

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2025

Vendula Siborová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Bakteriofágové biosenzory pro detekci patogenních mikroorganismů v
odpadních vodách
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Vendula Siborová**
Osobní číslo: **C22241**
Studijní program: **B0914P360019 Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Bakteriofágové biosenzory pro detekci patogenních mikroorganismů v odpadních vodách**
Téma práce anglicky: **Bacteriophage-Based Biosensors for Detection of Pathogenic Microbes in Waste Water**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na detekci patogenních bakterií pomocí bakteriofágových biosenzorů.
2. V úvodu práce se zaměřte na stručný popis biosenzorů s využitím bakteriofágů jako bioreceptoru. Popište různé způsoby detekce.
3. Z odborných studií uveďte konkrétní příklady využití bakteriofágových biosenzorů pro detekci patogenních bakterií v odpadních vodách.
4. Dále se ve studiích zaměřte na dosažené výsledky a jejich hodnocení příp. budoucnost využití bakteriofágových biosenzorů.
5. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 7/2019 ve znění dodatku č. 2 "Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací".

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Petra Motková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2025**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Bakteriofágové biosenzory pro detekci patogenních mikroorganismů v odpadních vodách jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 22.6.2025

Vendula Siborová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala mé vedoucí bakalářské práce Ing. Petře Motřkové, Ph.D. za její čas, trpělivost a věcné připomínky, které přispěly ke zpracování této práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá využitím biosenzorů na bázi bakteriofágů pro detekci patogenních mikroorganismů v odpadní vodě. V kontextu klimatických změn a potřeby zajištění bezpečného opětovného využití vody je důležité, aby voda splňovala jak fyzikální, tak chemické a biologické/mikrobiologické ukazatele. Z mikrobiologických požadavků je to mimo jiné i nepřítomnost patogenních mikroorganismů.

KLÍČOVÁ SLOVA

biosenzor, bakteriofág, odpadní vody, patogenní bakterie

TITLE

Bacteriophage-Based Biosensors for Detection of Pathogenic Microbes in Waste Water

ANNOTATION

This bachelor's thesis focuses on the use of bacteriophage-based biosensors for the detection of pathogenic microorganisms in treated wastewater. In the context of climate change and the need for safe water reuse, it is important that the water meets physical, chemical, and biological/microbiological limits. Microbiological requirements include, among other limits, the absence of pathogenic microorganisms.

KEYWORDS

biosensor, bacteriophage, wastewater, pathogenic bacteria

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	
SEZNAM ZKRATEK.....	
ÚVOD.....	11
1. Biosenzory.....	12
1.1. Popis jednotlivých částí biosenzorů.....	13
1.2. Mechanismus fungování.....	13
1.3. Dělení biosenzorů.....	14
1.3.1. Elektrochemické biosenzory.....	15
1.3.2. Kalorimetrické biosenzory.....	15
1.3.3. Piezoelektrické biosenzory.....	15
1.3.4. Optické biosenzory.....	15
2. Bakteriofágy.....	17
2.1. Životní cyklus bakteriofágů.....	17
2.2. Taxonomie.....	19
2.2.1. Řád <i>Caudovirales</i>	19
2.2.2. Čeleď <i>Leviviridae</i>	20
3. Fág jako biorekognitivní prvek biosenzoru.....	22
3.1. Izolace fágů.....	24
3.1. Modifikace bakteriofágů.....	26
3.1.1. Genetické modifikace.....	27
3.1.2. Chemická modifikace.....	29
3.1.3. Fágové koktejly.....	30
4. Kontaminace odpadních vod patogenními mikroorganismy.....	33
4.1. Příklady patogenních bakterií kontaminujících odpadní vody a využití fágů k jejich detekci.....	37
4.1.1. <i>Escherichia coli</i>	39
4.1.2. <i>Salmonella</i> spp.....	43
4.1.3. <i>Campylobacter</i> spp.....	44
4.1.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	45
5. Budoucnost detekce patogenních mikroorganismů fágovými bioreceptory.....	47
ZÁVĚR.....	49
POUŽITÁ LITERATURA.....	50

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Schéma vyhodnocování vzorků s použitím biosenzoru (upraveno dle Polat <i>et al.</i> , 2022)	12
Obrázek 2: Postup vzniku měřitelného signálu (upraveno dle Malhotra <i>et al.</i> , 2017)	14
Obrázek 3: Struktury vhodné pro adhezi bakteriofága na buněčnou stěnu (upraveno dle Hussain <i>et al.</i> , 2021)	18
Obrázek 4: Životní cykly bakteriofágů (Vaňková a kol., 2018)	19
Obrázek 5: Typická stavba bakteriofágů z řádu <i>Caudovirales</i> (Havránková, 2020)	20
Obrázek 6: Postup získání bakteriofágové suspenze (upraveno dle Runa <i>et al.</i> , 2021)	24
Obrázek 7: Izolace a kvantifikace fágů plakovou metodou (upraveno dle Runa <i>et al.</i> , 2021) ..	26
Obrázek 8: Třídy kvality recyklované vody a příslušné kategorie plodin (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/741)	35
Obrázek 9: Schéma kolorimetrické platformy pro detekci <i>E. coli</i> (upraveno dle Mann <i>et al.</i> , 2024)	41

SEZNAM ZKRATEK

AHL	acylhomoserin-laktony
ALP	alkalická fosfatáza
BRED	rekombinace bakteriofágů pomocí elektroporované DNA
CFU	kolonie tvořící jednotka
CRISPR-Cas	klastrované pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice s asociovanými proteiny
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EAEC	Enteroagregativní <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemoragická <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EU	Evropská Unie
ICTV	Mezinárodní výbor pro taxonomii virů
LTFPs	dlouhá vlákna ocasu (z anglického long tail fibre proteins)
MBR	membránový bioreaktor
PCR	polymerázová řetězová reakce
SPR	povrchová plazmonová rezonance
rGO	redukovaný oxid grafenu
RNA	ribonukleová kyselina
STEC	Shiga toxin produkující <i>Escherichia coli</i>
WHO	Světová zdravotnická organizace

ÚVOD

V posledních desetiletích čelí světová populace rostoucím výzvám v oblasti zajištění dostatku pitné a užitkové vody. Změny klimatu, častější výskyt sucha, růst populace a zvyšující se nároky na zemědělskou produkci vedou k narůstajícímu tlaku na vodní zdroje. V této souvislosti nabývá na významu strategie recyklace odpadních vod, zejména pro účely zavlažování. Tato cesta však s sebou nese i možná rizika. Zejména mikrobiální kontaminaci, která může ohrozit jak veřejné zdraví, tak i environmentální stabilitu. Patogenní mikroorganismy, běžně přítomné v komunálních i nemocničních odpadních vodách, mohou být při nedostatečném čištění převedeny do prostředí a potravinového řetězce. Detekce těchto organismů, jako je *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. či *Legionella pneumophila*, je proto zásadní pro rozhodování o mikrobiologické bezpečnosti recyklované vody.

Dosud používané metody mikrobiologické analýzy, zejména kultivační, molekulárně biologické nebo imunochemické, jsou sice účinné, ale často náročné na čas, personál i vybavení. V posledních letech se proto pozornost výzkumu obrací k biosenzorům, které představují rychlou a citlivou alternativu. Zvláštní místo mezi nimi zaujímají bakteriofágové biosenzory, které využívají přirozenou schopnost fágů selektivně napadat konkrétní bakteriální druhy. Díky tomu umožňují velmi přesnou detekci i v komplexních matricích, jako jsou odpadní vody. V kombinaci s pokročilými materiály (např. kovově-organickými nosiči či elektrochemickými platformami) lze dosáhnout vysoké citlivosti, rychlosti odezvy a možnosti terénního nasazení.

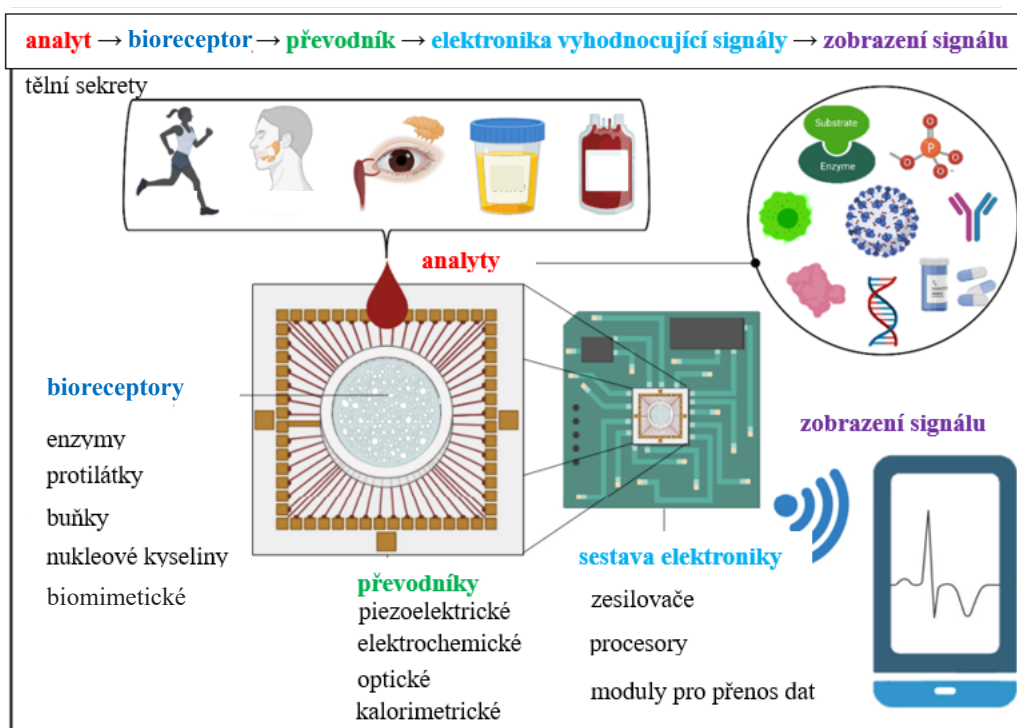
Cílem této bakalářské práce je představit možnosti využití bakteriofágových biosenzorů v oblasti detekce patogenních mikroorganismů ve vyčištěné odpadní vodě, s důrazem na jejich roli v ochraně veřejného zdraví a zajištění bezpečnosti při opětovném využití vody. Práce rovněž zohledňuje aktuální stav evropské i české legislativy týkající se kvality recyklované vody, rizik spojených s nemocničními odpadními vodami a diskutuje potenciál těchto nástrojů v rámci moderního vodního hospodářství.

1. Biosenzory

Biosenzory nacházejí využití v mnoha odvětvích moderní doby. Používají se v medicíně, příkladem může být glukometr, v potravinářství se využívají k detekci patogenních mikroorganismů a slouží tak ke kontrole kvality potravin, v oblasti biotechnologií se uplatňují při sledování biochemických procesů a jejich možného zdokonalování. V neposlední řadě se začaly čím dál více uplatňovat v oblasti ekologie, kde jsou využívány ke kontrole čistoty a kvality vod i ovzduší (Chadha *et al.*, 2022).

Jedná se o analytická zařízení, která detekují specifické látky nebo biologické procesy pomocí detekčního systému s použitím transduktoru, který převádí biologický signál na měřitelný elektrický signál. Ten je často preferován pro snadnou analýzu, zpracování a přenos dat, a proto je u většiny systémů cílem ho získat buď přímo, nebo po sekundárním převodu. Tento signál je následně měřen detektorem a vyhodnocen (Singh *et al.*, 2021).

Jako základní části biosenzoru se považují: bioreceptor (biorekogniční část), převodník a sestava elektroniky vyhodnocující signály (Singh *et al.*, 2022). Tyto jednotlivé komponenty biosenzoru a jejich propojení je vidět na Obrázku 1.



Obrázek 1: Schéma vyhodnocování vzorků s použitím biosenzoru (upraveno dle Polat *et al.*, 2022)

1.1. Popis jednotlivých částí biosenzorů

Biorekognitivní prvek neboli bioreceptor je část biosenzoru, která má schopnost specificky interagovat se stanovovanými látkami v analytickém vzorku (Chadha *et al.*, 2022). Dle tohoto prvku se následně volí i transduktor tak, aby dokázal zachytit změny vyvolané po vazbě analytu právě s touto částí biosenzoru, která je pevně adherována na povrch transduktoru.

Jako biorekognitivní prvek se nejčastěji používají enzymy, které katalyzují přeměnu substrátu na produkt za vytvoření měřitelného signálu nebo protilátky, které se specificky vážou na epitopy cílových molekul. Tato vazba se často značí pomocí značek (např. fluorescenčních). Dále lze využít nukleové kyseliny, díky schopnosti komplementarity bází se sekvencemi cílové deoxyribonukleové kyseliny (DNA) nebo ribonukleové kyseliny (RNA). Dalšími možnostmi jsou proteiny, živé buňky, aptamery (Chambers *et al.*, 2008), a v neposlední řadě také bakteriofágy, kdy může být vazba na detekovanou bakteriální buňku značena přímo, nebo se využívá schopnosti fága napadat a ničit struktury (Al-Hindi *et al.*, 2022).

Další částí je převodník, jehož typ, který bude pro dané analytické vyšetření použit, závisí na mnoha faktorech. Záleží především na typu použité biologické komponenty, a jejím případném značení a vlastním mechanismu přeměny vzniklého signálu na signál elektrický (Polat *et al.*, 2022). Čidlem transduktoru může být elektroda, optické vlákno, fotodetektory, krystaly a mnoho dalších. Do místa čidla se následně aplikují vzorky připravené k analýze.

Součástí sestavy elektroniky je i prvek zesilující signály, procesor, který následně tyto signály zpracuje podle zavedených algoritmů, převodníky signálů, pro převod mezi různými formami a obsahuje také komunikační moduly pro přenos dat do externího zařízení pro interpretaci výsledků (Malhotra *et al.*, 2017).

1.2. Mechanismus fungování

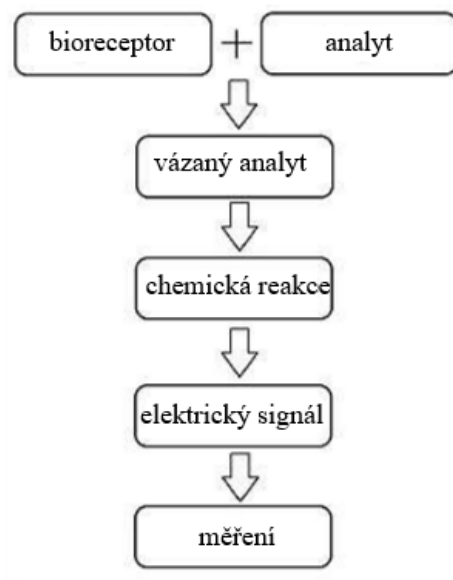
Specifický biologický materiál (bioreceptor) musí být nejdříve imobilizován běžně používanými metodami (Tetyana *et al.*, 2020), jako jsou například fyzikální zachycení, kdy je materiál ukotven v polymerní nebo gelové matici a membránové zachycení, kdy je maticí polopropustná membrána. Časté je také využití kovalentních i nekovalentních vazeb (Malhotra *et al.*, 2017; Martínková a kol., 2017).

Tento krok fixace na určitý povrch nebo zabudování do určité matrice je velice důležité pro stabilitu biologického materiálu, aby nedošlo k jeho odplavení nebo znehodnocení během interakce s analytem. Díky tomuto kroku lze také měření opakovat, neboť biologický materiál

zůstává na svém místě a není nutné jej při každém použití znovu přidávat. Dochází také ke zlepšení a větší spolehlivosti detekce, protože nedochází k rušivému pohybu přebytečných součástí analytu, které by mohly ovlivňovat signál. Jako hlavní důvod tohoto kroku je potřeba uvést integraci s transduktorem, aby mohly změny vyvolané interakcí s analytem (např. uvolnění elektronů nebo iontů) být převedeny na elektrický signál, musí být biologický materiál v těsném kontaktu (Malhotra *et al.*, 2017).

Následuje krok interakce s analytem obsahujícím stanovovanou látku, jejíž obsah chceme měřit. Tato látka nebo biologický materiál (bakterie) se váží na imobilizovanou biologickou komponentu, což vede k chemické nebo biochemické reakci. Transduktor následně převede tyto vyvolané změny na měřitelné elektrické signály (Tetyana *et al.*, 2020). Ty mohou mít podobu proudu nebo napětí. Pokud vzniká proud, musí být převeden na napětí pomocí operačního zesilovače. Výsledné napětí bývá velmi slabé a často rušené šumem, proto je dále zesíleno a filtrováno. Tím se signál zpřesní a stabilizuje, aby mohl odpovídat skutečné koncentraci detekované látky (Bhatia *et al.*, 2024; Tetyana *et al.*, 2020).

V posledním kroku dochází k zesílení a následnému měření signálu a jeho vyhodnocení (viz obrázek 2; Malhotra *et al.*, 2017).



Obrázek 2: Postup vzniku měřitelného signálu (upraveno dle Malhotra *et al.*, 2017)

1.3. Dělení biosenzorů

Biosenzory lze dělit mnoha způsoby, ale mezi nejběžněji používané patří dělení dle typu zvoleného převodníku a dělení dle použitého biologického materiálu.

Podle biologické složky lze senzory rozdělit na: biokatalytické, jejichž funkcí je podpora nebo urychlení chemické reakce (enzymové, buněčné) a afinitní, které detekují specifické vazebné interakce mezi analytem a senzorem (imunosenzory, receptory s DNA, protilátky) (Martínková a kol., 2017).

Dle typu převodníku lze biosenzory rozřadit na elektrochemické, kalorimetrické, optické a piezoelektrické (Karami and Kazemi-Lomedasht, 2022).

1.3.1. Elektrochemické biosenzory

Tento typ může být dále rozčleněn do čtyř podskupin dle vyvolané změny, na biosenzory potenciometrické, kdy dochází ke změně potenciálu mezi pracovní a referenční elektrodou bez průchodu proudu; voltametrické, kdy je potenciál řízen a postupně se mění (například lineárně nebo pulsně) a výsledný proud vzniká redoxními reakcemi probíhajícími na povrchu elektrody jako odpověď na aplikovaný potenciál; ampérometrické, kdy vzniká elektrický proud mezi elektrodami a impedimetrický, kde je měřenou změnou změna impedance (Singh *et al.*, 2021).

1.3.2. Kalorimetrické biosenzory

Jsou založeny na měření teplotních změn vyvolaných chemickými nebo biochemickými reakcemi analytu a biosenzoru. Může docházet jak k uvolnění tepelné energie, tak k jejímu spotřebování. Pomocí termistorů jsou tepelné změny převedeny na elektrický signál.

Používají se k monitorování metabolických procesů, detekci enzymových reakcí (např. v glukometru) nebo při analýze potravin (Polat *et al.*, 2022).

1.3.3. Piezoelektrické biosenzory

Princip měření spočívá ve změnách mechanických vlastností na povrchu biosenzoru, které jsou způsobeny vazbou analytu a specifického biologického materiálu. Tyto mechanické změny hmotnosti, pružnosti nebo hustoty jsou převedeny na elektrický signál pomocí piezoelektrického efektu (Malhotra *et al.*, 2017).

1.3.4. Optické biosenzory

Tyto biosenzory pracují na základě změny optických vlastností v závislosti na reakci mezi analytem a biosenzorickým prvkem. Může docházet ke změně intenzity, vlnové délky,

fázovému posunu nebo třeba ke změně polarizace světla. Na základě těchto změn se použije optický převodník, který může být založen na mnoha principech.

Tento typ biosenzorů lze na základě použitého specifického typu optického převodníku klasifikovat do hlavních skupin biosenzorů s použitím: optického vlákna, kruhového rezonátoru, interferometru, optického vlnovodu, fotonických krystalů, fluorescence a povrchové plazmonové rezonance (SPR) (Singh *et al.*, 2023).

2. Bakteriofágy

Jedná se o virovou částici, která je schopna napadat a ničit bakteriální buňky. Jejich výskyt je ubikvitární, stejně tak, jako výskyt jejich hostitelů. Fágy jsou jedni z nejrozšířenějších mikroorganismů na světě. Hrají klíčovou roli v udržení rovnováhy bakteriálních populací ve všech prostředích, jako je voda, půda, mikrobiom zvířat a lidí, ale mají také mnoho dalších funkcí (Hussain *et al.*, 2021). Zprostředkovávají mimo jiné horizontální přenos genů, což hraje zásadní roli v evoluci bakterií, ovlivňují jejich virulenci a další vlastnosti (Křivák, 2021).

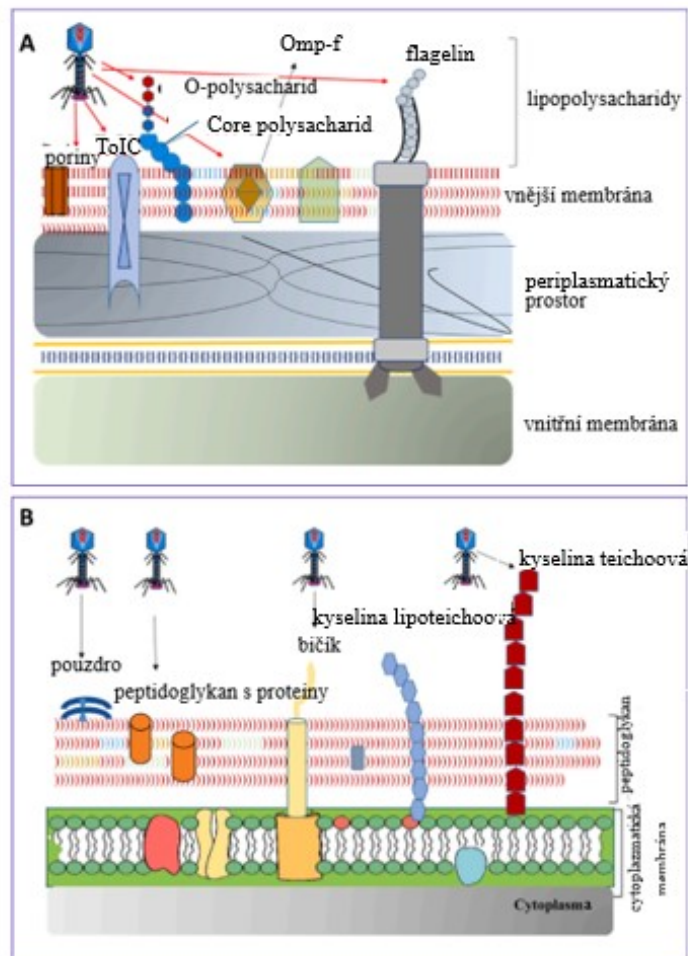
Tento styl přenosu genetické informace bakteriofágy se nazývá transdukce a může být buď specializovaná, nebo generalizovaná. Do fágové kapsidy se dostane bakteriální DNA přímo během jeho reprodukce v hostitelské buňce. U specializované transdukce, bakteriofág integruje svůj genom do bakteriálního a následně při své excizi pojme část bakteriálního genomu, který následně může po infekci dalšího hostitele integrovat do jeho genomu a tím obměnit jeho genetickou výbavu. Naopak generalizovaná transdukce probíhá zcela náhodně, kdy si fág během svého životního cyklu zahrne do své kapsidy náhodné sekvence (Hurych a kol., 2021). Pro tyto schopnosti jsou bakteriofágy hojně využívány v genomovém inženýrství nebo ve fágové terapii.

Základní stavba je u všech typů podobná, liší se především ve velikosti (20–200 nm) a tvaru. Genetická informace virusu je obsažena v DNA nebo RNA. Oba typy nukleových kyselin mohou mít jednovláknovou i dvouvláknovou strukturu uloženou v proteinové kapsidě. Ta přechází v krček a následně bičík a má většinou tvar ikosaedru. Vespod se nachází hexagonální bazální ploténka s hroty, které pomáhají k proniknutí fágů do hostitelské buňky. Pro přichycení na určité povrchové receptory vyskytujících se na hostitelské buňce slouží bičíková vlákna (Vaňková a kol., 2018).

2.1. Životní cyklus bakteriofágů

Fágy se dle svého životního cyklu dělí do dvou skupin, virulentní a temperované. Virulentní se po napadení svého hostitele začnou množit a tím způsobují lýzu této buňky (Hurych a kol., 2021). Tento lytický životní cyklus začíná adsorpcí fága na některou ze struktur bakteriální buňky (Obrázek 3). Fág následně penetruje svoji nukleovou kyselinu do cytoplazmy, kde je zahájen proces replikace s využitím DNA polymerázy bakteriální buňky. Nejprve vzniká raná fágová mRNA, syntéza proteinů kontrolujících další fáze replikace a tzv. pozdních bílkovin fága, které hrají klíčovou roli při tvorbě nových virových částic. Jakmile jsou všechny nezbytné

komponenty nasyntetizovány, dojde k jejich sestavení do kompletních virionů, které se následně uvolní do okolí pomocí endolyzinů, které rozruší bakteriální buňku. Uvolněné viriony poté mohou infikovat další vnímavé buňky (Vaňková a kol., 2018).

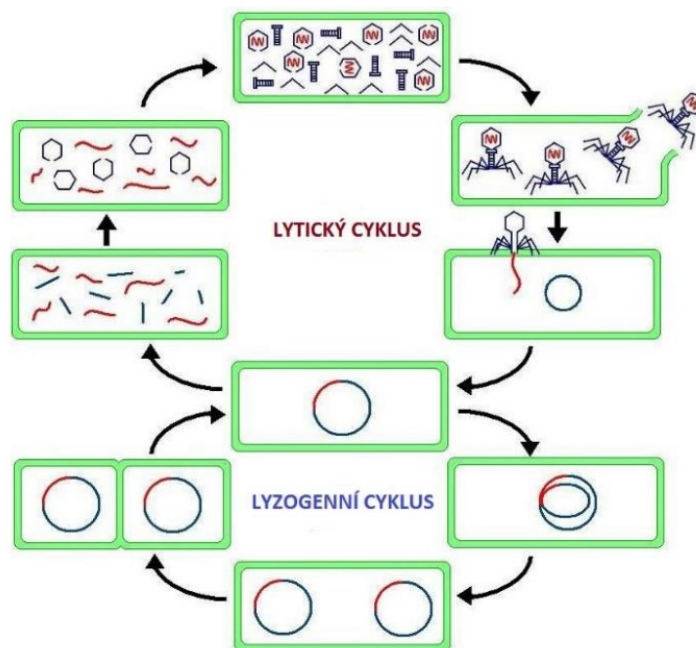


Obrázek 3: Struktury vhodné pro adhezi bakteriofága na buněčnou stěnu (upraveno dle Hussain *et al.*, 2021)

(A) Struktury a receptory buněčné stěny gramnegativních bakterií. (B) Receptory buněčné stěny grampozitivních bakterií

Temperované bakteriofágy s lyzogenním cyklem jsou ty, které se po infekci vnímavé buňky integrují do jejího genomu a replikují se společně s ní, čímž jsou nukleové kyseliny fága přenášeny do dceřiných buněk (vertikální přenos). Jakmile je proces přerušen vnějšími faktory, jako je UV záření nebo stres, může dojít k uvolnění profága (změna v lytický cyklus), a ten se tak stane virulentním (Hurych a kol., 2021; Hussain *et al.*, 2021).

Oba tyto životní cykly jsou zobrazeny na Obrázku 4.



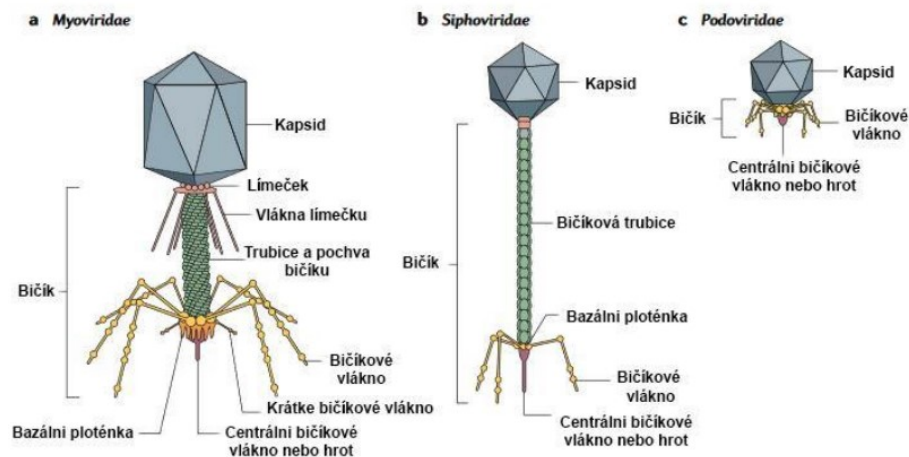
Obrázek 4: Životní cykly bakteriofágů (Vaňková a kol., 2018)

2.2. Taxonomie

Taxonomie bakteriofágů je dynamická, s každým nově objeveným druhem nebo na základě sekvenování je názvosloví pravidelně aktualizováno prostřednictvím webových stránek Mezinárodního výboru pro taxonomii virů (ICTV). V následujícím textu jsou uvedeny některé příklady bakteriofágů specifické pro bakterii *Escherichia coli* (*E. coli*) a jejich zařazení do příslušného řádu či čeledi. *E. coli* je považována za indikátor fekálního znečištění vod a je jedním z nejvíce rozšířených patogenních mikroorganismů v odpadních vodách.

2.2.1. Řád *Caudovirales*

Jedním z nejrozšířenějších a nejlépe prostudovaných řádů bakteriofágů je řád *Caudovirales*, známý také jako „ocasaté fágy“. Tento řád zahrnuje tři hlavní čeledi *Myoviridae*, *Siphoviridae* a *Podoviridae*. Názvy čeledí i samotného řádu jsou odvozeny z řeckých a latinských slov, která popisují charakteristiky jejich ocasů. (Lavigne *et al.*, 2012). Tyto rozdíly ve struktuře a stavbě jsou patrné na Obrázku 5.



Obrázek 5: Typická stavba bakteriofágů z řádu Caudovirales (Havránková, 2020)

Do čeledi *Myoviridae* patří bakteriofág T4, který je specifický pro *E. coli*. Je známý svou složitou strukturou. Slouží jako model pro studium virů a genetických procesů. Obsahuje dvouvláknovou DNA, kterou vpravuje do hostitelské bakterie v lytickém cyklu. Fág T4 byl klíčový pro výzkum struktury a funkce DNA. Jeho jednoduchý cyklus replikace a jasně definovaná biologie pomohly vědcům porozumět základním procesům, jako je replikace DNA, transkripce a translace.

Do čeledi *Siphoviridae* patří bakteriofág λ , který rovněž napadá gramnegativní bakterii *E. coli*. Tento fág může volit mezi dvěma životními styly – lytickým a lyzogenním. To řídí mechanismus známý jako genetický spínač. V lyzogenním režimu se fágový represor CI váže na specifické regulační sekvence (operátory) a tímto způsobem nejen potlačuje aktivitu lytických promotorů, ale zároveň aktivuje promotor zodpovědný za udržení lyzogenního stavu (Lewis and Adhya, 2024). Naopak pro navození lytického cyklu funguje protein Cro, který potlačuje expresi již zmiňovaného lambdového represoru. Toto rozhodnutí závisí na podmínkách prostředí a hostitelské buňce.

Mezi zástupce fágů z čeledi *Podoviridae* patří bakteriofág T7. Díky výhodám, jako je malý genom, dobře prostudovaná funkční genomika, rychlý životní cyklus a vysoká stabilita, je fág T7 široce využíván v mnoha oblastech, včetně biologie, medicíny a ekologie (Yu *et al.*, 2022).

2.2.2. Čeleď *Leviviridae*

Čeleď *Leviviridae* zahrnuje dva rody, *Levivirus* a *Allolevirus* (obsahuje delší genom). Jedná se o jednovláknové RNA bakteriofágy, které se vyskytují po celém světě, zejména ve splešcích,

odpadních vodách a ve výkalech lidí a zvířat. Nejsou pro člověka škodlivé. Kromě enterobakterií mohou druhy čeledi *Leviviridae* infikovat také bakterie z rodů *Caulobacter*, *Pseudomonas* a *Acinetobacter*, případně i mnoho dalších gramnegativních bakterií, pokud mají na svém povrchu vhodné pili. RNA kolifágy jsou často používány jako indikátory pro detekci enterovirů v odpadních a povrchových vodách, vzhledem k tomu, že *E. coli* je běžně přítomná ve výkalech, může jejich přítomnost naznačovat, že voda byla kontaminována fekáliemi, což může znamenat i přítomnost dalších patogenních mikroorganismů (van Duin and Olsthoorn, 2012).

Tyto bakteriofágy obsahují jeden z nejmenších genomů, s délkou kolem 3500–4200 nukleotidů. U všech zástupců této čeledi, u kterých je znám celý genom, se vyskytují pouze čtyři geny (Bollback and Huelsenbeck, 2000).

Mezi nejznámější zástupce této čeledi patří MS2 fág, který napadá především bakterii *E. coli*. Má čtyři geny, které kódují proteiny nezbytné pro jeho replikaci a tvorbu nových virionů v hostitelské buňce. Obsahuje gen, který kóduje protein pro obal viru (kapsidový protein), dále gen pro RNA-dependentní RNA polymerázu, a také další proteiny, které jsou důležité pro celý proces infekce.

Jeho jednoduchý genom a vysoká mutační frekvence (10^{-3} bp/replikace), umožnila vědcům studovat, jak se RNA viry chovají, jak mutují a jak interagují s hostitelskými buňkami (Bollback and Huelsenbeck, 2000).

3. Fág jako biorekognitivní prvek biosenzoru

Historie používání bakteriofágů ve vědeckém odvětví sahá již do začátku 20. století, ještě před objevením antibiotik. Tehdy byly fágy v Evropě užívány k boji proti nemocem jako byla cholera a mor. Po objevení antibiotik byl terapeutický potenciál bakteriofágů upozaděn a byly využívány pouze k výzkumu (Haq *et al.*, 2012). V současnosti, kdy se zvyšuje rezistence bakterií na antibiotika, a zároveň se zvyšuje počet patogenních mikroorganismů v odpadních vodách, se tak bakteriofágy dostávají opět do popředí a nacházejí využití i jako biosenzory.

Fágy mohou být použity jako účinné složky biosenzorů, díky své specifitě na povrchové struktury bakterií, na které jsou zacíleny. Ocas bakteriofágů obsahují specifické proteiny, především tzv. receptor-vazebné proteiny (RBPs), umístěné na koncích, které se vážou na specifické receptory na povrchu cílové bakterie. Rozhodujícím faktorem je především rozdíl ve složení buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií a schopnosti bakteriofága lyzovat buňku, když procházejí svým životním cyklem, což může být využito k detekci určitých signálů (Shivaram *et al.*, 2023b). Fágy procházející lytickým životním cyklem jsou preferovány, neboť přímo způsobují rychlou destrukci hostitele. Naopak lyzogenní bakteriofágy nejsou pro detekci patogenů ideální právě z důvodu neschopnosti daný mikroorganismus přímo zničit (Sinha *et al.*, 2018).

Mnoho bakteriofágů však patří mezi temperované, což znamená, že po infekci hostitelské buňky si mohou zvolit mezi lytickým a lyzogenním vývojovým cyklem. I když lyzogenie často poskytuje evoluční výhodu, neboť umožňuje fágové DNA přetrvávat v populaci bez destrukce hostitele a může tak probíhat vertikální přenos, infikovaná buňka zůstává ohrožena superinfekcí jinými fágovými částicemi. Tyto superinfekční fágy mohou být homotypické (úzce příbuzné profágu), mezotypické (středně příbuzné), nebo heterotypické (zcela odlišné). Za těchto okolností musí temperované fágy vyvíjet sofistikované regulační mechanismy, které nejen stabilizují lyzogenní stav, ale zároveň umožňují aktivní obranu proti superinfekci a obcházení obranných systémů jiných profágů v genomu hostitele (Mavrich *et al.*, 2019).

Jedním z těchto regulačních mechanismů je schopnost přetrvávat v hostitelské populaci díky tzv. homoimunitě – jedná se o situaci, kdy bakterie obsahující profág získává ochranu před napadením jinými lytickými fágy (Shivaram *et al.*, 2023b). Homoimunita je pro konstrukci biosenzorů cenná, neboť zajišťuje specifitu detekce tím, že brání opakovanému napadení infikované buňky. Umožňuje tedy přesnější a stabilnější měření. Například kolifágy HK97 a λ sdílejí homotypní imunitní systémy. Když je bakterie infikována profágem λ , získává imunitu

proti superinfekci jak samotným fágem λ , tak i fágem HK97. Tento ochranný efekt zprostředkovává represorový protein Cl, který rozpoznává regulační sekvence odpovědné za lytický cyklus u obou fágů a inhibuje jejich aktivaci, čímž zabraňuje přechodu do lytického cyklu (Mavrich *et al.*, 2019).

Další z alternativních forem přežívání fágů je tzv. stav přechodného nosiče (pseudolyzogenie), kdy virus nevstupuje ani do lytického, ani do lyzogenního cyklu. Tento stav je typický pro prostředí s nízkou dostupností živin a může být přerušeno, jakmile se zlepší podmínky, což umožní obnovení lytického cyklu (Chevallereau *et al.*, 2022).

Nové poznatky o těchto životních cyklech fágů otevírají možnosti jejich řízeného využití. Lze aktivovat lyzogenní fágy pouze ve chvílích, kdy je potřeba regulovat přemnožené populace cílových bakterií, což lze využít při detekci (Shivaram *et al.*, 2023b).

Další výhodou pro přesné monitorování mikrobiálních společenství je schopnost rozlišení mrtvých a životaschopných buněk. To potvrzuje studie, kdy byl jako elektrochemický biosenzor použit modifikovaný bakteriofág T4 s mikroelektrodou. Takto upravený fág byl schopen identifikovat s detekčním limitem 14 CFU/ml veškeré bakteriální buňky *E. coli*, včetně mrtvých (Xu *et al.*, 2020).

Pro rychlou identifikaci bakterií mají biosenzory založené na bakteriofázích i mnoho dalších pozitivních aspektů. Odolávají teplotám až 90–97 °C a zůstávají stabilní v širokém rozsahu organických rozpouštědel a pH (3–14). Navíc jsou bakteriofágy velice adaptabilní a schopní vlastní replikace (Shivaram *et al.*, 2023b). Na rozdíl od běžně užívaných a více dostupných protilátek je také mnohem snazší a levnější je ve velkém množství vyrábět. V neposlední řadě je důležité zmínit, že neinfikují lidi, takže jsou navíc i bezpečné pro použití a šetrné k životnímu prostředí (Sachdeva *et al.*, 2024).

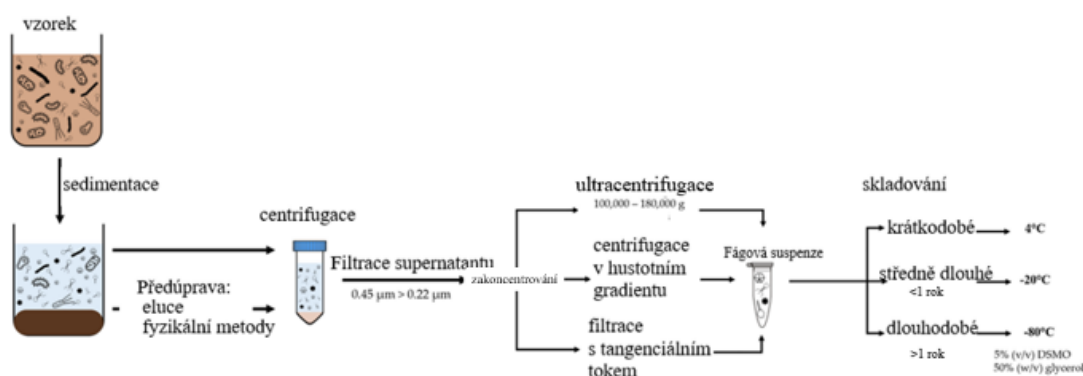
Přestože bakteriofágy vykazují značný potenciál využití v biosenzorech, současné technologie stále vyžadují výrazná zlepšení z hlediska citlivosti, selektivity a funkčnosti, než budou moci být komerčně využity. Nové praktické rozpoznávací prvky by pomohly zlepšit detekci potřebných parametrů, zejména ve vzorcích odpadních vod.

3.1. Izolace fágů

Pro praktické využití fágových biosenzorů je zásadní nejprve izolovat bakteriofágy cílené na konkrétní patogenní kmeny. Tento krok umožňuje navrhnout biosenzor schopný přesně odlišit patogenní bakterie od ostatních složek ve vzorku díky cílené vazbě fágů. Proto je kvůli jejich úzké specifitě potřeba pečlivého zvážení a výběru před implementací biosenzorů nebo fágových terapeutických řešení (Boeckeaerts *et al.*, 2021).

Vzhledem k tomu, že fágy samy o sobě nerozlišují mezi patogenními a nepatogenními kmeny bakterií téhož druhu, je nezbytné mít zavedené specifické izolační protokoly cílené právě na specifické patogenní kmeny. Po izolaci lze fág využít k vývoji biosenzoru, který prostřednictvím reportérského systému, jako je luciferáza, signalizuje přítomnost cílové bakterie (Runa *et al.*, 2021).

Bakteriofágy většinou koexistují v prostředí společně se svými hostiteli a pomáhají tak regulovat bakteriální populace. Proces izolace probíhá pomocí několika kroků zahrnujících centrifugaci nebo dvoustupňovou filtraci. Nejprve je vzorek přefiltrován přes polymerovou membránu s definovanou velikostí pórů 0,45 μm , což umožňuje selektivní záchyt prokaryotních buněk a jiných částic nad určitou velikostní hranicí, zatímco menší částice, jako jsou viry, mohou membránou volně procházet. Následuje filtrace skrz membránu o velikosti pórů 0,22 μm pro odstranění zbylých bakterií anebo bakteriálních spor. Cílem těchto kroků je získat vzorek, který obsahuje co nejčistší virovou suspenzi, kterou lze dále dle potřeby dočistit nebo zakonzentrovat (Runa *et al.*, 2021). Postup extrakce bakteriofágové suspenze a její skladování je znázorněno na Obrázku 6.



Obrázek 6: Postup získání bakteriofágové suspenze (upraveno dle Runa *et al.*, 2021)

Při práci s komplexními maticemi, jako je aktivovaný nebo anaerobní kal z čistíren odpadních vod, je často nutná předúprava, neboť fágy mohou být vázány na pevné částice nebo uvězněny ve strukturách jako jsou shluky částic a biofilmy. Adsorpce fágů je ovlivněna iontovým prostředím vzorku, a proto lze jejich desorpci podpořit změnou pH a iontové síly prostředí. Změnu podmínek lze provést použitím pufrů nebo tenzidů, často v kombinaci s fyzikálními metodami (Runa *et al.*, 2021). Bez těchto kroků může dojít k podhodnocení skutečné koncentrace fágů ve vzorku a získání nereprezentativního vzorku (Wu *et al.*, 2017). Pro lepší pochopení chování fágů v těchto prostředích a optimalizaci extrakce je potřebný další výzkum zaměřený na fyzikálně-chemické interakce mezi bakteriemi a fágy v kalu.

Běžnou praxí při samotné izolaci fágů je použití jednoho specifického bakteriálního hostitele, s nímž je suspenze inkubována za účelem obohacení – tedy zvýšení koncentrace fágových částic (Obrázek 7). Tento krok je klíčový zejména tehdy, když je koncentrace fágů ve vzorku nízká (Hyman *et al.*, 2019).

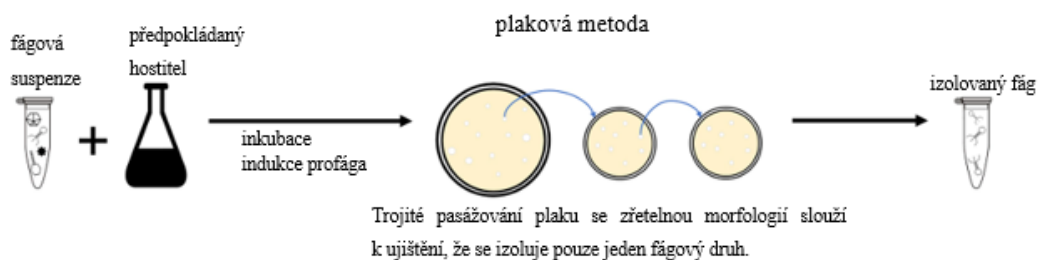
Následně lze využít plakové testy pro zjištění hostitelské specificity. Plaky na agarových deskách mohou mít různé morfologie, což naznačuje přítomnost více fágových typů. Proto se jednotlivé plaky opakovaně přeočkovávají do čerstvé kultury hostitele, dokud nejsou na deskách přítomné pouze morfologicky jednotné plaky. Tím se získá morfologicky jednotná a geneticky stabilní fágová kultura vhodná pro další použití. (Runa *et al.*, 2021; Shivaram *et al.*, 2023a).

Důležitou metodou pro charakterizaci a kvantifikaci fága je analýza jedno-fázové růstové křivky, která se provádí nejčastěji metodou s dvojitou agarovou vrstvou. Spodní tuhá agarová vrstva slouží jako stabilní základ. Na tuto vrstvu se nalije smíchaná suspenze fága s měkkým agarem a hostitelskými buňkami. Petriho miska se nechá ztuhnout a následně se inkubuje. Inkubace probíhá při 37 °C, což zajišťuje pozitivní adsorpci fágových částic na hostitele (Khorshidtalab *et al.*, 2022). Během růstu hostitelských bakterií dochází k lýze v místech, kde viry infikují a ničí hostitelské buňky, vznikají plaky (čiré zóny). Pomocí této techniky lze určit základní parametry infekčního cyklu fágů, jako je latentní perioda (doba od infekce po lýzu buňky), doba uvolňování nových virionů a průměrný počet nových fágů uvolněných po lýze jedné buňky. Výsledný titr fágů se uvádí jako počet plakotvorných jednotek na mililitr (PFU/ml), vypočítaný na základě ředění a objemu inokula. Před další aplikací musí být fágová kultura důkladně charakterizována a standardizována (Hyman *et al.*, 2019; Shivaram *et al.*, 2023a).

Kromě klasických kultivačních metod se nově uplatňují i moderní fluorescenční techniky, které zvyšují rychlost a přesnost detekce baktericidního účinku fágů. Tato technika je založená na použití resazurinu – fluorescenčního barviva pro měření viability buněk. Resazurin se v přítomnosti živých buněk redukuje na růžový resorufin, přičemž úroveň fluorescence (měřená při 530/590 nm) je přímo úměrná počtu živých bakterií. Pokud fágy infikují a lyzují bakterie, fluorescence klesá, což umožňuje rychlou a kvantitativní detekci fágové aktivity. Tato metoda je navíc plně automatizovatelná a použitelná v high-throughput formátu, což z ní činí cenný nástroj jak ve výzkumu, tak v průmyslové praxi, zejména v kontextu boje proti antibiotické rezistenci (Gilbert-Girard *et al.*, 2020).

K finální identifikaci morfologie jednotlivých fágů se běžně používá transmisní elektronová mikroskopie. Díky negativnímu náboji suspenze fágů v roztoku kovových solí jsou fágy na tmavém pozadí jasně viditelné, což umožňuje přesné určení jejich tvaru a velikosti (Shivaram *et al.*, 2023a).

Izolace fága



Kvantifikace fága



Obrázek 7: Izolace a kvantifikace fágů plakovou metodou (upraveno dle Runa *et al.*, 2021)

3.1. Modifikace bakteriofágů

V posledních letech došlo k významnému pokroku v oblasti modifikace bakteriofágů díky využití genetického a chemického inženýrství. Tyto úpravy mohou zahrnovat nahrazení nebo mutace genů, především těch kódujících vazebné proteiny, nebo vkládání cizích sekvencí do neesenciálních oblastí genomu. Chemické inženýrství se naproti tomu soustředí na úpravu

fágových obalů – ty jsou chemicky propojovány s antibiotiky, antimikrobiálními peptidy, ionty těžkých kovů nebo fototermickými látkami. Tyto zásahy výrazně rozšiřují spektrum bakterií, které fágy dokážou napadnout, a zvyšují jejich účinnost při ničení patogenů (Guo *et al.*, 2021).

Tato přehledová studie se zaměřuje právě na metody genetické a chemické modifikace fágů a zároveň upozorňuje na současné překážky, které brání širšímu využití těchto technologií v praxi.

3.1.1. Genetické modifikace

Genetické úpravy fágů obvykle spočívají v mutacích, náhradách genů nebo vkládání cizorodých genů pomocí molekulárních technik. Cílem těchto zásahů je buď rozšířit hostitelské spektrum fága, nebo zvýšit jeho antibakteriální účinek. Mutace a genové náhrady se často týkají genů, které kódují proteiny ocasního vlákna – tedy struktury, které určují, jaké bakterie fág rozpozná a infikuje. Cizí geny se naopak většinou integrují do nefunkčních oblastí fágového genomu, přičemž jejich produkty mohou být pro hostitelské bakterie smrtící (Guo *et al.*, 2021).

Genetické inženýrství otevřelo cestu k vývoji tzv. reportérových fágů, tedy bakteriofágů upravených tak, aby sloužily k detekci specifických bakterií. Tyto fágy mohou nést reportérové geny (například *lux* nebo *lacZ*), které jsou exprimovány pouze tehdy, pokud fág úspěšně infikuje cílovou bakteriální buňku. Výsledná produkce bioluminiscence nebo jiného signálu pak umožňuje rychlou a citlivou identifikaci přítomnosti patogenu. Tato technologie tak kombinuje přesnost virové infekce s vysokou citlivostí molekulární detekce (Meile *et al.*, 2020).

K vývoji těchto reportérových fágů bylo popsáno několik technik genetické modifikace: technika rekombinace bakteriofágů pomocí elektropotrované DNA (BRED), kdy se pomocí elektroporace vpravuje DNA do hostitelských buněk napadených bakteriofágem a následně se využívá rekombinace k úpravě fágového genomu (Payaslian *et al.*, 2021) a homologní rekombinace s výběrem pomocí klastrovaných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repeticí s asociovanými proteiny (CRISPR-Cas) (Mahler *et al.*, 2023). Těmito a mnoha dalšími způsoby genetických úprav vznikají fágy, které jsou schopné detekovat bakterie s vysokou citlivostí a specifitou.

Díky těmto technikám mohou být do bakteriofágů vnášeny geny pro enzymy. Tyto přístupy vedly ke vzniku fágů nesoucích reportérové enzymy, jako je luciferáza (*Nluc*), jako v případě modifikovaného fága T7, který umožňuje detekovat méně než 10 CFU/ml *E. coli* ve vzorku pitné vody do tří hodin (Hinkley *et al.*, 2018). Další studie pojednává o vyvinutí upraveného

fága T7-ALP, který exprimuje alkalickou fosfatázu (ALP) k detekci *E. coli*. Nadměrná exprese této fosfatázy po infekci poskytuje vysoce citlivou fluorescenční detekci bakterií (Wisuthiphaet *et al.*, 2019).

Další možností zvýšení účinnosti bakteriofágových biosenzorů za pomoci genetické modifikace je životní cyklus bakteriofágů geneticky upravit tak, aby byl výhradně lytický. Dojde k tomu odstraněním genů odpovědných za udržení profága v genomu hostitele (např. *int*, *am*, *oac*) a nahrazením reportérovými sekvencemi, jako je *luxCDABE* (Kim *et al.*, 2017).

Jiný směr výzkumu se zaměřuje na multiplexní detekci, tedy současné rozpoznání více patogenních mikroorganismů. Byly navrženy duálně modifikované fágy, které dokáží detekovat různé cílové bakterie, jako jsou *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium a *Pseudomonas aeruginosa*, s detekčním limitem 10^2 buněk/ml i za přítomnosti jiných necílových mikroorganismů (Wu *et al.*, 2021).

Kromě schopnosti detekovat planktonní buňky se současný výzkum stále více zaměřuje i na bakteriální formy odolné vůči běžným zásahům – především biofilmy, které představují zvlášť náročný cíl. Biofilm představuje strukturálně složitý útvar, tvořený buňkami obalenými lepkavou maticí, složenou převážně z extracelulárních polysacharidů, proteinů a DNA. Tato struktura poskytuje bakteriím vysokou míru ochrany před vnějšími vlivy, jako jsou antibiotika, oxidační stres, predace nebo napadení fágem. V prostředí, jako jsou nemocnice, vodovodní systémy či zdravotnické pomůcky, se biofilmy běžně vyskytují a jsou považovány za jeden z hlavních mechanismů bakteriální rezistence (Guo *et al.*, 2021).

Tato skutečnost vedla odborníky k hledání nových způsobů, jak biofilmy narušit. Jedním z prvních úspěšných přístupů bylo využití enzymu DspB, který cíleně štěpí polysacharidy stabilizující biofilm. Studie ukázaly, že použití tohoto enzymu vedlo k téměř úplnému potlačení tvorby biofilmu u různých druhů bakterií. Na základě těchto poznatků byl vytvořen geneticky upravený fág T7DspB, jenž nese gen pro DspB a během infekce efektivně degraduje biofilm. Ve srovnání s běžným fágem T7 vykázal tento modifikovaný fág přibližně stokrát vyšší účinnost při redukci biofilmových bakterií. Další inovativní strategie, která navazuje na předešlý výzkum se zaměřuje na narušení quorum sensing, což je komunikační systém bakterií, který reguluje mimo jiné tvorbu biofilmů. Tento systém funguje prostřednictvím autoinduktorů, například acylhomoserin-laktonů (AHL), které se hromadí podle hustoty populace. Inhibicí těchto signálů lze zasáhnout samotný základ bakteriální koordinace (Guo *et al.*, 2021).

Ve studii Pei *et al.* (2014) byl vyvinut T7 fág nesoucí gen pro enzym AiiA (laktonázu), který rozkládá AHL molekuly a tím účinně blokuje quorum sensing. Tento přístup vedl k výraznému snížení biofilmové aktivity u smíšených kultur *Pseudomonas aeruginosa* a *E. coli*. Takový fág tedy představuje slibný nástroj v boji proti biofilmům i odolnějším bakteriálním komunitám.

Tyto práce ukazují praktický přínos fágové modifikace nejen pro detekci, ale i pro přímou kontrolu biofilmů v náročném prostředí. Jinou strategií, jak vylepšit specifickou a dostupnost bakteriofágů je rozšiřování hostitelského spektra fágů pomocí modifikace ocáskových vláken.

Aby mohl bakteriofág úspěšně infikovat bakteriální buňku, musí se nejprve navázat na její povrch. Tento klíčový krok je závislý na vzájemném rozpoznání receptoru na povrchové bakteriální struktuře a specifického vazebného proteinu na fágovém ocasu. Vzhledem k tomu, že většina fágů má unikátní struktury vláken ocasu, je jejich přirozený hostitelský rozsah často velmi úzký (Guo *et al.*, 2021).

Významný průlom přinesl výzkum, při kterém byl nahrazen gen pro dlouhé vláknité struktury fága T2 genem z fága IP008. Výsledkem byl hybridní fág, který si zachoval štěpící schopnosti původního T2, ale zároveň získal širší spektrum odpovídající IP008 (Mahichi *et al.*, 2009). O pár let později byl vytvořen rekombinovaný fág T3/T7 kombinací genů z obou fágů. Tento hybrid dosáhl lepší schopnosti navázat se na bakterie a dokázal infikovat širší spektrum hostitelů než původní fág (Lin *et al.*, 2012). Přesto však i tyto vylepšené fágy narážely na schopnost bakterií rychle mutovat své receptorové proteiny, a tím se bránit (Guo *et al.*, 2021).

3.1.2. Chemická modifikace

Chemická modifikace bakteriofágů představuje účinnou metodu, jak zlepšit jejich navázání na povrch senzorů, což je zásadní například u elektrochemických biosenzorů (Xu *et al.*, 2019). Na povrchu fágů se nachází aminokyseliny s různými reaktivními funkčními skupinami, jako jsou karboxylové kyseliny, aminy, fenoly nebo thioly, které slouží jako možné cíle pro chemickou konjugaci. Úspěšnost modifikace závisí na tom, jak snadno jsou tyto skupiny dostupné, jejich chemických vlastnostech (pKa) a na prostředí, ve kterém se reakce odehrává. Nicméně, přítomnost více nukleofilních skupin může někdy způsobit nechtěné vedlejší reakce nebo vznik směsných produktů i při optimalizovaných podmínkách (Carmody *et al.*, 2021).

Pro větší kontrolu a specifitu modifikace se často využívají méně běžné aminokyseliny, například cystein, nebo se do fágů zavádějí nepřirozené aminokyseliny. U obalených fágů se jako další možný cíl chemických úprav nabízejí fosfolipidy v jejich lipidovém obalu. Podobné

strategie byly úspěšně aplikovány u lidských obalených virů pomocí kultivace v geneticky modifikovaných hostitelských buňkách, které začleňují speciální chemické složky do virových membrán, což může být slibná cesta i pro bakteriofágy (Carmody *et al.*, 2021).

K nejčastěji používaným chemickým reakcím patří tvorba kovalentních vazeb mezi aminoskupinami ($-NH_2$) na povrchu fágů a karboxylovými skupinami ($-COOH$), které jsou vytvořeny elektrochemickou oxidací a následně aktivovány činidly, jako jsou 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid a N-hydroxysulfosukcinimid. Další možnosti imobilizace zahrnují využití glutaraldehydu nebo samouspořádaných monovrstev, které rovněž reagují s aminoskupinami fágů. Pro zvýšení hustoty navázaných virů mohou být použity látky jako cystein, cysteamin nebo cukry, avšak příliš vysoká koncentrace těchto látek může naopak snížit účinnost díky překrývání vazebných míst (Xu *et al.*, 2019).

Je důležité mít na paměti, že příliš rozsáhlá modifikace může negativně ovlivnit strukturu fágů a jejich schopnost infikovat bakterie, což by mohlo snížit jejich funkčnost v biosenzorech (Carmody *et al.*, 2021).

Využití chemických modifikací tak nabízí perspektivní přístup k vytváření stabilnějších a citlivějších biosenzorů, zejména při detekci rezistentních bakterií, protože nové chemikálie, které v přírodě neexistovaly, mikroorganismy zatím neumí účinně rozpoznat a odolávat jim (Guo *et al.*, 2021).

3.1.3. Fágové koktejly

Směs dvou a více fágů se nazývá fágový koktejl. Pro úspěšnou aplikaci fágové terapie, bez rozvinutí rezistence bakterií vůči jednomu fágu, je ve většině případů nutné navrhnout tuto směs tak, aby byl její efekt synergický nebo aditivní. Pokud jsou známy mechanismy infekce jednotlivými fágy, mohou výzkumníci záměrně kombinovat fágy s odlišnými strategiemi napadení hostitele (Hegarty, 2025).

Zajímavý přístup představuje studie, která využila tzv. fágový trénink – techniku umožňující evoluční adaptaci fágů na rezistentní bakteriální kmeny. Výsledkem byly varianty schopné infikovat *Pseudomonas aeruginosa* s mutovanými O-antigeny. Kombinací těchto nově adaptovaných fágů s původními vznikl fágový koktejl, který si udržel účinnost po delší dobu a byl efektivní vůči širšímu spektru klinických izolátů (Yang *et al.*, 2020).

Vedle těchto aditivních účinků mohou být fágové koktejly navrženy tak, aby se fágy navzájem funkčně doplňovaly a vytvářely synergický efekt (Hegarty, 2025). Například fág J8–65

produkuje enzym kolanidázu, který rozkládá slizovitou ochrannou vrstvu v biofilmu tvořeném některými kmeny *E. coli*, čímž umožňuje fágů T7 snadnější přístup k receptorům na buněčném povrchu. Společná aplikace těchto dvou fágů tedy vede k výrazně vyšší účinnosti než použití kteréhokoli z nich samostatně (Schmerer *et al.*, 2014).

Nevhodné mohou být fágové koktejly s mnoha bakteriofágy, které napadají stejnou strukturu, takový účinek je antagonistický a je nutné se mu vyvarovat (Hegarty, 2025).

Vývoj fágových koktejlů určených k biologické kontrole bakterií se doposud opírá především o přístup typu pokus–omyl. V praxi to znamená, že výzkumníci testují různé kombinace fágů přímo na cílové bakterie, aby zjistili, která z nich je nejúčinnější. Tento proces je však časově náročný a technicky komplikovaný, což omezuje jeho využitelnost zejména tam, kde je potřeba rychle reagovat na konkrétní bakteriální hrozbu. Z toho důvodu roste zájem o metody, které by umožnily předběžný výběr optimálních fágových kombinací bez nutnosti rozsáhlého laboratorního testování (Hegarty, 2025).

Jedním z nadějných řešení jsou matematické modely, které umožňují simulovat průběh fágové infekce a tím předpovědět účinnost konkrétních koktejlů ještě před jejich praktickým nasazením. Modely založené na kinetice interakcí mezi fágem a hostitelskou bakterií představují důležitý doplněk ke klasickému experimentálnímu přístupu. Umožňují výzkumným skupinám simulovat dynamiku vztahu mezi fágem a hostitelskou bakterií a odhalit tak informace, které by bylo jinak složité či zdlouhavé získat v laboratoři (Delattre *et al.*, 2022). Jednou z překážek širšího využití těchto modelů je však potřeba velkého množství přesných vstupních dat, jako jsou rychlost růstu bakterií, množství virionů uvolněných z infikované bakterie, délka infekčního cyklu nebo míra infekčnosti. Jejich získání vyžaduje experimentální měření, což omezuje rychlost a hodnocení těchto modelů. Alternativním přístupem může být použití pravděpodobnostních modelů, jako je Poissonovo rozdělení, nebo prediktivní algoritmy, které pracují s existujícími daty o známých fág-hostitel interakcích. Tyto přístupy sice zatím nezahrnují komplexnost reálného mikrobiálního prostředí, přesto představují významný krok k racionálnímu návrhu koktejlů s vyšší šancí na úspěch (Hegarty, 2025).

S rozvojem sekvenčních technologií, především metagenomiky, výrazně vzrostla schopnost identifikovat nové fágy a lépe chápat jejich roli v mikrobiálních společenstvech. Díky těmto metodám je dnes možné sledovat vliv fágů nejen v klinickém, ale také v environmentálním kontextu, například ve vodních zdrojích či odpadních vodách. Sekvence navíc nabízí nepřímé možnosti predikce, jaké bakterie konkrétní fágy pravděpodobně infikují, a to na základě

genetických znaků jako jsou podobnosti v sekvencích, přítomnost CRISPR motivů nebo kompozice kodonů. Přestože jsou náklady na sekvenaci v posledních letech nižší, zůstává její širší využití v některých případech stále limitováno cenou či nedostatkem referenčních databází. Většina fágových genů totiž dosud nemá známou funkci (Hegarty, 2025).

Přes pokročilé metody zůstává vývoj a praktické nasazení fágových koktejlů složitou výzvou (Hegarty, 2025). Klíčovým faktorem této náročnosti je komplexní povaha vztahu mezi bakteriofágy a jejich hostiteli, která je i přes intenzivní výzkum dosud nedostatečně pochopena (Chen *et al.*, 2019; Hussain *et al.*, 2023). I když lze z environmentálních nebo klinických vzorků izolovat desítky různých fágů, ve skutečnosti se jen malá část z nich ukáže jako skutečně využitelná v praxi (Hoang *et al.*, 2019).

Abychom mohli vytvářet bezpečné a účinné koktejly, je třeba zaměřit výzkum nejen na úroveň jednotlivých fágů, ale také na úroveň jejich kombinací a širšího prostředí, v němž působí (Chen *et al.*, 2019; Hussain *et al.*, 2023).

4. Kontaminace odpadních vod patogenními mikroorganismy

S rostoucím počtem obyvatel a zvyšující se spotřebou vody začíná být zřejmé, že tradiční vodní zdroje již nedokáží uspokojit dlouhodobé potřeby společnosti. Opětovné využívání odpadních vod se proto dnes jeví jako klíčová strategie pro zajištění udržitelného hospodaření s vodou, zejména v době, kdy klimatické změny a rostoucí spotřeba způsobují stále výraznější nedostatek této životně důležité suroviny (Bonnetta *et al.*,2022; Salgot and Folch, 2018).

Přibývajících epizody sucha v posledním desetiletí, jako například rozsáhlé období sucha mezi lety 2014–2018 nebo 2020 ukazují, že i mírné klimatické pásmo střední Evropy bude muset hledat alternativní zdroje závlahové vody (Šereš, 2022). Vzhledem k předpokládanému vývoji klimatických podmínek se očekává, že po roce 2040 až 2060 bude závlaha zcela nezbytnou součástí zemědělské výroby i v mírném podnebném pásmu. S tím pravděpodobně souvisí i nutnost změnit dosavadní skladbu pěstovaných plodin, tradiční obiloviny a druhy rostlin s vyššími nároky na vláhu, jako jsou zelenina, ovoce či chmel, budou muset být nahrazeny za ty méně závlahově náročné (Punčochář,2023).

Historický vývoj technologií čištění odpadních vod byl úzce spjat s urbanizací – jak se populace koncentrovala do měst, rostly i nároky na zajištění hygieny a ochrany veřejného zdraví. Dnes však nejde jen o odvádění a čištění znečištěné vody, ale o její přeměnu na nový, využitelný zdroj. Vzhledem k narůstajícímu tlaku na omezené vodní zdroje vyvstává potřeba hledat alternativní způsoby, jak vyrovnat rostoucí poptávku po vodě. Recyklace a opětovné využití odpadních vod tak nabývají na významu nejen jako technické řešení, ale i jako strategický nástroj pro zajištění dlouhodobé vodní bezpečnosti. Je však zásadní, aby tyto vody byly dostatečně vyčištěny, protože jinak mohou představovat významné mikrobiologické riziko pro lidské zdraví i životní prostředí (Bonnetta *et al.*,2022; Salgot and Folch, 2018).

Na rostoucí potřebu efektivního a bezpečného využívání vodních zdrojů reaguje také legislativa Evropské unie. Zásadní právní rámec v této oblasti představuje Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/741, které stanovuje minimální požadavky pro opětovné využívání městské odpadní vody určené zejména k zemědělskému zavlažování. Jeho cílem je podpořit širší využívání recyklované vody v praxi a zároveň zajistit vysokou úroveň ochrany veřejného zdraví a životního prostředí. Nařízení vychází z vědecky ověřených standardů a mezinárodně uznávaných postupů a přináší jasně definovaná pravidla pro technickou i hygienickou bezpečnost celého procesu.

Jednou z klíčových součástí tohoto nařízení je plán řízení rizik, který slouží k systematickému vyhodnocení zdravotních a environmentálních hrozeb spojených s opětovným použitím vody. Tento plán je povinný pro všechny provozovatele zařízení, jež se recyklací vody zabývají, a musí být vypracován ve spolupráci s příslušnými úřady a koncovými uživateli. Obsahuje identifikaci potenciálních rizik, návrh kontrolních opatření a postupy průběžného monitoringu v celém řetězci využívání vody. Provozovatelé jsou odpovědní za kvalitu recyklované vody a musí kontinuálně sledovat biologické, chemické i fyzikální parametry, jako jsou například koncentrace *E. coli*, suspendovaných částic nebo zbytkového chlóru. Nařízení zároveň stanovuje požadavky na frekvenci validačních i provozních měření (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/741).

Důležitým prvkem právního rámce je také klasifikace recyklované vody do čtyř kvalitativních tříd (označených A–D) (Obrázek 8) podle typu zavlažovaných plodin a způsobu aplikace vody. Nejvyšší třída A je vyžadována pro plodiny konzumované za syrova, které přicházejí do přímého kontaktu se zavlažovanou vodou, například listová zelenina nebo jahody. Naopak třídy B až D se vztahují na méně rizikové aplikace, jako jsou technické plodiny, pícniny nebo plodiny určené ke zpracování. Každá třída má přesně stanovené hygienické, mikrobiologické limity a požadavky na typ zavlažování i systém monitorování. Tato kategorizace umožňuje flexibilní, ale zároveň bezpečné využívání recyklované vody v závislosti na jejím plánovaném účelu (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/74; Puškáčová a kol., 2024).

Přestože je právní rámec detailně propracovaný, nařízení zároveň upozorňuje na zásadní bariéry širší implementace těchto opatření, především na vysoké investiční náklady spojené s modernizací čistíren odpadních vod a na nedostatek ekonomických motivací pro zemědělce. K překonání těchto překážek dokument doporučuje zavedení inovativních ekonomických mechanismů, které by zohledňovaly nejen přímé náklady, ale také dlouhodobé socioekonomické a ekologické přínosy opětovného využívání vody (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/741). Klíčovým krokem však zůstává jeho důsledná implementace na národní úrovni, včetně zavedení ekonomických stimulů, podpory výzkumu a transparentní komunikace směrem k veřejnosti. Tento přístup je nezbytný, protože stejně jako v celé Evropské unii, i u nás stále přetrvává nedostatek investic do modernizace čistíren, chybí finanční motivace pro uživatele vody, řešení otázek odpovědnosti za kvalitu vody je stále nedokončené a společenské bariéry brání širšímu přijetí těchto opatření (Mannina *et al.*, 2022).

Závěrem je třeba doplnit, že část technických požadavků, které nařízení stanovuje, navazuje na starší směrnici 91/271/EHS, která tvoří základ evropské politiky v oblasti čištění městských odpadních vod. Na rozdíl od Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/741 se však tato směrnice zaměřuje výhradně na vypouštění vyčištěné vody do povrchových toků a nezabývá se jejím opětovným využitím v oběhovém hospodářství (91/271/EHS, 1991). Obě právní normy se tak vzájemně doplňují, jedna tvoří základ pro tradiční hygienická opatření, druhá reaguje na nové výzvy spojené s adaptací na klimatické změny.

Minimální třída kvality recyklované odpadní vody	Kategorie plodin (*1)	Metoda zavlažování
A	Všechny potravinářské plodiny konzumované za syrova, jejichž jedlá část je v přímém kontaktu s recyklovanou odpadní vodou, a kořenové plodiny konzumované za syrova.	Všechny metody zavlažování.
B	Potravinářské plodiny konzumované za syrova, jejichž jedlá část roste nad zemí a není v přímém kontaktu s recyklovanou odpadní vodou, zpracované potravinářské plodiny a nepotravinářské plodiny, včetně plodin určených ke krmení zvířat na produkci mléka a masa.	Všechny metody zavlažování.
C	Potravinářské plodiny konzumované za syrova, jejichž jedlá část roste nad zemí a není v přímém kontaktu s recyklovanou odpadní vodou, zpracované potravinářské plodiny a nepotravinářské plodiny, včetně plodin určených ke krmení zvířat na produkci mléka a masa.	Kapkové zavlažování (*2) nebo jiná metoda zavlažování, při níž nedochází k přímému kontaktu s jedlou částí plodiny.
D	Technické a energetické plodiny a plodiny z osiva.	Všechny metody zavlažování (*3).

Obrázek 8: Třídy kvality recyklované vody a příslušné kategorie plodin (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/741)

(*1) Pokud stejný druh zavlažované plodiny spadá do několika kategorií uvedených v tabulce 1, použijí se požadavky nejprísnější kategorie.

(*2) Kapkové zavlažování (nazývané také kapková závlaha) je systém mikrozávlahy, který dokáže dodávat kapky vody nebo malý proud vody k rostlinám a zahrnuje vodu odkapávající na půdu nebo přímo pod její povrch při velmi malých rychlostech (2–20 litrů za hodinu) ze systému plastových trubek o malém průměru vybavených otvory, které se nazývají kapkovače.

(*3) U metod zavlažování napodobujících dešť je třeba věnovat zvláštní pozornost ochraně zdraví pracovníků a osob v okolí. Za tímto účelem se použijí náležitá preventivní opatření.

Dalším mezinárodně uznávaným standardem je norma ČSN ISO 16075-1 z roku 2021. Poskytuje technický návod pro plánování, návrh a provoz systémů využívajících vyčištěnou odpadní vodu, zejména v zemědělství. Norma zahrnuje specifikaci kvality vody, návrh infrastruktury a doporučení pro řízení environmentálních i zdravotních rizik (ČSN ISO 16075-1, 2021).

Otázkou bezpečného využívání recyklované vody se však nezabývá pouze evropská legislativa. Světová zdravotnická organizace (WHO) již v roce 2006 zveřejnila soubor doporučení, který slouží jako rámec pro tvorbu národních předpisů a hygienických standardů při opětovném využití vody, a to se zvláštním důrazem na omezení mikrobiologických rizik (WHO, 2006). Na tato doporučení navázala WHO v roce 2016 praktickým manuálem, který obsahuje konkrétní příklady, modely řízení rizik i vodítka pro zavádění recyklace odpadních vod do praxe v různých podmínkách (WHO, 2016; Šeřeš, 2022).

Tyto mezinárodní rámce a technické standardy tak společně vytvářejí základní metodické vodítko pro bezpečné využívání vyčištěné odpadní vody, a to napříč legislativními systémy.

Zkušenosti některých států potvrzují, že při správném technologickém a legislativním nastavení může být recyklovaná voda bezpečně a efektivně využívána. Izrael je v tomto ohledu světovým lídrem – recykluje více než 85 % komunálních odpadních vod (Reznik, *et al.*, 2017).

Podobný přístup uplatňuje i Španělsko, kde klimatické podmínky dlouhodobě vyžadují alternativní přístupy k hospodaření s vodou – bez zavlažovacích systémů zde totiž zemědělci nemají reálnou šanci udržet produkční výnosy plodin na ekonomicky přijatelné úrovni (Punčochář, 2023). Například ve Valencii byla zavedena kombinace ozonizace, UV dezinfekce a biologických filtrací, která umožňuje bezpečně používat recyklovanou vodu pro městskou zeleň, golfová hřiště a zemědělství. Významnou roli zde hraje také aktivní podpora ze strany státu a vlád regionů (Jodar-Abellan *et al.*, 2019).

Obavy z opětovného využívání vyčištěné vody jsou často spojeny s otázkou její mikrobiologické bezpečnosti a spolehlivosti dezinfekčních procesů. Jako výstrahy slouží případy, kdy dezinfekce vody selhala i v běžných systémech zásobování pitnou vodou. Jedním z nejnámějších je tragická událost v kanadském městě Walkerton z roku 2000, kdy nedostatečné dávkování chlóru a selhání monitoringu vedly ke kontaminaci veřejného vodovodu bakterií *E. coli* O157:H7. Tato kontaminace způsobila smrt sedmi lidí a více než dva tisíce případů otravy vodou (Frigon *et al.*, 2013).

Ačkoliv se nejednalo o recyklovanou vodu, tento případ jasně dokládá, že pouhé formální splnění hygienických požadavků nemusí být dostatečné, pokud chybí funkční systém kontroly a validace. V kontextu opětovného využití vody to znamená, že jakákoliv nedůslednost v čištění a dezinfekci může představovat závažné riziko – a voda by v takovém případě nemohla být považována za bezpečnou ani pro účely závlahy, natož pro přímou spotřebu.

To, že ani moderní dezinfekční postupy nejsou vždy stoprocentně účinné, potvrzují i zjištění z prostředí evropských nemocnic. Rizika výskytu oportunně patogenních mikroorganismů, jako jsou zástupci rodu *Aeromonas* nebo *Acinetobacter*, byla prokázána i v několika evropských nemocnicích. Jejich přetrvávání v odpadních vodách i po chloraci lze přičíst rezistenci těchto mikroorganismů k dezinfekčním prostředkům, jako je chlór, případně jejich opakovanému vystavení chlorové dezinfekci ještě před vstupem do samotného čisticího procesu (Shivaram *et al.*, 2023b).

Aby se podobným selháním předešlo, je klíčové je především zavedení víceúrovňového systému ochrany, kombinujícího účinné technologie, důsledné monitorování a správnou regulaci. Kombinace technologií, jako jsou membránový bioreaktor (MBR), ozonizace, využití UV záření, chlorová dezinfekce, reverzní osmóza, či nanofiltrace (Puskáčová a kol., 2023) poskytují vysokou míru spolehlivosti a umožňují přizpůsobit čištění konkrétnímu účelu použití vody, ať už jde o zemědělství, městské služby nebo průmysl (Bonnetta *et al.*, 2022; Šrámková, 2013).

4.1. Příklady patogenních bakterií kontaminujících odpadní vody a využití fágů k jejich detekci

Mikrobiální kvalita recyklované vody je jedním z hlavních klíčových faktorů, který určuje, zda a jak může být vyčištěná voda bezpečně znovu použita. Základní mikrobiologické ukazatele, jako *E. coli*, *Enterococcus* ssp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* ssp., *Klebsiella pneumoniae* nebo *Legionella pneumophila*, slouží jako indikátory potenciálního zdravotního rizika. Jejich přítomnost ve vyčištěné vodě může být důsledkem nedostatečné dezinfekce, technologických poruch, osídlení vnitřních povrchů zařízení biofilmy nebo rostoucí rezistence patogenních mikroorganismů k běžným dezinfekčním prostředkům (Folorunso, 2025).

Při použití takto kontaminované vody k závlaze polních plodin může následně dojít k přenosu patogenů na povrch rostlin, které se konzumují v syrovém stavu. Tento přenos se navíc může prohloubit během distribuce, například při skladování v chladicích řetězcích, kde nižší teploty sice zpomalují růst mikroorganismů, ale zároveň prodlužují jejich přežívání v kontaminovaných potravinách (WHO, 2006).

Tyto skutečnosti podtrhují důležitost spolehlivých a citlivých metod k monitorování mikrobiální kontaminace, které by umožnily včasnou detekci a zabránily šíření infekcí v celém řetězci zpracování vody i potravin. Běžná sanitace, založená například na chloraci, přitom

nemusí být vždy dostatečně účinná, zejména proti mikroorganismům s přirozenou nebo získanou rezistencí.

Na tuto problematiku se zaměřila i studie, jejímž cílem bylo posoudit, jak různé technologie čištění ovlivňují přítomnost mikrobiologické kontaminace v odpadních vodách, a zároveň zhodnotit potenciální rizika spojená s jejich opětovným využitím. Výzkum probíhal s ohledem na platné Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/741 o minimálních požadavcích na opětovné využívání vody (Bonetta *et al.*, 2022).

Byly sledovány kmeny *E. coli* produkující shiga toxiny (STEC) a termotolerantní druhy rodu *Campylobacter*. Průkaz byl proveden nejdříve s předpomnožením vzorku a poté pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Patogeny jako *Salmonella* spp. a *Legionella* spp. byly detekovány jak klasickými kultivačními metodami, tak molekulárními přístupy včetně PCR a kvantitativní PCR. Současně bylo pomocí kultivace prováděno i kvantitativní hodnocení mikrobiálních ukazatelů, především stanovení počtu *E. coli*, jako hlavního indikátoru fekální kontaminace. Výsledky ukázaly, že čistírny odpadních vod vybavené membránovým bioreaktorem dosahují výrazně lepších výsledků při odstraňování mikroorganismů než čistírny, které využívají pouze dezinfekci pomocí oxidu chloričitého (ClO₂). Závěry studie potvrzují, že MBR technologie představuje vhodné řešení pro aplikace, kde má být vyčištěná odpadní voda znovu využita, například v zemědělství. Zároveň se však ukazuje, že v případě využívání vody ošetřené pouze ClO₂ je třeba zvýšené opatrnosti, neboť v těchto vzorcích se i po dezinfekci opakovaně vyskytovaly mikroorganismy potenciálně nebezpečné pro zdraví lidí (Bonetta *et al.*, 2022).

Právě zde se otevírá prostor pro nové metody detekce, jako jsou biosenzory využívající bakteriofágy, které by mohly v budoucnu představovat účinnější a specifické nástroje pro sledování mikrobiální kvality vody v reálném čase. Tato technologie, stále intenzivněji testovaná v laboratorním i poloprovozním měřítku, by mohla nahradit či doplnit tradiční kultivační postupy a výrazně tak posílit kontrolu mikrobiální kvality vody a zvýšit bezpečnost celého systému jejího opětovného využívání. Tato technologie rovněž otevírá nové možnosti nejen v oblasti detekce, ale i jako potenciální nástroj pro aktivní inaktivaci specifických patogenů, čímž získává význam i v kontextu dezinfekčních strategií budoucnosti.

Ve snaze reagovat na výše uvedená rizika a využít potenciál bakteriofágových biosenzorů, tato přehledová práce nabízí systematický souhrn nejvýznamnějších patogenních bakterií

přítomných v odpadních vodách, které zároveň představují vysoké riziko z hlediska multirezistence, environmentální perzistence a potenciálního dopadu na zdraví člověka.

U každého z těchto patogenních mikroorganismů je následně uveden jak jejich význam v kontextu kontaminace vod, tak příklady současných nebo navrhovaných metod jejich detekce s využitím bakteriofágů jako specifických bioreceptorů v biosenzorových platformách.

4.1.1. *Escherichia coli*

Jedná se o gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinkovitou bakterii, která patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Přirozeně se vyskytuje ve střevech lidí i dalších teplotokrevných živočichů, kde plní důležitou roli při trávení a udržování mikrobiální rovnováhy (Allocati *et al.*, 2013; Hurych a kol., 2021). Díky svému výlučnému výskytu ve střevním traktu je *E. coli* považována za hlavní ukazatel fekálního znečištění vodního prostředí. Její záchyt ve vodě signalizuje přítomnost výkalů a tím i možné riziko výskytu jiných, potenciálně patogenních mikroorganismů (WHO, 2006). Z tohoto důvodu je na tento mikroorganismus v bakalářské práci kladen největší důraz, neboť představuje nejen klíčový bioindikátor, ale také objekt největšího množství studií zaměřených na konkrétní využití biosenzorů k detekci této bakterie.

Vedle nepatogenních kmenů existuje i několik patogenních variant, které mohou způsobit závažná onemocnění. Shiga toxin produkující *E. coli* (STEC) produkují toxiny označované jako shiga like toxiny. Tyto cytotoxiny narušují funkci střevních buněk, vazbou na endotelie a mohou vyvolat těžká průjemová i systémová onemocnění. U závažnějších případů může infekce vést až k hemolyticko-uremickému syndromu, který postihuje ledviny a může být život ohrožující, zejména u dětí a starších osob. Infekce se může přenášet kontaminovanou vodou, potravinami nebo přímým kontaktem. Do této skupiny patří sérotyp O157:H7, který mimo jiné způsobil smrt několika osob, v již zmiňovaném případě v Kanadě. V roce 2023 také došlo k nákaze 13 dětí tímto sérotypem v americkém státu Utah. Vyšetřování odhalilo, že zdrojem byla nečištěná tlakově vedená městská závlahová voda, která byla používána k rekreaci a pití (Osborn *et al.*, 2024). Další významné kmeny zahrnují enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), jež tvoří enterotoxiny odpovědné za tzv. cestovatelský průjem, enteropatogenní *E. coli* (EPEC) způsobující průjmy zejména u kojenců, enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), které imitují infekce způsobené rodem *Shigella*, a enteroagregativní *E. coli* (EAEC), které jsou známé schopností přilnout ke střevní sliznici a vyvolávat dlouhodobé perzistující průjmy (Hurych a kol., 2021).

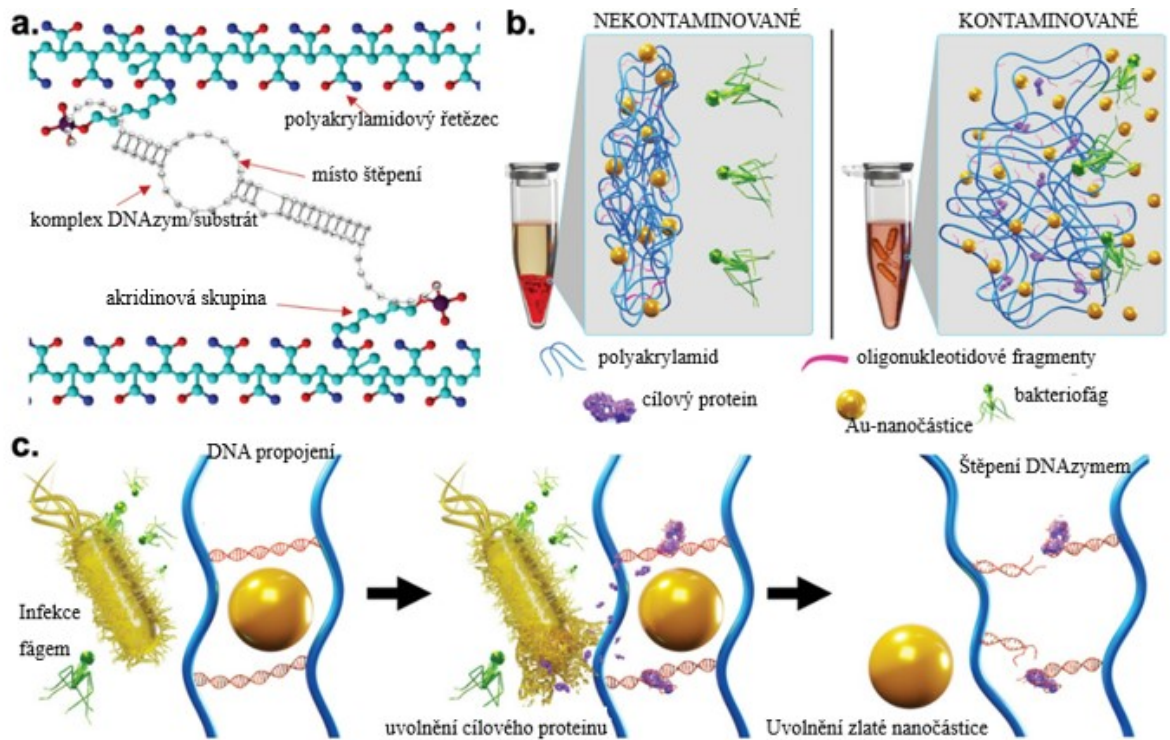
Vedle patogenity představuje *E. coli* i významný rezervoár genů antibiotické rezistence (Allocati *et al.*, 2013), které se v prostředí odpadních vod mohou šířit mezi další bakterie. Její

perzistence ve vodních systémech, odolnost vůči některým dezinfekčním postupům a genetická variabilita ji činí klíčovým ukazatelem nejen hygienické kvality vody, ale i potenciálního rizika vzniku infekcí obtížně léčitelných běžnými antibiotiky (Yu *et al.*, 2022).

V kombinaci s narůstající odolností ke klasickým dezinfekčním metodám a schopností přetrvávat v biofilmech jde o významný problém zejména v kontextu recyklace odpadních vod (Yu *et al.*, 2022).

V několika nedávných studiích byla pro tyto účely úspěšně testována přítomnost fágově specifických biosenzorů zaměřených právě na vybrané kmeny *E. coli*. Například Mann *et al.* (2024) ve své studii představili inovativní biosenzor na bázi DNAzymu pro detekci *E. coli* ve vzorcích vody a moči (Obrázek 9). Tento senzor využívá polyakrylamidový hydrogel, který je prokřížen DNAzymem citlivým na protein ECP1, specificky vylučovaný bakteriemi *E. coli*. V přítomnosti tohoto proteinu dochází ke štěpení DNAzymu, což způsobí rozpad gelové matrice a uvolnění zlatých nanočástic, které jsou vizuálně detekovatelné pouhým okem díky změně zbarvení. Aby byl zvýšen signál při nízkých koncentracích bakterií, autoři do systému integrovali lytický bakteriofág T7, který specificky napadá buňky *E. coli*, způsobuje jejich lýzi a tím uvolňuje větší množství cílového proteinu (ECP1). Tento postup vedl k významnému zlepšení citlivosti senzoru – zatímco bez fágů byl limit detekce (LOD) stanoven na 10^4 CFU/ml, po přidání T7 fágů klesl LOD na pouhých 10^1 CFU/ml, a to bez prodloužení celkové doby analýzy. Důležité je, že těchto výsledků bylo dosaženo bez nutnosti laboratorního vybavení nebo kultivace vzorků, což zásadně zvyšuje použitelnost tohoto přístupu v terénních podmínkách nebo v domácím prostředí. T7 fág byl pomnožen na hostitelském kmeni *E. coli* K12 BL21 a kvantifikován pomocí plakové metody, což zajistilo dostatečné množství aktivního fágového materiálu pro testy. Pro ověření účinku bakteriofága na bakterii byly provedeny kontrolní testy na DNAzymových vzorcích s a bez přítomnosti fágů. Výsledky ukázaly, že při koncentraci 10^8 CFU/ml bylo dosaženo 82,92 % štěpení v přítomnosti fága, zatímco bez něj pouze 45,86 %. Senzor byl testován také na reálných environmentálních vzorcích – vodě z jezera a cisterny, které byly kontaminovány nízkými koncentracemi *E. coli*. Detekce byla úspěšná až do koncentrace 10^1 CFU/ml pro vodu z jezera a 10^3 CFU/ml u cisternové vody. Kromě toho byl senzor úspěšně aplikován také na klinické vzorky moči od pacientů s infekcemi močových cest způsobených *E. coli*, kde vykazoval 100% přesnost detekce, bez falešně pozitivních výsledků u zdravých vzorků. Tato práce tedy nejenže demonstruje možnost vysoce citlivé a specifické detekce fekální kontaminace pomocí *E. coli* ve vodním prostředí, ale také potvrzuje průlomový potenciál integrace bakteriofágů do DNAzymových biosenzorů jako

prostředku k zesílení signálu bez potřeby technicky náročné manipulace. Výsledky studie naznačují, že princip bakteriofágem indukované lýzy může být univerzálně aplikovatelný i pro jiné cílové bakterie a biosenzory, což otevírá nové možnosti výzkumu i praktické implementace v oblasti bezpečného využívání vody (Mann *et al.*, 2024).



Obrázek 9: Schéma kolorimetrické platformy pro detekci *E. coli* (upraveno dle Mann *et al.*, 2024)

a) chemická struktura polymerní matrice s DNAzym-substrátovým propojením pomocí akridinové skupiny; b) chování hydrogelové matrice v makro- a mikroměřítku za přítomnosti a nepřítomnosti kontaminace; c) zamýšlená funkce senzoru při detekci kontaminovaného vzorku

Podobně Sethi a Rathod (2024) představili optický biosenzor založený na bakteriofágu imobilizovaném na fotoluminiscenčním kovově-organickém nosiči. Tento systém dokázal spolehlivě detekovat i velmi nízké koncentrace *E. coli* díky kombinaci vysoké vazebné afinity a silného optického signálu (Sethi and Rathod, 2024).

Jiný přístup k využití bakteriofágů v biosenzorech představuje jejich kombinace s iontově selektivní elektrodou v potenciometrickém detekčním systému. Tento přístup nevyžaduje žádné chemické značení rozpoznávacího prvku ani analytu, jde tedy o tzv. bezznačkovou metodu, která se odlišuje od běžných optických nebo enzymatických strategií.

Konkrétně byl navržen systém využívající bakteriofág MS2 k selektivní detekci jeho hostitelské bakterie *E. coli* H. Princip spočívá v tom, že vazba bakterie na povrch senzoru, kde jsou navázané bakteriofágy, brání průchodu indikátorového iontu k membráně iontově selektivní elektrody. Tento efekt zpomaluje ustálení elektrochemického potenciálu, tzv. zpožděná Nernstova odezva, která slouží jako měřitelný signál. Systém umožňuje detekci *E. coli* H s limitem 100 CFU/ml. Výhodou této metody je jednoduchost, vysoká selektivita a možnost přizpůsobení. Tento přístup tak nabízí novou cestu pro využití potenciometrických senzorů v biologické detekci bez nutnosti chemického značení (Wang *et al.*, 2024).

Dalším příkladem je sensorový systém využívající bakteriofág M13 jako biorekognitivní prvek. M13 je nelytický a stabilní fág, který selektivně rozpoznává kmeny *E. coli* nesoucí F-pili. Jako transdukční prvek byl v tomto biosenzoru použit chemirezistor na bázi redukováného oxidu grafenu (rGO). Tento nanomateriál má velký specifický povrch, který umožňuje efektivní interakci s biologickými molekulami a buňkami, a současně zajišťuje vhodné elektronické vlastnosti pro detekci. Mezi zlaté interdigitované elektrody byla nanosená tenká vrstva rGO, která fungovala jako polovodičová sensorová plocha citlivá na změny v chemickém okolí. Vyvinutý senzor umožnil detekci *E. coli* s limitem detekce 45 CFU/ml, což je srovnatelné s běžně užívanými metodami na principu enzymové imunoanalýzy či PCR. Dále vykazoval vysokou selektivitu, nereagoval na přítomnost jiných, necílových bakterií, jako např. *Pseudomonas chlororaphis*. Použití tohoto biosenzoru bylo úspěšně demonstrováno i ve vzorcích simulované říční vody (Nakala *et al.*, 2021).

Inovativní přístup využití bakteriofágových biosenzorů představuje studie Quintela and Wu (2020). Je založený na tzv. sendvičové detekci, který se liší od běžně používaných metod s jedním typem bakteriofága. Tento biosenzor je zaměřen na detekci STEC kmenů a využívá dvojici stejných bakteriofágů. Jedny k zachycení cílových buněk, druhé k jejich detekci. Bakteriofágy byly chemicky upraveny pomocí biotinylace a imobilizovány na uhlíkovou elektrodu pokrytou streptavidinem. Díky tomu došlo k jejich orientovanému usazení, které umožnilo efektivní navázání živých STEC buněk. Po jejich zachycení byl přidán druhý roztok fágů, tentokrát značených křenovou peroxidázou a zlatými nanočásticemi, což umožnilo elektrochemickou detekci (Quintela and Wu, 2020).

Celý systém fungoval na principu amperometrického měření, které poskytovalo rychlé výsledky (do 1 hodiny) a dosahovalo vysoké citlivosti, a to i ve složitých vzorcích bez nutnosti předchozí kultivace. Tento sendvičový biosenzor tedy představuje odlišný a v jistém smyslu

i pokročilejší přístup (zvýšená selektivita), než je běžné použití jednoho bakteriofága jako rozpoznávacího prvku (Quintela and Wu, 2020).

Vývoj bakteriofágových biosenzorů se uplatňuje nejen v oblasti sledování kvality odpadních vod, ale také v potravinářství, kde se zaměřuje na detekci mikrobiální kontaminace potravin. Obě sféry spolu úzce souvisejí, protože potraviny mohou být kontaminovány již při pěstování, například při již zmiňovaných závlahách znečištěnou vodou. Z toho důvodu jsou technologie využitelné v jednom sektoru často využitelné i sektoru druhém.

Tuto provázanost dokládá i studie zaměřená primárně na potraviny, konkrétně na vývoj přenosné detekční platformy pro identifikaci *E. coli* v potravinových vzorcích. Autoři využili geneticky upravený bakteriofág T7, do jehož genomu byl vložen gen pro alkalickou fosfatázu. Po infekci cílové bakterie došlo prostřednictvím rozrušení bakterií ke specifickému uvolnění enzymu ALP, který byl následně detekován elektrochemicky. Detekční mechanismus byl založen na defosforylaci nereaktivní látky 1-naftylfosfátu tímto enzymem. Vzniklá sloučenina 1-naftol, je elektroaktivní a poskytuje stabilní a silný elektrochemický signál, který je měřen na uhlíkové elektrodě elektrochemicky. Citlivost systému byla ověřována jak v živném médiu, tak na infikovaných listech špenátu. Zároveň byla hodnocena specifická biosenzoru vůči jiným běžným patogenním bakteriím v potravinách, aby byla potvrzena jeho selektivita vůči *E. coli* (El-Moghazy *et al.*, 2022). Tento typ technologie tak ukazuje potenciál nejen pro aplikaci v oblasti bezpečnosti potravin, ale také v širším kontextu pro monitorování mikrobiální kvality vody využívané pro zavlažování či recyklaci.

4.1.2. *Salmonella* spp.

Salmonella spp. jsou fakultativně anaerobní, gramnegativní, tyčinkovité bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* (Hurych a kol., 2021). Tento rod zahrnuje více než 2 500 sérovarů, z nichž mnohé jsou patogenní pro člověka i zvířata (Popa and Papa, 2021). Nejznámější jsou *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhi, způsobující břišní tyfus a *S. enterica* subsp. *enterica* sérovar Enteritidis, způsobující průjemové onemocnění, jehož základními projevy jsou průjem bez příměsí krve, bolest břicha, horečka a ojediněle i zvracení (Hurych a kol., 2021). Přenáší se nejčastěji kontaminovanými potravinami nebo vodou (Popa and Papa, 2021). U některých pacientů, zejména u dětí, starších osob a imunokompromitovaných jedinců, může dojít k závažnějším komplikacím v důsledku dehydratace (Hurych a kol., 2021).

Ve vodním prostředí se bakterie rodu *Salmonella* vyskytují poměrně běžně, což potvrzuje epidemiologická studie, která upozorňuje na jejich přítomnost nejen v surových odpadních

vodách, ale i v odtoku z čistírny odpadních vod. Tyto bakterie se mohou dostávat do vodních zdrojů přímo s fekáliemi infikovaných lidí nebo zvířat, nebo nepřímo skrze odtoky z kanalizace a zemědělské půdy. Zdrojem pak mohou být nejen řeky, jezera či pobřežní vody, ale i kontaminovaná podzemní voda. *Salmonella* má navíc schopnost přetrvávat v prostředí díky kolonizaci povrchů a tvorbě biofilmů, což dále zvyšuje její ekologickou stabilitu a šíření (Levantesi *et al.*, 2012).

Praktickým příkladem je specifická detekce bakterií rodu *Salmonella* ve vzorcích jezerní vody. V této práci byl vyvinut elektrochemický biosenzor na bázi elektrochemické impedanční spektroskopie, který využívá proteiny dlouhých vláken ocasu (long tail fibre proteins, LTFPs) bakteriofága SEP37. Tyto proteiny byly získány expresí genů ORF99, ORF100 a ORF256 v *E. coli* pomocí plazmidu pETduet1. Na povrch zlaté elektrody byly vrstveně navázány zlaté nanočástice, cysteamin a následně purifikované LTFPs, čímž vznikl detekční povrch schopný specifické vazby s bakteriemi (Liu *et al.*, 2024).

Zachycení cílové bakterie pomocí LTFPs na povrchu elektrody snižuje počet míst pro přenos elektronů, čímž dochází ke změně impedanční odezvy senzoru. Tento biosenzor umožnil detekci *Salmonella* ve vzorcích jezerní vody s detekčním limitem 9 CFU/ml. Výhodou tohoto systému je, že nevyužívá celý bakteriofág, ale pouze specifické receptorové proteiny, což přispívá ke stabilitě a opakovatelnosti signálu, aniž by docházelo k lýze bakterií. Tato metoda tak představuje alternativní strategii k běžným fágovým biosenzorům a rozšiřuje možnosti použití fágových komponent v oblasti detekce patogenů ve vodním prostředí (Liu *et al.*, 2024).

4.1.3. *Campylobacter* spp.

Zástupci rodu *Campylobacter* jsou gramnegativní, spirálovité až zakřivené bakterie s charakteristickým pohybem (Silva *et al.*, 2011). Patří mezi mikroaerofilní organismy a dokáží přežít i velice nízké teploty. Nejčastěji se u lidí vyskytují druhy *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*, které jsou hlavními původci kampylobakteriózy, jedné z nejčastějších bakteriálních gastroenteritid na světě. Onemocnění se projevuje horečkou, křečovitými bolestmi břicha a průjmem, často s příměsí krve. Ve výjimečných případech může infekce vyvolat autoimunitní komplikace, například Guillain-Barrého syndrom. Přenos je nejčastěji alimentární cestou, tedy kontaminovanou potravou nebo vodou (Hurych a kol., 2021).

Vzhledem k nízké infekční dávce byla vyvinuta pokročilá biosenzorová platforma využívající receptorový protein z bakteriofága specifického pro *C. jejuni* (RBPP – receptor binding phage protein), známý jako FlaGrab. Tento protein, pocházející z bakteriofága NCTC 12673, vykazuje

schopnost specificky se vázat na glykanové struktury ve flagelinových podjednotkách bičíku *C. jejuni*, aniž by lyzoval bakteriální buňky. Tím se snižuje riziko falešně negativních výsledků způsobených fágovou replikací nebo lýzou (Suganthan *et al.*, 2024).

Pro konstrukci biosenzoru byl použit elektrochemický impedanční přístup, při kterém se sledovaly změny odporu při navázání cílových bakterií. Bioreceptor FlaGrab byl navázán na uhlíkovou skleněnou elektrodu pokrytou vícevrstevnými uhlíkovými nanotrubicemi, a to za pomoci nosiče sukcinimidylesteru kyseliny 1-pyrenobutanoové (PBSE). Tato sloučenina zajišťuje pevné a orientované uchycení proteinu na uhlíkový povrch, přičemž zůstává zachována schopnost vazby na cílové bakterie. Po vystavení různým koncentracím *C. jejuni* (v rozsahu 10^2 až 10^7 CFU/ml) docházelo k měřitelným změnám impedanční odezvy. S rostoucí koncentrací bakterií se zvyšoval odpor přenosu náboje, což svědčilo o úspěšném navázání bakterií na bioreceptor. Z těchto dat byla sestavena kalibrační křivka, která ukázala téměř lineární závislost v uvedeném rozsahu, přičemž limit detekce byl stanoven na 10^3 CFU/ml. Ověření specifity biosenzoru proběhlo pomocí patogenů *Listeria monocytogenes* a *Salmonella* Typhimurium, proti nimž senzor nevykazoval žádnou významnou odezvu (Suganthan *et al.*, 2024).

Tato práce dokládá potenciál použití izolovaných bakteriofágových proteinů (namísto celých fágových částic) jako biorekognitivních prvků v biosenzorech. Kromě vyšší stability vůči podmínkám prostředí, jako je pH a teplota, umožňuje jejich menší velikost větší hustotu navázání na povrch senzoru, a tím i zvýšení citlivosti. Studie tak představuje významný krok směrem k vývoji přesných, rychlých a nákladově efektivních metod pro detekci *C. jejuni* v potravinách i vodním prostředí (Suganthan *et al.*, 2024).

4.1.4. *Klebsiella pneumoniae*

Tato gramnegativní tyčinkovitá opouzdřená bakterie, také z čeledi *Enterobacteriaceae*, je běžným komenzálem v lidském střevě, ale zároveň může být nebezpečným oportunním patogenem. Často je detekována v odpadních vodách, především v nemocničních, a je považována za významný indikátor fekální i nemocniční kontaminace (Hurych a kol., 2021). Výskyt *Klebsiella pneumoniae* je obávaný především kvůli schopnosti rychle získávat multirezistenci k antibiotikům (Wang *et al.*, 2020), zejména díky produkci širokospektrých β -laktamáz. *Klebsiella pneumoniae* způsobuje infekce především onemocnění plic, močového traktu, způsobuje infekce krevního řečiště nebo ran. Je schopna přežít ve vodním prostředí a tvořit biofilmy, čímž odolává i běžným dezinfekčním postupům (Hurych a kol., 2021).

I když zatím neexistuje mnoho studií o využití bakteriofágových biosenzorů pro detekci *Klebsiella pneumoniae*, jedná se o vysoce rizikový patogen, zejména v nemocničním prostředí, kde je častou příčinou nozokomiálních infekcí. Jeho schopnost tvořit rezistentní biofilmy a přetrvávat i ve znečištěných vodách, včetně nemocničních odpadních vod, podtrhuje jeho význam z hlediska veřejného zdraví (Mokeddem *et al.*, 2025).

Nemocniční odpadní vody představují zvláštní kategorii s vysokým mikrobiologickým a chemickým zatížením. Obsahují nejen patogeny, ale i zbytky léčiv, cytostatik či antibiotik (Khan *et al.*, 2021). Přesto však v rámci Evropské unie neexistuje závazná legislativa, která by vyžadovala jejich samostatné předčištění před vypouštěním do veřejné kanalizace (Fremrová, 2020). Jak dokládá technická zpráva Evropské komise, ve státech jako Slovinsko jsou tyto vody často vypouštěny bez jakékoli předúpravy přímo do městských čistíren odpadních vod, které obvykle nejsou navrženy pro eliminaci vysoce rezistentních mikroorganismů nebo farmaceutických zbytků (Gawlik *et al.*, 2021).

V České republice byla tato problematika dříve upravena normou ČSN 75 6406 z roku 1996. Na základě odborné rešerše zadané SOVAK ČR a zpracované Státním zdravotním ústavem v roce 2016 byla tato norma v roce 2020 revidována. Nové znění ČSN 75 6406 stanovuje doporučené technologické a provozní požadavky na předčištění nemocničních a obdobných odpadních vod. Nicméně tato norma je nadále nezávazná a její aplikace zůstává dobrovolná, závislá na rozhodnutí konkrétních zdravotnických zařízení či jejich provozovatelů (Fremrová, 2020).

V této souvislosti lze zmínit studii, která se zaměřila na vývoj papírového biosenzoru využívajícího bakteriofágy pro detekci *K. pneumoniae*. Tento systém byl založen na orientované adsorpci fágových částic na pozitivně nabitým povrchu, vytvořeném pomocí chloridu poly(dimethyldiallylamonném), díky kterému došlo ke specifické vazbě fágů na cílové bakterie. Detekce byla umožněna pomocí fluorescenčně značených biopanning peptidů a byla ověřena i na reálných vzorcích. Citlivost systému umožňovala kvantifikaci bakterií v rozsahu od 5×10^2 do 1×10^8 CFU/ml, což potvrzuje jeho vysoký aplikační potenciál i pro patogeny s nižší prevalencí v běžných odpadních vodách (Yang *et al.*, 2025).

5. Budoucnost detekce patogenních mikroorganismů fágovými bioreceptory

Bakteriofágové bioreceptory představují ideální biorekognitivní prvky pro biosenzory určené k identifikaci bakteriálních patogenů v klinických vzorcích. Díky svým důležitým vlastnostem jsou bakteriofágy jednodušší a levnější na produkci ve velkém měřítku než protilátky, což z nich činí finančně výhodnou platformu pro konstrukci biosenzorů. Jednou z hlavních výzev je však využití bakteriofágů se širokým spektrem hostitelů, což může vést k falešně negativním výsledkům. Aby se těmto chybám předešlo, je nezbytné testovat biosenzory jak na specifické, tak i nespecifické bakterie. Efektivním řešením může být použití tzv. fágových koktejlů (Sachdeva *et al.*, 2024).

Vedle správného výběru fágů je dalším významným problémem vývoje těchto biosenzorů vytvoření stabilního chemického spojení mezi povrchem senzoru a oblastí připojení bakteriofága. Ačkoliv je známo, že fágové proteiny lze chemicky ukotvit nebo fyzikálně adsorbovat na různé povrchy, výzkum stabilní imobilizace bakteriofágů na různých typech materiálů je stále v počáteční fázi. Budoucí vývoj by se proto měl zaměřit nejen na optimalizaci imobilizace, ale také na zesílení signálu, využití nanostruktur pro přesné uspořádání senzorů a na vývoj nových identifikačních platforem. Zásadní roli zde hrají geneticky modifikované bakteriofágy, které umožňují cílené přizpůsobení povrchových proteinů a peptidů, čímž se zvyšuje účinnost a flexibilita senzorů (Sachdeva *et al.*, 2024).

Další perspektivou je integrace bakteriofágových biosenzorů s novými biomolekulami a nanostrukturami, jako jsou magnetické částice, kovové nebo polymerní materiály či kvantové tečky. Tyto kombinace mohou vést ke vzniku inovativních senzorů. Přestože jsou výsledky výzkumu v oblasti bakteriofágové detekce slibné, je stále zapotřebí dalšího vývoje, který zvýší jejich celkovou detekční účinnost. K dosažení těchto cílů bude nezbytná úzká interdisciplinární spolupráce mezi odborníky z oblastí inženýrství, biotechnologie, biologie, fyziky, chemie, molekulární biologie, mikrobiologie a biochemie (Hussain *et al.*, 2021; Sachdeva *et al.*, 2024).

Pro efektivní využití biosenzorů pro detekci mikroorganismů je však nezbytné hlubší porozumění mikrobiálním komunitám a jejich interakcím. Moderní přístupy, jako je metagenomika a sekvenování nové generace, umožňují lepší analýzu mikrobiomů a přispívají k pochopení jejich struktury a funkce (Shivaram *et al.*, 2023b).

Tyto poznatky jsou zásadní také pro využití bakteriofágů jako biokontrolního prostředku v čistírnách odpadních vod. V reálném prostředí se vyskytují složité mikrobiální komunity, které mohou ovlivnit účinnost fagové terapie. Proto je nezbytné podrobně analyzovat parametry konkrétní čistírny a mikrobiální složení systému. Znalosti o genomové rozmanitosti virů jsou zatím omezené a dopad fágů na bakteriální společenstva v čistírnách zůstává málo probádaný. Zvláštní pozornost je třeba věnovat riziku degradace prospěšných bakterií polyvalentními fágy. Vzhledem k rozdílům v bakteriální populaci mezi jednotlivými čistírnami je nutné každé prostředí individuálně zmapovat a sledovat účinky těchto fágů na celý systém (Shivaram *et al.*, 2023a; Shivaram *et al.*, 2023b).

Je důležité dodat, že veškeré dosavadní studie byly prováděny v laboratorních podmínkách, nikoli přímo v čistírnách odpadních vod. Důvodem jsou právě neznámé interakce, přítomnost mnohem komplexnějších bakteriálních společenství a obtížná předvídatelnost reálného provozního prostředí, které může ovlivnit stabilitu i účinnost bakteriofágů (Shivaram *et al.*, 2023b).

Aplikace fágů v praxi čelí i dalším výzvám, například nepředvídatelným podmínkám, které mohou vést k inaktivaci fágů nebo k jejich nespecifické adsorpci. Dále je třeba sledovat množství fágů uvolněných do prostředí. S tímto cílem mohou výrazně pomoci technologie strojového učení a umělé inteligence, které umožní predikovat interakce mezi fágem a hostitelskou bakterií. Klíčové je také rozvíjet a sdílet databáze sekvenčních dat. Existuje databáze glykanových struktur, která pomocí zpracování přirozeného jazyka poskytuje informace o vazbách fágů a evolučních vztazích mezi bakteriemi (Shivaram *et al.*, 2023b).

Pro širší nasazení fagové terapie v čistírnách bude nezbytné vytvořit počítačové modely, které predikují dopad aplikace fágů na problémy, jako je nadměrný růst kalu, pění nebo tvorba biofilmu. Tyto modely musí být nejen precizně navrženy, ale i ověřeny v praxi. (Shivaram *et al.*, 2023a).

ZÁVĚR

Zajištění mikrobiologické kvality odpadních vod určených k opětovnému využití je klíčovým faktorem pro udržitelný rozvoj a ochranu veřejného zdraví. Jak ukazuje tato práce, biosenzory založené na bakteriofázích mají potenciál stát se významným nástrojem pro monitorování patogenních organismů ve vyčištěné vodě. Jejich vysoká specifická, možnost přímého nasazení v terénu a kompatibilita s různými analytickými platformami z nich činí technologii s širokým aplikačním potenciálem.

Navzdory tomu, že výzkum v této oblasti je zatím v počáteční fázi, již nyní existují slibné výsledky pro detekci klíčových patogenů, jako jsou *E. coli* nebo *Salmonella* spp. Detekce dalších bakterií jako *Klebsiella pneumoniae*, *Campylobacter* spp. nebo *Legionella pneumophila*, je rovněž předmětem probíhajícího vývoje. Současně je však nutné řešit legislativní a technologické výzvy, a to zejména v oblasti nemocničních odpadních vod, jejichž úprava dosud nepodléhá povinné regulaci a představuje značné riziko pro šíření rezistentních patogenů.

Vzhledem k probíhající klimatické krizi, tlaku na vodní zdroje a potřebě efektivního využívání vody se dá očekávat, že poptávka po rychlých, spolehlivých a ekonomicky dostupných metodách detekce bude dále narůstat. Bakteriofágové biosenzory mají potenciál tuto mezeru vyplnit a stát se důležitým článkem v systému ochrany vodních zdrojů a bezpečnosti opětovného využívání vody. Je proto žádoucí další podpora výzkumu, vývoje i aplikace těchto technologií v reálných podmínkách.

POUŽITÁ LITERATURA

AL-HINDI, R. R., TEKLEMARIAM, A. D., ALHARBI, M. G., ALOTIBI, I., AZHARI, S. A., QADRI, I., ALAMRI, T., HARAKEH, S., APPEGATE, B. M. and BHUNIA, A. K. Bacteriophage-based biosensors: A platform for detection of foodborne bacterial pathogens from food and environment. *Biosensors*. [online]. 2022, **12**(10), 905. [cit. 19. 6. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bios12100905>.

ALLOCATI, N., MASULLI, M., ALEXEYEV, M.F. and DI ILIO, C. *Escherichia coli* in Europe: An overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. [online]. 2013, **10**(12), 6235-6254. [cit. 18. 6. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>.

BHATIA, D., PAUL, S., ACHARJEE, T. AND RAMACHAIRY, S. S. Biosensors and their widespread impact on human health. *Sensors International*. [online]. 2024, **5**, 100257. [cit. 20. 6. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2023.100257>.

BOECKAERTS, D., STOCK, M., CRIEL, B., GERSTMANS, H., DE BAETS, B. and BRIERS, Y. Predicting bacteriophage hosts based on sequences of annotated receptor-binding proteins. *Scientific Reports*. [online]. 2021, **11**(1), 1467. [cit. 29. 3. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81063-4>.

BOLLBACK, J. P. and HUELSENBECK, J. P. Phylogeny, genome evolution, and host specificity of single-stranded RNA bacteriophage (Family *Leviviridae*). *Journal of Molecular Evolution*. [online]. 2001, **58**, 117-128. [cit. 6. 1. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s002390010140>.

BONETTA, S., PIGNATA, C., GASPARRO, E., RICHIARDI, L., BONETTA, S. and CARRARO, E. Impact of wastewater treatment plants on microbiological contamination for evaluating the risks of wastewater reuse. *Environmental Sciences Europe*. [online]. 2022, **34**(20), 2-13. [cit. 3. 5. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12302-022-00597-0>.

CARMODY, C. M, GODDARD, J. M. AND NUGEN, S. R. Bacteriophage capsid modification by genetic and chemical methods. *Bioconjugate Chemistry*. [online]. 2021, **32**(3), 466–481. [cit. 18. 6. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00018>.

ČSN ISO 16075-1 (2021). *Pokyny pro využívání recyklované odpadní vody při závlaze – Část 1: Základní principy*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2021. 28 s. Třídící znak 759023.

DELATTRE, R., SEURAT, J., HADDAD, F., NGUYEN, T.-T., GABORIEAU, B., KANE, R., DUFOUR, N., RICARD, J.-D., GUEDJ, J. and DEBARBIEUX, L. Combination of *in vivo* phage therapy data with *in silico* model highlights key parameters for pneumonia treatment efficacy. *Cell Reports*. [online]. 2022, **39**(7), 110825. [cit. 6. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110825>.

EL-MOGHAZY, A. Y., WISUTHIPHAET, N., YANG, X., SUN, G. and NITIN, N. Electrochemical biosensor based on genetically engineered bacteriophage T7 for rapid detection of *Escherichia coli* on fresh produce. *Food Control*. [online]. 2022, **135**, 108811 [cit. 16. 5. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108811>.

Evropské hospodářské společenství. SMĚRNICE RADY 91/271/EHS ze dne 21. května 1991 o čištění městských odpadních vod. Úřední věstník Evropských společenství.

NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) 2020/741 ze dne 25. května 2020 o minimálních požadavcích na opětovné využívání vody. Úřední věstník Evropské unie.

FOLORUNSO, O. Microbial contamination in urban wastewater systems: Emerging health threats and mitigation strategies. *International Journal of Science and Research Archive*. [online]. 2025, **14**(2), 1449-1463. [cit. 14. 5. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.30574/ijrsra.2025.14.2.0500>.

FREMROVÁ, L. Nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení. *Sovak*. [online]. 2020, **28**(7-8), 16-17 [cit. 16. 5. 2025]. ISSN 1210-3039. Dostupné z: <https://www.sovak.cz/sites/default/files/2021-08/Sovak782072.pdf>.

FRIGON, D., BISWAL, B.K., MAZZA, A., MASSON, L. and GEHR, R. Biological and physicochemical wastewater treatment processes reduce the prevalence of virulent *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, **79**(3), 835-844. [cit. 14. 5. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AEM.02789-12>.

GAWLIK, B., TAVAZZI, S., MARIANI, G., SKEJO, H., SPONAR, M., HIGGINS, T., MEDEMA, G. and WINTGENS, T. SARS-CoV-2 surveillance employing sewage: towards a sentinel system. *Publications Office of the European Union: Luxembourg*. [online]. 2021, **16**. [cit. 16. 5. 2025]. Dostupné z: <http://doi.org/10.2760/300580>.

GILBERT-GIRARD, S., SAVIJOKI, K., YLI-KAUHALUOMA, J. and FALLARERO, A. Optimization of a high-throughput 384-Well plate-based screening platform with *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 Biofilms. *International Journal of Molecular Science*. [online]. 2020, **21**, 3034. [cit. 1. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms2109303>.

GLEDOVÁ, K. *Bakteriofágy – současné poznatky a možnosti jejich terapeutického využití*. Praha, 2016. 42 s. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce RNDr. Irena Lichá, CSc.

GUO, D., CHEN, J., ZHAO, X., LUO, Y., JIN, M., FAN, F., PARK, C., YANG, X., SUN, C. and YAN, J. Genetic and chemical engineering of phages for controlling multidrug-resistant bacteria. *Antibiotics*. [online]. 2021, **10**, 202. [cit. 1. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020202>.

HAQ, I.U., CHAUDHRY, W.N., AKHTAR, M.N., ANDLEEB, S. and QADRI, I. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virology Journal* [online]. 2012, **9**, 1-2. [cit. 24. 3. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-9>.

HAVRÁNKOVÁ, J., BOTKA, T., BENEŠÍK, M., BÁRDY P. a PANTŮČEK, R. *Charakterizace nového druhu stafylokokového bakteriofága čeledi Podoviridae*. [online]. In Mgr. Lukáš Vacek. *Tomáškovy dny 2020 - XXIX. konference mladých mikrobiologů*. Brno: Masarykova univerzita, 2020, p. 12. ISBN 978-80-210-9611-0.

HEGARTY, B. Making waves: Intelligent phage cocktail design, a pathway to precise microbial control in water systems, *Water Research*. [online]. 2025, **268**, 122594. [cit. 6. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.122594>.

HINKLEY, T.C., SINGH, S., GARING, S., LE NY, A., NICHOLS, K. P., PETERS, J. E., TALBERT, J. N. and NUGEN, S. R. A phage-based assay for the rapid, quantitative, and single CFU visualization of *E. coli* (ECOR #13) in drinking water. *Scientific Reports*. 2018, **8**, 14630. [cit. 3. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33097-4>.

HOANG, A.H., TRAN, T.T.X., LE, P.N. and DANG, T.H.O. Selection of phages to control *Aeromonas hydrophila* – an infectious agent in striped catfish. *Biocontrol Science*. [online]. 2019, **24** (1), 23–28. [cit. 7. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.4265/bio.24.23>.

HURYCH, J. ŠTÍCHA, R., HANZLOVÁ, I., KŘÍŽOVÁ, Í. a TICHÁ, K. *Lékařská mikrobiologie-repetitorium*. 3. Praha: Triton, 2021, 637 s. ISBN 978-80-7553-976-2.

HUSSAIN, W., ULLAH, M. W., FAROOQ, U., AZIZ, A., & WANG, S. Bacteriophage-based advanced bacterial detection: Concept, mechanisms, and applications. *Biosensors and Bioelectronics*. [online]. 2021, **177**, 112973. [cit. 29. 12. 2024]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.112973>.

HUSSAIN, W., YANG, X., ULLAH, M., WANG, H., AZIZ, A., XU, F., ASIF, M., ULLAH, M.W. and WANG, S. Genetic engineering of bacteriophages: key concepts, strategies, and applications. *Biotechnology Advances*. [online]. 2023, **64**, 108116. [cit. 7. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108116>.

HYMAN, P. Phages for phage therapy: Isolation, characterization, and host range breadth. *Pharmaceuticals*. [online]. 2019, **12**, 35. [cit. 31. 3. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ph12010035>.

CHADHA, U., BHARDWAJ, P., AGARWAL, R., RAWAT, P., AGARWAL, R., GUPTA, I., PANJWANI, M., SINGH, S., AHUJA, CH., SELVARAJ, S. K., BANAVOTH, M., SONAR, P., BADONI, B. and CHAKRAVORTY, A. Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. [online]. 2022, **109**, 21-51. [cit. 19. 6. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2022.02.010>.

CHAMBERS, J. P., ARULANANDAM, B. P., MATTA, L. L., WEIS, A., and VALDES, J. J. Biosensor recognition elements. *Current Issues in Molecular Biology* [online]. 2008, **10**, 1-12. [cit. 28. 12. 2024]. Dostupné z: <https://doi.org/10.21775/cimb.010.001>.

CHEN, Y., BATRA, H., DONG, J., CHEN, C., RAO, V. B., and TAO, P. Genetic engineering of bacteriophages against infectious diseases. *Frontiers in microbiology*, [online]. 2019, **10**, 954. [cit. 6. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00954>.

CHEVALLEREAU, A., PONS, B. J., VAN HOUTE, S., WESTRA, E. R. Interactions between bacterial and phage communities in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*. [online]. 2022, **20**, 49–62. [cit. 28. 3. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00602-y>.

JODAR-ABELLAN A, LÓPEZ-ORTIZ M.I. and MELGAREJO-MORENO J. Wastewater Treatment and Water Reuse in Spain. Current Situation and Perspectives. *Water*. [online]. 2019; **11**(8),1551. [cit. 14. 5. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/w11081551>.

- KARAMI, E. and KAZEMI-LOMEDASHT, F. Biosensors: Types, features, and application in biomedicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. [online]. 2022, **12**(9), 367-373. [cit. 20. 6. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/2221-1691.354427>.
- KHAN, M. T., SHAH, I. A., IHSANULLAH, I., NAUSHAD, M., ALI, S., SHAH, S. H. A. and MOHAMMAD, A. W. Hospital wastewater as a source of environmental contamination: An overview of management practices, environmental risks, and treatment processes. *Journal of Water Process Engineering*. [online]. 2021, **41**, 101990. [cit. 17.5.2025]. ISSN 2214-7144. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.101990>.
- KHORSHIDTALAB, M., DURUKAN, İ., TUFEKCI, E. F., NAS, S. S., ABDURRAHMAN, M. A. and KILIÇ, A. O. Isolation and characterization of lytic bacteriophages from wastewater with phage therapy potentials against gram-negative bacteria. *The Eurasian Journal of Medicine*. [online]. 2022, **54**(2), 157-164. [cit. 1. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2022.21010>.
- KIM, J., KIM, M., KIM, S. and RYU, S. Sensitive detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 from foods using a luciferase-reporter phage phiV10lux. *International Journal of Food Microbiology*. 2017, **254**, 11-17. [cit. 3. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.002>.
- KŘIVÁK, F. *Synergický efekt antibiotik a bakteriofágů v terapii bakteriálních infekcí*. Brno, 2021. 61 s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Mgr. Tibor Botka, Ph.D.
- LAVIGNE, R. *Caudovirales*. [online]. 2011. [cit. 3. 1. 2025]. Dostupné z: https://ictv.global/report_9th/dsDNA/Caudovirales.
- LEVANTESI, C., BONADONNA, L., BRIANCESCO, R., GROHMANN, E., TOZE, S. and TANDOI, V. *Salmonella* in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. *Food Research International* [online]. 2012, **45**(2), 587–602. [cit. 23.5.2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.037>.
- LEWIS, D. E. A. and ADHYA, S. Research on phage λ : a lucky choice. *ASM Journals*. [online]. 2023, **12**(1), eesp00142023. [cit. 3.1. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0014-2023>.

LIN, T.-Y., LO, Y.-H., TSENG, P.-W., CHANG, S.-F., LIN, Y.-T. and CHEN, T.-S. A T3 and T7 recombinant phage acquires efficient adsorption and a broader host range. *PLOS ONE*. 2012, **7**(2), e30954. [cit. 5. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030954>.

LIU, R., WANG, J., SHAO, Y., LU, Y., and WANG, X. Bacteriophage long tail fibre proteins as a biorecognition element in electrochemical biosensors for the detection of *Salmonella* in lake water. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2024, **403**, 135148. [cit. 23.5.2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.135148>.

MAHICHI, F., SYNNOTT, A. J., YAMAMICHI, K., OSADA, T. and TANJI, Y. Site-specific recombination of T2 phage using IP008 long tail fiber genes provides a targeted method for expanding host range while retaining lytic activity. *FEMS Microbiology Letters*. 2009, **295**(2), 211–217. [cit. 5. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01588.x>.

MAHLER, M., COSTA, A. R., VAN BELJOUW, S. P. B., FINERAN, P. C. and BROUNS, S. J. J. Approaches for bacteriophage genome engineering. *Trends in Biotechnology*. 2023, **41**(5), 669-685. [cit. 3. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.08.008>.

MALHOTRA, S., VERMA, A., TYAGI, N., and KUMAR, V. Biosensors: principle, types and applications. *International Journal of Advance Research and Innovation* [online]. 2017, **3**(2), 3639-3643. [cit. 17. 12. 2024]. Dostupné z: <https://scispace.com/pdf/biosensors-principle-types-and-applications-4xvvi5ibw6.pdf>.

MANN, H., KHAN, S., PRASAD, A., BAYAT, F., GU, J., JACKSON, K., LI, Y., HOSSEINIDOUST, Z., DIDAR, T. F., and FILIPE, C. D. M. Bacteriophage-activated Dnazyme hydrogels combined with machine learning enable point-of-use colorimetric detection of *Escherichia coli*. *Advanced Materials*. [online]. 2024, **37**(3), 2411173. [cit. 16. 5. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adma.202411173>.

MANNINA, G., GULHAN, H. and NI, B.-J. Water reuse from wastewater treatment: The transition towards circular economy in the water sector. *Bioresource Technology*. [online]. 2022, **363**, 127951. [cit. 11. 5. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127951>.

MARTINKOVA, P., KOSTELNIK, A., VALEK, T. and POHANKA, M. Main streams in the construction of biosensors and their applications. *International Journal of Electrochemical Science*. [online]. 2017, **12**(8), 7386-7403. [cit. 19. 6. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.20964/2017.08.02>.

- MAVRICH, T. N. and HATFULL, G. F. Evolution of superinfection immunity in cluster A Mycobacteriophages. *ASM Journals*. [online]. 2019, **10**(3), 00971-19. [cit. 24. 3. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/mbio.00971-19>.
- MEILE, S., KILCHER, S., LOESSNER, M. J. and DUNNE, M. Reporter phage-based detection of bacterial pathogens: design guidelines and recent developments. *Viruses*. [online]. 2020, **12**(9), 944. [cit. 1. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/v12090944>.
- MOKEDDEM, F. Z., KHELIL, F. Z. A., MOKRANI, S., CHAHER, N. and BEHIRA, B. Changes in antibiotic resistance patterns of gram-negative bacilli across three different wastewater treatment plants in northwest Algeria; first comparative study. *Microbial Pathogenesis*. [online]. 2025, **199**, 107196. [cit. 17.5.2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.107196>.
- NAKAMA, K., SEDKI, M. and MULCHANDANI, A. Label-free chemiresistor biosensor based on reduced graphene oxide and M13 bacteriophage for detection of coliforms. *Analytica Chimica Acta*. [online]. 2021, **1150**, 338232. [cit. 19. 6. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338232>.
- OSBORN, B., HATFIELD, J., LANIER, W., WAGNER, J., OAKESON, K., CASEY, R., BULLOUGH, J., KACHE, P., MIKO, S., KUNZ, J., PEDERSON, G., LEEPER, M., STROCKBINE, N., MCKEEL, H., HOFSTETTER, J., ROUNDTREE, A., KAHLER, A. AND MATTIOLI, M. Shiga toxin–Producing *Escherichia coli* O157:H7 illness outbreak associated with untreated, pressurized, municipal irrigation water — Utah, 2023. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2024, **73**, 411–416. [cit. 10.6.2025]. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm7318a1>.
- PAYASLIAN, F., GRADASCHI, V. and PIURI, M. Genetic manipulation of phages for therapy using BRED. *Current Opinion in Biotechnology*. 2021, **68**, 8-14. [cit. 3. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.09.005>.
- PEI, R. and LAMAS-SAMANAMUD, G. R. Inhibition of biofilm formation by T7 bacteriophages producing quorum-quenching enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014, **80**(17), 5340-5348. [cit. 4. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AEM.01434-14>.
- POLAT, E. O., CETIN, M. M., TABAK, A. F., BILGET GÜVEN, E., UYSAL, B. Ö., ARSAN, T., KABBANI, A., HAMED, H. and GÜL, S. B. Transducer technologies for biosensors and

their wearable applications. *Biosensors* [online]. 2022, **12**(6), 385. [cit. 29. 12. 2024]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bios12060385>.

POPA, G.L. and PAPA, M.I. *Salmonella* spp. infection – a continuous threat worldwide. *Germs*. [online]. 2021, **11**(1), 88-96. [cit. 19. 6. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.18683/germs.2021.124>.

PUNČOCHÁŘ, P. Pohled na problematiku recyklace odpadních vod vypouštěných z čistíren odpadních vod pro veřejnou potřebu v České republice. *Vodní hospodářství*. [online]. 2023, **73**(1), 10-14. [cit. 8. 5. 2025]. Dostupné z: https://www.vodnihospodarstvi.cz/ArchivPDF/vh2023/vh_01-2023.pdf. ISSN 1211-0760.

PUSKÁČOVÁ, A., MYTÝSEK, D., PLISKA, D., SPĚVÁKOVÁ, J., SMRČKOVÁ, Š., ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J a WANNER, J. Využití nanofiltrace pro terciární dočištění odtoku z ČOV a jeho znovuvyužití pro závlahy. *Vodní hospodářství*. [online]. 2023, **74**(9), 1-6. [cit. 8. 5. 2025]. Dostupné z: https://www.vodnihospodarstvi.cz/ArchivPDF/vh2024/vh_09-2024.pdf. ISSN 1211-0760.

QUINTELA, I.A. and WU, V.CH. A sandwich-type bacteriophage-based amperometric biosensor for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in complex matrices. *RSC Advances*. [online]. 2020, **10**(59), 35765-35775. [cit. 19. 6. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/d0ra06223e>.

REZNIK, A., FEINERMAN, E., FINKELSHTAIN, I., FISHER, F., HUBER-LEE, A., JOYCE, B. and KAN, I. Economic implications of agricultural reuse of treated wastewater in Israel: A statewide long-term perspective. *Ecological Economics*. [online]. 2017, **135**, 222-233. [cit. 14. 5. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2017.01.013>.

RUNA, V., WENK, J., BENGTSSON, S., JONES, B. V. and LANHAM, A. B. Bacteriophages in biological wastewater treatment systems: occurrence, characterization, and function. *Frontiers in Microbiology*. [online]. 2021, **12**, 1-14. [cit. 29. 3. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.730071>.

SACHDEVA, P., NATH, G. AND JAIN, U. Phage based biosensors: Enhancing early detection of emerging pathogens in diagnostics. *Talanta Open*. [online]. 2024, **10**, 100345. [cit. 29. 3. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talo.2024.100345>.

SALGOT, M. and FOLCH, M. Wastewater treatment and water reuse. *Current Opinion in Environmental Science & Health*. [online]. 2018, **2**, 64-74. [cit. 3. 5. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.03.005>.

SETHI, S. and RATHOD, V. Isolation and chemical immobilization of *E. coli*-specific bacteriophage with NH₂-MIL-101(Fe) MOF, a high photoluminescence rod-shaped microcrystals for low-level bacteria detection. *Applied Organometallic Chemistry*. [online]. 2024, **38**(9), e7624. [cit. 16. 5. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/aoc.7624>.

SHIVARAM, K. B., BHATT, P., APPLGATE, B. and SIMSEK, H. Bacteriophage-based biocontrol technology to enhance the efficiency of wastewater treatment and reduce targeted bacterial biofilms. *Science of The Total Environment*. [online]. 2023a, **862**, 160723. [cit. 26. 3. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160723>.

SHIVARAM, K. B., BHATT, P., MOHIT, S. V., CLASE, K. and SIMSEK, H. Bacteriophage-based biosensors for detection of pathogenic microbes in wastewater. *Science of The Total Environment*. [online]. 2023b, **901**, 165859. [cit. 28. 3. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165859>.

SCHMERER, M., MOLINEUX, I.J. and BULL, J.J. Synergy as a rationale for phage therapy using phage cocktails. *PeerJ*. [online]. 2014, **2**, e590. [cit. 6. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.7717/peerj.590>.

SILVA, J., LEITE, D., FERNANDES, M., MENA, C., GIBBS, P. A. and TEIXEIRA, P. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: A review. *Frontiers in Microbiology*. [online]. 2011, **2**(200), 1-12. [cit. 19. 6. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00200>.

SINGH, A. K., MITTAL, S., DAS, M., SAHARIA, A. and TIWARI, M. Optical biosensors: a decade in review. *Alexandria Engineering Journal* [online]. 2023, **67**, 673-691. [cit. 28. 12. 2024]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aej.2022.12.040>.

SINGH, A., SHARMA, A., AHMED, A., SUNDRAMOORTHY, A.K., FURUKAWA, H., ARYA, S. and KHOSLA, A. Recent advances in electrochemical biosensors: applications, challenges, and future scope. *Biosensors* 2021, **11**(9), 336. [cit. 19. 12. 2024]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bios11090336>.

SINHA, S., GREWAL, R. K. AND ROY, S. Chapter three – Modeling bacteria–phage interactions and its implications for phage therapy, *Academic Press*. [online]. 2018, **103**, 103-141. [cit. 24. 3. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.aamb.2018.01.005>.

SUGANTHAN, B., ROGERS, A.M., CRIPPEN, C.S., ASADI, H., ZOLTI, O., SZYMANSKI, C.M. and RAMASAMY, R.P. A Bacteriophage protein-based impedimetric electrochemical biosensor for the detection of *Campylobacter jejuni*. *Biosensors*. [online]. 2024, **14**(2),402. [cit. 23.5.2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bios14080402>.

ŠEREŠ, M. *Environmentální aspekty čištění a využívání odpadních vod v rámci přírodních blízkých technologií*. Praha, 2022. 41 s. Disertační práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D., DSc.

ŠRÁMKOVÁ, M. Technická řešení a legislativa pro opětovné využití použitých vod. In: Sborník konference VODA 2013, Litomyšl, 17.–19. září 2013. [online]. Praha: Česká asociace pro vodu (CzWA), 2013. [cit. 14. 5. 2025]. Dostupné z: https://oscao.czwa.cz/assets/custom/dokumenty/horske-cov-2013/03-HORSKE_COV_VOJTECHOVSKA-SRAMKOVA.pdf. ISBN: 978-80-905356-1-0.

TETYANA, P., SHUMBULA, P. M., & NJENGELE-TETYANA, Z. Biosensors: Design, development and applications. *IntechOpen*. [online]. 2021. [cit. 20. 6. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/intechopen.97576>.

VAN DUIN, J. and OLSTHOORN, R.C.L. *Leviviridae*. [online]. 2011. [cit. 6.1. 2025]. Dostupné z: https://ictv.global/report_9th/RNApos/Leviviridae.

VAŇKOVÁ, I., ČUREČKOVÁ, V. a BURSOVÁ, Š. *Viry a bakteriofagy v potravinách*. [online]. Brno, 2018. 34 s. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Ústav hygieny a technologie mléka. Dostupné z: https://www.vetuni.cz/files/2340_53_Viry_a_bakteriofagy_v_potravinach.pdf.

WANG, G., ZHAO, G., CHAO, X., XIE, L. and WANG, H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. [online]. 2020, **17**(17), 6278. [cit. 19. 6. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>.

WANG, K., LIANG, R. and QIN, W. Surface blocking-based potentiometric biosensor for detection of *E. coli* ATCC 15597 using phage MS2 as a receptor. *ACS Sensors*. [online]. 2024, **9**(11), 6157–6166. [cit. 19. 6. 2025]. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssensors.4c02004>.

WHO, 2006. Guidelines for the safe use of wastewater, excreta, and greywater. World Health Organization

WHO, 2016. Sanitation safety planning: manual for safe use and disposal of wastewater, greywater and excreta.

WISUTHIPHAET, N., YANG, X., YOUNG, G. M., NITIN, N. Rapid detection of *Escherichia coli* in beverages using genetically engineered bacteriophage T7. *AMB Express*. 2019, **9**(1), 55. [cit. 3. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0776-7>.

WU, B., WANG, R., and FANE, A. G. The roles of bacteriophages in membrane-based water and wastewater treatment processes: a review. *Water Research*. [online]. 2017, **110**, 120–132. [cit. 31. 3. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.12.004>.

WU, L., HONG, X., LUAN, T., ZHANG, Y., LI, L., HUANG, T. and YAN, X. Multiplexed detection of bacterial pathogens based on a cocktail of dual-modified phages. *Analytica Chimica Acta*. [online]. 2021, **1166**, 338596. [cit. 4. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338596>.

XU, J., CHAU, Y. and LEE, Y.-K. Phage-based electrochemical sensors: A review. *Micromachines*. [online]. 2019, **10**(12), 855. [cit. 18. 6. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/mi10120855>.

XU, J., ZHAO, C., CHAU, Y. and LEE, Y. The synergy of chemical immobilization and electrical orientation of T4 bacteriophage on a micro electrochemical sensor for low-level viable bacteria detection via differential pulse voltammetry. *Biosensors and Bioelectronics*. [online]. 2020, **151**, 111914. [cit. 28. 3. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111914>.

YANG, H., YUAN, H., YU, Ch., LU, S. a FU, Z. Head-oriented adsorption of bacteriophages on paper-based device for fluorescent analysis of *Klebsiella pneumoniae*. *Sensors and Actuators B: Chemical*. [online]. 2025, **431**, 137421 [cit. 17.5.2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2025.137421>.

YANG, Y., SHEN, W., ZHONG, Q., CHEN, Q., HE, X., BAKER, J.L., XIONG, K., JIN, X., WANG, J., HU, F. and LE, S. Development of a bacteriophage cocktail to constrain the emergence of phage-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*. [online]. 2020, **11**, 1-11. [cit. 6. 4. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00327>.

YU, D., RYU, K., ZHI, S., OTTO, S. J. G. And NEUMANN, N. F. Naturalized *Escherichia coli* in Wastewater and the co-evolution of bacterial resistance to water treatment and

antibiotics. *Frontiers in Microbiology*. [online]. 2022, **13**, 810312. [cit. 18. 6. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.810312>.

YU, T., SUN, Z., CAO, X., PANG, Q. and DENG, H. Recent trends in T7 phage application in diagnosis and treatment of various diseases. *International Immunopharmacology*. [online]. 2022, **110**, 109071. [cit. 3.1. 2025]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109071>.