Obrada otpadne vode iz kućanstva tehnologijom efektivnih mikroorganizama

Bošnjaković, Goran

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:109:349528

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

Goran Bošnjaković

Obrada otpadne vode iz kućanstva tehnologijom efektivnih mikroorganizama

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad, 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 biotehnologija
Nastavni predmet: Opća mikrobiologija
Tema rada: Fakultetsko vijeće PTF Osijek na svojo X. sjednici u ak. 2013./2014.. godini održanoj dana 10.07.2014. prihvatilo je naslov teme diplomskog rada
Mentor: Dr.sc. Lidija Lenart,doc.
Pomoć pri izradi: Ana Škorvaga, tehnički suradnik

Obrada otpadne vode iz kućanstva tehnologijom efektivnih mikroorganizama

Goran Bošnjaković, 226-DI

Sažetak:

U radu je ispitivan stupanj mikrobiološkog onečišćenja kućanskih otpadnih voda. Mikrobiološki je analizirano 10 uzoraka otpadnih kućanskih voda, iz različitih lokacija. U uzorcima je ispitivano prisustvo aerobnih mezofilnih baketrija, bakterija porodice Enterobacteriaceae, Escherichia coli, prisustvo kvasaca, prisustvo plijesni, prisustvo Staphylococcus aureus te sulfitoredukcijskih klostridija. Nakon određenog prisustva i broja pojedinih mikroorganizama, uzorke smo tretirali s preparatom efektivnih mikroorganizama (EM AKTIV). Nakon sedam dana, određeno je prisustvo istih mikroorganizama kao u početnom uzorku. Rezultati su uspoređeni te grafički prikazani.

Ključne riječi: voda, efektivni mikroorganizmi, bakterije, kvasci, plijesni

Rad sadrži: 39 stranica
16 slika
0 tablica
0 dodataka
19 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. doc.dr.sc. Mirna Habuda — 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: 01.listopada, 2015.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATETHESIS

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: General microbiology
Thesis subject:
Mentor: Dr.sc. Lidija Lenart,doc.
Techical assistance: Ana Škorvaga, tehnical associate

Goran Bošnjaković,226-DI

Summary:

This study examines the level of microbiological contamination of household waste water. Microbiological analyzes of 10 samples of waste household water from different locations. The samples with the presence of aerobic mesophilic bacteria; Enterobacteriaceae, Escherichia coli, the presence of yeast, mold presence, the presence of Staphylococcus aureus and Clostridium bacteria. After a certain presence and the number of individual microorganisms, samples were treated with the preparation of effective microorganisms (EM AKTIV). After seven days, the presence of certain microorganisms of the same as in the original sample. The results are compared and graphically presented.

Key words:water, effective microorganisms, bacteria, yeasts, molds

Thesis contains: 38 pages
16 figures
0 tables
0 supplements
19 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. Mirna Habuda,PhD, 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 day: December, 01. 2015.

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

Prvenstveno se zahvaljujem svojim roditeljima i obitelji. Hvala vam što ste mi omogućili školovanje i uvijek mi bili podrška, što ste mi tijekom cijelog života pokazivali pravi put, ali i dali slobodu vlastitog izbora. Hvala vam na svim savjetima i ljubavi koju mi neprestano pružate.

Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Lidiji Lenart, doc. i teh. suradnici Ani Škorvaga, na strpljenju, pomoći i trudu uloženom pri izradi ovog diplomskog rada, kao i na vrlo ugodnoj suradnji.

Hvala svim djelatnicima Prehrambeno - tehnološkog fakulteta Osijek koji su mi svojim radom pomogli u stjecanju znanja, te na mnogobrojnim savjetima za daljnje učenje.

Hvala svim prijateljima i kolegama koji su me nasmijavali i učinili vrijeme provedeno na fakultetu lakšim i zabavnim.

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 3
2.1. OTPADNE VODE 4
2.1.1. Kućanske otpadne vode 4
2.1.2. Biološki postupci obrade otpadnih voda 5
2.2. TEHNOLOGIJA EFEKTIVNIH MIKROORGANIZAMA-EM TEHNOLOGIJA 7
2.2.1. Efektivni mikroorganizmi i njihova primjena 7
2.2.2. Efektivni mikroorganizmi u obradi otpadnih voda 9
2.3. AEROBNE MEZOFILNE BAKTERIJE 11
2.4. GLJIVE 12
2.4.1. Opće osobine i značaj plijesni 12
2.4.2. Kvasci 13
2.5. BAKTERIJSKE VRSTE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* 14
2.6. BAKTERIJE IZ PORODIE *ENTEROBACTERIACEAE* 15
2.7. BAKTERIJA VRSTE *ESCHERICHIA COLI* 16
2.8. SULFITO REDUKCIJSKE KLOSTRIDIJE 17
3. EKSPERIMENTALNI DIO 19
3.1. ZADATAK RADA 20
3.2. MATERIJAL I METODE 20
3.2.1. Materijal 20
3.2.2. Metode 20
3.3. OBRADA REZULTATA 22
4. REZULTATI I RASPRAVA 23
5. ZAKLJUČCI 34
6. LITERATURA 36

1. UVOD

Voda je najrasprostranjenija kapljevina (tekućina) na Zemlji i najvažnije (polarno) otapalo koje otapa kapljevine, plinove i mnogobrojne krutine. Voda zbog polarnosti posjeduje izvrstan kapacitet da otapa različite vrste tvari. Molekula vode (H_2O) sastoji se od dvaju atoma vodika i atoma kisika.

Voda je bitan sastojak živih organizama (maseni udio vode do 90%) i nužna je za život svih živih organizama. Znanstvenici tvrde da se živa bića najvećim dijelom sastoje od vode i da ona čini tri četvrtine (više od dvije trećine) ukupne površine Zemlje. Osim za piće, pripremu hrane i za pranje, voda se uvelike koristi za navodnjavanje poljodjelskoga tla. Voda kao dobro otapalo opskrbljuje biljke mineralnim tvarima i nužna je za fotosintezu. Voda nije samo otapalo u kojem funkcioniraju enzimi nego i izravni metabolit; supstrat je u svim hidrolitičkim, a nusprodukt u mnogim biosintetskim reakcijama.

Živi organizam neprekidno uzima i otpušta vodu, što se naziva ciklusom vode. Ključni je uvjet održivoga razvoja održavanje čistoće vode u prirodnim spremištima i vodotokovima. Sprječavanje zagađivanja voda najvažniji je dio zaštite okoliša.

Otpadne vode su vode s otopljenim i suspendiranim otpadnim tvarima iz domaćinstava, industrije i poljoprivrede. Sirove su otpadne vode zagađivala, koja u prirodne vode (rijeke i mora) dospijevaju sustavom kanalaili oborinskim vodama procesom ispiranja tla. Zbog složenoga sustava otpadnih voda potreban je niz postupaka za pročišćivanje, koji omogućuju ponovnu uporabu ili neopasno ispuštanje u prirodne vode.

Otpadna voda je voda uporabljena u kućanstvu, obrtu ili industriji i obično je toliko onečišćena da se ne smije ispuštati u vodene tokove bez pročišćavanja. Zagađivanje vode industrijskim otpacima stvara u novije doba veliku opasnost za održavanje biološke ravnoteže u rijekama, jezerima i morima (http://hr.wikipedia.org/wiki/Voda, 2015.).

Cilj ovog rada bio je ispitati mikrobiološku populaciju otpadnih kućanskih voda u slučajno odabranim uzorcima s različitih lokacija, koja uključuje aerobne, mezofilne bakterije (AMB), bakterije porodice *Enterobacteriaceae*, plijesni, kvasce, prisutstvo *Staphylococcus aureus* i sulfitoredukcijske klostridije. Uzorci su nakon mjerenja tretirani preparatom koji sadržava efektivne mikroorganizme.Pratile su se promjene nastale nakon tretmana efektivnim mikroorganizmima, a rezultati su prikazani kvantitativno i grafički u eksperimentalnom dijelu rada.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. OTPADNE VODE

Otpadna tvar i otpadna energija nastaju u postupcima čovjekovih djelatnosti, a za samog korisnika predstavljaju nekoristan i nepoželjan otpad. Otpadne tvari pojavljuju se u tekućem, krutom i plinovitom obliku. Otpadne tvari koje se pojavljuju u tekućem obliku nazivaju se otpadnim vodama.

Svojstva otpadnih voda razlikuju se prema podrijeklu, pa se mogu svrstati u kućanske, industrijske i poljoprivredne otpadne vode(M.Habuda; Tehnologija voda i obrada otpadnih voda, 2014.).

Kućanske otpadne vode (komunalne, gradske, fekalne) formiraju se u kućanstvima, te zdravstvenim, školskim, uslužnim, turističkim i drugim neproizvodnim objektima.

Industrijske otpadne vode prate odvijanje proizvodnih procesa. Svojstva industrijskih otpadnih voda su veoma različita i ovise o prirodi i parametrima proizvodnih procesa. Voda se u industrijskim tvrtkama koristi, kako neposredno u tehnološkim procesima i operacijama, tako i u pomoćnim operacijama. Industrijske otpadne vode mnogih industrijskih grana sadrže specifične primjese, od kojih mnoge imaju stupanj toksičnosti.

Oborinske vode ispiru zrak i površine tla (poljoprivredne, prometne) te pri tome u manjoj ili većoj mjeri bivaju zagađene. Budući da ima svojstva slabe kiseline (pH=4-5) ona je agresivna (otapa metalne dijelove vodovodnih instalacija) – trovanje živom.

Prema načinu unošenja otpadnih voda u velike sustave, razlikuju se točkasti ispust (koncentrirani-putem kanalskih ispusta) ili raspršeni ispust (oborinske vode). Nadzor je moguć samo nad točkastim ispustima (M.Habuda; Tehnologija voda i obrada otpadnih voda, 2014.).

2.1.1. Kućanske otpadne vode

Nastaju u seoskim i gradskim naseljima nastale u kućanstvima, ugostiteljskim obrtima, uslužnim i drugim neproizvodnim djelatnostima. Temeljno svojstvo kućanskih otpadnih voda je njezina biološka razgradivost. Sadrže visoke udjele organskih tvari koje se počinju razgrađivati čim dospiju u vodu.

Kućanske otpadne vode dijele se na tri kategorije:

- svježe otpadne vode; sadrže kisik,
- odstajale otpadne vode; ne sadrže kisik,
- trule vode; anaerobna razgradnja.

Sastav otpadne vode iz kućanstva je različit i ovisi o nizu čimbenika kao što su: način života, klima, vodoopskrbnim sustavima te ostalim čimbenicima. Obiluju mikroorganizmima od kojih prevladavaju bakterije i virusi. Imaju višu temperaturu u odnosu na vodovodnu vodu za 16-20 °C, što pogoduje ubrzavanju bioloških procesa (M.Habuda;Tehnologija voda i obrada otpadnih voda, 2014.).

Kućanske otpadne vode sadrže znatne količine krupne otpadne tvari kao što su papir, krpe, plastične vrećice, ostaci voća i povrća. Otpadne tvari u kućanstvu nalaze se u raspršenom koloidnom i otopljenom obliku. Približno jedna trećina od ukupnih krutina je u raspršenom obliku. Sitne čestice u koloidnom obliku čine otpadne vode izrazito mutnima. U načelu može se računati da su dvije trećine od ukupne raspršene i otopljene tvari organskog podrijekla. Organske tvari pretežno se nalaze kao bjelančevine (40-60%) i ugljikohidrati (25-50%). Najčešće se kao pokazatelj sastava kućanskih otpadnih voda upotrebljavaju biokemijska potrošnja kisika, količina raspršene tvari i sadržaj mikroorganizama fekalnog porijekla (Unizd; Onečišćenje i zaštita voda).

(http://www.unizd.hr/portals/4/nastavni_mat/2_godina/zastita_ok/predavanje_9.pdf, 2015.).

Postoje različiti postupci čišćenja otpadnih kućanskih voda: fizikalni postupci čišćenja (razrijeđenje, taloženje, cijeđenje), kemijski postupci (reakcije kisika u vodi s Fe ili Mn), te biokemijski postupci čišćenja (uz pomoć mikroorganizama) (M.Habuda;Tehnologija voda i obrada otpadnih voda, 2014.).

2.1.2. Biološki postupci obrade otpadnih voda

Mehaničkim se pročišćavanjem iz otpadnih voda uglavnom uklanja manji dio onečišćenja (krupni otpaci, brzo taložive krutine, ulja i masti), dok veći dio onečišćenja ostaje u otpadnim vodama (organske i anorganske krutine u otopljenom i koloidnom stanju, mikroorganizmi, hranjive soli, pesticidi, detergenti, otrovne i radioaktivne tvari). Za uklanjanje potonje skupine onečišćenja potrebno je primijeniti viši stupanj pročišćavanja otpadnih voda, odnosno biološko ili fizikalno – kemijsko pročišćavanje.

Za uklanjanje potonje skupine onečišćenja potrebno je primijeniti viši stupanj pročišćavanja otpadnih voda, odnosno biološko ili fizikalno – kemijsko pročišćavanje

(Sveučilište u Zagrebu, Građevinski fakultet; http://info.grad.hr/!res/odbfiles/1823/predavanja/2.6-pi.pdf, 2015.).

Sekundarna ili biološka obrada obuhvaća biološke postupke u kojima se djelovanjem mikroorganizama uklanjaju otopljeni organski sastojci i anorganski sastojci, te suspendirane čestice preostale nakon primarne obrade. U sekundarnoj obradi otpadne vode, ovisno o podrijetlu, za uklanjanje otopljenih sastojaka primjenjuju se biološki aerobni i anaerobni postupci temeljeni na različitom odnosu mikroorganizama prema otopljenom kisiku (hrcak.srce.hr/file/53001, 2015).

Biološki procesi se primjenjuju za pročišćavanje kućanskih otpadnih voda i industrijskih otpadnih voda s pretežnim udjelom organske (biološki razgradive) tvari i sa sadržajem opasnih tvari ispod kritičnih koncentracija. Pročišćavanje biološkim procesima temelji se na aktivnosti mikroorganizama koji razgrađuju mrtvu organsku tvar upotrebljavajući je kao hranu za gradnju novih stanica.

Prema količini otopljenog kisika u otpadnoj vodi i prema prilikama u staništu mogući su slijedeći procesi:

- aerobna gradnjai razgradnja stanica,
- anaerobno kiselo vrenjei metanska razgradnja,
- bakteriološka oksidacija i redukcija.

Uz razvoj mikroorganizama kao produkt bioloških procesa nastajuplinovi i nerazgradivi ostatak (Sveučilište u Zagrebu, Građevinski fakultet; (http://info.grad.hr/!res/odbfiles/1823/predavanja/2.6-pi.pdf, 2015.).

Mikroorganizmi se svrstavaju u grupe, ovisno o potrebnom kisiku:

- obvezni aerobi,
- fakultativni anaerobi,
- anaerobi,
- obvezni anaerobi.

Učinkovita provedba procesa obrade otpadnih voda ovisi o: kakvoći mikrobne biomase, aktivnosti biomase za razgradnju sastojaka koji čine onečišćenje, vrijeme provedbe procesa, koncentracija otopljenog kisika, pH-vrijednost vodenog okoliša,prisutnost sastojaka u otpadnoj vodi koji su/nisu biološki razgradljivi i drugo (hrcak.srce.hr/file/53001, 2015.)

2.2. TEHNOLOGIJA EFEKTIVNIH MIKROORGANIZAMA-EM TEHNOLOGIJA

Tehnologiju efektivnih mikroorganizama (EM tehnologiju) je razvio prof. Teruo Higa početkom '70-tih godina 20. st. na Sveučilištu Ryukyus, Okinawa, Japan. Različitim je istraživanjima ukazano na mnogobrojne mogućnosti primjene ove tehnologije kako u ekološkoj poljoprivredi i stočarstvu, tako i u obradi otpadnih voda. EM, na čijoj se primjeni bazira EM tehnologija, predstavljaju mikrobnu multikulturu anaerobnih i aerobnih beneficijskih vrsta mikroorganizama (http://www.candor.hr/dokumenti/up/GOSPODARENJE%20ORGANSKIM%20OTPADOM.pdf, 2015.).

Potpuno novi način korištenja korisnih mikroorganizama u poljoprivredi zastupa inovativna tehnologija Multikraft 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 ju 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.).

2.2.1. Efektivni mikroorganizmi i njihova primjena

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 simbiotski odnos aerobnih i anaerobnih vrsta, što je bit inovacije ove tehnologije i temelj njezinoga uspješnog djelovanja u tlu te na 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 topivi, 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 i teški se metali prevode u neutralni molekularni oblik, postaju teži od vode i s procjednim vodama iz oborina spuštaju se u dublje slojeve tla izvan zone korijenovog sustava biljaka.

Osim ovog primarnog djelovanja, efektivni mikroorganizmi svojom aktivnošću teža tla čine rahlijima, a u poroznijim i suhljim tlima povećavaju sposobnost zadržavanja vode. Također, neutraliziraju kiselost ili lužnatost tla, te sintetiziraju spojeve koji su po strukturi slični prirodnim antioksidansima (na primjer 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 antioksidacije. Slično djelovanje ispoljavaju i na ostale polutante (zagađivače) iz svojega okoliša, bilo da se oni nalaze u tlu, vodi ili u zraku (http://emteh.hr/osnovno-o-tehnologiji/, 2015.).

Tehnologija bazirana na efektivnim mikroorganizmima EM-1™ naziva se EM Tehnologija™ i kao takva se primjenjuje u preko 130 zemalja svijeta,a u 12 zemalja primjenjuje se kao državni program u ekološkom uzgoju i proizvodnji zdrave hrane. EM Tehnologiju™ mnogi smatraju i imunosistemom Zemlje jer njenom primjenom osiguravamo čiste vode,tlo i zrak te zdravi razvoj ljudskog,biljnog i životinjskog svijeta. Moguće je neutralizirati štetno djelovanje teških metala, radijacije, elektromagnetskog zračenja, štetnih isparavanja i plinova nastalih kemijskim reakcijama u otpadnim vodama, odlagalištima otpada i industriji.

EM™ živi od našeg otpada, dok mi živimo od "njihovog otpada" koji se jednostavno pretvara u zdrav okoliš za nas u kojem EM™ postaje inaktivan, dakle, može se ostvariti uzajamna suradnja. Mikroorganizmi postoje u cijeloj okolini od pukotina u stijenama pa do naših unutarnjih organa. U našem okruženju danas prevladavaju mikroorganizmi odgovorni za truljenje organske tvari koji uzrokuju bolesti u organizmima. EM™ ima potencijal da suzbija mikroorganizme uzročnike truljenja i da ovisno o uvjetima dominira u ovoj sferi te reanimira okolicu kroz proces fermentacije za razliku od procesa truljenja, a živi organizmi, kao i anorganski materijali su u tom slučaju sposobni da spriječe propadanje materijala. Pod propadanjem materijala ovdje se misli na djelovanje aktivnog kisika ili slobodnih radikala kroz koje organizam i anorganski materijali korodiraju (npr. korozija željeza). EM™ se na taj način može smatrati i kao antioksidans.

Svakako je važno napomenuti da se navedeno ne odnosi na mnoge takozvane "efektivne mikroorganizme",jer su efektivni mikroorganizmi točno definiran proizvod koji sadrži 80 raznih mikrobnih skupina i čija sinergija postiže navedene učinke dok takozvani

"efektivni mikroorganizmi" predstavljaju imitacije koje samo po boji,mirisu i izgledu sliče originalu ali nemaju sinergijski efekt originala koji im daje navedena svojstva (http://www.emtehri.com/view.asp?idp=18&c=7, 2015.).

EM tehnologija, predstavljaju mikrobnu multikulturu anaerobnih i aerobnih beneficijskih vrsta mikroorganizama koju čine sljedeće rodovi:

- BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE (BMK)- Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei, Streptococcus lactis,
- FOTOSINTETIČKE BAKTERIJE- Rhodopseudomonas palastrus, Rhodobacter spaeroides,
- KVASCI- Saccharomyces cerevisiae, Candida utilis,
- AKTINOMICETE- Streptomyces albus, Streptomyces griseus,
- PLIJESNI- Aspergillus oryzae, Mucor hiemalis.

(http://www.candor.hr/dokumenti/up/GOSPODARENJE%20ORGANSKIM%20OTPADOM.pdf, 2015.).

2.2.2. Efektivni mikroorganizmi u obradi otpadnih voda

Mikroorganizmi imaju veliku vezu s procesom pročišćavanja vode u prirodi. Čak i u najnovijim tehnologijama za pročišćavanje vode kao što je pročiščavanje s procesom aktivnim muljem mikroorganizmi igraju važnu ulogu.Moć samopročišćavanja vode radidobro u autohtonim ekosustavima koji su bogati organizmima iz piramide vodenog ekosustava. U zagađenim vodama s akumuliranim muljem na dnu i neugodnim mirisom, smanjuje se snaga samopročišćavanja kao rezultat dominacije trulih mikroorganizama. To dovodi do smanjenja prehrane potrebne da ekosustav funkcionira i zadržati svoju proces pročišćavanja.

Tretmanom zagađenih voda i i truljenja, efektivni mikroorganizmi uzimaju dominantan položaj u sloju mikroorganizama i pomožu ekosustavu da oživi te smanji mulj i neugodne mirise. Svrha uporabe efektivnih mikroorganizama nije stvoriti naizgled čistu vodu pomoću kemijskih sredstava, nego oživjeti prirodnu funkciju pročišćavanja vodenog ekosustava. U tom smislu, ovisno o preopterećenju odvodnje i volumenu vode, način i količina primjenjenih efektivnih mikroorganizama trebali bi biti različiti (http://www.emrojapan.com/application/environment/water-purification.html, 2015.).



Slika 1. Pročišćavanje otpadnih voda efektivnim mikroorganizmima. (http://www.emrojapan.com/application/environment/water-purification.html, 2015.)

Efektivni mikroorganizmi dolaze najčešće u obliku koncentrata. Kod javne odvodnje zajedničkim djelovanjem svih mikroorganizama koji čine EM grupu proizvoda, u odnosu na njihovo pojedinačno djelovanje, postiže se bolji rezultat u uklanjanju neugodnih mirisa te kod učestalih oscilacija pritoka u separatorima masnoća, kod korozije i obrade opasnih i drugih tvari. Kontinuiranim inokuliranjem sistema javne odvodnje osigurava se konstantno antikorozivno i antioksidacijsko djelovanje EM mikrobne kulture koja unutar cjevovoda i pumpi stvara zaštitni sloj, a samim tim potiče proces razgradnje onečišćenja. Budući da se tretman vrši unutarcjelokupnog sistema javne odvodnje, skraćuje se ukupno vrijeme obrade otpadnih voda (www.emplus.ba/DOC/eMB%20grupa%20proizvoda.pdf, 2015.).

U sistemima u kojima postoji biološka obrada otpadnih voda, EM tehnologija se primjenjuje u svrhu stabilizacije postojeće mikroflore aktivnog mulja dok u sistemima u kojima postoji isključivo mehanička obrada, inokulacija EM otopinom zamjenjuje biološku obradu otpadne vode (www.emplus.ba/DOC/KOMUNALNA%20DJELATNOST.pdf, 2015.).

Koncentrat predstavlja heterogenu mikrobnu kulturu unutar koje različite grupe mikroorganizama žive simbiotički i svojom aktivnošću utječu na aktivnost ostalih grupa mikroorganizama koji prebivaju u drugim staništima. Osnovu primjene EM mikrobnih vrsta predstavlja činjenica da iste proizvode različite organske kiseline, enzime i antioksidanse. Simbiozom različitih grupa mikroorganizama u EM preparatu u odnosu na zasebno djelovanje mikroorganizama i pod uvjetom pravilne primjene, postižu se vrlo korisni rezultati kod pojave neugodnih mirisa i obradi otpadnih voda (www.emplus.ba/DOC/KOMUNALNA%20DJELATNOST.pdf, 2015.).

Kod kućanstava, u sifonima i cjevovodima pojavljuju se neugodni mirisi, od kojih su osobito neugodni amonijak i sumporovodik (NH3 i H2S), koji se mogu u vrlo kratkom vremenskom periodu, ukloniti primjenom eMB® biotehnološke linije proizvoda. Fermentativni mikroorganizmi iz eMB® biotehnološke linije proizvoda, potiskuju sulfit-reducirajuće bakterije koje stvaraju većinu neugodnih mirisa, te one više nisu u stanju proizvoditi sumporovodik. Redovitom primjenom eMB® biotehnološke linije proizvoda na cjevovodima se nacjepljuju bakterije i stvaraju "film", te spriječavaju pojavu neugodnih mirisa i ujedno vrše antikorozivnu i antioksidativnu zaštitu cijelog sustava odvodnje.

Doziranje

- kod slabijeg intenziteta neugodnih mirisa

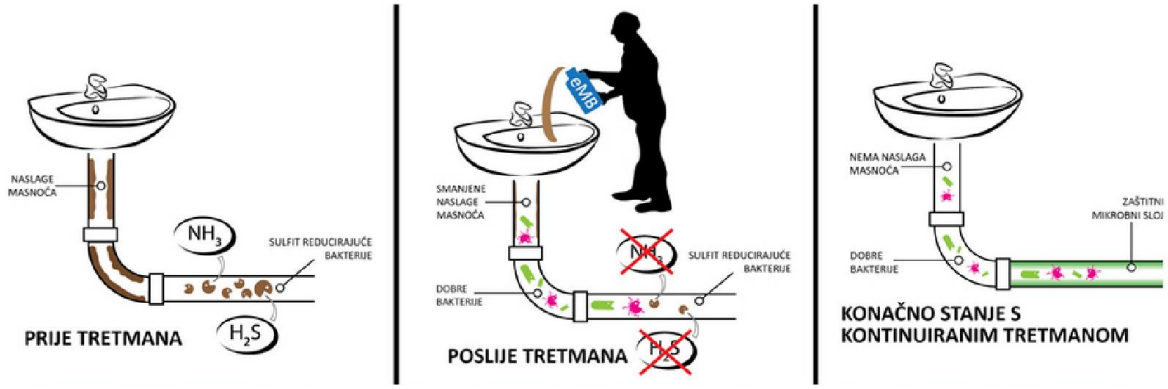
  (0,1 litra eMB AKTIV-a + 1 litra vode)

- kod jačeg intenziteta neugodnih mirisa

  (0,2 litre eMB AKTIV-a + 1 litra vode)

Način primjene

eMB AKTIV potrebno je razrijediti s vodom (ovisno o intenzitetu neugodnih mirisa). Razrijeđenu smjesu uliti u sifone i cjevovode. Ovu smjesu potrebno je potrošiti u roku od 3 dana. Ukoliko se neugodni mirisi javljaju učestalije, potrebno je povećati broj tretmana (http://emteh.hr/kucanstva/, 2015.).



Slika 2. Prikaz načina upotrijebe i djelovanja eMB AKTIV-a.
(http://emteh.hr/kucanstva/, 2015.)

2.3. AEROBNE MEZOFILNE BAKTERIJE

Riječ "aerobne" znači da bakterije rastu u prisustvu zraka, a "mezofilne" da im je optimalna temperatura za razvoj od 20 do 45°C. one se inače nalaze u zraku, vodi, ljudskom organizmu. Većini ovih bakterija je optimalna temperatura 37°C (čovjekova tjelesna temperatura), što znači da skupini aerobnih mezofilnih bakterija pripada većina patogenih

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

2.4. GLJIVE

Gljive pripadaju grupi eukariotskih mikroorganizama, koja sadrži oko 250 000 vrsta. Mogu biti jednostanične i višestanične. One su heterotroni organizmi. 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.).

2.4.1. Opće osobine i značaj plijesni

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 (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, a tako i u namirnice. Plijesni rastu na kruhu, voću, siru, na vlažnome tekstilu, koži, bojama, drvetu, papriu, 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 uvijeta 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.).

Mogu se klasificirati kao plijesni sa polja, plijesni u skladištima i plijesni uznapredovalog kvarenja. Rodovima koji najćešću rastu u uskladištenim namirnicama pripadaju *Penicillium*, *Aspregilus* i *Mucor* (Duraković i Duraković, 2001.).

Ujedno su ti rodovi plijesni najčešći proizvođači mikotoksina. Mikotoksini su toksični sekundarni produkti metabolizma nekih vrsta plijesni. Najpovoljniji uvijeti za rast toksikotvornih plijesni i proizvodnju njihovih toksina prisutni su u tropskim predjelima zbog prikladnih klimatsko-okolišnih uvijeta, 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.).

2.4.2. Kvasci

Kvasci pripadaju carstvu Fungi, zajedno sa plijesnima i mesnatim gljivama. Kvasci zasigurno po brojnosti čine ekonomski najznačajniju skupinu mikroorganizama (Vrsalović-Presečki, 2003.).

Poput plijesni, kvasci se također mogu prenositi zrakom, vodom ili na drugi način i tako dospjeti na površinu namirnica ili u samoj vodi. Kolonije kvasca su uglavnom vlažne ili mukozne po izgledu i blijedo žute boje. Kvascima najviše odgovara aw od 0,90 do 0,94, ali mogu rasti i ispod 0,90. Točnije, neki osmofilni kvasci mogu rasti čak i na aw od 0,60. Ovi mikroorganizmi najbolje rastu u kiseloj pH koja se kreće od 4,0 do 4,5 (Marriott i Gravani, 2006.).

Većina njih nije štetna po ljudsko zdravlje. Neki od njih koriste se kao radni mikroorganizmi ili starter kulture u prehrambenoj industriji, npr. u proizvodnji pekarskih i konditorskih proizvoda, piva i dr. Ova grupa mikroorganizama sadrži mnogobrojne rodove. Najveća pažnja posvećena je sljedećim rodovima: Candida, Saccharomyces i Rhodotorula (Škrinjar i Tešanović, 2007).

Neki od patogenih kvasaca: Candida albicans, Cryptococcus, Blastomyces, Histoplasma.

Za ljude su oni, s jedne strane od gospodarske važnosti ali također mogu biti uzročnici bolesti (općenito kod osoba sa slabim imunološkim statusom). Najpoznatiji kvasac u medicini je Candida albicans, koji uzrokuje kandidijazu. Ova gljiva često naseljava područja nosa, grla i usta i živi tamo bez izazivanja bolesti, ali isto tako može izazvati gljivične infekcije (“oralni osip”, “pelenski osip”) osobito kod dojenčadi (Buchrieser i Miorini, 2009.).

Candida albicans je pripadnik normalne fiziološke flore čovjeka. Manifestira se različitim kliničkim slikama. Infekcija može biti ograničena na sluznicu ili kožu ili može zahvatiti jedan ili više unutarnjih organa. Kanidioza usne šupljine javlja se često u novorođenčadi u prvim tjednima poslije rođenja te u odraslih s hormonalnim i imunološkim

poremećajima. Očituje se bijelim naslagama na jeziku, ždrijelu i sluznici obraza. Kanidioza jednjaka, želuca i crijeva razvija se često u osoba s malignim bolestima. Kanidioza rodnice javlja se češće u žena sa šećernom bolešću, u trudnoći i nakon lječenja antibioticima. Prisutan je bijel, sirast iscjedak i jak svrbež (Kalenić i Mlinarić, 1995.).



Slika 3. Kvasac roda Candida albicans na Sabouraud dekstroznom agaru (http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2009/12/candida-albicans.html, 2015.)

2.5. BAKTERIJSKE VRSTE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

U rodu *Staphylococcus* identificirane su 23 vrste. Samo*Staphylococcus aureus* posjeduje enzim koagulazu i naziva se koagulaza pozitivni *Staphylococcus*, dok se svi ostali nazivaju grupno koagulaza negativni *Staphylococcus* i označava se kao KNS (Hukić, 2005.). *Staphylococcus aureus* gormiraju karakteristične kolonije na površini selektivne podloge oblika koka u grozdovoima. Gram su (+) pozitivne bakterije, nepokretne, ne proizvode spore, a ponekad proizvode kapsule.

Fakultativno je anaerobna bakterija. Bolje raste u uvjetima povećanog parcijalnog tlaka CO_2 (5-10%). 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 izolaziciji *Staphylococcusa* iz materijala koji sadrži više vrsta bakterija. Kolonije su obično neprozirne, okrugle, glatke, uzdignute. Mogu biti pigmentirane, tako da se razlikuju zlatno-žute, svijetlo žute (boje krema) i bijele. Na krvnom agaru se oko kolonije stara uža ili šira zona β-hemolize. Samo mali postotak sojeva je nehemolitičan.

Ukoliko je *Staphylococcus aureus* prisutan u nekoj prehrambenoj namirnici moguće je da potječe iz koše, usta ili nosa osobe koja je radila sa hranom. Njeno prisustvo ili prisustvo

njenih termostabilnih toksičnih susptanci u prehrambenoj namirnici je znak nedovoljne higijene. Neke izolirane vrste su enterotoksične i samim time predstavljaju veliki rizik za zdravlje (Brčina, 2013.).

Prirodno stanište joj 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 4. Bakterija vrste Staphylococcus aureus na Baird Parker agaru (http://foodmicrobiologee.blogspot.com/2012_08_01_archive.html, 2015.)

2.6. BAKTERIJE IZ PORODIE *ENTEROBACTERIACEAE*

Bakterije iz 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 su najvažnije *Salmonella* i *Shigella*, koji su glavni zročnici 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.

Eterobakterije 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*

(patogen), *Escherichia* (potencijalni patogen), *Shigella* (patogen), *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.).

2.7. BAKTERIJA VRSTE *ESCHERICHIA COLI*

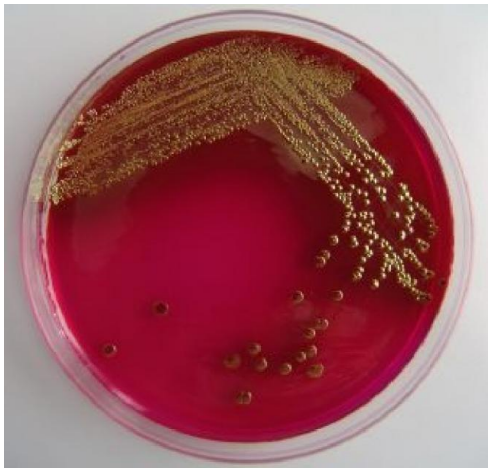
Bakterija vrste *Escherichia coli* je raširena u prirodi, u zemlji, u vodi, u probavnom traktu ljudi i životinja, odakle u okoliš dolazi preko fekalija. U crijevima imaju značajnu ulogu u probavi, vršeći razlaganje ugljikohidrata i bjelančevina. Proizvodi neke vitamine iz grupe B (B12) i K vitamin i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

Bakterija vrste *E.coli* je gram (-) negativan, kratak štapić, pojedinačan, 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. Izrasle 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 proivodi brojne enzime. Pomoću enzima intenzivno vrše razlaganje ugljikohidrata, škroba i bjelančevina (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 se na temperaturi od 60°C za 15 minuta. Osjetljive su na neke boje i kemijska sredstva (Brčina, 2013.).U okoliš dolazi putem fecesa i može kontaminirati vodu, zemlju, voće i povrće u kojima se može pronaći čak i unutar tkivnih stanica (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 kontaminiriane hrane i vode (fekalno-oralni put), može uzrokovati različite infekcije: sepsa, meningitis kod beba, infekcije urinalnog trakta i dr. jer proizvodi više vrsta toksina. Uzrokuje entrokolitis: dijarejno oboljenje, koje može biti i smrtonosno, naročito kod male djece i mladih životinja (Brčina, 2013.).

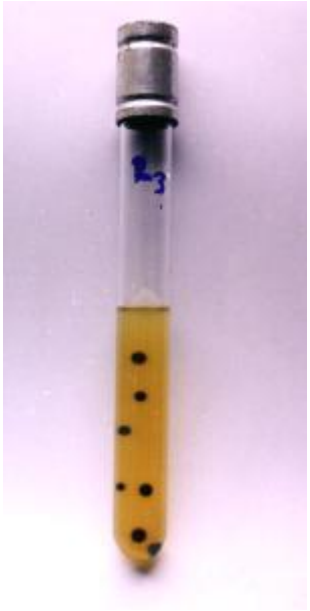


Slika 5. Bakterija vrste Escherichia coli na Endo agaru (http://www.freeimages.com/photo/1018465, 2015.)

2.8. SULFITO REDUKCIJSKE KLOSTRIDIJE

Bakterije roda *Clostridium* spadaju u 18. grupu Bergey-evog 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 (gasna 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. Vrsta *C. perfringens* se selektivno uzgaja na tripton-sulfit-neomicin (TNS) agaru na 46 °C/18 h. Vrsta *C. perfringens* je sposobna u anaerobnim uvjetima reducirati sulfit prisutan u podlozi do sumporovodika (H2S). Stvoreni H2S precipitirati će se sa željezom također prisutnim u podlozi i tvoriti crni talog željeznog sulfida (FeS). Stoga će kolonije *C. perfringens* u epruvetama s TSN podlogom biti obojene crno, trodimenzionalne, ovalnog oblika. Dodatak neomicina, polimiksina i uzgoj na temperaturi višoj od 36 °C inhibirati će razvoj ostalih sulfit-reducirajućih klostridija, te omogućiti selektivni porast vrste *C. perfringens* (http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/odgovori/odgovor258.htm, 2015).



Slika 6. Prikaz sulfito-reducirajućih klostridija u dubokom sulfitnom agaru (http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/odgovori/odg-slike/odg258-4.jpg, 2015.)

Širok rang klostridija (osim spomenutog *C. perfringens*) sposoban je u anaerobnim uvjetima iz sulfita producirati H2S - od tuda dolazi i naziv sulfit-reducirajuće klostridije za cijeli rod *Clostridium*. Za uzgoj šireg spektra sulfit-reducirajućih kolstridija koristi se SPS agar (Perfringens selektivni agar po Angelotti-u). Inkubacija uzoraka provodi se na 35 °C/24-48 h, što omogućava razvoj širokog spektra klostridija uključujući i *C. perfringens*. Stvoreni H2S precipitirati će se sa željezom u podlozi i tvoriti crni talog željeznog sulfida (FeS). Stoga će kolonije klostridija u epruvetama s SPS podlogom također biti obojene crno. Rast drugih sulfit-reducirajući mikroorganizama (koji nisu iz roda *Clostridium*) inhibiran je polimiksinom i sulfadiazinom.

Od patogenih sulfit-reducirajućih klostridija poznati su još *C. botulinum* - uzročnik botulizma i *C. tetani* - uzročnik tetanusa. Patogeni sojevi *C. difficile* uzrokuju (zbog prisutnih toksina) diareju, kolitis i nozokomijalne infekcije nakon terapije antibioticima, koji naruše sastav normalne crijevne flore (http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/odgovori/odgovor258.htm, 2015.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK RADA

Zadatak rada bio je ispitati mikrobiološku populaciju otpadnih kućanskih voda (10 uzoraka) iz domaćinstava prije i nakon tretmana istih s preparatom EM (efektivnih mikroorganizama) te usporediti promjenu u broja početne mikrobiološke populacije i one nakon tretmana. Uzorci otpadnih kućanskih voda su prikupljeni s različitih lokacija (domaćinstava). Ukupno je prikupljeno i analizirano 10 uzoraka. Pored samih uzoraka i njihovog tretmana preparatom koji sadrži EM, analizirano je i djelovanje i razgradnja masti (ulja), škroba, ugljikohidrata i celuloze. U uzorcima je određen, prije i nakon tretmana EM, broj aerobnih, mezofilnih bakterija (AB), aerobnih, sporogenih bakterija (ASB), bakterija porodice *Enterobacteriaceae* (E), plijesni (P), kvasaca (K), prisutnost *Staphylococcus aureus*, te sulfitoredukcijske klostridije.

3.2. MATERIJAL I METODE

3.2.1. Materijal

Uzorci otpadnih kućanskih voda prikupljeni su iz različitih kućanstava. Uzorci su prikupljani iz cjevovoda te odvoda u kuhinjama, gdje se određeno vrijeme prije prikupljanja uzoraka nije provodilo nikakvo kemijsko čišćenje ili primjenjivala kemijska sredstva za čišćenje i pranje. Uzorci su prikupljeni u plastične boce. Ukupno je prikupljeno 10 različitih uzoraka otpadnih kućanskih voda.

Preparat s efektivnim mikroorganizmima kojimsu prikupljeni uzorci tretirani uzet je u EM-TEH d.o.o. Valpovo.

3.2.2. Metode

Uzorci u bocama su promješani, te je u sterilnim uvjetima pomoću pipete u epruvetu preneseno 1 mL pojedinačnog uzorka u 9 mL sterilne fiziološke otopine (osnovno razrijeđenje 10^{-1}). Epruveta je zatvorena i homogenizirana u trajanju od 5 sekundi na uređaju za homogenizaciju (Vortex). Nakon homogenizacije, iz osnovnog razrijeđenja u sterilnim uvjetima prenesen je 1 mL u novu epruvetu s 9 mL sterilne fiziološke otopine te napravljeno razrijeđenje 10^{-2}koje je homogenizirano. Sljedeći takav postupak za svaki uzorak napravljena su razrijeđenja od 10^{-1} do 10^{-6}. Iz pripremljenih razrijeđenja odredili smo mikrobiološku populaciju uzoraka. Nakon provedenih analiza mikrobiološke populacije uzoraka, pojedinačni uzorci su tretirani s EM AKTIV-om. U Erlenmeyerovu tikvicu dodano je 100 mL uzorka vode i 10 mL EM AKTIV-a te je dobro začepljeno. Promješano je i ostavljeno 7 dana na 25°C nakon čega su pripremljena odgovarajuća razrijeđenja te je određena mikrobiološka populacija tretiranih uzoraka.

Aerobne mezofilne bakterije

Preneseno je 1 mL inokuluma razrijeđenja 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} u sterilne, prazne petrijeve zdjelice. U zdjelice je uliven Tryptic Glucose Yeast Agar (TGK; Biolife, Italija), otopljen i ohlađen na 55 °C. Nakon ulijevanja i homogenizacije, uzorci su inkubirani u termostatu pri 28 °C tijekom 7 dana. Nakon inkubacije se pratilo da li je došlo do porasta kolonija mezofilnih bakterija, te su prebrojane. Njihov broj je preračunat prema sljedećoj formuli (te je preračunat na 1mL):

$$\boldsymbol{CFU = \frac{broj\ poraslih\ kolonija\ \times\ recipročna\ vrijednost\ razrjeđenja}{volumen\ istraživanog\ uzorka\ inokuluma}}$$

CFU (Colony Forming Units/broj živih stanica)

Plijesni i kvasci

Broj kolonija plijesni određen je prenošenjem 1 mL inokuluma pripadajućeg razrijeđenja (10^{-1},10^{-2},10^{-3}) u sterilne petrijeve zdjelicu i ulijevanjem Czapekovog agara koji je prethodno rastopljen i ohlađen na 45 °C u vodenoj kupelji. Kvasci su se određivali na isti način, s time da se koristio Sabouraud dekstrozni agar. Nakon inkubacije od 7 dana pri 25 °C, prebrojane su porasle kolonije plijesni. Njihov broj je preračunat prema gore spomenutoj formuli za CFU (kao i za aerobne mezofilne bakterije), te je rezultat preračunat po 1mL.

Bakterije vrste Staphylococcus aureus

Prisutnost i broj bakterija vrste Staphylococcus aureus određena je na Baird Parker-ovom agaru (Biolife, Italija) prenošenjem 0,1mL inokuluma iz razrijeđenja 10^{-1} na površinu podloge i razmazivanjem sterilnim štapićem. Nakon inkubacije od 48 sati pri 37 °C se pratilo da li je došlo do porasta ove vrste bakterija koja na Baird Parker-ovom agaru raste u vidu sitnih crnih kolonija okruženih bijelo-sivim neprozirnim prstenom a zatim prozirnom zonom. Njihov broj je preračunat prema spomenutoj formuli za CFU, te je rezultat preračunat po 1 mL.

Bakterije porodice Enterobacteriaceae

Preneseno je 1 mL inokuluma iz osnovnog razrijeđenja u epruvetu s 10 mL Mossel-ovog bujona za enterobakterije (Mossel Bujon; Biolife, Italija). Nakon inkubacije od 24 sata pri 37 °C, bujon koji se zamutio i/ili promjenio boju iz zelene u žutu dokaz je prisutnosti bakterija porodice Enterobacteriaceae. Za određivanje broja bakterija vrste Enterobacteriaceae preneseno je 0,1 mL razrijeđenja 10^{-1} na VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar). Nakon ulijevanja i homogenizacije, uzorci su inkubirani na 28°C tijekom 7 dana. Nakon inkubacije se pratilo da li je došlo do porasta kolonija, te su prebrojane. Njihov broj je preračunat po 1 mL.

Bakterije vrste Escherichia coli

Prisutnost i broj bakterija vrste Escherichia coli određena je na Endo agaru (Biolife, Italija) prenošenjem 0,1mL inokuluma iz razrijeđenja 10^{-1} na površinu podloge i razmazivanjem sterilnim štapićem. Nakon inkubacije od 24 sata pri 37 °C, bakterije ove vrste tvore crveno obojene kolonije metalnog sjaja. Porasle kolonije se provjeravaju biokemijskim testovima. Njihov broj je preračunat prema spomenutoj formuli za CFU, te je rezultat preračunat po 1 mL (Pitt i Hocking, 1997.;Klix,2002.).

Sulfitoredukcijske klostridije

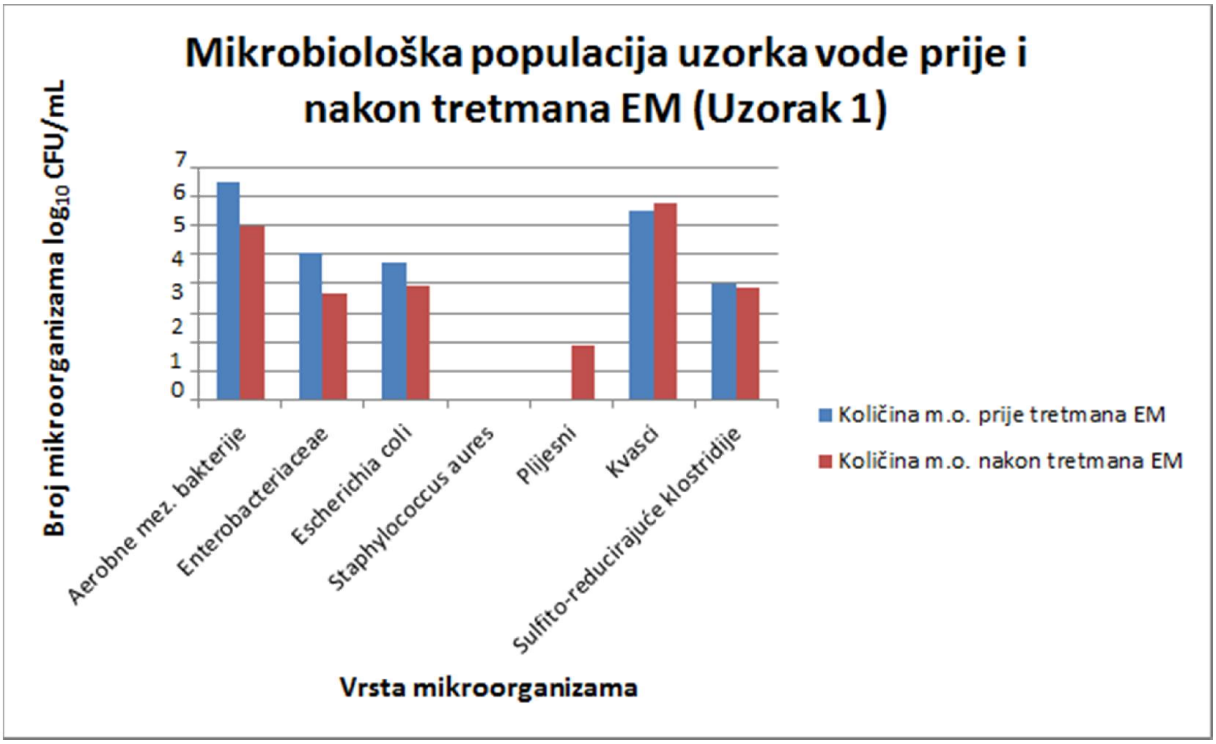
Izolaciju sulfitoredukcijskih klostridija obavili smo prenošenjem razrjeđenja 10^{-1}, poslije pasterizacije na 80°C u trajanju od 10 minuta, u epruvoetu s dubokim sulfitnim agarom (ohlađenim na 50°C). Podloga se inkubira 3 do 5 dana na 37°C. U anaerobnim uvjetima porasle karakteristične crne kolonije u dubini agara, pregledavaju se mikroskopski, pa se kao sulfitoredukcijske klostridije identificiraju G pozitivini, sporogeni štapići. Sulfitoredukcijske klostridije reduciraju natrijev sulfit (Na_2SO_3) u natrijev sulfid (Na_2S) koji u reakciji s $FeCl_2$ tvori željezni sulfid (FeS). Ovaj spoj oboji kolonije sulfitoredukcijskih klostridija u crno. Broj poraslih sulfitoredukcijskih klostridija preračunat je prema formuli za CFU, te je rezultat preračunat po 1mL.

3.3. OBRADA REZULTATA

Rezultati rada obrađeni su uz pomoć računalnih programa Microsoft® Office Excel 2010 za Windows, Microsoft Corporation, Redmond, SAD i GraphPad Prism verzija 5.00 za Windows, GraphPad Software, San diego, SAD.

4. REZULTATI I RASPRAVA

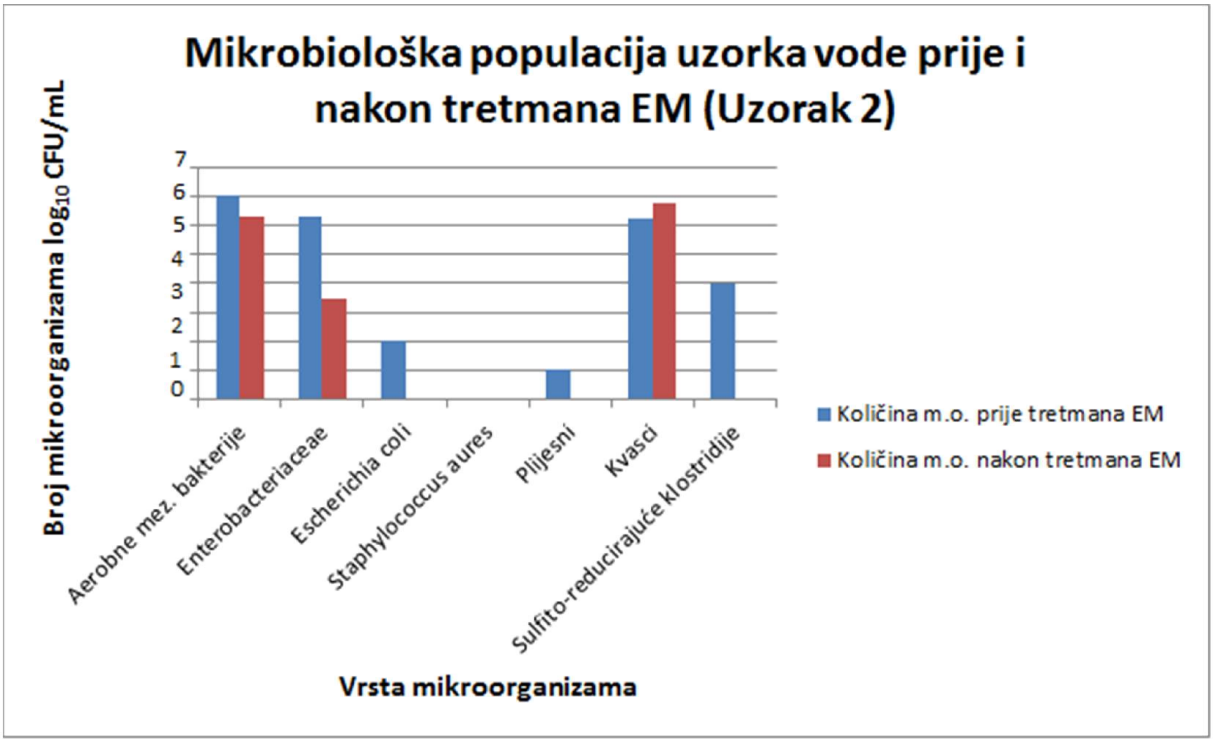
UZORAK 1



Slika 7. Mikrobiološki sastav otpadne vode (uzorak 1)

U uzorku označenom brojem 1 u otpadnoj vodi iz kućanstva bilo je 3 x 10^7 /mL aerobnih mezofilnih bakterija, 1,2 x 10^5/mL enterobakterija, 5 x 10^4 /mL bakterija vrste *Escherichia coli*, 3,1 x 10^6 /mL kvasaca i više od 10^4/mL sulfito-redukcijskih klostridija. Nakon tretmana vode s pomoću efektivnih mikroorganizama te vrijednosti su se uglavnom smanjile. Aerobnih mezofilnih bakterija bilo je 9 x 10^5/mL, enterobakterija 5 x 10^3/mL, *Escherichie coli* 9 x 10^3/mL i 7 x 10^3/mL sulfitoredukcijskih klostridija.

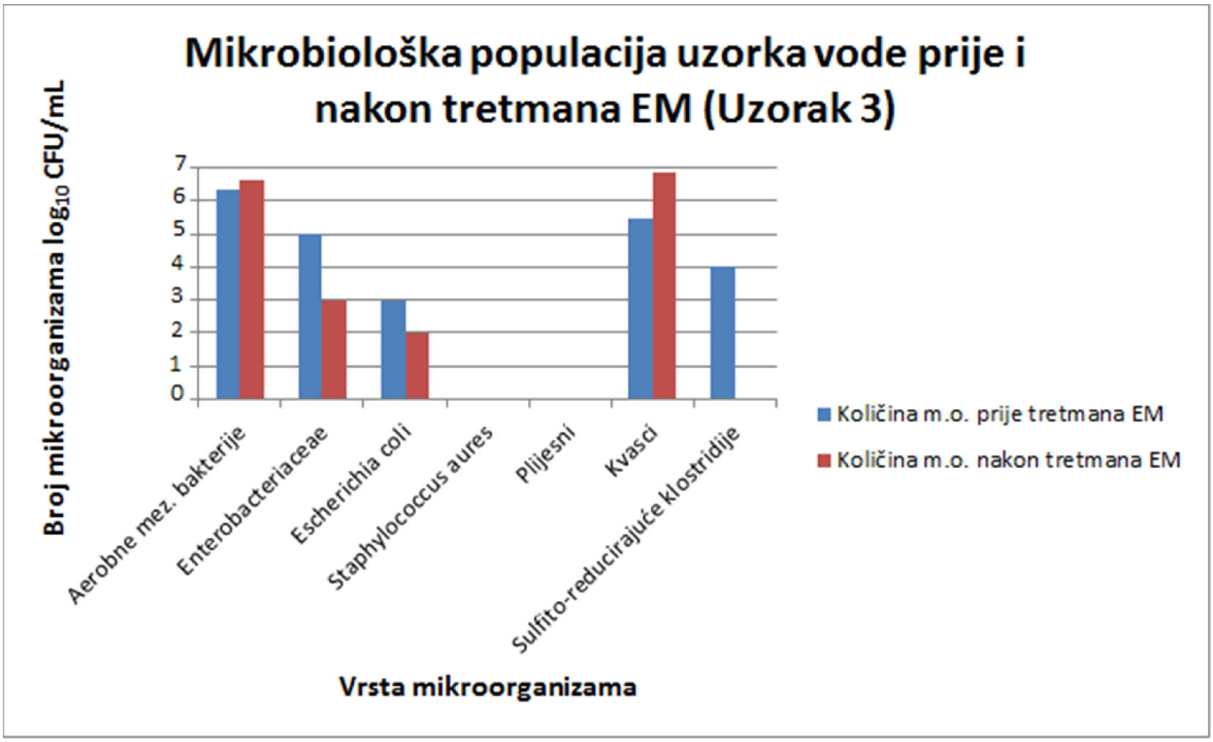
UZORAK 2



Slika 8. Mikrobiološki sastav otpadne vode (uzorak 2)

U ne tretiranom uzorku 2 dokazano je 1,1 x 10^7/mL aerobnih mezofilnih bakterija, 2 x 10^6/mL enterobakterija, 1 x 10^2/mL *E. coli* i ponovno više od 10^4 sulfito-redukcijskih klostridija. U tretiranom uzorku ustanovljen je znatno manji broj svih bakterijskih vrsta i to 2 x 10^6/mL aerobnih mezofilnih bakterija i 3 x 10^3/mL enterobakterija, dok bakterije vrste *E. coli* i sulfitorekcijskih klostridija uopće više nije bilo u uzorku.

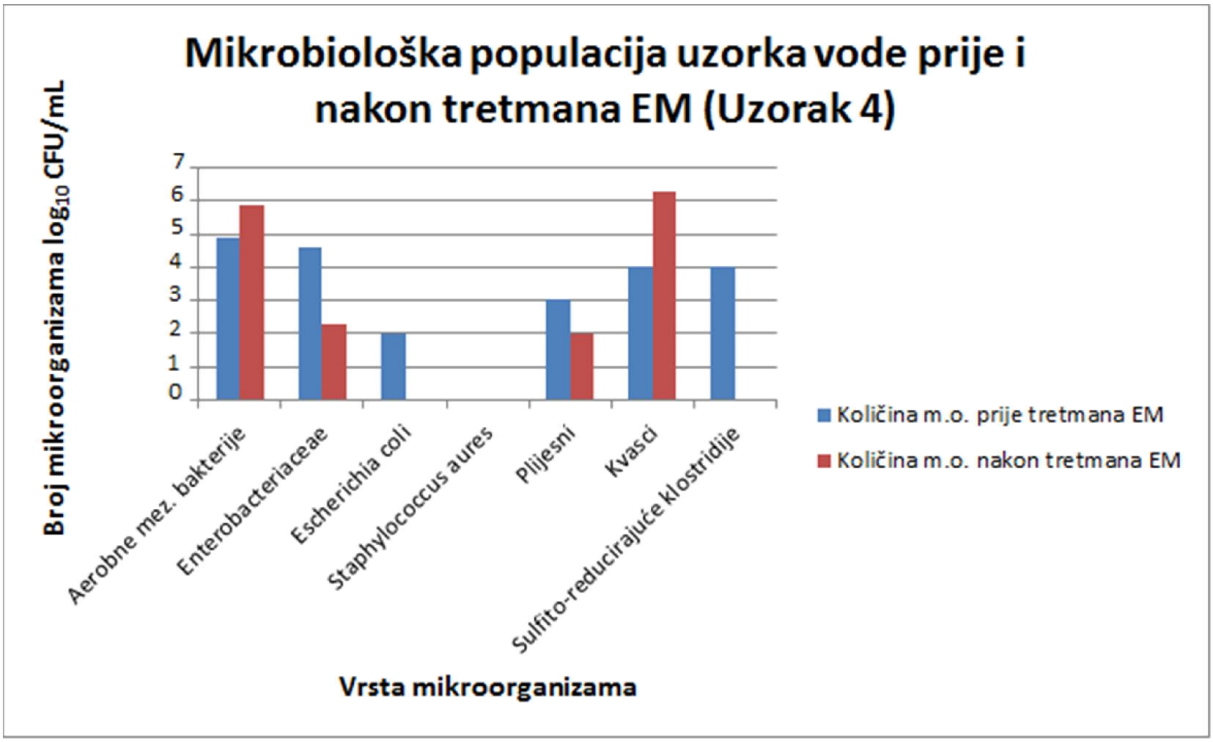
UZORAK 3



Slika 9. Mikrobiološki sastav otpadne vode (uzorak 3)

U uzorku 3 broj aerobnih mezofilnih bakterija se neznatno povećao i to od 2 x 10^6 na 4 x 10^6/mL. Broj enterobakterija se znatno smanjio u tretiranom uzorku i to sa 1 x 10^5 na 1 x 10^3/mL, Escherichia coli također sa 1 x 10^3/mL na 1 x 10^2/ml. Sulfitoredukcijske klostridije u tretiranom uzorku nisu uopće dokazane.

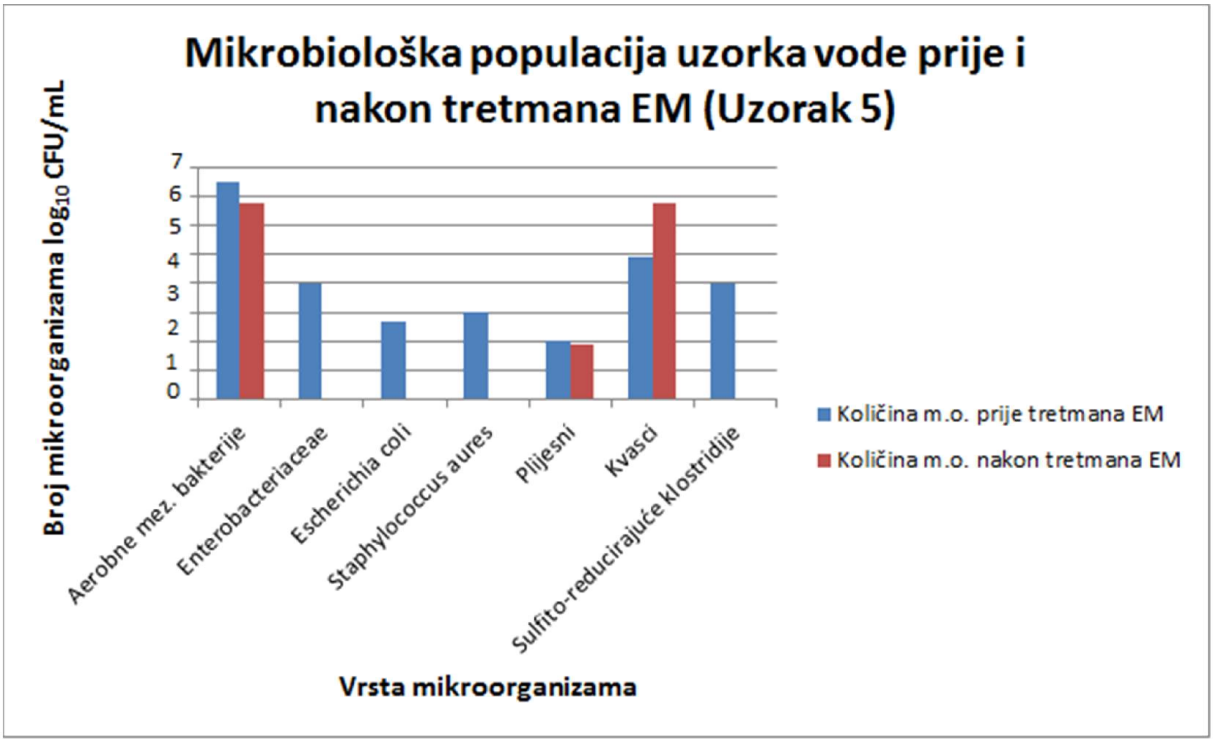
UZORAK 4



Slika 10. Mikrobiološki sastav otpadne vode (uzorak 4)

U uzorku 4 znatno je smanjen broj enterobakterija u tretiranom uzorku u odnosu na netritirani i to sa 4 x 10^4 na 2 x 10^2/mL. Bakterije *Escherichia coli* na početku u uzorku bez efektivnih mikroorrganizama je bilo 1 x 10^2 dok nakon tretmana njena prisutnost nije ustanovljena. U ovom uzorku za razliku od ostalih 3 ustanovljene su i plijesni. Na početku prije tretmana bilo ih je 1,1 x 10^3/mL, a nakon tretmana 1 x 10^2/mL. Sulfito-redukcijske klostridije su potpuno iščezle nakon tretmana, dok ih je u početnom uzorku bilo čak 1 x 10^4/mL.

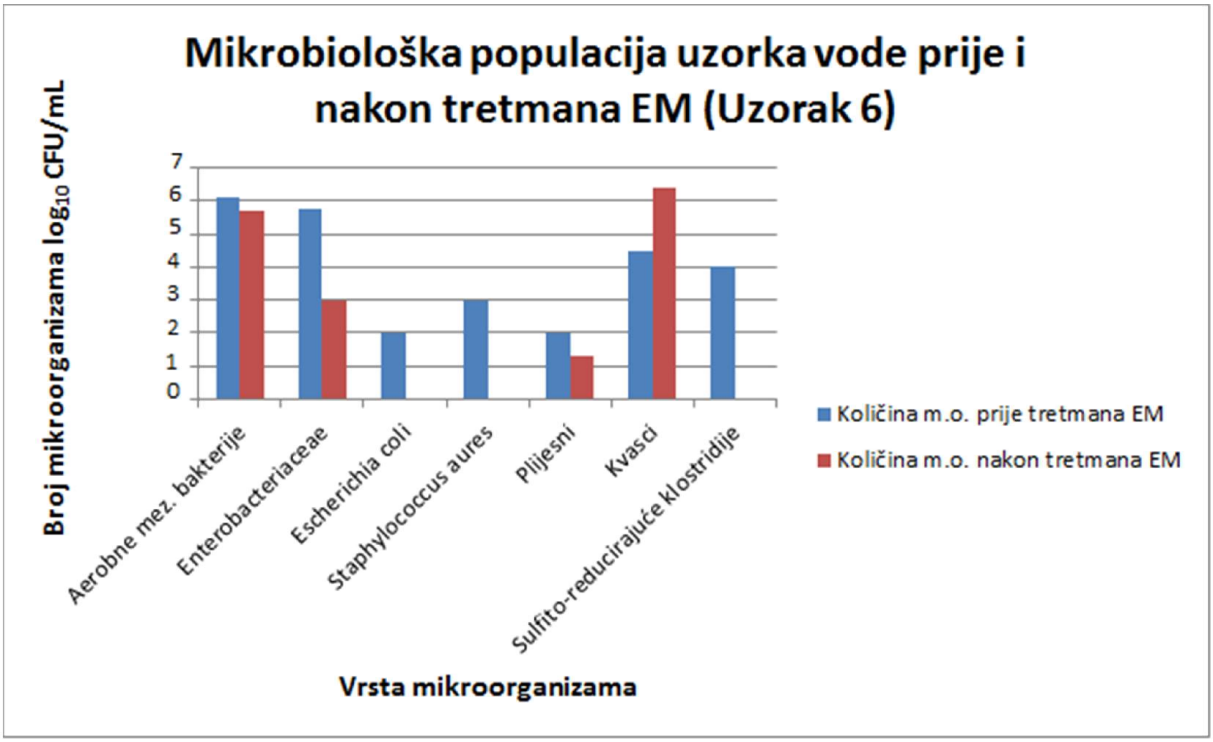
UZORAK 5



Slika 11. Mikrobiološki sastav otpadne vode (uzorak 5)

U uzorku 5 sve patogene bakterija nakon tretmana nisu ustanovljene, dok ih je u početnom uzorku bio popriličan broj. Broj aerobnih mezofilnih bakterija i plijesni se neznatno smanjio, dok su kvasci kao i u svim ostalim uzorcima porasli. Razlog tomu je što pripravak efektivnih mikroorganizama sadrži kvasce, a oni imaju pozitivnu ulogu u ovom slučaju.

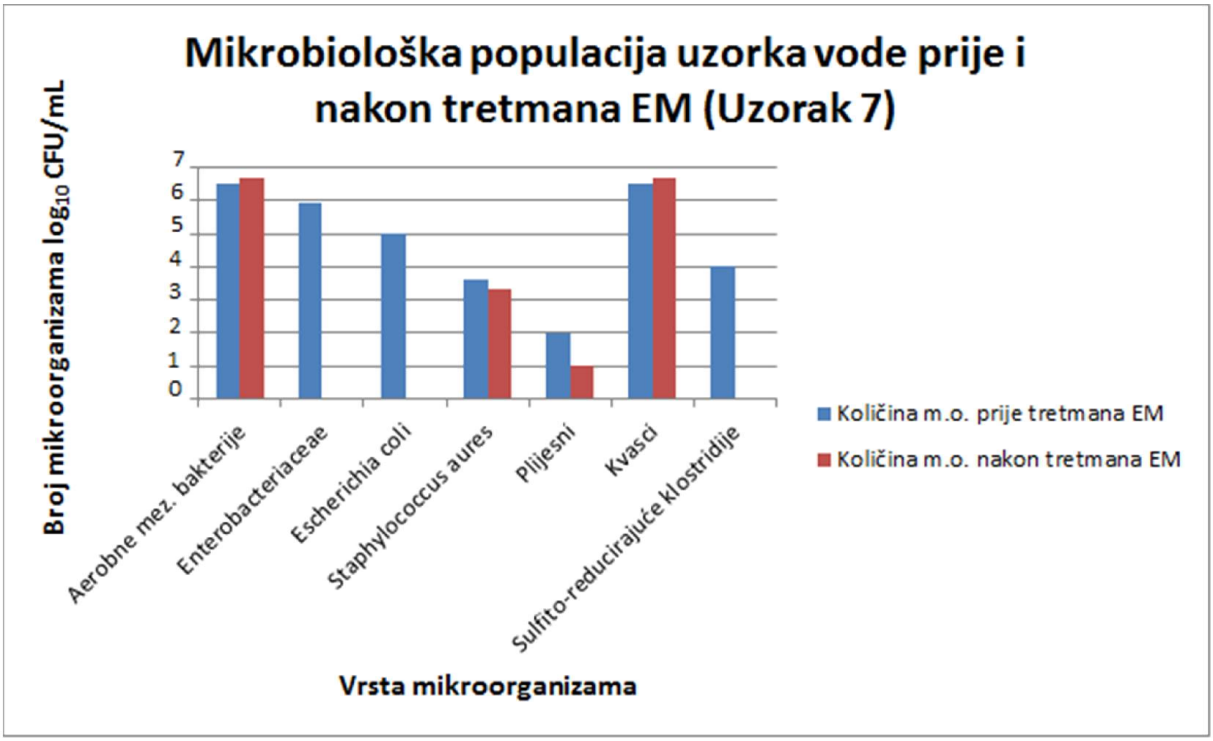
UZORAK 6



Slika 12. Mikrobiološki sastav otpadne vode (uzorak 6)

U uzorku 6 se ponovila slična stvar kao i u prethodnom uzorku. Patogene vrste E. coli, S. aureus i sulfitoreducirajuće klostridije je tretman efektivnim mikroorganizmima uništio, broj kvasaca je porastao nakon tretmana, a broj aerobnih mezofilnih bakterija i plijesni je smanjen.

UZORAK 7



Slika 13. Mikrobiološki sastav otpadne vode (uzorak 7)

U uzorku 7 prije tretmana preparatom efektivnih mikroorganizama ustanovljen je znatan broj enterobakterija (8 x 10^5/mL), zatim bakterije vrste *Escherichia coli* (1 x 10^5) i sulfito-redukcijske klostridije 1 x 10^4/mL. Nakon tretmana uopće ih nije bilo u uzorku.