznosile, za izolat *Aspergillus flavus* SA2BSS testiranjem kultivacione tečnosti i supernatanta 54 mm i 48 mm, redom.

Za izolat *Aspergillus flavus* PA2DSS, dobijena vrednost za kultivacionu tečnost je 50 mm, a za supernatant 40 mm.

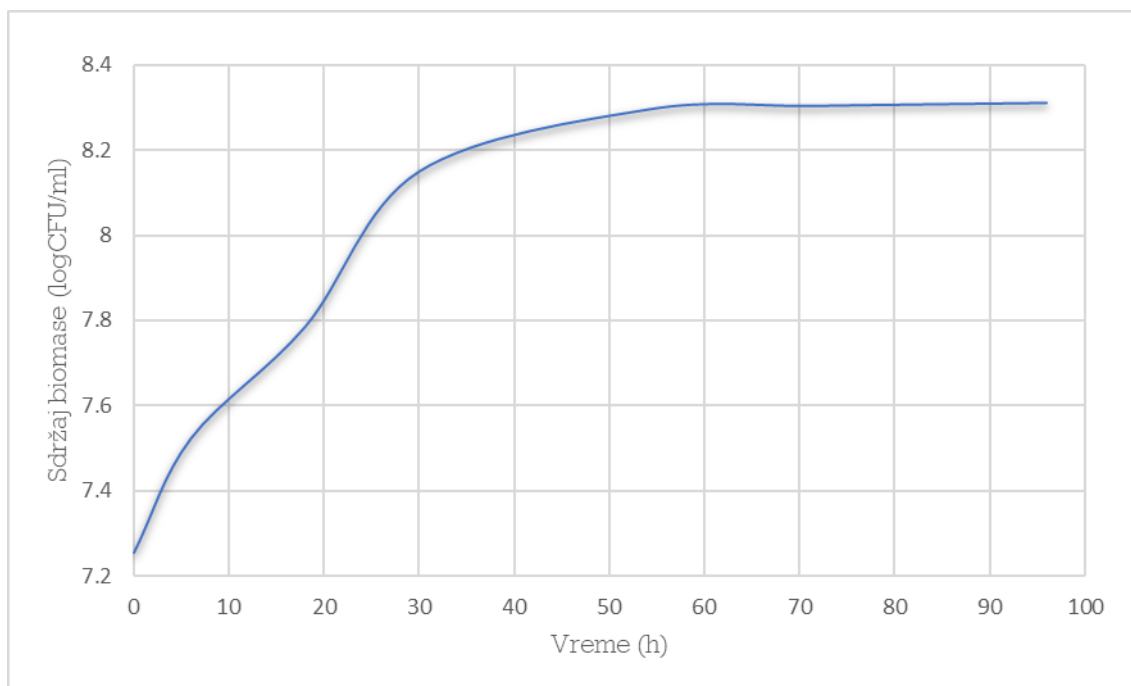


Slika 5.6.15. Trend promene prečnika zone inhibicije testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti i supernatanta dobijenih tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.

5.6.4. Analiza toka bioprocesa u laboratorijskom bioreaktoru pri uslovima aeracije 1,5 vvm i mešanja 300 o/min.

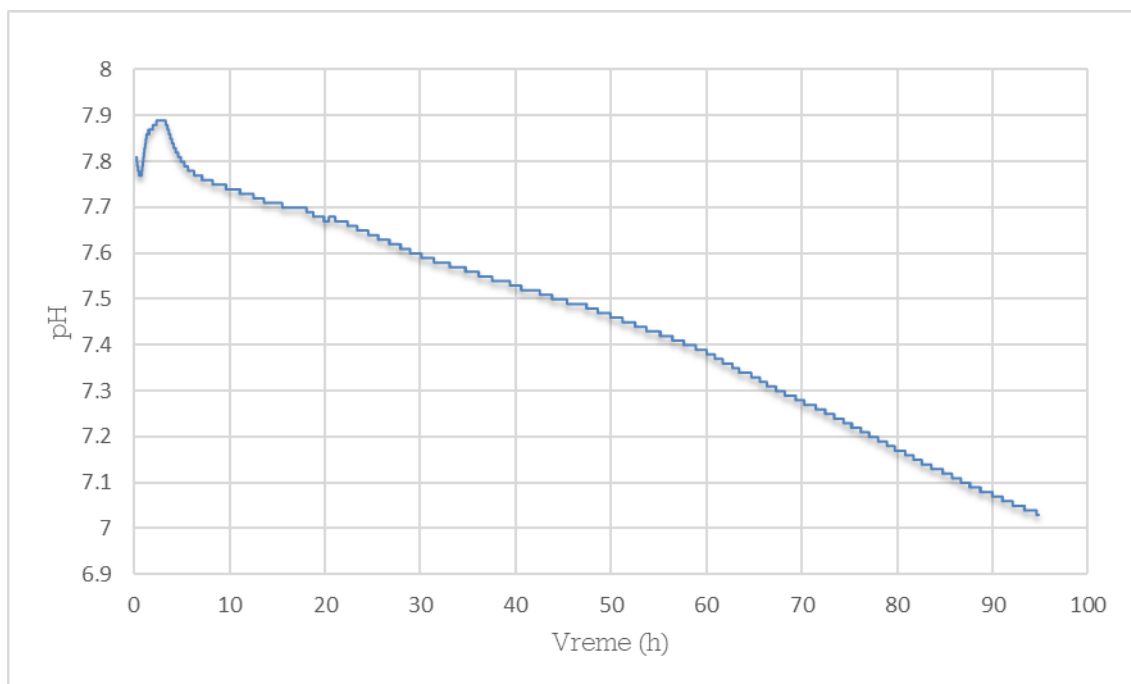
Trend prikazan na slici 5.6.16 ukazuje na promenu sadržaja biomase proizvodnog mikroorganizma tokom izvođenja bioprocesa. Pri definisanim eksperimentalnim uslovima, koji su podrazumevali maksimalan intenzitet aeracije i brzine mešanja, uočava se izostanak lag faze, uz izražen eksponencijalni rast koncentracije ćelija. Ako se uporede rezultati sa drugom postavkom eksperimenta sa istim uslovima mešanja gde je očigledno postojanje lag faze, stres ćelija u ovom eksperimentu ne dolazi do izražaja usled boljeg snabdevanja kiseonikom i njegovom intenzivnijom potrošnjom u prvim časovima kultivacije (Shih i sar., 2009). Uvećanje sadržaja biomase za čitavu logaritamsku jedinicu postiže se već nakon 40. časa kultivacije, što je duplo veća koncentracija u odnosu na vrednost postignutu za isto vreme u prvom eksperimentalnom setu. Bitna razlika u odnosu na krive rasta generisane u prethodnim setovima eskperimenata jeste očigledno prisustvo stacionarne faze rasta. U periodu kada se odigrava stacionarna faza nastavlja se pozitivan trend umerenijeg intenziteta u pogledu uvećanja sadržaja biomase sve do kraja trajanja bioprocesa. Maksimalna koncentracija ćelija proizvodnog

mikroorganizma *Bacillus* sp. BioSol021 8,31 log CFU/ml dostiže se nakon 96 h kultivacije.



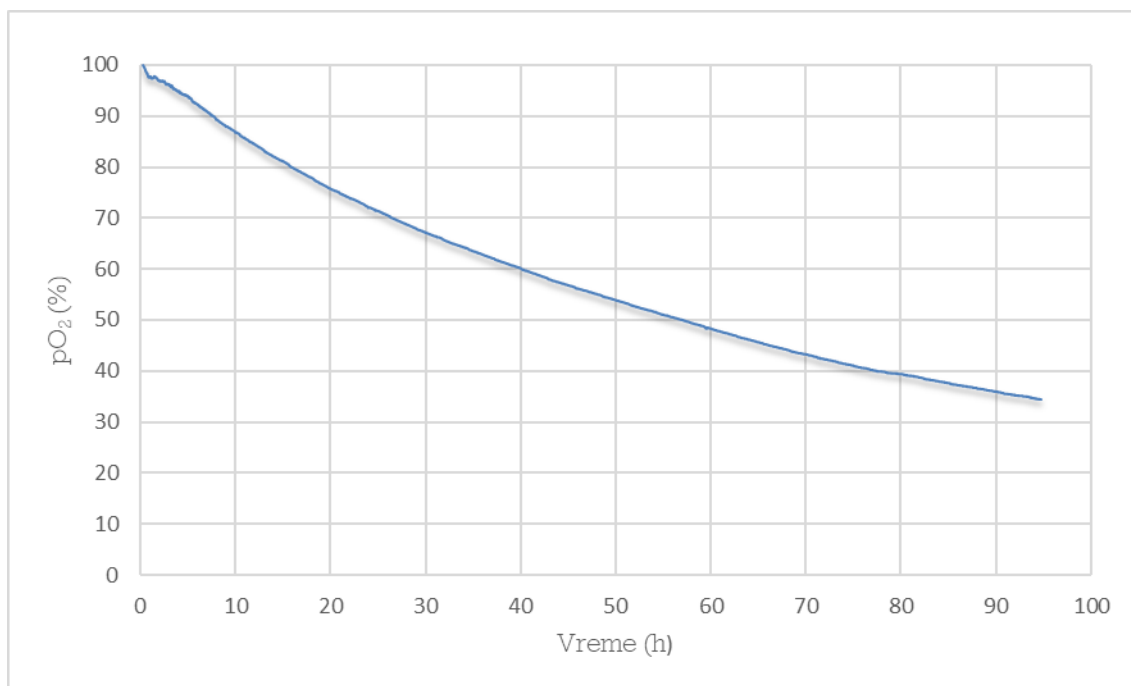
Slika 5.6.16. Trend promene sadržaja biomase tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.

Promena vrednosti pH tokom trajanja kultivacije praćena je kontinualno. Na slici 5.6.17 je prikazan trend promene vrednosti pH sa karakterističnim porastom u toku prvih časova izvođenja kultivacije. Dalje promene teku u smeru kontinuiranog smanjenja do minimalne vrednosti koja se dostiže na samom kraju kultivacije i iznosi 7,03. I pored evidentnog pada, krajnja vrednost pH nalazi se u optimalnom opsegu. Trend smanjenja vrednosti pH objašnjava se metaboličkom aktivnošću proizvodnog mikroorganizma koja se bazira na produkciji metabolita kiselog karaktera. Pored odgovarajućeg odabira komponenti kultivacionog medijuma, adekvatnog nivoa oksigenacije bioprocasa, vrednost pH se navodi kao bitan faktor koji određuje nivo produkcije lipopeptidnih komponenti, kao važnih činilaca koji definišu potencijal biokontrolnih agenasa. Razlika između inicijalne i finalne vrednosti pH tokom sve četiri eksperimentalne postavke nije prelazila jednu pH jedinicu. Ovakav opseg vrednosti pH odgovara idealnim uslovima za rast i željenu metaboličku aktivnost proizvodnog mikroorganizma (Satapute i sar., 2012; Yaseen i sar., 2017).



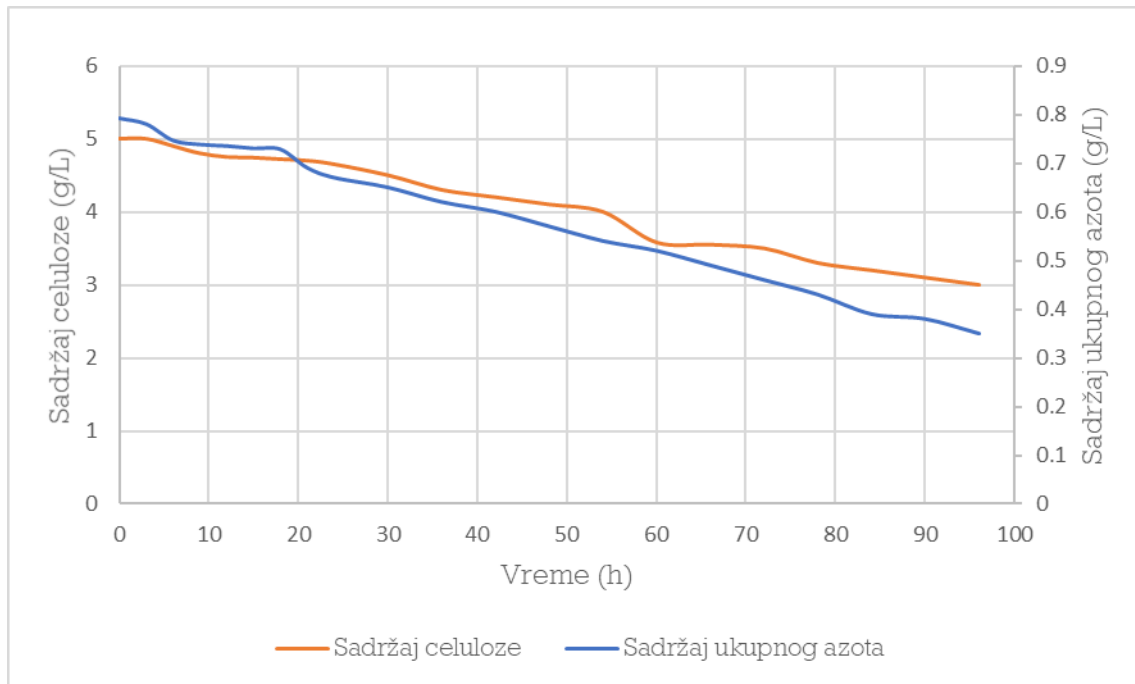
Slika 5.6.17. Trend promene vrednosti pH tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.

Promena sadržaja rastvorenog kiseonika tokom trajanja kultivacije praćena je kontinualno, a odziv je detektovan na svakih 60 sekundi. Uslovi definisani poslednjim setom eskperimenta koji je izveden u laboratorijskom bioreaktoru podrazumevali su maksimalan intenzitet aeracije 1,5 vvm, i maksimalnu brzinu mešanja 300 o/min. Na slici 5.6.18 je prikazana promena sadržaja kiseonika tokom trajanja kultivacije, koja ukazuje na ujednaćen pad vrednosti tokom čitavog trajanja bioprocasa. Ovako postavljeni eskperimentalni uslovi favorizovali su homogenizaciju kultivacionog medijuma, prenos mase nutrijenata, i snabdevanje ćelija dovoljnom količinom kiseonika. Intenzivna aeracija u kombinaciji sa intenzivnim mešanjem takođe obezbeđuje efikasno dispergovanje mehurića vazduha i transfer kiseonika do ćelija proizvodnog mikroorganizma, na šta upućuju i dobijeni rezultati u smislu visoke potrošnje koja rezultuje smanjenjem sadržaja dostupnog kiseonika tokom izvođenja bioprocasa koje iznosi gotovo 70% (Mounsef i Lteif, 2015). Pored pomentih uloga, intenzivna aeracija olakšava eliminaciju gasovitih produkata nastalih tokom kultivacije, čime se dodatno postiže bolja produktivnost bioprocasa (Wu i sar., 2019).



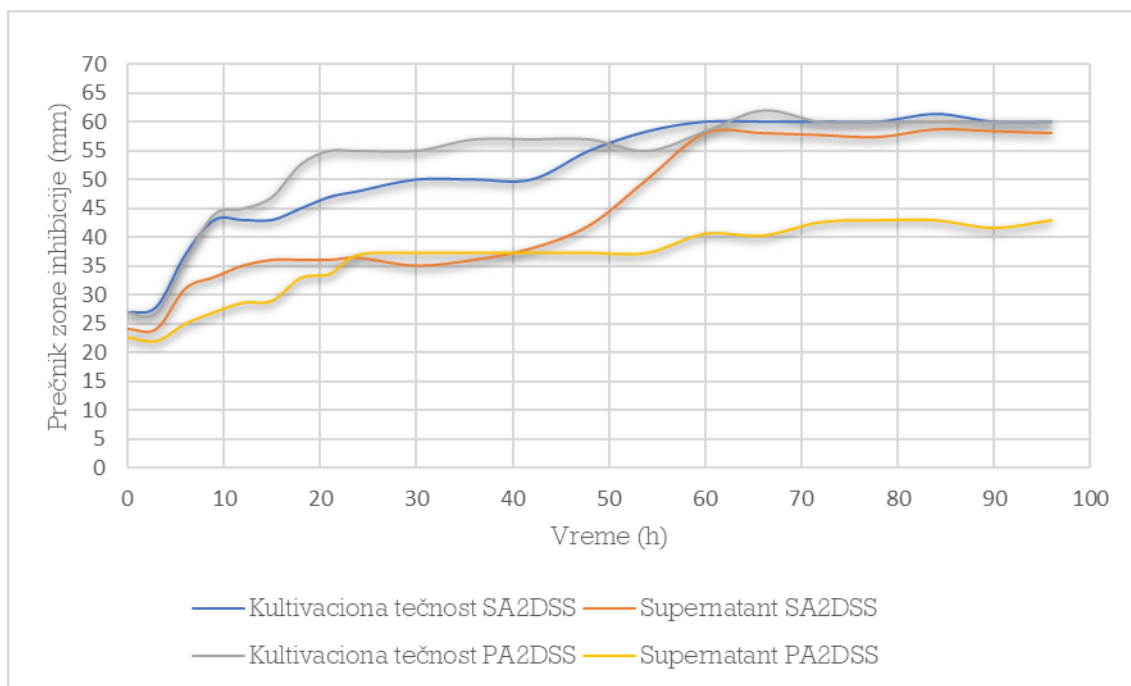
Slika 5.6.18. Trend promene sadržaja kiseonika tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.

Promene koncentracije nutrijenata (izvor ugljenika i izvor azota) tokom trajanja bioprocasa primenom proizvodnog izolata *Bacillus* sp. BioSol021 praćene su određivanjem sadržaja celuloze i ukupnog azota izvođenjem standardnih analitičkih metoda. U poslednjem eksperimentalnom setu koji karakterišu maksimalan intenzitet aeracije i brzine mešanja, beleži se i najveća potrošnja izvora ugljenika i azota. Definisani eksperimentalni uslovi omogućavaju bolje snabdevanje ćelija proizvodnog mikroorganizma nutrijentima što uslovljava i intenzivniji rast i razmnožavanje kao i produkciju sekundarnih proizvoda metabolizma (Tzeng i sar., 2008). Tokom čitavog trajanja kultivacije zabeleženo je kontinuirano smanjenje rezidualnih koncentracija celuloze i ukupnog azota (slika 5.6.19).



Slika 5.6.19. Trend promene rezidualnih koncentracija nutrijenata tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 u laboratorijskom bioreaktoru zapremine 16 l pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.

Procena nivoa antagonističke aktivnosti agenasa biološke kontrole tokom trajanja kultivacije praćena je testiranjem antimikrobne aktivnosti uzoraka kultivacione tečnosti i supernatanta protiv fitopatogenih izolata *Aspergillus flavus* SA2DSS i *Aspergillus flavus* PA2DSS. Poslednji eksperimentalni set podrazumevao je maksimalne uslove intenziteta aeracije i brzine mešanja. Ovakvi uslovi ispostavili su se najpogodnim sa aspekta nivoa antagonističke aktivnosti prevashodno uzoraka kultivacione tečnosti. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa određenim vrednostima koncentracije biomase, koje su pri definisanim eksperimentalnim uslovima dostigle maksimum (slika 5.6.20). S druge strane, uočava se osetnija razlika u supresivnom delovanju uzoraka supernanta kada je reč o testiranim fitopatogenim izolatima. Soj *Aspergillus flavus* PA2DSS pokazuje manju osetljivost prema primenjenim agensima biološke kontrole sa maksimalnom zonom inhibicije koja iznosi 43 mm, nasuprot izolatu *Aspergillus flavus* SA2DSS sa zonama koje dostižu 58 mm. Ovakav ishod upućuje na razliku u osetljivosti test mikroorganizama na delovanje metabolita čija se produkcija favorizuje u konkretnim eksperimentalnim uslovima. Dobijeni rezultati takođe ukazuju da je antimikrobna aktivnost posledica delovanja većeg broja komponenti, i da je pri tome prisutna različita osetljivost testiranih fitopatogena na one koje su u većim količinama produkovane pri većem intenzitetu aeracije i mešanja. Vrednosti zona inhibicije za oba izolata su imale maksimalne i istovetne vrednosti, 60 mm.



Slika 5.6.20. Trend promene prečnika zone inhibicije testiranjem uzoraka kultivacione tečnosti i supernatanta dobijenih tokom trajanja kultivacije primenom *Bacillus* sp. BioSol021 pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.

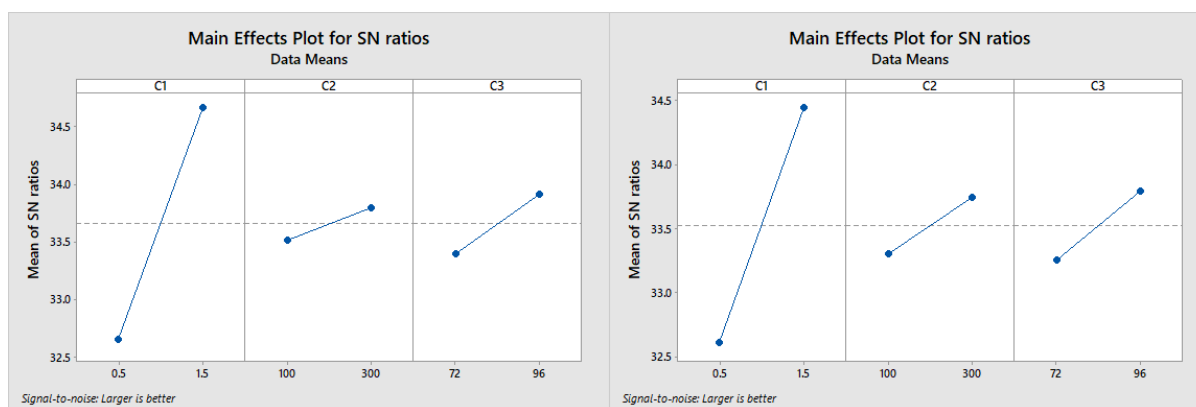
5.7. Optimizacija procesnih parametara

Faza koja je usledila nakon izvođenja kultivacija u uvećanim razmerama, odnosno u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 16 l (EDF – 15.4_1, A/S Biotehniskais centrs, Riga, Letonija) primenom proizvodnog soja *Bacillus* sp. BioSol021, podrazumevala je optimizaciju ključnih procesnih parametara bioprocasa: intenzitet aeracije, brzina mešanja i vreme kultivacije. U prethodno izvedenim eksperimentalnim setovima vršena je varijacija parametara zadatim vrednostima a generisani podaci su potom iskorišćeni za dalji korak optimizacije. Kao statistički pristup koji pogoduje obradi konkretnih eksperimentalnih podataka izabran je Tagučiči (engl. *Taguchi*) metod.

U osnovi Tagučiči metodologije je optimizacija procesa na osnovu jedne karakteristike kvaliteta. Optimizaciona metoda je bazirana na formiranju optimalnog skupa vrednosti parametara procesa koji zadovoljava nominalnu, maksimalnu ili minimalnu vrednost odabrane karakteristike kvaliteta u zavisnosti od potreba krajnjeg cilja posmatranog procesa (Küçük i sar., 2017). Ovakav pristup često se pronalazi kao rešenje pri optimizaciji uslova biotehnološke proizvodnje, uključujući vrednost pH, temperaturu, vreme kultivacije, sastav hranljivog medijuma, ali i intenzitet aeracije i brzinu mešanja (Singh i sar., 2017; Mazeed i sar., 2012; Suwanmanon i Hseih, 2014; Makowski i sar., 2017).

Za postupak optimizacije korišćen je Tagučijev L_4 ortogonalni niz, koji podrazumeva varijaciju tri faktora na dva nivoa. Kao faktori definisani su intenzitet areacije (0,5 vvm, 1,5 vvm), brzina mešanja (100 o/min, 300 o/min) i vreme trajanja kultivacije (72 h, 96 h). Posmatrani odziv je prečnik zone inhibicije izolata *Aspergillus flavus* SA2BB i *Aspergillus flavus* PA2DSS kao direktan pokazatelj supresivnog delovanja proizvodnog mikroorganizma *Bacillus* sp. BioSol021. Budući da je postavljeni cilj optimizacije podrazumevao maksimizaciju prečnika zone inhibicije, definisana je funkcija odnosa S/N „što je veće to je bolje”.

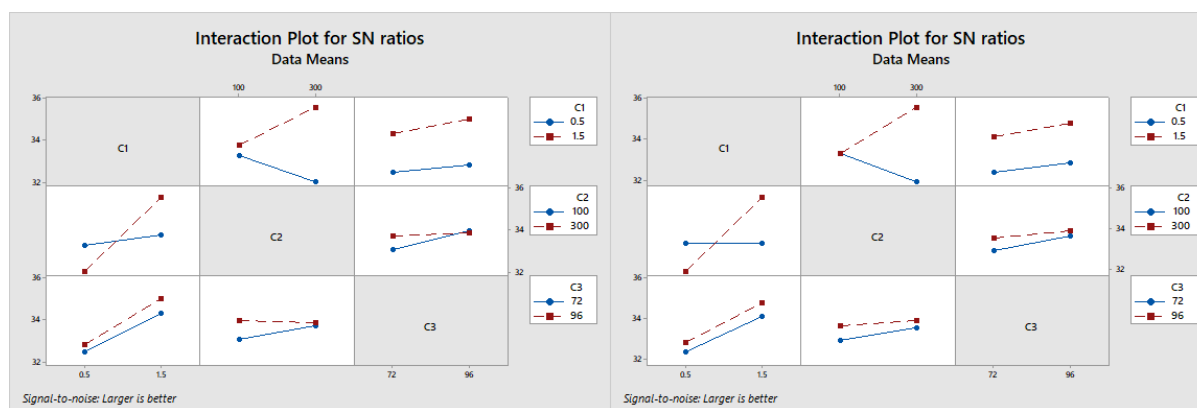
Na osnovu rezultata prikazanih na slici 5.7.1 a) gde je izvršena analiza S/N vrednosti za tri poređena faktora u slučaju izolata *Aspergillus flavus* SA2BB zaključuje se da najveći uticaj na odabrani odziv pokazuje intenzitet aeracije. Izvođenjem bioprocesa pri uslovima intenzivne aeracije obezbeđuje se bolje snabdevanje ćelija proizvodnog mikroorganizma molekulima kiseonika kao i dodatno mešanje kultivacionog medijuma. Adekvatna homogenizacija doprinosi boljoj potrošnji nutrijenata što deluje stimulatивно kako na rast ćelija tako i njihovu metaboličku aktivnost (Amani i sar., 2010; Shih i sar., 2009). Gotovo identičan slučaj uočava se na slici 5.7.1 b) gde su prikazani rezultati za izolat *Aspergillus flavus* PA2DSS.



Slika 5.7.1. Uticaj faktora na vrednost S/N za prečnik zone inhibicije za testirane fitopatogene izolate: a) *Aspergillus flavus* SA2BSS i b) *Aspergillus flavus* PA2DSS. C1 – intenzitet areacije; C2 – brzina mešanja; C3 – kultivaciono vreme.

Grafički prikazi interakcija među ispitivanim faktorima daju odgovore o njihovom međusobnom odnosu, tj. da li uticaj jednog faktora na odabrani odziv zavisi od nivoa drugog faktora. Ukoliko su linije međusobno paralelne, to znači da ne postoji međusobni odnos faktora, dok suprotno tome, drugačiji položaj linija upućuje na njihovu interakciju.

Analizom grafičkih prikaza interakcija ispitivanih faktora, kao i pojedinačnih efekata faktora na ispitivani odziv (slika 5.7.1 i slika 5.7.2) može se izvesti zaključak da optimalni uslovi za izvođenje bioprocesa podrazumevaju maksimalne ispitivane vrednosti intenziteta aeracije 1,5 vvm, brzine mešanja 300 o/min, i trajanja kultivacije 96 h.



Slika 5.7.2. Uticaj interakcije faktora na vrednost S/N za prečnik zone inhibicije za testirane fitopatogene izolate: a) *Aspergillus flavus* SA2BSS i b) *Aspergillus flavus* PA2DSS. C1 – intenzitet aeracije; C2 – brzina mešanja; C3 – kultivaciono vreme.

Detaljnijom analizom eksperimentalnih podataka dobijenih praćenjem toka kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru, kao i generisanih rezultata nastalih njihovom statističkom obradom dolazi se do zaključka da dostupnost kiseonika i nivo homogenizacije kultivacione tečnosti definišu uspešnost konkretnog bioprocesa. Dobijeni rezultati jasno upućuju da veći intenzitet aeracije i brzine mešanja utiču na pojačanu akumulaciju biomase. Ovakav ishod objašnjava se boljim snabdevanjem ćelija proizvodnog soja kiseonikom i nutrijentima tokom čitavog trajanja kultivacije, uključujući i terminalne faze kada dolazi do značajne promene viskoziteta kultivacione tečnosti. Nivo potrošnje nutrijenata takođe raste intenzifikacijom uslova mešanja i aeracije kao posledica boljeg prenosa mase (Cromwick i sar., 1996; Bajaj i Singhal, 2010; Abdella i sar., 2020).

Adekvatna kontrola vanćelijskog okruženja, uključujući i nivo rastvorenog kiseonika, neophodna je za usmeravanje bioprocesa ka dobijanju željenog proizvoda ili povećanju njegovog prinosa. Prisustvo kiseonika pokazuje različite efekte na sintezu proizvoda u aerobnim procesima usmeravanjem metaboličkih puteva i promenom metaboličkog fluksa. Izbor bioreaktora i optimalnih parametara proizvodnje u uvećanim razmerama, podrazumeva razmatranje nekoliko važnih aspekata bioprocesa uključujući energetske zahteve konkretnog postupka, hidro-mehanički stres i ponašanje fluida, kao i ćelijski odgovor uzrokovan disipacijom energije mešanja (Sarrafzadeh i sar., 2014).

U skladu sa uslovima rasta ćelija i na osnovu analize metaboličkih puteva, dokazano je da odvijanje određenih bioprocesa zahteva više vrednosti brizine transfera kiseonika, dok je za pojedine ključan parametar kontrolisan nivo dostupnog kiseonika. Kada je reč o bakterijama roda *Bacillus* u kontekstu odnosa sa spoljašnjom sredinom, kompleksnost ovih interakcija često se ogleda u posledičnim reakcijama koje se javljaju kao odgovor na određenu metaboličku aktivnost (Sarrafzadeh i sar., 2014).

Maksimalan nivo sinteze proizvoda sekundarnog metabolizma karakterističnih za predstavnike roda *Bacillus* dešava se nakon stadijuma intenzivnog rasta ćelija kada nastupaju uslovi koji limitiraju dalje generisanje biomase. Ovo objašnjava definisano optimalno vreme trajanja kultivacija od 96 h, kao neophodno za postizanje maksimalne efikasnosti proizvedenih agenasa biološke kontrole (Korenblum i sar., 2005; Li i sar., 2021; Perumal i sar., 2019). Sintaza metabolita kontrolisana je mehanizmima koji su takođe uključeni u inicijaciju sporulacije, iako se ne radi o međusobno uslovljenim procesima. Poznato je da se sporulacija javlja kao metabolički fenomen među sporogenim vrstama i da se procesi uključeni u njeno odigravanje razlikuju od onih koji se odnose na vegetativni rast ćelija. Sporulacija je inicirana stresom izazvanim uticajima okruženja pod kojima nije moguć vegetativni rast ćelija (Sarrafzadeh i sar., 2014). Suročeni sa iscrpljenjem nutrijenata predstavnici roda *Bacillus* razvijaju neki od odgovora među kojima su i produkcija antibiotka i fenomen sporulacije. U zavisnosti od signala iz okruženja u kom se nalaze, stimuliše se odnosno inhibira neka od navedenih aktivnosti. Dobijanje sporogenih oblika kao i produkcija antimikrobnih metabolita su od ključnog značaja za razvoj agenasa biološke kontrole. Biotehnološko rešenje produkcije biokontrolnih agenasa usmerava se ka maksimizaciji koncentracije sporogenih oblika mikroorganizama, iako je fiziologija vegetativnih ćelija zapravo odgovorna za aktivnost biokontrolnih agenasa u uslovima polja (Lacerda i sar., 2010). Razlog ovakvog pristupa objašnjava se pogodnošću primene sporogenih oblika pri različitim tehnikama formulacije finalnog preparate kao i boljom stabilnošću i dužim rokom trajanja proizvoda.

5.8. Identifikacija antimikrobnih komponenti dobijenih izvođenjem bioprocesa u laboratorijskom bioreaktoru

Pripadnici roda *Bacillus* prepoznati su kao značajni produceri biološki aktivnih molekula sa izraženim inhibitornim delovanjem prema fitopatogenim vrstama. Ciklični lipidi klasifikovani u tri familije kao predstavnici surfaktina, fengicina i iturina, izdvajaju se po svom potencijalu antimikrobne aktivnosti i ujedno su komponente od velikog značaja iz ugla biotehnoške proizvodnje. Pored činjenice da se ponašaju kao antagonisti prema fitopatogenim vrstama, istraživanja su ukazala na dodatni uticaj lipopetidnih komponenti na sposobnost kolonizacije korena biljaka i ispoljavanje uloge imuno-stimulatora (Ongena i Jacques, 2008).

Sinteza lipopeptida uslovljena je sastavom hranljivog medijuma ali i fizičko-hemijskim uslovima proizvodnje koji se odnose na temperaturu, dostupnost kiseonika i vrednost pH. Produkcija različitih lipopeptidnih komponenti vezuje sa određene faze rasta, pa je tako sinteza surfaktina najintenzivnija u tranziciji između eksponencijalne i stacionarne faze, fengicini se proizvode u ranoj stacionarnoj fazi dok se kao poslednja dešava akumulacija iturina (Ongena i Jacques, 2008). Produkcija lipopeptida je važan segment biološke aktivnosti antagonističkih sojeva roda *Bacillus* (Rodríguez-Chávez i sar., 2019). S druge strane, veliko interesovanje i potencijal komercijalne primene samih biološki aktivnih jedinjenja limitirano je kompleksnošću i visokim troškovima postupka prečišćavanja. Uobičajeno primenjujane analitičke metode za karakterizaciju lipopeptidnih komponenti podrazumevaju nuklearnu magnetnu rezonancu (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) infracrvenu spektroskopiju sa Furijeovom transformacijom (engl. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR), masenu spektrometriju zasnovanu na jonizaciji potpomognutoj laserskom desorpcijom iz matriksa/analizator sa vremenom preleta (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*, MALDI-TOF MS), masenu spektrometriju sa elektrosprej jonizacijom (engl. *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*, ESI-MS), hromatografiju pod visokim pritiskom (engl. *High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC) (Rodríguez-Chávez i sar., 2019; Jasim i sar., 2016; Zhang i sar., 2011; Price i sar., 2007; Biniarz i sar., 2017).

Identifikacija antimikrobnih komponenti sintetisanih tokom kultivacija izvedenih u bioreaktoru ukupne zapremine 16 l (EDF – 15.4_1, A/S Biotehniskais centrs, Riga, Letonija) primenom proizvodnog soja *Bacillus* sp. BioSol021 vršena je izvođenjem HPLC-MS i MALDI-TOF MS metode. Analizirani uzorci su

supernatanti dobijeni nakon 96 h kultivacije u četiri eksperimentalna seta izvedena pod različitim uslovima aeracije i mešanja. Poređenjem dobijenih vrednosti odnosa molekulske mase i naelektrisanja jedinjenja, m/z , sa dostupnim literaturnim podacima izvršena je identifikacija i klasifikacija produkovanih antimikrobnih komponenti na osnovu pripadnosti tri osnovne familije lipopeptida (tabele 5.8.1–5.8.4).

Pripadnici familije surfaktina detektuju se u opsegu vrednosti m/z 994,6–1036,7 (Toral i sar., 2018), 994,6–1058,7 (Mejri i sar., 2018), 995,2–1058,2 (Deng i sar., 2017), 1008–1074 (Athukorala i sar., 2009). Maseni spektar dobijen ESI metodom ukazao je na prisustvo predstavnika surfaktina u vidu jedinjenja sa vrednostima m/z 1022, 1036, 1044 i 1058. Takođe u okviru ispitivanog spektra uočeno je prisustvo protonizovanih molekula $[M+H]^+$ 1008, 1022, 1036 (m/z) i njihovih proizvoda adicije $[M+Na]^+$ 1044, 1058 i $[M+K]^+$ 1046 i 1060 (m/z) (Faria i sar., 2011). Proizvodi reakcije adicije predstavnika surfaktina i natrijumovih jona takođe su identifikovani u opsegu 1030,8–1058,8 m/z (Jha i sar., 2016; Arguelles-Arias i sar., 2009), odnosno 1030,8–1074,8 m/z (Adeniji i sar., 2019). Surfaktin A, dobijen metaboličkom aktivnošću soja *Bacillus subtilis* NH-100 detektovan je primenom metode ESI-MS/MS u pozitivnom i negativnom jonizacionom modu. Deprotonizovani molekuli $[M-H]^-$ surfaktina A sa vrednostima m/z 992, 1006, 1020, 1034, 1048 i 1052 detektovani su u negativnom režimu merenja. Izomeri surfaktina A sa dodatkom Na^+ i razlikom jedne CH_2 grupe mase 14 Da detektovani su u pozitivnom modu na 1016, 1030, 1044, 1058, 1072 i 1086 m/z (Sarwar i sar., 2018).

Tabela 5.8.1. Sadržaj lipopeptida iz familije surfaktina u supernatantima kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma (HPLC–MS analiza).

m/z	Uzorak	Retenciono vreme (min)	Površina pika	Koncentracija (%)
996,9	Bioproces 1	10,758	741,270	37,165
	Bioproces 2	10,743	610,848	30,626
	Bioproces 3	10,748	686,558	34,422
	Bioproces 4	10,733	1,994,540	100,000
1004,9	Bioproces 1	7,295	27,906	93,402
	Bioproces 2	7,290	32,278	108,037
	Bioproces 3	7,287	9,594	32,111
	Bioproces 4	7,292	29,877	100,000
1008,7	Bioproces 1	9,743	3,492,741	53,598
	Bioproces 2	9,736	3,556,582	54,578
	Bioproces 3	9,737	3,453,124	52,99
	Bioproces 4	9,728	6,516,552	100,000
1020,0	Bioproces 1	7,295	27,906	93,402
	Bioproces 2	7,290	32,278	108,037
	Bioproces 3	7,287	9,594	32,111
	Bioproces 4	7,292	29,877	100,000
1021,7	Bioproces 1	7,283	3,154,807	77,460
	Bioproces 2	7,277	3,763,703	92,410
	Bioproces 3	7,280	2,577,258	63,280
	Bioproces 4	7,274	4,072,811	100,000
1034,7	Bioproces 1	7,451	721,605	77,130
	Bioproces 2	7,448	984,537	105,234
	Bioproces 3	7,445	240,629	25,720
	Bioproces 4	7,449	935,566	100,000
1035,7	Bioproces 1	10,988	1,591,955	34,567
	Bioproces 2	10,984	1,054,238	22,891
	Bioproces 3	10,972	1,550,433	33,665
	Bioproces 4	10,972	4,605,436	100,000

Bioproces 1: 0,5 vvm, 100 o/min; Bioproces 2: 0,5 vvm, 300 o/min;

Bioproces 3: 1,5 vvm, 100 o/min; Bioproces 4: 1,5 vvm, 300 o/min.

Radi poređenja akumuliranih količina pojedinačnih molekula u četiri eksperimentalna seta izvedena u biorektoru pri različitim uslovima aeracije i mešanja, izražene su relativizovane koncentracije izražene u odnosu na maksimalnu vrednost dobijene koncentracije koja se definiše kao 100% (tabela 5.8.1). Najveća količina molekula surfaktina dobijena je pri maksimalnim

uslovima u pogledu intenziteta aeracije i mešanja, 1,5 vvm i 300 o/min. Izuzetak se javlja u tri pojedinačna slučaja, za lipopetidne komponente sa vrednostima m/z 1004,9 i 1020, 1034,7 gde je najveća koncentracija dobijena u trećem eksperimentalnom setu pri uslovima aeracije 1,5 vvm i mešanja 100 o/min.

Jedinjenja sa molekulskim masama u opsegu 1051–1093 m/z, 1044,3–1057,3 (Deng i sar., 2017) odnosno 1070–1150 m/z (Athukorala i sar., 2009) definisana su kao pripadnici familije iturina. Pikovi koji odgovaraju vrednostima m/z 1046,48, 1060,558, 1074,58 i 1088,51 predstavljaju protonizovane oblike iturina A sa lancima masnih kiselina dužine 14,15, 16 i 17 ugljenikovih atoma, redom. Proizvodi adicije jedinjenja sa 17 C atoma i jona Na⁺ detektuju se na 1109,602 m/z, dok se pikovi na 1095,55 i 1125,59 m/z vezuju za adukte reakcije sa Na⁺ i K⁺ i jedinjenja sa 16 i 17 ugljenikovih atoma (Rodríguez-Chávez i sar., 2019). Primenom HPLC i ESI masene spektrometrije detektovani su pikovi pri vrednostima m/z 1043 i 1057 identifikovani kao lipopeptidi iz familije iturina (Gong i sar., 2015).

Tabela 5.8.2. Sadržaj lipopeptida iz familije iturina u supernatantima kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma (HPLC–MS analiza)..

m/z	Uzorak	Retenciono vreme (min)	Površina pika	Koncentracija (%)
1043,6	Bioproces 1	7,285	1,475,332	65,499
	Bioproces 2	7,276	1,684,708	74,794
	Bioproces 3	7,281	1,328,659	58,987
	Bioproces 4	7,271	2,252,458	100,000
1057,6	Bioproces 1	7,443	2,698,898	54,048
	Bioproces 2	7,434	3,866,922	77,439
	Bioproces 3	7,439	2,915,614	58,388
	Bioproces 4	7,431	4,993,518	100,000

Bioproces 1: 0,5 vvm, 100 o/min; Bioproces 2: 0,5 vvm, 300 o/min;

Bioproces 3: 1,5 vvm, 100 o/min; Bioproces 4: 1,5 vvm, 300 o/min.

Na isti način kao u slučaju prethodno analiziranih količina sintetisanih surfaktina, izvršeno je poređenje koncentracija dobijenih lipopeptida iz familije iturina (tabela 5.8.2). U oba slučaja, maksimalna vrednost dobija se pri uslovima aeracije 1,5 vvm, i brzine mešanja 300 o/min. Takođe visok prinos beleži se u drugoj postavci eksperimenta pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min, što implicira pozitivan uticaj intenzivnog snabdevanja ćelija kiseonikom i favorizaciju produkcije iturina.

Lipopeptidi koji se identifikuju kao posebna grupa u okviru familije iturina, bacilomicini, detektovani su u opsegu 1030–1111 m/z (Athukorala i sar., 2009), 1031,5–1059,6 m/z (Toral i sar., 2018), 1031,7–1543,8 (Adeniji i sar., 2019). Molekuli bacilomicina javljaju se u obliku masnokiselinskog lanca dužine 14, 15 i 16 ugljenikovih atoma sa vrednostima m/z 1032 [M+H]⁺, 1046 [M+H]⁺, 1060 [M+H]⁺ (Adeniji i sar., 2019).

Poređenjem dobijenih koncentracija bacilomicina na istovetan način kao u slučaju surfaktina i iturina, beleži se sličan trend i maksimalna produkcija u četvrtom eksperimentalnom setu pri uslovima aeracije i brzine mešanja, 1,5 vvm i 300 o/min (tabela 5.8.3).

Tabela 5.8.3. Sadržaj lipopeptida iz familije iturina, grupe bacilomicina u supernatantima kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma (HPLC–MS analiza).

m/z	Uzorak	Retenciono vreme (min)	Površina pika	Koncentracija (%)
1045,6	Bioproc 1	10,779	2122,689	44,351
	Bioproc 2	10,773	1901,065	39,720
	Bioproc 3	10,770	1754,862	36,665
	Bioproc 4	10,758	4786,140	100,000
1052,7	Bioproc 1	7,443	943,666	59,729
	Bioproc 2	7,433	1429,512	90,481
	Bioproc 3	7,437	917,186	58,053
	Bioproc 4	7,433	1579,910	100,000

Bioproc 1: 0,5 vvm, 100 o/min; Bioproc 2: 0,5 vvm, 300 o/min;
Bioproc 3: 1,5 vvm, 100 o/min; Bioproc 4: 1,5 vvm, 300 o/min.

Maseni opseg fengicina podrazumeva vrednosti između 1047 i 1543 m/z (Athukorala i sar., 2009) odnosno 1435,8–1505,8 m/z (Mejri i sar., 2018). Maseni pikovi m/z 1449,8, 1461,8, 1463,8, 1475,8, 1477,8, 1491,8 i 1505,8 okarakterisani su kao protonizovani oblici C15–C17 fengicina (Athukorala i sar., 2009). Prisustvo pikova za vrednosti m/z 1452,24, 1466,33, 1480,34 i 1495,37, okarakterisano je kao frakcija lipopepetida koji pripadaju grupi fengicina A sa β-hidroksi masnim kiselinama dužine 15, 16, 17 i 18 ugljenikovih atoma. Jedinjenja sa vrednostima odnosa molekulskih masa i naelektrisanja 1488,23, 1503,36 i 1517,44 se karakterišu kao C16, C17 i C18 Na⁺ adukti. Jedinjenja 1508,42 i 1523,47 m/z predstavljaju fengicin B izoforme sa masnokiselinskim lancem dužine 17 i 18 ugljenikovih atoma. Proizvodi adicije Na⁺ sa izoformama fengicina B detektuju se na 1532,47 i 1544,43 m/z (Rodríguez-Chávez i sar., 2019). Podela na fengicin A i B izvršena je na osnovu prisustva aminokiselinskih

ostataka (alanin i valin) na poziciji šest peptidnog prstena. Istraživanja novijeg datuma ukazuju na postojanje novih varijanti fengicina, A2 ili B2, koje odlikuje prisustvo različitih aminokiselina na poziciji 10 (valin umesto izoleucina) (Lin i sar., 2020).

Tabela 5.8.4. Sadržaj lipopeptida iz familije fengicina u supernatantima kultivacionih tečnosti proizvodnog mikroorganizma (HPLC–MS analiza)..

m/z	Uzorak	Retenciono vreme (min)	Površina pika	Koncentracija (%)
1461,8	Bioproces 1	10,779	2122,689	44,351
	Bioproces 2	10,773	1901,065	39,720
	Bioproces 3	10,770	1754,862	36,665
	Bioproces 4	10,758	4786,140	100,00
1489,7	Bioproces 1	7,443	943,666	59,729
	Bioproces 2	7,433	1429,512	90,481
	Bioproces 3	7,437	917,186	58,053
	Bioproces 4	7,433	1579,910	100,000
1490,9	Bioproces 1	8,851	1870,000	12,360
	Bioproces 2	8,325	1729,000	11,429
	Bioproces 3	8,887	1576,000	10,418
	Bioproces 4	7,822	15125,000	100,00

Bioproces 1: 0,5 vvm, 100 o/min; Bioproces 2: 0,5 vvm, 300 o/min;
Bioproces 3: 1,5 vvm, 100 o/min; Bioproces 4: 1,5 vvm, 300 o/min.

Na osnovu vrednosti generisanih relativizovanih koncentracija dobijenih lipopeptidnih komponenti iz familije fengicina (tabela 5.8.4) uočava se maksimalna produkcija svih identifikovanih formi molekula pri uslovima aeracije 1,5 vvm i brzine mešanja 300 o/min.

Dobijeni rezultati semikvantifikacije identifikovanih molekula lipopeptida iz familija surfaktina, iturina i fengicina potvrđuju rezultate prethodno izvedenih testiranja antimikrobne aktivnosti gde se maksimalna inhibicija beleži ispitivanjem uzoraka poslednjeg eksperimentalnog seta izvedenog u uslovima proizvodnje na nivou bioreaktora. Maksimalna produkcija biomase praćena je i najintenzivnijom metaboličkom aktivnošću ispitivanog proizvodnog izolata koja rezultuje generisanjem lipopeptidnih komponenti koje se klasifikuju u sve tri najvažnije familije jednjenja sa antimikrobnim delovanjem.

Pored HPLC–MS metode, analiza sadržaja lipopeptida u supernatantima kultivacionih tečnosti dobijenih kultivacijom proizvodnog mikroorganizma *Bacillus* sp. BioSol021 na nivou laboratorijskog bioreaktora u navedenim

eksperimentalnim setovima sa variranim procesnim uslovima vršena je i primenom MALDI-TOF masene spektrometrije. Dobijeni rezultati prikazani u vidu masenih spektara na slikama 8.7.1–8.7.4 u Prilogu 7, ukazuju na dominantno prisustvo klastera lipopeptidnih komponenti iz familija iturina, sa vrednostima m/z 1043,57, 1057,63 i jedinjenjem m/z 1073,64 koje se definiše kao predstavnik familije surfaktina (Perez i sar., 2017; Bernat i sar., 2016). U slučaju rezultata analize supernatanta iz poslednjeg eksperimentalnog seta gde je prethodno dokazana najintenzivnija produkcija lipopeptidnih komponenti detektovan je veći broj molekula koji se klasifikuju kao članovi familije fengicina (1489,09, 1486,14, 1501,13, 1502,11, 1503,14, 1516,13, 1517,12, 1518,14 m/z) u ispitivanom opsegu merenja 1480–1540 m/z (slika 8.7.5 u Prilogu 7) (Kim i sar., 2010).

Dvostrukim pristupom karakterizacije sadržaja lipopeptida nastalih kao rezultat metaboličke aktivnosti proizvodnog izolata *Bacillus* sp. BioSol021, primenom dve analitičke tehnike visoke osetljivosti, utvrđeno je prisustvo širokog spektra jedinjenja sa antimikrobnim delovanjem. Determinisani uslovi produkcije na nivou laboratorijskog bioreaktora omogućavaju ispoljavanje prethodno dokazane genetske predispozicije soja za sintezu lipopeptidnih komponenti iz familija surfaktina, iturina i fengicina. Dobijeni rezultati semikvantifikacije identifikovanih molekula lipopeptida potvrđuju rezultate prethodno izvedenih testiranja antimikrobne aktivnosti gde se maksimalna inhibicija beleži ispitivanjem uzoraka poslednjeg eksperimentalnog seta izvedenog u uslovima proizvodnje agenasa biološke kontrole na nivou bioreaktora (1,5 vvm, 300 o/min). Na ovaj način potvrđen je značaj produkovanih metabolita u pogledu sinergističkog delovanja i njihov doprinos sveukupnom supresivnom delovanju prema ispitivanim fitopatogenim gljivama vrste *Aspergillus flavus*. Sumirajući rezultate iz ovog i prethodnih koraka istraživanja zaključuje se da je maksimalna produkcija biomase praćena i najintenzivnijom metaboličkom aktivnošću ispitivanog proizvodnog izolata koja rezultuje generisanjem lipopeptidnih komponenti. Poređenjem količina dobijenih lipopeptidnih komponenti kroz četiri eksperimentalna seta koja su karakterisali različiti uslovi u pogledu intenziteta aeracije i brzine mešanja, sa minimalnim izuzecima, uviđa se maksimizacija produkcije u poslednjem eksperimentu (1,5 vvm i 300 o/min). Rezultati su ukazali na dobijanje većih zona inhibicije koje direktno upućuju na bolju efikasnost agenasa biološke kontrole u slučaju izvođenja kultivacije u uslovima bioreaktora u odnosu na niže razmere proizvodnje. Ovakav rezultat objašnjava se obezbeđivanjem boljih uslova kultivacije u pogledu mešanja i aeracije, što se direktno odražava na prenos mase kiseonika do ćelija proizvodnog mikroorganizma i stimulacija njegovog

rasta i metaboličke funkcije (Amani i sar., 2010). Oksidativni zahtevi proizvodnih sojeva koji se koriste za dobijanje lipopeptidnih komponenti su predmet ispitivanja nekoliko istraživačkih grupa. Rezultati istraživanja koja su podrazumevala izvođenje kultivacije u bioreaktoru i varijaciju aeracionog profila u opsegu od 10% do 60%, ukazali su na rast koncentracije umnoženih ćelija i povećanje prinosa biosurfaktanata do vrednosti saturacije kiseonika od 30%. Dalje povećanje koncentracije dostupnog kiseonika uslovalo je pad produkcije biosurfaktanata, sa minimalnim prinosom ostvarenim pri vrednosti saturacije od 60% (Ghribi i Ellouze-Chaabouni, 2011). Istraživanjem naučnog tima Amani i saradnici, definisani su, kao najpogodniji uslovi za proizvodnju biosurfaktanata na nivou laboratorijskog bioreaktora, brzina mešanja 300 o/min i aeracija 1,5 vvm, što je u potpunoj saglasnosti sa dobijenim rezultatima u okviru ove doktorske disertacije.

Predmet nekoliko naučnih studija je izučavanje uticaja različitih faktora sredine na nivo produkcije lipopeptidnih komponenti pri čemu je ustanovljeno da je jedan od ključnih koji utiču na produktivnost soja nivo dostupnog kiseonika. Nekoliko istraživanja je obuhvatalo analizu ovog problema sa različitih aspekata. Izvođenjem kultivacije na nivou erlenmajera i bioreaktora, insuficijencija rastvorenog kiseonika nije pokazala negativan uticaj na produkciju iturina (Fahim i sar., 2012). Nizak nivo aeracije i mešanja u bioreaktoru stimulatивно su delovali na biosintezu surfaktina (Sen i Swaminathan, 2005), dok je zaključak drugog naučnog tima da se intenzivnim mešanjem erlenmajera favorizuje proizvodnja ukupne količine lipopeptidnih komponenti (Jacques i sar., 1999). Yeh i saradnici su u svom radu prepoznali efikasnost primene inovativnog modela bioreaktora sa kolektorima pene i mogućnost recirkulacije ćelija. Ispitivanjem uticaja vrednosti zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika na produkciju lipopeptidnih komponenti dokazano je da su niže vrednosti pogodovale proizvodnji mikosubtilina, kao i da povećan intenzitet aeracije ima nepovoljan uticaj na sintezu iturina. Za razliku od prethodno navedenih predstavnika lipopeptidnih komponenti, u naučnoj literaturi gotovo da se ne mogu pronaći podaci o uticaju prenosa mase kiseonika na proizvodnju fengicina (Yeh i sar., 2006).

Još jedan naučni tim istraživao je proizvodnju surfaktina i fengicina u erlenmajerima pri različitim uslovima u pogledu količine dostupnog kiseonika. Kultivacija proizvodnog soja vršena je u erlenmajerima zapremine 1000 ml pri dva nivoa mešanja, 150 o/min i 250 o/min, a kinetika proizvodnje lipopeptidnih komponenti analizirana je tokom 96 h. Rezultati inicijalnih ispitivanja ukazali su na potpuno oprečni odgovor u smislu produkcije surfaktina i fengicina na

promenu intenziteta mešanja. Veći broj obrtaja pogodovao je sintezi surfaktina, što je istovremeno uslovljavalo smanjenje prinosa fengicina. Takođe, maksimalne vrednosti koncentracija jednog i drugog proizvoda zabeležene su pri različitim uslovima kultivacije (Fahim i sar., 2012).

5.9. Formulacija preparata za biološku kontrolu

Kao limitirajući faktor u razvoju mikrobioloških preparata za zaštitu bilja često se navode striktni zahtevi u pogledu uslova njihovog skladištenja i transporta. Potencijalno rešenje za prevazilaženje navedenih ograničenja pronalazi se u primeni biokompatibilnih nosača koji ulaze u sastav finalnog proizvoda (Tao i sar., 2019).

Biougalj (pepeo) je čvrst materijal koji nastaje pirolizom (karbonizacijom) biomase, većinski biljnih ostataka. Značaj biouglja uz ugla poljoprivredne proizvodnje leži u činjenici da se smatra najperspektivnijim dugoročnim rešenjem za povećanje kvaliteta zemljišta (Zhu i sar., 2017; Živanov i sar., 2016). S druge strane, tipična struktura materijala koja podrazumeva postojanje široke raspodele veličine pora, predstavlja idealno okruženje za mikroorganizme. Biougalj karakteriše visok kapacitet zadržavanja vode, dostupnost kiseonika, a takođe i uloga izvora ugljenika i mineralnih materija, čime se omogućava dugoročniji opstanak bakterija (Lebrun i sar., 2020). Imobilizacija bakterija predstavnika roda *Bacillus* na čestice biouglja, pokazala je pozitivan efekat kako na kvalitet samog zemljišta, takođe i na prinos uzgajanih kultura. Reč je o sinergističkom delovanju bakterija okarakterisanih kao promotori rasta biljaka i benefitnim efektima koje ispoljava prisustvo biouglja u zemljištu, u smislu njegove regeneracije i poboljšanja fizičkih svojstava, strukture, sposobnosti zadržavanja nutrijenata i opšte produktivnosti (Zhu i sar., 2017; Azeem i sar., 2021).

U okviru istraživanja ove doktorske disertacije, kao finalni korak razvoja tehnologije proizvodnje agenasa biološke kontrole efikasnih u suzbijanju aflatoksigenih vrsta *Aspergillus flavus*, ispitana je mogućnost iskorišćenja biouglja (sojin pepeo) kao nosača ćelija proizvodnog mikroorganizma, njihova sposobnost preživljanja u datom okruženju i efekat antimikrobnog delovanja na ispitivane fitopatogene izolate.

Rezultati preliminarnog ispitivanja koje je podrazumevalo karakterizaciju korišćenog biouglja, prikazani su u prilogu 8. U nastavku istraživanja ispitivani su uslovi pri kojima se odigrava vezivanje ćelija proizvodnog mikroorganizma za čestice čvrstog nosača, pri čemu je kao polazni materijal korišćena kultivaciona smeša dobijena nakon 96 h kultivacije u bioreaktoru sa optimalnim

procesnim parametrima koji odgovaraju brzini mešanja 300 o/min i intenzitetu aeracije 1,5 vvm.

Kako bi se definisala statistička značajnost primenjene koncentracije biougla i dužine adhezije, dobijeni rezultati za broj ćelija proizvodnog mikroorganizma obrađeni su dvofaktorijalnom analizom varijanse, pri nivou značajnosti od 95%. Rezultati izvršene analize ukazali su da postoji statistički značajan uticaj koncentracije biougla i dužine adhezije kao i međusobne interakcije ispitivanih parametara na koncentraciju vezanih ćelija proizvodnog mikroorganizma, pri p -vrednosti koja je bila manja od granične, 0,05 (tabela 5.9.1).

Tabela 5.9.1. Dvofaktorijalna analiza varijanse dobijenih koncentracija ćelija proizvodnog mikroorganizma vezanih na biougalj variranjem koncentracije dodatog biuglja i vremena adhezije.

	SS	DF	MS	F-vrednost	p -vrednost
Odsečak	1111,675	1	1111,675	554338,6	0,000000
Koncentracija biougla	0,139	2	0,069	34,7	0,000001
Vreme adhezije	0,141	2	0,071	35,3	0,000001
Koncentracija biougla* Vreme adhezije	0,117	4	0,029	14,6	0,000017
Greška	0,036	18	0,002		

SS – suma kvadrata; DF – broj stepeni slobode; MS – suma srednjih kvadrata

Dankanovim testom višestrukih poređenja definisane su homogene grupe primenjenih koncentracija bouglja i vremena, na osnovu statističke značajnosti razlika u vrednostima koncentracija vezanih ćelija proizvodnog mikroorganizma (tabela 5.9.2). Najefikasnijim pristupom za imobilizaciju ćelija proizvodnog mikroorganizma *Bacillus* sp. BioSol021, ispostavila se primena biuglja u koncentraciji 0,01 g/ml i maksimalno vreme vezivanja, odnosno 72 h. Ovakav rezultat objašnjava se boljom disperzijom bouglja u celokupnoj zapremini kultivacione tečnosti pri dodatim manjim količinama kao i dužim vremenom interakcije tokom kog dolazi do adhezije ćelija na čvrsti nosač (Tao i sar., 2018). Kao dodatna potvrda mogućnosti formulacije agenasa biološke kontrole vezivanjem proizvodnog izolata za čestice primenjenog čvrstog nosača, ispitana je antimikrobna aktivnost uzoraka za svih devet kombinacija u *in vitro* uslovima. Zadovoljavajući rezultati usmerili su planove za buduća istraživanja u uslovima *in planta*, planirana za narednu proizvodnu sezonu.

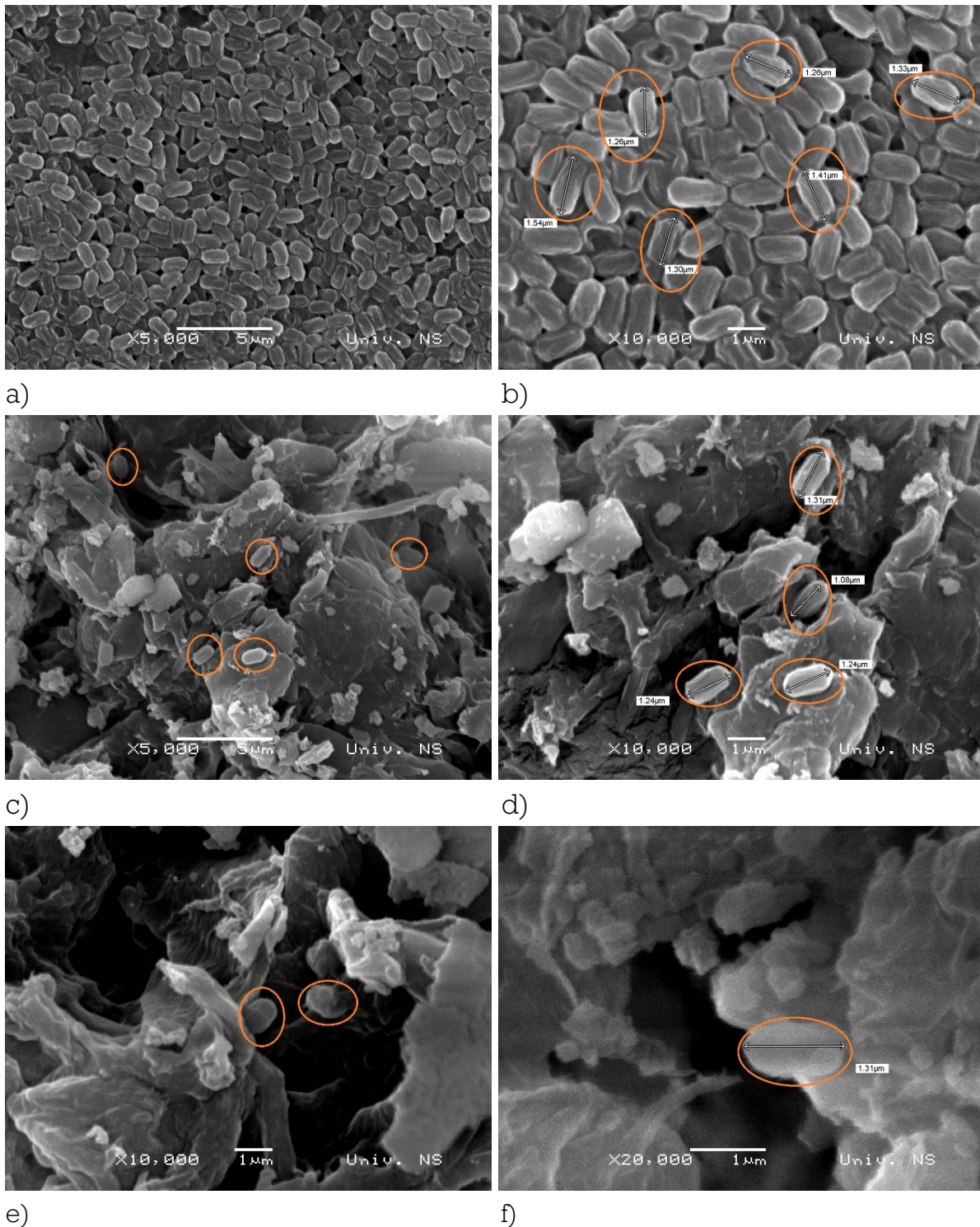
Tabela 5.9.2. Srednje vrednosti dobijenih koncentracija ćelija proizvodnog mikroorganizma vezanih na biougalj.

Koncentracija biouglja (g/ml)	Inkubacija (h)	Broj ćelija (log CFU/g)
0,05	24	8,204667 ^a
0,01	24	8,336333 ^b
0,05	48	8,343667 ^b
0,05	72	8,409667 ^{bc}
0,03	72	8,428333 ^c
0,03	48	8,44 ^c
0,01	48	8,447667 ^c
0,03	24	8,452667 ^c
0,01	72	8,686667 ^d

Vrednosti označene istim slovima u tabeli nalaze se na istom nivou statističke značajnosti sa intervalom poverenja od 95%.

Uzorak biouglja sa imobilisanim ćelijama proizvodnog mikroorganizma dobijen namešavanjem čvrstog nosača u koncentraciji 0,01 g/ml tokom 72 h, analiziran je primenom skenirajuće elektronske mikroskopije (engl. *Scanning Electron Microscopy*, SEM).

Na slici 5.9.1 a–b, prikazani su SEM snimci slobodnih ćelija proizvodnog mikroorganizma. Na SEM snimcima c–f nalaze se prikazi mikroskopiranih uzoraka biouglja sa imobilisanim ćelijama pri različitim uvećanjima. Morfologija ćelija proizvodnog mikroorganizma je tipičnog izgleda za predstavnike roda *Bacillus*. Štapićaste ćelije, pojedinačne ili raspoređene u parovima, prosečnog prečnika 0,5 μm i dužine oko 1,5 μm (Ngalimat i sar., 2021). Imobilisane bakterijske ćelije vezane su za strukturu poroznog materijala. Smeštene su unutar pora i na zidovima čvrstog nosača, čime je potvrđena sposobnost imobilizacije proizvodnog mikroorganizma primenom ispitivanog uzorka biouglja.



e) f)
Slika 5.9.1. SEM snimci ćelija proizvodnog mikroorganizma – slobodne, uvećanje: a) 5000 b) 1000; – imobilisane na biougalj, uvećanje: c) 5000; d), e) 10000; f) 20000.

Značaj integrisane primene biougija i bakterija promotora rasta biljaka među kojima vodeće mesto zauzimaju *Bacillus* vrste, ogleda se u dodatnom potencijalu ovako formulisanih preparata kao ekološke zamene za konvencionalno primenjivana sredstva za poboljšanje kvaliteta zemljišta. Višestruki mehanizam delovanja koji potiče od mikrobne aktivnosti, odnosno živih ćelija korisnih mikroorganizama u pogledu solubilizacije nutrijenata, produkcije biljnih hormona, siderofora, egzopolisaharida i fitoremedijacije polutanata, spregnut sa svim aspektima pozitivnog uticaja biougija rezultuje ukupnom poboljšanju aspekata poljoprivredne proizvodnje (Tao i sar., 2019; Azeem i sar., 2021; Saxena i sar., 2013).

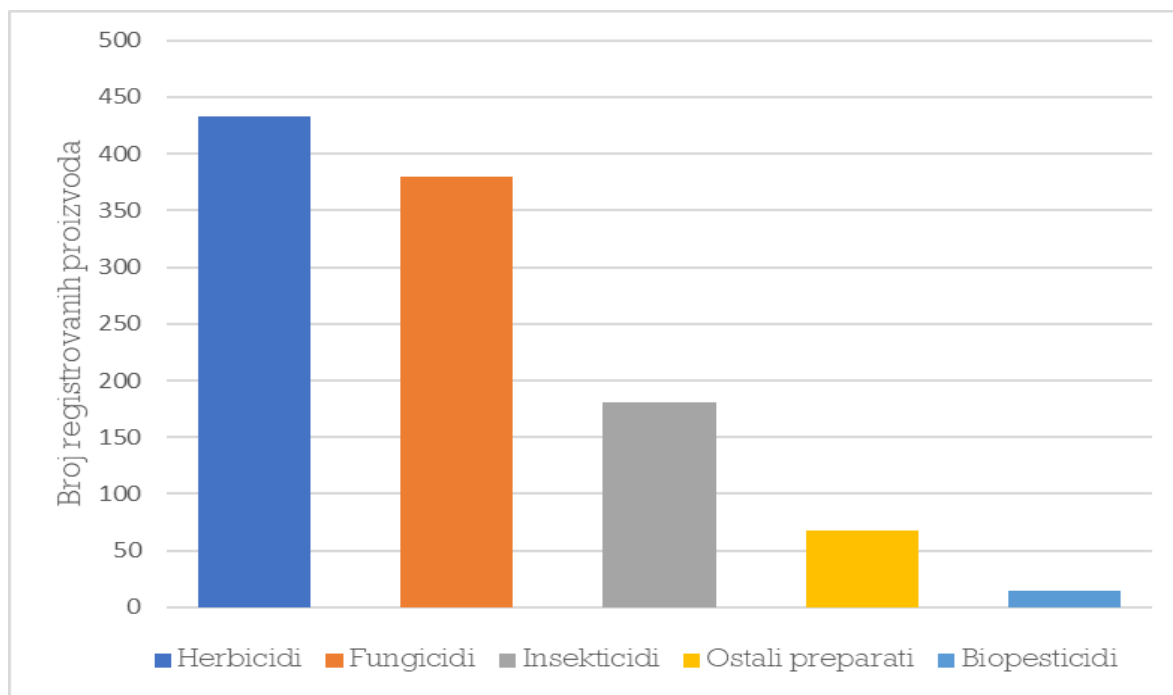
U centru interesovanja ispitivanja uticaja ovakvih preparata na kvalitet zemljišta i rast useva našao se i problem uzgoja kukuruza u uslovima limitirane dostupnosti vode. Ono što je karakteristično za proizvodnju kukuruza jesu visoki nutritivni zahtevi u poređenju sa ostalim usevima i problem njihove insuficijencije u zemljištu usled intenzivne potrošnje. Rezultati istraživanja drugih autora potvrdili su potencijal kombinovane primene korisnih sojeva mikroorganizama i biougija, doprinoseći kako poboljšanju kvaliteta zemljišta kao osnovnog resursa proizvodnje, tako i prinosu i kvalitetu dobijenih useva (Ahmad i sar., 2020).

Mogućnost formulacije agenasa biološke kontrole aflatoksigenih predstavnika *Aspergillus flavus* primenom biougija kao čvrstog nosača smatra se odličnim izborom sa nekoliko aspekata. Aplikacija finalnog proizvoda koji igra ulogu biološkog agensa efikasnog u suzbijanju aflatoksigenih gljiva vezuje se za preventivno i pravovremeno delovanje mikroorganizama kao aktivnih komponenti. Vezivanjem ćelija benefiitnih mikroorganizama za čvrsti nosač ostvaruje se visoka koncentracija aktivnih komponenti po jedinici mase finalnog proizvoda, čime se istovremeno postiže visoka efikasnost preparata na mestu aplikacije. Svojom specifičnom strukturom, čestice biougija ispoljavaju protektivnu ulogu prema biološkim agensima, ostvarujući dodatnu stimulaciju njihovog benefiitnog delovanja ali i visoku vijabilnost što je presudno u pogledu mogućnosti komercijalizacije preparata (Tu i sar., 2020; Saxena i sar., 2013; Maftuah i sar., 2020; Ahmad i sar., 2020).

5.10. Analiza stanja tržišta biopesticida u Republici Srbiji

Prema podacima Uprave za zaštitu bilja, u okviru Ministarstva poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva Republike Srbije za 2020. godinu, na teritoriji naše zemlje registrovano je ukupno 1076 preparata za zaštitu bilja, sa sledećom podelom prema kategorijama: 433 herbicida (40,3%), 380 fungicida (35,3%), 181 insekticid (16,8%) i 68 ostalih preparata. U ukupnom broju preparata dostupnih na tržištu biopesticidi zauzimaju svega 1,3% (slika 5.10.1). Dodatni značaj biopesticida ogleda se u mogućnosti primene ovih preparata u organskoj poljoprivredi, kao ekološki podobnih sredstava za zaštitu bilja. Od ukupnog broja preparata koji su dostupni za primenu u organskoj poljoprivredi na teritoriji Republike Srbije biopesticidi pokrivaju 22% (<https://www.uzb.minpolj.gov.rs/>).

Minorno učešće biopesticida u ukupnom tržištu sredstava za zaštitu bilja u Republici Srbiji dovodi se u vezu sa merama agrarne politike i socijalno-ekonomskim aspektom poljoprivrednog sektora. Promene u odnosu na postojeći scenario očekuju se kao posledica podizanja svesti kako poljoprivrednih proizvođača tako i krajnjih potrošača u vezi sa štetnošću hemijskih pesticida i zdravstvene bezbednosti proizvoda. Regulativa državnih organa koja podstiče preorijentaciju načina proizvodnje u smeru održive poljoprivrede i striktno odredbe koje se tiče organske poljoprivredne prakse su „alati“ koji bi podstakli značajne promene u načinu obavljanja ove delatnosti. Kako je Republika Srbija zemlja koja se nalazi na putu integracija u Evropsku uniju, zakonodavne odredbe nacionalnog nivoa usklađuju se sa zakonodavstvom EU. Direktiva EU 2009/128/CE predviđa smanjenje upotrebe hemijskih pesticida na teritoriji zemalja članica i ujedno je odredba na kojoj će se zasnivati promene i u Republici Srbiji (Official Journal of the European Union, 2009; <http://www.parlament.gov.rs>).



Slika 5.10.1. Struktura registrovanih pesticida u Republici Srbiji u 2020. godini.

Svetski trendovi rasta upotrebe sredstava za zaštitu bilja oslikavaju se i na trenutne prilike u našoj zemlji, gde je u poslednjih 20 godina zabeležen uzlazni trend uvoza biopesticida. Podaci koji govore o uvozu biopesticida u Republiku Srbiju se odnose na poslednjih šest godina, tačnije period 2015–2020. godine. Najveća količina uvezenih biopesticida se odnosi na bioinsekticide, zatim biofungicide, bioakaricide, i biobakterocide. Uvoz bioherbicida nije zabeležen. U tabeli 5.10.1 prikazane su uvezene količine biopesticida u Srbiju za period od 2015–2020. godine (Milić i sar., 2021; Uprava za zaštitu bilja Republike Srbije).

Tabela 5.10.1. Podaci o količinama biopesticida uvezenim u Republiku Srbiju za period 2015–2020. godine.

Godina	Bioinsekticidi (t)	Biofungicidi (t)	Ostali biopesticidi (t)
2020	8,00	-	-
2019	4,62	4,87	1,13
2018	2,00	-	1,00
2017	0,16	7,55	0,30
2016	-	0,04	0,14
2015	0,36	-	0,18
Ukupno	15,14	12,46	2,75
Prosek	3,03	4,15	0,55

Trend porasta organske poljoprivrede ukazuje na sve intenzivniju potražnju za biološkim preparatima, među kojima dominantnu ulogu zauzimaju biopesticidi. Zvanični podaci ukazuju da su u poslednjih deset godina površine namenjene organskoj proizvodnji u Republici Srbiji uvećane čak šest puta, međutim, smatra se da su potencijali i dalje nedovoljno iskorišćeni. Dalja perspektiva razvoja ovog sektora poljoprivrede zavisiće u velikoj meri od broja i količine preparata dozvoljenih za primenu u organskoj poljoprivredi, imajući u vidu striktnu legislativu i dosadašnju limitiranu dostupnost ovih preparata za poljoprivredne proizvođače. U periodu 2010–2019. godine obradive površine pod organskom proizvodnjom povećale su se sa 2784 ha na 15915 ha, dakle skoro šest puta. Sličan trend prati povećanje udela površina pod organskom proizvodnjom u odnosu na ukupnu obradivu površinu, sa 0,18% na 0,61%. Broj organskih poljoprivrednih proizvođača u istom periodu povećan je sa 137 na 6261 (<https://serbiaorganica.info>).

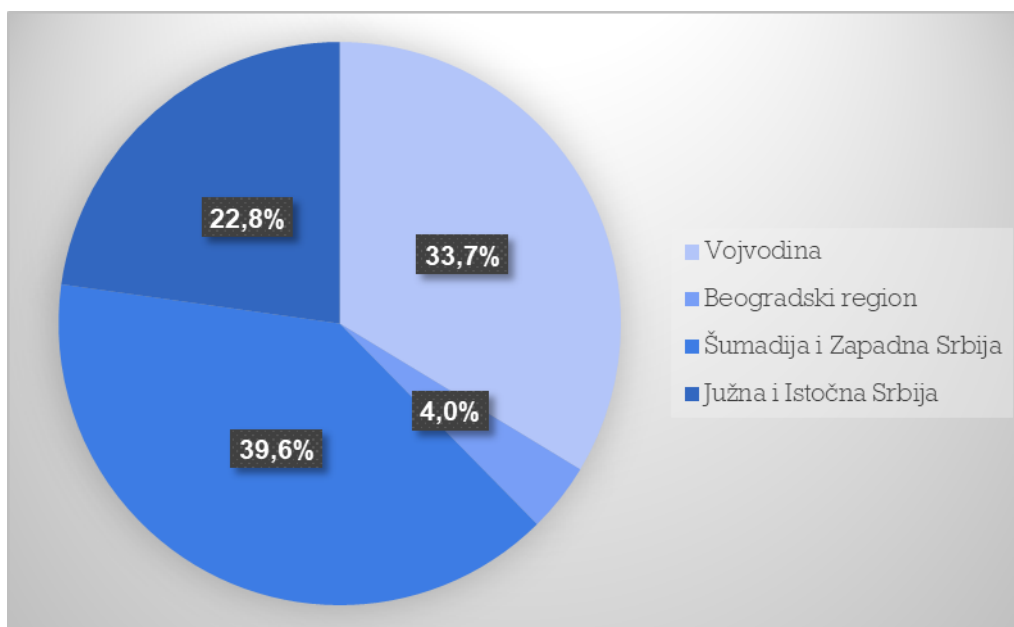
5.10.1. Istraživanje stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida

Istraživanje stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi sredstava za zaštitu bilja sprovedeno je anketiranjem ciljne grupe ispitanika sa teritorije Republike Srbije (101). Kao osnovni cilj istraživanja postavljen je dolazak do odgovora na nekoliko ključnih pitanja koja se odnose na stepen edukacije poljoprivrednih proizvođača o pesticidima i biopesticidima, mišljenje o posledicama smanjenje upotrebe pesticida, način izbora pesticida, najpouzdaniji izvor informisanja, spremnost na povećanje troškova za zaštitu bilja, ocenu kvaliteta prodaje, poverenje u prodaju, kao i ocenu rada odnosno poverenje u zvanične institucije. Kao poseban cilj istraživanja izdvaja se sagledavanje razmišljanja poljoprivrednih proizvođača po pitanju primene biopesticida kao ekološke alternative bezbedne za zdravlje ljudi i životinja, takođe značajne u pogledu doprinosa u očuvanju životne sredine.

Celokupan upitnik nalazi se u Prilogu 9. Broji 73 pitanja koja se mogu podeliti u 12 grupa. Prvih 12 pitanja se odnosi na socioekonomska pitanja koja pružaju osnovne informacije o ispitanicima. Sledećih 58 pitanja je predstavljeno u formi stavova gde se od ispitanika zahtevalo da zaokruže jednu ocenu od jedan do pet, pri čemu navedene ocene predstavljaju ocenu stava koji je prethodno naveden (Likertova skala) (Likert, 1932). Poslednja tri pitanja se odnose na upotrebu biopesticida, gde su ispitanici dali odgovor na pitanje: „Da

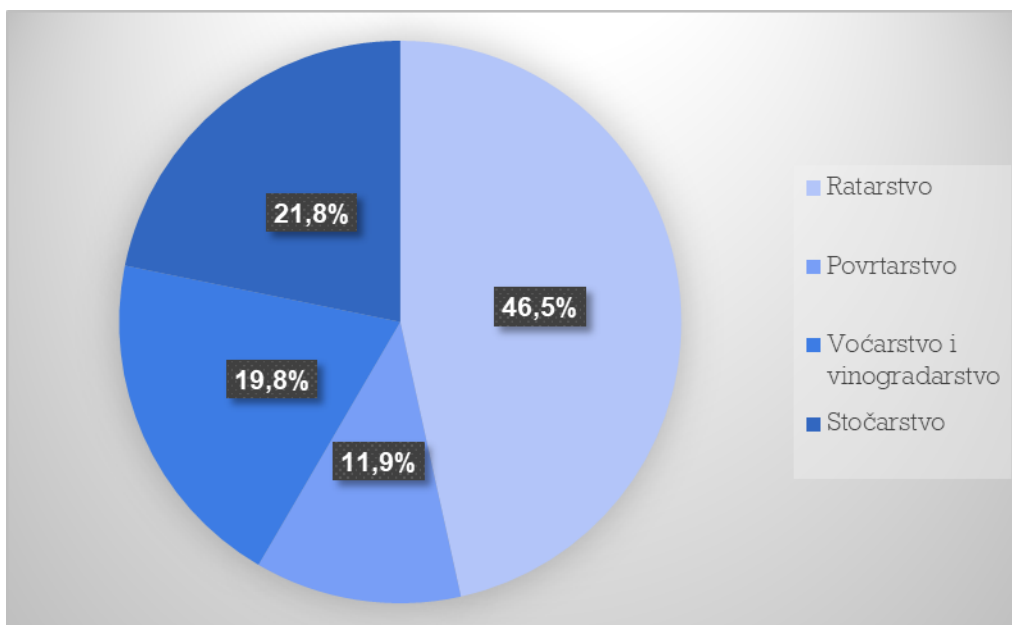
li koriste biopesticide?“ i ako ih ne koriste da li su spremni da ih koriste ukoliko bi im bile poznate prednosti njihovog korišćenja.

Od ukupnog broja ispitanika, najveći broj je sa teritorije Šumadije i Zapadne Srbije (39,6%), dok je najmanji broj ispitanika iz Beogradskog regiona. Teritorijalna raspodela ispitanika predstavljena je na slici 5.10.2



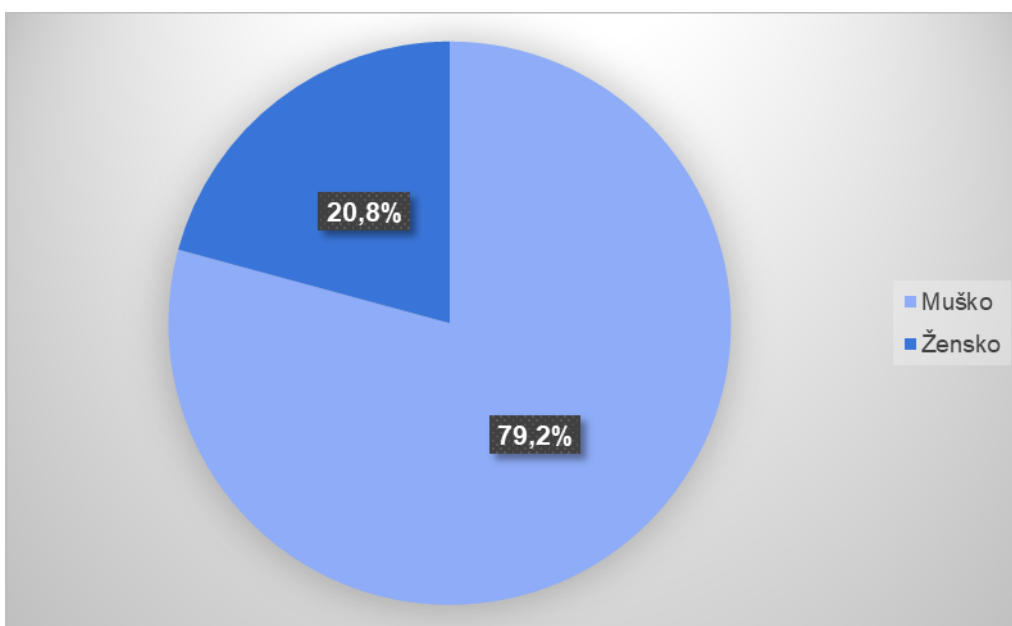
Slika 5.10.2. Teritorijalna raspodela ispitanika koji su učestvovali u istraživanju stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida.

Prema rezultatima sprovedenog istraživanja, ratarska proizvodnja u najvećoj meri obezbeđuje prihod gazdinstvima. Učešće ispitanika čija proizvodnja se bazira na ratarskim kulturama iznosi čak 46,5%, sa najmanjim učešćem figurišu gazdinstva specijalizovana za povrtarsku proizvodnju (11,9%), dok se stočarstvo i voćarstvo i vinogradarstvo pojavljuju sa relativno sličnim udelom, oko 20%. Proizvodna struktura gazdinstava u vlasništvu ispitanika prikazana je na slici 5.10.3.



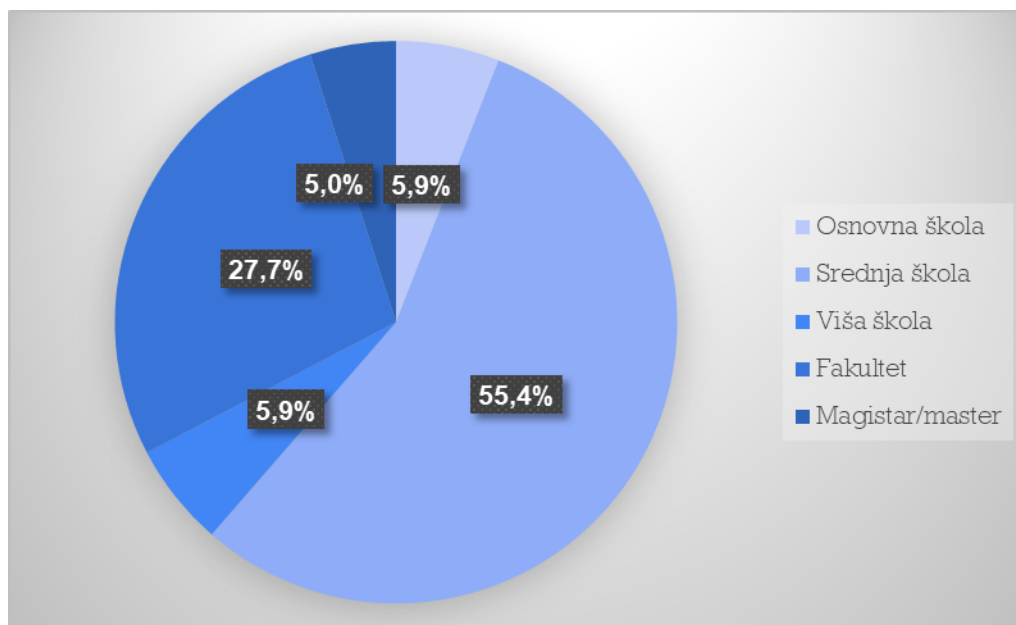
Slika 5.10.3 Proizvodna struktura gazdinstava u vlasništvu ispitanika koji su učestvovali u istraživanju stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida.

Kada je reč o polnoj strukturi ispitanika, približno 80% proizvođača je muškog pola, dok je preostalih 20% ženskog pola. Polna struktura ispitanika prikazana je na slici 5.10.4.



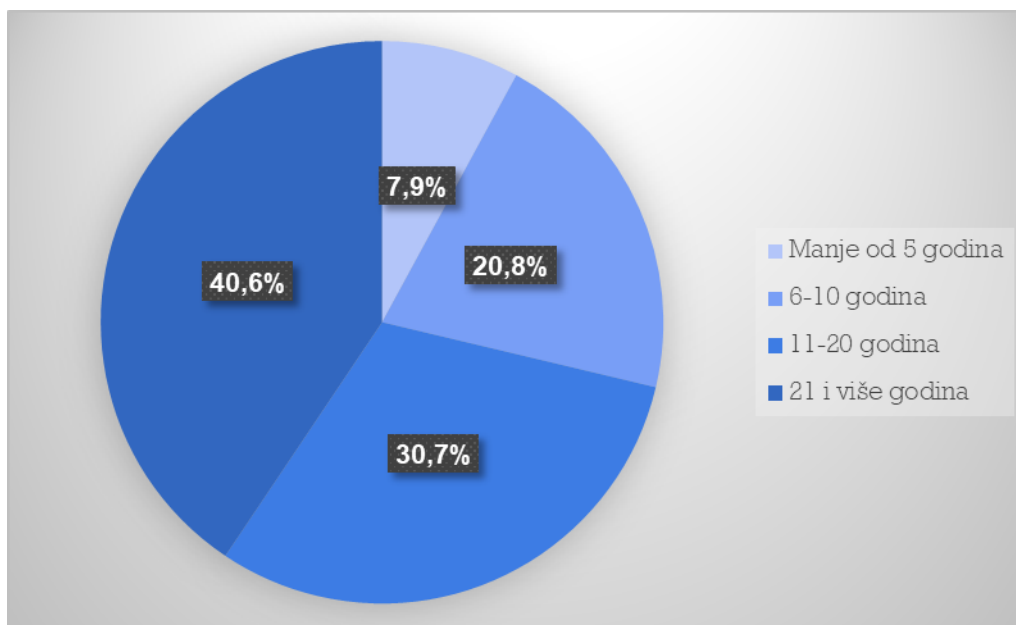
Slika 5.10.4. Polna struktura ispitanika koji su učestvovali u istraživanju stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida.

Dominantna stručna sprema ispitanika je srednje obrazovanje sa 55,4% učešća. Relativno visok procenat ispitanika ima završen viši stepen studija, 38,6%, dok je učešće ispitanika sa osnovnom školom na niskom nivou, koji iznosi 5,9%. Obrazovna struktura ispitanika je prikazana na slici 5.10.5.

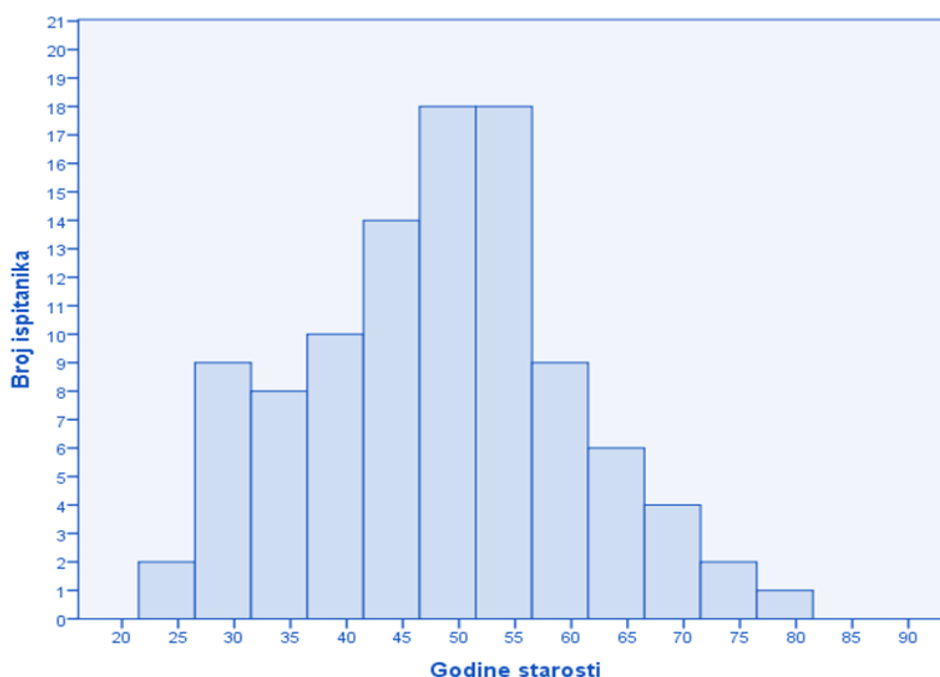


Slika 5.10.5. Obrazovna struktura ispitanika koji su učestvovali u istraživanju stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida.

Najveći deo ispitanika (30,7%) poseduje radno iskustvo u poljoprivrednoj proizvodnji koje se kreće u intervalu od 11 do 20 godina. Najmanji udeo poseduje radno iskustvo koje je manje od 5 godina, što govori u prilog reprezentativnosti uzorka sa tog aspekta. Struktura radnog iskustva u poljoprivrednoj proizvodnji ispitanika prikazana je na slici 5.10.6.



Slika 5.10.6. Struktura radnog iskustva u poljoprivrednoj proizvodnji ispitanika koji su učestvovali u istraživanju stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida.



Slika 5.10.7. Starosna struktura ispitanika koji su učestvovali u istraživanju stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida.

Najveći udeo ispitanika čine proizvođači između 45 i 55 godina starosti (37,6%). Značajan deo prelazi starosnu grupu od 65 godina (10,9%), dok tek 5,9% proizvođača ima manje od 30 godina. Histogram na kojem je predstavljena starosna struktura ispitanika je prikazan na slici 5.10.7.

Važan podatak odnosi se na to da se među ispitanicima svega dvoje proizvođača bavi organskom proizvodnjom pri čemu jedan od njih najveći deo prihoda ostvaruje od stočarske proizvodnje a drugi od povrtarstva. Od preostalih 99 proizvođača koji su usmereni na konvencionalan način proizvodnje, 16 ispitanika (16,2%) je istaklo da im je u planu preorijentacija na organsku proizvodnju.

U nastavku analize ankete istaknuti su odgovori ispitanika na pitanja koja su dobijena Likertovom skalom (Likert, 1932). U tabelama su iskazane srednje vrednosti dobijenih ocena u rangu od jedan do pet, kao i standardne devijacije koje predstavljaju odstupanje u odgovorima ispitanika u skladu sa pripadajućom grupom. Takođe, metodom analize varijanse su utvrđene statistički značajne razlike između posmatranih grupa ispitanika koje su formirane prema preovlađujućem tipu poljoprivredne proizvodnje. U analizu je uključeno ukupno 10 grupa odgovora koji se odnose na: znanje o pesticidima, znanje o biopesticidima, posledice smanjenja upotrebe pesticida, izbor pesticida, izvor informisanja, spremnost na povećanje troškova za zaštitu bilja, kvalitet prodaje, poverenje u prodaju, rad zvaničnih institucija i poverenje u zvanične institucije.

Tabela 5.10.2. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na znanje o pesticidima.

Stavovi proizvođača	Ratarstvo (n=47)	Povrtarstvo (n=12)	Voćarstvo i vinogradarstvo (n=20)	Stočarstvo (n=22)
	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD
Poseđujem odgovarajući nivo znanja o pesticidima.	3,94±0,84 ^a	3,92±0,79 ^{ab}	3,45±0,89 ^{bc}	3,09±1,02 ^{cd}
Instrukcije za korišćenje pesticida sa ambalaže su mi jasne.	4,38±0,85	4,42±0,67	4,05±0,89	4,05±0,90
Nakon korišćenja pesticida ambalažu odlažem prema uputstvu sa ambalaže.	4,26±0,87	3,83±1,11	3,80±1,01	4,00±1,15
Znam zašto su pojedini pesticidi zabranjeni za korišćenje.	3,70±1,25	3,67±0,89	3,75±0,97	3,68±1,17
Pesticidi ostavljaju štetne posledice na kvalitet poljoprivrednih proizvoda.	3,70±1,21	3,67±1,15	3,95±0,89	3,41±0,96
Životna sredina je ugrožena usled upotrebe pesticida.	4,04±1,10	3,83±1,27	4,35±0,75	3,95±1,00
Poznate su mi negativne posledice korišćenja pesticida po zdravlje rukovaoca preparatima.	4,34±0,79	4,25±0,75	4,50±0,61	4,23±0,69
Poznate su mi negativne posledice korišćenja pesticida po zdravlje potrošača.	4,32±0,89	4,50±0,67	4,20±1,01	4,09±0,68
Poznate su mi negativne posledice korišćenja pesticida po zdravlje životinja.	4,30±0,88	4,33±0,78	4,15±0,81	4,14±0,71
Umem da prepoznam posledice trovanja pesticidima na svom telu.	4,11±0,96	4,33±0,78	3,90±1,07	3,64±1,18
Poznat mi je period trajanja karence pesticida koje koristim.	4,45±0,85	4,58±0,67	4,65±0,59	4,36±0,85

Napomena: prosečna vrednost u tabeli je izračunata za vrednosti od 1 do 5: 1 – uopšte se ne slažem; 2 – ne slažem se; 3 – ne znam; 4 – slažem se; 5 – u potpunosti se slažem. Vrednosti označene istim slovima u tabeli nalaze se na istom nivou statističke značajnosti sa intervalom poverenja od 95%

Dobijeni rezultati prikazani u tabeli 5.10.2 ukazuju na statistički značajnu razliku u odgovorima ispitanika kod prvog stava koji se odnosi na ocenu znanja o pesticidima. Proizvođači čija gazdinstva su specijalizovana za ratarsku i povrtarsku proizvodnju u najvećoj meri vrednuju svoje znanje o pesticidima. S druge strane, iako proizvođači usmereni na proizvodnju voća i grožđa u manjoj meri vrednuju svoje znanje o pesticidima od ratara, nije utvrđena statistički značajna razlika između njih i povrtara. Proizvođači čija gazdinstva su specijalizovana za stočarsku proizvodnju vrednuju svoje znanje na sličnom nivou kao i proizvođači voća i grožđa, ali ga procenjuju na nižem nivou od ratara

i povrtara. Kod preostalih ispitanih stavova nije utvrđena statistički značajna razlika između različitih tipova poljoprivredne proizvodnje.

Tabela 5.10.3. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na znanje o biopesticidima.

Stavovi proizvođača	Ratarstvo (n=47)	Povrtarstvo (n=12)	Voćarstvo i vinogradarstvo (n=20)	Stočarstvo (n=22)
	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD
Poseđujem odgovarajući nivo znanja o biopesticidima.	2,83±0,99	3,25±0,97	3,05±1,05	2,95±1,05
Biopesticidi nemaju negativan uticaj na kvalitet poljoprivrednih proizvoda	3,57±0,99	3,00±0,85	3,75±0,97	3,45±1,01
Biopesticidi nemaju negativan uticaj na životnu sredinu.	3,57±0,95	3,75±0,62	3,90±0,97	3,73±0,88
Biopesticidi nemaju negativan uticaj na zdravlje rukovaoca preparatima.	3,57±0,88	3,75±0,75	3,90±1,02	3,82±0,85
Biopesticidi nemaju negativan uticaj na zdravlje potrošača.	3,64±0,87	3,67±0,78	3,95±0,76	3,59±0,85
Biopesticidi nemaju negativan uticaj na zdravlje životinja.	3,60±0,92	3,58±0,67	3,90±0,72	3,68±0,84
Poznato mi je vreme trajanja karence prilikom primene biopesticida.	3,30±1,08	3,75±0,87	3,60±1,10	3,59±0,96

Napomena: prosečna vrednost u tabeli je izračunata za vrednosti od 1 do 5: 1 – uopšte se ne slažem; 2 – ne slažem se; 3 – ne znam; 4 – slažem se; 5 – u potpunosti se slažem. Vrednosti označene istim slovima u tabeli nalaze se na istom nivou statističke značajnosti sa intervalom poverenja od 95%.

Prilikom ispitivanja stavova proizvođača po pitanju znanja o biopesticidima nije utvrđena statistički značajna razlika između različitih tipova gazdinstava. U proseku, znanje o biopesticidima je ocenjeno sa „ne znam”. Dobijeni rezultati prikazani u tabeli 5.10.3 ukazuju na činjenicu da je potrebno dodatnu pažnju posvetiti edukaciji i unapređenju znanja poljoprivrednih proizvođača u pogledu upotrebe bioloških preparata.

Tabela 5.10.4. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na posledice smanjenja upotrebe pesticida.

Stavovi proizvođača	Ratarstvo (n=47)	Povrtarstvo (n=12)	Voćarstvo i vinogradarstvo (n=20)	Stočarstvo (n=22)
	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD
Smanjenje upotrebe pesticida će ugroziti prinos.	3,96±0,95	3,50±0,90	3,65±1,39	3,45±1,01
Smanjenje upotrebe pesticida će ugroziti finansijski rezultat proizvodnje.	3,91±1,00	3,75±0,97	4,00±0,92	3,55±0,96
Smanjenje upotrebe pesticida će doprineti boljem kvalitetu poljoprivrednih proizvoda.	3,51±1,25	3,75±0,75	3,60±1,05	3,50±1,10
Smanjenje upotrebe pesticida će doprineti očuvanju životne sredine.	4,17±0,92	4,17±0,83	4,40±0,75	4,32±0,78
Smanjenje upotrebe pesticida će poboljšati zdravstvenu bezbednost proizvoda.	4,09±1,02	4,00±0,85	4,30±0,80	4,32±0,72
Smanjenje upotrebe pesticida će doprineti boljem zdravlju životinja.	4,19±0,85	3,92±0,90	4,40±0,75	4,23±0,75

Napomena: prosečna vrednost u tabeli je izračunata za vrednosti od 1 do 5: 1 – uopšte se ne slažem; 2 – ne slažem se; 3 – ne znam; 4 – slažem se; 5 – u potpunosti se slažem. Vrednosti označene istim slovima u tabeli nalaze se na istom nivou statističke značajnosti sa intervalom poverenja od 95%.

Kao i u slučaju prethodne grupe pitanja, nije utvrđena statistički značajna razlika u odgovorima između različitih tipova poljoprivrednih proizvođača po pitanju posledica smanjenja upotrebe pesticida. Rezultati ankete prikazani u tabeli 5.10.4 su pokazali da ispitanici nisu upoznati sa posledicama smanjenja upotrebe pesticida koje se odnose na bolji kvalitet poljoprivrednih proizvoda. S druge strane, u najvećoj meri se slažu sa stavovima koji se odnose na očuvanje životne sredine i poboljšanje zdravstvene bezbednosti ljudi i životinja.

Tabela 5.10.5. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na izbor pesticida.

Stavovi proizvođača	Ratarstvo (n=47)	Povrtarstvo (n=12)	Voćarstvo i vinogradarstvo (n=20)	Stočarstvo (n=22)
	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD
Cena najviše utiče na izbor korišćenih pesticida.	3,28±1,35	3,33±1,15	3,30±1,22	3,68±1,04
Savet prodavca najviše utiče na izbor korišćenih pesticida.	3,04±1,28	3,17±1,11	3,15±0,75	3,55±1,14
Savet stručnjaka (savetodavac, profesori sa fakulteta i sl.) najviše utiče na izbor korišćenih pesticida.	4,26±0,92 ^a	4,67±0,49 ^{ab}	4,65±0,59 ^b	4,55±0,51 ^{ab}
Sopstveno iskustvo u poljoprivrednoj proizvodnji najviše utiče na izbor korišćenih pesticida.	4,26±0,67	3,92±0,79	4,10±0,79	4,18±0,59
Iskustvo drugih proizvođača najviše utiče na izbor korišćenih pesticida.	3,43±1,10	3,25±0,97	3,50±1,15	3,68±0,84

Napomena: prosečna vrednost u tabeli je izračunata za vrednosti od 1 do 5: 1 – uopšte se ne slažem; 2 – ne slažem se; 3 – ne znam; 4 – slažem se; 5 – u potpunosti se slažem. Vrednosti označene istim slovima u tabeli nalaze se na istom nivou statističke značajnosti sa intervalom poverenja od 95%.

Odgovori na pitanja koja se tiču izbora pesticida u najvećoj meri ukazuju na nepostojanje statistički značajne razlike među ispitanicima. Ipak, statistički značajna razlika zabeležena je između ratara i voćara, pri čemu je utvrđeno da proizvođači voća i grožđa u većoj meri vrednuju savet stručnjaka. Savet prodavca, uz cenu, je najniže ocenjen faktor od uticaja prilikom izbora pesticida. Takođe, rezultati prikazani u tabeli 5.10.5 pokazuju da proizvođači najviše cene savet stručnjaka i sopstveno iskustvo (više nego iskustvo drugih).

Tabela 5.10.6. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na izvor informisanja.

Stavovi proizvođača	Ratarstvo (n=47)	Povrtarstvo (n=12)	Voćarstvo i vinogradarstvo (n=20)	Stočarstvo (n=22)
	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD
Internet	3,23±1,35 ^a	2,25±0,87 ^{bc}	3,15±0,99 ^a	3,18±1,18 ^a
Televizija	2,87±1,50	2,25±0,97	2,80±1,11	2,86±1,25
Radio	1,98±1,29	2,17±0,94	2,20±1,11	1,95±0,90
Poljoprivredne savetodavne službe	4,68±0,56	4,83±0,39	4,65±0,59	4,68±0,48
Stručnjaci sa Poljoprivrednog ili nekog drugog fakulteta	3,89±1,15 ^{ab}	4,33±0,89 ^a	3,90±1,29 ^{ab}	3,41±1,26 ^b _c
Prodavci preparata za zaštitu bilja	3,36±1,15	3,25±1,14	3,30±0,86	3,50±1,14

Napomena: prosečna vrednost u tabeli je izračunata za vrednosti od 1 do 5: 1 – uopšte se ne slažem; 2 – ne slažem se; 3 – ne znam; 4 – slažem se; 5 – u potpunosti se slažem. Vrednosti označene istim slovima u tabeli nalaze se na istom nivou statističke značajnosti sa intervalom poverenja od 95%.

Ispitivanjem stavova koji se odnose na izvore informisanja utvrđeno je da ispitanici pokazuju najveće poverenje u poljoprivredne savetodavne službe, dok su najslabije ocenjeni televizija i radio (tabela 5.10.6). Statistički značajna razlika između proizvođača prema preovlađujućem tipu poljoprivredne proizvodnje, je utvrđena u slučaju interneta i saveta stručnjaka sa Poljoprivrednog ili nekog drugog fakulteta, u korist naučno-obrazovanih institucija. Proizvođači koji su usmereni na stočarstvo u najmanjoj meri vrednuju savet stručnjaka sa Poljoprivrednog fakulteta i taj stav se statistički značajno razlikuje od povrtara koji u najvećoj meri vrednuju ovakav vid informisanja. S druge strane, povrtari koji u najvećoj meri vrednuju savet stručnjaka sa fakulteta, najmanje od svih proizvođača vrednuju internet kao izvor informisanja.

Tabela 5.10.7. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na spremnost na povećanje troškova za zaštitu bilja.

Stavovi proizvođača	Ratarstvo (n=47)	Povrtarstvo (n=12)	Voćarstvo i vinogradarstvo (n=20)	Stočarstvo (n=22)
	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD
Spreman sam da izdvojim više novca za zaštitu bilja ukoliko bih time povećao prinose poljoprivrednih proizvoda.	4,30±0,93	3,83±1,19	3,95±1,23	4,41±0,73
Spreman sam da izdvojim više novca za zaštitu bilja ukoliko bih time poboljšao kvalitet proizvedenih poljoprivrednih proizvoda.	4,26±0,90	4,08±0,90	4,30±0,92	4,41±0,73
Spreman sam da izdvojim više novca za zaštitu bilja ukoliko bih time doprineo očuvanju životne sredine.	4,21±0,91	3,67±0,98	4,15±0,88	4,14±1,08
Spreman sam da izdvojim više novca za zaštitu bilja ukoliko bih time doprineo očuvanju zdravlja ljudi.	4,36±0,85	4,08±0,90	4,45±0,76	4,45±0,67
Spreman sam da izdvojim više novca za zaštitu bilja ukoliko bih time doprineo očuvanju zdravlja životinja.	4,26±0,90	3,83±1,03	4,35±0,81	4,36±0,79

Napomena: prosečna vrednost u tabeli je izračunata za vrednosti od 1 do 5: 1 – uopšte se ne slažem; 2 – ne slažem se; 3 – ne znam; 4 – slažem se; 5 – u potpunosti se slažem. Vrednosti označene istim slovima u tabeli nalaze se na istom nivou statističke značajnosti sa intervalom poverenja od 95%.

Rezultati ankete prikazani u tabeli 5.10.7 govore u prilog tome da su svi proizvođači bez statistički značajnih razlika u stavovima između posmatranih grupa ispitanika, iskazali visoku spremnost na povećanje troškova ukoliko bi to poboljšanje doprinelo boljem prinosu, poboljšanju kvaliteta, očuvanju životne sredine, kao i očuvanju zdravlja ljudi i životinja.

Tabela 5.10.8. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na kvalitet prodaje.

Stavovi proizvođača	Ratarstvo (n=47)	Povrtarstvo (n=12)	Voćarstvo i vinogradar stvo (n=20)	Stočarstvo (n=22)
	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD
Prodavci su spremni da preporuče nov pesticid na tržištu.	4,13±1,01	4,00±0,95	4,05±0,94	3,68±1,13
Prodavci daju upustvo za upotrebu pesticida prilikom kupovine.	3,94±1,05	3,92±0,79	3,95±1,00	3,86±0,99
Prodavci su spremni da ukažu na štetnost prekomerne upotrebe pesticida.	3,26±1,33	2,92±1,51	3,15±1,04	3,55±1,14
U paleti svojih proizvoda, prodavci nude i biopesticide.	2,72±1,23	3,08±1,08	3,25±1,25	2,95±1,00

Napomena: prosečna vrednost u tabeli je izračunata za vrednosti od 1 do 5: 1 – uopšte se ne slažem; 2 – ne slažem se; 3 – ne znam; 4 – slažem se; 5 – u potpunosti se slažem. Vrednosti označene istim slovima u tabeli nalaze se na istom nivou statističke značajnosti sa intervalom poverenja od 95%.

Kada je reč o kvalitetu prodaje rezultati ankete prikazani u tabeli 5.10.8 ukazuju da ne postoji statistički značajna razlika među ispitanicima što implicira ujednačenost stavova proizvođača o kvalitetu prodaje. Opšti utisak je da u proseku ispitanici daju odgovor da se „ne slažu” ili „ne znaju” da li prodavci nude biološke preparate. Ovakvi podaci ukazuju na potrebu za dodatnom saradnjom sa sektorom prodaje u vidu informisanja o kvalitetima biopesticida i značaju njihove primene.

Tabela 5.10.9. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na poverenje u prodaju.

Stavovi proizvođača	Ratarstvo (n=47)	Povrтарstvo (n=12)	Voćarstvo i vinogradar stvo (n=20)	Stočarstvo (n=22)
	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD
Verujem u preporuku prodavca prilikom kupovine pesticida.	3,34±1,11	3,17±1,11	3,55±0,94	3,50±0,74
Uvažavam preporuke prodavca vezano za količine korišćenih pesticida.	3,64±1,17	3,42±0,90	3,90±0,72	3,86±0,94
Uvažavam preporuke prodavca vezano za mere zaštite prilikom rukovanja pesticidima.	3,96±1,16	3,50±1,31	3,70±0,92	3,91±0,92

Napomena: prosečna vrednost u tabeli je izračunata za vrednosti od 1 do 5: 1 – uopšte se ne slažem; 2 – ne slažem se; 3 – ne znam; 4 – slažem se; 5 – u potpunosti se slažem. Vrednosti označene istim slovima u tabeli nalaze se na istom nivou statističke značajnosti sa intervalom poverenja od 95%.

Po pitanju stavova koji se tiču poverenja u prodaju nije utvrđena statistički značajna razlika među ispitivanim proizvođačima (tabela 5.10.9). Ipak, poverenje je na najvišem nivou u pogledu saveta vezanih za mere zaštite, dok su na nižem nivou kada je reč o korišćenim količinama i samim preporukama prodavaca.

Tabela 5.10.10. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na rad zvaničnih institucija.

Stavovi proizvođača	Ratarstvo (n=47)	Povrтарstvo (n=12)	Voćarstvo i vinogradar stvo (n=20)	Stočarstvo (n=22)
	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD
Zvanične institucije pružaju potrebne informacije o karakteristikama pesticida na našem tržištu.	4,36±0,94	4,00±0,85	4,25±0,72	4,27±0,77
Zvanične institucije preporučuju nove vrste pesticida na tržištu.	4,32±0,93	3,83±1,03	4,30±0,73	4,09±0,87
Zvanične institucije pružaju potrebne informacije o prednostima korišćenja biopesticida.	3,53±1,30	3,58±1,08	3,85±1,23	3,95±1,13
Zvanične institucije pružaju potrebne informacije o uticaju pesticida na očuvanje živone sredine.	4,13±1,10	3,83±1,11	4,15±0,93	4,27±0,88
Zvanične institucije pružaju potrebne informacije o uticaju pesticida na zdravlje ljudi.	4,19±1,06	3,92±1,31	4,20±0,95	4,36±0,79

Napomena: prosečna vrednost u tabeli je izračunata za vrednosti od 1 do 5: 1 – uopšte se ne slažem; 2 – ne slažem se; 3 – ne znam; 4 – slažem se; 5 – u potpunosti se slažem. Vrednosti označene istim slovima u tabeli nalaze se na istom nivou statističke značajnosti sa intervalom poverenja od 95%.

Iskazani stavovi ispitanika (tabela 5.10.10) upućuju da je rad zvaničnih institucija ocenjen relativno visokom ocenom, sa izuzetkom pružanja potrebnih informacija o prednostima korišćenja biopesticida. Ovakav epilog govori o potrebi za dodatnom edukacijom predstavnika zvaničnih institucija po pitanju opštih svojstava i naročito prednosti bioloških preparata. Stavovi po pitanju svega navedenog su ujednačeni među anketiranim poljoprivrednim proizvođačima.

Tabela 5.10.11. Statistička analiza odgovora (aritmetička sredina i standardna devijacija) na pitanja koja se odnose na poverenje u zvanične institucije.

Stavovi proizvođača	Ratarstvo (n=47)	Povrtarstvo (n=12)	Voćarstvo i vinogradar stvo (n=20)	Stočarstvo (n=22)
	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD	Prosek±SD
Verujem zvaničnim institucijama u vezi sa informacijama o karakteristikama pesticida na našem tržištu.	4,11±1,01	4,08±1,08	4,30±0,92	4,45±0,51
Verujem u preporuke zvaničnih institucija u vezi sa karakteristikama novih pesticida na tržištu.	4,28±0,95	4,17±1,11	4,30±0,86	4,32±0,65
Preporuke zvaničnih institucija doprinose povećanju prinosa.	4,13±0,88	4,17±0,83	4,10±0,79	4,23±0,69
Preporuke zvaničnih institucija doprinose boljem finansijskom rezultatu.	4,11±0,98	3,58±1,00	3,95±0,76	4,05±0,90
Preporuke zvaničnih institucija doprinose boljem očuvanju životne sredine.	4,02±1,07	4,17±0,83	4,00±0,97	4,45±0,60
Preporuke zvaničnih institucija doprinose boljem očuvanju zdravlju ljudi.	4,09±1,12	3,92±1,08	4,05±1,00	4,41±0,67

Napomena: prosečna vrednost u tabeli je izračunata za vrednosti od 1 do 5: 1 – uopšte se ne slažem; 2 – ne slažem se; 3 – ne znam; 4 – slažem se; 5 – u potpunosti se slažem. Vrednosti označene istim slovima u tabeli nalaze se na istom nivou statističke značajnosti sa intervalom poverenja od 95%.

Poverenje u zvanične institucije je ocenjeno relativno visokom ocenom, pri čemu ne postoji statistički značajna razlika između različitih tipova proizvođača što ukazuje na ujednačenost stavova po ovom pitanju (5.10.11).

Opšti zaključak na koji navode rezultati sprovedene ankete govori o zadovoljavajućem nivou edukacije poljoprivrednih proizvođača kada je reč o

pesticidima. Potpuno drugačiji scenario uviđa se po pitanju bioloških sredstava za zaštitu bilja. Ovakve prilike javljaju se kao posledica limitirane primene biopesticida ali i nedovoljnih saznanja poljoprivrednih proizvođača o pozitivnim aspektima njihove upotrebe. Kako su rezultati ankete ukazali na visok nivo poverenja proizvođača u savetodavnu aktivnost stručnih lica u pogledu izbora sredstava za zaštitu bilja, nameće se potreba za intenziviranjem promotivnih i edukativnih programa u organizaciji stručnih službi i zvaničnih institucija. S druge strane, nasuprot važnosti edukacije, rezultati ankete su pokazali da prodaja zasićena strogo komercijalnim pristupom, nije adekvatan put izgradnje pozitivnog stava poljoprivrednih proizvođača prema biološkim sredstvima za zaštitu bilja.

Bitnu ulogu u daljem razvoju scenarija na polju implementacije bioloških sredstava za zaštitu bilja u tekućoj poljoprivrednoj praksi, igraju stručnjaci iz oblasti kako proizvodnje tako i primene ovih preparata. Poverenje poljoprivrednih proizvođača koje ukazuju stručnim licima je bitna osnova za promene dugogodišnje ustaljene proizvodne prakse i stvaranje prostora za nove preparate. Budućnost poljoprivredne proizvodnje temelji se na rešenjima koja povezuju nauku sa jedne strane i potrebe i iskustva ljudi koji su direktno uključeni u sam proizvodni sistem. Iako je tržište biopesticida u osetnom porastu u našoj zemlji, a narošito u inostranstvu, razvoj efikasnih bioloških preparata i dalje predstavlja ozbiljan zadatak. Dalja perspektiva razvoja poljoprivrede u smeru održive i ekološki podobne proizvodnje zavisiće u velikoj meri od broja i količine dostupnih bioloških preparata za zaštitu bilja ali i izgrađenog pozitivnog stava proizvođača u pogledu njihove primene (Bailey i sar., 2010; Samada i Tambunan, 2020; Kumar i sar., 2021; Fenibo i sar., 2021).

Komunikacija i dobro osmišljen program edukacija koji omogućava neposrednu interakciju i saradnju obe strane, predstavnika nauke i poljoprivrednih proizvođača, je ključan segment kreiranja atmosfere koja vodi razvoju održive i profitabilne poljoprivredne proizvodnje. Pored naučnih publikacija, rezultati istraživanja sprovedenog u okviru ove doktorske disertacije, podeljeni su i na edukativnim treninzima organizovanim za poljoprivredne proizvođače kao i organizovanim susretima sa zainteresovanim licima koja su uključivala vlasnike i radnike na porodičnim gazdinstvima, veće poljoprivredne proizvođače, proizvođače sredstava za biološku zaštitu bilja, diplomirane inženjere poljoprivrede i tehnologije, kao i pripadnike iz strukture vlasti.



Zaključci

6. Zaključci

Osnovni cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je razvoj tehnologije proizvodnje agenasa biološke kontrole toksigenih izolata roda *Aspergillus*. Kako bi se sagledala mogućnost rešavanja konkretnog i aktuelnog problema toksigene populacije roda *Aspergillus* prisutnih na teritoriji Republike Srbije, efikasnost biokontrolnih agenasa proveravana je testiranjem njihove aktivnosti protiv izolata gljiva uzorkovanih sa kukuruza uzgajanog na lokalnom području. Odabir potentnog biokatalizatora kao nosioca bioprocasa podrazumevao je nekoliko koraka koji su se temeljili na ispitivanju genetskog potencijala novoizolovanih sojeva *Bacillus* spp. za produkciju antimikrobnih komponenti i antagonističke aktivnosti prema izolatima vrste *Aspergillus flavus*. Dalji koraci razvoja bioprocenog rešenja obuhvatali su definisanje kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja hranljivog medijuma za produkciju biokontrolnih agenasa pripremanom odabranog proizvodnog mikroorganizma. U narednoj fazi istraživanja proizvodnja agenasa biološke kontrole skalirana je do nivoa laboratorijskog bioreaktora kako bi se izvršila optimizacija ključnih procesnih parametara i definisalo idejno rešenje primenljivo i na višim proizvodnim skalama. Dizajn bioprocenog rešenja zaokružen je ispitivanjem mogućnosti formulacije krajnjeg proizvoda primenom čestica biokompatibilnog čvrstog nosača. Poslednji korak istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je usmeren na sagledavanje stanja lokalnog tržišta i ispitivanje stavova poljoprivrednih proizvođača o primeni (bio)pesticida u Republici Srbiji.

Realizacijom navedenih specifičnih ciljeva istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, definisani su sledeći specifični zaključci:

Analizom rasporostranjenosti aflatoksigenih gljiva na poljima kukuruza u Republici Srbiji i identifikacijom izolata izdvojenih iz zrna kukuruza uzgajanog tokom 2019. i 2020. proizvodne godine, izveden je zaključak o visokom nivou distribucije sojeva koji pripadaju vrsti *Aspergillus flavus* na različitim lokalitetima širom zemlje. Genetska predispozicija ispitana primenom molekularne tehnike koja podrazumeva monitoring delecija u okviru klastera gena za biosintezu aflatoksina i potom ispitana ekspresija gena u uslovima koji favorizuju razvoj gljiva i sintezu mikotoksina, doveli su do zaključka o visokom potencijalu pojedinih izolovanih predstavnika *Aspergillus flavus* za produkciju aflatoksina, koji su odabrani kao test organizmi za dalja istraživanja. Takođe, potvrđen je značajan uticaj mikroklimatskih uslova na produkciju mikotoksina, te je utvrđeno da, uprkos prisustvu toksigenih sojeva *Aspergillus flavus* na njivama,

vremenski uslovi nisu omogućili visok stepen kontaminacije kukuruza aflatoksinima u 2019. i 2020. godini. Međutim, u ovoj vegetacionoj sezoni se, usled vremenskih prilika, očekuje viši stepen kontaminacije.

Izolacijom 76 predstavnika roda *Bacillus* iz rizosfere 12 biljnih vrsta i skriningom njihove antagonističke aktivnosti prema pripadnicama *Aspergillus flavus* odabran je uži izbor izolata kao potencijalnih proizvodnih mikroorganizama. Za narednu fazu evaluacije potencijala izolata kao biokontrolnih agenasa efikasnih u suzbijanju aflatoksigenih *Aspergillus flavus* odabrani su: Mahunarke 1a, Mahunarke 1b, Krompir 4a, Šargarepa 3a i Paradajz 3. Dalji kriterijum za selekciju podrazumevao je ispitivanje genetske predispozicije izolata za produkciju antimikrobnih komponenti. Analiziranjem prisustva gena odgovornih za sintezu lipopeptida, zaključeno je da se izolati Mahunarke 1a i Krompir 4a izdvajaju u odnosu na ostale, po prisustvu svih šest ispitivanih gena. Na ovaj način potvrđen je značajan potencijal izolata za produkciju lipopeptidnih komponenti koje su okarakterisane kao pripadnici familija surfaktina, iturina i fengicina. U narednom koraku evaluacije potencijala odabranih izolata kao biokontrolnih agenasa ispitivana je sposobnost ispoljavanja supresivnog delovanja na testirane predstavnike *Aspergillus flavus* nakon kultivacije u hranljivim medijumima sa različitim izvorima ugljenika i azota. I ovom slučaju kao najbolji izbor pokazao se soj Mahunarke 1a. Sumiranjem rezultata iz prethodno definisanih faza zaključeno je da najveći potencijal kao biokontrolni agens efikasan u suzbijanju aflatoksigenih sojeva *Aspergillus flavus* poseduje izolat poreklom iz rizosfere *Phaseolus vulgaris* (Mahunarke 1a). Filogenetskom analizom odabranog izolata, *Bacillus* sp. BioSol021, sekvenciranjem 16S rRNK regiona utvrđena je najveća bliskost sa izolatima iz operativne grupe *Bacillus amyloliquefaciens*.

Optimizacija sastava hranljivog medijuma za proizvodnju agenasa biološke kontrole aflatoksigenih predstavnika *Aspergillus flavus* započeta je odabirom optimalnog izvora ugljenika i azota, pri čemu su kao najbolji izbor definisani celuloza i urea. Modelovanje uticaja inicijalnih koncentracija komponenti hranljivog medijuma na odabrani odziv – prečnik zone inhibicije, vršeno je metodologijom odzivne površine i veštačkih neuronskih mreža. Poređenjem rezultata za modele generisane primenom dve metodologije, gde su vrednosti koeficijenta determinacije iznosili za testirani izolat *Aspergillus flavus* SA2BSS 0,96 (RSM), i 0,86 (ANN) odnosno izolat *Aspergillus flavus* PA2DSS 0,95 (RSM) i 0,84 (ANN), zaključeno je da su generisane matematičke relacije definisane primenom metodologije odzivne površine adekvatnije za simulaciju posmatranog sistema. Dalji korak podrazumevao je primenu metodologije

željene funkcije radi definisanja optimalnih vrednosti inicijalnih koncentracija osnovnih nutrijenata medijuma za proizvodnju agenasa biološke kontrole efikasnih u suzbijanju aflatoksigenih izolata *Aspergillus flavus*. Definirano je optimalno rešenje u pogledu sastava podloge: celuloza, 5 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,77 g/l, K_2HPO_4 0,3 g/l i $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g/l.

Validacija optimalnog rešenja u pogledu sastava hranljivog medijuma za proizvodnju agenasa biološke kontrole primenom *Bacillus* sp. BioSol021 izvršena je izvođenjem bioprocesa u uvećanim razmerama, na nivou laboratorijskog bioreaktora ukupne zapremine 16 l. Rezultati eksperimenata ukazali su na zadovoljavajući stepen korelacije između odziva predviđenih modelom i realnih vrednosti. Više vrednosti prečnika zone inhibicije u ovoj fazi razvoja tehnologije proizvodnje agenasa biološke kontrole pripisuju se boljim uslovima u laboratorijskom bioreaktoru za rast proizvodnog mikroorganizma i metaboličku funkciju u pogledu sinteze antimikrobnih komponenti. Dodatno, ova faza kreiranja bioprocesnog rešenja podrazumevala je optimizaciju osnovnih procesnih parametara: intenzitet aeracije, brzina mešanja i kultivaciono vreme. Eksperimentalni podaci generisani izvođenjem bioprocesa u laboratorijskom bioreaktoru iskorišćeni su za optimizaciju primenom Taguči metodologije. Rezultati statističke analize ukazali su da je za maksimizaciju antagonističke aktivnosti agenasa biološke kontrole protiv aflatoksigenih izolata *Aspergillus flavus* optimalno rešenje izvođenje bioprocesa tokom 96 h pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.

Pored dokazane kompetitivne aktivnosti proizvodnog soja, detekcijom antimikrobnih komponenti odgovornih za supresivno delovanje proizvodnog mikroorganizma primenom analitičkih metoda HPLC-MS i MALDI-TOF MS definiran je dodatni mehanizam delovanja agenasa biološke kontrole (antibioza) efikasnih u suzbijanju aflatoksigenih pripadnika *Aspergillus flavus*. Takođe, identifikacijom lipopeptida iz familija surfaktina, iturina i fengicina potvrđen je prethodno utvrđen genetski potencijal proizvodnog izolata *Bacillus* sp. BioSol021 za njihovu produkciju.

Kao finalni korak razvoja tehnologije proizvodnje agenasa biološke kontrole aflatoksigenih izolata *Aspergillus flavus* ispitana je mogućnost formulacije preparata primenom biokompatibilnih čvrstih nosača. Vezivanjem benefitnih mikroorganizama za čestice biougla ostvarena je visoka koncentracija ćelija kao aktivnih komponenti po jedinici mase finalnog proizvoda. Ovakav rezultat, upotpunjen činjenicom o ulozi čvrstog nosača u očuvanju vijabilnosti agenasa biološke kontrole pruža odličnu osnovu za

definisanje formulacije koja bi pogodovala dobijanju preparata s dobrim prilikama za širu komercijalizaciju.

Nakon definisanja ključnih koraka razvoja bioprocenog rešenja za proizvodnju agensa biološke kontrole efikasnih u suzbijanju aflatoksigenih predstavnika *Aspergillus flavus*, u istraživanje u okviru ove doktorske disertacije uključena je analiza domaćeg tržišta biopesticida i ispitivanje stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida. Zaključak izveden nakon sumiranja rezultata ankete uputio je na potrebu o ulaganju dodatnih napora stručnih lica iz oblasti u pogledu edukacije poljoprivrednih proizvođača o aspektima primene bioloških sredstava za zaštitu bilja. S druge strane, celokupan utisak o perspektivama daljeg razvoja tržišta biopesticida govori o pozitivnom stavu poljoprivrednih proizvođača prema promenama u trenutno aktuelnoj poljoprivrednoj praksi i bitnom mestu koje će zauzeti biološka sredstva za zaštitu bilja u budućnosti.



Reference

7. Reference

Ab Rahman, S. F.S.; Singh, E.; Pieterse, C. M. J.; Schenk, P. M. Emerging Microbial Biocontrol Strategies for Plant Pathogens. *Plant Sci.* 2018, 267, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012>.

Abd El-Aziz, A. R. M.; Shehata, S. M.; Hisham, S. M.; Alobathani, A. A. Molecular Profile of Aflatoxigenic and Non-Aflatoxigenic Isolates of *Aspergillus Flavus* Isolated from Stored Maize. *Saudi J. Biol. Sci.* 2021, 28 (2), 1383–1391. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.073>.

Abdallah, F.M.; Ameye, M.; De Saeger, S.; Audenaert, K.; Haesaert, G. Biological Control of Mycotoxigenic Fungi and Their Toxins: An Update for the Pre-Harvest Approach. *Mycotoxins - Impact Manag. Strateg.* 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76342>.

Abd-Elhalem, B. T.; El-Sawy, M.; Gamal, R. F.; Abou-Taleb, K. A. Production of Amylases from *Bacillus Amyloliquefaciens* under Submerged Fermentation Using Some Agro-Industrial by-Products. *Ann. Agric. Sci.* 2015, 60 (2), 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2015.06.001>.

Abdella, A.; Segato, F.; Wilkins, M. R. Optimization of Process Parameters and Fermentation Strategy for Xylanase Production in a Stirred Tank Reactor Using a Mutant *Aspergillus Nidulans* Strain. *Biotechnol. Reports* 2020, 26, e00457. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00457>.

Abdel-Mawgoud, A. M.; Aboulwafa, M. M.; Hassouna, N. A. H. Optimization of Surfactin Production by *Bacillus Subtilis* Isolate BS5. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2008, 150 (3), 305–325. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8155-x>.

Abdul Razack, S.; Velayutham, V.; Thangavelu, V. Medium Optimization for the Production of Exopolysaccharide by *Bacillus Subtilis* Using Synthetic Sources and Agro Wastes. *Turkish J. Biol.* 2013, 37 (3), 280–288. <https://doi.org/10.3906/biy-1206-50>.

Abiodun, O. I.; Jantan, A.; Omolara, A.E.; Dada, K.V.; Mohamed, N.A.; Arshad, H. State-of-the-art in artificial neural network applications: A survey. *Heliyon*, 2018, 4(11), e00938. doi:10.1016/j.heliyon.2018.e00938

Acur, A.; Arias, R. S.; Odongo, S.; Tuhaise, S.; Ssekandi, J.; Adriko, J.; Muhanguzi, D.; Buah, S.; Kiggundu, A. Genetic Diversity of Aflatoxin-Producing *Aspergillus Flavus* Isolated from Selected Groundnut Growing Agro-Ecological Zones of Uganda. *BMC Microbiol.* 2020, 20 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01924-2>.

Adeniji, A. A.; Aremu, O. S.; Babalola, O. O. Selecting Lipopeptide-Producing, Fusarium-Suppressing *Bacillus* Spp.: Metabolomic and Genomic Probing of *Bacillus Velezensis* NWUMFkBS10.5. *Microbiologyopen* 2019, 8 (6), 1–21. <https://doi.org/10.1002/mbo3.742>.

Adhikari, B.N.; Bandyopadhyay, R.; Cotty, P.J. Degeneration of aflatoxin gene clusters in *Aspergillus flavus* from Africa and North America. *AMB Express* 2016, 6, 62. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0228-6>.

Ahmad, B.; Nigar, S.; Sadaf Ali Shah, S.; Bashir, S.; Ali, J.; Yousaf, S.; Bangash, J. A. Isolation and Identification of Cellulose Degrading Bacteria from Municipal Waste and Their Screening for Potential Antimicrobial Activity. *World Appl. Sci. J.* 2013, 27 (11), 1420–1426. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.27.11.81162>.

Ahmad, M.; Wang, X.; Hilger, T. H.; Luqman, M.; Nazli, F.; Hussain, A.; Zahir, Z. A.; Latif, M.; Saeed, Q.; Malik, H. A.; Mustafa, A. Evaluating Biochar-Microbe Synergies for Improved Growth, Yield of Maize, and Post-Harvest Soil Characteristics in a Semi-Arid Climate. *Agronomy* 2020, 10 (7). <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY10071055>.

Akpa, E.; Jacques, P.; Wathelet, B.; Paquot, M.; Fuchs, R.; Budzikiewicz, H.; Thonart, P. Influence of Culture Conditions on Lipopeptide Production by *Bacillus Subtilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol.* 2001, 91–93, 551–561. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:551>.

Al-Ali, A.; Deravel, J.; Krier, F.; Béchet, M.; Ongena, M.; Jacques, P. Biofilm Formation Is Determinant in Tomato Rhizosphere Colonization by *Bacillus Velezensis* FZB42. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2018, 25 (30), 29910–29920. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0469-1>.

Aliye, N.; Fininsa, C.; Hiskias, Y. Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Biol. Control* 2008, 47, 282–288. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.09.003>.

Alizadeh, M.; Vasebi, Y.; Safaie, N. Microbial Antagonists against Plant Pathogens in Iran: A Review. *Open Agric.* 2020, 5 (1), 404–440. <https://doi.org/10.1515/opag-2020-0031>.

Aloo, B. N.; Makumba, B. A.; Mbega, E. R. The Potential of Bacilli Rhizobacteria for Sustainable Crop Production and Environmental Sustainability. *Microbiol. Res.* 2019, 219 (November 2018), 26–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.011>.

Alvarez, F.; Castro, M.; Príncipe, A.; Borioli, G.; Fischer, S.; Mori, G.; Jofré, E. The Plant-Associated *Bacillus Amyloliquefaciens* Strains MEP 218 and ARP 23 Capable of Producing the Cyclic Lipopeptides Iturin or Surfactin and Fengycin Are Effective in Biocontrol of Sclerotinia Stem Rot Disease. *J. Appl. Microbiol.* 2012, 112 (1), 159–174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05182.x>.

Amaike, S.; Keller, N. P. *Aspergillus Flavus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2011, 49, 107–133. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095221>.

Amani, H.; Mehrnia, M. R. Scale up and Application of Biosurfactant from *Bacillus Subtilis* in Enhanced Oil Recovery. 2010, 510–523. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8889-0>.

Amare, M. G.; Keller, N. P. Molecular Mechanisms of *Aspergillus Flavus* Secondary Metabolism and Development. *Fungal Genet. Biol.* 2014, 66, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.02.008>.

Amini, M.; Yousefi-Massumabad, H.; Younesi, H.; Abyar, H.; Bahramifar, N.; Production of the polyhydroxyalkanoate biopolymer by *Cupriavidus necator* using beer brewery wastewater containing maltose as a primary carbon source. *J. Environ. Chem. Eng.* 2020, 8, 103588. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103588>.

Amore, A.; Pepe, O.; Ventorino, V.; Aliberti, A.; Faraco, V. Cellulolytic Bacillus Strains from Natural Habitats - A Review. *Chim. Oggi/Chemistry Today* 2013, 31 (2), 49–52.

Andrade, C. J. de; Andrade, L. M. de; Bution, M. L.; Heidi Dolder, M. A.; Cavalcante Barros, F. F.; Pastore, G. M. Optimizing Alternative Substrate for Simultaneous Production of Surfactin and 2,3-Butanediol by *Bacillus Subtilis* LB5a. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2016, 6, 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.04.004>.

Arguelles-Arias, A.; Ongena, M.; Halimi, B.; Lara, Y.; Brans, A.; Joris, B.; Fickers, P. *Bacillus Amyloliquefaciens* GA1 as a Source of Potent Antibiotics and Other Secondary Metabolites for Biocontrol of Plant Pathogens. *Microb. Cell Fact.* 2009, 8, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-63>.

Arrebola, E.; Jacobs, R.; Korsten, L. Iturin A Is the Principal Inhibitor in the Biocontrol Activity of *Bacillus Amyloliquefaciens* PPCB004 against Postharvest Fungal Pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 2010, 108 (2), 386–395. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04438.x>.

Arthurs, S.; Dara, S. K. Microbial Biopesticides for Invertebrate Pests and Their Markets in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 2019, 165 (November 2017), 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.008>.

Athukorala, S. N. P.; Fernando, W. G. D.; Rashid, K. Y. Identification of Antifungal Antibiotics of *Bacillus* Species Isolated from Different Microhabitats Using Polymerase Chain Reaction and MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Can. J. Microbiol.* 2009, 55 (9), 1021–1032. <https://doi.org/10.1139/W09-067>.

Azeem, M.; Hassan, T. U.; Tahir, M. I.; Ali, A.; Jeyasundar, P. G. S. A.; Hussain, Q.; Bashir, S.; Mehmood, S.; Zhang, Z. Tea Leaves Biochar as a Carrier of *Bacillus Cereus* Improves the Soil Function and Crop Productivity. *Appl. Soil Ecol.* 2021, 157 (June 2019), 103732. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103732>.

Bagheri, M.; Akbari, A.; Mirbagheri, S.A. Advanced control of membrane fouling in filtration systems using artificial intelligence and machine learning techniques: A critical review. *Process Saf. Environ.* 2019, 123, 229–252. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.01.013>

Bailey, K. L.; Boyetchko, S. M.; Längle, T. Social and Economic Drivers Shaping the Future of Biological Control: A Canadian Perspective on the Factors Affecting the Development and Use of Microbial Biopesticides. *Biol. Control* 2010, 52 (3), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.003>.

Bajaj, I. B.; Singhal, R. S. Effect of Aeration and Agitation on Synthesis of Poly(γ -Glutamic Acid) in Batch Cultures of *Bacillus Licheniformis* NCIM 2324. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2010, 15 (4), 635–640. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-0059-2>.

Balderas-Ruíz, K. A.; Bustos, P.; Santamaria, R. I.; González, V.; Cristiano-Fajardo, S. A.; Barrera-Ortíz, S.; Mezo-Villalobos, M.; Aranda-Ocampo, S.; Guevara-García, Á. A.; Galindo, E.; Serrano-Carreón, L. *Bacillus Velezensis* 83 a Bacterial Strain from Mango Phyllosphere, Useful for Biological Control and Plant Growth Promotion. *AMB Express* 2020, 10 (1). <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01101-8>.

Banat, I. M.; Satpute, S. K.; Cameotra, S. S.; Patil, R.; Nyayanit, N. V. Cost Effective Technologies and Renewable Substrates for Biosurfactants' Production. *Front. Microbiol.* 2014, 5 (DEC), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00697>.

Baras, J.; Veljković, V.; Popov S.; Povrenović, D.; Lazić, M.; Zlatković B. *Osnovi Bioprocenog inženjerstva*, Tehnološki fakultet, Leskovac, 2009.

Battilani, P.; Toscano, P.; Van Der Fels-Klerx, H. J.; Moretti, A.; Camardo Leggieri, M.; Brera, C.; Rortais, A.; Goumperis, T.; Robinson, T. Aflatoxin B 1 Contamination in Maize in Europe Increases Due to Climate Change. *Sci. Rep.* 2016, 6 (March), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep24328>.

Bechard, J.; Eastwell, K.C.; Sholberg, Mazza, G.; Skura B.J. Isolation and Partial Chemical Characterization of an Antimicrobial Peptide Produced by a Strain of *Bacillus subtilis* J. *Agric. Food Chem.* 1998, 46, 12, 5355–5361. <https://doi.org/10.1021/jf9803987>.

Bernat, P.; Paraszkiwicz, K.; Siewiera, P.; Moryl, M.; Płaza, G.; Chojniak, J. Lipid Composition in a Strain of *Bacillus Subtilis*, a Producer of Iturin A Lipopeptides That Are Active against Uropathogenic Bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 32 (10). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2126-0>.

Besset-Manzoni, Y.; Joly, P.; Brutel, A.; Gerin, F.; Soudière, O.; Langin, T.; Prigent-Combaret, C. Does in Vitro Selection of Biocontrol Agents Guarantee Success in Planta? A Study Case of Wheat Protection against *Fusarium* Seedling Blight by Soil Bacteria. *PLoS One* 2019, 14 (12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225655>.

Bharose, A.; Gajera, H. Antifungal activity and metabolites study of bacillus strain against aflatoxin producing aspergillus. *J. Appl. Microbiol. Biochem.* 2018, 02, 1–8. <https://doi.org/10.21767/2576-1412.100024>.

Biniarz, P.; Łukaszewicz, M.; Janek, T. Screening Concepts, Characterization and Structural Analysis of Microbial-Derived Bioactive Lipopeptides: A Review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2017, 37 (3), 393–410. <https://doi.org/10.3109/07388551.2016.1163324>.

Brody, J.R. and Kern, S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques*, 2004, 36, 214–216.

Burke, S. A.; Wright, J. D.; Robinson, M. K.; Bronk, B. V.; Warren, R. L. Detection of Molecular Diversity in *Bacillus Atrophaeus* by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70 (5), 2786–2790. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2786-2790.2004>.

Caceres, I.; Al Khoury, A.; Khoury, R.; Lorber, S.; Oswald, I.P.; El Khoury A.; Atoui, A.; Puel O.; Bailly J.D. Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: A review. *Toxins*, 2020, 12, 150. [10.3390/toxins12030150](https://doi.org/10.3390/toxins12030150).

Cai, D.; Zhu, J.; Zhu, S.; Lu, Y.; Zhang, B.; Lu, K.; Li, J.; Ma, X.; Chen, S. Metabolic Engineering of Main Transcription Factors in Carbon, Nitrogen, and Phosphorus Metabolisms for Enhanced Production of Bacitracin in *Bacillus Licheniformis*. *ACS Synth. Biol.* 2019, 8 (4), 866–875. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00005>.

Callicott, K. A.; Cotty, P. J. Method for monitoring deletions in the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* with multiplex PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 2015, 60, 60–65. <https://doi.org/10.1111/lam.12337>.

Cao, Y.; Pi, H.; Chandrangsu, P.; Li, Y.; Wang, Y.; Zhou, H.; Xiong, H.; Helmann, J. D.; Cai, Y. Antagonism of Two Plant-Growth Promoting *Bacillus Velezensis* Isolates Against *Ralstonia Solanacearum* and *Fusarium Oxysporum*. *Sci. Rep.* 2018, 8 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22782-z>.

Casquete, R.; Benito, M. J.; Aranda, E.; Martín, A.; Ruiz-Moyano, S.; de Guía Córdoba, M. Gene Expression of *Aspergillus Flavus* Strains on a Cheese Model System to Control Aflatoxin Production. *J. Dairy Sci.* 2019, 102 (9), 7765–7772. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16722>.

Caulier, S.; Nannan, C.; Gillis, A.; Licciardi, F.; Bragard, C.; Mahillon, J. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus Subtilis* Group. *Front. Microbiol.* 2019, 10 (FEB), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>.

Cawoy, H.; Bettiol, W.; Fickers, P.; Ongena, M. *Bacillus* -Based Biological Control of Plant Diseases. In *Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management*, Stoytcheva M. Ed.; InTech; Rijeka, Croatia, 2011, 274–302.

Chen, C.Y.; Baker, S.C.; Darton, R.C. Continuous production of biosurfactant with foam fractionation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2006, 81(12), 1915–1922. <https://doi.org/10.1002/jctb.1624>.

Chen, K.; Tian, Z.; He, H.; Long, C. an; Jiang, F. *Bacillus* species as potential biocontrol agents against citrus diseases. *Biol. Control.* 2020, 151 (August), 104419. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104419> (a).

Chen, L.; Heng, J.; Qin, S.; Bian, K. A Comprehensive Understanding of the Biocontrol Potential of *Bacillus Velezensis* LM2303 against *Fusarium* Head Blight. *PLoS One* 2018, 13 (6), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198560>.

Chen, M.; Wang, J.; Liu, B.; Zhu, Y.; Xiao, R.; Yang, W.; Ge, C.; Chen, Z. Biocontrol of Tomato Bacterial Wilt by the New Strain *Bacillus Velezensis* FJAT-46737 and Its Lipopeptides. *BMC Microbiol.* 2020, 20 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01851-2> (b).

Chen, X. H.; Koumoutsis, A.; Scholz, R.; Borriss, R. More than Anticipated - Production of Antibiotics and Other Secondary Metabolites by *Bacillus Amyloliquefaciens* FZB42. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 16 (1–2), 14–24. <https://doi.org/10.1159/000142891>.

Chenikher, S.; Guez, J. S.; Coutte, F.; Pekpe, M.; Jacques, P.; Cassar., J. P. Control of the Specific Growth Rate of *Bacillus Subtilis* for the Production of Biosurfactant Lipopeptides in Bioreactors with Foam Overflow. *Process Biochem.* 2010, 45 (11), 1800–1807. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.06.001>.

Chiang, A.; Honey, C. M.; Lau, S.; Olver, D. Growth of *Bacillus Subtilis* in Phosphate Limited Media Reduces Susceptibility to Antibacterial Activity of Chitosan. *J. Exp. Microbiol. Immunol.* 2012, 16 (April), 54–58.

- Chowdhury, S. P.; Hartmann, A.; Gao, X. W.; Borriss, R. Biocontrol Mechanism by Root-Associated *Bacillus AmyloliQUEfaciens* FZB42 - A Review. *Front. Microbiol.* 2015, 6 (JUL). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>.
- Cooper, D.G.; MacDonald, C.R.; Duff, S.J.B.; Kosaric, N.. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981, 42, 408-412.
- Costa, N. R.; Lourenço, J.; Pereira, Z. L. Desirability Function Approach: A Review and Performance Evaluation in Adverse Conditions. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2011, 107 (2), 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2011.04.004>.
- Cotty, P. J. Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed. *Phytopathology*, 1994, 84, 1270–1277 (a).
- Cotty, P.J. Comparison of four media for the isolation of *Aspergillus flavus* group fungi. *Mycopathologia*, 1994, 125(3), 157-162 (b).
- Cotty, P.J. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* 1989, 79, 808–814.
- Cromwick, A.M.; Birrer, G. A.; & Gross, R.A. Effects of pH and aeration on γ -poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 1996, 50(2), 222–227. doi:10.1002/(sici)1097-0290(19960420)50:2<222::aid-bit10>3.0.co;2-p.
- Cui, X.; Goel, V.; Kingsbury, B. Data Augmentation for Deep Neural Network Acoustic Modeling. ICASSP, IEEE Int. Conf. Acoust. Speech Signal Process. - Proc. 2014, 5582–5586. <https://doi.org/10.1109/ICASSP.2014.6854671>.
- Czaja, K.; Góralczyk, K.; Struciński, P.; Hernik, A.; Korcz, W.; Minorczyk, M.; Łyczewska, M.; Ludwicki, J. K. Biopesticides - Towards Increased Consumer Safety in the European Union. *Pest Manag. Sci.* 2015, 71 (1), 3–6. <https://doi.org/10.1002/ps.3829>.
- Damalas, C. A.; Koutroubas, S. D. Current status and recent developments in biopesticide use. *Agric.* 2018, 8, 13. <https://doi.org/10.3390/agriculture8010013>.
- Danilova, I.; Sharipova, M. The Practical Potential of Bacilli and Their Enzymes for Industrial Production. *Front. Microbiol.* 2020, 11 (August). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01782>.
- Das, H.; Singh, S. K. Useful Byproducts from Cellulosic Wastes of Agriculture and Food Industry - A Critical Appraisal. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2004, 44 (2), 77–89. <https://doi.org/10.1080/10408690490424630>.
- Davis, D.A.; Lynch, H.C.; Varley, J. The production of Surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enzyme Microb. Technol.* 1999, 25, 322-329.

Deb, P.; Talukdar, S. A.; Mohsina, K.; Sarker, P. K.; Sayem, S. M. A. Production and Partial Characterization of Extracellular Amylase Enzyme from *Bacillus Amyloliquefaciens* P-001. Springerplus 2013, 2 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-154>.

Deleu, M.; Paquot, M.; Nylander, T. Effect of Fengycin, a Lipopeptide Produced by *Bacillus Subtilis*, on Model Biomembranes. *Biophys. J.* 2008, 94 (7), 2667–2679. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.114090>.

Deng, Q.; Wang, W.; Sun, L.; Wang, Y.; Liao, J.; Xu, D.; Liu, Y.; Ye, R.; Gooneratne, R. A Sensitive Method for Simultaneous Quantitative Determination of Surfactin and Iturin by LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2017, 409 (1), 179–191. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9984-z>.

Devaraj, K.; Aathika, S.; Periyasamy, K.; Manickam Periyaraman, P.; Palaniyandi, S.; Subramanian, S. Production of Thermostable Multiple Enzymes from *Bacillus Amyloliquefaciens* KUB29. *Nat. Prod. Res.* 2019, 33 (11), 1674–1677. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1425857>.

Dey, A.; Bhunia, B.; Dutta, S. Studies on the Effect of Agitation and Aeration for the Improved Protease Production by *Bacillus Licheniformis* NCIM-2042. *Mater. Today Proc.* 2016, 3 (10), 3444–3449. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2016.10.026>.

Di Benedetto, N.D.; Corbo, M.R.; Campaniello, D.; Cataldi, M.P.; Bevilacqua, A.; Sinigaglia, M.; Flagella, Z. The Role of Plant Growth Promoting Bacteria in Improving Nitrogen Use Efficiency for Sustainable Crop Production: A Focus on Wheat. *AIMS Microbiol.* 2017, 3 (3), 413–434. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.413>.

Dimkić I. Karakterizacija antimikrobnih supstanci prirodnih izolata *Bacillus* sp. za primenu u biološkoj kontroli fitopatogenih bakterija i gljiva. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu. 2015.

Dong, Y.; Li, H.; Rong, S.; Xu, H.; Guan, Y.; Zhao, L.; Chen, W.; He, X.; Gao, X.; Chen, R.; Li, L.; Xu, Z. Isolation and Evaluation of *Bacillus Amyloliquefaciens* Rdx5 as a Potential Biocontrol Agent against *Magnaporthe Oryzae*. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2019, 33 (1), 408–418. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1578692>.

Dorner J.W. Efficacy of a biopesticide for control of aflatoxins in corn. *J. Food Prot.* 2010, 37, 495–499. doi: 10.4315/0362-028x-73.3.495.

Dunlap, C. A.; Bowman, M. J.; Rooney, A. P. Iturinic Lipopeptide Diversity in the *Bacillus Subtilis* Species Group – Important Antifungals for Plant Disease Biocontrol Applications. *Front. Microbiol.* 2019, 10 (AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01794>.

El-Banna, N. M. Effect of Carbon Source on the Antimicrobial Activity of the Air Flora. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 21 (8–9), 1451–1454. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-6564-3>.

Eswari, J.; Anand, M.; Venkateswarlu, C. Optimum Culture Medium Composition for Lipopeptide Production by *Bacillus Subtilis* Using Response Surface Model-Based Ant Colony Optimization. *Sadhana - Acad. Proc. Eng. Sci.* 2016, 41 (1), 55–65. <https://doi.org/10.1007/s12046-015-0451-x>.

Fachrial, E.; Putri, R. R. J. S.; Lister, I. N. E.; Anggraini, S.; Harmileni; Nugroho, T. T.; Saryono. Molecular Identification of Cellulase and Protease Producing *Bacillus Tequilensis* Utmsal4 Isolated from the Geothermal Hot Spring in Lau Sidebuk Debuk, North Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas* 2020, 21 (10), 4719–4725. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d211035>.

Fahim, S.; Dimitrov, K.; Gancel, F.; Vauchel, P.; Jacques, P.; Nikov, I. Bioresource Technology Impact of Energy Supply and Oxygen Transfer on Selective Lipopeptide Production by *Bacillus Subtilis* BBG21. *Bioresour. Technol.* 2012, 126, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.019>.

Fan, B.; Blom, J.; Klenk, H. P.; Borriss, R. *Bacillus Amyloliquefaciens*, *Bacillus Velezensis*, and *Bacillus Siamensis* Form an “Operational Group *B. Amyloliquefaciens*” within the *B. Subtilis* Species Complex. *Front. Microbiol.* 2017, 8 (JAN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022> (a).

Fan, H.; Ru, J.; Zhang, Y.; Wang, Q.; Li, Y. Fengycin Produced by *Bacillus Subtilis* 9407 Plays a Major Role in the Biocontrol of Apple Ring Rot Disease. *Microbiol. Res.* 2017, 199, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.03.004> (b).

Faria, A. F.; Teodoro-Martinez, D. S.; De Oliveira Barbosa, G. N.; Gontijo Vaz, B.; Serrano Silva, Í.; Garcia, J. S.; Tótola, M. R.; Eberlin, M. N.; Grossman, M.; Alves, O. L.; Regina Durrant, L. Production and Structural Characterization of Surfactin (C 14/Leu7) Produced by *Bacillus Subtilis* Isolate LSFM-05 Grown on Raw Glycerol from the Biodiesel Industry. *Process Biochem.* 2011, 46 (10), 1951–1957. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.001>.

Fenibo, E. O.; Ijoma, G. N.; Matambo, T. Biopesticides in Sustainable Agriculture: A Critical Sustainable Development Driver Governed by Green Chemistry Principles. *Front. Sustain. Food Syst.* 2021, 5 (June), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.619058>.

Fernandes, P.A.V.; de Arruda, I.R.; dos Santos, A.F.A.B.; de Araújo, A.A.; Maior, A.M.S.; Ximenes, E.A. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 2007, 38, 704–709.

Ferreira, S. L. C.; Bruns, R. E.; Ferreira, H. S.; Matos, G. D.; David, J. M.; Brandão, G. C.; da Silva, E. G. P.; Portugal, L. A.; dos Reis, P. S.; Souza, A. S.; dos Santos, W. N. L. Box-Behnken Design: An Alternative for the Optimization of Analytical Methods. *Anal. Chim. Acta* 2007, 597 (2), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>.

Fira, D.; Dimkić, I.; Berić, T.; Lozo, J.; Stanković, S. Biological Control of Plant Pathogens by *Bacillus* Species. *J. Biotechnol.* 2018, 285 (July), 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>.

Focker, M.; van der Fels-Klerx, H.J.; Magan, N.; Edwards, S.G.; Grahovac, M.; Bagi, F.; Budakov, D.; Suman, M.; Schatzmayr, G.; Krska, R.; de Nijs, M. The impact of management practices to prevent and control mycotoxins in the European food supply chain: MyToolBox project results. *World Mycotoxin J.* 2021, 14, 139–154. <https://doi.org/10.3920/WMJ2020.2588>.

Fonseca, R. R.; Silva, A. J. R.; De França, F. P.; Cardoso, V. L.; Sérvulo, E. F. C. Optimizing Carbon/Nitrogen Ratio for Biosurfactant Production by a *Bacillus Subtilis* Strain. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2007, 137–140 (1–12), 471–486. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-9073-z>.

Frikha-Gargouri, O.; Ben Abdallah, D.; Bhar, I.; Tounsi, S. Antibiosis and BmyB Gene Presence as Prevalent Traits for the Selection of Efficient *Bacillus* Biocontrol Agents against Crown Gall Disease. *Front. Plant Sci.* 2017, 8 (August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01363>.

Gašić K.; Obradović. A. Induced Plant Resistance. *Ratar. i Povrt.* 2012, 49 (3), 326–334. <https://doi.org/10.5937/ratpov49-1877>.

Gašić, S.; Tanović, B. Biopesticide Formulations, Possibility of Application and Future Trends. *Pestic. i fitomedicina* 2013, 28 (2), 97–102. <https://doi.org/10.2298/pifl302097g>.

Ghosh, A.; Mahanta, S.; Banerjee, S.; Baishya, D. Exploration of Endo-Xylanase from Novel Strain of *Bacillus Velezensis* AG20 Isolated from the Cave of Meghalaya. 2020, 1–44. <https://doi.org/10.1101/2020.04.06.028878>.

Ghribi, D.; Ellouze-Chaabouni, S. Enhancement of *Bacillus Subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. *Biotechnol. Res. Int.* 2011, 2011, 1–6. <https://doi.org/10.4061/2011/653654>.

Glamočić, D.; Jajić, I.; Polovinski-Horvatović, M.; Krstović, S.; Guljaš, D. Aflatoxin in maize silage collected from AP Vojvodina, Serbia. *Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnol.* 2018, 51, 28–32.

Glare, T.; Caradus, J.; Gelernter, W.; Jackson, T.; Keyhani, N.; Köhl, J.; Marrone, P.; Morin, L.; Stewart, A. Have Biopesticides Come of Age? *Trends Biotechnol.* 2012, 30 (5), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.003>.

Gong, A. D.; Li, H. P.; Yuan, Q. S.; Song, X. S.; Yao, W.; He, W. J.; Zhang, J. B.; Liao, Y. C. Antagonistic Mechanism of Iturin a and Plipastatin a from *Bacillus Amyloliquefaciens* S76-3 from Wheat Spikes against *Fusarium Graminearum*. *PLoS One* 2015, 10 (2), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116871>.

Grahovac, J.; Pajčin, I.; Vlajkov, V.; Rončević, Z.; Dodić, J.; Cvetković, D.; Jokić, A. *Xanthomonas campestris* Biocontrol agent: selection, medium formulation and bioprocess kinetic analysis. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 2020, 00, 32–32. <https://doi.org/10.2298/ciceq200508032g>.

Grahovac, M.; Indjic, D.; Lazic, S.; Vukovic, S. Biofungicides and Their Applicability in Modern Agricultural Practice. *Pestic. i fitomedicina* 2009, 24 (4), 245–258. <https://doi.org/10.2298/pif0904245g>.

Grover, M.; Bodhankar, S.; Sharma, A.; Sharma, P.; Singh, J.; Nain, L. PGPR Mediated Alterations in Root Traits: Way Toward Sustainable Crop Production. *Front. Sustain. Food Syst.* 2021, 4 (January), 1–28. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.618230>.

Grubisha, L.C. ; Cotty, P. J. Genetic analysis of the *Aspergillus flavus* vegetative compatibility group to which a biological control agent that limits aflatoxin contamination in US crops belongs. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015, 81, 5889–5899. doi: 10.1128/aem.00738-15.

Gu, Q.; Yang, Y.; Yuan, Q.; Shi, G.; Wu, L.; Lou, Z.; Huo, R.; Wu, H.; Borriss, R.; Gao, X. Bacillomycin D Produced by *Bacillus Amyloliquefaciens* Is Involved in the Antagonistic Interaction with the Plantpathogenic Fungus *Fusarium Graminearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017, 83 (19). <https://doi.org/10.1128/AEM.01075-17>.

Guez, J.S.; Chenikher, S.; Cassar J.Ph.; Jacques, P.. Setting up and modeling of overflowing fed-batch cultures of *Bacillus subtilis* for the production and continuous removal of lipopeptides. *J. Biotechnol.* 2007, 131, 67-75.

Guo, Q.; Dong, W.; Li, S.; Lu, X.; Wang, P.; Zhang, X.; Wang, Y.; Ma, P. Fengycin Produced by *Bacillus Subtilis* NCD-2 Plays a Major Role in Biocontrol of Cotton Seedling Damping-off Disease. *Microbiol. Res.* 2014, 169 (7–8), 533–540. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.12.001>.

Hakim, S.; Naqqash, T.; Nawaz, M. S.; Laraib, I.; Siddique, M. J.; Zia, R.; Mirza, M. S.; Imran, A. Rhizosphere Engineering With Plant Growth-Promoting Microorganisms for Agriculture and Ecological Sustainability. *Front. Sustain. Food Syst.* 2021, 5 (February), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.617157>.

Hazarika, D. J.; Goswami, G.; Gautom, T.; Parveen, A.; Das, P.; Barooah, M.; Boro, R. C. Lipopeptide Mediated Biocontrol Activity of Endophytic *Bacillus Subtilis* against Fungal Phytopathogens. *BMC Microbiol.* 2019, 19 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1440-8>.

He, C. P.; Fan, L. Y.; Wu, W. H.; Liang, Y. Q.; Li, R.; Tang, W.; Zheng, X. L.; Xiao, Y. N.; Liu, Z. X.; Zheng, F. C. Identification of Lipopeptides Produced by *Bacillus Subtilis* Czkl Isolated from the Aerial Roots of Rubber Trees. *Genet. Mol. Res.* 2017, 16 (1), 1–13. <https://doi.org/10.4238/gmr16018710>.

Herlich, K. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virdžinija, SAD, 1990.

Heryani, H.; Putra, M. D. Kinetic Study and Modeling of Biosurfactant Production Using *Bacillus Sp.* *Electron. J. Biotechnol.* 2017, 27, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.005>.

Hmidet, N.; Ben Ayed, H.; Jacques, P.; Nasri, M. Enhancement of Surfactin and Fengycin Production by *Bacillus Mojavensis* A21: Application for Diesel Biodegradation. *Biomed Res. Int.* 2017,. <https://doi.org/10.1155/2017/5893123>.

Hsieh, F. C.; Li, M. C.; Lin, T. C.; Kao, S. S. Rapid Detection and Characterization of Surfactin-Producing *Bacillus Subtilis* and Closely Related Species Based on PCR. *Curr. Microbiol.* 2004, 49 (3), 186–191. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4314-7>.

<https://digitalworldbiology.com/FinchTV> (pristupljeno 15.05.2021.)

<https://ec.europa.eu/eurostat> (pristupljeno 10.06.2021.)

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (pristupljeno 15.05.2021)

<https://scikit-learn.org/stable/>

<https://serbiaorganica.info/wp-content/uploads/2021/01/ORGANSKA-PROIZVODNJA-U-SRBIJI-2020-online-1.pdf> (pristupljeno 17.06.2021.)

<https://www.businesswire.com/news/home/20210219005412/en/Global-Biopesticides-Market-Report-2021-Industry-Trends-Share-Size-Growth-Opportunity-and-Forecast-2015-2026---ResearchAndMarkets.com> (pristupljeno 06.07.2021.)

<https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/biopesticides-market-100073> (pristupljeno 29.06.2021.)

<https://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/biopesticide.asp> (pristupljeno 17.07.2021.)

<https://www.startus-insights.com/innovators-guide/5-top-biopesticide-startups-impacting-the-agriculture-industry/> (pristupljeno 17.07.2021.)

<https://www.tensorflow.org/>

Huang, X.; Niu, Q.; Zhou, W.; Ā, K. Z. *Bacillus Nematocida* Sp . Nov ., a Novel Bacterial Strain with Nematotoxic Activity Isolated from Soil in Yunnan , China. 2020, 28 (2005), 323–327. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.01.008>.

Huang, Y.; Wu, Z.; He, Y.; Ye, B. C.; Li, C. Rhizospheric *Bacillus Subtilis* Exhibits Biocontrol Effect against *Rhizoctonia Solani* in Pepper (*Capsicum Annuum*). *Biomed Res. Int.* 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9397619>.

Id, H.L.; Guan, Y.; Dong, Y.; Zhao, L.; Rong, S.; Chen, W.; Lv, M.; Xu, H.; Gao, X.; Chen, R.; Li, L.; Xu, Z. Isolation and Evaluation of Endophytic *Bacillus Tequilensis* GYLH001 with Potential Application for Biological Control of *Magnaporthe Oryzae*. 2018, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203505>.

Irshad, F.; Mushtaq, Z.; Jamil, A. PCR Based Screening for SrfAA ORF1 from Local *Bacillus* Species. *IJCBS* 2016, 9 (January), 1–9.

Jacques, P.; Hbid, C.; Destain, J.; Razafindralambo, H.; Paquot, M.; De Pauw, E.; Thonart, P. Optimization of Biosurfactant Lipopeptide Production from *Bacillus Subtilis* S499 Plackett-Burman Design. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol.* 1999, 77–79, 223–233. <https://doi.org/10.1385/abab:77:1-3:223>.

Jasim, B.; Sreelakshmi, K. S.; Mathew, J.; Radhakrishnan, E. K. Surfactin, Iturin, and Fengycin Biosynthesis by Endophytic *Bacillus* Sp. from *Bacopa Monnieri*. *Microb. Ecol.* 2016, 72 (1), 106–119. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0753-5>.

Jha, S. S.; Joshi, S. J.; Geetha, S. J. Lipopeptide Production by *Bacillus Subtilis* R1 and Its Possible Applications. *Brazilian J. Microbiol.* 2016, 47 (4), 955–964. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.006>.

Jiao, R.; Munir, S.; He, P.; Yang, H.; Wu, Y.; Wang, J.; He, P.; Cai, Y.; Wang, G.; He, Y. Biocontrol Potential of the Endophytic *Bacillus Amyloliquefaciens* YN201732 against

Tobacco Powdery Mildew and Its Growth Promotion. *Biol. Control* 2020, 143, 104160. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104160>.

Jiao, X.; Takishita, Y.; Zhou, G.; Smith, D. L. Plant Associated Rhizobacteria for Biocontrol and Plant Growth Enhancement. *Front. Plant Sci.* 2021, 12 (March). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634796>.

Jo, K. I.; Lee, Y. J.; Kim, B. K.; Lee, B. H.; Chung, C. H.; Nam, S. W.; Kim, S. K.; Lee, J. W. Pilot-Scale Production of Carboxymethylcellulase from Rice Hull by *Bacillus Amyloliquefaciens* DL-3. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2008, 13 (2), 182–188. <https://doi.org/10.1007/s12257-007-0149-y>.

Joshi, S.; Bharucha, C.; Jha, S.; Yadav, S.; Nerurkar, A.; Desai, A. J. Biosurfactant Production Using Molasses and Whey under Thermophilic Conditions. *Bioresour. Technol.* 2008, 99 (1), 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.010>.

Kaki, A.; Smargiasso, N.; Ongena, M.; Kara Ali, M.; Moula, N.; De Pauw, E.; Kacem Chaouche, N. Characterization of New Fengycin Cyclic Lipopeptide Variants Produced by *Bacillus Amyloliquefaciens* (ET) Originating from a Salt Lake of Eastern Algeria. *Curr. Microbiol.* 2020, 77 (3), 443–451. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01855-w>.

Karray, F., De Silva, C. (2004). *Soft Computing and Intelligent Systems Design*. Pearson Education Limited, England. ISBN: 0321116178.

Kerschke-Risch, P. The Aflatoxin-Affair: The Invisible Victims of Crime in the Food-Sector. *Temida* 2014, 17 (4), 107–120. <https://doi.org/10.2298/tem1404107k>.

Khan, R.; Ghazali, F. M.; Mahyudin, N. A.; Samsudin, N. I. P. Biocontrol of aflatoxins using non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus*: A literature review. *J. Fungi* 2021, 7 (5), 381. <https://doi.org/10.3390/jof7050381>.

Khan, R.; Ghazali, F.M.; Mahyudin, N.A.; Samsudin, N.I.P. Morphological characterization and determination of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolated from sweet corn kernels and soil in Malaysia. *Agric.* 2020, 10, 1–13. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100450>.

Kim, H.; Yoon, B.; Lee, C.; Katsuragi, T.; Tani, Y.; Oh, H. Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. 1997. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82784-5](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82784-5).

Kim, P. Il; Ryu, J.; Kim, Y. H.; Chi, Y. T. Production of Biosurfactant Lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus Subtilis* CMB32 for Control of *Colletotrichum Gloeosporioides*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 20 (1), 138–145. <https://doi.org/10.4014/jmb.0905.05007>.

Kim, Y. S.; Lee, Y.; Cheon, W.; Park, J.; Kwon, H. T.; Balaraju, K.; Kim, J.; Yoon, Y. J.; Jeon, Y. Characterization of *Bacillus Velezensis* AK-0 as a Biocontrol Agent against Apple Bitter Rot Caused by *Colletotrichum Gloeosporioides*. *Sci. Rep.* 2021, 11 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80231-2>.

Kim, Y. T.; Park, B. K.; Kim, S. E.; Lee, W. J.; Moon, J. S.; Cho, M. S.; Park, H. Y.; Hwang, I.; Kim, S. U. Organization and Characterization of Genetic Regions in *Bacillus Subtilis*

Subsp. Krietiensis ATCC55079 Associated with the Biosynthesis of Iturin and Surfactin Compounds. *PLoS One* 2017, 12 (12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188179>.

Kim, Y.-K.; Lee, S.-C.; Cho, Y.-Y.; Oh, H.-J.; Ko, Y. H. Isolation of Cellulolytic *Bacillus Subtilis* Strains from Agricultural Environments. *ISRN Microbiol.* 2012, 2012, 1–9. <https://doi.org/10.5402/2012/650563>.

Klich, M.A. *Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxin. *Mol. Plant Pathol.* 2007, 8 (6), 713–722. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00436.x>.

Knight, C. A.; Bowman, M. J.; Frederick, L.; Day, A.; Lee, C.; Dunlap, C. A. The First Report of Antifungal Lipopeptide Production by a *Bacillus Subtilis* Subsp. *Inaquosorum* Strain. *Microbiol. Res.* 2018, 216 (April), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.08.001>.

Korenblum, E.; Von Der Weid, I.; Santos, A. L. S.; Rosado, A. S.; Sebastián, G. V.; Coutinho, C. M. L. M.; Magalhães, F. C. M.; De Paiva, M. M.; Seldin, L. Production of Antimicrobial Substances by *Bacillus Subtilis* LFE-1, *B. Firmus* H2O-1 and *B. Licheniformis* T6-5 Isolated from an Oil Reservoir in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 2005, 98 (3), 667–675. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02518.x>.

Kos, J.; Janić Hajnal, E.; Šarić, B.; Jovanov, P.; Mandić, A.; Đuragić, O.; Kokić, B. Aflatoxins in maize harvested in the Republic of Serbia over the period 2012–2016. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* 2018, 11, 246–255. <https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1499675>.

Kos, J.; Mastilović, J.; Hajnal, E. J.; Šarić, B. Natural occurrence of aflatoxins in maize harvested in Serbia during 2009–2012. *Food Control* 2013, 34, 31–34. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.004>.

Kos, J.; Škrinjar, M.; Mandić, A.; Mišan, A.; Bursić, V.; Sarić, B.; Janić-Hajnal, E. Presence of Aflatoxins in Cereals from Serbia. *Food Feed Res.* 2014, 41 (1), 31–38. <https://doi.org/10.5937/ffr1401031k>.

Koul, O. Microbial Biopesticides: Opportunities and Challenges. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Resour.* 2011, 6 (January 2011). <https://doi.org/10.1079/PAVSNR20116056>.

Koumoutsis, A.; Chen, X. H.; Henne, A.; Liesegang, H.; Hitzeroth, G.; Franke, P.; Vater, J.; Borriss, R. Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Nonribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus Amylolyquefaciens* Strain FZB42. *J. Bacteriol.* 2004, 186 (4), 1084–1096. <https://doi.org/10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004>.

Krogh, A. What Are Artificial Neural Networks? *Nat. Biotechnol.* 2008, 26 (2), 195–197. <https://doi.org/10.1038/nbt1386>.

Krulj, J. Potencijal biosinteze aflatoksina b1 u različitim vrstama *Triticum* Spp. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, 2018.

- Küçük, Ö.; Elfarah, T. T. K.; Islak, S.; Özorak, C. Optimization by Using Taguchi Method of the Production of Magnesium-Matrix Carbide Reinforced Composites by Powder Metallurgy Method. *Metals* (Basel). 2017, 7 (9), 1–12. <https://doi.org/10.3390/met7090352>.
- Kulimushi, P. Z.; Basime, G. C.; Nachigera, G. M.; Thonart, P.; Ongena, M. Efficacy of *Bacillus Amyloliquefaciens* as Biocontrol Agent to Fight Fungal Diseases of Maize under Tropical Climates: From Lab to Field Assays in South Kivu. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2018, 25 (30), 29808–29821. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9314-9>.
- Kulpreecha, S.; Boonruangthavorn, A.; Meksiriporn, B.; Thongchul, N. Inexpensive Fed-Batch Cultivation for High Poly(3-Hydroxybutyrate) Production by a New Isolate of *Bacillus Megaterium*. *J. Biosci. Bioeng.* 2009, 107 (3), 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.10.006>.
- Kumar, J.; Ramlal, A.; Mallick, D.; Mishra, V. An Overview of Some Biopesticides and Their Importance in Plant Protection for Commercial Acceptance. *Plants* 2021, 10 (6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/plants10061185>.
- Kumar, L. R.; Ndao, A.; Valéro, J.; Tyagi, R. D. Production of *Bacillus Thuringiensis* Based Biopesticide Formulation Using Starch Industry Wastewater (SIW) as Substrate: A Techno-Economic Evaluation. *Bioresour. Technol.* 2019, 294 (August), 122144. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122144>.
- Kumar, P.; Dubey, R. C.; Maheshwari, D. K. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiol. Res.* 2012, 167, 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.05.002>.
- Kumar, R.; Balachandran, C. Histopathological changes in broiler chickens fed aflatoxin and cyclopiazonic acid. *Vet. Arhiv.* 2009 79, 31–40.
- Kumar, S.; Singh, A. Biopesticides: Present Status and the Future Prospects. *J. Biofertilizers Biopestic.* 2015, 06 (02). <https://doi.org/10.4172/jbfbp.1000e129>.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016, 33 (7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Lacerda, A.; Carvalho, U. De; Henrique, F.; Corrêa, P. Growth, Sporulation and Production Compounds by *Bacillus Subtilis* R14 of Bioactive. 2010, 53 (June), 643–652.
- Lagogianni, C. S.; Tsitsigiannis, D. I. Effective Biopesticides and Biostimulants to Reduce Aflatoxins in Maize Fields. *Front. Microbiol.* 2019, 10 (November), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02645>.
- Lal, N.; Jyoti, J.; Sachan, P. Optimization of Nitrogen Source(s) for the Growth and Amylase Production from *Bacillus Licheniformis* JAR-26 under Submerged Fermentation. *Indian J. Biol.* 2016, 3 (2), 127–132. <https://doi.org/10.21088/ijb.2394.1391.3216.6>.
- Lam, V. B.; Meyer, T.; Arias, A. A.; Ongena, M.; Oni, F. E.; Höfte, M. *Bacillus* Cyclic Lipopeptides Iturin and Fengycin Control Rice Blast Caused by *Pyricularia Oryzae* in

Potting and Acid Sulfate Soils by Direct Antagonism and Induced Systemic Resistance. *Microorganisms* 2021, 9(7), 1441; <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071441>.

Lan, Z.; Zhao, C.; Guo, W.; Guan, X.; Zhang, X. Optimization of Culture Medium for Maximal Production of Spinosad Using an Artificial Neural Network-Genetic Algorithm Modeling. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2015, 25 (4), 253–261. <https://doi.org/10.1159/000381312>.

Latorre, J. D.; Hernandez-Velasco, X.; Wolfenden, R. E.; Vicente, J. L.; Wolfenden, A. D.; Menconi, A.; Bielke, L. R.; Hargis, B. M.; Tellez, G. Evaluation and Selection of *Bacillus* Species Based on Enzyme Production, Antimicrobial Activity, and Biofilm Synthesis as Direct-Fed Microbial Candidates for Poultry. *Front. Vet. Sci.* 2016, 3 (OCT), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00095>.

Lebrun, M.; Miard, F.; Bucci, A.; Trupiano, D.; Nandillon, R.; Naclerio, G.; Scippa, G. S.; Morabito, D.; Bourgerie, S. Evaluation of Direct and Biochar Carrier-Based Inoculation of *Bacillus* Sp. on As- and Pb-Contaminated Technosol: Effect on Metal(Loid) Availability, *Salix Viminalis* Growth, and Soil Microbial Diversity/Activity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2021, 28 (9), 11195–11204. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11355-1>.

Lee, Y. J.; Kim, B. K.; Lee, B. H.; Jo, K. I.; Lee, N. K.; Chung, C. H.; Lee, Y. C.; Lee, J. W. Purification and Characterization of Cellulase Produced by *Bacillus Amyoliquefaciens* DL-3 Utilizing Rice Hull. *Bioresour. Technol.* 2008, 99 (2), 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.013>.

Legein, M.; Smets, W.; Vandenheuvel, D.; Eilers, T.; Muysshondt, B.; Prinsen, E.; Samson, R.; Lebeer, S. Modes of Action of Microbial Biocontrol in the Phyllosphere. *Front. Microbiol.* 2020, 11 (July). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01619>.

Li, M. S. M.; Piccoli, D. A.; McDowell, T.; MacDonald, J.; Renaud, J.; Yuan, Z. C. Evaluating the Biocontrol Potential of Canadian Strain *Bacillus Velezensis* 1B-23 via Its Surfactin Production at Various PHs and Temperatures. *BMC Biotechnol.* 2021, 21 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00690-x>.

Li, Y.; Héloir, M. C.; Zhang, X.; Geissler, M.; Trouvelot, S.; Jacquens, L.; Henkel, M.; Su, X.; Fang, X.; Wang, Q.; Adrian, M. Surfactin and Fengycin Contribute to the Protection of a *Bacillus Subtilis* Strain against Grape Downy Mildew by Both Direct Effect and Defence Stimulation. *Mol. Plant Pathol.* 2019, 20 (8), 1037–1050. <https://doi.org/10.1111/mpp.12809>.

Likert, R. A Technique for the Measurement of Attitudes. *Arch. of Psychol.* 1932 140, 1–55.

Lima, F. A.; Santos, O. S.; Pomella, A. W. V.; Ribeiro, E. J.; de Resende, M. M. Culture Medium Evaluation Using Low-Cost Substrate for Biosurfactants Lipopeptides Production by *Bacillus Amyoliquefaciens* in Pilot Bioreactor. *J. Surfactants Deterg.* 2020, 23 (1), 91–98. <https://doi.org/10.1002/jsde.12350>.

Lin, L.; Kan, X.; Yan, H.; Wang, D. Characterization of Extracellular Cellulose-Degrading Enzymes from *Bacillus Thuringiensis* Strains. *Electron. J. Biotechnol.* 2012, 15 (3), 1–7. <https://doi.org/10.2225/vol15-issue3-fulltext-1>.

Lin, L.Z.; Zheng, Q.W.; Wei, T.; Zhang, Z.Q.; Zhao, C.F.; Zhong, H.; Xu, Q.Y.; Lin, J.F. and Guo, L.Q., 2020. Isolation and Characterization of Fengycins Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* JFL21 and Its Broad-Spectrum Antimicrobial Potential Against Multidrug-Resistant Foodborne Pathogens. *Frontiers in microbiology*, 11, p.3319.

Lin, T. P.; Chen, C. L.; Fu, H. C.; Wu, C. Y.; Lin, G. H.; Huang, S. H.; Chang, L. K.; Liu, S. T. Functional Analysis of Fengycin Synthetase FenD. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 2005, 1730 (2), 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2005.02.005>.

Liu, D.; Li, K.; Hu, J.; Wang, W.; Liu, X.; Gao, Z. Biocontrol and Action Mechanism of *Bacillus Amyloliquefaciens* and *Bacillus Subtilis* in Soybean Phytophthora Blight. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20 (12). <https://doi.org/10.3390/ijms20122908>.

Liu, X.; Ren, B.; Chen, M.; Wang, H.; Kokare, C. R.; Zhou, X.; Wang, J.; Dai, H.; Song, F.; Liu, M.; Wang, J.; Wang, S.; Zhang, L. Production and Characterization of a Group of Bioemulsifiers from the Marine *Bacillus Velezensis* Strain H3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 87 (5), 1881–1893. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2653-9>.

Liu, X.; Ren, B.; Gao, H.; Liu, M.; Dai, H.; Song, F.; Yu, Z.; Wang, S.; Hu, J.; Kokare, C. R.; Zhang, L. Optimization for the Production of Surfactin with a New Synergistic Antifungal Activity. *PLoS One* 2012, 7 (5), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034430>.

Luo, C.; Liu, X.; Zhou, H.; Wang, X.; Chen, Z. Nonribosomal Peptide Synthase Gene Clusters for Lipopeptide Biosynthesis in *Bacillus Subtilis* 916 and Their Phenotypic Functions. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015, 81 (1), 422–431. <https://doi.org/10.1128/AEM.02921-14>.

Ma, L.; Lu, Y.; Yan, H.; Wang, X.; Yi, Y.; Shan, Y.; Liu, B.; Zhou, Y.; Lü, X. Screening of Cellulolytic Bacteria from Rotten Wood of Qinling (China) for Biomass Degradation and Cloning of Cellulases from *Bacillus Methylophilicus*. *BMC Biotechnol.* 2020, 20 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0593-8>.

Maftuah, E.; Saleh, M.; Pratiwi, E. The Potentials of Biochar from Agricultural Waste as a Carrier Material of Biofertilizer for Swamplands. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 2020, 980 (1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/980/1/012064>.

Mahato, D. K.; Lee, K.E.; Kamle, M.; Devi, S.; Dewangan, K.N.; Kumar, P.; Kang, S. G. Aflatoxins in food and feed: an overview on prevalence, detection and control strategies. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02266>.

Makowski, K.; Matusiak, K.; Borowski, S.; Bielnicki, J.; Tarazewicz, A.; Maroszyńska, M.; Leszczewicz, M.; Powalowski, S.; Gutarowska, B. Optimization of a Culture Medium Using the Taguchi Approach for the Production of Microorganisms Active in Odorous Compound Removal. *Appl. Sci.* 2017, 7 (8). <https://doi.org/10.3390/app7080756>.

Maksimov, I. V.; Maksimova, T. I.; Sarvarova, E. R.; Blagova, D. K.; Popov, V. O. Endophytic Bacteria as Effective Agents of New-Generation Biopesticides (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 2018, 54 (2), 128–140. <https://doi.org/10.1134/S0003683818020072>.

Malbaša, R.; Vitas, J.; Vukmanović, S. Analitička hemija: praktikum sa random sveskom. Tehnološki fakultet Novi Sad, 2021.

- Mandenijs, C.-F.; Brundin, A. REVIEW : BIOCATALYSTS AND BIOREACTOR DESIGN, Bioprocess Optimization, Using Design-of-Experiments Methodology. *Biotechnol. Progr.* 2008, 24 (6), 1191–1203. <https://doi.org/10.1021/bp.67>.
- Mangal, M.; Bansal, S.; Sharma, M. Macro and micromorphological characterization of different *Aspergillus* isolates. *Legum. Res.* 2014, 37, 372–378. <https://doi.org/10.5958/0976-0571.2014.00646.8>.
- Manhar, A. K.; Bashir, Y.; Saikia, D.; Nath, D.; Gupta, K.; Konwar, B. K.; Kumar, R.; Namsa, N. D.; Mandal, M. Cellulolytic Potential of Probiotic *Bacillus Subtilis* AMS6 Isolated from Traditional Fermented Soybean (Churpi): An in-Vitro Study with Regards to Application as an Animal Feed Additive. *Microbiol. Res.* 2016, 186–187, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.03.004>.
- Manjula K.; Podile A.R. Production of fungal cell wall degrading enzymes by a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF 1. *Indian J Exp Biol.* 2005, 43, 10, 892–6. PMID: 16235723.
- Mantelin, S.; Touraine, B. Plant Growth-Promoting Bacteria and Nitrate Availability: Impacts on Root Development and Nitrate Uptake. *J. Exp. Bot.* 2004, 55 (394), 27–34. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh010>.
- Massomo, S.M.S. *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in the maize value chain and what needs to be done in Tanzania. *Sci. African.* 2020, 10, e00606. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00606>.
- Masum, M. M. I.; Liu, L.; Yang, M.; Hossain, M. M.; Siddiqa, M. M.; Supty, M. E.; Ogunyemi, S. O.; Hossain, A.; An, Q.; Li, B. Halotolerant Bacteria Belonging to Operational Group *Bacillus Amyloliquefaciens* in Biocontrol of the Rice Brown Stripe Pathogen *Acidovorax Oryzae*; 2018; Vol. 125. <https://doi.org/10.1111/jam.14088>.
- Matar, S. M.; El-Kazzaz, S. A.; Wagih, E. E.; El-Diwany, A. I.; Moustafa, H. E.; El-Saadani, M. A.; Abo-Zaid, G. A.; Hafez, E. E. Bioprocessing and Scaling-up Cultivation of *Bacillus Subtilis* as a Potential Antagonist to Certain Plant Pathogenic Fungi, III. *Biotechnology* 2009, 8 (1), 138–143. <https://doi.org/10.3923/biotech.2009.138.143>.
- Mazeed, T. Optimization of Nutrient Composition Medium and Culture Condition for Mannanase Production By *Bacillus Velezensis* Nrc-1 Using Taguchi Method. *Al-Azhar J. Pharm. Sci.* 2012, 45 (1), 198–207. <https://doi.org/10.21608/ajps.2012.7240>.
- Medeot, D. B.; Bertorello-Cuenca, M.; Liaudat, J. P.; Alvarez, F.; Flores-Cáceres, M. L.; Jofré, E. Improvement of Biomass and Cyclic Lipopeptides Production in *Bacillus Amyloliquefaciens* MEP218 by Modifying Carbon and Nitrogen Sources and Ratios of the Culture Media. *Biol. Control* 2017, 115 (October), 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.10.002>.
- Medeot, D. B.; Fernandez, M.; Morales, G. M.; Jofré, E. Fengycins From *Bacillus Amyloliquefaciens* MEP218 Exhibit Antibacterial Activity by Producing Alterations on the Cell Surface of the Pathogens *Xanthomonas Axonopodis* Pv. *Vesicatoria* and *Pseudomonas Aeruginosa* PA01. *Front. Microbiol.* 2020, 10 (January), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03107>.

Medina, A.; Rodriguez, A.; Magan, N. Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin b1 production. *Front. Microbiol.* 2014, 5, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00348>.

Meena, K. R.; Dhiman, R.; Singh, K.; Kumar, S.; Sharma, A.; Kanwar, S. S.; Mondal, R.; Das, S.; Franco, O. L.; Mandal, A. K. Purification and Identification of a Surfactin Biosurfactant and Engine Oil Degradation by *Bacillus Velezensis* KLP2016. *Microb. Cell Fact.* 2021, 20 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01519-0>.

Meena, K. R.; Kanwar, S. S. Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. *Biomed Res. Int.* 2015, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/473050>.

Mejri, S.; Siah, A.; Coutte, F.; Magnin-Robert, M.; Randoux, B.; Tisserant, B.; Krier, F.; Jacques, P.; Reignault, P.; Halama, P. Biocontrol of the Wheat Pathogen *Zymoseptoria Tritici* Using Cyclic Lipopeptides from *Bacillus Subtilis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2018, 25 (30), 29822–29833. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9241-9>.

Meng, Q. X.; Jiang, H. H.; Hanson, L. E.; Hao, J. J. Characterizing a Novel Strain of *Bacillus Amylolyquefaciens* BAC03 for Potential Biological Control Application. *J. Appl. Microbiol.* 2012, 113 (5), 1165–1175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05420.x>.

Milić, D.; Novaković, T.; Grahovac, M.; Budakov, D.; Grahovac, J.; Vlajkov, V. Analiza proizvodno ekonomskih obeležja kukuruza u Srbiji, Letopis naučnih radova/Annals of Agronomy, 2020, 44 (2), 176–186. <https://img1.wsimg.com/blobby/go/09dd52a6-7efa-4d8f-b2fe-7dc8bcc44d4a/downloads/Proizvodno%20ekonomski%20zna%20C4%8Daj%20kukuruza%20u%20poljopr.pdf?ver=1608708103340>.

Milić, D.; Novaković, T.; Grahovac, M.; Budakov, D.; Grahovac, J.; Vlajkov, V.: Analysis of pesticide imports in the Republic of Serbia In Book of Abstracts of the International Symposium on Agricultural Sciences AgroReS 2021, p. 120X, Trebinje, Bosnia and Herzegovina, 27-29. May 2021.

Milićević, D.; Nedeljković-Trailović, J.; Mašić, Z. Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, Mikotoksini u Lancu Ishrane – Analiza Rizika i Značaj Za Javno Zdravstvo / Mycotoxins in Food Chain – Risk Assessment and Importance for Public Health. *Tehno. mesa / Meat Technol.* 2014, 55 (1), 22–38.

Milijašević-Marčić, S.; Todorović, V.; Stanojević, O.; Berić, T.; Stanković, S.; Todorović, B.; Potočnik, I. Antagonistic Potential of *Bacillus* Spp. Isolates against Bacterial Pathogens of Tomato and Fungal Pathogen of Pepper. *Pestic. i fitomedicina* 2018, 33 (1), 9–18. <https://doi.org/10.2298/pif1801009m>.

Miljaković, D.; Marinković, J.; Balešević-Tubić, S. The Significance of *Bacillus* Spp. In Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. *Microorganisms* 2020, 8 (7), 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>.

Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede. Lista sredstava za zaštitu bilja. https://www.uzb.minpolj.gov.rs/attachments/524_Lista_sredstava_za_zastitu_bilja15maj.pdf (pristupljeno 18.07.2021.)

Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede. Lista sredstava za zaštitu bilja za organsku proizvodnju. https://novi.uzb.minpolj.gov.rs/wp-content/uploads/2021/05/Lista_sredstava_za_zas_bilja_za_org_proizvodnju_na_dan_14. (pristupljeno 15.07.2021.).

Mitchell, N. J.; Bowers, E.; Hurburgh, C.; Wu, F. Potential Economic Losses to the US Corn Industry from Aflatoxin Contamination. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 2016, 33 (3), 540–550. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1138545>.

Moghannem, S. A. M.; Farag, M. M. S.; Shehab, A. M.; Azab, M. S. Exopolysaccharide Production from *Bacillus Velezensis* KY471306 Using Statistical Experimental Design. *Brazilian J. Microbiol.* 2018, 49 (3), 452–462. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.012>.

Mogollón, J. M.; Beusen, A. H. W.; van Grinsven, H. J. M.; Westhoek, H.; Bouwman, A. F. Future Agricultural Phosphorus Demand According to the Shared Socioeconomic Pathways. *Glob. Environ. Chang.* 2018, 50 (April), 149–163. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2018.03.007>.

Mohamed, M.S.; Tan, J.S.; Mohamad, R.; Mokhtar, M.N.; Ariff, A. B. Comparative Analyses of Response Surface Methodology and Artificial Neural Network on Medium Optimization for *Tetraselmis* sp. FTC209 Grown under Mixotrophic Condition. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–14. doi:10.1155/2013/948940

Montesinos, E. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *Int. Microbiol.* 2003, 6 (4), 245–252. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0144-x>.

Mora, I.; Cabrefiga, J.; Montesinos, E. Cyclic Lipopeptide Biosynthetic Genes and Products, and Inhibitory Activity of Plant-Associated *Bacillus* against Phytopathogenic Bacteria. *PLoS One* 2015, 10 (5), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127738>.

Moshtagh, B.; Hawboldt, K.; Zhang, B. Optimization of Biosurfactant Production by *Bacillus Subtilis* N3-1P Using the Brewery Waste as the Carbon Source. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 2019, 40 (25), 3371–3380. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1473502>.

Mosier, C. I. I. Problems and Designs of Cross-Validation I. *Educ. Psychol. Meas.* 1951, 11 (1), 5–11. <https://doi.org/10.1177/001316445101100101>.

Mota, M.S.; Gomes, C.B.; Souza Júnior, I.T.; Moura, A.B. Bacterial selection for biological control of plant disease: criterion determination and validation. *Brazilian J. Microbiol.* 2017, 48, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.003>.

Mounsef, J. R.; Salameh, D.; Louka, N.; Brandam, C.; Lteif, R. The Effect of Aeration Conditions, Characterized by the Volumetric Mass Transfer Coefficient K_La , on the Fermentation Kinetics of *Bacillus Thuringiensis* Kurstaki. *J. Biotechnol.* 2015, 210, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.387>.

Mrkovački, N.; Đalović, I.; Jarak, M.; Bjelić, D.; Adamović, D. Mikroorganizmi u rizosferi: uloga iznačaj u održivoj poljoprivredi. *Bilten za alternativne biljne vrste*. 2012, 44, 85, 40–49.

Mukherjee, R.; Chakraborty, R.; Dutta, A. Comparison of Optimization Approaches (Response Surface Methodology and Artificial Neural Network-Genetic Algorithm) for a Novel Mixed Culture Approach in Soybean Meal Fermentation. *J. Food Process Eng.* 2019, 42 (5), 1–10. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13124>.

Mullins, A. J.; Li, Y.; Qin, L.; Hu, X.; Xie, L.; Gu, C.; Mahenthiralingam, E.; Liao, X.; Webster, G. Reclassification of the Biocontrol Agents *Bacillus Subtilis* By-2 and Tu-100 as *Bacillus Velezensis* and Insights into the Genomic and Specialized Metabolite Diversity of the Species. *Microbiol. (United Kingdom)* 2020, 166 (12), 1121–1128. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000986>.

Nabti, E. Growth Stimulation of *Phaseolus Vulgaris* L Plantules by Strain *Bacillus Amyloliquefaciens* Hla Producer of Beneficial Agricultural Enzymes. *JOJ Hortic. Arboric.* 2018, 2 (2), 19–25. <https://doi.org/10.19080/jojha.2018.02.555581>.

Nadeem, A.; Sharma, A.; Deka, D.; Jawed, M.; Goyal, D.; Goyal, A. Characterization of Cellulase Producing *Bacillus* sp for Effective Degradation of Leaf Litter Biomass. *Environ. Progr. Sustain. Energy.* 2013. [10.1002/ep.11726](https://doi.org/10.1002/ep.11726).

Nakano, M. M.; Zuber, P. "Strict Aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annu. Rev. Microbiol.* 1998, 52, 165–1990.

Narodna skupština Republike Srbije.
http://www.parlament.gov.rs/upload/archive/files/lat/pdf/predlozi_zakona/2018/3544-18%20LAT.pdf (pristupljeno 05.07.2021.)

Nastasija, M.; Mirjana, J.; Ivica, D.; Djordje, J. Importance of PGPR Application and Its Effect on Microbial Activity in Maize Rhizosphere. *Ratar. i Povrt.* 2012, 49 (3), 335–344. <https://doi.org/10.5937/ratpov49-1915>.

Nawaz, M. A.; Pervez, S.; Jamal, M.; Jan, T.; Khan, W.; Rauf, A.; Aman, A.; Qader, S. A. U. Maltose Deterioration Approach: Catalytic Behavior Optimization and Stability Profile of Maltase from *Bacillus Licheniformis* KIBGE-IB4. *Biotechnol. Reports* 2019, 24, e00400. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00400>.

Nikolić, M. *Aspergillus parasiticus* Speare – toksigena vrsta gljive na zrnju kukuruza u proizvodnim uslovima Srbije. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Srbija. 2018.

Ngalimat, M. S.; Yahaya, R. S. R.; Baharudin, M. M. A. A.; Yaminudin, S. M.; Karim, M.; Ahmad, S. A.; Sabri, S. A Review on the Biotechnological Applications of the Operational Group *Bacillus Amyloliquefaciens*. *Microorganisms* 2021, 9 (3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030614>.

Nor, N. M.; Mohamed, M. S.; Loh, T. C.; Foo, H. L.; Rahim, R. A.; Tan, J. S.; Mohamad, R. Comparative Analyses on Medium Optimization Using One-Factor-at-a-Time, Response Surface Methodology, and Artificial Neural Network for Lysine–Methionine Biosynthesis by *Pediococcus Pentosaceus* RF-1. *Biotechnol. Equip.* 2017, 31 (5), 935–947. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1335177>.

Novaković, T. Analiza bruto dodate vrednosti poljoprivrede u Republici Srbiji (The analysis of gross value added of agricultural production in the Republic of Serbia). *Ekonomске ideje i praksa*. 2019, 32, 39–56.

Official Journal of the European Union Directive 200/128/EC of the European Parliament and of the Council, 2009, Brussels.

Oh, J.S.; Kim, B.G.; Park, T.H. 2002. Importance of specific growth rate for subtilisin expression in fed-batch cultivation of *Bacillus subtilis* spoII^G mutant. *Enzyme Microb. Technol.* 2002, 30, 747-751. [https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(02\)00052-2](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(02)00052-2).

Ohno, A.; Ano, T.; Shoda, M. Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, Iturin A and Surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* R14, in solid-state fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1995, 80, 5, 517-519.

Okaiyeto, K.; Nwodo, U. U.; Okoli, A. S.; Mabinya, L. V.; Okoh, A. I. Studies on Biofloculant Production by *Bacillus* Sp. AEMREG7. *Polish J. Environ. Stud.* 2016, 25 (1), 241–250. <https://doi.org/10.15244/pjoes/59331>.

Okayo, R.O.; Andika, D.O.; Dida, M. M.; K'otuto, G.O.; Gichimu, B. M. Morphological and molecular characterization of toxigenic *Aspergillus flavus* from groundnut kernels in Kenya. *Int. J. Microbiol.* 2020, 2020, 8854718. <https://doi.org/10.1155/2020/8854718>.

Olanbiwoninu, A. A.; Fasiku, S. Production of Bacterial Amylases and Cellulases Using Sweet Potato (*Ipomoea Batatas*. (L.) Lam.) Peels. *African J. Biochem. Res.* 2015, 9 (9), 104–109. <https://doi.org/10.5897/ajbr2015.0841>.

Oleńska, E.; Małek, W.; Wójcik, M.; Swiecicka, I.; Thijs, S.; Vangronsveld, J. Beneficial Features of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Improving Plant Growth and Health in Challenging Conditions: A Methodical Review; Elsevier B.V, 2020; Vol. 743. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140682>.

Oliveira, C.A.F.; Gonçalves, N.B.; Rosim, R.E.; Fernandes, A.M. Determination of aflatoxins in peanut products in the northeast region of São Paulo, Brazil. *Int. J. Mol. Sci.* 2009, 10, 174-183. <https://doi.org/10.3390/ijms10010174>.

Ongena, M.; Jacques, P. *Bacillus* Lipopeptides: Versatile Weapons for Plant Disease Biocontrol. *Trends Microbiol.* 2008, 16 (3), 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>.

Orji, F. A.; Dike, E. N.; Lawal, A. K.; Elemo, G. N.; Olatope, S. O. A.; Famotemi, A. C.; Itoandon, E. E.; Suberu, Y. L.; Asieba, G. O.; Sadiq, A. O.; Olasore, O.; Okafor, E. N.; Ugbana, A. I.; Adefiranye, A. O. Production of Cellulase from *Bacillus* Species Using Cellulose from Brewers Spent Grain (BSG) as Sole Carbon Source. *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.* 2013, 15 (4), 839–848.

Ostry, V.; Malir, F.; Toman, J.; Grosse, Y. Mycotoxins as Human Carcinogens—the IARC Monographs Classification. *Mycotoxin Res.* 2017, 33 (1), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0265-7>.

Ostry, V.; Toman, J.; Grosse, Y.; Malir, F. Cyclopiazonic acid: 50th anniversary of its discovery. *World Mycotoxin J.* 2018, 11, 135-148. DOI 10.3920/WMJ2017.2243.

Padmalatha, K.; Prasad, M.N.V. Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from peninsular India. *African J. Biotechnol.* 2006, 5, 230–234. <https://doi.org/10.4314/ajb.v5i3>.

Pajčin, I.; Grahovac, J.; Dodić, J.; Vlajkov, V.; Dodić, S.; Rončević, Z.; Mitrović, I. Utilization of Raw Glycerol from Biodiesel Industry for Production of Microbial Biocontrol Agents. In *Proceedings of the 5th Jubilee Virtual International Conference on Science, Technology and Management in Energy (eNergetics 2019)*; Niš, Serbia, 2019; pp 11–17.

Pajčin, I.; Vlajkov, V.; Frohme, M.; Grebinyk, S.; Grahovac, M.; Mojićević, M.; Grahovac, J. Pepper bacterial spot control by *Bacillus velezensis*: bioprocess solution. *Microorganisms* 2020, 8, 1–22. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101463>.

Palazzini, J. M.; Dunlap, C. A.; Bowman, M. J.; Chulze, S. N. *Bacillus Velezensis* RC 218 as a Biocontrol Agent to Reduce Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol Accumulation: Genome Sequencing and Secondary Metabolite Cluster Profiles. *Microbiol. Res.* 2016, 192, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.002>.

Pane, C.; Villecco, D.; Campanile, F.; Zaccardelli, M. Novel Strains of *Bacillus*, Isolated from Compost and Compost-Amended Soils, as Biological Control Agents against Soil-Borne Phytopathogenic Fungi. *Biocontrol Sci. Technol.* 2012, 22 (12), 1373–1388. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.729143>.

Papić Brankov, T.; Jovanović, M.; Grujić, B. Aflatoxin standards and maize trade. *Ekonom. Poljopr.* 2013, 60, 595–607.

Parikh, L.; Eskelson, M. J.; Adesemoye, A. O. Relationship of in Vitro and in Planta Screening: Improving the Selection Process for Biological Control Agents against Fusarium Root Rot in Row Crops. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 2018, 51 (3–4), 156–169. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1441098>.

Penha, R. O.; Vandenberghe, L. P. S.; Faulds, C.; Soccol, V. T.; Soccol, C. R. *Bacillus* Lipopeptides as Powerful Pest Control Agents for a More Sustainable and Healthy Agriculture: Recent Studies and Innovations. *Planta* 2020, 251 (3), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03357-7>.

Perez, K. J.; Viana, J. dos S.; Lopes, F. C.; Pereira, J. Q.; dos Santos, D. M.; Oliveira, J. S.; Velho, R. V.; Crispim, S. M.; Nicoli, J. R.; Brandelli, A.; Nardi, R. M. D. *Bacillus* Spp. Isolated from Puba as a Source of Biosurfactants and Antimicrobial Lipopeptides. *Front. Microbiol.* 2017, 8 (JAN), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00061>.

Pérez-García, A.; Romero, D.; de Vicente, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of bacilli in agriculture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011, 22, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>.

Perumal, V.; Yao, Z.; Kim, J. A.; Kim, H. J.; Kim, J. H. Purification and Characterization of a Bacteriocin, BacBS2, Produced by *Bacillus Velezensis* BS2 Isolated from Meongge Jeotgal. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2019, 29 (7), 1033–1042. <https://doi.org/10.4014/jmb.1903.03065>.

Plant Protection Directorate, Ministry of Agriculture, Water Management and Forestry (2020), Data on imports of plant protection products and active substances for the period 2015-2020, obtained on request from the author.

Plaza, G.; Chojniak, J.; Rudnicka, K.; Paraszkiwicz, K.; Bernat, P. Detection of Biosurfactants in *Bacillus* Species: Genes and Products Identification. *J. Appl. Microbiol.* 2015, 119 (4), 1023–1034. <https://doi.org/10.1111/jam.12893>.

Pliego, C.; Ramos, C.; de Vicente, A.; Cazorla, F. M. Screening for Candidate Bacterial Biocontrol Agents against Soilborne Fungal Plant Pathogens. *Plant Soil* 2011, 340 (1), 505–520. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0615-8>.

Posada-Urbe, L. F.; Romero-Tabarez, M.; Villegas-Escobar, V. Effect of Medium Components and Culture Conditions in *Bacillus Subtilis* EA-CB0575 Spore Production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2015, 38 (10), 1879–1888. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1428-1>.

Prashar, P.; Kapoor, N.; Sachdeva, S. Biocontrol of Plant Pathogens Using Plant Growth Promoting Bacteria In Sustainable Agriculture Reviews pp.319-360, 2013. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5961-9_10.

Price, M.S.; Yu, J.; Nierman, W.C.; Kim, H.S.; Pritchard, B.; Jacobus, C.A.; Bhatnagar, D.; Cleveland, T.E.; Payne, G.A. The aflatoxin pathway regulator AflR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006, 255, 275–279. ; doi:10.3390/toxins12030150.

Price, N. P. J.; Rooney, A. P.; Swezey, J. L.; Perry, E.; Cohan, F. M. Mass Spectrometric Analysis of Lipopeptides from *Bacillus* Strains Isolated from Diverse Geographical Locations. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007, 271 (1), 83–89. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00702.x>.

Priest, F.G.; Goodfellow, M., L. Shute, A.; Berkeley R.C.W. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov. *nom. rev. IJSB.* 1987, 37, 1, 69–71. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-1-69>.

Probst, C.; Cotty, P.J.; Harris, S. Relationships between in vivo and in vitro aflatoxin production: Reliable prediction of fungal ability to contaminate maize with aflatoxins. *Fungal Biol.* 2012, 116 (4), 503–510. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.02.001>.

Pusey, P. L. Use of *Bacillus Subtilis* and Related Organisms as Biofungicides. *Pestic. Sci.* 1989, 27 (2), 133–140. <https://doi.org/10.1002/ps.2780270204>.

Putri, B. R.; Santoso, I.; Yasman, Y. Antagonistic Potential of *Bacillus Siamensis* LDR against *Aspergillus Niger* ABP and ART. *AIP Conf. Proc.* 2020, 2242 (June), 0–7. <https://doi.org/10.1063/5.0012314>.

Radhakrishnan, R.; Hashem, A.; Abd Allah, E. F. *Bacillus*: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. *Front. Physiol.* 2017, 8 (SEP), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00667>.

Rafigh, S. M.; Yazdi, A. V.; Vossoughi, M.; Safekordi, A. A.; Ardjmand, M. Optimization of Culture Medium and Modeling of Curdlan Production from *Paenibacillus Polymyxa*

by RSM and ANN. *Int. J. Biol. Macromol.* 2014, 70, 463–473. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.034>.

Rajkumar, K.; Naik, M.K.; Amaresh, Y.S.; Mahadevaswamy; Chennappa, G.; Ravikiran. Bioefficacy of *Bacillus subtilis* against *Aspergillus flavus*, the cause of aflatoxin contamination in chilli. *Int. J. Chem. Sci.* 2018, 6 (6), 2050–2053.

Ramarathnam, R.; Bo, S.; Chen, Y.; Fernando, W. G. D.; Xuwen, G.; De Kievit, T. Molecular and Biochemical Detection of Fengycin- and Bacillomycin D-Producing *Bacillus* Spp., Antagonistic to Fungal Pathogens of Canola and Wheat. *Can. J. Microbiol.* 2007, 53 (7), 901–911. <https://doi.org/10.1139/W07-049>.

Rangarajan, V.; Clarke, K. G. Process Development and Intensification for Enhanced Production of *Bacillus* Lipopeptides. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2015, 31 (1–2), 46–68. <https://doi.org/10.1080/02648725.2016.1166335>.

Rangarajan, V.; Clarke, K. G. Towards Bacterial Lipopeptide Products for Specific Applications — a Review of Appropriate Downstream Processing Schemes. *Process Biochem.* 2016, 51 (12), 2176–2185. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.08.026>.

Rathnan, R.K.; John, D.; Balasaravanan, T. Isolation, screening, identification and optimized production of extracellular cellulase from *Bacillus subtilis* using cellulosic waste as carbon source. *JMBFS.* 2013, 2, 2383–2386.

Razzaghi-Abyaneh, M.; Shams-Ghahfarokhi, M.; Allameh, A.; Kazeroon-Shiri, A.; Ranjbar-Bahadori, S.; Mirzahoseini, H.; Rezaee, M.B.A. Survey on distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in corn field soils in Iran: Population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. *Mycopathologia* 2006, 161, 183–192. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0242-8>.

Reddy, K. V.; Lakshmi, T. V.; Reddy, A. V. K.; Bindu, V. H.; Narasu, M. L. Isolation, Screening, Identification and Optimized Production of Extracellular Cellulase from *Bacillus Subtilis* Sub.Sps Using Cellulosic Waste as Carbon Source. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2016, 5 (4), 442–451. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.504.052>.

Reddy, M. V.; Mawatari, Y.; Onodera, R.; Nakamura, Y.; Yajima, Y.; Chang, Y. C. Bacterial Conversion of Waste into Polyhydroxybutyrate (PHB): A New Approach of Bio-Circular Economy for Treating Waste and Energy Generation. *Bioresour. Technol. Reports* 2019, 7 (April), 100246. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100246>.

Republički zavod za statistiku (2000–2019), Statistički godišnjaci, Beograd.

RHMZ, Godišnja agrometeorološka analiza:
<http://www.hidmet.gov.rs/data/agro/godina.pdf>.

RHMZ, Godišnji bilten za Srbiju, 2019
<http://www.hidmet.gov.rs/data/klimatologija/latin/2020.pdf>.

RHMZ, Godišnji bilten za Srbiju, 2019.
<http://www.hidmet.gov.rs/data/klimatologija/latin/2019.pdf>.

Roberts, M. S.; Nakamura, L. K.; Cohan, F. M. *Bacillus Vallismortis* Sp. Nov., a Close Relative of *Bacillus Subtilis*, Isolated from Soil in Death Valley, California. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996, 46 (2), 470–475. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-2-470>.

Rodrigues, P.; Venâncio, A.; Kozakiewicz, Z.; Lima, N. A Polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *Int. J. Food Microbiol.* 2009, 129, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.023>.

Rodríguez-Chávez, J. L.; Juárez-Campusano, Y. S.; Delgado, G.; Pacheco Aguilar, J. R. Identification of Lipopeptides from *Bacillus* Strain Q11 with Ability to Inhibit the Germination of *Penicillium Expansum*, the Etiological Agent of Postharvest Blue Mold Disease. *Postharvest Biol. Technol.* 2019, 155 (April), 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.05.011>.

Romero, D.; De Vicente, A.; Rakotoaly, R. H.; Dufour, S. E.; Veening, J. W.; Arrebola, E.; Cazorla, F. M.; Kuipers, O. P.; Paquot, M.; Pérez-García, A. The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus Subtilis* toward *Podospaera Fusca*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2007, 20 (4), 430–440. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>.

Rong, S.; Xu, H.; Li, L.; Chen, R.; Gao, X.; Xu, Z. Antifungal activity of endophytic *Bacillus safensis* b21 and its potential application as a biopesticide to control rice blast. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2020, 162, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.09.003>.

Różewicz, M.; Wyzińska, M.; Grabiński, J. The most important fungal diseases of cereals—problems and possible solutions. *Agronomy* 2021, 11, 714. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040714>.

Saimmai, A.; Rukadee, O.; Sobhon, V.; Maneerat, S. Biosurfactant Production by *Bacillus Subtilis* TD4 and *Pseudomonas Aeruginosa* SU7 Grown on Crude Glycerol Obtained from Biodiesel Production Plant as Sole Carbon Source. *J. Sci. Ind. Res. (India)*. 2012, 71 (6), 396–406.

Samada, L. H.; Tambunan, U. S. F. Biopesticides as Promising Alternatives to Chemical Pesticides: A Review of Their Current and Future Status. *Online J. Biol. Sci.* 2020, 20 (2), 66–76. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2020.66.76>.

Santoso, I.; Fadhilah, Q. G.; Maryanto, A. E. Characterization of Potential Biocontrol Agent *Bacillus* Sp . 2021, 050002 (July).

Santoyo, G.; del Orozco-Mosqueda, M.C.; Govindappa, M. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: A Review. *Biocontrol Sci. Technol.* 2012, 22, 855–872. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>.

Sarrafzadeh, M. H.; Schorr-Galindo, S.; La, H. J.; Oh, H. M. Aeration Effects on Metabolic Events during Sporulation of *Bacillus Thuringiensis*. *J. Microbiol.* 2014, 52 (7), 597–603. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3547-9>.

Sarwar, A.; Hassan, M. N.; Imran, M.; Iqbal, M.; Majeed, S.; Brader, G.; Sessitsch, A.; Hafeez, F. Y. Biocontrol Activity of Surfactin A Purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217

against Rice Bakanae Disease. *Microbiol. Res.* 2018, 209 (January), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.006>.

Satapute, P.; Hiremath, G.; Satapute, P. P.; Shetti, H. S.; Kulkarni, A. A.; Hiremath, A. G.; Shivsharan, G. B.; Kaliwal, B. B. Isolation and Characterization of Nitrogen Fixing *Bacillus Subtilis* Strain As-4 from Agricultural Soil Pesticides Effect on Soil. *Int. J. Recent Sci. Res.* 2012, 3 (9), 762–765.

Savić, Z.; Dudaš, T.; Loc, M.; Grahovac, M.; Budakov, D.; Jajić, I.; Krstović, S.; Barošević, T.; Krska, R.; Sulyok, M.; Stojšin, V.; Petreš, M.; Stankov, A.; Vukotić, J.; Bagi, F. Biological control of aflatoxin in maize grown in Serbia. *Toxins.* 2020, 12, 1–11. <https://doi.org/10.3390/toxins12030162>.

Saxena, J.; Rana, G.; Pandey, M. Impact of Addition of Biochar along with *Bacillus* Sp. on Growth and Yield of French Beans. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 2013, 162, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.08.002>.

Schisler, D. A.; Slininger, P. J.; Behle, R. W.; Jackson, M. A. Formulation of *Bacillus* Spp. for Biological Control of Plant Diseases. *Phytopathology* 2004, 94 (11), 1267–1271. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1267>.

Sehrawat, A.; Sindhu, S. S. Potential of Biocontrol Agents in Plant Disease Control for Improving Food Safety. *Def. Life Sci. J.* 2019, 4 (4), 220–225. <https://doi.org/10.14429/dlsj.4.14966>.

Seiber, J. N.; Coats, J.; Duke, S. O.; Gross, A. D. Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62 (48), 11613–11619. <https://doi.org/10.1021/jf504252n>.

Sen, R., & Swaminathan, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. *Process Biochem.* 2005, 40(9), 2953–2958. doi:10.1016/j.procbio.2005.01.014.

Sendi, Y.; Pfeiffer, T.; Koch, E.; Mhadhbi, H.; Mrabet, M. Potential of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) root microbiome in the biocontrol of root rot disease and traits of performance. *J. Plant Dis. Prot.* 2020, 127, 453–462. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00338-6>.

Sethuraman, G.; Zain, N.A.M.; Yusoff, S.; Ng, Y.M.; Baisakh, N.; Cheng, A. Revamping ecosystem services through agroecology—the case of cereals. *Agric.* 2021, 11, 1–14. <https://doi.org/10.3390/agriculture11030204>.

Shafi, J.; Tian, H.; Ji, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: A Review. *Biotechnol. Equip.* 2017, 31, 446–459. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>.

Shahid, I.; Han, J.; Hanoq, S.; Malik, K. A.; Borchers, C. H.; Mehnaz, S. Profiling of Metabolites of *Bacillus* Spp. and Their Application in Sustainable Plant Growth Promotion and Biocontrol. *Front. Sustain. Food Syst.* 2021, 5 (February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.605195>.

Sharma, R. R.; Singh, D.; Singh, R. Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables by Microbial Antagonists: A Review. *Biol. Control* 2009, 50 (3), 205–221. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.001>.

Sheppard, J.D.; Jumarie, C.; Cooper, D.G.; Laprade, R. Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica acta – Biomembranes* 1991, 1064, 13–23. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(91\)90406-X](https://doi.org/10.1016/0005-2736(91)90406-X).

Shi, J.; Zhu, X.; Lu, Y.; Zhao, H.; Lu, F.; Lu, Z. Improving Iturin A Production of *Bacillus Amyloliquefaciens* by Genome Shuffling and Its Inhibition against *Saccharomyces Cerevisiae* in Orange Juice. *Front. Microbiol.* 2018, 9 (NOV), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02683>.

Shiferaw, B.; Prasanna, B. M.; Hellin, J.; Bänziger, M. Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Secur.* 2011, 3 (3), 307–327. <https://doi.org/10.1007/s12571-011-0140-5>.

Shih, I. L.; Lin, C. Y.; Wu, J. Y.; Hsieh, C. Production of Antifungal Lipopeptide from *Bacillus Subtilis* in Submerged Fermentation Using Shake Flask and Fermentor. *Korean J. Chem. Eng.* 2009, 26 (6), 1652–1661. <https://doi.org/10.1007/s11814-009-0237-0>.

Shuping, D.S.S.; Eloff, J. N. The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens : A review. *Afr J Tradit Complement Altern Med* . 2017, 14, 120–127.

Siahmoshteh, F.; Hamidi-Esfahani, Z.; Spadaro, D.; Shams-Ghahfarokhi, M.; Razzaghi-Abyaneh, M. Unraveling the mode of antifungal action of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* as potential biocontrol agents against aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Food Control.* 2018, 89, 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.010>.

Singh, B.; Satyanarayana, T. Microbial Phytases in Phosphorus Acquisition and Plant Growth Promotion. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 2011, 17 (2), 93–103. <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0062-x>.

Singh, D. P.; Prabha, R.; Gupta, V. K.; Verma, M. K. Metatranscriptome Analysis Deciphers Multifunctional Genes and Enzymes Linked with the Degradation of Aromatic Compounds and Pesticides in the Wheat Rhizosphere. *Front. Microbiol.* 2018, 9 (JUL), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01331>.

Singh, D.; Kumar Yadav, D. Potential of *Bacillus Amyloliquefaciens* for Biocontrol of Bacterial Wilt of Tomato Incited by *Ralstonia Solanacearum*. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 2016, 07 (01), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000327>.

Singh, V.; Haque, S.; Niwas, R.; Srivastava, A.; Pasupuleti, M.; Tripathi, C. K. M. Strategies for Fermentation Medium Optimization: An in-Depth Review. *Front. Microbiol.* 2017, 7 (JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087>.

Siu-Rodas, Y.; Calixto-Romo, M. de los A.; Guillén-Navarro, K.; Sánchez, J. E.; Zamora-Briseño, J. A.; Amaya-Delgado, L. *Bacillus Subtilis* with Endocellulase and Exocellulase Activities Isolated in the Thermophilic Phase from Composting with Coffee Residues. *Rev. Argent. Microbiol.* 2018, 50 (3), 234–243. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.08.005>.

Slininger, P. J.; Behle, R. W.; Jackson, M. A.; Schisler, D. A. Discovery and Development of Biological Agents to Control Crop Pests. *Neotrop. Entomol.* 2003, 32 (2), 183–195. <https://doi.org/10.1590/s1519-566x2003000200001>.

Smith, E.E.; Kubena, L.F.; Braithwaite, C.E.; Harvey, R.B.; Phillips, T.D.; A.H. Reine. Toxicological evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid in broiler chickens. *Poult. Sci.* 1992, 71, 1136–1144. <https://doi.org/10.3382/ps.0711136>.

Soccol, C. R.; Pollom, T. E. V.; Fendrich, R. C.; Prochmann, F. A.; Mohan, R.; Moreira Blaskowski, M. M.; De Almeida Melo, A. L.; Barros de Carvalho, C. J.; Thomaz-Soccol, V. Development of a Low Cost Bioprocess for Endotoxin Production by *Bacillus Thuringiensis* Var *Israelensis* Intended for Biological Control of *Aedes Aegypti*. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 2009, 52 (SPL.ISS.), 121–130. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000700017>.

Sousa, M.; Dantas, I. T.; Felix, A. K. N.; de Sant'ana, H. B.; Melo, V. M. M.; Gonçalves, L. R. B. Crude Glycerol from Biodiesel Industry as Substrate for Biosurfactant Production by *Bacillus Subtilis* ATCC 6633. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 2014. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014000200019>.

Stamenković-Stojanović, S.; Karabegović, I.; Beškoski, V.; Nikolić, N.; Lazić, M. *Bacillus* Based Microbial Formulations: Optimization of the Production Process. *Hem. Ind.* 2019, 73 (3), 169–182. <https://doi.org/10.2298/HEMIND190214014S>.

Stanković, S.; Mihajlović, S.; Draganić, V.; Dimkić, I.; Vukotić, G.; Berić, T.; Fira, D. Screening for the Presence of Biosynthetic Genes for Antimicrobial Lipopeptides in Natural Isolates of *Bacillus* Sp. *Arch. Biol. Sci.* 2012, 64 (4), 1425–1432. <https://doi.org/10.2298/ABS1204425S>.

Stopnisek, N.; Shade, A. persistent microbiome members in the common bean rhizosphere: an integrated analysis of space, time, and plant genotype. *ISME J.* 2021. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00955-5>.

Stülke, J.; Hillen, W. Regulation of Carbon Catabolism in *Bacillus* Species. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000, 54 (January), 849–880. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.849>.

Sun, D.; Liao, J.; Sun, L.; Wang, Y.; Liu, Y.; Deng, Q.; Zhang, N.; Xu, D.; Fang, Z.; Wang, W.; Gooneratne, R. Effect of Media and Fermentation Conditions on Surfactin and Iturin Homologues Produced by *Bacillus Natto* NT-6: LC–MS Analysis. *AMB Express* 2019, 9 (1). <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0845-y>.

Suwanmanon, K.; Hsieh, P. C. Isolating *Bacillus Subtilis* and Optimizing Its Fermentative Medium for GABA and Nattokinase Production. *CYTA - J. Food* 2014, 12 (3), 282–290. <https://doi.org/10.1080/19476337.2013.848472>.

Suwansukho, P.; Rukachisirikul, V.; Kawai, F.; H-kittikun, A. Production and Applications of Biosurfactant from *Bacillus Subtilis* MUV4. 2008, 30 (April), 87–93.

Taguchi, G., Chowdhury, S. and Wu, Y. (2005) *Taguchi's Quality Engineering Handbook*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 225–228.

- Tai, B.; Chang, J.; Liu, Y.; Xing, F. Recent Progress of the Effect of Environmental Factors on *Aspergillus Flavus* Growth and Aflatoxins Production on Foods. *Food Qual. Saf.* 2020, 4 (1), 21–28. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyz040>.
- Tamura, K.; Nei, M. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 1993, 10 (3), 512–526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>.
- Tao, S.; Wu, Z.; Wei, M.; Liu, X.; He, Y.; Ye, B. C. *Bacillus Subtilis* SL-13 Biochar Formulation Promotes Pepper Plant Growth and Soil Improvement. *Can. J. Microbiol.* 2019, 65 (5), 333–342. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0333>.
- Tapi, A.; Chollet-Imbert, M.; Scherens, B.; Jacques, P. New Approach for the Detection of Non-Ribosomal Peptide Synthetase Genes in *Bacillus* Strains by Polymerase Chain Reaction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 85 (5), 1521–1531. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2176-4>.
- Théâtre, A.; Cano-Prieto, C.; Bartolini, M.; Laurin, Y.; Deleu, M.; Niehren, J.; Fida, T.; Gerbinet, S.; Alanjary, M.; Medema, M. H.; Léonard, A.; Lins, L.; Arabolaza, A.; Gramajo, H.; Gross, H.; Jacques, P. The Surfactin-Like Lipopeptides From *Bacillus* Spp.: Natural Biodiversity and Synthetic Biology for a Broader Application Range. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021, 9 (March). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.623701>.
- Tian, Y.; Fan, Y.; Liu, J.; Zhao, X.; Chen, W. Effect of Nitrogen, Carbon Sources and Agitation Speed on Acetoin Production of *Bacillus Subtilis* SF4-3. *Electron. J. Biotechnol.* 2016, 19 (1), 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.11.005>.
- Toral, L.; Rodríguez, M.; Béjar, V.; Sampedro, I. Antifungal Activity of Lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis Cinerea*. *Front. Microbiol.* 2018, 9 (JUN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01315>.
- Tu, C.; Wei, J.; Guan, F.; Liu, Y.; Sun, Y.; Luo, Y. Biochar and Bacteria Inoculated Biochar Enhanced Cd and Cu Immobilization and Enzymatic Activity in a Polluted Soil. *Environ. Int.* 2020, 137 (October 2019), 105576. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105576>.
- Tzeng, Y. M.; Rao, Y. K.; Tsay, K. J.; Wu, W. S. Effect of Cultivation Conditions on Spore Production from *Bacillus Amylolyquefaciens* B128 and Its Antagonism to *Botrytis Elliptica*. *J. Appl. Microbiol.* 2008, 104 (5), 1275–1282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03683.x>.
- Udomkun, P.; Wiredu, A. N.; Nagle, M.; Müller, J.; Vanlauwe, B.; Bandyopadhyay, R. Innovative Technologies to Manage Aflatoxins in Foods and Feeds and the Profitability of Application – A Review. *Food Control.* 2017, 76, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.01.008>.
- Unni, S.; Prabhu, A. A.; Pandey, R.; Hande, R.; Veeranki, V. D. Artificial Neural Network-Genetic Algorithm (ANN-GA) Based Medium Optimization for the Production of Human Interferon Gamma (HIFN- γ) in *Kluyveromyces Lactis* Cell Factory. *Can. J. Chem. Eng.* 2019, 97 (4), 843–858. <https://doi.org/10.1002/cjce.23350>.

Uprava za zaštitu bilja, Ministarstvo poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva (2020), Podaci o uvozu SZB i AS za period od 2015-2020. godine, dobijeni na upit od strane autora.

USDA Foreign Agricultural Service (2013), Annual Report on Wheat, Corn and Barley, GAIN Report Number: RB1302.

Vassilev, N.; Vassileva, M.; Martos, V.; Garcia del Moral, L. F.; Kowalska, J.; Tylkowski, B.; Malusá, E. Formulation of Microbial Inoculants by Encapsulation in Natural Polysaccharides: Focus on Beneficial Properties of Carrier Additives and Derivatives. *Front. Plant Sci.* 2020, 11 (March), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00270>.

Venkateswarulu, T. C.; Abraham Peele, K.; Krupanidhi, S.; Prakash Narayana Reddy, K.; Indira, M.; Ranga Rao, A.; Bharath Kumar, R.; Vidya Prabhakar, K. Biochemical and Molecular Characterization of Lactase Producing Bacterium Isolated from Dairy Effluent. *J. King Saud Univ. - Sci.* 2020, 32 (2), 1581–1585. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.12.014>.

Ventorino, V.; Aliberti, A.; Faraco, V.; Robertiello, A.; Giacobbe, S.; Ercolini, D.; Amore, A.; Fagnano, M.; Pepe, O. Exploring the Microbiota Dynamics Related to Vegetable Biomasses Degradation and Study of Lignocellulose-Degrading Bacteria for Industrial Biotechnological Application. *Sci. Rep.* 2015, 5, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep08161>.

Villarreal-Delgado, M. F.; Villa-Rodríguez, E. D.; Cira-Chávez, L. A.; Estrada-Alvarado, M. I.; Parra-Cota, F. I.; De los Santos-Villalobos, S. El Género *Bacillus* Como Agente de Control Biológico y Sus Implicaciones En La Bioseguridad Agrícola. *Rev. Mex. Fitopatol. Mex. J. Phytopathol.* 2018, 36 (1), 95–130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>.

Vos, P.; Garrity, G.; Jones, D.; Krieg, N.R.; Ludwig, W.; Rainey, F.A.; Schleifer, K.-H.; Whitman, W. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed.; Springer: New York, NY, USA, 2009; ISBN 978-0-387-95041-9.

Wang, S.; Huijun, W.; Junqing, Q.; Lingli, M.; Jun, L.; Yanfei, X.; Xuewen, G. Molecular Mechanism of Plant Growth Promotion and Induced Systemic Resistance to Tobacco Mosaic Virus by *Bacillus* Spp. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 19 (10), 1250–1258. <https://doi.org/10.4014/jmb.0901.008>.

Wei, Y-H.; Chu, I.M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Enzyme Microb. Technol.* 1998, 22, 724–728. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00016-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00016-7).

Wu, R.; Chen, G.; Pan, S.; Zeng, J.; Liang, Z. Cost-Effective Fibrinolytic Enzyme Production by *Bacillus Subtilis* WR350 Using Medium Supplemented with Corn Steep Powder and Sucrose. *Sci. Rep.* 2019, 9 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43371-8>.

Wu, Y.; Lin, H.; Lin, Y.; Shi, J.; Xue, S.; Hung, Y. C.; Chen, Y.; Wang, H. Effects of Biocontrol Bacteria *Bacillus Amyloliquefaciens* LY-1 Culture Broth on Quality Attributes and Storability of Harvested Litchi Fruit. *Postharvest Biology and Technology.* 2017, pp 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.05.021>.

Xie, Z.; Li, M.; Wang, D.; Wang, F.; Shen, H.; Sun, G.; Feng, C.; Wang, X.; Chen, D.; Sun, X. Biocontrol Efficacy of *Bacillus Siamensis* LZ88 against Brown Spot Disease of Tobacco Caused by *Alternaria Alternata*. *Biol. Control* 2021, 154 (November 2019), 104508. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104508>.

Xu, Z.; Shao, J.; Li, B.; Yan, X.; Shen, Q.; Zhang, R. Contribution of Bacillomycin D in *Bacillus Amyloliquefaciens* SQR9 to Antifungal Activity and Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013, 79 (3), 808–815. <https://doi.org/10.1128/AEM.02645-12>.

Yan, T.; Id, Y.; Feng, R. J.; Zhou, D. B.; Pan, Y. Y.; Chen, Y. F.; Wang, F.; Yin, L. Y.; Zhang, Y. D.; Xie, J. H. Optimization of Fermentation Conditions through Response Surface Methodology for Enhanced Antibacterial Metabolite Production by *Streptomyces* Sp . 1-14 from Cassava Rhizosphere. *PLoS One* 2018, 1–14.

Yáñez-Mendizabal, V.; Viñas, I.; Usall, J.; Cañamás, T.; Teixidó, N. Endospore Production Allows Using Spray-Drying as a Possible Formulation System of the Biocontrol Agent *Bacillus Subtilis* CPA-8. *Biotechnol. Lett.* 2012, 34 (4), 729–735. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0834-y>.

Yáñez-Mendizabal, V.; Viñas, I.; Usall, J.; Torres, R.; Solsona, C.; Abadias, M.; Teixidó, N. Formulation Development of the Biocontrol Agent *Bacillus Subtilis* Strain CPA-8 by Spray-Drying. *J. Appl. Microbiol.* 2012, 112 (5), 954–965. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05258.x>.

Yang, Y.; Gao, M.; Yu, X.; Zhang, Y.; Lyu, S. Optimization of Medium Composition for Two-Step Fermentation of Vitamin C Based on Artificial Neural Network–Genetic Algorithm Techniques. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2015, 29 (6), 1128–1134. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1063970>.

Yaseen, Y.; Gancel, F.; Béchet, M.; Drider, D.; Jacques, P. Study of the Correlation between Fengycin Promoter Expression and Its Production by *Bacillus Subtilis* under Different Culture Conditions and the Impact on Surfactin Production. *Arch. Microbiol.* 2017, 199 (10), 1371–1382. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1406-x>.

Ye, M.; Tang, X.; Yang, R.; Zhang, H.; Li, F.; Tao, F.; Li, F.; Wang, Z. Characteristics and Application of a Novel Species of *Bacillus*: *Bacillus Velezensis*. *ACS Chem. Biol.* 2018, 13 (3), 500–505. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00874>.

Ye, Y. feng; Li, Q. qin; Fu, G.; Yuan, G. qing; Miao, J. hua; Lin, W. Identification of Antifungal Substance (Iturin A2) Produced by *Bacillus Subtilis* B47 and Its Effect on Southern Corn Leaf Blight. *J. Integr. Agric.* 2012, 11 (1), 90–99. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(12\)60786-X](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(12)60786-X).

Yadav, M.; Sehrawat, N.; Sangwan, A.; Kumar, S. Artificial Neural Network (ANN): Application in Media Optimization for Industrial Microbiology and Comparison with Response Surface Methodology (RSM) Artificial Neural Network (ANN): Application in Media Optimization for Industrial Microbiology And. *Adv Appl Sci Res* 2013, 4 (January), 457–460.

Yeh, M.; Wei, Y.; Chang, J. Bioreactor Design for Enhanced Carrier-Assisted Surfactin Production with *Bacillus Subtilis*. 2006, 41, 1799–1805. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.027>.

Yezza, A.; Tyagi, R. D.; Valèro, J. R.; Surampalli, R. Y.; Smith, J. Scale-up of Biopesticide Production Processes Using Wastewater Sludge as a Raw Material. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 31 (12), 545–552. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0176-z>.

Yu, J. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins.* 2012, 4, 1024–1057. doi:10.3390/toxins4111024.

Yu, K.; Pieterse, C. M. J.; Bakker, P. A. H. M.; Berendsen, R. L. Beneficial Microbes Going Underground of Root Immunity. *Plant Cell Environ.* 2019, 42 (10), 2860–2870. <https://doi.org/10.1111/pce.13632>.

Zain, M. E. Impact of Mycotoxins on Humans and Animals. *J. Saudi Chem. Soc.* 2011, 15 (2), 129–144. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>.

Zhang, J.; Xue, Q.; Gao, H.; Lai, H.; Wang, P. Production of Lipopeptide Biosurfactants by *Bacillus Atrophaeus* 5-2a and Their Potential Use in Microbial Enhanced Oil Recovery. *Microb. Cell Fact.* 2016, 15 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0574-8>

Zhang, W.; Wei, L.; Xu, R.; Lin, G.; Xin, H.; Lv, Z.; Qian, H.; Shi, H. Evaluation of the Antibacterial Material Production in the Fermentation of *Bacillus Amyloliquefaciens*-9 from Whitespotted Bamboo Shark (*Chiloscyllium Plagiosum*). *Mar. Drugs* 2020, 18 (2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/md18020119>.

Zhang, X. Z.; Sathitsuksanoh, N.; Zhu, Z.; Percival Zhang, Y. H. One-Step Production of Lactate from Cellulose as the Sole Carbon Source without Any Other Organic Nutrient by Recombinant Cellulolytic *Bacillus Subtilis*. *Metab. Eng.* 2011, 13 (4), 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.04.003>.

Zhao, J.; Li, Y.; Zhang, C.; Yao, Z.; Zhang, L.; Bie, X.; Lu, F.; Lu, Z. Genome Shuffling of *Bacillus Amyloliquefaciens* for Improving Antimicrobial Lipopeptide Production and an Analysis of Relative Gene Expression Using FQ RT-PCR. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 39 (6), 889–896. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1098-9>.

Zhou, L.; Song, C.; Li, Z.; Kuipers, O. P. Antimicrobial Activity Screening of Rhizosphere Soil Bacteria from Tomato and Genome-Based Analysis of Their Antimicrobial Biosynthetic Potential. *BMC Genomics* 2021, 22 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07346-8>.

Zhou, Z.; Liu, F.; Zhang, X.; Zhou, X.; Zhong, Z.; Su, H.; Li, J.; Li, H.; Feng, F.; Lan, J.; Zhang, Z.; Fu, H.; Hu, Y.; Cao, S.; Chen, W.; Deng, J.; Yu, J.; Zhang, W.; Peng, G. Cellulose-Dependent Expression and Antibacterial Characteristics of Surfactin from *Bacillus Subtilis* HH2 Isolated from the Giant Panda. *PLoS One* 2018, 13 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191991>.

Zhu, R.; Ma, X.; Liu, J. Optimization of γ -Polyglutamic Acid Synthesis Using Response Surface Methodology of a Newly Isolated Glutamate Dependent *Bacillus Velezensis* Z3. *Int. Microbiol.* 2018, 21 (3), 143–152. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-0011-4>.

Zhu, X.; Chen, B.; Zhu, L.; Xing, B. Effects and Mechanisms of Biochar-Microbe Interactions in Soil Improvement and Pollution Remediation: A Review. *Environ. Pollut.* 2017, 2. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.032>.

Živanov, M.; Šeremešić, S.; Vasin, J.; Milić, S.; Ninkov, J.; Jakšić, S.; Vojnov, B. Uticaj primene biougla u kontrolisanim uslovima na hemijska svojstva zemljišta. *Zemljište i biljka*, 2016, 65, 1, 31–44.



Prilozi

8. Prilozi

8.1. Prilog 1

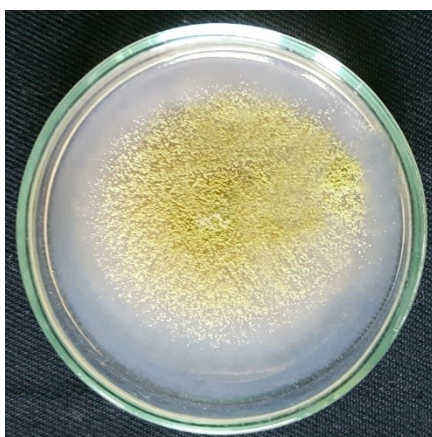
Tabela 8.1.1. Uzorci kukuruza uzgajanog tokom 2019. i 2020. na različitim lokalitetima u Republici Srbiji.

Redni broj uzorka	Uzorci roda kukuruza		
	Lokalitet	Šifra uzorka	Sezona
1.	Pančevo	PA	2019.
2.	Užice	UE	
3.	Loznica	LO	
4.	Subotica	SU	
5.	Valjevo	VA	
6.	Sirig	SI	
7.	Novi Sad	NS	
8.	Bečej	BČ	
9.	Sombor	SO	
10.	Maglić	MA	
11.	Karavukovo	KA	
12.	Vršac	NA	
13.	Kulpin	KU	
14.	Sivac	SC	
15.	Sabanta	SA	
16.	Štitar	ŠT	
17.	Lepojević	LE	2020.
18.	Rogojevac	RO	
1.	Rumenka	RU	
2.	Oparić	OP	
3.	Kuzmin	KU	
4.	Lepojević	LE	
5.	Martinci	MA	
6.	Krušedol	KR	
7.	Valjevo	VA	
8.	Beška	BŠ	
9.	Bečej	BČ	
10.	Sombor	SO	

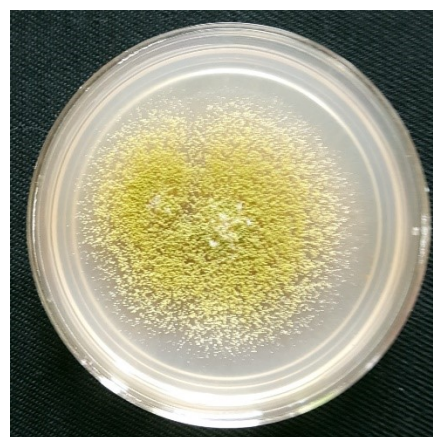
8.2. Prilog 2



ŠT2BSS,



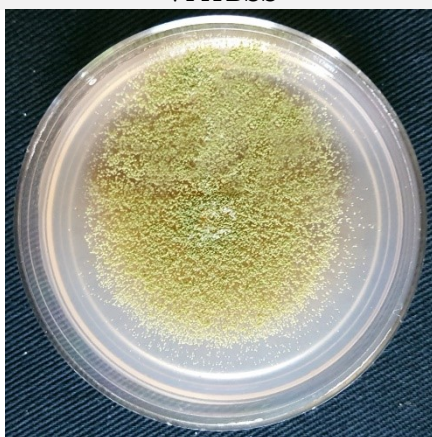
VA1BSS



PA2DSS



SA2BSS



SU1ASS



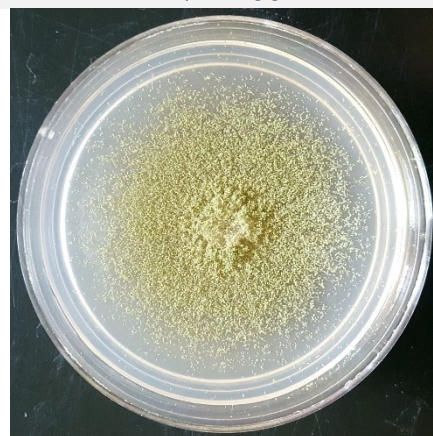
NA2BSS



LO1ASS



BČ1CSS



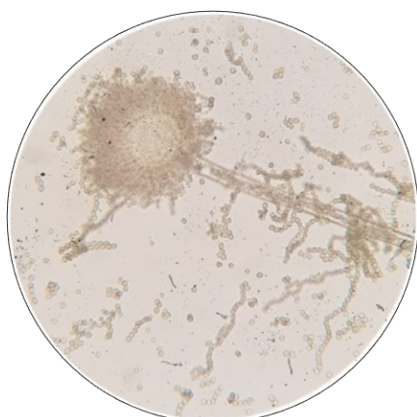
SO1ASS



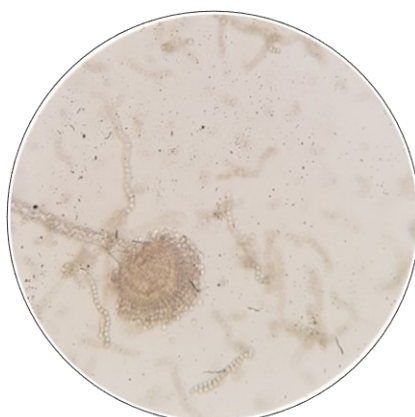
RO2BSS

Slika 8.2.1. Makromorfološke karakteristike izolata *Aspergillus flavus* izolovanih iz kukuruza uzorkovanog na različitim lokalitetima u Republici Srbiji.

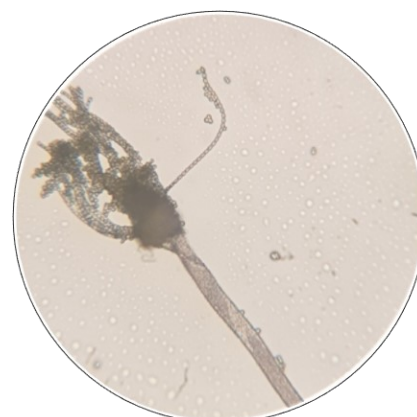
8.3. Prilog 3



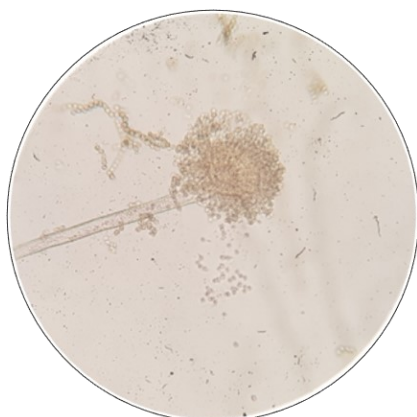
ŠT2BSS,



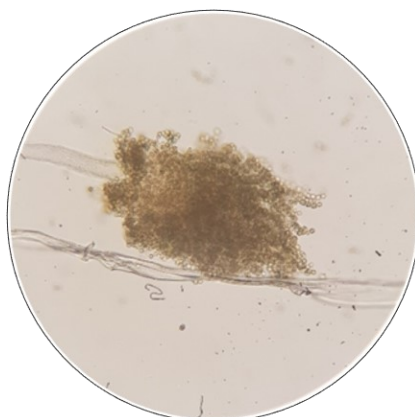
VA1BSS



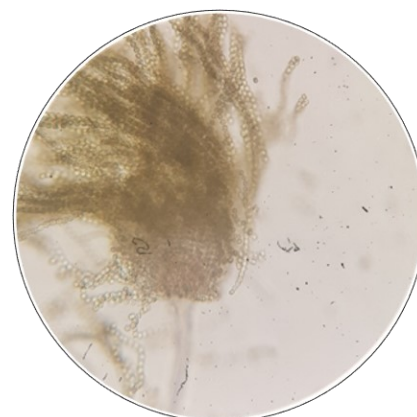
PA2DSS



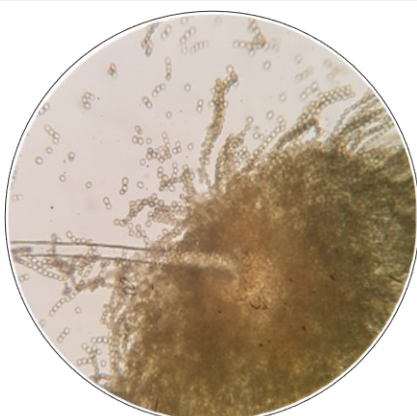
SA2BSS



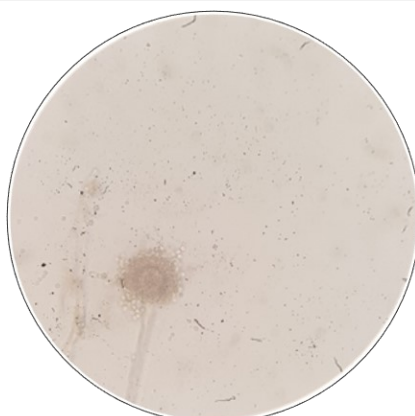
SU1ASS



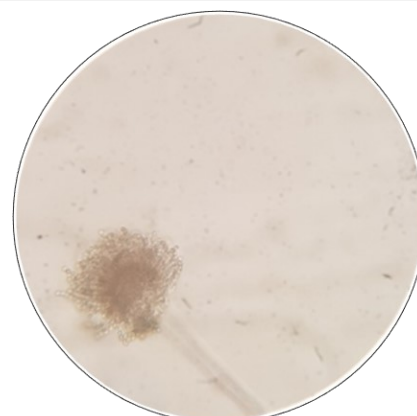
NA2BSS



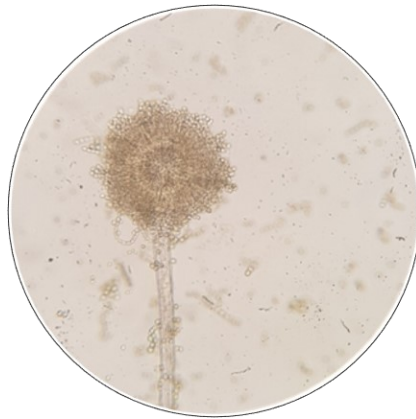
LO1ASS



BČ1CSS



SO1ASS



RO2BSS

Slika 8.3.1. Mikromorfološke karakteristike izolata *Aspergillus flavus* izolovanih iz kukuruza uzorkovanog na različitim lokalitetima u Republici Srbiji.

8.4. Prilog 4

Tabela 8.4.1. Spisak novoizolovanih sojeva *Bacillus* spp. sa istaknutim biljnim vrstama i lokalitetima na kojima je vršeno uzorkovanje rizosfere.

Redni broj	Uzorci rizosfere korišćeni za izolaciju	Lokacija	Izolat
1	<i>Allium cepa</i>	Maglić	Luk 1a
2			Luk 1b
3			Luk 2
4			Luk 3
5			Luk 4a
6			Luk 4b
7	<i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>	Selenča	Cvekla 1
8			Cvekla 2a
9			Cvekla 2b
10			Cvekla 3
11			Cvekla 4
12	<i>Cucumis sativus</i>	Bač	Krastavac 1a
13			Krastavac 1b
14			Krastavac 2a
15			Krastavac 2b
16			Krastavac 2c
17			Krastavac 3
18			Krastavac 4
19			<i>Pisum sativum</i>
20	Grašak 2a		
21	Grašak 2b		
22	Grašak 3a		
23	Grašak 3b		
24	Grašak 4a		
25	Grašak 4b		
26	<i>Brassica oleracea var. capitata</i>	Futog	Kupus 1
27			Kupus 2
28			Kupus 3a
29			Kupus 3b
30			Kupus 4
31	<i>Pastinaca sativa</i>	Gložan	Paštrnak 1a
32			Paštrnak 1b
33			Paštrnak 2
34			Paštrnak 3
35			Paštrnak 4
36	<i>Daucus carota subsp. sativus</i>	Begeč	Šargarepa 1
37			Šargarepa 2a
38			Šargarepa 2b
39			Šargarepa 3a
40			Šargarepa 3b
41		Šargarepa 4	
42		Deronje	Paradajz 1

43	<i>Solanum</i>	Paradajz 2
44	<i>lycopersicum</i>	Paradajz 3
45		Paradajz 4
46	<i>Solanum tuberosum</i>	Krompir 1a
47		Krompir 1b
48		Krompir 2
49		Krompir 3a
50		Krompir 3b
51		Krompir 4a
52		Krompir 4b
53	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pasulj 1a
54		Pasulj 1b
55		Pasulj 2a
56		Pasulj 2b
57		Pasulj 3a
58		Pasulj 3b
59		Pasulj 4a
60		Pasulj 4b
61	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mahunarke 1a
62		Mahunarke 1b
63		Mahunarke 2a
64		Mahunarke 2b
65		Mahunarke 3a
66		Mahunarke 3b
67		Mahunarke 3c
68		Mahunarke 4a ¹
69		Mahunarke 4b
70	<i>Capsicum annuum</i>	Paprika 1a
71		Paprika 1b
72		Paprika 2a
73		Paprika 2b
74		Paprika 3
75		Paprika 4a
76		Paprika 4b

8.5. Prilog 5

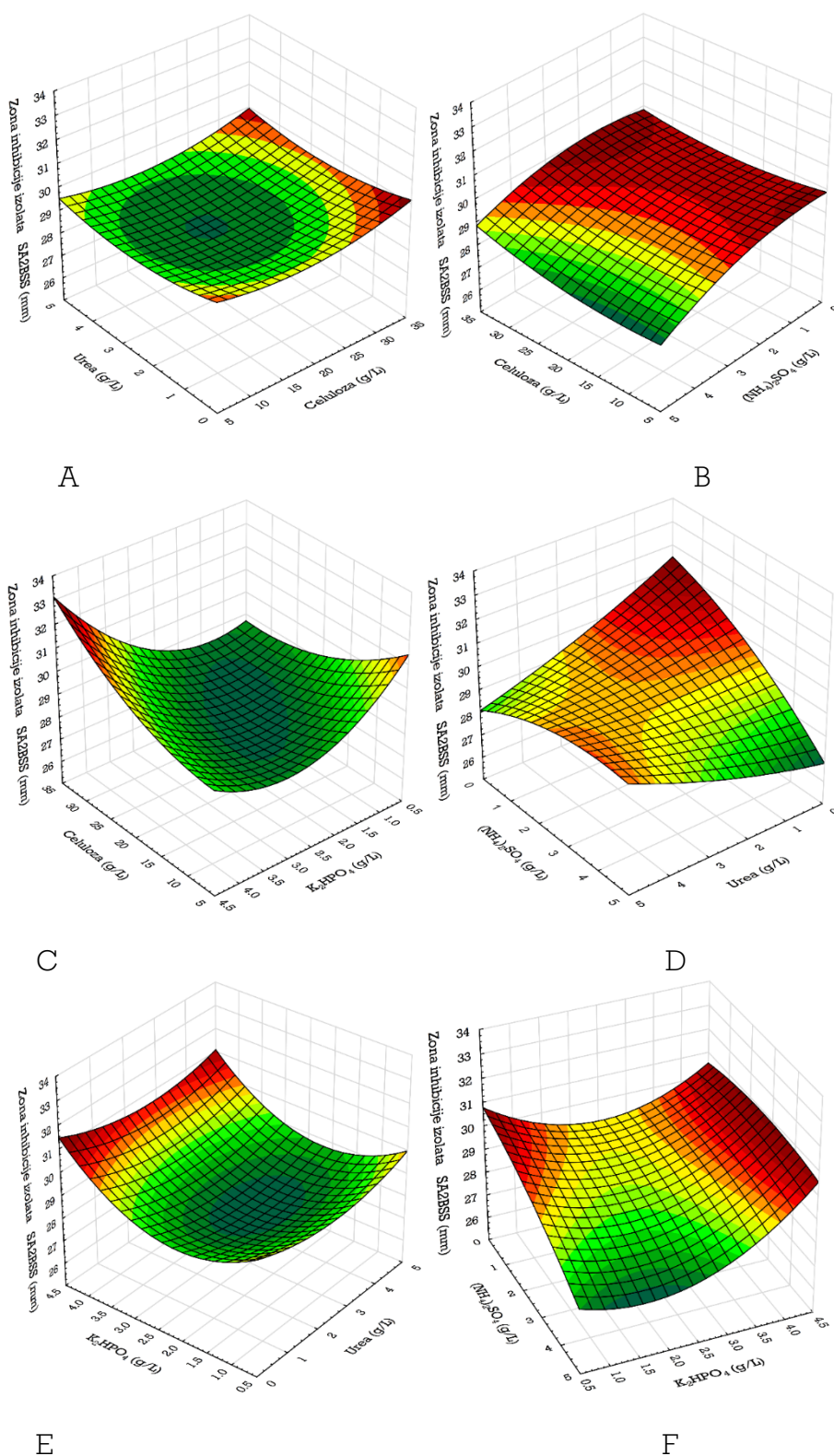
Tabela 8.5.1. Srednje vrednosti prečnika zone inhibicije dobijenih testiranjem antagonističkog efekta uzoraka kultivacione tečnosti proizvodnih izolata protiv izolata *Aspergillus flavus* SA2BSS.

Antagonist	Prečnik zone inhibicije
Cvekla 2b	0,00±0,00 ^a
Luk 1b	0,00±0,00 ^a
Luk 2	0,00±0,00 ^a
Luk 3	0,00±0,00 ^a
Luk 4a	0,00±0,00 ^a
Luk 4b	0,00±0,00 ^a
Krastavac 3	0,00±0,00 ^a
Pasulj 1b	0,00±0,00 ^a
Pasulj 2a	0,00±0,00 ^a
Pasulj 2b	0,00±0,00 ^a
Pasulj 3a	0,00±0,00 ^a
Krastavac 2c	0,00±0,00 ^a
Pasulj 4a	0,00±0,00 ^a
Pasulj 4b	0,00±0,00 ^a
Grašak 1	0,00±0,00 ^a
Grašak 2a	0,00±0,00 ^a
Grašak 2b	0,00±0,00 ^a
Grašak 3a	0,00±0,00 ^a
Grašak 3b	0,00±0,00 ^a
Grašak 4a	0,00±0,00 ^a
Grašak 4b	0,00±0,00 ^a
Krastavac 2b	0,00±0,00 ^a
Krastavac 2a	0,00±0,00 ^a
Mahunarke 2a	0,00±0,00 ^a
Mahunarke 2b	0,00±0,00 ^a
Mahunarke 3a	0,00±0,00 ^a
Mahunarke 3b	0,00±0,00 ^a
Paštrnak 3	0,00±0,00 ^a
Mahunarke 4a	0,00±0,00 ^a
Mahunarke 4b	0,00±0,00 ^a
Paštrnak 1a	0,00±0,00 ^a
Šargarepa 2a	0,00±0,00 ^a
Paprika 4b	0,00±0,00 ^a
Paprika 4a	0,00±0,00 ^a
Paprika 2b	0,00±0,00 ^a
Paprika 1b	0,00±0,00 ^a
Cvekla 1	0,00±0,00 ^a
Cvekla 2a	0,00±0,00 ^a
Krastavac 4	0,00±0,00 ^a
Cvekla 3	0,00±0,00 ^a
Cvekla 4	0,00±0,00 ^a
Krompir 1a	0,00±0,00 ^a

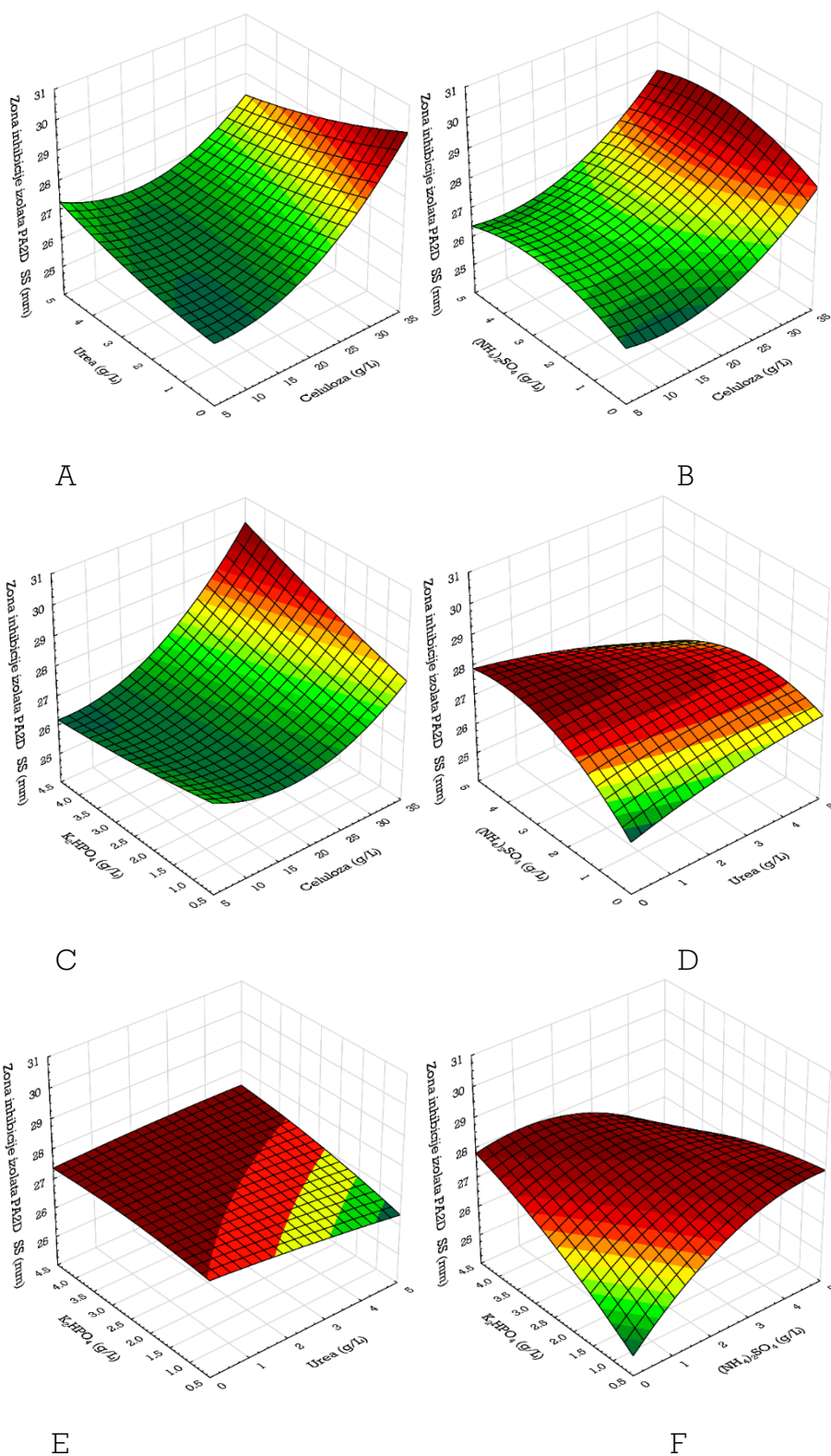
Krompir 1b	0,00±0,00 ^a
Krompir 2	0,00±0,00 ^a
Paprika 1a	0,00±0,00 ^a
Paradajz 4	0,00±0,00 ^a
Kupus 3b	0,00±0,00 ^a
Krompir 4b	0,00±0,00 ^a
Kupus 1	0,00±0,00 ^a
Kupus 2	0,00±0,00 ^a
Kupus 3a	0,00±0,00 ^a
Paradajz 1	17,00±0,00 ^b
Krastavac 1a	17,33±1,52 ^{bc}
Šargarepa 2b	18,00±1,00 ^{bcd}
Krastavac 1b	18,33±0,57 ^{bcde}
Krompir 3a	19,00±0,00 ^{bcde}
Paradajz 2	19,00±1,73 ^{bcde}
Paštrnak 2	19,67±0,57 ^{bcdef}
Paštrnak 4	19,67±0,57 ^{bcdef}
Mahunarke 3c	20,00±0,00 ^{bcdefg}
Luk 1a	20,00±1,00 ^{bcdefg}
Pasulj 1a	20,17±0,76 ^{cdefg}
Krompir 3b	20,33±0,57 ^{cdefg}
Pasulj 3b	20,67±0,76 ^{cdefg}
Kupus 4	20,83±1,15 ^{defg}
Šargarepa 4	21,33±2,30 ^{efgh}
Paradajz 3	22,67±0,57 ^{fghi}
Paštrnak 1b	23,00±1,00 ^{ghi}
Paprika 3	24,00±1,00 ^{hi}
Šargarepa 3b	25,33±4,50 ⁱ
Šargarepa 1	25,33±7,8 ⁱ
Paprika 2a	29,67±2,5 ^{lj}
Mahunarke 1b	30,00±5,00 ^j
Šargarepa 3a	35,00±4,50 ^k
Mahunarke 1a	40,00±0,00 ^l
Krompir 4a	42,33±6,80 ^l

Vrednosti označene istim slovima u tabeli nalaze se na istom nivou statističke značajnosti sa intervalom poverenja od 95%.

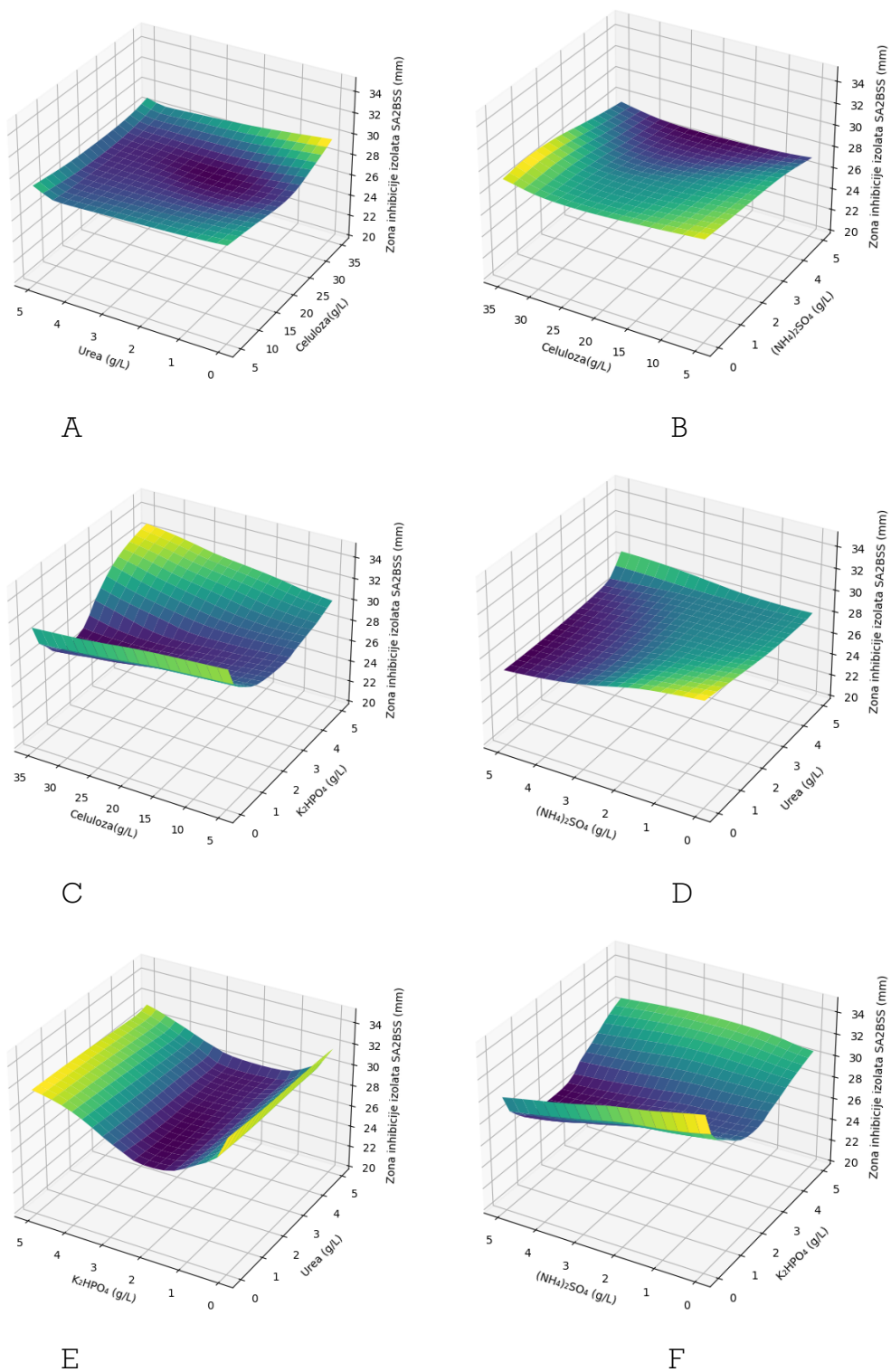
8.6. Prilog 6



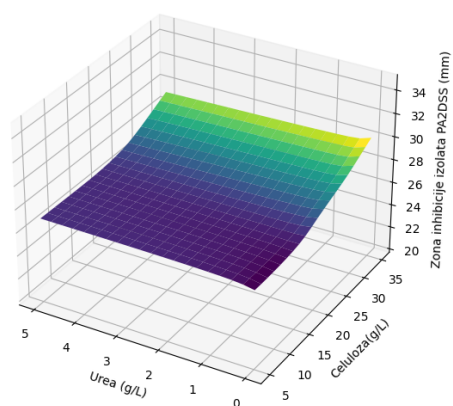
Slika 8.6.1. Odzivne površine koje opisuju uticaj inicijalnih koncentracija odabranih nutrijenata na prečnik zona inhibicije za izolat *Aspergillus flavus* SA2BSS tokom faze modelovanja sastava hranjivog medijuma (RSM): A – celuloza i urea; B – celuloza i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; C – celuloza i K_2HPO_4 ; D – urea i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; E – urea i K_2HPO_4 ; F – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i K_2HPO_4 .



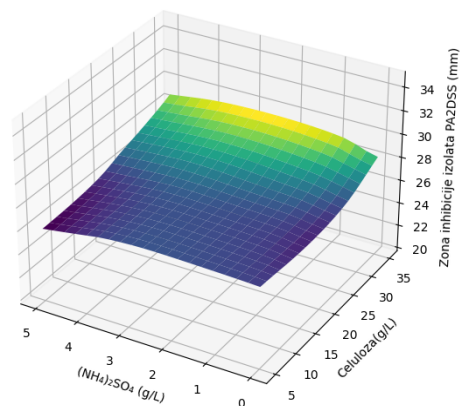
Slika 8.6.2. Odzivne površine koje opisuju uticaj inicijalnih koncentracija odabranih nutrijenata na prečnik zona inhibicije za izolat *Aspergillus flavus* PA2DSS tokom faze modelovanja sastava hranljivog medijuma (RSM): A – celuloza i urea; B – celuloza i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; C – celuloza i K_2HPO_4 ; D – urea i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; E – urea i K_2HPO_4 ; F – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i K_2HPO_4 .



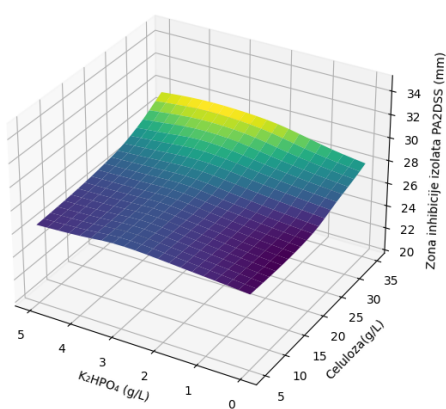
Slika 8.6.3. Odzivne površine koje opisuju uticaj inicijalnih koncentracija odabranih nutrijenata na prečnik zona inhibicije za izolat *Aspergillus flavus* SA2BSS tokom faze modelovanja sastava hranljivog medijuma (ANN): A – celuloza i urea; B – celuloza i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; C – celuloza i K_2HPO_4 ; D – urea i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; E – urea i K_2HPO_4 ; F – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i K_2HPO_4 .



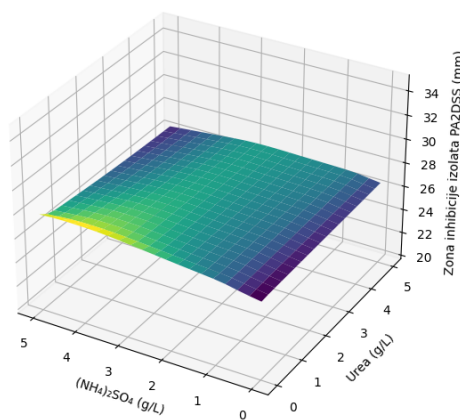
A



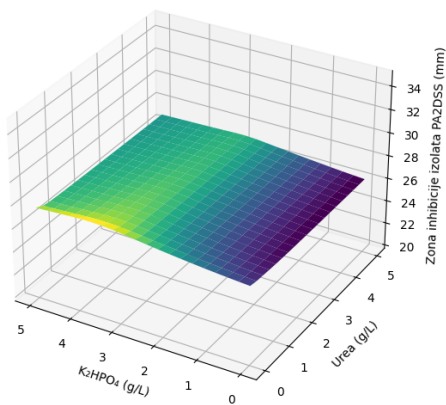
B



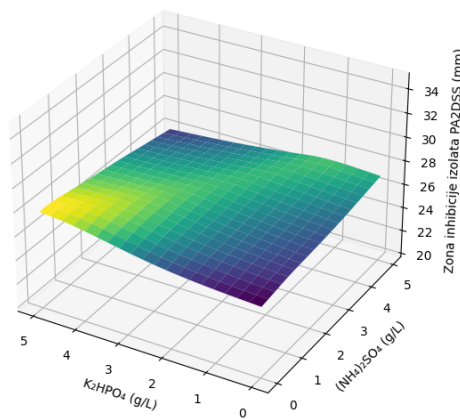
C



D



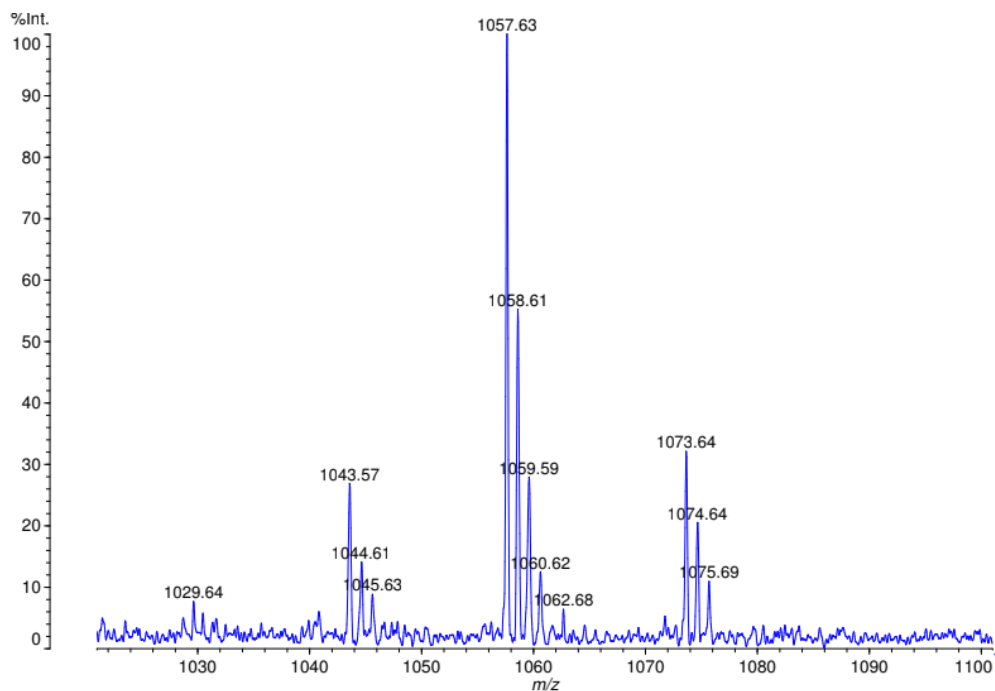
E



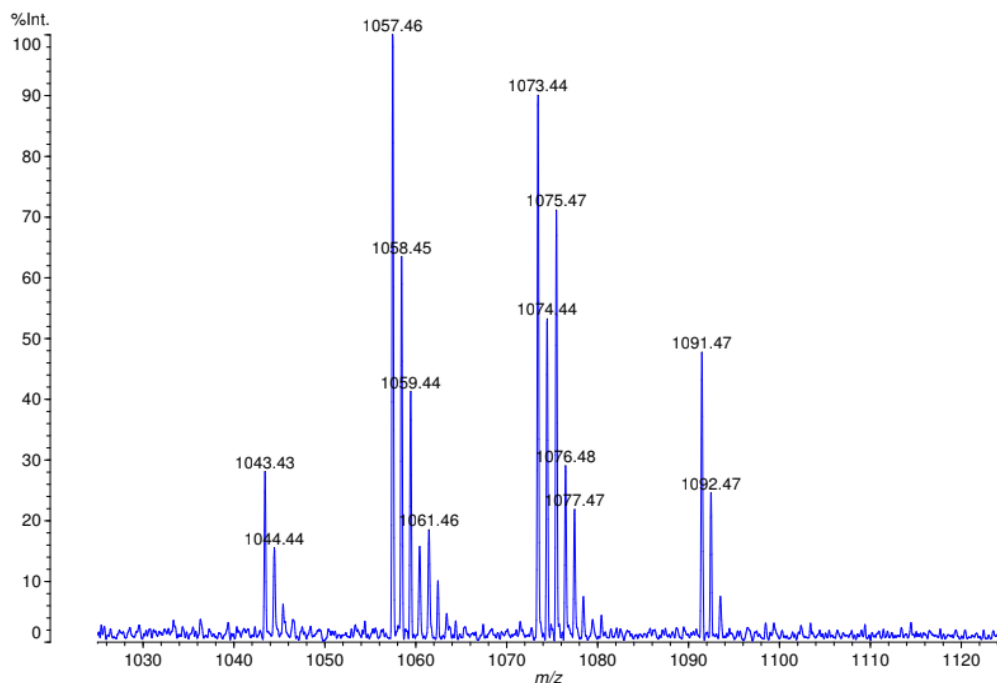
F

Slika 8.6.4. Odzivne površine koje opisuju uticaj inicijalnih koncentracija odabranih nutrijenata na prečnik zona inhibicije za izolat *Aspergillus flavus* PA2DSS tokom faze modelovanja ANN sastava hranjivog medijuma (ANN): A – celuloza i urea; B – celuloza i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; C – celuloza i K_2HPO_4 ; D – urea i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; E – urea i K_2HPO_4 ; F – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i K_2HPO_4 .

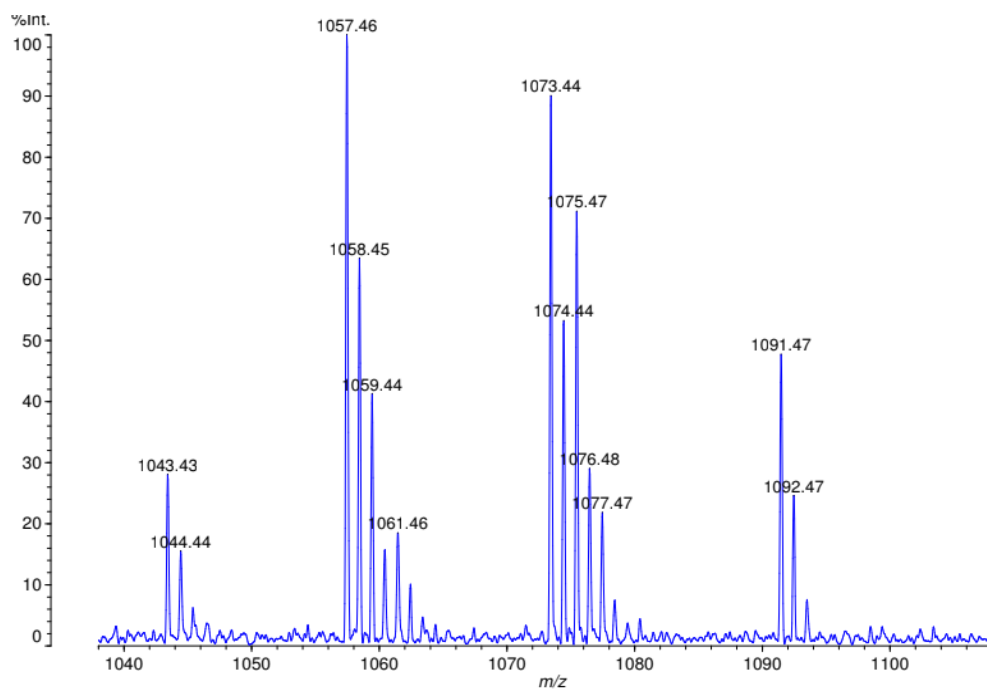
8.7. Prilog 7



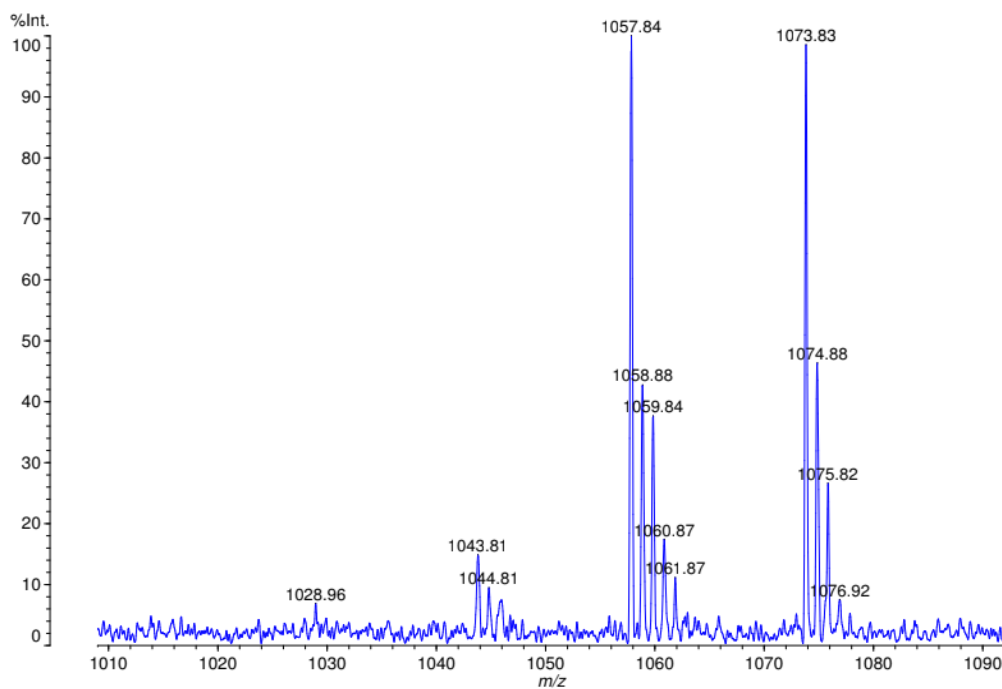
Slika 8.7.1. MALDI-TOF maseni spektar supernatanta kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma nakon kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.



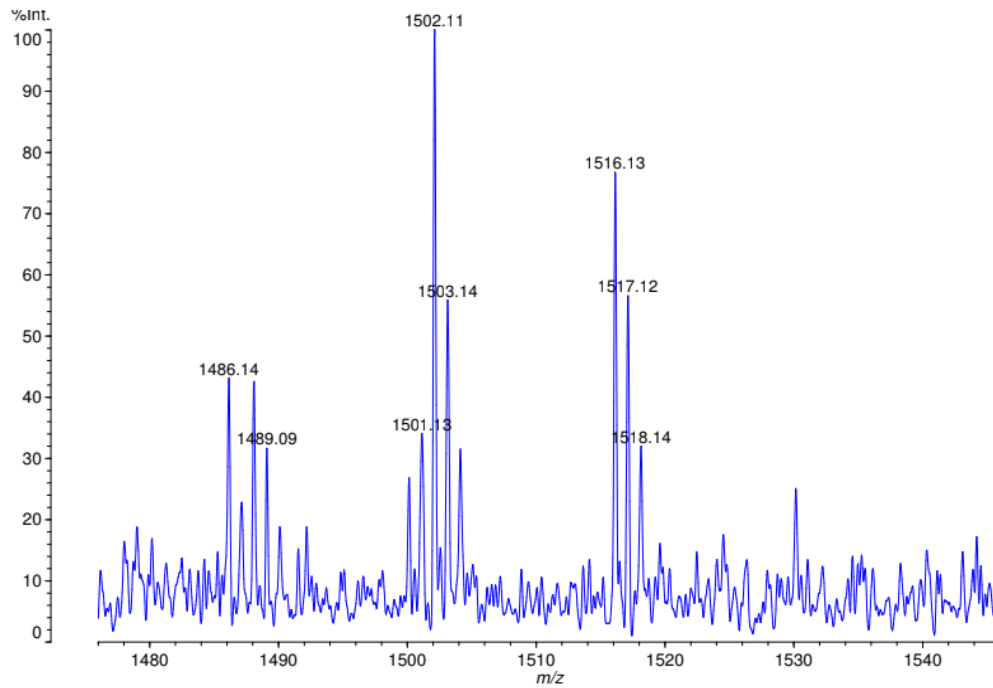
Slika 8.7.2. MALDI-TOF maseni spektar supernatanta kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma nakon kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru pri intenzitetu aeracije 0,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min.



Slika 8.7.3. MALDI-TOF maseni spektar supernatanta kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma nakon kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 100 o/min.

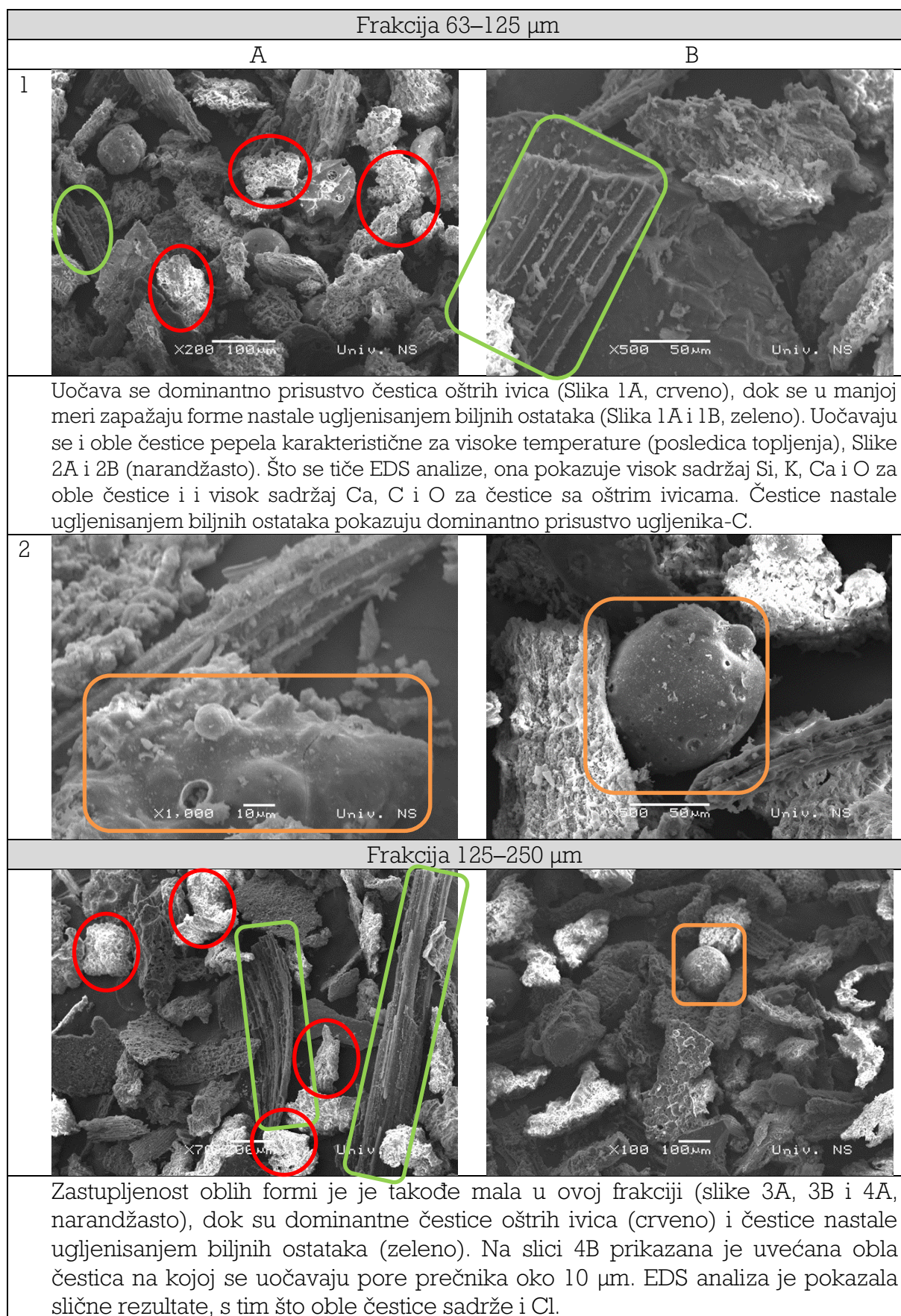


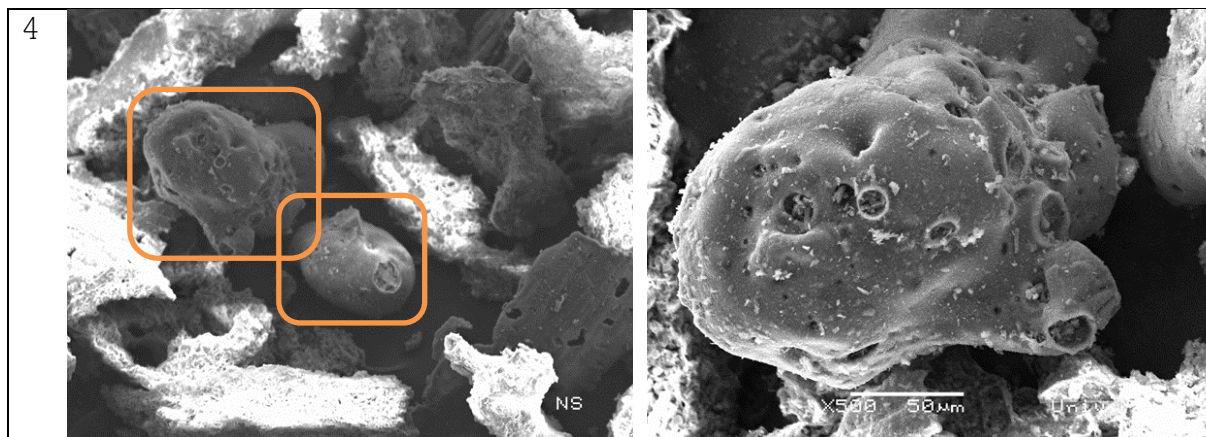
Slika 8.7.4. MALDI-TOF maseni spektar (opseg 1010–1090 m/z) supernatanta kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma nakon kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min..



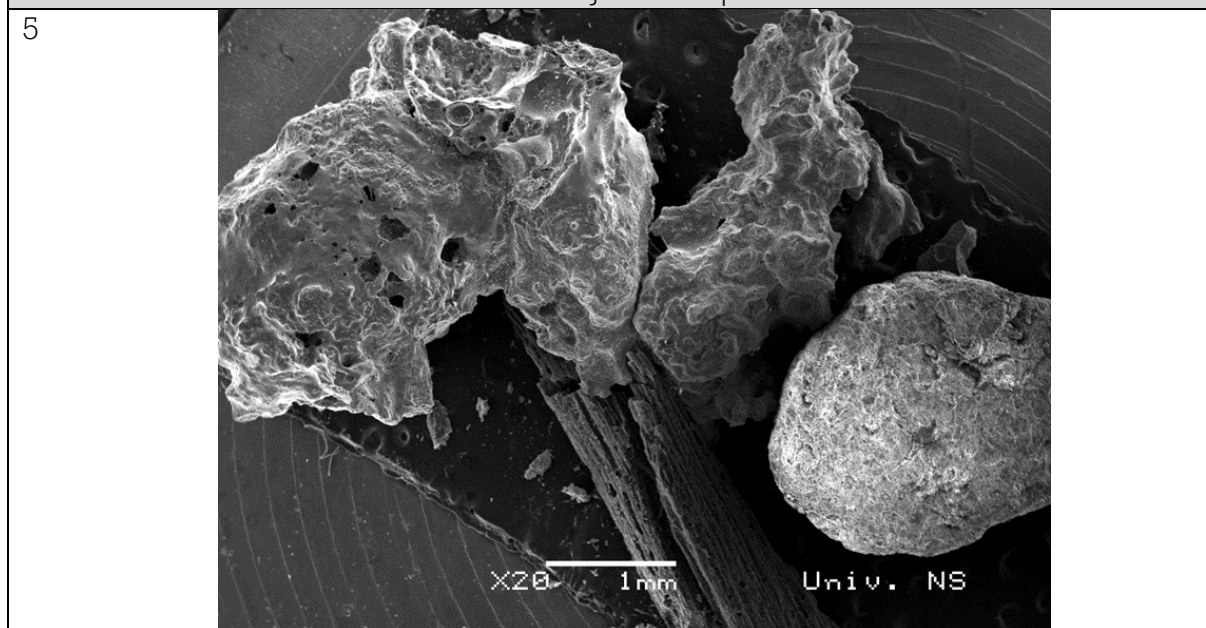
Slika 8.7.5. MALDI-TOF maseni spektar (opseg 1480–1540 m/z) supernatanta kultivacione tečnosti proizvodnog mikroorganizma nakon kultivacije u laboratorijskom bioreaktoru pri intenzitetu aeracije 1,5 vvm i brzini mešanja 300 o/min..

8.8. Prilog 8





Frakcija >1000 μm



Frakcija iznad 1000 μm (1 mm) sadrži veoma heterogen sastav čestica i po morfologiji i po veličini, ali se takođe uočavaju tri osnovne forme – čestice sa oštrim ivicama, ugljenisana biomasa i oble čestice. Rezultati EDS analize različitih morfologija čestica (oble, oštre i biomasa) odgovaraju frakciji 63 –125.

Slika 8.8.1. SEM/EDS ispitivanja tri frakcije pepela nakon spaljivanja biomase na bazi soje.

Tabela 8.8.1. Hemijsko-mineraloška analiza sojinog pepela

Uzorak	Jedinica	1 mm	63 mm	125 mm
XRF				
Suma		99,67	99,63	99,67
SiO ₂	%	37,526	24,125	25,383
Al ₂ O ₃	%	4,549	3,417	3,406
Fe ₂ O ₃	%	2,294	1,864	1,87
CaO	%	18,29	28,311	27,156
MgO	%	10,04	13,987	13,911
P ₂ O ₅	%	5,9279	5,2561	5,5875
SO ₃	%	0,641	1,556	1,034
K ₂ O	%	14,812	10,573	11,013
Na ₂ O	%	0,653	0,522	0,516
TiO ₂	%	0,2912	0,2438	0,2337
Cr ₂ O ₃	%	0,0143	0,0076	0,0084
Mn ₂ O ₃	%	0,0976	0,0947	0,0981
Zn	%	0,0096	0,01988	0,01279
Sr	%	0,083	0,133	0,127
LOI	%	4,44	9,52	9,31
XRD				
Halit	%	15,980	12,070	17,690
Kalcit	%	0,218	12,180	8,360
Kristobalit	%	0,000	0,201	0,352
Amorfni pepeo	%	34,080	0,000	0,000
Kreč (negašeni kreč)	%	0,714	16,650	15,760
Galenit	%	9,200	5,490	5,660
Hematit	%	2,990	5,130	5,840
K-feldspat	%	0,796	0,352	0,000
Magnetit	%	0,000	0,000	0,000
Mulit	%	1,840	1,670	0,000
Periklas	%	3,330	21,100	22,610
Plagioklas	%	11,980	2,990	2,830
Kvarc	%	10,610	10,720	7,600
Rutil	%	0,290	0,000	0,000
Anhidrit	%	0,000	0,002	0,000

Tabela 8.8.2. Vrednost pH u vodenoj sredini po frakcijama sojinog pepela

Veličina frakcije (µm)	Maseni procenat frakcije	pH (pepeo: voda = 1 : 5) (w/w)
> 1000	23 %	11,64
710 - 1000	8 %	11,57
500 - 710	6 %	11,74
315 - 500	9 %	11,96
250 - 315	4 %	12,16
125 - 250	15 %	12,61
63 - 125	16 %	13,10
< 63	18 %	13,41

8.9. Prilog 9

Upitnik – Istraživanje stavova poljoprivrednih proizvođača o upotrebi (bio)pesticida

Poštovana/i,

molimo Vas da učestvujete u istraživanju koje se odnosi na ispitivanje stavova poljoprivrednih proizvođača o primeni (bio)pesticida u Republici Srbiji. Istraživanje se sprovodi u sklopu projekta pod nazivom „*Bioprocess solution for the production of biocontrol agent against aflatoxigenic Aspergillus species (BioSolAfla)*” koji je finansiran od strane Fonda za nauku Republike Srbije.

Cilj ovog istraživanja je sagledati znanja poljoprivrednih proizvođača u vezi sa korišćenim pesticidima, ali i ispitati mogućnosti za uvođenje novih vrsta pesticida koji za cilj imaju istovremeno očuvanje životne sredine i zdravlja ljudi, kao i poboljšanje kvaliteta poljoprivrednih proizvoda uz stabilne prinose.

Anketa je anonimna, a potrebno vreme za njeno ispunjavanje je najviše 10 minuta.

Hvala Vam na odvojenom vremenu!

Opšti podaci o ispitaniku

1. Pol

- a) muško
- b) žensko

2. Godina rođenja: _____.

3. Stepen obrazovanja

- a) osnovna škola
- b) srednja škola
- c) viša škola
- d) fakultet
- e) magistar/master
- f) doktor nauka

4. Radno iskustvo u poljoprivrednoj proizvodnji:

- a) manje od 5 godina
- b) 6 - 10 godina
- c) 11 - 20 godina
- d) 21 i više godina

Opšti podaci o poljoprivrednom gazdinstvu

5. Naselje i/ili opština gde se nalazi gazdinstvo:

6. Tip poljoprivredne proizvodnje na gazdinstvu koji obezbeđuje najveći deo prihoda gazdinstva:

- a) Ratarstvo
- b) Povrtarstvo
- c) Voćarstvo
- d) Vinogradarstvo
- e) Stočarstvo

7. Navedite površinu korišćenog poljoprivrednog zemljišta u poslednjoj proizvodnoj godini:

8. Da li se bavite organskom proizvodnjom:

- a) Da
- b) Ne

9. Ukoliko je Vaš odgovor na prethodno pitanje „Ne”, odgovorite da li planirate da se bavite organskom proizvodnjom u budućnosti:

- a) Da
- b) Ne

10. Ocenite troškove zaštite bilja u poslednjoj proizvodnoj godini:

11. Da li posedujete adekvatnu mehanizaciju za primenu sredstava za zaštitu bilja?

- a) Da
- b) Ne

12. U kom usevu/zasadu ste u toku ove proizvodne godine imali najviše aplikacija pesticida i koliko je okvirno iznosio njihov broj?

Znanje o pesticidima

Ocenite Vaše znanje o pesticidima. Zaokružite jednu ocenu od 1 do 5.

- 1 – uopšte se ne slažem
- 2 – ne slažem se
- 3 – ne znam
- 4 – slažem se
- 5 – u potpunosti se slažem

Posedujem odgovarajući nivo znanja o pesticidima.

1 2 3 4 5

Instrukcije za korišćenje pesticida sa ambalaže su mi jasne.

1 2 3 4 5

Nakon korišćenja pesticida ambalažu odlažem prema upustvu sa ambalaže.

1 2 3 4 5

Znam zašto su pojedini pesticidi zabranjeni za korišćenje.

1 2 3 4 5

Pesticidi ostavljaju štetne posledice na kvalitet poljoprivrednih proizvoda.

1 2 3 4 5

Životna sredina je ugrožena usled upotrebe pesticida.

1 2 3 4 5

Poznate su mi negativne posledice korišćenja pesticida po zdravlje rukovaoca preparatima.

1 2 3 4 5

Poznate su mi negativne posledice korišćenja pesticida po zdravlje potrošača.

1 2 3 4 5

Poznate su mi negativne posledice korišćenja pesticida po zdravlje životinja.

1 2 3 4 5

Umem da prepoznam posledice trovanja pesticidima na svom telu.

1 2 3 4 5

Poznat mi je period trajanja karence pesticida koje koristim.

1 2 3 4 5

Znanje o biopesticidima

Ocenite Vaše znanje o biopesticidima. Zaokružite jednu ocenu od 1 do 5.

- 1 – uopšte se ne slažem
- 2 – ne slažem se
- 3 – ne znam
- 4 – slažem se

5 – u potpunosti se slažem

Posedujem odgovarajući nivo znanja o biopesticidima.

1 2 3 4 5

Biopesticidi nemaju negativan uticaj na kvalitet poljoprivrednih proizvoda.

1 2 3 4 5

Biopesticidi nemaju negativan uticaj na životnu sredinu.

1 2 3 4 5

Biopesticidi nemaju negativan uticaj na zdravlje rukovaoca preparatima.

1 2 3 4 5

Biopesticidi nemaju negativan uticaj na zdravlje potrošača.

1 2 3 4 5

Biopesticidi nemaju negativan uticaj na zdravlje životinja.

1 2 3 4 5

Poznato mi je vreme trajanja karence prilikom primene biopesticida.

1 2 3 4 5

Posledice smanjenja upotrebe pesticida

Ocenite posledice smanjenje upotrebe pesticida. Zaokružite jednu ocenu od 1 do 5.

1 – uopšte se ne slažem

2 – ne slažem se

3 – ne znam

4 – slažem se

5 – u potpunosti se slažem

Smanjenje upotrebe pesticida će ugroziti prinos.

1 2 3 4 5

Smanjenje upotrebe pesticida će ugroziti finansijski rezultat proizvodnje.

1 2 3 4 5

Smanjenje upotrebe pesticida će doprineti boljem kvalitetu poljoprivrednih proizvoda.

1 2 3 4 5

Smanjenje upotrebe pesticida će doprineti očuvanju životne sredine.

1 2 3 4 5

Smanjenje upotrebe pesticida će poboljšati zdravstvenu bezbednost proizvoda.

1 2 3 4 5

Smanjenje upotrebe pesticida će doprineti boljem zdravlju životinja.

1 2 3 4 5

Izbor pesticida

Ocenite faktore koji utiču na izbor korišćenih pesticida. Zaokružite jednu ocenu od 1 do 5.

1 – uopšte se ne slažem

2 – ne slažem se

3 – ne znam

4 – slažem se

5 – u potpunosti se slažem

Cena najviše utiče na izbor korišćenih pesticida.

1 2 3 4 5

Savet prodavca najviše utiče na izbor korišćenih pesticida.

1 2 3 4 5

Savet stručnjaka (savetodavac, profesori sa fakulteta i sl.) najviše utiče na izbor korišćenih pesticida.

1 2 3 4 5

Sopstveno iskustvo u poljoprivrednoj proizvodnji najviše utiče na izbor korišćenih pesticida.

1 2 3 4 5

Iskustvo drugih proizvođača najviše utiče na izbor korišćenih pesticida.

1 2 3 4 5

Izvor informisanja

Prilikom izbora pesticida najčešće se informišem putem sledećih izvora:

Zaokružite jednu ocenu od 1 do 5.

1 – uopšte se ne slažem

2 – ne slažem se

3 – ne znam

4 – slažem se

5 – u potpunosti se slažem

Intenet

1 2 3 4 5

Televizija

1 2 3 4 5

Radio

1 2 3 4 5

Poljoprivredne savetodavne službe

1 2 3 4 5

Stručnjaci sa Poljoprivrednog ili nekog drugog fakulteta

1 2 3 4 5

Prodavci preparata za zaštitu bilja

1 2 3 4 5

Spremnost na povećanje troškova za zaštitu bilja

Ocenite spremnost za povećanjem troškova za zaštitu bilja. Zaokružite jednu ocenu od 1 do 5.

1 – uopšte se ne slažem

2 – ne slažem se

3 – ne znam

4 – slažem se

5 – u potpunosti se slažem

Spreman sam da izdvojim više novca za zaštitu bilja ukoliko bih time povećao prinose poljoprivrednih proizvoda.

1 2 3 4 5

Spreman sam da izdvojim više novca za zaštitu bilja ukoliko bih time poboljšao kvalitet proizvedenih poljoprivrednih proizvoda.

1 2 3 4 5

Spreman sam da izdvojim više novca za zaštitu bilja ukoliko bih time doprineo očuvanju životne sredine.

1 2 3 4 5

Spreman sam da izdvojim više novca za zaštitu bilja ukoliko bih time doprineo očuvanju zdravlja ljudi.

1 2 3 4 5

Spreman sam da izdvojim više novca za zaštitu bilja ukoliko bih time doprineo očuvanju zdravlja životinja.

1 2 3 4 5

Kvalitet prodaje

Ocenite kvalitet prodaje sredstava za zaštitu bilja. Zaokružite jednu ocenu od 1 do 5.

- 1 – uopšte se ne slažem
- 2 – ne slažem se
- 3 – ne znam
- 4 – slažem se
- 5 – u potpunosti se slažem

Prodavci su spremni da preporuče nov pesticid na tržištu.

1 2 3 4 5

Prodavci daju upustvo za upotrebu pesticida prilikom kupovine.

1 2 3 4 5

Prodavci su spremni da ukažu na štetnost prekomerne upotrebe pesticida.

1 2 3 4 5

U paleti svojih proizvoda, prodavci nude i biopesticide.

1 2 3 4 5

Poverenje u prodaju

Ocenite stepen poverenja u prodavca sredstava za zaštitu bilja. Zaokružite jednu ocenu od 1 do 5.

- 1 – uopšte se ne slažem
- 2 – ne slažem se
- 3 – ne znam
- 4 – slažem se
- 5 – u potpunosti se slažem

Verujem u preporuku prodavca prilikom kupovine pesticida.

1 2 3 4 5

Uvažavam preporuke prodavca vezano za količine korišćenih pesticida.

1 2 3 4 5

Uvažavam preporuke prodavca vezano za mere zaštite prilikom rukovanja pesticidima.

1 2 3 4 5

Rad zvaničnih institucija

Ocenite kvalitet rada zvaničnih institucija (savetodavnih službi, Ministarstva poljoprivrede, Poljoprivrednog fakulteta i sl.) u pogledu pružanja potrebnih informacija o sredstvima za zaštitu bilja. Zaokružite jednu ocenu od 1 do 5.

- 1 – uopšte se ne slažem

2 – ne slažem se

3 – ne znam

4 – slažem se

5 – u potpunosti se slažem

Zvanične institucije pružaju potrebne informacije o karakteristikama pesticida na našem tržištu.

1 2 3 4 5

Zvanične institucije preporučuju nove vrste pesticida na tržištu.

1 2 3 4 5

Zvanične institucije pružaju potrebne informacije o prednostima korišćenja biopesticida.

1 2 3 4 5

Zvanične institucije pružaju potrebne informacije o uticaju pesticida na očuvanje živone sredine.

1 2 3 4 5

Zvanične institucije pružaju potrebne informacije o uticaju pesticida na zdravlje ljudi.

1 2 3 4 5

Poverenje u zvanične institucije

Ocenite stepen poverenja u zvanične institucije. Zaokružite jednu ocenu od 1 do 5.

1 – uopšte se ne slažem

2 – ne slažem se

3 – ne znam

4 – slažem se

5 – u potpunosti se slažem

Verujem zvaničnim institucijama u vezi sa informacijama o karakteristikama pesticida na našem tržištu.

1 2 3 4 5

Verujem u preporuke zvaničnih institucija u vezi sa karakteristikama novih pesticida na tržištu.

1 2 3 4 5

Preporuke zvaničnih institucija doprinose povećanju prinosa.

1 2 3 4 5

Preporuke zvaničnih institucija doprinose boljem finansijskom rezultatu.

1 2 3 4 5

Preporuke zvaničnih institucija doprinose boljem očuvanju životne sredine.

1 2 3 4 5

Preporuke zvaničnih institucija doprinose boljem očuvanju zdravlju ljudi.

1 2 3 4 5

Upotreba biopesticida

Biopesticidi su sredstva za zaštitu bilja biološkog porekla. Mogu biti na bazi biljnih ekstrakata, etarskih ulja ili korisnih mikroorganizama i koriste se u zaštiti bilja od bolesti, štetočina i korova. Bezbedni su za zdravlje ljudi i životinja i doprinose očuvanju životne sredine. Karenca u slučaju biopesticida najčešće iznosi od 1 do 2 dana ili je uopšte i nema.

1. Da li koristite biopesticide:

- a) Da
- b) Ne

Ukoliko je Vaš odgovor na prethodno pitanje „Ne“:

2. Da li ste spremni da koristite biopesticide ukoliko Vam je poznato da doprinose očuvanju životne sredine, zdravlja ljudi i životinja?

- a) Da
- b) Ne

3. Da li ste spremni da koristite biopesticide ukoliko su Vam poznate prednosti njihovog korišćenja uprkos povećanju troškova zaštite bilja?

- a) Da
- b) Ne

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
Развој технологије производње агенаса биолошке контроле токсигених изолата рода <i>Aspergillus</i>
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду б) Пољопривредни факултет, Нови Сад, Универзитет у Новом Саду в) Технички универзитет Вилдау, Немачка
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Истраживање се спроводи у склопу пројекта под називом „Bioprocess solution for the production of biocontrol agent against aflatoxigenic <i>Aspergillus</i> species (BioSolAfla)” који је финансиран од стране Фонда за науку Републике Србије у оквиру позива ПРОМИС. https://biosolafla.rs/ Евиденциони број пројекта: # 6064541
1. Опис података
1.1 Врста студије <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> <u>Докторска дисертација</u>
1.2 Врсте података а) квантитативни б) квалитативни
1.3. Начин прикупљања података а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту _____ г) административни подаци: навести врсту _____

д) узорци ткива: навести врсту зрна кукуруза

ђ) снимци, фотографије: навести врсту фотографије узорака и микроскопски прикази узорака

е) текст, навести врсту литература

ж) мапа, навести врсту _____

з) остало: описати web садржај

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека xlsx.

б) SPSS фајл, датотека sav.

в) PDF фајл, датотека

г) Текст фајл, датотека doc.

д) JPG фајл, датотека jpg. jpeg. tif.

е) Остало, датотека статистички софтвер Statistica 13, Design-Expert 8.1, FinchTV 1.4.0, MEGA 7, ScikitLearn 0.24.2, Tensorflow 2.5.0, Python 3.8., Minitab v17.1.

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли: велики број.

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.): велики број, број испитаника у оквиру анкете 101.

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) 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?

а) 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?

а) експеримент, навести тип: биолошка анализа, генетска анализа, хемијска анализа, статистичка анализа.

б) корелационо истраживање, навести тип обрада података ANOVA, RSM, ANN.

ц) анализа текста, навести тип преглед доступне литературе из области, дефинисање начина извођења истраживања, дискусија резултата и поређење са литературним подацима, извођење закључака.

д) остало, навести шта анкета.

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

PCR уређај (Surecycler 8800 Thermocycler, Agilent Technologies, Santa Klara, Kalifornija, SAD), Лабораторијски биореактор 16 l (EDF – 15.4 1, A/S Biotehniskais centrs, Riga, Letonija), ELISA читач (Microplate Photometer HiPo MPP-96, BioSan, Letonija), лабораторијске тресилице (Benchtop Shaking Incubator 222DS, Labnet International, Inc, Edison, SAD) (KS 4000i control, IKA® Werke, Staufen, Nemačka), HPLC систем серије 1260 (Agilent Technologies, Santa Klara, Kalifornija, SAD), HPLC систем (Nexera, Shimadzu, Tokio, Japan), MALDI TOF масени спектрометар (Axima Confidence, Shimadzu Biotech, Mančester, UK), центрифуга (Z 326 K, Hermle LaborTechnik GmbH, Vehingen, Nemačka).

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) 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 је контролисан извођењем вишеструких мерења и применом статистичких алата за евалуацију њиховог квалитета.

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

Контрола уноса података је извршена упоређивањем добијених података са литературним подацима.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

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

Подаци су такође чувани на Google Drive налогу пројекта BioSolAfla

3.1.2. URL адреса <https://nardus.mpi.gov.rs>, <http://www.uns.ac.rs/index.php/univerzitet/javnostrada-2/javni-uid-doktorske>

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? _____

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 09.02.2021. Одбор за етичка питања, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет, Наставно-научно веће.

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:

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

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

- а) 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.

Ауторство – некомерцијално – без прераде

6. Улоге и одговорност

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

Вања Влајков, vanja.vlajkov@uns.ac.rs.

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

Вања Влајков, vanja.vlajkov@uns.ac.rs.

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

Вања Влајков, vanja.vlajkov@uns.ac.rs