



UNIVERZITET U NIŠU
TEHNOLOŠKI FAKULTET U LESKOVCU



Sandra J. Stamenković Stojanović

**OPTIMIZACIJA POSTUPKA DOBIJANJA MIKROBNE
BIOMASE I FORMULACIJE MIKROBIOLOŠKOG
PREPARATA SA POTENCIJALNIM BIOPESTICIDNIM
I FITOSTIMULATORNIM DEJSTVOM**

- doktorska disertacija -

Leskovac, 2021.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF TECHNOLOGY IN LESKOVAC



Sandra J. Stamenković Stojanović

**OPTIMIZATION OF THE PRODUCTION OF MICROBIAL
BIOMASS AND FORMULATION OF MICROBIOLOGICAL
PREPARATIONS WITH POTENTIAL BIOPESTICIDAL
AND PHYTOSTIMULATORY ACTION**

- Doctoral disertation -

Leskovac, 2021.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	Проф. др Миодраг Лазић, редовни професор, Универзитет у Нишу, Технолошки факултет у Лесковцу
Наслов:	Оптимизација поступка добијања микробне биомасе и формулације микробиолошког препарата са потенцијалним биоpestицидним и фитостимулаторним дејством
Резиме:	<p>Микробиолошке формулације базиране на врсти <i>Bacillus</i>, захваљујући својим својствима да продукују разноврсне антимикробне метаболите и формирају ендоспоре, имају широку примену на различитим пољима: од фармације и медицине до заштите животне средине и пољопривреде. У последње време, посебну популарност стекле су као биоpestицидни и фитостимулаторни агенси, који представљају „зелену“ алтернативу прекомерно коришћеним агрохемикалијама које загађују животну средину. Међу њима <i>Bacillus subtilis</i> поседује бројна својства које га чине погодним за инкорпорисање у биођубрива са циљем стимулисања раста биљака и контроле болести. Због тога је циљ ове докторске дисертације био оптимизација процеса добијања микробне биомасе одабране бактеријске културе <i>Bacillus subtilis</i> NCIM2063 и технолошког поступка формулације микробиолошког препарата са потенцијалним биоpestицидним и фитостимулаторним ефектом. Најпре је истражен утицај процесних фактора на раст у Ерленмајеровим судовима на ротационој мућкалици. Највећи принос биомасе (6,2 g/l) је постигнут у подлози са 10 g/l глукозе и при вредности брзине преноса масе кисеоника (<i>OTR</i>) од 10 mol/m³h када су специфична брзина микробног раста и генерацијско време били 0,27 h⁻¹ и 2,54 h, редом после 24 h култивације. Применом дизајна експеримената, методе одзивне површине и Дерингерове функције пожељних одговора додатно су оптимизовани услови раста у ерленмајеровим судовима. Предложени су статистички значајни модели за сваку од истраживаних одзивних величина, чиме су успешно дефинисани услови за постизање максималне виабилности и спорулације (<i>T</i> = 33 °C, <i>OTR</i> = 10 mol/m³h и концентрација глукозе 4,89 g/L). Под задатим условима, предвиђене максималне концентрације вегетативних ћелија су 9,66 LOG(CFU/ml) и спора 9,19 LOG(CFU/ml). Размере процеса повећане су на ниво биореактора коришћењем запреминског коефицијента преноса масе кисеоника и дефинисањем емпиријске корелације за прорачун брзине мешања. У ерленмајеру је, након 48 h култивације, остварено 9,51±0,09 LOG(CFU/ml) за ћелије и 9,08±0,06 LOG(CFU/ml) за</p>

споре, док је у биореактору укупан број ћелија износио $9,66 \pm 0.13$ LOG(CFU/ml), од чега је $9,11 \pm 0,19$ LOG (CFU/ml) спора. Применом методе сушења распршивањем формулисан је микробиолошки препарат у праху, а додатно је извршено моделовање одзива система у зависности од услова сушења. У циљу добијања микробиолошког препарата максималне виабилности и приноса уз минималну количину заостале влаге, услови сушења распршивањем оптимизовани су применом Дерингерове функције пожељности. Као јединствено решење са комбинованом функцијом пожељности $D = 0,874$ предложено је: температура $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, концентрација малтодекстрина 50 g/l и проток течности $6,1\text{ ml/min}$, при протоку ваздуха 600 l/h и притиску атомизације $0,55\text{ bar}$. Утврђено је минимално одступање експерименталних и софтверски предвиђених вредности, висок степен преживљавања енкапсулисаних бактерија након чувања на собној температури у периоду од 6 месеци и годину дана. Препарат је показао изражен антифугални ефекат на 5 теситираних фитопатогених гљива и фитостимулаторно деловање на семе паприке.

Научна област:
Научна
дисциплина:

Технолошко инжењерство

Прехрамбена технологија и биотехнологија

Кључне речи:

Микробна биомаса, биођубриво, *Bacillus*, биореактор, оптимизација

УДК:

CERIF
класификација:

T490 – Биотехнологија

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Miodrag Lazić, PhD, full professor at Faculty of Technology, University of Niš
Title:	Optimization of the production of microbial biomass and formulation of microbiological preparations with potential biopesticidal and phytostimulatory action.
Abstract:	<p>Microbial fertilizers represent an alternative approach in agriculture that is supposed to replace agrochemicals that have a negative effect on the environment and human health. These formulations have the potential to stimulate plant growth, assimilate minerals from the soil and increase plant resistance to pathogens. <i>Bacillus</i> strain has numerous properties that make it suitable for incorporation into biofertilizers with the aim of stimulating plant growth and control the disease. Therefore, this doctoral dissertation aimed to optimize the production of <i>B. subtilis</i> NCIM 2063 biomass and to formulate the microbiological preparation with potential biopesticidal and phytostimulatory effects. First, the influence of process factors on bacterial growth was examined in shake-flasks. The highest biomass yield (6.2 g/L) was achieved in a medium with 10 g/L glucose and at an OTR value of 10 mol/m³h when the specific growth rate and generation time were 0.27 h⁻¹ and 2.54 h, respectively. Such a result can be achieved in just 24 h. By applying the design of the experiments, the response surface methods, and the Deringer's desirability function the growth conditions in shake-flasks were further optimized. Statistically significant models were proposed for each of the tested response values, which led to the definition of the conditions for achieving maximum viability and sporulation (T=33 °C, OTR=10 mol/m³h and glucose concentration 4.89 g/L). Under the given conditions, the maximum concentration of vegetative cells and spores is predicted to be 9.66 LOG (CFU/ml) and 9.19 LOG (CFU/ml), respectively. The process was scaled up to the bioreactor level by using the oxygen mass transfer coefficient as the main criteria. An empirical correlation for calculation of the mixing speed was defined and scale-up effect was monitored by parallel cultivation in a shake-flask and in a bioreactor under the same conditions. After 48 h of cultivation 9.51 ± 0.09 LOG (CFU/ml) of cells and 9.08 ± 0.06 LOG (CFU/ml) of spores were achieved in shake-flasks, while in the bioreactor the total number of cells was 9.66 ± 0.13 LOG (CFU/ml), of which 9.11 ± 0.19 LOG (CFU/ml) spores. A microbiological powder preparation was formulated using spray drying method, and the response surface models were developed. In order to obtain a microbiological preparation of maximum viability and yield, and with a minimum amount of residual moisture, spray drying conditions were optimized by applying the Deringer function of desirability. As a unique solution with a combined desirability function D=0.874, the following was proposed: an inlet temperature of 130 °C, maltodextrin concentration of 50 g/L and a feed flow rate of 6.1 ml/min. There was</p>

a minimum deviation of experimental and software predicted values. Obtained microbiological preparation showed a high survival rate of encapsulated bacteria after storage at room temperature for 6 months and 1 year period. and pronounced antifungal and phytostimulatory effect.

Scientific Field: Technological engineering

Scientific Discipline: Food technology and biotechnology

Key Words: Microbial biomass, biofertilizer, *Bacillus*, bioreactor, optimization

UDC:

CERIF Classification: T-490 Biotechnology

Creative Commons License Type:

CC BY-NC-ND

Autor:

Sandra Stamenković Stojanović, master inženjer tehnologije

Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu

Članovi komisije:

prof. dr Vlada Veljković, predsednik

Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu

prof. dr Miodrag Lazić, mentor

Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu

prof. dr Vladimir Beškoski, vanr. prof., član

Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet Beograd

prof. dr Bojana Danilović, vanr. prof., član

Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu

dr Marija Lješević, naučni saradnik, član

Univerzitet u Beogradu, Centar za hemiju IHTM, Beograd

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Stranice koje slede predstavljaju rezultate mog dugogodišnjeg rada kojih ne bi bilo da nije bilo divnih ljudi koji su mi pružili podršku i pomogli u ključnim trenucima.

Na prvom mestu zahvalnost dugujem nesvakidašnjem mentoru, prof. dr Miodragu Laziću, čoveku koji mi je krčio put kroz doktorske studije, koji za svaki problem ima najbolje rešenje i koji sva svoja znanja nesebično prenosi na svoje saradnike. Hvala za pružene prilike, inovativne ideje, otvorene saradnje, za sve savete i podršku.

Ogromnu zahvalnost dugujem prof. dr Vladi Veljkoviću, velikom profesoru i naučniku, a još većem čoveku, koji mi je pomogao u ključnim životnim situacijama i prema kome osećam neizmerno divljenje i poštovanje. Imala sam ogromnu čast što sam mogla da učim od njega. Svi njegovi saveti i sugestije bili su mi jako vredni i doprineli mom kritičkom mišljenju i naučnom razvoju.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj dragoj kolegini i prijateljici, prof. dr Ivani Karabegović, posvećenoj i preduzimljivoj ženi neverovatne energije koja mi je uzor i inspiracija u svakom smislu. Hvala za sve naučne i životne lekcije, za razumevanje, strpljenje i bezrezervnu podršku tokom izrade ove disertacije.

Naročito se zahvaljujem prof. dr Vladimiru Beškoskom na svim konstruktivnim sugestijama, divnoj saradnji i prilici da budem deo projekta u okviru kojeg je ova disertacija urađena.

Veliko hvala dragoj kolegini prof. dr Bojani Danilović, kao i dr Mariji Lješević na korisnim savetima, saradnji i velikoj časti pruženoj prihvatanjem članstva u komisiji.

Takođe zahvalnost dugujem:

- firmi Fertico iz Indije na čelu sa Slavoljubom Vukićevićem, na ustupljenom mikroorganizmu, na pruženim savetima, divnoj radnoj atmosferi i otvorenoj saradnji odakle je i proistekla ideja za temu disertacije,
- prof. dr Viktoru Nedoviću, dr Ani Kalušević i dr Stevi Leviću sa Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na saradnji i pruženoj mogućnosti da se sušenje raspršivanjem mikrobiološkog preparata ostvari u njihovoj laboratoriji,
- dr Ivici Đalović, višem naučnom saradniku Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, instituta od nacionalnog značaja za republiku Srbiju, na korisnim savetima, realizaciji dela eksperimentalnih istraživanja i svesrdnoj pomoći pri izradi disertacije,
- firmi Vikler S iz Leskovca na ekspeditivnoj i pravovremenoj tehničkoj pomoći.

Na kraju, ali ne i najmanje bitno, hvala mojoj porodici na podršci, razumevanju i tolerisanju nekada prevelikih obaveza i svih sati zajedničkog vremena koje nam je ova disertacija „ukrala“. Posebno hvala mojim momcima, suprugu Nikoli i sinu Matiji, što su stoički izdržali sve faze izrade disertacije i zajedno samnom došli do cilja.

Ova doktorska disertacija realizovana je na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, Program za finansiranje naučnog rada 451-03-9/2021-14/200133 (projekat ev. br. III 43004)

Spisak simbola

$Adj R^2$	prilagođeni koeficijent determinacije
C	koncentracija rastvorenog kiseonika, mol/l
c^*	rastvorljivost kiseonika u podlozi na datoj temperaturi, mol/l
\bar{c}	normalizovana koncentracija rastvorenog kiseonika
F	Fišerov kriterijum
N	brzina mešanja, s^{-1}
p	nivo statističke značajnosti
$Pred R^2$	predviđeni koeficijent determinacije
R^2	regresioni koeficijent determinacije
r_s	brzina potrošnje supstrata, g/lh
r_{O_2}	brzina potrošnje kiseonika, mmol/gh
S	koncentracija supstrata, g/l
t	vreme, h
t_d	generacijsko vreme, h
V_L	zapremina tečnosti, m^3
V_F	zapremina Erlenmajerovog suda, m^3
X	broj ili masa ćelija, koncentracija biomase, g _{s.b.} /l
x_0	početna koncentracija biomase, g/l
x_i i x_j	promenljive u kvadratnoj jednačini
$Y_{X/S}$	koeficijent prinosa biomase u odnosu na supstrat
$Y_{X/O}$	koeficijent prinosa biomase u odnosu na kiseonik

Grčka slova

β_{ij} i β_{ii}	regresioni koeficijenti efekta interakcije i kvadratnog efekta
μ	specifična brzina rasta, h^{-1}
μ_{max}	maksimalna specifična brzina rasta, h^{-1}

λ lag vreme, h

Skraćenice

AM	arbuskularne mikorize
BBD	Boks-Benkenov dizajn
CCD	centralni kompozitni dizajn
CCRD	centralni kompozitni rotabilni dizajn
CDM	hemijski definisana podloga
CFU	broj izniklih kolonija (eng. colony forming unit)
CV	koeficijent varijacije
DoE	dizajn eksperimenata
DMSO	dimetil-sulfoksid
DSM	difco sporulacioni medijum
EM	Embden-Majerhofov ciklus
GRAS	generalno prepoznat kao bezbedan (eng. generally regarded as safe)
HB	hranljivi bujon
IAA	indol sirćetna kiselina
k_{La}	zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika, s^{-1}
LB	Lurija-Bertani podloga
LA	Lurija agar
MRPD	srednje relativno odstupanje, %
OTR	brzina prenosa mase kiseonika, $mmol/m^3h$
OUR	brzina potrošnje kiseonika, $mmol/m^3h$
PGPB	bakterije koje promovišu rast biljaka
PGPM	mikroorganizmi koji promovišu rast biljaka
PDA	krompir-dekstroza agar agar (eng. potato dextrose agar)

PRESS	suma reziduala predikcijske greške
RMSE	koren srednje kvadratne greške
RSM	metoda površine odziva
SD	standardna devijacija
TCA	ciklus trikarbonskih kiselina

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	3
2.1. Faktori neophodni za razvoj biljaka	11
2.2. Mikroorganizmi koji promoviraju rast biljaka (PGPM)	11
2.3. Mehanizmi delovanja PGPB	16
2.3.1. Fitostimulativna svojstva PGPB	17
2.3.2. Biopesticidna svojstva.....	18
2.4. <i>Bacillus</i> sp.....	19
2.4.1. Fitostimulativno i biopesticidno dejstvo <i>B. subtilis</i>	19
2.4.2. Metabolizam <i>B. subtilis</i>	22
2.5. Dobijanje mikrobne biomase	24
2.5.1. Izbor bioreaktora	25
2.5.2. Tip fermentacije	26
2.5.3. Optimizacija sastava podloge.....	27
2.5.4. Uslovi kultivacije	28
2.5.5. Modelovanje rasta mikroorganizama	33
2.5.6. Povećanje razmere procesa	34
2.6. Formulacija mikrobioloških preparata.....	34
2.6.1. Tečne formulacije.....	35
2.6.2. Čvrste formulacije	36
2.7. Primena eksperimentalnog dizajna u optimizaciji procesa.....	39
3. MATERIJALI I METODE	43
3.1. Materijal.....	44
3.1.1. Hemikalije	44
3.1.2. Mikroorganizmi.....	44
3.2. Metode	44
3.2.1. Određivanje suve biomase	44
3.2.2. Određivanje vlage	44
3.2.3. Izračunavanje koeficijenta prinosa biomase u odnosu na glukozu i kiseonik....	45
3.2.4. Izračunavanje brzine prenosa mase kiseonika	45
3.2.5. Određivanje specifične brzine potrošnje kiseonika.....	46
3.2.6. Određivanje zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika.....	46
3.2.7. Priprema inokuluma	46

3.2.8. Kultivacija u bioreaktoru	46
3.2.9. Određivanje ukupnog broja ćelija	47
3.2.10. Određivanje broja spora	47
3.2.11. Određivanje viabilnosti mikrobiološkog preparata.....	47
3.2.12. Određivanje glukoze	48
3.2.13. Biološko (antagonističko) dejstvo preparata.....	48
3.2.14. Fitostimulativno dejstvo mikrobiološkog preparata	48
3.2.15. Utvrđivanje kinetičkih parametara rasta	49
3.2.16. Jednofaktorska optimizacija procesnih uslova za rast <i>B. subtilis</i> u erlenmajerovim sudovima sa mešanjem	49
3.2.17. Višekriterijumska optimizacija procesnih uslova	49
3.2.18. Formulisanje mikrobiološkog preparata	50
3.2.18.1. Uslovi sušenja raspršivanjem.....	50
3.2.18.2. Optimizacija uslova sušenja raspršivanjem	51
3.2.19. Statistička obrada podataka.....	52
4. REZULTATI I DISKUSIJA	53
4.1. Kultivacija <i>B. subtilis</i> NCIM 2063 u Erlenmajerovim sudovima na rotacionoj mučkalici	54
4.1.1. Jednofaktorska optimizacija procesnih uslova	54
4.1.1.1. Optimizacija koncentracije glukoze	54
4.1.1.2. Optimizacija brzine prenosa mase kiseonika.....	56
4.1.2. Višefaktorska optimizacija uslova rasta primenom metode odzivne površine.....	58
4.1.2.1. Uticaj procesnih uslova na broj vegetativnih ćelija <i>B. subtilis</i>	60
4.1.2.2. Uticaj procesnih uslova na ukupan broj spora.....	63
4.1.2.3. Višekriterijumska optimizacija primenom Deringerove funkcije.....	68
4.2. Povećanje razmere procesa	70
4.2.1. Uticaj brzine mešanja na specifičnu brzinu prenosa mase kiseonika.....	70
4.2.2. Kultivacija u bioreaktoru	71
4.3. Formulisanje mikrobiološkog preparata.....	73
4.3.1. Optimizacija uslova sušenja raspršivanjem primenom metode odzivnih površina... 73	
4.3.1.1. Uticaj uslova sušenja raspršivanjem na prinos proizvoda	75
4.3.1.2. Uticaj uslova sušenja raspršivanjem na viabilnost preparata.....	78
4.3.1.3. Uticaj parametra sušenja raspršivanjem na sadržaj vlage.....	81
4.3.1.4. Višefaktorska optmizacija uslova sušenja raspršivanjem primenom Deringerove funkcije	85
4.3.2. Biopesticidni i fitostimulatorni efekat formulacije	87

4.3.2.1. Biopesticidni efekat formulacije <i>B. subtilis</i> NCIM 2063 na odabrane fitopatogene gljive	87
4.3.2.2. Fitostimultorni efekat izolata <i>B. subtilis</i> NCIM 2063 na seme paprike.....	88
5. ZAKLJUČAK	90
LITERATURA.....	94
PRILOG	112

1. UVOD

Sve veća brojnost populacije na Zemlji vodi povećanoj potrebi za hranom i poljoprivrednom proizvodnjom. Upotreba hemijskih đubriva i agrohemijskih je nesumnjivo dovela do značajnog unapređenja poljoprivrede u prošlim decenijama, ali se ta praksa pokazala kao neodrživa zbog zagađenja prirodne sredine i narušavanja ekološke ravnoteže, plodnosti zemljišta i zdravlja ljudi. Sa ciljem podsticanja održive poljoprivrede, zaštite životne sredine i proizvodnje zdravstveno bezbedne hrane, kao alternativa hemijskim đubrivima i pesticidima, nameću se mikrobiološka đubriva čija su istraživanja postala fokus u celom svetu (Hassen et al., 2016; Szilagy-Zecchin et al., 2016).

Mikrobiološka đubriva predstavljaju formulacije u čiji sastav ulaze mikroorganizmi koji promovišu rast biljaka (*eng.* Plant Growth Promoting Microorganisms - PGPM). Ovi mikroorganizmi su prirodno prisutni u zemljištu u blizini korenovog sistema, i reaguju sa metabolitima koje oslobađa koren biljke (Zaidi et al., 2015). Takve interakcije utiču na rast biljke, usvajanja nutrijenata i esencijalnih minerala, a mogu da povećaju otpornost biljke na bolesti, abiotički stres i teške metale (Owen et al., 2015; Yadav et al., 2015). Istovremeno, ovi mikroorganizmi imaju važnu ulogu u bioremedijaciji zemljišta, jer stimulišu razgradnju zagađujućih materija prevodeći ih u organska jedinjenja manje opasna po životnu sredinu (Beškoski et al., 2011).

Iako se mnoga istraživanja bave temom mikrobioloških đubriva, njihova primena još uvek nije zaživela. Njihov učinak u realnim uslovima polja nije uvek konstantan, pa je u pojedinim slučajevima dolazilo do smanjenja broja viabilnih ćelija koje nisu u stanju da izvrše kolonizaciju korena. Većina dosadašnjih istraživanja usmerena je na izolaciju i selekciju mikroorganizama, kao i na dalju primenu na sistem zemlja-biljka pod kontrolisanim uslovima. Malo pažnje posvećeno je razvoju optimizovanih šema proizvodnje i procedurama formulacije – dva najvažnija koraka koji mogu da osiguraju efikasnost mikrobioloških đubriva (Vassilev et al., 2015).

Među velikim brojem mikroorganizama PGPM grupe, rod *Bacillus* ima veliki potencijal za primenu u obliku mikrobioloških đubriva zahvaljujući svojim fitostimulativnim i biopesticidnim svojstvima (Gotor-Vila et al., 2017; Mercado-Flores et al., 2014; Shafi et al., 2017). Među njima, *Bacillus subtilis* je najčešće karakterisana Gram pozitivna bakterija sa jedinstvenom sposobnošću brzog umnožavanja i formiranja endospora, što je čini otpornom na nepovoljne uslove sredine (Castillo et al., 2013). Široko je rasprostranjena u zemljištu i vodi, što je od izuzetne važnosti za efikasnost preparata, s obzirom da mikrobne populacije najbolje deluju u sredinama iz kojih su izolovane (Mishra et al., 2015; Vassilev et al., 2015). Takođe, njeno korišćenje predstavlja prirodni i ekološki prihvatljiv pristup zbog toga što je rizosfera biljaka njeno prirodno stanište. Ovaj soj ima sposobnost da proizvodi industrijski važne metabolite kao što su antibiotici, polisaharidi i proteini (Garcia-Fraile et al., 2015; Shafi et al., 2017; Shahcheraghi et al., 2015), a takođe mu se pripisuju probiotske osobine i ima „GRAS“ status (*eng.* generally recognized as safe), što ga čini bezbednim za ljudsku upotrebu (Wang et al., 2017). Zahvaljujući širokom spektru metabolita koji imaju fitostimulativno i biopesticidno dejstvo, ovaj soj se može koristiti samostalno u formulacijama, što u velikoj meri pojednostavljuje proizvodni proces. Upravo zahvaljujući svojoj nepatogenosti, izraženoj

antimikrobnoj aktivnosti, naglašenim metaboličkim potencijalima i sposobnosti da formira endospore, ovaj mikroorganizam ima veliki potencijal za široku primenu u raznim oblastima, od medicine i farmacije do poljoprivrede (Hashem et al., 2019; W. wei Liu et al., 2008; Schisler et al., 2004; Zhao et al., 2017). Svojstva, poput rasta na jeftinim izvorima ugljenika, male nutritivne potrebe, pogodnost za genetičke manipulacije, robusnost i otpornost prilikom izvođenja fermentacija većih razmera, čine ovu vrstu jako atraktivnom za dalje istraživanje i optimizaciju radi primene u biokontroli i fitostimulaciji biljnog rasta (Shafi et al., 2017; Zhao et al., 2017).

Pre započinjanja industrijske proizvodnje mikrobioloških preparata, važno je optimizovati uslove rasta u laboratorijskim uslovima sa ciljem povećanja prinosa biomase, skraćanja vremena proizvodnje i smanjenja proizvodnih troškova (Keskin Gündoğdu et al., 2016). Pre optimizacije procesa, potrebno je upoznati kinetičke parametre bakterijskog rasta u aktuelnim uslovima rasta, dok se efikasnost dodatno može poboljšati primenom višefaktorskih metoda, kao što su eksperimentalni dizajn i metoda odzivne površine. Nakon definisanja uslova rasta u laboratoriji, prelazi se na povećanje razmere bioprocesa i formulisanje preparata pogodnog za primenu u realnim uslovima sredine. Razvoj uspešnog proizvoda podrazumeva izbor odgovarajućeg nosača i tipa formulacije, optimizaciju proizvodnog procesa, kao i ogledne studije potencijalnog biopesticidnog i fitostimulatornog dejstva preparata. Svakom od ovih koraka potrebno je posvetiti odgovarajuću pažnju, kako bi se kao rezultat dobilo mikrobiološko đubrivo željenog kvaliteta (Vassilev et al., 2015). Veliki potencijal na polju formulacija imaju preparati sa mikroinkapsulisanim ćelijama nastalim u procesu sušenja raspršavanjem, koji još uvek nisu komercijalno razvijeni (Schoebitz et al., 2013).

Imajući u vidu navedene činjenice, opšti cilj istraživanja u okviru teme doktorske disertacije bio je optimizacija procesa dobijanja mikrobne biomase odabrane bakterijske kulture *Bacillus subtilis* NCIM2063 i razvoj tehnološkog postupka formulacije mikrobiološkog preparata. Specifični ciljevi istraživanja bili su:

- uvrđivanje optimalnih procesnih parametara na nivou Erlenmajerovih sudova na rotacionoj mućkalici za efikasnu produkciju vegetativnih ćelija i spora *B. subtilis* NCIM 2063 primenom jednofaktorske i višefaktorske metode optimizacije;
- utvrđivanje kinetičkih parametara rasta *B. subtilis* NCIM 2063;
- povećanje razmere šaržnog procesa sa erlenmajerovih sudova do nivoa laboratorijskog bioreaktora;
- definisanje uslova za postizanje maksimalne viabilnosti i efikasnosti sporulacije;
- formulisanje mikrobiološkog preparata u prahu primenom metode sušenja raspršivanjem i optimizacija procesa formulacije metodom odzivnih površina;
- provera biopesticidnog i fitostimulatornog dejstva mikrobiološkog preparata u laboratorijskim uslovima, *in vitro*.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Faktori neophodni za razvoj biljaka

Za svoj rast i razvoj biljke zahtevaju veliki broj različitih jedinjenja. Molekuli tih jedinjenja iskorišćeni su za stvaranje i održavanje ćelija i neophodnih životnih procesa, kao što su rast, reprodukcija, respiracija i fotosinteza. U procesu fotosinteze, biljke stvaraju različite oblike polisaharida, lipida, proteina i drugih organskih molekula (Kirkby, 2012). Za normalno funkcionisanje, biljka iz zemljišta apsorbuje različite hemijske elemente, koji u kombinaciji sa vodom i ugljen-dioksidom formiraju kompleksna jedinjenja (White, 2012).

Elementi koji su neophodni za normalne metaboličke procese, rast i reprodukciju tako da ni jedan drugi element ne može da ih zameni, nazivaju se esencijalni elementi, i mogu se podeliti na makronutrijente i mikronutrijente (Kirkby, 2012). Azot i fosfor su najbitniji makronutrijenti neophodni za razvoj biljke. Azot je ključan za formiranje proteina, nukleotida, hlorofila i koenzima, dok je fosfor, koji čini oko 0,2% suve mase biljke, komponenta značajnih molekula, kao što su nukleinske kiseline, fosfolipidi i ATP, a predstavlja, takođe, ključni faktor u kontroli enzimskih reakcija i regulaciji metaboličkih puteva (Hassen et al., 2016; Szilagyi-Zecchin et al., 2016). Pored toga, od makronutrijenata, biljci su neophodni kalcijum, koji je sastavna komponenta ćelijskog zida, magnezijum, koji ima ulogu aktivacije određenih enzima i sastavni je deo hlorofila, kao i sumpor, koji je neophodan kod sinteze proteina, koenzima A, tiamina i biotina (Kirkby, 2012).

S obzirom da većinu minerala biljka preuzima iz zemljišta zajedno sa vodom, rastvorljivost minerala je osnovni uslov za njihovu biodostupnost (White, 2012). Mnogi elementi, i pored svoje rasprostranjenosti u zemljištu, nisu pogodni za biljku, jer se nalaze u oblicima koje biljka ne može da asimilira. Jedan takav element je fosfor, koji najčešće potiče iz teško rastvornih fosfatnih stena, pa je, uprkos velikim količinama fosfora u zemljištu (400-1200 mg/kg), mali deo dostupan biljci za procese metabolizma (Avdalović et al., 2015). Takođe, biljke nisu u stanju da apsorbuju molekulski oblik azota, koji čini 78 % vazduha, već ga usvajaju u obliku nitrata i amonijaka. Kada je nivo azota u biljkama manji, aktivira se prvi limitirajući faktor vegetacionog rasta, što prouzorkuje smanjenu produktivnost (Hassen et al., 2016). Pored toga, na produktivnost biljke značajno utiče prisustvo mikroelemenata i biljnih hormona, pa je samim tim jasno da u svakom trenutku biljka treba da bude snabdevena dovoljnom količinom ovih materija. Dugogodišnja praksa obogaćivanja zemljišta agrohemijskim materijama pokazala se jako nepovoljnom za životnu sredinu i dovela je do potrebe da se istraže alternativni načini snabdevanja biljaka neophodnim jedinjenjima (Zaidi et al., 2015). Jedan od popularnih pristupa je korišćenje mikroorganizama koji promovišu rast biljaka i njihovo inkorporiranje u tzv. mikrobiološka đubriva, koja, nakon nanošenja na seme, nadzemni deo biljke ili u zemljište, pokazuju pozitivan efekat na rast biljke (Mrkovački i Bjelić, 2011).

2.2. Mikroorganizmi koji promovišu rast biljaka (PGPM)

PGPM se prirodno nalaze u rizosferi, delu zemljišta koji je pod uticajem korena biljke i njegovih eskudata, i mogu povoljno da utiču na biljke poboljšavajući njihovu produktivnost i otpornost (Mrkovački i Bjelić, 2011). Među najpoznatije PGPM ubrajaju se sledeći rodovi bakterija i gljiva: *Serratia*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*,

Bacillus, *Rhizobium*, *Azoarcus*, *Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Flavobacterium*, *Gluconobacter* (Nadeem et al., 2015). One na biljku mogu delovati fitostimulatorno (poboljšavajući rast i prinos useva) ili biopesticidno (sprečavajući razvoj bolesti i štetočina) (Abhilash et al., 2016). Pregled nekih od efekata inokulacije biljaka različitim mikroorganizmima dat je u tabeli 1.

Bakterije koje promovišu rast biljaka (PGPB) se, na osnovu interakcije sa biljkom, mogu da podele na simbiotske bakterije, koje žive unutar biljaka i razmenjuju metabolite direktno, i na slobodne bakterije, koje žive van ćelija biljaka (Zaidi et al., 2015). Još jedna podela PGPB je na ekstraćelijske i unutarćelijske. Ekstraćelijske PGPB mogu da naseljavaju prostor rizosfere, površinu korena biljke, dok unutarćelijske PGPB naseljavaju ćelije korena, probijaju ćelijski zid i integrišu se sa biljkom formirajući različite tvorevine (nodule i kvržice) na tkivu biljaka (Kiproviski, 2012; Owen et al., 2015).

Među gljive koje imaju povoljno dejstvo na biljku ubrajaju se arbuskularne mikorize (AM), ekto-mikorize i gljive korena iz rodova *Penicillium*, *Trichoderma* i *Aspergillus*. Njihovo dejstvo se ogleda u produkciji organskih kiselina i enzima koji inhibiraju potogene ili vrše solubilizaciju teško rastvornih jedinjenja (Owen et al., 2015). Mešovita inokulacija AM gljivama i bakterijama naročito pogoduje rastu i ishranjenosti ceralija i leguminoza, a takve višestruke interakcije otvorile su novi pristup u istraživanjima sa ciljem razumevanja kompleksnosti AM simbioza. (Rouphael et al., 2015). U proizvodima dostupnim na tržištu često se sreću mešoviti inokulumi, odnosno preparati koji u sebi sadrže veći broj različitih mikrobnih vrsta. Interesovanje za ovakve inokulume bazirano je na jednostavnoj činjenici da u zemlji mikroorganizmi normalno „žive“ u zajednicama, gde oslobađaju različite metabolite, što je u vezi sa njihovom povezanošću sa biljkom i drugim mikroorganizmima uključenih u prirodne procese odbrane i borbe za mesto i nutrijente (Owen et al., 2015). Različite mikrobne vrste mogu međusobno da inhibiraju rast, što može da utiče na efikasnost inokoluma. Takođe, takve proizvodne procedure su komplikovane i vremenski zahtevne zbog čega je potrebno razmotriti ekonomsku opravdanost dobijenih proizvoda (Vassilev et al., 2015).

Tabela 1 Efekti inokulacije biljaka različitim mikroorganizmima

Mikroorganizam	Biljka	Rezultat	Referenca
<i>Pseudomonas putida</i>	Dinja	Efektivna kontrola sušenja dinje uzrokovana <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> .	Bora et al. (2004)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Kikiriki	Smanjena pojava tačkica koje patogeni prouzrokuju na listovima	Meena et al. (2002)
<i>P. putida</i>	Krastavac	Smanjeno truljenje korena koje prouzrokuje <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucurbitacearum</i>	Amer i Utkhede (2000)
<i>Bacillus pumilis</i>	Paradajz	Povećana otpornost na <i>F. oxysporum</i>	Benhamou et al. (1998)
<i>P. fluorescens</i>	Pšenica	Značajno povećan rast pšenice	de Freitas i Germida (1992)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Krompir	Smanjenje bolesti koje izaziva <i>Ralstonia solanacearum</i>	Wei et al. (2011)
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> TSAU13	Krastavac i paradajz	Zaštita biljaka od patogena i regulacija produkcije fitohormona	Egamberdieva i Adesemoye (2016)

Nastavak tabele 1

Mikroorganizam	Biljka	Rezultat	Referenca
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Kukuruz	Solubilizacija fosfora, proizvodnja auksina, katalazna aktivnost. Zaštita biljke od inhibitornih efekata NaCl.	Rojas-Tapias et al. (2012)
<i>A. chroococcum</i>	Kukuruz	Povećana dužina korena i suva masa biljke	Sachin (2009)
1. <i>Risobia leguminosarum</i> <i>bv.phaseoli</i> 2. <i>A. chroococcum</i> 3. <i>R. leguminosarum bv.phaseoli</i> + <i>A. chroococcum</i> + <i>Streptomyces sp.</i>	Boranija	Pojedinačne kulture <i>Rhizobium</i> spp. i <i>Azotobacter</i> spp. su doprinele povećanju broja mahuna po biljci i mase zrna, dok mešoviti inokolum nije dao značajne rezultate	Jarak et al. (2010)
1. <i>Pseudomonas sp. PGERs17</i> 2. <i>R. leguminosarium</i>	Sočivo	Povećana otpornost na temperaturni stres. Povećana dužina korena i produkcija metabolita	Mishra et al. (2011)
<i>A. chroococcum</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Azospirillum lipoferum</i> i <i>B. subtilis</i> , pomešane u jednakim razmerama	Šećerna repa	Povećanje prinosa korena i kristalnog šećera	Govedarica et al. (2002)

Nastavak tabele 1

Mikroorganizam	Biljka	Rezultat	Referenca
<i>A. chroococcum</i> , <i>A. lipoferum</i> , <i>Bacillus megaterium</i> i gljiva <i>Glomus intraradices</i>	Kukuruz	Povećanje prinosa. Najveći prinos je dobijen primenom <i>A. chroococcum</i> i <i>A. lipoferum</i>	Hajnal-Jafari et al. (2012)
<i>A. chroococcum</i>	Šećerna repa	Povećanje prinosa korena šećerne repe za 7% i prinosa kristalnog šećera za 6%.	Mrkovački et al. (2011)
<i>P. fluorescenes</i> <i>P. putida</i> <i>A. lipoferum</i> <i>Azospirillum brasilense</i>	Kukuruz	Povećana visina i suva masa biljaka, lisna površina, težina 100 zrna i broj zrna po klipu	Gholami et al. (2009)
<i>A. chroococcum</i> <i>A. brasilense</i> <i>P. putida</i> <i>Bacillus lentus</i>	Kukuruz	Povećan prinos zrna, težina klipa, broj zrna po klipu	Yazdani et al. (2009)

2.3. Mehanizmi delovanja PGPB

Primena PGPB dovodi do povećanja prinosa i otpornosti biljke na spoljašnji stres i dejstvo patogena (Garcia-Fraile et al., 2015). Ove bakterije mogu direktnim putem da deluju na biljku fitostimulativno produkcijom regulatore rasta (fitohormona kao što su auksini, citokinini i giberelini) (Owen et al., 2015) ili povećanjem unosa vode, nutrijenata i esencijalnih elemenata (azotofiksatori i fosfosolubilizatori), sadržaja minerala (biopsivanjem gvožđa, cinka i selena) procesima solubilizacije, helacije ili omogućavanjem reakcija oksidacije/redukcije u zemljištu, čineći mikronutrijente dostupnijima (Abhilash et al., 2016). Pored toga, PGPB imaju i biopesticidno dejstvo koje podrazumeva inhibiciju patogena produkcijom antibiotika i ćelijskih enzima ili indukcijom odbrambenih mehanizama biljke. Pregled mehanizama delovanja pojedinih PGPM dat je u tabeli 2.

Tabela 2 Pregled mehanizama delovanja pojedinih PGPM

Mikroorganizam	Mehanizam regulacije rasta biljaka	Referenca
Simbiotski azotofiksatori: <i>Rhizobium undicola</i> ; <i>Mesorhizobium</i> , <i>R.</i> <i>leguminosarum</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Sinorhizobium meliloti</i> ; <i>Rhizobium radiobacter</i>	Fiksacija azota, solubilizacija fosfora; Sinteza: ACC (1-aminociklopropan-1-karboksilat) deaminaze, indol sirćetne kiselina (IAA), egzopolisaharida, siderofora, amonijaka, cijanovodonične kiselina, antifungalnih jedinjenja, proteaze, CoQ10.	Ghosh et al. (2015); Gopalakrishnan et al. (2014); Bhagat et al., (2014) Manwar et al. (2004); Machado et al., (2013); Wu et al. (2003)
Asimbiotski azotofiksatori: <i>A. lipoferum</i> , <i>Azospirillum</i> <i>brasiliense</i> , <i>Azotobacter</i> <i>chroococcum</i> , <i>A. vinelandi</i>	Povećanje otpornosti na NaCl, katalazna aktivnost; Sinteza: IAA, giberelinske kiseline, siderofora, proteaza, alginata.	Rojas-Tapias et al. (2012); Tortora et al. (2011); (Vučetić et al.) (1995)
<i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,	Deaminazna aktivnost, solubilizacija fosfora. Sinteza: IAA, ACC deaminaze, siderofra, cijanovodonika, egzopolisaharida, amonijaka, antifungalnih jedinjenja, alginske kiselina.	Grobelak et al. (2015); Sulochana et al. (2014); Vučetić et al. (1995)

Nastavak tabele 2

Mikroorganizam	Mehanizam regulacije rasta biljaka	Referenca
<i>B. subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. megaterium</i>	Solubilizacija cinka, solubilizacija fosfora. Sinteza: IAA, giberelinske kiseline, siderofora, ACC deaminaza, fosfataza, fitaza, cijanovodonične kiseline, celulaza, organskih kiselina, litičkih enzima, oksalat oksidaze.	Grobelak et al., (2015); Sharma et al. (2013); Vidhyalakshmi et al. (2016)
<i>Burkholderia</i> sp., <i>Acinetobacter</i> spp.	Solubilizacija fosfora, solubilizacija cink-oksida, antagonistička aktivnost. Sinteza: IAA, siderofora.	Farokh et al. (2011); Nailwal et al. (2014)

2.3.1. Fitostimulatorna svojstva PGPB

Glavni mehanizmi kojima PGPB doprinose povećanju i dostupnosti hranljivih materija u zemljištu su biološka fiksacija azota i solubilizacija fosfora. Azotofiksacija je posle fotosinteze najvažniji biološki proces u prirodi, koji omogućava kruženje azota u biosferi (Wani et al., 2016). Simbiotske bakterije rodova *Rhizobium* i *Frankia* i nesimbiotske, poput *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp. i *Acetobacter* sp., imaju sposobnost asimilacije azota iz atmosfere i konverzije do amonijaka, u procesu koji se naziva biološka fiksacija azota (Szilagyi-Zecchin et al., 2016). Fiksacija azota je regulisana koncentracijom kiseonika i dostupnošću azota, a vrši se uz pomoć enzima nitrogenaze koji produkuju bakterije (Vijayabharathi et al., 2016). Transformacija azota se odigrava kroz faze amonifikacije, nitrifikacije, denitrifikacije i azotofiksacije (Bjelić, 2014).

Konverzija nerastvornih oblika fosfora u oblike koje su dostupni biljci u rizosferi postiže se bakterijama fosfo-solubilizatorima (Szilagyi-Zecchin et al., 2016). Neke od PGPB, među kojima su *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Rhizobium* sp. i *Flavobacterium* sp., imaju sposobnost solubilizacije nerastvornih neorganskih fosfornih jedinjenja. Korišćenje ovih bakterija u inokulumima može da poveća asimilaciju fosfora i nudi brojne prednosti direktne stimulacije rasta biljaka (Hassen et al., 2016). U nekim slučajevima bakterije iz rodova *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* i *Streptomyces* mogu da imaju uloge solubilizatora i mineralizatora istovremeno. Ove bakterije naseljavaju koren biljke i vrše mineralizaciju fosfata i drugih organskih jedinjenja fosfora (Gopalakrishnan et al., 2014; Milošević i Govedarica, 2001).

PGPB imaju potencijal da produkuju fitohormone, supstance koje stimulišu rast biljke, pa se samim tim mehanizam njihovog delovanja naziva biostimulacija. U fitohormone se ubrajaju auksini, citokinini, giberelini, i absicinska kiselina (Gopalakrishnan et al., 2014).

Auksini su presudni biljni hormoni i osnovna komponenta koja moduliše rast i razvoj biljke. Čak 80% PGPB mogu da sintetišu fiziološki najaktivniji auksin u biljkama – IAA, koja ima

bitnu ulogu u stimulaciji deobe i diferencijacije ćelija (Mrkovački i Bjelić, 2011). IAA indukuje pojavu lateralnih korena kod dikotiledona i adventivnih korena kod monokotiledona, unapređuje sekundarno zadebljanje zidova i povećanje ksilemskih ćelija, što kao rezultat daje bolju adsorpciju minerala i vode (Ghosh et al., 2015; Ona et al., 2005). Nekoliko PGPB, među kojima su *Azospirillum* sp. i fluorescentna *Pseudomonas* sp., vrše sekreciju IAA (Hassen et al., 2016).

Giberelini imaju ulogu u elongaciji, deobi ćelija, kao i elongaciji internodija. Mehanizam kojim se pospešuje biljni rast giberelinima je još uvek nepoznat (Vijayabharathi et al., 2016). Postoji mišljenje da giberelini povećavaju gustinu korenovih dlačica u zoni korena koja upija vodu i nutrijente, što doprinosi stvaranju plodova velikih dimenzija, većem broju pupoljaka, sprečava mirovanje krtole i stimuliše partenokarpiju. Njihov nedostatak je odgovaran za pojavu patuljastih biljaka (Gopalakrishnan et al., 2014).

Citokinini stimulišu ćelijsku deobu kod biljaka i u nekim slučajevima razvoj korena i korenovih dlačica (Gopalakrishnan et al., 2014). Takođe, učestvuju u rastu kalusa i potpomažu diferencijaciju izdanaka (Vijayabharathi et al., 2016). Oko 90% rizosfernih mikroorganizama ima sposobnost produkcije i oslobađanja citokinina, a oko 30 jedinjenja iz grupe citokinina koja promovišu rast imaju mikrobno poreklo. Postoje podaci da *Rhizobium* sp. produkuje citokinine (Chauhan et al., 2015).

Abscinska kiselina je stres hormon koji reguliše razvoj biljke i fiziološke procese (Sukkasem et al., 2018). Sintetiše se delimično u hloroplastima, a cela biosinteza se primarno dešava u listovima, inicirana stresnim uslovima, kao što je nedostatak vode i niska temperatura (Gopalakrishnan et al., 2014). Imaju jako važu ulogu u germinaciji semena, zatvaranju stroma i toleranciji na abiotički stres (Vijayabharathi et al., 2016).

2.3.2. Biopesticidna svojstva

Različite patogene bakterije, gljive i nematode koje su prisutne u zemlji mogu da inficiraju biljku, smanjujući u velikoj meri prinos useva. Kao što je već istaknutno, PGPB, između ostalog, značajno utiču na indukovanje otpornosti biljaka na patogene sintezom različitih antibiotika, siderofora, cijanida ili litičkih enzima (Bjelić, 2014).

Jedan od glavnih mehanizama za kontrolu patogena je sposobnost sinteze jednog ili više antibiotika. Mnoge PGPB koje sintetizuju antibiotike imaju, takođe, sposobnost produkcije cijanida, koji u većini slučajeva imaju sinergističko dejstvo sa antibioticima (Glick, 2015). Pored toga, da bi se prevazišlo ograničeno snabdevanje biljaka gvožđem, PGPB, kao što je *Pseudomonas* sp., sintetizuje siderofore, tj. proteine male molekulske mase (~400-1500 Da) koji imaju visok afinitet prema jonu gvožđa (Fe^{+3}). Pod aerobnim uslovima, veći deo gvožđa je slabo rastvoran i samim tim nije u potpunosti dostupan bakterijama i biljkama (Gopalakrishnan et al., 2014). Bakterijske siderofore imaju direktan pozitivan učinak na rast biljke delujući kao direktan izvor gvožđa i čineći ga dostupnim za biljku (Hassen et al., 2016). Određena istraživanja su pokazala da *Pseudomonas*, koji ima sposobnost produkcije siderofora, utiče na

antifungalnu aktivnost prema patogenim gljivama - *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *F. oxysporum* i *Sclerotium rolfsii* (Manwar et al., 2004).

Pored toga, PGPB pozitivno deluju i na karakteristike samog zemljišta, a njihovi konzorcijumi uspešno se koriste u procesima bioremedijacije. Na taj način neplodne i zagađene površine postaju obradive i dostupne za poljoprivrednu proizvodnju, jer dolazi do transformacije zasićenih ugljovodonika i drugih zagađivača u manje štetne oblike (Beškoski et al., 2011; Gojgić-Cvijović et al., 2012). Među mikroorganizme koji efikasno razlažu ugljovodonike i zagađivače naftnog tipa navode se *Nocardia* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Arthrobacter* sp., *Corynebacterium* sp., *Mycobacterium* sp., *Bacillus* sp. i drugi (Milić et al., 2009).

2.4. *Bacillus* sp.

Rod *Bacillus* je jedan od najčešće korišćenih u biokontroli fitopatogena. U ovu grupu spadaju Gram pozitivne, štapičaste bakterije klasifikovane kao striktni ili fakultativni anaerobi. Rasprostranjene su u zemljištu, vazduhu i vodi, gde u nepovoljnim uslovima sredine formiraju endospore (Castillo et al., 2013). Formiranje endospora je zapravo način prilagođavanja bakterija na nepovoljne uslove sredine, koje može da prouzrokuje promena temperature, pH vrednosti ili gladovanje, odnosno nedostatak nutrijenata (Abhyankar et al., 2011). S obzirom da je sporulacija kompleksan proces koji oduzima dosta energije, *B. subtilis* je razvila niz odbrambenih mehanizama koji stupaju na snagu pre sporulacije. Sposobnost pokretljivosti, hemotaksa, proizvodnja enzima, genetičke transformacije i proizvodnja antibiotika omogućavaju ovoj vrsti preživljavanje u nepovoljnim uslovima sredine (Errington, 2003). Takva svojstva su izuzetno poželjna kod formulacija mikrobioloških đubriva, jer pružaju garanciju dugotrajnosti i otpornosti preparata bez obzira na vremenske uslove.

2.4.1. Fitosimulatorno i biopesticidno dejstvo *B. subtilis*

Mehanizmi delovanja mikroorganizama ove grupe mogu biti različiti. Pregled njihovog fitostimulatornog i biopesticidnog dejstva dat je u tabelama 3 i 4, redom. Na prvom mestu, karakteristična je proizvodnja različitih jedinjenja koja deluju kao prirodni pesticidi, odnosno štite biljke od patogena i stimulišu njihov rast. Produkuju isparljive supstance koje indukuju odbrambene mehanizme, poput indukovane sistemske otpornosti.

Tabela 3 Fitostimulatorno dejstvo sojeva iz roda *Bacillus*

Mikroorganizam	Mehanizam regulacije rasta biljaka	Referenca
<i>B. subtilis</i>	Produkcija jedinjenja koja deluju kao fitostimulatori (indol sirćetna kiselina) i prirodni pesticidi: amilaze, polisaharidi, lipopeptidi (fengicin C, surfaktin, iturin A).	Akcan et al. (2012); Božić et al. (2011); Cagri-Mehmetoglu et al. (2012); Grobelak et al. (2015); Guez et al. (2007); Mosquera et al. (2014); Yeh et al. (2006)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Solubilizacija cinka, solubilizacija fosfora. Sinteza jedinjenja koje pospešuju rast biljaka: indol sirćetna kiselina, giberelinska kiselina, siderofore, ACC deaminaza, fosfataze, fitaze, cijanovodonična kiselina, celulaze, amilaze.	Akcan et al. (2012); Sharma et al. (2013)
<i>B. megaterium</i>	Fosfosolubilizacija; produkcija jedinjenja koja pospešuju rast biljaka: 2-pentilfuran, 2,3-dimetil-butandinitril, 1-etenil-4-metoksi-benzen, 3,5-dimetoksi-toluen, heksadekan	Velineni i Brahmaaprakash (2011); Zou et al. (2010)
<i>B. cereus</i>	Produkcija lipaza, polisaharida	Lizárraga-Sánchez et al. (2015); Vasiee et al. (2016); Zhao et al., (2010)
<i>Bacillus circulans</i>	Produkcija egzopolisaharida	Vidhyalakshmi et al. (2016)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Proizvodnja indol-3-sirćetne kiseline i povećanje resorpcije fosfora. Povećanje ukupne količine hlorofila.	Sukkasem et al. (2018)

B. amyloliquefaciens ima sposobnost solubilizacije minerala i sinteze biljnih stimulatora rasta, dok *B. cereus* ima izraženu antagonističku aktivnost i vrši biološku kontrolu rasta nepoželjnih gljiva poput *Fusarium verticillioides* (Martinez-Alvarez et al., 2016; Sharma et al., 2013). *B. cereus* se primenjuje i u prečišćavanju otpadnih voda zagađenih naftom, jer ima sposobnost rezgradnje ugljovodonika (Banerjee i Ghoshal, 2017). Mosquera et.al. (2014) su ustanovili da lipopeptidi poput iturina A, surfaktina i fengicina koje proizvodi *B. subtilis* imaju antifungalno dejstvo protiv fitopatogena *Mycosphaerella fijiensis*. Pored toga, ustanovljeno je da inokulacija ovom bakterijskom kulturom utiče na poboljšanje usvajanja fosfora i cinka kod biljaka (Moreno-Lora et al., 2019). U jednom od istraživanja, čvrsto mikrobiološko đubrivo sa inkorporisanim ćelijama *B. subtilis* BY-2 je primenjeno u realnim uslovima polja na biljke kukuruza. Nakon dvogodišnjeg testiranja preparata na različitim lokacijama, izveden je zaključak da je izvršena uspešna supresija bolesti koje izaziva *Sclerotonia sclerotiorum* (Li et

al., 2020). Druga grupa istraživača testirala je efekat suve formulacije izolata *B. subtilis* T429 dobijene sušenjem raspršivanjem na sadnice pirinča. Testiranje je pokazalo da se njegovom primenom smanjuje plamenjača pirinča za čak 80%. S obzirom da se primenom komercijalnog fungicida na iste useve postiže slična efikasnost u smanjenju bolesti (79,5%), izveden je zaključak da se mikrobna formulacija bazirana na *B. subtilis* može koristiti umesto hemijskih pesticida sa ciljem zaštite sadnica pirinča (Meng et al., 2015).

Tabela 4 Pregled biopesticidnog dejstva bakterija grupe *Bacillus* na pojedine fitopatogene

Mikroorganizam	Biljka	Fitopatogen	Referenca
<i>Bacillus sp.</i>	-	<i>Macrophomina phaseolina</i> <i>F. oxysporum</i> <i>Fusarium solani</i> <i>S. sclerotiorum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Colletotricum sp</i>	Kumar et al. (2012)
<i>B. subtilis</i>	-	<i>Phytophthora infestans</i> <i>Alternaria solani</i> <i>Cladosporium fulvum</i> <i>Oidium neolycopersici</i>	Sultan (2010)
<i>B. subtilis</i>	-	<i>Mycosphae rella fijiensis</i>	Mosquera et al. (2014)
<i>B. subtilis</i>	Pamuk	<i>Fusarium cf. - incarnatum</i>	Li et al. (2013)
<i>B. subtilis</i>	Kikirirki	<i>R. solani</i> <i>S. rolfsii.</i>	Ahmad et al. (2019)
<i>B. subtilis</i>	Banana	<i>Fusarium sp.</i>	Zhang et al. (2014)
<i>B. subtilis</i>	Šljiva	<i>R. solanacearum</i>	Ji et al. (2008)
<i>B. subtilis</i>	Krompir	<i>P. infestans</i>	Kumbar et al. (2019)
<i>B. subtilis</i>	Pšenica	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Villa-Rodríguez et al. (2019)
<i>B. subtilis</i>	Pšenica	<i>Fusarium graminearum</i>	Zalila-Kolsi et al. (2016)

Nastavak tabele 4

Mikroorganizam	Biljka	Fitopatogen	Referenca
<i>B. subtilis</i>	-	<i>Penicillium digitatum</i>	Foysal i Lisa (2018)
<i>B. subtilis</i>	-	<i>S. sclerotiorum</i>	Liu et al. (2008)
<i>B. subtilis</i>	Pasulj i soja	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Torres et al. (2016)
<i>B. subtilis</i>	Paradajz	<i>F. oxysporum</i> <i>sp. lycopersici</i>	Aydi Ben Abdallah et al. (2017)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Pšenica	<i>F. graminearum</i>	Zalila-Kolsi et al. (2016)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Azijski ginseng	<i>Phytophthora cactorum</i>	Lee et al. (2015)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Lubenica	<i>Acidovoraxavenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	Jiang et al. (2015)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Pasulj i soja	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Torres et al. (2016)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Paradajz	<i>F. oxysporum</i> sp. <i>lycopersici</i>	Aydi Ben Abdallah et al. (2017)
<i>B. pumilis</i>	Mango	<i>Colletotrichum</i> spp.	Zheng et al. (2013)
<i>B. pumilis</i>	-	<i>Ascochyta citrullina</i> , <i>A. solani</i> , <i>Alternaria brassicae</i>	Liu et al. (2008)
<i>B. thuringiensis</i>	Mango	<i>Colletotrichum</i>	Zheng et al. (2013)
<i>B. licheniformis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	Sukkasem et al. (2018)

2.4.2. Metabolizam *B. subtilis*

Osnova mikrobnog rasta leži u balansu anaboličkih i kataboličkih reakcija. Ovi metabolički pravci su promenljivi i menjaju se u skladu sa uslovima sredine i brzinom rasta. Ćelijski metabolizam i uticaji sredine na metaboličke promene se najbolje proučavaju u limitiranim uslovima (Sonenshein, 2007).

Kada su mikroorganizmi limitirani za izvor energije (uglavnom izvor ugljenika), katabolizam je usko vezan za anabolizam i postižu se visoki prinosi biomase. S druge strane, kada je ugljenik u višku, smanjuje se energetska efikasnost: brzina potrošnje ugljenika je velika, a ostvaruju se mali prinosi biomase. Takav efekat, do kojeg dolazi i kod *B. subtilis*, naziva se preplavni metabolizam i objašnjava se odvajanjem anabolitičkih od katabolitičkih reakcija, prebacivanjem toka elektrona na manje efikasne cikluse što dovodi do rasipanja energije (Dauner et al., 2001).

Mikroorganizmi poput *B. subtilis* brzo rastu i zahtevaju velike količine kiseonika koje koriste za oksidaciju NAD(P)H ili FADH₂ čime se stvara ATP za rast i produkciju željenih proizvoda. Iako je *B. subtilis* aerobni mikroorganizam, ukoliko se nađe u uslovima limitiranim kiseonikom, može doći do anaerobne respiracije i fermentacionih procesa koji rezultuju različitim proizvodima metabolizma (Nakano i Hulett, 2006).

U anaerobnim uslovima *B. subtilis* ostvaruje rast u prisustvu glukoze, sa nitratima kao terminalnim akceptorom elektrona. Limitacija kiseonika šalje signal ćeliji koja onda prilagođava svoj metabolizam ekspresijom gena neophodnog za sintezu molibden kofaktora odgovornog za stvaranje nitrat reduktaze. Pri tome, signal koji prenosi informaciju ćeliji može biti sam kiseonik ili neki drugi molekul koji utiče na ekspresiju gena (Nakano i Zuber, 1998). Dokazano je da je respiratorna nitrat reduktaza prisutna samo ukoliko u kultivacionoj podlozi nema dovoljne količine kiseonika. U anaerobnim uslovima, uz prisustvo enzima nitrat reduktaze, dolazi do redukcije nitrata do nitrita uz oslobodenje NADH. NADH se generiše kroz dva ciklusa: Embden-Majerhofov (EMP) ciklus i ciklus trikarbonskih kiselina (TCA). U nedostatku kiseonika nitrati postaju preferirani terminalni akceptor elektrona zbog svojeg velikog redoks potencijala. Samim tim, ukoliko se kultivacija *B. subtilis* vrši u uslovima limitiranim kiseonikom, veći fluks se ostvaruje kroz EMP i TCA ciklus, pa je i količina oslobođenog NADH i NADPH veća. Tako nešto je očekivano zbog toga što je ćelijama u sredini sa manje kiseonika neophodan ATP generisan fosforilacijom supstrata kroz EMP ciklus. S druge strane, fluks ostvaren kroz pentoza fosfatni ciklus se znatno smanjuje. S obzirom da je ovaj ciklus odgovoran za biosintezu nukleotida i aminokiselina koji su esencijalni za ćelijski rast, jasno je da se u uslovima limitiranim kiseonikom očekuje smanjena količina biomase (Hu et al., 2017).

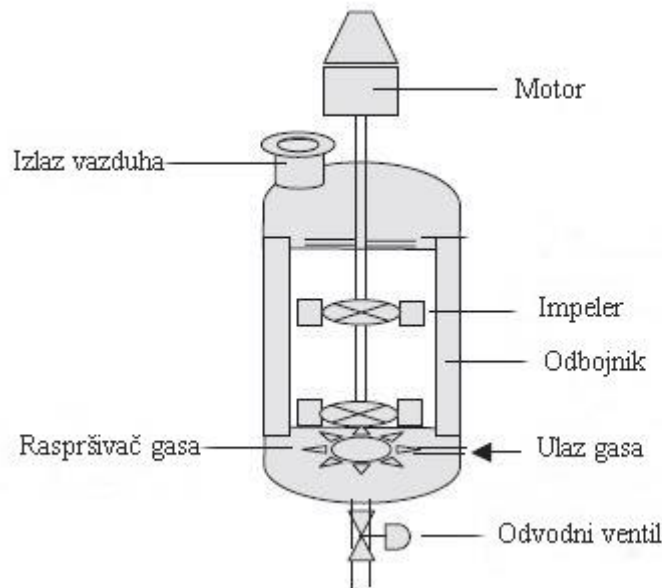
U nedostatku eksternih akceptora elektrona, *B. subtilis* generiše energiju fosforilacijom supstrata, pri čemu se piruvat koristi za reoksidaciju NADH, čime se omogućava nastavak glikolize. S obzirom da u ovom procesu ne postoji respiratorni lanac elektrona koji je potreban za terminalne akceptore elektrona, reoksidacija NADH se postiže konverzijom piruvata do proizvoda fermentacije. Najčešće zabeleženi proizvodi fermentacije *B. subtilis* u anaerobnim procesima su acetat, acetoin, etanol, laktat, sukcinat i 2,3-butandiol (slika 1) (Ramos et al., 2000).

2.5.1. Izbor bioreaktora

Odabir pravog bioreaktora je ključni korak u postizanju uspešne fermentacije. Stoga su dizajn i režim rada bioreaktora važni aspekti u procesu optimizacije. Učink bioreaktora zavisi od njegove geometrijske konstrukcije, unutrašnjeg dizajna, distributora gasa i režima rada. Pre odabira tipa bioreaktora, moraju da budu raspoloživi podaci o stehiometriji, kinetici, razmeni toplote, koncentraciji supstrata u podlozi i na kraju fermentacije. Stehiometrijski podaci, upotpunjeni podacima o kinetici, jezgro su za projektovanje bioreaktora (Fu et al., 2003).

Bioreaktori se mogu podeliti na osnovu različitih kriterijuma. Opšta podela na osnovu prisustva kiseonika i mešanja, je na aerobne i anaerobne bioreaktore, sa i bez mešanja. Reaktor sa mešanjem je najčešće korišćen tip bioreaktora u industriji. Ukoliko je odnos visine i prečnika bioreaktora $H/D \leq 3$ za bioreaktor se kaže da je sud, a ukoliko je $H/D > 3$ radi se o koloni. Prema režimu rada, bioreaktori se mogu podeliti na šaržne, protočne i poluprotočne (Dodić i Popov, 2009). Još jedna od podela bioreaktora je prema načinu gajenja mikroorganizama na dubinske (submerzne), površinske (emerzne) i bioreaktore sa čvrstom i polučvrstom podlogom. Submerzni bioreaktori se, prema konfiguraciji, mogu da podele na bioreaktore bez cirkulacije i sa cirkulacijom (unutrašnjom ili spoljašnjom). Unutrašnja cirkulacija predstavlja prirodno cirkulisanje tečnosti, dok spoljašnja cirkulacija može da bude prirodna ili prinudna, dejstvom crpki, mehaničkih mešalica ili aeracije. Ukoliko gas cirkuliše pomoću vazduha pod pritiskom radi se o barbotaznim kolonama ili o air-lift bioreaktoru, dok je bioreaktor sa prinudnom cirkulacijom (crpkom) modifikovan tip air-lift sistema u kojem pumpa transportuje vazduh i tečnost kroz sud. U zavisnosti od oblika ćelija u suspenziji bioreaktori se, takođe, dele na bioreaktore za slobodno suspendovane ćelije i bioreaktore za imobilisane ćelije. Kod imobilisanih sistema, vazduh cirkuliše preko filma mikroorganizama koji rastu na čvrstoj površini, a mogu da se koriste i određeni katalizatori (Najafpour, 2007).

Bioreaktori sa mehaničkim mešanjem su najkonvencionalnija vrsta bioreaktora koja se koristi od 1940. godine (Jambi, 2012). Tradicionalni bioreaktor predstavlja sud sa mešanjem, koji može da bude šaržni ili kontinualni. Ovakav bioreaktor sadrži unutrašnje odbojnice i mešalicu, kako bi se postiglo neophodno mešanje, homogenizacija, prenos mase i toplote. Ovi bioreaktori su izuzetno fleksibilni i mogu da omoguće jako visok zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika. Gas pod pritiskom se uvodi kroz distributore koji se nalaze ispod površine, kako bi se omogućila dovoljna količina gasova za ćelijski metabolizam. Veličina mehurova i sadržaj gasa u bioreaktoru su kritični za učinak bioreaktora. Slika 2 prikazuje tipični bioreaktor sa mešanjem.



Slika 2. Tradicionalni bioreaktor sa mešanjem (adaptirano prema Najafpour, 2007)

Generalno, glavne prednosti bioreaktora sa mehaničkim mešanjem su njihov dokazan učinak, lako održavanje homogenih uslova, lako povećanje razmere i monitorinog procesnih parametara. Nedostaci korišćenja ovih sistema odnose se na velike troškove usled stalnog mehaničkog mešanja, stvaranje statičkih i anoksičnih zona u delovima bioreaktora koji su udaljeni od impelera i stvaranje pene koje nastaje usled intenzivnog mešanja i aeracije (Jambi, 2012; Najafpour, 2007).

2.5.2. Tip fermentacije

Bakterije mogu da rastu u šaržnim, polukontinualnim ili kontinualnim uslovima. Kontinualna fermentacija se smatra eksperimentalnim postupkom i retko se koristi za industrijske razmere. Najčešće korišćeni postupak koji istovremeno omogućava i laku kontrolu i upravljanje procesom je šaržna submerzna fermentacija (Glick, 2015).

Šaržna fermentacija duguje svoju popularnost jednostavnosti i lakoći izvođenja, u poređenju sa polukontinualnim procesom koji zahteva stalno nadgledanje i veće troškove, ali u isto vreme daje i bolje rezultate (Stamenković et al., 2018). U slučaju primene polukontinualnog fermentacionog procesa, dolivanje supstrata se vrši različitom dinamikom: pulsним, konstantnim, eksponencijalnim ili linearnim dotokom podloge (Öztürk et al., 2016). Dodatak nutrijenata za vreme polukontinualnog procesa uglavnom se vrši sredinom eksponencijalne faze, što produžava eksponencijalnu i stacionarnu fazu, samim tim povećavajući količinu stvorene biomase (Glick, 2015). U jednom od istraživanja, kultivacija spora *B. subtilis* je izvedena korišćenjem oba postupka: šaržnog i polukontinualnog. Polukontinualni proces je bio podeljen u tri faze: šaržnu (koja traje 12 h), polukontinualnu (naredna 4 h) i još jednu šaržnu do samog kraja fermentacije. Obe metode su postigle visoke koncentracije vegetativnih ćelija, iako je polukontinualna kultivacija pomogla u sprečavanju liziranja ćelija i omogućila veće

koncentracije spora (Monteiro et al., 2014). Ključna stvar tokom polukontinualnih postupka je praćenje količine supstrata u podlozi kontinualno tokom celog procesa. U velikom broju slučajeva je teško izmeriti koncentraciju supstrata direktno za vreme fermentacije, pa se mogu koristiti drugi indikatori kao što su pH vrednost, količina CO₂ i organskih kiselina, da bi se procenilo da li je potreban dodatan supstrat. Generalno, polukontinualni proces zahteva veće nadgledanje i kontrolu u odnosu na šaržnu fermentaciju, pa se zbog toga manje koriste, uprkos potencijalu da se njima ostvare veće količine biomase (Glick, 2015).

2.5.3. Optimizacija sastava podloge

Podloga za dobijanje biomase bi trebalo da zadovolji nekoliko kriterijuma: da je jeftina, lako dostupna i sa odgovarajućim bilansom nutrijenata (Shaikh i Sayyed, 2015; Veljković, 1994). U većini slučajeva, fermentacija započinje inokulacijom u odgovarajućoj podlozi (hranljivi bujon, LB medijum, Tryptic soja agar i dr.), nakon čega se određena količina inokuluma (obično 1-10%) prenosi u odgovarajuću podlogu za rast, koja je specifična za svaki mikroorganizam i čiji sastav može varirati u zavisnosti od cilja fermentacije (Shaikh i Sayyed, 2015). Neophodno je da podloga sadrži izvor ugljenika (najčešće glukoza) i izvor azota, neorganske soli i druge supstance koje zadovoljavaju potrebe metabolizma. Takvi uslovi omogućavaju visok prinos biomase (Abhyankar et al., 2011; de Carvalho et al., 2010). U velikom broju radova, sastav hranljive podloge optimizovan je primenom višefaktorske analize: eksperimentalnog dizajna i metode odzivnih površina (Anh, 2010; Chen et al., 2010; Cho et al., 2009; Sreekumar i Krishnan, 2010). Primenom ove metode mogu da se, iz grupe različitih jedinjenja, izdvoje ona koja imaju pozitivan uticaj na rast mikroorganizma i utvrde njihove optimalne koncentracije u podlozi. Pregled različitih podloga korišćenih za gajenje *Bacillus* sp. dat je u tabeli 5.

Tabela 5 Najčešće korišćene podloge za kultivaciju *Bacillus* sp.

Naziv	Sadržaj	Mikroorganizam	Referenca
DSM (difco sporulacioni medijum)	Hranljivi agar, KCl, MgSO ₄ , Ca(NO ₃) ₂ , MnCl ₂ , FeSO ₄ ;	<i>B. subtilis</i>	Green et al. (1999); Karava et al. (2019); Monteiro et al. (2014); Tavares et al. (2013)
F-podloga	Glukoza, L-glutamat, ekstrakt kvasca, KH ₂ PO ₄ , (NH ₄) ₃ PO ₄ , MgSO ₄ , NaCl, CaCl ₂ , MnSO ₄ , ZnSO ₄ , FeSO ₄ ;	<i>B. subtilis</i>	Tavares et al. (2013)
NBY podloga (Nutrient broth yeast extract medium)	Hranljivi bujon, ekstrakt kvasca, K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄	<i>B. subtilis</i>	Ghasemi i Ahmadzadeh (2013)

Nastavak tabele 5

Naziv	Sadržaj	Mikroorganizam	Referenca
Bazalna podloga	Ekstrakt kvasca, glukoza, MnSO ₄ , CaCl ₂ , KH ₂ PO ₄ , K ₂ PO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , MgSO ₄	<i>B. subtilis</i>	Mosquera et al., (2014)
CDM1(hemijski definisana podloga1)	C ₆ H ₈ O ₇ , KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , MgCl ₂ , (NH ₄) ₂ HPO ₄ , FeCl ₃ , tiamin-HCl i Ca(NO ₃) ₂ , glukoza	<i>B. subtilis</i>	Monteiro et al., (2014)
CDM2 (hemijski definisana podloga 2)	Glukoza, pepton, ekstrakt kvasca, mesni ekstrakt, NH ₄ NO ₃ , KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ , NaCl, (NH ₄) ₂ Mo ₄ , Ca ₃ (NO ₃) ₂ , MgSO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , PVP-40, FeCl ₃ , EDTA, CaO, EDTA, rastvor soli, NH ₄ H ₂ PO ₄	<i>B. subtilis</i>	Ilić (2016)
CDM3 (hemijski definisana podloga 3)	Glukoza, ekstrakt kvasca, NH ₄ NO ₃ , KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ , NaCl, Ca ₃ (NO ₃) ₂ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , PVP-40, FeCl ₃ , rastvor soli, NH ₄ H ₂ PO ₄ , glicerol	<i>B. megaterium</i>	Ilić (2016)
CDM4 (hemijski definisana podloga 4)	Glukoza, KH ₂ PO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , ekstrakt kvasca, CaCl ₂ , MgCl ₂ , metali u tragovima;	<i>B. licheniformis</i>	Reis et al. (2005)

2.5.4. Uslovi kultivacije

Bacillus sp. pripada grupi mezofilnih mikroorganizama koji rastu na temperaturama između 20 °C i 40 °C. Temperaturni opseg 30-37 °C je uglavnom preporučen za optimalne uslove rasta, dok je temperatura od 85 °C letalna za vegetativne ćelije (Monteiro et al., 2005; Tavares et al., 2013). Pryor et. al (2007) su ustanovili da se jako dobra sporulacija (92%) može postignuti i na 27 °C u kombinaciji sa drugim faktorima kao što su visok sadržaj vlage i stopa aeracije, što može pomoći u smanjenju energetske troškova (Pryor et al., 2007). Otpornost spora može lako da se poboljša toplim ili hladnim šok tretmanom. Hladni šok tretman povećava otpornost spora do 100 °C zbog formiranja proteina koji štite DNK spore (Movahedi i Waites, 2002; Pandey et al., 2015). Za većinu bakterija, pH vrednost treba da se, takođe, održava na konstantom nivou 6-7. U jednom od istraživanja navedeno je da bazne podloge poboljšavaju sporulaciju *B. amyloliquefaciens*, dok kisela sredina otežava formiranje spora (Tzeng et al., 2008).

Znajući da su bakterije iz roda *Bacillus* aerobne ili fakultativno anaerobne, jasno je da kiseonik igra važnu ulogu u procesu kultivacije i predstavlja ključni faktor za njenu efikasnost (Naseva et al., 2002; Stamenkovic-Stojanovic et al., 2019). Povećanjem koncentracije rastvorenog

kiseonika, dolazi do povećanja broja ćelija, spora i željenih metabolita, dok njegov nedostatak ili smanjena dostupnost utiču na kinetiku fermentacije (Suresh et al., 2009b; Wu et al., 2003). Utvrđeno je da *Bacillus thuringiensis* ne sporuliše u uslovima limitiranih kiseonikom. Među tri korišćena zapreminska protoka vazduha, najbolji rezultati u pogledu sporulacije postignuti su sa najvećim specifičnim protokom vazduha (2 vvm.) (Elsayed et al., 2014). Isti zapreminski protok vazduha je primenjen za kultivaciju *B. subtilis* i produkciju iturina A sa odličnim prinostom (Shih et al., 2009). Još jedna studija, takođe, naglašava važnost aeracije tvrdeći da nedostatak kiseonika dovodi do liziranja sporangija (Sarrafzadeh et al., 2014).

Jako je bitno održavati nivo rastvorenog kiseonika na željenom nivou. Količina dostupnog kiseonika se u biohemijskom inženjerstvu izražava preko brzine prenosa mase kiseonika (eng. oxygen transfer rate, OTR) (Galaction et al., 2003; Suresh et al., 2009b). Brzina prenosa mase kiseonika predstavlja količinu kiseonika po jedinici zapremine i jedinici vremena koja se prenosi iz gasne u tečnu fazu. Kod aerobnih kultivacija, brzina potrošnje kiseonika (eng. oxygen uptake rate, OUR) bi trebalo da bude manja od brzine prenosa. Utvrđeno je da je maksimalni OUR za *B. subtilis* 20,3 mmolO₂/l·h, dok je specifična brzina potrošnje kiseonika 106 mmolO₂/g·h. Ovakav rezultat postignut je za 10 h kultivacije na početku ekspoencijalne faze, kada postoji najveća potreba za kiseonikom (Richard i Margaritis, 2003).

Kapacitet prenosa mase kiseonika zavisi od zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika (k_{La}), koji se može odrediti nekom od standardnih metoda (sulfitna, apsorpciona metoda) ili se mogu upotrebiti postojeće korelacije koje uzimaju u obzir specifičnu međufaznu površinu i brzinu mešanja (Garcia-Ochoa i Gomez, 2009; Veljković et al., 1995; Venkatachalam et al., 2011). Uticaj na k_{La} imaju i produkti metabolizma koji su prisutni u fermentacionoj tečnosti. Takav slučaj je zabeležen tokom kultivacije *B. subtilis*, koja ima sposobnost produkcije surfaktanata. Dodatak vektora kiseonika povećava vrednosti k_{La} , ali u isto vreme umanjuje produkciju metabolita (Hbid et al., 1996). Slično tome, Shih et. al. (2009) su potvrdili da povećanje k_{La} potpomaže proizvodnju ćelijske biomase, ali suzbija nastajanje iturina A (Shih et al., 2009). S obzirom da je prisustvo takvih metabolita u fermentacionoj tečnosti veoma poželjno zbog svojih antifugalnih svojstava, kultivacija se treba dalje optimizovati kontrolisanjem brzine mešanja (Hbid et al., 1996).

Adekvatno mešanje mikrobne kulture je neophodno sa mnogih aspekata fermentacije uključujući omogućavanje dovoljne količine nutrijenata i sprečavanje akumulacije toksičnih sporednih proizvoda metabolizma u lokalnim oblastima bioreaktora sa slabijim mešanjem (AL-Mashhadani et al., 2015). Efektivno mešanje se lako postiže kod kultura malih razmera, ali predstavlja glavni problem kada se razmera fermentacije povećava. Važno je znati da se optimalni uslovi menjaju sa svakim povećanjem zapremine bioreaktora (Liu, 2012). Adekvatnim mešanjem moguće je da se kontroliše koncentraciju kiseonika u podlozi (de Carvalho et al., 2010). Najčešće korišćene su Raštanove mešalice, dok opseg brzina mešanja varira u granicama 100-1500 rpm (Božić et al., 2011).

Pregled istraživanja kultivacije mikroorganizama grupe *Bacillus* pod različitim eksperimentalnim uslovima dat je u tabeli 6.

Tabela 6 Uslovi kultivacije mikroorganizama grupe *Bacillus* sp.

Tip mikroorganizma/Tip kultivacije	Podloga/ Substrat	Optimalni eksperimentalni uslovi				Rezultati/Zaključci	Reference
		Temperatura (°C)	Brzina mešanja (rpm)	Vreme inkubacije (h)	Stepen aeracije/koncentracija O ₂		
<i>B. subtilis</i> Erlenmajerovi sudovi na mućkalici	DSM, CDM1; Glukoza, vitamini, ammonijum-sulfat.	37	150	48	-	-Vitamini značajno utiču na sporulaciju. -Dodatkom glukoze do 20 g·L ⁻¹ i kalcijuma sporulacija se povećava	Monteiro et al.(2014)
<i>B. subtilis</i> Šaržno	DSM/CDM1	37	100-1200	48	2 L·min ⁻¹ / 30%	-Maksimalna koncentracija vegetativnih ćelija (1,3·10 ¹⁰ ćelija·mL ⁻¹) dostignuta je na kraju eksponencijalne faze. -Primećeno je liziranje ćelija. 48% ćelija je formiralo spore za krajnju koncentraciju: 6,3·10 ⁹ spora·L ⁻¹	(Monteiro et al. (2014)
<i>B. subtilis</i> Polukontinualno (3 faze)	DSM/CDM1; Glukoza, amonijum-sulfat	37	100-1200	48	2 L·min ⁻¹ / 30%	Višak glukoze u odnosu na amonijak sprečava liziranje ćelija i omogućava da veći broj ćelija sporuliše. Koncentracija glukoze ispod 20 mg·L ⁻¹ , amonijaka ispod 900 mg·L ⁻¹ i dodatak kalcijuma dali su rezultat od 3,6·10 ¹⁰ spora·mL ⁻¹	(Monteiro et al. (2014)

Nastavak tabele 6

Tip mikroorganizma/Tip kultivacije	Podloga/ Substrat	Optimalni eksperimentalni uslovi				Rezultati/Zaključci	Reference
		Temperatura (°C)	Brzina mešanja (rpm)	Vreme inkubacije (h)	Stepen aeracije/koncentracija O ₂		
<i>B. subtilis</i> Erlenmajerovi sudovi sa mešanjem i petri ploče	DSM/ F podloga	37	200	24 i 72	-	Najbolje rezultate dale su kulture gajene na F podlozi nakon 72 h (preko 10 ⁹ spora·mL ⁻¹ , nakon prečišćavanja).	Tavares et al. (2013)
<i>B. subtilis</i> Šaržna	CDM2	30	200-300	72	-	Postignuta koncentracija ćelija bila je 5·10 ⁸ CFU·mL ⁻¹	Ilić (2016)
<i>B. subtilis</i> Polukontinualna (2 faze)	CDM2/ Glukoza, Ca	30	200-300	72	-	Postignuta koncentracija ćelija bila je 5·10 ⁸ CFU·mL ⁻¹	Ilić (2016)
<i>B. megaterium</i> Šaržna	CDM3	30	200-300	72	-	Postignuta koncentracija ćelija bila je 1,55·10 ⁹ CFU·mL ⁻¹ .	Ilić (2016)

Nastavak tabele 6

Tip mikroorganizma/Tip kultivacije	Podloga/ Substrat	Optimalni eksperimentalni uslovi				Rezultati/Zaključci	Reference
		Temperatura (°C)	Brzina mešanja (rpm)	Vreme inkubacije (h)	Stepen aeracije/koncentracija O ₂		
<i>B. megaterium</i>							
Polukontinualna (2 faze)	CDM3	30	200-300	72	-	Postignuta koncentracija ćelija bila je $7 \cdot 10^9$ CFU·mL ⁻¹ .	Ilić (2016)
<i>B. megaterium</i> var, <i>phospaticum</i>	Modifikovani Pikovaskaya bujon	28	200	96	-	Dodatak PVP 2% je uticao na bolje održavanje ćelija. Postignuta koncentracija ćelija bila je: $3,7 \cdot 10^{10}$ CFU·mL ⁻¹	Leo Daniel et al. (2013)
Erlenmajerovi sudovi sa mešanjem							
<i>B. licheniformis</i>							
Polukontinualna (4 faza)	CDM4	45	1500	-	-	Period gladovanja je povećao broj ćelija sa depolarizovanom membranom, što daje indikacije da je stres prouzrokovan nedostatkom glukoze.	Reis et al. (2005)

2.5.5. Modelovanje rasta mikroorganizama

Biološki rast je vrlo kompleksan proces usko povezan sa sintezom ćelijskih konstituenata (biomasom) i umnožavanjem individualnih ćelija. Kinetika rasta predstavlja brzinu kojom se broj individualnih ćelija (ili aktivna biomasa) menja u definisanom sistemu. Povećanje biomase se može meriti u funkciji vremena, kako bi se dobila kriva rasta. Kriva rasta mikroorganizama je karakterističnog oblika i sadrži lag, eksponencijalnu (log) i stacionarnu fazu, praćenu fazom odumiranja (Zweiering et al., 1990).

Lag faza dešava se odmah nakon inokulacije i predstavlja period adaptacije mikroorganizama na nove uslove sredine. Definiše se kao tranzicija do eksponencijalne faze posle udvostručavanja početnog broja ćelija. Nakon lag faze, koja može trajati od nekoliko minuta do nekoliko sati, odpočinje rast mikroorganizama. Dužina lag faze se može kontrolisati veličinom inokuluma, sastavom podloge ili spoljašnjim uslovima.

Eksponencijalna faza je okarakterisana periodom intenzivnog rasta najvećom mogućom brzinom u datim uslovima. Brzina povećanja broja ćelija u eksponencijalnoj fazi proporcionalna je broju ćelija i generalno se može prikazati sledećom jednačinom (Egli, 2009) :

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (1)$$

gde je X – broj ili masa ćelija, t – vreme, a μ – specifična brzina rasta. Rešavanjem jednačine (1) dobija se:

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu_m \cdot t \quad (2)$$

Iz jednačine (2) može da se odredi generacijsko vreme t_d , odnosno vreme potrebno da se broj ćelija udvostruči:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_m} \quad (3)$$

Nakon eksponencijalne sledi stacionarna faza rasta u kojoj se ćelije i dalje dele i umnožavaju, ali je njihov rast balansirani jednakim brojem umrlih ćelija. Ćelijska kultura može ući u stacionarnu fazu ukoliko su iscrpljeni nutrijenti ili ukoliko je došlo do inhibicije rasta nekim od proizvoda metabolizma. Pri tom, iscrpljivanje nutrijenata ne mora nužno da dovede do prestanka rasta, zbog toga što ćelije koje liziraju predstavljaju izvor nutrijenata za ćelije koje su i dalje žive. Rast zasnovan na mrtvim ćelijama se naziva endogeni metabolizam, i razlog je za postojanje blagog porasta broja ćelija i tokom stacionarne faze. Poslednja faza je faza odumiranja, karakterisana gubitkom živih ćelija. Čak i u ovoj fazi mogu postojati žive ćelije koje metabolišu i dele se, ali je njihov broj dosta manji od broja umrlih ćelija.

Da bi se adekvatno opisala kriva rasta i sve njene faze i da bi se broj izmerenih podataka redukovao na ograničen broj interesantnih parametara, potrebno je naći odgovarajući matematički model. Prvi najjednostavniji model razvijen u mikrobiološkoj kinetici je Monodov

model koji ukazuje da brzina rasta zavisi od koncentracije supstrata. Pored Monodovog modela, u literaturi se može naći veći broj drugih modela rasta, koji opisuju ponašanje određenih organizama i ne uključuju potrošnju supstrata kao model baziran na Monodovoj jednačini. Ukoliko se pretpostavi da postoji dovoljno supstrata kojim će se postići željeni broj mikroorganizama, onda nivo supstrata nije od prevelikog interesa, pa se takvi modeli mogu upotrebiti (Zweiering et al., 1990).

2.5.6. Povećanje razmere procesa

Povećanje razmere bioprocesa podrazumeva prenošenje procesa sa laboratorijskog nivoa na poluindustrijski i industrijski nivo u cilju dobijanja željenog proizvoda u većim količinama. S obzirom na to da se početni eksperimenti uglavnom izvode na opremi manjih razmera, potrebno je utvrditi da li će se isti ili slični rezultati postići na opremi većih dimenzija (Wang et al., 1997). Promene dimenzija mogu da prouzrokuju promene u efikasnosti mešanja, utiču na snabdevanje kiseonikom i povećaju mogućnost kreiranja „mrtvih zona“ i nejednaku raspoređenost nutrijenta. Da bi se predvideo učinak procesa veće razmere, potrebno je razmotriti efekat povećanja dimenzija fermentora, odnosno dodatnih poteškoća u prenosu mase i toplote. Ključni parametri o kojima najviše treba voditi računa su povezani sa prenosom mase i toplote, mešanjem i aeracijom (Garcia-Ochoa i Gomez, 2009). Modelovanje kompleksnog hidrodinamičkog ponašanja je jedan od najtežih numeričkih problema koji ima fundamentalnu važnost u mnogim aspektima inženjerstva. Za optimizaciju učinka reaktora neophodno je znanje lokalne dinamike fluida u bioreaktoru, odnosno veze između hidrodinamike i koeficijenta prenosa mase (Suresh et al., 2009a).

Kombinacija različitih fizičkih parametara vodi do kreiranja dimenzionog broja, koji treba da ostane konstantan tokom procesa povećanja razmere (Maier et al., 2004; Meier et al., 2016; Trujillo-Roldán et al., 2013). Najčešća veličina koja se održava na konstantnom nivou prilikom povećanja razmere je k_{LA} . S obzirom da je cilj postići isti k_{LA} u oba bioreaktora, sve promenljive koje utiču na vredost k_{LA} se moraju držati konstantnim. Ova praksa je poduprta činjenicom da u aerobnim sistemima, naročito kod većih razmera, glavni problem predstavlja upravo adekvatno dopremanje kiseonika iz gasne faze. Dimenziona analiza pomaže da se razviju korelacije sa članovima bezdimenzionih grupa, čija jednakost će obezbediti konstantnu vrednost k_{LA} .

Uspeh procesa povećanja razmere potvrđuje se eksperimentalnim putem kada se prikazuje da se i na narednom nivou razmere pod istim uslovima mogu postići isti ili slični rezultati (Suresh et al., 2009a).

2.6. Formulacija mikrobioloških preparata

Komercijalna primena mikrobioloških đubriva zavisi od razvoja mikrobioloških preparata (formulacija) koje će omogućiti dužu viabilnost primenjenog mikroorganizma. S obzirom da formulacije predstavljaju konačan oblik proizvoda koji se stavlja u promet, njihova funkcija

je da stabilizuju mikroorganizam, pomognu njegovo oslobađanje na željenu biljku, štite mikroorganizam u ciljanoj zoni i povećaju njegovu funkcionalnost (Schoebitz et al., 2013; Shaikh i Sayyed, 2015).

Da bi se dobila čista kultura, ćelije se odvajaju od fermentacione tečnosti, najčešće centrifugiranjem i dalje prečišćavaju složenim protokolima, koji uključujući višestruka centrifugiranja, ispiranja i rastvaranja peleta (Tavares et al., 2013). Ipak, neki istraživači izostavljaju proces odvajanja i prečišćavanja i koriste ćelije zajedno sa fermentacionom tečnošću zbog toga što sadrži vredne metabolite koji su poželjan deo finalnog proizvoda (Chung et al., 2010; Gotor-Vila et al., 2017; Martinez-Alvarez et al., 2016).

Nakon umnožavanja ćelije mikroorganizama se inkorporiraju sa nosačem. Izbor nosača zavisi od željenog tipa formulacije. Idealan nosač treba da produži rok trajanja formulacije, bude rastvoran u vodi, netoksičan i biorazgradiv, sa dobrim puferskim kapacitetom i otporan na uslove spoljašnje sredine. Sa ekonomskog gledišta bitno je da bude jeftin i lako dostupan (Nakkeeran et al., 2005; Vassilev et al., 2015). Bakterije mogu da se, takođe, liofilizuju i skladištite bez nosača, mada uvek uz primenu nekog od krioprotektanata. Pored toga, mogu da se dodaju supstance koje štite ćeliju od spoljnih stresova i poboljšavaju fizička, hemijska ili nutritivna svojstva formulacije (glukoza, saharoza, maltoza, trehaloza, glicerol itd.) (Garcia-Fraile et al., 2015; Omer, 2010). Savremeno tržište ima potrebu za poboljšanjem formulacija, kreiranjem i komercijalizacijom novih biodubriva, koja će biti efikasnija, stabilnija i kvalitetnija (Herrmann i Lesueur, 2013).

Sa aspekta agregatnog stanja, mikrobiološke formulacije se mogu podeliti na tečne i čvrste (suve). Obe vrste formulacija postoje u većem broju varijacija i imaju svoje prednosti i nedostatke. Generalo, suve formulacije se češće koriste od tečnih, jer omogućavaju duži rok trajanja i lakše su za skladištenje i transport (Omer, 2010). Prednosti i nedostaci nekih od najčešće korišćenih formulacija dati su u tabeli 7.

2.6.1. Tečne formulacije

Tečne formulacije predstavljaju suspenzije mikroorganizama u vodi, ulju ili polimerima i obično zahtevaju dodavanje inertnih supstanci, kao što su stabilizatori, surfaktanti, učvršćivači, nutrijenti, boje itd. U tečne formulacije spadaju koncentracije suspenzija, emulzije, uljane disperzije, suspo-emulzije i suspenzije kapsula.

Koncentracije suspenzija predstavljaju smešu fino samlevenih čestica aktivnog sastojka u tečnoj fazi (najčešće u vodi). Čvrste čestice nisu rastvorene u tečnoj fazi, tako da je potrebno da se smeša dobro promeša pre upotrebe, kako bi se omogućila ravnomerna raspodela čestica. Primena ovakvih preparata zasniva se na potapanju semena u formulaciju pre sejanja ili ravnomernim prskanjem preko semena. Ovakve formulacije su jednostavnije za proizvodnju, jeftinije i lakše za upotrebu od suvih formulacija. Njihov glavni nedostatak je nedovoljna efikasnost i kratak rok trajanja. Pored toga mikroorganizmi nisu dovoljno zaštićeni od kontaminacije za vreme skladištenja, transporta i primene u zemljištu (Schoebitz et al., 2013).

Emulzije sačinjavaju kapi tečnosti raspoređene u drugoj nemešljivoj tečnosti, najčešće su to kapi ulja u vodi. Postoje i inverzne emulzije kod kojih su kapi vode raspoređene u ulju. S druge strane, uljane disperzije predstavljaju disperzije čvrstih aktivnih sastojaka u uljima. Nedostatak ovakvih sistema je njihova nestabilnost i potencijalna fitotoksičnost (Gasic i Tanovic, 2013)

Suspencije kapsula su stabilne suspencije mikroinkapsuliranih aktivnih sastojaka u vodenoj fazi. Enkapsulacija aktivnog sastojka se vrši u kapsulama od želatina, skroba, celuloze i drugih polimera čime se štiti od nepoželjnih uticaja okoline. Takođe, neophodan je dodatak surfaktanata i zgušnjivača. I pored toga što ovakva formulacija omogućava kontrolisano otpuštanje aktivnog sastojka, njena komercijalizacija je jako spora, jer su ovakvi proizvodi dosta skupi (Vassilev et al., 2015).

Mešavina koncentrata suspencije i emulzije sačinjava tzv. suspo-emulzije. Priprema ovakvih preparata je jako kompleksna, a primena još uvek nedovoljno istražena. Ipak njihov potencijal i značaj je veliki i tokom vremena će nastaviti da raste (Gasic i Tanovic, 2013).

2.6.2. Čvrste formulacije

Čvrste formulacije (koncentrovani suvi ili vlažni prahovi, granule ili briketi) se mogu proizvesti korišćenjem različitih vrsta zemljanih (treset, ugalj, glina, neorganska zemlja), organskih (kompost, sojina sačma, piljevina), inertnih (vermikulit, perlit, betonit, silikati) i polimernih materijala (Malusá et al., 2012). Prednosti čvrstih formulacija u odnosu na tečne su duži rok trajanja, smanjeni troškovi skladištenja, transporta i prodaje. Njihov najveći nedostatak je potencijalna inaktivacija mikrobne kulture za vreme sušenja. Najčešće je neophodno koristiti dosta veći broj bakterija, kako bi se osiguralo da će krajnji broj biti optimalan za komercijalnu primenu (Lievens i van't Riet, 1994).

Svaki tip formulacije proizvodi se na specifičan način, što može podrazumevati i kombinaciju nekoliko metoda, a izbor metode i vrste formulacije zavisi, pre svega, od tipa mikroorganizma (Behboudi-Jobbehdar et al., 2013). Tako, na primer, suvi prah i suve granule se najuspešnije proizvode sa mikroorganizmima koji formiraju spore, dok vlažni prahovi i granule sadrže metabolički aktivne mikroorganizme (Mishra i Arora, 2016)

Generalno, čvrste formulacije se mogu proizvesti jednostavnim sušenjem na vazduhu ili primenom nekih od dehidracionih tehnologija mikroinkapsulacije, poput sušenja raspršivanjem, sušenja zamrzavanjem ili sušenja u fluidizovanom sloju. Primenom ovih metoda, mikroorganizam, koji predstavlja aktivnu supstancu, oblaže se materijalima koji štite ćeliju, otpornost i trajnost krajnjeg proizvoda se povećava, a svojstva formulacije generalno poboljšavaju (Gasic i Tanovic, 2013). Iako se sušenje zamrzavanjem smatra najboljom metodom kojom se postižu najmanja oštećenja, sušenje raspršivanjem ima prednosti u pogledu troškova i iskorišćene energije, što naročito dolazi do izražaja u proizvodnji pri velikim razmerama (Behboudi-Jobbehdar et al., 2013; Campos et al., 2014).

Sušenje raspršivanjem predstavlja tehniku mikroinkapsulacije mikroorganizama u nekom od nosača, čime se povećava otpornost i trajnost krajnjeg proizvoda. Prilikom sušenja

raspršivanjem, tečna kultura se pretvara u prah atomizacijom kapljica suspenzije pri velikim brzinama u struji zagrejanog vazduha (150-200 °C) (Huang et al., 2017). Atomizovane kapljice su jako malih dimenzija (reda veličine mikrometra) i prisutne u velikom broju, imaju veliku dodirnu površinu, čime je omogućeno kratko vreme sušenja prilikom izlaganja vrelom vazduhu u komori za sušenje. Ipak i pored kratkog vremena zadržavanja, moguće je da dođe do termičke inaktivacije mikrobne kulture, a faktori koji najviše utiču na viabilnost ćelija u toku sušenja raspršivanjem su ulazna i izlazna temperatura, protoci suspenzije i vazduha, vreme sušenja i pritisak raspršivača (Peighambardoust et al., 2011). Najveći broj ćelija preživi ukoliko se sušenje izvodi pri nižim temperaturama, što, sa druge strane, uzrokuje veći sadržaj vlage i lošiji kvalitet proizvoda. Odgovarajući izbor protoka i temperature ulaznog vazduha, kao i protoka vode koja će isparavati (a samim tim i protoka suspenzije koja se pumpom dovodi do raspršivača), umanjice termičku inaktivaciju. Prave veličine ovih promenljivih se uglavnom pronalazi metodom probe i greške ili statističkom metodom optimizacije (Lievense i van't Riet, 1994).

Termička inaktivacija može da se spreči u velikoj meri izborom odgovarajućeg zaštitnog agensa. Neki od najčešće korišćenih agenasa za enkapsulaciju korišćenjem tehnike sušenja raspršivanjem su modifikovani i hidrolizovani skrob i guamarabika. Među njima najpoznatiji je maltodekstrin koji se dobija kiselom hidrolizom skroba (Ibrahim Silva et al., 2013). Zahvaljujući svojoj niskoj ceni, lakoj dostupnosti, visokoj rastvorljivosti i malom viskozitetu, ova supstanca predstavlja najčešće korišćeni nosač u procesima sušenja raspršivanjem.

Sama tehnika sušenja raspršivanjem je široko rasprostranjena i primenjena u različitim oblastima industrije. Svoju popularnost duguje činjenici da jednostavno i pouzdano omogućava velike kapacitete proizvodnje i izdašne prinose. Finalni proizvod ima nisku aktivnost vode, što ga sa mikrobiološkog aspekta čini stabilnim i dugotrajnim, lakši je za čuvanje, transport, skladištenje i manipulaciju (Huang et al., 2017). Zbog svega navedenog sušenje raspršivanjem je izabrana kao metoda za formiranje mikrobiološkog preparata *B. subtilis*, a maltodekstrin je izabran kao nosač u formulaciji.

Tabela 7 Prednosti i ograničenja nekih od najčešće korišćenih tipova formulacija (Herrmann i Lesueur, 2013; Mishra et al., 2015).

Vrsta inokuluma	Prednosti	Ograničenja
Kulture sa tresetom	Pogodne za širok opseg mikroorganizama: bakterije, AMF, ektomikorize; Zaštitna nutritivna sredina; Sadržaj vlage se može podesiti da optimizuje rast i opstanak bakterija za vreme skladištenja i inokulacije; Veliki puferski kapacitet.	Jak negativan uticaj na ekosistem; Skupe investicije za ekstrakciju; Toksična jedinjenja se oslobađaju za vreme sušenja i sterilizacije; Visoka varijabilnost sastava i kvaliteta u zavisnosti od porekla; Moguća toksičnost kroz kontakt sa drugim jedinjenjima.
Tečni inokulumi	Laki za rukovanje i primenu; Lako se dodaju aditivi da bi se poboljšao rast i opstanak ćelija; Sastav se lako definiše i kontroliše; Velike koncentracije ćelija.	Mala viabilnost za vreme skladištenja i nakon primene na semenima; Niska temperatura skladištenja (4 °C); Ograničen rok trajanja; Osetljivost na stresne uslove.
Granule	Lake za rukovanje, primenu i skladištenje; Manje prašnjave od treseta; Primena u zemljištu: nema direktnog kontakta sa drugim hemijskim jedinjenjima (nema toksičnosti).	Veliki troškovi transporta i skladištenja. Često nesterilni nosači.
Enkapsulisane ćelije	Naročito efikasne u stresnim uslovima sredine; Primenjiva na sve tipove ćelija; Ćelija je zaštićena u nutritivnom oklopu od mehaničkih i prirodnih stresova i predatora; Sporo i kontrolisano oslobađanje mikroorganizama kada se oklop degradira; Dostupan veliki broj polimera: netoksični, biodegradabilni; Skladištenje na sobnoj temperaturi (suve kapsule).	Neophodna specifična oprema i određena finansijska ulaganja; Ne postoji dostupan komercijalni proizvod.

2.7. Primena eksperimentalnog dizajna u optimizaciji procesa

Već duži vremenski period postoji trend da se jednofaktorska optimizacija, kod koje se jedan faktor varira na više nivoa, dok su drugi faktori konstantni, zameni višefaktorskim statističkim metodama (Das et al., 2014). Pored toga što ovaj pristup zahteva veće finansijske izdatke i oduzima puno vremena, on ne prikazuje interakcije koje postoje između parametara procesa, pa samim tim nije moguće pouzdano odrediti optimalne uslove za efektivnu i efikasnu proizvodnju ciljanog proizvoda. S druge strane, višefaktorska analiza minimizuje broj eksperimenata, dajući bolji pregled efekata interakcije između parametara odnosno kombinovani efekat faktora i njihov uticaj na čitav proces (Bezerra et al., 2008).

Jedna od najčešće korišćenih procedura višefaktorske optimizacije je metoda odzivne površine (RSM), koja kombinuje matematičke i statističke metode, kako bi se analizirao uticaj više faktora (nezavisno promenljivih) na jedan ili više praćenih odziva (zavisne promenljive) i pružio matematički model koji opisuje praćeni sistem (Baş i Boyacı, 2007; Ranjith Kumar et al., 2015), a uz Deringerovu funkciju poželjnosti istovremeno optimizuje različite izlazne promenljive predlažući nivo nezavisnih promenljivih koje će dati zadovoljavajuće odgovore sistema (Ibrahim Silva et al., 2013). Ova metoda omogućava smanjenje broja eksperimenata garantujući pritom dobru sposobnost predviđanja i potpuno objašnjenje ponašanja sistema (Sánchez Blanco et al., 2016). RSM se oslanja na dizajn eksperimenata (Design of Experiments, DoE), koji predstavlja sistematični pristup u planiranju eksperimenata i omogućava da se smanji broj eksperimenata, a poveća količina relevantnih i statistički validnih informacija (Franceschini i Macchietto, 2008).

RSM, zajedno sa DoE i višekriterijumskom optimizacijom, često su korišćeni u optimizaciji mnogobrojnih procesa, između ostalog i u biotehnologiji, jer s obzirom na to da nema subjektivnog uticaja istraživača, sami zaključci su objektivniji i pouzdaniji (Montgomery, 2001).

Proces višefaktorske analize uključuje nekoliko koraka (Bas i Boyacı, 2007):

1. izbor zavisnih i nezavisnih promenljivih i eksperimentalnog dizajna,
2. izvođenje eksperimenata prema utvrđenom eksperimentalnoj matrici,
3. statistička analiza rezultata i formiranje matematičkog modela,
4. provera adekvatnosti modela i
5. višekriterijumska optimizacija bazirana na modelu

1. Izbor promenljivih

RSM utvrđuje vezu između dva tipa promenljivih: zavisnih (odzivi sistema ili izlazne promenljive) i nezavisnih (faktori ili ulazne promenljive). Vrednost zavisnih promenljivih zavisi od nivoa na kojima se nalaze nezavisne promenljive (Ferreira et al., 2007; Lundstedt et al., 1998). Izbor zavisnih i nezavisnih promenljivih, kao i nivoa na kojima će se one varirati, bazira se na iskustvu istraživača, dostupnim literaturnim podacima i prethodno odrađenim

eksperimentima koji imaju zadatak da izdvoje najznačajnije faktore u moru promenljivih (Montgomery, 2001). Posle izbora promenljivih, njihove stvarne vrednosti transformišu se u kodirane (bezdimenzione) vrednosti. Takva transformacija omogućava zanemarivanje originalnih jedinica i opsega i pronalaženje značajnosti među nezavisnim promenljivim poređenjem regresionih koeficijenata (Baş i Boyacı, 2007).

2. Izbor eksperimentalnog dizajna i izvođenje eksperimenata

Postoji veliki broj eksperimentalnih dizajna koji se razlikuju po izboru eksperimentalnih tačaka, broju nivoa nezavisnih promenljivih, broju blokova i eksperimenata (Bezerra et al., 2008). Najčešće korišćeni su puni faktorijski dizajn, Boks-Benkenov dizajn i centralni kompozitni dizajn. Među njima, Boks-Benkenov dizajn je često korišćen zbog toga što značajno smanjuje broj eksperimenata. Može se definisati kao rotabilni dizajn drugog reda koji je izveden iz nepotpunog faktorijskog dizajna na tri nivoa (Ferreira et al., 2007). Faktori se variraju na tri nivoa (-1, 0, +1) na podjednakom rastojanju među nivoima (Ghaffari et al., 2014). Pri tom, faktori se ne variraju istovremeno, kombinuju se u takozvane blokove, što ovaj dizajn čini neopotpunim, ali veoma efikasnim i ekonomičnim (Bezerra et al., 2008). Posebna prednost ovog dizajna je u tome što ne sadrži kombinaciju parametara u kojima su faktori na svojim najvišim ili najnižim nivoima i izbegava ekstremne radne uslove kada se češće dešavaju velike devijacije u rezultatima (Ferreira et al., 2007).

Po izboru dizajna eksperimenata, sledeći korak je da se izvedu eksperimenti prema utvrđenom redosledu. Nakon toga, eksperimentalni podaci su spremni za statističku analizu koja će rezultirati predlaganjem matematičkog modela (Marinković, 1994; Montgomery, 2001).

3. Formiranje matematičkog modela

Matematički model predstavlja odgovarajuću aproksimaciju eksperimentalnih podataka korišćenjem nelinearne regresije, obično u formi polinoma prvog ili drugog reda (Bezerra et al., 2008). Polinomne jednačine modela drugog reda uključuju kombinovan uticaj procesnih parametara i njihove kvadratne efekte (Baş i Boyacı, 2007; Bezerra et al., 2008):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (4)$$

gde β_{ij} i β_{ii} predstavljaju regresione koeficijente efekta interakcije i kvadratnog efekta, respektivno. x_i i x_j su promenljive. Koeficijenti regresije u kvadratnoj jednačini se određuju metodom najmanjih kvadrata (Myers et al. 1995).

4. Provera adekvatnosti modela

Nakon kreiranja matematičkog modela, potrebno je da se utvrdi da li model adekvatno opisuje vezu između promenljivih i kolika je precizna njegova mogućnost predviđanja. Značajnost i adekvatnost modela i faktora se utvđuje analizom varijanse („ANOVA“) koja poredi varijacije do kojih dolazi u eksperimentalnim rezultatima (Mäkelä, 2017). Izvori varijacije mogu biti sam model, faktori, interakcije među faktorima, kvadratni članovi faktora, ostaci (reziduali),

odstupanje od modela (lack of fit), greška i ukupna korekcija modela, zbog čega svi ovi parametri podležu analizi.

Adekvatnost modela utvrđuje se procenom sledeći parametara:

- F i p vrednosti. Predstavljaju najbitnije parametre za procenu statističke značajnosti analiziranih veličina. p vrednost zavisi od nivoa značajnosti (intervala poverenja) koji određuje koliko je značajan izvor varijacije. Veća vrednost F -faktora ukazuje na veću značajnost faktora ili interakcije, dok p -vrednosti manje od 0,05 ili 0,001 ukazuju na nivo statističke značajnosti (interval poverenja) od 95 % i 99%, redom.
- Odstupanje od modela. Utvrđuje da li neslaganje između eksperimentalno utvrđenih vrednosti i onih koje predviđa model mogu biti objašnjene eksperimentalnom greškom. Model koji je značajan ima statistički neznačajno odstupanje modela ($p > 0,05$).
- Koeficijent determinacije (R^2) kao i njegova prilagođena i predviđena vrednost ($adj R^2$ i $pred R^2$). Ovim koeficijentom se opisuje procenat ukupnih varijacija koji se može objasniti predloženim modelom, odnosno fitovanje eksperimentalnih i predviđenih vrednosti. Da bi model bio adekvatan potrebno je da R^2 i $adj R^2$ budu što bliži jedinici, a razlika između $adj R^2$ i $pred R^2$ bude manja od 0,2 (Baş i Boyacı, 2007; Mäkelä, 2017; Vera Candiotti et al., 2014).
- Koeficijent varijacije (CV) i $PRESS$ (Predicted errors sum of squared). Ovim parametrima se procenjuje ponovljivost modela. Ukoliko su CV vrednosti manje od 10% i $PRESS$ vrednosti veće od 4 model se može smatrati ponovljivim.

Dodatno usklađenost eksperimentalnih i predviđenih rezultata se može analizirati nizom dijagnostičkih procedura, među kojima su grafik normalne raspodele rezidula, grafik koji poredi aktuelne i predviđene vrednosti, Boks-Koks grafik, Kukova distanca i drugi. Cilj svih dijagnostičkih procedura je utvrditi da li postoji dobro fitovanje sa eksperimentalnim podacima i kakva je raspodela reziduala, na osnovu čega se jednačina modela usvaja ili predlože transformacija podataka koje će omogućiti bolje fitovanje. Pored toga, pojedine vrste podataka (npr. rezultati mikrobiološkog brojanja, rezultati prikazani kao odnos, brojevi populacije) je potrebno pre početka analize transformisati kako bi se uskladili sa pretpostavkama ANOVA. Model se dodatno može modifikovati dodavanjem ili oduzimanjem članova. Ukoliko u kvadratnoj jednačini postoji veći broj parametara koji nisu statistički značajni, model se najčešće redukuje eliminisanjem svih članova čija p vrednost je veća od 0,1.

5. Analiza značajanih efekata

Ukoliko je model adekvatan, može da se pređe na procenjivanje individualnih i kombinovanih efekata analiziranih faktora. Procena se bazira na apsolutnim vrednostima koeficijenata u matematičkom modelu. Veća vrednost koeficijenta ukazuje da faktor ima veći uticaj na odgovore sistema, dok pozitivan predznak ukazuje da pozitivna promena faktora dovodi do povećanja zavisne promenljive, i obrnuto (Bezerra et al. 2008).

Dalja analiza članova u jednačini modela vrši se primenom 2D i 3D dijagrama. Grafička prezentacija jednačine modela u obliku 2D i 3D dijagrama je posebno korisna za interpretaciju kombinovanih efekta analiziranih faktora. 3D dijagram se koristi da objasni kombinovani efekat 2 faktora, dok se u određenim slučajevima na osnovu 3D dijagrama mogu utvrditi i optimalne oblasti. 2D dijagram u obliku kontura daje dobru predstavu o obliku odzivne površine. Centar elipse ili krugova na kontur dijagramu predstavlja maksimum ili minimum, dok konturni dijagrami u obliku hiperbole ili parabole imaju tačku ukrštanja koja nije niti minimum niti maksimum (Baş i Boyacı, 2007).

6. Utvrđivanje optimalnih uslova

Cilj optimizacije je pronaći uslove pri kojima se dobija maksimalna vrednost odziva sistema. U kompleksnim realnim sistemima često postoji potreba da se istovremeno optimizuje nekoliko odziva, pri čemu optimalni uslovi za jedan od odziva nisu u isto vreme optimalni i za drugi odziv (Castillo, 2007). Postoje različiti pristupi kojima se definiše globalni optimum koristeći višekriterijumsku optimizaciju. Jedna od najčešće korišćenih metoda je Deringerova funkcija poželjnih odgovora (Derringer i Suich, 1980).

Korišćenjem Deringerove funkcije poželjnih odgovora, svi odgovori sistema, bilo da su predviđeni ili dobijeni eksperimentalnim putem, transformišu se na istu skalu, a onda kombinuju u zajednički odgovor koji bi trebao da ima maksimalnu vrednost (Derringer i Suich, 1980). Transformisani odgovori (poželjnosti, d_i) su predstavljani na skali od 0 (što predstavlja neželjeni odgovor) do 1 (željeni odgovor). Kominacijom individualnih funkcija poželjnih odgovora dobija se ukupna funkcija poželjnih odgovora (D) koja može imati vrednosti od $D = 0$ (svi odgovori sistema imaju nepoželjnu vrednost) do $D = 1$ (svi odgovori sistema imaju poželjnu vrednost). Ukoliko se vrednost D približava jedinici, sistem se približava globalnoj optimalnoj vrednosti (Jeong i Kim, 2009; Sivakumar et al., 2007). U zavisnosti da li je cilj da se određeni odgovor maksimizira, minimizira ili dostigne unapred definisanu vrednost, koriste se različite transformacije (Simić et al., 2016).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Hemikalije

Hranljivi agar, hranljivi bujon, krompir dekstrozni agar - Torlak, Srbija; kalijum-hlorid (KCl), kalcijum-nitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), mangan-hlorid (MnCl_2), gvožđe(II)-sulfat (FeSO_4), glukoza – Zorka Pharma Hemija, Srbija; maltodekstrin (5 DE) – Geneza, Srbija, magnezijum-sulfat hepta hidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – NRK Inženjering, Srbija; pikrinska kiselina ($\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$) – Merck, Nemačka; NaOH – Sigma Aldrich, Nemačka; azot gas 5.0, 200 bar – Messer Tehnogas, Srbija.

3.1.2. Mikroorganizmi

Sporogena Gram pozitivna bakterija *B. subtilis* 2063 iz NCIM kolekcije ustupljena od firme Fertico d.o.o. iz Niša. Bakterijska kultura čuvana je na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ u vialama i na $4\text{ }^\circ\text{C}$ na agarnim pločama.

Za testiranje antifugalnog dejstva mikrobiološkog preparata *B. subtilis* NCIM 2063 korišćeni su sledeći fitopatogeni izolati gljiva: *S. sclerotiorum* (izolovana sa stabiljke suncokreta na Rimskim šančevinama u Novom Sadu), *R. solani* (izolovana sa korena mrkve u Futogu), *Alternaria alternata* (izolovana sa lista mrkve u Irigu), *Fusarium proliferatum* (izolovana sa kukurza na Rimskim šančevima u Novom Sadu) i *Leptosphaeria maculans* (izolovana sa stabla uljane repice u Crvenki). Svi izolati su identifikovani na molekularnom nivou i pripadaju kolekciji Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje suve biomase

Za određivanje suve biomase, 10 ml uzorka je centrifugirano na 4.000 o/min, supernatant dekantovan, pelet ispran destilovanom vodom, ponovo centrifugiran, resuspendovan u 5 ml vode, prenesen u prethodno izmerenu praznu staklenu Petri ploču i sušen na $105\text{ }^\circ\text{C}$ do konstantne mase. Suva biomasa je izračunata iz razlike masa pune i prazne Petri ploče.

3.2.2. Određivanje vlage

Za određivanje sadržaja vlage, 2 g praškaste formulacije, dobijene nakon sušenja raspršivanjem, premešteno je u aluminijumsku posudu i sušeno na $105\text{ }^\circ\text{C}$ do konstantne mase. Eksperiment je ponovljen u triplicatu. Rezidualni sadržaj vlage izračunat je prema sledećoj jednačini (Behboudi-Jobbehdar et al., 2013).

$$\% \text{ vlage} = 100 \cdot \frac{w_f - w_i}{w_i} \quad (5)$$

gde su w_f i w_i – izmerene mase formulacije pre i posle sušenja na 105 °C.

3.2.3. Izračunavanje koeficijenta prinosa biomase u odnosu na glukozu i kiseonik

Koeficijent prinosa biomase u odnosu na glukozu $Y_{x/s}$ računat je prema sledećoj formuli:

$$Y_{x/s} = \frac{s_0 - s}{X - X_0} \quad (6)$$

gde je: s_0 – početna koncentracija glukoze, s – krajnja koncentracija glukoze, X – krajnja koncentracija biomase i X_0 – početna koncentracija biomase.

Koeficijent prinosa u odnosu na kiseonik $Y_{x/o}$ računat je pod pretpostavkom da je sav kiseonik koji je prenet u podlogu utrošen od strane mikroorganizama, prema sledećoj formuli:

$$Y_{x/o} = \frac{X}{OTR \cdot t} \quad (7)$$

gde je X – koncentracija biomase u trenutku vremena t , OTR – brzina prenosa mase kiseonika i t – vreme.

3.2.4. Izračunavanje brzine prenosa mase kiseonika

Brzina prenosa mase kiseonika u Erlenmajerovim sudovima na rotacionoj mućkalici je izračunata na osnovu empirijske jednačine (Veljković et al., 1995):

$$OTR = 7.23 \cdot 10^{-4} \cdot \left(\frac{V_L}{V_F}\right)^{-0.845} \cdot C \cdot N \quad (8)$$

gde je: V_L – zapremina tečnosti, V_F – zapremina erlenmajerovog suda, C – koncentracija rastvorenog kiseonika i N – brzina mešanja (s^{-1}). S obzirom da su eksperimenti izvođeni pri konstantnoj brzini mešanja (150 rpm) i amplitudi mućkalice ($2cm^{-1}$), vrednosti OTR u Erlenmajerovim sudovima su kontrolisane podešavanjem odnosa zapremine podloge i zapremine Erlenmajerovog suda (testirani su udeli zapremine podloge od 0,1, 0,2, 0,3 i 0,5 kada se postižu vrednosti OTR 10, 6, 4 i 2 mol/m³h respektivno)

Za bioreaktor je vrednost OTR -a izračunata na osnovu eksperimentalno određene vrednosti $k_L a$ i računski dobijene vrednosti rastvorljivosti kiseonika (c^*) u podlozi na datoj temperaturi primenom sledeće jednačine (9):

$$OTR = k_L a \cdot c^* \quad (9)$$

3.2.5. Određivanje specifične brzine potrošnje kiseonika

Specifična brzina potrošnje kiseonika r_{O_2} računata je za eksponencijalnu fazu rasta prema sledećoj formuli:

$$r_{O_2} = \frac{OTR}{X} \quad (10)$$

gde je OTR - brzina prenosa mase kiseonika, a X – koncentracija biomase ostvarena u eksponencijalnoj fazi.

3.2.6. Određivanje zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika

Vrednosti k_{La} u bioreaktoru određene su apsorpcionom metodom. Najpre se prođuvavanjem azota kroz tečnost nivo rastvorenog kiseonika smanji do nule, nakon čega se kroz tečnost, uz mešanje, prođuvava vazduh uz praćenje promene nivoa rastvorenog kiseonika kiseoničnom elektrodom (Mettler Toledo 3420036). Kiseonična elektroda nije uticala na preciznost merenja s obzirom da je ispunjen Van't Rietov kriterijum (vremenska konstanta elektrode bila je znatno manja od vrednosti su vrednosti $1/k_{La}$) i da su vrednosti k_{La} bile manje od $0,1 \text{ s}^{-1}$ u svim slučajevima (Garcia-Ochoa et al., 2010; Van't Riet, 1979). Karakteristike kiseonične elektrode date su u prilogu (tabela PT6, slika PS1) Iz promene koncentracije kiseonika sa vremenom računa se k_{La} pomoću sledeće jednačine:

$$\ln(1 - \bar{c}) = -k_{La} \cdot t + const \quad (11)$$

Na osnovu zavisnosti promene k_{La} pri različitim brzinama mešanja se izvodi empirijska jednačina za proračun brzine mešanja koju je potrebno obezbediti da bi se u bioreaktoru postigla željena, prethodno utvrđena vrednost k_{La} .

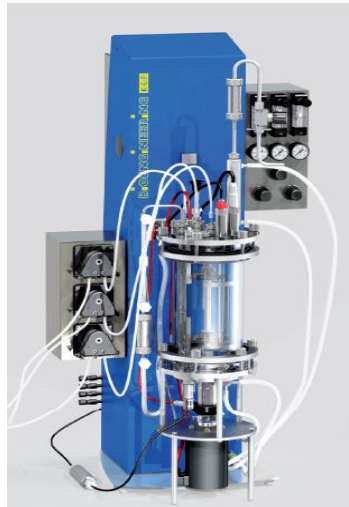
3.2.7. Priprema inokuluma

Inokulum se priprema zasejavanjem 300 ml hranljivog bujona u Erlenmajerovom sudu od 500 ml jednom kolonijom *B. subtilis* NCIM 2063 i gajenjem na temperaturi od $37 \text{ }^\circ\text{C}$ u toku 24 h na rotacionoj mućkalici pri frekvenciji od 2,5 Hz (150 rpm). Za kultivaciju je uziman inokulum starosti 24 h u količini od 1% (v/v).

3.2.8. Kultivacija u bioreaktoru

Kultivacija u bioreaktoru započeta je inokulacijom 1% ćelijskom kulturom starom 24 h, u prethodno sterilisanom Difco sporulacionom medijumu (DSM) sledećeg sastava: hranljivi agar, 10% (w/v) KCl, 1,2% (w/v) MgSO_4 u koji je dodato po 1 ml rastvora 1 M NaOH, 1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,01 M MnCl_2 i 1 mM FeSO_4 sterilisanih kroz membranski filter. Kultivacioni uslovi prethodno su određeni višekriterijskom optimizacijom. U podlogu je dodat 0,01 M NaOH radi

podešavanja pH vrednosti i antipenušavac (Delamex 120), da bi se sprečilo stvaranje pene tokom kultivacije. Čelijski rast praćen je merenjem optičke gustine uzorka u različitim vremenskim intervalima.



Slika 3. Fermentor KLF

Bioreaktor sa mehaničkim mešanjem (KLFM, BioEngineering, Wald, Switzerland), zapremine 3,7 l (radna zapremina 2,5 l), poseduje mešalicu opremljenu sa dva Raštanova impelera sa 6 lopatica, prečnika 48 mm i 4 odbojnika (slika 3). Za aeraciju specifičnim protokom vazduha od 0,3 vvm korišćen je sterilan vazduh, koji je dovođen iz eksternog kompresora. Bioreaktor je opremljen sa pH (BioEngineering 46955) i kiseoničnom elektrodom (Mettler Toledo 3420036) i povezan na BioScada softverski sistem pomoću kojeg se vrši praćenje procesnih parametara.

3.2.9. Određivanje ukupnog broja ćelija

Ukupan broj ćelija određivan je metodom razblaženja i brojanja kolonija na Petri ploči posle 24-časovne kultivacije na 30 °C.

3.2.10. Određivanje broja spora

Za određivanje broja spora uzorak je izlagan visokoj temperaturi (80 °C) 10 min, kako bi se deaktivirale vegetativne ćelije, nakon čega se broj spora određuje metodom razblaženja i brojanjem izraslih kolonija posle 24 h inkubacije.

3.2.11. Određivanje viabilnosti mikrobiološkog preparata

Viabilnost mikrobiološkog preparata dobijenog sušenjem raspršivanjem određivana je odmah posle sušenja raspršivanjem i nakon 6 meseci čuvanja na sobnoj temperaturi. Za određivanje ukupnog broja ćelija rehidratisanog preparata ,korišćena je metoda razblaženja i kultivacija na Petri ploči.

3.2.12. Određivanje glukoze

Koncentracija glukoze je određena spektrofotometrijski, metodom sa pikrinskom kiselinom (Willaman i Davison, 1924). Uzorak fermentacione tečnosti je centrifugiran 10 min na 3.000 0/min, supernatant razblažen i 1 ml razblaženog supernatanta mešan sa 5 ml rastvora pikrinske kiseline. Posle zagrevanja uz ključanje u trajanju od 15 min, normalni sud je dopunjen destilovanom vodom i merena je apsorbanca na 580 nm (UV/VIS Spectrophotometer - Pye Unicam Ltd, Cambridge England). Koncentracija glukoze određena je na osnovu standardne prave u opsegu do 5 g/l glukoze.

3.2.13. Biološko (antagonističko) dejstvo preparata

Antagonističko dejstvo mikrobiološkog preparata *B. subtilis* NCIM 2063 određeno je na 5 fitopatogenih gljiva izolovanih sa različitim biljaka metodom dvojne kultivacije. Izolati fitopatogenih gljiva (*S. sclerotiorum*, *R. solani*, *A. alternata*, *F. proliferatum*, *L. maculans*) su prvo preneti sa kose podloge na ravnu PDA (krompir dekstrozni agar) podlogu. Nakon 5 dana razvoja na ravnoj podlozi, kolonije gljive su ponovo prenete na PDA podlogu u Petri ploči. U centar Petri ploče je nanet micelijum fitopatogene gljive, a oko micelijuma je naneta resuspendovana kultura *B. subtilis* NCIM 2063, nakon čega su inkubirane 48 h na 30 °C. Merene su zone inhibicije rasta micelijuma patogenih gljiva (I), porast gljive u tretmanu (T) i kontroli (K) (izolati gljiva bez bakterijskog soja). Na osnovu dobijenih vrednosti izračunati su procenti inhibicije rasta (PGI, percentage of growth inhibition) micelijuma patogenih gljiva prema formuli (Korsten i De Jager, 1995):

$$PGI = (K - T)/K \cdot 100 \quad (12)$$

3.2.14. Fitostimulativno dejstvo mikrobiološkog preparata

Fitostimulativni efekat mikrobiološkog preparata *B. subtilis* NCIM 2063 istraživani je *in vitro* na semenu zelene paprike (*Capsicum annuum*). Seme paprike je dezinfikovano potapanjem u smešu (1:1) 30 % vodonik-peroksida i 70 % etanola u trajanju od 10 min, nakon čega je isprano (potapanjem) destilovanom vodom nekoliko puta. Seme je inokulirano potapanjem u resuspendovanu kulturu *B. subtilis* NCIM 2063, ćelijske gustine 9,1 LOG(CFU/g), nakon čega je zasejano u prethodno pripremljene saksije sa 200 g suve sterilisane zemlje. Seme potopljeno u sterilisanu vodu služilo je kao kontrola. Biljke su gajene 8 nedelja u komori pri konstantnoj temperaturi (22 °C), izložene svetlosti 16 h dnevno. Vegetativno tkivo je analizirano na sledeće parametre:

- visina stabiljke, dužina korena i broj listova
- masa lista i korena i
- sadržaj hlorofila u listovima.

Za određivanje sadržaja hlorofila, 100 mg listova se potopi u 7 ml DMSO i inkubira 30 min na 65 °C. Nakon dodavanja DMSO do ukupne zapremine 10 ml, 1 ml se prenese u kivetu i meri apsorbanca na 645 nm i 663 nm (slepa proba DMSO) (UV/VIS Spectrophotometer - Pye Unicam

Ltd, Cambridge England) (Hiscox i Israelstam, 1979). Sadržaj hlorofila izračunava se Armonovim jednačinama:

$$Chla \text{ (g/l)} = 0.0127 \times A663 - 0.00269 \times A645; \quad (13)$$

$$Chlb \text{ (g/l)} = 0.0229 \times A645 - 0.00468 \times A663; \quad (14)$$

$$Tot \text{ Chl (g/l)} = 0.0202 \times A645 + 0.00802 \times A663. \quad (15)$$

3.2.15. Utvrđivanje kinetičkih parametara rasta

Eksperimentalni podaci o rastu mikroorganizama su korišćeni za izračunavanje kinetičkih parametara: specifične brzine rasta μ_m i generacijskog vremena t_d sledećim jednačinama (Veljković, 1994):

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu_m \cdot t \quad (16)$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_m} \quad (17)$$

gde je x – koncentracija biomase u trenutku t , a x_0 – početna koncentracija biomase.

3.2.16. Jednofaktorska optimizacija procesnih uslova za rast *B. subtilis* u erlenmajerovim sudovima sa mešenjam

Koncentracija glukoze i brzina prenosa mase kiseonika u Erlenmajerovim sudovima sa mešanjem optimizovane su primenom jednofaktorske optimizacije. Kultivacija je započeta inokulacijom sterilne hranljive podloge inokulumom *B. subtilis* 2063 starosti 24 h u količini od 1 % (v/v) na rotacionoj mućkalici amplitude 2 cm, pri brzini obrtanja 150 rpm, 48 h na 37 °C. Eksperimenti su izvođeni u Erlenmajerovim sudovima zapremine 500 ml sa sterilisanom DSM podlogom, (sastav podloge opisan u delu 3.2.7.). Najpre je optimizovana koncentracija glukoze, nakon čega je, pri konstantnoj koncentraciji glukoze (10 g/l), optimizovana brzina prenosa mase kiseonika. U jednakim vremenskim intervalima uzimani su uzorci za određivanje suve biomase i glukoze.

3.2.17. Višekriterijumska optimizacija procesnih uslova

U cilju dalje optimizacije uslova rasta *B. subtilis* NCIM 2063 na nivou Erlenmajerovih sudova, primenjen je Boks-Benkenov eksperimentalni dizajn sa tri faktora, koja su varirana na tri nivoa, uz pet ponavljanja oko centralne tačke, tj. ukupno 17 eksperimenata (tabela 8). Inokulum *B. subtilis* 2063, veličine 1% i starosti 24 h, korišćen je za inokulaciju sterilisane hranljive DSM podloge u Erlenmajerovom sudu, zapremine 500 ml. Faktori odabrani na osnovu literaturnih podataka i preliminarnih istraživanja su: temperatura (25-37 °C), OTR (2-10 mol/m³h) i

koncentracija glukoze (0-20 g/l). Praćeni odgovori sistema bili su ukupan broj ćelija i ukupan broj spora. Kultivacija je vršena 24 h na rotacionoj mućkalici pri brzini obrtanja 150 rpm.

Tabela 8 Kodirane i nekodirane vrednosti praćenih procesnih faktora

Oznaka faktora	Faktor	Niži nivo (-1)	Srednji nivo (0)	Viši nivo (+1)
X_1	Temperatura, °C	25	31	37
X_2	OTR, mol/m ³ h	2	6	10
X_3	Koncentracija glukoze, g/L	0	10	20

3.2.18. Formulisanje mikrobiološkog preparata

Mikrobiološki preparat za biokontrolu fitopatogena i stimulaciju rasta biljaka dobijen je postupkom mikroinkapsulacije ćelija *B. subtilis* NCIM 2063 metodom sušenja raspršivanjem. Uslovi sušenja raspršivanjem optimizovani su primenom Boks-Benkenovog dizajna eksperimenata, RSM metode i Derignerove funkcije poželjnih odgovora.

3.2.18.1. Uslovi sušenja raspršivanjem

Mikrobiološki preparat pripremljen je mikroinkapsulacijom ćelijske kulture *B. subtilis* NCIM 2063, stare 24 h, dobijene pod optimalnim uslovima u laboratorijskom fermentoru, primenom metode sušenja raspršivanjem. Izlaganje umerenim temperaturnim stresovima može da poveća otpornost spora *B. subtilis*, pa je procesu sušenja raspršivanjem prethodilo izlaganje temperaturi od 54 °C u trajanju od 1 h (Chung et al., 2010). Nakon toga, fermentaciona tećnost je mešana sa odgovarajućom kolićinom nosaća (prema tabeli eksperimentalnog dizajna) u trajanju od 10 min radi homogenizacije, odnosno potpunog rastvaranja nosaća u fermentacionoj tećnosti.

Za sušenje raspršivanjem korišćen je *Büchi mini B-290* (Flavil, Švajcarska) sprej sušać (slika 4), sa diznom za raspršivanje, prećnika 0,7 mm. Protok vazduha i pritisak atomizacije imali su konstantne vrednosti od 600 l/h i 0,55 bar, redom. Ulazna temperatura i protok tećnosti varirani su prema matrici eksperimentalnog dizajna po Boks-Benkenu.



Slika 4. Sprej sušač Büchi mini B-290

3.2.18.2. Optimizacija uslova sušenja raspršivanjem

U cilju određivanja optimalnih parametara enkapsulacije *B. subtilis* NCIM 2063 metodom sušenja raspršivanjem primenjen je Boks-Benkenov eksperimentni dizajn sa tri faktora, koja su varirana na tri nivoa, tj. ukupno 17 eksperimenata (tabela 9). Odabrani faktori bili su: koncentracija maltodekstrina (10-50 g/L), ulazna temperatura vazduha (110-140 °C), i protok suspenzije (2-10 ml/min). Odgovori sistema bili su sadržaj vlage, prinos proizvoda i broj preživelih ćelija *B. subtilis*. Prinos proizvoda izračunat je kao odnos mase dobijenog praha i suve materije suspenzije koja se sastoji od kultivacione tečnosti sa dodatkom maltodekstrina.

Tabela 9. Kodirane i nekodirane vrednosti praćenih procesnih faktora

Oznaka faktora	Faktor	Niži nivo (-1)	Srednji nivo (0)	Viši nivo (+1)
X_1	Koncentracija maltodekstrina, g/l	10	30	50
X_2	Temperatura, °C	110	125	140
X_3	Protok tečnosti, ml/min	6	8	10

3.2.19. Statistička obrada podataka

Svi eksperimenti realizovani su u tri paralelna ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Programi Origin 6.0, Excell 2013, Expert Design 7.0 (Trial verzija) i SPSS Statistics (Trial verzija) primenjeni su za statističku obradu, modelovanje i grafičku analizu eksperimentalnih podataka. Značajne razlike aritmetičkih sredina tretmana određene su primenom Takijevog testa. Adekvatnost modela odzivnih površina procenjena je primenom analize varijanse (ANOVA) na osnovu Fišerovog kriterijuma (F -vrednost), nivoa statističke značajnosti (p -vrednost) i vrednosti odstupanja od modela. Model je ocenjen na osnovu vrednosti koeficijenta determinacije (R^2), prilagođenog i predviđenog koeficijenta determinacije ($Adj R^2$ i $Pred R^2$), koeficijenta varijacije (CV), sume reziduala predikcijske greške ($PRESS$) i srednjeg relativnog odstupanja ($MRPD$). Višekriterijumska optimizacija izvršena je primenom Deringerove funkcije poželjnih odgovora i izračunavanjem faktora poželjnosti.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Kultivacija *B. subtilis* NCIM 2063 u Erlenmajerovim sudovima na rotacionoj mućkalici

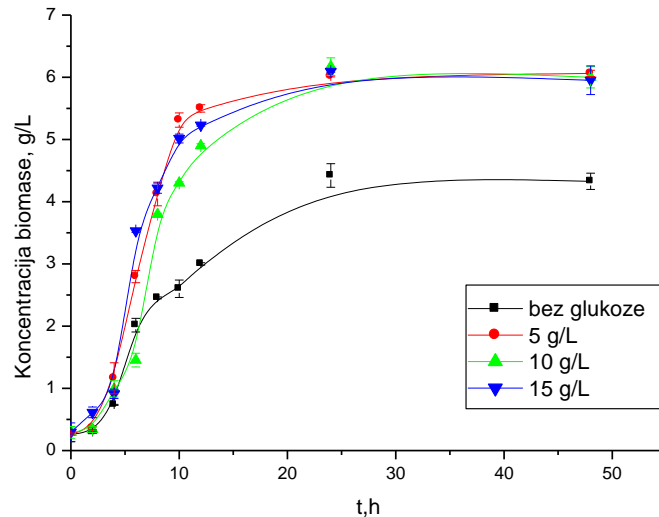
Optimalni uslovi za rast *B. subtilis* NCIM 2063 utvrđeni su gajenjem mikroorganizma u Erlenmajerovim sudovima na rotacionoj mućkalici. Uticaj procesnih uslova istražen je izvođenjem eksperimenata generisanih metodom jednofaktorske i višefaktorske optimizacije. Jednofaktorski pristup podrazumevao je praćenje samo jednog faktora (koncentracija glukoze ili brzina prenosa mase kiseonika, dok su drugi faktori bili na konstantom nivou. Praćeni odziv sistema bila je koncentracija biomase. Na osnovu zaključaka izvedenih jednofaktorskom optimizacijom, formirani su kriterijumi za kreiranje tabele eksperimentalnog dizajna po Boks-Benkenu, na osnovu koje je metodom površine odziva izvršena višefaktorska optimizacija procesnih uslova (koncentracije glukoze, brzina prenosa mase kiseonika i temperature) i utvrđen njihov uticaj na ukupan broj ćelija i ukupan broj spora. Primenom ovog pristupa, kreiran je matematički model koji opisuje zavisnost ukupnog broja ćelija i ukupnog broja spora od koncentracije glukoze, brzine prenosa mase kiseonika i temperature i istraženi su interakcioni efekti između tri procesna faktora.

4.1.1. Jednofaktorska optimizacija procesnih uslova

Uticaj odabranih faktora na kinetičke parametre rasta, kao početna faza eksperimenata, utvrđen je jednofaktorskom optimizacijom rasta *B. subtilis* u Erlenmajerovim sudovima na rotacionoj mućkalici.

4.1.1.1. Optimizacija koncentracije glukoze

Prethodna istraživanja su pokazala da obogaćivanje podloge glukozom u opsegu koncentracija do 20 g/l može pozitivno da utiče na rast *B. subtilis* (de Carvalho et al., 2010; Monteiro et al., 2005; Ngoc et al., 2017). Da bi se povećala ukupna količina biomase, glukoza je dodavana u DSM podlogu, pa je praćen rast biomase pri različitim koncentracijama glukoze. Kao što se može videti na slici 5, lag faza je trajala manje od 2 h nezavisno od koncentracije glukoze, dok se tranzicija iz eksponencijalne u stacionarnu fazu u podlogama sa glukozom odvijala brzo. Stacionarna faza je otpočela nakon 24 h kultivacije, tako da ne postoji potreba da fermentacija traje 48 h, odnosno ekonomski je opravdano da se proces zaustavi ranije.



Slika 5 Promena koncentracije biomase *B. subtilis* NCIM 2063 u DSM podlozi sa različitim početnim koncentracijama glukoze: 15 g/l, 10 g/l, 5 g/l i 0 g/l, na 37 °C i pri brzini obratanja 150 o/min

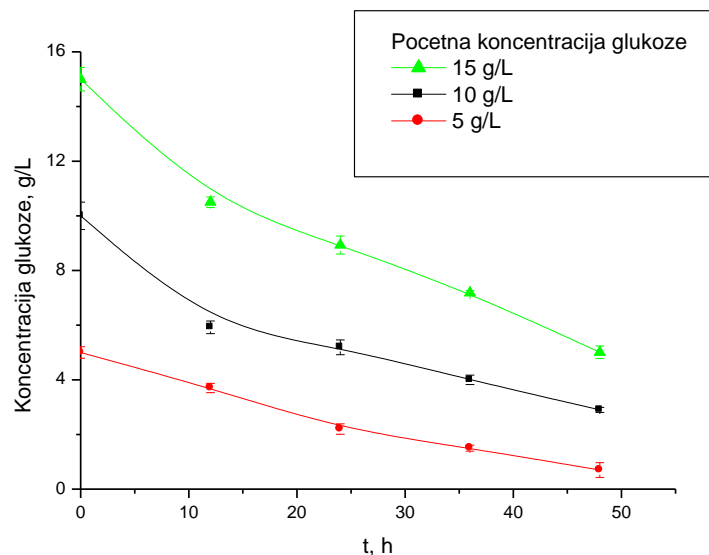
Uticaj glukoze na parametre rasta prikazan je u tabeli 10. Vrednosti specifične brzine rasta se nisu statistički značajno razlikovale, tj. varirale su u opsegu 0,26–0,33 h⁻¹. Takav rezultat je u saglasnosti sa rezultatima prethodno objavljenih istraživanja za šaržnu kultivaciju *B. subtilis* G-GANA7 (Matar et al., 2009) i *B. subtilis* ATCC 6051 (Panda et al., 2018) u kojima su postignute specifične brzine rasta 0,3 h⁻¹ i 0,325 h⁻¹, redom. Maksimalni prinos biomase (6,1 g_{s.b./l}) na kraju kultivacionog perioda ostvaren je u podlozi sa početnom koncentracijom glukoze 10 g/l. Povećanje početne koncentracije glukoze iznad 5 g/l ne dovodi do značajnog povećanja prinosa biomase na kraju kultivacionog perioda. Slično tome, Monteiro i sar. (2005) su zaključili da se ćelijska gustina povećava sa povećanjem početne koncentracije glukoze do 5 g/L, ali ostaje konstantna pri većim početnim koncentracijama (Monteiro et al., 2005). Maksimalan prinos biomase od 6,1 g_{s.b./l} dobijen u ovoj disertaciji je veći od prinosa ostvarenog na melasi šećerne trske (0,44 g/l biomase *B. subtilis* UTB96) posle 12 h kultivacije (Ghasemi i Ahmadzadeh, 2013).

Tabela 10 Specifična brzina rasta (μ_m), generacijsko vreme (t_d), brzina potrošnje glukoze (r_s), finalna koncentracija suve biomase (X) i koeficijent prinosa suve biomase u odnosu na glukozu ($Y_{x/s}$) na podlogama sa različitim koncentracijama glukoze

Početna koncentracija glukoze (g/L)	μ_m (h ⁻¹)	t_d (h)	X , g _{s.b./l}	r_s , g/lh	$Y_{x/s}$, g/g
0	0,26±0,08	2,67±0,58	4,33±0,13 ^a	-	-
5	0,33±0,00	2,10±0,01	6,06±0,05	0,09±0,00 ^a	1,35±0,00 ^a
10	0,28±0,03	2,46±0,26	6,00±0,17	0,13±0,00 ^a	0,80±0,01 ^a
15	0,32±0,06	2,16±0,36	5,95±0,23	0,19±0,01 ^a	0,56±0,01 ^a

^aNivo statističke značajnosti $p < 0,01$

Promena koncentracije glukoze sa vremenom u podlozi sa različitim početnim koncentracijama glukoze je prikazna na slici 6. Specifična brzina potrošnje glukoze je varirala u opsegu 0,09–0,19 g/l. Povećanje početne koncentracije glukoze u podlozi povećalo je brzinu potrošnje supstrata, ali i smanjilo koeficijent prinosa biomase, što navodi na zaključak da se glukoza, osim za stvaranje biomase, troši i za proizvodnju nekog od metabolita. Pri početnoj koncentraciji od 5 g/l ostvaruje se najveći koeficijent prinosa biomase (1,35 g/g) kada je sva glukoza potrošena na kraju procesa. Ova vrednost koeficijenta prinosa biomase značajno premašuje vrednost postignutu (0,183 g/g) tokom šaržne kultivacije *B. subtilis* ATCC 6051 (Panda et al., 2018). S obzirom da dalje povećanje koncentracije glukoze nije uticalo na povećanje biomase, može se zaključiti da je iznad 5 g/l glukoza u višku i da je aktiviran preplavni metabolizam čime se značajno smanjuje energetska efikasnost, a samim tim i umnožavanje ćelija (Dauner et al., 2001).

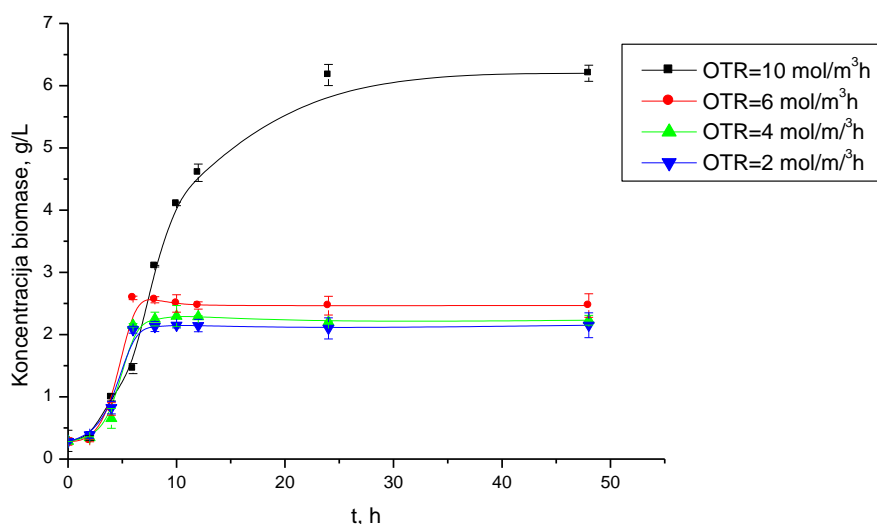


Slika 6 Promena koncentracije glukoze u podlozi sa vremenom pri različitim početnim koncentracijama glukoze: 5 g/l, 10 g/l, 15 g/l.

4.1.1.2. Optimizacija brzine prenosa mase kiseonika

Brzina prenosa mase kiseonika predstavlja ključni parametar u aerobnim sistemima na osnovu kojeg se procenjuje efikasnosti aeracije, optimizuje produktivnost i donosi odluka o izboru bioreaktora i povećanju razmere (Garcia-Ochoa i Gomez, 2009). Tok šaržne fermentacije u Erlenmajerovim sudovima na rotacionoj mućkalici pri različitim vrednostima brzine prenosa mase kiseonika prikazan je na slici 7. *OTR* od 10 mol/m³h je uticala na produženje eksponencijalne faze i postupan prelaz u stacionarnu fazu, što je rezultiralo značajnim povećanjem suve biomase na kraju kultivacionog perioda. S druge strane, brzine prenosa mase kiseonika od 6 mol/m³h, ili manje, deluju limitirajuće na mikrobn rast. Kultivacija *B. subtilis* u uslovima limitirane dostupnosti kiseonika aktivira aerobnu respiraciju koju karakteriše redukcija nitrata uz povećanje količine NADH i NADPH, i smanjenje količine ATP neophodog

za stvaranje ćelijske biomase. Samim tim, ćelijski metabolizam je okrenut u pravcu stvaranja metaboličkih proizvoda poput acetata, laktata, sukcinata ili 2,3-butandiola, dok je mikrobní rast zaustavljen (Hu et al., 2017). U slučaju *B. thuringiensis* je nađeno da povećanje *OTR* sa 1,6 mol/m³h na 2,8 mol/m³h utiće na povećanje ukupnog broja ćelija. Dalji rast ovog parametra do 14 mol/m³h utiće na povećanje specifične brzine rasta i sporulaciju, dok na ukupan broj ćelija nema statistički značajan uticaj (Mounsef et al., 2015).



Slika 7 Promena koncentracije biomase *B. subtilis* NCIM 2063 pri različitim vrednostima *OTR*: 10, 6, 4, 2 (mol/m³h), na 37 °C, u DSM podlozi sa 10 g/l glukoze

Analizom kinetičkih parametara (tabela 11) uočava se da *OTR* nema uticaj na specifičnu brzinu rasta i generacijsko vreme, ali ima značajan uticaj na prinos biomase. Povećanje *OTR* sa 2 mol/m³h na 10 mol/m³h povećava prinos biomase sa 2,15 g/l na 6,20 g/l (2,9 puta). Literaturni podaci potvrđuju da se maksimalni mikrobní rast postiže kada je kiseonik u višku. Koncentracija rastvorenog kiseonika u podlozi je rezultat odnosa brzine prenosa i brzine potrošnje kiseonika. Utvrđeno je da pri niskim koncentracijama kiseonika ne dolazi do umnožavanja ni do sporulacije *B. thuringiensis*, a najveći ćelijski rast zabeležen je pri maksimalnom korišćenom specifičnom protoku vazduha (2 vvm), koji odgovara brzini prenosa mase kiseonika od 1 mol/m³h (Elsayed et al., 2014). Drugo istraživanje uticaja nivoa rastvorenog kiseonika na rast i sporulaciju *B. subtilis* MB24 dovelo je do zaključka da se najveća koncentracija spora postiže kada je rastvoreni kiseonik iznad 30% od zasićenja podloge, dok se pri anaerobnim uslovima efikasnost sporulacije značajno smanjuje (Monteiro et al., 2005). U uslovima limitiranim kiseonikom, *B. subtilis* ima sposobnost adaptacije oslanjanjem uglavnom na usvajanje nitrata (Nakano i Hulett, 2006), što može objasniti relativno visoke vrednosti specifične brzine mikrobnog rasta zabeležene pri malim vrednostima *OTR*.

Tabela 11 Specifična brzina rasta (μ_m), generacijsko vreme (t_d), finalna koncentracija biomase (X) *B. subtilis* NCIM 2063, specifična brzina potrošnje kiseonika (r_{O_2}) i koeficijent prinosa biomase u odnosu na kiseonik ($Y_{x/o}$, g/g) na podlogama sa različitim vrednostima *OTR*

<i>OTR</i> mol/m ³ h	$k_L a$, h ⁻¹	μ_m (h ⁻¹)	t_d	X , g/l	r_{O_2} , mmol/gh	$Y_{x/o}$, g/g
2	9,1	0,3±0,09	2,46±0,76	2,15±0,2	0,94±0,04 ^a	4,16±0,16 ^a
4	18,3	0,27±0,04	2,26±0,31	2,23±0,08	1,78±0,09 ^a	2,20±0,11 ^a
6	27,5	0,29±0,01	2,59±0,10	2,47±0,19	2,34±0,05 ^a	1,67±0,03 ^a
10	45,8	0,27±0,00	2,51±0,00	6,20±0,13 ^a	3,22±0,01 ^a	1,21±0,00 ^a

^aNivo statističke značajnosti $p < 0,01$

Vrednosti specifične brzine potrošnje kiseonika i koeficijenta prinosa biomase u odnosu na kiseonik (tabela 11) izračunate su na osnovu pretpostavke da je sav kiseonik koji je prenet u podlogu potrošen od strane mikroorganizama, odnosno da je postignuta maksimalna očekivana vrednost brzine prenosa mase kiseonika. Uočljivo je da povećanjem brzine prenosa mase kiseonika dolazi do smanjenja koeficijenta prinosa biomase u odnosu na kiseonik i istovremenog povećanja specifične brzine potrošnje kiseonika u eksponencijalnoj fazi. Takav rezultat još jednom navodi na zaključak da se nove količine dovedenog kiseonika troše na umnožavanje biomase i produkciju nekog od metabolita. Kada je u pitanju formulacija mikrobioloških đubriva, takvo svojstvo se smatra poželjnom s obzirom da metaboliti *B. subtilis* imaju dokazano biopesticidno i fitostimulatorno dejstvo (Fábio et al., 2008; Su et al., 2020).

4.1.2. Višefaktorska optimizacija uslova rasta primenom metode odzivne površine

Istraživanja uticaja procesnih uslova na broj vegetativnih ćelija i spora, modelovanje dobijenih odgovora i utvrđivanje optimalnih uslova za kultivaciju *B. subtilis* NCIM 2063 izvršena su primenom multifaktorske optimizacije metodom odzivna površine. Tri nezavisna faktora (temperatura, brzina prenosa mase kiseonika i početna koncentracija glukoze) varirana su na tri nivoa primenom Boks-Benkenovog eksperimentalnog dizajna, a njihov uticaj na ukupan broj vegetativnih ćelija i ukupan broja spora, posle 24 h kultivacije prikazan je u tabeli 12.

Tabela 12 Matrica eksperimentalnog plana sa praćenim odzivnim veličinama

Broj eksperimenta	Nekodirane vrednosti faktora			Praćene odzivne veličine			
	Temperatura, °C (A)	OTR, mol/m ³ h (B)	Početna koncentracija glukoze g/l (C)	Ukupan broj ćelija, LOG(CFU/ml)		Broj spora, LOG(CFU/ml)	
				EKSP.	PRED.	EKSP.	PRED.
1	25,00	2,00	10,00	8,69±0,01	8,66	8,46±0,00	8,69
2	37,00	2,00	10,00	8,80±0,07	8,71	8,54±0,06	8,70
3	25,00	10,00	10,00	9,23±0,04	9,32	7,90±0,13	7,74
4	37,00	10,00	10,00	9,72±0,06	9,8	9,33±0,04	9,10
5	25,00	6,00	0,00	8,72±0,08	8,78	8,52±0,10	8,62
6	37,00	6,00	0,00	9,10±0,07	9,17	8,76±0,07	8,93
7	25,00	6,00	20,00	7,93±0,06	7,86	5,70±0,07	5,53
8	37,00	6,00	20,00	8,10±0,1	8,04	6,69±0,06	6,59
9	31,00	2,00	0,00	9,08±0,03	9,1	8,75±0,08	8,42
10	31,00	10,00	0,00	9,34±0,06	9,19	9,29±0,13	9,36
11	31,00	2,00	20,00	7,10±0,14	7,25	7,00±0,13	6,93
12	31,00	10,00	20,00	9,00±0,11	8,98	5,10±0,14	5,43
13	31,00	6,00	10,00	9,09±0,01	9,01	8,03±0,03	7,91
14	31,00	6,00	10,00	8,95±0,06	9,01	7,84±0,00	7,91
15	31,00	6,00	10,00	8,85±0,00	9,01	7,56±0,08	7,91
16	31,00	6,00	10,00	9,06±0,01	9,01	7,88±0,05	7,91
17	31,00	6	10,00	9,08±0,11	9,01	8,24±0,06	7,91

4.1.2.1. Uticaj procesnih uslova na broj vegetativnih ćelija *B. subtilis*

Primenom metode nelinearne regresije na podatke predstavljene u matrici eksperimentalnog dizajna (tabela 12), predložen je sledeći matematički model za ukupan broj vegetativnih ćelija *B. subtilis* izražen kao LOG (CFU/ml) u funkciji od temperature (*A*), brzine prenosa mase kiseonika (*B*) i početne koncentracije glukoze (*C*):

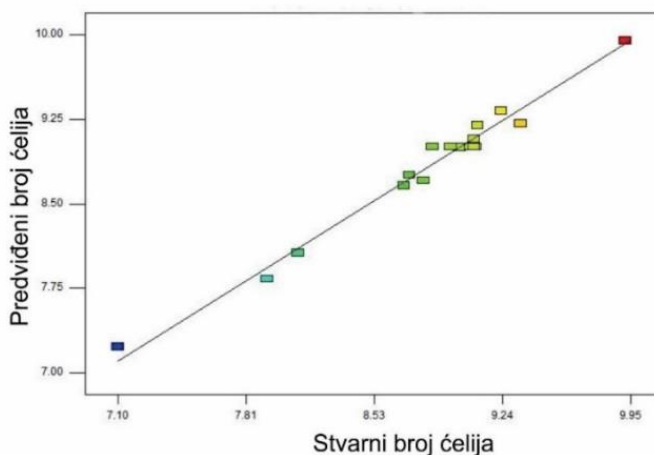
$$\text{Ukupan broj ćelija} = 9,04 + 0,01A - 0,29B + 0,02C + 6,04 \cdot 10^{-3}AB - 8,75 \cdot 10^{-4}AC + 0,01BC - 81,87 \cdot 10^{-4}A^2 + 0,01B^2 - 5,36 \cdot 10^{-3}C^2 \quad (18)$$

Tabela 13 Analiza varijanse modela za predviđanje ukupnog broja viabilnih ćelija

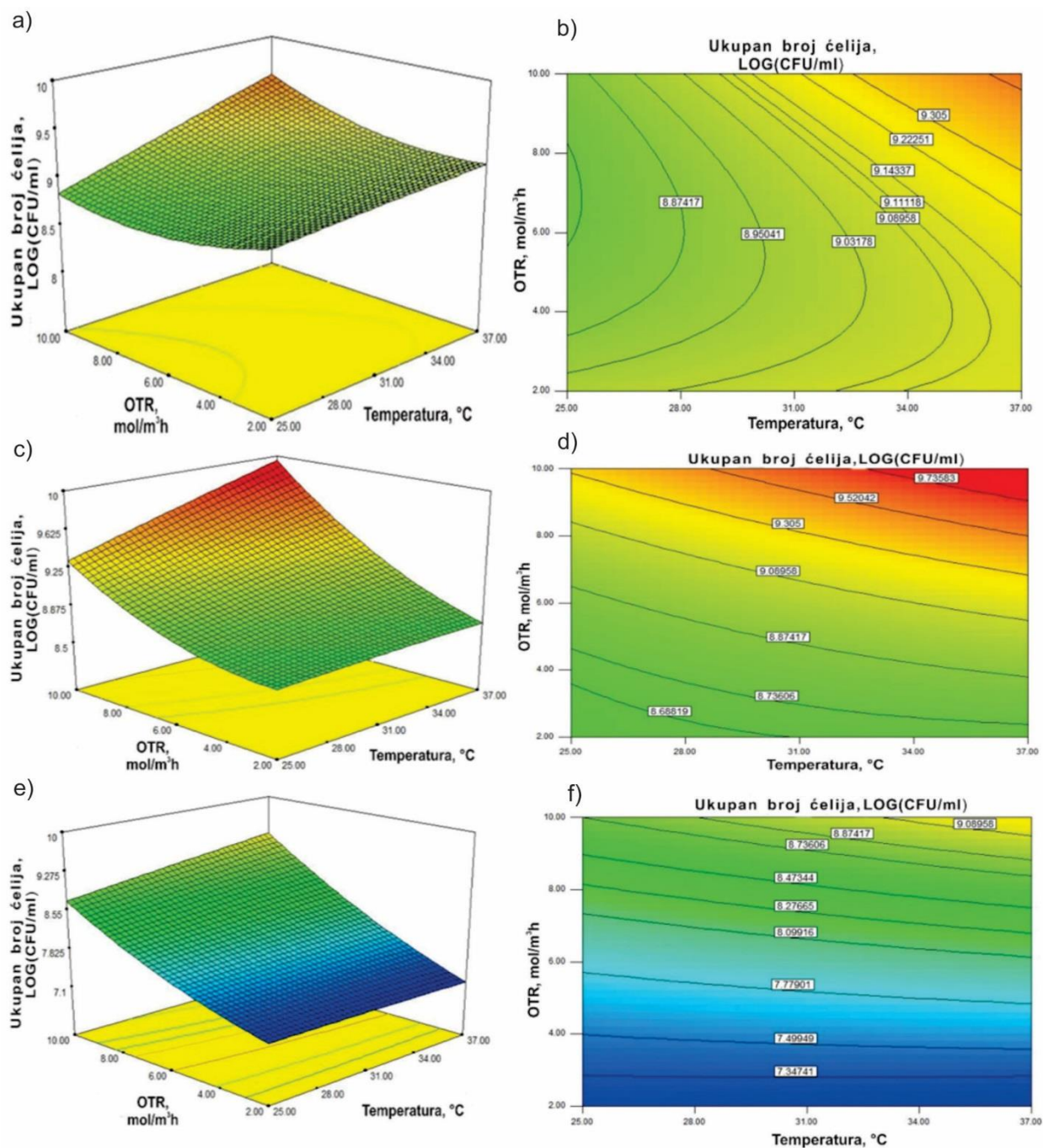
Parametar	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	<i>F</i> vrednost	<i>p</i> vrednost	
Model	6,22	9	41,32	< 0,0001	
<i>A</i>	0,23	1	13,62	0,0078	
<i>B</i>	1,82	1	109,04	<0,0001	
<i>C</i>	2,11	1	126,23	< 0,0001	
<i>AB</i>	0,084	1	5,03	0,0599	
<i>AC</i>	0,011	1	0,66	0,4436	
<i>BC</i>	0,67	1	40,2	0,0004	
<i>A</i> ²	1,9 · 10 ⁻⁴	1	0,011	0,9177	
<i>B</i> ²	0,11	1	6,5	0,0381	
<i>C</i> ²	1,21	1	75,52	<0,0001	
Ostatak	0,12	7			
Odstupanje od modela	0,074	3	2,3	0,2186	
Čista greška	0,043	4			
Ukupna korekcija	6,34	16			
<i>R</i> ²	<i>Adj R</i> ²	<i>Pred R</i> ²	<i>C.V.</i> , %	<i>PRESS</i>	<i>MRPD</i> , %
0,982	0,958	0,802	1,47	1,25	0,1

Poređenjem predviđenih i eksperimentalnih vrednosti i nizom statističkih testova (ANOVA) ocenjena je značajnost i pouzdanost modela. Može se uočiti da je svaki od pojedinačnih faktora statistički značajan sa stepenom pouzdanosti 99% (tabela 13). Najveću značajnost za ukupan broj ćelija imaju početna koncentracija glukoze i brzina prenosa mase kiseonika (i kao individualni i kao kvadratni član), praćeni faktorom interakcije ova dva člana, individualnim faktorom temperature i interakcijom temperature i brzine prenosa mase kiseonika. S obzirom da su brzina prenosa mase kiseonika i početna koncentracija glukoze značajni na kvadratnom nivou, mala varijacija u njihovim vrednostima će u velikoj meri uticati na brzinu rasta i konačan broj ćelija (Sen i Babu, 2005). Izračunata p -vrednost za odstupanje od modela (0,219) je statistički neznčajna i ukazuje na dobro fitovanje eksperimentalnih podataka.

Vrednosti R^2 , $Adj R^2$ i $Pred R^2$ (0,982, 0,958 i 0,802, redom) su u saglasnosti sa zahtevima da R^2 i $Adj R^2$ teže jedinici, kao i da razlika između $Adj R^2$ i $Pred R^2$ ne bude veća od 0,2. Ove vrednosti impliciraju da razvijena regresiona jednačina ima dobro fitovanje, da može uspešno da predvidi odgovore sistema i objasni više od 98,15 % varijacija u broju ćelija *B. subtilis*. Pored toga, koeficijent varijacije, suma reziduala predikcijske greške i srednje relativno odstupanje ($C.V. = 1,47\%$, $PRESS = 1,25$, $MRPD = 0,1$) indikuju visok stepen preciznosti i pouzdanosti eksperimentalnih rezultata. Poređenjem stvarnih vrednosti odziva i vrednosti izračunatih primenom regresionog modela dolazi se do zaključka o dobrom slaganju predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti (Slika 8).



Slika 8 Poređenje eksperimentalnih i predviđenih vrednosti ukupnog broja vegetativnih ćelija izraženih kao LOG (CFU/ml)



Slika 9 Odzivne površine i konturni dijagram za ukupan broj vaibilnih ćelija u funkciji brzine prenosa mase kiseonika, temperature i početne koncentracije glukoze 0 g/L (a, b), 10 g/L (c,d), 20 g/l (e, f)

Regresiona jednačina je, takođe, grafički predstavljena trodimenzionalnim prikazom odzivne površine, koja oslikava dvodimenzionalne konture (slika 9), čime je vizuelizovan odnos odziva i svake od nezavisno promenljivih u sistemu. Analizom 3D grafika može se zaključiti da pri višim početnim koncentracijama glukoze, povećanje brzine prenosa mase kiseonika pozitivno utiče na ukupan broj viabilnih vegetativnih ćelija, dok temperatura nema značajan uticaj. Smanjenjem koncentracije glukoze uticaj temperature postaje izraženiji, pri čemu se najveći broj ćelija postiže u podlozi sa 10 g/l glukoze. Suprotno tome, u podlozi bez glukoze povećanje brzine prenosa mase kiseonika ima neznatan uticaj na povećanje broja ćelija. Ovaj efekat biva ublažen povećanjem temperature, slično kao što u podlogama sa većim početnim koncentracijama glukoze povećanje temperature dobija na značaju pri višim vrednostima brzine prenosa mase kiseonika. Umerena interakcija brzine prenosa mase kiseonika i temperature je, takođe, prethodno potvrđena kroz izračunatu *p*-vrednost, a uticaj kombinacije ovih faktora je jasno primetan i na osnovu eliptične prirode konturnih grafika. Značajnost ovog interakcionog efekta je, takođe, primećena u istraživanju u kojem je optimizovan rast *Bacillus coagulans* primenom RSM metode, pri čemu je maksimalni prinos biomase dobijen kombinacijom visokih vrednosti temperatura i specifičnog protoka vazduha (Sen i Babu, 2005). Grafička analiza je potvrdila značajnost dostupnosti kiseonika, a važnost ovog fenomena objašnjava se činjenicom da nedostatak kiseonika utiče na smanjenje pH vrednosti podloge, što dovodi do brzog liziranja ćelije i pokretanja novih metaboličkih puteva (Sarrafzadeh et al., 2014).

4.1.2.2. Uticaj procesnih uslova na ukupan broj spora

Pouzdanost i dugotrajnost preparata za biokontrolu i stimulaciju rasta biljaka u velikoj meri zavisi od broja spora, zbog čega je bitno omogućiti da mikroorganizam sporuliše. Optimalni uslovi za produkciju spora utvrđeni su primenom Boks-Benkenovog eksperimentalnog dizajna i metodom odzivne površine (tabela 12). Metodom linearne regresije određen je sledeći kvadratni polinomni model za ukupan broj spora u funkciji od temperature (*A*), brzine prenosa mase kiseonika (*B*) i početne koncentracije glukoze (*C*):

$$\begin{aligned} \text{Broj spora} = & 17,55 - 0,51A - 0,6B + 0,01C + 0,01AB + 3,12 \cdot 10^{-3}AC - 0,01BC + \\ & 7,36 \cdot 10^{-3}A^2 + 0,02B^2 - 7,57 \cdot 10^{-3}C^2 \end{aligned} \quad (19)$$

Značajnost faktora razvijenog modela i njegova pouzdanost procenjeni su primenom ANOVA metode (Tabela 14). Prema ANOVA rezultatima, *F*- i *p*-vrednosti modela (21,01 i 0,0002, redom) ukazuju da je model statistički značajan, dok *p*-vrednost za odstupanje od modela (0,203) sugerise da takvo odstupanje nije značajno u poređenju sa čistom greškom. Među faktorima, statistički značajan uticaj na sporulaciju *B. subtilis* imaju početna koncentracija glukoze (individualni i kvadratni član), temperatura, kvadratni član brzine prenosa mase kiseonika i interakcija brzine

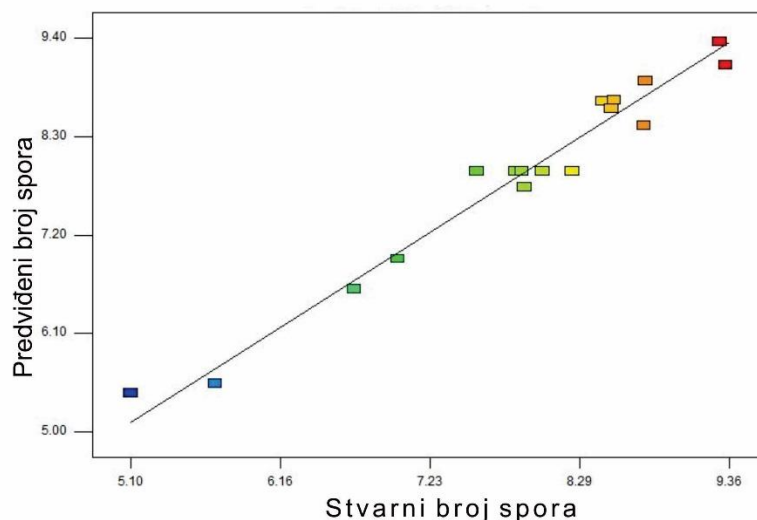
prenosa mase kiseonika i početne kocentracije glukoze, dok brzine prenosa mase kiseonika, kvadratni član temperature i interakcija temperature sa ostalim faktorima nisu statistički značajni.

Tabela 14 Analiza varijanse modela za predviđanje ukupnog broja spora

Parametar modela	Suma kvadrata		Broj stepeni slobode		F vrednost		P vrednost	
	Pre	Posle	Pre	Posle	Pre	Posle	Pre	Posle*
Model	21,01	20,12	9	6	22,85	20,86	0,0002	< 0,0001
<i>A</i>	0,94	0,94	1	1	9,18	5,84	0,0191	0,0363
<i>B</i>	0,16	0,16	1	1	1,56	0,99	0,2515	0,3425
<i>C</i>	14,66	14,66	1	1	143,49	91,22	< 0,0001	< 0,0001
<i>AB</i>	0,46	-	1	-	4,46	-	0,0726	-
<i>AC</i>	0,14	-	1	-	1,38	-	0,2791	-
<i>BC</i>	1,49	1,49	1	1	14,57	9,26	0,0066	0,0124
<i>A</i> ²	0,30	-	1	-	2,89	-	0,1327	-
<i>B</i> ²	0,62	0,66	1	1	6,03	4,13	0,0438	0,0696
<i>C</i> ²	2,42	2,33	1	1	23,65	14,52	0,0018	0,0034
Ostatak	0,72	1,61	7	10				
Odstupanje od modela	0,46	1,36	3	6	2,46	3,59	0,2027	0,1182
Čista greška	0,25	0,25	6	4				
Ukupna korekcija	21,72	21,72	16	16				

*Pre redukcije modela i posle redukcije modela

Iako vrednosti R^2 i $Adj R^2$ ukazuju na dobro fitovanje, razlika između $Pred R^2$ i $Adj R^2$ (koja ne bi trebala da bude veća od 0,2) ukazuje na potrebu redukovanja modela. Zbog toga su iz jednačine modela izbačeni statistički neznčajni članovi: A^2 , AC i AB . Ponovljena statistička analiza utvrdila je dodatno poboljšanje vrednosti svih parametara (tabela 14) uključujući i $Pred R^2$ koji je sada u razumnom slaganju sa $Adj R^2$ (Tabela 15). Ovako dobijen model ocenjen je kao pouzdan i reporduktivan s obzirom na zadovoljavajuće vrednosti koeficijenta varijacije ($C.V. = 4,07\%$) i sume reziduala predikcijske greške ($PRESS = 6,59$). Svi rezultati su pokazali dobro slaganje eksperimentalnih i predviđenih vrednosti (slika 10), što uz malu $MRPD$ vrednost (1,52%) takođe govori o adekvatnosti matematičkog modela za simulaciju sporulacije *B. subtilis*.



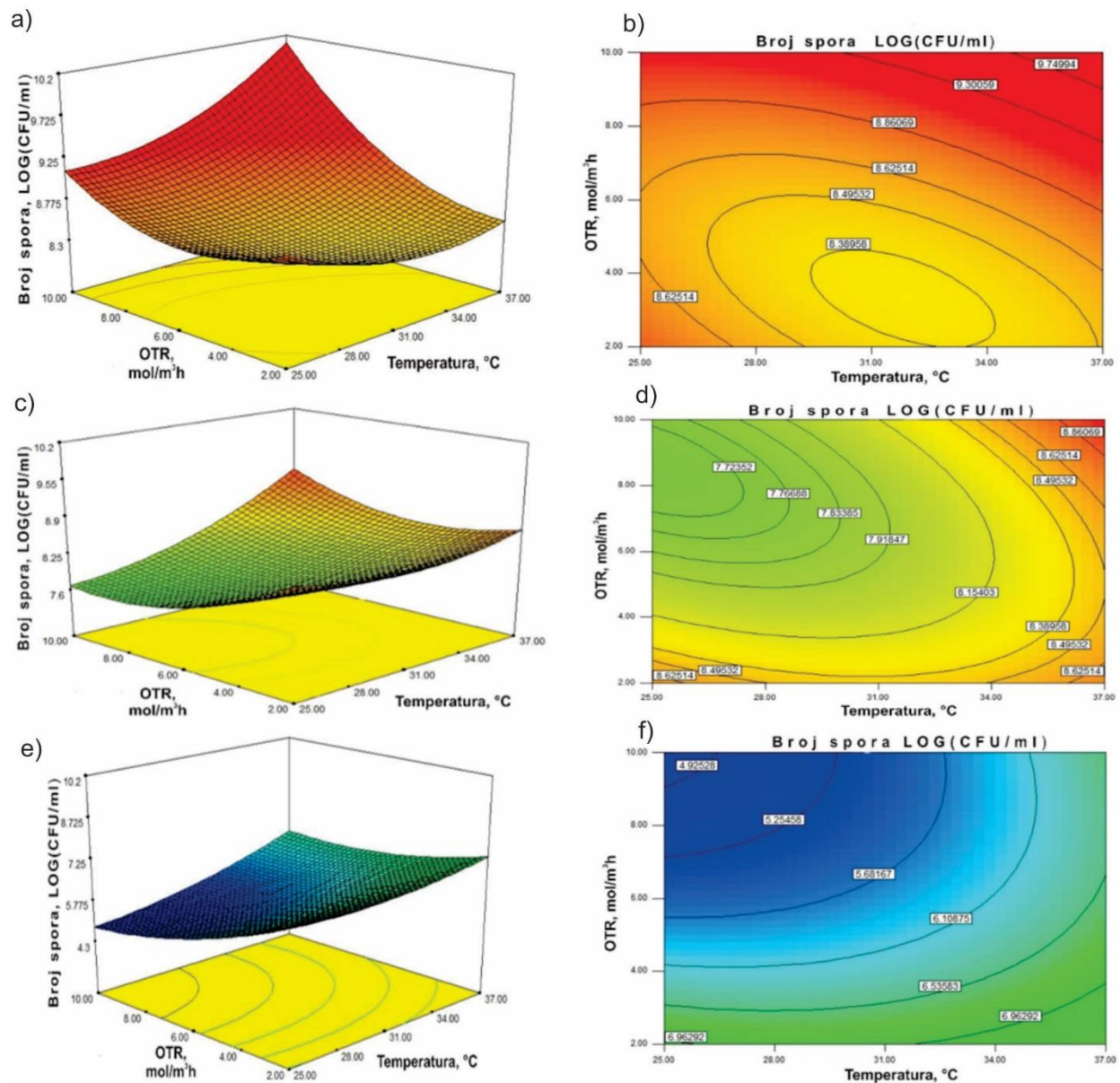
Slika 10 Slaganje eksperimentalnih i predviđenih vrednosti ukupnog broja spora *B. subtilis* NCIM 2063

Tabela 15 Parametri koji ukazuju na adekvatnost modela

	Pre redukcije modela	Posle redukcije modela
R^2	0,967	0,926
$Adj R^2$	0,925	0,882
$Pred R^2$	0,640	0,697
$C.V. \%$	4,07	5,10
$PRESS$	7,81	6,59
$MRPD, \%$	2,34	1,52

Konačna jednačina razvijenog modela, koja uključuje samo značajne članove, ima sledeći oblik:

$$\text{Broj spora} = 7,05 + 0,06A - 0,18B + 0,105C - 0,01BC + 0,02B^2 - 7,43 \cdot 10^{-3}C^2 \quad (20)$$



Slika 11 Odzivne površine i kontur dijagram za broj spora u funkciji brzine prenosa mase kiseonika, temperature i početne koncentracije glukoze 0 g/L (a, b), 10 g/L (c,d), 20 g/l (e, f)

Vizualizovana veza zavisnih i nezavisnih promenljivih je prikazana trodimenzionim površinama

odgovora i kontur graficima baziranim na polinomnoj regresionoj jednačini modela (slika 11). Sa slike 10, može se zaključiti da se maksimalni broj spora dobija u podlozi bez glukoze pri vrednosti $OTR = 10 \text{ mol/m}^3$, dok je uticaj temperature neznatan. Uticaj temperatura većih od $30 \text{ }^\circ\text{C}$ je najizraženiji pri maksimalnoj primenjenoj početnoj koncentraciji glukoze. U podlozi bez glukoze, povećanje brzine prenosa mase kiseonika povećava broj sporuliranih ćelija. Porastom početne koncentracije glukoze uticaj brzine prenosa mase kiseonika na sporulaciju se menja, pa tako početne koncentracije glukoze veće od 10 g/l smanjuju uticaj ovog faktora na sporulaciju. Kultivacijom na većim temperaturama, ovakav efekat glukoze se umanjuje, što se može objasniti činjenicom da se povećanjem početne koncentracije glukoze povećava viskozitet podloge, čime se stvara veći otpor tečnog filma i samim tim smanjuje realna vrednost prenosa kiseonika iz podloge do ćelije mikroorganizma. Povećanjem temperature povećava se rastvorljivost komponenti hranljive podloge, što ublažava negativni efekat glukoze u ovoj interakciji (Limpaiboon, 2013).

Literaturni podaci se slažu sa ovde postignutnim eksperimentalnim rezultatima. Utvrđeno je da se maksimalni prinos spora ostvaruje pri niskim početnim koncentracijama glukoze i da bakterijska kultura započinje sporulaciju kada je ćelijska gustina oko 10^8 CFU/ml (Khardziani et al., 2017). Razlog tome je svojstvo ćelija da sporulišu u nepovoljnim uslovima sredine, odnosno u uslovima kada nutrijenti nisu dostupni u višku. Samim tim se i predstavljeni postupak za dobijanje spora sastoji od kultivacije vegetativnih ćelija do rane eksponencijalne faze u podlozi sa glukozom, nakon čega se iscrpljivanjem glukoze prouzrokuje sporulacija (Abhyankar et al., 2011).

Potvrda validnosti eksperimentanih rezultata optimizacije uslova rasta za dobijanje maksimalnog broja spora može se izvršiti i poređenjem sa uslovima rasta za dobijanje nekog od korisnih metabolita. Naime, znajući da su sporulacija i produkcija metabolita usko povezani procesi, s obzirom da je njihova biosinteza regulisana zajedničkim faktorima, može se zaključiti da postoji podudaranje optimalnih uslova za produkciju nekog od metabolita i produkciju spora (Stein, 2005). Literaturni podaci potvrđuju da je dostupnost i koncentracija kiseonika izuzetno značajna za produkciju metabolita. Za sintezu ribloflavina u bioreaktoru korišćenjem rekombinantne *B. subtilis* RF1, neophodna je brzina mešanja u opsegu $600\text{-}900 \text{ o/min}$, kako bi se postigla maksimalna specifična brzina rasta ćelija (Man et al., 2014). U procesu optimizacije produkcije iturina A primenom *B. subtilis* i RSM metode zaključeno je, takođe, da linearni članovi početne koncentracije glukoze, brzine mešanja i površine aeracije imaju statistički značajan efekat na produkciju iturina, pri čemu je evidentan pozitivan uticaj brzine mešanja i površine aeracije i negativan uticaj početne koncentracije glukoze (Shih et al., 2009). Ipak, u mnogim slučajevima uslovi za gajenje spora u velikoj meri zavise od njihovih karakteristika, tako da svakoj bakterijskoj vrsti treba pristupiti pojedinično i sprovesti preliminarna istraživanja pre donošenja odluke o optimalnim uslovima. Često je potrebno obezbediti uslove koji će najpre omogućiti umnožavanje ćelija u dovoljnom broju, kako bi one u kasnijim fazama mogle da sporulišu (Brul et al., 2011).

4.1.2.3. Višekriterijumska optimizacija primenom Deringerove funkcije

Polinomni model drugog reda dobijen u regresionoj analizi korišćen je za izračunavanje optimalnih procesnih faktora za rast *B. subtilis* NCIM 2063. Kako bi se našlo kompromisno rešenje među faktorima koje će istovremeno omogućiti i uspešnu sporulaciju, neophodno je primeniti statističke metode koje omogućavaju procesuiranje više promenljivih istovremeno. Primenom Deringerove funkcije poželjnosti, a na osnovu ciljeva predstavljenih u tabeli 16, izvršena je višekriterijumska optimizacija procesnih parametara kojom se istovremeno dobijaju maksimalne vrednosti za sve praćene odzivne veličine.

Tabela 16 Kriterijumi i ciljevi optimizacije za svaki faktor i odziv

Faktori i odzivne veličine	Niži nivo	Viši nivo	Značajnos t	Kriterijum
Temperatura, °C	25	37	3	U opsegu
<i>OTR</i> , mol/m ³ h	2	10	3	U opsegu
Koncentracija glukoze, g/l	0	20	3	U opsegu
Ukupan broj ćelija, LOG(CFU/ml)	7,1	9,72	5	Maksimalan
Broj spora, LOG(CFU/ml)	5,1	9,15	3	Maksimalan

Na osnovu višekriterijumske optimizacije, predložen je veći broj kombinacija procesnih uslova kojima se dobija maksimalna vrednost funkcije poželjnosti. Uzimajući u obzir analize odzivnih površina i znajući da porast temperature ne utiče presudno na porast ukupnog broja ćelija, odlučeno je da se optimizacija izvrši kako bi se istovremeno omogućio maksimalan rast ćelija i obezbedio uslov neophodan za sporulaciju, a da se pri tom ostvari ušteda energije. Kao jedinstveno rešenje predložena je sledeća kombinacija analiziranih faktora: $T = 33$ °C, $OTR = 10$ mol/m³h i početna koncentracija glukoze 4,89 g/l. Pod ovim uslovima, model predviđa maksimalnu koncentraciju vegetativnih ćelija 9,66 LOG (CFU/ml) i spora 9,19 LOG (CFU/ml) uz visoku vrednost funkcije poželjnosti (0,931). Eksperimentalna ćelijska gustina za ukupan broj ćelija i spora pod datim uslovima iznosila je $9,51 \pm 0,09$ LOG(CFU/ml) i $9,08 \pm 0,06$ LOG(CFU/ml), respektivno. Eksperiment je rađen u triplikatu, a relativna greška između predviđene i dobijene vrednosti kod vegetativnih ćelija i spora iznosila je 1,5 % i 1,2 %, redom što potvrđuje da postoji dobro slaganje predviđenih i eksperimentalnih vrednosti.

Oskudan broj ranije objavljenih istraživanja je posvećen tematici višekriterijumske optimizacije proizvodnje ćelijske biomase, odnosno broja ćelija ili spora *B. subtilis*. Većina dostupnih

istraživanja bavi se optimizacijom sastava podloge (Anh, 2010; Cheng et al., 2011; Cho et al., 2009; Eswari et al., 2016; Singh et al., 2014), dok mali broj njih optimizuje uslove rasta. Posada-Urbe et. al. (2015) su sprovedi skrining uticaja zapreminskog protoka vazduha i brzine mešanja na ćelijsku gustinu i sporulaciju *B. subtilis* EA-CB0575 primenom centralnog kompozitnog eksperimentalnog dizajna. Kao optimalni uslovi, navedeni su brzina mešanja od 432 o/min i zapreminski protok vazduha od 12 l/min pri temperaturi 30 °C (Posada-Urbe et al., 2015). Takođe, primenom istog eksperimentalnog dizajna, optimizovana je sporulacija *B. subtilis* tokom gajenja na čvrstoj podlozi. Utvrđeno je da, između ostalog, temperatura i zapreminski protok vazduha imaju uticaj na sporulaciju, pri čemu se kao optimalne vrednosti preporučuju 27 °C i 1,2 l/min, respektivno (Pryor et al., 2007). Kada je u pitanju produkcija metabolita, Shih et. al. (2009) su primenom centralnog kompozitnog dizajna utvrdili da su optimalni uslovi za proizvodnju iturina A koršćenjem *B. subtilis* brzina mešanja od 180 o/min, površina aerisanja od 4,35 cm² i 1,11 % glukoze.

4.2. Povećanje razmere procesa

Zapreminski koeficijent prenosa mase (k_{LA}) izabran je za osnovni kriterijum povećanja razmere procesa na nivo laboratorijskog bioreaktora. k_{LA} je ključni parametar za povećanje razmere i optimizaciju u sistemima sa mehaničkim mešanjem, kod kojih je brzina prenosa mase kiseonika između gasne i tečne faze bitan fenomen za kontrolu procesa (Petříček et al., 2018). Potrebe mikroorganizma za kiseonikom određene su kultivacijom u Erlenmajerovim sudovima preko vrednosti brzine prenosa mase kiseonika. Zaključeno je da optimalna vrednost brzine prenosa mase kiseonika u Erlenmajerovim sudovima sa mešanjem iznosi $10 \text{ mol/m}^3\text{h}$, što odgovara vrednosti k_{LA} od $45,8 \text{ h}^{-1}$ (izračunato na osnovu jednačine 9).

4.2.1. Uticaj brzine mešanja na specifičnu brzinu prenosa mase kiseonika

Zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika određen je primenom apsorpcione metode pri različitim brzinama mešanja (tabela 17). Očekivano, manje brzine obrtanja mešalice uslovljavaju sporiji prenos mase kiseonika. Sa povećanjem brzine obrtanja mešalice sa 100 o/min na 400 o/min uočava se eksponencijalni rast zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika, pri čemu je ovaj porast relativno mali sa povećanjem brzine mešanja od 100 o/min na 200 o/min . Takav rezultat je u skladu sa literaturnim podacima, s obzirom da je u podlozi sa glukozom, koncentracije 10 g/l , pri specifičnom protoku vazduha 1 vvm , detektovano povećanje vrednosti k_{LA} sa $25,2 \text{ h}^{-1}$ na $104,4 \text{ h}^{-1}$ kada je brzina mešanja povećana sa 300 o/min na 600 o/min (Limpai boon, 2013). Do povećanja vrednosti k_{LA} dolazi jer se pri većim brzinama mešanja mehurići vazduha razbijaju u sitne mehure, čime se povećava međufazna površina gas-tečno za prenos mase kiseonika u podlozi (Suresh et al., 2009b).

Tabela 17 Uticaj brzine mešanja na vrednosti k_{LA} u bioreaktoru

Brzina mešanja, rpm	100	200	300	400
k_{LA}, h^{-1}	$5,26 \pm 0,02$	$6,51 \pm 0,11$	$11,88 \pm 0,15$	$45,35 \pm 0,25$
$OTR, \text{mmol/m}^3\text{h}$	1,15	1,42	2,59	9,88

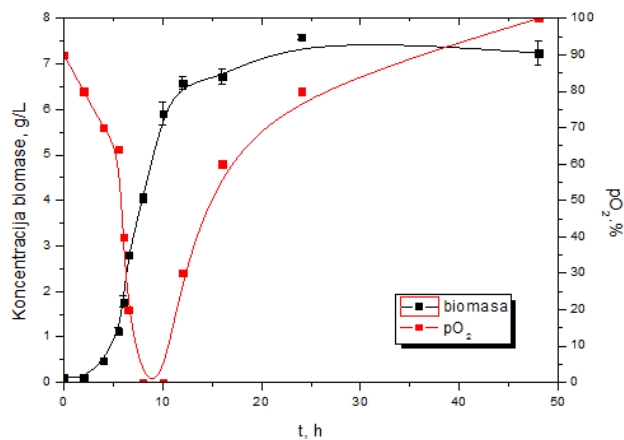
Primenom regresione analize na eksperimentalne podatke dobijene apsorpcionom metodom izvedena je empirijska korelacija koja povezuje brzinu mešanja (N) i k_{LA} :

$$k_{LA} = \exp(7,1 \cdot 10^{-3}N + 0,7) \quad (21)$$

Na osnovu korelacije 19. određuje se brzina mešanja koju je potrebno primeniti u bioreaktoru radne zapremine 2,5 l pri konstantnim uslovima temperature i protoka vazduha. Dok je vrednost temperature (33 °C) izabrana na osnovu višekriterijumske optimizacije, specifični protok vazduha je održavan na optimalnom nivou koji ne prouzrokuje stvaranje pene (0,3 vvm). Izračunato je da je u zadatim uslovima bioreaktora, neophodno podestiti brzinu obrtanja mešalice na 440 rpm, kako bi se postigao zahtevani koeficijent prenosa mase kiseonika od 45,8 h⁻¹.

4.2.2. Kultivacija u bioreaktoru

Efekat povećanja razmere na rast *B. subtilis* NCIM 2063 utvrđen je određivanjem ukupnog broja viabilnih ćelija u bioreaktoru na kraju kultivacionog perioda kada je ostvareno $4,57 \cdot 10^9$ CFU/ml što je 1,41 puta više u odnosu na broj ćelija postignutom u Erlenmajerima pod istim uslovima ($3,24 \cdot 10^9$ CFU/ml). Slično tome, povećanje razmere procesa sa Erlenmajera na bioreaktor zapremine 2 l je uticalo na četverostruko uvećanje biomase *B. circulans* (De Souza et al., 2009). Veća ćelijska gustina na kraju kultivacije u bioreaktoru može se objasniti boljom zasićenošću podloge kiseonikom. Naime, u Erlenmajerovim sudovima sa mešanjem indukcija gasa dešava se samo na osnovu površinske aeracije. U početku je količina kiseonika dovoljna za rast mikroorganizma s obzirom na to da je podloga zasićena vazduhom, ali nakon eksponencijalne faze dolazi do naglog pada koncentracije kiseonika. U slučaju bioreaktora, mešanje i stalno dovodenje svežeg vazduha osiguravaju dovoljne nivoe kiseonika, što može doprineti većem umnožavanju ćelijske mase, odnosno dovesti do produženja eksponencijalne faze. Time se još jednom potvrđuje da aeracija i mešanje imaju jako važnu ulogu za metaboličku aktivnost mikroorganizama (Shukla et al., 2001). S obzirom na to da je u bioreaktoru postigut zadovoljavajući broj ćelija na kraju kultivacionog perioda, izvodi se zaključak da je proces povećanja razmere uspešno sproveden, što je stvorilo osnovni usov za dalje povećanje razmere na poluindustrijski nivo.



Slika 12 Kinetika rasta *B. subtilis* NCIM 2063 na DSM podlozi sa 4,89 g/L glukoze u bioreaktoru sa mešanjem pod optimalnim uslovima: 33 °C i 440 o/min

Promena koncentracije biomase i rastvorenog kiseonika pod optimalnim uslovima u bioreaktoru sa mešanjem prikazani su na slici 12 dok je u tabeli 18 dat pregled kinetičkih parametara rasta. Maksimalna koncentracija biomase (7,24 g/l) dostignuta je nakon 24 h pri specifičnoj brzini rasta od $0,44 \text{ h}^{-1}$. Najveća potreba za kiseonikom, a samim tim i najveća specifična brzina potrošnje kiseonika zabeležena je u ranoj eksponencijalnoj fazi. Nakon 8-10 h kultivacije sistem ulazi u fazu limitiranu kiseonikom kada je brzina potrošnje kiseonika veća od brzine prenosa mase kiseonika ($OUR > OTR$), što rezultira sporijim ćelijskim rastom. S obzirom da u uslovima limitiranim kiseonikom mikroorganizam prelazi na anaerobnu respiraciju, očekivano je da u ovoj fazi dolazi do stvaranja proizvoda metabolizma. Kako se koncentracija biomase približava svojoj maksimalnoj vrednosti, brzina potrošnje kiseonika se smanjuje, tako da je $OUR < OTR$ i koncentracija rastvorenog kiseonika se povećava.

Tabela 18 Specifična brzina rasta (μ_m), generacijsko vreme (t_d), finalna koncentracija biomase (X) *B. subtilis* NCIM 2063, specifična brzina potrošnje kiseonika (r_{O_2}), koeficijent prinosa biomase u odnosu na kiseonik ($Y_{x/o}$) tokom kultivacije u bioreaktoru

k_{La}, h^{-1}	$\mu_m (\text{h}^{-1})$	t_d, h	$X, \text{g/L}$	$r_{O_2}, \text{mmol/gh}$	$Y_{x/o}, \text{g/g}$
45,8	0,44	1,57	7,24	2,47	1.58

Uspešnost strategije povećanja razmere procesa bazirane na k_{La} prikazana je ranije u literaturi. k_{La} je korišćen kao kriterijum povećanja razmere proizvodnje fenil acetil karbinola primenom kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. U tom istraživanju je prvo vrednost k_{La} procenjena u Erlenmajerovim sudovima sa mešanjem primenom apsorbacione metode, na osnovu čega su razvijene odgovarajuće korelacije i ostvarene slične vrednosti k_{La} i veći prinos željenog proizvoda u bioreaktoru zapremine 5 l. (Shukla et al., 2001). Slična strategija za povećanje razmere primenjena je u procesu kultivacije *Corynebacterium glutamicum* i proizvodnje mlečne kiseline korišćenjem prilagođenih empirijskih modela dobijenih sulfitnom metodom (Seletzky et al., 2007). Takođe, u slučaju proizvodnje biomase *Azospirillum brasilense* optimalna vrednost k_{La} (31 h^{-1}) predstavljala je vodeći parametar za podešavanje brzine mešanja i zapreminskog protoka vazduha kako bi se i na poluindustrijskom nivou dobio kvalitetan proizvod za biokontrolu patogena (Trujillo-Roldán et al., 2013)

4.3. Formulisanje mikrobiološkog preparata

Metoda sušenja raspršivanjem izabrana je za dobijanje suvog, praškastog mikrobiološkog preparata za biokontrolu fitopatogena i stimulaciju rasta biljaka, sa ciljem mikroinkapsulacije ćelija *B. subtilis* NCIM 2063. Na osnovu pretrage literaturnih podataka odlučeno je da se maltodekstrin koristi kao nosač u formulaciji. Njegova koncentracija, kao i optimalne vrednosti ostalih parametara sušenja raspršivanjem (temperatura, protok) procenjeni su primenom metode odzivnih površina i višekriterijumske optimizacije. Nakon formulisanja preparata praćena je njegova mikrobiološka stabilnost i utvrđen je potencijalni biopesticidni i fitostimulatorni efekat.

4.3.1. Optimizacija uslova sušenja raspršivanjem primenom metode odzivnih površina

U cilju matematičkog modelovanja, procene individualnih i kombinovanih uticaja variranih faktora i optimizacije procesa sušenja raspršivanjem primenjen je Box-Behnken dizajn sa 17 eksperimenata i pet ponavljanja u centralnoj tački, kao i metoda odzivnih površina.

Ispitan je uticaj tri procesna faktora (nezavisne promenljive): koncentracije maltodekstrina (*A*, 10, 30 i 50, % v/w), temperature (*B*, 110, 125 i 140 °C), i protoka (*C*, 6; 8 i 10 ml/min). Kao odzivne veličine sistema odabrane su: viabilnost, prinos i sadržaj vlage u finalnom proizvodu. Primenom nelinearne regresione analize dobijene su odgovarajuće jednačine odziva za praćene zavisno promenljive veličine. Puna matrica eksperimentalnog plana sa praćenim odzivnim veličinama i predviđenim vrednostima odzivnih veličina prikazana je u Tabeli 19.

Tabela 19 Matrica eksperimentalnog plana sa praćenim odzivnim veličinama

Rb.	Nekodirane vrednosti faktora			Praćene odzivne veličine					
	Koncentracija maltodekstrina, % (A)	Temperatura, °C (B)	Protok ml/min (C)	Viabilnost, LOG(CFU/g)		Prinos, %		Sadržaj vlage, %	
				EXP	PRED	EXP	PRED	EXP	PRED
1	50	140	8	8.83±0.06	8.83	93.51±1.13	94.35	2.43±0.13	2.40
2	50	125	6	9.19±0.13	8.97	96.80±2.26	97.20	3.20±0.1	3.01
3	30	125	8	8.70±0.1	8.68	75.83±0.99	77.62	3.51±0.18	3.46
4	30	125	8	8.55±0.08	8.68	81.38±0.85	77.62	3.60±0.04	3.46
5	30	125	8	8.79±0.07	8.68	80.65±0.57	77.62	3.01±0.3	3.46
6	10	140	8	7.90±0.00	7.94	80.35±0.99	80.25	2.40±0.19	2.18
7	30	110	6	8.56±0.07	8.67	86.09±1.27	85.59	5.30±1.13	5.12
8	30	125	8	8.69±0.05	8.68	77.70±1.98	77.62	3.51±0.14	3.46
9	50	110	8	9.30±0.00	9.41	68.36±0.99	68.46	5.88±0.12	6.48
10	10	125	6	8.04±0.14	8.08	89.11±0.55	90.46	4.13±0.14	4.33
11	30	140	6	8.30±0.07	8.38	95.16±1.27	93.92	1.44±0.07	0.58
12	50	125	10	8.93±0.07	8.96	86.15±0.85	84.80	8.90±0.64	9.86
13	10	110	8	8.65±0.12	8.52	47.33±0.21	46.48	6.30±0.16	6.37
14	10	125	10	8.09±0.11	8.07	55.87±1.27	55.47	5.19±0.07	5.52
15	30	110	10	8.94±0.13	8.95	39.15±0.10	40.39	9.10±1.29	8.46
16	30	125	8	8.69±0.06	8.68	72.53±0.28	77.62	3.71±1.03	3.46
17	30	140	10	8.10±0.11	8.08	91.23±2.26	91.73	3.42±0.14	3.54

4.3.1.1. Uticaj uslova sušenja raspršivanjem na prinos proizvoda

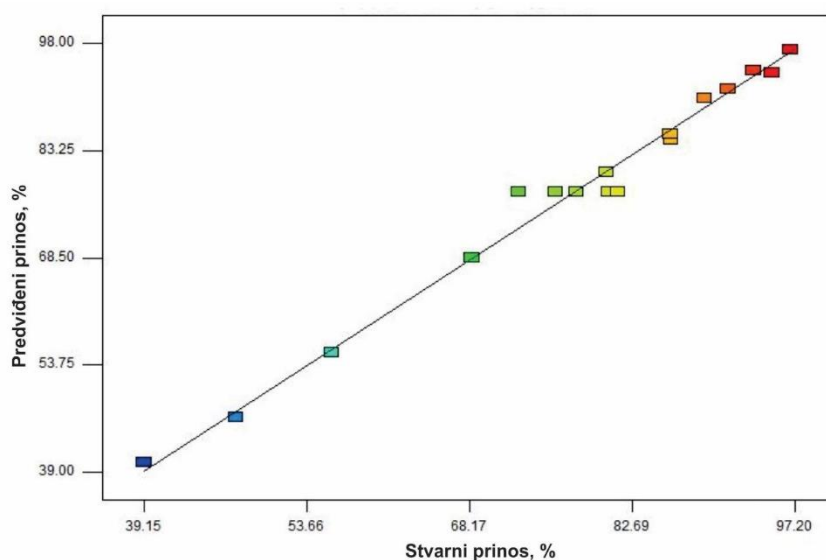
Prinos suvog praha mikrobiološkog preparata nakon sušenja raspršivanjem varirao je od 39,15 do 96,8 %. Metodom odzivnih površina utvrđen je uticaj odabranih parametara (koncentracija maltodekstrina, protok tečnosti i ulazna temperatura) na prinos proizvoda. Regresionom analizom eksperimentalnih podataka predstavljena je jednačina odziva:

$$\text{Prinos} = 109,53 + 0,23 \cdot A + 3,5 \cdot B - 74,73 \cdot C + 6,55 \cdot 10^{-3} AB - 0,14 \cdot AC - 0,36 \cdot BC + 1,47 \cdot 10^{-3} \cdot A^2 - 0,02 \cdot B^2 + 1,23 \cdot C^2 \quad (22)$$

Tabela 20 Analiza varijanse modela za predviđanje prinosa nakon sušenja raspršivanjem

Parametar modela	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	F-vrednost	p-vrednost	
Model	4344,26	9	54,99	< 0,0001	
A	452,01	1	51,50	0,0002	
B	815,11	1	92,86	< 0,0001	
C	1531,15	1	174,44	< 0,0001	
AB	15,47	1	1,76	0,2260	
AC	127,59	1	14,54	0,0066	
BC	462,48	1	52,69	0,0002	
A ²	1,41	1	0,16	0,7005	
B ²	9,18	1	10,39	0,0146	
C ²	102,85	1	11,72	0,0111	
Cor Total	4405,70	16			
Ostatak	61,44	7			
Odstupanje od modela	8,99	3	0,23	0,8724	
<i>R</i> ²	<i>Adj R</i> ²	<i>Pred R</i> ²	<i>C.V.</i> %	<i>PRESS</i>	<i>MRPD</i> , %
0,9861	0,9681	0,9488	3,82	225,76	1,79

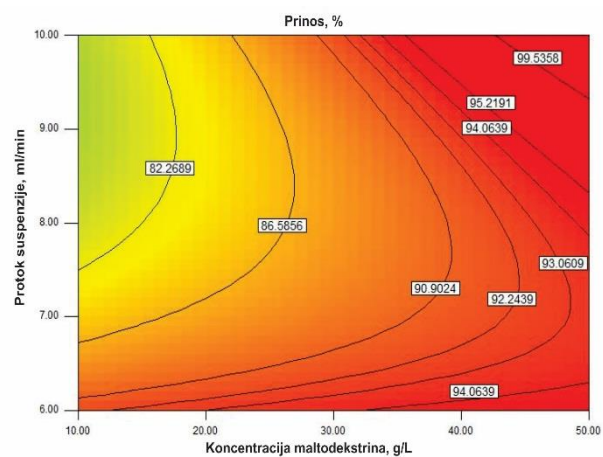
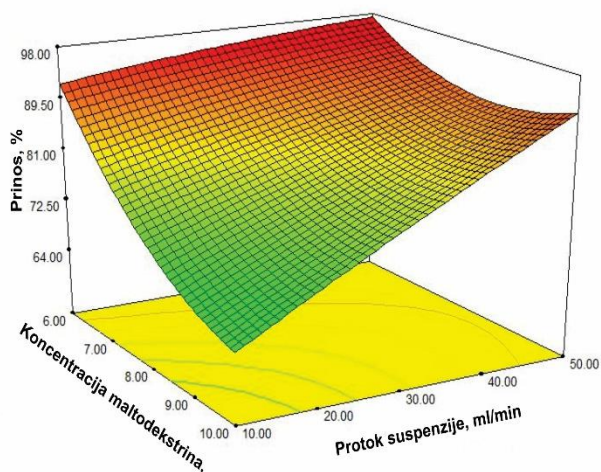
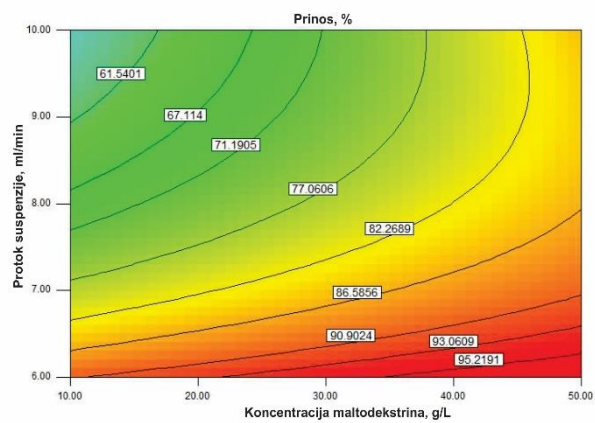
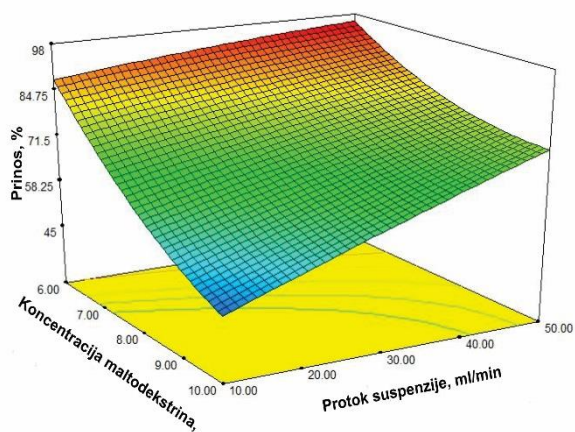
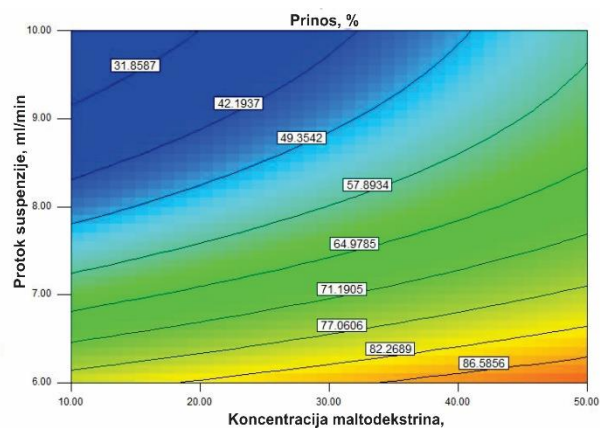
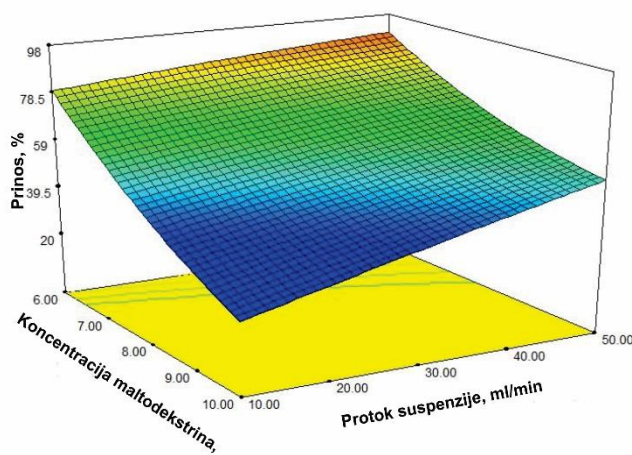
Analizom varijanse (Tabela 20) ustanovljeno je da je prikazan model statistički značajan (F vrednost 54,99) i da ima statistički neznačajano odstupanje od modela (F vrednost 0,23). Pri stepenu poverenja 99% statistički značajni članovi jednačine modela su protok i temperatura. Izražen uticaj na prinos imaju i njihovi kvadrati i međusobna interakcija, kao i samostalni član koncentracije maltodekstrina. Među njima, najveći uticaj na posmatrani odziv imaju protok suspenzije i temperatura. Na osnovu R^2 vrednosti dolazi se do zaključka da se 98,61% varijacija vrednosti odziva može objasniti modelom, što je dodatno potvrđeno vrednostima prilagođenog i korigovanog koeficijenta determinacije koji su međusobno adekvatno usklađeni. Na osnovu slike 12 i vrednost koeficijenta varijacije ($C.V.=3,82\%$) se može zaključiti da su razlike između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti odziva male što takođe potvrđuje adekvatnost modela za simulaciju prinosa mikrobiološkog preparata *B. subtilis*.



Slika 12 Usklađenost predviđenih i stvarnih vrednosti prinosa proizvoda

Na osnovu 2D i 3D grafika (slika 13) može se zaključiti da se maksimalni prinos postiže istovremenim porastom koncentracije maltodekstrina i temperature. Veća koncentracija nosača u ulaznoj suspenziji utiče na povećanje viskoznosti, a samim tim i na smanjenje radijalne brzine čestica, čime se umanjuje mogućnost sudaranja sa zidovima komore za sušenje i stvaraju uslovi da veći broj čestica dođe do sabirne posude (Schuck, 2009). Uticaj koncentracije maltodekstrina je najizraženiji na najvišim testiranim temperaturama, dok na nižim temperaturama uz istovremeno smanjenje protoka uticaj koncentracije maltodekstrina slabi. Povećanje protoka generalno smanjuje prinos proizvoda, ali se porastom temperature umanjuje uticaj protoka na prinos. Povećanje temperature uz istovremeno smanjenje protoka omogućava bolje sušenje proizvoda i smanjenje sadržaja vlage čime se umanjuje verovatnoća da dođe do aglomeracije mikročestica i stvaranja depozita na zidovima komore za sušenje, čime se direktno utiče na povećanje prinosa (Adhikari et al., 2005; Amiet-Charpentier et al., 1998). Ovakav zaključak je u skladu sa prethodnim rezultatima sušenja raspršivanjem *Lactobacillus acidophilus* (Behboudi-Jobbehdar et al., 2013) i *Pseudomonas putida* (Amiet-Charpentier et al., 1998) gde

je zabeleženo višestruko povećanje prinosa nakon istovremenog povećanja ulazne temperature vazduha i smanjenja protoka suspenzije.



Slika 13 Odzivne površine i kontur dijagram za prinos formulacije nakon sušenja raspršivanjem u funkciji koncentracije maltodekstrina, protoka suspenzije i temperature 110 °C (a, b), 125 °C (c,d), 140 °C (e, f)

4.3.1.2. Uticaj uslova sušenja raspršivanjem na viabilnost preparata

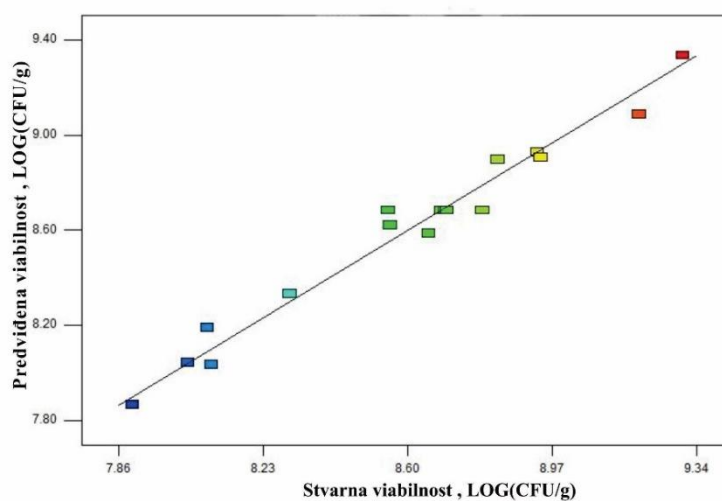
Uticaj odabranih parametara sušenja raspršivanjem na viabilnost analiziran je primenom metode odzivnih površina. Zavisnost viabilnosti proizvoda od parametara sušenja raspršivanjem predstavljena je redukovanim kvadratnim polinomnim modelom uz prethodnu modifikaciju odziva primenom funkcije dekadnog logaritma. Jednačina modela za predviđanje viabilnosti ćelija *B. subtilis* NCIM 2063 nakon procesa sušenja raspršivanjem ima sledeći oblik:

$$Viabilnost = 3,01 + 0,02A + 0,02B + 1,25C - 4,86 \cdot 10^{-3}BC - 0,04C^2 \quad (23)$$

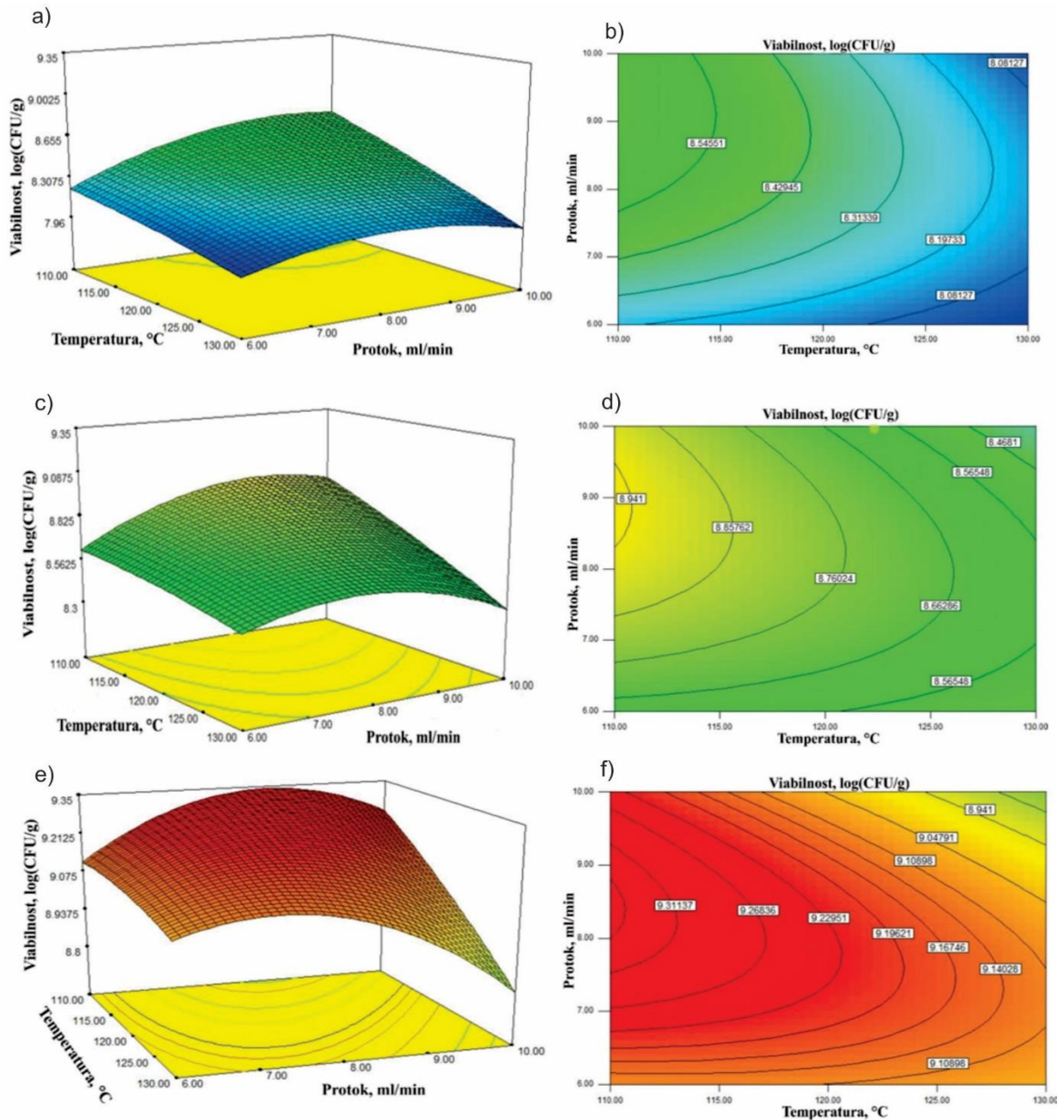
Analiza varijanse (Tabela 21) pokazala je da je usvojeni model ima statistički značaj, na šta ukazuje visoka F vrednost modela (40,80), mala p vrednost ($<0,0001$) i zanemarljivo odstupanje od modela (F vrednost odstupanja od modela izosi 1,99). Postoji dobro fitovanje modela sa eksperimentalnim podacima koji su adekvatno uklopljeni i minimalno odstupaju od izračunatih podataka (Slika 14). Pri stepenu poverenja 99% koncentracija maltodekstrina i ulazna temperatura imaju statistički značajan uticaj na viabilnost mikroorganizama u kranjem proizvodu. To potvrđuju i visoke F vrednosti za ova dva parametara. Iako protok tečnosti nije pokazao statističku značajnost kao samostalni faktor, kvadriran i u interakciji sa temperaturom, ovaj faktor ipak pokazuje statistički značaj pri stepenu poverenja 95%. Ostali kvadratni i faktori interakcije su eliminisani iz jednačine modela, s obzirom da nisu pokazali statističku značajnost. 94,88 % varijacija vrednosti odziva može se objasniti tako redukovanim modelom ($R^2=0,9488$), a njegova adekvatnost potvrđena je usklađenošću korigovanog i predviđenog koeficijenta determinacije čija je međusobna razlika manja od 0,2 ($Pred R^2=0,8527$; $Adj R^2=0,9256$) i malom vrednošću koeficijenta varijacije ($C.V.=1,28\%$). Svi statistički značajni faktori predloženih modela, osim kvadratnog člana i člana interakcije, imaju pozitivan uticaj na praćene odzivne veličine, što ukazuje na to da se porastom vrednosti nezavisno promenljive tj. faktora, povećava vrednost odziva. Slično tome, rezultati prethodnog istraživanja, koje se bavilo sušenjem raspršivanjem *B. thuringiensis*, ukazuju da statistički značajan pozitivan efekat na viabilnost imaju linearni članovi temperature i protoka, negativan efekat imaju njihovi kvadratni članovi dok članovi interakcije faktora nisu bili statistički značajni (Adjallé et al., 2011). Slični rezultati objavljeni su i kod sušenja raspršivanja *Sphingomonas* sp. gde takođe ulazna temperatura vazduha i protok suspenzije najviše utiču na preživljavanje mikroorganizma u formulaciji (Hui Wang et al., 2018).

Tabela 21 Analiza varijanse modela za predviđanje ukupnog broja viabilnih ćelija nakon sušenja raspršivanjem

Parametar modela	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	<i>F</i> -vrednost	<i>p</i> -vrednost	
Model	2,46	5	40,8	< 0,0001	
<i>A</i>	1,59	1	132,10	< 0,0001	
<i>B</i>	0,67	1	55,84	< 0,0001	
<i>C</i>	0,037	1	3,1	0,106	
<i>BC</i>	0,085	1	7,06	0,0223	
<i>C</i> ²	0,11	1	9,01	0,0120	
Cor Total	2,59	16			
Ostatak	0,13	11			
Odstupanje od modela (<i>Lack of Fit</i>)	0,1	7	1,99	0,2643	
<i>R</i> ²	<i>Adj R</i> ²	<i>Pred R</i> ²	<i>C, V, %</i>	<i>PRESS</i>	<i>MRPD, %</i>
0,9488	0,9256	0,8527	1,28	0,38	0,6

**Slika 14** Poređenje predviđene i stvarne viabilnosti ćelija *B. subtilis* NCIM 2063 nakon sušenja raspršivanjem

Da bi se odredile vrednosti nezavisno promenljivih veličina koje će rezultirati maksimalnim odzivom zavisno promenljivih, jednačine modela su grafički prikazane 2D i 3D dijagramima koji vizuelizuju ove relacije (Slika 15). Sa prikazanih 2D i 3D dijagrama može se uočiti da povećanje koncentracije maltodekstrina i smanjenje ulazne temperature pozitivno utiče na viabilnost mikroorganizama u finalnom proizvodu. Iako u većini slučajeva temperatura utiče na smanjenje ćelijske viabilnosti, istraživanja su pokazala da povećanje protoka tečnosti može da smanji negativan uticaj temperature. Naime, povećanjem protoka tečnosti dolazi do smanjenja temperature na površini kapljica što prouzrokuje promene u prenosu toplote smanjujući fizička oštećenja ćelijskih membrana bakterija (Behboudi-Jobbehdar et al., 2013). Ova tvrdnja dokazana je i u ovom doktoratu, pri čemu je primećeno da je uticaj protoka izraženiji na nižim i srednjim temperaturama u okviru ispitivanog opsega, dok na višim temperaturama protoci iz opsega 6-8 ml/min praktično nemaju uticaja na preživljavanje mikroorganizama u formulaciji. Maksimalna viabilnost u ispitivanom opsegu ($1,99 \cdot 10^9$ CFU/g) ostvarena je na najnižoj temperaturi (110 °C), pri srednjem protoku (8 ml/min) i maksimalnoj koncentraciji maltodekstrina (50 g/L). Ovakav rezultat u skladu je se prethodnim istraživanjem sušenja raspršivanjem *B. subtilis* CPA-8 kada je na 150 °C, pri protoku suspenzije 8 ml/min i uz dodatak MgSO₄ postignuta viabilnost od $3,3 \cdot 10^9$ CFU/g (Yáñez-Mendizabal et al., 2012). Razlika u broju preživelih ćelija se može pripasati korišćenim nosačima, uslovima kultivacije i starosti ćelija pre sušenja raspršivanjem (Peighambardoust et al., 2011).



Slika 15 Odzivne površine i kontur dijagram za viabilnost ćelija nakon sušenja raspršivanjem u funkciji temperature, protoka suspenzije i koncentracije maltodekstrina 10 g/L (a, b), 30 g/L (c,d), 50 g/L (e, f)

4.3.1.3. Uticaj parametra sušenja raspršivanjem na sadržaj vlage

Primenom RSM i Box-Benken eksperimentalnog dizajna analiziran je i uticaj parametra spej sušenja na sadržaj vlage u finalnom proizvodu. S obzirom na prirodu proizvoda, kombinacija faktora koja smanjuje sadržaj vlage se smatra najpoželjnijom za kvalitet proizvoda. Nakon sušenja raspršivanjem preparat bi trebao da sadrži manje od 5 % vlage.

Analizom eksperimentalnih podataka i primenom metode odzivnih površina predstavljen je empirijski kvadratni model. S obzirom da je primarna ANOVA analiza utvrdila da takav model nije odgovarajući, s obzirom na loše slaganje eksperimentalnih i predviđenih vrednosti i statistički značajno odstupanje od modela ($p=0,174$), predložena je njegova transformacija primenom funkcije prirodnog logaritma.

Tabela 22 Analiza varijanse modela za predviđanje sadržaja vlage u formulaciji

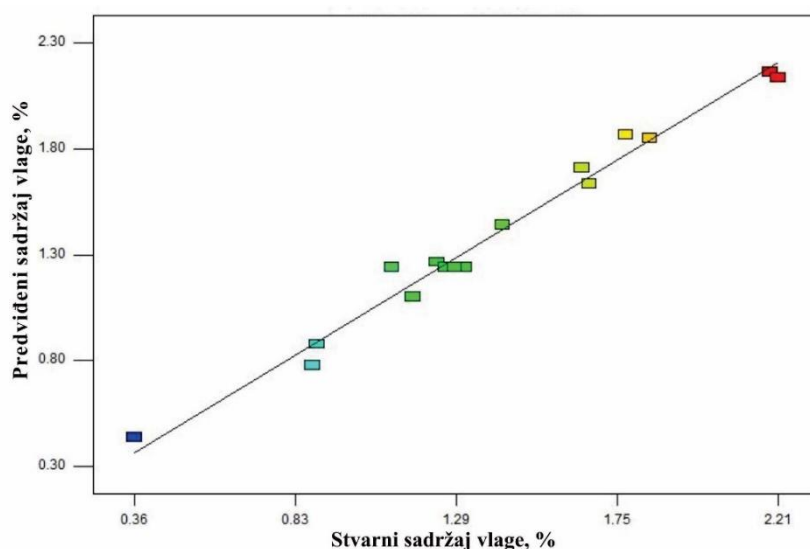
Parametar modela	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	F-vrednost	p-vrednost	
Model	3,51	9	40,85	<0,0001	
<i>A</i>	$9,53 \cdot 10^{-4}$	1	0,1	0,76	
<i>B</i>	0,33	1	35,02	0,0006	
<i>C</i>	0,33	1	22,57	0,0010	
<i>AB</i>	0,33	1	34,26	0,0006	
<i>AC</i>	$1,64 \cdot 10^{-3}$	1	0,17	0,6909	
<i>BC</i>	0,026	1	2,77	0,1401	
<i>A</i> ²	0,12	1	12,67	0,0092	
<i>B</i> ²	0,019	1	1,94	0,2059	
<i>C</i> ²	0,16	1	16,47	0,0048	
	3,58	16			
Ostatak	0,067	7			
Odstupanje od modela	0,041	3	2,06	0,2477	
<i>R</i> ²	<i>Adj R</i> ²	<i>Pred R</i> ²	<i>C,V, %</i>	<i>PRESS</i>	<i>MRPD, %</i>
0,9813	0,9573	0,8069	7,08	0,69	4,63

Ponovljena ANOVA analiza (Tabela 22) pokazala je da je novi model statistički značajan (F vrednost 48,67) dok je odstupanje od modela u ovom slučaju statistički neznačajno ($p=0,3133$). Na adekvatnost modela dodatno ukazuju dobra usklađenost vrednosti R^2 , $Adj R^2$, $pred R^2$ i $C.V.$ (%) koje iznose 0,9843, 1,964, 0,8499 i 7,68, respektivno. Dobro slaganje stvarnih i predviđenih

vrednosti dodatno je prikazano na slici 16. Statistički značaj članova modela se takođe procenjuje na osnovu F i p vrednosti. Pri stepenu poverenja 99% temperatura, protok i kvadrat protoka imaju značajan uticaj na sadržaj vlage. Koncentracija maltodekstrina nije statistički značajan član, dok među faktorima interakcije statistički značaj imaju interakcije koncentracije maltodekstrina sa temperaturom i protokom, i to pri nivou statističke značajnosti 95%. Ovakvi rezultati potvrđeni su i na osnovu analize apsolutnih vrednosti koeficijenata u samoj polinomnoj jednačini. Usvojena jednačina modela ima sledeći oblik:

$$\ln Y = 7,19 - 0,072A + 0,16B - 1,09C + 6,75 \cdot 10^{-5}AB + 4,96 \cdot 10^{-3}AC + 2,71 \cdot 10^{-3}BC + 4,23 \cdot 10^{-4}A^2 - 2,95 \cdot 10^{-4}B^2 + 0,05C^2 \quad (24)$$

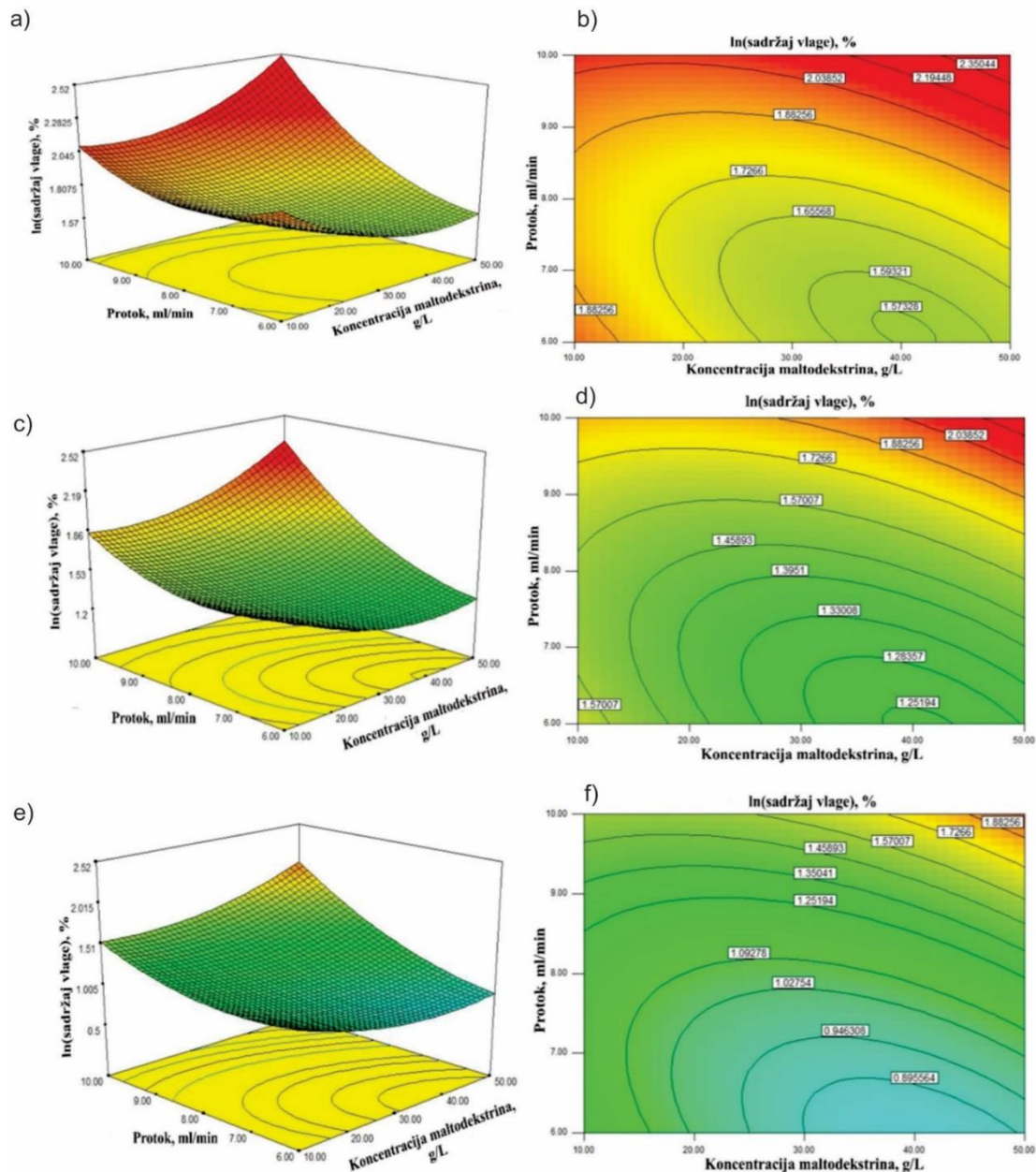
gde je Y – sadržaj vlage, %.



Slika 16 Poređenje stvarnog i softverski predviđenog sadržaja vlage u formulaciji *B. subtilis* NCIM 2063

Analizom 2D i 3D grafika potvrđeno je da na smanjenje sadržaja vlage utiče povećanje temperature i smanjenje protoka, dok je uticaj maltodekstrina neznatan. Značajnost uticaja ulazne temperature vazduha na sadržaj vlage je posledica stvaranja većeg temperaturnog gradijenta između atomizovanih čestica i vrelog vazduha na višim temperaturama, što omogućava veću pogonsku silu za uklanjanje vlage. S druge strane povećanje protoka utiče na stvaranje većih kapljica, što otežava isparavanje, pa je samim tim rezidualni sadržaj vlage veći (Seth et al., 2017). Takođe na slici 17. se može uočiti da pri manjim vrednostima protoka u ispitivanom opsegu uticaj maltodekstrina postaje izraženiji tako da se povećanjem njegove koncentracije postepeno smanjuje sadržaj vlage. Pri većim vrednostima protoka maltodekstrin nema presudnu ulogu za ovaj odziv sistema. Najsuvije formulacije dobijene su kombinacijom najviše temperature i najnižeg protoka. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim istraživanjem koje se bavilo sušenjem raspršivanjem *L. acidophilus* koristeći maltodekstrin kao nosač

(Behboudi-Jobbehdar et al., 2013). Seth i sar. su takođe došli do zaključka da u procesu sušenja raspršivanjem *Streptococcus thermophilus* i *L. delbrueckii bulgaricus*, najveći uticaj na sadržaj vlage imaju upravo temperatura i protok, čiji su linearni, kvadratni i interakcioni efekat bili statistički značajni (Seth et al., 2017). Druga grupa autora je ispitivala uticaj različitih nosača (obrano mleko i $MgSO_4$) na sadržaj vlage formulacije *B. subtilis* CPA 8 dobijene metodom sušenja raspršivanjem. Najniži sadržaj vlage (6%) postignut je primenom 10% obranog mleka u prahu i 10% $MgSO_4$ (Yáñez-Mendizábal et al., 2012). S obzirom da je u ovom doktoratu najniži postignuti sadržaj vlage 1,4 % izvodi se zaključak da maltodekstrin u kombinaciji sa visokom temperaturom ulazne struje vazduha postiže znatno bolji efekat.



Slika 17 Odzivne površine i kontur dijagram za prinos formulacije nakon sušenja raspršivanjem u funkciji protoka suspenzije, koncentracije maltodekstrina i temperature 110 °C (a, b), 125 °C (c, d), 140 °C (e, f)

4.3.1.4. Višefaktorska optimizacija uslova sušenja raspršivanjem primenom Deringerove funkcije

U cilju dobijanja mikrobiološkog preparata maksimalne viabilnosti i prinosa uz minimalnu količinu zaostale vlage, parametri sušenja raspršivanjem optimizovani su primenom Deringerove funkcije poželjnosti. Definisani su ciljevi i kriterijumi optimizacije kao i nivoi njihove značajnosti (tabela 23). Pored nivoa značajnosti faktora, definisani su i nivoi značajnosti odzivnih veličina shodno postavljenim kriterijumima optimizacije.

Tabela 23 Kriterijumi i ciljevi za svaki faktor i odziv

Faktori i odzivne veličine	Niži nivo	Viši nivo	Značajnost	Kriterijum
Temperatura, °C	110	140	3	U opsegu
Koncentracija maltodekstrina, g/l	10	50	3	U opsegu
Protok tečnosti, ml/min	6	10	3	U opsegu
Viabilnost, CFU/g	7,9	9,3	5	Maksimalna
Prinos, %	39,15	96,8	3	Maksimalan
Sadržaj vlage, %	1,43	9,03	3	Minimalan

Kao jedinstveno rešenje sa kombinovanom funkcijom poželjnosti od $D = 0,87$ za parametre sušenja raspršivanjem, predloženo je: temperatura 130 °C, koncentracija maltodekstrina 50 g/l i potok tečnosti 6,1 ml/min. Predloženo optimizovano rešenje verifikovano je u laboratorijskim uslovima (tabela 24) minimalnim odstupanjem eksperimentalnih i predviđenih vrednosti, kao i visok stepen preživljavanja enkapsuliranih bakterija nakon čuvanja na sobnoj temperaturi u periodu od 6 meseci i godinu dana.

Tabela 24 Poređenje eksperimentalnih i predviđenih vrednosti istraživanih parametara nakon sušenja raspršivanjem pod utvrđenim optimalnim uslovima

Promenljiva	Eksperimentalna vrednost	Predviđena vrednost
Viabilnost odmah nakon sušenja, LOG(CFU/g)	9,18 ± 0,01	9,07 CFU/g
Viabilnost posle 6 meseci, LOG (CFU/g)	8,93 ± 0,03	
Viabilnost posle godinu dana LOG (CFU/g)	8,45 ± 0,21	
Prinos, %	92,6 ± 1,98	96,8
Sadržaj vlage, %	2,90 ± 0,28	2,53

Višekriterijumska optimizacija procesa sušenja raspršivanjem različitih mikroorganizama je bila predmet istraživanja većeg broja istraživačkih grupa. Grupa istraživača bavila se optimizacijom sušenja raspršivanjem *B. thuringiensis* koristeći RSM metodu i centralni kompozitni dizajn. Pod utvrđenim optimalnim uslovima (protok 0,29 g/min, ulazna temperatura vazduha 180 °C), dobili su $2,2 \cdot 10^8$ viabilnih ćelija u suvoj formulaciji (Adjallé et al., 2011). U drugom istraživanju sušenja raspršivanjem *L. Acidophilus*, pri čemu je kao nosač korišćen maltodekstrin u kombinaciji sa glukozom i proteinima surutke, maksimalna poželjnost Deringerove funkcije prilikom postignuta je na 133,54 °C pri protoku od 7,14 ml/min. Pod tim optimalnim uslovima, postignuta je viabilnost od 8,59 CFU/g i aktivnost vode od 0,171 (Behboudi-Jobbehdar et al., 2013). Razlike u optimizovanim vrednostima sušenja se pripisuju na prvom mestu razlici u korišćenim sojevima i njihovim svojstvima, zbog čega je potrebno da se optimizaciju uslovi sušenja za svaku mikrobnu vrstu ponaosob. Kada je u pitanju *B. subtilis*, primenom jednofaktorskih metoda optimizovana je mikroinkapsulacija tehnikom sušenja raspršivanjem sa maltodekstrinom i gumiarabikom. Pri predloženim optimalnim uslovima (temperatura 140 °C i protok suspenzije 9,1 ml/min), dostignuta je koncentracija ukupnog broja ... $4,83\text{--}5,35 \cdot 10^8$ CFU/g (Ma et al., 2015). Još jedno istraživanje se bavilo sušenjem raspršivanjem biosurfaktanata dobijenih od *B. subtilis* LBBMA RI4914, gde je kao nosač korišćen maltodekstrin u koncentraciji 250 g/l (Barcelos et al., 2014). U ovom doktoratu, pokazano je da je moguće korišćenje nižih temperatura ulaznog vazduha u kombinaciji sa manjim protokom suspenzije za postizanje bolje viabilnosti bakterijske kulture. Takođe, značajne uštede mogu da se ostvare sa aspekta utrošenog materijala, jer se i sa znatno manjim koncentracijama maltodekstrina postižu zadovoljavajući efekti.

4.3.2. Biopesticidni i fitostimulatorni efekat formulacije

Veliki broj PGPB ima sposobnost da štiti biljke od patogena ili da pozitivno utiče na njihov rast. Ipak, efikasno biođubrivo bi trebalo da sadrži izolat kome se oba ova atributa pripisuju istovremeno, odnosno koji, uz izraženu biološku aktivnost, blagotvorno utiču i na biljku. Zbog toga je, u poslednjoj fazi istraživanja ove disertacije, istražen potencijalni biopesticidni i fitostimulatorni efekat formulacije *B. subtilis* NCIM 2063 dobijene metodom sušenja raspršivanjem.

4.3.2.1. Biopesticidni efekat formulacije *B. subtilis* NCIM 2063 na odabrane fitopatogene gljive

Biljni patogeni su, s obzirom na njihovu široku rasprostranjenost, uzročnici velikih ekonomskih gubitaka u poljoprivredi. Fitopatogene gljive poseduju veliki spektar enzima koji razaraju ćelijski zid, zbog čega biljna ćelija umire i gubi imunološka svojstva. Znajući da bakterije roda *Bacillus* imaju izražena antimikrobna svojstva, testirano je *in vitro* antagonističko delovanje mikrobne formulacije izolata 2063 na odabrane fitopatogene gljive (tabela 25). Fitopatogene gljive odabrane za testiranje napadaju širok spektar useva izazivajući bolesti poput truleži, krastavosti, plamenjače, pegavosti plodova ili raka stabiljke (Ajayi-Oyetunde i Bradley, 2018; Khosro Issazadeh, 2012; Shafi et al., 2017), a takođe produkuju miktoksine koji zaostaju u biljci i predstavljaju opasnost po ljudsko zdravlje (Iwamoto et al., 2019).

Antagonističko dejstvo izolata NCIM 2063 prema fungalnim patogenima istražen je metodom dvojne kultivacije *in vitro*. Rezultati su pokazali postojanje izražene antagonističke aktivnosti dobijene formulacije prema svim testiranim fitopatogenim gljivama (tabela 25). Procenat inhibicije rasta kretao se u opsegu 66,6 - 86,6 %. Najosetljivija na dejstvo izolata bila je *S. sclerotiorum*, dok je najveću otpornost pokazala *R. solani*. Inhibiciona zona bila je jasno uočljiva kod svih testiranih fitopatogenih gljiva nakon 5 dana inkubacije. U slučaju gljive *A. alternata* antifungalni efekat izolata *B. subtilis* je počeo da slabi, tako da je posle desetodnevnog inkubacije ova gljiva prerasla koloniju bakterije.

Antagonistička aktivnost izolata *B. subtilis* prema fitopatogenim gljivama i bakterijama je bila predmet velikog broja istraživanja, čiji su rezultati u saglasnosti sa zaključcima izvedenim u ovom doktoratu. Izolati *B. subtilis* uspešno vrše supresiju rasta *R. solani* (Madhi i Jumaah, 2020), *F. solani* (Madhi i Jumaah, 2020), *S. sclerotiorum* (Li et al., 2020), *A. alternata* (Swiontek Brzezinska et al., 2020), *Fusarium proliferatum* (Bjelic et al., 2017) i *L. maculans* (Lahlali et al., 2013). Ovakav učinak pripisuje se sposobnosti izolata *B. subtilis* da proizvodi veliki spektar metabolita, poput antibiotika (Ben Khedher et al., 2021; Madhi i Jumaah, 2020), enzima (Huang et al., 2020; Nakkeeran et al., 2020; Swiontek Brzezinska et al., 2020), lipopetida (Asaka i Shoda, 1996; Ben Khedher et al., 2021; de Souza Freitas et al., 2020; Hinarejos et al., 2016), siderofora, amonijaka, cijanovodonične i salicilne kiseline (Swiontek Brzezinska et al., 2020). U jednom od istraživanja antifungalno dejstvo *B. subtilis* B3 i B5 na gljivu *A. alternata* povezano je sa sposobnošću stvaranja hitanaze. Hitanaze vrše degradaciju

ćelijskog zida patogenih gljiva i bakterija, inhibiraju germinaciju spora i elongaciju filamentoznih nastavaka koji inficiraju biljku, pa samim tim učestvuju u stvaranju odbrambenog mehanizma biljaka (Swiontek Brzezinska et al., 2020). Antagonistički efekat komercijalnog preparata *B. subtilis* na *R. solani* i *F. solani* se, takođe, objašnjava dejstvom hitanaze, ali i sintezom glukanaze, subtilina, bacitracina i bacilomicina (Madhi i Jumaah, 2020). U jednom drugom istraživanju, navodi se da je supresija rasta *R. solani* posledica dejstva lipopeptida iz porodice iturina, pri čemu je utvrđeno da izolat *B. subtilis* RB14 produkuje iturine u zemlji nakon inokulacije biljke (Asaka i Shoda, 1996). Jedan ili više ovih mehanizama delovanja doprineo je i izraženom antimikrobnom efektu izolata NCIM 2063 testiranog u ovoj disertaciji.

Tabela 25 Procenat inhibicije rasta (*PGI*) testiranih fitopatogena pod dejstvom resuspendovane formulacije izolata *B. subtilis* NCIM 2063

Fitopatogen	<i>PGI</i> , %
<i>S. sclerotiorum</i>	83,7 ± 1,28
<i>R. solani</i>	68,5 ± 2,31
<i>A. alternata</i>	85,5 ± 1,11
<i>F. proliferatum</i>	77,4 ± 1,70
<i>L. maculans</i>	82,2 ± 2,22

4.3.2.2. Fitostimultorni efekat izolata *B. subtilis* NCIM 2063 na seme paprike

Efekat tretmana semena paprike mikrobnom formulacijom *B. subtilis* NCIM 2063 na parametre rasta prikazan je u tabeli 26. Korišćenje formulacije dovelo je do višestrukog povećanja sveže mase lista, kao i jasnog porasta biljke u visinu, dok se masa korena i broj listova nije značajno razlikovala u odnosu na kontrolu. Slično tome, izolat *B. subtilis* SL-13 doprineo je značajnom povećanju površine listova, ali ne i dužine korena (Tao et al., 2019). Povećanje prinosa, visine i sveže mase paprike postignuto je i primenom izolata *B. subtilis* CAS 15 (Yu et al., 2011), a slični rezultati primećeni su i primenom izolata *B. subtilis* V26 na sadnice krompira (Ben Khedher et al., 2021). Smatra se da pozitivan uticaj izolata soja *B. subtilis* na rast biljaka potiče od njegove sposobnosti da proizvodi hormone rasta i siderofore, utiče na fiksaciju azota i solubilizaciju fosfora (Ben Khedher et al., 2021; Khatoun i Khan, 2020).

Tabela 26 Fitostimulativni efekat tretmana izolatom *B. subtilis* NCIM 2063 na seme paprike

Tretman	Visina stabiljke (cm)	Broj listova	Masa svežeg lista, mg	Masa svežeg korena, mg	Hlorofil a	Hlorofil b	Ukupni hlorofil
<i>B. subtilis</i> NCIM 2603	14,66±2,88	3,66±0,58	100,47 ±20,7	3,03±0,3	10,2±1,85	3,66±0,57	13,66±3,05
Kontrola	11,97±2,41	3,33±0,57	38,33 ±12,58	4,86±1,60	5,77±0,46	2,9±0,65	8,67±1,53

Poznato je da u procesu fotosinteze ključnu ulogu ima hlorofil, a da je njegov sadržaj indikator kapaciteta fotosinteze i zdravlja biljke. Dobijeni rezultati ukazuju na jasan pozitivan uticaj izolata NCIM 2069 na sadržaj hlorofila u tretiranim sadnicama paprike. U poređenju sa kontrolom, primena formulacije uticala je na povećanje sadržaja hlorofila a (za 76,8%), hlorofila b (za 52,5%) i ukupnog hlorofila (57,7%), što je gotovo 3,5 puta bolji učinak u odnosu na izolat *B. subtilis* SL-13 koji je kod paprike doprineo povećanju ukupnog sadržaja hlorofila za 16% u odnosu na kontrolu (Tao et al., 2019). Kod biljne vrste *Moringa Oleifera* pored hlorofila primećeno je povećanje sadržaja α -tokoferola i β -karotena (Sonbarse et al., 2020). Pozitivan uticaj na količinu hlorofila se objašnjava sposobnošću ovog izolata da moduliše endogenim signalnim molekulima za glukozu i absicinsku kiselinu, koji imaju regulatornu ulogu u procesu fotosinteze (Zhang et al., 2008). Mehanistička studija je potvrdila da se primenom *B. subtilis* na seme paprike poboljšava efikasnost fotosistema II i pozitivno utiče na fotosintezu povećanjem količine hlorofila i brzine asimilacije ugljen dioksida. Takav efekat objašnjen je povećanjem brzine prenosa elektrona u tilakoidnoj membrani usled dejstva bakterije (Yesenia Samaniego-Gómez et al., 2016).

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu može se zaključiti sledeće:

- Jednofaktorskim istraživanjem uticaja procesnih uslova na rast *B. subtilis* NCIM 2063 u Erlenmajerovim sudovima na rotacionoj mućkalici utvrđeno je da ovaj izolat pokazuje brz rast na predloženoj DSM podlozi čak i bez prisustva glukoze, iako se najveći prinos biomase ostvaruje u podlozi sa glukozom. Povećanje početne koncentracije glukoze iznad 5 g/l ne dovodi do značajnog povećanja prinosa biomase na kraju kultivacionog perioda. Vrednosti specifične brzine rasta se nisu statistički značajno razlikovale, dok je specifična brzina potrošnje varirala u opsegu 0,09–0,19 g/l. Najveći koeficijent prinosa biomase (1,35 g/g) ostvaruje se pri početnoj koncentraciji od 5 g/l glukoze, kada je sva glukoza potrošena na kraju procesa. Povećanje početne koncentracije glukoze u podlozi povećalo je brzinu potrošnje supstrata, ali i smanjilo koeficijent prinosa biomase, što navodi na zaključak da se glukoza, osim za stvaranje biomase, troši i za proizvodnju nekog od metabolita
Brzina prenosa mase kiseonika nema uticaj na specifičnu brzinu rasta i generacijsko vreme, ali ima značajan uticaj na prinos biomase. Povećanje *OTR* sa 2 mol/m³h na 10 mol/m³h povećava prinos biomase sa 2,15 g/l na 6,20 g/l (2,9 puta). S druge strane, brzine prenosa mase kiseonika od 6 mol/m³h, ili manje, daluju limitirajuće na mikrobnog rast. Kultivacija *B. subtilis* u uslovima limitirane dostupnosti kiseonika aktivira aerobnu respiraciju koju karakteriše redukcija nitrata uz povećanje količine NADH i NADPH, i smanjenje količine ATP.
- Sa ciljem dodatne optimizacije uslova rasta, a sa posebnim osvrtom na viabilnost i sporulaciju ispitivanog izolata, primenjena je metoda odzivne površine u kombinaciji sa Deringerovom funkcijom poželjnosti. Predloženi modeli za sve odzive su statistički značajni i adekvatni sa statistički neznačajnim odstupanjem od modela dok eksperimentalni podaci minimalno odstupaju od izračunatih podataka.
- Za broj viabilnih ćelija najveći statistički značaj imaju koncentracija glukoze i *OTR* (i kao individualni i kao kvadratni član), praćeni faktorom interakcije ova dva člana, individualnim faktorom temperature i interakcijom temperature i *OTR*. Pri višim koncentracijama glukoze, povećanje *OTR* pozitivno utiče na ukupan broj viabilnih vegetativnih ćelija, dok temperatura nema značajan uticaj. Smanjenjem koncentracije glukoze uticaj temperature postaje izraženiji, pri čemu se najveći broj ćelija primećuje kada u podlozi ima 10 g/l glukoze. Suprotno tome, u podlozi bez glukoze povećanje *OTR* ima neznatan uticaj na povećanje broja ćelija.
- Kada je u pitanju ukupan broj spora, među faktorima statistički značajan uticaj na sporulaciju *B. Subtilis* NCIM 2063 imaju koncentracija glukoze (individualni i kvadratni član), temperatura, kvadratni član *OTR* i interakcija *OTR* i glukoze, dok *OTR*, kvadratni član temperature i interakcija temperature sa ostalim faktorima nisu bili statistički značajni. Utvrđeno je da nezavisno od koncentracije glukoze, povećanje *OTR* pozitivno utiče na sporulaciju. S druge strane, uticaj temperatura većih od 30 °C je najizraženiji pri maksimalnim primenjenim koncentracijama glukoze.

- Utvrđeni su sledeći optimalni uslovi za kultivaciju *B. subtilis* NCIM 2063: $T=33\text{ }^{\circ}\text{C}$, $OTR=10\text{ mol/m}^3\text{h}$ i koncentracija glukoze $4,89\text{ g/L}$. Pod ovim uslovima predviđena je maksimalna koncentracija vegetativnih ćelija $9,66\text{ LOG (CFU/ml)}$ i spora $9,19\text{ LOG (CFU/ml)}$ uz visoku vrednost funkcije poželjnosti ($0,931$). Eksperimentalna ćelijska gustina za ukupan broj ćelija i spora pod datim uslovima iznosila je $9,51\pm 0,09\text{ LOG(CFU/ml)}$ i $9,08\pm 0,06\text{ LOG(CFU/ml)}$, respektivno.
- Kao kriterijum za povećanje razmere procesa sa Erlenmajerovih sudova na bioreaktor zapremine $2,5\text{ L}$ izabran je zapreminski koeficijent prenosa mase (k_{LA}). Primenom aposorpcione metode izračunate su vrednosti k_{LA} pri različitim brzinama mešanja. Povećanjem brzine mešanja u bioreaktoru dolazi do eksponencijalnog povećanja vrednosti k_{LA} , dok je u slučaju Erlenmajera ova zavisnost linearna. Ova razlika dolazi do izražaja pri brzinama obrtanja većim od 400 rpm , kada je u bioreaktoru moguće ostvariti značajno veće vrednosti k_{LA} u odnosu na Erlenmajerov sud.
- Sa ciljem povećanja razmere procesa izvedena je korelacija za proračun brzine mešanja kojom se postiže željena vrednost k_{LA} . Izračunato je da je u zadatim uslovima bioreaktora, kada se sve ostale veličine drže na konstantnom nivou (nepromenjen sastav podloge, $T=33\text{ }^{\circ}\text{C}$, specifični protok vazduha $0,3\text{ vvm}$), neophodno podestiti brzinu obrtanja mešalice na 440 rpm , kako bi se postigla zahtevana brzina prenosa mase kiseonika.
- Efekat povećanja razmere na rast *B. subtilis* NCIM 2063 praćen je kultivacijom u bioreaktoru. Dok je nakon 48 h kultivacije u Erlenmajeru je ostvareno $9,51\pm 0,09\text{ LOG(CFU/ml)}$ ćelija i $9,08\pm 0,06\text{ LOG(CFU/ml)}$ spora, u bioreaktoru je ukupan broj ćelija iznosio $9,66\pm 0,13\text{ LOG (CFU/ml)}$, od čega $9,11\pm 0,19\text{ LOG (CFU/ml)}$ spora. S obzirom da je u bioreaktoru postigut zadovoljavajući broj ćelija i da je proces povećanja razmere uspešno sproveden, stvoren je preduslov da se u daljim istraživanjima razmere procesa povećaju na poluindustrijski i industrijski nivo.
- Metoda sušenja raspršivanjem, tj. mikroinkapsulacija ćelija *B. subtilis* NCIM 2063 sa maltodekstrinom kao nosačem izabrana je kao metoda za formulaciju suvog, praškastog mikrobiološkog preparata za biokontrolu fitopatogena i stimulaciju rasta biljaka. Proces je optimizovan primenom metode odziva površine. Rezultati ANOVA analize su i u ovom slučaju pokazali da su modeli za sve odzive statistički značajni i adekvatni, kao i da postoji dobro slaganje eksperimentalnih i predviđenih vrednosti.
- Povećanje koncentracije maltodekstrina i smanjenje ulazne temperature pozitivno utiče na viabilnost mikroorganizama u finalnom proizvodu. Povećanje protoka tečnosti može da smanji negativan uticaj temperature. Maksimalna viabilnost ($1,99\cdot 10^9\text{ CFU/g}$) u ispitivanom opsegu ostvarena je na najnižoj temperaturi ($110\text{ }^{\circ}\text{C}$), pri srednjem protoku (8 ml/min) i maksimalnoj koncentraciji maltodekstrina (50 g/L).
- Prinos suvog praha mikrobiološkog preparata nakon sušenja raspršivanjem varirao je od $39,15$ do $96,8\%$. Najveći uticaj na posmatrani odziv imaju protok i temperatura. Pored toga izražen uticaj imaju i njihovi kvadrati i međusobna interakcija, kao i samostalni član koncentracije maltodekstrina. Maksimalni prinos postiže se istovremenim porastom koncentracije maltodekstrina i temperature i smanjenjem protoka suspenzije. Porastom temperature uticaj protoka na prinos se smanjuje, dok je

- uticaj koncentracije maltodekstrina najizraženiji na najvišim testiranim temperaturama.
- Na smanjenje sadržaja vlage utiče povećanje temperature i smanjenje protoka, dok je uticaj maltodekstrina neznatan. Pri manjim vrednostima protoka u ispitivanom opsegu uticaj maltodekstrina postaje izraženiji tako da se povećanjem njegove koncentracije postepeno smanjuje sadržaj vlage. Pri većim vrednostima protoka maltodekstrin nema presudnu ulogu za ovaj odziv sistema. Najsuvije formulacije dobijene su kombinacijom najviše temperature i najnižeg protoka
 - Kao jedinstveno rešenje sa kombinovanom funkcijom poželjnosti $D=0,87$ za parametre sušenja raspršivanjem predloženo je: temperatura 130 °C, koncentracija maltodekstrina 50 g/L i potok tečnosti 6,1 ml/min. Predloženo optimizovano rešenje verifikovano je u laboratorijskim uslovima čime je potvrđeno minimalno odstupanje eksperimentalnih i softverski predviđenih vrednosti, kao i visok stepen preživljanja enkapsulisanih bakterija nakon čuvanja na sobnoj temperaturi u periodu od 6 meseci i godinu dana.
 - Metodom dvojne kultivacije ispitano je potencijalno antifugalno dejstvo preparata *B. subtilis* NCIM 2063 dobijene metodom sušenja raspršivanjem. Procenat inhibicije rasta kretao se u opsegu 66,6 - 86,6 %. Najosetljivija na dejstvo izolata bila je *S. sclerotiorum*, dok je najveću otpornost pokazala *R. solani*.
 - Fitostimulatorni efekat dobijenog mikrobiološkog preparata testiran je na semenu paprike. Nakon 40 dana, korišćena formulacija dovela je do višestrukog povećanja sveže mase lista kao i jasnog porasta biljke u visinu, dok se masa korena i broj listova nije značajno razlikovala u odnosu na kontrolu. Takođe, dobijeni rezultati ukazuju na jasan pozitivan uticaj izolata NCIM 2069 na sadržaj hlorofila u tretiranim sadnicama paprike. Naredni korak istraživanja je potvrda fitostimulatornog dejstva u realnim uslovima polja.

- Abhilash PC, Dubey RK, Tripathi V, Gupta VK, Singh HB. 2016. Plant growth-promoting microorganisms for Environmental Sustainability. *Trends Biotechnol.* 34(11):1–4.
- Abhyankar W, Beek A Ter, Dekker H, Kort R, Brul S, de Koster CG. 2011. Gel-free proteomic identification of the *Bacillus subtilis* insoluble spore coat protein fraction. *Proteomics.* 11:4541–4550.
- Adhikari B, Howes T, Lecomte D, Bhandari BR. 2005. A glass transition temperature approach for the prediction of the surface stickiness of a drying droplet during spray drying. *Powder Technol.* 149:168–179.
- Adjallé KD, Vu KD, Tyagi RD, Brar SK, Valéro JR, Surampalli RY. 2011. Optimization of spray drying process for *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater and wastewater sludge. *Bioprocess Biosyst Eng.* 34:237–246.
- Ahmad AGM, Attia AZG, Mohamed MS, Elsayed HE. 2019. Fermentation, formulation and evaluation of PGPR *Bacillus subtilis* isolate as a bioagent for reducing occurrence of peanut soil-borne diseases. *J Integr Agric.* 18:2080–2092.
- Ajayi-Oyetunde OO, Bradley CA. 2018. *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. *Plant Pathol.* 67:3–17.
- Akcan N, Serin B, Uyar F. 2012. Production and optimization parameters of amylases from *Bacillus subtilis* RSKK96 under solid state fermentation. 26:233–239.
- AL-Mashhadani MKH, Wilkinson SJ, Zimmerman WB. 2015. Airlift bioreactor for biological applications with microbubble mediated transport processes. *Chem Eng Sci.* 137:243–253.
- Amer GA, Utkhede RS. 2000. Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. *Can J Microbiol.* 46:809–816.
- Amiet-Charpentier C, Gadille P, Digat B, Benoit JP. 1998. Microencapsulation of rhizobacteria by spray-drying: Formulation and survival studies. *J Microencapsul.* 15:639–659.
- Anh NQ. 2010. Development of *Bacillus subtilis* spores and cells for surface display of proteins. *Doktorska disertacija.* Bayreuth: der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth.
- Asaka O, Shoda M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Appl Environ Microbiol.* 62:4081–4085.
- Avdalović J, Beškoski V, Gojgić-Cvijović G, Mattinen ML, Stojanović M, Zildžović S, Vrvic MM. 2015. Microbial solubilization of phosphorus from phosphate rock by iron-oxidizing *Acidithiobacillus* sp. B2. *Miner Eng.* 72:17–22.
- Aydi Ben Abdallah R, Stedel C, Garagounis C, Nefzi A, Jabnoun-Khiareddine H, Papadopoulou KK, Daami-Remadi M. 2017. Involvement of lipopeptide antibiotics and chitinase genes and induction of host defense in suppression of *Fusarium* wilt by endophytic *Bacillus* spp. in tomato. *Crop Prot.* 99:45–58.

- Banerjee A, Ghoshal AK. 2017. Biodegradation of an actual petroleum wastewater in a packed bed reactor by an immobilized biomass of *Bacillus cereus*. J Environ Chem Eng. 5:1696–1702.
- Barcelos GS, Dias LC, Fernandes PL, Fernandes R de CR, Borges AC, Kalks KHM, Tótola MR. 2014. Spray drying as a strategy for biosurfactant recovery, concentration and storage. Springerplus. 3:1–9.
- Baş D, Boyacı İH. 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. J Food Eng. 78:836–845.
- Behboudi-Jobbehdar S, Soukoulis C, Yonekura L, Fisk I. 2013. Optimization of Spray-Drying Process Conditions for the Production of Maximally Viable Microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. Dry Technol. 31:1274–1283.
- Ben Khedhr S, Mejdoub-Trabelsi B, Tounsi S. 2021. Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of *Fusarium wilt* and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. Biolog Control. 152, 104444.
- Benhamou N, Kloeppe JW, Tuzun S. 1998. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: Ultrastructure and cytochemistry of the host response. Planta. 204:153–168.
- Beškoski VP, Gojgić-Cvijović G, Milić J, Ilić M, Miletić S, Šolević T, Vrvic MM. 2011. Ex situ bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil) – A field experiment. Chemosphere. 83:34–40.
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta. 76:965–77.
- Bhagat D, Sharma P, Sirari A, Kumawat KC. 2014. Screening of *Mesorhizobium* spp. for control of *Fusarium* wilt in chickpea in vitro conditions. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 3:923–930.
- Bjelić D. 2014. Karakterizacija i efektivnost bakterija promotora biljnog rasta izolovanih iz rizosfere kukuruza. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Bjelic D, Ignjatov M, Marinkovic J, Spremo N, Karaman M, Nikolic Z, Ivanovic Z. 2017. Antifungal activity of indigenous *Bacillus* spp. isolated from soil. Matica Srp J Nat Sci.:261–269.
- Bora T, Özaktan H, Göre E, Aslan E. 2004. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis by wettable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*. J Phytopathol. 152:471–475.
- Božić N, Ruiz J, López-Santín J, Vujčić Z. 2011. Optimization of the growth and α -amylase production of *Bacillus subtilis* IP 5832 in shake flask and laboratory fermenter batch cultures. J Serbian Chem Soc. 76:965–972.
- Brul S, van Beilen J, Caspers M, O'Brien A, de Koster C, Oomes S, Smelt J, Kort R, Ter Beek A. 2011. Challenges and advances in systems biology analysis of *Bacillus* spore

- physiology; molecular differences between an extreme heat resistant spore forming *Bacillus subtilis* food isolate and a laboratory strain. *Food Microbiol.* 28:221–227.
- Cagri-Mehmetoglu A, Kusakli S, van de Venter M. 2012. Production of polysaccharide and surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using rehydrated whey powder as the fermentation medium. *J Dairy Sci.* 95:3643–9.
- Campos DC, Acevedo F, Morales E, Aravena J, Amiard V, Jorquera MA, Inostroza NG, Rubilar M. 2014. Microencapsulation by spray drying of nitrogen-fixing bacteria associated with lupin nodules. *World J Microbiol Biotechnol.* 30:2371–2378.
- de Carvalho ALU, de Oliveira FHPC, Mariano R de LR, Gouveia ER, Souto-Maior AM. 2010. Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14. *Brazilian Arch Biol Technol.* 53:643–652.
- Castillo HFD, Reyes CF, Morales GG, Herrera RR, Aguilar C. 2013. Biological control of root pathogens by plant-growth promoting *Bacillus* spp. U: Saloneski S, Larramedy M, ured. *Weed pest control - Conv New Challenges: InTech.* 80–103.
- Chauhan H, Bagyaraj DJ, Selvakumar G, Sundaram SP. 2015. Novel plant growth promoting rhizobacteria-Prospects and potential. *Appl Soil Ecol.* 95:38–53.
- Chen Z-M, Li Q, Liu H-M, Yu N, Xie T-J, Yang M-Y, Shen P, Chen X-D. 2010. Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85:1353–1360.
- Cheng S., Y.F. W, F.F. L. 2011. Optimization of medium compositions using statistical experimental design to produce lipase by *Bacillus subtilis*. *Chem Biochem Eng Q.* 25:377–383.
- Cho J-H, Kim Y-B, Kim E-K. 2009. Optimization of culture media for *Bacillus* species by statistical experimental design methods. *Korean J Chem Eng.* 26:754–759.
- Chung S, Lim JH, Kim SD. 2010. Powder formulation using heat resistant endospores of two multi-functional plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus* strains having phytophthora blight suppression and growth promoting functions. *J Appl Biol Chem.* 53:485–492.
- Das AK, Mandal V, Mandal SC. 2014. A Brief understanding of process optimisation in microwave-assisted extraction of botanical materials: Options and opportunities with chemometric tools. *Phytochem Anal.* 25:1–12.
- Dauner M, Storni T, Sauer U. 2001. *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon limited and excess-carbon chemostat culture. *Journal of Bacteriology*, 183(24), 7308-7317.
- Dodić S, Popov S. 2009. Bioreaktori. Novi Sad: Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Egamberdieva D, Adesemoye AO. 2016. Improvement of Crop Protection and Yield in Hostile Agroecological Conditions with PGPR-Based Biofertilizer Formulations. In: *Bioformulations Sustain Agric.* New Delhi: Springer India;
- Egli T. 2009. Growth Kinetics, Bacterial. U: Schaecter M, ured. *Encycl Microbiol.* Oxford:

Elsevier. 180–193.

Elsayed AE, Othman NZ, Malek Ro, Awad H, Wu K, Aziz R, Wadaan M, Enshasy H. 2014. Bioprocess development for high cell mass and endospore production by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in semi-industrial scale. *J Pure Appl Microbiol.* 8:2773–2783.

Errington J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol.* 1:117–126.

Eswari JS, Anand M, Venkateswarlu C. 2016. Optimum culture medium composition for lipopeptide production by *Bacillus subtilis* using response surface model-based ant colony optimization. *Sādhanā.* 41:55–65.

Farokh RZ, Sachdev D, Pour NK, Engineer A, Pardesi KR, Zinjarde S, Dhakephalkar PK, Chopade BA. 2011. Characterization of plant-growth-promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. *J Microbiol Biotechnol.* 21:556–566.

Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandão GC, da Silva EGP, Portugal LA, dos Reis PS, Souza AS, dos Santos WNL. 2007. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Anal Chim Acta.* 597:179–186.

Foysal MJ, Lisa AK. 2018. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. strain BC01 from soil displaying potent antagonistic activity against plant and fish pathogenic fungi and bacteria. *J Genet Eng Biotechnol.* 16:387–392.

Franceschini G, Macchietto S. 2008. Model-based design of experiments for parameter precision: State of the art. *Chem Eng Sci.* 63:4846–4872.

de Freitas JR, Germida JJ. 1992. Growth promotion of winter wheat by fluorescent *Pseudomonas* under field conditions. *Soil Biol Biochem.* 24:1137–1146.

Fu C-C, Wu W-T, Lu S-Y. 2003. Performance of airlift bioreactors with net draft tube. *Enzyme Microb Technol* 33:332–342.

Galaction A-I, Oniscu C, Cascaval D. 2003. Studies on oxygen mass transfer in stirred bioreactors 2: Suspensions of bacteria, yeasts and fungus. *Hem Ind.* 57:276–287.

Garcia-Fraile P, Menendez E, Rivas R. 2015. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioeng.* 2:183–205.

Garcia-Ochoa F, Gomez E. 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol Adv.* 27:153–176.

Garcia-Ochoa F, Gomez E, Santos VE, Merchuk JC. 2010. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochem Eng J.* 49:289–307.

Gasic S, Tanovic B. 2013. Biopesticide formulations, possibility of application and future trends. *Pesticidi i fitomedicina.* 28:97–102.

Ghaffari M, Yekke Z, Khajeh M. 2014. Application of response surface methodology in enzymatic synthesis: A review 1. *Russ J Bioorganic Chem.* 40:252–262.

- Ghasemi S, Ahmadzadeh M. 2013. Optimisation of a cost-effective culture medium for the large-scale production of *Bacillus subtilis* UTB96. Arch Phytopathol Plant Prot. 46:1552–1563.
- Gholami A, Shahsavani S, Nezarat S. 2009. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. World Acad Sci Eng Technol. 3:9–14.
- Ghosh PK, Kumar De T, Maiti TK, Ghosh PK, Kumar De T, Maiti TK. 2015. Production and metabolism of indole acetic acid in root nodules and symbiont (*Rhizobium undicola*) isolated from root nodule of aquatic medicinal legume *Neptunia oleracea* Lour. J Bot 2015:1–11.
- Glick BR. 2015. Beneficial plant-bacterial interactions: Springer International Publishing Switzerland.
- Gojgić-Cvijović GD, Milić JS, Šolević TM, Beškoski VP, Ilić M V., Djokić LS, Narančić TM, Vrvic MM. 2012. Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: A laboratory study. Biodegradation. 23:1–14.
- Gopalakrishnan S, Sathya A, Vijayabharathi R, Varshney RK, Gowda CLL, Krishnamurthy L. 2014. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. 3 Biotech 5:355–377.
- Gotor-Vila A, Usall J, Torres R, Abadias M, Teixidó N. 2017. Formulation of the biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 using different approaches: liquid, freeze-drying and fluid-bed spray-drying. BioControl. 62:545–555.
- Govedarica M, Milošević N, Jarak M, Kuzevski J, Krstanović S, Krunić V. 2002. Bakterizacija kao mera borbe protiv rizomanije šećerne repe. Naučni Inst za Ratar i Povrt Novi Sad, Zb Rad. 36:33–42.
- Green DH, Wakeley PR, Page A, Barnes A, Baccigalupi L, Ricca E, Cutting SM. 1999. Characterization of two *Bacillus* probiotics. Appl Environ Microbiol; 65:4288–4291.
- Grobelak A, Napora A, Kacprzak M. 2015. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. Ecol Eng. 84:22–28.
- Guez JS, Chenikher S, Cassar JP, Jacques P. 2007. Setting up and modelling of overflowing fed-batch cultures of *Bacillus subtilis* for the production and continuous removal of lipopeptides. J Biotechnol. 131:67–75.
- Hajnal-Jafari T, Jarak M, Djuric S, Stamenov D. 2012. Effect of co-inoculation with different groups of beneficial microorganisms on the microbiological properties of soil and yield of maize (*Zea mays* L.). Ratar i Povrt. 49:183–188.
- Hashem A, Tabassum B, Fathi Abd E. 2019. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. Saudi J Biol Sci 26(6):1291-1297.
- Hassen AI, Bopape FL, Sanger LK. 2016. Microbial inoculants as agents of growth promotion and abiotic stress tolerance in plants. U: Singh DP, Singh HB, Prabha R, ured. Microb inoculants sustain agric product. New Delhi: Springer India; 23–36.

- Hbid C, Jacques P, Razafindralambo H, Mpoyo MK, Meurice E, Paquot M, Thonart P. 1996. Influence of the production of two lipopeptides, Iturin a and Surfactin S1, on oxygen transfer during *Bacillus subtilis* fermentation. *Appl Biochem Biotechnol.* 57–58:571–579.
- Herrmann L, Lesueur D. 2013. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97:8859–8873.
- Hinarejos E, Castellano M, Rodrigo I, Bellés JM, Conejero V, López-Gresa MP, Lisón P. 2016. *Bacillus subtilis* IAB/BS03 as a potential biological control agent. *Eur J Plant Pathol.* 146:597–608.
- Hiscox JD, Israelstam GF. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can J Bot* 57:1332–1334.
- Hu J, Lei P, Mohsin A, Liu X, Huang M, Li L, Hu J, Hang H, Zhuang Y, Guo M. 2017. Mixomics analysis of *Bacillus subtilis*: Effect of oxygen availability on riboflavin production. *Microb Cell Fact*, 16(1), 1–16.
- Huang Huayi, Tian C, Huang Y, Huang Huanhua. 2020. Biological control of poplar anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. i Sacc. *Egypt J Biol Pest Control.* 10:15-30.
- Huang S, Vignolles ML, Chen XD, Le Loir Y, Jan G, Schuck P, Jeantet R. 2017. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends Food Sci Technol.* 63:1–17.
- Ibrahim Silva P, Stringheta PC, Teófilo RF, De Oliveira IRN. 2013. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *J Food Eng.* 117:538–544.
- Ilić D. 2016. Gajenje azotofiksirajućih fosfosolubilizirajućih bakterija u kontrolisanim uslovima fermentora u cilju biofertilizacije zemljišta. Master rad: Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Niš.
- Iwamoto K, Takamatsu S, Yamamoto M. 2019. *Alternaria alternata* causing black spot of peach produces a host-specific toxin. *J Gen Plant Pathol.* 85:395–400.
- Jambi E. 2012. Comparative studies on the cultivation of *Xanthomonas campestris* in submerged culture for the production of xanthan using the traditional industrial stirred tank reactor and a novel oscillatory baffled bioreactor. Doktorska disertacija: University of Strathclyde, Glasgow, Scotland.
- Jarak M, Đurić S, Gluvić N. 2010. Efekat primene inokulacije boranije na parametre prinosa i mikrobiološku aktivnost u rizosferi. *Letop naučnih Rad.* 34:80–89.
- Ji X, Lu G, Gai Y, Zheng C, Mu Z. 2008. Biological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic *Bacillus subtilis* strain. *FEMS Microbiol Ecol.* 65:565–573.
- Jiang CH, Wu F, Yu ZY, Xie P, Ke HJ, Li HW, Yu YY, Guo JH. 2015. Study on screening and antagonistic mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* 54 against bacterial fruit blotch (BFB) caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Microbiol Res.* 170:95–104.

- Karava M, Bracharz F, Kabisch J. 2019. Quantification and isolation of *Bacillus subtilis* spores using cell sorting and automated gating. PLoS One. 14(7): e0219892.
- Keskin Gündoğdu T, Deniz İ, Çalışkan G, Şahin ES, Azbar N. 2016. Experimental design methods for bioengineering applications. Crit Rev Biotechnol. 36:368–388.
- Khardziani T, Kachlishvili E, Sokhadze K, Elisashvili V, Weeks R, Chikindas ML, Chistyakov V. 2017. Elucidation of *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 Potential for spore production in submerged fermentation of plant raw materials. Probiotics Antimicrob Proteins. 9(4): 435-443.
- Khatoun N, Khan M. 2020. Evaluation of bacillus subtilis mrb4, as plant growth promoter and potential phosphate solubilizer under abiotic stress. J Appl Biol Biotechnol. 8:27–35.
- Khedher SB, Mejdoub-Trabelsi B, Tounsi S. 2021. Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of Fusarium wilt and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. Biol Control. 152:104444.
- Karava M, Bracharz F, Kabisch J. 2019. Quantification and isolation of *Bacillus subtilis* spores using cell sorting and automated gating. PLoS ONE, 14(7):e0219892.
- Khosro Issazadeh. 2012. Antagonism of *Bacillus* species against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. African J Microbiol Res. 6:1615–1620.
- Kiprovski B. 2012. Biohemijske i agronomske karakteristike biljaka soje, kukuruza i šećerne repe inokulisanih korisnim i štetnim mikroorganizmima. Doktorska disertacija: Univerzitet u Novom Sadu, Poljioprivredni fakultet, Novi Sad.
- Kirkby E. 2012. Introduction, definition and classification of nutrients. U: Marschner P, Marschner H, ured. Marschner's miner nutr high plants. Elsevier Ltd; 3–5.
- Korsten L, De Jager EE. 1995. Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado post-harvest pathogens. South African Avocado Grow Assoc Yearb. 18:124–130.
- Kumar P, Dubey RC, Maheshwari DK. 2012. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. Microbiol Res. 167:493–499.
- Kumbar B, Mahmood R, Nagesha SN, Nagaraja MS, Prashant DG, Kerima OZ, Karosiya A, Chavan M. 2019. Field application of *Bacillus subtilis* isolates for controlling late blight disease of potato caused by *Phytophthora infestans*. Biocatal Agric Biotechnol. 22:101366.
- Lahlali R, Peng G, Gossen BD, McGregor L, Yu FQ, Hynes RK, Hwang SF, McDonald MR, Boyetchko SM. 2013. Evidence that the biofungicide serenade (*Bacillus subtilis*) suppresses clubroot on canola via antibiosis and induced host resistance. Phytopathology. 103:245–254.
- Lee BD, Dutta S, Ryu H, Yoo SJ, Suh DS, Park K. 2015. Induction of systemic resistance in panax ginseng against phytophthora cactorum by native *Bacillus amyloliquefaciens* HK34. J Ginseng Res. 39:213–220.
- Leo Daniel A, Venkateswarlu B, Suseelendra D, Praveen Kumar G, Mir Hassan Ahmed S,

- Meenakshi T, Sultana U, Pinisetty S, M LN. 2013. Effect of polymeric additives, adjuvants, surfactants on survival, stability and plant growth promoting ability of liquid bioinoculants. *J Plant Physiol Pathol.* 1:1–5.
- Li S, Zhang N, Zhang Z, Luo J, Shen B, Zhang R, Shen Q. 2013. Antagonist *Bacillus subtilis* HJ5 controls *Verticillium* wilt of cotton by root colonization and biofilm formation. *Biol Fertil Soils.* 49:295–303.
- Li Y, Qin L, Roberts DP, Hu X, Xie L, Gu C, Liao Xiangsheng, Han P, Liao Xing. 2020. Biological fertilizer containing *Bacillus subtilis* BY-2 for control of *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape. *Crop Prot* 138:105340.
- Lievense LC, van't Riet K. 1994. Convective drying of bacteria. In: *Adv Biochem Eng Biotechnol.* Vol. 50. Springer Berlin Heidelberg; 71–89.
- Limpaiboon K. 2013. Influence of operating conditions and physical properties of liquid medium on volumetric oxygen transfer coefficient in a dual impeller bioreactor. *Walailak J Sci Technol.* 10:625–634.
- Liu S. 2012. *Bioprocess engineering: kinetics, biosystems, sustainability, and reactor design.* Amsterdam: Elsevier.
- Liu W wei, Mu W, Zhu B yu, Du Y chen, Liu F. 2008. Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens. *Agric Sci China.* 7:1104–1114.
- Lizárraga-Sánchez GJ, Leyva-Madrigal KY, Sánchez-Peña P, Quiroz-Figueroa FR, Maldonado-Mendoza IE. 2015. *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 controls maize stalk and ear rot in Sinaloa, Mexico. *F Crop Res.* 176:11–21.
- Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, Thelin B, Nyström Å, Pettersen J, Bergman R. 1998. Experimental design and optimization. *Chemom Intell Lab Syst.* 42:3–40.
- Ma X, Wang X, Cheng J, Nie X, Yu X, Zhao Y, Wang W. 2015. Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Biol Control.* 90:2–8.
- Machado RG, de Sá ELS, Bruxel M, Giongo A, Santos N da S, Nunes AS. 2013. Indoleacetic acid producing rhizobia promote growth of tanzania grass (*Panicum maximum*) and pensacola grass (*Paspalum sauræ*). *Int J Agric Biol.* 15:827–834.
- Madhi QH, Jumaah AM. 2020. Affectivity evaluation of *Bacillus subtilis* in controlling eggplant root rot caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 553:8-16.
- Maier U, Losen M, Büchs J. 2004. Advances in understanding and modeling the gas-liquid mass transfer in shake flasks. *Biochem Eng J.* 17:155–167.
- Mäkelä M. 2017. Experimental design and response surface methodology in energy applications: A tutorial review. *Energy Convers Manag.* 151:630–640.
- Malusá E, Sas-Paszt L, Ciesielska J. 2012. Technologies for beneficial microorganisms

inocula used as biofertilizers. *Sci World J.* 2012:1–12.

Man Z-W, Rao Z-M, Cheng Y-P, Yang T-W, Zhang X, Xu M-J, Xu Z-H. 2014. Enhanced riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RF1 through the optimization of agitation speed. *World J Microbiol Biotechnol.* 30:661–667.

Manwar A V, Khandelwal SR, Chaudhari BL, Meyer JM, Chincholkar SB. 2004. Siderophore production by a marine *Pseudomonas aeruginosa* and its antagonistic action against phytopathogenic fungi. *Appl Biochem Biotechnol.* 118:243–251.

Martinez-Alvarez JC, Castro-Martinez C, Sanchez-Pena P, Gutierrez-Dorado R, Maldonado-Mendoza IE. 2016. Development of a powder formulation based on *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 spores for biological control of *Fusarium verticillioides* in maize plants. *World J Microbiol Biotechnol.* 32:1–10.

Matar SM, El-Kazzaz SA, Wagih EE, El-Diwany AI, Moustafa HE, El-Saadani MA, Abo-Zaid GA, Hafez EE. 2009. Bioprocessing and scaling-up cultivation of *Bacillus subtilis* as a potential antagonist to certain plant pathogenic fungi, III. *Biotechnology.* 8:138–143.

Meena B, Radhajeyalakshmi R, Marimuthu T, Vidhyasekaran P, Velazhahan R. 2002. Biological control of groundnut late leaf spot and rust by seed and foliar applications of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens*. *Biocontrol Sci Technol.* 12:195–204.

Meier K, Klöckner W, Bonhage B, Antonov E, Regestein L, Büchs J. 2016. Correlation for the maximum oxygen transfer capacity in shake flasks for a wide range of operating conditions and for different culture media. *Biochem Eng J.* 109:228–235.

Meng X, Yu J, Yu M, Yin X, Liu Y. 2015. Dry flowable formulations of antagonistic *Bacillus subtilis* strain T429 by spray drying to control rice blast disease. *Biol Control* 85:46–51.

Mercado-Flores Y, Cárdenas-Álvarez IO, Rojas-Olvera AV, Pérez-Camarillo JP, Leyva-Mir SG, Anducho-Reyes MA. 2014. Application of *Bacillus subtilis* in the biological control of the phytopathogenic fungus *Sporisorium reilianum*. *Biol Control.* 76:36–40.

Milić J, Beškoski V, Ilić M, Ali S, Gojgić-Cvijović G, Vrvic M. 2009. Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products: Composition of the microbial consortium. *J Serbian Chem Soc.* 74:455–460.

Milošević N, Govedarica M. 2001. Mogućnost primene biofertilizatora u proizvodnji ratarskih neleguminoznih biljaka. *Naučni Inst za Ratar i Povrt Novi Sad, Zb Rad.* 35:53–65.

Mishra J, Arora NK. 2016. Bioformulations for plant growth promotion and combating phytopathogens: A sustainable approach. In: *Bioformulations sustain agric* New Delhi: Springer India; p. 3–33.

Mishra PK, Bisht SC, Ruwari P, Joshi GK, Singh G, Bisht JK, Bhatt JC. 2011. Bioassociative effect of cold tolerant *Pseudomonas* spp. and *Rhizobium leguminosarum*-PR1 on iron acquisition, nutrient uptake and growth of lentil (*Lens culinaris* L.). *Eur J Soil Biol.* 47:35–43.

Monteiro S, Clemente JJ, Carrondo MJT, Cunha AE. 2014. Enhanced spore production of *Bacillus subtilis* grown in a chemically defined medium. *Adv Microbiol.* 4:444–454.

- Monteiro SM, Clemente JJ, Henriques AO, Gomes RJ, Carrondo MJ, Cunha AE. 2005. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Prog.* 21:1026–1031.
- Moreno-Lora A, Recena R, Delgado A. 2019. *Bacillus subtilis* QST713 and cellulose amendment enhance phosphorus uptake while improving zinc biofortification in wheat. *Appl Soil Ecol.* 142:81–89.
- Mosquera S, González-Jaramillo LM, Orduz S, Villegas-Escobar V. 2014. Multiple response optimization of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 culture and identification of antifungal metabolites. *Biocatal Agric Biotechnol.* 3:378–385.
- Mounsef RJ, Salameh D, Nicolas L, Brandam C, Lteif R. 2015. The effect of aeration conditions, characterized by the volumetric mass transfer coefficient K_{LA} , on the fermentation kinetics of *Bacillus thuringiensis* kurstaki. *J Biotechnol.* 72(1):17–23.
- Movahedi S, Waites W. 2002. Cold shock response in sporulating *Bacillus subtilis* and its effect on spore heat resistance. *J Bacteriol.* 184:5275–81.
- Mrkovački N, Bjelić D. 2011. Rizobakterije koje promovišu biljni rast (PGPR) i njihov efekat na kukuruz. *Ratar i Povrt.* 48:305–312.
- Mrkovački N, Mezei S, Čačić N, Kovačev L. Effectiveness of different types of sugarbeet inoculation. *Zb Rad Instituta za Ratar i Povrt.* 43:201–207.
- Nadeem SM, Naveed M, Ahmad M, Zahir ZA. 2015. Rhizosphere bacteria for crop production and improvement of stress tolerance: Mechanisms of action, applications, and future prospects. U: Arora NK, ured. *Plant Microbes Symbiosis Appl Facet.* New Delhi: Springer India; 1–36.
- Nailwal S, Anwar S, Budhani KK, Verma A, Nailwal TK. 2014. *Burkholderia* sp. from rhizosphere of *Rhododendron arboretum*: Isolation, identification and plant growth promotory (PGP) activities. *J Appl Nat Sci.* 6:473–479.
- Najafpour GD. 2007. *Biochemical engineering and biotechnology.* Amsterdam: Elsevier;
- Nakano MM, Hulett FM. 2006. Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. *FEMS Microbiol Lett.* 157:1–7.
- Nakano M, Zuber P. (1998). Strict Aerobe (*Bacillus subtilis*). *Anu Rev Microbiol.* 52:165–1990.
- Nakkeeran S, Fernando WGD, Siddiqui ZA. 2005. Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. U: Siddiqui ZA, ured. *PGPR biocontrol biofertilization Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag;* 257–296.
- Nakkeeran S, Suganyadevi M, Rajamanickam S. 2020. Understanding the molecular basis on the biological suppression of bacterial leaf blight of anthurium exerted by *Bacillus subtilis* (BIO3) through proteomic approach. *3 Biotech.* 10:1–12.
- Naseva O, Stamenković I, Banković-Ilić I, Lazić M, Veljković V, Skala D. 2002. Sadržaj

- gasa u bioreaktoru sa vibracionom mešalicom - tečna faza je nenjutnovski fluid. HemInd. 56:198–203.
- Ngoc NN, Cach N Van, Giap TD. 2017. Optimization of fermentation conditions for collecting *Bacillus subtilis* biomass used in *Canna Edulis*. Ker processing wastewater treatment. Biotechnol Seedl. 2:3–8.
- Omer AM. 2010. Bioformulations of *Bacillus* spores for using as biofertilizer. Life Sci J. 7:124–131.
- Ona O, Van Impe J, Prinsen E, Vanderleyden J. 2005. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. FEMS Microbiol Lett. 246:125–132.
- Owen D, Williams AP, Griffith GW, Withers PJA. 2015. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. Appl Soil Ecol. 86:41–54.
- Öztürk S, Çalık P, Özdamar TH. 2016. Fed-batch biomolecule production by *Bacillus subtilis*: A State of the Art Review. Trends Biotechnol. 34:329–45.
- Panda I, Balabantaray S, Sahoo SK, Patra N. 2018. Mathematical model of growth and polyhydroxybutyrate production using microbial fermentation of *Bacillus subtilis*. Chem Eng Commun. 205:249–256.
- Pandey R, Pieper GH, Beek A Ter, Vischer NOE, Smelt JPPM, Manders EMM, Brul S. 2015. Quantifying the effect of sorbic acid, heat and combination of both on germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* spores at single cell resolution. Food Microbiol. 52:88–96.
- Peighambardoust SH, Golshan Tafti A, Hesari J. 2011. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: A review. Trends Food Sci Technol. 22:215–224.
- Petříček R, Moucha T, Rejl FJ, Valenz L, Haidl J, Čmelíková T. 2018. Volumetric mass transfer coefficient, power input and gas hold-up in viscous liquid in mechanically agitated fermenters. Measurements and scale-up. Int J Heat Mass Transf. 124:1117–1135.
- Posada-Urbe LF, Romero-Tabarez M, Villegas-Escobar V. 2015. Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. Bioprocess Biosyst Eng. 38:1879–1888.
- Pryor SW, Gibson DM, Hay AG, Gossett JM, Walker LP. 2007. Optimization of spore and antifungal lipopeptide production during the solid-state fermentation of *Bacillus subtilis*. Appl Biochem Biotechnol. 143:63–79.
- Ranjith Kumar M, Ashokraj S, Priyadarsini Brindha V. 2015. Antibiotics: Microbial sources, production and optimization. U: Chandrashekhara KN, Yakkaldevi A, ured. Basic concepts Biotechnol: Laxmi Book Publication, Solapur, India; 422–463.
- Reis A, Da Silva TL, Kent CA, Kosseva M, Roseiro JC, Hewitt CJ. 2005. Monitoring population dynamics of the thermophilic *Bacillus licheniformis* CCM1 1034 in batch and continuous cultures using multi-parameter flow cytometry. J Biotechnol. 115:199–210.

- Richard A, Margaritis A. 2003. Rheology, oxygen transfer, and molecular weight characteristics of poly(glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* 82:299–305.
- Rojas-Tapias D, Moreno-Galván A, Pardo-Díaz S, Obando M, Rivera D, Bonilla R. 2012. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Appl Soil Ecol.* 61:264–272.
- Rouphael Y, Franken P, Schneider C, Schwarz D, Giovannetti M, Agnolucci M, Pascale S De, Bonini P, Colla G. 2015. *Arbuscular mycorrhizal* fungi act as biostimulants in horticultural crops. *Sci Hortic.* 196:91–108.
- Sachin D. 2009. Effect of *Azotobacter chroococcum* (PGPR) on the Growth of Bamboo (*Bambusa bamboo*) and Maize (*Zea mays*) Plants. *Biofrontiers.* 1:37–46.
- Sánchez Blanco A, Palacios Durive O, Batista Pérez S, Díaz Montes Z, Pérez Guerra N. 2016. Simultaneous production of amylases and proteases by *Bacillus subtilis* in brewery wastes. *Brazilian J Microbiol.* 47:665–674.
- Sarrafzadeh MH, Schorr-Galindo S, La H-J, Oh H-M. 2014. Aeration effects on metabolic events during sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *J Microbiol.* 52:597–603.
- Schisler DA, Slininger PJ, Behle RW, Jackson MA. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for Biological Control of Plant Diseases. *Phytopathology.* 94:1267–1271.
- Schoebitz M, López MD, Roldán A. 2013. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. *Agron Sustain Dev.* 33: 751-756.
- Schuck P. 2009. Understanding the factors affecting spray-dried dairy powder properties and behavior. In: *Dairy-derived ingredients food nutraceutical uses.*: Elsevier Ltd; 24–50.
- Seletzky JM, Noak U, Fricke J, Welk E, Eberhard W, Knocke C, Büchs J. 2007. Scale-up from shake flasks to fermenters in batch and continuous mode with *Corynebacterium glutamicum* on lactic acid based on oxygen transfer and pH. *Biotechnol Bioeng.* 98:800–811.
- Sen R, Babu KS. 2005. Modeling and optimization of the process conditions for biomass production and sporulation of a probiotic culture. *Process Biochem.* 40:2531–2538.
- Seth D, Mishra HN, Deka SC. 2017. Effect of spray drying process conditions on bacteria survival and acetaldehyde retention in sweetened yoghurt powder: An optimization study. *J Food Process Eng.* 40: e12487.
- Shafi J, Tian H, Ji M. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens : a review. *Biotech and Biotech equip.* 2818: 446-459.
- Shahcheraghi S, Ayatollahi J, Lotfi M. 2015. Applications of *Bacillus subtilis* as an important bacterium in medical sciences and human life. *Trop J Med Res.* 18:1–9.
- Shaikh SS, Sayyed RZ. 2015. Role of Plant Growth-promoting rhizobacteria and their formulation in biocontrol of plant diseases. U: Arora NK, ured. *Plant microbes symbiosis appl facet.* New Delhi: Springer India; 337–351.

Sharma S, Ramesh A, Johri B. 2013. Isolation and characterization of plant growth-promoting *Bacillus amyloliquefaciens* strain sks_bnj_1 and its influence on rhizosphere soil properties and nutrition of soybean (*Glycine max* L. Merrill). J Virol Microbiol. 2013:1–19.

Shih I-L, Lin C-Y, Wu J-Y, Hsieh C. 2009. Production of antifungal lipopeptide from *Bacillus subtilis* in submerged fermentation using shake flask and fermentor. Korean J Chem Eng. 26:1652–1661.

Shih IL, Lin CY, Wu JY, Hsieh C. 2009. Production of antifungal lipopeptide from *Bacillus subtilis* in submerged fermentation using shake flask and fermentor. Korean J Chem Eng. 26:1652–1661.

Shukla VB, Parasu Veera U, Kulkarni PR, Pandit AB. 2001. Scale-up of biotransformation process in stirred tank reactor using dual impeller bioreactor. Biochem Eng J. 8:19–29.

Simić VM, Rajković KM, Stojičević SS, Veličković DT, Nikolić NČ, Lazić ML, Karabegović IT. 2016. Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network. Sep Purif Technol. 160:89–97.

Singh K, Richa K, Bose H, Karthik L, Kumar G, Bhaskara Rao KV. 2014. Statistical media optimization and cellulase production from marine *Bacillus* VITRKHB. 3 Biotech. 4:591–598.

Sonbarse PP, Kiran K, Sharma P, Parvatam G. 2020. Biochemical and molecular insights of PGPR application for the augmentation of carotenoids, tocopherols, and folate in the foliage of *Moringa oleifera*. Phytochemistry. 179:112506.

Sonenshein AL. 2007. Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. Nature Reviews Microbiology. 5(12):917–927.

De Souza CFV, Rodrigues RC, Ayub MAZ. 2009. Effects of oxygen volumetric mass transfer coefficient on transglutaminase production by *Bacillus circulans* BL32. Biotechnol Bioprocess Eng. 14:571–576.

de Souza Freitas F, Coelho de Assis Lage T, Ayupe BAL, de Paula Siqueira T, de Barros M, Tótola MR. 2020. *Bacillus subtilis* TR47II as a source of bioactive lipopeptides against Gram-negative pathogens causing nosocomial infections. 3 Biotech. 10:1–10.

Sreekumar G, Krishnan S. 2010. Enhanced biomass production study on probiotic *Bacillus subtilis* SK09 by medium optimization using response surface methodology. African J Biotechnol. 9:8078–8084.

Stamenković Stojanović S., Karabegović I., Beškoski V., Nikolić N., Lazić M. (2019). *Bacillus* based microbial formulations: Optimization of the production process. Hem. Ind. 73(3):169–182.

Stamenković S, Beškoski V, Karabegović I, Lazić M, Nikolić N. 2018. Microbial fertilizers: A comprehensive review of current findings and future perspectives. Spanish J Agric Res. 16:e09R01.

Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol

Microbiol. 56:845–857.

Sukkasem P, Kurniawan A, Kao TC, Chuang H wen. 2018. A multifaceted rhizobacterium *Bacillus licheniformis* functions as a fungal antagonist and a promoter of plant growth and abiotic stress tolerance. *Environ Exp Bot.* 155:541–551.

Sulochana MB, Jayachandra SY, Kumar SA, Parameshwar AB, Reddy KM, Dayanand A. 2014. Siderophore as a potential plant growth-promoting agent produced by *Pseudomonas aeruginosa* JAS-25. *Appl Biochem Biotechnol.* 174:297–308.

Sultan M. 2012. Biological control of leaf pathogens of tomato plants by *Bacillus subtilis* (strain FZB24): antagonist effects and induces plant resistance. Doktorska disertacija. Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät, Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität zu Bonn.

Suresh S., Srivastava VC, Mishra IM. 2009. Techniques for oxygen transfer measurement in bioreactors: A review. *J Chem Technol Biotechnol.* 84:1091–1103.

Suresh S, Srivastava VC, Mishra IM. 2009. Critical analysis of engineering aspects of shaken flask bioreactors. *Crit Rev Biotechnol.* 29:255–278.

Swiontek Brzezinska M, Kalwasińska A, Świętaczak J, Żero K, Jankiewicz U. 2020. Exploring the properties of chitinolytic *Bacillus* isolates for the pathogens biological control. *Microb Pathog.* 10:140-148.

Szilagyi-Zecchin VJ, Mógor ÁF, Figueiredo GGO. 2016. Strategies for characterization of agriculturally important bacteria. U: Singh DP, Singh HB, Prabha R, ured. *Microb inoculants sustain agric product* New Delhi: Springer India; 1–21.

Tao S, Wu Z, Wei M, Liu X, He Y, Ye BC. 2019. *Bacillus subtilis* SL-13 biochar formulation promotes pepper plant growth and soil improvement. *Can J Microbiol.* 65:333–342.

Tavares MB, Souza RD, Luiz WB, Cavalcante RCM, Casaroli C, Martins EG, Ferreira RCC, Ferreira LCS. 2013. *Bacillus subtilis* endospores at high purity and recovery yields: Optimization of growth conditions and purification method. *Curr Microbiol.* 66:279–285.

Torres MJ, Brandan CP, Petroselli G, Erra-Balsells R, Audisio MC. 2016. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiol Res.* 182:31–39.

Tortora ML, Díaz-Ricci JC, Pedraza RO. 2011. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Arch Microbiol.* 193:275–286.

Trujillo-Roldán MA, Valdez-Cruz NA, Gonzalez-Monterrubio CF, Acevedo-Sánchez E V., Martínez-Salinas C, García-Cabrera RI, Gamboa-Suasnavart RA, Marín-Palacio LD, Villegas J, Blancas-Cabrera A. 2013. Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* for preparing a liquid inoculant formulation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97:9665–9674.

Tzeng Y-M, Rao YK, Tsay K-J, Wu W-S. 2008. Effect of cultivation conditions on spore production from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 and its antagonism to *Botrytis elliptica*. *J Appl Microbiol.* 104:1275–1282.

- Van't Riet K. 1979. Review of measuring methods and results in nonviscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels. *Ind Eng Chem Process Des Dev.* 18:357–364.
- Vasiee A, Behbahani BA, Yazdi FT, Moradi S. 2016. Optimization of the production conditions of the lipase produced by *Bacillus cereus* from rice flour through Plackett-Burman Design (PBD) and response surface methodology (RSM). *Microb Pathog.* 101:36–43.
- Vassilev N, Vassileva M, Lopez A, Martos V, Reyes A, Maksimovic I, Eichler-Löbermann B, Malusà E. 2015. Unexploited potential of some biotechnological techniques for biofertilizer production and formulation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99:4983–4996.
- Velineni S, Brahma Prakash GP. 2011. Survival and phosphate solubilizing ability of *Bacillus megaterium* in liquid inoculants under high temperature and desiccation stress. *J Agric Sci Technol.* 13:795–802.
- Veljković VB. 1994. Osnovi biohemijskog inženjerstva. Leskovac: Univerzitet u Nišu. Tehnološki fakultet u Leskovcu, Leskovac.
- Veljković VB, Nikolić S, Lazić ML, Engler CR. 1995. Oxygen transfer in flasks shaken on orbital shakers. *Hem Ind.* 49:265–272.
- Venkatachalam S, Palaniappan A, Kandasamy S, Kandasamy K. 2011. Prediction of gas holdup in a combined loop air lift fluidized bed reactor using Newtonian and non-Newtonian liquids. *Chem Ind Chem Eng Q.* 17:375–383.
- Vera Candioti L, De Zan MM, Cámara MS, Goicoechea HC. 2014. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta.* 124:123–138.
- Vidhyalakshmi R, Valli NC, Narendra Kumar G, Sunkar S. 2016. *Bacillus circulans* exopolysaccharide: Production, characterization and bioactivities. *Int J Biol Macromol.* 87:405–414.
- Vijayabharathi R, Sathya A, Gopalakrishnan S. 2016. A Renaissance in Plant Growth-Promoting and Biocontrol Agents by Endophytes. U: Singh DP, Singh HB, Prabha R, ured. *Microb Inoculants Sustain Agric Product.* New Delhi: Springer India; 37–60.
- Villa-Rodríguez E, Parra-Cota F, Castro-Longoria E, López-Cervantes J, de los Santos-Villalobos S. 2019. *Bacillus subtilis* TE3: A promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Biol Control.* 132:135–143.
- Vučetić J, Veljković VB, Vrvic MM, Lazić ML. 1995. Mikrobiološke sinteze polisaharida. Beograd, Naučna knjiga Beograd.
- Wang DIC, Cooney CL, Demain AL, Dunnill P, Humphrey AE, Lilly MD. 1997. Translation of laboratory, pilot, and plant scale data. *Ferment Enzym Technol Wiley, New York.*:194–211.
- Wang H, Jiang K, Zhu Z, Jiang W, Yang Z, Zhu S, Qiu J, Yan X, He J, He Q, Hong Q. 2018. Optimization of fed-batch fermentation and direct spray drying in the preparation of microbial inoculant of acetochlor-degrading strain *Sphingomonas* sp. DC-6. *3 Biotech.* 8:1–9.

- Wang H, Wang Y, Yang R. 2017. Recent progress in *Bacillus subtilis* spore-surface display: concept, progress, and future. *Appl Microbiol Biotechnol.* 101:933–949.
- Wani SA, Chand S, Wani MA, Ramzan M, Hakeem KR. 2016. *Azotobacter chroococcum* – A Potential Biofertilizer in Agriculture: An Overview. U: Hakeem KR, Akhtar J, Sabir M, ured. *Soil Sci Agric Environ Prospect.* Cham: Springer International Publishing; 333–348.
- Wei Z, Yang X, Yin S, Shen Q, Ran W, Xu Y. 2011. Efficacy of *Bacillus*-fortified organic fertiliser in controlling bacterial wilt of tomato in the field. *Appl Soil Ecol.* 48:152–159.
- White PJ. 2012. Ion Uptake Mechanisms of individual cells and roots: Short-distance transport. U: Marschner P, Marschner H, ured. *Marschner's miner nutr high plants.* 7–47.
- Willaman JJ, Davison FR. 1924. Some modifications of the picric acid method for sugars. *J Agric Res.* 28:479–487.
- Wu Z, Du G, Chen J. 2003. Effects of dissolved oxygen concentration and DO-stat feeding strategy on CoQ 10 production with *Rhizobium radiobacter*. *World J Microbiol Biotechnol.* 19:925–928.
- Yadav BK, Akhtar MS, Panwar J. 2015. Rhizospheric plant-microbe interactions: Key factors to soil fertility and plant nutrition. U: Arora NK, ured. *Plant microbes symbiosis appl facet.* New Delhi: Springer India; 127–145.
- Yáñez-Mendizabal V, Viñas I, Usall J, Cañamás T, Teixidó N. 2012. Endospore production allows using spray-drying as a possible formulation system of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8. *Biotechnol Lett.* 34:729–735.
- Yáñez-Mendizabal V, Viñas I, Usall J, Torres R, Solsona C, Abadías M, Teixidó N. 2012. Formulation development of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* strain CPA-8 by spray-drying. *J Appl Microbiol.* 112:954–965.
- Yazdani M, Bahmanyar MA, Pirdashti H, Ali M. 2009. Effect of phosphate solubilization microorganisms (PSM) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of corn (*Zea mays L.*). *World Acad Sci Eng Technol.* 25:90–92.
- Yeh MS, Wei YH, Chang JS. 2006. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochem.* 41:1799–1805.
- Yesenia Samaniego-Gámez B, Garruña R, Tun-Suárez JM, Kantun-Can J, Reyes-Ramírez A, Cervantes-Díaz L. 2016. *Bacillus* spp. inoculation improves photosystem II efficiency and enhances photosynthesis in pepper plants. *Chil J Agircultural Res.* 76:409–416.
- Yu X, Ai C, Xin L, Zhou G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *Eur J Soil Biol.* 47:138–145.
- Zaidi A, Ahmad E, Khan MS, Saif S, Rizvi A. 2015. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: Current perspective. *Sci Hortic.* 193:231–239.
- Zalila-Kolsi I, Ben Mahmoud A, Ali H, Sellami S, Nasfi Z, Tounsi S, Jamoussi K. 2016.

- Antagonist effects of *Bacillus* spp. strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Microbiol Res.* 192:148–158.
- Zhang H, Xie X, Kim M-S, Korniyev DA, Holaday S, Paré PW. 2008. Soil bacteria augment *Arabidopsis photosynthesis* by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels *in planta*. *Plant.* J56:264–273.
- Zhang N, He X, Zhang J, Raza W, Yang XM, Ruan YZ, Shen QR, Huang QW. 2014. Suppression of *Fusarium* wilt of banana with application of bio-organic fertilizers. *Pedosphere.* 24:613–624.
- Zhao H, Shao D, Jiang C, Shi J, Li Q, Huang Q, Rajoka MSR, Yang H, Jin M. 2017. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 101:5951–5960.
- Zhao J-L, Zhou L-G, Wu J-Y. 2010. Promotion of *Salvia miltiorrhiza* hairy root growth and tanshinone production by polysaccharide–protein fractions of plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus*. *Process Biochem.* 45:1517–1522.
- Zheng M, Shi Jingying, Shi Jian, Wang Q, Li Y. 2013. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biol Control.* 65:200–206.
- Zhong JJ. 2007. *Bioreactor engineering*. U: Yang ST, ured. *Bioprocess value-added prod from renew resour.* Amsterdam: Elsevier.
- Zou C, Li Z, Yu D. 2010. *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. *J Microbiol.* 48:460–466.
- Zweiering MH, Jonhenburger I, Rombouts FM, Riet K van'T. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol.* 56:1875–1881.

Tabela PT1. Promena koncentracije biomase u vremenu pri različitim koncentracijama glukoze u Erlenmajerovim sudovima

<i>t</i> , h	0	2	4	6	8	10	12	24	48
0g/l									
glukoze	0,26±0,12	0,29±0,17	0,73±0,009	2,02±0,11	2,45±0,15	2,60±0,14	3,00±0,019	4,42±0,19	4,33±0,13
5 g/L									
glukoze	0,27±0,016	0,36±0,19	1,16±0,25	2,80±0,099	4,13±0,19	5,31±0,115	5,50±0,06	6,02±0,009	6,06±0,05
10 g/L									
glukoze	0,29±0,095	0,34±0,046	0,99±0,13	1,45±0,11	3,80±0,015	4,30±0,021	4,90±0,033	6,17±0,14	6,00±0,17
15 g/L									
glukoze	0,29±0,15	0,61±0,086	0,91±0,075	3,53±0,023	4,22±0,082	5,02±0,071	5,23±0,017	6,09±0,013	5,95±0,23

Tabela PT2. Promena koncentracije biomase (g/L) u vremenu pri različitim vrednostima *OTR* u Erlenmajerovim sudovima

<i>t</i> , h	0	2	4	6	8	10	12	24	48
<i>OTR</i> =10									
mol/m ³ h	0,29±0,17	0,34±0,296	0,99±0,056	1,45±0,081	3,10±0,013	4,10±0,029	4,60±0,14	6,17±0,17	6,20±0,13
<i>OTR</i> =6									
mol/m ³ h	0,28±0,06	0,30±0,02	0,80±0,1	2,59±0,028	2,56±0,049	2,50±0,14	2,47±0,059	2,47±0,15	2,47±0,19
<i>OTR</i> =4									
mol/m ³ h	0,29±0,005	0,34±0,015	0,65±0,16	2,15±0,026	2,25±0,11	2,30±0,17	2,29±0,013	2,20±0,017	2,23±0,078
<i>OTR</i> =2									
mol/m ³ h	0,28±0,018	0,39±0,055	0,83±0,098	2,08±0,056	2,13±0,08	2,15±0,043	2,15±0,1	2,10±0,17	2,15±0,2

Tabela PT3. Potrošnja glukoze (g/L) u vremenu pri različitim početnim koncentracijama glukoze u Erlenmajerovim sudovima

<i>t</i> , h	12	24	36	48
5 g/L glukoze	3,7±0,17	2,2±0,19	1,5±0,11	0,7±0,27
10 g/L glukoze	5,92±0,23	5,19±0,27	4±0,17	2,9±0,09
15 g/L glukoze	10,5±0,19	8,93±0,33	7,18±0,085	5,01±0,23

Tabela PT4. Promena % zasićenja kiseonikom tokom vremena pri različitim brzinama mešanja (apsorpciona metoda) u bioreaktoru

<i>t</i> , s / Brzina mešanja, rpm	10	20	30	40	50	60	70	80	90	180	
100	serija 1	1,8	3,1	4,4	5,7	7	8,3	9,5	10,8	12,3	23,4
	serija 2	1,5	3,5	4,5	5,7	7,2	8,5	9,7	11,1	12,4	23,3
	serija 3	1,9	3	4,3	5,8	6,9	8,2	9,4	10,7	12,2	23,5
200	serija 1	2,1	3,9	5,6	7,2	8,8	10,5	12,1	13,7	15,2	28
	serija 2	1,9	4	5,4	7,1	8,9	11,2	11,9	14	15,4	28,3
	serija 3	2,2	4	5,7	7,3	8,6	10	12,3	13,6	15,1	27,8
300	serija 1	3,2	6	8,6	11,8	14,5	17,1	19,5	22,3	24,8	44,8
	serija 2	3,5	5,8	9	11,5	14,7	16,5	19,3	22,4	23,5	44,6
	serija 3	3,3	6,1	8,5	11,8	14,4	17,3	19,7	22,2	25	45
400	serija 1	21,7	27,1	34,9	42,1	48,5	56,1	68	76,1	82,5	88,2
	serija 2	19,3	27,5	32,3	48,9	50,2	57	67,1	76,6	84	88,3
	serija 3	20	26,9	35	43,9	49,9	59,3	66,2	78	85,3	88
500	serija 1	26,7	40	45,2	50,9	60	76,8	82,2	89,1	90,7	96,2
	serija 2	23,7	38	48	50,1	60,3	76,7	82,4	86	91	97
	serija 3	27,8	42,1	42	48	51,2	74,3	83,5	89,9	88	95

Tabela PT 5. Uticaj brzine mešanja na vrednost k_{La} u bioreaktoru (apsorpciona metoda) i erlenmajeru sa mešanjem (empirijska jednačina)

Brzina mešanja, rpm	k_{La} (bioreaktor)	k_{La} (erlenmajer sa mešanjem)
100	5,26±0,02	9,38
200	6,51±0,11	18,81

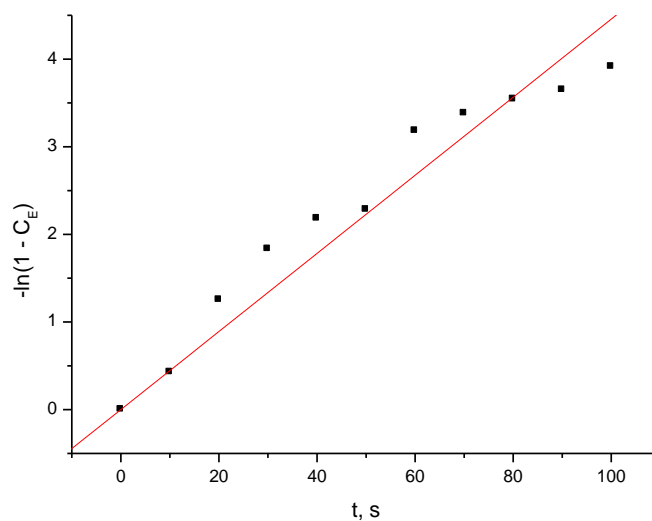
300	11,88±0,15	28,25
400	45,35±0,25	37,61
500	68,44±5,28	47,25

Tabela PT6. Određivanje karakteristika kiseonične elektrode primenom apsorpcione metode

t, s	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
%	34.7	71.4	84	88.7	90	95.5	96.6	97.1	97.4	98

Tabela PT7. Promena koncentracije biomase pri optimalnim uslovima u biorekatoru

t, h	0	2	4	5.5	6	6.5	8	10	12	16	24	48
$X, g/L$	0.1	0.1	0.48	1.13	1.77	2.8	4.05	5.9	6.57	6.71	7.59	7.24



Slika PS1. Određivanje karakteristika kiseonične elektrode primenom apsorpcione metode



Slika PS 2. Antifungalno dejstvo preparata *B. subtilis* na odabrane fitopatogene



Slika PS 3. Fitostimulatorno dejstvo preparata *B. subtilis* 40 dana nakon inokulacije semena paprike a) kontrola, b) tretaman

BIOGRAFIJA AUTORA

Sandra Stamenković Stojanović (rođena Stamenković), master inženjer tehnologije, rođena je 20. maja 1991. godine u Priboju. Osnovnu školu i prirodno-matematički smer Gimnazije u Leskovcu završila je kao nosilac Vukove diplome. Školske 2010/11 upisala je Tehnološki fakultet u Leskovcu na studijskom području Prehrambena tehnologija i biotehnologija na kome je diplomirala 2014. godine sa prosečnom ocenom 10. Iste godine upisuje master akademske studije na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu, koje završava jula 2015. godine sa prosečnom ocenom 10 i ocenom 10 na diplomskom ispitu.



Tokom osnovnih i master studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, Fonda za mlade talente Republike Srbije i Fonda za mlade talente grada Leskovca. Višestruko nagrađivana za postignute uspehe. Svake godine je dobijala zahvalnicu Fakulteta i diplomu Univerziteta u Nišu kao najbolji student za proteklu školsku godinu. Nakon diplomiranja odlikovana je Srebrnim znakom Univerziteta u Nišu i Godišnjom nagradom Srpskog hemijskog društva, dok je posle završenih master studija dobila Povelju Univerziteta u Nišu i Zlatni znak. Na ceremonijama dodele priznanja više puta je držala govor kao predstavnik nagrađenih studenata. Godinu dana je vršila funkciju Studenta prodekana. Sa ciljem promocije nauke učestvovala je na raznim studentskim konferencijama, naučnim skupovima i sajmovima nauke. Za izuzetan naučni i društveno korisni doprinos 2013. god. dobila je Konstantinovu stipendiju, a 2014. godine odlikovana je Oktobarskom nagradom grada Leskovca.

2015. god. upisala je doktorske studije na studijskom području Tehnološko inženjerstvo gde je položila sve ispite sa prosečnom ocenom 10. Kao istraživač – stipendista učestvovala je u realizaciji dva nacionalna projekta finansirana od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Ima jedan objavljeni naučni rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), tri rada u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), dva rada u međunarodnom časopisu (M23), po jedan rad u nacionalnom časopisu međunarodnog značaja (M24) i časopisu nacionalnog značaja (M52), 10 radova saopštenih na skupovima međunarodnog značaja štampano u izvodu (M34), 9 radova saopštenih na skupovima nacionalnog značaja, od toga 1 štampan u celini (M63), a 8 u izvodu (M64). 2015. godine je angažovana na Tehnološkom fakultetu kao stručni saradnik u laboratoriji, a od 2016. godine kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja angažovana je na izvođenju nastave (računske i laboratorijske vežbe) iz predmeta studijskog područja Prehrambena tehnologija i biotehnologija na osnovnim i master akademskim studijama. 2018. godine dobila je istraživačko zvanje istraživač-pripravnik kada je zaključila ugovor o radu sa Tehnološkim fakultetom u Leskovcu. Iste godine je izabrana u zvanje asistenta na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu na studijskom području Prehrambena tehnologija i biotehnologija.

Član je Srpskog hemijskog društva i Saveta za mlade grada Leskovca. Tečno govori engleski i makedonski jezik. Udata je i majka je jednog deteta.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

ОПТИМИЗАЦИЈА ПОСТУПКА ДОБИЈАЊА МИКРОБНЕ БИОМАСЕ И ФОРМУЛАЦИЈЕ МИКРОБИОЛОШКОГ ПРЕПАРАТА СА ПОТЕНЦИЈАЛНИМ БИОПЕСТИЦИДНИМ И ФИТОСТИМУЛАТОРНИМ ДЕЈСТВОМ

која је одбрањена на Технолошком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивала на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредила ауторска права, нити злоупотребила интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 21.06.2021.

Потпис аутора дисертације:

Сандра Стаменковић Стојановић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**ОПТИМИЗАЦИЈА ПОСТУПКА ДОБИЈАЊА МИКРОБНЕ БИОМАСЕ И
ФОРМУЛАЦИЈЕ МИКРОБИОЛОШКОГ ПРЕПАРАТА СА ПОТЕНЦИЈАЛНИМ
БИОПЕСТИЦИДНИМ И ФИТОСТИМУЛАТОРНИМ ДЕСЈТВОМ**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предала за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 21.06.2021.

Потпис аутора дисертације:

Сандра Стаменковић Стојановић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

**ОПТИМИЗАЦИЈА ПОСТУПКА ДОБИЈАЊА МИКРОБНЕ БИОМАСЕ И
ФОРМУЛАЦИЈЕ МИКРОБИОЛОШКОГ ПРЕПАРАТА СА ПОТЕНЦИЈАЛНИМ
БИОПЕСТИЦИДНИМ И ФИТОСТИМУЛАТОРНИМ ДЕСЈТВОМ**

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 21.06.2021.

Потпис аутора дисертације:

Сандра Стаменковић Стојановић