УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД

Примена природних флокуланата за примарно издвајање биомасе *Bacillus* sp. добијене култивацијом на отпадним водама прехрамбене индустрије

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор:

проф. др Александар Јокић

Кандидат:

маст. инж. Селена Дмитровић

Нови Сад, 2026. године

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ **ОБРАЗАЦ – 5а**
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Селена Дмитровић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција):	проф. др Александар Јокић, редовни професор, Технолошки факултет Нови Сад
Наслов рада:	Примена природних флокуланата за примарно издвајање биомасе *Bacillus* sp. добијене култивацијом на отпадним водама прехрамбене индустрије
Језик и писмо рада:	Српски (ћирилица)
Физички опис рада:	Унети број: Страница: 166 Поглавља: 7 Референци: 184 Табела: 59 Слика: 53
Научна област:	Технолошко инжењерство
Ужа научна област (научна дисциплина):	Биотехнологија
Кључне речи / предметна одредница:	*Bacillus* sp., биолошка контрола, оптимизација, флокулација, хитозан, љуске јаја
Апстракт на језику рада:	Интензивирање пољопривредне производње доноси бројне изазове у области заштите биља и очувања квалитета земљишта. Конвенционалне методе, засноване на примени хемијских пестицида, могу довести до накупљања резидуалних једињења у храни, негативног утицаја на животну средину и развоја резистенције код штеточина, што повећава интерес за еколошки прихватљивим алтернативама као што су биопестициди и биођубрива. Микроорганизми рода *Bacillus* представљају ефикасне, селективне и одрживе биолошке агенсе, који поред антагонистичког деловања према биљним патогенима доприносе и стимулисању раста биљака и побољшању њихове исхране. За комерцијалну примену биолошких агенаса неопходна је масовна производња микроорганизама и оптимизација технологије формулације финалног производа, уз могућност коришћења отпадних вода прехрамбене индустрије као економичних и нутритивно богатих медијума. Флокулација је примењена као ефикасан метод издвајања биомасе у процесу накнадне обраде, а као природни флокуланти испитивани су нетоксични, биоразградиви и биокомпатибилни флокуланти: хитозан и прах љуски јаја. Експерименти спроведени применом L_{18} Тагучијевог ортогоналног дизајна показали су да pH вредност и тип флокуланта имају највећи утицај на ефикасност флокулације културационе течности на бази целулозе. Хитозан је омогућио постизање високих нивоа флокулационе ефикасности за све три културационе течности. Добијене су вредности 97,1%, 99,3% и 98,8% за културациону течност на бази сирне сурутке, на бази отпадне воде из винарије и на бази отпадне воде из производње воћних сокова, редом.

	Поред тога, хитозан је показао снажан антимикробни ефекат против одабраних фитопатогена, што потврђује његову дуалну природу, као флокуланта и биоконтролног агенса. Флокулант на бази љуске јаја, такође је био ефикасан у издвајању биомасе за све три културационе течности. Добијене су вредности 95,9%, 95,8% и 97,8% за културациону течност на бази сирне сурутке, на бази отпадне воде из винарије и на бази отпадне воде из производње воћних сокова, редом. Овај флокулант је показао стабилну флокулациону активност у ширем опсегу pH вредности, уз економску оправданост, што га чини перспективном алтернативом за одрживе биотехнолошке и пољопривредне процесе. Резултати ове докторске дисертације, који обухватају високу ефикасност флокулације и њен утицај на повећање брзине таложења и пречника зоне инхибиције, јасно показују да природни флокуланти, хитозан и флокулант на бази љуске јаја, представљају ефикасно, економично и одрживо решење за примарно издвајање биомасе *Bacillus* sp. са значајним биоконтролним потенцијалом. Ови резултати истовремено указују и на оправданост интеграције природних флокуланата у биотехнолошке и пољопривредне системе, чиме се доприноси развоју циркуларне економије и унапређењу одрживости процеса, уз смањење трошкова и негативних утицаја на животну средину.
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	21.09.2023.
Датум одбране: (Попуњава накнадно институција)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	Председник: др Јована Граховац, редовни професор, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду Члан/Ментор: др Александар Јокић, редовни професор, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду Члан: др Драгољуб Цветковић, редовни професор, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду Члан: др Александра Ранитовић, ванредни професор, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду Члан: др Милан Николић, ванредни професор, Агрономски факултет у Чачку, Универзитет у Крагујевцу
Напомена:	

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY NOVI SAD

KEY WORD DOCUMENTATION

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Selena Dmitrović
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Aleksandar Jokić, PhD, Full Professor, Faculty of Technology Novi Sad
Thesis title in English:	Application of natural flocculants for the primary separation of *Bacillus* sp. biomass cultivated in food industry wastewaters
Language and script:	Serbian language (cyrillic)
Physical description:	Number of: Pages: 166 Chapters: 7 References: 184 Tables: 59 Illustrations: 53
Scientific field:	Technological Engineering
Scientific subfield (scientific discipline):	Biotechnology
Subject, Key words:	*Bacillus* sp., biological control, optimization, flocculation, chitosan, eggshells
Abstract in English:	The intensification of agricultural production brings numerous challenges in the field of plant protection and soil quality preservation. Conventional methods based on the use of chemical pesticides may lead to the accumulation of residual compounds in food, negative environmental impacts, and the development of pest resistance, which increases interest in environmentally friendly alternatives such as biopesticides and biofertilizers. Microorganisms of the genus *Bacillus* represent effective, selective, and sustainable biological agents that, in addition to their antagonistic activity against plant pathogens, also contribute to plant growth promotion and improved nutrient uptake. For the commercial application of biological agents, large-scale microbial production and optimization of formulation technology are necessary, with the possibility of using food industry wastewaters as cost-effective and nutrient-rich media. Flocculation was applied as an efficient biomass separation method during downstream processing, while natural flocculants examined in this study included non-toxic, biodegradable, and biocompatible agents: chitosan and eggshell powder. Experiments performed using the L_{18} Taguchi orthogonal design showed that pH value and flocculant type had the strongest influence on the flocculation efficiency of the cellulose-based cultivation broth. Chitosan enabled high flocculation efficiency levels for all three-cultivation media, with values of 97,1%, 99,3% and 98,8% for cheese whey-based medium, winery wastewater-based medium, and fruit juice industry wastewater-based medium, respectively. In addition, chitosan exhibited strong antimicrobial activity against selected phytopathogens, confirming its dual function as both a flocculant and a biocontrol agent. The eggshell-based flocculant was also effective in biomass separation for all three-cultivation media, achieving flocculation efficiencies of 95,9%, 95,8% and 97,8% for cheese whey-based medium, winery wastewater-based medium, and fruit juice industry wastewater-based medium, respectively. This flocculant demonstrated stable

	flocculation performance over a wider pH range and showed strong economic feasibility, making it a promising alternative for sustainable biotechnological and agricultural processes. The results of this doctoral dissertation, including high flocculation efficiency and its impact on increased settling velocity and inhibition zone diameter, clearly demonstrate that natural flocculants-chitosan and the eggshell-based flocculant-represent efficient, economical, and sustainable solutions for the primary separation of *Bacillus* sp. biomass, with significant biocontrol potential. These findings further support the integration of natural flocculants into biotechnological and agricultural systems, contributing to the development of a circular economy and enhanced process sustainability, while reducing costs and environmental impacts.
Date of endorsement by the scientific board:	21.09.2023.
Date of defence: (Filled in by the institution)	
Thesis defence board: (title, first name, last name, position, institution)	Chair: Jovana Grahovac, PhD, Full Professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad Member/Supervisor: Aleksandar Jokić, PhD, Full Professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad Member: Dragoljub Cvetković, PhD, Full Professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad Member: Aleksandra Ranitović, PhD, Full Professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad Member: Milan Nikolić, PhD, Associate Professor, Faculty of Agronomy Čačak, University of Kragujevac
Note:	

С љубављу и захвалношћу, мојој породици

Садржај

Списак табела I
Списак слика III
1. Увод 1
2. Циљеви истраживања 3
3. Преглед литературе 4
3.1. Савремена и одржива пољопривреда 4
3.2. Биолошка контрола и биоконтролни агенси 6
3.2.1. Биопестициди 8
3.3. Биођубрива 10
3.4. Биопестициди и биођубрива на бази *Bacillus* бактерија 12
3.5. Биотехнолошки процес производње биолошких агенаса 14
3.6. Отпадни токови прехрамбене индустрије-сировина у биотехнолошкој производњи 18
3.6.1. Отпадне воде индустрије млека и млечних производа 19
3.6.2. Отпадне воде индустрије вина 20
3.6.3. Отпадне воде индустрије воћних сокова 21
3.6.4. Биолошки третман отпадних вода прехрамбене индустрије 22
3.7. Процес накнадне обраде културационог медијума 24
3.7.1. Методе сепарације микробне биомасе и ферментационих производа 27
3.7.2. Стратегија смањења трошкова приликом процеса накнадне обраде 30
3.8. Флокулација као метода сепарације биомасе микроорганизама 31
3.8.1. Физичка флокулација 34
3.8.2. Хемијска флокулација 35
3.8.3. Биолошка флокулација 36
3.8.4. Механизми флокулације 37
3.8.4.1. Механизам умрежавања полимерним ланцима 37
3.8.4.2. Неутрализација наелектрисања 38
3.8.4.3. Механизам електростатичких мрља 39
3.8.4.4. Механизам захватања 40
3.9. Флокуланти 40
3.9.1. Хитозан 41
3.9.1.1. Фактори који утичу на антимикробну активност хитозана 42
3.9.1.2. Примена хитозана 44
3.9.1.3. Синергистички ефекат хитозана са *Bacillus* врстама 45
3.9.1.4. Флокулација хитозаном 46
3.9.2. Љуске јаја 49
3.9.2.1. Примена љуски јаја 51
3.9.2.2. Флокулација љускама јаја 51
4. Материјал и методе 54

4.1. Микроорганизми 54
4.2. Припрема флокулационих агенаса 54
4.3. Одређивање ефикасности флокулације 55
4.4. Одређивање брзине таложења 56
4.5. Аналитичке методе 58
4.5.1. *In vitro* тестирање антимикробне активности 58
4.5.2. Одређивање броја ћелија производног микроорганизма методом узастопних разређења у комбинацији са методом посева 59
4.6. Статистичка обрада експерименталних података 59
4.6.1. Прелиминарна испитивања процеса флокулације сивом Тагучијевом методом 59
4.6.2. Примена методе одзивне површине у процесу флокулације биомасе *Bacillus* sp. култивисане на отпадним водама прехрамбене индустрије 62
4.6.2.1. Флокулација биомасе *Bacillus* sp. хитозаном 62
4.6.2.2. Флокулација биомасе *Bacillus* sp. применом флокуланта на бази љуске јаја 63
4.6.2.3. Оптимизација експерименталних резултата 64
5. Резултати и дискусија 67
5.1. Прелиминарна испитивања сивом Тагучијевом методом 67
5.1.1. Оптимизација процеса флокулације Тагучијевом методом 67
5.1.2. Сива Тагучијева релациона анализа за вишекритеријумску оптимизацију 71
5.2. Примена хитозана за флокулацију биомасе *Bacillus* sp. култивисане на отпадним водама прехрамбене индустрије 76
5.2.1. Флокулација биомасе *Bacillus* sp. из култивационе течности на бази сирне сурутке 76
5.2.1.1. Ефикасност флокулације 77
5.2.1.2. Брзина таложења 78
5.2.1.3. Пречник зоне инхибиције 80
5.2.1.4. Оптимизација 83
5.2.2. Флокулација биомасе *Bacillus* sp. из култивационе течности на бази отпадне воде из винарије 86
5.2.2.1. Ефикасност флокулације 86
5.2.2.2. Брзина таложења 88
5.2.2.3. Пречник зоне нхибиције 91
5.2.2.4. Оптимизација 93
5.2.3. Флокулација биомасе *Bacillus* sp. из култивационе течности на бази отпадне воде из производње воћних сокова 96
5.2.3.1. Ефикасност флокулације 96
5.2.3.2. Брзина таложења 98
5.2.3.3. Пречник зоне инхибиције 101
5.2.3.4. Оптимизација 103
5.3. Примена љуски јаја за флокулацију биомасе *Bacillus* sp. култивисане на отпадним водама прехрамбене индустрије 106
5.3.1. Флокулација биомасе *Bacillus* sp. из култивационе течности на бази сирне сурутке 106
5.3.1.1. Ефикасност флокулације 107

5.3.1.2. Брзина таложења 111
5.3.1.3. Пречник зоне инхибиције 114
5.3.1.4. Оптимизација 118
5.3.2. Флокулација биомасе *Bacillus* sp. из културационе течности на бази отпадне воде из винарије 121
5.3.2.1. Ефикасност флокулације 121
5.3.2.2. Брзина таложења 125
5.3.2.3. Пречник зоне инхибиције 128
5.3.2.4. Оптимизација 132
5.3.3. Флокулација биомасе *Bacillus* sp. из културационе течности на бази отпадне воде из производње воћних сокова 135
5.3.3.1. Ефикасност флокулације 135
5.3.3.2. Брзина таложења 139
5.3.3.3. Пречник зоне инхибиције 142
5.3.3.4. Оптимизација 146
6. Закључак 149
7. Литература 152
План третмана података 167

Списак табела

Табела 3.1. Иницијални параметри квалитета отпадних вода прехрамбене индустрије коришћених за култивацију производног микроорганизма (Dmitrović и сар., 2022, 2025) 23
Табела 3.2. Параметри квалитета културационих медијума заснованих на отпадним водама прехрамбене индустрије (Dmitrović и сар., 2022, 2025) 23
Табела 3.3. Удео трошкова процеса накнадне обраде у укупним трошковима производње (Straathof, 2011) 25
Табела 3.4. Стратегија за контролу и смањење трошкова приликом процеса накнадне обраде (Prasad, 2010) 30
Табела 3.5. Поређење флокулационе ефикасности хитозана у односу на различите врсте микроорганизама и услове флокулације 49
Табела 3.6. Поређење флокулационе ефикасности флокуланта на бази љуске јаја приликом третмана отпадних вода и издвајања биомасе различитих врста микроорганизама у зависности од флокулационих услова 53
Табела 4.1. Експериментални фактори и њихови нивои 61
Табела 4.2. Експериментални дизајн у случају флокулације хитозаном 62
Табела 4.3. Експериментални дизајн у случају флокулације флокулантом на бази љуске јаја 63
Табела 5.1. Параметри квалитета хранљивог медијума на бази целулозе 67
Табела 5.2. Ефикасност флокулације добијена применом Тагучијеве L_{18} ортогоналне матрице 68
Табела 5.3. Анализа варијансе за S/N односе ефикасности флокулације 68
Табела 5.4. Резултати ефикасности флокулације и антимикробне активности талога против одабраних фитопатогена 70
Табела 5.5. Експериментални подаци након нормализације и њихова одговарајућа одступања 71
Табела 5.6. Коефицијент сиве релације, степен сиве релације и сигнал/шум конверзија степена сиве релације за различите комбинације оперативних параметара 72
Табела 5.7. Анализа варијансе за S/N односе степена сиве релације 72
Табела 5.8. Поређење резултата оптимизације и експерименталне валидације 74
Табела 5.9. Експериментални дизајн и одзиви у случају флокулације КТС применом хитозана 76
Табела 5.10. Анализа варијансе ефикасности флокулације КТС применом хитозана 77
Табела 5.11. Регресиони коефицијенти ефикасности флокулације КТС применом хитозана 77
Табела 5.12. Анализа варијансе брзине таложења КТС применом хитозана 79
Табела 5.13. Регресиони коефицијенти брзине таложења КТС применом хитозана 79
Табела 5.14. Анализа варијансе пречника зоне инхибиције КТС применом хитозана 81
Табела 5.15. Регресиони коефицијенти пречника зоне инхибиције КТС применом хитозана 81
Табела 5.16. Експериментални дизајн и одзиви у случају флокулације КТВ применом хитозана 86
Табела 5.17. Анализа варијансе ефикасности флокулације КТВ применом хитозана 86
Табела 5.18. Регресиони коефицијенти ефикасности флокулације КТВ применом хитозана 87
Табела 5.19. Анализа варијансе брзине таложења КТВ применом хитозана 89
Табела 5.20. Регресиони коефицијенти брзине таложења КТВ применом хитозана 89
Табела 5.21. Анализа варијансе пречника зоне инхибиције КТВ применом хитозана 91
Табела 5.22. Регресиони коефицијенти пречника зоне инхибиције КТВ применом хитозана 91
Табела 5.23. Експериментални дизајн и одзиви у случају флокулације КТВС применом хитозана 96
Табела 5.24. Анализа варијансе ефикасности флокулације КТВС применом хитозана 96
Табела 5.25. Регресиони коефицијенти ефикасности флокулације КТВС применом хитозана 97
Табела 5.26. Анализа варијансе ефикасности флокулације КТВС применом хитозана 99
Табела 5.27. Регресиони коефицијенти брзине таложења КТВС применом хитозана 99
Табела 5.28. Анализа варијансе пречника зоне инхибиције КТВС применом хитозана 101
Табела 5.29. Регресиони коефицијенти пречника зоне инхибиције КТВС применом хитозана 101
Табела 5.30. Експериментални дизајн и одзиви у случају флокулације КТС применом праха љуске јаја 106
Табела 5.31. Анализа варијансе ефикасности флокулације КТС применом праха љуске јаја 107
Табела 5.32. Регресиони коефицијенти ефикасности флокулације КТС применом праха љуске јаја 107
Табела 5.33. Анализа варијансе брзине таложења КТС применом праха љуске јаја 111
Табела 5.34. Регресиони коефицијенти брзине таложења КТС применом праха љуске јаја 112

Табела 5.35. Анализа варијансе пречника зоне инхибиције КТС применом праха љуске јаја 115
Табела 5.36. Регресиони коефицијенти пречника зоне инхибиције КТС применом праха љуске јаја 115
Табела 5.37. Експериментални дизајн и одзиви у случају флокулације КТВ применом праха љуске јаја 121
Табела 5.38. Анализа варијансе за ефикасност флокулације КТВ 121
Табела 5.39. Регресиони коефицијенти ефикасности флокулације КТВ применом праха љуске јаја 122
Табела 5.40. Анализа варијансе брзине таложења КТВ применом праха љуске јаја 125
Табела 5.41. Регресиони коефицијенти брзине таложења КТВ применом праха љуске јаја 126
Табела 5.42. Анализа варијансе пречника зоне инхибиције КТВ применом праха љуске јаја 129
Табела 5.43. Регресиони коефицијенти пречника зоне инхибиције КТВ применом праха љуске јаја 129
Табела 5.44. Експериментални дизајн и одзиви у случају флокулације КТВС применом праха љуске јаја 135
Табела 5.45. Анализа варијансе за ефикасност флокулације КТВС 135
Табела 5.46. Регресиони коефицијенти ефикасности флокулације КТВС применом праха љуске јаја 136
Табела 5.47. Анализа варијансе брзине таложења КТВС применом праха љуске јаја 139
Табела 5.48. Регресиони коефицијенти брзине таложења КТВС применом праха љуске јаја 139
Табела 5.49. Анализа варијансе пречника зоне инхибиције КТВС применом праха љуске јаја 142
Табела 5.50. Регресиони коефицијенти пречника зоне инхибиције КТВС применом праха љуске јаја 143

Списак слика

Слика 3.1. Концептуални приказ електричног двослоја (Suopajärvi, 2015) 32
Слика 3.2. Механизам умрежавања полимерним ланцима (Suopajärvi, 2015) 38
Слика 3.3. Механизам флокулације путем неутрализације наелектрисања (Suopajärvi, 2015) 39
Слика 3.4. Механизам електростатичких мрља (Suopajärvi, 2015) 39
Слика 3.5. Механизам захватања (Suopajärvi, 2015) 40
Слика 3.6. Хемијска структура молекула хитина и хитозана (Li J. и Zhuang, 2020) 41
Слика 3.7. Структура љуске јајета (Strelec и сар., 2023) 50
Слика 4.1. Хронолошки процес теста шаржног таложења (Torfs, 2016) 56
Слика 4.2. Крива шаржног таложења 57
Слика 5.1. Главни ефекти за S/N анализу ефикасности флокулације културационе течности *Bacillus* sp. BioSol021: A-врста хитозана, B-pH вредност, C-концентрација хитозана (mg/mL), D-већа брзина мешања (о/мин), E-мања брзина мешања (о/мин) 69
Слика 5.2. Главни ефекти за S/N анализу степена сиве релације (GRG) током флокулације културационе течности *Bacillus* sp. BioSol021 и испитивања антимикробне активности против изабраних фитопатогена: A-врста хитозана, B-pH вредност, C-концентрација хитозана (mg/mL), D-већа брзина мешања (о/мин), E-мања брзина мешања (о/мин) 73
Слика 5.3. Одзивна површина која описује утицај концентрације хитозана и брзине мешања на ефикасност флокулације КТС 78
Слика 5.4. Одзивна површина која описује утицај концентрације хитозана и брзине мешања на брзину таложења КТС 80
Слика 5.5. Одзивна површина која описује утицај концентрације хитозана и брзине мешања на пречник зоне инхибиције КТС 82
Слика 5.6. Парето фронт и простор одлуке скупа оптималних решења добијених применом вишекритеријумског генетског алгоритма у случају КТС 84
Слика 5.7. Одзивна површина која описује утицај концентрације хитозана и брзине мешања на ефикасност флокулације КТВ 87
Слика 5.8. Одзивна површина која описује утицај концентрације хитозана и брзине мешања на брзину таложења КТВ 90
Слика 5.9. Одзивна површина која описује утицај концентрације хитозана и брзине мешања на пречник зоне инхибиције КТВ 92
Слика 5.10. Парето фронт и простор одлуке скупа оптималних решења добијених применом вишекритеријумског генетског алгоритма у случају КТВ 94
Слика 5.12. Одзивна површина која описује утицај концентрације хитозана и брзине мешања на брзину таложења КТВС 100
Слика 5.13. Одзивна површина која описује утицај концентрације хитозана и брзине мешања на пречник зоне инхибиције КТВС 102
Слика 5.14. Парето фронт и простор одлуке скупа оптималних решења добијених применом вишекритеријумског генетског алгоритма у случају КТВС 104
Слика 5.15. Одзивна површина која описује утицај pH вредности и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на ефикасност флокулације КТС 108
Слика 5.16. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на ефикасност флокулације КТС 110
Слика 5.17. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и pH вредности на ефикасност флокулације КТС 110
Слика 5.18. Одзивна површина која описује утицај концентрације флокуланта на бази љуске јаја и pH вредности на брзину таложења КТС 112
Слика 5.19. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на брзину таложења КТС 113
Слика 5.20. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и pH вредности на брзину таложења КТС 114
Слика 5.21. Одзивна површина која описује утицај pH вредности и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на пречник зоне инхибиције КТС 116

Слика 5.22. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на пречник зоне инхибиције КТС 117
Слика 5.23. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и pH вредности на пречник зоне инхибиције КТС 118
Слика 5.24. Парето фронт и простор одлуке скупа оптималних решења добијених применом вишекритеријумског генетског алгоритма у случају КТС 119
Слика 5.25. Одзивна површина која описује утицај pH вредности и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на ефикасност флокулације КТВ 123
Слика 5.26. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на ефикасност флокулације КТВ 124
Слика 5.27. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и pH вредности на ефикасност флокулације КТВ 124
Слика 5.28. Одзивна површина која описује утицај концентрације флокуланта на бази љуске јаја и pH вредности на брзину таложења КТВ 126
Слика 5.29. Одзивна површина која описује утицај концентрације флокуланта на бази љуске јаја и брзине мешања на брзину таложења КТВ 127
Слика 5.31. Одзивна површина која описује утицај pH вредности и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на пречник зоне инхибиције КТВ 130
Слика 5.32. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на пречник зоне инхибиције КТВ 131
Слика 5.33. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и pH вредности на пречник зоне инхибиције КТВ 131
Слика 5.34. Парето фронт и простор одлуке скупа оптималних решења добијених применом вишекритеријумског генетског алгоритма у случају КТВ 133
Слика 5.35. Одзивна површина која описује утицај концентрације флокуланта на бази љуске јаја и pH вредности на ефикасност флокулације КТВС 137
Слика 5.36. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на ефикасност флокулације КТВС 137
Слика 5.37. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и pH вредности на ефикасност флокулације КТВС 138
Слика 5.38. Одзивна површина која описује утицај pH вредности и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на брзину таложења КТВС 140
Слика 5.39. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на брзину таложења КТВС 141
Слика 5.40. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и pH вредности на брзину таложења КТВС 142
Слика 5.41. Одзивна површина која описује утицај pH вредности и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на пречник зоне инхибиције КТВС 144
Слика 5.42. Одзивна површина која описује утицај концентрације флокуланта на бази љуске јаја и брзине мешања на пречник зоне инхибиције КТВС 145
Слика 5.43. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и pH вредности на пречник зоне инхибиције КТВС 145
Слика 5.44. Парето фронт и простор одлуке скупа оптималних решења добијених применом вишекритеријумског генетског алгоритма у случају КТВС 147

1. Увод

Интензивирање пољопривредне производње, условљено растом броја становника и све већом глобалном потражњом за храном, доноси бројне изазове у области заштите биља и очувања квалитета земљишта. Конвенционалне методе пољопривреде, углавном подразумевају употребу великог броја различитих хемијских једињења у циљу побољшања приноса и квалитета усева, међутим њихова прекомерна и неправилна употреба могу довести до великих количина резидуа у храни, опасних по људско здравље. Поред тога, процењује се да приближно 90% хемијских пестицида примењених у пољопривреди има негативан утицај на животну средину и организме који нису њихов примарни циљ. Такође, употреба хемијских пестицида доводи до развоја резистенције код циљних популација штеточина, што умањује њихову ефикасност. Управо из наведених разлога постоји растући интерес за развој сигурнијих и еколошки прихватљивијих алтернатива, првенствено у виду унапређења потенцијала биолошке контроле.

Биопестициди и биођубрива на бази микроорганизама, међу којима су најзаступљеније врсте рода *Bacillus,* представљају веома ефикасну, селективну и еколошки прихватљиву алтернативу конвенционалним агрохемикалијама. Поред антагонистичког дејства према биљним патогенима, велики број микроорганизама поседује и особине које имају позитиван утицај на биљке, као што су подстицање раста и побољшање исхране, путем стимулисања апсорпције микро- и макро- нутријената из земљишта. Њихова примена има значајно место у програмима интегралне заштите биља, који омогућавају развој одрживе пољопривредне производње уз смањење употребе хемијских средстава. Ипак, иако развој биолошких агенаса има значајан потенцијал, њихова комерцијализација суочава се са бројним изазовима које је неопходно превазићи како би се ови производи успешно пласирали на тржиште.

За комерцијалну производњу биолошких агенаса неопходна је масовна производња (култивација) микроорганизама, уз истовремено унапређење технологије формулације (течна или чврста), ради постизања веће ефикасности, дужег рока трајања готовог производа као и једноставније примене на већим пољопривредним површинама. Приликом производње микробиолошке биомасе све већу пажњу привлачи примена економичних производа и нуспроизвода различитих грана индустрије. Овакви медијуми не само да омогућавају добијање великих количина биомасе, уз нижу производну цену, већ су у складу са принципима циркуларне економије, односно смањењем индустријског отпада и његовом ефикасном валоризацијом. Отпадне воде прехрамбене индустрије попут отпадних вода индустрије млека и млечних производа али и индустрије вина и воћних сокова, имају велики потенцијал као сировина за производњу микробиолошких биопестицида, јер су богате органским и неорганским материјама. Ипак, пре њихове примене, неопходна је детаљна карактеризација сирових отпадних вода због могућих сезонских варијација у саставу и потенцијалних инхибиторних утицаја на раст микроорганизама.

У процесу накнадне обраде (ПНО) (енгл. *downstream process*), који обухвата издвајање и пречишћавање производа из ферментационог медијума, производни трошкови могу бити знатно увећани.

Једна од најпогоднијих техника за сепарацију биомасе у процесу накнадне обраде је флокулација. Коагулација/флокулација представља релативно једноставан физичко-хемијски метод сепарације. У првој фази, коагулацији, позитивно наелектрисана једињења дестабилизују колоидне честице у суспензији. У другој фази, флокулацији, дестабилизоване честице се повезују у веће агломерате, односно флокуле, које се лакше таложе. Циљ овог процеса је формирање флокула одговарајуће величине, густине и чврстоће, које је могуће ефикасно издвојити процесима таложења и филтрације. Флокулација се може спроводити физичким, хемијским или биолошким методама. При чему, традиционални процеси често подразумевају високу цену флокуланата, велику потрошњу енергије и повећан ризик од контаминације биомасе. Као одржива алтернатива све више се истражују природни флокуланти добијени из отпадних биогених материјала биљног или животињског порекла, попут хитозана и праха од љуски кокошјих јаја, који су се показали као веома ефикасни органски флокуланти за широк спектар микроалги. Њихова примена је оправдана из два основна разлога: прво, јер су нетоксични, биоразградиви и биокомпатибилни; и друго, јер флокулант попут хитозана може деловати и као средство за контролу биљних болести, али и као стимулатор и регулатор раста биљака. Употребом ових флокуланата могу се значајно смањити трошкови производње, потрошња енергије и негативан утицај на животну средину, што их чини врло перспективним за примену у одрживим биотехнолошким процесима.

Истраживања спроведена у оквиру докторске дисертације усмерена су на оптимизацију процеса флокулације применом природних флокуланата (хитозан и флокулант на бази љуске јаја), ради ефикасног издвајања биомасе (производног микроорганизма *Bacillus* sp. BioSol021), култивисане на отпадним водама прехрамбене индустрије (индустрији млека и млечних производа, индустрији вина и индустрији воћних сокова). Остварени резултати доприносе бољем разумевању могућности употребе отпадних вода као хранљивог медијума у биотехнолошким процесима, као и употребе природних флокуланата у процесима накнадне обраде. Овим приступом развијен је економичан и еколошки одржив поступак обраде отпадних вода, који не само да смањује степен загађења, већ омогућава и њихову валоризацију кроз добијање биолошких агенаса погодних за примену у пољопривреди.

2. Циљеви истраживања

Примарни циљ истраживања у оквиру ове докторске дисертације је утврђивање оптималних услова за развијање еколошки прихватљивог и економичног поступка примарног флокулативног издвајања микробне биомасе производног соја *Bacillus* sp. BioSol021, узгојене на отпадним водама прехрамбене индустрије (индустрија млека и млечних производа, индустрија вина, индустрија воћних сокова), коришћењем природних флокуланата (хитозан и флокулант на бази љуске јаја) са потенцијалном применом у пољопривреди.

Како би се испунио наведени примарни циљ истраживања, дефинисани су следећи специфични циљеви:

1. Систематизација и критичка анализа релевантне научне и стручне литературе у области биотехнолошке производње биопестицида и биођубрива на бази микроорганизама рода *Bacillus* sp.

2. Утврђивање оптималних услова флокулације

    a) Испитивање флокулационе ефикасности: одређивање утицаја параметара (концентрација флокуланта, pH вредност и брзина мешања) на ефикасност примарног флокулативног издвајања микробне биомасе (*Bacillus* sp. BioSol021) коришћењем хитозана и праха љуски јаја, засебно.

    b) Утврђивање оптималних услова: дефинисање оптималне концентрације сваког флокуланта и оптималних процесно-оперативних услова за постизање највећег приноса изоловане микробне биомасе.

3. Утврђивање утицаја услова флокулације на брзину таложења и антимикробну активност изоловане биомасе.

4. Мултикритеријална оптимизација за дефинисање услова флокулације усмерене на максимизацију ефикасности, али и на истовремену максимизацију брзине таложења и антимикробне активности.

3. Преглед литературе

3.1. Савремена и одржива пољопривреда

Глобална потражња за храном значајно је порасла последњих деценија, што је подстакнуто повећањем броја становништва и променама у прехрамбеним навикама. Као одговор на то, пољопривреда је постала интензивнија. Међутим, интензификација пољопривредних активности доноси и нове изазове, како у области контроле штеточина, тако и у погледу контроле квалитета земљишта (Krismawati и сар., 2024).

Велики број различитих хемијских једињења континуирано се користи у циљу сузбијања нежељених корова и инсеката одговорниих за уништавање усева и велике новчане губитке. Према подацима Светске здравствене организације (енгл. *World Health Organization*, WHO) под пестицидима се подразумева посебна класа хемијских једињења која се користе за елиминисање широког спектра штеточина, укључујући инсекте, корове и глодаре. Ови хемијски препарати користе се како за побољшање приноса тако и за побољшање квалитета усева, међутим, њихову употребу треба пажљиво надгледати јер се сматрају потенцијално опасним хемикалијама по људско здравље (Sharma и сар., 2020). Поред пестицида, конвенционалне методе пољопривреде често подразумевају употребу синтетичких ђубрива у циљу исхране биља и побољшања приноса усева. Међутим, прекомерна употреба синтетичких ђубрива може довести до пада садржаја хранљивих материја у земљишту као и повећања подложности усева различитим биљним болестима (Mącik и сар., 2020).

Агрохемикалије, као потенцијално токсичне супстанце, захтевају правилну и контролисану примену. Прекомерна или неправилна употреба може довести до великих количина резидуа у храни, њиховог задржавања у биљним ткивима, што дугорочно може узроковати здравствене проблеме. Како би се обезбедила безбедност хране, неопходно је ефикасно праћење нивоа резидуа пестицида у храни. Из тог разлога, националне и међународне регулаторне агенције су увеле строге смернице и програме за праћење присуства ових једињења у пољопривредним производима. Већина земаља усваја максималну концентрацију резидуа (енгл. *Maximum Residue Limit,* MRL) за регулисање употребе агрохемикалија. MRL представља највиши законски дозвољен ниво пестицидних резидуа у храни (изражен у mg/kg), који се заснива на доброј пољопривредној пракси у циљу смањења изложености потрошача штетним резидуама пестицида. Вредности MRL-а зависе од регулаторне агенције у земљи, активног састојка и произведене пољопривредне културе (de O. Gomes и сар., 2020).

Истраживања су показала да континуирана изложеност хемијским пестицидима може довести до њиховог накупљања у ткивима и изазвати штетне ефекте на раст, развој и метаболизам људи. Пестициди могу да доведу до различитих здравствених поремећаја, укључујући поремећаје кардиоваскуларног, централног нервног и респираторног

система. Такође, примећено је да ова једињења имају канцерогену, мутагену и тератогену природу (Sharma и сар., 2020).

Око 90% хемијских пестицида примењених у пољопривреди доводи до последица које могу бити штетне по екосистем, односно имају негативан утицај на животну средину и живе организме који нису примарни циљ ових хемикалија. Прекомерна употреба пестицида доводи до смањења садржаја органских материја у земљишту, што умањује његову способност да задржи воду. Као резултат тога, долази до деградације плодности земљишта услед смањења микробне разноврсности. Последично, укупан садржај органских материја значајно опада (Sharma и сар., 2020). Стога је неопходно предузети озбиљне мере на глобалном нивоу у циљу смањења загађења животне средине и развоја сигурнијих и еколошки прихватљивијих алтернатива хемијским пестицидима (Sporleder и Lacey, 2012).

Болести биљака узроковане гљивичним патогенима представљају глобални проблем који доводи до великих економских губитака мерених у милијардама америчких долара (Shuping и Eloff, 2017). Посебан изазов представљају микотоксигене плесни као што је *Aspergillus flavus*, јер контаминација биљака микотоксинима може утицати на људско здравље. *Aspergillus flavus* је познат као опортунистички патоген многих усева од економског значаја, укључујући кукуруз, кикирики и памук, а уједно је и главни произвођач афлатоксина. Према класификацији Међународне агенције за истраживање рака (енгл. *International Agency for Research on Cancer*, IARC), афлатоксин B1 (AFB1) сврстан је у 1а групу канцерогених једињења за људе и животиње (Khan и сар., 2021; Ostry и сар., 2017; Savić и сар., 2020). AFB1 се дефинише као јак природни канцероген и један је од ретких микотоксина коришћених приликом производње биолошког оружја (Amare и Keller, 2014). Род *Fusarium* обухвата гљивичне врсте које изазивају различите врсте биљних болести, укључујући фузариозу класа пшенице, васкуларно венуће, канцер и трулеж корена, инфицирајући преко 100 економски значајних усева. С обзиром да такође спадају у микотоксигене плесни, плесни овог рода представљају озбиљну претњу по безбедност хране (Aoki и сар., 2014). Гљивични патогени рода *Colletotrichum* спадају међу 10 најзначајнијих гљивичних патогена који погађају воће, житарице, махунарке и бројне друге усеве (Carbú и сар., 2020). *Xanthomonas* је род бактеријских фитопатогена који инфицирају економски значајне повртарске културе (An и сар., 2019). Озбиљност болести биљака и губици приноса могу достићи и 100%, а додатни изазов представља брз развој отпорности бактеријских фитопатогена на већину комерцијално доступних бактерицида (Itako и сар., 2015; Lai и сар., 2021).

Промена праксе управљања штеточинама повећањем потенцијала биолошке контроле, укључујући смањење употребе пестицида, представља циљ за будућност, јер се савремена пољопривреда суочава са три изазова: одржање производње хране за растућу светску популацију, смањење негативних утицаја агрохемикалија на животну средину и људско здравље и обезбеђивање задовољавајућег профита за произвођаче (Thomine и сар., 2022).

Биопестициди на бази микроорганизама су показали велики потенцијал у борби против биљних патогена, јер представљају веома ефикасну, селективну и еколошки прихватљиву алтернативу конвенционалним пестицидима (Glare и сар., 2012; S. Kumar и Singh, 2015). Производи на бази микроорганизама чине скоро 90% укупног тржишта биопестицида (Koul, 2011), а развој ових производа директно је повезан са проналаском и доступношћу продуктивних изолата који би се могли применити за сузбијање циљних патогена биљака. Поред примарног антагонистичког дејства, велики број микроорганизама поседује додатне особине које имају позитиван утицај на биљке, као што су подстицање раста и побољшање исхране, што се постиже стимулисањем апсорпције микро- и макро- нутријената доступних у земљишту (Glare и сар., 2012). Бактеријски биопестициди који садрже представнике рода *Bacillus* као активну компоненту показују интензивну активност у интеракцији биљка-окружење-патоген, кроз различите механизме деловања, укључујући подстицање раста биљака (енгл. *Plant Growth Promotion,* PGP), индукцију системске отпорности биљака, формирање биофилма, конкуренцију за нутријенте и простор као и литички ефекат и производњу антибиотика (Cawoy и сар., 2011). Један од најзначајнијих механизама биоконтролних *Bacillus* сојева базира се на производњи широког спектра метаболита са антибактеријским и антифунгалним дејством против циљних патогена биљака. Међу важним метаболитима које синтетишу *Bacillus* врсте, највише се истичу липопептиди, са акцентом на сурфактин, итурин и фенгицин (Penha и сар., 2020). Биоконтролни производи засновани на *Bacillus* сојевима обично укључују биомасу микробиолошке активне компоненте као и корисне метаболите које производи одабрани производни сој (Dmitrović и сар., 2022).

Поред биопестицида, биођубрива која садрже сојеве корисних микроорганизама, имају велики потенцијал у пољопривреди јер побољшавају раст и развој биљака повећањем доступности нутријената и производњом метаболита са антибактеријским и/или антифунгалним дејством због чега могу представљати алтернативу у смањењу контаминације микотоксинима. Примена биођубрива повећава активност аутохтоних микрорганизама у земљишту, побољшава квалитет земљишта, претвара сложена хемијска једињења у облике које биљке лако усвајају. Биођубрива су јефтин и еколошки прихватљив извор хранљивих материја у односу на синтетичка ђубрива, услед чега све више добијају на значају приликом производње усева широм света (Mącik и сар., 2020).

3.2. Биолошка контрола и биоконтролни агенси

Биолошка контрола подразумева наменско коришћење унесених или резидентних живих организама, различитих од биљака домаћина отпорних на болести, с циљем сузбијања активности и популација једног или више биљних патогена (Pal и McSpadden Gardener, 2006).

Уз коришћење сорти биљака отпорних на биљне болести, биолошка контрола има важну улогу у стратегијама интегрисаног управљања штеточинама, чији је циљ смањење

употребе хемијских пестицида. Биолошки контролни агенси (енгл. *Biological Control Agents,* BCAs) дефинишу се као природни непријатељи који се сами размножавају и успостављају у околини у коју су уведени, чиме помажу у сузбијању популација штеточина. За разлику од хемикалија, биолошки контролни агенс је организам или скуп организама који је специфичнији у свом деловању и мање је вероватно да ће оставити потенцијално штетне остатке у околини. Такође, применом биолошких контролних агенаса смањује се ризик од развоја отпорности патогена (Collinge и сар., 2022).

Током свог животног циклуса, биљке и патогени интерагују са широким спектром организама, што на различите начине може утицати на здравље биљака. Како би се разумели механизми биолошке контроле, важно је проучити начине на које организми међусобно интерагују, при чему је неопходно да организми имају неки облик директног или индиректног контакта како би дошло до интеракције (Pal и McSpadden Gardener, 2006).

Микроорганизми који се примењују у биолошкој контроли биљних болести делују на различите начине и могу се поделити у три основне групе. Прву групу чине микробни антагонисти који заузимају исту еколошку нишу као и биљни патоген и делују директно, кроз паразитизам или предаторство. Друга група микроорганизама делује индиректно, стимулисањем одбрамбених механизама у биљци или кроз механизам компетиције. У оквиру овог приступа могу се користити мање вирулентни сојеви биљних патогена, друге врсте микроорганизама или природни метаболити. Трећу групу антагониста дефинише *mixed path* антагонизам који подразумева производњу антибиотика, ензима и других биолошки активних једињења са директним инхибиторним ефектом на патогене. Најефикаснији биолошки контролни агенси обично користе више механизама, што им омогућава већу ефикасност приликом сузбијања патогена (Nega, 2014; Pal и McSpadden Gardener, 2006).

Биљке реагују на хемијске стимулаторе које производе агенси биолошке контроле, што доводи до одбрамбених реакција које повећавају отпорност биљке на патогене. Ове реакције могу бити локализоване или системске и укључују механизме као што су системски стечена отпорност, повезана са повећањем нивоа салицилне киселине као и са експресијом гена који кодирају синтезу протеина, и индукована системска отпорност, повезана са повећањем нивоа јасмонске киселине и етилена. Различити сојеви бактерија, као што су *Bacillus mycoides, Bacillus subtilis, Pseudomonas putida* и *Serratia marcescens* производе супстанце попут пероксидазе, хитиназе, сидерофора, липополисахарида и 2,3-бутандиола, које индукују ову отпорност (Nega, 2014).

Антибиотици су микробни токсини који делују у малим концентрацијама, инхибирајући раст других микроорганизама. Многи микроорганизми производе и излучују супстанце са антибактеријском активношћу које могу сузбити раст биљних патогена и болести које они изазивају. За ефикасност антибиотика у биолошкој контроли, важно је да буду произведени у довољним количинама у близини патогена. Биолошки контролни агенси као што су *Pseudomonas fluorescens, Agrobacterium*

radiobacter, Bacillus subtilis и *Trichoderma virens*, производе специфичне антибиотике који помажу у сузбијању различитих патогена (Nega, 2014).

Липопептиди спадају међу најчешће произведене антибиотске супстанце *Bacillus* врста. На основу аминокиселинског састава, липопептиди се деле у три групе: итурине, фенгицине и сурфактине. Сурфактини су снажни биосурфактанти који испољавају антибактеријско дејство, али у већини случајева немају изражено фунгицидно дејство. Насупрот томе, итурини показују снажну антифунгалну активност против широког спектра квасаца и гљива, док им је антибактеријски ефекат слабије изражен. Фенгицини такође показују фунгицидно дејство, с посебном ефикасношћу против гљива које формирају хифе. Управо се деловању итурина и фенгицина приписује способност појединих *Bacillus* сојева да ефикасно контролишу болести присутне у земљишту, на листовима, као и након жетве (Pérez-García и сар., 2011). Сурфактини имају широк спектар примена у различитим гранама индустрије, укључујући нафтну, прехрамбену, козметичку и фармацеутску индустрију (Zhi и сар., 2017). Познати су по великој структурној разноликости, која је резултат различитих аминокиселина у пептидном ланцу, као и варијација у дужини и изомерији липидног ланца. Импресиван биодиверзитет ових једињења углавном је резултат њихових биосинтетских механизама (Théatre и сар., 2021). Иако биосинтетски пут и природа мултиензимских система укључених у синтезу сурфактина још увек нису у потпуности разјашњени, откривено је да су сурфактини и други биоактивни липопептиди синтетисани нерибозомским путем у производним организмима (Sen, 2010). Директни антагонизам сурфактина против широког спектра биљних патогена претходно је потврђен (Dimkić и сар., 2013; Sarwar и сар., 2018), уз додатне користи за биљке које се заснивају на њиховој улози медијатора у олакшавању колонизације биљака биоконтролним и PGP *Bacillus* сојевима (Stoll и сар., 2021).

Неколико биолошких контролних агенаса производи ензиме који разграђују хитин, протеине, целулозу и хемицелулозу, чиме директно утичу на сузбијање биљних патогена. На пример, *Serratia marcescens* производи хитиназе које су показале биоконтролни потенцијал, укључујући сузбијање *Botrytis, Rhizoctonia solani* и *Fusarium oxysporum* патогена. Такође, микроорганизми попут *Lysobacter* и *Myxobacteria* производе значајне количине литичких ензима који су показали ефикасност у сузбијању гљивичних патогена (Nega, 2014).

3.2.1. Биопестициди

Биопестициди су природно синтетисане, биоразградиве супстанце које ефикасно контролишу циљне штеточине, могу побољшати доступност нутријената у земљишту као и повећати отпорност биљака на суше, што их чини важним елементом у интегрисаном управљању штеточинама (Sharma и сар., 2020).

Термин биопестициди односи се на једињења која се примењују за сузбијање пољопривредних штеточина путем специфичних биолошких ефеката. Овај термин се

односи на производе за заштиту биља на бази живих организама или супстанци добијених из природних извора (животиња, биљака, бактерија или одређених минерала), укључујући њихове гене или метаболите. Према дефиницији Организације за храну и пољопривреду уједињених нација (енгл. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO), биопестициди обухватају пасивне агенсе биолошке контроле, за разлику од агенаса биолошке контроле који активно делују на штеточине, као што су паразитоиди, предатори, и многе врсте ентомопатогених нематода. Дакле, биопестициди обухватају широк спектар потенцијалних производа који се могу класификовати на следећи начин:

- Микробиолошки (садрже микроорганизме, попут бактерија, гљива, вируса или протозоа као активне компоненте);
- Биохемијски (продукти метаболизма микроорганизама, биљака, животиња, инсеката који сузбијају штеточине нетоксичним механизмима, нпр. токсини, споре, антибиотици, феромони, етарска уља или биљни екстракти);
- Макробиолошки (подразумевају употребу природних непријатеља у сузбијању штеточина: инсекти, гриње, нематоде).

У односу на врсту штетних организама које сузбијају, биопестициди се могу поделити на: биофунгициде, биоинсектициде, биоакарициде, бионематоциде, биохербициде (Sporleder и Lacey, 2013; Vuković и Šunjka, 2021).

Биопестициди имају бројне предности у односу на конвенционалне пестициде. Док су хемијски пестициди одговорни за загађење животне средине, опасност по људско здравље, развој резистенције код циљних популација инсектних штеточина, смањење биодиверзитета и појаву секундарних штеточина које обично контролишу природни непријатељи, биопестициди, насупрот томе, су мање токсични за људе и животну средину, утичу само на циљну групу штеточина, имају краће каренце и радне каренце. Додатна предност већине биолошких агенаса је могућност њихове примене у програмима интегралне заштите биља, која омогућава развој одрживе пољопривредне производње и смањује потребу за употребом хемијских препарата (Sporleder и Lacey, 2013; Vuković и Šunjka, 2021).

Поред бројних предности, биопестициди поседују и одређене недостатке. Врло висока специфичност може представљати ограничење када је потребно контролисати више врста штеточина. Пошто биопестициди често садрже живи материјал, њихов рок трајања је краћи, а њихова ефикасност може варирати под утицајем различитих биотичких и абиотичких фактора. Због ограничене комерцијалне примене (нишни производи), биопестициди се углавном развијају у истраживачким институцијама, а не у индустрији. Иако су откривени ефикасни активни састојци, овим производима понекад недостаје одговарајућа формулација која би омогућила ефикасну примену. Пољопривредници често сматрају биопестициде алтернативом хемијским пестицидима,

али се они значајно разликују, пре свега по високо специфичном механизму деловања. Због тога, ефикасна употреба биопестицида захтева специфично знање корисника о самом агенсу и циљној штеточини како би се оптимизовало време примене, доза и интервали примене у пољу (Sporleder и Lacey, 2013).

3.3. Биођубрива

Биођубрива се дефинишу као препарати који садрже живе микроорганизме и/или биомолекуле изоловане из микроорганизама при чему побољшавају квалитет земљишта, подстичу раст биљака и доприносе повећању приноса усева (10-40%) (Ferreyra-Suarez и сар., 2024; Seenivasagan и Babalola, 2021).

Биођубрива се деле на она која фиксирају азот, растварају фосфор, растварају калијум, растварају цинк, и на она која растварају сумпор. Свака од ових врста биођубрива има своју улогу у расту и развоју биљака због чега их је неопходно користити на одговарајући начин (Lord и сар., 2020; Seenivasagan и Babalola, 2021).

Азот има кључну улогу у енергетском метаболизму и синтези протеина, активно учествује у фотосинтези и формирању хлорофила, чиме омогућава ћелијску пролиферацију и раст биљака. Недостатак азота доводи до успоравања раста, хлорозе (жућење листова), смањене продуктивности као и инхибиције синтезе протеина. Прекомерна количина азота може проузроковати неравнотежу хранљивих материја, загађење воде и закишељавање земљишта (Ferreyra-Suarez и сар., 2024). N_2-фиксирајући микроорганизми, као што су *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Trichoderma* претварају атмосферски N_2 у NH_3 кроз процес биолошке фиксације азота (Akter и сар., 2023), који представља врло динамичан и енергетски захтеван процес (Seenivasagan и Babalola, 2021). *Rhizobium* је симбиотске природе и може фиксирати 50-100 kg азота по хектару годишње (Lord и сар., 2020).

Фосфор доприноси отпорности биљака на болести, помаже у преживљавању зимских услова (Seenivasagan и Babalola, 2021), подстиче цветање и има значајну улогу у развоју корена (Ferreyra-Suarez и сар., 2024). Неопходан је за формирање органских једињења и ефикасно извођење фотосинтезе. Витални је састојак аденозин дифосфата и трифосфата (АДП и АТП), који служе за складиштење и пренос енергије. Представља основни градивни елемент дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) и рибонуклеинске киселине (РНК). Недостатак фосфора се манифестује слабијим развојем корена, одложеним сазревањем, тамнозеленим листовима, смањеном енергетском ефикасношћу биљака. Прекомерна количина фосфора може нарушити равнотежу хранљивих материја и утицати на микробну активност у земљишту (Ferreyra-Suarez и сар., 2024). Међутим, пошто се у земљишту налази углавном у нерастворљивом облику, чак 95-99% фосфора у тлу није доступно биљкама. Микроорганизми, као што су бактерије (*Pseudomonas* spp. и *Bacillus*), гљиве (*Penicillium* и *Aspergillus*), актиномицете и алге, укључујући цијанобактерије (плаво-зелене алге), имају способност да растварају фосфор и учине га доступним биљкама (Seenivasagan и Babalola, 2021).

Калијум управља регулацијом воде и транспортом виталних биљних хранљивих материја, чиме повећава ефикасност фотосинтезе, јача ћелијску структуру и олакшава апсорпцију нитрата. Такође, калијум подстиче цветање, синтезу угљених хидрата и ензимску активност, омогућавајући биљкама да издрже неповољне услове, попут ниских температура, док истовремено спречава венуће. Недостатак калијума доводи до појаве некрозе на ивицама листова, слабљења стабљике и лошег квалитета плодова. Са друге стране, прекомерна количина калијума може нарушити равнотежу хранљивих материја, смањити апсорпцију калцијума и магнезијума као и повећати осетљивост биљака на болести (Ferreyra-Suarez и сар., 2024). Укупна количина калијума у земљишту је велика, али само мале количине су доступне биљкама. Биођубрива могу помоћи у решавању овог проблема, растварањем недоступног калијума и тиме га учинити доступним за биљке (Lord и сар., 2020). Микробни инокуланти у земљишту ризосфере, укључујући родове *Aspergillus, Bacillus, Clostridium, Burkholderia, Acidithiobacillus ferrooxidans, Pseudomonas, Paenibacillus, Bacillus mucilaginosus, B. circulans* и *B. edaphicus,* производе органске киселине које могу растворити стене богате калијумом (Seenivasagan и Babalola, 2021).

Сумпор је четврти најзначајнији нутријент у производњи усева, након азота, фосфора и калијума. У земљишту се трансформише под утицајем микробне активности, кроз процесе минерализације, имобилизације, оксидације и редукције при чему ензим сулфатаза учествује у катализи минерализације сумпорних једињења и њиховом претварању у облике доступне биљкама (Seenivasagan и Babalola, 2021). Сумпор доприноси формирању хлорофила, што је кључно за фотосинтезу, побољшава ефикасност искоришћења азота и јача механизме одбране биљке. Недостатак сумпора утиче на синтезу протеина и метаболизам азота, што доводи до инхибиције раста, хлорозе (жућење листова), споријег сазревања. Прекомерна употреба биођубрива која садрже сумпор, може довести до снижавања pH вредности земљишта и пратећих проблема везаних за киселост (Ferreyra-Suarez и сар., 2024).

Цинк је значајан микронутријент за раст и метаболизам биљака, представља главну компоненту у ензимским системима, делује као метални активатор и ко-фактор за многе ензиме. Микроорганизми попут *Saccharomyces* sp., *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas* производе органске киселине које растварају једињења цинка због чега се могу користити као биођубрива и ефикасна замена за скупи цинк-сулфат (Seenivasagan и Babalola, 2021).

Иако представљају алтернативу хемијским ђубривима, и даље постоје одређени изазови приликом формулације биођубрива, јер услови складиштења и транспорта могу у значајној мери утицати на рок трајања производа, што потенцијално може имати негативне последице по људско здравље и животну средину. Због тога, адекватна формулација биођубрива има велики значај јер директно утиче на њихову ефикасност и примену у пољопривреди (Miranda и сар., 2024).

3.4. Биопестициди и биођубрива на бази *Bacillus* бактерија

Род *Bacillus* представља велику групу грам-позитивних бактерија које припадају породици *Bacillaceae*. Издваја се од других представника ове породице по бројним карактеристикама. То су штапићасте (пречник: 0,5–1,2 μm; дужина: 2,5–10 μm), каталаза-позитивне бактерије, способне за формирање ендоспора (облик отпорности и таксономски значајан критеријум за род *Bacillus*), са аеробним или факултативно анаеробним метаболизмом (Rkhaila и сар., 2021). Према последњем издању *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, описане су 142 врсте унутар рода *Bacillus*, а број и даље расте. Бактерије рода *Bacillus* су изузетно распрострањене, јер могу да насељавају велики број еколошких ниша; присутне су у земљишту, води, ваздуху, као и на површинама и ризосфери биљака. Такође, присутне су у гастроинтестиналном тракту животиња као и у многим екстремним окружењима. Са аспекта биотехнологије, најважнија особина врста из рода *Bacillus* је њихов разноврстан секундарни метаболизам и способност производње широког спектра антагонистичких супстанци. На пример, сојеви *Bacillus subtilis* користе 4 до 5% свог генома за синтезу секундарних метаболита и могу да произведу више од две десетине структурно различитих антимикробних једињења. Један од типичних примера је и сој *B. amyloliquefaciens* FZB42, код којег око 8% генома учествује у производњи секундарних метаболита, укључујући бактериоцине, антимикробне пептиде, липопептиде, поликетиде и сидерофоре, а такође показује својства промотора раста биљака (Fira и сар., 2018). *Bacillus* бактерије могу убрзати раст биљака директним генерисањем фитохормона (индол-3-ацетатна киселина) и других регулатора раста, заједно са побољшањем анаболизма домаћина (фотосинтезе) и нивоа фитохормона у биљци. Могу утицати на солубилизацију фосфата (у неорганском облику) и повећање толеранције биљака на абиотичке и биотичке стресове (Rkhaila и сар., 2021).

Сојеви који формирају ендоспоре у оквиру врста *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* и *B. pumilus* често се користе као биођубрива и агенси за биолошку контролу, због свог дугог рока трајања који је упоредив са роком трајања агрохемикалија. Међутим, унутар ових *Bacillus* врста постоје и вирулентни сојеви који могу изазвати озбиљне болести код кичмењака, оштећење мозга код пачића, као и упалу плућа код људи (*B. subtilis*). Такође, *B. pumilus* је идентификован као патоген који може нанети штету засаду боровница и ћумбиру, као и узроковати кожну инфекцију код људи. С друге стране, доказано је да *Bacillus amyloliquefaciens* нема патогене ефекте, што му даје предност у односу на друге две *Bacillus* врсте и пружа могућност да се користи као безбедно биођубриво и агенс за биолошку контролу (Luo и сар., 2022).

Ова особина је посебно важна када се бактерије примењују на производе након бербе, јер ће ти производи бити директно конзумирани. Ниска токсичност за људе и околину, као и способност да успоравају старење, побољшавају квалитет производа и контролишу гљивичне патогене, чине ову врсту изузетним биоконтролним агенсом за употребу након бербе. Већина истраживања фокусира се на примену на воћу, док је мало података о њиховој примени на поврћу и орашастим плодовима. Такође, показало се да

неки сојеви *B. amyloliquefaciens* могу синтетисати веће количине липопептида у односу на сојеве *B. subtilis*, што је корисно за контролу гљивичних патогена. Примена *B. amyloliquefaciens* такође доприноси побољшању квалитета и нутритивне вредности производа након бербе (Wang S. Y. и сар., 2022).

Bacillus amyloliquefaciens подстиче раст биљака путем различитих механизама: 1) побољшањем доступности хранљивих материја у земљишту, укључујући боље снабдевање азотом, растварање неорганских и органских фосфата, омогућавање доступности калијума из нерастворних облика и стварањем сидерофора које хелирају Fe^{3+}; 2) регулисањем микробиолошке заједнице у земљишту како би се повећао удео корисних микроба и смањила бројност патогена, чиме се побољшава доступност минерала и услови за раст биљака; 3) лучењем хормона и испарљивих органских једињења која регулишу раст биљних ћелија, подстичу развој корена и даље побољшавају унос хранљивих материја од стране биљака; 4) повећањем отпорности биљака на биотичке стресове изазване патогенима у земљишту кроз конкуренцију са патогенима за еколошке нише и хранљиве материје, производњом антимикробних метаболита као што су циклични липопептиди, поликетиди и испарљива органска једињења, те покретањем система индуковане резистенције за побољшање одбрамбених способности; 5) индуковањем толеранције на абиотичке стресове кроз генетске, хемијске и физичке промене у биљкама. Ови механизми пружају теоријску основу за будућу рационалну и ефикасну примену *B. amyloliquefaciens* у пољопривреди (Luo и сар., 2022). Осим тога *Bacillus amyloliquefaciens* је једна од најчешћих бактерија које колонизују биљке, где има важну улогу у биолошкој контроли васкуларних биљних патогена (Zalila-Kolsi и сар., 2023).

Током последњих неколико година, истраживања о *Bacillus amyloliquefaciens* се све више усмеравају на његову примену у пољопривреди. Међутим, постоје одређена ограничења која спречавају његову ширу употребу. Прва препрека је недовољно разумевање интеракција између бактерија, биљних домаћина и фактора животне средине, који се сматрају кључним за дистрибуцију и функцију биљних микробних заједница. Друга препрека лежи у томе што је већина претходних истраживања примене *Bacillus amyloliquefaciens* спровођена у контролисаним условима, попут лабораторија или стакленика, што може довести до резултата који су у супротности са онима који би се добили у стварним условима. Трећа препрека је чињеница да сојеви који се директно изолују често не испуњавају очекивања корисника у погледу одређених карактеристика (Luo и сар., 2022).

Иако су неки сојеви *B. amyloliquefaciens* комерцијализовани и могу се складиштити на стандардним условима током дужег периода, истраживања сугеришу да ови сојеви имају нижу ефикасност и вишу цену у поређењу са хемијским препаратима. Потребна су даља истраживања како би се оптимизовали услови примене, побољшала колонизација и смањили трошкови производње и складиштења (Wang S. Y. и сар., 2022).

3.5. Биотехнолошки процес производње биолошких агенаса

Иако развој биолошких агенаса има значајан потенцијал, суочава се с бројним изазовима које је потребно превазићи како би се ови производи успешно пласирали на тржиште. За комерцијалну производњу неопходна је масовна производња микроорганизама, а без обзира на примењену производну методу, неопходно је побољшати технологију формулације биолошких агенаса (течну или чврсту), ефикасност и рок трајања готовог производа (идеално до две године), као и омогућити једноставност приликом примене на већим површинама (Ayaz и сар., 2023; Teixidó и сар., 2022).

Скрининг новоизолованих микроорганизама за комерцијалну примену у биолошкој контроли биљних патогена представља сложен процес. Поред испитивања антагонистичке ефикасности, постоји низ различитих критеријума које је неопходно узети у обзир, од еколошких карактеристика потребних за добру ефикасност у пољским условима, преко токсиколошких профила и способности раста у биореакторима, до изводљивости успешне формулације, заштите права интелектуалне својине и одговарајуће стратегије комерцијализације (Droby и сар., 2016).

Велики број новоизолованих микроорганизама не испуњава критеријуме које захтева производња микроорганизама на индустријском нивоу, као ни поступак формулације крајњег производа. Изазов представља чињеница да се ради о живим организмима који су осетљиви на процесе формулације и неповољне услове складиштења. Због тога је често тешко постићи исте или сличне резултате као приликом употребе хемијских средстава, као и поновити резултате постигнуте у контролисаним условима (нпр. пластеницима). Микроорганизми су осетљиви на температурне флуктуације, као и деловање конкурентских микроорганизама присутних у природном окружењу, што може утицати на њихову ефикасност (Nega, 2014; Teixidó и сар., 2022).

Микроорганизми од индустријског значаја који имају својства корисна за биљке, углавном су бактерије родова *Bacillus, Pseudomonas, Rhizobium, Azotobacter* и плесни родова *Aspergillus, Penicillium, Trichoderma*. Њихова улога у земљишту је вишеструка: учествују у разградњи органских материја, омогућавају кружење хранљивих материја, ослобађају фитохормоне који подстичу раст биљака и доприносе заштити биљака од патогена (Vassileva и сар., 2021).

Методе које се примењују приликом производње биолошких контролних агенаса на индустријском нивоу обухватају ферментацију у чврстој или течној подлози, а основни циљ је постизање високог приноса биомасе уз минималне трошкове. Течна ферментација у биореактору са константним мешањем често се примењује за производњу бактерија и квасаца, како би се постигао висок степен аерације, док се велики број плесни углавном производи у чврстој фази (Teixidó и сар., 2022).

Иницијални услови за производњу биопестицида укључују температуру између 25 и 28 °C, при чему је запремина инокулума 10% од укупне запремине биореактора. У

зависности од примењене технологије, укупно време ферменатције може варирати али је углавном између 7 и 12 дана (Ferreyra-Suarez и сар., 2024).

Приликом процеса течне ферментације, микробне ћелије се узгајају у течној хранљивој подлози уз константно мешање и аерацију, при чему усвајају хранљиве материје из подлоге и продукују специфичне метаболите, од којих неки стимулишу раст биљака, док други испољавају заштитино дејство против патогена. По завршетку ферментације, добијена микробна биомаса и/или споре могу се употребити за припрему чврстих комерцијалних производа помоћу одговарајућих чврстих носача. Течне формулације микроорганизама корисних за биљке могу се формулисати директним додавањем стабилизујућих супстанци у културациону течност, чиме се обезбеђује дужи рок трајања производа, очување високе концентрације ћелија и појачана метаболичка активност (Vassileva и сар., 2021).

Чврста ферментација је ферментациони процес заснован на чврстим супстратима без присуства слободне воде. Како би се обезбедили оптимални услови за раст микроорганизама, формирање спора и високу метаболичку активност, неопходно је прилагодити процесне параметре као што су количина инокулума, ниво влаге, температура, pH вредност, додатак хранљивих материја, степен аерације, као и величина честица чврстог супстрата. Прилагођавање састава супстрата може допринети укупној продуктивности или указати на потребу за додатком одређених супстанци ради усмеравања метаболичке активности у правцу жељене количине крајњег производа (Vassileva и сар., 2021).

Масовна производња микроорганизама у течном медијуму има бројне предности, укључујући једноставну контролу и додавање нутријената, висок принос у кратком временском периоду и релативно ниске оперативне трошкове. Међутим, течна ферментација захтева издвајање и формулацију производа при чему капитални трошкови могу бити високи. Такође, потребна је сложена опрема за ферментацију, а генеришу се и велике количине отпадних вода. С друге стране, масовна производња на чврстом медијуму има предности попут једноставне формулације производа и ниских капиталних трошкова. Међутим, тешко је повећати обим производње, додавање нутријената може бити отежано, микроорганизми имају низак ниво активности воде, а контрола процеса је често врло комплексна (Teixidó и сар., 2022). При преласку на индустријски ниво производње, ферментацију у чврстом стању прати низ технолошких изазова, као што су акумулација топлоте, промене pH вредности, промене концентрације кисеоника као и неуједначена расподела супстрата и влаге. Ипак, овај тип ферментације пружа и значајне биотехнолошке предности укључујући већу продуктивност, већу крајњу концентрацију производа, већу стабилност финалног производа и смањене захтеве за стерилношћу услед ниске активности воде (Spadaro и Gullino, 2005).

Оптимизација масовне производње обухвата два кључна корака: 1) дефинисање састава медијума који обезбеђује адекватну количину нутријената за ћелијски метаболизам и 2) оптимизацију услова раста (температура, pH вредност, мешање и аерација) (Droby и сар., 2016). Да би се успешно управљало производним процесом

добијања биоконтролних агенаса и постизањем високог приноса биомасе или синтетисаних секундарних метаболита, или оба, неопходно је разумети њихов начин деловања. Први корак у експерименталном раду, спроводи се на лабораторијском нивоу у ерленмајерима, који омогућавају тестирање великог броја компоненти и концентрација, након чега се услови раста даље оптимизују на нивоу лабораторијског биореактора. Наредна фаза подразумева скалирање процеса на индустријски ниво у пилот постројењима са биореакторима запремине 100-300 L. Уколико се резултати у пилот постројењима покажу као успешни, даљи прелаз на комерцијалну производњу не представља проблем (Teixidó и сар., 2022).

Састав културационог медијума мора да задовољи основне захтеве за производњу ћелијске биомасе и/или метаболита, обезбеђујући адекватно снабдевање енергијом потребном за биосинтезу и одржавање ћелија. Обично су потребни извори азота и угљеника. Азот може бити неорганski (као што су амонијумове и нитратне соли), или органски (аминокиселине, протеини, уреа). Извор угљеника има двоструку улогу: у биосинтези и генерисању енергије, при чему су угљени хидрати уобичајени извор угљеника у процесу микробиолошке ферментације. Неки од уобичајених извора угљеника укључују шећере попут сахарозе и фруктозе, као и сложеније угљене хидрате попут екстракта слада (Teixidó и сар., 2022). Поред азота и угљеника, фосфор представља једну од кључних макрокомпоненти у ферментационој течности, јер значајно утиче на ситезу биомасе и метаболита. Неорганski облици фосфора чине основу подлоге, при чему су често ограничавајући фактор раста микроорганизама услед своје слабе доступности (Vassileva и сар., 2021).

Културациони медијуми који се користе за произвоњу микробиолошке биомасе могу бити хемијски дефинисани или комплексни, односно медијуми чији састав није у потпуности познат. Употреба економичних производа и нуспроизвода постаје све чешћа пракса и најефикаснији приступ за добијање великих количина биомасе. Примена медијума на бази отпадних материјала доприноси концепту циркуларне економије, смањењу индустријског отпада и његовој валоризацији (Teixidó и сар., 2022).

Хемијски дефинисани медијуми имају као главну предност свој стандардни састав и стабилност током времена; међутим, принос који се постиже обично није висок (Teixidó и сар., 2022). Само 10% микроорганизама који живе у зони корена биљке погодно је за културацију на стандардним хранљивим подлогама (Vassileva и сар., 2021). С друге стране, комплексни медијуми, који се базирају на производима и нуспроизводима из прехрамбене индустрије (као што су меласа од шећерне репе и трске, екстракти слада и квасца, пептони или екстракти меса и рибе, сурутка) генеришу висок принос биомасе. Међутим, њихов састав може варирати у зависности од сезонских фактора. У неким случајевима, њихова ниска цена не компензује недостатке које могу имати, као што су недостатак хомогености између серија и могућност присуства токсичних супстанци или метаболита који могу негативно утицати на раст микроорганизма и које је потребно уклонити током припреме медијума (Teixidó и сар., 2022).

Зависно од биоконтролног агенса, један од првих корака у фази накнадне обраде, усмерених на добијање производа након ферментације, јесте издвајање ћелија (или спора), супернатанта са синтетисаним метаболитима или у неким случајевима издвајање и ћелија и супернатанта. *B. amyloliquefaciens* представља пример биоконтролног агенса код којег се након ферментације издвајају и формулишу и ћелије и метаболити укључени у његов начин деловања приликом контроле биљних болести. Концентрација микроорганизама је углавном ниска, при чему су микроорганизми помешани са другим молекулима које је потребно одвојити применом различитих процеса (Teixidó и сар., 2022). Микробне ћелије као и други нерастворљиви материјали, најчешће се из култивационе течности издвајају применом филтрације или центрифугирања. Због малих димензија микробних ћелија, при филтрацији је често неопходна примена помоћних средстава ради повећања ефикасности процеса, док се топлота и флокулација примењују у циљу повећања брзине таложења током центрифугирања. Флокулација се, међутим, може применити и у другим фазама накнадне обраде, као техника која додатно олакшава процес издвајања компонената из култивационе течности (Stanbury и сар., 2017).

Процес формулације биолошких контролних агенаса захтева мултидисциплинарни приступ како би се оптимизовали принос, ефикасност и могућност складиштења развијеног производа. Главни циљеви формулације су: 1) стабилизација биоконтролних агенаса током рока трајања, дистрибуције и складиштења; 2) једноставно руковање и примена производа; 3) одржање ефикасности; 4) заштита од неповољних фактора животне средине. Такође, потребно је размотрити и компатибилност са пољопривредном опремом и трошкове производње. Због претходно поменутих фактора, формулација се често сматра главном препреком у комерцијализацији биоконтролних агенаса (Teixidó и сар., 2022).

Избор формулације зависи од планиране примене. У системима без земљишта, где се инокулант најједноставније уноси преко система за наводњавање кап по кап, предност се даје течним формулацијама. Гранулисани облици су погоднији за мешање са супстратима приликом садње, док су прашкасте формулације које се растварају прикладне за третман кореновог система потапањем или се у пракси примењују прскањем истом опремом која се користи за примену хемијских пестицида (Spadaro и Gullino, 2005).

Формулисани производи се углавном састоје од неколико компонената: (1) активне компоненте која обухвата ћелије микроорганизама и/или синтетисане секундарне метаболите; (2) инертног материјала који служи као носач; (3) помоћних средстава као што су заштитне супстанце, стабилизатори, адхезиви, сурфактанти и додатне хранљиве материје, које одржавају функцију активне компоненте штитећи је од високих температура, исушивања, ултраљубичастог зрачења и подстичу њено ширење и распршивање производа у окружење. Сва помоћна средства која се користе у процесу формулације морају бити компатибилна са микроорганизмом и не смеју имати негативан утицај на њега (Droby и сар., 2016; Teixidó и сар., 2022).

Да би се постигла успешна формулација биоконтролног агенса, потребно је скратити рок трајања биопестицида у поређењу са конвенционалним пестицидима. Рок трајања представља временски период у којем, под одговарајућим условима складиштења, долази до прихватљивог смањења квалитета упакованог производа. Услови складиштења и паковања имају значајан утицај на рок трајања било ког формулисаног производа, јер представљају баријеру реактивним агенсима као што су кисеоник, влага, светлост, микробиолошка контаминација и повишена температура, који могу оштетити формулисани производ. Како би се регулисала размена гасова, спречио губитак или усвајање влаге и минимизирала контаминација биопроизвода, неопходно је пажљиво одабрати материјале за паковање, контролисати атмосферске услове и температуру складиштења (Teixidó и сар., 2022).

Иако су биоконтролни агенси као и биођубрива, током последњих педесет година показали значајне резултате у пољопривреди, жељени ниво успеха још увек није у потпуности достигнут. Њихова шира примена ограничена је бројним факторима. Међу најважнијим разлозима издвајају се: конкуренција између формулисаних агенаса и природне микрофлоре за исти еколошки простор, неповољне особине земљишта, присуство загађивача у земљишту и животној средини, екстремни климатски услови, недоступност одговарајућих сојева и носача, као и недостатак стручног и обученог кадра у производним погонима. Осим тога, ограничавајући фактори укључују ограничене финансијске и техничке ресурсе државе и приватног сектора, неповољне услове за складиштење и транспорт, недовољну информисаност пољопривредника, као и проблеме приликом дистрибуције (недостатак адекватне регулативе и стандарда приликом производње као и непостојање организоване мреже за промоцију ових производа) (Nosheen и сар., 2021).

3.6. Отпадни токови прехрамбене индустрије-сировина у биотехнолошкој производњи

Упркос потенцијалу постојећих биопестицида, број производа доступних на тржишту и даље је ограничен. Изостанак потпуне комерцијализације проузрокован је високим трошковима биотехнолошке производње, са акцентом на трошкове производне опреме, захтеве стерилности и коришћење комерцијалних хранљивих медијума. Употреба синтетичких подлога је економски неисплатива, али њихова главна предност је у конзистентном, хемијски дефинисаном саставу. Како би се превазишла постојећа ограничења, предлаже се коришћење алтернативних комплексних медијума који се базирају на индустријским отпадним водама, што је економски повољније и еколошки прихватљивије. Ово решење доприноси већој одрживости производног процеса чији је циљ производња биоконтролних агенаса (Fenibo и сар., 2021).

Отпадне воде прехрамбене индустрије имају велики потенцијал као сировина за производњу микробиолошких биопестицида, јер садрже високе концентрације органских и неорганских материја, што чини њихов третман обавезним пре испуштања

у животну средину (Yi и сар., 2020). Поред тога, коришћење ових отпадних вода може бити начин за њихово рециклирање, чиме се смањује индустријска потрошња свеже воде и усклађује са принципима циркуларне економије и индустријске симбиозе (Neves и сар., 2020). Међутим, пре употребе у микробиолошким процесима, потребно је извршити детаљну карактеризацију сирових отпадних вода због могућих сезонских варијација у саставу и потенцијалних инхибиторних ефеката на раст микроорганизама (Ioannou и сар., 2015).

3.6.1. Отпадне воде индустрије млека и млечних производа

Индустрија млека и млечних производа заузима значајно место у прехрамбеној индустрији јер производи нутритивно богате производе као што су млеко, сир, путер и млеко у праху, који су саставни део свакодневне исхране. Међутим, индустрија млека и млечних производа је одговорна за генерисање велике количине загађења пре свега због велике потрошње воде током производних процеса и емисије отпадних вода у животну средину. Само у Европи, приближно 29 милиона тона млечних производа годишње заврши на отпаду (Usmani и сар., 2022).

Производња сира генерише три различите врсте отпада/нуспроизвода, укључујући сирну сурутку, секундарну сирну сурутку и млечне отпадне воде (Pires и сар., 2021). Иако представља вредан нуспроизвод млечне индустрије, сирна сурутка је једна од најзахтевнијих индустријских отпадних вода за третман због свог негативног ефекта на животну средину. То је зелено-жута течност која настаје током производње сира или казеина, са процењеном глобалном производњом од око 190 милијарди килограма годишње. Сурутка чини приближно 90% укупне запремине млека, при чему задржава око 55% његових хранљивих материја, укључујући приближно 20% млечних протеина (Asunis и сар., 2020). Прекомерна количина сурутке (која износи око 9 L по сваком килограму произведеног сира), испуштена током производног процеса, изазива озбиљне проблеме за животну средину. Отпадне воде индустрије млека и млечних производа карактеришу високе вредности хемијске (ХПК) и биолошке потрошње кисеоника (БПК), због млечних протеина и лактозе коју садрже (Sar и сар., 2022). Концентрације ХПК и БПК у сирној сурутки обично се крећу између 50 и 102 g/L и између 27 и 60 g/L, редом. Однос БПК/ХПК обично прелази 0,5, што указује на високу биоразградивост овог супстрата, како у анаеробним, тако и у аеробним процесима дигестије (Carvalho и сар., 2013). Међутим, третман сурутке и других млечних отпадних вода може бити непотпун у аеробним системима или отежан у анаеробним условима услед високог садржаја органских материја и тенденције брзог закишељавања (Sar и сар., 2022). pH вредност сурутке зависи од њеног типа (кисела или слатка). Кисела сирна сурутка има pH вредност мању од 5, а добија се након ферментације или додатка органских киселина, док слатка сирна сурутка, која се добија применом протеолитичких ензима, као што је химозин, има pH вредност између 6 и 7 (Carvalho и сар., 2013). Кисела сирна сурутка има већи садржај пепела и нижи садржај протеина у поређењу са слатком сирном сурутком. Карактерише је присуство соли натријума, калијума и калцијума (0,46-10%), при чему је концентрација калцијума у киселој сирној сурутки (1,2-1,6 g/L)

приближно два пута већа у односу на вредности уочене у слаткој сирној сурутки (Asunis и сар., 2020; Carvalho и сар., 2013). Високе концентрације натријума могу изазвати проблеме у раду биолошких дигестора (Carvalho и сар., 2013).

Отпадне воде индустрије млека и млечних производа могу се пречишћавати, третирати или поново користити у другим индустријама применом технологија као што су реверзна осмоза, сушење, хидролиза, јонска размена, нанофилтрација, ултрафилтрација и електродијализа. С друге стране, биолошке методе, попут микробиолошке ферментације и анаеробне дигестије, представљају одрживију алтернативу традиционалним приступима, јер омогућавају добијање производа више вредности. Биоконверзија сурутке и других млечних отпадних вода у производе са додатом вредношћу представља једно од кључних решења савременог приступа управљању отпадом. Нуспроизводи индустрије млека и млечних производа су богат извор лактозе и других нутријената, што их чини погодним супстратом за микробни раст. Интеграција ових отпадних вода у контекст биорафинерије може значајно допринети развоју разноврсних биопроизвода у складу са принципима циркуларне економије, чиме се обезбеђује значајан подстицај даљем развоју биоекономије. Међу потенцијалним правцима валоризације издвајају се употреба нуспроизвода/отпадних вода за микробну производњу јестивих производа, попут млечне киселине, као и за производњу микробне биомасе (Sar и сар., 2022).

3.6.2. Отпадне воде индустрије вина

Грожђе представља једну од најзначајнијих воћарских култура у свету, са глобалном производњом од преко 78 милиона тона у 2020. години. Више од 70% произведеног грожђа користи се за производњу вина. Међутим, процес производње вина генерише значајне количине отпадних материја, које чине приближно 20% од укупне масе грожђа, укључујући чврсте ефлуенте као што су семенке, кожа, петељке и остаци пулпе, као и течне ефлуенте који настају током различитих фаза производње вина (Costa и сар., 2019). Процењује се да се током производње једне литре вина генерише око 1,3-1,5 kg чврстог отпада, са садржајем воде од 65-75% (Jorge и сар., 2022), док се за сваку литру произведеног вина генерише од 2 до 14 литара отпадних вода, у зависности од примењене технологије производње (Oliveira и сар., 2009). Сходно томе, управљање отпадом у винаријама представља велики изазов за винску индустрију (Ilyas и сар., 2021). Чврсти отпад из винарија може се користити за производњу сточне хране и органских ђубрива, али његову ширу примену ограничавају висок садржај влакана и ниска сварљивост (Allison и Simmons, 2018). С друге стране, ефлуенти винарија садрже вредна једињења као што су уља, полифеноли и угљени хидрати, која имају потенцијалну примену у прехрамбеној, фармацеутској, козметичкој и биоенергетској индустрији (Caldas и сар., 2018). Процес издвајања нуспроизвода винске индустрије је веома важан за смањење еколошких проблема. Савремене технологије у винској индустрији све више примењују интегрисане приступе производњи, који једнаку пажњу посвећују и производима и нуспроизводима процеса. Интензивна индустријализација, праћена техничким и научним достигнућима, омогућила је развој различитих метода за

издвајање, прераду и валоризацију отпада, што доноси значајне економске предности. У појединим случајевима, производи добијени из нуспроизвода могу имати већу тржишну вредност од самог вина. У процесу производње вина настаје више врста нуспроизвода и отпада који се могу искористити: гроздови који се одвајају пре пресовања, грапа добијена пресовањем грожђа, квасац који се таложи на дну ферментационих судова, као и каменац на зидовима судова током чувања вина (Soceanu и сар., 2021).

Отпадне воде винарија настају као резултат различитих активности, укључујући прање подова, отворених простора, опреме, флаша, буради и резервоара за складиштење вина (Calheiros и сар., 2018; Ioannou и сар., 2015). Органски садржај ових отпадних вода зависи од фазе производног процеса, али обично обухвата шећере, алкохоле, киселине и полифеноле (Vlyssides и сар., 2005). Висок садржај органских и неорганских загађивача у овим отпадним водама доводи до веома високих вредности ХПК (320-49105 mg/L) и $БПК_5$ (203-22418 mg/L). За разлику од примене чврстог отпада винарије, који се може користити као биођубриво, примена нетретираних отпадних вода винарије на земљиште без одговарајућег надзора и припреме може изменити физичко-хемијске особине подземних вода, укључујући промену боје, pH вредности и електричне проводљивости, услед ниске pH вредности ефлуената као и неповољног односа угљеника и азота (C/N). Пошто отпадне воде винарија у одређеним концентрацијама могу проузроковати значајну штету по животну средину уколико се испусте нетретиране, неопходно је развити одговарајуће технологије за њихово пречишћавање. Ефлуенти са смањеним утицајем на животну средину могу се добити применом различитих поступака, као што су физичко-хемијски, биолошки и мембрански процеси сепарације, као и напредни процеси оксидације, или комбинација ових процеса (Ioannou и сар., 2015). Узимајући у обзир широк спектар микробиолошки прихватљивих нутријената у отпаду винарија, њихова микробна конверзија у производе са додатом вредношћу се предлаже као могући поступак пречишћавања (Mahajan и сар., 2014).

3.6.3. Отпадне воде индустрије воћних сокова

У оквиру прехрамбене индустрије, фабрике за прераду воћних сокова генеришу значајне количине отпадних вода (око 10 L по једној L произведеног сока) што може представљати проблем за животну средину (Rashid и сар., 2023). Ове фабрике годишње производе милијарде тона чврстог и течног отпада. Током прераде воћа и поврћа, отпад и отпадне воде настају у различитим фазама процеса: приликом потапања и прања сирових производа, сортирања и подрезивања, парења (бланширања), прања након парног/лужног љуштења, пуњења и паковања, као и током санитације/чишћења постројења и хлађења прерађеног производа. Количина произведених отпадних вода може се разликовати у зависности од врсте прерађеног воћа и поврћа, али варира између 5,4 и 12,4 галона по тони за поврће и између 3,4 и 9,8 галона по тони за воће (Güven и Ateş, 2024). Отпадне воде од прераде воћа и поврћа карактеришу висока хемијска потрошња кисеоника (ХПК), присуство суспендованих и растворених чврстих материја, ниске концентрације хранљивих материја као што су азот и фосфор, као и ниска pH вредност (Rashid и сар., 2023), али су веома биоразградиве и садрже мање неразградивих

једињења у поређењу са отпадним водама из других индустријских сектора. С друге стране, отпад воћарске индустрије садржи корисне полифеноле, витамине и флавоноиде који су добри за људско здравље. Овај индустријски отпад је богат фенолним антиоксидансима и представља обновљив, јефтин и лако доступан извор корисних једињења (Güven и Ateş, 2024). Концентрација и врста природних органских једињења (нарочито шећера и органских киселина), конзерванаса и других адитива варирају у зависности од врсте воћа које се прерађује, као и од тога да ли се производи сок од једне или више различитих врста (Rashid и сар., 2023).

Отпадне воде из производње воћних сокова, као и све отпадне воде, морају бити правилно третиране како би се испоштовали регулаторни стандарди и прописи који се односе на испуштање у површинске воде. Због високог садржаја органских материја, биолошке методе се истичу као најпогоднije решење за њихов третман. Међутим, присуство био-рекалцитрантних једињења често ограничава ефикасност биолошких процеса (Amor и сар., 2012). Такође, сезонски рад фабрика и токсичност ових отпадних вода додатно отежавају биолошки третман. С обзиром да је око 60% укупних органских материја у овим отпадним водама присутно у раствореном облику, механичке или физичке методе саме по себи нису довољно ефикасне за пречишћавање. Због тога се за ефикасан третман отпадних вода из индустрије прераде воћних сокова најчешће примењује комбинација биолошких, физичких и хемијских метода (Güven и Ateş, 2024). Биолошки третман обезбеђује минерализацију биоразградивог дела органских материја, ефикасно смањујући вредности ХПК, након чега се хемијским третманом разграђују преостала једињења отпорна на биолошку разградњу (Amor и сар., 2012).

За третман ових отпадних вода развијене су различите физичко-хемијске методе као што су флокулација, електрокоагулација, електрооксидација и мембранска филтрација. Међутим, њихова примена у процесима индустријских размера је често ограничена због високих енергетских трошкова и велике количине генерисаног муља (Rashid и сар., 2023).

Физичко-хемијски третмани као што су коагулација и флокулација могу бити ефикасни у смањењу загађења отпадних вода, конкретно, колоидних честица и природних органских материја. Колоидне честице углавном имају негативно површинско наелектрисање, а њихова величина (од 0,01 до 1 μm) је таква да су привлачне силе између честица знатно слабије од одбојних електростатичких сила. Коагулација представља уобичајен поступак у третману вода и отпадних вода, при чему се коагуланси попут соли алуминијума и гвожђа додају у ефлуенте ради дестабилизације колоида, што доводи до агломеризације ситних честица у веће флокуле које се затим таложе (Amor и сар., 2012).

3.6.4. Биолошки третман отпадних вода прехрамбене индустрије

Претходно описане отпадне воде прехрамбене индустрије (отпадне воде индустрије млека и млечних производа, отпадне воде индустрије вина, отпадне воде

индустрије воћних сокова) изабране су као потенцијалне сировине за производњу биоконтролних агенаса на бази производног соја *Bacillus* sp. BioSol021 од стране (Dmitrović и сар., 2022, 2025) (табела 3.1.). Главни критеријуми релевантни за припрему хранљивих подлога за раст микроорганизама, у контексту састава споменутих отпадних вода, узети су у обзир током њиховог испитивања, укључујући pH вредност (како би се проверило да ли је потребно подешавање пре инокулације производног соја *Bacillus* sp. BioSol021 на оптималну pH вредност), садржај суве материје/воде, садржај шећера (ради спречавања осмотског шока и инхибиције супстратом), као и испитивање потребе за разблаживањем отпадних вода пре инокулације.

Табела 3.1. Иницијални параметри квалитета отпадних вода прехрамбене индустрије коришћених за култивацију производног микроорганизма (Dmitrović и сар., 2022, 2025)

Параметар/Ефлуент	**pH вредност**	**Сува материја/Садржај воде [%, *w/v*]**	**Садржај шећера [g/L]**
Сирна сурутка	4,90	5,81/94,19	50,28^{L}
Отпадна вода из винарије	3,60	17,01/82,99	19,12^{F} 22,11^{G}
Отпадна вода из производње воћних сокова	4,92	0,5/99,5	2,47^{F} 3,28^{G}

L-лактоза, F-фруктоза, G-глукоза

Непосредно пре култивације pH вредност сурутке из производње сира коригована је на 7,0±0,1 применом 1M NaOH. Отпадна вода из винарије је пре култивације разблажена у односу 1:3 (v/v) помоћу дестиловане воде, након чега је pH вредност медијума за култивацију такође коригована на 7,0±0,1 применом 1M NaOH. Отпадна вода из производње воћних сокова је коригована додатком 3,5 g/L ($(NH_4)_2SO_4$), 0,3 g/L (K_2HPO_4) и 0,3 g/L ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), након чега је pH вредност медијума за култивацију коригована на 7,0±0,1 применом 1M NaOH. Стерилизација хранљивих медијума вршена је у аутоклаву при температури од 121 °C и притиску 2,1 bar током 20 минута. Култивација производног микроорганизма *Bacillus* sp. BioSol021 у трајању од 96 h при температури од 28 °C, вршена је у лабораторијском биореактору запремине 16 L (EDF – 15.4_1, A/S Biotehniskais centrs, Riga, Letonija). Након 96 h култивације добијени су култивациони медијуми чији су параметри квалитета наведени у табели 3.2.

Табела 3.2. Параметри квалитета култивационих медијума заснованих на отпадним водама прехрамбене индустрије (Dmitrović и сар., 2022, 2025)

Параметар/Ефлуент	**pH вредност**	**Садржај биомасе [g/L]**	**Садржај шећера [g/L]**
Сирна сурутка	9,13	4,27	35,20^{L}
Отпадна вода из винарије	5,92	3,52	13,00^{F} 6,63^{G}
Отпадна вода из производње воћних сокова	5,66	3,31	0,98^{F} 0,84^{G}

L-лактоза, F-фруктоза, G-глукоза

Виши садржај биомасе у медијуму на бази сурутке у односу на друга два културациона медијума, објашњен је богатијим нутритивним саставом, посебно азотом, који је кључан за синтезу протеина и ДНК, тј. за формирање микробне биомасе. Садржај протеина у сурутки креће се у распону од 1,4 до 8,0 g/L, што је чини вредним нуспроизводом. Такође значајно је присуство хидролизованих протеина, пептида и слободних аминокиселина, који омогућавају лакшу апсорпцију хранљивих материја од стране микроорганизама. Захваљујући повољном азотном профилу, сурутка се може користити за микробни раст и синтезу метаболита без додатка азотних једињења. Поред тога, сурутка је добар извор фосфора, што додатно погодује расту микроорганизама.

Пад концентрације угљеничних извора током културације, објашњен је нутритивним захтевима производног микроорганизма *Bacillus* sp. BioSol021 за умножавање, раст и метаболичку активност ћелија. Асимилација угљеничних извора од стране *Bacillus* sp. BioSol021 довела је до смањених остатака лактозе, глукозе и фруктозе у медијумима на крају културације, при чему је стопа искоришћења лактозе из медијума на бази сирне сурутке била 30%, стопа искоришћења глукозе и фруктозе из медијума на бази отпадне воде из винарије била је 70%, односно 32%, редом. Док је стопа искоришћења глукозе и фруктозе из медијума на бази отпадне воде из производње воћних сокова 60,32%, односно 74,39%, редом.

Смањење садржаја угљеничних извора, као главних загађивача медијума на бази отпадних вода, има велики значај са аспекта еколошке ефикасности развијеног биопроцесног решења јер позитивно утиче на смањење еколошког оптерећења. Осим аспекта одрживости, важно је истаћи и економске уштеде које проистичу из смањене потребе за водом у фази припреме медијума. За медијуме на бази сурутке и отпадне воде из производње воћних сокова постигнуто је 100% смањење потрошње воде, јер су коришћене саме отпадне воде без разблажења као медијуми за културацију. Код отпадне воде из винарије, која је разблажена због веома високих почетних концентрација шећера (како би се избегла инхибиција супстратом), остварена је уштеда воде од 25% (Dmitrović и сар., 2022, 2025).

3.7. Процес накнадне обраде културационог медијума

Процес накнадне обраде (ПНО) (енгл. *downstream process*) је сложен поступак који обухвата издвајање и пречишћавање производа из ферментационог медијума. Овај процес обухвата неколико фаза као што су сепарација биомасе, ослобађање интрацелуларних производа, концентрисање, пречишћавање и формулација финалног производа (Wang Y. и сар., 2019). У случају интрацелуларних или мембранских производа, овим корацима претходи поступак разарања ћелија (Beschkov и Yankov, 2021). Прва фаза ПНО је сепарација микробне биомасе, након чега следи даљи третман биомасе или супернатанта. За сепарацију биомасе развијене су бројне методе као што су гравитационо таложење, центрифугирање и филтрација. Међутим, ове методе обично подразумевају високу потрошњу енергије и значајне оперативне трошкове (Wang Y. и

сар., 2019). У циљу смањења укупних трошкова издвајања и повећања ефикасности процеса, предтретман има кључну улогу. Он подразумева примену процеса коагулације и/или флокулације, којима се подстиче формирање ћелијских агрегата или флокула чиме се побољшава ефикасност сепарације биомасе претходно наведеним методама (Yenkie и сар., 2016).

Приликом дизајнирања процеса биосепарације, потребно је узети у обзир више фактора који утичу на ефикасност и исплативост процеса. Међу најважнијим факторима су: врста и природа полазног материјала, локација и концентрација циљне супстанце, запремина полазног материјала, стабилност и биоактивност производа. Поред техничких аспеката, важно је размотрити и минимизацију отпада као и укупне трошкове процеса (Beschkov и Yankov, 2021).

Процес накнадне обраде је веома важан за цео процес формирања производа јер су концентрације циљних производа обично веома ниске. Ова чињеница подразумева да су потребни дуги, захтевни, енергетски интензивни процеси који захтевају скупу опрему, при чему трошкови накнадне обраде могу достићи чак 50% од укупних трошкова производње одређених производа (Beschkov и Yankov, 2021) (табела 3.3.). Према томе, прво што је неопходно размотрити приликом процеса издвајања је оптимизација приноса производа приликом пред-производног процеса (енгл. *upstream process*). Висока концентрација производа која долази до фазе издвајања смањује обим накнадне обраде, као и пратеће трошкове сепарације (Clarke, 2013).

Табела 3.3. Удео трошкова процеса накнадне обраде у укупним трошковима производње (Straathof, 2011)

Производ	**ПНО (% од укупних производних трошкова)**	**Продајна цена ($/kg)**
Кукурузни етанол	24	0,68
Липаза (сирови раствор)	27	78
Лимунска киселина	20-30	2,2[а]
Млечна киселина (70%)	36	1[а]
Bt-инсектицид	55	8
Интрацелуларни протеини	56	1300[а]
Хумани инсулин	92[б]	75 000

а-нема података о продајној цени, али је изведен закључак на основу производних трошкова

б-трошкови процеса накнадне обраде укључују скупе ензимске кораке производње

У зависности од тога да ли су производи интрацелуларни или екстрацелуларни, потребно је применити различите стратегије. Екстрацелуларни производи су обично растворљиви и могу се акумулирати у медијуму, што чини њихово издвајање релативно једноставним. Међутим, често се дешава да се производи акумулирају интрацелуларно, што знатно отежава њихово издвајање. Главна препрека у ослобађању интрацелуларних производа јесте чврст ћелијски зид микроорганизама (Wang Y. и сар., 2019).

Када се производи налазе унутар цитоплазме или на површини ћелија, неопходно је спровести поступак екстракције пре почетка пречишћавања. То подразумева

дезинтеграцију ћелија и раздвајање ћелијског екстракта од чврстог остатка. Добијени екстракт затим пролази кроз један или више процеса усмерених на концентрисање и пречишћавање растворљивих компонената (Clarke, 2013).

Интрацелуларни производи попут ензима (L-аспарагиназа, каталаза, холестерол оксидаза и глукоза изомераза) и генетског материјала издвајају се из ћелија процесом руптуре ћелија и издвајања екстракта од насталих ћелијских фрагмената. Међутим, микроорганизми су отпорнији него што се обично претпоставља, а њихова отпорност потиче од унутрашњег осмотског притиска. Руптура ћелија се може извршити помоћу механичке руптуре (разарања), немеханичке руптуре или комбинацијом механичке и немеханичке руптуре (Beschkov и Yankov, 2021; Clarke, 2013).

Механичка руптура млевењем абразивним керамичким перлама је једна од најчешћих и најуспешнијих метода дезинтеграције у процесима великих размера. Хомогенизација односно разарање под високим пнеуматским или хидрауличним притиском је такође често коришћен метод механичког разарања ћелија, који се може примењивати и при повећању размера процеса, уз одржање добре ефикасности. У овом процесу, суспензија ћелија се пропушта кроз уски вентил под високим притиском (10^5 kPa), где силе смицања разбијају ћелије. Други начини механичког разарања ћелија, попут ултразвука, користе се углавном на лабораторијском нивоу јер су ефикасни за разарање ћелија, али нису погодни за рад у процесима индустријских размера (Clarke, 2013).

Немеханичка руптура ћелија обухвата физичке, хемијске и биолошке методе које омогућавају ослобађање интрацелуларних производа без потпуног разарања ћелијске структуре. Најчешћа физичка метода заснива се на изазивању промене фаза у суспензији ћелија, што доводи до формирања кристалне структуре и руптуре ћелија. Ова метода је углавном погодна само за примену у процесима мањих размера. Друге физичке методе укључују руптуру ћелијских зидова услед осмотског шока употребом пуфера, растварача или шећера, као и термичког шока током којег се ћелије разарају кристалима леда. Осмотски шок се посебно користи за ослобађање периплазматских ензима. Хемијске методе подразумевају употребу литичких агенаса као што су алкалије, растварачи и детерџенти који растварају или дисосују ћелијске зидове. Иако ефикасне, ове методе могу бити превише агресивне и довести до денатурације осетљивих производа, а поред тога, њихова примена у индустријским размерама често изазива проблеме са трошковима и одлагањем отпадних хемикалија. Биолошка руптура користи литичке ензиме који хидролизују полисахариде ћелијског зида или антибиотике који ометају његову синтезу. Овај приступ је селективан и ефикасан, али углавном ограничен на специфичне производе и често скуп. Сматра се да су немеханичке методе блаже од механичких јер обично само перфорирају или повећавају пропустљивост ћелијске мембране, без потпуног разарања ћелија. Због тога се често разматрају комбиновани приступи, као што је примена антибиотика и осмотског шока, који могу побољшати ефикасност процеса и смањити оштећење производа (Clarke, 2013; Najafpour, 2015).

Многе студије се фокусирају на методе које олакшавају разарање ћелија или конструкцију система за њихову самолизу. Лиза ћелија може се постићи увођењем гена за лизирање, након чега се врши регулација раста ћелија и лизе. Уколико би се разарање ћелија вршило на овај начин, заобилажењем механичких корака у разарању ћелија, сам процес накнадне обраде био би поједностављен, што би довело до значајног смањења трошкова (Wang Y. и сар., 2019).

Након разарања ћелија, следећи корак је уклањање ћелијских остатака што се може спровести применом филтрације (у комбинацији са центрифугирањем), у случају издвајања циљних ензима. За екстракцију вредних производа, који су углавном протеини, примењују се методе као што је ултрафилтрација, типична за протеински инжењеринг (Beschkov и Yankov, 2021).

Фазна сепарација може се спровести применом претходно поменутих техника као што су седиментација, центрифугирање, филтрација, флотација, микрофилтрација, ултразвучно раздвајање, као и додатним поступцима као што су растварање, диференцијална дигестија и употреба различитих мембранских технологија-ултрафилтрација, обрнута осмоза и нанофилтрација (Yenkie и сар., 2016).

Након уклањања крупних честица, чврстих материја и биомасе, следећи корак је концентрисање производа различитим техникама. Најраспрострањеније технике су испаравање (евапорација) и дестилација (Beschkov и Yankov, 2021).

У случајевима када су саме ћелије крајњи производ (нпр. *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis* намењени за индустрију хране и пића), поступак се завршава финалним операцијама као што је сушење (Clarke, 2013). Остали процеси које је могуће применити у циљу концентрисања производа су: екстракција, евапорација, преципитација, адсорпција и дестилација (Yenkie и сар., 2016).

Последња фаза процеса зависи од физичког стања производа, његове намене и захтеваног степена чистоће. Током процеса пречишћавања и усавршавања, главне примесе које остају су трагови копроизвода са сличним својствима као што је циљни производ, као и растварачи и обојене материје. Обојене нечистоће могу се уклонити бељењем, док су первапорација, сушење, кристализација и хроматографија ефикасне методе за уклањање органских растварача, воде и копроизвода (Yenkie и сар., 2016).

3.7.1. Методе сепарације микробне биомасе и ферментационих производа

Гравитационо таложење представља једноставан и енергетски ефикасан метод сепарације микробне биомасе (Barros и сар., 2015). Заснива се на природној способности ћелија да се након завршетка ферментације, престанка мешања и аерације, таложе под утицајем гравитације (Wang Y. и сар., 2019). Ефикасност гравитационог таложења зависи од величине и густине ћелија. Међутим, микробиолошке ћелије су обично превише мале и лагане, па је процес таложења спор и често недовољно ефикасан за индустријску примену. Због тога се у пракси често примењују помоћни кораци као што

су коагулација и флокулација, како би се формирали већи и тежи агрегати ћелија. То се постиже додатком флокуланата или подстицањем самоагрегације, а у неким случајевима и генетским инжењерингом ради постизања аутофлокулације. Иако се гравитациони таложници сматрају једноставним и јефтиним решењем, без претходне коагулације или флокулације постижу се веома ниске концентрације биомасе, због чега се гравитационо таложење најчешће користи као први корак у комбинацији са другим методама унутар накнадног процеса обраде (Barros и сар., 2015; Wang Y. и сар., 2019).

Центрифугирање и ултрацентрифугирање су методе које се заснивају на разликама у густини између издвојених ћелија или производа и ферментационог медијума. Центрифугирање је уобичајен начин за издвајање микробиолошке биомасе, док се ултрацентрифугирање користи за издвајање биоактивних молекула и макромолекула као што су ензими, хормони, протеини и ћелијски отпад (Wang Y. и сар., 2019). Ове методе се успешно примењују у лабораторијским условима, али када се примењују на индустријском нивоу, суочавају се са бројним ограничењима, као што су сложеност процеса, велике капиталне инвестиције и велика потрошња енергије (Najjar и Abu-Shamleh, 2020).

Флокулација, а посебно аутофлокулација, представља ефикасан метод за издвајање ћелија током производње биогорива и других биопродуката, при чему омогућава економичну оптимизацију издвајања биомасе, чинећи процес лакшим и јефтинијим (Wang Y. и сар., 2019). Коагуланти, попут соли поливалентних катјона (Al^{3+}, Fe^{3+}), неутралишу електрични набој колоидних честица, смањују њихов ζ-потенцијал и олакшавају агломерацију честица. Коагуланти се користе за уклањање финих суспензија из отпадних вода и за издвајање биомасе са површине. Флокуланти, као што су наелектрисани полимери (полисулфонати, поликарбонати или полиамини), примењују се ради појачаног таложења чврстих материја и ефикаснијег издвајања биомасе. Избор одговарајућег флокуланта заснива се на наелектрисању колоидних честица (негативно наелектрисани полисулфонати, поликарбонати или позитивно наелектрисани полиамини). Након коагулације и флокулације, култивациона течност без биомасе се процеђује, а седимент са знатно мањом запремином и садржајем воде се подвргава филтрацији (Beschkov и Yankov, 2021). Иако процес коагулације/флокулације представља економски исплативу методу сепарације микроорганизама, трошкови коагуланата, односно флокуланата могу чинити значајан део укупних трошкова процеса (4-7%), због чега се разматра употреба природно доступних флокулишућих агенаса (Dubreuil и сар., 2017).

Испаравање има за циљ уклањање вишка воде из културационе течности како би се концентрисао жељени производ до прихватљиве концентрације, што омогућава накнадне процесе издвајања. Пошто су концентрације производа обично ниске (до 10 g/dm^3), велика количина воде мора бити уклоњена да би се постигла концентрација од око 100 g/dm^3, која је погодна за даљу обраду. Узимајући у обзир да је већина ферментационих производа термички нестабилна, испаравање треба да се врши на

ниским температурама, најчешће под вакуумом, како би се избегла деградација термолабилних компоненти (Beschkov и Yankov, 2021).

Мембрански процеси представљају ефикасну алтернативу за издвајање производа, посебно када су концентрације веома ниске и када испаравање није изводљиво. У мембранске процесе спадају: филтрација (микрофилтрација, ултрафилтрација, реверзна осмоза), електродијализа, мембранска хроматографија, мембранска емулзификација, а избор конкретне методе зависи од величине честица које треба уклонити или издвојити из течности (Beschkov и Yankov, 2021). Филтрација је једна од најчешће коришћених метода за сепарацију микробних ћелија из ферментационог медијума, и заснива се на мембранама или филтрима са различитим величинама пора. Микрофилтрација, која се користи за сепарацију честица величине од 0,1 до 10 μm, обично се примењује за сепарацију микроорганизама. Карактеристике филтрације могу се значајно мењати у зависности од морфолошке разноврсности ћелија, укључујући варијације у величини и облику ћелија (Wang Y. и сар., 2019). Мембрански процеси имају значајну примену у десалинизацији воде, концентрисању и издвајању протеина, као и у биотехнологији, где се често срећу термички нестабилни производи у ниским концентрацијама (Beschkov и Yankov, 2021). Мембрански процеси сепарације одликују се ниском потрошњом енергије, једноставном применом, повољним односом трошкова и ефикасности, као и компактношћу и флексибилношћу у дизајну опреме, што их чини веома атрактивним решењем за индустријску примену. Лако се могу интегрисати у производни процес, при чему доприносе поједностављењу поступка пречишћавања производа (Dubreuil и сар., 2017).

После грубог концентрисања вакуумским испаравањем или мембранским процесима, следећи корак је фина екстракција циљног производа. У случају органских производа који имају добру растворљивост у органским растварачима, као што су антибиотици, екстракција растварачем представља ефикасну методу за селективно издвајање циљног производа. Након екстракције, растварачи се могу уклонити дестилацијом, што омогућава добијање производа високе чистоће. Једна од најприкладнијих техника екстракције у оквиру биотехнологије је центрифугална екстракција. Ова метода има два режима рада: са радом мешача и таложника у центрифугалном пољу или комбиновани. Предности комбинованог режима рада су боље распршивање и брза фазна сепарација у ротирајућем бубњу центрифуге. Ова врста уређаја може радити у серијама или континуирано, чинећи процес веома интензивним и ефикасним (Beschkov и Yankov, 2021).

Одвајање чврстог производа се може постићи кристализацијом (хлађењем концентрованог раствора) или сушењем (испаравањем у струји топлог ваздуха). Сушење, обухвата испаравање воде из концентрованих раствора који садрже производ или директно сушење добијеног концентрата до прашкастог облика. Ова техника се широко користи за припрему финалних производа ниског квалитета који морају бити у сувом стању, као што су адитиви (нпр. L-лизин за сточну храну) и једноћелијски протеини (Beschkov и Yankov, 2021). Међутим, важно је водити рачуна о термичкој

осетљивости производа, микробних ћелија или хемикалија, јер поступци и услови сушења могу утицати на квалитет производа као и њихово уништење (Guerrero и сар., 2003).

3.7.2. Стратегија смањења трошкова приликом процеса накнадне обраде

Како би се развила стратегија за контролу и смањење трошкова, први корак подразумева детаљну анализу технологије и трошкова који у највећој мери доприносе високој цени процеса накнадне обраде. У табели 3.4. наведени су најзначајнији циљеви у оквиру стратегије за контролу и смањење трошкова као и њихов потенцијални утицај на процес или производ (Prasad, 2010).

Табела 3.4. Стратегија за контролу и смањење трошкова приликом процеса накнадне обраде (Prasad, 2010)

Циљ	Утицај на процес или производ
Побољшање оперативне ефикасности	Смањење производних трошкова Оптимална искоришћеност производних капацитета Нижи капитални трошкови Повећана ефикасност биосепарације
Повећање приноса производа	Смањење трошкова намењених за супстрате Смањена продукција топлоте и CO_2 Смањење потребе за контролом температуре Смањена количина отпада
Модификација катаболичких способности	Прелазак на повољније, алтернативне супстарте Избегавање нежељене производње полисахарида, што смањује број корака пред-третмана
Модификација физичко-хемијских карактеристика значајних за биопроцес	Додатна својства, као што је способност флокулације, стабилност мицелија и спорулација, као и већа стабилност соја, што доприноси смањењу како капиталних тако и оперативних трошкова и олакшава сепарациони процес Повећана ефикасност приликом припреме инокулума као и током повећања размера процеса
Побољшање квалитета производа	Смањење производних трошкова услед мањег броја нечистоћа Мања подложност ензимској деградацији
Модификација производа	Побољшана екстрактибилност услед додатка бочних ланаца Измењена термичка стабилност услед промене структуре протеина
Промена локације производа	Лакше издвајање производа, како би се избегле технике разарања ћелија Избегавање стреса и денатурације производа услед примене техника разарања ћелија

3.8. Флокулација као метода сепарације биомасе микроорганизама

Коагулација је процес дестабилизације суспензије или раствора, чији је главни циљ превазилажење фактора који доприносе стабилности система. Овај процес се подстиче додавањем коагуланата, односно супстанци које подстичу дестабилизацију. Након коагулације, долази до флокулације, процеса у коме се дестабилизоване честице подстичу на међусобно приближавање, контакт и формирање већих агломерата. Овај процес се подстиче додавањем флокуланата, супстанци које се додају дестабилизованој суспензији или раствору како би се убрзао процес флокулације или ојачале флокуле које се формирају током флокулације. Граница између коагулације и флокулације је често нејасна, јер већина коагуланата може истовремено обављати обе функције (Ravina, 1993).

Честице које је потребно флокулисати углавном су колоидно стабилне услед постојања одбојних сила између њих. У стабилним суспензијама, судари између честица не резултују њиховим спајањем, па самим тим не долази до флокулације. Како би се омогућило спајање честица, неопходно је дестабилизовати суспензију, што може бити постигнуто физичким путем (нпр. загревањем), променом pH вредности, или у већини случајева додатком специфичног дестабилизујућег агенса (Gregory, 2013).

Реакције дестабилизације колоида у воденим дисперзијама проистичу из више механизама. Преовлађујући механизам у великој мери зависи од два фактора:

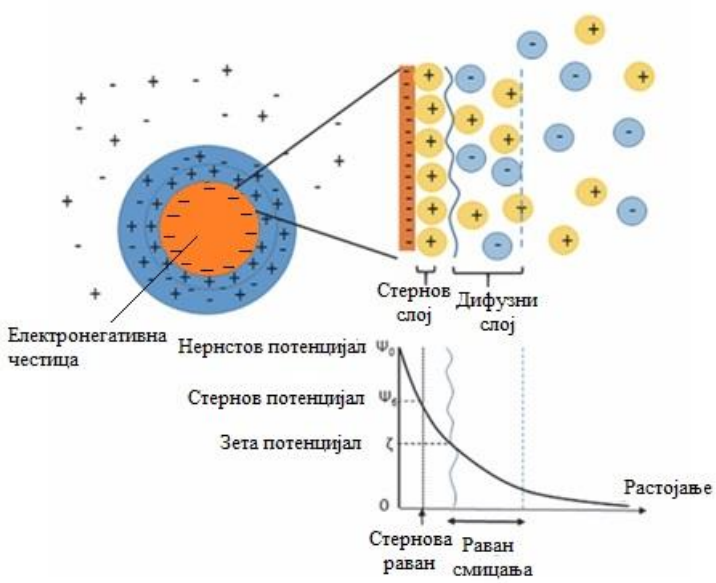
- Природе колоидне дисперзије, укључујући површинска својства честица и интензитет њиховог површинског наелектрисања.

- Типа коагуланта додатог у колоидну дисперзију (ненаелектрисан или наелектрисан), интензитета наелектрисања у случају наелектрисаних коагуланата, адсорптивног капацитета и способности формирања мостова између суседних колоидних честица (Bratby, 2016).

Како би се постигла ефикасна коагулација, односно флокулација неопходно је разумети начин на који честице међусобно интерагују, при чему велики утицај има њихово електрокинетичко наелектрисање. Колоидне честице носе истоимено наелектрисање, које је у природи углавном негативно, што доводи до међусобног одбијања честица и спречавања флокулације. Уколико се то наелектрисање смањи или уклони долази до формирања флокула које се брзо таложе и лако филтрирају (Ravina, 1993).

Површинско наелектрисање колоида утиче на расподелу јона у раствору (Bratby, 2016). Укупан електрични потенцијал на површини примарно наелектрисане честице назива се Нернстов потенцијал (Suopajärvi, 2015). Негативно наелектрисани колоид привлачи позитивне јоне (контра-јоне), узрокујући да се неки од њих чврсто вежу за површину колоида формирајући слој који се назива Стернов слој. Остале позитивне јоне

и даље привлачи негативно наелектрисани колоид али сада их одбијају позитивно наелектрисани јони из Стерновог слоја. Као резултат тога успоставља се динамичка равнотежа, што доводи до формирања дифузног слоја контра-јона. У оквиру дифузног слоја, концентрација позитивних јона је највећа у близини површине колоида, и постепено опада са удаљеношћу, све док не постигне равнотежу са концентрацијом у остатку раствора. Супротно томе, долази до мањка негативних јона у непосредној близини површине, јер их негативно наелектрисани колоид одбија, али њихова концентрација постепено расте како позитивни јони ублажавају одбијајуће силе негативно наелектрисаног колоида, све док се поново не успостави равнотежа са концентрацијом јона у раствору. Густина наелектрисања је највећа на самој површини колоида и опада како се концентрације позитивних и негативних јона изједначавају. Контра-јони у Стерновом слоју и наелектрисана атмосфера у дифузном слоју чине електрични двослој. Негативно наелектрисани колоид и његова позитивно наелектрисана атмосфера стварају електрични потенцијал кроз дифузни слој (Ravina, 1993). Између Стерновог и дифузног слоја налази се раван смицања, при чему разлика у електричном потенцијалу између равни смицања и расутог раствора представља зета потенцијал (слика 3.1.), који одређује ефективни потенцијал на површини честице (Suopajärvi, 2015). Зета потенцијал је највиши на равни смицања и постепено опада са удаљеношћу, достижући нулу на спољашњој граници дифузног слоја (Ravina, 1993). Са порастом зета потенцијала, одбојне силе између честица истог наелектрисања постају јаче, што доводи до повећања стабилности суспензије (Suopajärvi, 2015).



Слика 3.1. Концептуални приказ електричног двослоја (Suopajärvi, 2015)

ДЛВО теорија (названа по Дерјагину, Ландау, Вервеју и Овербеку) објашњава механизам интеракције између колоидних честица. Теорија се ослања на равнотежу између две супротстављене силе: електростатичког одбијања и ван дер Валсовог привлачења. Када се две честице приближе и њихови електрични двослоји почну да се преклапају, долази до пораста електростатичког одбијања. Како би се одбијање између

честица савладало потребна је енергија. Ниво потребне енергије расте како се честице приближавају једна другој. Ван дер Валсово привлачење настаје као резултат привлачних сила између појединачних молекула у колоидним честицама. Тај ефекат је адитиван, што значи да један молекул из првог колоида има ван дер Валсову привлачну силу према сваком молекулу из другог колоида. Ово се понавља за сваки молекул у првом колоиду, а укупна сила представља збир свих појединачних интеракција (Ravina, 1993).

Процес флокулације одвија се у две фазе. Прва фаза, перикинетичка флокулација, резултат је термичке агитације (Брауновог кретања) и представља природан процес који почиње одмах након дестабилизације и траје само неколико секунди, јер постоји ограничена величина флокула изнад које Брауново кретање нема значајан ефекат. Иако се потенцијлна енергетска баријера између колоидних честица може превазићи термалном кинетичком енергијом Брауновог кретања, како се честице спајају, енергетска баријера расте пропорционално површини флокула, због чега перикинетичка флокулација таквих потенцијално одбијајућих честица престаје (Iwuozor, 2019). Пошто Брауново кретање готово никада не доводи до настанка флокула довољне величине неопходан је неки други облик кретања честица (Gregory, 2013). Друга фаза процеса флокулације, ортокинетичка флокулација, зависи од примењеног градијента брзине у течности, као кључног параметра за брзину овог процеса (Iwuozor, 2019). Флокулација која се на овај начин остварује има велики практични значај (Gregory, 2013).

Процес коагулације/флокулације је релативно једноставан физичко-хемијски метод сепарације. У првој фази, коагулацији, користе се позитивно наелектрисана једињења која дестабилизују колоидне честице у суспензији. Након тога, у другој фази, флокулацији, дестабилизоване честице се подстичу на међусобно повезивање и формирање агломерата, односно спајају се у веће честице, што доводи до њиховог таложења (Benalia и сар., 2024; Ghafari и сар., 2009). Циљ флокулације је створити флокуле одговарајуће величине, густине и чврстоће које ће касније бити уклоњене процесима таложења и филтрације. Идеална величина флокула обично је између 0,1 mm до око 3 mm, у зависности од методе сепарације која се користи (Iwuozor, 2019).

Флокулација је техника која се примењује у различитим гранама индустрије, као што су прерада воде и отпадних вода, текстилна индустрија, рударство, козметичка и фармацеутска индустрија, прехрамбена индустрија (пиварска индустрија) (Vollan, 2019). У овим индустријама, флокулација се користи за уклањање мањих количина нечистоћа из течности, при чему је течност крајњи производ. С друге стране, када се флокулација примењује за издвајање алги или бактерија, биомаса је финални производ (Min и сар., 2022).

Технике флокулације за издвајање биомасе микрорганизама могу се поделити у три главне категорије: физичке, хемијске и биолошке. Свака од ових техника има своје предности и ограничења, као и факторе који одређују њихову укупну ефикасност (Min и сар., 2022). Физички процеси флокулације омогућавају добијање биомасе микроорганизама без контаминације, па се добијена биомаса може користити као храна,

сточна храна, гориво или ђубриво. Међутим, процеси који укључују рад апарата као што су центрифуге и вакуумски филтри захтевају велике количине енергије, што значајно повећава трошкове производње биомасе. Хемијски процеси флокулације користе конвенционалне хемикалије попут алуминијума, гвожђе хлорида и гвожђе сулфата, које су јефтине и погодне за примену у процесима великих размера, али се често акумулирају у издвојеној биомаси, што онемогућава њену употребу у сточној храни и храни. Биомаса издвојена на овај начин може се користити искључиво као гориво. Биолошки процеси флокулације имају слична ограничења као хемијски процеси, јер употреба микроорганизама или њихових метаболита такође може довести до контаминације биомасе и тиме ограничити њену примену. Дакле, главни изазови процеса флокулације су високе цене флокуланата, енергетски интензивни процеси и добијање биомасе одговарајуће чистоће (Singh и сар., 2023).

У бројним истраживањима предложена су алтернативна решења која могу превазићи ограничења конвенционалних процеса флокулације. Једно од најперспективнијих решења су природни флокуланти добијени из отпадних биогених материјала, који могу бити биљног (биополимери екстраховани из биљног отпада као што су кора банане, листови кактуса, кора цитруса, екстракт сочива, кора маниоке, целулоза, скроб, танини, итд.) и животињског порекла (биополимери добијени из животињских отпадних материјала). Отпадни материјали животињског порекла који имају способност флокулације обухватају хитозанске егзоскелетне делове (љуштуре, шкољке) љускара као што су шкампи, ракови, итд., калцификоване ендоскелетне делове (кости) риба и других морских животиња, калцификоване спољне омоте љуски јаја, масти, итд. Након одређених третмана, који варирају од једноставних до комплексних, ови материјали се сврставају у групу органских полимера и показују изузетну ефикасност у процесима флокулације. Посебно се истичу хитин и хитозан, као и прах богат калцијумом добијен из љуски јаја, који су се показали као веома ефикасни природни флокуланти за широк спектар микроалги као што су *Neochloris oleoabundans, Chlorella* sp., *Desmodesmus subspicatus* и *Tetradesmus obliquus*. Ови природни флокуланти су јефтини, нетоксични и биоразградиви, а њиохом употребом смањују се енергетски и еколошки проблеми (Singh и сар., 2023).

3.8.1. Физичка флокулација

Физичка флокулација користи физичке силе као што су електрицитет, магнетизам или ултразвук за агрегирање честица, без додатка хемијских агенаса, што је чини еколошки прихватљивом методом (Li S. и сар., 2020).

У ултразвучном пољу, ћелије микроорганизама имају тенденцију да се агрегирју у чворове ултразвучног таласа и потом таложе под утицајем гравитације. Развијен је уређај за ултразвучно издвајање микроорганизама који постиже до 75% ефикасности при протоку од 25 mL/min и потрошњи енергије од 3,6 kWh/m^3. Међутим, висока енергетска потрошња и потреба за специјализованом опремом ограничавају примену на индустријском нивоу (Li S. и сар., 2020).

У процесу електрофлокулације, флокулација се индукује електролизом металних јона који се ослобађају са галванских анода. Негативно наелектрисане ћелије микроорганизама померају се ка аноди, где долази до смањења наелектрисања, што доводи до формирања агрегата (Li S. и сар., 2020). Недавни лабораторијски резултати су показали да је електрофлокулација ефикасна техника за издвајање биомасе, међутим примена ове методе у индустријским размерама је и даље ограничена због високе потрошње енергије и могућег оштећења опреме (Min и сар., 2022).

Магнетне наночестице (нпр. Fe_3O_4) директно се вежу за површину ћелија и индукују флокулацију у присуству магнетног поља, чиме се омогућава издвајање ћелија из медијума. Ова метода укључује могућност поновног коришћења наночестица, као и производњу биомасе без ризика од контаминације, али њена примена је ограничена високом ценом магнетних наночестица и специјализоване опреме потребне за њихово издвајање (Li S. и сар., 2020).

3.8.2. Хемијска флокулација

Према карактеристикама хемијских флокуланата, хемијска флокулација се дели на флокулацију неорганским флокулантима и флокулацију органским флокулантима. Неоргански флокуланти, попут соли алуминијума и гвожђа (нпр. $Al_2(SO_4)_3$, $Fe_2(SO_4)_3$, $FeCl_3$, поли-алуминијум хлорид (PAC)) обично делују путем неутрализације наелектрисања. Поред тога, Al^{3+} и Fe^{3+} могу формирати агрегате као што су $[Al_2(OH)_3]_n$ и $[Fe(OH)_3]_n$, који делују на ћелије путем механизма умрежавања полимерним ланцима (енгл. *bridging*). На одређеној pH вредности, ове металне соли могу формирати велике количине талога, као што су $Al(OH)_3$ и $Fe(OH)_3$, који подстичу флокулацију и таложење микроорганизама путем механизма захватања (енгл. *net-sweeping*) (Li S. и сар., 2020). Главни недостаци примене неорганских флокуланата су могућа контаминација биомасе током процеса накнадне обраде као и генерисање велике количине отпада, уз ограничену могућност рециклирања култивационог медијума (Yin и сар., 2020).

Флокулација полимерима је један од најчешће примењиваних облика флокулације како на лабораторијском, тако и на индустријском нивоу. Употреба полимерних флокуланата није скупа, а они резултују већом ефикасношћу издвајања биомасе у поређењу са металним јонима. Због тога се полимерни флокуланти детаљно проучавају на различитим нивоима, од лабораторијског, преко полуиндустријског, до индустријског (Min и сар., 2022).

Органски полимерни флокуланти могу бити природни (нпр. хитозан, катјонски скроб, сурфактанти и целулоза) или синтетички (полиакриламид) (Li S. и сар., 2020). Анјонски и нејонски полимери обично показују слабу ефикасност флокулације микроорганизама када се користе самостално, јер је површина микроорганизама негативно наелектрисана. Међутим, катјонски полимери ефикасније изазивају агрегацију микроорганизама, јер имају способност да неутралишу или смање њихов јонски површински набој, што доводи до флокулације (Min и сар., 2022). Главни

механизми флокулације органским полимерним флокулантима су неутрализација наелектрисања, механизам умрежавања полимерним ланцима и механизам захватања. Такође, површински набој микроорганизама, pH вредност и густина ћелија у суспензији значајно утичу на ефикасност флокулације органским флокулантима (Li S. и сар., 2020).

Полиакриламид је синтетички полимер молекулске масе 4-20 милиона. Поседује позитивно наелектрисану и хидрофилну групу (-$CONH_2$), што му омогућава неутрализацију и повезивање микроорганизама. Хитозан добијен из љуски ракова, је природни катјонски полимер, који у киселој средини јонизује амино групе и делује путем адсорпционог механизма умрежавања полимерним ланцима. Његове главне предности су биоразградивост и нетоксичност, што омогућава употребу издвојене биомасе у различите сврхе (као што су сточна храна и биогорива). Међутим, главне мане су висока цена и потреба за већим дозама, што га чини неприкладним за примену у процесима већих размера. Катјонски скроб се добија увођењем квартерне амонијум групе на крај ланца скроба. Због своје инхерентне структуре, полимеризованог молекула, катјонски скроб има дуалну функцију, неутрализације наелектрисања и адсорпционог механизма умрежавања полимерним ланцима, при чему је флокулација ефикаснија у киселој средини, а у алкалној се формирају веће и стабилније флокуле. Природни биљни екстракти, као што су кора банане и наранџе, представљају еколошки прихватљиве флокуланте, са потенцијалом за искоришћење биолошког отпада, укључујући и љуске јаја (Li S. и сар., 2020).

Иако органски флокуланти попут хитозана, катјонског скроба и биљних екстраката показују добре резултате, висока цена и енергетски захтевна производња представљају изазов. Хитозан, на пример, је еколошки прихватљивији од неорганских флокуланата попут алуминијум-сулфата, не доводи до контаминације биомасе, али је истовремено знатно скупљи. Због тога је при избору оптималног флокуланта потребно пронаћи компромис између ефикасности, трошкова и утицаја на животну средину (Li S. и сар., 2020; Yin и сар., 2020).

3.8.3. Биолошка флокулација

Биолошка флокулација се односи на флокулацију коју изазивају различити микроорганизми као што су самофлокулишуће алге, бактерије, гљиве и квасци, или екстрацелуларне полимерне супстанце (биофлокуланти) које производе поменути микроорганизми. Иако бројна истраживања настоје да повећају ефикасност и применљивост ове методе, већина стратегија је потврђено само на лабораторијском нивоу, без успешних примена у индустријским размерама. Поред тога, биофлокулација је дуготрајан процес који је често недоследан, зависно од сојева микроорганизама (Li S. и сар., 2020).

Аутофлокулација није само спонтано таложење ћелија микроорганизама одређених сојева, већ и агрегација изазвана додатком алкалија или потрошњом CO_2 како би се повећала pH вредност медијума (Li S. и сар., 2020). При високим pH вредностима,

негативно наелектрисана површина ћелија се дестабилизује услед промене изоелектричних услова (Kurniawan и сар., 2022). Поред тога, агрегација може бити резултат нутритивног стреса и присуства металних јона. Аутофлокулација се често повезује са таложењем карбоната и ко-таложењем јона магнезијума и калцијума када је pH вредност висока. Будући да овај процес не захтева додавање хемикалија, медијум се може поново користити током процеса повећања обима производње (Li и сар., 2020).

Главне предности биолошке флокулације су одсуство хемијских флокуланата и одрживост процеса, али механизам још није у потпуности разјашњен, што захтева додатна истраживања. Укупни трошкови биофлокулације укључују нутријенте, одржавање опреме и енергију за осветљење, мешање и контролу температуре. Коришћење природне сунчеве светлости и отпадних материјала као извора угљеника може значајно смањити трошкове. Биолошка флокулација је комплексна и зависи од више фактора, укључујући садржај хранљивих материја, pH вредност, врсту микроорганизама, као и врсту и количину флокуланта (Li S. и сар., 2020). Детаљно проучавање и боље разумевање механизама биофлокулације, укључујући механизам електростатичких мрља и механизам умрежавања полимерним ланцима, могло би значајно допринети оптимизацији процеса и смањењу трошкова биолошке флокулације (Yin и сар., 2020).

3.8.4. Механизми флокулације

Четири главна механизма флокулације приликом употребе неорганских и органских флокуланата су: механизам умрежавања полимерним ланцима (енгл. *bridging*), неутрализација наелектрисања, механизам електростатичких мрља (енгл. *patching*) и механизам захватања (енгл. *sweeping*) (Singh и сар., 2023).

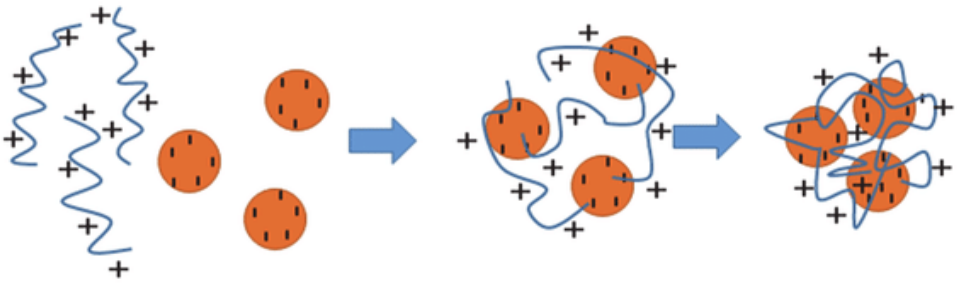
Постоји неколико процесних параметара који утичу на механизам флокулације, као што су тип и концентрација флокуланта, pH вредност, зета потенцијал, температура, време и брзина мешања. Ови кључни параметри имају значајну улогу у процесу сепарације биомасе микроорганизама (Iwuozor, 2019; Singh и сар., 2023).

Како би се адекватно одредили оптимални услови за целокупан процес, потребно је применити поступак тестирања у којем се сваки параметар секвенцијално одржава константним док се одређује оптимална вредност другог параметра (Iwuozor, 2019).

3.8.4.1. Механизам умрежавања полимерним ланцима

Механизам умрежавања полимерним ланцима (енгл. *bridging*) је најистакнутији механизам издвајања микроорганизама коришћењем биокоагуланата/биофлокуланата и јавља се приликом употребе компонената на бази полимера или скроба (Kurniawan и сар., 2022). Када се адсорбујући полимер дода суспензији честица, један полимерни ланац може да се повеже са две или више честица, што се не догађа истовремено, осим у веома концентрованим суспензијама. Међутим, када се ланац причврсти за једну

честицу, судари са другим честицама могу довести до полимерног повезивања између њих (слика 3.2.). На овај начин, честице формирају агрегате иако су наелектрисане и међусобно се одбијају. Предуслов за полимерно повезивање је да постоји довољно слободне површине на честици за приањање полимерних сегмената са ланаца који су причвршћени за друге честице и да полимерни мостови буду довољно дугачки како би се превазишло растојање на којем делује међучестична одбојност. Везивање полимерних ланаца резултује јачим међучестичним везама него што то чине ван дер Валсове силе, чему значајно доприноси флексибилност полимерних мостова јер је неопходно истезање пре него што дође до прекида веза, односно мостова. Полимерним повезивањем настају чврсте флокуле, већих димензија које могу достићи и неколико милиметара, међутим када дође до нарушавања њихове структуре, највероватније се неће поново формирати, што може бити последица пуцања полимерних ланаца или одбијања адсорбованих полимерних сегмената. Полимери са већом молекулском масом показују већу ефикасност као флокуланти. Из сличног разлога се сматра да су линеарни полимери ефикаснији од разгранатих или умрежених структура са истом молекулском масом. У случају полиелектролита, густина наелектрисања може бити важан параметар. Јако наелектрисани ланци имају тенденцију да заузму шире конфигурације и због тога су ефикаснији агенси за повезивање (Tadros, 2013).

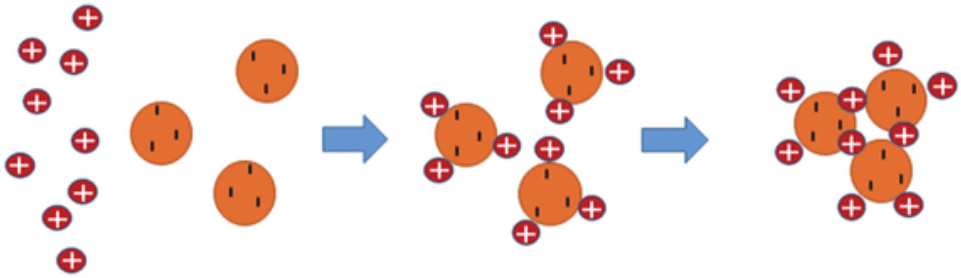


Слика 3.2. Механизам умрежавања полимерним ланцима (Suopajärvi, 2015)

3.8.4.2. Неутрализација наелектрисања

Механизам издвајања честица (микроорганизама) путем неутрализације наелектрисања одвија се када позитивно наелектрисани коагуланти/флокуланти, хидролизују након растварања у води и ступају у интеракцију са честицама (микроорганизмима) које у природи углавном имају негативно наелектрисање (слика 3.3.). Интеракција дестабилизује површински набој микроорганизама (елиминишући енергетску баријеру и смањујући одбијање наелектрисања), што омогућава микроорганизмима да се агломерирају и таложе (Kurniawan и сар., 2022). Ове електростатичке интеракције се одвијају смањујући густину површинског набоја колоидних и суспендованих честица. Смањење густине површинског набоја доводи до смањења електростатичког отпора између честица, чиме долази до њиховог приближавања и формирања великих флокула. Дакле, механизам неутрализације наелектрисања за флокулацију биомасе може се дефинисати као неутрализација негативног површинског наелектрисања ћелија адсорпцијом било ког позитивно

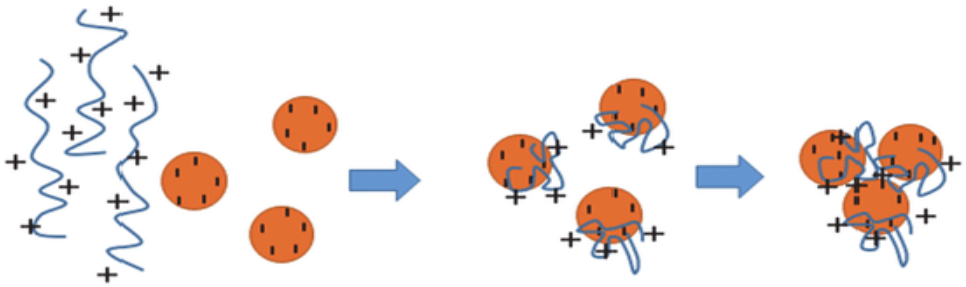
наелектрисаног јона или полимера (Singh и сар., 2023). У пракси се показало да су полиелектролити ниске молекулске масе врло ефикасни, снажно се адсорбују на негативно наелектрисане честице, неутралишу њихово наелектрисање и изазивају дестабилизацију. Полиелктролити високе густине наелектрисања имају тенденцију да се адсорбују у готово равној конфигурацији, што смањује могућност интеракције путем механизма умрежавања полимерним ланцима, због чега неутрализација наелектрисања може бити главни механизам дестабилизације (Gregory, 2013).



Слика 3.3. Механизам флокулације путем неутрализације наелектрисања (Suopajärvi, 2015)

3.8.4.3. Механизам електростатичких мрља

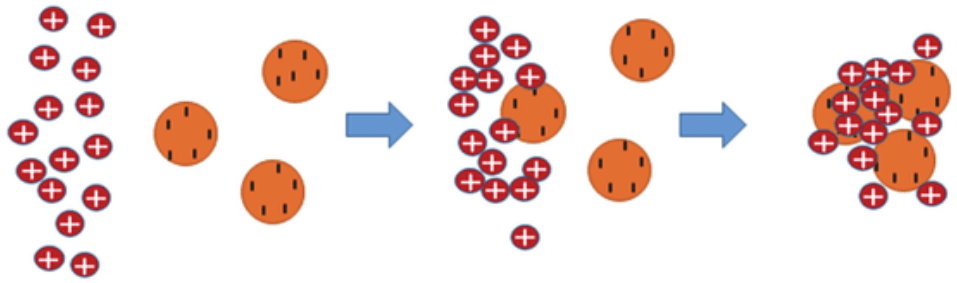
Ефекат електростатичких мрља (енгл. *patching*), је механизам неутрализације супротног наелектрисања. Полимери који повезују микроорганизме адсорбују се на површину и стварају позитивно наелектрисање на тој површини. Позитивно наелектрисање привлачи друге ћелије, што доводи до ефикасне флокулације. У суштини, флокуланти или полиелектролити доводе суседне честице у близину због развоја електростатичких интеракција између негативно наелектрисаних места на површинама честица и позитивно наелектриснаих ”флека” на флокулантима (слика 3.4.). Утврђено је да су флокуле формиране овим механизмом јаче од оних формираних током неутрализације наелектрисања, али слабије од флокула формираних приликом умрежавања полимерним ланцима. Међутим, за разлику од механизма умрежавања, механизам електростатичких мрља омогућава лакше поновно флокулисање након што флокуле пукну. Када је у питању овај механизам, углавном се користе органски полимери (Singh и сар., 2023).



Слика 3.4. Механизам електростатичких мрља (Suopajärvi, 2015)

3.8.4.4. Механизам захватања

Овај механизам се јавља када је pH вредност система у базном стању и применом металних коагуланата/флокуланата или хитозана. Механизам захватања (енгл. *sweeping*) је феномен у коме се микроорганизми таложе помоћу чврстог облика хидроксида/депротонованог хитозана који се формира након хидролизе у воденом раствору или интеракцијом метала са хидроксидним јонима при базним pH вредностима (слика 3.5.) (Kurniawan и сар., 2022). Када су присутне велике количине металних хидроксида ($M(OH)_3$), јони метала као што су Mg^{2+} и Ca^{2+} подстичу формирање талога, док металне соли, кроз хидролизу, формирају позитивне јоне који флокулишу негативно наелектрисане ћелије електростатичком силом. Овај процес је сличан неутрализацији, али када се концентрација флокуланта повећава, достиже се праг изнад којег ефекат флокулације опада, што може довести до стварања велике количине муља на крају процеса флокулације. Генерисање муља може изазвати еколошке проблеме (Singh и сар., 2023).



Слика 3.5. Механизам захватања (Suopajärvi, 2015)

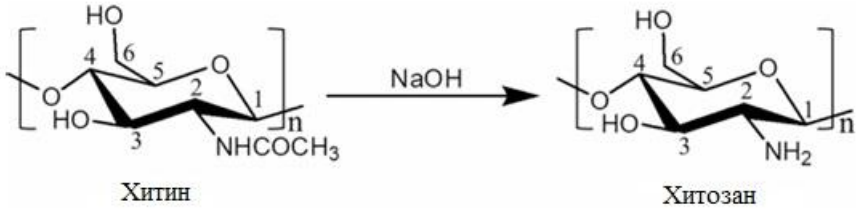
3.9. Флокуланти

Неефикасна примена коагуланата и флокуланата на бази алуминијума и гвожђа доводи до високих оперативних трошкова и контаминације биомасе металима. Неорганski флокуланти производе велике количине муља, а металне соли нису погодне за примену у биомаси која се користи као сточна храна или ђубриво. Поред тога, флокуланти који садрже алуминијум могу бити носиоци канцерогених једињења. Због тога је приоритет проналажење природних, нетоксичних и некорозивних флокуланата, безбедних за употребу. На индустријском нивоу, када је потребно издвојити велике количине биомасе из културационог медијума, кључно је развијати економичне алтернативе за третман великих запремина културационе течности, као и обезбедити довољну производњу биомасе која омогућава њену комерцијалну примену као производа ниске вредности (Hadiyanto и сар., 2022).

3.9.1. Хитозан

Хитин је након целулозе најзаступљенији природни полисахарид, који се добија хемијском екстракцијом из спољашњег скелета ракова (чини око 14-35% љуски ракова, док остатак чине протеини и калцијум карбонат), мекушаца и зглавкара. Такође, налази се у структури цитоплазматских мембрана одређених гљива и алги (Rkhaila и сар., 2021). Хитозан, дериват хитина, је линеарни кополимер D-глукозамина и N-ацетил-D-глукозамина, повезаних β-1,4 гликозидним везама, произведен алкалном деацетилацијом хитина (Renault и сар., 2009) (слика 3.6.). Хитозан је растворљив у киселој воденој средини услед протоновања амино група, док висок садржај ацетилованих јединица у хитину спречава његово растварање (Aranaz и сар., 2021). Конверзија хитина у хитозан обухвата неколико основних корака који започињу деминерализацијом (са HCl), затим депротеинизацијом (са NaOH или KOH), а завршавају се деколоризацијом (Rkhaila и сар., 2021). Хитозан има јединствена својства међу биополимерима, нарочито због присуства примарних амино група, а представља комерцијално интересантан спој због високог садржаја азота у поређењу са целулозом. Молекулска маса и степен деацетилације хитозана су кључни структурни параметри који утичу на његову растворљивост, конформацију и чврстину ланца у раствору. Ови параметри зависе од производног процеса (Renault и сар., 2009). Степен деацетилације, који према дефиницији представља уклањање ацетил групе (-$COCH_3$) са молекула (Реакција 1), може се користити за разликовање хитозана и хитина, јер одређује садржај слободних амино група биополимера (Rkhaila и сар., 2021).

$$R - NHCOCH_3 + OH^- \rightarrow R - NH_2 + CH_3COO^-$$



Хитин Хитозан

Слика 3.6. Хемијска структура молекула хитина и хитозана (Li J. и Zhuang, 2020)

На основу степена деацетилације хитозан се може класификовати на: хитозан ниског степена деацетилације у опсегу од 55% до 70%, средњег степена од 70% до 85%, високог степена од 85% до 95%, и изузетно високог степена деацетилације између 95% и 100% (Rkhaila и сар., 2021). Степен деацетилације је повезан са густином наелектрисања и утиче на ефикасност неутрализације наелектрисања, док је молекулска маса повезана са механизмима флокулације који укључују механизам умрежавања полимерним ланцима и механизам захватања. Слободне амино групе присутне у његовој полимерној ланчаној структури могу бити протоноване у киселом окружењу, што доводи до његовог понашања као типичног катјонског полиелектролита. Хитозан, који показује двоструку функцију (коагуланта и флокуланта), неутрализује негативно наелектрисане групе и олакшава флокулационе процесе (Rasweefali и сар., 2024).

Ланци хитозана имају изузетно високе масе у распону од 1 MDa до 3 MDa, у зависности од начина екстракције и врсте жељене примене. Молекулска маса утиче на растворљивост хитозана и његове реолошке особине, претежно његову вискозност. Висока вискозност ограничава могућност руковања концентрованим растворима хитозана, због чега је потребно постићи равнотежу између крутости система (која је подстакнута високом молекулском масом хитозана) и реолошких својстава раствора (лакше руковање полимерима са ниском масом). Поред молекулске масе, растворљивост хитозана зависи и од pH вредности (Rkhaila и сар., 2021). Олигомери хитозана растворљиви су у широком pH опсегу, од киселог до базног. Насупрот томе, хитозан веће молекулске масе, растворљив је само у киселим воденим срединама (при pH<6,5), чак и при високом степену деацетилације. Ова ограничена растворљивост у неутралним и базним срединама условљава ограничену примену хитозана у условима који захтевају физиолошке вредности pH (~7,4) (Aranaz и сар., 2021).

Последњих година, хитозан је привукао велику пажњу, због својих својстава, као што су биокомпатибилност, биоразградивост, нетоксичност и специфичних карактеристика, попут улоге у формирању биофилма, хелирања и адсорпције, као и антимикробне активности против широког спектра микроорганизама, као што су алге, бактерије, квасци и плесни (Kumar M. N. V. R., 2000).

Хитозан је подложан разградњи бројним ензимима попут хитиназе, хитосаназе, декстраназе, пектиназе, липазе, пепсина, папаина, панкреатина и лизозима, док се само хитиназа, хитосаназа и лизозим сматрају специфичним. Међутим, и неспецифични ензими као што су α-амилазе и липазе такође могу утицати на деградацију хитозана (Rkhaila и сар., 2021).

У овом тренутку, производња хитина и хитозана зависи од љуски ракова и шкампи које се одбацују од стране индустрије конзервисане хране, и сматра се да је економски исплатива, посебно ако се у њу укључи издвајање каротеноида. За производњу 1 kg 70% деацетилованог хитозана из љуски шкампи, потребно је 6,3 kg HCl и 1,8 kg NaOH, заједно са азотом, процесном водом (0,5 t) и водом за хлађење (0,9 t). Најважнији фактори у процени трошкова производње укључују транспорт, који варира у зависности од посла и локације. Међународна цена хитозана (у малим количинама) износи 7,5 USD/10 g (према ценовнику *Sigma-Aldrich*-а) (Rkhaila и сар., 2021).

3.9.1.1. Фактори који утичу на антимикробну активност хитозана

Хитин, хитозан и њихови деривати испољавају антимикробно деловање против различитих микроорганизама, укључујући бактерије, плесни и квасце. Ипак, до данас је хитозан признат од стране регулаторних агенција само као помоћна супстанца у лечењу болести (Aranaz и сар., 2021). Да би хитозан испољио своју антимикробну активност, мора продрети кроз ћелијску мембрану микроорганизама. Ефикасност тог процеса зависи од више фактора као што су молекулска маса хитозана, степен деацетилације хитозана, концентрација хитозана, pH вредност, порекло хитозана, температура, фаза

ћелијског раста ћелија, тип микроорганизама као и композити хитозана са металима и металним оксидима. Интеракција између хитозана и бактеријских ћелија углавном се заснива на електростатичким интеракцијама. Позитивно наелектрисане амино групе хитозана реагују са негативно наелектрисаним молекулима на површини бактеријских ћелија. Ове интеракције доводе до повећане пермеабилности ћелијске мембране, што узрокује цурење унутрашњих супстанци и на крају смрти бактеријске ћелије (Li J. и Zhuang, 2020). Међутим, неке студије указују на смањење пермеабилности ћелијске мембране услед везивања полимера на површину ћелија, што онемогућава приступ нутријентима. Овај процес настаје услед интеракције -NH_2 група у ланцима хитозана са -COO- групама на спољашњим мембранама микроорганизама (Aranaz и сар., 2021). Такође, хитозан може утицати на експресију ДНК везујући се за нуклеинске киселине (Li J. и Zhuang, 2020). Претпоставља се да ови механизми нису међусобно искључиви, већ да више процеса истовремено доприноси инхибицији раста ћелија (Aranaz и сар., 2021).

Хитозан ниже молекулске масе и вишег степена деацетилације има јаче позитивно наелектрисање и показује јачу антимикробну активност, нарочито према грам-позитивним бактеријама. Ниже концентрације хитозана омогућавају боље везивање за ћелијске зидове, док више концентрације могу спречити цурење ћелијског садржаја услед превелике обавијености ћелија. Хитозан је најефикаснији у киселој средини (pH<6,5), јер се тада амино група хитозана протонује са NH_3^+ и омогућава јаку електростатичку интеракцију са негативно наелектрисаним мембранама микроорганизама. Са порастом pH вредности антимикробна активност хитозана опада. Хитозан добијен из различитих извора (нпр. хитин из ракова, гљива или инсеката) може варирати по структури и ефикасности. Хитозан показује појачану антимикробну активност са порастом температуре у опсегу од 4 до 37 °C, али му се ефикасност смањује током дужег складиштења. Раствор хитозана складиштен на 25 °C има сличну или слабију антибактеријску активност у поређењу са раствором хитозана складиштеним на 4 °C (Li J. и Zhuang, 2020). Хитозан испољава антимикробну активност у свима фазама раста ћелија (Li J. и Zhuang, 2020), али су ћелије у касној експоненцијалној фази углавном најосетљивије на хитозан (Rkhaila и сар., 2021). Истраживања су показала да хитозан има израженији бактерицидни ефекат према грам-позитивним бактеријама (нпр. *Listeria monocytogenes, B. megaterium, B. cereus, Staphylococcus aureus, Lactobacillus plantarum, L. brevis, L. bulgaris* и др.), јер њихова ћелијска мембрана садржи дебели слој пептидогликана и теихоичних киселина, снажно наелектрисаних негативним фосфатним групама. Ове групе омогућавају електростатичку интеракцију са катјонским антибактеријским једињењима, попут соли хитозана, што чини грам-позитивне бактерије осетљивијим на хитозан. Међутим, друга истраживања сугеришу да су грам-негативне бактерије (нпр. *Escherichia coli, Pseudomonas fluorescens, Salmonella typhimurium, Vibrio parahaemolyticus* и др.) осетљивије на хитозан, јер површина њихових ћелија има већи негативни набој (Kyoon No и сар., 2002; Li J. и Zhuang, 2020). Хитозан је познат и по својим антифунгалним својствима у односу на различите врсте гљива, осим оних које садрже хитозан као важан састојак свог ћелијског омотача, као што су зигомицете (Rkhaila и сар., 2021). Веома је ефикасан у инхибицији клијања спора,

продужетку клициног влакна и инхибицији радијалног раста (Sahai и Manocha, 1993). Олигомери хитозана дифундују у хифе и ометају активности ензима који су одговорни за раст гљива (Eweis и сар., 2006). Показано је да хитозан има корисна својства у борби против фитопатогених сојева као што су *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* и *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, *Penicillium digitatum*, *Pyricularia grisea* (Rkhaila и сар., 2021). Такође, мишљења се разликују у погледу тога да ли хитозан има јачи антимикробни ефекат против бактерија или плесни (Dutta и сар., 2009; Jeon и сар., 2001; Kyoon No и сар., 2002; Li J. и Zhuang, 2020). Комбинација хитозана са металима (нпр. сребром, цинком) и металним оксидима (Ag_2O, CuO, ZnO, TiO_2) значајно побољшава његову антибактеријску активност, услед бољег везивања за ћелијске зидове и изазивања цурења интрацелуларних компоненти. Хемијска модификација хитозана (кватернарни амонијум хитозан, карбоксиметил хитозан, сулфонисани хитозан и фосфорилисани хитозан) доводи до побољшања електростатичког наелектрисања и, самим тим, антимикробне активности. Најуспешнији су деривати који комбинују модификације на више позиција у молекулу (Li J. и Zhuang, 2020).

3.9.1.2. Примена хитозана

Хитозан се користи у разним областима као што су биомедицински инжењеринг, фармација, стоматологија, офталмологија, биотехнологија, хемија, виноградарство, пољопривреда, прехрамбена, козметичка, текстилна и индустрија целулозе и папира (Renault и сар., 2009).

Прехрамбена индустрија користи његове антибактеријске и антифунгалне особине како би смањила употребу синтетичких конзерванаса. Изузетна својства хелирања омогућавају примену хитозана у обради отпадних вода, док су његове слободне амино групе способне да вежу све прелазне метале и радионуклиде. Употреба хитозана у пољопривреди показује ефекте на убрзање раста биљака и побољшање приноса. Његове биолошке особине чине га погодним за биомедицинску примену у својству антимикробног агенса, хемостатског агенса као и за лечење рана. Такође се интензивно истражује као систем за ограничено отпуштање терапијских агенаса путем оралних, трансдермалних, очних и носних путева. Хитозан успорава раст многих паразита и бактерија. Поред тога, има имунолошка, антитуморска, антибактеријска и антифунгална својства. Изазива активацију макрофага и стимулише производњу циркулишућих антитела (Rkhaila и сар., 2021).

Хитозан се може користити као носилац за активне компоненте биопестицида и (био)ђубрива, чиме се доприноси смањењу губитака (Sharif и сар., 2018). Хитозан има повољне ефекте на раст и цветање, како монокотиледона тако и дикотиледона. Резултати добијени на парадајзу потврђују овај ефекат, јер третман прскањем хитозана омогућава побољшање свих агрономских параметара биљке, као што су специфична тежина, број листова и број грана, у поређењу са органском фумигацијом и третманом са синтетичким аминокиселинама. Примена хитозана утиче на широк распон параметара,

као што су морфологија (висина биљке, број листова), раст (апсолутна брзина раста, укупна брзина раста, релативна маса биљке), принос (број и величина плодова) и биохемијски параметри (редукција нитрата и фотосинтеза). Примена хитозана повећава апсорпцију минералних хранљивих материја попут фосфора, калијума, азота, магнезијума и калцијума, што стимулише раст биљака третираних хитозаном. Функционалне групе хитозана (хидроксилне и амино групе) омогућавају формирање комплекса са јонима гвожђа, цинка и бакра, чинећи га одрживом алтернативом синтетичким хелатним агенсима. Његова катјонска својства такође га чине погодним носачем за испоруку додатних есенцијалних хранљивих материја. Семенке натопљене хитозаном показале су повећање стопе клијања, дужине и тежине хипокотила и радикуле у семену уљане репице. Такође, се сматра корисним за побољшање стопе клијања купуса, бундеве, чилија и краставца. Премазивање семена хитозаном побољшава клијање и потенцију садница. Поред тога, истакнуто је да третирање семена киселим раствором хитозана побољшава виталност кукуруза (Rkhaila и сар., 2021). Хитозан се може применити и као агенс за подстицање биљног имунитета и обогаћивање земљишта (Orzali и сар., 2017), што резултира побољшањем физиолошког стања биљака и дужег постжетвеног рока трајања пољопривредних производа. Хитозан такође побољшава имунитет биљака, стимулишући одбрамбене механизме и повећавајући отпорност на патогене. Поред тога, хитозан побољшава доступност воде за биљке и повећава њихову толеранцију на сушу, салинитет и високе температуре (Zhang и сар., 2022), чиме помаже у смањењу абиотичког стреса биљака (Bandara и сар., 2020).

Сви ови разлози подржавају примену хитозана као агенса за флокулацију, који се користи за сепарацију бактеријских антагониста као потенцијалних агенаса за биолошку контролу. Такође, хитозан може бити коришћен у формулацијама које имају неколико корисних својстава за финалне производе биолошке контроле, намењене примени у пољопривреди. У већини случајева, формулације биопроизвода на бази хитозана могу се применити као чврсте формулације (за обогаћивање земљишта) или након ресуспензије у води (за премазивање семена, фолијарно прскање и премазивање плодова и површина након бербе) (Shahrajabian и сар., 2021).

3.9.1.3. Синергистички ефекат хитозана са *Bacillus* врстама

Због присуства слободне амино групе, хитозан је растворљив у благо киселим воденим растворима, који имају честу примену у пољопривреди. Тестови на гајеним биљкама показали су да хитин и његови копроизводи могу бити коришћени као средства за контролу биљних болести (фунгициди), ђубрива (агенси за кондиционирање земљишта), бактерициди, нематициди и антиперспиранти. Хитин и његови копроизводи побољшавају или подстичу природне механизме одбране биљака и препознају се као стимулатори раста биљака, регулатори раста и агенси против стреса. Употреба ендофитских бактерија има позитиван ефекат на стимулацију раста биљака кроз различите механизме, синтетишући хормоне раста (фитохормоне) и повећавајући доступност нутријената биљкама (биођубрива). Примери биоконтролних и биофертилизационих агенаса су сојеви рода *Bacillus* који подстичу раст и развој биљака

путем фитохормона (гиберелина, етилена, ауксина и цитокинина) и ензима (1-аминоциклопропан-1-карбоксилне киселине, хитиназе, целулазе, итд.). Поред тога, ови сојеви подржавају минерализацију нутријената (солубилизација цинка, фосфата и калијума), фиксацију азота и високу апсорпциону способност корена. Сходно томе, комбинација хитина/хитозана са ендофитским сојевима је веома корисна како за подстицање раста, тако и за имунизацију биљака против биотских болести (Rkhaila и сар., 2021).

С обзиром на то да величина полимера хитозана ограничава њихову употребу као промотора раста биљака, развој ендофитских бактерија са хитинолитичком активношћу гарантује разградњу полимера, чиме се олакшава апсорпција производа разградње од стране биљака. Осим што индукује активност хитиназе и промовише раст бактерија, додавање хитина је такође показано као корисно за бактерије. Комбинација хитозана и ендофитских бактерија повећала је индекс виталности семена кукуруза (*Zea mays* L.) за више од 36,44% у поређењу са контролом (Rkhaila и сар., 2021).

Претходна истраживања су потврдила антифунгалну активност микроорганизама *Bacillus* sp. соја BioSol021 против фитопатогених и микотоксигених гљива *Aspergillus flavus* (Vlajkov и сар., 2022). Токсични *Aspergillus* сојеви су контаминанти пољопривредних производа, укључујући три водеће пољопривредне културе: пшеницу, пиринач и кукуруз, што представља проблем за безбедност хране и сточне хране, међународну трговину, као и људско и животињско здравље (Vlajkov и сар., 2021).

3.9.1.4. Флокулација хитозаном

Хитозан поседује карактеристике и коагуланта и флокуланта, захваљујући високој катјонској густини наелектрисања и дугим полимерним ланцима. Његова примена је оправдана из два главна разлога: прво, јер је нетоксичан и биоразградив; и друго, јер показује изузетно добре хелационе особине. Ова физичко-хемијска својства чине га веома ефикасним у интеракцијама са различитим контаминантима, укључујући честице и растворене супстанце (Renault и сар., 2009). Поред дуголанчане структуре, хитозан садржи велики број слободних амино група дуж полимерног ланца које се у киселој средини протонују, због чега се понаша као типичан катјонски полиелектролит. Управо катјонска природа омогућава хитозану добру флокулациону ефикасност, пре свега путем механизма неутрализације наелектрисања и механизма умрежавања полимерним ланцима, што је посебно значајно приликом третмана воде, јер већина контаминаната има негативно површинско наелектрисање (Yang R. и сар., 2016).

Бројни фактори утичу на структуру и особине раствора полимерних флокуланата, а самим тим и на механизам и ефикасност флокулације (Yang R. и сар., 2016):

1. Порекло и природа хитозана (степен деацетилације, молекулска маса и услови активације сировог биополимера);

2. Утицај промењљивих процеса, као што су опрема, додавање реагенса, доза коагуланта, тип киселине која се користи за растварање хитозана, време реакције, брзина мешања и градијент брзине;

3. Врста загађивача и њихова физичко-хемијска својства као што су поларитет и хидрофилност;

4. Карактеристике раствора, укључујући pH вредност, јонску јачину, зета потенцијал, боју, концентрацију колоидних честица, присуство нечистоћа (као што су растворене соли или трагови елемената као што су јони и хемикалије) и температура (Renault и сар., 2009).

Ефективан опсег дозе флокуланта зависи од доминантног механизма флокулације. Када преовлађује механизам неутрализације наелектрисања, оптимални опсег доза је углавном уско дефинисан (Yang R. и сар., 2016). У таквим условима, прекомерно додавање флокуланта може довести до поновне стабилизације суспензије и смањења ефикасности флокулације (Renault и сар., 2009). Насупрот томе, уколико је доминантан механизам електричних мрља, прекомерне дозе флокуланта обично не умањују ефикасност, због чега је опсег дозирања флокуланта знатно шири. Осим тога, pKa вредност хитозана и густина његовог наелектрисања мењају се у зависности од pH вредности раствора. Уопштено, ефикасност флокуланата на бази хитозана расте при нижим pH вредностима, јер се у таквим условима остварује ефикаснија неутрализација наелектрисања и израженији ефекат умрежавања полимерним ланцима. То је последица повећане густине позитивног наелектрисања и развијеније конформације полимерног ланца хитозана у воденим растворима. Потреба за нижом дозом флокуланта при вишим температурама, објашњава се двема појавама. Прва је смањење вискозности течне фазе са порастом температуре, што повећава Брауново кретање колоида и учесталост судара, омогућавајући лакше формирање већих честица. Друга појава је израженије развијање полимерних флокуланата услед боље растворљивости на вишим температурама, што резултује ефикаснијом флокулацијом (Yang R. и сар., 2016).

Један од најважнијих параметара који треба узети у обзир при креирању експерименталног дизајна је растворљивост хитозана, која је врло тежак параметар за контролисање. Хитозан је линеарни хидрофилни кополимер са крутом структуром која садржи глукозамин и ацетилглукозамин. Он није растворљив у води или органским растварачима, али се раствара у разблаженим органским киселинама као што су сирћетна и мрављa киселина, као и у неким неорганским киселинама (са изузетком сумпорне киселине). При pH вредностима испод 5, хитозан постаје растворљив катјонски полимер са високом густином наелектрисања. Третман хитозана киселинама доводи до протоновања амино група дуж ланца, што олакшава електростатичке интеракције између полимерних ланаца и негативно наелектрисаних контаминаната. Растворљивост хитозана зависи од неколико фактора, као што су степен деацетилације, молекулска маса, расподела ацетилних група дуж макромолекулског ланца, тип и концентрација киселине која се користи за растварање полимера, концентрација полимера и јонска јачина. Такође, степен деацетилације утиче на pKa (константа

дисоцијације киселине), што има ефекта на наелектрисање, вискозност и растворљивост (Renault и сар., 2009).

При флокулацији микробних ћелија, хитозан у киселим срединама постаје позитивно наелектрисан и привлачи негативно наелектрисане ћелије микроорганизама. Ови јони смањују електронегативност микроорганизама и подстичу њихову седиментацију адсорпцијом полимерних ланаца. У алкалним растворима, амино групе хитозана постају нејонизоване или слабо негативне, што смањује ефикасност флокулације. Флокулација је најефикаснија када негативно наелектрисане ћелије коегзистирају, при чему хитозан делује као биофлокулант и омогућава формирање флокула. Доза хитозана и брзина мешања утичу на ефикасност издвајања и количину добијене биомасе (Hadiyanto и сар., 2022).

У процесу, коагулације/флокулације, брзина таложења формираних флокула је такође важна јер утиче на укупне трошкове и ефикасност. Познато је да додавање флокуланта има значајан утицај на време таложења, у случају хитозана, повећање величине флокула, погодује брзини њиховог таложења чиме се смањује време таложења (Renault и сар., 2009).

У табели 3.5. приказани су резултати испитивања ефикасности флокулације различитих микроорганизама применом хитозана, при чему су наведени услови флокулације, укључујући pH вредност и концентрацију хитозана као најзначајније факторе ефикасности. Zhu и сар. (2018) испитивали су ефикасност флокулације биомасе микроалги *Chlorella vulgaris* култивисаних на модификованом Бристол медијуму, док су Rashid и сар. (2013) испитивали ефикаснсот флокулације микроалги *Chlorella vulgaris* али култивисаних на BG-11 (*Blue-Green*) медијуму. Chen и сар. (2013) су испитивали флокулацију *Scenedesmus* sp. на BB медијуму (*Bold Basal Medium*), док су de Godos и сар. (2011) проучавали ефикасност хитозана у флокулацији микроалги узгајаних на отпадној води са фарме свиња. Zou и сар. (2018) су користили BG-11 и SE медијум (*Selenite Enrichment Medium*). Blockx и сар. (2018) су радили са *Wright's cryptophyte medium*-ом. Hadiyanto и сар. (2022) култивисали су микроалге на нутритивно обогаћеној води. Поред микроалги Strand и сар. (2002) су испитали и флокулацију бактеријских сојева попут *E. coli, Enterobacter cloacae, Serratia marcescens, Microccocus luteus, Bacillus megaterium* и *Pseudomonas* sp. култивисане на *Luria–Bertani medium*-у. Tharunkumar и сар. (2025) су испитивали утицај хитозана на флокулацију три соја квасаца: *Trichosporon pullulans, Rhodotorula glutinis* и *Yarrowia lipolytica*, који су култивисани на MGYP (*Malt extract-Glucose-Yeast extract-Peptone medium*) медијуму. Разлике у хемијском саставу културационих медијума примењених за културацију микроалги и бактерија у оквиру претходно наведених истраживања, директно утичу на: састав и наелектрисање површине ћелија микроорганизама, pH вредност и јонску јачину раствора, присуство органских и неорганских једињења као и количину и тип екстрацелуларних метаболита, што се последично рефлектује на ефикасност флокулације.

Табела 3.5. Поређење флокулационе ефикасности хитозана у односу на различите врсте микроорганизама и услове флокулације

Микроорганизам	**Концентрација**	**pH**	**Ефикасност (%)**	**Литература**
Chlorella vulgaris	250 mg/L	9,5	91,9	Zhu и сар., 2018
Chlorella vulgaris	50 mg/L	9,5	92,3	
Chlorella vulgaris	120 mg/L	6	99	Rashid и сар., 2013
Scenedesmus sp.	80 mg/l	9	95	Chen и сар., 2013
Chlorella sp.	200 mg/L	8	96,12	Hadiyanto и сар., 2022
Scenedesmus obliquus	30 mg/L	7,5	83,77	Zou и сар., 2018
Chlorella vulgaris	20 mg/L	7,5	92,47	
Chlorococcum sp.	25 mg/L	-	40	de Godos и сар., 2011
Nannochloropsis oculata	75 mg/L	8-9	90	Blockx и сар., 2018
E.coli	1 mg/g*	6,5	75	Strand и сар., 2002
Enterobacter cloacae	10 mg/g	6,5	75	
Serratia marcescens	1 mg/g	6,5	75	
Micrococcus luteus	< 1 mg/g	6,5	75	
Bacillus megaterium	100 mg/g	6,5	75	
Pseudomonas sp.	10 mg/g	6,5	75	
Trichosporon pullulans	100 mg/L	6	88-94	Tharunkumar и сар., 2025
Rhodotorula glutinis	100 mg/L	6		
Yarrowia lipolytica	100 mg/L	6		

*Јединица mg/g, односи се на масу хитозана по маси суве масе ћелија

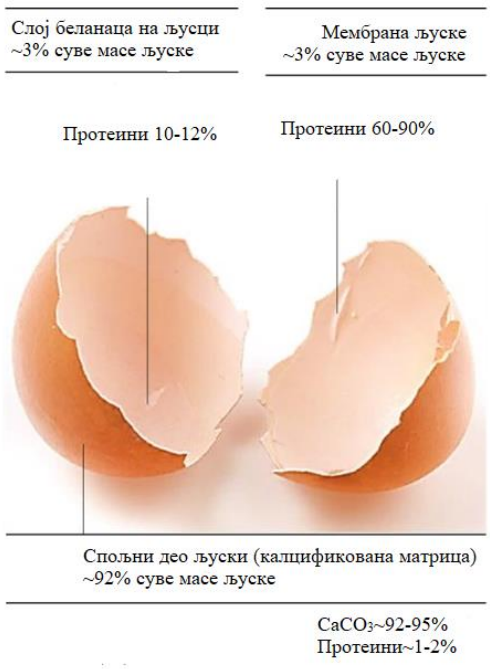
3.9.2. Љуске јаја

Кокошја јаја су важан део свакодневне исхране људи широм света, јер су економичан и висококвалитетан извор хранљивих материја. Глобална производња јаја у 2018. години износила је више од 76,7 милиона метричких тона. Сваке године, широм света генеришу се велике количине отпада од љуски јаја, али се највећи део тог отпада одлаже на депоније без претходног третмана, што представља озбиљан еколошки проблем и потенцијалну биолошку опасност, услед ослобађања амонијака (NH_3) и водоник-сулфида (H_2S) непријатног мириса. Производњом јаја настаје и проблем са одлагањем отпада у складу са локалним еколошким регулативама; али то такође значи да се потенцијално вредни састојци попут калцијум карбоната и биоактивних протеина губе (Ahmed и сар., 2021). Таква пракса изненађује с обзиром на бројне научне извештаје и патенте који указују на разноврсне могућности искоришћења отпада од љуски јаја. Иако се љуске јаја често користе за производњу производа са ниском додатом вредношћу, попут ђубрива или хране за кућне љубимце и стоку, или за израду појединачних производа са нешто већом вредношћу, постоји читав низ алтернатива које омогућавају примену отпада од љуски јаја у производњи високовредних производа,

посебно у контексту савремених „*zero-waste*“ модела (Strelec и сар., 2023). Све више истраживања указује на могућу примену праха од љуски јаја као средства за флокулацију (Pandey и сар., 2019).

Љуске јаја су биоразградиве, биокомпатибилне, показују особине адсорпције и способност флокулације. Имају високу катјонску густину наелектрисања, што омогућава ефикасну неутрализацију негативно наелектрисаних честица, попут микробних ћелија. Главни састојак љуски јаја је калцијум карбонат, који чини око 95% њиховог састава, док преосталих 5% чине калцијум фосфат, магнезијум карбонат и растворљиви и нерастворљиви протеини (Choi, 2015). Љуска кокошјег јајета има вишеслојну отпорну структуру која се, од унутрашњости ка спољашњости, састоји од мембране љуске, слоја мамиларних конуса, палисадног слоја и кутикуле (Ahmed и сар., 2021).

Унутрашњи део љуске јаја покрива танак, лепљиви слој беланца који се задржава на љусци, а који обухвата око 3% суве масе љуске и који је богат извор високовредних протеина као што су овалбумин, овотрансферин и лизозим. Овај лепљиви слој беланца је причвршћен за мембрану љуске јаја, која такође чини око 3% суве масе љуске, а садржи значајне количине колагених влакана, хијалуронске киселине и других корисних гликозоаминогликана. Спољни део љуски чини калцификована матрица, претежно састављена од калцијум карбоната, која обухвата између 92 и 95% суве масе. Овај део садржи и мале количине антимикробних протеина који имају значајну биолошку вредност (Strelec и сар., 2023) (слика 3.7.).



Слика 3.7. Структура љуске јајета (Strelec и сар., 2023)

3.9.2.1. Примена љуски јаја

Љуске јаја могу се користити као извор калцијума у медицинске сврхе, као и у прехрамбеној индустрији за производњу адитива као што су калцијум лактат, калцијум пропионат, калцијум глуконат, калцијум цитрат и калцијум ацетат (Ahmed и сар., 2021).

Калцијум има важну улогу у расту биљака, али већина неорганских калцијумових соли, укључујући калцијум карбонат ($CaCO_3$), има слабу растворљивост у води, што их чини мање ефикасним приликом употребе. Љуске јаја могу се претворити у течни калцијум ацетат (ђубриво) тако што се уситне и комбинују са сирћетном киселином. Овај калцијум ацетат је релативно неутралан (0,2 М раствор има pH 7,6) и не закишељава земљиште. Суве, млевене љуске се такође могу мешати са другим органским материјалима као што су мекиње кикирикија, стајско и перадарско ђубриво и микробни инокуланти како би се произвело еколошки прихватљиво и ефикасно ђубриво. Слично томе, отпад од љуски јаја који садржи мембране, беланце и жуманце може се третирати и растворити како би се произвело природно течно ђубриво са побољшаном растворљивошћу. У овом процесу, љуске се уситњавају и мешају са протеазом и органским киселинама (попут сирћетне, јабучне, млечне, сукцинске и лимунске киселине) које разлажу протеински садржај и стварају калцијум растворљив у води (Ahmed и сар., 2021).

Током последње две деценије, природни отпадни материјал од љуски јаја широко се користи као адсорбенс за уклањање различитих органских и неорганских загађивача из отпадних вода. Љуске јаја се одликују порозном, влакнастом структуром и великом специфичном површином, као и присуством посебних функционалних група као што су хидроксилна (-OH), тиолна (-SH), карбоксилна (-COOH) и амино група ($-NH_2$), што их чини одличним адсорбентом. Процене показују да свака љуска јаја садржи између 7 000 и 17 000 пора (Jaradat и сар., 2022).

Љуске имају високу густину катјонског наелектрисања (Ca^{2+}) и могу снажно адсорбовати и дестабилизовати негативно наелектрисане честице, као што су микробне ћелије, посебно ћелије микроалги. Ова врста флокуланта има велики потенцијал за примену у индустрији. Међутим, потребно је решити ограничења као што су ниска ефикасност флокулације и потреба за великим дозама флокуланта (Jusoh и сар., 2023а).

3.9.2.2. Флокулација љускама јаја

Jusoh и сар. (2023б) су забележили да је pH вредност између 6 и 7 била најповољнија за ефикасно формирање биофлокула (фитопланктон и суспендоване чврсте материје) применом флокуланта на бази љуске јаја, приликом пречишћавања отпадне воде из аквакултуре, при чему је забележена вредност ефикасности флокулације била већа од 80%. Повећањем pH на вредности између 8 и 10 уочен је благи пад ефикасности на око 65%. Овакав утицај pH вредности се може објаснити физичким својствима љуски и физичкохемијским интеракцијама флокуланта са микроорганизмима унутар биофлокула. При неутралним pH вредностима, коагуланти

(протеини из љуски јаја као и екстрацелуларни метаболити микроорганизама који се налазе унутар биофлокула) задржавају спиралну структуру која омогућава привлачење и везивање микроорганизама, формирајући стабилне флокуле. Поред тога, двовалентни Ca^{2+} јони присутни у љусци играју важну улогу, јер неутралишу негативно наелектрисане ћелије и подстичу стварање агрегата. При ниским pH вредностима висока концентрација водоничних јона (H^+) ствара конкуренцију за места везивања, што умањује ефикасност деловања Ca^{2+} јона, док је у опсегу pH вредности између 6 и 7, где је концентрација H^+ јона нижа, ефекат калцијума израженији, што доводи до боље флокулације и већег приноса биомасе.

Према Suparmaniam и сар. (2019), температура од 40 °C се показала као оптимална за процес флокулације, јер умерено повишена температура убрзава отпуштање Ca^{2+} јона и тиме подстиче формирање флокула. Међутим, врло високе температуре, преко 50 °C, доводе до пада ефикасности, што се приписује негативном утицају повишене температуре на везивање флокуланта тј. дестабилизацију полимера.

Такође, већа ефикасност флокулације (до 80%) постигнута је при споријој брзини мешања, што је у складу са енергетском ефикасношћу и оптимизацијом процеса (Jusoh и сар., 2023б).

У табели 3.6. приказани су резултати испитивања ефикасности флокулације применом праха од љуски јаја, са циљем издвајања микропластике (Liemin и сар., 2023), односно пречишћавања подземних вода (Rifgyawarman и сар., 2024) као и отпадних вода фармацеутске индустрије (Hanifah и сар., 2020). Такође, у оквиру исте табеле, приказани су и резултати испитивања ефикасности флокулације различитих микроорганизама применом флокуланта на бази љуске јаја, при чему су наведени услови флокулације, укључујући pH вредност и концентрацију флокуланта као најзначајније факторе ефикасности.

Choi (2015) је испитивао ефикасност флокулације биомасе микроалги *Chlorella vulgaris* култивисаних на *Jaworski* медијуму, док су Suparmaniam и сар. (2019), као и Shazili и сар. (2025) испитивали ефикаснсот флокулације микроалги *Chlorella vulgaris,* односно *Chlorella* sp. али култивисаних на BB медијуму (*Bold Basal Medium*). Roy и Mohanty (2020) и Pandey и сар. (2019) користили су BG-11 (*Blue-Green*) медијум, док су Shurair и сар. (2019) вршили култивацију у инкубатору уз температурну регулацију.

Слично као и у случају флокулације хитозаном, и примена флокуланта на бази љуске јаја, показује да састав културационог медијума има значајан утицај како на крајњу ефикасност флокулације, тако и на количину потребног флокуланта. Ови подаци наглашавају важност оптимизације услова флокулације у зависности од типа микроорганизама и састава културационог медијума како би се постигли максимални резултати приликом издвајања биомасе и пречишћавања отпадних вода.

Табела 3.6. Поређење флокулационе ефикасности флокуланта на бази љуске јаја приликом третмана отпадних вода и издвајања биомасе различитих врста микроорганизама у зависности од флокулационих услова

	Концентрација	**pH**	**Ефикасност (%)**	**Литература**
Микропластика	85 000 mg/L	-	89,14	Liemin и сар., 2023
Подземне воде	500 mg/L	-	97,17	Rifgyawarman и сар., 2024
Отпадне воде фармацеутске индустрије	100 000 mg/L	8	81,18	Hanifah и сар., 2020
Микроорганизам				
Chlorella vulgaris	80 mg/L	6-7	99	Choi, 2015
Chlorella pyrenoidosa	100 mg/L	4	99	Pandey и сар., 2019
Chlorella vulgaris	80 mg/L	11,8	60	Suparmaniam и сар., 2019
T. obliquus	120 mg/L	4	98,62	Roy и Mohanty, 2020
Chlorella vulgaris	4,7 mg/g*	4	96,6	Shurair и сар., 2019
Spirulina platensis	2,2 mg/g*	4	96	
Chlorella sp.	6000 mg/L	6	97	Shazili и сар., 2025

* Јединица mg/g, односи се на масу љуски јаја по маси суве масе ћелија

4. Материјал и методе

4.1. Микроорганизми

Производни микроорганизам коришћен у оквиру ове докторске дисертације био је *Bacillus* sp. coj BioSol021, изолован из ризосфере пасуља (*Phaseolus vulgaris*) и идентификован као члан оперативне групе *Bacillus amyloliquefaciens*.

У првој фази истраживања, приликом испитивања ширег спектра антимикробног деловања производног микроорганизма, као тест микроорганизми коришћени су следећи фитопатогени изолати: *Xanthomonas* sp. изолован са листа паприке; *Colletotrichum* sp. и *Fusarium* sp. изоловани из плодова јабуке и афлатоксигени соj *Aspergillus flavus* SA2B SS изолован из кукуруза. У другој фази истраживања, тестирана је антимикробна активност производног микроорганизма против афлатоксигеног соја *Aspergillus flavus* PA2D SS изолованог из кукуруза. Сви микроорганизми чувају се на 4 °C у збирци култура Лабораторије за биохемијско инжењерство Технолошког факултета Нови Сад, Универзитета у Новом Саду.

За култивацију производног микроорганизма прелиминарно је коришћена синтетичка хранљива подлога на бази целулозе (целулоза (0,5 g/L); $(NH_4)_2SO_4$ (3,8 g/L); K_2HPO_4 (0,3 g/L); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,3 g/L)), а потом су коришћене течне хранљиве подлоге засноване на отпадним токовима прехрамбене индустрије, укључујући индустрију млека и млечних производа, индустрију вина и индустрију производње воћних сокова. Иницијални параметри квалитета ефлуената коришћених за припрему култивационих медијума, као и извршене корекције непосредно пре култивације наведени су у поглављу 3.6.4. у табели 3.1.

Након 96 h култивације добијени су култивациони медијуми чији су параметри квалитета наведени у поглављу 3.6.4. у табели 3.2.

4.2. Припрема флокулационих агенаса

У оквиру ове докторске дисертације, коришћене су три врсте хитозана: хитозан 1: ≥ 75% деацетилован, 100 000-300 000 Da (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); хитозан 2: ≥ 75% деацетилован, 310 000-375 000 Da (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); хитозан 3: ≥ 90% деацетилован, 600 000-800 000 Da (Acros-Organic, Geel, Belgium). Раствори хитозана концентрације 1 mg/mL припремљени су растварањем хитозана у 0,1 M раствору HCl мешањем на магнетној мешалици брзином од 100 о/мин, на собној температури (25 °C) у трајању од 30 минута, односно до потпуног растварања хитозана у раствору киселине. Раствор је припреман непосредно пре извођења самих експеримената и чуван у фрижидеру на 4 °C не дуже од 24 h.

Прикупљене љуске јаја су опране у дестилованој води и загреване (стерилисане) на температури од 105 °C, 30 минута како би садржај воде потпуно испарио. Након тога, осушене љуске су уситњене у фини прах и просејане кроз сито (0,075 mm). Раствори од просејаног праха љуски јаја концентрације 10 mg/mL припремљени су растварањем праха љуски у 0,1 M раствору HCl мешањем на магнетној мешалици брзином од 100 о/мин, на собној температури (25 °C) у трајању од 30 минута.

4.3. Одређивање ефикасности флокулације

Процес флокулације у оквиру истраживања обухваћених овом докторском дисертацијом подразумевао је примену стандардног теста флокулације у лабораторијским чашама (енгл. *Jar test*).

Серија експеримената изведена је у стакленим чашама запремине 400 mL у којима се налазило по 250 mL културе течности *Bacillus* sp. BioSol021, добијене након 96 h културе у лабораторијском биореактору (EDF – 15.4_1, A/S Biotehniskais centrs, Riga, Letonija) како би се одредили оптимални експериментални услови у погледу изабраних променљивих.

Први корак приликом извођења процеса флокулације подразумевао је додавање одговарајуће количине флокуланта (концентрација и врста флокуланта варирали су у зависности од експерименталног плана), након чега је вршена корекција pH вредности додатком 0,1 M NaOH/0,1 M HCl до постизања жељене вредности.

Други корак је обухватао две фазе. У првој фази спроведено је брзо мешање (брзина мешања је варирала у зависности од експерименталног плана) у трајању од 5 минута, ради равномерне дисперзије флокуланта. У другој фази брзина мешања је смањена на 50 о/мин током 30 минута, како би дошло до формирања флокула. Серија експеримената изведена је на собној температури (25 °C).

По завршетку мешања вршено је таложење током 60 минута, након чега је одвајан супернатант од талога. Ефикасност флокулације одређена је спектрофотометријски, мерењем апсорбанције на таласној дужини од 600 nm применом двозрачног спектрофотометра (UV-1800 UV-Vis Spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan) и израчуната помоћу једначине:

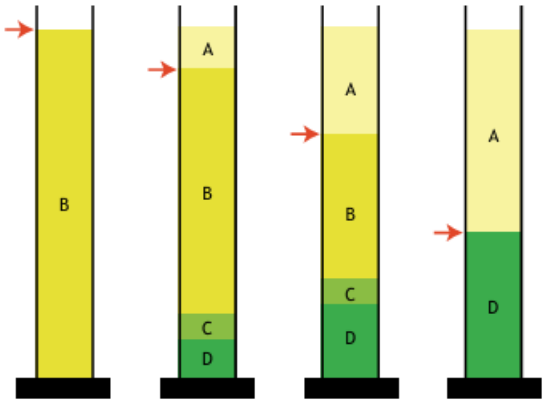
$$\%\mathrm{E}F = \frac{OD_0 - OD}{OD_0} \times 100 \quad (1)$$

OD_0 и OD оптичке густине узорака пре и након флокулације, редом.

4.4. Одређивање брзине таложења

Како би се измерила шаржна крива таложења, колона (висина колоне 20 cm; унутрашњи пречник 2,6 cm) се пажљиво пуни претходно флокулисаним узорком културационе течности како би се спречило кидање флокула и покреће се штоперица ради мерења брзине таложења формираних флокула. Формиране флокуле се таложе а позиција додирне површине између талога и супернатанта се мери у различитим временским интервалима. Праћење висине додирне површине између талога и супернатанта у временском интервалу од 60 минута резултира кривом таложења, која показује промену висине слоја талога током времена. На почетку теста, висина додирне површине између талога и супернатанта се обично мери чешће, због бржег таложења флокула, док се касније током теста учесталост мерења смањује јер се додирна површина спорије креће. Такође, изведени су и тестови таложења саме културационе течности без додатка флокуланта и без мешања.

Процес таложења подразумева раздвајање суспензије помоћу гравитације на бистру течност и талог са повећаном концентрацијом чврстих честица (Camarote и сар., 2017). На слици 4.1. приказана је расподела зона таложења по дубини колоне у различитим временским интервалима током експеримента шаржног таложења (Torfs, 2016).



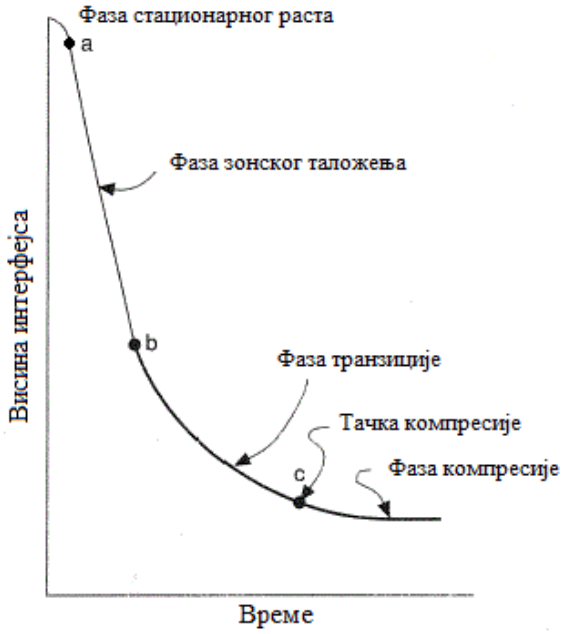
Слика 4.1. Хронолошки процес теста шаржног таложења (Torfs, 2016)

Након што се експеримент покрене, формирају се четири различите зоне. Горња зона (зона A) састоји се од супернатанта. Испод те зоне формирају се три додатне зоне: B, C, D, које су одвојене према врсти таложења. У зони B одвија се зонско таложење, у зони C прелазно таложење, а у зони D компресивно таложење (Torfs, 2016). Позиција додирне површине између зоне A и зоне B назива се седиментациони интерфејс. Висина интерфејса, означена црвеном стрелицом, представља растојање од дна таложног резервоара до седиментационог интерфејса (Camarote и сар., 2017).

Тест таложења почиње са суспензијом која има уједначену концентрацију чврстих материја (зона B) (Ferreira и сар., 2021). Како процес седиментације напредује,

зоне A и D се повећавају (слика 4.1.), док се зона B смањује. Дубина зоне C остаје готово константна (Camarote и сар., 2017). На крају експеримента, очекује се формирање бистре зоне на врху (зона A) и густог слоја талога на дну цилиндра (зона D), где се налазе исталожене честице. Како се висина интерфејса између бистре зоне A и хомогене суспензије B смањује, висина интерфејса C-D се повећава. Зона C постепено нестаје, а зона D наставља да се смањује све док не достигне статички ниво (Ferreira и сар., 2021).

Крива шаржног таложења (слика 4.2.) приказује четири различите фазе, које одражавају прелазак седиментационог интерфејса кроз различите зоне таложења (Torfs, 2016).



Слика 4.2. Крива шаржног таложења

Од почетка теста до тачке (a), седиментациони интерфејс налази се у фази стационарног раста. У овој фази, суспензија се стабилизује након турбуленција насталих приликом пуњења колоне (Torfs, 2016).

Фаза ометаног (зонског) таложења, почиње тачком (a) и завршава се тачком (b), при чему се додирна површина налази у зони ометаног таложења (зона B). Ову зону карактерише линеарно опадање на кривој шаржног таложења. Услед равнотеже између гравитационих сила, које узрокују таложење честица, и хидрауличних сила трења, које пружају отпор кретању, све честице у овој зони таложе се истом брзином. Уколико колона није мешана, брзина којом се додирна површина спушта назива се брзина ометаног таложења v_{hs} при почетној концентрацији чврстих честица. Уколико су услови за шаржни тест постављени тако да се минимизирају ефекти зидова, добијена вредност v_{hs} одговара реалној брзини зонског таложења у секундарној таложници (Torfs, 2016).

Фаза транзиције почиње у тачки (b) када слој муља достигне прелазни слој (зона C). Прелазни слој је слој константне дебљине који се формира од честица које потичу из

зоне ометаног таложења и честица које долазе из растуће компресионе зоне. Иако током ове фазе постоје исте карактеристике као у режиму зонског таложења, брзина таложења опада јер се градијент концентрације повећава са дубином. Фаза транзиције се завршава када слој муља достигне компресиони слој (Torfs, 2016).

Фаза компресије почиње у тачки (c), где се честице компресују, што доводи до повећања градијента концентрације и смањења брзине таложења. Тренутак у коме фаза компресије почиње, а који се назива тачка компресије, тешко је прецизно одредити (Torfs, 2016).

При нижим концентрацијама муља, таложење се у почетној фази одвија у режиму зонског, односно ометаног таложења. Линеарни део криве шаржног таложења има нагиб који одговара брзини ометаног таложења v_i (Torfs, 2016).

Ова брзина се дефинише као нагиб тангенте на криву таложења и израчунава се према изразу (Camarote и сар., 2017):

$$v_i = \frac{z_i - z_{i+1}}{t_{i+1} - t_i} \quad (2)$$

при чему је v_i брзина таложења, а z висина интерфејса у односу на временски интервал t.

4.5. Аналитичке методе

4.5.1. *In vitro* тестирање антимикробне активности

Антимикробна активност узорака културе течности (*Bacillus* sp. BioSol021) након флокулације против фитопатогених плесни, испитана је дифузионом методом бунарчића. Као негативна контрола коришћена је културациона течност након 96 h културације у биореактору.

Суспензија тест микроорганизама припремљена је ресуспендовањем биомасе претходно освежених тест микроорганизама у стерилном физиолошком раствору до постизања концентрације спора од 10^5 CFU/mL. Отопљене и темпериране (50±1 °C) комерцијалне хранљиве подлоге (engl. *Sabouraud Maltose Agar* – SMA) (HiMedia Laboratories, Mumbaj, Indija) (15 mL) за тестирање антимикробне активности, засејане су преношењем по 1 mL суспензије тест микроорганизама. Након хомогенизације на вортексу (IKA Vortex 1 Shaker, IKA® Werke, Staufen, Немачка) засејане хранљиве подлоге су изливене и благим покретима равномерно распоређене у стерилним Петри плочама пречника 90 mm. Након очвршћавања хранљивих подлога, на свакој хранљивој подлози направљена су по три бунарчића пречника 8 mm, у које је апликовано по 100 μL испитиваног узорка. Инкубација је вршена током 96 h на температури 26 °C, након чега је уследило мерење пречника зоне инхибиције.

Антимикробна активност узорака културационе течности (*Bacillus* sp. BioSol021) након флокулације против фитопатогених бактерија, испитана је диск-дифузионом методом. Као негативна контрола коришћена је културациона течност након 96 h културације у биореактору.

Суспензија тест микроорганизама припремљена је ресуспендовањем биомасе претходно освежених тест микроорганизама у стерилном физиолошком раствору до постизања концентрације спора од 10^8 CFU/mL. Отопљене и темперираne (50±1 °C) хранљиве подлоге (енгл. *Yeast Maltose Agar* – YMA) (HiMedia Laboratories, Mumbaj, Indija) (15 mL) за тестирање антимикробне активности, засејане су преношењем по 1 mL суспензије тест микроорганизама. Након хомогенизације на вортексу (IKA Vortex 1 Shaker, IKA® Werke, Staufen, Немачка) засејане хранљиве подлоге су изливене и благим покретима равномерно распоређене у стерилним Петри плочама пречника 90 mm. Након очвршћавања хранљивих подлога, на сваку хранљиву подлогу постављена су по три папирна диска, на које је апликовано по 10 µL испитиваног узорка. Инкубација је трајала 48 h на температури 28 °C, након чега је уследило мерење пречника зоне инхибиције.

4.5.2. Одређивање броја ћелија производног микроорганизма методом узастопних разређења у комбинацији са методом посева

Број ћелија производног микроорганизма *Bacillus* sp. coj BioSol021 из узорака културационих течности прикупљених након 96 h културације у биореактору као и након флокулације узорака одређен је методом узастопних разређења у комбинацији са методом посева. Хранљива подлога коришћена приликом засејавања узастопних разређења узорака је хранљиви агар (HiMedia Laboratories, ThaneWest, Maharashtra, India). Инкубација је вршена током 48 h на температури 28 °C, након чега је уследило бројање колонија и одређивање броја вијабилних ћелија по 1 mL узорка. Резултат је изражен у јединицама log CFU/mL (енгл. *Colony Forming Unit*-CFU).

4.6. Статистичка обрада експерименталних података

4.6.1. Прелиминарна испитивања процеса флокулације сивом Тагучијевом методом

У циљу одређивања оптималних вредности и процене утицаја одабраних параметара на ефикасност процеса флокулације, примењена је Тагучијева метода. Ова метода представља практичан и систематичан начин за одређивање оптималне комбинације различитих фактора, нарочито код процеса као што је флокулација, која захтева велики број експеримената ради идентификације утицаја појединачних фактора на циљни одзив (Jozić и сар., 2015). Тагучијева метода користи ортогоналне матрице из теорије експерименталног дизајна, што омогућава испитивање великог броја променљивих помоћу малог броја експеримената (Aber и сар., 2010). У оквиру ове докторске дисертације, примењен је L_{18} ортогонални дизајн, који омогућава анализу пет

независних променљивих (врста хитозана, pH вредност, концентрација хитозана, брзо и споро мешање) на три нивоа, при чему је потребно 18 понављања, чиме се број експеримената значајно смањује у односу на потпуни факторијални дизајн.

Квалитет експерименталног одговора изражава се као однос жељеног фактора (сигнал) у односу на неконтролисане, ометајуће факторе (шум) (Aber и сар., 2010). Овај однос, познат као однос сигнал/шум (енгл. *Signal to Noise*-S/N), дефинисан формулом (3), омогућава процену одступања између експерименталне и циљне вредности. Однос сигнал/шум представља однос средње вредности карактеристике одговора према одговарајућој стандардној девијацији, због чега се може користити за одређивање нивоа сваког фактора који оптимизује одзив. У анализи овог односа разликују се три категорије: мање је боље (енгл. *smaller the better*), веће је боље (енгл. *larger the better*), номинално је најбоље (енгл. *nominal is the best*) (Okolie и сар., 2021).

$$\frac{S}{N} = -10log\left(\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\frac{1}{Y_i^2}\right) \quad (3)$$

где је n број понављања експеримената, а Y_i измерена вредност посматране карактеристике квалитета.

У оквиру прелиминарних испитивања, даља анализа резултата имала је за циљ одређивање оптималних вредности независних променљивих за потребе вишекритеријумске оптимизације, применом методе сиве релационе анализе. На тај начин, сложена вишекритеријумска оптимизација поједностављена је и сведена на један излазни параметар, односно релациони степен. За потребе ове анализе одабрано је пет одзива: ефикасност флокулације и четири пречника зоне инхибиције као показатељи антифунгалне и антибактеријске активности према изабраним фитопатогенима.

Иницијална обрада података представља први корак сиве релационе анализе и спроводи се како би се оригинални низ података трансформисао у упоредиви низ. Нумерички подаци се нормализују на вредности између 0 и 1. Нормализована вредност оригиналног низа за све одзиве који имају карактеристику „што већа то боља“ (енгл. larger-the-better) може се изразити следећом једначином:

$$X_{ij} = \frac{Y_{ij} - \min(Y_{ij})}{\max(Y_{ij}) - \min(Y_{ij})} \quad (4)$$

где је X_{ij} нормализована вредност одзива, а Y_{ij} вредност одзива добијена на основу експерименталних мерења. У оквиру експерименталног плана, разматрано је пет одзива, тако да је индекс j имао вредности j=1, 2, 3, 4, 5. Број експерименталних мерења означен је индексом i, при чему је i=1, 2, 3,…, 18. Вредности $\min(Y_{ij})$ и $\max(Y_{ij})$ представљају минималну, односно максимлану вредност Y_{ij} за сваки одзив.

Следећи корак сиве релационе анализе подразумева израчунавање коефицијента сиве релације (енгл. *Grey Relational Coefficient*-GRC) за сваки одзив, према једначини:

$$GRC_{ij} = \frac{(\Delta_{min} + \Psi\Delta_{max})}{(\Delta_{ij} + \Psi\Delta_{max})} \quad (5)$$

где је GRC_{ij} коефицијент сиве релације за j-ти одзив у i-том експерименталном мерењу. Секвенца одступања (Δ_{ij}) се третира као губитак квалитета у односу на циљну вредност, и израчунава се као разлика између 1 и нормализоване вредности за сваки одзив. Коефицијент разликовања (Ψ) узима вредности у опсегу од 0 до 1, а у оквиру овог истраживања одабрана је вредност од 0,5.

Последњи корак представља израчунавање степена сиве релациије (енгл. *Grey Relational Grade*-GRG) за више одзива, применом једначине:

$$GRG_i = \frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n} GRC_{ij} \quad (6)$$

где је GRG_i степен сиве релације за i-ту експерименталну серију, а n је број одзива, који у овом истраживању износи 5.

За статистичку анализу добијених резултата коришћен је софтверски пакет Minitab (верзија 17.0, Minitab, State College, PA, SAD).

Стандардни тест флокулације у лабораторијским чашама примењен је како би се одредили оптимални експериментални услови у погледу изабраних променљивих процеса флокулације. Табела 4.1. приказује експерименталне факторе и њихове нивое.

Табела 4.1. Експериментални фактори и њихови нивои

Параметар	**Ознака**	**Нивои**		
		1	**2**	**3**
Врста хитозана	A	ch1	ch2	ch3
pH вредност	B	5	6	7
Концентрација хитозана (mg/mL)	C	45	55	65
Већа брзина мешања (о/мин)	D	250	350	450
Мања брзина мешања (о/мин)	E	50	100	150

ch-хитозан; ch1: ≥ 75% деацетилован, 100 000-300 000 Da (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); ch2: ≥ 75% деацетилован, 310 000-375 000 Da (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); ch3: ≥ 90% деацетилован, 600 000-800 000 Da (Acros-Organic, Geel, Belgium)

Раствори хитозана, као и процес флокулације, припремљени су и изведени на начин који је претходно описан у оквиру поглавља 4.2.

4.6.2. Примена методе одзивне површине у процесу флокулације биомасе *Bacillus* sp. култивисане на отпадним водама прехрамбене индустрије

Метода одзивне површине (енгл. *Response Surface Methodology*-RSM) примењена је ради моделовања и анализе односа између испитиваних фактора и одзива.

4.6.2.1. Флокулација биомасе *Bacillus* sp. хитозаном

Експериментални дизајн (табела 4.2.) у случају флокулације хитозаном био је заснован на централном композитном дизајну. Овом методом извршена је оптимизација утицаја два фактора (концентрација хитозана и већа брзина мешања) на процес флокулације. У овом случају представљен је факторијални дизајн другог реда, при чему је α износило 1,41421. У централном композитном дизајну, α представља удаљеност аксијалних тачака (енгл. *star points*) и центра. Свака променљива у дизајну има најмање и највеће вредности (енгл. *star points*) које омогућавају дизајнирање закривљености модела око централне тачке. Независне променљиве биле су концентрација хитозана (ch3) (mg/L) и брзина мешања (о/мин), при pH 5, која је утврђена као оптимална за процес флокулације хитозаном, на основу претходно добијених резултата у оквиру прелиминарних испитивања. Одабрани опсези вредности за брзину мешања кретали су се од 150 до 600 о/мин за култивациону течност на бази сирне суротке (КТС) и култивациону течност на бази отпадне воде из винарије (КТВ); брзина мешања за култивациону течност на бази отпадне воде из индустрије воћних сокова (КТВС) била је у опсегу 100-300 о/мин, док су за концентрацију хитозана одабрана три опсега вредности: 30-150 mg/L за КТС, 120-400 mg/L за КТВ и 250-600 mg/L за КТВС.

Табела 4.2. Експериментални дизајн у случају флокулације хитозаном

Експеримент	**Фактори-независне променљиве**				
	Концентрација хитозана (mg/L)			Већа брзина мешања (о/мин)	
	КТС	КТВ	КТВС	КТС/КТВ	КТВС
1	150	400	250	600	100
2	150	400	600	150	100
3	30	120	250	600	300
4	30	120	600	150	300
5	90	260	177,5	693,2	200
6	90	260	672,5	56,8	200
7	174,85	457,99	425	375	58,6
8	5,15	62,01	425	375	341,4
9	90	260	425	375	200
10	90	260	425	375	200

Из експерименталног плана, добијена је следећа полиномска једначина другог реда:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad (7)$$

где X_i представља независне промењљиве (X_1-концентрација хитозана (mg/L) и X_2-брзина мешања (о/мин)); b_0 представља одсечак (константу), b_i линеарни, b_{ii} квадратни и b_{ij} интеракциони ефекат независних променљивих; Y представља одзиве (ефикасност флокулације (%), брзина таложења (mm/s) и пречник зоне инхибиције (mm)).

4.6.2.2. Флокулација биомасе *Bacillus* sp. применом флокуланта на бази љуске јаја

Експериментални дизајн (табела 4.3.) у случају флокулације применом флокуланта на бази љуске јаја био је заснован на Бокс-Бенкеновом дизајну (енгл. *Box-Behnken design*), који представља факторијални дизајн другог реда. Експериментални дизајн са три фактора на три нивоа и три понављања у централној тачки обухвата укупно 15 експеримената. Независне промењљиве биле су концентрација флокуланта (g/L), pH вредност и брзина мешања (о/мин). Одабрани опсези вредности за брзину мешања кретали су се од 150 до 450 о/мин, док су за концентрацију флокуланта на бази љуске јаја одабрана два опсега вредности: 3-7 g/L за КТС и КТВ и 2,5-5,5 g/L за КТВС. Опсег pH вредности за све три култивационе течности био је између 5 и 9.

Табела 4.3. Експериментални дизајн у случају флокулације флокулантом на бази љуске јаја

Експеримент	**Фактори-независне промењљиве**			
	Концентрација љуски (g/L)		Већа брзина мешања (о/мин)	pH вредност
	КТС/КТВ	КТВС	КТС/КТВ/КТВС	КТС/КТВ/КТВС
1	3	2,5	300	5
2	7	5,5	300	5
3	3	2,5	300	9
4	7	5,5	300	9
5	3	2,5	150	7
6	7	5,5	150	7
7	3	2,5	450	7
8	7	5,5	450	7
9	5	4	150	5
10	5	4	150	9
11	5	4	450	5
12	5	4	450	9
13	5	4	300	7
14	5	4	300	7
15	5	4	300	7

Из експерименталног плана, добијена је следећа полиномска једначина другог реда:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (8)$$

где X_i представља независне промењљиве (X_1-концентрација флокуланта на бази љуске јаја (g/L), X_2-pH вредност и X_2-брзина мешања (о/мин)); b_0 представља одсечак (константу), b_i линеарни, b_{ii} квадратни и b_{ij} интеракциони ефекат независних

променљивих; Y представља одзиве (ефикасност флокулације (%), брзина таложења (mm/s) и пречник зоне инхибиције (mm)).

4.6.2.3. Оптимизација експерименталних резултата

Оптимизација експерименталних резултата извршена је нумеричким путем, односно применом функције пожељности (енгл. *desirability function*-DF) и генетског алгоритма (енгл. *genetic algorithm*-GA) у комбинацији са моделима одзивне површине. Нумеричка оптимизација помоћу одзивне површине даје локално решење за нелинеарне моделе, док генетски алгоритам омогућава добијање скупа недоминираних Парето оптималних решења (Kumar R. V. и сар., 2015). Посматрани проблем оптимизације може се математички представити на следећи начин: (1) у случају флокулације хитозаном, (2) у случају флокулације флокулантом на бази љуске јаја:

$$(1)\ \text{максимум}\begin{cases}\text{Ефикасност флокулације } (X_1, X_2)\\ \text{Брзина таложења } (X_1, X_2)\\ \text{Пречник зоне инхибиције } (X_1, X_2)\end{cases}$$

$$(1)\ \text{под условима ограничења опсега}\begin{cases}\text{КТС } 30 \le X_1 \le 150\ mg/L\\ \text{КТВ } 120 \le X_1 \le 400\ mg/L\\ \text{КТВС } 250 \le X_1 \le 600\ mg/L\\ \text{КТС, КТВ } 150 \le X_2 \le 600\ \text{о/мин}\\ \text{КТВС } 100 \le X_2 \le 300\ \text{о/мин}\end{cases}$$

$$(2)\ \text{максимум}\begin{cases}\text{Ефикасност флокулације } (X_1, X_2, X_3)\\ \text{Брзина таложења } (X_1, X_2, X_3)\\ \text{Пречник зоне инхибиције } (X_1, X_2, X_3)\end{cases}$$

$$(2)\ \text{под условима ограничења опсега}\begin{cases}\text{КТС, КТВ } 3 \le X_1 \le 7\ g/L\\ \text{КТВС } 2{,}5 \le X_1 \le 5{,}5\ g/L\\ \text{КТС, КТВ, КТВС } 5 \le X_2 \le 9\\ \text{КТС, КТВ, КТВС } 150 \le X_3 \le 450\ \text{о/мин}\end{cases}$$

За креирање полиномских модела одзивне површине и оптимизацију применом функције пожељности коришћен је Stat-Ease, Inc.'s Design-Expert софтвер, верзија 8.1, док је оптимизација генетским алгоритмом реализована помоћу софтвера MATLAB (R2015b, MathWorks, SAD).

На основу вишеструке регресионе анализе експерименталних података, дефинисана је квадратна једначина која повезује одзиве и процесне променљиве. Адекватност квадратног полиномског модела процењена је применом анализе варијансе (енгл. *Analysis of Variance*-ANOVA).

Анализа варијансе обухвата прорачуне који пружају увид у нивое варијабилности унутар регресионог модела и представљају основу за испитивање статистичке значајности модела. Ова анализа укључује више параметара: број степени слободе (DF),

сума квадрата (SS) и сума средњих квадрата (MS). Наведени параметри израчунавају се за сваки модел и припадајућу грешку. Статистичка значајност процењује се анализом p-вредности.

Добијене p-вредности користе се за процену статистичке значајности модела и њихових коефицијената, док се квалитет прилагођавања модела експерименталним подацима процењује на основу вредности одступања (енгл. *lack-of-fit*), чисте грешке (енгл. *pure error*) и коефицијента детерминације (R^2). Коефицијент детерминације представља удео укупне варијабилности зависне променљиве око средње вредности коју модел успева да објасни, при чему вредности варирају у распону од 0 до 1, где вредност 1 означава идеално прилагођавање. Због мерних грешака или односа између одзива и фактора које изабрани квадратни полиномски модел другог реда не може у потпуности да опише, долази до одступања између предвиђених и измерених вредности. Ова одступања се називају резидуали. Стога, у тачкама експерименталног дизајна присутне су тзв. резидуалне вредности (Jokić и сар., 2021).

Значај одступања модела (енгл. *lack-of-fit*) може се проценити у случајевима када су поједина мерења поновљена, као што је случај код централно-композитног дизајна. За процену прихватљивости модела примењује се статистички тест који раздваја укупну резидуалну варијансу на два дела: варијансу одступања модела (енгл. *lack-of-fit*), која се односи на варијације проузроковане факторима који нису обухваћени моделом, и чисту грешку (енгл. *pure error*), која представља случајне варијације узроковане грешкама при мерењу. Ниска p-вредност (мања од 0,05) за одступање модела у ANOVA анализи указује да анализирани модел није довољно добро прилагођен експерименталним подацима (Jokić и сар., 2021; Kumar R. V. и сар., 2015). Све статистичке анализе спроведене су на нивоу значајности од 95%.

Циљ вишекритеријумске оптимизације примењене у оквиру овог рада јесте одређивање вредности улазних променљивих које омогућавају постизање максималне вредности ефикасности флокулације, брзине таложења и пречника зоне инхибиције. У складу с тим, оптимизациони проблем дефинишу три циља, позната и као функције погодности. За формулисање функција погодности коришћени су полиноми другог степена добијени из модела одзивне површине. Све улазне променљиве (концентрација флокуланта, брзина мешања и pH вредност) постављене су као одлучујуће променљиве.

За решавање проблема примењен је елитистички алгоритам генетског сортирања по Парето доминацији, у коме је уведен концепт елитизма у постојећи алгоритам сортирања по недоминираности ради побољшања конвергенције. Генетски алгоритам је итеративан и стохастички. На почетку се генерише иницијална популација потенцијалних оптимизационих решења у складу са оптимизационим проблемом и задатим ограничењима. Ова популација се најчешће генерише насумично, на основу унапред дефинисане расподеле по вероватноћи. У свакој итерацији, званој генерацијом, изводи се низ корака са циљем еволуције популације, тако да јединке (једно од потенцијалних решења проблема) у следећој генерацији буду боље прилагођене у односу на јединке из претходне генерације и да коначно конвергирају ка глобалном

оптимуму. Свака итерација елитистичког алгоритма генетског сортирања по недоминираности најпре користи операције укрштања (енгл. *crossover*) и мутације како би креирала нову популацију, названу потомци (енгл. *offspring*). Након тога се комбинују популације родитеља и потомака, а јединке се бирају на основу принципа елитизма и растојања нагомилаености (енгл. *crowding distance*). Уколико је испуњен један од дефинисаних критеријума за завршетак алгоритма, алгоритам престаје са радом; у супротном креира се наредна (енгл. *offspring*) популација (Jokić и Lukić, 2019).

Оптимизациони прорачуни извршени су уз помоћ Matlab Global Optimization Toolbox-a (верзија R2015b), користећи вишекритеријумску функцију "gamultiobj" са контролисаним елитистичким генетским алгоритмом, који представља варијанту елитистичког алгоритма генетског сортирања по недоминираности.

Пошто функција подржава само минимизацију, све функције погодности су помножене са -1 како би се проблеми максимизације претворили у минимизационе. У овом истраживању дефинисани су следећи параметри генетског алгоритма: величина популације 50 и максималан број генерација 600. За функцију селекције изабрана је турнирска селекција величине 3, једна од најпопуларнијих метода у генетским алгоритмима. Удео укрштања (енгл. *crossover fraction*) подешен је на 0,75 уз примену распрострањене (енгл. *scattered*) функције укрштања. Примењена је адаптивна функција мутације, смер миграције унапред (енгл. *forward direction*) са уделом миграције (енгл. *migration fraction*) подешеним на 0,15. Поред тога, сортирање се врши према растојању нагомилаености (енгл. *crowding distance*). Алгоритам се зауставља уколико је просечна релативна промена распрострањености Парето решења током 50 генерација мања од 10^{-5} или уколико је достигнут максималан број генерација (Jokić и Lukić, 2019).

5. Резултати и дискусија

5.1. Прелиминарна испитивања сивом Тагучијевом методом

У оквиру прелиминарних истраживања, испитан је утицај хитозана на процес флокулације културационе течности *Bacillus* sp. BioSol021; као и антимикробна активност флокулацијом издвојеног талога против ширег спектра биљних патогена. Анализирани су ефекти врсте и концентрације хитозана, pH вредности и брзине мешања како би се дефинисали оптимални услови флокулације. Примењена је L_{18} Тагучијева ортогонална матрица као ефикасан метод за одређивање оптималне комбинације различитих параметара. Сива релациона анализа (енгл. *Grey Relational Analysis*-GRA) омогућила је идентификацију фактора који истовремено утичу на ефикасност флокулације и антимикробну активност биоконтролног агенса.

5.1.1. Оптимизација процеса флокулације Тагучијевом методом

Културациона течност соја *Bacillus* sp. BioSol021, добијена након 96 h културације у лабораторијском биореактору запремине 16 L, коришћена је као биолошки контролни агенс и као почетна смеша у поступку флокулације. Састав културационе течности испитан је на крају процеса културације ради одређивања садржаја главних компоненти и биомасе. Како се може уочити (табела 5.1.), садржај целулозе износио је 3,4 g/L, садржај биомасе *Bacillus* sp. BioSol021 на крају културације и на почетку процеса флокулације био је $2 \cdot 10^8$ CFU/mL, док је измерена pH вредност износила 7,51.

Табела 5.1. Параметри квалитета хранљивог медијума на бази целулозе

Параметар	**Вредност**
Садржај целулозе (g/L)	3,4
Садржај биомасе (CFU/mL)	$2 \cdot 10^8$
pH вредност	7,51

Стварне вредности ефикасности флокулације, као и одговарајући односи сигнал/шум (енгл. *Signal to Noise*-S/N), одређени су за сваки од 18 експеримената на основу Тагучијевог дизајна. Испитивање 1 (истакнуто) имало је највећи S/N однос у поређењу са осталим експериментима (табела 5.2.). Комбинација параметара за ово испитивање била је $A_1B_1C_1D_1E_1$ (хитозан ch1, pH 5, доза флокуланта 45 mg/L, брзо мешање 250 о/мин и споро мешање 50 о/мин).

Табела 5.2. Ефикасност флокулације добијена применом Тагучијеве L_{18} ортогоналне матрице

Експеримент	Комбинација параметара	EF (%)	S/N
1	**$A_1B_1C_1D_1E_1$**	**98,60**	**39,8776**
2	$A_1B_2C_2D_2E_2$	97,63	39,7918
3	$A_1B_3C_3D_3E_3$	76,63	37,6883
4	$A_2B_1C_1D_2E_2$	89,23	39,0104
5	$A_2B_2C_2D_3E_3$	76,06	37,6230
6	$A_2B_3C_3D_1E_1$	73,76	37,3566
7	$A_3B_1C_2D_1E_3$	97,27	39,7598
8	$A_3B_2C_3D_2E_1$	97,60	39,7886
9	$A_3B_3C_1D_3E_2$	79,83	38,0431
10	$A_1B_1C_3D_3E_2$	95,55	39,6045
11	$A_1B_2C_1D_1E_3$	86,36	38,7263
12	$A_1B_3C_2D_2E_1$	75,27	37,5323
13	$A_2B_1C_2D_3E_1$	94,19	39,4797
14	$A_2B_2C_3D_1E_2$	83,35	38,4176
15	$A_2B_3C_1D_2E_3$	63,10	36,0008
16	$A_3B_1C_3D_2E_3$	93,90	39,4531
17	$A_3B_2C_1D_3E_1$	91,56	39,2346
18	$A_3B_3C_2D_1E_2$	72,97	37,2631

A-тип хитозана, B-pH вредност, C-концентрација хитозана (mg/mL), D-већа брзина мешања (о/мин), E-мања брзина мешања (о/мин), EF-ефикасност флокулације (%), S/N-однос сигнал/шум

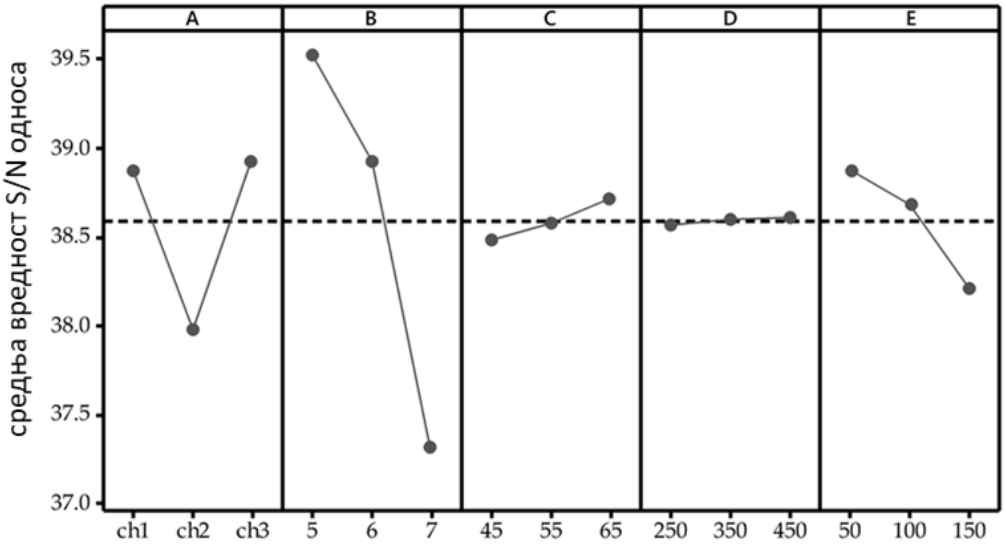
Табела 5.3. приказује резултате анализе варијансе (енгл. *Analysis of Variance*-ANOVA) за S/N односе ефикасности флокулације. Добијене p-вредности за испитиване факторе указују да је pH вредност имала највећи утицај на ефикасност флокулације, а затим тип хитозана. Оба фактора су показала статистичку значајност на нивоу значајности од 95%.

Табела 5.3. Анализа варијансе за S/N односе ефикасности флокулације

	DF	SS	MS	F-однос	p-вредност
A	**2**	**3,3618**	**1,68088**	**7,72**	**0,017**
B	**2**	**15,7743**	**7,88714**	**36,24**	**0,000**
C	2	0,1697	0,08483	0,39	0,691
D	2	0,0064	0,00318	0,01	0,986
E	2	1,4295	0,71477	3,28	0,099
Грешка	7	1,5234	0,21763		
Укупно	17	22,2650			

A-врста хитозана, B-pH вредност, C-концентрација хитозана (mg/mL), D-већа брзина мешања (о/мин), E-мања брзина мешања (о/мин), DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

Слика 5.1. приказује главне ефекте који утичу на S/N однос ефикасности флокулације. Пуне линије повезују средње вредности унутар сваког одабраног фактора, док испрекидана референтна линија означава укупну средњу вредност. Главни ефекат појединачне променљиве процењује се упоређивањем пуне линије са испрекиданом референтном линијом. Као што је приказано, pH вредност је показала најзначајнији утицај на ефикасност флокулације, што се огледа у стрмијем нагибу у односу на остале факторе.



Слика 5.1. Главни ефекти за S/N анализу ефикасности флокулације култивационе течности *Bacillus* sp. BioSol021: A-врста хитозана, B-pH вредност, C-концентрација хитозана (mg/mL), D-већа брзина мешања (о/мин), E-мања брзина мешања (о/мин)

Највећа ефикасност флокулације постигнута је при pH вредности 5. Имајући у виду да је хитозан слаб полиелектролит, густина његовог наелектрисања значајно зависи од pH вредности средине (Hughes и сар., 1990). Са повећањем pH вредности, запажено је смањење ефикасности флокулације, што је у складу са литературним подацима (Weir и сар., 1993; Yang R. и сар., 2016). Hughes и сар. (1990) су запазили да смањење pH вредности испод 7,0 омогућава успешну флокулацију *B. subtilis* применом хитозана. Изражена зависност ефикасности флокулације *Bacillus amyloliquefaciens* хитозаном од pH вредности у комплексним медијумима указује да је механизам флокулације у великој мери условљен присуством електростатичких интеракција (Weir и сар., 1993).

Процеси флокулације обично се одвијају помоћу два или више различитих механизама. Хитозан је специфичан катјонски полиелектролит са амино групама које се протонују у киселим воденим растворима (Roussy и сар., 2005). Његово катјонско понашање, као и молекулска маса, могу бити корисни и за неутрализацију наелектрисања и заробљавање честица (Kaseamchochoung и сар., 2006). Због различитих структурних карактеристика и бројних функционалних група присутних на ћелијама бактерија, веза између структурних параметара хитозана (степен деацетилације-DD и молекулска маса-Mw) и ефикасности флокулације бактеријских суспензија показује нерегуларан (неједнозначан) карактер (Hughes и сар., 1990). У оквиру ове докторске дисертације, утврђено је да је хитозан ниже молекулске масе (ch1), при истом степену деацетилације, постигао већу ефикасност флокулације у поређењу са хитозаном више молекулске масе (ch2). Слични резултати забележени су и у ранијим студијама флокулације анаеробног муља (Sheng и сар., 2006). Иако је хитозан ch3 имао већу молекулску масу, ефикасност флокулације постигнута са хитозанима ch1 и ch3 биле су сличне, што се може објаснити високим степеном деацетилације хитозана ch3 (изнад 90%).

Ефикасност флокулације показала је благо повећање са порастом концентрације флокуланта. Културациона течност представља сложен матрикс који, поред микробних ћелија, садржи и различите екстрацелуларне компоненте, као и заостале нутријенте из хранљивог медијума. Хитозан ступа у интеракцију са свим присутним компонентама. У свим спроведеним експериментима, забележена ефикасност флокулације била је изнад 70%. Слика 5.1. приказује да је утицај веће брзине мешања приближно једнак укупној средњој вредности (средња вредност је представљена испрекиданом линијом), што указује да она нема значајан утицај на ефикасност флокулације у оквиру испитиваног опсега експерименталних параметара. Ови резултати су у сагласности са анализом варијансе (табела 5.3.). Подаци указују да су све испитиване вредности веће брзине мешања биле довољне да обезбеде равномерну дисперзију хитозана у културационој течности, што је омогућило ефикасну флокулацију (Rkhaila и сар., 2021; Rossini и сар., 1999). С друге стране, утицај мање брзине мешања је израженији у односу на већу брзину мешања, што се може уочити по стрмијем нагибу (слика 5.1.). Повећање мање брзине мешања довело је до смањења ефикасности флокулације, што се може приписати механичком нарушавању већ формираних флокула услед интензивног мешања.

Табела 5.4. Резултати ефикасности флокулације и антимикробне активности талога против одабраних фитопатогена

	EF (%)	**Антимикробна активност/пречник зоне инхибиције (mm)**			
		***Xanthomonas* sp.**	***Colletotrichum* sp.**	***Fusarium* sp.**	***Aspergillus* sp.**
	Y1	**Y2**	**Y3**	**Y4**	**Y5**
1	98,60	42,00	40,33	36,33	36,33
2	97,63	42,67	34,67	37,00	32,33
3	76,63	22,33	29,33	35,33	41,00
4	89,23	43,33	35,00	35,00	41,67
5	76,06	43,00	35,00	35,00	39,33
6	73,76	41,33	33,00	34,33	35,33
7	97,27	40,33	41,00	36,67	44,33
8	97,60	40,00	38,33	37,67	41,33
9	79,83	43,67	39,33	34,67	40,67
10	95,55	29,00	32,00	38,00	26,00
11	86,36	31,00	32,67	36,67	33,00
12	75,27	32,33	32,67	35,00	29,67
13	94,19	40,00	41,00	37,00	37,33
14	83,35	37,33	34,67	35,67	35,33
15	63,10	31,33	32,00	31,33	40,67
16	93,90	40,00	35,00	35,33	40,33
17	91,56	44,67	35,33	34,67	40,00
18	72,97	34,00	31,67	34,00	43,67

Y1-ефикасност флокулације (%); Y2, Y3, Y4 и Y5-представљају пречнике зоне инхибиције (mm) према изабраним фитопатогенима

На основу података презентованих на слици 5.1., оптимални параметри флокулације су $A_3B_1C_3D_3E_1$, односно, врста хитозана 3 (ch3), pH вредност 5, доза флокуланта 65 mg/mL, већа и мања брзина мешања 450 о/мин и 50 о/мин, редом.

5.1.2. Сива Тагучијева релациона анализа за вишекритеријумску оптимизацију

Као што је већ истакнуто, хитозан је добро познат флокулант, али такође поседује и значајан потенцијал у биолошкој контроли различитих фитопатогених микроорганизама (Rkhaila и сар., 2021). Из тог разлога, у оквиру овог истраживања испитана је антимикробна активност талога који се састоји од хитозана и флокулисаних ћелија *Bacillus* sp. BioSol021, против различитих бактеријских и гљивичних фитопатогена (*Xanthomonas* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp.). Циљ истраживања било је како постизање високе ефикасности флокулације, тако и високе биоконтролне активности талога флокулисане култивационе течности. У ток контексту, примењена је Тагучијева сива релациона анализа као метод вишекритеријумске оптимизације. Резултати тестова антимикробне активности талога заједно са ефикасношћу флокулације приказани су у табели 5.4.

Нормализоване вредности експерименталних података, добијене након нормализације оригиналних података за одабране одзиве, као и њихова одговарајућа одступања, приказани су у табели 5.5.

Табела 5.5. Експериментални подаци након нормализације и њихова одговарајућа одступања

	Нормализоване вредности					**Одступања**				
	Y1	**Y2**	**Y3**	**Y4**	**Y5**	**Y1**	**Y2**	**Y3**	**Y4**	**Y5**
1	1,0000	0,8806	0,9429	0,7500	0,5636	0,0000	0,1194	0,0571	0,2500	0,4364
2	0,9727	0,9104	0,4571	0,8500	0,3455	0,0273	0,0896	0,5429	0,1500	0,6545
3	0,3812	0,0000	0,0000	0,6000	0,8182	0,6188	1,0000	1,0000	0,4000	0,1818
4	0,7361	0,9403	0,4857	0,5500	0,8545	0,2639	0,0597	0,5143	0,4500	0,1455
5	0,3650	0,9254	0,4857	0,5500	0,7273	0,6350	0,0746	0,5143	0,4500	0,2727
6	0,3003	0,8507	0,3143	0,4500	0,5091	0,6997	0,1493	0,6857	0,5500	0,4909
7	0,9626	0,8060	1,0000	0,8000	1,0000	0,0374	0,1940	0,0000	0,2000	0,0000
8	0,9717	0,7910	0,7714	0,9500	0,8364	0,0283	0,2090	0,2286	0,0500	0,1636
9	0,4712	0,9552	0,8571	0,5000	0,8000	0,5288	0,0448	0,1429	0,5000	0,2000
10	0,9141	0,2985	0,2286	1,0000	0,0000	0,0859	0,7015	0,7714	0,0000	1,0000
11	0,6552	0,3881	0,2857	0,8000	0,3818	0,3448	0,6119	0,7143	0,2000	0,6182
12	0,3428	0,4478	0,2857	0,5500	0,2000	0,6572	0,5522	0,7143	0,4500	0,8000
13	0,8756	0,7910	1,0000	0,8500	0,6182	0,1244	0,2090	0,0000	0,1500	0,3818
14	0,5703	0,6716	0,4571	0,6500	0,5091	0,4297	0,3284	0,5429	0,3500	0,4909
15	0,0000	0,4030	0,2286	0,0000	0,8000	1,0000	0,5970	0,7714	1,0000	0,2000
16	0,8675	0,7910	0,4857	0,6000	0,7818	0,1325	0,2090	0,5143	0,4000	0,2182
17	0,8018	1,0000	0,5143	0,5000	0,7636	0,1982	0,0000	0,4857	0,5000	0,2364
18	0,2781	0,5224	0,2000	0,4000	0,9636	0,7219	0,4776	0,8000	0,6000	0,0364

Y1-ефикасност флокулације (%), Y2, Y3, Y4 и Y5-представљају пречнике зоне инхибиције (mm) према изабраним фитопатогенима: *Xanthomonas* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp. и *Aspergillus* sp., редом

У оквиру прелиминарних испитивања, циљеви постизања добре ефикасности флокулације и високе антимикробне активности талога против изабраних фитопатогена оцењени су као подједнако значајни, односно свим одзивима је додељена иста тежина приликом израчунавања степена сиве релације. Вредности коефицијента сиве релације (GRC), степена сиве релације (GRG) и S/N конверзија степена сиве релације за сваку

серију приказани су у табели 5.6., при чему су веће вредности пожељније. Седма експериментална серија ($A_3B_1C_2D_1E_3$) одређена је као најповољнија комбинација процесних параметара (хитозан ch3, pH 5, концентрација флокуланта 55 mg/L, већа брзина мешања 450 о/мин и мања брзина мешања 50 о/мин), са GRG вредношћу од 0,8730.

Табела 5.6. Коефицијент сиве релације, степен сиве релације и сигнал/шум конверзија степена сиве релације за различите комбинације оперативних параметара

	Коефицијент сиве релације					**GRG**	**S/N**	**Ранг**
	Y1	**Y2**	**Y3**	**Y4**	**Y5**			
1	1,0000	0,8072	0,8974	0,6667	0,5340	0,7811	-2,14629	3
2	0,9482	0,8481	0,4795	0,7692	0,4331	0,6956	-3,15261	5
3	0,4469	0,3333	0,3333	0,5556	0,7333	0,4805	-6,36628	16
4	0,6545	0,8933	0,4930	0,5263	0,7746	0,6684	-3,49982	8
5	0,4405	0,8701	0,4930	0,5263	0,6471	0,5954	-4,50383	11
6	0,4168	0,7701	0,4217	0,4762	0,5046	0,5179	-5,71558	15
7	**0,9304**	**0,7204**	**1,0000**	**0,7143**	**1,0000**	**0,8730**	**-1,17951**	**1**
8	0,9464	0,7053	0,6863	0,9091	0,7534	0,8001	-1,93719	2
9	0,4860	0,9178	0,7778	0,5000	0,7143	0,6792	-3,36039	7
10	0,8533	0,4161	0,3933	1,0000	0,3333	0,5992	-4,44838	10
11	0,5919	0,4497	0,4118	0,7143	0,4472	0,5229	-5,63086	14
12	0,4321	0,4752	0,4118	0,5263	0,3846	0,4460	-7,01354	18
13	0,8008	0,7053	1,0000	0,7692	0,5670	0,7685	-2,28754	4
14	0,5378	0,6036	0,4795	0,5882	0,5046	0,5427	-5,30826	12
15	0,3333	0,4558	0,3933	0,3333	0,7143	0,4460	-7,01333	17
16	0,7906	0,7053	0,4930	0,5556	0,6962	0,6481	-3,76703	9
17	0,7161	1,0000	0,5072	0,5000	0,6790	0,6805	-3,34368	6
18	0,4092	0,5115	0,3846	0,4545	0,9322	0,5384	-5,37790	13

Y1-ефикасност флокулације (%), Y2, Y3, Y4 и Y5-представљају пречнике зоне инхибиције (mm) према изабраним фитопатогенима: *Xanthomonas* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp. и *Aspergillus* sp., редом

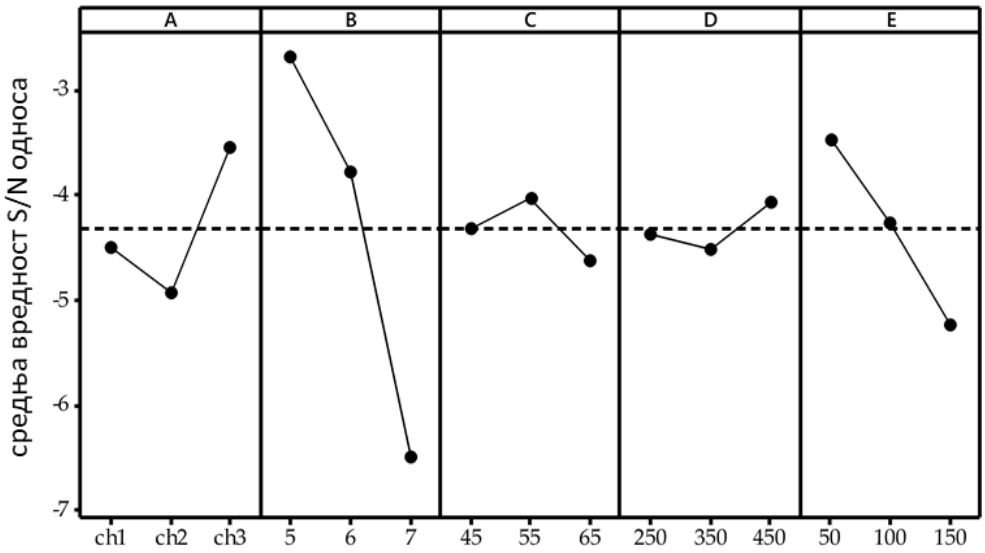
Табела 5.7. приказује резултате анализе варијансе S/N односа за GRG. Анализа добијених p-вредности за испитиване факторе флокулације показала је да pH вредност има највећи утицај на GRG (статистички значајан на нивоу значајности од 95%), а затим су следили тип хитозана, мања брзина мешања и концентрација флокуланта. Већа брзина мешања показал се као најмање значајан фактор утицаја на GRG.

Табела 5.7. Анализа варијансе за S/N односе степена сиве релације

	DF	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
A	2	10,2073	5,1037	3,01	0,114
B	**2**	**26,1180**	**13,0590**	**7,71**	**0,017**
C	2	1,3837	0,6918	0,41	0,680
D	2	0,3583	0,1791	0,11	0,901
E	2	3,0274	1,5137	0,89	0,451
Грешка	7	11,8635	1,6948		
Укупно	17	52,9581			

A-врста хитозана, B-pH вредност, C-концентрација хитозана (mg/mL), D-већа брзина мешања (о/мин), E-мања брзина мешања (о/мин)

Слика 5.2. приказује главне ефекте за S/N однос степена сиве релације. За разлику од резултата добијених приликом оптимизације искључиво ефикасности флокулације, примећене су израженије разлике између хитозана ch1 и ch3 када су узети у обзир и пречници зона инхибиције као додатни одзиви. Познато је да хитозан вишег степена деацетилације показује снажнију антимикробну активност (Jung и сар., 2010), што је у овом истраживању био случај са хитозаном ch3. Поред степена деацетилације, потенцијални разлог побољшаног утицаја хитозана ch3 у оквиру вишекритеријумске оптимизације може бити и разлика у молекулској маси примењених типова хитозана. Раније студије показале су да нижа молекулска маса хитозана негативно утиче на раст и размножавање микроорганизама (Goy и сар., 2009). Стога, у овом случају, хитозан са већом молекулском масом могао би имати повољан ефекат на антимикробну активност добијеног талога према одабраним фитопатогенима.



Слика 5.2. Главни ефекти за S/N анализу степена сиве релације (GRG) током флокулације културационе течности *Bacillus* sp. BioSol021 и испитивања антимикробне активности против изабраних фитопатогена: A-врста хитозана, B-pH вредност, C-концентрација хитозана (mg/mL), D-већа брзина мешања (о/мин), E-мања брзина мешања (о/мин)

Као што се може видети на сликама 5.1. и 5.2., pH вредност показује идентичан тренд у оба случаја оптимизације. Највеће GRG вредности, као и ефикасност флокулације хитозаном, добијене су у киселој средини (pH 5). У складу са тим, и антимикробна активност хитозана била је већа при нижим pH вредностима (Kong и сар., 2010; Sudarshan и сар., 1992).

У случају вишекритеријумске оптимизације, оптимална концентрација хитозана износила је 55 mg/L. Ови резултати су прилично охрабрујући због мање потрошње хитозана током процеса флокулације, што позитивно утиче на економску исплативост предложене методе накнадне обраде.

Утицај мање брзине мешања је већи у случају вишекритеријумске оптимизације него што је то био случај када се оптимизовала искључиво ефикасност флокулације. У

том случају, мања брзина мешања има стрмији нагиб (слика 5.2.) у односу на утицај који има на ефикасност флокулације. Исте вредности брзине мешања могу се применити и у случају вишеструке оптимизације.

На основу података приказаних на слици 5.2., оптимални фактори флокулације за постизање максималних вредности ефикасности флокулације и антимикробне активности против одабраних фитопатогена су $A_3B_1C_2D_3E_1$, односно: врста хитозана (ch3), pH 5, концентрација флокуланта 55 mg/L, већа брзина мешања 450 о/мин и мања брзина мешања 50 о/мин, редом.

Комбинација фактора $A_3B_1C_2D_3E_1$ представљала је оптималну комбинацију фактора у вишекритеријумској оптимизацији добијеној применом сиве релационе анализе, и као таква примењена је у валидационом експерименту. Резултати валидационог теста приказани су у табели 5.8.

Табела 5.8. Поређење резултата оптимизације и експерименталне валидације

Излаз	**Иницијални контролисани параметри**	**Оптимални контролисани параметри**	
		Предвиђено	Експериментално
Комбинација фактора	$A_3B_1C_2D_1E_3$	$A_3B_1C_2D_3E_1$	$A_3B_1C_2D_3E_1$
Y1	97,27	-	97,50
Y2	40,33	-	43,00
Y3	41,00	-	40,33
Y4	36,67	-	37,00
Y5	44,33		44,85
GRG	0,8730	0,8673	0,8956

A-врста хитозана, B-pH вредност, C-концентрација хитозана (mg/mL), D-већа брзина мешања (о/мин), E-мања брзина мешања (о/мин); Y1-ефикасност флокулације (%), Y2, Y3, Y4 и Y5-представљају пречнике зоне инхибиције (mm) против изабраних фитопатогена: *Xanthomonas* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp. и *Aspergillus* sp., редом

Добро слагање између стварне и предвиђене GRG вредности је постигнуто. Показано је да су различити аспекти процеса флокулације побољшани, што је довело до бољих вредности одзива.

Подаци из литературе указују на постојање синергијског ефекта између хитозана и ендофитских врста рода *Bacillus* (Rkhaila и сар., 2021) када је реч о антимикробној активности против биљних патогена. Антимикробна активност хитозана потврђена је против одабраних фитопатогена помоћу диск-дифузионе методе и методе бунарчића, при коришћењу хитозана ch3 у концентрацији од 55 mg/L. За све испитиване фитопатогене, пречник зоне инхибиције био је у опсегу од 13,5 до 15 mm. Даље анализе спроведене су ради процене и квантификације могуће синергије антимикробне активности између *Bacillus* sp. BioSol021 и хитозана. *Bacillus* sp. BioSol021 културациона течност центрифугирана је на 12 000 о/мин током 10 минута, а исталожена биомаса је ресуспендована до запремине флокулисаних узорака (флокулациони талог), како би се упоредила антимикробна активност саме биомасе и флокулисаних узорака. Резултати су показали да су тестирањем антимикробне активности суспендоване биомасе *Bacillus* sp.

BioSol021 без додатка хитозана измерене зоне инхибиције од 25,00 mm, 26,33 mm, 28,33 mm и 30,33 mm према *Xanthomonas* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., и *Aspergillus* sp., редом. С друге стране, резултати испитивања антимикробне активности флокулисаних узорака показали су следеће вредности прречника зона инхибиција против *Xanthomonas* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp. и *Aspergillus* sp.-43,00 mm; 40,33 mm; 37,00 mm и 44,85 mm, редом. Виша антимикробна активност флокулисаних узорака указује на синергијски ефекат између *Bacillus* sp. BioSol021 и хитозана у погледу антагонистичког ефекта према испитиваним фитопатогенима.

5.2. Примена хитозана за флокулацију биомасе *Bacillus* sp. култивисане на отпадним водама прехрамбене индустрије

Примарни циљ овог дела истраживања био је да се испита потенцијал хитозана као флокулационог агенса у процесу концентрисања биомасе *Bacillus* sp. BioSol021, култивисане ради производње биопестицида. У оквиру истраживања, анализиран је утицај концентрације хитозана и брзине мешања на процес флокулације култивационе течности *Bacillus* sp. BioSol021, добијене биолошким третманом отпадних вода из индустрије млечних производа (сирна сурутка), индустрије вина (отпадна вода од флотације вина) и индустрије производње воћних сокова. Други циљ обухватао је процену потенцијалног синергијског антимикробног ефекта хитозана у комбинацији са наведеном бактеријском биомасом према афлатоксигеној плесни *Aspergillus flavus*. Поред тога, спроведена је евалуација утицаја испитиваних фактора флокулације на брзину таложења и антимикробну активност флокулисане биомасе. У циљу оптимизације процеса издвајања биомасе и постизања максималне ефикасности флокулације, примењене су метода одзивне површине (RSM) и генетски алгоритам (GA), како би се постигао компромис између постављених циљева у оквиру оптимизације поступка издвајања.

5.2.1. Флокулација биомасе *Bacillus* sp. из култивационе течности на бази сирне сурутке

Отпадне воде индустрије млечних производа представљају погодан супстрат за култивацију микроорганизама, јер садрже висок удео лактозе, протеина и других нутријената неопходних за микробни раст (Dmitrović и сар., 2022). Њихова интеграција у биотехнолошке процесе представља еколошки и економски оправдан приступ, у складу са принципима циркуларне економије. Експериментални дизајн са две независне променљиве (концентрација хитозана и већа брзина мешања) и одзиви (ефикасност флокулације, брзина таложења, пречник зоне инхибиције) дати су у табели 5.9.

Табела 5.9. Експериментални дизајн и одзиви у случају флокулације КТС применом хитозана

Експеримент	**Фактори-независне променљиве**		**Одзиви-зависне променљиве**		
	Концентрација хитозана (mg/L)	Већа брзина мешања (о/мин)	Ефикасност флокулације (%)	Брзина таложења (mm/s)	Пречник зоне инхибиције (mm)
1	150	600	90,1	0,0708	52,13
2	150	150	91,2	0,1254	45,90
3	30	600	69,4	0,0566	47,03
4	30	150	73,3	0,1188	47,60
5	90	693,2	71,8	0,0600	51,00
6	90	56,8	77,6	0,1387	45,33
7	174,85	375	97,1	0,0667	51,00
8	5,15	375	68,6	0,0615	47,03
9	90	375	77,4	0,0758	54,40
10	90	375	79,6	0,0728	51,34

5.2.1.1. Ефикасност флокулације

Резиме анализе варијансе за полиномски модел другог реда приказан је у табели 5.10. Развијени модел за процену ефикасности флокулације показао се као статистички значајан, са p-вредношћу од 0,0011. Такође, резултати анализе варијансе показују високе вредности прилагођеног коефицијента детерминације (Adj. R^2= 96,47%). Поред високих вредности прилагођеног коефицијента детерминације, предложени полиномски модел другог реда за КТС није показао значајно одступање (p-вредност= 0,5355).

Табела 5.10. Анализа варијансе ефикасности флокулације КТС применом хитозана

Извор варијабилности	**DF**	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
Модел	5	870,7081	174,1416	50,1969	0,0011
Резидуал	4	13,8767	3,4692		
Одступање модела	3	11,2546	3,7515	1,4308	0,5355
Чиста грешка	1	2,6221	2,6221		
Укупно	9	884,5848			
		R^2	Adj. R^2	Adeq. Precision	
		0,9843	0,9647	20,9669	

DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

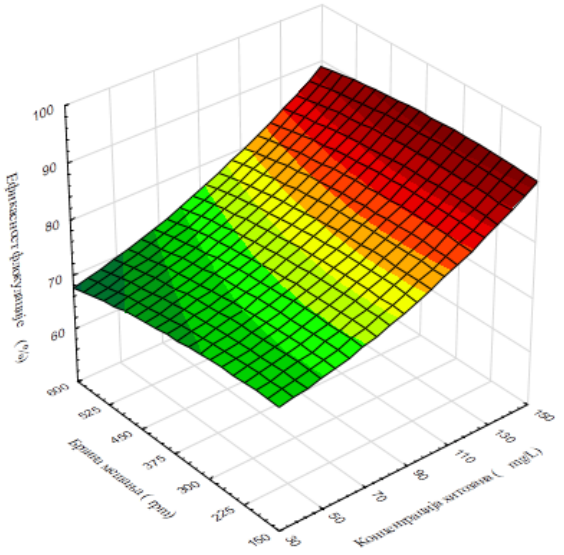
Параметар адекватна прецизност представља показатељ односа сигнал/шум, при чему је пожељно да је тај однос већи од 4. Добијени однос од 20,9669 за КТС, указује на адекватан сигнал, што потврђује поузданост модела.

Коефицијенти регресионе једначине за ефикасност флокулације, изражени у виду кодираних и стварних вредности променљивих, као и одговарајуће p-вредности, приказани су у табели 5.11. Линеарни (b_1, b_2), квадратни (b_{11}, b_{22}) и интеракциони (b_{12}) коефицијенти сваког модела сматрају се статистички значајним уколико су p-вредности мање од 0,05. Добијени резултати указују на статистичку значајност линеарних и квадратних ефеката концентрације хитозана.

Табела 5.11. Регресиони коефицијенти ефикасности флокулације КТС применом хитозана

Ефекти	**Коефицијент**		**p-вредност**
	Стварни	**Кодирани**	
Одсечак			
b_0	70,7245	78,5000	<0,0001
Линеарни			
b_1	0,0070	9,8575	0,0001
b_2	0,0077	-1,6416	0,0673
Квадратни			
b_{11}	0,0008	2,7388	0,0347
b_{22}	$-2{,}60\times10^{-5}$	-1,3388	0,1992
Интеракција			
b_{12}	$-5{,}43\times10^{-5}$	0,7325	0,4755

На слици 5.3. приказана је тродимензионална одзивна површина која илуструје утицај концентрације хитозана и брзине мешања на ефикасност флокулације.



Слика 5.3. Одзивна површина која описује утицај концентрације хитозана и брзине мешања на ефикасност флокулације КТС

Повећање концентрације хитозана у испитиваном опсегу доводи до континуираног раста ефикасности флокулације, која се повећава са ~ 70% на приближно 90%. Овај тренд уочљив је при свим испитиваним брзинама мешања. Добијени резултати су у сагласности са претходним истраживањима која указују на високу ефикасност хитозана у процесима издвајања биомасе микроалги и бактерија (Riaño и сар., 2012). За постизање задовољавајуће ефикасности флокулације, неопходна је релативно висока концентрација флокуланта у случајевима када је садржај нутријената у медијуму висок (Yang Z. и сар., 2014).

Као што је приказано на слици 5.3., ефикасност флокулације већа од 90% постигнута је при концентрацијама хитозана од 150 mg/L, без обзира на брзину мешања. Када је реч о утицају брзине мешања, делује да она има мање утицаја на ефикасност флокулације у поређењу са концентрацијом хитозана. Резултати који се односе на утицај брзине мешања на ефикасност флокулације у случају култивације на отпадној води од сурутке (слика 5.3.) показују да повећање брзине мешања доводи до благог смањења ефикасности. Веће брзине мешања имају тенденцију да наруше структуру већ формираних флокула при чему долази до њихове дисперзије и поновног враћања у течни медијум (Hadiyanto и сар., 2022).

5.2.1.2. Брзина таложења

Табела 5.12. приказује резултате анализе варијансе за квадратни модел брзине таложења у случају КТС. Регресиони модел је статистички значајан, што потврђује ниска p-вредност (<0,05), при чему p-вредност за полиномски модел другог реда износи 0,0047.

Табела 5.12. Анализа варијансе брзине таложења КТС применом хитозана

Извор варијабилности	**DF**	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
Модел	5	0,0081	0,0016	23,1802	0,0047
Резидуал	4	0,0003	$7{,}00\times10^{-5}$		
Одступање модела	3	0,0003	$9{,}00\times10^{-5}$	20,4778	0,1607
Чиста грешка	1	$5{,}00\times10^{-6}$	$5{,}00\times10^{-6}$		
Укупно	9	0,0084			
		R^2	Adj. R^2	Adeq. Precision	
		0,9666	0,9249	14,1569	

DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

Да би модел био адекватно прилагођен експерименталним подацима, p-вредност за проверу неприлагођености модела треба да буде већа од 0,05. Како је приказано у табели 5.12., добијена p-вредност за неприлагођеност модела у односу на брзину таложења износила је 0,1607. Овај резултат указује на то да не постоји статистички значајна разлика између експерименталних и предвиђених вредности, што потврђује добру прилагођеност модела.

Коефицијент детерминације за брзину таложења флокулисане КТС указује да приближно 4% варијација није могуће објаснити применом квадратног модела. Однос сигнал/шум од 14,1569, потврђује постојање адекватног сигнала и поузданост добијеног модела.

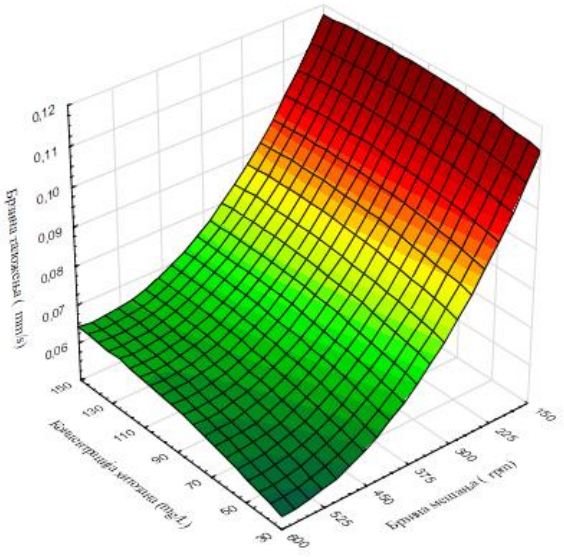
Коефицијенти регресионе једначине за брзину таложења, изражени у облику кодираних и стварних вредности променљивих, као и припадајуће p-вредности приказани су у табели 5.13. Резултати указују на статистичку значајност линеарног и квадратног утицаја брзине мешања.

Табела 5.13. Регресиони коефицијенти брзине таложења КТС применом хитозана

Ефекти	**Коефицијент**		**p-вредност**
	Стварни	**Кодирани**	
Одсечак			
b_0	0,1587	0,0743	<0,0001
Линеарни			
b_1	0,0001	0,0035	0,2999
b_2	-0,0004	-0,0285	0,0007
Квадратни			
b_{11}	$-6{,}30\times10^{-7}$	-0,0023	0,5918
b_{22}	$3{,}03\times10^{-7}$	0,0153	0,0173
Интеракција			
b_{12}	$1{,}39\times10^{-7}$	0,0019	0,6777

У нефлокулисаној култивационој течности, измерена брзина таложења за КТС износила је 0,061 mm/s. Слабо таложење муља, забележено је у већини постројења за прераду млечних отпадних вода која примењују аеробне процесе (Slavov, 2017).

Утицај концентрације хитозана и брзине мешања на брзину таложења флокулисаног медијума приказан је на слици 5.4. Повећање величине флокула након додавања хитозана доводи до убрзања процеса таложења и тиме до скраћења времена потребног за таложење. Ипак, постигнуте брзине таложења остају релативно ниске. Овакво понашање може се објаснити чињеницом да хитозан у киселој средини формира дуже ланце, што резултира стварањем мањих и слабије повезаних флокула (Riaño и сар., 2012).



Слика 5.4. Одзивна површина која описује утицај концентрације хитозана и брзине мешања на брзину таложења КТС

Слика 5.4. показује да брзина мешања има знатно већи утицај на брзину таложења медијума на бази сурутке у поређењу са утицајем концентрације хитозана у оквиру испитиваног опсега. Флокуле су се брже таложиле при нижим брзинама мешања. Веће брзине мешања могу довести до кидања флокула, што отежава њихово таложење (Riaño и сар., 2012). Са друге стране, повећање концентрације хитозана доводи до умереног пораста брзине таложења, при чему је тај ефекат израженији при већим брзинама мешања.

5.2.1.3. Пречник зоне инхибиције

Резултати анализе варијансе за квадратни модел пречника зоне инхибиције у случају КТС, приказани су у табели 5.14.

Табела 5.14. Анализа варијансе пречника зоне инхибиције КТС применом хитозана

Извор варијабилности	**DF**	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
Модел	5	78,0900	15,6184	9,8507	0,0229
Резидуал	4	6,3421	1,5855		
Одступање модела	3	1,6603	0,5534	0,1182	0,9379
Чиста грешка	1	4,6818	4,6818		
Укупно	9	84,4342			
		R^2	Adj. R^2	Adeq. Precision	
		0,9249	0,8310	7,5661	

DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

На основу p-вредности, која за КТС износи 0,0229, потврђује се статистичка значајност регресионе једначине модела. Као што је приказано у табели 5.14., p-вредност за тест неприлагођености модела у односу на пречник зоне инхибиције износи 0,9379, што указује на то да је модел успешно прилагођен добијеним експерименталним подацима. Релативно висока вредност коефицијента детерминације (R^2), која је изнад 0,75, потврђује да је модел погодан за поуздано представљање емпиријских података. Такође, вредност односа адекватне прецизности од 7,5661, указује на то да је однос сигнал/шум за одзив који се односи на пречник зоне инхибиције задовољавајући.

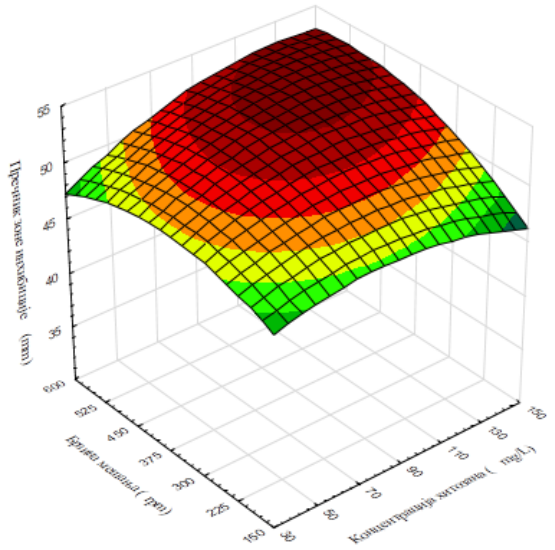
Коефицијенти регресионе једначине за пречник зоне инхибиције, изражени у облику кодираних и стварних вредности променљивих, као и припадајуће p-вредности, приказани су у табели 5.15. Добијени резултати указују на статистичку значајност линеарних и квадратних ефеката брзине мешања, као и квадратних ефеката концентрације хитозана у случају КТС.

Табела 5.15. Регресиони коефицијенти пречника зоне инхибиције КТС применом хитозана

Ефекти	**Коефицијент**		**p-вредност**
	Стварни	**Кодирани**	
Одсечак			
b_0	41,1790	52,8700	<0,0001
Линеарни			
b_1	0,0732	1,1262	0,0647
b_2	0,0327	1,7101	0,0184
Квадратни			
b_{11}	$-5{,}60\times10^{-4}$	-2,0329	0,0260
b_{22}	$-4{,}90\times10^{-5}$	-2,4579	0,0140
Интеракција			
b_{12}	$1{,}26\times10^{-4}$	1,7000	0,0541

Утицај концентрације хитозана и брзине мешања на пречник зоне инхибиције против плесни *Aspergillus flavus* флокулисане културационе течности приказан је на слици 5.5. Резултати показују да и културациона течност и хитозан позитивно утичу на антимикробну активност према испитиваном фитопатогену (*Aspergillus flavus*). Пречник зоне инхибиције нефлокулисаног узорка КТС износио је 42 mm. С обзиром на добро позната антимикробна својства хитозана, испитана је и антимикробна активност раствора хитозана, при чему су пречници зона инхибиције били у распону од 13 до 15

mm. Већи пречници зона инхибиције флокулисаних узорака култивационе течности указују на постојање синергијског ефекта између култивационе течности и раствора хитозана. Слични резултати, забележени су у литератури (Ahmad и сар., 2011; Rkhaila и сар., 2021; Mingzheng и сар., 2009).



Слика 5.5. Одзивна површина која описује утицај концентрације хитозана и брзине мешања на пречник зоне инхибиције КТС

Пречник зоне инхибиције достигао је максималне вредности у опсегу највећих концентрација хитозана, као и при највећим брзинама мешања. Потенцијална токсичност високе концентрације хитозана (до 150 mg/L) на виталност бактеријске културе *Bacillus* sp. BioSol021 није уочена. Након култивације, концентрација бактерија износила је 10,6 log CFU/mL. Након флокулације забележена је благо смањена вредност од 10,38 log CFU/mL, када је концентрација хитозана од 150 mg/L примењена. Тиме је потврђено да је сој задржао виталност и функционалност за предвиђену примену. Иако је повећање брзине мешања резултовало благим падом ефикасности флокулације (слика 5.3.), забележено је повећање пречника зоне инхибиције за већину експеримената (слика 5.5.).

Разлог за овакво понашање може се пронаћи у сложеној природи култивационих течности на бази отпадних вода из прехрамбене индустрије. Хитозан је познат адсорбенс за разне супстанце попут фармацеутика, ензима, боја и других органских једињења (Bodakowska-Boczniewicz и Garncarek, 2019; Rizzi и сар., 2019; Trikkaliotis и сар., 2022). Поред микробних ћелија, култивациона течност садржи и низ екстрацелуларних компоненти, као и заостале нутријенте из медијума. Све ове компоненте интерагују са хитозаном, утичући на ефикасност флокулације, а самим тим и на антимикробну активност флокулисаних узорака.

Hughes и сар. (1990), уочили су да на флокулацију бактеријских ћелија може утицати присуство различитих адсорбованих материја, али се ове компликације уклањају када се користе испране ћелије. Могуће је да су управо интеракције флокуланата са протеинима, полисахаридима и нуклеинским киселинама које настају током раста ћелија узрок овог ефекта (Hughes, 1990). Једна од супстанци која потенцијално утиче на ове интеракције је сурфактин, присутан у културационој течности. Концентрација сурфактина у КТС износила је 1,54 g/L (Dmitrović и сар., 2022). Сурфактин је липопептид познат по биосурфактантским особинма, али су бројна истраживања показала његову значајну улогу у инхибицији фунгалних патогена (Krishnan и сар., 2019).

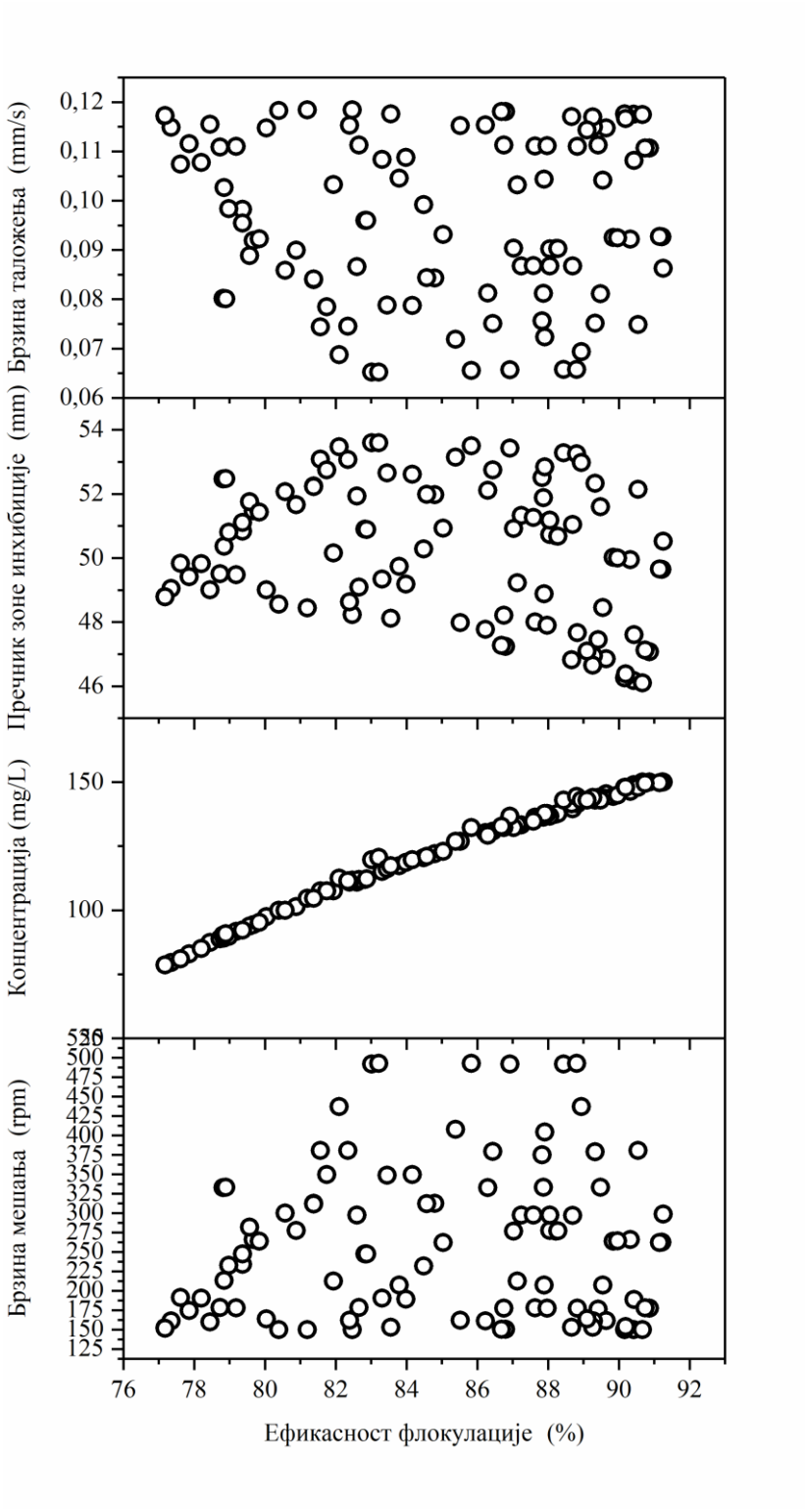
5.2.1.4. Оптимизација

Оптимизација оперативних услова током флокулације у процесу издвајања биомасе *Bacillus* sp. BioSol021 из културационе течности изведена је применом функције пожељности (DF) и генетског алгоритма (GA). Резултати оптимизације добијени GA методом приказани су на слици 5.6. Обе методе оптимизације имале су за циљ постизање максималних вредности три одзива моделована применом методе одзивне површине (RSM).

Оптимизација помоћу функције пожељности (DF) представља приступ којим се омогућава проналажење оптималних експерименталних услова за истовремено постизање максималних вредности више одзива. Метода функције пожељности омогућава комбиновање више циљних одзива у један жељени одзив. Одабрани одзиви претварају се у појединачне вредности пожељности, које се крећу у опсегу од 0 до 1. Укупна пожељност процеса одређује се као геометријска средина појединачних функција пожељности (Jokić и сар., 2021).

У почетној фази, функција пожељности примењена је на појединачне одзиве. За максимизацију ефикасности флокулације, оптимални услови (концентрација хитозана од 150 mg/L и брзина мешања од 298,45 о/мин) дали су вредност пожељности од 0,794, при чему је ефикасност флокулације износила 91,25%. У случају максимизације брзине таложења, оптимално решење (концентрација од 111,80 mg/L и брзина мешања од 150 о/мин) имало је пожељност од 0,753, а брзина таложења под овим условима била је 0,1184 mm/s. За максимизацију пречника зоне инхибиције, најповољнији услови (концентрација од 119,61 mg/L и брзина мешања од 491,82 о/мин) резултовали су пожељношћу од 0,911, док је пречник зоне инхибиције под овим условима износио 74,4 mm.

За КТС, оптимално решење остварено је при укупној пожељности од 0,553. Ово решење постигнуто је са концентрацијом хитозана од 141,23 mg/L и брзином мешања од 263,6 о/мин. При овим експерименталним условима, ефикасност флокулације износила је 89%, брзина таложења била је 0,09 mm/s, док је пречник зоне инхибиције достигао 50,18 mm.



Слика 5.6. Парето фронт и простор одлуке скупа оптималних решења добијених применом вишекритеријумског генетског алгоритма у случају КТС

Разлог за релативно ниску укупну вредност пожељности лежи у супротном утицају брзине мешања на ефикасност флокулације и брзину таложења. Док се са повећањем брзине мешања, ефикасност флокулације у мањој мери снижава, то доводи до значајнијег смањења брзине таложења. Као што је раније напоменуто, велике брзине мешања могу проузроковати разбијање флокула, што отежава њихово таложење (Riaño и остали, 2012). Што се тиче концентрације хитозана, оптимална вредност је ближа вишим концентрацијама у оквиру експерименталног опсега.

Контролни експерименти спроведени при оптималним условима показали су задовољавајуће слагање између предвиђених и експерименталних вредности. Овај резултат потврђује валидност предложеног полиномског модела другог реда за приказивање експерименталних резултата. Експериментално добијене оптималне вредности за ефикасност флокулације, брзину таложења и пречник зоне инхибиције у случају КТС износиле су 88%, 0,10 mm/s и 51,00 mm, редом.

Резултати мултикритеријалне оптимизације помоћу генетског алгоритма приказани су на слици 5.6. Проблем оптимизације решен је применом кодиране NSGA-II методе у MATLAB-у, чиме је добијен скуп Парето оптималних решења. За визуализацију Парето фронта у вишедимензионалном простору најчешће се користе дијаграми расејања и паралелне координате (Banerjee и сар., 2016; Yang K. и сар., 2017; Yan и сар., 2016).

Парето фронт и најбоља предикција добијена методом функције пожељности се подударају. Иако Парето фронт пружа велики број оптималних решења, одабир компромисног решења може бити изазован. Приликом избора одговарајућег решења могу се узети у обзир жељени циљ(еви) оптимизације. Ипак, често је потребно направити компромисе између различитих циљева (Jokić и сар., 2021).

5.2.2. Флокулација биомасе *Bacillus* sp. из култивационе течности на бази отпадне воде из винарије

Отпадне воде винарија представљају погодан супстрат за култивацију микроорганизама, јер садрже нутритивно вредна органска једињења као што су шећери, алкохоли, киселине, полифеноли и уља. Висок садржај ових органских материја обезбеђује извор угљеника и енергије за различите биотехнолошке процесе, чиме се истовремено смањује загађење животне средине и омогућава добијање производа са додатом вредношћу (Dmitrović и сар., 2022). Експериментални дизајн са две независне променљиве (концентрација хитозана и већа брзина мешања) и одзиви (ефикасност флокулације, брзина таложења, пречник зоне инхибиције) дати су у табели 5.16.

Табела 5.16. Експериментални дизајн и одзиви у случају флокулације КТВ применом хитозана

Есперимент	**Фактори-независне променљиве**		**Одзиви-зависне променљиве**		
	Концентрација хитозана (mg/L)	Већа брзина мешања (о/мин)	Ефикасност флокулације (%)	Брзина таложења (mm/s)	Пречник зоне инхибиције (mm)
1	400	600	97,6	0,0217	49,85
2	400	150	96,8	0,0225	42,23
3	120	600	76,9	0,0538	39,68
4	120	150	74,6	0,0451	47,22
5	260	693,2	86,2	0,0355	43,24
6	260	56,8	87,8	0,0379	44,72
7	457,99	375	99,3	0,0216	47,43
8	62,01	375	67,5	0,0667	38,37
9	260	375	93,6	0,0524	47,72
10	260	375	92,0	0,0507	45,45

5.2.2.1. Ефикасност флокулације

Резиме анализе варијансе за полиномски модел другог реда приказан је у табели 5.17. Развијени модел за процену ефикасности флокулације показао се као статистички значајан, са p-вредношћу од 0,0003. Такође, резултати анализе варијансе показују високе вредности прилагођеног коефицијента детерминације (Adj. R^2= 98,15%). Поред високих вредности прилагођеног коефицијента детерминације, предложени полиномски модел другог реда за КТВ није показао значајно одступање (p-вредност= 0,4743).

Табела 5.17. Анализа варијансе ефикасности флокулације КТВ применом хитозана

Извор варијабилности	**DF**	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
Модел	5	1056,1800	211,2360	96,3548	0,0003
Резидуал	4	8,7691	2,1923		
Одступање модела	3	7,4891	2,4964	1,9503	0,4743
Чиста грешка	1	1,2800	1,2800		
Укупно	9	1064,9490			
		R^2	Adj. R^2	Adeq. Precision	
		0,9918	0,9815	27,0894	

DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

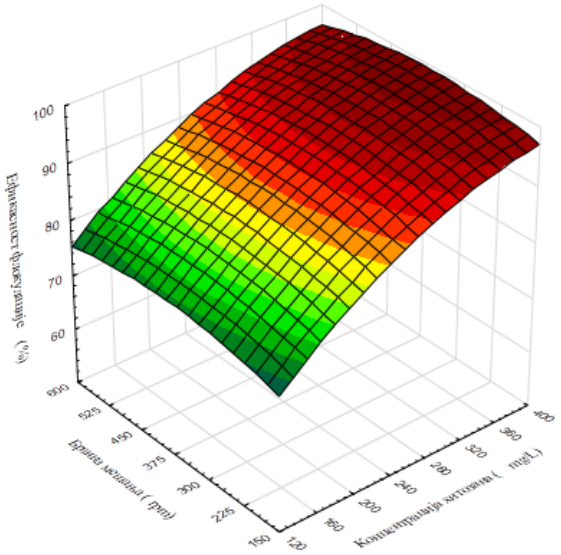
Параметар адекватна прецизност представља показатељ односа сигнал/шум, при чему је пожељно да је тај однос већи од 4. Добијени однос од 27,0894 за КТВ указује на адекватан сигнал, што потврђује поузданост модела.

Коефицијенти регресионе једначине за ефикасност флокулације, изражени у виду кодираних и стварних вредности променљивих, као и одговарајуће p-вредности, приказани су у табели 5.18. Линеарни (b_1, b_2), квадратни (b_{11}, b_{22}) и интеракциони (b_{12}) коефицијенти сваког модела сматрају се статистички значајним уколико су p-вредности мање од 0,05. Добијени резултати указују на статистичку значајност линераних ефеката концентрације хитозана и квадратних ефеката за оба фактора.

Табела 5.18. Регресиони коефицијенти ефикасности флокулације КТВ применом хитозана

Ефекти	**Коефицијент**		**p-вредност**
	Стварни	**Кодирани**	
Одсечак			
b_0	48,7680	92,8000	<0,0001
Линеарни			
b_1	0,1989	10,9844	<0,0001
b_2	0,0420	0,1219	0,8273
Квадратни			
b_{11}	$-2{,}20\times10^{-4}$	-4,3719	0,0032
b_{22}	$-5{,}00\times10^{-5}$	-2,5883	0,0202
Интеракција			
b_{12}	$-1{,}19\times10^{-5}$	-0,3750	0,6391

На слици 5.7. приказана је тродимензионална одзивна површина која илуструје утицај концентрације хитозана и брзине мешања на ефикасност флокулације.



Слика 5.7. Одзивна површина која описује утицај концентрације хитозана и брзине мешања на ефикасност флокулације КТВ

Повећање концентрације хитозана у испитиваном опсегу доводи до континуираног раста ефикасности флокулације, од почетних вредности које износе ~ 75% до вредности које су приближне максималној ефикасности од готово 100%. Овакав тренд је запажен и у случају културационе течности на бази сирне сурутке и конзистентан је при свим испитиваним брзинама мешања. Добијени резултати су у сагласности са претходним истраживањима која указују на високу ефикасност хитозана у процесима издвајања биомасе микроалги и бактерија (Riaño и сар., 2012). За постизање задовољавајуће ефикасности флокулације, неопходна је релативно висока концентрација флокуланта у случајевима када је садржај нутријената у медијуму висок (Yang Z. и сар., 2014).

Када је реч о утицају брзине мешања, делује да она има мање утицаја на ефикасност флокулације у поређењу са концентрацијом хитозана, што је такође уочено и у случају КТС.

За постизање флокулације у случају КТВ била је потребна већа концентрација хитозана (слика 5.7.). Концентрација хитозана потребна за ефикасност флокулације већу од 80% износила је 300 mg/L, што је три пута више у поређењу са супстратом на бази отпадне воде од сурутке. Ово се може објаснити чињеницом да отпадна вода из винарије има већи садржај суве материје у односу на сурутку (Dmitrović и сар., 2022; Xu и сар., 2013). Када је у питању ова културациона течност, повећање брзине мешања доводи до благог пораста ефикасности флокулације. Тај пораст је уочљив при брзинама мешања до приближно 350 о/мин. Даље повећање брзине мешања доводи до незнатног смањења ефикасности флокулације. Овакав тренд је уочен при свим испитиваним концентрацијама хитозана. При нижим брзинама мешања, контакт између полимерних молекула и површине честица није довољно ефикасан, па се повећање ефикасности постиже интензивнијим мешањем (Duzyol, 2018). Међутим, интензивно мешање може довести до кидања већ формираних флокула, као и до поновне адсорпције молекула полимера на исту површину честице, чиме се додатно спречава формирање мостова између честица (Duzyol, 2018). Као последица тога, долази до поновне дисперзије честица у медијуму и пада ефикасности флокулације.

5.2.2.2. Брзина таложења

Табела 5.19. приказује резултате анализе варијансе за квадратни модел брзине таложења у случају КТВ. Регресиони модел је статистички значајан, што потврђује ниска p-вредност (<0,05), при чему p-вредност за полиномски модел другог реда износи 0,0045.

Да би модел био адекватно прилагођен експерименталним подацима, p-вредност за проверу неприлагођености модела треба да буде већа од 0,05. Како је приказано у табели 5.19., добијена p-вредност за неприлагођеност модела у односу на брзину таложења износила је 0,1805. Ови резултати указују на то да не постоји статистички

значајна разлика између експерименталних и предвиђених вредности, што потврђује добру прилагођеност модела.

Табела 5.19. Анализа варијансе брзине таложења КТВ применом хитозана

Извор варијабилности	**DF**	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
Модел	5	0,0021	0,0004	23,8604	0,0045
Резидуал	4	$7{,}00\times10^{-5}$	$2{,}00\times10^{-5}$		
Одступање модела	3	$7{,}00\times10^{-5}$	$2{,}00\times10^{-5}$	16,1489	0,1805
Чиста грешка	1	$1{,}50\times10^{-6}$	$1{,}50\times10^{-6}$		
Укупно	9	0,0022			
		R^2	Adj. R^2	Adeq. Precision	
		0,9676	0,9270	14,8134	

DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

Коефицијент детерминације за брзину таложења флокулисане КТВ указује да приближно 3% варијација није могуће објаснити применом квадратног модела. Однос сигнал/шум од 12,8134, потврђује постојање адекватног сигнала и поузданост добијеног модела.

Коефицијенти регресионе једначине за брзину таложења, изражени у облику кодираних и стварних вредности променљивих, као и припадајуће p-вредности приказани су у табели 5.20. Резултати указују на статистичку значајност линеарног утицаја концентрације хитозана и квадратног утицаја брзине мешања.

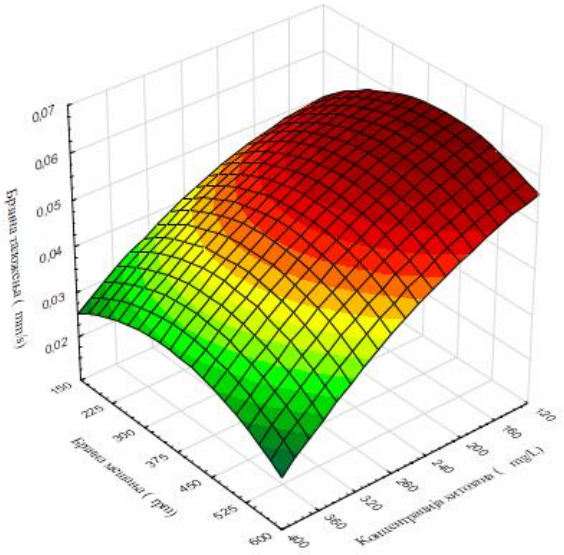
Табела 5.20. Регресиони коефицијенти брзине таложења КТВ применом хитозана

Ефекти	**Коефицијент**		**p-вредност**
	Стварни	**Кодирани**	
Одсечак			
b_0	0,0301	0,0516	<0,0001
Линеарни			
b_1	$5{,}21\times10^{-4}$	-0,0148	0,0006
b_2	0,0002	0,0006	0,7247
Квадратни			
b_{11}	$-2{,}50\times10^{-7}$	-0,0049	0,0687
b_{22}	$-1{,}70\times10^{-7}$	-0,0086	0,0121
Интеракција			
b_{12}	$-7{,}50\times10^{-8}$	-0,0024	0,3239

У нефлокулисаној култивационој течности, измерена брзина таложења износила је 0,004 mm/s. Отпадна вода из винарије карактерише се већим садржајем суспендованих чврстих материја и мањим уделом таложивих честица, што отежава процес таложења биомасе настале током биолошке обраде и тиме смањује поузданост самог процеса (Bolzonella и сар., 2019).

Утицај концентрације хитозана и брзине мешања на брзину таложења флокулисаног медијума приказан је на слици 5.8. Повећање величине флокула након додавања хитозана доводи до убрзања процеса таложења и тиме до скраћења времена потребног за таложење. Ипак, постигнуте брзине таложења остају релативно ниске.

Овакво понашање може се објаснити чињеницом да хитозан у киселој средини формира дуже ланце, што резултира стварањем мањих и слабије повезаних флокула (Riaño и сар., 2012).



Слика 5.8. Одзивна површина која описује утицај концентрације хитозана и брзине мешања на брзину таложења КТВ

Резултати експеримената таложења за КТВ приказани су на слици 5.8. Повећање концентрације хитозана показује другачији тренд у односу на резултате добијене за КТС. Са порастом концентрације хитозана долази до благог смањења брзине таложења. Овакво понашање може се објаснити тиме што је опсег концентрација хитозана у овом случају значајно већи у поређењу са опсегом примењеним за супстрат на бази сурутке, табела 4.3. Резултати показују да повећањем концентрације хитозана са 120 mg/L на 400 mg/L, при највећој брзини мешања (600 о/мин), брзина таложења опада за 50%. Сличан тренд смањења брзине таложења примећен је и при другим брзинама мешања. Ово се може објаснити тиме што већа концентрација хитозана доводи до интензивније адсорпције на површину честица, чиме се повећава њихово позитивно наелектрисање. Као последица тога, јављају се снажне електростатичке одбојне силе између честица, што значајно отежава процес таложења (Ahmad и сар., 2011; Feng и сар., 2017; Lichtfouse и сар., 2019). Када је реч о утицају брзине мешања, примећено је да повећање брзине мешања до 350 о/мин доводи до благог пораста брзине таложења, док даље повећање узрокује смањење брзине таложења (слика 5.8.). Након додатка хитозана, долази до мешања суспензије, што омогућава формирање већих флокула које се брже таложе. Међутим, при брзинама мешања изнад 350 о/мин долази до разбијања флокула, што отежава њихово таложење (Riaño и сар., 2012).

5.2.2.3. Пречник зоне нхибиције

Резултати анализе варијансе за квадратни модел пречника зоне инхибиције у случају КТВ, приказани су у табели 5.21.

Табела 5.21. Анализа варијансе пречника зоне инхибиције КТВ применом хитозана

Извор варијабилности	**DF**	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
Модел	5	109,6000	21,9202	6,3257	0,0491
Резидуал	4	13,8612	3,4653		
Одступање модела	3	11,2733	3,7578	1,4522	0,5325
Чиста грешка	1	2,5877	2,5877		
Укупно	9	123,4618			
		R^2	Adj. R^2	Adeq. Precision	
		0,8877	0,7474	8,3791	

DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

На основу p-вредности, која за КТВ износи 0,0491, потврђује се статистичка значајност регресионе једначине модела. Као што је приказано у табели 5.21., p-вредност за тест неприлагођености модела у односу на пречник зоне инхибиције износи 0,5325, што указује на то да је модел успешно прилагођен добијеним експерименталним подацима. Релативно висока вредност коефицијента детерминације (R^2), која је изнад 0,75, потврђује да је модел погодан за поуздано представљање емпиријских података. Такође, вредност односа адекватне прецизности од 8,3791, указује на то да је однос сигнал/шум за одзив који се односи на пречник зоне инхибиције задовољавајући.

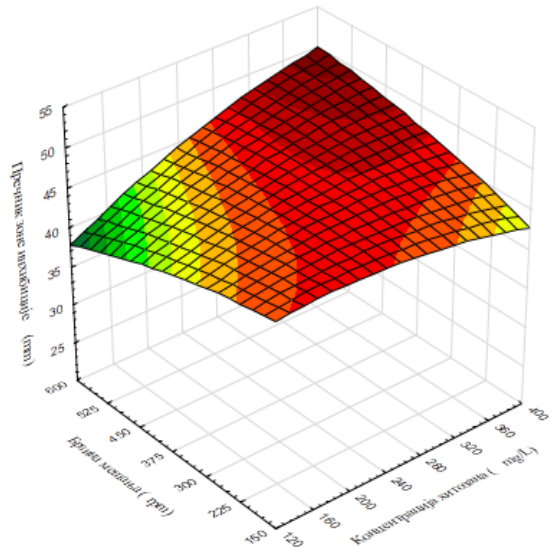
Коефицијенти регресионе једначине за пречник зоне инхибиције, изражени у облику кодираних и стварних вредности променљивих, као и припадајуће p-вредности, приказани су у табели 5.22. Добијени резултати указују на статистичку значајност линеарних ефеката концентрације хитозана и интеракционих ефеката концентрације хитозана и брзине мешања.

Табела 5.22. Регресиони коефицијенти пречника зоне инхибиције КТВ применом хитозана

Ефекти	**Коефицијент**		**p-вредност**
	Стварни	**Кодирани**	
Одсечак			
b_0	46,6231	46,5834	<0,0001
Линеарни			
b_1	0,0732	1,1262	0,0647
b_2	0,0327	1,7101	0,0184
Квадратни			
b_{11}	$-7{,}70\times10^{-5}$	-1,5167	0,1565
b_{22}	$-1{,}90\times10^{-5}$	-0,9750	0,3255
Интеракција			
b_{12}	0,0001	3,7917	0,0152

Утицај концентрације хитозана и брзине мешања на пречник зоне инхибиције против плесни *Aspergillus flavus* флокулисане културационе течности приказан је на слици 5.9. Резултати показују да и културациона течност и хитозан позитивно утичу на

антимикробну активност према испитиваном фитопатогену (*Aspergillus flavus*). Пречник зоне инхибиције нефлокулисаног узорка КТВ износио је 35 mm. С обзиром на добро позната антимикробна својства хитозана, испитана је и антимикробна активност раствора хитозана, при чему су пречници зона инхибиције били у распону од 13 до 15 mm. Већи пречници зона инхибиције флокулисаних узорака културационе течности указују на постојање синергијског ефекта између културационе течности и раствора хитозана. Слични резултати, забележени су у литератури (Ahmad и сар., 2011; Rkhaila и сар., 2021; Mingzheng и сар., 2009).



Слика 5.9. Одзивна површина која описује утицај концентрације хитозана и брзине мешања на пречник зоне инхибиције КТВ

Пречник зоне инхибиције достигао је максималне вредности у опсегу највећих концентрација хитозана, као и при највећим брзинама мешања. Потенцијална токсичност високе концентрације хитозана (до 400 mg/L) на виталност бактеријске културе *Bacillus* sp. BioSol021 није уочена. Након културације, концентрација бактерија износила је 9,6 log CFU/mL. Након флокулације забележена је благо смањена вредност од 9,44 log CFU/mL, када је концентрација хитозана од 400 mg/L примењена. Тиме је потврђено да је сој задржао виталност и функционалност за предвиђену примену. Иако је повећање брзине мешања резултовало благим падом ефикасности флокулације (слика 5.7.), забележено је повећање пречника зоне инхибиције за већину експеримената (слика 5.9.).

Разлог за овакво понашање може се пронаћи у сложеној природи културационих течности на бази отпадних вода из прехрамбене индустрије. Хитозан је познат адсорбенс за разне супстанце попут фармацеутика, ензима, боја и других органских једињења (Bodakowska-Boczniewicz и Garncarek, 2019; Rizzi и сар., 2019; Trikkaliotis и сар., 2022). Поред микробних ћелија, културациона течност садржи и низ екстрацелуларних

компоненти, као и заостале нутријенте из медијума. Све ове компоненте интерагују са хитозаном, утичући на ефикасност флокулације, а самим тим и на антимикробну активност флокулисаних узорака.

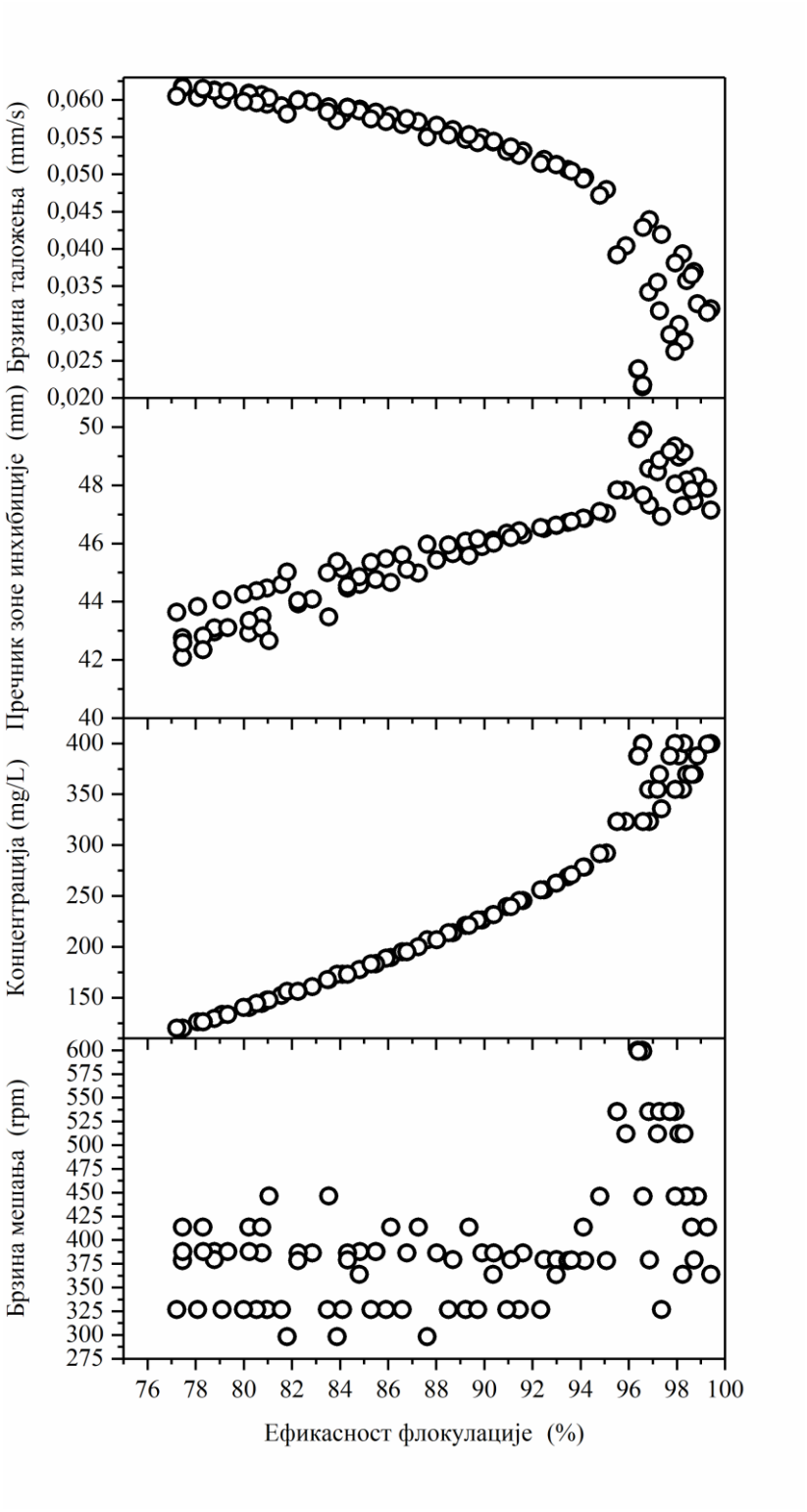
Hughes и сар. (1990), уочили су да на флокулацију бактеријских ћелија може утицати присуство различитих адсорбованих материја, али се ове компликације уклањају када се користе испране ћелије. Могуће је да су управо интеракције флокуланата са протеинима, полисахаридима и нуклеинским киселинама које настају током раста ћелија узрок овог ефекта (Hughes и сар., 1990). Једна од супстанци која потенцијално утиче на ове интеракције је сурфактин, присутан у културационој течности. Концентрација сурфактина у КТВ износила је 2,65 g/L (Dmitrović и сар., 2022). Сурфактин је липопептид познат по биосурфактантским особинма, али су бројна истраживања показала његову значајну улогу у инхибицији фунгалних патогена (Krishnan и сар., 2019).

Иницијални пад пречника зоне инхибиције, забележен при нижим концентрацијама хитозана уз повећање брзине мешања (слика 5.9.), може бити последица мање концентрације хитозана у суспензији. Ова концентрација може бити недовољна за флокулацију других супстанци присутних у медијуму на бази отпадне воде из винарије, који већ садржи висок удео суве материје у поређењу са суротком (Dmitrović и сар., 2022; Hadiyanto и сар., 2022).

5.2.2.4. Оптимизација

Оптимизација оперативних услова током флокулације у процесу издвајања биомасе *Bacillus* sp. BioSol021 из културационе течности изведена је применом функције пожељности (DF) и генетског алгоритма (GA). Резултати оптимизације добијени GA методом приказани су на слици 5.10. Обе методе оптимизације имале су за циљ постизање максималних вредности три одзива моделована применом методе одзивне површине (RSM).

У почетној фази, функција пожељности примењена је на појединачне одзиве. За максимизацију ефикасности флокулације, оптимални услови (концентрацији хитозана од 397,96 mg/L и брзина мешања од 353,33 о/мин) дали су вредност пожељности од 1,00, при чему је ефикасност флокулације износила 99,38%. У случају максимизације брзине таложења, оптимално решење (концентрација од 120 mg/L и брзина мешања од 413,46 о/мин) имало је пожељност од 0,891, а брзина таложења под овим условима била је 0,0618 mm/s. За максимизацију пречника зоне инхибиције, најповољнији услови (концентрација од 399,93 mg/L и брзина мешања од 597,33 о/мин) резултовали су пожељношћу од 1,00, док је пречник зоне инхибиције под овим условима износио 49,86 mm.



Слика 5.10. Парето фронт и простор одлуке скупа оптималних решења добијених применом вишекритеријумског генетског алгоритма у случају КТВ

За КТВ, оптимално решење остварено је при укупној пожељности од 0,727. Ово решење постигнуто је са концентрацијом хитозана од 280,60 mg/L и брзином мешања од 384,95 о/мин. При овим експерименталним условима, ефикасност флокулације износила је 94%, брзина таложења била је 0,05 mm/s, док је пречник зоне инхибиције достигао 46,89 mm. Оптимална брзина мешања је у складу са резултатима за ефикасност флокулације и брзину таложења, будући да су оптималне вредности ових одзива постигнуте при приближно 350 о/мин. Као што се може видети на сликама 5.7. и 5.8., уочава се појас највиших вредности одзива управо око те брзине мешања, и то за све испитане концентрације хитозана. Када је у питању концентрација хитозана, оптимална вредност (280,60 mg/L) представља компромис између повећане ефикасности флокулације која се добија са повећањем концентрације и истовременог смањења брзине таложења услед поменутог повећања концентрације хитозана.

Контролни експерименти спроведени при оптималним условима показали су задовољавајуће слагање између предвиђених и експерименталних вредности. Овај резултат потврђује валидност предложеног полиномског модела другог реда за приказивање експерименталних резултата. Експериментално добијене оптималне вредности за ефикасност флокулације, брзину таложења и пречник зоне инхибиције у случају КТВ износиле су 95%, 0,05 mm/s и 48,00 mm, редом.

Резултати мултикритеријалне оптимизације помоћу генетског алгоритма приказани су на слици 5.10. Проблем оптимизације решен је применом кодиране NSGA-II методе у MATLAB-у, чиме је добијен скуп Парето оптималних решења.

Парето фронт и најбоља предикција добијена методом функције пожељности се подударају. Парето фронт указује на контрадикторан однос између ефикасности флокулације, брзине таложења и пречника зоне инхибиције (слика 5.10.) при чему са повећањем концентрације хитозана, ефикасност флокулације расте, док брзина таложења опада. Стога се као најадекватније издваја компромисно решење добијено методом функције пожељности, јер најефикасније усаглашава различите циљеве.

5.2.3. Флокулација биомасе *Bacillus* sp. из културационе течности на бази отпадне воде из производње воћних сокова

Отпадне воде из производње воћних сокова представљају погодан супстрат за културацију микроорганизама, због високог садржаја органских материја, пре свега шећера, киселина и осталих нутријената који могу служити као извор угљеника и енергије. Њихова примена у биотехнолошким процесима представља одржив начин валоризације и смањења загађења (Dmitrović и сар., 2025). Експериментални дизајн са две независне променљиве (концентрација хитозана и већа брзина мешања) и одзиви (ефикасност флокулације, брзина таложења, пречник зоне инхибиције) дати су у табели 5.23.

Табела 5.23. Експериментални дизајн и одзиви у случају флокулације КТВС применом хитозана

Есперимент	**Фактори-независне променљиве**		**Одзиви-зависне променљиве**		
	Концентрација хитозана (mg/L)	Већа брзина мешања (о/мин)	Ефикасност флокулације (%)	Брзина таложења (mm/s)	Пречник зоне инхибиције (mm)
1	250	100	80,6	0,0533	68,67
2	600	100	97,2	0,0369	74,00
3	250	300	80,0	0,0451	66,67
4	600	300	96,5	0,0323	65,00
5	177,5	200	84,0	0,0730	65,00
6	672,5	200	98,8	0,0433	71,00
7	425	58,6	89,0	0,0356	73,33
8	425	341,4	87,9	0,0378	66,67
9	425	200	91,4	0,0338	66,00
10	425	200	90,9	0,0304	65,33

5.2.3.1. Ефикасност флокулације

Резиме анализе варијансе за полиномски модел другог реда приказан је у табели 5.24. Развијени модел за процену ефикасности флокулације показао се као статистички значајан, са p-вредношћу од 0,0124. Статистичка значајност добијеног модела за КТВС додатно је потврђена F-вредношћу од 13,8272 и p-вредношћу теста неадекватног прилагођавања (0,0978), која није била статистички значајна.

Табела 5.24. Анализа варијансе ефикасности флокулације КТВС применом хитозана

Извор варијабилности	**DF**	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
Модел	5	379,9947	75,9989	13,8272	0,0124
Резидуал	4	21,9853	5,4963		
Одступање модела	3	21,8553	7,2851	56,0176	0,0978
Чиста грешка	1	0,1301	0,1301		
Укупно	9	401,9800			
		R^2	Adj. R^2	Adeq. Precision	
		0,9453	0,8769	10,5085	

DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

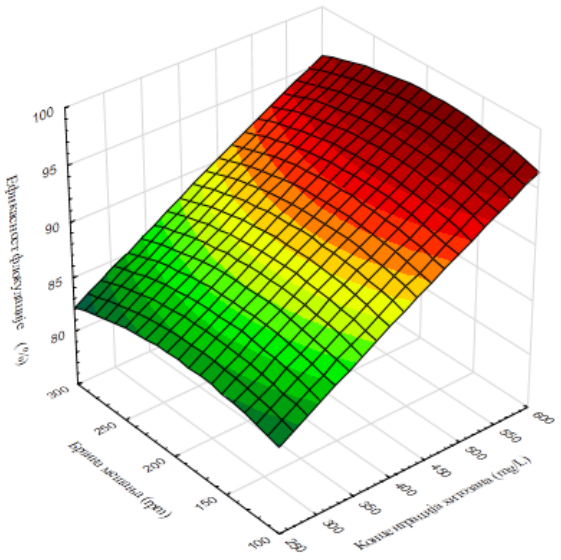
Параметар адекватна прецизност представља показатељ односа сигнал/шум, при чему је пожељно да је тај однос већи од 4. Добијени однос од 10,5085 за КТВС указује на адекватан сигнал, што потврђује поузданост модела.

Коефицијенти регресионе једначине за ефикасност флокулације, изражени у виду кодираних и стварних вредности промењивих, као и одговарајуће p-вредности, приказани су у табели 5.25. Линеарни (b_1, b_2), квадратни (b_{11}, b_{22}) и интеракциони (b_{12}) коефицијенти сваког модела сматрају се статистички значајним уколико су p-вредности мање од 0,05. Добијени резултати указују на статистичку значајност линеарног утицаја концентрације хитозана, док остали фактори нису показали статистичку значајност.

Табела 5.25. Регресиони коефицијенти ефикасности флокулације КТВС применом хитозана

Ефекти	**Коефицијент**		**p-вредност**
	Стварни	**Кодирани**	
Одсечак			
b_0	67,4120	91,1851	<0,0001
Линеарни			
b_1	0,0446	6,7466	0,0012
b_2	0,0647	-0,3656	0,6820
Квадратни			
b_{11}	$-7{,}00\times10^{-6}$	-0,2142	0,8546
b_{22}	-0,0002	-1,7049	0,1950
Интеракција			
b_{12}	$-4{,}29\times10^{-7}$	-0,0075	0,9952

На слици 5.11. приказана је тродимензионална одзивна површина која илуструје утицај концентрације хитозана и брзине мешања на ефикасност флокулације.



Слика 5.11. Одзивна површина која описује утицај концентрације хитозана и брзине мешања на ефикасност флокулације КТВС

Повећање концентрације хитозана у испитиваном опсегу доводи до континуираног раста ефикасности флокулације, од почетних вредности које износе ~ 82% до вредности од преко 95%. Овакав тренд је запажен и у случају културационих течности на бази сирне сурутке, односно отпадне воде из винарије и конзистентан је при свим испитиваним брзинама мешања. Добијени резултати су у сагласности са претходним истраживањима која указују на високу ефикасност хитозана у процесима издвајања биомасе микроалги и бактерија (Riaño и сар., 2012). За постизање задовољавајуће ефикасности флокулације, неопходна је релативно висока концентрација флокуланта у случајевима када је садржај нутријената у медијуму висок (Yang Z. и сар., 2014).

Када је реч о утицају брзине мешања, делује да она има мање утицаја на ефикасност флокулације у поређењу са концентрацијом хитозана, што је у складу са резултатима добијеним за претходне две културационе течности (слике 5.3. и 5.7.).

Као што је приказано на слици 5.11., у случају КТВС, при свим брзинама мешања постигнута је ефикасност већа од 90% за концентрације хитозана изнад 450 mg/L, док је максимална вредност од 98,83% забележена при додатку 672,5 mg/L хитозана (табела 4.4.). У овом опсегу концентрација хитозана долази до ефекта засићења, тако да даљи пораст концентрације (изнад 700 mg/L) може благо смањити ефикасност флокулације. Повећање ефикасности видљиво је при порасту брзине мешања до 200 о/мин, док даље повећање резултира благим падом ефикасности. Овакав образац запажен је у целом посматраном опсегу концентрација хитозана. При нижим брзинама мешања, контакт између полимера и честица није довољан за формирање стабилних флокула. Повећањем брзине мешања, ефикасност се побољшава захваљујући бољој дисперзији и контакту између компоненти. Међутим, преинтензивно мешање може механички нарушити формиране флокуле и изазвати поновну адсорпцију истих полимерних молекула на површину исте честице, чиме се спречава даље умрежавање (Duzyol, 2018). Резултат тога је поновно распршивање честица и пад ефикасности флокулације. На индустријском нивоу, могуће решење представља примена вишестепеног процеса мешања, при чему се у почетној фази примењује висока брзина мешања ради ефикасне дисперзије и формирања флокула, док се у каснијим фазама користи нижа брзина како би се спречило њихово нарушавање. Детаљна анализа овог приступа биће обухваћена у наредној фази истраживања кроз експерименте скалирања процеса.

5.2.3.2. Брзина таложења

Табела 5.26. приказују резултате анализе варијансе за квадратни модел брзине таложења у случају КТВС. Регресиони модел је статистички значајан, што потврђује ниска p-вредност (<0,05), при чему p-вредност за полиномски модел другог реда износи 0,0262.

Да би модел био адекватно прилагођен експерименталним подацима, p-вредност за проверу неприлагођености модела треба да буде већа од 0,05. Како је приказано у

табели 5.26., добијена p-вредност за неприлагођеност модела у односу на брзину таложења износила је 0,2827. Ови резултати указују на то да не постоји статистички значајна разлика између експерименталних и предвиђених вредности, што потврђује добру прилагођеност модела.

Табела 5.26. Анализа варијансе ефикасности флокулације КТВС применом хитозана

Извор варијабилности	**DF**	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
Модел	5	0,0014	0,0003	9,1225	0,0262
Резидуал	4	0,0001	$2,99\times10^{-5}$		
Одступање модела	3	0,0001	$3,78\times10^{-5}$	6,3129	0,2827
Чиста грешка	1	$5,99\times10^{-6}$	$5,99\times10^{-6}$		
Укупно	9	0,0015			
		R^2	Adj. R^2	Adeq. Precision	
		0,9194	0,8186	8,4735	

DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

Коефицијент детерминације за брзину таложења флокулисане КТВС показује да се приближно 9% варијација не може објаснити применом квадратног модела. Однос сигнал/шум од 8,4735, потврђује постојање адекватног сигнала и поузданост добијеног модела.

Коефицијенти регресионе једначине за брзину таложења, изражени у облику кодираних и стварних вредности променљивих, као и припадајуће p-вредности приказани су у табели 5.27. Резултати указују на статистичку значајност линеарног и квадратног ефекта концентрације хитозана за модел флокулисане КТВС.

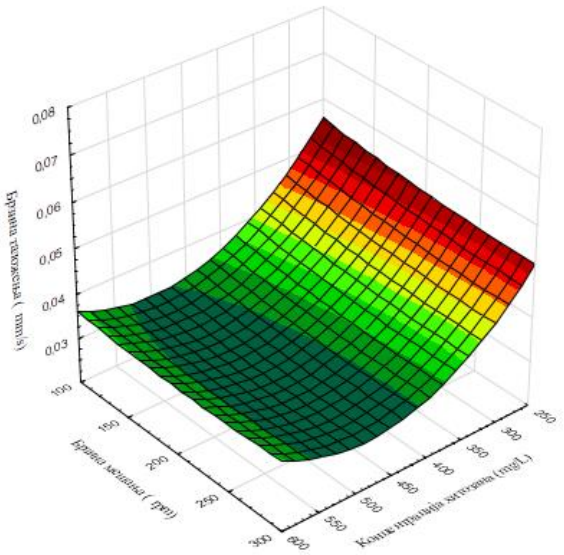
Табела 5.27. Регресиони коефицијенти брзине таложења КТВС применом хитозана

Ефекти	**Коефицијент**		**p-вредност**
	Стварни	**Кодирани**	
Одсечак			
b_0	0,1328	0,0321	<0,0001
Линеарни			
b_1	-0,0004	-0,0089	0,0100
b_2	-0,0001	-0,0012	0,5627
Квадратни			
b_{11}	$3,80\times10^{-7}$	0,0116	0,0104
b_{22}	$8,91\times10^{-8}$	0,0009	0,7451
Интеракција			
b_{12}	523×10^{-8}	0,0009	0,7547

У нефлокулисаној култивационој течности, измерена брзина таложења за КТВС износила је 0,03965 mm/s.

Утицај концентрације хитозана и брзине мешања на брзину таложења флокулисаног медијума приказан је на слици 5.12. Повећање величине флокула након додавања хитозана доводи до убрзања процеса таложења и тиме до скраћења времена потребног за таложење. Ипак, постигнуте брзине таложења остају релативно ниске. Овакво понашање може се објаснити чињеницом да хитозан у киселој средини формира

дуже ланце, што резултира стварањем мањих и слабије повезаних флокула (Riaño и сар., 2012).



Слика 5.12. Одзивна површина која описује утицај концентрације хитозана и брзине мешања на брзину таложења КТВС

Слика 5.12. показује да у оквиру експерименталног опсега, утицај концентрације хитозана на брзину таложења надмашује утицај брзине мешања. Брже таложење забележено је при нижим брзинама мешања, док интензивније мешање може довести до кидања формираних флокула, што успорава њихово таложења (Riaño и сар., 2012). Ипак, уочено је да повећање концентрације хитозана води ка смањењу брзине таложења, при чему је тај ефекат израженији при већим брзинама мешања.

Резултати показују да повећање концентрације хитозана у опсегу од 250 mg/L до 600 mg/L смањује брзину таложења за готово половину, независно од брзине мешања. Ова појава објашњава се чињеницом да веће присуство хитозана повећава позитивно наелектрисање честица, што ствара снажну електростатичку одбојност међу њима и тиме спречава њихово таложење (Ahmad и сар., 2011; Feng и сар., 2017; Lichtfouse и сар., 2019).

Слично запажање уочено је и у претходним истраживањима приликом издвајања микроалгално-бактеријске биомасе из фотобиореактора за третман отпадних вода из индустрије прераде рибе, где је прекорачење оптималне концентрације хитозана (око 220 mg/L) довело до рестабилизације честица услед обновљене електростатичке одбојности (Riaño и сар., 2012).

5.2.3.3. Пречник зоне инхибиције

Резултати анализе варијансе за квадратни модел пречника зоне инхибиције за КТВС, приказани су у табели 5.28.

Табела 5.28. Анализа варијансе пречника зоне инхибиције КТВС применом хитозана

Извор варијабилности	**DF**	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
Модел	5	102,4538	20,4908	21,6161	0,0054
Резидуал	4	3,7918	0,9479		
Одступање модела	3	3,5673	1,1891	6,3129	0,3067
Чиста грешка	1	0,2245	0,2245		
Укупно	9	106,2456			
		R^2	Adj. R^2	Adeq. Precision	
		0,9643	0,9197	11,8916	

DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

На основу p-вредности, која за КТВС износи 0,0054, потврђује се статистичка значајност регресионе једначине модела. Као што је приказано у табели 5.28., p-вредност за тест неприлагођености модела у односу на пречник зоне инхибиције износи 0,3067, што указује на то да је модел успешно прилагођен добијеним експерименталним подацима. Релативно висока вредност коефицијента детерминације (R^2), која је изнад 0,75, потврђује да је модел погодан за поуздано представљање емпиријских података. Такође, вредност односа адекватне прецизности од 11,8916, указује на то да је однос сигнал/шум за одзив који се односи на пречник зоне инхибиције задовољавајући.

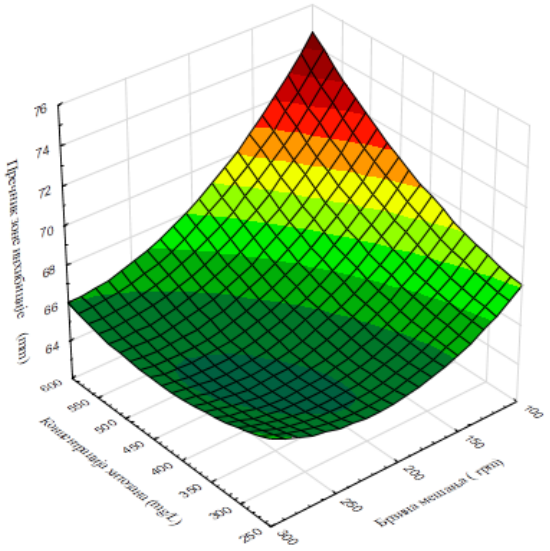
Коефицијенти регресионе једначине за пречник зоне инхибиције, изражени у облику кодираних и стварних вредности променљивих, као и припадајуће p-вредности, приказани су у табели 5.29. Добијени резултати указују на статистичку значајност линеарних ефеката обе независне променљиве као и квадратних ефеката брзине мешања. Такође, интеракција између брзине мешања и концентрације хитозана у регресионој једначини показала је статистичку значајност.

Табела 5.29. Регресиони коефицијенти пречника зоне инхибиције КТВС применом хитозана

Ефекти	**Коефицијент**		**p-вредност**
	Стварни	**Кодирани**	
Одсечак			
b_0	73,1125	65,6650	<0,0001
Линеарни			
b_1	-0,0008	1,5781	0,0116
b_2	-0,0656	-2,5525	0,0018
Квадратни			
b_{11}	$3,47\times10^5$	1,0635	0,0797
b_{22}	0,0002	2,0642	0,0106
Интеракција			
b_{12}	0,0002	-1,7500	0,0229

Утицај концентрације хитозана и брзине мешања на пречник зоне инхибиције против плесни *Aspergillus flavus* флокулисане културационе течности приказан је на

слици 5.13. Резултати показују да и култивациона течност и хитозан позитивно утичу на антимикробну активност према испитиваном фитопатогену (*Aspergillus flavus*). Пречник зоне инхибиције нефлокулисаног узорка КТВС износио је 60,67 mm. С обзиром на добро позната антимикробна својства хитозана, испитана је и акнтимикробна активност раствора хитозана, при чему су пречнци зона инхибиције били у распону од 13 до 15 mm. Већи пречници зона инхибиције флокулисаних узорака култивационе течности указују на постојање синергијског ефекта између култивационе течности и раствора хитозана. Слични резултати, забележени су у литератури (Ahmad и сар., 2011; Rkhaila и сар., 2021; Mingzheng и сар., 2009).



Слика 5.13. Одзивна површина која описује утицај концентрације хитозана и брзине мешања на пречник зоне инхибиције КТВС

Максимална вредност пречника зоне инхибиције у случају КТВС постигнута је комбинацијом најниже брзине мешања и највише концентрације хитозана. Овакав образац може се објаснити чињеницом да ефикасност флокулације расте са порастом концентрације хитозана; као што је приказано на слици 5.11., ефикасност већа од 90% постигнута је за концентрације изнад 450 mg/L. Потенцијална токсичност високе концентрације хитозана (до 672,5 mg/L) на виталност бактеријске културе *Bacillus* sp. BioSol021 није уочена. Након култивације, концентрација бактерија износила је 9,26 log CFU/mL. Након флокулације забележена је благо смањена вредност од 9,1 log CFU/mL, када је концентрација хитозана од 672,5 mg/L примењена. Тиме је потврђено да је сој задржао виталност и функционалност за предвиђену примену. Поред микробних ћелија, култивациона течност базирана на комплексном индустријском отпадном току садржи бројне екстрацелуларне компоненте и резидуалне хранљиве материје које улазе у интеракцију са хитозаном, што додатно утиче на ефикасност флокулације, а самим тим и на антимикробну активност. Многе од ових екстрацелуларних компоненти поседују антимикробна својства, доприносећи супресивном деловању флокулисане култивационе

течности (Dmitrović и сар., 2023). Анализа утицаја брзине мешања на пречник зоне инхибиције показала је јасно смањење антимикробне активности са порастом брзине мешања, нарочито при вредностима изнад 150 о/мин. Веће брзине мешања могу довести до разбијања флокула, док се издужени молекули хитозана могу поново адсорбовати на исту честицу, али на друго место, што онемогућава формирање мостова између честица (Lichtfouse и сар., 2019), као што је раније описано. Као последица тога долази до поновне дисперзије честица, смањења ефикасности флокулације и пада антимикробне активности. Сама антифунгална активност ћелија соја *Bacillus* остаје непромењена, док се смањење укупног антифунгалног ефекта при вишим брзинама мешања (око 9%) може приписати смањеној флокулацији секундарних метаболита са антифунгалним дејством, попут сурфактина, који су карактеристични за сој *Bacillus* sp. BioSol021 (Dmitrović и сар., 2022).

5.2.3.4. Оптимизација

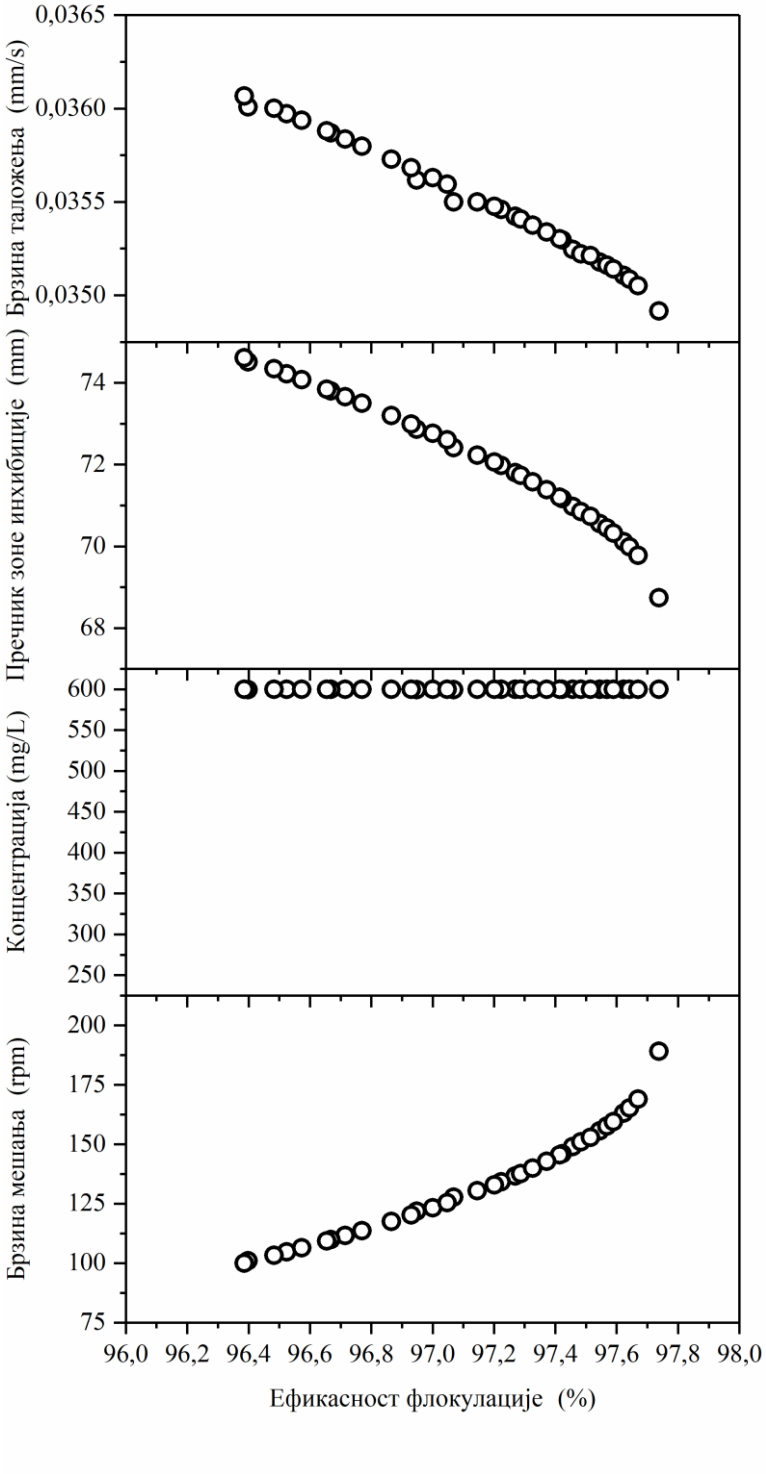
Оптимизација оперативних услова током флокулације у процесу издвајања биомасе *Bacillus* sp. BioSol021 из културе течности изведена је применом функције пожељности (DF) и генетског алгоритма (GA). Резултати оптимизације добијени GA методом приказани су на слици 5.14. Обе методе оптимизације имале су за циљ постизање максималних вредности три одзива моделована применом методе одзивне површине (RSM).

У почетној фази, функција пожељности примењена је на појединачне одзиве. За максимизацију ефикасности флокулације, оптимални услови (концентрацији хитозана од 600 mg/L и брзина мешања од 100 о/мин) дали су вредност пожељности од 0,890, при чему је ефикасност флокулације износила 96,76%. У случају максимизације брзине таложења, оптимално решење (концентрација од 250 mg/L и брзина мешања од 100 о/мин) имало је пожељност од 0,596, а брзина таложења под овим условима била је 0,0556 mm/s. За максимизацију пречника зоне инхибиције, најповољнији услови (концентрација од 591,70 mg/L и брзина мешања од 101,81 о/мин) резултовали су пожељношћу од 1,00, док је пречник зоне инхибиције под овим условима износио 74,4 mm.

За КТВС, оптимално решење постигнуто је при укупној пожељности од 0,491. Ово решење постигнуто је при концентрацији хитозана од 600 mg/L и брзини мешања од 100 о/мин. При овим експерименталним условима, ефикасност флокулације износила је 96,76%, брзина таложења била је 0,036 mm/s, док је пречник зоне инхибиције достигао 74,61 mm.

Контролни експерименти спроведени при оптималним условима показали су задовољавајуће слагање између предвиђених и експерименталних вредности. Овај резултат потврђује валидност предложеног полиномског модела другог реда за приказивање експерименталних резултата. Експериментално добијене оптималне

вредности за ефикасност флокулације, брзину таложења и пречник зоне инхибиције у случају КТВС износиле су 97%, 0,037 mm/s и 73,82 mm, редом.



Слика 5.14. Парето фронт и простор одлуке скупа оптималних решења добијених применом вишекритеријумског генетског алгоритма у случају КТВС

Резултати мултикритеријалне оптимизације помоћу генетског алгоритма приказани су на слици 5.14. Проблем оптимизације решен је применом кодиране NSGA-II методе у MATLAB-у, чиме је добијен скуп Парето оптималних решења.

Парето фронт и најбоља предикција добијена методом функције пожељности се подударају. Са повећањем брзине мешања (са око 100 о/мин на приближно 175 о/мин), Парето фронт (слика 5.14.) указује на могућност веома благог повећања ефикасности флокулације, уз истовремено благо смањења пречника зоне инхибиције и брзине таложења. Због тога се као најповољније издваја компромисно решење добијено функцијом пожељности.

5.3. Примена љуски јаја за флокулацију биомасе *Bacillus* sp. култивисане на отпадним водама прехрамбене индустрије

Циљ овог дела истраживања био је да се испита потенцијал љуски јаја као флокулационог агенса у процесу концентрисања биомасе *Bacillus* sp. BioSol021, култивисане ради производње биопестицида. Анализиран је утицај концентрације флокуланта, брзине мешања и pH вредности на процес флокулације културне течности *Bacillus* sp. BioSol021, добијене биолошким третманом отпадних вода из индустрије млечних производа (сирна сурутка), индустрије вина (отпадна вода од флотације вина) и индустрије производње воћних сокова. Поред тога, спроведена је евалуација утицаја испитиваних фактора флокулације на брзину таложења и антимикробну активност флокулисане биомасе према афлатоксигеној плесни *Aspergillus flavus*. У циљу оптимизације процеса издвајања биомасе и постизања максималне ефикасности флокулације, примењене су метода одзивне површине (RSM) и генетски алгоритам (GA), како би се постигао компромис између постављених циљева у оквиру оптимизационог поступка издвајања.

5.3.1. Флокулација биомасе *Bacillus* sp. из културне течности на бази сирне сурутке

Експериментални дизајн са три независне променљиве (концентрација флокуланта на бази љуске јаја, већа брзина мешања и pH вредност) и одзиви (ефикасност флокулације, брзина таложења, пречник зоне инхибиције) дати су у табели 5.30.

Табела 5.30. Експериментални дизајн и одзиви у случају флокулације КТС применом праха љуске јаја

Експеримент	Фактори-независне променљиве			Одзиви-зависне променљиве		
	Концентрација љуски (g/L)	pH вредност	Већа брзина мешања (о/мин)	Ефикасност флокулације (%)	Брзина таложења (mm/s)	Пречник зоне инхибиције (mm)
1	3	5	300	81,2	0,0760	30,33
2	7	5	300	87,6	0,2200	32,33
3	3	9	300	90,7	0,0700	31,67
4	7	9	300	95,9	0,1400	38,33
5	3	7	150	90,3	0,1270	32,67
6	7	7	150	95,5	0,1800	35,00
7	3	7	450	88,4	0,0900	30,00
8	7	7	450	93,8	0,2020	39,00
9	5	5	150	83,6	0,1400	30,00
10	5	9	150	95,5	0,0580	37,00
11	5	5	450	81,0	0,1320	29,50
12	5	9	450	94,4	0,0810	30,67
13	5	7	300	93,5	0,1400	41,67
14	5	7	300	91,8	0,1380	40,00
15	5	7	300	92,8	0,1480	40,00

5.3.1.1. Ефикасност флокулације

Резиме анализе варијансе за полиномски модел другог реда приказан је у табели 5.31. Развијени модел за процену ефикасности флокулације показао се као статистички значајан, са p-вредношћу од 0,0016. Такође, резултати анализе варијансе показују високе вредности прилагођеног коефицијента детерминације (Adj. R^2= 93,19%). Поред високих вредности прилагођеног коефицијента детерминације, предложени полиномски модел другог реда за КТС није показао значајно одступање (p-вредност= 0,2405).

Табела 5.31. Анализа варијансе ефикасности флокулације КТС применом праха љуске јаја

Извор варијабилности	**DF**	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
Модел	9	350,11	38,90	22,29	0,0016
Резидуал	5	8,73	1,75		
Одступање модела	3	7,26	2,42	3,31	0,2405
Чиста грешка	2	1,46	0,73		
Укупно	14	358,84			
		R^2	Adj. R^2	Adeq. Precision	
		0,9757	0,9319	15,140	

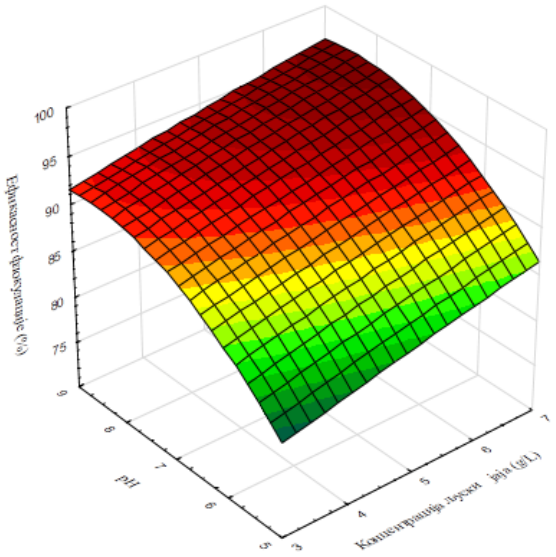
DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

Параметар адекватна прецизност представља показатељ односа сигнал/шум, при чему је пожељно да је тај однос већи од 4. Добијени однос од 15,140 за КТС, указује на адекватан сигнал, што потврђује поузданост модела. Коефицијенти регресионе једначине за ефикасност флокулације, изражени у виду кодираних и стварних вредности променљивих, као и одговарајуће p-вредности, приказани су у табели 5.32. Линеарни (b_1, b_2, b_3), квадратни (b_{11}, b_{22}, b_{33}) и интеракциони (b_{12}, b_{13}, b_{23}) коефицијенти модела сматрају се статистички значајним уколико су p-вредности мање од 0,05. Добијени резултати указују на статистичку значајност линеарних ефеката концентрације флокуланта и pH вредности, као и квадратног ефекта pH вредности.

Табела 5.32. Регресиони коефицијенти ефикасности флокулације КТС применом праха љуске јаја

Ефекти	**Коефицијент**		**p-вредност**
	Стварни	**Кодирани**	
Одсечак			
b_0	21,3483	92,69	<0,0001
Линеарни			
b_1	2,4467	2,77	0,0019
b_2	15,3758	5,40	<0,0001
b_3	$-3,89\times10^{-3}$	-0,91	0,1096
Квадратни			
b_{11}	-0,0617	-0,25	0,7344
b_{22}	-0,9042	-3,62	0,0033
b_{33}	$-1,96\times10^{-5}$	-0,44	0,5489
Интеракција			
b_{12}	-0,0750	-0,30	0,6687
b_{13}	$2,67\times10^{-4}$	0,080	0,9083
b_{23}	$1,18\times10^{-3}$	0,36	0,6140

На сликама 5.15., 5.16. и 5.17. приказане су тродимензионалне одзивне површине које илуструју утицај концентрације флокуланта, pH вредности и брзине мешања на ефикасност флокулације КТС.



Слика 5.15. Одзивна површина која описује утицај pH вредности и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на ефикасност флокулације КТС

Ефикасност флокулације се повећава са порастом pH вредности. Овај тренд уочљив је при свим испитиваним концентрацијама флокуланта на бази љуске јаја. При нижим концентрацијама флокуланта (3 g/L), ефикасност флокулације расте са почетних вредности од око 80% при pH 5 до око 91% при pH 9. Док при вишим концентрацијама (7 g/L) ефикасност флокулације расте са почетних вредности од око 86% до максималних вредности које прелазе 95% при pH 9.

За постизање високе ефикасности флокулације неопходна је висока концентрација флокуланта, што је у складу са претходно добијеним резултатима у случају флокулације хитозаном у условима повишеног садржаја нутријената у медијуму (Yang Z. и сар., 2014).

Хитозан је снажан поликатјонски биополимер чије амино групе ($-NH_2$) се у киселој средини протонују ($-NH_3^+$), услед чега хитозан има високу густину позитивног наелектрисања. Катјонски карактер хитозана омогућава ефикасну неутрализацију негативно наелектрисаних бактеријских ћелија, што резултује приближавањем ζ-потенцијала ка нули и формирањем стабилних флокула (Yang R. и сар., 2016; Low и Lau, 2017).

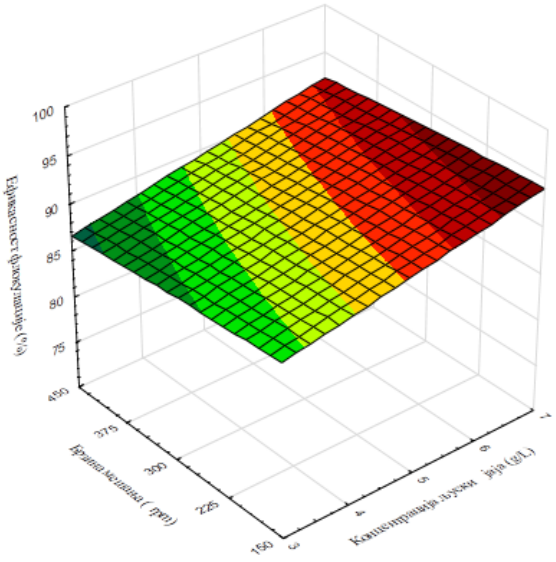
Насупрот томе, флокулант на бази љуске јаја, који се претежно састоји од $CaCO_3$, минерала који не поседује катјонске групе и чији се флокулациони ефекат заснива на

ограниченом ослобађању Ca^{2+} јона, је знатно слабији катјонски флокулант у односу на хитозан, што оправдава примену већих концентрација. Choi (2015) је уочио да се зета потенцијал култивационе течности повећава са повећањем концентрације флокуланта и да такво повећање зета потенцијала указује на смањење површинског наелектрисања ћелија микроалги услед неутрализације флокулантом на бази љуске јаја.

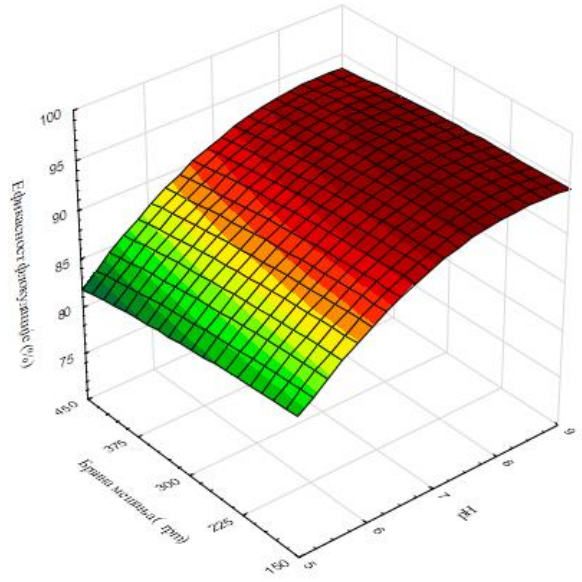
Знатно веће концентрације флокуланта на бази љуске јаја, примењене у оквиру ове докторске дисертације у односу на концентрације описане у радовима других аутора (Choi, 2015; Pandey и сар., 2019; Suparmaniam и сар., 2019), који су исти флокулант користили за издвајање биомасе микроалги, могу се делимично објаснити разликама у типу биомасе-у овом случају бактеријске, а не биомасе алги. Ипак, највећа разлика произилази из природе примењених култивационих медијума. У наведеним радовима коришћени су медијуми комерцијалног типа са јасно дефинисаним хемијским саставом, док су у овој дисертацији као медијуми употребљене отпадне воде прехрамбене индустрије, изузетно разноврсног и нутритивно богатог састава.

Максимална ефикасност флокулације од преко 95%, постигнута је при концентрацији љуски јаја од 7 g/L и pH вредности 9. Према Choi (2015), пораст ефикасности флокулације при вишим pH вредностима, вероватно је последица аутофлокулације микробних ћелија. Исто је потврђено и од стране Hadiyanto и сар. (2022) који су максималну ефикасност флокулације љускама јаја у случају микроалги постигли управо при pH 9. Ово је објашњено разликом у степену протонације и структурним променама унутар флокула. Промена pH вредности може утицати на промену структуре флокуланта и површинско наелектрисање ћелија микроорганизама које су при нижим pH вредностима протоноване, а при вишим вредностима де-протоноване. Као последица дисоцијације киселина на pH већим од 6, површина ћелија постаје све негативније наелектрисана. Повећање негативног наелектрисања ћелија појачава електростатичку привлачност између микроорганизама и флокуланта, што доводи до раста ефикасности флокулације. Ипак изузето високе pH вредности могу довести до тога да флокулант на бази љуске јаја, који се углавном састоји од $CaCO_3$, постане негативно наелектрисан, јер се површинске групе депротонују, услед чега доминирају карбонатни и хидроксилни јони, што изазива електростатичко одбијање и смањење ефикасности флокулације.

Анализом одзивне површине на слици 5.16., ефикасност флокулације већа од 90% постигнута је при концентрацији љуски јаја изнад 5,5 g/L, без обзира на примењену брзину мешања. Овај резултат указује да брзина мешања има мање утицаја на ефикасност флокулације у поређењу са концентрацијом флокуланта. Ипак, примећено је да са повећањем брзине мешања долази до благог пада ефикасности флокулације (слика 5.16. и 5.17.). Ово се може објаснити чињеницом да веће брзине мешања имају тенденцију да наруше структуру већ формираних флокула при чему долази до њихове дисперзије и поновног враћања у течни медијум (Hadiyanto и сар., 2022).



Слика 5.16. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на ефикасност флокулације КТС



Слика 5.17. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и pH вредности на ефикасност флокулације КТС

На слици 5.17. уочљиво је да се ефикасност флокулације повећава са порастом pH вредности при свим испитиваним брзинама мешања. Ефикасност већа од 90% постигнута је при pH вредностима изнад 7. Овај резултат указује да pH вредност има

већи утицај на ефикасност флокулације у односу на брзину мешања. Благо смањење ефикасности флокулације при брзинама мешања изнад 375 о/мин, може се као и у случају анализе одзивне површине која је приказана на слици 5.16. објаснити чињеницом да веће брзине мешања имају тенденцију нарушавања структуре формираних флокула, услед чега долази до њихове дисперзије и поновног враћања у течни медијум (Hadiyanto и сар., 2022).

5.3.1.2. Брзина таложења

Табела 5.33. приказују резултате анализе варијансе за квадратни модел брзине таложења у случају КТС. Регресиони модел је статистички значајан, што потврђује ниска p-вредност (<0,05), при чему p-вредност за полиномски модел другог реда износи 0,0014.

Табела 5.33. Анализа варијансе брзине таложења КТС применом праха љуске јаја

Извор варијабилности	**DF**	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
Модел	9	0,031	$3{,}49\times10^{-3}$	23,45	0,0014
Резидуал	5	$7{,}45\times10^{-4}$	$1{,}49\times10^{-4}$		
Одступање модела	3	$6{,}89\times10^{-4}$	$2{,}30\times10^{-4}$	8,2	0,1106
Чиста грешка	2	$5{,}60\times10^{-5}$	$2{,}80\times10^{-5}$		
Укупно	14	0,032			
		R^2	Adj. R^2	Adeq. Precision	
		0,9769	0,9352	15,266	

DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

Да би модел био адекватно прилагођен експерименталним подацима, p-вредност за проверу неприлагођености модела треба да буде већа од 0,05. Како је приказано у табели 5.33., добијена p-вредност за неприлагођеност модела у односу на брзину таложења износила је 0,1106. Ови резултати указују на то да не постоји статистички значајна разлика између експерименталних и предвиђених вредности, што потврђује добру прилагођеност модела.

Коефицијент детерминације за брзину таложења флокулисане КТС показује да се приближно 3% варијација не може објаснити применом квадратног модела. Однос сигнал/шум од 15,266, потврђује постојање адекватног сигнала и поузданост добијеног модела.

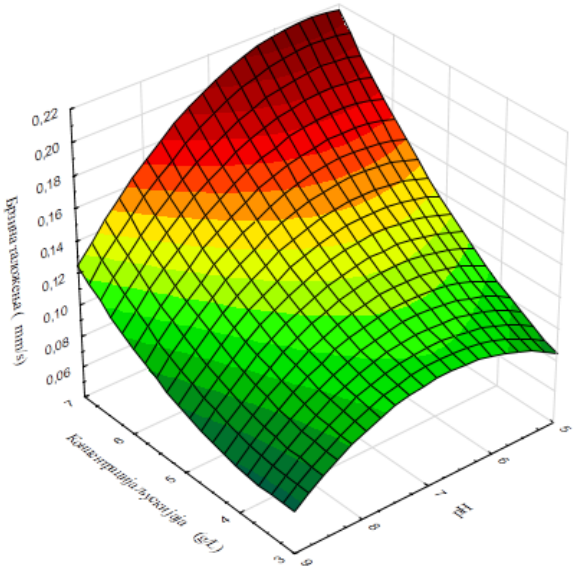
Коефицијенти регресионе једначине за брзину таложења, изражени у облику кодираних и стварних вредности промењљивих, као и припадајуће p-вредности приказани су у табели 5.34. Резултати указују на статистичку значајност линеарног утицаја концентрације и pH вредности, квадратног утицаја pH вредности, као и утицаја интеракције концентрације и pH вредности за модел флокулисане КТС. Статистички најзначајнији линеарни ефекат имала је концентрација флокуланта, док је линеарни ефекат брзине мешања имао најмање утицаја на брзину таложења.

Табела 5.34. Регресиони коефицијенти брзине таложења КТС применом праха љуске јаја

Ефекти	**Коефицијент**		**p-вредност**
	Стварни	**Кодирани**	
Одсечак			
b_0	-0,2309	0,14	<0,0001
Линеарни			
b_1	$1,94\times10^{-3}$	0,047	0,0001
b_2	0,1111	-0,027	0,0014
b_3	$-2,13\times10^{-4}$	0,000	1,0000
Квадратни			
b_{11}	$3,94\times10^{-3}$	0,016	0,0559
b_{22}	$-7,81\times10^{-3}$	-0,031	0,0044
b_{33}	$-3,56\times10^{-7}$	$-8,00\times10^{-3}$	0,2634
Интеракција			
b_{12}	$-4,62\times10^{-3}$	-0,019	0,0290
b_{13}	$4,92\times10^{-5}$	0,015	0,0603
b_{23}	$2,58\times10^{-5}$	$7,75\times10^{-3}$	0,2600

На сликама 5.18., 5.19. и 5.20. приказане су тродимензионалне одзивне површине које илуструју утицај концентрације флокуланта, pH вредности и брзине мешања на брзину таложења КТС.

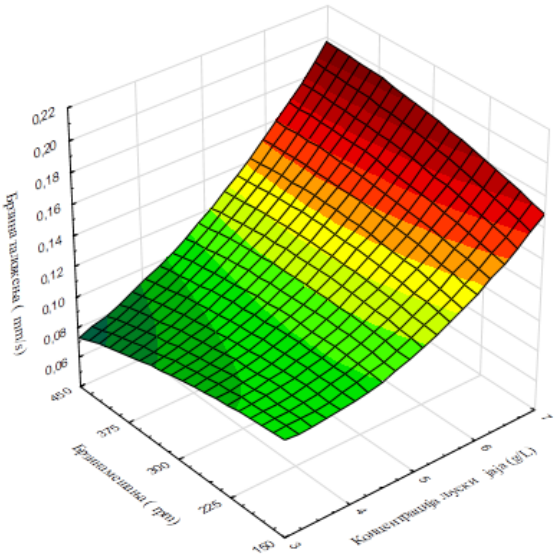
У нефлокулисаној култивационој течности, измерена брзина таложења за КТС износила је 0,061 mm/s. У случају флокулације хитозаном, брзине таложења су се кретале у распону од 0,0566 до 0,1387 mm/s.



Слика 5.18. Одзивна површина која описује утицај концентрације флокуланта на бази љуске јаја и pH вредности на брзину таложења КТС

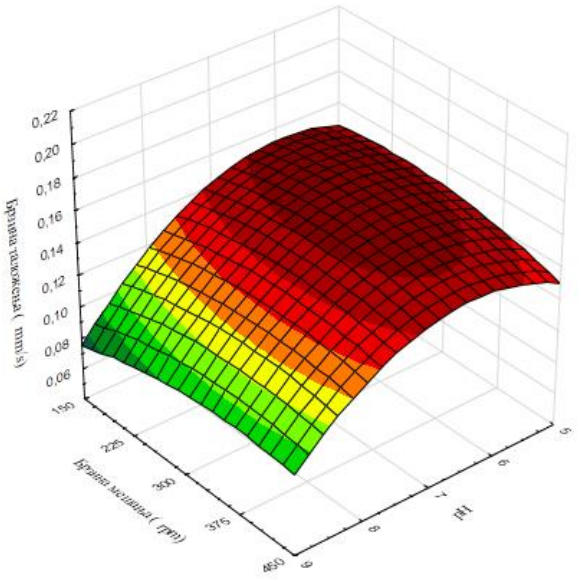
С друге стране, у култивационој течности флокулисаној флокулантом на бази љуске јаја забележене су знатно веће брзине таложења, у интервалу од 0,058 до 0,220 mm/s. Уочене разлике у брзинама таложења у зависности од примењеног флокуланта могу се објаснити запажањем Jusoh и сар. (2023) да су флокуле формиране деловањем Ca^{2+} јона већих димензија, што последично доводи до убрзаног таложења.

Анализом графика на слици 5.18. може се уочити да при нижим концентрацијама флокуланта (до 5,5 g/L) пораст pH вредности у распону од 5 до 7 доводи до повећања брзине таложења, након чега даљи пораст pH вредности узрокује пад брзине таложења. При вишим концентрацијама (посебно изнад 6 g/L) примећује се изражено већа брзина таложења у условима нижих pH вредности. Овакав тренд може се објаснити чињеницом да са порастом pH вредности флокулант на бази љуске јаја, који се претежно састоји од $CaCO_3$ може постати негативно наелектрисан, што доводи до смањења брзине таложења услед појаве одбојних сила између флокуланта и микробних ћелија (Choi, 2015).



Слика 5.19. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на брзину таложења КТС

На слици 5.19. приметно је да са повећањем концентрације флокуланта расте и брзина таложења и то се односи на све испитиване брзине мешања. При нижим концентрацијама флокуланта на бази љуски (до 5 g/L) брзина таложења бележи благи пад у условима интензивнијег мешања (преко 300 о/мин). Веће брзине мешања могу довести до распадања флокула што отежава њихово таложење (Riaño и сар., 2012).



Слика 5.20. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и pH вредности на брзину таложења КТС

На графику зависности брзине таложења од брзине мешања и pH вредности (слика 5.20.), уочава се да повећање pH вредности са 5 на 6 доводи до раста брзине таложења при свим испитиваним брзинама мешања. Полазећи од вредности од око 0,13 mm/s при pH 5, брзина таложења достиже вредности од око 0,15 mm/s при pH 6. Међутим, изнад pH 6 долази до пада брзине таложења, који постаје најизраженији изнад pH 7, па тако при pH 9 износи око 0,075 mm/s. Овај тренд је забележен при свим испитиваним брзинама мешања, с тим да је нешто израженији у области мањих брзина мешања. Овакво запажање може се делимично објаснити на исти начин као и код резултата приказаних на слици 5.18. где са порастом pH вредности, флокулант на бази љуске јаја, који се претежно састоји од $CaCO_3$, може постати негативно наелектрисан. То доводи до појаве одбојних сила између флокуланта и микробних ћелија, што резултује смањењем брзине таложења. Поред тога, израженије смањење брзине таложења при нижим брзинама мешања може бити последица неједнаке и недовољне дистрибуције флокуланта (Choi, 2015).

5.3.1.3. Пречник зоне инхибиције

Резултати анализе варијансе за квадратни модел пречника зоне инхибиције за КТС, приказани су у табели 5.35.

На основу p-вредности, која за КТС износи 0,0060, потврђује се статистичка значајност регресионе једначине модела. Као што је приказано у табели 5.35., p-вредност за тест неприлагођености модела у односу на пречник зоне инхибиције износи 0,2392, што указује на то да је модел успешно прилагођени добијеним експерименталним подацима. Релативно висока вредност коефицијента детерминације (R^2), која је изнад

0,75, потврђује да је модел погодан за поуздано представљање емпиријских података. Такође, вредност односа адекватне прецизности од 9,405, указује на то да је однос сигнал/шум за одзив који се односи на пречник зоне инхибиције задовољавајући.

Табела 5.35. Анализа варијансе пречника зоне инхибиције КТС применом праха љуске јаја

Извор варијабилности	**DF**	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
Модел	9	255,76	28,42	12,73	0,0060
Резидуал	5	11,16	2,23		
Одступање модела	3	9,30	3,10	3,33	0,2392
Чиста грешка	2	1,86	0,93		
Укупно	14	266,92			
		R^2	Adj. R^2	Adeq. Precision	
		0,9582	0,8829	9,405	

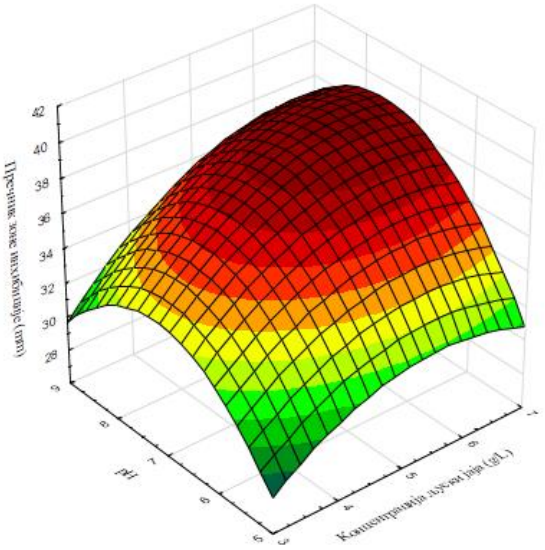
DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

Коефицијенти регресионе једначине за пречник зоне инхибиције, изражени у облику кодираних и стварних вредности променљивих, као и припадајуће p-вредности, приказани су у табели 5.36. Добијени резултати указују на статистичку значајност линеарних ефеката концентрације и pH вредности, као и квадратних ефеката за сва три фактора.

Табела 5.36. Регресиони коефицијенти пречника зоне инхибиције КТС применом праха љуске јаја

Ефекти	**Коефицијент**		**p-вредност**
	Стварни	**Кодирани**	
Одсечак			
b_0	-53,7933	40,56	<0,0001
Линеарни			
b_1	3,8140	2,50	0,0052
b_2	18,0623	1,94	0,0144
b_3	0,1051	-0,69	0,2498
Квадратни			
b_{11}	-0,6271	-2,51	0,0233
b_{22}	-1,2208	-4,88	0,0015
b_{33}	$-1{,}72\times10^{-4}$	-3,88	0,0041
Интеракција			
b_{12}	0,2912	1,16	0,1796
b_{13}	$5{,}56\times10^{-3}$	1,67	0,0759
b_{23}	$-4{,}86\times10^{-3}$	-1,46	0,1085

На сликама 5.21., 5.22. и 5.23. приказане су тродимензионалне одзивне површине које илуструју утицај концентрације флокуланта, pH вредности и брзине мешања на пречник зоне инхибиције КТС. Пречник зоне инхибиције нефлокулисане КТС износио је 42 mm. При примени хитозана као флокуланта, распон пречника зоне инхибиције био је од 45,33 до 54,40 mm (табела 5.9.).

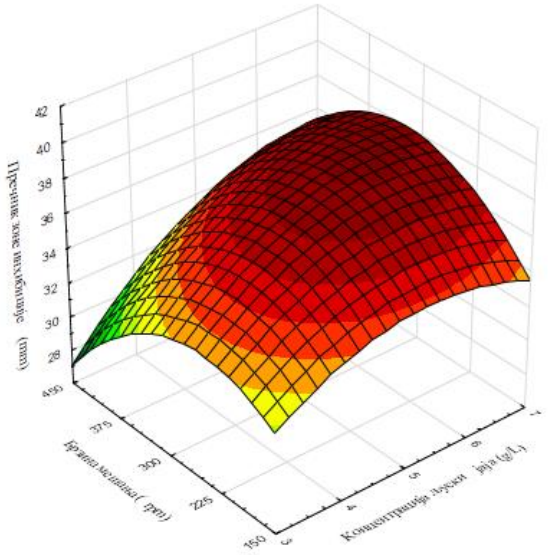


Слика 5.21. Одзивна површина која описује утицај pH вредности и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на пречник зоне инхибиције КТС

У случају примене флокуланта на бази љуске јаја распон пречника био је између 29,50 и 41,67 mm (табела 5.30.). Веће вредности пречника зоне инхибиције у случају хитозана могу се приписати његовом антимикробном дејству, које није присутно код флокуланта на бази љуске јаја.

Анализом графика 5.21 уочава се да пречник зоне инхибиције расте са повећањем концентрације флокуланта и pH вредности (до pH 8), што је у складу са високим ефикасностима флокулације постигнутим под тим условима. Са даљим повећањем pH вредности долази до смањења пречника зоне инхибиције. Иако је антимикробна активност евидентна у целом испитиваном опсегу pH вредности (5-9), највећи пречници зоне инхибиције забележене су при pH вредностима између 7 и 8. То представља оптималан опсег за раст *Bacillus* бактерија и продукцију метаболита са антимикробним дејством, што је у складу ра резултатима које су пријавили Palacinos-Rodriguez и сар. (2024).

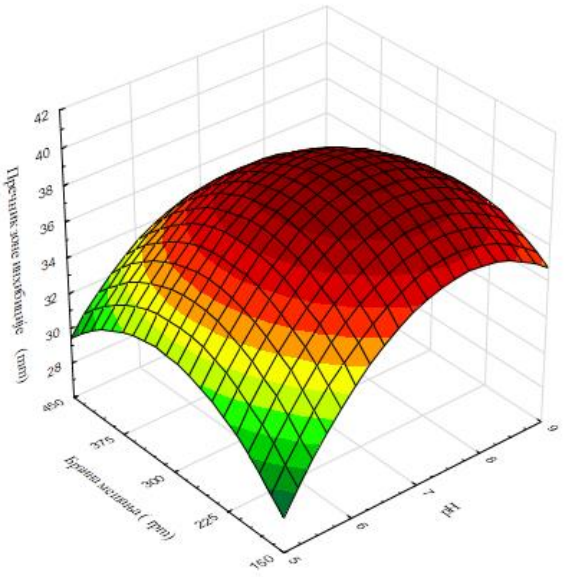
Потенцијална токсичност високе концентрације флокуланта (до 7 g/L) на виталност бактеријске културе *Bacillus* sp. BioSol021 није уочена. Након култивације, концентрација бактерија износила је 10,6 log CFU/mL. Након флокулације забележена је благо смањена вредност од 10,44 log CFU/mL, када је концентрација хитозана од 7 g/L примењена. Тиме је потврђено да је сој задржао виталност и функционалност за предвиђену примену.



Слика 5.22. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на пречник зоне инхибиције КТС

Одзивна површина која приказује утицај брзине мешања и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на пречник зоне инхибиције (слика 5.22.) показује да се максималне вредности постижу при брзини мешања од око 300 о/мин и концентрацијама флокуланта изнад 5 g/L. Са даљим повећањем брзине мешања, посебно изнад 375 о/мин, долази до смањења пречника зоне инхибиције, при чему је овај тренд израженији у условима нижих концентрација (<5 g/L). Сличан тренд забележен је и приликом флокулације хитозаном. Као што је претходно наведено, ова појава може бити последица недовољне количине флокуланта у суспензији. У таквим условима флокулант није у могућности да ефикасно флокулише све присутне честице, док веће брзине мешања доводе до разбијања већ формираних флокула, што резултује њиховом поновном дисперзијом, смањењем ефикасности флокулације и падом антимикробне активности (Dmitrović и сар., 2022; Hadiyanto и сар., 2022).

Са порастом pH вредности од 5 до 8 долази до повећања пречника зоне инхибиције, при чему се највеће вредности постижу при брзинама мешања у опсегу од 225 до 375 о/мин. Након pH 8 бележи се благо смањење пречника зоне инхибиције (слика 5.23.), што је у складу са претходно наведеним објашњењем за слику 5.21. Најниже вредности пречника зоне инхибиције остварене су при брзини мешања од 150 и 400 о/мин у условима ниских pH вредности. Ово се може приписати, с једне стране, недовољној дисперзији флокуланта при ниским брзинама мешања, а с друге стране, прекомерном интензитету мешања који доводи до кидања већ формираних флокула. Као последица, ефикасност флокулације опада, што се одражава и на смањену антимикробну активност.

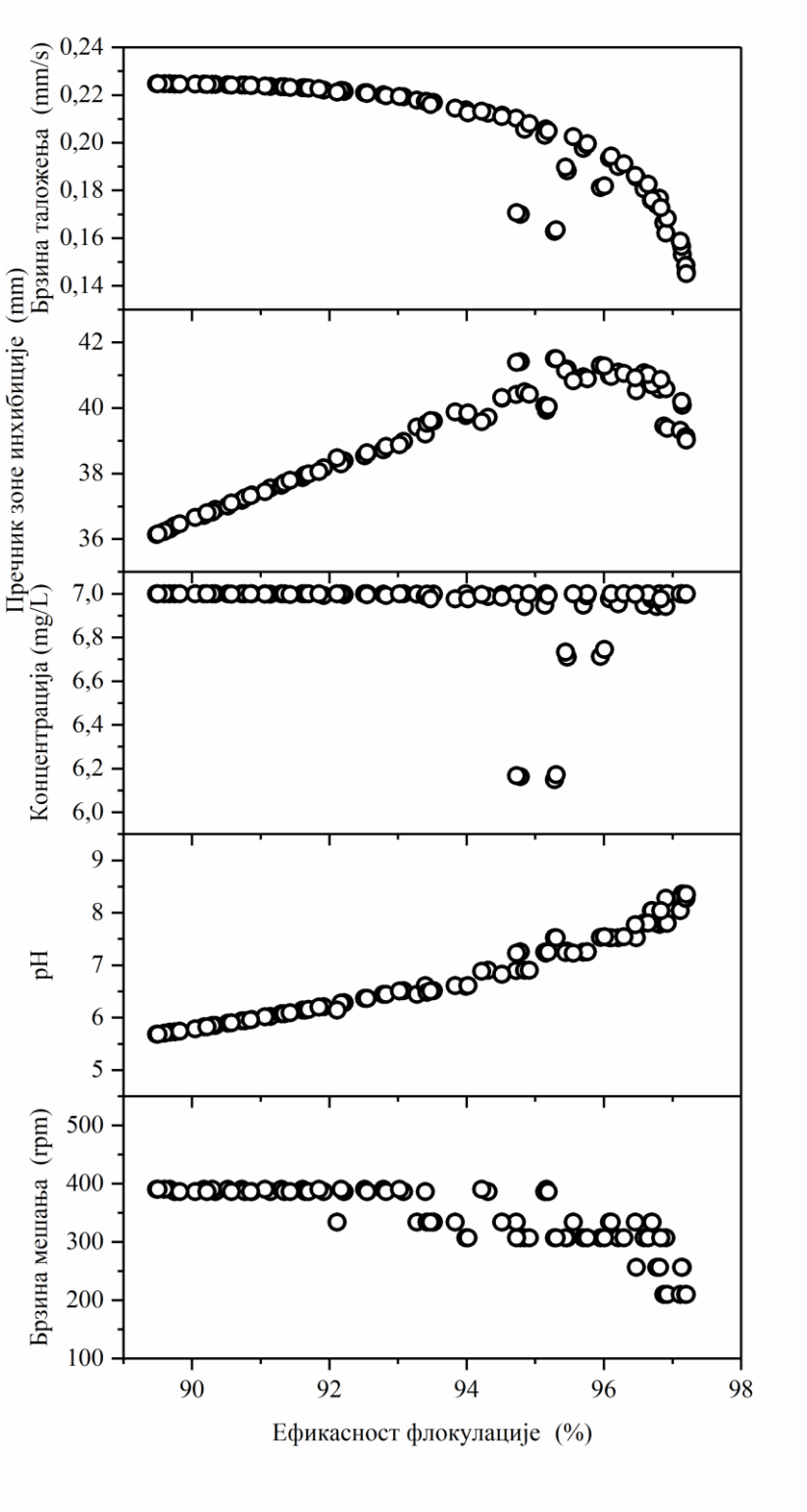


Слика 5.23. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и pH вредности на пречник зоне инхибиције КТС

5.3.1.4. Оптимизација

Оптимизација оперативних услова током флокулације у процесу издвајања биомасе *Bacillus* sp. BioSol021 из култивационих течности изведена је применом функције пожељности (DF) и генетског алгоритма (GA). Резултати мултикритеријалне оптимизације помоћу генетског алгоритма приказани су на слици 5.24. Проблем оптимизације решен је применом кодиране NSGA-II методе у MATLAB-у, чиме је добијен скуп Парето оптималних решења. Обе методе оптимизације имале су за циљ постизање максималних вредности три одзива моделована применом методе одзивне површине (RSM).

У почетној фази, функција пожељности примењена је на појединачне одзиве. За максимизацију ефикасности флокулације, оптимални услови (концентрацији флокуланта на бази љуске јаја од 6,61 g/L, pH вредност 8,02 и брзина мешања од 273,05 о/мин) дали су вредност пожељности од 1,00, при чему је ефикасност флокулације износила 96,56%. У случају максимизације брзине таложења, оптимално решење (концентрација од 6,98 g/L, pH вредност 5,63 и брзина мешања од 350,21 о/мин) имало је пожељност од 1,00, а брзина таложења под овим условима била је 0,2233 mm/s. За максимизацију пречника зоне инхибиције, најповољнији услови (концентрација од 6,11 g/L, pH вредност 7,54 и брзина мешања од 297,01 о/мин) резултовали су пожељношћу од 0,987, док је пречник зоне инхибиције под овим условима износио 41,51 mm.



Слика 5.24. Парето фронт и простор одлуке скупа оптималних решења добијених применом вишекритеријумског генетског алгоритма у случају КТС

За КТС, оптимално решење остварено је при укупној пожељности од 0,935. Ово решење постигнуто је са концентрацијом љуски јаја од 7,00 g/L, pH вредности 7,32 и брзином мешања од 322,16 о/мин. При овим експерименталним условима, ефикасност флокулације износила је 95,81%, брзина таложења била је 0,2 mm/s, док је пречник зоне инхибиције достигао 40,94 mm.

Контролни експерименти спроведени при оптималним условима показали су задовољавајуће слагање између предвиђених и експерименталних вредности. Овај резултат потврђује валидност предложеног полиномског модела другог реда за приказивање експерименталних резултата. Експериментално добијене оптималне вредности за ефикасност флокулације, брзину таложења и пречник зоне инхибиције у случају КТС износиле су 96%, 0,21 mm/s и 40,00 mm, редом.

Резултати мултикритеријалне оптимизације помоћу генетског алгоритма приказани су на слици 5.24. Проблем оптимизације решен је применом кодиране NSGA-II методе у MATLAB-у, чиме је добијен скуп Парето оптималних решења.

Парето фронт и најбоља предикција добијена методом функције пожељности се подударају. Благо повећање pH вредности (до pH 8) доводи до незнатног повећања ефикасности флокулације, док се пречник зоне инхибиције смањује, а брзина таложења значајно опада. Због тога се као најповољније издваја компромисно решење добијено методом функције пожељности.

5.3.2. Флокулација биомасе *Bacillus* sp. из култивационе течности на бази отпадне воде из винарије

Експериментални дизајн са три независне променљиве (концентрација флокуланта на бази љуске јаја, већа брзина мешања и pH вредност) и одзиви (ефикасност флокулације, брзина таложења, пречник зоне инхибиције) дати су у табели 5.37.

Табела 5.37. Експериментални дизајн и одзиви у случају флокулације КТВ применом праха љуске јаја

Експеримент	Фактори-независне променљиве			Одзиви-зависне променљиве		
	Концентрација љуски (g/L)	pH вредност	Већа брзина мешања (о/мин)	Ефикасност флокулације (%)	Брзина таложења (mm/s)	Пречник зоне инхибиције (mm)
1	3	5	300	82,8	0,0727	29,67
2	7	5	300	84,2	0,1025	27,67
3	3	9	300	91,9	0,0170	25,67
4	7	9	300	95,8	0,1022	32,67
5	3	7	150	81,6	0,1093	23,33
6	7	7	150	86,8	0,1454	31,67
7	3	7	450	83,9	0,0636	34,67
8	7	7	450	89,9	0,1361	32,00
9	5	5	150	81,2	0,1069	23,33
10	5	9	150	93,8	0,0468	25,33
11	5	5	450	84,8	0,1000	30,00
12	5	9	450	94,6	0,0475	27,67
13	5	7	300	87,3	0,1055	33,67
14	5	7	300	87,2	0,0954	34,00
15	5	7	300	86,2	0,0929	31,67

5.3.2.1. Ефикасност флокулације

Резиме анализе варијансе за полиномски модел другог реда приказан је у табели 5.38. Развијени модел за процену ефикасности флокулације показао се као статистички значајан, са p-вредношћу од 0,0007. Такође, резултати анализе варијансе показују високе вредности прилагођеног коефицијента детерминације (Adj. R^2= 95,24%). Поред високих вредности прилагођеног коефицијента детерминације, предложени полиномски модел другог реда за КТВ није показао значајно одступање (p-вредност= 0,1894).

Табела 5.38. Анализа варијансе за ефикасност флокулације КТВ

Извор варијабилности	**DF**	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
Модел	9	308,67	34,30	32,15	0,0007
Резидуал	5	5,33	1,07		
Одступање модела	3	4,64	1,55	4,44	0,1894
Чиста грешка	2	0,70	0,35		
Укупно	14	314,01			
		R^2	Adj. R^2	Adeq. Precision	
		0,9830	0,9524	18,373	

DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

Параметар адекватна прецизност представља показатељ односа сигнал/шум, при чему је пожељно да је тај однос већи од 4. Добијени однос од 18,373 за КТВ, указује на адекватан сигнал, што потврђује поузданост модела.

Коефицијенти регресионе једначине за ефикасност флокулације, изражени у виду кодираних и стварних вредности променљивих, као и одговарајуће p-вредности, приказани су у табели 5.39. Линеарни (b_1, b_2, b_3), квадратни (b_{11}, b_{22}, b_{33}) и интеракциони (b_{12}, b_{13}, b_{23}) коефицијенти модела сматрају се статистички значајним уколико су p-вредности мање од 0,05. Добијени резултати указују на статистичку значајност линеарних ефеката сва три фактора, као и квадратног ефекта pH вредности.

Табела 5.39. Регресиони коефицијенти ефикасности флокулације КТВ применом праха љуске јаја

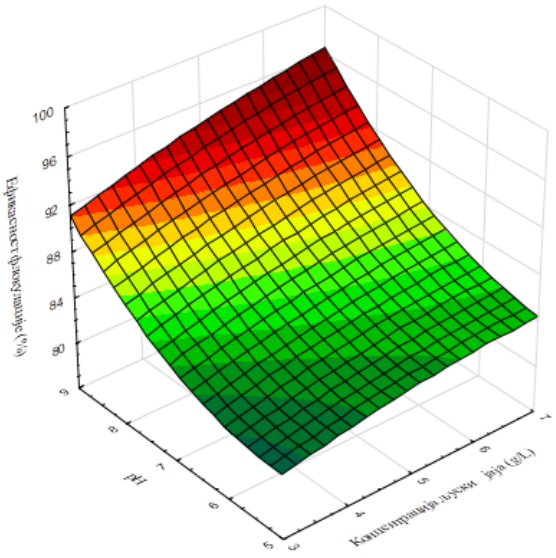
Ефекти	**Коефицијент**		**p-вредност**
	Стварни	**Кодирани**	
Одсечак			
b_0	85,2512	86,90	<0,0001
Линеарни			
b_1	1,2631	2,05	0,0025
b_2	-5,9394	5,38	<0,0001
b_3	0,0404	1,23	0,0201
Квадратни			
b_{11}	-0,1584	-0,63	0,2914
b_{22}	0,6091	2,44	0,0062
b_{33}	$-3{,}23\times10^{-5}$	-0,73	0,2346
Интеракција			
b_{12}	0,1619	0,65	0,2653
b_{13}	$7{,}17\times10^{-4}$	0,21	0,6944
b_{23}	$-2{,}35\times10^{-3}$	-0,71	0,2304

На сликама 5.25., 5.26. и 5.27. приказане су тродимензионалне одзивне површине које илуструју утицај концентрације флокуланта, pH вредности и брзине мешања на ефикасност флокулације КТВ.

Ефикасност флокулације се повећава са порастом pH вредности. Овај тренд уочљив је при свим испитиваним концентрацијама флокуланта на бази љуске јаја. При нижим концентрацијама флокуланта (3 g/L), ефикасност флокулације расте са почетних вредности од око 80% при pH 5 до око 91% при pH 9. Док при вишим концентрацијама (7 g/L) ефикасност флокулације расте са почетних вредности од око 84% до максималних вредности које прелазе 96% при pH 9.

За постизање флокулације КТВ примењен је исти експериментални дизајн као и код флокулације КТС (табела 4.6.), јер је за постизање високе ефикасности флокулације, неопходна релативно висока концентрација флокуланта. Овај захтев је у складу са претходно добијеним резултатима како приликом флокулације хитозаном, тако и у случају флокулације применом флокуланта на бази љуске јаја за КТС у условима повишеног садржаја нутријената у медијуму (Yang Z. и сар., 2014). Објашњење дато

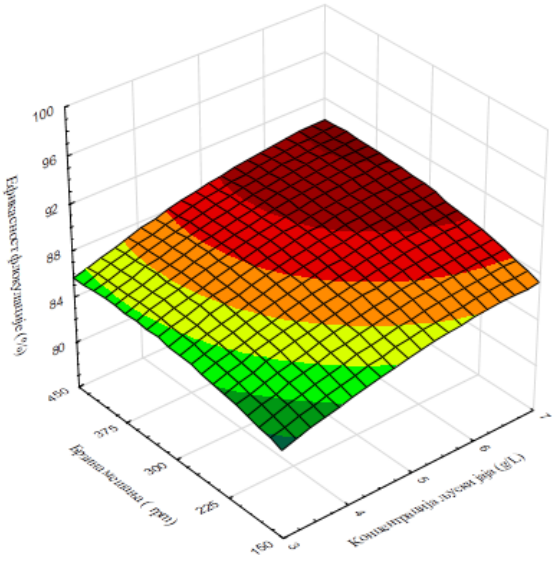
приликом анализе слике 5.15. у потпуности се односи и на слику 5.25. јер механизам деловања флокуланта и утицај његове концентрације зависе од природе биомасе, као и од хемијске варијабилности и сложености културационог медијума. Стога, и у систему КТВ, хитозан као јак поликатјонски биополимер, испољава снажнији флокулациони ефекат у поређењу са флокулантом на бази љуске јаја.



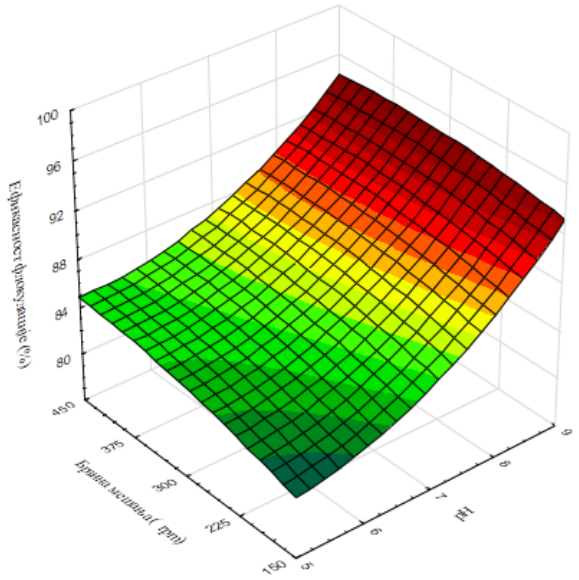
Слика 5.25. Одзивна површина која описује утицај pH вредности и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на ефикасност флокулације КТВ

Максимална ефикасност флокулације од око 97%, постигнута је при концентрацији љуски од 7 g/L и pH вредности 9. Овај резултат је у сагласности са претходно добијеним резултатима у случају КТС (слика 5.25.).

Анализа одзивне површине на слици 5.26., указује да је ефикасност флокулације већа од 88% постигнута при концентрацијама флокуланта на бази љуске јаја изнад 5 g/L и брзинама мешања већим од 225 о/мин. Уочава се да брзина мешања има мањи утицај на ефикасност флокулације у односу на концентрацију флокуланта, али да њено повећање ипак доводи до благог раста ефикасности флокулације. То се може објаснити равномернијом дисперзијом флокуланта у медијуму при већим брзинама мешања. Овај резултат је супротан тренду забележеном у случају КТС, где је повећање брзине мешања довело до благог пада ефикасности флокулације. Највероватније објашњење лежи у разликама у садржају суве материје у примењеним отпадним водама. Садржај суве материје у отпадној води на бази сирне сурутке био је 5,81%, док је у отпадној води из винарије био знатно виши и износио је 17,01% (табела 3.1.). Већи садржај суве материје повећава вискозност и количину присутних честица у медијуму, услед чега је за ефикасну дисперзију флокуланта и остваривање судара неопходна нешто већа брзина мешања.



Слика 5.26. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на ефикасност флокулације КТВ



Слика 5.27. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и pH вредности на ефикасност флокулације КТВ

На слици 5.27. уочљиво је да се ефикасност флокулације повећава са порастом pH вредности при свим испитиваним брзинама мешања. Ефикасност већа од 92% постигнута је при pH вредностима изнад 8. Овај резултат указује да pH вредност има већи утицај на ефикасност флокулације у односу на брзину мешања. Благо смањење ефикасности флокулације при брзинама мешања испод 300 о/мин, може се као и у случају анализе одзивне површине на слици 5.26. објаснити чињеницом да при мањим брзинама мешања, контакт између флокуланта и честица није довољан (Duzyol, 2018).

5.3.2.2. Брзина таложења

Табела 5.40. приказују резултате анализе варијансе за квадратни модел брзине таложења у случају КТВ. Регресиони модел је статистички значајан, што потврђује ниска p-вредност (<0,05), при чему p-вредност за полиномски модел другог реда износи 0,0083.

Табела 5.40. Анализа варијансе брзине таложења КТВ применом праха љуске јаја

Извор варијабилности	**DF**	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
Модел	9	0,016	$1{,}75\times10^{-3}$	11,04	0,0083
Резидуал	5	$7{,}92\times10^{-4}$	$1{,}59\times10^{-4}$		
Одступање модела	3	$7{,}03\times10^{-4}$	$2{,}34\times10^{-4}$	5,27	0,1637
Чиста грешка	2	$8{,}90\times10^{-5}$	$4{,}45\times10^{-5}$		
Укупно	14	0,017			
		R^2	Adj. R^2	Adeq. Precision	
		0,9521	0,8658	12,870	

DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

Да би модел био адекватно прилагођен експерименталним подацима, p-вредност за проверу неприлагођености модела треба да буде већа од 0,05. Како је приказано у табели 5.40., добијена p-вредност за неприлагођеност модела у односу на брзину таложења износила је 0,1637. Ови резултати указују на то да не постоји статистички значајна разлика између експерименталних и предвиђених вредности, што потврђује добру прилагођеност модела.

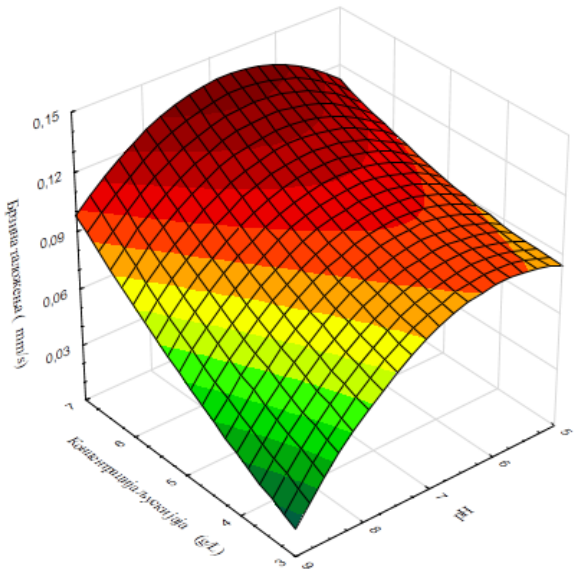
Коефицијент детерминације за брзину таложења флокулисане КТВ показује да се приближно 5% варијација не може објаснити применом квадратног модела. Однос сигнал/шум био је 12,870, што указује на адекватан сигнал и поузданост модела.

Коефицијенти регресионе једначине за брзину таложења, изражени у облику кодираних и стварних вредности променљивих, као и припадајуће p-вредности приказани су у табели 5.41. Резултати указују на статистичку значајност линеарног утицаја концентрације и pH вредности, као и квадратног утицаја pH вредности за модел флокулисане КТВ.

Табела 5.41. Регресиони коефицијенти брзине таложења КТВ применом праха љуске јаја

Ефекти	Коефицијент		p-вредност
	Стварни	Кодирани	
Одсечак			
b_0	$-8{,}14\times10^{-3}$	0,098	<0,0001
Линеарни			
b_1	-0,0368	0,028	0,0015
b_2	0,0798	-0,021	0,0052
b_3	$-4{,}78\times10^{-4}$	$-7{,}65\times10^{-3}$	0,1463
Квадратни			
b_{11}	$1{,}75\times10^{-3}$	$6{,}98\times10^{-3}$	0,3352
b_{22}	$-7{,}83\times10^{-3}$	-0,031	0,0050
b_{33}	$3{,}86\times10^{-7}$	$8{,}68\times10^{-3}$	0,2423
Интеракција			
b_{12}	$3{,}46\times10^{-3}$	0,014	0,0790
b_{13}	$3{,}03\times10^{-5}$	$9{,}10\times10^{-3}$	0,2078
b_{23}	$6{,}33\times10^{-6}$	$1{,}90\times10^{-3}$	0,7749

На сликама 5.28., 5.29. и 5.30. приказане су тродимензионалне одзивне површине које илуструју утицај концентрације флокуланта, pH вредности и брзине мешања на брзину таложења КТВ.

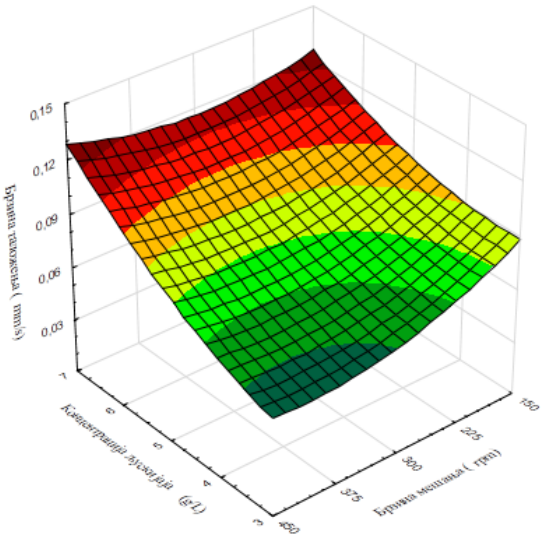


Слика 5.28. Одзивна површина која описује утицај концентрације флокуланта на бази љуске јаја и pH вредности на брзину таложења КТВ

У нефлокулисаној култивационој течности, измерена брзина таложења за КТВ износила је 0,004 mm/s. У случају флокулације хитозаном, брзине таложења су се кретале у распону од 0,0216 до 0,0667 mm/s. С друге стране, у култивационој течности флокулисаној флокулантом на бази љуске јаја забележене су знатно веће брзине таложења, у интервалу од 0,0468 до 0,1454 mm/s. Уочене разлике у брзинама таложења

у зависности од примењеног флокуланта могу се објаснити као и у случају КТС запажањем Jusoh и сар. (2023) да су флокуле формиране деловањем Ca^{2+} јона већих димензија, што последично доводи до убрзаног таложења. Мање брзине таложења запажене у случају флокулације КТВ у односу на КТС применом флокуланта на бази љуске јаја, могу бити последица већег садржаја суспендованих чврстих материја и мањим уделом таложивих честица, што отежава односно успорава процес таложења (Bolzonella и сар., 2019).

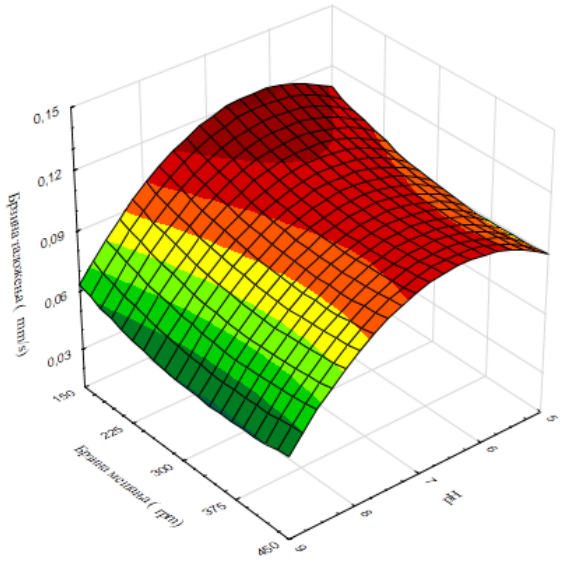
Резултати експеримента таложења за КТВ, приказани на слици 5.28. указују да са порастом концентрације флокуланта на бази љуске јаја расте и брзина таложења, при чему се максималне вредности достижу при концентрацијама изнад 5 g/L и pH вредностима око 7. У распону pH вредности између 5,5 и 8 брзине таложења имају високе вредности, које су при концентрацији флокуланта од 7 g/L изнад 0,12 mm/s. Након тога, са даљим порастом pH вредности до 9, долази до пада брзине таложења, који је знатно израженији при нижим концентрацијама љуски јаја (испод 5 g/L). Овакав тренд може се објаснити као и у случају КТС чињеницом да са порастом pH вредности флокулант на бази љуске јаја, који се претежно састоји од $CaCO_3$ може постати негативно наелектрисан, што доводи до смањења брзине таложења услед појаве одбојних сила између флокуланта и микробних ћелија (Choi, 2015).



Слика 5.29. Одзивна површина која описује утицај концентрације флокуланта на бази љуске јаја и брзине мешања на брзину таложења КТВ

При концентрацијама изнад 6 g/L пораст брзине мешања од 150 до 300 о/мин узрокује благи пад брзине таложења, након чега у интервалу од 300 до 450 о/мин долази до благог повећања брзине таложења. Насупрот томе, у условима нижих концентрација флокуланта (испод 5 g/L), са порастом брзине мешања бележи се пад брзине таложења.

Веће брзине мешања могу довести до кидања флокула, што у условима недовољне количине флокуланта долази до изражаја и отежава таложење (Riaño и сар., 2012).



Слика 5.30. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и pH вредности на брзину таложења КТВ

На графику зависности брзине таложења од брзине мешања и pH вредности (слика 5.30.), уочава се да повећање pH вредности са 5 на 7 доводи до раста брзине таложења при свим испитиваним брзинама мешања. Полазећи од вредности од око 0,11 mm/s при pH 5 и брзини мешања од 150 о/мин, брзина таложења достиже вредности од око 0,125 mm/s при pH 6,5 и брзини мешања од 150 о/мин. Међутим, изнад pH 7 долази до пада брзине таложења, па тако при pH 9 износи око 0,07 mm/s за цео опсег испитиваних брзина мешања, с тим да је нешто израженији у области већих брзина мешања. Овакво запажање може се делимично објаснити на исти начин као и код резултата приказаних на слици 5.28. где са порастом pH вредности, флокулант на бази љуске јаја, који се претежно састоји од $CaCO_3$, може постати негативно наелектрисан. То доводи до појаве одбојних сила између флокуланта и микробних ћелија, што резултује смањењем брзине таложења. Поред тога, израженије смањење брзине таложења при већим брзинама мешања може бити последица ре-стабилизације ћелија услед разбијања флокула (Choi, 2015).

5.3.2.3. Пречник зоне инхибиције

Резултати анализе варијансе за квадратни модел пречника зоне инхибиције за КТВ, приказани су у табели 5.42.

На основу p-вредности, која за КТВ износи 0,0011, потврђује се статистичка значајност регресионе једначине модела. Као што је приказано у табели 5.42., p-вредност

за тест неприлагођености модела у односу на пречник зоне инхибиције износи 0,8616, што указује на то да је модел успешно прилагођен добијеним експерименталним подацима.

Табела 5.42. Анализа варијансе пречника зоне инхибиције КТВ применом праха љуске јаја

Извор варијабилности	**DF**	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
Модел	9	200,90	22,32	25,71	0,0011
Резидуал	5	4,34	0,87		
Одступање модела	3	1,16	0,39	0,24	0,8616
Чиста грешка	2	3,18	1,59		
Укупно	14	205,24			
		R^2	Adj. R^2	Adeq. Precision	
		0,9788	0,9408	15,234	

DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

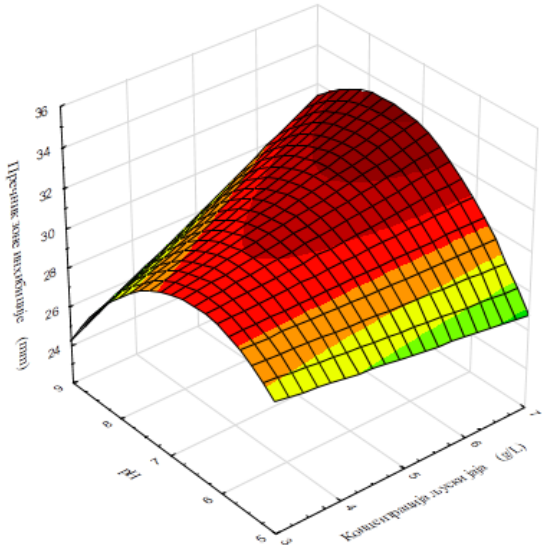
Релативно висока вредност коефицијента детерминације (R^2), која је изнад 0,75, потврђује да је модел погодан за поуздано представљање емпиријских података. Такође, вредност односа адекватне прецизности од 15,234, указује на то да је однос сигнал/шум за одзив који се односи на пречник зоне инхибиције задовољавајући.

Коефицијенти регресионе једначине за пречник зоне инхибиције, изражени у облику кодираних и стварних вредности променљивих, као и припадајуће p-вредности, приказани су у табели 5.43. Добијени резултати указују на статистичку значајност линеарних ефеката концентрације и брзине мешања, квадратних ефеката pH вредности и брзине мешања и интеракционих ефеката концентрације и pH вредности, као и концентрације и брзине мешања.

Табела 5.43. Регресиони коефицијенти пречника зоне инхибиције КТВ применом праха љуске јаја

Ефекти	**Коефицијент**		**p-вредност**
	Стварни	**Кодирани**	
Одсечак			
b_0	-37,6967	33,11	<0,0001
Линеарни			
b_1	-0,0702	1,33	0,0098
b_2	12,3615	0,084	0,8094
b_3	0,1555	2,59	0,0005
Квадратни			
b_{11}	-0,0448	-0,18	0,7269
b_{22}	-1,0035	-4,01	0,0004
b_{33}	$-1{,}12\times10^{-4}$	-2,52	0,0035
Интеракција			
b_{12}	0,5625	2,25	0,0048
b_{13}	$-9{,}17\times10^{-3}$	-2,75	0,0020
b_{23}	$-3{,}61\times10^{-3}$	-1,08	0,0678

На сликама 5.31., 5.32. и 5.33. приказане су тродимензионалне одзивне површине које илуструју утицај концентрације флокуланта, pH вредности и брзине мешања на пречник зоне инхибиције КТВ.

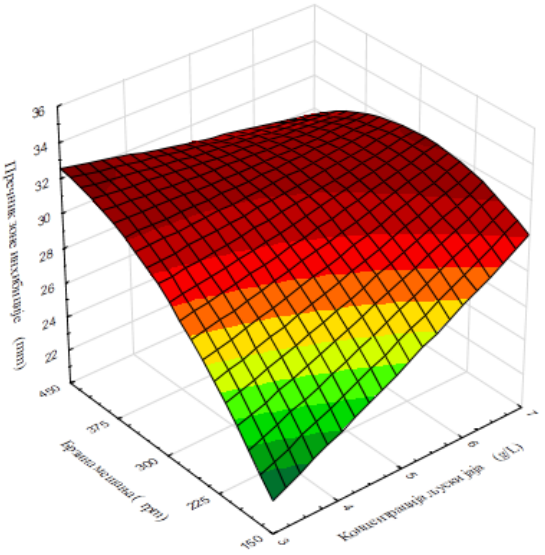


Слика 5.31. Одзивна површина која описује утицај pH вредности и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на пречник зоне инхибиције КТВ

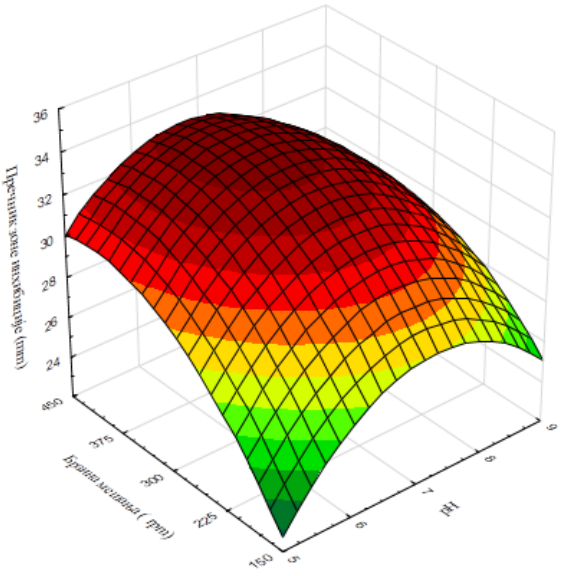
Пречник зоне инхибиције нефлокулисане КТВ износио је 35 mm. При примени хитозана као флокуланта, распон пречника зоне инхибиције био је од 38,37 до 49,85 mm (табела 5.16.). У случају примене флокуланта на бази љуске јаја распон пречника био је између 23,33 и 34,67 mm. Веће вредности пречника зоне инхибиције у случају хитозана могу се приписати његовом антимикробном дејству, које није присутно код флокуланта на бази љуске јаја.

Анализом графика 5.31 уочава се да пречник зоне инхибиције расте са повећањем концентрације флокуланта, при чему се највише вредности пречника зоне инхибиције постижу када је pH вредност између 6,5 и 8,5 што је у складу са високим ефикасностима флокулације постигнутим под тим условима. Са даљим повећањем pH вредности долази до смањења пречника зоне инхибиције, поготово у условима нижих концентрација флокуланта. Иако је антимикробна активност евидентна у целом испитиваном опсегу pH вредности (5-9), највећи пречници зоне инхибиције забележене су при pH вредностима између 7 и 8. То представља оптималан опсег за раст *Bacillus* бактерија и продукцију метаболита са антимикробним дејством, што је у складу са резултатима које су пријавили Palacinos-Rodriguez и сар. (2024).

Потенцијална токсичност високе концентрације флокуланта (до 7 g/L) на виталност бактеријске културе *Bacillus* sp. BioSol021 није уочена. Након култивације, концентрација бактерија износила је 9,6 log CFU/mL. Након флокулације забележена је благо смањена вредност од 9,51 log CFU/mL, када је концентрација хитозана од 7 g/L примењена. Тиме је потврђено да је сој задржао виталност и функционалност за предвиђену примену.



Слика 5.32. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на пречник зоне инхибиције КТВ



Слика 5.33. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и pH вредности на пречник зоне инхибиције КТВ

Анализом слике 5.32. уочава се да са повећањем брзине мешања долази до повећања пречника зоне инхибиције. Најмање вредности пречника забележене су при нижим концентрацијама флокуланта (до 5 g/L) и брзинама мешања до 225 о/мин. Овакав

тренд може бити последица недовољне количине флокуланта у суспензији. У таквим условима флокулант није у могућности да ефикасно флокулише све присутне честице (Dmitrović и сар., 2022; Hadiyanto и сар., 2022). Са повећањем концентрације изнад 5 g/L и брзиама мешања већим од 225 о/мин, пречник зоне инхибиције задржава константно више вредности (веће од 30 mm).

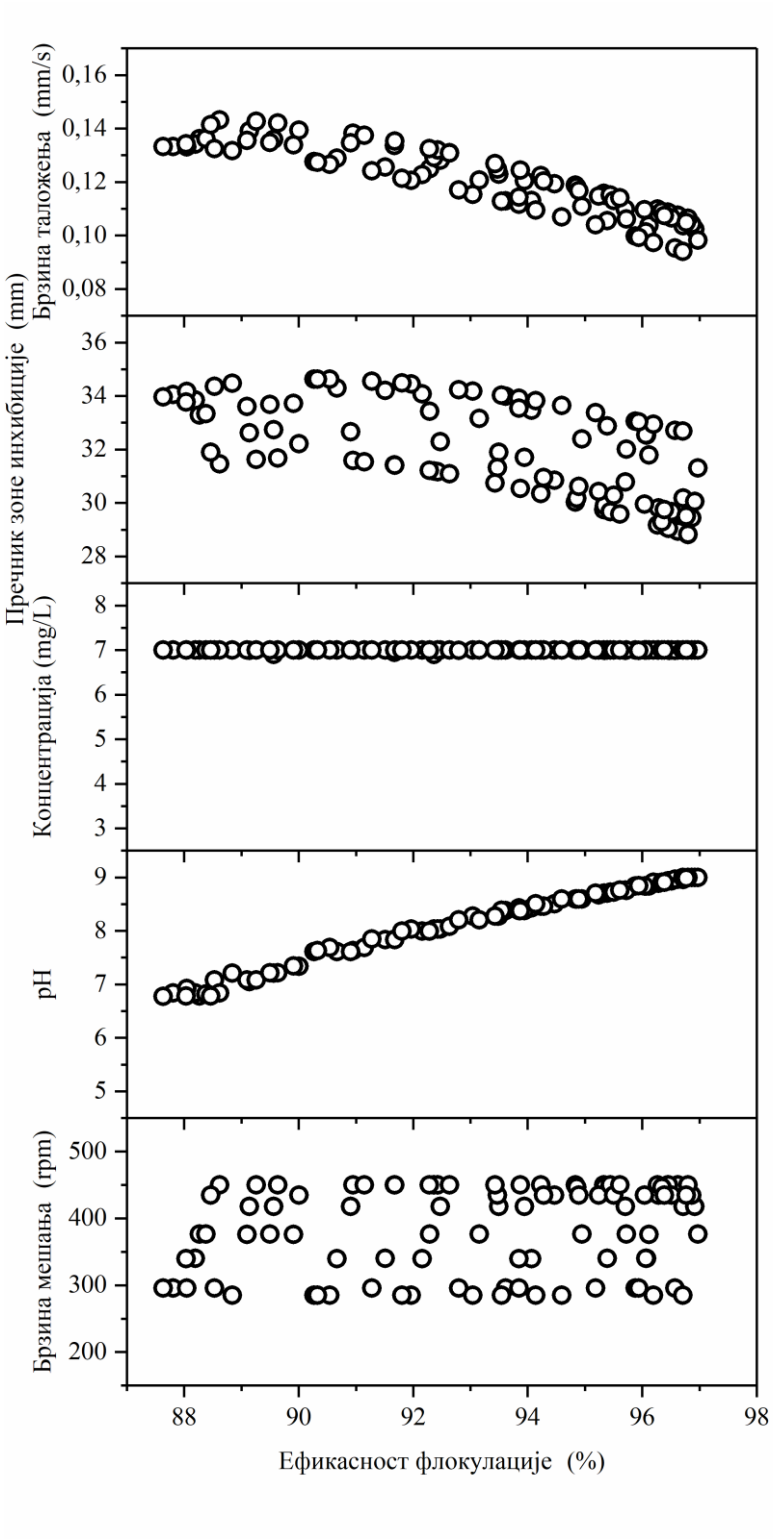
Са порастом pH вредности од 5 до 7,5 долази до повећања пречника зоне инхибиције, при чему се највеће вредности постижу при брзинама мешања изнад 225 о/мин. Након pH 8 бележи се смањење пречника зоне инхибиције (слика 5.33.), што је у складу са претходно наведеним објашњењем за слику 5.31. Најниже вредности пречника зоне инхибиције остварене су при брзини мешања од 150 до 225 о/мин у условима ниских pH вредности. Ово се може приписати недовољној дисперзији флокуланта при ниским брзинама мешања. Као последица, ефикасност флокулације опада, што се одражава и на смањену антимикробну активност.

5.3.2.4. Оптимизација

Оптимизација оперативних услова током флокулације у процесу издвајања биомасе *Bacillus* sp. BioSol021 из култивационих течности изведена је применом функције пожељности (DF) и генетског алгоритма (GA). Резултати мултикритеријалне оптимизације помоћу генетског алгоритма приказани су на слици 5.34. Проблем оптимизације решен је применом кодиране NSGA-II методе у MATLAB-у, чиме је добијен скуп Парето оптималних решења. Обе методе оптимизације имале су за циљ постизање максималних вредности три одзива моделована применом методе одзивне површине (RSM).

У почетној фази, функција пожељности примењена је на појединачне одзиве. За максимизацију ефикасности флокулације, оптимални услови (концентрацији флокуланта на бази љуске јаја од 6,90 g/L, pH вредност 8,98 и брзина мешања од 310,33 о/мин) дали су вредност пожељности од 1,00, при чему је ефикасност флокулације износила 96,63%. У случају максимизације брзине таложења, оптимално решење (концентрација од 7 g/L, pH вредност 6,83 и брзина мешања од 450 о/мин) имало је пожељност од 0,983, а брзина таложења под овим условима била је 0,1432 mm/s. За максимизацију пречника зоне инхибиције, најповољнији услови (концентрација од 3,13 g/L, pH вредност 6,27 и брзина мешања од 419,71 о/мин) резултовали су пожељношћу од 1,00, док је пречник зоне инхибиције под овим условима износио 34,74 mm.

За КТВ, оптимално решење остварено је при укупној пожељности од 0,842. Ово решење постигнуто је са концентрацијом хитозана од 7,00 g/L, pH вредности 8,29 и брзином мешања од 309,95 о/мин. При овим експерименталним условима, ефикасност флокулације износила је 93,28%, брзина таложења била је 0,11 mm/s, док је пречник зоне инхибиције достигао 34,04 mm.



Слика 5.34. Парето фронт и простор одлуке скупа оптималних решења добијених применом вишекритеријумског генетског алгоритма у случају КТВ

Контролни експерименти спроведени при оптималним условима показали су задовољавајуће слагање између предвиђених и експерименталних вредности. Овај резултат потврђује валидност предложеног полиномског модела другог реда за приказивање експерименталних резултата. Експериментално добијене оптималне вредности за ефикасност флокулације, брзину таложења и пречник зоне инхибиције у случају КТВ износиле су 93%, 0,10 mm/s и 33,00 mm, редом.

Резултати мултикритеријалне оптимизације помоћу генетског алгоритма приказани су на слици 5.34. Проблем оптимизације решен је применом кодиране NSGA-II методе у MATLAB-у, чиме је добијен скуп Парето оптималних решења.

Парето фронт и најбоља предикција добијена методом функције пожељности се подударају. Парето фронт нуди могућност избора благог повећања ефикасности флокулације (са приближно 93% на око 96%) при истој концентрацији флокуланта, али уз истовремено смањење друга два одзива - пречника зоне инхибиције и брзине таложења. Стога се као најповољније издваја компромисно решење добијено методом функције пожељности.

5.3.3. Флокулација биомасе *Bacillus* sp. из културационе течности на бази отпадне воде из производње воћних сокова

Експериментални дизајн са три независне променљиве (концентрација флокуланта на бази љуске јаја, већа брзина мешања и pH вредност) и одзиви (ефикасност флокулације, брзина таложења, пречник зоне инхибиције) дати су у табели 5.44.

Табела 5.44. Експериментални дизајн и одзиви у случају флокулације КТВС применом праха љуске јаја

Експеримент	Фактори-независне променљиве			Одзиви-зависне променљиве		
	Концентрација љуски (g/L)	pH вредност	Већа брзина мешања (о/мин)	Ефикасност флокулације (%)	Брзина таложења (mm/s)	Пречник зоне инхибиције (mm)
1	2,5	5	300	66,0	0,6970	60,00
2	5,5	5	300	97,8	0,1035	61,00
3	2,5	9	300	37,1	0,0571	58,33
4	5,5	9	300	60,5	0,2167	54,67
5	2,5	7	150	67,1	0,0736	57,33
6	5,5	7	150	88,2	0,2250	56,00
7	2,5	7	450	55,1	0,0548	54,67
8	5,5	7	450	82,7	0,2500	53,00
9	4	5	150	95,3	0,0905	59,00
10	4	9	150	51,6	0,1833	56,33
11	4	5	450	92,1	0,1036	58,67
12	4	9	450	58,2	0,1153	47,50
13	4	7	300	78,5	0,1604	58,67
14	4	7	300	77,3	0,1500	59,67
15	4	7	300	84,8	0,1426	59,67

5.3.3.1. Ефикасност флокулације

Резиме анализе варијансе за полиномски модел другог реда приказан је у табели 5.45. Развијени модел за процену ефикасности флокулације показо се као статистички значајан, са p-вредношћу од 0,0016. Такође, резултати анализе варијансе показују високе вредности прилагођеног коефицијента детерминације (Adj. R^2= 93,28%). Поред високих вредности прилагођеног коефицијента детерминације, предложени полиномски модел другог реда за КТВС није показао значајно одступање (p-вредност= 0,4140).

Табела 5.45. Анализа варијансе за ефикасност флокулације КТВС

Извор варијабилности	**DF**	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
Модел	9	4409,74	489,97	22,59	0,0016
Резидуал	5	108,47	21,69		
Одступање модела	3	75,96	25,32	1,56	0,4140
Чиста грешка	2	32,51	16,26		
Укупно	14	4518,21			
		R^2	Adj. R^2	Adeq. Precision	
		0,9760	0,9328	16,289	

DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

Параметар адекватна прецизност представља показатељ односа сигнал/шум, при чему је пожељно да је тај однос већи од 4. Добијени однос од 16,289 за КТВС указује на адекватан сигнал, што потврђује поузданост модела.

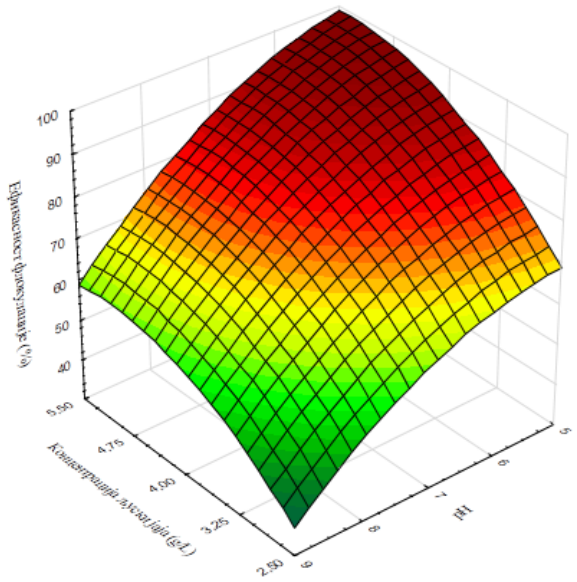
Коефицијенти регресионе једначине за ефикасност флокулације, изражени у виду кодираних и стварних вредности промењљивих, као и одговарајуће p-вредности, приказани су у табели 5.46. Линеарни (b_1, b_2, b_3), квадратни (b_{11}, b_{22}, b_{33}) и интеракциони (b_{12}, b_{13}, b_{23}) коефицијенти модела сматрају се статистички значајним уколико су p-вредности мање од 0,05. Добијени резултати указују на статистичку значајност линеарних и квадратних ефеката концентрације флокуланта и pH вредности за модел заснован на КТВС.

Табела 5.46. Регресиони коефицијенти ефикасности флокулације КТВС применом праха љуске јаја

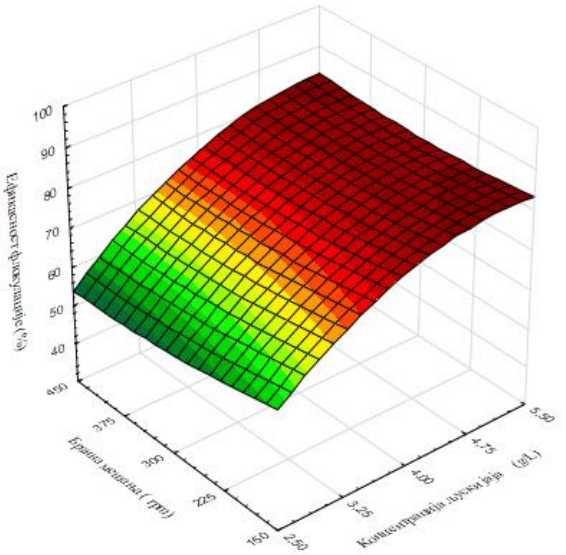
Ефекти	**Коефицијент**		**p-вредност**
	Стварни	**Кодирани**	
Одсечак			
b_0	-18,6916	76,16	<0,0001
Линеарни			
b_1	39,6419	21,81	0,0004
b_2	15,5057	-17,42	0,0002
b_3	-0,1250	-2,19	0,2684
Квадратни			
b_{11}	-3,5233	-12,72	0,0222
b_{22}	-1,7257	-6,90	0,0359
b_{33}	$4{,}51\times10^{-5}$	1,01	0,6928
Интеракција			
b_{12}	-0,7038	-2,67	0,4062
b_{13}	$7{,}10\times10^{-3}$	2,02	0,5233
b_{23}	$8{,}26\times10^{-3}$	2,48	0,3361

На сликама 5.35., 5.36. и 5.37. приказане су тродимензионалне одзивне површине које илуструју утицај концентрације флокуланта, pH вредности и брзине мешања на ефикасност флокулације КТВС.

Ефикасност флокулације се повећава са порастом концентрације флокуланта. Максимална ефикасност флокулације од близу 100%, постигнута је при концентрацији флокуланта од 5,5 g/L и pH вредности 5. За постизање високе ефикасности флокулације, неопходна је релативно висока концентрација флокуланта, што је у складу са претходно добијеним резултатима у условима повишеног садржаја нутријената у медијуму (Yang Z. и сар., 2014). Међутим, за постизање флокулације КТВС била је потребна мања концентрација флокуланта на бази љуске јаја у поређењу са претходне две култивационе течности (табела 5.44.). Ово се може објаснити мањим садржајем суве материје у отпадној води из производње воћних сокова у односу на сурутку и отпадну воду из винарије (Dmitrović и сар., 2022; Xu и сар., 2013).



Слика 5.35. Одзивна површина која описује утицај концентрације флокуланта на бази љуске јаја и pH вредности на ефикасност флокулације КТВС

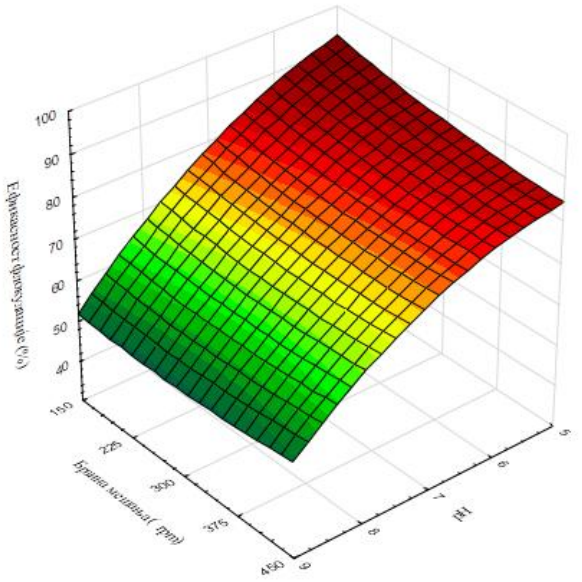


Слика 5.36. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на ефикасност флокулације КТВС

Ефикасност флокулације (слика 5.35.) расте са порастом концентрације, што је у складу са резултатима добијеним за КТС и КТВ али за разлику од КТС и КТВ већа ефикасност постигнута је при нижим pH вредностима. При концентрацијама флокуланта на бази љуски јаја испод 4 g/L и pH вредностима преко 7, ефикасност флокулације значајно опада и достиже вредности испод 40%. Овакав резултат указује да састав

медијума може имати пресудан утицај на механизам флокулације-вероватно због различитог садржаја органских киселина које мењају површинско наелектрисање честица и интеракцију са флокулантом. У киселој средини површина микробних ћелија носи анјонско наелектрисање, што доприноси појачаној електростатичкој привлачности између негативно наелектрисаних група на површини микроорганизама и позитивно наелектриснаих јона калцијума присутних у љускама јаја (Shazili и сар., 2025).

Анализа одзивне површине на слици 5.36., указује да је ефикасност флокулације већа од 80% постигнута при концентрацији флокуланта на бази љуске јаја изнад 4,75 g/L при свим испитиваним брзинама мешања. Приметно је да са повећањем концентрације флокуланта ефикасност флокулације континуирано расте, при чему брзина мешања има мањи утицај на ефикасност флокулације у односу на концентрацију флокуланта, али да њено повећање ипак доводи до благог пада ефикасности флокулације. Овакав тренд забележен је и у случају флокулације КТС истим флокулантом. Разлог може бити низак садржај суве материје, који је у случају КТВС износио 0,5%, услед чега веће брзине нису биле неопходне за равномерну дисперзију флокуланта као у случају КТВ (садржај суве материје 17,01%). Преинтензивно мешање може механички нарушити формиране флокуле и изазвати поновну адсорпцију истих полимерних молекула на површину исте честице, чиме се спречава даље умрежавање (Duzyol, 2018).



Слика 5.37. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и pH вредности на ефикасност флокулације КТВС

На слици 5.37. уочљиво је да се ефикасност флокулације повећава при нижим pH вредности за све испитиване брзине мешања. Ефикасност већа од 90% постигнута је при pH 5 и брзини мешања од 150 о/мин. На вишим pH вредностима (изнад 8) ефикасност значајно опада до вредности од око 50%, при свим испитиваним брзинама мешања. Овај

резултат указује да pH вредност има већи утицај на ефикасност флокулације у односу на брзину мешања.

5.3.3.2. Брзина таложења

Табела 5.47. приказују резултате анализе варијансе за квадратни модел брзине таложења у случају КТВС. Регресиони модел је статистички значајан, што потврђује ниска p-вредност (<0,05), при чему p-вредност за полиномски модел другог реда износи 0,0161.

Табела 5.47. Анализа варијансе брзине таложења КТВС применом праха љуске јаја

Извор варијабилности	**DF**	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
Модел	9	0,053	$5,84\times10^{-3}$	8,19	0,0161
Резидуал	5	$3,56\times10^{-3}$	$7,13\times10^{-4}$		
Одступање модела	3	$3,40\times10^{-3}$	$1,13\times10^{-3}$	14,18	0,0666
Чиста грешка	2	$1,60\times10^{-4}$	$8,00\times10^{-5}$		
Укупно	14	0,056			
		R^2	Adj. R^2	Adeq. Precision	
		0,9365	0,8222	9,081	

DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

Да би модел био адекватно прилагођен експерименталним подацима, p-вредност за проверу неприлагођености модела треба да буде већа од 0,05. Како је приказано у табели 5.47., добијена p-вредност за неприлагођеност модела у односу на брзину таложења износила је 0,0666. Ови резултати указују на то да не постоји статистички значајна разлика између експерименталних и предвиђених вредности, што потврђује добру прилагођеност модела.

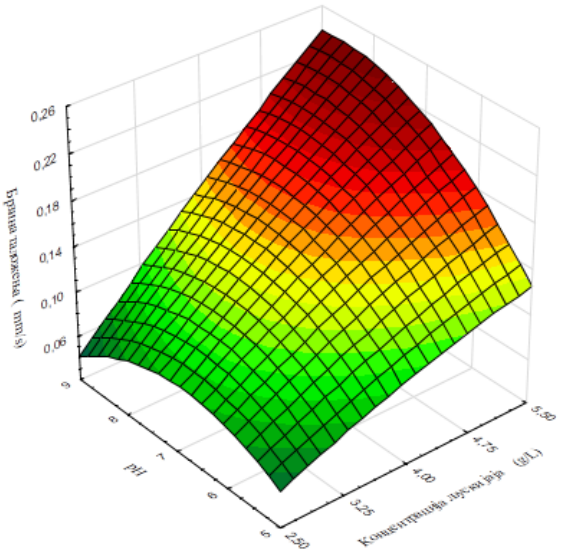
Табела 5.48. Регресиони коефицијенти брзине таложења КТВС применом праха љуске јаја

Ефекти	**Коефицијент**		**p-вредност**
	Стварни	**Кодирани**	
Одсечак			
b_0	-0,3251	0,13	<0,0001
Линеарни			
b_1	-0,0224	0,089	0,0020
b_2	0,1083	0,017	0,1479
b_3	$8,75\times10^{-5}$	$-9,01\times10^{-3}$	0,4127
Квадратни			
b_{11}	$-2,57\times10^{-3}$	$-9,29\times10^{-3}$	0,6942
b_{22}	$-8,37\times10^{-3}$	-0,033	0,0609
b_{33}	$2,51\times10^{-7}$	$5,64\times10^{-3}$	0,7016
Интеракција			
b_{12}	0,0105	0,040	0,0650
b_{13}	$4,87\times10^{-5}$	0,014	0,4493
b_{23}	$-6,76\times10^{-5}$	-0,020	0,1892

Коефицијент детерминације за брзину таложења флокулисане КТВС показује да се приближно 7% варијација не може објаснити применом квадратног модела. Однос сигнал/шум био је 9,081, што указује на адекватан сигнал и поузданост модела.

Коефицијенти регресионе једначине за брзину таложења, изражени у облику кодираних и стварних вредности променљивих, као и припадајуће p-вредности приказани су у табели 5.48. Резултати указују на статистичку значајност линеарног ефекта концентрације за модел флокулисане КТВС.

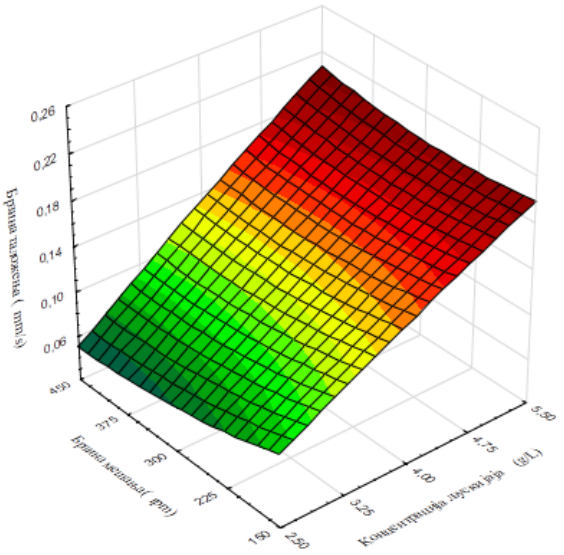
На сликама 5.38., 5.39. и 5.40. приказане су тродимензионалне одзивне површине које илуструју утицај концентрације флокуланта, pH вредности и брзине мешања на брзину таложења КТВС.



Слика 5.38. Одзивна површина која описује утицај pH вредности и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на брзину таложења КТВС

У нефлокулисаној култивационој течности, измерена брзина таложења за КТВС износила је 0,0396 mm/s. У случају флокулације хитозаном, брзине таложења су се кретале у распону од 0,0304 до 0,0730 mm/s. С друге стране, у култивационој течности флокулисаној флокулантом на бази љуске јаја забележене су знатно веће брзине таложења, у интервалу од 0,0548 до 0,2500 mm/s. Уочене разлике у брзинама таложења у зависности од примењеног флокуланта могу се објаснити као и у случају КТС и КТВ запажањем Jusoh и сар. (2023) да су флокуле формиране деловањем Ca^{2+} јона већих димензија, што последично доводи до убрзаног таложења. Веће брзине таложења запажене у случају флокулације КТВС у односу на КТС и КТВ применом флокуланта на бази љуске јаја, могу бити последица мањег садржаја суспендованих чврстих материја, што олакшава односно убрзава процес таложења.

Резултати експеримента таложења за КТВС, приказани на слици 5.38. указују да са порастом концентрације флокуланта на бази љуске јаја расте и брзина таложења, при чему се максималне вредности достижу при концентрацијама изнад 5 g/L и pH вредностима изнад 7. У распону pH вредности између 6,5 и 9 брзине таложења имају високе вредности при концентрацијама флокуланта већим од 4,5 g/L и износе преко 0,14 mm/s. Овакав тренд је у складу са резултатима за ефикасност флокулације.

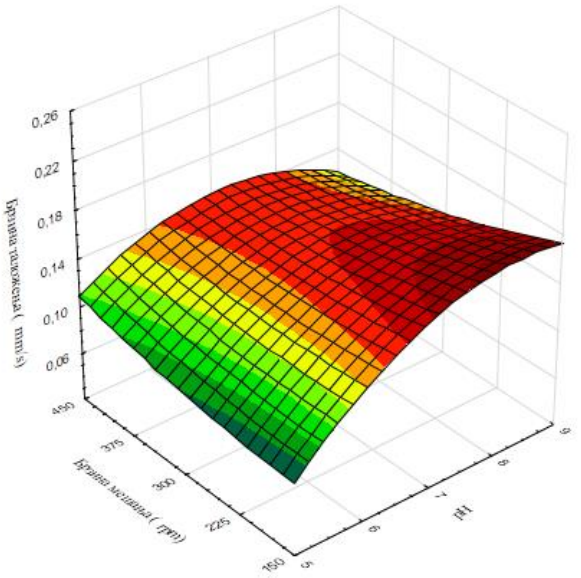


Слика 5.39. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на брзину таложења КТВС

На слици 5.39. брзина таложења показује линеарни раст са повећањем концентрације флокуланта за све испитиване брзине мешања. При нижим концентрацијама (до 3,25 g/L) и већим брзинама мешања (преко 300 о/мин) забележене су најниже вредности брзине таложења (испод 0,06 mm/s), врло сличан тренд забележен је и у случају КТВ. Веће брзине мешања могу довести до распадања флокула што у условима недовољне количине флокуланта долази до изражаја и отежава таложење (Riaño и сар., 2012). При вишим концентрацијама (преко 4,75 g/L) забележен је благи пад брзине таложења у интервалу од 150 до 300 о/мин, након чега са даљим повећањем брзине мешања од 300 о/мин до 450 о/мин долази до благог раста брзине таложења.

На графику зависности брзине таложења од брзине мешања и pH вредности (слика 5.40.), уочава се да повећање pH вредности са 5 на 7 доводи до раста брзине таложења при свим испитиваним брзинама мешања. Полазећи од вредности од око 0,09 mm/s при pH 5 и брзини мешања од 150 о/мин, брзина таложења достиже вредности од око 0,15 mm/s при pH 7 у целом распону брзина мешања. Међутим, изнад pH 7 долази до пада брзине таложења, у распону брзина мешања од 300 до 450 о/мин, па тако при pH 9 износи око 0,12 mm/s, док у распону брзина мешања од 150 до 300 о/мин и pH

вредности изнад 7, долази до повећања брзине таложења. Максимална вредност од око 0,17 mm/s постигнута је при pH 9 и брзини мешања од 150 о/мин.



Слика 5.40. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и pH вредности на брзину таложења КТВС

5.3.3.3. Пречник зоне инхибиције

Резултати анализе варијансе за квадратни модел пречника зоне инхибиције за КТВС, приказани су у табели 5.49.

Табела 5.49. Анализа варијансе пречника зоне инхибиције КТВС применом праха љуске јаја

Извор варијабилности	**DF**	**SS**	**MS**	**F-однос**	**p-вредност**
Модел	9	162,78	18,09	13,97	0,0048
Резидуал	5	6,48	1,30		
Одступање модела	3	5,81	1,94	5,81	0,1504
Чиста грешка	2	0,67	0,33		
Укупно	14	169,25			
		R^2	Adj. R^2	Adeq. Precision	
		0,9617	0,8929	14,012	

DF-број степени слободе, SS-сума квадрата, MS-сума средњих квадрата

На основу p-вредности, која за КТВС износи 0,0048, потврђује се статистичка значајност регресионе једначине модела. Као што је приказано у табели 5.49., p-вредност за тест неприлагођености модела у односу на пречник зоне инхибиције износи 0,1504, што указује на то да је модел успешно прилагођен добијеним експерименталним подацима. Релативно висока вредност коефицијента детерминације (R^2), која је изнад 0,75, потврђује да је модел погодан за поуздано представљање емпиријских података.

Такође, вредност односа адекватне прецизности од 14,012, указује на то да је однос сигнал/шум за одзив који се односи на пречник зоне инхибиције задовољавајући.

Коефицијенти регресионе једначине за пречник зоне инхибиције, изражени у облику кодираних и стварних вредности променљивих, као и припадајуће p-вредности, приказани су у табели 5.50. Добијени резултати указују на статистичку значајност линеарних ефеката pH вредности и брзине мешања, као и квадратних ефеката брзине мешања. Такође, интеракција између концентрације и брзине мешања, као и pH вредности и брзине мешања у регресионој једначини показала је статистичку значајност.

Табела 5.50. Регресиони коефицијенти пречника зоне инхибиције КТВС применом праха љуске јаја

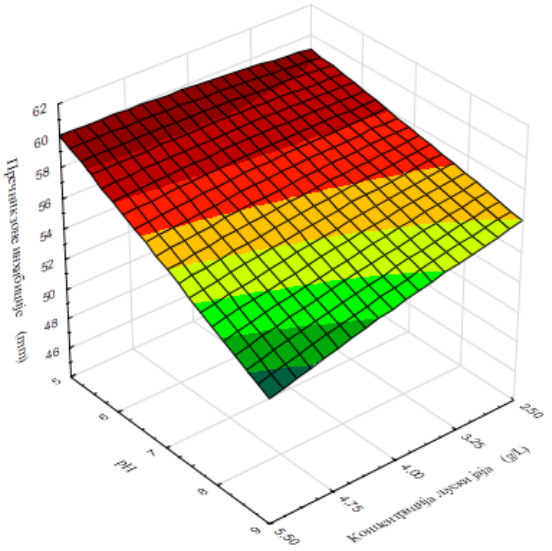
Ефекти	**Коефицијент**		**p-вредност**
	Стварни	**Кодирани**	
Одсечак			
b_0	26,0801	59,49	<0,0001
Линеарни			
b_1	4,0696	-0,57	0,4183
b_2	3,5587	-2,42	0,0025
b_3	0,1349	-1,83	0,0081
Квадратни			
b_{11}	-0,2137	-0,77	0,4538
b_{22}	-0,08896	-0,36	0,5742
b_{33}	$-1,60\times10^{-4}$	-3,61	0,0017
Интеракција			
b_{12}	-0,3883	-1,48	0,0960
b_{13}	$-3,78\times10^{-4}$	-0,11	0,0071
b_{23}	$-7,08\times10^{-3}$	-2,13	0,0135

На сликама 5.41., 5.42. и 5.43. приказане су тродимензионалне одзивне површине које илуструју утицај концентрације флокуланта, pH вредности и брзине мешања на пречник зоне инхибиције КТВС.

Пречник зоне инхибиције нефлокулисане КТВС износио је 60,67 mm. При примени хитозана као флокуланта, распон пречника зоне инхибиције био је од 65 до 74 mm (табела 5.23.). У случају примене флокуланта на бази љуске јаја распон пречника био је између 47,50 и 61 mm. Веће вредности пречника зоне инхибиције у случају хитозана могу се приписати његовом антимикробном дејству, које није присутно код флокуланта на бази љуске јаја.

Анализом графика 5.41 уочава се да са повећањем pH вредности долази до смањења пречника зоне инхибиције при свим испитиваним концентрацијама флокуланта. При pH вредностима испод 7, пречник зоне инхибиције бележи благи раст са повећањем концентрације флокуланта, при чему се највише вредности пречника зоне инхибиције постижу када је pH вредност 5 и концентрација флокуланта 5,5, g/L, што је у складу са високим ефикасностима флокулације постигнутим под тим условима. Са даљим повећањем pH вредности долази до смањења пречника зоне инхибиције,

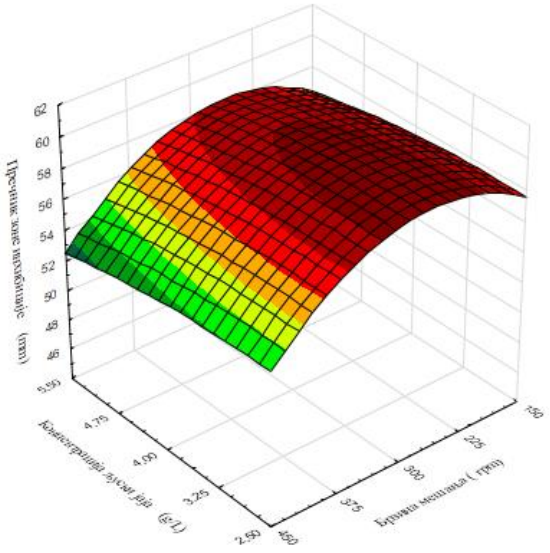
поготово у условима виших концентрација флокуланта. Иако је антимикробна активност евидентна у целом испитиваном опсегу pH вредности (5-9), највећи пречници зоне инхибиције забележени су при pH вредностима нижим од 7.



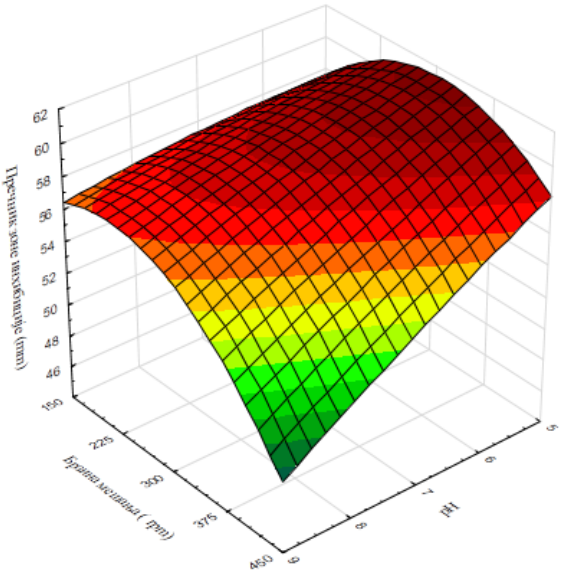
Слика 5.41. Одзивна површина која описује утицај pH вредности и концентрације флокуланта на бази љуске јаја на пречник зоне инхибиције КТВС

Потенцијална токсичност високе концентрације флокуланта (до 5,5 g/L) на виталност бактеријске културе *Bacillus* sp. BioSol021 није уочена. Након култивације, концентрација бактерија износила је 9,26 log CFU/mL. Након флокулације забележена је благо смањена вредност од 9,17 log CFU/mL, када је концентрација хитозана од 5,5 g/L примењена. Тиме је потврђено да је сој задржао виталност и функционалност за предвиђену примену.

Анализом слике 5.42. уочава се да са повећањем брзине мешања од 150 до 300 о/мин долази до повећања пречника зоне инхибиције за све испитиване концентрације флокуланта. Са даљим повећањем брзине мешања изнад 300 о/мин, долази до смањења пречника зоне инхибиције, што је уочљиво при свим испитиваним концентрацијама. Најмање вредности пречника забележене су при концентрацијама флокуланта преко 4,75 g/L и брзинама мешања изнад 375 о/мин. Овакав тренд може бити последица поновне дисперзије честица, смањења ефикасности флокулације и пада антимикробне активности услед разбијања флокула (Choi, 2015). Сличан тренд запажен је и приликом тестирања антимикробне активности КТВС применом хитозана као флокуланта, где је уочено да сама антимикробна активност ћелија соја *Bacillus* остаје непромењена, док се смањење укупног антимикробног ефекта при вишим брзинама мешања може приписати смањеној флокулацији секундарних метаболита са антимикробним дејством, попут сурфактина, који су карактеристични за сој *Bacillus* sp. BioSol021 (Dmitrović и сар., 2022).



Слика 5.42. Одзивна површина која описује утицај концентрације флокуланта на бази љуске јаја и брзине мешања на пречник зоне инхибиције КТВС



Слика 5.43. Одзивна површина која описује утицај брзине мешања и pH вредности на пречник зоне инхибиције КТВС

Пречник зоне инхибиције има константно високе вредности у условима брзине мешања до око 350 о/мин у целокупном опсегу pH вредности. При чему се највеће

вредности (преко 60 mm) постижу при брзинама мешања од око 300 о/мин и pH вредностима од 5 до 7. Након pH 7 и брзинама мешања већим од 350 о/мин бележи се значајно смањење пречника зоне инхибиције (слика 5.43.). Најмање вредности пречника зоне инхибиције (око 48 mm) постижу се при pH 9 и брзини мешања од 450 о/мин. Ово се може приписати прекомерној брзини мешања., али и условима pH вредности који не погодују ефикасној флокулацији, што се одражава и на смањену антимикробну активност.

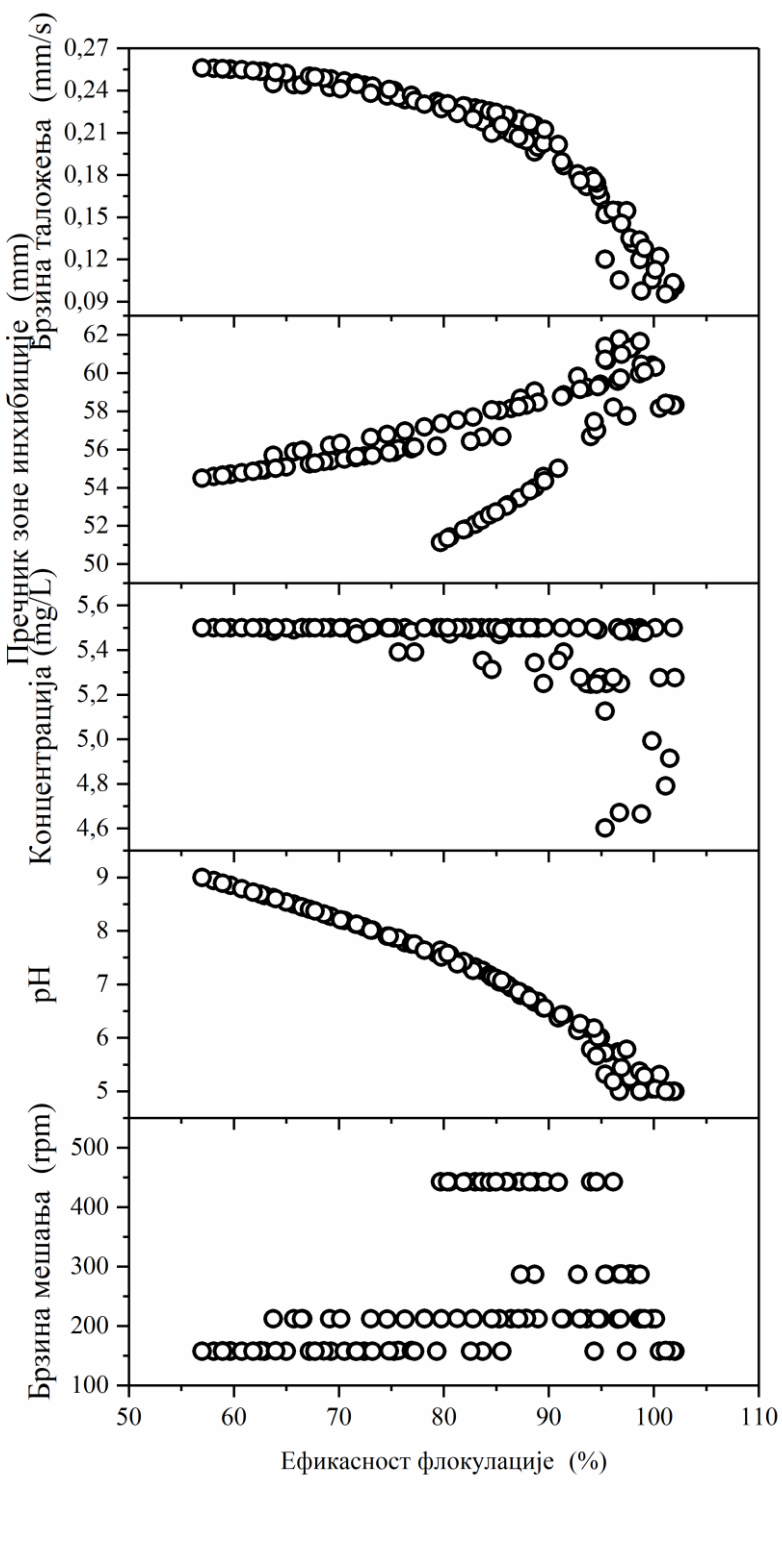
5.3.3.4. Оптимизација

Оптимизација оперативних услова током флокулације у процесу издвајања биомасе *Bacillus* sp. BioSol021 из култивационих течности изведена је применом функције пожељности (DF) и генетског алгоритма (GA). Резултати мултикритеријалне оптимизације помоћу генетског алгоритма приказани су на слици 5.44. Проблем оптимизације решен је применом кодиране NSGA-II методе у MATLAB-у, чиме је добијен скуп Парето оптималних решења. Обе методе оптимизације имале су за циљ постизање максималних вредности три одзива моделована применом методе одзивне површине (RSM).

У почетној фази, функција пожељности примењена је на појединачне одзиве. За максимизацију ефикасности флокулације, оптимални услови (концентрацији флокуланта на бази љуске јаја од 5,13 g/L, pH вредност 5,16 и брзина мешања од 265,91 о/мин) дали су вредност пожељности од 1,00, при чему је ефикасност флокулације износила 98,33%. У случају максимизације брзине таложења, оптимално решење (концентрација од 5,46 g/L, pH вредност 8,96 и брзина мешања од 167,53 о/мин) имало је пожељност од 1,00, а брзина таложења под овим условима била је 0,2519 mm/s. За максимизацију пречника зоне инхибиције, најповољнији услови (концентрација од 3,60 g/L, pH вредност 5,36 и брзина мешања од 302,45 о/мин) резултовали су пожељношћу од 1,00, док је пречник зоне инхибиције под овим условима износио 61,23 mm.

За КТВС, оптимално решење постигнуто је при укупној пожељности од 0,817. Ово решење постигнуто је при концентрацији хитозана од 5,50 g/L, pH вредности 6,37 и брзини мешања од 287,55 о/мин. При овим експерименталним условима, ефикасност флокулације износила је 91%, брзина таложења била је 0,19 mm/s, док је пречник зоне инхибиције достигао 59,42 mm.

Контролни експерименти спроведени при оптималним условима показали су задовољавајуће слагање између предвиђених и експерименталних вредности. Овај резултат потврђује валидност предложеног полиномског модела другог реда за приказивање експерименталних резултата. Експериментално добијене оптималне вредности за ефикасност флокулације, брзину таложења и пречник зоне инхибиције у случају КТВС износиле су 89%, 0,20 mm/s и 59,00 mm, редом.



Слика 5.44. Парето фронт и простор одлуке скупа оптималних решења добијених применом вишекритеријумског генетског алгоритма у случају КТВС

Резултати мултикритеријалне оптимизације помоћу генетског алгоритма приказани су на слици 5.44. Проблем оптимизације решен је применом кодиране NSGA-II методе у MATLAB-у, чиме је добијен скуп Парето оптималних решења.

Парето фронт и најбоља предикција добијена методом функције пожељности се подударају. Са смањењем pH вредности при истој концентрацији флокуланта, ефикасност флокулације расте, али истовремено долази до пада брзине таложења. Због тога се као најповољније издваја компромисно решење добијено методом функције пожељности.

6. Закључак

Примарни циљ ове докторске дисертације био је дефинисање оптималних услова за развој еколошки прихватљивог и економичног поступка примарног флокулативног издвајања микробне биомасе производног соја *Bacillus* sp. BioSol021, узгојене на отпадним водама прехрамбене индустрије (индустрија млека и млечних производа, индустрија вина, индустрија воћних сокова), уз примену природних флокуланата (хитозан и прах љуске јаја) са потенцијалном применом у пољопривреди.

У складу са постављеним специфичним циљевима, изведени су следећи закључци:

Експерименти засновани на L_{18} Тагучијевом ортогоналном дизајну са пет улазних параметара (тип и концентрација хитозана, pH вредност, брзо и споро мешање) показали су да pH вредност одређује ефикасност флокулације хитозаном, а затим његов тип. Ефикасност флокулације показала је благо повећање са порастом концентрације флокуланта, док је брзина мешања имала мањи утицај. С друге стране, утицај мање брзине мешања био је већи у поређењу са већим брзинама мешања. Хитозан се показао као ефикасан природни флокулант за издвајање бактерија *Bacillus* sp. BioSol021 из културационе течности на бази целулозе, при чему је постигнута ефикасност флокулације од 98,6% (тип хитозана: ch1, pH 5, концентрација хитозана: 45 mg/L, већа брзина мешања: 250 о/мин, мања брзина мешања: 50 о/мин). Поред тога, добијен је виши антимикробни ефекат против одабраних фитопатогена у поређењу са културационом течношћу. Висок антимикробни ефекат, указују на дуалну природу хитозана као флокуланта, али и као биоконтролног агенса са потенцијалном применом у пољопривреди.

Утврђено је да је хитозан (ch3: ≥ 90% деацетилован, 600 000-800 000 Da; Acros-Organic, Geel, Belgium) веома ефикасан природни флокулант за издвајање биомасе *Bacillus* sp. BioSol021 из културационе течности након биолошког третмана отпадних вода индустрије млека и млечних производа, индустрије вина и индустрије производње воћних сокова. Показано је да се ефикасност флокулације већа од 90% може постићи већ при примени концентрације хитозана од 150 mg/L за КТС. За КТВ била је неопходна примена најмање 260 mg/L хитозана, како би се постигла иста ефикасност, док је за КТВС концентрација од најмање 425 mg/L била потребна да би се остварила ефикасност флокулације изнад 90%. Пошто су претходна испитивања спроведена Тагучијевом методом показала да pH вредност доминантно утиче на ефикасност флокулације, ови експерименти су изведени при pH 5, која се претходно показала као најоптималнија. У тим условима, концентрација хитозана показала се као главни фактор који одређује ефикасност флокулације, док је утицај брзине мешања био знатно мањи. С друге стране, брзина таложења углавном је зависила од кидања флокула при већим брзинама мешања. Максималне брзине таложења износиле су 0,1387 mm/s за КТС, 0,0667 mm/s за КТВ и 0,0730 mm/s за КТВС. Антимикробна активност против афлатоксигене плесни *Aspergillus flavus* била је резултат не само бактеријске биомасе, већ и деловања

антимикробних метаболита присутних у културационој течности, као што је сурфактин. Максималне вредности за пречник зоне инхибиције износиле су 54,40 mm, 49,85 mm и 74,00 mm за КТС, КТВ и КТВС редом. У случају све три културационе течности, Парето фронт и најбоља предикција добијена методом функције пожељности се подударају. За КТС, оптимално решење остварено је при укупној пожељности од 0,553. Ово решење постигнуто је са концентрацијом хитозана од 141,23 mg/L и брзином мешања од 263,6 о/мин. При овим експерименталним условима, ефикасност флокулације износила је 89%, брзина таложења била је 0,09 mm/s, док је пречник зоне инхибиције достигао 50,18 mm. За КТВ, оптимално решење остварено је при укупној пожељности од 0,727. Ово решење постигнуто је са концентрацијом хитозана од 280,60 mg/L и брзином мешања од 384,95 о/мин. При овим експерименталним условима, ефикасност флокулације износила је 94%, брзина таложења била је 0,05 mm/s, док је пречник зоне инхибиције достигао 46,89 mm. Парето фронт указује на контрадикторан однос између ефикасности флокулације, брзине таложења и пречника зоне инхибиције при чему са повећањем концентрације хитозана, ефикасност флокулације расте, док брзина таложења опада. Стога се као најадекватније издваја компромисно решење добијено методом функције пожељности, јер најефикасније усаглашава различите циљеве. За КТВС, оптимално решење постигнуто је при укупној пожељности од 0,491. Ово решење постигнуто је при концентрацији хитозана од 600 mg/L и брзини мешања од 100 о/мин. При овим експерименталним условима, ефикасност флокулације износила је 96,76%, брзина таложења била је 0,036 mm/s, док је пречник зоне инхибиције достигао 74,61 mm. Са повећањем брзине мешања (са око 100 о/мин на приближно 175 о/мин), Парето фронт указује на могућност веома благог повећања ефикасности флокулације, уз истовремено благо смањења пречника зоне инхибиције и брзине таложења. Због тога се као најповољније издваја компромисно решење добијено функцијом пожељности.

Утврђено је да је флокулант на бази љуске јаја ефикасан природни флокулант за издвајање биомасе *Bacillus* sp. BioSol021 из културационе течности након биолошког третмана отпадних вода млечне, винске и индустрије производње воћних сокова. За разлику од флокулације хитозаном, у овом случају испитиван је шири опсег pH вредности (5-9) како би се детаљније сагледао утицај pH фактора на процес. Показано је да се ефикасност флокулације од преко 90% за КТС и КТВ може постићи применом 7 g/L флокуланта на бази љуске јаја. У случају КТВС, ефикасност флокулације од преко 90% остварена је применом 5,5 g/L флокуланта. Анализа утицаја фактора показала је да концентрација флокуланта има највећи утицај на ефикасност флокулације, затим pH вредност, док је брзина мешања имала најмањи утицај. Максималне брзине таложења износиле су 0,2200 mm/s за КТС, 0,1454 mm/s за КТВ и 0,2500 mm/s за КТВС. Антимикробна активност против афлатоксигене плесни *Aspergillus flavus* била је резултат не само присуства бактеријске биомасе, већ и деловања антимикробних метаболита присутних у културационој течности, као што је сурфактин. Максималне вредности за пречник зоне инхибиције биле су 41,67 mm, 34,67 mm и 61,00 mm за КТС, КТВ и КТВС редом. За КТС, оптимално решење остварено је при укупној пожељности од 0,935. Ово решење постигнуто је са концентрацијом љуски јаја од 7,00 g/L, pH вредности 7,32 и брзином мешања од 322,16 о/мин. При овим експерименталним

условима, ефикасност флокулације износила је 95,81%, брзина таложења била је 0,2 mm/s, док је пречник зоне инхибиције достигао 40,94 mm. Парето фронт и најбоља предикција добијена методом функције пожељности се подударају. Благо повећање pH вредности (до pH 8) доводи до незнатног повећања ефикасности флокулације, док се пречник зоне инхибиције смањује, а брзина таложења значајно опада. Због тога се као најповољније издваја компромисно решење добијено методом функције пожељности. За КТВ, оптимално решење остварено је при укупној пожељности од 0,842. Ово решење постигнуто је са концентрацијом хитозана од 7,00 g/L, pH вредности 8,29 и брзином мешања од 309,95 о/мин. При овим експерименталним условима, ефикасност флокулације износила је 93,28%, брзина таложења била је 0,11 mm/s, док је пречник зоне инхибиције достигао 34,04 mm. Парето фронт и најбоља предикција добијена методом функције пожељности се подударају. Парето фронт нуди могућност избора благог повећања ефикасности флокулације (са приближно 93% на око 96%) при истој концентрацији флокуланта, али уз истовремено смањење друга два одзива - пречника зоне инхибиције и брзине таложења. Стога се као најповољније издваја компромисно решење добијено методом функције пожељности. За КТВС, оптимално решење постигнуто је при укупној пожељности од 0,817. Ово решење постигнуто је при концентрацији хитозана од 5,50 g/L, pH вредности 6,37 и брзини мешања од 287,55 о/мин. При овим експерименталним условима, ефикасност флокулације износила је 91%, брзина таложења била је 0,19 mm/s, док је пречник зоне инхибиције достигао 59,42 mm. Парето фронт и најбоља предикција добијена методом функције пожељности се подударају. Са смањењем pH вредности при истој концентрацији флокуланта, ефикасност флокулације расте, али истовремено долази до пада брзине таложења. Због тога се као најповољније издваја компромисно решење добијено методом функције пожељности.

Резултати добијени у оквиру докторске дисертације јасно показују да природни флокуланти - хитозан и флокулант на бази љуске јаја представљају ефикасно, економично и одрживо решење за издвајање микробне биомасе *Bacillus* sp. BioSol021 са значајним биоконтролним потенцијалом. Хитозан се издваја по високој ефикасности и јаком антимикробном деловању, док флокулант на бази љуске јаја пружа економичну алтернативу са стабилном флокулационом активношћу у ширем опсегу pH вредности. Добијени резултати указују на могућност интеграције ових природних флокуланата у биотехнолошке и пољопривредне системе, посебно у производњу биолошких агенаса на бази биомасе *Bacillus* sp. BioSol021, чиме се доприноси развоју циркуларне економије и одрживости процеса.

7. Литература

Aber, S., Salari, D., Parsa, M. R. (2010). Employing the Taguchi method to obtain the optimum conditions of coagulation-flocculation process in tannery wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, 162(1), 127–134. https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.05.012

Ahmad, A. L., Mat Yasin, N. H., Derek, C. J. C., Lim, J. K. (2011). Optimization of microalgae coagulation process using chitosan. *Chemical Engineering Journal*, 173(3), 879–882. https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.07.070

Ahmed, T. A. E., Wu, L., Younes, M., Hincke, M. (2021). Biotechnological applications of eggshell: Recent advances. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 675364. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.675364

Akter, T., Shah, S. T., Mamun, M. A. Al, Bari, M. L., Begum, S., Rahman, N., Miah, M. I. (2023). Cost effective formulation of bio-fertilizer using agricultural residues as carriers and determination of shelf life of bio-fertilizer inoculants. *Dhaka University Journal of Biological Sciences*, 32(2), 189–199. https://doi.org/10.3329/dujbs.v32i2.67678

Allison, B. J., Simmons, C. W. (2018). Obtaining multiple coproducts from red grape pomace via anthocyanin extraction and biogas production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(30), 8045–8053. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02250

Amare, M. G., Keller, N. P. (2014). Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genetics and Biology*, 66, 11–18. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.02.008

Amor, C., Lucas, M. S., Pirra, A. J., Peres, J. A. (2012). Treatment of concentrated fruit juice wastewater by the combination of biological and chemical processes. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 47(12), 1809–1817. https://doi.org/10.1080/10934529.2012.689244

An, S. Q., Potnis, N., Dow, M., Vorhölter, F. J., He, Y. Q., Becker, A., Teper, D., Li, Y., Wang, N., Bleris, L.,Tang, J. L. (2019). Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(1), 1–32. https://doi.org/10.1093/femsre/fuz024

Aoki, T., O'Donnell, K., Geiser, D. M. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: Current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80(3), 189–201. https://doi.org/10.1007/s10327-014-0509-3

Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Caballero, A. H., Acosta, N. (2021). Chitosan: An overview of its properties and applications. *Polymers*, 13(19), 3256. https://doi.org/10.3390/polym13193256

Asunis, F., De Gioannis, G., Dessì, P., Isipato, M., Lens, P. N. L., Muntoni, A., Polettini, A., Pomi, R., Rossi, A., Spiga, D. (2020). The dairy biorefinery: Integrating treatment processes for cheese whey valorisation. *Journal of Environmental Management*, 276, 111240. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111240

Ayaz, M., Li, C. H., Ali, Q., Zhao, W., Chi, Y. K., Shafiq, M., Ali, F., Yu, X. Y., Yu, Q., Zhao, J. T., Yu, J. W., Qi, R. De, Huang, W. K. (2023). Bacterial and fungal biocontrol agents for plant disease protection: Journey from lab to field, current status, challenges, and global perspectives. *Molecules*, 28(18), 6735. https://doi.org/10.3390/molecules28186735

Bandara, S., Du, H., Carson, L., Bradford, D., Kommalapati, R. (2020). Agricultural and biomedical applications of chitosan-based nanomaterials. *Nanomaterials*, 10(10), 1–31. https://doi.org/10.3390/nano10101903

Banerjee, A., Guria, C., Maiti, S. K. (2016). Fertilizer assisted optimal cultivation of microalgae using response surface method and genetic algorithm for biofuel feedstock. *Energy*, 115, 1272–1290. https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.09.066

Barros, A. I., Gonçalves, A. L., Simões, M., Pires, J. C. M. (2015). Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 1489–1500. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037

Benalia, A., Baatache, O., Derbal, K., Khalfaoui, A., Amrouci, Z., Pizzi, A., Panico, A. (2024). The use of central composite design (CCD) to optimize and model the coagulation-flocculation process using a natural coagulant: Application in jar test and semi-industrial scale. *Journal of Water Process Engineering*, 57. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.104704

Beschkov, V., Yankov, D. (2021). Chemical engineering methods in downstream processing in biotechnology. In Beschkov V. and Yankov D. (Eds.), *Downstream Processing in Biotechnology* (1-16). De Gruyter. https://doi.org/10.1515/9783110574111-001

Blockx, J., Verfaillie, A., Thielemans, W., Muylaert, K. (2018). Unravelling the mechanism of chitosan-driven flocculation of microalgae in seawater as a function of pH. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(9), 11273–11279. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b04802

Bodakowska-Boczniewicz, J., Garncarek, Z. (2019). Immobilization of naringinase from *Penicillium decumbens* on chitosan microspheres for debittering grapefruit juice. *Molecules*, 24(23), 4234. https://doi.org/10.3390/molecules24234234

Bolzonella, D., Papa, M., Da Ros, C., Anga Muthukumar, L., Rosso, D. (2019). Winery wastewater treatment: A critical overview of advanced biological processes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(4), 489–507. https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1573799

Bratby, J. (2016). *Coagulation and flocculation in water and wastewater treatment* (3rd ed.). IWA Publishing. https://doi.org/10.2166/9781780407500

Caldas, T. W., Mazza, K. E. L., Teles, A. S. C., Mattos, G. N., Brígida, A. I. S., Conte-Junior, C. A., Borguini, R. G., Godoy, R. L. O., Cabral, L. M. C., Tonon, R. V. (2018). Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 111, 86–91. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.012

Calheiros, C. S. C., Pereira, S. I. A., Castro, P. M. L. (2018). Culturable bacteria associated to the rhizosphere and tissues of *Iris pseudacorus* plants growing in a treatment wetland for winery wastewater discharge. *Ecological Engineering*, 115, 67–74. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.02.011

Camarote, B. K. C., Romelo, N. B., Valdon, S. J. I. (2017). Experiment 2 solid-liquid separation: Batch sedimentation .

Carbú, M., Moraga, J., Cantoral, J. M., Collado, I. G., Garrido, C. (2020). Recent approaches on the genomic analysis of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum* spp. *Phytochemistry Reviews*, 19(3), 589–601. https://doi.org/10.1007/s11101-019-09608-0

Carvalho, F., Prazeres, A. R., Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of the Total Environment*, 445–446, 385–396. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038

Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P., Ongena, M. (2011). *Bacillus*-based biological control of plant diseases. In Stoytcheva M. (Ed.), *Pesticides in the Modern World: Pesticides Use and Management* (274-302). InTech. https://doi.org/10.5772/17184

Chen, L., Wang, C., Wang, W., Wei, J. (2013). Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. cultivated in an open-pond system. *Bioresource Technology*, 133, 9–15. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.071

Choi, H. J. (2015). Effect of eggshells for the harvesting of microalgae species. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, *29*(4), 666–672. https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1031177

Clarke, K. G. (2013). Downstream processing. Clarke K.G. (Ed.), *Bioprocess Engineering* (209–234). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1533/9781782421689.209

Collinge, D. B., Jensen, D. F., Rabiey, M., Sarrocco, S., Shaw, M. W., Shaw, R. H. (2022). Biological control of plant diseases – What has been achieved and what is the direction? *Plant Pathology*, 71(5), 1024–1047. https://doi.org/10.1111/ppa.13555

Costa, J. R., Tonon, R. V., Gottschalk, L. M. F., Santiago, M. C. de A., Mellinger-Silva, C., Pastrana, L., Pintado, M. M., Cabral, L. M. C. (2019). Enzymatic production of xylooligosaccharides from Brazilian Syrah grape pomace flour: a green alternative to conventional methods for adding value to agricultural by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(3), 1250–1257. https://doi.org/10.1002/jsfa.9297

de Godos, I., Guzman, H. O., Soto, R., García-Encina, P. A., Becares, E., Muñoz, R., Vargas, V. A. (2011). Coagulation/flocculation-based removal of algal-bacterial biomass from piggery wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 102(2), 923–927. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.036

de O. Gomes, H., Menezes, J. M. C., da Costa, J. G. M., Coutinho, H. D. M., Teixeira, R. N. P., do Nascimento, R. F. (2020). A socio-environmental perspective on pesticide use and food production. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 197. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110627

Dimkić, I., Živković, S., Berić, T., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Stanković, S., Fira, D. (2013). Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biological Control*, 65(3), 312–321. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.03.012

Dmitrović, S., Lukić, N., Danilov, I., Vlajkov, V., Grahovac, J., Jokić, A. (2025). Synergistic effect of *Bacillus* and chitosan: From flocculation to enhanced antimicrobial activity. *Antibiotics*, 14(4), 412. https://doi.org/10.3390/antibiotics14040412

Dmitrović, S., Lukić, N., Pajčin, I., Vlajkov, V., Grahovac, J., Jokić, A. (2023). The use of chitosan for flocculation recovery of *Bacillus* biomass grown on dairy and wine industry effluents. *Processes*, 11(4), 1099. https://doi.org/10.3390/pr11041099

Dmitrović, S., Pajčin, I., Vlajkov, V., Grahovac, M., Jokić, A., Grahovac, J. (2022). Dairy and wine industry effluents as alternative media for the production of *Bacillus*-based biocontrol agents. *Bioengineering*, 9(11), 663. https://doi.org/10.3390/bioengineering9110663

Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D., Jijakli, M. H. (2016). The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 22–29. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.006

Dubreuil, M. F. S., Servaes, K., Ormerod, D., Van Houtven, D., Porto-Carrero, W., Vandezande, P., Vanermen, G., Buekenhoudt, A. (2017). Selective membrane separation technology for biomass valorization towards bio-aromatics. *Separation and Purification Technology*, 178, 56–65. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.12.033

Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114(4), 1173–1182. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.047

Duzyol, S. (2018). Turbidity removal of fine coal–water suspension by flocculation using Taguchi (L_{16}) experimental design. *Particulate Science and Technology*, 36(3), 351–356. https://doi.org/10.1080/02726351.2016.1248264

Eweis, M., Elkholy, S. S., Elsabee, M. Z. (2006). Antifungal efficacy of chitosan and its thiourea derivatives upon the growth of some sugar-beet pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38(1), 1–8. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.12.009

Feng, B., Peng, J., Zhu, X., Huang, W. (2017). The settling behavior of quartz using chitosan as flocculant. *Journal of Materials Research and Technology*, 6(1), 71–76. https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2016.09.004

Fenibo, E. O., Ijoma, G. N., Matambo, T. (2021). Biopesticides in sustainable agriculture: A critical sustainable development driver governed by green chemistry principles. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 619058. https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.619058

Ferreira, D. J. de O., Fiuza, M. P. de M., Cardoso, M., de Oliveira, I. M. (2021). Use of the Weibull model on sizing thickeners - Part I: Sedimentation curve representation. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 99(3), 708–724. https://doi.org/10.1002/cjce.23904

Ferreyra-Suarez, D., García-Depraect, O., Castro-Muñoz, R. (2024). A review on fungal-based biopesticides and biofertilizers production. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 283. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116945

Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44–55. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044

Ghafari, S., Aziz, H. A., Isa, M. H., Zinatizadeh, A. A. (2009). Application of response surface methodology (RSM) to optimize coagulation-flocculation treatment of leachate using poly-aluminum chloride (PAC) and alum. *Journal of Hazardous Materials*, 163(2–3), 650–656. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.090

Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., Marrone, P., Morin, L., Stewart, A. (2012). Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology*, 30(5), 250–258. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.003

Goy, R. C., de Britto, D., Assis, O. B. G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros: Ciênca e Technologia*, 19(3), 241-247. https://doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013

Gregory, J. (2013). Flocculation fundamentals. In Tadros, T. (Ed.), *Encyclopedia of colloid and interface science* (459-491). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20665-8_17

Guerrero, M., Albet, C., Palomer, A., Guglietta, A. (2003). Drying in pharmaceutical and biotechnological industries. *Food Science and Technology International*, 9(3), 237–243. https://doi.org/10.1177/1082013203035567

Güven, H. M., Ateş, H. (2024). A holistic approach to the recovery of valuable substances from the treatment sludge formed from chemical precipitation of fruit processing industry wastewater. *Science of the Total Environment*, 917. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170372

Hadiyanto, H., Widayat, W., Christwardana, M., Pratiwi, M. E. (2022). The flocculation process of *Chlorella* sp. using chitosan as a bio-flocculant: Optimization of operating conditions by response surface methodology. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 5, 100291. https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2022.100291

Hanifah, H. N., Hadisoebroto, G., Anggraeni, D. I. S. (2020). Efektivas biokoagulan cangkang telur ayam ras dan kulit pisang kapok (Musa balbisiana ABB) dalam menurunkan turbiditas, TDS, dan TSS dari limbah cair industry farmasi, *al Kimiya*, 7(1), 47-54. https://doi.org/10.15575/ak.v7i1.6615

Hughes, J., Ramsden, D. K., Symes, K. C., (1990). The flocculation of bacteria using cationic synthetic flocculants and chitosan. *Biotechnology Techniques*, 4, 55-60. https://doi.org/10.1007/BF00156611

Ilyas, T., Chowdhary, P., Chaurasia, D., Gnansounou, E., Pandey, A., Chaturvedi, P. (2021). Sustainable green processing of grape pomace for the production of value-added products: An overview. *Environmental Technology and Innovation*, 23, 101592. https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101592

Ioannou, L. A., Puma, G. L., Fatta-Kassinos, D. (2015). Treatment of winery wastewater by physicochemical, biological and advanced processes: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 286, 343–368. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.043

Itako, A. T., Tolentino Júnior, J. B., Da Silva Júnior, T. A. F., Soman, J. M., Maringoni, A. C. (2015). Chemical products induce resistance to *Xanthomonas perforans* in tomato. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 701–706. https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140177

Iwuozor, K. O. (2019). Prospects and challenges of using coagulation-flocculation method in the treatment of effluents. *Advanced Journal of Chemistry-Section A*, 2(2). http://ajchem-a.com

Jaradat, A. Q., Shtayat, A. R., Odat, S. (2022). A coagulation-flocculation process combined with continuous adsorption using eggshell waste materials for phenols and PAHs removal from landfill leachate. *Environmental Engineering Research*, 27(3), 210133. https://doi.org/10.4491/eer.2021.133

Jeon, Y.-J., Park, P.-J., Kim, S.-K. (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, 44(1), 71-76. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00200-9

Jokić, A. I., Lukić N. LJ. (2019). Modelling and optimization by neural networks and genetic algorithm of yeast suspensions turbulence promoter assisted cross-flow microfiltration in concentration operation mode. Rayess, Y. E. (Ed.), *Microfiltration: Principles, Process and Applications*. Nova Science Publishers, Inc.

Jokić, A., Pajčin, I., Lukić, N., Vlajkov, V., Kiralj, A., Dmitrović, S., Grahovac, J. (2021). Modeling and optimization of gas sparging-assisted bacterial cultivation broth microfiltration by response surface methodology and genetic algorithm. *Membranes*, 11(9), 681. https://doi.org/10.3390/membranes11090681

Jorge, N., Teixeira, A. R., Guimarães, V., Lucas, M. S., Peres, J. A. (2022). Treatment of winery wastewater with a combination of adsorption and thermocatalytic processes. *Processes*, 10(1), 75. https://doi.org/10.3390/pr10010075

Jozić, S., Bajić, D., Celent, L. (2015). Application of compressed cold air cooling: Achieving multiple performance characteristics in end milling process. *Journal of Cleaner Production*, 100, 325–332. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.03.095

Jung, E. J., Youn, D. K., Lee, S. H., No, H. K., Ha, J. G., Prinyawiwatkul, W. (2010). Antibacterial activity of chitosans with different degrees of deacetylation and viscosities. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(4), 676–682. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02186.x

Jusoh, H. H. W., Kasan, N. A., Manan, H., Nasir, N. M., Yunos, F. H. M., Hamzah, S., Jusoh, A. (2023a). Chicken eggshell as an innovative bioflocculant in harvesting biofloc for aquaculture wastewater treatment. *Journal of Renewable Materials*, 11(5), 2321–2332. https://doi.org/10.32604/jrm.2023.026086

Jusoh, H. H. W., Kasan, N. A., Manan, H., Nasir, N. M., Yunos, F. H. M., Hamzah, S., Jusoh, A. (2023b). Chicken eggshell as an innovative bioflocculant in harvesting biofloc for aquaculture wastewater treatment. *Journal of Renewable Materials*, 11(5), 2321–2332. https://doi.org/10.32604/jrm.2023.026086

Kaseamchochoung, C., Lertsutthiwong, P., Phalakornkule, C. (2006). Influence of chitosan characteristics and environmental conditions on flocculation of anaerobic sludge. *Water Environment Research*, 78(11), 2210–2216. https://doi.org/10.2175/106143005x72830

Khan, R., Ghazali, F. M., Mahyudin, N. A., Samsudin, N. I. P. (2021). Biocontrol of aflatoxins using non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus*: A literature review. *Journal of Fungi*, 7(5), 381. https://doi.org/10.3390/jof7050381

Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51–63. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012

Koul, O. (2011). Microbial biopesticides: Opportunities and challenges. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 6, 1-26. https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20116056

Krishnan, N., Velramar, B., Velu, R. K. (2019). Investigation of antifungal activity of surfactin against mycotoxigenic phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme* and its impact in seed germination and mycotoxicosis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 155, 101–107. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.01.010

Krismawati, A., Yustisia, Y., Arifin, Z., Purbiati, T., Rachmawati, D., Latifah, E., Putra, N. R., Irianto, I., Qomariyah, L. (2024). A bibliometric analysis of biopesticides in corn pest management: Current trends and future prospects. *Heliyon*, 10(22), e40196. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e40196

Kumar, M. N. V. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1-27. https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00038-9

Kumar, R. V., Moorthy, I. G., Pugazhenthi, G. (2015). Modelling and optimization of critical parameters by hybrid RSM-GA for the separation of BSA using a tubular configured MFI-type zeolite microfiltration membrane. *RSC Advances*, 5(106), 87645–87659. https://doi.org/10.1039/c5ra20114d

Kumar, S., Singh, A. (2015). Biopesticides: Present status and the future prospects. *Journal of Fertilizers and Pesticides*, 6(2), 129. https://doi.org/10.4172/2471-2728.1000e129

Kurniawan, S. B., Ahmad, A., Imron, M. F., Abdullah, S. R. S., Othman, A. R., Hasan, H. A. (2022). Potential of microalgae cultivation using nutrient-rich wastewater and harvesting performance by biocoagulants/bioflocculants: Mechanism, multi-conversion of biomass into valuable products, and future challenges. *Journal of Cleaner Production*, 365, 132806. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.132806

Lai, Y. R., Lin, C. H., Chang, C. P., Ni, H. F., Tsai, W. S., Huang, C. J. (2021). Distribution of copper resistance gene variants of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. *Plant Protection Science*, 57(3), 206–216. https://doi.org/10.17221/160/2020-PPS

Li, J., Zhuang, S. (2020). Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. *European Polymer Journal*, 138, 109984. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109984

Li, S., Hu, T., Xu, Y., Wang, J., Chu, R., Yin, Z., Mo, F., Zhu, L. (2020). A review on flocculation as an efficient method to harvest energy microalgae: Mechanisms, performances, influencing factors and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 131, 110005. https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110005

Lichtfouse, E., Morin-Crini, N., Fourmentin, M., Zemmouri, H., do Carmo Nascimento, I.O., Queiroz, L.M., Tadza, M.Y.M., Picos-Corrales, L.A., Pei, H., Wilson, L.D., Crini, G. (2019). Chitosan for direct bioflocculation of wastewater. Environmental Chemistry Letters, 17, 1603–1621. https://doi.org/10.1007/s10311-019-00900-1

Liemin, A. N., Sembiring, M. K., Hadiyanto, H. (2023). Utilization of chicken eggshell and chitosan as coagulants for microplastic removal from aquatic system. *Journal of Bioresources and Environmental Sciences*, 2(1), 21–30. https://doi.org/10.14710/jbes.2023.16478

Lord, A., Abbey, J., Leke-Aladekoba, A., Iheshiulo, M.-A., Ijenyo, M. (2020). Biopesticides and biofertilizers: Types, production, benefits, and utilization. In Simpson B. K., Aryee A. N. A., Toldrá F. (Eds.), *Byproducts from agriculture and fisheries: Adding value for food, feed, pharma, and fuels* (1st ed., 479-500). Wiley. https://doi.org/10.1002/9781119383956.ch20

Low, Y. J., Lau, S. W. (2017). Effective flocculation of *Chlorella vulgaris* using chitosan with zeta potential measurement. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 206(1), 012073. https://doi.org/10.1088/1757-899X/206/1/012073

Luo, L., Zhao, C., Wang, E., Raza, A., Yin, C. (2022). *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms. *Microbiological Research*, 259, 127016. https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127016

Mącik, M., Gryta, A., Frąc, M. (2020). Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. *Advances in Agronomy*, 162, 31–87. https://doi.org/10.1016/bs.agron.2020.02.001

Mahajan, C. S., Sarode, D. B., Jadhav, R. N., Attarde, S. B., Ingle, S. T. (2014). Removal of heavy metals from winery wastewater by using natural adsorbents. *International Journal of Conservation Science*, 5(1), 69-78.

Min, K. H., Kim, D. H., Ki, M. R., Pack, S. P. (2022). Recent progress in flocculation, dewatering, and drying technologies for microalgae utilization: Scalable and low-cost harvesting process development. *Bioresource Technology*, 344, 126404. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126404

Mingzheng, Z., Bo, L., Naiquan, L., Chuanqing, R., Jianglin, L. (2009). Factors affecting flocculation of fermentation broth of *Bacillus thuringiensis* by chitosan. *Chinese Journal of Biological Control*, 25, 133–137.

Miranda, A. M., Hernandez-Tenorio, F., Villalta, F., Vargas, G. J., Sáez, A. A. (2024). Advances in the development of biofertilizers and biostimulants from microalgae. *Biology*, 13(3), 199. https://doi.org/10.3390/biology13030199

Najafpour, G. D. (2015). Advanced downstream processing in biotechnology. *Biochemical Engineering and Biotechnology*, 495–526. Elsevier. https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63357-6.00017-1

Najjar, Y. S. H., Abu-Shamleh, A. (2020). Harvesting of microalgae by centrifugation for biodiesel production: A review. *Algal Research*, 51, 102046. https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102046

Nega, A. (2014). Review on concepts in biological control of plant pathogens. *Biology Agriculture and Healthcare*, 4(27). www.iiste.org

Neves, A., Godina, R., Azevedo, S. G., Matias, J. C. O. (2020). A comprehensive review of industrial symbiosis. *Journal of Cleaner Production*, 247, 119113. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119113

No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., Meyers, S. P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 65-72. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00717-6

Nosheen, S., Ajmal, I., Song, Y. (2021). Microbes as biofertilizers, a potential approach for sustainable crop production. *Sustainability*, 13(4), 1–20. https://doi.org/10.3390/su13041868

Okolie, J. A., Epelle, E. I., Nanda, S., Castello, D., Dalai, A. K., Kozinski, J. A. (2021). Modeling and process optimization of hydrothermal gasification for hydrogen production: A comprehensive review. *Journal of Supercritical Fluids*, 173, 105199. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2021.105199

Oliveira, M., Queda, C., Duarte, E. (2009). Aerobic treatment of winery wastewater with the aim of water reuse. *Water Science and Technology*, 60(5), 1217–1223. https://doi.org/10.2166/wst.2009.558

Orzali, L., Corsi, B., Forni, C., Riccioni, L. (2017). Chitosan in agriculture: A new challenge for managing plant disease. In Shalaby E. A. (Ed.), *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides* (17-36). InTech. https://doi.org/10.5772/66840

Ostry, V., Malir, F., Toman, J., Grosse, Y. (2017). Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Research*, 33(1), 65–73. https://doi.org/10.1007/s12550-016-0265-7

Pal, K. K., McSpadden Gardener, B. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 2, 1117-1142 https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02

Palacios-Rodriguez, A. P., Espinoza-Culupú, A., Durán, Y., Sánchez-Rojas, T. (2024). Antimicrobial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* BS4 against Gram-negative pathogenic bacteria. *Antibiotics*, 13(4), 304. https://doi.org/10.3390/antibiotics13040304

Pandey, A., Pathak, V. V., Kothari, R., Black, P. N., Tyagi, V. V. (2019). Experimental studies on zeta potential of flocculants for harvesting of algae. *Journal of Environmental Management*, 231, 562–569. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.096

Penha, R. O., Vandenberghe, L. P. S., Faulds, C., Soccol, V. T., Soccol, C. R. (2020). *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: Recent studies and innovations. *Planta*, 251(3), 70. https://doi.org/10.1007/s00425-020-03357-7

Pérez-García, A., Romero, D., de Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 187–193. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003

Pires, A. F., Marnotes, N. G., Rubio, O. D., Garcia, A. C., Pereira, C. D. (2021). Dairy by-products: A review on the valorization of whey and second cheese whey. *Foods*, 10(5), 1067. https://doi.org/10.3390/foods10051067

Prasad, N. K. (2010). *Downstream process technology: A new horizon in biotechnology*. PHI Learning Private Limited.

Rashid, N., Abdelnabi, M. N. A., Vincent, A. S., Mackey, H. R. (2023). Simultaneous treatment of fruit juice industry wastewater and single-cell protein synthesis using purple non-sulfur bacteria. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(18), 16321–16332. https://doi.org/10.1007/s13399-022-03669-6

Rashid, N., Rehman, S. U., Han, J. I. (2013). Rapid harvesting of freshwater microalgae using chitosan. *Process Biochemistry*, 48(7), 1107–1110. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.018

Rasweefali, M. K., Sabu, S., Sreedevi, O. K., Rahman, M. K. R., Shabeeba, T. K., Anoop, K. K., Sasidharan, A., Sunooj, K. V. (2024). Influence of chitosan properties and operating parameters on the flocculation efficiency and harvesting of microalgae (*Scenedesmus* sp.). *International Journal of Biological Macromolecules*, 272(1), 132894. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132894

Ravina, L. (1993). *Everything you want to know about coagulation and flocculation*. Zeta-Meter. http://www.zeta-meter.com

Renault, F., Sancey, B., Badot, P. M., Crini, G. (2009). Chitosan for coagulation/flocculation processes - An eco-friendly approach. *European Polymer Journal*, 45(5), 1337–1348. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.12.027

Riaño, B., Molinuevo, B., García-González, M. C. (2012). Optimization of chitosan flocculation for microalgal-bacterial biomass harvesting via response surface methodology. *Ecological Engineering*, 38(1), 110–113. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.10.011

Rifqyawarman, H., Kusumadewi, R. A., Aphirta, S., Winarni, W. (2024). Effectiveness of using chicken eggshells as a biocoagulant in groundwater treatment. *Journal of Community Based Environmental Engineering and Management*, 8(8), 57–66. https://doi.org/10.23969/jcbeem.v8i1.12700

Rizzi, V., Romanazzi, F., Gubitosa, J., Fini, P., Romita, R., Agostiano, A., Petrella, A., Cosma, P. (2019). Chitosan film as eco-friendly and recyclable bio-adsorbent to remove/recover diclofenac, ketoprofen, and their mixture from wastewater. *Biomolecules*, 9(10), 571. https://doi.org/10.3390/biom9100571

Rkhaila, A., Chtouki, T., Erguig, H., Haloui, N. El, Ounine, K. (2021). Chemical proprieties of biopolymers (chitin/chitosan) and their synergic effects with endophytic *Bacillus* species: Unlimited applications in agriculture. *Molecules,* 26 (4), 1117. https://doi.org/10.3390/molecules26041117

Rossini, M., Garrido, J. G., Galluzzo, M. (1999). Optimization of the coagulation-flocculation treatment: influence of rapid mix parameters. *Water Research*, 33(8), 1817-1826. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00367-4

Roussy, J., Van Vooren, M., Guibal, E. (2005). Influence of chitosan characteristics on coagulation and flocculation of organic suspensions. *Journal of Applied Polymer Science*, 98(5), 2070–2079. https://doi.org/10.1002/app.22411

Roy, M., Mohanty, K. (2020). Valorization of waste eggshell-derived bioflocculant for harvesting *T. obliquus*: Process optimization, kinetic studies and recyclability of the spent medium for circular bioeconomy. *Bioresource Technology*, 307, 123205. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123205

Sahai, A. S., Manocha, M. S. (1993). Chitinases of fungi and plants: Their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews*, 11(4), 317–338. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00004.x

Sar, T., Harirchi, S., Ramezani, M., Bulkan, G., Akbas, M. Y., Pandey, A., Taherzadeh, M. J. (2022). Potential utilization of dairy industries by-products and wastes through microbial processes: A critical review. *Science of the Total Environment*, 810, 152253. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152253

Sarwar, A., Hassan, M. N., Imran, M., Iqbal, M., Majeed, S., Brader, G., Sessitsch, A., Hafeez, F. Y. (2018). Biocontrol activity of surfactin A purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 against rice bakanae disease. *Microbiological Research*, 209, 1–13. https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.006

Savić, Z., Dudaš, T., Loc, M., Grahovac, M., Budakov, D., Jajić, I., Krstović, S., Barošević, T., Krska, R., Sulyok, M., Stojšin, V., Petreš, M., Stankov, A., Vukotić, J., Bagi, F. (2020). Biological control of aflatoxin in Maize grown in Serbia. *Toxins*, 12(3), 162. https://doi.org/10.3390/toxins12030162

Seenivasagan, R., Babalola, O. O. (2021). Utilization of microbial consortia as biofertilizers and biopesticides for the production of feasible agricultural product. *Biology*, 10(11), 1111. https://doi.org/10.3390/biology10111111

Sen, R. (2010). Surfactin: Biosynthesis, genetics and potential applications. In Sen R. (Ed.), *Biosurfactants*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, (Vol. 672, 316-323). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_24

Shahrajabian, M. H., Chaski, C., Polyzos, N., Tzortzakis, N., Petropoulos, S. A. (2021). Sustainable agriculture systems in vegetable production using chitin and chitosan as plant biostimulants. *Biomolecules*, 11(6), 819. https://doi.org/10.3390/biom11060819

Sharif, R., Mujtaba, M., Rahman, M. U., Shalmani, A., Ahmad, H., Anwar, T., Tianchan, D., Wang, X. (2018). The multifunctional role of chitosan in horticultural crops; A review. *Molecules*, 23(4), 872. https://doi.org/10.3390/molecules23040872

Sharma, A., Shukla, A., Attri, K., Kumar, M., Kumar, P., Suttee, A., Singh, G., Barnwal, R. P., Singla, N. (2020). Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201, 110812. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110812

Shazili, F. S., Serri, N. A., Merican, F. M. M. S. (2025). A preliminary study of sustainable coagulant produces from chicken eggshells to accelerate microalgae harvesting. *Journal of Physics: Conference Series*, 3003(1), 012023. https://doi.org/10.1088/1742-6596/3003/1/012023

Sheng, W. Y., Peng, X. F., Lee, D. J., Su, A. (2006). Coagulation of particles through rapid mixing. *Drying Technology*, 24(10), 1271–1276. https://doi.org/10.1080/07373930600840377

Shuping, D. S. S., Eloff, J. N. (2017). The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: A review. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM*, 14(4), 120–127. https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i4.14

Shurair, M., Almomani, F., Bhosale, R., Khraisheh, M., Qiblawey, H. (2019). Harvesting of intact microalgae in single and sequential conditioning steps by chemical and biological based – flocculants:

Effect on harvesting efficiency, water recovery and algal cell morphology. *Bioresource Technology*, 281, 250–259. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.103

Singh, H. M., Sharma, M., Tyagi, V. V., Goria, K., Buddhi, D., Sharma, A., Bruno, F., Sheoran, S., Kothari, R. (2023). Potential of biogenic and non-biogenic waste materials as flocculant for algal biomass harvesting: Mechanism, parameters, challenges and future prospects. *Journal of Environmental Management*, 337, 117591. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117591

Slavov, A. K. (2017). General characteristics and treatment possibilities of dairy wastewater-A review. Food Technology and Biotechnology, 55(1), 14–28. https://doi.org/10.17113/ftb.55.01.17.4520

Soceanu, A., Dobrinas, S., Sirbu, A., Manea, N., Popescu, V. (2021). Economic aspects of waste recovery in the wine industry. A multidisciplinary approach. *Science of the Total Environment*, 759, 143543. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143543

Spadaro, D., Gullino, M. L. (2005). Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Protection*, 24(7), 601–613. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2004.11.003

Sporleder, M., Lacey, L. A. (2013). Biopesticides. In Alyokhin A., Vincent C., Giordanengo P. (Eds.), *Insect Pests of Potato* (463–497). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386895-4.00016-8

Stanbury, P. F., Whitaker, A., Hall, S. J. (2017). The recovery and purification of fermentation products. *Principles of Fermentation Technology* (619-686). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099953-1/00010-7

Stoll, A., Salvatierra-Martínez, R., González, M., Araya, M. (2021). The role of surfactin production by *Bacillus velezensis* on colonization, biofilm formation on tomato root and leaf surfaces and subsequent protection (ISR) against *Botrytis cinerea*. *Microorganisms*, 9(11), 2251. https://doi.org/10.3390/microorganisms9112251

Straathof, A. J. J. (2011). The proportion of downstream costs in fermentative production processes. In Moo-Young E. (Ed.), *Comprehensive Biotechnology* (2nd ed., Vol. 2, 811–814). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00492-X

Strand, S. P., Nordengen, T., Østgaard, K. (2002). Efficiency of chitosans applied for flocculation of different bacteria. *Water Research*, 36(19), 4745-4752. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00173-2

Strelec, I., Tomičić, K., Zajec, M., Ostojčić, M., Budžaki, S. (2023). Eggshell-waste-derived calcium acetate, calcium hydrogen phosphate and corresponding eggshell membranes. *Applied Sciences*, 13(13), 7372. https://doi.org/10.3390/app13137372

Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., Knorr, D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, 6(3), 257–272. https://doi.org/10.1080/08905439209549838

Suopajärvi, T. (2015). *Functionalized nanocelluloses in wastewater treatment applications* (Acta Univ. Oul. C 526). University of Oulu. https://www.researchgate.net/publication/275634703

Suparmaniam, U., Lam, M. K., Uemura, Y., Shuit, S. H. (2019). Development of bioflocculant from chicken's eggshell membrane to harvest *Chlorella vulgaris*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 268(1), 012121. https://doi.org/10.1088/1755-1315/268/1/012121

Teixidó, N., Usall, J., Torres, R. (2022). Insight into a successful development of biocontrol agents: Production, formulation, packaging, and shelf life as key aspects. *Horticulturae*, 8(4), 305. https://doi.org/10.3390/horticulturae8040305

Tharunkumar, J., Parsanathan, R., Phillip, N. E., Rakesh, S. (2025). Response surface methodology for optimizing flocculation efficiency of chitosan and inorganic flocculants in microalgae and yeast cultures. *Biomass and Bioenergy*, 202, 108222. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2025.108222

Théatre, A., Cano-Prieto, C., Bartolini, M., Laurin, Y., Deleu, M., Niehren, J., Fida, T., Gerbinet, S., Alanjary, M., Medema, M. H., Léonard, A., Lins, L., Arabolaza, A., Gramajo, H., Gross, H., Jacques, P. (2021). The surfactin-like lipopeptides from *Bacillus* spp.: Natural biodiversity and synthetic biology for a broader application range. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 623701. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.623701

Thomine, E., Mumford, J., Rusch, A., Desneux, N. (2022). Using crop diversity to lower pesticide use: Socio-ecological approaches. *Science of the Total Environment*, 804, 150156. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150156

Torfs, E., Nopens, I., Winkler, M. K. H., Vanrolleghem, P. A., Balemans, S., Smets, I. Y. (2016). Settling tests. In van Loosdrecht, M. C. M., Nielsen P. H., Lopez-Vasquez C. M., Brdjanović D. (Eds.), *Experimental methods in wastewater treatment*. IWA Publishing.

Trikkaliotis, D. G., Ainali, N. M., Tolkou, A. K., Mitropoulos, A. C., Lambropoulou, D. A., Bikiaris, D. N., Kyzas, G. Z. (2022). Removal of Heavy Metal Ions from Wastewaters by Using Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Adsorbents: A Review. *Macromol*, 2(3), 403–425. https://doi.org/10.3390/macromol2030026

Usmani, Z., Sharma, M., Gaffey, J., Sharma, M., Dewhurst, R. J., Moreau, B., Newbold, J., Clark, W., Thakur, V. K., Gupta, V. K. (2022). Valorization of dairy waste and by-products through microbial bioprocesses. *Bioresource Technology*, 346, 126444. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126444

Vassileva, M., Malusà, E., Sas-Paszt, L., Trzcinski, P., Galvez, A., Flor-Peregrin, E., Shilev, S., Canfora, L., Mocali, S., Vassilev, N. (2021). Fermentation strategies to improve soil bio-inoculant production and quality. *Microorganisms*, 9(6), 1254. https://doi.org/10.3390/microorganisms9061254

Vlajkov, V., Anđelić, S., Pajčin, I., Grahovac, M., Budakov, D., Jokić, A., Grahovac, J. (2022). Medium for the production of *Bacillus*-based biocontrol agent effective against aflatoxigenic *Aspergillus flavus*: Dual approach for modelling and optimization. *Microorganisms*, 10(6), 1165. https://doi.org/10.3390/microorganisms10061165

Vlajkov, V., Grahovac, M., Budakov, D., Loc, M., Pajčin, I., Milić, D., Novaković, T., Grahovac, J. (2021). Distribution, genetic diversity and biocontrol of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* in Serbian maize fields. *Toxins*, 13(10), 687. https://doi.org/10.3390/toxins13100687

Vlyssides, A. G., Barampouti, E. M., Mai, S. (2005). Wastewater characteristics from Greek wineries and distilleries. *Water Science and Technology*, 51(1), 53–60. https://doi.org/10.2166/wst.2005.0007

Vollan, E. (Ed.) (2019). *Flocculation: Processes and applications*. Nova Science Publishers.

Vuković, S. M., Šunjka, D. B. (2021). *Biopesticidi: Udžbenik za predmet Korovi i biopesticidi* (Edicija Osnovni udžbenik). Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet. ISBN 978-86-7520-543-2.

Wang, S. Y., Herrera-Balandrano, D. D., Wang, Y. X., Shi, X. C., Chen, X., Jin, Y., Liu, F. Q., Laborda, P. (2022). Biocontrol ability of the *Bacillus amyloliquefaciens* group, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. nakamurai*, and *B. siamensis*, for the management of fungal postharvest diseases: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(22), 6591–6616. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c01745

Wang, Y., Ling, C., Chen, Y., Jiang, X., Chen, G. Q. (2019). Microbial engineering for easy downstream processing. *Biotechnology Advances*, 37(6), 107365. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.004

Weir, S., Ramsdenl, D. K., Hugheg, J. (1993). The effect of complex growth media on microbial flocculation by the cationic polyelectrolyte chitosan. *Biotechnology techniques*, 7(2), 111-116.

Xu, Y., Purton, S., Baganz, F. (2013). Chitosan flocculation to aid the harvesting of the microalga *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource Technology*, 129, 296–301. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.068

Yan, N., Ren, B., Wu, B., Bao, D., Zhang, X., Wang, J. (2016). Multi-objective optimization of biomass to biomethane system. *Green Energy and Environment*, 1(2), 156–165. https://doi.org/10.1016/j.gee.2016.05.001

Yang, K., He, Y., Ma, Z. (2017). Multi-objective steady-state optimization of two-chamber microbial fuel cells. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 25(8), 1000–1012. https://doi.org/10.1016/j.cjche.2017.03.019

Yang, R., Li, H., Huang, M., Yang, H., Li, A. (2016). A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment. *Water Research*, 95, 59–89. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.068

Yang, Z., Degorce-Dumas, J. R., Yang, H., Guibal, E., Li, A., Cheng, R. (2014). Flocculation of *Escherichia coli* using a quaternary ammonium salt grafted carboxymethyl chitosan flocculant. *Environmental Science and Technology*, 48(12), 6867–6873. https://doi.org/10.1021/es500415v

Yenkie, K. M., Wu, W. Z., Clark, R. L., Pfleger, B. F., Root, T. W., Maravelias, C. T. (2016). A roadmap for the synthesis of separation networks for the recovery of bio-based chemicals: Matching biological and process feasibility. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1362–1383. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.003

Yi, H., Li, M., Huo, X., Zeng, G., Lai, C., Huang, D., An, Z., Qin, L., Liu, X., Li, B., Liu, S., Fu, Y., Zhang, M. (2020). Recent development of advanced biotechnology for wastewater treatment. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(1), 99–118. https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1682964

Yin, Z., Zhu, L., Li, S., Hu, T., Chu, R., Mo, F., Hu, D., Liu, C., Li, B. (2020). A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control

and future directions. *Bioresource Technology*, 301, 122804. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122804

Zalila-Kolsi, I., Ben-Mahmoud, A., Al-Barazie, R. (2023). *Bacillus amyloliquefaciens*: Harnessing its potential for industrial, medical, and agricultural applications—A comprehensive review. *Microorganisms*, 11(9), 2215. https://doi.org/10.3390/microorganisms11092215

Zhang, M., Zhang, F., Li, C., An, H., Wan, T., Zhang, P. (2022). Application of chitosan and its derivative polymers in clinical medicine and agriculture. *Polymers*, 14(5), 958. https://doi.org/10.3390/polym14050958

Zhi, Y., Wu, Q., Xu, Y. (2017). Production of surfactin from waste distillers' grains by co-culture fermentation of two *Bacillus amyloliquefaciens* strains. *Bioresource Technology*, 235, 96–103. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.090

Zhu, L., Li, Z., Hiltunen, E. (2018). Microalgae *Chlorella vulgaris* biomass harvesting by natural flocculant: Effects on biomass sedimentation, spent medium recycling and lipid extraction. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 183. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1183-z

Zou, X., Li, Y., Xu, K., Wen, H., Shen, Z., Ren, X. (2018). Microalgae harvesting by buoy-bead flotation process using bioflocculant as alternative to chemical flocculant. *Algal Research*, 32, 233–240. https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.04.010

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

План третмана података

8. Назив пројекта/истраживања
Примена природних флокуланата за примарно издвајање биомасе *Bacillus* sp. добијене култивацијом на отпадним водама прехрамбене индустрије
9. Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду
10. Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Истраживање се реализује у оквиру националног програма 451-03-136/2025-03/200134
11. 1. Опис података
1.1 Врста студије *Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају* Докторска дисертација 1.2 Врсте података а) квантитативни б) квалитативни 1.3. Начин прикупљања података а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту г) административни подаци: навести врсту д) узорци ткива: навести врсту ђ) снимци, фотографије: навести врсту е) текст: научна литература ж) мапа, навести врсту з) остало: експериментални резултати, интернет садржај 1.3 Формат података, употребљене скале, количина података 1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке: a) Excel фајл, датотека: .xlsx b) SPSS фајл, датотека c) PDF фајл, датотека: .pdf d) Текст фајл, датотека: .docx e) JPG фајл, датотека: .png .tif .jpg f) Остало, датотека: Design-Expert 8.1, Minitab v17.0, MATLAB vR2015b, Statistica 13

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли: велики број
б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.): велики број

1.3.3. Поновљена мерења
а) да
б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:
а) временски размак између поновљених мера је: од неколико минута до неколико дана
б) варијабле које се више пута мере односе се на: све експерименталне анализе
в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као:

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?
а) Да
б) Не
Ако је одговор не, образложити _____
_____

12. 2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?
а) експеримент, навести тип: биолошка анализа, хемијска анализа, статистичка анализа
б) корелационо истраживање, навести тип: обрада података ANOVA, RSM
ц) анализа текста, навести тип: преглед доступне научне литературе, дефинисање начина извођења истраживања, дискусија резултата и поређење са литературним подацима, извођење закључака
д) остало, навести шта:

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).
Магнетна мешалица
Аналитичка вага
Спектрофотометар (UV-1800 UV-Vis Spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan)
Апаратура за таложење

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података
а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да Не

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

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати
Квалитет података је контролисан извођењем вишеструких мерења и применом статистичких алата за евалуацију њиховог квалитета.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?
Контрола уноса података је извршена упоређивањем добијених података са литературним подацима.

13. 3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму докторских дисертација на Универзитету у Новом Саду.
3.1.2. URL адреса
3.1.3. DOI

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?
а) Да
б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____
в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

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

3.2 Метаподаци и документација података
3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен?

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

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

3.3 Стратегија и стандарди за чување података
3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? _____
3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да Не
3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не
3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?
Да Не
Образложити
_____

_____

14. 4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

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

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

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не
Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање
_____

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не
Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:
а) Подаци нису у отвореном приступу
б) Подаци су анонимизирани
ц) Остало, навести шта
_____
_____

15. 5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити
а) јавно доступни
б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области
ц) затворени

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

_____

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

_____

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.
Ауторство – некомерцијално - без прераде

16. 6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података
Селена Дмитровић, selena.dmitrovic@uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима
Селена Дмитровић, selena.dmitrovic@uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима
Селена Дмитровић, selena.dmitrovic@uns.ac.rs