

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Mikroobsed riskifaktorid biogaasi tootmise järgis

Bakalaureusetöö
12 EAP

Harold Oja

Juhendaja PhD Jaak Truu

TARTU 2023

INFOLEHT

Mikroobsed riskifaktorid biogaasi tootmise jäägis

Käesolev töö annab kirjanduse põhjal ülevaate biogaasi kääritusjäätis leiduvatest mikroobsetest riskifaktoritest nagu patogeeneid ja antibiootikumiresistentsusgeeneid ning neid mõjutavatest protsessidest. Töös on keskendunud enamlevinud digestaadi käitlemise meetoditele.

Märksõnad: biogaas, digestaat, patogeeneid, antibiootikumiresistentsusgeeneid, ringmajandus

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Assessment of microbial hazards in biogas digestate

The current thesis presents an overview, based on literature, of microbial hazards connected to biogas digestate, such as pathogens and antibiotic resistant bacteria, and processes influencing these hazards, with emphasis on most common processing methods.

Keywords: biogas, digestate, pathogens, ARG, circular economy

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord.....	3
KASUTATUD LÜHENDID.....	4
Sissejuhatus.....	5
1. Biogaas.....	6
1.1 Biogaasi tootmine.....	7
1.1.1. Tootmis etappide arv.....	8
1.1.2. Kääritamise temperatuur.....	8
1.1.3. Kääriti täitmise viisid.....	9
1.1.4. Kuivaine sisaldus.....	9
1.2. Biogaasi puhastamine ja kasutamine.....	10
2. Kääritusjääk ja selle kasutamine.....	10
2.1. Digestaadiga seotud patogeeneid.....	11
2.2. Antibiootikumiresistentsed mikroobid digestaadis.....	15
3. Patogeene ja antibiootikumiresistentsete geenide tuvastamine digestaadis.....	16
3.1. Tuvastamise meetodid.....	16
3.1.1. Mikroobide kultiveerimine.....	16
3.1.1.1. Mittekultiveeritavad bakterid.....	16
3.1.2. Molekulaarsed meetodid.....	17
3.2. Indikaatororganismid.....	18
4. Patogeene ja ARG inaktiveerimine.....	19
4.1. Patogeene inaktiveerimine käärimisel.....	19
4.1.1. Temperatuuri mõju.....	20
4.1.2. Toksilised vaheühendid.....	23
4.2. Anaeroobse käärimise mõju antibiootikumiresistentsetele bakteritele ja antibiootikumiresistentsus geenidele.....	23
4.3. Digestaadi eel- ja järeltöötlus.....	24
4.4. Digestaadi käitlemine kompostimise abil.....	25
4.4.1. Patogeene inaktiveerimine kompostimisel.....	25

4.4.1.1. Temperatuuri mõju.....	26
4.4.1.2. Segamine ja õhustatus.....	27
4.4.1.3. Tugiained, toksilised laguained ja pH.....	28
4.4.1.4. Komposti mikrobioom.....	29
4.4.1.5. Niiskus.....	29
4.4.1.6. Kompostimise tehnoloogia.....	30
4.4.2. Kompostimise mõju antibiootikumiresistentsetele bakteritele ja antibiootikumiresistentsus geenidele.....	30
5. Patogeenide ja antibiootikumiresistentsus geenide püsivus keskkonnas.....	33
6. Arutelu.....	34
Kokuvõtte.....	36
Summary.....	36
Kirjanduse loetelu.....	37
Kasutatud veebiaadressid.....	56
Lihtlitsents.....	58

KASUTATUD LÜHENDID

ARG- antibiootikumiresistentsusgeen

ARM- antibiootikumiresistentsed mikroobid

CFU- *Colony forming unit*

DM- kuivaine

DS- kuiv tahke materjal

Dw- kuivkaal

MPN- *most probable number*

PCR- polümeraasahelreaktsioon

PFU- *plaque-forming units*

qPCR- kvantitatiivne polümeraasahelreaktsioon

RT-qPCR- kvantitatiivne pöördpolümeraasahelreaktsioon

VFA- lenduvad rasvhapped

Sissejuhatus

Biogaas on orgaanilise aine anaeroobse kääritamise kaudu saadud kütus mis on võtnud Euroopas üha olulisemat rolli ühe taastuvenergia allikana. Eestis valmis esimene biogaasijaam 1987 aastal ning hetkel on Eestis 17 töötavat biogaasi jaama (Eesti Biogaasi Assotsiatsioon, 2023). Biogaas võib olla oluline osa meie tuleviku energia võrgustikust täiendades teisi taastuvenergia liike.

Mitmed biogaasijaamad toetavad ka hajusat energia tootmist, mis on oluline meie energia iseseisvuse ja julgeoleku vaatekohalt. Biogaasi oluliseks eeliseks on see, et seda saab toota orgaanilistest jäätmetest ja taimsest biomassist, olles nii ringmajanduse oluliseks lüliks.

Biogaasi tootmisel tekkinud kääritusjäät ehk digestaat omab väärtust väetisena ning pakub alternatiivi mineraalväetistele, edendades samas ka kohaliku tootmist ja tarbimist. Siiski kaasnevad digestaadi kasutamisega põllumajanduses ohud nagu patogeenide ja antibiootikumiresistentsete mikroobide (ARM) levimine keskkonda ja toiduahelasse.

Käesoleva töö eesmärk on anda ülevaade biogaasi tootmisest, kääritusjäätisest leitud mikroobsetest riskifaktoritest nagu patogeenid ja antibiootikumiresistentsed mikroobid ning neid mõjutavatest protsessidest.

Kirjanduse põhjal koostatud ülevaate tulemuste põhjal analüüsitakse võimalust kavandada kehtivate hügieeni ja ohutusnõuetele vastav väikesemõõduline biogaasi tootmise reaktor kodumajapidamisele.

Kirjanduse otsimiseks kasutati Google Scholar otsingumootorit, Tartu Ülikooli raamatukogu ja DSpace digitaalarhiivi.

1. Biogaas

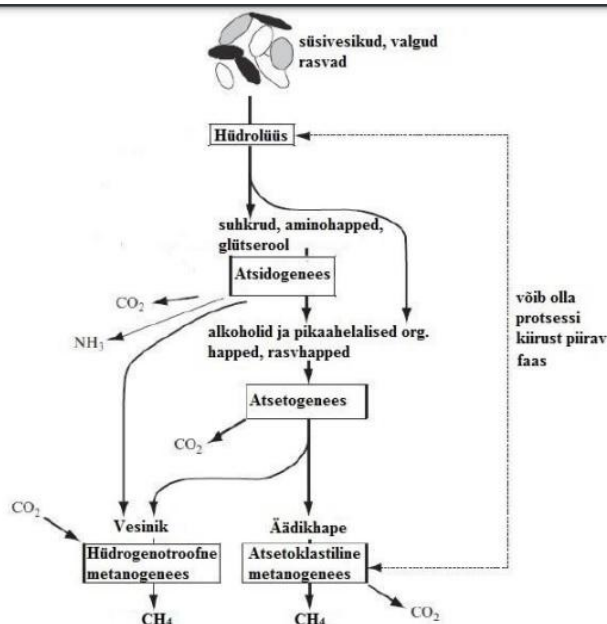
Biogaas on orgaanilisest ainest anaeroobse kääritamise teel saadud gaasiline kütus, mis koosneb põhiliselt metaanist (ca. 60%) ja süsihappegaasist (ca.40%), kuid sisaldab vähesel määral ka veeauru, divesiniksulfiidi (H_2S), ammoniaaki (NH_3) vingugaasi ja lämmastikku (N_2). On leitud arheoloogilisi andmeid biogaasi tootmise ja kasutamise kohta juba assüürlaste poolt 17. Saj Ekr (Kriipsalu et al., 2016). Sõltuvalt metaani sisaldusest on biogaasi kütteväärtus üldjuhul vahemikus 5-7 kWh/m³ (Eesti Biogaasi Assotsiatsioon, 2023)

Biogaasi saab toota ükskõik millisest orgaanilisest materjalist, mille põhikoostisteks on süsivesikud, valgud, rasvad, tselluloos ja hemitselluloos.(Braun, 2007)

Biogaas tekib metaankäärimisel anaeroobses keskkonnas erinevate arhede ja bakterite ainevahetuse tulemusel ning jaguneb üldiselt neljaks faasiks:

- 1) Võrdlemisi aeglane hüdrolyüs, kus bakterid lagundavad tahkeid orgaanilisi kompleksühendeid monomeerseteks ühenditeks
- 2) Kiire happemoodustumisfaas, kus atsetogeensed bakterid muudavad monomeersed ühendid lenduvateks rasvhapeteks, süsinikdioksiidiks ja vesinikuks
- 3) Kiire käärimisfaas, kus bakterid muudavad pikema ahelaga orgaanilised happed ja alkoholid äädikhappeks ja molekulaarseks vesinikuks H_2
- 4) Aeglane gaasitekkefaas, milles obligatoorselt anaeroobsed arhed viivad lagunemise lõpuni, kusjuures ühed toodavad metaani vesinikust ja süsihappegaasist, teised aga äädikhapest

(Kriipsalu et al., 2016)



Joonis 1. Orgaanilise aine lagunemisetapid anaeroobses keskkonnas (Angelidaki *et al.* 2011 põhjal)

Joonis 1. Orgaanilise aine lagunemisetapid anaeroobses keskkonnas (Angelidaki *et al.*, 2011 põhjal, tõlkis: Seevri, 2016)

Biogaasi ja digestaadi keemiline koostis on mõjutatud kasutatavast substraadist, käärیتی tehnoloogiast ja käärیتuse ajast (Braun, 2007).

1.1 Biogaasi tootmine

Traditsioonilised biogaasi tootmise substraadid on loomasõnnik ja reovesi või reoveesete (Weiland, 2009). Need on suure ohufactoriga jäätmed, kuna tõenäoliselt sisaldavad patogeene, ravimijääke ja antibiootikumiresistentseid mikroobe (Calero-Cáceres *et al.*, 2014; Sahlström, 2003). Lisaks toodetakse biogaasi toidujäätmetest, energiakultuuridest, haljastusjäätmetest, ja erinevatest tööstusjäätmetest (*Biogaasi Tootmine Ja Kasutamine*, 2009).

Biogaasi tootmise tehnoloogiaid on erinevaid ning neid eristavad üksteisest protsessi etappide arv, käärیتamise temperatuur, käärیتی täitmise viis ning kuivaine sisaldus substraadis (*Biogaasi tootmine ja kasutamine*, 2009).

Tabel 1 Biogaasi tootmise tehnoloogiad erinevate kriteeriumite alusel (*Biogaasi Tootmine Ja Kasutamine*, 2009)

Kriteerium	Tehnoloogia
Protsessi etappide arv	Üheetapiline (astmeline) Kaheetapiline Kolmeetapiline
Protsessi temperatuur	Psührofiilne Mesofiilne Termofiilne
Kääritusmahuti täitmisviis	Katkev täitmine (perioodiline, tsükliline) Osaliselt katkev (pooltsükliline) Katkematu (pidev)
Substraadi kuivaine sisaldus	Märgkääritamine Kuivkääritamine

1.1.1. Tootmis etappide arv

Põllumajanduslikes biogaasijaamades kasutatakse peamiselt ühe- või kaheastmelisi protsesse. Üheastmelistes protsessides toimuvad kõik käärimise faasid (hüdrolüüs, hapete moodustumine, äädikhappe teke, metaani teke) ühes mahutis. Kaheastmelistes protsessides eraldatakse mingid faasid üksteisest ruumiliselt. Näiteks on kaheastmelises protsessis hüdrolüüsi, hapete moodustumine esimeses mahutis ning äädikhappe ja metaani teke teises mahutis.

1.1.2. Kääritamise temperatuur

Termofiilne (50-57°C) kääritamine on kõige kiirem ja tõhusam ka umbrohuseemnete hävitamisel. Samas on see kõige energiakulukam ning termofiilsed mikroorganismid on tundlikumad temperatuuri kõikumistele kui mesofiilsed (Kriipsalu et al., 2016)

Mesofiilne (30-38°C) käärimine on aeglasem, kuid väiksema küttevajaduse tõttu on energiatootlikus sarnane termofiilsega. Samas on mesofiilse kääritamise puhul soodsamad tingimused horisontaalse geeniulekande jaoks, mille kaudu võivad levida antibiootikumiresistentsust kodeerivad geenid. (Ziemba & Peccia, 2011)

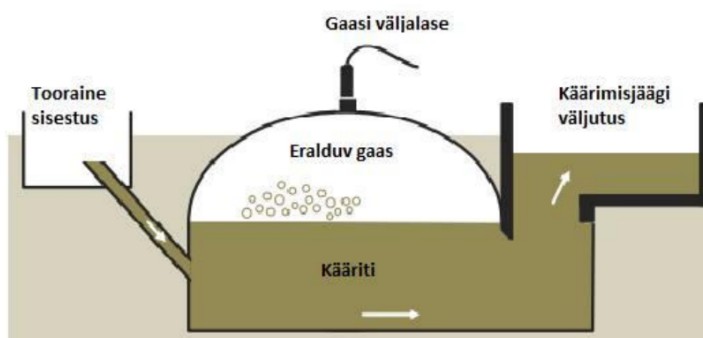
Vähesel määral toodavad metaani ka mõned psührofiilsed arhed (20-6°C), kuid nii madalatel temperatuuridel on metaani tootlikkus väga madal (Hall, 2023; Kriipsalu et al., 2016).

1.1.3. Kääriti täitmise viisid

Biogaasijaamade mahutite täitmine jaguneb tsükliliseks, pooltsükliliseks ja pidevaks.

Tsüklilise täitmise puhul täidetakse õhukindel anum substraadiga ning sellel lastakse lõpuni käärida ja seejärel anum tühjendatakse

Pidevate ja pooltsükliliste täitmis viiside seast on levinuimaks läbivoolu meetod kus kääritisse antakse värsket toorainet iga päev, ning kääritusjääk väljub vastavalt lisatud substraadi kogusele lõpphoidlasse. (*Biogaasi Tootmine Ja Kasutamine*, 2009)



Joonis 2. Klassikaline pidevalt täidetava maa-aluse kääriti skeem (Rakotojaona, 2013, tõlkis Kukke, 2015)

1.1.4. Kuivaine sisaldus

Märgkääritamisel on substraat pumbatav (kuivaine sisaldus <15%) ning kuivkääritamisel kuhjatav (kuivaine sisaldus >20%) (*Biogaasi Tootmine Ja Kasutamine*, 2009)

1.2. Biogaasi puhastamine ja kasutamine

Biogaas sisaldab lisaks metaanile ka süsihappegaasi, veeauru, ammoniaaki (NH₃) vingugaasi, lämmastikku (N₂) ja väävelvesinikku (H₂S), mis on toksiline mädamunalõhnaline gaas. Väävelvesinikku kokkupuutel biogaasis oleva veeauruga tekib divesiniksulfiidhape (H₂S), mis kahjustab biogaasi torustikku, põletusseadmeid (katel,

mootor jm) ja heitgaasi torustikku. Seetõttu on vaja biogaasi enne kasutamist puhastada (*Biogaasi Tootmine Ja Kasutamine*, 2009)

Üheks väävelvesinikku eemaldamise meetodiks on biogaasi juhtimine läbi rauapuru, mis reageerib väävelvesinikuga ning seob seda (Hall, 2023).

Teine levinud biogaasi puhastamise meetod, põhineb füüsikalisel absorbeerimisel, kus erinevad gaasid lahustuvad vees erinevatel rõhkudel ja temperatuuridel. Kuna vees lahustuvad hästi nii CO₂, kui ka väävlit sisaldavad ained, on selle puhastusmeetodiga võimalik saada 98% metaan, mida kasutatakse sarnaselt maagaasiga (Kask et al., 2014).

Soojema kliimaga maades on levinud koduselt toodetud biogaasi kasutamine toidu küpsetamiseks ja kütusena gaasi lampides.

2. Kääritusjääk ja selle kasutamine

Kääritusjääk ehk digestaat on biogaasi tootmise vedel kõrvalprodukt, mis koosneb mikroobide biomassist ning orgaanilistest ja anorgaanilistest ühenditest, ning omab väärtust väetisena (Kumar, 2012).

Lisaks muudab kääritamine toitained taimedele kergemini kättesaadavaks võrreldes algse materjaliga (M.Mutli 2014)

Vastavalt lähtematerjalile võib käärimisjääki laotada põllule väetisena või tuleb seda järeltöödelda. Näiteks reoveesette ja loomasõnniku digestaadiga tuleb toimida vastavalt jäätmeloale. Levinud digestaadi järeltöötlemise meetod on eraldada vedel ja tahke fraktsioon (väduks ja tahseks) ning viimane kompostida (Kriipsalu et al., 2016). Vedelat digestaati on võimalik kasutada ka hüdroponilistes ja aeropoonilistes süsteemides (Möller & Müller, 2012) ning anaeroobne kääritamine on väga efektiivne taimepatogeenide eemaldamisel (Seadi & Lukehurst, 2012).

Kääritusjäägi valmistamisel tuleb arvestada, et kasutatavad biolagunevad jäätmed ei tohi sisaldada ohtlikke aineid või aineid, mis biolagunemisel võivad ohtlikke aineid tekitada, samuti biotsiide ning aineid, mis võivad jäätmete biolagunemist takistada (nt säilitusained) (Riigi Teataja, 2016).

Mineraalväetiste asendamine digestaadiga edendab kohalikku ringmajandust (Carraturo et al., 2022), ning vähendab keskkonnasaastet (Banks et al., 2011). Siiski kaasnevad digestaadi kasutamisega ka mõned ohud nagu patogeene ja toksiliste ainete võimalik jõudmine põldudele (Carraturo et al., 2022; Roopnarain et al., 2023).

Tõvestavate- ja antibiootikumiresistentsete mikroobide sisaldus digestaadis sõltub kääritamiseks kasutatud algmaterjalist. Võrreldes toidu- ja taimejäätmega on sõnnikus ja reovees suurtemates kogustes ohtlikke mikroobe, kuid ka toidujäätmetes võib leiduda inimestele ohtlike patogeene (Sahlström, 2003)(Jones & Martin, 2003; Seadi & Lukehurst, 2012).

Lisaks on reoveesetted üks kõige rikkalikum antibiootikumiresistentsusgeenide reservuaar (Calero-Cáceres et al., 2014).

2.1.Digestaadiga seotud patogeened

Orgaanilised jäätmelised võivad sisaldada erinevaid patogeene, mis pärinevad kas surnud loomsetest kudedest või elavate haiguskandjate väljaheidetest ja eritistest (Sahlström, 2003), seega võib ka jäätmelised saadud käärimisjäätmed vastavalt lähtematerjalile sisaldada erinevaid patogeene. Eraldi kogutud toidu- ja haljastusjäätmelised puhul on patogeene sisalduse oht väike. Reoveesetel ning loomsete kõrvalsaadustel puhul on aga patogeene sisalduse tõenäosus märkimisväärne ning nendest saadud käärimisjäätmed kasutamine on Eestis seadusega reguleeritud (Riigi Teataja, 2016)

Põhilisteks tõvestavateks bakteriteks, mis kujutavad endast ohtu digestaadi kasutamisel väetisena on *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Mycobacteria*, *Clostridia* ja *Yersinia* (Nag et al., 2020; Sahlström, 2003)

- ***Salmonella***

Salmonella on gram-negatiivsete bakterite perekond, mis kuulub *Enterobacteriaceae* sugukonda ja koosneb kahest liigist, *Salmonella bongori* ja *S. enterica*. Kõik *S. enterica* serovarid on ohtlikud nii loomadele kui ka inimestele ning kõige tavalisem *Salmonella* põhjustatud haigus on toidumürgitus (Sahlström, 2003)

- ***Listeria monocytogenes***

Listeria monocytogenes on zoonoos ehk ta võib põhjustada listerioosi haigestumist nii inimestel kui ka loomadel. Listeriabakterit on leitud pinnasest, silost, väljaheidetest ja eritistest, kuid teda peetakse põhiliselt toiduga levivaks patogeeniks (Sahlström, 2003).

- **Enterohemorraagiline *Escherichia coli***

Shiga-toksiini tootvad *E.Coli* tüved koondnimega enterohemorraagiline *Escherichia coli*- EHEC (sealhulgas *E. coli* O157) põhjustavad verist kõhulahtisust ja kõhukrampe ning tüsistusena võib kujuneda hemolüütilis ureemiline sündroom (HUS), mida iseloomustab äge neerupuudulikkus ja närvisüsteemi talitlushäired. HUS kujuneb tavaliselt ühe nädala jooksul pärast haigestumist ja võib lõppeda surmaga. Nakkusallikaks on patogeenset kolibakterit kandvad kariloomad või haige inimene. EHEC paljuneb hästi temperatuuril 7°–50°C ja hävib temperatuuril üle 70°C.

Kuni 85%-l haigusjuhtudest on levinud haigustekitaja saastunud toidu ja joogivee kaudu. Sagedamini levib haigustekitaja mittepastöriseeritud piima, ebapiisavalt kuumtöödeldud liha, taime idude, roheline salat ja muude köögiviljadega. Hügieeninõuete mittetäitmisel võib inimene nakatuda ka haige poolt saastatud pindade või esemetega kokku puutumisel. Nakatuda võib ka suplemisel saastunud vees (Terviseamet, 2023a)

Põhiliseks *E. coli* O157 reservauriks on veised ning seda bakterit on leitud veise sõnnikust, mis on tavaline biogaasi tootmise substraat (Kudva et al., 1998; Sahlström, 2003)

- ***Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis***

Mycobacterium paratuberculosis tekitab mäletsejatel kroonilist peensoolepõletikku. Patogeen levib läbi väljaheidete, saastunud vee ja toidu kaudu (Sahlström, 2003).

- ***Campylobacter jejuni***

Campylobacter on Euroopas kõige sagedamini esinev zoonoos (Terviseamet, 2023) ning on paljudes riikides üheks põhiliseks bakteriaalseks mao-soole põletiku põhjuseks inimestel (Sahlström, 2003). Kampülobakterid esinevad tapaloomade (peamiselt veiste, kuid ka broilerite) seedetraktis, kuid nakatuda võib ka vee kaudu,

koertelt ning kassidelt. Nii kodu- kui ka metsloomad võivad kogu oma elu olla bakterikandjad (Terviseamet, 2023)

Kearney et al. (1993) näitas mesofiilse anaeroobse kääritamise laboriuuringus, et elavaid *C. jejuni* organisme on võimalik tuvastada 112 päeva hoiustamisel olnud digestaadis (Kearney et al., 1993).

- ***Clostridium spp.***

Perekonna *Clostridium* liigid on anaeroobsed sporuleeruvad bakterid, kes põhjustavad erinevaid raskeid haigusi nagu teetanus (*Clostridium tetani*), botulism (*Clostridium botulinum*) ja gangreen (*Clostridium chauvoie*). *Clostridium spp.* ja ka teised sporuleeruvad bakterid on anaeroobse kääritamise suhtes väga vastupidavad ning spoorid võivad keskkonnas elus püsida aastaid (Sahlström, 2003). Elmerdahl Olsen & Errebo Larsen, (1987) näitasid, et *Clostridium perfringens* elab üle nii mesofiilset kui ka termofiilset kääritamist.

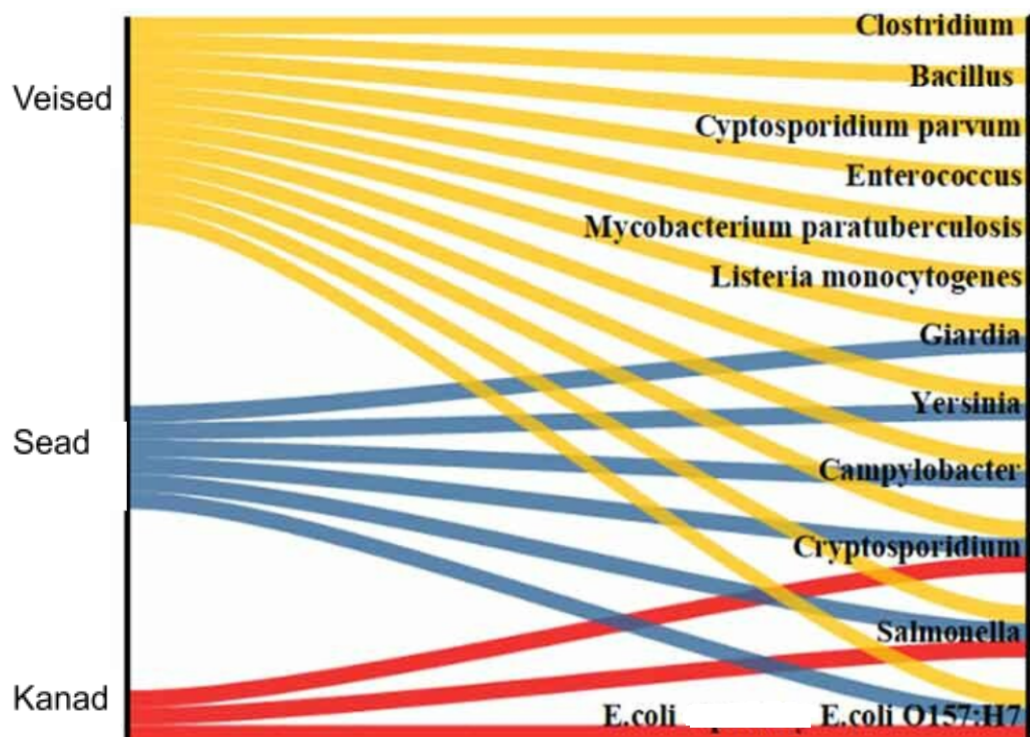
- ***Yersinia enterocolitica***

Yersinia enterocolitica põhjustab jersinioosi ehk seedetrakti vaevusi.

Jersinioosi võib nakatuda haigustekitajaga saastunud sea- ja veiseliha kaudu, kuhu bakter pääseb looma keelelt ja neelust. Lisaks toidule võib mikroob pesitseda ka vees. Haigust esineb ka kõrge elatustasemega maades. Jersiiniad on vastupidavad, optimaalne paljunemistemperatuur jääb vahemikku +22–28°kuid nad võivad areneda ka 0 kuni +4°C juures, seega külmkapi temperatuuril (Terviseamet, 2023b)

- **Helmintid ehk nugiussid**

Helmintid on selgrootud kõhuparasiidid, kes põhjustavad erinevaid haigusi. Nugiusside tavaliseks indikaatoriks jäätmetes kasutatakse *Ascaris sp.* mune, kes on ka levinuim helmint Eestis ning põhjustab maailmas iga aasta umbes 20 000 inimese surma. Nakatumine toimub suu kaudu haigustekitajate munadega saastunud aedviljade, marjade, muude toiduainete ning samuti saastunud käte vahendusel ja joogiveega. Nakkusallikaks on roojaga ussimune eritavad inimesed ja loomad (Aitken et al., 2005; Terviseamet, 2023).



Joonis 2. Erinevate patogeensete bakterite tüüpilised kandjad (Lin et al., 2022)

Enamus patogeenseid baktereid on kohanenud elama peremeesorganismi kudedes või vedelikes temperatuuril circa 37°C ning üldiselt ei paljune väljaspool vastavat keskkonda. Ka viirused, algloomad ja helmintid vajavad paljunemiseks loomset kude. Samas on erandeid nagu *E.coli* ja *Salmonella*, kes on võimelised paljunema fekaalidega reostunud vees või vastavate toitainete olemasolul ka steriliseeritud kompostis (Jones & Martin, 2003).

Mõistlik on inimeste ja kariloomade jäätmeid eraldi käidelda ning vältida inimeste ja loomade patogeenide segunemist keskkonna organismidega (Baquero et al., 2008).

2.2. Antibiootikumiresistentsed mikroobid digestaadis

Suureks ohuks digestaadi kasutamisel väetisena võib olla antibiootikumiresistentsete mikroobide (ARM) ja antibiootikumiresistentsusgeenide (ARG) sattumine põldudele ning seal levimine (Baquero et al., 2008; Heuer et al., 2011). Kuna antibiootikumi resistentsust kodeerivad geenid asuvad tihti plasmiididel ja teistel mobiilsetel geneetilistel elementidel, võivad nad sattuda patogeensete bakterite genoomi läbi horisontaalse geeniülekanne (Palmer et al., 2010).

Antibiootikumiresistentsus on looduses esinev nähtus, kus mikroorganismidel on mehhanismid teiste organismide poolt toodetud toksiliste ainete üle elamiseks (Su et al., 2015). Keskkond kus on palju ravimijääke soodustab antibiootikumiresistentsuse teket ja püsimist. Suur oht on antibiootikumiresistentsuse tekkimiseks antibiootikumide valel kasutamisel (Baquero et al., 2008).

Antibiootikumiresistentsed patogeenid on inimestele ohtlikud, kuna nad ei pruugi alluda ravile tuntud antibiootikumidele (Kemper, 2008).

Erinevatest läga töötlevatest biogaasijaamade digestaatidest on leitud järgmisi ARM-e: *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, vankomütsiini-resistentsed enterokokid (VRE), metitsilliini-resistentsed stafülokokid (MRS), *C. perfringens* ja *Escherichia/Shigella* (Derongs et al., 2020; Glaeser et al., 2016; Pulami et al., 2020; Schauss et al., 2016; Sun et al., 2020).

Lisaks on seostatud Salmonellat antibiootikumiresistentsus geenidega (Antunes et al., 2005).

3. Patogeenide ja antibiootikumiresistentsetegeenide tuvastamine digestaadis

3.1. Tuvastamise meetodid

Kõige levinumad meetodid patogeenide tuvastamiseks on kultiveeritud patogeenide kolooniate loendamine ja polümeraasahelreaktsioon. Mikroobide kultiveerimine on kordades aeglasem kui PCR meetod, kuid mõlemaga saab lõplikke ja ühemõttelisi tulemusi ning tihti kasutatakse mõlemaid meetodeid üheskoos kindlamate tulemuste saamiseks (Lazcka et al., 2007).

3.1.1. Mikroobide kultiveerimine

Mikroobide kultiveerimine on vanim bakterite tuvastamise viis. Kindlate bakteriliikide jaoks kasutatakse erinevaid selektiivseid söötmeid, mis sobivad ainult soovitud bakterile või põhjustavad uuritava bakteri koloonia värvumist. Nähtavate kolooniate tekkimisel on võimalik neid visuaalselt loendada (Lazcka et al., 2007). Kultiveerimise eelisteks on odavus ja lihtsus (Foddai & Grant, 2020), kuid see on väga aeganõudev protsess. Vaatamata sellele kasutatakse kultiveerimist kõrge selektiivsuse ja tundlikkuse tõttu (Lazcka et al., 2007).

Lisades kultiveerimise söötmele antibiootikume, on võimalik tuvastada ka antibiootikumiresistentsed mikroobe (Schwartz et al., 2003).

3.1.1.1. Mittekultiveeritavad bakterid

Paljusid keskkonnas leiduvaid mikroobe ei ole võimalik kultiveerida ning mitmetel patogeenidel, nende hulgas *E.coli*, *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella*, *Enterococcus*, *C.jejuni* esineb mittekultiveeritav seisund. Erinevad bakterid võivad ebasoodsate keskkonnatingimuste üle elamiseks siseneda VBNC (*viable but not-culturable*) seisundisse. Sellises olekus bakteri rakud ei paljune, kuid neil säilib aeglustunud ainevahetus, ning nad võivad sobivatel tingimustel uuesti paljunema hakata (J. D. Oliver, 2010).

Kuna patogeensete bakterite jaoks on kasvuks sobivad tingimused peremehe organismis, omavad ka VBNC seisundis patogeenid ohtu tervisele (Cappelier et al., 1999; Colwell et al., 1996).

Üks baktereid uuesti paljunevaks muutev töötlus on digestaadi tahkise ja vädu eraldamine tsentrifuugi abil (Higgins et al., 2007).

3.1.2. Molekulaarsed meetodid

Alternatiiviks mikroobide kultiveerimisele nende tuvastamiseks on molekulaarsed meetodid, nende seas DNA sekveneerimine ja qPCR abil märklaudgeeni koguse tuvastamine (Ginzinger, 2002).

PCR on meetod, mille abil on võimalik kindlat nukleiinhappe molekuli katseklaasis paljundada miljoneid kordi. Esmalt sünteesitakse kaks lühikest oligonukleotiidi mis kinnituvad soovitud DNA vastas otstele. Kinnituskohal saab lisatud ensüüm (DNA polümeraas) alustada geneetilise info lugemist ja uue DNA loomist. Seejärel proovi kuumutatakse, mille tulemusel DNA ahelad eralduvad üksteisest nii, et reaktsiooni saab uuesti korrata. (*The Nobel Prize in Chemistry*, 1993)

Kvantitatiivse PCR (qPCR- *quantitativePCR*) meetodi puhul mõõdetakse reaktsiooni toimumise jooksul produkti moodustumist ja amplifikatsioonikõverate alusel saab hinnata algset märklaudgeeni kogust proovis (Ginzinger, 2002).

qPCR on kiire, täpne, tundlik, korratav ja automatiseeritav (Valasek & Repa, 2005) ning sellega on võimalik tuvastada ka antibiootikumiresistentsust kodeerivaid geene (Mutli, 2014).

Lisaks on molekulaarsete meetoditega võimalik tuvastada ka mittekultiveeritavaid baktereid kes ainult kultiveerimismeetodite puhul jääksid tuvastamata (Higgins et al., 2007).

Nimelt on võimalik qPCR-iga mõõta mRNA kogust proovis, mis on sobiv nukleiinhape bakterite elujõulisuse indikaatoriks kuna tal on keskne roll valgusünteesis ning selle kadumise kineetika on seotud elujõulisuse kadumisega ja mRNA laguneb kiiresti peale rakku surma.(Sheridan et al., 1998)

Sheridan et al. (1998) uurisid mRNA tuvastamise ja raku elujõulisuse vahelist seost kuuma või etanooliga surmatud *E.Coli* rakkudel. Kuumaga hukatud rakkude puhul, ei olnud võimalik mõndasi märklaud geene enam tuvastada peale 2 kuni 16 tundi, kuid etanooliga surmatud rakkude puhul oli võimalik mRNA-d võimalik tuvastada ka peale 16 tunni möödumist. Vastukaaluks, oli võimalik surnud rakkude 16s RNA-d tuvastada ka peale 16 tunnist inkubeerimist toatemperatuuril.

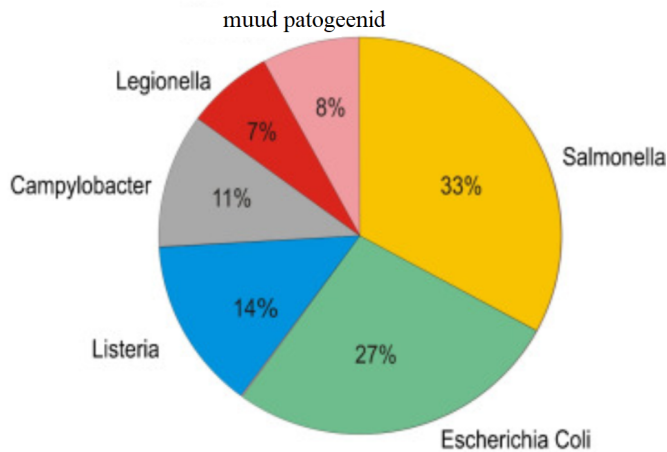
Enterokokide tuvastamine qPCR meetodi abil on kasulik tööriist patogeensete bakterite kontsentratsiooni ja saatuse indikeerimiseks biojäätmes.

Kultiveerimise ja qPCR andmeid kõrvutades saab teada ka paljunemisvõimeliste patogeenide osakaalu (Viau & Peccia, 2009).

3.2. Indikaatororganismid

Biojäätmes ja digestaadis võib esineda palju erinevaid patogeene väikestes kogustes ning nende tuvastamine võib olla keeruline ning aeganõudev. Seetõttu kasutatakse fekaalse saaste tuvastamiseks indikaatorbaktereid. Indikaatorbakterid on eelistatavalt mitte-tõvestavad bakterid, keda leidub loomulikult suurtes kogustes inimeste ja loomade seedekulglates (Sahlström, 2003).

Levinumaiteks indikaatorbakteriteks on *Salmonella* ja *E.coli* (Lazcka et al., 2007).



Joonis 3. Enim kasutatud indikaatorbakterid kirjanduse põhjal (Lazcka et al., 2007)

Eestis kasutatakse käärimisjäägi puhul indikaatoritena salmonellabakterit, *E.coli*, ja enterobaktereid (Riigi Teataja, 2016).

Tabel 2. Nõuded biolagunevatest jäätmetest biogaasi tootmisel tekkiva kääritusjäägi kohta (Riigi Teataja, 2016)

	Parameeter	Piirväärtus
Hügieen	Salmonellabakter	25 grammis puudub salmonella
	<i>E. Coli</i>	Maksimaalselt 1000 CFU/g tootes
	Enterobakterid	1 grammis tootes puuduvad enterobakterid

4. Patogeenide ja ARG omavate mikroobide inaktiveerimine

4.1. Patogeenide inaktiveerimine käärimisel

Anaeroobse kääritamisega on võimalik patogeene vähendada, kuid see ei pruugi olla piisav nende täielikuks eemaldamiseks ning esialgses substraadis leiduvad patogeenid võivad protsessi üle elada (Nag et al., 2020).

Anaeroobse käärimise puhul mõjutavad patogeenide inaktiveerimist patogeenide omapära, konkurents kohaliku mikrobiomiga, toitainete kättesaadavus, temperatuur, metabolismi vaheproduktid, pH ja käärimise aeg (Kunte et al., 2000; Pecson et al., 2007; Smith et al., 2005).

Tsüklilise täitmise viisiga biogaasi jaamad on edukamad patogeenide inaktiveerimisel, kuna käärimise ajal ei lisata substraadiga kaasnevaid patogeene (Jiang et al., 2020)

Erinevalt märgkäärimisest akumulereub kuivkääritamise puhul rohkem toksilisi vaheühendeid (Jiang et al., 2020), ning kuivkääritamine on efektiivne sporuleerivate ja mitte-sporuleerivate bakterite inaktiveerimisel, kuid kõrge kuivaine sisalduse nõude tõttu ei ole kuivkääritamine sobiv viis sõnniku töötlemiseks (Subirats et al., 2022).

4.1.1. Temperatuuri mõju

Kuna mesofiilne käärimine toimub enterobakteritele kodusel temperatuuril (Roberts et al., 1996), on selle termiline mõju patogeenidele väike. Madalal temperatuuril kääritamise puhul on põhilisteks patogeene inaktiveerivateks faktoriteks toidupuudus, mürgised laguained ja konkurents kohaliku mikroobioomiga (Orzi et al., 2015; Smith et al., 2005)

Üldiselt peetakse tõhusamaks hügieeni nõuete täitmisel termofiilset kääritamist.

Jiang et al (2020) tõid oma ülevaate artiklis välja, et keskmiselt on mesofiilse kääritamisega võimalik saavutada kuni 3 \log_{10} patogeenide vähendamine, samas kui termofiilsega on saavutatud 4-5 \log_{10} vähendamine (Jiang et al., 2020).

Temperatuuri tõustes muutub raku membraan vedelamaks ja läbilaskvamaks ning membraani valgud denatureeruvad (Bischof et al., 1995). See omakorda kiirendab mürgiste ainete difusiooni rakku. Lisaks võib temperatuur mõjutada ka mürgiste vaheainete, nagu lenduvad rasvhapped ja ammoniaak, moodustumist (Jiang et al., 2020).

Tabel 3. Erinevate töötlemisviiside mõju kultiveeritavatele bakteritele, viirustele ja helmintidele kirjanduse andmetel.

Patogeen	Lähte- materjal	Kääriti temp. (°C)	Kääriti toite- süsteem	Arvukus lähte- materjalis	log ₁₀ vähenemine	Arvukus digestaadis	Kirjanduse viide
<i>Salmonella</i> <i>spp</i>	sealäga	20	pidev	2.2x10 ³ (CFU/mL)	1.2–1.4		(Massé et al., 2011)
	lehmäsõnnik	55	pidev	1000-1500 MPN/g DM		<1 MPN/g DM	(Harikishan & Sung, 2003)
	seasõnnik	22	tsükliline	10 ⁶ -10 ⁷ (CFU/mL)		10 ¹ -10 ² (CFU/mL)	(Fongaro et al., 2018)
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	jääkmuda	35	pidev	>10 ⁶ /g DS		1.8×10 ⁴ /g DS	(Horan et al., 2004)
<i>Enterococcus</i>	jääkmuda	34-39	pidev	3.6x10 ⁴ (CFU/mL)		2x10 ³	(Sahlström et al., 2004)
	jääkmuda	55	pidev	3.2x10 ⁴ (CFU/mL)		Ei tuvastatud	(Sahlström et al., 2004)
fekaalsed koli-laadsed bakterid	Sealäga + põllu- majandus jäätmel	39	pidev	1.55x10 ⁵ (CFU/mL)		1.09x10 ³ (CFU/mL)	(Orzi et al., 2015)
<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	jääkmuda	34-39	pidev	3.6x10 ⁵ (CFU/mL)		8.4x10 ³ (CFU/mL)	(Sahlström et al., 2004)

	lehmasõnnik	55	pidev	0.54x10 ⁶ - 1.44x10 ⁶ (CFU/mL)		< 10 ² (CFU/mL)	(Aitken et al., 2007)
	lehmasõnnik	25	tsükliline	6.5 × 10 ⁷ (CFU/mL)		< 10 ² (CFU/mL)	(Pandey & Soupir, 2011)
	Toidujäätmed ja sealäga	37	tsükliline	7.9 × 10 ⁸ (CFU/mL)		Ei tuvastatud	(Jiang et al., 2018)
	Piimakarja läga	52.5	tsükliline	2.5x 10 ⁷ (CFU/mL)		Ei tuvastatud	(Pandey & Soupir, 2011)
<i>Clostridium</i> <i>spp.</i>	jääkmuda	55	pidev	1.7x10 ⁵ (CFU/mL)		10 ⁵ (CFU/mL)	(Sahlström et al., 2004)
	jääkmuda	34-39	pidev	1.7x10 ⁵ (CFU/mL)		6x10 ⁴ (CFU/mL)	(Sahlström et al., 2004)
	jääkmuda	Meso- fiilne	tsükliline	1.31x10 ⁵ ±1.41 × 10 ⁵ (CFU/mL)		3.9x10 ⁴ ± 4.85x10 ⁴ (CFU/mL)	(Xu et al., 2014)
	lehmasõnnik	55	tsükliline	10 ³ -10 ⁴ (CFU/mL)	<1		(Watcharasuk arn et al., 2009)
<i>Poliovirus</i>	jääkmuda	51	tsükliline	10 ⁴ -10 ⁶ PFU/L		Alla tuvastus- piiri	(Aitken et al., 2005)
	jääkmuda	34	pidev	10 ⁶ PFU/L	~1.2		(Sanders et al., 1979)

<i>Ascaris munad</i>	jääkmuda	49	tsükiline	4x10 ⁵ muna/L		10 ¹ -10 ² muna/L	(Aitken et al., 2005)
	jääkmuda	55	tsükiline	4x10 ⁵ muna/L		Alla tuvastuspiiri	(Aitken et al., 2005)

Samas leidsid Fu et al. (2014) molekulaarseid meetodeid kasutades, et anaeroobsel kääritamisel mõjutab temperatuur vaid bakterite kultiveeritavust, mitte ei hävita neid.

Nende läbiviidud katses langes kultiveeritava *E.coli* hulk mitte tuvastatavale tasemele termofiilsel ja mesofiilsel kääritamisel vastavalt 7 ja 22 päevaga, kuid RT-qPCR abil tuvastatud elujõuliste bakterite arv oli sarnane, vastavalt 10⁸ MPN g/dw ja 10⁷ MPN g/dw.

Kääritusjäakide tsentrifugimise tagajärjel tõusis mõlemas digestaadis kultiveeritav *E.Coli* sarnasele tasemele 10² MPN g/dw.

Peale 30 päeva toatemperatuuril hoiustamist püsis mõlemas digestaadis elujõuliste bakterite arv 10⁸ MPN g/dw kandis, kuid kultiveeritavate bakterite arv oli termofiilse käärituse järgis tõusnud tasemele 2.7 log₁₀ MPN g/dw ja mesofiilse omas langenud tasemele 1.6log₁₀ MPN g/dw (Fu et al., 2014).

Q. Jiang et al. (2013) leidsid samuti, et mesofiilse kääritamise käigus püsisid elujõuliste *E. coli*, *Salmonella typhimurium* ja *Shigella flexneri* bakterite arvukused võrdlemisi stabiilsed, kuid kultiveeritavate bakterite arvukus langes vastavalt 3, 5 ja 5 log ühiku võrra.

4.1.2 Toksilised vaheühendid

Lenduvad rasvhapped (VFA) on bakterite jaoks mürgised vaheühendid, mis läbivad rakumembraani ja eraldavad tsütoplasmasse H⁺ ioone, mille väljutamine on energiakulukas ning kurnab rakku (Puchajda & Oleszkiewicz, 2006).

Lenduvate rasvhapete toksilisust bakteritele mõjutavad pH, temperatuur ja rasvhappe pikkus (Jiang et al., 2020).

Temperatuuri tõusmisega, suureneb lenduvate rasvhapete difusioon läbi rakumembraani. Neutraalse pH juures on VFA mõju patogeenidele väike, kuid toksilisus tõuseb jõudsalt happelises keskkonnas (Salsali et al., 2006).

Ammoniaak tekib valkude anaeroobsel lagunemisel ning on mürgine paljudele mikroorganismidele, kaasa arvatud viirused ja parasiidid (Jenkins et al., 1998; Park & Diez-Gonzalez, 2003; Ward, 1978), kuid kõrge ammoniaagi tase häirib ka metaankäärimisega seotud mikroobe (Hashimoto, 1986).

4.2. Anaeroobse käärimise mõju antibiootikumiresistentsetele bakteritele ja antibiootikumiresistentsusgeenidele

Koos üldise indikaatororganismide vähenemisega, väheneb ka kultiveeritavate antibiootikumiresistentsete bakterite (ARB) kontsentratsioon termofiilsel käärimisel rohkem kui mesofiilsel käärimisel (Youngquist et al., 2016). Näiteks Beneragama et al. (2013) läbiviidud katses langesid kindlate kultiveeritavate kanamütsiini ja oksütetratsükliini resistentsete bakterite populatsioonid lehmäsõnniku meso- ja termofiilse kääritamise käigus vastavalt 90% ja 100% ning Han et al. (2009) ei tuvastanud ARB peale 3 päeva termofiilset kääritamist.

ARG-dele pühendunud uuringud annavad aga vastakaid tulemusi, kus käärimisel mõned ARG-d vähenevad, teised aga võivad paljuneda ning ARG kontsentratsioon kääritusjärgis on tugevalt mõjutatud käärituse tehnoloogiast ja kohaliku mikrobiomi liigilisest koosseisust (Ma et al., 2011; Miller et al., 2013).

Ma et al. (2011) uurisid anaeroobse käärimise mõju ARG-dele sul I , sul I I , erm(B), erm(F), tet(O), tet(W), tet(C), tet(G), tet(X). Lisaks jälgiti ka geeni intI1, et hinnata horisontaalse geeniülekanne potentsiaali.

Mesofiilne käärimine vähendas märgatavalt geene sul I , sul I I , tet(C), tet(G), ja tet(X), kuid geenide tet(W), erm(B) ja erm(F) tasemed tõusid võrreldes substraadiga.

Termofiilne kääritamine tagas tõhusama erm(B), erm(F), tet(O), ja tet(W) geenide vähendamise, kuid teiste ARG ja intI1 puhul tagas mesofiilsega sarnase või halvema vähendamise. Termiline hüdroolüüs eeltötlusena vähendas drastiliselt kõiki ARG, kuid üldiselt need taastusid järgneva kääritamise käigus).

Miller et al. (2013) läbiviidud katses olid samuti tet(O) ja tet(W) tasemed kõrgemad peale mesofiilset kääritamist

Mario Mutli läbiviidud katses, kus uuriti patogeenide ja ARG-de sisaldust lüpsikarja vedelsõnnikus ja sellest toodetud digestaadis, tuvastati digestaadis patogeen *E. faecalis* ning ARG-d tetA, tetB, sul1, qnrS blaTEM1 ja blaCTX-M. Anaeroobne kääritamine vähendas märgatavalt ARG-de qnrS, blaTEM1 ja blaCTX-M arvukust, kuid suurendas patogeeni *E. faecalis* ning ARG-ide tetA, tetB ja sul1 arvukust (Mutli, 2014).

Riaz et al. (2020) uurisid kanasõnniku kääritamise mõju ARG-dele ning leidsid, et anaeroobne käärimine suurendas geenide ere(A) ja tet(A) üldist kogust.

Lisaks täheldati ARG-de ja intl1 koos esinemist.

4.3. Digestaadi eel- ja järeltöötlus

Lisaks anaeroobsele kääritamisele on veel mitmeid meetodeid patogeenide vähendamiseks lõpptootes, nende seas kompostimine, töötlemine lubja, kloori, UV-kiirguse, osooni või kõrge rõhuga (Álvarez et al., 2003; Erickson & Ortega, 2006). Kõige tavapärasemaks eeltötluseks vastavalt Euroopa komisjoni soovitudele on enne kääritamist substraadi pastöriseerimine 70°C juures 1 tund (Nag et al., 2020; Smith et al., 2005). Mõned patogeenid, nagu *Clostridium spp.* võivad tänu kaitsemehhanismidele selle üle elada (Sahlström et al., 2008).

Läbi digestaadi lisatötluse on võimalik saada kvaliteetsem ja ohutum toode ning levinumaks järeltötluseks on kääritusjärgist tahkise eraldamine ja selle komposteerimine (Zeng et al., 2016).

4.4. Digestaadi käitlemine kompostimise abil

Kompostimine on kontrollitud tingimustes kulgev aeroobne eksotermiline bioloogiline lagundamisprotsess, milles orgaaniline aine laguneb bakterite ja seente ning muude organismide elutegevuse toimele homogeenseks huumusrikkaks materjaliks (Riigi Teataja, 2013).

Eestis on tööstuslikule kompostimisele seadusega seatud järgmised nõuded:

- (1) komposti tootja peab tagama toimiva kompostimise protsessi.
- (2) kompostitava materjali viibeaeg peab sõltuvalt temperatuurist olema:
 - 1) kompostimisel avatud aunades temperatuuril ≥ 55 °C vähemalt 10 ööpäeva;
 - 2) kompostimisel avatud aunades temperatuuril ≥ 65 °C vähemalt 3 ööpäeva;

3) kompostimisel kinnises reaktoris või välitingimustest eraldatud süsteemis temperatuuril ≥ 60 °C vähemalt 3 ööpäeva.

Aunades kompostimisel tuleb kompostitav materjal regulaarselt mehaaniliselt läbi segada või lisada aunadesse gaasivahetuse kanalid, et tagada nõuetekohane protsess kogu materjali ulatuses (Riigi Teataja, 2013).

4.4.1. Patogeenide inaktiveerimine kompostimisel

Üldiselt peetakse kompostimist tõhusaks meetodiks patogeenide inaktiveerimisel ning õigetest tingimustel on võimalik eemaldada enamik patogeene (Manga et al., , 2023). Ebapädev kompostimine võib aga tuua kaasa patogeenide nagu *Clostridium sp.*, *E.coli* ja *Salmonella* püsivuse lõpptootes (Jones & Martin, 2003)

Enamus patogeenseid baktereid on kohanenud elama peremeesorganismi kudedes või vedelikes temperatuuril ca. 37°C ning üldiselt ei paljune väljaspool vastavat keskkonda. Ka viirused, algloomad ja helmintid vajavad paljunemiseks loomset kude. Samas on erandeid nagu *E.coli* ja *Salmonella*, kes on võimelised paljunema fekaalidega reostunud vees või vastavate toitainete olemasolul ka steriliseeritud kompostis (Jones & Martin, 2003)

Kompostimine on tüüpiliseks digestaadi järeltöötlemise meetodiks, kus väga olulisteks faktoriteks on termofiilse faasi temperatuur ja kestus.

Lisaks mõjutavad patogeenide inaktiveerimist kompostimisel niiskus, õhustatus, segamise sagedus, tugiaine, toitainete hulk, happelisus, toksilised lagunemised ning kohalik mikroobioom (Manga, Muoghalu, & Acheng, 2023; Subirats et al., 2022).

Digestaadi tahke osa kompostimine muudab selles olevad toitained taimedele kergemini omastatavaks vähendab patogeenide sisaldust ja fütotoksilisust (Song et al., 2021; Zeng et al., 2016).

4.4.1.1. Temperatuuri mõju

Erinevatel patogeenidel on erinevad temperatuuri taluvuse piirid. Kindla temperatuuri saavutamisel raku ensüümid denatureeruvad ning muutuvad pöördumatult kasutuks, mille tagajärjel muutub ka rakk eluvõimetuks, kuna ensüümid mängivad olulist rolli raku elutegevuses (Wichuk & McCartney, 2007).

Kompostimise temperatuur sõltub lähtematerjali C:N suhtest, niiskusest, hapniku kättesaadavusest ja välistemperatuurist. Lisaks on temperatuuri mõju mikroorganismidele sõltuv muutujatest nagu pH, niiskus, segamise sagedus ja tugiaine (Manga et al, 2023)

On tõendeid, et kompostimise termofiilses faasis saavutatud kõrge temperatuur aitab vähendada ARB ja ARG kogust (Youngquist et al., 2016), kuna kõrge temperatuur takistab konjugatiivset plasmiidi ülekannet bakterite vahel (Guan et al., 2007).

Kuigi sporuleeruvad bakterid on väga vastupidavad ebasoodsatele tingimustele, on kompostimisega võimalik neid vähendada (log vähenemine 1.7-6.5), kui kompostimise temperatuur ulatub termofiilses faasis $>60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Subirats et al., 2022).

Xu et al. (2016) läbiviidud katses suudeti aunkompostimisega vähendada *C. perfringens* ja *C. difficile* arvukust jääkmudas vastavalt 2.8 ja 3.4 log võrra, kui temperatuur ulatus $>70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Lisaks bakteritele on kompostimine tõhus ka patogeensete algloomade ja helmintide inaktiveerimisel, kui temperatuur ulatub mõneks päevaks $60\text{-}70^{\circ}\text{C}$ (Manga et al., 2023).

Déportes et al. (1998) täheldasid, et *Ascarise* munad püsisid kompostimise käigus elus 27 päeva, millest 16 päeva oli temperatuur $>55^{\circ}\text{C}$.

Samas täheldasid Cabañas-Vargas et al. (2013) kõigest 81% helmintide munade inaktivatsiooni jääkmuda kompostimisel 30 päeva jooksul, kus temperatuuri $>55^{\circ}\text{C}$ hoiti üle 15 päeva .

Koné et al. (2007) näitasid, et 90%-100% *Ascarise* munade suremus on võimalik saavutada jääkmuda ja orgaaniliste jäätmete koos-kompostimisel 80 päevaga, millest 40 päeva oli temperatuuril $>45^{\circ}\text{C}$ ja 21 päeva $>60^{\circ}\text{C}$, kuid munad püsisid elujõulisena peale termofiilset faasi veel 55 päeva ning need inaktiveerusid komposti küpsemise faasis, mille põhjal saab hüpoteesida, et patogeenide inaktivatsioon kompostimisel ei põhine ainult temperatuuril .

Franke-Whittle et al. (2014) kasutasid molekulaarseid meetodeid uurimaks mikroobikoosluste muutusi digestaadi kompostimisel. Nad tuvastasid *Salmonella* peale

termofiilset (55°C) faasi värskes (20 päeva) ja poolküpse (34 päeva) kompostis, kuid *Salmonella* kogus oli langenud alla tuvastamispiiri küpse (63 päeva) kompostis kahes kolmest katses. See näitab, et lisaks temperatuurile on muid digestaadi kompostimisel hügieeni mõjutavaid faktoreid. Lisaks tuvastati kõigis toormetes *Listeria*, kuid seda ei tuvastatud üheski küpse kompostis.

4.4.1.2. Segamine ja õhustatus

Pidev aeratsioon soodustab soojuste teket ja komposti mikroobide arengut, kes konkureerivad patogeenidega toitainete pärast või toituvad neist (Ravva & Sarreal, 2014). On täheldatud, et aeroobsed tingimused on efektiivsed enteroviiruste ja ssDNA viiruste hävitamisel ning aereerimine vähendab kindlate patogeenide inaktiveerimis aega (Grewal et al., 2006; Munch et al., 1987).

Lisaks aitab sageda komposti läbisegamine vähendada *E.coli* ja *Enterococcus spp.* arvukust, kuna tihe segamine toob kaasa mitmeid soojenemis tsükleid, mis on tõhusamad patogeenide inaktiveerimisel ka madalamatel temperatuuridel.

Seega on aeratsioon oluline parameeter patogeenide inaktiveerimisel, eriti kompostimise mesofiilses ja küpsemise faasis (Manga et al, 2023; Manga, Muoghalu, Camargo-Valero, et al., 2023).

4.4.1.3. Tugiained, toksilised laguained ja pH

Tugiained mängivad kompostimisel olulist rolli, kuna nende koostis võib soodustada või takistada patogeenide inaktivatsiooni.

Põhu kasutamine tugiainena kiirendab inaktivatsiooni oma kõrge pH ja kiudaine sisalduse tõttu (Lepesteur, 2022).

Sõe lisamine võimaldab saavutada kõrgemaid temperatuure pikema aja vältel kuna süsi on poorne ning aitab seeläbi kaasa õhutamisele ning on pinnaks kohalikele mikroobidele (Manu et al., 2021; Wu et al., 2017).

Ligniini sisaldavad tugiained nagu saepuru aitavad kaasa patogeenide inaktiveerimisele, kuna nende lagundamise käigus tekivad mürgised fenoolsed ühendid (Erickson et al., 2014).

Kompostimise käigus tavaliselt pH väärtus tõuseb metaboolsete kõrvalproduktide nagu süsihappegaas, orgaanilised happed ja ammoniaak tõttu (Popat et al., 2010), mis võivad olla mürgised ning aidata kaasa patogeenide inaktiveerimisele (Avery et al., 2012). Näiteks ammoniaak on väga reageeriv ja efektiivne fekaalsete kolibakterite ja helmintide munade inaktiveerimisel, kuid selle toksilisus on sõltuv pH-st (Pecson et al., 2007).

4.4.1.4. Komposti mikrobioom

Kompostis leiduvate mikroobide poolt toodetud toksilised ained mängivad olulist rolli patogeenide inaktiveerimisel (Manga, Muoghalu, & Acheng, 2023).

Sidhu et al. (2001) täheldasid katses, et steriliseeritud ja *Salmonella typhimuriumiga* nakatatud kompost koloniseeriti kiiresti jõudes koguseni 10^8g^{-1} , samas kui mitte-steriliseeritud kompostis oli *Salmonella* kasv pidurdatud ning jõudis tasemele 10^3g^{-1} .

Mõned mikroorganismid nagu näiteks *Penicillium* toodavad *Salmonellat* ja teisi patogeene pärssivaid antibiootikume (Larsen & Knøchel, 1997).

Patogeene pärssivaid mikroobe saab kompostile lisada erinevate tugiainetega.

Piimakarja sõnnikus leiduvad saprofüütsed bakterid toodavad antimikroobseid aineid, mis aitavad kaasa patogeenide inaktivatsioonil (Manga, Muoghalu, & Acheng, 2023).

Linnu suled kannavad endaga bakterit *Bacillus licheniformis*, kes suudab mesofiilsetes tingimustes toota helmintide mune surmavaid ensüüme.

Manga et al. (2016) täheldasid 100% helmeniitide munade suremust 4 nädalaga jääkmuda kompostis kuhu oli lisatud kanasulgi, kui ilma saavutati 8 nädalaga 93.7% suremus .

Lisaks võib kisklust pidada üheks patogeene hävitavaks faktoriks kompostis. Puri & Dudley (2010) täheldasid olulist *Escherichia coli* O157:H7 vähenemist protistide kiskluse tagajärjel kompostis. Li et al.(2022) katses täheldati tetratsükliini resistentsete geenide vähenemist seene *Phanerochaete chrysosporium* tõttu, kuna tetratsükliini-resistentsus geene kandvad bakterid tungisid seene rakku, jäid sinna kinni ja lüüsiiti koos oma geenidega seene poolt ära.

4.4.1.5. Niiskus

Niiskuse sisaldus mõjutab orgaanilise aine lagundamise kiirust ning sporuleerivate bakterite hävinemist, kuna endosporidel on suurem vastupanu võime kuivale kuumusele. Lisaks mõjutab niiskus kompostimise temperatuuri ja õhustatust (Harvey, 2019; Manga, Muoghalu, & Acheng, 2023).

4.4.1.6. Kompostimise tehnoloogia

Reaktor-kompostrid on tõestanud ennast patogeenide inaktiveerimisel, kuid nad on kallid ning neil on kõrged ülalpidamiskulud ja suur energianõudlus. Aunkompostimine on odavam, kuid täieliku patogeenide inaktivatsioon tagamiseks (rohkem kui 99.99% või 4-log vähenemine) peaks temperatuur ületama 55°C 100 päeva. Kuna soovitud temperatuuri peavad saavutama kõik komposti osad, on soovitatav tihe segamine, et tagada kogu komposti massi läbi soojenemine (Manga, Muoghalu, & Acheng, 2023).

Lisaks on võimalik digestaati töödelda ka vermikompostimisega (Krishnasamy et al., 2014).

4.4.2. Kompostimise mõju antibiootikumiresistentsetele bakteritele ja antibiootikumiresistentsusgeenidele

Kuigi kompostimine on levinud digestaadi käitlemise viis, on kirjandust mis uurib kompostimise mõju digestaadis leiduvatele ARG-dele vähe. Rohkem on kirjandust, mis keskendub sõnniku kompostimisele, kuid ka siin leidub vastakaid tulemusi.

Kompostimisega võimalik vähendada mitmeid meditsiinilise tähtsusega ARG-ne, aga need püsivad ka küpses kompostis ning võivad levida keskkonda (Oliver et al., 2020; Riaz et al., 2020; Walczak & Xu, 2011).

Lisaks on täheldatud ka kindlate ARG-de tasemete tõusu kompostimisel (Riaz et al., 2020; Su et al., 2015)

ARG-de saatust kompostimisel mõjutavad kompostimise tehnoloogia, antibiootikumide ja nende jääkide sisaldus algaines, raskemetallid, horisontaalne geeniülekanne ning muutused mikrobioomis (Qian et al., 2018; 2016).

Gurmessa et al., (2021) uurisid ARG-de erm(B), tet(K), tet(M), tet(O) ja tet(S) saatust digestaadi kompostimisel ning leidsid, et sõltuvalt tugist on võimalik eemaldada rohkem kui 80% kõigist uuritud ARG-dest ning nad seostasid ARG-de kadu mikrobioomi muutustega).

Tabel 4. ARG-de muutused kompostimisel

Viide	ARG geen	Muutus	Algaine
(Gurmessa et al., 2021)	ermB	vähenes >80%	digestaat
	tetK	vähenes >80%	digestaat
	tetM	vähenes >80%	digestaat
	tetO	vähenes >80%	digestaat
	tetS	vähenes >80%	digestaat
(Qian et al. 2016)	tetC	vähenes	lehmäsõnnik
	tetG	vähenes	lehmäsõnnik
	tetM	vähenes	lehmäsõnnik
	tetQ	vähenes	lehmäsõnnik
	tetX	vähenes	lehmäsõnnik
	ermB	vähenes	lehmäsõnnik
	aac(6')-Ib-cr	vähenes	lehmäsõnnik
	intl2	vähenes	lehmäsõnnik
	sul1	stabiilne	lehmäsõnnik
	sul2	stabiilne	lehmäsõnnik

(Riaz et al., 2020)	blaCTX-M	väheneb	kanasõnnik
	intl1	väheneb	kanasõnnik
	aac6'-Ib	väheneb	kanasõnnik
	aadA	väheneb	kanasõnnik
	oqxB	väheneb	kanasõnnik
	qnrD	tõus	kanasõnnik
	sul1	tõus	kanasõnnik
	tetA	tõus	kanasõnnik
(Cao et al., 2022)	blaCTX-M	väheneb	sea ja kanasõnnik
	intl1	väheneb	sea ja kanasõnnik
	oqxB	väheneb	sea ja kanasõnnik
	aac6'-Ib	väheneb	sea ja kanasõnnik
	aadA	väheneb	sea ja kanasõnnik
	qnrD	väheneb	sea ja kanasõnnik
	sul1	väheneb	sea ja kanasõnnik
	tetA	väheneb	sea ja kanasõnnik
	ereA	tõus	sea ja kanasõnnik
(Sharma et al., 2009)	tetG	väheneb	veisesõnnik
	ermB	väheneb	veisesõnnik
	ermC	väheneb	veisesõnnik

	ermF	väheneb	veisesõnnik
	ermT	väheneb	veisesõnnik
	ermX	väheneb	veisesõnnik

5. Patogeenide ja antibiootikumiresistentsusgeenide püsivus keskkonnas

Kuna muld on väga keeruline ja mitmekülgne keskkond, on raske ennustada patogeenide püsivust mullas, mis on tingitud paljudest faktoritest, nende hulgas patogeeni liik ja kogus, mulla lõimis, kohalik kliima, kohalik mikrobiom jne (Piveteau et al., 2022).

Coelho et al. (2020) näitasid, et digestaadis domineerivad mikroobid ei suutnud asustada mulda ning 2 aastat digesaadiga väetamist ei mõjutanud mulla mikrobiomi.

Goberna et al. (2011) uurisid kultiveeritava *E.coli*, *Salmonella* ja *Listeria* püsivust mullas peale väetamist värske ja anaeroobselt kääritatud sõnnikuga ning leidsid, et uuritud patogeenid langesid kontrolltasemele 3 kuuga.

Gondim-Porto et al. (2016) uurisid kolibakterite, enterokokide ja *Clostridium spp.* spooride püsivust jääkmuda digestaadiga väetatud mullas.

Madala digestaadi koguse ($40 \text{ Mg} \cdot \text{ha}^{-1}$) puhul langes kolibakterite arvukus kontrolltasemele, kuid kõrge koguse ($160 \text{ Mg} \cdot \text{ha}^{-1}$) puhul püsis kolibakterite tase kõrge ($4\text{--}5 \log_{10} \text{CFUs} \cdot \text{g}^{-1}$) peale 24 kuud. Ka enterokokid ja *Clostridium spp.* spoorid olid arvukamad digestaadiga väetatud muldades peale 24 kuud.

Gómez-Brandón et al. (2016) võrdlesid erinevate orgaaniliste väetistega mulda viidud bakterite püsivust mullas. 60 päeva peale väetamist oli kultiveeritava *C.perfringens* tase madalaim digestaadiga väetatud mullas.

Samas tõid autorid välja, et digestaat on vedel ja sellega mulda viidud mikroorganismid võivad kergemini sattuda sügavamale mulla kihtidesse.

Nõlvak et al. (2016) uurisid ARG-de sull1, tetA, blaCTX-M, blaOXA2, qnrS ning horisontaalse geeniülekanega seotud geenide intl1 ja intl2 muutusi mullas erinevate väetiste kasutamisel. Mitte-väetatud mullas esinesid stabiilsed tetA, blaCTX-M ja sull1 tasemed, millest kõige arvukam oli tetA (9.63×10^4 koopiat $g^{-1} dw^{-1}$) ning blaCTX-M ja sull1 kogused olid üks või kaks suurusjärku väiksemad.

Sõnniku või digestaadiga väetamise järel tõusid geenide Sul1, blaCTX-M, intl1 ja intl2 kogused, mis aja möödudes langesid, kuid ei saavutanud katse lõpuks (180 päeva) esialgseid tasemeid. Enne katse algust võetud proovidega määrati, et eelneval aastal digestaadiga väetatud mullas oli märgatavalt kõrgem blaCTX-M kogus ja osakaal võrreldes kontrolliga kuid väiksem tetA kogus ja osakaal, mis viitab tõenäoliselt püsivamatele muutustele mulla bakterite kooslustes väetamise tulemusena.

6. Arutelu

Biogaasi ja kääritusjäägi tootmine omab suurt potentsiaali ringmajanduse edendamisel, kuid kääritusjäägi kasutamisel tuleb veenduda selle ohutuses

Hetkel Eestis kehtivad kääritusjäägi kvaliteedinäitajad ei arvesta vastupidavate patogeenidega nagu *Clostridium sp.* ega mittekultiveeritavas olekus bakteritega.

Klassikalised biogaasi toormed: sõnnik ja reovesi, sisaldavad patogeene, millest vastupidavamad (nt. *Clostridium sp.*) elavad üle levinud kääritamise meetodeid (Sahlström, 2003; Subirats et al., 2022). Siiski on võimalik kääritamisprotsessi optimeerida võimalikult väikse patogeenide sisalduse saavutamiseks. Käesoleva töö autor peab sõnniku ja reovee käitlemisel sobivaks tsüklilise täitmisviisiga termofiilseid biogaasijaamu, mis on üldiselt edukamad patogeenide vähendamisel. Vaatamata sellele vajab reoveest ja sõnnikust saadud digestaat ohutuse saavutamiseks enamasti täiendavat töötlust (Subirats et al., 2022).

Levinud lisatöötused on toorme pastöriseerimine enne kääritamist (Nag et al., 2020) ning kääritusjäägi tahese kompostimine (Zeng et al., 2016).

Eestis kehtivad nõuded tööstuslikule kompostimisele tagavad märkimisväärse patogeenide vähenemise, kuid aunkompostimine ei pruugi tagada täielikku patogeenide hävimist).

Aunkompostimise tõhusust patogeenide eemaldamisel saab mõjutada õhustamise ja tugiainetega ning kui digestaadi kompostimisel keskenduda kääritamist üle-elanud mikroobidele, on võimalik saavutada hügieeninõuetele vastav toode).

Eestis peab aunkompostimisel arvestamaga ka kliimaga, kuna talvel on raskem saavutada nõuetele vastavale temperatuuril püsimist. Siiski on talvistes oludes aunkompostimine võimalik, kui kasutada sobivaid tugimaterjale (nt sütt) ning protsessi optimeerida (Liiv, 2019).

Orgaanilistest jäätmetest toodetud väetiste ohutuse hindamisel tuleks tähelepanu pöörata ka mittekultiveeritavatele bakteritele .

Töö autor ei leidnud ühtegi uuringut mis jälgiks elujõuliste patogeenide saatust läbi järgnevate käitlemis etappide: tooraine-kääritamine-kompostimine-mulda viimine.

Samas võib eeldada, et kui anaeroobsel käärimisel VBNC olekusse sunnitud bakterid peavad läbima ebasoodsaid tingimusi ka kompostimisel ning mullas, ei kujuta nad endast suurt ohtu, kuna töötlus protsessi jooksul tekitatud stress kurnab neid ja VBNC olekus bakterid eemaldatakse olulisel määral.

Üheks võimaluseks patogeensete VBNC bakterite ohu vähendamiseks oleks vädu ja tahese eraldamine kasutades teisi meetodeid kui tsentrifuugimine, mis põhjustab bakterite väljumist VBNC olekust (Higgins et al., 2007).

Kuigi kääritamise ja kompostimisega on võimalik vähendada kindlaid meditsiinilise tähtsusega ARG-ne substraadis, ei taga kumbki töötlus täielikku ARG eemaldamist ning mõned ARG-d võivad töötluse käigus ka paljuneda (Ma et al., 2011; Riaz et al., 2020).

Pidev ARG-de rikka väetise kasutamine võib kaasa tuua püsivamaid muutusi mulla mikrobioomis (Nölvak et al., 2016).

Koduseks biogaasi tootmiseks peab autor paslikuks kasutada väikese ohufaktoriga taimset päritolu toormeid, et vältida kääritusjäägi lisatöötlemise vajadust.

Lisaks on Eesti kliimas mõistlik võtta eeskju Rootsisis asuvast Suderbyni kogukonna biogaasijaamast, kus on inokulaadina kasutatud segu meso- ja psührofiilsetest metaani tootvatest mikroorganismidest. See tagab biogaasi tootmise ka jahedates tingimustes ($\geq 6^{\circ}\text{C}$) (R. Hall, personal communication, 2023; Suderbyn, 2023).

Kodustes tingimustes kõrge riskifaktoriga toormest toodetud digestaadi kasutuseks võiks kaaluda energiavõsa või viljapuude väetamist, vältides digestaadi sattumist taime maapealsetele osadele.

Kokkuvõtte

Käesolev töö annab kirjanduse põhjal ülevaate biogaasi kääritusjärgis leiduvatest mikroobsetest riskifaktoritest nagu patogeeneid ja antibiootikumiresistentsusgeene ning neid mõjutavatest protsessidest. Töös on keskendunud enamlevinud digestaadi käitlemise meetoditele.

Tähelepanu pööramine mikroobsed riskifaktoritele on oluline just sõnniku ja reovee käitlemisel, mis on ühed levinud biogaasi tootmise toormed Eestis. Anaeroobse kääritamise ning kääritusjärgi kompostimise protsesse optimeerides on ka neist võimalik saavutada kehtivatele ohutusnõuetele orgaaniline väetis.

Kääritusjärgi ning sellest toodetud komposti ohutuse hindamisel peaks arvestama ka mittekultiveeritavate ja sporuleeruvate patogeenidega, mis hetkel ei kuulu Eestis kehtivate kvaliteedinäitajate hulka.

Kirjanduse andmete põhjal anaeroobne kääritamine ega kompostimine ei taga täielikku antibiootikumiresistentsus geenide hävitamist digestaadis ning ARG rikka väetise kasutamine põhjustab nende levikut keskkonda.

Kodustes tingimustes biogaasi ja digestaadi tootmisel tuleks vältida suure riskifaktoriga substraate, et saada kehtivatele hügieeninõuetele vastav toode.

Assessment of microbial hazards in biogas digestate

Harold Oja

Summary

The current thesis presents an overview, based on literature, of microbial hazards connected to biogas digestate, such as pathogens and antibiotic resistant bacteria, and processes influencing these hazards, with emphasis on most common processing methods.

Microbial hazards are prevalent in manure and sewage sludge, which are common substrates for biogas production. By optimising the anaerobic digestion and subsequent composting, even these substrates can be turned into organic fertilisers that meet the current safety standards.

When evaluating the safety of organic fertilisers, viable-but-not-culturable pathogens and spore-forming pathogens should also be considered, but they are not included in the current safety standards in Estonia.

Neither anaerobic digestion, nor composting can completely remove microbes possessing antibiotic resistance genes (ARGs) from manure or sewage sludge, and usage of fertilisers containing high amounts of ARGs can lead to their dissemination into soil.

When producing biogas at home, substrates with potentially high hazard should be avoided to obtain a digestate that meets current safety standards.

Kirjanduse loetelu

- Aitken, M. D., Sobsey, M. D., Blauth, K. E., Shehee, M., Crunk, P. L., & Walters, G. W. (2005). Inactivation of *Ascaris suum* and Poliovirus in Biosolids under Thermophilic Anaerobic Digestion Conditions. *Environmental Science & Technology*, 39(15), 5804–5809. <https://doi.org/10.1021/es048004h>
- Aitken, M. D., Sobsey, M. D., Van Abel, N. A., Blauth, K. E., Singleton, D. R., Crunk, P. L., Nichols, C., Walters, G. W., & Schneider, M. (2007). Inactivation of Escherichia coli O157:H7 during thermophilic anaerobic digestion of manure from dairy cattle. *Water Research*, 41(8), 1659–1666. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.01.034>
- Álvarez, I., Mañas, P., Sala, F. J., & Condón, S. (2003). Inactivation of Salmonella enterica Serovar Enteritidis by Ultrasonic Waves under Pressure at Different Water Activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 668–672. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.668-672.2003>
- Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D. J., Plugge, C. M., & Stams, A. J. M. (2011). Biomethanation and its potential. *Methods in Enzymology*, 494, 327–351. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385112-3.00016-0>
- Antunes, P., Machado, J., Sousa, J. C., & Peixe, L. (2005). Dissemination of Sulfonamide Resistance Genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese Salmonella enterica Strains and Relation with Integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 836–839. <https://doi.org/10.1128/aac.49.2.836-839.2005>
- Avery, L. M., Booth, P., Campbell, C., Tompkins, D., & Hough, R. L. (2012). Prevalence and survival of potential pathogens in source-segregated green waste compost. *Science of The Total Environment*, 431, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.020>
- Banks, C., Salter, A., Heaven, S., & Riley, K. (2011). Energetic and environmental benefits of co-digestion of food waste and cattle slurry: A preliminary assessment. *Resources Conservation and Recycling - RESOUR CONSERV RECYCL*, 56, 71–79.

<https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2011.09.006>

Baquero, F., Martínez, J.-L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 260–265.

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>

Beneragama, N., Iwasaki, M., Lateef, S. A., Yamashiro, T., Ihara, I., & Umetsu, K. (2013). The survival of multidrug-resistant bacteria in thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion of dairy manure and waste milk. *Animal Science Journal*, 84(5), 426–433.

<https://doi.org/10.1111/asj.12017>

Biogaasi tootmine ja kasutamise (Margo Mansberg, Trans.). (2009). Eesti Põllumeeste Keskliit.

https://dspace.emu.ee/xmlui/bitstream/handle/10492/3678/biogaasiraamat_veebiversioon.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Bischof, J. C., Padanilam, J., Holmes, W. H., Ezzell, R. M., Lee, R. C., Tompkins, R. G., Yarmush, M. L., & Toner, M. (1995). Dynamics of cell membrane permeability changes at supraphysiological temperatures. *Biophysical Journal*, 68(6), 2608–2614.

[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80445-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80445-5)

Braun, R. (2007). Anaerobic digestion: A multi-faceted process for energy, environmental management and rural development. In *Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses* (pp. 335–416). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5486-0_13

Cabañas-Vargas, D. D., De los Ríos Ibarra, E., Mena-Salas, J. P., Escalante-Réndiz, D. Y., & Rojas-Herrera, R. (2013). Composting Used as a Low Cost Method for Pathogen Elimination in Sewage Sludge in Mérida, Mexico. *Sustainability*, 5(7), Article 7.

<https://doi.org/10.3390/su5073150>

Calero-Cáceres, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J., & Muniesa, M. (2014). Sludge As a Potential Important Source of Antibiotic Resistance Genes in Both the Bacterial and Bacteriophage Fractions. *Environmental Science & Technology*, 48(13), 7602–7611. <https://doi.org/10.1021/es501851s>

<https://doi.org/10.1021/es501851s>

Cao, Y., Zhao, J., Wang, Q., Bai, S., Yang, Q., Wei, Y., & Wang, R. (2022). Industrial aerobic composting and the addition of microbial agents largely reduce the risks of heavy metal and

- ARG transfer through livestock manure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 239, 113694. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113694>
- Cappelier, J. M., Minet, J., Magras, C., Colwell, R. R., & Federighi, M. (1999). Recovery in Embryonated Eggs of Viable but Nonculturable *Campylobacter jejuni* Cells and Maintenance of Ability To Adhere to HeLa Cells after Resuscitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 5154–5157. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.11.5154-5157.1999>
- Carraturo, F., Panico, A., Giordano, A., Libralato, G., Aliberti, F., Galdiero, E., & Guida, M. (2022). Hygienic assessment of digestate from a high solids anaerobic co-digestion of sewage sludge with biowaste by testing *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* and SARS-CoV-2. *Environmental Research*, 206, 112585. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112585>
- Coelho, J. J., Hennessy, A., Casey, I., Bragança, C. R. S., Woodcock, T., & Kennedy, N. (2020). Biofertilisation with anaerobic digestates: A field study of effects on soil microbial abundance and diversity. *Applied Soil Ecology*, 147, 103403. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103403>
- Colwell, R. R., Brayton, P., Herrington, D., Tall, B., Huq, A., & Levine, M. M. (1996). Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(1), 28–31. <https://doi.org/10.1007/BF00327795>
- Déportes, Benoit-Guyod, Zmirou, & Bouvier. (1998). Microbial disinfection capacity of municipal solid waste (MSW) composting. *Journal of Applied Microbiology*, 85(2), 238–246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00484.x>
- Derongs, L., Druilhe, C., Ziebal, C., Le Maréchal, C., & Pourcher, A.-M. (2020). Characterization of *Clostridium Perfringens* Isolates Collected from Three Agricultural Biogas Plants over a One-Year Period. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(15), Article 15. <https://doi.org/10.3390/ijerph17155450>
- Elmerdahl Olsen, J., & Errebo Larsen, H. (1987). Bacterial decimation times in anaerobic digestions

- of animal slurries. *Biological Wastes*, 21(3), 153–168.
[https://doi.org/10.1016/0269-7483\(87\)90121-2](https://doi.org/10.1016/0269-7483(87)90121-2)
- Erickson, M. C., Liao, J., Ma, L., Jiang, X., & Doyle, M. P. (2014). Thermal and Nonthermal Factors Affecting Survival of Salmonella and Listeria monocytogenes in Animal Manure–Based Compost Mixtures. *Journal of Food Protection*, 77(9), 1512–1518.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-111>
- Erickson, M. C., & Ortega, Y. R. (2006). Inactivation of Protozoan Parasites in Food, Water, and Environmental Systems. *Journal of Food Protection*, 69(11), 2786–2808.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.11.2786>
- Foddai, A. C. G., & Grant, I. R. (2020). Methods for detection of viable foodborne pathogens: Current state-of-art and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(10), 4281–4288. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10542-x>
- Fongaro, G., Kunz, A., Magri, M. E., Viancelli, A., Schissi, C. D., da Silva Lanna, M. C., Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., García-González, M. C., & Barardi, C. R. M. (2018). Evaluation of the Effective Inactivation of Enteric Bacteria and Viruses From Swine Effluent and Sludge at Tropical Temperatures. *Water, Air, & Soil Pollution*, 229(7), 226.
<https://doi.org/10.1007/s11270-018-3878-y>
- Franke-Whittle, I. H., Confalonieri, A., Insam, H., Schlegelmilch, M., & Körner, I. (2014). Changes in the microbial communities during co-composting of digestates. *Waste Management*, 34(3), 632–641. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.12.009>
- Fu, B., Jiang, Q., Liu, H., & Liu, H. (2014). Occurrence and reactivation of viable but non-culturable *E. coli* in sewage sludge after mesophilic and thermophilic anaerobic digestion. *Biotechnology Letters*, 36(2), 273–279. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1361-9>
- Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30(6), 503–512.
[https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00806-8](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00806-8)
- Glaeser, S. P., Sowinsky, O., Brunner, J. S., Dott, W., & Kämpfer, P. (2016). Cultivation of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant staphylococci from input and

- output samples of German biogas plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(3), fiw010.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiw010>
- Goberna, M., Podmirseg, S. M., Waldhuber, S., Knapp, B. A., García, C., & Insam, H. (2011). Pathogenic bacteria and mineral N in soils following the land spreading of biogas digestates and fresh manure. *Applied Soil Ecology*, 49, 18–25.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.07.007>
- Gómez-Brandón, M., Juárez, M. F.-D., Zangerle, M., & Insam, H. (2016). Effects of digestate on soil chemical and microbiological properties: A comparative study with compost and vermicompost. *Journal of Hazardous Materials*, 302, 267–274.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.09.067>
- Gondim-Porto, C., Platero, L., Nadal, I., & Navarro-García, F. (2016). Fate of classical faecal bacterial markers and ampicillin-resistant bacteria in agricultural soils under Mediterranean climate after urban sludge amendment. *Science of The Total Environment*, 565, 200–210.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.160>
- Grewal, S. K., Rajeev, S., Sreevatsan, S., & Michel, F. C. (2006). Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* and Other Zoonotic Pathogens during Simulated Composting, Manure Packing, and Liquid Storage of Dairy Manure. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 565–574. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.565-574.2006>
- Guan, J., Wasty, A., Grenier, C., & Chan, M. (2007). Influence of Temperature on Survival and Conjugative Transfer of Multiple Antibiotic-Resistant Plasmids in Chicken Manure and Compost Microcosms. *Poultry Science*, 86(4), 610–613. <https://doi.org/10.1093/ps/86.4.610>
- Gurmessa, B., Milanovic, V., Foppa Pedretti, E., Corti, G., Ashworth, A. J., Aquilanti, L., Ferrocino, I., Rita Corvaglia, M., & Cocco, S. (2021). Post-digestate composting shifts microbial composition and degrades antimicrobial resistance genes. *Bioresource Technology*, 340, 125662. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125662>
- Hall, R. (2023). *Suderbyn* [Personal communication].
- Han, Il., Congeevaram, S., & Park, J. (2009). Improved control of multiple-antibiotic-resistance-related microbial risk in swine manure wastes by autothermal

- thermophilic aerobic digestion. *Water Science and Technology*, 59(2), 267–271.
<https://doi.org/10.2166/wst.2009.856>
- Harikishan, S., & Sung, S. (2003). Cattle waste treatment and Class A biosolid production using temperature-phased anaerobic digester. *Advances in Environmental Research*, 7(3), 701–706.
[https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(02\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(02)00034-5)
- Harvey, A. J. D. (2019). *Biodegradation of Bacillus anthracis Endospores in Compost—ProQuest* [Magistritöö, University of Lethbridge].
<https://www.proquest.com/openview/f3d80bee2bf56928bbfd41cc07478b53/1?pq-origsite=gscolar&cbl=18750&diss=y>
- Hashimoto, A. G. (1986). Ammonia inhibition of methanogenesis from cattle wastes. *Agricultural Wastes*, 17(4), 241–261. [https://doi.org/10.1016/0141-4607\(86\)90133-2](https://doi.org/10.1016/0141-4607(86)90133-2)
- Heuer, H., Schmitt, H., & Smalla, K. (2011). Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 236–243.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.009>
- Higgins, M. J., Chen, Y.-C., Murthy, S. N., Hendrickson, D., Farrel, J., & Schafer, P. (2007). Reactivation and growth of non-culturable indicator bacteria in anaerobically digested biosolids after centrifuge dewatering. *Water Research*, 41(3), 665–673.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.09.017>
- Horan, N. J., Fletcher, L., Betmal, S. M., Wilks, S. A., & Keevil, C. W. (2004). Die-off of enteric bacterial pathogens during mesophilic anaerobic digestion. *Water Research*, 38(5), 1113–1120. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.004>
- Jenkins, M. B., Bowman, D. D., & Ghiorse, W. C. (1998). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by Ammonia. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 784–788.
<https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.784-788.1998>
- Jiang, Y., Dennehy, C., Lawlor, P. G., Hu, Z., Zhan, X., & Gardiner, G. E. (2018). Inactivation of enteric indicator bacteria and system stability during dry co-digestion of food waste and pig manure. *Science of The Total Environment*, 612, 293–302.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.214>

- Jiang, Y., Xie, S. H., Dennehy, C., Lawlor, P. G., Hu, Z. H., Wu, G. X., Zhan, X. M., & Gardiner, G. E. (2020). Inactivation of pathogens in anaerobic digestion systems for converting biowastes to bioenergy: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *120*, 109654. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109654>
- Jones, P., & Martin, M. (2003). A REVIEW OF THE LITERATURE ON THE OCCURRENCE AND SURVIVAL OF PATHOGENS OF ANIMALS AND HUMANS IN GREEN COMPOST. *Research Report*.
- Kask, Ü., Soosaar, S., Kask, L., Pachel, K., Kallaste, T., Menert, A., Saaliste, M., & Vohu, V. (2014). *Eesti tingimustesse sobivate biogaasi metaaniks puhastamise tehnoloogiate rakendatavus ning keskkonna ja majanduslikud mõjud*. <https://doi.org/10.13140/2.1.3846.8161>
- Kearney, T. E., Larkin, M. J., & Levett, P. N. (1993). The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, *74*(1), 86–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb03000.x>
- Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, *8*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.06.002>
- Koné, D., Cofie, O., Zurbrügg, C., Gallizzi, K., Moser, D., Drescher, S., & Strauss, M. (2007). Helminth eggs inactivation efficiency by faecal sludge dewatering and co-composting in tropical climates. *Water Research*, *41*(19), 4397–4402. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.024>
- Kriipsalu, M., Truu, J., & Maastik, A. (2016). *Jäätmekäitlus ja pinnase tervendamise*. TTÜ Kirjastus.
- Krishnasamy, K., Jaya, N., & Bell, R. (2014). Evaluation of anaerobic digestate as a substrate for vermicomposting. *International Journal of Environment and Waste Management*, *14*, 149–164. <https://doi.org/10.1504/IJEWM.2014.064084>
- Kudva, I. T., Blanch, K., & Hovde, C. J. (1998). Analysis of Escherichia coli O157:H7 Survival in Ovine or Bovine Manure and Manure Slurry. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(9), 3166–3174. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.9.3166-3174.1998>
- Kukke, A. (2015). *BIOGAASI TOOTMISSEADMETE UURIMUS* [Bakalaureusetöö]. Eesti Maaülikool.

- Kumar, S. (2012). *Biogas*. BoD – Books on Demand.
- Kunte, D. P., Yeole, T. Y., & Ranade, D. R. (2000). Effect of volatile fatty acids on *Shigella dysenteriae* during anaerobic digestion of human night soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *16*(6), 519–522. <https://doi.org/10.1023/A:1008915231175>
- Lazcka, O., Campo, F. J. D., & Muñoz, F. X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, *22*(7), 1205–1217. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.036>
- Lepesteur, M. (2022). Human and livestock pathogens and their control during composting. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *52*(10), 1639–1683. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1862550>
- Li, H., Xu, Y., Zheng, X., Tan, L., Cheng, W., Zhang, C., Wang, Q., Yang, B., & Gao, Y. (2022). Optimising mixed aerobic and anaerobic composting process parameters for reducing bacterial pathogenicity in compost-derived products. *Journal of Environmental Management*, *304*, 114293. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114293>
- Liiv, A. (2019). *REOVEESETTE AUNKOMPOSTIMINE TALVISTES OLUDES* [Magistritöö]. Eesti Maaülikool.
- Lin, M., Wang, A., Ren, L., Qiao, W., Wandera, S. M., & Dong, R. (2022). Challenges of pathogen inactivation in animal manure through anaerobic digestion: A short review. *Bioengineered*, *13*(1), 1149–1161. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2017717>
- Ma, Y., Wilson, C. A., Novak, J. T., Riffat, R., Aynur, S., Murthy, S., & Pruden, A. (2011). Effect of Various Sludge Digestion Conditions on Sulfonamide, Macrolide, and Tetracycline Resistance Genes and Class I Integrons. *Environmental Science & Technology*, *45*(18), 7855–7861. <https://doi.org/10.1021/es200827t>
- Manga, M., Evans, B. E., Camargo-Valero, M. A., & Horan, N. J. (2016). Effect of filter media thickness on the performance of sand drying beds used for faecal sludge management. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, *74*(12), 2795–2806. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.451>
- Manga, M., Muoghalu, C. C., & Acheng, P. O. (2023). Inactivation of faecal pathogens during faecal

- sludge composting: A systematic review. *Environmental Technology Reviews*, 12(1), 150–174. <https://doi.org/10.1080/21622515.2023.2182719>
- Manga, M., Muoghalu, C., Camargo-Valero, M. A., & Evans, B. E. (2023). Effect of Turning Frequency on the Survival of Fecal Indicator Microorganisms during Aerobic Composting of Fecal Sludge with Sawdust. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ijerph20032668>
- Manu, M. K., Wang, C., Li, D., Varjani, S., Xu, Y., Ladumor, N., Lui, M., Zhou, J., & Wong, J. W. C. (2021). Biodegradation kinetics of ammonium enriched food waste digestate compost with biochar amendment. *Bioresource Technology*, 341, 125871. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125871>
- Massé, D., Gilbert, Y., & Topp, E. (2011). Pathogen removal in farm-scale psychrophilic anaerobic digesters processing swine manure. *Bioresource Technology*, 102(2), 641–646. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.020>
- Miller, J. H., Novak, J. T., Knocke, W. R., Young, K., Hong, Y., Vikesland, P. J., Hull, M. S., & Pruden, A. (2013). Effect of Silver Nanoparticles and Antibiotics on Antibiotic Resistance Genes in Anaerobic Digestion. *Water Environment Research*, 85(5), 411–421. <https://doi.org/10.2175/106143012X13373575831394>
- Möller, K., & Müller, T. (2012). Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review. *Engineering in Life Sciences*, 12(3), 242–257. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100085>
- Munch, B., Errebo Larsen, H., & Aalbæk, B. (1987). Experimental studies on the survival of pathogenic and indicator bacteria in aerated and non-aerated cattle and pig slurry. *Biological Wastes*, 22(1), 49–65. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(87\)90099-1](https://doi.org/10.1016/0269-7483(87)90099-1)
- Mutli, M. (2014). *ANAEROOBSE KÄITLEMISE MÕJU VEISELÄGA ANTIBIOOTIKUMIRESISTENTSETE BAKTERITE JA PATOGEENIDE SISALDUSELE* [Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool]. http://dspace.ut.ee/bitstream/handle/10062/42907/Mutli_Mario.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Nag, R., Whyte, P., Markey, B. K., O'Flaherty, V., Bolton, D., Fenton, O., Richards, K. G., & Cummins, E. (2020). Ranking hazards pertaining to human health concerns from land application of anaerobic digestate. *Science of The Total Environment*, *710*, 136297. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136297>
- Nölvak, H., Truu, M., Kanger, K., Tampere, M., Espenberg, M., Loit, E., Raave, H., & Truu, J. (2016). Inorganic and organic fertilizers impact the abundance and proportion of antibiotic resistance and integron-integrase genes in agricultural grassland soil. *Science of The Total Environment*, *562*, 678–689. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.035>
- Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *34*(4), 415–425. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>
- Oliver, J. P., Gooch, C. A., Lansing, S., Schueler, J., Hurst, J. J., Sassoubre, L., Crossette, E. M., & Aga, D. S. (2020). Invited review: Fate of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems. *Journal of Dairy Science*, *103*(2), 1051–1071. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16778>
- Orzi, V., Scaglia, B., Lonati, S., Riva, C., Boccasile, G., Alborali, G. L., & Adani, F. (2015). The role of biological processes in reducing both odor impact and pathogen content during mesophilic anaerobic digestion. *Science of The Total Environment*, *526*, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.038>
- Palmer, K. L., Kos, V. N., & Gilmore, M. S. (2010). Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, *13*(5), 632–639. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.08.004>
- Pandey, P. K., & Soupir, M. L. (2011). Escherichia coli inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. *AMB Express*, *1*(1), 18. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-18>
- Park, G. W., & Diez-Gonzalez, F. (2003). Utilization of carbonate and ammonia-based treatments to eliminate Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium DT104 from cattle manure. *Journal of Applied Microbiology*, *94*(4), 675–685.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01899.x>

- Pecson, B. M., Barrios, J. A., Jiménez, B. E., & Nelson, K. L. (2007). The effects of temperature, pH, and ammonia concentration on the inactivation of *Ascaris* eggs in sewage sludge. *Water Research*, *41*(13), 2893–2902. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.03.040>
- Piveteau, P., Druilhe, C., & Aissani, L. (2022). What on earth? The impact of digestates and composts from farm effluent management on fluxes of foodborne pathogens in agricultural lands. *Science of The Total Environment*, *840*, 156693. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156693>
- Popat, S. C., Yates, M. V., & Deshusses, M. A. (2010). Kinetics of inactivation of indicator pathogens during thermophilic anaerobic digestion. *Water Research*, *44*(20), 5965–5972. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.045>
- Puchajda, B., & Oleszkiewicz, J. (2006). Extended Acid Digestion for Inactivation of Fecal Coliforms. *Water Environment Research*, *78*(12), 2389–2396. <https://doi.org/10.2175/106143005X86655>
- Pulami, D., Schauss, T., Eisenberg, T., Wilharm, G., Blom, J., Goesmann, A., Kämpfer, P., & Glaeser, S. P. (2020). *Acinetobacter baumannii* in manure and anaerobic digestates of German biogas plants. *FEMS Microbiology Ecology*, *96*(10), fiaa176. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa176>
- Puri, A., & Dudley, E. G. (2010). Influence of indigenous eukaryotic microbial communities on the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in compost slurry. *FEMS Microbiology Letters*, *313*(2), 148–154. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02141.x>
- Qian, X., Gu, J., Sun, W., Wang, X.-J., Su, J.-Q., & Stedfeld, R. (2018). Diversity, abundance, and persistence of antibiotic resistance genes in various types of animal manure following industrial composting. *Journal of Hazardous Materials*, *344*, 716–722. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.11.020>
- Qian, X., Sun, W., Gu, J., Wang, X.-J., Sun, J.-J., Yin, Y.-N., & Duan, M.-L. (2016). Variable effects of oxytetracycline on antibiotic resistance gene abundance and the bacterial community during aerobic composting of cow manure. *Journal of Hazardous Materials*, *315*, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.002>

- Qian, X., Sun, W., Gu, J., Wang, X.-J., Zhang, Y.-J., Duan, M.-L., Li, H.-C., & Zhang, R.-R. (2016). Reducing antibiotic resistance genes, integrons, and pathogens in dairy manure by continuous thermophilic composting. *Bioresource Technology*, *220*, 425–432.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.101>
- Rakotojaona, L. (2013). *Domestic biogas development in developing countries*.
- Ravva, S. V., & Sarreal, C. Z. (2014). Survival of *Salmonella enterica* in Aerated and Nonaerated Wastewaters from Dairy Lagoons. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *11*(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijerph111111249>
- Riaz, L., Wang, Q., Yang, Q., Li, X., & Yuan, W. (2020). Potential of industrial composting and anaerobic digestion for the removal of antibiotics, antibiotic resistance genes and heavy metals from chicken manure. *Science of The Total Environment*, *718*, 137414.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137414>
- Roberts, T., vanSchothorst, M., Sharpe, A., BairdParker, A., Bryan, F., Buchanan, R., Busta, F., Doyle, M., Farkas, J., Grau, F., Hobbs, B., Jouve, J., Mendoza, S., Merican, Z., Quevedo, F., Pitt, J., Teufel, P., & Tompkin, R. (1996). The International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF). *Food Control*, *7*, 99–101.
- Roopnarain, A., Akindolire, M. A., Rama, H., & Ndaba, B. (2023). Casting Light on the Micro-Organisms in Digestate: Diversity and Untapped Potential. *Fermentation*, *9*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020160>
- Sahlström, L. (2003). A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresource Technology*, *87*(2), 161–166.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00168-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00168-2)
- Sahlström, L., Aspan, A., Bagge, E., Tham, M.-L. D., & Albiñ, A. (2004). Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Research*, *38*(8), 1989–1994. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.01.031>
- Sahlström, L., Bagge, E., Emmoth, E., Holmqvist, A., Danielsson-Tham, M.-L., & Albiñ, A. (2008).

- A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants. *Bioresource Technology*, 99(16), 7859–7865.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.071>
- Salsali, H. R., Parker, W. J., & Sattar, S. A. (2006). Impact of concentration, temperature, and pH on inactivation of *Salmonella* spp. By volatile fatty acids in anaerobic digestion. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(4), 279–286. <https://doi.org/10.1139/w05-125>
- Sanders, D. A., Malina, J. F., Moore, B. E., Sagik, B. P., & Sorber, C. A. (1979). Fate of Poliovirus during Anaerobic Digestion. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 51(2), 333–343.
- Schauss, T., Wings, T. K., Brunner, J. S., Glaeser, S. P., Dott, W., & Kämpfer, P. (2016). Bacterial diversity and antibiotic resistances of abundant aerobic culturable bacteria in input and output samples of 15 German biogas plants. *Journal of Applied Microbiology*, 121(6), 1673–1684.
<https://doi.org/10.1111/jam.13277>
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., & Obst, U. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(3), 325–335. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01073.x>
- Seadi, T., & Lukehurst, C. (2012). *Quality Management of Digestate from Biogas Plants Used as Fertiliser*.
- Seevri, K. (2016). *BIOSÖE VÕIMALIKUD RAKENDUSED BIOGAASI TOOTMISEL: BIOGAASI TOODANGU SUURENDAMINE VERSUS KASVUHOONEGAASIDE VÄHENDAMINE* [Magistritöö]. Tartu Ülikool.
- Sharma, R., Larney, F. J., Chen, J., Yanke, L. J., Morrison, M., Topp, E., McAllister, T. A., & Yu, Z. (2009). Selected Antimicrobial Resistance during Composting of Manure from Cattle Administered Sub-Therapeutic Antimicrobials. *Journal of Environmental Quality*, 38(2), 567–575. <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0638>
- Sheridan et al. (1998). *Detection of mRNA by Reverse Transcription-PCR as an Indicator of Viability in Escherichia coli Cells*. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.4.1313-1318.1998>
- Sidhu, J., Gibbs, R. A., Ho, G. E., & Unkovich, I. (2001). The role of indigenous microorganisms in suppression of salmonella regrowth in composted biosolids. *Water Research*, 35(4), 913–920.

[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00352-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00352-3)

- Smith, S. R., Lang, N. L., Cheung, K. H. M., & Spanoudaki, K. (2005). Factors controlling pathogen destruction during anaerobic digestion of biowastes. *Waste Management*, 25(4), 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.02.010>
- Song, B., Manu, M. K., Li, D., Wang, C., Varjani, S., Ladumor, N., Michael, L., Xu, Y., & Wong, J. W. C. (2021). Food waste digestate composting: Feedstock optimization with sawdust and mature compost. *Bioresource Technology*, 341, 125759. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125759>
- Su, J.-Q., Wei, B., Ou-Yang, W.-Y., Huang, F.-Y., Zhao, Y., Xu, H.-J., & Zhu, Y.-G. (2015). Antibiotic Resistome and Its Association with Bacterial Communities during Sewage Sludge Composting. *Environmental Science & Technology*, 49(12), 7356–7363. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01012>
- Subirats, J., Sharpe, H., & Topp, E. (2022). Fate of Clostridia and other spore-forming Firmicute bacteria during feedstock anaerobic digestion and aerobic composting. *Journal of Environmental Management*, 309, 114643. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114643>
- Sun, H., Bjerketorp, J., Levenfors, J. J., & Schnürer, A. (2020). Isolation of antibiotic-resistant bacteria in biogas digestate and their susceptibility to antibiotics. *Environmental Pollution*, 266, 115265. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115265>
- Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29(3), 151–159. <https://doi.org/10.1152/advan.00019.2005>
- Viau, E., & Peccia, J. (2009). Evaluation of the enterococci indicator in biosolids using culture-based and quantitative PCR assays. *Water Research*, 43(19), 4878–4887. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.016>
- Walczak, J. J., & Xu, S. (2011). Manure as a Source of Antibiotic-Resistant Escherichia coli and Enterococci: A Case Study of a Wisconsin, USA Family Dairy Farm. *Water, Air, & Soil Pollution*, 219(1), 579–589. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0729-x>
- Ward, R. L. (1978). Mechanism of poliovirus inactivation by ammonia. *Journal of Virology*, 26(2), 299–305. <https://doi.org/10.1128/jvi.26.2.299-305.1978>

- Watcharasukarn, M., Kaparaju, P., Steyer, J.-P., Krogfelt, K. A., & Angelidaki, I. (2009). Screening *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Clostridium perfringens* as Indicator Organisms in Evaluating Pathogen-Reducing Capacity in Biogas Plants. *Microbial Ecology*, *58*(2), 221–230. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9497-9>
- Weiland, P. (2009). Biogas production: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*, 849–860. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2246-7>
- Wichuk, K. M., & McCartney, D. (2007). A review of the effectiveness of current time–temperature regulations on pathogen inactivation during composting. *Journal of Environmental Engineering and Science*, *6*(5), 573–586. <https://doi.org/10.1139/S07-011>
- Wu, H., Lai, C., Zeng, G., Liang, J., Chen, J., Xu, J., Dai, J., Li, X., Liu, J., Chen, M., Lu, L., Hu, L., & Wan, J. (2017). The interactions of composting and biochar and their implications for soil amendment and pollution remediation: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, *37*(6), 754–764. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1232696>
- Xu, C., Wang, D., Huber, A., Weese, S. J., & Warriner, K. (2016). Persistence of *Clostridium difficile* in wastewater treatment-derived biosolids during land application or windrow composting. *Journal of Applied Microbiology*, *120*(2), 312–320. <https://doi.org/10.1111/jam.13018>
- Xu, C., Weese, J. S., Flemming, C., Odumeru, J., & Warriner, K. (2014). Fate of *Clostridium difficile* during wastewater treatment and incidence in Southern Ontario watersheds. *Journal of Applied Microbiology*, *117*(3), 891–904. <https://doi.org/10.1111/jam.12575>
- Youngquist, C. P., Mitchell, S. M., & Cogger, C. G. (2016). Fate of Antibiotics and Antibiotic Resistance during Digestion and Composting: A Review. *Journal of Environmental Quality*, *45*(2), 537–545. <https://doi.org/10.2134/jeq2015.05.0256>
- Zeng, Y., De Guardia, A., & Dabert, P. (2016). Improving composting as a post-treatment of anaerobic digestate. *Bioresource Technology*, *201*, 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.013>
- Ziemba, C., & Peccia, J. (2011). Net energy production associated with pathogen inactivation during mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research*, *45*(16), 4758–4768. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.06.014>

Kasutatud veebiaadressid

Kõik veebiaadressid kontrollitud 28.05.2023

Eesti Biogaasi Assotsiatsioon. (2023). *Tootmine ja kasutamine*.

<http://eestibiogaas.ee/tootmine-ja-kasutamine/>

Riigi Teataja. (2016). *Nõuded biolagunevatest jäätmetest biogaasi tootmisel tekkiva kääritusjäägi kohta*. <https://www.riigiteataja.ee/akt/119052016009>

Riigi Teataja. (2013, April 13). *Biolagunevatest jäätmetest komposti tootmise nõuded*.

<https://www.riigiteataja.ee/akt/110042013001>

Suderbyn. (2023). *Closed Loop*. <https://suderbyn.se/closed-loop/>

Terviseamet. (2023a). *Enterohemorraagiline E.coli*.

<https://www.terviseamet.ee/et/nakkushaigused-a-u/enterohemorraagiline-ecoli>

Terviseamet. (2023). *Helmintiaasid ehk nugiussahaigused*.

<https://www.terviseamet.ee/et/nakkushaigused-a-u/helminthiaasid-ehk-nugiussahaigused>

Terviseamet. (2023b). *Jersinioos*. <https://www.terviseamet.ee/et/nakkushaigused-a-u/jersinioos>

Terviseamet. (2023). *Kampülobakterenteriit*.

<https://www.terviseamet.ee/et/nakkushaigused-a-u/kampulobakterenteriit>

The Nobel Prize in Chemistry. (1993). NobelPrize.Org.

<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/press-release/>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Harold Oja

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Mikroobsed riskifaktorid biogaasi tootmise järgis

mille juhendaja on PhD Jaak Truu

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Harold Oja

29.05.2023