

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Těžké kovy ve výživě hospodářských zvířat a jejich vliv
na střevní rezistom**

Bakalářská práce

Pavla Klepišová DiS.

Chov hospodářských zvířat

**prof. MVDr. Eva Pěchoučková, Ph. D.
Mgr. Martina Slaninová Kyselková, Ph. D.**

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Těžké kovy ve výživě hospodářských zvířat a jejich vliv na střevní rezistom" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 28.04.2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. MVDr. Evě Pěchoučkové, Ph.D. a Mgr. Martině Slaninové Kyselkové, Ph.D. za trpělivost, cenné rady, odborné vedení a pomoc v průběhu zpracování bakalářské práce. Mé poděkování patří také spolužákům za vzájemnou motivaci po celou dobu studia a blízkým přátelům za podporu.

Těžké kovy ve výživě hospodářských zvířat a jejich vliv na střevní rezistom

Souhrn

Tato práce se podrobně zabývá vlivem těžkých kovů ve výživě hospodářských zvířat na střevní rezistom a související problematikou antimikrobiální rezistence. Těžké kovy, přirozeně se vyskytující v půdě a životním prostředí, mohou v nadměrných koncentracích poškozovat buněčnou strukturu organismů. Zvláštní pozornost je věnována obsahu těžkých kovů v krmivech pro zvířata, neboť jejich akumulace v tkáních může ohrozit zdraví zvířat i spotřebitelů. Evropská legislativa stanovuje limity pro obsah těžkých kovů v krmivech, což je klíčové pro ochranu veřejného zdraví.

Výživa skotu z velké části ovlivňuje mikrobiom trávicího traktu. Ten je složen z rozmanitého společenstva bakterií, archeí, hub a prvoků. Pro detailní zkoumání tohoto mikrobiomu s cílem rozšířit pohled na rozmanitost bachorového a střevního mikrobiomu se využívají techniky metagenomiky. Rozsáhlý bachorový mikrobiom je známý svou schopností fermentovat rostlinné látky a tyto procesy v bachoru vedou k produkci těkavých mastných kyselin a dalších metabolitů, které jsou dále využívány jako zdroj energie. Porozumění mikrobiomu je nezbytné pro optimalizaci živočišné produkce a ochranu veřejného zdraví.

Používání antibiotik v chovech zvířat a související problematika antimikrobiální rezistence je v poslední době často diskutovaným tématem. Nadměrné používání antibiotik může vést k rezistenci, což nese vážné důsledky pro veřejné zdraví. Antimikrobiální rezistence je podle prognóz WHO řazena pro rok 2030 mezi 10 největších globálních výzev v oblasti veřejného zdraví. Evropská komise zveřejnila cílovou hodnotu používání antibiotik v chovech zvířat na 59,2 mg/PCU, a to pro rok 2030 s cílem minimalizovat rizika antimikrobiální rezistence. Česká republika již úspěšně snížila spotřebu antibiotik až za tuto cílovou mez, ale důležité bude sledovat především celkový údaj, který je stanovený pro 27 členských států EU.

Cílem práce bylo zkoumat možné korelace mezi těžkými kovy a antimikrobiální rezistencí. Výsledky ukazují, že těžké kovy mají významné antimikrobiální účinky a mohou vést k rezistenci vůči antimikrobiálním látkám. Navrhovaná řešení zahrnují snížení používání antibiotik a těžkých kovů v zemědělské produkci, stejně jako snižování koncentrace těžkých kovů v životním prostředí. Integrace těchto strategií je klíčová pro ochranu zdraví zvířat a prevenci antimikrobiální rezistence.

Klíčová slova: antibiotika, antimikrobiální rezistence, skot, těžké kovy, výživa

Heavy metals in livestock nutrition and the effect on intestinal resistome

Summary

This thesis dealt in detail with the effect of heavy metals in livestock nutrition on intestinal resistome and the related issue of antimicrobial resistance. Heavy metals, naturally occurring in soil and the environment, can damage the cellular structure of organisms in excessive concentrations. Special attention is paid to the levels of heavy metals in animal feed, as their accumulation in tissues can endanger the health of animals and consumers. European legislation sets limits for the levels of heavy metals in feed, which is essential for the protection of public health.

Cattle nutrition greatly influences the microbiome of the digestive tract. This is made up of a diverse community of bacteria, archaea, fungi and protozoa. Metagenomics techniques are used to investigate this microbiome closely in order to extend the view of the diversity of the rumen and gut microbiome. The extensive rumen microbiome is known for its ability to ferment plant matter, and these processes in the rumen lead to the production of volatile fatty acids and other metabolites that are further used as a source of energy. Understanding the microbiome is essential for optimizing animal production and protecting public health.

The use of antibiotics in animal husbandry and the related issue of antimicrobial resistance has been a frequently discussed theme recently. Excessive use of antibiotics can lead to resistance, with serious public health consequences. According to WHO prognoses, antimicrobial resistance is ranked among the top 10 global public health challenges for 2030. The European Commission has published a target for antibiotic use in livestock farming of 59.2 mg/PCU for 2030 to minimize the risks of antimicrobial resistance. The Czech Republic has already successfully reduced antibiotic consumption beyond this target, but it will be important to focus on the overall data set for the 27 EU Member States.

The aim of this thesis was to investigate possible correlations between heavy metals and antimicrobial resistance. The results show that heavy metals have significant antimicrobial effects and can lead to antimicrobial resistance. Proposed solutions include reducing the use of antibiotics and heavy metals in agricultural production, as well as reducing the concentration of heavy metals in the environment. The integration of these strategies is key to protecting animal health and preventing antimicrobial resistance.

Keywords: antibiotics, antimicrobial resistance, cattle, heavy metals, nutrition

Obsah

1 Úvod	7
2 Cíl práce	8
3 Literární rešerše	9
3.1 Těžké kovy a jejich výskyt v zemědělsko – krmivářském sektoru	9
3.1.1 Toxicita těžkých kovů	9
3.1.2 Charakteristika jednotlivých těžkých kovů	10
3.1.2.1 Arsen	10
3.1.2.2 Chrom	10
3.1.2.3 Kadmium	10
3.1.2.4 Měď	10
3.1.2.5 Olovo	11
3.1.2.6 Rtuť	11
3.1.2.7 Zinek	11
3.1.3 Těžké kovy v krmivech	11
3.1.3.1 Limity těžkých kovů v krmivech	13
3.1.4 Těžké kovy v zemědělství a v potravinářské produkci	15
3.2 Mikrobiom trávicího traktu skotu	16
3.2.1 Bachorový mikrobiom	16
3.3 Antibiotika používaná v chovech zvířat	18
3.3.1 Hlavní třídy antibiotik používaných v živočišné výrobě	25
3.4 Rezistence vůči antibiotikům	29
3.4.1 Výskyt a eliminace genů rezistence	30
3.4.2 Významné rezistentní bakterie	32
3.5 Těžké kovy a vazba na antimikrobiální rezistenci	33
3.5.1 Vztahy mezi těžkými kovy a antimikrobiální rezistencí	34
3.5.1.1 Cd	34
3.5.1.2 Cu	35
3.5.1.3 Hg	36
3.5.1.4 Zn	36
3.5.1.5 Společný výskyt ARG a kovů či antibiotik	40
3.6 Potenciální řešení	42
3.6.1 Snížení používání ATB	42
3.6.2 Snížení koncentrace těžkých kovů v životním prostředí	43
4 Závěr	45
5 Literatura	47

1 Úvod

Používání antibiotik v zemědělství přispívá k šíření genů rezistence vůči antibiotikům, které se mohou hromadit v lidských patogenech a ohrožovat tak léčbu infekčních onemocnění (Smith et al. 2005; Forsberg et al. 2012; Durso & Cook, 2014; Jechalke et al. 2014). Hospodářským zvířatům jsou totiž k léčbě a prevenci onemocnění podávány stejné třídy antibiotik jako v humánní medicíně (Chee-Sanford et al. 2009; Chowdhury et al. 2014).

Podle prognóz WHO pro rok 2030 je antimikrobiální rezistence řazena mezi 10 největších globálních výzev v oblasti veřejného zdraví a 20 největších globálních příčin úmrtnosti a nemocnosti, což způsobuje skutečnou krizi ve zdravotnictví, kterou navíc dále zhoršuje nedostatek inovací ve vývoji nových antimikrobiálních léčiv (World Health Organization, 2015, 2021).

Existují studie, které se zaměřují na prevenci/omezení vzniku rezistence, což je klíčový krok na podporu zachování účinnosti našeho stávajícího arzenálu antimikrobiálních látek. V humánní medicíně lze ve většině zemí tato cenná léčiva získat pouze na lékařský předpis. Naproti tomu pro potřeby živočišné výroby jsou v některých zemích některé třídy antibiotik volně dostupné (Yu et al. 2017).

Za vznik a šíření determinantů antibiotické rezistence nejsou odpovědná pouze antibiotika, ale podílí se na ní řada faktorů (Andersson & Hughes, 2010). Kovy přimíchávané do krmiv se používají k dosažení rychlého růstu a kontroly nemocí prostřednictvím zvýšené imunomodulace, což je cílené ovlivňování imunitní reakce u krmených zvířat. Byl zjištěn přímý vztah mezi přítomností těžkých kovů a geny rezistence vůči antibiotikům (ARG). Kovy mohou také vytvářet dlouhodobý selekční tlak¹ na ARG (Baker-Austin et al. 2006; Song et al. 2017). Bylo možné prokázat, že koselekce² ARG, díky přítomnosti těžkých kovů, byla hlavní příčinou pozorovaného nárůstu množství ARG (Stepanuskas et al. 2006).

Geny rezistence vůči kovům (MRG) a ARG byly koselektovány různými mechanismy v prostředí (Ji et al. 2012). Mobilní genetické elementy (MGE) se často nacházely v bezprostřední blízkosti těchto ARG, což umožňovalo jejich společný přenos na jiné mikroorganismy prostřednictvím horizontálního přenosu genů (HGT) (Allen et al. 2010). Ukázalo se, že plazmidy hrají klíčovou roli při šíření ARG i MRG (Fang et al. 2016). Přítomnost kovů, jako je arsen (As), rtuť (Hg), kadmium (Cd), měď (Cu), kobalt (Co), chrom (Cr), olovo (Pb), nikl (Ni) a zinek (Zn), je běžně spojována se současnou přítomností ARG a MRG (Seiler & Berendonk, 2012; Yazdankhah et al. 2014; Zhao et al. 2019).

¹ Selekční tlak je faktor, který ovlivňuje, které organismy v daném prostředí budou mít větší pravděpodobnost přežití a reprodukce. V kontextu antibiotické rezistence se jedná o tlak, který způsobuje, že bakterie vyvinou odolnost vůči antibiotikům kvůli opakované expozici těmto léčivům. Tento tlak může být způsoben přímým podáním antibiotik nebo nepřímo přítomností antibiotik v prostředí.

² Koselekce je proces, při kterém se selekce na určité vlastnosti nebo geny odehrává současně se selekcí na jiné vlastnosti nebo geny, které jsou vzájemně propojeny nebo interagují. V kontextu antibiotické rezistence to znamená, že používání antibiotik může zároveň vést k selekci na odolnost vůči dalším faktorům, jako jsou těžké kovy (nebo naopak). Tento proces může mít za následek současný vývoj rezistence na různé stresory.

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo na základě vypracování literární rešerše vyhledat a propojit problematiku těžkých kovů ve výživě a krmení zvířat s problematikou antibiotik v chovech zvířat. Pokusila jsem se ukázat, jak přítomnost těžkých kovů ve výživě může ovlivňovat výskyt rezistence k antibiotikům v chovech skotu.

3 Literární rešerše

3.1 Těžké kovy a jejich výskyt v zemědělsko – krmivářském sektoru

Těžké kovy zahrnují skupinu asi 40 prvků s hustotou větší než 5 t/m³. Mezi tuto skupinu můžeme zařadit následující kovy: arsen, chrom, kadmium, měď, olovo, rtuť a zinek. Patří sem například ale i kobalt, nikl, selen, antimon, thalium a další. Těžké kovy jsou přirozenou součástí půdy. Dále jsou, v nízkých koncentracích, nezbytnou součástí životních pochodů organismů. Naopak ve vyšších koncentracích se stávají toxickými. Těžké kovy způsobují denaturaci enzymů, bílkovin a ovlivňují propustnost buněčných membrán (Nábělková & Nekovářová 2010).

3.1.1 Toxicita těžkých kovů

Těžké kovy jsou toxické pro buněčné organismy, i když míra toxicity se u jednotlivých těžkých kovů liší a je závislá na jejich koncentraci a formě výskytu (Lemire et al. 2013). Výskyt těžkých kovů v podobě samotných prvků není tak častý jako jejich výskyt v různých sloučeninách. Tyto sloučeniny se můžou měnit na organokovové sloučeniny, obvykle mnohem toxičtější. Dále jsou také jednoduché iontové formy toxičtější než kovy vázané v komplexních sloučeninách a k zesílení účinku dochází při výskytu kombinace kovů: Cd + Zn, Hg + Cu nebo Ni + Zn (Nábělková & Nekovářová 2010).

Toxicita těžkých kovů na buněčné úrovni je především způsobena tím, že vysoké hladiny intracelulárních volných kovových iontů se často nevhodně vážou na vazebná místa kovů v enzymech, které se následně inaktivují. Pokud se ionty kovů nebo komplexy kovů s podobnou strukturou nesprávně vážou na biomolekuly (vlastnost, která se označuje jako iontové mimikry nebo molekulární mimikry), dochází k buněčné dysfunkci (Lemire et al. 2013).

Reaktivní formy kyslíku (ROS) generované těžkými kovy během metabolických reakcí mohou také způsobit genetické, enzymatické a strukturální poškození buněčných komponent (Smaldone & Helmann, 2007). Tyto účinky podporuje studie využívající analýzu pomocí mikročipů DNA ke zkoumání mechanismů využívaných *Staphylococcus aureus* ke zmírnění vysokých hladin mědi v životním prostředí. Odolnost vůči oxidačnímu stresu a počet chybně složených proteinových struktur se zvyšuje, když jsou bakterie vystaveny nadměrnému množství mědi (Baker et al. 2010).

Mezi další možné mechanismy toxicity patří kompetitivní inhibice některých membránových transportních systémů pro základní substráty a odčerpávání elektronů za účelem vyčerpání energie bakterií protonové hybné síly (Harrison et al. 2007).

Vzhledem k velkým rozdílům mezi fyziologií živočichů, rostlin a mikroorganismů nemusí být chemické formy kovů, které jsou vysoce biologicky dostupné pro živočichy, nutně vysoce biologicky dostupné pro bakterie. V důsledku toho je při posuzování rizika rezistence vůči antibiotikům způsobené těžkými kovy rozumné se ptát, jak jsou tyto kovy biologicky dostupné pro konkrétní bakterie (Yu et al. 2017). Podle aktuálních poznatků jsou anorganické formy minerálů, včetně chloridů a sulfátů, obecně považovány za biologicky dostupnější pro bakterie, než uhličitany a oxidy (Taylor-Pickard et al. 2005). Metoda použita v minulosti použila geny bakteriální rezistence vůči kovům jako indikátor biologické dostupnosti těžkých

kovů v sedimentech, které mají potenciál poskytnout lepší posouzení vlivu těžkých kovů na bakterie v prostředí (Roosa et al. 2014).

3.1.2 Charakteristika jednotlivých těžkých kovů

3.1.2.1 Arsen

Arsen v malém množství doprovází téměř všechny sulfidické rudy, je častou součástí různých hornin a půd a jejich zvětráváním se přirozeně v malém množství dostává do podzemních i povrchových vod. V zemědělství může být arsen používán v podobě arsenových pesticidů. Arsen může být obsažen v některých minerálních vodách³, jejichž krátkodobé užívání má léčebné účinky, podporuje tvorbu červených krvinek a ukládání tuků a bílkovin v těle. Jinak je však arsen značně jedovatý a dlouhodobé používání vod s nízkými koncentracemi arsenu způsobuje chronické onemocnění arsenikózu. Otrava arsenem se projevuje abnormálním ukládáním pigmentu (melanóza), chorobným rohovatěním kůže (keratóza) a poruchami srdeční činnosti. Byly prokázány i karcinogenní a teratogenní účinky arsenu (Nábělková & Nekovářová 2010).

3.1.2.2 Chrom

Chrom se v přírodě vyskytuje např. v minerálu chromit či krokit, často také doprovází hliník v jeho minerálech. Dále je to esenciální mikroprvek podílející se na regulaci hladiny glukózy v krvi a na syntéze nukleových kyselin. Ovlivňuje organoleptické vlastnosti jako barvu a chuť vody a je považován za karcinogenní a genotoxický (Nábělková & Nekovářová 2010).

3.1.2.3 Kadmium

Kadmium ve vodách doprovází zinek, i když ve výrazně nižších koncentracích. Je to velmi nebezpečný jed, zaujímá 2. místo po rtuti. Kumuluje se v biomase a synergicky působí se Zn a Cu. Negativně ovlivňuje reprodukci savců. U člověka způsobuje anémii, pigmentaci zubů a odvápnění kostí. Kadmium má také karcinogenní účinky prokázané u zvířat a pravděpodobně u lidí. Je spojováno s rakovinou plic a prostaty (Nábělková & Nekovářová 2010).

3.1.2.4 Měď

Měď se může dostávat do vod, zejména podzemních, rozkladem sulfidických rud. Je toxická pro ryby a řasy a kumuluje se v sedimentu. Její výskyt v pitné vodě ovlivňuje následnou chuť vody. Pro člověka je měď esenciální prvek a onemocnění z vody není známo.

³ V ČR je vyhláškou 252/2004 Sb. o pitné vodě stanoven limit pro arsen 10 µg/l. Vyhláškou 275/2004 Sb. o balených vodách je stanoven limit 10 µg/l pro přírodní minerální vody, a pro balené kojenecké a pramenité vody platí limit 5 µg/l. (Ministerstvo zdravotnictví, 2004)

Akutní a chronické otravy mohou vznikat při inhalaci aerosolů a dochází k poškození jater, ledvin a k ukládání v mozku, což vede k rozvoji syndromu podobného schizofrenii (Nábělková & Nekovářová 2010).

3.1.2.5 Olovo

Olovo je součástí některých rud, např. galenit (PbS). Do vod se ale přirozenou cestou uvolňuje málo. Hlavním zdrojem v nedávné minulosti byly výfukové plyny motorových vozidel. Olovo má vysoký akumulací koeficient, ukládá se v sedimentech i biomase mikroorganismů a rostlin. Je silně toxické jak pro vodní organismy, tak pro člověka. Narušuje činnost enzymů, potlačuje tvorbu hemoglobinu, negativně působí na červené krvinky a nervový systém. Hromadí se v kostech, játrech a ledvinách. Olovo je také potenciálním karcinogenem (Nábělková & Nekovářová 2010).

3.1.2.6 Rtuť

Rtuť je nejnebezpečnějším jedem se závažnými akutními i chronickými účinky. Rtuť je známá svým vysokým kumulačním koeficientem, ukládá se ve dnovém sedimentu a vodní biotě. Akutní účinek rtuti se projevuje poruchami trávicího ústrojí, provázenými průjmami a zvýšeným sliněním, poruchami ledvin a centrálního nervového systému. Dlouhodobý příjem nízkých dávek Hg má za následek nervové poruchy, uvolňování a vypadávání zubů a poruchy ledvin (Nábělková & Nekovářová 2010).

3.1.2.7 Zinek

Zinek, obdobně jako měď, je součástí sulfidických rud a jejich rozkladem se může přirozeně dostávat zejména do podzemních vod. Je rovněž toxický pro ryby a vodní organismy. Dále způsobuje svíravou chuť vody. Pro lidský organismus je zinek esenciální a jeho nedostatek se může projevit v podobě akné, ztráty chuti k jídlu, průjmových onemocnění a vypadávání vlasů. Při nadbytku v organismu hrozí zvýšené riziko onemocnění srdce, poruchy imunitního systému či trávicí obtíže (Nábělková & Nekovářová 2010).

3.1.3 Těžké kovy v krmivech

Některé těžké kovy se přidávají i do krmiv jako stopové minerály, které jsou potřebné pro zdraví a růst zvířat. Tyto stopové minerály, jako je měď a zinek, jsou potřebné pro funkci hormonů, normální reprodukci, syntézu vitaminů, tvorbu enzymů a pro podporu integrity imunitního systému hostitele. Další skupinou minoritních prvků považovaných za nezbytné pro homeostázu jsou chrom, vanad, cín, nikl a molybden. Vzhledem k omezenému množství dostupných informací o tom, jaká koncentrace minerálních látek je pro určitá zvířata přesně potřebná, obsahuje doplňkové krmivo často vyšší koncentrace minerálních látek, než může být nezbytné, aby byla zajištěna odpovídající výživa. Mnohé z těchto látek se z krmiva plně nevstřebávají a jsou vylučovány zvířaty. Minerální látky, které nebyly vstřebány, stabilně zůstávají v kejďe, která je následně rozmetána do půdy (Yu et al. 2017).

Vysoké koncentrace oxidu zinečnatého (2000 až 3000 ppm Zn oproti požadovaným 100 ppm) a síranu měďnatého (125 až 250 ppm Cu oproti požadovaným 6 ppm) se běžně přidávají jednotlivě nebo v kombinaci do krmiv pro prasata, protože mohou zlepšit užitkovost po odstavu (Hill et al. 2000; Taylor-Pickard et al. 2005). Jejich antimikrobiální účinky vedou k hypotéze, že mohou působit jako antibiotické stimulatory růstu v krmivu (Jensen, 2006).

Kromě záměrně přidávaných těžkých kovů mohou být krmiva příležitostně kontaminována také těžkými kovy jako je arsen, kadmium, olovo a rtuť. Ačkoli se tyto prvky přirozeně vyskytují v životním prostředí, mohou pocházet také z antropogenních zdrojů (vznikající činností člověka) (Bampidis et al. 2013). Hnojiva v zemědělství, která se používají k dodávání dusíku, fosforu a draslíku do půdy, často obsahují příměsi, jako je kadmium a olovo, které se mohou hromadit v zemědělské půdě. Půda přiléhající k průmyslovým zařízením nebo dálnicím může být také vystavena znečištění těžkými kovy. Opatření pro bezpečnost potravin a protokoly biologické bezpečnosti sice mohou snížit mnohá biologická rizika spojená s křížovou kontaminací, ale pro mlynáře i zemědělce je náročné zabránit tomu, aby jejich půda, voda nebo dokonce vzduch nebyly znečištěny jinými subjekty, například blízkými továrnami. Proto může být kontrola hladin těchto těžkých kovů při výrobě krmiv kritická (Yu et al. 2017).

Nadměrné vystavení nežádoucím hladinám těžkých kovů poškozuje zdraví zvířat určených k produkci potravin. Mnohé z těchto kovů se také mohou koncentrovat ve tkáních, mléce a vejcích zvířat (proces označovaný jako bioakumulace), což následně ohrožuje zdraví spotřebitelů (Castro-Gonzalez & Mendez-Armenta, 2008).

Biologický poločas kadmia a olova (v kostech) se odhaduje na 10 a 30 let, což je déle než život většiny hospodářských zvířat. Naproti tomu většina veterinárních léčiv včetně antimikrobiálních sloučenin může být metabolizována a odstraněna ze zvířat určených k produkci krmiva během několika týdnů nebo měsíců (Yu et al. 2017).

3.1.3.1 Limity těžkých kovů v krmivech

Dle směrnice o nežádoucích látkách⁴ v krmivech mohou produkty určené ke krmení zvířat obsahovat nežádoucí látky, které mohou ohrozit zdraví zvířat anebo i zdraví lidí či životní prostředí, jsou-li přítomny v živočišných produktech. Je nemožné zcela vyloučit přítomnost nežádoucích látek, je však důležité, aby se jejich obsah v produktech určených ke krmení zvířat snížil, přičemž se musí náležitě vzít v úvahu akutní toxicita, bioakumulace a odbouratelnost látek, aby se zabránilo vzniku nežádoucích a škodlivých účinků. V současnosti je nemožné stanovit tento obsah pod úroveň hladin detekovatelných analytickými metodami definovanými evropským společenstvím. Metody stanovení reziduí nežádoucích látek se stále zdokonalují tak, aby bylo možné odhalit i množství reziduí, která jsou pro zdraví zvířat a lidí zanedbatelná. Nežádoucí látky mohou být přítomny v produktech určených ke krmení zvířat pouze za podmínek stanovených touto směrnicí (viz tabulka č. 1-4) a nemohou být použity pro účely krmení zvířat jiným způsobem. Tato směrnice tedy musí být uplatňována, aniž jsou dotčena jiná ustanovení Společenství o krmivech, a zejména pravidla týkající se krmných směsí (EP, Směrnice evropského parlamentu a rady 2002/32/ES, 2002). Pro zinek a měď nejsou dohledatelné směrnice určující maximální obsah prvku v krmivu.

Tabulka 1: Maximální obsah arsenu v krmivu (Zdroj: EP, Směrnice evropského parlamentu a rady 2002/32/ES, 2002)

Nežádoucí látka	Produkty určené ke krmení zvířat	Maximální obsah v mg/kg (ppm) v krmivu s 12% obsahem vlhkosti
Arsen	Krmné suroviny, s výjimkou:	2
	<ul style="list-style-type: none">travní, vojtěškové a jetelové moučky a sušených řízků cukrovkových a cukrovarských	4
	<ul style="list-style-type: none">fosfátů a krmiv získaných při zpracování ryb nebo jiných mořských živočichů	10
	Kompletní krmiva, s výjimkou:	2
	<ul style="list-style-type: none">kompletních krmiv pro ryby	4
	Doplňková krmiva, s výjimkou:	4
	<ul style="list-style-type: none">minerálních krmiv	12

⁴ „Nežádoucí látka“: jakákoliv látka nebo jakýkoliv produkt vyjma patogenních činitelů, která je přítomna v a/nebo na povrchu produktu určeného ke krmení zvířat a která představuje možné riziko pro zdraví zvířat a lidí nebo pro životní prostředí, nebo která by mohla nepříznivě ovlivnit živočišnou výrobu (EP, Směrnice evropského parlamentu a rady 2002/32/ES, 2002).

Tabulka 2: Maximální obsah kadmia v krmivu (Zdroj: EP, Směrnice evropského parlamentu a rady 2002/32/ES, 2002)

Nežádoucí látka	Produkty určené ke krmení zvířat	Maximální obsah v mg/kg (ppm) v krmivu s 12% obsahem vlhkosti
Kadmium	Krmné suroviny rostlinného původu	1
	Krmné suroviny živočišného původu, s výjimkou	2
	<ul style="list-style-type: none"> • krmiv pro domácí zvířata 	
	Fosfáty	10 ⁽⁵⁾
	Kompletní krmiva pro skot, ovce a kozy, s výjimkou:	1
	<ul style="list-style-type: none"> • kompletních krmiv pro telata, jehňata a kůzlata 	
	Ostatní kompletní krmiva, s výjimkou:	0,5
	<ul style="list-style-type: none"> • krmiv pro domácí zvířata 	
	Minerální krmiva	5 ⁽⁶⁾
Ostatní doplňková krmiva pro skot, ovce a kozy	0,5	

Tabulka 3: Maximální obsah olova v krmivu (Zdroj: EP, Směrnice evropského parlamentu a rady 2002/32/ES, 2002)

Nežádoucí látka	Produkty určené ke krmení zvířat	Maximální obsah v mg/kg (ppm) v krmivu s 12% obsahem vlhkosti
Olovo	Krmné suroviny, s výjimkou:	10
	<ul style="list-style-type: none"> • zelené píče 	40
	<ul style="list-style-type: none"> • fosfátů 	30
	<ul style="list-style-type: none"> • kvasnic 	5
	Kompletní krmiva	5
	Doplňková krmiva, s výjimkou:	10
<ul style="list-style-type: none"> • minerálních krmiv 	30	

⁵ Členské státy mohou rovněž stanovit maximální obsah kadmia 0,5 mg na 1 % fosforu.

⁶ Členské státy mohou rovněž stanovit maximální obsah kadmia 0,75 mg na 1 % fosforu.

Tabulka 4: Maximální obsah rtuti v krmivu (Zdroj: EP, Směrnice evropského parlamentu a rady 2002/32/ES, 2002)

Nežádoucí látka	Produkty určené ke krmení zvířat	Maximální obsah v mg/kg (ppm) v krmivu s 12% obsahem vlhkosti
Rtuť	Krmné suroviny, s výjimkou:	0,1
	<ul style="list-style-type: none"> • krmiv získaných při zpracování ryb nebo jiných mořských živočichů 	0,5
	Kompletní krmiva, s výjimkou:	0,1
	<ul style="list-style-type: none"> • kompletních krmiv pro psy a kočky 	0,4
	Doplňková krmiva, s výjimkou:	0,2
	<ul style="list-style-type: none"> • doplňkových krmiv pro psy a kočky 	

3.1.4 Těžké kovy v zemědělství a v potravinářské produkci

Těžké kovy mají v zemědělství široké spektrum využití; od přídavku do krmiva pro hospodářská zvířata až po jejich využití v zahradnictví. Zpravidla se používá anorganická forma minerálních látek, jejíž využitelnost je pro hospodářská zvířata poměrně nízká. V důsledku toho se těžké kovy, které se nevstřebaly, vylučují. Studie z roku 2014 porovnávala koncentrace zinku a mědi v krmivu pro prasata a následně v jejich výkalech. Ukázalo se, že výkaly prasat obsahují vyšší koncentrace mědi a zinku ve srovnání s obsahem v krmivu, což poukazuje na množství těžkých kovů, které se dostávají do životního prostředí (Medardus et al. 2014).

Hospodářská zvířata vylučují výkaly na pastviny. Mnoho systémů hospodaření shromažďuje výkaly zvířat ve vlastním hospodářství a následně je používá jako hnojivo (Moore et al. 1995). V důsledku toho se v systémech hospodaření těžké kovy, jako je zinek a měď, které vylučují jatečná zvířata, aplikují na půdu, kde se hmota rozkládá a proniká do půdy a obvykle nemigruje ve velkém množství do vodních zdrojů. Tyto prvky se hromadí v půdě, pokud nejsou absorbovány rostlinami na pastvinách (Ferket et al. 2002). V půdě ošetřené drůbežím a prasečím hnojem byla pozorována akumulace těžkých kovů (Han et al. 2001).

3.2 Mikrobiom trávicího traktu skotu

V gastrointestinálním traktu (GIT) skotu se nachází rozmanitý, komplexní a dynamický mikrobiom, který řídí trávení a fermentaci krmiva a také ovlivňuje využitelnost krmiva a produkci škodlivin (Minseok et al. 2017).

Biologické procesy probíhající v GIT skotu ovlivňují zdraví zvířat a jejich výkaly jsou významným přenašečem zoonotických patogenů a bakterií rezistentních vůči antibiotikům (Durso et al. 2017)

Již více než sto let probíhá výzkum zaměřený na pochopení gastrointestinálního mikrobiomu a jeho vztahu k využitelnosti krmiva a zdraví jedince. Tradiční výzkum založený na kultivaci objasnil některé z hlavních metabolismů, ale studie využívající techniky molekulární biologie prováděné od konce 80. let 20. století do konce počátku roku 2000 výrazně rozšířily pohled na rozmanitost bachorového a střevního mikrobiomu skotu. V poslední době je metagenomika hlavní technologií pro charakterizaci mikrobiomu trávicího traktu a jeho vztahu k výživě a zdraví jedince (Minseok et al. 2017).

V mikrobiomu GIT se nachází složité společenství prokaryot, eukaryot a virů. Mezi prokaryota patří bakterie, především anaerobní bakterie, a archea, především metanogeny. Společenstvo eukaryot tvoří anaerobní houby a prvoci, výhradně řasinky. Velké množství přítomných druhů a jejich nerovnoměrné rozložení mezi jednotlivými druhy vytváří několik problémů pro komplexní analýzu nebo charakterizaci jakéhokoli bachorového mikrobiomu (Minseok et al. 2017).

3.2.1 Bachorový mikrobiom

Přežvýkavci mohou využívat biomasu buněčných stěn rostlin (Dai et al. 2015; He et al. 2019) a mnoho vedlejších produktů zemědělského a potravinářského průmyslu díky bachorové mikrobiotě (Kimball, 1991; Westendorf, 2000; Malaweera & Wijesundara, 2014). Bachor je popisován jako "černá skříňka" kvůli velkému množství mikrobů a bachorová mikrobiota je považována za nový orgán, který se skládá z bilionů mikrobů a jehož genový obsah je stokrát vyšší než u buněk jedince (Huttenhower et al. 2012). Tyto geny ovlivňují využití živin a zdraví jedince prostřednictvím specifických metabolických drah. Proto je bachorová mikrobiota do značné míry spojena s trávením a metabolismem krmiva jedince. Bachorové epitelové buňky mají zásadní význam pro vstřebávání živin, jako jsou těkavé mastné kyseliny, jakožto produkt fermentace, a vitaminy (Liu et al. 2021). V bachoru dospělých přežvýkavců se nachází hustá a rozmanitá mikrobiota, zatímco v bachoru novorozených telat a jehňat je mikrobiota poměrně jednoduchá. Bachor je osídlován během laktace, příjmu potravy a kontaktu s prostředím, takže je postupně osídlen velkým množstvím rozmanitých mikrobů, které ovlivňují funkci epitelálních buněk a vývoj střevních lymfoidních tkání (Jami et al. 2013).

Bachorová mikrobiota obsahuje bakterie (*Firmicutes* a *Bacteroidetes* jako 2 převládající fyly), archea (např. *Methanobrevibacter smithii* a *Methanosphaera stadtmanae*), houby a prvoky (Liu et al. 2021). Vedle bakteriální mikroflóry se v předžaludku přežvýkavců nachází i druhově bohatá mikrofauna. Jedná se o přibližně 150 druhů nálevníků typu *Ciliata* (Jelínek & Koudela, 2003). Bachorová mikrobiota reaguje na změny prostředí změnou svého složení a funkce. Na utváření bachorové mikrobioty se významně podílí strava (Liu et al. 2021).

Zejména typ stravy může silně ovlivnit funkci bachoru tím, že mění mikrobiální populace a fermentační aktivity (Bevans et al. 2005; Auffret et al. 2017; Liu et al. 2017; Pandit et al. 2018). Dále se na utváření bachorové mikrobioty podílí životní prostředí, věk a zdravotní stav jedince (Liu et al. 2021).

Mikroorganismy obsažené v bachoru fermentují rostlinné organické látky (anaerobní proces zvaný fermentace), jež jsou využívány přežvýkavci, kteří jsou jedinečnou skupinou zvířat, jež může přeměnit rostlinné materiály nestrávitelné lidmi na vysoce kvalitní živočišné bílkoviny jako je maso a mléko (Liu et al. 2021). Celulolytické mikroorganismy produkující enzym celulázu, patří mezi nejvýznamnější bakterie v bachoru. Celuláza je klíčovým enzymem pro využití rostlinných buněčných stěn přežvýkavci díky její schopnosti štěpit celulózu (Liu et al. 2021). Jak bakterie, tak i prvoci produkují při fermentaci potravy těkavé mastné kyseliny s krátkým řetězcem, oxid uhličitý a metan. Základní těkavé mastné kyseliny jsou kyselina octová, propionová a máselná. Tyto kyseliny jsou většinou resorbovány z bachoru ještě před tím, než obsah dojde do dvanáctníku. Produkty fermentace většiny sacharidů jsou jednoduché směsi těkavých mastných kyselin s oxidem uhličitým (Reece, 2011). Vzniklé těkavé mastné kyseliny se podílejí až z 80 % na celkové energii potřebné pro přežvýkavce (Wolin, 1979). Někteří bachoroví mikrobi také syntetizují vlastní bílkoviny pro svůj růst (označované jako mikrobiální hrubý protein, MCP) s využitím energie a dusíku získaného z krmiva. Mikrobiální hrubý protein je tráven v tenkém střevě a vstřebáván, čímž přispívá k výživě a zdraví jedince (Russell & Rychlik, 2001; Hall & Huntington, 2008). Kromě toho mohou někteří mikrobi produkovat vitaminy, například vitaminy B a K. Bachoroví mikrobi mají mnoho enzymů podílejících se na de novo syntéze vitamínu B12 (Seshadri et al. 2018). Hlavní funkcí bachorových mikrobů je jejich schopnost využívat rostlinné polysacharidy a nebílkovinné dusíkaté látky v potravě, které jedince nedokáže strávit a využít (Liu et al. 2021).

3.3 Antibiotika používaná v chovech zvířat

Antibiotika jsou léky, které usmrcují bakterie nebo zpomalují bakteriální růst a jsou používána pro léčbu nebo prevenci bakteriálních infekcí. (AP NAP, 2019).

Většina antibiotik působí na buněčnou stěnu nebo inhibuje syntézu proteinu nebo nukleové kyseliny. Na každém místě existuje mnoho různých molekulárních cílů (enzymy nebo substráty), které mohou být inhibovány (Ambrožová et al. VŠCHT, 2022).

Antibiotika můžeme rozdělit podle intenzity účinku (viz. Tabulka č. 5) či podle mechanismu účinku (viz tabulka č. 6). Mechanismus účinku je dále znázorněn na obrázku č. 1.

Tabulka 5: Antibiotika rozdělena podle intenzity účinku (Zdroj: Pavlík et al. 2023)

Baktericidní antibiotika	Bakteriostatická antibiotika
<p><u>Aminoglykosidy:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Gentamicin • Amikacin • Tombramycin • Neomycin 	<p><u>Linkosamidy:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Klindamycin • Linkomycin
<p><u>Betalaktamy:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Cefalosporiny⁷: 1., 2., 3. a 4. generace • Peniciliny: Amoxicillin, Ampicillin 	<p><u>Makrolidy:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Erythromycin • Azithromycin
<p><u>Fluorochinolony:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Enrofloxacin • Marbofloxacin • Pradofloxacin 	<p><u>Tetracykliny:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Doxycyklin
<p><u>Nitroimidazoly:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Metronidazol 	

Tabulka 6: Antibiotika rozdělena podle mechanismu účinku (Zdroj: Ambrožová et al. VŠCHT, 2022)

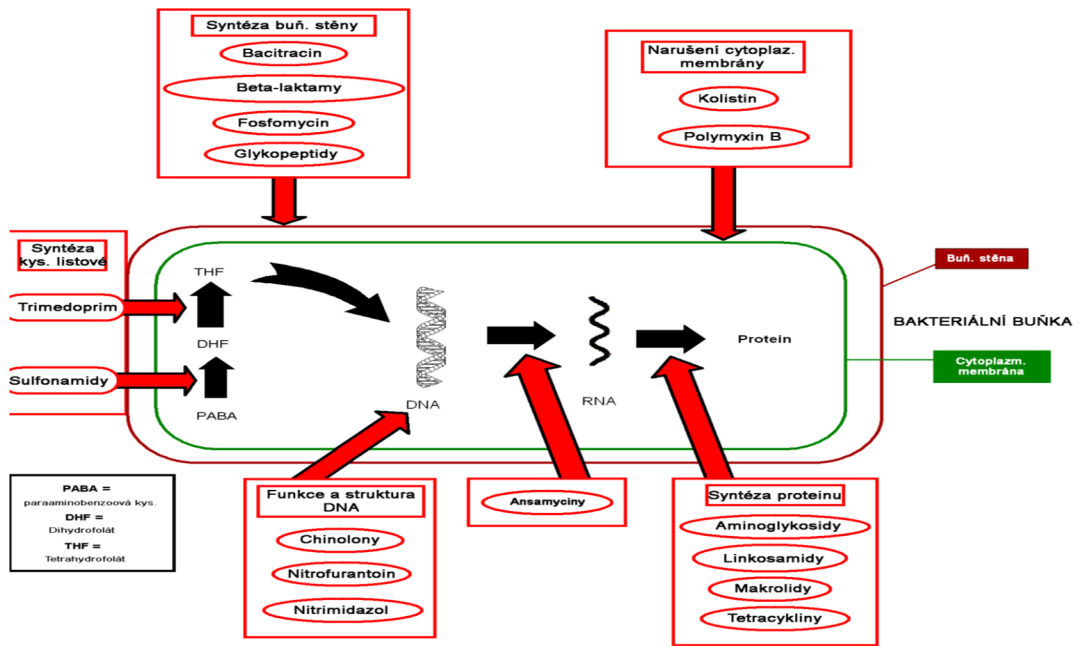
ATB podle mechanismu účinku	
Inhibice syntézy buněčné stěny	peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy, karbapenemy, vankomycin, bacitracin
Porucha funkce cytoplazmatické membrány	amfotericin B, azoly, polyeny, polymyxiny
Inhibice syntézy bílkovin	aminoglykosidy, chloramfenikol, makrolidy, tetracykliny, linkomycin
Inhibice syntézy nukleových kyselin	chinolony, rifampicin, pyrimetamin
Inhibice syntézy kyseliny listové	sulfonamidy, trimetoprim

⁷ Cefalosporiny 1. generace: cefazolin, cefalexin

Cefalosporiny 2. generace: cefuroxim

Cefalosporiny 3. generace: ceftazidim, cefovecin

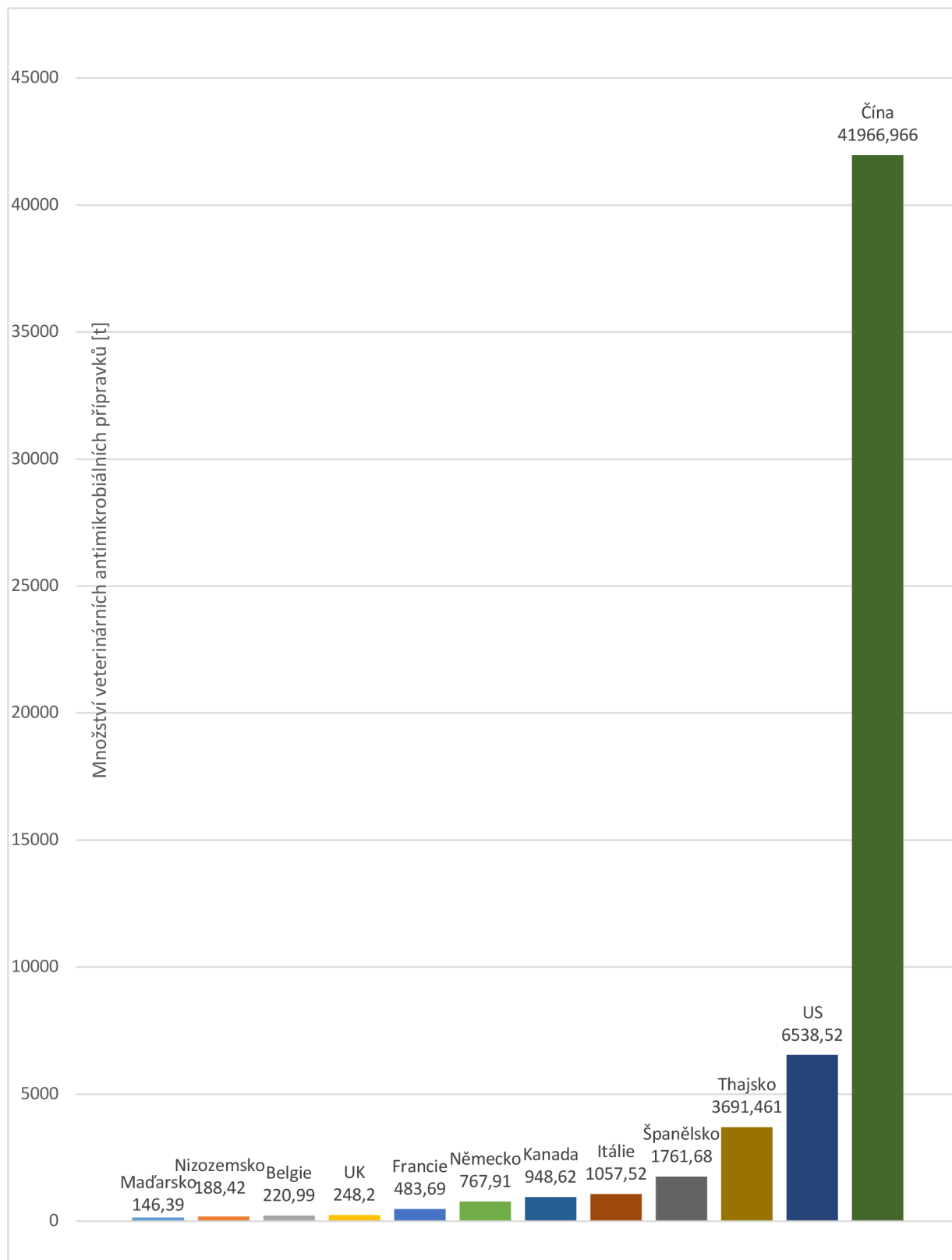
Cefalosporiny 4. generace: cefepim



Obrázek 1: Mechanismus účinku ATB (Zdroj: Ambrožová et al. VŠCHT, 2022)

Tiseo et al. 2020 zveřejnil ve své publikaci hlášený prodej veterinárních antimikrobiálních přípravků podle zemí, jejichž množství je vyobrazeno v grafu č. 1. Tento přehled odpovídá stavu v roce 2017.

Graf 1: Hlášený prodej veterinárních antimikrobiálních přípravků podle zemí v roce 2017 (Zdroj: Tiseo et al. 2020)



Antibiotika minimalizují například četnost, závažnost a zdravotní dopady výskytu infekčních onemocnění zvířat a s tím spojené nepříznivé ekonomické dopady (Vorlíček, SVS, 2023).

Antibiotika, jako je avoparcin, penicilin, streptomycin a tetracyklin, dříve byla používána jako růstové stimulatory v chovech hospodářských zvířat (Cogliani et al. 2011). Protože používání antibiotik přináší také řadu rizik, je v celé Evropské unii od roku 2006 zakázáno používat antibiotika coby stimulatory růstu a produkce u potravinových zvířat (Vorlíček, SVS, 2023). Přesto se v některých regionech, kde jsou nižší normy nebo kde není prosazování takové regulace dostatečně silné, tyto látky zvířatům určeným k produkci potravin stále podávají, aby se zlepšila konverze krmiva, stimuloval růst zvířat a aby se předcházelo onemocněním (Cogliani et al. 2011).

Od roku 2023 také vstoupilo v platnost Evropské nařízení vyhrazující seznam antimikrobiálních látek, které se nesmí ve veterinární medicíně používat ani registrovat a jsou určeny pouze jako záloha pro humánní medicínu (Vorlíček, SVS, 2023).

Antimikrobiální látky⁸ lze v některých zemích podávat i k profylaxi velkého počtu zvířat během stresových období. Například v chovech dojnic, kde mastitida způsobená etiologickými agens, mezi něž patří *Staphylococcus aureus*, koaguláza-negativní stafylokoky, *Streptococcus agalactiae* a další, může vést ke změně kvality mléka a problémům s užitkovostí (Yu et al. 2017).

Profylaxe představuje soubor opatření, která se používají k prevenci vzniku nemocí. Cílem profylaxe je minimalizovat riziko vzniku nemocí, udržet zdravá zvířata a zamezit šíření infekcí v chovech. V případě antibiotické profylaxe dochází k preventivnímu podávání antibiotik s cílem zabránit vzniku bakteriálních infekcí nebo minimalizovat jejich průběh u zvířat v chovech.

K prevenci nebo léčbě bakteriální infekce se používá několik tříd antimikrobiálních látek, jako jsou aminoglykosidy, cefalosporiny, peniciliny a tetracykliny. Obvykle asi 2 měsíce před otelením se krávy nedojí, aby si zvíře mohlo odpočinout a došlo k regeneraci mléčné tkáně s cílem dosáhnout optimálního zdraví zvířete a vyšší kvality a množství mléka během následující laktace. Aby se zabránilo případným klinickým nebo subklinickým mastitidám a zabránilo se infekcím, které se během období stání na sucho pravděpodobně vyskytnou, jsou vysokoprodukčním zvířatům ve vybraných případech do struků aplikovány antimikrobiální látky (Yu et al. 2017).

⁸ Antimikrobiální látky usmrcují mikroorganismy nebo inhibují jejich růst a množení. Jsou určeny k potlačení jednoho systému (mikrobů) a zároveň musí způsobit minimální poškození druhého systému (pacientovi) a musí mít selektivní toxicitu. Jedná se o produkty mikroorganismů (přírodní produkty), ale většina z nich je chemicky upravena pro zlepšení jejich vlastností. Některé jsou zcela syntetické (Ambrožová et al. VŠCHT, 2022).

Srovnání evropských zemí v rámci prodeje účinné látky antibiotických veterinárních léčivých přípravků je znázorněno v tabulce č. 7.

Tabulka 7: Prodej účinné látky antibiotických veterinárních léčivých přípravků uváděných na trh zejména pro zvířata určená k produkci potravin¹ v tunách, PCU v 1 000 tunách a prodej v mg/PCU v 31 evropských zemích v roce 2022 (Zdroj: EMA, 2023)

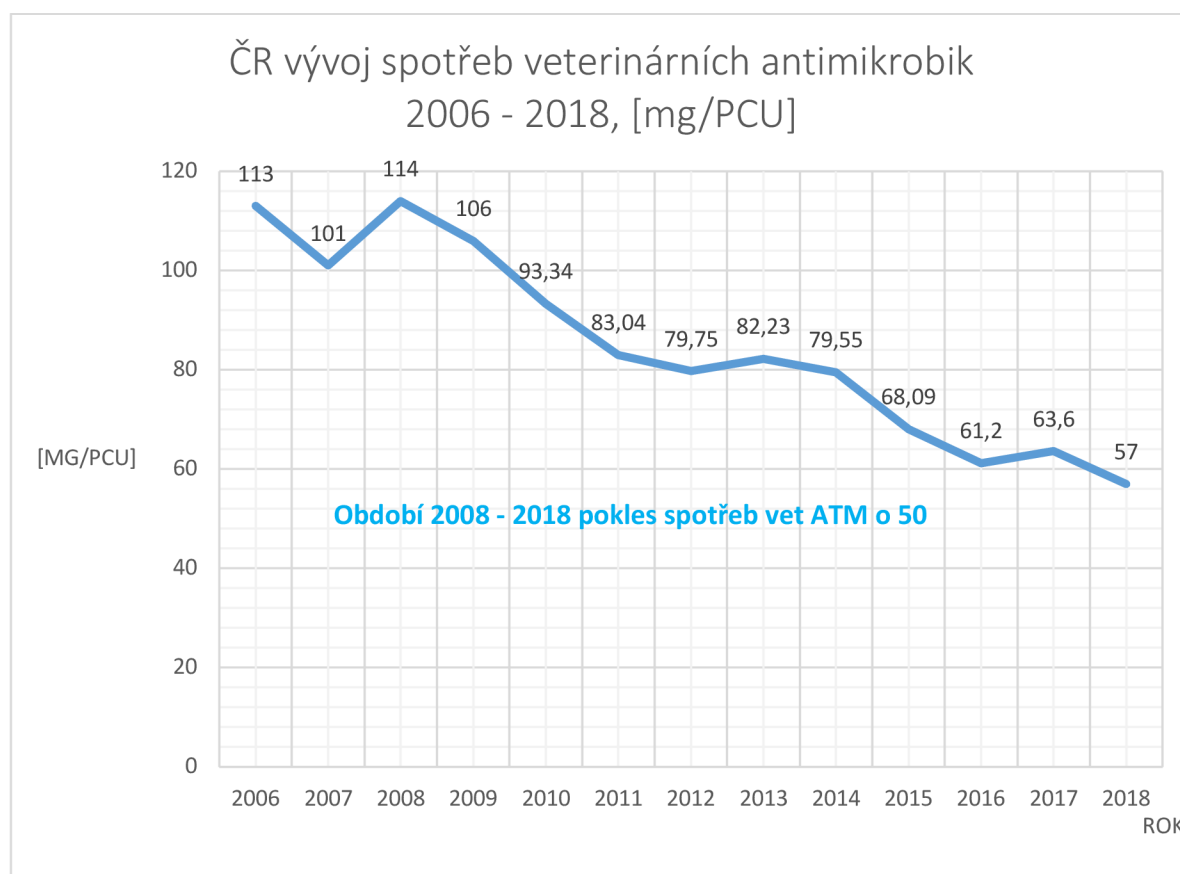
Země	Prodej (v tunách) zvířat určených k produkci potravin	PCU (1 000 tun)	mg/PCU
Rakousko	34.3	946.4	36.2
Belgie	120.2	1,634.6	73.5
Bulharsko	37.0	358.0	103.2
Chorvatsko	17.1	304.1	56.2
Kypr	35.6	139.7	254.7
Česko	32.3	696.7	46.4
Dánsko	80.2	2,355.9	34.1
Estonsko	5.2	114.5	45.8
Finsko	7.2	484.8	14.9
Francie	255.2	6,561.4	38.9
Německo	531.1	7,600.9	69.9
Řecko	101.7	1,141.9	89.0
Maďarsko	92.6	832.9	111.2
Island	0.6	140.2	4.4
Irsko	75.6	2,246.0	33.6
Itálie	585.4	3,716.3	157.5
Lotyšsko	3.4	163.7	20.8
Litva	14.5	300.1	48.2
Lucembursko	1.3	51.1	25.1
Malta	1.1	15.3	74.4
Nizozemsko	112.0	3,025.4	37.0
Norsko	4.7	2,198.1	2.1
Polsko	838.3	4,277.7	196.0
Portugalsko	82.0	1,062.4	77.1
Rumunsko	136.4	2,794.4	48.8
Slovensko	9.2	223.9	41.1
Slovinsko	4.7	182.4	25.7
Španělsko	1,027.2	8,063.3	127.4
Švédsko	8.3	788.1	10.6
Švýcarsko	22.6	829.0	27.3
Spojené království	181.1	7,037.5	25.7
Celkem 31 zemí	4,458.1	60,286.7	73.9*

¹Tablety jsou vyloučeny, protože se používají téměř výhradně u společenských zvířat. Naopak prodej některých injekčních antibiotik VMP a několika dalších přípravků, které se používají výhradně nebo také u zvířat určených k produkci potravin, je zahrnut do prodeje zvířat určených k produkci potravin, protože jejich poměrné použití u zvířat určených k produkci potravin je zanedbatelné.

* Celkové mg/PCU pro 31 zemí představuje souhrnný prodej (v tunách) zvířat určených k produkci potravin, včetně koní a ryb chovaných na farmách, normalizovaný souhrnnou jednotkou PCU (1 000 tun).

Graf č. 2 zobrazuje vývoj spotřeb veterinárních léčivých přípravků (VLP) obsahujících antimikrobika za léta 2006–2018 v České republice. Pro přehlednost je v grafu vizualizována poslední dekáda, tj. období 2008–2018, kdy za toto období došlo ke snížení spotřeb veterinárních antimikrobik o 50 %. S ohledem na jistou míru srovnání s dalšími státy EU je třeba říct, že ČR v roce 2018 byla svými spotřebami přímo na mediánu ze sumy spotřeb 31 zemí EU/EEA (57 mg/PCU) a byla o 45 % pod průměrem, který činil 103,2 mg/PCU v roce 2018. Bylo by vhodné uvést, že mezi 31 hodnocenými zeměmi je veliký rozdíl ve spotřebách, skandinávské země patří k těm s minimálními spotřebami (v čele s Norskem 2,9 mg/PCU), zatímco nejvyšší spotřeby má Kypr 466,3 mg/PCU (ÚSKVBL, 2020).

Graf 2: Trendy v celkové spotřebě veterinárních antimikrobik ČR, 2006–2018: korekce na populace hospodářských zvířat (mg/PCU). (Zdroj: ÚSKVBL, 2020)



Z novějších statistik Ústavu pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv (ÚSKVBL) vyplývá, že mezi roky 2008 a 2022 klesla celková spotřeba veterinárních léčiv u zvířat v ČR takřka o dvě třetiny z 95,5 tuny na 35,7 tuny. V rámci srovnání evropských zemí zaujímá Česká republika se svými 46,4 mg/PCU místo hluboko pod průměrem spotřeb veterinárních antibiotik Evropy (73,9 mg/PCU). Česká republika již v roce 2021 splňovala evropský cíl pro rok 2030, který je stanoven na průměr 59,2 mg/PCU. Zásadní podíl na tomto pozitivním vývoji má proaktivní přístup chovatelů, veterinárních lékařů i státních institucí v této oblasti a dlouhodobá osvěta (Vorlíček, SVS, 2023).

Intenzivní zemědělské systémy s vysokou hustotou chovu zvířat, které jsou v mnoha zemích běžným rysem, usnadnily šíření nakažlivých chorob. V těchto situacích často chybí zavedení důkladných postupů biologické bezpečnosti a hygieny, které jsou nezbytné pro zabránění šíření jakýchkoliv infekcí. V některých systémech prvovýroby se jako náhrada správných chovatelských postupů i nadále používají antimikrobiální látky (Yu et al. 2017).

Antibiotika podávaná zvířatům mění složení střevní mikroflóry, jak bylo prokázáno u chlortetracyklinu, sulfamethazinu a penicilinu, které po 14 dnech podávání prasatům vyvolaly zvýšení populace *Escherichia coli*, známé svým patogenním potenciálem, ale také v množství a rozmanitosti genů rezistence vůči antibiotikům (ARG), přičemž některé z nich, jako aminoglykosidové O-fosfotransferázy, propůjčovaly rezistenci k antibiotikům, která nebyla podávána, což ukazuje na možnost nepřímé selekce rezistence k třídám antibiotik, která nebyla podávána (Loof et al. 2011). Snížení střevní diverzity vlivem antibiotik by navíc mohlo usnadnit přerůstání již rezistentních mikrobů a horizontální přenos genů (HGT) ARG.

Bylo prokázáno, že antibiotika by mohla podporovat HGT prostřednictvím: 1) aktivací SOS reakce, která zvyšuje přenos rozmanitých mobilních genetických elementů (ostrůvků patogenity, integronů, konjugativních transpozonů, plazmidů atd. (Couce & Blázquez, 2009); 2) podporou transdukce tím, že stimuluje excizi profágů a lýzu hostitelské buňky a také receptorového kmene (Hastings et al. 2004; Lopatkin et al. 2016); 3) zvýšení PT (plazmid transfer), jak bylo prokázáno např. u ESBL nesoucích plazmidů v *E. coli* (Liu et al. 2019). Kromě toho se mutace a rekombinace zvyšují také v přítomnosti antibiotického stresu (Couce & Blázquez, 2009).

3.3.1 Hlavní třídy antibiotik používaných v živočišné výrobě

Odhaduje se, že celosvětově se 73 % všech antibiotik používá v chovech hospodářských zvířat, nikoliv v humánní medicíně, což podporuje rostoucí povědomí o souvisejících rizicích (Boeckel et al. 2017; Van et al. 2020). Velká část těchto antimikrobiálních látek se používá ke kontrole infekčních onemocnění, která by jinak způsobila vážné ztráty nebo dokonce zcela znemožnila intenzivní produkci (Aarestrup, 2015). WHO (World Health Organisation) uvádí, že 57 % všech antimikrobiálních látek používaných v živočišné výrobě je nezbytných pro humánní medicínu. V této souvislosti byly WHO a vládami jednotlivých států vytvořeny seznamy kriticky důležitých antimikrobiálních látek (viz tabulky č. 8, 9, a 10), které mají za cíl stanovit priority a chránit nejnужnější antibiotika (WHO, 2019).

Tabulka 8: Kriticky důležité třídy antibiotik v živočišné výrobě (Zdroj: Marutescu et al. 2022)

Kriticky důležité třídy antibiotik				
Betalaktamy	Vankomycin	Makrolidy	Fluorochionolony	Cyklické polypeptidy
Amoxicilin		Azithromycin	Ciprofloxacin	Polymyxin E (Colistin)
Ampicilin		Clarithromycin	Ofloxacin	
Benzylpenicilin		Clindamycin	Danofloxacin	
Cloxacilin		Erythromycin	Difloxacin	
Dicloxacilin		Roxithromycin	Enrofloxacin	
Flucloxacilin		Spiramycin		
Meticilin		Tylosin		
Mezlocilin				
Nafcilin				
Oxacilin				
Piperacilin				
Fenoxymethylcilin				
Cefalonium				
Cefalexin				
Cefoperazon				
Cefquinome				
Ceftiofur				

Tabulka 9: Vysoce důležité třídy antibiotik v živočišné výrobě (Zdroj: Marutescu et al. 2022)

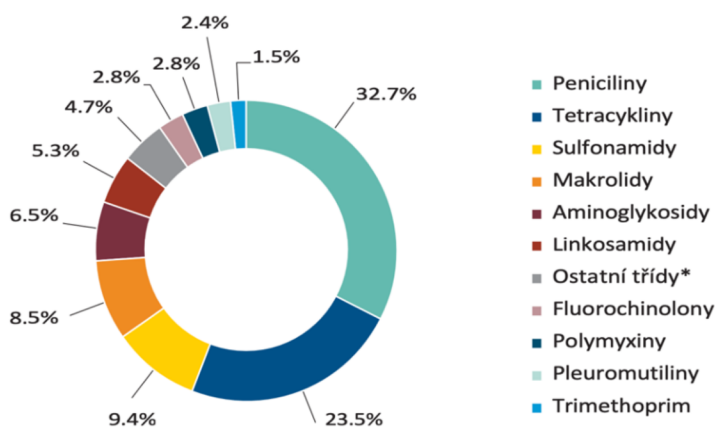
Vysoce důležité třídy antibiotik			
Tetracykliny	Aminoglykosidy	Linkosamidy	Sulfonamidy
Chlortetracyklin	Dihydrostreptomycin	Linkomycin	Sulfadimidin
Doxycyklin	Apramycin sulfát		Sulfamethoxazol
Oxytetracyklin	Neomycin		Trimethoprim
Tetracyklin	Paromomycin		
	Spectinomycin		

Tabulka 10: Důležité třídy antibiotik v živočišné výrobě (Zdroj: Marutescu et al. 2022)

Důležité třídy antibiotik		
Polyetherová antibiotika	Amfenikoly	Pleuromutiliny
Monesin	Florfenikol	Tiamulin
	Thiamfenikol	

V roce 2022 byly celkově nejprodávanějšími třídami antibiotik peniciliny (32,7 %), tetracykliny (23,5 %) a sulfonamidy (9,4 %), které představovaly 65,5 % celkového prodeje antibiotik VMP pro zvířata určená k živočišné produkci v mg/PCU. Mezi třídami antibiotik označenými jako "Ostatní třídy" tvořily cefalosporiny 1. a 2. generace, cefalosporiny 3. a 4. generace, amfenikoly a další chinolony 0,15 %, 0,17 %, 2,7 % a 0,16 % z celkového prodeje v 31 evropských zemích. Ucelený přehled prodeje jednotlivých tříd antibiotik je zobrazen v grafu č. 3 (EMA, 2023).

Graf 3: Podíl souhrnného prodeje antibiotických veterinárních léčivých přípravků pro zvířata určená k produkci potravin v mg/PCU podle třídy antibiotik v 31 evropských zemích v roce 2022 (Zdroj: EMA, 2023)



* "Ostatní třídy" zahrnují amfenikoly, cefalosporiny, ostatní chinolony a "Ostatní". Třída "Ostatní" zahrnuje tyto podtřídy: deriváty imidazolu (metronidazol), deriváty nitrofuranu (furazolidon) a ostatní antibakteriální látky (bacitracin, furaltadon, novobiocin, rifaximin a spektinomycin). Za zmínku stojí, že některé prodeje mohou být určeny pro zvířata, která nejsou určena k produkci potravin, jako jsou společenská zvířata, kožešinová zvířata, exotické ptactvo a poštovní holubi.

Tabulka č. 11 uvádí prodeje v mg/PCU různých tříd antibiotik v jednotlivých zemích a celkový prodej v 31 evropských zemích. Celkově se struktura prodeje jednotlivých tříd antibiotik mezi zeměmi lišila. Přestože penicilin byl v roce 2022 celkově nejprodávanější třídou antibiotik, prodej tetracyklinu překonal prodej penicilinů ve 13 zemích. Rozdíly mezi zeměmi lze částečně vysvětlit mimo jiné rozdíly v demografických údajích o zvířatech, ve výběru antibiotik, v dávkovacích režimech, ve zdrojích údajů a ve zvyklostech veterinárních lékařů při předepisování (EMA, 2023).

Tabulka 11: Prodeje pro zvířata určená k produkci potravin v mg/PCU podle třídy antibiotik v 31 evropských zemích v roce 2022 (Zdroj: EMA, 2023)

Země	Tetracykliny	Amphenicols	Peniciliny	cefalosporiny 1. a 2. generace	Cefalosporiny 3. a 4. generace	Sulfonamidy	Trimetoprim	Makrolidy	Linkosamidy	Fluorochinolony	Ostatní chinolony	Aminoglykosidy	Polymyxiny	Pleuromutiliny	Ostatní*	Celkem mg/PCU
Rakousko	16.7	0.4	8.5	0.1	0.2	3.4	0.7	2.7	0.1	0.4	0	1.4	1.2	0.3	0.1	36.2
Belgie	14.7	1.9	30.0	0.3	0.1	11.7	2.3	5.3	1.6	0.2	0.2	2.3	0.6	0.1	2.1	73.5
Bulharsko	37.2	3.3	22.8	0.04	0.2	5.9	0.7	12.2	2.0	7.8	0.01	5.3	3.9	1.3	0.5	103.2
Chorvatsko	16.9	1.5	19.1	0.04	0.2	2.7	0.6	4.2	0.2	2.6	0	1.7	5.6	0.5	0.3	56.2
Kypr	68.5	1.7	49.1	0.02	0.4	45.0	9.0	11.6	40.7	1.8	0	5.5	6.3	14.5	0.6	254.7
Česko	11.2	0.4	16.7	0.1	0.5	6.8	0.8	2.2	0.1	1.6	0	2.5	0.6	2.5	0.3	46.4
Dánsko	4.9	0.7	9.7	0.02	<0.01	3.0	0.6	5.0	0.8	<0.01	0.2	5.8	0	2.5	1.0	34.1
Estonsko	13.2	0.6	11.1	0.1	0.5	3.3	0.7	1.5	0.4	0.8	0	2.3	0.4	10.2	0.6	45.8
Finsko	2.6	0.2	8.2	0	<0.01	2.9	0.6	0.2	0.05	0.1	0	0.0	0	0	0	14.9
Francie	11.4	0.8	7.4	0.2	0.02	6.6	1.2	3.1	0.3	0.1	0.2	5.5	1.1	0.3	0.6	38.9
Německo	11.8	0.7	29.1	0.1	0.1	7.2	1.0	6.5	1.5	0.6	0	2.7	5.8	1.1	1.6	69.9
Řecko	42.6	0.9	16.2	0.01	0.2	7.3	0.8	5.2	0.9	3.0	0.7	7.9	1.7	1.1	0.6	89.0
Maďarsko	36.6	3.2	32.6	0.1	0.3	6.3	1.3	4.5	1.8	6.6	0	3.6	5.8	7.8	0.8	111.2
Island	1.5	0	2.2	0	<0.01	0.1	0.02	0	0	<0.01	0	0.6	0	0	<0.01	4.4
Itálie	12.2	1.1	8.8	0.5	0.1	5.3	0.3	1.9	0.4	0.2	0	2.5	0	0.3	0.3	33.6
Lotyšsko	35.6	6.4	54.6	0.1	0.1	21.8	1.9	8.0	13.4	0.9	0.4	7.3	0.6	4.3	2.2	157.5
Lotyšsko	3.4	0.1	5.9	0.7	0.4	0.5	0.1	3.3	0.1	0.8	0	3.9	0.3	1.2	0.1	20.8
Litva	4.2	0.3	13.5	0.2	0.4	1.7	7.7	8.0	0.2	1.5	0	3.8	5.8	0.5	0.3	48.2
Lucembursko	5.0	1.1	6.6	0.2	0.5	4.5	0.9	1.0	0.6	0.9	0	3.2	0.2	0.01	0.5	25.1
Malta	20.6	0.9	9.5	0.04	0.3	12.2	2.3	3.5	0.3	12.6		4.7	0.3	4.7	2.5	74.4
Nizozemsko	10.7	1.4	9.4	0.03	<0.01	6.4	1.1	6.1	0.1	0.03	0.8	0.5	0.3	0.1	0.1	37.0
Norsko	0.03	0.2	1.2	0	<0.01	0.5	0.1	<0.01	<0.01	<0.01	0.01	0.04	0	0.02	<0.01	2.1
Polsko	39.0	2.4	69.1	0.2	0.4	8.9	1.7	28.8	3.8	11.8	<0.01	9.3	10.2	7.7	2.5	196.0
Portugalsko	25.7	1.5	17.6	0.06	0.2	2.8	0.6	7.4	5.8	5.2	0	3.6	1.8	4.5	0.6	77.1
Rumunsko	10.7	2.4	8.7	0.01	0.1	1.9	0.4	7.5	1.3	5.5	0.1	5.1	2.7	1.9	0.6	48.8
Slovensko	9.2	0.2	10.6	0.3	0.5	5.3	0.9	0.6	0.2	3.2	0.01	4.2	1.6	3.5	0.9	41.1
Slovensko	5.9	2.4	8.5	0.05	0.2	2.3	0.5	0.3	0.02	0.9	0	4.0	0.1	0.5	0.02	25.7
Španělsko	28.1	5.4	44.2	0.03	0.2	9.8	1.9	5.2	15.6	3.3	0.02	9.7	0.4	1.3	2.2	127.4
Švédsko	0.7		6.8		<0.01	1.5	0.3	0.4	0.05		0.02	0.6		0.1	10.6	
Svýcarsko	5.6	0.8	10.3	0.1	0.1	6.3	0.6	0.8		0.2		2.6	0.1	0.03	27.3	
Spojené království	8.3	0.5	7.3	0.1	0.02	1.9	0.4	2.3	0.7	0.1	0	2.6	0	1.0	0.5	25.7
Celkové prodeje v 31 zemích (mg/PCU)⁶	17.4	2.0	24.2	0.1	0.1	6.9	1.1	6.3	3.9	2.1	0.1	4.8	2.1	1.8	1.1	73.9
Medián 31 zemí (mg/PCU)⁷	11.4	0.9	10.3	0.1	0.2	5.3	0.7	3.9	0.4	0.9	0.01	3.6	0.6	1.1	0.6	45.8

* Třída "ostatní" zahrnuje tyto podtřídy: deriváty imidazolu (metronidazol), deriváty nitrofuranu (furazolidon) a jiná antibakteriální léčiva (bacitracin, furaltadon, novobiocin, rifaximin a spektinomycin). Za zmínku stojí, že některé prodeje mohou být určeny pro zvířata, která nejsou určena k produkci potravin, jako jsou společenská zvířata, kožešinová zvířata, exotické ptactvo a poštovní holubi.

¹ Země, kde jsou injekční cefalosporiny 3. a 4. generace uváděny na trh výhradně nebo také pro psy a kočky, poskytují údaje značně nadhodnocené údaje pro zvířata určená k produkci potravin.

² Z důvodu zachování obchodního tajemství jsou pleuromutiliny sloučeny s "ostatními".

³ Z důvodů zachování obchodního tajemství jsou ostatní chinolony sdruženy s fluorochinolony.

⁴ Z důvodu zachování obchodního tajemství jsou amfenikoly, polymyxiny a pleuromutiliny sloučeny s "ostatními", cefalosporiny 1. a 2. generace jsou sloučeny s cefalosporiny 3. a 4. generace a fluorochinolony jsou sloučeny s ostatními chinolony.

⁵ Z důvodu zachování obchodního tajemství jsou pleuromutiliny zařazeny do skupiny "Ostatní" a linkosamidy do skupiny makrolidů.

⁶ Celkový agregovaný prodej vyjádřený v mg/PCU se skládá z celkového množství prodaných antibioticky účinných látek (mg) vyděleného celkovým počtem PCU (kg) pro 31 zemí.

⁷ Medián ukazuje 16. hodnotu seřazenou od nejnižší po největší z 31 porovnávaných hodnot pro každou třídu antibiotik.

Podle čtvrtého vydání výroční zprávy Office International des Epizooties (OIE) o antimikrobiálních látkách určených k použití u zvířat představuje v Evropě nejvyšší procento spotřeby antibiotik skot (38,3 %) následovaný prasaty (27,1 %) (OIE, 2018).

Antibiotika uvolňovaná do prostředí mohou ovlivnit mikrobiální diverzitu s významnými ekologickými důsledky (Duygan et al. 2021). Používání antibiotik v živočišné výrobě se odráží v přítomnosti těchto látek v hnoji. Hnůj je směs zvířecích výkalů, moči, podestýlky a dalších materiálů spojených s živočišnou výrobou (Shober & Maguire, 2018). Vzhledem k vysokému obsahu organických živin v hnoji se hojně využívají jako přírodní hnojiva ke zvýšení výnosů potravinářské produkce. Koncentrace reziduí antibiotik zjištěné v hnoji se v jednotlivých studiích liší. Studie Marutescu et al. 2022 zobrazuje množství antibiotik, které bylo zjištěno v hovězím trusu v různých zemích v tabulce č. 12.

Tabulka 12: Množství antibiotik zjištěné v hovězím trusu v různých zemích (Marutescu et al. 2022)

Množství antibiotik zjištěné v hovězím trusu v různých zemích			
Třída antibiotik		Koncentrace [mg/kg]	Země
Fluorochinolony:	Danofloxacin Difloxacin Enrofloxacin Ciprofloxacin	0,4-46	Čína
Sulfonamidy:		0–0,4 0-10	US Čína
Tetracykliny:		0-1,2 0,4-27	US Čína
Tetracykliny:	Oxytetracyklin	0-20 0-0,5 0,21-103	Itálie US Čína
Tetracykliny:	Chlortetracyklin	0-0,1 0,02-0,5 0,2-27	US Německo, Španělsko Čína
Tetracyklin:	Doxycyklin	0-0,02 0,4-10	Německo, Španělsko Čína

3.4 Rezistence vůči antibiotikům

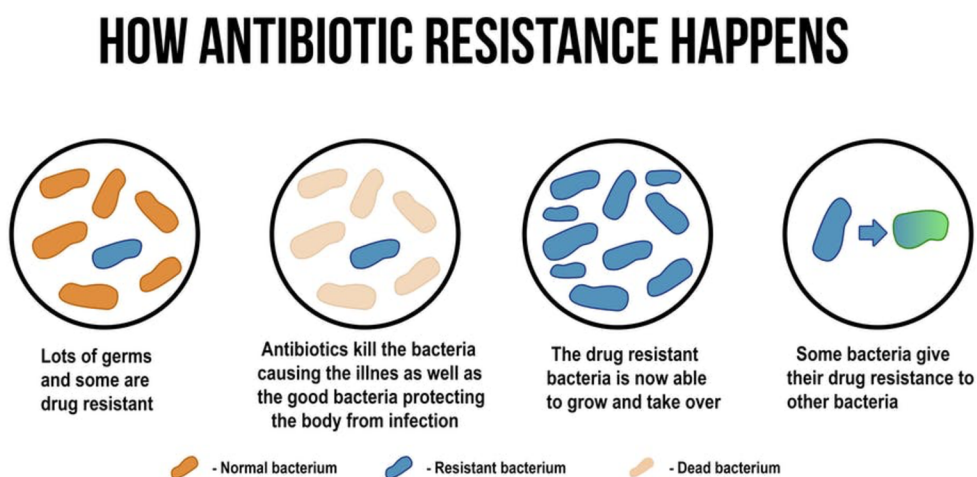
Antimikrobiální rezistence je v poslední době často diskutovaným tématem v oblasti veřejného zdraví, jelikož značně omezuje terapeutické možnosti, které komplikují léčbu jak lékařům, tak i veterinářům. Rostoucí znepokojení veřejnosti ohledně používání antimikrobiálních látek v zemědělské praxi a výskyt bakterií odolných vůči více lékům vyvolává tlak na zemědělsko-potravinářský průmysl, aby jednal (Yu et al. 2017).

Přirozená nebo vnitřní antimikrobiální rezistence je základní složkou arzenálu, který různé mikrobiální druhy využívají k maximalizaci konkurence různých nik (Walsh, 2013; Nguyen et al. 2020).

Mutované nebo získané geny vytvářejí rezistenci změnou cílového místa ATB, změnou absorpce léku nebo produkcí enzymů, které lék ničí. ATB rezistence se vyskytuje přirozeně, ale zneužívání ATB v humánní a veterinární medicíně urychluje proces tvorby rezistence. Geny rezistence vůči antibiotikům jsou nesené na bakteriálním chromozomu nebo na malých extrachromozomálních DNA (př. plazmidy). Jeden plazmid může nést až několik set různých genů, a v jedné buňce může být 1 až 1000 kopií jednoho plazmidu či několik různých plazmidů (Ambrožová et al. VŠCHT, 2022).

K šíření antibiotické rezistence dochází 2 způsoby, vertikálně a horizontálně. Při vertikálním šíření dochází k přenosu na přímé potomstvo kopií chromozomu nebo plazmidů během dělení hostitelské buňky. U horizontálního šíření je přenos nezávislý na příbuznosti či podobnosti, takže dochází k šíření mezi bakteriemi stejného nebo různého druhu a rodu. Horizontální přenos může probíhat prostřednictvím 4 způsobů: transdukce (přenos pomocí bakteriofágů), konjugace (vytvoření cytoplazmatického spojení mezi dvěma bakteriemi), transformace (přenos genetického materiálu z okolního prostředí do buňky) a transpozice (přenos genetického materiálu na jiné místo genomu buď autonomně anebo pomocí mobilních elementů – transpozonů) (Schwarz et al. 2005).

Jak vzniká rezistence je znázorněno na obrázku č. 2.

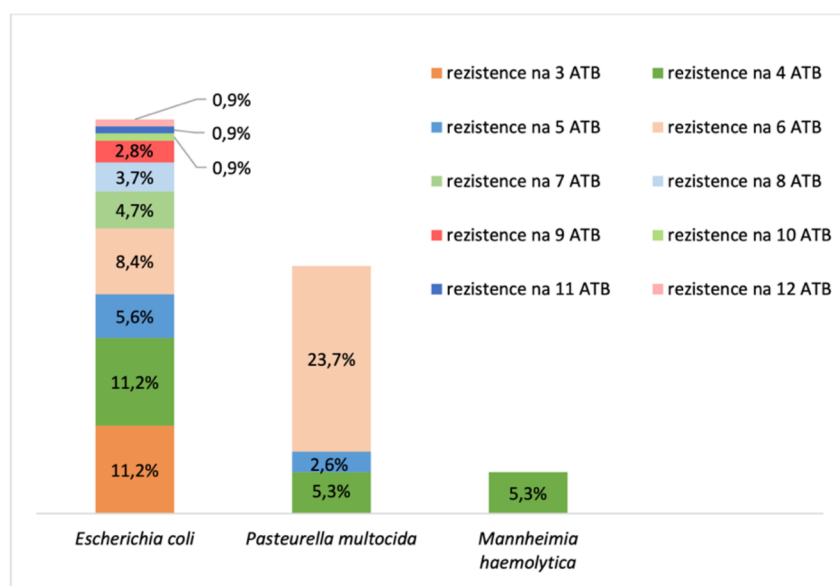


Obrázek 2: Jak vzniká rezistence vůči antibiotikům (Zdroj: Menšíková, 2020)

Osoby, které se pohybují v chovu hospodářských zvířat, jako jsou zemědělci a veterináři, jsou vystaveny vyššímu riziku nákazy rezistentními bakteriemi, včetně *Staphylococcus aureus* rezistentního vůči meticilinu. Spotřebitelé si stále více uvědomují skutečnost, že v důsledku této praxe může v potravinářských výrobcích přetrvávat buď rezistentní bakterie, účinná látka, nebo její odvozený metabolit či reziduum, což spotřebitele ohrožuje (Yu et al. 2017).

Národní program sledování rezistencí k antimikrobikům u veterinárně významných patogenů provádí každoroční vyhodnocení výsledků a ve zprávě za rok 2021 uveřejnil, mimo jiné, zastoupení rezistencí u původců detekovaných v chovech hospodářských zvířat. Jejich graf (viz graf č. 4) znázorňuje procenta rezistentních kmenů k 3-12 ATB.

Graf 4: Zastoupení rezistencí u původců detekovaných v chovech skotu v roce 2021 (Zdroj: Jeřábková et al. SVÚ Jihlava, 2022)



3.4.1 Výskyt a eliminace genů rezistence

Faktory, které stojí za vznikem rezistence:

- 1) antimikrobiální látky (antibiotika, antivirotika)
- 2) těžké kovy
- 3) biocidy (dezinfekční činidla, povrchově aktivní látky).

Některé mechanismy rezistence jsou společné pro biocidy, těžké kovy a antibiotika, což může vést k tzv. korezistenci ARG. Příklady takových mechanismů zahrnují:

- a) Efluxní pumpa: Tento mechanismus umožňuje buňkám vylučovat různé látky z buněčného prostoru, což zahrnuje jak těžké kovy (např. Cu, Co, Zn, Cd, Ni, As), tak i některá antibiotika (jako jsou tetracykliny, chloramfenikol a β -laktamy). Tímto způsobem se buňky brání proti toxicitě těchto látek.
- b) Snížení permeability membrány: Některé bakterie mohou změnit svou buněčnou membránu tak, aby byla méně propustná pro určité látky. Snížená permeabilita membrány brání vstupu těchto látek do buňky, což snižuje jejich účinek. Tento mechanismus je spojen jak s těžkými kovy (např. As, Cu, Zn, Mn, Co, Ag),

tak s určitými antibiotiky (např. ciprofloxacin, tetracyklin, chloramfenikol, β -laktamy (Ambrožová et al. VŠCHT, 2022).

Bylo prokázáno, že subinhibiční hladiny selekčních činidel, jako jsou antibiotika nebo těžké kovy, zvyšují množství ARG a mobilních genetických elementů (MGE) prostřednictvím korezistence (selekce pro různé ARG na stejném MGE) a křížové rezistence (selekce pro ARG kódující společný mechanismus rezistence k antibiotikům i biocidům) (Jutkina et al. 2016; Zhang et al. 2018; Cao et al. 2020). ARG spojená s mrtvými bakteriemi nebo volnou DNA by navíc mohla přispět k získané rezistenci prostřednictvím transformace (Woegerbauer et al. 2020). Také znečištění životního prostředí rezidui antibiotik může změnit složení půdní mikrobioty a obohatit půdu o bakterie schopné z těchto léčiv čerpat nutriční výhody, což vede k jejich urychlené biodegradaci (Topp et al. 2013).

Bakterie vyjadřují rezistentní fenotyp po získání mobilních genetických elementů obsahujících tyto geny, což pro bakterie představuje další metabolickou zátěž, která může mít dopady na její životaschopnost (Andersson & Hughes, 2010). Jinak řečeno, nadměrná exprese efluxních pump s vícečetnou lékovou rezistencí (MDR) může způsobit snížení životaschopnosti bakterií v důsledku vytlačování klíčových metabolitů (Sánchez et al. 2002). Výsledkem je, že rezistentní bakterie mohou vykazovat snížený fenotyp růstu v prostředí bez selekčního tlaku. Tato hypotéza naznačuje, že za předpokladu prostředí s nedostatkem antimikrobiálních látek mohou být bakterie nesoucí geny rezistence méně konkurenceschopné ve srovnání s ostatními a následně mohou být tyto geny v populaci rozředěny. Naopak, když jsou antimikrobiální látky aplikovány v prostředí, kde bakterie rostou, ty, které nesou geny rezistence, se množí v reakci na selekční tlak. Nakonec lze očekávat, že rezistentní izoláty budou v takovém prostředí (Yu et al. 2017).

Studie Gullberg et al. 2014 zjišťovala účinky nízkých hladin antibiotik a těžkých kovů na selektivní udržování 220-kbp plazmidu β -laktamázy s rozšířeným spektrem (ESBL) identifikovaného v nemocničním ohnisku *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli*. Koncentrace antibiotik a těžkých kovů potřebné k udržení bakterií nesoucích plazmid, minimální selektivní koncentrace (MSC), byly ve všech případech nižší (téměř až 140krát) než MIC citlivých bakterií bez plazmidu. Toto zjištění naznačuje, že velmi nízké hladiny antibiotik a těžkých kovů zjištěné ve znečištěném prostředí a u ošetřených lidí a zvířat mohou být dostatečně vysoké k udržení multirezistence plazmidů. Když byly geny rezistence přesunuty z plazmidu na chromozom, MSC se snížila, což ukazuje, že MSC pro specifickou rezistenci podmíněně závisí na genetickém kontextu. Toto zjištění naznačuje, že beznákladová rezistence by mohla být v populaci udržována nekonečně nízkou koncentrací antibiotika. Studium účinku kombinací několika sloučenin bylo zjištěno, že u určitých kombinací léčiv každá nově přidaná sloučenina snižuje minimální selektivní koncentraci ostatních. Tento účinek kombinací by mohl být významným faktorem při selekci plazmidů/bakteriálních klonů rezistentních vůči více léčivům ve složitém prostředí s více léčivy.

V některých, vědeckých stanoviscích zveřejněných Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) o bezpečnosti a účinnosti určitých minerálních doplňkových látek do krmiv pro zvířata byly provedeny studie k testování minimální inhibiční koncentrace (MIC) těchto doplňkových látek, proti pěti bakteriím citlivým na tetracyklin (EFSA, 2013a, 2013b, 2013c). Produkty, které byly předmětem zkoumání, byly všechny organické minerály. Tyto produkty jsou vytvářeny chelatací těžkých kovů s aminokyselinami získanými po kyselé hydrolyze

sójového proteinu za tepla. Údaje uvedené v těchto stanoviscích ukázaly, že i při nejvyšší koncentraci (50 mg Cu/L, 300 mg Fe/L, 200 mg Mn/L) nedošlo k inhibici bakteriálního růstu, což podporuje hypotézu, že těžké kovy v určitých chemických formách mohou být pro bakterie méně toxické či zcela netoxické (Yu et al. 2017).

3.4.2 Významné rezistentní bakterie

WHO zveřejnila seznam prioritních patogenů rezistentních proti antibiotikům (viz tabulka č. 13). Seznam obsahuje 12 rodů bakterií, které představují největší hrozbu pro lidské zdraví. Tabulka byla sestavena s cílem usměrnit a podpořit výzkum a vývoj nových antibiotik, jako součást snahy WHO o zvládnutí rostoucí globální rezistence na antimikrobiální léčiva (WHO, 2017).

Tabulka 13: Klinicky významné rezistentní bakterie seřazené dle priority (Zdroj: WHO, 2017)

Priorita	Bakterie	Rezistence
Kritická	<i>Acinetobacter baumannii</i>	karbapenem-rezistentní
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	karbapenem-rezistentní
	<i>Enterobacteriaceae</i>	karbapenem-rezistentní, producent ESBL
Vysoká	<i>Enterococcus faecium</i> ⁹	vankomycin-rezistentní
	<i>Staphylococcus aureus</i> ¹⁰	methicilin-rezistentní, vankomycin-rezistentní
	<i>Helicobacter pylori</i>	clarithromycin-rezistentní
	<i>Campylobacter</i> spp.	fluorochinolon-rezistentní
	<i>Salmonellae</i>	fluorochinolon-rezistentní
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	cefalosporin-rezistentní, fluorochinolon-rezistentní
Střední	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	penicilin-necitlivý
	<i>Haemophilus influenzae</i>	ampicilin-rezistentní
	<i>Shigella</i> spp.	fluorochinolon-rezistentní

⁹ Ve studii Hasman & Aarestrup, (2002) je zmiňován nově objevený gen *tcrB* nacházející se na konjugativním plazmidu. Tento gen byl v této studii identifikován v izolátu z prasete. Gen *tcrB* propůjčuje právě bakterii *Enterococcus faecium* získanou rezistenci vůči mědi. Více informací k tomuto genu je v kapitole 3.5.2.2

¹⁰ Publikace Yu et al. 2017 informuje o stavu, kdy v chovech dojnic dochází k mastitidě způsobené etiologickými agens, mezi něž patří právě *Staphylococcus aureus* a dále také koaguláza-negativní stafylokoky, *Streptococcus agalactiae* a další. To může vést ke změně kvality mléka a problémům s užitkovostí.

3.5 Těžké kovy a vazba na antimikrobiální rezistenci

Těžké kovy rovněž vykazují antimikrobiální vlastnosti. Na některých klinikách se používají kovové povrchy potažené mědí, aby se snížilo riziko nozokomiálních infekcí¹¹ (Grass et al. 2011). V důsledku toho mohou i tyto prvky přispívat k dalšímu rozvoji a šíření antimikrobiální rezistence. Obecně platí, že i když se nepoužívají žádné antimikrobiální sloučeniny, mohou některé těžké kovy udržovat nebo dokonce zvyšovat rezistenci bakterií vůči určitým činitelům. Těžké kovy se v životním prostředí vyskytují všudypřítomně a v určitých podmínkách příležitostně ve vysokých koncentracích (Yu et al. 2017). Nejčastěji se vyskytující kontaminace těžkými kovy v pořadí podle množství jsou: olovo, chrom, arsen, zinek, kadmium, měď a rtuť (Wuana & Okieimen, 2011). Některé produkty obsahující těžké kovy, jako je zinek a měď, se používají v zemědělské výrobě pro různé účely. Snaha o snížení používání antimikrobiálních sloučenin v zemědělských podnicích může být ohrožena kvůli potenciálním souvislostem mezi tímto a dalšími mechanismy, které vytvářejí rezistenci vůči těžkým kovům (Yu et al. 2017).

Těžké kovy v různých chemických formách mají odlišnou reaktivitu a rozpustnost a tím pádem i toxicitu. Je tak možné, že stabilní sloučeniny kovů, které neuvolňují volné kovové ionty, nemusí vykazovat antimikrobiální účinek. Vzhledem k tomu, že antimikrobiální rezistence vyvolaná těžkými kovy se objevuje hlavně tehdy, když se bakterie snaží přežít po expozici, lze předpokládat, že pokud určité chemické formy těžkých kovů nejsou pro bakterii toxické, nemusí vyvolávat ani rezistenci vůči antibiotikům. Bohužel v současné době neexistují žádné důkazy podporující tuto hypotézu. Toxicita různých forem těžkých kovů také zůstává neznámá (Yu et al. 2017).

Bakterie mají různé mechanismy, jak se vypořádat s koncentracemi těžkých kovů, aby přežily v různých prostředích. Některé bakterie používají organickou vazbu s ionty kovů jako mechanismus ke zvýšení tolerance. Například měděný metalochaperon je protein, který existuje v bakteriích a slouží k vázání iontů mědi a následně je dopravuje na specifické intracelulární cíle, kde jsou potřebné substitucí ligandu (Osman & Cavet, 2011; Robinson & Winge, 2010). Tím lze redukovat nebo eliminovat toxicitu kovových iontů přeměnou na organickou formu. Podobně mohou působit siderofory (chelatační sloučeniny železa), jako je například yersiniabaktin u druhů *Yersinia* a uropatogenní *E. coli*, které vytváří komplexy s Cu^{2+} , čímž zabrání tvorbě toxického Cu^+ . Fenotypické testy potvrdily zvýšenou odolnost vůči Cu u bakterií produkujících yersiniabaktin (Becker & Skaar, 2014).

¹¹ Nozokomiální nákaza je infekce, která propukne v souvislosti s poskytovanou zdravotnickou péčí, tedy během hospitalizace (ale i určitý čas po propuštění), po ambulantním výkonu či ošetření. Nozokomiální nákaza je i infekce získaná v zařízeních sociální péče. Za nozokomiální nákazu není považována infekce, pro kterou byl pacient do nemocnice přijat. Pro nemocniční kmeny mikroorganismů je charakteristická vyšší rezistence na antimikrobiální preparáty a dezinfekce (Jirouš, FN Plzeň).

3.5.1 Vztahy mezi těžkými kovy a antimikrobiální rezistencí

Ukázalo se, že jak antimikrobiální sloučeniny, tak těžké kovy vyvíjí selekční tlak, ale v případě prvně jmenovaných se hladiny reziduí v prostředí snižují v důsledku degradace, absorpce a sekvestrace, zatímco těžké kovy jsou stabilnější a mohou vyvíjet selekční tlak po delší časové období (Yu et al. 2017).

Těžké kovy mají významné antimikrobiální účinky (Grass et al. 2011). Přestože souvislost mezi rezistencí vůči těžkým kovům a antibiotikům byla pozorována již před několika desetiletími, tato problematika stále není zcela objasněna. Již v roce 1978 byla provedena studie, z níž vyplynulo, že kontaminace těžkými kovy působí selekční tlak na bakterie rezistentní k antibiotikům, když bylo ze sedimentů odebraných na skládce čistírenských kalů vykultivováno výrazně vyšší procento kmenů *Bacillus* rezistentních k ampicilinu a v porovnání se sedimenty studovanými v neznečištěné oblasti (Timoney et al. 1978). Jiný příklad tohoto typu vazby byl zaznamenán v čínské studii, která identifikovala silou korelaci mezi existencí těžkých kovů v zemědělské půdě a geny rezistence vůči antibiotikům, zatímco souvislost mezi existencí antibiotik v prostředí a jim odpovídajícími geny rezistence k antibiotikům byla slabá (Ji et al. 2012).

Molekulární mechanismy, které jsou základem schopnosti bakterií vyvinout rezistenci vůči těžkým kovům, jsou často podobné těm, které jsou zodpovědné za rezistenci vůči antimikrobiálním sloučeninám. Mohou zahrnovat efluxní pumpy zprostředkované chromozomálně i extrachromozomálně spolu s dalšími geny umístěnými na mobilních genetických elementech (Yu et al. 2017). Baker-Austin et al. (2006) podali přehled různých způsobů koselekce, které jsou obecně klasifikovány jako korezistence, křížová rezistence, koregulace a indukce biofilmu. Rostou obavy, že kontaminace kovy působí jako selektivní faktor při šíření rezistence vůči antibiotikům. Zdokumentované souvislosti mezi typy a úrovní kontaminace kovy a specifickými vzorci rezistence vůči antibiotikům naznačují, že tento proces koselekce je založen na několika mechanismech. Mezi tyto mechanismy koselekce patří korezistence (různé determinanty rezistence přítomné na stejném genetickém prvku) a křížová rezistence (stejný genetický determinant zodpovědný za rezistenci k antibiotikům a kovům). Nepřímé, ale společné regulační reakce (koregulace) na expozici kovům a antibiotikům, jako je indukce biofilmu, také představují potenciální koselekční mechanismy používané prokaryoty. Kontaminace kovy tedy představuje dlouhodobý, rozšířený a nepřizpůsobivý selekční tlak s environmentálním i klinickým významem, který potenciálně přispívá k udržování a šíření faktorů rezistence vůči antibiotikům.

3.5.1.1 Cd

Ukazuje se, že některé těžké kovy mohou spoluvytvářet rezistenci vůči jedné nebo několika antimikrobiálním sloučeninám. Jako příklad lze uvést systém DsbA-DsbB u *Burkholderia cepacia*, který propůjčuje rezistenci vůči Cd^{2+} , Zn^{2+} a několika sloučeninám včetně betalaktamů, erytromycinu, kanamycinu, novobiocinu, ofloxacinu a dodecylsulfátu sodného (Hayashi et al. 2000). Bylo prokázáno, že experimentálně přidané Cd a Ni do sladkovodního prostředí vyvolává rezistenci bakterií vůči antibiotikům, včetně oportunních lidských patogenů (Stepanauskas et al. 2006).

3.5.1.2 Cu

Cílem studie Berg et al. (2005) bylo zjistit, zda doplňování mědi na polích ovlivňuje četnost výskytu rezistence vůči mědi a vzorce rezistence vůči antibiotikům u původních půdních bakterií. Půdní bakterie byly izolovány z neošetřených a mědi upravených polí. Doplnění mědi výrazně zvýšilo četnost izolátů rezistentních vůči mědi. Více než 95 % izolátů rezistentních vůči mědi bylo gramnegativních. Gramnegativní izoláty rezistentní vůči mědi měly významně vyšší výskyt rezistence vůči ampicilinu, sulfanilamidu a více (≥ 3) antibiotikům než gramnegativní izoláty citlivé na měď. Kromě toho měly gramnegativní izoláty rezistentní vůči mědi z polí kontaminovaných mědi významně vyšší výskyt rezistence vůči chloramfenikolu a více (≥ 2) antibiotikům než odpovídající izoláty z kontrolních polí. Výsledky tohoto polního pokusu ukazují, že vnášení mědi do zemědělské půdy vede k selekci rezistence vůči mědi, ale také k nepřímé selekci rezistence vůči antibiotikům u bakterií rezistentních vůči mědi. Proto by celosvětově rozšířená akumulace mědi v zemědělských půdách mohla mít významný vliv na environmentální selekci rezistence k antibiotikům.

Údaje z jiné studie rovněž zdůraznily význam zkoumání celé mikrobiální populace namísto omezeného počtu izolátů. Početnost tří genů kódujících rezistenci vůči mědi a zinku (*pcoA*, *pcoD* a *zntA*) byla sledována ve třech typech orné půdy: v neošetřené půdě, v půdě ošetřené hnojem a v půdě ošetřené hnojem s přidavkem kovů (100 mg/kg mědi a 300mg/kg zinku). Ačkoliv se za normálních okolností očekává, že půda ošetřená hnojem s přidavkem kovů bude obsahovat nejvíce genů kódujících rezistenci vůči kovům, údaje z této studie uvádějí, že půda ošetřená pouze hnojem měla ve srovnání s dalšími dvěma porovnávanými skupinami v den 0 výrazně vyšší hladiny genů kódujících rezistenci vůči kovům. Po 60 dnech byla početnost *pcoD* ve skupině s hnojem významně nižší než u neošetřené půdy. Možným vysvětlením těchto výsledků je, že hostitelé těchto tří genů rezistence vůči kovům sledovaných v této studii se nemusí dobře adaptovat na nové prostředí (Xiong et al. 2015).

Nově objevený gen, označený *tcrB*, který se nachází na konjugativním plasmidu, jenž propůjčuje *Enterococcus faecium* získanou rezistenci vůči mědi, byl identifikován v izolátu z prasete ve studii Hasman & Aarestrup, (2002). Gen *tcrB* kóduje předpokládaný protein patřící do skupiny ATPáz typu CPx s homologií (46 %) s proteinem *CopB* (*CopB* je gen, který je rezistentní vůči mědi) z *Enterococcus hirae*. Gen *tcrB* byl nalezen u *E. faecium* izolovaného z prasat (75 %), brojlerů (34 %), telat (16 %) a lidí (10 %). Rezistentní izoláty obsahující gen *tcrB* rostly na agarových plotnách s infuzí mozkového srdce, které obsahovaly až 28 mM CuSO₄, zatímco citlivé izoláty pouze 4 mM. Rezistence vůči mědi, a tedy přítomnost genu *tcrB*, silně souvisela s rezistencí vůči makrolidům a glykopeptidům u izolátů z prasat a bylo prokázáno, že gen *tcrB* se nachází na stejném konjugativním plasmidu jako geny zodpovědné za rezistenci vůči těmto dvěma antimikrobiálními látkám. Jedná se tedy o příklad koselektce. Častý výskyt tohoto nového genu rezistence vůči mědi u izolátů z prasat, kde se síran měďnatý používá ve velkém množství jako přísada do krmiv, naznačuje, že používání mědi vedlo k selekci rezistence k antibiotikům (Hasman & Aarestrup, 2002).

3.5.1.3 Hg

Hölzel et al., (2012) uvedli podobné pozorování při propojování antimikrobiální sloučeniny s těžkými kovy. V tomto případě byly v prasečím hnoji zjištěny zvýšené hladiny rtuti, které byly spojeny s nižší mírou rezistence u *E.coli* vůči aminoglykosidům, β -laktamům a dalším antibiotikům. Další výzkum s využitím metagenomických technologií zkoumajících geny kódující rezistenci vůči kovům by měl poskytnout lepší představu o tom, jak zvýšené hladiny kovů ovlivňují populaci bakterií v půdě. Lze očekávat, že tento přístup poskytne spolehlivější důkazy pro usměrňování zemědělských postupů.

3.5.1.4 Zn

Společným výskytem genů rezistence vůči antimikrobiálním látkám a kovům se také zabývala studie Peng et al. (2021), která prováděla svůj výzkum v Číně na dvou prasečích farmách, kde se v minulosti používal oxid zinečnatý. Koncentrace zinku používaného jako krmný doplněk byla podle obou majitelů farem 2500 až 3000 mg/kg. Chovatelé uvedli, že na obou farmách používali k léčbě nemocí oxytetracyklin a tetracyklin, ale žádná jiná antibiotika.

V této studii byl použit metagenomický¹² přístup k profilování ARG, MRG a MGE. Byly také stanoveny koncentrace běžně sledovaných veterinárních antibiotik a kovů v prostředí farem s cílem určit korelační vztahy mezi výskytem ARG, MRG, MGE a kovů v těchto místech.

Analyzované vzorky zahrnovaly čerstvé prasečí výkaly, půdu hnojenou upravenou kejdou a sediment z rybníka, do kterého byly vypouštěny odpadní vody z upravené kejdy.

Bylo stanoveno následujících deset těžkých kovů: Zn, Cu, Ni, Cd, Cr, Pb, Mn, Fe, Hg a Al (viz tabulka č. 14). Kovy byly kvantifikovány pomocí optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES, PlasmaQuant, PQ 9000).

¹² Metagenomika je obor biologie, který se zabývá studiem genetického materiálu získaného přímo z prostředí, jako je půda, voda, vzduch, či různé biologické vzorky, které obsahují směs mikroorganismů. Tento genetický materiál je zpravidla analyzován pomocí moderních metod molekulární biologie a bioinformatiky. Metagenomika umožňuje studovat složité mikrobiální komunity a jejich funkce v přirozeném prostředí, aniž by bylo nutné pěstovat jednotlivé mikroorganismy v laboratoři.

Tabulka 14: Průměrná koncentrace (mg/kg) kovů v různých vzorcích ze dvou prasečích farem. (Zdroj: Peng et al. 2021)

Category	Name	Fresh feces (n = 10)	Sediment (n = 10)	Soil (n = 10)
PTM	Lead	5.5 ^{a,b}	24.1	24.0
	Aluminum	6,952.0 ^{a,b}	43,968.0 ^c	38,264.0
TM	Cadmium	0.3 ^{a,b}	0.1	0.1
	Chromium	9.27 ^{a,b}	70.40 ^c	58.27
	Copper	689.0 ^{a,b}	86.5	86.5
	Zinc	824.8 ^{a,b}	342.9	141.7
	Nickel	9.0 ^{a,b}	30.8 ^c	23.7
	Iron	4,009.0 ^{a,b}	13,912	13,706
	Manganese	544.1 ^b	535.7 ^c	421.8
	Mercury ^d	17.99	31.39	17.17

PTM and TM stand for post-transition metal and transition metal, respectively.

^a Statistically significant difference between fresh feces and sediment.

^b Statistically significant difference between fresh feces and soil.

^c Statistically significant difference between sediment and soil.

^d The unit of µg/kg specifically for Hg, and the mg/kg for the rest of metals.

Byla stanovena koncentrace 15 veterinárních antibiotik patřících do čtyř tříd, tj. fluorochinolonů, cefalosporinů, tetracyklinů a sulfonamidů (viz tabulka č. 15). Pro stanovení koncentrace antibiotik ve vzorcích byla použita extrakce na pevné fázi (SPE) spojená s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS).

Tabulka 15: Zjištěná rezidua antibiotik (mg/kg) v různých vzorcích ze dvou prasečích farem. (Zdroj: Peng et al. 2021)

Antimicrobial class	Antimicrobial	Feces (n = 10)	Sediment (n = 10)	Soil (n = 10)
Quinolones	Ciprofloxacin	0.06 ^a	0.46 ^c	0.15
	Enrofloxacin	0.14	0.38	0.35
	Ofloxacin	0.01	0.09	0.30
Sulfonamides	Sulfadiazine	ND	ND	ND
	Sulfadimidine	ND	ND	ND
	Sulfamerazine	ND	ND	ND
	Sulfathiazole	ND	ND	ND
Tetracyclines	Tetracycline	26.84 ^{a,b}	0.43	ND
	Oxytetracycline	173.6 ^{a,b}	3.92	0.52
	Doxycycline	2.54	3.45	0.36
Simple β-lactams	Ampicillin	ND	ND	ND
	Penicillin	0.003	0.002	0.002
Cephalosporins	Cephalexin	ND	ND	ND
	Ceftiofur	ND	ND	ND
	Cefradine	ND	ND	ND

ND stands for Not detected (< LOD).

^a Statistically significant difference between fresh feces and sediment.

^b Statistically significant difference between fresh feces and soil.

^c Statistically significant difference between sediment and soil.

Celková genomová DNA byla ze vzorků extrahována metodou hexadecylmethylammonium bromid (CTAB) / dodecylsulfát sodný (SDS) (Zhou et al. 1996). Koncentrace a čistota DNA byla sledována pomocí elektroforézy v agarózovém gelu a ultrafialové absorbance (ND1000, Nanodrop, Thermo Fisher Scientific Inc.).

3.5.1.4.1 Mikrobiální společenstva objevena v analyzovaných vzorcích

V bakteriálním společenstvu přítomném ve vzorcích trusu se nejčastěji vyskytovaly rody *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Treponema* a *Oscillibacter*, zatímco v bakteriálním společenstvu sedimentu a půdy dominovaly rody *Thiobacillus* a *Bradyrhizobium*. Dále na úrovni fylémů byly *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a *Spirochaetes* třemi nejčastějšími fylémy ve výkalech, zatímco ve společenstvech sedimentů i půd dominovaly *Proteobacteria*. V čerstvých výkalech prasat odebraných v ohradách navíc dominovaly *Prevotella sp. P2-180*, *Prevotella sp. P5-92* a *Treponema bryantii*.

3.5.1.4.2 Výskyt antimikrobiálních látek a ARG v analyzovaných vzorcích

Z pěti analyzovaných tříd antibiotik byly v odebraných vzorcích zjištěny chinolony, tetracykliny a jednoduché β -laktamy, zatímco sulfonamidy a cefalosporiny zjištěny nebyly. Konkrétně chinolony a tetracykliny byly běžně nalezeny v čerstvých výkalech, sedimentech a vzorcích půdy. Dále byly koncentrace tetracyklinu a oxytetracyklinu významně vyšší v čerstvém trusu než v sedimentu a půdě. V souladu s tím tvořily ARG kódující rezistenci k tetracyklinům největší podíl u všech vzorků. Je třeba poznamenat, že chovatelé uváděli pouze užívání léčiv typu tetracyklinů, ale nikoliv chinolonů nebo beta-laktamů.

V čerstvých výkalech (646 podtypů), v sedimentu (830 podtypů) a v půdě (1000 podtypů) bylo zjištěno celkem 1230 podtypů ARG s rezistencí k více než 20 typům antibiotik. Geny propůjčující rezistenci k tetracyklinu tvořily nejvyšší podíl ve všech typech vzorků, zejména u vzorků trusu. Také geny rezistence k makrolidům, aminoglykosidům a cefalosporinům byly v těchto vzorcích nalezeny ve vysokém podílu. Pozorované geny reprezentují většinu hlavních mechanismů rezistence včetně antimikrobiální inaktivace, efluxních pump, buněčné ochrany a snížené permeability. Inaktivace antibiotik a efluxní pumpy představovaly dva nejvyšší podíly v půdě a sedimentu, zatímco v čerstvém trusu byla nejčastější cílová ochrana antibiotik. ARG, *tetW*, *tetQ* a *ermF* byly nejčastější v čerstvých výkalech, zatímco *adeF* byl nejčastější ARG v sedimentu a půdě.

3.5.1.4.3 Výskyt kovů a MRG v analyzovaných vzorcích

Studie zjistila, že hladiny Cd, Cu a Zn byly v čerstvém trusu významně vyšší než v sedimentu a půdě, zatímco koncentrace Pb, Cr, Ni, Al a Fe byly v trusu statisticky nižší než v půdě a sedimentu. Kromě toho byly koncentrace Cr, Ni, Al a Mn významně vyšší v sedimentu než v půdě. MRG kódující rezistenci vůči Zn, Cu a Ni však tvořily největší podíl u všech vzorků, ačkoli koncentrace kovů se u jednotlivých typů vzorků značně lišily.

3.5.1.4.4 Společný výskyt ARG, MRG, MGE a kovů

Mezi ARG, MRG, MGE a kovy bylo identifikováno celkem 325 silných korelací (byla použita prahová hodnota Pearsonova korelačního koeficientu 0,9, nikoli 0,7 jako v několika srovnatelných studiích (Pal et al. 2015; Luo et al. 2017; Zhao et al. 2019)),

z toho 269 pozitivních korelací a 56 negativních korelací. Bylo zjištěno, že míra výskytu patnácti MGE koreluje s mírou výskytu ARG a/nebo MRG a devět z nich pozitivně koreluje jak s ARG, tak s MRG.

Společný výskyt v trusu

Schéma společného výskytu zahrnuje 56 uzlů: 13 ARG, 33 MRG, 6 MGE a 4 kovy. Schéma společného výskytu mezi koncentrací zinku a ARG ukázalo, že zinek vykazuje společný výskyt s geny multirezistence (*mdtB* a *yegN*) ve výkalech. Chrom se vyskytoval společně s genem integrázy (*intI1*), který hraje klíčovou roli při získávání a šíření ARG (Partridge et al., 2018). Zjistili také, že výskyt mnoha ARG koreluje s výskytem MRG. ARG *ImuB* (kóduje endoinulinázu), *optrA* (propůjčuje přenosnou rezistenci k oxazolidinonům a fenikolům) a *tetL* (propůjčuje rezistenci k tetracyklinům) tvořily hlavní uzly v síti čerstvých výkalů, což naznačuje, že byly běžně koselektovány s jinými geny. Konkrétně *ImuB* pozitivně koreloval se *zinT* (dříve známý jako *yodA*) a *znuB*, které se podílejí na homeostáze a regulaci zinku v periplasmě (Petarca et al. 2010; Ilari et al. 2014). Kromě toho zjistili, že ARG, MRG a MGE spolu vzájemně korelují, například geny rezistence *optrA* (ARG) a *farR* (MRG) se společně vyskytují v inserční sekvenci (IS) 981.

Kromě těchto vzorců společného výskytu v čerstvých vzorcích stolice zjistili řadu významných korelací mezi střevní mikrobiotou a specifickými ARG a MRG. Za zmínku stojí, že početnost *Streptococcus* silně korelovala až s devíti geny rezistence (ARG a MRG) a mezi korelované ARG a MRG patřily *ImuB/ErmT* (propůjčující rezistenci k makrolid linkosamid streptograminu B) /*tetL* a *zinT/yodA/pbrA* (kódující rezistenci k olovu), v tomto pořadí.

Společný výskyt v sedimentu

Schéma společného výskytu zahrnuje 88 uzlů: 3 ARG, 71 MRG, 7 MGE a 7 kovů. Výskyt manganu koreloval s mnoha různými geny, například s ARG *sul2* (kódujícím rezistenci k sulfonamidům). Nikl koreloval s MGE *qacEA* a *IS91*, zatímco *qacEA* silně koreloval s ARG *sul1* a MRG (*znuA*, *qacE* a *yebL*). Zjistili také, že *sul1* a *sul2* silně korelovaly s více než dvaceti MRG (např. *znuA*) v sedimentu.

Společný výskyt v půdě

Schéma společného výskytu zahrnuje 51 uzlů: 2 ARG, 42 MRG, 5 MGE a 3 kovy. Nejvyšší počet korelací byl s genem tetracyklinové rezistence *tetW* a mobilním genetickým prvkem *intI1*. Za zmínku stojí, že *tetW* koreloval s přibližně 27 MRG v půdních vzorcích a tyto MRG jsou známé tím, že propůjčují rezistenci k mnoha kovům, jako je Mn (*yebN*), Ni (*nikR*) a Al (*ALUI_P*). Zjistili, že výskyt chromu koreluje s *tetW* a MGE *intI1* a *IS91* a hliník koreluje s ARG *emrA* (uděluje rezistenci k 2, 4-dinitrofenolu a kyselíně nalidixové).

3.5.1.4.5 Závěr studie

Dominantními ARG identifikovanými ve studii Peng et al. (2021) byly geny propůjčující rezistenci k tetracyklinu u všech typů vzorků, zatímco geny rezistence k zinku tvořily většinu MRG. To by mohlo být vysvětleno používáním tetracyklinu pro prevenci a léčbu

chorob zvířat a velkou závislostí na denních zinkových doplňcích krmiva pro zlepšení růstové výkonnosti (Kyselkova et al. 2015; Vahjen et al. 2015).

Souhrnně výsledky naznačují, že přídavek zinku do krmiva může mít koselekční vlastnosti pro antimikrobiální a kovovou rezistenci, což vede ke zvýšenému výskytu ARG a antimikrobiálně rezistentních bakterií u prasat, jejich kejdy a hnojené půdy.

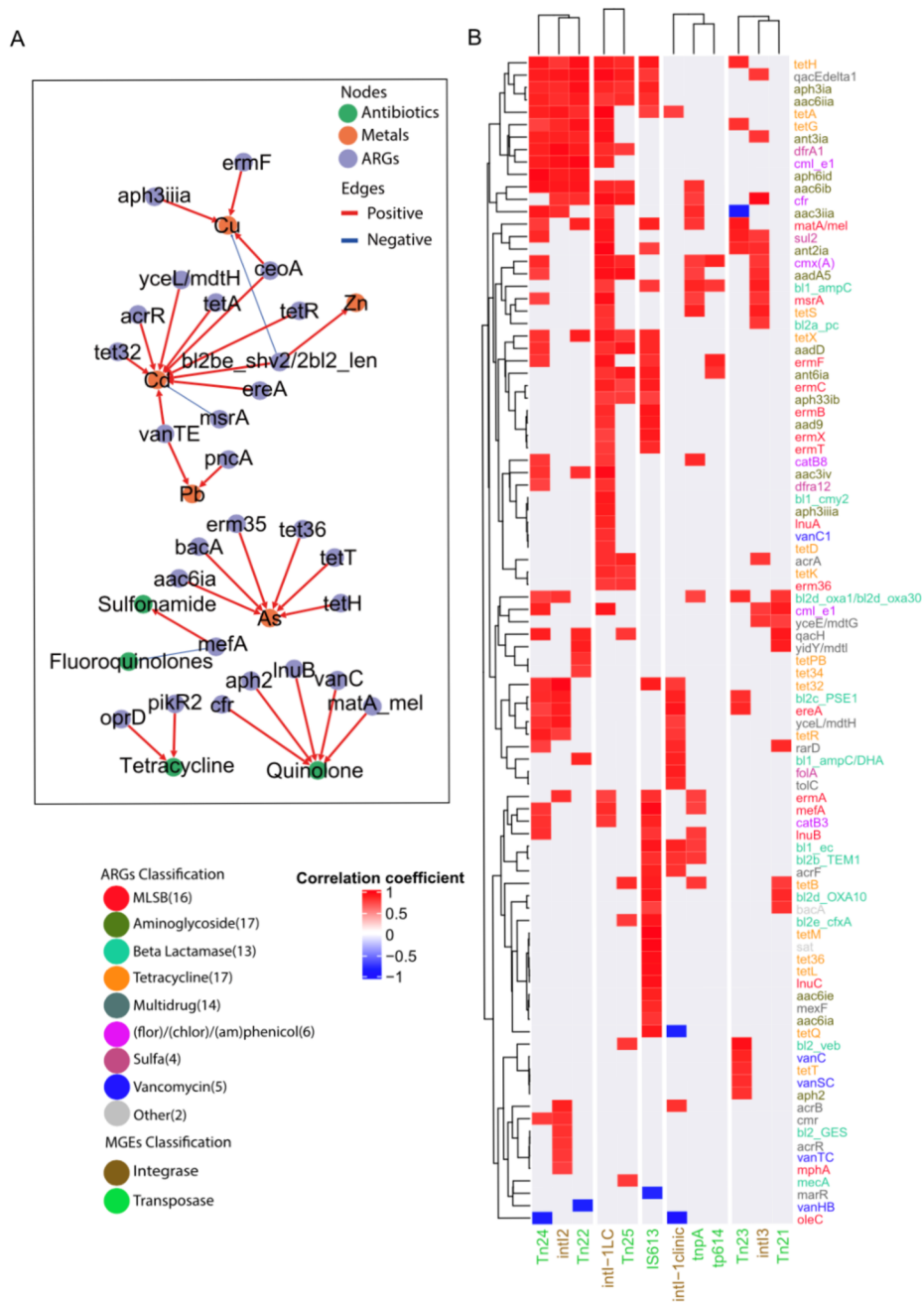
3.5.1.5 Společný výskyt ARG a kovů či antibiotik

Ve studii Sohaib et al. (2021) byla k předpovědi společného výskytu ARG a kovů/antibiotik v prostředí drůbežích farem použita Spearmanova korelační analýza. Použili přísnou prahovou hodnotu (upravené $P < 0,05$ a korelační koeficient $r > 0,7$), aby definovali významné korelace uvedené na obrázku č. 3 a do korelační analýzy byly zahrnuty pouze ty geny, které se vyskytovaly alespoň u poloviny vzorků v každé skupině. Síť se skládala z 5 těžkých kovů, 4 antibiotik a 27 ARG.

Studie nezjistila žádný ARG, který by měl korelace jak s kovy, tak s antibiotiky. Pět kovů včetně kadmia, arsenu, zinku, mědi a olova tvořilo většinu pozitivních korelací s ARG. Antibiotika, v porovnání s kovy, významně nekorelovala s ARG. Byly pozorovány tři hlavní moduly s kadmíem, arzenem a chinolony zastoupenými jako uzly spojující se s ARG s významnými korelacemi. Potenciální koselekce kadmia byla rozmanitější a silnější vůči ARG: geny rezistence k tetracyklinu, geny rezistence k vankomycinu, geny rezistence k beta – laktamáze, geny rezistence k více léčivům, MLSB antibiotika a geny rezistence k (flor)/(chlor)/(am)fenikolu.

Byly zjištěny tři negativní korelace mezi kadmíem s genem *msrA*, mědi s genem *bl2be_shv2/2bl2_len* a fluorochinolony s genem *mefA*. Arzén spoluurčoval tři geny rezistence k tetracyklinům (*tet36*, *tetH* a *tetT*), jeden gen rezistence k MLSB (*erm35*), jeden gen rezistence k bacitracinům (*bacA*) a jeden gen rezistence k aminoglykoidům (*aac6ia*). Chinolon tvořil třetí velký modul, který je spojen s geny rezistence k MLSB, geny rezistence k vankomycinu, geny rezistence k aminoglykosidu a geny rezistence k (flor)/(chlor)/(am)fenikolu.

Mezi MGE a ARG bylo zjištěno mnoho významných korelací ve vzorcích, jak je znázorněno na tepelné mapě, která vymezuje významný vliv MGE na ARG. Bylo zjištěno, že devět tříd ARG v této síti korelovalo s MGE, z nichž nejvíce bylo zjištěno genů rezistence k aminoglykoidům, tetracyklinům a MLSB. Integrony a transpozony (typy mobilních genetických elementů MGE) související s ARG odpovídaly každé třídě antibiotik zkoumané v této studii. Bylo zjištěno, že intergráza třídy *I intI-ILC* ovlivňuje nejvíce ARG (46 interakcí) v porovnání s ostatními integrázami, další byla inzertní sekvence 613 (*IS613*) korelující se 40 ARG a *Tn24* korelující s 36 ARG ve všech vzorcích. Bylo zjištěno, že *Tn24*, *IntI-2* a *Tn22* mají silnou korelaci s ARG, zatímco *Tn22* negativně korelovala s rezistencí k vankomycinu.



Obrázek 3: Korelační analýza mezi kovy, antibiotiky, ARG, MRG a MGE. (A) Síť zobrazující významné korelace (upravené $P < 0,05$ a korelační koeficient $r > 0,7$) mezi kovy, antibiotiky, ARG a MRG. Pro korelační analýzu byly použity geny přítomné alespoň v polovině. (Zdroj: Sohaib et al. 2021)

3.6 Potenciální řešení

Společné selekce rezistence bakterií vůči antimikrobiálním látkám a těžkým kovům má významný vliv na účinnost dostupných léčiv a léčebných postupů pro infekční onemocnění. Zemědělsko-potravinářský průmysl hraje v této oblasti značnou roli ve vývoji a šíření rezistentních bakterií vzhledem k povaze tohoto odvětví. Zemědělství závisí na udržení zdravého chovu hospodářských zvířat, kterého se dosahuje používáním obohacených krmiv spolu s profylaktickým podáváním léků nebo používáním biocidů. Vztah mezi těžkými kovy a antimikrobiální rezistencí byl většinou přehlížen. Nicméně vzhledem k tomu, že se antimikrobiální rezistence stala výzvou pro veřejné zdraví, je kladen stále větší důraz na porozumění tohoto vztahu. Používání antimikrobiálních látek by nemělo nahrazovat správné zemědělské postupy, navíc používání těžkých kovů v obohaceném krmivu by nemělo nahrazovat správnou hygienu a výživu. Použití organických forem těžkých kovů může být možným řešením, ale vyžaduje další zkoumání. Použití krmných směsí z organických a anorganických minerálních látek může být prostředkem k dosažení dobrého zdraví zvířat při nízkých nákladech. Moderní systémy zemědělství potřebují být také vylepšeny tak, aby se snížilo používání antibiotik, přičemž se zachová stejný standard zdraví a welfare zvířat (Yu et al. 2017).

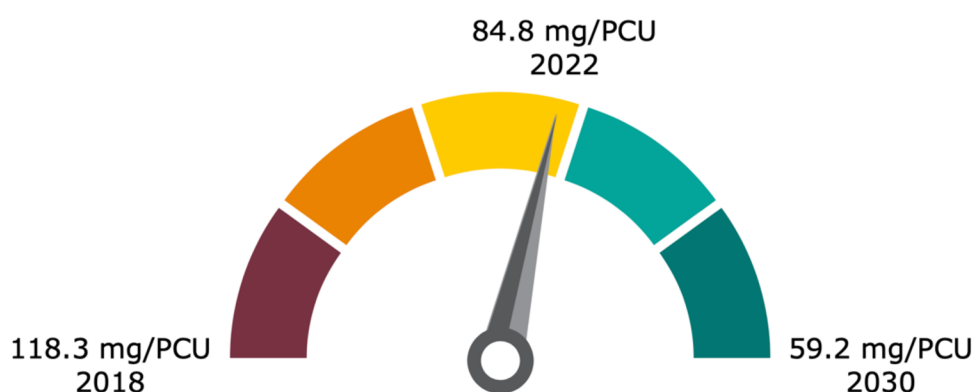
Antimikrobiální přípravky, zmíněné ve studii Sedláková et al., 2012, mají tu neblahou vlastnost, že jejich podání vytváří selekční tlak, který podmiňuje šíření antibiotické rezistence. Kromě selekčního tlaku se na růstu bakteriální rezistence podílejí i rekombinační procesy a horizontální, klonální šíření. Zatímco selekční tlak je možné zmírnit racionální antibiotickou politikou a klonální šíření rezistentních kmenů dodržováním hygienicko-epidemiologických pravidel, transfer mobilních elementů mezi bakteriálními kmeny i druhy nelze v klinické praxi příliš ovlivnit. Z toho důvodu je důležité zjišťovat, o jaký mechanismus šíření rezistence se jedná, aby mohl být použit účinný nástroj pro její omezení.

3.6.1 Snížení používání ATB

Globalizace potravinového řetězce činí z boje proti antimikrobiální rezistenci celosvětový problém. Snaha jednoho státu omezit používání antimikrobiálních léčiv v zemědělsko-potravinářské produkci sama osobě nepřinese požadovaný výsledek, pokud jde o omezení expozice spotřebitelů. Všechny země vyvážející potraviny proto musí vypracovat kodex postupů, aby zmírnily rizika pro spotřebitele a zachovaly tato cenná chemoterapeutika pro budoucí generace (Yu et al. 2017).

Mělo by se zastavit používání rezervních antibiotik pro humánní účely ve veterinární medicíně a nepředepsaných antimikrobiálních látek pro zvířata a omezit používání antibiotik v zemědělských podnicích. Tento integrovaný přístup je nutný ke stanovení optimálních podmínek pro odstraňování reziduí antibiotik, bakterií antimikrobiální rezistence a genů rezistence vůči antibiotikům, k formulaci konkrétních doporučení pro ošetřování statkových hnojiv, postupy skladování a manipulace s nimi a k jejich převedení do praktických rozhodnutí o hospodaření na farmách, aby se v konečném důsledku zabránilo expozici lidské populace (Marutescu et al. 2022).

AMR je problémem, který ovlivňuje zdraví lidí i zvířat, a proto Evropská komise přijala opatření s cílem snížit celkový prodej antimikrobiálních látek v EU pro hospodářská zvířata a akvakulturu o 50 % do roku 2030. Ve svých doporučeních pro 27 členských států EU týkajících se strategického plánu společné zemědělské politiky Evropská komise zveřejnila výchozí a cílové hodnoty s použitím referenční hodnoty celkového prodeje antibiotických VLP z roku 2018 na základě údajů z 10. zprávy ESVAC pro 27 členských států EU. Ačkoli jsou tedy uvedeny i údaje za jednotlivé země, je třeba sledovat pouze celkový údaj za EU-27 pro hospodářská zvířata a akvakulturu. Referenční hodnota z roku 2018 pro celkový souhrnný prodej antibiotických VMP (118,3 mg/PCU) ve 27 členských státech EU tak stanovuje cíl pro rok 2030 na 59,2 mg/PCU viz obrázek č. 4 (EMA, 2023).



Obrázek 4: Současný pokrok při plnění cíle strategie Farm to Fork, kterým je snížení celkového prodeje antibiotik v EU pro hospodářská zvířata a akvakulturu o 50 % do roku 2030 ve 27 členských státech EU (Zdroj: EMA, 2023)

3.6.2 Snížení koncentrace těžkých kovů v životním prostředí

Celkově je kontrola vývoje a šíření rezistence vůči antibiotikům složitá, kvůli závislosti lidské medicíny a zemědělství na těchto látkách. Tuto skutečnost dále komplikují kontroly znečištění těžkými kovy v životním prostředí z důvodu nepřesných a specifických zdrojů znečištění. V určitých situacích, kde by jakákoliv další redukce používání antimikrobiálních látek vedla k obrovským ekonomickým nákladům, může někdy kontrola hladiny těžkých kovů v životním prostředí dosáhnout podobného efektu (Yu et al. 2017).

V posledních letech mnoho studií prokázalo, že organické minerály jsou pro zvířata lépe vstřebatelné než běžné anorganické formy. Studie, která částečně nebo úplně nahradila anorganický zinek v krmivu pro kuřata organickou formou zinku, zinek-methionin (ZnMet), prokázaly zlepšení přírůstků v tělesné hmotnosti, účinnosti konverze krmiva, výtěžnosti masa a jatečně upraveného těla a snížení procenta břišního tuku. Zvýšila se také koncentrace zinku v játrech (Jahanian & Rasouli, 2015). Několik krmivářských společností již vyvinulo nové produkty obsahující různé typy organických minerálů. V takových případech je nutné doplňovat krmiva pro zvířata nižšími koncentracemi minerálních látek díky jejich vysoké biologické dostupnosti. V důsledku toho mají zvířata prospěch z lepší výživy, stejně jako spotřebitelé, kteří pak budou mít prospěch z kvalitnějších potravin, protože maso, mléko nebo vejce obsahují více minerálních látek díky jejich vyšší retenci. Nižší obsah anorganických minerálních látek v prostředí produkce potravin by také mohl přispět ke snížení rozvoje rezistence vůči antibiotikům, což bude chránit veřejné zdraví (Yu et al. 2017).

Zajímavé je, že vysoké dostupnosti těchto organických minerálních forem se obvykle dosahuje změnou jejich vstřebávání v trávicím traktu zvířat. Zvířata mají vlastní mechanismy, které vyrovnávají koncentraci vstřebávaných minerálních látek, takže když je jich v krmivu nadbytek, vstřebávají jich méně a naopak. Když se však do krmiva přidá nový typ minerálního produktu, který se vstřebává jinou cestou, jejich schopnost kontrolovat množství těchto vstřebávaných minerálních látek se ztrácí. Proto bude pro zemědělce i odborníky na výživu zvířat náročnější najít optimální krmivo pro každý druh hospodářských zvířat (Yu et al. 2017)

4 Závěr

Tato práce poskytla podrobný pohled na problematiku těžkých kovů ve výživě hospodářských zvířat a jejich vliv na střevní rezistom.

Těžké kovy jsou přirozenou součástí půdy a životních procesů organismů. Avšak v příliš vysokých koncentracích se mohou stát toxickými, což může mít negativní dopady na živé organismy. Toxicita těžkých kovů je komplexní a závisí na jejich koncentraci a formě výskytu. Studie naznačují, že reaktivní formy kyslíku generované těžkými kovy mohou způsobit genetické a strukturální poškození buněk. Důležité je také zdůraznit, že těžké kovy v krmivech mohou mít dopad na zdraví zvířat určených k produkci potravin a mohou se akumulovat ve tkáních, což může ohrozit zdraví spotřebitelů. Je proto nezbytné sledovat a kontrolovat obsah těžkých kovů v krmivech, aby se minimalizovala expozice a rizika pro lidské zdraví. Evropská směrnice stanovuje limity pro obsah těžkých kovů v krmivech, což je důležitý krok směrem k ochraně spotřebitelů a životního prostředí. Je třeba pokračovat v monitorování a výzkumu, aby se lépe porozumělo dopadům těžkých kovů na životní prostředí a zdraví a aby se vyvinuly účinné strategie pro ochranu a prevenci.

Dále práce informovala o mikrobiomu trávicího traktu skotu. Mikrobiom hraje klíčovou roli v trávení potravy a celkovém zdraví zvířat. Moderní výzkum, zejména pomocí technik molekulární biologie jako je metagenomika, umožňuje detailní zkoumání tohoto mikrobiomu. Výsledky naznačují, že mikrobiom skotu se skládá z rozmanitých druhů mikroorganismů, jako jsou bakterie, archea, houby a prvoci, které společně ovlivňují trávení potravy a produkci škodlivin. Důsledky tohoto výzkumu jsou zásadní nejen pro zdraví a výživu zvířat, ale také pro lidské zdraví, zejména s ohledem na přenos zoonotických patogenů a rezistenci bakterií vůči antibiotikům.

Značná část práce byla zaměřena na antibiotika, která jsou v chovech zvířat široce používána k léčbě a prevenci bakteriálních infekcí. I když antibiotika mohou minimalizovat zdravotní dopady infekčních onemocnění a zajišťují stabilní živočišnou produkci, jejich nadměrné používání může vést k riziku rezistence. Evropské nařízení a seznamy WHO upravují používání antibiotik v chovech zvířat s cílem minimalizovat tyto rizika. Data ukazují, že Česká republika úspěšně snížila spotřebu veterinárních antibiotik, čímž dosáhla, a dokonce předčila evropský cíl pro rok 2030. Přestože se antibiotika stále používají, je důležité sledovat jejich vliv na životní prostředí a zvážit alternativní přístupy k péči o zdraví zvířat.

Načež navazuje část o antimikrobiální rezistenci, která je klíčovým problémem veřejného zdraví, který omezuje terapeutické možnosti léčby. Rezistence vzniká přirozeně, ale intenzivní používání antimikrobiálních látek v lékařství, veterinární medicíně a zemědělství urychluje její šíření. Rezistentní bakterie se mohou šířit jak vertikálně, tak horizontálně mezi různými druhy bakterií. Faktory jako antibiotika, těžké kovy a biocidy přispívají k vzniku rezistence. Významným problémem je i kontaminace životního prostředí rezidui antibiotik a geny rezistence. Zavedení minimálních selektivních koncentrací (MSC) může udržovat rezistenci i při nízkých hladinách antibiotik a těžkých kovů. Tato situace vyžaduje komplexní přístup k regulaci a monitorování používání antimikrobiálních látek a zdůrazňuje potřebu inovací v léčbě infekcí.

Cílem práce bylo zmapovat možné korelace mezi těžkými kovy a antimikrobiální rezistencí. Ukazuje se, že těžké kovy jako měď, chrom, a zinek mají významné antimikrobiální účinky a mohou vést k rezistenci vůči antimikrobiálním látkám. Studie naznačují, že kontaminace těžkými kovy v půdě a životním prostředí může vést k selekci rezistence u bakterií nejen vůči těmto kovům, ale také vůči antibiotikům. Identifikovány byly mechanismy korezistence a křížové rezistence, které spojují rezistenci vůči těžkým kovům a antibiotikům. Celkově se zdá, že vliv těžkých kovů na mikrobiální rezistenci je komplexní a má potenciál ovlivnit šíření rezistence vůči antimikrobiálním látkám.

Potenciální řešení problému spojeného se selekcí rezistence bakterií vůči antimikrobiálním látkám a těžkým kovům vyžaduje integrovaný přístup. Je třeba přijmout opatření pro omezení expozice spotřebitelů antimikrobiálním látkám. Snížení používání antibiotik a těžkých kovů v krmivech a zemědělské produkci je nezbytné.

Kromě toho je důležité snížit koncentraci těžkých kovů v životním prostředí. Nahrazení anorganických forem minerálů organickými formami může přinést zlepšení vstřebatelnosti pro zvířata a zároveň snížit expozici antibiotikům. Avšak tato opatření vyžadují další výzkum a optimalizaci krmiv pro každý druh hospodářských zvířat. Celkově je nezbytné integrovat strategie, které budou chránit zdraví zvířat, spotřebitelů a přispět k celkovému snížení antimikrobiální rezistence.

5 Literatura

- Aarestrup, F. M. (2015). The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. *Phil. Trans. R. Soc.* 370:20140085. doi: 10.1098/rstb.2014.0085
- Akcni plán Národního antibiotického programu České republiky (AP NAP). 2019. Ministerstvo zdravotnictví, Česká republika. Available from <https://ppo.mzcr.cz/upload/files/akcni-plan-akcni-plan-narodniho-antibiotickeho-programu-ceske-republiky-textova-cast-632c457a2d508.pdf> (accessed April 2024).
- Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., Handelsman, J., 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 251–259. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>.
- Ambrožová J., Kok D., VŠCHT, 2022, Patogeny a rizikové organismy v životním prostředí, VŠCHT, Praha. Available from https://tvp.vscht.cz/files/uzel/0060816/0007~~M7CMd8wryczNzC7KT8o8vDAn7_BahZzDC0uyK3UUhKzS1KLMIMViIKrMotLUvNKQLJ5iQqJQC1JmfklmdmJAA.pdf?re-directed (accessed April 2024).
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (4), 260e271. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2319>.
- Auffret MD, Dewhurst RJ, Duthie CA, Rooke JA, Wallace RJ, Freeman TC, et al. The rumen microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance and pathogenicity genes is directly affected by diet in beef cattle. *Microbiome* 2017;5:159.
- Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J.V., 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* 14, 176e182. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.006>.
- Baker, J., Sitthisak, S., Sengupta, M., Johnson, M., Jayaswal, R.K., Morrissey, J.A., 2010. Copper stress induces a global stress response in *Staphylococcus aureus* and represses *sae* and *agr* expression and biofilm formation. *Appl. Environ. Microb.* 76, 150e160. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02268-09>.
- Bampidis, V.A., Nistor, E., Nitas, D., 2013. Arsenic, cadmium, lead and mercury as undesirable substances in animal feeds. *Sci. Pap. Animal Sci. Biotechnol.* 46, 17e22.
- Becker, K.W., Skaar, E.P., 2014. Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 1235e1249. <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6976.12087>.
- Berg, J., Tom-Petersen, A., Nybroe, O., 2005. Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 146e151. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01650.x>.
- Bevans DW, Beauchemin KA, Schwartzkopf-Genswein KS, Mckinnon JJ, Mcallister TA. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. *J Anim Sci* 2005;83(5):1116e32.

- Boeckel, T. P. V., Glennon, E. E., Chen, D., Gilbert, M., Robinson, T. P., Grenfell, B. T., et al. (2017). Reducing antimicrobial use in food animals. *Science* 357, 1350–1352. doi: 10.1126/science.aao1495
- Cao, J., Yang, G., Mai, Q., Zhuang, Z., and Zhuang, L. (2020). Co-selection of antibiotic-resistant bacteria in a paddy soil exposed to As(III) contamination with an emphasis on potential pathogens. *Sci. Total Environ.* 725:138367. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138367
- Castro-Gonzalez, M.I., Mendez-Armenta, M., 2008. Heavy metals: implications associated to fish consumption. *Environ. Toxicol. Phar.* 26, 263e271. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2008.06.001>.
- Cogliani, C., Goosens, H., Greko, C., 2011. Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. *Microbe* 6, 274e279. <http://dx.doi.org/10.1128/microbe.6.274.1>.
- Couce, A., and Blázquez, J. (2009). Side effects of antibiotics on genetic variability. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 531–538. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00165.x
- Dai X, Tian Y, Li J, Su X, Wang X, Zhao S, et al. Metatranscriptomic analyses of plant cell wall polysaccharide degradation by microbiota in the cow rumen. *Appl Environ Microbiol* 2015;81(4):1375e86.
- Durso, L. M., and Cook, K. L. (2014). Impacts of antibiotic use in agriculture: what are the benefits and risks? *Curr. Opin. Microbiol.* 19, 37–44. doi: 10.1016/j.mib.2014.05.019
- Durso, L.M., Miller, D.N., Schmidt, T.B. and Callaway, T. (2017), Tracking Bacteria through the Entire Gastrointestinal Tract of a Beef Steer. *Agricultural & Environmental Letters*, 2: 170016. <https://doi.org/10.2134/acl2017.05.0016>
- Duygan, B. O., Gaille, C., Fenner, K., and van der Meer, J. (2021). Assessing antibiotics biodegradation and effects at sub-inhibitory concentrations by quantitative microbial community Deconvolution. *Front. Environ. Sci.* 9:737247. doi: 10.3389/fenvs.2021.737247
- European Medicines Agency (EMA). 2023. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2022. EMA, Nizozemsko. Available from https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2022-trends-2010-2022-thirteenth-esvac-report_en.pdf (accessed April 2024).
- Evropský parlament (EP), Rada Evropské unie, 2002, Směrnice evropského parlamentu a rady 2002/32/ES ze dne 7. května 2002 o nežádoucích látkách v krmivech. Pages 3-9 in Směrnice evropského parlamentu a rady, 2002, Brusel.
- Fang, L., Li, X., Li, L., Li, S., Liao, X., Sun, J., Liu, Y., 2016. Co-spread of metal and antibiotic resistance within ST3-IncHI2 plasmids from *E. coli* isolates of food-producing animals. *Sci. Rep.* 6, 25312. <https://doi.org/10.1038/srep25312>.
- Ferret, P.R., Van Heugten, E., Van Kempen, T.A.T.G., Angel, R., 2002. Nutritional strategies to reduce environmental emissions from nonruminants. *J. Anim. Sci.* 80, E168eE182.

- Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O. A., and Dantas, G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* 337, 1107–1111. doi: 10.1126/science.1220761
- Grass, G., Rensing, C., Solioz, M., 2011. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1541e1547. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02766-10>.
- Gullberg, E., Albrecht, L.M., Karlsson, C., Sandegren, L., Andersson, D.I., 2014. Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *mBio* 5, e01918eeo2014. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.01918-14>.
- Hall MB, Huntington G. Nutrient synchrony: sound in theory, elusive in practice. *J Anim Sci* 2008;86(suppl_14):E287e92.
- Han, F.X., Kingery, W.L., Selim, H.M., 2001. Accumulation, redistribution, transport and bioavailability of heavy metals in waste-amended soils. In: Iskandar, I.K., Kirkham, M.B. (Eds.), *Trace Elements in Soil: Bioavailability, Flux and Transfer*. Lewis Publishers Boca Raton, London, New York, Washington D.C., pp. 141e168. <http://dx.doi.org/10.1201/9781420032734.ch8>
- Harrison, J.J., Ceri, H., Turner, R.J., 2007. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 928e938. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1774>.
- Hasman, H., Aarestrup, F.M., 2002. *tcxB*, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. *Antimicrob. Agents Ch.* 46, 1410e1416. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.46.5.1410-1416.2002>.
- Hastings, P. J., Rosenberg, S. M., and Slack, A. (2004). Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.* 12, 401–404. doi: 10.1016/j.tim.2004.07.003
- Hayashi, S., Abe, M., Kimoto, M., Furukawa, S., Nakazawa, T., 2000. The DsbA-DsbB disulfide bond formation system of *Burkholderia cepacia* is involved in the production of protease and alkaline phosphatase, motility, metal resistance, and multi-drug resistance. *Microbiol. Immunol.* 44, 41e50. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2000.tb01244.x>.
- He B, Jin S, Cao J, Mi L, Wang J. Metatranscriptomics of the Hu sheep rumen microbiome reveals novel cellulases. *Biotechnol Biofuels* 2019;12(1):153.
- Hill, G.M., Cromwell, G.L., Crenshaw, T.D., Dove, C.R., Ewan, R.C., Knabe, D.A., Lewis, A.J., Libal, G.W., Mahan, D.C., Shurson, G.C., Southern, L.L., Veum, T.L., 2000. Growth promotion effects and plasma changes from feeding high dietary concentrations of zinc and copper to weanling pigs (regional study). *J. Anim. Sci.* 78, 1010e1016, 2000.7841010x.
- Hölzel, C.S., Müller, C., Harms, K.S., Mikolajewski, S., Sch€afer, S., Schwaiger, K., Bauer, J., 2012. Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. *Environ. Res.* 113, 21e27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2012.01.002>.
- Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486(7402):207.

- Chee-Sanford, J. C., Mackie, R. I., Koike, S., Krapac, I. G., Lin, Y.-F., Yannarell, A. C., et al. (2009). Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *J. Environ. Qual.* 38, 1086–1108. doi: 10.2134/jeq2008.0128
- Chowdhury, P. R., McKinnon, J., Wyrsh, E., Hammond, J. M., Charles, I. G., and Djordjevic, S. P. (2014). Genomic interplay in bacterial communities: implications for growth promoting practices in animal husbandry. *Front. Microbiol.* 5:394. doi: 10.3389/fmicb.2014.00394
- Ilari, A., Alaleona, F., Tria, G., Petrarca, P., Battistoni, A., Zamparelli, C., Verzili, D., Falconi, M., Chiancone, E., 2014. The Salmonella enterica ZinT structure, zinc affinity and interaction with the high-affinity uptake protein ZnuA provide insight into the management of periplasmic zinc. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 535–544.
- Jahanian, R., Rasouli, E., 2015. Effects of dietary substitution of zinc-methionine for inorganic zinc sources on growth performance, tissue zinc accumulation and some blood parameters in broiler chicks. *J Anim. Physiol.* N 99, 50e58. [http:// dx.doi.org/10.1111/jpn.12213](http://dx.doi.org/10.1111/jpn.12213).
- Jami E, Israel A, Kotser A, Mizrahi I. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *ISME J* 2013;7(6):1069.
- Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W., and Smalla, K. (2014). Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends Microbiol.* 22, 536–545. doi: 10.1016/j.tim.2014.05.005
- Jelínek, P., Koudela, K., 2003. *Fyziologie hospodářských zvířat*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-7157-644-1.
- Jensen, H.M., 2006. Health management with reduced antibiotic use: experiences of a Danish pig vet. *Anim. Biotechnol.* 17, 189e194. <http://dx.doi.org/10.1080/10495390600957142>.
- Jeřábková J., Kucharovičová I., Vonderka K., RL – antibiotické centrum pro veterinární klinickou praxi v SVÚ Jihlava. 2022. Národní program sledování rezistencí k antimikrobikům u veterinárně významných patogenů za rok 2021. SVÚ Jihlava, Jihlava. Available from <https://www.svscr.cz/wp-content/files/dokumenty-a-publikace/Narodni-program-sledovani-rezistenci-k-antimikrobikum-u-veterinarne-vyznamnych-patogenu-2021.pdf> (accessed April 2024).
- Ji, X., Shen, Q., Liu, F., Ma, J., Xu, G., Wang, Y., Wu, M., 2012. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai. China. *J. Hazard Mater* 235, 178e185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.07.040>.
- Jirouš J. Fakultní nemocnice Plzeň. Nozokomiální nákazy. FN Plzeň, Plzeň. Available from <https://www.fnplzen.cz/sites/default/files/dokumenty/nozokomialni.pdf> (accessed March 2024).
- Jutkina, J., Rutgersson, C., Flach, C. F., and Joakim Larsson, D. G. (2016). An assay for determining minimal concentrations of antibiotics that drive horizontal transfer of resistance. *Sci. Total Environ.* 548–549, 131–138. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.01.044

- Kimball D. Animal feed and fuel by-products. Citrus Processing. Springer Netherlands; 1991.
- Kyselková M, Jirout J, Vrchotová N, Schmitt H and Elhottová D (2015) Spread of tetracycline resistance genes at a conventional dairy farm. *Front. Microbiol.* 6:536. doi: 10.3389/fmicb.2015.00536
- Lemire, A.J., Harrison, J.J., Turner, R.J., 2013. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 371e384. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3028>.
- Liu, G., Bogaj, K., Bortolaia, V., Olsen, J. E., and Thomsen, L. E. (2019). Antibiotic-induced, increased conjugative transfer is common to diverse naturally occurring ESBL plasmids in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 10:2119. doi: 10.3389/fmicb.2019.02119
- Liu K, Xu Q, Wang L, Wang J, Guo W, Zhou M. The impact of diet on the composition and relative abundance of rumen microbes in goat. *Asian Austral J Anim* 2017;30(4):531e7.
- Liu K, Zhang Y, Yu Z, Xu Q, Zheng N, Zhao S, Huang G, Wang J. Ruminant microbiota-host interaction and its effect on nutrient metabolism. *Anim Nutr.* 2021 Mar;7(1):49-55. doi: 10.1016/j.aninu.2020.12.001. Epub 2020 Dec 15. PMID: 33997331; PMCID: PMC8110878.
- Looft, T., Johnson, T. A., Allen, H. K., Bayles, D. O., Alt, D. P., Stedtfield, R. D., et al. (2011). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *PNAS* 109, 1691–1696. doi: 10.1073/pnas.1120238109
- Lopatkin, A. J., Sysoeva, T. A., and You, L. (2016). Dissecting the effects of antibiotics on horizontal gene transfer: analysis suggests a critical role of selection dynamics. *BioEssays* 38, 1283–1292. doi: 10.1002/bies.201600133
- Luo, G., Li, B., Li, L.G., Zhang, T., Angelidaki, I., 2017. Antibiotic resistance genes and correlations with microbial community and metal resistance genes in full-scale biogas reactors as revealed by metagenomic analysis. *Environ. Sci. Technol.* 51, 4069–4080.
- Malaweera BO, Wijesundara WMNM. Use of seafood processing by-products in the animal feed industry. *Seafood Processing By-Products*; 2014.
- Marutescu LG, Jaga M, Postolache C, Barbuceanu F, Milita NM, Romascu LM, Schmitt H, de Roda Husman AM, Sefeedpari P, Glaeser S, Kämpfer P, Boerlin P, Topp E, Gradisteanu Pircalabioru G, Chifiriuc MC and Popa M (2022) Insights into the impact of manure on the environmental antibiotic residues and resistance pool. *Front. Microbiol.* 13:965132.
- Medardus, J.J., Molla, B.Z., Nicol, M., Morrow, W.M., Rajala-Schultz, P.J., Kazwala, R., Gebreyes, W.A., 2014. In-feed use of heavy metal micronutrients in US swine production systems and its role in persistence of multidrug-resistant salmonellae. *Appl. Environ. Microb.* 80, 2317e2325. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.04283-13>.
- Menšíková K., Bmedic, 2020, Antibiotická rezistence, Bmedic. Available from <https://bmedic.cz/antibioticka-rezistence/> (accessed April 2024).

- Ministerstvo zdravotnictví. 2004. Vyhláška č. 252 ze dne 22.4.2004, kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody. Pages 6 in Sběrka zákonů České republiky, Česká republika.
- Ministerstvo zdravotnictví. 2004. Vyhláška č. 275 ze dne 28.4.2004, o požadavcích na jakost a zdravotní nezávadnost balených vod a o způsobu jejich úpravy. Pages 9-10 in Sběrka zákonů České republiky, Česká republika.
- Minseok Kim, Tansol Park, Zhongtang Yu. Metagenomic investigation of gastrointestinal microbiome in cattle. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2017 Nov;30(11):1515-1528. doi: 10.5713/ajas.17.0544. Epub 2017 Aug 22. PMID: 28830126; PMCID: PMC5666186.
- Moore, P.A., Daniel, T.C., Sharpley, A.N., Wood, C.W., 1995. Poultry manure management: environmentally sound options. *J. Soil Water Conserv.* 50, 321e327.
- Nábělková J., Nekovářová J., 2010, *Chemie životního prostředí, České vysoké učení technické, Praha*
- Nguyen, B. T., Chen, Q. L., He, J. Z., and Hu, H. W. (2020). Microbial regulation of natural antibiotic resistance: understanding the protist-bacteria interactions for evolution of soil resistome. *Sci. Total Environ.* 705:135882. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135882
- Office International des Epizooties (OIE) (2018). OIE Annual Report on Antimicrobial Agents Intended for Use in Animals – Better Understanding of the Global Situation. Third Report. Available at: https://rr-africa.oie.int/wp-content/uploads/2019/09/annual_report_amr_3.pdf
- Osman, D., Cavet, J.S., 2011. Metal sensing in Salmonella: implications for pathogenesis. *Adv. Microb. Physiol.* 58, 175e232. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-381043-4.00005-2>.
- Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., Larsson, D.J., 2015. Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics* 16 (1), 1. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-2153-5>.
- Pandit RJ, Hinsu AT, Patel SH, Jakhesara SJ, Koringa PG, Bruno F, et al. Microbiota composition, gene pool and its expression in Gir cattle (*Bos indicus*) rumen under different forage diets using metagenomic and metatranscriptomic approaches. *Syst Appl Microbiol* 2018;41(4). S072320201830081X.
- Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N., Jensen, S.O., 2018. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 31.
- Pavlik M., Krafka J., Radó A., VETUNI Brno. 2023. Antibiotická terapie v medicíně psů a koček. VETUNI Brno, Brno. Available from https://www.vetuni.cz/files/upload/904/Vystup_Pavlik%202023FVL166016%20Antibioticka%20terapie%20v%20medicine%20psu%20a%20kocek%20-%20brozura.pdf (accessed April 2024).

- Peng S, Zheng H, Herrero-Fresno A, Olsen JE, Dalsgaard A, Ding Z. Co-occurrence of antimicrobial and metal resistance genes in pig feces and agricultural fields fertilized with slurry. *Sci Total Environ.* 2021 Oct 20;792:148259. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.148259. Epub 2021 Jun 17. PMID: 34147788.
- Petrarca, P., Ammendola, S., Pasquali, P., Battistoni, A., 2010. The Zur-regulated ZinT protein is an auxiliary component of the high-affinity ZnuABC zinc transporter that facilitates metal recruitment during severe zinc shortage. *J. Bacteriol.* 192, 1553–1564.
- Reece W. O., 2011, *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*, Grada Publishing, Praha
- Robinson, N.J., Winge, D.R., 2010. Copper metallochaperones. *Annl Rev. Biochem.* 79 (537) <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-030409-143539>.
- Roosa, S., Wattiez, R., Prygiel, E., Lesven, L., Billon, G., Gillan, D.C., 2014. Bacterial metal resistance genes and metal bioavailability in contaminated sediments. *Environ. Pollut.* 189, 143e151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2014.02.031>.
- Russell JB, Rychlik JL. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* 2001;292(5519):1119e22.
- Sánchez, P., Linares, J.F., Ruiz-Díez, Beatriz, Campanario, E., Navas, A., Baquero, F., Martínez, J.L., 2002. Fitness of in vitro selected *Pseudomonas aeruginosa* nalB and nfxB multidrug resistant mutants. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 657e664. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dfk185>.
- Sedláková M., Vojtová V., Hanulík V., Suchánková H., Kolář M., 2012. Rezistence enterobakterií k vybraným antibiotikům v souvislosti s jejich spotřebou. *Klinická farmakologie a farmacie* 26(2): 61-66
- Seiler, C., Berendonk, T.U., 2012. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.* 3, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00399>.
- Seshadri R, Leahy SC, Attwood GT, Teh KH, Lambie SC, Cookson AL, et al. Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate 1000 Collection. *Nat Biotechnol* 2018;36(4):359.
- Shober, A. M., and Maguire, R. O. (2018). *Manure Management*. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Elsevier.
- Schwarz, S., Cloeckert, A. and Roberts, M.C. (2005). Mechanisms and Spread of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. In *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*, F.M. Aarestrup (Ed.). <https://doi.org/10.1128/9781555817534.ch6>
- Smaldone, G.T., Helmann, J.D., 2007. CsoR regulates the copper efflux operon copZA in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 153, 4123e4128. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.02007/011742-0>.
- Smith, D. L., Dushoff, J., and Morris, J. G. (2005). Agricultural antibiotics and human health. *PLoS Med.* 2:e232. doi: 10.1371/journal.pmed.0020232

- Sohaib H. Mazhar, Xuanji Li, Azhar Rashid, JunMing Su, Junqiang Xu, Asker Daniel Brejnrod, Jian-Qiang Su, Yijian Wu, Yong-Guan Zhu, Shun Gui Zhou, Renwei Feng, Christopher Rensing, Co-selection of antibiotic resistance genes, and mobile genetic elements in the presence of heavy metals in poultry farm environments, *Science of The Total Environment*, Volume 755, Part 2, 2021, 142702, ISSN 0048-9697.
- Song, J., Rensing, C., Holm, P.E., Virta, M., Brandt, K.K., 2017. Comparison of metals and tetracycline as selective agents for development of tetracycline resistant bacterial communities in agricultural soil. *Environ. Sci. Technol.* 51, 3040–3047. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05342>.
- Stepanauskas, R., Glenn, T.C., Jagoe, C.H., Tuckfield, R.C., Lindell, A.H., King, C.J., McArthur, J.V., 2006. Coselection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms. *Environ. Microbiol.* 8, 1510–1514. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01091.x>.
- Taylor-Pickard, Julie A., Tucker, Lucy A., 2005. *Re-defining Mineral Nutrition*. Nottingham University Press. <http://dx.doi.org/10.1017/bjn20061767>.
- Timoney, J.F., Port, J., Giles, J., Spanier, J., 1978. Heavy-metal and antibiotic resistance in the bacterial flora of sediments of New York Bight. *Appl. Environ. Microb.* 36, 465e472.
- Tiseo, K., Huber, L., Gilbert, M., Robinson, T. P., and Van Boeckel, T. P. (2020). Global trends in antimicrobial use in food animals from 2017 to 2030. *Antibiotics (Basel)* 9:918. doi: 10.3390/antibiotics9120918
- Topp, E., Chapman, R., Devers-Lamrani, M., Hartmann, A., Marti, R., Martin-Laurent, F., et al. (2013). Accelerated biodegradation of veterinary antibiotics in agricultural soil following long-term exposure, and isolation of a Sulfamethazine-degrading sp. *J. Environ. Qual.* 42, 173–178. doi: 10.2134/jeq2012.0162
- ÚSKVBL. 2020. Spotřeba antimikrobik ve veterinární medicíně v ČR: Detailní komentované srovnání trendů ve spotřebách antimikrobik 2010-2018, p. 1–48. ÚSKVBL. Available from https://www.uskvbl.cz/attachments/1529_Spotřeba%20antimikrobik%20ve%20veterinární%20medicině%20v%20ČR%20v%20období%202010-2018_final.pdf (accessed January, 2024).
- Vahjen, W., Pietruszynska, D., Starke, I.C., Zentek, J., 2015. High dietary zinc supplementation increases the occurrence of tetracycline and sulfonamide resistance genes in the intestine of weaned pigs. *Gut. Pathog.* 7, 23.
- Van, T. T. H., Yidana, Z., Smooker, P. M., and Coloe, P. J. (2020). Antibiotic use in food animals worldwide, with a focus on Africa: pluses and minuses. *J. Global Antimicrob. Resist.* 20, 170–177. doi: 10.1016/j.jgar.2019.07.031
- Vorlíček P., Státní veterinární správa, 2023, Spotřebu veterinárních antibiotik se daří v ČR dlouhodobě snižovat, je nižší než průměr EU. SVS. Available from <https://www.svs.cz/spotrebu-veterinarnich-antibiotik-se-dari-v-cr-dlouhodobě-snizovat-je-nizsi-nez-prumer-eu/> (accessed April 2024).

- Walsh, F. (2013). The multiple roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front. Microbiol.* 4:255. doi: 10.3389/fmicb.2013.00255
- Westendorf ML. Food waste to animal feed. John Wiley & Sons; 2000.
- Woegerbauer, M., Bellanger, X., and Merlin, C. (2020). Cell-free DNA: an underestimated source of antibiotic resistance gene dissemination at the interface between human activities and downstream environments in the context of wastewater reuse. *Front. Microbiol.* 11:671. doi: 10.3389/fmicb.2020.00671
- Wolin MJ. The rumen fermentation: a model for microbial interactions in anaerobic ecosystems. *Adv Microb Ecol* 1979:49e77.
- World Health Organization (WHO) (2015). The Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS). Available at: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>
- World Health Organization (WHO). 2017. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Available at: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed April 2024)
- World Health Organization (WHO) (2019). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine, 6th Revision. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- World Health Organization (WHO) (2021). Antimicrobial Resistance. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Wuana, R.A., Okieimen, F.E., 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecol.* 2011 <http://dx.doi.org/10.5402/2011/402647>.
- Xiong, W., Zeng, Z., Zhang, Y., Ding, X., Sun, Y., 2015. Fate of metal resistance genes in arable soil after manure application in a microcosm study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 59e63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.026>.
- Yazdankhah, S., Rudi, K., Bernhoft, A., 2014. Zinc and copper in animal feed – development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin. *Microb. Ecol. Heal. Dis.* 25, 1–7. <https://doi.org/10.3402/mehd.v25.25862>.
- Yu Zhongyi , Lynda Gunn, Patrick Wall, Séamus Fanning, Antimicrobial resistance and its association with tolerance to heavy metals in agriculture production, *Food Microbiology*, Volume 64, 2017, Pages 23-32, ISSN 0740-0020.
- Zhang, Y., Gu, A. Z., Cen, T., Li, X., He, M., Li, D., et al. (2018). Sub-inhibitory concentrations of heavy metals facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes in water environment. *Environ. Pollut.* 237, 74–82. doi: 10.1016/j.envpol.2018.01.032

Zhao, Y., Cocerva, T., Cox, S., Tardif, S., Su, J.-Q., Zhu, Y.-G., Brandt, K.K., 2019. Evidence for co-selection of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in metal polluted urban soils. *Sci. Total Environ.* 656, 512–520. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.372>.

Zhou, J., Bruns, M.A., Tiedje, J.M., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 316–322.