

Vědecký výbor výživy zvířat

**Diverzita potenciálních bakteriálních patogenů
ve fugátu bioplynových stanic zpracovávajících kejdu
hospodářských zvířat**

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

Praha, listopad 2021



ISBN 978-80-7403-267-7

Souhrn

Významnou vstupní surovinu pro anaerobní digesce v bioplynových stanicích je kromě siláží také biologický odpad skotu, prasat nebo drůbeže. Fugát, odpadní produkt z výroby bioplynu, který se v zemědělství pravidelně využívá jako hnojivo, může nicméně obsahovat bakteriální patogeny způsobující nejrůznější zoonózy. Anaerobní digesce (AD), hlavní metoda stabilizace biologických pevných látek, může účinně a do značné míry deaktivovat životaschopné patogeny, včetně parazitů, virů a patogenů obsahujících geny rezistence na antibiotika. Tento přehled si klade za cíl poskytnout kritický přehled týkající se deaktivace patogenů souvisejících s produkty bioplynových stanic pomocí AD, díky čemuž byly vzneseny vážné obavy ohledně účinnosti a racionality AD vůči kontrole patogenů ve fugátu. Byly diskutovány základní deaktivací mechanismy a ovlivňující faktory se zaměřením na modelování související s patogeny a technologické aspekty AD. Cílem studie je porovnat diverzitu potenciálních bakteriálních patogenů v různých typech kejdy, vše s použitím molekulárně-biologických metod na úrovni DNA. Společenstva byla zkoumána metodou fragmentační analýzy T-RFLP a sekvenováním části 16S rRNA dideoxy metodou. Studie má za cíl zvýšit povědomí o diverzitě potenciálních patogenů pocházejících z chovu zvířat a vlivu anaerobní digesce na složení bakteriálního společenstva, a celkově tak má přispět ke zlepšení hygieny zemědělské produkce.

Summary

In addition to silage, biological waste from cattle, pigs or poultry is also an important input raw material for anaerobic digestion in biogas plants. However, fugate, a waste product from biogas production that is regularly used in agriculture as a fertilizer, may contain bacterial pathogens causing a variety of zoonoses. Anaerobic digestion (AD), the main method of stabilizing biological solids, can effectively and largely inactivate viable pathogens, including parasites, viruses, and pathogens containing antibiotic resistance genes. This review aims to provide a critical overview of the inactivation of biogas plant-related pathogens using AD, which has raised serious concerns about the effectiveness and rationality of AD in controlling pathogens in the plant. Basic deactivation mechanisms and influencing factors were discussed with a focus on modeling related to pathogens and technological aspects of AD. The aim of the study is to compare the diversity of potential bacterial pathogens in different types of slurry, all using molecular-biological methods at the DNA level. Communities were examined by T-RFLP fragment analysis and sequencing of the 16S rRNA. The study aims to raise awareness of the diversity of potential animal pathogens and the impact of anaerobic digestion on the

composition of the bacterial community, and overall to help improving the hygiene of agricultural production.

1 Úvod

Anaerobní fermentace (anaerobní digesce, AD) je komplexní proces, při kterém dochází mikrobiální činností k postupnému rozkladu organické hmoty na směs plynů (bioplyn) a fermentovaný zbytek organické hmoty (digestát). V zemědělských bioplynových stanicích se nejčastěji zpracovává kejda a plodiny k energetickému využití cíleně pěstované, ze kterých má největší zastoupení silážní kukuřice. Důvody, proč je kukuřice pro anaerobní fermentaci nejvyužívanější, spočívají ve vysokém výnosovém potenciálu této plodiny, příznivých kvalitativních charakteristikách a možnosti konzervace hmoty silážováním. Původ kejdy ovlivňuje do určité míry složení bakteriálního společenstva ve fermentoru. Produktem anaerobní fermentace je tzv. digestát, tj. nerozložený zbytek po anaerobní fermentaci. Ten se obvykle využívá jako tekuté organické hnojivo, které je svým použitím srovnatelné s kejdou. Alternativně lze z digestátu oddělit tuhou frakci - separát, jež lze následně kompostovat, využít jako podestýlku či sušit a spalovat. Tekutý zbytek - fugát, se obvykle aplikuje na ornou půdu nebo trvalé travní porosty, příp. se dle technologie vrací do fermentačního procesu bioplynové stanice.

Vážnou výzvu pro životní prostředí a veřejné zdraví však představuje šíření patogenů prostřednictvím různých zemědělských aplikací. Anaerobní digesce může účinně a do značné míry deaktivovat životaschopné patogeny, včetně parazitů, virů a patogenů obsahujících geny rezistence na antibiotika. Tento přehled si klade za cíl poskytnout kritický přehled týkající se deaktivace patogenů souvisejících s produkty bioplynových stanic pomocí AD, díky čemuž byly vzneseny vážné obavy ohledně účinnosti a racionality AD vůči kontrole patogenů ve fugátu. Byly diskutovány základní deaktivční mechanismy a ovlivňující faktory se zaměřením na modelování související s patogeny a technologické aspekty AD. AD široce používaná pro úpravu biokalů a živočišné kejdy s cílem redukce objemu a výroby bioplynu je komplexní biologický proces s víceúrovňovými reakcemi, tj. hydrolýza, acidogeneze, acetogeneze a methanogeneze, při kterých se organická frakce biokalu přeměňuje převážně na biometan nebo vodík, vznikající zdroj obnovitelné energie. V mnoha zemích se pevný zbytek produkovaný z AD z čistírenských kalů používá jako hnojivo pro rostlinnou výrobu a také jako stabilizátor půdy pro zlepšení kvality půdy. Bez ohledu na zemědělské či jiné účely se AD považuje za předběžný krok. Tyto aplikace těchto zbytků digestátu by však měly být regulovány, aby bylo zajištěno, že jsou hygienicky bezpečné. Bylo prokázáno, že relativní množství patogenních mikroorganismů včetně bakterií, parazitů a virů po AD významně klesá. Různé patogenní druhy

mohou mít různou náchylnost k AD, rozpad patogenů také souvisel s provozními podmínkami (Ju a kol., 2016; Kearney a kol., 1993a; Sahlström a kol., 2008). Mechanismus deaktivace patogenů nebyl dosud plně objasněn. V současné době je značné úsilí věnováno identifikaci potenciálního ekologického a zdravotního rizika životaschopných a infekčních patogenů přežívajících po anaerobní stabilizaci čistírenských kalů, přičemž velká pozornost byla věnována také standardizaci metod kvantifikace životaschopných patogenů (např. kromě toho, se stále se zvyšující spotřebou antibiotik, proliferace a uvolňování patogenů spojených s ARG (antibiotic resistance genes = geny pro rezistenci k antibiotikům) do životního prostředí prostřednictvím vypouštění biologických látek vyvolává větší obavy. Vzhledem k takové situaci získala AD rostoucí zájem díky své zásluze o kontrolu ARG, ačkoli mechanismus za tím není úplně jasný. Ty naznačují, že životní cyklus ARG po vstupu do půdního prostředí si zaslouží více zkoumání. V opačném případě může digestátové hnojivo jako přenašeč patogenů s ARG představovat potenciální zdravotní riziko pro zemědělce během produkce plodin, zejména některé specifické patogeny využívají půdu jako vektor přenosu ve svých životních cyklech (Manser a kol., 2015; Wang a kol., 2015).

S rostoucí citlivostí na životní prostředí a zdraví bylo digestátové hnojivo regulováno v nulovém návrhu ministerského závěrečného dokumentu „Towards a Pollution-Free Planet“ shromážděním OSN pro životní prostředí v roce 2017. Nařízení EU o vedlejších živočišných produktech stanoví, že digestát opouštějící bioplyn nebo kompostárny jsou považovány za přijatelné pouze v případě, že *Escherichia coli* a obě jsou nižší než 1000 CFU/g a *Salmonella* není detekovatelná v 5 testovaných vzorcích o hmotnosti 25 g (Ahn a kol., 2007; Commission Regulation, 2011). Např. v USA lze pro zemědělské účely použít pouze kal třídy A, tj. obsahující nedetekovatelné hladiny patogenů. 75 % stabilizovaného čistírenského kalu používaného v zemědělství však patřilo k biologickým pevným látkám (separát, pevné části obsažené v digestátu) třídy B s patogeny (Grübel a Suschka, 2015). U separátů třídy A by měla být přísně sledována hladina fekálních koliformních bakterií jako indikátoru patogenu, se současným sledováním výskytu enterálních virů, vajíček helmintů a rodu *Salmonella* sp. Nemusí to být vyžadováno, pokud jsou čas procesu a teplota správně řízeny na požadovaných úrovních. Je třeba zdůraznit, že i když je hladina indikátorových patogenů pod detekčním limitem, nelze to přímo považovat za absenci potenciálního patogenního rizika v důsledku výskytu jiných patogenů. Dosud nebyl proveden komplexní průzkum obsahu a kategorií patogenů v digestátu AD. Základní otázkou je, jak optimalizovat provoz AD pro minimalizaci

potenciálních patogenních rizik. Je zřejmé, že bez úplného posouzení rizik je téměř nemožné zajistit bezpečné použití digestátu AD.

Tento přehled se proto pokouší nabídnout systematický přehled profilu patogenů v digestátu/fugátu z bioplynových stanic, roli AD při zmírňování patogenů, možné mechanismy deaktivace patogenů u AD, provozní podmínky a hlavní faktory proti patogenům. Dále bylo diskutováno možné využití tekutého fugátu jako ekologického biohnojiva. Cílem experimentální části pak bylo porovnání diverzity potenciálních bakteriálních patogenů ve fugátu pocházejícího z bioplynových stanic na základě použití druhu kejdy jako vstupní suroviny.

2 Patogeny v digestátu/fugátu a jejich potenciální hrozby

2.1 Bakteriální patogeny, paraziti a viry

Úplné pochopení profilu bakteriálních patogenů je zásadním a primárním krokem pro jejich bezpečnou likvidaci a opětovné použití výstupních složek z BPS po AD. S rychlým rozvojem pokročilých metod molekulární detekce bylo v digestátu nalezeno stále více životaschopných, ale nekultivovatelných patogenů. Pokud jde o celkovou prokaryotickou patogenní diverzitu, existují zprávy o přístupu k fylogenetické a funkční diverzitě pomocí sekvenování celého metagenomu, stejně jako bioinformatické analýzy pomocí nástroje MetaPhlAn (Metagenomic Phylogenetic Analysis) (Lu a kol., 2015; Li a kol., 2015). Žádný však neprovedl výzkum patogenních komunit se sekvenováním markerového genu na bázi amplikonu, které je nákladově efektivnější. A sekvenování 16S rRNA může být jednou z nákladově efektivních metod sekvenování na bázi amplikonu k předpovědi funkčních schopností bakteriálních patogenních komunit po provedení bioinformatické analýzy pomocí bioinformatických nástrojů (např. MEGAN nebo softwarového balíku Tax4Fun). Pro komunitu hub a dalších patogenních eukaryot se využívá sekvenování interního transkribovaného spaceru (ITS) u ribozomální 18S rRNA. Bylo hlášeno mnoho zjištěných patogenů, jako jsou rody *Aeromonas*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Vibrio* a různí parazitická helminti, většina těchto patogenů by mohla způsobit závažnou morbiditu nebo dokonce úmrtnost u lidí. Mohou způsobovat onemocnění dýchacích cest, gastroenteritidu, konjunktivitidu, cystitidu, onemocnění pohlavních orgánů, infekce kůže a měkkých tkání atd. (Tabulka 1). Mezi detekovanými patogeny zranitelnými vůči

AD byly *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus*, zatímco *Campylobacter jejuni* a *Streptomyces*, *Collinsella aerofaciens*, *Streptococcus salivarius* a *Gordonia bronchialis* byly hlášeny jako mnohem odolnější vůči AD (Ju a kol., 2016; Kearney a kol., 1993b; Stiborová a kol., 2015). Je třeba také poznamenat, že některé patogeny mohou dokonce vykazovat po AD i nárůst (Li a kol., 2015). Dále některé sporotvorné patogeny, např. rody *Clostridium* a *Bacillus* s vysokou odolností vůči akutním stresům mohou přežít po mezofilní nebo dokonce termofilní anaerobní digesci, což vytváří hygienický problém při aplikaci separátu či fugátu (Dixit a kol., 2005; Guzmán a kol., 2007; Lloret a kol., 2013). Například separát získaný z termofilní AD nemohly splnit požadavky směrnice Evropského parlamentu pro aplikaci na půdu kvůli přítomnosti spor *C. perfringens* (např. $9,6 \times 10^4$ CFU/ml) (Lloret a kol., 2013).

Tabulka 1: Patogeny zjištěné v digestátu a kalech a jejich potenciální ohrožení zdraví.

rod	druh, kmen	způsobené onemocnění	reference
<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium perfringens</i> (spore-forming bacteria)	Nekrotriceritida, kolitida koní, otrava jídlem, úplavice jehňat a neonatální hemoragické nekrotické enterotoxémie nebo plynová gangréna	(Kashan a kol., 2015; Meer a kol., 1997)
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Emetický nebo průjmový syndrom	(Ahn a kol., 2007; Govasmark a kol., 2011; Marrollo, 2016)
<i>Campylobacter</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	Průjmová onemocnění	(Wéry a kol., 2008)
<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>	Průjmová onemocnění	(Shannon a kol., 2007)

<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis, M. avium, M. intracellulare, M. phlei, M. bovis and M. kansasii</i>	Tuberkulóza, paratuberkulóza, infekce kůže a měkkých tkání, cervikální lymfadenitida, fibronodulární onemocnění s bronchiektázií středního laloku	(Gautam a kol., 2017; Hamilton a kol., 2017)
<i>Corynebacterium</i>		Záškrt (<i>C. diphtheriae</i>), ovčí a kozí kaseózní lymfadenitida (<i>C. pseudotuberculosis</i>)	(Raynal a kol., 2018; Wittchen a kol., 2018)
<i>Enterococcus</i>		Nozokomiální infekce	(Guzman Prieto a kol., 2016)
<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Nozokomiální infekce, plicní infekce	(Holt a kol., 2015)
<i>Legionella</i>		Infekce dýchacích cest	(Comas, 2016)
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptomyces somaliensis, Streptococcus Salivarius</i>	Mycetom, meningitida	(Fahal a kol., 2015; Ju a kol., 2016; Sehu a kol., 2014)
<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio cholera, Vibrio parahaemolyticus</i>	Průjem (choroba cholery), gastrointestinální infekce a infekce ran	(Fu a kol., 2018; Trinh a kol., 2018)
<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Průjem	(Teunis and Figueras, 2016)
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	Lidská gastroenteritida	(Cullinan a kol., 2017)
<i>Yersinia</i>		Enterické infekce	(Shannon a kol., 2007)
<i>Shigella</i>		Akutní krvavý průjem	(Chauret a kol., 1999)

<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Dysenterický syndrom	(Börjesson a kol., 2009)
<i>Propionibacterium</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	Onemocnění kůže	(Ju a kol., 2016; Petersen a kol., 2015)
<i>Eggerthella</i>	<i>Eggerthella lenta</i>	Život ohrožující infekce s gastroenteritidou	(Ju a kol., 2016; Wong a kol., 2014)
<i>Collinsella</i>	<i>Collinsella aerofaciens</i>	Syndrom dráždivého tračníku	(Bag a kol., 2017; Ju a kol., 2016)
<i>Gordonia</i>	<i>Gordonia bronchialis</i>	Osteomyelitida	(Ju a kol., 2016; Siddiqui a kol., 2012)

Ačkoli většina patogenů přenášených digestátem a jejich ekologické dopady byly popsány v literatuře, je obtížné určit, které druhy patogenů by představovaly vyšší riziko pro veřejné zdraví a které by měly být primárními cíli deaktivace během AD. V tomto ohledu bylo navrženo, že by se měly primárně zaměřit na stabilní patogeny s vysokou frekvencí výskytu (např. *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Collinsella aerofaciens* a *Streptococcus salivarius*). Dále by měly být sledovány nově se objevující patogeny, včetně *Propionibacterium acnes*, *Gordonia bronchialis*, *Eggerthella lenta*, *Mycobacterium bovis*, *Streptococcus salivarius*, *Collinsella aerofaciens* (Ju a kol., 2016; Lahiri a kol. 2014., Li a kol., 2015). Ještě důležitější je, že potenciální environmentální rizika spojená s těmito infekčními patogeny by měla být plně posouzena holistickým způsobem.

2.2 Zdroje ARG

Riziko patogenů ukrývajících ARG v digestátu získává stále větší zájem veřejnosti. Bakteriální patogeny mohou sloužit jako zdroje ARG k antibiotikům, včetně skupiny MLS (makrolid-linkosamid-streptogramin G) (Ju a kol., 2016). Je známo, že ARG se mohou šířit

prostřednictvím mobilních genetických elementů, jako je integron, plazmidy, transposon atd., s přenosnými geny kódovanými faktory patogenity (Yu a kol., 2016). Termofilní AD byla akceptována jako nápravný prostředek k zeslabení integronů a ARG v čistírenském kalu, včetně genů rezistence na tetracyklin (*tetA*, *tetO*, *tetX*) a genu integron-integrázy (*intI1*) (Diehl a LaPara, 2010; Ghosh a kol., 2009). Bylo hlášeno, že termofilní ošetření pomohlo snížit akumulaci a šíření těchto ARG spojených s patogeny v půdě (Kang a kol., 2017). Naopak, existují důkazy ukazující, že většina ARG byla AD redukována jen stěží. Proto je nevyhnutelný další výzkum k vyhodnocení snížení ARG vlivem AD. To přispěje k minimalizaci šíření ARG a pomůže lépe zvládat riziko využívání digestátu/fugátu v zemědělských aplikacích.

3 Faktory ovlivňující deaktivaci patogenů u AD

3.1 Teplota

Množství patogenů v digestátu obecně kolísá s konfigurací procesu a provozními podmínkami. Teplota byla považována za primární supresivní faktor patogenů v anaerobně zpracovaném digestátu (Forbis-Stokes a kol., 2016). Smrtící účinek vysoké teploty lze ve skutečnosti primárně připsat denaturaci inaktivujících enzymů nebo kapsidového proteinu (Pandey a Soupir, 2011). Ve skutečnosti mírný tepelný proces provozovaný při mírné teplotě dokázal inaktivovat řadu enzymů, jako je pektin methylesteráza, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, kreatinkináza, trióza fosfát izomeráza, kyselá fosfatáza, sérový albumin a imunoglobulin G, laktát dehydrogenáza (Veeramuthu a kol., 1998). Tepelné podmínky aplikované na AD by mohly vyvolat destrukci patogenů rozpadem gelové struktury a lýzou buněk (Arora a Kazmi, 2015). Podle Arrheniovy rovnice byla míra inaktivace patogenů (např. helmintových vajíček a střevních virů) při 55 °C 15–17krát vyšší než při 25–37 °C (Pandey a Soupir, 2011). Termofilní digesce by mohla zcela eliminovat všechny *E. coli*, *Aerogenes* a *Enterococcus*, zatímco životaschopné patogeny byly stále detekovány za mezofilních podmínek při době trvání AD 12–15 dní (Iwasaki a kol., 2011). Podobně bylo zjištěno, že např. multirezistentní bakterie přežívají v mléčném odpadu po 22denní mezofilní anaerobní digesci, ale zmizely po termofilní digesci při 55 °C (Beneragama a kol., 2013; Nilmini a kol., 2013). Navíc podtypy ARG vykazovaly různé reakce na mezofilní a termofilní podmínky. Metagenomická analýza dále odhalila nižší množství mobilomu (např. integronů, inzertových sekvencí a plazmidů) a také nižší potenciál horizontálního přenosu genů za termofilních podmínek ve srovnání s

mezofilními podmínkami. Je však třeba si uvědomit, že patogeny odolné vůči teplu včetně *Bacillus cereus*, *Erysipelotrix rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Yersinia enterocolitica*, spory *C. perfringens* atd. byly stěží odstraněny mezofilní a termofilní AD nebo kompostováním (Elmerdahl Olsen and Errebo Larsen, 1987; Kearney a kol., 1993a). Proto se zdá, že vysoká teplota by neměla být vždy považována za záruku odstranění vysokých hladin ARG.

3.2 **Koncentrace amoniaku**

Toxicita amoniaku na patogeny je pozoruhodná a dezinfekce čpavkem byla často používána jako jednoduchá a levná alternativa k inaktivaci bakterií, virů, prvoků, adenovirů, reovirů, bakteriofágů a dalších patogenů (Fidjeland a kol., 2015; Magri a kol., 2015). Dávkování by nemělo překročit esenciální množství pro anaerobní mikroorganismy v digestoři (Rajagopal a kol., 2013; Yenigün a Demirel, 2013). Mezitím další faktory, např. substráty, inokulum, teplota, pH a období aklimatizace by měly být kontrolovány, protože mohou změnit účinek amoniaku na patogeny úpravou rovnováhy mezi toxickými N (volný amoniak) a netoxickými N frakcemi mezi dusíkatými sloučeninami (Scaglia a kol., 2014). Vajíčka helmintů a spory klostridií, které vykazovaly silnou rezistenci vůči inaktivaci amoniakem při teplotě okolí, by měly být inaktivovány pomocí asistenčních technik (Fidjeland a kol., 2015).

Kromě toho je také známo, že amoniak může účinně deaktivovat bakteriální patogeny změnou poměru intracelulárního/extracelulárního K^+/NH_3 (Sprott a Patel, 1986). Pokud jde o viry, NH_3 může způsobit ztrátu integrity genomu, konkrétně štěpení virové RNA v neporušených částicích (Decrey a kol., 2015). Pokud jde o vajíčka škrkavek, mechanismus inaktivace amoniaku zůstává nejasný, ale obecně se má za to, že nenabitý volný amoniak je schopen proniknout buněčnou membránou, což má za následek vyšší intracelulární pH (Pecson a kol., 2007).

3.3 **Těkavé mastné kyseliny a pH**

Vysoce koncentrované těkavé mastné kyseliny (VFA = volatile fatty acids) ve spojení s kyselým pH podporují deaktivaci a eliminaci patogenů v čistírenských kalech či fugátu. Například VFA produkované v acidogenním stadiu AD by mohly účinně inaktivovat *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* nebo dokonce *Clostridium* spp. (Orzi a kol., 2015;

Sahlström, 2003). Naproti tomu VFA byly neúčinné při deaktivaci *Ralstonia solanacearum*, půdního patogenu, zatímco u bakteriofága MS2 bylo zjištěno, že nejsou citlivé na pH při 50 °C (Chen a kol., 2016). Enterokoky a *Enterobacteriaceae*, které jsou všudypřítomnými a potenciálně oportunními střevními patogeny, mohou přežít a proliferovat ve stresových podmínkách díky své vysoké toleranci k pH roztoku (Fisher a Phillips, 2009). Není však praktické upravovat nebo kontrolovat hladinu VFA nebo pH v anaerobním fermentoru pro deaktivaci patogenu, protože taková kontrola by nepříznivě ovlivnila celkový výkon AD nebo dokonce způsobila selhání provozu.

Je třeba poznamenat, že základní mechanismus deaktivace patogenů podporovaný VFA nebyl dosud popsán. Podle zjištění z výzkumu bakteriálních patogenů v mikrobiotě gastrointestinálního traktu mohou vysokokontrační VFA s krátkým řetězcem a nízké pH generované během anaerobní hydrolýzy a acidogeneze pravděpodobně vykazovat nepříznivé účinky na přenos elektronů a translokaci protonů, vedoucí k deaktivaci patogenu. Bylo však zjištěno, že některé VFA v nízké koncentraci (např. *Salmonella* Typhimurium, enterohemoragická *Escherichia coli*) stimulují expresi genu virulence, což vede k systémové infekci (Vogt a kol., 2015).

3.4 Retenční čas

Retenční čas digestátu (Solid retention time = SRT) je doba, kterou obecně stráví pevná frakce kalu ve fermentoru. Jeho prodloužení u AD deaktivuje asi 90 % patogenních druhů (včetně např. *Yersinia enterocolitica*) při SRT 18,2 d (definováno jako T90) (Kearney a kol., 1993a), zatímco celkový počet koliformních bakterií by mohl být snížen pod detekční limit při SRT déle než 15 dní u AD (Coelho a kol., 2011; Iranpour a Cox, 2007). Podobný jev byl pozorován také u *Escherichia coli* a *Salmonella* spp. které bylo možné odstranit minimálně po 15 dnech SRT (Forster-Carneiro a kol., 2010). Některé patogeny však mohou přežít i při prodloužené SRT, např. 90 % deaktivace *Campylobacter jejuni* vyžadovalo SRT po dobu 438,6 dne, což bylo daleko za operačním rozsahem SRT pro AD (Kearney a kol., 1993b).

3.5 Další faktory

Tabulka 2 shrnuje vliv teploty, SRT, amoniaku, VFA a pH na účinnost odstraňování patogenů u AD. Lze konstatovat, že neexistuje jediný faktor, který by měl širokospektrální antipatogenní účinek. Tepelné podmínky udržované pro AD by ve srovnání s tím mohly eliminovat více druhů patogenů. Kromě faktorů diskutovaných výše může růst a akumulaci patogenů ovlivnit také mnoho dalších faktorů, jako je dostupnost živin, sporulace, provozní režimy AD atd. Například

Campylobacter jejuni může využívat aminokyseliny a vitamíny, které jiné bakterie nevyužívají, a vytváří tak příznivé životní prostředí pro potlačení deaktivačního stresu, zatímco *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* a *Yersinia enterocolitica* musí o sacharidy soutěžit s jinými bakteriálními druhy. Bylo hlášeno, že enteropatogenní *Escherichia coli* a *Salmonella* Typhimurium mají nižší hodnoty T90 při vsádkové anaerobní digesci než u semikontinuálních nebo plně kontinuálních operací (Kearney a kol., 1993a). Aby přežily nebo infikovaly hostitele, musí patogeny soutěžit mezi sebou nebo s anaerobními bakteriemi o živiny a životní prostor (Vogt a kol., 2015), zatímco o některých sloučeninách v AD bylo známo, že chrání patogeny před deaktivací (Pandey a Soupir, 2011).

Byla stanovena korelace mezi sukcesí bakteriální komunity a patogenní populací u AD (Luo a kol., 2017). Jak celkové organické látky, tak dusík v čistírenském kalu byly během AD podstatně sníženy, což vedlo zase k posunu ve společenství archaea a bakterií, včetně patogenů. Obecně byla po AD pozorována méně diverzifikovaná mikrobiální komunita (Ennouri a kol., 2016). Bylo například zjištěno, že Firmicutes (např. *Bacilli* a *Clostridia* jako reprezentativní řád) a Actinobacteria (např. Actinomycetales jako typický člen) jsou dominantními kmeny v digestátu, zatímco jejich početnost klesala během AD spolu s nárůstem Bacteroidetes. Bylo také zjištěno, že mikrobiální diverzita byla dále snížena, když byla AD přeměněna z mezofilní na termofilní operaci s výraznými posuny směrem k vyššímu počtu termotolerantních taxonů a nižším výskytem Bacteroidetes a Proteobacteria (Sun a kol., 2016; Stiborová a kol., 2015). Další provozní podmínky, jako je SRT, VFA, čpavek, jak bylo diskutováno výše, mohou také ovlivnit strukturu komunity. Po změně provozních podmínek AD byly pozorovány pozitivní nebo negativní korelace mezi bakteriálními patogeny nebo mezi patogeny a integrazovými geny nebo ARG, což naznačuje, že posun bakteriální komunity byl jedním z klíčových faktorů variace v přežití nebo smrti antirezistentních jedinců. patogeny během AD (Sun a kol., 2016; Jang a kol., 2019).

U AD jsou faktory prostředí často korelované a mají vzájemně propojený účinek na výsledek. Například teplota může působit přímo nebo nepřímo na patogeny zvýšením toxicity amoniaku a VFA. Souvisí to i s časem. A účinky pH nejsou samy o sobě významné, ale nelze je oddělit jak od teploty, tak od koncentrace amoniaku (Pecson a kol., 2007). Nepatrná změna teploty, amoniaku, VFA a SRT by formovala odlišnou posloupnost bakteriální komunity. Celkový hygienický výkon AD by tedy měl být hodnocen a optimalizován na základě těchto parametrů integrity.

4 Je AD spolehlivá pro kontrolu patogenů v kalu: výzvy pro potenciální využití digestátu?

Až dosud se po celém světě zvažovaly nebo zvažují možnosti optimalizace a modernizace AD v BPS, aby byly výstupní složky bezpečnější pro aplikaci na půdu. Pro AD byly vyvinuty vylepšené techniky pro zvýšení účinnosti odstraňování patogenů. Předpokládá se, že tepelná předúprava indukuje hydrolyzu kalu rozbitím gelové struktury a buněčnou lýzu, která zahrnovala také destrukci patogenů (Ennouri a kol., 2016; Daneshmand a kol., 2012). Bylo také zjištěno, že nízkofrekvenční předúprava ultrazvukem před termofilní AD umožňuje významné logaritmické odstranění fekálních koliformních bakterií, somatických kolifágů a dalších patogenů v kalu. Ultrazvuk generoval smykové napětí vyvolané kavitací, zatímco vysoká teplota vedla k denaturaci a ztrátě funkce enzymů, nukleových kyselin, organel a dalších buněčných struktur (Neumann a kol., 2018). Bylo také popsáno, že mikrovlnné záření, UV záření nebo nanočástice úspěšně zlepšují výkon AD a dosahují vyšší míry inaktivace fekálních koliformních bakterií než jediná AD (Hong a kol., 2006; Neto a kol., 2006; Miller a kol., 2013). Biotechnologický vývoj se méně integroval s AD ve srovnání s fyzikálně-chemickými technologiemi. Jedním z pozoruhodných příkladů je pasterizační latrínový systém anaerobní digesce vyvinutý výzkumníky v Severní Karolíně ve Spojených státech – samostatný a energeticky neutrální sanitární systém na místě – využívající bioplyn generovaný z kalu k pasterizaci digestátu při teplotě 65–75 °C za účelem výroby bezpečného hnojiva (Forbis-Stokes a kol., 2016). Jednalo se v podstatě o integrovaný AD s tepelnou úpravou prostřednictvím technických úprav. Ovšem mírné podmínky udržované pro anaeroby v čistém biosystému nemusí patogeny úplně vymýtít na požadovanou úroveň. Proto byly preferovány fyzikálně-chemické metody pro integraci s AD. A biologická digesce a fyzikálně-chemická sanitace byly obecně rozděleny do dvou oddílů/kroků, takže drsné podmínky ve fázi sanitace by neměly fatální nebo škodlivý účinek na anaeroby a další funkční organismy v AD.

AD s asistovanými technikami byla testována pro dosažení dobrého výkonu. Je tedy AD spolehlivou metodou eliminace nejen bakteriálních patogenů ve fermentoru? Ve skutečnosti je propuknutí infekčních chorob způsobených zbytky digestátu extrémně komplikovanou událostí, protože postupy šíření zahrnovaly složitou matici dílčích postupů a faktorů, např. úroveň patogenů v kalech, konkrétní kombinace chemikálií, míra použití na zemědělské půdě, vystavení slunci, podnebí, cesty infekce a vnímavost hostitele atd. Některé patogenní mikroby lze snadno deaktivovat prostřednictvím AD, ale mohou se během následného přenosu

regenerovat. Na druhou stranu některé patogenní mikroby, i když existovaly v digestátu, nemohly být odstraněny po vystavení slunečnímu záření nebo rostlinám během hnojení. Mezitím je také třeba vzít v úvahu antagonistické mikroby a antimikrobiální látky (Cao a kol., 2013). I když AD může deaktivovat širokou škálu patogenů, přičemž splňuje legislativní požadavek EU, patogeny lze stále detekovat v povrchové vodě po použití digestátů na zemědělskou půdu. Proto existuje obava spojená s používáním digestátů pro zemědělské účely.

AD lze považovat za hygienicky spolehlivou pouze v případě, že je sledován i následný patogenní migrační proces. Doporučeným řešením je kvantitativní hodnocení mikrobiálního rizika (Quantitative microbial risk assessment = QMRA) v kombinaci s AD. Přístup QMRA se doporučuje pro AD za různých citlivých podmínek, včetně teploty, SRT, koncentrace volného amoniaku, pH, VFA atd. Druhy patogenů určují, zda je nutné provést posouzení rizik a rozsah zmírnění. Poté by měly být odhadnuty cesty expozice a ohrožená populace, kdy k expozici došlo. Po posouzení expozice lze riziko charakterizovat na základě kvantitativních modelů odezvy na dávku, které byly nebo budou vyvinuty pro druhy/poddruhy identifikovaných patogenů. A konečně, riziko infekce spojené s AD digestátem může být přesněji posouzeno vyjádřením roční pravděpodobnosti infekce a let života přizpůsobených invaliditě. Nyní se zdá, že obohacení modelů dávkové odezvy je nejvyšší prioritou pro patogeny relevantní pro digestát, protože hodnota parametrů v modelech dávkové odezvy se u různých patogenních mikroorganismů liší (Xiao a kol., 2018). Někdy jsou potřebné modely transportu aerosolu pro dávky patogenů pro receptory po větru od míst aplikace na zemi. Velmi potřebné jsou také studie propuknutí příslušných infekcí a epidemiologická šetření týkající se digestátu. Díky úplnějším a přesnějším modelům pomáhá QMRA vyvinout vhodnější strategie řízení AD na fyziologické hygienické úrovni, aby bylo možné vyhodnotit, zda je AD určité SRT, teploty atd. přiměřená a spolehlivá. To je také užitečné pro hodnotitele rizik a environmentální regulátory při přijímání politických a technických rozhodnutí.

5 Shrnutí

Tento přehled osvětluje roli AD při deaktivaci patogenů v digestátu/fugátu. Různé patogeny, včetně bakterií, parazitů, virů a patogenních hostitelů ARG jsou úspěšně deaktivovány AD. Mechanismus inaktivace lze přičíst mnoha formám cytopatie, jako je denaturace enzymů, změna obsahu intracelulárních/extracelulárních iontů, štěpení virové RNA, sukcese bakteriální

komunity atd., při dané teplotě, koncentraci amoniaku, obsahu VFA, hodnotě pH, SRT, atd. A hygienický výkon AD lze optimalizovat nastavením těchto parametrů na rozumný rozsah. Aby byl zbytek digestátu vypouštěný z AD k dispozici pro zemědělské účely, měl by být nevyhnutelně vyhodnocován a posuzován pohledem do integrovaného ekologického a epidemiologického systému. Budoucí studie by se měly zaměřit na:

- Je potřeba odhalit diverzitu a vlastnosti více patogenů v digestátu, protože nebyly získány celé genomové sekvence mnoha druhů a nebyl navržen relevantní primer.
- Měla by být lépe kontrolována aplikace fugátu jako hnojiva do půdy, protože dochází k opětovnému nárůstu počtu patogenů a k proliferaci nositelů ARG.
- Patogeny, které nesou ARG, by měly být sledovány a podrobněji popsány. Rovněž by měly být identifikovány vztahy mezi koncentracemi rezistentních patogenů a fekálními indikátory.
- Doporučuje se lepší kvantifikace cest expozice člověka patogenům. Prospektivní epidemiologické studie jsou nepostradatelné, přičemž k provedení komplexního hodnocení rizik na kvantitativní úrovni jsou pravděpodobně nutné modely odezvy na dávku. Stručně řečeno, je nutné provést komplexní analýzu životního cyklu systému týkající se osudu patogenů – ve fermentoru, manipulace s kompostováním, expozice na zemědělské půdě.
- Je potřeba se zabývat problematikou eliminace patogenů a ARG v souvislosti s AD. Proces AD by měl být provozován a udržován s přísným sledováním patogenů s nízkým obsahem, nízkou rychlostí odstraňování a nízkými potenciálními riziky pro veřejné zdraví. AD, která přeměňuje různé kaly či kejdu hospodářských zvířat na bezpečné kvalifikované biohnojivo, je robustním biologickým procesem, který si získává uznání ve vědecké komunitě i ve veřejné doméně.

6 Experimentální část

6.1 Úvod

Anaerobní fermentace (anaerobní digesce, metanová fermentace) je komplexní proces, při kterém dochází mikrobiální činností k postupnému rozkladu organické hmoty na směs plynů (bioplyn) a fermentovaný zbytek organické hmoty (digestát). V zemědělských bioplynových stanicích se nejčastěji zpracovává kejda a plodiny k energetickému využití cíleně pěstované, ze kterých má největší zastoupení silážní kukuřice. Důvody, proč je kukuřice pro anaerobní fermentaci nejvyužívanější, spočívají ve vysokém výnosovém potenciálu této plodiny, příznivých kvalitativních charakteristikách a možnosti konzervace hmoty silážováním. Původ kejdy ovlivňuje do určité míry složení bakteriálního společenstva ve fermentoru. Produktem anaerobní fermentace je tzv. digestát, tj. nerozložený zbytek po anaerobní fermentaci. Ten se obvykle využívá jako tekuté organické hnojivo, které je svým použitím srovnatelné s kejdou. Alternativně lze z digestátu oddělit tuhou frakci - separát, jež lze následně kompostovat, využít jako podestýlku či sušit a spalovat. Tekutý zbytek - fugát, se obvykle aplikuje na ornou půdu nebo trvalé travní porosty, příp. se dle technologie vrací do fermentačního procesu bioplynové stanice. Cílem experimentu bylo porovnání diverzity bakteriálních společenstev ve fugátu pocházejícího z bioplynových stanic na základě použití druhu kejdy jako vstupní suroviny.

6.2 Metodika

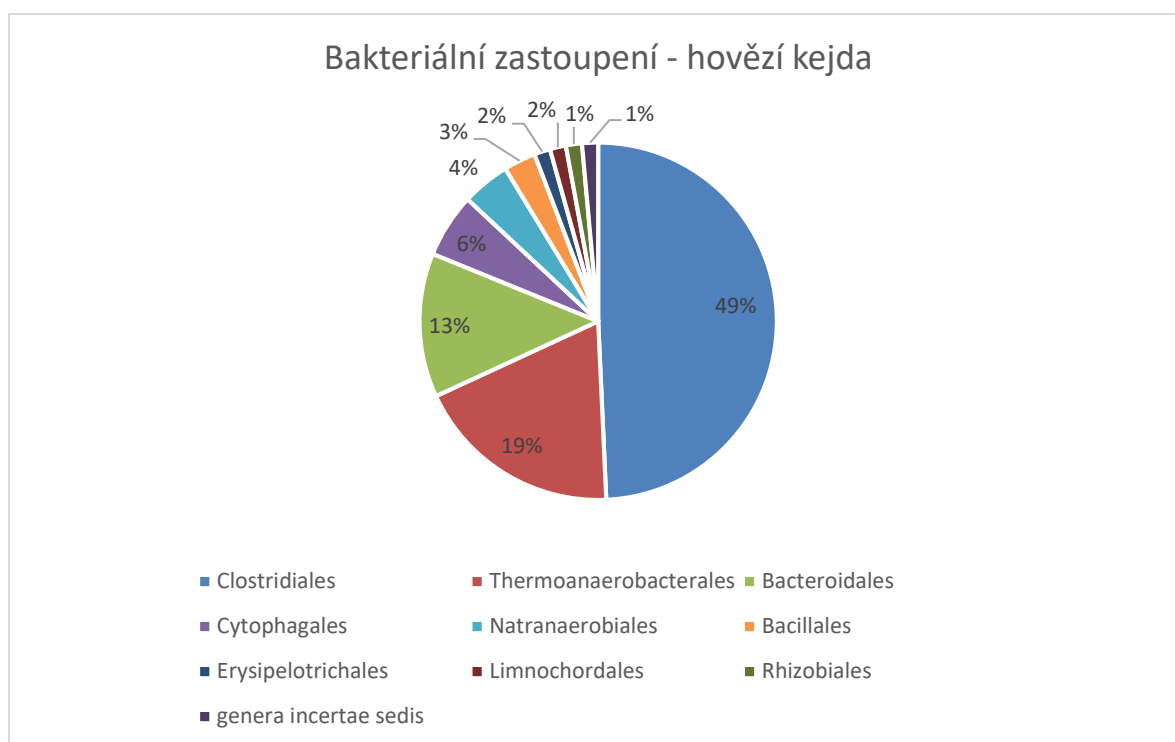
Vzorky fugátů byly získány během roku 2018 z vytipovaných zemědělských bioplynových stanic na území Středočeského a Plzeňského kraje ČR. Vybrány byly celkem tři BPS, které jako jednu ze vstupních surovin pro výrobu bioplynu používají kejdu hospodářských zvířat (skotu, prasat a drůbeže). Bezprostředně po odběru vzorků z výpustného ventilu fermentoru byly vzorky dovezeny ve sterilních uzavíratelných vzorkových lahvích do laboratoří VÚŽV, kde byly zpracovány za účelem extrakce DNA pomocí QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo). Byla vytvořena knihovna částečných sekvencí 16S rDNA za použití univerzálních primerů 27F (Lane, 1991) a 783R (Sakai a kol., 2004). Získané DNA fragmenty byly klonovány do vektoru pGEM-T Easy (Promega, Madison, USA), upravenými vektory

byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* JM109. Transformanty byly kultivovány na živných půdách LB agar s přidavkem antibiotika ampicilinu z důvodu selekce. Identifikace jednotlivých bakteriálních klonů byla provedena pomocí RDP classifier (Wang a kol. 2007) na základě sekvencí klonovaných DNA fragmentů, sekvenaci provedla společnost Macrogen Inc. (Amsterdam, Nizozemí). Rozdíly v bakteriální diverzitě fugátů byly dále testovány pomocí T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism). Byly analyzovány terminální fragmenty 16S rDNA (s použitím fluorescenčně značeným primerem 27F a restrikční endonukleázy *Alu I*, analýzu T-RFLP provedla společnost SEQme s.r.o., Dobříš, ČR), k výpočtu vzdáleností a grafickému znázornění byl použit program R x64 4.1.0 včetně MASS package (Venables a Ripley, 2002).

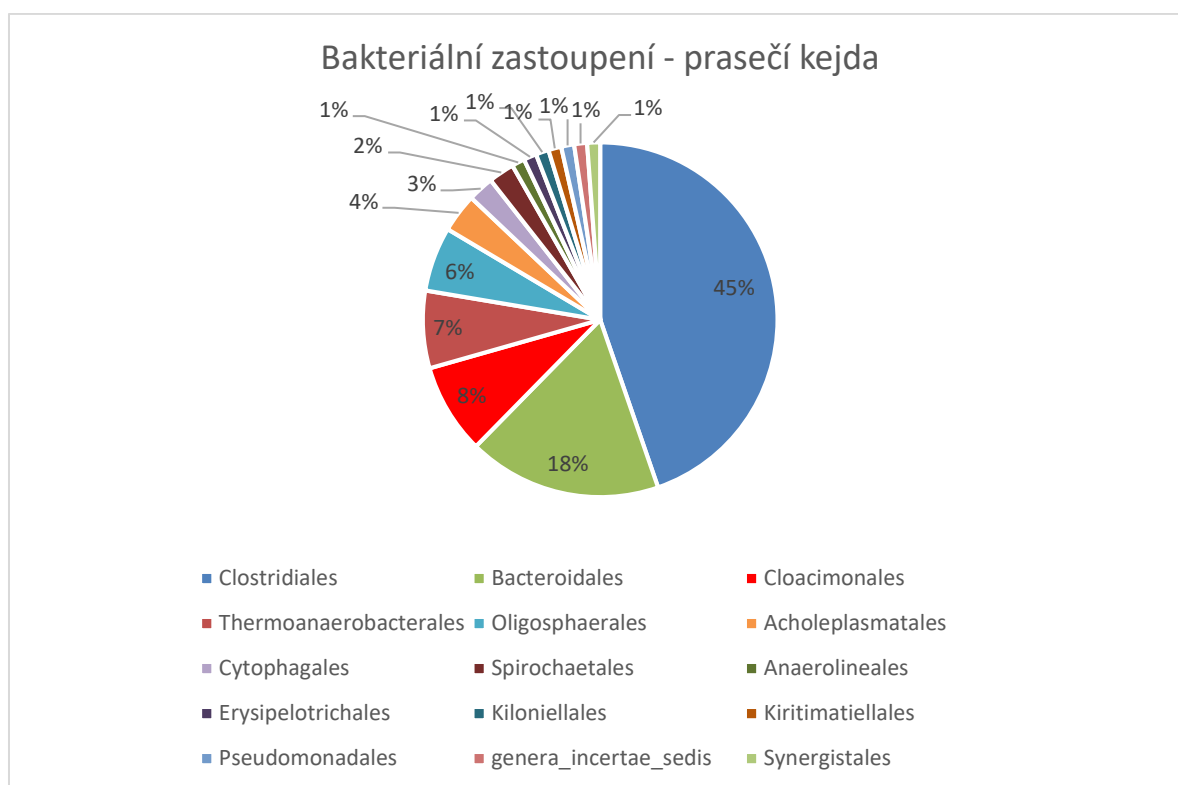
6.3 *Výsledky*

Celkem bylo získáno 69 klonů z fugátu z hovězí kejdy, 85 klonů z prasečí kejdy a 82 z kejdy drůbeží. Ve všech kejdách byla nalezena podobná skladba mikroorganismů, ve všech s přehledem dominují zástupci řádu Clostridiales (přes 40 %). Dalšími početnými skupinami byly řády Thermoanaerobacterales a Bacteroidales (7-19 %). V menší míře se vyskytovali zástupci řádu Cytophagales (2-9 %) (Obr. 1, 2, 3). Pro prasečí fugát byla typická skupina Cloacimoniales (8 %) a Oligosphaerales (6 %), pro hovězí a drůbeží Bacillales (1-3 %). Acholeplasmatales (4-7 %) se vyskytovaly výhradně ve fugátu prasečím a drůbežím. Všichni nalezení zástupci jsou typickými obyvateli prostředí s nízkou nebo nulovou koncentrací kyslíku, běžně je nalzáme v odpadních vodách, jímkách, fermentorech nebo střevním traktu nejrůznějších živočichů.

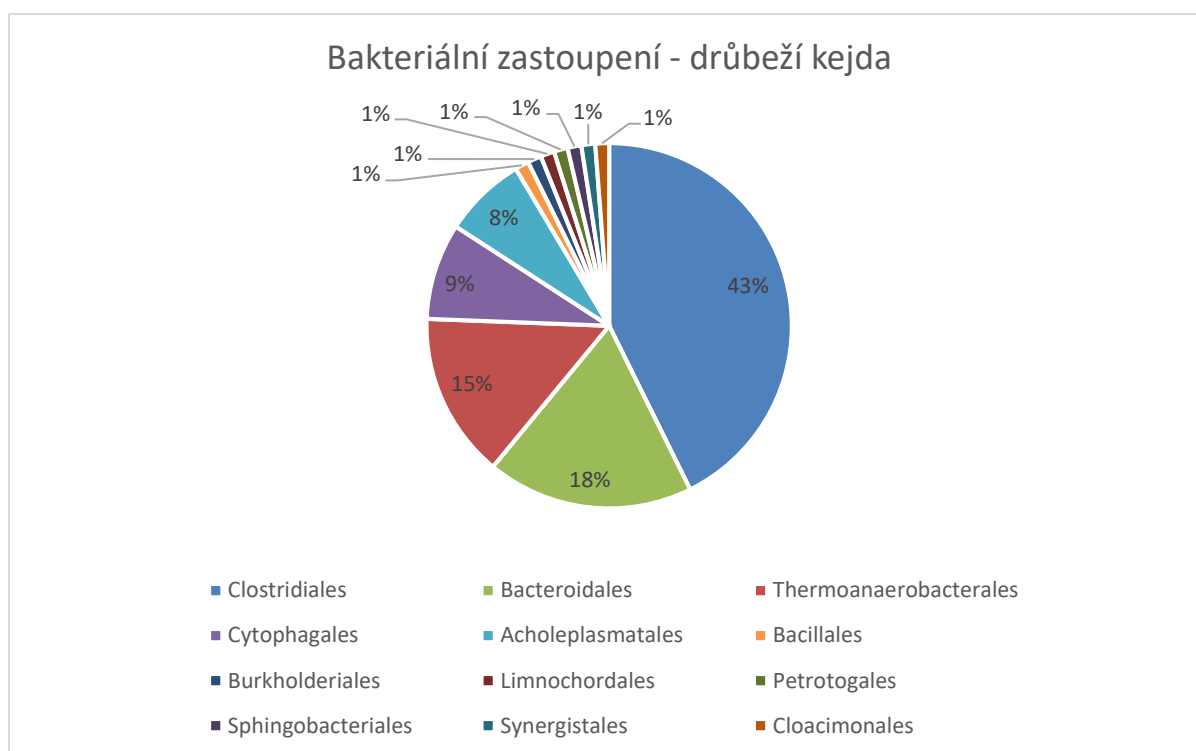
Obr. 1



Obr. 2

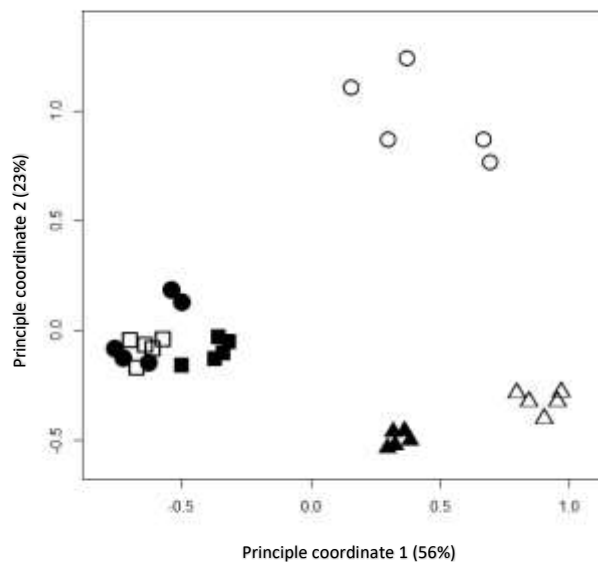


Obr. 3



Porovnání mikrobiálních společenství na základě výsledků T-RFLP (obr. 4) ukazuje rozdíly v diverzitě nejen mezi fugáty různého původu, ale v některých případech i rozdíly mezi časnou a terminální fází anaerobní digesce u fugátů stejného původu. Vzorčky pocházející z hovězího fugátu vykazují vysokou homogenitu během zpracovávání kejdy anaerobní digescí ve fermentoru, naproti tomu maximální rozdíly jsou patrné u fugátu prasečího původu. Z pohledu grafu je patrné, že hovězí fugát před i po AD a prasečí fugát před AD vykazují poměrně podobný stupeň diverzity, od nich se velmi odlišuje fugát drůbeží a prasečí po AD. Podle osy Y se ale významně odlišuje i fugát prasečí o obou fugátů drůbežího původu. Podobnosti fugátů z pohledu původu i fáze AD odráží i výsledky taxonomické identifikace na obrázcích 1. 2 a 3.

Obr. 4. Analýza hlavních komponent (PCA, Principal component analysis). Graf PCA zobrazuje rozdíly mezi fugáty z různých bioplynových stanic a zároveň před a po anaerobní digesci (AD). Osa X (principle component 1) vysvětluje nejmarkantnější rozdíly mezi zobrazenými hodnotami, celkem z 56 %, osa Y (principle coordinate 2) zobrazuje rozdíly v dalším rozměru ve výši 23%. Vysvětlivky symbolů: □ hovězí kejda před anaerobní digescí (AD), ◻ hovězí kejda po AD, ◻ prasečí kejda před AD, ◻ prasečí kejda po AD, ◻ drůbeží kejda před AD, ◻ drůbeží kejda po AD.



6.4 Závěr

Studie ukázala, že existují rozdíly v diverzitě bakterií mezi vzorky z bioplynových stanic zpracovávajících různé druhy kejdy. Byla provedena identifikace bakteriálního společenstva na základě 16S rRNA na úrovni řádů a pomocí fragmentační analýzy ribozomální RNA byly sledovány změny bakteriálních společenstev v čase. Další studium problematiky bude zahrnovat detekci patogenů na molekulární úrovni s využitím metod qPCR, výsledky této studie umožní snadnější zacílení na zajímavé taxonomické jednotky.

7 Poděkování

Tato studie vznikla s podporou projektu MZE-RO0718.

8 Seznam použitých zkratk

AD = anaerobní digesce

ARG = antibiotic resistance genes (geny pro rezistenci k antibiotikům)

BPS = bioplynová stanice

DNA = deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)

PCA = principal component analysis

QMRA = Quantitative microbial risk assessment (kvantitativní hodnocení mikrobiálního rizika)

SRT = solids retention time (retenční čas pevné složky, např. digestátu)

T-RFLP = terminal restriction fragment length polymorphism

VFA = volatile fatty acids (těkavé mastné kyseliny)

9 Reference

- Ahn J., Balasubramaniam V.M., Yousef A.E. Inactivation kinetics of selected aerobic and anaerobic bacterial spores by pressure-assisted thermal processing. *Int. J. Food Microbiol.* 2007;113:321–329.
- Arora S., Kazmi A.A. The effect of seasonal temperature on pathogen removal efficacy of vermifilter for wastewater treatment. *Water Res.* 2015;74:88–99.
- Bag S., Ghosh T.S., Das B. *Complete Genome Sequence of Collinsella aerofaciens Isolated from the Gut of a Healthy Indian Subject.* *Genome Announcements.* 2017:5.
- Beneragama N., Iwasaki M., Lateef S.A., Yamashiro T., Ihara I., Umetsu K. The survival of multidrug-resistant bacteria in thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion of dairy manure and waste milk. *Anim. Sci. J.* 2013;84:426–433.
- Börjesson S., Melin S., Matussek A., Lindgren P.-E. A seasonal study of the *mecA* gene and *Staphylococcus aureus* including methicillin-resistant *S. aureus* in a municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* 2009;43:925–932.
- Cao Y., Chang Z., Wang J., Ma Y., Fu G. The fate of antagonistic microorganisms and antimicrobial substances during anaerobic digestion of pig and dairy manure. *Bioresour. Technol.* 2013;136:664–671.
- Coelho N.M.G., Droste R.L., Kennedy K.J. Evaluation of continuous mesophilic, thermophilic and temperature phased anaerobic digestion of microwaved activated sludge. *Water Res.* 2011;45:2822–2834.
- Comas I. *Legionella* effectors reflect strength in diversity. *Nat. Genet.* 2016;48:115.
- Commission Regulation (EU) No. 142/2011.
- Cullinan M., Clarke M., Dallman T., Peart S., Wilson D., Weiland D. *Salmonella typhimurium* gastroenteritis leading to chronic prosthetic vascular graft infection. *JMM Case Reports.* 2017;4
- Daneshmand T.N., Beton R., Hill R.J., Gehr R., Frigon D. Inactivation mechanisms of bacterial pathogen indicators during electro-dewatering of activated sludge biosolids. *Water Res.* 2012;46:3999–4008.

- Decrey L., Kohn T. Virus inactivation in stored human urine, sludge and animal manure under typical conditions of storage or mesophilic anaerobic digestion. *Environmental Science: Water Research & Technology*. 2017;3:492–501.
- Diehl D.L., LaPara T.M. Effect of temperature on the fate of genes encoding tetracycline resistance and the integrase of class 1 integrons within anaerobic and aerobic digesters treating municipal wastewater solids. *Environ. Sci. Technol.* 2010;44:9128–9133.
- Dixit A., Alam S.I., Dhaked R.K., Singh L. Sporulation and heat resistance of spores from a *Clostridium* sp. *RKD. J. Food Sci.* 2005;70:m367–m373.
- Elmerdahl Olsen J., Errebo Larsen H. Bacterial decimation times in anaerobic digestions of animal slurries. *Biol. Wastes*. 1987;21:153–168.
- Ennouri H., Miladi B., Diaz S.Z., Güelfo L.A.F., Solera R., Hamdi M., Bouallagui H. Effect of thermal pretreatment on the biogas production and microbial communities balance during anaerobic digestion of urban and industrial waste activated sludge. *Bioresour. Technol.* 2016;214:184–191.
- Fahal A., Mahgoub E.L.S., Hassan A.M.E.L., Abdel-Rahman M.E. Mycetoma in the Sudan: an update from the Mycetoma Research Centre, University of Khartoum. *Sudan. PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015;9
- Fidjeland J., Nordin A., Pecson B.M., Nelson K.L., Vinnerås B. Modeling the inactivation of ascaris eggs as a function of ammonia concentration and temperature. *Water Res.* 2015;83:153–160.
- Fisher K., Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 2009;155:1749–1757.
- Forbis-Stokes A.A., O'Meara P.F., Mugo W., Simiyu G.M., Deshusses M.A. On-site fecal sludge treatment with the anaerobic digestion pasteurization latrine. *Environ. Eng. Sci.* 2016;33:898–906.
- Forster-Carneiro T., Riau V., Pérez M. Mesophilic anaerobic digestion of sewage sludge to obtain class B biosolids: microbiological methods development. *Biomass Bioenergy*. 2010;34:1805–1812.

Fu Y., Ho B.T., Mekalanos J.J. Tracking vibrio cholerae cell-cell interactions during infection reveals bacterial population dynamics within intestinal microenvironments. *Cell Host & Microbe*. 2018;23:274–281.

Gautam S.S., Mac Aogáin M., Bower J.E., Basu I., O'Toole R.F. Differential carriage of virulence-associated loci in the New Zealand Rangipo outbreak strain of Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Dis.* 2017;49:680–688.

Ghosh S., Ramsden S.J., LaPara T.M. The role of anaerobic digestion in controlling the release of tetracycline resistance genes and class 1 integrons from municipal wastewater treatment plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009;84:791–796.

Govasmark E., Ståb J., Holen B., Hoornstra D., Nesbakk T., Salkinoja-Salonen M. Chemical and microbiological hazards associated with recycling of anaerobic digested residue intended for agricultural use. *Waste Manag.* 2011;31:2577–2583.

Grübel K., Suschka J. Hybrid alkali-hydrodynamic disintegration of waste-activated sludge before two-stage anaerobic digestion process. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015;22:7258–7270.

Guzmán C., Jofre J., Montemayor M., Lucena F. Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *J. Appl. Microbiol.* 2007;103:2420–2429.

Guzman Prieto A.M., van Schaik W., Rogers M.R.C., Coque T.M., Baquero F., Corander J., Willems R.J.L. Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones? *Front. Microbiol.* 2016;7

Hamilton K.A., Weir M.H., Haas C.N. Dose response models and a quantitative microbial risk assessment framework for the Mycobacterium avium complex that account for recent developments in molecular biology, taxonomy, and epidemiology. *Water Res.* 2017;109:310–326.

Holt K.E., Wertheim H., Zadoks R.N., Baker S., Whitehouse C.A., Dance D., Jenney A., Connor T.R., Hsu L.Y., Severin J., Brisse S., Cao H., Wilksch J., Gorrie C., Schultz M.B., Edwards D.J., Nguyen K.V., Nguyen T.V., Dao T.T., Mensink M., Minh V.L., Nhu N.T.K., Schultsz C., Kuntaman K., Newton P.N., Moore C.E., Strugnell R.A., Thomson N.R. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in “Klebsiella pneumoniae”, an urgent threat to public health. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015;112:E3574–E3581.

Hong S.M., Park J.K., Teeradej N., Lee Y.O., Cho Y.K., Park C.H. Pretreatment of sludge with microwaves for pathogen destruction and improved anaerobic digestion performance. *Water Environ. Res.* 2006;78:76–83.

Chauret C., Springthorpe S., Sattar S. Fate of Cryptosporidium oocysts, Giardia cysts, and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. *Can. J. Microbiol.* 1999;45:257–262.

Chen L., Jian S., Bi J., Li Y., Chang Z., He J., Ye X. Anaerobic digestion in mesophilic and room temperature conditions: digestion performance and soil-borne pathogen survival. *JEnvS.* 2016;43:224–233.

Iranpour R., Cox H.H.J. Evaluation of thermophilic anaerobic digestion processes for full-scale class A biosolids disinfection at hyperion treatment plant. *Biotechnol. Bioeng.* 2007;97:19–39.

Iwasaki M., Yamashiro T., Beneragama N., Nishida T., Kida K., Ihara I., Takahashi J.-i., Umetsu K. The effect of temperature on survival of pathogenic bacteria in biogas plants. *Anim. Sci. J.* 2011;82:707–712.

Jang H.M., Choi S., Shin J., Kan E., Kim Y.M. Additional reduction of antibiotic resistance genes and human bacterial pathogens via thermophilic aerobic digestion of anaerobically digested sludge. *Bioresour. Technol.* 2019;273:259–268.

Ju F., Li B., Ma L., Wang Y., Huang D., Zhang T. Antibiotic resistance genes and human bacterial pathogens: co-occurrence, removal, and enrichment in municipal sewage sludge digesters. *Water Res.* 2016;91:1–10.

Kearney T.E., Larkin M.J., Frost J.P., Levett P.N. Survival of pathogenic bacteria during mesophilic anaerobic digestion of animal waste. *J. Appl. Bacteriol.* 1993;75:215–219.

Kearney T.E., Larkin M.J., Levett P.N. The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 1993;74:86–93.

Lahiri A., Kneisel J., Kloster I., Kamal E., Lewin A. Abundance of Mycobacterium avium ssp. hominissuis in soil and dust in Germany – implications for the infection route. *Lett. Appl. Microbiol.* 2014;59:65–70.

- Lane D. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E. and Goodfellow M. (eds): *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley and Sons, Chichester, UK, 1991:115–175.
- Li B., Ju F., Cai L., Zhang T. Profile and fate of bacterial pathogens in sewage treatment plants revealed by high-throughput metagenomic approach. *Environ. Sci. Technol.* 2015;49:10492–10502.
- Lloret E., Pastor L., Pradas P., Pascual J.A. Semi full-scale thermophilic anaerobic digestion (TAnD) for advanced treatment of sewage sludge: stabilization process and pathogen reduction. *Chem. Eng. J.* 2013;232:42–50.
- Lu X., Zhang X.X., Wang Z., Huang K., Wang Y., Liang W., Tang J. Bacterial pathogens and community composition in advanced sewage treatment systems revealed by metagenomics analysis based on high-throughput sequencing. *PLoS One.* 2015;10
- Luo G., Li B., Li L.-G., Zhang T., Angelidaki I. Antibiotic resistance genes and correlations with microbial community and metal resistance genes in full-scale biogas reactors as revealed by metagenomic analysis. *Environ. Sci. Technol.* 2017;51:4069–4080.
- Magri M.E., Fidjeland J., Jönsson H., Albiñ A., Vinnerås B. Inactivation of adenovirus, reovirus and bacteriophages in fecal sludge by pH and ammonia. *Sci. Total Environ.* 2015;520:213–221.
- Manser N.D., Wald I., Ergas S.J., Izurieta R., Mihelcic J.R. Assessing the fate of *Ascaris suum* ova during mesophilic anaerobic digestion. *Environ. Sci. Technol.* 2015;49:3128–3135.
- Marrollo R. *The Diverse Faces of Bacillus cereus*. Academic Press; 2016. Chapter 5 - *Bacillus cereus* food-borne disease A2 - Savini, Vincenzo; pp. 61–72.
- Miller J.H., Novak J.T., Knocke W.R., Young K., Hong Y., Vikesland P.J., Pruden A. Effect of silver nanoparticles and antibiotics on antibiotic resistance genes in anaerobic digestion. *Water Environ. Res.* 2013;85:411–421.
- Neto R.C., Santos J.U., Franco R.M.B. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil. *Water Sci. Technol.* 2006;54:89–94.

- Neumann P., Barriga F., Alvarez C., Gonzalez Z., Vidal G. Process performance assessment of advanced anaerobic digestion of sewage sludge including sequential ultrasound–thermal (55° C) pre-treatment. *Bioresour. Technol.* 2018;262:42–51.
- Nilmini B., Yusuke M., Takaki Y., Masahiro I., Suraju A.L., Chun Y., Kazutaka U. The survival of cefazolin-resistant bacteria in mesophilic co-digestion of dairy manure and waste milk. *Waste Manage. Res.* 2013;31:843–848.
- Orzi V., Scaglia B., Lonati S., Riva C., Boccasile G., Alborali G.L., Adani F. The role of biological processes in reducing both odor impact and pathogen content during mesophilic anaerobic digestion. *Sci. Total Environ.* 2015;526:116–126.
- Pandey P.K., Soupir M.L. Escherichia coli inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. *AMB Express.* 2011;1:18.
- Pecson B.M., Barrios J.A., Jiménez B.E., Nelson K.L. The effects of temperature, pH, and ammonia concentration on the inactivation of Ascaris eggs in sewage sludge. *Water Res.* 2007;41:2893–2902.
- Petersen R., Lomholt H.B., Scholz C.F.P., Brüggemann H. Draft Genome Sequences of Two *Propionibacterium acnes* Strains Isolated from Progressive Macular Hypomelanosis Lesions of Human Skin. *Genome Announcements.* 2015:3.
- Rajagopal R., Massé D.I., Singh G. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. *Bioresour. Technol.* 2013;143:632–641.
- Raynal J.T., Bastos B.L., Vilas-Boas P.C.B., Sousa T.d.J., Costa-Silva M., de Sá M.d.C.A., Portela R.W., Moura-Costa L.F., Azevedo V., Meyer R. Identification of membrane-associated proteins with pathogenic potential expressed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* grown in animal serum. *BMC Res. Notes.* 2018;11:73.
- Sahlström L. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresour. Technol.* 2003;87:161–166.
- Sahlström L., Bagge E., Emmoth E., Holmqvist A., Danielsson-Tham M.-L., Albiñ A. A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants. *Bioresour. Technol.* 2008;99:7859–7865.

Sakai M., Matsuka A., Komura T., Kanazawa S. Application of a new PCR primer for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the bacterial communities in plant roots. *Journal of Microbiol Meth.* 2004; 59, 81–89.

Scaglia B., D'Imporzano G., Garuti G., Negri M., Adani F. Sanitation ability of anaerobic digestion performed at different temperature on sewage sludge. *Sci. Total Environ.* 2014;466-467:888–897.

Sehu, M.M., Heney C., Chandra S., Bergh H., Nimmo G. “Streptococcus salivarius” meningitis post spinal procedure: Diagnosis by 16S and a call to better aseptic practices. *Int. J. Infect. Dis.* 2014: 21, 405.

Shannon K.E., Lee D.Y., Trevors J.T., Beaudette L.A. Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 2007;382:121–129.

Siddiqui N., Toumeh A., Georgescu C. Tibial osteomyelitis caused by *Gordonia bronchialis* in an immunocompetent patient. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50:3119–3121.

Sprott G.D., Patel G.B. Ammonia toxicity in pure cultures of methanogenic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 1986;7:358–363.

Stiborova H., Wolfram J., Demnerova K., Macek T., Uhlik O. Bacterial community structure in treated sewage sludge with mesophilic and thermophilic anaerobic digestion. *Folia Microbiol.* 2015;60:531–539.

Sun W., Qian X., Gu J., Wang X.J., Duan M.L. Mechanism and effect of temperature on variations in antibiotic resistance genes during anaerobic digestion of dairy manure. *Sci. Rep.* 2016;6:30237.

Teunis P., Figueras M.J. Reassessment of the enteropathogenicity of mesophilic *Aeromonas* species. *Front. Microbiol.* 2016;7:1395.

Trinh S.A., Leyn S.A., Rodionov I.D., Godzik A., Satchell K.J.F. Draft Genome Sequences of Two *Vibrio parahaemolyticus* Strains Associated with Gastroenteritis after Raw Seafood Ingestion in Colorado. *Genome Announcements.* 2018:6.

- Veeramuthu G.J., Price J.F., Davis C.E., Booren A.M., Smith D.M. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* senftenberg, and enzymes with potential as time-temperature indicators in ground Turkey thigh meat. *J. Food Prot.* 1998;61:171–175.
- Venables, W.N., Ripley, B.D. *Modern Applied Statistics with S.* Springer, New York, 2002, p. 495.
- Vogt S.L., Peña-Díaz J., Finlay B.B. Chemical communication in the gut: effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. *Anaerobe.* 2015;34:106–115.
- Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology.* 2007: 73, 5261–5267.
- Wang X.-H., Wang X., Huppel G., Heijungs R., Ren N.-Q. Environmental implications of increasingly stringent sewage discharge standards in municipal wastewater treatment plants: case study of a cool area of China. *J. Clean. Prod.* 2015;94:278–283.
- Wéry N., Lhoutellier C., Ducray F., Delgenès J.-P., Godon J.-J. Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Res.* 2008;42:53–62.
- Wittchen M., Busche T., Gaspar A.H., Lee J.H., Ton-That H., Kalinowski J., Tauch A. Transcriptome sequencing of the human pathogen *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 13129 provides detailed insights into its transcriptional landscape and into DtxR-mediated transcriptional regulation. *BMC Genomics.* 2018;19:82.
- Wong D., Aoki F., Rubinstein E. *Bacteremia Caused by Eggerthella lenta in an Elderly Man with a Gastrointestinal Malignancy: A Case Report.* *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology.* 2014:25.
- Xiao S., Yin P., Zhang Y., Zhao X., Sun L., Yuan H., Lu J., Hu S. Occurrence, genotyping, and health risk of *Cryptosporidium* and *Giardia* in recreational lakes in Tianjin. *China. Water Res.* 2018;141:46–56.
- Yenigün O., Demirel B. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: a review. *Process Biochem.* 2013;48:901–911.

Yu Z., He P., Shao L., Zhang H., Lü F. Co-occurrence of mobile genetic elements and antibiotic resistance genes in municipal solid waste landfill leachates: a preliminary insight into the role of landfill age. *Water Res.* 2016;106:583–592.

Obsah

1	Úvod.....	4
2	Patogeny v digestátu/fugátu a jejich potenciální hrozby	6
2.1	Bakteriální patogeny, paraziti a viry.....	6
2.2	Zdroje ARG	9
3	Faktory ovlivňující deaktivaci patogenů u AD	10
3.1	Teplota	10
3.2	Koncentrace amoniaku	11
3.3	Těkavé mastné kyseliny a pH.....	11
3.4	Retenční čas	12
3.5	Další faktory	12
4	Je AD spolehlivá pro kontrolu patogenů v kalu: výzvy pro potenciální využití digestátu? 14	
5	Shrnutí.....	15
6	Experimentální část.....	17
6.1	Úvod	17
6.2	Metodika.....	17
6.3	Výsledky.....	18
6.4	Závěr.....	23
7	Poděkování.....	23
8	Seznam použitých zkratk	23
9	Reference	24