

Středoškolská odborná činnost 2008/2009
Obor 08 - Ochrana a tvorba životního prostředí

Vstup antibiotik do prostředí a šíření antibiotické rezistence mezi půdními bakteriemi

Alžběta Elhottová

8.E, Gymnázium Jana Valeriána Jirsíka, Fráni Šrámka 23,
České Budějovice 370 01, Jihočeský kraj

Studie byla vypracována v Biologickém centru AV ČR, v. v. i. – v Ústavu půdní biologie,
Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice

Autor práce: Alžběta Elhottová, Gymnázium Jana Valeriána Jirsíka, adresa: Skuherského 54,
České Budějovice 370 01, email: a.elhottova@seznam.cz, tel.: 728 766 156

Konzultant: Ing. Václav Křišťufek, CSc.

Zadavatel práce: RNDr. Dana Elhottová, PhD.

Práce byla řešena v rámci úkolů projektu MŠMT *Centrum environmentální mikrobiologie*
(LC06066)

Čestné prohlášení autora o zveřejnění všech informačních zdrojů

Prohlašuji tímto, že jsem soutěžní práci vypracovala samostatně pod odborným vedením
vědeckých pracovníků Ústavu půdní biologie BC AV ČR v Českých Budějovicích, a že jsem
 uvedla všechny zdroje informací potřebné k vypracování předkládané práce.

V Českých Budějovicích, 16.4. 2009

.....

Anotace

Práce se vztahovala k studiu rezervoárů mikrobiální antibiotické rezistence v půdním prostředí. Studovaným rezervoárem byla luční půda (PK) více jak 30 let cyklicky hnojená kejdou z velkovýkrmny vepřů, ošetřovaných z terapeutických i subterapeutických důvodů veterinárními antibiotiky. Vedle půdy PK byla studována kontrolní nekejdovaná půda (N) z téže lokality.

V laboratorním experimentu byla provedena inkubace obou půd s různě vysokou koncentrací antibiotika chlor-tetracyklinu (TET), aplikovaného ve velkovýkrmně. Experiment simuloval selekční tlak ATB na půdní bakteriální společenstvo obou půd. Pomocí kultivačních technik bylo hodnoceno, jak se změnila počty celkových i TET-rezistentních bakterií, jejich druhová/rodová skladba (MIS Sherlock Sytem) a rezistence k dalším antibiotikům (difuzní ATB zónový test).

Bylo zjištěno, že půda PK se lišila v reakci na přídavek TET ve srovnání s půdou N. Nejnižší testovaná dávka TET (0,1 mg TET. kg⁻¹s.p.) průkazně stimulovala počty celkových bakterií na počátku i konci inkubace v půdě PK.

Výsledky dále prokázaly stimulační vliv selekčního tlaku TET na nárůst TET rezistentních bakterií v obou půdách. Půda PK, dlouhodobě vystavovaná ATB reziduí, na selekční tlak TET odpovídala intenzivněji než kontrolní půda N. Pod vlivem nejvyšší testované dávky TET (200mg TET. kg⁻¹s.p) došlo po 14 dnech inkubace v půdě PK k nárůstu TET-rezistentních bakterií z 4,1% na 13,8% a v půdě N z 3,5 % na 4,9 %. V obou půdách došlo pod vlivem selekčního tlaku TET k rozvoji zástupců aktinobakterií a r. *Bacillus* a jemu příbuzných rodů. Mezi bakteriálními izoláty z půdy PK byl zjištěn *Mycobacterium chelonae*, podmíněný patogen hospodářských zvířat i člověka. U tohoto kmene stejně jako u většiny TET-rezistentních izolátů byla zjištěna ATB multirezistence k dalším 5 ATB.

Významné rozdíly ve výskytu ATB multirezistence u TET-rezistentních bakteriálních izolátů půdy N a PK však zjištěny nebyly.

Práce demonstrovala, že bakteriální společenstvo půdy, která dlouhodobě opakovaně přicházela do kontaktu s rezidui veterinárních antibiotik, má jiné charakteristiky, a reaguje na vstup antibiotika do půdy zvýšením svojí ATB rezistentní složky, v porovnání s půdou, která s antibiotiky nikdy do styku nepřišla.

ÚDAJE PRO CITOVÁNÍ PRÁCE:

ELHOTTOVÁ, A. Vstup antibiotik do prostředí a antibiotická rezistence půdních bakterií. Práce SOČ, České Budějovice, str. 28, 2009.

Poděkování

Moje poděkování patří Ing. V. Křišťůfkovi, CSc. za zasvěcení do světa kultivací bakterií, za jeho čas a energii, které mi věnoval a RNDr. Daně Elhottové, PhD. za zadání odborného úkolu, seznámení s problematikou a odborné vedení práce.

Moje poděkování patří také Biologickému centru AVČR, Ústavu půdní biologie za možnost pracovat v jeho laboratořích.

Práce byla součástí řešení projektu financovaného grantem MŠMT Centrum environmentální mikrobiologie (č. LC06066).

Seznam použitých zkratek

AMX ... Amoxicilin

ATB ... antibiotikum/antibiotický

DO ... Doxycyklin

G+ bakterie ... Gram pozitivní bakterie

G- bakterie ... Gram negativní

GM ... Gentamicin

C ... Chloramfenicol

KTJ ... kolonii tvořící jednotka

L ... Linkomycin

P ... Penicilin

PB ... Polymyxin

Půda N ... kontrolní půda, která nebyla ošetřována kejdou s rezidui antibiotik

Půda PK ... půda dlouhodobě ošetřovaná prasečí kejdou z výkrmny vepřů s rezidui antibiotik

s.p. ... suchá půda

S ... Streptomycin

SSS ... Sulphonamid

TET ... Tetracyklin (chlortetracyklin)

TET-r ... Tetracyklin- rezistentní

VA ... Vankomycin

WHC ... maximální vodní kapacita

Obsah

1. Úvod a cíle práce	7
2. Literární přehled	9
3. Materiál a metody	13
3.1. Odběr a zpracování půdních vzorků	13
3.2. Stanovení suché hmotnosti (sušiny) půdy	13
3.3. Stanovení WHC	13
3.4. Vybrané půdní charakteristiky půdy N a PK.....	14
3.5. Stanovení počtů kultivovatelných bakterií v půdních vzorcích.....	15
3.6. Inkubace půd s přidavkem TET-antibiotika	15
3.7. Identifikace TET-rezistentních bakteriálních izolátů metodou MIS Sherlock.....	16
3.8. Uchovávání TET rezistentních bakteriálních izolátů pomocí glycerolových konzerv.....	16
3.9. Diskový difuzní test citlivosti bakteriálních kmenů k ATB.....	18
3.10. Statistické přístupy	18
4. Výsledky	19
4.1. Celkové počty kultivovatelných a TET-rezistentních bakterií v půdě N a PK.....	19
4.2. Odpověď bakteriálního společenstva půdy N a PK na aktuální selekční tlak TET.....	19
4.3. Druhov/rodová skladba TET rezistentních bakterií v půdě PK a N.....	22
4.4. Odolnost TET-rezistentních bakteriálních izolátů k dalším antibiotikům	24
5. Diskuse a závěry	25
6. Seznam použité literatury	28

1. Úvod a cíle

Vědecko-technický pokrok významně ovlivňuje lidskou společnost a snižuje její životní prostředí. Jedním z nejvýznamnějších objevů minulého století byl objev antibiotik (ATB). Více jak půl století sloužila ATB téměř zázračně v lidské i veterinární medicíně. V posledních desetiletích se však stává alarmující skutečností narůstající rezistence patogenních mikroorganismů vůči běžným ATB, zvyšuje se také výskyt mikroorganismů odolných k několika ATB najednou (tzv. ATB-multirezistence) a každý rok vzrůstá počet úmrtí zapříčiněných ATB-multirezistentními patogeny.

Proč a jakým způsobem dochází k šíření bakteriální ATB multirezistence? To jsou otázky, na které hledají odpověď lékaři i vědci na celém světě.

Jednou z pravděpodobných příčin jsou masivní vstupy ATB do prostředí. ATB nejsou v různých částech světa používána pouze jako léčebný prostředek, ale i jako preventivní či dokonce růstový prostředek v živočišné a rostlinné výrobě. ATB jsou přidávána do krmiva ve velkochovech prasat, drůbeže, na rybích farmách či ve velkochovech včel. Nevstřebaná ATB rezidua vstupují do půdy a povrchových i podpovrchových vod. Opakované vstupy ATB mohou vyvolávat selekční tlak na mikroflóru prostředí a podporovat výskyt ATB rezistentních mikroorganismů. V prostředí tak mohou vznikat rezervoáry ATB rezistentních mikroorganismů a tyto mohou přispívat k šíření ATB rezistence a multirezistence mezi mikroorganismy navzájem.

O vlivu ATB vstupujících do půdy s odpadními produkty na původní přirozené společenstvo půdy je však stále nedostatek informací.

Předložená práce se snažila přispět k řešení této problematiky v rámci půdně mikrobiologického výzkumu, který je veden v Biologickém centru AVČR v Ústavu půdní biologie v Českých Budějovicích. Práce byla zadána jako provedení samostatného experimentu, který měl přinést charakteristiku kultivovatelných ATB-rezistentních bakterií v půdě, která byla více než 30 let pravidelně hnojena prasečí kejdou z výkrmny vepřů, ošetřovaných veterinárními antibiotiky z terapeutických i subterapeutických důvodů. Pozornost byla soustředěna na vliv chlor-tetracyklinu (TET), nejrozšířenějšího a nejdéle používaného ATB v živočišné výrobě.

Hlavní cíle práce a pracovní hypotézy

1) Stanovení počtů celkových kultivovatelných a TET-rezistentních bakterií v půdě (PK), do které dlouhodobě vstupovala ATB rezidua a porovnání s charakteristikou kontrolní půdy (N).

H1: V půdě dlouhodobě ovlivňované ATB rezidui je vyšší zastoupení TET-rezistentních bakterií než v půdě kontrolní.

2) Popis kvantitativních změn celkových kultivovatelných a TET-rezistentních bakterií v půdě PK pod vlivem aktuálního selekčního tlaku antibiotika (TET).

H2: Vlivem přidaného TET do půdy dojde k snížení celkových počtů bakterií v kontrolní půdě a zvýšení počtů TET-rezistentních bakterií v půdě dlouhodobě ovlivňované ATB rezidui.

3) Popis a porovnání druhové/rodové skladby TET-rezistentního bakteriálního společenstva půd PK a N

H3: Skladba TET-rezistentního bakteriálního společenstva obou půd se liší.

4) Charakteristika citlivosti TET-rezistentních bakteriálních izolátů půdy PK a N k dalším antibiotikům a popis výskytu ATB-multirezistentních kmenů v půdě PK a N.

H4: Zastoupení ATB-multirezistence je vyšší v půdě dlouhodobě ovlivňované ATB rezidui

Práce byla řešena v průběhu let 2007-2009 a pro splnění cílů byl zvolen následující postup: Byla vyhledána lokalita, na které se nacházely zemědělsky využívané pozemky s trvale zatravněným lučním porostem, z nichž jeden byl pravidelně dlouhodobě, cyklicky hnojen prasečí kejdou a druhý naopak nikdy kejdou hnojen nebyl. Prasečí kejda pocházela z výkrmny prasat, která byla ošetřována ATB: fluorofenikolem, doxycyklinem, chlortetracyklinem a amoxicilinem. Půdní vzorky byly z lokality jednorázově odebrány pro 1) pro základní kvantitativní a kvalitativní charakteristiku kultivovatelných bakterií, včetně její TET-rezistentní složky a 2) pro manipulační laboratorní studii s přidavky ATB do půd, simulující aktuální selekční tlak ATB vstupujícího do půdy. Pro sledování vlivu ATB na půdní bakterie v laboratorních podmínkách byl vybrán chlortetracyklin (TET), který patřil mezi ATB aplikované ve výkrmně prasat.

Ze všech testovaných půd byly provedeny izolace dominantních bakteriálních zástupců a determinace do rodu či druhu pomocí identifikačního systému mikroorganismů MIS Sherlock System. Z bakteriálních kmenů byla vytvořena pracovní sbírka pro další výzkumné účely. V rámci této práce byly provedeny u všech TET-rezistentních kmenů obou půd zkoušky citlivosti k vybraným antibiotikům za účelem odhadnutí výskytu ATB-multirezistence mezi rezistentními bakteriálními společenstvy obou studovaných půd.

Předkládaná práce zahrnuje nejvýznamnější výsledky získané v letech 2007-2009, z nichž část již byla podrobně zpracovaná v roce 2008 formou SOČ (Elhottová, 2008). Výsledky této práce byly zahrnuty do výstupů výzkumných úkolů zadavatele.

2. Literární přehled

Antibiotika

Antibiotika (ATB) jsou látky zejména mikrobiálního původu, které potlačují růst jiných organismů. Mají velký praktický přínos pro člověka v humánní a veterinární medicíně, kde se využívají pro léčbu infekčních onemocnění. K rozvoji využívání antibiotik došlo během II. světové války, kdy na základě objevu Alexandra Fleminga (1929) došlo k vypracování technologie výroby penicilinu a jeho využívání k léčbě. Objevy dalších významných antibiotik následovaly brzy poté (Spížek, 1999; Madigan a Martinko, 2006).

Rozdělení antibiotik

Antibiotika mají různorodou chemickou povahu a proto je i jejich účinek v buňce rozmanitý. Vymezuje antibiotika *baktericidní*, jejichž účinek je usmrťující a antibiotika *bakteriostatická*, která zabraňují růstu a množení bakterií. Přehled významných antibiotik a jejich účinku udává Tab. 1. (<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/tetracycline/tetracycline.htm>; Madigan a Martinko, 2006).

Tab. 1. Přehled významných antibiotik a jejich účinku

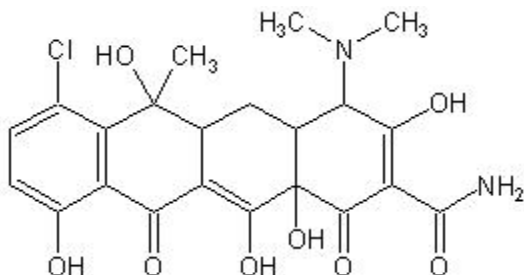
Antibiotikum	Mechanismus účinku
peniciliny	inhibice biosyntézy buněčné stěny
cefalosporiny	inhibice biosyntézy buněčné stěny
vankomycin	inhibice biosyntézy buněčné stěny
streptomycin	inhibice proteosyntézy
neomycin	inhibice proteosyntézy
tetracykliny	inhibice proteosyntézy
linkosamidy	inhibice proteosyntézy
fluorochinolony	inhibice replikace DNA
rifampicin	inhibice biosyntézy RNA

Tetracyklin

Toto antibiotikum bylo objeveno v roce 1947 a o rok později izolováno ze *Streptomyces aureofaciens* a poprvé užito v roce 1950. Do skupiny tetracyklinů (TET) patří oxytetracyklin, chlortetracyklin, doxycyklin a mynocyklin; tyto látky mají shodnou aktivitu s širokospektrým bakterostatickým účinkem na Gram pozitivní (G+) i Gram negativní (G-) bakterie, ale i na atypické mikroorganismy, jako chlamydie, mycoplazmy a parazitické prvoky (Chopra a Roberts, 2001). Pokud se TET dostane do bakterie, která je na něj citlivá, brání v další výstavbě bílkovin, takže zastaví její růst. Váže se na ribozomální podjednotku a blokuje přístup aminokyselin k ribozomům, kde tímto zásahem nedochází k jejich spojování. TET antibiotika mají relativně nízkou toxicitu pro léčeného pacienta, avšak mohou při opakovaném podání v době růstu kostí a zubní tkáně vyvolat jejich poruchy a mohou i vyvolat gastrointestinální potíže na základě porušení střevní mikroflóry. Pouhý bakteriostatický účinek je však nevýhodou TET, a proto jejich využití v humánní medicíně je dnes již omezené (<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/tetracycline/tetracycline.htm>). Přesto TET

zaujímá největší podíl v celkové spotřebě antibiotik České republiky (v roce 2000 to bylo 35,8%). Důvodem je využívání TET k léčebným a preventivním účelům ve veterinární medicíně, a také k stimulačním účelům růstu hospodářských zvířat ve velkovýkrmnách.

Obr. 1. Strukturní vzorec chlortetracyklinu.



Jedná se o žlutý krystalický prášek, bez zápachu, stabilní na vzduchu, ale na světle se pomalu rozkládají.

Rezistence mikroorganismů k antibiotikům

Některé bakterie mohou růst i v přítomnosti určitého množství antibiotika; tento jev se nazývá antibiotická rezistence. Rezistenci neboli odolnost organismů vůči antibiotiku rozeznáváme dvojího typu:

(1) Primární (přirozená) rezistence je dána druhem bakterie a jeho přirozenými vlastnostmi. Bez jakýchkoliv genetických změn je tento druh bakterií rezistentní, jelikož nenese pro antibiotikum zásahové místo. Kupříkladu antibiotika, která narušují syntézu bakteriální buněčné stěny, jsou primárně neúčinná vůči mykoplasmatům, které buněčnou stěnu nemají.

(2) Sekundární (získaná) rezistence je výsledkem přizpůsobení se bakterie k působení antibiotik, vzniká jako důsledek mutací nebo různých genetických přenosů. Bakterie, kterou původně antibiotikum zabíjelo, najednou začne být odolná (Spížek, 1999).

Rezistence se šíří prostřednictvím plasmidů a transposonů; rychle exploduje a po pomnutí selekčního tlaku v prostředí se snižuje a může vymizet.

Tetracyklinová rezistence

Rezistenci k tetracyklinu můžeme popsat třemi základními mechanismy. Prvním je snížená akumulace a únik tetracyklinu z buňky. Rezistentní buňka pomocí specifického transportního systému (bílkoviny v cytoplasmatické membráně) aktivně vypuzuje TET z buňky ven. Druhým je změna zásahového místa v buňce (ribozomy jsou před vazbou TET chráněny specifickými bílkoviny). Třetím způsobem je modifikace molekuly antibiotika, které je pozměněno tak, že vazba molekuly tetracyklinu na ribozom není možná. Rezistence k tetracyklinu se může přenášet i mezi nepříbuznými druhy (Spížek, 1999; http://en.wikipedia.org/wiki/Antibiotic_resistance). Je prokázán přenos např. mezi *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae* a streptomycet (Bednář a kol., 1996). TET-geny jsou umístěny na plasmidu nebo transpozicí na chromozomu; přenášejí se konjugací a transformací.

ATB multirezistence

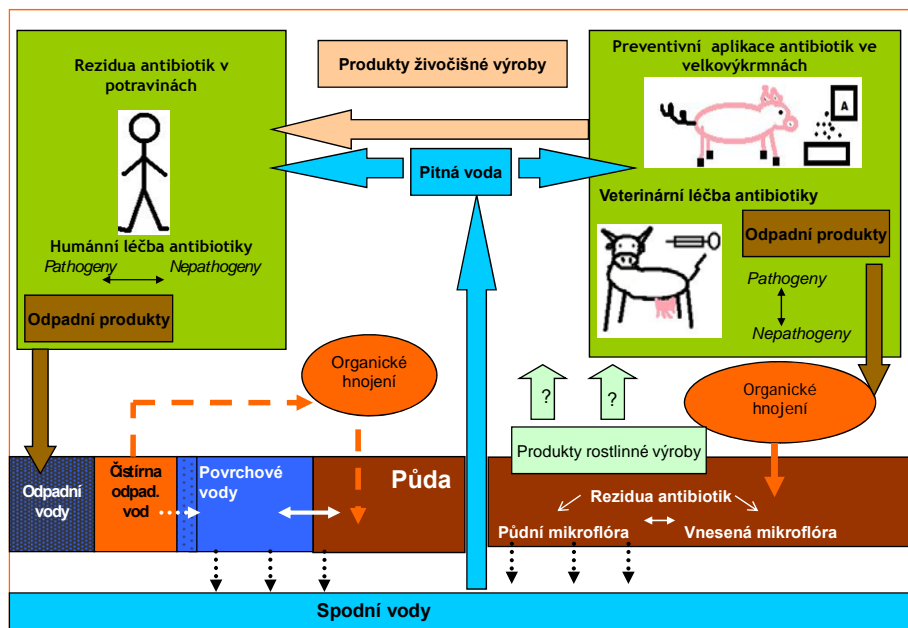
Kmeny, které jsou rezistentní k více než dvěma antibiotikům (kromě přirozené rezistence) se označují jako multirezistentní. Kombinace znaků rezistence u jednoho kmene se označuje jako *profil rezistence* (fenotyp rezistence). Může být užitečným znakem pro epidemiologii nozokominálních nákaz.

Dosud neexistuje žádná mezinárodní dohoda o hodnocení bakteriální rezistence a citlivosti. Pravidla amerického Národního komitétu standardizace v klinických laboratořích (NCCLS) se používají v USA a v dalších zemích. Tyto standardy vyžadují přesné dodržování určité metody včetně předepsaného média, obsahu ATB v disku a hustoty inokula.

Prostředí, antibiotika a rezistentní mikroorganismy

Masivní využívání antibiotik, ať už ve veterinární nebo humánní medicíně, vedlo k závažnému dnes už celosvětovému problému nárůstu rezistence patogenních mikroorganismů k většině běžně užívaných antibiotik. Situace, týkající se výskytu a šíření patogenních mikroorganismů v lidské populaci i u hospodářsky významných zvířat je v ČR detailně sledována. Nedostatečně je však známa situace šíření ATB rezistence v prostředí. Ačkoliv hlavním rezervoárem ATB rezistentních mikroorganismů jsou lidé i zvířecí pacienti a jejich bezprostřední okolí, nové rezervoáry ATB rezistentních mikroorganismů se mohou vytvářet ve volné přírodě, kam rezistentní mikroorganismy, ale i nevstřebaná antibiotika vstupují prostřednictvím odpadních produktů. Jak ukazuje Obr. 2, ATB rezistentní mikroorganismy se mohou šířit směrem od člověka a člověkem využívaných zvířat do vody, půdy a zase zpět z prostředí k člověku (podle Alcock et. al., 1999; Nwosu, 2001; Ghosh et al., 2007; Sarmah et al., 2006).

Obr. 2. Základní schéma vazeb mezi člověkem a prostředím v důsledku antropogenního užívání antibiotik



Půdní prostředí a veterinární antibiotika

V živočišné výrobě, jak už bylo zmíněno, jsou antibiotika používána k potlačení infekcí v chovech, k zabránění šíření infekce při výměně chovů a také k podpoře růstu. Tato praxe může přispívat k šíření ATB rezistence několika způsoby: konzumací produktů živočišné výroby obsahujících rezidua antibiotik; vystavení ošetřovatelů vlivu antibiotik i rezistentních mikroorganismů během ošetřování zvířat v živočišné výrobě; kontaminací půdy, vody a plodin odpadními produkty z živočišné výroby (formou aplikace organických hnojiv) (Jindal et al., 2006). Půda je významným rezervoárem mikroorganismů obecně; horní 10 cm vrstva úrodné půdy může obsahovat až 2 tuny mikroorganismů na 1 akr (Alexander, 1977). Půda je velmi složité prostředí, které poskytuje široké spektrum odlišných mikroprostředí podporujících rozvoj odlišných typů mikroorganismů. Velmi stručně lze charakterizovat roli hlavních skupin půdních mikroorganismů následovně: Půdní houby jsou významné pro rozklad složitých organických sloučenin a zadržování živin v půdě. Bakterie jsou nejpočetnější skupinou půdních mikroorganismů; v 1 gramu půdy se nachází 10^{6-10} bakterií. Půdní bakterie hrají nepostradatelnou úlohu v procesu dokončení rozkladu organické hmoty – mineralizaci; spolu se skupinou půdních archeí jsou schopny udržet koloběh látek i v extrémních podmínkách (Alexander, 1977; Madigan a Martinko, 2006). Mikroorganismy a zvláště pak bakterie jsou velmi adaptabilní na nové podmínky prostředí. O vlivu ATB a ATB rezistentních mikroorganismech vstupujících do půdy s odpadními produkty z živočišné výroby na původní přirozené společenstvo půdy je však stále nedostatek informací. Závažnost problematiky vstupu antibiotik do prostředí a potravního řetězce vyústila v zemích Evropské unie k přijetí opatření, které vešlo v platnost od 1. ledna 2006, jedná se o Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 zakazující používání antibiotických stimulatorů růstu při výrobě a zkrmování krmných směsí (Fisherová, 2006).

3. Materiál a metody

Pro sledování vlivu ATB na půdní bakteriální společenstvo byla vyhledána lokalita v Jižních Čechách, na které se nacházely ve vzdálenosti cca 600 m zemědělsky využívané pozemky s trvale zatravněným lučním porostem, z nichž jeden byl pravidelně (2 x ročně) ošetřován prasečí kejdou a druhý naopak nikdy kejdou ošetřován nebyl. Prasečí kejda pocházela z výkrmny prasat, která byla ošetřována ATB fluorofenikolem, doxycyklinem, chlortetracyklinem a amoxycylinem.

3.1. Odběr a zpracování půdních vzorků

V červenci 2007 byly z hloubky 5 až 20 cm odebrány půdní vzorky, dále označované **PK** (půda ošetřovaná kejdou) a **N** (půda kontrolní, která nepřišla do styku s prasečí kejdou). Vzorky o celkové hmotnosti cca 3 kg byly odebrány ve třech opakováních, z nichž každé se skládalo ze 7 podvzorků. Po odebrání byly vzorky odvezeny do laboratoře a homogenizovány přes síto s velikostí ok 2 mm a uskladněny při teplotě 4°C.

3.2. Stanovení suché hmotnosti (sušiny) půdy

Toto stanovení bylo důležité pro přepočítání všech měřených parametrů na jednotku suché hmotnosti půdy, což umožnilo vzájemné porovnání parametrů mezi půdami, které se vzájemně lišily aktuální vlhkostí.

Do hliníkové váženky o známé hmotnosti se vložilo asi 5 g vlhké půdy. Váženka s vlhkou půdou se zvažila a nechala se sušit 4 h při 105 °C v sušárně. Vzorek s váženkou se po vychladnutí opět zvažil. Sušina půdy byla udána jako hmotnostní % suché půdy z vlhké půdy (Tab. 2).

$$\text{Výpočet: sušina [\%]} = 100 - \left(\frac{B - C}{B - A} \cdot 100 \right)$$

- A hmotnost váženky [g]
- B hmotnost váženky s vlhkou půdou [g]
- C hmotnost váženky se suchou půdou [g]

3.3. Stanovení WHC

WHC (maximální vodní kapacita) je tzv. třicetiminutová vlhkost, která slouží ke klasifikaci půdních pórů. Udává vlhkost půdy po odtoku vody gravitací, kdy voda zůstává v kapilárních a semikapilárních pórech. Tato charakteristika byla nutná pro udržování konstantní vlhkosti v inkubovaných vzorcích v laboratorních podmínkách, kdy se vzorky dovlhčovaly na 60% WHC (viz část 2.5). WHC se stanovila tak, že se prázdný umělohmotný váleček opatřený na konci nylonovou sítkou zvažil, naplnil se do tří čtvrtin prosátou půdou a opět zvažil. Poté se vložil do nádoby s vodou tak, aby vodní hladina dosahovala asi 1 cm pod okraj vzorku a celá nádoba se překryla hodinovým sklem. Po třech hodinách se váleček vyjmul z vody, položil se na čtyřikrát přeložený filtrační papír, nechal se třicet minut odsát a opět se zvažil.

WHC se počítá podle rovnice:

$$\text{WHC} = (c - b) / (b - a)$$

- a hmotnost prázdného válečku [g]
- b hmotnost válečku s půdou přirozeně vlhkou [g]
- c hmotnost válečku s nasáklou půdou [g]

Po stanovení hodnot WHC v jednotlivých půdních vzorcích, udaných v Tabulce 2, bylo dopočteno jakým objemem sterilní destilované vody budou vzorky dovlhčeny na 60% WHC.

3.4. Vybrané půdní charakteristiky půdy N a PK

U obou půdních vzorků byly stanoveny doprovodné charakteristiky, které udává Tablka 2. Stanovení byla provedena v referenční laboratoři Agro-La, spol. s.r.o. Jindřichův Hradec.

Tab. 2. Fyzikálně-chemické parametry půdy dlouhodobě ovlivňované ATB rezdui (PK) a v kontrolní luční půdě (N)

Půda	pH	Cox [%]	N [%]	P [mg/kg]	K [mg/kg]	Mg [mg/kg]	Ca [mg/kg]	WHC [%]	Sušina [%]
PK	5,90	5,35	0,24	63	61	179	1881	24,5	84,0
N	5,71	3,83	0,14	89	99	60	1494	29,7	83,0

3.5. Stanovení počtů kultivovatelných bakterií v půdních vzorcích

Pro zjištění, zda bakteriální společenstvo půdy, do které dlouhodobě vstupovala ATB rezidua, je charakteristické odlišným zastoupením TET-rezistentních bakterií v porovnání s kontrolní půdou byly stanovovány počty kultivovatelných bakterií pomocí kultivační plotnové metody. Celkové počty bakterií byly stanoveny na komplexním kultivačním médiu a počty TET-rezistentních bakterií na TET-selektivním médiu (komplexní médium s přidavkem TET). Ze získaných stanovení bylo vypočteno procentuální zastoupení TET-rezistentních bakterií v celkovém společenstvu kultivovatelných bakteriálních počtů.

Tato stanovení byla provedena u obou čerstvě odebraných půd (N a PK).

Plotnová metoda spočívala v naočkování inokulační půdní suspenze o vhodném ředění na komplexní živné agarové médium (TSBA, Becton Dickinson, USA). Na sterilní Petriho misky se ztuhlým živným agarem (průměr 100 mm, 20 ml média) bylo sterilní pipetou nanášeno 0,2 ml půdní suspenze o ředění 10^{-5} . Tento objem byl sterilní skleněnou hokejkou rozetřen rovnoměrně po povrchu celé Petriho misky. Očkování bylo prováděno ve sterilních podmínkách mikrobiologického laminárního boxu (Biohazard, Holten LaminarAir, Dánsko). Naočkované misky byly inkubovány v termoboxu 7 dní při 28°C.

Každý den kultivace byly zaznamenávány nově narostlé bakteriální kolonie (tzv. kolonie tvořící jednotky – KTJ), po sedmi dnech byla kultivace ukončena. Celkový počet KTJ po 7 denním růstu na Petriho misce byl přepočten na 1 gram suché půdy podle vzorce:

Výpočet počtu kultivovatelných bakterií v půdním vzorku

$$[(KTJ_{pm} \cdot 10^n / V_{in}) / m] = \underline{KTJ \cdot 10^5 \cdot g^{-1} sp}$$

KTJ_{pm} počet KTJ na Petriho misce

n použité ředění inokulační suspenze (v tomto případě 5)

V_{in} inokulační objem [mL]

m navážka půdy přepočtená na hmotnost vzorku suché půdy [g sp]

Složení komplexního kultivačního média (TSBA, Becton Dickinson, USA)

kasein (štěpeno pankreatinem)	17 g
sojová mouka (štěpeno papainem)	3 g
dextróza	2,5 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
BBL Brand Agar	15 g
Destilovaná voda	1000 mL
pH = 7,4	

Do sterilního média bylo přidáno fungistatikum cykloheximid (actidion, Sigma Aldrich) o koncentraci 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ pro zamezení rozvoje půdních hub na komplexním médiu.

Příprava ředící řady inokulační půdní suspenze

Pro každý analyzovaný vzorek byla připravena inokulační suspenze:

Do sterilní 100 mL Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 5 gramů půdy a přidáno 45 mL sterilního 0,1% roztoku kalgonu (hexametrafosfřečnan sodný); vzniklá suspenze byla homogenizována v ultrazvukové lázni (50 kHz, 4 minuty) a následným desetinásobným ředěním ve sterilní vodovodní vodě připravena ředící řada půdní suspenze (vždy 1 mL suspenze o předchozím nižším ředění do 9 mL sterilní H₂O). 200 μL suspenze o vytypovaném ředění bylo použito k inokulaci kultivačních misek, vždy ve třech opakováních. Při rozboru první inkubační řady byly použity suspenze o ředění 10⁻⁴, 10⁻⁵ a 10⁻⁶ tak, aby bylo zjištěno optimální ředění vzorků studovaných půd. Jako optimální ředění pro celkové počty bylo zvoleno ředění 10⁻⁵.

Stanovení počtu kultivovatelných TET-rezistentních půdních bakterií

Ke stanovení počtu kultivovatelných půdních bakterií rezistentních k antibiotiku chlor-tetracyklinu (TET) byla použita plotnová metoda založená na selektivní kultivaci TET-rezistentních bakterií na TSBA médiu (Becton Dickinson, USA) obohaceném o antibiotikum chlor-tetracyklin (o koncentraci 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Po otestování několika ředění inokulační suspenze bylo zvoleno ředění 10⁻⁴.

3.6. Inkubace půd s přídatkem TET-antibiotika

Pro zjištění, zda se liší odpověď bakteriálních společenstev obou půd po vystavení aktuálnímu selektivnímu tlaku antibiotika (TET) byl uspořádán inkubační pokus, ve kterém byla půda N a PK inkubována s různě vysokou dávkou TET různou dobu. Byly opět zjišťovány počty celkových a TET-rezistentních bakterií v obou půdách v průběhu experimentu.

Celkem byly založeny tři inkubační řady vzorků (lišící se délkou inkubace: 12 hodin, 7 dnů a 14 dnů), každá řada se skládala ze čtyř variant podle množství aplikovaného antibiotika (0 – 0,1 – 1,0 – 100 mg TET $\cdot \text{kg}^{-1}$ suché půdy), každá varianta měla tři nezávislá opakování. Toto uspořádání bylo provedeno pro každou z půd.

Vzorky byly inkubovány za stabilních kultivačních podmínek při teplotě 20°C a vlhkosti (60% WHC) v klimatizační komoře (Binder KBWF72, BINDER GmbH, Německo).

Každý vzorek o hmotnosti 100 g půdy byl navážen do 250 ml Erlenmayerových baněk s širokým hrdlem opatřených alobalovou fólií.

Na základě výpočtů WHC, bylo zjištěno kolika ml destilované vody má být vzorek dovlhčen. Na základě tohoto údaje byly připraveny roztoky TET o příslušných koncentracích. Po aplikaci TET byly vzorky důkladně promíchány a uloženy do klimatizační komory.

Použité antibiotikum

Vzorky byly inkubovány s tetracyklin-hydro-chloridem ($C_{22}H_{24}N_2O_8$ HCl, Sigma Aldrich) o koncentracích: 0 – 0,1 – 1,0 – 100 mg TET . kg^{-1} suché půdy.

Inkubace první řady vzorků byla ukončena 2. den po založení celého pokusu (po 12 hodinách od zahájení práce), druhé řady po 7 dnech a třetí řady po 14 dnech. Po ukončení inkubace následoval mikrobiologický rozbor kultivovatelné části společenstva. Veškerá půda, inkubovaná s antibiotiky byla po ukončení pokusu vysterilizována (autokláv, 120°C, 60 min).

3.7. Identifikace TET-rezistentních izolátů metodou MIS Sherlock

Kolonie TET rezistentních bakterií narostlých na selektivním médiu (viz 2.5) byly jednotlivě izolovány z narostlé směsné kultury na novou Petriho misku s živným médiem, zde byla kultura přečištěna. Čistá kultura byla použita k druhové identifikaci pomocí chemotaxonomické metody MIS Sherlock System (MIDI, Inc. Dalaware, USA). Principem této metody je získání profilu mastných kyselin (MK) z čisté kultury neznámého izolátu, následné porovnání profilu MK izolátu s databází Systému MIS Sherlock (který obsahuje řádově 10^3 známých druhů) a na základě podobnosti s databází přiřazení k druhu. Profil MK z každého izolátu byl získán z biomasy narostlé po 24 hodinové kultivaci (28°C) na komplexním živném agarovém médiu (TSBA, Becton Dickinson, USA). Čtyři mikrobiologické kličky biomasy byly přeneseny do zkumavky, zality 1 ml 4M roztoku NaOH v methanolu; 5 minut inkubovány při 100°C; po zchlazení přidány 2 ml 6M roztoku HCl v methanolu; 10 minut inkubovány při 80°C; po ochlazení byl vzorek obohacen 1,25 ml směsí hexanu a methyl tetra-butyl etheru (1:1, V/V). Na závěr byly přidány 3 ml 0,3M roztoku NaOH v destilované vodě. Oddělila se tak vrchní vrstva, která byla přenesena do speciálních vialek pro plynovou chromatografii (GC). Za předepsaných podmínek byl na GC přístroji (Agilent 6850, Agilent Technologies, USA) získán profil mastných kyselin neznámého izolátu, který software systému porovnal s databází (Aerobe Bacteria TSBA6). Výsledkem tohoto porovnání byl protokol (Obr. 3), udávající zastoupení identifikovaných mastných kyselin a druhová identifikace, doprovázená tzv. indexem podobnosti Sim Index (SI). Pokud je hodnota SI větší než 0,5 je druhová identifikace považována za pozitivní, pokud je SI menší než 0,5 lze neznámý izolát zařadit pouze do navrženého rodu.

3.8. Uchovávání TET rezistentních bakteriálních izolátů pomocí glycerolových konzerv

Jednotlivé bakteriální izoláty byly převedeny do glycerolových konzerv a uchovány při -75°C.

Příprava glycerolové konzervy: Do sterilní plastové mikrozkuhavky se přidá 700 μ L tekuté kultury (24 hodinová inkubace na TSB médiu) a 300 μ L 50% glycerolu, po jemném promíchání se uloží do -75°C.

Obr. 3. Protokol o identifikaci neznámého izolátu metodou MIS Sherlock System (MIDI Inc. Dalaware, USA)

E082294.46A [3454] VeterAntib2007-7BA-III-1r

Page 1

Volume: DATA File: E082294.46A Samp Ctr: 3 ID Number: 3454
 Type: Samp Bottle: 2 Method: TSBA6
 Created: 2/29/2008 11:29:00 AM
 Sample ID: VeterAntib2007-7BA-III-1r

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.740	3.728E+8	0.026	----	6.998	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.845	1283	0.016	----	7.196		----	< min rt	
1.875	1133	0.018	----	7.253		----	< min rt	
1.938	537	0.021	----	7.372		----	< min rt	
1.987	424	0.025	----	7.465		----	< min rt	
2.700	647	0.026	----	8.816		----	< min rt	
2.874	750	0.026	----	9.144		----		
3.118	214	0.024	1.197	9.605	10:0 iso	0.04	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
3.734	707	0.033	----	10.559		----		
3.835	233	0.024	1.115	10.697	11:0 anteiso	0.04	ECL deviates 0.002	Reference 0.002
4.462	316	0.025	1.071	11.426	10:0 3OH	0.05	ECL deviates 0.004	
4.636	2173	0.031	1.061	11.608	12:0 iso	0.36	ECL deviates -0.001	Reference -0.001
5.008	498	0.033	1.041	11.997	12:0	0.08	ECL deviates -0.003	Reference -0.002
5.740	1253	0.033	1.014	12.613	13:0 iso	0.20	ECL deviates -0.001	Reference 0.000
5.844	1419	0.034	1.010	12.701	13:0 anteiso	0.22	ECL deviates -0.001	Reference -0.001
6.833	1021	0.048	0.984	13.451	12:0 3OH	0.16	ECL deviates -0.003	
7.068	54807	0.038	0.979	13.619	14:0 iso	8.31	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
7.192	1196	0.038	0.976	13.707	14:0 anteiso	0.18	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
7.601	2661	0.038	0.968	13.998	14:0	0.40	ECL deviates -0.002	Reference -0.002
8.582	32704	0.039	0.954	14.623	15:0 iso	4.83	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
8.725	79334	0.042	0.952	14.714	15:0 anteiso	11.71	ECL deviates 0.001	Reference 0.000
8.915	8672	0.043	----	14.835		----		
9.173	4130	0.039	0.947	14.999	15:0	----	ECL deviates -0.001	
9.870	766	0.029	----	15.412		----		
9.953	74046	0.044	0.941	15.461	16:1 iso H	10.79	ECL deviates 0.000	
10.240	263260	0.044	0.938	15.631	16:0 iso	38.27	ECL deviates 0.004	Reference 0.003
10.388	908	0.049	0.937	15.719	16:0 anteiso	0.13	ECL deviates 0.001	
10.558	29597	0.049	0.936	15.820	Sum In Feature 3	4.29	ECL deviates -0.002	16:1 w7c/16:1 w6c
10.764	10373	0.043	----	15.941		----		
10.862	20065	0.044	0.935	15.999	16:0	2.91	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
11.597	20508	0.046	0.931	16.420	Sum In Feature 9	2.96	ECL deviates 0.004	17:1 iso w9c
11.784	19357	0.048	0.931	16.527	17:1 anteiso w9c	2.79	ECL deviates 0.003	
11.966	7744	0.044	0.930	16.631	17:0 iso	1.12	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
12.130	25048	0.046	0.929	16.725	17:0 anteiso	3.61	ECL deviates 0.002	Reference -0.002
12.254	2571	0.043	0.929	16.795	17:1 w8c	0.37	ECL deviates 0.003	
12.377	22663	0.065	0.929	16.866	17:1 w6c	3.26	ECL deviates 0.006	
12.608	655	0.041	0.928	16.998	17:0	0.09	ECL deviates -0.002	Reference -0.006
13.340	8034	0.046	0.927	17.411	17:0 10-methyl	1.15	ECL deviates 0.002	
13.444	5649	0.047	0.927	17.469	18:1 iso H	0.81	ECL deviates 0.005	
13.735	1922	0.071	0.927	17.634	18:0 iso	0.28	ECL deviates 0.002	Reference -0.003
13.981	964	0.044	0.927	17.772	18:1 w9c	0.14	ECL deviates 0.003	
14.077	609	0.042	0.927	17.826	Sum In Feature 8	0.09	ECL deviates 0.003	18:1 w7c
14.174	836	0.042	----	17.881		----		
14.380	1667	0.059	0.927	17.997	18:0	0.24	ECL deviates -0.003	Reference -0.009
16.290	885	0.044	0.930	19.083	18:1 2OH	0.13	ECL deviates -0.006	
----	29597	----	----	----	Summed Feature 3	4.29	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	609	----	----	----	Summed Feature 8	0.09	18:1 w7c	18:1 w6c
----	20508	----	----	----	Summed Feature 9	2.96	17:1 iso w9c	16:0 10-methyl

ECL Deviation: 0.003 Reference ECL Shift: 0.003 Number Reference*Peaks: 18
 Total Response: 706087 Total Named: 683982
 Percent Named: 96.87% Total Amount: 649393

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA6 6.00	0.605	Lechevalieria-flava (Saccharothrix, Nocardioopsis flava)

3.9. Diskový difuzní test citlivosti bakteriálních kmenů k ATB

U všech TET-rezistentních bakteriálních kmenů obou půd byly provedeny zkoušky citlivosti k vybraným antibiotikům, pomocí ATB- diskových testů.

Diskový test byl proveden podle striktních standardních podmínek: Miller-Hinton agar (pH=7,2-7,4) nalitý na Petriho misce (průměr 9 mm) do výšky 5 mm byl rovnoměrně inokulován testovanou bakteriální kulturou ve fyziologickém roztoku o standardní hustotě 0,5 McF (Mc Farland denzitometr, 565 nm ± 15 nm.). Na naočkovanou kulturu byly dispensorem nanесeny antibiotické disky (BIO-RAR, testovány podle NCCLS normy). Po 24-hodinové inkubaci (28 °C) byl proveden odečet průměrů inhibičních zón kolem disků s jednotlivými ATB. Hodnoty byly interpretovány podle NCCLS normy. Zóny o průměru větším než udávala norma indikovaly citlivý kmen vůči testovanému ATB, zóny menší než udávala mezní hodnota indikovaly intermediální ATB rezistenci. Velmi slabá inhibiční zóna (<3 mm) nebo její absence indikovala silnou ATB rezistenci. Byla použita klasifikace citlivý kmen, intermediálně rezistentní a rezistentní.

Pro G+ izoláty byly použity disky s následujícím obsahem antibiotika (μg/disk): tetracyklin (30), doxycylin (30), streptomycin (10), gentamycin (10), penicilin (6), chloramfenicol (30), vankomycin (30), linkomycin (200).

Pro G- izoláty byly použity disky s následujícím obsahem antibiotika (μg/disk): tetracyklin (30), doxycylin (30), streptomycin (10), gentamycin (10), amoxicilin (25), chloramphenicol (30), polymyxin (300).

3.10. Statistické přístupy

Všechna měřená data byla podrobena jednoduchému statistickému vyhodnocení pomocí výpočtu aritmetického průměru a směrodatné odchylky (Microsoft - Excel). Uváděné průměrné hodnoty byly získány z devíti nezávislých měření. Pro zjištění statistické průkaznosti rozdílů mezi porovnávanými variantami byly všechny naměřené hodnoty příslušného parametru a varianty zpracovány metodou ANOVA a následným Tukey post-hoc testem. Statisticky průkazné rozdíly byly určeny podle hladiny významnosti p (p≤0,05).

4. Výsledky

4.1. Celkové počty kultivovatelných a TET-rezistentních bakterií v půdě N a PK

Celkové počty kultivovatelných a TET-rezistentních bakterií v půdě dlouhodobě ovlivňované ATB rezidui (PK) a kontrolní půdě (N) udává Tabulka 3.

Počty TET rezistentních bakterií vykazovaly o řád nižší hodnoty než celkové kultivovatelné bakterie v obou půdách .

Mezi oběma půdami nebyl zjištěn na úrovni celkových ani TET-rezistentních bakteriálních počtů průkazný rozdíl. TET-rezistentní složka v rámci celkového bakteriálního společenstva představovala v půdě PK 2,5% a v kontrolní půdě N 2,6%.

Tab. 3. Celkové počty kultivovatelných (C) a TET-rezistentních (TET-r) bakterií (KTJ . 10^5 . g^{-1} suché půdy) v půdě dlouhodobě ovlivňované ATB rezdui (PK) a v kontrolní luční půdě (N) hodnoty udávají aritmetický průměr a směrodatnou odchylku; $n=9$)

	Půda PK	Půda N
Celkové počty kultivovatelných bakterií	55,2 ± 14,7	50,7 ± 12,6
Počty TET-rezistentních bakterií	1,4 ± 0,3	1,3 ± 0,2

Předpoklad vyššího zastoupení TET-rezistentních bakterií v půdě dlouhodobě ovlivňované ATB rezidui ve srovnání s kontrolou se nepotvrdil.

4.2. Odpověď bakteriálního společenstva půdy PK a N na aktuální selekční tlak TET antibiotika

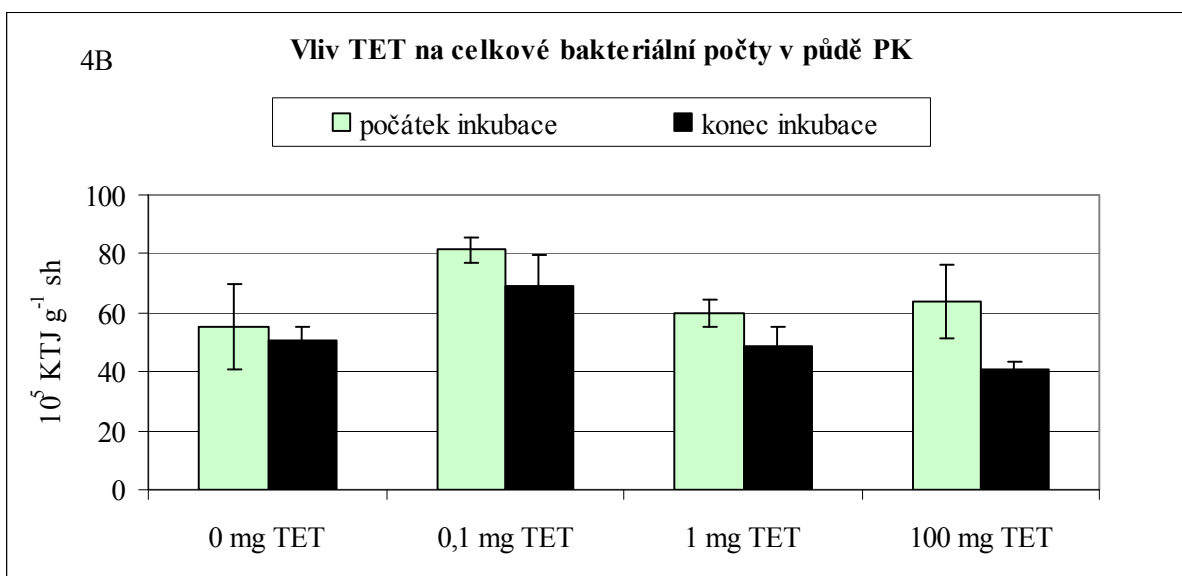
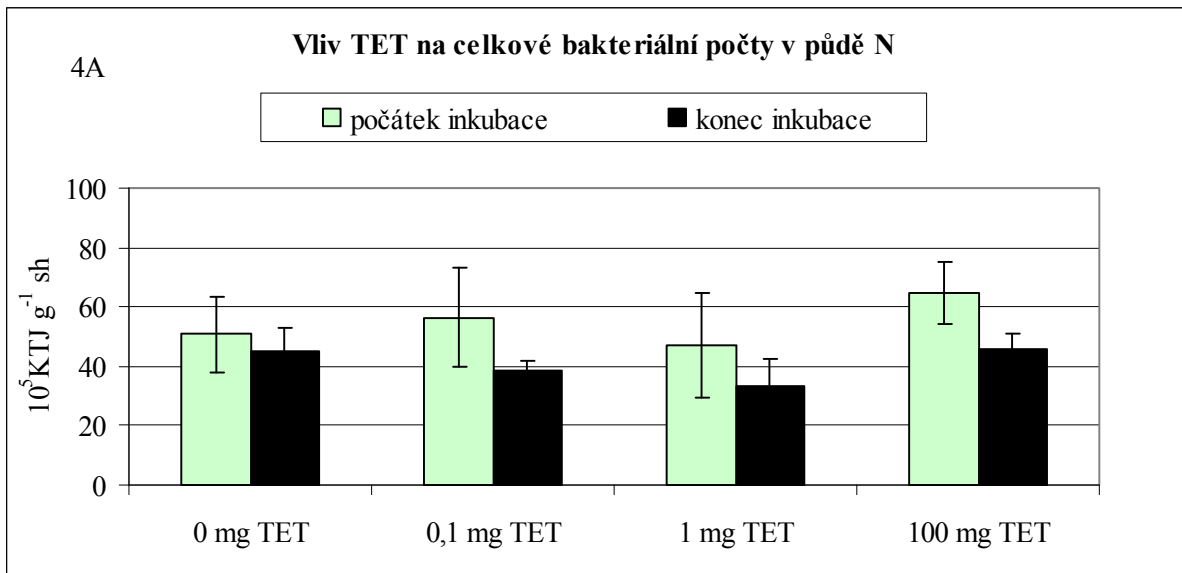
Do této práce byly zahrnuty výsledky z počátku inkubace (po 12 hodinách) a z konci inkubace (po 14 dnech). Výsledky 7 denní inkubace neukázaly významné rozdíly mezi testovanými variantami, podrobně jsou uvedeny v práci Elhottová (2008).

Odpověď celkového bakteriálního společenstva kontrolní půdy na různě vysoké dávky TET po 14 denní inkubaci znázorňuje Obr. 4A. Výsledky naznačily negativní vliv antibiotika na celkové počty bakterií. Po aplikaci všech dávek antibiotika do půdy došlo po 14 dnech k poklesu počtu bakteriálních KTJ oproti počátku inkubace. Statisticky průkazný rozdíl byl zjištěn pouze u nejvyšší dávky antibiotika (100 mg TET . kg^{-1} s.p.) při porovnání počtů KTJ na počátku a konci inkubace půdy s antibiotikem.

Odpověď celkového bakteriálního společenstva kejdované půdy PK na různě vysoké dávky TET se ve srovnání s kontrolní půdou lišila (Obr. 4B). Při nejnižší dávce (0,1 mg TET . kg^{-1} s.p.) počty v PK půdě byly signifikantně vyšší ve srovnání s půdou N i s půdou PK neinkubovanou s antibiotikem; podobně také při aplikaci střední dávky antibiotika (1 mg TET . kg^{-1} s.p.) byly vyšší počty bakterií zaznamenány v PK půdě oproti půdě N, avšak rozdíly nebyly průkazné. Při aplikaci nejvyšší dávky (100 mg TET . kg^{-1} s.p.) byly půdě PK zjištěny stejné počty bakterií jako v půdě N a shodně také zaznamenán průkazný pokles bakteriálních počtů na konci 14-denní inkubace.

Lze shrnout, že půda PK se lišila v reakci na přidavek TET ve srovnání s půdou N, neboť nejnižší dávka TET (0,1 mg TET. kg⁻¹s.p.) průkazně stimulovala počty celkových bakterií na počátku i konci inkubace.

Obr. 4. Vliv různě vysokých dávek TET na celkové počty kultivovatelných bakterií v kontrolní půdě N (4A) a v půdě PK (4B) (hodnoty udávají aritmetický průměr a směrodatnou odchylku; n=9)

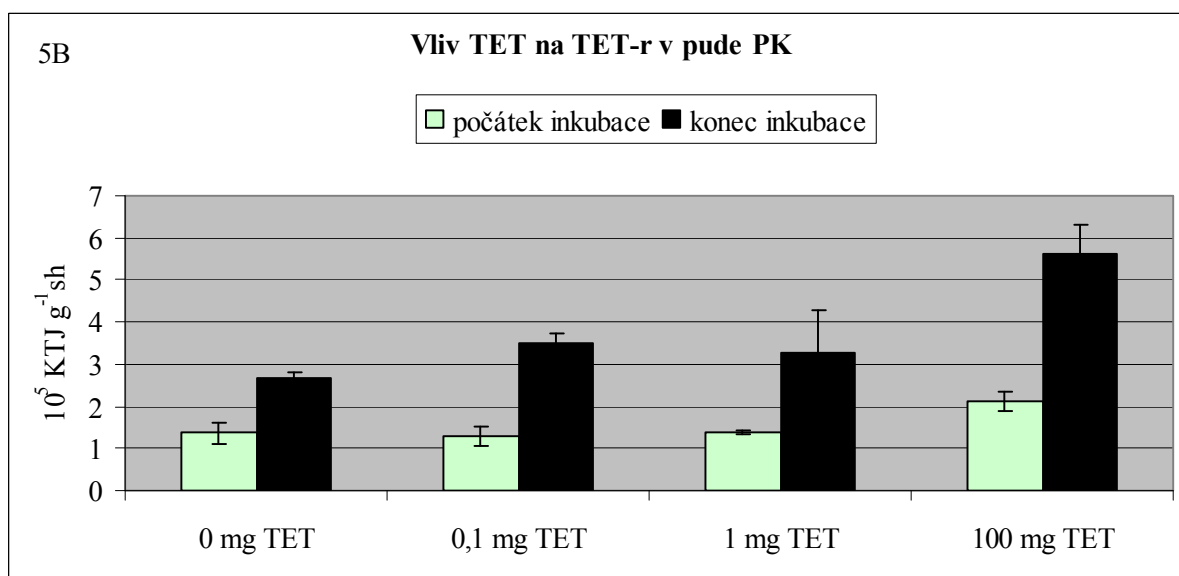
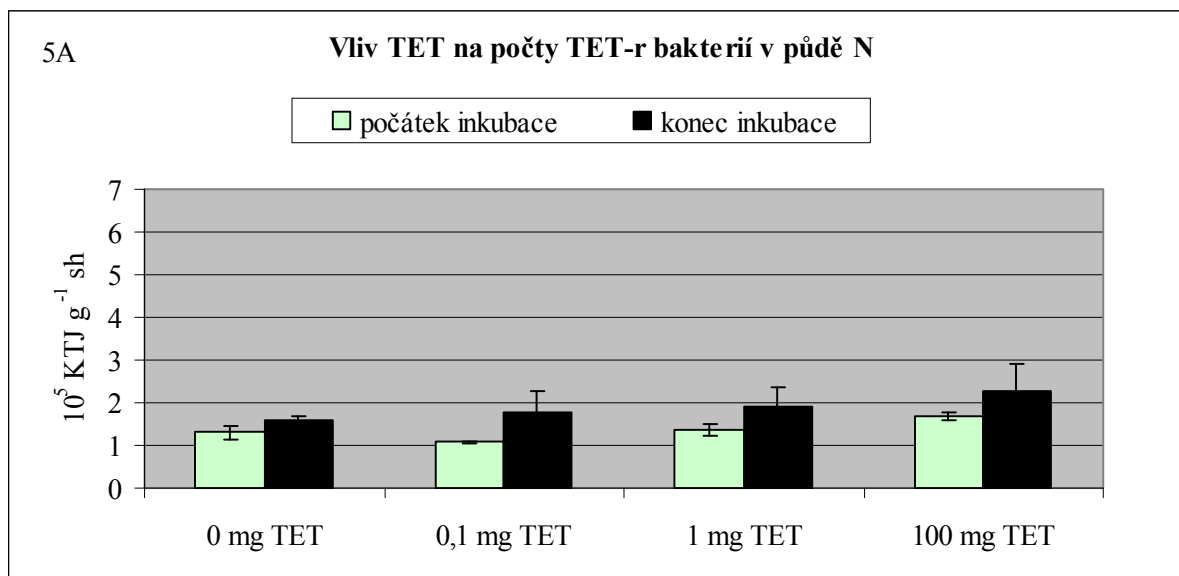


Odpověď TET-rezistentního bakteriálního společenstva kontrolní půdy N a kejdované půdy PK na různě vysoké dávky TET po 14 denní inkubaci znázorňuje Obr. 5A, respektive 5B. Obě půdy reagovaly po 14 dnech na přítomnost TET o všech koncentracích průkazným nárůstem počtů TET-rezistentních bakterií (Tabulka 5). Tento nárůst byl významně vyšší v půdě PK v porovnání kontrolní půdou N.

V půdě PK se počty TET- rezistentních bakterií zvýšily po 14 dnech inkubace půdy dokonce i ve variantě bez přídatku TET. Tato změna by mohla indikovat, že optimální teplota a vlhkost půdy by mohla stimulovat šíření TET-rezistence mezi půdními bakteriemi.

Varianta s nejvyšší dávkou antibiotika v obou půdách vykazovala po 14. dnech inkubace průkazně vyšší počty oproti kontrolní půdě bez TET.

Obr. 5. Vliv různě vysokých dávek TET na počty kultivovatelných TET-rezistentních bakterií v kontrolní půdě N (5A) a v půdě PK (5B) (hodnoty udávají aritmetický průměr a směrodatnou odchylku; n=9)



Tab. 5. udává procentuální zastoupení TET rezistentních bakterií v rámci celkových počtů bakterií. Na počátku inkubace se procentuální zastoupení TET rezistentních bakterií v půdě N ani v půdě PK průkazně nelišilo v žádné variantě ošetření antibiotikem. Na konci inkubace se

procentuelní zastoupení TET rezistentních bakterií zvýšilo. V porovnání s půdou inkubovanou bez přídavku TET byl maximální nárůst zaznamenán v případě inkubace se nejvyšší dávkou TET, a to v půdě N z 3,5 % na 4,9 % a v půdě PK z 4,1% na 13,8%.

Tab. 5. Relativní zastoupení (%) TET rezistentních bakterií v celkovém počtu kultivovatelných bakterií v luční půdě ošetřované prasečí kejdou (PK) a v půdě neošetřované (N) inkubované 12 hodin a 14 dnů s různě vysokou dávkou antibiotika chlortetracyklinu (TET); (hodnoty udávají aritmetický průměr a směrodatnou odchylku; n=9)

Dávka TET [mg TET . kg ⁻¹ s.p.]	Počátek inkubace (12 hod)		Konec inkubace (14 dní)	
	Půda N	Půda PK	Půda N	Půda PK
0	2,6±0,5	2,5±0,6	3,5±0,7	4,1±1,0
0,1	1,9±0,3	1,6±0,2	4,6±0,7 [§]	5,1±0,9 [§]
1,0	2,9±0,7	2,3±0,5	5,7±0,8 [§]	6,8±1,1 [§]
100	2,6±0,4	3,3±0,6	4,9±0,9 [§]	13,8±2,8 ^{§*}

*statistický rozdíl (ANOVA; $p \leq 0,05$) mezi hodnotami půdy PK a N na konci inkubace

§ statistický rozdíl (ANOVA; $p \leq 0,05$) mezi hodnotami příslušné varianty na počátku a konci inkubace

Výsledky ukázaly průkazně stimulační vliv selekčního tlaku TET na nárůst TET rezistentních bakterií v obou půdách.

Půda PK, dlouhodobě vystavovaná ATB reziduím, na selekční tlak TET odpovídala intenzivněji než kontrolní půda N.

4.3. Druhová/rodová skladba TET rezistentních bakterií

V půdě N bylo charakterizováno celkem 21 izolátů, z čehož se podařilo do druhu identifikovat 9. Nejfrekventovanější byl druh *Lechevalieria flava*, *Streptoverticillium reticulum* a *Virgibacillus pantothenicus*. Dále byl identifikován *Chryseobacterium balustinum*, *Stenotrophomonas maltophilia*. Rodová příslušnost byla přiřazena 7 izolátům: r. *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*. U pěti izolátů se podařilo zjistit příslušnost ke G+ nebo G- skupině. Jelikož toto bakteriální společenstvo nebylo v minulosti ani během pokusu vystaveno působení antibiotika, lze předpokládat, že tyto druhy jsou nositeli přirozené TET rezistence. Přehled výskytu druhů/rodů v půdě N udává Tab. 6.

V půdě PK bylo charakterizováno celkem 18 izolátů, z čehož se podařilo do druhu identifikovat 11. Nejfrekventovanější byl druh *Streptoverticillium reticulum* a *Rhodococcus erythropolis*. Dále byl identifikován *Chryseobacterium indologenes*, *Kocuria erythromyxa* a *Staphylococcus hominis hominis*. Rodová příslušnost byla přiřazena 7 izolátům: r. *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Variovorax*, *Lechevalieria*, *Microbiospora* a *Xanthobacter*. Přehled výskytu druhů/rodů v půdě PK udává Tab. 6.

Skladba TET rezistentních bakterií byla ovlivněna inkubační dávkou TET; při nejnižší dávce TET stoupla rodová pestrost; byl zaznamenán nový výskyt zástupců r. *Brevibacillus*, *Kocuria*, *Microbiospora*, *Microbacterium* a *Mycobacterium*. Při střední dávce TET byla zjištěna nejnižší pestrost TET- rezistentního společenstva; specificky se vyskytl rod *Nocardia* a dále zástupci r. *Streptomyces*, a *Variovorax*, kteří byli dále nalezeni již jen v přítomnosti nejvyšší dávky TET. Specifikem nejvyšší dávky TET byl ve srovnání s ostatními variantami půdy N relativně vysoký výskyt G- zástupců. Přesto zástupci skupiny G+ dominovali ve všech variantách. Přehled výskytu druhů/rodů v půdě N udává Tab. 6.

Skladba TET rezistentních bakterií v půdě PK byla ovlivněna inkubační dávkou TET; při nejnižší dávce TET se v půdě PK vyskytly druhy, které v ostatních variantách PK půdy nebyly nalezeny, jednalo se o *Kocuria rhizophila*, *Chryseobacterium balustinum*, *Microbacterium saperdae* a *Mycobacterium chelonae* a také rod *Nocardia* a *Micromonospora*. Nejvyšší dávka TET měla stimulační vliv na výskyt zástupců rodů *Bacillus*, *Brevibacillus* a *Paenibacillus*. Vliv střední dávky na skladbu TET rezistentních bakterií nebyl ničím specifický. Přehled výskytu druhů/rodů v půdě PK udává Tab. 6.

Tab. 6. Druhové/rodové zastoupení chlortetracyklin-rezistentních bakterií v kejdované (PK) a kontrolní (N) půdě.

Inkubační dávka tetracyklinu (mg kg ⁻¹ sp)	Půda N				Půda PK			
	0	0.1	1	100	0	0.1	1	100
<i>Bacillus cereus</i>					0,23		0,15	0,16
<i>Bacillus megaterium</i>	0,48		0,74					0,76
<i>Brevibacillus parabrevis</i>								0,63
<i>Brevibacillus reuszeri</i>		0,55						
<i>Chryseobacterium balustinum</i>	0,78	0,96		0,79		0,95		
<i>Chryseobacterium indologenes</i>				0,61	0,89		0,55	
<i>Corynebacterium</i> sp.					0,24	0,23		0,22
G+ NI*	3	7	4	1		2	4	4
G- NI*	1			1	2			1
<i>Kocuria erythromyxa</i>					0,67			
<i>Kocuria rhizophila</i>		0,68				0,66		
<i>Kocuria varians</i>		0,7						
<i>Lechevalieria flava</i>	0,55	0,12		0,25	0,19		0,20	0,53
<i>Microbacterium flavescens</i>						0,12		
<i>Microbacterium laevaniformans</i>		0,14						
<i>Microbacterium neoaurum</i>		0,31						
<i>Microbacterium saperdae</i>						0,52		
<i>Microbiospora diastatica</i>		0,27			0,25	0,31		
<i>Micromonospora carbonacea</i>			0,13			0,15		
<i>Mycobacterium chelonae</i>						0,72		
<i>Mycobacterium mucogenicum</i>		0,45		0,16				
<i>Mycobacterium triviale</i>		0,41						
<i>Mycobacterium vaccae</i>		0,41						
<i>Nocardia brasiliensis</i>			0,25			0,13		
<i>Paenibacillus macerans</i>	0,27	0,18		0,26			0,24	0,12
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	0,15							0,70
<i>Paenibacillus validus</i>				0,75				
<i>Rhodococcus erythropolis</i>					0,69		0,69	0,68
<i>Staphylococcus hominis hominis</i>	0,26	0,57			0,84			
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,53	0,86	0,66	0,29			0,59	
<i>Streptomyces cinnamoneus cinnamoneus</i>			0,29	0,75				
<i>Streptovercillium reticulum</i>	0,63	0,16		0,45	0,73	0,55	0,78	0,38
<i>Variovorax paradoxus</i>			0,59	0,62	0,22	0,64		0,89
<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	0,72						0,27	
<i>Xanthobacter agilis</i>					0,12			
Počet různých druhů (druhová pestrost)	5	5	3	5	5	6	4	6
Počet různých rodů (rodová pestrost)	7	11	6	8	10	9	8	8

Číselné údaje poskytují hodnotu indexu podobnosti (SI) s identifikační databází Systému MIS Sherlock. Hodnoty > 0,5 udávají příslušnost k druhu; hodnoty < 0,5 udávají příslušnost k rodu.

G+ NI = neznámý izolát, (na základě profilu mastných kyselin potvrzena příslušnost do skupiny Gram+ bakterií)

G- NI = neznámý izolát, (na základě profilu mastných kyselin potvrzena příslušnost do skupiny Gram- bakterií)

* číselný údaj znamená počet přiřazených izolátů

Porovnání druhové/rodové skladby TET-rezistentních bakterií v půdě N a PK ukázalo, že v půdě N se narozdíl od půdy PK specificky vyskytovali *Brevibacillus reuszeri*, *Kocuria varians*, *Paenibacillus validus*, *Streptomyces cinnamoneus cinnamoneus*.

V půdě PK narozdíl od půdy N se specificky vyskytovali *Rhodococcus erythropolis*, *Corynebacterium* sp., *Kocuria erythromyxa*, *Microbacterium saperdae*, *Mycobacterium chelonae* a *Xanthobacter* sp.

Ačkoliv údaje o druhové/rodové skladbě nebyly podrobeny statistickému porovnání, lze konstatovat, že různě vysoká dávka TET má vliv na druhovou/rodovou skladbu TET rezistentních bakterií půdy N i půdy PK, a že obě půdy se skladbou TET rezistentních bakterií liší.

Praktickým výstupem této části práce je 208 izolátů TET rezistentních bakterií uložených v pracovní sbírce laboratoře 242 BC AV ČR ÚPB, které jsou předmětem dalšího výzkumu.

4.4. Odolnost TET-rezistentních bakteriálních kmenů k dalším ATB

Celkem bylo testováno 147 G⁺ bakteriálních TET-rezistentních izolátů (80 z půdy PK, 67 z půdy N) a 61 G⁻ bakteriálních izolátů (15 z půdy PK a 46 z půdy N). Byla použita klasifikace citlivý kmen, intermediálně rezistentní a rezistentní podle normy NCCLS.

Tři G⁻ izoláty z kontrolní půdy N byly citlivé na amoxicilin, u všech ostatních byla zjištěna intermediální nebo silná rezistence. Zastoupení a rozdělení testovaných kmenů podle typu rezistence uvádí Tabulka 7. Nejčastějším typem ATB rezistence u G⁺ izolátů v půdě PK i N byla rezistence vůči 1 ATB (jednalo se o linkomycin), nejfrekventovanějším typem multirezistence byla rezistence vůči 2 a 6 ATB, jednalo se o linkomycin, chloramfenikol, tetracyklin, streptomycin, penicilin a gentamycin. Nejčastějším typem ATB rezistence u G⁻ izolátů v půdě PK byla intermediální rezistence a silná rezistence vůči 1 ATB (jednalo se o polymyxin). Nejčastějším typem multirezistence byla odolnost vůči 5 a 6 ATB. Jednalo se o polymyxin, streptomycin, amoxicilin, gentamycin, chloramfenikol, tetracyklin. Nejméně častá byla rezistence k doxycyklinu. Pro G⁻ izoláty kontrolní půdy byla typická multirezistence k 6, 5 a 4 ATB. Nejčastěji zaznačenou ATB rezistencí byla odolnost vůči chloramfenikolu, streptomycinu, gentamycinu, a nejméně častá byla odolnost vůči doxycyklinu. Na rozdíl od kejdované půdy PK byla v kontrolní půdě N málo frekventovaná rezistence vůči polymyxinu a tetracyklinu.

Tab. 7. Počty a rozdělení bakteriálních kmenů podle ATB rezistence na základě semikvantitativního zónového testu

		Počet G ⁺ izolátů podle typu ATB rezistence								
Typ ATB rezistence	It-r	1ATB	2ATB	3ATB	4ATB	5ATB	6ATB	7ATB	8ATB	9ATB
Půda N (67 kmenů)	8	29	9	8	3	6	9	3	3	0
Půda PK (80 kmenů)	7	18	16	5	2	4	6	1	3	0
		Počet G ⁻ izolátů podle typu ATB rezistence								
Typ ATB rezistence	It-r	1ATB	2ATB	3ATB	4ATB	5ATB	6ATB	7ATB	8ATB	9ATB
Půda N (46 kmenů)	2	1	1	2	4	4	5	0	nt	nt
Půda PK (15 kmenů)	13	9	3	2	2	9	7	1	nt	nt

It-r = intermediální rezistence (zóna < hraniční hodnota, podle NCCLS normy)

1ATB-9ATB = silná rezistence (zóna < 3 mm), číslice značí počet ATB rezistencí/kmen

nt = netestováno

Předběžný semikvantitativní test citlivosti k ATB neukázal významné rozdíly ve výskytu multirezistence mezi půdou N a PK.

5. Diskuse a závěry

Porovnání počtů celkových kultivovatelných a TET-rezistentních bakterií v půdě (PK), do které dlouhodobě vstupovala ATB rezidua s počty kontrolní půdy nepotvrdilo předpoklad o vyšším zastoupení TET-rezistentních bakterií v této půdě.

Celkové počty kultivovatelných bakterií v obou půdách se nelišily; řádově dosáhly hodnot 10^6 KTJ \cdot g⁻¹ suché půdy, což je typická hodnota pro zemědělsky využívané půdy (Alexander, 1977). Podobně i zastoupení TET-rezistentních bakterií se nelišilo; v půdě PK reprezentovaly TET-r bakterie 2,5% a v kontrolní půdě N 2,6% v rámci celkových bakteriálních počtů

Výsledky, ale prokázaly, že pod aktuálním selekčním tlakem přidaného TET reagují bakteriální společenstva obou půd odlišně. Kontrolní půda reagovala na přídavek TET snížením celkových počtů bakterií, na rozdíl od půdy PK. V kejdované půdě PK působil přídavek TET na celkové bakterie v závislosti na použité koncentraci. Zásadní rozdíl byl pozorován při aplikaci nejnižší dávky TET (0,1 mg TET. kg⁻¹s.p), která celkové bakteriální společenstvo neredukovala, ale naopak průkazně stimulovala, a to okamžitě po 12 hodinách i po 14 dnech. Tato skutečnost indikovala, že bakterie kejdované půdy byly na nízké dávky antibiotika vstupujícího do půdy dobře adaptované a využívaly ho k svému růstu. Nejvyšší dávka TET celkové bakteriální společenstvo kejdované půdy ve shodě s kontrolní půdou redukovala.

V obou půdách byl prokázán stimulační selekční vliv TET na počty TET rezistentních bakterií. Půda PK, dlouhodobě vystavovaná ATB reziduím, na selekční tlak TET odpovídala intenzivněji než kontrolní půda N. Na rozdíl od kontrolní půdy N byl stimulační efekt TET v půdě PK zaznamenán nejen u nejvyšší (200mg TET. kg⁻¹s.p), ale u všech aplikovaných dávek TET. Pod vlivem nejvyšší testované dávky TET došlo po 14 dnech inkubace v půdě PK k nárůstu TET-rezistentních bakterií z 4,1% na 13,8% a v půdě N pouze z 3,5 % na 4,9 %.

Kejdovaná půda reagovala na přídavek antibiotika silněji, vysoký nárůst TET rezistentních bakterií po aplikaci TET svědčí o intenzivních interakcích uvnitř bakteriálního společenstva kejdované půdy. Na jedné straně ve společenstvu vystavenému tetracyklinu dochází k odumírání TET senzitivních mikroorganismů, které se stávají lukrativním zdrojem substrátu, živin a energie, pro rozvoj TET rezistentních organismů na straně druhé. Ve společenstvu patrně dochází také k intenzivní výměně genetické informace zajišťující TET rezistenci.

Druhová/rodová skladba TET-rezistentního bakteriálního společenstva půd PK a N indikovala rozdíly mezi oběma půdami.

Druhová skladba TET rezistentních bakterií ukázala, že převážná část izolátů obou půd shodně patřila do skupiny G⁺ bakterií. Nejčastěji se vyskytujícím druhem u obou půd byl *Streptoverticillium reticulum*. Jedná se o typického půdního zástupce G⁺ bakterií ze skupiny streptomycetů a příbuzných rodů; charakteristickou vlastností rodu *Streptoverticillium* je produkce širokého spektra látek s antifungální, antibakteriální, antiprotozoální a antitumorální aktivitou. Známa je rezistence k lysozymu a neomycinu (Holt et al., 1994).

Rozdíly byly i v druhové skladbě mezi oběma půdami. Společenstvo TET rezistentních bakterií v kejdované půdě bylo charakteristické některými druhy, které se z kontrolní půdy nepodařilo izolovat. Jednalo se o *Rhodococcus erythropolis*, *Kocuria erythromyxa*, *Microbacterium saperdae*, *Mycobacterium chelonae*, *Corynebacterium* sp. a *Xanthobacter* sp. Ačkoliv nebyly vyizolovány klinicky významné patogeny, za zmínění stojí výskyt podmíněného patogena hospodářských zvířat i člověka *Mycobacterium chelonae*, nalezeného pouze v kejdované půdě vystavené nejnižší dávce TET (0,1 mg kg⁻¹ sp). Tato

bakterie způsobuje zejména u prasat infekce v mízních uzlinách trávicího ústrojí. Zdrojem atypických mykobaktérií je nejčastěji vnější prostředí, kterým může být rašelina, substráty z listů a dalších tlejících organických zbytků v listnatých a jehličnatých porostech, bahno, kalíšť a další. Za „transportní médium“ mykobaktérií je považována především voda. Podmíněně patogenní mykobaktérie byly izolovány prakticky ze všech různých vod (povrchová sladká, mořská, brakická, studniční, říční, potoční a další) kromě vody pocházející z Artézských studní, tedy vody získané z vrtů několik set metrů hlubokých. Problémem je také jejich rezistence vůči běžné dezinfekci pitné vody a schopnost přežívat uvnitř prvků (Pavlík, 2006). Při poranění může vyvolávat komplikace i u člověka. Odborná literatura udává *Mycobacterium chelonae* jako původce častých kožních komplikací po nesprávném akupunkturním ošetření (Ara et al., 2003).

Naopak výskyt *Brevibacillus reuszeri*, *Kocuria varians*, *Paenibacillus validus*, *Streptomyces cinnamomeus cinnamomeus* byl potvrzen pouze v kontrolní nekejdované půdě.

Výsledky studia druhové skladby bakterií v obou půdách ukázaly, že mezi TET rezistentními bakteriemi převládali zástupci aktinobakterií a r. *Bacillus* a jemu blízké příbuzných rodů. Tyto mikroorganismy patří mezi významné producenty antibiotik a nesou si zároveň i výbavu zajišťující jim odolnost vůči antibiotikům. Právě tyto skupiny jsou také považovány za významné pro zprostředkování přenosu ATB rezistence mezi patogenními bakteriemi zažívacího traktu člověka i zvířat a přirozenou mikroflórou prostředí (Nwosu, 2001).

V reakci na přidavek TET do media se v obou půdách shodně objevili zástupci rodů *Kocuria*, *Nocardia*, *Mycobacterium* a *Microbacterium*. Přičemž v kontrolní půdě to byl ještě navíc r. *Brevibacillus*, *Microbiospora*, *Streptomyces*, *Variovorax* a v kejdované půdě r. *Chryseobacterium* a *Micromonospora*. Vlivem nejnižší dávky TET v kontrolní půdě stoupla druhová i rodová pestrost TET rezistentního společenstva. V kejdované půdě měla nejvyšší dávka TET stimulační vliv na výskyt zástupců rodů *Bacillus*, *Brevibacillus* a *Paenibacillus*. Většina identifikovaných bakterií opět patřila mezi G⁺ rody významné v přenosu ATB rezistence. Mezi G⁻ bakteriemi se vyskytl r. *Chryseobacterium* a *Variovorax*. V kontrolní půdě se ve všech variantách vyskytl *Stenotrophomonas maltophilia* nositel multirezistence, charakteristický vysokou schopností získat ATB rezistenci je-li vystaven selekčnímu tlaku. Všechny tyto bakterie patří do skupiny G⁻ aerobních a mikroaerofilních tyček (Holt et al., 1994). *Stenotrophomonas maltophilia* a zástupci r. *Chryseobacterium* patří mezi známé potenciální patogeny způsobující obtíže pacientům se sníženou imunitou (Bednář et al., 1996). *Variovorax paradoxus* patří mezi běžné bakterie vyskytující se v prostředí. Informace o rezistenci zástupců rodu *Variovorax* k antibiotikům není dostupná.

Je otázkou, jak dlouho G⁻ kmeny se získanou rezistencí v prostředí zůstávají a zda si tuto vlastnost udrží neboť udržování získaných genů je pro buňku energetická zátěž. Výsledky této práce ukázaly, že výskyt *Stenotrophomonas maltophilia* i *Chryseobacterium balustinum* se právě zvyšoval pod selekčním tlakem antibiotika v případě obou studovaných půd.

Výsledky semikvantitativní testu ATB citlivosti u kmenů *Stenotrophomonas maltophilia* i *Chryseobacterium balustinum*, jakož i většiny aktinobakterií a zástupců r. *Bacillus* potvrdily, že se jednalo o ATB multirezistentní kmeny.

Výsledky těchto testů však nepotvrdily vyšší zastoupení ATB-multirezistentních kmenů v půdě PK ve srovnání s půdou N.

Na šíření rezistentních mikroorganismů v lidské populaci i prostředí může podílet právě přirozená mikroflóra prostředí, která používá nejrůznější ATB rezistenční mechanismy jako svoji přirozenou obranu (Thomashow et al., 1997). Zejména půdní bakteriální producenti

antibiotik jsou v poslední době považovány za významné kandidáty při šíření ATB rezistence mezi přirozenou mikroflórou a patogenními mikroorganismy (Nwosu, 2001). Pro ověření této hypotézy i samotné ekologie ATB rezistentních mikroorganismů, je zapotřebí studovat prostředí ovlivňovaná antropogenními vstupy ATB, ale i prostředí vzdálená civilizačním vlivům. Studie Mindlina et al. (2008) zabývající se analýzou ATB rezistence bakterií izolovaných z arktických půd permafrostu ukázala, že ATB rezistence existovala v přirozené mikroflóře dávno před zahájením antibiotické éry, tj. obdobím zahájení masivní aplikace ATB.

V objasnění a poznání, jak tyto přirozeně rezistentní mikroorganismy mohou ovlivňovat přenos a šíření ATB-rezistence je zatím stále velmi mnoho neznámého

Tato práce je malým příspěvkem, který upozorňuje na problematiku šíření ATB rezistence v našem přirozeném prostředí.

6. Seznam použité literatury

- Alcock R.E., Sweetman A., Jones K.C. 1999. Assessment of organic contaminant fate in wastewater treatment plants I. Selected compounds and physiochemical properties. *Chemosphere* 38, 2247-2262.
- Alexander M. 1977. Introduction to soil microbiology. John Willey and Sons, New York, pp. 467.
- Ara M., de Santamaría C.S., Zaballos P., Yus C., Lezcano M.A. 2003. *Mycobacterium chelonae* infection with multiple cutaneous lesions after treatment with acupuncture. *International Journal of Dermatology*, 42, 642-644.
- Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J. 1996. *Lékařská mikrobiologie*, Marvil, str. 160 – 184.
- De Leij F.A.A.M., Whipps J.M., Lynch J.M. 1993. The use of colony development for the characterization of bacterial communities in soil and on roots. *Microbial Ecology* 27, 81-97.
- Elhottová, A. 2008. Vliv veterinárních antibiotik na společenstvo půdních kultivovatelných bakterií – tetracyklinová studie. *Práce SOČ, České Budějovice*, str. 33.
- Elmund G.K., Morrison, S.M., Grant D.W., Nevins Sr.M.P. 1971. Role of excreted chlortetracycline in modifying the decomposition process in feedlot waste. *Bulletin of Environmental Toxicology* 6, 129-132.
- Fisherová J. 2006. Antibiotické stimulatory zakázány. *Krmivářství* 1, 5-6.
- Ghosh, S. and La Para, M. T. 2007 The effect of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among bacteria. *The ISME Journal* 1: 191-203.
- Chopra I. and Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications and molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65: 232-260.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H., Staley J.T., Williams S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed., Williams & Wilkins, Baltimore, Md., 787 pp.
- Jindal A., Kocherginskaya S., Mehboob A., Robert M., Mackie R.I., Raskin L., Zilles J.I. 2006. Antimicrobial use and resistance in swine waste treatment systems. *Applied Environmental Microbiology* 72: 7813-7820.
- Madigan M.T., Martinko J.M. 2006. *Brock Biology of Microorganisms*. 11th Edition. Pearson Prentice Hall Inc., 992 pp.
- Mindlin, S. Z., Soina, V. S., Petrova, M. A., Gorlenko, Zh. M. 2008 Isolation of antibiotic resistance bacterial strains from Eastern Siberia permafrost sediments. *Russ. J. Genet.* 44: 27-34.
- Nwosu V.C. 2001. Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Research in Microbiology* 152, 421-430.
- Pavlík I. 2006. Various stages in the life cycle of syrphid flies (*Eristalis tenax*; Diptera: Syrphidae) as potential mechanical vectors of pathogens causing mycobacterial infections in pig herds. *Folia Microbiologica* 51, 147-153.
- Sarmah A.K., Meyer M.T., Boxall A.B.A. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65, 725-759.
- Spížek J. 1999. Rezistence na antibiotika. *Vesmír* 78: 27.
- Thomashow R.F., Bonsall R.F., Weller D.M. 1997. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. In: C.J. Hurst, G.R. Knudson, M.J. McInerney, Stetzenbach L.D., Walter M.V. (Eds.) *Manual of Environmental Microbiology*, ASM Press, Washington, DC. pp. 493-499
- <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/tetracycline/tetracycline.htm>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Antibiotic_resistance