

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



**Přežívání termotolerantních koliformních bakterií a
Escherichia coli během vermikompostování**

Diplomová práce

Autor práce: Klára Stegbauerová

Vedoucí práce: Ing. Aleš Hanč, Ph.D.

Konzultant práce: Ing. Ladislava Matějů

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Přežívání termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli* během vermikompostování" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Aleši Hančovi Ph.D. za poskytování informací a vstřícný přístup při zpracování této diplomové práce. Poděkování rovněž patří Ing. Ladislavě Matějů a celému týmu pracovníků laboratoře SZÚ v Praze za jejich rady, odborné vedení a pomoc při práci v laboratoři a psaní této odborné práce. Své rodině nesmím zapomenout poděkovat za pevné nervy, trpělivost a duševní oporu, kterou pro mě měli při psaní a shánění materiálů pro tuto práci.

Přežívání termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli* během vermikompostování

Souhrn

Cílem této diplomové práce „přežívání termotolerantních koliformních bakterií (TKB) a *Escherichia coli* během vermikompostování“ bylo posoudit schopnost žížal z rodu *Eisenia* (*Eisenia andrei* a *Eisenia fetida*) na redukci počtu těchto patogenních organismů v průběhu procesu vermikompostování.

Pro potvrzení nebo vyloučení hypotézy, že vermikompostovací proces je schopen eliminace počtů zmíněných patogenních organismů, byl založen pokus ve výzkumné stanici FAPPZ v Červeném Újezdu, na který navázal osmitýdenní laboratorní pokus, který byl realizován v laboratoři SZÚ v Praze.

Vermikompostování je proces, kterým je možné rozkládat různé druhy biologicky rozložitelného materiálu rostlinného nebo živočišného původu. V rámci pokusu byly mezi sebou porovnávány pouze substráty rostlinného charakteru – jablečné výlisky a matolina. Tyto rostlinné materiály byly míseny v poměru 75 % předrozloženého materiálu a 25 % čerstvého materiálu. Z takto upravených surovin bylo odebráno vždy 50g a vloženo do jednotlivých perforovaných nádobek. V rámci laboratorního pokusu byly založeny 4 varianty vzorků suspenze/žížaly, suspenze/ bez žížal obsahující přídavek inokula a kontrolní varianty bez inokula (bez suspenze/ bez žížal a bez suspenze/žížaly). U inokulovaných variant bylo přidáno přesné množství patogenních organismů *Escherichia coli* ($2,1 \cdot 10^7$ KTJ/g) a TKB ($6,1 \cdot 10^8$ KTJ/g) a u příslušných variant ještě 2,5g žížal. Takto připravené vzorky byly ve dvoutýdenních intervalech analyzovány v laboratoři (9. 11. 2015 počátek pokusu, 23. 11. 2015, 7. 12. 2015, 7. 12. 2015, 4. 1. 2016). Ze vzorků se před samotným mikrobiologickým rozborem vždy vyndaly žížaly a byla stanovena jejich hmotnost a vitalita. V počátečních substrátech byly navíc stanoveny ještě celkové počty mikroorganismů (CPM) rostoucí při 30 °C. Tyto mikroorganismy byly stanoveny pro posouzení vlivu vlastního kompostovacího procesu na vývoj mikrobiálních společenstev. U matoliny byl zjištěn počet CPM $9,4 \cdot 10^6$ KTJ/g a u jablečných výlisků $1,2 \cdot 10^7$ KTJ/g. Výsledky jednotlivých variant mezi sebou byly navzájem porovnány.

Ze stanovených výsledků byl zjištěn vliv žížal na urychlení procesu redukce počtu patogenních bakterií rodu *Escherichia coli*, kde dokonce během doby pokusu došlo k naprosté eliminaci tohoto patogenu. Bohužel není zcela jasně průkazné, jak velký podíl na této eliminaci měli právě žížaly a z jaké části se podílel samotný proces kompostování. Největší pokles počtů sledovaných patogenů byl pozorován vždy v průběhu druhého týdne pokusu, poté byl pokles už jen pozvolný.

Výsledky sledování redukce počtu termotolerantních koliformních bakterií naznačují, že přítomnost žížal v substrátu neměla příliš významný vliv na redukci těchto patogenů. Vstupní substrát obsahoval vysoké počáteční hodnoty CPM, lze se tedy domnívat, že redukce počtu TKB byla především ovlivněna samotným průběhem procesu kompostování. K úplné eliminaci TKB během pokusu nedošlo. V tomto případě je tedy nutné prodloužit dobu pokusu pro ověření hypotézy, zda je vermikompostovací proces schopen eliminace těchto patogenů.

Detaily pokusu jsou podrobně popsány v metodice této práce a výsledky pokusu jsou shrnuty v kapitole Výsledky.

Klíčová slova: Termotolerantní koliformní bakterie, *E. coli*, vermikompostování, bioodpad

Survival of thermotolerant coliform bacteria and *Escherichia coli* during vermicomposting

Summary

The aim of this thesis "survival of thermotolerant coliform bacteria (TCB) and *Escherichia coli* during vermicomposting" is to assess the ability of the earthworm *Eisenia* species (*Eisenia andrei* and *Eisenia fetida*) to reduce the number of these pathogens in the process of vermicomposting.

To prove or disprove the hypothesis that vermicomposting process is able to eliminate the number of these pathogenic organisms, an experiment was conducted at the research facility FAPPZ in Červený Újezd, which was followed by eight-week laboratory experiment carried out in the laboratory of SZÚ in Prague.

Vermicomposting is a process whereby it is possible to decompose various kinds of biodegradable material of plant or animal origin. In the experiment only the substrates of vegetable nature - apple pomace and marc - were compared with each other. These plant materials were mixed in a ratio of 75 % of preprocessed material and 25 % of the fresh material. 50 g of this mixture was inserted into each individual perforated container. The laboratory experiment included four variants of samples - suspension/ earthworms, suspension/ without earthworms with the addition of the inoculum and control variants without inoculum (without suspension/ without earthworms and without suspension/ earthworms).

To inoculated variants it was added the exact amount of pathogenic organisms, *Escherichia coli* ($2,1 \cdot 10^7$ cfu/ g) and TCB ($6,1 \cdot 10^8$ cfu/ g) and to the respective variants additional 2.5 g of earthworms. These samples were analyzed on two-week intervals in a lab (beginning November 9, 2015, then November 23, 2015, December 7, 2015, December 21, 2015, January 4, 2016). Prior to the microbiological analysis the earthworms were always removed and their weight and vitality were determined. Also the initial substrates were examined to define the total number of microorganisms (CPM) growing at 30°C to assess the impact of their own composting process on the development of microbial communities. For marc it was CPM $9,4 \cdot 10^6$ cfu/ g and for apple pomace $1,2 \cdot 10^7$ cfu/ g. The results of individual variations were compared with one another.

According to the results, earthworms influence acceleration of the process of reducing the number of pathogenic *Escherichia coli* bacteria, when even during the period of the experiment a complete elimination of the pathogen occurred. However, there is no clear evidence to the degree of how much earthworms participate on the elimination and how much of that was caused by the actual process of composting. The largest decline in the number of monitored pathogens was always observed during the second week of the experiment, then the decrease was only moderate.

The results of monitoring the reduction of thermotolerant coliform bacteria suggest that the presence of earthworms in the substrate has no significant impact on the reduction of these pathogens. Initial substrate contained high initial quantity of CPM, so it can be assumed that the reduction in the number of TCB was mainly influenced by the actual composting process. The complete elimination of TCB did not occur. In this case it is necessary to extend the testing period to prove or disprove the hypothesis whether vermicomposting process is capable of eliminating these pathogens.

Details of the experiment are thoroughly described in the methodology of this thesis and the results of the experiment are summarized in the results section.

Keywords: Thermotolerant coliform bacteria, *E. coli*, vermicomposting, biowaste

Obsah

1 ÚVOD	10
2 CÍL PRÁCE	11
3 LITERÁRNÍ REŠERŠE	12
3.1 Předpisy pro proces kompostování a nakládání s bioodpady	12
3.2 Kompostování	14
3.2.1 Technologie kompostování.....	14
3.2.2 Fyzikální, chemické a mikrobiologické podmínky kompostování.....	15
3.3 Vermikompostování.....	20
3.3.1 Technologie vermikompostování	22
3.3.2 Jednotlivé kroky vermikompostovacího procesu	24
3.3.3 Vermikopost.....	25
3.3.4 Podmínky vermikompostovacího procesu	27
3.3.5 Surovinová skladba	29
3.3.5.1 Jablečné výlisky	30
3.3.5.2 Matolina	31
3.4 Žížaly a jejich vliv na půdu	31
3.4.1 Druhy žížal využívané pro vermikompostování v našich podmínkách	32
3.4.1.1 Žížala hnojní (<i>Eisenia fetida</i>)	33
3.4.1.2 Žížala červená kalifornská (<i>Eisenia andrei</i>)	34
3.5 Přežívání termotolerantních koliformních bakterií v kompostech	35
3.5.1 Termotolerantní koliformní bakterie.....	36
3.5.1.1 <i>Escherichia coli</i> spp.....	37
3.5.1.2 <i>Enterobacter</i> spp.	38
3.5.1.3 <i>Klebsiella</i> spp.....	38
3.5.1.4 <i>Citrobakter</i> spp.....	39
3.5.1.5 <i>Serratia</i> spp.	39
4 MATERIÁLY A METODIKA	40
4.1 Postup práce	40
4.1.1 Vermikompostování.....	41
4.1.2 Příprava materiálu pro laboratorní pokus	42
4.1.2.1 Přehled použitých bakterií	44
4.1.3 Laboratorní stanovení termotolerantních koliformních bakterií a <i>E. coli</i>	44
5 VÝSLEDKY	47

5.1	Sledování přežívání <i>E. coli</i> v procesu vermikompostování	48
5.1.1	Matolína.....	48
5.1.2	Jablečné výlisky	49
5.2	Sledování přežívání TKB v procesu vermikompostování	50
5.2.1	Matolína.....	51
5.2.2	Jablečné výlisky	54
6	DISKUZE.....	57
6.1	Koncentrace a druh patogenu	58
6.2	Substrát a jeho vlastnosti	61
6.3	Faktory ovlivňující průběh procesu vermikompostování a jeho vlivu na redukci patogenů	62
7	ZÁVĚR.....	66
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	70
9	SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ.....	71
10	PŘÍLOHY	73
11	SEZNAM LITERATURY	76

1 ÚVOD

Stále větší nároky rychle se rozrůstající lidské populace a dnešního konzumního stylu života se odráží především v rostoucí produkci komunálního odpadu, jehož hlavní složku tvoří převážně odpad z potravin. S rostoucí spotřebou roste i produkce odpadu a není-li tento odpad smysluplně využit, končí na skládkách odpadů a to s sebou přináší závažné problémy. Problémů při uložení biologicky rozložitelných odpadů na skládku je mnoho, jedná se například o nepříjemný zápach, nebezpečné výluhy ze skládky, které mohou ohrozit podzemní vody, a hlavně únik oxidu uhličitého a metanu, který přispívá ke vzniku skleníkového efektu. Objem odpadů, který končí na skládkách, lze přitom snadno regulovat jeho tříděním, recyklací a biologickým zpracováním. Právě oblast biologického zpracování umožňuje nejefektivněji zpracovat biologicky rozložitelný odpad.

Kompostování a vermikompostování jsou dva z nejznámějších ekologicky vhodných technologií pro úpravu velkého množství odpadu, který vykazuje infekčnost jako nebezpečnou vlastnost a organického odpadu různého charakteru vůbec. Jejich podstata spočívá především v tvorbě kvalitního hnojiva, které udržuje půdu zdravou, úrodnou a celkově přispívá k ochraně životního prostředí. V současné době se při zpracování organických odpadů stále více využívá základních biologických principů. Tyto principy jsou založeny na metabolických aktivitách různých skupin mikroorganismů, některé i na interakcích mezi mikroorganismy a bezobratlými živočichy. Výsledkem těchto procesů je látková přeměna organických odpadů. Biologické zpracování odpadů s sebou přináší jak redukcí objemu a hmotnosti odpadů, tak i jejich částečnou hygienizaci. Aplikací kompostu na půdu se mohou šířit do životního prostředí patogenní organismy, které představují významné riziko pro člověka, proto se Česká republika v rámci principu předběžné opatrnosti zavázala k maximální snaze o omezení vstupu a šíření patogenních organismů do životního prostředí. Jednou z metod redukcí počty patogenních organismů v prostředí se ukazuje vedle procesu kompostování i proces vermikompostování, ovšem tato fakta zatím nejsou dostatečně v praxi podložena, a proto cílem této práce je zjistit podrobnosti přežívání patogenních organismů během procesu vermikompostování.

2 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo ověřit vliv vermikompostovacího procesu na změnu počtu termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli* (dále jen *E. coli*) v surovinách odlišného složení. Kompostování probíhá za vysoké teploty, která je postačující pro hygienizaci, avšak u vermikompostování není možné, aby proces proběhl za teplot, které postačí pro hygienizaci.

Hypotézou této práce je, že vermikompostování má schopnost redukovat počty termotolerantních koliformních bakterií a *E. coli*.

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 Předpisy pro proces kompostování a nakládání s bioodpady

Kompost je ve smyslu zákona o hnojivech považován za hnojivo se všemi právními důsledky, i pokud je jeho hlavní složkou statkové hnojivo. Výroba kompostu se zákonem o hnojivech řídí v případě, kdy je kompost uváděn na trh. To znamená, že se v plné míře vztahuje na výrobu a distribuci průmyslového kompostu a v některých případech i na komunitní komposty, pokud jsou uváděny na trh. Nařízeními zákona o odpadech se musí řídit všichni výrobci kompostů, pokud alespoň jedna složka vyráběného kompostu je deklarována vlastníkem jako odpad. (Pastorek, 2004).

Výroba kompostů je v ČR regulována pomocí tří základních zákonných norem, na které navazují prováděcí vyhlášky:

1. **Zákon č. 185/2001 Sb., o odpadech** (připravuje se novela)
2. **Zákon č. 263/2014 Sb.,** kterým se mění zákon č. 156/1998 Sb., o hnojivech
3. **Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1069/2009 o hygienických pravidlech pro vedlejší produkty živočišného původu**
 - Pokud se v základce kompostu vyskytují kuchyňské odpady a nebo VŽP (živočišné produkty), tak se kvalitativní parametry řídí tímto nařízením a příslušné mikrobiologické parametry se řídí předpisem rady EU č. 142/2011 Sb.

Na ně navazují následující prováděcí vyhlášky:

Zákon č. 185/2001 Sb., O odpadech

- vyhláška MŽP č. 381/2001 Sb., kterou se stanoví Katalog odpadů
- vyhláška MŽP č. 382/2001 Sb., o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě
- vyhláška MŽP č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady

Zákon č. 156/1998 Sb., o hnojivech

- Uvádění kompostů do oběhu prodejem a užívání kompostů na zemědělské půdě je upraveno tímto zákonem, který dle § 1, odst. 1 stanovuje podmínky pro uvádění do oběhu a pro používání hnojiv, statkových hnojiv, pomocných půdních látek, pomocných rostlinných přípravků a substrátů. Dále tento zákon řeší registraci výstupů (hnojiv) ze zařízení na zpracování bioodpadů. O registraci hnojiva rozhoduje Ústřední kontrolní a

zkušební ústav zemědělský na základě žádosti výrobce, dovozce nebo dodavatele hnojiva.

- Vyhláška č. **341/2008 Sb. O podrobnostech nakládání s BRO** a změně vyhlášky č. **294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu** a změně vyhlášky č. **383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady** (vyhláška o podrobnostech nakládání s BRO).
- Vyhláška č. **131/2014 Sb.**, kterou se mění vyhláška MZ č. **474/2000 Sb., o stanovení požadavků na hnojiva**, ve znění pozdějších předpisů, a vyhláška č. **377/2013 Sb., o skladování a způsobu používání hnojiv**.
 - uvádí rizikové prvky a jejich limitní hodnoty v hnojivech a substrátech a stanoví typy hnojiv
- vyhláška č. **377/2013 Sb. o skladování a způsobu používání hnojiv**
- vyhláška č. **400/2004 Sb.**, kterou se mění vyhláška MZ č. **275/1998 Sb., o agrochemickém zkoušení zemědělských půd** a zjišťování půdních vlastností lesních pozemků, ve znění vyhlášky č. **477/2000 Sb.**
- Nařízení vlády č. **117/2014 Sb.**, kterým se mění nařízení vlády č. **262/2012 Sb., o stanovení zranitelných oblastí** a akčním plánu, ve znění pozdějších předpisů.

Způsob zpracování biologicky rozložitelných odpadů a výroba kompostů v kompostárně se řídí normou **ČSN EN 46 5735 o průmyslových kompostech**. Tato norma je doporučena pro výrobu, zkoušení, dodávku a užívání průmyslově vyráběných kompostů používaných jako organické hnojivo. Průmyslovým kompostem se dle této normy rozumí „organické hnojivo vyráběné mícháním, biologickým zráním různých látek obsahující rozložitelné organické látky a rostlinné živiny“. Navíc také tato norma stanovuje nejvyšší přípustné množství látek kompostovatelného odpadu včetně těžkých kovů a patogenních mikroorganismů (ČSN ISO 10381).

3.2 Kompostování

Kompostování je proces aerobního rozkladu bioodpadů, což je exotermní, mikrobiologický rozklad a přeměna organické hmoty na humusové látky. Pomocí kompostovacího procesu dochází k ekologické transformaci organických materiálů na velmi kvalitní hnojivo zlepšující úrodnost půdy (Kalina, 2004).

Výsledkem kompostování je přeměna nestabilních organických surovin na stabilní produkt (humus), což je spojeno se snížením celkového objemu, hmotnosti, množství obsažené vody a zredukováním nežádoucích druhů mikroorganismů (Plíva a kol., 2006). Kompostování je člověkem záměrně vyvolaná a řízená intenzivní biodegradace organických odpadů na jednodušší sloučeniny, vyvolaná enzymatickým rozkladem za pomoci aerobních mikroorganismů (bakterií a hub) v kombinaci s některými dalšími reakcemi jako je oxidace a hydrolýza. Při tomto procesu jsou organické látky postupně rozkládány na jednodušší formy vhodné pro přímou aplikaci do půdy jako zdroj organické hmoty a energie pro růst nových rostlin a rozvoj půdní mikroflóry. Zastoupení mikroorganismů podílejících se na biodegradaci není konstantní a závisí jak na složení kompostu, tak na stupni humifikace kompostovaného materiálu. Jedná se však převážně o heterotrofní mikroorganismy spotřebovávající uhlík a kyslík ze svého prostředí potřebný pro jejich růst a vývoj. Tyto mikroorganismy postupně odbourávají organické látky, některé z nich oxidují až na konečné produkty s nízkým obsahem energie, tj. CO_2 a H_2O (Junga a kol., 2015).

3.2.1 Technologie kompostování

Mezi základní typy technologií řadíme kompostování na volné ploše, které je realizováno jako kompostování v pásových nebo plošných hromadách. Intenzivnějším typem kompostování je kompostování v uzavřeném nebo polouzavřeném zařízení, tedy v bioreaktoru, boxu nebo žlabu. Další možností je kompostování odpadního materiálu přímo ve vacích nebo pomocí žížal v procesu vermikompostování, které je blíže popsáno v následujících kapitolách této práce. Plíva a kol., (2006) uvádí, že jsou ve své podstatě všechny kompostovací technologie až na malé odchylky stejné, hlavní odlišnost spočívá především v délce a intenzitě probíhajících dějů a také v optimalizaci základních podmínek průběhu procesu jako jsou:

- **Volba správného surovinového složení zakládky kompostu**, která obnáší výběr vstupních surovin a přípravu surovin do zakládek kompostu (drcení, homogenizace).
- **Sledování fyzikálních, chemických a mikrobiálních podmínek** jako je teplota, obsahu kyslíku (aerace), vlhkost, hodnota pH, obsah živin, poměru C:N, mikrobiální aktivita, pórovitost, zrnitost a velikost částic.
- **Využívat především taková zařízení, která zajistí vhodné procesní podmínky**, především provzdušňování a promíchávání kompostu (překopávání), úpravu vlhkosti, udržení mikroklima v kompostovací hromadě například překrytím kompostovací plachtou.

3.2.2 Fyzikální, chemické a mikrobiologické podmínky kompostování

Zabezpečení optimálních podmínek pro existenci a činnost mikroorganismů je základní podmínkou pro správný průběh kompostovacích procesů a dosažení požadované kvality výsledných produktů. Optimální podmínky pro mikroorganismy lze zajistit monitorováním určitých fyzikálních, chemických a mikrobiologických vlastností zpracovávaných surovin a řízením celého procesu (Plíva a kol., 2006).

Teplota

Autoři (Váňa, 2002; Edwards et al., 2011; Khalil et al., 2011) se jednohlasně shodují, že teplota kompostu je nejjednodušeji identifikovatelným ukazatelem zrání kompostu, který koresponduje s intenzitou činnosti mikroorganismů. Společně označují jako počátek kompostovacího procesu tzv. **termofilní fázi**, kdy se pomocí činnosti mikroorganismů organická hmota intenzivněji rozkládá a současně uvolňuje více tepla. Jedná se o aktivní fázi kompostování, při které se uplatňuje především proces oxidace. Zvyšuje se také kyselost substrátu v důsledku nahromadění organických kyselin. Teplota uvnitř zrajícího kompostu běžně dosahuje teplot okolo 50 - 60 °C, tyto vysoké teploty slouží především k hygienizaci odpadů. Hlavním přínosem vysoké teploty během klasického kompostování je jeho potenciál pro snížení velkého množství lidských patogenních organismů jako jsou *E. coli*, *Salmonella* spp., lidské viry a helminti (Edwards et al., 2011).

Účinnost hygienizace a kvalita kompostu je pravidelně monitorována prostřednictvím sledování indikátorových mikroorganismů (termotolerantní koliformní bakterie, *Salmonella*

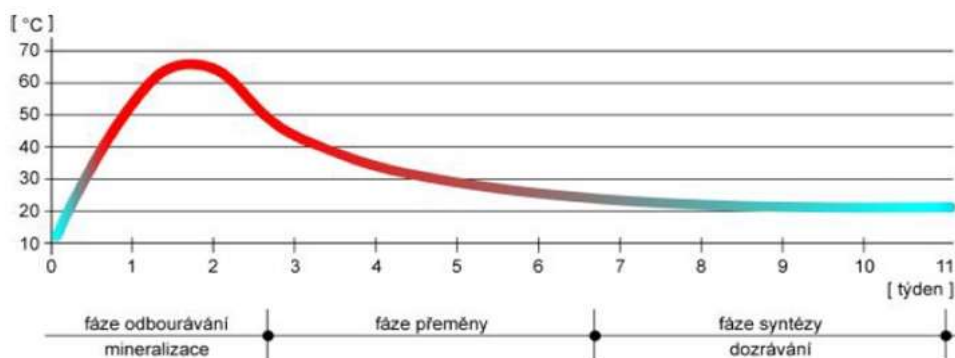
spp., Enterokoky) jejichž limitní hodnoty uvádí (tab. 1). Mikrobiologická kritéria pro hodnocení účinnosti hygienizace kompostu jsou v ČR uvedena ve vyhlášce č. 341/2008 Sb., o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady. Limitní hodnoty a specifikace indikátorových mikroorganismů vycházejí z doporučení WHO (Plíva a kol, 2004).

Tabulka č. 1 Limitní hodnoty pro komposty (ČSN EN 46 5735)

Indikátorový mikroorganismus	Výstup	Jednotky	Počet zkoušených vzorků při každé výstupu		Limit (nález/KTJ)
Salmonella spp.	Rekultivační kompost	nález v 50g	5		Negativní
Termotolerantní koliformní bakterie **	Rekultivační kompost	KTJ v 1 gramu	5	2	< 10 ³
				3	< 50
Enterokoky **	Rekultivační kompost	KTJ v 1 gramu	5	2	< 10 ³
				3	< 50

Plíva a kol., (2006) konstatuje, že „pro eliminaci lidských, živočišných i rostlinných patogenů, je třeba dosáhnout teploty alespoň 55 °C a pro zneškodnění semen plevelů až 63 °C“. Tato fáze trvá 2 - 3 týdny, u kompostu s obsahem velkého množství dřevní štěpky až 2 měsíce. Následuje tzv. **mezofilní fáze** neboli fáze přeměny a tvorby humusu. Teplota postupně klesá na 40 - 45°C, zpomaluje se degradace organických sloučenin, tvoří se humusové látky a mění se barva a struktura kompostu. Závěrečná **fáze syntézy** vede k poklesu kyselosti substrátu, omezuje se fytotoxicita a kompost se stává dostatečně vyzrálým a stabilním humusem. Průběh a doba trvání kompostovacího procesu je značně ovlivněna kvalitou aerace a množstvím vlhkosti během celého procesu. Konečný materiál kompostování (humus) by měl být zcela bez nepříjemného zápachu, hub a plísní a strukturou a vůní by měl připomínat zeminu.

Obrázek č. 1. Fáze procesu kompostování

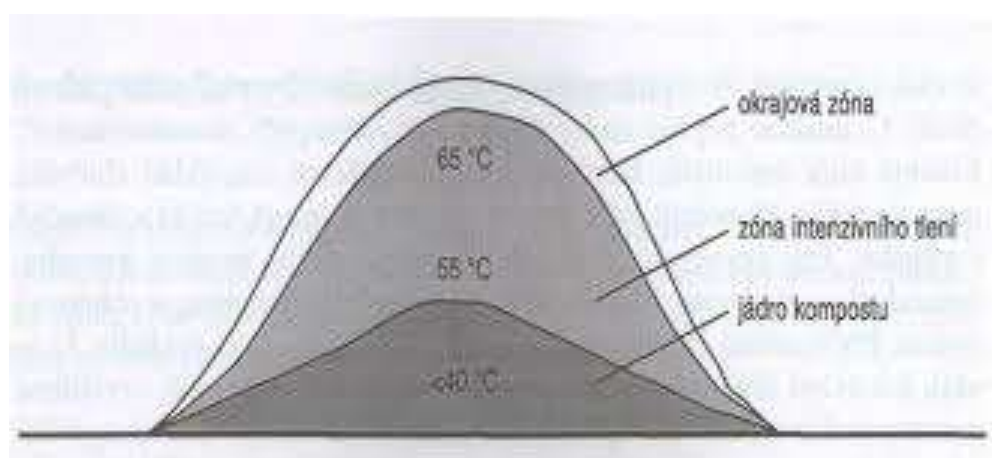


Zdroj: Biom.cz

Obsah kyslíku

Kompostování je velmi podstatně ovlivněno kvalitou a intenzitou provzdušňování (aerací), především v první fázi kompostování. Čím důkladněji je provzdušňování prováděno, tím rychleji kompost zraje, naopak při nedostatečné aeraci nastupují anaerobní procesy a kompost je tak znehodnocen (Váňa, 2002). Dodávka vzduchu je především důležitá pro vytvoření **aerobního prostředí**, které podporuje vhodnou mikrobiální aktivitu, dále pro regulaci teploty, snižování a optimalizaci vlhkosti, odstranění vodních par, CO₂ a ostatních plynů (Plíva a kol., 2006; Khalil et al., 2011). Nepřetržitě zásobovat kyslíkem, a tím i homogenizovat je nutné veškerý materiál, především jádro kompostu, aby byly zabezpečeny stejné procesní podmínky v celém profilu kompostu. Důsledkem rozdílných podmínek by mohlo dojít v krátké době k tvorbě různých zón pro tlení (obr. 2) a tím i k přesychání materiálu ve svrchní vrstvě kompostu (Kalina, 2004).

Obrázek č. 2. Zóny rozdílných podmínek rozkladu



Zdroj: Kalina (2004)

Obsah O₂ ve vzdušných pórech kompostu nesmí klesnout pod 6 %, zamezí se tak vzniku anaerobních podmínek, které vedou ke vzniku nepříjemného zápachu a celkově k zhoršené hygienizaci kompostu. U kompostování na volné ploše v pásových hromadách je nejčastěji pro zajištění dostatečného množství vzdušného kyslíku využíváno překopávání vhodným překopávačem kompostu (Plíva a kol., 2006). Aerace se obecně provádí pomocí pravidelného překopávání kompostované hmoty, nebo tlakovou aerací či odsáváním vzduchu s oxidem uhličitým přes vzdušné filtry. Dále je možné podle Khalil et al. (2011) využít

různých způsobů aerace, jako je usnadněná aerace (perforované dno kompostéru, porézní materiál zakládky – piliny, kůra, štěpka), mechanické aerace (promíchávání, překopávání a obracení kompostované hmoty), nebo aerace nucené (ventilátory na výměnu plynů).

Vlhkost

Vlhkost je ovlivněna mikrobiální aktivitou a biologickou oxidací organického materiálu. Zabezpečuje především životní procesy v kompostu jako je transport živin, pohyb mikroorganismů a tvoří médium pro chemické reakce. Regulace vlhkosti probíhá samovolně prostřednictvím odparu. Optimální vlhkost je při 50 až 60 % nasycení vodou, avšak rozhoduje především povaha složení a struktury kompostovaných surovin, kde nejdůležitější je jejich pórovitost. Optimální surovinová skladba čerstvého kompostu je taková, kdy jsou póry ze 70 % zaplněny vodou. Komposty zemitého charakteru vyžadují optimální vlhkost 50 až 55 %, naproti tomu komposty s převahou dřevní štěpky nebo stromové kůry, tedy svým charakterem převážně sušší komposty, potřebují vlhkost pravidelně dodávat a to až na 65 až 70 %. Při poklesu pod hranici 40 % je zpomalena mikrobiální aktivita a nedostatečná vlhkost dává prostor pro rozvoj nevhodné mikroflóry s převahou plísní a aktinomycet. V opačném případě při nadbytku vlhkosti (vyšší než 60 %) se snižuje množství kyslíku v důsledku vyplnění pórů vodou a vyvíjí se nežádoucí anaerobní mikroflóra (Váňa, 2002; Plíva a kol., 2006).

Poměr C:N

Rozvoj mikroorganismů v kompostu je také podstatně ovlivněn správným poměrem uhlíku a dusíku (C:N), tedy vhodnou surovinovou skladbou čerstvého kompostu. Poměr C:N by měl být v čerstvém kompostu v rozmezí 30 - 35:1 a ve zralém kompostu 25 - 30:1. Příliš široký poměr C:N prodlužuje zrání kompostu. Při příliš nízkém poměru C:N (16:1) v čerstvém kompostu klesne metabolická přeměna mikroorganismů, která způsobí ztráty čpavkového dusíku a pokles produktivity tvorby humusových látek (Váňa, 2002; Plíva a kol., 2006).

Hodnota pH

Ideální pH pro zakládku kompostu je pH neutrální až lehce zásadité, tedy v rozmezí 6,5 - 8. Pokles pod hranici pH 6 vede k úhynu nebo úplnému zastavení metabolismu mikroorganismů, naopak růst pH nad hodnotu 8,5 je doprovázen přeměnou dusíkatých sloučenin na amoniak. V počáteční fázi kompostování je hodnota pH okolo 5 v důsledku

tvorby organických sloučenin, na kterých se podílí především plísně a houby, kterým kyselé pH tak nevadí, tyto mikroorganismy začnou kyseliny rozkládat a dochází tak k postupné neutralizaci kompostu. V tuto chvíli převažují hlavně bakterie podílející se dále na rozkladných procesech (Váňa, 2002; Plíva a kol., 2006).

Pórovitost, zrnitost, velikost částic

Pórovitost je poměrem objemu dutin k celkovému objemu kompostované hmoty. Tyto charakteristiky značně ovlivňují množství vzduchu v kompostovaném materiálu. Struktura a pórovitost je dána především výběrem vstupních surovin a mírou nadrcení a homogenizace těchto surovin. Co se velikosti částic týče, čím jsou částice drobnější, tím mají větší aktivní plochu pro mikroorganismy a ti mohou mnohem rychleji a účinněji působit na rozklad těchto částic. Nejlépe kompostovatelné jsou částice o velikosti 20 - 50 mm (Plíva a kol., 2006).

Mikroorganismy

Mezi zástupce bakterií, které se nejčastěji podílí na procesu kompostování, řadíme zejména tři hlavní skupiny mikroorganismů a to bakterie mezofilní a termofilní z čeledi *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Bacillaceae*, dále aktinomycety a mikromycety - plísně/ nižší houby z rodu *Mucor*, *Penicillium* a *Aspergillus* a také kvasinky (Plíva et al. 2006). Podle toho, jaký zvolíme druh vstupního materiálu, může kompost obsahovat i značné množství patogenů. Nejčastěji jde o druhy *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia* spp., *Streptococcus* či *Staphylococcus*. Jako další patogenní organismy je třeba zmínit také enteroviry (viry hepatitidy A), mikromycety nebo parazity jako je např.: *Ascaris lumbricoides* a *Protozoa*. Se vzrůstající teplotou kompostovaného materiálu klesá růst a rozmnožování mezofilních mikroorganismů, tedy i patogenů a dochází k rozvoji organismů termotolerantních (< 45 °C), jejichž teplotní maximum je 50 °C, dále organismů termofilních (45-60 °C) a striktně termofilních (>60 °C). Postupný pokles teploty je pak provázen rozvojem mezofilních mikroorganismů, kam řadíme zejména mikromycety, jejichž zástupci jsou druhy rodu *Aspergillus*. V konečné fázi kompostování při rozkladu humusových látek se uplatňují zejména zástupci rodů *Ascomycetes*, *Fungi Imperfectii* a *Basidiomycetes*, z aktinomycet jsou to především druhy rodu *Streptomyces* (Plíva et al. 2006; Monroy et al., 2007, Juga a kol. 2015).

3.3 Vermikompostování

Jedním z možných způsobů kompostování je kompostování s využitím žížal neboli vermikompostování, pro které jsou důležité následující pojmy:

- **Kompostování** je biologický aerobní rozklad organických materiálů, při kterém jsou labilní organické látky degradovány za pomoci vysokých teplot na CO_2 , H_2O , NH_3 , anorganické živiny a stabilní organický materiál (huminové látky).
- **Předkompostování** je v podstatě krátkou termofilní fází aerobní fermentace, která má odstranit veškeré těkavé a potenciálně toxické sloučeniny, (např.: NH_3 , amonné soli a kyselé látky), které mohou být nebezpečné pro žížaly (Nair et al., 2006).
- **Vermikompostování** je dekompoziční proces, při kterém dochází k oxidaci a stabilizaci organických materiálů interakcí žížal a mikroorganismů při mezofilní teplotě (Domínguez and Edwards, 2004).
- **Vermikompost** je konečný produkt procesu vermikompostování.

Hlavní překážkou pro rozšíření vermikompostování jako alternativního zpracování organických odpadů je nedostatek vědeckých informací o potenciálu, který má pro snížení lidských patogenů v průběhu vermikompostování odpadní biomasy nebo zvířecího trusu (Eastman et al., 2002). Vermikompostování je definováno jako proces bio oxidace a stabilizace organických odpadů, který zahrnuje interakci mezi žížalou a mikroorganismy (Domínguez and Edwards, 2004). Tyto interakce mohou vést ke změně mikrobiální biomasy a činností souvisejících se změnami ve struktuře mikrobiální komunity (Lores et al. 2006, Aira et al. 2007). Na rozdíl od klasického kompostování, které probíhá za vysokých teplot (termofilní fáze) 50 – 70 °C, vermikompostování je mezofilní proces. To vyžaduje, aby teplota byla poměrně nízká 30 – 35 °C jinak se žížaly mohou stát neaktivní, utéct nebo zemřít a narušit tak celý vermikompostovací proces (Edwards et al., 2011).

Žížaly se prostřednictvím svého trávicího traktu intenzivně podílí na rozkladu a přeměně organických odpadů na kvalitní hnojivo v podobě žížalích exkrementů (koprolitů). Navíc si samy svým pohybem napříč substrátem dokáží zabezpečit jeho provzdušňování (Dominguez et al., 1997). Podstatou procesu je dekompozice organických látek, jejich oxidace, stabilizace a částečná hygienizace, ke které dochází právě při průchodu trávicím traktem (Domínguez and Edwards, 2004; Jamaludin and Mahmood, 2010; Edwards et al.,

2011). Tento způsob degradace biologických odpadů je technologicky nenáročný, nízkonákladový a šetrný k životnímu prostředí, především proto, že se jedná o proces převzatý z přírody, je tak ideální pro ekologické hospodaření. Jde především o čistý, společensky přijatelný způsob jak snížit množství bioodpadů, které končí na skládkách a ve spalovnách a to až o 30 % (Chaoui, 2010; Hanč a Plíva, 2013).

Celý proces probíhá v mezofilních teplotních podmínkách při 35 - 40 °C, což je ideální teplota pro rozvoj a intenzivní aktivitu mikroorganismů, které celému procesu velice napomáhají (Garg and Gusta, 2009). Ve srovnání s klasickým kompostováním, vermikompost vytváří konečný produkt o nižší hmotnosti ale s vysokým obsahem kvalitního humusu, nižší dobou zpracování a sníženou fytotoxicitou (Garg and Gupta 2009). Hnojivo vzniklé touto cestou tedy značně převyšuje kvalitu běžného kompostu (Zajonc, 1992). Průchodem organické hmoty přes trávicí trakt žížal jsou do jejich těl částečně bioakumulovány kontaminanty z okolního substrátu a díky tomu konečný produkt vermikompost obsahuje mnohem méně kontaminantů a rizikových látek, dále jsou zde zničeny aerobní bakterie, které průchod přes anaerobní prostředí (trávicí trakt) nejsou schopny přežít (Sinha et al. 2010). Žížaly navíc pozitivně působí na substrát trávicími enzymy a jinými antibakteriálními tekutinami a snižují tak množství patogenů v kompostu (Aira et al., 2006; Sinha et al., 2010).

Důležitá fakta o vermikompostu (Chaoui, 2010):

- Jedná se o přirozený aerobní proces s ideální dobou rozkladu organické hmoty 22 - 32 dní podle druhu odpadu, který by měl rovněž splňovat optimální měrnou hmotnost v rozmezí 350 - 650 g/ L, která je pro žížaly nejvhodnější.
- Vermikompost nemusí dozrávat, ale samotnému procesu předchází 2týdenní fáze nitrifikace, kde je amonný dusík přeměněn na dusičnanovou formu netoxickou pro žížaly a rostliny.
- Ideální četnost osazení materiálu žížalami je 150 kusů / L odpadu.
- Každý den dokáží žížaly zkonsumovat v průměru 75 % své hmotnosti (0,2 g žížala asi 0,15 g/ den krmiva).
- Žížaly jsou schopny si samy zabezpečit aktivní provzdušňování, míchání a úpravu teploty.

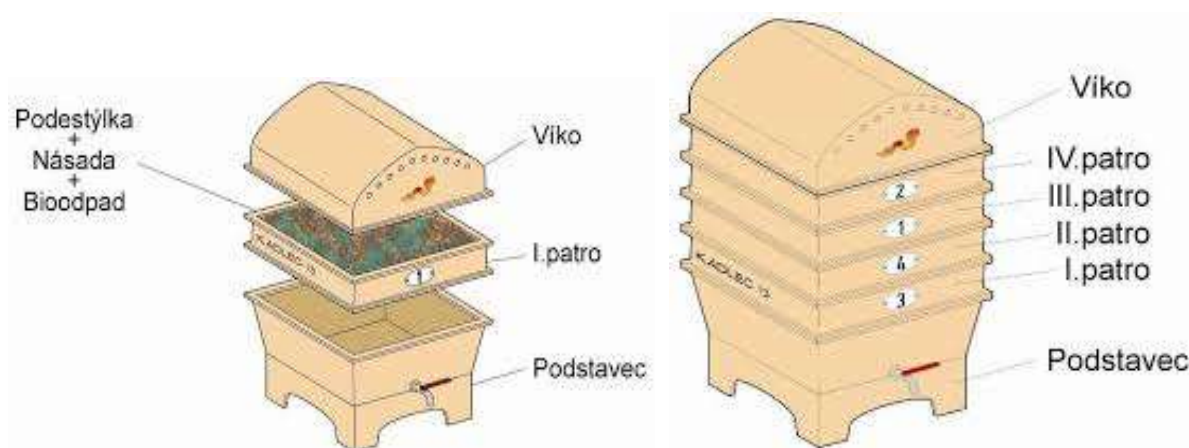
3.3.1 Technologie vermikompostování

Názory, způsob a rozdělení technologií vermikompostování se u jednotlivých autorů dost liší, proto jsem se pro zjednodušení a přehlednost rozhodla shrnout jednotlivé technologie následujícím způsobem.

Kompostování s využitím žížal lze provozovat jednak jako malé „domácí“ kompostovací systémy využívající menší vermikompostovací nádoby různé velikosti a konstrukce. Tyto vermikompostéry jsou vhodné především pro zpracování kuchyňských zbytků a jiných bioodpadů vzniklých přímo v domácnosti či kanceláři. Další možností je provozovat tento proces jako velkoprodukční systém s použitím kompostování na volné ploše nebo v uzavřených či polouzavřených zařízeních.

Malé domácí kompostéry

Obrázek č. 3. Schéma vermikompostéru



Zdroj: Hanč a Plíva, 2013

Jejich využití je vhodné zejména tam, kde nemáme dostatek prostoru nebo máme k dispozici menší množství surovin ke kompostování. Nejčastěji se jedná právě o domácnosti nebo kancelářské prostory, kde lze vermikompostér umístit všude tam, kde jsme schopni zajistit teplotu kolem 20 °C a správnou vlhkost substrátu (chodba, balkon, garáž, dílna, kancelář, školní třída). V zimě je tedy nutné nenechávat vermikompostér venku bez izolace a v létě ho nevystavovat přímému slunci, aby nedocházelo k výparu vody a k přehřívání. V dnešní době je na trhu volně k dostání velké množství druhů několikapatrových nádob z

plastu či ze dřeva. Plocha dna a tím i velikost nádoby se odvíjí od množství vermikompostovaného bioodpadu, tedy na 1 kg týdně je potřeba zhruba 0,2 m².

Nezbytnou součástí je perforace dna jednotlivých nádob, které zajišťují odvod přebytečné tekutiny ve formě výluhu, a také volný pohyb žížal mezi jednotlivými patry a provzdušňování. Bioodpady z domácností jsou zpracovávány postupně v jednotlivých patrech vermikompostéru po dobu cca 2 měsíců.

Kompostování na volné ploše

Je nejjednodušším a nejméně finančně nákladným způsobem. Odpadní materiál je vrstven do řádků nebo na hromady trojúhelníkového a lichoběžníkového profilu na předem zpevněnou plochu volného prostranství. Plocha pod hromadou musí být zpevněna betonem nebo alespoň pevnou folií, aby se zamezilo průsaku odpadní vody z hromady do podzemní a povrchové vody v okolí. Šířka hromady se liší podle použité mechanizace, maximálně však do 2 m pro snadnou manipulaci a kontrolu zakládky. Samotná délka hromady se odvíjí pouze od velikosti prostoru, který máme pro kompostování vymezen. Jednotlivé kultivační vrstvy by neměly překročit výšku 60 cm, aby nebylo omezeno proudění vzduchu hromadou (Zajonc, 1992). Zpracovávané suroviny se přidávají na povrch hromady ve vrstvě (cca 20 - 30 cm jednou za 2 týdny, 30 - 50 cm jednou za 3 týdny nebo 10 cm jednou za týden), žížaly se následně stěhují do vyšších vrstev za novou potravou a dochází k postupnému zpracování surovin. Tento způsob vermikompostování zahrnuje větší množství pracovních operací a vyšší náchylnost k povětrnostním podmínkám (Hanč a Plíva, 2013).

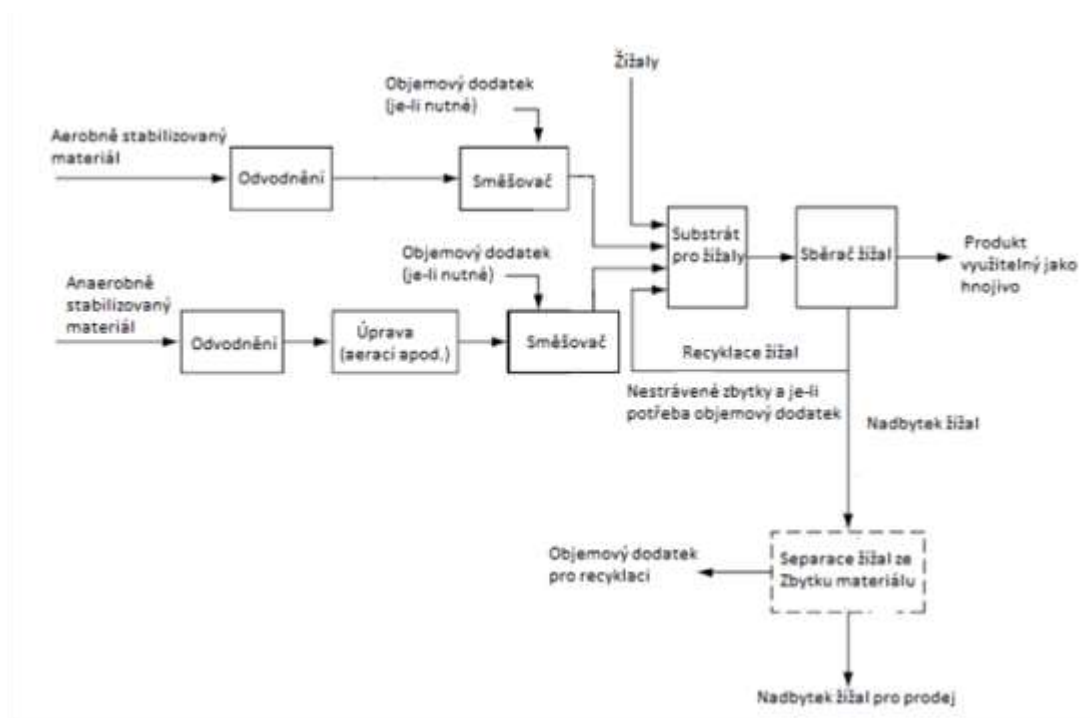
Kompostování v uzavřených nebo polouzavřených nádobách

Jedná se především o žlaby, boxy, kompostéry a bioreaktory. Podstatou tohoto způsobu je mnohem intenzivnější průběh rozkladné fáze, protože v uzavřených podmínkách můžeme lépe optimalizovat teplotu a proudění vzduchu a tak zkrátit i dobu celého procesu. Další výhodou je, že v uzavřených prostorách nemusíme brát zřetel na okolní podmínky podnebí a proces tak může probíhat celoročně bez přestávky. Hlavní nevýhodou tohoto způsobu je značná investiční náročnost (Zajonc, 1992).

3.3.2 Jednotlivé kroky vermikompostovacího procesu

Ve své podstatě je jedno, jakou z výše zmíněných technologií pro tvorbu vermikompostu zvolíme, všechny by měly obsahovat následující kroky, rozdíl je jen ve velikosti produkce a v optimalizaci podmínek. V první řadě je třeba nashromáždit a roztřídit dostatečné množství biologicky rozložitelných odpadů a biomasy, následuje jejich drcení, smísení a homogenizace do základní směsi, která je navíc ještě odvodněna od přebytečné odpadní vody. Tato směs je asi 15 dní před vložení žížal předkompostována. Předkompostování substrátu před samotným vermikompostováním zlepšuje výslednou kvalitu vermikompostu. Termofilní fáze, která je nezbytnou součástí procesu kompostování, zahubí většinu nežádoucích organismů. To zajistí nejen přežití žížal v materiálu, ale také vermikompost s mnohem nižším obsahem patogenů a semen nežádoucích plevelných rostlin. Dále je pomocí předkompostování upravena základka vermikompostu pro lepší stravitelnost substrátu. Upraví se tak především hodnoty pH, velikost částic, obsah amonných solí (Abbasi et al., 2009; Garg and Gupta, 2009).

Obrázek č. 4. Průběh vermikompostovacího procesu (Wang et al., 2007)



Po úpravě substrátu následuje naočkování vhodným druhem žížal, v našich podmínkách je to nejčastěji Žížala hnojní (*Eisenia foetida*) a Žížala kalifornská (*Eisenia andrei*), které mechanicky promíchávají, rozměňují organickou hmotu, upravují její fyzikální

a chemické vlastnosti a výrazně dokáží snížit poměr C:N. Dále zvětšují plochu povrchu jednotlivých částic, které se tak stávají lépe přístupné pro mikroorganismy a napomáhají tak mikrobiální aktivitě a dalšímu rozkladu organické hmoty (Slejška, 1999; Lores et al., 2006). Vermikompostovací proces ve své podstatě zahrnuje dvě různé fáze ve vztahu k činnosti žížal, a to **aktivní fázi**, během které žížaly mechanicky působí na organický substrát, mění jeho fyzikální stav a mikrobiální složení (Lores et al., 2006). V druhé fázi, tzv. **fázi zrání**, se žížaly přemisťují do vrstev za čerstvým substrátem a starší substrát rozkládají už jen mikroorganismy (Aira et al., 2007; Gómez-Brandón et al., 2012). Délka zrající fáze není pevně stanovena a závisí na účinnosti rozkladu v aktivní fázi, která se liší s druhem a hustotou obsazení žížal v substrátu (Dominguez et al., 2010). V poslední fázi je nutná ještě kontrola a separace žížal od vermistabilizovaného vermikomposu, která se provádí pomocí sít, světelného či tepelného podnětu (Garg and Gupta, 2009).

3.3.3 Vermikopost

Produktem výše zmíněného procesu je tzv. **vermikopost**, což je vlastně vysoce porézní materiál podobný rašelině. Jeho struktura je jemně granulovaná a drobtovitá (příloha č. 10), je proto vhodné použít jej jako hnojivo pro zemědělské půdy, samostatně jako zeminu, nebo ve směsi se zeminou jako náhradu substrátů, kompostů a minerálních hnojiv. Aplikace tohoto materiálu na půdu napomáhá zvýšit vodní kapacitu půdy, obsah živin a podpořit tak zdraví a odolnost rostlin (Garg and Gupta, 2009; Chaoui, 2010).

Vermikompost je na živiny bohatým hnojivem bez chemických přísad a v mnohem přístupnější formě pro rostliny, než jsou minerální hnojiva a běžný kompost (Edwards et al., 2010). Obsahuje totiž značné množství živin, jako jsou huminové látky, růstové hormony (auxiny, gibbereliny, cytokininy) a enzymy obsažené ve výměšcích žížal zvyšující úrodnost půdy až o 30 %, což přináší i značnou úsporu finančních prostředků za průmyslová hnojiva a pesticidy (Sinha et al., 2010; Hanč a Plíva, 2013). Rostliny se díky těmto látkám stávají odolnější k chorobám a škůdcům, lépe využívají minerální látky obsažené v půdě a to až o několik desítek procent (Aira et al., 2006; Hanč a Plíva, 2013).

Pecl (2007) dále uvádí jako významné přínosy aplikace vermikompostu zlepšení retenční schopnosti, optimalizaci vodního a vzdušného režimu půdy, udržení neutrálního až mírně zásaditého pH. Chaoui (2010) také poukazuje na to, že při průchodu trávícím systémem kalifornských žížal jsou úspěšně likvidovány i patogenní látky a plísně, které nízké

hladiny v zaživacím traktu nedokáží přežít. Příznivě působí na klíčivost semen, vzcházení rostlin, zvyšování tvorby kořenového systému a celkové biomasy, prodlužuje délku kvetení i samotnou tvorbu květů. Velmi významně snižuje hladinu dusičnanů prostřednictvím pevné vazby na stabilní organickou hmotu, které obsahuje až 60 %, což vede ke snížení vyplavování sloučenin dusíku a omezení potřeby dalšího přihnojování. Dále napomáhá vyšší koncentraci cukrů a vitamínu C v dozrávajících plodech. Vermikompost také přispívá k regeneraci unavených a vyčerpaných půd po záplavách či erozi a celkově přispívá k obnově biologické činnosti v takto postižených půdách. Vermikompost napomáhá vstřebávání živin a zabraňuje jejich následnému vyplavování a udržuje optimální poměr C:N (16 - 20: 1) značně omezující imobilizaci dusíku. Tyto vlastnosti se pozitivně odráží v agrochemických a biologických vlastnostech hnojené půdy, vedoucí nepopíratelně ke zlepšení výnosů a kvality produkce (Aira et al., 2006; Hanč a Plíva, 2013).

Je patrné, že vermikompost a produkty z něj vyrobené mají opravdu širokou škálu uplatnění. Je možné používat vermikompost nejen v domácnostech, na zahradách, vinicích, v ovocných sadech, ale i v zemědělství. Právě v oblasti zemědělství je jeho využití nejvíce opodstatněné v důsledku vyčerpání půdy dlouhodobým užíváním chemických hnojiv a postřiků, které narušily chemické, biologické i fyzikální vlastnosti půdy. Pozitivní přínosy vermikompostu tkví především v rychlé a jednoduché optimalizaci situace. Vyčerpaná půda potřebuje obnovu, aby znovu byla schopna zabezpečit ideální podmínky pro pěstování nejrůznějších užitkových plodin s odpovídajícími výnosy v rámci období sklizně (Pecl, 2007). V České republice se vermikompost používá v souladu s vyhláškou č. 131/2014 Sb. o stanovení požadavků na hnojiva a vyhláškou č. 377/2013 Sb. o skladování a způsobu použití hnojiv jako typové organo-minerální hnojivo.

Konkrétní příklady využití kompostů a vermikompostů (Pecl, 2012):

- Doplnují organickou hmotu u zemědělsky vyčerpaných půd
- Zlepšují vlastnosti lehkých písčitých a těžkých jílovitých půd
- Zlepšují odolnost městské zeleně
- Mulčováním půdy vylepšují ovocnářství a pěstování vinné révy
- Využívají se k rekultivacím
- Využívají se k výrobě speciálních substrátů a zemin

3.3.4 Podmínky vermikompostovacího procesu

Pro tvorbu kvalitního a plnohodnotného vermikompostu je nutné zajistit co nejoptimálnější podmínky pro zdravý vývoj žížal.

Pižl (2002) a Garg and Gupta (2009) společně uvádí jako nejdůležitější požadavek žížal na prostředí dostatečné množství kvalitní odumřelé organické hmoty rostlinného původu, optimální vlhkost, teplotu, půdní reakci a půdní texturu, v neposlední řadě také přítomnost vhodných půdních mikroorganismů napomáhajících při rozkladu substrátu. Vlivem snížené pohyblivosti a rychlému vysychání jsou žížaly nuceny žít v těsné blízkosti potravních zdrojů.

Teplota nejvíce ovlivňuje metabolismus, růst a rozmnožování žížal. Nejvhodnější podmínky pro žížaly jsou mezofilní teploty v rozmezí 10 až 35 °C. Při teplotě přesahující 35 °C začíná klesat metabolická aktivita žížal a někdy dochází k úmrtí. Proto je velmi důležité udržet teplotu procesu pokud možno co nejvíce konstantní (Ismail, 2005; Garg and Gupta, 2009). Zajonc (1992) uvádí, že aktivita žížal začíná při teplotách nad 5 °C avšak pro tvorbu co nejkvalitnějšího vermikompostu je třeba udržet rozmezí teplot 15 - 25 °C. Za chladnějšího období žížaly přežijí, ale nepřetváří organické materiály na hodnotný vermikompost. Nebezpečná je především počáteční fáze rozkladu organické hmoty, kdy může docházet ke vzniku vysokých teplot ohrožujících žížaly a prospěšné mikroorganismy pro zdraví rostlin, proto klíčem k úspěšnému vermikompostovacímu procesu je přidání čerstvého materiálu pouze na povrch hromady v tenké vrstvě, protože žížaly jsou aktivními konzumenty organického materiálu ve vrstvě 6 - 9 centimetrů pod povrchem kompostu, díky čemuž mají prostor pro únik od nejvyšších teplot, které při rozkladu čerstvé hmoty mohou vznikat (Ismail, 2005).

Pokud hovoříme o **vlhkosti**, musíme brát v úvahu jak vlhkost substrátu, která je potřebná pro jeho rozklad, tak i atmosférickou vlhkost. Během vermikompostovacího procesu závisí na mnoha faktorech, jako je fyzický stav odpadu, jeho pórovitost, typ použitého vermikompostovacího systému atd. Vlhkost potřebují žížaly, aby mohly dýchat, protože kyslík obsažený v půdě jsou schopné vstřebávat do těla jen prostřednictvím slizu, kterým je jejich tělo pokryté (Garg a Gupta, 2009). Proto by měl odpadní materiál obsahovat optimálně 75 % vlhkosti, ale nikdy ne více jak 85 %. Je tedy potřeba pravidelně zabezpečovat vlhčení substrátu nejlépe kapkovou závlahou či přidávkem čerstvých surovin s vysokým obsahem vody, jako je ovoce a zelenina (Dominguez et al., 1997; Chaoui, 2010).

Vermikompostování vyžaduje oproti klasickému procesu kompostování až o 30 % více vlhkosti, pokles pod hranici 50 % je nežádoucí. V nedostatečně vlhkém prostředí jsou žížaly značně stresovány, dále se zde koncentrují **amonné soli** v hodnotách nad 5mg/g (0,5 %), které však zvýšenou závlahou z materiálu dokážeme vyplavit. Vyšší vlhkost žížalám přímo nevádí, avšak významně ovlivňuje průběh kompostovacího procesu. Dojde-li k zaplnění póru vodou v kombinaci se špatnou cirkulací vzduchu, žížaly nemají dostatek kyslíku a hynou. Vysoká vlhkost má za následek nežádoucí anaerobní procesy a tvorbu nepříjemného zápachu (Váňa, 2002; Garg and Gupta, 2009; Chaoui, 2010).

Přebytečná vlhkost by měla být odváděna perforovaným dnem jako výluh, který je velice účinný pro přihnojování květin a zeleniny během vegetace. Tato tekutina obsahuje značné množství biostimulátorů a je vhodné ji použít jako postřik např. u vinné révy. Výluh se používá zředěný, jinak by mohlo dojít ke spálení rostlin. Ideálně se používá jako 5 % roztok výluhu (Gómez-Brandón et al., 2012).

Substrát, ve kterém se žížaly pohybují, musí obsahovat dodatečné množství **kyslíku** a to nejméně 15 %, proto musí být tento materiál dostatečně porézní.

Maximální povolená koncentrace oxidu uhličitého v prostředí je do 6 % **CO₂** (Pižl V., 2002). Většina žížal je neutrofilních, jsou tak značně citlivé na **hodnotu pH**, optimálním je pro ně neutrální pH (6,5 - 7,5 pH), proto je nezbytně nutné kontrolovat pravidelně reakci kompostované směsi, která se během vermikompostovacího procesu často mění. Výkyvy mohou již v několika málo dnech zapříčinit úhyn žížal (Zajonc I., 1992; Pižl V., 2002; Garg and Gupta, 2009). Během počáteční fáze, kdy vzniká největší množství CO₂ a organické kyseliny, jsou hodnoty pH nižší, jak proces postupuje, pH stoupá v důsledku rozkladu proteinů (Garg and Gupta, 2009). V případě, že je substrát značně kyselý, doporučuje Kalina (2004) upravit jej neutralizací přídavkem mletého vápence v množství 0,7 kg na 1m³.

Kvalitu výsledného materiálu významně také ovlivňuje **poměr C:N** (ideálně 22:1). Obsah dusíku v materiálu poukazuje na dostatečnou zásobu bílkovin. Bílkoviny jsou nepostradatelné pro vývoj a rozmnožování žížal, avšak vysoký obsah dusíku vázaný v rychle se rozkládajících bílkovinách produkuje pro žížaly jedovaté látky, proto jeho vysoký obsah není nijak žádoucí a může při zvýšených koncentracích způsobit úhyn žížalí populace. Optimální obsah N v substrátu se pohybuje okolo 1 - 9 %. Při vysokých koncentracích substrát upravíme přídavkem materiálu, který obsahuje dostatek celulózy (plevy, krátká slámová řezanka, seno), naopak přídavkem slepičího trusu či jiných zvířecích výkalů obsah N

navýšíme (Zajonc, 1992). K méně významným faktorům prostředí, které se však za určitých podmínek mohou stát limitujícími pro přežití a vývoj žížal, lze zařadit – světelné (UV) záření, obsah CO₂, redox - potenciál půdy, utužení a texturu půdy (Pižl V., 2002).

Srovnání procesu kompostování a vermikompostování

Jednotlivé rozdíly mezi parametry pro klasické kompostování a proces vermikompostování shrnuje následující tabulka (tabulka č. 2).

Tabulka č. 2 Srovnání procesních parametrů kompostování a vermikompostování (upraveno dle Slejška, 1999)

		Kompostování	Vermikompostování
Počátek	Poměr C:N	30-35:1	20:1
	Optimální pH	6,0-8,0	6,5-7,5
	Min. obsah P (%)	0,2	
Průběh	Doba kompostování	2-3 měsíce	Léto 2-3 měsíce Zima 3-5 měsíců
	Vlhkost (%)	70	70 - 80 (min. 60 %)
	Teplota (°C)	50-60	18-25
	Obsah O ₂ v prostředí (%)	Min. 4 ⁶	15 ²
	Max. koncentrace CO ₂	17 ⁶	6 ²
	Výška zakládky (m)	4 ¹	0,6-0,8 ²
	Max. obsah čpavku (%)		0,1 ²
Po ukončení	Max. poměr C:N	30:1	30:1
	pH	6,0-8,5	6,0-8,5
	Vlhkost (%)	40- 65	40-65

3.3.5 Surovinová skladba

Celková skladba substrátu se značně liší co do skladby i obsahu látek a rozdílného pH či vlhkosti, ale i podle místa vzniku. Zásadní rozdíly lze zaznamenat v substrátu z domácností a ze zemědělské produkce (Zajonc, 1992; Sinha et al., 2008). Substráty z domácností obsahují jako hlavní podíl kuchyňský odpad, jako ovocné a zeleninové slupky, výlisky, čajové sáčky,

kávovou sedlinu, nadrcené skořápky a staré pečivo. Dále také obsahuje zahradní odpad s hlavním podílem sečené trávy a suchého listí, stonky, kůru, štěpku, rostlinný odpad, odpad z ovocných sadů, piliny a papírový karton.

Nevhodné jsou v tomto případě materiály obsahující vysoké množství soli (NaCl), maso a zbytky mastných jídel, tuk, mléčné výrobky, části uhynulých zvířat, cibule, čerstvé exkrementy domácích zvířat, čerstvá tráva a listí. Jako substrát nelze rovněž použít slupky z exotického ovoce jako je banán, pomeranč a ostatní citrusy obsahující zárodky plísní a zbytky pesticidů, které mohou ohrozit zdraví žížal (Kalina, 2004; Sinha et al., 2008).

Oproti tomu substráty vzniklé v zemědělství nejsou tak rozmanité, z velké části především obsahují různé druhy vyzrálého chlévského hnoje, kdy za nejkvalitnější považujeme hnůj koňský, ovčí a kravský. Nevhodný je pak trus drůbeže, který má značně kyselé pH a navyšuje hodnotu dusíku (Kalina, 2004).

Žížaly se živí především živinami bílkovinného charakteru (albumin, kasein, vaječný bílek a žloutek) a sacharidy (celulóza, škrob, sacharóza). Podstatná je i velikost částic přijímané potravy, u rostlinných zbytků mají mít částice méně než 0,5 mm² (Zajonc, 1992).

3.3.5.1 Jablečné výlisky

Jablečné výlisky neboli jablečná dřeň vznikají jako vedlejší produkt při lisování jablečné šťávy a tvoří tak objemově největší podíl odpadů z konzervářského průmyslu. Jde o směs dužniny, slupek, jádřinců a stopek z jablka, které tvoří asi 30 % podíl z jablka. Tato směs je často používána jako krmivo pro hospodářská zvířata a to v čerstvém stavu nebo sušeném. Jablečné výlisky jsou materiálem, který obsahuje velké množství zbytkových cukrů, dále doplňují do stravy zvířat hlavně vlákninu, minerální látky a působí také jako antioxidant (Mamma et al., 2009). Dalším způsobem zpracování tohoto odpadního materiálu je kompostování, které je ale velmi obtížné bez přídavku dostatečného množství nasávací složky a na dusík bohatší frakce. Výlisky z jablek totiž tvoří nestrukturní materiál o vlhkosti 65 - 85 % s poměrem C:N (30 - 40):1, kdy je nutné pro jeho lepší rozklad přidat řezanou slámu, drcenou révu a jiné sušší materiály. I při takto upravené zakládce však mohou nastat problémy s urovnáním profilu hromady a se zásobením vzduchem, hlavně v dolních vrstvách zakládky, kdy často dochází k úplnému utužení materiál a vzniku anaerobních podmínek, které jsou pro tento proces nežádoucí. Proto bývá v praxi podíl jablečných výlisků v zakládce nízký a to max. do 10 % (Zemánek a kol., 2010).

3.3.5.2 Matolina

Matoliny neboli výlisky z hroznů jsou ve své podstatě odpadní produkty z výroby vína, které vznikají během rozdrčení, odvodnění a lisování hroznů (Jin and Kelly, 2009). Jejich podíl z celkového množství zpracovávaných hroznů není nijak zanedbatelný, činí až 20 % (v závislosti na odrůdě, stupni zralosti, použitém lisovacím zařízení, počtu lisovacích cyklů aj.). Nejčastěji se matolina skládá z 50 % slupek, 25 % jader a 25 % stopek hroznů. Při výnosu hroznů 7,0 - 10,0 t.ha⁻¹ se jedná o množství 1,40-2,0 t.ha⁻¹ o objemové hmotnosti 150 - 180 kg.m⁻³. Poměr C:N čerstvé hmoty činí (45 - 48):1. Tento materiál se musí co nejdříve po vylisování zpracovat, velmi rychle totiž působením okolního vzduchu podléhá hnití a kvašení a tak k celkovému znehodnocení. Přímá aplikace na povrch pozemku a následné zaorání matolin se především pro nepříznivý poměr C:N nedoporučuje, dalším důvodem je také dlouhá doba rozkladu a klíčení jader. Matolina je charakteristická právě vysokým obsahem jader, která udávají strukturní a zrnitý charakter materiálu. Jádra obsahují řadu kyselin a silic, které omezují činnost mikroorganismů, způsobujících jejich rozklad. Pro dosažení požadovaného poměru C:N jsou přidávány komponenty ve formě slámy, znehodnoceného sena, prasečí kejdy. Samotné matoliny jsou velmi dobrým nasávacím materiálem právě pro kejdu či jiné tekuté odpady (Zemánek a kol., 2010). Běžně se matolina užívá k výrobě alkoholického nápoje Grappa, nebo se může zkrmovat hospodářským zvířatům a v poslední době je matolina stále více oblíbeným odpadním materiálem využívaným při kompostování (Jin and Kelly, 2009; Garg and Gupta, 2009).

3.4 Žížaly a jejich vliv na půdu

O žížalách lze jednoznačně tvrdit, že patří k našim nejvýznamnějším bezobratlým živočichům podílejícím se na tvorbě půdy a udržení její úrodnosti. Půdní prostředí ovlivňují především produkcí exkrementů a tvorbou velkého množství chodeb, čímž pozitivně působí na fyzikální vlastnosti půdy, jako je vodní režim, provzdušnění půdy (plynný režim) a pórovitost půdy, což napomáhá mikrobiální aktivitě a rozvoji mikrofauny (Pommeresche a kol., 2007; Sinha et al., 2010; Chaoui, 2010).

Půdy s velkým počtem žížal se vyznačují zrychlenou infiltrací vody do půdy a to až o 15 - 93 %, nejpatrnější je tento přínos v polních kulturách při použití bezorebných agrotechnik, půda je potom méně náchylná k podmáčení během zimních a jarních měsíců a zvýšený podíl

srážkové vody je tak rovnou přiváděn přímo ke kořenům rostlin. Následně je tak půda mnohem odolnější proti vlivům eroze. Činností žížal se navyšuje i vzdušná kapacita půdy o 8-30 % (Sinha et al., 2010). Chemicky půdu žížaly ovlivňují především zavlečením částečně rozložené organické hmoty z povrchu do hlubších vrstev půdy, kde je macerována a promísená s anorganickou frakcí, následný průchod hmoty trávicím systémem žížal obsahující značné množství mikroorganismů napomáhá k rychlejší a dokonalejší mineralizaci hmoty, dá se tedy tvrdit, že exkrementy mohou být považovány za centrum mikrobiální aktivity v půdě (Pommeresche et al., 2007).

3.4.1 Druhy žížal využívané pro vermikompostování v našich podmínkách

Žížaly patří mezi hermafrodity nesoucí samčí i samičí orgány (Sherman, 2003). Taxonomicky je řadíme do kmenu kroužkovci (*Annelida*), třídy opaskovci (*Clitellata*) a do podtřídy máloštětinatci (*Oligochaeta*), řádu *Opisthophora* (Pižl, 2002). Žížalí druhy je možné rozdělit podle způsobu a místa příjmu potravy na žížaly epigeické (povrchové), endogeické (15 cm hloubky) nebo anektické (1 m hloubky). Pro účely vermikompostování různých organických odpadů je široce využíváno především epigeických druhů žížal jež se vyznačují tím, že se přemísťují do míst s vysokým obsahem organické hmoty (Sherman, 2003; Ismail, 2005; Chaoui, 2010).

Na přeměně organického substrátu se v našich podmínkách podílí zejména dva druhy žížal a to **Žížala hnojní** (*Eisenia fetida*) a **Žížala kalifornská** (*Eisenia andrei*), které jsou příbuznými druhy z rodu *Lumbricidae*. Jsou z chovaných druhů nejvhodnější k interiérovému kompostování, neboť vyžadují pro svoji aktivitu vyšší teploty kolem 25 °C, dokáží tak rychle zpracovávat kompostovaný odpad a rychle se množit na rozdíl od ostatních volně žijících druhů vyskytujících se v našich podmínkách, které pro svůj vývoj potřebují mnohem nižší teploty. Jedinci obou volně žijících druhů se liší pouze malými morfologickými rozdíly znaků a to barvou a charakterem vylučované lymfy. Co se podmínek prostředí týče, mají oba tyto druhy přibližně shodné nároky. Avšak i přes podobnost těchto druhů není možné tyto druhy vzájemně křížit, jejich zkřížení vede ke vzniku neplodných a rozmnožování neschopných jedinců (Zajonc, 1992; Slejška, 1999; Kalina, 2004).

3.4.1.1 Žížala hnojní (*Eisenia fetida*)

Eisenia fetida je epigeický, celosvětově rozšířený druh žížaly vhodný pro proces vermikompostování a nejrůznější toxikologické studie. Dorůstá 5 - 8 cm a dosahuje 0,4 - 1,5 g tělesné hmotnosti. Žížala hnojní má krátký životní cyklus s vysokou reprodukční a regenerační schopností, kdy dospělí jedinci průměrně produkují jeden kokon každý třetí den s obsahem 1 - 3 vajíček. Celkově se žížaly tohoto druhu dožívají 1 - 2 let (Pommeresche et al., 2007; Garg and Gupta, 2009; Chaoui, 2010).

Ve volné přírodě se vyskytuje především v teplých oblastech Evropy (Francie, Itálie) a Malé Asie a to v listnatých i jehličnatých lesních společenstvech a silně zamokřených půdách, činností člověka se však rozšířila prakticky po celém světě. Tento druh se převážně živí rostlinnými zbytky, proto ho nejčastěji můžeme nalézt v menších hnojištích, hromadách kompostu, mokré rozkládající se slámě a smetištích s vyšším podílem organických zbytků. V samotné půdě vydrží jen krátce, protože má značné nároky na obsah organických látek ve svém prostředí (Zajonc, 1992; Pižl, 2002). *Eisenia fetida* dokáže zkonzumovat potravu o hmotnosti až 75 % svého těla za den.

Žížala hnojní nese na těle hnědočervené pruhy uprostřed jednotlivých článků těla (obr. 5), tyto pruhy se pravidelně střídají s tmavožlutými pruhy v mezičláňkových brázdách (Garg and Gupta, 2009; Pižl, 2002). Při podráždění vylučuje z hřbetního póru žlutavou páchnoucí tekutinu (Kalina, 2004). Teplotní optimum pro její vývoj a rozmnožování je v rozmezí 18 až 25 °C kdy při překročení této hranice 15 °C se zvyšuje její příjem potravy a urychluje rozmnožování. Života schopná je však do maxima 35 °C a minima 0 °C. Zimu v našich klimatických podmínkách překonává v hlubších vrstvách organických odpadů, kde se díky rozkladným procesům udržuje teplota nad kritickým bodem. Vetší problém jí činí letní období, kdy dochází k vysychání a přehřátí substrátů, proto je nezbytně nutné neustálé pravidelné ovlhčování, žížaly totiž potřebují k životu velké množství kyslíku a vlhkosti (75 %) která je přijímána přes jejich kůži (Chaoui, 2010).

Žížala hnojní je značně vlhkomilná a dokáže vydržet ve vodě až několik dní, pokud má dostatek kyslíku. Nejvhodnější je tedy substrát o 70-80 % vlhkosti. Pokles vlhkosti pod 60 % má za následek zpomalení růstu, příjmu potravy a poruchy rozmnožování. (Zajonc, 1992)

Obrázek č. 5. *Eisenia fetida*



Zdroj: www.natuga.de

3.4.1.2 Žížala červená kalifornská (*Eisenia andrei*)

Tento druh byl původně zastoupen zejména na území Francie, Itálie a v jižní a střední části Evropy. Jedná se o jednobarevný druh, tmavočerveného nebo světočerveného zabarvení (obr. 6). Při podráždění hřbetních pórů vylučuje pouze bezbarvou nezapáchající tekutinu (Pižl, 2002). Dorůstá 13 cm a váhy 0,2 - 1,0 g. Dospívá do šesti týdnů po vylíhnutí a dožívá se 2 až 4 let v závislosti na kvalitě prostředí. Jeden kokon může obsahovat 5 až 7 vajíček. Ideální teplota, pro jejich růst a rozmnožování je mezi 15 °C a 25 °C. V případě, že teplota klesne pod 10 °C nebo se začne zvyšovat nad 26 °C, jejich metabolismus a aktivita výrazně klesá. Při teplotách nad 32 °C kalifornské žížaly hynou stejně tak jako při teplotách pod bodem mrazu.

Obrázek č. 6. *Eisenia andrei*



Zdroj: www.natuga.de

Tento druh je specifický několika vlastnostmi oproti žížale hnojní a to především tím, že zpracovává organický materiál mnohem rychleji, množí se mnohem rychleji, dožívá se výrazně vyššího věku, prokazuje značné migrační chování a jedná se o striktního pojídače pouze organické odumřelé hmoty závislého na velkém množství potravy. Kalifornské žížaly je

tedy vhodné chovat na zpevněné ploše nebo v izolovaném vermikompostéru (Pšenička, 2009).

3.5 Přežívání termotolerantních koliformních bakterií v kompostech

Cílem práce je posoudit vliv žížal na přežívání mikroorganismů během vermikompostovacího procesu. Za zdravotně závadné se považují především skupiny bakterií, které způsobují onemocnění lidí, zvířat a rostlin. Bakterií, které jsou rizikem pro životní prostředí a zdraví člověka je velké množství, a proto se tato práce zabývá pouze vybranými bakteriemi z řady termotolerantních koliformních bakterií a především kmenem *Escherichia coli* (dále jen *E. coli*).

Komposty ze živočišných produktů jsou velmi často hlavním zdrojem patogenních mikroorganismů jako je *E. coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* a jiné. Zemědělské využívání takovýchto kompostů představuje vážnou hrozbu související s přechodem patogenních organismů do životního prostředí. Některé z těchto kmenů bakterií jsou silně rezistentní na antibiotika a jejich geny rezistence mohou být předány do půdní mikrofauny. Tyto kmene se poté stávají velice odolnými a nebezpečnými. Pro omezení přenosu patogenů do životního prostředí je nezbytně nutné zabezpečit nejrůznější metody hygienizace (Skowron et al., 2015). Při kompostování je nejběžnější metodou pro snížení množství patogenních organismů, zajištění vhodných podmínek pro průběh termofilní fáze po dostatečně dlouhou dobu. Dále k potlačení patogenů přispívá umělé navýšení poměru C:N, například přidávkem starého sena, pilin, slámy anebo již vyzrálého kompostu, čímž vytváří zóny pro aerobní termofilní rozklad. Zvláštním faktorem je čpavek, který se podle některých studií jeví jako stresor urychlující pokles *E. coli* a *Salmonella* spp. v rané fázi kompostování. Celkové řízení procesu jako je způsob skladování, aerace má také podstatný vliv na účinnost snížení hladin patogenů a zajištění biologické bezpečnosti výsledného produktu (Millner et al., 2014; Skowron et al., 2015).

Některé studie potvrzují pokles fekálních koliformních bakterií a *Salmonella* spp. i během procesu vermikompostování (Eastman et al., 2002). Během vermikompostování organického odpadu dochází k interakci epigeických druhů žížal a detritických mikrobiálních společenstev, které vedou k poklesu počtu některých potenciálně patogenních mikroorganismů (Monroy et al., 2009).

Exkrementy vyprodukované žížalou poskytují mikroorganismům v půdě a kompostech organický substrát, a tím značně podporují jejich pohyb a aktivitu (Williams et al., 2006). Žížaly dokáží počty patogenních mikroorganismů ovlivnit přímo i nepřímo při průchodu přes jejich trávicí trakt. Mezi přímé účinky lze zařadit mechanické narušování, enzymatické trávení a biologické přeměny látek při požití a rozměňování potravy ve svalnatém žaludku. Dále se počty patogenů výrazně sníží pomocí mikrobiální inhibice antimikrobiálními látkami nebo pomocí mikrobiálních antagonistů produkovaných ve střevech a v tělních dutinách žížal. Stimulace endemických nebo jiných mikrobiálních druhů činností žížal vedoucí ke konkurenci a antagonismu s patogeny a celkové působení obrany imunitního systému žížal rodu *Eisenia* (buněčná obrana fagocytózou) ředíme mezi nepřímé účinky ovlivňující množství patogenů ve výsledném produktu vermikompostování (Lores et al., 2006; Monroy et al., 2009).

Nejen žížaly se mohou podílet na redukcí bakterií a plísní a nepřímo tak napomáhat ke snížení koncentrace patogenů v kompostech. Přirozené půdní mikroorganismy a prvoci se podílí na poklesu patogenních organismů formou predace. Puri et al. (2010) zjistil, že komposty vyrobené ze statkových hnojiv se běžně používají jako hnojivo k rostlinám a slouží jako možný vektor pro přenos *Escherichia coli* O157: H7 na čerstvé ovoce a zeleninu. Předpokládá, že původní mikrobiální společenstva přítomná v kompostu nepříznivě ovlivní přežití *E. coli* O157: H7. *Escherichia coli* O157: H7 byla v suspenzi inokulována do kompostu a inkubována při 25 °C. Po 16 dnech inkubace byla zjištěna redukce o 4 řády. Když byl kompost navíc doplněn přidáním cyklohexinem poklesl počet *E. coli* O157: H7 po 16 dnech jen minimálně. Analýza mikrobiálních společenstev přítomných v kompostu (DGGE) vykazala malé rozdíly ve změně plísňových komunit přítomných v kompostu upraveném cykloheximidem. Ve srovnání s kompostem bez přídavku cyklohexinu, který byl inkubován po dobu 12 dní při teplotě 25 °C. Nicméně, analýza DGGE na prvoky ukázala drastické rozdíly ve druhovém složení. Také sekvenční analýza ukázala, významně odlišné druhové složení populací prvků mezi inkubovanými a kontrolními vzorky v různých časech. To naznačuje, že predace ze strany prvků může být potenciálním mechanismem pro snížení *E. coli* O157: H7 v kompostovaných materiálech.

3.5.1 Termotolerantní koliformní bakterie

Jedná se o bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, definované jako gramnegativní tyčinky (G-) netvořící spory. Rostou za aerobních i anaerobních podmínek a mají negativní

cytochromidázový test, jsou schopné zkvašovat laktózu při 42 ± 2 °C do 48 hodin za doprovodné tvorby kyseliny a plynu. Bakterie ze skupiny termotolerantních koliformních bakterií jsou přirozenou, hojně se vyskytující složkou střevního traktu člověka. Tato skupina bakterií slouží především k identifikaci fekálního znečištění. Ke kontaminaci prostředí dochází nejčastěji prostřednictvím exkrementů živočichů, a to zejména u povrchové vody, půdy a následně u podzemních zdrojů pitné vody (Veger a Baudišová, 1996).

Mezi hlavní zástupce termotolerantních koliformních bakterií řadíme především kmeny uvedeny v následujících kapitolách.

3.5.1.1 *Escherichia coli* spp.

Jedná se o bakterie přirozeně se vyskytující ve střevech lidí a zvířat. Mnohé kmeny *Escherichia coli* (dále jen *E. coli*) jsou nepatogenní a jsou nezbytnou součástí zdravého střevního traktu. Některé však způsobují onemocnění, zejména ta průjmová, infekce močových cest, onemocnění dýchacích cest a plic. Rizikovou skupinou jsou zejména děti, senioři a lidé s oslabenou imunitou. Nejvýznamnějším patogenním kmenem z hlediska onemocnění *E. coli* je kmen 0157:H7.

***Escherichia coli* 0157:H7** je střevní bakterií mnoha druhů zvířat a je spojována se vznikem závažných nákaz po celém světě. Infikované zvíře obvykle vylučuje $10^2 - 10^5$ KTJ/g trusu, infekční dávka pro člověka je velmi malá, stačí pozřít méně jak 10 buněk této bakterie, aby došlo k onemocnění. U lidí tento kmen způsobuje nejčastěji krvácivá průjmová onemocnění a selhání ledvin. Nakazit se člověk může fekálně-orální cestou při konzumaci špatně očištěné nebo tepelně neupravené zeleniny, která rostla v půdě kontaminované touto bakterií. Další riziko představuje čerstvé mléko a nedostatečně tepelně zpracované maso koz, ovcí a skotu, který je velmi často právě zdrojem a přenašečem infekce *E. coli* 0157:H7, avšak sám nemusí vykazovat žádné příznaky tohoto onemocnění. Komposty zahrnující odpady živočišného původu jsou častým místem vzniku patogenní bakterie *E. coli* 0157:H7. Přežívání a pohyb *E. coli* 0157:H7 v půdě a kompostech je znepokojující vzhledem k lidskému zdraví, protože tento kmen bakterie dokáže v půdě přežít velmi dlouhou dobu. Je navíc i velice odolný působení vysokých teplot při kompostovacích procesech, tyto vysoké teploty dokážou zničit bakterie *E. coli* 0157:H7 pouze za předpokladu, že trvají dostatečně dlouhou dobu (Williams et al., 2006).

Jelikož žížaly tvoří centrální část biologického společenstva u většiny zemědělsky obhospodařovaných půd, může tak jejich pohyb půdním profilem (substrátem) nepřímo zapříčinit šíření fekálních indikátorových organismů a patogenů v tomto prostředí. Také díky výluhu, který odtéká ze systému vermikompostování může docházet k šíření těchto patogenů, avšak dlouhodobé přežití patogenu *E. coli* 0157:H7 nijak žížaly nepodporují (Eastman et al., 2002; Williams et al., 2006).

3.5.1.2 *Enterobacter* spp.

Typickým zástupcem rodu *Enterobacter* je ***Enterobacter cloacae***, který je po *E. coli* druhým nejčastějším zástupcem čeledi *Enterobacteriaceae* v lidské střevní mikroflóře. Významným zástupcem tohoto rodu je také ***Enterobacter arogenes***, který je považován za tzv. oportunní patogen způsobující infekce ran. V přírodě je tento druh široce rozšířen ve sladké vodě, v půdě, splaškách, odpadech, na zelenině a jiných rostlinách, v lidských a zvířecích fekáliích. Může vyvolat infekci močových cest a respiračního ústrojí nebo meningitidu. Dále je značně nebezpečný pro imunitně oslabené jedince a pacienty u kterých dokáže zapříčinit vážné infekční onemocnění ran a popálenin. Celý rod *Enterobacteriaceae* je považován za nebezpečné nozokomiální patogeny (Veger a Baudišová, 1996).

3.5.1.3 *Klebsiella* spp.

Je rozšířena po celém světě, zejména v tropických a subtropických oblastech a to ve všech typech prostředí jako je půda, vegetace, voda, zvířata, lidská stolice a také na ovoci, zelenině a obilí. Jedná se o důležitý oportunistický patogen napadající především jedince se sníženou imunitou v nemocničním prostředí (Kumar et al., 2013).

Nejvýznamnějším patogenem toho rodu je ***Klebsiella pneumoniae*** žijící převážně ve střevech, ústní dutině a horních cestách dýchacích, ale je možné ji nalézt i na povrchu kůže a v okolním prostředí, protože se chová jako roztoč. Je jednou z hlavních příčin vzniku pneumonie (zánětu plic) a močových infekcí především u oslabených jedinců a u novorozenců, kterým způsobuje meningitidy a sepse (Veger a Baudišová, 1996).

3.5.1.4 *Citrobakter* spp.

Jedná se o bakterie, které jsou součástí normální střevní mikroflóry lidí a zvířat. Nejčastější výskyt je ve stolici, moči, ale i jiných tělních orgánech, dále také v půdě, vodě, splaškách, potravinách a vnějším prostředí. Klinický význam mají především druhy ***Citrobakter freundii*** (oportunní patogen) a ***Citrobakter diversus*** způsobující nejčastěji infekce močových cest a krevního řečiště, abscesy mozku, sepse břišní dutiny, zápal plic a novorozeneckou meningitidu. Nejčastěji postihuje právě děti do dvou let věku, avšak byly zaznamenány i případy u dospělých jedinců s oslabenou imunitou (Abbott, 2007).

3.5.1.5 *Serratia* spp.

Tento rod je velmi snadno rozpoznatelný od ostatních rodů enterobakterií a je tedy nejlépe prozkoumaným rodem. Vyskytuje se v půdě, vodě, na povrchu rostlin a i na spoustě jiných míst vnějšího prostředí. Dále je možné ho nalézt v trávicím traktu hlodavců a u hmyzu. Zástupcem tohoto rodu ***Serratia marcescens*** je oportunním lidským patogenem hospitalizovaných pacientů, kterým způsobuje infekce močových cest a septikémii. U zvířat, především u krav způsobuje bakteriální onemocnění vemene (mastitidu) a jiné živočišné infekce. Druh ***Serratia ficaria*** dobře roste již při 30 - 37 °C a ohrožuje fíkovníky, které byly oplozeny infikovanou včelou. ***Serratia forticola*** je rozšířena převážně ve vodním prostředí (Veger a Baudišová, 1996).

4 MATERIÁLY A METODIKA

Cílem této práce bylo zjistit, jaký vliv na přežití termotolerantních koliformních bakterií a především *Escherichia coli* (dále jen *E. coli*) má proces vermikompostování. Za účelem tohoto pozorování byl založen laboratorní experiment, ve kterém byly použity dva druhy surovin, matolína a jablečné výlisky. Ve sledovaném procesu vermikompostování byly použity výhradně žížaly rodu *Eisenia*. Na základě mikrobiologického rozboru surovin bylo rozhodnuto o jejich sterilizaci a následné inokulaci části materiálu přesně stanoveným množstvím a směsí sledovaných indikátorových organismů *E. coli* o celkovém počtu $2,1 \cdot 10^7$ KTJ/g a termotolerantních koliformních bakterií o celkovém počtu $6,1 \cdot 10^8$ KTJ/g. Inokulace byla provedena dne 9. 11. 2015 a jde tedy o počátek pokusu.

Pro splnění cílů práce byl pokus uspořádán dle následujících variant:

- Nádoba obsahující substrát bez žížal a bez přídatku indikátorových organismů.
- Nádoba obsahující substrát bez žížal ale s přídatkem známého počtu indikátorových organismů.
- Nádoba obsahující substrát s přídatkem 2,5 g žížal rodu *Eisenia* a s přídatkem známého počtu indikátorových organismů.
- Nádoba obsahující substrát s přídatkem 2,5 g žížal rodu *Eisenia* ale bez přídatku indikátorových organismů.

Varianty bez inokulace sloužily především jako kontrola. Rozbor takto připravených vzorků a záznam získaných dat byl proveden v období od 9. 11. 2015 do 4. 1. 2016, vždy v dvoutýdenním intervalu. Pro hodnocení výsledků byly použity platné dále použité metodiky.

4.1 Postup práce

Pro naplnění cílů práce bylo pokus nutné rozčlenit do několika kroků:

1. Vermikompostování
2. Příprava materiálu pro laboratorní pokus
3. Laboratorní stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *E. coli*

4.1.1 Vermikompostování

Příprava výchozího substrátu pro laboratorní pokus proběhla v listopadu 2015 ve výzkumné stanici FAPPZ v Červeném Újezdu. Jako základní surovina pro pokus byla zvolena matolína a jablečné výlisky. Tyto materiály byly předrozloženy pomocí žížal v dvoupatrových plastových vermikompostérech značky *Worm Factory* o rozměrech 40 x 40 x 18 cm. Jednotlivé misky měly perforované dno s otvory o velikosti 4 mm, které byly ještě překryty geotextilií pro optimalizaci vlhkosti a provzdušnění. Na geotextilii byl postupně vrstven biologicky rozložitelný odpad spolu se substrátem od firmy *Ekoverms*.

Obrázek č. 7. a 8. Předrozložený substrát (matolína a jablečné výlisky)



Zdroj: Archiv autorky

Tento substrát obsahoval žížaly rodu *Eisenia* (obr. 9) v poměru 200 jedinců na 1 litr substrátu. První patro bylo naplněno 10 litry substrátu a druhé jen 5 litry stejného substrátu. Aby se zamezilo vyschnutí substrátu, byla každá miska ještě zavlažena vodou. Větrání místnosti s vermikompostéry zabezpečovaly ventilátory nastavené na interval větrání 15 minut ráno a večer. Teplota v místnosti byla konstantně 25 °C. Po celou dobu pokusu se navíc v místnosti svítilo, aby se zamezilo migraci žížal mezi substráty. Jednou za týden byla provedena kontrola substrátu a jednou za 14 dní byl doplněn čerstvý biologický materiál.

Obrázek č. 9. Žížaly rodu *Eisenia*



Zdroj: Archiv autorky

4.1.2 Příprava materiálu pro laboratorní pokus

Z každého vermikompostu byl odebrán po dvou měsících substrát pro mikrobiologický rozbor. Každý z těchto substrátů byl smísen v poměru 75 % předrozloženého materiálu (obr. 7. a 8.) z vermikomposteru a doplněn o 25 % čerstvého materiálu. Takto připravený materiál posloužil pro naplnění preformovaných nádobek (obr. 11. a 12.) o objemu 125 ml, kdy do každé z těchto nádobek bylo naváženo přesně 50 g substrátu. Podle schéma pokusu (tab. 3) byly vybrané nádobky doplněny o 2,5 g žížal a některé byly inokulovány suspenzí o známém počtu mikroorganismů (tab. 4), aby mohl být posouzen vliv žížal na redukci počtu bakterií.

Obrázek č. 10. a 11. Perforované nádobky



Zdroj: Archiv autorky

Takto upravené nádoby byly umístěny do nádoby s pískem, kterým byly zahrnuty až po okraj pro udržení optimální vlhkosti. Celá nádoba s pískem byla na víc ještě zakryta geotextilií pro zajištění co nejstabilnějšího prostředí. Nádoba byla navíc vybavena kapkovou závlahou a umístěna v místnosti s konstantní teplotou 20 °C. Odběr vzorků z jednotlivých nádobek probíhal podle schéma pokusu (tab. 3).

Tabulka č. 3. Schéma pokusu 11/2015 až 1/2016:

<u>nádob. č.</u>	<u>materiál</u>	<u>spikování</u>	<u>žížaly</u>	<u>analýza</u>
1	matolina	NE	NE	23. 11. 2015
2	matolina	NE	ANO	23. 11. 2015
3	matolina	TKB, <i>E. Coli</i>	NE	23. 11. 2015
5	matolina	TKB, <i>E. Coli</i>	ANO	23. 11. 2015
10	jabl. výlis	NE	NE	23. 11. 2015
11	jabl. výlis	NE	ANO	23. 11. 2015
12	jabl. výlis	TKB, <i>E. Coli</i>	NE	23. 11. 2015
14	jabl. výlis	TKB, <i>E. Coli</i>	ANO	23. 11. 2015
19	matolina	NE	NE	7. 12. 2015
20	matolina	NE	ANO	7. 12. 2015
21	matolina	TKB, <i>E. Coli</i>	NE	7. 12. 2015
23	matolina	TKB, <i>E. Coli</i>	ANO	7. 12. 2015
28	jabl. výlis	NE	NE	7. 12. 2015
29	jabl. výlis	NE	ANO	7. 12. 2015
30	jabl. výlis	TKB, <i>E. Coli</i>	NE	7. 12. 2015
32	jabl. výlis	TKB, <i>E. Coli</i>	ANO	7. 12. 2015
37	matolina	NE	NE	21. 12. 2015
38	matolina	NE	ANO	21. 12. 2015
39	matolina	TKB, <i>E. Coli</i>	NE	21. 12. 2015
41	matolina	TKB, <i>E. Coli</i>	ANO	21. 12. 2015
46	jabl. výlis	NE	NE	21. 12. 2015
47	jabl. výlis	NE	ANO	21. 12. 2015
48	jabl. výlis	TKB, <i>E. Coli</i>	NE	21. 12. 2015
50	jabl. výlis	TKB, <i>E. Coli</i>	ANO	21. 12. 2015
55	matolina	NE	NE	4. 1. 2016
56	matolina	NE	ANO	4. 1. 2016
57	matolina	TKB, <i>E. Coli</i>	NE	4. 1. 2016
59	matolina	TKB, <i>E. Coli</i>	ANO	4. 1. 2016
64	jabl. výlis	NE	NE	4. 1. 2016
65	jabl. výlis	NE	ANO	4. 1. 2016
66	jabl. výlis	TKB, <i>E. Coli</i>	NE	4. 1. 2016
68	jabl. výlis	TKB, <i>E. Coli</i>	ANO	4. 1. 2016

4.1.2.1 Přehled použitých bakterií

Pro inokulaci sledovaných materiálů byly použity bakterie uvedené v následující tabulce.

Tabulka č. 4. Spikovací suspenze:

<i>E. coli</i>	$2,1 \cdot 10^7$	<i>Escherichia coli</i>	CCM 3954
TKB	$6,1 \cdot 10^8$	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SZÚ 6121
		<i>Enterobacter eboaceae</i>	CCM 1903
		<i>Serratia marcescens</i>	CCM 4224
		<i>Citrobakter freundii</i>	SZÚ 5852

4.1.3 Laboratorní stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *E. coli*

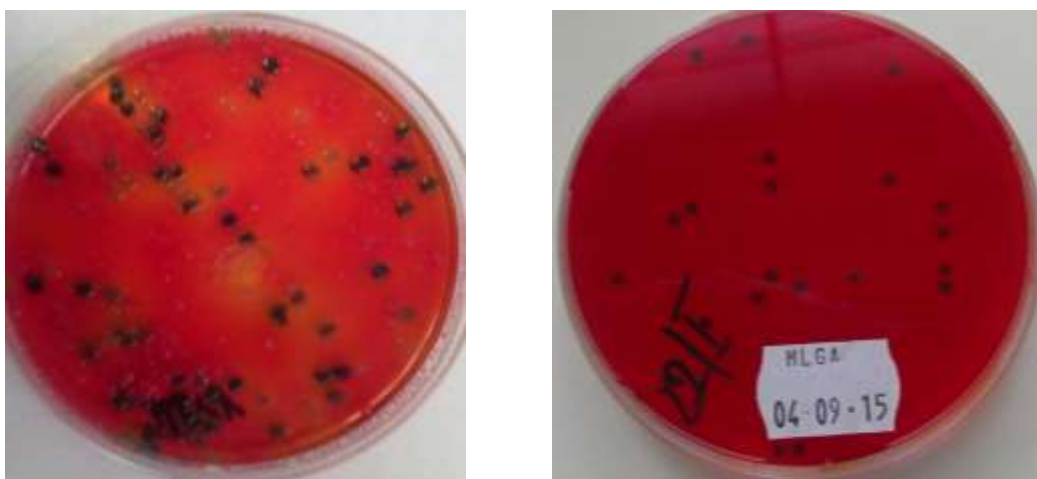
Byla použita metoda přímého výsevu na povrch kultivačního media, která slouží ke stanovení počtu termotolerantních koliformních bakterií (dále jen TKB) a *E. coli* ve vzorcích kalů, sedimentů, upravených bioodpadů, komunálních odpadů, kompostů, písku z pískovišť, zemin, stavebních materiálů, organominerálních hnojivech, substrátech a rašelinách. Principem této metody je zachycení mikroorganismů obsažených v analyzovaném vzorku na povrchu m-FC agaru po kultivaci při teplotě $43 \pm 0,5$ °C během 18 - 24 hodin. Jako TKB jsou vyhodnoceny všechny tmavě modré kolonie (obr. 12. a 13.) narostlé na povrchu tohoto typu agaru. Počty takto vyhodnocených kolonií se vyjadřují v KTJ/ 1 g vzorku nebo sušiny vzorku. Jako *E. coli* jsou vyhodnoceny zeleno-modré kolonie narostlé na MLGA agaru (obr. 14. a 15.) po stejných podmínkách kultivace.

Obrázek č. 12. a 13. Modré kolonie TKB narostlé na m-FC agaru



Zdroj: Archiv autorky

Obrázek č. 14. a 15. Zeleno - modré kolonie *E. coli* narostlé na MLGA agaru



Zdroj: Archiv autorky

Výše popsaná metoda sestává z několika základních kroků, které jsou provedeny v průběhu tří po sobě následujících dnů. V rámci prvního dne se provádí příprava vzorku, příprava suspenze a desetinasobného ředění a poté přímý výsev na povrch m-FC agaru pro stanovení celkového počtu TKB a na MLGA agar pro stanovení *E. coli*.

Obrázek č. 16. Ředění a přímý výsev na povrch agarových ploten



Zdroj: Archiv autorky

Takto připravené Petriho misky se kultivují v termostatu při teplotě $43 \pm 0,5$ °C po dobu 18-24 hodin. Následující den je proveden odečet kolonií, které narostly na agarových plotnách. V případě potřeby se z každé m-FC plotny se odebere 5 suspektních kolonií pro confirmaci a přeočkují se na živný agar pro potvrzení přítomnosti *E. coli*. Takto připravené plotny se opět

inkubují při teplotě $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ po dobu dalších 18 - 24 hodin a vyrostlé kolonie se podrobí konfirmačním testům na zjištění produkce indolu a pozitivní β -glukoronidázu. Poslední den následuje vyhodnocení počtů kolonií a přepočet na KTJ/ 1 g vzorku nebo sušiny vzorku.

5 VÝSLEDKY

V práci byly hodnoceny výsledky vermikompostovacího procesu a vliv trávícího systému žížal rodu *Eisenia* na snížení patogenů u dvou vstupních rostlinných substrátů (jablečné výlisky a matolina). V celkovém rozsahu 8 týdnů byla provedena analýza 32 vzorků, které byly umístěny do zvláštních perforovaných nádobek. Polovina vzorků sledovaného materiálu vždy obsahovala přírůstek $2,1 \cdot 10^7$ KTJ/g indikátorových organismů *E. coli* a $6,1 \cdot 10^8$ KTJ/g termotolerantních koliformních bakterií.

Variety bez inokulace sloužily jako kontrola. Rozbor takto připravených vzorků a záznam získaných dat byl proveden v období od 9. 11. 2015 do 4. 1. 2016 vždy v dvoutýdenním intervalu. V počátečním substrátu (kontrola) byly navíc stanoveny ještě celkové počty mikroorganismů rostoucích při 30 °C (CPM), aby mohl být zároveň posouzen i vliv vlastního procesu kompostování. V matolině byla zjištěna hodnota CPM $9,4 \cdot 10^6$ KTJ/g a u jablečných výlisků $1,2 \cdot 10^7$ KTJ/g CPM. Společně se sledováním průběhu změn patogenů byly sledovány i změny počtů žížal u jednotlivých vzorků (graf č. 5, 6 a 9, 10). Konkrétní výsledky experimentu jsou shrnuty v následujícím textu.

Tabulka č. 5 Výsledky sledování redukce *E. coli* (KTJ/g)

Substrát	žížaly/ bez žížal	kompost*	9. 11. 2015	23. 11. 2015	7. 12. 2015	21. 12. 2015	4. 1. 2016
MATOLINA	bez žížal	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	žížaly (2,5 g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	bez žížal	<1	$2,1 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^4$	$6,3 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^2$	<1
	žížaly (2,5 g)	<1	$2,1 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^3$	$7,9 \cdot 10^2$	<1	<1
JABLEČNÉ VÝLISKY	bez žížal	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	žížaly (2,5 g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	bez žížal	<1	$2,1 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^2$	<1
	žížaly (2,5 g)	<1	$2,1 \cdot 10^7$	$3,0 \cdot 10^3$	$4,5 \cdot 10^1$	$2,2 \cdot 10^1$	<1

*předrozložený materiál pro vermikompostování

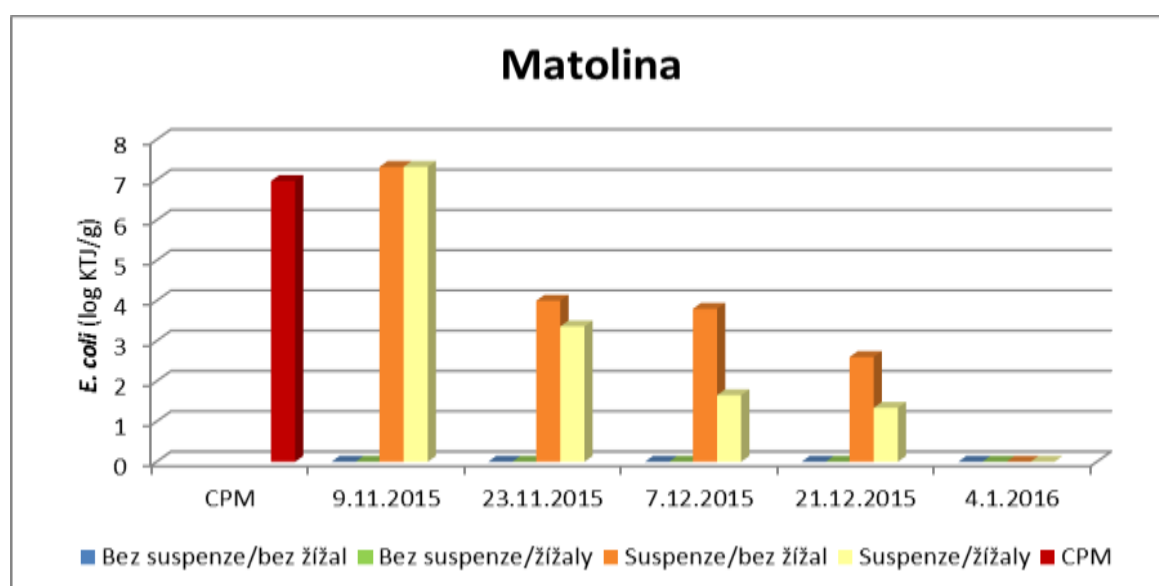
5.1 Sledování přežívání *E. coli* v procesu vermikompostování

Patogenní bakterií rodu *E. coli* bylo v rámci pokusu inokulováno celkem 16 nádobek - 8 nádobek s matolinu a 8 nádobek s jablečnými výlisky. U stejného počtu nádobek inokulace provedena nebyla a tato skupina vzorků sloužila pouze jako kontrola. Podle tab. 5 je tedy zřejmé, že v intervalu vždy dvou týdnů byl proveden rozbor čtyř inokulovaných vzorků a čtyř neinokulovaných vzorků pro každý druh substrátu (celkem 4x matolina a 4x jablečné výlisky). Dva vzorky vždy obsahovaly přídavek 2,5 g žížal (suspenze/ žížaly) a do dalších žížaly přidány nebyly (suspenze/ bez žížal). Stejný postup byl proveden i u kontrolní skupiny bez inokulace – (bez suspenze/ žížaly) a (bez suspenze/ bez žížal).

5.1.1 Matolina

Rozbor předrozloženého substrátu neprokázal přítomnost sledované bakterie *E. coli*. Varianty suspenze/ žížaly a suspenze/ bez žížal byly na počátku pokusu uměle inokulovány suspenzí o známém počtu bakterií rodu *E. coli* na hodnotu $2,1 \cdot 10^7$ KTJ/g. Již po dvou týdnech vermikompostování došlo k výraznému poklesu počtu bakterií *E. coli* o několik řádů. Konkrétně u matoliny typu suspenze/ žížaly klesly počty na $2,3 \cdot 10^3$ KTJ/g a u nádobky obsahující suspenzi/bez žížal na $1,0 \cdot 10^4$ KTJ/g. V následujících týdnech počty bakterie *E. coli* stále klesaly.

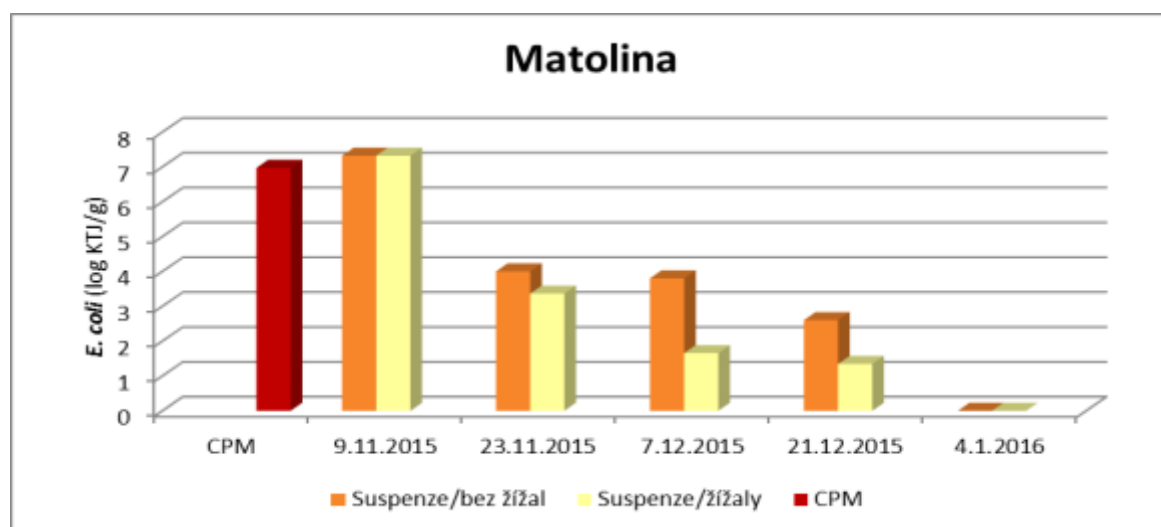
Graf č. 1 Sledování poklesu počtů *E. coli* při vermikompostování matoliny



9.11.2015 je dnem inokulace, tedy počátek pokusu

Z výše uvedených výsledků je možné konstatovat, že u sledovaného druhu substrátu mohly mít žížaly vliv na urychlení průběhu redukce počtu bakterií *E. coli*. Oproti tomu skupina vzorků suspenze/ bez žížal prokázala redukci počtu bakterií *E. coli* s pozvolnějším poklesem (graf č. 1). Po 8 týdnech vermikompostování se pokles sledovaných indikátorových organismů zcela vyrovnal a došlo tedy k úplné eliminaci bakterií *E. coli* u obou sledovaných variant (graf č. 2).

Graf č. 2 Sledování průběhu poklesu *E. coli* v inokulovaném vzorku matoliny



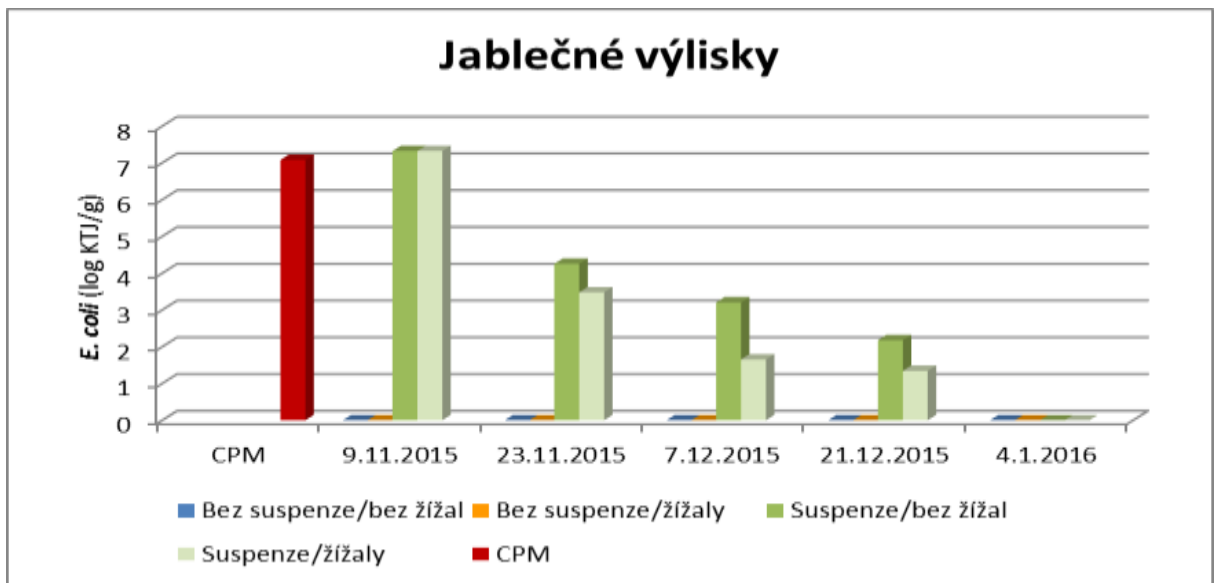
9.11.2015 je dnem inokulace, tedy počátek pokusu

5.1.2 Jablečné výlisky

Výsledky jsou popsány v tabulce 5 a graficky zpracovány v grafu 3 a 4. U jablečných výlisků, varianty s inokulovanými bakteriemi a žížalami (suspenze/ žížaly) se snížily počty sledovaných indikátorových organismů v druhém týdnu na $3,0 \cdot 10^3$ KTJ/g. Ve vzorcích typu suspenze/ žížaly se snížily na hodnotu $1,8 \cdot 10^4$ KTJ/g. Následující vývoj byl téměř totožný jako u výše zmíněného popisu redukce počtu bakterií *E. coli* u rostlinného substrátu matolina.

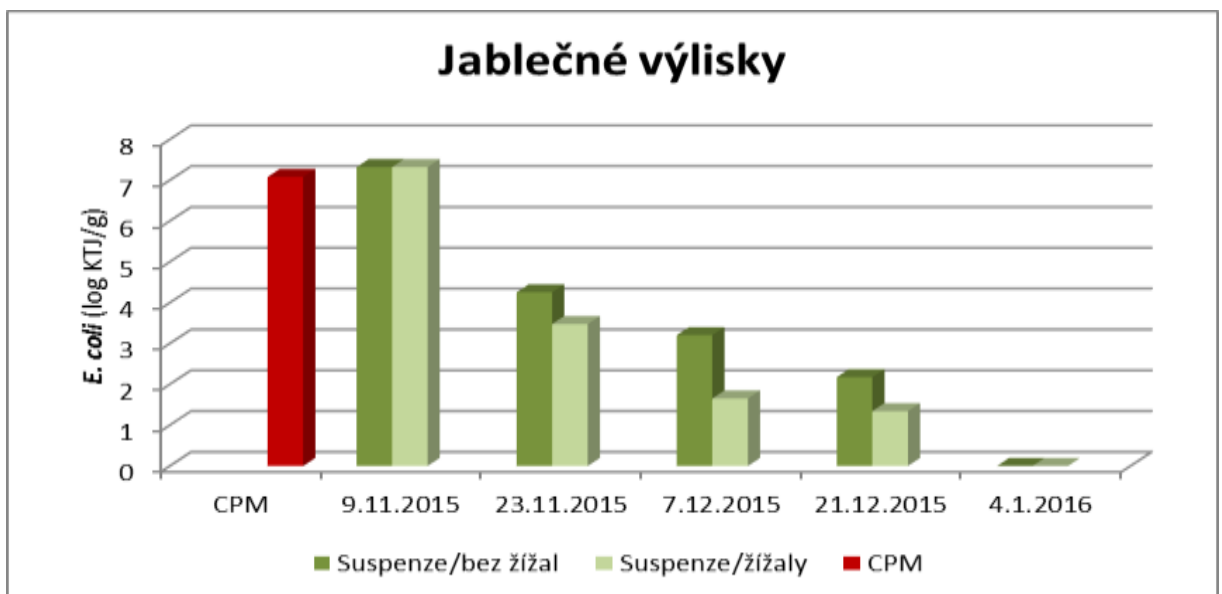
Získané výsledky v tomto případě opět ukazují na možný vliv žížal, který se projevil na urychlení redukce počtu bakterií *E. coli*. U varianty, kde žížaly přidány nebyly a redukci počtů ovlivnil hlavně samotný proces kompostování, je zřejmé, že redukce postupovala pomaleji, nicméně po 8 týdnech došlo stejně jako u varianty se žížalami k naprostému vymizení sledovaných patogenů.

Graf č. 3 Sledování poklesu počtů *E. coli* při vermikompostování jablečných výlisků



9.11.2015 je dnem inokulace, tedy počátek pokusu

Graf č. 4 Sledování průběhu poklesu *E. coli* v inokulovaném vzorku jablečných výlisků



9.11.2015 je dnem inokulace, tedy počátek pokusu č.

5.2 Sledování přežívání TKB v procesu vermikompostování

Suspenzí s obsahem termotolerantních koliformních bakterií bylo také inokulováno celkem 16 nádobek - 8 nádobek s matolinou a 8 nádobek s jablečnými výlisky. Do všech nádobek typu suspenze/ žížaly a suspenze/ bez žížal bylo tedy přidáno inokulum o známém počtu indikátorových organismů o celkové hodnotě $6,1 \cdot 10^8$ KTJ/g vzorku. U stejného počtu

nádobek inokulace provedena nebyla a tato skupina vzorků byla založena jako kontrolní - (bez suspenze/ bez žížal a bez suspenze/ žížaly). Ve výchozím substrátu byly stanoveny celkové počty mikroorganismů (CPM), aby mohl být zároveň posouzen i vliv vlastního procesu kompostování:

- matolina $9,4 \cdot 10^6$ KTJ/g
- jablečné výlisky $1,2 \cdot 10^7$ KTJ/g.

V tabulce 6 jsou uvedeny jednotlivé výsledky redukce počtů sledovaných bakterií a podrobný přehled pokusů.

Tabulka č. 6 Výsledky sledování redukce termotolerantních koliformních bakterií (KTJ/g)

Substrát	žížaly	kompost*	9. 11. 2015	23. 11. 2015	7. 12. 2015	21. 12. 2015	4. 1. 2016
MATOLINA	bez žížal	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	bez žížal	<1	$6,1 \cdot 10^8$	$5,9 \cdot 10^4$	$2,9 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^4$
	žížaly (2,5 g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	žížaly (2,5 g)	<1	$6,1 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^5$	$7,2 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^3$
JABLEČNÉ VÝLISKY	bez žížal	<1	<1	$7,9 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^3$	$7,7 \cdot 10^2$	<1
	bez žížal	<1	$6,1 \cdot 10^8$	$5,4 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^5$	$2,9 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^4$
	žížaly (2,5 g)	$1,8 \cdot 10^5$	<1	$2,5 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	$4,3 \cdot 10^2$
	žížaly (2,5 g)	$1,8 \cdot 10^5$	$6,1 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^4$

*předrozložený materiál pro vermikompostování

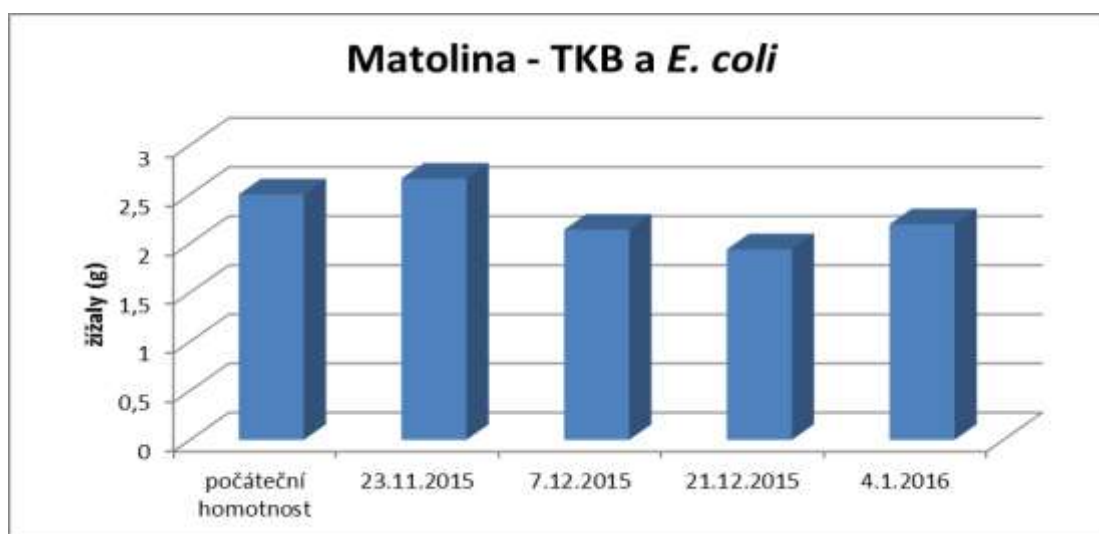
5.2.1 Matolina

Při rozboru předrozloženého substrátu určeného pro tento pokus nebyly nalezeny žádné termotolerantní koliformní bakterie. Varianty suspenze/ žížaly a suspenze/ bez žížal byly doplněny o přídavek inokula s obsahem termotolerantních koliformních bakterií o celkové hodnotě $6,1 \cdot 10^8$ KTJ/g. V průběhu druhého týdne experimentu došlo u těchto variant k výrazné redukci počtu sledovaných patogenů.

Počty bakterií TKB ve variantě suspenze/ žížaly se snížily během druhého týdne o tři řády na hodnotu $3,1 \cdot 10^5$ KTJ/g a nadále pozvolně klesaly až na konečnou hodnotu $1,3 \cdot 10^3$ KTJ/g.

Počty ve variantě suspenze/bez žížal v druhém týdnu klesly na hodnotu $5,9 \cdot 10^4$ KTJ/g a do konce pokusu se snižovaly velmi pozvolna na $4,2 \cdot 10^4$ KTJ/g. Jedinou odchylkou ve sledovaném trendu byla hodnota $2,9 \cdot 10^5$ KTJ/g naměřená v průběhu čtvrtého týdne u varianty suspenze/bez žížal, která vykazala mírný nárůst. Tento mírný nárůst mohl být způsobený v důsledku pomnožení sledovaných bakterií, avšak pravděpodobnější je, že výsledek byl zkreslen v důsledku nepřesností při analýze vzorku.

Graf č. 5 Změny hmotnosti žížal v inokulovaném substrátu

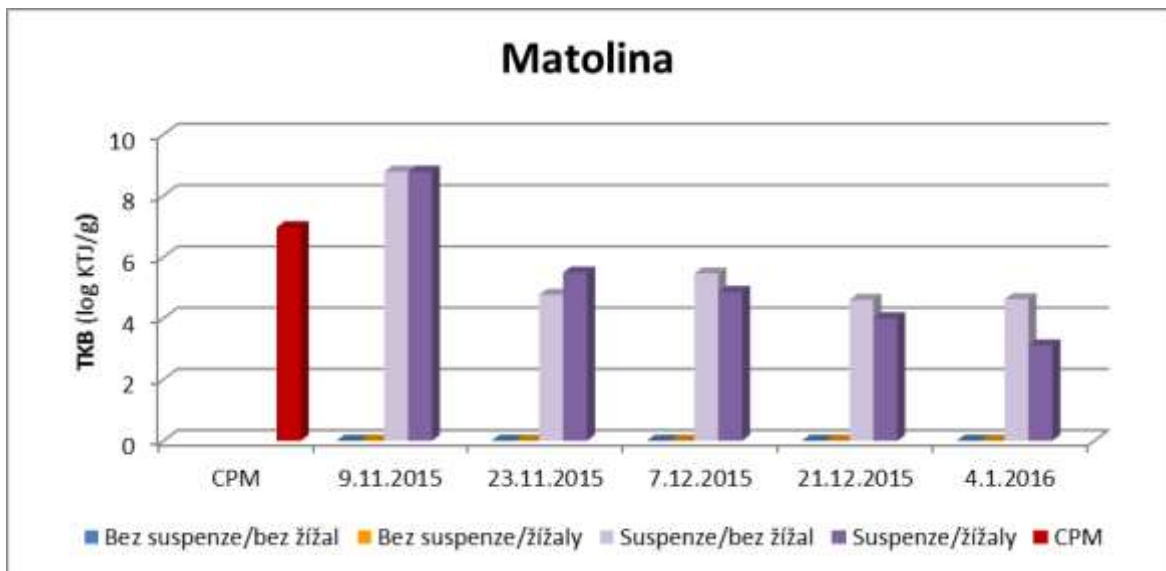


Přítomnost a změny v hmotnosti žížal byly během pokusu sledovány jak v baňkách s inokulací, tak i bez inokulace (graf č. 5 a 6), kdy se substrát matolina prokázal jako méně příznivý pro dlouhodobý vývoj žížal. Na této skutečnosti se mohly podílet, nevhodný poměr vlhkosti substrátu a také nedostatek substrátu, který by mohly žížaly během pokusu konzumovat. Tento fakt potvrzují následující grafická znázornění, kdy optimální podmínky pro vývoj žížal byly zřejmě jen po dobu dvou týdnů, kdy žížaly vykazaly nárůst hmotnosti.

Graf č. 6 Změny hmotnosti žížal v neinokulovaném substrátu

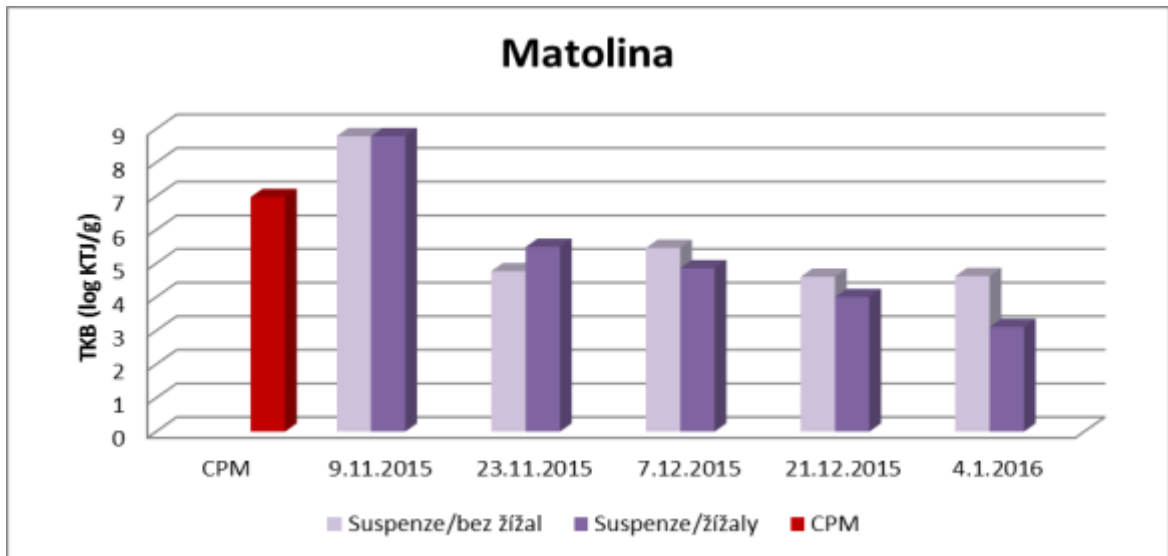


Graf č. 7 Sledování poklesu počtů TKB při vermikompostování matoliny



9.11.2015 je dnem inokulace, tedy počátek pokusu

Graf č. 8 Sledování průběhu poklesu TKB v inokulovaném vzorku matoliny

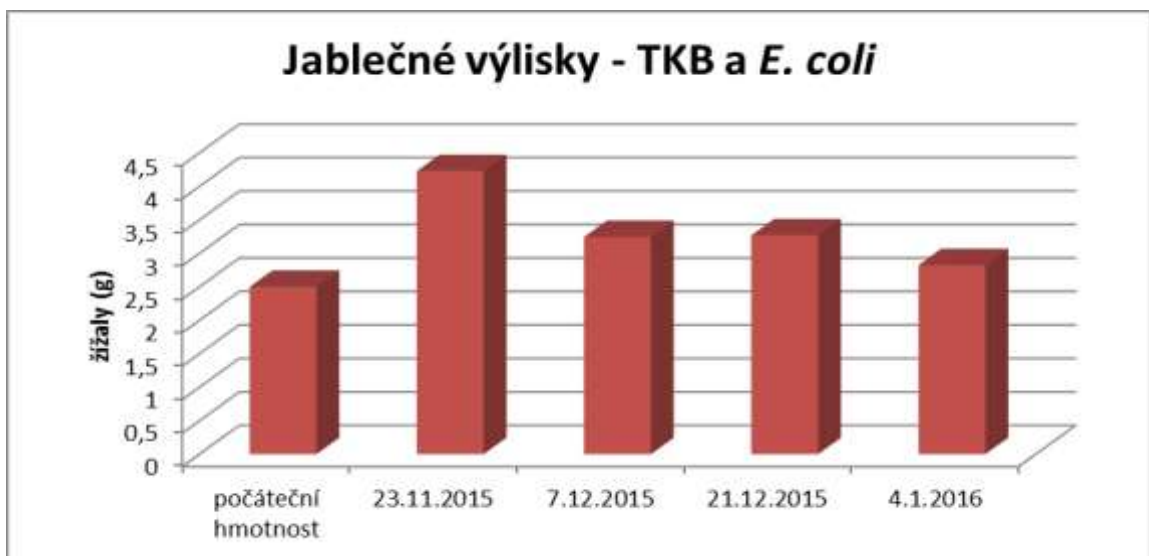


9.11.2015 je dnem inokulace, tedy počátek pokusu

5.2.2 Jablečné výlisky

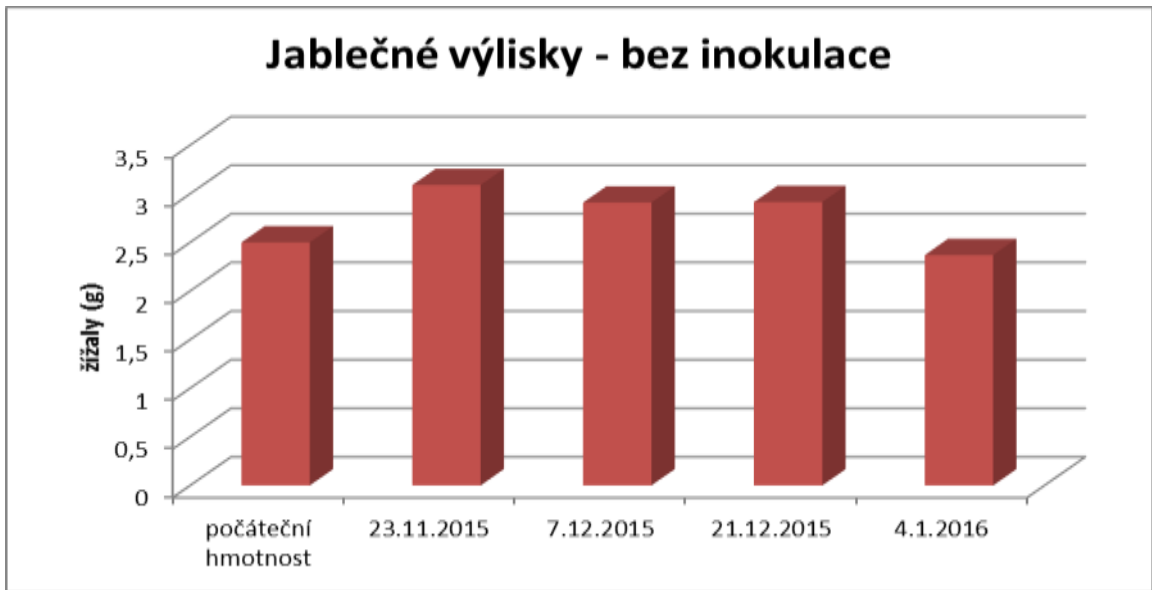
Při rozboru samotného substrátu byla stanovena hodnota CPM $1,8 \cdot 10^5$ KTJ/g. Varianty suspenze/ žížaly a suspenze/ bez žížal byly inokulovány suspenzí o známém počtu TKB o celkové hodnotě $6,1 \cdot 10^8$ KTJ/g. Druhý týden pokusu se počty sledovaných indikátorových organismů vždy redukovaly o několik řádů – varianta suspenze/bez žížal na $5,4 \cdot 10^6$ KTJ/g a varianta s přidavkem žížal dokonce na $2,5 \cdot 10^5$ KTJ/g. V dalších týdnech už jen mírně klesaly, ale úplné eliminace TKB nebylo dosaženo ani po 8 týdnech.

Graf č. 9 Změny hmotnosti žížal v inokulovaném substrátu



Průběh redukce počtu TKB u jablečných výlisků koresponduje s průběhem výskytu žížal v baňkách (graf č. 9 a 10), kdy k největší redukci sledovaných bakterií došlo při nejvyšším nárůstu žížal. Na základě této skutečnosti lze uvažovat o možném vlivu metabolismu žížal na sledovaný patogen.

Graf č. 10 Změny hmotnosti žížal v neinokulovaném substrátu

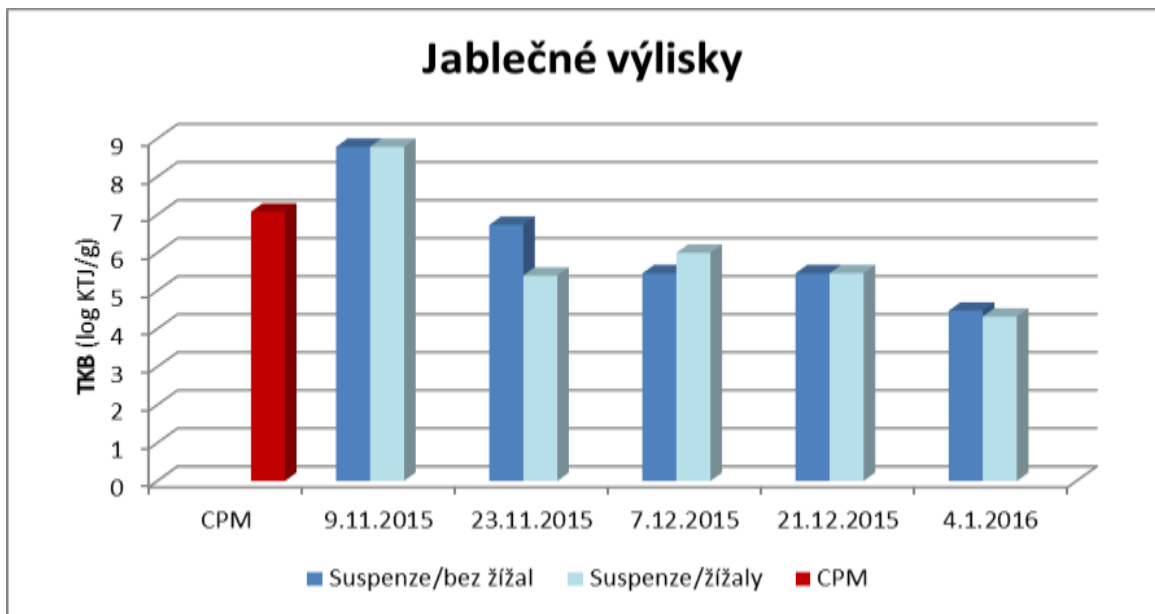


Graf č. 11 Sledování poklesu počtů TKB při vermikompostování jablečných výlisků



9.11.2015 je dnem inokulace, tedy počátek pokusu

Graf č. 12 Sledování průběhu poklesu TKB v inokulovaném vzorku jablečných výlísků



9.11.2015 je dnem inokulace, tedy počátek pokusu

6 DISKUZE

Komposty vyrobené z odpadních produktů velmi často mohou být zdrojem patogenních mikroorganismů převážně bakterií *Escherichia coli* (dále také *E. coli*) spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. a jiných. Aplikace takového kompostu na zemědělskou půdu představuje vážnou hrozbu rozšiřování patogenních organismů do životního prostředí a potravního řetězce. I když většina potenciálních lidských patogenů je procesem kompostování inaktivována, zůstává zde stále velké riziko, že tyto patogeny, které představují riziko pro lidské zdraví, zůstanou přítomny v konečném produktu a tedy i v půdě.

Na problematiku sledování přežívání patogenů se zaměřila studie Franceschini et al. (2016), ve které bylo posouzeno přežívání patogenních organismů rodu *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* (dále jen *L. monocytogenes*), *Escherichia coli* a *Aspergillus fumigatus* v různých typech kompostů. Bylo hodnoceno celkem patnáct evropských kompostů, vyrobených z různých druhů odpadu a různými procesy. Tyto komposty byly hodnoceny pomocí molekulárních a kultivačních technik. Střevní bakterie byly zjištěny pomocí molekulární metody u osmi z patnácti kompostů, nicméně životaschopné buňky byly potvrzeny pro *L. monocytogenes* pouze u dvou kompostů, a pro *E. coli* u dalších tří kompostů.

Ze studie Franceschini et al. (2016) a dalších autorů (viz. kap 3.5) je jasné, že patogeny mohou přežívat proces kompostování. Některé z kmenů bakterií dokáží být navíc rezistentní vůči antibiotikům a jejich geny rezistence se mohou přenášet na půdní mikrofaunu. Takové kmeny se poté stávají velice odolnými a nebezpečnými. Pro omezení přenosu těchto patogenů do životního prostředí je nezbytně nutné zabezpečit výrobu kompostů, tak aby v nich probíhala účinná hygienizace (Skowron et al., 2015).

Toto platí hlavně pro výrobu kompostů ze statkových hnojiv. Toth et al. (2011) při laboratorních pokusech zjistili, že statková hnojiva, která nejsou vhodně hygienizována mohou obsahovat patogenní organismy po dobu 6 až 10 měsíců a při jejich aplikaci na půdu a vstupu do životního prostředí mohou tedy představovat značné riziko pro lidi a životní prostředí. Jedním ze způsobů hygienizace by mohlo být právě vermikompostování.

Vermikompostování se podle studií (Aira et al. 2011) jeví jako vhodná technologie pro zpracování různých druhů odpadů, při kterém dochází k redukcím patogenních organismů a navíc i k produkci na živiny bohatého konečného produktu (vermikompostu)

Hlavní překážkou pro rozšíření vermikopostování jako alternativy zpracování organických odpadů je v současné době nedostatek informací o vlivu, který tento proces má na snížení patogenů. Na základě nedostatku těchto informací a ve snaze zjistit detaily působení vermikompostovacího procesu na redukce počtů patogenních organismů vznikla právě tato diplomová práce, která zaměřena na sledování dvou skupin patogenů a to na TKB a *E. coli*. V průběhu řešení bylo zjištěno, že proces eliminace sledovaných patogenů ovlivňuje velké množství rozdílných faktorů, které na sebe významně působí. Byly to: koncentrace a druh patogenů, délka pokusu kompostování, pH, vlhkost, poměr C:N, druh substrátu a proces předkompostování.

6.1 Koncentrace a druh patogenu

Mnoho studií prokázalo, že vermikompostováním je opravdu možné dosáhnout bezpečné hladiny patogenů (Aira et al., 2007; Monroy et al., 2009; Aira et al., 2011; Erickson et al., 2015; Fu et al., 2016).

Je obecně známo, že zvýšením původní mikrobiální biomasy může docházet k nárůstu teploty nebo k antagonismu mezi patogeny a půdní mikroflórou. Lze se tedy domnívat, že navýšením původní mikroflóry v důsledku probíhajícího kompostovacího procesu je redukce patogenů významně ovlivněna.

Koliformní bakterie se vyskytují jako přirozená součást půdní mikroflóry a střevního prostředí většiny teplokrevných živočichů, proto je jejich přítomnost v životním prostředí spojována se zdroji fekálního znečištění. Z tohoto důvodu jsou používány jako indikátor možného výskytu enteropatogenů (Rompré et al. 2002). Nejen přítomnost v životním prostředí, ale i v zemědělských produktech a vodě představuje potenciální hrozbu a proto má jejich sledování zvláštní význam v procesu vermikompostování (Smith, 2001). Vliv koncentrace a druhu patogenu na jejich redukci během kompostování a vermikompostování se zabývalo několik autorů (Smith, 2001; Eastman et al., 2002; Aira et al., 2007, Aira et al., 2011; Puri et al. 2010; Monroy et al., 2009; Edwards et al., 2010; Hait et al., 2011).

V této diplomové práci jsme při sledování redukce počtu patogenů TKB (tabulka č. 6), zjistili, že redukce těchto patogenů probíhá pomaleji, než u bakterií *E. coli*. U matoliny je z grafického znázornění (graf č. 8) patrný o něco rychlejší průběh poklesu koncentrace TKB (KTJ/g) s přidavkem žížal než tam, kde přítomny vůbec nebyly. Pokles koncentrace TKB u jednotlivých variant s anebo bez žížal byl u jablečných výlisků téměř vyrovnaný (graf č. 12).

Pouze ve 2. a 4. týdnu pozorování došlo pravděpodobně ke konkurenci (žížaly x mikroorganismy kompostovacího procesu) vlivem možné změny procesních podmínek (změna pH, vlhkosti, NH₃ aj.) (graf č. 9).

Fu et al. (2016) je také toho názoru, že žížaly mohou podstatně usnadnit a urychlit stabilizaci organických materiálů úpravou mikrobiální aktivity a navýšením celkové mikrobiální biomasy již v počáteční fázi vermikompostování. Ve své studii, prostřednictvím které se snažil ověřit toto tvrzení, zkoumal vermikompostování peletovaného odvodněného kalu (PDS). Tento materiál byl zkoumán v rámci dvou degradačních systémů a to s a bez zapojení žížal *Eisenia fetida*, obdobně jako v naší studii. Po 60 dnech experimentu, byl u varianty se zapojením žížal získán relativně stabilní produkt s nízkým obsahem organické hmoty a vysokým obsahem dusičnanů a fosforu. V počáteční fázi procesu činnost žížal opravdu způsobila navýšení mikrobiální biomasy, čímž urychlila rozklad substrátu, ale po té se snížily hodnoty bakteriálních a plísňových společenství.

Mikroorganismy jsou navíc důležitou součástí stravy žížal, již dříve bylo prokázáno, že žížaly mohou eliminovat plísně a bakterie. Tím, že se žížala selektivně živí různými druhy plísní tak usnadňuje ve své podstatě stabilizaci organických odpadů a napomáhá tak nepřímo k rychlejší redukci patogenů. Složení mikrobiální komunity a počty mikroorganismů přítomných v žížalím střevě obecně závisí na druhu žížaly, druhu a množství substrátu, který pozřela a také na ročním období a režimu přikrmování (Levelle and Spain, 2001). Vlivem metabolismu žížal na mikroorganismy se zabýval i Edwards et al. (2010), který jasně prokázal, že složení druhů půdních mikroorganismů a jejich aktivita se výrazně mění při průchodu střevy žížal.

Změny ve složení druhů bakterií a plísní (hub) během vermikompostování rostlinných odpadů při různých vývojových fázích *Eisenia foetida*, byly zkoumány ve studii Huang et al. (2013). V pokusech byly bakterie stanovovány analýzou extrahované bakteriální 16S rDNA a plísňové 18S rDNA s kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a denaturační gradientovou gelovou elektroforézou (DGGE). Po 60 dnech kompostování, byly výrazně sníženy hodnoty mikrobiální činnosti a koncentrace plísní v konkurenčních produktech získaných pomocí žížal oproti kontrolní (bez žížal). PCR-DGGE snímky ukázaly, že vermikompostování výrazně mění složení bakteriálních a plísňových společenství. V kontrole (bez žížal), převládaly bakterie kmene *Firmicutes*. V kompostech se žížalami byly přítomné bakterie kmene *Bacteroidetes* a *Aktinomycet*, plísně (houby) *Sordariomycetes*. Kromě toho,

byly z vermikompostu izolovány i některé užitečné druhy bakterií a plísní působící proti patogenům.

Monroy et al. (2009). Ve své studii zjistil, že v průběhu vermikompostovacího procesu různých typů organických odpadů dochází k přirozeným interakcím mezi detritickými mikrobiálními společenstvy a epigeickými druhy žížal. Tyto interakce mohou vést ke změnám mikrobiální biomasy a činnosti související se změnami ve struktuře mikrobiální komunity a v konečném důsledku může tento efekt významně ovlivnit pokles počtu některých potenciálně patogenních mikroorganismů (Monroy et al., 2009). I když jsou tyto interakce velmi důležité, existuje bohužel jen velmi málo dostupných informací, popisujících působení tohoto mechanismu na lidské patogeny (Eastman et al., 2002).

Námi zjištěné výsledky, které jsou znázorněny v grafech č. 1, 5, 7, 11 a shrnuty v tabulkách č. 5 a 6. jsou také v souladu s uvedenými autory i s výsledky práce Aira et al. (2011), který ve své práci studoval, zda vermikompostování v kontinuálně plněném reaktoru, je schopno snížit patogenní zátěž z kravského hnoje při aplikaci různých dávek tohoto materiálu. Aira et al. (2011) zjistil, že účinek *E. andrei* na patogeny se především projevil na druhu patogenu a jeho vstupní koncentraci. Koncentrace klostridií a některých koliformních bakterií nebyla snížena, ale koncentrace fekálních enterokoků, termotolerantních koliformních bakterií a *E. coli* byly sníženy na požadovanou úroveň. Z grafu č. 1 a tabulky č. 5 jasně vyplývá, že v našem případě došlo k podobnému efektu pro *E. coli*. *E. coli* byla při vermikompostování matoliny snížena z počáteční koncentrace $2,1 \cdot 10^7$ KTJ/g na <1 KTJ/g už v 6. týdnu pozorování a u jablečných výlisků (graf č. 3) byla *E. coli* ze stejné počáteční koncentrace snížena na $2,2 \cdot 10^1$ KTJ/g, avšak pokles TKB, který graficky znázorňuje graf č. 7, 11 a tabulka č. 6, nevykázal po 8 týdnech tak vysokou redukci. Došlo k redukci patogenů z původní koncentrace $6,1 \cdot 10^8$ KTJ/g na $2,1 \cdot 10^4$ KTJ/g u jablečných výlisků a u matoliny byl sledován pokles po 8 týdnech na hodnotu $1,3 \cdot 10^3$ KTJ/g. Výsledky diplomové práce potvrzuje i studie Edwardse et al. (2015), kde bylo zjištěno, že ve většině sledovaných případů počet enterobakterií při průchodu střevy žížal poklesl. Edwards (2010) dále uvádí, že některé studie s *Lumbriculus rubellus* prokázaly, že problém je poměrně složitější a různé druhy mikroorganismů se nechovají stejně, čímž se ukazují velmi rozdílné změny v redukci při průchodu střevy. Dle uvedené studie bylo prokázáno, že u *E. coli* byly sníženy koncentrace (stejně jako v našich pokusech) a naopak u *Enterobacter cloacae* zůstali téměř neměnné.

6.2 Substrát a jeho vlastnosti

V diplomové práci pro vermikompostování byly použity dva substráty rostlinného charakteru, matolína a jablečné výlisky. Těchto substrátů bylo přidáno v čerstvé formě 25 % již k předrozloženému materiálu té samé suroviny (75 %). V případě vermikompostování těchto substrátů došlo k úplné redukci *E. coli* (graf č. 2 a 4) během 8 týdnů. Při vermikompostování matoliny a jablečných výlisků ale nedošlo k úplné redukci TKB (graf č. 8 a 12) za stejné časové období. U jablečných výlisků bylo zaznamenáno ve čtvrtém týdnu dokonce i jejich pomnožení (graf č. 11). Zároveň bylo zjištěno, že současně v této době došlo ke snížení hmotnosti (a tím i jejich množství) žížal (graf č. 9). Faktorem, který se na těchto změnách podílel (nárůst TKB a redukce žížal) je s největší pravděpodobností vliv vlhkosti. Je to patrné z grafů č. 6 a 7, které znázorňují nárůst žížal. Po dvou týdnech vermikompostování u matoliny došlo k poklesu hmotnosti žížal, a tím byla zřejmě ovlivněna i redukce patogenů. Lze to vysvětlit vysycháním matrice (matoliny) a tím sníženou vlhkostí (viditelné pouhým okem). Oproti tomu druhá matrice (jablečné výlisky) poskytovala optimálnější vlhkoštní podmínky a to se pozitivně projevilo i na nárůstu žížal v tomto substrátu a celkově na rychlejším průběhu redukce sledovaných patogenů.

Dalším faktorem, kterým lze vysvětlit stimulaci patogenů, mohl být zvýšený obsah humátů vznikajících při vermikompostování, který také dokáže výrazně ovlivnit složení druhů mikroorganismů a jejich aktivitu. Tuto skutečnost potvrzuje ve své studii Hartenstein (1978), který přezkoumal všechny dostupné důkazy stimulace endemických bakterií prostřednictvím aktivity žížal rodu *Eisenia fetida*. V experimentu, který provedl Pramanik et al. (2008) byly tři mikrobiální kmeny naočkovány do dvou různých organických odpadů a byl pozorován jejich vliv na obsah huminových kyselin, aktivitu fosfatázy a mikrobiální vlastnosti konečného stabilizovaného produktu. Výsledky experimentu naznačují, že vermikompostování zvyšuje obsah huminových kyselin a aktivitu fosfatázy kyseliny v organických substrátech a v přítomnosti mikrobiální biomasy. Dále také zvyšuje rychlost humifikační a enzymatické aktivity. Uvažovaná stimulace může vést k distribuci patogenů cestou konkurenčních anebo antagonistických interakcí. Kromě uvedeného zdůvodnění se nabízí další skutečnost, a to, že možná stimulace mikrobiologické aktivity prostřednictvím žížal je spojena s různými procesy jako jsou změny fyzikální struktury půdy, zvýšení povrchového napětí a úprava pH. Tyto parametry jsou rozhodující pro posouzení a řízení celého procesu vermikompostování, proto

je opravdovým nedostatkem, že sledování změn těchto parametrů do našeho pokusu nebylo zahrnuto. Změřeny byly pouze hodnoty pH u vstupního substrátu, kde pro matolinu bylo pH stanoveno na 6,6 a pro jablečné výlisky 7,2. Vzhledem k tomu, že se měření těchto parametrů neprovádělo po celou dobu pokusu, není možné vliv pH, změny fyzikální struktury půdy či, zvýšení povrchového napětí ani potvrdit ani vyloučit.

Redukce patogenů může také být ovlivněna vznikajícím amoniakem a jeho koncentrací. Amoniak je považován podle studií Millner et al., (2014) a Skowron et al.,(2015) za zvláštní faktor, který se chová jako stresor působící na urychlení poklesu počtu *E. coli* a *Salmonella* spp. v rané fázi kompostování. Z uspořádání našeho pokusu není jasné, zda se mohl amoniak na redukcii sledovaných patogenů podílet, ale jeho vliv také nelze zcela vyloučit.

6.3 Faktory ovlivňující průběh procesu vermikompostování a jeho vlivu na redukcii patogenů

Z výsledků uvedených v kapitole 5.1 a 5.2 této práce vyplývá, že samotný vliv žížal není jednoznačný. Z výsledků v tabulkách č. 5 a 6 bylo zjištěno, že žížaly měly vliv na redukcii *E. coli* u obou sledovaných substrátů. U TKB měly žížaly také zřejmě vliv na urychlení procesu redukce, ale pouze u matoliny (graf č. 5 a 7). Z tohoto grafického znázornění je dobře patrné, že žížaly mohly proces redukce patogenů urychlit. U jablečných výlisků byl pozorován menší vliv žížal než u matoliny (graf č. 9 a 11). Podle Dvořáka a kol., (2013) přežití žížal v prostředí závisí na její schopnosti rozpoznat a eliminovat potenciální patogeny, tedy opět závisí na druhu patogenu, u kterého dojde k redukcii.

Erickson et al. (2015). v rámci své práce zkoumal optimální nastavení minimální hustoty žížal nebo maximální míry fluktuace materiálu (hmotnostní poměr žížal: organickému odpadu). Dospěl k závěru, že hmotnostní poměr 1:10 a rychlost obratu 1 kg materiálu za den na kg žížal je ideálním poměrem. Hait et al. (2011) na základě svých pozorování konstatuje, že podmínky životního prostředí podstatně ovlivňují hustotu osazení žížal a mají tak výrazné účinky na průběh vermikompostovacího procesu. Optimální hustota osazení vermikultur je 0,5-2,0 kg m² (optimálně 0,5 kg m²) a pro vermikompostování je to 2.0-4.0 kg m² (optimálně 3.0 kg m⁻²). Poznatky Ericksona et al. (2015) jsou v souladu s možným závěrem z našich pokusů, že snížení hmotnosti žížal má za následek nárůst patogenů (graf č. 5) u matoliny. V našem případě byl ideální poměr 50 g substrátu 2,5 g žížal.

Tento poměr byl stanoven jako optimální na základě dlouhodobých pozorování a je v souladu s doporučenou hodnotou dle Hait et al. (2011).

Vliv žížal ovšem není jednoznačný, protože na vermikompostování se podílí mnoho dalších faktorů, jak bylo již dříve uvedeno v této diplomové práci a pracích Ericksona et al. (2015).

Výsledky Edwardse et al., (2011) nepřímo potvrzují i výsledky naší studie. Z výsledků sledování přežívání termotolerantních koliformních bakterií v procesu vermikompostování (tabulka č. 6) je patrné, že na redukcii počtu patogenních mikroorganismů neměl trávicí systém žížal rodu *Eisenia* tak výrazný vliv jako samotný proces kompostování. Vzhledem k tomu, že počáteční substrát obsahoval vysoké počty celkových mikroorganismů (bez sledovaných indikátorových organismů), lze se domnívat, že na poklesu patogenů ve vzorcích měl vliv především narůstající počet a diverzita jednotlivých druhů organismů a v neposlední řadě jejich podíl na kompostovacím procesu samotném (možná zvýšená teplota, pH a nedostatek substrátu). Toto potvrzuje i studie Kleina et al. (2011), ve které bylo sledováno chování vybraných patogenů (*Escherichia coli*, *Clostridium perfringenes*, enterokoků, koliformních bakterií, bakterií *Listeria monocytogenes* a *Campylobacter jejuni*) během kompostování chlévské mrvy a hnoje a během jejich uskladnění. Bylo zjištěno, že na přežívání uvedených patogenů mělo vliv velké množství rozličných parametrů. Kromě teploty a poměru C:N byl zjištěn vliv druhu matrice (chlévká mrva, hnůj, slepičí kejda apod.) a pH. Vliv podmínek na kompostování byl studován několika autory (Edwards et al., (2011); Hait et al., 2011; Klein et al., 2011; Erickson et al., 2015; Skowron et al., 2015). Na základě výsledků mé diplomové práce je také možné konstatovat, že na změně počtu patogenů se podílely i jiné faktory než jen činnost žížal.

S výskytem žížal, jejich přežíváním a rozmnožováním souvisí jednoznačně i vliv teploty. Vyšší teplota (nad 55 °C) napomáhá hygienizaci, ale neprospívá žížalám. V případě, že dojde ke zvýšení teploty během počátku rozkladné fáze vermikompostování, může dojít k výraznému pomnožení všech mikroorganismů. Tuto skutečnost potvrzuje graf č. 6 a tabulka č. 6, ze které je patrné, že prostřednictvím vzrůstající teploty během počátku rozkladné fáze vermikompostování došlo k výraznému pomnožení těchto mikroorganismů, což poukazuje na menší procento vlhkosti substrátu v dalších týdnech pokusu (patrná souvislost s již diskutovanou vlhkostí). Tato skutečnost mohla nepříznivě ovlivnit další vývoj žížal a

mikroorganismů, což se v konečném důsledku mohlo projevit na pomalejším průběhu procesu kompostování. Jednoznačný vliv žížal na redukci bakterií nemůžeme považovat za prokazatelný, protože stejné redukce bylo dosaženo i v nádobkách, kde žížaly přítomny nebyly.

V rámci naší práce bylo zjištěno, že přítomnost žížal má tendence ke snížení počtu sledovaných termotolerantních koliformních bakterií, avšak z grafického znázornění (graf č. 7 a 8) je patrné, že ani po 8 týdnech k celkové redukci nedošlo. Nicméně když budeme posuzovat vliv odděleně, tak v nádobkách kde byly žížaly přidány, došlo k rychlejší redukci počtů TKB, než kde žížaly přítomny nebyly. Pro úplnou průkaznost jakým způsobem se na redukci podílela přítomnost a aktivita žížal by bylo ale vhodné délku pokusu o několik týdnů prodloužit a pokus několikrát opakovat.

Monroy et al. (2008) také v rámci své studie sledoval účinky žížal rodu *E. fetida* na snížení celkového počtu koliformních bakterií. Zjistil, že aktivita žížal výrazně přispívá ke snížení celkového počtu koliformních bakterií pouze při nízkých dávkách prasečí kejdy, tedy při nízké koncentraci patogenních organismů. Tento fakt naznačuje, že právě trávicí procesy probíhající ve střevech *E. fetida* jsou hlavními faktory podílejícími se na poklesu počtu koliformních bakterií, avšak jsou velmi podstatně ovlivněny hodnotou koncentrace a druhem patogenního organismu, který do procesu vstupuje. Monroy et al. (2008) svou studií potvrdil naše výsledky, které jsou již diskutovány v kapitole o vlivu počáteční koncentrace a druhu patogenu. V souladu s našimi výsledky, které uvádí tabulka č. 5 a 6 je jasně prokázáno, že vysoké koncentrace TKB nebyly redukovány na hodnotu <1 KTJ/g, na rozdíl od redukce *E. coli*, kde došlo k úplné redukci za stejné časové období.

Nejen koncentrace a druh patogenu má vliv na jejich redukci ale i druh žížal. Tuto skutečnost však potvrdit nemůžeme, protože v rámci našeho pokusu byla použita směs druhů žížal *Eisenia andrei* a *Eisenia fetida*. Aira et al. (2007) však sledoval účinky trávení tří druhů epigeických žížal (*E. fetida*, *E. andrei* a *Eudrilus eugeniae*) na počty bakterií a mikrobiální aktivitu v prasečí kejdě a dospěl k závěru, že nejen koncentrace a druh patogenů ovlivňují pokles počtu bakterií, ale významně se tyto hodnoty liší i v závislosti na použitém druhu žížal v procesu vermikompostování. Nejlepší výsledky eliminace bakterií byly u prasečí kejdy, zjištěny po průchodu střevy žížal rodu *E. andrei* a *E. eugeniae*, oproti tomu u druhu *E. fetida* se počty TKB téměř neměnily. Tato studie tedy naznačuje, že by bylo podstatně lepší

použít pro urychlení redukce počtů TKB v našem pokusu žížaly druhu *E. andrei* a *Eudrilus eugeniae* a nikoliv žížaly rodu *E. fetida*.

Na základě skutečností zjištěných Airou et al. (2007) je možné uvažovat o tom, že na redukci TKB *E. fetida* neměla vliv a proto došlo k pomalejšímu poklesu a zbytkové koncentraci patogenů ($1,3 \cdot 10^3$ z matoliny a $2,1 \cdot 10^4$ u jablečných výlisků).

Podle Eastmena et al. (2002) může být efektivního poklesu patogenních organismů dosaženo jen za určitých podmínek. Z našich výsledků i výsledků výše uvedených studií vyplývá, že redukce patogenů má svá omezení a neprobíhá vždy stejně. S tímto tvrzením jsou v souladu i výsledky zjištěné v této diplomové práci.

7 ZÁVĚR

Výstupy z této diplomové práce jsou součástí řešeného školního projektu. Z tohoto důvodu byl design pokusu dopředu pevně navržen tak, aby byl v souladu právě s tímto řešeným projektem.

Cílem této práce bylo ověřit, zda má vermikompostovací proces probíhající při mezofilních teplotách vliv na změny počtů termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli* v surovinách rostlinného původu. Konkrétně se jednalo o jablečné výlisky a matolinu. Po vyhodnocení výsledků pokusu a jejich porovnání s dalšími studiemi byly stanoveny následující závěry:

- žížaly mohou ovlivnit rychlost průběhu redukce počtů patogenních organismů (tabulka č. 5 a 6), avšak aby bylo prokázáno, že dochází k naprosté redukci patogenů činností žížal, je nutné sledovat mnoho dalších parametrů ovlivňující tento proces. Mezi sledované parametry je třeba zařadit sledování doby vermikompostování a zrání vermikompostu, sledování pH, teploty, poměru C:N a vlhkosti substrátu,
- počáteční koncentrace a druhy patogenů mohou významně ovlivnit množství žížal, které je pro proces nutné,
- žížaly rodu *Eisenia* (*E. andrei* a *E. fetida*) mají prokazatelný vliv na zrychlený pokles počtů bakterií *E. coli* v průběhu vermikompostování sledovaných rostlinných substrátů (tabulka č. 5),
- doba, po kterou pobíhal pokus, byla pro úplnou eliminaci počtů termotolerantních koliformních bakterií krátká. Během pokusu s TKB nebylo možno zjistit, zda má činnost žížal rodu *Eisenia* na redukci TKB tak výrazný vliv, nebo zda se na redukci podílí samotný proces kompostování a ostatní parametry. Navíc nemůžeme vliv žížal na redukci těchto bakterií považovat za prokazatelný, protože stejné redukce bylo dosaženo i v nádobkách, kde žížaly přítomny nebyly (graf č. 7 a 11),
- předrozložení vstupního materiálu před samotným procesem vermikompostování je nepostradatelnou součástí tohoto procesu. Prostřednictvím předrozložení totiž dokážeme vhodně připravit podmínky pro činnost žížal,
- druh vstupního materiálu a jeho parametry (vlhkost, pH, poměr C:N, velikost částic, množství patogenů) dokáží významně ovlivnit aktivitu a vývoj žížal. Ze sledování změn

hmotností žížal (graf č. 5 a 6) se jeví v našem pokuse matolína jako méně příznivá pro dlouhodobý vývoj žížal, protože neudržela vlhkost tak, jak jablečné výlisky,

- vzhledem k tomu, že počáteční substrát obsahoval vysoké počty celkových mikroorganismů (bez sledovaných indikátorových organismů), je možnou příčinou poklesu patogenů ve vzorcích (graf č. 1, 3, 7 a 11) především narůstající počet a diverzita jednotlivých druhů organismů a v neposlední řadě jejich podíl na kompostovacím procesu samotném. Činnost těchto organismů mohla způsobit zvýšenou teplotu, negativní změnu pH a nedostatek substrátu, které mohly negativně působit na činnost žížal,
- ve výše popsaném experimentu řada důležitých parametrů (teplota, vlhkost, pH, obsah prvků, vodivost aj.) změřena nebyla, a tak některé úvahy jsou postaveny na závěrech studií jiných autorů,
- jednoznačný vliv žížal na redukci bakterií nemůžeme považovat za průkazný, protože stejné redukce bylo dosaženo i v nádobkách, kde žížaly přítomny nebyly. Bylo by tedy třeba toto tvrzení podložit vícečetným opakováním.

V rámci pokusu nebylo zařazeno klasické předkompostování, tak jak jej popisují někteří autoři, kteří se zabývají procesem vermikompostování (Erickson et al., 2015; Nair et al., 2006; Mupundi et al., 2011).

Předkompostování po krátkou dobu před samotným procesem kompostování je však nezbytně nutné pro zajištění kvality a bezpečnosti konečného produktu, protože teplo zůstává stále primárním mechanismem, kterým aerobní kompostování ničí původce bakteriálních patogenů ve vstupních substrátech.

Nair et al., (2006) vypožorovali, že spojení procesu předkompostování po dobu 9 dní a vermikompostovacího procesu v délce 2,5 měsíce je ideální pro úpravu biologického odpadu. Pomocí této kombinace dochází totiž ke zlepšení výsledného produktu (vermikompostu), sníží se hodnoty patogenů a zkrátí se doba potřebná pro stabilizaci odpadu. Výsledkem je v tomto případě tedy stabilní homogenní produkt s mnohem nižším rizikem pro životní prostředí.

Mupundi et al., (2011) také poukazuje na tepelné kompostování jako na ideální prostředek pro hygienizaci odpadů (kravský hnůj + papír) před samotným procesem vermikompostování. Správné nastavení délky předkompostování je však rozhodující pro

úspěch vermikompostovacího procesu, protože to může přímo ovlivnit žížalí populace. Tato studie hodnotí účinnost různých délek předkompostování (0, 1, 2, 3 a 4 týdny) pro hygienizaci před vermikompostováním pro směsi kravského hnoje s přídavkem papíru. Měření parametrů bylo v rámci studie zaměřeno na změny počtů koliformních bakterií, růst žížal, stabilizaci a obsah živin ve vermikompostu. Více než 95 % termotolerantních koliformních bakterií, *Escherichia coli* a *Escherichia coli* 0157 bylo z odpadů odstraněno do 1 týdne předkompostování a celkového odstranění těchto bakterií bylo dosaženo do 3 týdnů předkompostování. Vermicompost z odpadů, který byl předkompostován déle než 2 týdny byl méně stabilizovaný, méně humifikovaný a obsahoval méně živin, než vermicompost z odpadů, který byl předkompostována za 1 týden nebo méně. Předkompostování po dobu 1 týdne bylo tedy stanoveno jako ideální pro efektivní vermicompostování zmíněného vstupního materiálu.

V našem případě, ale metoda předkompostování nebyla zahrnuta, nelze se proto domnívat, že za úbytek sledovaných patogenů mohou vysoké teploty, které jsou pro tento proces typické. Ovšem pro dosažení optimální hygienizace je vhodné tuto metodu do procesu zařadit.

Závěrem lze konstatovat, že vermikompostování je velmi složitý proces, na kterém se podílí mnoho různých faktorů. Z výsledků této diplomové práce nezbývá než tuto skutečnost potvrdit, protože jednoznačný vliv činnosti žížal na redukci sledovaných patogenů nemůžeme považovat za průkazný, protože v některých případech bylo dosaženo stejné redukce v nádobkách se žížalami a i v kontrolních nádobkách bez žížal.

Práce byla zajímavá především z hlediska procesu enzymatického trávení žížal a schopnosti interakce s různými druhy mikroorganismů. Jelikož se jedná o složité téma s mnoha proměnnými, je třeba, aby v dalších pracích byly pokusy prováděny s vícečetným opakováním a probíhaly po delší časové období. Dále by bylo vhodné provést sledování všech důležitých parametrů, které mohou ovlivňovat vermikompostování (teplota, vlhkost, pH, obsah prvků, vodivost aj.) na počátku, v průběhu a po ukončení pokusu. Po lepší udržení přirozených podmínek pokusu by bylo vhodné umístit zkušební nádoby přímo do vermikompostovacích nádob.

Hypotéza této práce, že vermikompostování je schopno redukovat počty termotolerantních koliformních bakterií a *E. coli*, byla prokázána jen částečně. K určité

redukci činností žížal došlo, avšak stále zůstává otázkou, jak velký podíl na této redukci sledovaných patogenních organismů měl samotný průběh procesu kompostování a vliv jiných faktorů než samotná činnost žížal.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

SZÚ	Státní zdravotní ústav
MBÚ	Mikrobiologický ústav
FAPPZ	Fakulta agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů
EU	Evropská unie
CPM	celkový počet mikroorganismů
ČR	Česká republika
ČSN	Česká technická norma
EN	Evropská (mezinárodní) norma
ISO	International organization for standardization (mezinárodní organizace pro tvorbu norem)
BRO	biologicky rozložitelný odpad
MZ	Ministerstvo zemědělství
VŽP	vedlejší produkt živočišné výroby
KTJ/CFU	kolonie tvořící jednotky
TKB/TCB	termotolerantní koliformní bakterie
MLGA	Membrane Lactose Glucuronide Agar
m-FC	Membrane Fecal Coliform Agar
WHO	World health organization (světová zdravotnická organizace)
PCR	polymerázová řetězová reakce
DGGE	denaturační gradient gelová elektroforéza
O ₂	kyslík
CO ₂	oxid uhličitý
NH ₃	amoniak
NaCl	chlorid sodný
C:N	poměr uhláku a dusíku
PDS	pelletized dewatered sludge (peletizovaný odvodněný kal)

9 SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

Obrázky:

- Obrázek č. 1 Fáze procesu kompostování
- Obrázek č. 2 Zóny rozdílných podmínek tlení
- Obrázek č. 3 Schéma vermikompostéru
- Obrázek č. 4 Průběh vermikompostovacího procesu
- Obrázek č. 5 *Eisenia fetida*
- Obrázek č. 6 *Eisenia andrei*
- Obrázek č. 7 a 8 Předrozložený substrát (matolína a jablečné výlisky)
- Obrázek č. 9 Žížaly rodu *Eisenia*
- Obrázek č. 10 a 11 Perforované nádoby
- Obrázek č. 12 a 13 Modré kolonie TKB narostlé na m-FC agaru
- Obrázek č. 14 a 15 Zeleno – modré kolonie *E. coli* narostlé na MLGA agaru
- Obrázek č. 16 Ředění a přímý výsev na povrch agarových ploten

Tabulky:

- Tabulka č. 1 Limitní hodnoty pro komposty
- Tabulka č. 2 Srovnání procesních parametrů kompostů a vermikompostů
- Tabulka č. 3 Schéma pokusu
- Tabulka č. 4 Spikovací suspenze
- Tabulka č. 5 Výsledky sledování redukce *E. coli* (KTJ/g)
- Tabulka č. 6 Výsledky sledování redukce termotolerantních koliformních bakterií (KTJ/g)

Grafy:

- Graf č. 1 Sledování poklesu počtů *E. coli* při vermikompostování matoliny
- Graf č. 2 Sledování průběhu poklesu *E. coli* v inokulovaném vzorku matoliny
- Graf č. 3 Sledování poklesu počtů *E. coli* při vermikompostování jablečných výlisků
- Graf č. 4 Sledování průběhu poklesu *E. coli* v inokulovaném vzorku jablečných výlisků
- Graf č. 5 Změny hmotnosti žížal v inokulovaném substrátu matoliny
- Graf č. 6 Změny hmotnosti žížal v neinokulovaném substrátu matoliny

- Graf č. 7 Sledování poklesu počtů TKB při vermikompostování matoliny
- Graf č. 8 Sledování průběhu poklesu TKB v inokulovaném vzorku matoliny
- Graf č. 9 změny hmotnosti žížal v inokulovaném substrátu jablečných výlisků
- Graf č. 10 změny hmotnosti v neinokulovaném substrátu jablečných výlisků
- Graf č. 11 Sledování poklesu počtů TKB při vermikompostování jablečných výlisků
- Graf č. 12 Sledování průběhu poklesu TKB v inokulovaném vzorku jablečných výlisků

10 PŘÍLOHY

- Obrázek č. 1. a 2. Příprava vzorků a homogenizace ve Stomacheru
Obrázek č. 3. a 4. Přímý výsev na povrch agarových ploten
Obrázek č. 5. a 6. Příprava agarových ploten
Obrázek č. 7. a 8. Odečty kolonií termotolerantních koliformních bakterií
Obrázek č. 9. Umístění perforovaných nádobek v písku
Obrázek č. 10. Hotový vermikompost

Obrázek č. 1. a 2. Příprava vzorků a homogenizace ve Stomacheru



Zdroj: Archiv autorky

Obrázek č. 3. a 4. Přímý výsev na povrch agarových ploten



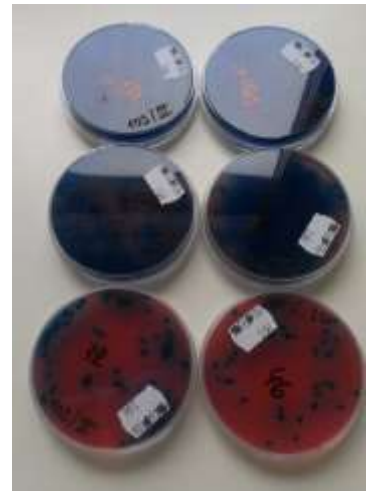
Zdroj: Archiv autorky

Obrázek č. 5. a 6. Příprava agarových ploten



Zdroj: Archiv autorky

Obrázek č. 7. a 8. Odečty kolonií termotolerantních koliformních bakterií



Zdroj: Archiv autorky

Obrázek č. 9 Umístění perforovaných nádobek do písku



Zdroj: Archiv autorky

Obrázek č. 10. Hotový vermikompost



Zdroj: biom.cz

11 SEZNAM LITERATURY

Abbasi, T., Gajalakshmi, S., Abbasi, S. A. 2009. Towards modeling and design of vermicomposting systems. Mechanisms of composting/ vermicomposting and their implications. Indian Journal of Biotechnology. Volume 8.

Abbott, S. L. 2007. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas* and Other *Enterobacteriaceae*. In: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller & M. L. Landry (Eds.). Manual of Clinical Microbiology . Washington, DC: ASM press. Volume 9.

Aira, M., Monroy, F., Dominiguez, J. 2006a. C to N ratio strongly affects population structure of *Eisenia fetida* in vermicomposting systems. European Journal of Soil Biology. Volume 42.

Aira, M., Monroy, F., Dominiguez, J. 2006b. Changes in microbial biomass and microbial activity of pig slurry after the transit through the gut of the earthworm *Eudrilus eugeniaes*. Biol. Fertil. Soils 42. p. 371- 378.

Aira, M., Monroy, F., Dominiguez, J. 2007. *Eisenia fetida* (Oligocheata: Lumbricidae) modifies the structure and physiological capabilities of microbial communities improving carbon mineralization during vermicomposting of pig manure. Microb Ecol. Volume 54. p. 662-711.

Aira, M., Monroy, F., Dominiguez, J. 2008. Changes in bacterial number and microbial activity of pig slurry during gut transit of epigeic and anecic earthworms. Journl of Hazardous Materials 162. p. 1404 -1407.

Aira, M., Gómez-Brandón, M., González-Porto, P. Domínguez, J. 2011. Selective reduction of the pathogenic load of cow manure in an industrial-scale continuous-feeding vermireactor. Bioresource technology. Departamento de Ecoloxía e Bioloxía Animal. Universidade de Vigo, Vigo E-36310, Spain. Volume 120 (20). ISSN: 0960-8524.

Časopis Priorita. Vermikompostování: šikovné žížaly. Biom.cz [online]. 2011.10.03 [cit. 22. 10. 2015]. Dostupné z <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/vermikompostovani-sikovne-zizaly>>.

ČSN 46 5735 Průmyslové komposty. 1996. Český normalizační institut. Praha. s. 31.

Diao, J., Chen, Z., Gong, Ch., Jiang, X. 2015. Factors Affecting Pathogen Survival in Finished Dairy Compost with Different Particle Sizes Under Greenhouse Conditions. *Foodborne pathogens and disease*. Department of Food, Nutrition, and Packaging Sciences, Clemson University, Clemson, South Carolina. Volume 12(9). ISSN: 1535-3141.

Dominguez, J., Edwards C. A., Subler S. 1997. A comparison of vermicomposting and composting: *Biocycle*. Volume 3. p. 57-59.

Domínguez, J., Edwards C. A. 2004. Vermicomposting organic wastes. A review. *Soil Zoology for sustainable development in the 21st century*. Self-Publisher. Cairo. p. 369-395.

Dvořák, J., Mančíková, V. Pižl, V., Elhottová, D. Silerová, M., Roubalová, R., Skanta, F., Procházková, P., Bilej, M. 2013. Microbial environment affects innate immunity in two closely related earthworm species *Eisenia andrei* and *Eisenia fetida*. *Laboratory of Cellular and Molecular Immunology. PloS one*. Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic. Prague. Volume 8 (11). ISSN: 1932-6203.

Eastman B. R., Kane P. N., Edwards C. A, Trytek L., Gunadi B., Stermer A. L., Mobley J. R. 2002. The effectiveness of vermiculture in human pathogen reduction for USEPA biosolids stabilization. *Compost Sci Util.*

Edwards, C. A., Bohlen, P. J. 1996. *Biology and Ecology of Earthworms*, 3rd ed. Chapman and Hill, London, New York.

Edwards, C. A., Subler, S. Arancon, N. 2010. Quality criteria for vermicomposts. *Vermiculture technology: earthworms, organic wastes and environmental management*. CRC Press. ISBN: 978-1-4398-0987-7.

Edwards, C. A., Arancon, N. Q., Sherman, R. L. 2011. Human pathogen reduction during vermicomposting. In: *Vermiculture technology: Earthworms, organic waste and environmental*. Boca Raton, FL: CRC Press. p. 249–261.

Erickson, M. C., Smith, Chris, Jiang, X., Flitcroft, I. D., Doyle, M. P. 2015. Manure source and age affect survival of zoonotic pathogens during aerobic composting at sublethal

temperatures. Journal of food protection. Center for Food Safety and Department of Food Science and Technology. University of Georgia. 1109 Experiment Street. Griffin. Georgia. USA. Volume 78 (2). ISSN: 0362-028X.

Franceschini, S., Chitarra, W., Pugliese, M., Gisi, U., Garibaldi, A., Gullino, M. L. 2016. Quantification of *Aspergillus fumigatus* and enteric bacteria in European compost and biochar. COMPOST SCIENCE & UTILIZATION. Volume 24 (1). ISSN: 1065-657X.

Fu, X., Cui, G., Huang, K., Chen, X., Li, F., Zhang, X., Li, F. 2016. Earthworms facilitate the stabilization of pelletized dewatered sludge through shaping microbial biomass and activity and community. Environmental science and pollution research international. School of Environmental and Municipal Engineering. Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou. China. Volume 23 (5). ISSN: 0944-1344.

Garg, V. K., Gupta, R. 2009. Vermicomposting of agro-industrial processing waste. In - Nigan, P. S., Pandey, A. Biotechnology for agro-industrial residues utilisation. Springer Science and Business Media B. V. ISBN: 9781402099410.

Gómez-Brandón, M., Lores, M., Domínguez, J. 2012. Species-Specific Effects of Epigeic Earthworms on Microbial Community Structure during First Stages of Decomposition of Organic Matter. PLoS ONE. Volume 7 (2).

Hanč, A., Plíva, P. 2013. Vermikompostování bioodpadů (certifikovaná metoda). ČZU. Praha. s. 35. ISBN: 978 80 213 2422 0.

Hartenstein, R. 1978. The most important problém in sludge management as seen by a biologist. In: R. Hartenstein (Ed.). Utilization of soil organisms in sludge management. The national technology information service. PB28693. Springfield. VA.

Hait, S., Tare, V. 2011. Vermistabilization of primary sewage sludge. BIORESOURCE TECHNOLOGY. Volume 102 (3). ISSN: 0960-8524

Huang, K., Li, F., Wei, Y., Chen, X., Fu, X. 2013. Changes of bacterial and fungal community compositions during vermicomposting of vegetable wastes by *Eisenia foetida*. Bioresource

technology. Graduate School of Engineering, Gifu University. 1-1 Yanagido. Gifu 501-1193. Japan. Volume 150. ISSN: 0960-8524.

Chaoui, I. H. 2010. Vermicasting (or Vermicomposting): Processing Organic Wastes Trough Earthworms. Ontario Factsheet [online]. 02/2010 [cit. 04. 11. 2015]. Dostupné z <<http://www.omafra.gov.on.ca/english/engineer/facts/10-009.htm>>.

Jamaludin, A. A., Mahmood N. Z. 2010. Effects of Vermicomposting Duration To Macronutrient Elements and Heavy Metals Concentrations in Vermicompost. Sains Malaysiana. p. 711-715.

Jin, B., Kelly, J. M. 2009. Wine industry residues. In - Nigan, P. S., Pandey, A. Biotechnology for agro-industrial residues utilisation. Springer Science and Business Media B. V. ISBN: 978-1-4020-9941-0.

Juga, P., Vítěz, T. 2015. Technika pro zpracování odpadů II. Mendelova univerzita v Brně. Brno. 78s. ISBN: 978 80 7509 208 3.

Kalina, M., 2004. Kompostování a péče o půdu. Grada Publishing. Praha. 116s. ISBN: 80 247 0907 4.

Khalil, A. I., Hassouna M. S., H. El-Ashqar M. A., Fawzi M. 2011. Changes in physical, chemical and microbial parameters during the composting of municipal sewage sludge. World J Microbiol Biotechnology. Volume 27. ISSN: 1573 0972.

Klein, M., Brown, L., Ashbolt, N. J., Stuetz, R. M, Roser, D. J. 2011. Inactivation of indicators and pathogens in cattle feedlot manures and compost as determined by molecular and culture assays. FEMS microbiology ecology. UNSW Water Research Centre. School of Civil and Environmental. Volume 77 (1). ISSN: 0168-6496

Kompostuj.cz. Jak využít kompost [online]. 2010.03.12 [cit. 19. 8. 2015]. Dostupné z <<http://www.kompostuj.cz/vime-jak/jak-vyrabet-kompost/jak-vyuzit-kompost/>>.

Kumar, J. 2013. Klebsiella In drinking water [online]. 2013.05.14 [cit. 6. 2. 2016]. International Journal of Pharmaceutical Science Invention. Dostupné z <<http://www.ijpsi.org>>.

- Lavelle**, P., Spain, A. V. 2001. Soil Ecology. Kluwer Academic Publisher. London.
- Lores**, M., Gómez Brandón M., Pérez Díaz D., Domínguez, J. 2006. Using FAME profiles for the characterization of animal wastes and vermicomposts. Soil Biol Biochem. ISSN: 38 29936.
- Mamma**, D., Topakas, E., Vafiadi, C., Christakopoulos, P. 2009. Biotechnological potential of fruit processing industry residues. In - Nigan, P. S., Pandey, A. Biotechnology for agro-industrial residues utilisation. Springer Science and Business Media B. V. ISBN: 978-1-4020-9941-0.
- Millner**, P., Ingram, D., Mulbry, W., Arkan, OA. 2014. Pathogen reduction in minimally managed composting of bovine manure. Beltsville Agricultural Research Center, Environmental Microbial and Food Safety Laboratory, Beltsville. Waste Management. Volume 34 (11). p. 1992-1999.
- Monroy**, F., Aira, M., and Domínguez, J. 2007. Changes in density of nematodes, protozoa and total coliforms after transit through the gut of four epigeic earthworms (Oligochaeta). Applied Soil Ecology. Volume 39. p. 127–132
- Monroy**, F., Aira, M., and Domínguez, J. 2009. Reduction of total coliform numbers during vermicomposting is caused by short-term direct effects of earthworms on microorganisms and depend on the dose of application of pig slurry. Science of the Total Environment. Volume 407. p. 5411–5416.
- Mupondi**, L. T., Mnkeni, P. N. S., Muchaonyerwa, P. 2011. Effects of a precomposting step on the vermicomposting of dairy manure-waste paper mixtures. Waste management & research : the journal of the International Solid Wastes and Public Cleansing Association. ISWA. Faculty of Science and Agriculture. Department of Agronomy. University of Fort Hare. Alice. South Africa. Volume 29 (2).
- Nair**, J., Sekiozoc, V., Anda, M. 2006. Effect of precomposting on vermicomposting of kitchen waste. Bioresource technology. s. 97.
- Norman**, Q. A., Edwards A. C., Sherman, R. L. 2010. Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management. Taylor & Francis Group. s. 601. ISBN: 9781439809877.

- Pastorek, Z.** 2004. Legislativa bioodpadů - kompostování v praxi. *Biom.cz* [online]. 2004-04-19 [cit. 25. 10. 2015]. Dostupné z <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/legislativa-bioodpadu-kompostovani-v-praxi>>. ISSN: 1801-2655.
- Pecl, K.** 2007. Jednička mezi hnojivy- vermikompost. *Zahradnictví* č. 8. s. 24. ISBN: 1213-7569.
- Pecl, K.** 2012. Vermiprodukty - nový trend v péči o rostliny [online] *Ekoverms*. 03. 02. 2012 [cit.19.10.2015].
Dostupné z < <http://www.ekoverms.cz/uploads/dokumenty/vermiprodukty.pdf>>.
- Pižl, V.** 2002. Žížaly České Republiky. Sborník přírodovědného klubu č. 9. Uherské hradiště. s. 153. ISBN: 80 86485 04 8.
- Plíva, P., Banout, J., Habart, J.** 2006. Zakládání, průběh a řízení kompostovacího procesu. *VÚZT*. Praha. s. 65 . ISBN: 80 86884 11 2.
- Plíva, P., Kollárová, M.** Kompostování na volné ploše [online]. *Vuzt.cz*. [cit. 25. 10. 2015].
Dostupné z <<http://svt.pi.gin.cz/vuztweb/doc/clanky/zivotniprostredi/VUZT14Kompost.pdf?menuid=10>>.
- Pommeresche, R., Hansen, S., Løes, A. K., Sveistrup, T.** 2007. Žížaly a jejich význam pro zlepšení kvality půdy. *Bioinstitut*. Olomouc. ISBN: 978-80-87371-02-2.
- Pramanik, P., Ghosh, G. K., Banik, P.** 2008. Effect of microbial inoculation during vermicomposting of different organic substrates on microbial status and quantification and documentation of acid phosphatase. *Waste Management. Agricultural and Ecological Research Unit, Indian Statistical Institute*. 203, B. T. Road, Kolkata 700108, India. Volume 29. p. 574-578.
- Pšenička, P.** 2009. Jsou kalifornské žížaly rizikové řešení?. *Ekodomov*.
Dostupné z <http://www.kompostuj.cz/index.php?id=162&backPID=107&tx_faq_faq=63>.
- Puri, Amrita, Dudley, Edward, G.** 2010. Influence of indigenous eukaryotic microbial communities on the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in compost slurry. *FEMS*

microbiology letters Department of Food Science. The Pennsylvania State University. University Park. USA. Volume 313 (2). ISSN: 0378-1097.

Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., Robin, M. R., Laurent, P. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J Microbial Meth.* ISSN: 493154.

Sherman, R. 2003. Raising Earthworms Successfully. North Carolina Cooperative Extension Service. s. 26.

Sinha, R. K., Agarwal S., Chauchan K., Valani, D. 2010. The wonders of earthworms & its vermicompost in farm production. Charles Darwin's „friends of farmers“, with potential to replace destructive chemical fertilizers from agriculture. *Agricultural Sciences.* 1(2). p.76 – 94.

Sinha, R. K., Nair, J., Bharambe, G., Patil, S., Bapat, P. 2008. Vermiculture revolution: a low-cost and sustainable technology for management of municipal and industrial organic wastes (solid and liquid) by earthworms with significantly low greenhouse gas emissions. In: Daven, J. I., Klein, R. N. (eds.). *Progress in waste management research.* Nova Science Publishers. New York. p.158-229. ISBN: 1604562358.

Skowron, K., Bauza-Kaszewska, J., Kaczmarek, A., Budzynska, A., Gospodarek, E. 2015. Microbiological aspects of slurry management. *POSTĘPY MIKROBIOLOGII.* Volume 54 (3). p. 235-249. ISSN: 0079-425.

Slejška, A. 1999. Vermikompostování. *Regena.5/99, IX. Ročník.* [20. 12. 2015] Dostupné z <http://stary.biom.cz/c/en/as/a_regena99.html>.

Smith, L. 2001. The incidence of potentially pathogenic bacteria in liquor from selected wormfarms. *Biol Fertil Soils.* ISSN: 34-2157

Toth, J. D., Aceto, H. W., Rankin, S. C., Dou, Z. 2011. Survival characteristics of *Salmonella enterica* serovar Newport in the dairy farm environment. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* Volume. 94 (10). p. 5238-5246. ISSN: 0022-0302.

Váňa, J. 2002. Kompostování bioodpadu [online]. *Biom.cz.* 14. 01. 2002 [cit. 10. 09. 2015]. Dostupné z <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/kompostovani-odpadu>>. ISSN: 1801 2655.

Veger, J., Baudišová D. 1996. Bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* ve vodním prostředí. Výzkumný ústav vodohospodářský T.G. Masaryka.s. 99. ISBN: 80-85900-11-4.

Wang, L. K., Shamma, N. K., Hung, Y. T. 2007. Biosolids Treatment Processes. Humana Press Inc. Totowa. New Jersey.p. 689 – 704. ISBN: 978-1-59259-996-7.

Williams P. A., Roberts P., Avery L. M., Killham K. & Jones D. L. 2006. Earthworms as vectors of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and vermicomposts. School of Agriculture and Forest Sciences. [5. October 2015]. Dostupné z <<http://femsec.oxfordjournals.org/>>.

Zajonc, I. 1992. Chov dážďovek a výroba vermikompostu. Animapress. Povoda. Nitra. s. 59. ISBN: 80 85567 00 8.

Zemánek, P. 2010. Biologicky rozložitelné odpady a kompostování. Praha. Výzkumný ústav zemědělské techniky. s. 113. ISBN 978-80-86884-52-3.