Biorazgradnja lignocelulozno otpada procesom kompostiranja

Krivičić, Denija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:117374

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Denija Krivičić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Denija Krivičić

BIORAZGRADNJA LIGNOCELULOZNOG OTPADA PROCESOM KOMPOSTIRANJA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Članovi ispitnog povjerenstva:

Izv. prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac
Dr. sc. Dajana Kučić, znan. sur.
Izv. prof. dr. sc. Zvjezdana Findrik Blažević

Zagreb, rujan 2017.

Diplomski rad je izrađen na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu u Zavodu za industrijsku ekologiju pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marije Vuković Domanovac uz pomoć dr. sc. Dajane Kučić, znan. sur.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Mariji Vuković Domanovac na ukazanom povjerenju, pomoći i sugestijama tijekom izrade diplomskog rada. Velika hvala dr. sc. Dajani Kučić na stručnom vodstvu, korisnim savjetima, stečenim znanjima, strpljivosti, pruženim prilikama, kao i na korektnom i prijateljskom odnosu.

Hvala tehničkoj suradnici Marijani Vidaković na pomoći i stručnim savjetima te svim ostalim članovima Zavoda za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije na ugodnoj radnoj atmosferi i kolegijalnosti.

Posebnu zahvalu upućujem svojim roditeljima, bratu, stricu i ostaloj obitelj koji su me tijekom čitavog školovanja podupirali i vjerovali u mene. Na samome kraju, hvala mojim prijateljima i kolegama koji su postali prijatelji i uvijek bili uz mene te ovo razdoblje mojega života učinili lijepim i nezaboravnim.

SAŽETAK

U današnje vrijeme jedan od ključnih ekoloških problema je otpad. Od posebne važnosti je agroindustrijski otpad koji predstavlja opasnost za okoliš ako se njime ne gospodari na odgovarajući način. Duhanski otpad i komina maslina kategorizirani su kao agroindustrijski otpad koji sadrže visoke količine organske tvari, visoke koncentracije nikotina i fenola te ih zato nije moguće odložiti u okoliš bez prethodne obrade. Također, navedeni otpad sadrži visoke koncentracije složenih molekula kao što su lignin, celuloza i hemiceluloza te se kao takvi svrstavaju i u lignoceulozni otpad. Jedan od načina zbrinjavanja agroindustrijskog i lignoceluloznog otpada je proces kompostiranja. Kompostiranjem se biorazgradiva tvar prevodi u stabilan produkt-kompost, prilikom čega se oslobađaju CO_2, NH_3, voda i toplina.

U ovom radu istraživana je biorazgradivost lignoceluloznog otpada, duhanskog otpada i komine masline procesom kompostiranja bez (P1) i uz (P2) inokulaciju mikroorganizama. U svrhu odabira mikroorganizama prethodno su postavljeni pokusi biorazgradnje lignoceluloznog otpada uz inokulaciju različitih kultura mikroorganizama kao što su *Phanerochaete chrysosporium, Trichoderma reesei, Pseudomonas aeruginosa* FN, *Candida rugosa, Aspergillus fumigatus* i aktinomiceti. Na temelju FTIR analize kulture *P. chrysosporium i T. reesei* pokazale su najveću sposobnost razgradnje lignoceluloznih komponenti te su korištene u pokusu kompostiranja. Proces kompostiranja provodio se u adijabatskom reaktoru radnog volumena 10 dm^3 s prisilnom aeracijom tijekom 28 dana. Rezultati istraživanja pokazuju povećanje brzine procesa kompostiranja pomoću inokuliranih kultura u P2, odnosno termofilna faza se postiže 24 sata ranije i traje šest dana duže nego u P1. U procesu kompostiranja ukupno je nastalo 123 g kg_{HT0}^{-1} CO_2 i 118 g kg_{HT0}^{-1} CO_2 uz ukupnu vrijednost konverzije od 45 % i 35 % u P1 odnosno P2. Rezultati FTIR analize pokazuju da je došlo do razgradnje složenih organskih molekula u oba pokusa.

Ključne riječi: biorazgradnja, kompostiranje, lignocelulozni materijal, duhanski otpad, komina masline, *Phanerochaete chrysosporium, Trichoderma reesei*

ABSTRACT

Nowadays, one of the major environmental issues is a solid waste. Agro-industrial waste is of a particular importance because it negatively influences on the environment if isn't properly managed. Tobacco waste and olive pomace are categorized as agro-industrial waste, which contain considerable amount of organic matter, high concentration of nicotine and phenols and therefore they can't be disposed of in landfills without treatment. Also, mentioned wastes contain high concentrations of complex molecules such lignin, cellulose and hemicelluloses, and therefore they are classified as lignocellulosic waste. Agroindustrial and lignocellulosic waste can be treated by composting process. During the composting process, biodegradable organic matter is converted to the stable product-compost, along with the production of CO_2, NH_3, water and releasing heat.

In this work a biodegradability of lignocellulosic waste, tobacco waste and olive pomace, by composting process without (P1) and with (P2) inoculation of microorganisms was examined. In order to select microorganisms, previous biodegradation experiments of lignocellulosic waste with inoculation of different cultures of microorganisms such as *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma reesei*, *Pseudomonas aeruginosa* FN, *Candida rugosa*, *Aspergillus fumigatus* and actinomycetes were conducted. Results of FTIR analysis showed that fungal cells of *P. chrysosporium* and *T. reesei* have efficiently degraded lignocellulosic components and therefore they were inoculated in the composting experiment. Composting processes were conducted in a closed thermally insulated column reactor of an effective volume of 10 dm^3 and forced aeration during 28 days. The results of composting exp. in P2 show that the inoculated microorganisms have increased rate of biodegradation and the thermophilic phase has been achieved 24 h earlier and lasts six days longer than in exp. P1. The obtained conversion during process in P1 and P2 was 45 % and 35 %, respectively, and the mass of evolved carbon dioxide was 123 g kg_{VS0}^{-1} CO_2, and 118 g kg_{VS0}^{-1} CO_2, respectively. The FTIR analysis shows that in both processes a degradation of complex molecules was occured.

Key words: biodegradation, composting, lignocellulosic material, tobacco waste, olive pomace, *Phanerochaete chrysosporium, Trichoderma reesei*

SADRŽAJ

1. UVOD.....1
2. TEORIJSKI DIO.....2
2.1. Čvrsti otpad.....2
2.1.1. Biorazgradivi otpad.....2
2.1.2. Lignocelulozni otpad.....3
2.1.3. Obrada čvrstog otpada.....6
2.1.4. Biorazgradnja lignoceluloznog otpada.....7
2.1.5. Kompostiranje.....9
2.1.6. Čimbenici koji utječu na proces kompostiranja.....12
2.1.7. Sustavi za provedbu procesa kompostiranja.....16
3. METODIKA.....19
3.1. Materijali.....19
3.1.1. Supstrati za kompostiranje.....19
3.2. Kemikalije i otopine.....19
3.2.1. Priprema hranjivih podloga.....20
3.3. Instrumenti.....20
3.4. Aparatura.....21
3.5. Analitički postupci.....22
3.5.1. Određivanje suhe tvari.....22
3.5.2. Određivanje hlapive tvari.....23
3.5.3. Određivanje pH-vrijednosti i električne vodljivosti.....23
3.5.4. Spektrofotometrijsko određivanje anorganskih oblika dušika i fenola.....24
3.5.5. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK).....24
3.5.6. Određivanje koncentracije plinovitog amonijaka i ugljikovog dioksida.....25
3.5.7. Određivanje dušika po Kjeldahu.....25
3.5.8. Mikrobiološka analiza supstrata.....25
3.6. Postupci provedenih ispitivanja.....26
3.6.1. Biorazgradnja lignoceluloznog materijala.....26
3.6.2. Kompostiranje lignoceluloznog materijala.....27

4. REZULTATI.....29
4.1. Fizikalno - kemijska karakterizacija supstrata.....29
4.2. Analiza biorazgradnje lignoceluloznog materijala.....29
4.3. Analiza procesa kompostiranja.....36
4.3.1. Analiza procesa kompostiranja supstrata bez inokulacije mikroorganizama...37
4.3.2. Analiza procesa kompostiranja uz inokulaciju mikroorganizama.....41
5. RASPRAVA.....46
5.1. Fizikalno - kemijska karakterizacija supstrata.....46
5.2. Analiza biorazgradnje lignoceluloznog materijala.....47
5.3. Analiza procesa kompostiranja.....54
5.3.1. Analiza procesa kompostiranja bez inokulacije mikroorganizama, P1.....54
5.3.2. Analiza procesa kompostiranja uz inokulaciju mikroorganizama, P2.....58
6. ZAKLJUČAK.....63
7. LITERATURA.....64

1. UVOD

Narušavanje prirodne ravnoteže i uništavanje pojedinih ekosustava posljedica je ljudske aktivnosti vezane uz industriju, intenzivnu poljoprivredu, graditeljstvo, promet itd. Ishod navedenih djelatnosti dovodi do onečišćenja tla, podzemnih i površinskih voda, mora, zraka, uništavanja šuma, promjene klime, smanjivanja ozonskog sloja u atmosferi te smanjivanja biološke raznolikosti.[1] Kako bi se negativni utjecaji na okoliš sveli na najmanju moguću mjeru potrebno je otpadnim tokovima gospodariti na odgovarajući način poštivajući hijerarhiju gospodarenja otpadom.[2]

Ekološki prihvatljivim načinom zbrinjavanja biorazgradivog otpada smatra se proces kompostiranja. Kompostiranje dolazi od latinske riječi *compostium* što u prijevodu znači mješavina, a odnosi se na raznolikost supstrata kojeg zajednice mikroorganizama u aerobnim uvjetima prevode u stabilan produkt-kompost uz oslobađanja plinova (ugljikov dioksid, amonijak), topline i vode. Navedenim procesom mogu se zbrinuti različiti biorazgradivi otpadi među koje se ubrajaju i pojedini agroindustrijski otpadi.[1-3] Tijekom prerade duhana nastaje duhanski otpad koji se zbog visokih koncentracija nikotina klasificira kao štetan i opasan otpad.[4,5] Komina maslina nastaje u procesu proizvodnje maslinovog ulja i bez prethodne obrade ne smije se odložiti u okoliš jer sadrži visoke koncentracije fenola koje uzrokuju fitotoksičnost, visoki omjer C:N, različite organske kiseline.[6,7] Oba navedena agroindustrijska otpada karakterizira visok udio organske tvari među kojima lignocelulozna komponenta otežava njihovu biorazgradnju. Biorazgradnja je posljedica biokemijske aktivnosti mikroorganizama. Pojedini mikroorganizmi kao što su *Phanerochaete chrysosporium*[8], *Trichoderma reesei*[9,10], *Pseudomonas* spp.[11], *Cellulomonas* sp.[11], *Candida rugosa*[11], *Aspergillus ellipticus*[12], *Aspergillus fumigatus*[12] i aktinomiceti[11] pokazuju visoku sposobnost razgradnje lignina, celuloze i hemiceluloze.

U ovom radu ispitivana je biorazgradnja lignoceluloznog materijala, duhanskog otpada i komine masline procesom kompostiranja u zatvorenom sustavu bez (P1) i uz (P2) inokulaciju mikroorganizama. Mikroorganizmi koji su pokazali najveću učinkovitost biorazgradnje korišteni su u procesu kompostiranja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Čvrsti otpad

Otpad se prema Zakonu o održivom gospodarenju otpadom NN 94/13 definira kao svaka tvar ili predmet koje posjednik odbacuje, namjerava ili mora odbaciti. Prema mjestu nastanka svrstava se u dvije kategorije komunalni i proizvodni.[13]

- *Komunalni otpad* je otpad iz kućanstava te otpad iz proizvodne ili uslužne djelatnosti ako je po svojstvima i sastavu sličan otpadu iz kućanstava.
- *Proizvodni otpad* je otpad koji nastaje u proizvodnom procesu u industriji, obrtu i drugim procesima, a po sastavu i svojstvima se razlikuje od komunalnog otpada.

Prema svojstva kojima djeluje na zdravlje ljudi i okoliš otpad se može klasificirati kao inertni otpad, opasni otpad te neopasni otpad (NN 39/09).[14]

- *Inertni otpad* podrazumijeva otpad koji ne podliježe značajnim fizičkim, kemijskim ili biološkim promjenama. Takav otpad nije topiv, nije zapaljiv te na bilo koje druge načine fizikalno ili kemijski ne reagira niti je biorazgradiv.
- *Opasan otpad* karakterizira barem jedno od svojstava koje ga čine opasnim, kao što su primjerice eksplozivnost, zapaljivost, karcinogenost, infektivnost, toksičnost, teratogenost, mutagenost itd..
- *Neopasnim otpadom* smatra se otpad koji nema neko od svojstava opasnog otpada, otpad iz kućanstva ili iz drugih djelatnosti, a čiji je sastav isti onom iz kućanstva.

Upravo kako bi se spriječio štetan utjecaj na okoliš i zdravlje ljudi potrebno je otpadom gospodariti na odgovarajući način, odnosno sve aktivnosti, mjere i odluke usmjeriti u svrhu zaštite navedenog.[15]

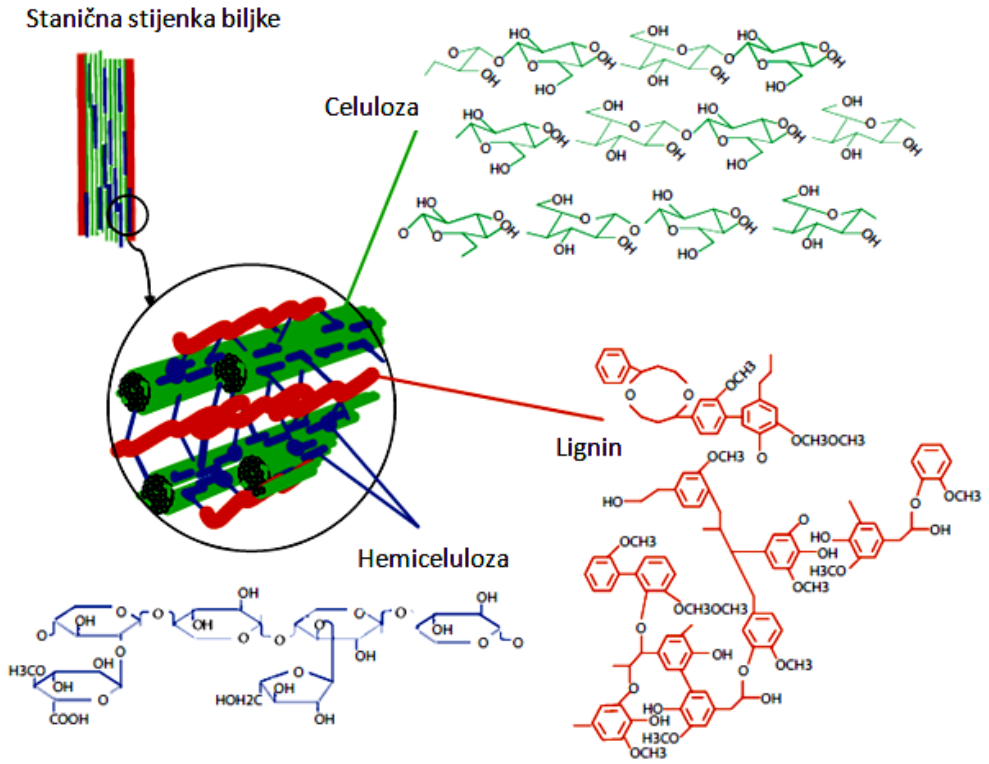
2.1.1. Biorazgradivi otpad

Biološki razgradivi otpad je otpad koji se može razgraditi aerobnim ili anaerobnim postupkom.[13] U ovu kategoriju otpada ubrajaju se komunalni otpad, karton, papir, tekstil, drvo, itd. te ovakav otpad pokazuje razgradivost tijekom duljeg izlaganja aerobnim, odnosno anaerobnim mikroorganizmima.[15] Prema podacima Europske agencije za okoliš (engl. European Environment Agency – EEA)

procijenjeno je kako u brojnim europskim zemljama kućanski otpad sadrži više od 66 % biorazgradivog čvrstog otpada te prema direktivama i ciljevima Europska unija, EU, teži se smanjenju odlaganja komunalnog otpada na odlagališta. Upravo takav otpad potrebno je izdvajati i reciklirati te se na taj način smanjuje utjecaj na okoliš, emisije stakleničkih plinova koje nastaju na odlagalištima, a recikliranjem može postati dobar izvor sekundarnih sirovina. S istim izazovima suočena je i Republika Hrvatska. U 2013. godini odloženo je 870 434 tona biorazgradivog otpada te prema Okvirnoj direktivi (2008/EZ) i Zakonu o održivom gospodarenju otpadom (NN 94/2013) cilj je do kraja 2020. godine smanjiti količinu ovakvog otpada na odlagalištima za 70 %.[1,13]

2.1.2. Lignocelulozni otpad

Lignocelulozne komponente osnovne su građevne jedinice svih biljaka, sastavljene od dva linearna polimera – celuloze i hemiceluloze te nelinearnog, trodimenzijskog polimera – lignina (slika 2.1.).[16]



Slika 2.1. Prikaz strukture lignoceluloznog materijala.[17]

Lignocelulozni materijal se sastoji od 38 - 50 % celuloze, 23 - 32 % hemiceluloze i 15 - 25 % lignina. Kod biljaka je osim primarnih moguća identifikacija i strukturnih polimera (5 – 13 %) kao što su voskovi i proteini.[18] Lignocelulozni supstrati nusprodukti su različitih agroindustrija i stvaraju veliki problem u okolišu. U različitim studijima ispitivana su svojstva i načini zbrinjavanja lignoceluluznih materijala poput papira[19], piljevine[20], ostaci šećernih trski[21], pamučnog otpada[21], lišća[22], otpada iz pivovara[21], komina masline[23], duhanski otpad[16,24,25].

Osnovna strukturna komponenta biljaka je lignin čija je razgradnja najsporija u odnosu na ostale komponente kao što su celuloza, hemiceluloza, škrob, pektin itd.[2] Prema nekim istraživanjima priroda lignina opisuje se negativno upravo zbog toga što usporava razgradnju lignoceluloznog materijala.[22] Uzrok tome je izuzetna raznolikost vezanja između osnovnih monomernih jedinica. Razgradnja lignina učestalo je kometaboličkog tipa te neznačajne su količine oslobođene energije. Razgradnja ovog polimera postiže se najčešće gljivama bijelog truljenja (*Stereum hirsutum, Trametes versicolor, Pleurotus ostreatus, Phanerochaete chrysosporium*).[2,8]

Biljke karakterizira najveći udio celuloze, a nalazi se u gotovo svakoj vrsta organskog otpada. Celuloza je polimer glukoze, građena od dugih nizova međusobno povezanih molekula disaharida celobioze od koje potpunom hidrolizom nastaje glukoza.[2] Jednostavnost celulozne strukture (ponavljanje jednakih veza) zahtjeva malu količinu enzima za razgradnju.[26] U aerobnim uvjetima razgradnja celuloze moguća je gljivama, ali i bakterijama. S obzirom na to da je celuloza bogata ugljikom i ne sadrži dušik, bolju sposobnost razgradnje imaju gljive micelijske strukture (*Chaetomium* sp., *Fusarium* sp. i *Aspergillus* sp.).[2]

Hemiceluloza je razgranati polimeri ksiloze, arabinoze, galaktoze, manoze i glukoze. Ona povezuje snopove celuloznih vlakana kako bi se formirala mikrovlakna koja poboljšavaju stabilnost stanične strukture biljaka. S ligninom tvore umrežene strukture koje osiguravaju strukturnu snagu, ali samim time otežavaju mikroorganizmima put razgradnje.[27-28]

DUHANSKI OTPAD

Nicotiana tabacum L. uzgaja se radi lišća koje nakon obrade i sušenja služi kao osnovna sirovina za cigarete i slične proizvode. Tijekom prerade dolazi do nastajanja tekućeg i čvrstog otpada koji se klasificira kao agroindustrijski otpad te kao

opasan odnosno toksičan za okoliš i ljudsko zdravlje ukoliko sadrži više od 0,05 % nikotina.[4,14] Od ukupne količine ulazne sirovine duhana oko 4 % tijekom prerade postaje otpad.[1] Ovisno o mjestu i sustavu za proizvodnju cigareta, ostaci duhana razlikuju se u konzistenciji. Mogu sadržavati biljne fragmente, komadiće ili prah različitih granularnosti. Nikotin je topiv u vodi te se zbog toga ne smije odložiti na tlo jer može dospjeti u podzemne vode, kao procjedna voda duhanskog otpada. Duhanski otpad karakterizira visok udio organske tvari (TOC > 200 mg dm^{-3}), visoka pH-vrijednost (9,1), visok udio dušika (> 2,18 %) te nizak C:N omjer (~20:1). Osim nikotina, visok udio celuloze, hemiceluloze i lignina čine biorazgradnju složenijom (tablica 2.1.).[5,23,29-31]

Tablica 2.1. Prosječni sastav duhanskog otpada.[5]

Komponente	**Udio (%)**
hlapljive tvari	65,4
pepeo	17,0
vlaga	16,2
fiksirani ugljik	1,4
celuloza	30,3
hemiceluloza	13,0
lignin	20,4
ekstrakti (šećeri, pektin)	36,3

KOMINA MASLINE

Posljednjih desetak godina u Mediteranskim krajevima bilježi se povećanje proizvodnje maslinovog ulja, a usporedno s time generiranje većih količina neželjenih otpadnih tokova - komine maslina i otpadne vode. U komini masline nalazi se endokarp (koštica), epikarp (kožica), kamenje, voda te ulje koje nije ekstrahirano. Kemijski sastav komine masline ovisi o sorti masline, porijeklu, uvjetima uzgoja te načinu ekstrakcije maslinovog ulja. Sastav nastalih otpadnih tokova ovisi o tome je li riječ o diskontinuranom ili kontinuiranom (dvofaznom i trofaznom) procesu proizvodnje maslinovog ulja.[6] Dvofazni kontinuirani način ekstrakcije smatra se ekološki najprihvatljivijim jer zahtjeva manje količine vode potrebne u procesu te

količine otpadnih tokova su 75 % manje od ostalih procesa. Na kraju procesa nastaje komina koju karakterizira niska pH-vrijednost, te visoke vrijednosti vodljivosti, sadržaja vlage i koncentracije organske tvari i fenola (tablica 2.2.). Organske tvari koje se nalaze u otpadnom toku su lignin, celuloza, hemiceluloza, masne kiseline te proteini. Upravo lignocelulozne komponente otežavaju sam proces biorazgradnje komine. Ovakav opasni otpad potrebno je zbrinuti na odgovarajući način jer odlaganjem u okoliš može uzrokovati neželjene posljedice zbog svojeg fizikalno-kemijskog sastava.[6,7]

Tablica 2.2. Prosječni sastav komine masline.[7]

Pokazatelji	**Raspon vrijednosti**
TOC (g kg^{-1})	848,9 - 976,0
lignin (g kg^{-1})	323,0 - 556,5
hemiceluloza (g kg^{-1})	273,0 - 415,8
celuloza (g kg^{-1})	140,2 - 249,0
masti (g kg^{-1})	77,5 - 194,6
proteini (g kg^{-1})	43,8 - 115,0
ugljikohidrati topivi u vodi (g kg^{-1})	12,9 - 164,0
fenoli topljivi u vodi (g kg^{-1})	6,2 - 23,9
vlaga (%)	55,6 - 74,5
pH (-)	4,86 - 6,45
λ (dS m^{-1})	0,88 - 4,76
C:N (-)	28,2 - 72,9

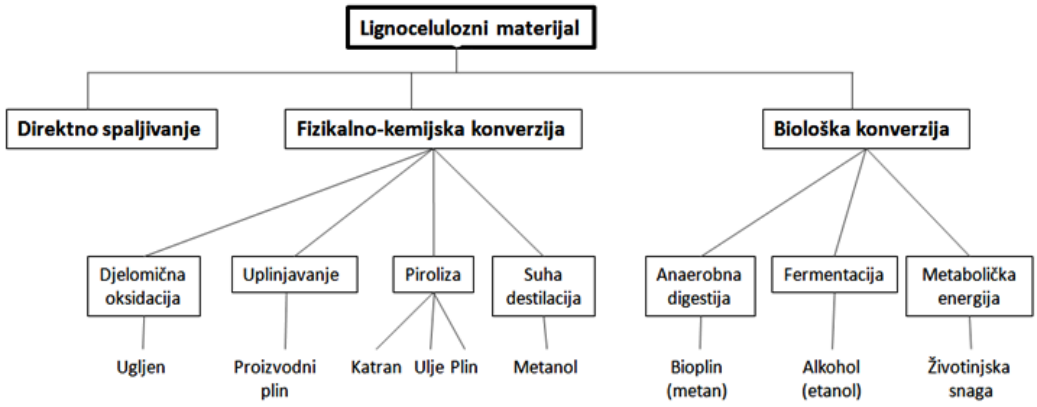
2.1.3. Obrada čvrstog otpada

Otpad koji nastaje potrebno je zbrinuti kako bi se smanjio pritisak na okoliš i samim time zaštitio čovjek. EU je 1973. donijela šest akcijskih programa o okolišu u kojima se izmjenjuje pristup na način da se prati i sprječava onečišćenje okoliša te da se ugradi održivi razvoj u svaki aspekt čovjekovog djelovanja. Hijerarhijski pristup upravljanja otpadom nalaže redom: smanjivanje otpada na izvoru nastanka, ponovnu uporabu, recikliranje i kompostiranje, povrat energije te na samom kraju odlaganje. Vrsta otpada, načela zaštite okoliša i ekonomska isplativost uvjetuju odabir načina obrade otpada među kojima su predloženi različiti postupci:[1,14,23,24]

- **Kemijski i fizikalni postupci obrade otpada** podrazumjevaju promjenu fizikalno–kemijskih i bioloških svojstava kao posljedica kemijskih i fizikalnih postupaka (neutralizacija, taloženje, ekstrakcija, redukcija, oksidacija, dezinfekcija, filtracija, sedimentacija)
- **Biološki postupci obrade** – fizikalna, kemijska i biološka svojstva mijenjaju se biološkim postupcima (aerobna i anaerobna razgradnja)
- **Termički postupci obrade** – mijenjanje fizikalnih, kemijskih i bioloških svojstava uporabom topline pod točno propisanim uvjetima (spaljivanje, piroliza, sterilizacija, žarenje, taljenje, sinteriranje)
- **Kondicioniranje otpada** – priprema otpada za određeni način zbrinjavanja (usitnjavanje, ovlaživanje, pakiranje, otprašivanje, stabilizacija)[14]

2.1.4. Biorazgradnja lignoceluloznog otpada

Velike količine lignoceluloznih materijala nastaju u različitim agroindustrijskim djelatnostima poput šumarstva, poljoprivrede i dr. te pritom mogu onečistiti okoliš. Ovakav otpad se često spaljuje, a pritom nastaju plinovi koji također mogu onečistiti okoliš. U današnje vrijeme teži se okolišno prihvatljivijem načinu obrade, a jedan od njih je pretvorba otpada u različite korisne proizvode kao što su papir, hrana za životinje, različite organske kemikalije (bio-etanol, bio-metan, limunska kiselina, mliječna kiselina), kompost.[33] Na slici 2.2. dani su neki od mogućih produkata obrađenog lignoceluloznog materijala primjenom različitih postupaka.



Slika 2.2. Konverzija lignoceluloznog materijala u različite izvore energije.[33]

Različita istraživanja pokazala su da organizmi koji posjeduju lignolitičke enzime razgrađuju učinkovito lignocelulozni materijal.[34-36] Mikroorganizmi (gljive, bakterije i aktinomiceti) kao i životinje imaju sposobnost razgradnje celuloze. Količina proizvedenog enzima celulaze iz bakterija, koje imaju sposobnost razgrađivati celulozu, nije velika. Veliki dio proizvedene celulaze sastavljen je od endoglukanaze i nije aktivan u kristalnom obliku celuloze. Osim toga navedeni enzim je intracelularni i adsorbiran u staničnoj stijenci bakterija, a količina ekstracelularnih je neznačajna. Prema istraživanjima gljive su najpoznatija skupina mikroorganizama koja može razgraditi celulozu s visokim stupnjem proizvodnje celulaze.[37]

Prema razgradnji lignoceluloznih komponenti, mikroorganizmi mogu se podijeliti u sljedeće kategorije:

1. Mikroorganizmi sa sposobnošću razgradnje celuloze. Tu spadaju gljive, aktinomiceti, bakterije, protozoe. Mikroorganizmi pripadaju sljedećim vrstama: *Polyporus* spp., *Agaricales* spp., *Trichoderma* spp., *Sporocytophaga myxococcoides, Streptomyces antibioticus*.
2. Mikroorganizmi sa sposobnošću razgradnje hemiceluloze. Gljive prevladavaju u početnoj fazi razgradnje celuloze, a aktinomiceti su dominantniji u kasnijim fazama. Većina gljiva može razgraditi hemicelulozu te je njihov broj daleko veći od broja gljiva sa sposobnošću razgradnje celuloze.
3. Mikroorganizmi sa sposobnošću razgradnje lignina. Mikroorganizmi iz ove kategorije uglavnom su gljive koje pripadaju koljenu basidiomycota. Najznačajnije vrsta su *Fomes* spp., *Polyporus* spp., *Polystictus* spp., *Phanerochaete* spp.[37]

Saprofitske gljive razvile su dva mehanizma, oksidacijski i hidrolitički, koji zajedno u različitim kombinacijama mogu razgraditi lignocelulozne komponente.[38] *Phanerochaete chrysosporium,* gljiva bijelog truljenja, je najpoznatiji i najistraživaniji lignolitički mikroorganizam. Sposobnost razgradnje lignina i različitih aromatskih komponenti pripisuje se nespecifičnom ekstracelularnom enzimskom sustavu koji uključuje mangan peroksidazu, lignin peroksidazu te laktazu.[8] *Trichoderma reesei* je glavni industrijski izvor celulaze i hemicelulaze koje se koriste za depolimerizaciju biomase na jednostavne šećere, koji se pretvaraju u kemijske intermedijere i biogoriva kao što je etanol. Celulazna aktivnost, koju proizvodi ovaj mikroorganizam, sastoji se

od različitih endoglukanaza i egzoglukanaza koje djeluju sinergistički u cilju pretvorbe celuloze u celobiozu.[9-10]

U današnje vrijeme sve su veći zahtjevi za bioproduktima nastalim iskorištavanjem vrijednih sekundarnih sirovina. Kompostiranje, zbog prihvatljivih ekonomskih i okolišnih aspekata, smatra se učinkovitim procesom zbrinjavanja različitog otpada, posebice lignocelulozno.[2,3,33]

2.1.5. Kompostiranje

Kompostiranje je proces biorazgradnje čvrste organske tvari koju provodi zajednica mikroorganizma u aerobnim uvjetima. Produktima mikrobnog metabolizma ovog procesa smatraju se ugljikov dioksid, amonijak, voda, biomasa i toplina uz stvaranje stabilnog produkta, komposta. Takav produkt može se koristiti za poboljšavanje strukture te kao dodatak organskih i mineralnih tvari tlu.[1,2] Proces kompostiranja može se prikazati općom jednadžbom (2.1)[39]:

$$\textbf{Supstrat} + O_2 \rightarrow \textbf{Kompost} + CO_2 + H_2O + NH_3 + \textbf{Biomasa} + (-\Delta H_r) \qquad \textbf{(2.1)}$$

Kompostiranje je kontrolirani biokemijski proces čiji supstrati su najčešće materijali biljnog, životinjskog ili mikrobiološkog podrijetla.[3] Udio biljnih supstrata je najveći, dok životinjska tkiva i mikrobne komponente čine manje frakcije bilo koje mješavine.[2] U tablici 2.3. dani su glavni prirodni spojevi pronađeni u kompostnim materijalima.

Za razgradnju složene strukture odgovorni su mikroorganizmi čija aktivnost je prisutna u pojedinim fazama kompostiranja. Proces započinje oksidacijom lakše razgradivih organskih tvari koje se naziva truljenje nakon čega slijedi stabilizacija što podrazumijeva razgradnju složenijih organskih molekula i humifikaciju lignoceluloznog materijala.[1,2] Tijekom kompostiranja izmjenjuju se četiri faze[1] ovisno o promjeni temperature: 1. Mezofilna faza (25 – 45 °C), 2. Termofilna faza (45 – 65 °C), 3. Faza hlađenja (druga mezofilna faza) i Faza zrenja.

Tablica 2.3. Najznačajnije prirodne komponente biljaka koje se nalaze u biorazgradivim materijalima.[2]

Komponenta	Sastav	Funkcija	Razgradljivost
Lignin	Polimerizati derivata fenilpropana	Strukturna komponenta	Vrlo otporno; najčešće gljivama
Celuloza	β – 1,4 glukozidne veze	Strukturna komponenta (stabljika i lišće biljaka)	Jednostavno; najčešće gljivama, ali i bakterijama, aktinomicetima
Škrob	Amiloza: linearne α - 1, 4 veze Amilopektin: razgranate α - 1, 4 veze	Skladišna komponenta u korijenju i sjemenkama	Dobro; anaerobno i aerobno
Laminarin	β – 1,3 veze	Morske alge	Jednostavno
Agar	Polimeri galaktoze i galakturonskih kiselina	Morske alge	Otporno
Hemiceluloza	Niski stupanj polimerizacije šećera monomera i uronskih kiselina	Komponenta stanične stijenke (drvo, alge, sjemenke, slama)	Promjenjivo; često zajedno s ligninom
Pektin	Polimer galakturnske kiseline	Stanične stijenke biljaka, sjemenke, voće, mladi dijelovi stabala	Jednostavno; djelovanjem većine mikroorganizama
Saharoza	Disaharid glukoze i fruktoze	Vakuole	Vrlo jednostavno; djelovanjem većine mikroorganizama
Klorofil i ostali pigmenti		Plastidi	Jednostavno
Alkaloidi, tanini	Šećeri, alfa - D - glukoza	Vakuole	Promjenjivo
Masnoće, voskovi	Glicerin i masne kiseline	Skladišna komponenta	Promjenjivo
DNS, RNS	Nukleinske kiseline	Jezgre, mitohondriji	Jednostavno

- **Mezofilna faza**

U ovoj fazi bakterije, aktinomiceti i gljive razgrađuju lako razgradive i energijom bogate molekule kao što su šećeri i proteini. Ovisno o vrsti supstrata, broj mezofilnih mikroorganizama u ovoj fazi je veći od broja termofilnih za tri reda

veličine, a porast temperature u kompostnoj masi uzorkovan je upravo njihovom metaboličkom aktivnošću.

- **Termofilna faza**

Ovu fazu karakteriziraju mikroorganizmi koji imaju sposobnost prilagodbe visokim temperaturama te s vremenom broj termofilnih mikroorganizama naglo raste dok se broj mezofilnih smanjuje. Do temperaturne vrijednosti od 62 °C razgradnja je vrlo brza, a iznad navedene vrijednosti inhibiran je rast pojedinih termofilnih gljiva dok termotolerantne i termofilne bakterije te aktinomiceti ostaju aktivni i pri višim temperaturama. Termofilna faza vrlo je važna zbog higijenizacije kompostne mase te pogoduje uništavanju patogenih mikroorganizma, sjemenke korova te ličinki insekata. Higijenizaciju, osim visoke temperature, uzrokuju antibiotici koje proizvode aktinomiceti. Temperature iznad 70 °C su nepoželjne zato što dolazi do uništavanja mezofilnih mikroorganizama te je otežana njihova ponovna aktivacija u fazi hlađenja.

- **Faza hlađenja (druga mezofilna faza)**

Nakon termofilne faze dolazi do smanjenje udjela biorazgradive frakcije što uzrokuje opadanje aktivnosti termofilnih mikroorganizama, a samim time sniženje temperature u kompostnoj masi. Pri temperaturi od 40 °C ponovno se aktiviraju mezofilni mikroorganizmi iz preživjelih spora te ostali mikroorganizmi s ruba kompostne mase ponovno naseljavaju njezinu unutrašnjost. Dok prvu mezofilnu fazu karakteriziraju mikroorganizmi sa sposobnošću razgradnje šećera, oligosaharida i proteina, u drugoj mezofilnoj fazi povećava se broj organizama koji imaju sposobnost razgradnje celuloze i škroba.

- **Faza zrenja**

Posljednja faza u procesu kompostiranja može trajati u rasponu od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci. U ovoj fazi broj prevladavaju gljive, dok se broj bakterija smanjuje. Tijekom kompostiranja dolazi do nastanka i isparavanja amonijaka zbog čega sadržaj dušika u kompostu može biti niži. Faza zrenja traje dokle god dolazi do razgradnje ugljikovih spojeva, a kao pokazatelji razgradnje su nastanak CO_2, vode, niži omjer C:N, blago lužnata pH-vrijednost komposta.[1,2]

2.1.6. Čimbenici koji utječu na proces kompostiranja

Uspješnost procesa kompostiranja ovisi o različitim fizikalnim, kemijskim i biološkim čimbenicima kao što su: omjer C:N, sadržaj vlage, odgovarajući sadržaj kisika, temperatura, raspon pH-vrijednosti, veličina čestica te broj i vrsta mikroorganizama.[1-2,40]

Omjer C:N

Za metabolizam mikroorganizama, koji su odgovorni za biorazgradnju, neophodne su hranjive tvari koje sadrže osnovne elemente kao što su ugljik, dušik, fosfor i kalij te različite elemente u tragovima. Upravo je omjer organskog ugljika i dušika jedan od najvažnijih pokazatelja ravnoteže nutrijenata. U metabolizmu mikroorganizama uključeno je oko 30 jedinica ugljika na svaku jedinicu dušika, od čega gotovo 20 jedinica je oksidirano u ugljikov dioksid. Pregled nekih materijala i pripadajućih C:N omjera dan je u tablici 2.4.

Tablica 2.4. Omjer C:N različitih vrsta biorazgradivog otpada.[2,42]

Materijal	**C:N omjer**
Papir	173:1
Aktivni mulj	6:1
Plodna zemlja	6-10:1
Trava	20-40:1
Otpad hrane	15,6:1
Otpad voća	34,8:1
Farmaceutski otpad	19:1
Duhanski otpad	20:1
Komina masline	50:1
Drveće	723:1

Optimalnim omjerom smatra se raspon od 25:1 do 35:1. Omjeri veći od navedenog uzrokuju usporavanje brzine kompostiranja dok kod nižih omjera dolazi do gubitka dušika. Ako je riječ o višim C:N omjerima, ugljik je vezan u složenim molekulama kao što su lignin celuloza i hemiceluloza te polako postaje dostupan

mikroorganizmima. Pri nižim omjerima C:N dolazi do gubitka dušika što rezultira stvaranjem amonijaka. Amonijak biva istjeran iz kompostne mase pri pH-vrijednostima supstrata iznad 8 odnosno pred kraj termofilne faze odnosno početka druge mezofilne faze. Smanjeni sadržaj dušika ograničava vrijednost konačnog produkta komposta.[1,2] Uspješnost procesa kompostiranja uočljiva je iz stalnog smanjenja C:N omjera koji na samom kraju govori o zrelosti i stabilnosti krajnjeg produkta.[41] Također valja naglasiti kako su ostale organske tvari u tipičnom organskom otpadu u odgovarajućim količinama i omjerima.[2]

Sadržaj vlage

Tijekom cijelog procesa kompostiranja neophodna je optimalna količina vode za aktivnost svih mikroorganizama. Prema literaturnim podacima optimalna početna vlažnost je između 50 – 60 %. Vlažnost ispod 40 % uzrokuje dehidriranje kompostne mase i zaustavljanjem biološkog procesa što rezultira fizički stabilnim, a biološki nestabilnim produktom. Osim toga, sve mikrobne aktivnosti prestaju pri sadržaju vlage koji je manji od 8 – 12 %. Anaerobni uvjeti u kompostnoj masi posljedica su vlažnosti veće od 60 % zbog toga što voda zauzima slobodni zračni prostor između čestica. U takvim uvjetima dolazi do nastanka anaerobnih plinova i smanjenja brzine razgradnje organskih spojeva. Iz navedenog može se zaključiti kako su sadržaj vlage i dostupnost kisika usko povezani.[1,2,24,40]

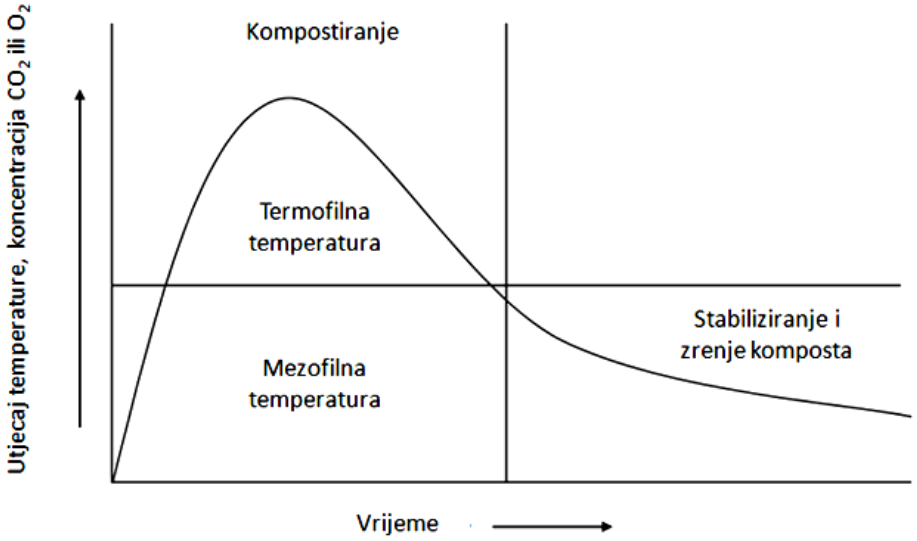
Sadržaj kisika

Jedan od najznačajnijih čimbenika u procesu kompostiranja je sadržaj kisika u kompostnoj masi, a uvjetovan je tehnologijom i sustavom provođenja procesa.[2] Aeracija u sustavima može biti prirodna, pasivna ili prisilna.[41] Potrebno je osigurati više od 10 % kisika u plinovitoj fazi unutar kompostne hrpe za održavanje aerobnih uvjeta. Razina kisika ispod 5 % je ograničavajuća je za mikrobnu aktivnost te dolazi do stvaranja anaerobnih uvjeta i plinova kao što je metan. Visoke koncentracije kisika su također nepoželjne za uspješno provođenje procesa jer uzrokuju isušivanje kompostne mase i samim time smanjenje mikrobne aktivnosti. Zrak se nalazi u međuprostorima kompostne mase te zbog mikrobne aktivnosti mijenja se njegova razina, odnosno koncentracija ugljikovog dioksida postupno se povećava, a koncentracija kisika smanjuje. Upravo zbog toga važno je da mikroorganizmi imaju

stalnu opskrbu kisikom kako bi njihove metaboličke aktivnosti bile nepromijenjene.[1,2,43]

Temperatura

Jedan od rezultata mikrobne aktivnosti su promjene temperature koje rastu od okolišnih, odnosno temperatura aktivnosti mezofilnih mikroorganizama do temperatura aktivnosti termofilnih mikroorganizama (slika 2.3.).[43] Kompostiranje je egzotermni proces koji proizvodi velike količine energije, ali samo 40 - 50 % mikroorganizmi mogu iskoristiti za sintezu ATP-a dok je preostala energija izgubljena kao toplina u masi.[2] Pri temperaturama od 30 do 45 °C najveća je mikrobiološka raznolikost zbog čega dolazi do intenzivne biorazgradnje.[44] Dostupnost jednostavno razgradivih molekula omogućuje dosezanje visokih temperatura i do 70 °C. Pri temperaturama od 70 – 90 °C dolazi do inhibicije rasta mikroorganizama i usporava se biorazgradnja organske tvari te samo nekoliko vrsta termofilnih bakterija pokazuju metaboličku aktivnost.[44] Procesna temperatura je vrlo važna za razgradnju složenih molekula i higijenizaciju kompostne mase, odnosno uništavanje patogenih organizama, ličinka insekata te sjemenki korova što se postiže visokim temperaturama. Druga mezofilna faza ukazuje na hlađenje kompostne mase i skoro zrenje i stabiliziranje krajnjeg produkta. Vrsta procesa i stupanj kontrole imaju veliki utjecaj na temperaturu, zbog toga je kontrola temperature jednostavnija u zatvorenim nego otvorenim sustavima.[2,43]



Slika 2.3. Promjene temperature i koncentracije ugljikovog dioksida tijekom procesa kompostiranja.[43]

Vrijednost pH

Optimalni raspon pH-vrijednosti supstrata za kompostiranje je od 5,5 – 8,0. Za rast bakterija povoljno je neutralno područje dok se gljive bolje razvijaju u kiselom okolišu. Iako postoje iznimke, opće je poznato kako je pH-vrijednost kompostne mase niža na početku samog procesa jer bakterije razgrađuju jednostavne organske spojeve, a kao međuprodukt nastaju organske kiseline. Povećanje pH-vrijednosti (8,0 - 8,5) u termofilnoj fazi dovodi do oslobađanja amonijaka kroz mineralizaciju organskog dušika.[2,44] Supstrate s niskim pH-vrijednostima pogodno je miješati sa supstratima lužnate ili neutralne pH-vrijednosti ili se kiselost regulira dodavanjem anorganskih soli kao što su vapno i natrijev hidrogen-karbonat.[45]

Veličina čestica

Usitnjavanjem supstrata povećava se ukupna površina materijala te se tako ubrzava proces kompostiranja. Optimalna veličina čestica kreće se od 4 – 7 cm. Čestice manjeg promjera mogu uzrokovati sabijanje kompostne mase te onemogućiti prolazak kisika, na taj način dolazi do stvaranja anaerobnih uvjeta.[39] Ako je riječ o praškastim supstratima, onda se oni miješaju s krupnijim inertnim materijalima koji omogućuju prozračnost kompostne mase, a na kraju se izdvajaju iz produkta.[2]

Broj i vrsta mikroorganizama

Najznačajnije skupine aerobnih mikroorganizama koje su odgovorne za biorazgradnju tijekom procesa kompostiranja su gljive i bakterije. Na njihovu aktivnost utječu vlažnost kompostne mase, dostupnost kisika, pH-vrijednost, vrsta supstrata.[46] S obzirom na promjenu temperature u kompostnoj masi, mikroorganizme možemo podijeliti u dvije skupine[47]: mezofili (20 - 45 °C) i termofili (45 – 90 °C).

- ***Gljive***

Stanice gljiva oblikovane su u duge filamente koje se nazivaju hife, a znatno su veće od onih koje razvijaju aktinomiceti. One prolaze kroz kompostnu masu mijenjajući njezina kemijska i mehanička svojstva. Stabiliziraju kompost na način da tvore manje nakupine te se tako poboljšava propusnost i aeracija. Uloga gljiva je vrlo važna jer su upravo ovi mikroorganizmi odgovorni za razgradnju odumrlih biljaka u okolišu zbog sposobnosti razgradnje složenih molekula kao što su lignin i celuloza.[46]

- ***Bakterije***

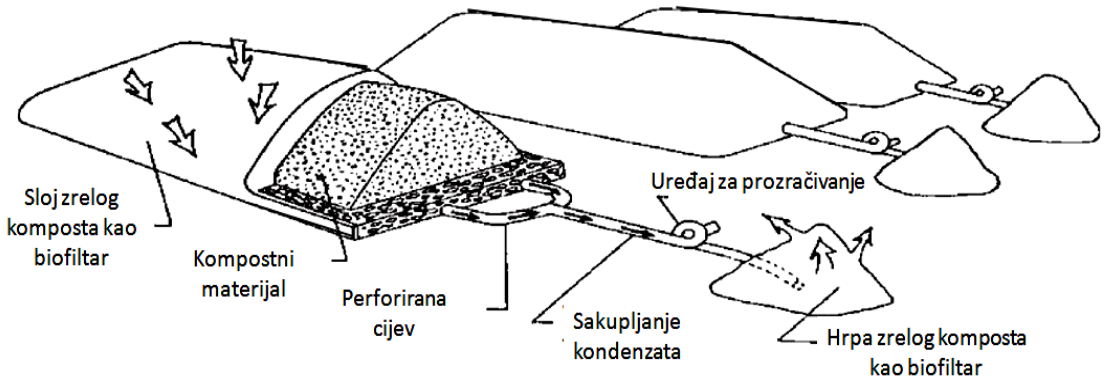
Pripadaju najbrojnijoj mikrobiološkoj komponenti kompostne mase te su dominantna populacija tijekom cijelog procesa.[46] Za razgradnju organskih tvari u otpadnim materijalima najznačajnija je uloga onih vrsta koje pokazuju proteolitičku i celulolitičku aktivnost.[48] Aktinomiceti pripadaju skupini bakterija, iako su vizualno nalik gljivama jer tvore hife. One im omogućuju širenje po cijeloj kompostnoj masi i stvaranje stabilnih organskih nakupina u krajnjim fazama kompostiranja. Zemljani miris komposta rezultat je mikrobiološke aktivnosti aktinomiceta.[46]

2.1.7. Sustavi za provedbu procesa kompostiranja

Odabir sustava za kompostiranje ovisi o vrsti i količini otpada, ekonomskoj isplativosti, zakonskim propisima, lokaciji te zahtjevima vezanim za kvalitetu konačnog produkta. Proces je moguće provoditi u otvorenim (nereaktorski) i zatvorenim (reaktorski) sustavima.[1,43]

Otvoreni sustavi primjenjivi su zbog jednostavnosti i nižih financijskih troškova. Dugotrajnost procesa, ovisnost o vremenskim uvjetima, emisiji štetnih plinova, širenje neugodnih mirisa te mogućnost samozapeljnja ako nema redovitog miješanja, glavni su nedostaci ovih sustava. Nereaktorski sustavi mogu se podijeliti u dvije osnovne vrste:„windrow“ sustavi (slika 2.4.) te sustavi kompostiranja u hrpi odnosno stogu (slika 2.5.).[24]

Slika 2.4. Prikaz windrow sustava kompostiranja.[49]



Slika 2.5. Shematski prikaz procesa kompostiranja u hrpama s prisilnom aeracijom.[2]

Zatvoreni (rekatorski) sustavi (slika 2.6.) u osnovi mogu se podijeliti na vertikalne i horizontalne, a proces se u njima može odvijati šaržno ili kontinuirano. Jedna od podjela horizontalnih reaktorskih sustava je na kanalske reaktore, reaktore u obliku stanica, spremnika i tunela. Također u uporabi zatvorenog reaktorskog sustava poznat je rotirajući bubanj. U navedenim sustavima mehaničko miješanje je ponekad uključeno, dok je prozračivanje kontinuirano.[2] Stabilizacija organske tvari postiže se u puno kraćem vremenu (10 – 30 dana) kod automatiziranih reaktorskih sustava. Zrenje komposta provodi se na otvorenom prostoru.[1]

Slika 2.6. Prikaz zatvorenog reaktorskog sustava.[50]

Najznačajnija prednost kompostiranja u zatvorenom reaktorskom sustavu je mogućnost kontrole procesa čime se značajno skraćuje vrijeme biorazgradnje organskih spojeva. Ovakvi sustavi sprječavaju gubitak topline i isparavanje vode što je ključni nedostatak otvorenih reaktorskih sustava. Osim toga, aeracija i ovlaživanje kompostne mase su automatizirani i kontrolirani. Navedene prednosti iziskuju ekonomski trošak, kao i sama izgradnja ovakvih sustava, te je upravo zbog toga ključni nedostatak zatvorenih sustava cijena.[39]

3. METODIKA

3.1. Materijali

3.1.1. Supstrati za kompostiranje

Supstrati korišteni u pokusima su komina masline i duhanski otpad (slika 3.1.). Duhanski otpad dopremljen je iz tvornice duhana Rovinj, Hrvatska. Svježi duhanski otpad osušen je na zraku i skladišten te potom korišten u pokusima. Komina maslina, nastala tijekom procesa proizvodnje maslinovog ulja, porijeklom je iz uljara sjevernog i južnog priobalja Republike Hrvatske. Komina masline pohranjena je u plastičnim spremnicima u zamrzivaču na temperaturi od -18 °C.

Slika 3.1. Fotografski snimci supstrata za biorazgradnju i kompostiranje (a) komina masline i (b) duhanski otpad.

3.2. Kemikalije i otopine

Otopine korištene u radu pripremane su u deioniziranoj vodi s električnom provodnošću $\kappa < 1$ μS cm^{-1}:

Za određivanje amonijaka: Standardna otopina amonijevog sulfata, sumporna kiselina, trinatrijev citrat, natrijev nitroprusid, natrijev salicilat, natrijeva lužina, izosan;

Za određivanje fenola**:** Otopina 0,5N NH_4OH, fosfatni pufer, 4-aminoantipyrin, $K_3Fe(CN)_6$;

Za određivanje nitrita: Standardna otopina natrijevog nitrita, sulfanilna kiselina, L-naftilamin, octena kiselina;
Za određivanje nitrata: Standardna otopina kalijevog nitrata, brucin sulfat, sulfanilna kiselina, klorovodična kiselina, sumporna kiselina;
***Za određivanje* KPK:** KPK reagens, živin(II) sulfat;
Apsorpcija amonijaka: Otopina 4 % borna kiselina (H_3BO_3) i indikatori (brom krezol zeleni i metil crveni);
Apsorpcija ugljikovog (IV) dioksida. Otopina 1 mol dm^{-3} natrijeva lužina (NaOH).

3.2.1. Priprema hranjivih podloga

Hranjivi agar

Podloga za uzgoj bakterijskih kultura pripremila se prema uputama proizvođača. Otapanjem 4 g bujona i 8 g agara u 500 cm^3 deionizirane vode. Podloga je homogenizirana, zagrijana do vrenja i sterilizirana 15 min u autoklavu pri 120 °C i 1,1 at. (Biolife Manual, Italija).

Sladni agar

Podloga za uzgoj kultura kvasaca i plijesni pripremala se prema uputama proizvođača. Otapanjem 10 g sladnog ekstrakta i 8,5 g agara u 500 cm^3 deionizirane vode. Podloga je homogenizirana, zagrijana do vrenja i sterilizirana 15 min u autoklavu pri 120 °C i 1,1 at. (Biolife Manual, Italija).

3.3. Instrumenti

Spektrofotometrijska mjerenja tijekom laboratorijskih istraživanja provedena su na spektrofotometru HACH, DR 2400, USA. Za određivanje pH - vrijednosti otopina korišten je instrument Multi 340i, WTW, USA. Za precizno vaganje uzorka korištena je analitička vaga mjernog područja 10 mg - 210 g, Sartorious Ag, Göttingen, Njemačka, a za mjerenje mase cijelog reaktora korištena je vaga tipa WPT/L60/C2/K, mjernog područja od 50 g do 60 kg, Radwag, Poljska. Analiza supstrata provedena je na FTIR (Fourier Transform InfraRed Spectroscopy) uređaju, Perkin Elmer, USA. Za prozračivanje kompostne mase unutar reaktora korišten je kompresor DE 50/204,

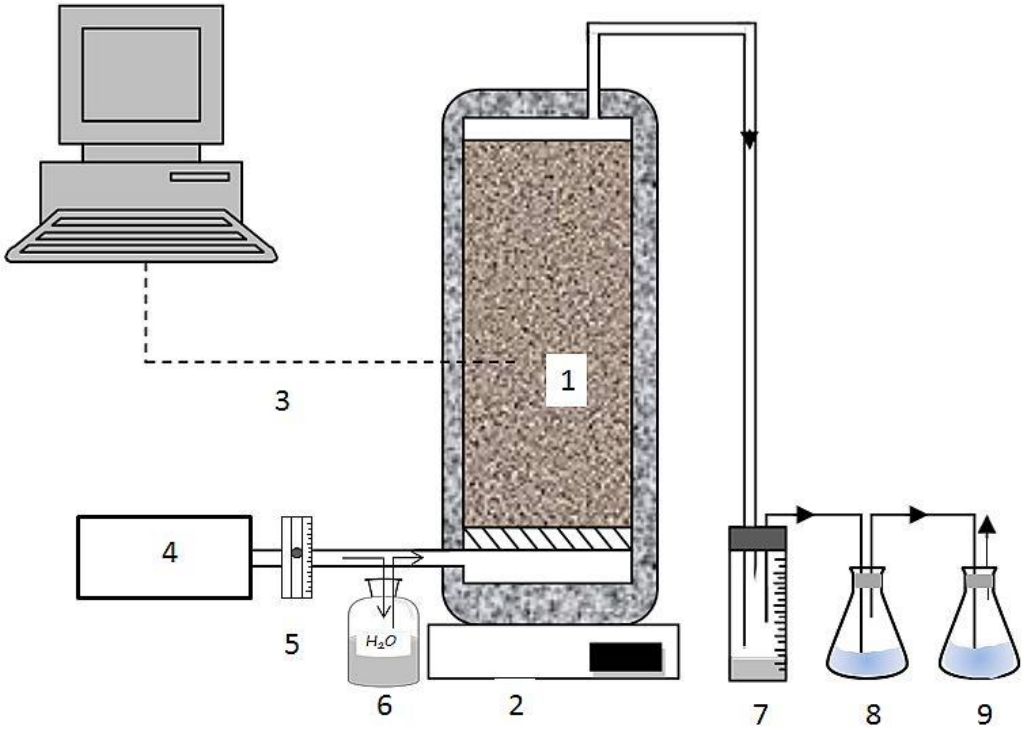
FIAC, Italija, a protok je mjeren pomoću rotametara s pripadajućim regulacijskim ventilima u mjernim područjima 0,04 – 0,5 dm^3 min^{-1}, 0 – 2,313 dm^3 min^{-1}, Cole-Parmer, USA. Uzorci supstrata i kompostne mase sušeni su u sušioniku Sterimatic ST-11, Instrumentaria, Hrvatska, a žarenje je provedeno u peći za žarenje Demiterm Easy, Elektrosanitarij, Hrvatska. Dušik po Kjeldahlu određivan je pomoću jedinice za raščinjavanje Digestor 2006 i jedinice za destilaciju Kjeltec 2001, FOSS, USA. Sterilizacija hranjivih podloga i deionizirane vode provođena je u autoklavu Sutjeska, Jugoslavija, a čistog staklenog posuđa u suhom sterilizatoru Instrumentaria, Hrvatska. Eksperimenti biorazgradnje su se provodili na termostatiranoj rotacijskoj tresilici Heidolph, Unimax 1010, Heidolph – Inkubator 1000, Njemačka. Za homogeniziranje priređenih razrjeđenja korišten je homogenizator REAX top, Heidolph, Njemačka. Za miješanje supstrata i deionizirane vode korištena je rotacijska tresilica, Orbital Shaker PSU-10i, Engleska. Uzgoj mikroorganizama provođen je u termostatima, Termomedicinski aparati, Hrvatska.

3.4. Aparatura

Pokusi biorazgradnje lignoceluloznog materijala provedeni su u termostatiranoj rotacijskoj tresilici (slika 3.2.) u Erlenmeyer tikvicama ukupnog volumena 250 cm^3.

Slika 3.2. Rotacijska tresilica Unimax 1010, Heidolph – Inkubator 1000.

Pokusi kompostiranja provedeni su u adijabatskom reaktoru radnog volumena V_r = 10 dm^3 (slika 3.3). Zrak je upuhivan na dnu reaktora, a protok ulaznog zraka podešen je rotametrom. Izlaz iz rotametra je spojen na bocu ispiralicu koja je postavljena prije reaktora. Na izlazu iz reaktora sakupljan je kondenzat, a izlazni plinovi, CO_2 i NH_3, apsorbirani su u 1 mol dm^{-3} NaOH odnosno 4 % H_3BO_3. Temperaturna osjetila su smještena na ulazu i u sredini reaktora te spojena na osobno računalo te primjenom programa Lab View očitavala se temperatura. Uzorkovanje se provodilo kroz otvor na vrhu reaktora.



Slika 3.3. Shematski prikaz procesa kompostiranja: **1** - reaktor, **2** - vaga, **3** - temperaturna osjetila s akvizicijom, **4** - kompresor, **5** - rotametar, **6** - boca ispiralica, **7** - posuda za prikupljanje kondenzata, **8** - 4 % H_3BO_3, **9** - 1 mol dm^{-3} NaOH.

3.5. Analitički postupci

3.5.1. Određivanje suhe tvari

Maseni udio suhe tvari, odnosno sadržaj vlage, određivan je sušenjem uzorka pri 105 °C do konstantne mase. Iz razlike mase prije i poslije sušenja određena je masa vode, odnosno maseni udio vlage u uzorku (3.1.) te maseni udio suhe tvari (3.2.):

$$w(\mathrm{H_2O}) = \frac{m(\mathrm{VT}) - m(\mathrm{ST})}{m(\mathrm{VT})} \quad [\mathrm{kg\,kg^{-1}}] \tag{3.1.}$$

$$w(\mathrm{ST}) = 1 - w(\mathrm{H_2O}) \quad [\mathrm{kg\,kg^{-1}}] \tag{3.2.}$$

gdje $w(H_2O)$ predstavlja udio vlage u uzorku; m(VT) masu vlažnog uzorka, kg; m(ST) masu suhog uzorka, kg; w (ST) udio suhe tvari u uzorku.

3.5.2. Određivanje hlapive tvari

Uzorci su nakon sušenja spaljeni na plameniku u digesteru, a zatim žareni u mufolnoj peći pri 550 °C do konstantne mase. Udio hlapive tvari u supstratu izračunava se iz empirijskog izraza 3.3.. Udio ugljika izračunat je iz empirijskog izraza 3.4.:

$$w(\mathrm{HT}) = \frac{m(\mathrm{ST}) - m(\mathrm{pepeo})}{m(\mathrm{ST})} \quad [\mathrm{kg\,kg^{-1}}] \tag{3.3.}$$

$$w(\mathrm{C}) = \frac{\mathrm{w(HT)}}{1{,}8} \cdot 100 \quad [\%] \tag{3.4.}$$

gdje je w(HT) udio hlapive tvari; m(pepeo) masa uzorka nakon žarenja, kg; odnosno masa pepela; w(C) udio ugljika, %.

3.5.3. Određivanje pH-vrijednosti i električne vodljivosti

U Erlenmeyer tikvicu odvagano je 5 g uzorka i dodano 100 cm^3 deionizirane vode. Nakon 15 minuta miješanja na rotacijskoj tresilici uzorak je filtriran kroz naborani filter papir te su određivani pH-vrijednost i električna vodljivost. U kondenzatu pH-vrijednost i električna vodljivost su određene izravnim uranjanjem elektrode (slika 3.4.).

Slika 3.4. Uređaj za mjerenje pH-vrijednosti i vodljivosti Multi 340i WTW.

3.5.4. Spektrofotometrijsko određivanje anorganskih oblika dušika i fenola

U Erlenmeyer tikvicu odvagano je 5 g uzorka i dodano 100 cm^3 deionizirane vode. Nakon 15 minuta miješanja na rotacijskoj tresilici, uzorak je filtriran kroz naborani filter papir nakon čega su provedene spektrofotometrijske analize. U kondenzatu koncentracije amonijaka i fenola određivane su bez prethodne pripreme.

Amonijak: Koncentracije NH_4^+ iona određivane su metodom po Wagneru.[51] Nakon dodavanja reagensa na Hachovom spektrofotometru pri valnoj duljini od 680 nm provedena su mjerenja.

Nitrati: Koncentracije NO_2^- iona određivane su prema standardnoj metodi za određivanje koncentracije nitrita u otpadnim vodama.[51] Nakon dodavanja reagensa na Hachovom spektrofotometru pri valnoj duljini od 410 nm provedena su mjerenja.

Nitrati: Koncentracije NO_3^- iona određivane su prema standardnoj metodi za određivanje koncentracije nitrata u otpadnim vodama.[51] Nakon dodavanja reagensa na Hachovom spektrofotometru pri valnoj duljini od 500 nm provedena su mjerenja.

Fenoli: Koncentracija fenola određivana je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 500 nm prema standardnoj metodi 4-aminoantipyrin-om.[51]

3.5.5. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK)

Organsko opterećenje, izraženo preko kemijske potrošnje kisika (mg O_2 dm^{-3}) određivano je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 670 nm prema standardnoj metodi.[51]

3.5.6. Određivanje koncentracije plinovitog amonijaka i ugljikovog dioksida

Plinovi, NH_3 i CO_2, nastali tijekom procesa kompostiranja apsorbirani su u 4 % H_3BO_3 s indikatorima, odnosno u 1 mol dm^{-3} NaOH, te je titrimetrijski s 0,1 mol dm^{-3} HCl, odnosno s 1 mol dm^{-3} HCl (uz dodatak fenoftaleina kao indikatora) određen volumen utrošene klorovodične kiseline iz čega je izračunata koncentracija NH_3 i masa CO_2.

3.5.7. Određivanje dušika po Kjeldahu

Nakon sušenja uzorka na zraku i usitnjavanja u tarioniku, odvagano je ~0,5 g uzoraka u epruvete. U epruvete dodano je 12 cm^3 sulfatne kiseline i dvije tablete katalizatora i sve zajedno zagrijavano je u bloku za digestiju oko 60 min pri 420 °C. Po završetku digestije i hlađenja u epruvete je dodano 75 cm^3 deionizirane vode. Epruvete i Erlenmeyer tikvice s 30 cm^3 H_3BO_3 u koju se uvodio dušik postavljene su u jedinicu za destilaciju. Otopina je titrirana s 0,1 mol dm^{-3} HCl do promjene boje iz zelene u crvenu. Iz dobivenih podataka izračunat je udio dušika prema jednadžbi 3.5.:

$$w(\mathrm{N}) = \frac{(V(\mathrm{HCl,\,uzorak}) - V(\mathrm{HCl,\,sp})) \cdot c(\mathrm{HCl}) \cdot 14{,}007 \cdot 100}{m(\mathrm{uzorka})} \quad [\%] \tag{3.5.}$$

gdje je w(N) udio dušika, %; V(HCl,uzorak) titrimetrijski utrošeni volumen za određeni uzorak, dm^3; V(HCl,sp) titrimetrijski utrošeni volumen za slijepu probu, dm^3; c(HCl) koncentracija klorovodične kiseline, mol dm^{-3}; m(uzorka) masa uzorka u kojem je određivan udio dušika, kg.

3.5.8. Mikrobiološka analiza supstrata

Prije mikrobiološke analize bilo je potrebno odvagati 5 g uzorka u Erlenmeyer tikvicu u koju je dodano 100 cm^3 deionizirane vode. Suspenzija je miješana na rotacijskoj tresilici 15 minuta te iz suspenzije su pripremana decimalna razrjeđenja. Ukupan broj živih stanica bakterija i gljiva, CFU (Colony Forming Units), određivan je nacjepljivanjem po 1 cm^3 dobro homogeniziranog originalnog uzorka ili određenog

decimalnog razrjeđenja u Petrijeve zdjelice koje su zalivene hranjivim agarom odnosno sladnim agarom. Petrijeve zdjelice inkubirane su pri 37 °C, 24 - 48 h, za bakterije, odnosno pri 28 °C, 3 - 5 dana, za gljive, a broj mikroorganizama određivan je brojanjem izraslih kolonija i rezultat je izražen kao CFU cm^{-3}.[52]

3.6. Postupci provedenih ispitivanja

3.6.1. Biorazgradnja lignoceluloznog materijala

Procesi biorazgradnje lignoceluloznog materijala provodili su se na termostatiranoj rotacijskoj tresilici pri 37 °C i 160 o min^{-1} tijekom 21 dana. Provedeno je šest pokusa označenih s T1 - T6 (tablica 3.1.) u Erlenmeyer tikvicama od 250 cm^3.

Tablica 3.1. Početni uvjeti za pokuse T1-T6.

Pokus	**Inokulirana kultura**	**CFU / st cm^{-3}**	**Supstrat**	***m*₀ (supstrat) / g**	**C:N / -**	***T* / °C**
T1	-	-	nesterilni D i KM	10	30	37
T2	MK1	~$1 \cdot 10^6$	nesterilni D i KM			
T3	*Phanerochaete chrysosporium*	~$1 \cdot 10^6$	sterilni D i KM			
T4	*Trichoderma reesei*	~$1 \cdot 10^6$	sterilni D i KM			
T5	MK1	~$1 \cdot 10^6$	sterilni D i KM			
T6	MK2	~$1 \cdot 10^6$	sterilni D i KM			

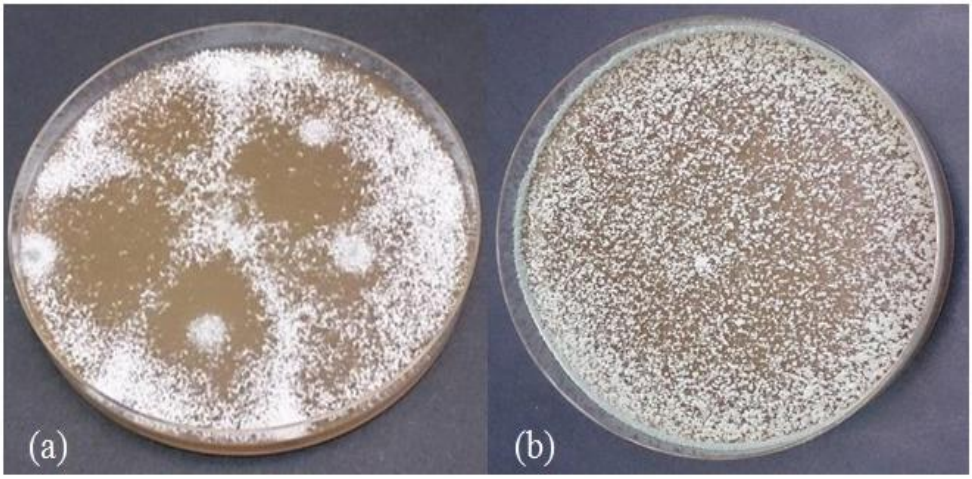
*D - duhanski otpad, KM – komina maslina

Supstrati, duhanski otpad (D) i komina masline (KM), pomiješani su u omjeru C:N 30:1. U T1 i T2 provodena je biorazgradnja nesterilnog duhana i komine maslina bez inokulacije i uz inokulaciju mješovite kulture mikroorganizama (MK1): *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma reesei*, *Pseudomonas aeruginosa* FN, *Candida rugosa, Aspergillus fumigatus* i aktinomiceta. U T3 do T6 supstrati su prethodno sterilizirani vlažnom sterilizacijom. U T3 inokulirana je kultura *Phanerochaete chrysosporium*, a u T4 *Trichoderma reesei*. U T5 i T6 inokulirana je mješovita kultura MK1 i MK2. MK2 se sastojala od mikroorganizama izoliranih iz korištenih supstrata: *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus, Candida*

rugosa i aktinomiceta. Početni broj spora plijesni i stanica kvasaca u 1 cm^3 (CFU) određen je brojanjem u Thominoj komorici, odnosno CFU bakterija određen je prema McFarland standardima. Tijekom procesa u uzorcima su određivani: udio vlage, suha tvar, hlapiva tvar, fenoli, ukupno organsko opterećenje, pH-vrijednost, ukupan broj mezofilnih i termofilnih mikroorganizama te su FTIR analizom praćene strukturne promjene supstrata.

3.6.2. Kompostiranje lignoceluloznog materijala

Kompostiranje lignoceluloznog materijala provedeno je u adijabatskom reaktoru radnog volumena 10 dm^3 tijekom 28 dana. U tablici 3.2. dani su početni radni uvjeti procesa kompostiranja bez inokulacije (P1) i uz inokulaciju mikroorganizama (P2) koja je sadržavala po 50 cm^3 suspenzije kultura *Phanerochaete chrysosporium* i *Trichoderma reesei* početne koncentracije $1 \cdot 10^7$ st cm^{-3}. Navedene kulture mikroorganizama prikazane su na slici 3.5. Početni broj stanica plijesni, odnosno spora u 1 cm^3 (CFU) određen je brojanjem u Thominoj komorici. Tijekom procesa kompostiranja u uzorku supstrata određivani su: udio vlage, suha tvar, hlapiva tvar, NH_4^+, NO_2^-, NO_3^-, fenoli, pH-vrijednost, električna vodljivost, temperatura, ukupan broj mezofilnih i termofilnih mikroorganizama te su FTIR analizom praćene strukturne promjene supstrata.



Slika 3.5. *Phanerochaete chrysosporium* (a) i *Trichoderma reesei* (b) izrasle na hranjivoj podlozi.

Tablica 3.2. Početni uvjeti procesa kompostiranja za pokuse P1 i P2.

Pokusi	**P1**	**P2**
V(reaktor) / dm^3	10	
m_0 / kg	4,5	
$w_0(H_2O)$ / %	60	
Qz / $dm^3 min^{-1} kg_{HT0}^{-1}$	0,8413	
C:N omjer / -	25	30
Inokulirane kulture	-	*P. chrysosporium, T. reesei*

4. REZULTATI

4.1. Fizikalno - kemijska karakterizacija supstrata

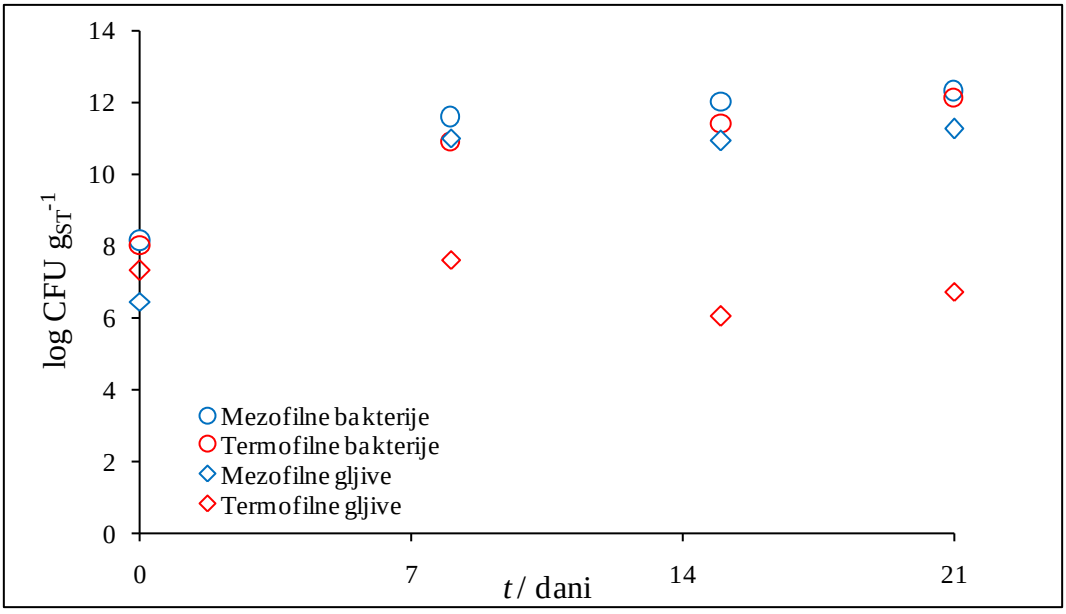
U tablici 4.1. dani su rezultati fizikalno-kemijske karakterizacije supstrata korištenih u pokusima biorazgradnje.

Tablica 4.1. Fizikalno - kemijska karakterizacija supstrata.

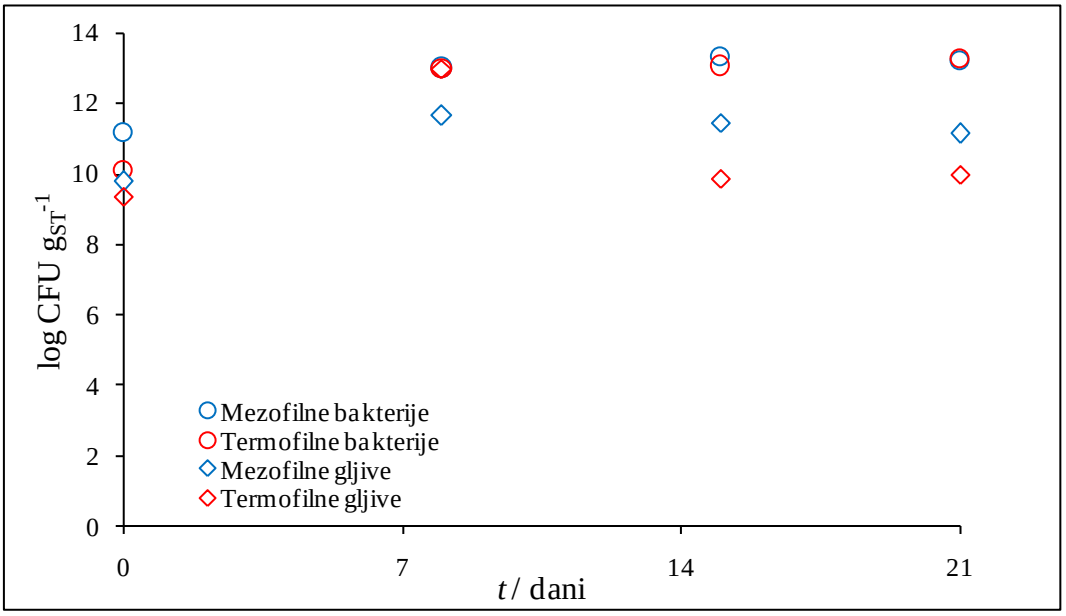
	Duhanski otpad	Komina maslina	Supstrat u P1	Supstrat u P2
$w(H_2O)$ / %	19,9	57,8	61,9	57,2
w(ST) / %	80,1	42,2	38,1	42,8
w(HT) / %	80,1	97,3	82,7	85,9
C:N / -	16	45	24	27
pH- vrijednost / -	7,10	5,55	6,45	7,20

4.2. Analiza biorazgradnje lignoceluloznog materijala

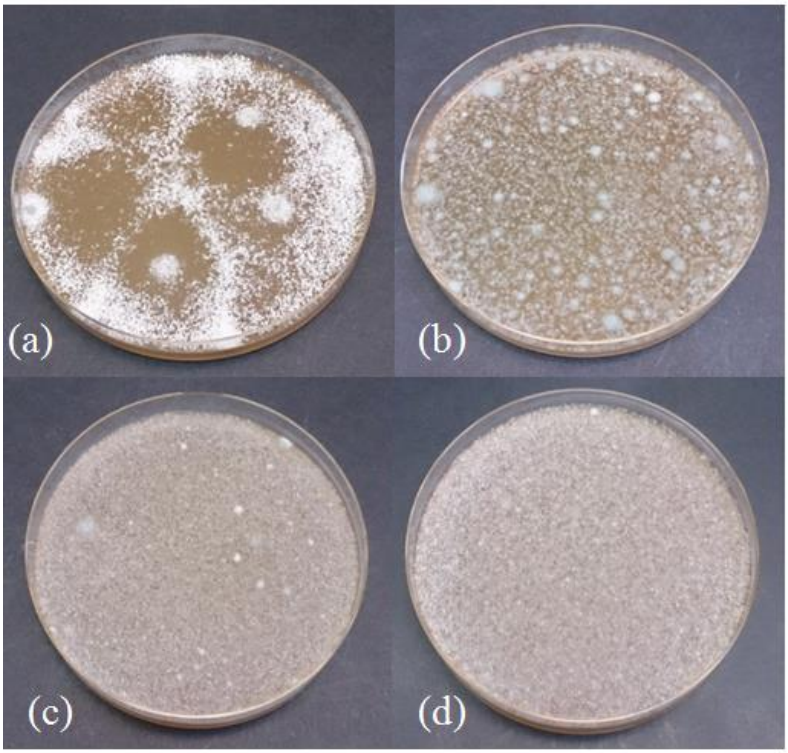
U ovom poglavlju prikazani su rezultati biorazgradnje lignoceluloznog materijala u pokusima T1 - T6 koji su opisani u poglavlju 3.6.1.



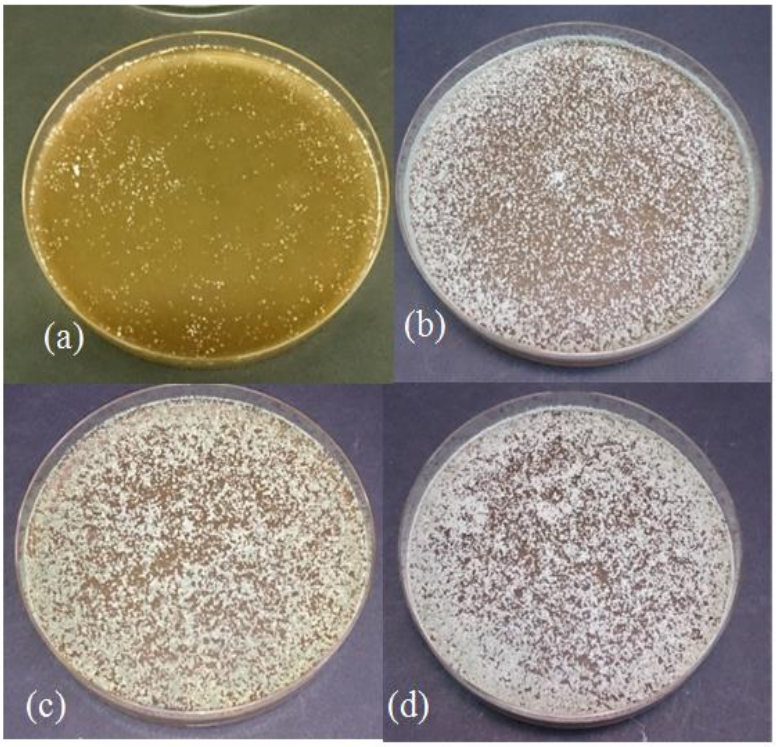
Slika 4.1. Promjena ukupnog broja mezofilnih i termofilnih mikroorganizama tijekom 21 dana procesa biorazgradnje u pokusu T1.



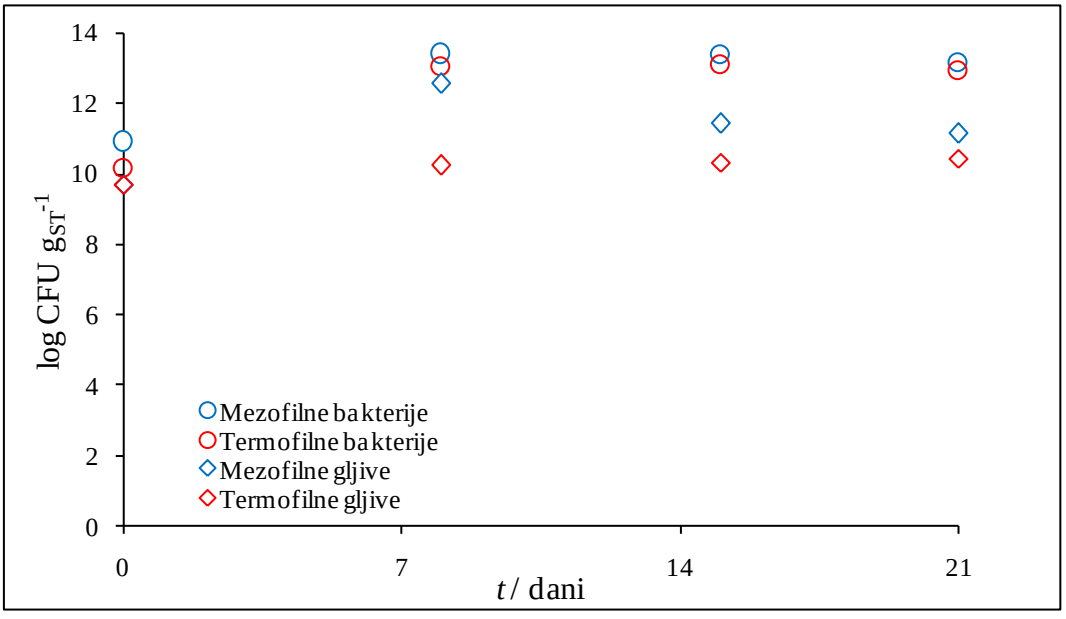
Slika 4.2. Promjena ukupnog broja mezofilnih i termofilnih mikroorganizama tijekom 21 dana procesa biorazgradnje u pokusu T2.



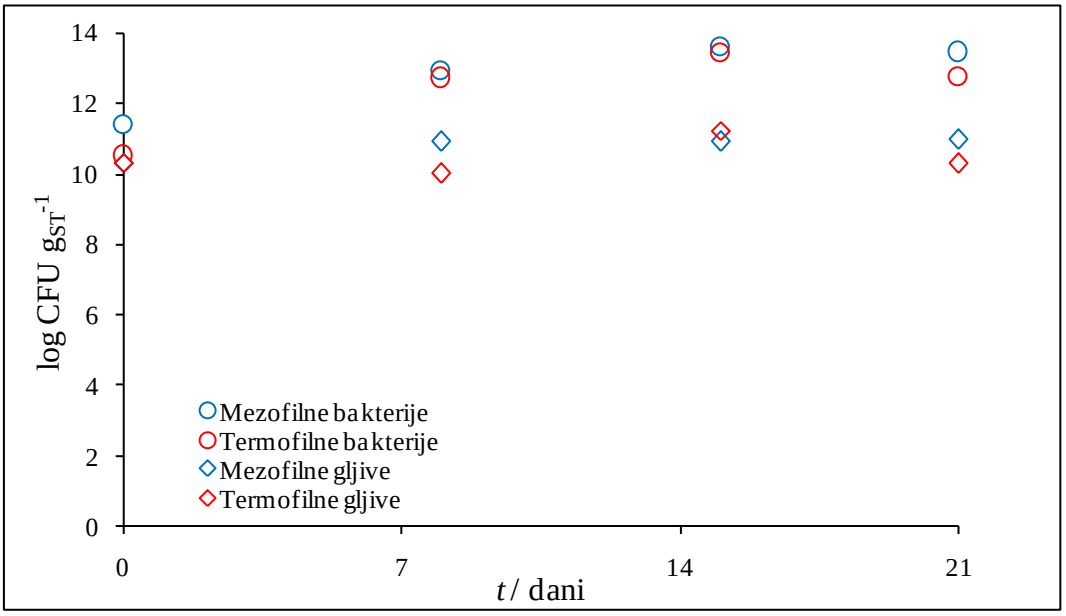
Slika 4.3. Prikaz mezofilnih gljiva tijekom 21 dana procesa biorazgradnje u pokusu T3 (0 dan (a), 8 dan (b), 15 dan (c) i 21 dan (d)).



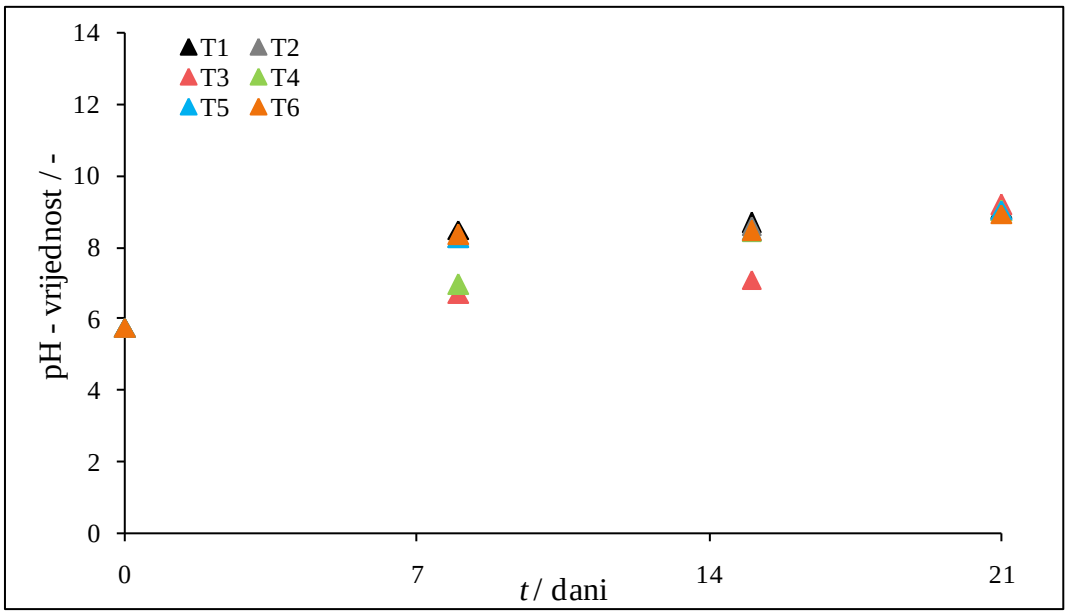
Slika 4.4. Prikaz mezofilnih gljiva tijekom 21 dana procesa biorazgradnje u pokusu T4 (0 dan (a), 8 dan (b), 15 dan (c) i 21 dan (d)).



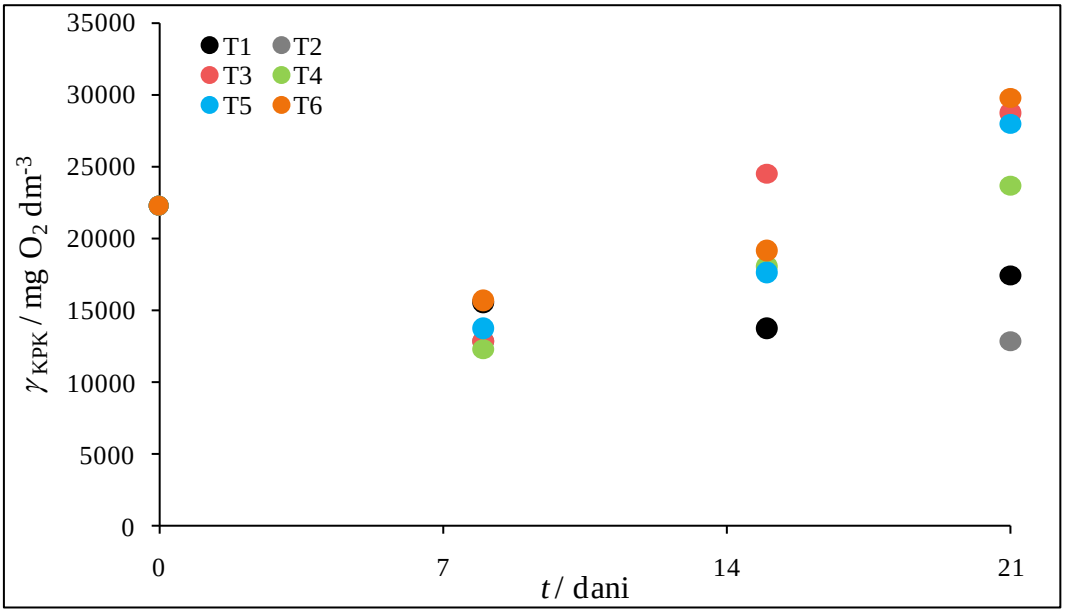
Slika 4.5. Promjena ukupnog broja mezofilnih i termofilnih mikroorganizama tijekom 21 dana procesa biorazgradnje u pokusu T5.



Slika 4.6. Promjena ukupnog broja mezofilnih i termofilnih mikroorganizama tijekom 21 dana procesa biorazgradnje u pokusu T6.

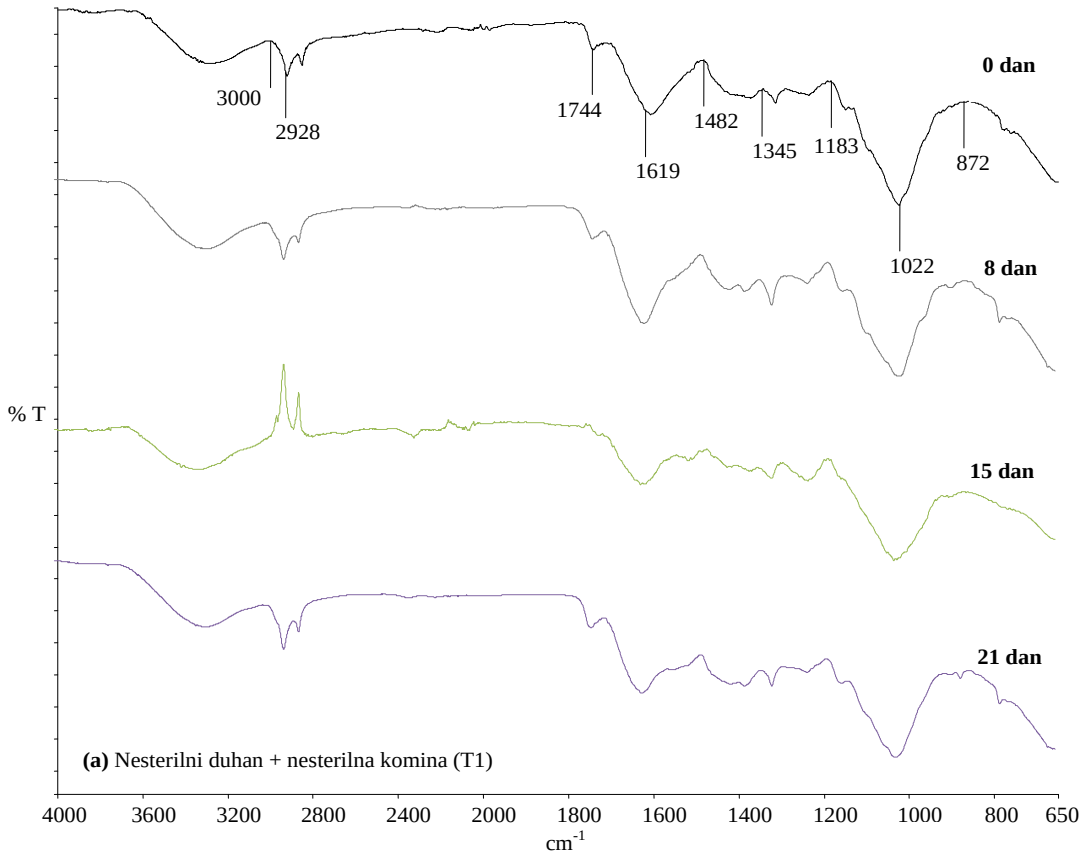


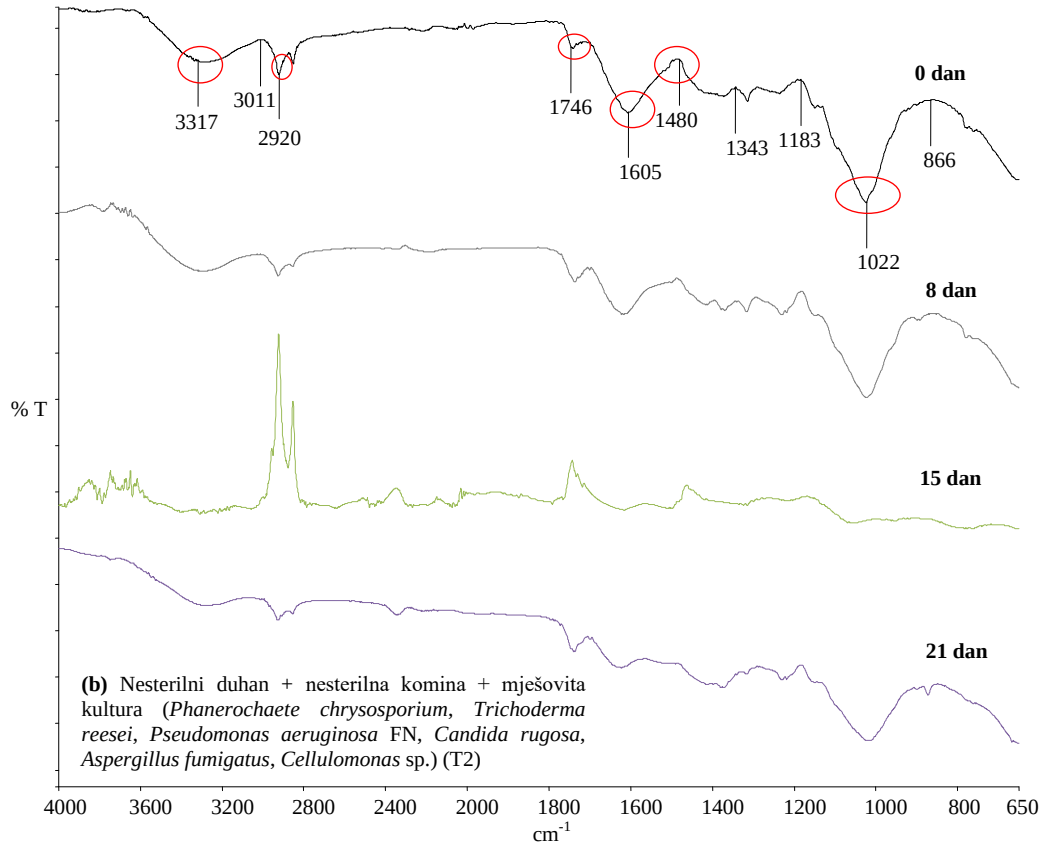
Slika 4.7. Promjena pH–vrijednosti tijekom 21 dana procesa biorazgradnje u pokusima T1 - T6.



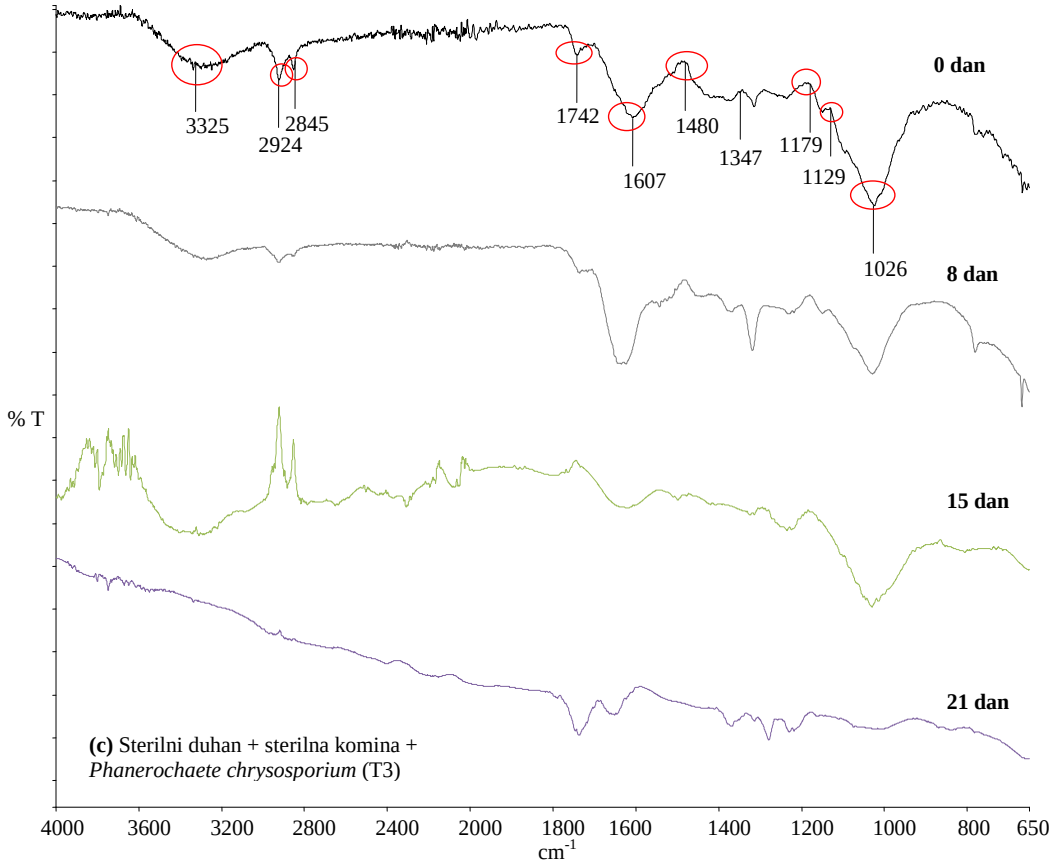
Slika 4.8. Promijena organskog opterećenja izraženog preko vrijednosti KPK tijekom 21 dana u pokusima T1 - T6.

Na slici 4.9. prikazani su rezultati strukturne promjene lignoceluloznog supstrata u pokusima T1 - T6.

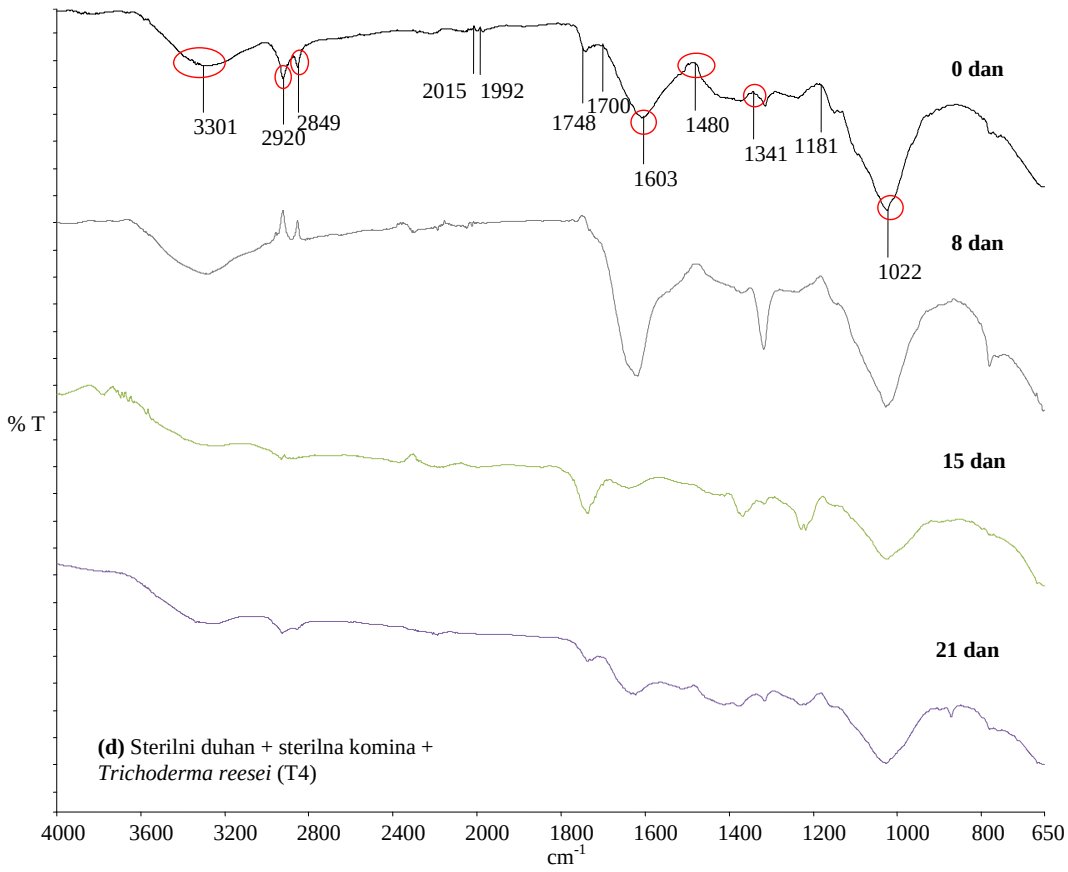




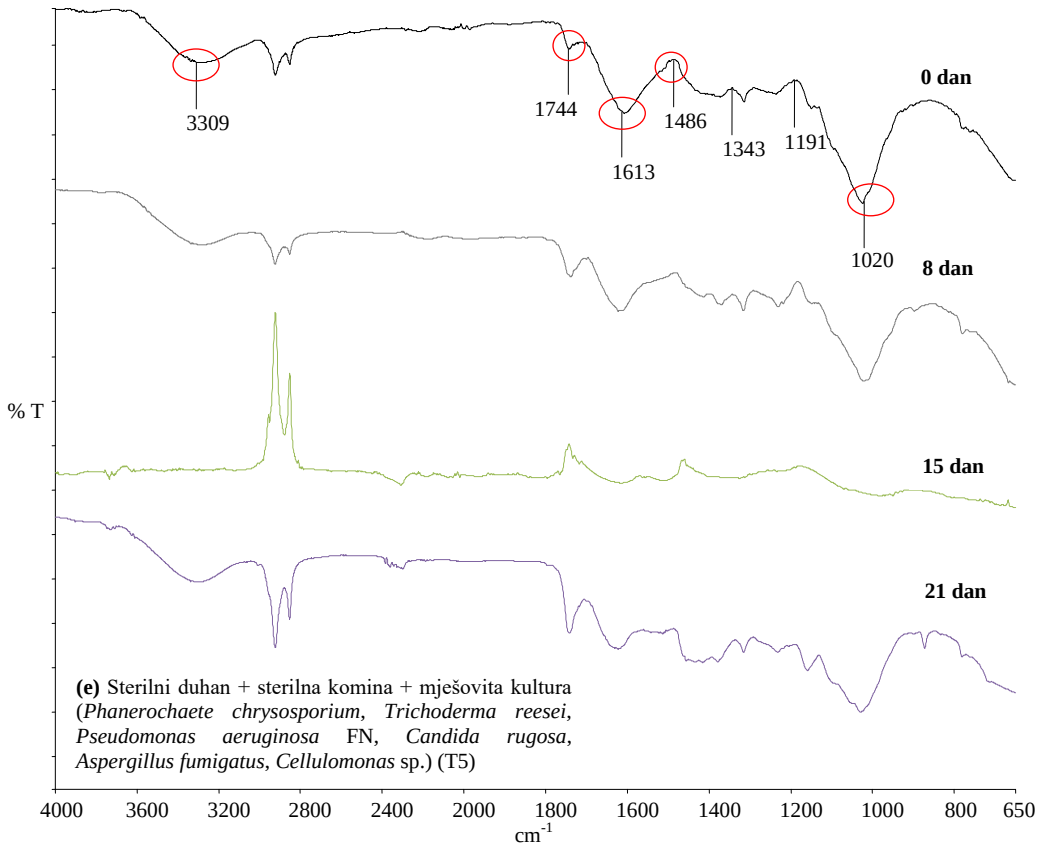
(b) Nesterilni duhan + nesterilna komina + mješovita kultura (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma reesei*, *Pseudomonas aeruginosa* FN, *Candida rugosa*, *Aspergillus fumigatus*, *Cellulomonas* sp.) (T2)



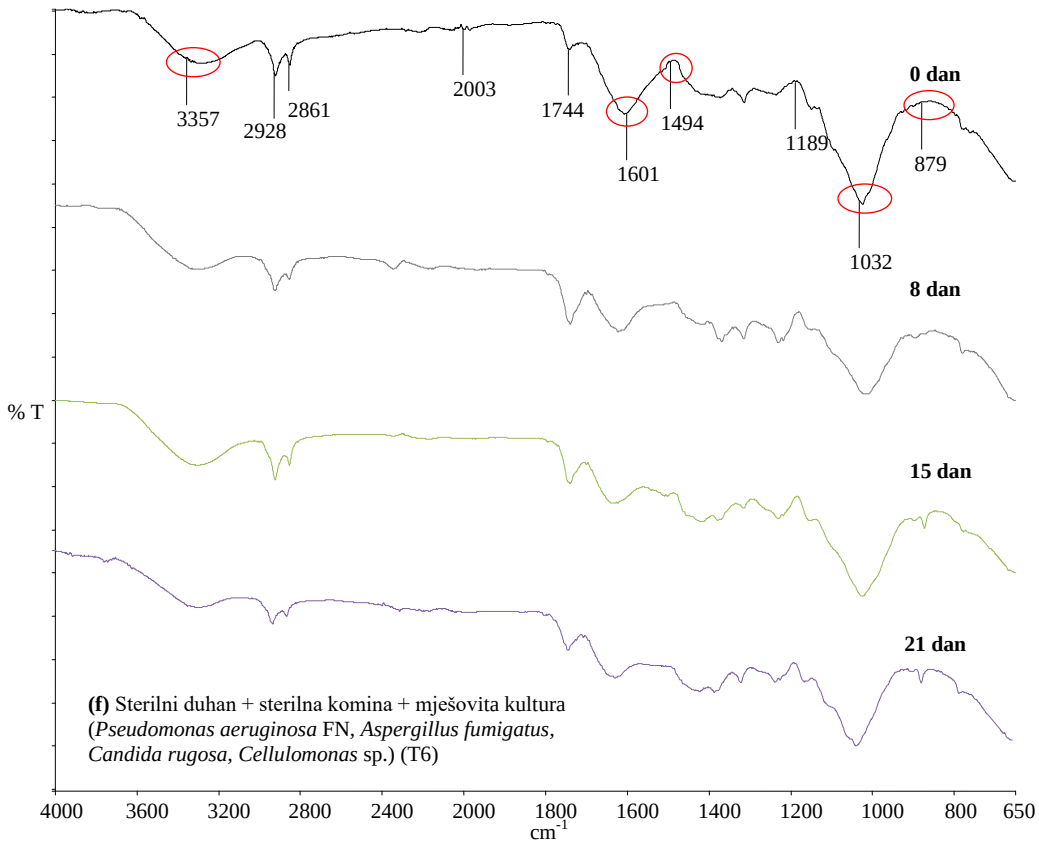
(c) Sterilni duhan + sterilna komina + *Phanerochaete chrysosporium* (T3)



(d) Sterilni duhan + sterilna komina + *Trichoderma reesei* (T4)



(e) Sterilni duhan + sterilna komina + mješovita kultura (*Phanerochaete chrysosporium, Trichoderma reesei, Pseudomonas aeruginosa* FN, *Candida rugosa, Aspergillus fumigatus, Cellulomonas* sp.) (T5)

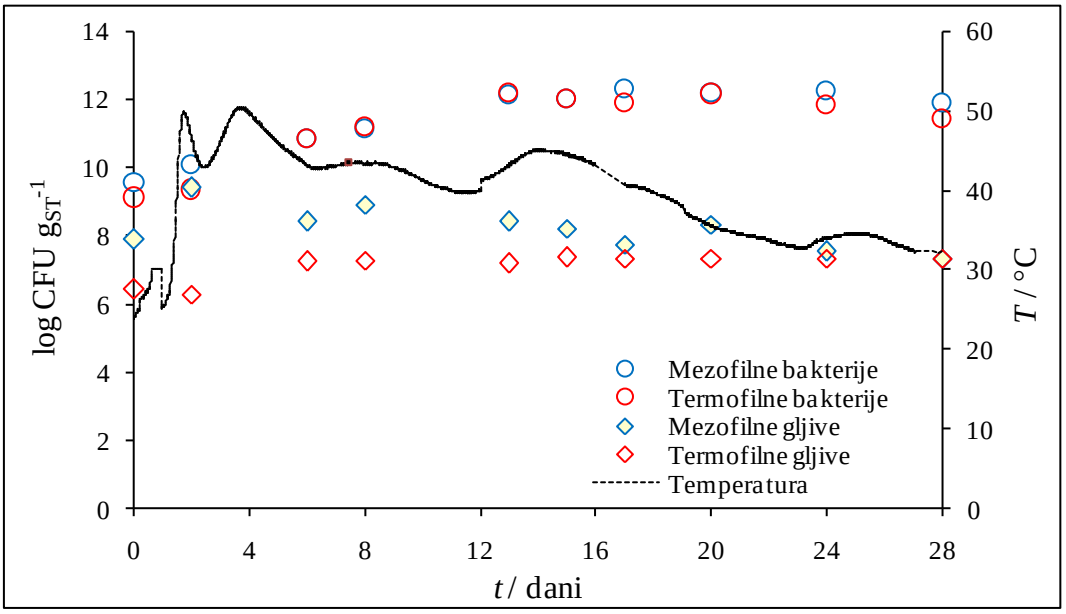


Slika 4.9. Spektri FTIR-a tijekom procesa biorazgradnje lignoceluloznog supstrata u pokusima T1 (a), T2 (b), T3 (c), T4 (d), T5 (e) i T6 (f) tijekom 21 dana.

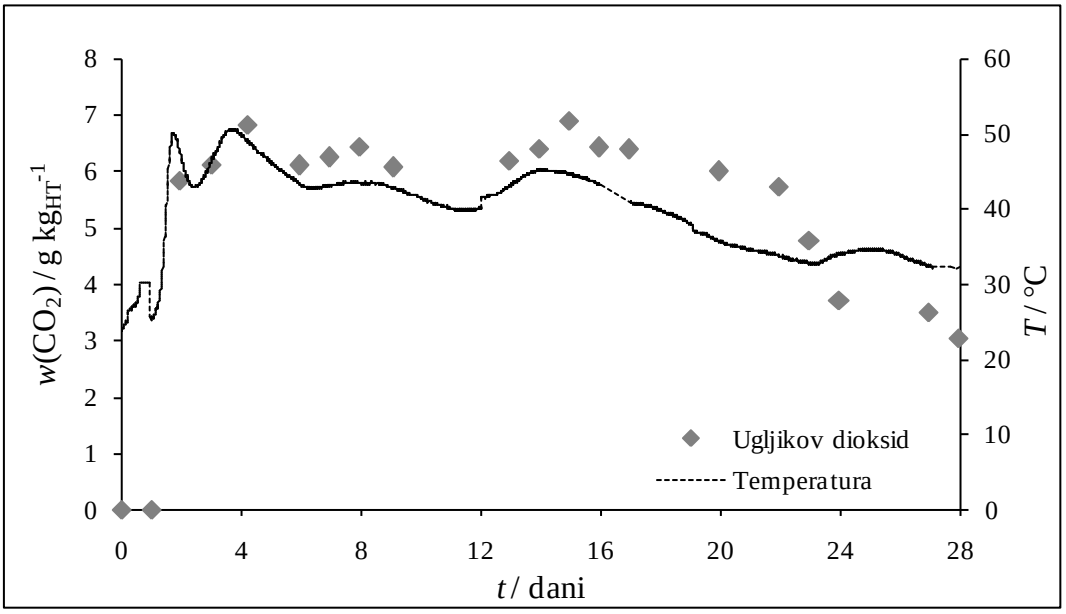
4.3. Analiza procesa kompostiranja

U ovom poglavlju prikazani su rezultati fizikalno-kemijske i mikrobiološke karakterizacije supstrata tijekom procesa kompostiranja bez inokulacije (P1) i uz inokulaciju mikroorganizama (P2) kako je opisano su u poglavlju 3.6.2.

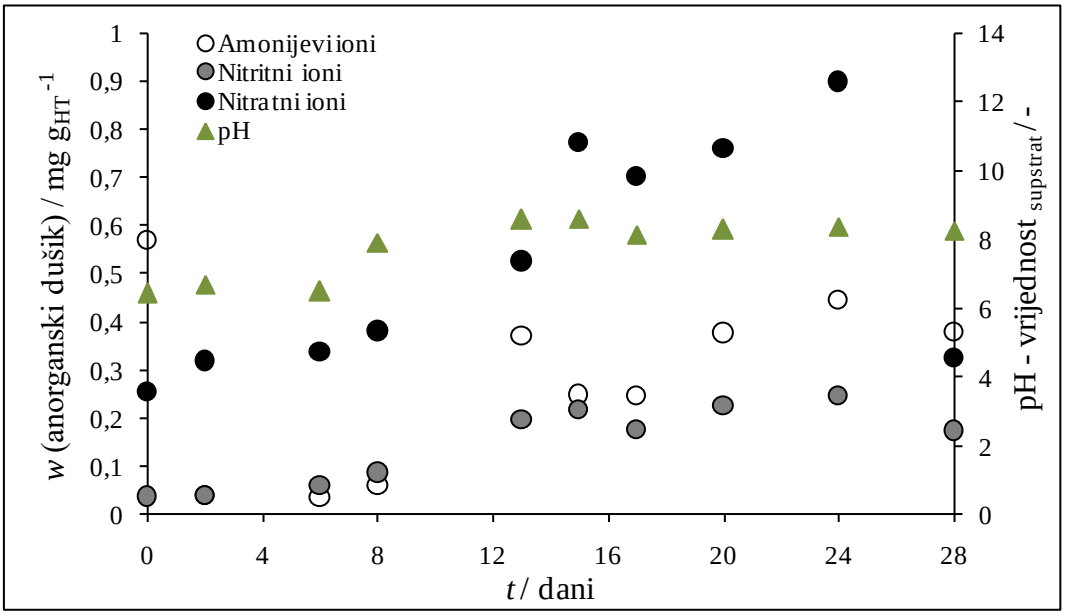
4.3.1. Analiza procesa kompostiranja supstrata bez inokulacije mikroorganizama



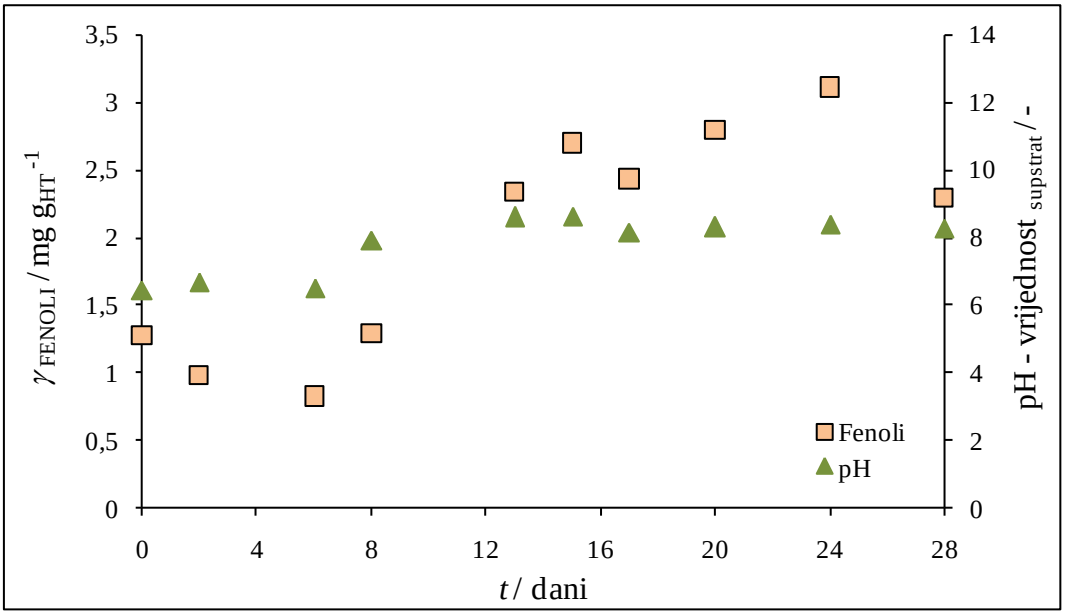
Slika 4.10. Promjena ukupnog broja mezofilnih i termofilnih mikroorganizama i temperature u kompostnoj masi tijekom 28 dana u pokusu P1.



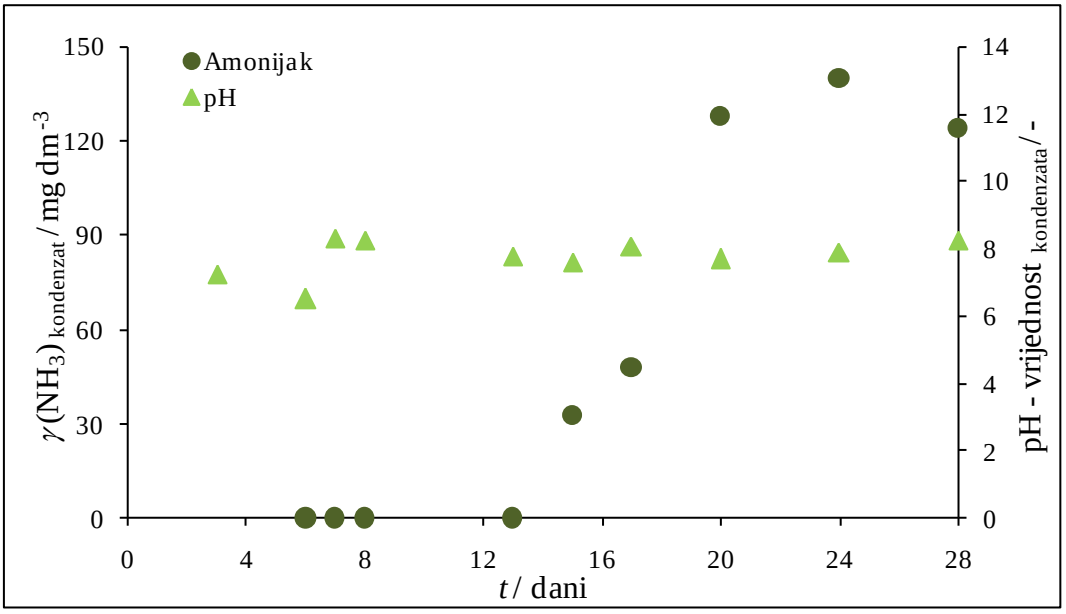
Slika 4.11. Promjena masenog udjela CO_2 u struji zraka na izlazu iz reaktora i temperature tijekom 28 dana u pokusu P1.



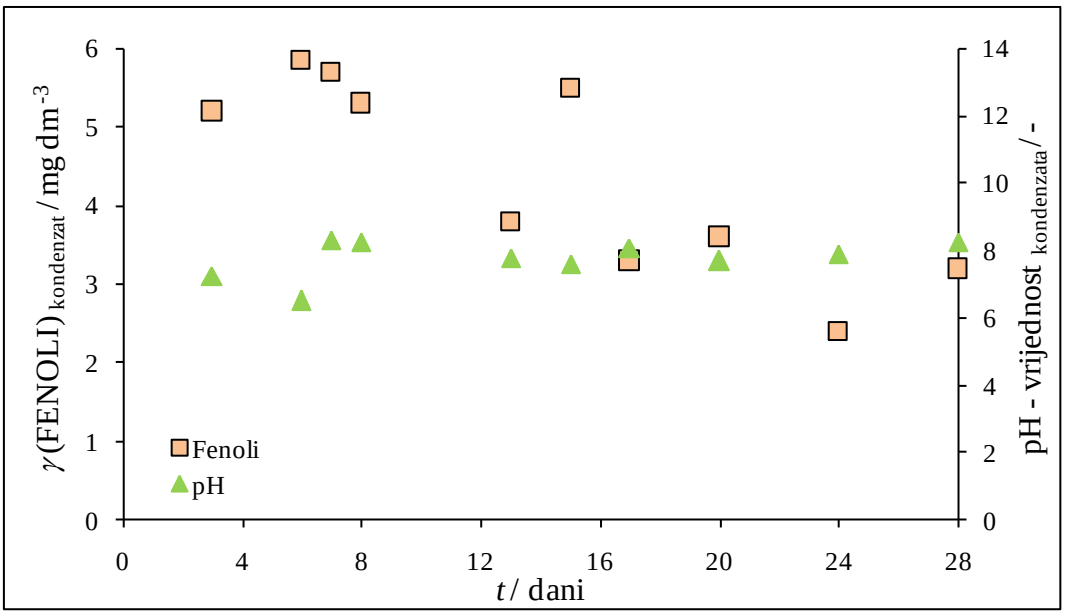
Slika 4.12. Promjena masenog udjela NH_4^+, NO_2^- i NO_3^- iona u kompostnoj masi i pH-vrijednosti tijekom 28 dana u pokusu P1.



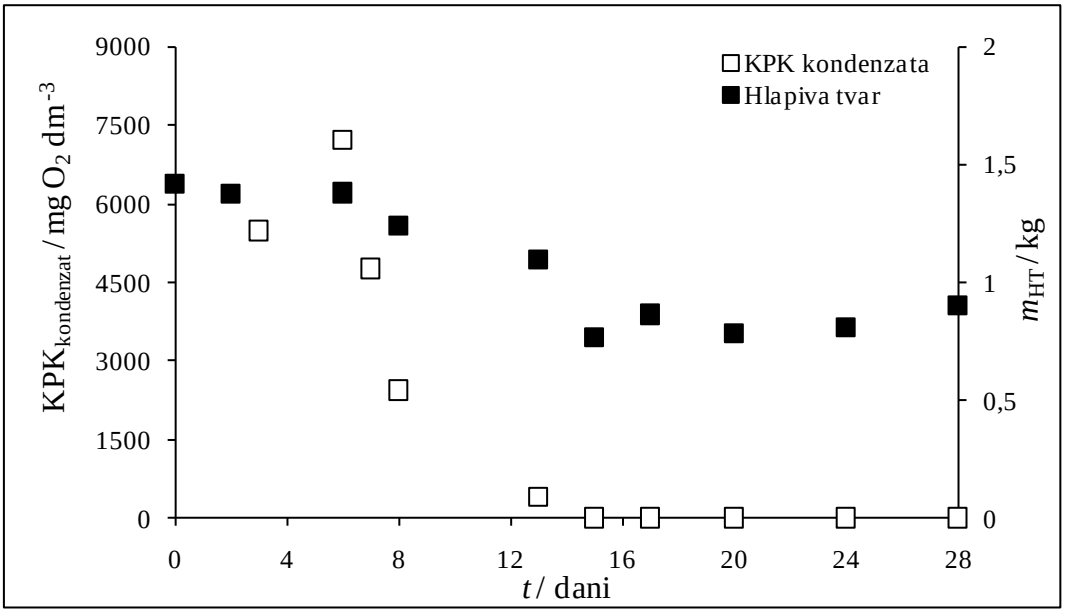
Slika 4.13. Promjena koncentracije fenola u kompostnoj masi i pH-vrijednosti tijekom 28 dana u pokusu P1.



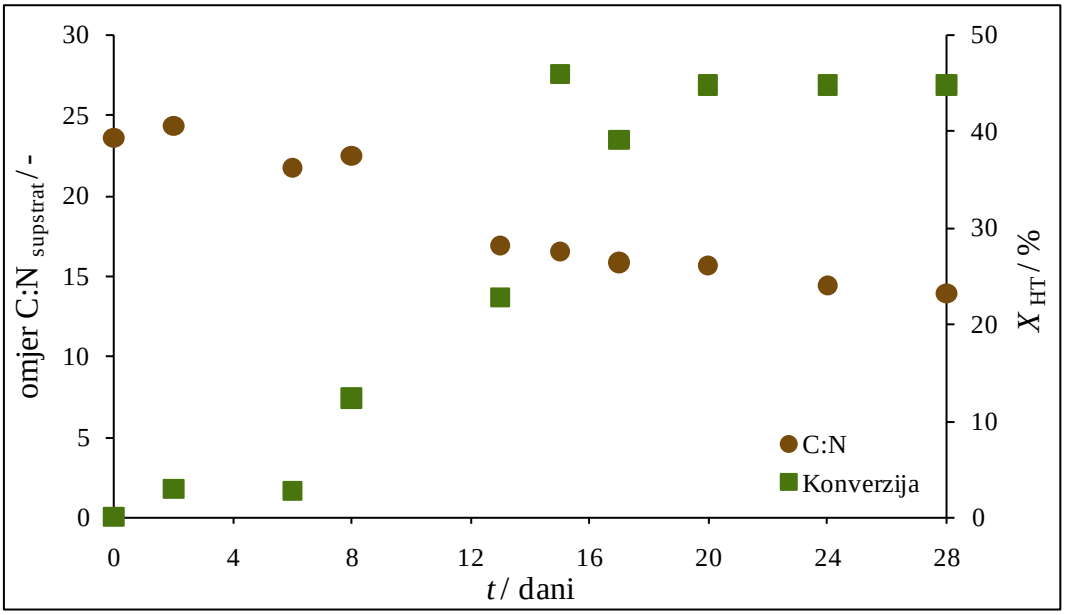
Slika 4.14. Promjena koncentracije NH_3 i pH–vrijednosti u kondenzatu tijekom 28 dana u pokusu P1.



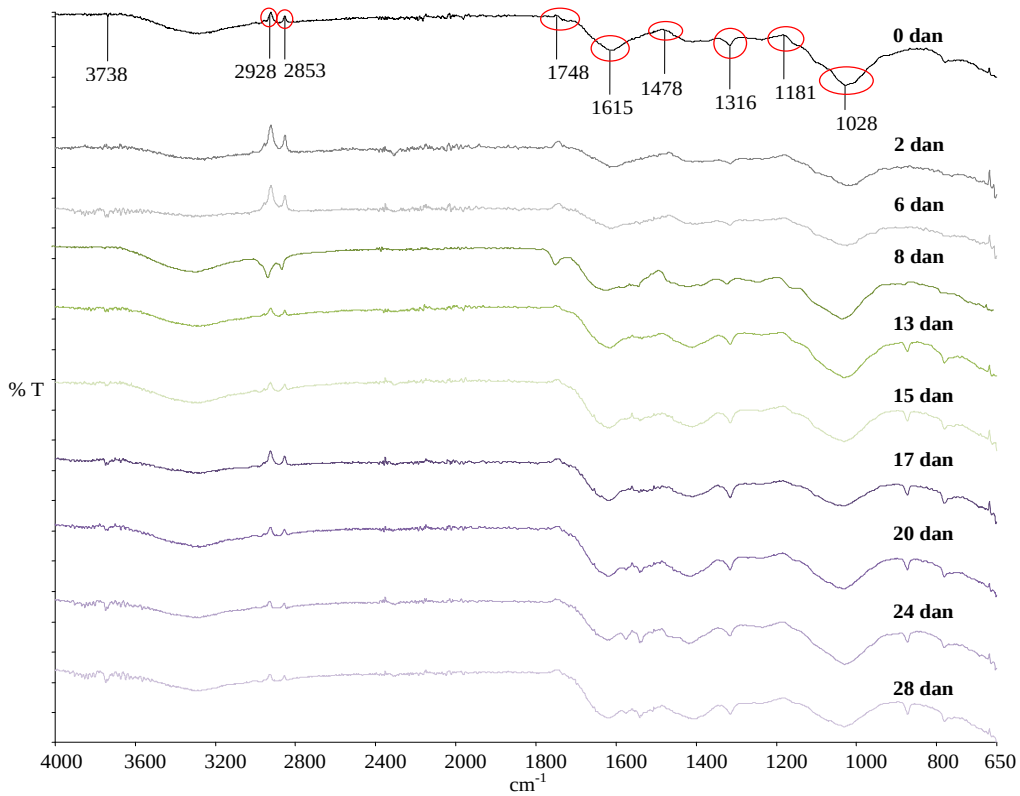
Slika 4.15. Promjena koncentracije fenola i pH–vrijednosti u kondenzatu tijekom 28 dana u pokusu P1.



Slika 4.16. Promjena vrijednosti organskog opterećenja u kondenzatu i hlapive tvari u kompostnoj masi tijekom 28 dana u pokusu P1.

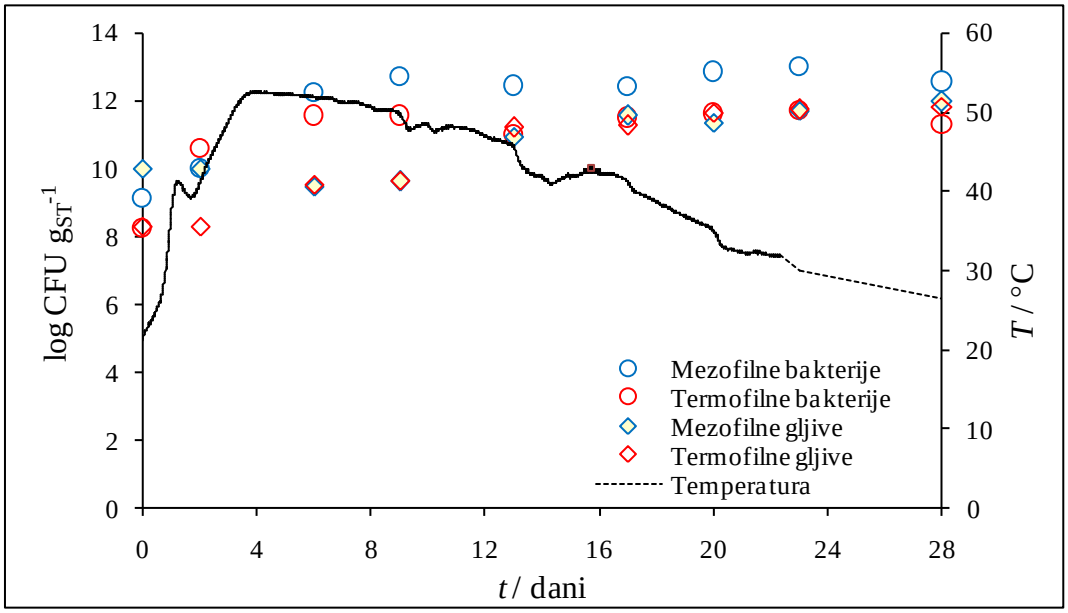


Slika 4.17. Promjena omjera C:N i konverzije u kompostnoj masi tijekom 28 dana u pokusu P1.

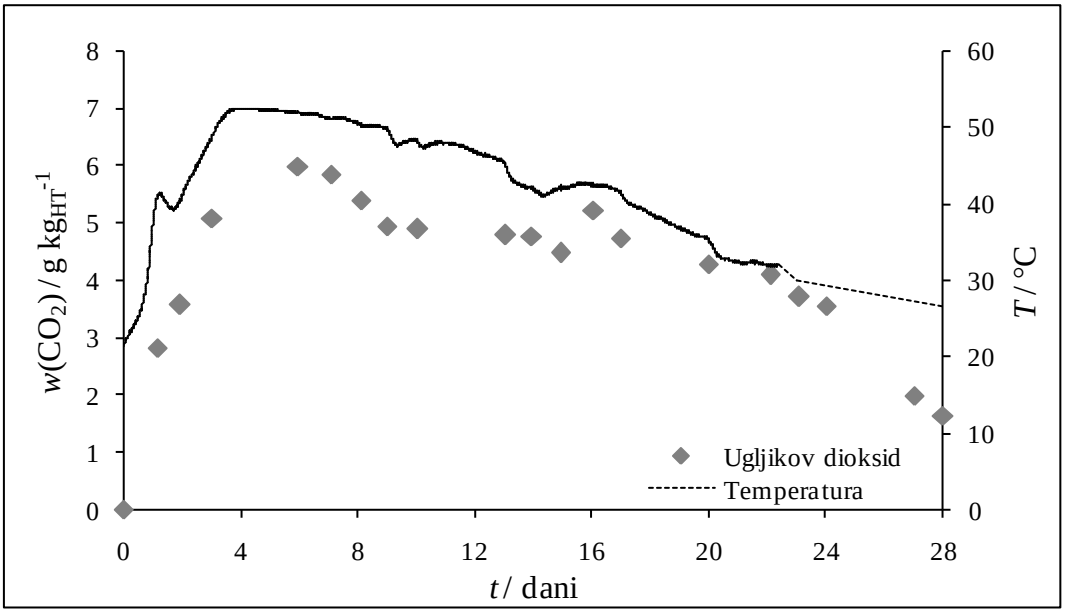


Slika 4.18. Spektar FTIR- a u procesu kompostiranja tijekom 28 dana u pokusu P1.

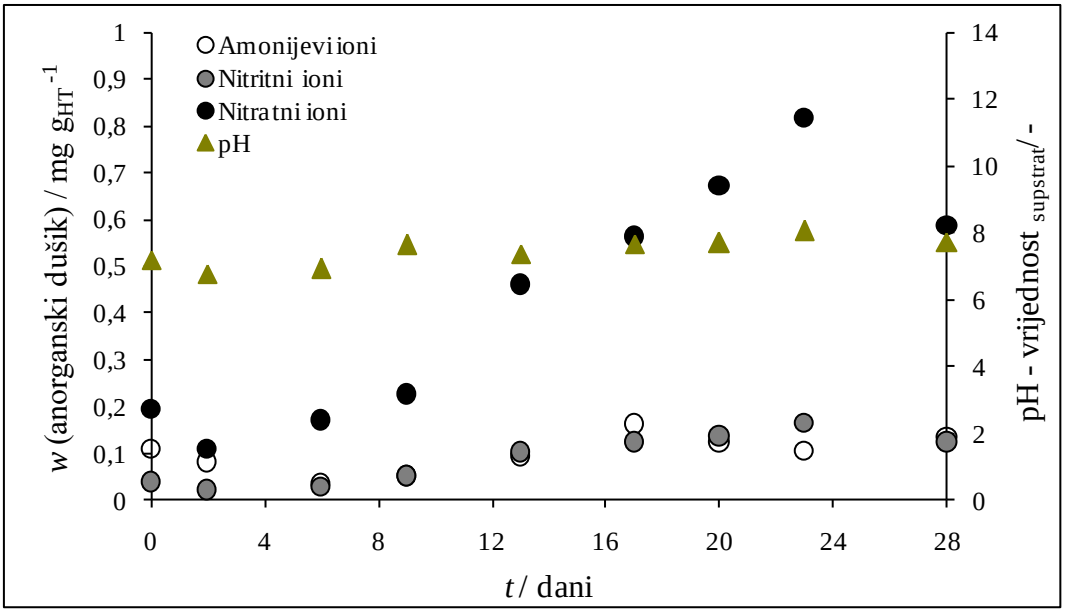
4.3.2. Analiza procesa kompostiranja uz inokulaciju mikroorganizama



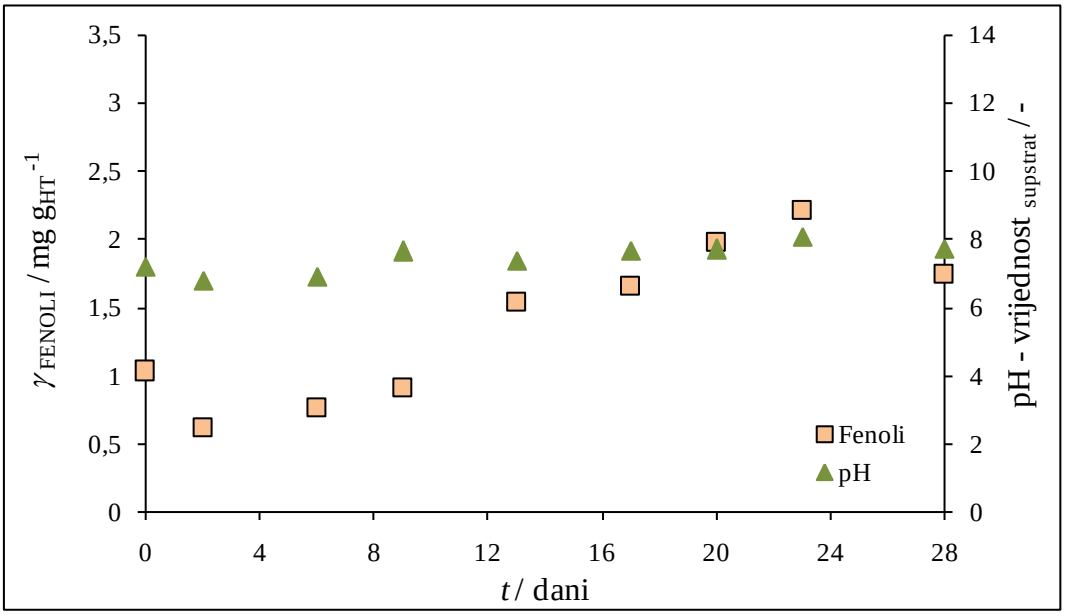
Slika 4.19. Promjena ukupnog broja mezofilnih i termofilnih mikroorganizama i temperature u kompostnoj masi tijekom 28 dana u pokusu P2.



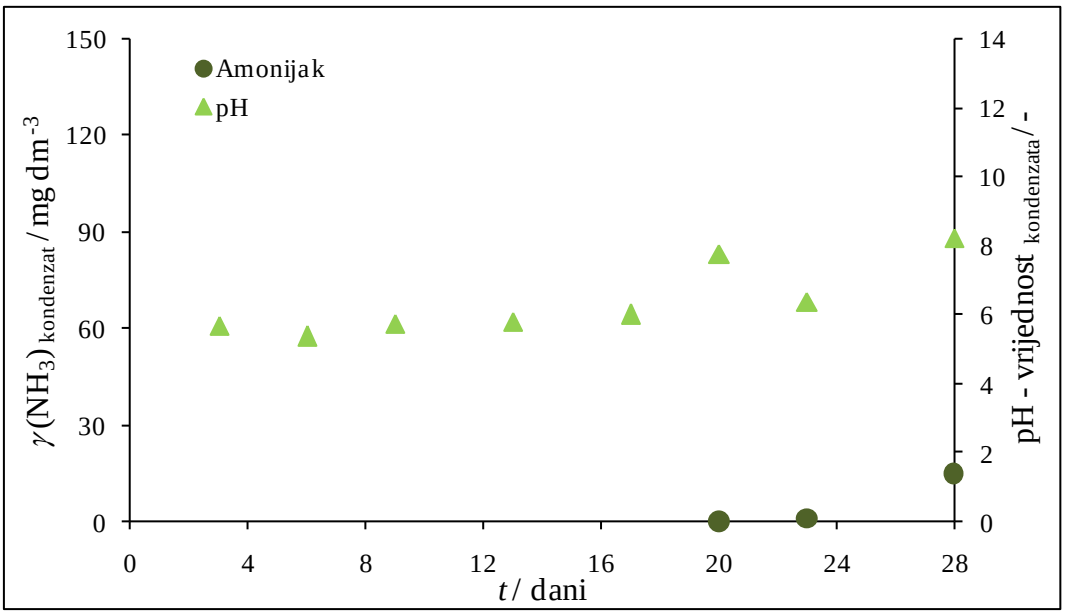
Slika 4.20. Promjena masenog udjela CO_2 u struji zraka na izlazu iz reaktora i temperature tijekom 28 dana u pokusu P2.



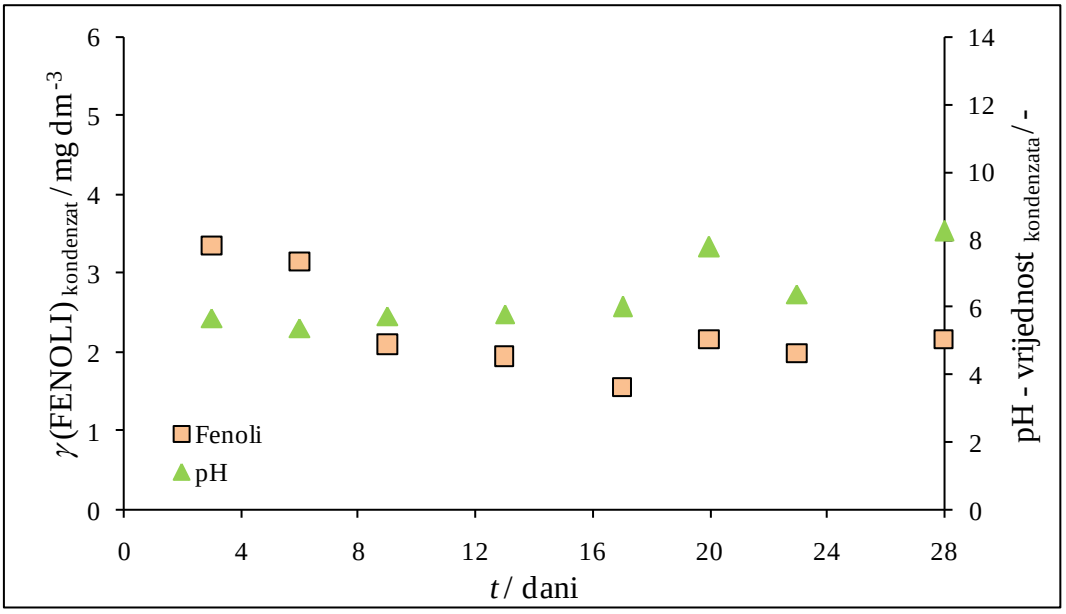
Slika 4.21. Promjena masenog udjela NH_4^+, NO_2^- i NO_3^- iona u kompostnoj masi i pH-vrijednosti tijekom 28 dana u pokusu P2.



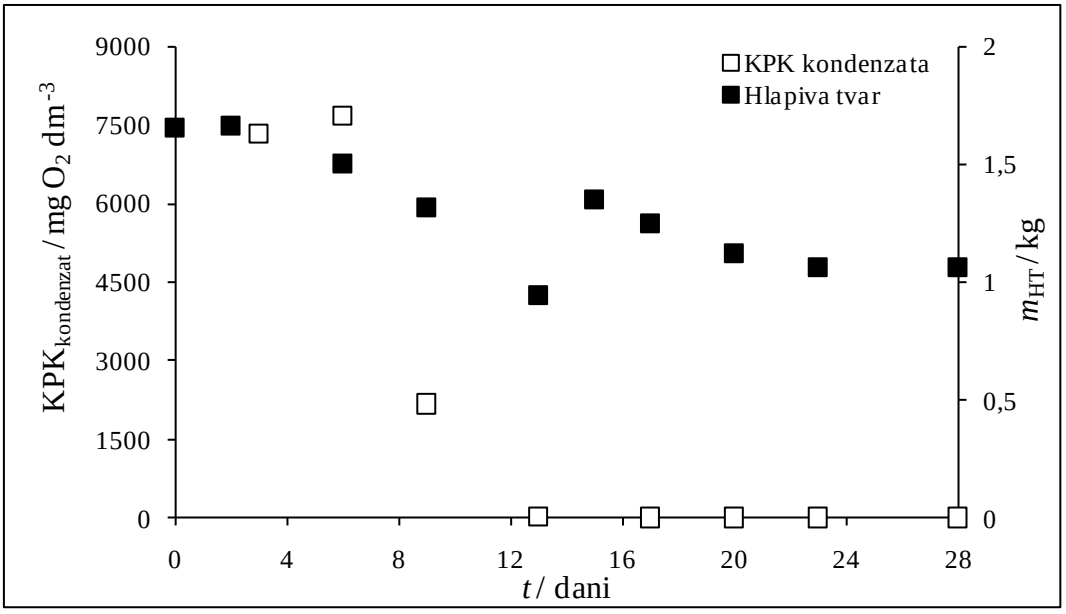
Slika 4.22. Promjena koncentracije fenola u kompostnoj masi i pH-vrijednosti tijekom 28 dana u pokusu P2.



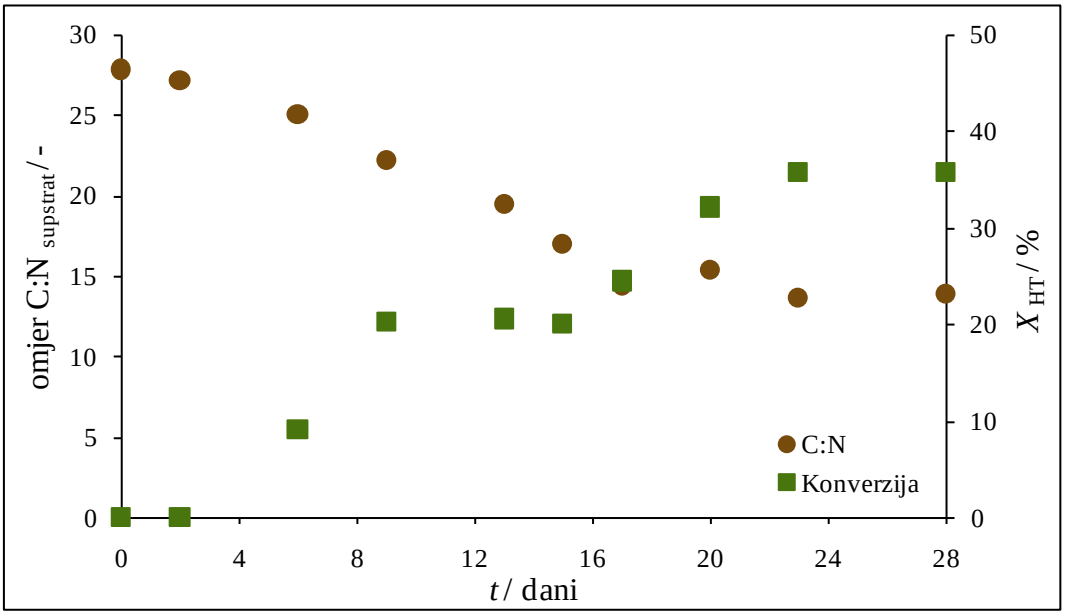
Slika 4.23. Promjena koncentracije NH_3 i pH–vrijednosti u kondenzatu tijekom 28 dana u pokusu P2.



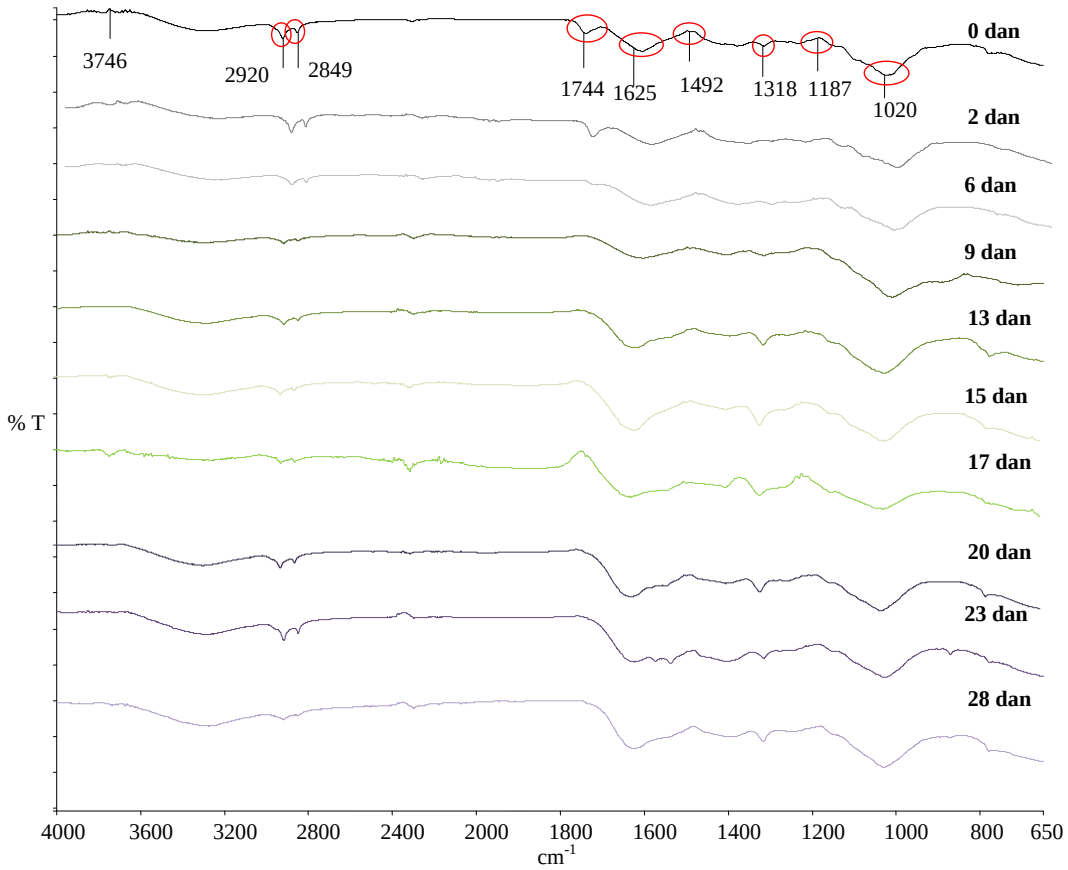
Slika 4.24. Promjena koncentracije fenola i pH–vrijednosti u kondenzatu tijekom 28 dana u pokusu P2.



Slika 4.25. Promjena organskog opterećenja u kondenzatu i hlapive tvari u kompostnoj masi tijekom 28 dana u pokusu P2.



Slika 4.26. Promjena omjera C:N i konverzije u kompostnoj masi tijekom 28 dana u pokusu P2.



Slika 4.27. Spektar FTIR- a u procesu kompostiranja tijekom 28 dana u pokusu P2.

5. RASPRAVA

Gospodarski rast te povećanje potrošnje materijala i sirovina rezultiraju stalnim porastom proizvodnje otpada. Kako bi se spriječilo onečišćenje okoliša i smanjio pritisak na okoliš potrebno je nastali otpad zbrinuti na način da se minimizira rizik za ljudsko zdravlje i okoliš. Kompostiranje je jedan od načina zbrinjavanja biorazgradivog čvrstog otpada, čiji je produkt vrijedna sirovina koja se može koristiti kao sredstvo za oplemenjivanje tla ili kao prihrana osiromašenih tala.[2,53]

U ovom radu istražena je mogućnost zbrinjavanja lignocelulozno otpada procesom kompostiranja. Duhanski otpad i komina maslina odabrani su kao lignocelulozni supstrati u svrhu provedbe pokusa. Navedeni otpadi pripadaju kategoriji agroindustrijskog otpada te se ne smiju odložiti na tlo bez prethodne obrade. Prije provedbe procesa kompostiranja provedena su preliminarna ispitivanja biorazgradnje lignocelulozno supstrata na rotacijskoj tresilici uz inokulaciju različitih mikroorganizama. Prema literaturi[8-10] pojedine kulture mikroorganizama pokazuju visoku sposobnost razgradnje složenih molekula lignina, celuloze i hemiceluloze. Postavljeno je šest pokusa, T1-T6, te na temelju FTIR analize najbolji pokus, odnosno kultura koja je pokazala najbolju učinkovitost razgradnje lignocelulozno komponenti, odabrana je za inokulaciju u kompostnu masu. Nakon preliminarnih ispitivanja provedena su dva pokusa kompostiranja u adijabatskom reaktoru, bez i uz inokulaciju mikroorganizama, P1 i P2. Kulture mikroorganizama koje su korištene u provedenim pokusima izolirane su iz korištenog supstrata.

5.1. Fizikalno - kemijska karakterizacija supstrata

Prije samog postavljanja pokusa biorazgradnje i kompostiranja lignocelulozno supstrata provedena je fizikalno-kemijska karakterizacija duhanskog otpada i komine maslina. Prema literaturi[5,29-31] i iz tablice 2.1. te tablice 4.1 može se vidjeti da duhanski otpad u odnosu na kominu masline karakterizira visok udio organske tvari, viša pH-vrijednost te ako sadrži više od 0,05 % nikotina klasificira se kao toksičan i opasan otpad[14]. Nadalje, duhanski otpad ima nizak omjer C:N što znači da je bogatiji dušikom. Prema provedenim istraživanjima[54] koncentracija amonijaka u izlaznoj struji zraka je znatno veća nego pri kompostiranju mješavine duhana sa

supstratom koji ima veći omjer C:N. U tablici 4.1. navedene su dobivene vrijednosti karakterizacije za kominu maslina te se uočava kako je udio hlapive tvari veći od 97 %, dok je pH-vrijednost niža u odnosu od duhanskog otpada. Prema literaturi[6,7], osim navedenog, kominu karakterizira C:N omjer do 47:1, koncentracija suspendiranih tvari koja prelazi i 90 %, KPK vrijednosti veće od 190 g O_2 dm^{-3} i koncentracije fenola koje prema nekim istraživanjima prelaze 106 mg g^{-1}. S obzirom na početne fizikalno-kemijske karakteristike može se vidjeti da se mješanjem navedenih supstrata mogu postići optimalni početni uvjeti koji su potrebni za provedbu procesa kompostiranja.

5.2. Analiza biorazgradnje lignocelulozno materijala

Pokusi procesa biorazgradnje lignocelulozno materijala, duhanskog otpada i komine maslina, provodili su se na termostatiranoj rotacijskoj tresilici pri 37 °C i 160 o min^{-1}, 21 dan. U poglavlju 3.6.1. opisan je postupak provedbe pokusa T1-T6 uz definirane početne uvjete prikazane u tablici 3.1.

U pokusu T1 kao supstrati korišteni su nesterilni duhan i komina maslina bez inokulacije mikroorganizama. Na slici 4.1. prikazana je promjena ukupnog broja mezofilnih i termofilnih bakterija i gljiva tijekom 21 dana. Početni broj mezofilnih bakterija iznosio je $1,4 \times 10^8$ g^{-1}_{ST}, u osmom danu broj je eksponencijalno porastao na $3,9 \times 10^{11}$ g^{-1}_{ST}, a 15. i 21. dan iznosio je $9,9 \times 10^{11}$ g^{-1}_{ST} odnosno $2,1 \times 10^{12}$ g^{-1}_{ST}. Gotovo jednaki rast moguće je uočiti i kod termofilnih bakterija. Početni broj termofilnih bakterija iznosio je $1,0 \times 10^8$ g^{-1}_{ST}, osmog dana broj je narastao na $8,2 \times 10^{10}$ g^{-1}_{ST}, a u 21 danu iznosio je $1,3 \times 10^{12}$ g^{-1}_{ST}. Broj mezofilnih gljiva u nultom danu iznosio je $2,7 \times 10^6$ g^{-1}_{ST} te se do osmog dana povećavao do $8,3 \times 10^{11}$ g^{-1}_{ST}. Od 8. do 21. dana nisu zabilježene značajne promjene i red veličine ostao je jednak. Broj mezofilnih gljiva na kraju pokusa iznosio je $1,8 \times 10^{11}$ g^{-1}_{ST}. Broj termofilnih gljiva smanjivao se tijekom 21 dana procesa biorazgradnje s početnih $2,0 \times 10^7$ g^{-1}_{ST} do krajnjih $5,4 \times 10^6$ g^{-1}_{ST}. Prema navedenim rezultatima može se vidjeti da je u pokusu T1 broj mezofilnih termofilnih bakterija i gljiva rastao, što ukazuje da mikroorganizmima odgovaraju navedeni uvjeti te da razgrađuju organsku tvar prisutnu u duhanskom otpadu i komini masline.[19]

U pokusu T2 kao supstrati također su korišteni nesterilni duhan i komina masline te je inokulirana mješovita kultura mikroorganizama (MK1): *Phanerochaete chrysosporium, Trichoderma reesei, Pseudomonas aeruginosa* FN, *Candida rugosa, Aspergillus fumigatus* i aktinomiceta. Mikroorganizmi, *Pseudomonas aeruginosa* FN, *Candida rugosa, Aspergillus fumigatus* i aktinomiceti su izolirani iz navedenih supstrata. Na slici 4.2. prikazana je promjena ukupnog broja mezofilnih i termofilnih mikroorganizama tijekom 21 dana. Početni broj mezofilnih bakterija iznosio je $1{,}4 \times 10^{11}$ g^{-1}_{ST}, a 8. dana pokusa broj je uvećan za dva reda veličine i ostao je nepromijenjen do 21. dana i iznosio je $1{,}6 \times 10^{13}$ g^{-1}_{ST}. Početni broj termofilnih bakterija iznosio je $1{,}2 \times 10^{10}$ g^{-1}_{ST} te u 8. danu se kao i kod mezofilnih bakterija uočava eksponencijalni rast broja kolonija i 21. danu iznosio je $1{,}7 \times 10^{13}$ g^{-1}_{ST}. Broj mezofilnih gljiva na početku pokusa iznosio je $5{,}9 \times 10^{9}$ g^{-1}_{ST} te se eksponencijalno povećavao do osmog dana kada je broj iznosio $4{,}4 \times 10^{11}$ g^{-1}_{ST}. Do kraja ispitivanja broj mezofilnih gljiva ostao je gotovo nepromijenjen i 21. dana iznosio je $1{,}3 \times 10^{11}$ g^{-1}_{ST}. Za razliku od mezofilnih, broj termofilnih gljiva raste s početnih $2{,}3 \times 10^{9}$ g^{-1}_{ST} na $9{,}4 \times 10^{12}$ g^{-1}_{ST} (8. dan), nakon čega se broj ponovno smanjuje za dvije potencije i ostaje gotovo nepromijenjen 21. dana i iznosi $9{,}1 \times 10^{9}$ g^{-1}_{ST}. Kao i u pokusu T1 može se uočiti da broj mezofilnih i termofilnih mikroorganizama raste kao posljedica razgradnje organske tvari. Nadalje, broj termofilnih bakterija i gljiva tijekom 21 dana pokusa je porastao iz čega možemo pretpostaviti da kulturi MK1 odgovaraju termofilni uvjeti. Uspoređujući pokus T1 i T2 može se vidjeti da u pokusu T2 je broj mikroorganizama veći zbog provedene inokulacije, ali trend rasta stanica bakterija i gljiva je u oba pokusa jednak.

U pokusu T3 supstrati duhan i komina maslina bili su sterilizirani i inokulirana kultura je *Phanerochaete chrysosporium*. Prema literaturnim podacima ovaj mikroorganizam pokazuje visoku djelotvornost pri razgradnji lignoceluloznih komponenti.[16] Tijekom ovog istraživanja bilo je otežano pratiti promjenu broja mezofilnih i termofilnih mikroorganizama. Uzrok tome je način rasta kulture *Phanerochaete chrysosporium* na hranjivoj podlozi što onemogućava određivanje točnog broja mikroorganizama. Na slici 4.3. prikazane su izrasle mezofilne gljive na razrjeđenju 10^{-4} u 0. danu, odnosno na razrijeđenju 10^{-2} u 8., 15. i 21. danu. Na slici se može vidjeti da je *P. chrysosporium* bila prisutna tijekom 21 dana.

Sterilni supstrati, duhan i komina maslina, korišteni su u pokusu T4, a inokulirani mikroorganizam bio je *Trichoderma reesei*. Kao i kod pokusa T3, broj

mezofilnih i termofilnih mikroorganizama bilo je teško odrediti zbog karakterističnog rasta kulture na hranjivoj podlozi. Na slici 4.4. prikazane su mezofilne gljive na razrijeđenju 10^{-4} u 0. danu, odnosno na 10^{-2} u 8.,15. i 21. danu. Na slici se može vidjeti da je *T. reseei* bila prisutna tijekom 21 dana.

U pokusu T5 kao supstrati korišteni su sterilni duhan i komina masline i inokulirana mješovita kultura mikroorganizama (MK1): *Phanerochaete chrysosporium, Trichoderma reesei*, *Pseudomonas aeruginosa* FN, *Candida rugosa*, *Aspergillus fumigatus* i aktinomiceta. Na slici 4.5. prikazana je promjena ukupnog broja mezofilnih i termofilnih mikroorganizama tijekom 21 dana. Početni broj mezofilnih bakterija iznosio je $8{,}2 \times 10^{10}$ g^{-1}_{ST} i do 8. dana se povećao za tri potencije nakon čega se gotovo nije mijenjao te je u 21. dana iznosio $1{,}4 \times 10^{13}$ g^{-1}_{ST}. Inicijalni broj termofilnih bakterija u ovom pokusu iznosio je $1{,}4 \times 10^{10}$ g^{-1}_{ST} te je eksponencijalno rastao do osmog dana ($1{,}08 \times 10^{13}$ g^{-1}_{ST}), a u 21. danu je iznosio $8{,}2 \times 10^{12}$ g^{-1}_{ST}. Početni broj mezofilnih gljiva iznosio je $4{,}8 \times 10^{9}$ g^{-1}_{ST} te do osmog dana uočava se nagli rast od $3{,}6 \times 10^{12}$ g^{-1}_{ST}. Nakon osmog dana uočava se smanjenje broja mezofilnih gljiva za jednu potenciju te broj ostaje nepromjenjen do kraja pokusa. Broj termofilnih gljiva nije se značajno mijenjao tijekom pokusa. Uočava se povećanje s početnih $4{,}8 \times 10^{9}$ g^{-1}_{ST} na $1{,}7 \times 10^{10}$ g^{-1}_{ST} nakon čega broj ostaje gotovo nepromijenjen do kraja pokusa.

U pokusu T6 korišteni supstrati, duhan i komina maslina, bili su sterilni i inokulirana je mješovita kultura mikroorganizama koja se sastojala se od mikroorganizama (MK2) izoliranih iz supstrata: *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida rugosa* i aktinomicete. Na slici 4.6. prikazana je promjena ukupnog broja mezofilnih i termofilnih mikroorganizama tijekom 21 dana pokusa. Početni broj mezofilnih bakterija iznosio je $2{,}5 \times 10^{11}$ g^{-1}_{ST}, 8. i 15. dana iznosio je 8×10^{12} g^{-1}_{ST} odnosno $3{,}8 \times 10^{13}$ g^{-1}_{ST} nakon čega ostaje nepromijenjen do kraja pokusa. Početni broj termofilnih bakterija iznosio je $3{,}2 \times 10^{10}$ g^{-1}_{ST} te se uočava uvećanje broja za dvije potencije do 15. dana ($5{,}4 \times 10^{12}$ g^{-1}_{ST}) nakon čega ostaje nepromjenjen do kraja pokusa i iznosi $5{,}6 \times 10^{12}$ g^{-1}_{ST}. Broj mezofilnih i termofilnih gljiva nije se značajno mijenjao tijekom ispitivanja. Početni broj mezofilnih gljiva iznosio je $2{,}1 \times 10^{10}$ g^{-1}_{ST}, a na kraju pokusa $1{,}6 \times 10^{11}$ g^{-1}_{ST}. Broj termofilnih gljiva na početku iznosio je $2{,}1 \times 10^{10}$ g^{-1}_{ST}, te se do 15 dana pokusa se nije značajno mijenjao, kada se uočava rast za jedan red veličine. Do 21. dana usporen je rast

termofilnih gljiva koji je iznosio 1,9 × 10^{10} g^{-1}_{ST}. Prema rezultatima, broj stanica mezofilnih i termofilnih gljiva u pokusu T5 nije puno veći od broja u pokusu T6.

U slici 4.7. prikazana je promjena pH- vrijednosti za pokuse T1 - T6 tijekom 21. dan. Početna pH- vrijednost za sve pokuse iznoslila je 5,74. U prvih osam dana u svih šest pokusa može se uočiti najveći porast pH-vrijednosti (pH ≈ 8,5), te do kraja pokusa se nije značajno mijenjala. Nagli porast pH-vrijednosti je posljedica intenzivne biorazgradnje organske tvari što se vidi iz porasta broja mikroorganizama (slike 4.1. – 4.6.), te iz promjene organskog opterećenja izraženog preko KPK vrijednosti (slika 4.8.). Vrijednost pH uslijed biorazgradnje raste jer dolazi do raspadanja organske tvari te amonifikacije, odnosno stvaranja amonijevih iona.[23,55]

U slici 4.8. prikazana je promjena ukupnog organskog opterećenja izraženog preko KPK vrijednosti u T1-T6. Na početku procesa ukupno organsko opterećenje u pokusima T1-T6 iznosilo je 22 260 mg O_2 dm^{-3}. U prvih osam dana u svih šest pokusa uočava se smanjenje KPK vrijednosti za 30 %, 19 %, 42 %, 43 %, 38 % odnosno 30 %. Prema navedenim rezultatima može se vidjeti da u pokusima T3-T6 gdje je supstrat bio prethodno steriliziran je bolja biorazgradnja nego u pokusima T1 i T2 gdje supstrat nije bio steriliziran. Nadalje, u T3 i T4 se najviše organske tvari razgradilo, a razlog tome može biti prisutnost samo jedne kulture te ne dolazi do kompeticije s drugim mikroorganizmima te da ostale kulture mikroorganizama u odnosu na *P. chrysosporium* i *T. reseei* neznatno razgrađuju složene molekule poput lignina, celuloze i hemiceluloze. U pokusu T5 se 8 % više organske tvari razgradilo nego u pokusu T6 zbog prisutnosti *P. chrysosporium* i *T. reseei*. Od osmog do 15. dana trend smanjenja KPK vrijednosti se nastavio te u 15-om danu u pokusima T1 i T2 vrijednost se smanjila u odnosu na početnu za 38 %, odnosno za 29 %. U pokusima T3 - T6 KPK vrijednost je porasla u odnosu na osmi dan za 48 %, 32 %, 22 % odnosno za 19 %. U pokusu T3 vrijednost KPK u 15. danu je bila veća od početne vrijednosti KPK za 6 %. Pretpostavlja se da je razlog porasta KPK vrijednosti razgradnja složenih u jednostavnije molekule koje utječu na povećanje organskog opterećenja. Prema nekim saznanjima složene molekule poput celuloze, lignina i hemiceluloze često se ne mogu detektirati preko kemijske potrošnje kisika. U pokusima T1 ne dolazi do značajne promjene vrijednosti KPK nakon 8. dana, što je u skladu i s FTIR analiza koja ne ukazuje na značajne promjene u strukturi supstrata (slika 4.9. (a)). U pokusu T2 promjena vrijednosti KPK značajnija je od promjene u pokusu T1 što se slaže s FTIR analizom supstrata tijekom biorazgradnje (slika 4.9.

(b)). Također se može vidjeti, da u pokusima T3 i T4 je vrijednost KPK porasla najviše jer kulture *P.chrysosporium* i *T. reseei* pokazuju sposobnost cijepanja molekula u manje molekule što je i potvrđeno FTIR analizom, slika 4.9. (c) i (d). Na kraju procesa biorazgradnje uočava se povećanje KPK vrijednosti u svim pokusima, znatnim povećanjem rezultiraju pokusi T3-T6, gdje ukupno organsko opterećenje prelazi početnu vrijednost za 22 %, 6 %, 20 % odnosno 25 %. Prema rezultatima u 21. danu može se primijetiti da je pokusima T5 i T6 porasla vrijednost KPK zbog razgradnje složenih molekula, što i potvrđuje FTIR analiza (slika 4.9 (e) i (f)).

Kako bi se odredile funkcionalne skupine i pratile strukturne promjene lignoceluloznog supstrata korištenog provedena je FTIR analiza. Usporedbom pikova u spektru moguće uvidjeti na strukturne promjene materijala, odnosno zaključiti da je postignut određeni stupanj razgradnje.[56] Kompleksnost strukture analiziranih uzoraka uočava se iz brojnosti pikova u spektru (slika 4.9). U tablici 5.1. navedene su najčešće valne duljine na kojima su određivane molekule lignina, celuloze i hemiceluloze.

Tablica 5.1. Valni brojevi FTIR spektra lignina, celuloze i hemiceluloze.[57-60]

Celuloza	Hemiceluloza	Lignin
2924, 2916, 2900	2928, 2932	2937, 2933, 2917
2800	2850	2845
-	-	1717, 1705
1634, 1630	1646, 1634, 1606	1610, 1605
-	-	1514
1460, 1433, 1431, 1430	1421, 1413	1424
1378, 1373, 1367, 1338, 1319, 1315	1378, 1324	1328, 1327
1208, 1203, 1200	1262, 1251, 1242, 1212	1276, 1220, 1213
1161, 1160, 1114, 1110	1130	1113
1064, 1055	1049, 1044	1038
-	908	-
897, 878	873	854
	621	590

U pokusu T1 (slika 4.9. (a)), gdje su kao supstrati ispitivani nesterilni duhan i komina masline, nisu zabilježene značajne promjene tijekom dvadeset jednog dana biorazgradnje. U pokusu T2 (slika 4.9. (b)), gdje su kao supstrati ispitivani nesterilni duhan i komina masline te inokulirana je mješovita kultura mikroorganizama MK1 uočene su blage promjene pikova od 15. dana do kraja procesa biorazgradnje, što se odgovara porastu vrijednosti KPK, slika 4.8.. Promjene pikova na valnim duljinama

3317 cm^{-1} i 2920 cm^{-1} ukazuju da se postiže razgradnja tvari s hidroksilnim i alifatskim skupinama što je karakteristično kod celuloze i hemiceluloze.[62,63] Promjena pika na valnoj duljini 1746 cm^{-1}, 1605 cm^{-1}, 1480 cm^{-1} i 1022 cm^{-1} ukazuje na istezanje C=O vrpce u acetilnoj grupi, promjene aromatske strukture lignina, asimetrično savijanje CH_3 kod lignina te C-O i C-C istezanje polisaharida ili polisaharidnih tvari.[62-66]

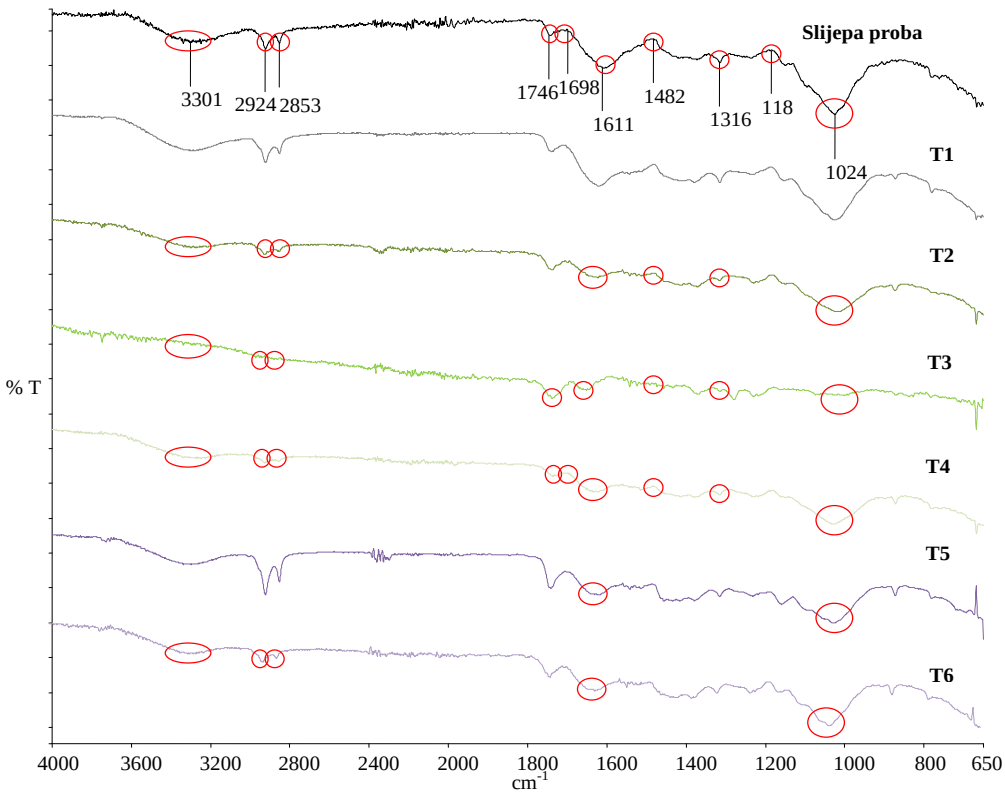
U pokusu T3 (slika 4.9. (c)), gdje su kao supstrati ispitivani sterilni duhan i sterilna komina maslina uz inokuliranu kulturu *Phanerochaete chrysosporium*, uočene su značajne promjene FTIR spektra već u osmom danu. Područje od 3000 – 2800 cm^{-1} odražava hidrofobna svojstva alifatske organske tvari.[56] U navedenom području najznačajnije promjene su kod pikova na valnoj duljini 3325 cm^{-1}, 2924 cm^{-1} te 2845 cm^{-1} što ukazuje na istezanje O-H skupine[65], vibracije C-H vrpce u CH_2, CH_3 i CH_3OH (grupe koje su dio lignina)[65], odnosno simetrično istezanje C-H vrpce u o-CH_3 grupi.[67] Poznato je da lignin sadrži karboksilne skupine koje se predstavljaju karboksilne vibracije u području između 1750 i 1500 cm^{-1}.[61] Pik na valnoj duljini 1480 cm^{-1} predstavlja asimetrično savijanje CH_3 kod lignina, pikovi 1179 cm^{-1}, 1129 cm^{-1} te 1026 cm^{-1} ukazuju na C-O-C vibracije kod celuloze i hemiceluloze, C-O istezanje te C-C i C-O istezanje prstena kod celuloze i hemiceluloze.[65-68] Navedeni rezultati slažu se s promjenom vrijednosti pH (slika 4.7.) kao i povećanjem vrijednosti KPK (slika 4.8.).

U pokusu T4 (slika 4.9. (d)), gdje su kao supstrati ispitivani sterilni duhan i sterilna komina maslina te se inokulirala kultura *Trichoderma reesei*, FTIR spektroskopijom zabilježene su značajne promjene u osmom danu kao i u pokusu T3. Smanjenje intenziteta pikova zabilježeno je na valnim duljinama 3301 cm^{-1}, 2920 cm^{-1}, 2849 cm^{-1}, 1603 cm^{-1}, 1480 cm^{-1}, 1341 cm^{-1} te 1022 cm^{-1}. Navedene valne duljine predstavljaju: 3301 cm^{-1}-istezanje O-H skupine[65], 2849 cm^{-1}- vibracije C-H vrpce u CH_2, CH_3 i CH_3OH (grupe koje su dio lignina)[65], 2849 cm^{-1}- simetrično istezanje C-H vrpce u o-CH_3 grupi[67], 1603 cm^{-1}- promjene aromatske strukture lignina[66], 1480 cm^{-1}- asimetrično savijanje CH_3 kod lignina, 1341 cm^{-1}- C-H vibracije kod celuloze i C_I-O vibracije[68] te 1022 cm^{-1}- C-O istezanje te C-C i C-O istezanje prstena kod celuloze i hemiceluloze[65,68]. Navedeni rezultati ukazuju na intenzivnu biorazgradnju složenih molekula, kao što su lignin, celuloza i hemiceluloza.

U pokusu T5 (slika 4.9. (e)), gdje su kao supstrati ispitivani sterilni duhan i komina masline te je bila inokulirana mješovita kultura mikroorganizama MK1

uočene su blage promjene intenziteta pojedinih apsorpcijskih vrpca pri valnim duljinama: 3309 cm^{-1}, 1744 cm^{-1}, 1613 cm^{-1}, 1486 cm^{-1} te 1020 cm^{-1}. Smanjenje intenziteta navedenih pikova su zabilježene u 15. i 21.danu, što odgovara porastu vrijednosti KPK (slika 4.8.). Pikovi predstavljaju redom: istezanje O-H skupine[65], karboksilne vibracije kod lignina[61], promjene aromatske strukture lignina[66], asimetrično savijanje CH_3 kod lignina te C-O istezanje te C-C i C-O istezanje prstena kod celuloze i hemiceluloze[65,68].

U pokusu T6 (slika 4.9. (f)), gdje su kao supstrati ispitivani sterilni duhan i komina masline te inokulirana je mješovita kultura mikroorganizama izoliranih iz supstrata MK2 uočene su blage promjene intenziteta pojedinih apsorpcijskih vrpca pri valnim duljinama: 3357 cm^{-1}, 1601 cm^{-1}, 1494 cm^{-1} te 1032 cm^{-1} te 879 cm^{-1}. Smanjenje inzenziteta navedenih pikova su zabilježene u 15. i 21. danu kao i u pokusu T5. Pikovi predstavljaju redom: istezanje O-H skupine[65], promjene aromatske strukture lignina[66], asimetrično savijanje CH_3 kod lignina[65,68], C-O istezanje te C-C i C-O istezanje prstena kod celuloze i hemiceluloze[65,68] te deformacije u ravnini C-H kod celuloze[68].



Slika 5.1. Usporedba FTIR spektara za pokuse T1 - T6 u 21. danu.

Relativni intenzitet apsorpcijskih vrpca mijenja se tijekom procesa biorazgradnje, a promjene postaju značajnije nakon 15. dana biorazgradnje. Najveće promjene u strukturi ispitivanih supstrata uočavaju se u pokusima T3 i T4 (slika 5.1.). Dobiveni FTIR spektri u svih šest pokusa potvrđuju promjenu vrijednosti KPK u uzorcima.

Na temelju dobivenih rezultata, kulture u pokusima T3 i T4 su korištene u pokusima kompostiranja.

5.3. Analiza procesa kompostiranja

Proces kompostiranja provoden je u okomitom reaktoru, radnog volumena 10 dm^3, tijekom 28 dana kako je opisano u poglavlju 3.6.2.

5.3.1. Analiza procesa kompostiranja bez inokulacije mikroorganizama, P1

Na slici 4.10. prikazana je promjena ukupnog broja mezofilnih i termofilnih mikroorganizama u kompostnoj masi tijekom 28 dana procesa. U 1. danu kompostiranja broj mezofilnih bakterija iznosio je $3{,}79 \times 10^9$ g^{-1}_{ST}, a u drugom danu vidljiv je porast za jednu potenciju. Broj bakterija ostaje gotovo jednak do osmog dana kada raste za još jednu potenciju te iznosi $1{,}38 \times 10^{11}$ g^{-1}_{ST}. Trinaestog dana broj se povećao za još jednu potenciju te se neznatno mijenjao do kraja procesa kada je iznosio $8{,}9 \times 10^{11}$ g^{-1}_{ST}. Početni broj termofilnih bakterija iznosio je $1{,}38 \times 10^9$ g^{-1}_{ST}, te se eksponencijalni rast uočava se sve do 13. dana kada je ukupan broj termofilnih bakterija iznosio $1{,}56 \times 10^{12}$ g^{-1}_{ST}. Od 13. do 20. dana se nije značajno mijenjao, a od 20. dana do kraja procesa je padao i iznosio je $2{,}81 \times 10^{11}$ g^{-1}_{ST}. Eksponencijalni porast termofilnih bakterija je bio uslijed povećanja temperature u kompostnoj masi. U kompostnoj masi također je praćena promjena mezofilnih i termofilnih gljiva. Na početku procesa kompostiranja određen je ukupan broj mezofilnih gljiva koji je iznosio $7{,}95 \times 10^7$ g^{-1}_{ST}, nakon čega je uslijedio eksponencijalni rast i već drugog dana kada započinje termofilna faza te broj iznosi $2{,}68 \times 10^9$ g^{-1}_{ST}. Potom dolazi do smanjenje broja mezofilnih gljiva za jedan red veličine ($2{,}7 \times 10^8$ g^{-1}_{ST}) te broj ostaje gotovo nepromijenjen sve do 24. dana kada je broj umanjen za još jednu potenciju ($2{,}3 \times 10^7$ g^{-1}_{ST}) i ostaje gotovo jednak sve do 28. dana. Broj termofilnih gljiva u

početku procesa iznosio je $2,74 \times 10^6$ g^{-1}_{ST} te ostaje istog reda veličine do šestog dana kada je iznosio $1,78 \times 10^7$ g^{-1}_{ST} koji se neznatno mijenjao do kraja procesa. Na početku procesa kompostiranja razgrađuju se jednostavne molekule, nakon čega slijedi razgradnja složenijih molekula, poput lignina, celuloze i hemiceluloze.[16,23]

Iz slike 4.11. mogu se vidjeti promjene masenog udjela ugljikovog dioksida. Tijekom prvih dvadeset dana procesa, razgradnja organske tvari je najintenzivnija te je u tom razdoblju detektirano najviše CO_2 u izlaznoj struji zraka. Nakon dvadesetog dana udio CO_2 se smanjuje što se izravno može povezati sa smanjenom aktivnošću mikroorganizama.[71] Tijekom 28 dana procesa kompostiranja nastalo je ukupno 123 g kg_{HT0}^{-1} CO_2.

Na slikama 4.10 i 4.11. prikazana je promjena temperature kompostne mase tijekom 28. dana procesa. Na početku procesa temperatura je iznosila 24 °C te je nakon 24 sata porasla na 30 °C, nakon čega se ponovno se smanjuje u kratkom vremenskom periodu na početnu vrijednost. Naredna 24 sata bilježi se eksponencijalni rast kada započinje termofilna faza te temperatura iznosi 50 °C, potom je ponovno vidljiv pad na 42 °C te u kratkom vremenskom razdoblju ponovni rast na najvišu postignutu vrijednost od 50,6 °C u ovom procesu. Trajanje termofilne faza u pokusu P1 iznosi svega pet dana. Od četvrtog do dvanaestog dana bilježi se blagi pad te izmjerena temperatura u 12. danu iznosi 39 °C nakon čega do petnaestog dana ponovno raste i doseže 45 °C. Nadalje temperatura se smanjuje sve do kraja procesa kompostiranja. Aktivnost pojedinih vrsta mikroorganizma uzrokuje razgradnju organskih frakcija i promjene temperature.[2] Porast temperature izravno je povezana s izraženijom biokemijskom aktivnosti termofilnih zajednica mikroorganizama, nakon čega u fazi hlađenja ponovno dolazi do aktivacije mezofilnih mikroorganizama.[69,70]

Na slici 4.12. prikazana je promjena masenog udjela anorganskih oblika dušika, NH_4^+, NO_2^- i NO_3^- iona, i promjena pH-vrijednosti supstrata. Početna pH-vrijednost supstrata iznosila je 6,45 te raste tijekom prvih 13 dana procesa kada dostiže vrijednost 8,63, nakon čega se bilježi blagi pad do kraja procesa. Niže pH-vrijednosti u početku procesa posljedica su stvaranja organskih kiselina koje nastaju razgradnjom jednostavnih organskih molekula.[23] Promjena kemijskog sastava kompostne mase za vrijeme procesa kompostiranja utječe na promjenu pH-vrijednosti supstrata. Razgradnjom organskih dušikovih spojeva dolazi do stvaranja amonijevih iona te pH-vrijednost supstrata raste.[23] Tijekom procesa koncentracije svih anorganskih oblika dušika vrlo su niske. Maseni udio NH_4^+ iona u početku procesa

iznosio je 0,57 mg g_{HT}^{-1} nakon čega naglo opada gotovo do nestanka te povećanjem pH-vrijednosti supstrata raste i udio oslobođenih NH_4^+ iona do 22. dana raste, a zatim se do kraja procesa smanjuje kao rezultat amonifikacije. Maseni udio NO_2^- iona na samom početku procesa bio je izrazito nizak te se povećanjem pH-vrijednosti supstrata bilježi njegov rast do 13. dana nakon čega se nije značajno mijenjao. Tijekom cijelog procesa maseni udio NO_3^- iona se linearno povećavao te početna vrijednost od 0,25 mg g_{HT}^{-1} dosegla je vrijednost od 0,90 mg g_{HT}^{-1}. U 28. danu koncentracija NO_3^- iona se počinje smanjivati. Razlog smanjenja koncentracije NO_3^- iona je proces denitrifikacije, odnosno stvaranja anaerobnih uvjeta u kompostnoj masi uslijed čega mikroorganizmi kao izvor kisika koriste nitrate.[23] Pojedini istraživači[72,73] prenose kako dio NH_4^+ iona prelazi u plin amonijak pri visokoj pH-vrijednosti i temperaturi, a dio NH_4^+ iona prevodi se u NO_3^- ione procesom nitrifikacije.

Na slici 4.13 prikazana je promjena koncentracije fenola i pH vrijednosti supstrata tijekom 28. dana procesa kompostiranja. Početna koncentracija fenola iznosila je 1,27 mg g_{HT}^{-1} nakon čega se bilježi blagi pad te ponovni rast nakon petog dana procesa. Promjena koncentracije fenola prati dinamiku pH-vrijednosti supstrata. Najviša zabilježena koncentracija je u 24. danu te iznosi 3,11 mg g_{HT}^{-1} nakon čega se smanjuje do 28. dana i iznosi 2,29 mg g_{HT}^{-1}. Zabilježene koncentracije fenola su izrazito niske te ne utječu na proces kompostiranja, odnosno ne inhibiraju rast mikroorganizama. Međutim, prema literaturi navedene koncentracije fenola u komini masline su daleko veće, a razlog tome može biti drugačiji način određivanja fenola, odnosno ekstrakcije fenola iz komine masline.

Na slici 4.14. prikazana je promjena koncentracije amonijaka i pH-vrijednosti kondenzata. Amonijak nije određen u prvih trinaest dana procesa nakon čega počinje naglo rasti te u 24. danu postiže vrijednost od 140 mg dm^{-3} i do kraja provođenja procesa opada. Razgradnjom organskih dušičnih spojeva, pri visokim temperaturama, nastaje amonijak koji isparava te aeracijom biva istjeran iz kompostne mase, zbog čega je određen u kondenzatu. Upravo zbog povećane koncentracije amonijaka u kondenzatu dolazi do lužnate promjene pH-vrijednosti kondenzata. Prisutnost amonijaka u kondenzatu usko je povezana s pH-vrijednosti kondenzata. Prema literaturnim podacima kada pH-vrijednost kondenzata dosegne vrijednosti veće od 8 moguće je odrediti sadržaj amonijaka.[72,74] U izlaznoj struji zraka prisutan je amonijak od 22. dana te je do 28. dana ukupno nastalo 5,51 mg kg_{HT0}^{-1} NH_3.

Na slici 4.15. prikazana je promjena koncentracije fenola u kondenzatu i pH-vrijednosti kondenzata tijekom procesa kompostiranja. Koncentracija fenola u početku procesa iznosila je 5,2 mg dm^{-3} nakon čega se bilježi blagi rast te postepeni pad koncentracije sve do kraja procesa. Koncentracija fenola u kondenzatu je niža od MDK vrijednosti, te zbog toga ne predstavlja opasnost za okoliš. Tijekom procesa kompostiranja ukupno je nastalo 290 cm^3 kondenzata. Najveći volumeni nastalog kondenzata (60 cm^3) zabilježeni su u razdoblju od trećeg do šestog dana nakon čega se bilježi smanjenje volumene te ponovni porast od 13. do 17. dana (82 cm^3). U slikama 4.10. i 4.11. može se vidjeti kako je temperatura kompostne mase dostigla maksimum, uz povećanu razgradnja što se očituje iz povećanja volumena kondenzata.

Na slici 4.16. prikazana je promjena organskog opterećenja u kondenzatu te hlapive tvari u supstratu. Vrijednost KPK kondenzata u 3. danu procesa iznosila je 5485 mg O_2 dm^{-3}, a 6. dana bilježi rast na 7215 mg O_2 dm^{-3} nakon čega slijedi eksponencijalni pad te vrijednost doseže 394 mg O_2 dm^{-3} u 13. danu. Masa hlapive tvari u reaktoru na početku procesa je najveća i iznosi 1,41 kg te se postepeno smanjuje tijekom biorazgradnje. Početna masa hlapive tvari do kraja procesa smanjila se za gotovo 43 %. Visoke vrijednosti KPK u početku procesa izravno su povezane s intenzivnom biorazgradnjom i stvaranjem hlapivih organskih spojeva.[55]

Na slici 4.17 prikazana je promjena konverzije i omjera C:N tijekom 28 dana procesa kompostiranja. Omjer C:N na početku iznosio je 24:1 te se tijekom procesa smanjivao porastom konverzije hlapive tvari i na samom kraju iznosio je 14:1 jer dolazi do razgradnje spojeva koje sadrže u svojoj strukturi ugljik. Intenzivnija razgradnja uočava se u prvoj polovici procesa. Konverzija hlapive tvari u 15. danu postiže visoku vrijednost te ostaje gotovo nepromijenjena do kraja procesa kada iznosi 45 %. Upravo je omjer C:N jedan od najvažnijih pokazatelja razgradnje organske frakcije tijekom kompostiranja i stupnja zrelost komposta.[75]

Na slici 4.18. prikazani su FTIR spektri procesa kompostiranja te se strukturne promjene supstrata zamjećuju već nakon 13. dana kompostiranja. Smanjenje intenziteta pika pri valnoj duljini od 2928 cm^{-1} ukazuje vibracije C-H vrpce u CH_2, CH_3 i CH_3OH (grupe koje su dio lignina).[65] Pik lokaliziran na valnoj duljini 2853 cm^{-1} odgovara simetričnom istezanju C-H vrpce u o-CH_3 grupi.[67] Pikovi na valnim duljinama 1748 cm^{-1} i 1615 cm^{-1} ukazuje na istezanje C=O vrpce u acetilnoj grupi, odnosno promjene aromatske strukture lignina.[66] Promjene su uočene i kod pikova na valnim duljinama 1478 cm^{-1}, 1316 cm^{-1}, 1181 cm^{-1} te 1028 cm^{-1} te redom odgovaraju:

asimetričnom savijanju CH_3 kod lignina[66], slabim CH_2 vibracijama kod celuloze[68], C-O-C vibracije kod celuloze i hemiceluloze[68] te C-C i C-O istezanje prstena kod celuloze i hemiceluloze[66,68]. Prema dobivenim FTIR spektrima može se vidjeti da autohtona zajednica mikroorganizama prisutna u supstratu ima sposobnost razgradnje lignina, celuloze i hemiceluloze.

5.3.2. Analiza procesa kompostiranja uz inokulaciju mikroorganizama, P2

U pokusu P2 na početku procesa inokulirana je mješovita kultura mikroorganizama *Phanerochaete chrysosporium* i *Trichoderma reesei*. Početne koncentracije inokulirane kulture određene su brojanjem u Thominoj komorici, a iznosile su $7{,}136 \times 10^7$ st cm^{-3} za *P. chrysosporium* te $1{,}146 \times 10^7$ st cm^{-3} za *T. reesei*.

Na slikama 4.19. - 4.20 prikazana je promjena temperature kompostne mase tijekom 28 dana kompostiranja. Iz grafova može se vidjeti kako je početna temperatura kompostne mase iznosila 21,3 °C te kroz 24 sata postiže vrijednost od 37,4 °C. Nagli porast temperature posljedica je inokulacije mikroorganizama koji ubrzavaju proces biorazgradnje. Nakon 48 sati temperatura postiže vrijednost od 42 °C te nastavlja rasti unutar idućih 24 sata kada postiže svoju maksimalnu vrijednost od 52 °C. Ova vrijednost se održava do 9. dana kada se počinje snižavati do iznad 40 °C sve do 18. dana kada započinje faza hlađenja. Termofilna faza u pokusu P2 traje punih 11 dana (od 2. do 13. dana), za razliku od pokusa P1 kada temperatura prelazi 45 °C svega pet dana (slike 4.19. i 4.20.).

Na slici 4.19 prikazana je promjena ukupnog broja mezofilnih i termofilnih mikroorganizama u kompostnoj masi tijekom 28 dana procesa. Prvog dana kompostiranja broj mezofilnih bakterija iznosio je $1{,}4 \times 10^9$ g^{-1}_{ST} te je eksponencijalno rastao do 6. dana kada je iznosio $1{,}7 \times 10^{12}$ g^{-1}_{ST} te do kraja procesa se nije značajno mijenjao i iznosio je $3{,}6 \times 10^{12}$ g^{-1}_{ST}. Početni broj termofilnih mikroorganizama iznosio je $1{,}8 \times 10^8$ g^{-1}_{ST} te se eksponencijalno povećavao do šestog dana uslijed porasta temperature kada je broj iznosio $3{,}8 \times 10^{11}$ g^{-1}_{ST}. Do kraja procesa kompostiranja broj termofilnih bakterija ostao je nepromijenjen. Početni broj mezofilnih gljiva je bio veći nego u pokusu P1 zbog inokuliranih mikroorganizama te je iznosio $1{,}1 \times 10^{10}$ g^{-1}_{ST}, nakon čega se bilježi smanjenje broja za jednu potenciju koji se ne mijenja značajno do 13. dana kada se uočava ponovni rast. Broj mezofilnih gljiva u 17. danu procesa iznosio je $3{,}7 \times 10^{11}$ g^{-1}_{ST} te ostaje nepromijenjen sve do

kraja procesa. U početnoj fazi kompostiranja broj termofilnih gljiva bio je $3,4 \times 10^9$ g^{-1}_{ST} te u 13. danu procesa bilježi porast i iznosi $1,9 \times 10^{11}$ g^{-1}_{ST} i ostao je nepromijenjen sve do kraja pokusa. Promjena broja mezofilnih i termofilnih bakterija u P1 i P2 prati isti trend, a i broj je približno isti, dok kod gljiva nije zbog inokulacije *P. chrysosporium* i *T. reesei* koje pripadaju rodu gljiva. Prisutnost inokuliranih kultura zabilježena je tijekom cijelog procesa kompostiranja s naglaskom na početnu fazu kada je njihov broj bio veći. U termofilnoj fazi uočava se intenzivan rast kulture *A. fumigatus* koji ima sposobnost razgradnje lignocelulozne komponenti zbog stvaranja enzima celulaze i ksilanaze.[2] Prema istraživanjima[76] dokazano je kako navedenoj kulturi za intenzivan rast odgovaraju temperature između 37 °C i 42 °C, ali može rasti i pri temperaturama od 55 °C .

U pokusima P1 (slika 4.11.), i u P2 (slika 4.20.), tijekom cijelog procesa vrijednost masenog udjela CO_2 na izlazu iz reaktora prati promjenu temperature. Najveće koncentracije zabilježene su kada je temperatura kompostne mase bila najviša, uz najveću aktivnost mikroorganizama, te se s vremenom smanjuje.[71] Kompostiranjem nastalo je ukupno 118 g kg_{HT0}^{-1} CO_2 što je isto kao i u pokusu P1.

Na slici 4.21 prikazana je promjena masenog udjela NH_4^+, NO_2^- i NO_3^- iona u u kompostnoj masi i pH-vrijednosti supstrata. Početna pH-vrijednost supstrata iznosila je 7,2 i u početnoj fazi kompostiranja može se uočiti blagi pad te ponovni rast na pH-vrijednost od 7,64, nešto alkalniju od početne. Do kraja procesa pH-vrijednost nije se značajno mijenjala. Gotovo jednake promjene pH-vrijednosti zabilježene su u pokusu P1 (slika 4.12.). Tijekom procesa određene koncentracije svih anorganskih oblika dušika bile manje od istih u pokusu P1. Maseni udio NH_4^+ iona u početku procesa iznosio je 0,1 mg g_{HT}^{-1} te tijekom procesa kompostiranja nije zabilježena koncentracija veća od 0,2 mg g_{HT}^{-1}. Promjena koncentracije NO_2^- iona vrlo je slična promjeni koncentracije NH_4^+ iona tijekom cijelog procesa. Iz grafičkog prikaza 4.21. primjetno je kako maseni udio NO_3^- iona eksponencijalno raste sve do dvadeset trećeg dana kada postiže svoju najveću vrijednost nakon čega počinje opadati kao i u P1.

Iz slike 4.22. vidljivo je kako je početna koncentracija fenola u supstratu iznosila 1,0 mg g_{HT}^{-1} nakon čega uočava se blagi pad zabilježen 2. dana procesa te eksponencijalni rast sve do 21. dana kada postiže maksimalnu vrijednost od 2,21 mg g_{HT}^{-1} nakon čega uočava se pad. Kao i u pokusu P1 (slika 4.13) koncentracije fenola su izrazito niske i ne djeluju inhibirajuće na mikroorganizme.

Na slici 4.23. prikazana je promjena koncentracije amonijaka u kondenzatu i pH-vrijednost kondenzata. Amonijak u kondenzatu prisutan je tek 20. dana procesa kompostiranja kada pH-vrijednosti kondenzata doseže gotovo 8, nakon čega naglo raste te u 28. danu iznosi 15 mg dm^{-3}. S obzirom na pokus P1 (slika 4.14.) koncentracija amonijaka u kondenzatu u pokusu P2 bila je skoro deset puta niža, kao i koncentracije anorganskih oblika dušika. U izlaznoj struji zraka detektira se amonijak na samom kraju procesa kompostiranja te je 28. dana izmjereno 1,16 mg kg_{HTO}^{-1} NH_3.

Na slici 4.24. prikazana je promjena koncentracije fenola u kondenzatu i pH vrijednosti kondenzata tijekom procesa kompostiranja. Koncentracija fenola u 4. danu procesa iznosila je 3,35 mg dm^{-3} nakon čega se bilježi postepeni pad koncentracije sve do 17. dana kada koncentracija ponovno raste kraja procesa i iznosi 2,16 mg dm^{-3}.

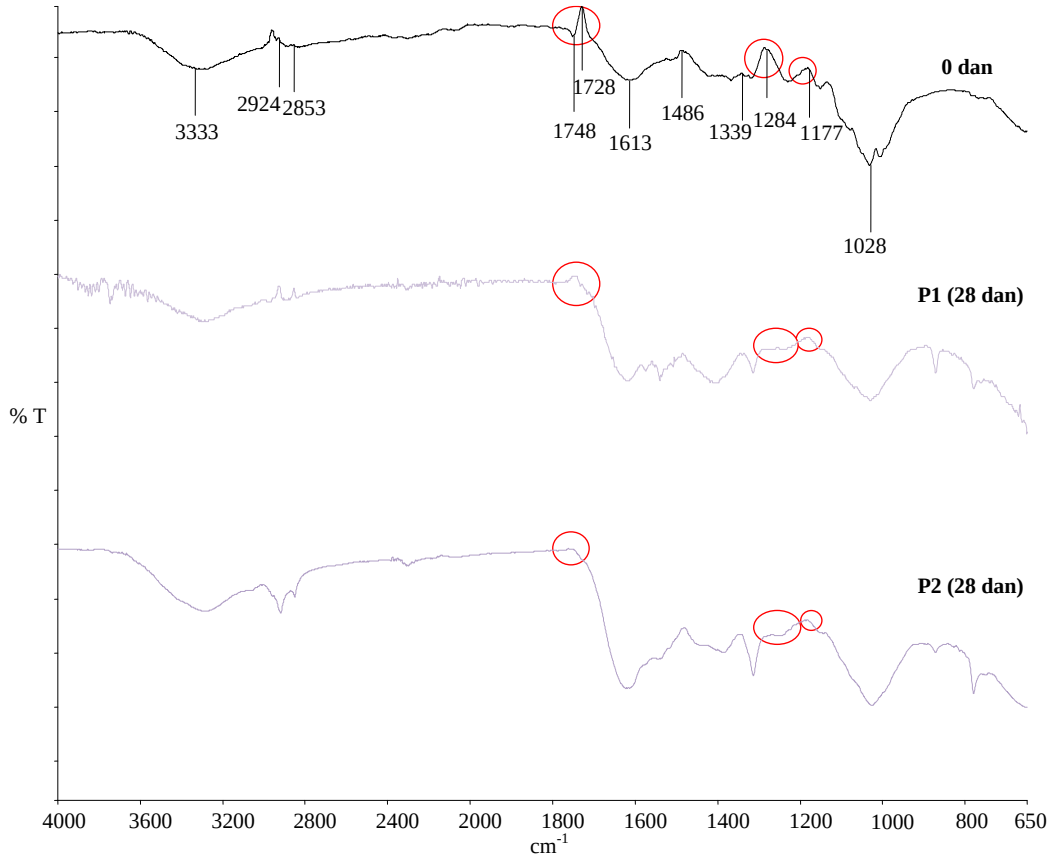
Tijekom procesa kompostiranja ukupno je nastalo 430 cm^3 kondenzata, gotovo 30 % više nego u pokusu P1 zbog dužeg vremena trajanja termofilne faze. Najviše kondenzata (volumena 221 cm^3) nastalo je u razdoblju od petog do 13. dana kada je prevladavala termofilna faza (slike 4.19. i 4.20.) i razgradnja je bila najintenzivnija.

Na slici 4.25. prikazana je promjena organskog opterećenja u kondenzatu i hlapive tvari u supstratu. Vrijednost KPK kondenzata u 3. danu procesa iznosila je 7320 mg O_2 dm^{-3}, nakon čega uočava se blagi rast na 7660 mg O_2 dm^{-3}. Nakon šestog dana KPK vrijednost supstrata počinje naglo opadati te u 14. danu iznosi 14 mg O_2 dm^{-3}. Masa hlapive tvari u reaktoru na početku procesa je najveća te se postepeno smanjuje tijekom procesa biorazgradnje. Početna masa hlapive tvari do kraja procesa smanjila se za gotovo 38 %. Smanjenje KPK vrijednosti kondenzata u pokusu P2 prati trend smanjenja u pokusu P1, a i približno su iste početne koncentracije.

Na slici 4.26 prikazana je promjena konverzije i omjera C:N tijekom 28 dana procesa kompostiranja. Omjer C:N na početku iznosio je 28:1 te se tijekom procesa smanjivao porastom konverzije hlapive tvari i na samom kraju je iznosio 15:1. Intenzivnija razgradnja uočava se u prvoj dijelu procesa. Konverzija hlapive tvari devetog dana postiže vrijednost od 20 % te ostaje nepromijenjena narednih 6. dana kada ponovno počinje rasti do 23. dana kada postiže 35 % nakon čega ostaje jednaka do kraja procesa. Prema rezultatima, u pokusu P1 (slika 4.17.) postignuta je za 6 % veća konverzija od P2, što nije bilo očekivano. Inokulacijom kultura očekivalo se da će se ubrzati razgradnja i povećati konverzija. Pretpostavlja se da kulture koje su sudjelovale u razgradnji složenih molekula, čija razgradnja teče sporo i dugotrajna je, ne doprinose povećanju konverzije u 28 dana. Nadalje, razlike u konverziji u

pokusima P1 i P2 mogu nastati zbog samog uzorkovanja, jer se supstrat ne može homogeno pomiješati i ne dobije se reprezentativan uzorak.

Na slici 4.27. prikazani su FTIR spektri ukazuju da se strukturne promjene supstrata zamjećuju već nakon trinaestog dana kompostiranja. Na prikazanom spektru mogu se uočiti promjene supstrata već nakon šestog dana kompostiranja. Smanjenje intenziteta pika pri valnoj duljini od 2920 cm^{-1} ukazuje vibracije C-H vrpce u CH_2, CH_3 i CH_3OH (grupe koje su dio lignina).[65] Pik lokaliziran na valnoj duljini 2849 cm^{-1} odgovara simetričnom istezanju C-H vrpce u o-CH_3 grupi.[67] Pikovi na valnim duljinama 1744 cm^{-1} i 1625 cm^{-1} ukazuju na istezanje C=O vrpce u acetilnoj grupi koja potječe od zaostale hemiceluloze, odnosno promjene aromatske strukture lignina.[66] Promjene su uočene i kod pikova na valnim duljinama 1492 cm^{-1}, 1318 cm^{-1}, 1187 cm^{-1} te 1020 cm^{-1} te redom odgovaraju: asimetričnom savijanju CH_3 kod lignina[66], slabim CH_2 vibracijama kod celuloze[68], C-O-C vibracije kod celuloze i hemiceluloze[68] te C-C i C-O istezanje prstena kod celuloze i hemiceluloze[66,68].



Slika 5.2. Usporedba FTIR spektara za pokuse P1 i P2 u 0. i 28. danu.

Na slici 5.2. prikazana je usporedba FTIR spektara supstrata koji je podvrgnut kompostiraju u pokusima P1 i P2. Značajne promjene u strukturi vidljive pri valnim duljinama 1748 cm^{-1}, 1728 cm^{-1}, 1339 cm^{-1}, 1177 cm^{-1} te 1028 cm^{-1}, ali i pri valnim duljinama opisanim u poglavljima 5.3.1. i 5.3.2.. Smanjenja intenziteta i pomaci pojedinih pikova koji odgovaraju ligninu, celulozi i hemicelulozi ukazuju kako je došlo do razgradnje navedenih organskih molekula.[56,68]

6. ZAKLJUČAK

(1) U procesu biorazgradnje lignoceluloznog supstrata najveću sposobnost cijepanja molekula lignina, celuloze i hemiceluloze pokazale su kulture *Phanerochaete chrysosporium* i *Trichoderma reesei* uz učinkovitost od 42 % i 43 %,. što je potvrđeno FTIR analizom.

(2) Proces kompostiranja lignoceluloznog supstrata (P1), odnosno mješavine duhanskog otpada i komine maslina, proveden je pri početnom omjeru C:N od 24:1 do krajnjeg od 14:1 uz konverziju od 45 %.

(3) U P1 ukupno je nastalo 123 g kg_{HT0}^{-1} CO_2 i 290 cm^3 kondenzata. Ukupna količina nastalog NH_3 u struji zraka na izlazu iz reaktora iznosila je 5,51 mg kg_{HT0}^{-1}, a u kondenzatu 13,17 g $NH_3\,dm^{-3}$.

(4) FTIR analizom supstrata u P1 utvrđeno je kako autohtona zajednica mikroorganizama prisutna u supstratu ima sposobnost razgradnje lignina, celuloze i hemiceluloze.

(5) Proces kompostiranja lignoceluloznog supstrata (P2), odnosno mješavine duhanskog otpada i komine maslina uz inokulaciju kultura *Phanerochaete chrysosporium* i *Trichoderma reesei* proveden je pri početnom omjeru C:N 28:1 do krajnjeg od 15:1 uz konverziju od 35 %.

(6) U P2 ukupno je nastalo 118 g kg_{HT0}^{-1} CO_2 i 430 cm^3 kondenzata. Ukupna količina nastalog NH_3 u struji zraka na izlazu iz reaktora iznosila je 1,16 mg kg_{HT0}^{-1}, a u kondenzatu 0,26 g $NH_3\,dm^{-3}$.

(7) FTIR analizom supstrata u P2 utvrđeno je kako inokulirana mješovita kultura u odnosu na autohtonu kulturu sadržanu u supstratu ima izraženiju sposobnost razgradnje složenih organskih molekula kao što su lignin, celuloza i hemiceluloza.

7. LITERATURA

1. Briški, F., Zaštita okoliša, Element, Zagreb, 2016.
2. Diaz, L. F., de Bertoldi, M., Bidlingmaier, W., (Eds.) Compost Science and technology, Elsevier, Amsterdam, 2007.
3. Kuhad, R. C., Singh, A., Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects, I.K.International (P) Ltd, New Delhi, 2010.
4. Piotrowska-Cyplik, A., Olejnik, A., Cyplik, P., Dach, J., Czarnecki, Z., The kinetics of nicotine degradation, enzyme activities and genotoxic potential in the characterization of tobacco waste composting, *Bioresour. Technol.* **100** (2009) 5037 - 5044.
5. Cardoso, C. R., Miranda, M. R., Santos, K. G., Ataíde, C. H., Determination of kinetic parameters and analytical pyrolysis of tobacco waste and sorghum bagasse, *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* **92** (2011) 392 – 400.
6. Niaounakis, M., Halvadakis, C. P., Olive Processing Waste Management: Literature Review and Patent Survey 2nd ed., Elsevier, Italy, 2006.
7. Alburquerque, J. A., Gonzálvez, J., García, D., Cegarra, J., Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction, *Bioresour. Technol*. **91** (2) (2004) 195 - 200.
8. Zeng, G., Yu, M., Chen, Y., Huang, D., Zhang, J., Huang, H., Jiang, R., Yu, Z., Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* at various time points on enzyme activities during agricultural waste composting, *Bioresour. Technol.* **101** (2010) 222 – 227.
9. Foreman, P. K., Brown, D., Dankmeyer, L., Dean, R., Diener, S., Dunn-Coleman, N. S., Goedegebuur, F., Houfek, T. D., England, G. J., Kelley, A. S., Meerman, H. J., Mitchell, T., Mitchinson, C., Olivares, H. A., Teunissen, P. J. M., Yao, J., Ward, M., Transcriptional Regulation of Biomass-degrading Enzymes in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*, *J. Biol. Chem.* **278** (34) (2003) 31988 – 31997.
10. Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M. i sur., Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*), *Nat. Biotechnol.* **26** (5) (2008) 553 - 60.
11. Boer, W., Folman, L. B., Summerbell, R. C., Boddy L., Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development, *Microbiol. Rev.* **29** (2) (2004) 795 – 811.
12. Solid State Fermentation of Lignocellulosic Waste for Cellulase and β-Glucosidase Production by Cocultivation of Aspergillus ellipticusand Aspergillus fumigatus, Gupte, A., Madamwar, D., *Biotechnol. Prog*. **13** (2) (1997) 166 – 169.
13. Zakon o održivom gospodarenju otpadom, NN 94/13.
14. Uredba o kategorijama, vrstama i klasifikaciji otpada s katalogom otpada i listom opasnog otpada, NN 39/09.
15. Williams, P. T., Waste Treatment and Disposal 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2005.

16. Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martínez, J., Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview, *Int. Microb.* **5** (2) (2002) 53 – 63.

17. https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lignocellulose_biodegradation_in_Asian_long-horned_beetle (pristup 25. travnja 2017.)

18. Deobald, L. A., Crawford, Don L., Activities of cellulase and other extracellular enzymes during lignin solubilization by *Streptomyces viridosporus, Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26** (2) (1987) 158 – 163.

19. Sung, M., Ritter, W. F., Food waste composting with selected paper products, *Compost Sci. Util.* **16** (1) (2008) 36 - 42.

20. Atkinson, C. F., Jones, D. D., Gauthier, J. J., Biodegradability and microbial activities during composting of poultry litter, *Poultry Sci.* **75** (5) (1996) 608 - 617.

21. Garcia-Gomez, A., Bernal, M. P., Roig, A., Organic matter fractions involved in degradation and humification processes during composting, *Compost Sci. Util.* **13** (2) (2005) 127 - 135.

22. Ekinci, K., Keener, H. M., Elwell, D. L., Composting short paper fiber with broiler litter and additives part I: Effects of initial pH and carbon/nitrogen ratio on ammonia emission, *Compost Sci. Util.* **8** (2) (2000) 160 - 172.

23. Komilis, D. P., Ham, R. K., The effect of lignin and sugars to the aerobic decomposition of solid wastes, *Waste Manag.* **23** (5) (2003) 419 - 423.

24. Kučić, D., Integracija procesa kompostiranja i adsorpcije, Doktorski rad. Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2010.

25. Kopčić, N., Disertacija – Studij procesa aerobnog kompostiranja čvrstog otpada, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2011).

26. http://compost.css.cornell.edu/science.html (pristup 25. travnja 2017.)

27. Ladisch, M. R., Lin, K. W., Voloch, M., Tsao, G. T., Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass, *Enzyme Microb. Technol*. **5** (2) (1983) 82 - 102.

28. Lynch, J. M., Substrate availability in the production of composts, Proceedings of the International Composting Research Symposium, (1992) 24 - 35.

29. Tuzzin, G., Godinho, M., Dettmer, A., Zattera, A. J., Nanofibrillated cellulose from tobacco industry wastes, *Carbohydr. Polym*. **148** (2016) 69 – 77.

30. Agrupis, S., Maekawa, E., Suzuki, K., Industrial utilization of tobacco stalks II: preparation and characterization of tobacco pulp by steam explosion, *J. Wood Sci.* **46** (2000) 222 – 229.

31. Okur, N., Kayikçioglu, H. H., Okur, B., Delibacak, S., Organic Amendment Based on Tobacco Waste Compost and Farmyard Manure: Influence on Soil Biological Properties and Butter-Head Lettuce Yield, *Turk. J. Agric*. **32** (2008) 91 - 99.

32. Chowdhury, A. K. M. M. B., Akratos, C. S., Vayenas, D. V., Pavlou, S., Olive mill waste composting: A review, *Int. Biodeteri. Biodegr*. **85** (2013) 108 - 119.

33. Barreveld, W. H., Rural use of lignocellulosic residues, FAO , Rim, 1989.

34. Xi, B. D., Zhang, G. J., Liu, H. L., Process kinetics of inoculation composting of municipal solid waste, *J. Hazard. Mater.* **124** (1 - 3) (2005) 165 - 172.

35. Vargas-Garcia, M. C., Suarez-Estrella, F., Lopez, M. J., Moreno, J., In vitro studies on lignocellulose degradation by microbial strains isolated from composting processes, *Int. Biodeterior. Biodegradation* **59** (4) (2007) 322 - 328.

36. Hubbe, M. A., Nazhad, M., Sánchez, C., Composting as a way to convert cellulosic biomass and organic waste into high-value soil amendments: a review, *BioResources*. **5** (4) 2808 - 2854.

37. Chen, H., Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice, Springer, Dordrecht, 2014.

38. Chandel, A. K., Silva, S. S., Sustainabledegradation of lignocellulosic biomass - techniques,applications and commercialization, InTech, Rijeka, 2013.

39. Haug, R. T., The Practical Handbook of Compost Engineering, Lewis Publisher, USA, 1993.

40. El Kader, N. A., Robin, P., Paillat, J.-M., Leterme, P., Turning, compacting and the addition of water as factors affecting gaseous emissions in farm manure composting, *Bioresour. Technol.* **98** (2007) 2619 – 2628

41. Boulter, J. I. , Boland, G.J., Trevors, J.T., Compost: A study of the development process and end-product potential for suppression of turfgrass disease, *World J. Microb. Biot.* **16** (2000) 115 - 134.

42. Guo, R., Li, G., Jiang, T., Schuchardt, F., Chen, T., Zhao, Y., Shen, Y., Effect of aeration rate, C/N ratio and moisture content on the stability and maturity of compost, *Bioresour. Technol*. **112** (2012) 171 – 178.

43. Epstein, E., Industrial composting Enviromental Engineering and Facilities Management, Taylor & Francis Group, 2011., USA.

44. Finstein, M. S., Miller, F. C., Strom, P.F., MacGregor, S. T., Psarianos, K. M., Composting ecosystem management for waste treatment, *Biotechnol.* **1** (1983) 347 – 353.

45. Yu, H., Huang, G. H., Effects of sodium acetate as a pH control amendment on the composting of food waste, *Bioresour. Tehnol.* **100** (2009) 2005 - 2011.

46. https://georgiaorganics.org/wp-content/themes/GeorgiaOrganics/Downloads/pdf/CompostMicrobiologyandtheSoilFoodWeb.pdf (pristup 21. svibnja 2017.)

47. Duraković, S., Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.

48. Neklyudov, A. D., Fedotov, G. N., Ivankin, A. N., Intensification of Composting Processes by Aerobic Microorganisms: A Review, *Appl. Biochem. Micro.* **44** (2008) 6 - 18.

49. http://www.greenvillesoilandwater.com/composting/aerated-turned-windrow-composting/ (pristup 27. travnja 2017.)

50. https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_MEDIA/nrcs141p2_021328.jpg (pristup 27. travnja 2017.)

51. Standard methods for the examination of waste and wastewater, American public health association, 1999.

52. F. Briški, N. Kopčić, I. Ćosić, D. Kučić, M. Vuković, Biodegradation of tobacco waste by composting: Genetic identification of nicotine-degrading bacteria and kinetic analysis of transformations in leachate, *Chem. Pap.* **66** (2012) 1103 - 1110.
53. Chamy, R., Rosenkranz, F., Soler, L., Biodegradation and Bioremediation of Polluted Systems - New Advances and Technologies, *InTech* 2015.
54. Kučić Dajana, Briški Felicita, Emission of gases during Composting of Solid Waste, Kemija u industriji, 2017., rad u postupku objavljivanja
55. Kučić, D., Kopčić, N., Briški, F., Zeolite and potting soil sorption of CO_2 and NH_3 evolved during co-composting of grape and tobacco waste, *Chem. Pap.* **67** (2013) 1172 - 1180.
56. Xu, F., Geng, Z.C., Sun, J.X., Liu, C.F., Ren, J.L., Sun, R.C., Fowlerd, P., Baird, M.S., Fractional and structural characterization of hemicelluloses from perennial ryegrass (Lolium perenne) and cocksfoot grass (Dactylis glomerata), *Carbohydr. Res.* **341** (12) (2006) 2073 – 2082.
57. Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D.H., Zheng, C., Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis, *Fuel* **86** (2007) 1781 – 1788.
58. Liu, C.F., Xu, F., Sun, J.X., Ren, J.L., Curling, S., Sun, R.C., Fowlere, P., Baird, M.S., Physico-chem- ical characterization of cellulose from perennial ryegrass leaves (Lolium perenne), *Carbohydr. Res.* **341** (2006) 2677 – 2687.
59. Méndez, A., Fidalgo, J.M., Guerrero, F., Gascoó, G., Characterization and pyrolysis behav- iour of different paper mill waste materials, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **86** (2009) 66 – 73.
60. Eyheraguibel, B., Caractérisation des substances humiques biomimetiques—effets sur les végétaux, thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, 2004.
61. Boeriu, C.G., Bravo, D., Gosselink, R.J., van Dam, J.E., Characterisation of structure-de- pendent functional properties of lignin with infrared spectroscopy, *Ind. Crop. Prod.* **20** (2) (2004) 205 – 218.
62. Plaza, C., Nogales, R., Senesi, N., Benitez, E., Polo, A., Organic matter humification by vermicomposting of cattle manure alone and mixed with two-phase olive pomace, *Bioresour. Technol.* **99** (2008) 5085 – 5089.
63. Campitelli, P., Ceppi, S., Effects of composting technologies on the chemical and physicochemical properties of humic acids, *Geoderma* **144** (2008) 325 – 333.
64. Smidt, E., Meissl, K., Schwanninger, M., Lechner, P., Classification of waste materials using Fourier transform infrared spectroscopy and soft independent modeling of class analogy, *Waste Manag.* **28** (2008) 1699 – 1710.
65. Xu, J., Xu, X., Liu, Y., Li, H., Liu, H., Effect of microbiological inoculants DN-1 on lignocellulose degradation during co-composting of cattle manure with rice straw monitored by FTIR and SEM, *Environ. Prog. Sustain. Energy* **35** (2016) 345 - 351.
66. Pandeya, K.K., Pitman, A.J., FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi, *Int. Biodeterior. Biodegradation* **52** (2003) 151 – 160.

67. Heitner, C., Dimmel, D.R., Schmidt, J.A., Lignin and lignans advances in chemistry, CRC Press, Boca Raton (2010) 103 - 136.

68. Popescu, C.M., Vasile, C., Structural analysis of photodegraded lime wood by means of FT-IR and 2D IR correlation spectroscopy, *Int. J. Biol. Macromol.* **48** (2011) 667 – 675.

69. Briški, F., Gomzi, Z., Hublin, A., Vuković, M., Aerobno kompostiranje otpadaka voća I povrća: modeliranje procesa, *Kem. Ind.* **52** (2003) 95 - 102.

70. Hassen, A., Belguith, K., Jedidi, N., Cherif, M., Boudabous, A., Microbial characterization during composting of municipal solid waste, Proceedings of International Symposium on Environmental Pollution Control and Waste Management, Tunis, (2002) 357 - 368.

71. Paillat, J. M., Robin, P., Hassouna, M., Leterme, P., Predicting ammonia and carbon dioxide emissions from carbon and nitrogen biodegradability during animal waste composting, *Atmos. Environ.* **39** (2005) 6833 - 6842.

72. Sanchez Mondero, M. A., Roig, A., Paredes, C., Bernal, M. P., Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixtures, *Bioresour. Technol.* **78** (2001) 301 - 308.

73. de Guardia, A., Mallard, P., Teglia, C., Marin, A., Le Pape, C., Launay, M., Benoist, J. C., Petiot, C., Comparison of five organic wastes regarding their behaviour during composting: Part 2, nitrogen dynamic, *Waste Manage.* **30** (2010) 415 – 425.

74. Nakasaki, K., Ohtaki, A., Takano, H., Biodegradable plastic reduces ammonia emission during composting, *Poly. Degrad. Stabil.* **70** (2000) 185 - 188.

75. Garcia, C., Hernandez, T., Costa, F., Ayuso, M., Evaluation of the maturity of municipal waste compost using simple chemical parameters, *Commun. Soil. Sci. Plan* **23** (1992) 1501 - 1512.

76. Chang, Y.C., Tsai, H.F., Karos, M., Kwong-Chung, K.J., THTA, a thermotolerance gene of *Aspergillus fumigatus*, *Fungal Genet. Biol.* **41** (2004) 888 – 896.

ŽIVOTOPIS

Denija Krivičić [redacted] Osnovnoškolsko obrazovanje završila je u rodnome gradu Buzetu u Osnovnoj školi Vazmoslava Gržalje. Od 2007. do 2011. godine srednjoškolsko obrazovanje je nastavila u Pazinskom kolegiju - klasičnoj gimnaziji s pravom javnosti. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, studij Ekoinženjerstvo upisala je 2011. godine. Stručnu praksu, u sklopu preddiplomskog studija, odradila je u Istarskom vodovodu. U rujnu 2015. godine obranila je završni rad *Poboljšanje efikasnosti oksidacijske desulfurizacije korištenjem dodekafosfovolframove kiseline* pod mentorstvom prof. dr. sc. Katice Sertić–Bionde. Iste godine nastavila je diplomski studij Ekoinženjerstvo na istome Fakultetu. U sklopu završnoga rada 2016. godine sudjelovala je na XI. Susretu mladih kemijskih inženjera. Individualnim znanstvenim radom *Remedijacija otpadne vode iz procesa proizvodnje maslinovog ulja*, pod stručnim vodstvom dr. sc. Dajane Kučić, znan. sur., postala je dobitnica Rektorove nagrade 2016. godine. Iste godine nagrađena je za najbolji studentski rad pod naslovom *Obrada otpadnih tokova nastalih tijekom proizvodnje maslinovog ulja* na Sajmu ideja 2016. Dobitnica je stipendije Istarske županije za akademsku godinu 2016./2017. Također, dobitnica je stipendije za sudjelovanje na 25. Hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera s potpunim pokrićem troškova. Sudjelovala je na XXI. Tehnologijadi sa znanstvenim radom *Obrada otpadnih tokova nastalih u procesu proizvodnje maslinovog ulja*. U 2017. godini objavila je rad u Zborniku radova međunarodnog znanstveno-stručnog skupa *16. Ružičkini dani: "DANAS ZNANOST - SUTRA INDUSTRIJA"* pod naslovom *Obrada otpadne vode iz procesa proizvodnje maslinovog ulja postupcima adsorpcije i biosorpcije,* str. 262.-275. Za vrijeme studija sudjelovala je na različitim znanstveno-stručnim skupovima, radionicama i stručnim konferencijama. U ak. god. od 2012./2013. do 2016./2017. angažirana je kao demonstrator u Zavodu za industrijsku ekologiju na vježbama iz kolegija *Mikrobiologija* i *Zaštita okoliša* te u 2015./2016. na vježbama iz kolegija *Kompostiranje otpada*.