Obrada otpada organskog podrijetla iz kućanstva tehnologijom efektivnih mikroorganizama

Ižaković, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:483351

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Maja Ižaković

OBRADA OTPADA ORGANSKOG PODRIJETLA IZ KUĆANSTVA TEHNOLOGIJOM EFEKTIVNIH MIKROORGANIZAMA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za ispitivanje hrane i prehrane
Katedra za biologiju i mikrobiologiju
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Opća mikrobiologija

Tema rada je prihvaćena na X. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, održanoj 10. 07. 2014.

Mentor: doc. dr. sc. *Lidija Lenart*,

Pomoć pri izradi: *Ana Škorvaga*, tehničar

OBRADA OTPADA ORGANSKOG PODRIJETLA IZ KUĆANSTVA TEHNOLOGIJOM EFEKTIVNIH MIKROORGANIZAMA

Maja Ižaković, 252-DI

Sažetak: U ovom radu koji se bavi mogućnostima primjene tehnologije efektivnih mikroorganizama ispitana je mogućnost proizvodnje efektivnih mikroorganizama prilikom kompostiranje organske biomase koja zaostaje prilikom svakog procesa pripreme hrane u kućanstvima. Organski otpaci koji se inače beskorisno bacaju mogu se uspješno iskoristiti tako da se prikupe na odgovarajućim mjestima i u odgovarajućim posudama i tretiranjem biomase pomoću suspenzije efektivnih mikroorganizama dobiti bezbroj blagodati u mogućnostima primjene. Dakle, prema postavljenom cilju istaživanja utvrđen je mikrobiološki sastav dobivene fermentacijske tekućine, kako u smislu udjela efektivnih mikroorganizama tako i u smislu sadržaja nekih drugih prisutnih mikroorganizama u kompostnoj masi. Ustanovljeno je kako se brojnost efektivnih mikroorganizama umnožila prilikom kompostiranja, pri čemu se kao rezultat tretiranja smanjio broj nepoželjnih vrsta mikrorganizama. Ovaj postupak stoga valja učestalo ponavljati sa svim otpacima organskog podrijetla bilo u kućanstvima ili uopće u svakodnevom životu, jer time se sprječava zagađivanje okoliša, a otvaraju se brojne pogodnosti primjene dobivenih korisnih i lako upotrebljivih vlastitih proizvoda.

Ključne riječi: EM tehnologija, efektivni mikroorganizmi, kompostiranje

Rad sadrži: 45 stranica

15 slika

1 tablicu

0 priloga

40 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	doc. dr. sc. *Mirna Habuda-Stanić*	predsjednik
2.	doc. dr. sc. *Lidija Lenart*	član-mentor
3.	izv. prof. dr. sc. *Vinko Krstanović*	član
4.	izv. prof. dr. sc. *Vedran Slačanac*	zamjena člana

Datum obrane: 23. rujan, 2015.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Faculty of Food Technology Osijek

Department of Food Science and Nutrition

Subdepartment of Biology and Microbiology

Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Basic microbiology

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. X. held on 10. 07. 2014.

Mentor: *Lidija Lenart, PhD, assistant prof.*

Technical assistance: *Ana Škorvaga, tehnical*

TREATMENT OF ORGANIC WASTES FROM HAUSEHOLD BY EFFECTIVE MICROORGANISMS TECHNOLOGY

Maja Ižaković, 252-DI

Summary:

In this work, which deals with possibilities of appliance effective microorganisms technology, are tested possibilities of making effective microorganisms while composting organic biomass from residues from households. Organic waste, which is usually useless throw away, can be successfully used by collecting it on some spots or in appropriate containers, and treating the biomass with suspension of effective microorganisms. According to the research goals, it is determined microbiological composition of obtained fermentation liquid, both in terms of effective microorganisms and other microorganisms which are contained in the compost. It was found that the number of effective microorganisms multiplied during composting, whereby as a result of the treatment reduced the number of undesirable species of microorganisms. This process, therefore, must be frequently repeated with all the waste of organic origin either in homes or even in daily lives, as this prevents contamination of the environment, and open up a number of benefits obtained by the application of useful and easy to apply its own products.

Key words: EM technology, effective microorganisms, composting

Thesis contains: 45 pages

15 figures

1 tables

0 supplements

40 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1.*Mirna Habuda-Stanić*, PhD, assistant prof. (chair person)

2.*Lidija Lenart*, PhD, assistant prof. (supervisor)

3. *Vinko Krstanović*, PhD, associate prof. (member)

4. *Vedran Slačanac*, PhD, associate prof. (stand-in)

Defense date: September, 23, 2015.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 4

2.1. TEHNOLOGIJA EFEKTIVNIH MIKROORGANIZAMA - EM TEHNOLOGIJA 5

2.2. EFEKTIVNI MIKROORGANIZMI 6

2.2.1. Kvasci 7

2.2.2. Bakterije mliječne kiseline 8

2.2.3. Fotosintetske bakterije 9

2.2.4. Ostali efektivni mikroorganizmi 10

2.3. PRIMJENA EFEKTIVNIH MIKROORGANIZAMA 10

2.3.1. Mogućnost nadzora nad štetnicima i patogenima 11

2.3.2. Mehanizam utjecaja na kvalitetu i prinos plodova 12

2.3.3. Kontrola korova i gospodarenje dušikom u tlu 13

2.3.4. EM u komunalnoj djelatnosti 13

2.4. OSTALE VRSTE MIKROORGANIZAMA 15

2.4.1. Bakterije porodice *Enterobacteriaceae* 16

2.4.2. Bakterije vrste *Escherichia coli* 17

2.4.3. Bakterije vrste *Staphylococcus aureus* 18

2.4.4. Sulfito-redukcijske klostridije 20

2.4.5. Plijesni 21

2.4.6. Aerobne mezofilne bakterije 23

2.4.7. Aerobne sporogene bakterije 24

3. EKSPERIMENTALNI DIO 25

3.1. ZADATAK 26

3.2. MATERIJALI I METODE 26

3.2.1. Materijali 26

3.2.2. Metode 27

4. REZULTATI I RASPRAVA 31

4.1. ODREĐIVANJE BROJA EFEKTIVNIH MIKROORGANIZAMA U PRIPRAVCIMA KOMPOSTNOG „SOKA“ . 32

4.2. ODREĐIVANJE BROJA OSTALIH VRSTA MIKROORGANIZAMA U PRIPRAVCIMA KOMPOSTNOG „SOKA“ 35

5. ZAKLJUČCI 39

6. LITERATURA 41

Popis oznaka, kratica i simbola

EM	Efektivni mikroorganizmi

...

1.UVOD

Sa sve većim napretkom i razvojem industrije i mnogih područja znanosti, te porastom broja stanovnika na Zemlji i njihovih potreba, u svijetu se javlja značajan problem zagađivanja okoliša. Kao odgovor na taj problem razvija se veliki broj novih grana znanosti, kao i interes pojedinaca, koji izučavaju moguća rješenja i donose nove metode za rješavanje istih (http://emteh.hr/o-nama/, 2015.).

Tako se prije 28 godina u Japanu, razvila jedna od novih mogućnosti za smanjenje onečišćenja - EM tehnologija. To je prirodna tehnologija bazirana na primjeni efektivnih mikroorganizama koji se sastoje od niza korisnih i visokoučinkovitih mikroorganizama, koji ujedno nisu štetni, patogeni, genetski modificirani, niti kemijski sintetizirani (Higa, 1995.).

Od davnina je poznata značajna uloga mikroorganizama u okolišu budući da dinamičke interakcije između pojedinih mikrobnih populacija pridonose održavanju cijelog našeg ekosustava u različitim prebivalištima: voda, zrak, tlo. Efektivni mikroorganizmi imaju široki spektar djelovanja. Učinkovito djeluju na području komunalne djelatnosti, industrije i poljoprivrede a imaju i iznimnu ulogu u pročišćavanju otpadnih voda Sav otpad organskog podrijetla može se kompostirati i na taj način značajno smanjiti količinu otpada i njegov odvoz, a osim toga kompostiranje omogućava vraćanje hranjivih tvari tlu te povećavanje mikrobiološke aktivnosti tla. Kompostirati se može industrijski te kućanski otpad organskog podrijetla. Primjenom efektivnih mikroorganizama potiče se razgradnja organske tvari te ona teče ujednačeno i kontinuirano u cijeloj kompostnoj hrpi, čime se sprječavaju procesi truljenja i nastajanje neugodnih mirisa. Kompostna masa tretirana EM biotehnološkom linijom proizvoda omogućuje pristup kisiku u kompostnoj hrpi, dolazi do prozračivanja anaerobnih džepova, čime se poboljšava kvaliteta komposta, a potrebno vrijeme kompostiranja skraćuje. Stoga je potreba za prevrtanjem mase smanjena na minimum, a time se smanjuju i troškovi kompostiranja (Craford, 1983.).

Cilj ovog rada je bio prikupiti organski otpad iz kućanstva, pripraviti od njega kompost pomoću efektivnih mikroorganizama, a potom u fermentacijskoj tekućini, tzv. kompostnom „soku“ odrediti prisustvo i broj određenih, kako efektivnih, tako i ostalih vrsta

mikroorganizama, te konačno utvrditi ima li primjena efektivnih mikroorganizama utjecaj na mikrobiološki sastav dobivenog kompostnog „soka“.

2.TEORIJSKI DIO

2.1. TEHNOLOGIJA EFEKTIVNIH MIKROORGANIZAMA - EM TEHNOLOGIJA

Tehnologija efektivnih mikroorganizama razvijena je 70-tih godina na Univerzitetu Ryukyus, Okinawa, Japan (Sangakkara, 2002.). Najzaslužniji znanstvenik tog otkrića je prof. Teruo Higa. Različitim je istraživanjima ukazano na mnogobrojne mogućnosti primjene ove tehnologije u ekološkoj poljoprivredi, stočarstvu, komunalnoj djelatnosti, obradi otpadnih voda i sl. (Diver, 2001.).

EM tehnologija se bazira na primjeni efektivnih mikroorganizama, njih oko 80 različitih postojećih vrsta. Među najučinkovitijim čimbenicima te mikrobne multikulture su:

• bakterije mliječne kiseline (BMK) vrsta: Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei, Streptococcus lactis;

• fotosintetske bakterije vrsta: Rhodopseudomonas palastris, Rhodobacter spaeroides;

• kvasci vrsta: Saccharomyces cerevisiae, Candida utilis;

• aktinomicete vrsta: Streptomyces albus, Streptomyces griseus

• plijesni vrsta *Aspergillus oryzae, Mucor hiemalis* (Higa, 1995.).

Osnova djelovanja efektivnih vrsta mikroorganizama njihova sposobnost stvaranja organskih kiselina enzima, antioksidansa i ostalih produkata metabolizma pomoću kojih složene organske tvari razlažu u jednostavne anorganske spojeve kao što su ugljikov dioksid (CO_2) metan (CH_4), amonijak (NH_3) i sl. od kojih neki služe kao hrana biljkama. Stoga je primjena tehnologije efektivnih mikroorganizma nužna u ekološkoj poljoprivredi i u ekologiji uopće.

(Higa i Chinen, 1998.).

EM je skraćenica od sintagme „efektivni mikroorganizmi" te ona predstavlja skup raznih i učinkovitih, korisnih i nepatogenih mikroorganizama proizvedenih prirodnim postupkom, koji nisu kemijski sintetizirani ili genetski modificirani (http://emrojapan.com/page/7-whatisem/, 2015.)

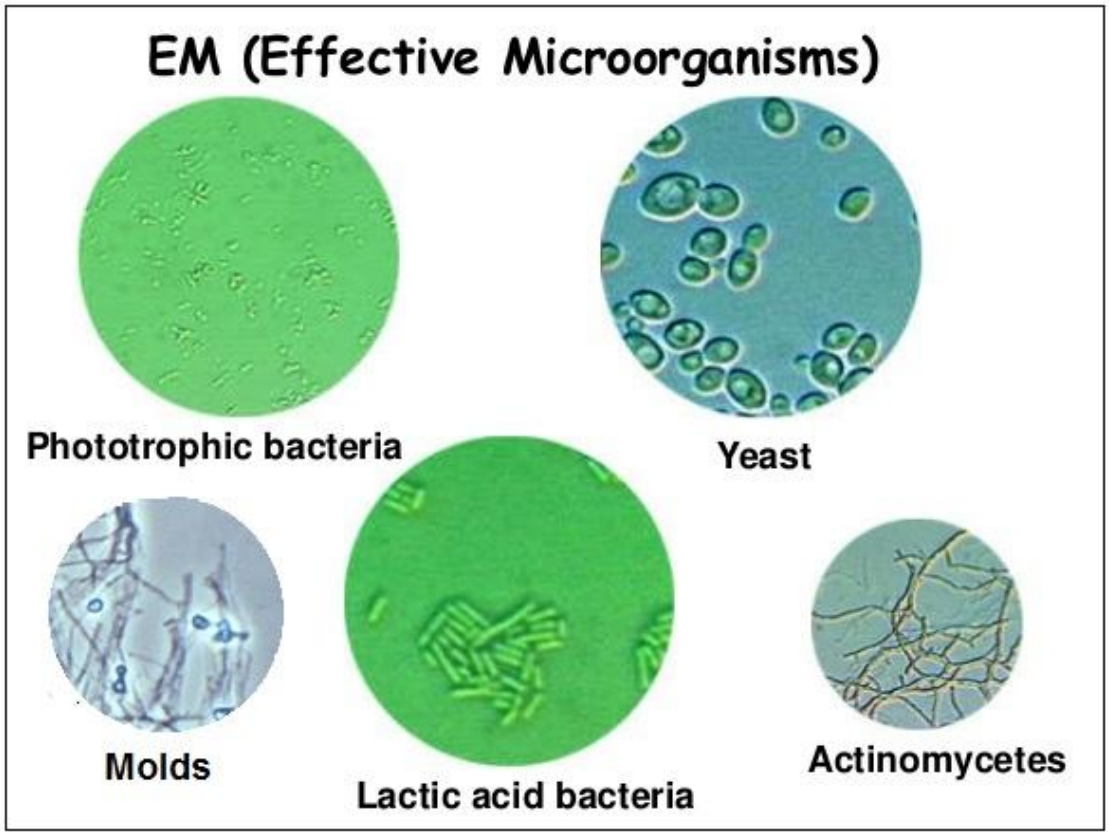
EM tehnologija ima široku primjenu. Efektivni mikroorganizmi nemaju negativne učinke na biljke, životinje i ljude, dapače, oni su vrlo korisni biljkama, životinjama i ljudima. Budući da

razgrađuju organske tvari, EM zapravo žive od našeg otpada, dok mi živimo od "njihovog otpada".(http://emrojapan.com/page/7-whatisem/, 2015.).

Potpuno novi način uporabe korisnih mikroorganizama u poljoprivredi zastupa inovativna tehnologija efektivnih mikroorganizama, koje proizvodi tvrtka Multikraft iz Austrije već dugi niz godina. Naime, ovaj koncept dugotrajnim unošenjem efektivnih (korisnih) mikroorganizama nastoji preventivno gospodariti tlom i okolišem uzgajane biljke omogućujući usjevu optimalan rast i razvoj. Stoga ova tehnologija spada u holističke odnosno sveobuhvatne metode poljoprivrednog uzgoja, kakve bi trebale prevladati u budućnosti. Uzgoj kultura pomoću ove tehnologije superioran je u odnosu na uobičajene poljoprivredne metode bilo u klasičnom, integriranom ili ekološkom (organskom) uzgoju, jer poboljšava proizvodnju u kvalitativnom i kvantitativnom smislu. Tako se na ovaj način zbog potpuno prirodnog upravljanja procesima uzgoja dobivaju stabilniji rezultati u proizvodnji uz blagotvoran utjecaj na okoliš (http://emteh.hr/osnovno-o-tehnologiji/, 2015.).

2.2. EFEKTIVNI MIKROORGANIZMI

Iako je poznat veliki broj mikroorganizama štetnih i opasnih po ljudsko zdravlje i okoliš, postoje i korisni mikroorganizmi koji se primjenjuju u mnogim područjima. Jedan primjer takvih mikroorganizama su efektivni mikroorganizmi koji uključuju mliječne bakterije, kvasce i fotosintetske bakterije u određenom omjeru. Efektivni mikroorganizmi isključuju bilo kakve patogene i genetski modificirane mikroorganizme koji su štetni za ljude, životinje i biljke. Efektivne mikroorganizme predstavljaju sigurni mikroorganizmi koji su namjerno ili nenamjerno, poznati i korišteni od antičkih vremena. (http://emrojapan.com/page/8-microorganismsinem/, 2015.).



Slika 1 Efektivni mikroorganizmi

(http://www.slideshare.net/MauraMcDW/emimo-kcsa-resilient-farmer-april- , 2015.)

2.2.1. Kvasci

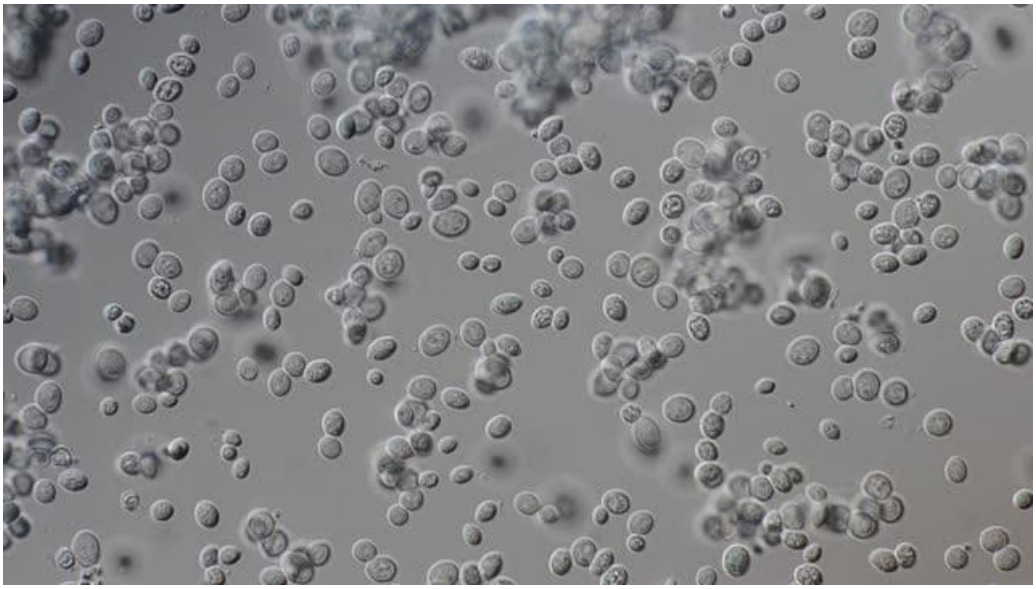
Kvasci su jednostanične mikroskopske gljivice koje se razmnožavaju jednostavnom diobom i pupanjem. Kvasci pripadaju carstvu *Fungi*, zajedno sa plijesnima i mesnatim gljivama. Kvasci zasigurno po brojnosti čine ekonomski najznačajniju skupinu mikroorganizama (Vrsalović-Presečki, 2003.).

Kolonije kvasaca su uglavnom vlažne ili mukozne po izgledu i blijedo žute boje. Za uspješan rast kvascima najviše odgovara aktivitet vode koji se kreće od 0,90 do 0,94, ali mogu rasti i pri nižim vrijednostima aktiviteta vode. Točnije, neki osmofilni kvasci mogu rasti čak i pri aktivitetu vode vrijednosti 0,60. Najbolji rast kvasci pokazuju u kiseloj sredini pri pH vrijednostima od 4,0 do 4,5 (Marriott i Gravani, 2006.).

Većina kvasaca nije štetna po ljudsko zdravlje. Kvasci se uglavnom koriste kao radni mikroorganizmi ili starter kulture u prehrambenoj industriji, npr. u proizvodnji pekarskih i konditorskih proizvoda, alkoholnih pića, piva, vina i dr. Ova grupa mikroorganizama sadrži mnogobrojne rodove. Najviše primjenjivani kvasci su kvasci iz rodova: *Candida*, *Saccharomyces* i *Rhodotorula* (Škrinjar i Tešanović, 2007.).

Efektivni kvasci razgrađuju organske tvari vrenjem i proizvode bioaktivne tvari kao što su enzimi i hormoni.

Neki od patogenih vrsta kvasaca su *Candida albicans*, *Cryptococcus*, *Blastomyces*, *Histoplasma*, no oni ne pripadaju u skupinu efektivnih mikroorganizama pa ih se stoga u ovom radu neće spominjati.



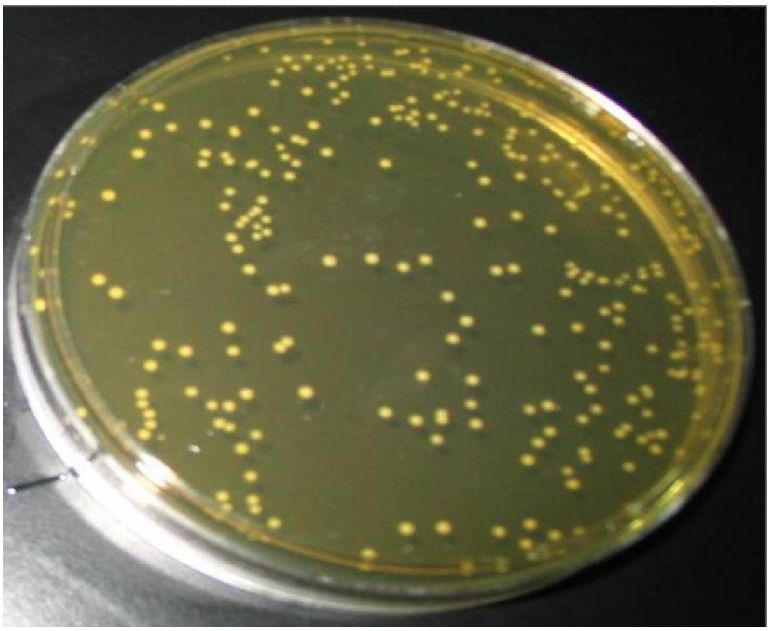
Slika 2 Stanice kvasca roda *Saccharomyces* pod mikroskopom

2.2.2. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline su generalni pojam za kategoriju bakterija koje pretvaraju šećer u mliječnu kiselinu kroz mliječne kisele fermentacije. Jedna od karakteristika bakterija mliječne kiseline je da može relativno lako koegzistirati s drugim bakterijama. Bakterije mliječne kiseline imaju široku primjenu, koriste se u proizvodnji fermentiranih namirnica kao što su sir i jogurt koji se mogu prirodno sačuvati za dugo vremensko razdoblje.

Otkako je Louis Pasteur otkrio bakterije mliječne kiseline u 1875., primijećen je njihov blagotvorni učinak na zdravlje i dugovječnost. Nedavna istraživanja pokazuju da osim reguliranja crijeva, bakterije mliječne kiseline također su poznate po tome što su uključene u imuno stimulirajuće djelovanje, pospješuju snižavanje kolesterola i imaju sposobnost snižavanja krvnog tlaka.

Bakterije mliječne kiseline u EM razgrađuju organske tvari vrenjem i sprečavaju razvoj štetnih mikroorganizama. Dobar primjer tomu je da mliječne bakterije mogu suzbiti razmnožavanje štetnih gljiva roda *Fusarium* koje čine velike štete usjevima žitarica. (http://emrojapan.com/page/8-microorganismsinem/, 2015.).



Slika 3 Kolonije mliječnih bakterija na MRS agaru

(http://nutribitsforeinstein.blogspot.hr/2010_06_20_archive.html, 2015.)

2.2.3. Fotosintetske bakterije

Fotosintetske bakterije su drevna bakterija koje su postojale još od vremena prije nego je Zemljina atmosfera imala svoj sadašnji sadržaj kisika. Kao što mu ime govori, te bakterije

koriste sunčevu energiju za metabolizam organske i anorganske tvari. Fotosintetske bakterije postoje u rižinim poljima, jezerima i svugdje na Zemlji. Potencijal fotosintetskih bakterija se posebice očituje u zaštiti okoliša jer su one zaslužne za razgradnju organskih materijala i zbog toga je značajna njihova primjena u obradi otpadnih voda i ekološkoj poljoprivredi.

Fotosintetske bakterije su bitan element efektivnih mikroorganizama. Fotosintetske bakterije su uključene u različite metaboličke sustave i igraju važnu ulogu u dušikovom i ugljikovom ciklusu. One pridonose boljoj pretvorbi sunčeve svjetlosti ili, drugim riječima, boljoj fotosintezi (http://emrojapan.com/page/8-microorganismsinem/, 2015.).

Fotosintetske bakterije uklanjaju štetne plinove (primjerice amonijak i sumporovodik) iz otpada organskog podrijetla dajući im ugodan miris.

2.2.4. Ostali efektivni mikroorganizmi

Ostali efektivni mikroorganizmi kao što su neke vrste aktinomiceta i plijesni s pozitivnim djelovanjem, sinergijski djeluju s prethodne tri skupine i daju specifičnost pojedine primjene.

2.3. PRIMJENA EFEKTIVNIH MIKROORGANIZAMA

Multikraft efektivni mikroorganizmi, odnosno pripravak EM AKTIV, dolazi u obliku tekućeg koncentrata sa 25 sojeva bakterija, kvasaca, aktinomiceta i plijesni, koji su izvorno izdvojeni iz preko 80 vrsta korisnih mikroorganizama iz 5 porodica i 10 rodova aerobnih i anaerobnih vrsta. Osnovna karakteristika ovih mikroorganizama jest simbiontski odnos aerobnih i anaerobnih vrsta, što je bit inovacije ove tehnologije i temelj njezina uspješnog djelovanja. Iz navedenoga slijedi i kompleksno djelovanje efektivnih mikroorganizama na tlo i biljku.

Tako u tlu efektivni mikroorganizmi svojim metabolizmom proizvode antioksidante s prolongiranim antioksidacijskim djelovanjem, pa dolazi do bržeg rasta i razvoja biljke. Naime, u tlu s visokim stupnjem oksidacije, esencijalni hranjivi elementi nisu potpuno topljivi, pa biljke moraju uložiti veću energiju da ih apsorbiraju korijenom. S druge strane u takvom tlu teški metali ioniziraju i spajaju se s drugim spojevima povećavajući njihovu topivost, pa u tlu nastaje široki spektar toksičnih (otrovnih) spojeva koji štetno utječu na ukupni rast i razvoj

uzgajane biljke. Unosom efektivnih mikroorganizama u takvo tlo procesi se usmjeravaju u pravcu antioksidacije te se teški metali prevode u neutralni molekularni oblik, postaju teži od vode i s vodama iz oborina spuštaju se u dublje slojeve tla izvan zone korjenova sustava biljaka.

Osim ovog primarnog djelovanja, efektivni mikroorganizmi svojom aktivnošću teža tla čine rahlijima, a u poroznijim i sušim tlima povećavaju sposobnost zadržavanja vode. Također, neutraliziraju kiselost ili lužnatost tla, te sintetiziraju spojeve koji su po strukturi slični prirodnim antioksidansima, primjerice vitaminima C i E. Ovi spojevi u zoni korijena snažno stimuliraju rast biljaka.

Efektivni mikroorganizmi su u stanju razgraditi i sintetičke kemikalije (kao što su rezidue pesticida) i to relativno brzo, u roku od mjesec dana do jedne godine, sve zbog svoje iznimne sposobnosti anti oksidacije. Slično djelovanje prikazuju i na ostale zagađivače iz svojega okoliša, bilo da se oni nalaze u tlu, vodi ili u zraku.

U nadzemnim dijelovima biljaka proces anti oksidacije pospješuje usvajanje hranjivih sastojaka iz tla i optimizira trajanje fotosinteze, pa biljke ne troše previše energije na taj proces i ne iscrpljuje se, kakav je inače slučaj na oksidiranim, osiromašenim tlima. Na taj način efektivni mikroorganizmi povećavaju prilagodljivost biljke na uvjete okoline i smanjuju stres u slučaju klimatskih ekstrema.

Uporaba pripravaka na bazi efektivnih mikroorganizama u poljoprivredi zasniva se na tretmanima tla, sjemena ili sadnog materijala, uzgoju presadnica i folijarnim tretmanima uzgajanih biljaka u vegetaciji. Osim toga istim pripravcima je moguće kompostirati organske ostatke ili stajnjak, te dezinficirati prostor za držanje životinja i boriti se protiv neugodnih mirisa i štetnih plinova koji nastaju u stočarstvu. To pruža mogućnost da se gospodarstvo uz pomoć efektivnih mikroorganizama okrene potpuno zatvorenom ciklusu proizvodnje u kojemu bi se životinjski izmet i biljni ostaci usjeva kompostiranjem pretvarali u visokovrijedan kompost za gnojidbu usjeva, dok bi prskanjem tla i biljaka u vegetaciji osiguravali zaštitnu i hranidbenu funkciju za stabilnu i profitabilnu proizvodnju (http://emteh.hr/osnovno-o-tehnologiji/, 2015.).

2.3.1. Mogućnost nadzora nad štetnicima i patogenima

Temelj djelovanja Multikraft efektivnih mikroorganizama u kontroli štetnika i bolesti koje napadaju uzgajane kulture, temelji se na činjenici da štetnici preferiraju oksidanse, pa kada polože jajašca na biljku koja ima razvijenu sposobnost anti oksidacije, ona im inhibira rast. Tako je poznato da efektivni mikroroorganizmi blokiraju razvoj kućne muhe iz stadija jajašca u ličinku. Općenito vrijedi pravilo da se insekti, koji zbog svojega životnog ciklusa prenose patogene mikroorganizme s biljke na biljku, hrane bolesnim i gnjilim jedinkama, dok svi anti oksidansi snažno blokiraju njihov razvoj i širenje. Korisni insekti u pravilu se hrane štetnim insektima i organizmima, pa njih ne inhibiraju antioksidacijski procesi nego im čak daju dodatnu energiju.

S druge strane, unošenje efektivnih mikroorganizama u tlo direktno može suzbiti patogeni potencijal štetnih mikroorganizama, pa su klijanci u tretiranom tlu pošteđeni napada patogenih mikroorganizama. Sličan se efekt postiže jesenskim tretiranjem usitnjenih biljnih ostataka pred kulture (kukuružnjak, lišće u vinogradima i voćnjacima) sa efektivnim mikroorganizmima. Tako su višegodišnji pokusi i praksa u Austriji pokazali da se u uzgoju pšenice tretiranjem kukuružnjaka u jesen s Multikraft efektivnim mikroorganizmima može smanjiti sadržaj mikotoksina u zrnu pšenice od 30 do 50%. Ovaj efekt se zasniva na kompeticijskom odnosu i antagonizmu između korisnih mikroorganizama i patogenih mikroorganizama koji napadaju usjeve (http://emteh.hr/osnovno-o-tehnologiji/, 2015.).

2.3.2. Mehanizam utjecaja na kvalitetu i prinos plodova

Višestruko djelovanje efektivnih mikroorganizama na tlo i uzgajanu kulturu proizlazi iz jačanja antioksidacijskih procesa u filosferi i samim biljkama, a osobito u zoni korijena. Uslijed čega biljka ima jači imunitet, bujnost i korijen kojega ne napada trulež. Zbog snažnog i zdravog korijena biljka uspješno usvaja hranjiva čak i u nepovoljnim uvjetima, pa je režim usvajanja hranjiva kontinuiran, bez oscilacija čak i u uvjetima stresa. Ovo rezultira stabilnim urodom i kvalitetom plodova. Plodovi koji su rasli u takvim uvjetima odlikuju se ujednačenom krupnoćom, dobrom strukturom, intenzivnijom bojom i okusom. Istovremeno se povećava broj takvih plodova po biljci, što se opet direktno reflektira na prinose uzgajane kulture. Kvalitetniji plodovi dobre strukture se kasnije mnogo uspješnije čuvaju i skladište u

odnosu na plodove iz uobičajenog načina uzgoja (http://emteh.hr/osnovno-o-tehnologiji/, 2015.).

2.3.3. Kontrola korova i gospodarenje dušikom u tlu

Svojstvo efektivnih mikroorganizama da snažno potaknu rast može se djelotvorno koristiti za dugoročnu kontrolu korova i njihovo olakšano mehaničko uništavanje. Naime, u proljeće treba efektivnim mikroorganizmima tretirati tlo barem dvadesetak dana prije sjetve i odmah zatim sredstvo unijeti u tlo. Na taj način se pospješuje istovremeno klijanje i nicanje svih korova, koje zatim lagano uništavamo prilikom pripreme tla za sjetvu. Na ovaj način se kroz više godina mogu iscrpljivati svi korovi i smanjivati njihova populacija do razine kada više ne predstavljaju ekonomski rizik za sam uzgajani usjev.

Efektivni mikroorganizmi imaju važnu ulogu i u gospodarenju dušikom u tlu, jer učinkovito inhibiraju sintezu nitratnih spojeva, osobito nitrozamina, tako da razgrađuju ione dušične kiseline prije nego se ona spoji sa solima iz tla i tako formira nitrate (http://emteh.hr/osnovno-o-tehnologiji/, 2015).

2.3.4. EM u komunalnoj djelatnosti

EM tehnologija ima široku primjenu. Ona se može primijeniti za pročišćavanje otpadnih voda (gradskih, industrijskih, otpadnih vodi s farmi i s deponija otpada), za održavanje higijene kontejnera i voznog parka, za tretiranje odlagališta otpada te za tretiranje krutog otpada, odnosno kompostiranje.

2.3.4.1.Kompostiranje

Organski otpad čini oko 30% od ukupnog otpada otpada i upravo njegovo zbrinjavanje može uvelike smanjiti ukupni volumen otpada (Velić i sur., 2014). Budući da je organski otpad podložan nepoželjnim procesima, kao što je truljenje, prilikom čega mogu nastati staklenički

plinovi i štetne procjedne vode, nužno ga je dobro obraditi (http://emteh.hr/kompostiranje-komunalnog-otpada/, 2015.).

Postupak kojim se najbolje može zbrinuti i razgraditi organski otpad je postupak kompostiranja. Kompostiranje je biološka razgradnja krutog otpada pomoću mikroorganizama pri kontroliranim aerobnim uvjetima. Ono predstavlja prihvatljiv način zbrinjavanja organskog otpada budući da sam postupak rezultira smanjenjem volumena otpada i rasterećenjem odlagališta, smanjenjem troškova odlaganja otpada, te smanjenjem onečišćenja tla, vode i zraka. Osim toga, kompostiranjem se povećava kvaliteta tla i povećava se njegova mikrobiološka aktivnost (Velić i sur., 2014.).

Ovim procesom odvija se razgradnja organske tvari u stabilno stanje prilikom čega nastaje biološki stabilan koristan proizvod nalik humusu, koji može poslužiti kao poboljšivač tla. Ključnu ulogu u kompostiranju imaju mikroorganizmi koji su odgovorni za razgradnju organske tvari. Upravo oni uz odgovarajući stupanj vlažnosti i kisika prerađuju organsku tvar u kompost. Na brzinu procesa kompostiranja ograničavajući činitelj je udio ugljika i dušika u sastavu organske tvari, jer su ta dva elementa neophodna za mikrobiološku aktivnost i rast. Naime, ugljik (C) je izvor energije, a dušik (N) je neophodan za rast mikroorganizama koji sudjeluju u procesu kompostiranja organske tvari. Stoga dodavanje kultura mikroorganizama u kompostnu masu može značajno utjecati na brzinu kompostiranja i kvalitetu kompostne mase.

Kompostirati se može velika većina organskog otpada, zbog toga se ono može primijeniti na više načina. Osim u velikim, industrijskim mjerilima, kompostirati se može i u manjim mjerilima – zajednički, u naseljima, ali i individualno – u domovima i vrtovima (N.Velić, Bioprocesi u zaštiti okoliša, 2014.). U industrijskim mjerilima rade se velike kompostane, dok se za kućnu upotrebu proizvode različite plastične kante prilagođene za provođenje istog. Prilikom prikupljanja uzoraka za obradu i njegovog tretiranja najprimjereniji je spremnik „Organko“.

„Organko“ je funkcionalno izrađen i napredan spremnik koji vas rješava neugodnosti prilikom sakupljanja i odvajanja biološkog otpada u kućanstvima, kuhinji, auto kampu ili poduzeću. Neugodne mirise koji nastaju prilikom procesa truljenja možemo riješiti uporabom suspenzije efektivnih mikroorganizama nanesenih na pšenične mekinje koje u tom slučaju služe kao mikrobiološki nosač. U tom se slučaju u spremniku „Organko“ događa

se proces fermentacije. Na taj način od biološkog otpada možemo proizvesti kompost najbolje kvalitete kojim je moguće obogatiti tlo.

Primjenom mikrobnog preparata efektivnih mikroorganizama pri procesu kompostiranja postižu se slijedeće prednosti:

➔ ubrzava se proces razgradnje;

➔ uklanjaju se neugodni mirisi;

➔ suzbija se rast patogenih mikroorganizmima;

➔ skraćuje se vrijeme kompostiranja;

➔ umanjuje se gubitak vlage;

➔ uklanja se potreba kontinuiranog prevrtanja kompostne mase.



Slika 4 „Organko“ - spremnik za kompostiranje kućanskog otpada (http://emteh.hr/kompostiranje-kucnog-otpada/, 2015.)

Spremnik „Organko“ je primjerenih dimenzija za ormar, spremište ili za čuvanje ispod pulta.

2.4. OSTALE VRSTE MIKROORGANIZAMA

2.4.1. Bakterije porodice *Enterobacteriaceae*

Bakterije porodice *Enterobacteriaceae* čine gram (-) negativni, uglavnom pokretni štapići koji ne stvaraju spore, a u odnosu na kisik oni su fakultativni anaerobi. Porodica obuhvaća veliki broj (oko 100) srodnih vrsta bakterija, koje su razvrstane u 22 roda. Svega oko 25 vrsta, međutim, mogu uzrokovati bolest čovjeka. Među njima najvažniji su rodovi *Salmonella* i *Shigella*, koji su glavni uzročnici akutnog proljeva širom svijeta. Ostale vrste predstavljaju uglavnom oportunističke patogene bakterije, koje uzrokuju različite bolesti izvan probavnog sustava ili u osoba oslabljenog imuniteta. Pripadnici ove vrste naročito su značajni kao uzročnici bolničkih infekcija. U čovjeka enterobakterije čine oko 5% ukupne normalne crijevne flore.

Enterobakterije dobro rastu na različitim jednostavnim te na selektivinim i diferencijalnim podlogama. Kolonije su velike, sjajne i glatke površine i obično glatkih rubova. Boja kolonija na običnim je hranjivim podlogama sivkasta, a na selektivnim i diferencijalnim ovisi o podlozi i indikatoru, te biokemijskoj aktivnosti pojedine vrste (Kalenić i Mlinarić-Missoni, 1995.).

Bakterije porodice *Enterobacteriaceae* ili crijevne bakterije su normalna mikroflora probavnog sustava u ljudi i životinja. Obitelj *Enterobactriaceae* obuhvaća rodove: *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Hafnia*, *Serratia*, *Edwardsiella* i *Erwinia*. Prisutnost enterobakterija u namirnicama i vodi indikator je fekalnog zagađenja, tj. nedovoljne higijene tijekom proizvodnje, čuvanja i rukovanja sa namirnicama. Namirnice u kojima se ustanovi prisutnost enterobakterija smatraju se zdravstveno neispravnima (Brčina, 2013.).



Slika 5 Bakterija porodice *Enterobacteriaceae* na VRBG agaru

(http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/SW_PROD/2534514325C567C8C12574950048C168?opendocument&LG=EN&, 2015.)

2.4.2. Bakterije vrste *Escherichia coli*

Bakterijska vrsta *Escherichia coli* je raširena u prirodi, u zemlji, u vodi i u probavnom traktu ljudi i životinja, odakle u okoliš dolazi putem fekalija. U crijevima ima značajnu ulogu u probavi, jer obavlja razlaganje ugljikohidrata i bjelančevina. Proizvodi neke vitamine iz grupe B (B12) i K vitamin te tvari koje antagonistički djeluju na druge bakterije. Njihovo prisustvo u prehrambenim namirnicama ili vodi za piće ocjenjuje se kao znak loših higijenskih uvjeta u proizvodnji i mogućnosti fekalnog zagađanja.

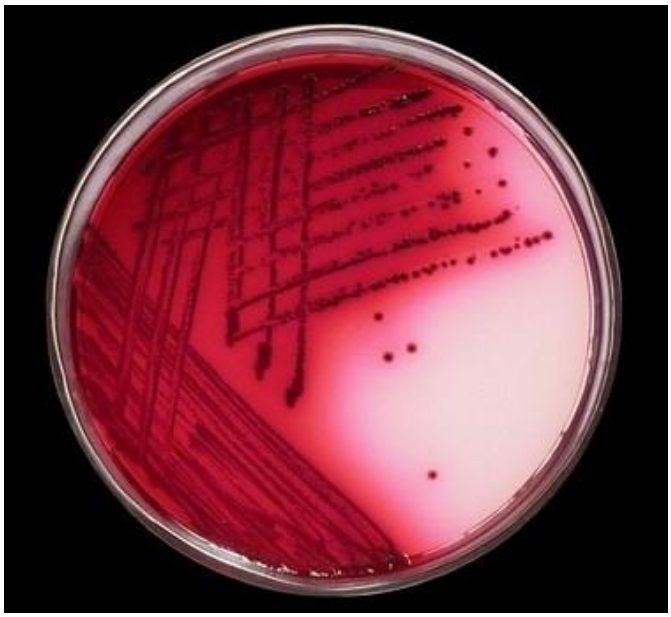
Bakterija vrste *E. coli* je gram (-) negativan, kratak štapić, i raste pojedinačno, u parovima ili nepravilnim grupama. Posjeduje flagele peritrihijalno raspoređene, što im omogućava intezivno kretanje. Pojedini sojevi posjeduju kapsule. Ne formiraju spore.

Razmnožavaju se dobro na mnogim hranjivim podlogama. Porasle kolonije na Endo agaru posjeduju karakterističan metalan sjaj. Dobro raste i na MacConkey agaru, Krvnom agaru, na temperaturi od 20-40°C. Escherichia coli je fakultativno anaerobna bakterija koja proizvodi

brojne enzime. Pomoću enzima intenzivno razlažu ugljikohidrata, škrob i bjelančevine (Brčina, 2013.).

Bakterije vrste *E. coli* su vrlo otporne i mogu mjesecima živjeti u vodi, zemljištu i na površini mnogih predmeta. Dugo mogu živjeti u raznim vrstama prehrambenih namirnica gdje se mogu razmnožavati. Povišena temperatura ih uništava. Uništavaju ih temperatura od 60°C za vrijeme od 15 minuta. Osjetljive su na neke boje i kemijska sredstva (Brčina, 2013.). U okoliš dolazi putem fecesa te na taj način može kontaminirati vodu, zemlju, voće i povrće. (Bhunia, 2008.).

Bakterija vrste *E. coli* je uvjetno patogena bakterija (oportunistička). Korisna je za domaćina jer djeluje antagonistički na razne patogene i proteolitičke bakterije. Ako dospije u druge organe izvan probavnog trakta ili preko kontaminirane hrane i vode (fekalno-oralni put), može uzrokovati različite infekcije kao što su primjerice sepsa, meningitis, infekcije urinalnog trakta i dr. jer proizvodi više vrsta toksina. (Brčina, 2013.).



Slika 6 Kolonije bakterijske vrste *Escherichia coli* na Endo agaru

(http://www.bacteriainphotos.com/agar%20cultivation%20media.html, 2015.)

2.4.3. Bakterije vrste *Staphylococcus aureus*

U bakterijskom rodu *Staphylococcus* identificirane su 23 vrste. Samo bakterijska vrsta *Staphylococcus aureus* posjeduje enzim koagulazu i naziva se koagulaza pozitivni stafilokok, dok se svi ostali nazivaju grupno koagulaza negativni stafilokoki. (Hukić, 2005.). Bakterije vrste *Staphylococcus aureus* formiraju karakteristične kolonije na površini selektivne podloge Baird-Parkerova agara. To su Gram pozitivne bakterije, koje ne proizvode spore.

Optimalna temperatura rasta je 35°C, a optimalni pH je 7,4. Raste dobro na jednostavnim hranjivim podlogama koje sadrže 7-10% NaCl (slani bujon). Ova karakteristika se koristi u diferencijaciji i izolaciji ove bakterijske vrste iz materijala koji sadrži više vrsta bakterija.

Ukoliko je *Staphylococcus aureus* prisutan u nekoj prehrambenoj namirnici moguće je da potječe sa kože, usta ili nosa osobe koja je radila sa hranom. Njeno prisustvo ili prisustvo njenih termostabilnih toksičnih tvari u prehrambenoj namirnici je znak nedovoljne higijene. Neke izolirane vrste su enterotoksične i samim time predstavljaju veliki rizik za zdravlje (Brčina, 2013.).

Prirodno stanište ove bakterijske vrste je koža i sluzokoža toplokrvnih životinja. Kod čovjeka je pronađena u nosnoj sluznici, čak u 20% do 50% populacije. Također se može izolirati iz fecesa, a pronađena je i skoro svugdje u prirodnom okolišu, zemlji, prašini, vodi i zraku (Adams i Moss, 2008.).



Slika 7 Kolonije bakterijske vrste *Staphylococcus aureus* na Baird-Parkerovu agaru

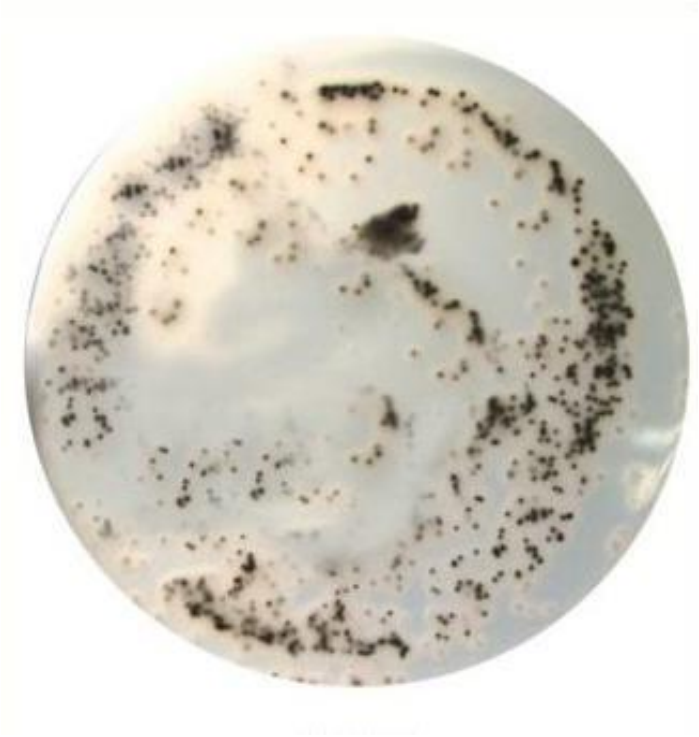
(http://foodmicrobiologee.blogspot.com/2012_08_01_archive.html, 2014.)

2.4.4. Sulfito-redukcijske klostridije

Bakterije roda *Clostridium* pripadaju u 18. grupu Bergey-eva priručnika za determinativnu bakteriologiju (Gram-pozitivni štapići i koki koji formiraju endospore). Radi se o Gram-pozitivnim sporogenim štapićima, koji kod sporulacije poprimaju oblik vretena zbog velikih endospora (lat. closter = vreteno). Obligatni su anaerobi, što znači da žive u medijima bez otopljenog kisika. Bakterije roda *Clostridium* su široko rasprostranjene u prirodi. Mnoge vrste produciraju egzotoksine i patogene su za čovjeka i životinje zbog primarne izazvane infekcije ili potencijalne apsorpcije egzotoksina.

Clostridium perfringens je jedna od čestih patogenih klostridija. Izvori zaraza (plinska gangrena, sekundarne infekcije rana, enteritis, sepsa) su probavni trakt već zaraženih životinja i ljudi. Preko fecesa dolazi u vodu, zemlju, zrak, a u organizam se unosi pasivno. Ova bakterijska vrsta je sposobna u anaerobnim uvjetima reducirati sulfit prisutan u podlozi do sumporovodika (H_2S). Stvoreni H_2S precipitirati će se sa željezom također prisutnim u podlozi i tvoriti crni talog željeznog sulfida (FeS).

http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/odgovori/odgovor258.htm , 2015.).



Slika 8 Kolonije bakterijske vrste *Clostridium perfringens* na TSC agaru

(http://www.himedialabs.com/intl/en/products/Microbiology/Media-Supplements-Identification-and-Growth-Clostridia-Clostridium-Perfringens-Supplement/Perfringens-Agar-Base-T-S-C-S-F-P--Agar-Base-M837, 2015.)

Bakterije svrstane u ovu skupinu su u mogućnosti u anaerobnim uvjetima iz sulfita redukcijom izdvojiti H_2S. Tako je spomenuta skupina i dobila naziv sulfito-redukcijske klostridije. Izdvojeni H_2S precipitirati će sa željezom u podlozi i tvoriti crni talog željeznog sulfida (FeS). Stoga će uzgojene kolonije bakterija *Clostridium* vrste u hranjivoj podlozi sulfitnog agara biti obojene crno. Od patogenih sulfito-redukcijskih klostridija poznati su još *Clostridium botulinum* koji je uzročnik botulizma i *Clostridium tetani* koji ima značajku uzrokovanja bolesti tetanus. Patogeni sojevi *Clostridium difficile* uzrokuju diareju, kolitis i slične bolesti. (http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/odgovori/odgovor258.htm, 2015.).

2.4.5. Plijesni

Gljive pripadaju grupi eukariotskih mikroorganizama, koja sadrži oko 250 000 vrsta. Mogu biti jednostanične i višestanične. One su heterotrofni mikroorganizmi. Razmnožavaju se

vegetativno stvaranjem spora ili pupanjem, a neke i diobom. Nepokretne su a oblik im je jajast ili u obliku niti. Gljive mogu tvoriti spolne i nespolne spore. Većina gljiva su saporfiti, ali ima i patogenih vrsta. Gljive ili fungi dijele se u tri empirijske grupe: plijesni, kvasci i pečurke (Duraković, 1996.).

Plijesni su velika skupina gljiva, kod kojih je tijelo građeno od gustog sustava cjevastih stanica bez klorofila (Duraković, 1996.). Zato što ne sadrže klorofil, plijesni su heterotrofi, uglavnom aerobi (Pinter, 2010.). Nitaste su građe, a niti zvane hife se isprepliću i tvore micelij. Splet micelija čini talus ili tijelo plijesni. Micelij se, kao prašnjava ili paučinasta, pahuljasta prevlaka, rasprostire po podlozi. Plijesni se klasificiraju i identificiraju kao separirane (pregrađene) i neseparirane. Separirane hife su poprečno pregrađene nitima zvanim septa, kroz čije pore struji citoplazma i stanične organele. Kod nesepariranih hifa pregrade ne postoje (Duraković, 1996.).

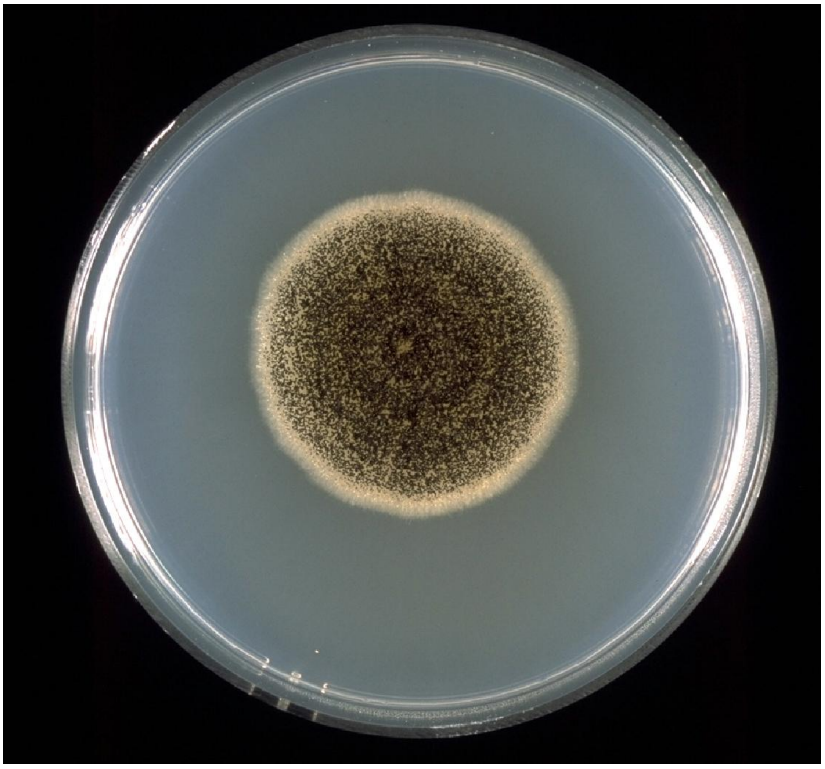
Plijesni su vrlo rasprostranjeni mikroorganizmi. Najviše naseljavaju vlažno tlo i biljke, odakle dospijevaju na plodove voća, povrća, ratarskih kultura gdje izazivaju razne nepoželjne pojave. Plijesni rastu na kruhu, voću, siru, na vlažnome tekstilu, koži, bojama, drvetu, papiru, vodi i dr. Iako se plijesni mogu upotrijebiti u raznim granama industrije, u medicini i dr., neke mogu ugroziti zdravlje ljudi i životinja (Duraković, 1996.).

Proizvode mnoštvo enzima tako što koriste ugljik iz supstrata te enzimima razgrađuju molekule supstrata u manje molekule koje stanica tada može apsorbirati. Mogu se nastaniti (kolonizirati) i rasti na različitim tipovima hrane. Postoje četiri kritična uvjeta za rast plijesni: dostupnost spora plijesni, dostupnost hrane, odgovarajuća temperatura i udio vlage. Uklanjanje bilo kojeg od navedenog, spriječit će rast plijesni. Većina plijesni raste pri sobnim temperaturama (Nujić, 2011.).

Plijesni se mogu klasificirati kao plijesni sa polja, plijesni u skladištima i plijesni uznapredovalog kvarenja. Rodovima koji najčešću rastu u uskladištenim namirnicama pripadaju *Penicillium*, *Aspregillus* i *Mucor* (Duraković i Duraković, 2001.).

Ujedno su ti rodovi plijesni najčešći proizvođači mikotoksina. Mikotoksini su sekundarni produkti metabolizma nekih vrsta plijesni. Najpovoljniji uvjeti za rast toksikotvornih plijesni i proizvodnju njihovih toksina prisutni su u tropskim predjelima zbog prikladnih klimatsko-okolišnih uvjeta, temperature i vlage. Plijesni posjeduju sposobnost proizvodnje različitih

kemijskih spojeva, od jednostavnih kiselina do složenih makromolekula. Većina plijesni opasnih za zdravlje podrijetlom je iz skladišta, iako su neki biološki aktivni produkti metabolizma plijesni s prirodnih staništa pokazali toksičan učinak na zdravlje ljudi i životinja (Šarkanj i sur., 2010.).



Slika 9 Kolonija plijesni vrste *Aspergillus niger* na PDA agaru

(http://www.pfdb.net/photo/mirhendi_h/box020909/photolist.htm, 2015.)

2.4.6. Aerobne mezofilne bakterije

U aerobne mezofilne bakterije pripada mnoštvo bakterija koje rastu pri temperaturnom rasponu od 20 do 45 °C, uz prisustvo kisika (aerobno) ili kao fakultativni anaerobi koji ne koriste kisik, ali u njegovoj prisutnosti bolje rastu. Većini ovih bakterija je optimalna temperatura 37°C (čovjekova tjelesna temperatura), što znači da skupini aerobnih mezofilnih bakterija pripada većina patogenih bakterija (Duraković, 1996). Široko su rasprostranjene jer se nalaze u zraku, vodi i ljudskom organizmu. U aerobne mezofilne bakterije ubrajamo rodove: *Pseudomonas, Legionella, Neisseria, Brucella, Staphylococcus, Streptococcus,*

Clostridium, Escherichia, Shigella, Salmonella, Proteus, Yersinia, Citrobacter, Klebsiella, Vibrio itd. (Weisglass, 1989.).

Povećan broj aerobnih mezoflinih bakterija u hrani indikator je starosti i lošije mikrobiološke kakvoće (kontaminacije i/ili početka kvarenja) (Hukić, 2005.).

2.4.7. Aerobne sporogene bakterije

Aerobne sporogene bakterije mogu preživjeti nepovoljne ekološke uvjete kao što su visoka i niska temperatura, nedostatak hranjiva, nepovoljne pH vrijednosti u okolini, prisutnost zračenja itd. jer imaju sposobnost prelaska živih stanica u konzervacione oblike zvane spore. Mnoge aerobne sporogene baketrije su uzročnici različitih bolesti. (Thomas, 1977.).

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je pripraviti kompost od otpada iz kućanstva organskog podrijetla s pomoću efektivnih mikroorganizama i u dobivenoj fermentacijskoj tekućini tzv. kompostnom „soku“ odrediti prisutnost i broj određenih mikroorganizama, te ustanoviti je li primjena efektivnih mikroorganizama imala utjecaj na sastav dobivenog soka.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Materijali

U ovom radu korišteni su slijedeći materijali:

- Mikrobiološki pripravak efektivnih mikroorganizama, proizvod tvrtke EM Tehnologija d.o.o.;
- Fermentacijska tekućina nazvana kompostni „sok“.

Aktiviranje mikrobiološkog pripravka

Navedeni pripravak radi se u sastavu kojeg čine 5% efektivni mikroorganizmi, 5% melasa šećerne trske i 90% vode. Postupak dobivanja odvija se u bioreaktoru za anaerobnu fermetaciju pri temperaturi od 34°C za vrijeme od 10 dana. Kada proizvodna smjesa postigne pH vrijednost 3.8, spremna je za primjenu. Dobiveni pripravak nanosi se na pšenične posije koje služe kao mikrobiološki nosač u omjeru 1 mL tekuće suspenzije efektivnih mikroorganizama po gramu sterilnih pšeničnih posija.

Kompostni „sok“ dobiven je kompostiranjem organskog otpada iz kućanstva u „Organko“ spremniku. Prethodno usitnjeni otpad dobiven prilikom svakodnevne priprave hrane u kućansvu (uglavnom ostaci oljuštenog voća i povrća različitih vrsta, te ljuske od jaja) slojevito je postavljan u spremnik za kompostiranje, naizmjence s EM mikrobiološkim pripravkom pšeničnih mekinja. Kada je kompostna masa počela otpuštati sok u porozno dvostruko dno, s pomoću pipca su se oduzimali uzorci dobivenog kompostnog „soka“. Kompostni „sok“ je uzorkovan jednom mjesečno tijekom pola godine, počevši u proljeće

2014. godine. Na taj način prikupljeno je pet uzoraka kompostnog „soka“ koji su čuvani pri sobnoj temperaturi godinu dana u staklenim laboratorijskim bočicama volumena 500 mL. Postupak prikupljanja kompostnog „soka“ proveden ja na isti način 2015.-te godine pri čemu je prikupljeno narednih pet uzoraka kompostnog „soka“. U proljeće 2015. godine na sličan je način pripravljena još jedna vrsta kompostnog „soka“, ali u ovom je slučaju izostavljena primjena efektivnih mikroorganizama. I ovaj puta iz kompostne mase prikupljeno je pet uzoraka kompostnog „soka“. Mikrobiološke analize sve tri vrste kompostnog „soka“ obavljale su se istodobno pri čemu su uspoređivane vrijednosti mikrobiološkog sastava uzoraka kompostnog „soka“ čuvanog godinu dana i svježeg kompostnog „soka“, koji su dobiveni s pomoću tretmana efektivnim mikoorganizama, sa vrijednostima mikrobiološkog sastava svježeg kompostnog soka dobivenog kompostiranjem bez primjene efektivnih mikroorganizama.

3.2.2. Metode

3.2.2.1. Određivanje broja efektivnih mikroorganizama u pripravcima kompostnog soka

Određivanje broja stanica kvasaca

Postupak nacjepljivanja uključuje pripravu čvrste hranjive podloge miješanjem 2 x 1 mL pripravljenih decimalnih razrjeđenja s rastaljenim i na 45 °C, ohlađenim Saboraud glukoznim agarom (Biolife, Italia). Porasle kolonije broje se nakon 3 – 5 dana inkubcije, pri temperaturi 25 °C. Broj poraslih kolonija preračunava se s pomoću formule za CFU na broj živih stanica kvasaca u 1 mL tekućeg uzorka.

$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{volumen upotrijebljenog uzorka}} * \text{recipročna vrijednost decimalnog razrijeđenja} \quad (\text{jed/mL})$$

Određivanje broja stanica bakterija mliječne kiseline

Postupak nacjepljivanja uključuje pripravu čvrste hranjive podloge miješanjem 2 x 1 mL pripravljenih decimalnih razrjeđenja s rastaljenim i na 45 °C, ohlađenim MRS agarom (DE MAN, ROGOSA i SHARPE agar) (Biolife, Italia), u dvostrukom sloju. Porasle kolonije broje se nakon 3 dana inkubcije, pri temperaturi 37 °C pri anaerobnim uvjetima. Broj poraslih kolonija preračunava se s pomoću formule za CFU na broj živih stanica bakterija u 1 mL tekućeg uzorka.

Određivanje broja stanica fotosintetskih bakterija

Postupak nacjepljivanja uključuje pripravu čvrste hranjive podloge miješanjem 2 x 1 mL pripravljenih decimalnih razrjeđenja s rastaljenim i na 45 °C ohlađenim Tripton agarom s kvaščevim ekstraktom (bez glukoze). Porasle kolonije broje se nakon 3 – 5 dana inkubcije, pri temperaturi 30 °C te pri jarkom dnevnom svijetlu. Broj poraslih kolonija preračunava se s pomoću formule za CFU na broj živih stanica fotosintetskih bakterija u 1 mL tekućeg uzorka.

3.2.2.2. Određivanje prisutnosti i broja ostalih vrsta mikroorganizama u kompostnom „soku“

Određivanje broja stanica aerobnih mezofilnih bakterija

Od pripravljenih decimalnih razrjeđenja otpipetira se u sterilnim uvjetima 2 x 1 mL uzorka u Petrijeve zdjelice koje se zaliju otopljenim i na 45 °C ohlađenim Tripton glukoza agarom s kvaščevim ekstraktom. Nacijepljena podloga se inkubira pri temperaturi 30 °C tijekom 24 – 48 sati. Broj poraslih kolonija preračunava se s pomoću formule za CFU na broj živih stanica bakterija u 1 mL uzorka.

Određivanje broja stanica aerobnih sporogenih bakterija

Po 1 mL osnovnog razrjeđenja uzorka, odnosno odgovarajućih decimalnih razrjeđenja otpipetira se u epruvetu 16 x 160 mL. Razrjeđenja se potom zagrijavaju u vodenoj kupelji pri 80 °C za vrijeme od 10 minuta. Nakon takve pasterizacije uzorci se nacijepe sa po 1 mL u

Petrijeve zdjelice koje se zaliju otopljenim i na 45 °C ohlađenim Tripton glukoza agarom s kvaščevim ekstraktom. Nacijepljena podloga se inkubira pri temperaturi 30 °C tijekom 24 – 48 sati. Broj poraslih kolonija preračunava se s pomoću formule za CFU na broj sporogenih stanica bakterija u 1 mL uzorka.

Određivanje broja spora plijesni

Postupak nacjepljivanja uključuje pripravu čvrste hranjive podloge miješanjem 2 x 1 mL pripravljenih decimalnih razrjeđenja s rastaljenim i na 45 °C ohlađenim Glukoza s kvasnim ekstraktom i kloramfenikolom agarom (Biolife, Italia). Porasle kolonije broje se nakon 3 – 5 dana inkubacije, pri temperaturi 25 °C. Broj poraslih kolonija preračunava se s pomoću formule za CFU na broj spora plijesni u 1 mL uzorka.

Određivanje sulfitoredukcijskih klostridija

Sulfit polimiksin sulfadiazin (SPS) agar (Biolife, Italia) je selektivna podloga za izolaciju sulfito-redukcijskih klostridija. Sulfitoredukcijski klostridiji na toj podlozi tvore karakteristične crne kolonije. Boja kolonija i okoliša nastaje stvaranjem željeznog sulfida. Postupak uključuje pasterizaciju odgovarajućih decimalnih razrjeđenja uzorka u vodnoj kupelji pri 80 °C za vrijeme od 10 minuta. Epruvete sa po 1 mL pasteriziranih razrjeđenja zaliju se sa SPS agarom tako da udaljenost od zatvarača epruvete ne prelazi 1 cm. Nacijepljene podloge inkubiraju se 3 – 5 dana pri 37 °C. Porast karakterističnih crnih kolonija u dubini podloge ili difuzno zcrnjenje cijele podloge, uz stvarnje plina ili bez stvaranja plina, znak je da su sulfito-redukcijski klostridiji vjerojatno prisutni.

Dokazivanje bakterijske vrste *Eschericia coli*

Prisutnost ove bakterijske vrste dokazuje se na Endo agaru (Biolife, Italija) prenošenjem 0,1 mL inokuluma iz osnovnog (10^{-1}) razrjeđenja na površinu podloge i razmazivanjem sterilnim štapićem. Nakon inkubacije od 48 sati pri 37 °C porast karakterističnih kolonija crvene boje, metalnog sjaja znak je da su bakterija vrste *Escherichia coli* vjerojatno prisutne.

Dokazivanje bakterijske vrste *Staphylococcus aureus*

Prisutnost ove bakterijske vrste dokazuje se na Baird-Parker-ovu agaru (Biolife, Italija) prenošenjem 0,1 mL inokuluma iz osnovnog (10^{-1}) razrjeđenja na površinu podloge i razmazivanjem sterilnim štapićem. Nakon inkubacije od 48 sati pri 37 °C porast sitnih crnih kolonija okruženih bijelo-sivim neprozirnim prstenom a zatim prozirnom zonom znak je da su bakterija vrste *Staphylococcus aureus* vjerojatno prisutne.

Dokazivane bakterija porodice *Enterobacteriaceae*

Dokazivanje bakterija koje pripadaju porodici *Enterobacteriaceae* odvija se s pomoću Mosselov-a bujona (EE bujon, *Enterobacteriaceae* broth Mossel bujon) (Biolife, Italija).

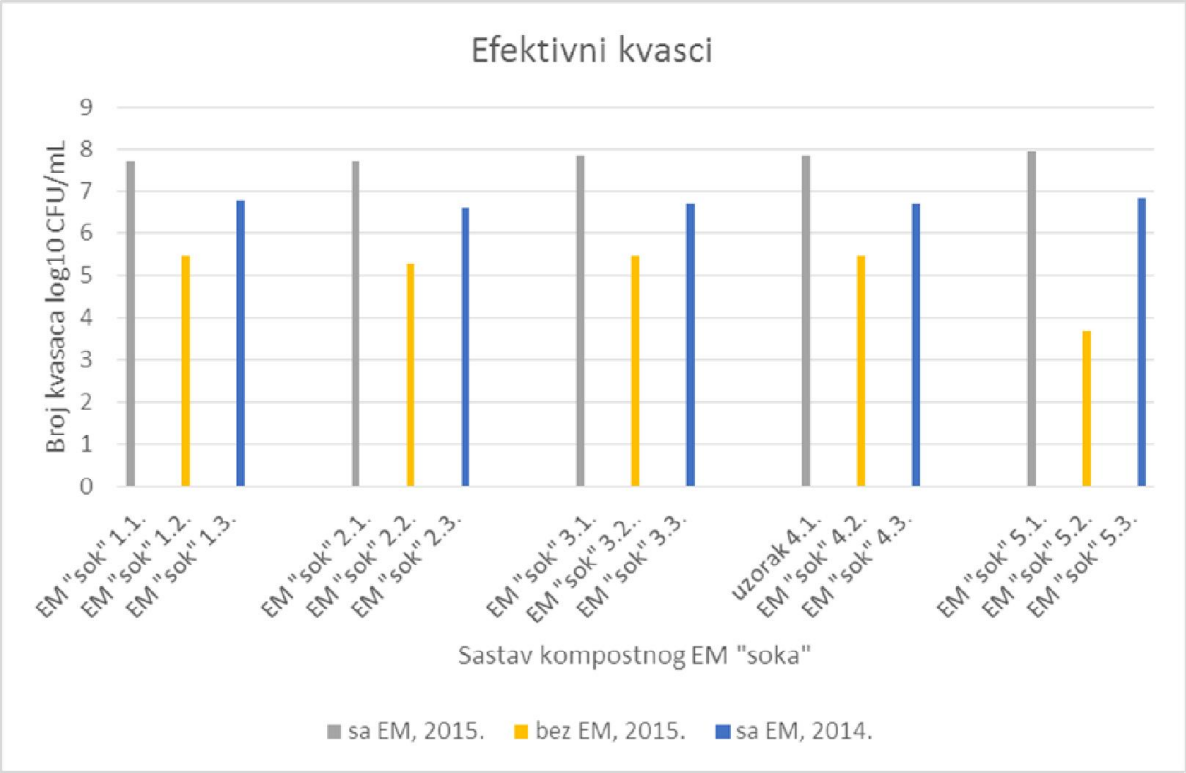
Volumen jednog mL osnovnog razrjeđenja uzorka koji se ispituje sterilno se prenese u epruvetu sa Mossel-ovim bujonom, te nakon inkubacije pri 37 °C zamućenje i/ili promjena boje bujona iz zelene u žutu znak je da su bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae* vjerojatno prisutne.

Obrada podataka

Rezultati određivanja mikrobne populacije analiziranih uzoraka obrađeni su s pomoću računalnih programa Microsoft® Office Excel 2003 za Windows (Microsoft Corporation, Redmond, SAD) i GraphPad Prism verzija 5.00 za Windows (GraphPad Software, San Diego, SAD).

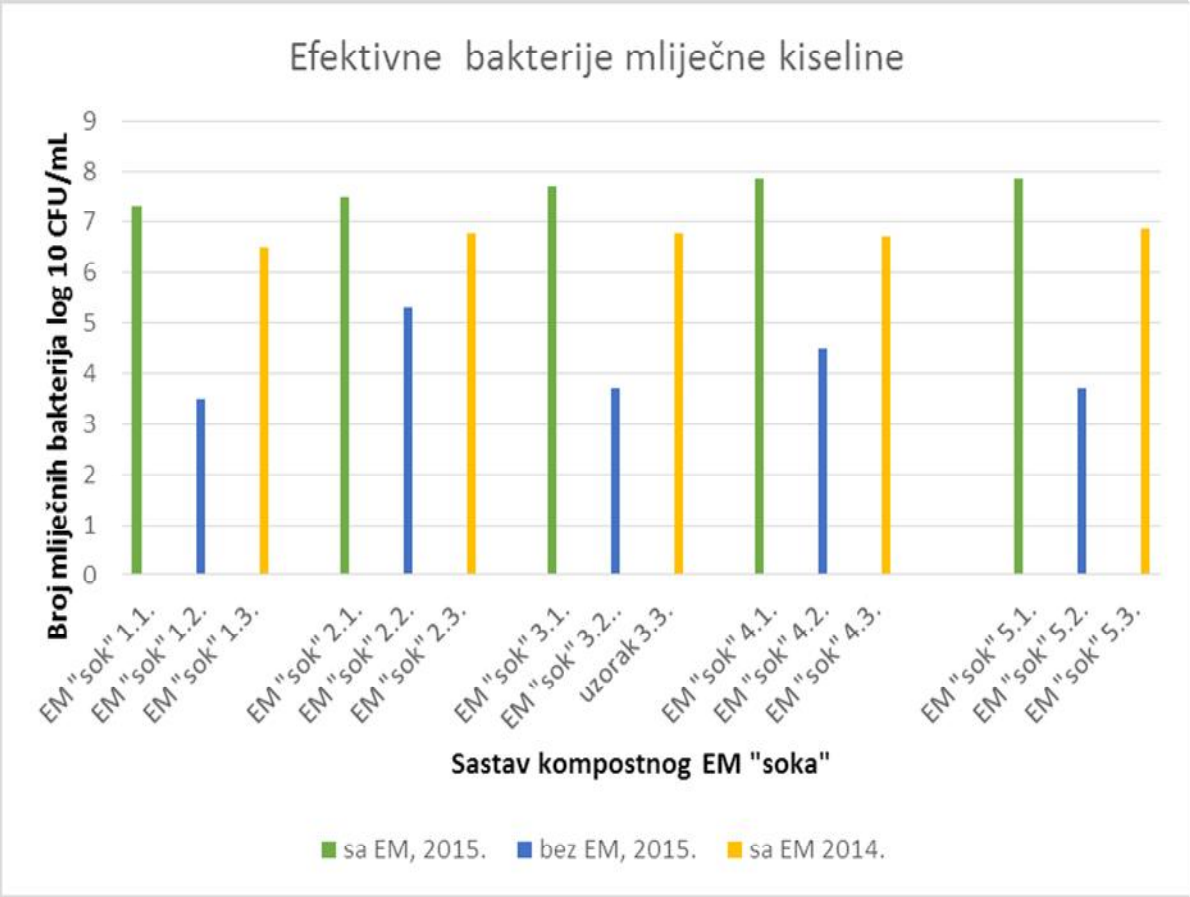
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ODREĐIVANJE BROJA EFEKTIVNIH MIKROORGANIZAMA U PRIPRAVCIMA KOMPOSTNOG „SOKA“



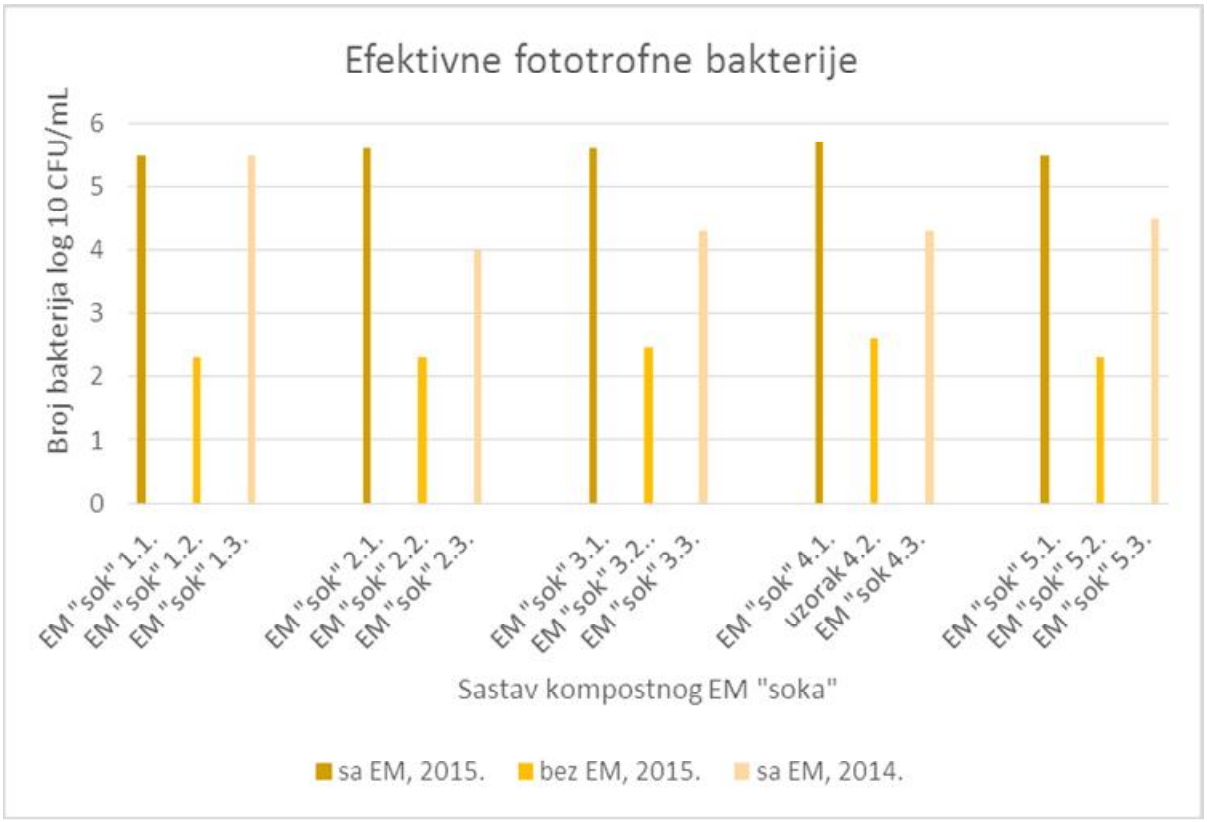
Slika 10 Brojnost efektivnih kvasaca u EM kompostnom „soku“

Broj efektivnih kvasaca u kompostnom „soku“ (Slika 10) kretao se u području reda veličine 10^7/mL u uzorcima pripravljenima 2015. godine i to najviše u uzorku broj 5.1. gdje je ta vrijednost iznosila 9 x 10^7 živih stanica efektivnih kvasaca u 1 mL pripravka. Nešto manje vrijednosti (reda veličine 10^6 zabilježene su u uzorcima kompostnog „soka“ koji su pripravljeni godinu dana ranije, tj, 2014. godine što je i logično jer su ti pripravci skladišteni pri sobnoj temperaturi godinu dana i analizirani zajedno s uzorcima iz 2015. godine. Izmjerene vrijednosti za broj efektivnih kvasaca u tim uzorcima nisu međusobno mnogo odstupale, što nije ni čudo jer su se slični procesi među mikrobnom populacijom odvijali u svih pet uzoraka za vrijeme jedne godine. Najmanje vrijednosti broja kvasaca zabilježene su u uzorcima kompostnog „soka“ 2015. godine jer u kompostnu masu nisu dodavani efektivni mikroorganizmi, primjerice uzorak br. 5.2. u kojem je ustanovljeno samo 7 x 10^3 stanica kvasaca u 1 mL.



Slika 11 Brojnost efektivnih bakterija mliječne kiseline u EM kompostnom „soku“

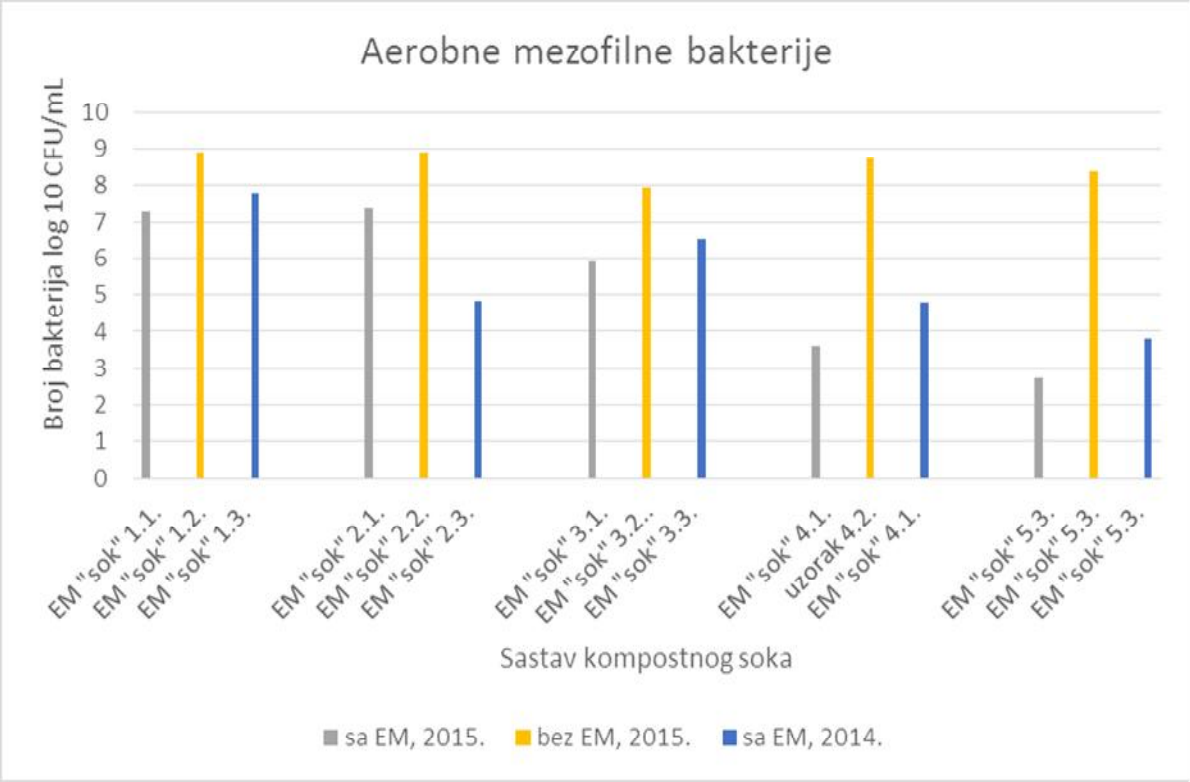
Broj efektivnih mliječnih bakterija u kompostnom „soku“ (Slika 11) kretao se u području reda veličine 10^7/mL u uzorcima pripravljenima 2015. godine i to najviše u uzorku broj 5.1. gdje je ta vrijednost iznosila 7 x 10^7 živih stanica bakterija mliječne kiseline u 1 mL pripravka. Nešto manje vrijednosti reda veličine 10^6 zabilježene su u uzorcima kompostnog „soka“ koji su pripravljeni godinu dana ranije, tj, 2014. godine što je i logično jer su ti pripravci skladišteni pri sobnoj temperaturi godinu dana i analizirani zajedno s uzorcima iz 2015. godine. Izmjerene vrijednosti za broj efektivnih mliječnih bakterija u tim uzorcima nisu međusobno mnogo odstupale međusobno iz istih razloga kao i kod kvasaca. Najmanje vrijednosti broja mliječnih bakterija zabilježene su u uzorcima kompostnog „soka“ 2015. godine jer u kompostnu masu nisu dodavani efektivni mikroorganizmi, primjerice uzorak br. 1.2. u kojem je ustanovljeno samo 5 x 10^3 stanica kvasaca u 1 mL.



Slika 12 Brojnost efektivnih fototrofnih bakterija u kompostnom EM „soku“

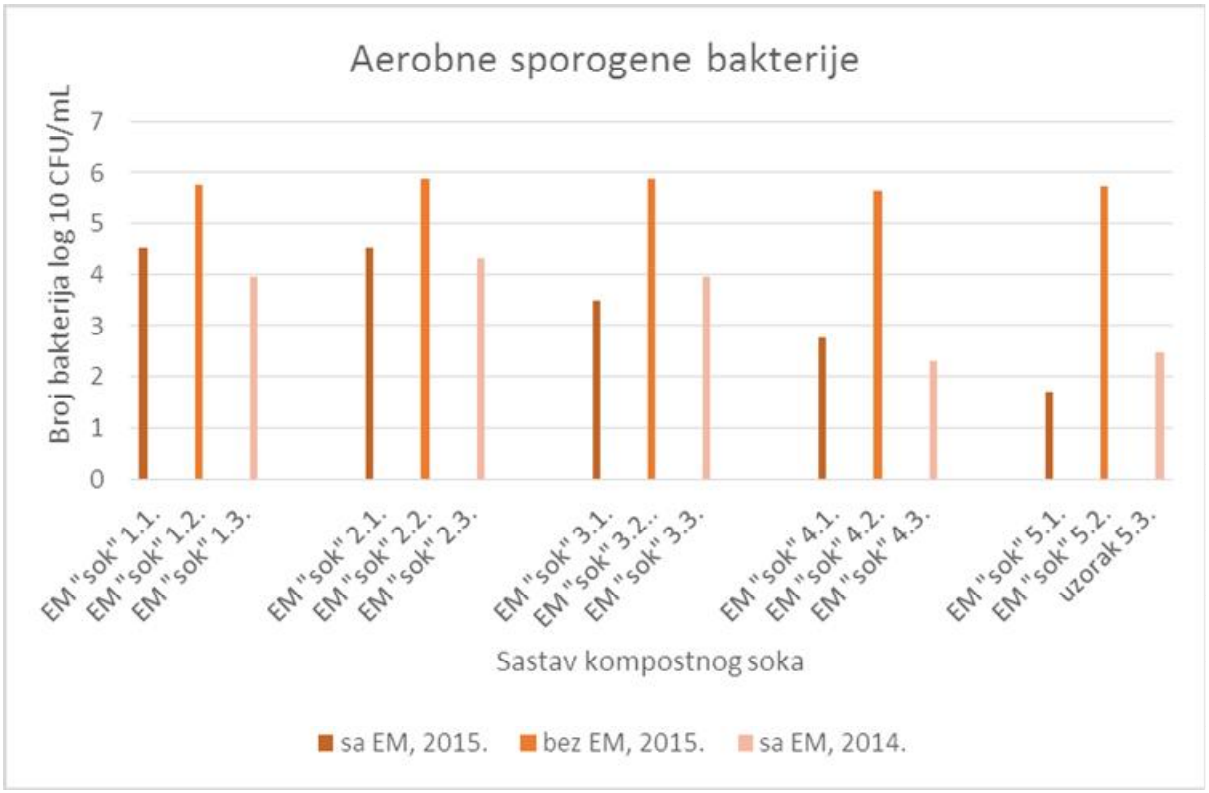
Fototrofne, zvane još i fotosintetske bakterije za svoj rast i razvoj potrebuju sunčevu svjetlost. One iz anorganskih tvari s pomoću energije sunčeve svjetlosti proizvode organske sastojke. Broj efektivnih fototrofnih bakterija u kompostnom „soku“ (Slika 12) kretao se u području reda veličine 10^5/mL u uzorcima pripravljenima 2015. godine i to najviše u uzorku broj 4.1. gdje je ta vrijednost iznosila 5 x 10^5 živih stanica efektivnih kvasaca u 1 mL pripravka. U uzorcima kompostnog „soka“ koji su pripravljeni godinu dana ranije, tj, 2014. godine izmjerena je najveća vrijednosti za broj efektivnih fototrofnih bakterija u uzorku br. 1.3. i to 6 x 10^5 živih stanica/mL dok su te vrijednosti u ostalim uzorcima imale nešto niže vrijednosti reda veličine 10^4/mL. Najmanje vrijednosti broja fototrofnih bakterija zabilježene su u uzorcima kompostnog „soka“ 2015. godine jer u kompostnu masu nisu dodavani efektivni mikroorganizmi i kretale su se između 2 x 10^2 i 5 x 10^2/mL.

4.2. ODREĐIVANJE BROJA OSTALIH VRSTA MIKROORGANIZAMA U PRIPRAVCIMA KOMPOSTNOG „SOKA“



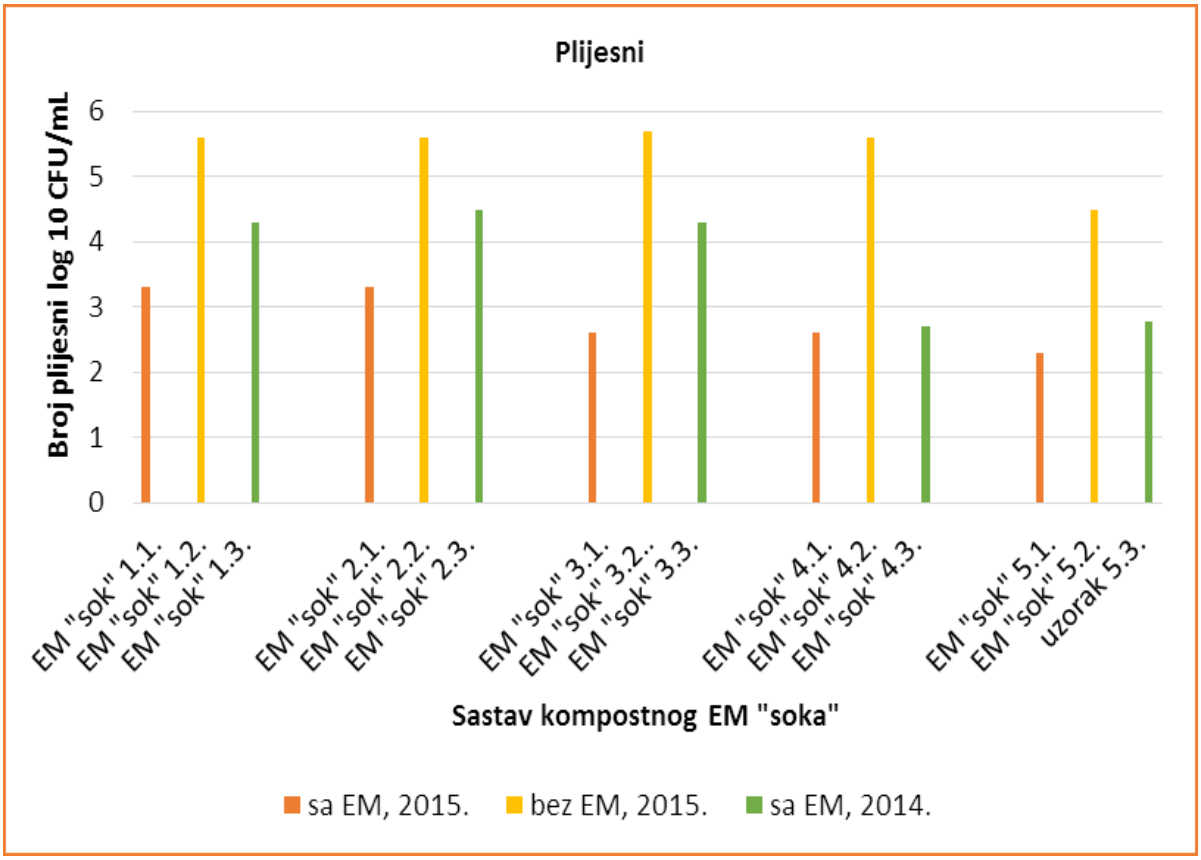
Slika 13 Brojnost aerobnih mezofilnih bakterija u kompostnom EM „soku“

Broj aerobnih mezofilnih bakterija u uzorcima dobivenog kompostnog „soka“ (Slika 13) kretao se u vrijednostima za CFU od 5 x 10^2/mL u uzorku označenom brojem 5.1. (uzorak dobiven s pomoću efektivnih mikroorganizama 2015. godine) do najveće vrijednosti u iznosu 8 x 10^8/mL u uzorku pod brojem 1.2 koji je pripravljen bez dodatka efektivnih mikroorganizama u kompostnu hrpu.



Slika 14 Brojnost aerobnih sporogenih bakterija u kompostnom EM „soku"

Kod aerobnih sporogenih bakterija također je ustanovljen obrnuti poredak po brojnosti ako bi se usporedili uzorci kompostnog soka dobiveni s pomoću efektivnih mikroorganizama i onih bez njihova djelovanja. Najveći broj CFU imao je kompostni sok dobiven bez djelovanja efektivnih mikroorganizama, primjerice uzorak broj 2.2. (8×10^5) dok je taj broj znatno manji u uzorcima kompostnog soka dobivenog s pomoću efektivnih mikroorganizama, reda veličine čak niskih 10^2/mL.



Slika 15 Brojnost plijesni u kompostnom EM „soku“

Za brojnost plijesni mogu se ustanoviti ista zapažanja kao i kod broja aerobnih mezofilnih i aerobnih sporogenih bakterija. Najveći CFU broj pokazuju uzorci kompostnog soka nastalog bez djelovanja efektivnih mikroorganizama, a najmanje ih je prisutno u uzorcima su tretirani preparatom efektivnih mikroorganizama što upućuje na zaključak da efektivni mikroorganizmi pogubno djeluju na uobičajeno prisutne i stvorene plijesni na organskim otpacima koji se raspadaju.

Određivanje prisutnosti patogenih bakterijskih vrsta

Tablica 1 Određivanje prisutnosti patogenih bakterijskih vrsta u kompostnom „soku“

Mikroorganizmi: Uzorci:	Bakterijske vrste *Escherichia coli*	Bakterijske vrste Staphylococcus aureus	Bakterijske vrste sulfitoreduk cijskih klostridija	Bakterija porodice *Enterobac teriaceae*
Kompostni „sok“ iz 2015., sa EM	-	-	-	-
Kompostni „sok“ iz 2015.,bez EM	+	+	+	+
Kompostni „sok“ iz 2014., sa EM	-	-	-	-

Ustanovljena je prisutnost bakterijskih vrsta *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i sulfitoredukcijskih klostridija te bakterija porodice *Enterobacteriaceae* samo u uzorcima kompostnog soka dobivenog bez tretmana efektivnih mikroorganizama.

5.ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. U uzorcima kompostnog „soka“ proizvedenog uz djelovanje efektivnih mikroorganizama ustanovljen je približno isti broj efektivnih kvasaca, efektivnih bakterija mliječne kiseline i efektivnih fototrofnih, odnosno fotosintetskih bakterija kao i u preparatu efektivnih mikroorganizama koji je dodavan u kompostnu masu kako bi pospješio kompostiranje.

2. Za efektivne kvasce te vrijednosti za CFU kretale su se od 5×10^7/mL do 9×10^7/mL.

3. Za efektivne bakterije mliječne kiseline te vrijednosti su se kretale od 2×10^7/mL do 7×10^7/mL.

4. Za efektivne fototrofne bakterije te vrijednosti su se kretale od 3×10^5/mL do 5×10^5/mL.

5. U preparatu efektivnih mikroorganizama koji je unesen u kompostnu masu pomoću pšeničnih mekinja bilo je standardnih 8×10^7/g efektivnih kvasaca, 5×10^7/g efektivnih bakterija mliječne kiseline i 7×10^5/g živih stanica efektivnih fototrofnih bakterija.

6. Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da kompostni „sok“ dobiven kompostiranjem s pomoću efektivnih mikroorganizama se može koristiti u iste svrhe kao i preparati efektivnih mikroorganizama koji se kupe za primjenu. Osim sličnog mikrobiološkog sastava tekući preparati efektivnih mikroorganizama imaju slična i organoleptička svojstva kao i kompostni „sok“ koji se proizvede s pomoću njih iz organskog otpada.

7. Također se može zaključiti da efektivni mikroorganizmi imaju mikrobicidna svojstva na patogene bakterije i plijesni pa iz toga proizlazi naputak da bi trebalo kompostirati sav organski otpad s pomoću efektivnih mikroorganizama i primjenjivati ga kao biološko gnojivo.

6.LITERATURA

Adams MR, Moss MO: *Food microbiology*. RSC Publishing, Cambridge, 2008.

Bacteria in photos - Bakterija vrste *Escherichia coli* na Endo agaru:

http://www.bacteriainphotos.com/agar%20cultivation%20media.html

Bhunia AK: *Fooodborne microbial pathogens: mehanisms and pathogenesis*. Springer, New York, 2008.

Brčina A: *Mikrobiološka kontrola hrane (interna skripta za učenike).* Tuzla, 2013.

Buchrieser V, Miorini T: *Osnove mikroiologije i infektologije.* Austria, 2009.

Craford J H: *Rewiew of composting*. Process Biochemistry, 18, 14-15, 1983.

Duraković S: *Opća mikrobiologija*. Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.

Duraković S*: Primijenjena mikrobiologija*. Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.

Duraković S, Duraković L: *Mikrobiologija namirnica: osnove i dostignuća*. Kugler, Zagreb, 2001.

EM tehnologija d.o.o. Valpovo:

http://emteh.hr/o-nama/(30.08.2015)

EM tehnologija d.o.o. Valpovo:

http://emteh.hr/kompostiranje-komunalnog-otpada/

EM tehnologija d.o.o. Valpovo, Organko - spremnik za kompostiranje kućanskog otpada:

http://emteh.hr/kompostiranje-kucnog-otpada/, 15.9.2015.)

EM tehnologija d.o.o. Valpovo:

http://emteh.hr/osnovno-o-tehnologiji/

EM tehnologija d.o.o. Valpovo:

http://emteh.hr/kruti-otpad/ [30.08.2015.]

Higa T: *What is EM Technology*. Okinawa, Japan: University of Ryukus, COllege of Agriculture, 1995.

Higa T, Chinen N: *EM treatment of odor, wastewater, and environmental problems*. Okinawa, Japan: Universitiy of Ryukyus, College of Agriculture, 1998.

Latin America official EM technology portal:

http://www.em-la.com/what_is_the_em_technologyyy_en.php?idioma=2 [30.08.2015.]

EMRO – EM research organization:

http://emrojapan.com/page/7-whatisem/ (15.09.2015.)

EMRO – EM research organization:

http://emrojapan.com/page/8-microorganismsinem/, (15.09.2015.)

EMRO – EM research organization:

http://emrojapan.com/page/8-microorganismsinem/, (10.09.2015.)

Food microbiology and bacteriology - Bakterija vrste *Staphylococcus aureus* na Baird Parker agaru:

http://foodmicrobiologee.blogspot.com/2012_08_01_archive.html (11.09.2015.)

Himedia - *Clostridium perfringens* na TSC agaru:

http://www.himedialabs.com/intl/en/products/Microbiology/Media-Supplements-Identification-and-Growth-Clostridia-Clostridium-Perfringens-Supplement/Perfringens-Agar-Base-T-S-C-S-F-P--Agar-Base-M837 (11.09.2015.)

Hukić M i suradnici: *Bakteriologija*, Sarajevo, 2005.

Jasna Hrenović, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Odgovori na postavljena pitanja – Biologija:

http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/odgovori/odgovor258.htm (25.08.2015.)

Kalenić S, Mlinarić-Missoni E: *Medicinska bakteriologija i mikologija*. Zagreb, 1995.

Kršev Lj: Mikrobiološki aspekti proizvodnje topljenih sireva, Zagreb, 1986.

Marriott N G, Gravani R B: *Principles of Food Sanitation*, Springer, USA, 2006.

Nujić M: *Antifugalni učinak eteričnih ulja Cinnamomum cassia, Litsea cubeba i timola na odabrane plijesni roda Penicillium*. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2011.

Nutri bits for Einstein - Kolonija mliječnih bakterija na MRS agaru:

http://nutribitsforeinstein.blogspot.hr/2010_06_20_archive.html (11.09.2015.)

Pathogenic Fungi Database - *Aspergilus Niger* na PDA agaru:

http://www.pfdb.net/photo/mirhendi_h/box020909/photolist.html (11.09.2015.)

Ružica Tomas, Primjena EM tehnologije u procesu gospodarenja organskog otpada:

http://www.candor.hr/dokumenti/up/GOSPODARENJE%20ORGANSKIM%20OTPADOM.pdf (15.09.2015.)

Sangakkara U R: *The technology of effective microorganisms*: Case studies of application . Cirencester, UK: Royal Agricultural College, 2002.

Steve Diver, Microbial Inoculants: Effective microrganisms and Indigenous microorganisms:

http://www.slideshare.net/MauraMcDW/emimo-kcsa-resilient-farmer-april-2013 (11.09.2015)

Solabia - Bakterija roda *Enterobacteriaceae* na VRBG agaru*:*

http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/SW_PROD/2534514325C567C8C12574950048C168?opendocument&LG=EN& (11.09.2015.)

Šarkanj B, Kipčić D, Vasić-Rački Đ, Galić K, Katalenić M, Dimitrov N, Klapec T: *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani.* Hrvatska agencija za hranu (HAH), Grafika d.o.o., Osijek, 2010.

Škrinjar M, Tešanović D: *Hrana u ugostiteljstvu i njeno čuvanje*. Prirodno matematički fakultet, Novi Sad, 2007.

Thomas M A: The processed cheese industry, First Ed. Derpatment of Agriculture, New South Wales,1977.

Vrsalović-Presečki A: *Studij proces pridobivanja enzima u rastućim stanicama pekarskog kvasca*. Magistarski rad, Zagreb, 2003.

Weisglass H: *Aerobni štapići i koki. U Medicinska bakteriologija, 2. izdanje*, Zagreb 1989.

Wikipedia - Kvasac roda *Candida albicans* na Sabouraud dekstroznom agaru https://en.wikipedia.org/wiki/Sabouraud_agar (11.09.2015.)