

**Vědecký výbor výživy zvířat**

**Potenciální patogeny ve výstupních složkách bioplynových stanic zpracovávajících kejdu hospodářských zvířat**

**Mgr. Ladislav Čermák, Ph.D.  
prof. MVDr. Eva Skřivanová, Ph.D.**

Praha, listopad 2019

ISBN 978-80-7403-229-5



## **SOUHRN**

Bioplynové stanice v současné době představují důležitou součást řízení zemědělské výroby. Zatímco hlavní surovinou pro anaerobní digesci je kukuřičná a travní siláž, mohou být krmeny také biologickými odpady, jako je skot, prasata nebo drůbež. Fugát, odpadní produkt z výroby bioplynu, se v zemědělství pravidelně používá jako hnojivo, ale může obsahovat bakteriální patogeny běžně související s chovem zvířat. Cílem studie bylo (i) porovnat různé druhy kejdy s ohledem na obsah vybraných zoonotických agens po anaerobní digesci a (ii) prozkoumat vliv fáze odběru fugátu během a po anaerobní digesci na počty sledovaných potenciálních patogenů. Počty koliformních bakterií, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp. a celkové anaeroby byly zkoumány kultivací ve vzorcích fugátu a vyhodnoceny jako log CFU / g sušiny. Studie má za cíl zvýšit povědomí o zoonotických infekcích pocházejících z chovu zvířat a přispět ke zlepšení hygieny zemědělské produkce.

## **SUMMARY**

Biogas stations present currently an important part of agricultural production management. While the main feedstock for anaerobic digestion is corn and grass silage, they can be fed also with bio-waste materials, such as cattle, swine or poultry manure. Fugate, the waste product of biogas production, is regularly used in agriculture as fertiliser, but can contain bacterial pathogens commonly related to animal husbandry. The aim of the study was (i) to compare different types of manure with regard to the content of selected zoonotic agents after anaerobic digestion and (ii) examine the effect of a stage of treating fugate after anaerobic digestion. The numbers of coliform bacteria, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp. and total anaerobes were investigated by cultivation in fugate samples and evaluated as log CFU/g of a dry matter. The study should help improve the hygiene of agricultural production and raises awareness of zoonotic infections originating from animal husbandry.

## Obsah

1	Teoretická část .....	4
1.1	Princip bioplynových stanic .....	4
1.1.1	Anaerobní digesce .....	4
	Produkty anaerobní digesce .....	5
1.1.2	.....	5
1.2	Bioplynové stanice v ČR a v zahraničí .....	6
1.2.1	Desatero bioplynových stanic .....	6
1.3	Patogenní mikroorganismy v digestátu a fugátu BPS .....	7
1.3.1	Salmonella sp. ....	7
1.3.2	Koliformní bakterie .....	7
1.3.3	Campylobacter sp. ....	9
1.3.4	Clostridium perfringens .....	10
1.3.5	Mycobacterium sp. ....	11
1.3.6	Yersinia sp. ....	12
1.3.7	Listeria sp. ....	12
2	Experimentální část .....	14
3.1.1	Úvod do experimentu .....	14
3.1.2	Metodika experimentu .....	14
3.1.3	Výsledky .....	15
4	Závěr .....	20
5	Poděkování .....	20
6	Literatura .....	21

# 1 Teoretická část

Bioplynové stanice jsou pro zemědělce v mnoha směrech přínosem. Pro zemědělce představují nový zdroj pravidelných a stabilních příjmů. Bioplynová stanice představuje jednu z mála možností, kdy zemědělec svou produkci – elektrickou energii a teplo – prodává přímo konečnému odběrateli. Mezi důvody, které vedly a vedou k výstavbě zemědělských bioplynových stanic po roce 2005, patří vhodné finanční a legislativní podmínky, pokles stavu hospodářských zvířat, nízká cena rostlinných komodit, využití mechanizačního vybavení a stavebních objektů, jednoduchost, nenáročnost a návratnost u bioplynových stanic a pravidelný příjem provozovatele bioplynové stanice.

Prvotním vstupem BPS je biomasa, která se umístí do reaktoru (fermentorů), tam se zahřívá bez přístupu vzduchu. Teplota v reaktoru závisí na kmenu bakterií, které biologický materiál rozkládají. Z fermentoru je bioplyn odváděn do zásobníků a je zde upravován na požadované vlastnosti (např. je z něj odstraňován sirovodík a čpavek). Upravený plyn je spalován buď v kogeneračních agregátech, případně se využívá jen na výrobu tepla.

Biologický odpad (digestát, fugát) však může obsahovat patogenní bakterie různých druhů, jako jsou salmonely, listerie, *E. coli*, kampylobaktery, mykobakterie, klostridie nebo yersinie. Mnohé z těchto bakterií jsou zoonotické patogeny. Mohou způsobit infekce jak u zvířat, tak u lidí - je to problém veřejného zdraví. Navíc několik bakterií je velmi perzistentních a mohou se dokonce množit v prostředí BPS. Studie má poukázat na negativní dopady patogenů na zdraví člověka a zvířat.

## 1.1 Princip bioplynových stanic

Bioplynová stanice je technologické zařízení využívající procesu anaerobní digesce ke zpracování bioodpadu, případně jiného biologicky rozložitelného materiálu. Hlavním produktem anaerobní digesce je bioplyn, který lze využít jako alternativní zdroj energie.

### 1.1.1 Anaerobní digesce

Anaerobní digesce (anaerobní fermentace) je proces, při kterém mikroorganismy rozkládají organický materiál bez přístupu vzduchu. Může probíhat samovolně v přírodě nebo řízenou metodou v bioplynových stanicích. Celý proces probíhá ve čtyřech základních fázích:

- hydrolýza - hydrolytické mikroorganismy štěpí makromolekulární organické látky na menší molekuly schopné transportu do buňky, kde probíhají další fáze
- **acidogeneze** - produkty hydrolýzy jsou štěpeny na jednodušší látky (kyseliny, alkoholy, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>)
- **acetogeneze** - tvorba kyseliny octové, CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>
- methanogeneze - vznik methanu ze směsi CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub> nebo z kyseliny octové; vedlejším produktem je CO<sub>2</sub> (Straka a kol. 2006)

V bioplynové stanici lze zpracovávat kejdu, hnůj a jiné odpady z živočišné výroby, fytomasu, odpady z rostlinné výroby, ze stravování, biologicky rozložitelný komunální odpad a čistírenské kaly. Vhodné jsou zvláště materiály s vyšší vlhkostí. Často se uplatňuje kofermentace (Schulz a Eder 2004), tzn.

zpracování různých materiálů v jednom zařízení. Vhodnou kombinací substrátů lze docílit složení, které bude mít příznivý vliv na průběh procesu a tím i na výsledné množství a kvalitu bioplynu.

Zařízení pro anaerobní digesce organických odpadů může mít mnoho variant. Na začátku bioplynové linky je zpravidla přípravná nádrž, kde se skladuje surový materiál. Ten je podle potřeby přečerpáván do fermentoru, kde se odehrává vlastní proces anaerobní digesce a tvorby bioplynu. Bioplyn vznikající ve fermentoru je jímán do zásobníku a upravován pro další využití.

Aby proces anaerobní digesce probíhal správně, je třeba zajistit vhodné životní podmínky pro činnost mikroorganismů. Těmi jsou:

- striktně anaerobní prostředí
- optimální pH
- stálá teplota
- vhodné složení substrátu (Schulz a Eder 2004)

### 1.1.2 Produkty anaerobní digesce

#### **1.1.2.1 Bioplyn**

Bioplyn je tvořen převážně methanem a oxidem uhličitým. Obsah methanu se pohybuje mezi 50 a 75 % (Pastorek a kol. 2004). Bioplyn se nejčastěji spaluje v kotlích a vyprodukované teplo se používá na vytápění budov nebo na ohřev vody. Další možností je kombinovaná výroba tepla a elektrické energie v tzv. kogenerační jednotce.

#### **1.1.2.2 Digestát**

Tuhý zbytek po vyhnití se sníženým obsahem biologicky rozložitelných látek se nazývá digestát. Tento materiál, pokud vyhovuje všem parametrům stanoveným vyhláškou Ministerstva životního prostředí (Vyhláška č. 382/2001 Sb.), lze využít jako hnojivo, přídatek do kompostu nebo k úpravě povrchu terénu (Váňa 2007). Digestát se obvykle vyrábí po celý rok a to bude proto nutné skladovat až do doby, kdy je to vhodné čas na jeho aplikaci jako hnojiva během pěstování sezóna. Délka doby skladování závisí na zeměpisné oblasti, typu půdy, zimních srážkách, střídání plodin, a vnitrostátních předpisech upravujících aplikaci kejdy. V mnoha případech se doporučuje skladovací kapacita 6–9 měsíců a v některých zemích je to povinné (Lukehurst a kol. 2010). Například v Estonsku zákon o vodě (Estonian Water Act) nedovoluje hnojení od začátku prosince do konce března a je vyžadována osmiměsíční skladovací doba (Riigikogu 2016). Během skladování digestát na rozdíl od kejdy (zejména skotu) obvykle netvoří krustu, protože pevný materiál, který by krustu vytvořil, je během procesu anaerobní digesce rozrušen. Pokud je digestát skladován v otevřených nádržích stejným způsobem jako čerstvá kejda, amoniak a metanové plyny těkají. Přírodní krusty (za předpokladu, že mají tloušťku 10–20 cm, tvořené plovoucí vrstvou měkkých a poddajných částic (hliněné hrudky nebo organické zbytky siláže) minimalizují uvolňování plynů.

### **1.1.2.3 Fugát**

Fugát, neboli procesní voda, je tekutý produkt vyhnívacího procesu a má charakter vody odpadní. Je silně zakalený a obsahuje produkty anaerobního rozkladu organických látek. Zpravidla je odváděn do čistírny odpadních vod nebo jímán do nádrží a posléze používán jako hnojivo na zemědělských půdách. Dlouhodobě panují názory, že digestát nebo fugát představují vynikající hnojiva pro zemědělskou produkci. Obě frakce však mají nízký obsah minerálního dusíku (fugát dokonce jen 0,04–0,4 % hmotnosti) a velmi nízký obsah organické hmoty (Gujer a Zehnder 1983).

## **1.2 Bioplynové stanice v ČR a v zahraničí**

Na začátku roku 2008 bylo na našem území v provozu asi 23 bioplynových stanic (Bačík 2008), z nichž převážná většina zpracovává bioodpady ze zemědělství. Nejdéle fungujícím zařízením na zpracování zemědělských odpadů v ČR je bioplynová stanice v Třeboni. V provozu je nepřetržitě od roku 1974 a zpracovává kejdu z velkovýkrmny prasat spolu s čistírenskými kaly (Kajan 2004). Další stanice jsou například v Kroměříži, Velkých Albrechticích, Mimoni, Kladrubech nebo Trhovém Štěpánově. K 31. 12. 2017 bylo v ČR registrováno 574 bioplynových stanic ([www.czba.cz](http://www.czba.cz)).

Z evropských zemí má nejvíce zkušeností s bioplynovou technologií Německo, kde je v současné době v provozu přes 3500 fermentačních zařízení především komunálního charakteru. V Dánsku funguje systém tzv. centralizovaných bioplynových stanic. Ke každé stanici je odpad svážen z okolních oblastí a stanice jsou umístovány tak, aby se jejich svozové zóny nepřekrývaly (Straka a kol. 2006). Ve Švédsku se bioplyn kromě vytápění a výroby elektrické energie využívá i pro pohon vozidel a nedávno zde byl také zprovozněn první vlak poháněný bioplynem na světě.

### **1.2.1 Desatero bioplynových stanic**

Zájem o výstavbu bioplynových stanic na našem území v posledních letech stoupá. Kvalitně zpracovaný projekt a důsledné dodržování zásad udržitelného provozu mohou předejít mnohým problémům, které provoz bioplynové stanice často doprovázejí. České sdružení pro biomasu proto zpracovalo Desatero bioplynových stanic, které má poskytnout základní informace všem zájemcům o výstavbu zemědělských bioplynových stanic. Zkrácená verze desatera (Bačík 2008):

- I. Precizní příprava projektu
- II. Dostatek kvalitních vstupních surovin
- III. Výtěžnost bioplynu z jednotlivých materiálů
- IV. Komunikace se samosprávou a veřejností
- V. Spolehlivá a ověřená technologie
- VI. Optimalizace investičních nákladů
- VII. Volba vhodné kogenerační jednotky
- VIII. Využití odpadního tepla
- IX. Nakládání s digestátem – hnojivo

X. Další možnosti využití bioplynu

### 1.3 **Patogenní mikroorganismy v digestátu a fugátu BPS**

#### 1.3.1 Salmonella sp.

Bakterie rodu *Salmonella* jsou Gram-negativní tyčinky patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Patří mezi původce gastroenteritidy a tyfoidní horečky a patří mezi nejvýznamnější patogeny osidlující trávicí trakt drůbeže. Salmonely (stejně jako většina bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*) jsou fakultativně anaerobní a netvoří spory. Jsou až na výjimky pohyblivé díky 4 – 5 peritrichálním bičíkům, povrch těla kryjí fimbrie adhezivního typu. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 0,7 – 1,5 µm na šířku a přibližně 2 – 5 µm na délku. Teplotně jsou tyto bakterie poměrně odolné, přežívají dokonce mrazení. Obecně dokáží salmonely růst v rozmezí teplot 6 – 50 °C, ideálně však při 37 °C. Pod mikroskopem je můžeme pozorovat jako jednotlivé tyčinky, páry, ale i ve formě řetízků. Salmonely redukují nitráty na nitrity, fermentují glukózu a jsou oxidáza-negativní. Většinu případů salmonelózy lze označit za zoonózy, některé sérotypy (jako *S. typhi* a *S. paratyphi*) jsou charakteristické pouze pro lidský organismus.

*Salmonella* spp. se taxonomicky dělí do dvou druhů: *Salmonella enterica* se šesti poddruhy a *Salmonella bongori*, dříve považován za poddruh *S. enterica*. Zdrojem infekcí salmonelou jsou nejčastěji potraviny, zejména drůbeží maso a vejce.

Salmonely se běžně nachází v zažívacím traktu hmyzu, zvířat a člověka. Jsou vylučovány fekáliemi a kontaminují životní prostředí a potraviny. Častým rezervoárem salmonel jsou vejce, zvláště u sérotypu Enteritidis, kdy salmonely mohou kolonizovat ovaria u nosnic a tímto tzv. transovariálním přenosem se salmonely stávají součástí vejce ještě před jeho dalším formováním ve vejcovodu. Pěstované polní plodiny mohou být kontaminovány salmonelami během růstu, sklizně, uskladnění nebo transportu (Beuchat and Ryu, 1997; Davies and Hinton, 2000).

#### 1.3.2 Koliformní bakterie

Pojem koliformní bakterie zahrnuje velkou skupinu Gram-negativních, pohyblivých nebo nepohyblivých bakterií z rodu *Enterobacteriaceae*, které mají tvar tyčinky a netvoří spory. Mezi koliformní bakterie jsou řazeny rody *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella* a *Escherichia*.

Důležitou vlastností je fermentace laktózy při 35 – 37 °C za aerobních či fakultativně anaerobních podmínek v selektivním prostředí žlučových solí (či jiných povrchově aktivních látek s podobnými, růst inhibujícími vlastnostmi), při které vzniká kyselina (příp. aldehyd) a plyn. V rámci koliformních bakterií dále rozlišujeme fekální (nebo přesněji termotolerantní) koliformy, které jsou schopny růst

a fermentovat laktózu i ve 44 °C. Schopnost fermentovat laktózu je závislá na přítomnosti enzymu beta-galaktosidázy a galaktosidu permeázy, které usnadňují vstup laktózy do buňky. Nevykazují cytochromoxidázovou aktivitu.

Koliformní bakterie a fekální koliformní bakterie jsou dlouhou dobu používány jako indikátory fekálního znečištění. Mohou být však nalezeny ve vodním prostředí, v půdě nebo vegetaci. Jsou ve velkých počtech běžně přítomny ve výkalech teplokrevných živočichů. Protože se tedy v rámci této skupiny (zejména mezi koliformními bakteriemi) vyskytuje řada druhů, které nemusejí mít fekální původ, směřuje současný trend k přímému stanovení *Escherichia coli*, která je podle směrnic Světové zdravotnické organizace (WHO, 1993) považována za hlavní indikátor fekálního znečištění. Přítomnost termotolerantních koliformů téměř vždy indikuje fekální kontaminaci. Obvykle více než 95 % termotolerantních koliformů izolovaných z vody jsou identifikovány jako střevní *E. coli*. V laboratorních podmínkách jsou termotolerantní koliformy kultivovány na médiu obsahujícím laktózu.

Virulentní kmeny *E. coli* jsou odborníky považovány za jedny z hlavních patogenů v chovech drůbeže. Jejich působením se zvyšuje mortalita, brakace i veterinární náklady. Tento podmíněný patogen se běžně vyskytuje ve střevech ptáků a savců v počtu cca  $10^6$  CFU/g zažitiny. Je detekován ve stovkách kmenů, z nichž je 10 až 15 % potencionálně patogenních. *E. coli* je gramnegativní fakultativně anaerobní spory netvořící tyčinkovitá bakterie pohybující se pomocí bičíků. Je podmíněně patogenní (může, ale nemusí u člověka vyvolat onemocnění), běžně se vyskytuje ve střevním traktu lidí a vyšších obratlovců. Její teplotní optimum je 37 °C, je značně odolná, ve vlhkém prostředí (v pitné a odpadní vodě, ve výkalech aj.) relativně dlouho přetrvává vitální a používá se proto s jinými koliformními bakteriemi (tj. bakteriemi, které při teplotě 30 °C zkvašují laktózu za vzniku kyselin a plynu) jako indikátor fekálního znečištění vody a potravin, který signalizuje potenciální přítomnost střevních patogenů (salmonel, shigel aj.). *E. coli* je za normálních okolností běžnou součástí mikrobioty trávicího traktu. Existují však kmeny, které za určitých okolností mohou být patogenní pro zvířata a člověka (Hejlíček and Vrtiak, 1982; Vařejka, 1989; Sherris, 1990). *E. coli* je nesporotvorná tyčinka pohybující se pomocí bičíku. Dosahuje délky 2 – 3  $\mu\text{m}$  a šířky 0,6  $\mu\text{m}$ . Roste za teploty 8 – 48 °C, optimum je při 37 °C. Rozsah pH pro růst je 6 až 8. Některé druhy mohou tvořit slizovité obaly, jež jsou složeny z polysacharidů. Na svém povrchu nese dva typy fimbrií. Jak bičík, tak fimbrie jsou vysoce antigenní. Bakterie produkuje indol, neroste na citrátu a neprodukuje sirovodík. Je kataláza-pozitivní, oxidáza-negativní. Inkubační doba *E. coli* je 12 – 72 hodin s optimální růstovou teplotou je 30-37 °C. Na rozdíl od skupiny koliformních bakterií obecně, *E. coli* jsou téměř výlučně fekálního původu a jejich přítomnost je tak definitivním potvrzením fekálního znečištění.



Průběh infekcí *E. coli* odpovídá virulenci příslušného kmene a vnímavosti hostitele. Známe několik faktorů, které mohou mít souvislost s virulencí *E. coli* u drůbeže. Nebyl však zjištěn žádný jednotlivý faktor virulence, pomocí něhož by bylo možné odlišit izolované kmeny patogenní od nepatogenních. Průběh infekce a závažnost klinických příznaků mohou být dále ovlivněny faktory, které působí na vnímavost hostitele. K těmto činitelům patří například vystavení jinému infekčnímu agens, vlivy životního prostředí, stav imunitního systému, plemeno nebo linie ptáků. Klinické příznaky jsou nespecifické a liší se podle věku ptáka, délky trvání infekce, postižených orgánů a souběžně probíhajících infekcí. Mortalita z důvodu akutní sepse se objevuje často u mladých jedinců, a to hlavně mezi 4. a 8. týdnem věku. Ptáci, kteří přežijí tuto fázi nemoci, se vyznačují celkově špatným zdravotním stavem doprovázeným často postižením srdce, jater a ostatních vnitřních orgánů. Přenos *Escherichia coli* je možný několika způsoby: vertikálně, například vzduchem a horizontálně, např. krmivem, vodou nebo kontaktem mezi zvířaty. Faktory jako stres, nadměrná vlhkost či sekundární infekce situaci jen zhoršují (Doktorová, 2001).

### 1.3.3 Campylobacter sp.

Kampylobaktery jsou spirální, tenké nebo jen zakřivené  $G^-$  nesporulující tyčky široké 0,2-0,8  $\mu m$  a dlouhé 0,5 - 6,0  $\mu m$ . Rod *Campylobacter* náleží do čeledi *Campylobacteriaceae*, aktuálně jej tvoří 18 druhů gramnegativních bakterií s 6 podruhy a 2 biovary. Ve starých kulturách přecházejí spirálovité buňky na kokoidní formu. K těmto morfologickým změnám dochází pravděpodobně v důsledku enzymové degradace peptidoglykanové vrstvy. Na jednom nebo obou koncích buňky je umístěn bičík, který umožňuje vývrtkovitý pohyb bakterie. Kampylobaktery jsou oxidáza pozitivní, netvoří z tryptofanu indol, redukují nitráty, ale nefermentují sacharidy. Jsou termofilní, pohyblivé polárně umístěnými bičíky, podmíněně patogenní. Tvar bakteriální buňky a pohyblivost usnadňují průnik vrstvou hlenu ve střevu hostitele. Vyskytují se v trávicím traktu člověka i téměř u všech domácích a velkého počtu divoce žijících zvířat. Pro dospělou drůbež jsou většinou nepatogenní, přesto je drůbež považována za primárního rezervoárového hostitele. *Campylobacter* sp. je hlavním původcem průjemových onemocnění u lidí (Dirksen and Flagg, 1988), ty bývají následkem požití kontaminovaného jídla nebo vody. Přítomnost kampylobakterů není spojená s přítomností indikátorových mikroorganismů pro čištění odpadních vody, což ukazuje na to, že hlavními přenašeči v přírodě jsou volně žijící nebo domácí zvířata (Carter et al., 1987). Svými nároky na prostředí jsou odlišné od jiných patogenních bakterií spojovaných s alimentárními infekcemi. Jsou mikroaerofilní, rostoucí nejlépe v atmosféře složené z přibližně 85 %  $N_2$ , 10 %  $CO_2$  a 5 %  $O_2$ . Kampylobaktery jsou extrémně citlivé na vyschnutí, jsou ale schopné delší dobu přežít v povrchových vodách, trusu a podestýlce. Infekčnost si zachovávají ve vodě po 4 týdny při 4 °C, v mléce 3 týdny při 4 °C a po 24 hod při 25 °C. V trusu zůstávají životaschopné po 3 týdny při 4 °C. Při teplotě -9 nebo -12 °C

přetrvávají na povrchu opracovaných kuřat 10 dní a po 182 dní při teplotě -20 °C. Lyofilizovaná kultura přežívá po mnoho let (Silva et al., 2011).

Hlavním rezervoárem *Campylobacter* spp. je zažívací trakt hospodářských zvířat (*C. jejuni* a *C. coli*), domácích mazlíčků (*C. upsaliensis*), ptáků i člověka. Z prostředí střevní mikrobioty se patogen dostává do prostředí porážky. Ve střevním obsahu brojlerů se nachází v průměru  $10^6 - 10^7$  CFU/g kampylobakterů a převládá výskyt druhů *C. jejuni* a *C. coli*. Kolonizace střeva probíhá díky pohyblivosti bakterií (chemotaxe) a produkci adhezivních proteinů. Přežití uvnitř vakuol epiteliálních buněk bakteriím usnadňuje produkce katalázy a superoxid-dismutázy, která inaktivuje volné kyslíkové radikály. Významné pro přežití a patogenitu je schopnost získávat železo z transferinu a laktoferinu obsažených v séru a sliznicích hostitele. Hlavním produkovaným toxinem je CDT (cytolethal distending toxin). Tento toxin narušuje epiteliální klky, čímž je dočasně narušena absorpční funkce střeva a vzniká průjem. CDT je termolabilní (70 °C) a trypsin senzitivní (Silva et al., 2011).

V Evropské unii se roční počet případů pohybuje od roku 2009 nad hranicí 200 tisíc. V České republice byl prudký nárůst kampylobakterióz zaznamenán od konce 90. let minulého století až do roku 2005. Počet hlášených onemocnění způsobených bakterií rodu *Campylobacter* se v ČR pohyboval mezi lety 2001 – 2010 v rozmezí 20 063 – 30 268 nemocných osob za rok (Epidat, SZÚ). Prevencí výskytu *Campylobacter* spp. je důkladné tepelné opracování potravin, zamezení křížové kontaminace v průběhu zpracování a skladování potravin, dodržování nejen sanitace a desinfekce v průběhu produkce a zpracování potravin, ale i osobní hygieny osob zpracovávajících potraviny. Kampylobaktery se rychle šíří v rámci intenzivních chovů drůbeže během několika dnů a bývají zřídka zjištěny před druhým až třetím týdnem věku (Newell and Fearnley, 2003). Šíření organismu zvyšuje koprofagie a přenos z jedince na jedince fekálně-orální cestou (Newell and Fearnley, 2003).

#### 1.3.4 *Clostridium perfringens*

*C. perfringens* je relativně velká, nepohyblivá, Gram-pozitivní, sporulující, striktně anaerobní tyčinka z čeledi *Bacillaceae*, která na agaru tvoří velké, pravidelné, okrouhlé, lehce lesklé kolonie. Bakterie roste za teploty 15 až 50 °C, s optimem mezi 37 °C a 45 °C pro většinu kmenů. Schopnost tvořit termorezistentní endospory a široké teplotní rozmezí, ve kterém je mikroorganismus schopný růst jsou vlastnosti, které mu umožňují se množit a přežít v rozličném prostředí. Endospory jsou často širší než vegetativní organismy, ve kterých vznikají, přičemž buňky mají charakteristické tvary včetně nebo klostridiové formy. Klostridie jsou v přírodě hojně rozšířena právě díky schopnosti tvořit odolné endospory. *C. perfringens* je prakticky všudypřítomná bakterie, je možné ji nalézt v půdě, vodě, mléce, prachu, mořském sedimentu, odpadní vodě, stejně jako ve střevě lidí a zvířat a tělech hmyzu. Vyskytuje se hlavně v půdě, vodních usazeninách a v gastrointestinálním traktu zvířat. *C. perfringens*

má několik vlastností, které významně přispívají k jeho schopnosti způsobit alimentární onemocnění. Jednak se *C. perfringens* všudypřítomně šíří přirozeným prostředím, takže existuje mnoho příležitostí ke kontaminaci potravin. Dalším důvodem je jeho schopnost vytvářet termorezistentní spory, umožňující přežívání v různých prostředích, včetně nedostatečně uvařeného masa a nesprávných sterilizačních technik. *C. perfringens* má také schopnost rychlého růstu v potravinách a množství může dosáhnout takového počtu bakterií, které je schopnost způsobit alimentární otravu. Poslední důležitou vlastností *C. perfringens* je produkce ve střevech aktivního enterotoxinu (CPE), který je odpovědný za symptomy typické pro gastrointestinální alimentární otravu. *C. perfringens* je původcem například plynatého sněti a velmi vzácného onemocnění u lidí, nekrotické enteritidy (způsobuje ji typ C). Tato bakterie je také původcem mnoha chorob zvířat, jako jsou enterotoxémie a nekrotická enteritida u ptáků včetně drůbeže.

### 1.3.5 *Mycobacterium sp.*

Mykobakterie jsou mírně zakřivené tyčinky 0,2-0,7 x 1,0-10 µm, někdy mají tendenci k větvení. Velmi obtížně se barví podle Grama, obvykle se jeví jako slabě gramnegativní. Charakteristický pro ně je pomalý růst v podmínkách *in vitro*. Typovým druhem je *Mycobacterium tuberculosis*, původce tuberkulózy (Holt et al., 1994). V přírodě jsou rezervoárem tuberkulózy divoce žijící zvířata, v Evropě hlavně jezevec (*Meles meles*). Tato zvířata vylučují infekční agens výkaly a močí a teoreticky tak mohou znečistit pastviny pro skot (Hinton, 2000).

Produkty zemědělských bioplynových stanic (živočišné odpady, ať hovězí, drůbeží, či vepřové) mohou představovat nové, nepoznané riziko z hlediska šíření původců různých onemocnění, např. paratuberkulózy, aviární mykobakterií, aviární tuberkulózy. V případech, kdy se v chovu skotu vyskytuje paratuberkulóza, je možné rozšíření a i pomnožení jejího původce - *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) je etiologický původce Johneovy choroby (JD) nebo paratuberkulózy, achronické granulomatózní enteritidy přežvýkavců. MAP izoláty lze klasifikovat do dvou genotypů na základě kulturních charakteristik a analýzy genomu: izoláty ovcí (také nazývané typ S nebo typ I) a izoláty skotu (také nazývané typ C nebo typ II) (Collins a kol., 1990; Bryant a kol., 2016). JD způsobuje značné ztráty hospodářských zvířat v zemědělských chovech, konkrétně snížením produkce mléka u krav, předčasné utracení nebo sníženou hodnotu jatečně upravených těl (Ott et al., 1999). Princip patogeneze u MAP je následovný: makrofágy primárně používají manózový receptor (MR, CD207) a receptor komplementu C3 pro fagocytózu MAP (Souza et al., 2007). Tyto receptory se vyznačují skutečností, že zprostředkovávají pohlcování mikrobů, aniž by nutně vyvolaly prozánětlivou imunitní odpověď, a tak se již dlouho předpokládá, že se zvyšuje časné intracelulární přežití některých mikrobů. K dalšímu porozumění

patogenezi paratuberkulózy je nutné pokračovat v definování faktorů ovlivňujících časnou interakci mezi hostitelskými makrofágy a MAP. Dalšími patogeny, které se v BPS můžou v závislosti na nálezové situaci v chovu vyskytovat, je původce aviární tuberkulózy - *Mycobacterium avium subsp. avium* (MAA) a aviární mykobakterií - *Mycobacterium avium subsp. hominissuis* (MAH).

#### 1.3.6 Yersinia sp.

*Yersinia enterocolitica* je hlavní potravinový patogen způsobující yersiniózu. V roce 2011 bylo v Evropské unii hlášeno celkem 7017 potvrzených případů yersiniózy, což odpovídá nárůstu o 3,5% ve srovnání s rokem 2010 (European Food Safety Authority 2013). *Y. enterocolitica* je rozšířená v životním prostředí a populaci zvířat a představuje potenciální zdroj infekce pro člověka. Hlavním rezervoárem kmenů *Y. enterocolitica* patogenních pro člověka jsou prasata (Huovinen a kol. 2010). Vypuknutí onemocnění je také spojeno se spotřebou neupravené vody, kontaminovaného mléka (nepasterizovaného nebo nedostatečně pasterizovaného), tofu nebo klíčků fazole (Sabina a kol. 2011). Přenos patogenu z člověka na člověka je vzácný, ale byla zaznamenána kontaminace potravin infikovanými zpracovateli potravin a nozokomiálními infekcemi (Sabina a kol. 2011). *Y. enterocolitica* je heterogenní skupina bakterií. Druh byl rozdělen do 2 poddruhů (*Y. enterocolitica subsp. Enterocolitica a subsp. Palearctica*) (Neubauer a kol. 2000). Z 6 známých biotypů jsou kmeny patřící k biotypům 1B a 2–5 považovány za patogenní pro zvířata a lidi (Huovinen a kol. 2010, Sabina a kol. 2011). Kmeny biotypu 1A bez klasických markerů virulence jsou považovány za nepatogenní (Bhagat a Viridi 2007). Podle některých autorů má však biotyp 1A patogenní potenciál (Batzilla a kol. 2011), což naznačuje, že způsob definování patogenity založený pouze na stanovení biotypu je třeba změnit. Obecně patogenita *Y. enterocolitica* závisí na přítomnosti několika genů, známých jako virulenní markery. Tyto geny umožňují bakteriím vstoupit do vnímavého organismu, kolonizovat jej, obejít imunitní systém a růst za nepříznivých podmínek (Gierczyński 2000).

#### 1.3.7 Listeria sp.

Zástupci rodu *Listeria* jsou pravidelné tyčinky o velikosti 0,4-0,5 x 0,5-2  $\mu\text{m}$ . Jsou grampozitivní, pohyblivé a fakultativně anaerobní. Optimální kultivační teplota je 20-25 °C. Listerie jsou široce rozšířeny ve vnějším prostředí, vyskytují se pravidelně např. v kazící se zelenině. Typovým druhem je *Listeria monocytogenes*, který působí celková septická onemocnění, většinou u imunitně oslabených lidí (Holt et al., 1994). Vyskytuje se celosvětově, v přírodě jsou rezervoárem listerií hlodavci, kteří se na podzim stahují do zemědělských objektů, kde infikují krmiva, listeriózy mívají proto v našich podmínkách sezónní výskyt (Hejlíček and Vrtiak, 1982). Listerie jsou častým původcem infekcí stádových zvířat, u mnohých patří k fyziologické střevní flóře. Nacházejí se i volně v přírodě. Pro

člověka je typická nákaza kontaminovanými potravinami. Mezi rizikové patří nepasterizované mléko, nedostatečně tepelně upravené maso a zrající sýry (Beneš a kol. 2009). K faktorům patogenity patří tzv. monocytosis producing agent, který zvyšuje počet makrofágů, dále faktor Ei, který má pyrogenní efekt a spolupůsobí při patogenezi edému, listerolysin O, sfingomyelináza C a lipáza (Bednář 1996). Mezi další patogenní druhy patří *L. ivanovii* a *L. seeligeri*. Všechny tyto druhy produkují hemolysin, jsou kataláza pozitivní. *L. monocytogenes* je původcem listeriózy. Hospodářská zvířata (drtivou měrou přežvýkavci) hrají klíčovou roli v přetrvávání *Listeria spp.* ve venkovském prostředí prostřednictvím kontinuálního fekálně-orálního cyklu (Vazquez-Boland et al., 2001). Riziko listeriózy u přežvýkavců se zvyšuje u fermentovaných krmiv nízké kvality, například když je mléčný skot krmen silážovými potravinami (Donnelly, 2002). Dále mohou *L. monocytogenes* kontaminovat mléko od zvířat s mastitidou.

## 2 Experimentální část

### 3.1.1 Úvod do experimentu

Bioplynové stanice představují moderní a ekologická zařízení se schopností využít některé odpadní suroviny a přeměnit je na užitečné komodity, jako je například bioplyn. Obecně převažují zemědělské BPS, které vedle rostlinných vstupních materiálů (nejčastěji energetické plodiny, např. kukuřičná siláž) využívají také odpadní produkty živočišné výroby (keжда, hnůj). Vedlejším odpadním produktem z provozu BPS je digestát. Jde o zbytek po fermentačním procesu (tzv. anaerobní digesce), který probíhá bez přístupu vzduchu a jehož hlavním cílem je výroba bioplynu. Digestát tvoří převážně tekutý zbytek fermentačního procesu, který obsahuje velké množství živin. Digestát je možno rozdělit na pevný separát sloužící např. jako stelivo v chovech zvířat a tekutý fugát. Nejčastějším použitím digestátu a fugátu je jejich aplikace jako hnojiva na zemědělské půdy.

Potenciální zdravotní riziko výstupních složek z BPS je částečně určováno substrátem, který je do fermentoru vpravován. Je dobře známo, že odpadní složky obsahují nejrozumnější patogenní bakterie. Pocházejí z tkání zvířat jak nemocných, tak zdravých, kteří vylučují bakterie ve stolici, moči a exudátech. Proto biologický odpad může obsahovat patogenní bakterie, jako jsou *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* sp., *Mycobacterium* sp., *Clostridium* sp. a *Yersinia* sp. (Dudley a kol. 1980, Larsen 1995, Larsen a Munch 1986, Strauch 1991). Mnohé z nich představují zoonotické patogeny a mohou způsobit infekce u zvířat i lidí.

Cílem experimentu bylo zjistit přítomnost vybraných potenciálně patogenních bakterií ve výstupních složkách procesu výroby bioplynu v bioplynových stanicích. Metodou kultivace byly porovnávány fugáty pocházející z různých druhů kejď (skotu, prasečí, drůbeží), a to z hlediska výskytu bakteriálních patogenů a jejich kvantity.

### 3.1.2 Metodika experimentu

Vzorky fugátů byly získány během roku 2018 z vytipovaných zemědělských bioplynových stanic na území Středočeského a Plzeňského kraje ČR. Vybrány byly celkem tři BPS, které jako jednu ze vstupních surovin pro výrobu bioplynu používají kejď hospodářských zvířat (skotu, prasat a drůbeže). Bezprostředně po odběru vzorků z výpustného ventilu fermentoru byly vzorky dovezeny ve sterilních uzavíratelných vzorkových lahvích do laboratoří VÚŽV, kde byly týž den zpracovány za účelem mikrobiální kultivace, části objemu vzorků byly zamrazeny pro pozdější extrakci DNA či RNA.

Kampylobaktery, klostridia, salmonely a koliformní bakterie byly kultivovány přímo za specifických podmínek. Salmonely rostly na X.L.D. agaru (CM0469) a koliformy na MacConkey agaru No. 3 (CM0115) za aerobních podmínek při 37°C po dobu 24 hodin. Klostridia byla kultivována na Perfringens Agar Base TSC & SFP (CM0587) s přísávkem Egg Yolk Emulsion (SR0047) a TSC Supplement (SR0088) v anaerostatu za anaerobních podmínek 24 hodin při 37°C. Kampylobaktery byly kultivovány na Campylobacter Selective Agar (CM0689) doplněném o Preston Campylobacter Selective Supplement (SR0117) a Laked Horse Blood (SR0048). Počty CFU/g sušiny byly převedeny

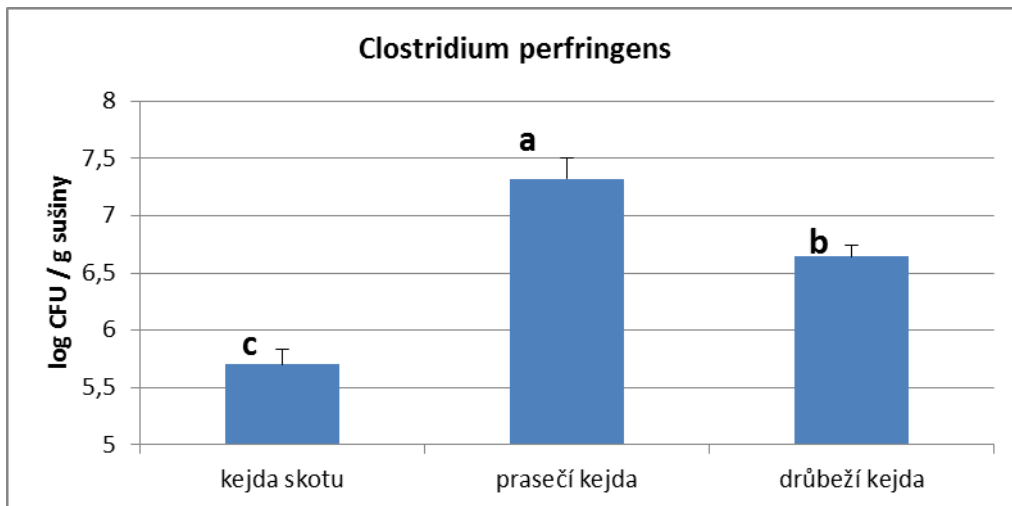
na logCFU/g a podrobeny statistické analýze (one way ANOVA). Veškerá média a doplňky dodala společnost OXOID CZ, s.r.o. (Brno, Česká republika).

### 3.1.3 Výsledky

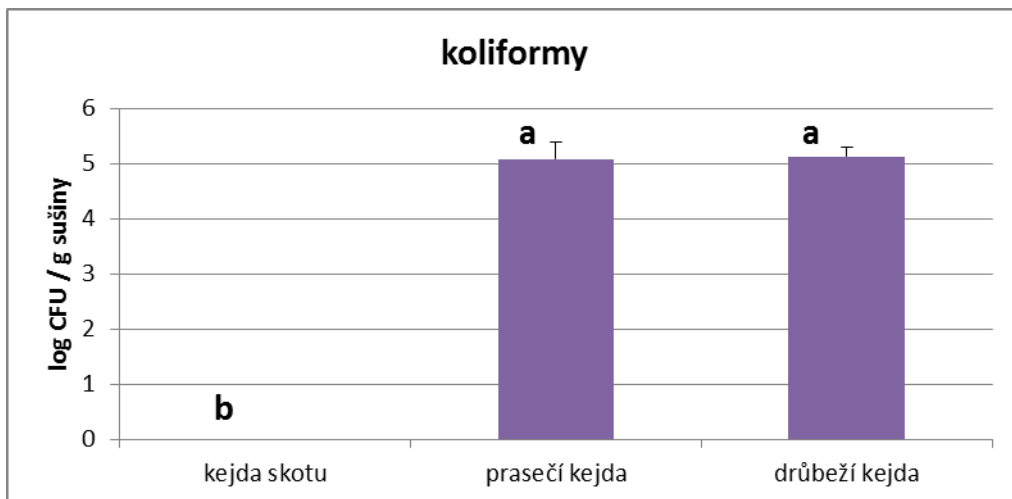
Fugát z prasečí kejdy vykazoval vyšší počty *Clostridium perfringens* než ty z kejdy drůbeže a skotu (o jeden řád, respektive dva řády;  $P < 0,0001$ ). Nejnižší počet patogenů byl detekován ve fugátu z kejdy skotu, s nezjistitelným počtem koliformů po procesu anaerobní digesce (předchozí log CFU = 5).

**Obr. 1. Grafy znázorňují počty (logCFU) jednotlivých kultivovaných bakterií ve fugátu pocházejícího z BPS používajících různé druhy kejdy. A) *Clostridium perfringens*, B) koliformní bakterie, C) kampylobakterie, D) salmonely a E) celkové anaeroby. Graf srovnává počty bakterií ve fugátu po skončení anaerobní digesce ve fermentoru.**

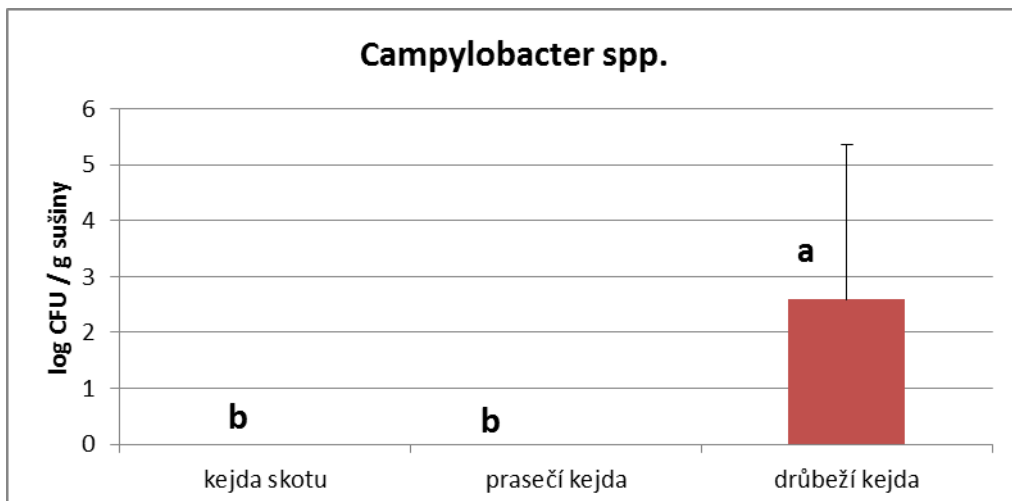
**A**



**B**

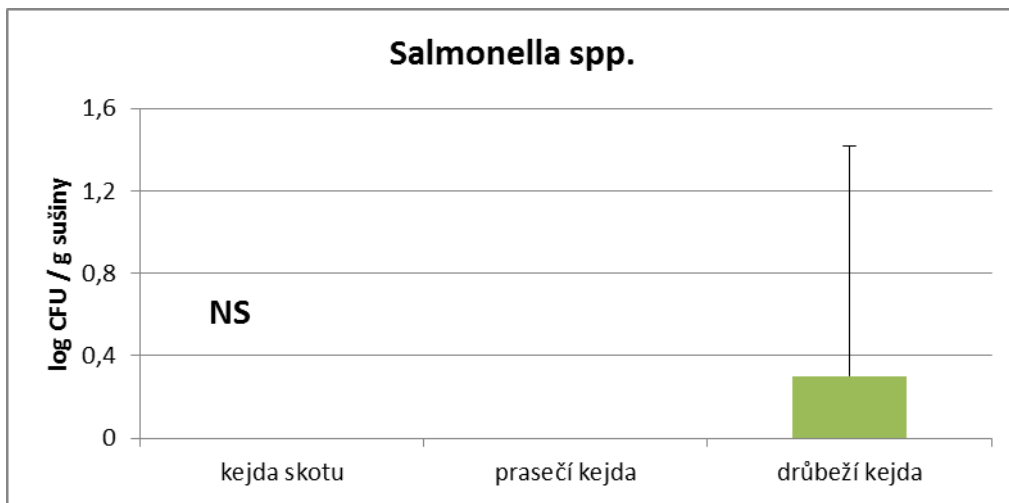


**C**

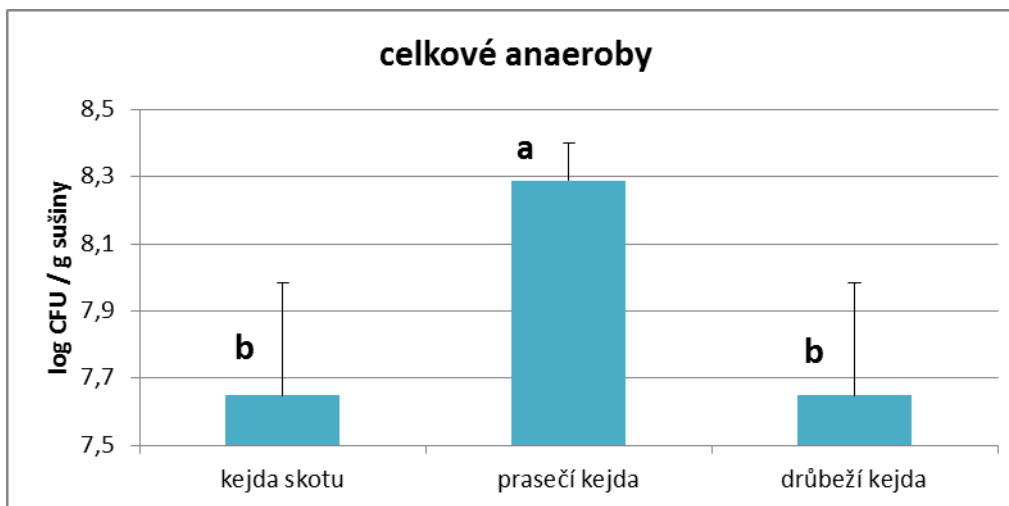




**D**

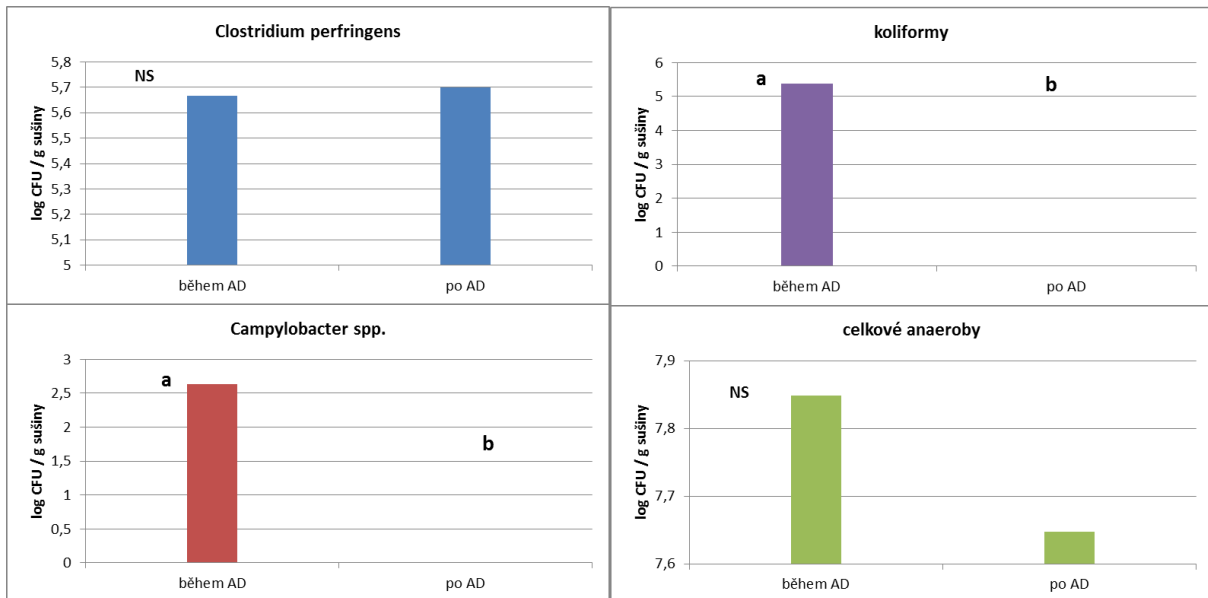


**E**

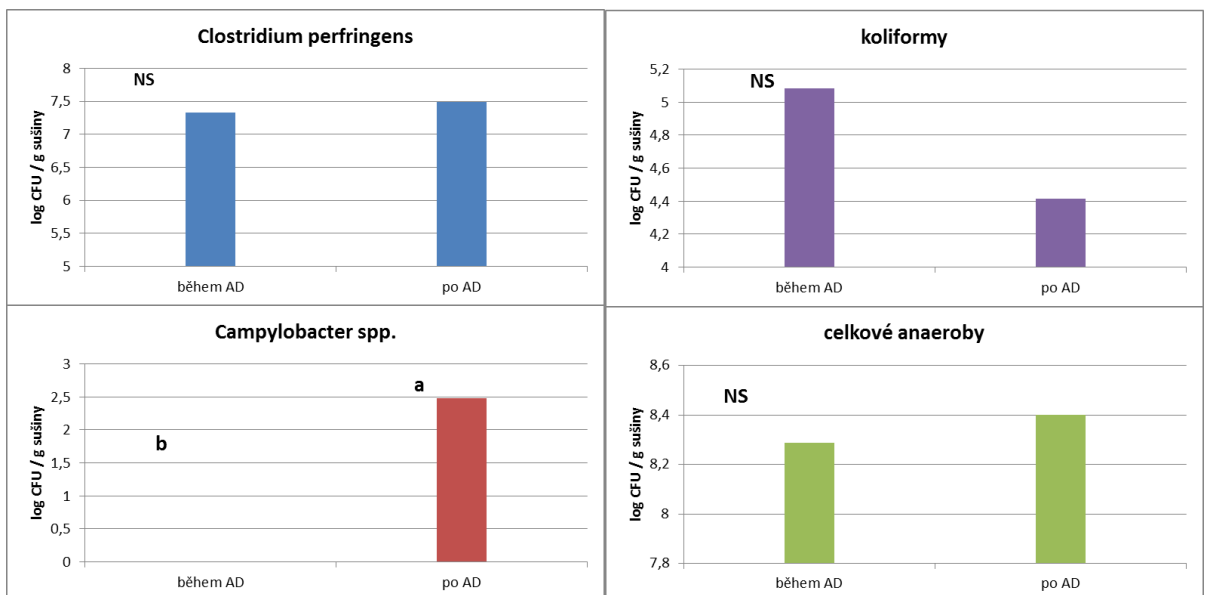


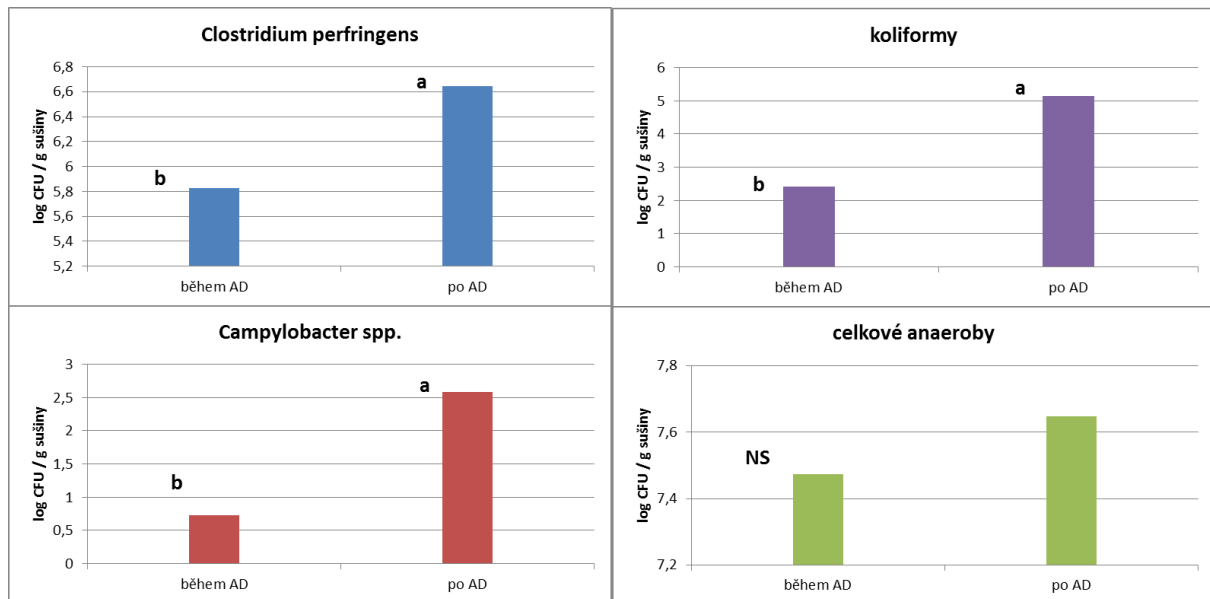
Obr. 2. Grafy znázorňují počty (logCFU) jednotlivých kultivovaných bakterií ve fugátu pocházejícího vždy z BPS používající jeden druh kejdy: A) kejdu skotu, B) prasečí kejdu, C) drůbeží kejdu. Grafy ukazují změny v počtu CFU během a po skončení anaerobní digesce (AD) ve fermentoru.

**A**



**B**



**C**

Z našich výsledků plyne, že nejmenší dopad má na kontaminaci půdy zoonotickými patogeny použití kejdy skotu. Bylo opakovaně zjištěno, že procesem anaerobní digesce se např. koliformní bakterie zcela eliminují. Naopak u kejdy prasat byla pozorována zvýšená hladina klostridií, jmenovitě *Clostridium perfringens*, a tato hladina zůstávala v případě volného skladování kejdy v řádech měsíců prakticky na stejné úrovni. Taktéž u drůbeží kejdy byl zaznamenáván vyšší podíl nebezpečných kampylobakterů. Ukazuje se tedy, že použití kejdy skotu se jeví jako nejpříjemnější z hlediska ochrany zdraví člověka i hospodářských zvířat. Získané poznatky chceme využít k návrhu opatření, která sníží výskyt patogenních bakterií ve fugátu před aplikací do půdy.

## **4 Závěr**

Experimentální část studie ukázala, že došlo k významným rozdílům v počtech všech sledovaných skupin bakterií mezi vzorky z bioplynových stanic zpracovávajících různé druhy kejdy. Fugát z prasečí kejdy vykazoval vyšší počty *Clostridium perfringens* než ty z kejdy drůbeže a skotu. Nejnižší počet patogenů byl detekován ve fugátu z kejdy skotu, s nezjistitelným počtem koliformů po procesu anaerobní digesce. Další studium problematiky bude zahrnovat detekci patogenů na molekulární úrovni s využitím metod qPCR, identifikace jednotlivých taxonů na základě 16S rRNA a případně fragmentační analýzu ribozomální RNA pro charakterizaci a změnu bakteriálních společenstev v prostoru a čase.

## **5 Poděkování**

Tato studie vznikla s podporou projektu MZE-RO0718.

## 6 Literatura

Bačík O. (2008): Bioplynové stanice: technologie celonárodního významu. *Biom.cz* [online]. 2008-01-14 [cit. 2019-11-01]. Dostupné z WWW: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/bioplynovne-stanice-technologie-celonarodniho-vyznamu>. ISSN: 1801-2655.

Batzilla J., Heesemann J., Rakin A. (2011): The pathogenic potential of *Yersinia enterocolitica* 1A. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(7): 556–561.

Bednář M. (1996): Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. 1. vydání. Triton 1996. ISBN 859-40-3150-528-0.

Beneš J. a kol. (2009): *Infekční lékařství*. 1. vydání. Galén, 2009. 651 s. ISBN 978-80-7262-644-1.

Beuchat L.R., Ryu J.H. (1997): Produce handling and processing practices. *Emerging Infectious Diseases*, 3: 459–465.

Bhagat N., Viridi J.S. (2007): Distribution of virulence-associated genes in *Yersinia enterocolitica* biovar 1A correlates with clonal groups and not the source of isolation. *FEMS Microbiology Letters*, 266: 177–183.

Bryant J.M., Thibault V.C., Smith D.G., McLuckie J., Heron I., Sevilla I. A., a kol. (2016): Phylogenomic exploration of the relationships between strains of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *BMC Genomics*, 17:79.

Carter A.M., Pacha R.E., Clarke G.W., Williams E.A. (1987): Seasonal occurrence of *Campylobacter* spp. in surface waters and their correlation with standard indicator bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 53: 523–526.

Collins D.M., Gabric, D.M., de Lisle G.W. (1990): Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 1591–1596.

Davies R.H., Hinton M.H. (2000): Salmonella in animal feed. In: Wray C., Wray A. (Eds.): *Salmonella in Domestic Animals*. CAB International, Oxford, England, pp. 285–300.

Dirksen J., Flagg P. (1988): Pathogenic organisms in dairy products; cause, effects and control. *Food Science and Technology Today*, 2: 41–43.

Doktorová J. (2001): Jak se bránit infekci *Escherichia coli* u drůbeže. *Náš chov*, online (<http://naschov.cz/jak-se-branit-infekci-escherichia-coli-u-drubeze/>).

Donnelly C.W. (2002): Detection and isolation of *Listeria monocytogenes* from food samples: implications of sublethal injury. *Journal of AOAC International*, 85, 495–500.

Dudley D.J., Guentzel M.N., Ibarra M.J., Moore B.E., Sagik B.P. (1980): Enumeration of potentially pathogenic bacteria from sewage sludges. *Appl. Environ. Microbiol* 39 (1), 118–126.

European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*. 2013; 11: 3129–3379.

Gierczyński R. (2000): Evaluation of the usefulness of selected virulence markers for identification of virulent *Yersinia enterocolitica* strains. II. Genotypic markers associated with the pYV plasmid. *Med Dośw Mikrobiol*. 2000; 52: 35–49.

Gujer W., Zehnder A.J.B. (1983): Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 15: 127–167.

Hejlíček K., Vrtiak J.O. (1982): Speciální epizootologie 1. SZN Praha, 320 s.

Hinton M.H. (2000): Infections and intoxications associated with animal feed and forage which may present a hazard to human health. *The Veterinary Journal*, 159: 124.

Holt J.G., Krieg N.G., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (1994): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edition, Williams and Wilkins, Baltimore, 787 s.

Huovinen E., Sihvonen L.M., Virtanen M.J., Haukka K., Siitonen A., Kuusi M. (2010): Symptoms and sources of *Yersinia enterocolitica*-infection: a case-control study. *BMC Infect Dis.*, 10: 122.

Kajan M. (2004): Bioplynová stanice Třeboň. *Biom.cz* [online]. 2004-06-07 [cit. 2019-11-01]. Dostupné z WWW:<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/bioplynova-stanice-trebon>. ISSN: 1801-2655.

Larsen H.E. (1995): Bakteriologiske risici ved anvendelse af husdyrgodning og affald. *Rev. DanskVet. Tidsskrift*. 78 (15), 763–766 (in Danish, with English summary).

Larsen H.E., Munch B. (1986): Pathogenic bacteria in extraanimal environments. *Ugeskrift Jordbrug, Sel. Res. Rev.*, 57–66.

Lukehurst C.T., Frost P., Al Seadi T. (2000): *Utilisation of Digestate from Biogas Plants as Biofertiliser. IEA Bioenergy*.

Neubauer H., Aleksic S., Hensel A., Finke E.J., Meyer H. (2000): *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. *Int J Med Microbiol.*, 290: 61–64.

Newell D.G., Fearnley C. (2003): Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4343–4351.

Ott, S. L., Wells, S. J., and Wagner, B. A. (1999). Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.* 40, 179–192.

Pastorek Z., Kára J., Jevič P. (2004): *Biomasa – obnovitelný zdroj energie*. Praha: FCC PUBLIC s.r.o., 2004. 286 s, ISBN 80-86534-06-5.

Riigikogu. Veeseadus [Water Act]. *Riigi Teataja I*, 27.12.2016, 6.

Sabina Y., Rahman A., Ramesh C.R., Montet D. (2011): *Yersinia enterocolitica*: Mode of Transmission, Molecular Insights of Virulence, and Pathogenesis of Infection. *J Pathog.*

- Sherris J.C. (1990): *Medical Microbiology*, Prentice-Hall International Inc., Toronto, 991 s.
- Schulz H., Eder B. (2004): *Bioplyn v praxi – Teorie, projektování, stavba zařízení, příklady*. Ostrava: HEL. 166 s, ISBN 80-86167-21-6.
- Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P. A., Teixeira P. (2011): *Campylobacter spp. as a foodborne pathogen: a review*. *Frontiers in microbiology*, 2.
- Souza C., Davis W.C., Eckstein T.M., Sreevatsan S., Weiss D.J. (2013): *Mannosylated lipoarabinomannans from *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* alters the inflammatory response by bovine macrophages and suppresses killing of *Mycobacterium avium subsp. Avium* organisms*. *PLoS ONE* 8:e75924.
- Straka F. a kol. (2006): *Bioplyn – příručka pro výuku, projekci a provoz bioplynových systémů*. Praha: GAS s.r.o., 2006, 706 s, ISBN 80-7328-090-6.
- Strauch D. (1991): *Survival of pathogenic micro-organisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge*. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 10 (3), 813–846.
- Váňa J. (2007): *Využití digestátů jako organického hnojiva*. *Biom.cz* [online]. 2007-04-25 [cit. 2019-11-04]. Dostupné z WWW: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/vyuziti-digestatu-jako-organickeho-hnojiva>. ISSN: 1801-2655.
- Vařejka F., Mráz O., Smola J. (1989): *Speciální veterinární mikrobiologie*. SZN, Praha, 264 s.
- Vazquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J. (2001): *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 584–640.