

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

Analýza mikrobiomu opakovaně použitelných lahví na vodu

Emma Engelsmannová
Jihomoravský kraj

Brno 2025

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

Analýza mikrobiomu opakovaně použitelných lahví na vodu

Analysis of microbiome of reusable water bottles

Autor: Emma Engelsmannová

Škola: Gymnázium Brno-Řečkovice, příspěvková organizace, Terezy
Novákové 963/2, Brno 621 00

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultant: Mgr. David Novák, Mgr. Michal Kuňák, Ph.D.

Brno 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 3. února 2025

Emma Engelsmannová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce **Mgr. Davidu Novákovi** za vedení mé práce, trpělivé vysvětlování laboratorních postupů, vědeckých praktik a tématu, veškerý investovaný čas, ochotu a možnost kdykoliv a s čímkoliv se na něj obrátit.

Mé poděkování patří **doc. Mgr. Janu Lochmanovi, Ph.D.** za umožnění realizace této práce na **Ústavu biochemie v laboratoři Molekulární patologie**, za uvedení do problematiky a konzultaci výsledků. Dále děkuji **Mgr. Ondřeji Šedo, Ph.D.** za možnost provedení analýzy pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

Děkuji svému školnímu konzultantovi **Mgr. Michalu Kuňákovi, Ph.D.** za cenné rady při sepisování práce.

Nakonec děkuji všem **dobrovolníkům** z mého gymnázia za účast v mém výzkumu a také mé pomocnici, která mi asistovala při odběrech vzorků lahví. Bez vás a vašich lahví by tato práce nevznikla.



Anotace

Práce se zabývá mikrobiálním osídlením opakovaně použitelných lahví na vodu. Obliba těchto lahví stoupá zejména díky zvyšujícímu se povědomí o ekologii a udržitelnosti. Nicméně tyto lahve jsou bohatě osídleny mikroorganismy, které mohou představovat zdravotní riziko zejména kvůli nedostatečnému čištění. Mikrobiální složení bylo analyzováno ze stěrů z hrdel a pítek lahví pomocí sekvenování nové generace (NGS) Illumina MiniSeq a tradiční kultivace na TYEA médiu. Vykultivované kolonie byly identifikovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Výsledná data byla propojena s informacemi získanými z dotazníkového šetření. Z výsledků vyplývá, že většina uživatelů provádí údržbu své lahve nedostatečně, nejčastěji pouhým každodenním vypláchnutím vody, což nevede k efektivnímu odstranění biofilmu. Naopak nejúčinnější metoda čištění je použití kartáče na lahve nebo myčky na nádobí. Mikrobiom lahví je vysoce variabilní a sdílení mezi více lidmi přispívá ke zvýšení bakteriální diverzity, přičemž byly detekovány oportunní patogeny, které mohou pro uživatele představovat zdravotní riziko.

Klíčová slova

Opakovaně použitelné lahve; mikrobiom; sekvenování nové generace – Illumina; MALDI-TOF

Annotation

The study deals with microbial colonisation of reusable water bottles. The popularity of these bottles is increasing with the growing awareness of environmental and sustainability issues. However, these bottles are heavily colonised by microorganisms that can pose a health risk, especially due to inadequate cleaning. Microbial composition was analyzed from bottle spouts or mouths using Illumina MiniSeq next generation sequencing (NGS) and traditional cultivation on TYEA medium. The cultured colonies were identified using MALDI-TOF mass spectrometry. The resulting data were combined with information obtained from a questionnaire survey. The results show that most users do not clean their bottles properly, often only rinsing the bottle with water, which does not lead to effective biofilm removal. In contrast, the most effective cleaning method is the use of a bottle brush or a dishwasher. The microbiome of bottles is highly variable and sharing bottles among multiple people contributes to increased bacterial diversity. Opportunistic pathogens have been detected, posing a potential health risk to users.

Keywords

Reusable water bottles; microbiome; new generation sequencing – Illumina; MALDI-TOF

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Mikrobiom	8
2.1.1	Bakteriom	9
2.2	Lidský mikrobiom	9
2.2.1	Orální mikrobiom	11
2.2.2	Kožní mikrobiom	12
2.3	Opakovaně použitelné lahve	13
2.3.1	Materiály opakovaně použitelných lahví	15
2.3.2	Mikrobiom opakovaně použitelných lahví	15
2.4	Čištění lahví	16
2.4.1	Vliv čištění na mikrobiom	16
3	CÍLE	17
4	METODY	18
4.1	Odběr vzorku	18
4.2	Izolace DNA	18
4.3	Příprava knihovny	19
4.3.1	Amplifikace	19
4.3.2	Purifikace	21
4.3.3	Fluorescenční měření koncentrace vzorků	22
4.3.4	Pooling	23
4.3.5	Kontrola délky fragmentů	23
4.4	Sekvenace	24
4.4.1	Analýza dat	25
4.5	Kultivace	25
4.5.1	MALDI-TOF	26
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	29
5.1	Dotazníkové šetření	29
5.2	Sekvenační analýza	32
5.2.1	Příprava	32
5.2.2	Bakteriální složení z pohledu diverzity	34
5.2.3	Bakteriální složení z pohledu taxonů	40
5.2.4	Porovnání 2 lahví stejného uživatele	42
5.2.5	Faktory a selekce taxonů	45
5.2.6	Oportunní patogeny	48
5.3	Kultivační analýza	49
5.3.1	MALDI-TOF	52
5.4	Porovnání sekvenační a kultivační analýzy	54

6	ZÁVĚR	55
7	SEZNAM OBRÁZKŮ	56
8	SEZNAM TABULEK	58
9	SEZNAM LITERATURY	59
10	PŘÍLOHY.....	66

1 ÚVOD

„Reusable water bottles” neboli opakovaně použitelné lahve na vodu, se stávají běžným společníkem každodenního života stále většího počtu lidí. Zvyšující se povědomí o ekologii a snaha žít udržitelně jsou hlavní motivací uživatelů tyto lahve využívat. Lahve ale nabízejí i další výhody, jako nižší zdravotní riziko než jednorázové lahve, ekonomické benefity, praktické vlastnosti a širokou nabídku designu.

Tyto lahve jsou však bohatě osídleny různými mikroorganismy, převážně bakteriemi, které se v nich hromadí díky kontaktu lahve s různými prostředími. Už během 24 hodin dojde k nárůstu mikroorganismů, které mohou představovat riziko onemocnění obzvláště pro osoby s oslabenou imunitou. Pouze polovina uživatelů čistí svoji láhev denně a opravdu důkladné čištění je spíše výjimečné, většina uživatelů spoléhá na pouhé vypláchnutí vodou (Liu & Liu, 2017; Amadi et al., 2020).

Dosavadní studie, které se tímto tématem zabývají, využívají zejména kultivační metody a zkoumají obsah lahve. Tyto vědecké práce popsaly růst mikroorganismů v lahvích a identifikovaly kultivovatelné druhy. Limity kultivační analýzy je proto potřeba doplnit metodou sekvenování DNA.

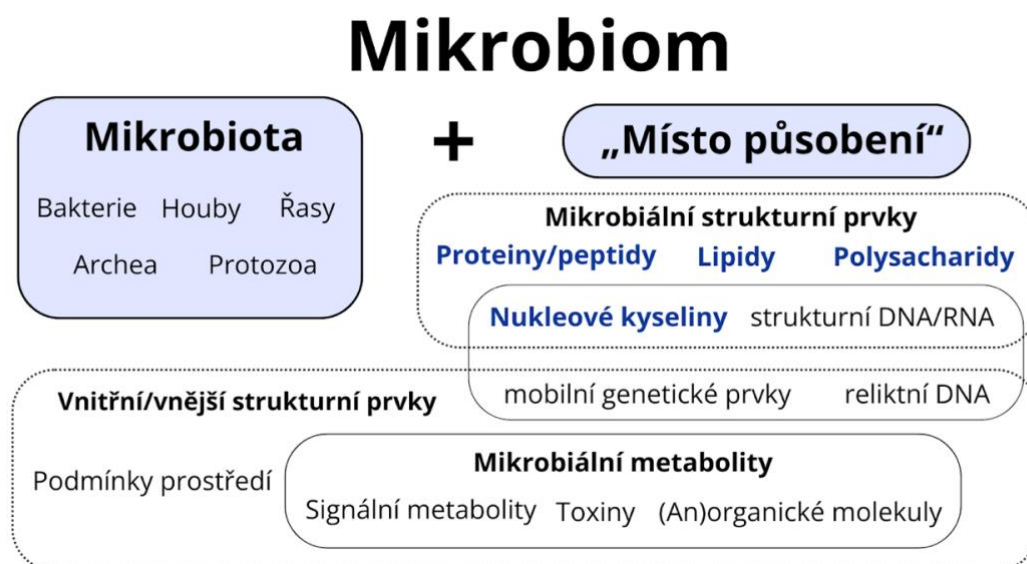
Cílem mé práce je pomocí sekvenační analýzy zkoumat bakteriom pítek opakovaně použitelných lahví na vodu studentů gymnázia a identifikovat případné oportunní patogeny. Dále prozkoumat jaký vliv má čištění, materiál a konstrukce na složení mikrobiomu. Hlavní sekvenační analýza bude doplněna i o klasickou kultivaci mikroorganismů z pítek lahví na TYEA médiu, přičemž získané poznatky mohou přispět budoucím výzkumům v této oblasti.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mikrobiom

Z etymologického hlediska slovo *mikrobiom* pochází z řečtiny, kdy došlo ke spojení dvou částí: „*micro*” (malý) a „*bios*” (život) (Cabrera & Monte, 2024).

Pro pochopení významu mikrobiomu je důležité nejdříve porozumět pojmu *mikrobiota*, který označuje soubor všech mikroorganismů z říší Bakterie, Archaea, Houby, Řasy a podskupiny Protozoa. *Mikrobiom* zahrnuje nejen tuto mikrobiotu, ale také jejich metabolity, struktury, mobilní genetické prvky (transpozony, viry a fágy) a reliktní DNA. Toto společenství mikroorganismů obývá jasně vymezený prostor s jedinečnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a zároveň tvoří dynamický a interaktivní systém (Berg et al., 2020).



Obrázek 1: Schéma složení mikrobiomu. Upraveno autorem na základě Berg et al. (2020).

Počátky studia mikrobiomu sahají do roku 1676, kdy Anthony van Leeuwenhoek pozoroval mikroorganismy ze stěru dutiny ústní. K pozorování použil mikroskop s jednou čočkou, který sám sestavil. Nalezené mikroorganismy obecně nazval „animalcules”, dnes víme, že se pravděpodobně jednalo o bakterie z rodu *Selenomonas*. Leeuwenhoek však nesdílel své mikroskopické metody, což vedlo k tomu, že se mikrobiologie začala znovu rozvíjet až o 200 let později (Sidebottom, 2023). V druhé polovině 19. století Robert Koch rozvinul koncept patogenity. To vedlo k vnímání mikroorganismů jako původců nemocí a k potřebě je eliminovat (Berg et al., 2020). Článek *Microbiology by Numbers* (2011) uvedl, že na planetě Zemi existuje zatím známých 1 400 druhů lidských patogenů. I když se toto číslo zdá jako vysoké, jedná se dokonce o méně než 1 % všech objevených mikrobiálních druhů na Zemi.

Na konci 19. století došlo k rozvoji mikrobiální ekologie. Výzkumy ukázaly, že mikroorganismy mohou mít i pozitivní účinky pro své hostitele. Následně bylo dokázáno, že mikroby žijí v různých společenstvech, kde jsou interakce a komunikace extrémně důležité k samotnému fungování systému (Berg et al., 2020).

2.1.1 Bakteriom

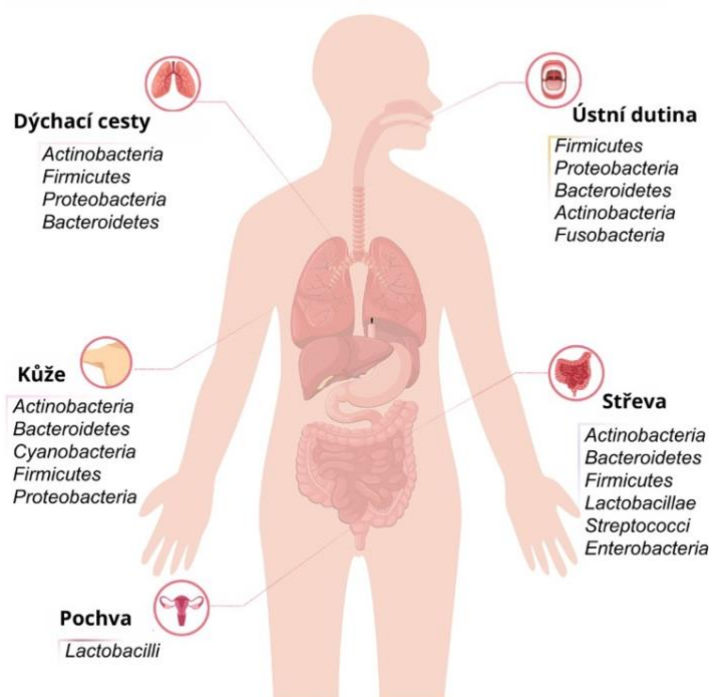
Součástí mikrobiomu jsou různé složky: mykobiom, virom, archaeon, bakteriom a Protozoa. Z nich je zatím nejvíce zkoumaný bakteriom, který je definován jako soubor všech bakterií vyskytujících se v určitém prostředí (Vemuri & Herath, 2023).

2.2 Lidský mikrobiom

Lidský mikrobiom zahrnuje veškerou mikrobiotu, která je přítomná na povrchu i uvnitř lidského těla. Mikrobiota dohromady čítá 10–1000 bilionů mikroorganismů, které mezi sebou různě interagují a během života se tento mikrobiom mění. Tyto mikroorganismy zastávají několik zásadních funkcí, například chrání člověka před vnějšími patogeny a regulují imunitní systém, podílejí se na metabolismu a syntéze živin (např. vitamíny a mastné kyseliny) nebo ovlivňují homeostázu (Turnbaugh et al., 2007; Thomas et al., 2017).

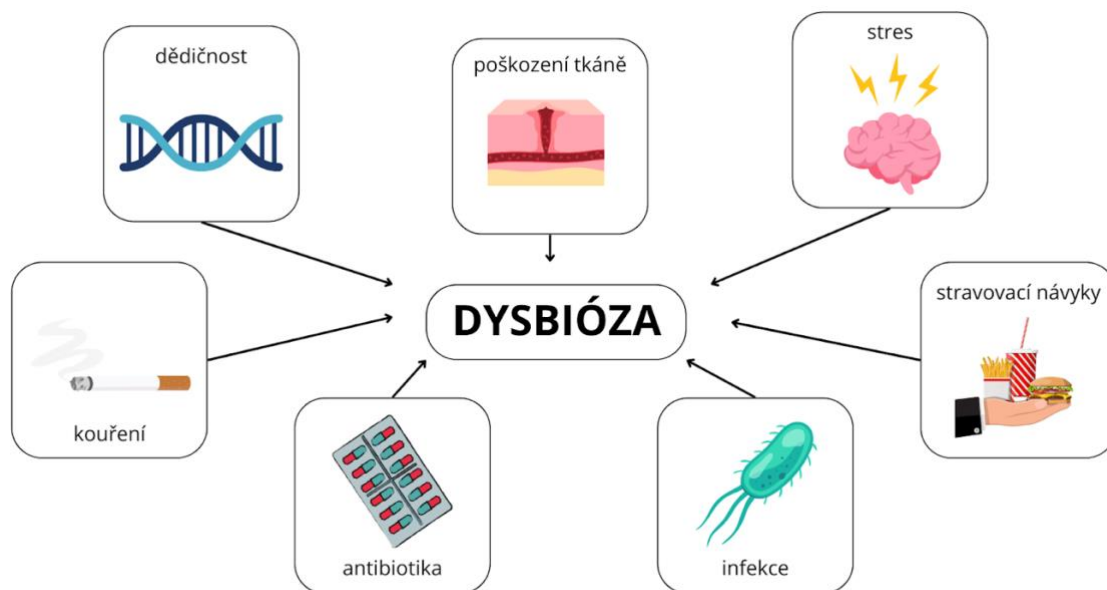
Říše Bakterie je hlavní a nejpočetnější složkou lidského mikrobiomu, mezi nejběžnější kmeny patří Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria a Proteobacteria (Khanna & Tosh, 2014). Bakterie dokonce převyšují počet lidských buněk – na každou lidskou buňku připadá přibližně 1,3 bakteriální buňky (Sender et al., 2016). Mikroorganismy ani bakterie však nejsou rozloženy rovnoměrně, například v 1 mililitru obsahu tlustého střeva se nachází přibližně 10^{11} mikrobiálních buněk, ale v tenkém střevě je to pouze 10^8 buněk na 1 mililitr (Walter & Ley, 2011).

Vědecké studie se primárně zaměřují na čtyři hlavní složky mikrobiomu: střevní, orální, vaginální a kožní. Za nejdiverznější je považován střevní a kožní mikrobiom, na druhou stranu orální a vaginální mikrobiom jsou relativně stálé, což je dáno jejich specifickým prostředím. Mikrobiom se velmi liší mezi jedinci, nejvýraznější rozdíly jsou pozorovány ve střevech (Li et al., 2012). Ve studii Eckburg et al. (2005) zjistili, že vzorky mezi různými osobami jsou diverznější než mezi různými lokalitami střeva jednoho člověka, a to i přes fakt, že plní stejnou funkci.



Obrázek 2: Dominantní bakteriální kmeny obývající jednotlivé části lidského těla (Hou et al., 2022). Přeloženo autorem.

Mikrobiální profil může být buď vyvážený a rozmanitý, nebo nevyvážený a dysbiotický. Dysbióza, tedy narušení mikrobiálního profilu, může vzniknout vlivem několika faktorů. Patří sem dědičnost, stravovací návyky, stres, kouření, užívání antibiotik, poškození tkáně a infekce. Tento stav je spojován s rozvojem a progresí mnoha onemocnění, včetně zánětlivých onemocnění střev, obezity, metabolických poruch i duševních chorob. I přes velké množství studií zabývajících se vlivem mikrobiální dysbiózy na konkrétní onemocnění, mechanismy těchto vztahů nejsou stále přesně pochopeny (Levy et al., 2017; Mousa et al., 2022; Yadav & Chauhan, 2022).

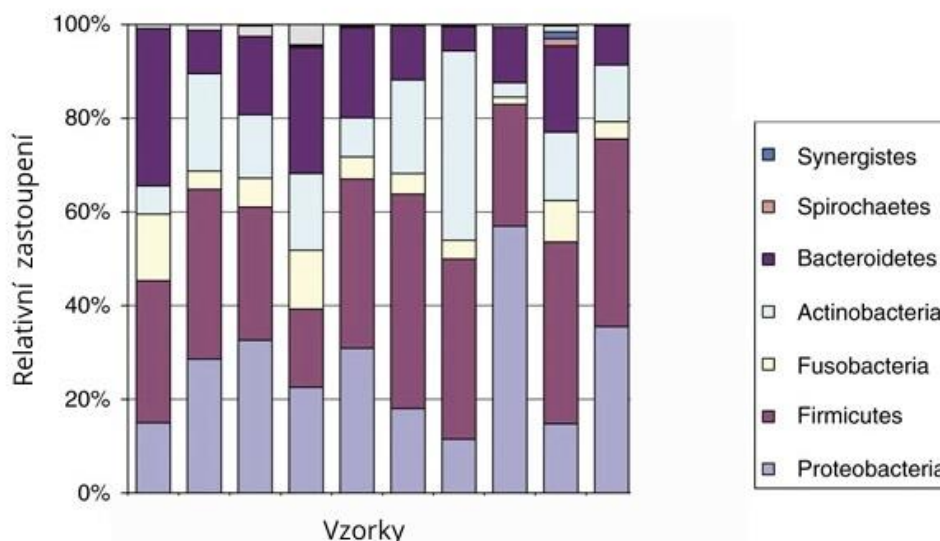


Obrázek 3: Faktory podněcující mikrobiální dysbiózu. Vytvořeno autorem dle Huang et al. (2023).

2.2.1 Orální mikrobiom

Ústní dutina, jako hlavní vstupní brána do lidského těla, hostí velmi diverzní mikroflóru. Tato diverzita je zajištěna různými mikrobiálními biotopy, jako jsou zuby, bukalní sliznice, jazyk, měkké a tvrdé patro (Kilian, 2018).

Hlavními zástupci orálního mikrobiomu jsou bakterie, a to z kmenů Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes a Fusobacteria (Dewhirst et al., 2010). Mezi dominantní rody patří *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Veillonella* a *Rothia* (Bik et al., 2010). Jednotlivá místa v ústní dutině se vyznačují různými strukturami a funkcemi, a proto i specifickými druhy bakterií. Například *Streptococcus sanguinis* a *Streptococcus australis* se nevyskytují na zubech, ale preferují měkké tkáně. *Streptococcus intermedius* je součástí zubního plaku. Druhy *Streptococcus mitis* a *Granulicatella adiacens* se vyskytují ve všech orálních lokalitách (Aas et al., 2005).



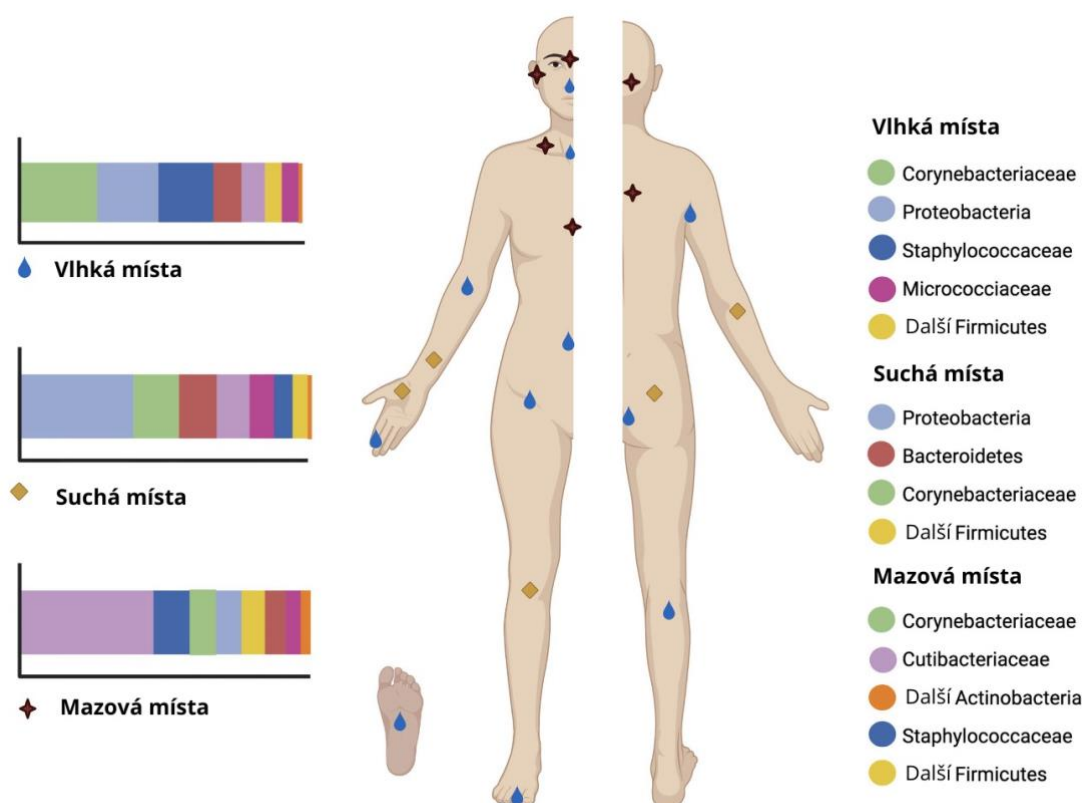
Obrázek 4: Relativní zastoupení bakteriálních kmenů v dutině ústní u 10 zdravých jedinců (Bik et al., 2010). Upraveno autorem.

Při dysbióze orální mikroflóry dochází ke vzniku několika onemocnění. *Streptococcus mutans*, spolu s bakteriemi z rodu *Lactobacillus* hraje klíčovou roli při vzniku zubního kazu (Gross et al., 2010). Zánět dásní může přejít do chronické formy – parodontitidy, kterou způsobují *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* a *Treponema denticola* (Popova et al., 2014). Halitóza neboli páchnoucí dech, která je často spojována se zmíněnými onemocněními, je důsledkem přemnožení bakterií *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella spp.* a *Solobacterium moorei* (Haraszthy et al., 2007).

2.2.2 Kožní mikrobiom

Kůže, největší orgán lidského těla, představuje díky své neustálé expozici vnějšímu prostředí a různým funkcím, extrémně heterogenní povrch. Jeho hlavní funkcí je ochrana před externím vlivy a regulace imunity (Gallo, 2017).

Po narození dochází ke kolonizaci kůže mikrobiotou, která následně hraje zásadní roli při vývoji imunitní tolerance (Dominiguez-Bello et al., 2010). Kůže se skládá z různých prostředí se specifickými podmínkami, proto ji obývají i různé druhy, a to převážně bakterií (viz obrázek 5). Celkově se na kůži vyskytují převážně grampozitivní bakterie, zejména z rodů *Staphylococcus*, *Cutibacterium* (také známé jako *Propionibacterium*), *Corynebacterium* (Scharschmidt & Fischbach, 2013).



Obrázek 5: Rozložení bakteriálních kmenů na různých prostředích kůže (Carmona-Cruz et al., 2022). Přeloženo autorem.

Jedním z nejhojnějších druhů kožního mikrobiomu je oportunní bakterie *Staphylococcus epidermidis*. Ta může způsobovat infekce, ale také dokáže inhibovat růst patogenních bakterií, jako *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* způsobuje např. atopickou dermatitidu a infekce. Některé kmeny této bakterie vykazují rezistenci vůči mnoha antibiotikům. Bakterie *Propionibacterium acnes* je spojována s rozvojem akné (Sfriso et al., 2019).

2.3 Opakovaně použitelné lahve

„Reusable water bottles” v moderní společnosti nabývají stále větší oblibu. Tento trend je výsledkem zvyšujícího se povědomí o globálních ekologických výzvách a s tím spojenou snahou spotřebitelů žít udržitelně.

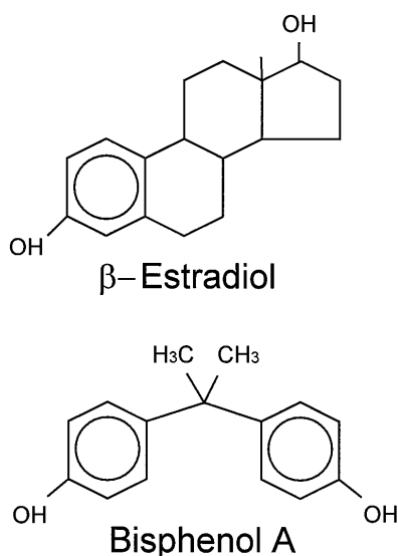
Jedním z hlavních ekologických problémů je skutečnost, že většina plastových obalů slouží pouze k jednorázovému použití. Polyethylentereftalát (PET) je nejpoužívanější jednorázové plastové balení na světě a taky recyklovatelný materiál, avšak má své limity. Při každém recyklačním cyklu dochází k degradaci materiálu a narušení jeho polymerní struktury. Navíc je recyklace plastových lahví často komplikována přítomností aditiv nebo kontaminantů (Al-Sabbagh et al., 2016; Pivnenko & Astrup, 2016).

Dalším problémem je, že k samotné recyklaci se nedostanou všechny lahve. Podle výzkumu Ministerstva životního prostředí (2024) se v České republice recykluje pouze 58,9 % PET lahví. To odpovídá každé druhé lahvi, zbytek lahví končí na skládkách nebo v přírodě, kde se vlivem exogenních faktorů, jako např. sluneční záření, velice pomalu rozpadají na malé fragmenty – mikroplasty. Tyto částice následně pronikají do ekosystémů, kde představují riziko pro životní prostředí i zdraví člověka (Haque & Fan, 2023).

Hlavní ekologickou výhodou opakovaně použitelných lahví je snížení odpadu. Například průměrný Američan spotřebuje měsíčně přibližně 13 jednorázových lahví, což odpovídá roční spotřebě 156 lahví na osobu. Narozdíl od jednorázových PET lahví, které mají krátkou životnost a jsou po využití vyhozeny a nahrazeny novými, používáním „reusable water bottles“, by Spojené státy americké mohly svoji spotřebu snížit o 50 miliard plastových lahví ročně (Earth Day Network, 2022).

Dlouhodobé vlastnictví jedné lahve je také ekonomicky výhodné. Pokud by si zmíněný průměrný Američan koupil kvalitní láhev z nerezové oceli za 30 \$, jeho investice by se mu vrátila už druhý měsíc. Od té chvíle by šetřil každým napuštěním láhve (Ruiz, 2024).

Polykarbonátové lahve obsahují bisfenol A (BPA), který se uvolňuje při vysokých teplotách nebo za účasti kyselých a zásaditých látek, kdy dochází k hydrolýze esterové vazby mezi BPA monomery. BPA je klasifikován jako xenoestrogen, což je chemická látka s podobnou strukturou jako estrogen. Proto se může vázat na estrogenní receptory a tím estrogen napodobovat nebo blokovat. BPA tak působí jako endokrinní disruptor a narušuje hormonální rovnováhu. BPA byl nahrazen jinými bisfenoly, které však vykazují podobné účinky, z toho důvodu se začalo apelovat na výrobu lahví bez bisfenolů, označovaných jako BPA-free (Richter et al., 2007; Cao & Corriveau, 2008; Rochester & Bolden, 2015)



Obrázek 6: Podobnost chemické struktury BPA a běžné formy estrogenu – Estradiol. Tyto látky sdílí benzenová jádra a hydroxylové skupiny, díky kterým BPA ovlivňuje endokrinní systém. Zdroj: Steinmetz et al., 1997

Mikroplasty, definované jako plastové částice menší než 5 mm, se mohou uvolňovat z plastových lahví vlivem vysokých teplot nebo mechanickým opotřebením. Po vniknutí do lidského těla mohou vyvolávat zánětlivé reakce, oxidační stres nebo přenášet toxické látky, které mohou narušovat hormonální rovnováhu (NOAA, 2024; Winiarska et al., 2024).

2.3.1 Materiály opakovaně použitelných lahví

Materiál opakovaně použitelných lahví hraje klíčovou roli při jejich výběru díky jejich specifickým vlastnostem. Mezi nejčastěji používané materiály se řadí plast, kov a sklo, přičemž každý z nich má své výhody a nevýhody.

Plastové lahve jsou oblíbené díky své nízké hmotnosti, odolnosti, cenové dostupnosti a rozmanitosti designu. V posledních letech se stává populárním Tritan[™], BPA-free kopolyester, který je považován za bezpečnější alternativu polykarbonátů. Kovové lahve, většinou vyrobené z nerezové oceli nebo hliníku, vynikají termoizolačními vlastnostmi. Jejich nevýhodou je vyšší cena nebo v některých případech nevyhovující kovová pachut'. Skleněné lahve jsou křehké a těžké, ale zdravotně nejméně závadné a chuťově neutrální.

2.3.2 Mikrobiom opakovaně použitelných lahví

Opakovaně použitelné lahve se staly běžnou součástí každodenního života, ale zároveň představují ideální prostředí pro život a růst mikroorganismů. Tyto mikroorganismy mohou potenciálně představovat riziko pro lidské zdraví. Například z opakovaně použitelné lahve byla izolována bakterie *Klebsiella grimonti*, která vykazuje rezistenci vůči několika antibiotikům a je schopna tvořit biofilm. Kontaminace vzniká přímým kontaktem lahve s ústy, rukama, kohoutkovou vodou či okolním prostředím. Navíc nápoje v lahvích nabízejí vlhké prostředí a jsou obvykle skladovány při pokojové teplotě, což podporuje růst bakterií a dalších mikroorganismů (Hubbard et al., 2020).

Mezi mikrobiotu obývající tyto lahve, patří převážně bakterie a houby. Wakui et al. (2021) zkoumali pomocí kultivační a metagenomické analýzy bakteriální složení na povrchu PET lahví s čajem u zdravých lidí ve věku 19–23 let. Stěry z hrdla lahve byly odebrány ihned po vypití čaje a po 24 hodinách. Dominantním rodem bakterií byl *Streptococcus*, což dokazuje, že bakterie z úst mohou být snadno přeneseny na hrdlo lahve a v lahvi přetrvávat delší dobu. Dále byly nalezeny *Actinomyces*, *Veillonella*, *Cutibacterium*, *Prevotella*, *Schaalia*, *Gemella*, *Rothia* a *Neisseria*.

Další zdroj kontaminace představuje kohoutková voda, jejíž kvalita je v mnoha zemích striktně regulována. Sledované oportunní bakterie zahrnují koliformní druhy, jako jsou *Escherichia coli* a *Salmonella*. Další sledované bakterie jsou například *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* a *Vibrio cholera* (Chaidez et al., 2008).

2.4 Čištění lahví

Pravidelné a důkladné čištění opakovaně použitelných lahví je zásadní pro prevenci mikrobiální kontaminace, která může vést k různým zdravotním rizikům. K nárůstu mikroorganismů v lahvi dochází již během prvních 24 hodin, kdy se počet CFU z desítek tisíc může zvýšit na 1–2 miliony CFU/ml (Liu & Liu, 2017). Přestože si většina uživatelů uvědomuje význam hygieny lahví, jejich čištění bývá často nedostatečné. Ve studii Amadi et al. (2020) analyzovali návyky uživatelů lahví. Zjistili, že pouze polovina uživatelů si čistí svoji láhev denně, 33 % uživatelů jednou za měsíc a dokonce 6 % uživatelů si láhev nečistí nikdy. Nejběžnější způsob umývání lahve bylo použití čistícího prostředku a vody (65 %), dále vypláchnutí teplou vodou (24 %) a pouze 4 % uživatelů si svoji láhev i dezinfikovalo.

Slazené nápoje významně podporují růst mikroorganismů, jelikož nabízejí ideální pH a cukry jako zdroj energie. Tyto nápoje dále napomáhají tvorbě biofilmu na vnitřním povrchu. Biofilm představuje soubor mikroorganismů obklopených polymerními strukturami, které vytváří. Tím významně zvyšují svoji odolnost vůči běžným mycím prostředkům, dezinfekci a antibiotikům. Odhaduje se, že 65 % bakteriálních infekcí je spojeno s biofilmy. Kolonizaci také usnadňují porézní povrchy (u plastových lahví), kde se mikroorganismy lépe usazují (Jamal et al., 2015; Sun et al., 2017; Wakui et al., 2021).

Konstrukce a materiál lahví často komplikují samotné čištění. Některé plastové a hliníkové lahve nebývají vhodné pro mytí v myčce, což je jeden z efektivnějších způsobů čištění. Neprůhledné lahve, úzká hrdla či jiné tvary, ztěžují vizuální kontrolu i odstranění nečistot na nedostupných místech. K tomu se také přidává fakt, že lahve s integrovanými brčky vyžadují ještě kvalitnější a specifitější údržbu (Sun et al., 2017).

2.4.1 Vliv čištění na mikrobiom

Nepravidelná a nedostatečná údržba lahví podporuje růst mikrobiální populace v lahvi. Ve studii Hariharan & Sankar (2024) bylo zjištěno, že PET lahve jsou signifikantně více kontaminované mikroorganismy než lahve z nerezové oceli, ale i tak by všechny lahve měly být čištěny pravidelně bez ohledu na materiál. Na základě doporučení uvedených v článku na Delish (2020) je láhev potřeba denně umýt vodou a čistícím prostředkem, jednou týdně je nezbytné provést důkladnější čištění, například použitím myčky nebo dezinfekčního prostředku. K odstranění biofilmu může také sloužit kartáč na lahve. Po každém umytí je důležité lahev nechat vysušit, aby se minimalizoval mikrobiální růst.

3 CÍLE

Mikrobiom opakovaně použitelných lahví je stále nedostatečně prozkoumán, přestože popularita těchto lahví roste. Studie, které se touto problematikou zabývají, využívají primárně kultivační metody a vzorky odebírají z obsahu lahve. Přitom právě hrdlo je hlavním místem přímého kontaktu lahve s uživatelem a vnějším prostředím. Vzhledem k nedostatečným čistícím návykům uživatelů těchto lahví a potenciálnímu riziku onemocnění, je potřeba se zabývat tímto tématem více.

Práce si proto klade za cíle:

- Zanalyzovat mikrobiom osidlující hrdla a pítka opakovaně použitelných lahví.
- Detekovat a uvést případné oportunní patogeny.
- Prozkoumat vliv materiálu a konstrukce lahve na složení mikrobiomu.
- Prozkoumat vliv intenzity čištění na složení mikrobiomu.

4 METODY

4.1 Odběr vzorku

Pro sekvenační analýzu byly vybrány lahve studentů Gymnázia Brno-Řečkovice ve věku 14–18 let. Stěry lahví proběhly v budově školy.

K izolaci DNA ze vzorků byla použita sada QIAGEN DNeasy UltraClean Microbial Kit (QIAGEN, Německo). Vzorek byl odebrán sterilní výtěrovou tyčinkou z míst, kde dochází ke kontaktu lahve se rty (hrdlo, pítko) a z vnitřní části víčka. Následně byla tyčinka zalomena do 2ml mikrozkušavky, která byla naplněna lyzačním pufrem, tedy směsí 420 μ l PowerBead roztoku a 70 μ l SL roztoku. Vzorky byly dále skladovány při pokojové teplotě v tmavé místnosti a následně při 4°C.

Dobrovolníci obdrželi unikátní kód své lahve a vyplnili dotazník shrnující informace o jejich lahvi. Dotazníkové šetření (příloha A) bylo částečně inspirováno výzkumem *"The Cleanliness of Reusable Water Bottles: How Contamination Levels are Affected by Bottle Usage and Cleaning Behaviors of Bottle Owners"* (Sun et al., 2017).

4.2 Izolace DNA

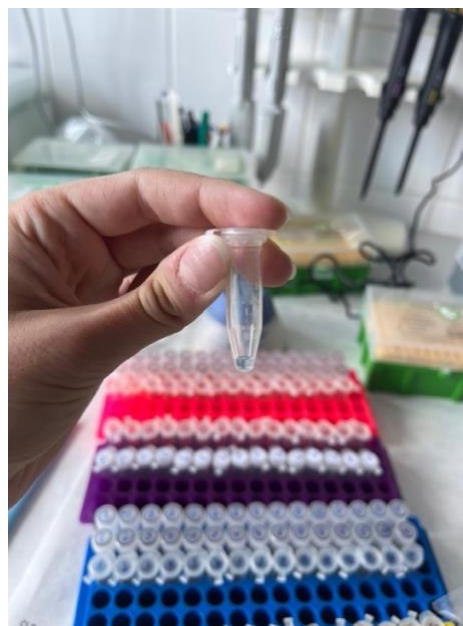
Izolace proběhla podle protokolu DNeasy UltraClean Microbial Kit Handbook (QIAGEN, 2020).

Vzorek byl zvortexován 30 sekund a poté byl centrifugován na 10 000 g po dobu 30 sekund. Z mikrozkušavky bylo odebráno 350 μ l vzorku a přeneseno do homogenizační zkumavky. Proběhla inkubace při 55 °C po dobu 5 minut a poté byl vzorek horizontálně vortexován na maximální rychlost po dobu 10 minut. Vzorek byl stočen po dobu 30 sekund, 300–350 μ l supernatantu bylo přeneseno do 2ml zkumavky naplněné 100 μ l IRS roztoku a krátce zvortexováno. Proběhla další inkubace při 4 °C po dobu 5 minut. Vzorek byl stočen 1 minutu.

Očekávaných 450 μ l supernatantu bylo opatrně přeneseno tak, aby se pipeta vyhnula peletu, do nové 2ml zkumavky, kam pak bylo přidáno 900 μ l roztoku SB.



Obrázek 7: Zkumavka obsahující supernatant (DNA a kontaminanty), pelet (buněčný odpad, proteiny, ...) a zbytky homogenizační směsi (skleněné perličky). Foto: Autor, 2024



Obrázek 8: Vyizolovaná DNA. Foto: Autor, 2024

Vzorek byl stočen na 30 sekund. Do MB kolonky bylo napipetováno 700 μ l směsi a znovu stočeno na 30 sekund. Kapalina ze sběrné zkumavky byla vylita. Tento krok byl jednou zopakován a poté bylo na kolonku přidáno 300 μ l CB roztoku. Vzorek byl krátce stočen. Kapalina ze sběrné zkumavky byla vylita a kolonka byla stočena na 1 minutu. Kolonka byla přenesena do nové sběrné zkumavky a na kolonku bylo napipetováno 50 μ l EB roztoku doprostřed bílého filtru membrány. Vzorek byl stočen a kolonka byla následně vyhozena a DNA byla skladována při -20 °C.

4.3 Příprava knihovny

4.3.1 Amplifikace

Pro analýzu mikrobiomu lahví byla vybrána hypervariabilní oblast V4 genu 16S rRNA. K amplifikaci byly použity modifikované primery 515F-V a 806RB dle Pichler et al. (2018). Vzorky byly pipetovány do 96 jamkové PCR destičky, nejprve bylo přidáno do každé jamky 10 μ l polymerázy Platinum™ II Hot-Start PCR (Thermo Fisher Scientific, USA) a 9 μ l DEPC H₂O. Dále bylo přidáno 2 μ l FW primeru a 2 μ l REV primeru, primery byly přidány tak, aby tvořily unikátní kombinace. Následně bylo napipetováno do každé jamky 2 μ l vzorku DNA.

Mikrotitrační destička byla vložena do přístroje Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) a byl zahájen program popsáný v tabulce 2.

Tabulka 1: Schéma reakční směsi pro PCR.

Master mix	1 vzorek
Polymeráza Platinum™ II Hot-Start PCR 2x	10,0 µl
FW primer 2,5 µM	2,0 µl
REV primer 2,5 µM	2,0 µl
DEPC-H ₂ O	9,0 µl
Vzorek DNA	2,0 µl

Tabulka 2: Teplotní program termocykleru Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) pro amplifikaci V4 oblasti genu 16S rRNA.

Program cyklu	Teplota	Čas	Opakování
Iniciální denaturace	95 °C	3 min	1
Denaturace	95 °C	45 s	35
Annealing (ramp rate 60%)	52 °C	60 s	
Extenze	72 °C	90 s	
Finální extenze	72 °C	5 min	1
	12 °C	Hold	

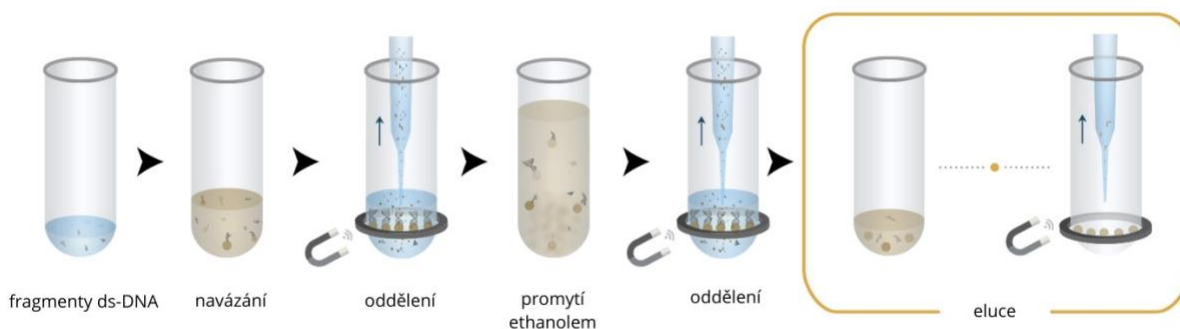


Obrázek 9: Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA). Foto: Autor, 2024

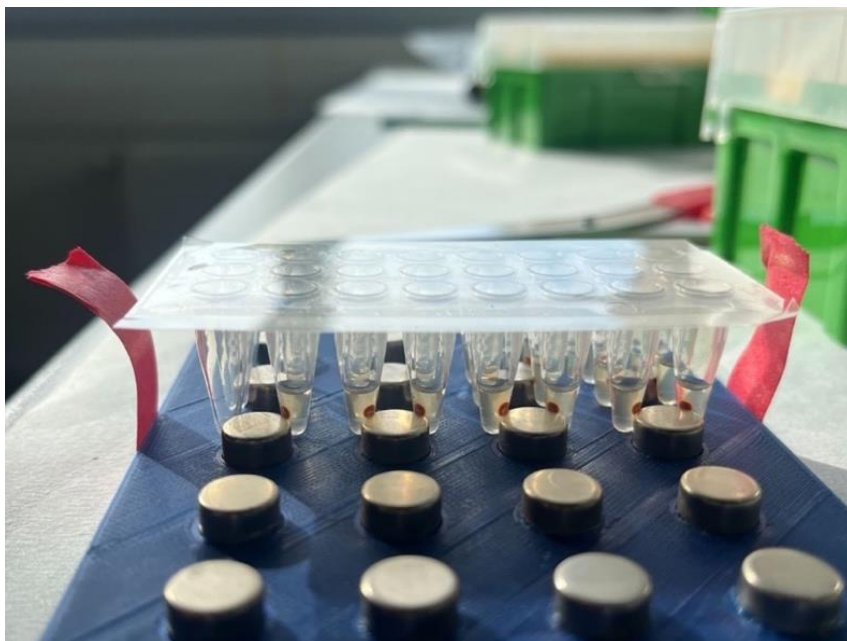
4.3.2 Purifikace

Po amplifikaci bylo nutné přechistit naamplifikované fragmenty s délkou kolem 400 párů bází. Z tohoto důvodu byly použity magnetické kuličky AMPure XP Beads (Beckman Coulter, USA). Purifikace proběhla podle protokolu AMPure XP PCR Purification Protocol (Beckman Coulter, 2016).

Magnetické kuličky byly přivedeny na pokojovou teplotu a poté zvortexovány po dobu 60 sekund. K 25 μ l produktu PCR reakce bylo přidáno 20 μ l Ampure XP Beads, směs byla krátce zvortexována a následně inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Destička byla položena na magnetický stojánek po dobu 2 minut a následně byl opatrně odebrán supernatant. Do jamek bylo přidáno 200 μ l čerstvého ethanolu (80%) a po 30 sekundách byl supernatant odstraněn. Tento krok byl opakován, a nakonec byly kuličky ponechány oschnout po dobu cca 2 minut, bylo důležité nenechat pelet vyschnout úplně. Destička byla přemístěna z magnetického stojánku a do jamek bylo přidáno 26,5 μ l elučního pufru. Vzorky byly zvortexovány a inkubovány po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Destička byla znovu přenesena na magnety, kde byl supernatant po 2 minutách s přečištěnou DNA odebrán a přenesen do nové 96 jamkové PCR destičky.



Obrázek 10: Grafické znázornění použití magnetických kuliček AMPure XP Beads (Beckman Coulter, USA). Přeloženo autorem.



Obrázek 11: Přechištění DNA pomocí magnetické destičky a magnetických kuliček AMPure XP Beads (Beckman Coulter, USA). Dlouhé fragmenty DNA se navážou na magnetické kuličky díky iontovým interakcím mezi negativně nabitými fosfátovými skupinami DNA a kladně nabitými skupinami na povrchu kuliček v přítomnosti roztoku polyethylenglykolu a solí. Následně jsou zmagnetizovány pomocí destičky. Krátké fragmenty zůstanou v roztoku a jsou odstraněny spolu s roztokem. Foto: Autor, 2024

4.3.3 Fluorescenční měření koncentrace vzorků

Koncentrace jednotlivých vzorků byla měřena pomocí sady QuantiFluor® dsDNA (Promega, USA) podle protokolu výrobce na přístroji LightCycler 480 II (Roche, Švýcarsko). Nejprve bylo připraveno 60 μ l master mixu, 400x QF Dye bylo smícháno s 20x TE pufrem v poměru 1:400. Následovalo krátké vortexování a pipetování do jamek, poté bylo přidáno 2 μ l vzorku. V dalším kroku byla připravena kalibrační křivka z DNA standardů.



Obrázek 12: LightCycler 480 II (Roche, Švýcarsko). Foto: Autor, 2024

Vzorky byly následně naředěny na domluvenou koncentraci 4 ng/μl.

4.3.4 Pooling

Naředěné vzorky byly smíchány dohromady do poolů po skupinách A–G, každého vzorku bylo použito 4 μl. Koncentrace jednotlivých poolů byly překontrolovány na přístroji Qubit 4 (Thermo Scientific, USA) pomocí sady QuantiFluor dsDNA System (Promega, USA).

4.3.5 Kontrola délky fragmentů

Očekávaná délka fragmentů DNA byla kolem 400 bp, fragmenty byly kontrolovány na přístroji 5200 Fragment Analyzer (Agilent, USA) pomocí kapilární elektroforézy. K ověření byla použita sada High Sensitivity NGS Analysis Kit (Agilent, USA) pro 1bp–6000bp a měření bylo provedeno podle protokolu výrobce (Agilent Technologies, 2020). Poté byla vypočítána molární koncentrace vzorků.



Obrázek 13: 5200 Fragment Analyzer (Agilent, USA). Foto: Autor, 2025

4.4 Sekvenace

Ověřené pooly byly smíchány a poté sekvenovány na přístroji MiniSeq (Illumina, USA) podle protokolu výrobce (Illumina, 2018).

V prvním kroku byl připraven 0,1N roztok NaOH. Sekvenační primery (příloha B) byly zředěny na koncentraci 50 μM a denaturovány při teplotě 95 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 minut, poté byly přeneseny do ledové lázně. V dalším kroku byla knihovna zředěna na koncentraci 1 nM pomocí RSB pufru. Do nové zkumavky bylo přidáno 5 μl zředěné knihovny a 5 μl nachystaného 0,1N roztoku NaOH. Proběhlo krátké vortexování a stočení. Knihovna byla denaturována při pokojové teplotě po dobu 5 minut. NaOH bylo v dalším kroku zneutralizováno 5 μl 200 μM Tris-HCl. Směs byla krátce vortexována a stočena. Do zkumavky bylo napipetováno 985 μl chlazeného hybridizačního pufru, výsledný objem byl 1 ml a stávající koncentrace 5 pM. Směs byla opět rychle vortexována a centrifugována. Následovalo přenesení 140 μl zředěné knihovny do nové zkumavky, bylo přidáno 360 μl chlazeného hybridizačního pufru a nakonec byla směs krátce zvortexována a stočena. Po přidání pufru byla výsledná koncentrace knihovny 1,4 pM.

Byl připraven 4 nM roztok fága PhiX. 5 μl fága bylo smícháno s 5 μl 0,1N NaOH, proběhlo rychlé vortexování a spin. Směs byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Následně bylo přidáno 5 μl 200 μM Tris-HCl a směs byla opět krátce vortexována a stočena. Do nové zkumavky bylo napipetováno 35 μl zředěné fágové knihovny a bylo přidáno 465 μl chlazeného hybridizačního pufru. Výsledná koncentrace PhiX kontroly byla 1,4 pM.

Bylo smícháno 425 μl knihovny s 75 μl kontroly PhiX, tedy výsledná knihovna připravená pro sekvenaci obsahovala 15 % PhiX. Knihovna a primery byly napipetovány do sekvenační kazety. V posledním kroku byl sestaven SampleSheet s primery a názvy vzorků, následně byla spuštěna sekvenace.



Obrázek 14: Sekvenační kazeta (Illumina, USA). Foto: Autor, 2024



Obrázek 15: MiniSeq (Illumina, USA). Foto: Autor, 2024

4.4.1 Analýza dat

Sekvenační data byla zpracována pomocí softwarového balíčku DADA2. Vizualizace výsledků byla vytvořena v grafickém prostředí RStudio a programu Excel. Bioinformatické zpracování provedl Mgr. David Novák z laboratoře Molekulární patologie (Ústav Biochemie, PřF MU).

4.5 Kultivace

Bylo vybráno 6 lahví od dobrovolníků, kteří se účastnili předešlé sekvenační analýzy. Sťěr byl odebrán z hrdla (pítka) lahve a z vnitřní části víčka, tyčinka byla následně zalomena do zkumavky s 1 ml fyziologického roztoku (0,9% roztok NaCl).

Pro kultivaci mikroorganismů bylo zvoleno neselektivní kultivační médium Tryptone Yeast Extract Agar (TYEA), které se používá při mikrobiologických rozbořech pitné vody. V 1000ml nádobě bylo smícháno 6 g tryptonu, 3 g kvasničného extraktu a 12 g agarů, směs byla doplněna H₂O na 700 ml. Směs byla míchána magnetickým míchadlem, dále bylo zkontrolováno pH roztoku a dorovnáno pomocí 1M NaOH na pH 7,1. Roztok byl doplněn H₂O, aby se výsledný objem rovnal 800 ml. Poté byla směs autoklávována 15 minut při 121 °C. Po sterilizaci bylo médium nalito do sterilních Petriho misek po zhruba 15 ml. Kultivační média byla ponechána ztuhnout při pokojové teplotě ve sterilním boxu.

Vzorky byly vortexovány, 100 µl vzorku bylo napipetováno na ztuhlé médium a rozetřeno pomocí L-kličky po celé ploše. Jeden vzorek o původní koncentraci byl nanesen na 4 misky.

Vzorek byl poté 10x zředěn fyziologickým roztokem a nanesen po 100 μ l na 4 misky. Byly připraveny 3 kontrolní misky, na které bylo rozetřeno pouze 100 μ l fyziologického roztoku.

Nachystané misky byly vloženy do inkubátoru na 66 hodin. Pro psychrofilní mikroorganismy byla zvolena teplota 24 °C a pro mezofilní 36 °C. Pro každou teplotu byly připraveny 2 misky pro původní koncentraci a 2 misky pro 10x zředěný vzorek. Celkem bylo pro jednu láhev připraveno 8 misek.



Obrázek 16: Autokláv. Foto: Autor, 2024



Obrázek 17: Inkubátor (36 °C) s Petriho miskami se vzorky. Foto: Autor, 2024

4.5.1 MALDI-TOF

Bylo vybráno 16 různých kolonií z Petriho misek se vzorky z lahví. Tyto kolonie byly pomocí špičky pipety nanесeny a rozetřeny na médium TYEA. Nachystané misky byly inkubovány po dobu 116 hodin při teplotě 24°C.

Z každého vzorku byly kličkou odebrány 2 kolonie, poté byly přeneseny do 2ml zkumavky s 1 ml ethanolu (75%). Zkumavky byly vortexovány 5 sekund a následně centrifugovány na 10 000 g po dobu 5 minut. Nakonec byl odebrán supernatant a inaktivované pelety byly ponechány při teplotě 4 °C.

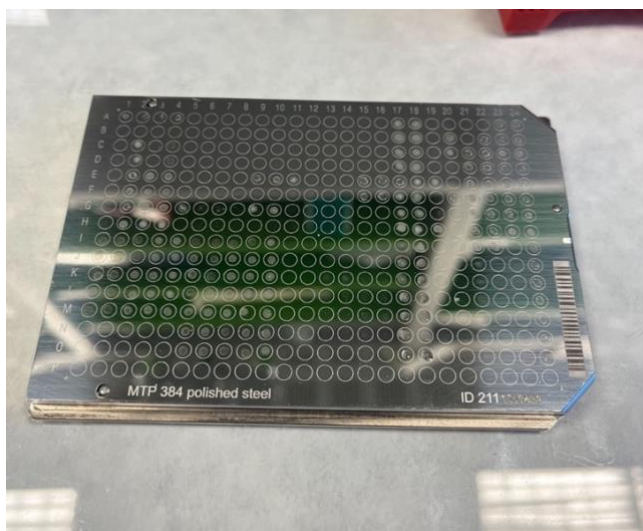


Obrázek 18: Kultivace vybraných kolonií ze vzorků píteč lahví. Foto: Autor, 2025



Obrázek 19: Zkumavka s peletem po odpipetování supernatantu. Foto: Autor, 2025

Do každé zkumavky bylo přidáno 50 μ l kyseliny mravenčí (70%) a 50 μ l acetonitrilu. Zkumavky byly zvortexovány a následně centrifugovány po dobu 90 sekund na 10 000 g. Těmito kroky byly extrahovány proteiny z peletů do supernatantu. Od každého vzorku bylo napipetováno 0,6 μ l supernatantu, který byl poté nanesen na pozici ocelové vzorkovací desky. Pro každý vzorek byly extrakty naneseny na dvě pozice a po zaschnutí byly převrstveny 0,6 μ l nasyceným roztokem kyseliny alfa-kyano-4-hydroxyskořicové ve směsi acetonitril:voda:kyselina trifluoroctová v poměru 50:47,5:2,5 (v/v).



Obrázek 20: Ocelová vzorkovací deska pro MALDI analýzu. Foto: Autor, 2025

Vzorky byly analyzovány na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Ultraflex extreme (Bruker Daltonics, Německo) v lineárním pozitivním režimu detekce. Pro každý vzorek bylo získáno 6 akumulací (z každé pozice 3) hmotnostních spekter po 1000 laserových pulzech. V konečném vyhodnocení byly ponechány pouze signály, které byly zaznamenány minimálně v 5 akumulacích každého vzorku. Získané signály byly identifikovány pomocí databáze MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) Mgr. Ondřejem Šedo, Ph.D. z Centrální laboratoře Proteomiky (CEITEC, MU).



Obrázek 21: MALDI-TOF hmotnostní spektrometr Ultraflex extreme (Bruker Daltonics, Německo). Foto: Autor, 2025

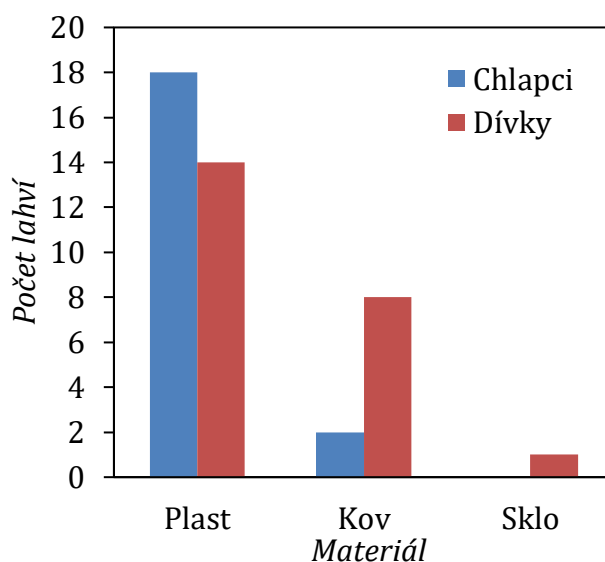
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Opakovaně použitelné lahve jsou každodenním společníkem čím dál většího množství lidí. Díky přímému kontaktu s ústní dutinou a okolním prostředím jsou lahve bohatě osídleny různými mikroorganismy, a to převážně bakteriemi. Vzhledem k běžnému nedostatečnému čištění se tyto lahve stávají potenciálním rizikem pro lidské zdraví.

5.1 Dotazníkové šetření

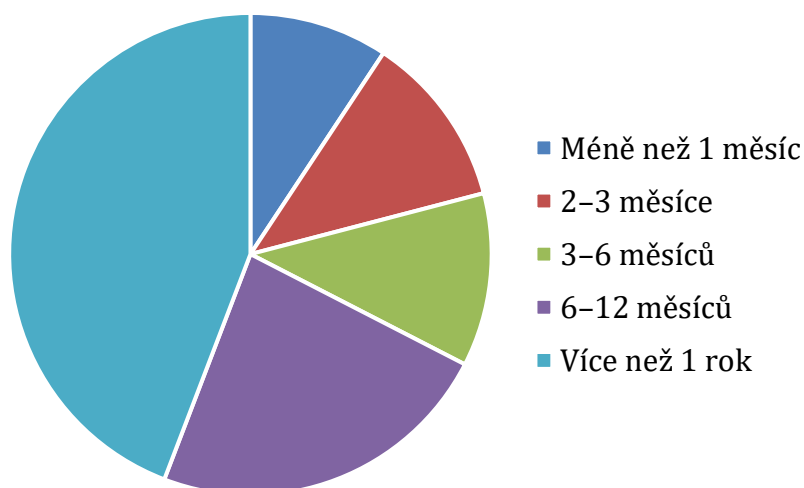
Data byla získána prostřednictvím dotazníku (příloha A) od všech dobrovolníků. Výzkumu se celkem zúčastnilo 20 chlapců a 21 dívek ve věku 14–18 let z Gymnázia Brno-Řečkovice.

Nejpopulárnějším materiálem lahve mezi respondenty byl bezpochyby plast. Z celkového počtu 43 lahví bylo 32 plastových, z toho 10 lahví bylo vyrobeno z tritanu. Dominující počet plastových lahví nejspíše souvisel s vlastnostmi těchto lahví, jako je nízká váha, cenová dostupnost a široký výběr designu. Celkem 7 lahví disponovalo alternativními pítky. 10 lahví bylo kovových, z toho 8 lahví bylo vyrobeno z nerezové oceli a 2 z hliníku. Tento materiál byl rozšířenější mezi dívkami, což mohlo být způsobeno vyšším povědomím o zdravotních aspektech a ekologii, nebo praktickými vlastnostmi lahví jako např. tepelná izolace. Výzkumu se zúčastnila pouze 1 skleněná láhev, z čehož vyplývá, že tyto lahve nejsou mezi studenty rozšířené.



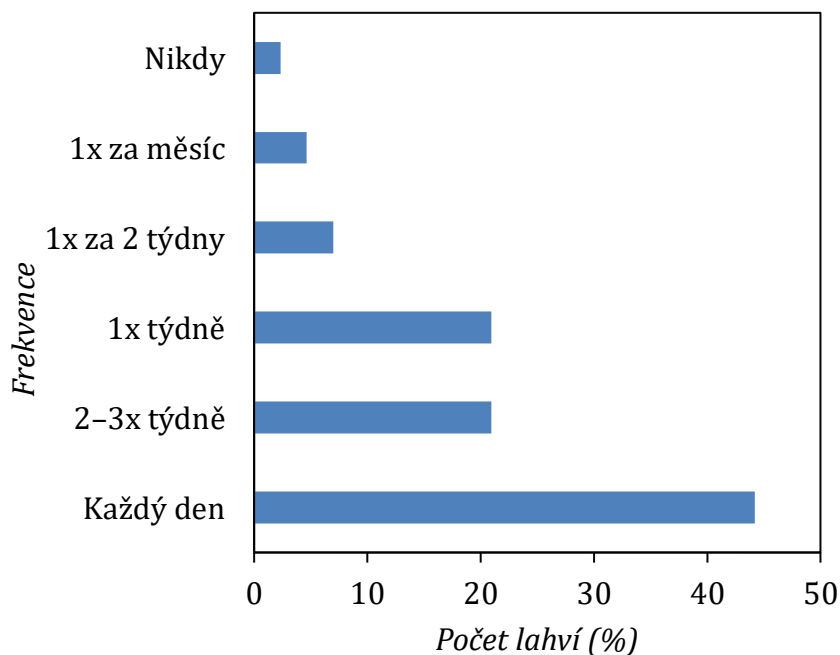
Obrázek 22: Srovnání preference materiálů zkoumaných lahví mezi chlapci a dívkami.

Dalším zkoumaným parametrem bylo stáří lahve, tedy jak dlouho byly lahve používány. Z grafu uvedeného na obrázku 22 vyplývá, že necelá polovina lahví byla dobrovolníky využívána více než 1 rok. Tento fakt svědčí o dlouhé životnosti těchto lahví a také o spokojenosti uživatelů, kteří nemají potřebu je často nahrazovat.

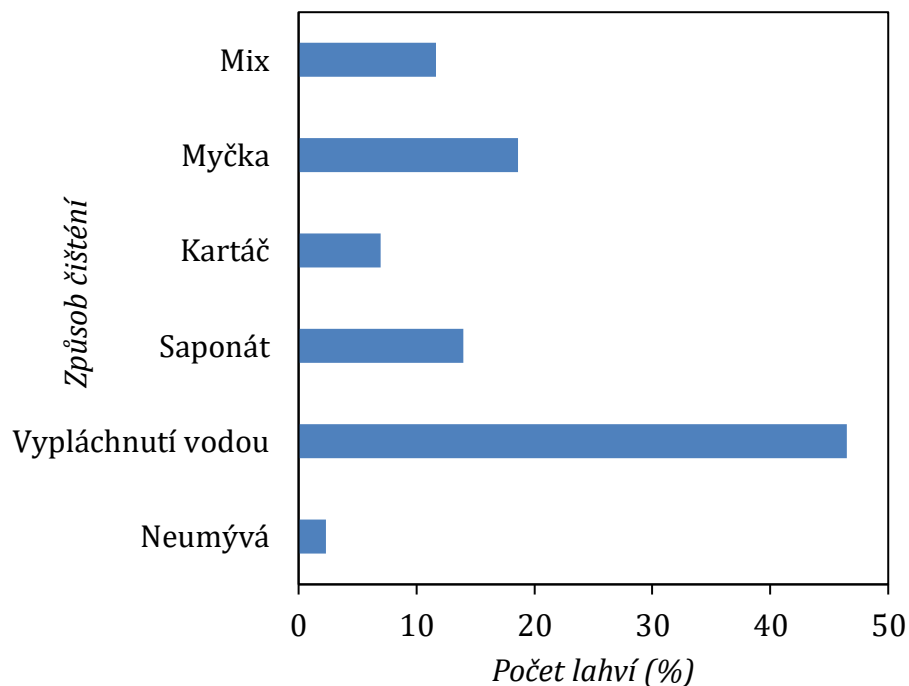


Obrázek 23: Srovnání stáří zkoumaných lahví.

Intenzita čištění byla rozdělena do dvou faktorů – frekvence a způsob čištění lahví. Na obrázku 24 vidíme, že 44,2 % lahví bylo čištěno každý den, což je doporučený interval čištění. Na druhou stranu nejčastějším způsobem čištění bylo vypláchnutí vodou (viz obrázek 25). Ze spojení těchto dvou otázek, bylo zjištěno, že většina studentů, kteří láhev čistili každý den, ji většina vypláchla vodou (46,5 %). Nejpopulárnějším způsobem kvalitního čištění byla myčka (18,6 %), avšak bylo prováděno po delších časových úsecích. Důkladné čištění kartáčem na lahve není mezi studenty běžné (7 %). Jedna lahev nebyla čištěná nikdy.

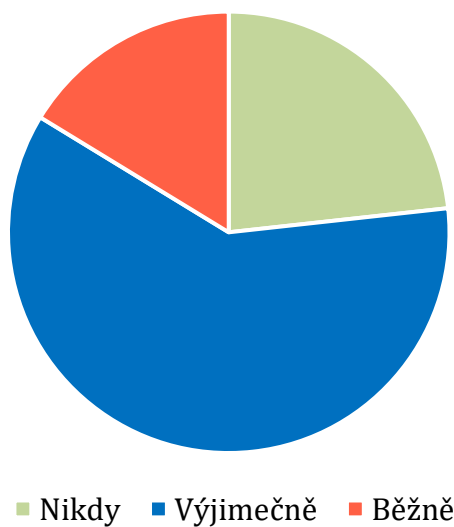


Obrázek 24: Srovnání preference frekvence čištění lahví.



Obrázek 25: Srovnání preference způsobu čištění lahví.

Posledním zkoumaným faktorem bylo, zda uživatelé sdílejí své lahve s jinými lidmi. Jak je patrné z grafu na obrázku 26, více než 75 % lahví je výjimečně nebo běžně sdíleno. Tato skutečnost může být jednoduše důsledkem tím, že sdílení lahví studentům nevadí a nevnímají riziko přenosu cizí mikrobioty.



Obrázek 26: Srovnání pravidelnosti sdílení lahví.

5.2 Sekvenační analýza

5.2.1 Příprava

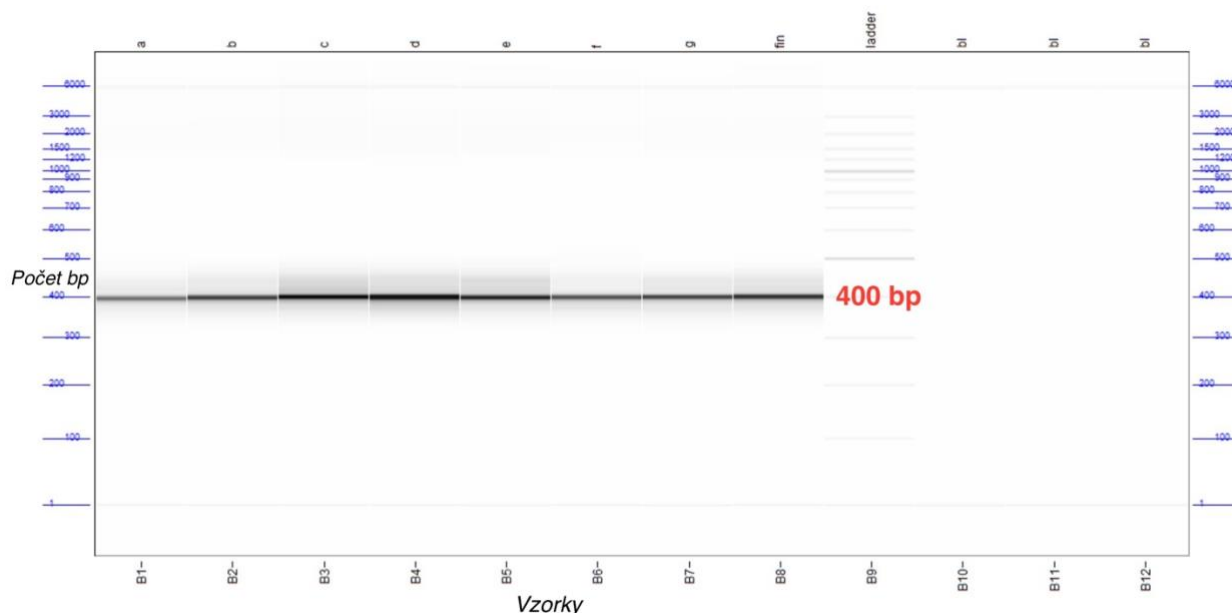
Vzorky byly odebrány během května a června roku 2024 v budově školy ze 43 lahví, 2 dobrovolníci poskytli každý 2 lahve. V rámci analýzy byly vytvořeny 2 skupiny, první skupina (T) zahrnovala 16 lahví, ze kterých byly provedeny 3 stěry s týdenním rozestupem. Druhá skupina (S) obsahovala 27 lahví, ze kterých byl odebrán pouze jeden stěr na konci pracovního týdne. Ze dvou lahví z této skupiny byly odebrány 2 stěry po 7 dnech. Celkem bylo odebráno 78 vzorků, které byly následně izolovány.

Tabulka 3: Počet provedených stěrů z lahví dvou analyzovaných skupin.

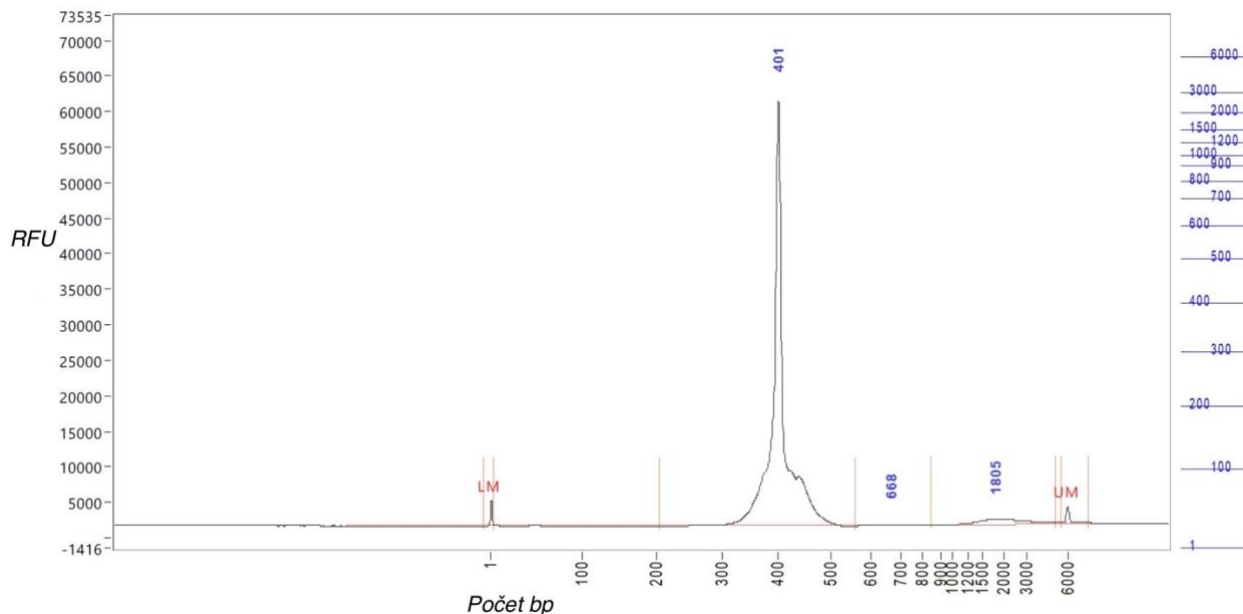
	Počet stěrů	Počet lahví
Skupina T	3	16
Skupina S	1	27

Po izolaci DNA, amplifikaci a vyčištění fragmentů byla zkontrolována koncentrace vzorků. Počáteční koncentrace vzorků se pohybovala od 1,6 do 16,8 ng/μl. Ředění vzorků vycházelo z kalibrační křivky, vzorky byly ředěny na koncentraci 4 ng/μl a poté smíchány 7 poolů (směsi všech vzorků v řádku, z každého vzorku odebráno 4 μl).

Dále byla měřena délka fragmentů na přístroji 5200 Fragment Analyzer (Agilent, USA). Jde vidět, že kontrola délky fragmentů byla úspěšná. Nejčastěji byly fragmenty dlouhé 400 bp, peak jednotlivých poolů sahal od 396 bp do 401 bp.



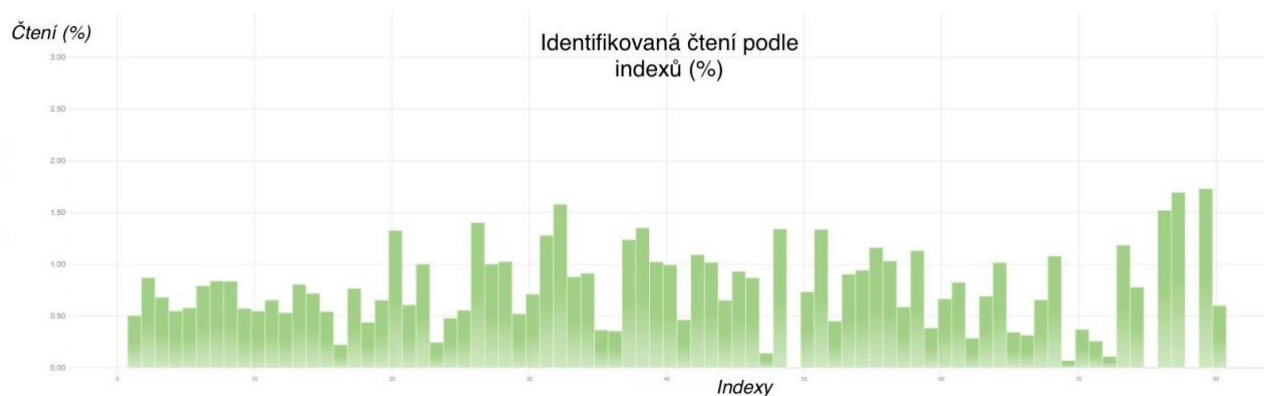
Obrázek 27: Ověření délky fragmentů jednotlivých poolů pomocí kapilární elektroforézy na přístroji 5200 Fragment Analyzer (Agilent, USA). Sloupce B1–B7 zobrazují 7 poolů, B8 je finální knihovna, tedy směs všech 7 poolů.



Obrázek 28: Délka fragmentů výsledné knihovny (B8). Výsledná délka fragmentů byla 401 bp. LM – dolní referenční marker; UM – horní referenční marker

Následně byla vypočítána molární koncentrace finální knihovny podle předpokládané koncentrace 4 ng/μl na 20 nM.

Sekvenační analýza vygenerovala celkem 16,1 milionů čtení a přečetla 2,27 Gbp. Z výsledků sekvenace bylo zjištěno, že koncentrace knihovny byla nižší, než se očekávalo. Namísto plánovaných 15 % phiX bylo obsaženo 25 %. Přesto byla celková kvalita výsledků vysoká - 93,3 %, tedy přes 90 % čtení mělo vyšší kvalitu než Q30. Dále byla zaznamenána nerovnoměrnost počtu čtení mezi vzorky, což mohlo být způsobeno nepřesným ředěním vzorků na stejnou koncentraci.



Obrázek 29: Počet (%) identifikovaných čtení na jednotlivé indexy (vzorky).

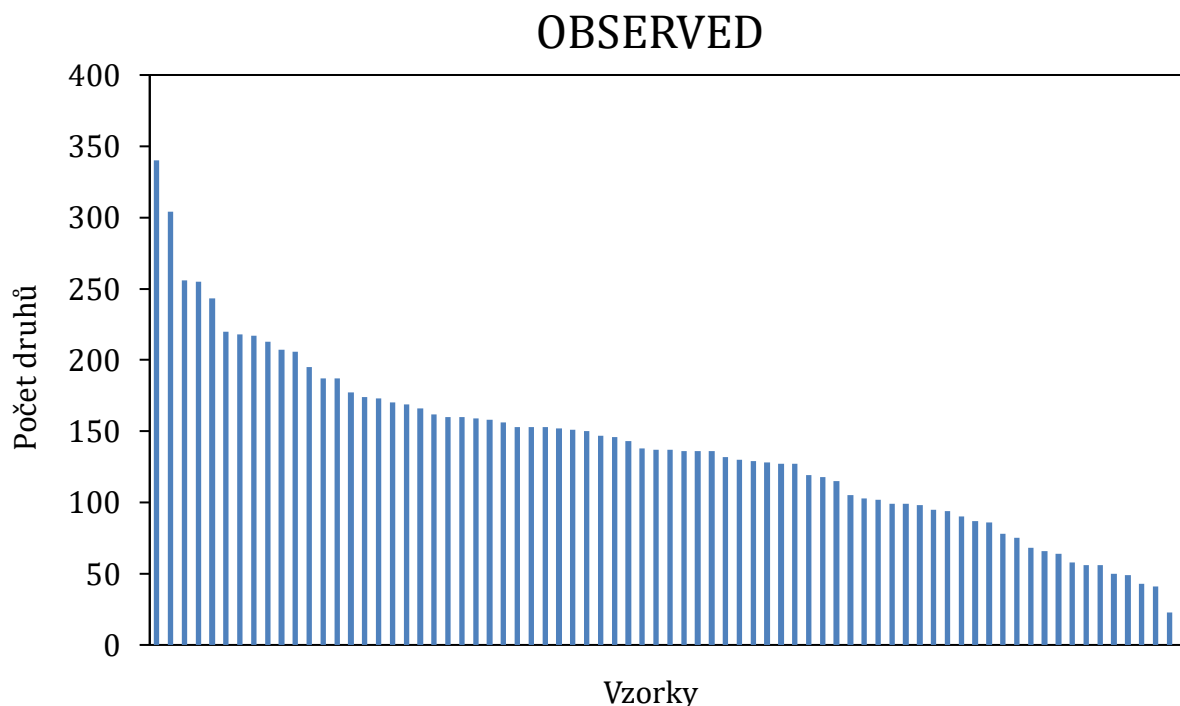
Po zpracování dat v DADA2 byly všechny vzorky zarovnány na 16 810 čtení. Tímto krokem byly vyřazeny 2 vzorky, protože jejich celkový počet čtení byl nižší než stanovený limit. Nižší počet čtení pravděpodobně souvisel s nižší koncentrací těchto vzorků.

Ve vyhodnocení sekvenačních výsledků bylo k dispozici 16 lahví ze skupiny T (3 vzorky) a jejich první sěr byl zahrnut do skupiny S. Skupina S tedy obsahovala 41 lahví a 1 kontrolní vzorek ze vzduchu.

5.2.2 Bakteriální složení z pohledu diverzity

Sekvenační analýza přinesla rozsáhlé informace o bakteriálním složení vzorků. Bohatost byla ohodnocena pomocí alfa diverzity, která popisuje diverzitu v rámci jednotlivých vzorků prostřednictvím různých indexů.

Index Observed udává počet detekovaných druhů ve vzorku. Nejdiverzifikovanější vzorek obsahoval až 340 bakteriálních druhů, zatímco nejméně diverzifikovaný pouze 16. Průměrný počet druhů napříč všemi vzorky činil 138 druhů a směrodatná odchylka se rovnala 62. Z grafu (viz obrázek 30) je patrné, že počet bakteriálních druhů ve vzorcích odebraných z pítek lahví se značně liší.



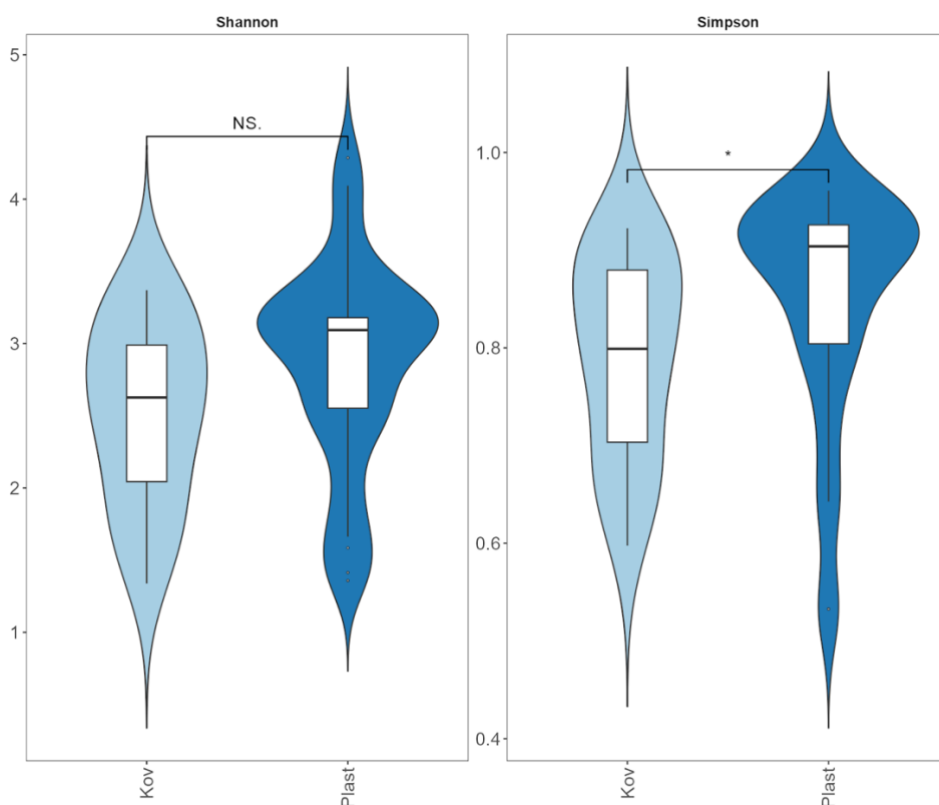
Obrázek 30: Alfa diverzita – Observed, počet druhů v jednotlivých vzorcích.

Sekvenační data byla analyzována prostřednictvím Shannonova a Simpsonova indexu diverzity. Shannonův index nabývá hodnot v rozmezí 0 až 5 a zohledňuje jak rozmanitost, tak i rovnoměrnost. S vyšší počtem druhů a jejich rovnoměrným zastoupením roste hodnota indexu. Simpsonův index je založen na pravděpodobnosti, že dva náhodně vybraní jedinci ze stejného vzorku budou patřit ke stejnému druhu. Hodnoty se pohybují v rozmezí 0 až 1, čím vyšší je

pravděpodobnost (tedy nižší diverzita), tím vyšší je hodnota tohoto indexu. Jelikož Simpson interpretuje data právě naopak než ostatní indexy alfa diverzity, v této práci je použita jeho inverzní verze.

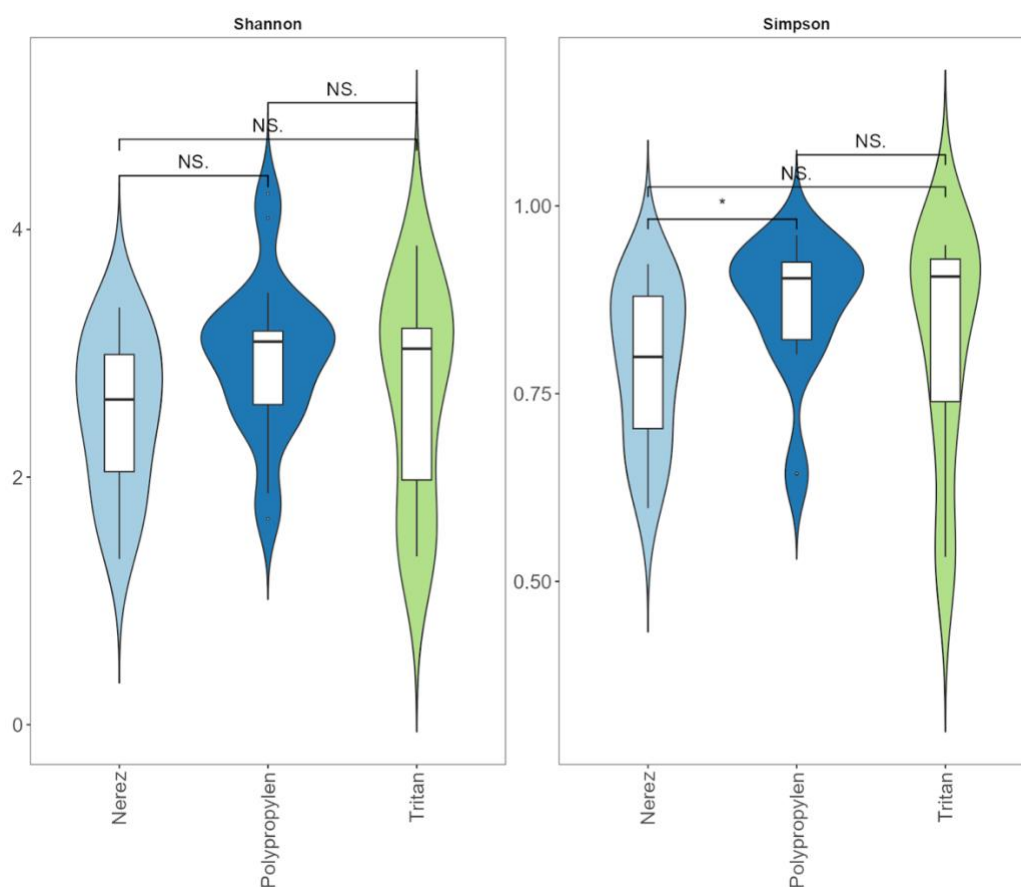
K vizualizaci dat byly použity Violin ploty, což jsou grafy, které zobrazují rozložení dat v různých skupinách. Širší části ukazují oblasti s vyšší hustotou dat, užší části s nižší hustotou dat. Ve špičkách se nachází maximum a minimum. Boxplot neboli bílý obdélník zobrazuje rozmezí, ve kterém se nachází 50 % dat. Uvnitř boxplotu je středová čára (medián), která rozděluje data na dvě stejně velké části. Na ose x jsou uvedeny skupiny, které daný index hodnotí. Na ose y se nachází stupnice měřeného indexu, obvykle s rostoucí hodnotou roste i diverzita. P-hodnota udává pravděpodobnost, že pozorované rozdíly mezi skupinami vznikly náhodou. $P > 0,05$ vyjadřuje statisticky nevýznamný rozdíl, označen jako NS – Not Significant. Naopak $p \leq 0,05$ (*) je statisticky významný rozdíl, ale také 5% šance, že tento nálezn je náhodný. Pokud $p \leq 0,01$ (**), rozdíl je velmi významný a $p \leq 0,001$ (***) vyjadřuje extrémně významný rozdíl.

Alfa diverzita byla nejprve porovnána na základě materiálu lahví. Grafy na obrázcích 31 a 32 ukazují hodnoty alfa diverzity Shannonova a Simpsonova indexu mezi skupinami plastových a kovových materiálů. Pouze Simpsonův index ukázal malé, ale statisticky významné rozdíly. Bylo zjištěno, že plastové lahve vykazují vyšší diverzitu než kovové.



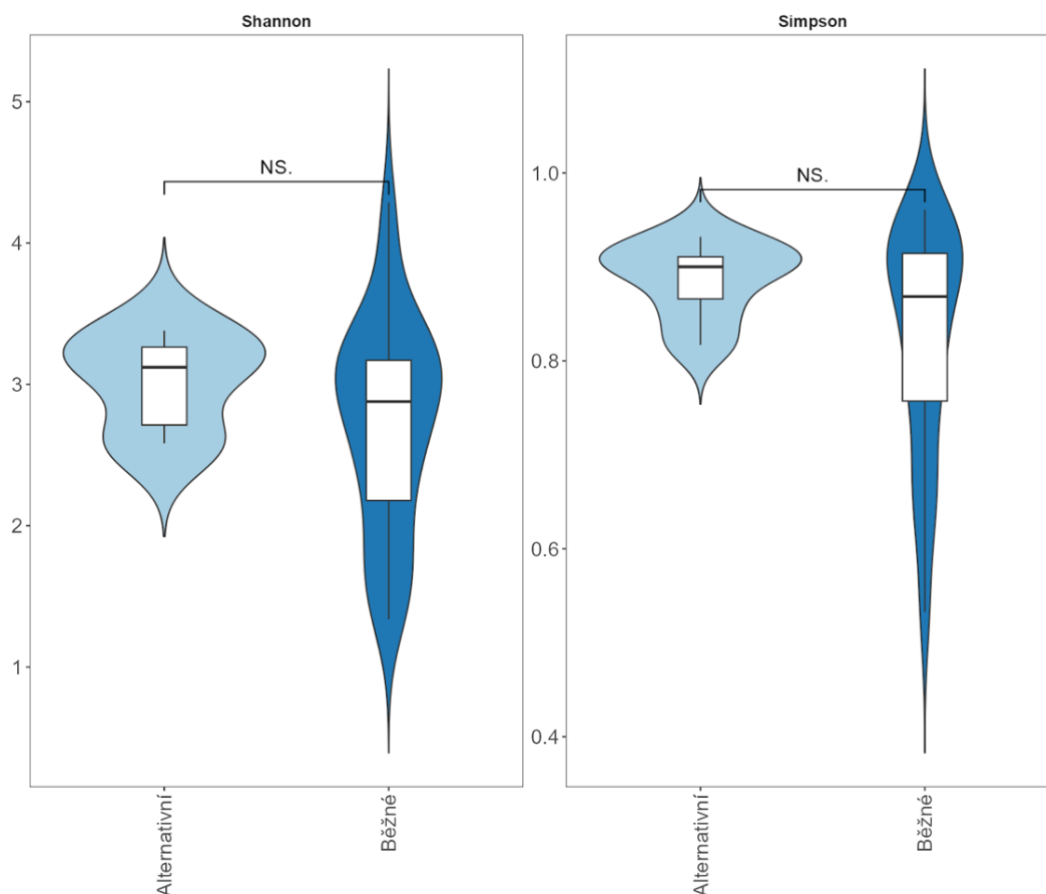
Obrázek 31: Srovnání alfa diverzity kovových a plastových lahví. Vyjádřeno pomocí Shannonova indexu a Simpsonova indexu diverzity.

Při porovnání specifických materiálů, lahve z nerezové oceli vykazovaly nižší diverzitu než polypropylenové. Vzorky z tritanových lahví vykazovaly velký rozptyl. Tento rozptyl byl pravděpodobně důsledkem různých návyků uživatelů.



Obrázek 32: Srovnání alfa diverzity lahví z nerezové oceli, polypropylenu a tritanu. Vyjádřeno pomocí Shannonova indexu a Simpsonova indexu diverzity.

Dále byla vypočítána alfa diverzita mezi skupinami lahví s alternativními pítky (vytahovací, cucacími) a běžnými hrdly. Bylo očekáváno, že alternativní pítka budou díky své konstrukci mikrobiálně bohatší, protože při pití dochází k většímu kontaktu s ústní dutinou. Nicméně graf na obrázku 33 ukázal, že mezi diverzitou alternativních pítek a běžných hrdel nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl. Zajímavé je, že rozptyl hodnot indexu alternativních pítek je poměrně malý, což bylo pravděpodobně ovlivněno nízkým počtem lahví s alternativními pítky.



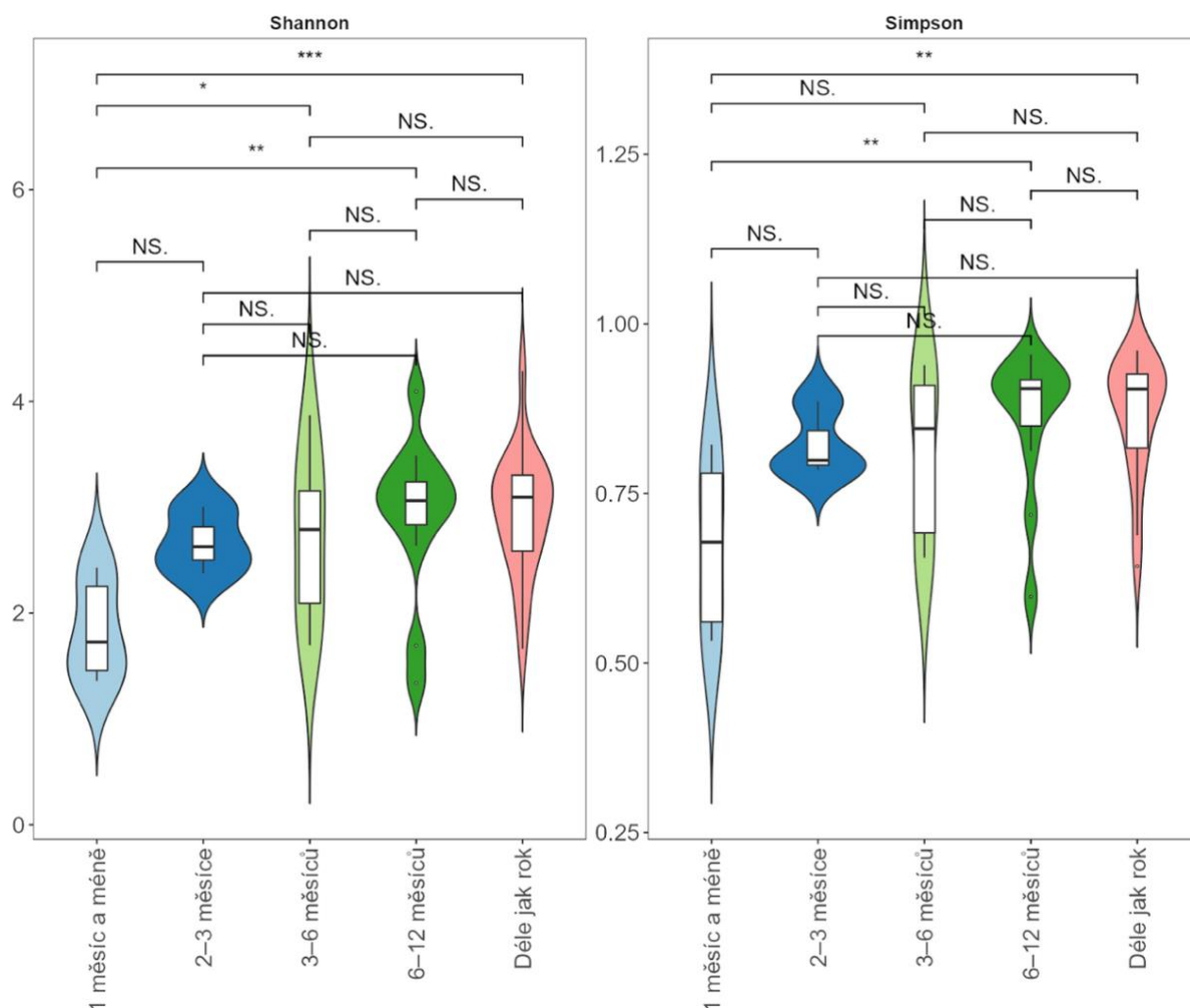
Obrázek 33: Srovnání alfa diverzity alternativních píték a hrdel lahví. Vyjádřeno pomocí Shannonova indexu a Simpsonova indexu diverzity.

Dalším zkoumaným parametrem bylo stáří lahve, tedy doba aktivního využívání. Z grafu na obrázku 34 vyplývá, že bohatost druhů lahví používaných méně než 1 měsíc byla významně nižší oproti lahvím starším než 3 měsíce. Vzhledem k tomu, že alfa diverzita mezi lahvemi používanými déle než 3 měsíce se výrazně nelišila, lze usoudit, že bakteriom se po více než 3 měsících využívání ustálí.

Tento trend je pravděpodobně způsoben pravidelným používáním lahve a s tím souvisejícím kontaktem s poměrně stabilní ústní mikroflórou. Zároveň lze usuzovat, že mikrobiota potřebuje určitý čas k tvorbě a stabilizaci biofilmu. S rostoucí dobou využívání lahve dochází k degradaci materiálu, a to vlivem mechanického a chemického opotřebení i vlivem bakterií, které jsou schopné využívat některé složky tohoto materiálu. Opotřebení materiálu může zvyšovat přístupnost povrchu pro přilnutí mikroorganismů.

Zatím nebylo zkoumáno, zda biofilm lahví po delším časovém úseku představuje zdravotní riziko. Stabilní mikrobiom by mohl poskytovat ochrannou bariéru proti potenciálním patogenům. Na druhou stranu by patogenní mikroorganismy jako součást stabilního biofilmu mohly představovat hrozbu v případě oslabení imunitního systému uživatele. Proto by bylo vhodné provést dlouhodobou studii zaměřenou na analýzu tohoto mikrobiomu v závislosti na lidském zdraví.

Zde nastává dilema mezi ekologií a lidským zdravím. Z jednoho pohledu by se mohlo zdát, že by lahve měly být vyměněny po 3 měsících, aby se minimalizovalo potenciální zdravotní riziko. To by však bylo v rozporu s ekologickými cíli, a to snížit environmentální stopu omezením jednorázových obalů. Jak bylo uvedeno, není jasné, jestli stabilní mikrobiom po více než 3 měsících využívání je přínosný, nebo nežádoucí vzhledem ke zdraví uživatele.

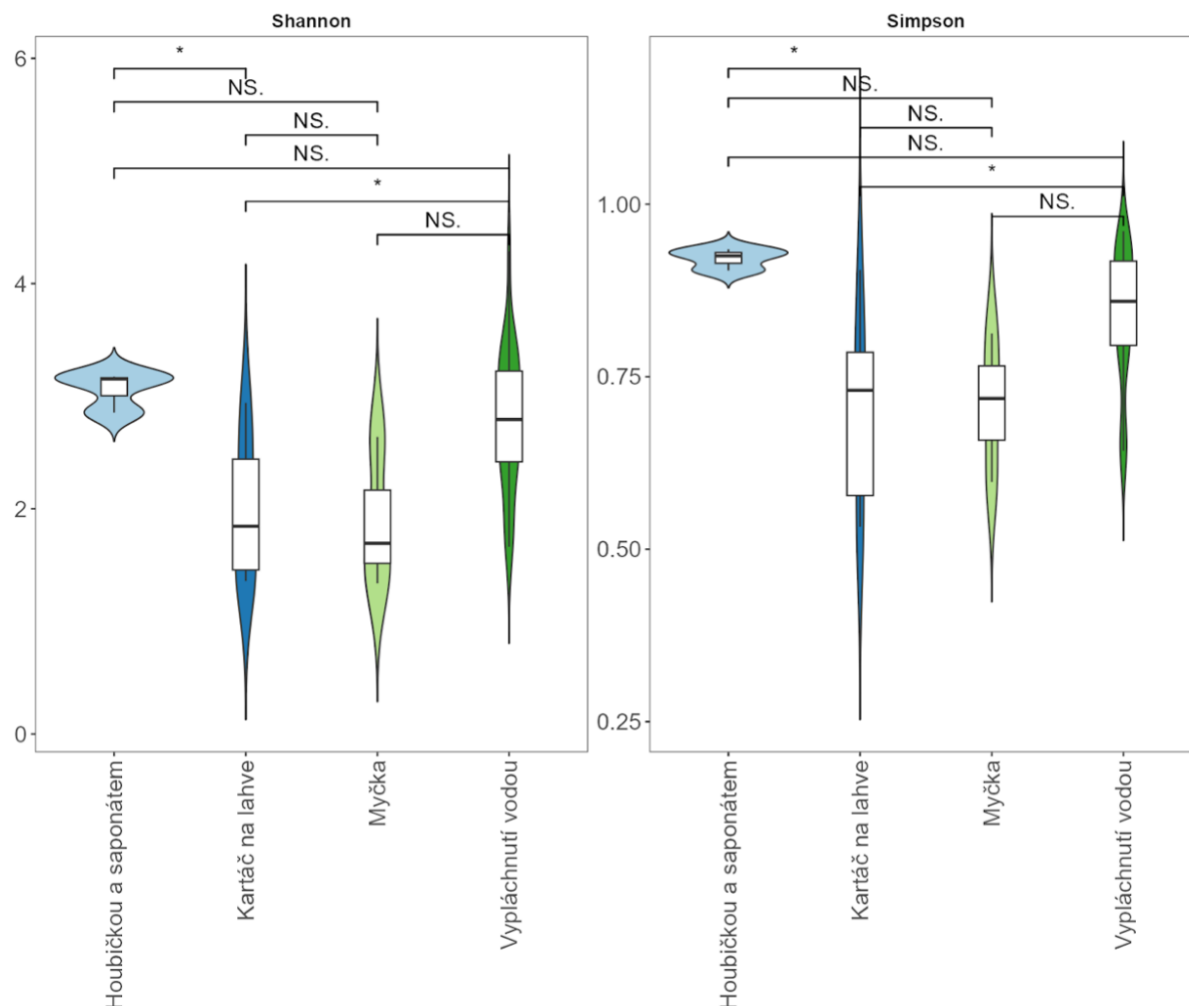


Obrázek 34: Srovnání alfa diverzity lahví různého stáří. Vyjádřeno pomocí Shannonova indexu a Simpsonova indexu diverzity.

Důležitým faktorem mikrobiálního složení lahví je jejich údržba. Z hlediska frekvence čištění se alfa diverzita lahví nelišila (viz příloha C). Z toho vyplývá, že frekvence čištění byla očekávaně závislá na způsobu, kterým byla láhev čištěna.

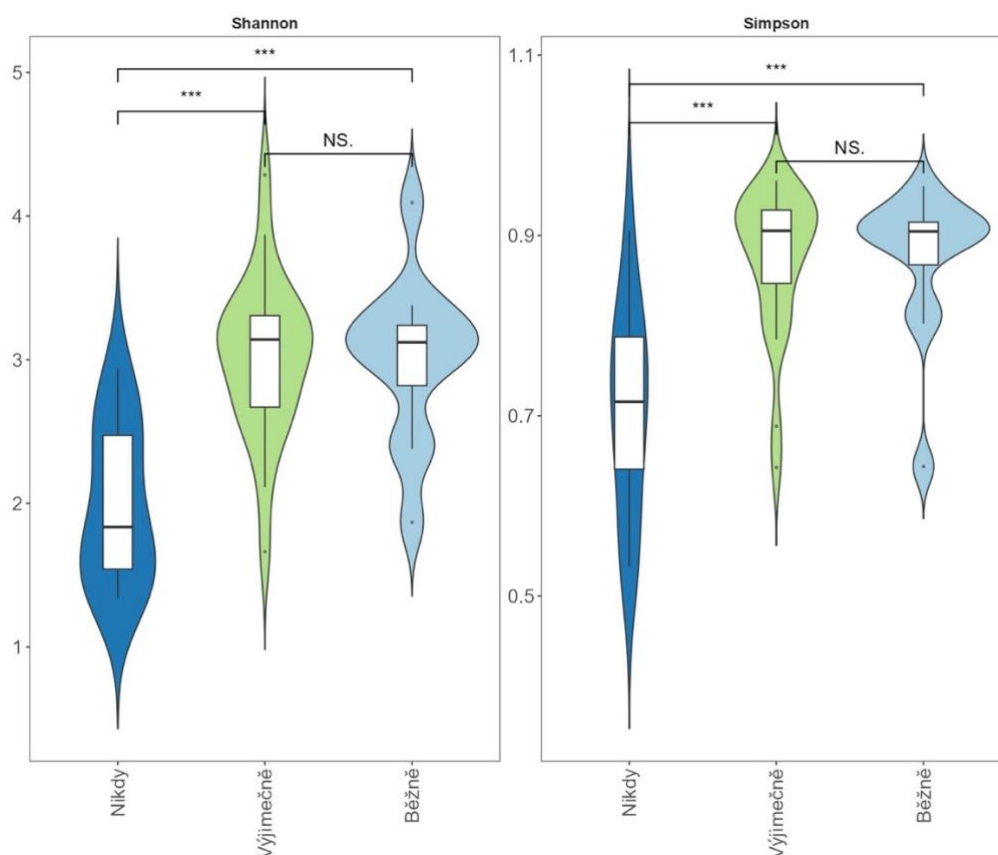
Hodnoty (viz obrázek 35) ukazují, že lahve umývané v myčce nebo kartáčem vykazovaly výrazně nižší alfa diverzitu. To naznačuje, že k účinnému vyčištění lahve, je pouhé vypláchnutí vodou a použití houbičky nedostatečné, je třeba metody, které kvalitněji odstraní biofilm. Tedy využít mechanický (kartáč) nebo chemický (horká voda v myčce a dezinfekční prostředky) způsob čištění.

Nicméně je důležité poznamenat, že tato data nelze považovat za zcela přesná, protože jednotlivé vzorky ve skupinách byly velmi rozptýlené, což pravděpodobně souviselo s různou frekvencí čištění, nízkým počtem vzorků v některých skupinách nebo absencí kontroly nad posledním umytím lahve.



Obrázek 35: Srovnání alfa diverzity lahví čištěných různými způsoby. Vyjádřeno pomocí Shannonova indexu a Simpsonova indexu diverzity.

Poslední zkoumaným parametrem pomocí alfa diverzity bylo sdílení lahve s jinými osobami. Bylo zjištěno, že lahve, které nebyly nikdy sdíleny, vykazují signifikantně nižší alfa diverzitu ve srovnání s těmi, které sdíleny byly. Toto zjištění naznačuje, že sdílení lahve vede k přenosu ústní mikrobioty, velice pravděpodobně včetně oportunních patogenů. Cizí mikrobiota pak obohacuje mikrobiom sdílených lahví. Nebyly zaznamenány rozdíly mezi skupinami, které lahve sdílí výjimečně a běžně.



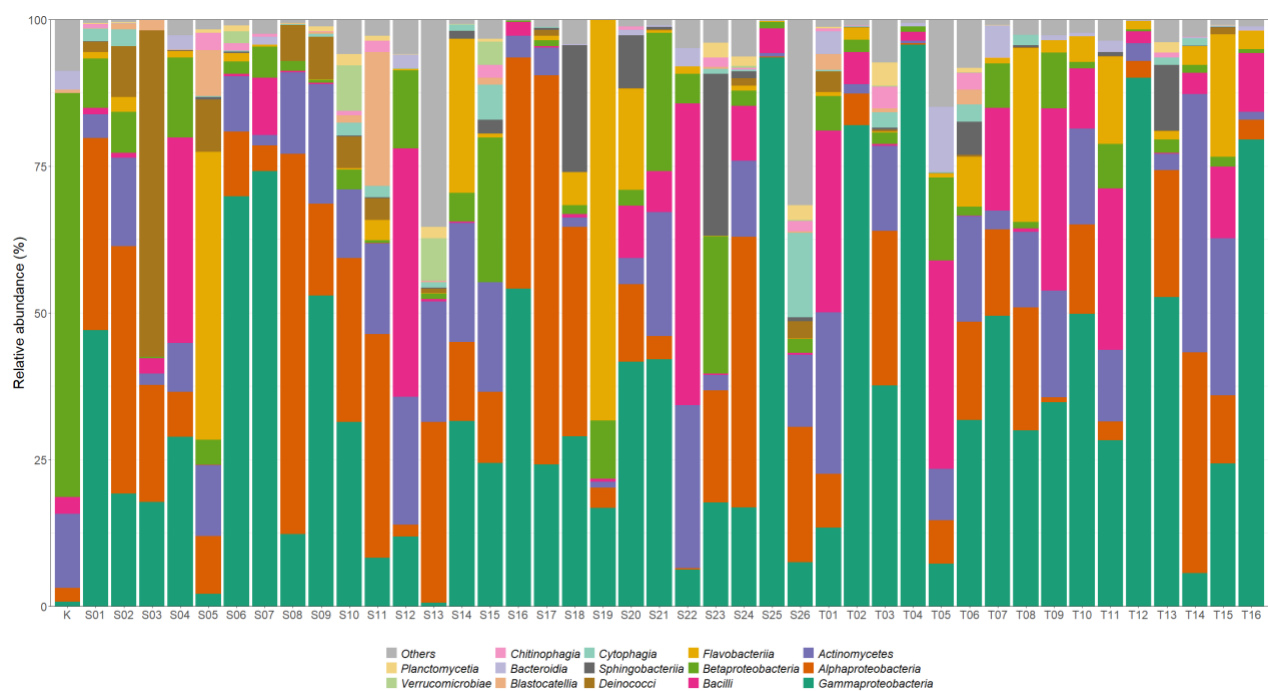
Obrázek 36: Srovnání alfa diverzity lahví, které jsou sdíleny výjimečně, běžně, nebo nikdy. Vyjádřeno pomocí Shannonova indexu a Simpsonova indexu diverzity.

5.2.3 Bakteriální složení z pohledu taxonů

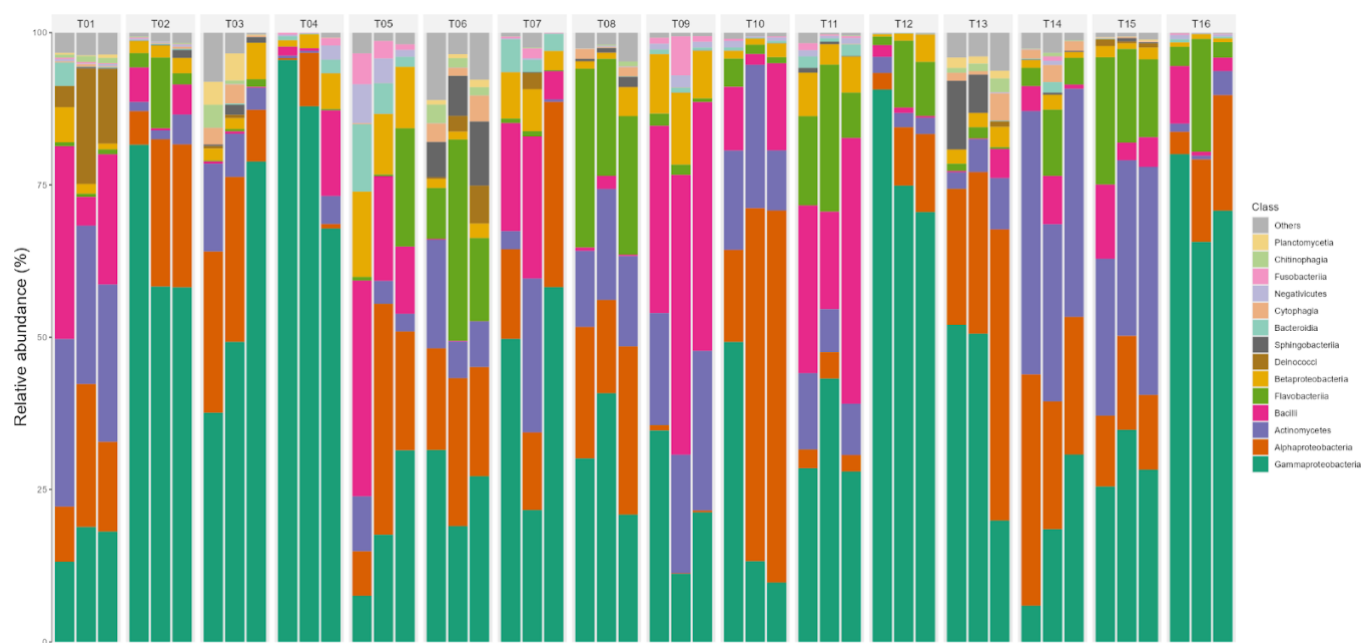
S využitím sloupcového grafu (viz obrázek 37), který znázorňuje relativní zastoupení bakterií ve všech prvních vzorcích, bylo identifikováno 15 nejvíce abundantních tříd, z nich dominovaly: gram-negativní Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Flavobacteria a gram-pozitivní Actinomycetes a Bacilli. První sloupec na obrázku 37 reprezentuje kontrolní odběr ze vzduchu, jehož mikrobiální komunita je z více než z poloviny tvořena třídou Betaproteobacteria. Nejvíce abundantní rody byly (příloha D): *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Chryseobacterium*, *Streptococcus* a *Rhodococcus*.

Vyobrazená data na obrázku 38 popisují rozložení bakteriálních tříd ve vzorcích 16 lahví ze skupiny T. Z každé lahve byly odebrány 3 vzorky v intervalu 7 dní. Z vizuální analýzy těchto trojic stěrů je zřejmé, že nejvíce abundantní třídy se vyskytují ve všech 3 stěrech a s malými rozdíly v procentuálním zastoupením. Proto lze považovat mikrobiom v rámci jedné lahve za poměrně stabilní.

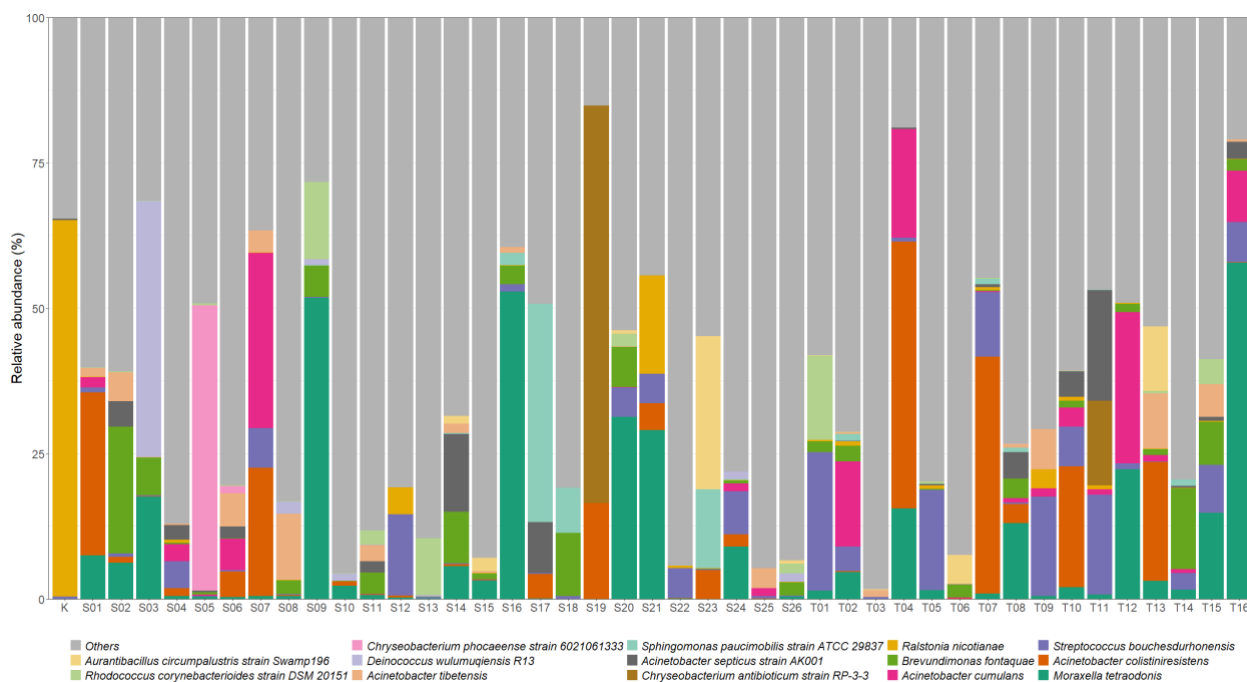
Nicméně při porovnání jednotlivých lahví mezi sebou, se ukázala značná heterogenita. Tato variabilita naznačuje, že mikrobiální komunity lahví jsou specifické a individuální. Také jsou velmi ovlivněny dalšími faktory, jako jsou návyky uživatelů. Současně lze konstatovat, že hrdla lahví jsou odrazem ústní mikrobioty, která je formována různými faktory jako životní styl a hygiena.



Obrázek 37: Relativní zastoupení bakteriálních tříd v prvních stěrech všech zkoumaných lahví. K značí kontrolní vzorek.



Obrázek 38: Relativní zastoupení bakteriálních tříd ve všech vzorcích skupiny T. Byly odebrány 3 stěry z každé lahve v rozmezí 7 dní.



Obrázek 39: Relativní zastoupení bakteriálních druhů v prvních vzorcích všech zkoumaných lahví. K značí kontrolní vzorek.

Dále proběhla analýza pomocí dalšího sloupcového grafu (viz obrázek 39), který zobrazuje procentuální zastoupení druhů bakterií v jednotlivých vzorcích. V několika vzorcích se jeden druh vyskytoval jako značně dominantní. Světle šedé plochy zobrazují všechny ostatní bakterie, které ve vzorcích nebyly abundančně významné.

Kontrolní vzorek (K) se primárně skládal z *Ralstonia nicotianae*, což je patogenní bakterie izolovaná z vadnoucího tabáku (Liu et al., 2023). Tento vzorek byl odebrán v místnosti s rostlinami, proto lze očekávat, že *R. nicotianae* mohla být kontaminantem z okolního prostředí. Případně se mohlo jednat o kontaminaci izolačním kitem.

V lahvích S09, S16, S20, S21 a T16 se primárně vyskytovala *Moraxella tetraodonis*, která byla nedávno izolována z kůže sladkovodního čtverzubce (Das & Das, 2022). V lahvi S05 byla identifikována bakterie *Chryseobacterium phocaeense*, která byla nově izolována u pacientů s cystickou fibrózou (Abdallah et al., 2019). *Chryseobacterium antibioticum* byla nalezená v lahvi S19, tato bakterie byla izolována z arktické půdy a bylo zjištěno, že vykazuje antimikrobiální aktivitu vůči gramnegativním bakteriím (Dahal et al., 2021). V lahvích S01, T04, T07 byl identifikována bakterie *Acinetobacter colistiniresistens*, která byla izolována z lidských infekcí, ale nebyl zatím prokázán jako patogen. Je ale přirozeně rezistentní vůči kolistinu, antibiotiku poslední volby (Nemec et al., 2017).

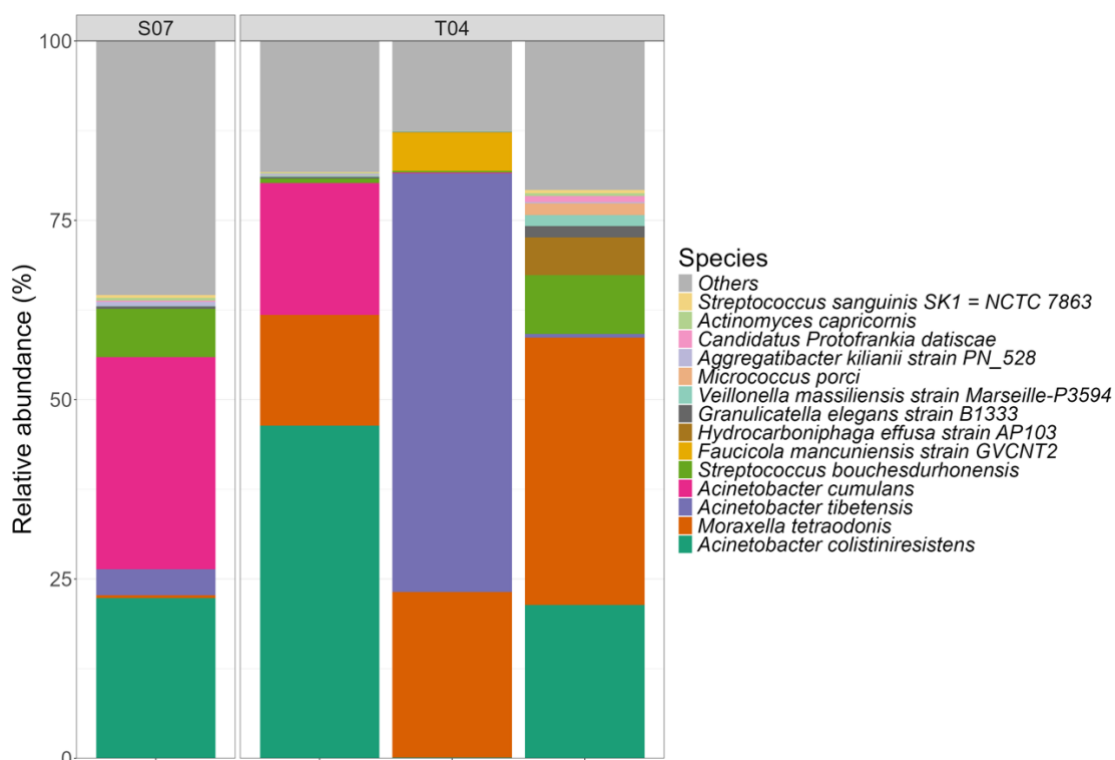
5.2.4 Porovnání 2 lahví stejného uživatele

Prostřednictvím sloupcových grafů bylo na úrovni druhů porovnáno relativní zastoupení bakterií 2 lahví stejného uživatele.

Tabulka 4: Charakteristika lahví prvního dobrovolníka.

Kód lahve	T04	S07
Materiál	Nerezová ocel	Polypropylen
Stáří lahve	6–12 měsíců	3–6 měsíců
Způsob a frekvence čištění	1x týdně v myčce	
Sdílení	Nesdílí	

Na obrázku 40 je zobrazeno relativní druhové zastoupení těchto 2 lahví, které na první pohled nevykazovaly vysokou diverzitu a nebyly složením až tak rozdílné. To lze přičíst podobné údržbě těchto dvou lahví. Ve všech vzorcích lahve T04 byla významnou bakterií *Moraxella tetraodonis*, která se ale nenacházela v lahvi S07. První vzorek z lahve T04 a vzorek z lahve S07 vykazují podobnost, a to díky přítomnosti bakterií *Acinetobacter colistiniresistens* a *Streptococcus bouchesdurhonensis*, což bylo nejspíše způsobeno tím, že vzorky byly odebrány ve stejném týdnu.

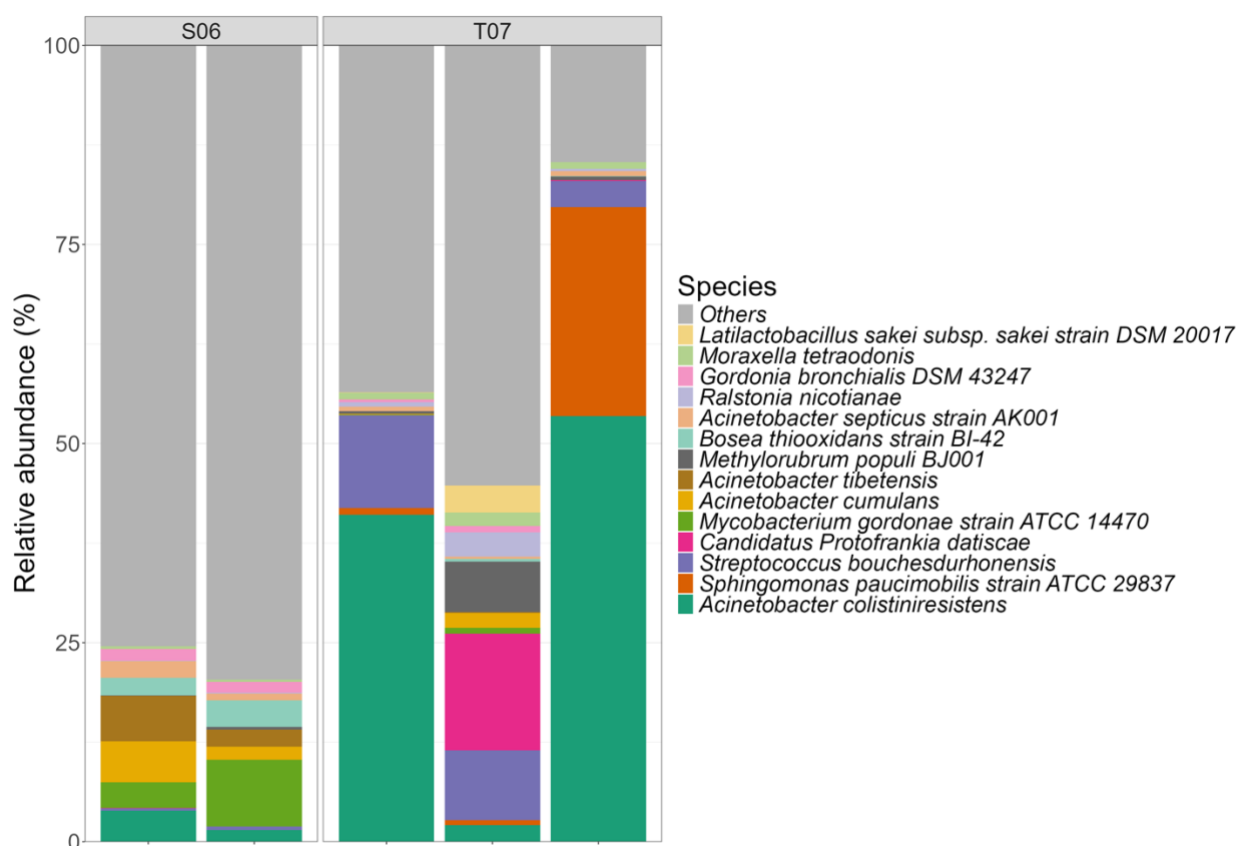


Obrázek 40: Relativní zastoupení druhů bakterií ve vzorcích ze 2 lahví stejného uživatele. Z lahve T04 byly odebrány 3 vzorky po 7 dnech a z lahve S07 jeden vzorek.

Tabulka 5: Charakteristika lahví druhého dobrovolníka.

Kód lahve	T07	S06
Materiál	Polypropylen	Tritan
Stáří lahve	>1 rok	6–12 měsíců
Způsob a frekvence čištění	1x týdně vypláchnutí vodou	1x za 2 týdny houbičkou a saponátem
Sdílení	Výjimečně	Běžně

Mezi lahvemi druhého dobrovolníka nebyla nalezena žádná významná shoda. Z obrázku 41 vyplývá, že lahev S06 vykazovala vyšší diverzitu (vyšší procento šedé části) než lahev T07. To mohlo být způsobeno tím, že lahev S06 je využívána kratší dobu, je běžně sdílená a také umývaná pouze 1x za 2 týdny. Bakterie *Acinetobacter colistiniresistens* byla přítomna ve všech vzorcích.



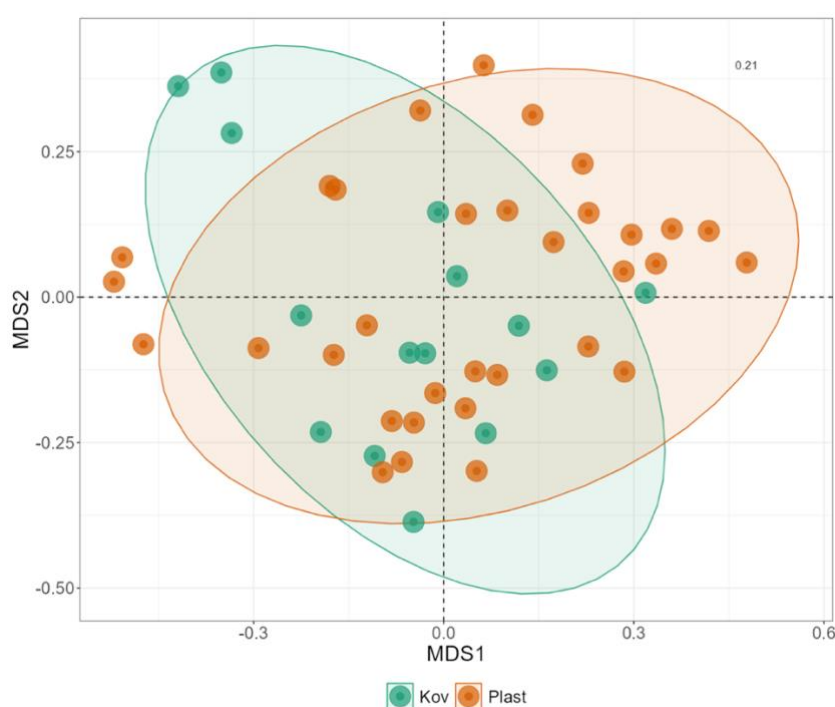
Obrázek 41: Relativní zastoupení druhů bakterií ve vzorcích ze 2 lahví stejného uživatele. Z lahve T07 byly odebrány 3 vzorky po 7 dnech a z lahve S06 2 vzorky po 7 dnech.

Z tohoto srovnání vyplývá, že lahve používané stejným uživatelem vykazují nízkou vzájemnou podobnost a jsou výrazně ovlivněny faktory jako je charakteristika samotné lahve i způsob její údržby.

5.2.5 Faktory a selekce taxonů

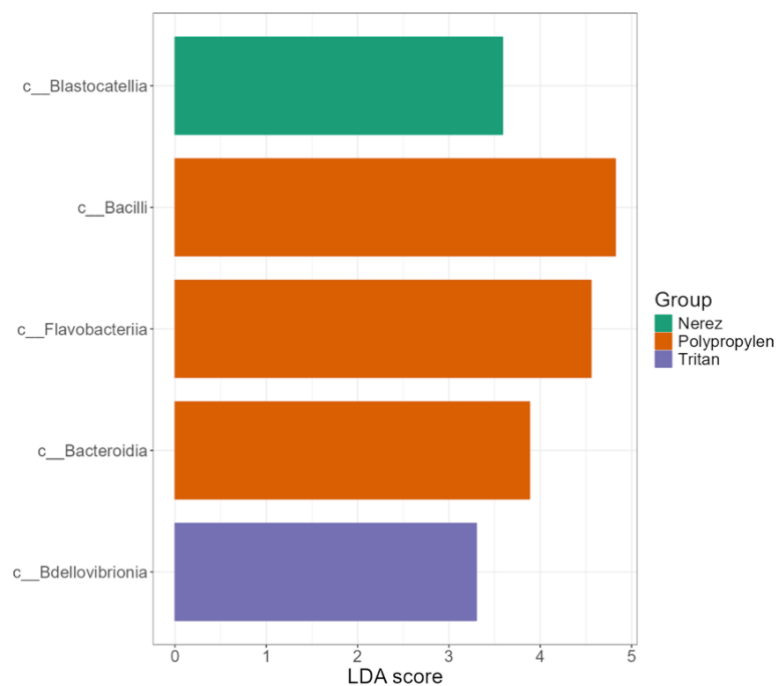
V této části práce bylo analyzováno, jestli některé faktory z dotazníkové analýzy selektují určité bakteriální taxony. K tomuto účelu byly použity analýza beta diverzity a graf LEfSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size). Beta diverzita porovnává bakteriální složení mezi jednotlivými skupinami vzorků a LEfSe ukazuje, které taxony nejvíce přispívají k rozdílům mezi skupinami.

MDS (Multidimensional Scaling) graf na obrázku 42 vizualizuje bakteriální beta diverzitu dvou skupin – plastových a kovových lahví. Body znázorňují jednotlivé vzorky a elipsy ukazují rozptyl skupiny. Jde vidět, že vzorky z plastových a kovových lahví se z velké části překrývají, což naznačuje, že tyto materiály mají relativně podobné bakteriální složení.



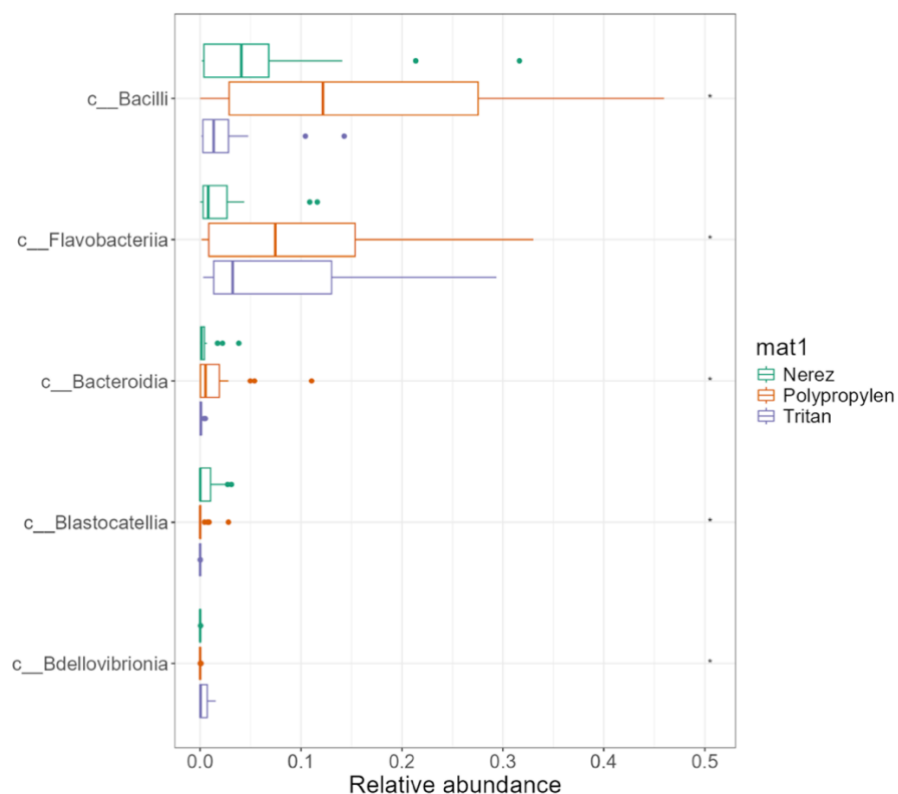
Obrázek 42: Srovnání beta diverzity plastových a kovových lahví. Vyjádřeno pomocí grafu MDS vyjadřující beta diverzitu.

Přesto byl vytvořen graf LEfSe (viz obrázek 43), který představuje identifikátory jednotlivých materiálů. Bylo zjištěno, že třídy *Flavobacteria* a *Bacilli* preferují polypropylenové lahve, což je v souladu s předchozími vědeckými studiemi, které potvrzují jejich schopnost kolonizovat i částečně degradovat tyto materiály (Pollet et al., 2018; Jain & Bhunia., 2021). Tritan byl identifikován přítomností třídy *Bdellovibrionia*, známé predátorskými vlastnostmi vůči gram-negativním bakteriím (Harini et al., 2013). Nerezovou ocel preferovala třída *Blastocatellia*, což naznačuje, že tato třída by mohla v tomto prostředí bez nižšího přístupu organických látek prosperovat.



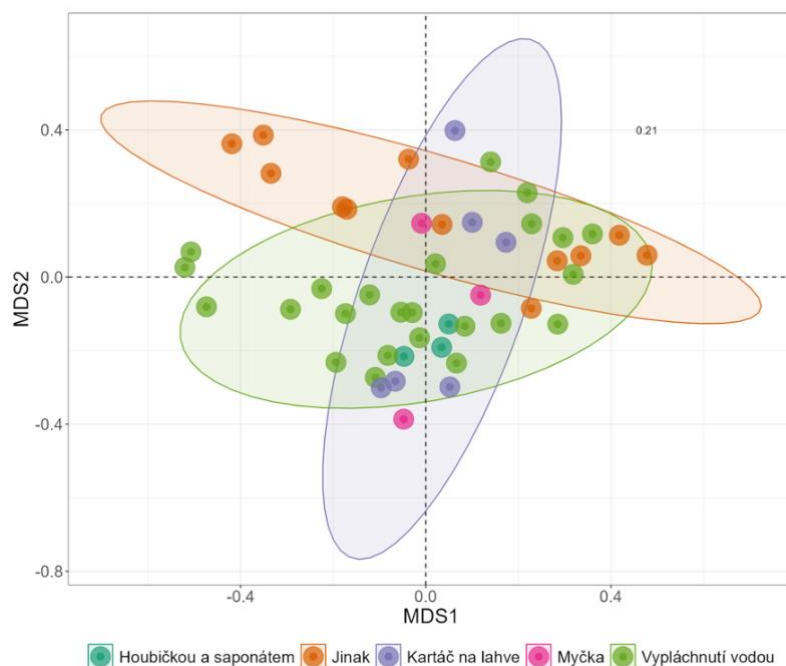
Obrázek 43: Třídy bakterií specifické pro jednotlivé materiály lahví. Zobrazeno pomocí analýzy LEfSe.

Dále byl vytvořen krabicový graf, který vizualizuje relativní zastoupení zmíněných bakteriálních tříd. Za významné rozdíly lze považovat preferenci Flavobacteria k plastovým materiálům, Bacilli vykazující afinitu k polypropylenu a Bdellovibrionia k nerezové oceli.



Obrázek 44: Relativní zastoupení bakteriálních tříd, které jsou identifikátory materiálů opakovaně použitelných lahví.

Druhý faktor zkoumaný pomocí beta diverzity, byl způsob čištění lahve. Z MDS grafu na obrázku 45 vyplývá, že jednotlivé skupiny se bakteriálním složením významně od sebe nelišily, což bylo pravděpodobně důsledkem variabilních způsobů čištění lahví kombinovaných s různou frekvencí údržby a také absencí kontroly nad posledním čištěním lahve.



Obrázek 45: Srovnání beta diverzity lahví s různými způsoby čištění. Vyjádřeno pomocí grafu MDS.

5.2.6 Oportunní patogeny

Prostřednictvím databáze BacDive (Bacterial Diversity Metadatabase) a WHO Bacterial Priority Pathogens List (World Health Organization, 2024) byly vyhledány oportunní patogeny (Bednář et al., 1996; Von Graevenitz, 2004, Ekkelenkamp et al., 2012; Ahmad & Guo, 2014; Chen et al., 2022).

Bakterie spojené s nozokomiálními infekcemi:

<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Enterobacter roggkampii</i>
<i>Acinetobacter septicus</i>
<i>Chryseobacterium indologenes</i>
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>

Orální bakterie, které mohou způsobovat infekce:

<i>Streptococcus mutans</i>	zubní kaz
<i>Veillonella parvula</i>	zubní kaz
<i>Rothia dentocariosa</i>	zubní kaz, endokarditida
<i>Rothia mucilaginosa</i>	endokarditida, bakteriémie
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	parodontitida
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	parodontitida
<i>Prevotella melaninogenica</i>	parodontitida
<i>Streptococcus anginosus (milleri)</i>	endokarditida, bakteriémie, abscesy
<i>Kingella bonacorsii</i>	parodontitida

Bakterie, které jsou potenciálními environmentálními patogeny:

<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Mycobacterium gordonae</i>

Další oportunní patogeny:

<i>Cronobacter sakazakii</i>	meningitida a sepse u kojenců
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	infekce močových cest, meningitida
<i>Haemophilus aegyptius</i>	zánět spojivek
<i>Campylobacter concisus</i>	onemocnění gastrointestinálního traktu, Crohnova choroba
<i>Abiotrophia defectiva</i>	endokarditida

Nález oportunních patogenů na hrdlech a pítkách opakovaně použitelných lahví je významný vzhledem k faktu, že 75 % účastníků tohoto výzkumu své lahve sdílí s ostatními lidmi. Při sdílení může docházet k přenosu těchto bakterií a potenciálně způsobit infekce u jedinců se sníženou imunitou.

5.3 Kultivační analýza

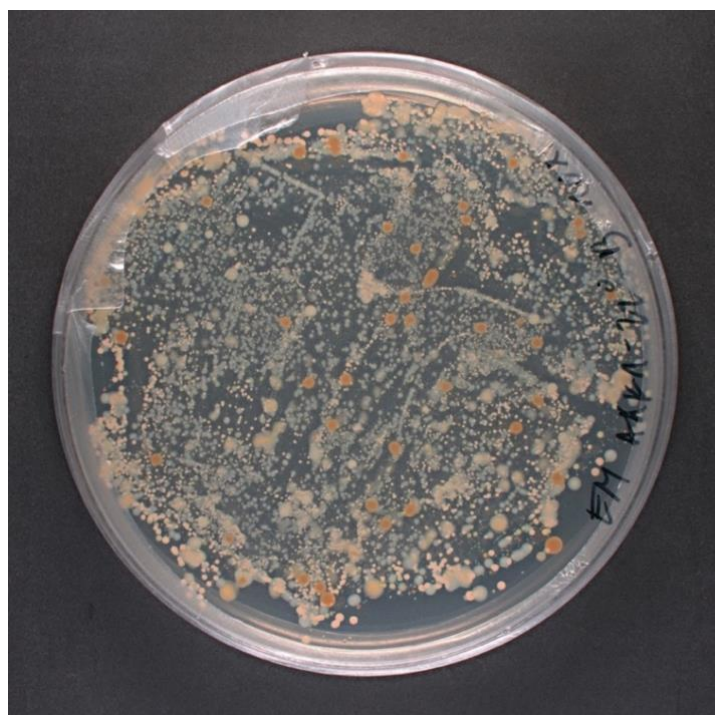
Pro kultivační analýzu bylo zvoleno lahve, které se účastnily předešlé sekvenační analýzy. V prosinci 2024 bylo odebráno 6 vzorků a následně bylo pro každý vzorek nachystáno 8 Petriho misek s TYEA médiem. Celkem bylo kultivováno 51 misek, z toho 3 byly kontrolní.

Kultivace byla úspěšná – kontrolní misky zůstaly bez mikrobiálního nárůstu a všechny misky se vzorky (kromě T09) vykazaly pozitivní nárůsty. Následně byly počítány CFU (Colony-Forming Unit) pomocí programu OpenCFU. Průměrné hodnoty, zaokrouhlené na desetitisíce pro jednotlivé teploty jsou znázorněny v tabulce 7.

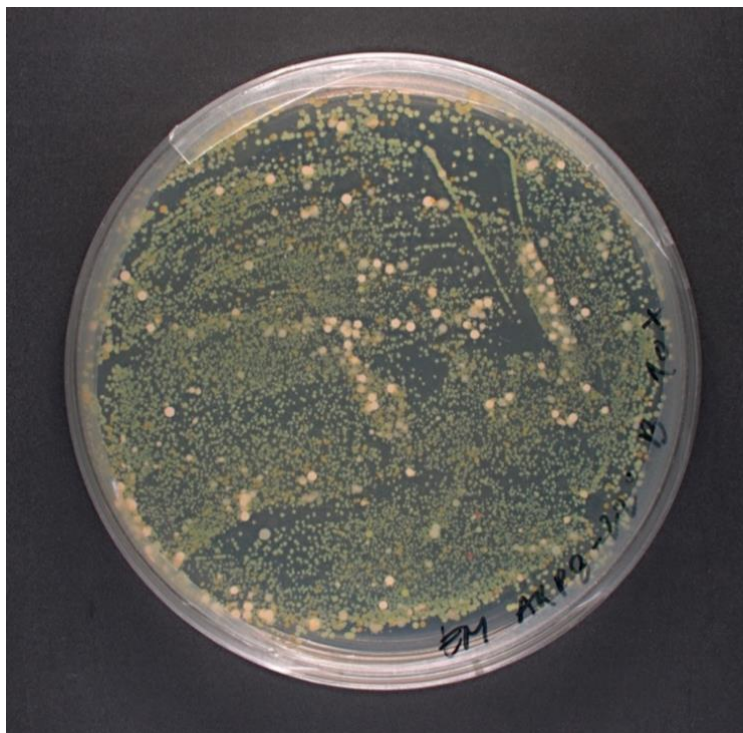
Tabulka 6: Průměrný počet CFU na miskách jednotlivých vzorků lahví.

teplota/vzorek	T14	T08	T09	S02	T02	T12
22 °C	370 000	120 000	0	350 000	80 000	260 000
36 °C	190 000	110 000	50	360 000	36 000	160 000

Z obrázků 46 a 47 jasně vyplývá, že vzorky z pítek lahví byly velmi koncentrované a ředění bylo podceněno. Tato skutečnost ztížila počítání CFU a mohla ovlivnit výsledky.



Obrázek 46: Kultivované mikroorganismy ze stěru hrdla opakovaně použitelné lahve na médiu TYEA. Tento vzorek byl 10x zředěn.



Obrázek 47: Kultivované mikroorganismy ze stěru hrdla opakovaně použitelné lahve na médiu TYEA. Tento vzorek byl 10x zředěn.

Průměrný počet CFU byl 240 000 CFU, nejvyšší počet CFU byl 370 000. Jelikož výsledky z lahve T09 se odchyľují od ostatních hodnot, tato láhev byla z analýzy vynechána. Počet CFU byl porovnán s výsledky vědeckého článku *Water bottle germs revealed* (TreadmillReviews.ca, 2019), který uvádí, že hrdlech lahví průměrně kolonizuje více než 300 000 CFU/cm² a nejvíce kontaminovaná hrdla (s posuvnými uzávěry) kolonizuje až 900 000 CFU/cm². Oproti tomuto článku, bylo v této práci detekován nižší počet CFU. To mohlo být způsobeno rozdílným postupem, který ale v článku není uveden.

Mikrobiální nárůst na hrdlech lahví byl výrazně vyšší než na běžných domácích předmětech (TreadmillReviews.ca, 2019). Například miska pro psy obsahuje přes 47 000 CFU/cm², zkoumaná hrdla lahví jsou tedy cca 6x bohatší na mikroorganismy.

Mikrobiální nárůst na hrdlech lahví byl srovnán s hranicemi povoleného znečištění pitné vody podle vyhlášky č. 252/2004 Sb., která provádí kontrolu právě pomocí TYEA média. Psychrofilní bakterie jsou kultivovány při teplotách kolem 22 °C a indikují přítomnost organických látek ve vodě, ale v pitné vodě nesmí překročit 500 CFU na 1 ml (1x). Mezofilní mikroorganismy jsou kultivovány při 37 °C a indikují kontaminaci mikroflórou, v pitné vodě je jich povoleno pod 100 CFU na 1 ml (1x). Všechny vzorky, s výjimkou lahve T09, překračovaly tyto hranice 1000x, což bylo způsobeno kontaminací nejen ústní mikrobiotou.

Vzorek T09 se výrazně odlišoval mikrobiálním nárůstem, který byl pozitivní pouze při teplotě 37 °C. Negativní nárůst mohl být následkem kvalitního čištění lahve den před odběrem a slabý nárůst následným pitím z lahve druhý den, kdy by došlo ke kontaminaci ústní mikroflórou.

5.3.1 MALDI-TOF

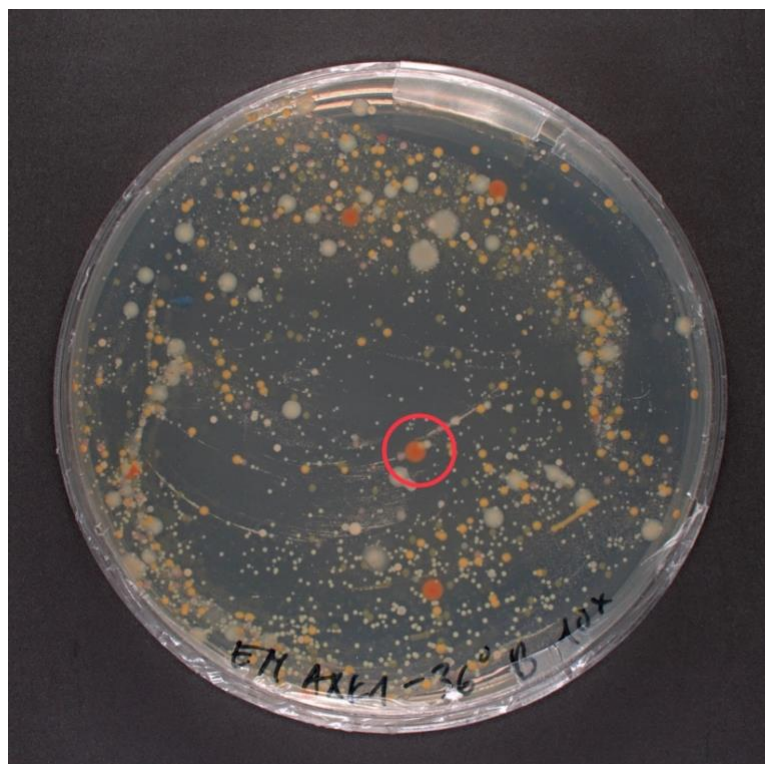
Z 16 kolonií z první kultivace vyrostlo 15 kolonií, kolonie 12 nevyrostla. Celkem 15 kolonií bylo analyzováno pomocí MALDI-TOF. Na základě získaných signálů hmotnostních spekter se podařilo identifikovat 13 z 15 vzorků. Vzorky číslo 2 a 11 nebyly shodné s žádným z výstupů databáze MALDI Biotyper (Bruker Daltonics).

Pozitivní nálezy byly ohodnoceny identifikačním skórem, přičemž spolehlivost identifikace roste s vyšší hodnotou skóre. Pokud bylo skóre vyšší než 2000 byla identifikace druhu vysoce spolehlivá. Skóre 1999–1700 bylo vysoce spolehlivé v rámci identifikace rodu, ale méně spolehlivé v rámci druhu. Vzorek 8 má skóre mírně nižší než 1700, proto byl potvrzen manuální validací dat.

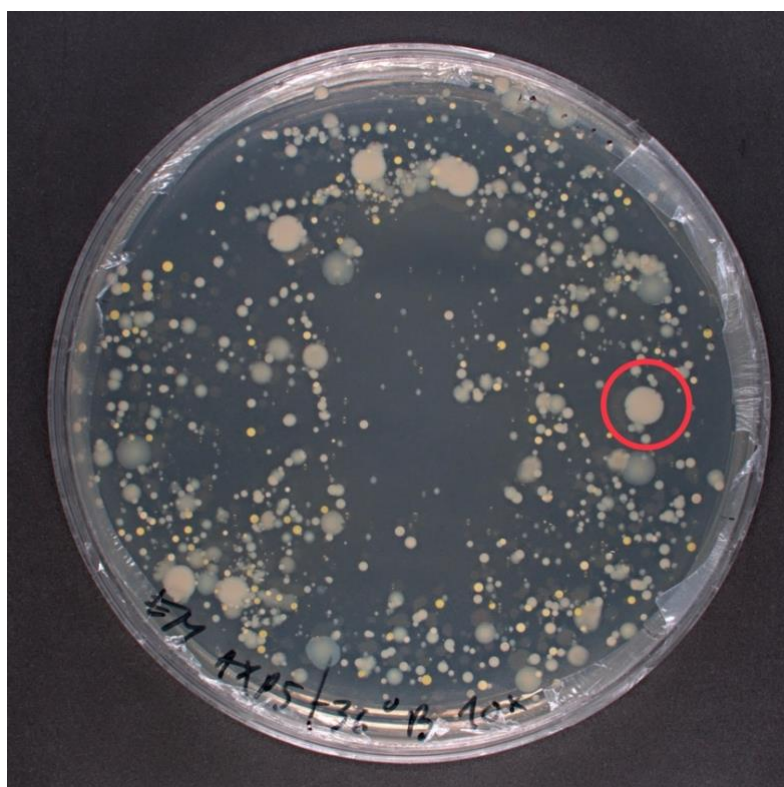
Bylo nalezeno 11 různých mikroorganismů, 2 kvasinky a 9 bakterií, které jsou zobrazeny v tabulce 8.

Tabulka 7: Seznam bakterií a kvasinek, které byly vykultivovány ze vzorků z pítek lahví.

Číslo vzorku	Název druhu	Skóre	Třída
1	<i>Staphylococcus warneri</i>	1,981	Bacilli
2	bez identifikace	-	-
3	<i>Yarrowia galli</i>	1,787	Saccharomycetes
4	<i>Microbacterium oxydans</i>	2,159	Actinomycetes
5	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	1,769	Actinomycetes
6	<i>Microbacterium maritopicum</i>	1,855	Actinomycetes
7	<i>Trichosporon asahii</i>	1,866	Tremellomycetes
8	<i>Microbacterium maritopicum</i>	1,692	Actinomycetes
9	<i>Chryseobacterium pallidum</i>	1,989	Flavobacteria
10	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	1,956	Actinomycetes
11	bez identifikace	-	-
12	bez identifikace	-	-
13	<i>Kocuria rhizophila</i>	2,238	Actinomycetes
14	<i>Acinetobacter pittii</i>	2,104	Gammaproteobacteria
15	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,071	Gammaproteobacteria
16	<i>Corynebacterium callunae</i>	2,234	Actinomycetes



Obrázek 48: *Chryseobacterium pallidum* – lahev T08



Obrázek 49: *Klebsiella oxytoca* – lahev T14

5.4 Porovnání výsledů kultivační a sekvenační analýzy

V rámci kultivační analýzy byly identifikovány dominantní kultivovatelné bakterie a kvasinky přítomné na hrdlech a pítkách opakovaně použitelných lahví. Bakterie ze tříd Actinomycetes, Bacilli, Flavobacteria a Gammaproteobacteria byly dominantní jak v kultivační, tak i sekvenační analýze. Kultivační analýza práci obohatila o druhy ze tříd Saccharomycetes a Tremellomycetes z říše Fungi.

Metoda MALDI-TOF je velice spolehlivá pro identifikaci rodů. Všechny rody bakterií byly detekovány ve stejných lahvích v kultivační i sekvenační analýze, s výjimkou rodu *Kocuria*. Avšak na úrovni druhů jediným detekovaným mikroorganismem ve stejné lahvi byla *Klebsiella oxytoca*. Tyto vzorky byly odebrány v rozmezí 6 měsíců. To naznačuje, že bakterie *K. oxytoca* byla pravděpodobně stálou složkou mikrobiální komunity této konkrétní lahve.

Nicméně je důležité poznamenat, že nízký počet kultivovaných a následně identifikovaných vzorků metodou MALDI-TOF mohl významně ovlivnit toto srovnání. Metagenomická analýza je velice podrobná a detekuje široké spektrum, které není kultivační metodou zachyceno. Na druhou stranu některá sekvenační data nebyla zařazena do použité databáze, což mohlo vést k neúplnosti výsledků.

Lahev, v níž se vyskytovala oportunní bakterie *K. oxytoca*, byla čištěna pouze vypláchnutím vodou. Tím pádem nedocházelo k účinnému odstranění biofilmu včetně *K. oxytoca*. Toto naznačuje, že z hlediska zdravotních rizik, je potřeba lahev čistit důkladněji.

Vzhledem k různorodosti návyků a charakteristik lahví by budoucí studie mohly provést striktněji kontrolovaný výzkum nebo zahrnout větší počet zkoumaných lahví, včetně vyššího zastoupení skleněných lahví. Tímto by bylo možné vytvořit specifitější analyzační skupiny.

Jelikož bylo zjištěno, že bakteriální diverzita se stabilizuje po více než 3 měsících aktivního používání lahve a bakterie *K. oxytoca* byla detekována ve stejné lahvi i po 6 měsících, je důležité objasnit roli mikrobiomu a hlavně biofilmu, kterou hraje na hrdlech lahví v delších časových horizontech. Klíčová otázka je, zda tento biofilm představuje pro uživatele riziko nebo ochrannou funkci.

V neposlední řadě by se budoucí výzkumy mohly zaměřit i na analýzu fungálních komunit v opakovaně použitelných lahvích s využitím sekvenační metody.

6 ZÁVĚR

Mikrobiální složení opakovaně použitelných lahví na vodu je vysoce individuální a výrazně se liší i mezi lahvemi stejného uživatele. Po více než 3 měsících používání se bakteriom na hrdle lahví stabilizuje. Tento jev vyvolává otázku, zda se jedná o pozitivní či negativní dopad na lidské zdraví. Sdílení lahví bylo spojeno s vyšší bakteriální diverzitou, přičemž bylo identifikováno několik významných oportunních patogenů, jako jsou bakterie *Acinetobacter baumannii* a *Klebsiella oxytoca*.

Různorodé přístupy k údržbě mezi dobrovolníky ztížily analýzu vlivu čištění na mikrobiální složení. I přes tuto různorodost bylo zjištěno, že většina dobrovolníků své lahve čistí nedostatečně, nejčastěji každodenním vypláchnutím vody.

Otázkou zůstává: Jaká je tedy ideální lahev?

Na základě výsledků této práce by lahev měla být kovová, s jakýmkoliv hrdlem, umožňující snadné čištění kartáčem nebo v myčce. Vzhledem k výskytu oportunních bakterií by také neměla být sdílena s ostatními lidmi.

7 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma složení mikrobiomu	8
Obrázek 2: Dominantní bakteriální kmeny obývající jednotlivé části lidského těla	10
Obrázek 3: Faktory podněcující mikrobiální dysbiózu	11
Obrázek 4: Relativní zastoupení bakteriálních kmenů v dutině ústní u 10 zdravých jedinců	12
Obrázek 5: Rozložení bakteriálních kmenů na různých prostředích kůže	13
Obrázek 6: Podobnost chemické struktury BPA a běžné formy estrogenu – Estradiol	14
Obrázek 7: Zkumavka obsahující supernatant, pelet a zbytky homogenizační směsi	19
Obrázek 8: Vyizolovaná DNA	19
Obrázek 9: Veriti 96 Well Thermal Cycler	20
Obrázek 10: Grafické znázornění použití magnetických kuliček AMPure XP Beads	21
Obrázek 11: Přečištění DNA pomocí magnetické destičky a magnetických kuliček AMPure XP Beads	22
Obrázek 12: LightCycler 480 II	23
Obrázek 13: 5200 Fragment Analyzer	24
Obrázek 14: Sekvenační kazeta	25
Obrázek 15: MiniSeq	25
Obrázek 16: Autokláv	26
Obrázek 17: Inkubátor (36 °C) s Petriho miskami se vzorky	26
Obrázek 18: Kultivace vybraných kolonií ze vzorků pítek lahví	27
Obrázek 19: Zkumavka s peletem po odpipetování supernatantu	27
Obrázek 20: Ocelová vzorkovací deska pro MALDI analýzu	27
Obrázek 21: MALDI-TOF hmotnostní spektrometr Ultraflex extreme	28
Obrázek 22: Srovnání preference materiálů zkoumaných lahví mezi chlapci a dívkami	29
Obrázek 23: Srovnání stáří zkoumaných lahví	30
Obrázek 24: Srovnání preference frekvence čištění lahví	30
Obrázek 25: Srovnání preference způsobu čištění lahví	31
Obrázek 26: Srovnání pravidelnosti sdílení lahví	31
Obrázek 27: Ověření délky fragmentů jednotlivých poolů pomocí kapilární elektroforézy na přístroji 5200 Fragment Analyzer	32
Obrázek 28: Délka fragmentů výsledné knihovny (B8)	33
Obrázek 29: Počet (%) identifikovaných čtení na jednotlivé indexy	33
Obrázek 30: Alfa diverzita – Observed, počet druhů v jednotlivých vzorcích	34
Obrázek 31: Srovnání alfa diverzity kovových a plastových lahví	35
Obrázek 32: Srovnání alfa diverzity lahví z nerezové oceli, polypropylenu a tritanu	36
Obrázek 33: Srovnání alfa diverzity alternativních pítek a hrdel lahví	37
Obrázek 34: Srovnání alfa diverzity lahví různého stáří	38
Obrázek 35: Srovnání alfa diverzity lahví čištěných různými způsoby	39
Obrázek 36: Srovnání alfa diverzity lahví, které jsou sdíleny výjimečně, běžně, nebo nikdy	40
Obrázek 37: Relativní zastoupení bakteriálních tříd v prvních stěrech všech zkoumaných lahví	41

Obrázek 38: Relativní zastoupení bakteriálních tříd ve všech vzorcích skupiny T	41
Obrázek 39: Relativní zastoupení bakteriálních druhů v prvních vzorcích všech zkoumaných lahví	42
Obrázek 40: Relativní zastoupení druhů bakterií ve vzorcích ze 2 lahví stejného uživatele .	43
Obrázek 41: Relativní zastoupení druhů bakterií ve vzorcích ze 2 lahví stejného uživatele .	44
Obrázek 42: Srovnání beta diverzity plastových a kovových lahví	45
Obrázek 43: Třídy bakterií specifické pro jednotlivé materiály lahví	46
Obrázek 44: Relativní zastoupení bakteriálních tříd, které jsou identifikátory materiálů opakovaně použitelných lahví	47
Obrázek 45: Srovnání beta diverzity lahví s různými způsoby čištění	48
Obrázek 46: Kultivované mikroorganismy ze stěru hrdla opakovaně použitelné lahve na médiu TYEA	50
Obrázek 47: Kultivované mikroorganismy ze stěru hrdla opakovaně použitelné lahve na médiu TYEA	51
Obrázek 48: <i>Chryseobacterium pallidum</i>	53
Obrázek 49: <i>Klebsiella oxytoca</i>	53

8 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Schéma reakční směsi pro PCR	20
Tabulka 2: Teplotní program termocykleru	20
Tabulka 3: Počet provedených stěrů z lahví dvou analyzovaných skupin	32
Tabulka 5: Charakteristika lahví prvního dobrovolníka	43
Tabulka 6: Charakteristika lahví druhého dobrovolníka	44
Tabulka 7: Průměrný počet CFU na miskách jednotlivých vzorků lahví	50
Tabulka 8: Seznam bakterií a kvasinek, které byly vykultivovány ze vzorků z pítek lahví ..	52

9 SEZNAM LITERATURY

AAS, J. A.; PASTER, B. J.; STOKES, L. N.; OLSEN, I. a DEWHIRST, F. E., 2005. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. Online. *Journal of Clinical Microbiology*. Roč. 43, č. 11, s. 5721-5732. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005>. [cit. 2025-01-28].

ABOU ABDALLAH, R.; OKDAH, L.; BOU KHALIL, J.; ANANI, H.; FOURNIER, P. E. et al., 2019. Draft genome and description of *Chryseobacterium phocaeense* sp. nov.: a new bacterial species isolated from the sputum of a cystic fibrosis patient. Online. *Archives of Microbiology*. Roč. 201, s. 1361–1368. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01704-1>. [cit. 2025-01-29].

AGILENT TECHNOLOGIES, INC., 2020. *5200, 5300, and 5400 Fragment Analyzer System Manual*. Online. Dostupné z: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/Fragment_Analyzer_system_manual_D0002110.pdf. [cit. 2025-01-29].

AHMAD, S. a GUO, M., 2014. Infant formula quality control. Online. *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*. Č. 10, s. 246-272. Dostupné z: <https://doi.org/10.1533/9780857099150.3.246>. [cit. 2025-02-01].

AL-SABAGH, A. M.; YEHA, F. Z.; ESHAQ, Gh.; RABIE, A. M. a ELMETWALLY, A. E., 2016. Greener routes for recycling of polyethylene terephthalate. Online. *Egyptian Journal of Petroleum*. Roč. 25, č. 1, s. 53–64. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.001>. [cit. 2025-01-28].

AMADI, A.; CHEN, D. a TONG, E., 2020. Analyzing knowledge, attitudes and practices around reusable water bottles. Online. *BCIT Environmental Public Health Journal*. Dostupné z: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.47339/ephj.2020.16>. [cit. 2025-01-27].

BECKMAN COULTER, INC., 2016. *Agencourt AMPure XP Information For Use Guide PCR Purification*. Online. Dostupné z: <https://www.beckman.cz/reagents/genomic/cleanup-and-size-selection/pcr/ampure-xp-protocol>. [cit. 2025-01-29].

BEDNÁŘ, M.; FRAŇKOVÁ, V.; SCHINDLER, J.; SOUČEK, A. a VÁVRA, J., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil. ISBN 80-238-0297-6. Dostupné také z: <http://kramerius4.nkp.cz/search/handle/uuid:4b8795c0-ebe2-11e3-a2c6-005056827e51>.

BERG, G.; RYBAKOVA, D.; FISCHER, D.; CERNAVA, T.; VERGÈS, M. C. C. et al., 2020. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. Online. *Microbiome*. Roč. 8, č. 1, s. 103. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>. [cit. 2025-01-27].

- BIK, E. M.; LONG, C. D.; ARMITAGE, G. C.; LOOMER, P.; EMERSON, J. et al., 2010. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. Online. *The ISME Journal*. Roč. 4, č. 8, s. 962-974. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.30>. [cit. 2025-01-28].
- CABRERA, J. M. a MONTE, D. F. M., 2024. Microbiota [mī''-krō-bī'-ō-'tə], microbiome [mī''-krō-bī'-ōm]. Online. *Emerging Infectious Diseases*. Roč. 30, č. 8, s. 1663. Dostupné z: <https://doi.org/10.3201/eid3008.230677>. [cit. 2025-01-27].
- CAO, X. L. a CORRIVEAU, J., 2008. Migration of bisphenol A from polycarbonate baby and water bottles into water under severe conditions. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Roč. 56, č. 15, s. 6378-81. Dostupné z: <https://doi.org/https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18636679/>. [cit. 2025-02-01].
- COSTALONGA, M. a HERZBERG, M. C., 2014. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. Online. *Immunology Letters*. Roč. 162, č. 2, s. 22-38. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.08.017>. [cit. 2025-01-28].
- DAHAL, R. H.; CHAUDHARY, D. K.; KIM, D. U.; PANDEY, R. P. a KIM, J., 2021. *Chryseobacterium antibioticum* sp. nov. with antimicrobial activity against Gram-negative bacteria, isolated from Arctic soil. Online. *The Journal of Antibiotics*. Roč. 74, s. 115-123. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41429-020-00367-1>. [cit. 2025-01-29].
- DAS, L. a DAS, S. K., 2022. *Moraxella tetraodonis* sp. nov., isolated from freshwater pufferfish (*Tetraodon cutcutia*) skin. Online. *Archives of microbiology*. Roč. 204, s. 389. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03013-6>. [cit. 2025-01-29].
- DELISH, 2020. *You Should Be Cleaning Your Water Bottle Way More Often Than You Already Are*. Online. Dostupné z: <https://www.delish.com/food-news/a33275086/wash-reusable-water-bottle/>. [cit. 2025-02-02].
- DEWHIRST, F. E.; CHEN, T.; IZARD, J.; PASTER, B. J.; TANNER, A. C. R. et al., 2010. The Human Oral Microbiome. Online. *Journal of Bacteriology*. Roč. 192, č. 92, s. 5002-17. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/jb.00542-10>. [cit. 2025-01-28].
- DOMINIGUEZ-BELLO, M. G., 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Roč. 107, č. 26, s. 11971-11975. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>. [cit. 2025-01-28].
- EARTHDAY.ORG, 2022. *END PLASTIC POLLUTION Fact Sheet: Single-Use Plastics*. Online. Dostupné z: <https://www.earthday.org/fact-sheet-single-use-plastics/>. [cit. 2025-02-01].
- ECKBURG, P. B.; BIK, E. M.; BERNSTEIN, C. N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L. et al., 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. Online. *Science*. Roč. 308, č. 5728, s. 1635-1638. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.1110591>. [cit. 2025-01-28].

- EKKELENKAMP, M. B.; ROOIJAKKERS, S. H. M. a BONTEN, M. J. M., 2012. Staphylococci and micrococci. Online. *Infectious Diseases*. Roč. 2, č. 165, s. 1632-1644. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323045797001659>. [cit. 2025-02-01].
- GALLO, R. L., 2017. Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes. Online. *The Journal of Investigative Dermatology*. Roč. 137, č. 6, s. 1213–1214. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.045>. [cit. 2025-01-28].
- GROSS, E. L.; LEYS, E. J.; GASPAROVICH, S. R.; FIRESTONE, N. D.; SCHWARTZBAUM, J. A. et al., 2010. Bacterial 16S Sequence Analysis of Severe Caries in Young Permanent Teeth. Online. *Journal of Clinical Microbiology*. Roč. 48, č. 11, s. 4121–4128. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JCM.01232-10>. [cit. 2025-02-02].
- HAQUE, F. a FAN, C., 2023. Fate of microplastics under the influence of climate change. Online. *IScience*. Roč. 26, č. 9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107649>. [cit. 2025-02-01].
- HARASZTHY, V. I.; ZAMBON, J. J.; SREENIVASAN, P. K.; ZAMBON, M. M.; GERBER, D. et al., 2007. Identification of oral bacterial species associated with halitosis. Online. *Journal of the American Dental Association*. Roč. 138, č. 8, s. 1113–1120. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.14219/jada.archive.2007.0325>. [cit. 2025-02-02].
- HARIHARAN, A. V. a SANKAR, M. M., 2024. Daily Use Water Bottles as a Hub for Microbial Population: A Comparative Study of PET vs. Stainless Steel Water Bottles and Outcome of Washing Strategy Intervention. Online. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. Roč. 16, č. 2, s. 1242–1245. Dostupné z: https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_559_23. [cit. 2025-02-02].
- HARINI, K.; AJILA, V. a HEGDE, S., 2013. Bdellovibrio bacteriovorus: A future antimicrobial agent? Online. *Indian Society Periodontology*. Roč. 17, č. 6, s. 823–825. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.4103/0972-124X.124534>. [cit. 2025-02-01].
- HOU, K.; WU, Z. X.; CHEN, X. Y.; WANG, J. Q.; ZHANG, D. et al., 2022. Microbiota in health and diseases. Online. *Signal transduction and targeted therapy*. Roč. 7, č. 135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>. [cit. 2025-01-28].
- HUANG, X.; HUANG, X.; HUANG, Y.; ZHENG, J.; LU, Y. et al., 2023. The oral microbiome in autoimmune diseases: friend or foe? Online. *Journal of Translational Medicine*. Roč. 21, č. 211. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12967-023-03995-x>. [cit. 2025-01-28].
- HUBBARD, A. T. M.; NEWIRE, E.; BOTELHO, J.; REINÉ, J.; WRIGHT, E. et al., 2020. Isolation of an antimicrobial-resistant, biofilm-forming, *Klebsiella grimontii* isolate from a reusable water bottle. Online. *Microbiology Open*. Roč. 9, č. 6, s. 1128–1134. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mbo3.1023>. [cit. 2025-01-28].

CHAIDEZ, C.; SOTO, M. a MARTINEZ, C., 2008. Drinking water microbiological survey of the Northwestern State of Sinaloa, Mexico. Online. *Journal of Water and Health*. Roč. 6, č. 1, s. 125–9. Dostupné z: <https://doi.org/10.2166/wh.2007.01>. [cit. 2025-02-01].

CHEN, Y.; HUANG, Z.; TANG, Z.; HUANG, Y.; H., M. et al., 2022. More Than Just a Periodontal Pathogen -the Research Progress on *Fusobacterium nucleatum*. Online. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. Roč. 12. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.815318>. [cit. 2025-02-01].

ILLUMINA, 2018. *MiniSeq System Denature and Dilute Libraries Guide*. Online. 2021. Dostupné z: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miniseq/miniseq-denature-dilute-guide-1000000002697-09.pdf. [cit. 2025-01-29].

ANTEZACK, A.; BOXBERGER, M.; ROLLAND, C.; MONNET-CORTI, V. a LA SCOLA, B., 2021. Isolation and Characterization of *Kingella bonacorsii* sp. nov., A Novel *Kingella* Species Detected in a Stable Periodontitis Subject. Online. *Pathogens*. Roč. 10, č. 2, s. 240. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pathogens10020240>. [cit. 2025-02-01].

JAIN, K.; BHUNIA, H. a BHUDDY, M. S., 2021. Degradation of polypropylene-poly-L-lactide blends by *Bacillus* isolates: a microcosm and field evaluation. Online. *Bioremediation Journal*. Roč. 26, č. 1, s. 64–75. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10889868.2021.1886037>. [cit. 2025-02-01].

JAMAL, M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S.; JALIL, F.; IMRAN, M. et al., 2018. Bacterial biofilm and associated infections. Online. *Journal of the Chinese Medical Association*. Roč. 81, č. 7, s. 7-11. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>. [cit. 2025-02-02].

KHANNA, S. & TOSH, P. K., 2014. A clinician's primer on the role of the microbiome in human health and disease. Online. *Mayo Clinic proceedings*. Roč. 89, č. 1, s. 107–114. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.10.011>. [cit. 2025-01-27].

KILIAN, M., 2018. The oral microbiome – friend or foe? Online. *European Journal of Oral Science*. Roč. 126, č. S1, s. 5–12. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/eos.12527>. [cit. 2025-01-28].

LEVY, M.; KOŁODZIEJCZYK, A. A.; THAISS, C. A. a ELINAV, E., 2017. Dysbiosis and the immune system. Online. *Nature reviews Immunology*. Roč. 17, s. 219–232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nri.2017.7>. [cit. 2025-01-28].

LI, K.; BIHAN, M.; YOOSEPH, S. a METHÉ, B. A., 2012. Analyses of the microbial diversity across the human microbiome. Online. *PLoS one*. Roč. 7, č. 6. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032118>. [cit. 2025-01-28].

- LIU, H. a LIU, Q., 2017. Rapid Microbial Growth in Reusable Drinking Water Bottles. Online. *Annals of Civil and Environmental Engineering*. Roč. 1, č. 1, s. 55–62. ISSN 25740350. Dostupné z: <https://doi.org/10.29328/journal.acee.1001007>. [cit. 2025-01-27].
- LIU, J. Y.; ZHANG, J. F.; WU, H. L.; CHEN, Z.; LI, S. Y. et al., 2023. Proposal to classify *Ralstonia solanacearum* phylotype I strains as *Ralstonia nicotianae* sp. nov., and a genomic comparison between members of the genus *Ralstonia*. Online. *Frontiers in microbiology*. Roč. 14. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1135872>. [cit. 2025-01-29].
- Microbiology by numbers, 2011. Online. *Nature Reviews Microbiology*. Roč. 9, s. 628. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2644>. [cit. 2025-01-27].
- MINISTERSTVO ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ, 2024. *Unikátní experiment: Jen každá druhá PET lahev putuje k recyklaci. Zlepšit to může zálohový systém*. Online. Dostupné z: https://www.mzp.cz/cz/news_20240606_Unikatni-experiment-Jen-kazda-druha-PET-lahev-putuje-k-recyklaci. [cit. 2025-01-28].
- MOUSA, W. K.; CHEHADEH, F. a HUSBAND, S., 2022. Recent Advances in Understanding the Structure and Function of the Human Microbiome. Online. *Frontiers in microbiology*. Roč. 13. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.825338>. [cit. 2025-01-28].
- MUHSIL, J.; WISAL, A.; SAADIA, A.; FAZAL, J.; MUHAMMAD, I. et al., 2018. Bacterial biofilm and associated infections. Online. *Journal of the Chinese Medical Association*. Roč. 8, č. 11, s. 7–11. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>. [cit. 2025-02-01].
- NEMEC, A.; RADOLFOVA-KRIZOVA, L.; MAXINEROVA, M. a SEDO, O., 2017. *Acinetobacter colistiniresistens* sp. nov. (formerly genomic species 13 sensu Bouvet and Jeanjean and genomic species 14 sensu Tjernberg and Ursing), isolated from human infections and characterized by intrinsic resistance to polymyxins. Online. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. Roč. 67, č. 7, s. 2134–2141. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001903>. [cit. 2025-01-29].
- PICHLER, M.; COSKUN, Ö. K.; ORTEGA-ARBULÚ, A. S.; CONCI, N.; WÖRHEIDE, G. et al., 2018. A 16S rRNA gene sequencing and analysis protocol for the Illumina MiniSeq platform. Online. *MicrobiologyOpen*. Roč. 7, č. 1. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mbo3.611>. [cit. 2025-01-29].
- PIVNENKO, K. a ASTRUP, T. F., 2016. The challenge of chemicals in material lifecycles. Online. *Waste Management*. Roč. 56, s. 1–2. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956053X1630441X?via%3Dihub>. [cit. 2025-01-28].
- POLLET, T.; BERDJEB, L.; GARNIER, C.; DURRIEU, G.; LE POUPON, C. et al., 2018. Prokaryotic community successions and interactions in marine biofilms: the key role of

Flavobacteriia. Online. *FEMS Microbiology Ecology*. Roč. 94, č. 6. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy083>. [cit. 2025-02-01].

POPOVA, C.; DOSSEVA-PANOVA, V. a PANOV, V., 2013. Microbiology of Periodontal Diseases. A Review. Online. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. Roč. 27, č. 3, s. 3754-3759. Dostupné z: <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2013.0027>. [cit. 2025-02-02].

PROMEGA, 2024. *QuantiFluor® dsDNA System Technical Manual*. Online. Dostupné z: https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/quantifluor-dsdna-system-protocol-tm346.pdf?rev=e4a9ac60a77448108b16293db41935d8&sc_lang=en. [cit. 2025-01-29].

QIAGEN, 2020. *DNeasy UltraClean Microbial Kit*. Online. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/microbial-dna/dneasy-ultraclean-novipure-microbial-kits>. [cit. 2025-01-29].

RICHTER, C. A.; BIRNBAUM, L. S.; FARABOLLINI, F.; NEWBOLD, R. R.; RUBIN, B. S. et al., 2007. In Vivo Effects of Bisphenol A in Laboratory Rodent Studies. Online. *Reproductive toxicology*. Roč. 24, č. 2, s. 199-224. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.06.004>. [cit. 2025-01-28].

ROCHESTER, J. R. a BOLDEN, A. L., 2015. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. Online. *Environmental Health Perspectives*. Roč. 123, č. 7, s. 643-50. Dostupné z: <https://doi.org/10.1289/ehp.1408989>. [cit. 2025-02-01].

RUIZ, A., 2024. 15 Fascinating Reusable Water Bottle Statistics & Facts. Online. *TheRoundup.org*. Dostupné z: <https://theroundup.org/reusable-water-bottle-statistics/>. [cit. 2025-02-01].

SENDER, R.; FUCHS, S. & MILO, R., 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. Online. *PLoS Biology*. Roč. 14, č. 8. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>. [cit. 2025-01-27].

SFRISO, R.; EGERT, M.; GEMPELER, M.; VOEGELI, R. a CAMPICHE, R., 2020. Revealing the secret life of skin - with the microbiome you never walk alone. Online. *International Journal of Cosmetic Science*. Roč. 42, č. 2, s. 116–126. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ics.12594>. [cit. 2025-01-28].

SCHARSCHMIDT, T. C. a FISCHBACH, M. A., 2013. What Lives On Our Skin: Ecology, Genomics and Therapeutic Opportunities Of the Skin Microbiome. Online. *Drug discovery today. Disease mechanisms*. Roč. 10, č. 3–4, s. e83-e89. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2012.12.003>. [cit. 2025-01-28].

SIDEBOTTOM, A. M., 2023. A Brief History of Microbial Study and Techniques for Exploring the Gastrointestinal Microbiome. Online. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. Roč. 36, č. 2, s. 98–104. Dostupné z: <https://doi.org/10.1055/s-0042-1760678>. [cit. 2025-01-27].

STEINMETZ, R.; BROWN, N. G.; ALLEN, D. L.; BIGSBY, R. M. a BEN-JONATHAN, N., 1997. The Environmental Estrogen Bisphenol A Stimulates Prolactin Release in Vitro and in Vivo 1. Online. *Endocrinology*. Roč. 138, č. 5, s. 1780–6. Dostupné z: <https://doi.org/10.1210/en.138.5.1780>. [cit. 2025-02-01].

SUN, X.; KIM, J.; BEHNKE, C.; ALAMANZA, B.; GREENE, C. et al., 2017. The Cleanliness of Reusable Water Bottles: How Contamination Levels are Affected by Bottle Usage and Cleaning Behaviors of Bottle Owners. Online. *Food Protection Trends*. Roč. 37, č. 6, s. 392–402. Dostupné z: <https://www.foodprotection.org/members/fpt-archive-articles/2017-11-the-cleanliness-of-reusable-water-bottles-how-contamination-levels-are-affected-by-bottle-us/>. [cit. 2025-01-29].

SUNIL, T.; IZARD, J.; WALSH, E.; BATICH, K.; CHONGSATHIDKIET, P. et al., 2017. The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. Online. *Cancer Research*. Roč. 77, č. 8, s. 1783–1812. Dostupné z: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/77/8/1783/625126/The-Host-Microbiome-Regulates-and-Maintains-Human>. [cit. 2025-01-31].

THE NATIONAL OCEAN SERVICE, 2024. *What are microplastics?* Online. Dostupné z: <https://oceanservice.noaa.gov/education/tutorial-coastal/marine-debris/md04.html>. [cit. 2025-02-01].

THOMAS, S.; IZARD, J.; WALSH, E.; BATICH, K.; CHONGSATHIDKIET, P. et al., 2017. The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. Online. *A Primer and Perspective for Non-Microbiologists*. Roč. 77, č. 8, s. 1783–1812. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2929>. [cit. 2025-02-02].

TREADMILL REVIEWS, 2019. *Water bottle germs revealed*. Online. Dostupné z: <https://www.treadmillreviews.ca/water-bottle-germs-revealed-2019/>. [cit. 2025-01-29].

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C.; KNIGHT, R., 2007. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. Online. *Nature*. Roč. 449, s. 804–810. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nature06244>. [cit. 2025-01-27].

VEMURI, R. a HERATH, M. P., 2023. Beyond the Gut, Emerging Microbiome Areas of Research: A Focus on Early-Life Microbial Colonization. Online. *Microorganisms*. Roč. 11, č. 2, s. 239. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/2/239>. [cit. 2025-01-27].

VON GRAEVENITZ, A., 2004. *Rothia dentocariosa*: taxonomy and differential diagnosis. Online. *Clinical Microbiology and Infection*. Roč. 10, č. 5, s. 399-402. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00784.x>. [cit. 2025-02-01].

Vyhláška č. 252/2004 Sb.: Vyhláška, kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, 2004. In:.

WAKUI, A.; SANO, H.; HIRABUKI, Y.; KAWACHI, M.; AIDA, A. et al., 2021. Profiling of Microbiota at the Mouth of Bottles and in Remaining Tea after Drinking Directly from Plastic Bottles of Tea. Online. *Dentistry Journal*. Roč. 9, č. 6, s. 58. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/dj9060058>. [cit. 2025-01-28].

WALTER, J. a LEY, R., 2011. The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. Online. *Annual review of microbiology*. Roč. 65, s. 411–429. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102830>. [cit. 2025-01-27].

WINIARSKA, E.; JUTEL, M. a ZEMELKA-WIACEK, M., 2024. The potential impact of nano- and microplastics on human health: Understanding human health risks. Online. *Environmental research*. Roč. 251, č. 2. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118535>. [cit. 2025-02-01].

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024. *WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*. Online. Dostupné z: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>. [cit. 2025-01-29].

YADAV, M. a CHAUHAN, N. S., 2022. Microbiome therapeutics: exploring the present scenario and challenges. Online. *Gastroenterology report*. Roč. 10. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/gastro/goab046>. [cit. 2025-01-28].