

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Markéta Matějková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Problematika výskytu rodu *Ralstonia* v čištěné vodě  
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Markéta Matějková**  
Osobní číslo: **C21396**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Problematika výskytu bakterií rodu *Ralstonia* v čištěné vodě**  
Téma práce anglicky: **The Problem of Occurrence of Bacteria of the Genus *Ralstonia* in Purified Water**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši popisující bakterie rodu *Ralstonia*. Zaměřte se na výskyt, metody identifikace, šíření tohoto rodu. Věnujte se tvorbě biofilmu, rezistenci na antibiotika, kolonizaci výrobníků čištěné vody (aqua purificata). Popište epidemiologickou situaci, zdravotní rizika, porovnejte situaci v ČR i ve světě. Seznamte se zajímavými kazuistikami.
2. Literární zdroje čerpejte zejména z databází WOS a Medline.
3. Bakalářskou práci zpracujte dle směrnice Univerzity Pardubice upravující formální zpracování závěrečných prací.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: 22. prosince 2023  
Termín odevzdání bakalářské práce: 1. července 2024

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

L.S.

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

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Problematika výskytu rodu *Ralstonia* v čištěné vodě 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 8. 6. 2024

Markéta Matějková v.r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. Marcele Pejchalové, Ph.D., za její cenné rady, odborné vedení a připomínky, které mi pomohly při psaní bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a přáteli, kteří mě po celou dobu studia plně podporovali.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce pojednává o bakteriálním rodu *Ralstonia* se zaměřením na jeho problematickém výskytu v čištěné vodě (*aqua purificata*). V první kapitole je popsána obecná charakteristika mikroorganismů, včetně jejich morfologie a růstu, přičemž je kladen důraz na tvorbu biofilmu a antibiotickou rezistenci. Druhá kapitola pojednává o úpravě vod pitných a následně čištěných vod. Následuje třetí kapitola s detailním popisem rodu *Ralstonia* včetně morfologie, patogenity a detekce tohoto rodu. Součástí bakalářské práce jsou čtyři kazuistiky týkající se infekcí způsobené bakteriemi *Ralstonia spp.*

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

*Ralstonia*, *aqua purificata*, nozokomiální infekce, biofilm, efluxní pumpa, detekce

## **TITLE**

The Problem of Occurrence of Bacteria of the Genus *Ralstonia* in Purified Water

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with the bacterial genus *Ralstonia* with a focus on its problematic occurrence in purified water (*aqua purificata*). The first chapter describes the general characteristics of the microorganisms, including their morphology and growth, with focus on biofilm formation and antibiotic resistance. The second chapter deals with the treatment of drinking water and then purified water. This is followed by a third chapter with a detailed description of the genus *Ralstonia* including morphology, pathogenicity and detection of this genus. The thesis includes four case reports on infections caused by *Ralstonia spp.*

## **KEYWORDS**

*Ralstonia*, *aqua purificata*, nosocomial infection, biofilm, eflux pump, detection

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ .....	9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	10
ÚVOD .....	11
1 BAKTERIE .....	12
1.1 Morfologie buněk .....	12
1.2 Velikost a tvar .....	15
1.3 Růst a množení bakterií .....	16
1.4 Faktory ovlivňující množení bakterií.....	17
1.5 Biofilm .....	19
1.5.1 Tvorba biofilmu .....	20
1.5.2 <i>Quorum sensing</i> .....	21
1.5.3 Antibiotická rezistence .....	22
1.5.4 Biofilmy v lidském těle.....	23
2 PROBLEMATIKA ČIŠTĚNÉ VODY .....	24
2.1 Vodní bakterie.....	24
2.1.1 Výběr z patogenních bakterií .....	24
2.2 Rozdělení vod .....	25
2.3 Úprava vod na pitnou vodu.....	26
2.4 Čištěná voda.....	27
2.4.1 Online analyzátory biologické zátěže vody .....	28
3 ROD <i>RALSTONIA</i> .....	29
3.1 Taxonomie .....	29
3.2 Morfologie a biochemické vlastnosti.....	29
3.3 Patogenita <i>Ralstonia</i> .....	30
3.3.1 RND efluxní pumpa.....	31
3.3.2 Antibiotická rezistence .....	31
3.3.3 Tvorba vícedruhového biofilmu .....	32
3.4 Výskyt v čištěné vodě .....	33
3.5 Detekce .....	34
3.5.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	34
3.5.2 16S rDNA .....	35
3.5.3 Vitek® 2.....	36
3.5.4 MALDI-TOF MS.....	36
4 KAZUISTIKA .....	38
4.1 Souhrn kazuistik .....	40
ZÁVĚR .....	42

POUŽITÁ LITERATURA .....	43
ZDROJE POUŽITÝCH ILUSTRACÍ .....	50

## **SEZNAM ILUSTRACÍ**

Obrázek 1 Stavba bakteriální buňky .....	14
Obrázek 2 Nákres několika základních tvarů bakterií .....	16
Obrázek 3 Růstová křivka bakteriální kultury .....	17
Obrázek 4 Schéma tvorby biofilmu .....	21

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ATB	antibiotikum
ATP	adenosintrifosfát
CFU	kolonie tvořící jednotky
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
CRP	C-reaktivní protein
CT	počítačová tomografie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EPS	extracelulární polymerní substance
HGT	horizontální přenos genetické informace
LPS	lipopolysacharid
MALDI-TOF MS	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s analýzou doby letu
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NaCl	chlorid sodný
OWBA	online analyzátor biologické zátěže vody
PP	polypropylen
PVDF	polyvinylidenfluorid
QS	<i>quorum sensing</i>
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina

## ÚVOD

V této bakalářské práci se budu zabývat problematikou výskytu *Ralstonia* v čištěné vodě. V nemocničním prostředí se u pacienta může vyvinout takzvaná nozokomiální infekce. Taková infekce může být způsobena vlivem mikroorganismů při zavedení katetrů, při operacích a jiných invazivních lékařských postupech. Mezi mikroby způsobující nozokomiální infekce u imunosuprimovaných pacientů patří i bakterie rodu *Ralstonia*.

Zástupci rodu *Ralstonia* se řadí mezi gramnegativní bakterie, které jsou známé svou schopností přežít i v prostředí s nízkým obsahem živin a tvořit biofilmy. Tyto vlastnosti jim umožňují přežít a šířit se v různých vodních systémech, včetně těch, ve kterých by se mikroorganismy neměly vyskytovat. Jako příklad slouží výskyt *Ralstonia* v čištěné vodě, jež je následně využita na výrobu farmaceutických výrobků včetně těch užívaných v nemocnicích, a tím často vede k již zmíněným nozokomiálním infekcím.

# 1 BAKTERIE

Bakterie jsou jednoduché organismy, jejichž tělo je tvořeno pouze jednou buňkou. Svou velikostí se řadí mezi mikroorganismy, někdy zkráceně uváděné jako mikroby (Madigan et al, 2017). Samotné bakterie nelze vidět pouhým lidským okem a na jejich pozorování je vždy zapotřebí mikroskopu. Věda, která se zabývá zkoumáním bakterií, se nazývá bakteriologie. Jedná se o jednu z disciplín<sup>1</sup> mikrobiologie.

Taxonomicky se bakterie řadí mezi prokaryotické<sup>2</sup> buňky. V rámci české terminologie se užívá výrazu prvojaderné buňky. Každý prokaryotní organismus je tvořen jádrem, ribozomy, cytoplazmatickou membránou a buněčnou stěnou. Některé druhy pak mohou mít bičíky, fimbrie, plazmidy nebo jiné přídatné organely.

## 1.1 Morfologie buněk

Jádro bakterie se nachází volně v cytoplazmě buňky a není ohraničeno jadernou membránou. Proto je označeno jako jádro nepravé, takzvaný nukleoid. Funkce jádra je nést genetickou informaci. Ta je uložena v jediné, do kruhu stočené, molekule deoxyribonukleové kyseliny – DNA. V buňce ji nalezneme ve zhuštěné podobě jako chromozom. Geny obsažené v nukleoidu jsou nezbytné pro přežívání a rozmnožování prokaryot.

Bakterie většinou nese ještě další geny, díky kterým může získávat různé genetické výhody. Nejčastěji se jedná o rezistenci vůči antibiotikům. Takové geny jsou uloženy v plazmidech jako krátké kruhové molekuly DNA.

Ribozomy jsou tvořeny z ribozomální ribonukleové kyseliny rRNA a proteinů. V prokaryotických buňkách slouží jako hlavní nástroj proteosyntézy. Jedná se o tělíška, která lze nejlépe charakterizovat a rozdělit podle jejich sedimentačního koeficientu<sup>3</sup>. Bakterie mají ribozomy se sedimentačním koeficientem 70 S. Ribozomy jsou složeny ze dvou podjednotek – menší s koeficientem 30 S a větší s koeficientem 50 S. Každá z nich obsahuje i jiné množství rRNA a polypeptidů.

Cytoplazmou se rozumí tekuté prostředí buňky ohraničené cytoplazmatickou membránou. Zahrnují se sem všechny buněčné organely s výjimkou jádra. Kromě organel do cytoplazmy dále náleží velké množství proteinů, cukrů, enzymů a ribonukleové kyseliny.

---

<sup>1</sup> Dalšími disciplínami mikrobiologie jsou například: Mykologie, parazitologie, nebo virologie.

<sup>2</sup> Kromě prokaryotických buněk se mikrobiologie zabývá i eukaryotickými buňkami. Ty jsou fylogeneticky mladší a mají složitější strukturu. Eukaryotické buňky můžeme nalézt u řas, hub, ale i zvířat a lidí.

<sup>3</sup> Sedimentační koeficient je definován jako poměr rychlosti sedimentace ke zrychlení. Rozměr jednotky je čas, který se udává ve Svedbergových jednotkách [S], kde 1 S = 10<sup>-13</sup> sekund

V cytoplazmě probíhá většina enzymatických procesů, proto se zde vyskytují i živiny a vzniklý metabolický odpad.

Cytoplazmatická membrána je tenká blána, která ohraničuje cytoplazmu od okolí. U prokaryot se jedná o jedinou biologickou membránu. Složena je z dvojvrstvy fosfolipidů, do níž jsou vmezeřeny respirační enzymy a bílkoviny. Nejdůležitější vlastností této membrány je její polopropustnost, která umožňuje transport látek do nitra buňky i do jejího okolí.

Na cytoplazmatickou membránu těsně naléhá buněčná stěna. Bakteriím udává tvar a chrání je před nepříznivými vlivy. Hlavní komponentou buněčné stěny je peptidoglykan (též nazývaný jako murein, mukopeptid). Na základě jeho procentuálního zastoupení v buněčné stěně lze bakterie rozdělit do dvou skupin – grampozitivní a gramnegativní bakterie<sup>4</sup>.

Buněčná stěna grampozitivních bakterií je složena ze silné peptidoglykanové vrstvy. Místy je prostoupena kyselinou teichoovou, která upevňuje buněčnou stěnu k cytoplazmatické membráně. Buněčná stěna gramnegativní bakterie je tvořena tenkou vrstvou peptidoglykanu. Oproti grampozitivní buňce má navíc vnější membránu. Ta obsahuje bílkovinné kanálky – poriny<sup>5</sup>, umožňující vstup živin do buňky. Na povrchu vnější membrány se nachází lipopolysacharid<sup>6</sup> (LPS). Ten je složen z lipidu A, základního polysacharidu a specifického polysacharidu. Mezi vnější membránou a buněčnou stěnou se nachází periplazmatický prostor. Zde se kromě vrstvy peptidoglykanu nachází enzymy, živiny nebo vzniklé metabolity (Klaban, 2018).

Další možnou strukturou bakterií je pouzdro. Nejčastěji bývá tvořeno polysacharidy, polypeptidy či kyselinou hyaluronovou. Tloušťka pouzdra může být až 1  $\mu\text{m}$ . Slouží jako obal buňky, který ji chrání před nepříznivými vlivy a fagocytózou (Schindler, 2014).

U některých prokaryot lze nalézt bičíky. Bičíky jsou zvlněné útvary sloužící k pohybu<sup>7</sup>. Jedná se o 20-30 nm tenké a asi 20  $\mu\text{m}$  dlouhé výběžky tvořené bílkovinou flagelinem. Část

---

<sup>4</sup> Tyto názvy vychází z barvení dle Grama. Hans Christian Gram (1853–1938) vymyslel postup, který rozlišuje bakterie na základě zadržení barvy v buněčné stěně. Postup barvení zahrnuje krystalovou violet na obarvení a jod v podobě Lugolova roztoku na fixaci. Následně dochází k odstranění barviva rozpouštědlem, nejčastěji ethanolem nebo acetonem. Nakonec se bakterie dobarví karbolfuchsinem nebo safraninem. Bakterie, jejíž buněčná stěna byla schopna zadržet krystalovou violet, zůstane po promytí rozpouštědlem fialová, a proto je označena jako grampozitivní. Buněčná stěna bakterie, která nezachytí krystalovou violet, a proto musí být dobarvena karbolfuchsinem až po promytí na růžovou barvu, je bakterií gramnegativní.

<sup>5</sup> Poriny umožňují vstup do buňky pasivní difuzí nízkomolekulárním hydrofilním sloučeninám. Velké molekuly (například antibiotika) mohou také pronikat, ale mnohem pomaleji. Proto bývají gramnegativní bakterie méně citlivé na antibiotickou léčbu. (Carroll et al; 2015)

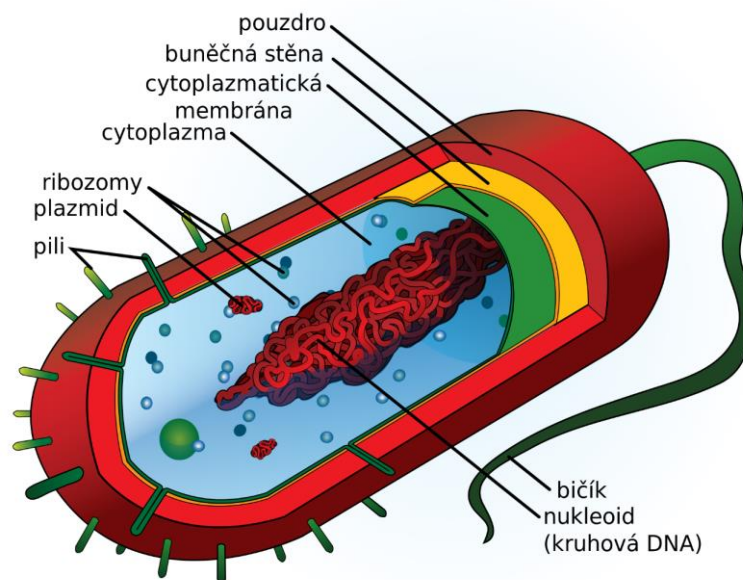
<sup>6</sup> Lipopolysacharid (LPS) je označován jako endotoxin (Votava, 2005). Jedná se o toxin, který je součástí vnější membrány buňky. Takový toxin je v době života buňky neaktivní a uvolňuje se až při poškození buňky.

<sup>7</sup> Mechanicky je přirovnáván k funkci statoru (nepohyblivá složka) a rotoru (pohyblivá složka), kde jako stator slouží prstence v peptidoglykanové vrstvě a jako rotor je prsteneček uložený v cytoplazmatické membráně. Takový prsteneček je pak spojen s kolénkem a vláknem, čímž umožňuje rotaci bičíku a následný točivý pohyb.

bičíku, kterou jsme schopni pozorovat, se nazývá vlákno. To je u povrchu bakterie díky kolénku zahnuté o 90°. Bičíky jsou ukotveny v cytoplazmatické membráně a buněčné stěně pomocí několika prstenců, které tvoří bazální tělísko. Na základě počtu bičíků a jejich umístění na buňce se prokaryota rozdělují na několik skupin: *monotricha* s jedním bičíkem, *lofotricha* s několika bičíky na jednom konci buňky, *amfitricha* s bičíky na obou koncích buňky a *peritricha* s bičíky po celém povrchu buňky.

K pohybu mohou prokaryota využívat i pili, neboli fimbrie. Oproti bičíkům jsou fimbrie mnohem kratší a drobnější, proto jsou někdy označovány jako chloupky (Schindler, 2014). Na povrchu buňky se vyskytují v desítkách až stovkách. Pili slouží buňce nejčastěji k usnadnění adheze k povrchu. Někdy dochází k připojení buněk mezi sebou a tím tvorbě biofilmu. Kromě těchto fimbrií se v buňce může nacházet tzv. sex-pili, který slouží k přenosu genetické informace jiné buňce (Votava, 2005).

Některé bakterie jsou schopny přejít do klidového stavu a přežít nepříznivé podmínky pomocí sporulace. Sporulace je proces vytváření endospor<sup>8</sup>, což jsou vysoce odolné útvary, díky kterým je bakterie schopna odolat působení vysoké teploty či nedostatku živin. V tomto stavu mohou bakterie přežít nepříznivé podmínky až stovky let (Votava, 2005). Nejčastěji vytváří spory grampozitivní bakterie rodu *Bacillus* a *Clostridium*.



Obrázek 1 Stavba bakteriální buňky

<sup>8</sup> Endospory vznikají uvnitř buňky a tvoří je právě bakterie rodu *Bacillus* a *Clostridium*. Exospory se vytvářejí přeměnou vícejaderných vláken a jsou tvořeny např. rodem *Streptomyces*. (Votava, 2005)

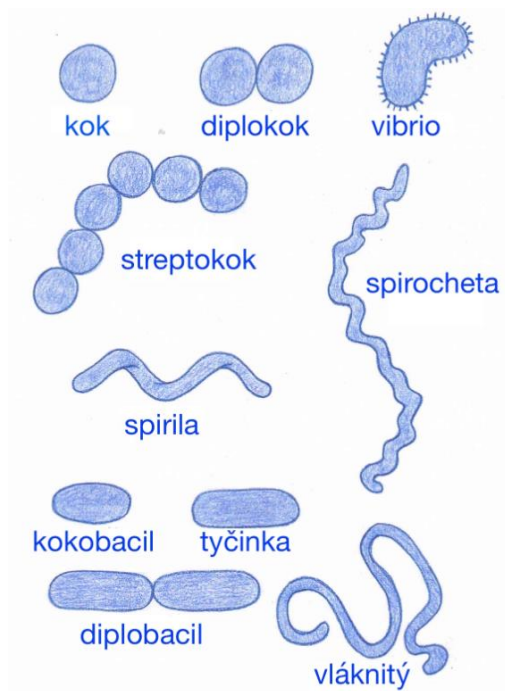
## 1.2 Velikost a tvar

Velikost bakteriálních buněk je v závislosti na evoluci a způsobu života různá. Obecně platí, že se pohybuje v řádu mikrometrů. Nejmenší velikost bakterie se pohybuje v průměru okolo 0,2  $\mu\text{m}$  (rod *Mycoplasma*), největší okolo 0,75 cm (*Thiomargarita namibiensis*). Dosud největší objevená bakterie je *Thiomargarita magnifica*, která dorůstá do délky až dvou centimetrů (Volland et al., 2022). Bakterii takové velikosti by tedy bylo možné pozorovat i pouhým okem.

Rozeznáváme tři hlavní tvary bakterií (Votava, 2005). Jedná se o tvar kulovitý, tyčinkovitý a spirálovitý. Kulovité bakterie (koky) se mohou vyskytovat jako samostatné bakterie, častěji ale bývají ve dvojicích, řetězcích či shlucích. Pravidelné koky uspořádané v řetězcích tvoří bakterie *Streptococcus pyogenes*, ve shlucích podobných hroznu pak bakterie rodu *Staphylococcus* (staphyló = hrozen). Některé koky mohou být zašpičatělé (*Streptococcus pneumoniae*) nebo například oploštělé (rod *Neisseria*). Protáhlé formy koků se nazývají kokobacily, kam se řadí bakterie rodu *Moraxella* či *Acinetobacter*.

Většina bakterií se vyskytuje ve tvaru tyčinek. Přestože morfologie tyčinek je různá, nejčastěji nalezneme tyčinky rovné (*Escherichia coli*). Pokud je tyčinka na jednom konci rozšířená, je označována jako kyjovitá, častěji koryneformní (rod *Corynebacterium*). Tvar prohnuté tyčinky, podle Schindlera (2014) až tvar rohlíčkovitý, mívají bakterie *Vibrio cholerae*. Tyčinky vícekrát zprohýbané mohou být bakterie rodu *Campylobacter*. U tyčinek je důležitá i její délka, ať už se jedná o výše zmíněný kokobacil, či naopak dlouhé štíhlé tyčinky (*Mycobacterium tuberculosis*) až vlákna dlouhá desítky mikrometrů (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) (Votava, 2005).

Spirálovité bakterie se rozeznávají podle míry stočení spirály a pravidelnosti závitů. Hrubými závitů je typická bakterie rodu *Borrelia*, nejjemnějšími závitů bakterie *Leptospira*. Nepravidelným stočením spirály je charakteristická bakterie rodu *Spirillum*, naopak *Treponema* je štíhlá bakterie s pravidelným spinem (Votava, 2005).



Obrázek 2 Nákres několika základních tvarů bakterií

### 1.3 Růst a množení bakterií

Nejčastěji se bakterie rozmnožují takzvaným příčným dělením. Buňka zdvojnásobí svůj objem, zvýší syntézu makromolekul a vedlejších metabolitů. Poté se buňka (označována jako mateřská) rovnoměrně rozdělí na dvě (dceřiné) buňky vytvořením septa uprostřed buňky. Doba, která je potřeba na vznik dceřiné buňky z mateřské, se nazývá generační doba<sup>9</sup>. V laboratorních podmínkách je generační doba bakterií kratší a bakterie se množí rychleji oproti růstu v přírodě. To je dáno vhodně zvoleným živným médiem, díky kterému má bakterie k dispozici dostatečné množství potřebných živin. Generační doba bakterie *Escherichia coli* je v laboratorních podmínkách zhruba 20 minut (Madigan et al., 2017). Bakterie mají častěji generační dobu delší, zhruba v jednotkách hodin až dní (*Mycobacterium tuberculosis*).

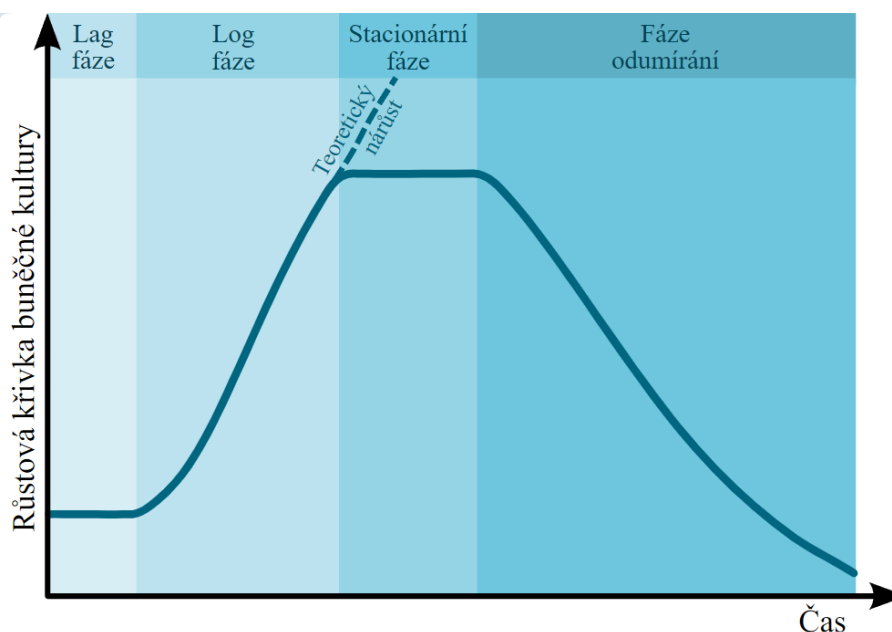
V ideálních podmínkách lze popsat množení bakterií matematicky geometrickou posloupností, přesněji exponenciální řadou. Tato řada lze popsat rovnicí:

$$\log N_n = \log N_0 + n * \log 2$$

přičemž  $n$  je počet generací,  $N_n$  je celkový počet buněk a  $N_0$  je výchozí počet buněk (Klaban, 2018). Častěji je množení bakterií znázorněno graficky, a to růstovou křivkou, kde je exponenciální fáze vyobrazena jako jeden z úseků. Růstová křivka je zanesena v grafu vyjadřujícím závislost počtu živých bakterií na čase (Hurych, 2020).

<sup>9</sup>Generační doba závisí nejen na druhu mikroorganismu, ale také na množství živin v prostředí, rychlosti odvádění nežádoucích metabolitů aj.

Celkem je křivka rozdělena na 4 fáze – lag-fázi, log-fázi, stacionární fázi a fázi odumírání. V první zmíněné fázi se buňky adaptují na nové prostředí a syntetizují potřebné molekuly. Na dělení se teprve připravují a některé buňky i odumírají. Proto je označována jako lag-fáze (z angličtiny to lag = loudat se) (Klaban, 2018). Poté nastává fáze exponenciální neboli log-fáze, logaritmická fáze. V této části křivky je vidět strmý exponenciální růst, bakterie se v této fázi dělí, jelikož mají dostatek prostoru a živin. Zde se určuje generační doba. Jakmile začnou docházet živiny, prostor, nebo dochází k hromadění toxických metabolitů, nastává fáze stacionární. Buňky se již nemnoží takovou rychlostí a začíná jich spíše ubývat důsledkem odumírání. Délka stacionární fáze je závislá na druhu mikroorganismu a charakteru prostředí. Podobně jako poslední fáze – fáze odumírání, kdy se sice některé buňky ještě mohou dělit, ovšem buněk odumírajících je daleko více a křivka tak v čase klesá (Votava, 2005).



Obrázek 3 Růstová křivka bakteriální kultury

#### 1.4 Faktory ovlivňující množení bakterií

Základní složkou živé hmoty je voda. Ta je významným faktorem ovlivňující růst a množení bakterií. Voda tvoří až 80% hmotnosti bakterie, u odolnějších spor jen asi 15%. Bakterie využívá vodu k biochemickým reakcím, jako rozpouštědlo a také je to faktor ovlivňující stavbu bílkovin. V suchém prostředí je pak pozorovatelný úbytek životaschopných mikroorganismů (Klaban, 2018). Na nedostatek vody jsou spíše citlivější gramnegativní bakterie než bakterie grampozitivní (Votava, 2005).

Kyslík je důležitou složkou pro růst mikroorganismů. Mikroby aerobní (např. bakterie rodu *Pseudomonas*) ke svému růstu kyslík vyžadují, zatímco pro obligátní anaeroby (*Clostridium difficile*) je kyslík přímo toxický. Některé anaeroby jsou schopny růst i za přístupu

kyslíku, takové bakterie se pak řadí do skupiny anaerobů aerotolerantních (*Clostridium perfringens*). Většina bakterií však patří mezi anaeroby fakultativní. Ty sice mohou růst i bez přístupu kyslíku, ovšem v jeho přítomnosti rostou mnohem lépe (např. stafylokoky, streptokoky, escherichie). Mikroby rostoucí při nižší koncentraci kyslíku, než je jeho atmosférická koncentrace, jsou označeny jako mikroaerofilní. Sem lze zařadit bakterie rodu *Lactobacillus* či *Campylobacter* (Votava, 2005).

Dalším faktorem ovlivňujícím množení bakterií je teplota. Mikroby jsou schopny se množit v určitém rozmezí teplot. Podle toho je lze rozdělit do třech skupin – bakterie psychrofilní, mesofilní a termofilní. Psychrofilní (chladnomilné) bakterie se rozmnožují při teplotách 0°C-20°C, řadí se sem tedy bakterie obývající chladné vody či jezera. Psychrofilní bakterie je možné najít i v potravinách uchovávaných v lednici. V takovém prostředí je uváděna obvyklá teplota 8°C (Votava, 2005). Z patogenních mikroorganismů sem lze zařadit bakterie rodu *Salmonella* či *Staphylococcus aureus*. Z málo patogenních mikrobů do této skupiny řadíme *Pseudomonas fluorescens*. Ta bývá zodpovědná za kažení potravin v lednici. Bakterie mezofilní mají teplotní optimum mezi 20°C a 40°C. Řadí se zde většina patogenních mikroorganismů (*Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*) důležitá pro lékařskou mikrobiologii, jelikož je v tomto rozmezí obsažena i teplota lidského těla. Jejich nález v potravinách či ve vodě může být ukazatelem obecného znečištění. Termofilní (teplomilné) bakterie se pak nejčastěji rozmnožují při teplotách vyšších než 40°C. Díky této teplotě, jež je vyšší než je tělesná teplota člověka, zde nejsou zařazeny žádné lidské patogeny. Termofilní bakterie se vyskytují například v horkých pramenech či kompostech (Klaban, 2018).

Osmotický tlak je dalším důležitým faktorem množení, ale i přežívání mikroorganismů. Bakterie se většinou vyskytují v prostředí hypotonickém. To je takové prostředí, kde je koncentrace rozpuštěných látek nižší, než je koncentrace rozpuštěných látek v cytoplazmě. Díky relativně pevné buněčné stěně však nedochází k lýze buňky. V hypertonickém prostředí, kde je koncentrace látek vyšší než v cytoplazmě, by docházelo k odčerpávání vody z buňky, tím jejímu vysoušení, a proto by bylo zamezeno dělení buňky. Tento proces se nazývá plasmolýza a je běžně užíván v potravinářském průmyslu ke konzervování potravin. Bakterie, které jsou schopné se množit v hypertonickém prostředí, jsou nazývány halofily. Ty se dají rozdělit na halotolerantní, které přímo nevyžadují vyšší koncentraci solí, ale rostou i v běžných koncentracích (např. bakterie rodu *Staphylococcus* roste v běžných i 10% koncentracích soli), dále na obligátně halofilní, které žijí většinou v mořských vodách a potřebují alespoň přídavek 1 % NaCl ke svému růstu (např. bakterie rodu *Vibrio*), a na extrémně halofilní bakterie rostoucí v nasycených roztocích soli (např. bakterie rodu *Halobacterium*) (Votava, 2005).

Sledování koncentrace vodíkových iontů, jinak řečeno pH, je důležité při kultivaci bakterií v laboratořích. Bakterie vylučují do média produkty metabolismu, které bývají nejčastěji kyselé povahy. Po překročení určitého pH se může zastavit růst bakteriálních buněk. Většina bakterií roste při neutrálním pH, tedy mezi pH 6–8. V zásaditém pH (rozmezí pH 7-14) rostou alkalofily, kam můžeme zařadit *Vibrio cholerae* rostoucí dobře mezi pH 7,4 - 9,6. V kyselém pH (rozmezí pH 1-7) se daří množit acidofilům. Do této skupiny se řadí kvasinky a plísně schopné se dělit i při pH 3, nebo například bakterie rodu *Lactobacillus*, kterým nejvíce vyhovuje pH 6 (Votava, 2005).

Bakterie potřebuje ke svému růstu a následnému množení energii. Tu nejčastěji získává dvěma základními metabolickými procesy – respirací nebo fermentací. Fermentace, jinými slovy kvašení, je takový metabolický proces, kde se neuplatňuje kyslík, jedná se tedy o proces anaerobní. Princip spočívá v předání elektronu donorem (dárce) akceptoru (příjemci). Dárce i příjemcem elektronu je organická molekula. Bakterie může zkvašovat glukózu, což je proces zvaný glykolýza. Dále se může jednat o ethanolové kvašení či mléčné kvašení, přičemž obě jsou často užívané v potravinářském průmyslu (Votava, 2005). Respirace, kterou lze přeložit jako dýchání, je takový metabolický proces, kde jsou z dárce na příjemce převedeny elektrony i vodíkové ionty. U respirace aerobní je příjemcem vždy molekulární kyslík za vzniku vody. Toto dýchání je společné i pro všechny rostliny a živočichy (Klaban, 2018). Pokud bude aerobní respirace bakterie uskutečněna pomocí glukózy, lze ji znázornit touto rovnicí:



Respirace anaerobní je typická pouze pro prokaryota. Probíhá za nepřítomnosti kyslíku, proto jsou příjemci elektronů jiné sloučeniny, které kyslík mohou, ale nemusí obsahovat. Jedná se převážně o dusičnany, sírany nebo CO<sub>2</sub> (Klaban, 2018).

## 1.5 Biofilm

Bakterie se ve vodě mohou pohybovat volně jako planktonické buňky, avšak nedávné studie ukázaly, že určité druhy bakterií zvýhodňuje přilnutí k povrchu, díky čemuž mohou utvářet mikrobiální společenství známá pod názvem biofilm. Vytvářet biofilm je ve schopnostech prakticky všech mikroorganismů (Subramani, 2019). Bakteriální buňky obsažené v biofilmu vykazují odlišné fenotypové i genotypové vlastnosti oproti planktonickým buňkám.

Změna fenotypových vlastností znesnadňuje detekci a degradaci bakteriálních buněk, zatímco změna genotypových vlastností může vést například k produkci ars operonů<sup>10</sup>, nebo extracelulární polymerní substance (EPS). EPS je složena z polysacharidů, extracelulárních proteinů a extracelulární DNA a vytvářejí spolu s vodou a mikrobiálními buňkami strukturu biofilmu. Hlavními funkcemi EPS jsou usnadnění adheze bakterií k povrchu, stabilizace 3D struktury biofilmu a ochrana před antimikrobiálními látkami (Rather, 2021).

Bakteriální buňky v biofilmu vykazují výraznou odolnost vůči různým stresovým faktorům, což představuje výzvu pro jejich detekci a eliminaci v různých prostředích, včetně vodních systémů. Biofilmy mohou způsobovat řadu problémů, včetně zvýšené odolnosti vůči dezinfekčním prostředkům a antibiotikům.

### 1.5.1 Tvorba biofilmu

Pro tvorbu biofilmu existuje několik teorií. Každá z nich je charakteristická svým vlastním postupem a rozčleněním. Vznik biofilmu popisuje v pěti krocích Rather (Rather, 2021), zatímco Cleaver (Cleaver, 2023) ho člení pouze do kroků tří. Tento model tvorby biofilmu je obecnější než starší pětikrokový model, protože bere v úvahu možnost tvorby agregátů bez adheze k povrchu. Takové agregáty jsou pozorovatelné například v medicíně při tvorbě biofilmu v dýchacích cestách (Cleaver, 2023).

Podle Rathera (2021) v první fázi dojde k přichycení planktonických bakterií na jakýkoliv povrch.

Druhá fáze je charakteristická ireverzibilním uchycením mikroorganismů. Jejich delší strana těla tak leží na povrchu uchyceného předmětu/hmoty a kvůli tomu je pohyb pomocí bičíku omezen.

Poté, co bakterie přilnou, nastane třetí fáze, kdy začnou produkovat extracelulární polymerní substance (EPS). To umožní shlukování a tvorbu mikrokolonií.

Dalším, v pořadí čtvrtým krokem, je zrání biofilmu. Během tohoto procesu narůstá množství EPS a tím biofilm získává podobu houby či věže.

V poslední, páté, fázi zralý biofilm praskne, mikroorganismy se uvolní a zahájí se nový cyklus tvorby biofilmu.

Podle Cleavera (2023) je tvorba biofilmu rozdělena do tří hlavních fází.

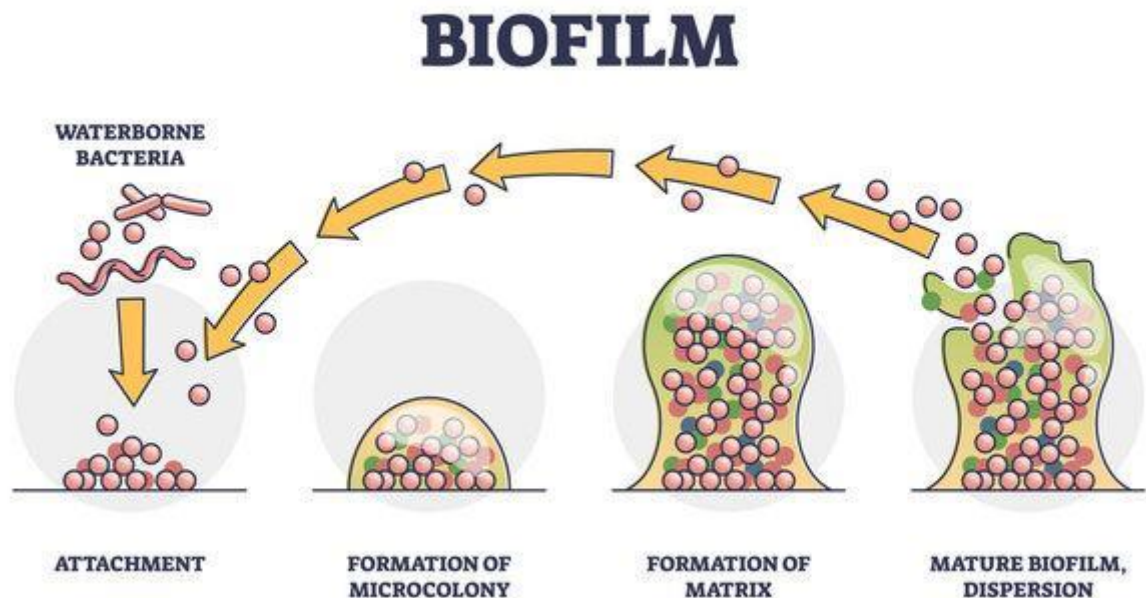
První fází je agregace či připojení, při které se bakterie pomocí fimbrií adhezuje k pevnému povrchu, nebo k jiné bakterii.

---

<sup>10</sup> Ars operony jsou geny zajišťující rezistenci na arsen. (Tripathi, 2007)

Následuje fáze růstu a akumulace, během níž je vylučována EPS, biofilm zraje a vytváří trojrozměrnou strukturu ve tvaru houby.

Poslední fáze je disagregace, kde jsou agregáty nebo jednotlivé planktonické buňky odděleny od biofilmu s možností pohybovat se dál prostředím.



Obrázek 4 Schéma tvorby biofilmu

### 1.5.2 Quorum sensing

Mikroorganismy mezi sebou v rámci biofilmu komunikují pomocí tzv. *quorum sensing* (QS), mechanismu, který reguluje metabolickou aktivitu buněk a zvyšuje virulenci. *Quorum sensing* nejenže přispívá k tvorbě a rozšiřování biofilmu, ale také reguluje různé buněčné procesy, jako je produkce toxinů, toleranci vůči dezinfekčním prostředkům a rezistenci vůči léčivům (Zhao, 2020).

Signální molekuly *quorum sensing* jsou u gramnegativních bakterií odlišné od těch, které se nacházejí u grampozitivních bakterií. Zatímco gramnegativní bakterie produkují N-acyl-L-homoserin laktony (AHSL), signální molekuly u grampozitivních bakterií často představují krátké oligopeptidy podobné hormonům (Šilha, 2024).

S QS a tvorbou biofilmu je často spojována antibiotická rezistence, která může být příčinou až 80 % chronických mikrobiálních onemocnění (Sionot, 2022). Tato kombinace faktorů představuje značnou výzvu v léčbě infekcí a vyžaduje další výzkum a vývoj nových terapeutických přístupů.

### 1.5.3 Antibiotická rezistence

Antibiotická rezistence bakteriálních buněk je vyšší u gramnegativních bakterií než u grampozitivních bakterií. To je zapříčiněno stavbou buněčné stěny, která obsahuje velké množství LPS omezující průnik ATB do buňky. Díky změně genotypových vlastností je buňka v biofilmu schopna produkovat *mar* geny (multiple antibiotic resistance genes). Mnoho mikroorganismů je schopno enzymaticky inaktivovat antibiotikum pomocí hydrolýzy nebo substituce. Jedním z nejběžnějších enzymů je beta-laktamáza schopná štěpit beta-laktamový kruh vyskytující se v penicilínech a CEF (Šilha, 2024).

Aktivně vypuzovat antibiotikum z těla buňky jsou schopny efluxní pumpy. Tyto proteinové pumpy jsou zabudovány v cytoplazmatické membráně grampozitivních bakterií nebo přímo v buněčné stěně gramnegativních bakterií. Zdrojem energie je většinou protonový gradient na membráně, kdy je jeden proton z membrány přesunut do cytoplazmy na úkor vyloučené molekuly. Efluxní pumpy mohou vypuzovat více druhů antibiotik, v takovém případě je pumpa označována jako MDR (multiple drug resistance). Podle sekvence aminokyselin lze rozdělit efluxní pumpy do pěti kategorií: RND (resistance-nodulation-division), MF (major facilitator), MATE (multidrug and toxic efflux), SMR (small multi-drug resistance/staphylococcal multiresistance family) a ABC pumpy, které jako jediné využívají jako zdroj energie ATP. Kromě antibiotik může efluxní pumpa vylučovat i barviva či dezinfekční prostředky (Hricová, 2014). Antibiotická rezistence buněk biofilmu souvisí s několika dalšími faktory. Jedním z takových faktorů je koexistence několika druhů bakterií, které se v biofilmu nachází. Některé druhy si mezi sebou mohou předávat geny rezistence horizontálním přenosem genetické informace (HGT). Do HGT lze zařadit procesy transformace, transdukce a konjugace (Šilha, 2024).

**Transformace** – jeden ze základních mechanismů přenosu genetické informace mezi bakteriemi, je komplexní proces, který probíhá za určitých podmínek. Tento proces může nastat v důsledku porušení buněčné stěny donorové bakteriální buňky, což umožňuje přenos deoxyribonukleové kyseliny (DNA) jako jednotlivé molekuly. Díky své velikosti může tato molekula projít buněčnou stěnou a cytoplazmatickou membránou do recipientní buňky, kde může být integrována do jejího chromozomu.

**Transdukce** – další mechanismus přenosu DNA, vyžaduje přítomnost bakteriálního viru, známého jako bakteriofág. Tento vir náhodně vstříkne fragmenty DNA do svého chromozomu v recipientní buňce a poté je přeneseno do donorové buňky. Transformace i transdukce jsou procesy, při kterých není nutný fyzický kontakt mezi buňkami pro přenos genetické informace.

Konjugace, na rozdíl od dvou předchozích mechanismů přenosu genů, využívá speciální fimbrie nazývané sex-pili, které slouží k přenosu genetické informace z donorové do recipientní buňky. Tento přenos je jednosměrný, jelikož donorová buňka obsahuje samčí plazmidy (F – plazmidy) a může pouze darovat genetickou informaci. Naopak recipientní buňka obsahuje samičí plazmidy (F+ plazmidy) a je schopna pouze přijímat genetickou informaci.

Sex-pili, které jsou přítomny pouze u donorových buněk, přitahují recipientní buňku a propichují ji za účelem přenosu jednoho vlákna F-plazmidu do recipientní buňky. Druhé vlákno je syntetizováno jak donorovou, tak recipientní buňkou. Recipientní buňka obsahující F+ plazmid se po přenosu genu může transformovat na donorovou buňku, což jí umožní přenášet genetickou informaci do další recipientní buňky.

#### **1.5.4 Biofilmy v lidském těle**

Biofilmy jsou také nedílnou součástí lidského těla. Typickým příkladem takového biofilmu je zubní plak, na němž Antonie van Leeuwenhoek již v 80. letech 17. století popsal první bakterie. Dále se v těle nachází biofilm v podobě střevní mikroflóry, která je součástí trávicího traktu, či vaginální mikroflóry v urogenitálním traktu. Výše zmíněné mikroflóry se vyskytují v těle zdravého člověka i pacienta s infekcí, nalezl od biofilmů nalezených v horních či dolních cestách dýchacích, které značí vždy patogenitu (Perry, 2023).

## 2 PROBLEMATIKA ČIŠTĚNÉ VODY

Lidé si nejspíše uvědomovali činnosti mikroorganismů ještě před objevením mikrobů a vznikem oboru mikrobiologie (Mara, 2003). Jako pozitivní dopad využití bakterií lze uvést používání mořské soli ke konzervování potravin či výrobě produktů mléčného kvašení, jako je máslo a sýr. Negativní dopady patogenních bakterií se vyznačovaly nemocemi, které mohly vyústit až v opakující se pandemie. Egypťané byli jedni z prvních lidí, kteří si uvědomovali přenos nemocí pomocí kontaminace pitné vody uhynulými zvířaty. Dále lze zmínit Římany, kteří do vody určené k pití házeli ze zvyku stříbrné mince, což také vedlo ke snížení patogenních bakterií (Mara, 2023).

### 2.1 Vodní bakterie

Bakterie patří mezi neodmyslitelnou součást přírody. Díky své velikosti a způsobu využití látek ze svého okolí mohou vyskytovat prakticky všude na Zemi. Do ekosystému, ve kterém se nacházejí, často přispívají interakcemi s dalšími organismy. Sladká voda<sup>11</sup> je jeden z nejčastějších biotopů, ve kterých se bakterie vyskytují (Madigan, 2017).

#### 2.1.1 Výběr z patogenních bakterií

Ve vodě se vyskytují stovky bakterií, avšak pouze některé z nich jsou patogenní pro člověka. Velmi často se jedná o koliformní<sup>12</sup> bakterie, jejichž přítomnost ve vodě je obvykle způsobena fekální kontaminací. Tyto bakterie přirozeně osidlují střevní trakt, kde mají přístup k dostatku uhlíku, nízkému pH a teplotě 37°C (Yates, 2019). Naproti tomu má voda mnohem nižší obsah uhlíku a teplotu kolem 20°C, což činí dlouhodobé přežívání těchto bakterií ve vodě nepravděpodobným. Nejznámější a nejčastěji diagnostikovanou koliformní bakterií je *Escherichia coli*, podle níž je celá skupina pojmenována. Po průniku do těla orální cestou se koliformní bakterie vyznačují způsobováním průjmů a následnou dehydratací, která může být smrtelná. K prevenci takových onemocnění je zásadní monitorovat kvalitu pitné vody (Yates, 2019).

Fekální enterokoky jsou další skupinou patogenních mikroorganismů. Bakterie rodu *Enterococcus* jsou grampozitivní bakterie schopny zkvašovat laktózu. Podobně jako koliformní bakterie jsou i enterokoky (např. *Enterococcus faecalis*) bakterie nacházející se ve střevech. Enterokoky se od jiných střevních bakterií liší zvýšenou odolností vůči různým faktorům

---

<sup>11</sup> Ve vodě se kromě bakterií mohou vyskytovat i další mikroorganismy. Příklady takových organismů jsou viry, prvoci či sinice.

<sup>12</sup> Název koliformní je odvozen od střevní bakterie *Escherichia coli*. Výskyt koliformních bakterií indikuje fekální znečištění vody, přičemž tato voda není pitná.

prostředí, jako je vyšší pH, změna teplot či vyšší koncentrace NaCl (Tamai, 2023). V přírodě se enterokoky většinou nemnoží, proto je jejich výskyt ve vodě využíván jako indikátor čerstvého fekálního znečištění (Yates, 2019).

S fekálním znečištěním je spojována i bakterie *Clostridium perfringens*. Tato grampozitivní anaerobní bakterie tvoří několik druhů toxinů, kvůli čemuž se řadí mezi lidské patogeny způsobující enterokolitidy a enterotoxémie (Mehdizadeh Gohari, 2021). *Clostridium perfringens* vytváří odolné spory, které přežijí náročnější podmínky než jiné střevní bakterie. Z toho důvodu lze její spory použít jako indikátory fekálního znečištění staršího data (Stelma, 2018).

*Legionella pneumophila* je gramnegativní bakterie běžně přítomna ve vodním prostředí včetně pitné vody. Rozmnožování této bakterie probíhá ve stojaté vodě při teplotě mezi 25-45°C. *Legionella* je považována za lidský oportunní<sup>13</sup> patogen, který způsobuje legionářskou nemoc<sup>14</sup> charakteristickou zápallem plic. Do lidského těla se dostává inhalací aerosolu obsahující tohoto mikroba, nejčastěji ze sprch, vířivek či zvlhčovačů vzduchu (Gleason, 2022).

## 2.2 Rozdělení vod

Voda se dá rozdělit do několika kategorií na základě její čistoty, původu nebo účelu. Podle původu lze vodu rozdělit na atmosférickou vodu, povrchovou vodu a podzemní vodu. Dle účelu a zároveň čistoty lze vodu vnímat jako vodu pitnou, užitkovou a odpadní.

Podzemní voda se nachází pod zemským povrchem a vzniká nejčastěji vsakováním atmosférické vody. Ta má často pH mírně kyselé, jelikož reaguje se vzdušným oxidem uhličitým za vzniku kyseliny uhličité. Při vsakování voda prochází půdou, kde se nachází oxid uhličitý jako produkt dýchání rostlin a mikroorganismů. Podzemní voda má postupem času zásaditější pH, což je způsobeno hned několika faktory. Důvod vyššího pH může být zapříčiněn rozpouštěním uhličitanových a křemičitanových minerálů, čímž snižuje kyselost stojaté vody (Kirk, 2023). Na zvýšení pH se podílejí i mikroby, které jsou schopny ve svých metabolických drahách spotřebovat vodíkové ionty. V podzemní vodě se vyskytuje jen omezené množství kyslíku, jelikož je tato voda od atmosféry izolována. Při spotřebě zásob kyslíku aerobními mikroorganismy se v podzemní vodě často začínají množit mikroby anaerobní.

Povrchová voda se podle názvu nachází na zemském povrchu. Podle zákona č. 254/2001 Sb. se sem řadí i voda přechodně protékající přirozenými dutinami pod zemským

---

<sup>13</sup> Oportunní patogeny vyvolávají onemocnění u lidí se sníženou imunitou. Takové oportunní infekce většinou provází jiné primární onemocnění. Pro zdravé jedince jsou takové bakterie nepatogenní.

<sup>14</sup> Legionářská nemoc je název plicního onemocnění vyvolaného bakteriemi *Legionella pneumophila*. Jedná se o pneumonii, jejíž hlavní příznaky zahrnují vysokou teplotu, kašel, dušnost a bolesti na hrudi.

povrchem nebo v nadzemních vedeních. V povrchové vodě je možné díky slunečnímu záření nalézt fototrofní organismy<sup>15</sup>, které ve svých metabolických drahách produkují kyslík. Ten je k dispozici aerobním mikroorganismům i z ovzduší společně s dalšími plyny. Kromě kyslíku ovlivňují složení vody srážky, sucha a znečištění z okolního prostředí<sup>16</sup>. Dostupné podmínky jsou tedy v povrchové vodě dynamičtější než v podzemní vodě. (Kirk, 2023)

Pitná voda musí mít podle vyhlášky č. 252/2004 Sb. “takové fyzikálně-chemické vlastnosti, které nepředstavují ohrožení veřejného zdraví”. Zároveň nesmí obsahovat takové množství mikroorganismů a parazitů, které by mohlo ohrozit zdraví člověka. Jakost pitné vody je stanovena limity mikrobiologických, biologických fyzikálních, chemických a organoleptických ukazatelů jakosti, jejíž hodnoty jsou upraveny vyhláškou.

Užitková voda je podle Zákona o ochraně veřejného zdraví č. 258/2000 Sb. srážková voda nebo použitá pitná voda, například po sprchování či po použití umyvadla. Takto použitá voda je označena jako šedá voda. Užitkovou vodu je možné používat při splachování toalet, praní prádla či mytí vozidel.

Odpadní vody je potřeba rozlišit na průmyslové odpadní vody a splaškové odpadní vody. Splaškovou odpadní vodou se rozumí převážně voda vypouštěná do veřejné kanalizace z bytů a rodinných domů. Složení takové vody se skládá z větší části z moči a fekálií, vyskytují se zde i zbytky potravin či pracích prostředků. Průmyslová odpadní voda je svým složením mnohem rozmanitější, jelikož může obsahovat látky organické i anorganické, které se do vody vylučují zpracováním různých produktů.

### 2.3 Úprava vod na pitnou vodu

Voda se dá upravit různými způsoby a technologiemi v závislosti na jejím složení, výskytu v přírodě či způsobu dalšího užití. Nejčastěji je potřeba úprava znečištěné vody na vodu pitnou.

K získání pitné vody ze surové<sup>17</sup> vody je potřeba dodržet několik základních kroků (Olumuyiwa, 2012). První krok je provzdušňování, který zahrnuje vhánění proudu vzduchu do vody, čímž dochází k oxidaci železa a manganu na nerozpustné soli. Provzdušnění zároveň sníží množství CO<sub>2</sub> ve vodě, které je ve své volné formě agresivní vůči betonu či železu, což by ztížilo přepravu vody (Malý, 1996).

---

<sup>15</sup> Jedná se o organismy, které získávají energii ze světla. Do této skupiny se řadí hlavně řasy, sinice a zelené rostliny.

<sup>16</sup> Jedna z nejčastějších kontaminací podzemních i povrchových vod dusičnany a fosforečnany bývá přičítána zemědělské činnosti. Do povrchových vod je vypouštěna i většina odpadních vod

<sup>17</sup> Surová voda je taková voda, která neprošla žádnou úpravou.

Dalším krokem je koagulace, která využívá kamence (síranu hlinitého,  $(\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O})$ ) dodaného do vody k vytvoření shluků z malých částic, díky čemuž je odstranění těchto částic efektivnější. Následuje sedimentace spočívající v oddělení pevných částic od kapaliny na základě hmotnosti částic a gravitačního působení. K odstranění menších a lehčích částic pak slouží filtrace. Jako konečné stádium je uvedena dezinfekce, jejíž hlavní funkce v úpravě vody je usmrcení všech organismů, včetně mikroorganismů (Olumuyiwa, 2012).

Upravit je zapotřebí i vodu odpadní, která by mohla zásobníky pitné vody kontaminovat. Farmaceutický průmysl využívá celou škálu způsobů čištění odpadních vod. Pomocí fyzikální metody nanofiltrace jsou čistírny farmaceutických průmyslů schopny vychytávat molekuly léčiv (Gadipelly, 2014). Aktivovaný kal je jedna z hojně rozšířených biologických metod čištění vody. Jedná se o směs mikroorganismů prostoupenou organickou hmotou tvořící různě velké shluky – vločky. Aktivovaný kal za aerobních podmínek zesílí rozklad organického substrátu přítomnými mikroby, převážně bakteriemi, prvoky a nálevníky (Klaban, 2018).

## 2.4 Čištěná voda

Pitná voda slouží jako základ tvorby dalších vod vhodných pro farmaceutické účely. Úpravou pitné vody je možné vytvořit *vodu čištěnou*, *vodu dialyzační* a *vodu pro injekce* (Český lékopis, 2017). Čištěná voda, jinými názvy *aqua purificata*, *aqua demineralisata* či *aqua destillata*, je hojně využívaným vehikulem v přípravě kapalných forem léků. Může se jednat o ředění sirupů, rozpouštění práškových forem léků nebo přidávání injekčních roztoků do infuzí (Vyhláška č. 84/2008 Sb.). Čištěná voda je definována jako “voda určená pro výrobu a přípravu léčiv, u nichž není požadováno, aby byly sterilní.” Současně musí být prostá pyrogenních látek<sup>18</sup>, pokud není předepsáno a schváleno jinak. (Český lékopis, 2017)

Čištěná voda je rozdělena na vodu rozplněnou a nerozplněnou. Čištěnou vodu nerozplněnou je možné vytvořit z pitné vody několika způsoby. Mezi ty nejznámější a nejčastěji využívané lze zařadit filtraci, jež využívá polymerové filtry nebo filtr s aktivním uhlím (Sweetman, 2017). Další častou metodou čištění pitné vody je reverzní osmóza. To je takový fyzikální separační proces, při kterém je přirozený tok vody tlačěn přes membránu směrem ke koncentrovanějšímu roztoku. Děje se tak pomocí kladného hydrostatického tlaku, čímž je překonán osmotický tlak (Zhai, 2022). Membránová destilace je v posledních desetiletích poměrně studovanou metodou nejen na úpravu znečištěné sladké vody, ale i na

---

<sup>18</sup> Látky vyvolávající zánětlivou reakci organismu.

odsolení vody mořské. Princip takové destilace spočívá ve filtraci pouze těkavých látek přes membránu z polypropylenu (PP) nebo polyvinylidenfluoridu (PVDF) (Julian, 2022).

Čištěná voda je následně rozplněna do předem připravených nádob zaručujících mikrobiologickou jakost.

#### **2.4.1 Online analyzátory biologické zátěže vody**

Online analyzátory biologické zátěže vody (OWBA) mohou v reálném čase poskytovat zpětnou vazbu o přítomnosti životaschopných bakterií v systémech čištěné vody. Detekce bakterií probíhá pomocí rozptýleného světla z laseru a následné bakteriální autofluorescence. Standardy používané pro analýzu, jako jsou fluorescenční mikrokuličky, musí co nejlépe napodobovat charakteristiky bakterií v čištěné vodě. Z hlediska velikosti, počtu, životaschopnosti a autofluorescence po 24 hodinách vystavení čištěné vodě nebo živnému prostředí byla pro kalibraci standardu vybrána právě *Ralstonia spp.* Fluorescenční mikrokuličky by měly být relativně malé, o průměru menším než 1  $\mu\text{m}$ , a měly by pokrývat široký emisní rozsah od 420 do 600 nm, aby co nejlépe napodobovaly zástupce *Ralstonia pickettii* (Benkstein, 2019).

## 3 ROD RALSTONIA

### 3.1 Taxonomie

Bakterie rodu *Ralstonia* je zařazena do třídy *Betaproteobacteria*. Původně tato bakterie patřila do rodu *Pseudomonas*, později byla přearžena do rodu *Burkholderia*. Samostatný rod *Ralstonia* vznikl v roce 1995 z bakterií rodu *Burkholderia* a *Alcaligenes*. Na základě výsledků analýz lipidů a mastných kyselin obsažených v buněčné stěně bylo zjištěno, že některé druhy, konkrétně *Burkholderia pickettii*, *Burkholderia solanacearum* a *Alcaligenes eutrophus*<sup>19</sup>, jsou si navzájem podobné. Předpokládané příbuzenství mezi těmito třemi druhy bylo definitivně potvrzeno analýzou sekvencí ribozomální nukleové kyseliny 16S rDNA (Yabuuchi et al, 1995).

V současnosti je známo 11 druhů bakterií rodu *Ralstonia*. Ty byly rozděleny na fytopatogeny<sup>20</sup> (např. *R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* a *R. syzygii*) a lidské patogeny (*R. pickettii*, *R. insidiosa*, *R. mannitolilytica*) (Fluit, 2021).

Samotný název rodu je odvozen od amerického mikrobiologa Ernesta Ralstona, který poprvé popsal *Ralstonia pickettii*, tehdy známou jako *Pseudomonas pickettii*, a navrhl taxonomický vztah s *Pseudomonas solanacearum* na základě podobnosti DNA (Yabuuchi et al, 1995).

### 3.2 Morfologie a biochemické vlastnosti

Bakterie rodu *Ralstonia* se řadí mezi aerobní gramnegativní nefermentující bakterie tvaru tyčinky. Podle biochemických testů jsou kataláza-pozitivní i oxidáza-pozitivní (Ryan, 2011). Patří do skupiny oligotrofních mikroorganismů, což znamená, že dokážou přežít i v prostředí s nízkou koncentrací živin. Teplota přežití má poměrně široké rozmezí 15°C–42°C. Jednotlivé bakterie procházejí sítím o velikosti 0,2 µm. Jedná se tedy o velmi drobné bakterie (Menekse, 2022). Pro *Ralstonii* je vhodná živná půda R2A (Benkstein, 2019), což je agar používaný diagnostiku bakterií z kohoutkové vody (Reasoner, 1985).

Nejčastější výskyt *Ralstonii* je v půdě a ve vodě, a to jak podzemní, tak i čištěné či destilované (Yunfeng, 2017). Díky tomu se řadí mezi mikroorganismus, který může způsobovat nozokomiální<sup>21</sup> infekce. Nejčastější druhy způsobující tyto infekce jsou *R. pickettii*, *R. mannitolilytica* a *R. insidiosa*. Ty mají podobné biochemické vlastnosti jako jiné gramnegativní tyčinky (např. bakterie *Burkholderia cepacia* nebo *Pseudomonas fluorescens*), kvůli čemuž je

---

<sup>19</sup> *Ralstonia eutropha*, tehdy známá jako *Alcaligenes eutrophus*, je v dnešní taxonomii označena jako *Cupriavidus necator*. (Zhang, 2016)

<sup>20</sup> Fytopatogen je patogen rostlin

<sup>21</sup> Nozokomiální infekce, někdy uváděna jako nozokomiální nákaza, je takový druh infekce, který vzniká v souvislosti s hospitalizací v nemocničním zařízení.

obtížné stanovit *Ralstonia* běžnými diagnostickými metodami a odlišit je od zbylých mikroorganismů (Ryan, 2014).

První místo výskytu bakterie *Ralstonia spp.* je datováno do roku 1990, kdy bakterii ve formě biofilmu identifikoval Anderson se svým týmem v plastovém vodovodním potrubí (Ryan, 2006). Izolace této bakterie probíhala postupně z různých materiálů. *Ralstonia* byla nalezena v čištěné vodě v průběhu její výroby ve farmaceutickém průmyslu. Probíhá zde čištění pitné vody membránovou filtrací s filtrem o průměru 0,2  $\mu\text{m}$ , kterým *Ralstonia* prochází (Krone, 2024). Kvůli kontaminaci čištěné vody se bakterie může vyskytovat ve fyziologickém solném roztoku nebo zásobnících pitné vody na Mezinárodní vesmírné stanici (Thompson, 2020). Dále bylo možné izolovat *Ralstonii* i z klinických materiálů, jako je krev, moč nebo likvor (Yuan, 2024).

### 3.3 Patogenita *Ralstonia*

V rámci několika studií je o *Ralstonii pickettii* často diskutováno jako o patogenu s nízkou virulencí, který může vyvolat bakteriémií nebo pseudobakteriémií (Barbut, 2006). Zástupci rodu *Ralstonia*, zejména *Ralstonia pickettii* a *Ralstonia mannitolilytica*, jsou známí svou schopností vyvolávat infekce jako je zánět plic, cystická fibróza (Stelzmueller, 2006), infekce krevního řečiště nebo prostatitida. Tyto infekce jsou často spojovány s výskytem bakterií *Ralstonia* v pitné vodě a čištěné vodě, což může vést k následné kontaminaci farmaceutických produktů z těchto zdrojů, jako jsou fyziologický roztok s obsahem 0,9% NaCl, sterilní roztok určený pro injekční stříkačky nebo vodný roztok chlorhexidinu<sup>22</sup>. Tento jev je částečně způsoben oligotrofními vlastnostmi mikroorganismů tohoto rodu, které jim umožňují přežít v prostředí s omezeným množstvím živin.

Dalším faktorem, který ovlivňuje virulenci a patogenitu, je schopnost tvorby biofilmu. *Ralstonia* je schopna vytvářet biofilmy na pevných suchých površích, avšak častěji ji nalzáme ve vodním prostředí. Tyto biofilmy poskytují bakteriálním buňkám ochranu před vysycháním, účinky dezinfekčních prostředků a antibiotik. Schopnost tvorby biofilmu je možná díky produkcí homoserinových laktonů – signálních molekul, které se zapojují do systému *quorum sensing* u gramnegativních bakterií. Tento systém nejen umožňuje tvorbu biofilmu, ale také zvyšuje rezistenci bakterií vůči některým antibiotikům (Zhao, 2020).

---

<sup>22</sup> Chlorhexidin je dezinfekční činidlo schopné ničit některé bakterie, viry i plísňe. Používá se jako účinná složka zubních past či ústních vod.

### 3.3.1 RND efluxní pumpa

Efluxní pumpy hrají významnou úlohu při vytváření multirezistence bakteriálních buněk. Tyto pumpy představují systém proteinů, který aktivně odčerpává různé látky z těla bakteriální buňky. Mezi tyto látky nejčastěji patří barviva, dezinfekční prostředky, detergenty a antibiotika (Hricová 2014). *Ralstonia* využívá princip efluxních pump typu RND (resistance-nodulation-division), které jsou obvykle více zastoupeny v buňkách gramnegativních bakterií. Tento typ efluxních pumpy se skládá ze tří hlavních částí.

První částí je transportní protein lokalizovaný ve vnitřní plazmatické membráně, který rozpoznává molekuly určené k vyloučení z buňky. Druhou částí je protein ve vnější membráně, který umožňuje transport vylučovaných látek z buňky. Třetí částí je pomocný protein uložený v periplazmatickém prostoru, který slouží k propojení membránových proteinů a zajišťuje jejich koordinovanou činnost. Tento složitý systém umožňuje bakteriím efektivně odstraňovat nežádoucí látky a přispívá k jejich schopnosti vyvinout odolnost vůči různým druhům léčiv (Hricová, 2014).

### 3.3.2 Antibiotická rezistence

Většina klinických izolátů *Ralstonia spp.* vykazuje multirezistenci na širokou škálu běžně používaných antibiotik (Ryan, 2011). I když přesné mechanismy této antimikrobiální rezistence nejsou dosud zcela prozkoumány, je předpoklad, že zvýšená rezistence je přisuzována tvorbě specifických genů, zejména těch, které ovlivňují beta-laktamová antibiotika. Tyto geny vedly k vzniku beta-laktamáz třídy D, jako jsou bla<sub>OXA-22</sub> a bla<sub>OXA-60</sub>. Bla<sub>OXA-22</sub> projevuje aktivitu proti benzylpenicilinu, cloxacilinu a cefalosporinům s omezeným spektrem, zatímco gen bla<sub>OXA-60</sub> má aktivitu pouze proti imipenemu (Ryan, 2013).

Citlivost na antibiotika je však proměnlivá a závisí na specifickém fenotypu bakterie, který je ovlivněn tvorbou biofilmu. Důležité je poznamenat, že neexistuje stanovená minimální inhibiční koncentrace pro *Ralstonia spp.*, a proto se u antibiotických testů často používají hodnoty MIC<sup>23</sup> stanovené pro příbuzné druhy bakterií, zejména pro *Burkholderia cepacia* a *Pseudomonas aeruginosa* (Ryan, 2013).

Ve studii z roku 2019 (Fang, 2019) byla bakterie *Ralstonia insidiosa* izolovaná z klinického vzorku rezistentní vůči několika antibiotikům, včetně amikacinu, amoxicilinu/klavulanátu, ampicilinu, aztreonamu, gentamicinu, polymyxinu B, tobramycinu a nitrofurantoinu (Fang, 2019). Z německé studie provedené na klinických vzorcích v roce 2023

---

<sup>23</sup> MIC = minimální inhibiční koncentrace – nejnižší koncentrace antibiotika, která byla ještě schopna potlačit (inhibovat) viditelný růst dané bakterie.

(Krone, 2024) vyplývá, že rezistence na osm zkoumaných antibiotik byla zjištěna pouze u dvou antimikrobiálních léčiv, a to u ceftazidimu a gentamicinu (Krone, 2024).

V nejnovější studii z dubna 2024 (Sheng, 2024) bylo podrobně zkoumáno 48 kmenů bakterie *Ralstonia*. Zjištěno bylo, že všechny tyto kmeny byly citlivé na ceftazidim, ale rezistentní byly na amikacin, gentamicin a polymyxin B (Sheng, 2024). Ve vzorcích *Ralstonia* odebraných z vody byla spolu s gentamicinem zjištěna rezistence k arsenu, která je pravděpodobně způsobena tvorbou genů ars operonu, konkrétně genů arsH a acr3 (Ferro, 2021).

### 3.3.3 Tvorba vícedruhového biofilmu

*Ralstonia* byla často nalezena ve společenství několika dalších druhů bakterií. Častý byl nález *Ralstonia spp.* s bakteriemi *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* nebo *Escherichia coli* (Zuo, 2023). *Ralstonia* dokáže vytvořit v prostředí ochuzeném o živiny biofilm, ve kterém dokážou následně přežít další druhy mikroorganismů. Nebezpečné by pak mohly být biofilmy tvořené mikroorganismy které jsou pro člověka patogenní.

Byla provedena studie zabývající se vlivem *Ralstonia insidiosa* na *Listeria monocytogenes* (Zuo, 2023). Jako živné médium byl použit tryptokasein-sójový bujón (TSB), který je vhodný pro pěstování aerobních mikroorganismů s vysokými nutričními požadavky. Toto živné médium bylo použito ve dvou formách – ve 100% koncentraci a 10% koncentraci, čímž bylo zajištěno bohatší a chudší živné prostředí. Izolovaná *Listeria monocytogenes* neprojevila schopnost vytvářet agregáty ani biofilm, a to ani v jednom z testovaných prostředí. Naopak, izolovaná *Ralstonia insidiosa* vykazovala tvorbu malých bílých agregátů v 10% TSB, což naznačuje, že není vysoce náročná na nutriční zdroje v prostředí. Dále byly zkoumány směsi těchto dvou druhů mikroorganismů. Bylo zjištěno, že v chudším prostředí byly vytvořeny agregáty, které byly dokonce větší a pevnější než v bohatším prostředí. Tuto pozoruhodnou vlastnost lze přičíst metabolitům *Ralstonia*, které vznikají během biosyntézy aminokyselin a metabolismu uhlíku, jako je například fenylalanin a kyselina aminomalonová. Tyto metabolity pravděpodobně vytvářejí extracelulární polymerní substance (EPS), které shlukují jednotlivé bakterie *L. monocytogenes* a tím vytvářejí zmíněné agregáty. (Zuo, 2023)

Problematika koexistence bakterií rodu *Ralstonia* a zástupců rodu *Legionella* byla podrobně zkoumána ve studii publikované v roce 2017 (Rao, 2017). Tato studie se zaměřila na hodnocení účinnosti chlornanu sodného, běžně používaného bělidla, jako dezinfekčního prostředku při úpravě pitné vody. Současně se zabývala vztahem mezi tvorbou biofilmu a přítomností bakterie *Legionella* v distribučním systému pitné vody. Výsledky ukázaly, že bakterie rodu *Ralstonia* jsou schopny tvořit dvoudruhový biofilm obsahující *Legionella*,

čímž mohou přispívat k jejímu přežití v méně příznivých podmínkách prostředí. Navíc byla bakterie rodu *Ralstonia* detekována a izolována i po aplikaci chlornanu sodného, což naznačuje, že biofilm poskytuje ochranu před dezinfekčními prostředky. (Rao, 2017).

Bakteriální buňky v planktonním stavu se od buněk tvořících biofilm liší i v interakci s imunitním systémem člověka. Při tvorbě biofilmu v lidském těle se bakteriální buňky nejprve objevují ve formě planktonních buněk, které následně kolonizují povrch tkáně. Studie z roku 2013 (Hernández-Jiménez, 2013) se zabývala rozdíly ve fagocytóze mezi bakteriemi ve formě biofilmu a v planktonním stavu. K tomuto výzkumu byly použity metody jako průtoková cytometrie<sup>24</sup>, konfokální mikroskopie<sup>25</sup> a stanovení počtu kolonií (CFU). Výsledky studie ukázaly, že planktonní buňky vyvolávají tvorbu makrofágů a imunitní odpověď v mnohem větší míře než buňky rostoucí ve formě biofilmu. Mechanismus snížené imunitní reakce na biofilm může zahrnovat expresi znaku CD64. Přítomnost biofilmu neměla vliv na základní hladinu tohoto znaku, zatímco planktonní bakterie zvyšovaly jeho expresi. Tento jev naznačuje, že lidské makrofágy preferují fagocytózu planktonních bakterií před buňkami v biofilmu, což by mohlo umožnit bakteriím tvořícím biofilm uniknout imunitnímu systému a vést k chronickým infekcím. Podle autorů mají tyto poznatky významný dopad na pochopení patogeneze bakteriálních infekcí a mohou přispět k vývoji nových terapeutických strategií (Hernández-Jiménez, 2013).

### 3.4 Výskyt v čištěné vodě

Bakterie rodu *Ralstonia* se spolu s dalšími gramnegativními tyčinkovitými bakteriemi<sup>26</sup> řadí mezi kontaminanty čištěné vody. Znečištěná *aqua purificata* může vést ke kontaminaci dalších výrobků, které jsou z této vody připravovány. Tímto způsobem mohou být kontaminovány fyziologické roztoky s 0,9% NaCl, roztoky do injekčních stříkaček nebo kožní dezinfekční roztoky, které jsou pacientům podávány intravenózní infuzí, prostřednictvím katetrů či při čištění ran.

Studie z roku 2017 (Chen, 2017) byla zaměřena na ohnisko výskytu *Ralstonia spp.* v tchajwanské nemocnici. V období od 3. května do 30. června 2015 byla na chemoterapeutickém oddělení zkoumána infekce *Ralstonia pickettii* u imunosuprimovaných

---

<sup>24</sup> Průtoková cytometrie je analytická technika používaná na detekci buněk. Metoda detekce pomocí průtokového cytometru je založena na fluorescenci buněk po průniku laserem. Detekovat lze kromě velikosti buněk i jejich granularitu, počet či na detekci mikroorganismů.

<sup>25</sup> Konfokální mikroskop je druh světelného mikroskopu, který jako zdroj světla využívá laser. Může být použit k pozorování buněčných struktur.

<sup>26</sup> Mezi další gramnegativní tyčinkovité bakterie lze řadit rod *Achromobacter* či *Burkholderia* (Mayhua, 2019)

pacientů. Během tohoto období bylo 30 pacientů pozitivních na *Ralstonia pickettii*, přičemž všichni měli zavedený intravaskulární katetr, který byl proplachován 20ml ampulí fyziologického roztoku. Po přezkoumání bylo potvrzeno, že zdrojem kontaminovaných 20ml ampulí fyziologického roztoku byla kontaminovaná čištěná voda. Pozitivní nález *Ralstonia pickettii* byl potvrzen u šesti šarží ampulí, které se s velkou pravděpodobností shodovaly s ampulemi podávanými pacientům při proplachu katetru. Po ukončení používání přípravků s těmito šaržemi se nevyskytly žádné další případy (Chen, 2017).

### 3.5 Detekce

Existuje několik metod pro detekci *Ralstonia spp.* V praxi jsou často využívány genotypové metody, jako je polymerázová řetězová reakce (PCR), která umožňuje amplifikaci specifických úseků DNA pro identifikaci bakteriálního druhu. Biochemické metody, například systém Vitek® 2 od společnosti BioMérieux, jsou rovněž běžně používané k identifikaci bakteriálních druhů na základě jejich biochemických vlastností.

K přesnějšímu určení fenotypu je nejčastěji využívána sekvenace 16S rDNA, což je gen kódující úsek ribozomální RNA. Tento gen se vyznačuje vysokou variabilitou mezi různými druhy bakterií, čímž umožňuje detailnější identifikaci bakteriálního druhu na základě jeho genetického materiálu.

Pro kontrolu a potvrzení výsledků je možné použít metodu MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry). Tato metoda funguje na principu určení mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie, která porovnává hmotnostní spektra biomolekul, jako jsou proteiny, mezi vzorky mikroorganismů a referenčními vzorky v databázi. Tím je umožněna rychlá a přesná identifikace bakteriálních druhů.

#### 3.5.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je molekulárně genetická technika vyznačující se vysokou citlivostí, která umožňuje amplifikaci specifických úseků DNA. Základním principem této metody je cyklická denaturace a renaturace DNA, což vede k exponenciálnímu nárůstu množství cílové DNA sekvence. Celý proces je prováděn v termocykleru, zařízení schopném přesně regulovat teplotu s přesností na desetiny stupně Celsia a rychle měnit teplotní hodnoty v průběhu jednotlivých cyklů (Beránek, 2016).

První krok PCR zahrnuje denaturaci, při níž dochází k rozštěpení dvouvláknové DNA na dva jednovláknové řetězce. Tento proces je umožněn vysokou teplotou, která rozruší vodíkové vazby mezi komplementárními bázemi.

Následuje krok nazývaný annealing neboli hybridizace, během něhož se teplota sníží na úroveň, která umožní připojení primerů<sup>27</sup> k jednovláknové DNA. Primery specificky označují úseky DNA, které budou v následujícím kroku syntetizovány (Beránek, 2016).

Třetím krokem je elongace, při které DNA polymeráza prodlužuje primery syntézou nového vlákna DNA, což vede k vytvoření dvou identických kopií původní DNA molekuly. Tyto tři fáze – denaturace, hybridizace a elongace – se opakují v mnoha cyklech, dokud není dosaženo dostatečného množství amplifikovaných DNA fragmentů pro další analýzu. Tento opakovaný cyklus zajišťuje exponenciální nárůst cílové DNA, což je klíčové pro detekci a další molekulárně genetické aplikace (Beránek, 2016).

### 3.5.2 16S rDNA

Jednou z hojně využívaných technik k určení taxonomie mikroorganismů je sekvenace genu 16S rDNA. Tato sekvence kóduje podjednotku ribozomu 16S. Analýza tohoto genu patří mezi metody DNA sekvenování, což lze do češtiny přeložit jako "čtení DNA". K dispozici jsou starší metody, jako je *Sangerovo sekvenování*, nebo modernější technologie *sekvenování druhé generace* (NGS).

Sangerovo sekvenování je založeno na modifikované DNA replikaci, po níž následuje analýza pomocí kapilární elektroforézy. Během replikace dochází k rozpletení dvoušroubovice DNA, přičemž jednovláknová DNA slouží jako templát pro syntézu nového vlákna za využití komplementarity bází – guanin (G) se páruje s cytosinem (C) a adenin (A) s thyminem (T). V modifikované replikaci jsou do směsi nukleotidů přidávány dideoxynukleotidy, což jsou modifikované nukleotidové báze označené specifickou fluorescenční barvou. Dideoxynukleotidy zároveň ukončují syntézu nového vlákna. Tyto modifikované báze se náhodně zařazují do nově vznikajícího řetězce, což při dostatečném počtu cyklů vede k tvorbě různě dlouhých kopií DNA. Molekuly zakončené modifikovanou bází jsou poté seřazeny od nejkratší po nejdelší a pomocí odlišných fluorescenčních barev pro každou ze čtyř bází je následně přečtena sekvence. Tento postup umožňuje přesné určení sekvence nukleotidů a je klíčovým nástrojem v molekulární taxonomii mikroorganismů (Kolísko, 2017).

Metody sekvenování druhé generace (next generation sequencing, NGS) zahrnují několik metod a postupů při určování sekvence. Narozdíl od Sangerova sekvenování, kdy je

---

<sup>27</sup> Primer je krátká sekvence oligonukleotidů, která zahajuje transkripci DNA.

potřeba vzniku velkého počtu nahodile dlouhých kopií, jsou metody NGS schopné vytvořit otisk DNA již napoprvé. Nejprve je potřeba dlouhou molekulu DNA “nastříhat” na kratší části a poté je adaptérem<sup>28</sup> připevnit na pevný povrch, kde bude probíhat sekvenace. Aby byl zajištěn dostatečně silný výsledný signál, je třeba tyto úseky DNA před sekvenováním namnožit. Jedna z nejhojněji užívaných metod je technologie vyvinutá společností Illumina, která podobně jako Sangerovo sekvenování používá báze s navázanou fluorescenční barvou pro detekci nukleotidu, a podobně jako u starší metody tato báze zároveň zastaví syntézu DNA. Jedná se ovšem o vratný proces, kdy po zastavení syntézy a nasnímání výsledného signálu kamerou dochází k enzymatickému odstranění poslední báze a fluorescenčního značení, díky čemuž může proběhnout další kolo reakce. Tím dochází k postupnému sekvenování krátkého úseku molekuly DNA báze po bázi (Kolísko, 2017).

### 3.5.3 Vitek® 2

Další způsob detekce bakterie *Ralstonia* zahrnuje použití automatizovaného systému Vitek® 2, který využívá biochemické testy k průkazu mikroorganismů (Sheng, 2024). Tento přístroj pracuje s ID kartami, které jsou specializovány na konkrétní druhy bakterií na základě jejich fenotypových vlastností. Společnost bioMérieux nabízí na svých webových stránkách různé typy ID karet, například pro identifikaci fermentujících a nefermentujících gramnegativních bakterií, grampozitivních bakterií nebo pro identifikaci kvasinek a organismů podobných kvasinkám.

ID karty obsahují řadu biochemických testů, které umožňují rychlé a přesné určení specifických mikrobiálních druhů podle jejich metabolických a enzymatických aktivit. Tento systém zjednodušuje a urychluje proces identifikace mikroorganismů ve srovnání s tradičními metodami, což je klíčové pro efektivní diagnostiku a následnou léčbu infekcí způsobených různými bakteriemi včetně *Ralstonia*. Automaty Vitek® 2 tak představují moderní a spolehlivý nástroj v mikrobiologických laboratořích (Pincus, 2006).

### 3.5.4 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS slouží k identifikaci mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie. Jedná se o techniku, jejíž název je odvozen z anglického Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization a Time-Of-Flight, přičemž zkratka MS znamená Mass Spectrometry, hmotnostní spektrometrie. Používá detektor doby letu (TOF), který měří dobu průletu částic a umožňuje vypočítat jejich rychlost (Li, 2022).

---

<sup>28</sup> Adaptér je krátký úsek DNA, který slouží k navázání sekvenovaného úseku DNA na pevný povrch.

Hmotnostní spektra získaná z MALDI-TOF MS představují molekulární indikátory specifické pro jednotlivé druhy, podobně jako otisk prstu. Princip této metody spočívá v ozáření směsi vzorku a matrice laserem. Matrice absorbuje energii laserového pulzu a její rozklad ionizuje molekuly vzorku. Ionty vzorku jsou následně urychleny elektrickým polem a vstupují do trubice detektoru, kde je vakuum, což umožňuje jejich pohyb rychlostí úměrnou jejich hmotnosti a náboji. Hodnota doby letu iontů je pak konvertována na poměr molekulové hmotnosti a náboje (Li, 2022). Tento proces umožňuje rychlou a přesnou identifikaci mikroorganismů na základě jejich specifických hmotnostních spekter, díky čemuž se MALDI-TOF MS stala významným nástrojem v mikrobiologii.

## 4 KAZUISTIKA

Případ z roku 2019 (Lin, 2023) pojednává o dvouletém chlapci čínské národnosti, který trpěl zvýšenou teplotou a kašlem. Na tyto příznaky byla nasazena antibiotika azithromycin a erythromycin. Po 20 dnech se stav pacienta nezlepšoval, proto byl 27. února 2019 převezen do místní nemocnice. Chlapec byl přijat se zvýšenou teplotou 39,6 °C, tepovou frekvencí 120 tepů/min, ale s pravidelným dechem. Laboratorní testy ukázaly zvýšený C-reaktivní protein (CRP), což naznačovalo infekci či bakteriální nákazu, a abnormální hodnoty lymfocytů, jejichž procentuální množství bylo menší než 10 %, zatímco fyziologická hodnota je mezi 24 %–40 %. Bylo provedeno CT vyšetření plic, a to v den převozu do nemocnice a poté po čtyřech dnech, 31. ledna 2019. Právě na snímku z 31. ledna byla zjevná probíhající infekce, díky které mohla být později diagnostikována pacientovi pneumonie způsobená *Ralstonia insidiosa*. Diagnóza byla potvrzena bronchoalveolární laváží a kultivací tekutiny získané touto laváží. Následně započala léčba antibiotiky, konkrétně byl podáván meropenem 20 mg/kg třikrát denně v kombinaci s azithromycinem 10 mg/kg jednou denně. Po sedmi dnech byly horečky pacienta a infekce pod kontrolou. Další CT plic následovalo 42 dní po propuštění, tedy 21. března 2019. Na snímcích bylo patrné zlepšení textury plic a nebyla prokázána recidiva onemocnění (Lin, 2023).

Případ infekce bakteriemi rodu *Ralstonia* popsáný roku 2017 (Sharma, 2017) se týká onemocnění novorozence indického původu. Dítě narozené předčasně ve 34. týdnu těhotenství bylo po porodu převezeno na neonatální jednotku intenzivní péče kvůli rozvoji respirační tísně. Zde byla zahájena léčba pomocí ventilačního přístroje Bubble CPAP (Continuous positive airway pressure) na podporu dechu kontinuálním přetlakem v dýchacích cestách, přičemž byly dodávány intravenózní tekutiny. Po 48 hodinách byl CPAP odstraněn, jelikož došlo ke zlepšení respirační tísně pacienta. V postnatálním věku pacienta 84 hodin se u kojence vyvinuly rysy novorozenecké sepse<sup>29</sup> a laboratorní výsledky poukázaly na leukopenii, trombocytopenii a zvýšené CRP. Pomocí rentgenu plic byla diagnostikována pneumonie pravé plíce, což vedlo k opětovné plicní ventilaci. Po odběru krve a kultivaci hemokultury byl zjištěn nález bakterie *Ralstonia pickettii*. Podle vyhodnocení citlivosti tohoto kmene na antibiotika bylo nasazeno léčivo tigecyklin. Klinický stav pacienta se postupně zlepšoval a kojeneček byl po kontrole hemokultury po 14 dnech propuštěn v dobrém stavu. Přestože zdroj infekce nebyl oficiálně potvrzen, autoři studie se domnívají, že šlo o přenos bakterie čištěnou vodou, která se dále

---

<sup>29</sup> Novorozenecká sepsa se může vyznačovat nízkým objemem pulzů, tachykardií (180–184 tepů/min) či nízkým krevním tlakem (průměrný krevní tlak 24 mmHg).

používá například na výrobu fyziologických roztoků a dalších ředěných roztoků (Sharma, 2017).

Další studie (Pan, 2011) popisuje případ pětadesátiletého pacienta čínské národnosti. Po prvních pěti dnech suchého kašle se na pacientovi projevovala zvýšená tělesná teplota 39°C, načež byla nasazena antibiotika – penicilin intravenózně po dobu sedmi dnů, lavo-ofloxacin po dobu pěti dnů a cefotaxim po dobu sedmi dnů. Stav pacienta se po antibiotické léčbě nezlepšil a po dvaceti dnech trvajících horečce byl převezen do nemocnice. Fyzikální vyšetření ukázalo zvýšenou teplotu 38,8 °C, krevní tlak 120/85 mmHg a puls 90 tepů/min. V anamnéze bylo uvedeno, že pacient trpí posledních 10 let hypertenzí a závislostí na cigaretách. Rentgenové vyšetření a následné CT potvrdilo zdroj horečky na pravé straně plic, jehož přesnější diagnóza zněla pravostranná lobární pneumonie. Byla provedena plicní biopsie a odebrána tkáň, z níž byly odebrány vzorky na kultivaci. Narostlou čistou kulturu detekoval systém API 20NE od BioMérieux jako oportunní patogen *Ralstonia pickettii* a pacientovi byla předepsána antibiotika cefepim nitrožilně. Po šesti dnech bylo opakováno CT plic, přičemž byla zjištěna přítomnost pravostranného abscesu. Byla provedena punkce a odběr hnisavé tekutiny, která rovněž potvrdila nález bakterie *Ralstonia pickettii*. Pacientovi byla zahájena léčba drenáží, procesu zajišťující odvod hnisavé tekutiny z abscesu a těla pomocí výplachu sterilním roztokem chloridu sodného. Bylo zřejmé, že ani tato antibiotická léčba nezabrala, tudíž byla vyšetřována citlivost na antibiotika metodou diskové difúze. Vyšetřovaný klinický vzorek *Ralstonia pickettii* byl citlivý na cefoperazon-sulbaktam, ceftazidim a imipenem, antibiotická léčba spočívala v nasazení cefoperazonu/sulbaktamu po dobu osmnácti dnů a imipenemu/cilastatinu po dobu dvanácti dnů. Další snímek rentgenu uskutečněný po 48 dnech odhalil ústup abscesu i zlepšení zápalu plic. Pacient při kontrole po dvou měsících nejevil známky recidivy a zůstal bez respiračních příznaků (Pan, 2011).

Případ z roku 2021 (Zhou, 2021) pojednává o šestatřicetileté ženě podstupující dne 2. dubna 2021 plánovanou operaci štítné žlázy. Teplota těla pacientky vystoupala až na 40 °C a projevil se u ní septický šok vyznačující se zvýšenou srdeční frekvencí a sníženým krevním tlakem. Nejprve byly tyto symptomy přiřazené k diagnóze hypertyreózy, později po zhoršení příznaků byla žena převezena na jednotku intenzivní péče a byly jí provedeny laboratorní testy. Tato analýza odhalila vyšší hladinu CRP, počet bílých krvinek  $1,47 \times 10^9$ , neutrofilii a vysokou hladinu prokalcitoninu. Kvůli možnosti invazivní infekce byly odebrány dvě hemokultury na kultivaci a zároveň nasazena antibiotika imipenem a daptomycin. Mikrobiologický rozbor vzorku hemokultury z periferní krve odhalil gramnegativní tyčinky v aerobní kultuře, které jsou schopné růst na krevním agaru v hladkých koloniích, přičemž na MacConkeyho agaru

nefermentovaly laktózu. Následná identifikace probíhala pomocí MALDI–TOF MS, který detekoval bakterii jako *Ralstonia mannitolilytica*. Jelikož se hodnota spolehlivosti MALDI–TOF pohybovala kolem 2,3, bylo provedeno i sekvenování genu 16S rRNA, které identifikovalo stejnou bakterii jako *Ralstonia pickettii*. 10. dubna byla kultivována i drenážní tekutina štítné žlázy a špička drenážní trubice. Oba vzorky byly také pozitivní na nález *Ralstonia pickettii*. Byla zahájena antibiotická léčba dle výsledků testu citlivosti na antibiotika. Citlivá byla bakterie na ciprofloxacin, cefoperazon/sulbaktam, sulfamethoxazol a ceftriaxon, lékař předepsal antibiotikum levofloxacin. Antibiotickou léčbu lékaři několikrát změnili podle hodnot CRP a počtu bílých krvinek. Pacientka byla propuštěna 27. den v dobrém klinickém stavu (Zhou, 2021).

#### 4.1 Souhrn kazuistik

Všechny čtyři popsané kazuistiky měly společnou infekci oportunním patogenem *Ralstonia spp.* Léčba všech pacientů probíhala pomocí antibiotik, jejichž následné užití k zahájení léčby se v rámci případů lišilo. V prvním případě dvouletého chlapce byla nasazena antibiotika azithromycin a erythromycin, které nezlepšily průběh infekce. Z toho důvodu byl v nemocnici po stanovení diagnózy proveden test citlivosti na antibiotika bakterie *Ralstonia*, po jehož výsledcích byl podáván meropenem v kombinaci s azithromycinem. V druhém popsaném případě bylo novorozenci po stanovení diagnózy nasazeno antibiotikum tigeckylin. V případě pětadesátiletého pacienta byla před stanovením přesné diagnózy nasazena antibiotika penicilin a lavo-ofloxacin. Ta ale nezabrala a po hospitalizaci a stanovení diagnózy byla pacientovi podávána kombinace antibiotik cefoperazonu/sulbaktamu a následně imipenemu/cilastatinu. Šestatřicetileté ženě byla po operaci podána antibiotika imipenem a daptomycin, a po diagnóze infekce bakterií *Ralstonia pickettii* byla podávána antibiotika levofloxacin a další ATB v závislosti na laboratorních výsledcích.

Tři případy ze čtyř vykazovaly společnou diagnózu – pneumonii způsobenou bakteriemi rodu *Ralstonia spp.* Ve všech těchto případech byla k potvrzení diagnózy využita zobrazovací vyšetření, jako je rentgen nebo počítačová tomografie – CT, a v některých případech byly použity obě metody. U dvou případů byla provedena bronchoalveolární laváž a odběr tekutiny, díky jejíž kultivaci byla diagnostikována *Ralstonia spp.* V případě novorozence se také jednalo o pneumonii, odebrán byl ale vzorek hemokultury. U ženy proběhla po operaci štítné žlázy sepsa, načež byla také jako vzorek odebrána hemokultura a následně i drenážní tekutina štítné žlázy, což vedlo k cílené antibiotické léčbě.

V případě předčasně narozeného novorozence s infekcí způsobenou bakteriemi rodu *Ralstonia spp.* autoři studie předpokládají, že zdrojem nákazy by mohly být kontaminované roztoky čištěné vody. Tyto roztoky se běžně používají při výrobě fyziologických roztoků s 0,9% NaCl nebo roztoků pro dýchací přístroje. To podporuje hypotézu o nozokomiální povaze infekce, což znamená, že nákaza mohla být získána během pobytu v nemocnici. Další případ, který se týká zdravé ženy po plánované operaci štítné žlázy, rovněž naznačuje možnou nozokomiální infekci. V předoperačním vyšetření nebyly zjištěny žádné komplikace, což vede k domněnce, že infekce mohla být způsobena během operace nebo po ní, v nemocničním prostředí. Ve všech popsanych případech se zdá, že identifikace zdrojů těchto infekcí nebyla provedena včas, což mohlo komplikovat léčbu a prognózu pacientů. Autoři studií zdůrazňují zvýšenou ostražitost zdravotnického personálu, zejména u imunosuprimovaných pacientů, kteří využívají invazivní metody, jako jsou dýchací a dialyzační přístroje.

## ZÁVĚR

Tato bakalářská práce pojednává o problematice výskytu bakterií rodu *Ralstonia* v čištěné vodě. Práce shrnuje klíčová zjištění o zástupcích bakterií rodu *Ralstonia*, jejich detekci a rizicích spojených s jejich přítomností. Tyto bakterie mohou kontaminovat lékařské roztoky, což může vést k nozokomiálním infekcím, zejména u pacientů se zavedenými intravaskulárními katetry. *Ralstonia* představuje významné riziko díky své schopnosti tvořit biofilmy a vysoké rezistenci na antibiotika.

Do budoucna je důležité se zaměřit na zlepšení detekce *Ralstonia* a monitorování kontaminace čištěných vod. Výskyt infekcí by mohl být minimalizován při zvýšeném povědomí o bakteriích rodu *Ralstonia* a vzdělávání zdravotnického personálu o správném používání a údržbě lékařských zařízení. Přístup nemocnic a zdravotnických zařízení k prevenci a kontrole kontaminace je klíčový pro snížení rizika infekcí způsobených bakteriemi rodu *Ralstonia*.

## POUŽITÁ LITERATURA

1. ADLEY, C.; RYAN, Michael; PEMBROKE, Joseph a SAIEB, F.M. *Ralstonia pickettii: biofilm formation in high-purity water*. In: Biofilms: Persistence and Ubiquity. Biofilm Club: Cardiff, 2005, s. 261-271. ISBN 978-0955103001.
2. BARBUT, F.; KOSMANN, M.-J.; LALANDE, V.; NEYME, D.; COPPO, P. et al. Outbreak of *Ralstonia pickettii* Pseudobacteremia Among Patients With Hematological Malignancies. Online. 2006, roč. 27, č. 6, s. 642-644. ISSN 0899-823X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1086/505100>. [cit. 2024-06-08].
3. BENKSTEIN, Kurt D; DA SILVA, Sandra M; LIN, Nancy J; RIPPLE, Dean C a ZHANG, Lina. *Evaluating changes to Ralstonia pickettii in high-purity water to guide selection of potential calibration materials for online water bioburden analyzers: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism*. Online. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2019, roč. 46, č. 11, s. 1469-1478. ISSN 1476-5535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02192-4>. [cit. 2024-05-05].
4. BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.
5. CARROLL, Karen C.; BUTEL, Janet a MIETZNER, Timothy. *Jawetz, Melnick & Adelbergs Medical Microbiology*. 27th edition. McGraw-Hill Education/Medical, 2015. ISBN 978-0071824989.
6. CHEN, Yin-Yin; HUANG, Wan-Tsuei; CHEN, Chia-Ping; SUN, Shu-Mei; KUO, Fu-Mei et al. An Outbreak of *Ralstonia pickettii* Bloodstream Infection Associated with an Intrinsically Contaminated Normal Saline Solution. Online. 2017, roč. 38, č. 4, s. 444-448. ISSN 0899-823X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/ice.2016.327>. [cit. 2024-06-08].
7. CLEAVER, Leanne a GARNETT, James A. *How to study biofilms: technological advancements in clinical biofilm research*. Online. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2023, roč. 13. ISSN 2235-2988. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1335389>. [cit. 2024-04-03].
8. ČESKO. Český lékopis 2017: Pharmacopoea Bohemica MMXVII (Ph.B. MMXVII). 1. díl., Evropská část. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.
9. ČESKO. *Zákon č. 254/2001 Sb.: Zákon o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon)*. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2001-254/zneni-20240101#cast1>. [cit. 2024-04-02].
10. FANG, Qingqing; FENG, Yu; FENG, Ping; WANG, Xiaohui; ZONG, Zhiyong et al. *Nosocomial bloodstream infection and the emerging carbapenem-resistant pathogen Ralstonia*

*insidiosa*. Online. BMC Infectious Diseases. 2019, roč. 19, č. 1. ISSN 1471-2334. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3985-4>. [cit. 2024-05-09].

11. FERRO, Pompeyo; VAZ-MOREIRA, Ivone; MANAIA, Célia M.; CLAUS, Heike; KURZAI, Oliver et al. *Evolution of gentamicin and arsenite resistance acquisition in Ralstonia pickettii water isolates*. Online. Research in Microbiology. 2021, roč. 172, č. 1, s. 1025-1031. ISSN 09232508. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.11.001>. [cit. 2024-05-09].

12. FLUIT, Ad C.; BAYJANOV, Jumamurat R.; AGUILAR, María Díez; CANTÓN, Rafael; TUNNEY, Michael M. et al. *Characterization of clinical Ralstonia strains and their taxonomic position*. Online. Antonie van Leeuwenhoek. 2021, roč. 114, č. 10, s. 1721-1733. ISSN 0003-6072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01637-0>. [cit. 2024-05-20].

13. GADIPELLY, Chandrakanth; PÉREZ-GONZÁLEZ, Antía; YADAV, Ganapati D.; ORTIZ, Inmaculada; IBÁÑEZ, Raquel et al. *Pharmaceutical Industry Wastewater: Review of the Technologies for Water Treatment and Reuse*. Online. 2014, roč. 53, č. 29, s. 11571-11592. ISSN 0888-5885. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ie501210j>. [cit. 2024-04-16].

14. GLEASON, Jessie A. a COHN, Perry D. *A review of legionnaires' disease and public water systems – Scientific considerations, uncertainties and recommendations*. Online. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 2022, roč. 240. ISSN 14384639. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2021.113906>. [cit. 2024-04-03].

15. HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, Enrique; DEL CAMPO, Rosa; TOLEDANO, Victor; VALLEJO-CREMADES, Maria Teresa; MUÑOZ, Aurora et al. *Biofilm vs. planktonic bacterial mode of growth: Which do human macrophages prefer?* Online. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2013, roč. 441, č. 4, s. 947-952. ISSN 0006291X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.012>. [cit. 2024-05-17].

16. HRICOVÁ, Kristýna a Milan KOLÁŘ. *Efluxní pumpy bakterií - role v rezistenci na antibiotika a jejich možné inhibitory*. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství. 2014, 20(4), 116-120. ISSN 1211-264X. Dostupné také z: [https://trios.cz/wp-content/uploads/2023/09/KMIL\\_04-2014.pdf](https://trios.cz/wp-content/uploads/2023/09/KMIL_04-2014.pdf)

17. HURYCH, Jakub a ŠTÍCHA, Roman. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium*. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2020. ISBN 978-80-7553-844-4.

18. JULIAN, Helen; NURGIRISIA, Novesa; QIU, Guanglei; TING, Yen-Peng a WENTEN, I. Gede. *Membrane distillation for wastewater treatment: Current trends, challenges and prospects of dense membrane distillation*. Online. Journal of Water Process Engineering. 2022, roč. 46. ISSN 22147144. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102615>. [cit. 2024-04-16].

19. KIRK, Mattew. *Impacts to the Hydrosphere*. In: Microbiology for Earth Scientists. Manhattan: New Prairie Press, 2023, s. 235-258. ISBN 978-1-944548-51-3.

20. KLABAN, Vladimír. *Obecná a environmentální mikrobiologie: fascinující, neuvěřitelný a tajemný svět mikrobu v přírodním prostředí*. Hradec Králové: Gaudeamus, 2018. ISBN 978-80-7435-673-5.
21. KOLÍSKO, Martin. *Moderní metody sekvenování DNA*. Živa. 2017, č. 3, s. 73-76.
22. KRONE, Manuel; RAUSCHENBERGER, Vera; BLASCHKE, Vera; CLAUS, Heike; KURZAI, Oliver et al. *Ralstonia pickettii bloodstream infections with potential genomic link to internationally distributed contaminated saline solution, Germany, October 2023*. Online. Eurosurveillance. 2024, roč. 29, č. 3. ISSN 1560-7917. Dostupné z: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.3.2400010>. [cit. 2024-05-07].
23. LI, Dandan; YI, Jia; HAN, Guobin; QIAO, Liang; VASILEV, Krasimir et al. *MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research: Materials and Composites for Advanced Water Purification*. Online. ACS Measurement Science Au. 2022, roč. 2, č. 5, s. 385-404. ISSN 2694-250X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsmeasuresciau.2c00019>. [cit. 2024-05-20].
24. LIN, Shuang-Zhu; QIAN, Mei-Jia; WANG, Yan-Wei; CHEN, Qian-Dui; WANG, Wan-Qi et al. *Children with infectious pneumonia caused by Ralstonia insidiosa: A case report*. Online. World Journal of Clinical Cases. 2023, roč. 11, č. 9, s. 2002-2008. ISSN 2307-8960. Dostupné z: <https://doi.org/10.12998/wjcc.v11.i9.2002>. [cit. 2024-05-20].
25. MADIGAN, Michael; BENDER, Kelly; BUCKLEY, Daniel; SATTLEY, W. Matthew a STAHL, David. *Brock Biology of Microorganisms*. 15th edition. Pearson, 2017. ISBN 9780134261928.
26. MALÝ, Josef a MALÁ, Jitka. *Chemie a technologie vody*. Brno: NOEL 2000, 1996. ISBN 80-860-2013-4.
27. MAYHUA, Felix Pompeyo Ferro. *Ecology and antimicrobial resistance of Ralstonia spp. in drinking water*. 2019.
28. MEHDIZADEH GOHARI, Iman; A. NAVARRO, Mauricio; LI, Jihong; SHRESTHA, Archana; UZAL, Francisco et al. *Pathogenicity and virulence of Clostridium perfringens*. Online. Virulence. 2021, roč. 12, č. 1, s. 723-753. ISSN 2150-5594. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1886777>. [cit. 2024-04-02].
29. MENEKŞE, Şirin; HACISEYITOĞLU, Demet; SÜZÜK YILDIZ, Serap a BAYRAKDAR, Fatma. *An outbreak of Ralstonia pickettii bloodstream infection and clinical outcomes: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism*. Online. The Journal of Infection in Developing Countries. 2022, roč. 16, č. 04, s. 705-711. ISSN 1972-2680. Dostupné z: <https://doi.org/10.3855/jidc.15159>. [cit. 2024-05-02].

30. OLUMUYIWA I. OJO. *Groundwater: Characteristics, qualities, pollutions and treatments*. Online. International Journal of Water Resources and Environmental Engineering. 2012, roč. 4, č. 6. ISSN 21416613. Dostupné z: <https://doi.org/10.5897/IJWREE12.038>. [cit. 2024-04-10].
31. OTOVÁ, Berta; KOHOUTOVÁ, Milada a PANCZAK, Aleš. *Lékařská biologie a genetika*. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2415-0.
32. PAN, Wensen; ZHAO, Zhiming a DONG, Mei. *Lobar pneumonia caused by Ralstonia pickettii in a sixty-five-year-old Han Chinese man: a case report*. Online. Journal of Medical Case Reports. 2011, roč. 5, č. 1. ISSN 1752-1947. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1752-1947-5-377>. [cit. 2024-05-23].
33. PINCUS, David H. *Microbial identification using the bioMérieux Vitek® 2 system*. Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association, 2006, 2006: 1-32.
34. RAO, Subramanya . *Bleach-tolerant Bacterial Species Isolated from Potable Water in Hong Kong*. Online. 2017, roč. 5, č. 1, s. 1-4. ISSN 23720956. Dostupné z: <https://doi.org/10.15226/sojmid/5/1/00164>. [cit. 2024-05-20].
35. RATHER, Muzamil Ahmad; GUPTA, Kuldeep a MANDAL, Manabendra. *Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies*. Online. Brazilian Journal of Microbiology. 2021, roč. 52, č. 4, s. 1701-1718. ISSN 1517-8382. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>. [cit. 2024-04-03].
36. REASONER, D J; GELDREICH, E E; ADLEY, C; JANG, Xudong a ZHANG, Lina. *A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism*. Online. Applied and Environmental Microbiology. 1985, roč. 49, č. 1, s. 1-7. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/aem.49.1.1-7.1985>. [cit. 2024-05-05].
37. RYAN, Michael P.; ADLEY, Catherine C.; BLASCHKE, Vera; CLAUS, Heike; KURZAI, Oliver et al. *The antibiotic susceptibility of water-based bacteria Ralstonia pickettii and Ralstonia insidiosa*. Online. Journal of Medical Microbiology. 2013, roč. 62, č. 7, s. 1025-1031. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.054759-0>. [cit. 2024-05-09].
38. RYAN, M; PEMBROKE, J a ADLEY, C. *Ralstonia pickettii: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism*. Online. Journal of Hospital Infection. 2006, roč. 62, č. 3, s. 278-284. ISSN 01956701. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2005.08.015>. [cit. 2024-05-02].
39. RYAN, Michael P; PEMBROKE, J Tony; ADLEY, Catherine C; RIPPLE, Dean C a ZHANG, Lina. *Genotypic and phenotypic diversity of Ralstonia pickettii and Ralstonia insidiosa isolates from clinical and environmental sources including High-purity Water. Diversity in Ralstonia pickettii: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism*. Online. BMC Microbiology. 2011, roč. 11,

č. 1, s. 1469-1478. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-194>. [cit. 2024-05-05].

40. SARAVANAN, A.; SENTHIL KUMAR, P.; JEEVANANTHAM, S.; KARISHMA, S.; TAJ SABREEN, B. et al. *Effective water/wastewater treatment methodologies for toxic pollutants removal: Processes and applications towards sustainable development*. Online. Chemosphere. 2021, roč. 280. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130595>. [cit. 2024-04-10].

41. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4771-2.

42. SHARMA, Deepak; SHARMA, Pradeep; SONI, Priyanka; GUPTA, Basudev; WANG, Wan-Qi et al. *Ralstonia picketti neonatal sepsis: a case report*. Online. BMC Research Notes. 2017, roč. 10, č. 1, s. 2002-2008. ISSN 1756-0500. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2347-1>. [cit. 2024-05-20].

43. SHENG, Zhaojun; LI, Jiabin; HAN, Guojing; FAN, Ru; ZHU, Pingjun et al. *Molecular epidemiological and clinical infection characteristics analysis of Ralstonia*. Online. 2024. ISSN 0934-9723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10096-024-04823-w>. [cit. 2024-05-09].

44. SIONOV, Ronit Vogt; STEINBERG, Doron a FERGUSON, J. *Targeting the Holy Triangle of Quorum Sensing, Biofilm Formation, and Antibiotic Resistance in Pathogenic Bacteria: Skin prick testing*. Online. *Microorganisms*. 2022, roč. 10, č. 6, s. 414-414. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061239>. [cit. 2024-04-09].

45. STELMA, Gerard N. *Use of bacterial spores in monitoring water quality and treatment*. Online. *Journal of Water and Health*. 2018, roč. 16, č. 4, s. 491-500. ISSN 1477-8920. Dostupné z: <https://doi.org/10.2166/wh.2018.013>. [cit. 2024-04-02].

46. STELZMUELLER, I.; BIEBL, M.; WIESMAYR, S.; ELLER, M.; HOELLER, E. et al. *Ralstonia pickettii—innocent bystander or a potential threat?* Online. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006, roč. 12, č. 2, s. 99-101. ISSN 1198743X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01309.x>. [cit. 2024-06-08].

47. SUBRAMANI, Ramesh a JAYAPRAKASHVEL, Mani. *Bacterial Quorum Sensing: Biofilm Formation, Survival Behaviour and Antibiotic Resistance*. Online. *Implication of Quorum Sensing and Biofilm Formation in Medicine, Agriculture and Food Industry*. 2019, s. 21-37. ISBN 978-981-32-9408-0. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9409-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9409-7_3). [cit. 2024-04-03].

48. SWEETMAN, Martin; MAY, Steve; MEBBERSON, Nick; PENDLETON, Phillip; VASILEV, Krasimir et al. *Activated Carbon, Carbon Nanotubes and Graphene: Materials and Composites for*

*Advanced Water Purification*. Online. C. 2017, roč. 3, č. 4, s. 1469-1478. ISSN 2311-5629. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/c3020018>. [cit. 2024-05-20].

49. ŠILHA, David. *Problematika mikrobiální rezistence a tvorba biofilmových struktur*. Katedra biologických a biochemických věd, Univerzita Pardubice, 2024.

50. TAMAI, Soichiro a SUZUKI, Yoshihiro. *Diversity of Fecal Indicator Enterococci among Different Hosts: Importance to Water Contamination Source Tracking*. Online. *Microorganisms*. 2023, roč. 11, č. 12. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122981>. [cit. 2024-04-02].

51. THOMPSON, Alex F.; ENGLISH, Erika L.; NOCK, Adam M.; WILLSEY, Graham G.; ECKSTROM, Korin et al. *Characterizing species interactions that contribute to biofilm formation in a multispecies model of a potable water bacterial community: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism*. Online. *Microbiology*. 2020, roč. 166, č. 1, s. 34-43. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/mic.0.000849>. [cit. 2024-05-02].

52. TRIPATHI, Rudra D.; SRIVASTAVA, Sudhakar; MISHRA, Seema; SINGH, Nandita; TULI, Rakesh et al. *Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants*. Online. *Trends in Biotechnology*. 2007, roč. 25, č. 4, s. 158-165. ISSN 01677799. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.02.003>. [cit. 2024-06-09].

53. VOLLARD, Jean-Marie; GONZALEZ-RIZZO, Silvina; GROS, Olivier; IVANOVA, Natalia; SCHULZ, Frederik et al. *A centimeter-long bacterium with DNA contained in metabolically active, membrane-bound organelles*. Online. *Science*. 2022, roč. 376, s. 1453-1458. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.abb3634>. [cit. 2024-03-18].

54. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-868-5000-5.

55. WANG, Jinwen; SONG, Yu; LIU, Siqin; JANG, Xudong a ZHANG, Lina. *Persistent bacteremia caused by *Ralstonia pickettii* and *Microbacterium*: a case report*. Online. *BMC Infectious Diseases*. 2024, roč. 24, č. 1, s. 278-284. ISSN 1471-2334. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09228-w>. [cit. 2024-05-05].

56. WOO, P.C.Y.; LAU, S.K.P.; TENG, J.L.L.; TSE, H; YUEN, K.-Y. et al. *Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories*. Online. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008, roč. 14, č. 10, s. 908-934. ISSN 1198743X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x>. [cit. 2024-05-20].

57. YATES, Marylynn V. *Drinking Water Microbiology*. Online. Reference Module in Biomedical Sciences. 2018. ISBN 9780128012383. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.66123-8>. [cit. 2024-04-02].
58. YUAN, Chao; AN, Tianfeng; LI, Xinlong; ZOU, Jiao; LIN, Zhan et al. *Genomic analysis of Ralstonia pickettii reveals the genetic features for potential pathogenicity and adaptive evolution in drinking water*. Online. Frontiers in Microbiology. 2024, roč. 14. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1272636>. [cit. 2024-05-05].
59. ZHAI, Yujia; LIU, Gang a VAN DER MEER, Walter G.J. *One-Step Reverse Osmosis Based on Riverbank Filtration for Future Drinking Water Purification*. Online. Engineering. 2022, roč. 9, s. 27-34. ISSN 20958099. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.02.015>. [cit. 2024-04-15].
60. ZHAO, Xihong; YU, Zixuan a DING, Tian. *Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria*. Online. Microorganisms. 2020, roč. 8, č. 3. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030425>. [cit. 2024-05-05].
61. ZHOU, Liyan; QIN, Weijuan; LIANG, Zhengyi; WEI, Huanhuan a WU, Xiaoning. *A Rare Case of Ralstonia pickettii Infection in a Patient Undergoing Thyroid Surgery*. Online. Jundishapur Journal of Microbiology. 2021, roč. 14, č. 9. ISSN 2008-3645. Dostupné z: <https://doi.org/10.5812/jjm.119418>. [cit. 2024-05-23].
62. ZUO, Xifeng; CHEN, Meilin; ZHANG, Xinshuai; GUO, Ailing; CHENG, Si et al. *Transcriptomic and metabolomic analyses to study the key role by which Ralstonia insidiosa induces Listeria monocytogenes to form suspended aggregates*. Online. Frontiers in Microbiology. 2023, roč. 14. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1260909>. [cit. 2024-04-16].

## ZDROJE POUŽITÝCH ILUSTRACÍ

1. WIKISKRIPTA. *Obecná stavba prokaryotické buňky.* Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Struktura\\_bakterií#/media/Soubor:Average\\_prokaryote\\_cell\\_cs.svg](https://www.wikiskripta.eu/w/Struktura_bakterií#/media/Soubor:Average_prokaryote_cell_cs.svg). [cit. 2024-03-18].
2. PUBLI. *Nákres několika základních tvarů bakterií.* Dostupné z: <https://publi.cz/books/294/images/pics/04/44.jpg>. [cit. 2024-03-18].
3. WIKISKRIPTA. *Růstová křivka bakteriální kultury.* Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Měření\\_růstu\\_bakterií#/media/Soubor:Bacterial\\_growth\\_cs.svg](https://www.wikiskripta.eu/w/Měření_růstu_bakterií#/media/Soubor:Bacterial_growth_cs.svg). [cit. 2024-03-18].
4. VECTORMINE. *Biofilm formation stages with development and dispersion outline diagram.* Dostupné z: [https://stock.adobe.com/cz/search/images?k=biofilm&asset\\_id=477118663](https://stock.adobe.com/cz/search/images?k=biofilm&asset_id=477118663). [cit. 2024-06-10].