

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



**Výskyt genů rezistence k tetracyklinu v prostředích
s různou mírou antropogenního vlivu**

Bakalářská práce

Zuzana Stehlíková

školitel: Mgr. Martina Kyselková Ph.D.
(BC AV ČR, v.v.i. – ÚPB)

školitel – specialista: RNDr. Dana Elhottová Dr.
(BC AV ČR, v.v.i. – ÚPB)

České Budějovice 2011

Stehlíková, Z., 2011: Výskyt genů rezistence k tetracyklinu v prostředích s různou mírou antropogenního vlivu [Presence of tetracycline resistance genes in ecosystems with distinct levels of human impact. Bc Thesis, in Czech.] – 53 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Tato práce shrnuje současné poznatky o výskytu genů tetracyklinové rezistence v prostředích s různou mírou vlivu člověka. V experimentální části byl sledován výskyt osmi vybraných genů tetracyklinové rezistence v půdních vzorcích z farem hnojených kravskou mrvou a farem nehnojených (představujících půdy člověkem ovlivněné) a z národních parků (představujících půdy člověkem neovlivněné).

Annotation:

The incidence of tetracycline resistance genes in the environments with different levels of human impact were compared in this work. The experimental part included detection of eight tetracycline resistance genes in soils from manured and non-manured farms (representing man-affected environment) and soils from national parks (representing non-affected environment).

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Dále prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 19.4.2011

.....
Zuzana Stehlíková

Poděkování

Největší poděkování patří mé školitelce Mgr. Martině Kyselkové Ph.D., za odborné vedení, poskytování cenných rad a podkladů pro moji práci, za její čas, trpělivost, ochotu a podporu. Velmi ráda bych také poděkovala RNDr. Daně Elhottové Dr. za skvělou možnost práce v laboratoři na zajímavém tématu, za šanci prezentovat své výsledky na konferenci, za cenné připomínky a za poskytnutí údajů o lokalitách, uvedených v práci. Tímto také děkuji Mgr. Jiřímu Petráskovi za grafické úpravy schémat odběrových míst. Velký dík patří také všem ostatním pracovníkům Ústavu půdní biologie, se kterými jsem měla čest se poznat a kteří mi po dobu práce v laboratoři velmi ochotně pomáhali. V neposlední řadě děkuji také své rodině, všem svým blízkým a přátelům za jejich psychickou a morální podporu. Bakalářská práce byla finančně podporována projektem Grantové agentury GAČR P504/10/2077 s názvem *Charakteristika a hodnocení rizik spojených s rezervoáry antibiotické rezistence v půdě*, a z části také grantem MŠMT ČR (LC06066) *Centra environmentální mikrobiologie*.

OBSAH

1	Úvod	1
2	Literární rešerše	4
2.1	Antibiotika.....	4
2.2	Rezistence k antibiotikům	5
2.2.1	Mechanismy rezistence	6
2.2.2	Horizontální přenos genů rezistence k antibiotikům.....	6
2.2.3	Význam zemědělské antibiotické praxe pro vznik a šíření antibiotické rezistence	7
2.2.4	Detekce genů antibiotické rezistence v prostředí.....	7
2.3	Tetracyklinová antibiotika.....	8
2.3.1	Účinky tetracyklinu	8
2.3.2	Rezistence k tetracyklinu: mechanismy, geny a jejich distribuce.....	9
2.4	Výskyt bakteriální rezistence k tetracyklinu v prostředí.....	11
2.4.1	Bakteriální rezistence v prostředí vysoce ovlivněném člověkem.....	16
2.4.2	Bakteriální rezistence v prostředí málo ovlivněném člověkem.....	18
2.4.3	Bakteriální rezistence v člověkem neovlivněném prostředí.....	21
3	Experimentální část.....	25
3.1	Charakteristika odběrových míst.....	25
3.2	Izolace bakteriální DNA z půdy	29
3.3	Izolace DNA z bakterie rodu <i>Streptomyces</i>	30
3.4	Polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR)	31
3.5	Gelová elektroforéza.....	34
4	Výsledky	36
5	Diskuze.....	39
6	Závěr	42
7	Seznam literatury.....	43
8	Přílohy.....	51

Seznam zkratek

A-T pár	Komplementární pár adenin-thymin
ATP	Adenosintrifosfát
BSA	Hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumine)
Da	Dalton
dATP	Deoxyadenosintrifosfát
dCTP	Deoxycytidintrifosfát
dGTP	Deoxyguanosintrifosfát
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	Deoxynukleotidtrifosfáty
dTTP	Deoxythimidintrifosfát
eDNA	Environmentální DNA (DNA izolovaná přímo z půdy, vody, apod.)
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
G ⁺	Gram pozitivní
G ⁻	Gram negativní
G-C pár	komplementární pár bází guanin-cytosin
MBC	Minimální baktericidní koncentrace
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
RNA	Ribonukleová kyselina
RPM	Počet otáček za minutu (Revolutions Per Minute)
SDS	Dodecylsírán sodný
TAE pufr	40 mM Tris, 20mM kys. octová, 1 mM EDTA, pH=8,0
Taq-polymeráza	Termostabilní DNA polymeráza bakterie <i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	$C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$
16S rRNA	Ribozomální RNA malé podjednotky prokaryotního ribozomu

1 Úvod

Vznik a vývoj populace člověka na naší planetě doprovází vznik a vývoj populací bakterií. Většina bakterií osidlujících tělo člověka jsou komenzálové, některé ale mohou být zdrojem závažných onemocnění. V minulosti byli lidé proti bakteriálním infekcím většinou bezbranní, a docházelo tak k častým epidemiím. Velkým krokem kupředu v léčbě bakteriálních infekcí byl objev britského bakteriologa Alexandera Fleminga z roku 1929, který zjistil, že látka produkovaná plísní *Penicillium chrysogenum* inhibuje růst okolních bakterií. Takto bylo tedy objeveno první antibiotikum - penicilin. Po zavedení antibiotik do klinické praxe po 2. světové válce se zdálo, že lidé zvítězili nad bakteriemi a bakteriálními infekcemi, které byly jedním z hlavních problémů v terapii onemocnění člověka (Levy, 1998).

Se zvyšujícím se používáním antibiotik se ovšem začaly vyskytovat případy, kdy antibiotika nezabírala, a to proto, že na ně byly bakterie rezistentní. To vedlo vědce k hledání antibiotik od nových producentů (především bakterií) a také dalších možností produkce nových antibiotik, například modifikací jejich chemické struktury nebo vytvářením antibiotik nových, čistě chemickou cestou (semisyntetická a syntetická antibiotika). K těmto novým typům antibiotik se ovšem také selektovaly rezistentní kmeny bakterií a šířily se dál do prostředí. Vznik a přenos antibiotických rezistencí představuje v současné době pro lidstvo hrozbu v podobě bakteriálních infekcí, které nebudeme schopni účinně léčit. Hledání nových antibiotik představuje navíc nemalý ekonomický problém při financování těchto výzkumů.

Abychom mohli předcházet rizikům spojeným se šířením rezistencí na antibiotika, musíme nejprve pochopit původ těchto rezistencí a také mechanismy, kterými se mohou dále vyvíjet a šířit. Počátky vzniku antibiotické rezistence u bakterií můžeme s jistotou zařadit do pre-antibiotické éry. Rezistence na antibiotika se totiž musela vždy vyskytovat (a stále se vyskytuje) u organismů, které takové látky produkují a které se tedy samy musí chránit před jejich účinkem (např. u bakterií rodu *Streptomyces*). Jak se tedy objevila rezistence u bakterií, které nejsou přirozenými producenty používaných antibiotik (např. *Escherichia coli*)? Můžeme si to vysvětlovat tak, že bakterie na antibiotikum původně citlivá získala geny rezistence od bakterie antibiotika produkující – primárně rezistentní – pomocí takzvaného horizontálního přenosu genů (Schwarz a Chaslus-Dancla, 2001). U bakterií navíc stále dochází i ke vzniku nových genů rezistence, na základě mutací (změn) v jejich genomech.

Některé geny rezistence na antibiotika se tak nejspíše postupně vyvinuly z genů, které měly v bakteriálních buňkách původně jinou funkci (Piepersberg et al. 1988; Gaze et al. 2008).

Dnes již víme, že k selekci genů rezistence u bakterií přispívá nevhodné užívání antibiotik lidmi, např. při nedobráni antibiotika, kdy nedojde k úplnému vyhubení cílené bakterie, nebo při nasazování antibiotik proti virovým nemocem, k jejichž léčení jsou naprosto nevhodná (Levy, 2002). Za rozšíření rezistencí k antibiotikům může v nemalé míře také jejich nadužívání v zemědělství. Dříve se používala antibiotika nejen jako léky na různá onemocnění zvířat, ale také jako prevence proti chorobám nebo dokonce jako stimulatory růstu hospodářských zvířat (Sarmah et al. 2006). Jako stimulatory růstu a profylaktika byla podávána především antibiotika ze skupiny tetracyklinů (Sawant et al. 2005), která se navíc používají i v klinické praxi, a to už od 50. let (Aminov et al. 2001). Toto dlouhodobé používání u lidí a zvířat vedlo k selekci velkého množství nových genů rezistence k tetracyklinovým antibiotikům – v současné době jich známe přes čtyřicet různých tříd a téměř každý rok je popsána nějaká nová (Teo et al. 2002; Agerso a Guardabassi, 2005; Brown et al. 2008).

Výskyt identických genů tetracyklinové rezistence u bakterií izolovaných z lidí, hospodářských zvířat a půdy (Aarestrup et al. 2000; Bryan et al. 2004) napovídá, že hnojení půd živočišným odpadem z antibiotiky ošetřovaných zvířat zřejmě velkou měrou přispívá k výskytu a následnému šíření rezistentních bakterií v půdách a dalších ekosystémech. Samotné zemědělské půdy jsou považovány za důležitý rezervoár rezistencí k tetracyklinu (Chee-Sanford et al. 2009). Otázkou ale zůstává, do jaké míry je výskyt genů rezistence k tetracyklinu v půdě zaviněn lidskými aktivitami a do jaké míry odpovídá přirozenému výskytu rezistencí u půdních mikroorganismů – např. u přirozených producentů antibiotik nebo bakterií žijících v kontaktu s těmito producenty. Studie prováděné v permafrostech (Midlin et al. 2008) nebo v sedimentech starých několik milionů let (Brown et al. 2008) totiž ukazují, že i v prostředích nezasazených průmyslovou výrobou antibiotik se rezistence na tetracyklin vyskytují.

Hlavním cílem této studie bylo porovnat výskyt genů rezistence na tetracyklin v půdách člověkem neovlivněných a v půdách s různým zemědělským zatížením v souvislosti s použitím antibiotik a organickým hnojením. Na tetracyklin jsme se zaměřili z toho důvodu, že patří k nejdéle používaným antibiotikům s aplikací v humánní i veterinární medicíně, včetně stimulace růstu hospodářských zvířat. Ke studii byly vybrány půdy pocházející z málo

přístupných kanadských národních parků, zemědělské půdy nehnojené živočišnými odpady a zemědělské půdy, do kterých se aplikuje hnůj z antibiotiky ošetřovaných zvířat. Geny tetracyklinové rezistence byly detekovány v celkové půdní DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (*polymerase chain reaction*, PCR). Tato bakalářská práce byla vypracována jako součást projektu GAČR P504/10/2077 s názvem *Charakteristika a hodnocení rizik spojených s rezervoáry antibiotické rezistence v půdě*.

Hypotézy:

- Geny rezistence na tetracyklin se vyskytují v půdách všech testovaných oblastí, tedy jak v půdách národních parků, tak i v půdách hnojených a nehnojených farem.
- Nejvíce typů genů rezistence na tetracyklin očekáváme v půdách z hnojených farem, méně pak z farem nehnojených.
- Nejméně typů genů rezistence očekáváme v národních parcích. Zde předpokládáme výskyt především producentických genů.

Jednotlivé cíle práce:

- Kriticky zhodnotit současné poznání o výskytu bakteriálních rezistencí na tetracyklin v prostředích s různou mírou antropogenního vlivu.
- Zvládnout základní metody molekulární biologie, především izolaci DNA z půdních vzorků a metodu PCR používanou pro detekci jednotlivých genů v půdě.
- Pomocí reakce PCR porovnat výskyt genů tetracyklinové rezistence v půdách neovlivněných člověkem (půdy kanadských národních parků) a v půdách s různým zemědělským zatížením (půdy z farem hnojených a nehnojených).

2 Literární rešerše

2.1 Antibiotika

Antibiotika jsou nízkomolekulární látky (menší než 2000Da) různorodých chemických struktur, přirozeně produkované některými organismy jako jedny ze sekundárních metabolitů. Tyto látky, na rozdíl od metabolitů primárních, nejsou nezbytně nutné pro růst a množení organismů, ale má se za to, že v přírodě zvyšují konkurenceschopnost vůči druhům s podobnými ekologickými nároky nebo zvyšují odolnost proti některým parazitům či herbivorům (Spížek, 2007).

Antibiotika produkují různé druhy bakterií (např. z rodu *Streptomyces*), hub (např. rod *Penicillium*), ale i rostlin (např. fytoncidy se vyskytují u křenu selského (*Armoracia rusticana*); Thurzová et al. 1983) a živočichů (např. polypeptidy defenziny tvořené v bílých krvinkách člověka (Ganz, 2003)). Nejvíce známých antibiotik je produkováno půdními bakteriemi rodu *Streptomyces* (kmen Actinobacteria), což jsou gram pozitivní aerobní tyčinkovité bakterie tvořící v půdě vláknitá mycelia. Nejznámější pro produkci antibiotik jsou např. *Streptomyces griseus* (streptomycin), *Streptomyces kanamyceticus* (kanamycin), *Streptomyces erythraeus* (erythromycin), *Streptomyces venezuelae* (chloramfenikol) či *Streptomyces aureofaciens* (chlortetracyklin)¹.

Proč, za jakých podmínek, a v jakém množství jsou antibiotika produkována v přirozeném prostředí (např. u bakterií žijících v půdě) je stále předmětem debat (Yim et al. 2006). Zdá se, že koncentrace antibiotik uvolňovaných do okolí buněk určují, jakou budou mít tyto látky funkci (Davies et al. 2006). Zatímco v nízkých koncentracích mohou antibiotika fungovat jako prostředek komunikace mezi buňkami (signální molekuly), ve vysokých koncentracích zabraňují růstu buněk (účinek bakteriostatický) nebo je přímo zabíjejí (účinek bakteriocidní), což může mít u půdních bakterií význam při likvidaci potravního konkurenta. Právě pro své bakteriostatické či bakteriocidní účinky začali lidé využívat antibiotika k léčbě mikrobiálních infekcí.

Antibiotika byla zavedena do léčebné praxe počátkem padesátých let dvacátého století. Od té doby se způsob jejich produkce i použití velmi posunuly, čímž se smazal rozdíl mezi antibiotiky a synteticky připravenými chemoterapeutiky. Dnes tak již hovoříme o

¹ <http://www.gate2biotech.cz/nova-latka-klicem-ke-stovkam-antibiotik/>, 13.11.2008

antibiotických a chemoterapeutických látkách souhrnně jako o antimikrobiálních látkách (Bednář et al. 1996). Podle toho, na které mikroorganismy působí, lze mezi antimikrobiálními látkami rozlišit látky antibakteriální (antibiotika), antimykotika, antivirotika nebo antituberkulotika (Lochmann, 1990). Pojem *antibiotikum* může tedy v širším slova smyslu zahrnout všechny antimikrobiální látky, nebo v užším smyslu pouze látky účinné proti bakteriím – a právě v tomto užším smyslu budeme v této práci dále pojem antibiotikum používat.

Důležitou požadovanou vlastností antibiotik pro jejich použití při léčbě infekcí člověka a zvířat je jejich selektivní toxicita, která zajišťuje působení těchto látek pouze na buňky prokaryotické a tak neškodí buňkám makroorganismu (Votava, 2005). Selektivity účinku lze dosáhnout působením na struktury v buňce nebo na enzymatické pochody specifické pro bakterie. Typické mechanismy účinku antibiotik na bakterie jsou potlačení syntézy buněčné stěny bakterií (např. peniciliny, cefalosporiny), poškození funkce cytoplazmatické membrány (např. polypeptidy – polymyxiny aj.), potlačení syntézy bílkovin (např. makrolidy, tetracykliny, aminoglykosidy), potlačení syntézy nukleových kyselin (např. chinolony, rifampicin) a potlačení syntézy růstových faktorů (sulfonamidy) (Votava, 2005; Spížek, 2007).

Účinnost antibiotika na bakterie můžeme hodnotit podle minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) dané látky. MIC je definována jako nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která inhibuje viditelný růst mikroorganismu (Andrews, 2001). MBC je definována jako minimální koncentrace látky, která usmrtí 99,9% původní populace mikroorganismů (Votava, 2005). Podle spektra účinku dělíme antibiotika na úzkospektrá, která ovlivňují jen úzké skupiny bakterií a širokospektrá, která působí na širokou škálu mikroorganismů, včetně těch, které se vyskytují v organismu přirozeně, což může mít negativní dopad na běžnou, komenzální mikroflóru.

2.2 Rezistence k antibiotikům

Rezistenci bakterie k antibiotiku lze definovat jako schopnost bakteriální populace přežít v prostředí s inhibiční koncentrací příslušného antibiotika (Levy, 1998). Některé bakterie jsou přirozeně rezistentní k určitému typu antibiotik, např. proto, že pro něj nenesou zásahové místo v buňce. V tom případě hovoříme o primární rezistenci. Získaná (sekundární) rezistence naopak vzniká jako důsledek genetických změn v původně citlivé populaci, a to buď jako důsledek postupných mutací předávaných vertikálně (při dělení bakterií) nebo jako

důsledek horizontálního přenosu genetické informace (organismus přijímá část genetické informace jiného jedince) (Spížek, 2007). V této práci se budeme nadále zabývat převážně získanými rezistencemi.

2.2.1 Mechanismy rezistence

Geny zajišťující rezistenci k antibiotikům mají různý fenotypový projev, na jehož základě můžeme rozlišit různé typy mechanismů rezistence (Spížek, 1999):

- Změna zásahového místa antibiotika v buňce – antibiotikum se na takovéto místo už nedokáže navázat a bakterie se stává rezistentní. Jako příklad lze uvést změny ve vazebných bílkovinách pro penicilin – jsou to bílkoviny obalů buňky, které syntetizují bakteriální buněčnou stěnu.
- Aktivní vypuzování antibiotika z buňky – bakterie produkují membránové proteiny (takzvané efluxní pumpy), které z buňky antibiotikum odstraňují. Tento typ rezistence zahrnuje rezistenci na tetracyklin nebo některé chinolony.
- Zneškodnění antibiotika pomocí bakteriálních enzymů – příkladem může být rezistence na β -laktamová antibiotika, kdy bakterie produkují enzymy β -laktamázy, které se vážou na antibiotika a otvírají β -laktamový kruh.
- Změna prostupnosti obalů buňky – sníží pronikání antibiotika do buňky (Spížek, 2007).

2.2.2 Horizontální přenos genů rezistence k antibiotikům

Horizontální přenos genetické informace se může odehrávat jak mezi bakteriemi téhož druhu, tak mezi nepříbuznými bakteriemi. Na horizontálním přenosu genů rezistence se významně podílí plazmidy (Roberts, 1996). Plazmidy jsou přídavné kruhové molekuly DNA, které často nesou právě geny antibiotické rezistence a mohou být mezi bakteriemi přenášeny procesem konjugace. Geny rezistence jsou navíc často asociovány také s integrony a transpozony, které umožňují akumulaci většího množství genů rezistence a jejich přenos mezi různými částmi genomu bakterie (např. mezi plazmidem a chromozomem), nebo v případě konjugativních transpozonů i mezi různými bakteriemi (Spížek, 1999).

2.2.3 Význam zemědělské antibiotické praxe pro vznik a šíření antibiotické rezistence

Má se za to, že na udržení a dalším přenosu antibiotické rezistence v půdě se podílí selekční tlak vyvolaný přítomností reziduí antibiotik v půdě (která projdou trávicím traktem zvířat a dostanou se do půdy spolu s hnojem či jinou formou exkrementů). Stopy antibiotik se podařilo detekovat v půdě, hnoji i v povrchové vodě (Chee-Sanford et al. 2009). Vzhledem k tomu, že množství antibiotik produkovaných do půdy přirozenými půdními bakteriemi je velmi malé a těžko detekovatelné (Raaijmakers et al. 2002), hlavní úlohu v udržení tohoto selekčního tlaku mají průmyslově produkovaná antibiotika. Například v roce 1996 bylo celosvětové používání antibiotik odhadováno na 27000 tun, z čehož 25% připadalo na tehdejší státy Evropské unie. Z celkové distribuce antibiotik v Evropské unii v roce 1996 bylo 50% použito k terapeutickým účelům (terapie lidí a zvířat) a 25% jako přísady do krmiv (Boatman, 1998). Uvádí se, že z roční produkce antibiotik v USA se až polovina použije v zemědělství a z toho 90% je použito na podporu růstu (Levy, 1998 a 2001). Odhaduje se, že značné množství těchto antibiotik (až 75%) je vylučováno spolu s exkrementy zvířat jako aktivní metabolity (Chee-Sanford et al. 2009).

Selekce rezistentních bakterií probíhá ale už v trávicích traktech hospodářských zvířat (Levy a Marshall, 2004). Podávání antibiotik pro podporu růstu má daleko větší dopad na vznik rezistentních kmenů bakterií, než terapeutická léčba (Van den Bogaard et al. 2001), protože zde se antibiotika podávají v subterapeutických dávkách. Tyto dávky nejsou pro bakterie smrtelné, naopak, bakterie jsou schopny v takto nízkých koncentracích antibiotik přežít a pro svoji obranu si vytvářet rezistenci. Při hnojení živočišnými exkrementy se tedy do půdy dostávají jak rezidua antibiotik, tak vlastní rezistentní mikroflóra nesoucí horizontálně přenosné geny rezistence (Sengelov et al. 2003; Schmitt et al. 2006).

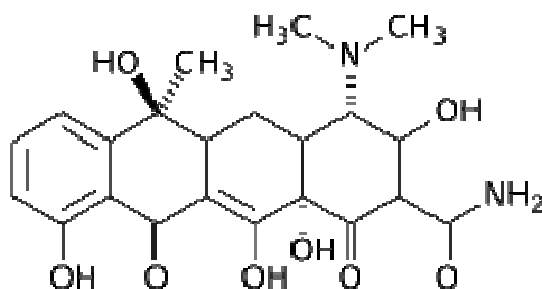
2.2.4 Detekce genů antibiotické rezistence v prostředí

Mikroorganismy, které dokážeme v laboratoři kultivovat, jsou zdrojem téměř všech dosud popsanych genů antibiotické rezistence. Geny antibiotické rezistence se izolují buď z kultivovatelných bakterií, nebo z DNA izolované přímo z přírodních vzorků (environmentální DNA; např. Aminov et al. 2001). V obou případech je možno geny amplifikovat pomocí PCR a následně klonovat do vhodných vektorů. Výsledek PCR reakce ale závisí na použitých primerech, které jsou vybrány na základě sekvencí již popsanych genů rezistence (Riesenfeld et al. 2004). Proto pomocí této metody nacházíme geny rezistence, které jsou již známé nebo

známým genům velmi podobné. Většina půdních bakterií nelze ale v laboratoři kultivovat, proto mnoho genů rezistence ještě čeká na své objevení. Jednou z cest pro objevování nových genů rezistence jsou metagenomové knihovny (Riesenfeld et al. 2004; Spížek et al. 2010).

2.3 Tetracyklinová antibiotika

Roku 1948 byl izolován a charakterizován první z tetracyklinů, chlortetracyklin, produkt bakterie *Streptomyces aureofaciens* a o něco později tetracyklin (viz Obr. 1), taktéž z bakterie *Streptomyces aureofaciens*. Do roku 1980 bylo synteticky připraveno na 1000 tetracyklinových derivátů (Chopra et al. 1992). Pro tetracyklinová antibiotika je charakteristická chemická struktura odvozená od struktury čtyř šestičlenných kruhů, z nichž první je aromatický.



Obr. 1 Strukturální vzorec tetracyklinu²

2.3.1 Účinky tetracyklinu

Tetracykliny vykazují bakteriostatickou aktivitu. V bakteriální buňce se reverzibilně vážou na ribozom a brání syntéze bílkovin (Schnappinger et al. 1996). Svoji přítomností v ribozomu zabrání nasednutí molekuly aminoacyl-tRNA na A místo (ribozomální akceptor) v malé podjednotce ribozomu, a tak nedochází k přidávání aminokyselin a tvorbě peptidického řetězce. Jsou to antibiotika se širokým spektrem účinku, díky kterému působí na G⁺ (gram pozitivní) a G⁻ (gram negativní) bakterie a na organismy jako jsou chlamydie, mykoplazmata, rickettsie a prvoci (Chopra a Roberts, 2001).

² <http://cs.wikipedia.org/wiki/Tetracyklin> 13.3.2011

2.3.2 Rezistence k tetracyklinu: mechanismy, geny a jejich distribuce

Rezistence k tetracyklinu byla zjištěna již čtyři roky po jeho zavedení do klinické praxe v roce 1956 (Spížek et al. 2010). Výzkum rezistentních bakterií ukázal, že rezistence na tetracyklinová antibiotika je zajištěna přítomností jednoho nebo více genů tetracyklinové rezistence (označované *tet*, případně *otr* a *tcr* v případě producentů z rodu *Streptomyces* – viz Tab. 1). Tyto geny kódují proteiny zajišťující jeden ze tří mechanismů rezistence: efluxní pumpa, proteiny ribozomální ochrany, nebo přímá enzymatická inaktivace léku (acetylací nebo fosforylací tetracyklinu) (Chopra a Roberts, 2001). Jednotlivé geny tetracyklinové rezistence jsou rozdělovány do tříd (rozišovaných písmeny abecedy a později i čísly, viz Tab. 1) s tím, že geny s více než 80% shodou sekvence aminokyselin patří k téže třídě (Levy et al., 1999). V rámci jednotlivých tříd je ale variabilita sekvencí poměrně nízká (u genů patřících do třídy *tet(B)* je například shoda nukleotidových sekvencí nejméně 99%; Kyselková et al., osobní komunikace). Některé třídy genů tetracyklinové rezistence se nacházejí u velkého počtu bakteriálních rodů (viz Tab. 1) a jsou tedy nejspíše předmětem častého horizontálního přenosu. Existují ale i geny, které byly nalezeny jen u jednoho bakteriálního rodu, a není tedy zatím známo, zda mohou být přeneseny i do nepříbuzných bakterií.

Tab. 1 Distribuce genů rezistence k tetracyklinu³ a jimi kódovaný mechanismus rezistence^{a,b}

Mechanismus rezistence	Geny rezistence	Počet rodů bakterií
Efluxní pumpa Všechny tyto geny kódují membránové proteiny, které transportují tetracyklin z buňky. Export snižuje intracelulární koncentraci látky a chrání tak ribozomy uvnitř buňky.	<i>tet(A)</i>	12
	<i>tet(B)</i>	16
	<i>tet(C)</i>	19
	<i>tet(D)</i>	10
	<i>tet(E)</i>	3
	<i>tet(G)</i>	5
	<i>tet(H)</i>	7
	<i>tet(I)</i>	0
	<i>tet(J)</i>	1

³ <http://arldb.cbcb.umd.edu/index.html>

	<i>tet(K)</i>	2
	<i>tet(L)</i>	10
	<i>tet(A/P)</i>	18
	<i>tet(V)</i>	1
	<i>tet(Y)</i>	4
	<i>tet(Z)</i>	1
	<i>tet(30)</i>	1
	<i>tet(31)</i>	1
	<i>tet(33)</i>	2
	<i>tet(35)</i>	0
	<i>tet(38)</i>	1
	<i>tet(39)</i>	1
	<i>tet(40)</i>	4
	<i>tet(41)</i>	1
	<i>tet(42)</i>	0
	<i>tcr(3)</i>	1
	<i>otr(B)</i>	1
	<i>otr(C)</i>	0
<p style="text-align: center;">Ochrana ribozomů</p> <p>Tyto geny kódují cytoplazmatické proteiny, které chrání ribozom před akcí tetracyklinu. Zajišťují také rezistenci také rezistenci k derivátům tetracyklinu jako např. k doxycyklinu a minocyklinu.</p>	<i>tet(M)</i>	18
	<i>tet(O)</i>	16
	<i>tet(B/P)</i>	20
	<i>tet(Q)</i>	5
	<i>tet(S)</i>	4
	<i>tet(T)</i>	2
	<i>tet(W)</i>	19
	<i>tet(32)</i>	10
	<i>tet(36)</i>	1
	<i>tet</i>	88
	<i>otr(A)</i>	1

Enzymatická inaktivace Příklad genů rezistence, které kódují enzymatické změny tetracyklinu.	<i>tet(X)</i>	4
	<i>tet(34)</i>	2
	<i>tet(37)</i>	2

^a Chopra a Roberts (2001)

^b Speer et al. (1991)

2.4 Výskyt bakteriální rezistence k tetracyklinu v prostředí

Význam lidské činnosti pro vznik a šíření rezistence k tetracyklinu můžeme pochopit pomocí porovnání výskytu rezistence v prostředí člověkem neovlivněném s prostředími v různé míře člověkem ovlivněnými. K nejčastěji studovaným neklinickým prostředím v souvislosti s výskytem rezistence k tetracyklinu patří trávicí trakt a exkrementy zvířat, půda a voda. Zde převládají práce z prostředí hluboce ovlivněných lidskou činností (především zemědělstvím) nad pracemi z prostředí člověkem nedotčenými. Porovnání také ztěžuje fakt, že se práce různých autorů liší v přístupu a použité metodice. V některých pracích jsou stanovovány pouze frekvence rezistencí u vybraného typu izolátů, zatímco v některých studiích najdeme i stanovení výskytu vybraných genů rezistence u izolátů. Jiné studie se zabývaly detekcí či kvantifikací rezistenčních genů přímo v environmentální DNA. Výběr hledaných genů se také liší studií od studie. O přehledné shrnutí výsledků těchto studií jsem se pokusila v Tab. 2.

Tab. 2 Výskyt bakteriální rezistence k tetracyklinu v prostředí s různým antropogenním vlivem

	Prostředí	Izolát či eDNA	% <i>tet</i> ^R izolátů	Výskyt genů	Citace
Prostředí neovlivněná člověkem	Permafrost (1,5 – 40m)	Gram pozitivní	5%	-	Midlin et al. (2008)
		Gram negativní	5%		
	Půda pod povrchem (170 – 210m) (stáří 3 miliony let)	Gram pozitivní	-	<i>tet(42)</i>	Brown et al. (2008)
		Gram negativní			
Miocénní sediment (stáří 17 – 19 milionů let)	<i>Streptomyces</i>	5%	-	Chroňáková et al. (2010)	

	Pramen řeky v místě nedotčeném lidskou činností		eDNA	-	<i>tet(O)</i>	Pei et al. (2006)
	Mořská voda		<i>Streptomyces</i>	-	<i>otr(A), otr(B)</i>	Nikolakopoulou et al. (2005)
Prostředí málo ovlivněná člověkem	Primární sukcese na výsypkách (stáří 1 – 44 let)	1-2 roky	<i>Streptomyces</i>	2,4%	-	Chroňáková et al. (2010)
		11-12 let		3,6%	-	
		21-22 let		2,3%	-	
		43-44 let		11,7%	-	
	Divoká zvířata	Bez kontaktu s lidmi	<i>Escherichia coli</i>	7,6%	<i>tet(A), tet(B)</i>	Literák et al. (2007)
			<i>Enterococcus</i>	8%	<i>tet(O)</i>	Anderson et al. (2008)
			<i>Escherichia coli</i>	15%	-	Nakamura et al. (1982)
			<i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus</i>	12% 8,5%	-	Livermore et al. (2001)
			<i>Enterococcus</i>	29%	<i>tet(M), tet(L)</i>	Poeta et al. (2005)
			Gram negativní	11%	-	Nascimento et al. (2003)
			Firmicutes Bacteroidetes	-	<i>tet(M)</i> a <i>tet(W)</i> ; (již se neuvádí zda se oba geny našly u obou skupin bakterií)	Jeters et al. (2009)
			Gram negativní	průměrně 20%	-	Rolland et al. (1985)
			<i>Escherichia coli</i>	12% jeleni a lišky, 0% medvědi	<i>tet(A), tet(B)</i> ; u jelenů a lišek	Literák et al. (2009)
			<i>Escherichia coli</i>	0%	-	Routman et al. (1985)

Prostředí velmi ovlivněné člověkem	V kontaktu s lidmi	Gram negativní	94%	-	Rolland et al. (1985)	
		<i>Escherichia coli</i>	5,3%	-	Routman et al. (1985)	
		Firmicutes Bacteroidetes	-	<i>tet(M)</i> , <i>tet(W)</i> a <i>tet(Q)</i> (již se neuvádí všechny tři geny našly u obou skupin bakterií)	Jeters et al. (2009)	
		<i>Escherichia coli</i>	3%	-	Sayah et al. (2005)	
		<i>Escherichia coli</i>	4%	<i>tet(B)</i>	Bryan et al. (2004)	
		<i>Staphylococcus</i>	6%	<i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i>	Hauschild et al. (2003)	
		<i>Escherichia coli</i>	3,7%	<i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> u divokých prasat; u hmyzožravců a hlodavců jen <i>tet(B)</i>	Literák et al. (2009)	
	Domáci a zájmová zvířata	Hospodářská zvířata	<i>Escherichia coli</i>	10%	-	Sayah et al. (2005)
			<i>Escherichia coli</i>	17%	<i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tet(C)</i>	Bryan et al. (2004)
			<i>Escherichia coli</i>	42%	-	Authier et al. (2006)
			<i>Escherichia coli</i>	79%	-	Clark et al. (2008)
		Hospodářská zvířata	<i>Escherichia coli</i>	28%	-	Sayah et al. (2005)
			eDNA	-	<i>tet(O)</i> , <i>tet(W)</i> , <i>tet(Q)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(S)</i>	Aminov et al. (2001)
			<i>Escherichia coli</i>	42%	<i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tet(C)</i> , <i>tet(D)</i> , <i>tet(M)</i>	Bryan et al. (2004)
eDNA			-	<i>tet(39)</i>	Agerso et al. (2004)	
<i>Escherichia coli</i>			93%	z toho <i>tet(B)</i> v 93% a <i>tet(A)</i> ve zbylých 7%	Sawant et al. (2005)	
<i>Escherichia coli</i>			64%	-	Van den Bogaard et al. (2001)	
<i>Enterococcus</i>	64%	<i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> ,	Aarestrup et al.			

			<i>tet(O)</i>	(2000)
	<i>Enterococcus</i>	43%	<i>tet(O)</i>	Anderson et al. (2008)
	<i>Vibrio harveyi</i>	-	<i>tet(A), tet(R), tet(35)</i>	Teo et al. (2002)
Zemědělské organické půdy	Gram negativní	-	<i>tet(A), tet(C), tet(E)</i>	Bronstad et al. (1996)
Zemědělské písčité půdy	Gram negativní	-	<i>tet(A), tet(C), tet(D), tet(E)</i>	Bronstad et al. (1996)
Podzemní voda	Gram pozitivní Gram negativní	-	<i>tet(M), tet(O), tet(Q), tet(W)</i>	Chee-Sanford et al. (2001)
Říční sedimenty ovlivněné zemědělskou činností	eDNA	-	<i>tet(O), tet(W), tet(T)</i>	Pei et al. (2006)
Říční sedimenty ovlivněné městskou činností	eDNA	-	<i>tet(O), tet(W)</i>	Pei et al. (2006)
Říční sedimenty ovlivněné městskou a zemědělskou činností	eDNA	-	<i>tet(O), tet(W)</i>	Pei et al. (2006)
Povrchové vody řeky v zemědělské oblasti	<i>Escherichia coli</i>	0%	-	Sayah et al. (2005)
Příměstská jezera	eDNA	-	<i>tet(A)</i>	Auerbach et al. (2007)
Zemědělské prostředí (farmy)	<i>Escherichia coli</i>	27%	-	Sayah et al. (2005)
	eDNA	-	<i>tet(39)</i>	Agerso a Guardabassi (2004)
Půda a rhizosféra	<i>Streptomyces</i>	-	<i>otr(A), otr(B)</i>	Nikolakopoulou et al. (2005)
Zemědělská půda před aplikací hnoje	eDNA	-	<i>tet(T), tet(W), tet(Z)</i>	Smitt et al. (2006)
Zemědělská půda po aplikaci hnoje	eDNA	-	<i>tet(C), tet(H), tet(Q), tet(S), tet(T), tet(W), tet(Z), tet(Y)</i>	Smitt et al. (2006)
Odpadní vody	eDNA	-	<i>tet(39)</i>	Agerso a Guardabassi (2004)

	<i>Escherichia coli</i>	28%	-	Reinhalter et al. (2003)
Lidské jímky	<i>Escherichia coli</i>	33%	-	Sayah et al. (2005)
Aktivované kaly	eDNA	-	<i>tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E), tet(G), tet(M), tet(O), tet(Q), tet(S)</i>	Auerbach et al. (2007)
	<i>Streptomyces</i>	-	<i>otr(A), otr(B)</i>	Nikolakopoulou et al. (2005)
	<i>Escherichia coli</i>	27%	-	Reinhalter et al. (2003)
Hnůj	<i>Streptomyces</i>	-	<i>otr(B)</i>	Nikolakopoulou et al. (2005)
	eDNA	-	<i>tet(B), tet(C), tet(H), tet(M), tet(E), tet(O), tet(Q), tet(S), tet(T), tet(W), tet(Z), tet(Y)</i>	Smitt et al. (2006)
Kejdivé jímky	eDNA Gram pozitivní a Gram negativní izoláty	-	<i>tet(O), tet(Q), tet(W), tet(M), tetB(P), tet(S), tet(T), otr(A)</i>	Chee-Sanford et al. (2001)
	eDNA	-	<i>tet(M), tet(O), tet(Q), tet(W), tet(B), tet(L)</i>	Peak et al. (2007)
Lidé (exkrementy)	<i>Enterococcus</i>	37%	<i>tet(M), tet(S)</i>	Aarestrup et al. (2000)
	<i>Escherichia coli</i>	21%	<i>tet(A), tet(B), tet(C)</i>	Bryan et al. (2004)

2.4.1 Bakteriální rezistence v prostředí vysoce ovlivněném člověkem

Za prostředí vysoce ovlivněná člověkem považujeme z hlediska rezistence k tetracyklinu především lidská sídla a jejich okolí včetně septiků a odpadních vod, ale také domácí a hospodářská zvířata, živočišné odpady a zemědělskou půdu. Jedná se tedy o prostředí, kde se antibiotika přímo aplikují, nebo prostředí, kam se mohou rezidua antibiotik dostat a vytvářet tak tlak na selekci a udržení genů rezistence.

Domácí zvířata žijící v těsném kontaktu s člověkem (především kočky, psi) jsou důležitými rezervoáry rezistentních či multirezistentních bakterií (Devriese et al. 1996; Weese, 2008). Výzkumy prováděné na citlivost izolátů bakterie *Escherichia coli* v Kanadě na psích (Authier et al. 2006) a koňských (Clark et al. 2008) plemenech poukazují na více jak 50% výskyt rezistence na tetracyklin. Vysoký výskyt rezistentních bakterií u domácích mazlíčků se vysvětluje jako důsledek jejich vlastní antibiotické terapie i jako důsledek kontaktu s léčenými majiteli (Prescott et al. 2002). Vedle domácích mazlíčků jsou zdrojem rezistence k tetracyklinu i hospodářská zvířata. Zajímavé výsledky přináší výskyt rezistencí u *E. coli* z hospodářských (prasata atd.) a domácích (kočky, psi) zvířat v porovnání s rezistencemi z lidských zdrojů a divokých zvířat (jelenů): Bryan et al. (2004) zjistili, že 31% izolátů (z celkového počtu) bylo vysoce rezistentní na tetracyklin a 97% z těchto kmenů neslo nejméně 1 ze 14 testovaných genů rezistence. Nejčastější výskyt byl zaznamenán u genu *tet(B)* (63%) a u genu *tet(A)* (35%). Izoláty *E. coli* získané z prasat vykazovaly největší průměrnou MIC na tetracyklin (více jak 150 μ g/ml) v kontrastu s průměrnou hodnotou MIC u izolátů z jelenů, která byla nejmenší (10 μ g/ml). MIC lidských izolátů byla srovnatelná s MIC izolátů z koček a psů a také u nich byly nalezeny shodné rezistenční geny. Výskyt genu *tet(B)* u lidí, koček, psů a i u jelenů, poukazuje na snadné šíření tohoto genu v přírodě, což může být dáno širokým spektrem jeho bakteriálních hostitelů (Tab. 1).

Při přenosu bakteriálních genů rezistence mezi jednotlivými druhy živočichů (včetně člověka) nesdílejících stejné životní areály hrají s největší pravděpodobností důležitou roli exkrementy, z nichž se rezistentní bakterie dostávají do vod a půd. Mezi důležité rezervoáry genů antibiotické rezistence do prostředí se proto řadí odpadní vody a čističky odpadních vod (Yang a Carlson, 2003). Reinhalter et al. (2003) například testovali izoláty *E. coli* ze tří čističek odpadních vod v jižním Rakousku na rezistenci k 24 antibiotikům. Nejčastěji se vyskytovala rezistence na tetracyklin, a to v průměru u 24% izolátů. Auerbach et al. (2007) pak našli v aktivovaných kalech čističek z Wisconsinu (USA) až deset různých genů

tetracyklinové rezistence, z nichž tři se vyskytovaly v menší míře i v příměstských jezerech (Tab. 2).

Dalším důležitým rezervoárem genů rezistence jsou pak živočišné odpady ze zemědělské výroby, jako například prasečí kejda a kravský hnůj. Výskyt genů rezistence k tetracyklinu v živočišných odpadech se zdá být závislý na míře použití antibiotik na farmách, jak ukázali například Peak et al. (2007). V kalojemech z farem, kde se antibiotika podávala zvířatům pouze pro terapeutické účely, bylo o tři řády méně rezistentních bakterií než v kalojemech z farem, kde se antibiotika používala i za účelem profylaxe. Prosakováním kalojemů se mohou geny tetracyklinové rezistence dostat i do podzemních vod, často používaných jako zdroj pitné vody (Chee-Sanford et al. 2001).

Vliv lidské činnosti na šíření rezistence k antibiotikům v povrchové vodě zase dobře ukázali Pei et al. (2006) ve své studii sedimentů řeky Cache La Poudre (Colorado). Autoři kvantifikovali rezidua tetracyklinu a sulfonamidů a zároveň i vybrané geny rezistence k těmto antibiotikům v pěti lokalitách s různou úrovní městského a zemědělského dopadu. V oblastech urbanizovaných či zemědělských se vyskytovalo prokazatelně více genů rezistence, než v oblastech nedotčených lidskou společností, a zároveň zde byla detekována rezidua antibiotik. Odlišné výsledky z povrchových vod získali Sayah et al. (2005). Ve své studii zjišťovali rezistenci k antibiotikům u izolátů bakterie *E. coli* ze septiků, z výkalů zvířat chovaných na farmách, hnoje a prasečí a kejdy, a z okolních povrchových vod v povodí řeky Red Cedar v Michiganu. Zatímco výskyt tetracyklin rezistentních izolátů *E. coli* dosahoval u zvířat 28%, v zemědělském prostředí (hnůj, chlévy) téměř 27% a v odpadních jímkách až 33%, v povrchových vodách zemědělských oblastí nebyly tetracyklin rezistentní izoláty nalezeny. Tento výsledek ale může být dán tím, že se jednalo pouze o jeden typ izolátu, a že v případě vzorků z povrchových vod autoři vyšetřovali pouze 26 izolátů.

Přenos genů rezistence ze zemědělských odpadů přímo do půdy prokázali např. Schmitt et al. (2006). Autoři studovali rozmanitost genů tetracyklinové rezistence v půdě ovlivněné hnojením prasečí kejdou. Zatímco na počátku pokusu detekovali v půdě pomocí PCR pouze geny *tet(T)*, *tet(W)* a *tet(Z)*, po aplikaci hnoje mohli detekovat i *tet(C)*, *tet(H)*, *tet(S)*, *tet(Q)* a *tet(Y)*, které byly přítomny i v samotném hnoji. Vliv masivního používání tetracyklinu v průběhu 20. století na vzrůst počtu genů rezistence v zemědělských půdách ukazuje i originální studie archivních půd odebíraných mezi roky 1940 – 2008 v Nizozemsku (Knapp et al. 2010). Autoři ukázali, že se od roku 1940 zvýšil počet detekovatelných tříd genů

rezistence k různým antibiotikům v půdě. Nejvyšší byl nárůst počtu tříd genů tetracyklinové rezistence, jež stoupl jen od roku 1970 patnáctkrát.

2.4.2 Bakteriální rezistence v prostředí málo ovlivněném člověkem

Za prostředí málo ovlivněná člověkem považujeme taková prostředí, kam by se neměla rezidua průmyslově vyráběných antibiotik dostat vůbec a nebo pouze výjimečně. Předpokládáme ale, že se tam mohly dostat rezistentní bakterie z prostředí člověkem ovlivněného, např. pomocí povrchové vody (Pei et al. 2006), podzemní vody (Chee Sanford et al. 2001), prostřednictvím méně plachých zvířat nebo fyzickými silami přírody (Allen et al. 2010).

Ukazuje se, že i v půdách, které zjevně nebyly vystaveny živočišným odpadům z antibiotiky krměných zvířat, se vyskytují tetracyklin rezistentní bakterie nesoucí rozšířené geny tetracyklinové rezistence (*tet(A)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*; Bronstad et al. 1996). Výskytem těchto genů v půdách nezemědělských, např. v lesích, nebylo doposud věnováno příliš pozornosti. Můžeme zde ale výskyt těchto genů předpokládat, jak napovídají četné studie izolátů z divokých zvířat a jejich exkrementů (Livermore et al. 2001; Nascimento et al. 2003; Literák et al. 2009 a další).

Rozšíření genů antibiotické rezistence u volně žijících zvířat se ovšem liší mezi jednotlivými druhy živočichů. Přesvědčili se o tom Literák et al. (2009), kteří v České a Slovenské republice stanovovali přítomnost antimikrobiální rezistence v divoce žijících savcích. V České republice byli odchyceni menší savci a divoká prasata (v příměstských a lesních prostředích), ve slovenském národním parku Poloniny byly pořízeny vzorky z medvědů, lišek a jelenů. Ze vzorků byly izolovány bakterie *E. coli*, jež byly testovány na citlivost ke 12 druhům antibiotik. Výskyt genů antibiotické rezistence v izolátech byl stanoven metodou PCR. Největší zastoupení (12%) tetracyklin-rezistentních izolátů *E. coli* bylo nalezeno u přežvýkavců a u lišek, méně u divokých prasat (1,7%), hlodavců a hmyzožravců (2%). Je překvapivé, že ačkoliv by se medvědi mohli dostat do blízkosti lidských obydlí, kde by se mohli přizívat například na zbytcích jídla, jejich izoláty nevykazovaly žádnou rezistenci. Vysoký výskyt rezistencí u izolátů z lišek bychom si mohli vysvětlovat například jako důsledek propojených životních areálů lišek a koček a přenosu rezistence mezi těmito zvířaty. Srovnatelné výsledky pro hlodavce a hmyzožravce přinesla i studie Hauschild et al. (2003). Autoři sledovali (1995 – 2001) výskyt rezistence na tetracyklin u 158 izolátů bakteriálního rodu *Staphylococcus* z hlodavců a hmyzožravců odchycených

v lesích, na loukách, u bažin a v národních parcích v oblastech severovýchodního Polska. Našli 6% tetracyklin-rezistentních izolátů.

Jako důležitý přenašeč na dlouhé vzdálenosti, a tedy jako spojka v přenosu rezistence mezi nejrůznějšími ekosystémy, se jeví ptáci. Často se totiž přiživují na zbytcích lidské nebo zvířecí potravy, včetně nestrávených rostlinných částí v exkrementech zvířat, a mohou tak snadno získat rezistentní bakterie a přenášet je dále do prostředí. Autoři Literák et al. (2007) se zabývali výskytem tetracyklin rezistentních bakterií u ruských havranů rodu *Corvus frugileus*, kteří zimují v České republice. Poukázali na výskyt tetracyklin rezistentních bakterií (7,6%) *Escherichia coli* a *Salmonella* u těchto stěhovavých ptáků. Podle autorů článku mohli být havrani infikováni rezistentními bakteriemi ze zdrojů potravy nebo vody v životním prostředí, v němž se pohybovali. Podobné výsledky byly získány i na strakách (*Pica pica*), odchycených v oblastech jižního Walesu, u kterých našli Livermore et al. (2001) tetracyklin-rezistentní bakterie rodu *Enterococcus* (v roce 1999 5%, v roce 2000 necelých 18%) a druhu *E. coli* (v roce 1999 40%, v roce 2000 necelých 6%). Přítomnost rezistentních bakterií se potvrdila také u divoce žijících ptáků v povodí řeky Jequitinhonha, v Brazílii (Nascimento et al. 2003). Z celkového počtu 191 G⁻ izolátů získaných z kloakálních stěrů bylo 11% tetracyklin-rezistentních. Odchycení ptáci byli převážně hmyzožravci a jejich teritoria v povodí řeky se nacházela v blízkosti farmářské krajiny s pastvinou pro skot a s políčky pro domácí obživu. Je tedy možné, že ptáci získali geny rezistence přímým kontaktem se zemědělským prostředím, anebo nepřímo, pitím vody z řeky, kam se bakterie s geny rezistence mohly dostat kontaminovanou dešťovou vodou, spláchnutou spolu s rezistentními bakteriemi z hnojených polí. Ovšem i divoce žijící vrány (*Corvus macrorhynchos japonensis*), které byly v malém nebo žádném kontaktu s lidskou populací, nesly tetracyklin rezistentní bakterie *E. coli* (Nakamura et al. 1982).

Migrace živočichů může být jednou možností, jak se bakterie nesoucí geny rezistence k tetracyklinu dostávají i do oblastí člověkem málo zasažených, jakými jsou např. evropské národní parky. Na výskyt bakterií rodu *Enterococcus* rezistentních na různá antibiotika (včetně tetracyklinu) u divoce žijících zvířat z portugalských národních parků poukázala studie autorů Poeta et al. (2005). Ze 140 izolátů rodu *Enterococcus* pocházejících ze 77 divoce žijících zvířat bylo 29% izolátů rezistentních na tetracyklin. Všechny rezistentní izoláty nesly gen *tet(M)* a většina z nich navíc i gen *tet(L)*. Zjištění, že u zvířat žijících na území národního parku (ekosystému nezatíženého průmyslově vyráběnými antibiotiky) byl prokázán výskyt genů rezistence na tetracyklin, které jsou jinak běžné u izolátů z chovaných

zvířat či člověka (Aarestrup et al. 2000), je jedním z nepřehlédnutelných výsledků této studie. Navíc výskyt tetracyklin rezistentních bakterií rodu *Enterococcus* v tomto prostředí nebyl o mnoho nižší, než zjistili Aarestrup et al. (2000) u bakterií téhož rodu izolovaných z lidí (37%). Na druhou stranu ale nedosahoval frekvence zjištěné u brojlerů a prasat (kolem 60%) z dánských farem, kde se tetracyklin ve velké míře používá.

Zajímavé jsou především studie, kde byl výskyt rezistentních izolátů či genů rezistence k tetracyklinu porovnáván v populacích stejných (nebo alespoň příbuzných) druhů živočichů žijících v prostředí s různým vlivem člověka. Například Anderson et al. (2008) hledali geny rezistence nejen u skotu chovaného na pastvinách, ale také u volně žijících bizonů (*Bison bison*) z chráněných oblastí prairie Konza (Kansas) a tyto výsledky mezi sebou porovnávali. Bakteriální izoláty (charakterizované jako rod *Enterococcus*) vykazovaly u skotu rezistenci ve 43% (z 63 testovaných kolonií), izoláty z bizonů v 8% (ze 125 testovaných kolonií). Všechny izoláty ze skotu a také většina z bizonů nesly gen *tet(O)*, a zajímavé bylo, že u dvou izolátů z bizonů byl navíc přítomen i gen *tet(M)*.

Dvě podobné studie z roku 1985 zkoumaly výskyt antibiotické rezistence u afrických divokých paviánů a dalo by se říci, že dosáhly i podobných výsledků. Obě studie testované opice rozdělují do několika skupin dle míst pohybu paviánů a jejich možného kontaktu s lidmi. Publikace Routman et al. (1985) uvádí nejčastěji zaznamenaný výskyt rezistence izolátů *E.coli* ke streptomycinu (téměř 8% všech izolátů), následovaný rezistencí na tetracyklin, která byla téměř 6% u izolátů z paviánů, kteří byli v kontaktu s lidmi. U paviánů bez kontaktu uvádějí autoři nulový výskyt tetracyklinové rezistence. Podobných výsledků dosáhli autoři Rolland et al. (1985), kteří zkoumali výskyt antibiotické rezistence u paviánů (*Papio cynocephalus*) z národního parku Amboseli a kteří prokázali u paviánů s téměř denním kontaktem s turistickými chatami a latrinami 94% výskyt G⁻ tetracyklin-rezistentních izolátů. U paviánů vyskytujících se na území s velmi malým kontaktem s lidskou populací bylo přibližně 40% izolátů tetracyklin-rezistentních. Rozdíly mezi opicemi žijícími v kontaktu s lidmi a divokými opicemi byl ukázán i na genové úrovni. Jeters et al. (2009) se zaměřili na geny tetracyklinové rezistence *tet(M)*, *tet(W)*, *tet(Q)* u bakteriálních skupin Firmicutes a Bacteroidetes z vaginálních stěrů z dospělých samic odchycených divokých paviánů (*Papio hamadryas*). Vaginální mikroflóra byla zvolena proto, že zde byla pravděpodobnost ovlivnění bakteriální populace druhem stravy minimální. Geny *tet(M)*, *tet(W)* byly s větší četností detekovány u odchycených paviánů než u paviánů divokých (i když počet opic srovnávaných v této studii byl poměrně nízký). Navíc gen *tet(Q)* byl nalezen pouze u odchycených paviánů.

Z výsledků těchto studií se dá shrnout, že zvířata v kontaktu s lidmi nesou ve většině případů více tetracyklin rezistentních bakterií (popřípadě genů tetracyklinové rezistence), než zvířata s omezeným kontaktem s lidmi. Poukazuje to tedy na vliv člověka na šíření rezistence k tetracyklinu v prostředí. Předpokládáme, že tomu tak bude i v půdě, i když práce, které by jednotnou metodikou porovnávaly větší množství půd s různou úrovní antropogenního vlivu a jasněji ukazovaly závislost mezi lidskými aktivitami a množstvím rezistencí, chybí. Výjimkou je studie archivních půd (Knapp et al. 2010, viz výše). Za zvyšování množství rezistencí k tetracyklinu a jiným antibiotikům v průběhu 20. století nemusí stát ovšem jen průmyslová výroba antibiotik. Také zvýšená množství těžkých kovů v prostředí mohou napomáhat k (ko)selekcí a udržení genů rezistence k antibiotikům i bez přítomnosti vlastních reziduí antibiotik (Baker-Austin et al. 2006; Berg et al. 2005).

2.4.3 Bakteriální rezistence v člověkem neovlivněném prostředí

Zatímco výskytem rezistencí k tetracyklinu v zemědělských půdách se zabývalo velké množství studií (Aarestrup et al. 2000; Sayah et al. 2005; Pei et al. 2006; Schmitt et al. 2006), o výskytu rezistencí v člověkem neovlivněných půdách máme podstatně méně informací, což může být dáno právě obtížností najít prostředí člověkem skutečně neovlivněná. Za prostředí člověkem neovlivněná považujeme místa, kam se člověk dostane jen velmi obtížně a která jsou obvykle člověkem navštěvovaná jen v rámci speciálních výzkumných výprav. Navíc takováto prostředí musí být dostatečně odlehlá od lidské činnosti, aby se minimalizovala možnost přenosu rezistentních bakterií např. zvířaty. Typickými příklady takových prostředí jsou např. hluboký oceán, nepřístupné polární oblasti a vysokohorské oblasti. V současné době je ale výzkum v tomto směru komplikován tím, že i do prostředí, která jsou člověkem zdánlivě nedotčená, mohly být zaneseny bakterie nesoucí nově selektované geny rezistence vzniklé v období antibiotické éry, např. větrem (Kellog et al. 2006), vodou nebo právě divokými zvířaty (Literák et al. 2007; Jeters et al. 2009). Z tohoto pohledu se zdají být jako příklad člověkem neovlivněných půd, vhodných ke studiu, především hluboké vrstvy sedimentů vzniklé před mnoha miliony let nebo permafrost. Studium těchto prostředí, skutečně osvobozených od vlivu lidského užívání antibiotik, může být velkým přínosem pro porozumění původu antibiotické rezistence u bakterií (Allen et al. 2010).

Jako jedni z mála se výskytem rezistencí k tetracyklinu v takových prostředích zabývali Mindlin et al. (2008). Autoři izolovali G^+ a G^- bakterie z vrstev sibiřského permafrostu starých tři tisíce až tři miliony let, a našli přibližně 5% tetracyklin rezistentních izolátů u obou

skupin bakterií. Jako jedno vysvětlení přítomnosti rezistentních bakterií by byl přenos rezistence i v ekologických podmínkách permafrostu. Jako druhé vysvětlení se nabízí, že rezistentní bakterie existovaly v půdě již v době jejího vzniku. Tomu by napovídala i práce autorů Brown et al. (2008). Ti v sedimentech z hloubek 170 – 210 m, starých přibližně tři miliony let, našli několik G^+ i G^- izolátů nesoucích dosud nepopsaný gen (třídu) tetracyklinové rezistence *tet*(42). Tento gen byl značně odlišný od genů běžně nacházených v zemědělských půdách. Nejvíce se podobal genu třídy *tet*(Z), známému z bakterie *Corynebacterium* (kmen Actinobacteria).

Je velmi pravděpodobné, že geny tetracyklinové rezistence nalézané v historických vrstvách patří vlastním producentům antibiotik či bakteriím, které s nimi byly v kontaktu a tyto geny od nich získaly (Smith, 1967), případně si vyvinuly geny vlastní, aby v blízkosti producentů mohly přežívat. Svědčí o tom i studie autorů Chroňáková et al. (2010), kteří zkoumali rozmanitost bakteriálního rodu *Streptomyces* v izolátech z výsypek v Sokolově v České republice. Vzorke byly získány z čerstvě vyhloubených sedimentů, vzniklých v období miocénu (před 17 – 19 miliony let) a ze čtyř míst ponechaných přirozené sukcesí na výsypkách (stáří od 1 do 44 let). Ve vlastním sedimentu, představujícím prostředí člověkem neovlivněné, našli jak producenty antibiotik (bakterie *Streptomyces* inhibující růst jiných bakterií), tak tetracyklin-rezistentní bakterie tohoto rodu (5% izolátů, ale celkový počet izolátů ze sedimentu byl malý). V místech, kde byl vyzdvižený sediment ponechaný sukcesí a která mohla být do jisté míry ovlivněná člověkem, pak množství tetracyklin-rezistentních izolátů stoupalo se stářím sukcesních stádií, s maximem 16% rezistentních izolátů z vrchního horizontu půdy z nejstaršího sukcesního stádia. Izoláty produkující antibiotika a rezistentní ke známým antibiotikům včetně tetracyklinu byly získány i z mořské vody u Antarktidy, Terra Nova Bay (Lo Giudice et al. 2007). Nejvíce rezistencí vykazovaly izoláty kmene Actinobacteria, ale některé tetracyklin-rezistentní izoláty patřily i do kmene Proteobacteria. Naopak studie půdy z Antarktidy neukázala výskyt tetracyklin-rezistentních bakterií, počet testovaných izolátů byl v tomto případě ale velmi nízký (Wong et al. 2011). Výskyt tetracyklin-rezistentních bakterií kmene Proteobacteria byl prokázán také ve sladkých vodách v Národním parku Serra de Cipó v Brazílii (Lima-Bittencourt et al. 2007). V deštivém období dosahoval výskyt tetracyklin-rezistentních izolátů až 49%, v suchém období pak 16%.

Většina výše zmíněných studií bakteriálních izolátů nezahrnuje studium genů, které rezistenci k tetracyklinu zajišťují. Není tedy jasné, zda izoláty nesou geny známé z člověkem ovlivněných prostředí, geny typické pro známé producenty (Nikolakopoulou et al. 2005) nebo

geny dosud nepopsané, jako byl např. *tet(42)* (Brown et al. 2008). Možný výskyt starobylých, dosud nepopsaných genů rezistence naznačují především práce zaměřené na rezistenci k betalaktamovým antibiotikům. Na základě analýzy sekvencí genů pro betalaktamázy Hall et al. (2004) odhadují, že některé z těchto genů byly funkční již před dvěma miliardami let. Práce autorů Allen et al. (2009) zaměřená na rezistence k betalaktamovým antibiotikům ukázala, že na těžko přístupném ostrově uprostřed divoké řeky Tanana na Aljašce se nacházejí jak geny pro betalaktamázy podobné již popsáným genům, tak geny dosud nepopsané. Autoři použili k vyhledávání genů rezistence metagenomický přístup, což jim umožnilo získat geny i z nekultivovaných bakterií. Zajímavé bylo, že většina těchto genů byla funkční po jejich vnesení do *E. coli*, což naznačuje, že půdní rezervoár antibiotických resistencí může být použitelný pro patogenní bakterie. To by vysvětlovalo rychlý nástup antibiotické rezistence patogenních bakterií po zavedení antibiotik do klinické praxe (Allen et al. 2010).

Ze srovnání výskytu bakterií rezistentních k tetracyklinu v prostředích s různou mírou antropogenního vlivu (Tab. 2) se dá soudit, že výskyt rezistentních bakterií stoupá s mírou vlivu člověka, ovšem není nulový ani v prostředích člověkem naprosto neovlivněných. Tato porovnání mohou být samozřejmě do jisté míry zkreslená typem a množstvím izolovaných bakterií. Srovnání na genetické úrovni (diverzita a kvantita genů tetracyklinové rezistence) je ještě těžší, protože mnoho studií se geny vůbec nezabývá, nebo se studie liší v typech hledaných genů (Brown et al. 2008; Chee-Sanford et al. 2001; Yang a Carlson, 2003).

V experimentální části této práce jsme se proto rozhodli zkoumat výskyt genů rezistence k tetracyklinu v půdách s různým vlivem antropogenního vlivu pomocí stejných metod. Aby výsledky nebyly zkresleny kultivovatelností bakterií, izolovali jsme celkovou DNA přímo z půdních vzorků a v ní stanovovali výskyt vybraných genů pomocí metody PCR. Ke studiu jsme si z celkového počtu genů kódujících rezistenci k tetracyklinu (Tab. 1), vybrali osm genů na základě jejich funkce a distribuce mezi bakteriemi. Vybrané geny kódovaly jak efluxní pumpy, tak proteiny ribozomální protekce (RPP) (enzymy modifikující antibiotikum jsme nezkoumali, protože jejich rozšíření je poměrně malé; Tab. 1) a nacházely se jak v G^+ , tak v G^- bakteriích, včetně bakterií anaerobních.

Z genů kódujících efluxní pumpy jsme vybrali gen *otr(B)* s výskytem u producenta tetracyklinu (*Streptomyces* (G^+)) a u některých bakterií rodu *Mycobacterium*, gen *tet(V)* nalezený doposud pouze u rodu *Mycobacterium* (G^+), geny *tet(K)* a *tet(L)* typicky se vyskytující u Firmicutes (G^+) s tím, že spektrum hostitelů *tet(L)* je ale širší a zahrnuje i G^-

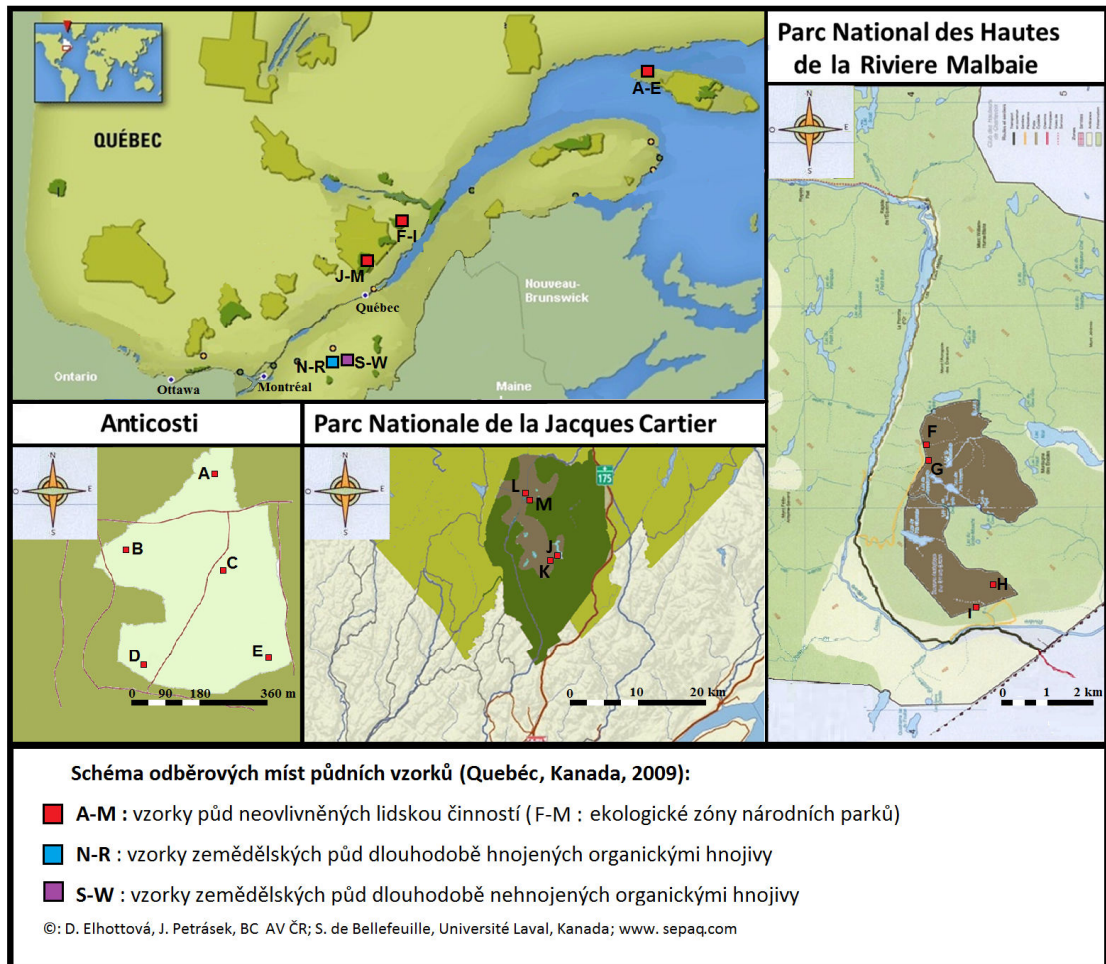
bakterie, a gen **tet(C)** vyskytující se u velkého množství bakteriálních rodů (Tab. 1), především G^- (*Acinetobacter*, *Escherichia*). Z genů kódujících RPP jsme vybrali producentský gen **otr(A)**, gen **tet(M)**, který je velmi rozšířený mezi G^+ i G^- bakteriemi (18 rodů), včetně patogenů jako *Klebsiella* (G^-), *Mycoplasma* (G^+) nebo *Neisseria* (G^-), a další velmi rozšířený (19 rodů) gen **tet(W)**, jehož spektrum hostitelů zahrnuje i (fakultativně) anaerobní bakterie.

3 Experimentální část

V experimentální části jsem testovala vzorky půd na přítomnost vybraných tetracyklin-rezistentních genů. Mým úkolem bylo porovnat výskyt rezistenčních genů mezi půdami neovlivněnými člověkem a mezi půdami z farem hnojených a nehnojených. Vzorky půd a data o nich mi byla poskytnuta v rámci projektu P504/10/2077, jehož je bakalářská práce součástí.

3.1 Charakteristika odběrových míst

Vzorky půd byly pořízeny již před zahájením bakalářské práce a to v regionu Québec v Kanadě během měsíce srpna a září 2009. Vzorky byly vždy odebrány na vytyčeném 100m transektu, každý vzorek sestával z deseti podvzorků, které byly po odběru v semisterilních podmínkách homogenizovány (5mm síto), zamraženy (-20°C) a transportovány do České republiky. Lokalizace odběrových míst je znázorněna na Obr. 2. Vzorky reprezentující půdy neovlivněné lidskou činností byly odebrány ve 2 národních parcích v jeho nepřístupných částech (tzv. ekologické rezervace) a na ostrově Anticosti. Dále byly odebrány vzorky půd pravidelně hnojených kravskou mrvou a vzorky půd bez aplikace organického hnojení minimálně 20 let. Základní charakteristiky půd použitých v této práci a příslušných odběrových míst shrnuje Tabulka 3.



Obr. 2 Lokalizace odběrových míst s různým antropogenním vlivem

Tab. 3 Základní charakteristiky půd a příslušných odběrových míst použitých v této práci

Základní charakteristika odběrových míst				Základní půdní parametry							
Lokalita	Antropogenní vliv (zdroj antibiotik)	Typ vegetace	Označení	sušina [%]	pH (CaCl ₂)	Cox [%]	Ntot [%]	P [mg/kg]	K [mg/kg]	Mg [mg/kg]	Ca [mg/kg]
Ostrov Anticosti 49°N, 62°W; 7943 km ²	Omezený (<i>nepředpokládá se</i>)	Travní porost	C	46,0	3,57	71,4	0,79	20	167	481	3011
Ostrov Anticosti 49°N, 62°W; 7943 km ²	Omezený (<i>nepředpokládá se</i>)	Travní porost	E	68,6	4,50	46,8	0,37	<5	76	134	1578
NP des Hautes de la Riviera Malbaie 47°N, 70°W; 310 km ²	NE (<i>žádný</i>)	Arkticko-alpínská v.	F	52,5	3,29	61,9	0,86	32	112	53	257
NP des Hautes de la Riviera Malbaie 47°N, 70°W; 310 km ²	NE (<i>žádný</i>)	Sub-alpínský les	G	56,5	3,42	55,0	0,72	<5	171	61	467
NP des Hautes de la Riviera Malbaie 47°N, 70°W; 310 km ²	NE (<i>žádný</i>)	Boreální les	H	40,7	5,12	71,8	1,38	9	176	517	6393
NP Jacques Cartier 46°N, 71°W; 670 km ²	NE (<i>žádný</i>)	Boreální les	K	39,2	3,49	69,6	0,83	47	137	73	490
NP Jacques Cartier 46°N, 71°W; 670 km ²	NE (<i>žádný</i>)	Boreální les	L	76,3	3,47	30,8	0,36	159	75	43	214
The Dairy and Swine Research and Development Centre Lennoxville, Oblast Sherbrooke; 45°N, 72°W	ANO - silný (<i>hnij z živočišné výroby, dlouhodobá aplikace</i>)	Pole - kukuřice	N	85,2	6,94	17,1	0,18	104	149	165	2677
The Dairy and Swine Research and Development Centre Lennoxville, Oblast Sherbrooke; 45°N, 72°W	ANO - silný (<i>hnij z živočišné výroby, dlouhodobá aplikace</i>)	Pole - kukuřice	O	78,9	5,61	26,8	0,17	38	89	149	1325

The Dairy and Swine Research and Development Centre Lennoxville, Oblast Sherbrooke; 45°N, 72°W	ANO - silný (<i>hnůj z živočišné výroby, dlouhodobá aplikace</i>)	Pole - kukuřice	P	77,0	6,27	23,6	0,14	150	104	142	1803
Soukromá farma I Oblast Sherbrooke	ANO - silný (<i>hnůj z živočišné výroby, dlouhodobá aplikace</i>)	Pole - kukuřice	Q	79,6	5,74	21,5	0,25	8	31	30	1516
Soukromá farma II Oblast Sherbrooke	ANO - silný (<i>hnůj z živočišné výroby, dlouhodobá aplikace</i>)	Pole - kukuřice	R	78,6	5,34	22,6	0,11	26	66	45	752
Soukromá farma III Oblast Sherbrooke	ANO - slabý (<i>nehnojeno 20 let organickými hnojivy živočišného původu</i>)	Pole - kukuřice	S	75,7	6,05	27,0	0,25	42	122	261	1811
Soukromá farma IV Oblast Sherbrooke	ANO - slabý (<i>nehnojeno 20 let organickými hnojivy živočišného původu</i>)	Pole - kukuřice	T	79,0	6,60	24,2	0,29	62	177	103	2781
Soukromá farma V Oblast Sherbrooke	ANO - slabý (<i>nehnojeno 20 let organickými hnojivy živočišného původu</i>)	Pole - kukuřice	U	82,3	5,12	19,8	0,18	56	108	78	748
Soukromá farma VI Oblast Sherbrooke	ANO - slabý (<i>nehnojeno 20 let organickými hnojivy živočišného původu</i>)	Travní porost	V	73,3	6,05	30,9	0,38	34	87	119	2338
Soukromá farma VII Oblast Sherbrooke	ANO - slabý (<i>nehnojeno 20 let organickými hnojivy živočišného původu</i>)	Malinové pole	W	87,2	6,42	14,5	0,20	70	74	157	1363

3.2 Izolace bakteriální DNA z půdy

Neselektivní, přímá izolace genomové DNA z půdy byla provedena pomocí kitu *Power SoilTM DNA Isolation Kit* (Mo Bio). Tento kit byl zvolen pro jeho schopnost izolovat DNA z přírodních vzorků (především takových, které mají vysoký obsah huminových kyselin – půdy) a vyizolovat tak vysoce čistou DNA, což pak umožňuje úspěšnější PCR amplifikaci DNA.

Z každého vzorku půdy bylo pro izolaci DNA použito 0,25g zeminy. Tyto vzorky půd byly na počátku rychle a důkladně homogenizovány v rozbíjecích zkumavkách, které obsahovaly rozbíjecí kuličky (skleněné) a lyzující pufr (pomáhá rozpustit půdní částice, začíná rozkládat huminové kyseliny a chrání nukleové kyseliny před degradací). V průběhu následného vortexování nastala buněčná lyze prostřednictvím mechanických a chemických metod.

Po homogenizaci jsme ke každému vzorku přidali 60 μ l roztoku C1 (obsahující SDS), čímž byl podpořen buněčný rozklad. Zkumavky jsme za účelem jemného promíchání obsahu několikrát obrátili. Následně jsme vzorky vortexovali na zařízení *FastPrep System* (MGP) po dobu 40s při rychlosti 5,5 m/s. Půdní částice a jednotlivé buňky byly opět rozkládány spojením účinku chemických činidel a mechanických sil (narážení rozbíjecích kuliček). Po vortexování jsme zkumavky centrifugovali 30s při 10000g (všechny centrifugace byly prováděny při pokojové teplotě). Vzniklý supernatant jsme přenesli do čisté 2ml zkumavky, přidali k němu 250 μ l roztoku C2, vortexovali 5 sekund a inkubovali 5 minut na ledu. Působením roztoku C2 se vysrážely organické (kromě DNA) a anorganické nečistoty, včetně huminových kyselin, úlomků buněk a proteinů. Poté jsme směs centrifugovali 1min při 10000g. Připravili jsme si čistou 2ml zkumavku a do ní přenesli 600 μ l supernatantu. K supernatantu jsme přidali 200 μ l roztoku C3 (účinky podobné roztoku C2), krátce vortexovali a nechali znovu vysrážet případné kontaminující látky (5min na ledu). Směs jsme poté centrifugovali 1min při 10000g a kromě sedimentu přenesli do čisté 2ml zkumavky nejvýše 750 μ l supernatantu. K supernatantu jsme přidali 1200 μ l roztoku C4 a vortexovali 5 sekund. C4 je vysoce koncentrovaný solný roztok, který umožní vazbu DNA na křemičitou membránu kolonky v dalším kroku.

Připravili jsme si mikrozukavky s kolonkou (součástí kitu) a přenesli 675 μ l do kolonky. Následně jsme kolonky centrifugovali 1min při 10000g. Přefiltrovanou kapalinu jsme vylili a postup opakovali, protože každý vzorek bylo nutno rozdělit na tři dávky. Ve

výsledku se nám na membráně kolonky zachytila téměř výhradně DNA, protože se selektivně vážala na křemičitou membránu kolonky při vysoké koncentraci soli. Téměř všechny kontaminující složky prošly přes membránu.

Po vylití poslední přefiltrované kapaliny jsme na kolonku napipetovali 500 μ l promývacího roztoku C5 (na bázi ethanolu) a centrifugovali 30s při 10000g. Přefiltrovanou kapalinu jsme opět vylili a vzorek centrifugovali „na sucho“ 1min při 10000g. Tato centrifugace odstranila reziduální zbytky ethanolu z membrány. Po této centrifugaci jsme přenesli kolonku do čisté 2ml zkumavky a přidali 100 μ l roztoku C6 (sterilní 10mM Tris), tak, aby se zvlhčil celý povrch membrány. Centrifugovali jsme 30s při 10000g a následně jsme kolonku odstranili, protože veškerá DNA se uvolnila do zkumavky.

Koncentraci a čistotu vyizolované DNA jsme poté měřili pomocí přístroje NanoDrop2000 (Fisher Scientific), který proměřuje absorbanci vzorků při vlnových délkách 220 – 350nm. Přístroj počítá koncentraci DNA ve vzorku na základě absorbance při 260nm. Případné nečistoty ve vzorku, jako např. fenol či proteiny, je možno odhalit na základě zvýšené absorbance při 230 a 280nm. Připravenou DNA jsme skladovali zmraženou při minus 20°C.

3.3 Izolace DNA z bakterie rodu *Streptomyces*

Izolovali jsme genomovou DNA z bakterie *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* DSM 40260, produkující antimikrobiální látku oxytetracyklin a nesoucí zároveň geny rezistence k oxytetracyklinu *otr(A)* a *otr(B)*. Tuto vyizolovanou DNA jsme poté mohli použít jako pozitivní kontrolu pro reakce PCR.

Kulturu jsme nejprve předpěstovali v tekutém médiu (65. GTM *Streptomyces* Medium; 0,4% glukóza, 0,4% kvasnicový extrakt, 1% sladové výtažky, 0,2% CaCO₃, 1,2% agar, pH 7,2). Zaočkování bakteriální kultury jsme prováděli sterilně ve flow boxu. Do Erlenmayerových baněk (objem 100 ml) jsme sterilně napipetovali 10ml média. Médium jsme zaočkovali 1ml předpěstované bakteriální kultury a kultivovali při 28 °C, 280 RPM, 3 dny.

Narostlou bakteriální kulturu *Streptomyces rimosus* jsme centrifugovali 5min při 4500g. Supernatant jsme slili a k peletě přidali 480 μ l EDTA (50mM, pH 8), 120 μ l lysozymu (100mg/ml; Sigma) a jemně propipetovali. Toto jsme inkubovali 60 min při 37°C. Poté jsme kulturu přenesli do 1,5ml eppendorfky a centrifugovali jsme 2min při 16000g. Vzniklý supernatant jsme vylili, k peletě přidali 600 μ l *Nuclei Lysis Solution* (*Wizard Genomic DNA*

Extraction kit, Promega) a řádně propipetovali. Po dobu 5min při 80°C jsme nechali lyzovat buňky a poté vzorek zchladili na pokojovou teplotu. Přidali jsme 3μl enzymu RNázy (4mg/ml; *Wizard Genomic DNA Extraction kit*, Promega) a směs promíchali 5x obrácením zkumavky. Tímto začalo štěpení molekuly RNA (30min při 37°C). Když jsme pak kulturu zchladili na pokojovou teplotu, přidali jsme 200μl *Protein Precipitation Solution* (*Wizard Genomic DNA Extraction kit*, Promega) a vortexovali 20s. Proteiny jsme nechali vysrážet na ledu po dobu 5min a centrifugovali 3min při 16000g. Vzniklý supernatant obsahující DNA jsme napipetovali do sterilních eppendorfek a v digestoři jsme k supernatantu přidali 600μl isopropanolu a jemně promíchali. Centrifugovali jsme 10min při 16000g. Supernatant obsahující isopropanol jsme slili do speciální odpadní láhve a peletu DNA propláchnli přidáním 600μl 70% ledového ethanolu. Centrifugovali jsme 2min při 16000g, odebrali opatrně ethanol a nechali dobře vysušit při pokojové teplotě. Nakonec jsme přidali 50μl Tris pufru (10mM, pH 7) a vyizolovanou DNA jsme nechali rozpustit (rehydratovat) 60min při 65°C. Po zchlazení jsme proměřili koncentraci DNA na přístroji *NanoDrop2000* (Fisher Scientific).

3.4 Polymerázová řetězová reakce (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) (Sambrook and Russel, 2001)

PCR je biochemická reakce, která využívá enzym DNA-dependentní DNA polymerázu k amplifikaci vymezených úseků DNA – jednotlivých genů či jejich částí.

PCR probíhá na principu replikace molekuly DNA, procesu pravidelně nastávajícím v živých buňkách před jejich rozdělením na dvě dceřiné buňky. Při PCR je tato replikace uměle navozena *in vitro* a její průběh je kontrolován změnami teplot. Díky této reakci je možné selektivně namnožit určité oblasti genomu z několika málo kopií do řádově biliónů kopií, pokud známe sekvence, ležící na okrajích této cílové oblasti. DNA úseky namnožené pomocí PCR mohou být využity např. pro účely detekce přítomnosti vybraných genů v určitém organismu nebo prostředí nebo k molekulárnímu klonování.

Při PCR se používají DNA-dependentní DNA polymerázy, pocházející z mikroorganismů žijících za extrémně vysokých teplot – např. v hloubce moří poblíž ústí podmořských sopek. Nejčastěji se používá tzv. *Taq* polymeráza (nazvaná podle *Archaea Thermus aquaticus*) s teplotním optimem 72°C. Použití této termostabilní polymerázy umožní amplifikaci za teplot, kdy DNA zůstává z velké části denaturovaná, a tedy přístupná replikaci. Prakticky se tedy v průběhu cyklů PCR pravidelně střídají tři teploty: denaturační (94-95°C –

rozestoupení dvoušroubovice templátové DNA), annealingová (54-65°C – nasednutí primerů na komplementární úseky templátových vláken) a polymerační (72°C – maximální aktivita *Taq* polymerázy, která od primerů prodlužuje komplementární vlákna).

DNA-dependentní DNA polymeráza syntetizuje komplementární vlákno podle předlohy jednovláknové DNA tak, že přidává k existujícímu úseku druhého vlákna nové nukleotidy ve směru od 5' ke 3' konci. K tomu polymeráza potřebuje templátové vlákno (předlohu), nukleotidtrifosfáty (stavební kameny) a úseky DNA, od kterých reakci započne (*primery*).

Primery jsou krátké jednovláknové DNA (oligonukleotidy), které nasednou na DNA v místě s komplementární sekvencí. Na základě znalosti sekvence si tedy můžeme navrhnout primer, který bude za určité teploty (tzv. *annealingové teploty*) specificky nasedat na určité vybrané místo v templátové DNA. Specifitu této reakce zajistí vedle vhodné annealingové teploty také dostatečná délka primeru (cca 20 nukleotidů). Takto jsme schopni určit DNA-dependentní DNA polymeráze, od kterého místa a kterým směrem (od 3' konce primeru) má začít syntetizovat nové vlákno. Primery musí být navrženy tak, aby se v cílové DNA jejich sekvence vyskytovala vždy pouze jednou (unikátnost zabezpečuje mimo jiné délka sekvence cca 20 nukleotidů).

K tomu, aby mohly primery nasednout na templátové vlákno DNA, je nezbytná počáteční denaturace DNA. Při teplotě cca 95°C se dvoušroubovice rozestoupí na dvě komplementární vlákna, která tak budou přístupná nasednutí primerů. Vzhledem k tomu, že denurací jednoho úseku DNA vzniknou dvě vlákna, jsou zapotřebí k úspěšnému kopírování žádaného úseku dva primery (z angličtiny nazývané *forward* a *reverse*), z nichž každý bude nasedat na jedno vlákno. Použitím dvou primerů je zajištěno, že dojde k řetězovému hromadění produktu. Vzdálenost mezi místy nasedání primerů na komplementární vlákna DNA pak udává délku amplifikovaného úseku.

Primery musí být navrženy tak, aby oba měly přibližně stejnou teplotu tání (a tedy *annealingovou teplotu*). Teplota tání závisí na délce molekuly (čím delší molekula, tím více vodíkových můstků, tím větší energie je nutná k denuraci) a na její sekvenci, především na poměru G-C párů a A-T párů (čím více G-C párů se třemi vodíkovými můstky, tím vyšší teplota tání). Pro navrhování primerů se dnes používají různé počítačové programy.

Reakční směs tedy obsahuje tyto komponenty:

- Termostabilní DNA-řizenou DNA polymerázu (*Taq* polymerázu)

- Deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTPs) - dATP, dTTP, dCTP a dGTP, sloužící k syntéze polynukleotidového řetězce
- Dvojici primerů
- Vhodný pufr zajišťující optimální podmínky pro aktivitu *Taq* polymerázy. Obsahuje Mg^{2+} , které vyžadují všechny termostabilní polymerázy pro svou aktivitu, jednomocné kationty (standardní PCR pufr obsahuje 50mM KCl), Tris-Cl (ve standardních PCR reakcích používán o koncentraci 10mM)
- Templátovou DNA

Za určitých podmínek (např. při podezření na přítomnost inhibitorů *Taq* polymerázy v roztoku templátové DNA) se do reakce přidávají další aditiva, mající za úkol předejít inhibici a zvýšit výtěžky a někdy též specifitu reakce:

- Hovězí sérum-albuminu (BSA). Prostřednictvím tohoto enzym-stabilizujícího proteinu můžeme dosáhnout vyšších výnosů PCR reakce
- Dimethyl sulfoxid (DMSO, molekulární vzorec C_2H_6OS), rozšiřuje optimální rozmezí koncentrací $MgCl_2$, zlepšuje denaturaci DNA

Praktické provedení:

Namíchání reakce pro PCR jsme prováděli ve sterilním boxu, který byl prostý nejen mikroorganismů, ale také veškeré DNA, která by mohla kontaminovat vzorky a sloužit jako nechtěný templát. Stanovili jsme si přesné složení reakční směsi, např. podle již vyzkoušeného protokolu (Tab. 6, viz Přílohy). Následně jsme si stanovili složení *master mixu*, tj. reakční směsi vynásobené počtem vzorků, včetně pozitivní a negativní kontroly. Jako pozitivní kontrola sloužila reakce s templátovou DNA, která obsahovala úsek DNA specifický pro danou reakci (Tab. 7, viz Přílohy). Po amplifikaci tohoto produktu a elektroforetickém vyhodnocení by se nám měl na gelu objevit pruh, odpovídající svou polohou délce sekvence požadovaného produktu (viz dále). Negativní kontrola obsahovala všechny složky PCR kromě templátové DNA. Ověřovala čistotu reakční směsi od náhodné kontaminace DNA, vylučovala falešně pozitivní výsledek amplifikace. Při elektroforetickém vyhodnocení se na gelu nesměl objevit žádný pruh. Složení *master mixu* jsme počítali bez objemu templátové DNA, který se pak přidával do každé mikrozkušavky zvlášť.

Před prací v boxu jsme si připravili všechny potřebné roztoky na led, aby se pomalu rozmrazily. V boxu jsme si připravili do sterilní zkumavky master mix podle protokolu (začínali jsme puftrem a vodou a končili *Taq* polymerázou), ze kterého jsme pipetovali vždy stejný objem (24 μ l) do jednotlivých tenkostěnných mikrozkušavek (objem 200 μ l).

Přidání DNA jsme prováděli mimo PCR box, na vyhraněném místě vedle boxu. Obvykle jsme mikrozkušavky při přidávání DNA umístili do chladicího bločku. Částečně jsme tak snížili pravděpodobnost, že při laboratorní teplotě primery nespecificky nasednou na místa, která neodpovídají zcela jejich sekvenci, a *Taq* polymeráza zahájí jejich extenzi. To by mohlo vést ke vzniku nespecifických PCR produktů. Do každé mikrozkušavky, kromě negativní kontroly, jsme přidali 1 μ l příslušné DNA (naředěné na cca 20-50 ng/ μ l).

Takto připravené vzorky jsme umístili do termocykleru, s jehož pomocí lze automatizovaně řídit cyklické změny teplot reakční směsi. Zkušavky s reakční směsí jsou v termocykleru uloženy v kovovém bloku, jehož teplota je řízena podle programu nastaveného uživatelem (Tab. 7). Nastavením teplot denaturace, annealingu a extenze na termocykleru, včetně příslušného počtu opakování cyklů se zajistí řetězová reakce.

3.5 Gelová elektroforéza

Principem gelové elektroforézy je využití rozdílné pohyblivosti nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli k jejich separaci. Toto elektrické pole se vytváří vložením konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. Vzhledem k tomu, že rychlost pohybu částic v gelu je závislá na velikosti náboje a velikosti molekuly, různě velké a různě nabitě molekuly se pohybují odlišnou rychlostí. Molekuly nukleových kyselin nesou záporný náboj, tudíž se pohybují směrem k elektrodě s kladnou polaritou.

Molekuly DNA o stejné velikosti putují v gelu v jednom pruhu. Pokud jsou ve vzorku molekuly DNA o různých velikostech, budou tyto putovat v gelu různě rychle a vytvoří tak větší množství pruhů, s tím, že nejmenší molekuly budou putovat nejrychleji a budou se nacházet v pruhu, který bude nejdále od jamek v gelu.

Dva hlavní faktory, ovlivňující rychlost pohybu DNA molekul v gelu, jsou velikost molekul DNA a hustota gelu. Pro naše účely jsme používali agarózové gely, jejichž koncentraci jsme volili podle velikosti fragmentů, které měly být separovány. 1% na rozdělení delších molekul a 2% na rozdělení kratších molekul. Agaróza vytváří síť z dlouhých

cukerných polymerů, vázaných nekovalentními vodíkovými můstky a hydrofóbními vazbami. Čím delší molekula DNA, tím pomaleji se v agarózovém gelu pohybuje.

Celý postup byl následující:

Agarózu jsme smíchali s pufrem v daném poměru (Tab. 4) a nechali dokonale rozpustit v mikrovlnné troubě. Vzniklý gel jsme zchladili na cca 50 °C a nalili do předem připravené vaničky s hřebenem. Po ztuhnutí jsme hřeben odstranili z gelu. Gel z nalévací vaničky jsme vložili do elektroforetické nádoby, obsahující TAE pufr. Abychom mohli odhadovat velikost molekul DNA, do první jamky jsme nanесли marker (měřítko, podle kterého se odečítá velikost jednotlivých pruhů DNA) a do ostatních jamek naše vzorky (5 μ l z PCR reakční směsi) smíchané s nanášecím pufrem (*6x Orange DNA Loading Dye*, Fermentas) v poměru 1:5. Barva pufru usnadňuje orientaci (ve kterých jamkách je již nanesen vzorek). Pufr je navíc velmi hustý, takže po smíchání s ním vzorek dobře klesá do jamek v gelu. Pufr též barevně označuje čelo migrace molekul v gelu, takže v průběhu migrace můžeme kontrolovat, jak molekuly postupují. Používali jsme napětí 100V a elektroforézu nechali běžet přibližně 30-45 min. Po uplynutí této doby jsme gel obarvili ethidium-bromidem (1mg/l pufru), což je fluorescenční barvivo, které se velmi intenzivně a specificky váže na dsDNA. DNA s navázaným ethidium-bromidem jsme detekovali pomocí UV záření. V místě, kam doputovaly molekuly DNA o jednotné velikosti, se vytvořil viditelný proužek. Přibližnou velikost molekul DNA v jednotlivých prouzcích jsme odečítali podle markeru.

Tab. 4 Příprava agarózových gelů dle velikostí fragmentů DNA, vhodné markery

	Agaróza [g]	Pufr (1xTAEa) [ml]	Velikosti fragmentů [pb]	Použitý marker
1% gel	1	100	250 - 10000	Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder
2% gel	2	100	100 - 1000	Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder

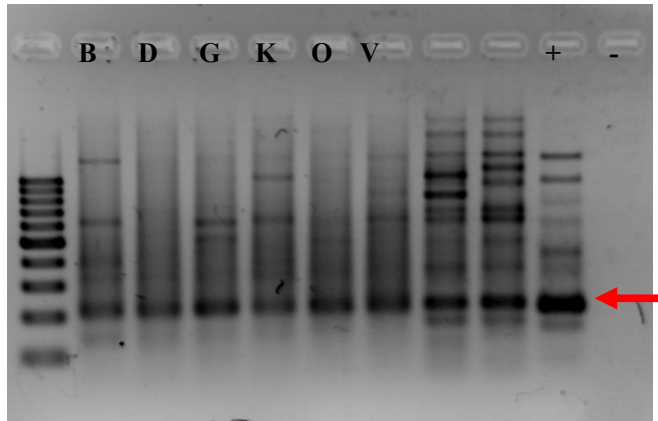
^a 40 mM Tris, 20mM kys. octová, 1 mM EDTA, pH=8,0

4 Výsledky

Podářilo se nám vyizolovat DNA ze všech 17 vzorků odebraných půd, t.j. 7 vzorků z kanadských národních parků, 5 vzorků z nehnojených farem a 5 hnojených farem. Z 0,25 g vlhké půdy jsme získali přibližně 1,5-5 μ g DNA. Pomocí amplifikace genu pro 16S rRNA jsme ověřili, že DNA lze reakcí PCR amplifikovat ze všech vzorků, tedy že neobsahuje inhibitory bránící průběhu PCR reakce. Mohli jsme tedy přikročit k vlastní PCR detekci jednotlivých genů tetracyklinové rezistence ve vzorcích.

Ve všech vzorcích jsme stanovovali přítomnost genů *tet(C)*, *tet(K)/tet(L)* (společná detekce), *tet(V)*, *tet(M)*, *tet(W)*, *otr(A)* a *otr(B)* pomocí PCR. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 5. Z tabulky je patrné, že žádný z těchto genů nebyl detekován v člověkem neovlivněných půdách kanadských národních parků. Naopak v zemědělských půdách, a to jak v hnojených tak nehnojených půdách, jsme detekovali geny *tet(K)/tet(L)*, *tet(V)* a *tet(M)*. Vzorky, které dávaly produkt o očekávané velikosti s primery pro společnou detekci *tet(K)/tet(L)*, jsme dále zvlášť analyzovali pomocí primerů specifických pro geny *tet(K)* a *tet(L)*. Výsledky ukázaly, že gen *tet(L)* byl přítomen ve dvou vzorcích z nehnojených farem a ve dvou vzorcích z farem hnojených (Tab. 5). Gen *tet(V)* jsme detekovali v půdě pouze jedné nehnojené farmy a ve všech půdách hnojených farem. Gen *tet(M)* byl detekovatelný (velmi slabé specifické bandy) ve třech půdách z nehnojených farem a ve třech půdách z farem hnojených. Geny *tet(C)*, *tet(W)* a produkční geny *otr(A)* a *otr(B)* jsme nedetekovali v žádné z půd (Tab. 5).

Zatím nepublikované a neověřené degenerované primery pro společnou detekci produkčních genů *otr(A)* a *tet* (Kyselková, nepublikováno) jsme testovali se dvěma vzorky člověkem neovlivněných půd, jedním vzorkem nehnojené půdy a jedním vzorkem hnojené půdy. Ve všech případech (včetně pozitivní kontroly) jsme získali PCR produkt o očekávané velikosti a velké množství silných nespecifických bandů (Obr. 3, očekávaný produkt označen šipkou). Vzhledem k tomu, že vlastní gen *otr(A)* nebyl pomocí specifických primerů ve vzorcích detekován (Tab. 5), mohli bychom usuzovat na přítomnost genu *tet*, nebo na přítomnost jiného, jemu podobnému genu, který je možno zachytit pomocí degenerovaných primerů. Velké množství silných nespecifických produktů vznikajících spolu s produktem o očekávané velikosti vedlo ale k pochybám o specificitě primerů a nebyly proto dále používány s ostatními vzorky.



Obr. 3 PCR produkty z degenerovaných primerů pro společnou detekci producentských genů *otr(A)* a *tet*. DNA elektroforéza, 2% agarózový gel. Nanáška 5 μ l z 25 μ l PCR reakce. Vzorky G, K, O a V byly použity v této práci. Marker, GeneRuler 100pb DNA ladder (Fermentas) odspodu 100, 200, 300...1000 pb; +, pozitivní kontrola; -, negativní kontrola.

Tab. 5 Souhrn dosažených výsledků; detekce rezistenčních genů v půdách s různým antropogenním vlivem. Legenda: - .gen nedetekován; **NSB** nespecifický band; +++ gen detekován, silný specifický band; + gen detekován, velmi slabý specifický band o předpokládané velikosti; **ND** nepoužité půdy

Charakteristika půdy	Označení	Lokalita	Geny pro effluxní pumpy							Geny pro proteiny ribozomální ochrany					
			<i>tet(C)</i>	<i>tet(K/L)</i>	<i>tet(K)</i>	<i>tet(L)</i>	<i>tet(V)</i>	<i>otr(B)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(W)</i>	<i>otr(A)</i>	<i>otr(A/tet)</i>			
Půda člověkem neovlivněná (národní parky)	C	Anticosti	-	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	ND	
	E	Anticosti	-	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	ND	
	F	Hautes-Gorges-de-la-Riviere-Malbaie	-	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	ND	
	G	Hautes-Gorges-de-la-Riviere-Malbaie	-	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	+++/NSB	
	H	Hautes-Gorges-de-la-Riviere-Malbaie	-	NSB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	
	K	Jack Cartier	-	NSB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/NSB	
	L	Jack Cartier	-	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	ND	
	N	Lennoxville	-	+/NSB	-	+	+++	-	-	+	-	-	-	ND	
	O	Lennoxville	-	-	ND	ND	+	-	-	-	-	-	-	+++/NSB	
	P	Lennoxville	-	+/NSB	ND	+++	+	-	+	-	-	-	-	ND	
Zemědělská půda – hnojena	Q	Chemin Dion	-	-	ND	ND	+	-	+	-	-	-	-	ND	
	R	Chemin Dion	-	-	ND	ND	+	-	-	-	-	-	-	ND	
	S	Eduardo	-	+	-	+++	+++	-	-	+	-	-	-	ND	
	T	Sanders	-	+	-	+++	-	-	+	-	-	-	-	ND	
	U	Quirion	-	-	ND	ND	-	-	+	-	-	-	-	ND	
	V	Quirion	-	NSB	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	+++/NSB	
	W	Lessard	-	NSB	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	ND	
	Zemědělská půda – nehnojena														

5 Diskuze

V předložené práci jsme porovnávali výskyt genů tetracyklinové rezistence v oblastech neovlivněných lidskou činností a v oblastech s různým zemědělským zatížením. V experimentální části práce tyto oblasti představovaly půdy z člověkem neovlivněných míst kanadských národních parků a půdy z člověkem ovlivněných míst, konkrétně půdy z nehnoujících farem a půdy z farem hnojených živočišným odpadem. Cílem experimentální části bylo porovnat mezi sebou tyto tři typy prostředí a následně porovnat zjištěný počet genů rezistence s počty z jiných studií. Provést porovnání s jinými studiemi je obtížné, neboť se nejen liší hledané geny rezistence studií od studie, ale autoři ostatních publikací často ani přímo po rezistenčních genech nepátrají a jejich práce se liší použitou metodikou, včetně způsobu získání DNA. Někteří izolovali DNA přímo z prostředí a pak stanovovali rezistenční geny (Pei et al. 2006) – podobná metodika naší studii, zatímco v jiných pracích nejdříve kultivovali bakterie, které následně pouze testovali na citlivost k dané antimikrobiální látce a konkrétní rezistenční geny nehledali (Sayah et al. 2005). My jsme v této práci hledali geny tetracyklinové rezistence, objevující se u nejrůznějších skupin bakterií (Tab. 1), a to v celkové půdní DNA pomocí reakce PCR. Pro všechny testované půdní vzorky jsme použili stejnou metodu, a to hlavně z toho důvodu, aby výsledky nebyly zkresleny kultivovatelností půdních bakterií.

Jak vyplynulo z literární rešerše, informací o výskytu genů antibiotické rezistence (včetně často studovaného tetracyklinu) v člověkem skutečně nezasažených oblastech je podstatně méně, než informací o těchto genech v zemědělských, či zemědělstvím ovlivněných oblastech. Přitom tyto informace nám mohou pomoci při zhodnocení vlivu člověka na šíření rezistencí, a napovědět něco o původu rezistenčních genů. Je známo, že geny rezistence k tetracyklinu jsou velmi rozšířené (Chopra a Roberts, 2001) a byly nejspíše zaneseny i do divoké přírody (např. turisty nebo pohybem zvěře; Poeta et al. 2005). Proto jsme si ke studování zvolili právě půdy z odlehlých míst kanadských národních parků, především z tzv. ekologických zón přístupných pouze se speciálním povolením. V půdách z těchto oblastí bylo naší snahou hledat geny tetracyklinové rezistence, které jsou jinak běžné v klinickém (Agero a Guardabassi, 2004) a zemědělském (Sayah et al. 2005) prostředí. V těchto oblastech jsme předpokládali velmi malý či nulový výskyt těchto genů a naopak jsme očekávali výskyt genů typických pro půdní producenty tetracyklinu (bakterie z rodu *Streptomyces*; Nikolakopoulou et al. 2005). Abychom měli představu o výskytu genů rezistence v zemědělském prostředí,

studovali jsme zároveň výskyt těchto genů v polích a sadech na dvou typech farem – hnojených a nehnojených odpady z živočišné výroby. Půdy z farem bez aplikace živočišných hnojiv měly představovat relativně nezasazenou půdu, tedy jakousi střední cestu mezi půdami národních parků a půdami z farem pravidelně a dlouhodobě hnojených živočišnými odpady.

Výsledky neprokázaly výskyt běžných genů tetracyklinové rezistence (jinak častých v zemědělském prostředí) v člověkem neovlivněném prostředí kanadských národních parků. Zdá se tedy, že do těchto těžko přístupných prostředí nebyly geny rezistence zaneseny ani zvířaty (Literák et al. 2007) či přírodními silami (Kellog et al. 2006), alespoň ne v takovém množství, které bychom v našich laboratorních podmínkách byli schopni detekovat. Tyto naše výsledky jsou odlišné od výsledků studie Ghosh a La Para (2007), kteří ve zdánlivě nedotčených půdách (např. oblastní parky v Kanadě) detekovali velmi rozšířený (Aarestrup et al. 2000; Hauschild et al. 2003; Poeta et al. 2005) gen *tet(L)*, což by mohlo být nejspíše odrazem návštěvnosti testovaných oblastí.

Oproti našemu očekávání jsme v národních parcích pomocí použitých primerů nedetekovali ani producentské geny *otr(A)* a *otr(B)*, které se vyskytují u půdních bakterií rodu *Streptomyces* a které se v takovýchto prostředích nacházet mohou (nepublikovaná data laboratoře). Může to být dáno poměrně nízkým výskytem těchto genů u zmiňovaných bakterií (*otr(B)* detekován u 6%, *otr(A)* u necelých 1,5% izolátů; Nikolakopoulou et al. 2005), které samotné mohou představovat méně než jedno procento půdních bakterií (Janssen, 2006)⁴. Dalším vysvětlením může být, že se sice v panenských půdách producentské geny vyskytují, ale že jsou odlišné od námi studovaných *otr(A)* a *otr(B)*. Této domněnce by nasvědčoval výskyt PCR produktu správné velikosti (vedle velkého množství nespecifických bandů), který byl získán degenerovanými primery pro společnou detekci producentských genů *otr(A)* a *tet*. V budoucnu by tedy stálo za to tento produkt osekvenovat a zjistit, zda se jedná o producentský gen *tet*, gen jemu příbuzný, nebo zda jde o artefakt. To, že se v panenských půdách (například vrstvách izolovaných od povrchu po dobu tří milionů let) vyskytují dosud nepoznané geny rezistence k tetracyklinu, které se jen vzdáleně podobají těm popsaným u rodu *Actinobacteria* (konkrétně genu *tet(Z)* z *Corynebacterium*) ukázali již Brown et al. (2008).

⁴ <http://www.bacterio.cict.fr/index.html>, duben 2011

Půdy z tak odlehlých míst, jako jsou těžko přístupná místa národních parků, by bylo vhodné zkoumat pomocí novějších metod, mezi které můžeme řadit rozvíjející se metagenomiku. Její výhoda spočívá v tom, že není závislá na kultivovatelných bakteriích a mohou se s její pomocí objevovat i rezistenční geny dosud neznámé – metagenomika, na rozdíl od PCR metody totiž nevyužívá k detekci rezistenčních genů primery (Spížek et al. 2010). Touto metodou našli Allen et al. (2010) v člověkem neovlivněném prostředí nové geny pro betalaktamázy.

Naše výsledky poukazují dále na to, že u jednotlivých typů farem se nelišilo zastoupení typů rezistenčních genů. Na farmách hnojených i nehnojených jsme našli geny *tet(M)*, *tet(L)* a *tet(V)*. Výskyt genů *tet(L)* (Aarestrup et al. 2000) a *tet(M)* (Chee-Sanford et al. 2001) v zemědělském prostředí v souvislosti s hnojením je již dobře popsán. Zde je překvapivé, že se tyto geny vyskytují i na farmách, které nebyly hnojené již více jak 20 let organickými odpady živočišného původu. Oba geny jsou nejspíše předmětem častého horizontálního přenosu, protože se vyskytují u velkého množství bakteriálních rodů (viz Tab. 1). Je u nich tedy větší pravděpodobnost, že budou spolu s nějakou bakterií zaneseny i do půd nehnojených, například zvířaty nebo farmáři. Gen *tet(V)* byl nalezen ve všech námi testovaných půdách hnojených farem, na rozdíl od půd z farem nehnojených, kde byl detekován pouze ve vzorku jedné půdy. Gen *tet(V)* je zatím znám pouze u rodu *Mycobacterium* (viz Tab. 1) a nejspíše patří k vlastnímu rezistomu těchto bakterií (nepřenáší se horizontálně) (De Rossi et al. 1998). Výskyt tohoto genu v půdě nebyl doposud zkoumán a není tedy jisté, zda jeho výskyt skutečně souvisí se selekčním tlakem antibiotik nebo zda se přirozeně vyskytuje v určitých populacích těchto bakterií, které se z jiných důvodů, než je přítomnost reziduí antibiotik, vyskytují ve zvýšené míře v hnojených půdách.

V žádné z testovaných půd jsme nedetekovali geny *tet(C)*, *tet(K)*, *tet(W)*, přestože geny *tet(C)* (Bronstad et al. 1996) a *tet(W)* (Schmitt et al. 2006) se v zemědělském prostředí vyskytují často. Tento výsledek může být dán místními rozdíly ve výskytu jednotlivých rezistenčních genů (Schmitt et al. 2006) anebo je samozřejmě možné, že se tam tyto geny vyskytují, ale nejsou dostatečně abundantní na to, abychom byli schopni je detekovat.

6 Závěr

V teoretické části své práce jsem shrnula výsledky prací zabývajících se výskytem rezistencí k tetracyklinu v půdách a dalších prostředích s různou mírou antropogenního vlivu. Z porovnání výsledků uvedených publikací (Tab. 2) se dá usoudit, že výskyt bakterií rezistentních k tetracyklinu a genů rezistence k tetracyklinu se zvyšuje s mírou vlivu člověka a použitím průmyslově vyráběných antibiotik. Ovšem i v oblastech člověkem neovlivněných se v menší míře bakterie rezistentní k tetracyklinu vyskytují a genetické základy jejich rezistence jsou zatím málo prozkoumány.

Z výsledků experimentální části vyplynulo, že v půdách člověkem neovlivněných se nevyskytují geny tetracyklinové rezistence běžné v zemědělských půdách (i ve státě Québec, ze kterého všechny zkoumané půdy pocházely), jako např. *tet(L)* a *tet(M)*.

Výsledky této práce nepřispívají k hypotéze, že nejvíce typů genů rezistence na tetracyklin je v hnojených půdách z farem, kde se antibiotika používají, a méně pak ze zemědělských půd dlouhodobě nehnojených živočišnými odpady. Podle výsledků naší práce se v obou typech půd nacházejí stejné geny rezistence, což může ukazovat na všeobecnou rozšířenost genů tetracyklinové rezistence v půdě v této oblasti. Porovnání více vzorků půd a rozšíření spektra sledovaných genů, případně i kvantitativní PCR by mohly pomoci při dalším zhodnocení vlivu hnojení živočišnými odpady z antibiotiky krměných zvířat na výskyt genů rezistence.

V půdách člověkem neovlivněných jsme nenašli očekávané producentské geny *otr(A)* a *otr(B)*. Protože tyto dva geny mohou představovat jen zlomek z celkové diverzity genů rezistence přirozených půdních bakterií, další výzkum v tomto směru by se neměl opírat o hledání genů již známých z jiných prostředí, ale zaměřit se na hledání genů dosud nepoznaných, například s použitím již zmíněné metagenomiky.

7 Seznam literatury

- Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB (2000) Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 37:127–137.
- Agerso Y, Guardabassi L (2005) Identification of Tet 39, a novel class of tetracycline resistance determinant in *Acinetobacter* spp. of environmental and clinical origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55:566–569.
- Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J (2010) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews* 8:251–259.
- Allen HK, Moe LA, Rodbumrer J, Gaarder A, Handelsman J (2009) Functional metagenomic reveals diverse β -lactamases in a remote Alaskan soil. *The ISME Journal* 3:243–251.
- Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI (2001) Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistant genes encoding ribosomal protection proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 22–32.
- Aminov RI, Chee-Sanford JC, Garrigues N, Teferedegne B, Krapac IJ, White BA, Mackie RI (2002) Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1786–1793.
- Anderson JF, Parrish TD, Akhtar M, Zurek L, Hirt H (2008) Antibiotic resistance of enterococci in animal bison (*Bison bison*) from nature preserve compared to that of enterococci in pastured cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 74:1726–1730.
- Andrews JM (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48:5–16.
- Auerbach EA, Seyfried EE, McMahon KD (2007) Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water Research* 41:143–1151.
- Authier S, Paquette D, Labrecque O, Messier S (2006) Comparison of susceptibility to antimicrobials of bacterial isolates from companion animals in a veterinary diagnostic

- laboratory in Canada between 2 time points 10 years apart. *Canadian Veterinary Journal* 47:774–778.
- Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV (2006) Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology* 14:176–182.
- Bednář M, Fraňková V, Schindler J, Souček A, Vávra J (1996) Antibiotika. In: Marvil, s. r. o. (eds), *Lékařská Mikrobiologie*. Marvil, Praha, pp. 160–162.
- Berg J, Tom-Petersen A, Nybroe O (2005) Copper amendment of agriculture soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Letters in Applied Microbiology* 40:146–151.
- Boatman M (1998) Survey of antimicrobial usage in animal health in the European union. Boatman consulting, by order of FEDESA.
- Bronstad K, Dronen K, Ovreas L, Torsvik V (1996) Phenotypic diversity and antibiotic resistance in soil bacterial communities. *Journal of Industrial Microbiology* 17:253–259.
- Brown MG, Mitchell EH, Balkwill DL (2008) Tet 42, a novel tetracycline resistance determinant isolated from deep terrestrial subsurface bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52:4518–4521.
- Bruce KD, Hiorns WD, Hobman JL, Osborn AM, Strike P, Ritchie DA (1992) Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 58:3413–3416.
- Bryan A, Shapir N, Sadowsky MJ (2004) Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology* 70:2503–2507.
- Clark C, Greenwood S, Boison JO, Chirino-Trejo M, Dowling PM (2008) Bacterial isolates from equine infections in western Canada (1999 – 2003). *Canadian Veterinary Journal* 49:153–160.
- Davies J, Spiegelman GB, Yim G (2006) The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology* 9:445–453.
- De Rossi E, Blokpoel MCJ, Cantoni R, Branzoni M, Riccardi G, Young DB, De Smet KAL, Ciferri O (1998) Molecular cloning and functional analysis of a novel tetracycline resistance

- determinant, *tet(V)*, from *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42:1931–1937.
- Devriese LA, Ieven M, Goossens H, Vandamme P, Pot B, Hommez J, Haesebrouck F (1996) Presence of vancomycin-resistant enterococci in farm and pet animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40:2285–2287.
- Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 3:710–720.
- Gaze W, O'Neill C, Wellington E, Hawkey P (2008) Antibiotic resistance in the environment, with particular reference to MRSA. *Advances in Applied Microbiology* 63:249–280.
- Ghosh S, LaPara TM (2007) The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *The ISME Journal* 1:191–203.
- Hall BG, Salipante SJ, Barlow M (2004) Independent origins of subgroup B1+B2 and subgroup B3 metallo- β -lactamases. *Journal of Molecular Evolution* 59:133–141.
- Hauschild T, Kehrenberg C, Schwarz S (2003) Tetracycline resistance in Staphylococci from free-living rodents and insectivores. *Journal of Veterinary Medicine A* 50:443–446.
- Chee-Sanford JC, Aminov RI, Krapac IJ, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI (2001) Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Applied and Environmental Microbiology* 67:1494–1502.
- Chee-Sanford JC, Mackie RI, Koike S, Krapac IG, Lin Y-F, Yannarell AC, Maywell S, Aminov RI (2009) Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *Journal of Environmental Quality* 38:1086–1108.
- Chopra I, Hawkey PM, Hinton M (1992) Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 29:245–277.
- Chopra I, Roberts M (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65:232–260.

- Chroňáková A, Křišťůfek V, Tichý M, Elhottová D (2010) Biodiversity of streptomycetes isolated from a succession sequence at a post-mining site and their evidence in Miocene lacustrine sediment. *Microbiological Research* 165:594–608.
- Janssen PH (2006) Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 72:1719–1728.
- Jeters RT, Rivera AJ, Boucek LM, Stumpf RM, Leigh SR, Salyers AA (2009) Antibiotic resistance genes in the vaginal microbiota of primates not normally exposed to antibiotics. *Microbial Drug Resistance* 15:309–315.
- Kellog CA, Griffin DW (2006) Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends in Ecology and Evolution* 21:638–644.
- Knapp CW, Dolfing J, Ehlert PAI, Graham DW (2009) Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental Science and Technology* 44:580–587.
- Levy SB (1998) The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American* 278:46–53.
- Levy SB (2001) Antibiotic resistance: consequences of inaction. *Clinical Infectious Diseases* 33:124–129.
- Levy SB (2002) Éru antibiotik zahájila tragédie. In: Galileo (eds), *Antibiotický paradox: jak se nesprávným používáním antibiotik ruší jejich léčebná moc*. Academia, Praha, pp. 20–25.
- Levy SB, Marshall B (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 10:S122–S129.
- Levy SB, McMurry LM, Barbosa TM, Burdett V, Courvalin P, Hillen W, Roberts MC, Rood JI & Taylor DE (1999) Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:1523-1524.
- Lima-Bittencourt CI, Cursino L, Goncalves-Dornelas H, Pontes DS, Nardi RMD, Callisto M, Chartone-Souza E, Nascimento AMA (2007) Multiple antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolates from pristine freshwater. *Genetics and Molecular Research* 6:510–521.
- Literák I, Dolejská M, Radimerský T, Klimeš J, Friedman M, Aarestrup FM, Hasman H, Čížek A (2009) Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe:

- multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *Journal of Applied Microbiology* 108:1702–1711.
- Literák I, Vanko R, Dolejská M, Čížek A, Karpíšková R (2007) Antibiotic resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* in russian rooks (*Corvus frugileus*) wintering in the Czech Republic. *Letters in Applied Microbiology* 45:616–621.
- Livermore DM, Warner M, Hall LMC, Enne VI, Projan SJ, Dunman PM, Wooster SL, Harrison G (2001) Antibiotic resistance in bacteria from magpies (*Pica pica*) and rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from west Wales. *Environmental Microbiology* 3:658–661.
- Lo Giudice A, Brillì M, Bruni V, De Domenico M, Fani R, Michaud L (2007) Bacterium–bacterium inhibitory interactions among psychrotrophic bacteria isolated from Antarctic seawater (Terra Nova Bay, Ross Sea). *FEMS Microbiology Ecology* 60: 383–396.
- Lochmann O (1990) Nežádoucí účinky antibiotik a hlavní zásady racionální antimikrobiální terapie. Vydání první, AVICENUM, zdravotnické nakladatelství, Praha.
- Midlin SZ, Soina VS, Petrova MA, Gorlenko ZM (2008) Isolation of antibiotic resistance bacterial strains from Eastern Siberia permafrost sediments. *Russian Journal of Genetics* 44:27–34.
- Nakamura M, Yoshimura H, Koeda T (1982) Drug resistance and R plasmids of *Escherichia coli* strains isolated from six species of wild birds. *Nippon Juigaku Zasshi* 44:465–471.
- Nascimento AMA, Cursino L, Goncalves-Dornelas H, Reis A, Chartone-Souza E, Marini MA (2003) Antibiotic-resistant gram-negative bacteria in birds from the brazilian atlantic forest. *The Condor* 105:358–361.
- Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M (2001) Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes* 15:209–215.
- Nikolakopoulou TL, Egan S, van Overbeek LS, Guillaume G, Heuer H, Wellington EMH, van Elsas JD, Collard J-M, Smalla K, Karagouni AD (2005) PCR detection of oxytetracycline resistance genes *otr(A)* and *otr(B)* in tetracycline-resistant streptomycete isolates from diverse habitats. *Current Microbiology* 51:211–216.

- Pei R, Kim SCh, Carlson KH, Pruden A (2006) Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Research* 40:2427–2435.
- Piepersberg W, Distler J, Heinzl P, Perez-Gonzales J-A (1988) Antibiotic resistance by modification: many resistance genes could be derived from cellular control genes in actinomycetes. – a hypothesis. *Actinomycetologica* 2:83–98.
- Peak N, Knapp CW, Yang RK, Hanfelt MM, Smith MS, Aga DS, Graham DW (2007) Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. *Environmental Microbiology* 9:143–151.
- Poeta P, Costa D, Sáenz Y, Klibi N, Ruiz-Larrea F, Rodrigues J, Torres C (2005) Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal *Enterococci* of wild animals in Portugal. *Journal of Veterinary Medicine* 52:396–402.
- Prescott JF, Brad Hanna WJ, Reid-Smith R, Drost K (2002) Antimicrobial drug use and resistance in dogs. *The Canadian Veterinary Journal* 43:107–116.
- Raaijmakers JM, Vlami M, De Souza JT (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:537–547.
- Reinhalter FF, Posch J, Feierl G, Wüst G, Haas D, Ruckebauer G, Mascher F, Marth E (2003) Antibiotic resistance of *E.coli* in sewage and sludge. *Water Research* 37:1685–1690.
- Riesenfeld CS, Goodman RM, Handelsman J (2004) Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology* 6:981–989.
- Roberts MC (1996) Tetracycline resistance determinants: mechanism of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews* 19:1–24.
- Rolland RM, Hausfater G, Marshall B, Levy SB (1985) Antibiotic-resistant bacteria in wild primates: increased prevalence in baboons feeding on human refuse. *Applied and Environmental Microbiology* 49:791–794.
- Routman E, Miller RD, Phillips-Conroy J, Hartl DL (1985) Antibiotic resistance and population structure in *Escherichia coli* from free-ranging african yellow baboons. *Applied and Environmental Microbiology* 50:749–754.

- Sambrook J, Russel DW (2001) In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. In: Cold Spring Harbor Laboratory Press (eds), Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed, Cold Spring Harbor, New York, pp.8.18 – 8.113.
- Sarmah AK, Meyer MT, Boxall AB (2006) A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65:725–759.
- Sayah RS, Kaneene JB, Johnson Y, Miller R-A (2005) Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1394–1404.
- Sawant AA, Sordillo LM, Jayarao BM (2005) A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science* 88:2991–2999.
- Sengelov G, Agerso Y, Halling-Sorensen B, Baloda SB, Andersen JS, Jensen LB (2003) Bacterial resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environmental International* 28: 587–595.
- Smith DH (1967) R factor infection of *Escherichia coli* lyophilized in 1946. *Journal of Bacteriology* 94:2071–2072 .
- Schmitt H, Stoob K, Hamscher G, Smit E, Seinen W (2006) Tetracyclines and tetracycline resistance in agriculture soils: microcosm and field studies. *Microbial Ecology* 51:267–276.
- Schnappinger D, Hillen W (1996) Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Archives of Microbiology* 165:359–369.
- Schwarz S, Chaslus-Dancla E (2001) Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research* 32:201–225.
- Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA (1992) Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews* 5:387–399.
- Spížek J (1999) Rezistence na antibiotika: je třeba hledat nové látky a nové postupy. *Vesmír* 78:27.
- Spížek J (2007) Rezistence na antibiotika trochu jinak: vztahy mezi antibiotiky, bakteriemi a člověkem. *Vesmír* 86:455–458.

- Spížek J, Novotná J, Řezanka T, Demain AL (2010) Do we need new antibiotics? The search for new targets and new compounds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 37:1241–1248.
- Teo JWP, Tan TMC, Poh CL (2002) Genetic Determinants of Tetracycline Resistance in *Vibrio harveyi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:1038–1045.
- Thurzová L, Kresánek J, Mareček Š, Mika K (1983) Další důležité rostliny a drogy. In: Osveta, n.p. (eds), Malý atlas léčivých rostlin. Neografia, Martin, pp. 282 – 370.
- Van den Bogaard AE, London N, Driessen C, Stobberingh EE (2001) Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47:763–771.
- Votava M (2005) Obecné vlastnosti antimikrobiálních léčiv. In: Neptun (eds), Lékařská mikrobiologie obecná. Neptun, Brno, pp. 235.
- Weese JS (2008) Antimicrobial resistance in companion animals. *Animal Health Research Reviews* 9:169–176.
- Wong CMVL, Tam HK, Alias SA, González M, González-Rocha M, Domínguez-Yévenes M (2011) *Pseudomonas* and *Pedobacter* isolates from King George Island inhibited the growth of foodborne pathogens. *Polish Polar Research* 32:3–14.
- Yang S, Carlson K (2003) Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. *Water Research* 37:4645–4656.
- Yim G, Wang HH, Davies J (2006) The truth about antibiotics. *International Journal of Medical Microbiology* 296:163–170.

8 Přílohy

Tab. 6 Finální složení PCR reakčních směsí pro jednotlivé geny tetracyklinové rezistence a pro gen 16S rRNA.

Výsledné koncentrace ve 25 μ l reakci												
	<i>ter</i> (C)	<i>ter</i> (K)/ <i>ter</i> (L)	<i>ter</i> (K)	<i>ter</i> (V)	<i>ter</i> (L)	<i>ter</i> (M)	<i>ter</i> (W)	<i>otr</i> (A)	<i>otr</i> (B)	<i>otr</i> (A)/ <i>ter</i>	16S rRNA	
Pufr	1x ^b	1x ^a	1x ^a	1x ^a	1x ^a	1x ^a	1x ^a	1x ^c	1x ^c	1x ^a	1x ^a	
MgCl₂	-	1,5mM	1,5mM	1,5mM	1,5mM	1,5mM	1,5mM	-	-	1,5mM	1,5mM	
dNTPs	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	
Forward primer	100nM	1000nM	500nm	500nm	1000nM	500nm	300nM	500nm	100nm	500nm	500nM	
Reverse primer	100nM	1000nM	500nm	500nm	1000nM	500nm	300nM	500nm	100nm	500nm	500nM	
DMSO	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	-	-	5%	5%	
BSA	0,12mg/ml	0,12mg/ml	0,12mg/ml	0,12mg/ml	0,12mg/ml	0,12mg/ml	0,12mg/ml	-	-	0,12mg/ml	0,12mg/ml	
DreamTaqTM polymeráza	0,05U/ μ l	0,05U/ μ l	0,05U/ μ l	0,05U/ μ l	0,05U/ μ l	0,05U/ μ l	0,05U/ μ l	-	-	0,05U/ μ l	0,05U/ μ l	
Templátová DNA	0,8 – 2ng/ μ l	0,8 – 2ng/ μ l	0,8 – 2ng/ μ l	0,8 – 2ng/ μ l	0,8 – 2ng/ μ l	0,8 – 2ng/ μ l	0,8 – 2ng/ μ l	0,8 – 2ng/ μ l	0,8 – 2ng/ μ l	0,8 – 2ng/ μ l	0,8 – 2ng/ μ l	
Q-solution	-	-	-	-	-	-	-	1x	1x	-	-	
Quiagen Taq	-	-	-	-	-	-	-	0,05U/ μ l	0,05U/ μ l	-	-	

^a Pufr bez přísady MgCl₂, který obsahuje 500mM KCl, 100mM Tris-Cl (pH 9.0) a 0,1% Triton X-100 v optimalizovaném poměru (Fermentas) ^b Pufr s přísadkou 20mM MgCl₂ (Fermentas) ^c Pufr dodávaný s QuiagenTaq (Quiagen; obsahuje již Mg²⁺ ionty, přesné složení nezveřejněno)

Tab. 7 Primery a PCR podmínky používané pro amplifikaci genů tetracyklinové rezistence a genu 16S rRNA.

Gen	Primery	Sekvence primerů 5'-3' (Odkaz)	Cykly PCR reakce	Délka výsledného produktu [bp]	Pozitivní kontrola (Odkaz)
<i>otr(A)</i>	<i>otr(A)</i> (F) <i>otr(A)</i> (R)	GAACACGTAAGCGGAGAAAG CAGAAAGTAGTTGTGCGTCCG (Nikolakopoulou <i>et al.</i> 2005)	I. 5min/95°C II. 1min/94°C III. 30s/60°C IV. 30s/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 5min/72°C	778	<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> DSMZ 40260 (ATTC 10970)
<i>otr(B)</i>	<i>otr(B)</i> (F) <i>otr(B)</i> (R)	CCGACATCTACGGGGCAAGC GGTGATGACGGTCTGGGACAG (Nikolakopoulou <i>et al.</i> 2005)	I. 5min/94°C II. 1min/94°C III. 1min/68°C IV. 1min/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 7min/72°C	947	<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> DSMZ 40260 (ATTC 10970)
<i>ter(M)</i>	<i>ter(M)</i> (F) <i>ter(M)</i> (R)	ACAGAAAAGCTTATTATATAAC TGGCGTGTCTATGATGTTTAC (Aminov <i>et al.</i> 2001)	I. 4min/94°C II. 20s/94°C III. 30s/52,3°C IV. 1min/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 7min/68°C	171	Plazmid pATI101, nesoucí gen <i>ter(M)</i> z transpozonu Tn1545 rodu <i>Streptococcus</i> (Martin <i>et al.</i> , 1986)
<i>ter(W)</i>	<i>ter(W)</i> (F) <i>ter(W)</i> (R)	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC GGGCGTATCCACAAATGTTAAC (Aminov <i>et al.</i> 2001)	I. 4min/94°C II. 20s/94°C III. 20s/64°C IV. 20s/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 5min/72°C	168	Plazmid nesoucí gen <i>ter(W)</i>
<i>ter(C)</i>	<i>ter(C)</i> (F) <i>ter(C)</i> (R)	GCGGATATCGTCCATTCCG GCGTAGAGGATCCACAGGAC (Aminov <i>et al.</i> 2002)	I. 4min/94°C II. 20s/94°C III. 30s/68°C IV. 50s/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 5min/68°C	207	Plazmid nesoucí gen <i>ter(C)</i>

<i>tet(V)</i>	<i>tet(V)</i> (f) <i>tet(V)</i> (frc)	CGAGACCACCTTCGACAGCG GCCTACGGTTTCATCCTGGC (Kyselková et al., nepublikováno)	I. 7min/95°C II. 1min/94°C III. 15s/65°C IV. 30s/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 5min/72°C	331	<i>Mycobacterium</i> DNA 4C
<i>tet(K-L)</i>	<i>tet(K-L)</i> (a) <i>tet(K-L)</i> (brc)	TTACCTGATATTGCAA GACCAATGAATATAAT (Kyselková et al., nepublikováno)	I. 5min/95°C II. 30s/94°C III. 30s/40°C IV. 30s/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 3min/72°C	397	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>tet(K)</i>	<i>tet(K)</i> (F) <i>tet(K)</i> (R)	TTAGGTGAAGGTTAGGTCC GCAAACTCATTCAGAAAGCA Aarestrup et al. (2000)	I. 5min/95°C II. 1min/95°C III. 1min/49°C IV. 1min30s/72°C (zpět na krok II., opakovat 25x) V. 10min/72°C	700	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>tet(L)</i>	<i>tet(L)</i> -Ng (F) <i>tet(L)</i> -Ng (R) <i>tet(L)</i> (F) <i>tet(L)</i> (R)	Ng et al. (2001) Aarestrup et al. (2000)	I. 5min/94°C II. 30s/94°C III. 30s/55°C IV. 1min/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 3min/72°C	286 494	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>otr(A/tet)</i>	<i>otr</i> (FW) <i>otr</i> – tet (R)	Aminov et al. (2001), upraveno	I. 7min/95°C II. 1min/94°C III. 30s/58°C IV. 30s/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 5min/72°C	212	<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> DSMZ 40260 (ATTC 10970)
16S rRNA	pA pH	Bruce et al. (1992)	I. 5min/95°C II. 1min/94°C III. 30s/61°C IV. 1min30s/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 5min/72°C		<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> DSMZ 40260 (ATTC 10970)