

OD PŘIROZENÉHO FENOMÉNU VÝSKYTU GENŮ REZISTENCE K ANTIBIOTIKŮM V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ KE VZNIKU MULTIREZISTENTNÍCH KMENŮ

HANA STIBOROVÁ, ADÉLA BAČÁKOVÁ,
LUCIE MUSILOVÁ a KATEŘINA DEMNEROVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6
hana.stiborova@vscht.cz

Došlo 8.1.18, přijato 3.5.18.

Klíčová slova: antibiotika, rezistence, sub-inhibiční koncentrace, rezervoáry, multirezistence

Obsah

1. Úvod
2. Antibiotika – kontaminanty životního prostředí
 - 2.1. Přirozená rezistence k antibiotikům
 - 2.2. Rezervoáry antibiotik
 - 2.2.1. Čistírny odpadních vod a čistírenský kal
 - 2.2.2. Statková hnojiva
 - 2.2.3. Půda
 - 2.2.4. Říční sediment
3. Šíření genů rezistence k antibiotikům
 - 3.1. Horizontální genový transfer
 - 3.2. Vliv sub-inhibičních koncentrací antibiotika
 - 3.3. Multirezistentní mikroorganismy
4. Závěr

1. Úvod

Produkce a aplikace antibiotik v humánní medicíně patří mezi největší úspěchy 20. století. V současné době jsou antibiotika připravována zejména chemickou syntézou nebo chemickou modifikací původních struktur a využívají se především k léčbě a prevenci řady infekčních onemocnění způsobených širokým spektrem bakterií¹. V některých zemích antibiotika jsou nebo byla využívána i jako stimulatory růstu hospodářských zvířat^{2,3}. Přesný mechanismus účinku antibiotik na stimulaci gastrointestinálního traktu chovných zvířat není znám, ale byly navrženy následující hypotézy: příznivé ovlivnění střevní mikroflóry, snížení zátěže mikrobiálními toxiny, lepší vstřebávání živin vlivem ztenčení střevní stěny a snížení množství střevních infekcí^{2,4,5}. Kvůli obavám z vývoje antibiotické rezistence a přenosu genů rezistence ze zvířete na člověka je od roku 2006 používání všech antibiotik jako stimula-

rů růstu v EU zakázáno⁶. Nicméně nadměrné využívání antibiotik a přítomnost jejich reziduí v životním prostředí vedly ke zvýšenému výskytu bakterií odolných k antimikrobiálním přípravkům a velkým problémem se tak stává nejen šíření sekundární (získané) rezistence bakterií k jednomu typu antibiotika, ale i vznik multirezistentních kmenů⁷. Tento problém lze demonstrovat tím, že v Evropě zemře ročně přibližně 5,1 obyvatele na 100 000 a v USA 2,8 obyvatele na 100 000 na následky infekcí způsobených bakteriálními kmeny, které jsou rezistentní k antibiotikům běžně používaným k jejich léčbě^{8,9}. Mezi nejčastěji aplikovaná antibiotika patří β-laktamy, makrolidy, sulfonamidy, fluorochinolony a tetracykliny a volba antibiotika je ovlivněna potřebným mechanismem účinku a původcem infekce. Nejčastěji antibiotika účinkují na citlivé mikroorganismy čtyřmi mechanismy: (a) inhibují syntézu buněčné stěny, (b) inhibují proteosyntézu, (c) inhibují syntézu nukleových kyselin a (d) narušují funkci cytoplasmatické membrány¹. Po požití jsou antibiotika částečně vyloučena v nezměněné formě, nebo mohou být organismem biotransformována a poté vyloučena ve formě konjugovaných či nekonjugovaných metabolitů, z nichž některé mohou být stále bioaktivní^{1,10,11}. Vylučování aktivních forem je závislé na druhu antibiotika, např. pro klindamycin se uvádí 10–35 %, zatímco u piperacillinu se obsah aktivní formy pohybuje v rozmezí od 60 do 95 % (cit.¹²).

2. Antibiotika – kontaminanty životního prostředí

2.1. Přirozená rezistence k antibiotikům

Rezistenci vůči antibiotikům lze definovat jako schopnost bakterie přežít účinek inhibiční koncentrace příslušného antibiotika¹³. V životním prostředí se rezistence u mikroorganismů vůči antimikrobiálním látkám vyskytuje přirozeně jako důsledek přítomnosti bioaktivních látek. Již ve zkamenělých stromatolitech, jejichž stáří se odhaduje na více než 3,45 miliard let, byly detegovány zbytky sinic. Sinice jsou schopné produkovat různé spektrum sekundárních metabolitů s rozdílnou biologickou aktivitou. Dalšími producenty bioaktivních sloučenin jsou rostliny, jejichž výskyt na Zemi byl prokázán před více než 0,4 miliardami let¹⁴. Není tedy překvapivé, že si mikroorganismy za tak dlouhou dobu kontaktu s bioaktivními látkami vyvinuly mechanismy pro jejich rozpoznání, transformaci a buněčnou odpověď. Odhaduje se, že se přírodní antibiotika objevila více než před 2 miliony let a koncentrace antibiotik přirozeně produkováná bakteriemi v životním prostředí se pohybuje daleko

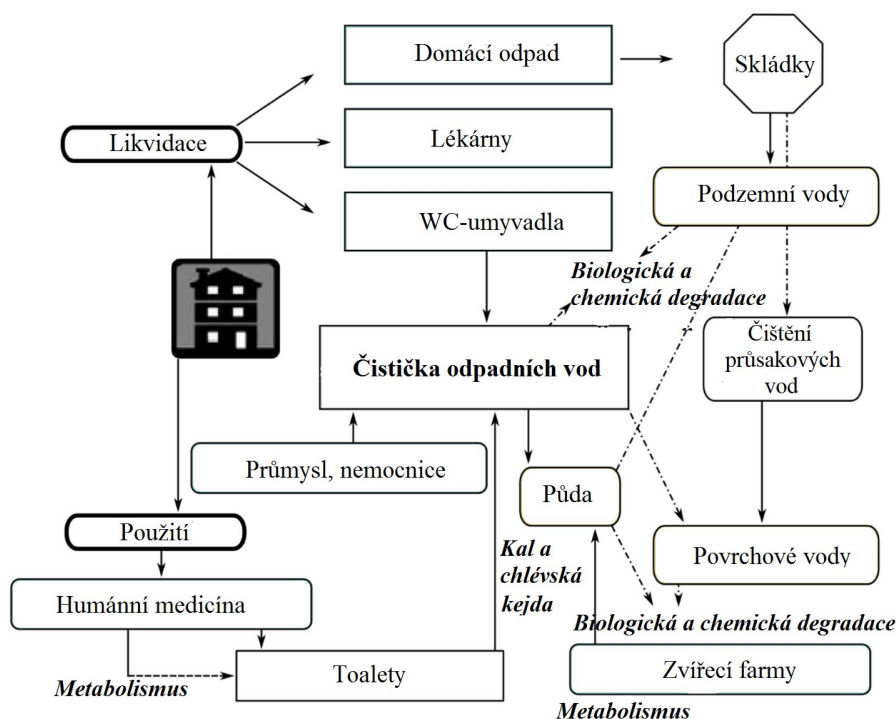
pod minimální inhibiční koncentrací (MIC, minimální koncentrace látky vyvolávající inhibici viditelného růstu mikroorganismu v definovaných podmínkách)¹⁵. Předpokládá se, že sub-inhibiční koncentrace antibiotik plní v životním prostředí důležitou roli regulačních sloučenin, signálních molekul pro komunikaci bakterií, indukci tvorby biofilmu, SOS odpověď a pro změny v základním metabolismu. Ale je také potvrzeno, že sub-inhibiční koncentrace antibiotik vedou k selekci rezistentní populace¹⁶.

Metagenomové studie prokázaly, že environmentální rezistom (soubor všech genů rezistence k antibiotikům) se v životním prostředí běžně vyskytuje a obsahuje velké množství genů, které jsou zahrnuty v metabolických drahách bakterií a mohou se podílet i na rezistenci k antimikrobiálním látkám. Například v půdě odebrané na Aljašce, kde byla minimální antropogenní aktivita, byly detegovány geny kódující β -laktamasy. Tyto geny však vykazovaly vyšší příbuznost k ancestrální β -laktamase, než ke genům izolovaným ze současných klinických vzorků. Obdobně tomu bylo s geny kódujícími rezistenci k aminoglykosidům a tetracyklinům⁹. Vyšší koncentrace antibiotik, které se nyní v životním prostředí vyskytují, vytvářejí selekční tlak a zvyšuje se tak přenos, vznik a výskyt nových mechanismů rezistence. Během posledních 10 let byly zaznamenány přenosy genů rezistence z bakterií, které se původně vyskytovaly pouze v životním prostředí, do patogenních bakterií způsobujících závažná onemocnění člověka a zvířat.

2.2. Rezervoáry antibiotik

Rezistence k antibiotikům je podmíněna složitými a vícenásobnými mechanismy a je schopna se šířit mezi bakteriemi stejného nebo dokonce různého druhu. Citlivé bakterie se mohou stát odolnými vůči antibiotikům díky mutacím a selekci nebo získem genetické informace kódující rezistenci od jiných bakterií prostřednictvím horizontálního genového transferu (HGT)¹⁷.

Příležitost ke genetické výměně se vyskytuje zejména v místech, kde je vysoký stupeň biologického propojení, variabilita a přítomnost selekce. Taková místa se nazývají genetické sektory¹⁸. V současnosti jsou známy čtyři hlavní genetické sektory. Primární sektor je tvořen lidskou a zvířecí mikroflórou. Sekundární sektor zahrnuje nemocnice, zařízení dlouhodobé péče a farmy. Terciární sektor je tvořen odpadními vodami a biologickými rezidui vzniklými v sekundárním sektoru, včetně lagun, čistíren odpadních vod (ČOV) a kompostů. Kvartérní sektor je půda a prostředí povrchových i podzemních vod. Mikroorganismy v primárním sektoru jsou vystaveny terapeutickému nebo preventivnímu působení antibiotik, což vede ke vzniku rezistence a jejímu šíření pomocí HGT v rámci téhož sektoru a k rozšíření do sekundárního sektoru, čímž dochází k dalšímu zvýšení počtu rezistentních mikroorganismů. Způsob šíření do terciárního a kvartérního sektoru je analogický a vždy s sebou nese vzrůst genetické variability a možnosti vzniku nových mechanismů rezistence a jejich



Obr. 1. Zdroje antibiotik v životním prostředí (upraveno z cit.²¹)

další šíření do vyšších, ale i nižších sektorů¹⁷.

Výzkumy týkající se výskytu reziduí antibiotik v životním prostředí jsou na celém světě prováděny již několik let a jako nejdůležitější zdroje přispívající k uvolňování zbytkových antibiotik do prostředí byly identifikovány domácnosti, ČOV, nemocnice, průmyslové jednotky a farmy zaměřené na intenzivní chov zvířat (obr. 1)^{17,19}. Doba perzistence antibiotik v prostředí se pohybuje v rámci dní až měsíců. Běžně detegované koncentrace antibiotik pohybující se v řádu od ng l^{-1} do $\mu\text{g l}^{-1}$ stačí k vyvolání toxických účinků na bakteriální populaci^{20–22}. Ekotoxické účinky antibiotik na vodní a suchozemské mikroorganismy a volně žijící živočichy jsou prozkoumány velmi málo a chybí jejich komplexní zhodnocení^{23–25}.

2.2.1. Čistírný odpadních vod a čistírenský kal

Čištění odpadních vod zpravidla zahrnuje primární a sekundární stupeň čištění. V primárním stupni dochází k odstranění pevných látek z odpadních vod, a to buď filtrací nebo sedimentací²⁶. Sekundární čištění zahrnuje biologické působení směsi anaerobních nebo aerobních mikroorganismů v aktivovaném kalu, kdy dochází nejen k odstraňování organických látek, ale i k transformaci a eliminaci antibiotik a jiných léčiv. V některých ČOV je ještě před uvolněním odpadní vody do životního prostředí zařazen terciární stupeň čištění sloužící k dočištění a sanitaci odpadních vod. K dočištění vody se často používá chlorace nebo UV záření²⁷. ČOV mají vysokou účinnost ve snižování množství organických látek a patogenních bakterií v odpadních vodách a čistírenském kalu, současně však slouží jako rezervoáry rezistentních bakterií a antibakteriálních látek^{28,29}.

Stupeň eliminace antibiotik závisí především na jejich chemických vlastnostech, zejména na schopnosti sorpce na aktivovaný kal. Hydrofobní antibiotika se lépe vážou na aktivovaný kal, nicméně většina antibiotik je hydrofilní povahy, a proto nejsou tímto způsobem zachycena a dále se šíří do vodních toků^{30–32}. Aktivovaný i stabilizovaný kal se vyznačují vysokou hustotou a rozmanitostí mikroorganismů³³, které jsou obecně neustále ve styku s různými typy léčiv v sub-inhibičních koncentracích, což vede k vytváření selekčního tlaku pro kmeny odolné vůči antibiotikům a HGT genů nesoucích rezistenci^{12,16,34}.

Přítomnost rezistentních i multirezistentních bakterií byla detegována v aktivačních nádržích a během procesu anaerobní stabilizace kalu v ČOV, jejímž výsledkem je bioplyn, aktivovaný kal a kalová voda, která se vrací zpět do čistícího procesu^{28,35}. ČOV, obzvláště ty, do kterých jsou přiváděny odpadní vody z nemocnic, byly identifikovány jako jedny z hlavních rezervoárů antibiotik.

S neustále rostoucím počtem ČOV se tedy nejsložitějším inženýrským problémem v oblasti odpadních vod stává zpracování, opětovné použití a likvidace čistírenských kalů. Zatímco v roce 1992 bylo v EU vyrobeno přibližně 5,5 milionů tun kalu, v současné době země EU produkují přibližně 11,5 milionů tun kalu, z čehož je až 70 % aplikováno přímo do zemědělské půdy nebo zpracováno kompo-

stováním či skládkováním³³. Proto je nezbytné zavádět technologie, které účinněji odstraní antibiotika a redukují počet rezistentních mikroorganismů. Mezi tyto procesy patří např. membránová filtrace, sorpce na aktivní uhlí, ionizace, hydrolyza a fotolýza³⁶.

2.2.2. Statková hnojiva

Veterinární antibiotika jsou hospodářským zvířatům podávána z důvodu léčby a prevence onemocnění. V roce 2010 bylo hospodářským zvířatům podáno přes 63 tis. tun antibiotik a jejich spotřeba neustále roste³⁷. Nejčastěji jsou používána antibiotika oxytetracyklin, chlortetracyklin, penicilin, sulfomethazin, neomycin, monensin a tylosin, přičemž většina z nich není zcela transformována a jsou vylučována v nezměněné formě. Looft a Johnson³⁸ prokázali, že dlouhodobé i krátkodobé podání antibiotik vede v kejdě ke zvýšenému výskytu bakterie *Escherichia coli* (indikátor fekálního znečištění) a ke zvýšení celkového počtu genů rezistence vztaženo na buňku a jejich diverzitu. Množství produkované chlévské kejdy není zanedbatelné, protože například prase vyprodukuje během dne 40 až 70 kg chlévské kejdy, která se dále může využít jako organické hnojivo³⁹. Orná půda, pastviny a voda jsou pak hlavní sektory, kam se antibiotika a mikroorganismy nesooucí geny rezistence šíří z hnojiv dál. Například v České republice bylo za hospodářský rok 2014/2015 celkem použito 4,8 t statkových hnojiv na 1 ha zemědělské půdy⁴⁰.

2.2.3. Půda

Sorpce a zadržení antibiotik a jejich degradace v půdě závisí na klimatických podmínkách, typu půdy, obsahu organické hmoty a fyzikálně-chemických vlastnostech daného antibiotika. Zatímco β -laktamová antibiotika jsou hydrolyticky odbouratelná poměrně snadno, některá antibiotika, např. sulfonamidy a fluorochinolony se pevně adsorbují na organickou hmotu a mohou přetrvávat v půdním prostředí i několik let³⁷. Některá antibiotika se zde vyskytují přirozeně díky sekundárnímu metabolismu půdních mikroorganismů¹¹, nicméně nedávné studie poukazují na to, že půdy hnojené kaly z ČOV nebo statkovým hnojem obsahují významně vyšší množství kopií genů rezistence vztažených na buňku než půda nehnojená^{41,42}.

2.2.4. Říční sediment

Prostorové rozložení antibiotik v fece a sedimentech ukázalo, že hlavním zdrojem znečištění jsou zemědělské pozemky s chovem užitkových zvířat lokalizované v blízkosti vodních toků a vyčištěných odpadních vod vypouštěných do říčního řečiště^{12,26}. Využití antibiotik v akvakultuře má také za následek výskyt rezistentních bakterií v říčním sedimentu⁴³. Aplikace antibiotik k profylaktickým účinkům v EU je zakázána a množství použitých antibiotik na kg ryby tedy výrazně pokleslo⁴⁴. Nejčastěji jsou používána chinolová a fluorochinolonová antibiotika, oxytetracyklin, případně β -laktamová antibiotika^{44,45}. Nicméně chovy ryb představují prostředí s vysokou koncentrací bakterií a tedy i vyšším rizikem HGT (cit.⁴⁶) a navíc se většina bakterií ve vodním prostředí vyskytuje ve formě

biofilmů, které usnadňují jejich přežití a zvyšují odolnost vůči stresu⁹. Biofilmy jsou vysoce strukturované a organizované mikrobiální společenství, které je vysoce odolné vůči působení antibiotik především díky jejich nižší penetraci dovnitř polysacharidové matrice obklopující biofilm. Zároveň vysoká koncentrace buněk v biofilmu a jejich soudržnost zvyšuje možnost HGT⁴⁷.

3. Šíření genů rezistence k antibiotikům

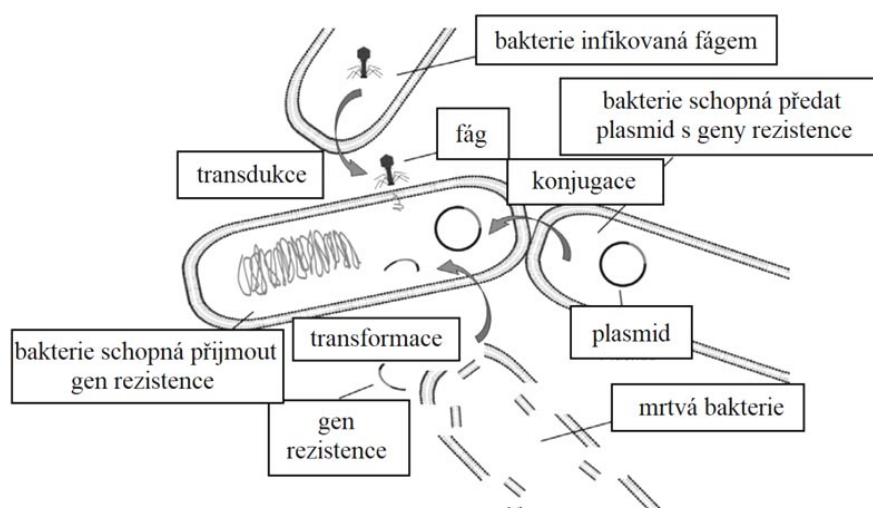
3.1. Horizontální genový transfer

HGT je významný proces v evoluci bakterií a je také nejčastějším způsobem, jak mohou bakterie získávat rezistenci k antibiotikům⁴⁸. HGT probíhá mezi donorovou buňkou obsahující genetickou informaci a recipientní buňkou, která genetickou informaci přijímá⁴⁹. Jsou známy tři základní mechanismy HGT (obr. 2): (a) konjugace, při které dochází ke spojení dvou bakterií a k přenosu DNA pomocí pilů, (b) transformace, kdy buňka přijímá DNA a (c) transdukce, při níž je genetická informace přenášena pomocí virů⁵⁰. K přenosu genů rezistence může docházet přímo z chromosomální DNA, ale častěji jsou geny rezistence neseny mobilními genetickými elementy, zejména transposony, plasmidy a integrony. Tyto mobilní elementy fungují jako vektory pro přenos genů rezistence k antibiotikům a podporují jejich šíření v životním prostředí a výměnu mezi mikroorganismy^{12,51}.

3.2. Vliv sub-inhibičních koncentrací antibiotika

Při léčbě infekčních onemocnění je primárním cílem použít takovou koncentraci antibiotika, která není pro léčebný organismus toxická, ale zároveň dostačuje k odstranění původce onemocnění a k prevenci vzniku mutací *de novo*. Léčba nicméně mnohdy nesplňuje tento cíl a koncentrace antibiotik je v určitých částech nebo tkáních těla nižší než potřebná MIC. Stejně tak koncentrace antibiotik, které kontaminují životní prostředí, jsou nižší než MIC.

Dříve se předpokládalo, že k selekci rezistentních bakterií dochází pouze tehdy, když se koncentrace antibiotika pohybuje mezi hodnotami MIC pro citlivou a rezistentní populaci, a že koncentrace, které růst citlivé populace neinhibují, nejsou selektivní. Nicméně nedávné studie potvrdily, že právě sub-inhibiční koncentrace antibiotik výrazně ovlivňují dynamiku celé populace⁵². Přítomnost této koncentrace vede k následujícím změnám: (a) k naboracení již existující rezistentní populace, (b) ke vzniku tzv. rezistencí *de novo*, (c) k vyššímu výskytu HGT a rekombinací spojených s indukci SOS odpovědi, (d) ke zvýšení četnosti mutací, které jsou spojené s indukci a expresí sigma faktoru RpoS jako následek stresu buňky a aktivaci DNA-polymerasy IV, která nemá 3'-5' exonukleasovou aktivitu a je tedy více chybová a (e) k ovlivnění fenotypové variability, která se projevuje především v selekci perzistentních, pomalu rostoucích bakterií, které jsou díky snížené metabolické aktivitě odolnější k působení vyšší koncentrace antibiotik. Antibiotika v MIC mohou také fungovat jako signální molekuly, které indukují tvorbu biofilmu, quorum sensing, virulenci, genovou expresi a konjugaci^{16,53}.



Obr. 2. Mechanismy horizontálního genového transferu u bakterií (upraveno z cit. ^{17,51}). Příjem DNA pomocí a) konjugace, b) transformace a c) transdukce

3.3. Multirezistentní mikroorganismy

Přítomnost většího spektra antibiotik v sub-inhibičních koncentracích vede k šíření genů rezistence ke všem z nich. Není tedy výjimkou, že jedna bakterie nese několik různých genů zvyšujících její rezistenci k odlišným skupinám antibiotik nebo že získá gen kódující mechanismus umožňující mnohočetnou rezistenci (např. aktivní efflux, který v případech tzv. transportérů není úzce specifický pro určitou skupinu antibiotik). Takové mikroorganismy se nazývají multirezistentní a jejich šíření v prostředí vede k onemocněním, která jsou velice obtížně léčitelná, protože na ně nezabírají běžně aplikované léky⁵⁴.

Jako příklad lze uvést multirezistentní tuberkulózu (MDR-TB), jejíž původce, bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, nereaguje na léky první volby isoniazid a rifampicin. Primární příčinou vzniku a šíření MDR-TB je nevhodné používání antibiotik nebo využití nekvalitních a prošlých léků. MDR-TB je léčitelná podáváním antibiotik druhé volby: kanamycinu, kapreomycinu nebo amikacinu. V roce 2013 bylo ve světě zaznamenáno 480 tis. případů MDR-TB, přičemž frekvence zastoupení MDR-TB se mezi jednotlivými monitorovanými zeměmi liší. Například v zemích bývalého Sovětského svazu se v 20–30 % nových případů tuberkulózy jedná o MDR-TB, zatímco celosvětový průměr je 3,5 % (cit.⁵⁴). Závažnější formou tuberkulózy je extenzivně rezistentní tuberkulóza (XDR-TBC), která je odolná vůči fluorochinolonu a jakémukoli antibiotiku druhé volby⁵⁴. Další mikroorganismy vyhodnocené Střediskem pro prevenci a kontrolu nemocí při Ministerstvu zdravotnictví USA jako ohrožující jsou: panrezistentní nebo extenzivně rezistentní *Acinetobacter* spp., dále flukonazol-rezistentní *Candida* spp., bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* produkující ESBL, vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE), methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) a multirezistentní *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* a *Streptococcus pneumoniae*⁵³.

Otázkou ovšem zůstává, zda se obrovský environmentální rezistom podílí na vzniku rezistomu patogenních bakterií. Tuto hypotézu potvrzuje stále více studií⁵⁵. Příkladem je výše uvedená rezistence ESBL. Tato rezistence byla původně kódovaná na chromosomu bakterií rodu *Kluyvera*, které se vyskytují v půdě, vodě a odpadních kalcích. Nyní se tyto geny přenášejí pomocí HGT, zejména konjugací nebo pomocí transpozonů⁵⁶. Obdobná situace byla popsána pro gen *gmrA* kódující rezistenci k fluorochinolonům. Tento gen byl původně detegován u bakterie *Shewanella algae*, která se převážně vyskytuje ve vodním prostředí. Stejným způsobem se přenáší i genový klastér kódující rezistenci k vankomycinu (*vanHAX*), který byl původně detegován u bacilů nacházejících se v environmentálních vzorcích⁵⁷. Tyto příklady jasně ukazují na spojení rezistence u klinických patogenních mikroorganismů a mikroorganismů nacházejících se v životním prostředí.

4. Závěr

Preventivní opatření proti šíření genů rezistence k antimikrobiálním látkám v životním prostředí spočívá hlavně v omezení nadměrného užívání antibiotik jak v humánní, tak i ve veterinární medicíně, čímž by se snížil i jejich výskyt v životním prostředí a na to navazující selekční tlak a výskyt multirezistentních kmenů. Zvýšení kvality kontroly používání antibiotik, jako je zpřesnění indikací (dávky, aplikačních intervalů a doby podávání), stejně jako preference cílené léčby a omezení necíleného podávání širokospektrých přípravků může pomoci při řešení tohoto problému. Vývoj nových antibiotik a antimikrobiálních látek, chemické modifikace stávajících sloučenin a hledání nových producentů bioaktivních látek jsou důležitou součástí komplexního přístupu k řešení problematiky léčby infekčních onemocnění způsobených patogenními multirezistentními mikroorganismy.

ČOV, do kterých přichází odpadní voda z nemocničních zařízení, by měly být vybaveny technologiemi, které napomáhají účinně odstraňovat antibiotika a redukovat počty mikroorganismů nesoucích rezistenci³⁶. V legislativě nejsou dosud uvedeny žádné závazující limity nebo doporučení, jaké koncentrace antibiotik by stabilizované kalý nebo odtoky z ČOV měly obsahovat, aby se předešlo šíření nežádoucích rezistencí. Ve Směrnici 86/278/EEC jsou určeny pouze limity těžkých kovů a vybraných organických polutantů⁵⁸.

Tato práce byla podpořena projektem (č. 16-07441S) financovaným Grantovou agenturou České republiky.

Seznam zkratk

ČOV	čistírna odpadních vod
ESBL	širokospektré β-laktamasy
HGT	horizontální genový transfer
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MDR-TB	multirezistentní tuberkulóza
VRE	vankomycin-rezistentní enterokoky
XDR-TB	extenzivně rezistentní tuberkulóza

LITERATURA

1. Wright P. M., Seiple I. B., Myers A. G.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53, 8840 (2014).
2. Koluman A., Dikici A.: *Crit. Rev. Microbiol.* 39, 57 (2013).
3. Brown K., Uwiera R. R. E., Kalmokoff M. L., Brooks S. P. J., Inglis G. D.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 49, 12 (2017).
4. Butaye P., Devriese L. A., Haesebrouck F.: *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 175 (2003).
5. Lin J., Hunkapiller A. A., Layton A. C., Chang Y.-J., Robbins K. R.: *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 331 (2013).

6. Cogliani C., Goossens H., Greko C.: *Microbe* 6, 274 (2011).
7. Blair J. M. A., Webber M. A., Baylay A. J., Ogbolu D. O., Piddock L. J. V.: *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 42 (2015).
8. <http://www.ecdc.europa.eu/>, staženo 2. 2. 2017.
9. Marti E., Variatza E., Balcazar J. L.: *Trends Microbiol.* 22, 36 (2014).
10. Carlsson C., Johansson A.-K., Alvan G., Bergman K., Kühler T.: *Sci. Total Environ.* 364, 67 (2006).
11. Thiele-Bruhn S., Beck I.-C.: *Chemosphere* 59, 457 (2005).
12. Sanderson H., Fricker C., Brown R. S., Majury A., Liss S. N.: *Environ. Rev.* 24, 205 (2016).
13. Perry C., Hall C.: *Nurs. Times* 105, 20 (2017).
14. Perry J. A., Westman E. L., Wright G. D.: *Curr. Opin. Microbiol.* 21, 45 (2014).
15. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R. E. W.: *Nat. Protocols* 3, 163 (2008).
16. Andersson D. I., Hughes D.: *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 465 (2014).
17. Marti E., Balcázar J. L., v knize: *Comprehensive Analytical Chemistry* (Petrovic M., Sandra P., Barcelo D., ed.), svazek 62, kap. 19. Elsevier 2013.
18. Baquero F., Martínez J.-L., Cantón R.: *Curr. Opin. Biotech.* 19, 260 (2008).
19. Nikolaou A., Meric S., Fatta D.: *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1225 (2007).
20. Hernando M. D., Mezcuca M., Fernández-Alba A. R., Barceló D.: *Talanta* 69, 334 (2006).
21. Kostopoulou M., Nikolaou A.: *Trends Anal. Chem.* 27, 1023 (2008).
22. Rabølle M., Spliid N. H.: *Chemosphere* 40, 715 (2000).
23. Fent K., Weston A. A., Caminada D.: *Aquat. Toxicol.* 76, 122 (2006).
24. Fent K.: *Ökotoxikologie: Umweltchemie – Toxikologie – Ökologie*. Thieme Verlag, Stuttgart 2003.
25. González-Pleiter M., Gonzalo S., Rodea-Palomares I., Leganés F., Rosal R., Boltes K., Marco E., Fernandez-Pinas F.: *Water Res.* 47, 2050 (2013).
26. Michael I., Rizzo L., McArdell C. S., Manaia C. M., Merlin C., Schwartz T., Dargot C., Fatta-Kassinos D.: *Water Res.* 47, 957 (2013).
27. Batt A. L., Kim S., Aga D. S.: *Chemosphere* 68, 428 (2007).
28. Kümmerer K.: *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 311 (2004).
29. Pruden A., Pei R., Storteboom H., Carlson K. H.: *Environ. Sci. Technol.* 40, 7445 (2006).
30. Vieno N., Tuhkanen T., Kronberg L.: *Water Res.* 41, 1001 (2007).
31. Xu Y., Guo C., Luo Y., Lv J., Zhang Y., Lin H., Wang L., Xu J.: *Environ. Pollut.* 213, 833 (2016).
32. Xu J., Xu Y., Wang H., Guo C., Qiu H., He Y., Zhang Y., Li X., Meng W.: *Chemosphere* 119, 1379 (2015).
33. Stiborová H., Wolfram J., Demnerová K., Macek T., Uhlík O.: *Folia Microbiol.* 60, 531 (2015).
34. Calero-Cáceres W., Melgarejo A., Colomer-Lluch M., Stoll C., Lucena F., Jofre J., Muniesa M.: *Environ. Sci. Technol.* 48, 7602 (2014).
35. Reinthaler F., Posch J., Feierl G., Wüst G., Haas D., Ruckebauer G., Mascher F., Marth E.: *Water Res.* 37, 1685 (2003).
36. Garrido-Baserba M., Molinos-Senante M., Abelleira-Pereira J. M., Fdez-Güelfo L. A., Poch M., Hernández-Sancho F.: *J. Clean. Prod.* 107, 410 (2015).
37. Tasho R. P., Cho J. Y.: *Sci. Total Environ.* 563-564, 366 (2016).
38. Looft T., Johnson T. A., Allen H. K., Bayles D. O., Alt D. P., Stedtfeld R. D., Sul W. J., Stedtfeld T. M., Chai B., Cole J. R., Hashsham S. A., Tiedje J. M., Stanton T. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1691 (2012).
39. https://katedry.czu.cz/storage/3375_kejda.pdf, staženo 28. 4. 2017.
40. Český statistický úřad: https://www.czso.cz/csu/czso/zemedelstvi_zem?p_p_id=3&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&_3_struts_action=%2Fsearch%2Fsearch&_3_redirect=%2Fc%2Fportal%2Flayout%3Fp_1_id%3D20137706%26p_v_1_s_g_id%3D0&_3_keywords=hnuj&_3_groupId=0, staženo 2. 2. 2017.
41. Chen Q., An X., Li H., Su J., Ma Y., Zhu Y. G.: *Environ. Int.* 92-93, 1 (2016).
42. Rahube T. O., Marti R., Scott A., Tien Y. C., Murray R., Sabourin L., Duenk P., Lapen D. R., Topp E.: *Can. J. Microbiol.* 62, 600 (2016).
43. Watts J. E. M., Schreier H. J.: *Mar. Drugs* 15, 158 (2017).
44. <https://www.vetinst.no/en/reports-and-publications/reports,report22-2016>, staženo 6. 4. 2018.
45. Cabello F. C., Godfrey H. P., Tomova A., Ivanova L., Dolz H., Millanao A., Buschmann A. H.: *Environ. Microbiol.* 15, 1917 (2013).
46. Watts J. E. M., Schreier H. J., Lanska L., Hale M. S.: *Mar. Drugs* 15, 158 (2017).
47. Balcázar J. L., Subirats J., Borrego C. M.: *Front. Microbiol.* 6, 1216 (2015).
48. Gyles C., Boerlin P.: *Vet. Pathol.* 51, 328 (2014).
49. Elufisan T., Oyedara O., Oyelade B.: *Afr. J. Microbiol. Res.* 6, 4833 (2012).
50. Dutta C., Sarkar M., v knize: *Encyclopedia of Metagenomics* (Nelson K. E., ed.), Springer-Verlag, New York 2015.
51. Taylor N. G. H., Verner-Jeffreys D. W., Baker-Austin C.: *Trends Ecol. Evol.* 26, 278 (2011).
52. Martínez J. L.: *F1000Res.* 6, 51 (2017).
53. Adegoke A. A., Faleye A. C., Singh G., Stenström T. A.: *Molecules* 22, 29 (2017).
54. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1, staženo 2. 2. 2017.
55. Palacios O. A., Contreras C. A., Muñoz-Castellanos L. N., González-Rangel M. O., Rubio-Arias H., Pala-

- cios-Espinosa A., Nevarez-Moorillon G. V.: *Agr. Water Manage.* 184, 19 (2017).
56. Shaikh S., Fatima J., Shakil S., Rizvi S. M. D., Kamal M. A.: *Saudi J. Biol. Sci.* 22, 90 (2015).
57. Wright G. D.: *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 589 (2010).
58. Stiborová H., Kolář M., Vrkoslavová J., Pulkrabová J., Hajšlová J., Demnerová K., Uhlík O.: *J. Hazard. Mater.* 321, 672 (2017).

H. Stiborová, A. Bačáková, L. Musilová, and K. Demnerová (*University of Chemistry and Technology, Prague*): **From Natural Phenomenon of Antibiotic Resistance in the Environment to Emergence of Multiresistant Strains**

The increase the antibiotic resistance in the surrounding environment promotes the selection of resistant bacteria, which poses risks to human health. The sub-inhibition concentration of antibiotics in various environmental niches promotes the bacteria with resistance genes and accelerates their spread by horizontal gene transfer, as well as the origin and occurrence of new mechanisms of resistance. In addition to that, there is an evidence that the resistance towards antibiotics in pathogenic bacteria originates from the environmental resistome and the increase of multi-resistance bacteria has become a serious public health problem.

Keywords: antibiotics, resistance, sub-inhibition concentration, reservoir, multi-resistance