

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



**Význam horizontálního přenosu genů při šíření
bakteriální rezistence k tetracyklinu v zemědělské půdě**

Diplomová práce

Vypracoval: Bc. Karel Kopejtko

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

Školitelka – specialistka: RNDr. Dana Elhottová, Ph.D.
(BC AV ČR, v.v.i. - ÚPB)

České Budějovice 2012

Kopejtka, K., (2012): Význam horizontálního přenosu genů při šíření bakteriální rezistence k tetracyklinu v zemědělské půdě. [The role of horizontal gene transfer in disseminating tetracycline resistance among bacteria in farm soil. Mgr. Thesis, in Czech] – 82 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This master thesis is focused on the role of horizontal gene transfer in disseminating tetracycline resistance among bacteria in farm soils. In the experimental part, plasmids carrying antibiotic resistance, were exogenously isolated in biparental matings with cattle manure and *Escherichia coli* K-12 CV601 gfp recipients.

Tato magisterská práce byla financována z grantu GAČR P504/10/2077: *Charakteristika a hodnocení rizik spojených s rezervoáry bakteriální antibiotické rezistence v půdě.*

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

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

V Českých Budějovicích dne 14.12. 2012

.....

Karel Kopejtka

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval Mgr. Martině Kyselkové, Ph.D. za její svatou trpělivost při vedení méj diplomové práce, pomoc při jejím sepisování a v neposlední řadě za její lidský přístup při každodenní práci v laboratoři. RNDr. Daně Elhottové, Ph.D. patří můj velký dík za to, že jsem dostal příležitost zúčastnit se stáže v laboratoři prof. Kornelie Smally v Braunschweigu v létě 2011. Dále děkuji za pomoc a cenné rady při laboratorní práci zaměstnancům Ústavu půdní biologie v Českých Budějovicích, zejména Elišce Zadákové, Ing. Lucii Kotrbové, RNDr. Alici Chroňákové, Ph.D., Mgr. Jiřímu Petráskovi a RNDr. Jiřímu Jiroutovi, Ph.D. Za podporu nejen finanční děkuji své rodině.

OBSAH

1 Úvod a cíle práce.....	1
1.1 Hypotézy.....	2
1.2 Hlavní cíle práce.....	3
2 Literární rešerše.....	4
2.1 Rezistence k tetracyklinovým antibiotikům.....	4
2.1.1 Mechanizmy rezistence k tetracyklinovým antibiotikům.....	4
2.1.2 Bílkoviny ribozomální protekce (RPP, ribosomal protection proteins).....	5
2.2 Šíření rezistence k tetracyklinu v zemědělské půdě jako důsledek hnojení exkrementy od hospodářských zvířat ošetřovaných antibiotiky.....	10
2.3 Bakteriální mobilní genetické elementy.....	13
2.3.1 Transpozóny.....	13
2.3.2 Integrony.....	16
2.3.3 Bakteriální plazmidy.....	17
2.4 Horizontální přenos plazmidů mezi půdními bakteriemi.....	25
3 Experimentální část.....	27
3.1 Materiál.....	27
3.1.1 Média.....	27
3.1.2 Antibiotika.....	28
3.1.3 Bakteriální kmeny.....	29
3.1.4 Kity pro izolaci a přečištění DNA.....	29
3.1.5 Vzorky půdy.....	29
3.1.6 Vzorky feces od krav léčených tetracyklinem.....	30
3.2 Metody práce.....	30
3.2.1 Exogenní izolace plazmidů.....	30
3.2.2 Test antibiotické citlivosti (difúzní disková metoda).....	38
3.2.3 Identifikace bakterií na základě profilu mastných kyselin.....	39
3.2.4 Izolace plazmidové DNA.....	39
3.2.5 Detekce genů rezistence pomocí PCR.....	42
3.2.6 Sekvenování genu pro 16S rRNA.....	42
3.2.7 Úprava sekvencí a identifikace pomocí algoritmu BLAST.....	43
4 Výsledky.....	44
4.1 Konjugační pokusy.....	44

4.2 Fenotypová charakterizace transkonjugantů.....	51
4.3 Izolace plazmidů.....	54
4.4 Detekce <i>tet-r</i> genů.....	55
4.5 Detekce IncP-1 a LowGC plazmidů.....	56
5 Diskuze.....	59
6 Závěr.....	64
7 Seznam použité literatury.....	65
8 Přílohy.....	79

Seznam zkratek

AMC	kombinace amoxicilinu a kyseliny klavulanové
AMX	Amoxicilin
AN	Amikacin
BHR	široké spektrum hostitelů (B road H ost R ange) algoritmus používaný pro porovnávání dat (B asic L ocal A lignment S earch T ool)
BLAST	
BSA	hovězí sérový albumin (B ovine S erum A lbumin)
C	Chloramfenikol
Ccc	kruhová nadšroubovicová forma DNA
CFU	kolonie tvořící jednotky (C olony- F orming U nits)
CIP	Ciprofloxacin
CLR	Claritomylin
CTC	Chlortetracyklin
CTns	konjugativní transpozóny
CTR	Klotrimazol
Cyclo	Cykloheximid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (D eoxyribo N ucleic A cid)
DO	Doxycylin
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (E thylene D iamine T etraacetic A cid)
<i>EF-G</i>	elongační faktor <i>G</i>
<i>EF-Tu</i>	elongační faktor <i>Tu</i>
Ex	Exkrement
FASTA	datový formát používaný v bioinformatice (F AST A lignment)
G+C	komplementární pár bází guanin+cytosin
GFP	zeleně fluoreskující bílkovina (G reen F luorescent P rotein)
GM	Gentamycin
GTP	Guanosintrifosfát
HGP/HGT	horizontální genový přenos (H orizontal G ene T ransfer)
Inc	inkompatibilní skupina plazmidů
IS	inzerční sekvence
Kan	Kanamycin
L	Linkomycin
MEM	Meropenem
MGE	mobilní genetické elementy
N-konec	konec peptidu/bílkoviny končící aminovou skupinou
OFX	Ofloxacin
P	Penicilin
PB	Polymixin
PCR	polymerázová řetězová reakce (P olymerase C hain R eaction)
PLFA	mastné kyseliny fosfolipidů (P hospho L ipid-derived F atty A cids)

Rif	Rifampicin
RNA	ribonukleová kyselina (RiboNucleic Acid)
RPP	bílkoviny ribozomální protekce (Ribosomal Protection Proteins)
S	Streptomycin
SDZ	antibiotikum sulfadiazin
SSS	Sulfonamidy
<i>sul-r</i> geny	sulfonamid rezistenční geny
<i>Taq</i> -polymeráza	termostabilní DNA polymeráza bakterie <i>Thermus aquaticus</i>
TC	Tetracyklin
<i>tet-r</i> geny	tetracyklin rezistenční geny
Tn	Transpozón
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
VA	Vankomycin

1 Úvod a cíle práce

Odhaduje se, že bakterie existují na Zemi již přes tři miliardy let. Za tuto dobu si vyvinuly množství obranných mechanismů, kterými se chrání před účinky nejrůznějších toxických látek ze svého životního prostředí. Jedněmi z takových látek jsou i antibiotika. Většina dnes používaných antibiotik má svůj původ v antimikrobiálních látkách produkovaných mikroorganismy – jsou to tedy látky, se kterými se bakterie setkávají od nepaměti.

Tetracyklinová antibiotika patří do skupiny širokospektrých antimikrobiálních agens. Vykazují bakteriostatickou aktivitu proti celé řadě gram pozitivních i gram negativních mikroorganismů. Během 50. a 60. let 20. století se antibiotikum tetracyklin začalo intenzivně používat při léčbě lidských i zvířecích bakteriálních infekcí, profylakticky jako prevence malárie (způsobované prvokem *Plasmodium falciparum*) a v subterapeutických dávkách se začalo přidávat do zvířecích krmiv jako růstový faktor. Následkem toho byl vznik a rozšíření bakteriálních kmenů rezistentních k tetracyklinu.

První geny rezistence (R-faktory) byly poprvé zjištěny v 50. letech minulého století v Japonsku (Watanabe 1963) a od té doby je možné detekovat determinanty rezistence vůči tetracyklinu u čím dál tím většího počtu druhů bakterií. Geny rezistence se šíří mezi bakteriemi konjugativním přenosem pomocí plazmidů a/nebo transpozónů (Chopra *et* Roberts 2001). Obecně se dá říci, že čím více se antibiotika používají, tím vyšší je riziko vzniku rezistentních kmenů bakteriálních patogenů (Levy 2002).

V současnosti dosahují problémy spojené s rozšířením bakterií rezistentních k tetracyklinu epidemického rozsahu. Vysoký podíl rezistentních mikroorganismů v životním prostředí má přímou souvislost s intenzivním užíváním tetracyklinu v lidské i veterinární medicíně v průběhu posledních šedesáti let (Andersen *et* Sandaa 1994). Odhaduje se, že až 80 % orálně podávaného tetracyklinu je vyloučeno zvířecími exkremty do prostředí, a to z velké části jako aktivní metabolit (Feinman *et* Matheson 1978; Hamscher *et al.* 2002). Tetracyklin pak může vytvářet selekční tlak na přenos a udržení antibiotické rezistence v půdě a její další šíření do prostředí. Používání tetracyklinu k profylaktickým účelům ve velkochovech hospodářských zvířat se tedy stává nežádoucím, protože může přispívat ke vzniku rezistencí i u lidských patogenů (Sawant *et al.* 2007).

Tato diplomová práce byla vypracována jako součást projektu GAČR P504/10/2077: *Charakteristika a hodnocení rizik spojených s rezervoáry bakteriální antibiotické rezistence v půdě*. Formálně je členěna do dvou částí – literární rešerše a experimentální části. Stěžejní částí experimentální části jsou konjugační experimenty, jejichž cílem bylo zachycení horizontálně přenosných genetických elementů podílejících se na přenosu rezistence k tetracyklinu.

Tato práce navazuje na inkubační pokus, který byl proveden na Ústavu půdní biologie v Českých Budějovicích pod vedením RNDr. Dany Elhottové, Ph.D. v létě roku 2011, za účelem sledování přenosu genů tetracyklinové rezistence z kravských exkrementů do půdy. Směs exkrementů od tří krav léčených metricyklinem (nitroděložní globule chlortetracyklinu) byla smíchána se třemi půdami, reprezentujícími gradient předchozího zatížení pastvou skotu [zimní pastvina (**W**) > pastvina (**P**) > louka (**M**)]. Exkrementy byly do půd přidány buď samostatně [10% suché váhy (**F**)], nebo s přídatkem nízké [0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$, (**LF**)] nebo vysoké dávky chlortetracyklinu [(100 $\mu\text{g g}^{-1}$, (**HF**)], a půdy byly inkubovány v uzavřených nádobách po dobu tří měsíců. Exkrementy všech krav obsahovaly geny *tet(M)*, *tet(O)* a *tet(W)*, a tyto geny byly proto v půdách monitorovány pomocí kvantitativní PCR v průběhu tříměsíční inkubace. Geny *tet(O)* a *tet(Q)* spadly ve většině případů pod limit detekce již po dvou týdnech inkubace, zatímco gen *tet(W)* byl detekován ve všech půdách i po třech měsících inkubace (Kyselková *et al.*, nepublikováno). Protože přežití fekální mikroflóry v půdě po dobu tří měsíců je nepravděpodobné, usuzujeme, že alespoň gen *tet(W)* mohl být horizontálně přenesen do půdních bakterií.

1.1 Hypotézy

1. Bakterie z exkrementů krav léčených tetracyklinovými antibiotiky a z půd inkubovaných s těmito exkrementy jsou zdrojem horizontálně přenosných genů rezistence k tetracyklinu.
2. Na tomto horizontálním genovém přenosu se podílejí plazmidy se širokým spektrem hostitelů nebo konjugativní transpozóny.
3. Spolu s geny rezistence k tetracyklinu se horizontálně přenášejí i rezistence k jiným typům antibiotik.

1.2 Hlavní cíle práce

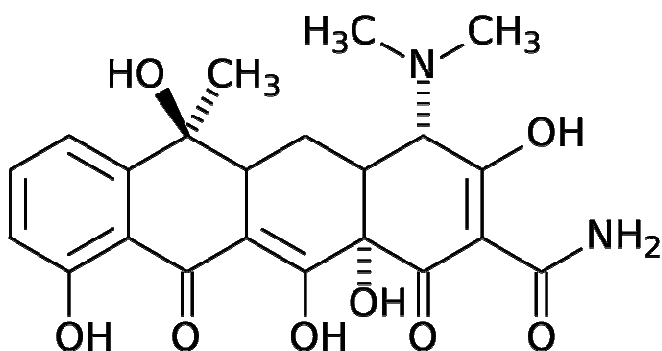
1. V podobě literární rešerše kriticky zhodnotit dostupnou literaturu týkající se horizontálního přenosu genů rezistence k tetracyklinu u bakterií a jeho významu v souvislosti s užíváním antibiotik v zemědělství a šíření rezistence k tetracyklinu v životním prostředí.
2. Prokázat horizontální genový přenos genů rezistence k tetracyklinu mezi bakteriemi z kravských exkrementů nebo z půdy inkubované s těmito exkrementy, a laboratorním bakteriálním recipientem (*Escherichia coli* K-12 CV601 gfp, *Pseudomonas putida* KT2442-GFP, *Acinetobacter baylyi* BD413-GFP).
3. Zjistit, které genetické elementy se uplatnily při horizontálním přenosu jednotlivých genů rezistence k tetracyklinu.
4. Podrobněji identifikovat tyto elementy.
5. Zjistit fenotypové vlastnosti (konkrétní antibiotické rezistence) kódované těmito elementy.

2 Literární rešerše

2.1 Rezistence k tetracyklinovým antibiotikům

Již záhy po uvedení tetracyklinových antibiotik do klinické praxe byl zjištěn vznik rezistentních kmenů bakterií. Tetracyklin (viz Obr. 1) se začal používat v roce 1956 a už za čtyři roky byly detekovány tetracyklin rezistentní bakterie (Spížek *et al.* 2010).

Na Obr. 1 je zobrazen strukturní vzorec tetracyklinu.



Obr. 1: Tetracyklin (<http://www.wikipedia.org>, prosinec 2012).

2.1.1 Mechanizmy rezistence k tetracyklinovým antibiotikům

Zkoumáním rezistentních kmenů bakterií bylo zjištěno, že rezistenci na tetracyklinová antibiotika v bakteriální buňce zajišťují bílkovinné produkty jednoho nebo více genů tetracyklinové rezistence (*tet-r* geny). Tyto bílkoviny zajišťují jeden ze tří mechanismů rezistence:

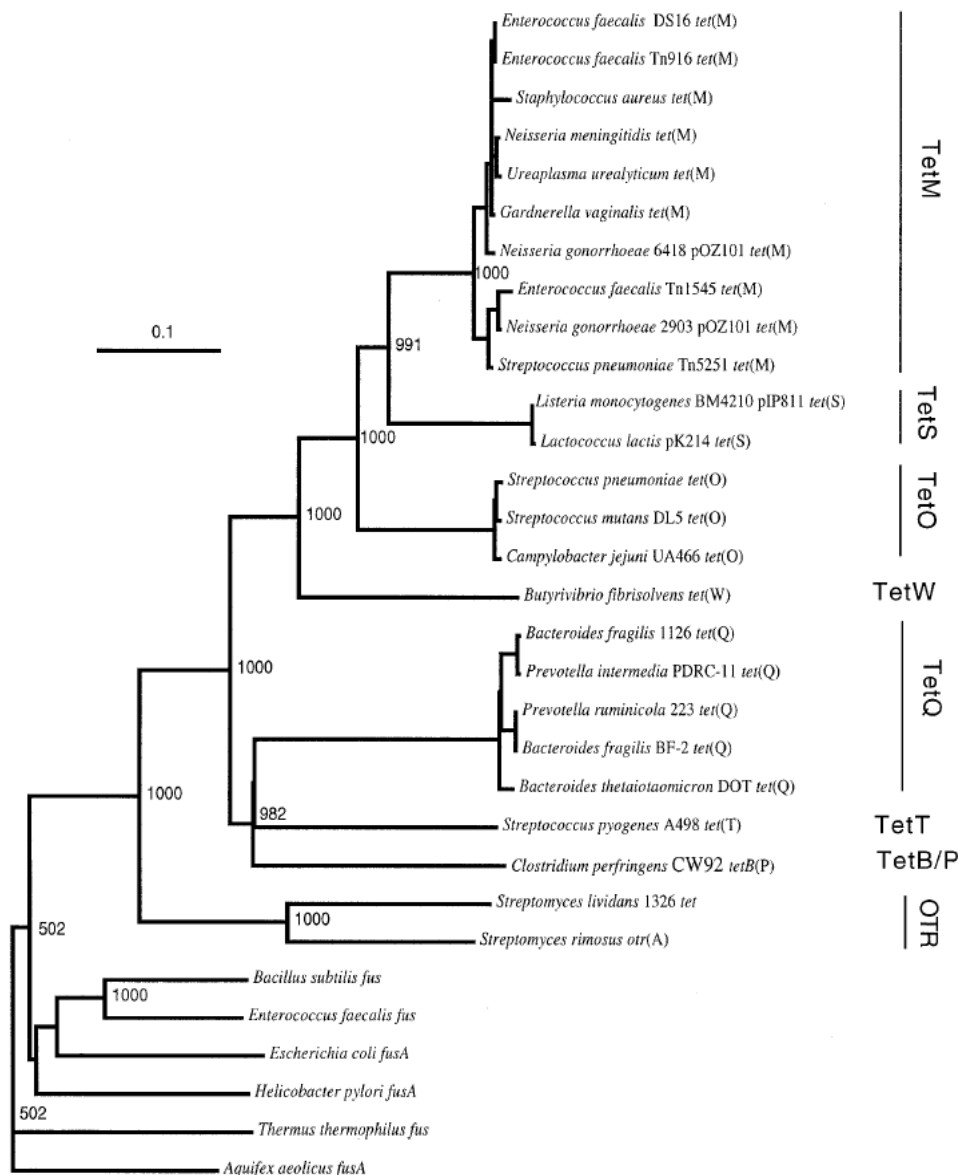
- efluxní pumpy
- bílkoviny ribozomální protekce
- enzymatická inaktivace antibiotika

Dále se budu podrobněji věnovat bílkovinám ribozomální protekce, protože některé z *tet-r* genů, které je kódují, jsme detekovali i v našich vzorcích (viz Experimentální část).

2.1.2 Bílkoviny ribozomální protekce (RPP, ribosomal protection proteins)

Tento typ mechanismu antibiotické rezistence patří spolu s effluxními pumpami [geny *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(I)*, *tet(J)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(A/P)*, *tet(V)*, *tet(Y)*, *tet(Z)*, *tet(30)*, *tet(31)*, *tet(33)*, *tet(35)*, *tet(38)*, *tet(39)*, *tet(40)*, *tet(41)*, *tet(42)*, *trc(3)*, *otr(B)*, *otr(C)*]; (Levy 1992; Schnappinger *et* Hillen 1996) k nejčastějším způsobům ochrany bakterií vůči působení tetracyklinu (Aminov *et al.* 2001). Do této skupiny patří 12 velkých cytoplazmatických bílkovin [(*tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(W)*, *tet(32)*, *tet(Q)*, *tet(T)*, *tet(36)*, *otr(A)*, *tetB(P)*, *tet* a *tet(44)*]; (Roberts 2012), které chrání ribozomy před akcí tetracyklinu; zprostředkovávají také antibiotickou rezistenci k derivátům tetracyklinu (např. k doxycyklinu, minocyklinu); (Chopra *et* Roberts 2001). Nejrozšířenější a nejprostudovanější bílkoviny z třídy RPP jsou Tet(M) a Tet(O); (Thaker *et al.* 2010).

Na Obr. 2 je znázorněn fylogenetický strom bílkovin ribozomální protekce.



Obr. 2: Fylogenetický strom bílkovin ribozomální protekce (Aminov *et al.* 2001).

RPP mají velikost přibližně 72,5 kDa (Taylor *et Chau* 1996) a sekvenací genů kódujících tyto bílkoviny se ukázalo, že mají sekvenční podobnost s translačními elongačními faktory *EF-Tu* a *EF-G* (Burdett 1991; Manavathu *et al.* 1988; Sanchez-Pescador *et al.* 1988). Aminov ve své studii zjistil, že geny pro RPP mají monofyletický původ; dále ve své práci navrhuje hypotézu, že tyto geny (přesněji jejich produkty) plnily původně v bakteriální buňce nějaké metabolické funkce – spíše než poskytovaly antibiotickou rezistenci (Aminov *et al.* 2001).

V Tab. I je uveden přehled čtyř *tet-r* genů RPP běžně se vyskytujících v zemědělských půdách a jejich výskyt v bakteriálních rodech.

Tab. I: Známý výskyt genů RPP *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)* a *tet(W)* v bakteriálních rodech (<http://faculty.washington.edu/marilynr>, říjen 2012).

PROTEINY RIBOZOMÁLNÍ PROTEKCE (PRP)	
tet(M)	<i>Acinetobacter, Actinomyces, Abiotrophia, Aerococcus, Aeromonas, Afipia, Amycolatopsis, Anaerococcus, Arthrobacter, Bacillus, Bacterionema, Bacteroides, Bifidobacterium, Brachybacterium, Catenibacterium, Citrobacter, Clostridium, Corynebacterium, Edwardsiella, Eikenella, Enterobacter, Enterococcus, Erysipelothrix, Escherichia, Eubacterium, Finegoldia, Flavobacterium, Fusobacterium, Gardnerella, Gemella, Granulicatella, Haemophilus, Hafnia, Kingella, Klebsiella, Kurthia, Lactobacillus, Lactococcus, Lawsonia, Listeria, Microbacterium, Mycobacterium, Mycoplasma, Neisseria, Paenibacillus, Paenibacillus, Pantoea, Pasteurella, Peptostreptococcus, Photobacterium, Prevotella, Proteus, Providencia, Pseudoalteromonas, Pseudomonas, Psychrobacter, Ralstonia, Rhanella, Selenomonas, Serratia, Shewanella, Shigella, Sporosarcina, Staphylococcus, Streptococcus, Streptomyces, Ureaplasma, Veillonella, Vibrio</i>
tet(O)	<i>Actinobacillus, Aerococcus, Anaerovibrio, Bifidobacterium, Butyrivibrio, Campylobacter, Citrobacter, Clostridium, Eubacterium, Enterococcus, Fusobacterium, Gemella, Granulicatella, Lactobacillus, Megasphaera, Mobiluncus, Neisseria, Pasteurella, Peptostreptococcus, Psychrobacter, Staphylococcus, Streptococcus</i>
tet(W)	<i>Acidaminococcus, Actinomyces, Arcanobacterium, Bacillus, Bacteroides, Bifidobacterium, Butyrivibrio, Citrobacter, Clostridium, Escherichia, Fusobacterium, Klebsiella, Lactobacillus, Megasphaera, Mitsukella, Neisseria, Porphyromonas, Prevotella, Selenomonas, Staphylococcus, Streptococcus, Streptomyces, Subdolgranulum, Veillonella</i>
tet(Q)	<i>Anaerovibrio, Bacteroides, Capnocytophaga, Clostridium, Eubacterium, Fusobacterium, Gardnerella, Lactobacillus, Mitsukella, Mobiluncus, Neisseria, Peptostreptococcus, Porphyromonas, Prevotella, Selenomonas, Streptococcus, Subdolgranulum, Ruminococcus, Veillonella</i>

Dále se budu ve své rešerši podrobněji věnovat genům *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)* a *tet(W)*, protože se jedná o geny tetracyklinové rezistence běžně se vyskytující v zemědělských půdách a obecně v prostředí ovlivněném lidskou činností (Chee-Sanford *et al.* 2001; Schmitt *et al.* 2006). Tyto determinanty byly také detekovány ve vzorcích půdy z manipulačního mikrokosmového pokusu, který jsme provedli v létě 2011.

Tet(M)

Uvádí se, že tento gen je nejrozšířenější determinantou tetracyklinové rezistence mezi aerobními grampozitivními bakteriemi a gramnegativními neenterickými druhy (Roberts 1996); byl nalezen u 42 rodů (Roberts 2005). Např. u *S. aureus* je *tet(M)* [spolu s *tet(K)*] nejběžnějším genem tetracyklinové rezistence (Bismuth *et al.* 1990; Schmitz *et al.* 2001; Warsa *et al.* 1996; Schwarz *et al.* 1998).

Tato široká škála hostitelů je pravděpodobně způsobeno tím, že *tet(M)* bývá součástí transpozónů a konjugativních transpozónů (které umožňují horizontální přenos genů rezistence); (Burrus *et al.* 2002). Obzvláště u grampozitivních streptokoků a enterokoků

bývá nacházen na konjugativních transpozónech z rodiny Tn916/Tn1545, které patří mezi transpozóny s extrémně širokou škálou hostitelů (Rice 1998).

Je známo, že gen *tet(M)* vykazuje mozaikovou strukturu; např. Oggioni ve své studii porovnal nukleotidové sekvence osmi různých *tet(M)* genů (pocházejících z izolátů *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Ureaplasma urealyticum* a *Neisseria*) a tímto porovnáním odhalil mozaikovou strukturu, kterou tvořily dvě různé alely lišící se o 8 % v nukleotidové sekvenci a mající různý obsah G/C. Tato heterogenita lokusů genu *tet(M)* je způsobeno pravděpodobně homologní rekombinací (Oggioni *et al.* 1996; Doherty *et al.* 2000).

Tet(O)

Je výrazně homologní s genem *tet(M)* u rodu *Streptococcus* a předpokládá se tedy, že tyto dva geny mají společný původ (Taylor 1986). Sougakoff určil nukleotidovou sekvenci genu *tet(O)* na plazmidu pIP1433 izolovaného z *Campylobacter coli* BM2509 a zjistil, že *tet(O)* měl 76% sekvenční shodu s genem *tet(M)* z bakterií *Streptococcus*; sekvence aminokyselin byla homologní ze 77% (Sougakoff *et al.* 1987). Tyto dva geny také byly detekovány společně v izolátech *Streptococcus pneumoniae* (Luna *et Roberts* 1998). Gen *tet(O)* byl nalezen na plazmidech nebo na chromosomu (Batchelor *et al.* 2004).

Tet(Q)

Poprvé byl izolován ze střevních bakterií rodu *Bacteroides* (Nikolich *et al.* 1992), krom tohoto rodu byl nalezen i u bakterií rodu *Prevotella* a *Porphyromonas* (Lacroix *et Walker* 1996; Olsvik *et al.* 1994; Olsvik *et al.* 1993). Obzvláště u rodu *Bacteroides* tato determinanta významně přispívá ke vzrůstající rezistenci vůči tetracyklinu; např. Shoemaker ve své práci uvádí, že za posledních 30 let došlo ke zvýšení výskytu genu *tet(Q)* v rámci rodu *Bacteroides* z 30 % na více než 80 % kmenů. Mezi rody *Prevotella* a *Bacteroides* byl navíc prokázán horizontální přenos tohoto genu na konjugativním transpozónu typu *CTnDOT* (Shoemaker *et al.* 2001). Horizontálního přenosu genu *tet(Q)* se dále účastní konjugativní transpozóny typu *CTnERL* (Valentine *et al.* 1988).

Po translaci poskytuje gen *tet(Q)* bílkovinu složenou z 642 aminokyselin o molekulové hmotnosti 72,5 kDa (Nikolich *et al.* 1992). Vypadá to, že *tet(Q)* vykazuje ribozóm-dependentní GTP-ázovou aktivitu podobně jako determinanta *tet(M)* a *EF-G* (elongační faktor *G*); (Felsenstein 1985).

Tet(W)

Tet(W) je jedním z nejrozšířenějších genů tetracyklinové rezistence v environmentálních vzorcích (Aminov *et al.* 2001; Villedieu *et al.* 2003). Široká škála hostitelů genu *tet(W)* zahrnuje grampozitivní, gramnegativní, aerobní i anaerobní bakterie (Roberts 2005). Tato 1,9 kbp velká determinanta tetracyklinové rezistence byla poprvé identifikována u kmene *Butyrivibrio fibrisolvens* 1.230, kde byla přítomna na velkém chromozomálním elementu (Barbosa *et al.* 1999; Scott *et al.* 1997). *Tet(W)* byl detekován na konjugativních transpozónech (Billington *et al.* 2002; Stanton *et al.* Humphrey 2003; Melville *et al.* 2004).

Tet(W) je mezi ostatními *tet* geny ribozomální protekce unikátní tím, že vykazuje vysoký obsah G+C (53%); to by mohlo naznačovat, že tento gen má původ v bakteriích s vysokým obsahem G+C [např. *Selenomonas* (Stackebrandt *et al.* 1985), *Mitsuokella* (Shah *et al.* Collins 1982)]. S ostatními *tet* geny je *tet(W)* homologní z méně než 65% nukleotidové sekvence; největší míra podobnosti byla zjištěna s genem *tet(O)* ze *Streptococcus pneumoniae* a s *tet(M)* na transpozónu Tn916 z *Enterococcus faecalis* (65% shoda nukleotidové a 68% shoda aminokyselinové sekvence); (Barbosa *et al.* 1999). Dále bylo prokázáno, že *tet(W)* má velkou sekvenční podobnost s translačními elongačními faktory, především na svém N-konci (Taylor *et al.* Chau 1996).

Mozaikové geny tetracyklinové rezistence

Tyto geny jsou deriváty běžných genů rezistence; v takovém mozaikovém genu je jedna jeho část homologní minimálně z 80 % s běžným genem rezistence a další jeho část je homologní s jiným (nebo stejným) genem rezistence. Mozaikové geny jsou tvořeny determinantami rezistence ze skupiny RPP. Bílkovinné produkty některých mozaikových

genů mohou vykazovat vyšší rezistenci na tetracyklin než produkty genů, ze kterých jsou tyto mozaikové struktury složeny (Thaker *et al.* 2010).

Do skupiny mozaikových genů se řadí *tet(O/W)*; (Stanton *et al.* 2003), *tet(O/W/O)*; (Stanton *et al.* 2004), *tet(O/32/O)*, *tet(O/W/32/W/O)*; (Thaker *et al.* 2010) a *tet(S/M)*; (Barile *et al.* 2012).

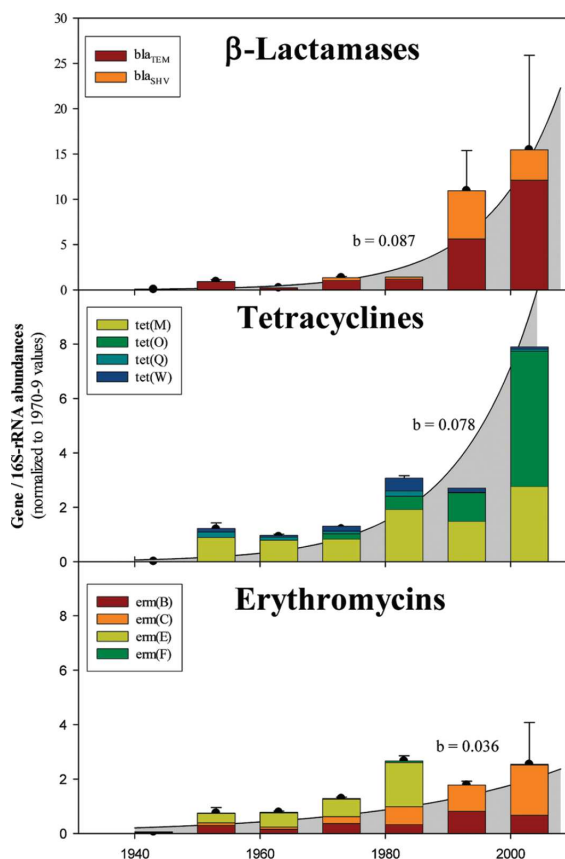
2.2. Šíření rezistence k tetracyklinu v zemědělské půdě jako důsledek hnojení exkrementy od hospodářských zvířat ošetřovaných antibiotiky

Šíření genů rezistence mezi environmentálními bakteriemi představuje v kontextu k léčbě lidských patogenů závažný problém, protože právě bakterie environmentálního původu jsou označovány jako významný zdroj rezistenčních genů u klinických izolátů (Martinez 2009).

Antibiotika jsou již přes 60 let používána v humánní i veterinární medicíně. V průběhu této doby je možné sledovat vzrůstající trend ve zvyšování počtu rezistentních kmenů bakterií (patogenních i benigních) v klinických vzorcích (Martinez 2009). Jedním z faktorů přispívajících k selekci rezistentních bakterií může být používání živočišných odpadů (chlévská mrva, prasečí kejda) od zvířat ošetřovaných antibiotiky ke hnojení zemědělských půd. Půda je tak obohacena o rezidua antibiotik a/nebo samotné geny rezistence, zanesené spolu s fekálními bakteriemi. Studie archivních vzorků půd z různých lokalit v Holandsku z období let 1940 – 2008 ukázala, že množství vybraných osmnácti genů rezistence v půdách významně vzrostla od roku 1940 (viz grafy na Obr. 2); (Knapp *et al.* 2010). Co se týče konkrétně *tet-r* genů, nejrychleji přibývalo v půdách množství genů *tet(M)*, *tet(O)* a *tet(Q)*.

Problematická je i otázka akumulace a perzistence rezistenčních genů v živočišných odpadech a půdě. Alexander ve své práci (Alexander *et al.* 2011) zkoumal účinek aplikace subterapeutických dávek antibiotik hovězímu dobytku v souvislosti s následným výskytem a přetrváváním genů antibiotické rezistence v mikrobiálních společenstvech fekálních bakterií z exkrementů tohoto dobytka. Závěry této studie ukazují, že koncentrace genů rezistence v exkrementech léčeného dobytka se může časem zvyšovat a tyto geny mohou v exkrementech přetrvávat v detekovatelném množství až 175 dnů.

Na Obr. 2 je znázorněno relativní zvýšení množství genů rezistence v půdě na pěti místech Holandska v letech 1940 až 2008.



Obr. 2: Grafy přírůstků rezistenčních genů v půdě (Knapp *et al.* 2010).

Dalším krokem ve výzkumu vlivu hnojení zemědělských půd živočišnými odpady na výskyt a diverzitu genů antibiotické rezistence v půdě jsou mikrokosmové (inkubační/manipulační) pokusy. Schmitt (Schmitt *et al.* 2006) studovala diverzitu *tet-r* (a *sul-r*) genů v půdách hnojených prasečí kejdou (mikrokosmový pokus) a v půdách dlouhodobě nehnojených (dvě polní lokality ve Švýcarsku a Německu). V mikrokosmových vzorcích půdy byl po přidání kejdy zřejmý jasný vzestup počtu *tet-r* genů. Přidání TC do mikrokosmových vzorků mělo jen malý aditivní vliv na změnu diverzity *tet-r* genů. Do půdy v mikrokosmech byly z prasečí kejdy zaneseny geny *tet(Y)*, *tet(S)*, *tet(C)*, *tet(Q)* a *tet(H)*.

Studii zabývající se problematikou výskytu genů antibiotické rezistence v živočišných odpadech a zemědělské půdě publikovala dále např. Smalla (Smalla *et al.* 2000). V této práci byly z prasečí kejdy jako zdroje donorů bakteriálních plazmidů metodou exogenní izolace zachyceny plazmidy nesoucí geny antibiotické rezistence. Pro záchyt plazmidů byly použity laboratorní kmeny recipientů *Escherichia coli* CV601 a *Pseudomonas putida* UWC1. V *P. putida* UWC1 transkojugantech byly detekovány plazmidy z inkompatibilní skupiny IncQ. Byly objeveny čtyři různé profily antibiotické multirezistence nesené IncQ

plazmidy. Záchyt IncQ plazmidů kojugačním experimentem poukazuje nejenom na vysoký výskyt těchto plazmidů v prasečí kejďě, ale i na přítomnost dostatečného množství mobilizujících plazmidů. Dále byla provedena amplifikace celkové DNA izolované přímo z různých vzorků živočišných exkrementů, odpadů a zemědělské půdy, která odhalila vysoký výskyt IncQ plazmidů v těchto prostředích. Hlavní význam této studie tkví ve zjištění, že IncQ plazmidy mohou hrát významnou roli v rozšiřování antibiotických rezistencí, protože se tyto plazmidy hojně vyskytují v živočišných odpadech a dalších prostředích, mají BHR a často nesou různé kombinace genů rezistence (multirezistence).

Podobným tématem jako výše uvedené studie se zabývala bakalářská práce mojí kolegyně Petry Havlíčkové (Havlíčková 2011). Cílem této práce bylo detekovat pomocí PCR *tet-r* geny v modelovém pokusu sledujícím přenos *tet-r* genů z exkrementu skotu léčeného tetracyklinovými antibiotiky do půdy a ověřit zda *tet-r* geny fekálního bakteriálního společenstva obohatily rezistom bakteriálního společenstva půd. Exkrement skotu byl do půdních vzorků přidáván opakovaně. Detekce *tet-r* genů byla provedena po třech týdnech od posledního přidání exkrementu do půdy. Slabinou tohoto pokusu byla skutečnost, že nebylo možné zjistit, zda detekované *tet-r* geny pocházely od přeživších fekálních bakterií nebo zda opravdu došlo k HGT těchto genů do půdních bakterií.

Z šesti *tet-r* genů detekovaných v exkrementech se do půdy nepřenášel (v detekovatelném množství) pouze jeden gen. Dále bylo zjištěno, že tetracyklinový rezistom půdních vzorků byl významně obohacen *tet-r* geny fekálního bakteriálního společenstva. Rozdíl mezi přenosem genů z exkrementu léčeného a neléčeného zvířete do půdy byl minimální, autorka proto vyvodila závěr, že rezidua tetracyklinových antibiotik v exkrementu měla zanedbatelný vliv na rezistom bakteriálního společenstva exkrementy obohacených půd. Autorka dále uvádí, že tento minimální rozdíl mezi přenosem genů z exkrementu léčeného a neléčeného zvířete do půdy lze vysvětlit získáním rezistenčních genů kontrolním zvířetem v důsledku předchozí léčby tetracyklinovými antibiotiky v průběhu života.

Jak již bylo zmíněno výše – detekce *tet-r* genů proběhla už po třech týdnech od posledního přidání exkrementů do půdy, proto není jisté, zda skutečně došlo k HGT *tet-r* genů mezi fekálními bakteriemi a bakteriemi v půdě. Na tuto otázku měl lépe odpovědět „nový“ inkubační pokus provedený naší laboratoří v létě 2011 (viz Úvod a cíle práce). V tomto pokusu jsme *tet-r* geny detekovali až po třech měsících – byla tedy menší pravděpodobnost, že fekální bakterie přežily (přežití fekální mikroflóry v půdě po dobu tří

měsíců je nepravděpodobné), a podstatně se zvýšila šance, že došlo k HGT *tet-r* do půdních bakterií (Kyselková *et al.*, nepublikováno).

Nicméně, existují důkazy, které mohou svědčit o HGT přenosu *tet-r* genů: detekce stejných genů rezistence i u nepříbuzných bakterií (Roberts 2005), detekce stejných genů rezistence u bakterií z různých prostředí (klinické izoláty humánní a veterinární, půdní bakterie, atd.). Aplikace živočišných odpadů do zemědělské půdy může tedy hrát významnou roli při rozšiřování genů tetracyklinové rezistence mechanismy horizontálního genového přenosu v životním prostředí. Bakterie environmentálního původu mohou tyto *tet-r* geny předávat pomocí HGT dále a tím přispívat ke vzniku rezistentních patogenních bakterií. Zvyšující se množství *tet-r* genů v prostředí tak může mít přímý (negativní) vliv na léčbu nemocí způsobených lidskými patogeny (Martinez 2009).

Ve své literární rešerši se dále budu věnovat mechanismům HGT přenosu *tet-r* genů mezi bakteriemi v prostředí a elementům, které se tohoto přenosu účastní.

2.3 Bakteriální mobilní genetické elementy

Mobilní genetické elementy je možné zařadit do dvou hlavních skupin: elementy schopné se přemisťovat z jedné bakteriální buňky do druhé (intercelulární přenos) a elementy, které se mohou pohybovat z jednoho místa genomu na druhé v rámci jedné a té samé buňky (intracelulární přenos).

Do první skupiny patří plazmidy a konjugativní transpozóny, které se přemisťují z jedné buňky do druhé procesem zahrnujícím replikaci; do druhé skupiny je možné počítat transpozóny, genové kazety a ISCR („insertion sequences with common regions“) elementy. Elementy z druhé skupiny se pohybují v rámci jedné molekuly DNA nebo mezi různými molekulami dějem spojeným s rekombinací, která může (a nemusí) v sobě zahrnovat replikaci (Bennett 2005).

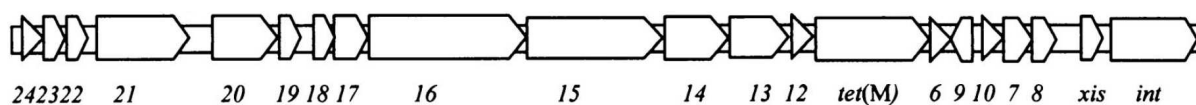
2.3.1 Transpozóny

Transpozóny patří do skupiny mobilních genetických elementů zvaných transpozibilní genetické elementy [spolu s IS („insertion sequence“) elementy a některými bakteriofágy]

(Bennett 2004). Mohou mít různé formy odlišující se od sebe strukturou, genetickou příbuzností a mechanismem transpozice. Tyto elementy mají schopnost se přemisťovat v rámci jedné a té samé molekuly DNA i mezi různými molekulami (např. z jednoho plazmidu na druhý, z plazmidu na bakteriální chromozom apod.). Pohybují se intra- i intercelulárně.

Při přenosu antibiotické rezistence mezi bakteriemi hrají významnou roli tzv. konjugativní transpozóny (conjugative transposons, CTns; viz Tab. II), které je možné nalézt mezi mnoha klinicky významnými skupinami bakterií, včetně gram pozitivních koků a *Bacteroides* spp. (Clewel *et al.* 1995). Jedná se o jasně ohraničené DNA elementy, které jsou po většinu času součástí bakteriálního chromozomu (Bedzyk *et al.* 1992); kombinují v sobě charakteristiku transpozónů, plazmidů a bakteriofágů zároveň.

Na Obr. 3 je schématicky znázorněna struktura transpozónu Tn916 nesoucího gen rezistence *tet(M)*.



Obr. 3: Transpozón Tn916 (Roberts *et al.* 2001; čísla ORFs podle Flannagana *et al.* 1994, viz Tab. III).

V Tab. III je uvedeno 24 potenciálních ORFs transpozónu Tn916 a jejich předpokládané bílkovinné produkty.

Tab. III: ORFs a bílkoviny transpozónu Tn916 (Flannagana *et al.* 1994).

ORF ^a	Velikost ^b	Hmotnost ^c	ORF ^a	Velikost ^b	Hmotnost ^c
1 <i>xis-Tn</i>	67	8,1	13	310	35,7
2 <i>int-Tn</i>	405	47,1	14	333	36,8
3	361	41,7	15	754	84,9
4	324	37,6	16	815	93,7
5	83	9,1	17	168	19,1
6	62	7,4	18	165	19,1
7	157	18,4	19	73	8,1
8	76	8,9	20	329	39,1
9	117	13,5	21	461	53,4

10	23	2,9	22	128	14,4
11 <i>tet(M)</i>	639	72,5	23	104	11,9
12 <i>tet(M)</i> leader	28	3,4	24	39	4,6

^a Pokud byla determinanta pojmenována, je její označení uvedeno vedle čísla ORF.

^b Velikost bílkovin je vyjádřena v počtu aminokyselin.

^c Molekulová hmotnost bílkovin je uvedena v kilodaltonech (kDa).

Konjugativní transpozóny jsou podobné ostatním transpozónům ve smyslu svojí excize a následného začlenění se do molekuly DNA. Tyto dva děje však probíhají odlišně než např. u dobře prostudovaných transpozónů Tn5 a Tn10 (Bedzyk *et al.* 1992). Konjugativní transpozóny se podobají plazmidům, protože se přenášejí procesem konjugace a v průběhu této konjugace vytvářejí kovaletně uzavřený kruhový intermediát (Scott *et al.* 1988). Co se týče podobnosti s bakteriofágy, konjugativní transpozóny sice netvoří virové částice, nicméně se bakteriofágům podobají svojí excizí a integrací do hostitelské molekuly DNA; sekvenční analýzy integráz některých konjugativních transpozónů naznačují, že tyto integrázy patří do rodiny lambda integráz (Poyart-Salmeron *et al.* 1990).

Transpozóny nesoucí geny rezistence mají schopnost začlenit určitý gen rezistence do plazmidu nebo bakteriálního chromozomu. Pro tento děj (tzv. transpozici) není bezpodmínečně nutná stejnorodost nukleotidových sekvencí transpozónu a místa, do kterého se tento element vloží. Jsou ovšem popsány případy, kdy určitý transpozón upřednostňuje pro svoji transpozici specifickou sekvenci DNA (Craig 1997).

V Tab. II jsou uvedeny některé konjugativní transpozóny z rodiny Tn916 nesoucí rezistenci k tetracyklinu.

Tab. II: Konjugativní transpozóny z rodiny Tn916.

Označení transpozónu	Typ rezistence	Velikost (kb)	Původ	Citace
Tn916	Tcr	18	<i>Enterococcus faecalis</i>	Franke <i>et</i> Clewell 1981
Tn918	Tcr	16	<i>Enterococcus faecalis</i>	Clewell 1990
Tn919	Tcr	15,4	<i>Streptococcus sanguis</i>	Fitzgerald <i>et</i> Clewell 1985
Tn920	Tcr	23	<i>Enterococcus faecalis</i>	Murray <i>et al.</i> 1988
Tn925	Tcr	18	<i>Enterococcus faecalis</i>	Christie <i>et al.</i> 1987
Tn1545	Emr, Kmr, Tcr	25,4	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Courvalin <i>et</i> Carlier 1987
Tn3702	Tcr	18	<i>Enterococcus faecalis</i>	Horraud <i>et al.</i> 1990

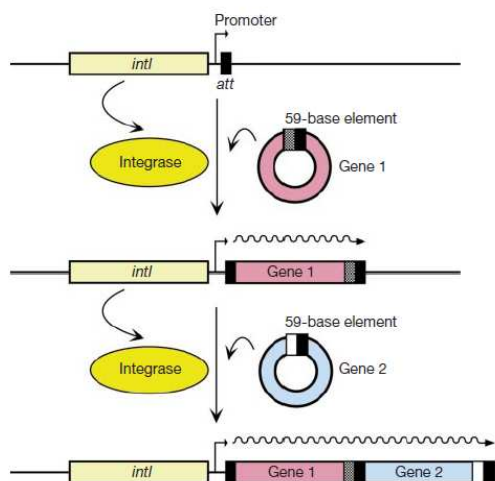
Tn3703	Emr, Tcr	19,7	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Horaud <i>et al.</i> 1990
Tn3704	Emr, Tcr	20,3	<i>Streptococcus anginosus</i>	Horaud <i>et al.</i> 1990
Tn5251	Tcr	18	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ayoubi <i>et al.</i> 1991
Tn5381	Tcr	18	<i>Enterococcus faecalis</i>	Rice <i>et al.</i> 1992
Tn5383	Tcr	18	<i>Enterococcus faecalis</i>	Rice <i>et al.</i> 1992
Tn5397	Tcr	> 10,4	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Mullany <i>et al.</i> 1996

2.3.2 Integrony

Integrony patří mezi elementy schopné rozpoznat a zachytit specifické sekvence genetické informace. Strukturně se skládají z genu kódujícího enzym integrázu (*int*), genových kazet a integračního místa pro genové kazety (*att*). Integráza zajišťuje vyříznutí a začlenění genových kazet z a do integronu, ale integrony samy o sobě nejsou mobilní. Genové kazety nemusí nutně být součástí integronu.

Jsou známy dvě skupiny integronů: integrony pro rezistenci (RI) a superintegrony (SI). Téměř všechny známé genové kazety pocházející z integronů pro rezistenci kódují rezistence proti nejrůznějším druhům antibiotik a dezinfekčních prostředků. Tyto integrony se nacházejí na plazmidech, transpozónech a bakteriálních chromozomech. Superintegrony bývají umístěny na bakteriálních chromozomech a často obsahují více než 100 genových kazet (na rozdíl od RI, kde bývá přítomno obvykle méně než 10 kazet), které mohou kódovat v bakteriální buňce široké spektrum funkcí.

Na Obr. 4 je znázorněno zachycení genu integronem a jeho exprese.



Obr. 4: Zachycení genu integronem (Ochman *et al.* 2000).

2.3.3 Bakteriální plazmidy

Plazmidy jsou u bakterií významným zdrojem genů antibiotické rezistence (Roberts 1996). Je možné je charakterizovat jako malé, autonomní genetické elementy tvořené kruhovou nadšroubovicovou (ccc) (Obr. 5) nebo lineární dvoušroubovicovou DNA, v některých případech s kovalentně uzavřenými konci (Kinashi *et al.* 1987; Barbour *et al.* 1987). Obecně se dá říci, že v buňce přetrvávají odděleně od hlavního bakteriálního chromozomu a jejich replikace probíhá fyzicky nezávisle na něm; nicméně většina dějů nutných pro tuto replikaci je zajišťována hostitelskou buňkou.

Plazmidy neobsahují geny nutné pro základní buněčné funkce a buněčné dělení, mohou ale nést geny umožňující přežívání (a příp. dělení) buňky v potenciálně nepřátelském prostředí – např. v přítomnosti antibiotik, dezinfekčních prostředků a toxických těžkých kovů (měď, kadmium, stříbro). Společné umístění genů kódujících rezistence na různá antibiotika na jednom mobilním elementu může vést ke vzniku multirezistentních kmenů bakterií (Szczepanowski *et al.* 2004). Plazmidy dále často poskytují geny kódující enzymy, které dovolují buněčnému energetickému metabolismu štěpení alternativních zdrojů živin, determinanty virulence, které umožňují bakteriím pronikání do nových životních prostředí (Hinnebusch *et al.* 2002; Lathem *et al.* 2007), příp. geny způsobující lepší fungování DNA reparačních mechanismů (Stanisich 1988).

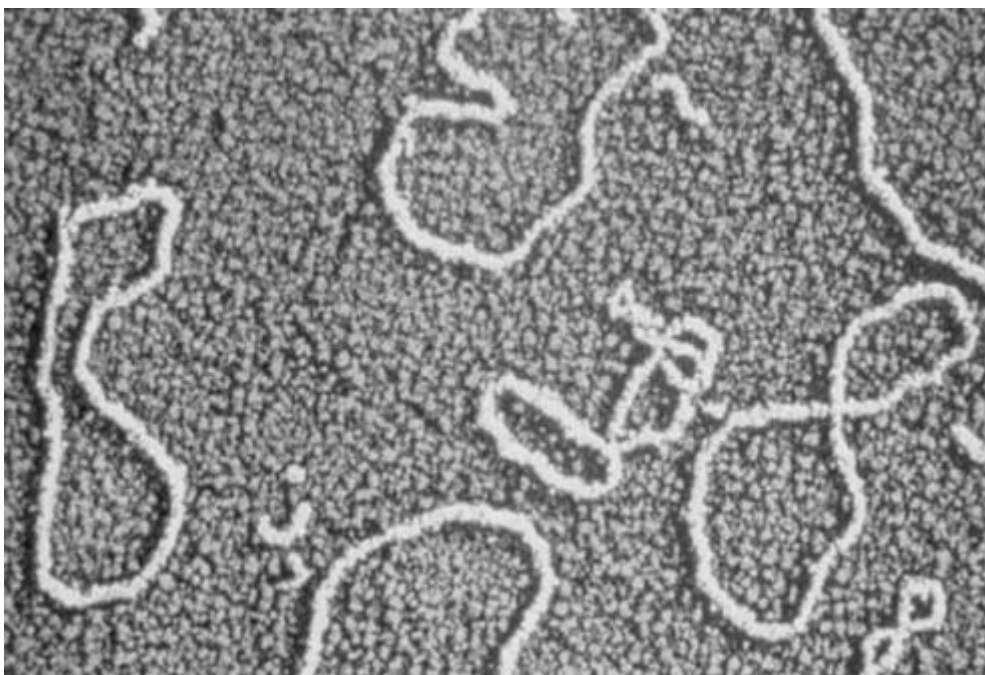
Plazmidy nesoucí geny rezistence bývají dvojího typu – tzv. konjugativní nebo mobilizovatelné plazmidy. Geny konjugativních plazmidů kódují struktury nutné pro přenos

plazmidové DNA z jedné buňky (dárce) do druhé buňky (příjemce). Mobilizovatelné plazmidy naproti tomu takovéto geny nemají. Vyskytují se v buňkách spolu s konjugativními plazmidy, které jim poskytují vše potřebné pro přesun jejich vlastní DNA do jiných buněk. Z výše uvedeného vyplývá, že konjugativní plazmidy bývají větší (30 kbp a více) než mobilizovatelné plazmidy (často méně než 10 kbp). Konjugativní plazmidy v grampozitivních bakteriích jsou menší než v gramnegativních; důvodem je odlišný mechanismus vzniku buněčného spojení při přenosu DNA (Bennett 2005). Konjugace je replikativní děj, jehož výsledkem je určitý počet kopií plazmidu v buňce dárcovské i recipientní (Wilkins 1995).

Transmisibilita plazmidů je závislá na přímém kontaktu bakteriálních buněk a na jejich fyzickém propojení při procesu konjugace; plazmidy přecházejí jako molekuly DNA a na rozdíl od např. bakteriofágů nikdy nevytvářejí bílkovinné obaly, které by jim umožňovaly existenci i mimo buňku bakterií [výjimkou může být intenzivně studovaný „plazmid“ P1 (*IncY*), což je ale nejspíše bakteriofág přizpůsobený k dlouhodobé existenci ve formě volné DNA v buňce (Łobocka *et al.* 2004)].

Systém a nomenklatura plazmidů jsou založeny zejména na tzv. inkompatibilitě plazmidů; tato inkompatibilita je těsně spjata s rovnovážným počtem plazmidů na jednu bakteriální buňku (tzv. „copy number,“ c. n.). Tento počet je charakteristický pro každou skupinu plazmidů. U velkých plazmidů je c. n. často jen 1 - 2, u malých plazmidů i několik desítek či stovek. Soubor plazmidů patřících do určité inkompatibilní skupiny v bakterii vyprodukuje takovou koncentraci represoru replikace, která zabrání jim i další skupině (nebo skupinám) plazmidů s týmž replikátorem (t.j. na který působí represor replikace) množit se, dokud se buňka nerozdělí. Nová skupina plazmidů je tím z populace vytěsněna, pokud nenese gen (či geny), který hostitelskou bakterii v daném prostředí nějakým způsobem zvýhodňuje; v tom případě naopak vytěsní původní plazmidy.

Na Obr. 5 je snímek malého bakteriálního plazmidu z elektronového mikroskopu.



Obr. 5: Bakteriální plazmid (Bennett 2008).

Dále se budu věnovat plazmidům, které často přenášejí determinanty rezistence k antibiotikům a jsou charakteristické širokým spektrem hostitelů (BHR, „broad-host-range plasmids“). BHR plazmidy se mohou přenášet i mezi fylogeneticky velmi vzdálenými druhy bakterií žijícími v nejrůznějších habitatech (Schlüter *et al.* 2007). V souvislosti s rezistencemi k antibiotikům (včetně tetracyklinu) jsou nejčastěji zmiňovány tyto inkompatibilních skupiny plazmidů: *IncF*, *IncHI*, *IncP-1*, *IncP-9*, *IncQ*, *IncU*, *IncW*, *LowGC*.

V Tab. IV jsou uvedeny vybrané BHR plazmidy nesoucí geny rezistence na tetracyklin.

Tab. IV: BHR plazmidy.

Plazmid	Skupina	Velikost [kbp]	Hostitel	Citace
pFBAOT6	IncU	85	<i>Aeromonas caviae</i>	Rhodes <i>et al.</i> 2004
pHH1107	LowGC	58	<i>Acinetobacter</i> spp.*	Heuer <i>et al.</i> 2009
pHHV216	LowGC	58	<i>Acinetobacter</i> spp.*	Heuer <i>et al.</i> 2009
pIE1069	IncN	58	<i>E. coli</i>	Götz <i>et al.</i> 1996
pIE1072	IncN	106	<i>E. coli</i>	Götz <i>et al.</i> 1996
pIE1093	IncN	39	<i>E. coli</i>	Götz <i>et al.</i> 1996
pIE1096	IncN	36	<i>E. coli</i>	Götz <i>et al.</i> 1996

pIE1100	IncN	45	<i>E. coli</i>	Götz <i>et al.</i> 1996
pIE319	IncN	39	<i>Shigella sonnei</i>	Götz <i>et al.</i> 1996
pIE322	IncN	45	<i>E. coli</i>	Götz <i>et al.</i> 1996
pIE331	IncN	52	<i>Salmonella dublin</i>	Götz <i>et al.</i> 1996
pIE393	IncN	39	<i>Shigella sonnei</i>	Götz <i>et al.</i> 1996
pIE465	IncN	42	<i>Shigella sonnei</i>	Götz <i>et al.</i> 1996
pIE500	IncN	45	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Götz <i>et al.</i> 1996
pIE601	IncN	38	<i>Shigella flexneri</i>	Götz <i>et al.</i> 1996
pIE765	IncN	45	<i>Salmonella typhimurium</i>	Götz <i>et al.</i> 1996
pM3	IncP-9	75	<i>Pseudomonas putida</i>	Krasowiak <i>et al.</i> 2002
pM77	IncP-9	75	<i>Paracoccus</i> spp.	Krasowiak <i>et al.</i> 2002
pM80	IncP-9	75	<i>Paracoccus</i> spp.	Krasowiak <i>et al.</i> 2002
pIE1120	IncQ α	9	γ -proteobacteria	Sakai <i>et al.</i> Komano 1996
pIE1101	IncN	45	Neznámý	Götz <i>et al.</i> 1996
pRSB107	IncFI	121	<i>Enterobacteriaceae</i>	Szczepanowski <i>et al.</i> 2005
NR1/R100	IncFII	95	<i>Shigella flexneri</i>	Womble <i>et al.</i> Rownd 1988
pIE1105	IncW	30	<i>Salmonella dublin</i>	Götz <i>et al.</i> 1996
pIE321	IncW	38	<i>Salmonella enterica</i>	Götz <i>et al.</i> 1996
R478	IncHI	275	<i>Serratia marcescens</i>	Gilmour <i>et al.</i> 2004
pTB11	IncP-1 α	69	Neznámý	Tennstedt <i>et al.</i> 2005
pB2	IncP-1 β	61	Neznámý	Heuer <i>et al.</i> 2004
pB3	IncP-1 β	56	Neznámý	Heuer <i>et al.</i> 2004
pB10	IncP-1 β	65	Neznámý	Schlüter <i>et al.</i> 2003
pKJK5	IncP-1 ϵ	54	Neznámý	Bahl <i>et al.</i> 2007
pHHV35	LowGC	59	<i>Acinetobacter</i> spp.*	Heuer <i>et al.</i> 2009

* předpokládaný hostitel (Heuer *et al.* 2009)

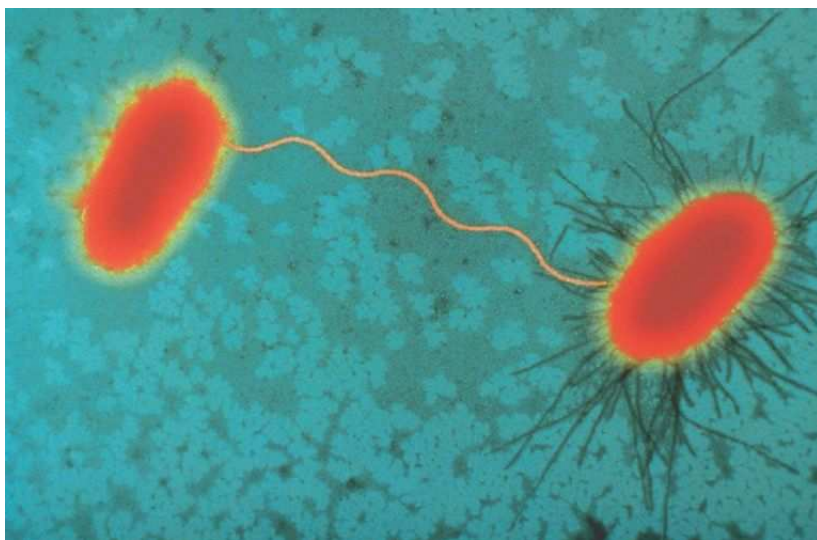
IncF plazmidy

Plazmidy patřící do inkompatibilní skupiny IncF jsou charakteristické tím, že poskytují svým hostitelům neobyčejně široké spektrum výhodných vlastností; přenášejí např. geny antibiotických rezistencí (Womble *et al.* Rownd 1988), kódují faktory virulence (Herrero *et al.* 1988), nebo geny pro produkci bakteriálního toxinu kolicínu (Spiers *et al.* 1993). Tyto plazmidy mají také schopnost se velice rychle vyvíjet (Johnson *et al.* Nolan 2009).

IncF plazmidy se dělí do šesti podskupin: IncFI – IncFVI (Saadi *et al.* 1987). Prototypovým plazmidem této skupiny je fertility faktor F z bakterie *Escherichia coli* (Perez-Casal *et al.* 1989). Mezi kmeny *E. coli* jsou tyto plazmidy obzvláště hojně rozšířeny (Johnson *et al.* Nolan 2009).

Závažným problémem se stává šíření multirezistentních kmenů bakterií rodu *Enterobacteriaceae* v nemocničním prostředí; významnými přenašeči genů antibiotických rezistencí mezi těmito bakteriemi jsou právě IncF plazmidy (Dolejska *et al.* 2012).

Na Obr. 6 je znázorněna konjugace dvou buněk *E. coli*, při které jedna buňka předává druhé skrze sex pilus plazmid fertility faktor F.



Obr. 6: Bakteriální konjugace (<http://www.nicerweb.com>, listopad 2012).

IncHI plazmidy

IncH plazmidy zahrnují dvě skupiny – IncHI a IncHII; toto rozdělení je založené na podobné struktuře jejich H-pilu (povrchová struktura sloužící ke konjugaci); (Taylor *et* Grant 1977). Na základě dalšího zkoumání (štěpení restričními enzymy, DNA-DNA hybridizace apod.) byly vytvořeny tři podskupiny pro IncHI plazmidy: IncHI1, IncHI2 a IncHI3 (Whiteley *et* Taylor 1983).

Všechny IncH plazmidy mají velikost 150 kb nebo větší a všechny jsou citlivé na teplotu, při které probíhá jejich konjugativní přenos (Taylor *et* Levine 1980). Plazmidy z podskupiny IncHI1 mají optimální teplotu pro přenos 22 °C – 30 °C, proto se dá předpokládat, že tyto plazmidy jsou potenciálním vektorem pro přenos genů mezi bakteriemi

v prostředí (půda, voda, ...); (Maher *et al.* 1993).

IncP-1 plazmidy

Plazmidy náležící do inkompatibilní skupiny IncP-1 patří mezi plazmidy s širokým spektrem hostitelů, V současnosti jsou považovány za nejvíce promiskuitní skupinu plazmidů a mezi BHR plazmidy jsou nejvíce prostudovány (Schlüter *et al.* 2007).

V kontextu k rezistencím na antibiotika budí tyto mobilní genetické elementy velkou pozornost, protože mohou šířit antibiotické rezistence napříč bakteriálními taxony a tím přispívají k selekci rezistentních kmenů bakterií v přírodním prostředí i klinickým podmínkách (Thomas 2000). Dalším významným rysem je jejich schopnost mobilizovat mobilizovatelné plazmidy, které mohou také přenášet antibiotické rezistence (Top *et al.* 1994; Boon *et al.* 2001). IncP-1 plazmidy často obsahují nejenom geny antibiotické rezistence, ale i geny rezistence na těžké kovy a geny kódující enzymy účastníci se biodegradace organických sloučenin obsahujících atomy chloru (obsažených např. v některých dezinfekčních prostředcích); (Schlüter *et al.* 2007).

V současnosti se na základě fylogenetické příbuznosti rozdělují IncP-1 plazmidy do pěti podskupin: α (Pansegrau *et al.* 1994), β (Thorsted *et al.* 1998), γ (Haines *et al.* 2006; Hill *et al.* 1992), δ (Vedler *et al.* 2004), ϵ (Bahl *et al.* 2007), ζ (Norberg *et al.* 2011). Hlavním genetickým markerem pro zařazení do příslušné podskupiny je gen *trfA* (Bahl *et al.* 2007; Haines *et al.* 2006; Vedler *et al.* 2004). Tento gen kóduje bílkovinu TrfA, která hraje důležitou roli při zahájení replikace plazmidové DNA.

IncP-1 plazmidy vykazují modulární strukturu; mezi hlavní moduly jsou začleněny přídatné genetické elementy, které mohou nést mimo jiné i geny rezistence na antibiotika a těžké kovy. Těmito přídatnými genetickými elementy často bývají transpozóny z rodiny Tn402 nesoucí na sobě integrony třídy 1 („class 1 integrons“). Hlavní moduly pak zajišťují replikaci plazmidů a funkce nutné k udržení se plazmidů v hostitelských buňkách (Schlüter *et al.* 2007).

IncP-9 plazmidy

Plazmidy patřící do skupiny IncP-9 byly nejčastěji detekovány v izolátech bakterií z rodu *Pseudomonas*. Tyto izoláty pocházely z kontaminované půdy, proto se má za to, že IncP-9 plazmidy hrají významnou roli v adaptaci bakterií rodu *Pseudomonas* na znečištěné životního prostředí. Co se týče škály hostitelů IncP-9 plazmidů, nebyl zjištěn genový transfer mimo bakterie rodu *Pseudomonas* (Krasowiak *et al.* 2002).

Oproti IncP-1 plazmidům jsou plazmidy z inkompatibilní skupiny IncP-9 mnohem méně prostudovány. Na základě sekvencí genů *oriV* a *rep* bylo vytvořeno devět podskupin. Překvapivé je, že v sekvenci genu *rep* se jednotlivé IncP-9 plazmidy mezi sebou liší v pouze sedmi procentech – např. u IncP-1 plazmidů je to 22 – 29 procent. Sevastysyanovich provedla hybridizační experimenty, z jejichž výsledků vyvozuje, že některé IncP-9 plazmidy mohly vzniknout rekombinací mezi různými IncP-9 replikony (Sevastysyanovich *et al.* 2008).

IncQ plazmidy

IncQ plazmidy jsou relativně malé, mobilizovatelné plazmidy s extrémně širokým spektrem bakteriálních hostitelů (gramnegativní i grampozitivní bakterie); (Gormley *et Davis* 1991). Tyto plazmidy mohou být účinně mobilizovány především plazmidy z inkompatibilních skupin IncP, IncI α , IncM a IncX (Guiney 1993). IncQ plazmidy dělí na dvě podskupiny – IncQ α (plazmidy typu RSF1010) a IncQ β (plazmidy typu pIE1107). Smalla objevila odlišný plazmid pIE1130, který nepatří do IncQ α ani do IncQ β podskupiny; ve své publikaci navrhuje, aby byla vytvořena další podskupina IncQ α , do které by tento plazmid patřil (Smalla *et al.* 2000).

Protože se IncQ plazmidy vyskytují ve velkém množství v nejrůznějších přírodních nikách, mají široké spektrum hostitelů (Frey *et Bagdasarian* 1989) a přenášejí různé kombinace genů rezistence, jsou považovány za významné elementy horizontálního přenosu antibiotických rezistencí (Smalla *et al.* 2000).

IncU plazmidy

Tato skupina plazmidů je častá zejména mezi tetracyklin rezistentními kmeny bakterií rodu *Aeromonas*. Jednotlivé IncU plazmidy jsou si navzájem velice příbuzné a mají společnou kostru (genetický základ); (Adams *et al.* 1998; Rhodes *et al.* 2000; Sorum *et al.* 2003), je možné je rozdělit do dvou skupin: pASOT skupina (Adams *et al.* 1998) a pFBAOT skupina (Rhodes *et al.* 2000). Na mnoha těchto plazmidech byly detekovány transpozóny z rodiny Tn1721, které nesly determinantu rezistence k tetracyklinu *tet(A)* a často i integrony třídy 1 (Rhodes *et al.* 2004).

IncW plazmidy

Tato skupina plazmidů dostala své označení podle T. Watanabeho, který popsal první plazmid tohoto typu, pSa (Watanabe *et al.* 1968). IncW plazmidy jsou mobilizovatelné a mají jeden z nejmenších genomů mezi plazmidy, které byly dosud studovány; např. genom plazmidu R388 obsahuje pouze 33 926 bp (Datta *et Hedges* 1972).

IncW plazmidy jsou nacházeny v mnoha druzích bakterií, proto jsou považovány za plazmidy s širokým spektrem hostitelů (BHR); (Fernandez-Lopez *et al.* 2006).

LowGC plazmidy

LowGC plazmidy byly objeveny na základě zkoumání vlivu veterinárních léků na přenos antibiotických rezistencí ze zvířecích exkrementů do půdy. Sekvenováním tří plazmidů z této skupiny - pHHV35, pHHV216, pHH1107 – byl zjištěn neobvykle nízký obsah G+C nukleotidů, v průměru 36 procent. Další analýza sekvencí odhalila společnou, vysoce konzervovanou kostru (geny pro replikaci a přenos plazmidů) a doplňkové genetické moduly, které kódují rezistence k antibiotikům. LowGC plazmidy se mezi sebou liší především těmito moduly (Heuer *et al.* 2009).

Heuer vytvořil PCR primery pro detekci této skupiny plazmidů; pomocí real-time PCR následně zjistil velkou četnost těchto plazmidů v půdních vzorcích. Z tohoto vyvozuje, že LowGC plazmidy hrají významnou roli při šíření antibiotických rezistencí mezi půdními

bakteriemi. Na základě několika nepřímých důkazů dále tento autor předpokládá, že přirozenými hostiteli LowGC plazmidů jsou bakterie rodu *Acinetobacter* (Heuer *et al.* 2009).

2.4 Horizontální přenos plazmidů mezi půdními bakteriemi

Ze studia dostupné literatury jsem zjistil, že pouze přibližně třetina publikací (které jsem nashromáždil a přečetl) zabývajících se přenosem *tet-r* genů pomocí MGE vychází ze studia klinických vzorků (humánních a/nebo veterinárních).

Existují mnohé studie, které naznačují, že k horizontálnímu genovému přenosu dochází v půdním prostředí s nižší frekvencí než v laboratorních podmínkách při konjugačních pokusech (Smets *et al.* 2003). Nepříznivým faktorem je omezené spektrum živin v půdě, což u mnohých bakterií způsobuje nižší metabolickou aktivitu (Heuer *et Smalla* 2012).

V půdě mohou horizontálnímu přenosu napomáhat faktory jako např. tvorba půdních agregátů, vznik biofilmů (Molin *et Tolker-Nielsen* 2003) a vysoká hustota bakteriálních buněk v jednotlivých mikrokoloniích. Navíc existují studie dokládající přítomnost plazmidů v bakteriálních izolátech z prostředí půdní rhizosféry (van Elsas *et al.* 1998). Dalšími možnými „hot spots“ (místy se zvýšenou frekvencí HGT) může být rozkládající se organická hmota, trávicí trakt půdních členovců, hlístic a žížal (van Elsas *et al.* 2003; Thimm *et al.* 2001), živočišné odpady ze zemědělství (hnůj); (Binh *et al.* 2008).

Např. Heuer ve své práci (Heuer *et Smalla* 2007) zkoumal v mikrokosmovém pokusu vliv aplikace prasečích exkrementů obsahujících SDZ (sulfadiazin) do půdy na frekvenci HGT mezi půdními bakteriemi a laboratorním recipientním kmenem. Výsledky tohoto experimentu potvrdily zvýšený přenos plazmidů nesoucích SDZ rezistenci mezi půdními bakteriemi a recipientním kmenem *E. coli* po aplikaci prasečí kejdy. Přítomnost antibiotika a zároveň i velké množství živin v substrátu významným způsobem zvýšily horizontální genový přenos mezi bakteriemi.

Je možno usuzovat, že podobně tomu bude i v případě HGT genů tetracyklinových rezistencí, ale na rozdíl od sulfonamidů (SDZ apod.) se tetracyklinová antibiotika (tetracyklin, chlortetracyklin, oxytetracyklin) poměrně pevně vážou na půdní částice (Krapac

et al. 2004) a jejich vliv na půdní mikroflóru je diskutabilní (Kyselková *et al.*, osobní komunikace).

Jen málo dostupných ekologických studií zabývajících se problémem antibiotických rezistencí a jejich přenosem do prostředí řeší konkrétně rezistenci na tetracyklin. Autoři environmentálních studií s tematikou tetracyklinové rezistence často zkoumají diverzitu a procentuální zastoupení *tet-r* genů v nejrůznějších [často i obskurních, např. mořská houba *Haliclona simulans* (Phelan *et al.* 2010)] prostředích, jen velmi málo z nich však sleduje výskyt (příp. přenos) plazmidů nesoucích tyto rezistenční geny. Pokud některý autor plazmidy detekuje, většinou je již blíže necharakterizuje a neidentifikuje, jaké konkrétní *tet-r* geny tyto plazmidy nesou.

Často autoři uvádějí, že se jim podařilo izolovat plazmidy o určité velikosti a frekvenci přenosu na pevném nebo v tekutém médiu, a z tohoto vyvozují, o jaké plazmidy by se mohlo jednat. Např. Anderson ve své komparativní studii (Anderson *et al.* 2008) detekoval v exkrementech préríjních bizonů a pastevního skotu přítomnost konjugativních plazmidů (autor usuzuje, že se jedná o konjugativní plazmidy na základě frekvence přenosu do recipienta *Enterococcus faecalis* OG1RF) nesoucích gen *tet(O)*, bližší identifikace (např. některými/dalšími metodami molekulární biologie) však chybí. Podobně Agersø (Agersø *et Sandvang* 2005) popisuje výskyt plazmidů o velikosti cca 30 kbp nesoucích *tet-r* geny [*tet(C)* a *tet(A)*] v bakteriích z prasečí kejdy a půdy jí hnojené; opět chybí zařazení do konkrétní inkompatibilní skupiny.

Co se týče laboratorních (mikrokosmových) a polních pokusů, přenos *tet-r* genů horizontálním genovým přenosem z fekálních izolátů do půdních nebyl dosud přímo prokázán. Konkrétně není známo, mezi kterými fekálními a půdními bakteriemi dochází k předávání *tet-r* genů a které mobilní genetické elementy se tohoto přenosu účastní.

3 Experimentální část

Hlavním cílem projektu, v jehož rámci byla magisterská práce vypracována, bylo prokázat horizontální přenos genů tetracyklinové rezistence mezi bakteriemi z feces skotu léčeného antibiotiky a půdní mikroflórou. Dílčí experimentální cíle zadané pro tuto magisterskou práci pak byly:

- prokázat horizontální genový přenos genů rezistence k tetracyklinu mezi bakteriemi z kravských exkrementů, případně půdy smíchané s kravskými exkrementy, a bakteriálním recipientem
- získat čisté kultury transkonjugantů (bakteriální recipient s přijatým MGE) rezistentní k tetracyklinu
- zjistit, které MGE se uplatnily při horizontálním přenosu rezistence k tetracyklinu
- zjistit, které geny tetracyklinové rezistence byly přeneseny těmito MGE
- fenotypová charakterizace získaných bakteriálních transkonjugantů (zjištění rezistencí kódovaných těmito MGE)

3.1 Materiál

3.1.1 Média

LB agar	100 mL
Tryptone	1 g
Yeast extract	0,5 g
NaCl	1 g
Agar	1,5 g
TSB 1/10	100 mL
Tryptone	0,15 g
Soyotone	0,05 g
NaCl	0,05 g
pH 7,3 ± 0,2 při 25 °C	

Schaedler broth	100 mL
Enzymatic digest of casein	0,56 g
Enzymatic digest of soybean meal	0,1 g
Enzymatic digest of animal tissue	0,5 g
Yeast extract	0,5 g
NaCl	0,17 g
K ₃ PO ₄	0,082 g
Dextrose	0,582 g
Tris aminomethane	0,3 g
Hemin	0,001 g
L-Cystine	0,04 g
pH 7,6 ± 0,2 při 25 °C	

M-H agar	100 mL
Beef infusion	0,2 g
Acid casein peptone	1,75 g
Starch	0,15 g
Agar	1,5 g

MacConkey broth	100 mL
Enzymatic digest of gelatin	2 g
Lactose	1 g
Oxbile	0,5 g
Bromcresol Purple	0,001 g
pH 7,3 ± 0,2 při 25 °C	

PCA agar	100 mL
Peptone	0,5 g
Yeast extract	0,25 g
Glucose	0,1 g
Agar	1,5 g

3.1.2 Antibiotika

Antibiotikum	Zkratka	Zásobní roztok	Rozpouštědlo
Cykloheximid	Cyclo	10 mg/mL	H ₂ O
Kanamycin	Kana	50 mg/mL	H ₂ O
Rifampicin	Rif	25 mg/mL	methanol
Sulfadiazin	SDZ	50 mg/mL	0,25 N NaOH
Chlortetracyklin	CTC	10 mg/mL	50% ethanol

Finální koncentrace antibiotik v médiích

Antibiotikum	Koncentrace
Cyclo ₁₀₀	100 µg/mL
Cyclo ₂₀₀	200 µg/mL
kan ₅₀	50 µg/mL
rif ₅₀	50 µg/mL
SDZ ₁₀₀	100 µg/mL
CTC ₁	1 µg/mL
CTC ₅	5 µg/mL
CTC ₁₀	10 µg/mL
CTC ₂₀	20 µg/mL

3.1.3 Bakteriální kmeny

Acinetobacter baylyi BD413-GFP

Escherichia coli K-12 CV601 gfp

Pseudomonas putida KT2442-GFP

3.1.4 Kity pro izolaci a přečištění DNA

NucleoSpin[®] Plasmid (Qiagen[®])

QIAGEN[®] Plasmid Mini Kit

Amicon Ultra-0,5 mL Centrifugal Filters for DNA (EMD Millipore[®])

GenElute[™] PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich[®])

3.1.5 Vzorčky půdy

W	půda ze zimní pastviny
WF	půda ze zimní pastviny s přídatkem exkrementů
WFH	půda ze zimní pastviny s přídatkem exkrementů s vysokou dávkou CTC
MFH	půda z louky s přídatkem exkrementů s vysokou dávkou CTC

3.1.6 Vzorčky feces od krav léčených metricyklinem

Kráva	plemeno*	stáří	počet telat**	doba léčení
H	C 100%	5 let	4 telata	7 dnů
I	C 80% / R 20%	9 let	7 telat	7 dnů
J	C 88% / R 12%	4 roky	2 telata	30 a 0 dnů
K	C 84% / A 16%	8 roků	6 telat	14 dnů
L	C 100%	3 roky	2 telata	7 dnů
N	C 100%	2 roky	1 tele	7 dnů
P	N/A	N/A	N/A	7 dnů
Q	N/A	N/A	N/A	5 dnů
V	N/A	N/A	N/A	5 dnů

* A - Ayshire; C - Česká straka; R - Red Holstein

** každé tele odpovídá jedné profylaktické léčbě metricyklinem

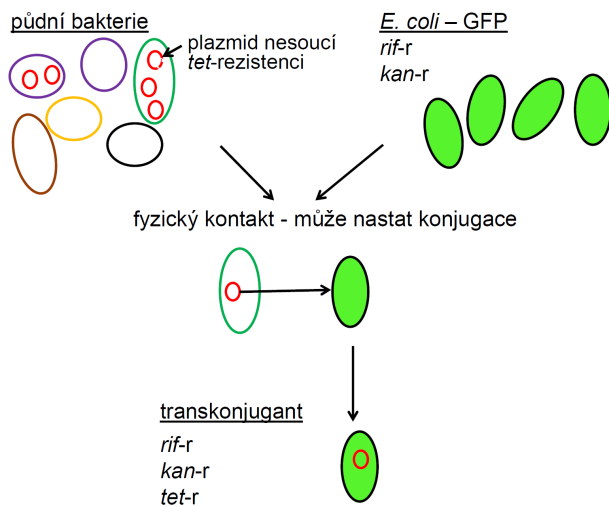
3.2 Metody práce

3.2.1 Exogenní izolace plazmidů

Princip:

Technika exogenní izolace plazmidů (též zvaná Triparental mating) umožňuje izolovat z prostředí, např. z půdního vzorku, bakteriální plazmidy bez nutnosti kultivovat jejich přirozeného hostitele. K tomu se využívají recipientní kmeny, které jsou schopny přijímat plazmidy konjugací, pokud přijdou do fyzického kontaktu se vzorkem. Recipienti se dají zpětně selektovat pomocí rezistence na antibiotika a fluorescence (přítomnost genu pro GFP protein, konstitutivní exprese). Při selekci transkonjugantů se navíc použije selekce antibiotikem, ke kterému by měl získaný plazmid nést rezistenci.

Na Obr. 7 je schématicky znázorněn princip exogenní izolace plazmidů.



Obr. 7: Exogenní izolace plazmidů.

Konjugační pokus 0

(laboratoř prof. K. Smally, Julius-Kühn Institut, Braunschweig, Německo)

Vzorky exkrementu krávy léčené metricyklinem a půdní vzorky (WF) sloužily jako zdroj bakteriálních donorů plazmidů. Recipientními kmeny bakterií byly rifampicin a kanamycin rezistentní kmeny *E. coli* K-12 CV601 gfp a *Pseudomonas putida* KT2442-GFP. Oba recipientní kmeny (40 μ L tekuté kultury od každého kmene) byly preinkubovány do druhého dne v tekutém médiu LB (20 mL) s přidavkem rifampicinu a kanamycinu o konečné koncentraci 50 μ g/mL na třepače (180 RPM) při 28 °C. Zároveň bylo použito 20 mL LB média s antibiotiky jako negativní kontrola. Vzorky obsahující donory (1 g od každého vzorku) byly aktivovány v tekutém médiu TSB 1/10 (9 mL) při 20 °C na třepačce (50 RPM) do druhého dne.

Druhý den proběhl mating. Kultury donorů (cca 8 mL supernatantu odebraného nad usazeninou od každého vzorku) i recipientů (1,4 mL tekuté kultury od každého kmene) byly stočeny (2800 g, 10 a 5 min). Peleta fekálních/půdních mikrobů byla resuspendována v TSB 1/10 (8 mL) a stočena (2800 g, 10 min), peleta recipientů byla resuspendována v LB (1,4 mL, bez antibiotik) a stočena (2800 g, 5 min). Konečná peleta donorů byla resuspendována v TSB 1/10 (800 μ L), recipienti byli resuspendováni v TSB 1/10 (1,4 mL).

100 μ L donorů a 100 μ L recipientů bylo smícháno dohromady a stočeno (2800 g, 5 min). Vzniklá peleta byla resuspendována v médiu TSB 1/10 (100 μ L). Tato směs byla nanesena na Durapore® membránové filtry umístěné na pevné médium PCA s přidavkem

cykloheximidu o konečné koncentraci 100 µg/mL. Médium s filtry bylo inkubováno 20 hodin při 28 °C. Pro mating byly použity tyto kombinace donorů a recipientů:

- WF + *E. coli* K-12 CV601 gfp
- Ex + *E. coli* K-12 CV601 gfp
- WF + *Pseudomonas putida* KT2442-GFP
- Ex + *Pseudomonas putida* KT2442-GFP

Zároveň byly na filtry nanášeny kultury samotných recipientů a samotných donorů (100 µL od každé kultury). Tyto „singles“ nám sloužily jako kontrola pozadí.

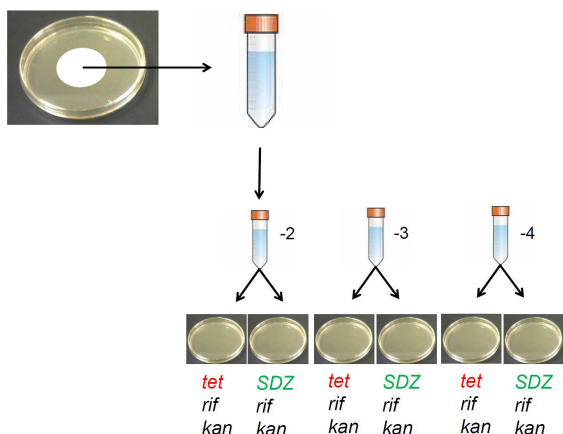
Protože prof. K. Smalla zkoumá výskyt genů rezistence na sulfadiazin (SDZ) v půdě a hospodářských odpadech, používali jsme pro selekci krom tetracyklinu i SDZ (odděleně). Selekcce potenciálních transkonjugantů byla tedy provedena na dvou typech pevného média s přidavkem antibiotik a cykloheximidu: a) PCA cyclo₁₀₀, rif₅₀, kan₅₀, TC₂₀; b) MH cyclo₁₀₀, rif₅₀, kan₅₀, SDZ₁₀₀. Filtry s nárůsty bakterií byly zvortexovány (1 min) každý v 10 mL fyziologického roztoku (0,85 % roztok NaCl) a 100 µL vzniklé suspenze bylo nanášeno v několika ředěních (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) na selekční misky s antibiotiky a rozetřeno skleněnými hokejkami. Stejným způsobem jsme vyseli suspenze z filtrů s kontrolou pozadí („singles“), v tomto případě bylo ale použito pouze ředění 10^{-2} . V následujících pokusech jsme pro kontrolní misky použili ředění 10^{-2} a 10^{-3} , protože při ředění 10^{-2} misky často přerůstaly plísně a kvasinky, což činilo odečet problematickým.

K výpočtu celkového množství CFU/mL pro každou kombinaci donorů a recipientů nám sloužil tzv. „Drop-Test;“ jednalo se o misky PCA cyclo₁₀₀, rif₅₀, kan₅₀. Tyto misky jsme rozdělili na čtvrtiny a do každého kvadrantu jsme nakapali tři kapky (každá o objemu 20 µL) suspenze z filtrů v ředěních 10^{-6} – 10^{-9} .

Inkubace všech misek probíhala do druhého dne (cca 20 hod) při 28 °C. Selekční misky byly inkubovány dnem vzhůru, misky s „Drop-Tests“ dnem dolů.

Druhý a třetí den jsme provedli odečet všech misek a přepíchlí potenciální transkonjuganty na příslušné selekční misky. Po získání čistých kultur jsme vzorky zakonzervovali v glycerolových konzervách a umístili je do – 80 °C.

Na Obr. 8 je znázorněno schéma výsevu suspenze s potenciálními transkojuganty na selekční misky s antibiotiky.



Obr. 8: Schéma výsevu na selekční misky.

Konjugační pokus I

Postup byl shodný s KP 0, kromě následujících bodů:

- jako donoři plazmidů sloužily bakterie ze vzorků půdy (MFH a WFH) z třetího manipulačního pokusu.
- recipientními kmeny bakterií byly rifampicin a kanamycin rezistentní kmeny *E. coli* K-12 CV601 gfp a *Acinetobacter baylyi* BD413-GFP.

Mating

Koncentraci cykloheximidu ve všech médiích jsme zvýšili na 200 µg/mL a tuto koncentraci jsme použili i ve všech následujících pokusech.

Kombinace donorů a recipientů:

- WFH + *E. coli* K-12 CV601 gfp
- MFH + *E. coli* K-12 CV601 gfp
- WFH + *Acinetobacter baylyi* BD413-GFP
- MFH + *Acinetobacter baylyi* BD413-GFP

Selekční média:

- a) PCA cyclo₂₀₀, rif₅₀, kan₅₀, CTC₅
- b) PCA cyclo₂₀₀, rif₅₀, kan₅₀, CTC₁₀

Konjugační pokus II

Postup byl shodný s KP 0, kromě následujících bodů:

- jako donoři plazmidů sloužili bakterie ze vzorků půdy (W, WF a WFH) z třetího manipulačního pokusu.
- půdní vzorky (1 g od každého vzorku) byly aktivovány v tekutém médiu MacConkey (9 mL) při 28 °C na třepačce (50 RPM) do druhého dne.
- recipientními kmeny bakterií byly rifampicin a kanamycin rezistentní kmeny *E. coli* K-12 CV601 gfp a *Acinetobacter baylyi* BD413-GFP.

Mating

Konečná peleta donorů byla resuspendována v MacConkey broth (800 µL), recipienti byly resuspendováni v médiu LB (1,4 mL).

Kombinace donorů a recipientů:

- W + *E. coli* K-12 CV601 gfp
- WF + *E. coli* K-12 CV601 gfp
- WFH + *E. coli* K-12 CV601 gfp
- W + *Acinetobacter baylyi* BD413-GFP
- WF + *Acinetobacter baylyi* BD413-GFP
- WFH + *Acinetobacter baylyi* BD413-GFP

Selekční média:

- a) PCA cyclo₂₀₀, rif₅₀, kan₅₀, CTC₁₀
- b) PCA cyclo₂₀₀, rif₅₀, kan₅₀, CTC₂₀

Konjugační pokus III

Postup byl shodný s KP 0, kromě následujících bodů:

- jako donoři plazmidů sloužily bakterie z exkrementů od dvou krav (vzorek H a I) po sedmi dnech léčby metricyklinem
- exkrementy od obou krav byly smíchány a ze směsi byly vytvořeny vzorky o hmotnosti cca 1 g
- recipientním kmenem bakterií byl rifampicin a kanamycin rezistentní kmen *E. coli* K-12 CV601 gfp
- vzorky exkrementů byly aktivovány ve dvou druhích tekutých médií - MacConkey broth a TSB 1/10 – bez přídavku a s přídavkem chlortetracyklinu o konečné koncentraci 5 µg/mL
- inkubace probíhala při 28 °C na třepačce (50 RPM) do druhého dne.

Mating

Konečná peleta donorů byla resuspendována v MacConkey broth (800 µL), recipient byl resuspendován v médiu LB (1,4 mL).

Kombinace donorů a recipientů:

- Ex (TSB-TET) + *E. coli* K-12 CV601 gfp
- Ex (TSB) + *E. coli* K-12 CV601 gfp
- Ex (MC-TET) + *E. coli* K-12 CV601 gfp

Selekce potenciálních transkonjugantů byla provedena na pevném médiu PCA s přidavkem antibiotik a cykloheximidu (PCA cyclo₂₀₀, rif₅₀, kan₅₀, CTC₂₀).

Konjugační pokus IV

Postup byl shodný s KP 0, kromě následujících bodů:

- jako donoři plazmidů sloužily bakterie z exkrementů od dvou krav (vzorek J a K) po sedmi dnech léčby metricyklinem
- exkrementy od obou krav byly smíchány a ze směsi byly vytvořeny vzorky o hmotnosti cca 1 g
- recipientním kmenem bakterií byl rifampicin a kanamycin rezistentní kmen *E. coli* K-12 CV601 gfp
- vzorky exkrementů byly aktivovány v tekutém médiu Schaedler broth s přidavkem chlortetracyklinu o konečné koncentraci 1 µg/mL a 5 µg/mL
- na 1g vzorku směsi exkrementů bylo použito 11 mL sterilního média
- inkubace probíhala anaerobně bez třepání při 37 °C dva dny

Mating

Kultury s exkrementy byly zvortexovány a sonikovány 4 minuty, poté byly nechány ustát jednu hodinu při pokojové teplotě. Peleta s recipienty byla promyta v 1,4 mL LB média a stočena (2800 g, 5 min), pelety s donory v 9 mL Schaedler broth a stočeny (2800 g, 10 min). Konečné pelety donorů byly resuspendovány v Schaedler broth (800 µL), recipient byl resuspendován v médiu LB (1,4 mL). Peleta se směsí donorů a recipientů byla resuspendována v médiu Schaedler broth (100 µL). Filtry byly inkubovány v anaerobních podmínkách při 37 °C do druhého dne.

Mating schéma:

- Ex + *E. coli* K-12 CV601 gfp - 1 - AE

- Ex + *E. coli* K-12 CV601 gfp - 5 - AE
- Ex + *E. coli* K-12 CV601 gfp - 1 - AN
- Ex + *E. coli* K-12 CV601 gfp - 5 - AN

„1“ = vzorek exkrementu zaočkovaný do Schaedler broth s přidavkem chlortetracyklinu o konečné koncentraci 1 µg/mL

„5“ = vzorek exkrementu zaočkovaný do Schaedler broth s přidavkem chlortetracyklinu o konečné koncentraci 5 µg/mL

„AE“ = aerobní selekce

„AN“ = anaerobní selekce

Selekce potenciálních transkonjugantů byla provedena na pevném médiu PCA s přidavkem antibiotik (PCA cyclo₂₀₀, rif₅₀, kan₅₀, CTC₂₀). Inkubace probíhala dva dny při 37°C.

Konjugační pokus V

Postup byl shodný s KP 0, kromě následujících bodů:

- jako donoři plazmidů sloužily bakterie z exkrementů od tří krav (vzorek L, N a P) po sedmi dnech léčby metricyklinem
- recipientním kmenem bakterií byl rifampicin a kanamycin rezistentní kmen *E. coli* K-12 CV601 gfp
- vzorky exkrementů byly aktivovány v tekutém médiu Schaedler broth s přidavkem chlortetracyklinu o konečné koncentraci 1 µg/mL a 5 µg/mL
- na 1g vzorku směsi exkrementů bylo použito 11 mL sterilního média
- inkubace probíhala anaerobně (bez třepání) při 37 °C dva dny

Mating

Peleta s recipienty byla promyta v 1,4 mL LB média a stočena (2800 g, 5 min), pelety s donory v 9 mL Schaedler broth a stočeny (2800 g, 10 min). Konečné pelety donorů byly resuspendovány v Schaedler broth (800 µL), recipient byl resuspendován v médiu LB (1,4 mL). Peleta se směsí donorů a recipientů byla resuspendována v médiu Schaedler broth (100 µL). Filtry byly inkubovány v anaerobních podmínkách při 37 °C do druhého dne.

Mating schéma:

- Ex + *E. coli* K-12 CV601 gfp - 1 - AE
- Ex + *E. coli* K-12 CV601 gfp - 5 - AE
- Ex + *E. coli* K-12 CV601 gfp - 1 - AN

➤ Ex + *E. coli* K-12 CV601 gfp - 5 - AN

„1“ = vzorek exkrementu předinkubovaný ve Schaedler broth s přídavkem chlortetracyklinu o konečné koncentraci 1 µg/mL

„5“ = vzorek exkrementu předinkubovaný ve Schaedler broth s přídavkem chlortetracyklinu o konečné koncentraci 5 µg/mL

„AE“ = mating za aerobních (standardních) podmínek

„AN“ = mating za anaerobních podmínek

Selekce potenciálních transkonjugantů byla provedena na pevném médiu PCA s přídavkem antibiotik a cykloheximidu (PCA cyclo₂₀₀, rif₅₀, kan₅₀, CTC₂₀). Inkubace probíhala dva dny při 37°C za aerobních podmínek.

Konjugační pokus VI

Postup byl shodný s KP 0, kromě následujících bodů:

- jako donoři plazmidů sloužily bakterie z exkrementů od čtyř krav (vzorky H4, I4, Q, V) po sedmi (H4, I4) a pěti (Q, V) dnech léčby metricyklinem
- vzorky exkrementů byly aktivovány v tekutém médiu TSB 1/10 s přídavkem chlortetracyklinu o konečné koncentraci 5 µg/mL
- inkubace probíhala při pokojové teplotě na třepačce (50 RPM) jeden den

Mating

Peleta s donory byla promyta v 8 mL TSB 1/10. Konečné pelety donorů byly resuspendovány v TSB 1/10 (800 µL), recipient byl resuspendován v médiu LB (1,4 mL). Peleta se směsí donorů a recipientů byla promyta v médiu LB (1,4 mL), stočena (2800 g, 5 min) a resuspendována v TSB 1/10 (100 µL). Filtry byly inkubovány v aerobních podmínkách při 28 °C cca 20 hodin.

Mating schéma:

- ExH4 + *E. coli* K-12 CV601 gfp
- ExI4 + *E. coli* K-12 CV601 gfp
- ExV1 + *E. coli* K-12 CV601 gfp
- ExQ1 + *E. coli* K-12 CV601 gfp

Selekce potenciálních transkonjugantů byla provedena na pevném médiu PCA s přídavkem antibiotik a cykloheximidu (PCA cyclo₂₀₀, rif₅₀, kan₅₀, CTC₂₀).

Konjugační pokus VI (2. výsev)

Byla vyseta pouze kombinace *E. coli* K-12 CV601 gfp - I4 v ředění 10^{-2} a 10^{-3} na selektivní misky PCA cyclo₂₀₀, rif₅₀, kan₅₀, CTC₂₀. Pro tento výsev byla použita suspenze po vortexování filtru, který byl po matingu konzervován v glycerolové konzervě a uložen do -80 °C.

3.2.2 Test antibiotické citlivosti (difúzní misková metoda)

Princip:

Antibiogram je výsledkem laboratorního testování citlivosti izolovaných bakteriálních kultur na různá antibiotika. Z principu se jedná o testování citlivosti *in vitro*.

Difúzní misková metoda testování citlivosti na antibiotika je semikvantitativní metoda založená na difúzi antibiotika do pevného média; malé papírové disky obsahující antibiotika (tzv. antibiotické terčičky) jsou umístěny na agar s naočkovanou bakteriální kulturou. Antibiotikum difunduje do oblasti kolem disku a inhibuje bakteriální růst, což se projevívá vznikem viditelné zóny (<http://en.wikipedia.org/wiki/Antibiogram>, listopad 2012).

Provedení:

Pro antibiogram jsme vždy použili kultury narostlé na pevném PCA médiu. Malé množství bakteriální kultury jsme pomocí mikrobiologické kličky přenesli do sterilní zkumavky (krátké, šířka 18 mm) se sterilním fyziologickým roztokem (na jednu testovanou misku 1 mL roztoku). Zkumavku jsme uzavřeli a zvortexovali (dokud nevznikl rovnoměrný zákal). Zákal jsme změřili na denzitometru (DEN-1, Biosan, Latvia); (požadovaná hodnota byla 0,5 – 1,0).

Jeden mL suspenze jsme nanесли pipetou na misku s M-H agarem (průměr misky 9 cm, přesně 20 mL média na misku), připravenou předchozího dne, dobře rozlili po celém povrchu misky. Přebytkovou suspenzi jsme odsáli.

Pomocí raznice jsme na každou misku sterilně umístili antibiotické terčičky. Inkubace misek probíhala 24 hodin dnem vzhůru při 28 °C.

Druhý den jsme pomocí pravítka odečetli velikost jednotlivých zón inhibice bakteriálního růstu.

3.2.3 Identifikace bakterií na základě profilu mastných kyselin (MIS Sherlock System)

Princip:

Mastné kyseliny fosfolipidů (PLFA, phospholipid fatty acids) jsou základními stavebními prvky mikrobiálních buněčných membrán. Tyto mastné kyseliny mohou být analyzovány např. pomocí plynové chromatografie. Soubor mastných kyselin z neznámého vzorku vytváří profil, který je možné porovnat s databází známých profilů (zde používána databáze MIS Sherlock System, ver. 6.0), a na základě tohoto srovnání je možné identifikovat organismus, ze kterého vzorek pochází (<http://en.wikipedia.org>, listopad 2012).

Provedení:

Kultury transkonjugantů byly rozočkovány (do čtyř kvadrantů) na TSBA agar (misky o průměru 9 cm, 20 mL média) a inkubovány 24 hodin při 28 °C. Kultury na analýzu byly vždy odebrány ze čtvrtého kvadrantu (nejpozději narostlé kolonie, v exponenciální fázi růstu). Příprava vzorků pro plynový chromatograf probíhala podle protokolu MIDI *Instant FAME*[™] for Sherlock. Analýzu vzorků na plynovém chromatografu a vyhodnocení získaných dat provedl RNDr. Jiří Jirout, Ph.D.

3.2.4 Izolace plazmidové DNA

- a) izolace kitem NucleoSpin[®] Plasmid
- b) izolace kitem QIAGEN[®] Plasmid Mini Kit s modifikací pro velké plazmidy (prof. K. Smalla, osobní komunikace)

Ad a):

Izolace kitem NucleoSpin[®] Plasmid

Princip:

Izolace plazmidové DNA komerčně dostupným kitem NucleoSpin® Plasmid zahrnuje tyto kroky:

- alkalickou lýzi bakteriálních buněk
- přečištění lyzátu (precipitace bílkovin a genomové DNA, odstranění buněčných úlomků)
- navázání plazmidové DNA na křemičitou membránu
- promytí DNA ethanolovým pufrem
- vysušení membrány
- eluce plazmidové DNA z membrány do elučního roztoku

Provedení:

Jednu plnou bakteriologickou kličku od každé bakteriální kultury jsme zaočkovali do 10 mL LB média s příslušnými selekčními antibiotiky. Inkubace probíhala přes noc na třepačce (170 RPM) při 28 °C. 1,4 mL tekuté kultury jsme stočili při pokojové teplotě (2800 g, 5 min), odsáli zbytek média a pelety jsme skladovali v -20 °C.

Izolace DNA kitem NucleoSpin® Plasmid probíhala přesně podle protokolu od výrobce. DNA byla skladována při -20 °C. Ověření přítomnosti plazmidové DNA ve vzorcích proběhla pomocí gelové elektroforézy.

Ad b):

Izolace kitem QIAGEN® Plasmid Mini Kit s modifikací pro velké plazmidy

Princip:

Izolace podle tohoto upraveného protokolu v sobě zahrnuje jeden společný krok (izolace plazmidové DNA kitem QIAGEN® Plasmid Mini Kit), který následují dva různé způsoby purifikace a zakoncentrování DNA (buď precipitací DNA nebo přečištění DNA zachycené na Amicon filtrech).

Provedení:

Pro každou bakteriální kulturu jsme si připravili dvě pelety. Jednu plnou bakteriologickou kličku od každé čerstvě narostlé bakteriální kultury jsme resuspendovali v 1 mL 0,85 % NaCl a centrifugovali při pokojové teplotě (1358 g, 7 min).

Lýze buněk proběhla v pufrch P1 a P2. Vzniklé pelety jsme resuspendovali (možno pipetou nebo vortexem) v 600 μ L pufru P1, přidali jsme 600 μ L pufru P2 a důkladně promíchali (převrácením eppendorfek nahoru a dolů). Vzorky jsme nechali inkubovat 5 minut při pokojové teplotě.

Následovala precipitace acetátem draselným. Ke každému vzorku jsme přidali 600 μ L pufru P3 vychlazeného na cca 4 °C (uchováván v ledničce). Každou eppendorfku jsme ihned důkladně promíchali (převrácením nahoru a dolů). Vzorky jsme inkubovali 15 minut na ledu a poté centrifugovali při 4 °C (21885 g, 12 min). Supernatant jsme přepipetovali do nové eppendorfky a opět centrifugovali při 4 °C. Předchozí krok jsme zopakovali.

Přečištění plazmidové DNA proběhlo na Qiagen kolonkách. Supernatant získaný precipitací acetátem draselným jsme nanесли na ekvilibrované Qiagen kolonky (ekvilibrace proběhla 1 mL pufru QBT). Po zachycení DNA na kolonkách jsme kolonky čtyřikrát promyli 1 mL pufru QC. Eluce plazmidové DNA z kolonek do roztoku proběhla 800 μ L pufru QF předehřátého na 65 °C. Takto získanou DNA jsme dále purifikovali a zakoncentrovali dvěma různými způsoby: 1. precipitací; 2. pomocí Amicon filtrů.

Ad 1.:

Precipitace isopropanolem

K DNA získané izolací kitem jsme přidali 560 μ L 70 % isopropanolu a centrifugovali při 4 °C (15000 g, 30 min). Opatrně jsme odpipetovali supernatant a přidali 1 mL 70 % ethanolu. Opět jsme centrifugovali při 4 °C (15000 g, 15 min). Opatrně jsme odpipetovali supernatant a vytvořené pelety jsme sušili při pokojové teplotě. Po odpaření ethanolu jsme plazmidovou DNA rozpustili ve 30 μ L 10 mM Tris/HCl o pH 8,0 (možno použít 1x TE o pH 8,0; doporučený objem je 20 - 50 μ L).

DNA byla skladována při -20 °C. Ověření přítomnosti plazmidové DNA ve vzorcích proběhla pomocí gelové elektroforézy.

Ad 2.:

Purifikace a zakoncentrování na Amicon filtrech

DNA získanou izolací kitem QIAGEN® Plasmid Mini Kit jsme napipetovali do kolonek s Amicon filtry, stočili při pokojové teplotě (13000 g, 15 min). Protože objem kolonek s filtry je jen 500 μ L, museli jsme tento krok opakovat. Po zachycení DNA na filtrech jsme kolonky třikrát promyli 450 μ L ultračisté vody, vždy centrifugace při pokojové teplotě (13000 g, 10 min). Poslední promytí bylo provedeno 450 μ L Tris/HCl o pH 8,0.

Třicet μL stejného roztoku bylo použito pro eluci (možno použít eluční pufr z kitu PowerSoil[®] DNA Isolation Kit); nanесли jsme tento roztok na filtry a kolonky s fitry jsme umístili „hlavou dolů“ do nových mikrozku mávek a centrifugovali při pokojové teplotě (1000 g, 2 min).

DNA byla skladována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ověření přítomnosti plazmidové DNA ve vzorcích proběhla pomocí gelové elektroforézy.

3.2.5 Detekce genů rezistence pomocí PCR

Princip:

Polymerázová řetězová reakce umožňuje amplifikovat libovolný úsek DNA, s použitím termostabilní DNA-dependentní DNA-polymerázy. Tento úsek musí být na začátku a na konci ohraničen krátkými oligonukleotidy DNA - tzv. primery. PCR produkty mohou být následně elektroforeticky separovány na agarózovém gelu a obarveny v barvivu, které se váže na DNA. Po ozáření UV světlem v transiluminátoru je možné separované úseky DNA vizualizovat a odhadnout jejich velikost podle velikostního standardu.

Provedení:

PCR reakce probíhaly s reagensii u vedenými v Tab. V (viz Přílohy) podle optimalizovaných protokolů (Tab. VI, viz Přílohy) v cykleru (Biometra[®] T3000 Thermocycler, Schoeller INSTRUMENTS). Jako templát sloužila plazmidová DNA nebo bakteriální lyzáty.

3.2.6 Sekvenování genu pro 16S rRNA

Princip:

Jednou z možností identifikace bakterií je sekvenace genu pro 16S rRNA, který je běžně používaným taxonomickým markerem u bakterií (Woese *et* Fox 1977; Woese *et al.* 1990). Jedná se o gen kódující RNA malé ribozomální podjednotky, který je poměrně konzervovaný a má se za to, že jeho fylogeneze dobře vystihuje fylogenezi bakterií. Jeho velikost je přibližně 1500 bází.

Provedení:

PCR produkty získané amplifikací genu pro 16S rRNA jsme přečistili pomocí kitu GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich®). Sekvenační reakce o celkovém objemu 7,5 µL se skládala z DNA (10 - 20 ng), primeru pA (2,5 pmol) a PCR H₂O. Sekvence (Sanger *et al.* 1977) probíhala za standardních podmínek (teplota nasedání primeru 50 °C) na přístroji ABI PRISM 3130xl v laboratoři genomiky Ústavu molekulární biologie rostlin, BC AV ČR, v. v. i., České Budějovice.

3.2.7 Úprava sekvencí a identifikace pomocí algoritmu BLAST

Princip:

Sekvence získané ze sekvenátoru často obsahují místa, kde přístroj nebyl schopný jednoznačně určit, kterou bázi má zařadit. Na takové místo zařadí písmeno (B, D, H, R, Y, K, M, S, W nebo V) značící, které báze mohou na tomto místě být (viz IUPAC/IUB kódy). Doplnit správnou bázi je možné pomocí stanovení nejvyššího píku v chromatogramu upravované sekvence. K tomuto účelu se používá specializovaný software.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) je algoritmus používaný v bioinformatice pro porovnávání biologických dat, jako jsou sekvence aminokyselin v bílkovinách nebo sekvence nukleotidů v DNA. BLAST umožňuje porovnat neznámou sekvenci s databázemi známých sekvencí a tak identifikovat určitou bílkovinu nebo gen. Volně je přístupný na adrese <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

K úpravě sekvencí byl použit program BioEdit Sequence Alignment Editor (v. 7.1.3.0). Upravené sekvence byly uloženy ve formátu FASTA a následně přiřazeny k nejpodobnějším sekvencím z databází pomocí algoritmu blastn (nucleotide blast), optimalizovaný pro vysoce podobné sekvence (megablast).

4 Výsledky

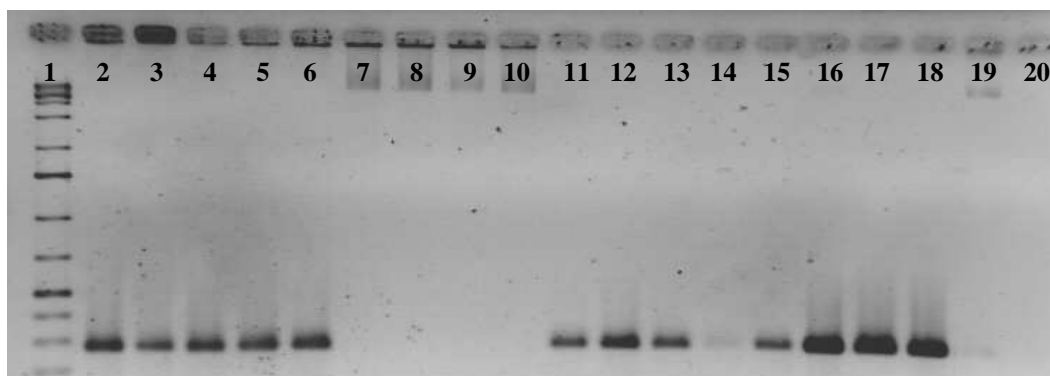
4.1 Konjugační pokusy

Konjugační pokus 0

Z exkrementu od metricyklinem léčené krávy jsme nedostali žádné transkonjuganty, protože misky byly masivně přerostlé plísněmi (přestože jsme použili cykloheximid). Ze vzorku WF z inkubačního pokusu (půda zimní pastviny smíchaná s feces krav léčených metricyklinem, viz výše) jsme získali transkonjuganty pouze při selekci na SDZ (32 kultur; frekvence konjugace byla 10^5 CFU/mL), při selekci na tetracyklin jsme žádné transkonjuganty nedostali. Transkonjuganti *Pseudomonas putida* KT2442-GFP byli pravděpodobně pouze falešně pozitivní (tj. nejednalo se o transkonjuganty, ale „prázdné“ recipienty), což naznačovaly vysoké nárůsty (10^4 CFU/mL) na miskách s kontrolou pozadí (vyseta samotná kultura *Pseudomonas putida* KT2442-GFP na médium s antibiotiky) a také to, že jsme z nich nemohli vyizolovat žádné plazmidy. Testování antibiotických citlivostí a molekulární screening jsme tedy zaměřili na transkonjuganty *E. coli* K-12 CV601 gfp.

Fenotypová charakterizace *E. coli* K-12 CV601 gfp transkojugantů byla provedena pomocí antibiogramu; kultury transkojugantů byly testovány na citlivost k osmi antibiotikům (tetracyklinu, streptomycinu, kyselině nalidixové, chloramfenikolu, ampicilinu, sulfadiazinu, gentamycinu a ciprofloxacinu). Na základě tohoto antibiogramu bylo možné určit, zda se antibiotické profily transkojugantů liší od profilu parentálního kmene *E. coli* K-12 CV601 gfp.

Na Obr. 10 je fotografie agarózového gelu z elektroforézy produktů PCR pro gen *trfA* (IncP-1 plazmidy).



Obr. 10: Detekce IncP-1 plazmidů.

1: size-marker

2 – 6: vzorky WF-*E. coli*

7 – 10: vzorky WF-*P. putida*

15 – 19: pozitivní kontroly

20: negativní kontrola

Konjugační pokus I

Oproti KP 0 jsme v tomto pokusu použili jako druhý recipientní kmen *Acinetobacter baylyi* BD413-GFP, protože tento druh je nespíš přirozeným hostitelem pro LowGC plazmidy (Heuer *et al.* 2009), jejichž přítomnost ve vzorcích ukázal předcházející konjugační pokus. Plazmidy jsme se snažili získat ze vzorků WFH a MFH z inkubačního pokusu (půda zimní pastviny nebo louky, smíchaná s feces krav léčených metricyklinem a vysokou dávkou chlortetracyklinu, viz výše). Doufali jsme, že přítomnost vysoké koncentrace ($100 \mu\text{g g}^{-1}$) chlortetracyklinu v půdě napomůže horizontálnímu přenosu. Přestože jsme v tomto pokusu nepoužili vzorky exkrementů, jako prevenci před přerůstáním misek plísněmi jsme zdvojnásobili dávku cykloheximidu (na koncentraci $200 \mu\text{g/mL}$).

Bylo získáno celkem šest potenciálních transkonjugantů (pět *Acinetobacter baylyi* BD413-GFP „transkonjugantů“ a jeden *E. coli* K-12 CV601 gfp „transkonjugant“). Všechny přepíchné kolonie „transkonjugantů“ byly žluté (zatímco samotní recipienti tvoří bílé nebo krémové kolonie). Dále byl zjištěn růst kolonií o stejné barvě a morfologii na miskách s výsevem půdních vzorků z MP III (kontrola pozadí). S největší pravděpodobností se tedy jednalo o kontaminující *tet-r* bakterie pocházející z půdních vzorků. Identifikace systémem Sherlock (Tab. VII) a sekvenování genu pro 16S rRNA (Tab. VIII) tento závěr potvrdily - jednalo se o bakterie rodu *Variovorax* a *Stenotrophomonas*. Dále byl proveden antibiogram. Kultury těchto kontaminujících bakterií byly konzervovány v glycerolu a uloženy do $-80 \text{ }^\circ\text{C}$,

protože jejich další zkoumání se jeví jako potenciálně zajímavé - tyto bakterie mohou být rezervoárem *tet-r* genů.

V Tab. VII jsou výsledky identifikace systémem Sherlock pro žluté kontaminující bakterie získané v KP I.

Tab. VII: Identifikace systémem Sherlock.

Vzorek	Identifikace systémem Sherlock	% shody
MFH – <i>A. baylyi</i> -3 #1	<i>Acidovorax / Hydrogenophaga / Variovorax</i>	66
MFH – <i>A. baylyi</i> -3 #4	<i>Acidovorax / Hydrogenophaga / Variovorax</i>	68
MFH – <i>A. baylyi</i> -3 #5	<i>Acidovorax / Hydrogenophaga / Variovorax</i>	68
MFH #1	<i>Micrococcus / Stenotrophomonas</i>	35
MFH #2	<i>Stenotrophomonas</i>	46
WFH – <i>A. baylyi</i> -3 #1	<i>Stenotrophomonas</i>	42
WFH – <i>A. baylyi</i> -3 #2	<i>Stenotrophomonas</i>	46
WFH – <i>E. coli</i> -3 #1	<i>Stenotrophomonas</i>	47
WFH #1	<i>Stenotrophomonas</i>	43
WFH #2	<i>Stenotrophomonas</i>	42

V Tab. VIII jsou výsledky sekvenování genu pro 16S rRNA pro žluté kontaminující bakterie získané v KP I.

Tab. VIII: Sekvenování genu pro 16S rRNA.

Vzorek	Primer	Délka sekvence [b]	BLAST	% identity
MFH #1	pA	405	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	100%
MFH - <i>A. baylyi</i> -3 #1	pA	572	<i>Variovorax</i> sp.	100%
WFH - <i>A. baylyi</i> -3 #1	pA	574	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	100%

Konjugační pokus II

Oproti KP I jsme použili pro předkultivaci donorů médium MacConkey, abychom selektivně zvýšili růst enterobakterií ve vzorcích. Doufali jsme, že se tak zvýší pravděpodobnost konjugace s recipienty *E. coli* K-12 CV601 *gfp* a *Acinetobacter baylyi* BD413-GFP. Plazmidy jsme se snažili získat ze vzorků W, WF a WFH z inkubačního pokusu (půda zimní pastviny, půda zimní pastviny smíchaná s feces krav léčených metricyklinem, a půda zimní pastviny smíchaná s feces a vysokou dávkou chlortetracyklinu, viz výše). Zvýšili jsme koncentraci chlortetracyklinu v selekčních médiích (10 µg/mL a 20 µg/mL), abychom snížilo riziko falešně pozitivních výsledků.

V tomto pokusu bylo získáno celkem dvanáct potenciálních transkonjugantů (jeden *Acinetobacter baylyi* BD413-GFP „transkojugant“ a jedenáct *E. coli* K-12 CV601 gfp „transkojugantů“). Kromě „transkonjugantů“ byl zjištěn i růst drobných kolonií na kontrolních selektivních miskách s *E. coli* K-12 CV601 gfp, především při koncentraci chlortetracyklinu 10 µg/mL. Důvodem může být přirozená nízká rezistence *E. coli* K-12 CV601 gfp na chlortetracyklin nebo postupná degradace tohoto antibiotika v médiu (případně i kombinace obojího). Vystala tedy alternativa, že naši „transkonjuganti“ (respektive většina z nich) jsou pouze „prázdné“ bakterie *E. coli* K-12 CV601 gfp. Dalším problémem byla častá kontaminace „čistých“ kultur při pasážování. Předpoklad, že získané kultury nejsou transkonjuganti, dále podpořil fakt, že při použití dvojnásobné dávky cykloheximidu (k čemuž došlo omylem) v selekčním médiu nevyrostly téměř žádné bakteriální kolonie [cykloheximid působí jako inhibitor syntézy bílkovin, a to pouze u eukaryotických organizmů (www.wikipedia.org, říjen 2012)].

Další zkoumání získaných „transkonjugantů“ spočívalo v porovnání jejich růstu na selekčních s miskách s přidavkem dvojí koncentrace chlortetracyklinu (10 µg/mL a 20 µg/mL) s růstem kontrolních kmenů *E. coli* K-12 CV601 gfp a *Acinetobacter baylyi* BD413-GFP. Na základě výsledků tohoto testu bylo vybráno šest kultur pro testování citlivosti na 13 vybraných antibiotik.

Dále byl proveden pokus o izolaci plazmidů a kontrola GFP fluorescence pod UV světlem. Ze čtyř vybraných kultur „transkonjugantů“ se nám nepodařilo vyizolovat žádné plazmidy, test GFP fluorescence byl pro všechny kultury negativní. Pokus o identifikaci „transkojugantů“ systémem Sherlock nebo sekvenováním genu pro 16S rRNA nebyl proveden. Bylo provedeno mikroskopické pozorování preparátů zhotovených z vybraných kultur „transkonjugantů“, které potvrdilo, že zkoumané kultury nepatří mezi prokaryota (byly to pravděpodobně houby).

Na základě výše uvedených testů a zkoumání jsme došli k závěru, že v KP II jsme nezískali žádné *E. coli* K-12 CV601 gfp ani *Acinetobacter baylyi* BD413-GFP transkojuganty. Narostlé kultury mohly patřit do jedné z dvou skupin: a) eukaryota (houby, plísně) – tyto kultury byly rezistentní na tetracyklin a všechna další testovaná antibiotika; b) „prázdní“ recipienti – kultury slabě rezistentní na tetracyklin (jednalo se o přirozenou rezistenci).

Konjugační pokus III

Protože jsme v předchozích pokusech při použití půdních vzorků z inkubačního pokusu nezískali žádné *tet-r* transkojuganty, rozhodli jsme se v tomto pokusu použít vzorky čerstvých exkrementů (předpokládali jsme, že v prostředí bohatším na živiny a při větší hustotě bakteriálních buněk se šance na získání transkojugantů zvýší). Abychom ještě více stimulovali bakteriální konjugaci, přidali jsme do kultivačního média s exkrementy nízkou dávku chlortetracyklinu (5 µg/mL); (Whittle *et al.* 2002). Pro selekci potenciálních transkojugantů jsme použili médium s koncentrací chlortetracyklinu 20 µg/mL, protože v předchozím pokusu jsme zjistili, že recipientní kmen *E. coli* K-12 CV601 gfp vykazuje rezistenci na určitou nízkou dávku tetracyklinu - chtěli jsme tímto zabránit falešným pozitivním výsledkům.

V KP III bylo získáno 14 potenciálních transkojugantů, kteří byli dále zkoumáni. Nejdříve byl proveden pokus o identifikaci 11 kultur „transkojugantů“ systémem Sherlock. U dvou kultur „transkojugantů“ z kombinace TSB-TET-*E. coli* byl zjištěn profil mastných kyselin podobný profilu *E. coli* K-12 CV601 gfp, u tří zbývajících kultur nebyla identifikace možná, protože tyto kultury byly pro spolehlivou identifikaci tímto systémem málo narostlé. Profily „transkojugantů“ ze zbývajících dvou kombinací obsahovaly houbový marker (mastnou kyselinu 18:2w6,9). Pro všechny potenciální transkojuganty byl proveden antibiogram (viz Obr. 11).

Na základě antibiotických profilů, výsledků identifikace systémem Sherlock a částečně i pozorovaných fenotypových odlišností (tvar kolonií, zápach) bylo možné zařadit naše „transkojuganty“ do dvou skupin: a) skupina z média TSB; b) skupina z média MacConkey broth (viz Tab. IX). Kolonie ze skupiny média MacConkey broth jsme vyhodnotili jako kvasinky.

Pro sekvenaci genu pro 16S rRNA jsme na základě výsledků z identifikace systémem Sherlock vybrali dvě kultury potenciálních transkojugantů z kombinace TSB-TET-*E. coli* (pět ze šesti kultur pod UV světlem zeleně fluoreskovalo). Výsledky této sekvenace (viz Tab. IX) potvrdily, že kultury z kombinace TSB-TET-*E. coli* jsou s největší pravděpodobností opravdu *E. coli* K-12 CV601 gfp transkojuganti. Kultury těchto transkojugantů jsme později použili k izolaci plazmidů a k detekci determinant tetracyklinové rezistence.

V Tab. IX je přehled kultur potenciálních transkojugantů získaných v KP III.

Tab. IX: „Transkonjuganti“ z KP III.

Označení kombinace	Fluorescence pod UV	Sherlock identifikace	Sekvenování 16S rRNA
TSB-TET- <i>E.coli</i> -2-1	GFP	ND	<i>E. coli</i> (100% identity)
TSB-TET- <i>E.coli</i> -2-4	GFP	profil podobný <i>E. coli</i>	
TSB-TET- <i>E.coli</i> -2-5	GFP	profil podobný <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> (100% identity)
TSB-TET- <i>E.coli</i> -2-6	GFP	Slabý signál	
TSB-TET- <i>E.coli</i> -2-7	GFP	Slabý signál	
MC-TET- <i>E.coli</i> -2-2		ND	
MC-TET- <i>E.coli</i> -2-3		houbový marker 18:2w6,9	
MC-TET- <i>E.coli</i> -2-6		houbový marker 18:2w6,9	
MC-TET- <i>E.coli</i> -2-8		ND	
MC- <i>E.coli</i> -2-1		houbový marker 18:2w6,9	
MC- <i>E.coli</i> -2-8		houbový marker 18:2w6,9	
MC- <i>E.coli</i> -2-16		ND	
MC- <i>E.coli</i> -2-23		ND	

^aOznačení transkonjuganta zahrnuje médium (TSB nebo MC – McConkey), ředění -2, č. kolonie

^bND – neděláno

Konjugační pokus IV

Opět jsme použili vzorky čerstvých exkrementů, které jsme předkultivovali v médiu Schaedler broth (chtěli jsme selektivně podpořit růst anaerobních bakterií a bakterií náročných na živiny) s přidavkem dvou různých koncentrací chlortetracyklinu (1 µg/mL a 5 µg/mL). Preinkubace vzorků i selekce transkonjugantů tedy probíhala za aerobních i anaerobních podmínek. Před matingem byla suspenze exkrementů 3 minuty sonikována, aby se lépe uvolnily bakterie z matrice exkrementů.

Při odečítání nebyly na selektivních miskách zjištěny žádné bakteriální kolonie, pouze plísně a kvasinky – v tomto pokusu jsme tedy nezískali žádné transkojuganty.

Konjugační pokus V

Tento pokus měl stejný design jako KP IV, pouze jsme neprovedli sonikaci dárcovských bakterií před matingem.

Při prvním výsevu nebyly na selektivních miskách zjištěny žádné bakteriální kolonie, pouze opět plísně a kvasinky. Z druhého výsevu se nám podařilo získat jednu kolonii, která se později ukázala být *E. coli* K-12 CV601 gfp transkonjugant (identifikace systémem Sherlock a následné sekvenování genu pro 16S rRNA).

Konjugační pokus VI

V době provedení tohoto pokusu jsme již věděli, že část kultur získaných v KP III jsou opravdu transkonjuganti, proto jsme v KP VI použili stejné médium, koncentraci chlortetracyklinu pro předkultivaci exkrementů i podmínky při předkultivaci jako v případě úspěšné kombinace těchto faktorů v KP III.

Ze dvou výsevů KP VI se nám podařilo získat 47 čistých kultur *tet-r E. coli* K-12 CV601 gfp transkonjugantů. Potvrzení, že se skutečně jedná o transkojuganty, bylo postaveno na pozorování fenotypu (tvar a barva kolonií, zápach), GFP fluorescenci, identifikaci systémem Sherlock a sekvenování genu pro 16S rRNA (viz Tab. XI).

Šest transkonjugantů bylo následně použito pro izolaci plazmidů a detekci genů tetracyklinové rezistence.

V Tab. XI jsou uvedeny výsledky sekvenace genu pro 16S rRNA pro dvě vybrané kultury transkonjugantů z Konjugačního pokusu VI.

Tab. XI: Sekvenace genu pro 16S rRNA pro transkojuganty z KP VI.

Vzorek	BLAST	Délka sekvence [b]	% identity
<i>E. coli</i> -2-4-1	<i>Escherichia coli</i>	518	100%
<i>E. coli</i> -2-8-1	<i>Escherichia coli</i>	580	100%
<i>E. coli</i> -2-10-1	<i>Escherichia coli</i>	517	100%
<i>E. coli</i> -2-16-1	<i>Escherichia coli</i>	580	100%
<i>E. coli</i> -2-25-1	<i>Escherichia coli</i>	580	99%
<i>E. coli</i> -2-6-2	<i>Escherichia coli</i>	580	100%
<i>E. coli</i> -2-9-2	<i>Escherichia coli</i>	580	100%
<i>E. coli</i> - GFP*	<i>Escherichia coli</i>	483	99%

* „prázdný“ recipientní kmen *E. coli* K-12 CV601 gfp

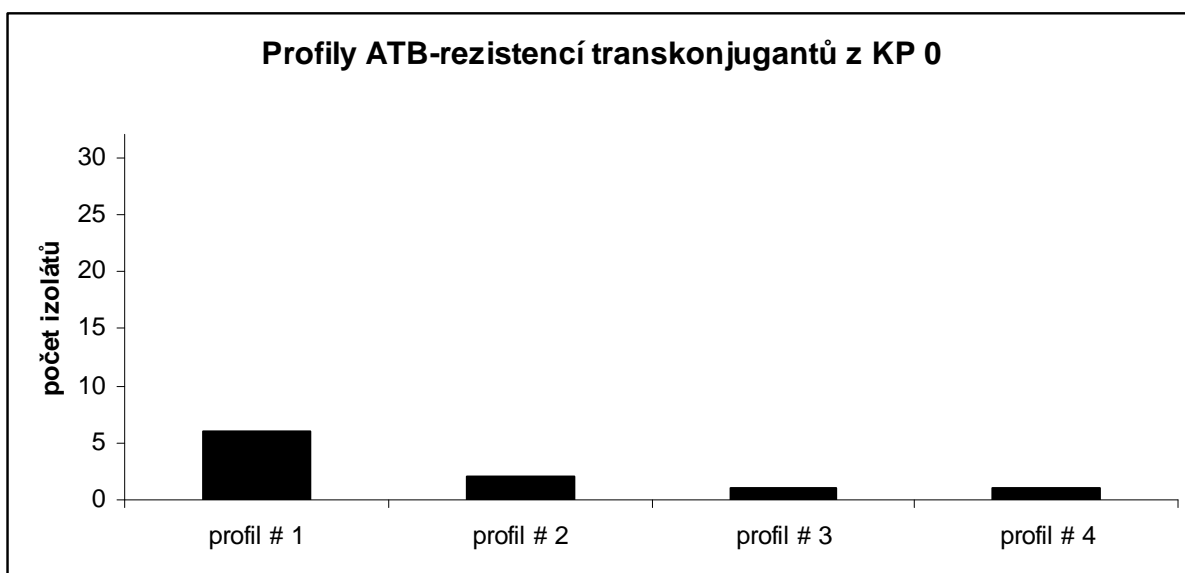
Ze sedmi konjugačních pokusů byly tři (KP III, KP V, KP VI) úspěšné – celkem jsme získali 53 *tet-r* transkojugantů. Tito transkonjuganti byli dále zkoumáni, fenotypově

(antibiogramy) a genotypově (HGT elementy, geny rezistence) charakterizování a někteří byli použiti na izolaci plazmidové DNA.

4.2 Fenotypová charakterizace transkonjugantů

U transkonjugantů z KP 0 byly prokázány čtyři profily antibiotické rezistence (viz Obr. 9).

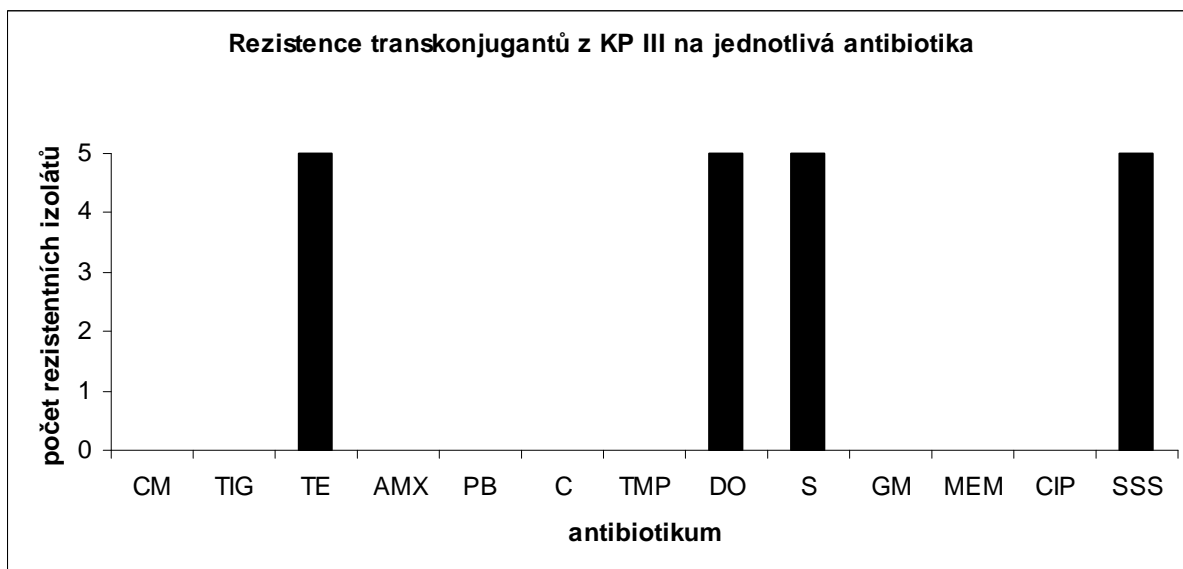
Na Obr. 9 je graf zobrazující zastoupení čtyř zjištěných profilů antibiotické rezistence mezi transkojuganty z KP 0.



Obr. 9: Profily antibiotické rezistence transkonjugantů z KP 0.

profil # 1: sulfadiazin, streptomycin, gentamycin; profil # 2: sulfadiazin, streptomycin; profil # 3: sulfadiazin, streptomycin, ciprofloxacin; profil # 4: sulfadiazin, streptomycin, ampicilin, kyselina nalidixová, ciprofloxacin, gentamycin

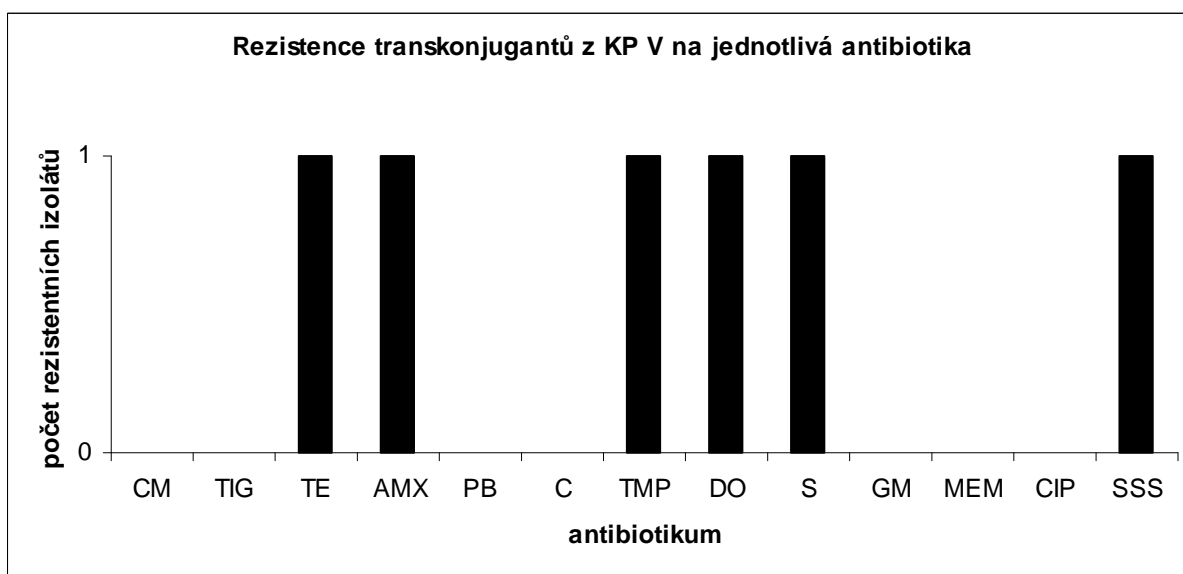
Na Obr. 11 je zobrazen graf znázorňující rezistenci transkonjugantů z KP III na jednotlivá antibiotika.



Obr. 11: Graf antibiotické rezistence transkonjugantů z KP III.

CM – klaritomycin; TIG – tigeicyklin; TE – tetracyklin; AMX – amoxycilin; PB – polymixin;
 C – chloramfenikol; TMP – trimetoprim; DO – doxycyklin; S – streptomycin; GM –
 gentamycin; MEM – meropenem; CIP – ciprofloxacin; SSS – sulfonamidy

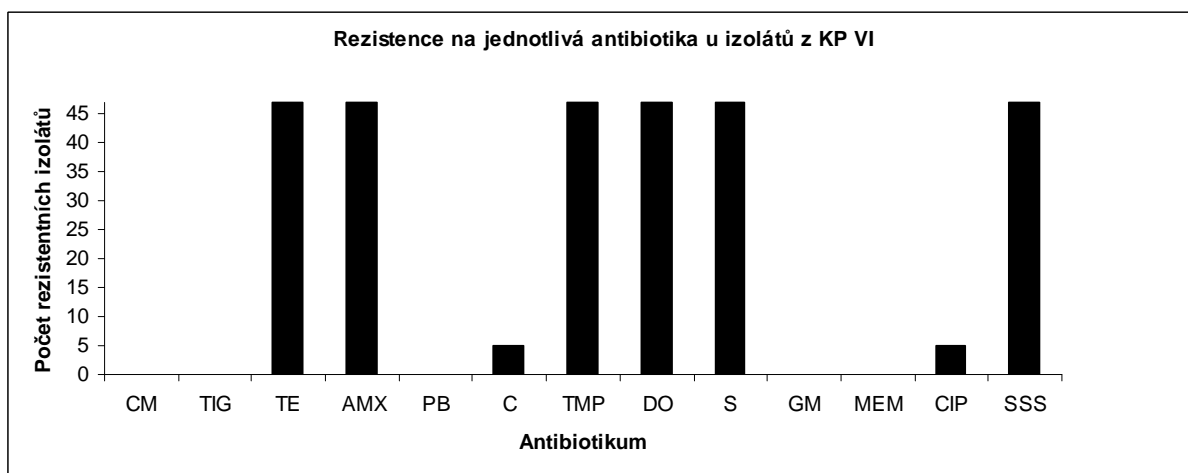
Na Obr. 12 je zobrazen graf rezistence transkonjuganta z KP V na jednotlivá antibiotika.



Obr. 11: Graf antibiotické rezistence transkonjuganta z KP V.

CM – klaritomycin; TIG – tigeicyklin; TE – tetracyklin; AMX – amoxycilin; PB – polymixin;
 C – chloramfenikol; TMP – trimetoprim; DO – doxycyklin; S – streptomycin; GM –
 gentamycin; MEM – meropenem; CIP – ciprofloxacin; SSS – sulfonamidy

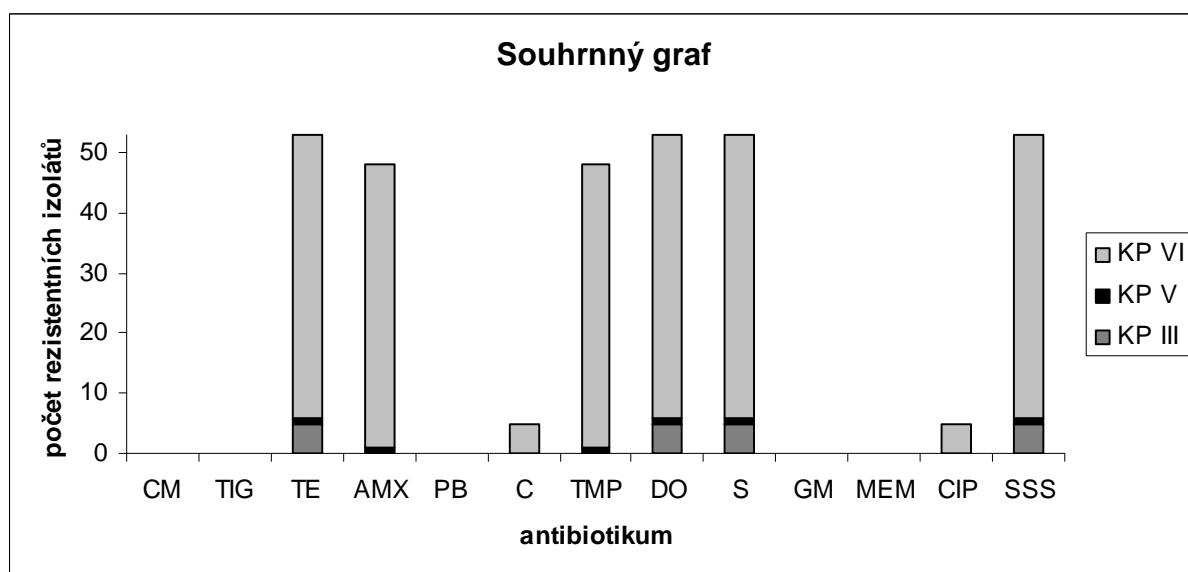
Na Obr. 13 je znázorněn graf rezistence na jednotlivá antibiotika u transkojugantů z KP VI.



Obr. 13: Graf antibiotické rezistence transkonjugantů z KP VI.

CM – klaritomycin; TIG – tigecyklin; TE – tetracyklin; AMX – amoxycilin; PB – polymixin;
 C – chloramfenikol; TMP – trimetoprim; DO – doxycyklin; S – streptomycin; GM –
 gentamycin; MEM – meropenem; CIP – ciprofloxacín; SSS – sulfonamidy

Na Obr. 14 je znázorněn souhrnný graf antibiotické rezistence pro transkonjuganty ze všech třech úspěšných konjugačních pokusů se selekcí na tetracyklinovou rezistenci.



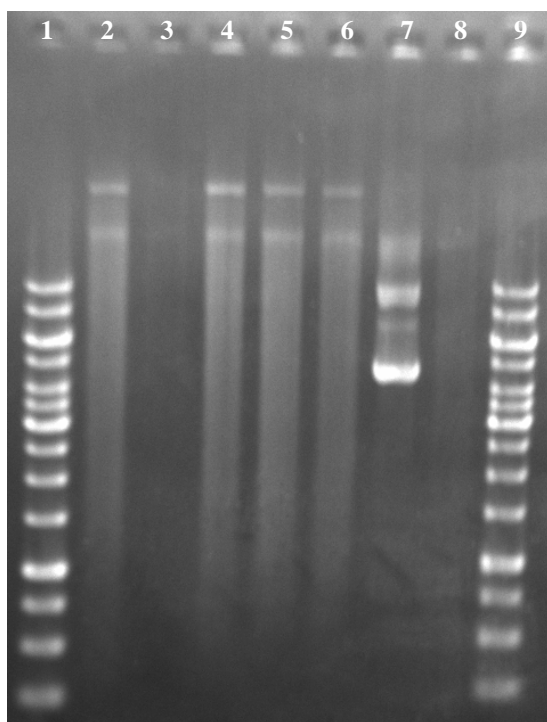
Obr.: 14: Souhrnný graf antibiotické rezistence transkonjugantů z KP III, V a VI (selektovaných na rezistenci k chlortetracyklinu).

CM – klaritomycin; TIG – tigecyklin; TE – tetracyklin; AMX – amoxycilin; PB – polymixin;
 C – chloramfenikol; TMP – trimetoprim; DO – doxycyklin; S – streptomycin; GM –
 gentamycin; MEM – meropenem; CIP – ciprofloxacín; SSS – sulfonamidy

4.3 Izolace plazmidů

Z pěti transkonjugantů z KP III a jednoho transkonjugantu z KP V se nám podařilo vyizolovat kitem NucleoSpin plazmidy o velikosti více jak 10 kb (viz Obr. 15).

Na Obr. 15 je zobrazena fotografie agarózového gelu po elektroforéze plazmidů z KP III a V.



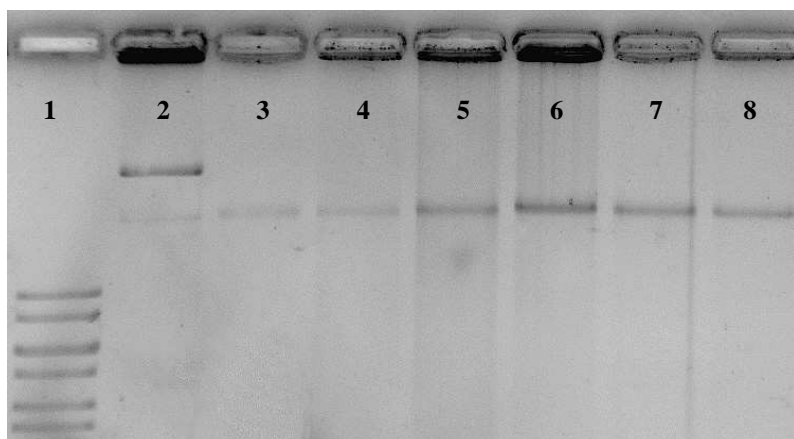
Obr. 15: Plazmidy z KP III a V.

1; 9: size-marker

2 – 8: vzorky

Z KP VI jsme použili pro izolaci plazmidů šest kmenů transkojugantů; ze všech se nám podařilo vyizolovat plazmidy o velikosti více jak 10 kb (viz Obr. 16).

Na Obr. 16 je zobrazena fotografie agarózového gelu po elektroforéze plazmidů z KP VI.



Obr. 16: Plazmidy z KP VI.

1: size-marker

2 – 8: vzorky

4.4 Detekce *tet-r* genů

Vyizolovanou plazmidovou DNA z transkojugantů získaných v KP III a V jsme použili pro detekci genů rezistence *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)* a *tet(W)* pomocí metody PCR. Gen *tet(M)* jsme detekovali ve dvou vzorcích plazmidové DNA. Gen *tet(O)* jsme detekovali pouze u jednoho vzorku. *Tet(Q)* nebyl detekován v žádném vzorku. Determinanta *tet(W)* byla detekována ve stejných vzorcích jako *tet(M)*. Přítomnost těchto genů byla potvrzena i sekvenací (viz Tab. XII).

V Tab. XII jsou uvedeny výsledky sekvenace *tet-r* genů [*tet(M)* a *tet(W)*] amplifikovaných z plazmidové DNA izolované z transkojugantů z KP III.

Tab. XII: Sekvenace *tet-r* genů [*tet(M)* a *tet(W)*] na plazmidech z KP III.

Vzorek	Délka sekvence [b]	BLAST	% identity
TSB-TET- <i>E. coli</i> -2-6 (primer tetM-F, Aminov <i>et al.</i> 2001)	124	Riemerella anatipestifer ribosomal protection protein (<i>tetM</i>) gene	100
		Enterococcus faecium DO plasmid 1, complete Sequence	99
		Clostridium difficile strain CD2403B transposon Tn916-like TetM protein (<i>tetM</i>) gene	99
TSB-TET- <i>E. coli</i> -2-7 (primer tetM-F, Aminov <i>et al.</i> 2001)	115	Enterococcus faecium DO plasmid 1, complete Sequence	100
		Clostridium difficile strain CD2403B transposon Tn916-like TetM protein (<i>tetM</i>) gene	100
TSB-TET- <i>E. coli</i> -2-6	113	Lactobacillus reuteri strain CH1-1-T-32 TetW	99

(primer tetW-F, Aminov <i>et al.</i> 2001)	(tetW) gene Clostridium difficile tetW gene for tetracycline resistance protein, strain C17	99
TSB-TET- <i>E. coli</i> -2-7 108 (primer tetW-F, Aminov <i>et al.</i> 2001)	Lactobacillus reuteri strain CH1-1-T-32 TetW (tetW) gene, partial Cds Clostridium difficile tetW gene for tetracycline resistance protein, strain C17	100 100

Výše uvedené geny rezistence jsme se pokusili amplifikovat i z 10x ředěných bakteriálních lyzátů, v tomto případě jsme však žádný z nich nedetekovali. Pro jediného transkonjuganta z KP V jsme nedetekovali sledované geny v plazmidové DNA ani v bakteriálním lyzátu.

Pro šest vzorků plazmidové DNA z transkojugantů z KP VI jsme provedli PCR reakce na detekci genů rezistence *tet(O)* a *tet(W)*. Jako templát jsme použili plazmidovou DNA, na bakteriálních lyzátech jsme PCR reakce nezkoušeli. Výsledek detekce byl negativní pro oba dva geny.

4.5 Detekce IncP-1 a lowGC plazmidů

Gen *trfA* (marker pro IncP-1 plazmidy) jsme detekovali u třech (viz Obr. 17) a gen *traN* (marker pro LowGC plazmidy) u dvou (Obr. 18) vzorků plazmidové DNA izolované z transkonjugantů z KP VI. Pro transkojuganty z KP III a KP V jsme amplifikaci těchto dvou genů zatím neprováděli.

Přítomnost plazmidů skupiny IncP-1 byla následně potvrzena sekvenováním (viz Tab. XIII), zatímco produkt *traN* (marker pro LowGC plazmidy) se nepodařilo prosekvenovat. Později byl tento produkt opět osekvenován a vyhodnocen jako marker plazmidů skupiny IncP-1e.

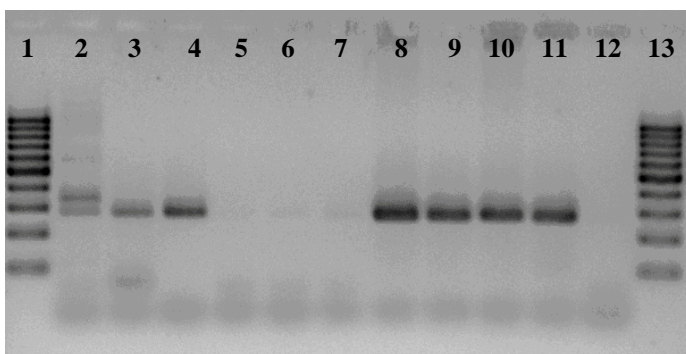
V Tab. XIII jsou uvedeny výsledky sekvenace genu *trfA* amplifikovaného z plazmidové DNA izolované z transkonjugantů z KP VI.

Tab. XIII: Sekvenace genu *trfA*.

Vzorek	Délka sekvence [b]	BLAST	% identity
2-34-1	214	Pseudomonas putida strain KT2442 plasmid pMLUA3	99%
		TrfA (<i>trfA</i>) gene, partial cds	
		Uncultured bacterium plasmid pKS77, complete sequence	
		IncP-1 plasmid pKJK5 complete sequence	

		Ralstonia pickettii plasmid p712, complete sequence	96%
3-51-1	215	Pseudomonas putida strain KT2442 plasmid pMLUA3	
		TrfA (trfA) gene, partial cds	96%
		Uncultured bacterium plasmid pKS77, complete sequence	96%
		IncP-1 plasmid pKJK5 complete sequence	96%
		Ralstonia pickettii plasmid p712, complete sequence	91%

Na Obr. 17 je fotografie agarózového gelu z elektroforézy produktů PCR pro gen *trfA* (IncP-1 plazmidy).



Obr. 17: Detekce IncP-1 plazmidů.

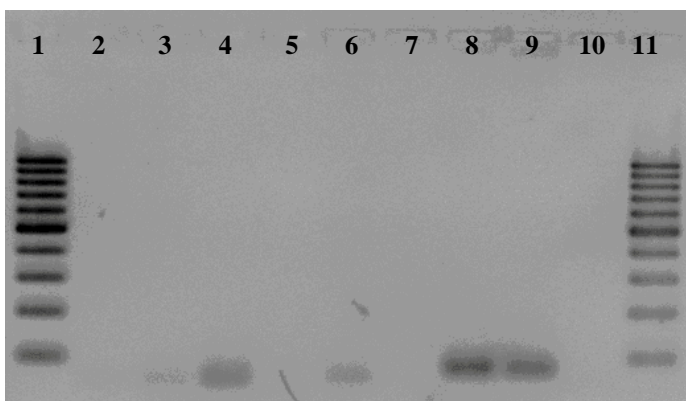
1; 13: size-marker

2 – 7: vzorky

8 – 11: pozitivní kontroly

12: negativní kontrola

Na Obr. 18 je fotografie agarózového gelu z elektroforézy produktů PCR pro gen *traN* (LowGC plazmidy).



Obr. 18: Detekce LowGC plazmidů.

1; 11: size-marker

2 – 7: vzorky

8; 9: pozitivní kontroly

10: negativní kontrola

5 Diskuze

Metodou exogenní izolace plazmidů (konjugační experimenty) jsme získali bakteriální *tet-r E. coli* K-12 CV601 gfp transkojuganty a tím se nám podařilo prokázat horizontální genový přenos genů rezistence k tetracyklinu mezi bakteriemi z kravských exkrementů a laboratorním bakteriálním recipientem *Escherichia coli* K-12 CV601 gfp.

Konjugační pokusy byly úspěšné jen při použití čerstvých kravských exkrementů jako zdroje dárcovských bakterií a pouze pokud jsme exkrementy preinkubovali v médiu s malým množstvím CTC. Co se týče preinkubace exkrementů s dárcovskými bakteriemi v médiu s malým množstvím CTC (5 µg/mL), byl tento krok zahrnut do pokusu za účelem zvýšení frekvence bakteriální konjugace (Whittle *et al.* 2002). Je známo, že např. konjugativní transpozóny z rodiny CTnDOT/ERL při preinkubaci v médiu obsahujícím nízkou koncentraci tetracyklinu (1 µg/mL) zvýší frekvenci svého přenosu a mobilizaci ostatních HGT elementů 100 – 10 000 x (Shoemaker *et al.* 2001; Whittle *et al.* 2002).

Je možné předpokládat, že při použití vzorků půd inkubovaných s kravskými exkrementy byly pokusy neúspěšné z důvodu špatné adaptace fekálních bakterií z exkrementu přidaného do půdy na půdní prostředí; bylo prokázáno, že půdní bakteriální společenstva se od těch fekálních výrazně liší (Hammesfahr *et al.* 2008). Předpokládáme ale, že některé půdní bakterie mohly konjugací získat plazmidy nebo konjugativní transpozóny od fekálních bakterií. Např. gen *tet(W)* byl detekován v půdních vzorcích i na konci inkubačního pokusu (Kyselková *et al.*, nepublikováno), t.j. po třech měsících inkubace, kdy už nepředpokládáme přežití fekálních bakterií v půdě.

Také aktuální fyziologický stav dárcovských bakterií může hrát významnou roli v procesu konjugace; problematická může být dlouhodobá inkubace půdy s exkrementy – fekální (dárcovské) bakterie se dostanou do (pro ně) nevhodného prostředí, kde se navíc musí kompetitivně dělit o živiny s půdními bakteriemi, které jsou pro toto prostředí lépe uzpůsobeny a proto mají výhodu. Otázkou tedy zůstává, po jak dlouhou dobu jsou fekální bakterie schopné přežít v půdním prostředí – navíc ve stavu, kdy jsou ještě schopné konjugace.

Götz a Smalla (1997) ukázali, že hospodářské odpady (hnůj) a BHR plazmidy v nich obsažené mohou zvýšit horizontální genový transfer genů rezistence do půdních bakterií až po dobu 79 dnů.

Dalšími problémy může být malá abundance bakterií nesoucích plazmidy v půdě (ve srovnání s fekálními bakteriemi) a tedy menší pravděpodobnost záchytu, nebo nekompatibilita půdních bakterií nesoucích plazmidy s naším bakteriálním recipientem *E. coli* K-12 CV601 gfp. Výběr recipientních laboratorních kmenů do našich konjugačních pokusů byl limitován dostupností těchto kmenů; z laboratoře prof. K. Smally v Braunschweigu (kde jsme se metodu exogenní izolace plazmidů učili) jsme do naší laboratoře přivezli tři rifampicin a kanamycin rezistentní kmeny recipientů: *Pseudomonas putida* KT2442-GFP, *Escherichia coli* K-12 CV601 gfp a *Acinetobacter baylyi* BD413-GFP. V KP 0 se kmen *P. putida* KT2442-GFP neosvědčil, v dalších pokusech jsme ho tedy již nepoužili. Smalla použila kmen *P. putida* UWC1 jako recipienta pro záchyt IncQ plazmidů nesoucích multirezistence z fekálních bakterií prasečí kejdy (Smalla *et al.* 2000). Ve všech *P. putida* UWC1 transkonjugantech byla dot blot hybridizací potvrzena přítomnost IncQ plazmidů. Protože tyto plazmidy nesly mimo jiné i rezistenci na tetracyklin, bylo by vhodné tento kmen v dalších konjugačních pokusech znovu vyzkoušet (zejména pro záchyt plazmidů z čerstvých exkrementů). Určitou nevýhodou u bakterií rodu *Pseudomonas* by pro nás mohl být fakt, že jsou přirozeně rezistentní na antibiotikum chloramfenikol (Alonso *et al.* 1999).

V KP I a KP II jsme použili jako recipientní kmeny *E. coli* K-12 CV601 gfp i *A. baylyi* BD413-GFP; bohužel design těchto prvních dvou pokusů se ukázal jako nevhodný (nezískali jsme žádné bakteriální transkonjuganty) a v dalších pokusech jsme z kapacitních důvodů použili už jen recipientní kmen *E. coli* K-12 CV601 gfp. Heuer *et al.* ve své studii z roku 2009 zkoumali plazmidy, které potenciálně mohou zvýšit šíření a mezidruhový přenos antibiotických rezistencí mezi fekálními a půdními bakteriemi. Jako předpokládaného přirozeného hostitele LowGC plazmidů v zemědělských odpadech a půdě určili bakterie rodu *Acinetobacter*. Protože se nám podařilo z našich vzorků izolovat LowGC plazmidy, bylo by v budoucích konjugačních pokusech vhodné použít pro záchyt LowGC plazmidů *A. baylyi* BD413-GFP jako recipientního kmene.

Z pěti transkonjugantů z KP III, jednoho transkonjuganta z KP V a šesti transkonjugantů z KP VI se nám podařilo vyizolovat plazmidy o velikosti více jak 10 kb a z některých vzorků plazmidové DNA se nám podařilo amplifikovat geny tetracyklinové rezistence – plazmidy izolované z bakteriálních transkonjugantů se tedy uplatnily při HGT genů rezistence k TC. Pro podrobnější charakterizaci (např. restričním štěpením) detekovaných plazmidů jsme bohužel neměli dostatek plazmidové DNA – měli jsme opakovaně problémy s její izolací a při úspěšné izolaci jsme dostávali malé výtěžky. Z nízké koncentrace plazmidové DNA ve vzorcích po izolaci jsme tedy usoudili, že by se mohlo

jednat o nízkokopiové plazmidy. Problematické pro nás bylo i určení velikosti získaných plazmidů, které jsme provedli jen orientačně pomocí gelové elektroforézy. Pro tento účel by bylo vhodné použít pulzní gelovou elektroforézu (Schwartz *et Cantor* 1984), naše laboratoř na ni ale bohužel není vybavena.

Na některých z plazmidů jsme detekovali genové markery pro plazmidy z inkompatibilních skupin IncP-1 (podskupina IncP-1 ϵ) a LowGC. Tyto skupiny BHR plazmidů jsou svým výskytem charakteristické pro prostředí se zvýšenou frekvencí HGT (tzv. „hot spots“); (Heuer *et al.* 2009).

Při pokusech o amplifikaci *tet-r* genů z plazmidové DNA izolované z transkonjugantů z KP III jsme detekovali geny *tet(M)*, *tet(O)* a *tet(W)*. Pro amplifikaci genů byly použity různé páry primerů. PCR reakce pro gen *tet(M)* proběhla úspěšně s primery navrženými podle studie Aminov *et al.* (2001); (nukleotidy 57 – 227), žádné produkty jsme nedostali při použití primerů od autorů Ng *et al.* (2001); (n. 105 – 510). Naopak primery od Ng *et al.* (2001); (n. 12 – 526) byly použity při úspěšné amplifikaci genu *tet(O)*, a primery podle studie Aminov *et al.* (2001); (n. 58 – 228) byly pro tento gen nevhodné. Gen *tet(W)* nebyl amplifikován při použití primerů od autorů Call *et al.* (2003); (n. 899 – 1447), úspěšně reakce proběhla s primery od Aminov *et al.* (2001); (n. 61 – 228). Všechny determinanty tetracyklinové rezistence, které jsme se snažili detekovat v našich vzorcích, patří do skupiny RPP. O genech kódujících tyto bílkoviny je známo, že často vykazují mozaikovou strukturu (Patterson *et al.* 2007; van Hoek *et al.* 2008).

Mozaikový gen však může být derivátem i dvou různých *tet-r* genů. Stanton *et al.* (2004) ve své studii detekovali mozaikové *tet-r* geny v kulturách *Megasphaera elsdenii* izolovaných z prasečích výkalů. Tyto geny byly různými kombinacemi genů *tet(O)* a *tet(W)*. V případě našich vzorků je možné předpokládat, že obsahují mozaikové geny složené z *tet-r* genů, které jsme ve vzorcích detekovali. Z analýzy překryvů oblastí ohraničených primery se dá v našem případě usuzovat na mozaikové geny typu *tet(O/W/O)* a *tet(O/M/O)*.

Námi detekované geny *tet(M)*, *tet(O)* a *tet(W)* bývají horizontálně přenášeny na BHR plazmidech a konjugativních transpozónech. Gen *tet(M)* je často součástí transpozónů Tn916 a Tn1545. Agersø *et al.* (2002) detekovali tento gen v rezistentních izolátech rodu *Bacillus* izolovaných z prasečích exkrementů a ze zemědělské půdy, která byla těmito exkrementy hnojena. Všechny izoláty pozitivní na gen *tet(M)* zároveň obsahovaly transpozón Tn916 a byly schopné tento mobilní element přenést do laboratorních recipientních kmenů *Enterococcus faecalis* JH2-2, *Enterococcus faecium* BM4105, *Bacillus subtilis* AW59 a *Staphylococcus aureus* 8794RF. V bakteriální transkojugantech nebyla zjištěna přítomnost

plazmidů, proto se dá předpokládat, že gen *tet(M)* do nich byl přenesen na transpozónu Tn916.

Ze čtyř determinant tetracyklinové rezistence [*tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(W)*], jejichž přítomnost jsme ověřovali ve vzorcích plazmidové DNA z našich transkonjugantů, jsme nedetekovali pouze gen *tet(Q)*. Všechny zmíněné determinanty byly detekovány ve vzorcích půdy z inkubačního pokusu, který jsme provedli v létě 2011, a je o nich známo, že se běžně vyskytují v zemědělských půdách a obecně v prostředí ovlivněném lidskou činností (Chee-Sanford *et al.* 2001; Schmitt *et al.* 2006). Charakteristickými přirozenými nositeli genu *tet(Q)* jsou především anaerobní bakterie z kmenů *Firmicutes*, *Actinobacteria* a *Bacteroidetes*, z nichž *Bacteroidetes* mohou představovat až 40 % bakterií exkrementu (Durso *et al.* 2010).

Protože mating dvou konjugačních pokusů, ze kterých jsem získali drtivou většinu transkonjugantů, probíhal za aerobních podmínek, bylo nepravděpodobné, že by se gen *tet(Q)* přenesl do našich transkonjugantů (z KP V, jehož mating probíhal za anaerobních podmínek, jsme získali pouze jednu kolonii transkonjugantů, ale ani u něj jsme gen *tet(Q)* nedetekovali).

Při testování našich transkonjugantů na citlivost ke třinácti vybraným druhům antibiotik (CM, TIG, TE, AMX, PB, C, TMP, DO, S, GM, MEM, CIP, SSS) jsme zjistili, že kultury transkonjugantů ze všech třech úspěšných pokusů získaly kromě rezistence na tetracyklin dále ještě rezistenci na doxycyklin, streptomycin a sulfonamidy. Kultury transkonjugantů z KP V a VI byly dále rezistentní i na amoxicilin a trimetoprim. Transkonjuganti z KP VI vykazovali navíc oproti kulturám z KP III a V rezistenci na další dvě antibiotika – chloramfenikol a ciprofloxacin.

Je známo, že k získání nové antibiotické rezistence u bakterie může dojít třemi možnými způsoby – mutací některého genu na bakteriálním chromozómu (Martinez *et Baquero* 2000), rekombinací cizorodé DNA z prostředí do chromozómu (Davies 1997) nebo HGT genu rezistence (neseného na plazmidu nebo transpozónu) z prostředí do bakterie (Davies 1994). V časovém horizontu, ve kterém byly prováděny naše konjugační pokusy, připadá v úvahu prakticky jen HGT nových rezistenčních genů do námi použitého recipientního kmene *E. coli* K-12 CV601 gfp. V současnosti jsou známy rezistenční geny nesené na plazmidech pro většinu běžně používaných antibiotik a často se stává, že jeden jediný plazmid může přenášet geny rezistence na pět až šest různých antibiotik zároveň (Sherley *et al.* 2004). Do našich *E. coli* K-12 CV601 gfp se spolu s rezistencí na TC přeneslo ještě sedm dalších antibiotických rezistencí (rezistence na AMX, C, TMP, DO, S, SSS a

CIP). Smalla *et al.* (2000) použili pro záchyt BHR plazmidů z fekálních bakterií prasečí kejdy jako laboratorního recipienta kmen *E. coli* CV601. V této studii se do bakteriálních transkonjugantů přenesla determinanta rezistence nejenom na TC, ale i na C, S, SSS, kanamycin a ampicilin.

V kontextu k hromadění multirezistencí v environmentálních bakteriích jsou, kromě odpadů ze zemědělské živočišné výroby, významným zdrojem rezistenčních genů i odpadní vody. Szczepanowski *et al.* (2004) ve své práci izolovali z aktivních kalů z čističky odpadních vod deset různých BHR plazmidů. Podrobně charakterizovali „IncQ-like“ plazmid pod označením pRSB101. Tento mobilizovatelný plazmid nesl spolu s rezistencí na TC i další antibiotické rezistence – na erytromycin, roxytromycin, SSS, cefalosporiny, spektinomycin, S, TMP, kyselinu nalidixovou a na nízkou koncentraci norfloxacinu.

Tato zjištění indikují, že rezistence na TC přenášená BHR plazmidy je doprovázena dalšími rezistencemi, zejména na SSS a S.

6 Závěr

- bakteriální *tet-r E. coli* K-12 CV601 gfp transkojuganty jsme získali pouze v konjugačních pokusech (exogenní izolace plazmidů), ve kterých jsme použili jako zdroje dárcovských bakterií čerstvé exkrementy od krav léčených metricyklinem (chlortetracyklin)
- kravské exkrementy použité v konjugačních pokusech jako zdroj dárcovských bakterií bylo třeba před matingem preinkubovat v médiu s malým množstvím chlortetracyklinu (5 µg/mL)
- z dvanácti bakteriálních *tet-r E. coli* K-12 CV601 gfp transkonjugantů se nám podařilo vyizolovat plazmidy (o velikosti > 10 kb)
- na třech plazmidech izolovaných z bakteriálních *tet-r E. coli* K-12 CV601 gfp transkonjugantů jsme detekovali rezistenční geny *tet(M)*, *tet(O)* a *tet(W)*
- na žádném z testovaných plazmidů jsme nedetekovali gen *tet(Q)*
- PCR reakce pro amplifikaci *tet-r* genů z plazmidové DNA s některými ověřenými páry primerů fungovaly, s jinými ne; důvodem může být výskyt mozaikových *tet-r* genů
- na čtyřech testovaných plazmidech jsme detekovali genové markery pro plazmidy inkompatibilních skupin IncP-1 a LowGC
- přítomnost plazmidů podskupiny IncP-1ε byla potvrzena sekvenováním

7 Seznam použité literatury

- Adams, C.A., et al., *Molecular Characterization of Plasmid-Mediated Oxytetracycline Resistance in Aeromonas salmonicida*. Applied and Environmental Microbiology, 1998. **64**(11): p. 4194-4201.
- Agersø, Y., et al., *The identification of a tetracycline resistance gene tet(M), on a Tn916-like transposon, in the Bacillus cereus group*. FEMS Microbiology Letters, 2002. **214**(2): p. 251-256.
- Agersø, Y. and D. Sandvang, *Class 1 Integrons and Tetracycline Resistance Genes in Alcaligenes, Arthrobacter, and Pseudomonas spp. Isolated from Pigsties and Manured Soil*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(12): p. 7941-7947.
- Alexander, T., et al., *Longitudinal characterization of antimicrobial resistance genes in feces shed from cattle fed different subtherapeutic antibiotics*. BMC Microbiology, 2011. **11**(1): p. 19.
- Alonso, A., F. Rojo, and J.L. Martínez, *Environmental and clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin*. Environmental Microbiology, 1999. **1**(5): p. 421-430.
- Aminov, R.I., N. Garrigues-Jeanjean, and R.I. Mackie, *Molecular Ecology of Tetracycline Resistance: Development and Validation of Primers for Detection of Tetracycline Resistance Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. **67**(1): p. 22-32.
- Andersen, S.R. and R.A. Sandaa, *Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments*. Applied and Environmental Microbiology, 1994. **60**(3): p. 908-912.
- Anderson, J.F., et al., *Antibiotic Resistance of Enterococci in American Bison (Bison bison) from a Nature Preserve Compared to That of Enterococci in Pastured Cattle*. Applied and Environmental Microbiology, 2008. **74**(6): p. 1726-1730.
- Avrain, L., C. Vernozy-Rozand, and I. Kempf, *Evidence for natural horizontal transfer of tetO gene between Campylobacter jejuni strains in chickens*. Journal of Applied Microbiology, 2004. **97**(1): p. 134-140.
- Ayoubi, P., A.O. Kilic, and M.N. Vijayakumar, *Tn5253, the pneumococcal omega (cat tet) BM6001 element, is a composite structure of two conjugative transposons, Tn5251*

- and Tn5252. *Journal of Bacteriology*, 1991. **173**(5): p. 1617-1622.
- Bahl, M.I., et al., *All IncP-1 plasmid subgroups, including the novel ϵ subgroup, are prevalent in the influent of a Danish wastewater treatment plant*. *Plasmid*, 2009. **62**(2): p. 134-139.
- Bahl, M.I., et al., *The multiple antibiotic resistance IncP-1 plasmid pKJK5 isolated from a soil environment is phylogenetically divergent from members of the previously established α , β and δ sub-groups*. *Plasmid*, 2007. **58**(1): p. 31-43.
- Bale, M.J., M.J. Day, and J.C. Fry, *Novel method for studying plasmid transfer in undisturbed river epilithon*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988. **54**(11): p. 2756-2758.
- Barbosa, T.M., K.P. Scott, and H.J. Flint, *Evidence for recent intergeneric transfer of a new tetracycline resistance gene, tet(W), isolated from Butyrivibrio fibrisolvens, and the occurrence of tet(O) in ruminal bacteria*. *Environmental Microbiology*, 1999. **1**(1): p. 53-64.
- Barbour, A.G. and C.F. Garon, *Linear plasmids of the bacterium Borrelia burgdorferi have covalently closed ends*. *Science (New York, N.Y.)*, 1987. **237**(4813): p. 409-411.
- Barile, S., C. Devirgiliis, and G. Perozzi, *Molecular characterization of a novel mosaic tet(S/M) gene encoding tetracycline resistance in foodborne strains of Streptococcus bovis*. *Microbiology*, 2012. **158**(Pt 9): p. 2353-2362.
- Barile, S., C. Devirgiliis, and G. Perozzi, *Molecular characterization of a novel mosaic tet(S/M) gene encoding tetracycline resistance in foodborne strains of Streptococcus bovis*. *Microbiology*, 2012. **158**(Pt 9): p. 2353-2362.
- Batchelor, R.A., et al., *Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different Campylobacter species*. *Microbiology*, 2004. **150**(10): p. 3507-3517.
- Bedzyk, L.A., et al., *Insertion and excision of Bacteroides conjugative chromosomal elements*. *Journal of bacteriology*, 1992. **174**(1): p. 166-172.
- Bennett, P.M., (2004). *Transposable elements*. In: Schaechter M (ed) *The Desk Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier Academic Press: San Diego, CA, pp 1025–1041.
- Bennett, P.M., (2005). *Genome plasticity*. In: Woodford N, Johnson A (eds). *Methods in Molecular Biology*, Vol 266, Genomics, Proteomics and Clinical Bacteriology. Humana Press Inc.: Totowa, NJ, pp 71–113.

- Bennett, P.M., *Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria*. British Journal of Pharmacology, 2008. **153**(S1): p. S347-S357.
- Billington, S.J., J.G. Songer, and B.H. Jost, *Widespread Distribution of a Tet W Determinant among Tetracycline-Resistant Isolates of the Animal Pathogen Arcanobacterium pyogenes*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002. **46**(5): p. 1281-1287.
- Binh, C.T.T., et al., *Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids*. FEMS Microbiology Ecology, 2008. **66**(1): p. 25-37.
- Bismuth, R., et al., *Gene heterogeneity for tetracycline resistance in Staphylococcus spp*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1990. **34**(8): p. 1611-1614.
- Boon, N., et al., *Genetic Diversity among 3-Chloroaniline- and Aniline-Degrading Strains of the Comamonadaceae*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. **67**(3): p. 1107-1115.
- Burdett, V., *Purification and characterization of Tet(M), a protein that renders ribosomes resistant to tetracycline*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(5): p. 2872-2877.
- Burrus, V., et al., *Conjugative transposons: the tip of the iceberg*. Molecular Microbiology, 2002. **46**(3): p. 601-610.
- Call, D.R., et al., *Identifying Antimicrobial Resistance Genes with DNA Microarrays*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003. **47**(10): p. 3290-3295.
- Clewell, D.B., *Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1990. **9**(2): p. 90-102.
- Clewell, D.B., et al., *Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons*. Trends in Microbiology, 1995. **3**(6): p. 229-236.
- Courvalin, P. and C. Carrier, *Tn1545: A conjugative shuttle transposon*. Molecular and General Genetics MGG, 1987. **206**(2): p. 259-264.
- Craig, N.L., *Target site selection in transposition*. Annual review of biochemistry, 1997. **66**: p. 437-474.
- Datta, N. and R.W. Hedges, *Trimethoprim Resistance Conferred by W Plasmids in Enterobacteriaceae*. Journal of General Microbiology, 1972. **72**(2): p. 349-355.
- Davies, J., *Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes*. Science, 1994. **264**(5157): p. 375-382.
- Davies, J.E., *Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants*. Ciba Found Symp, 1997. **207**: p. 15-27; discussion 27-35.

- Doherty, N., et al., *Genetic Diversity of the tet(M) Gene in Tetracycline-Resistant Clonal Lineages of Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000. **44**(11): p. 2979-2984.
- Dolejska, M., et al., *Dissemination of IncFIIK-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates from children in hospital paediatric oncology wards*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2012. **40**(6): p. 510-515.
- Durso, L.M., et al., *Animal-to-Animal Variation in Fecal Microbial Diversity among Beef Cattle*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010. **76**(14): p. 4858-4862.
- Edwards, U., et al., *Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA*. *Nucleic Acids Research*, 1989. **17**(19): p. 7843-7853.
- Feinman, S.E., and J.C. Matheson, III. 1978. *Draft environmental impact statement: Subtherapeutic antibacterial agents in animal feeds*. Bureau of Veterinary Medicine. Food and Drug Admin., Rockville, MD.
- Felsenstein, J., *Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap*. *Evolution*, 1985. **39**: p. 783-791.
- Fernández-López, R., et al., *Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2006. **30**(6): p. 942-966.
- Fitzgerald, G.F. and D.B. Clewell, *A conjugative transposon (Tn919) in Streptococcus sanguis*. *Infection and Immunity*, 1985. **47**(2): p. 415-420.
- Flannagan, S.E., et al., *Nucleotide sequence of the 18-kb conjugative transposon Tn916 from Enterococcus faecalis*. *Plasmid*, 1994. **32**(3): p. 350-354.
- Franke, A.E. and D.B. Clewell, *Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in Streptococcus faecalis that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid*. *Journal of Bacteriology*, 1981. **145**(1): p. 494-502.
- Frey, J., and M. Bagdasarian. 1989. *The biology of IncQ plasmids*, p. 79–93. In C. M. Thomas (ed.), *Promiscuous plasmids of Gram-negative bacteria*. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom.
- Gilmour, M.W., et al., *The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics*. *Plasmid*, 2004. **52**(3): p. 182-202.
- Gormley, E.P. and J. Davies, *Transfer of plasmid RSF1010 by conjugation from Escherichia coli to Streptomyces lividans and Mycobacterium smegmatis*. *Journal of*

- Bacteriology, 1991. **173**(21): p. 6705-6708.
- Götz, A., et al., *Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. **62**(7): p. 2621-8.
- Gotz, A. and K. Smalla, *Manure Enhances Plasmid Mobilization and Survival of Pseudomonas putida Introduced into Field Soil*. Applied and Environmental Microbiology, 1997. **63**(5): p. 1980-6.
- Haines, A.S., et al., *Plasmids from freshwater environments capable of IncQ retrotransfer are diverse and include pQKH54, a new IncP-1 subgroup archetype*. Microbiology, 2006. **152**(9): p. 2689-2701.
- Hammesfahr, U., et al., *Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils*. Soil Biology and Biochemistry, 2008. **40**(7): p. 1583-1591.
- Hamscher, G., et al., *Determination of Persistent Tetracycline Residues in Soil Fertilized with Liquid Manure by High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(7): p. 1509-1518.
- Havlíčková, P., 2011: *Šíření bakteriální rezistence k tetracyklinovým antibiotikům z chovu hospodářských zvířat do půdního prostředí [Dissemination of bacterial resistance to tetracycline antibiotics from animal husbandry to the soil*. Bc thesis, in Czech.] – 48 p.,
Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Herrero, M., V. de Lorenzo, and J.B. Neilands, *Nucleotide sequence of the iucD gene of the pColV-K30 aerobactin operon and topology of its product studied with phoA and lacZ gene fusions*. Journal of Bacteriology, 1988. **170**(1): p. 56-64.
- Heuer, H., et al., *Spreading antibiotic resistance through spread manure: characteristics of a novel plasmid type with low %G+C content*. Environmental Microbiology, 2009. **11**(4): p. 937-949.
- Heuer, H. and K. Smalla, *Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months*. Environmental Microbiology, 2007. **9**(3): p. 657-666.
- Heuer, H. and K. Smalla, *Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil*. FEMS Microbiology Reviews, 2012. **36**(6): p. 1083-1104.
- Heuer, H., et al., *The complete sequences of plasmids pB2 and pB3 provide evidence for a*

- recent ancestor of the IncP-1 β group without any accessory genes.* Microbiology, 2004. **150**(11): p. 3591-3599.
- Hill, K.E., A.J. Weightman, and J.C. Fry, *Isolation and screening of plasmids from the epilithon which mobilize recombinant plasmid pD10.* Applied and Environmental Microbiology, 1992. **58**(4): p. 1292-1300.
- Hinnebusch, B.J., et al., *Role of Yersinia Murine Toxin in Survival of Yersinia pestis in the Midgut of the Flea Vector.* Science, 2002. **296**(5568): p. 733-735.
- Horaud, T., F. Delbos, and G. de Cespédès, *Tn3702, a conjugative transposon in Enterococcus faecalis.* FEMS Microbiology Letters, 1990. **72**(1-2): p. 189-194.
- Chee-Sanford, J.C., et al., *Occurrence and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and Groundwater Underlying Two Swine Production Facilities.* Applied and Environmental Microbiology, 2001. **67**(4): p. 1494-1502.
- Chopra, I. and M. Roberts, *Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance.* Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001. **65**(2): p. 232-260.
- Christie, P.J., et al., *Two conjugation systems associated with Streptococcus faecalis plasmid pCF10: identification of a conjugative transposon that transfers between S. faecalis and Bacillus subtilis.* Journal of Bacteriology, 1987. **169**(6): p. 2529-2536.
- Johnson, T.J. and L.K. Nolan, *Pathogenomics of the Virulence Plasmids of Escherichia coli.* Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2009. **73**(4): p. 750-774.
- Kinashi, H., M. Shimaji, and A. Sakai, *Giant linear plasmids in Streptomyces which code for antibiotic biosynthesis genes.* Nature, 1987. **328**(6129): p. 454-456.
- Knapp, C.W., et al., *Evidence of Increasing Antibiotic Resistance Gene Abundances in Archived Soils since 1940.* Environmental Science and Technology, 2010. **44**(2): p. 580-587.
- Krapac, I.G., S. Koike, M.T. Meyer, D.D. Snow, S.-F.J. Chou, R.I. Mackie, W.R. Roy, and J.C. Chee-Sanford. 2004. *Long-term monitoring of the occurrence of antibiotic residues and antibiotic resistance genes in groundwater near swine confinement facilities.* p. 158-174. In Proc. of the 4th Int. Conf. on Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Chemicals in Water, Minneapolis, MN. October 2004. National Groundwater Assoc., Westerville, OH.
- Krasowiak, R., et al., *PCR primers for detection and characterisation of IncP-9 plasmids.* FEMS Microbiology Ecology, 2002. **42**(2): p. 217-225.
- Lacroix, J.M. and C.B. Walker, *Detection and prevalence of the tetracycline resistance*

- determinant Tet Q in the microbiota associated with adult periodontitis. Oral Microbiology and Immunology*, 1996. **11**(4): p. 282-288.
- Latham, W.W., et al., *A Plasminogen-Activating Protease Specifically Controls the Development of Primary Pneumonic Plague*. *Science*, 2007. **315**(5811): p. 509-513.
- Levy, S.B., *Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1992. **36**(4): p. 695-703.
- Levy SB (2002). *The Antibiotic Paradox: How the Misuse of Antibiotics Destroys their Curative Powers*. Perseus Publishing, Boston, MA.
- Łobocka, M.B., et al., *Genome of Bacteriophage P1*. *Journal of Bacteriology*, 2004. **186**(21): p. 7032-7068.
- Luna, V.A. and M.C. Roberts, *The presence of the tetO gene in a variety of tetracycline-resistant Streptococcus pneumoniae serotypes from Washington State*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1998. **42**(5): p. 613-619.
- Maher, D., R. Sherburne, and D.E. Taylor, *H-pilus assembly kinetics determined by electron microscopy*. *Journal of Bacteriology*, 1993. **175**(8): p. 2175-2183.
- Manavathu, E.K., K. Hiratsuka, and D.E. Taylor, *Nucleotide sequence analysis and expression of a tetracycline-resistance gene from Campylobacter jejuni*. *Gene*, 1988. **62**(1): p. 17-26.
- Martin, P., P. Trieu-Cuot, and P. Courvalin, *Nucleotide sequence of the tetM tetracycline resistance determinant of the streptococcal conjugative shuttle transposon Tn1545*. *Nucleic Acids Research*, 1986. **14**(17): p. 7047-7058.
- Martinez, J.L., *The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2009. **276**(1667): p. 2521-2530.
- Martinez, J.L. and F. Baquero, *Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000. **44**(7): p. 1771-1777.
- Melville, C.M., et al., *The Butyrivibrio fibrisolvens tet(W) Gene Is Carried on the Novel Conjugative Transposon TnB1230, Which Contains Duplicated Nitroreductase Coding Sequences*. *Journal of Bacteriology*, 2004. **186**(11): p. 3656-3659.
- Molin, S. and T. Tolker-Nielsen, *Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003. **14**(3): p. 255-261.
- Mullany, P., et al., *A group II intron in a conjugative transposon from the gram-positive bacterium, Clostridium difficile*. *Gene*, 1996. **174**(1): p. 145-150.

- Murray, B.E., F.Y. An, and D.B. Clewell, *Plasmids and pheromone response of the beta-lactamase producer Streptococcus (Enterococcus) faecalis HH22*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1988. **32**(4): p. 547-551.
- Ng, L.K., et al., *Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes*. Molecular and Cellular Probes, 2001. **15**(4): p. 209-215.
- Nikolich, M.P., N.B. Shoemaker, and A.A. Salyers, *A Bacteroides tetracycline resistance gene represents a new class of ribosome protection tetracycline resistance*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1992. **36**(5): p. 1005-1012.
- Norberg, P., et al., *The IncP-1 plasmid backbone adapts to different host bacterial species and evolves through homologous recombination*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 268.
- Oggioni, M.R., et al., *The Tetracycline Resistance Genetet(M) Exhibits Mosaic Structure*. Plasmid, 1996. **35**(3): p. 156-163.
- Ochman, H., J.G. Lawrence, and E.A. Groisman, *Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation*. Nature, 2000. **405**(6784): p. 299-304.
- Olsvik, B., I. Olsen, and F.C. Tenover, *The tet(Q) gene in bacteria isolated from patients with refractory periodontal disease*. Oral Microbiology and Immunology, 1994. **9**(4): p. 251-255.
- Olsvik, B. and F.C. Tenover, *Tetracycline Resistance in Periodontal Pathogens*. Clinical Infectious Diseases, 1993. **16**(Supplement 4): p. S310-S313.
- Pansegrau, W., et al., *Complete Nucleotide Sequence of Birmingham IncPa Plasmids: Compilation and Comparative Analysis*. Journal of Molecular Biology, 1994. **239**(5): p. 623-663.
- Patterson, A.J., et al., *Mosaic Tetracycline Resistance Genes Are Widespread in Human and Animal Fecal Samples*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007. **51**(3): p. 1115-1118.
- Perez-Casal, J.F., A.E. Gammie, and J.H. Crosa, *Nucleotide sequence analysis and expression of the minimum REPI replication region and incompatibility determinants of pColV-K30*. Journal of Bacteriology, 1989. **171**(4): p. 2195-2201.
- Phelan, R.W., et al., *Tetracycline Resistance-Encoding Plasmid from Bacillus sp. Strain #24, Isolated from the Marine Sponge Haliclona simulans*. Applied and Environmental Microbiology, 2011. **77**(1): p. 327-329.
- Poyart-Salmeron, C., et al., *The integration-excision system of the conjugative transposon Tn 1545 is structurally and functionally related to those of lambdoid phages*. Molecular Microbiology, 1990. **4**(9): p. 1513-1521.

- Rhodes, G., et al., *Distribution of Oxytetracycline Resistance Plasmids between Aeromonads in Hospital and Aquaculture Environments: Implication of Tn1721 in Dissemination of the Tetracycline Resistance Determinant Tet A*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(9): p. 3883-3890.
- Rhodes, G., et al., *Complete Nucleotide Sequence of the Conjugative Tetracycline Resistance Plasmid pFBAOT6, a Member of a Group of IncU Plasmids with Global Ubiquity*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(12): p. 7497-7510.
- Rice, L.B., *Tn916 Family Conjugative Transposons and Dissemination of Antimicrobial Resistance Determinants*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998. **42**(8): p. 1871-1877.
- Rice, L.B., S.H. Marshall, and L.L. Carias, *Tn5381, a conjugative transposon identifiable as a circular form in Enterococcus faecalis*. Journal of Bacteriology, 1992. **174**(22): p. 7308-7315.
- Roberts, A.P., et al., *Transfer of Tn916-Like Elements in Microcosm Dental Plaques*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001. **45**(10): p. 2943-2946.
- Roberts, M., *Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution*. FEMS Microbiology Reviews, 1996. **19**(1): p. 1-24.
- Roberts, M.C., *Update on acquired tetracycline resistance genes*. FEMS Microbiology Letters, 2005. **245**(2): p. 195-203.
- Roberts, M. (2012) *Mechanism of resistance for characterized tet and otr genes*. Dostupné na:
<http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb1.pdf> [12-12-2012]
- Saadi, S., et al., *Nucleotide sequence analysis of RepFIC, a basic replicon present in IncFI plasmids P307 and F, and its relation to the RepA replicon of IncFII plasmids*. Journal of Bacteriology, 1987. **169**(5): p. 1836-1846.
- Sakai, H. and T. Komano, *DNA replication of IncQ broad-host-range plasmids in gram-negative bacteria*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1996. **60**(3): p. 377-382.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(12): p. 5463-5467.
- Sanchez-Pescador, R., et al., *Homology of the TetM with translational elongation factors: implications for potential modes of tetM-conferred tetracycline resistance*. Nucleic

- Acids Res, 1988. **16**(3): p. 1218.
- Sawant, A.A., et al., *Antimicrobial-Resistant Enteric Bacteria from Dairy Cattle*. Applied and Environmental Microbiology, 2007. **73**(1): p. 156-163.
- Scott, J.R., P.A. Kirchman, and M.G. Caparon, *An intermediate in transposition of the conjugative transposon Tn916*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. **85**(13): p. 4809-4813.
- Scott, K.P., et al., *High-frequency transfer of a naturally occurring chromosomal tetracycline resistance element in the ruminal anaerobe Butyrivibrio fibrisolvens*. Applied and Environmental Microbiology, 1997. **63**(9): p. 3405-11.
- Sevastyanovich, Y.R., et al., *Diversity of IncP-9 plasmids of Pseudomonas*. Microbiology, 2008. **154**(10): p. 2929-2941.
- Shah, H.N. and M.D. Collins, *Reclassification of Bacteroides multiacidus (mitsuoka, terada, watanabe and uchida) in a new genus Mitsuokella, as Mitsuokella multiacidus comb. nov.* Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie, 1982. **3**(4): p. 491-494.
- Sherley, M., D.M. Gordon, and P.J. Collignon, *Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of Escherichia coli*. Microbiology, 2004. **150**(5): p. 1539-1546.
- Shoemaker, N.B., et al., *Evidence for Extensive Resistance Gene Transfer among Bacteroides spp. and among Bacteroides and Other Genera in the Human Colon*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. **67**(2): p. 561-568.
- Schlüter, A., et al., *The 64 508 bp IncP-1beta antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a waste-water treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1beta group*. Microbiology (Reading, England), 2003. **149**(Pt 11): p. 3139-3153.
- Schlüter, A., et al., *Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool*. FEMS Microbiology Reviews, 2007. **31**(4): p. 449-477.
- Schmitt, H., et al., *Tetracyclines and Tetracycline Resistance in Agricultural Soils: Microcosm and Field Studies*. Microbial Ecology, 2006. **51**(3): p. 267-276.
- Schmitz, F.-J., et al., *Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European Staphylococcus aureus isolates*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001. **47**(2): p. 239-240.
- Schnappinger, D. and W. Hillen, *Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance*

- mechanisms*. Archives of Microbiology, 1996. **165**(6): p. 359-369.
- Schwartz, D.C. and C.R. Cantor, *Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis*. Cell, 1984. **37**(1): p. 67-75.
- Schwarz, S., et al., *Tetracycline resistance in Staphylococcus spp. from domestic animals*. Veterinary Microbiology, 1998. **63**(2-4): p. 217-227.
- Smalla, K., et al., *Exogenous Isolation of Antibiotic Resistance Plasmids from Piggery Manure Slurries Reveals a High Prevalence and Diversity of IncQ-Like Plasmids*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(11): p. 4854-4862.
- Smets, B.F., J.B. Morrow, and C. Arango Pinedo, *Plasmid Introduction in Metal-Stressed, Subsurface-Derived Microcosms: Plasmid Fate and Community Response*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. **69**(7): p. 4087-4097.
- Sørum, H., et al., *Integron-Containing IncU R Plasmids pRAS1 and pAr-32 from the Fish Pathogen Aeromonas salmonicida*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003. **47**(4): p. 1285-1290.
- Sougakoff, W., et al., *Nucleotide sequence and distribution of gene tetO encoding tetracycline resistance in Campylobacter coli*. FEMS Microbiology Letters, 1987. **44**(1): p. 153-159.
- Spiers, A.J., N. Bhana, and P.L. Bergquist, *Regulatory interactions between RepA, an essential replication protein, and the DNA repeats of RepFIB from plasmid P307*. Journal of Bacteriology, 1993. **175**(13): p. 4016-4024.
- Spížek, J., et al., *Do we need new antibiotics? The search for new targets and new compounds*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010. **37**(12): p. 1241-1248.
- Stackebrandt, E., et al., *16S rRNA analysis of Sporomusa, selenomonas, and Megasphaera: on the phylogenetic origin of Gram-positive Eubacteria*. Archives of Microbiology, 1985. **143**(3): p. 270-276.
- Stanisich, V.A., (1988). *Identification and analysis of plasmids at the genetic level*. In: Grinsted J, Bennett PM (eds). Methods in Microbiology, Vol. 21, Plasmid Technology 2nd edn. Academic Press: London, pp 11-47.
- Stanton, T.B. and S.B. Humphrey, *Isolation of Tetracycline-Resistant Megasphaera elsdenii Strains with Novel Mosaic Gene Combinations of tet(O) and tet(W) from Swine*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. **69**(7): p. 3874-3882.
- Stanton, T.B., J.S. McDowall, and M.A. Rasmussen, *Diverse Tetracycline Resistance Genotypes of Megasphaera elsdenii Strains Selectively Cultured from Swine Feces*.

- Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(6): p. 3754-3757.
- Szczepanowski, R., et al., *The 120592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions*. Microbiology, 2005. **151**(4): p. 1095-1111.
- Szczepanowski, R., et al., *Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system*. Microbiology, 2004. **150**(11): p. 3613-3630.
- Taylor, D.E., *Plasmid-mediated tetracycline resistance in Campylobacter jejuni: expression in Escherichia coli and identification of homology with streptococcal class M determinant*. Journal of Bacteriology, 1986. **165**(3): p. 1037-1039.
- Taylor, D.E. and R.B. Grant, *Incompatibility and surface exclusion properties of H1 and H2 plasmids*. Journal of Bacteriology, 1977. **131**(1): p. 174-178.
- Taylor, D.E. and A. Chau, *Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1996. **40**(1): p. 1-5.
- Taylor, D.E. and J.G. Levine, *Studies of Temperature-sensitive Transfer and Maintenance of H Incompatibility Group Plasmids*. Journal of General Microbiology, 1980. **116**(2): p. 475-484.
- Tennstedt, T., et al., *Sequence of the 68,869 bp IncP-1 α plasmid pTB11 from a wastewater treatment plant reveals a highly conserved backbone, a Tn402-like integron and other transposable elements*. Plasmid, 2005. **53**(3): p. 218-238.
- Thaker, M., P. Spanogiannopoulos, and G. Wright, *The tetracycline resistome*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010. **67**(3): p. 419-431.
- Thimm, T., et al., *Contribution of the earthworm Lumbricus rubellus (Annelida, Oligochaeta) to the establishment of plasmids in soil bacterial communities*. Microbial Ecology, 2001. **41**(4): p. 341-351.
- Thomas, C.M., *Paradigms of plasmid organization*. Molecular Microbiology, 2000. **37**(3): p. 485-491.
- Thorsted, P.B., et al., *Complete sequence of the IncP β plasmid R751: implications for evolution and organisation of the IncP backbone*. Journal of Molecular Biology, 1998. **282**(5): p. 969-990.
- Top, E., et al., *Exogenous Isolation of Mobilizing Plasmids from Polluted Soils and Sludges*.

- Applied and Environmental Microbiology, 1994. **60**(3): p. 831-839.
- Valentine, P.J., N.B. Shoemaker, and A.A. Salyers, *Mobilization of Bacteroides plasmids by Bacteroides conjugal elements*. Journal of Bacteriology, 1988. **170**(3): p. 1319-1324.
- Van Elsas, J.D., et al., *Isolation, Characterization, and Transfer of Cryptic Gene-Mobilizing Plasmids in the Wheat Rhizosphere*. Applied and Environmental Microbiology, 1998. **64**(3): p. 880-889.
- Van Elsas, J.D., S. Turner, and M.J. Bailey, *Horizontal gene transfer in the phytosphere*. New Phytologist, 2003. **157**(3): p. 525-537.
- Van Hoek, A.H.A.M., et al., *Mosaic Tetracycline Resistance Genes and Their Flanking Regions in Bifidobacterium thermophilum and Lactobacillus johnsonii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008. **52**(1): p. 248-252.
- Vedler, E., M. Vahter, and A. Heinaru, *The Completely Sequenced Plasmid pEST4011 Contains a Novel IncP1 Backbone and a Catabolic Transposon Harboring tfd Genes for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Degradation*. Journal of Bacteriology, 2004. **186**(21): p. 7161-7174.
- Villedieu, A., et al., *Prevalence of Tetracycline Resistance Genes in Oral Bacteria*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003. **47**(3): p. 878-882.
- Warsa, U.C., et al., *Detection of tet(K) and tet(M) in Staphylococcus aureus of Asian countries by the polymerase chain reaction*. The Journal of antibiotics, 1996. **49**(11): p. 1127-1132.
- Watanabe, T., *Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria*. Bacteriol Rev, 1963. **27**: p. 87-115.
- Watanabe, T., C. Furuse, and S. Sakaizumi, *Transduction of Various R Factors by Phage P1 in Escherichia coli and by Phage P22 in Salmonella typhimurium*. Journal of Bacteriology, 1968. **96**(5): p. 1791-1795.
- Whiteley, M. and D.E. Taylor, *Identification of DNA homologies among H incompatibility group plasmids by restriction enzyme digestion and Southern transfer hybridization*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1983. **24**(2): p. 194-200.
- Whittle, G., N.B. Shoemaker, and A.A. Salyers, *Characterization of Genes Involved in Modulation of Conjugal Transfer of the Bacteroides Conjugal Transposon CTnDOT*. Journal of Bacteriology, 2002. **184**(14): p. 3839-3847.
- Wilkins, B.M., (1995). *Gene transfer by bacterial conjugation: diversity of systems and functional specifications*. In: Baumberg S, Young JPW (eds). Society for General Microbiology Symposium 52, Population Genetics of Bacteria. Cambridge

University Press: Cambridge, pp 59–88.

Woese, C.R. and G.E. Fox, *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(11): p. 5088-5090.

Woese, C.R., O. Kandler, and M.L. Wheelis, *Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990. **87**(12): p. 4576-4579.

Womble, D.D. and R.H. Rownd, *Genetic and physical map of plasmid NR1: comparison with other IncFII antibiotic resistance plasmids*. Microbiological reviews, 1988. **52**(4): p. 433-451.

8 Přílohy

Tab. V: Finální složení PCR reakčních směsí - výsledné koncentrace ve 25 μ l reakci.

	<i>tet(M)</i>	<i>tet(O)</i>	<i>tet(Q)</i>	<i>tet(W)</i>	16S rRNA	<i>trfA</i>	<i>traN</i>
Pufr	10x ^a	10x ^a	10x ^a	10x ^a	10x ^a	10x ^c	10x ^c
MgCl₂	-	-	-	-	-	1,5mM	1,5mM
dNTPs	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM
Forwad primer	500nM	500nM	500nM	500nM	500nM	500nM	500nM
Reverse primer	500nM	500nM	500nM	500nM	500nM	500nM	500nM
DMSO	-	-	-	-	-	1,5mM	1,5mM
BSA	-	-	-	-	-	0,12mg/ml	0,12mg/ml
DreamTaqTM polymeráza	-	-	-	-	-	0,05U/ μ l	0,05U/ μ l
Templátová DNA	20 - 50ng/ μ l	20ng/ μ l	20ng/ μ l	20ng/ μ l	20 - 50ng/ μ l	20 - 50ng/ μ l	20 - 50ng/ μ l
Q-solution	5x ^b	5x ^b	5x ^b	5x ^b	5x ^b	-	-
Quiagen Taq	0,05U/ μ l	0,05U/ μ l	0,05U/ μ l	0,05U/ μ l	0,05U/ μ l	-	-

^a Pufr bez přídavku MgCl₂, který obsahuje 500mM KCl, 100mM Tris-Cl (pH 9.0) a 0,1% Triton X-100 v optimalizovaném poměru (Fermentas)

^b Pufr dodávaný s QuiagenTaq (Quiagen; obsahuje již Mg²⁺ ionty, přesné složení nezveřejněno)

^c Pufr B33, který obsahuje 750 mM Tris-HCl (pH 8,8), 200mM (NH₄)₂SO₄ a 0,1% (v/v) Tween 20 (Fermentas)

Tab. VI: Primery a PCR podmínky používané pro amplifikaci genů.

Gen	Primery	Sekvence primerů 5'-3' (Citace)	Cykly PCR reakce	Délka výsledného produktu [bp]	Pozitivní kontrola (Citace)
<i>tet(M)</i>	<i>tet(M)</i> (F)	ACAGAAAGCTTATTATATAAC	I. 4min/94°C II. 20s/94°C III. 30s/52,3°C IV. 1min/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 7min/68°C	171	Plazmid pAT101, nesoucí gen <i>tet(M)</i> z transpozonu Tn1545 rodu <i>Streptococcus</i> (Martin <i>et al.</i> 1986)
	<i>tet(M)</i> (R)	TGGCGTGTCTATGATGTTAC			
		(Aminov <i>et al.</i> 2001)			
	<i>tet(M)</i> (F)	GTGGACAAAGGTACAACGAG		406	
<i>tet(M)</i> (R)	CGGTAAAGTTCGTCACACAC				
	(Ng <i>et al.</i> 2001)				
<i>tet(O)</i>	<i>tet(O)</i> (F)	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC	I. 5min/95°C II. 30s/94°C III. 30s/58°C IV. 30s/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 5min/74°C	515	Plazmid pGEM nesoucí gen <i>tet(O)</i> (Aminov <i>et al.</i> 2001)
	<i>tet(O)</i> (R)	TCCCACTGTCCATATCGTCA			
		(Ng <i>et al.</i> 2001)			
	<i>tet(O)</i> (F)	ACGGARAGTTTATTGTATACC		515	
<i>tet(O)</i> (R)	TGGCGTATCTATAATGTTGAC				
	(Aminov <i>et al.</i> 2001)				

<i>tet(Q)</i>	<i>tet(Q)</i> (F) <i>tet(Q)</i> (R)	AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG CGGAGTGTCAATGATATTGCA (Aminov <i>et al.</i> 2001)	I. 4min/94°C II. 30s/94°C III. 30s/64°C IV. 30s/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 5min/72°C	169	Plazmid pBT-1 nesoucí gen <i>tet(Q)</i> (Aminov <i>et al.</i> 2001)
<i>tet(W)</i>	<i>tet(W)</i> (F) <i>tet(W)</i> (R)	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC GGGCGTATCCACAATGTTAAC (Aminov <i>et al.</i> 2001)	I. 4min/94°C II. 20s/94°C III. 20s/64°C IV. 20s/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 5min/72°C	168	Plazmid pGEM nesoucí gen <i>tet(W)</i> (Aminov <i>et al.</i> 2001)
	<i>tet(W)</i> (F) <i>tet(W)</i> (R)	GGGAAATTGTTCCGGACAGAC AACGGATACCATCCCTGACA (Call <i>et al.</i> 2003)	I. 2min/95°C II. 30s/96°C III. 30s/60°C IV. 50s/72°C (zpět na krok II., opakovat 30x) V. 10min/72°C	549	
16S rRNA	pA pH	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG AAGGAGGTGATCCAGCCGCA (Edwards <i>et al.</i> 1989)	I. 5min/95°C II. 1min/94°C III. 30s/61°C IV. 1min 30s/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 5min/72°C	1500	<i>Streptomyces rimosus subsp. rimosus</i> DSMZ 40260 (ATTC 10970)
<i>trfA</i>	<i>trfA</i> 733 (F) <i>trfA</i> 1013 (R)	TTCACSTTCTACGAGMKTGCCAGGAC GWCAGCTTGCGGTACTTCTCCCA	I. 5min/94°C II. 30s/94°C III. 20s/60°C IV. 20s/72°C (zpět na krok II., opakovat 30x) V. 3min/72°C	281	Plazmidy pQKH54 (IncP1 γ), pKJK5 (IncP1 \square), pEST4011 (IncP1 δ)
	<i>trfA</i> -e (F) <i>trfA</i> -e (R)	TTCACGTTCTACGAGCTTTGCCAGGAC GTCAGCTTGCGGTACTTCTCCCA			
	<i>trfA</i> -d (F) <i>trfA</i> -d (R)	TTCACGTTCTACGAGCTTTGCACAGAC GACAGCTCGCGGTACTTTTCCCA			
	<i>trfA</i> -z (F) <i>trfA</i> -z (R)	TTCACTTTCTACGAAATCTGCAAAGAC GATAGCTTCCGATACTTTTCCCA			

		(Bahl <i>et al.</i> 2009)			
<i>traN</i>	<i>traN</i> (F) <i>traN</i> (R)	GCTTGGCGGTCAGCAATT TTAGGAATAACAATCGCTACACCTTTAC (Binh <i>et al.</i> 2008)	I. 5min/94°C II. 30s/94°C III. 20s/60°C IV. 20s/72°C (zpět na krok II., opakovat 30x) V. 3min/72°C	48	Plazmid pHHV216