

Geny antibiotické rezistence v odpadních produktech zemědělské výroby

Anna Vlastníková

Bakalářská práce
2025



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Anna Vlastníková
Osobní číslo: T22201
Studijní program: B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin
Specializace: Potravinářské biotechnologie a aplikovaná mikrobiologie
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Geny antibiotické rezistence v odpadních produktech zemědělské výroby

Zásady pro vypracování

- Vypracujte literární rešerši zaměřenou na téma geny antibiotické rezistence v odpadních produktech zemědělské výroby. Zaměřte také na metody stanovení těchto genů.
- Optimalizujte metodiku pro sledování výskytu genů antibiotické rezistence pomocí real-time PCR.
- Výsledky vyhodnotte, zpracujte do grafů a tabulek, diskutujte a formulujte závěry práce.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

FRIERI, Marianne, Krishan KUMAR a Anthony BOUTIN. Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*. 2017, vol. 10, no. 4, s. 369-378. ISSN 1876-0341.
YANG, Gaixiu et al. A critical review on retaining antibiotics in liquid digestate: Potential risk and removal technologies. *The Science of the Total Environment*. 2022, vol. 853, s. 158550-158550. ISSN 0048-9697.
HE, Liang-Ying et al. Discharge of swine wastes risks water quality and food safety: Antibiotics and antibiotic resistance genes from swine sources to the receiving environments. *Environment International*. 2016, vol. 92-93, s. 210-219. ISSN 0160-4120.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Jana Šerá, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2025**
Termín odevzdání bakalářské práce: **16. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2025

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení bakalářské práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – bakalářskou práci – nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá; neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji, že

- jsem na bakalářské práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval(a); v případě publikace výsledků budu uveden(a) jako spoluautor;
- odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne

.....
podpis autora

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá výskytem, šířením a detekcí genů antibiotické rezistence v odpadních produktech vznikajících v rámci zemědělské výroby, zejména v oblasti živočišné produkce. Zvláštní pozornost je věnována anaerobní digesci jako běžně využívané metodě zpracování biologicky rozložitelných odpadů a jejímu vlivu na přetrvávání genů antibiotické rezistence v konečném produktu – digestátu. Práce shrnuje současné poznatky o diagnostických metodách pro detekci genů antibiotické rezistence, diskutuje problematiku používání antibiotik v zemědělství, principy účinku rezistence a možné mechanismy šíření genů mezi mikroorganismy a v životním prostředí. Cílem práce je poskytnout ucelený přehled o rizicích spojených s aplikací digestátu na zemědělskou půdu a poukázat na ekologické důsledky šíření antibiotické rezistence. Praktická část této práce je zaměřena na detekci vybraných genů antibiotické rezistence ve vzorcích digestátů pocházejících z různých bioplynových stanic a na optimalizaci metodiky pro jejich stanovení pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce.

Klíčová slova: antibiotická rezistence, geny rezistence, anaerobní digesce, digestát, zemědělská výroba, diagnostika, qPCR

ABSTRACT

This bachelor's thesis focuses on the occurrence, spread, and detection of antibiotic resistance genes in agricultural waste products, particularly in the field of livestock farming. Special attention is given to anaerobic digestion, a commonly used method for processing biodegradable waste, and its impact on the persistence of antibiotic resistance genes in the final product – digestate. The thesis summarizes current knowledge on diagnostic methods for detecting antibiotic resistance genes, discusses the use of antibiotics in agriculture, the mechanisms of resistance, and possible pathways for gene dissemination among microorganisms and within the environment. The aim of this work is to provide an overview of the risks associated with digestate application to agricultural soil and to highlight the ecological implications of antibiotic resistance spread. The practical part of this thesis focuses on the detection of selected antibiotic resistance genes in digestate samples from various biogas plants and on the optimization of the methodology for their quantification using quantitative polymerase chain reaction.

Keywords: antibiotic resistance, resistance genes, anaerobic digestion, digestate, agriculture, diagnostics, environment

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí Ing. Janě Šeré PhD. za její odborné vedení, poskytování rad, a především její trpělivý a vstřícný přístup. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Veronice Kučabové a Mgr. Adéle Baťové za pomoc a udělení cenných rad při zpracování praktických úloh.

OBSAH

ÚVOD	13
I TEORETICKÁ ČÁST	14
1 CHARAKTERISTIKA ODPADNÍCH ZEMĚDĚLSKÝCH PRODUKTŮ A PROCESU ANAEROBNÍ DIGESCE	15
1.1 ODPADNÍ ZEMĚDĚLSKÉ PRODUKTY	15
1.2 ANAEROBNÍ DIGESCE A JEJÍ VYUŽITÍ PRO ZPRACOVÁNÍ ODPADNÍCH ZEMĚDĚLSKÝCH PRODUKTŮ	16
1.2.1 Fáze anaerobní digesce	16
1.2.2 Bioplyn.....	17
1.3 BAKTERIE PŘÍTOMNÉ V ODPADNÍCH ZEMĚDĚLSKÝCH PRODUKTECH A DIGESTÁTU	18
1.4 UDRŽITELNOST A VÝZVY VYUŽITÍ DIGESTÁTU ZE ZEMĚDĚLSKÝCH ODPADŮ	19
1.5 POKROČILÉ METODY ODSTRAŇOVÁNÍ ANTIBIOTIK Z DIGESTÁTU A VODNÉHO PROSTŘEDÍ	21
1.5.1 Membránová separace	21
1.5.2 Pokročilé oxidační procesy	22
1.5.3 Biochar	22
2 ANTIBIOTIKA A GENY ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE PŘÍTOMNÉ V ODPADNÍCH PRODUKTECH ZEMĚDĚLSKÉ VÝROBY	24
2.1 ANTIBIOTIKA VYUŽÍVANÉ VE VETERINÁRNÍ MEDICÍNĚ V EU	25
2.2 KLÍČOVÉ GENY ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE V ODPADNÍCH ZEMĚDĚLSKÝCH PRODUKTECH	25
3 VYBRANÉ METODY DETEKCE GENŮ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE	27
3.1 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	27
3.1.1 RT-PCR.....	28
3.1.2 qPCR.....	29
3.2 SANGEROVO SEKVENOVÁNÍ	29
3.3 NEXT GENERATION SEQUENCING	30
3.4 LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION	31
3.5 TECHNOLOGIE ZALOŽENÉ NA CRISPR/CAS SYSTÉMECH.....	32
3.6 FLUORESCENČNÍ <i>IN SITU</i> HYBRIDIZACE	33
3.7 MICROARRAY TECHNOLOGIE	34
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	35
4 MATERIÁL A METODY	36
4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL	36
4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, KITY A ROZTOKY.....	36

4.3	SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ	38
4.4	PŘEDÚPRAVA VZORKŮ DIGESTÁTŮ	39
4.5	METODIKA IDENTIFIKACE REZISTENTNÍCH IZOLÁTŮ	39
4.5.1	Mikroskopie a Grammovo barvení	39
4.5.2	Izolace DNA z rezistentních izolátů.....	40
4.5.3	Měření koncentrace DNA fluorometricky.....	41
4.5.4	Amplifikace DNA pomocí Touchdown PCR	42
4.5.5	Purifikace DNA amplifikovaného fragmentu genu 16S rRNA	44
4.5.6	Sangerovo sekvenování	45
4.6	METODIKA DETEKCE GENŮ REZISTENCE V REZISTENTNÍCH IZOLÁTECH	46
4.6.1	PCR detekce genů rezistence ve vybraných rezistentních izolátech.....	48
4.7	METODIKA DETEKCE GENŮ REZISTENCE V DIGESTÁTECH	48
4.7.1	Izolace DNA ze vzorků digestátů	49
4.7.2	PCR detekce genů antibiotické rezistence z DNA digestátů	50
5	VÝSLEDKY	53
5.1	VÝSLEDKY ANALÝZY REZISTENTNÍCH IZOLÁTŮ.....	53
5.1.1	Koncentrace DNA izolované z rezistentních mikroorganismů	53
5.1.2	Amplifikace genu 16S rRNA.....	54
5.1.3	Identifikované mikroorganismy	55
5.1.4	Výsledky detekce genů rezistence ve vybraných rezistentních izolátech.....	58
5.2	SCREENING GENŮ REZISTENCE V DIGESTÁTECH POMOCÍ PCR	63
5.3	GENY DETEKOVANÉ V DIGESTÁTECH POMOCÍ QPCR	69
	ZÁVĚR.....	75
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	77
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	84
	SEZNAM TABULEK	85
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	86
	SEZNAM PŘÍLOH.....	88

ÚVOD

Antibiotická rezistence představuje jednu z nejzávažnějších hrozeb 21. století pro zdraví veřejnosti. Rostoucí výskyt bakterií, které jsou rezistentní vůči běžně používaným antibiotikům, omezuje možnosti účinné léčby infekčních onemocnění a zvyšuje riziko vzniku neléčitelných infekcí. Zemědělská výroba, zejména intenzivní živočišná produkce, hraje v tomto procesu významnou roli.

Zvířatům jsou často podávána antibiotika za účelem léčby, významná část podaných antibiotik však není metabolizována a vylučuje se ve formě aktivních látek či jejich reziduí spolu s exkrementy. Tyto exkrementy, kromě reziduí léčiv, často obsahují také rezistentní bakterie a geny antibiotické rezistence. Odpady ze zemědělské produkce jsou často využívány jako surovina pro anaerobní digesci v bioplynových stanicích. Anaerobní digestce je biotechnologický proces, při kterém mikroorganismy za nepřístupu kyslíku rozkládají organickou hmotu za vzniku bioplynu. Vedlejším produktem tohoto procesu je digestát – směs zbytkového organického materiálu, mikroorganismů a živin, která je běžně využívána jako hnojivo na zemědělskou půdu.

Ačkoliv anaerobní digestce může částečně přispět ke snížení množství patogenů, zůstává otázkou, do jaké míry dochází k eliminaci genů antibiotické rezistence. Digestát tak může představovat významný environmentální rezervoár těchto genů a přispívat k jejich šíření v půdních ekosystémech, vodních tocích či zemědělských produktech. Tato problematika nabývá na významu zejména v kontextu cirkulárního hospodaření s odpady, kdy jsou odpadní produkty zemědělské výroby po digesci zpětně uváděny do prostředí.

Cílem této bakalářské práce je popsat výskyt a možné diagnostické metody genů antibiotické rezistence v odpadních produktech ze zemědělství, se zvláštním zaměřením na anaerobní digesci a vlastnosti digestátu jako potenciálního nosiče genů antibiotické rezistence. V praktické části byly detekovány geny rezistence a rezistentní mikroorganismy v několika digestátech z různých bioplynových stanic.

I TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA ODPADNÍCH ZEMĚDĚLSKÝCH PRODUKTŮ A PROCESU ANAEROBNÍ DIGESCE

Odpadní produkty zemědělské výroby představují významný zdroj organické hmoty, kterou je možné dále využít v rámci udržitelného hospodaření s odpady. Tyto substráty jsou bohaté na organický uhlík, dusík a další živiny, a zároveň často obsahují mikrobiální populace, včetně potenciálně patogenních organismů a genů antibiotické rezistence. Jednou z efektivních metod zpracování zemědělských odpadů je anaerobní digesce (AD), biologický proces, při kterém mikroorganismy v prostředí bez přístupu kyslíku rozkládají organickou hmotu na bioplyn a stabilizovaný digestát.

1.1 Odpadní zemědělské produkty

Zemědělské odpady lze obecně rozdělit na odpady pocházející z rostlinné a živočišné výroby.

Odpady vznikající v živočišné výrobě zahrnují široké spektrum materiálů, jako je hnůj, kejda, zbytky krmiv, podestýlka, odpadní voda a vedlejší produkty z porážky zvířat – např. kůže, kosti, chrupavky, krev, tuk a jiné kožní deriváty. Tyto odpady představují významnou ekologickou zátěž v případě, že nejsou adekvátně zpracovávány. Mezi hlavní rizika spojená s jejich nesprávným nakládáním patří šíření patogenních mikroorganismů, kontaminace povrchových a podzemních vod dusičnany a fosfáty, emise skleníkových plynů a produkce zápachu. Vedlejší živočišné produkty z porážky zvířat, které nejsou určeny pro lidskou spotřebu, jsou nejčastěji zpracovávány v krmivářském průmyslu nebo likvidovány v kafilerních zařízeních. Hnůj a kejda se běžně využívají jako statková hnojiva nebo jsou dále zpracovávány prostřednictvím AD při výrobě bioplynu. Neefektivní nakládání s těmito materiály může rovněž přispívat k šíření antimikrobiální rezistence. ^[19]

Rostlinné odpady tvoří převážně biomasa, jako je sláma, ořezky a zbytky zeleniny a ovoce, kukuřičné stvolky, odpad po čištění obilovin či odpadní materiál z lesnické výroby. Tato biomasa může být dále využita jako krmivo pro hospodářská zvířata, ke kompostování nebo jako substrát pro AD za účelem produkce bioplynu. ^[20]

1.2 Anaerobní digesce a její využití pro zpracování odpadních zemědělských produktů

AD je biologický proces, při kterém dochází k rozkladu organické hmoty za nepřítomnosti kyslíku za současné produkce bioplynu a stabilizovaného organického zbytku – digestátu. Tento proces představuje efektivní a environmentálně šetrný způsob využití odpadních zemědělských produktů, jako jsou statková hnojiva, rostlinné zbytky, kejda nebo organické odpady ze živočišné výroby. ^[16, 17]

AD nejen že přispívá ke snížení množství biologicky rozložitelného odpadu, ale zároveň umožňuje produkci obnovitelné energie ve formě bioplynu. Tento přístup podporuje cirkulární ekonomiku v zemědělství a významně přispívá k ochraně životního prostředí. ^[18]

1.2.1 Fáze anaerobní digesce

Samotný proces AD lze rozdělit do čtyř hlavních fází, které na sebe plynule navazují:

1. Hydrolýza

V první fázi dochází k rozkladu komplexních organických látek (např. polysacharidů, bílkovin a lipidů) na jednodušší sloučeniny, jako jsou oligosacharidy, monosacharidy, aminokyseliny a mastné kyseliny. Hydrolýza je často limitujícím krokem, zejména při zpracování materiálů s vysokým podílem vlákniny. ^[16]

2. Acidogeneze

V této fázi mikroorganismy přeměňují produkty hydrolýzy na těkavé mastné kyseliny, alkoholy, vodík a oxid uhličitý. Dochází zde k významnému poklesu pH, což může ovlivnit stabilitu celého procesu. ^[16]

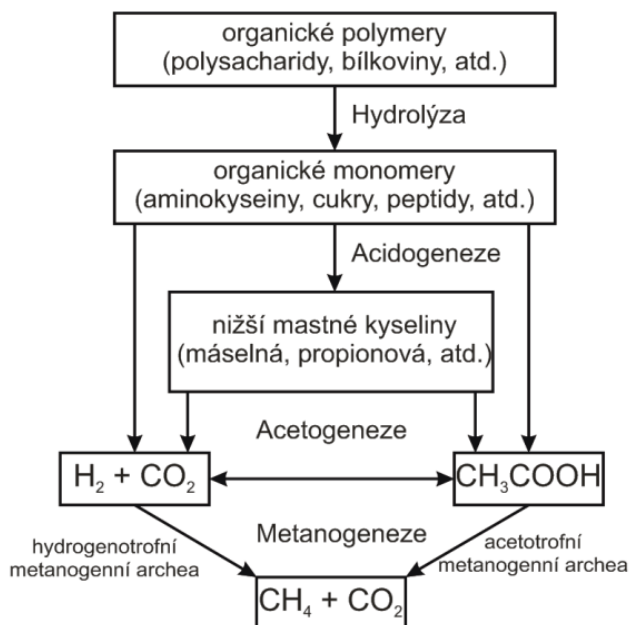
3. Acetogeneze

Během acetogeneze jsou těkavé mastné kyseliny a alkoholy dále přeměňovány na acetát, vodík a oxid uhličitý – sloučeniny, které jsou klíčovými substráty pro následnou tvorbu metanu. ^[16]

4. Metanogeneze

Závěrečná fáze zahrnuje tvorbu bioplynu. První skupina metanogenních bakterií konvertují acetát a vodík na methan (CH_4) a oxid uhličitý (CO_2). Druhá skupina metanogenních bakterií využívá vodík jako donor elektronu a oxid uhličitý jako

akceptor k produkci metanu. Tato fáze je citlivá na změny teploty, pH a přítomnost toxických látek. ^[16]



Obrázek 1 Schématické znázornění fází anaerobní digesce. ^[16]

1.2.2 Bioplyn

Výsledkem AD je směs plynů označovaná jako bioplyn. Typické složení bioplynu je následující: ^[17]

- Methan (CH_4): 50–75 %
- Oxid uhličitý (CO_2): 25–45 %
- Vodík (H_2): 1–5 %
- Sirovodík (H_2S): 0,1–1 %
- Stopové množství dalších plynů: např. dusík (N_2), kyslík (O_2), amoniak (NH_3)

Vysoký obsah metanu určuje energetickou hodnotu bioplynu, zatímco přítomnost sirovodíku a dalších korozivních plynů vyžaduje následné čištění bioplynu před jeho využitím. ^[17]

1.3 Bakterie přítomné v odpadních zemědělských produktech a digestátu

Digestát vznikající po procesu AD obsahuje mikroorganismy, které hrají klíčovou roli při rozkladu organických materiálů. Tento materiál, bohatý na organické zbytky, je osídlen širokým spektrem bakterií podílejících se na anaerobním rozkladu. Diverzita a zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů jsou značně proměnlivé a závisí zejména na složení vstupních surovin použitých pro výrobu bioplynu. Přesto se napříč různými typy digestátů vyskytuje několik bakteriálních kmenů ve výrazné převaze. ^[1]

Nejčastější kmeny bakterií přítomné v digestátu jsou:

1. *Firmicutes* (synonymum *Bacillota*)

Bakterie tohoto kmene jsou dobře přizpůsobeny anaerobním podmínkám panujícím při výrobě bioplynu. Jedná se o kokovité nebo tyčinkovité bakterie, většinou s gram-pozitivní stavbou buněčné stěny. Nejvýznamněji je zastoupena třída *Clostridia*, tvořená gram-pozitivními, sporotvornými tyčinkami s anaerobním metabolismem. Tyto bakterie hrají zásadní roli v rozkladu celulózy a dalších komplexních organických sloučenin. Dále je významná i třída *Bacilli*, zahrnující fakultativně anaerobní, sporulující tyčinkovité bakterie, které se rovněž výrazně podílejí na procesu AD. ^[1, 2]

2. *Bacteroidetes* (synonymum *Bacteroidota*)

Tento kmen zahrnuje gram-negativní nesporulující tyčinkovité bakterie. V kontextu digestátu a bioplynových stanic jsou dominantní anaerobní zástupci. Bakterie z této skupiny jsou široce rozšířeny v půdě, sedimentech, mořské vodě a v trávicím traktu živočichů. Významnou schopností těchto bakterií je rozklad polysacharidů a bílkovin. V digestátech dominují zástupci třídy *Bacteroidia*, zejména rody *Prevotella* a *Bacteroides*, běžně se vyskytující v tlustém střevě člověka i jiných živočichů. ^[1, 2, 3]

3. *Actinobacteria*

Jedná se o kmen gram-pozitivních bakterií, mnohé druhy jsou vláknité. Tento kmen patří mezi nejrozsáhlejší taxonomické skupiny v doméně *Bacteria*. *Actinobacteria* tvoří významnou součást střevní mikrobioty a některé jejích třídy, především *Bifidobacteria*, jsou známé využitím v probiotických preparátech. Patří sem však i

patogenní rody jako *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium* a *Tropheryma*. V rámci AD se tyto bakterie uplatňují díky své schopnosti degradovat komplexní organické látky, například chitin a lignin. ^[1, 4]

4. *Mycoplasmata*

Tento kmen zahrnuje gram-negativní bakterie, které postrádají peptidoglykanovou buněčnou stěnu a patří mezi nejmenší známé prokaryotické organismy. Dříve byly tyto bakterie řazeny do kmene *Tenericutes*, ten však již není v moderní taxonomii (např. GTDB) považován za platný a jeho zástupci jsou nyní klasifikováni pod kmenem *Mycoplasmata*. Zástupci tohoto kmene se vyskytují v různých prostředích, od mořského dna až po trávicí trakt živočichů. Významné jsou zejména patogenní rody jako *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma* a *Spiroplasma*. ^[1, 5]

5. *Spirochaetes*

Tento kmen zahrnuje tenkostěnné, spirálovité bakterie, pohybující se axiálními filamenti, které umožňují pohyb i adhezi. Mezi nejznámější rody patří *Leptospira*, *Borrelia* a *Treponema*, z nichž mnohé jsou významnými patogeny. ^[1, 6]

6. *Proteobacteria* (nově označované jako *Pseudomonadota*)

Jedná se o kmen gram-negativních bakterií, které mohou být fakultativně či obligátně anaerobní, přičemž mnohé druhy jsou pohyblivé. Zahrnuje mnoho významných rodů, jako například *Escherichia*, *Salmonella*, *Brucella* či *Vibrio*. Tyto bakterie se přirozeně vyskytují v trávicím traktu savců, přičemž některé druhy jsou významnými patogeny. V některých nových systémech (např. GTDB) označovány jako *Pseudomonadota*. ^[1, 2]

1.4 Udržitelnost a výzvy využití digestátu ze zemědělských odpadů

AD představuje v současné době klíčovou technologii pro stabilizaci organických materiálů a produkci obnovitelné energie v podobě bioplynu. S rostoucím objemem odpadů a zvýšenou poptávkou po udržitelných energetických zdrojích se instalace bioplynových stanic rozšiřují po celém světě, zejména v Evropě ^[21]. V rámci AD procesu vzniká digestát, vedlejší produkt skládající se z uhlíku (10-30% v sušině), dusíku (2-7% v sušině), draslíku (2-6% v sušině), fosforu, síry a mikroprvků (vápník, hořčík, železo, mangan, zinek, měď a další). ^[21, 31]

Digestát může být využit jako hnojivo v zemědělství, nicméně oproti statkovým hnojivům postrádá klíčové složky důležité pro zdraví půdních bakterií, komplexní organické

látky. Digestát má nižší poměr uhlíku a dusíku (C:N), obvykle se pohybuje mezi 5:1 až 15:1, nejčastěji kolem 8:1 až 10:1, ve srovnání s čerstvým hnojem (který mívá C:N kolem 20–30:1, v závislosti na původu a podestýlce). Velká část organického uhlíku byla během AD přeměněna na bioplyn. Výsledný produkt má tedy menší obsah snadno odbouratelného uhlíku a vyšší podíl minerálního dusíku, což zvyšuje jeho hodnotu jako rychle dostupného hnojiva, ale zároveň může zvyšovat riziko úniku dusíku (např. ve formě amoniaku). Statková hnojiva také obsahují zbytky podestýlky (např. seno, slámu a piliny), které při hnojení prokypřují půdu a přispívají tak ke zdraví půdy, půdních bakterií a kořenových systémů rostlin. Tekutá frakce digestátu má formu téměř homogenní husté tekutiny až pasty a obvykle nepřispívá ke zlepšení půdní struktury. Tuhá frakce digestátu však může částečně obsahovat nestrávené organické složky, které mohou strukturální vlastnosti půdy do určité míry ovlivnit. Dále digestát představuje potenciální environmentální riziko, neboť může obsahovat zbytky antibiotik (ATB), antibioticky rezistentní bakterie (ARB), geny antibiotické rezistence (antibiotic resistance genes, ARG) a těžké kovy. Tyto kontaminanty mohou být přenášeny do půdy a následně do potravního řetězce, což představuje hrozbu jak pro ekosystémy, tak pro lidské zdraví. ^[21]

Významné množství farmaceutických látek a těžkých kovů obsažených v digestátu pochází ze substrátů používaných v AD, zejména z kalů z ČOV, živočišných exkrementů a jiných zemědělských odpadů. Vzhledem k tomu, že ATB nejsou v tělech hospodářských zvířat plně metabolizována, velké množství jejich reziduí je vylučováno močí a trusem, které jsou následně využívány jako substráty v bioplynových stanicích. Například v Číně činila celková spotřeba ATB v zemědělství v roce 2013 přibližně 45 000 tun, z čehož významná část může být vyloučena s exkrementy do životního prostředí. ^[21]

Během AD může docházet k částečnému odbourávání ATB, ale tento proces na jejich odstranění není primárně navržen, což vede k velmi rozdílné účinnosti degradace v závislosti na struktuře konkrétní látky. Například β -laktamy jsou za určitých podmínek anaerobní digesce dobře odbouratelné (v některých případech >90 %), ale účinnost závisí na specifickém procesu a podmínkách, zatímco tetracykliny a fluorochinolony přetrvávají, často kvůli své chemické stabilitě. Teplota a obsah sušiny při AD ovlivňují míru odbourání. ^[22]

Nekontrolované využívání digestátu může vést k akumulaci ATB, těžkých kovů a ARG v půdě, což může ovlivnit půdní mikrobiotu, zvýšit šíření antibiotické rezistence a kontaminovat plodiny. Navíc mobilní genetické elementy (MGEs), jako integrony, umožňují

horizontální přenos genů rezistence mezi mikroorganismy, což urychluje šíření rezistence v životním prostředí. I nízké koncentrace ATB vytvářejí selekční tlak, který podporuje vznik rezistentních kmenů bakterií. Doba rozkladu ATB v půdě závisí na jejich chemické struktuře, půdních podmínkách a přítomnosti mikroorganismů. Některá ATB, např. fluorochinolony a tetracykliny, mohou mít poločas degradace v půdě až stovky dní, výjimečně i přes 1000 dní, což představuje dlouhodobé riziko. ^[21, 22]

Udržitelné využívání digestátu proto vyžaduje pečlivé monitorování jeho chemického a mikrobiologického složení, především koncentrací ATB, těžkých kovů a ARG. Existuje však stále značná výzkumná mezera týkající se obsahu těchto kontaminantů v digestátu na bázi různých substrátů a jejich dopadu na půdní prostředí, rostliny a živočichy. V současnosti chybí rozsáhlé studie hodnotící koncentrace širokého spektra antibiotik, ARG a těžkých kovů v digestátu a jejich dlouhodobé ekologické důsledky. ^[21]

Zajištění udržitelného využívání digestátu je proto spojeno nejen s jeho agronomickým přínosem, ale také s minimalizací rizik souvisejících s šířením antimikrobiální rezistence a environmentální kontaminace. ^[21]

1.5 Pokročilé metody odstraňování antibiotik z digestátu a vodného prostředí

1.5.1 Membránová separace

Membránový bioreaktor (MBR) je moderní technologie pro odstraňování ATB, která kombinuje biologické procesy s membránovou separací. ATB jsou odstraňována prostřednictvím zachycení membránou, adsorpce, biodegradace a hydrolýzy. MBR umožňuje efektivní odstranění různých ATB (např. sulfamethoxazol až 94 %, trimethoprim 68 %). Vysoce účinné jsou i systémy s nanofiltrací a reverzní osmózou. ^[22]

MBR využívá biologický reaktor s aktivovaným kalem, kde mikroorganismy rozkládají znečišťující látky. Separace biomasy a čištěné vody se provádí přes membrány, nejčastěji mikrofiltrační nebo ultrafiltrační. Systémy s nanofiltrací a reverzní osmózou se pak často využívají jako následný krok pro další dočištění vody. Výhodou je vysoká účinnost odstranění ATB a dalších mikropolutantů a vyšší kvalita vyčištěné vody než u běžných ČOV. Nevýhodou této metody jsou vysoké investiční náklady a náročnost údržby. ^[22]

1.5.2 Pokročilé oxidační procesy

Pokročilé oxidační procesy jsou účinné při odstraňování ATB a produktů rozkladu ATB, které jsou rezistentní vůči biodegradaci. Patří sem např. ozonizace, Fentonova reakce, fotolýza a elektrochemická oxidace. Všechny generují vysoce reaktivní hydroxylové radikály, které mají velmi vysokou oxidační schopnost a mohou neselektivně napadat a rozkládat složité organické molekuly, včetně ATB. [22]

Ozonizace je účinná metoda pro rozklad ATB ve vodě pomocí přímé (v kyselém prostředí) a nepřímé (v zásaditém prostředí) oxidace. Dosahuje vysokých účinností, např. až 79,9 % u cefalosporinů. Kombinace ozonizace s biologickým čištěním může zvýšit účinnost až na 100 %. Použití ultrazvuku zlepšuje přenos ozonu a tvorbu radikálů. Ozon (O_3) oxiduje organické látky buď přímo, nebo prostřednictvím volných radikálů vzniklých při jeho rozkladu ve vodě. [22]

Fentonova oxidace využívá reakci peroxidu vodíku (H_2O_2) s železem (Fe^{2+}) k produkci vysoce reaktivních hydroxylových radikálů, které za kyselého pH rychle a účinně rozkládají ATB. Lze tak dosáhnout téměř úplného odstranění různých ATB během několika minut. Heterogenní (např. foto-Fenton) procesy navíc řeší problémy s pH, tvorbou kalu a recyklací katalyzátoru. [22]

Fotolýza je proces degradace ATB pomocí světla, který probíhá buď přímo (pohlcením fotonů samotnou látkou), nebo nepřímo (pomocí fotosenzitizérů, které generují reaktivní formy kyslíku). Tato metoda je účinná zejména pro ATB s aromatickými strukturami (např. tetracykliny, fluorochinolony). Účinnost se zvyšuje kombinací s jinými metodami, např. UV/ H_2O_2 nebo TiO_2 katalýzou. [22]

Bioelektrochemické systémy, jako jsou mikrobiální palivové články a elektrolyzéry, se využívají k degradaci ATB oxidací pomocí mikroorganismů na anodě. Odstranění ATB v mikrobiálních palivových člancích dosahuje až 99 % (např. β -laktamy, chinolony). V elektrolyzérech se účinnost zvyšuje pomocí aplikovaného napětí, které stimuluje aktivitu biofilmu. [22]

1.5.3 Biochar

Biochar (uhlíkatý materiál z biomasy) je levný, účinný adsorbent pro odstranění ATB z digestátu. Jeho účinnost závisí na typu vstupní suroviny, teplotě pyrolýzy a případných modifikacích. Adsorpce probíhá přes elektrostatické interakce, zaplnění pórů, π - π interakce

a tvorbu komplexů s povrchovými funkčními skupinami. Adsorpční kapacita lze výrazně zvýšit úpravou biocharu (např. chemická aktivace, kombinace s bentonitem). Výhodou této metody jsou nízké náklady (využití odpadu jako suroviny), jednoduchá výroba, široká dostupnost a rozsáhlé spektrum cílových ATB. ^[22]

2 ANTIBIOTIKA A GENY ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE PŘÍTOMNÉ V ODPADNÍCH PRODUKTECH ZEMĚDĚLSKÉ VÝROBY

Antimikrobiální rezistence u bakterií představuje závažný celosvětový problém, který přispívá ke zvýšené morbiditě a mortalitě jak u lidí, tak u zvířat. V posledních letech je zaznamenáván nárůst výskytu multirezistentních mikroorganismů, které jsou odolné vůči více skupinám antimikrobiálních látek současně. Infekce způsobené takto rezistentními patogeny jsou obtížně léčitelné dostupnými ATB, přičemž možnosti efektivní terapie se významně zužují. [33]

Nedostatečná diagnostika a nevhodné použití ATB umožňují snadné šíření rezistentních bakterií a ARG do životního prostředí. Situaci zhoršuje nedostatečný počet nových ATB ve vývoji, snižující se účinnost stávajících léčiv a nedostatek rychlých a dostupných diagnostických metod pro detekci rezistentních mikroorganismů. Významný podíl na eskalaci tohoto problému má zemědělská výroba, především živočišná produkce, kde jsou ATB celosvětově využívána nejen k léčbě, ale i prevenci onemocnění a k podpoře růstu, s výjimkou evropské unie (EU) kde jsou tyto praktiky zakázány. [22, 33]

Až 60–90 % podaných léčiv není vstřebáno v gastrointestinálním traktu a je z těla vylučováno v aktivní formě nebo jako metabolity prostřednictvím moči či exkrementů. Vzhledem k nemožnosti individuální diagnostiky a léčby zvířat jsou ATB často aplikována hromadně, což vede k jejich nadužívání a následnému vzniku a šíření rezistentních bakterií. Tyto mikroorganismy dále horizontálně přenášejí své rezistentní geny, čímž se ARG šíří mezi patogenními, komenzálními i environmentálními bakteriemi. Spolu s MGEs a bakteriofágy tvoří tzv. rezistom – soubor genetických zdrojů rezistence, ze kterého mohou patogeny získávat nové ARG. Lidské odpadní vody jsou v současnosti většinou lépe zpracovávány v centralizovaných ČOV než živočišné odpady, které často procházejí pouze jednoduchými způsoby úpravy, nebo v některých zemích mimo EU nejsou před vypuštěním do životního prostředí upravovány vůbec [36]. [22, 33]

Na problém antimikrobiální rezistence upozornila i Světová zdravotnická organizace, která podpořila globální výzkumné aktivity prostřednictvím kampaně s mottem „Boj proti lékové rezistenci: žádná akce dnes znamená žádný lék zítra“. Tato výzva vedla k identifikaci několika nadějných strategií, které by mohly přispět k obnovení účinné léčby infekcí vyvolaných rezistentními bakteriálními patogeny. [33]

2.1 Antibiotika využívané ve veterinární medicíně v EU

Evropská unie (EU) se staví k problematice nadužívání ATB, jejich šíření do životního prostředí poměrně odpovědně a provedla řadu kroků k ochraně všeobecného zdraví a životního prostředí. Nařízení Evropské komise COM(2020) 667, známé jako „Strategie pro udržitelnost v oblasti chemických látek“, je klíčovým prvkem Green Deal. Jeho hlavním cílem je zajistit, aby chemické látky vyráběné a používané v EU byly bezpečné a udržitelné. V souvislosti s ATB a antimikrobiální rezistencí strategie stanovuje konkrétní opatření, jako je podpora vývoje nových antimikrobiálních látek, optimalizace jejich používání a zavedení přísnějších pravidel pro jejich uvádění na trh. ^[34]

Podle údajů Evropské agentury pro léčivé přípravky klesla v roce 2022 spotřeba veterinárních antimikrobiálních látek u hospodářských zvířat o 28 % ve srovnání s rokem 2018, což představuje významný krok k naplnění cíle EU – 50% snížení do roku 2030. Nové evropské předpisy zpřísnují jejich používání a podporují alternativy, což zároveň přispívá ke snižování rizika antimikrobiální rezistence i environmentální zátěže. ^[35]

2.2 Klíčové geny antibiotické rezistence v odpadních zemědělských produktech

Četnost výskytu ARG v odpadních zemědělských produktech úzce souvisí s druhy ATB využívanými v chovech zvířat. Mezi nejčastěji využívané skupiny ATB a k nim příslušné ARG patří tetracykliny (tet), sulfonamidy (sul), β -laktamy (bla), makrolidy-linkosamidy-streptogramin B (erm), aminoglykosidy (aac), fenikolová ATB (fca, floR, cef), kolistiny (mcr) a vankomycin (van) ^[37]. Geny rezistence na sulfonamidy (sul) a tetracykliny (tet) patří k nejčastěji uváděným ARG v různých typech chovů, jako jsou vepřiny a drůbežárny, následované ARG na makrolidy (erm), dále na fenikolová ATB (cmlA, floR, fexA, cfr a fexB) ^[36].

Základními mechanismy rezistence jsou deaktivace ATB, jejich aktivní vylučování z buňky prostřednictvím efluxních pump a ochrana cílových struktur (např. ribozomů) specifickými proteiny ^[37]. Například geny *tetW* a *tetM* kódují ribozomálně ochranné proteiny, které se váží na ribozomy a mění jejich konfiguraci tak, aby tetracyklin nemohl účinně inhibovat syntézu proteinů ^[38]. Gen *floR* pak kóduje proton-dependentní efluxní pumpu, která aktivně transportuje chloramfenikol i florfenikol z bakteriální buňky ven ^[39]. Důležitou roli v horizontálním přenosu ARG rezistence hrají také geny pro integrony (*intI*),

které jsou často asociovány s MGEs, jako jsou transpozony a/nebo konjugativní plazmidy, což podporuje jejich přenos mezi různými buňkami i druhy mikroorganismů ^[40].

Studie realizovaná v roce 2016 pod vedením Čínské akademie věd se zaměřila na výskyt 22 vybraných genů antibiotické rezistence (*sul1*, *sul2*, *cmlA*, *fexA*, *fexB*, *floR*, *tetM*, *tetO*, *tetW*, *tetQ*, *tetS*, *tetT*, *tetA*, *tetG*, *tetH*, *tetX*, *ermB*, *ermC* a *ermE*) v odpadních vodách z chovu prasat v řece Longkou a v zelenině hnojené odpadní vodou z těchto chovů, po předešlém zpracování odpadů na farmách (např. kompostování, AD). Detekce byla provedena pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) ^[36]. Celkem bylo prokázáno 19 ze 22 sledovaných ARG, přičemž jejich celkové množství se lišilo mezi jednotlivými farmami. V průměru byl výskyt ARG až 31krát vyšší než v negativních kontrolách, přičemž nejčastěji se vyskytovaly geny *tetA*, *ermE*, *tetH* a *sul2*. V řece Longkou, kam byly vypouštěny odpadní vody ze dvou farem, byla zaznamenána výrazně vyšší koncentrace ARG ve srovnání s kontrolními vzorky z horního toku. Geny antibiotické rezistence byly rovněž často detekovány v konzumní zelenině, přičemž referenční (nezavlažovaná) zelenina vykazovala nižší výskyt ARG než ta zavlažovaná odpadní vodou. Ve vzorcích zeleniny odebraných v roce 2013 z polí hnojených prasečími exkrementy bylo pozitivních 18 z 22 sledovaných genů rezistence ^[36].

3 VYBRANÉ METODY DETEKCE GENŮ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE

3.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda umožňující amplifikaci (zmnožení) specifických úseků DNA na miliony kopií. Princip PCR vychází z přirozeného způsobu replikace DNA, tak jak probíhá v buňce. Pro provedení reakce je zapotřebí templátová DNA (cílová sekvence nebo gen), specifické primery (krátké oligonukleotidy o délce 18–25 bp) komplementární k cílovým oblastem DNA, volné nukleotidy (dNTPs) a DNA polymeráza. Obvykle se používá termostabilní Taq DNA polymeráza, izolovaná z extremofilního mikroorganismu *Thermus aquaticus*, která odolává vysokým teplotám během cyklů.^[23]

PCR probíhá v zařízení nazývaném termocyklér, které umožňuje opakovanou změnu teplot podle potřeby jednotlivých kroků reakce. Proces se skládá ze tří hlavních fází:

1. **Denaturace** – při vysoké teplotě (obvykle kolem 94–98 °C) dochází k rozdělení dvoušroubovice DNA (dsDNA) na jednotlivá vlákna (ssDNA).
2. **Annealing (nasednutí primerů)** – při nižší teplotě (cca 50–65 °C) primery specificky nasedají na komplementární sekvence na ssDNA.
3. **Elongace (syntéza)** – při optimální teplotě (kolem 72 °C) DNA polymeráza prodlužuje primery připojováním volných nukleotidů a syntetizuje nové vlákno DNA.

Opakováním těchto cyklů (obvykle 25–40krát) dochází k exponenciálnímu zmnožení cílové DNA sekvence, což umožňuje její další analýzu nebo využití v různých aplikacích. Úspěšnost provedené amplifikace je nejčastěji ověřena pomocí gelové elektroforézy, která umožňuje vizualizaci DNA produktů na základě jejich délky. Od svého objevu v roce 1983 má dnes klasická PCR metoda mnoho modifikací a vylepšení, které jsou klíčem pro dnešní molekulárně biologický výzkum.^[23]

PCR se již osvědčila jako vhodná metoda pro detekci ARG, pokud jsou primery navrženy tak, aby specificky nasedaly na místo cíleného genu. Například studie na jihokorejských farmách ukázala přenos genů rezistence na oxazolidinony a fenikoly u pěti z deseti izolátů *Enterococcus* rezistentních na linezolid, a to detekcí plazmidových genů *optrA* a *fexA*. PCR byla také využita k detekci vícenásobné rezistence u izolátů *Staphylococcus aureus* ze vzorků mléka, masa a jiných živočišných produktů z tržních sítí. Z 125 izolátů

vykazovalo 19 vícenásobnou rezistenci na penicilin, enteromycin, kanamycin a tetracyklin, přičemž byly identifikovány geny blaZ, msrA, ermB, ermC a tetK. [25]

Ačkoli PCR nabízí rychlou a účinnou detekci ARG, její úspěšnost závisí na různých vnitřních a vnějších faktorech, jako jsou podmínky nakládání s vyšetřovaným vzorkem, teplotní profily cyklů, koncentrace primerů a použitá metoda izolace DNA. Přítomnost složek potravinových matric, jako je mleté hovězí nebo kuřecí maso, může inhibovat účinnost PCR. Tento problém lze řešit efektivním zpracováním vzorků, purifikací nebo koncentrací cílových patogenů před samotnou amplifikací. Navíc konvenční PCR není schopna rozlišit mezi životaschopnými a neživotaschopnými buňkami, což lze překonat použitím metod, jako je reverzní transkripční PCR (RT-PCR) nebo kvantitativní reverzní transkripční PCR (RT-qPCR), které umožňují nepřímou detekci životaschopných buněk díky cílení na RNA, která je typicky přítomná jen v aktivních buňkách. [25]

3.1.1 RT-PCR

RT-PCR využívá enzym reverzní transkriptázu, který umožňuje přepis molekuly mRNA na komplementární DNA (cDNA), jež je následně amplifikována klasickou PCR. Jedná se o metodu s vysokou specificitou, senzitivitou a spolehlivostí. Bylo prokázáno, že cDNA vzniklá z původní RNA vykazuje vyšší čistotu ve srovnání s DNA izolovanou přímo z cílového materiálu. Tato metoda navíc umožňuje detekci replikujících se buněk a vykazuje vysokou citlivost při detekci transkribovaných genů, což může nepřímo indikovat živé buňky, protože RNA se degraduje po smrti buňky. [23]

RT-PCR je vhodná pro kvalitativní studium genové exprese a je nezbytná pro provádění dalších molekulárně-biologických technik, jako je qPCR sloužící ke kvantifikaci hladiny RNA, nebo mikroarray umožňující detekci exprese více cílových genů současně. RT-PCR se běžně využívá v experimentech zaměřených na rozlišení exonů a intronů v genetické informaci eukaryotických organismů, stejně tak jako při diagnostice genetických onemocnění a monitorování účinnosti antimikrobiální terapie. [25]

Významnou nevýhodou této metody je vysoká nestabilita RNA molekuly. Z tohoto důvodu představuje zpracování vzorků velkou výzvu, prodlužuje celkovou dobu analýzy a zároveň ji činí finančně náročnější. [25]

3.1.2 qPCR

Reakce qPCR probíhá ve specializovaném termocykléru vybaveném optickým systémem pro snímání intenzity fluorescenčního signálu, který umožňuje sledování amplifikaci DNA v reálném čase. Ve srovnání s klasickou PCR má qPCR kratší reakční čas a výsledky okamžitě. Proto je tato metoda hojně využívána při detekci ARG. [23]

Reportérové molekuly mohou být buď fluorescenční barviva, která se nespecificky vážou na dsDNA, což znamená, že označují jak cílové, tak i nespecifické amplifikační produkty, nebo fluorescenční sondy, které se specificky vážou na cílovou oblast mezi primery. Tento druhý přístup poskytuje nej přesnější kvantifikaci v reálném čase. Fluorescenční sonda je krátký oligonukleotid, který je na 5' konci označen fluorescenční značkou a na 3' konci zhášecí molekulou. Sonda je navržena tak, aby hybridizovala buď s templátovou DNA, nebo v blízkosti primerů, a je využívána v kombinaci s DNA polymerázou, která disponuje 5'→3' exonukleázovou aktivitou. Během amplifikace polymeráza sondu rozštěpí, čímž dojde k oddělení fluorescenční značky od zhášecí molekuly a k následnému vzniku fluorescenčního signálu. [23, 25]

Výzkumná skupina vedená Jiyoung Lee z Korejské republiky využila metodu multiplexní qPCR k detekci methicilin-rezistentního *Staphylococcus aureus* a vankomycin-rezistentních enterokoků z klinických izolátů v raném stádiu infekce. Multiplexní qPCR umožňuje současnou amplifikaci a kvantifikaci více cílových genů v jediné reakci, čímž zvyšuje efektivitu diagnostiky. Ve své studii výzkumníci detekovali gen *mecA* u *S. aureus* s dosaženou specifitou 97,44 % a geny *vanA* nebo *vanB* u enterokoků se specifitou 96,15 %. [32]

3.2 Sangerovo sekvenování

Tuto metodu čtení nukleotidové posloupnosti DNA vyvinul v roce 1977 Frederick Sanger, za což mu byla o tři roky později udělena Nobelova cena, to vypovídá o významu, jakou Sangerovo sekvenování má. Princip této metody spočívá v modifikovaném procesu DNA replikace. Do reakční směsi se přidávají fluorescenčně značené dideoxyribonukleotidtrifosfáty (ddNTPs), které jsou náhodně začleněny do nově syntetizovaných řetězců, čímž dochází k jejich předčasnému ukončení. Výsledkem reakce je směs různě dlouhých fragmentů DNA, které jsou následně separovány kapilární elektroforézou. Po jejich rozdělení podle délky lze na základě terminálních nukleotidů rekonstruovat celkovou sekvenci. [23, 26]

Sangerovo sekvenování se primárně nevyužívá jako diagnostická metoda, ale představuje důležitý nástroj v molekulární biologii a často navazuje na jiné diagnostické metody. Umožňuje sekvenovat fragmenty o délce až 1000 bp. Mezi hlavní nevýhody patří omezený počet čtení, v jednom běhu lze analyzovat pouze jeden vzorek DNA. I přes nástup vysoce výkonných metod sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing, NGS) zůstává Sangerovo sekvenování široce používané díky své přesnosti a spolehlivosti. [23, 26]

3.3 Next Generation Sequencing

NGS představuje souhrn moderních technik sekvenování DNA, které umožňují simultánní analýzu velkého množství genetických sekvencí. Díky využití bioinformatických nástrojů lze tato data efektivně zpracovat a porovnat s referenčními genomy. NGS technologie zpracovávají tisíce až miliony fragmentů DNA současně, což vede k získání rozsáhlých a detailních informací o genetickém materiálu. [26]

NGS výrazně zjednodušilo celogenomové sekvenování (whole genome sequencing – WGS), protože umožňuje přečíst celý genom v rámci jediné reakce. WGS se proto stále častěji využívá jako diagnostický nástroj pro detekci ARG. Ze sekvenačních čtení se sestavují úseky DNA označované jako *kontigy* (contigs), které lze následně anotovat a analyzovat za účelem identifikace genů rezistence. Několik studií prokázalo efektivitu WGS v detekci ARG a identifikaci rezistentních mikroorganismů. Například výzkumný tým z Environmentální a biotechnologické laboratoře z Hong Kongské Univerzity využil WGS k analýze exkrementů prasat, kuřat a lidí, přičemž v genetickém materiálu identifikoval nejen řadu genů rezistence, ale také mobilní genetické elementy (MGEs) a geny související s rezistencí vůči těžkým kovům. [25, 29]

Sekvenace se rovněž hojně využívá k taxonomické identifikaci mikroorganismů prostřednictvím tzv. amplikonového sekvenování. U prokaryotických organismů se nejčastěji amplifikuje gen pro 16S ribozomální RNA (16S rRNA), jehož sekvence umožňuje určovat taxonomické zařazení izolátu až na úroveň rodu, v některých případech i druhu. Díky metodám NGS lze z jednoho vzorku současně identifikovat desítky až stovky různých mikroorganismů, což umožňuje komplexní pohled na mikrobiální diverzitu v prostředí nebo biologickém materiálu. [26]

Vybrané platformy pro sekvenování nové generace

Illumina

Technologie Illumina představuje jeden z nejrozšířenějších přístupů NGS, konkrétně metodu *sekvenování syntézou*. Fragmenty analyzované DNA se pomocí adaptérů naváží na povrch tzv. *flow-cell*, což je skleněná destička pokrytá oligonukleotidy komplementárními k adaptérům. Po navázání dochází k amplifikaci fragmentů a vytvoření shluků identických kopií. Během sekvenace jsou do rostoucího řetězce začleňovány fluorescenčně značené nukleotidy, jejichž specifický signál je snímán opticky. Díky tomu lze přesně určit sekvenci každého fragmentu a získat stovky čtení ve dvou směrech současně. [23]

Nanopore sekvenování

Další významnou metodou NGS je nanopore sekvenování vyvinuté společností Oxford Nanopore Technologies. Tato technologie využívá také tzv. *flow-cells*, které na rozdíl od sekvenování technologií Illumina obsahují pole nanopórů zabudovaných v elektrozestupní membráně. Každý nanopór je propojen se senzorem, jenž zaznamenává elektrický proud procházející skrze pór. Při průchodu molekuly DNA nebo RNA nanopórem dojde k narušení proudu, čímž vzniká charakteristický elektrický signál. Tento signál je následně zpracován pomocí algoritmů basecallingu, které v reálném čase převádějí signál na konkrétní sekvenci nukleotidů. [30]

3.4 Loop-mediated Isothermal Amplification

Metoda Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) je rychlá screeningová technika spadající do skupiny metod amplifikace nukleových kyselin. Metoda vzrostla na popularitě při diagnostice koronaviru způsobující SARS, virů západonilské horečky. Pomocí LAMP byly vyvinuty diagnostické testy zaměřené na *on site* detekci celé řady virových, bakteriálních, plísňových i parazitárních patogenů. [26, 27]

LAMP využívá čtyři až šest primerů: vnější primery (F3 a B3), vnitřní primery (FIP – tvořený sekvencemi F2 a komplementem F1; a BIP – tvořený B2 a komplementem B1). Pro zvýšení rychlosti a efektivity amplifikace lze přidat tzv. smyčkové primery (LF, LB), které umožňují vznik charakteristické „kvěťákové“ struktury obsahující více smyček. Tím lze cílit až na osm různých sekvencí v rámci cílové oblasti DNA. [26, 27]

K amplifikaci se používá Bst DNA polymeráza, která má schopnost vytěsnění vláken DNA (strand displacement) a pracuje optimálně při teplotách 60–65 °C. Díky těmto vlastnostem není nutné teplotní cyklování jako u PCR – amplifikace probíhá izotermně. To umožňuje provádět reakci v jednoduchých podmínkách, např. ve vodní lázni nebo vyhřívacím bloku, bez potřeby sofistikovaných přístrojů. [27]

Výsledky amplifikace lze detekovat různými metodami – gelovou elektroforézou, pomocí DNA čipů, fluorescenčními barvivami vázícími se na dsDNA, nebo vizuálně pomocí barevných indikátorů. Jednou z nevýhod této metody je vyšší riziko falešně pozitivních výsledků v důsledku tvorby nespecifických produktů. [27]

3.5 Technologie založené na CRISPR/Cas systémech

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) je antivirový obranný systém prokaryotických organismů, který se vyskytuje přibližně u 40 % bakterií a 90 % archeí, u nichž byl kompletně sekvenován genom. Pro svou funkci vyžaduje endonukleázy známé jako Cas proteiny (CRISPR-associated proteins), které specificky štěpí DNA. Díky vědeckým modifikacím a zjednodušením byl tento systém přizpůsoben pro editaci genomu prakticky jakéhokoliv organismu. [26]

Modifikovaný CRISPR/Cas systém se skládá ze dvou hlavních komponent: První z nich je tzv. naváděcí RNA (single guide RNA, sgRNA), která je navržena tak, aby svým 5' koncem specificky hybridizovala s cílovou sekvencí DNA, zatímco 3' konec váže příslušný Cas protein. Druhou komponentou je samotný Cas protein, který je geneticky upraven tak, aby mohl být transportován do buněčného jádra, kde následně interaguje s DNA. V jádře komplex Cas/sgRNA rozpozná cílovou sekvenci a provede její štěpení, čímž zahájí proces editace genomu. Prvním využitým systémem byl CRISPR/Cas9, který se běžně používá pro cílené štěpení dsDNA, tento systém je významný v oblasti genového inženýrství a genové terapie. [26, 27]

V posledních letech se technologie CRISPR/Cas rozšiřuje také jako nástroj pro molekulární diagnostiku, konkrétně pro detekci DNA a RNA s vysokou citlivostí a specifitou. Diagnostické metody využívající efektorové Cas proteiny – Cas9, Cas12, Cas13 a Cas14, na rozdíl od Cas9 mají ostatní Cas proteiny „kolaterální aktivitu“, při které po rozpoznání cíle štěpí necílové jednořetězcové nukleové kyseliny (ssDNA nebo ssRNA). Na základě této funkce byly vyvinuty různé CRISPR/Cas diagnostické platformy. [27]

Protože specifická detekce pomocí CRISPR/Cas vyžaduje předamplifikační nebo poamplifikační krok, kombinuje se tato technologie s metodami amplifikace nukleových kyselin, jako jsou PCR, LAMP, rekombinázová polymerázová amplifikace (RPA), nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) nebo replikace rotujícího kruhu (RCA). Bylo vyvinuto několik diagnostických metod v závislosti na typu Cas enzymu: například CRISPR/Cas9 kombinovaný s NASBA pro detekci viru Zika, systém SHERLOCK (Cas13 + RPA) pro diagnostiku virů Zika a dengue nebo metoda DETECTR (Cas12 + LAMP/RPA) pro specifickou detekci patogenů. Tyto kombinované technologie přispěly k vývoji rychlých, přesných a praktických testů pro diagnostiku patogenních organismů v klinické praxi. [27]

CRISPR/Cas systémy vykazují značný potenciál při detekci ARG. Výzkumné skupině Müllera a kol. se podařilo úspěšně propojit jednorázový optický test mapování DNA s technologií CRISPR-Cas9 za účelem přímé identifikace specifických genů rezistence (blaCTX-M, blaNDM a blaKPC) na plazmidových molekulách. Tato metoda umožňuje získat sekvenční informace během několika hodin, což ji činí vhodnou pro rychlé sledování šíření infekcí. Technologie byla dále využita k analýze typu plazmidu nesoucího gen blaCTX-M během nozokomiálního výskytu infekce, přičemž byla prokázána přítomnost tohoto plazmidu ve vzorcích. [28]

3.6 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je metoda identifikace a analýzy, využívající fluorescenčně značené sondy, které se hybridizují přímo na DNA nebo RNA uvnitř buňky, aniž by bylo nutné předem izolovat nukleové kyseliny. Sonda je krátký oligonukleotid DNA nebo RNA, označený fluorescenční značkou za účelem vizualizace pomocí epifluorescenční nebo konfokální laserové skenovací mikroskopie. Cílový úsek DNA nebo RNA se nachází přímo v buňce, která musí být před hybridizací vhodně upravena – například v případě biopsie se vzorek tkáně před zpracováním zahřeje, aby došlo k denaturaci dvoušroubovice DNA na jednotlivé řetězce; u RNA není tento krok nutný. Po hybridizaci fluorescenčně značené sondy s cílovým úsekem je vzorek ozářen světlem určité vlnové délky a následně mikroskopicky vizualizován. [23, 24]

Ve studii z roku 2019 vyvinuli vědci z Korejského výzkumného institutu fluorescenční nanosondy pro detekci bakterií rezistentních na ATB. Nanosondy byly připraveny metodou sol-gel a skládaly se z poly(d,l-lactide-co-glycolide) (PLGA) a křemičitých nanočástic, které

byly označeny fluorescenčními barvivy, což vedlo k silnému fluorescenčnímu signálu. Tyto nanosondy byly upraveny tak, aby se zaměřovaly na specifické geny, včetně genu bla, který kóduje enzym beta-laktamázu. Pomocí těchto nanosond bylo úspěšně detekováno ampicilin-rezistentní *Escherichia coli*. Charakterizace nanosond byla provedena pomocí elektronové mikroskopie, infračervené spektroskopie a fluorescenční analýzy. [24]

3.7 Microarray technologie

Microarray technologie je technika využívána pro studium genové exprese a detekci ARG. Umožňuje hybridizaci oligonukleotidových sond na specifické molekuly RNA bez nutnosti předchozí kultivace bakterií. I když microarray přinesla významný pokrok ve výzkumu, dnešní moderní technologie, jako jsou NGS, qPCR nebo CRISPR/Cas, postupně nahradily její použití díky vyšší citlivosti, flexibilitě a schopnosti detekovat širší spektrum genetických informací. [23, 35]

Například Baumgartner a kol. použili microarray techniku k identifikaci ARG v potravinách určených k přímé konzumaci. Byly nalezeny geny rezistence na methicilin (*mecA*), vankomycin (*vanB*), makrolidy (*msr*), tobramycin (*aadD*), tetracyklin (*tet*) a chloramfenikol (*cat*). Výzkumná skupina Morach a kol. také použili této metody k vyhledávání patogenních mikroorganismů a genů kódujících enterotoxiny. Celkově zjistili nízkou prevalenci *S. aureus* a identifikovali geny kódující enterotoxiny *sea*, *seb*, *sec*, *seh*, *sel* a *egc*. [25]

I když některé starší metody, jako je PCR, FISH a Sangerova sekvenace, stále mají své místo v diagnostice antibiotické rezistence, technologie jako CRISPR/Cas a NGS rychle přebírají hlavní roli díky své vyšší specifitě, citlivosti a schopnosti zpracovávat větší množství informací. V budoucnu lze očekávat, že tyto nové metody nahradí tradiční přístupy a umožní rychlejší, levnější a přesnější detekci antibiotických rezistencí. [25]

II PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*

V Tabulce 1 je uveden seznam a základní charakteristika vzorků digestátů, které byly v bakalářské práci analyzovány.

Tabulka 1 Seznam vzorků digestátů, jejich typ, původ a druh substrátu.

Číslo označení BPS	Typ BPS	Vzorek	substrát
1	ČOV	digestát	směs primárního a aktivovaného kalu
2	zemědělská	digestát	kejda prasat, kukuřice
3	ČOV	digestát	směs primárního a aktivovaného kalu
4	zemědělská	digestát	kejda skotu, hnůj, zbytky krmiv, odpady z výroby, kukuřice
5	zemědělská	digestát	kejda skotu, kukuřice
6	zemědělská	digestát	kravská kejda, kukuřičná siláž, travní senáž
7	zemědělská	digestát	kravská kejda, kukuřičná siláž, travní senáž, jádro
8	zemědělská	digestát	*
9	ČOV	digestát	směs primárního a aktivovaného kalu
10	ČOV	digestát	směs primárního a aktivovaného kalu, příležitostně externí substrát
11	zemědělská	digestát	*
12	zemědělská	digestát	kukuřice, siláž, senáž, kravský a koňský hnůj, biologický rozložitelný odpad
13	zemědělská	fermentát	kukuřice, siláž, senáž, kravský a koňský hnůj, biologický rozložitelný odpad

* informace o složení substrátu nebyly poskytnuty

4.2 Použité chemikálie, kity a roztoky

Použité chemikálie:

- Destilovaná voda
- 70 % a 96 % ethanol
- Agaróza (Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, Německo)

- PCR ddH₂O (Biologix Europe GmbH; Shandong, Čína)
- Primery pro PCR (Metabion international AG, Planegg, Německo)
- VWR Red Taq DNA Polymerase Master Mix (2x Master Mix Kit (1.5 mM MgCl₂); VWR international bvba, Haasrode, Belgie)
- Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs Inc.; Massachusetts, USA)

Použité kity:

- DNeasy blood and tissue Kit (Qiagen, Německo)
- DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen, Německo)
- Fluorescence Quantification Assays, dsDNA High Sensitivity (DeNovix, USA)
- NucleoMag SEP (Macherey-Nagel, Německo)

Použité roztoky:

- krystalová violet
 - krystalová violet 10 g/500 ml
 - 96% ethanol 100 ml/500 ml
 - 1% šťavelan amonný 400 ml/500 ml
- Lugolův roztok
 - I₂ 1 g/100ml
 - KI 2 g/100 ml
- safranin
 - safranin 1 g/100 ml
- TAE pufr
 - 10 mmol.l⁻¹ Tris
 - 1 mmol.l⁻¹ EDTA, pH = 8
 - 0,5 mmol.l⁻¹ kyselina octová

- Marker molekulové hmotnosti Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA)
- GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, Fremont, USA)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- laminární box (SCS II-4; MERCI s.r.o., Brno, ČR)
- dekontaminační box (AURA PCR work station; BioAir SpA, Siziano, Itálie)
- mrazicí box -20 °C (Beko CSA 34020; Beko Česko s.r.o., Praha, Česká republika)
- laboratorní mikroskop Olympus CX41RF-3 (Olympus, Šidžuku, Japonsko)
- zdroj stejnosměrného napětí Consort EV243 (Consort bvba, Turnout, Belgie)
- aparatura pro horizontální gelovou elektroforézu (Cleaver Scientific, Somers, UK)
- gelový zobrazovací systém, InGenius system (Syngene, Bengaluru, IND)
- fluorometr QFX DeNovix (DeNovix, Wilmington, USA)
- vortex mixer Labnet (Labnet international, Inc., Edison, USA)
- stolní centrifuga HERMLE Z 100 M (Hermle LaborTechnik GmbH, Wehingen, Německo)
- centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- mikrovlnná trouba Electrolux EMS21400S (Electrolux, Stockholm, Švédsko)
- digitální předvážka KERN 440-45N (KERN, Německo)
- termocyklér pro PCR Aeris™ (Esco Micro Pte. Ltd., Singapur)
- termocyklér pro PCR C1000 Touch™ (Bio-Rad Laboratoties, Hercules, USA)
- CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratoties, Hercules, USA)
- termostat Bio TDB-100 (Biosan, Riga, Litva)
- automatické pipety Xplorer (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- Infinite 200 PRO (Tecan Group Ltd., Männedorf, Švýcarsko)
- Automatický pipetovací robot (OT-2 Robot; Opentrons labworks, Inc., New York, USA)

4.4 Předúprava vzorků digestátů

Pro účely tohoto výzkumu bylo dodáno 13 vzorků digestátů pocházejících z různých bioplynových stanic, které zpracovávají odpady převážně ze zemědělské výroby, zejména z chovu dobytka. Tyto vzorky byly využity k optimalizaci metodiky a k screeningu přítomnosti ARG.

Z jednotlivých digestátů byly následně kultivovány mikroorganismy rezistentní vůči vybraným ATB, konkrétně: tetracyklin, erytromycin, ciprofloxacin, vankomycin, ampicilin, polymyxin B, sulfamethoxazol, chloramfenikol a streptomycin. Po inkubaci byly pomocí přeočkování získány čisté kultury rezistentních mikroorganismů.

Vybrané rezistentní izoláty byly následně identifikovány pomocí Sangerova sekvenování. Kultivace mikroorganismů probíhala ve spolupráci s doc. Mgr. Magdou Janalíkovou, Ph.D.

4.5 Metodika identifikace rezistentních izolátů

4.5.1 Mikroskopie a Gramovo barvení

Před samotnou izolací DNA z izolátů rezistentních mikroorganismů byla u všech vzorků provedena kontrola čistoty kultur pomocí Gramova barvení. Tato metoda umožňuje rozlišení bakterií na základě rozdílů ve struktuře jejich buněčné stěny.

Gram-pozitivní (G^+) bakterie mají buněčnou stěnu tvořenou silnou vrstvou peptidoglykanu, která je prostoupena teichovými kyselinami a polysacharidy. Během barvicího postupu dochází k penetraci této vrstvy krystalovou violetí, která v přítomnosti Lugolova roztoku vytváří stabilní fialový komplex. Tato silná vrstva peptidoglykanu neumožňuje vymytí komplexu alkoholem, a bakterie si tak zachovávají fialové zbarvení.

Naopak Gram-negativní (G^-) bakterie mají buněčnou stěnu složenou z tenčí vrstvy peptidoglykanu, překryté vnější membránou tvořenou lipopolysacharidy. Tenká peptidoglykanová vrstva nedokáže udržet barvicí komplex, který je při působení alkoholu rychle vymyt, a buňky jsou následně dobarveny kontrastním barvivem, nejčastěji safraninem.

Při mikroskopickém pozorování se tak Gram-pozitivní bakterie jeví fialově, zatímco Gram-negativní bakterie se barví růžově až červeně, v závislosti na použitém kontrastním barvivu.

Barvení bylo provedeno následujícím postupem:

1. Na podložní sklo byla nanесena kapka destilované vody.
2. Sterilní mikrobiologickou kličkou byla odebrána část samostatné bakteriální kolonie z Petriho misky s vykultivovanou čistou kulturou.
3. Klička byla položena do kapky vody, prvně bylo inokulum rozmícháno a následně rozetřeno po ploše sklíčka.
4. Sklíčko bylo vysušeno a následně zafixováno plamenem plynového kahanu.
5. Po vychladnutí, bylo sklíčko namočeno na jednu minutu do krystalové violeti.
6. Následně bylo sklíčko vytaženo a převrstveno Lugolovým roztokem. Po uplynutí jedné minuty byl Lugolův roztok opláchnut destilovanou vodou a poté proudem acetonu, dokud nebyl odtékající roztok bezbarvý.
7. Destilovanou vodou bylo sklíčko znovu opláchnuto a na další minutu namočeno do Safraninu. Nakonec bylo sklíčko opláchnuto destilovanou vodou a usušeno.

Po provedení barvení byly preparáty pozorovány pod laboratorním mikroskopem Olympus CX41RF-3 (Olympus, Šidžuku, Japonsko) za použití imerzního oleje a při zvětšení 1600x. Cílem barvení a mikroskopování byla i kontrola mikroskopické morfologie, a tudíž jestli jsou kultury opravdu čisté.

4.5.2 Izolace DNA z rezistentních izolátů

Pro izolaci DNA byl použit komerční kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Německo). Princip této metody spočívá v rozrušení buněčné struktury pomocí lýzy cytoplazmatické membrány a buněčné stěny, čímž dojde k uvolnění DNA do pufrovaného prostředí. Následně se DNA naváže na křemičitanovou membránu v přítomnosti chaotropních solí, které podporují vazbu nukleových kyselin na membránu. V dalších krocích dochází k promývání membrány s navázanou DNA za účelem odstranění buněčných zbytků, proteinů a dalších kontaminantů. V závěrečné fázi je DNA eluována čistým elučním pufrem nebo vodou, čímž je získána čistá DNA.

Postup izolace DNA:

1. Do 1,5 ml eppendorf zkumavky bylo napipetováno 200 µl PBS pufru.
2. Z Petriho misky s čistými kulturami bylo odebráno inokulum sterilní mikrobiologickou kličkou a rozmícháno ve zkumavce s PBS pufrem.

3. Poté bylo přidáno 20 μ l proteinázy K. Krok 1 až 3 byl prováděn v laminárním boxu.
4. K objemu bylo následně přidáno 200 μ l AL pufru, zkumavky byly uzavřeny a promíchány na vortexu. Poté byly inkubovány při 56 °C po dobu 10 minut.
5. Po inkubaci bylo k objemu přidáno 200 μ l 96 % ethanolu a promícháno vortexováním.
6. Celý objem zkumavky byl poté přenesen na DNeasy mini spin kolonu umístěnou na čistou zkumavku. Zkumavky s kolonou byly poté centrifugovány při 8000 rpm po dobu jedné minuty. Kolona byla poté přemístěna do čisté 2 ml zkumavky a zbytek vyhozen.
7. Na kolonu bylo nanášeno 500 μ l AW1 pufru a opět byla provedena centrifugace při 8000 rpm jednu minutu. Kolona byla opět přemístěna do čisté 2 ml zkumavky a zbytek vyhozen.
8. Na kolonu bylo nanášeno 500 μ l AW2 pufru a poté byla provedena centrifugace při 14500 rpm tři minuty. Tento krok byl ještě jednou zopakován, aby byla dokonale vysušena membrána. Kolona byla poté přemístěna do čisté 2 ml uzavíratelné eppendorf zkumavky a zbytek vyhozen.
9. Do středu membrány bylo napipetováno 100 μ l EA elučního pufru, kolona byla inkubována při pokojové teplotě po dobu pěti minut. Poté byla provedena centrifugace při 8000 rpm po dobu jedné minuty. Kolona byla vyhozena, ponechána byla pouze zkumavka s elučním objemem.

4.5.3 Měření koncentrace DNA fluorometricky

Pro další práci s vyizolovanou DNA bylo nezbytné stanovit její koncentraci, k čemuž byla zvolena fluorescenční metoda kvantifikace. Měření bylo provedeno pomocí fluorometru QFX DeNovix (DeNovix, Wilmington, USA) s využitím sady Fluorescence Quantification Assays Kit (DeNovix, USA) určené pro kvantifikaci dvouřetězcové DNA (dsDNA) s vysokou citlivostí.

Princip této metody spočívá v navázání fluorescenčního barviva na dsDNA, přičemž interakce barviva se strukturou DNA zesiluje fluorescenční signál. Po excitaci barviva světlem o specifické vlnové délce dochází k emitaci záření, jehož intenzita je úměrná koncentraci přítomné DNA. Tato emise je detekována fluorometrem a výsledná hodnota umožňuje přesný výpočet koncentrace DNA ve vzorku.

Postup měření koncentrace DNA:

1. Před použitím byly všechny vzorky a roztoky vytemperovány na pokojovou teplotu.
2. Následně byly všechny roztoky vortexovány a odstředěny.
3. Poté byl připraven pracovní roztok smícháním DeNovix dsDNA High Sensitivity Dye s DeNovix dsDNA High Sensitivity Buffer v poměru 1:100 tak, aby bylo dostatek roztoku na alikvot 190 μ l pro standard a 199 μ l na každý vzorek.
4. Standart byl připraven z 10 μ l standardy dsDNA a 190 μ l pracovního roztoku. Stanovované vzorky byly připraveny z 1 μ l izolované DNA a 199 μ l pracovního roztoku.
5. Vzorky a standardy byly inkubovány po dobu pěti minut při pokojové teplotě.
6. Po inkubaci bylo provedeno měření na fluorometru QFX DeNovix (DeNovix, Wilmington, USA).

4.5.4 Amplifikace DNA pomocí Touchdown PCR

Po stanovení koncentrace izolované DNA byla provedena amplifikace genu pro 16S rRNA pomocí PCR. Gen pro 16S rRNA kóduje malou podjednotku ribozomální RNA (30S) a jeho sekvence jsou běžně využívány k identifikaci prokaryotických organismů i ke studiu jejich fylogenetických vztahů, jelikož v této části genomu dochází k evolučním změnám velmi pomalu, což zajišťuje její konzervovanost napříč druhy.

Gen pro 16S rRNA byl amplifikován pomocí primerů FD1 a RD1 (Metabion international AG, Planegg, Německo) metodou Touchdown PCR (TD-PCR), sekvence a délka výsledného produktu je uvedena v Tab. 3. Při metodě TD-PCR je v úvodních cyklech použita vyšší teplota annealingu, která zajišťuje vyšší specifitu nasedání primerů na templátovou DNA a snižuje riziko nespecifické amplifikace. V následujících cyklech dochází k postupnému snižování teploty annealingu, což zvyšuje efektivitu reakce a umožňuje amplifikaci i méně dostupných templátů.

Příprava reakční směsi byla provedena v PCR boxu AURA PCR Work Station (BioAir SpA, Siziano, Itálie) za sterilních podmínek (viz Tabulka 2). PCR reakce následně probíhala v termocykléru Aeris™ (Esco Micro Pte. Ltd., Singapur), přičemž reakční podmínky jsou podrobně uvedeny v Tabulce 4. ^[7]

Tabulka 2 Schéma pipetování PCR reakční směsi pro 1 vzorek/25 μl .

Složka PCR reakční směsi	Koncentrace zásobního roztoku	Finální koncentrace	Objem ve 25 μl reakci
2x Master Mix Kit	2x	1x	12,5
Forward primer	10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	0,5
Reverse primer	10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	$\mu\text{mol.l}^{-1}$	0,5
DNA	-	0,1-0,5 ng	1
ddH ₂ O	-	-	10,5

Tabulka 3 Primery použité pro PCR.

Název primeru	Sekvence primeru (5' $\rightarrow$ 3')	Délka produktu [bp]	Použití
FD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500	amplifikace genu 16S rRNA
RD1	AAGGAGGTGATCCAGCC		

Tabulka 4 Podmínky PCR reakce.

krok reakce		teplota [$^{\circ}\text{C}$]	čas	počet cyklů
denaturace		95	2 min	1
syntéza	denaturace	95	30 s	9
	annealing	62–57 každý cyklus - 0,5	30 s	
	elongace	72	1,5 min	
	denaturace	95	30 s	24
	annealing	57	30 s	
	elongace	72	1,5 min	
extenze		72	10 min	1
udržování		8	∞	1

Úspěšnost PCR reakce byla ověřena pomocí horizontální gelové elektroforézy (ELFO), provedené v 1,5 % agarózovém gelu za přítomnosti fluorescenčního barviva. Gel byl připraven rozpuštěním agarózy (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Německo) v TAE pufru, přičemž ke zviditelnění DNA fragmentů bylo přidáno barvivo GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, Fremont, USA).

Separace PCR produktů probíhala v horizontální elektroforetické vaně (Clever Scientific, Somers, UK) po dobu 50–70 minut při napětí 120 V. Pro orientační určení velikosti amplifikovaných fragmentů byl na začátek (a případně i konec) každé řady

aplikován DNA marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), obsahující fragmenty o známé velikosti.

Z celkového objemu PCR reakce bylo pro ELFO použito 5 µl produktu. Výsledky byly následně vizualizovány pomocí zobrazovacího systému InGenius (Syngene, Bengaluru, Indie) a získané snímky byly upraveny v grafickém editoru GIMP 2.10 (The GIMP Development Team).

4.5.5 Purifikace DNA amplifikovaného fragmentu genu 16S rRNA

Pro purifikaci amplifikovaného genu byl využit magnetický separační kit NucleoMag SEP (Macherey-Nagel, Německo), pipetování reakce bylo provedeno multikanálovou pipetou Xplorer (Eppendorf, Hamburk, Německo) a k sušení vzorků byl využit termostat Bio TDB-100 (Biosan, Riga, Litva).

Postup purifikace:

1. Byly promíchány všechny chemikálie, s důrazem na NucleoMag B-Beads kovové kuličky, aby byly rovnoměrně rozprostřeny v celém objemu.
2. Do jamky reakční destičky bylo napipetováno 20 µl PCR reakce s 16 µl NucleoMag B-Beads, celý obsah byl poté promíchán pipetováním a ponechán inkubovat 1 minutu při pokojové teplotě.
3. Po inkubaci byla reakční destička se vzorky přenesena na separační magnetickou destičku, kde byly ponechány, aby kovové kuličky sedimentovaly na dně jamek.
4. K reakci bylo poté přidáno 180 µl 85 % ethanolu, po 30 sekundách byl celý objem reakce odpipetován tak, aby zůstaly na dně jamky pouze magnetické kuličky.
5. Reakční destička byla oddělena z magnetické destičky a vzorky byly ponechány sušit při 65 °C po dobu 5 minut.
6. Do vysušených jamek bylo přidáno 30 µl ddH₂O pro PCR, celý objem byl promíchán pipetováním a ponechán inkubovat po dobu 1 minuty při pokojové teplotě.
7. Reakční destička byla opět přenesena na magnetickou separační destičku, po sedimentaci kovových kuliček byl obsah reakce odpipetován tak, aby nedošlo k rozvíření kuliček a jejich nabrání.

Purifikovaná DNA byla následně kvantifikována fotometricky pomocí modulárního readeru Infinite 200 PRO (Tecan Group Ltd., Männedorf, Švýcarsko) za účelem ověření

koncentrace a čistoty vzorků. DNA obsahuje vysoký podíl purinových bází, díky čemuž vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 260 nm. Při této vlnové délce však částečně absorbují i jiné biomolekuly, zejména bílkoviny, které mají své absorpční maximum při 280 nm.

Poměr absorbancí při 260/280 nm (A_{260}/A_{280}) je proto běžně používán k posouzení čistoty DNA. Hodnota tohoto poměru se u vysoce čisté DNA pohybuje přibližně kolem 1,8, což svědčí o minimální kontaminaci bílkovinami nebo jinými organickými sloučeninami.

4.5.6 Sangerovo sekvenování

Sangerovo sekvenování je metoda určování sekvence DNA, která využívá modifikovanou PCR. Během sekvenování se k replikovanému DNA řetězci přidávají fluorescenčně značené ddNTPs, které postrádají 3'-OH skupinu, což způsobí ukončení syntézy řetězce. Výsledkem je směs různě dlouhých DNA fragmentů, z nichž každý končí na specifickém ddNTP. Tyto fragmenty jsou následně separovány pomocí kapilární elektroforézy, která umožňuje rozlišit jejich délku a detekovat fluorescenční signál, čímž se získá přesná sekvence templátové DNA.

Přesné složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 5. Zkumavky byly jednoznačně popsány a následně odeslány ke Sangerovu sekvenování do specializované laboratoře SEQme s.r.o.

Tabulka 5 Rozpis složek reakce pro Sangerovo sekvenování.

Složka reakce pro sekvenaci - forward	Objem ve 10 µl reakci	Složka reakce pro sekvenaci - reverse	Objem ve 10 µl reakci
purifikovaný PCR produkt	8,8	purifikovaný PCR produkt	8,8
PCR primer FD1	1,2	PCR primer RD1	1,2

Ze sekvenace byly obdrženy *ready*, jež byly následně upraveny v programu DNA baser assembler (SciVance Technologies). Jednotlivé opravené *ready* (+)ssDNA a (-)ssDNA byly poté spojeny dle komplementarity do dsDNA, ta byla z programu převedena do HTML formátu. Sekvence dsDNA v HTML formátu byly identifikovány na webové stránce BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; National Library of Medicine, USA) s důrazem na maximální shodu.^[8]

4.6 Metodika detekce genů rezistence v rezistentních izolátech

Po provedené identifikaci rezistentních izolátů bylo přistoupeno k jejich využití za účelem optimalizace PCR reakce pro screeningu přítomnosti ARG. Ve spolupráci s doc. Mgr. Magdou Janalíkovou PhD., Ing. Janou Šerou PhD. a Mgr. Adélou Baťovou byla vypracována rešerše (viz. kapitola 5.1.4.) vybraných ATB a s nimi asociované ARG. Součástí rešerše byl rovněž stručný popis principu účinku jednotlivých genových mechanismů a výběr primerů vhodných pro jejich amplifikaci. Vybrané primery (viz Tabulka 6 a 6a) byly následně objednány u společnosti Metabion international AG, Planegg, Německo.

Tabulka 6 Seznam primerů použitých pro optimalizaci PCR.

Název primeru	Sekvence primeru	Délka produktu [bp]	Sk. antibiotik
tetA_F	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	274	tetracykliny
tetA_R	CATAGATCGCCGTGAAGAGG		
tetC_F	GCGGGATATCGTCCATTCCG	207	tetracykliny
tetC_R	GCGTAGAGGATCCACAGGACG		
tetW_F	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC	168	tetracykliny
tetW_R	GGGCGTATCCACAATGTTAAC		
tetM_F	ACAGAAAGCTTATTATATAAC	406	tetracykliny
tetM_R	TGGCGTGTCTATGATGTTCAC		
ermA_F	GAAATYGGRTCAGGAAAAGG	332	makrolidy
ermA_R	AAAYAGYAAACCYAAAGCT C		
ermB_F	GATACCGTTTACGAAATTGG	364	makrolidy
ermB_R	GAATCGAGACTTGAGTGTGC		
MsrAB_F	GCAAATGGTGTAGGTAAGACAAC	399	makrolidy
MsrAB_R	ATCATGTGATGTAAACAAAAT		
mefA_F	AGTATCATTAATCACTAGTGC	348	makrolidy
mefA_R	TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG		
gyrA_F	GGTACACCGTCGCGTACTTT	311	fluorochinolony
gyrA_R	GCCTTGCGCTACATGAATTT		
qepA_F	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	199	fluorochinolony
qepA_R	CTTCCTGCCCCGAGTATCGTG		
qnrA_F	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	140	fluorochinolony
qnrA_R	GCAGATCGGCATAGCTGAAG		
parC_F	ATCGGCGACGGCCTGAAGCC	273	fluorochinolony
parC_R	CGGGATTTCGGTATAACGCAT		
VanA_F	ATCAACCATGTGATGTAGC	136	vankomycin
VanA_R	AAGGGATACCGGACAATTCA		

Tabulka 6a Seznam primerů použitých pro optimalizaci PCR, pokračování.

Název primeru	Sekvence primeru	Délka produktu [bp]	Sk. antibiotik
VanB_F	ACCCTGTCTTTGTGAAG	121	vankomycin
VanB_R	GAAATCGCTTGCTCAAT		
VanD_F	TGGAATCACAAAATCCGGCG	311	vankomycin
VanD_R	TWCCCGCATTTTTTCACAACS		
blaTEM_F	TTCCTGTTTTTGCTCACCCAG	112	betalaktamy
blaTEM_R	CTCAAGGATCTTACCGCTGTTG		
blaSHV_F	CCATTACCATGAGCGATAACA	-	betalaktamy
blaSHV_R	ACCACAATGCGCTCTGC		
mecA_F	GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA	310	betalaktamy
mecA_R	CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA		
blaZ_F	AAGAGATTTGCCTATGCTTC	228	betalaktamy
blaZ_R	GCTTGACCACTTTTATCAGC		
mcr1_F	AGTCCGTTTGTCTTGTGGC	320	polymyxin
mcr1_R	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG		
mcr2_F	CCTTTTGTGCTGATGGGTT	279	polymyxin
mcr2_R	ATTTTGGAGCATGGTGGTGT		
sul1_F	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	162	sulfonamidy
sul1_R	TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG		
sul2_F	TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG	191	sulfonamidy
sul2_R	CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG		
sul3_F	TCCGTTCAGCGAATTGGTGCAG	128	sulfonamidy
sul3_R	TTCGTTACGCGCTTACACCAGC		
catI_F	CGAACTGGCAAAATAACGCA	199	fenikolová ATB
catI_R	TCAACAAGTAACACTCCGCT		
catIII_F	TTCGCCGTGAGCATTTTG	286	fenikolová ATB
catIII_R	TCGGATGAGTATGGGCAAC		
floR_F	AATCACGGGCCACGCTGTATC	215	fenikolová ATB
floR_R	CGCCGTCATTCTTCACCTTC		
strA_F	CCGTCAATCCCGACTTCTTA	263	aminoglykosidy
srtA_R	CCAGTTCTCTTCGGCGTTAG		
strB_F	CGGTCGTGAGAACAATCTGA	313	aminoglykosidy
srtB_R	ATGATGCAGATCGCCATGTA		
aadA2_F	GCAGCGCAATGACATTCTTG	282	aminoglykosidy
aadA2_R	ATCCTTCGGCGCGATTTTG		
rpsL_F	GCAAGCGCATGGTCGACAAGA	201	aminoglykosidy
rpsL_R	CGCTGTGCTCTTGCAGGTTGTGA		
intl2_F	GTTATTTTATTGCTGGGATTAGGC	166	multirezistence, MGEs
intl2_R	TTTTACGCTGCTGTATGGTGC		

4.6.1 PCR detekce genů rezistence ve vybraných rezistentních izolátech

V první fázi experimentální části bylo nezbytné ověřit funkčnost vybraných primerů a optimalizovat podmínky PCR reakce tak, aby docházelo ke specifickému nasedání primerů na cílové sekvence DNA a zároveň byla minimalizována tvorba nespecifických amplifikačních produktů. Složení reakční směsi bylo shodné s protokolem používaným pro amplifikaci genu 16S rRNA (viz Tabulka 2).

Primery byly rozděleny do tří skupin podle teploty nasedání (annealingu, T_a), konkrétně na 50 °C, 55 °C a 60 °C. Každý primer byl zařazen do příslušné skupiny tak, aby se experimentální annealingová teplota co nejvíce přiblížila jeho optimální hodnotě. S ohledem na rozsah analýzy byly PCR reakce prováděny paralelně ve dvou termocyklech: Aeris™ (Esco Micro Pte. Ltd., Singapur) a C1000 Touch™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

Detailní podmínky PCR reakce pro jednotlivé skupiny jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7 Podmínky PCR reakce zkouška primerů rezistence.

krok reakce		teplota [°C]	čas	počet cyklů
denaturace		95	2 min	1
syntéza	denaturace	95	30 s	35
	annealing	50/55/60 (dle T_a skupiny)	30 s	
	elongace	72	1,5 min	
extenze		72	10 min	1
udržování		8	∞	1

Po provedení PCR byla její úspěšnost opětovně ověřena pomocí ELFO na 1,5 % agarózovém gelu. Postup přípravy gelu a podmínky ELFO odpovídaly protokolu popsanému v kapitole 4.5.4, s výjimkou prodloužené doby reakce, která byla upravena na 1 hodinu a 40 minut.

4.7 Metodika detekce genů rezistence v digestátech

Třináct vzorků digestátů, které byly využity pro kultivaci rezistentních izolátů, bylo rovněž použito k izolaci DNA. Z každého vzorku byla pro účely izolace odebrána tři technická opakování (označená A, B, C), přičemž hmotnost každého z nich činila 250 mg. K izolaci DNA byl použit komerčně dostupný DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen, Německo).

Izolace DNA byla provedena ve spolupráci s Ing. Janou Šerou, Ph.D., a Ing. Veronikou Kučabovou. Při přípravě vzorků byly využity přístroje vortex mixer Labnet (Labnet International, Inc., Edison, USA) a centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf, Hamburk, Německo).

4.7.1 Izolace DNA ze vzorků digestátů

Postup izolace DNA:

1. Prvně bylo naváženo 250 mg vzorku do PowerBead Pro Tube a poté bylo přidáno 800 μ l CD1 roztoku. Celý obsah byl zvortexován.
2. Zkumavky byly přemístěny na třepačku a ponechány míchat na maximální rychlost po dobu 10 minut.
3. Po promíchání byly zkumavky centrifugovány při 15 000 g po dobu 1 minuty.
4. Supernatant byl přemístěn do čisté 2 ml mikrocentrifugační zkumavky, poté bylo přidáno 200 μ l roztoku CD2 a promícháno na vortexu.
5. Opět byla provedena centrifugace při 15 000 g po dobu 1 minuty a následně bylo převedeno 700 μ l supernatantu do čisté 2 ml mikrocentrifugační zkumavky, tak aby nebyl porušen pelet.
6. Následně bylo přidáno 600 μ l roztoku CD3 a promícháno vortexem.
7. Promíchaný lyzát byl přenesen v objemu 650 μ l na MS Spin kolonu, ta byla poté centrifugována při 15 000 g po dobu 1 minuty. Zbývajících 650 μ l lyzátu bylo také přeneseno na MS Spin kolonu a centrifugace byla opakována. Kolona byla přenesena do čisté 2 ml kolekční zkumavky.
8. Na kolonu bylo napipetováno 500 μ l roztoku EA a byla provedena centrifugace při 15 000 g po dobu 1 minuty. Poté byla kolona přemístěna do čisté 2 ml kolekční zkumavky.
9. Opět na kolonu bylo přidáno 500 μ l roztoku C5, byla provedena centrifugace při 15 000 g po dobu 1 minuty. Po centrifugaci byla kolona přemístěna do čisté 2 ml kolekční zkumavky.
10. Kolona byla opět centrifugována 16 000 g po dobu 2 minut, poté byla kolona přemístěna do 1,5 ml eluční zkumavky.

11. Na závěr bylo do středu kolony napipetováno 100 μ l C6 elučního pufru a byla provedena centrifugace při 15 000 g po dobu 1 minuty.

Aby byla ověřena úspěšnost izolace DNA, bylo provedeno fotometrické měření koncentrace a čistoty DNA na modulárním readeru Infinite 200 PRO (Tecan Group Ltd., Männedorf, Švýcarsko).

4.7.2 PCR detekce genů antibiotické rezistence z DNA digestátů

Složení jednotlivých PCR reakcí bylo identické se složením použitým při amplifikaci genu 16S rRNA (viz Tabulka 2). Pro první zkušební reakci byl vybrán primer int12 a vzorky DNA označené jako 11A, 12A a 13A.

Na základě výsledků předchozích PCR reakcí provedených s rezistentními izoláty (viz kapitola 5.1) následovala optimalizace podmínek PCR pro primery parC, blaTEM a aadA2. Vzhledem k rozdílným T_a těchto primerů byla provedena gradientová PCR, umožňující simultánní testování více teplot nasedání v jedné reakci.

PCR s primerem blaTEM byla provedena se vzorky DNA 42 (rezistentní izolát), 11A, 12A, 13A, a jejich 10 $\times$ ředěnými variantami (označené jako 11Ař, 12Ař a 13Ař).

Gradientová PCR s primerem parC byla provedena na vzorcích 38, 38ř (10 $\times$ ředěné), 39 a 40 (rezistentní izoláty), spolu se vzorky 11Ař, 12Ař a 13Ař.

Pro primer aadA2 byla gradientová PCR provedena se vzorky 22 (rezistentní izolát), 11Ař, 12Ař a 13Ař.

Následně byla provedena PCR analýza se zbývajícími primery za použití vzorků DNA označených jako 1A až 10A. U všech těchto vzorků byla DNA před amplifikací 10 $\times$ naředěna, neboť předchozí reakce prokázaly, že koncentrace původních zásobních roztoků byla příliš vysoká.

Vzhledem k rozsahu experimentu byly PCR reakce prováděny paralelně v termocyklech Aeris™ (Esco Micro Pte. Ltd., Singapur) a C1000 Touch™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Podmínky cyklování odpovídaly protokolu uvedenému v Tabulce 7, s výjimkou optimalizačních reakcí pro primery parC, blaTEM a aadA2, jejichž specifické annealingové teploty jsou uvedeny v Tabulkách 8 a 9.

Tabulka 8 Teplota annealingu pro optimalizační PCR s primerem blaTEM.

umístění vzorku v jamce termocykleru	T _a [°C]
C	62,2
E	60,0
H	58,0

Tabulka 9 Teplota annealingu pro optimalizační PCR s primery parC a aadA2.

umístění vzorku v jamce termocykleru	T _a [°C]
A	60,0
C	58,7
E	55,2
H	52,0

Úspěšnost amplifikace PCR produktů byla ověřena ELFO v 1,5 % agarózovém gelu. Příprava a podmínky reakce byly použity shodně jako v kapitole 4.6.1.

4.7.3 qPCR detekce genů antibiotické rezistence ve vybraných vzorcích digestátů

qPCR detekce genů antibiotické rezistence ve vybraných vzorcích digestátů qPCR je kvantitativní metoda umožňující amplifikaci specifických úseků DNA a současné sledování množství vznikajícího PCR produktu v reálném čase. Princip této metody vychází z klasické PCR, liší se však tím, že v každém amplifikačním cyklu je monitorována intenzita fluorescenčního signálu, která je přímo úměrná množství vzniklé dsDNA.

Pro optimalizaci qPCR reakce byly vybrány pouze geny kódující rezistenci vůči ATB z pěti skupin: tetracykliny, ciprofloxaciny, erytromyciny, sulfonamidy a fenikolová ATB. Ke každému ATB byl zvolen jeden ARG, který vykazoval nejlepší výsledky v předchozích PCR experimentech (viz kapitola 5.2) a sice tetW, ermB, parC, sul2 a floR.

Z analyzovaných digestátů byly pro qPCR vybrány vzorky č. 1A, 2A, 6A, 7A a 11A, které vykázaly nejvyšší úspěšnost amplifikace genů ARG napříč sledovaným spektrem. Pro provedení qPCR byla použita komerční směs Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs Inc., Massachusetts, USA). Složení a objem reakční směsi jsou uvedeny v Tabulce 10. Pro každý primer, byla připravena jedna reakční destička, kdy v jedné řadě byly

umístěny ředění jednoho vzorku digestátu, DNA byla naředěna 0krát, 10krát, 100krát, 1000krát a 10000krát. Většina reakční destičky byla připravena pomocí automatizovaného pipetovacího systému (OT-2 Robot; Opentrons labworks, Inc., New York, USA), přičemž negativní kontroly byly na destičku pipetovány manuálně. Jako negativní kontrola byla použita ddH₂O a dále DNA mikroorganismu neobsahujícího geny rezistence k příslušnému ATB, která sloužila jako kontrola falešné positivity.

Amplifikace probíhala v termocykléru C1000 Touch™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) za podmínek uvedených v Tabulce 11, pouze T_a byla upravena na optimální teplotu pro daný primer. Pro primery tetW a sul2 byla zvolena teplota 60 °C, pro ermB a parC teplota 55 °C, pro primer floR teplota 62 °C.

Tabulka 10 Schéma pipetování reakční směsi pro 1 vzorek/20 µl pro qPCR.

Složka PCR reakční směsi	Koncentrace zásobního roztoku	Finální koncentrace	Objem ve 20 µl reakci
2x Master Mix Kit	2x	1x	10
Forward primer	10 µmol.l ⁻¹	0,25 µmol.l ⁻¹	0,5
Reverse primer	10 µmol.l ⁻¹	0,25 µmol.l ⁻¹	0,5
DNA	-	0 až 10 000x ředěná	5
ddH ₂ O	-	-	4

Tabulka 11 Schéma kroků termocykléru pro qPCR.

krok reakce		teplota [°C]	čas	počet cyklů
denaturace		95	60 s	1
syntéza	denaturace	95	15 s	45
	extenze	(dle optim. T _a)	1 min	
extenze		(dle optim. T _a)	10 min	1
denaturace		95		1

5 VÝSLEDKY

5.1 Výsledky analýzy rezistentních izolátů

5.1.1 Koncentrace DNA izolované z rezistentních mikroorganismů

Pomocí Gramova barvení bylo ověřeno, že všechny rezistentní izoláty jsou čisté kultury. Izolace DNA byla úspěšně provedena u všech 51 rezistentních bakteriálních kmenů, také koncentrace DNA, která byla naměřena na zařízení QFX DeNovix (DeNovix, Wilmington, USA), byla vyhodnocena jako dostačující pro následnou amplifikaci a identifikaci izolátů pomocí sangerovi sekvenace (Tab. 12).

Tabulka 12 Koncentrace DNA izolované z čistých kultur rezistentních mikroorganismů.

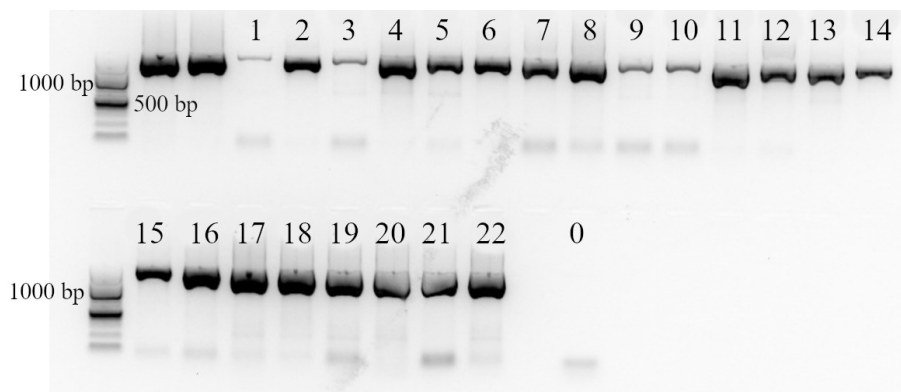
číslo	Rezistence na ATB	koncentrace [ng/μl]	číslo	Rezistence na ATB	koncentrace [ng/μl]
1	tetracyklin	0,41	27	vankomycin	43,40
2	tetracyklin	105,7	28	vankomycin	28,00
3	tetracyklin	19,80	29	vankomycin	17,50
4	tetracyklin	3,65	30	sulfametoxazol	2,23
5	tetracyklin	0,82	31	sulfametoxazol	1,65
6	tetracyklin	2,88	32	sulfametoxazol	11,70
7	vankomycin	2,90	33	sulfametoxazol	1,19
8	vankomycin	4,21	34	sulfametoxazol	5,06
9	erythromycin	14,60	35	tetracyklin	22,90
10	erythromycin	23,40	36	tetracyklin	53,00
11	polymyxin B	28,40	37	tetracyklin	4,34
12	polymyxin B	12,69	38	ciprofloxacin	52,80
13	polymyxin B	4,16	39	ciprofloxacin	46,30
14	polymyxin B	2,09	40	ciprofloxacin	38,20
15	polymyxin B	0,38	41	erythromycin	3,91
16	polymyxin B	0,83	42	ampicilin	24,60
17	erythromycin	4,18	43	chloramfenikol	21,40
18	erythromycin	7,91	44	chloramfenikol	38,60
19	erythromycin	2,04	45	streptomycin	26,90
20	erythromycin	7,94	46	polymyxin B	4,15
21	tetracyklin	47,70	47	sulfametoxazol	10,50
22	streptomycin	5,10	48	sulfametoxazol	27,20
23	vankomycin	12,50	49	vankomycin	33,90
24	vankomycin	16,90	50	chloramfenikol	40,20
25	vankomycin	43,10	51	vankomycin	18,40
26	vankomycin	40,30			

5.1.2 Amplifikace genu 16S rRNA

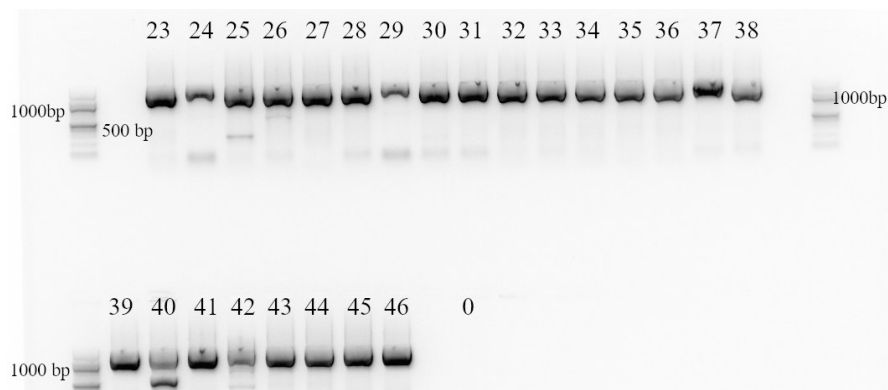
Úspěšnost amplifikace DNA ve všech vzorcích byla ověřena pomocí ELFO, jejíž výsledky jsou zachyceny na Obrázcích 2, 3 a 4.

Ve většině případů byla PCR úspěšná a specifická, což potvrzují jednoznačné pruhy odpovídající očekávané délce amplifikovaných fragmentů. Výjimku představovaly vzorky č. 25, 40 a 50, u nichž byla detekována nespecifická amplifikace dvou produktů různé délky, patrná jako dvojitý band na elektroforegramu (Obr. 3 a 4). Nespecifické produkty však nebyly významně výrazné a pravděpodobně neměly zásadní vliv na další analýzu. K tvorbě nespecifických produktů může během PCR docházet v případě, že se na templátové DNA vyskytují sekvence s částečnou homologií k primerům, na které mohou primery nespecificky nasednout. Alternativním vysvětlením může být fragmentace vzniklého PCR produktu, který byl následně dále amplifikován v dalších cyklech.

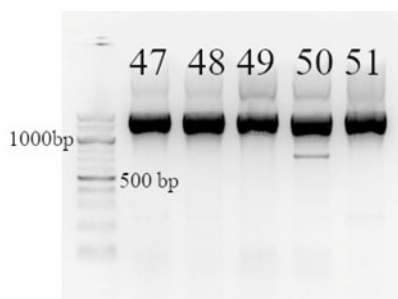
Zbylých 20 μ l reakční směsi bylo použito k purifikaci PCR produktů magnetickým kitem, jejichž koncentrace a čistota byly následně ověřeny spektrofotometricky (viz Tabulka 13). Koncentrace všech vzorků byla vyhodnocena jako dostatečná pro sekvenaci. Poté byla DNA ve vzorcích sekvenována pomocí Sangerova sekvenování.



Obrázek 2 Ověření úspěšnosti amplifikace genu 16S rRNA se vzorky 1-22.



Obrázek 3 Ověření úspěšnosti amplifikace genu 16S rRNA se vzorky 23-46.



Obrázek 2 Ověření úspěšnosti amplifikace genu 16S rRNA se vzorky 47-51.

Tabulka 13 Koncentrace DNA fragmentů po purifikaci.

Číslo vzorku	koncentrace [ng/μl]	Číslo vzorku	koncentrace [ng/μl]
1	3,96	24	22,40
2	36,10	25	51,30
3	8,91	26	52,30
4	56,80	27	60,50
5	30,80	28	49,30
6	40,80	29	18,60
7	32,10	30	61,60
8	53,90	31	72,20
9	8,30	32	60,60
10	11,40	33	54,10
11	61,30	34	56,70
12	30,60	35	59,60
13	31,00	36	63,80
14	19,80	37	51,70
15	17,60	38	58,90
16	30,40	39	66,80
17	49,20	40	35,20
18	49,00	41	55,10
19	19,70	42	62,30
20	43,10	43	60,40
21	25,00	44	22,10
22	42,80	45	52,00
23	58,10	46	50,80

5.1.3 Identifikované mikroorganismy

Výsledky Sangerova sekvenování (viz kapitola 4.5) jsou zaznamenány v Tabulce 14 a 14a, které shrnují taxonomickou identifikaci jednotlivých rezistentních izolátů na úrovni druhu a zařazení do čeledi. Sekvence a identifikace byla úspěšná u všech analyzovaných vzorků. V tabulce je dále uvedeno konkrétní ATB, na které byly jednotlivé rezistentní izoláty rezistentní.

Tabulka 14 Souhrnný seznam identifikovaných rezistentních bakterií.

Číslo vzorku	ATB	Identifikovaný mikroorganismus	Čeleď
1	tetracyklin	<i>Paenaltcaligenes faecalis</i>	<i>Alcaligenaceae</i>
2	tetracyklin	<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i>	<i>Brucellaceae</i>
3	tetracyklin	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Morganellaceae</i>
4	tetracyklin	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Alcaligenaceae</i>
5	tetracyklin	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> / <i>B. velezensis</i> / <i>B. subtilis</i>	<i>Bacillaceae</i>
6	tetracyklin	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> / <i>B. velezensis</i>	<i>Bacillaceae</i>
7	vankomycin	<i>Pseudomonas guangdongensis</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
8	vankomycin	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	<i>Moraxellaceae</i>
9	erythromycin	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Morganellaceae</i>
10	erythromycin	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Morganellaceae</i>
11	polymyxin B	<i>Brevundimonas diminuta</i> / <i>B. naejangsanensis</i>	<i>Caulobacteraceae</i>
12	polymyxin B	<i>Halopseudomonas formosensis</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
13	polymyxin B	<i>Bacillus thuringensis</i> / <i>B. cereus</i>	<i>Bacillaceae</i>
14	polymyxin B	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillaceae</i>
15	polymyxin B	<i>Bacillus pumilus</i> / <i>B. zhangzhouensis</i> / <i>B. stratosphericus</i>	<i>Bacillaceae</i>
16	polymyxin B	<i>Bacillus pumilus</i> / <i>B. zhangzhouensis</i> / <i>B. stratosphericus</i>	<i>Bacillaceae</i>
17	erythromycin	<i>Bacillus sonorensis</i>	<i>Bacillaceae</i>
18	erythromycin	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	<i>Bacillaceae</i>
19	erythromycin	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillaceae</i>
20	erythromycin	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	<i>Bacillaceae</i>
21	tetracyklin	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Morganellaceae</i>
22	streptomycin	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Bacillaceae</i>
23	vankomycin	<i>Comamonas denitrificans</i>	<i>Comamonadaceae</i>
24	vankomycin	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Morganellaceae</i>
25	vankomycin	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
26	vankomycin	<i>Pseudomonas saudiphocaensis</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
27	vankomycin	<i>Comamonas jiangduensis</i>	<i>Comamonadaceae</i>
28	vankomycin	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
29	vankomycin	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Morganellaceae</i>
30	sulfametoxazol	<i>Peribacillus simplex</i> / <i>P. frigoritolerans</i>	<i>Bacillaceae</i>
31	sulfametoxazol	<i>Bacillus tequilensis</i> / <i>B. subtilis</i>	<i>Bacillaceae</i>
32	sulfametoxazol	<i>Paenaltcaligenes hermetiae</i>	<i>Alcaligenaceae</i>
33	sulfametoxazol	<i>Bacillus tequilensis</i> / <i>B. subtilis</i>	<i>Bacillaceae</i>
34	sulfametoxazol	<i>Bacillus subsp.</i>	<i>Bacillaceae</i>
35	tetracyklin	<i>Paenaltcaligenes hermetiae</i>	<i>Alcaligenaceae</i>
36	tetracyklin	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Alcaligenaceae</i>

Tabulka 15a Souhrnný seznam identifikovaných rezistentních bakterií, pokračování.

Číslo vzorku	ATB	identifikovaný mikroorganismus	čeleď
37	tetracyklin	<i>Sporosarcina newyorkensis</i>	<i>Planococcaceae</i>
38	ciprofloxacin	<i>Brevundimonas diminuta</i> / <i>B. naejangsanensis</i> / <i>B. sanguinis</i>	<i>Caulobacteraceae</i>
39	ciprofloxacin	<i>Brevundimonas diminuta</i>	<i>Caulobacteraceae</i>
40	ciprofloxacin	<i>Glutamicibacter sp.</i>	<i>Micrococcaceae</i>
41	erythromycin	<i>Bacillus licheniformis</i> / <i>B. paralicheniformis</i> / <i>B. haynesii</i>	<i>Bacillaceae</i>
42	ampicilin	<i>Aeromonas media</i>	<i>Aeromonadaceae</i>
43	chloramfenikol	<i>Halopseudomonas xiamenensis</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
44	chloramfenikol	<i>Halopseudomonas xiamenensis</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
45	streptomycin	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	<i>Paenibacillaceae</i>
46	polymyxin B	<i>Bacillus tequilensis</i> / <i>B. subtilis</i>	<i>Bacillaceae</i>
47	sulfametoxazol	<i>Peribacillus simplex</i> / <i>P. frigoritolerans</i>	<i>Bacillaceae</i>
48	sulfametoxazol	<i>Mesobacillus foraminis</i>	<i>Bacillaceae</i>
49	vankomycin	<i>Pseudomonas denitricikans</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
50	chloramfenikol	<i>Stutzerimonas nitrititolerans</i> / <i>S. xanthomarina</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
51	vankomycin	<i>Paenibacillus cookii</i>	<i>Paenibacillaceae</i>

Mezi 51 analyzovanými vzorky rezistentních izolátů bylo identifikováno celkem 11 různých čeledí bakterií, přičemž nejvyšší zastoupení vykazovala čeleď *Bacillaceae*, reprezentovaná 19 izoláty. Druhou nejčtetnější skupinou byla čeleď *Pseudomonadaceae* s 9 izoláty, zatímco zbývající čeledi byly mezi rezistentními mikroorganismy zastoupeny jedním až pěti zástupci.

Zástupci čeledi *Bacillaceae* se významně podílejí na procesech AD, jelikož se jedná o sporulující fakultativně anaerobní bakterie. Někteří členové této čeledi, například *Bacillus cereus*, jsou schopni produkovat termostabilní toxiny způsobující potravinové intoxikace. Tato čeleď je rovněž často spojována s výskytem rezistence vůči ATB, zejména vankomycinu, erytromycinu a gentamycinu. Různé studie prokázaly vysoký podíl rezistentních zástupců této čeledi v digestátech, bez ohledu na typ vstupní suroviny, ať už se jednalo o živočišný hnůj nebo zbytky potravin, přičemž *Bacillaceae* byly ve srovnání s jinými čeleděmi dominantní. [9, 10, 11]

Druhá nejpočetnější čeleď *Pseudomonadaceae* zahrnuje bakterie s vysokou ekologickou plasticitou a širokým metabolickým spektrem, což jim poskytuje významnou evoluční výhodu. Významným zástupcem této čeledi je *Pseudomonas aeruginosa*, známá

jako původce nozokomiálních infekcí, přičemž její rezistence vůči více typům ATB představuje závažný problém v klinické praxi. Rezistentní kmeny rodu *Pseudomonas* jsou často detekovány ve vodním a odpadním prostředí, kde se vyskytují ve vysoké míře. [12]

Z čeledi *Morganellaceae* byl jako významný patogenní zástupce identifikován druh *Proteus mirabilis*, známý jako etiologický agens infekcí močových cest. Tento druh byl detekován ve třech různých vzorcích (10, 21 a 29), přičemž vykazoval rezistenci vůči erytromycinu, tetracyklinu a vankomycinu. Dalším identifikovaným patogenem z této čeledi byl *Providencia alcalifaciens*, bakterie způsobující průjemová onemocnění u lidí i zvířat. [13, 14]

Ze skupiny dalších identifikovaných patogenů byl rovněž detekován druh *Aeromonas media* z čeledi *Aeromonadaceae*, který je rovněž spojován s alimentárními průjemovými nemocemi. Tento mikroorganismus je typicky vázán na vodní prostředí, kde se přirozeně vyskytuje. [15]

5.1.4 Výsledky detekce genů rezistence ve vybraných rezistentních izolátech

Před samotným zahájením experimentální části bylo nezbytné provést literární rešerši a následný výběr relevantních ARG asociovaných s mikroorganismy běžně se vyskytujícími v odpadních produktech zemědělské výroby. Tato rešerše byla provedena ve spolupráci s doc. Mgr. Magdou Janalíkovou, Ph.D., Ing. Janou Šerou, Ph.D., a Mgr. Adélou Baťovou. Na jejím základě byla sestavena Tabulka 15 a 15a, která shrnuje přehled vybraných genů antibiotické rezistence, cílových antibiotik a stručný popis jejich mechanismu účinku.

Na základě této rešerše byly ke zvoleným genům následně vybrány specifické primery vhodné pro qPCR, jak je uvedeno v kapitole 4.6 a v Tabulce 6 a 6a.

Tabulka 16 Seznam vybraných antibiotik a genů rezistence.

Skupina ATB	Gen	Princip funkce genu
tetracykliny	tetA	metal-tetracyklin/H ⁺ antiporter (efluxní pumpa) [41]
tetracykliny	tetC	metal-tetracyklin/H ⁺ antiporter (efluxní pumpa) [41]
tetracykliny	tetW	způsobuje nekovalentní modifikace ribozomů [38]
tetracykliny	tetM	způsobuje nekovalentní modifikace ribozomů [38]
makrolidy	ermA	methylují adenin v 23S rRNA - modifikace ribozomů [42]
makrolidy	ermB	methylují adenin v 23S rRNA - modifikace ribozomů [42]
makrolidy	Msr(A/B)	ABC-F protein (transportní pumpa) [43]

Tabulka 15a Seznam vybraných antibiotik a genů rezistence, pokračování.

Skupina ATB	Gen	Princip funkce genu
makrolidy	mefA	efluxní pumpa, patřící do Major Facilitator Superfamily (MFS) ^[43]
fluorochinolony	gyrA	mutace genu způsobují změny v podjednotce A DNA gyrázy ^[44]
fluorochinolony	qepA	chinolonová pumpa (patří do MFS) ^[45]
fluorochinolony	qnrA	mutace genu způsobují změny DNA gyrázy a topoisomerázy IV ^[46]
fluorochinolony	parC	mutace genu způsobí změny struktury topoisomerázy IV ^[44]
vankomyciny	VanA	protein vytvářející ester D-alanin : D-lactát v buněčné stěně ^[47]
vankomyciny	VanB	protein vytvářející ester D-alanin : D-lactát v buněčné stěně ^[47]
vankomyciny	VanD	protein vytvářející ester D-alanin : D-lactát v buněčné stěně ^[47]
betalaktamy	blaTEM	TEM β -laktamáza hydrolyzující β -laktamové kruhy ^[48]
betalaktamy	blaSHV	SHV β -laktamáza hydrolyzující β -laktamové kruhy ^[48]
betalaktamy	mecA	low-affinity penicillin-binding protein (PBP) – PBP 2A, ochrana proteosyntézy ^[56]
betalaktamy	blaZ	Z β -laktamázu hydrolyzující β -laktamové kruhy ^[48]
polymyxiny	mcr-1	MCR-1 protein, fungující jako lipid A fosfoethanolamin transferáza (změna stavby buněčné stěny) ^[49]
polymyxiny	mcr-2	MCR-2 protein, fungující jako lipid A fosfoethanolamin transferáza (změna stavby buněčné stěny) ^[49]
fenikolová ATB	catI	protein CAT (chloramfenikol acetyl transferasa) ^[50]
fenikolová ATB	catIII	protein CAT (chloramfenikol acetyl transferasa) ^[50]
fenikolová ATB	floR	enzym acetylující florfenikol ^[39]
aminoglykosidy	strA	enzymy aminoglykosid-3"-fosfotransferázu (APH(3")-Ib) a aminoglykosid-6-fosfotransferázu (APH(6)-Id) ^[51]
aminoglykosidy	strB	enzymy aminoglykosid-3"-fosfotransferázu (APH(3")-Ib) a aminoglykosid-6-fosfotransferázu (APH(6)-Id) ^[51]
aminoglykosidy	aadA2	enzym aminoglykosid-nukleotidyltransferáza ^[51]
aminoglykosidy	rpsL	mutace genu způsobují změny ve stavbě 12S podjednotce 30S rRNA ribozomů ^[51]
sulfonamidy	sul1	protein dihydropteorát syntáza (DHPs), alternativní cesta syntézy kyseliny listové ^[52]
sulfonamidy	sul2	DHPs, alternativní cesta syntézy kyseliny listové ^[52]
sulfonamidy	sul3	DHPs, alternativní cesta syntézy kyseliny listové ^[52]
MGEs	int12	mobile genetic elements, zkřížená rezistence na více ATB ^[40]

Primery byly rozděleny do tří skupin dle T_a , konkrétně na 50 °C, 55 °C a 60 °C, tak, aby se experimentální T_a co nejvíce přiblížila optimální hodnotě daného primeru (viz. Tab. 16 a 17). Ke každému primeru byly zpravidla vybrány alespoň dva reprezentativní vzorky s důrazem na zachování diverzity bakteriálních čeledí. Do skupiny s T_a 55 °C byly zařazen pouze primery int12, které byly použity výhradně na izolátech z digestátů (viz kapitola 4.6).

Tabulka 17 Vzorky izolátů vybraných pro zkoušku primerů skupiny T_a 50°C.

Skupina T_a 50°C			
Název skupiny primerů	T_a optimum [°C]	číslo vzorku	Čeď
tetM	55	2	<i>Brucellaceae</i>
		6	<i>Bacillaceae</i>
ermA	55	10	<i>Morganellaceae</i>
		41	<i>Bacillaceae</i>
MsrA/B	52	10	<i>Morganellaceae</i>
		41	<i>Bacillaceae</i>
qepA	48	38	<i>Caulobacteraceae</i>
		40	<i>Micrococcaceae</i>
qnrA	51	38	<i>Caulobacteraceae</i>
		40	<i>Micrococcaceae</i>
parC	55	38	<i>Caulobacteraceae</i>
		40	<i>Micrococcaceae</i>
VanA	52	49	<i>Pseudomonadaceae</i>
		51	<i>Paenibacillaceae</i>
VanB	52	49	<i>Pseudomonadaceae</i>
		51	<i>Paenibacillaceae</i>
cat III	50	43	<i>Pseudomonadaceae</i>
		50	<i>Pseudomonadaceae</i>

Tabulka 18 Vzorke izolátů vybraných pro zkoušku primerů skupiny T_a 60°C.

Skupina T _a 60°C			
Název primeru	T _a [°C]	optimum	číslo vzorku Čeleď
tetA	60		2 <i>Brucellaceae</i>
			6 <i>Bacillaceae</i>
tetC	68		2 <i>Brucellaceae</i>
			6 <i>Bacillaceae</i>
tetW	64		2 <i>Brucellaceae</i>
			6 <i>Bacillaceae</i>
ermB	58		10 <i>Morganellaceae</i>
			41 <i>Bacillaceae</i>
mefA	57		10 <i>Morganellaceae</i>
			41 <i>Bacillaceae</i>
gyrA	57		38 <i>Caulobacteraceae</i>
			40 <i>Micrococcaceae</i>
VanD	64		49 <i>Pseudomonadaceae</i>
			51 <i>Paenibacillaceae</i>
blaTEM	60		42 <i>Aeromonadaceae</i>
blaSHV	60		42 <i>Aeromonadaceae</i>
mecA	60		42 <i>Aeromonadaceae</i>
blaZ	60		42 <i>Aeromonadaceae</i>
mcr1	67		11 <i>Caulobacteraceae</i>
			12 <i>Pseudomonadaceae</i>
mcr2	59		11 <i>Caulobacteraceae</i>
			12 <i>Pseudomonadaceae</i>
sul1	60		31 <i>Bacillaceae</i>
			32 <i>Alcaligenaceae</i>
sul2	59		31 <i>Bacillaceae</i>
			32 <i>Alcaligenaceae</i>
sul3	61		31 <i>Bacillaceae</i>
			32 <i>Alcaligenaceae</i>
cat I	57		43 <i>Pseudomonadaceae</i>
			50 <i>Pseudomonadaceae</i>
floR	67		43 <i>Pseudomonadaceae</i>
			50 <i>Pseudomonadaceae</i>
strA	60		22 <i>Bacillaceae</i>
			45 <i>Paenibacillaceae</i>
strB	60		22 <i>Bacillaceae</i>
			45 <i>Paenibacillaceae</i>
aadA2	60		22 <i>Bacillaceae</i>
			45 <i>Paenibacillaceae</i>
rpsL	60		22 <i>Bacillaceae</i>
			45 <i>Paenibacillaceae</i>

Tabulka 19 Výsledky detekce genů rezistence u vybraných DNA rezistentních bakterií.

Název primeru	Skupina ATB	výsledek PCR	Název primeru	Skupina ATB	výsledek PCR
tetA	tetracykliny	-	mecA	betalaktamy	-
tetC	tetracykliny	-	blaZ	betalaktamy	-
tetW	tetracykliny	-	mcr1	polymyxiny	-
tetM	tetracykliny	-	mcr2	polymyxiny	-
ermA	makrolidy	-	sul1	sulfonamidy	-
ermB	makrolidy	-	sul2	sulfonamidy	vz.31 -
Msr(A/B)	makrolidy	-			vz.32 +
mefA	makrolidy	-	sul3	sulfonamidy	-
gyrA	fluorochinolony	-	catI	fenikol. ATB	-
qepA	fluorochinolony	-	catIII	fenikol. ATB	-
qnrA	fluorochinolony	-	floR	fenikol. ATB	-
parC	fluorochinolony	-	strA	aminoglykosidy	vz.22 +
VanA	vankomyciny	-			vz.45 +
VanB	vankomyciny	-	strB	aminoglykosidy	-
VanD	vankomyciny	-	aadA2	aminoglykosidy	vz.22 +
blaTEM	betalaktamy	-			vz.45 +
blaSHV	betalaktamy	-	rpsL	aminoglykosidy	-

Tabulka 18 shrnuje výsledky detekce vybraných ARG u rezistentních izolátů, pozitivní záchyt byl pouze u genu sul2, strA a aadA2. Na elektroforetických gelech byla pozorována výrazná míra nespecifických amplifikačních produktů, případně k amplifikaci cílového fragmentu nedošlo vůbec. Tato skutečnost může být vysvětlena několika faktory. Jedním z nich je skutečnost, že existuje široké spektrum ARG, přičemž v této práci byl analyzován pouze omezený výběr cílových sekvencí, což mohlo vést k nízkému zachytu [37].

Použitý komerční izolační kit je určen k izolaci celkové DNA, která zahrnuje jak chromozomální, tak plazmidovou složku, jelikož tato DNA byla použita také pro identifikaci mikroorganismů pomocí sekvenování. Z časových a finančních důvodů již nebyla izolována kitem pro izolaci plazmidové DNA. Snímky z ELFO, ze kterých bylo provedeno vyhodnocení a kompletní Tabulka 18 se nacházejí v Příloze I.

Jedním z dalších důvodů nízkého zachytu genů rezistence může být i skutečnost, že DNA byla extrahována z kolonií rostoucích na pevném médiu, které obecně poskytuje menší množství biomasy ve srovnání s kultivací v tekutém médiu. Kultivace mikroorganismů v

tekutém médiu zpravidla umožňuje získat vyšší koncentraci buněk, což může vést k větší výtěžnosti a kvalitnější izolaci DNA pro následné analýzy.

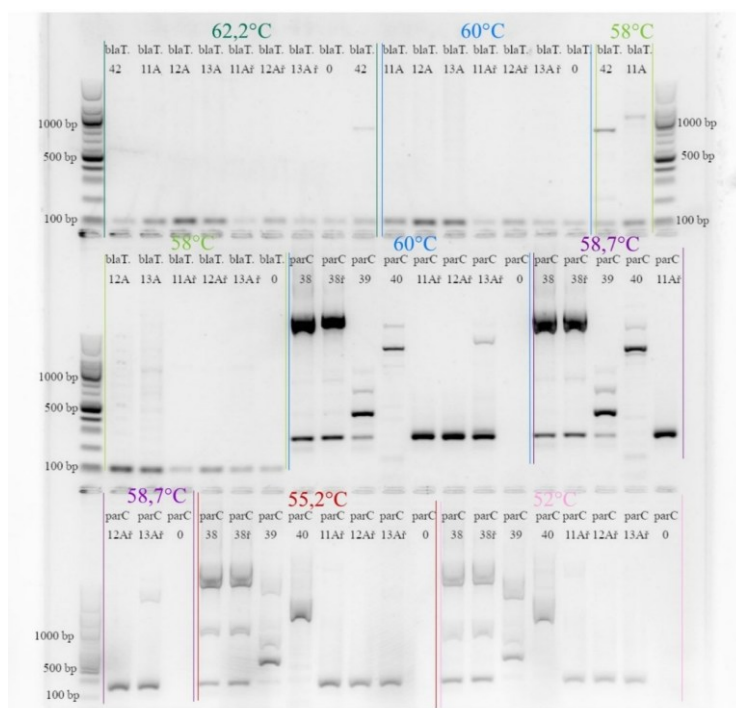
Vzhledem k cílům bakalářské práce (detekce genů rezistence přímo v digestátu) nebyla dále metodika detekce genů v izolovaných mikroorganismech optimalizována. Vybrané izoláty však budou dále charakterizovány pomocí celogenomového sekvenování, které umožní identifikaci všech genů, včetně těch, jež nebyly zachyceny předchozími metodami.

5.2 Screening genů rezistence v digestátech pomocí PCR

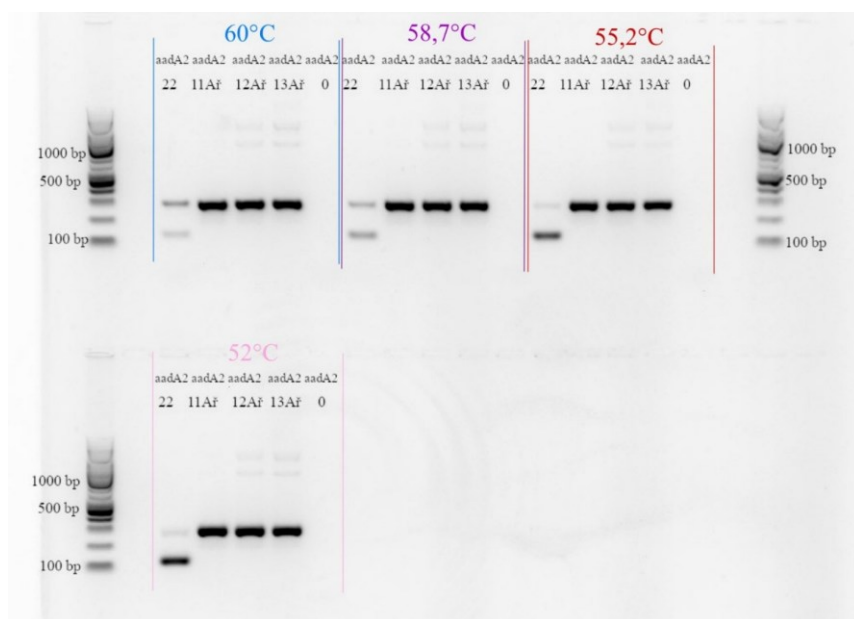
Po provedené izolaci DNA (viz kapitola 4.7.1) byla fotometrickou metodou stanovena koncentrace a čistota získaných vzorků DNA (Tab. 19). Izolace byla vyhodnocena jako velmi úspěšná, neboť se podařilo získat DNA s vysokou koncentrací a odpovídající čistotou, která je vhodná pro následné analýzy. DNA byla izolována z každého vzorku v triplicátech (A, B, C).

Tabulka 20 Naměřené koncentrace DNA po izolaci z digestátů.

číslo vzorku	koncentrace [ng/μl]	číslo vzorku	koncentrace [ng/μl]	číslo vzorku	koncentrace [ng/μl]
1A	283,4	1B	349,9	1C	277,8
2A	157,0	2B	118,4	2C	92,1
3A	183,1	3B	152,4	3C	115,2
4A	190,3	4B	172,5	4C	160,2
5A	108,3	5B	97,4	5C	96,2
6A	159,4	6B	158,1	6C	196,2
7A	132,0	7B	135,3	7C	124,4
8A	123,3	8B	116,6	8C	131,3
9A	220,2	9B	177,4	9C	197,9
10A	145,3	10B	152,9	10C	106,2
11A	135,6	11B	140,5	11C	205,2
12A	156,0	12B	184,7	12C	189,4
13A	323,6	13B	140,7	13C	188,0



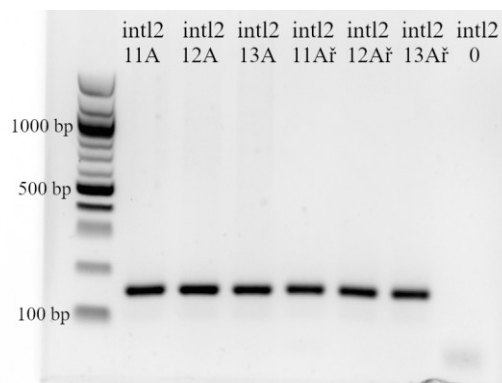
Obrázek 4 Výsledky gradientové PCR s primery blaTEM (blaT.) a parC.



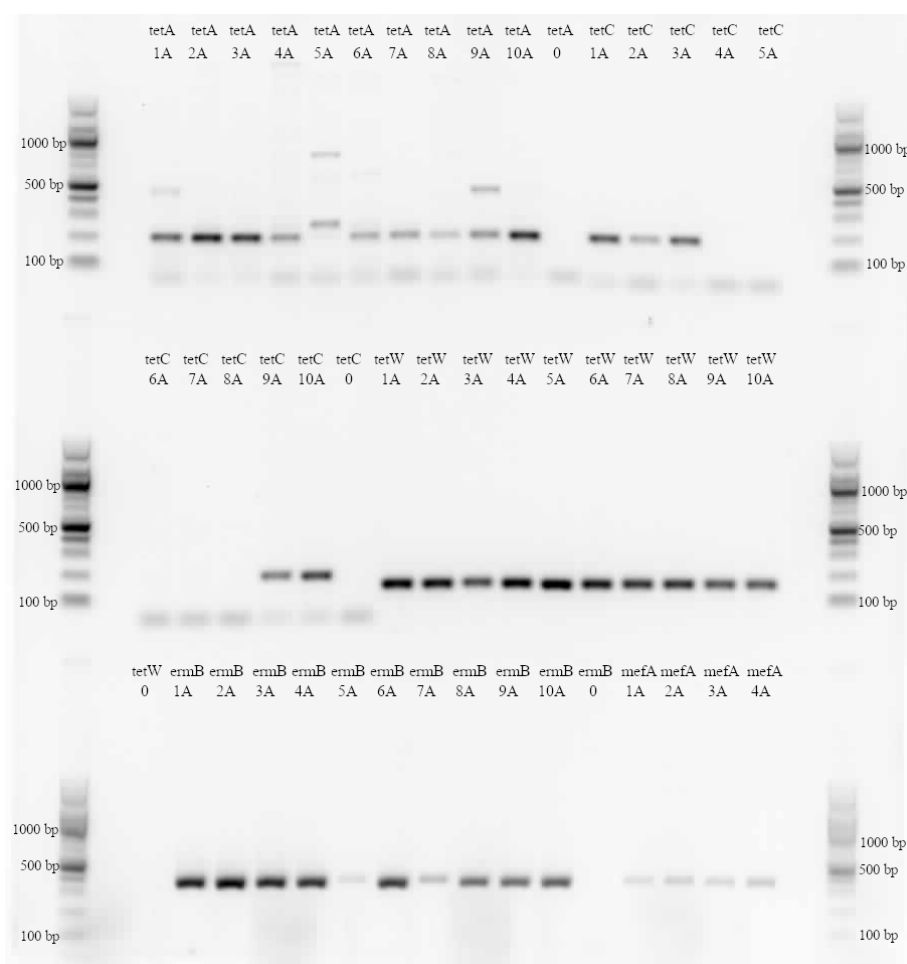
Obrázek 3 Výsledky gradientové PCR s primerem aadA2.

Po vyhodnocení detekce ARG u vybraných izolátů byla provedena optimalizace PCR reakcí pro primery blaTEM, parC a aadA2, u nichž bylo zjištěno, že použité podmínky annealingu neodpovídaly optimálním hodnotám doporučeným výrobcem. Kromě DNA rezistentních izolátů byla do reakcí přidána desetkrát ředěná DNA z digestátů 11A, 12A a 13A. Výsledky ELFO jsou zobrazeny na Obrázcích 5 a 6. Na základě elektroforegramů bylo

určeno, že optimální T_a jsou 60 °C pro primer blaTEM, 55 °C pro primer parC a 60 °C pro primer aadA2.



Obrázek 7 Amplifikace genu *intl2* se vzorky DNA 1A, 2A a 3A.



Obrázek 8 Amplifikace genů *tetA*, *tetC*, *tetW* a *ermB* se vzorky DNA 1A-10A.

Screening výskytu ARG ve vzorcích DNA izolovaných přímo z digestátů vykázal výrazně vyšší úspěšnost ve srovnání s detekcí v DNA rezistentních izolátů. Nejčastěji detekovanými geny byly *tetW*, *ermB*, *sul2*, *strA* a *strB*. Tyto geny byly úspěšně amplifikovány ve všech analyzovaných vzorcích, přičemž amplifikační produkty odpovídaly očekávané délce a nebyla pozorována tvorba nespecifických produktů.

Detekovány byly také geny *sul1*, *floR*, *aadA2* a *intl2*, u nichž byla přítomnost cílové sekvence potvrzena ve 12 ze 13 vzorků. I v tomto případě byla amplifikace vysoce specifická a bez vedlejších produktů. U 13 z celkových 31 sledovaných genů byla amplifikace cílové DNA méně efektivní, v některých případech nebyl cílový úsek vůbec amplifikován nebo reakce produkovaly vysoký podíl nespecifických produktů. Do této skupiny spadají geny *tetM*, *gyrA*, *qepA*, *VanA*, *VanB*, *VanC*, *blaSHV*, *mecA*, *blaZ*, *mcr1*, *mcr2*, *catI* a *catII*. Tyto geny se ve většině vzorků digestátů pravděpodobně nevyskytovaly a rezistence na příslušná antibiotika byla zřejmě způsobena přítomností jiných genů rezistence.

Vzorky digestátů s nejvyšším počtem detekovaných ARG byly 1A, 2A, 3A, 6A, 9A, 12A a 13A. Výskyt ARG v digestátech výrazně koreluje se složením vstupních surovin používaných při výrobě bioplynu, které určují jak bakteriální konsorcium, tak i diverzitu přítomných genů.

U vzorků 12A a 13A byl součástí vstupní suroviny pro anaerobní digestci hnůj pocházející z chovů koní a skotu. Zatímco v zemědělských provozech s mléčným skotem se antibiotika používají pouze v nezbytných případech, především z důvodu vysokých nákladů a přísné kontroly obsahu reziduí v mléce, v hobby chovech koní je situace odlišná ^[53]. Indikace ATB v zájmových chovech nepodléhá tak přísné restrikci jako je tomu u živočišné produkce ^[57]. Koně se běžně dožívají vyššího věku a chovatelé často věnují značnou péči zdravotnímu stavu zvířat, což může zahrnovat častější podávání ATB a dalších léčiv. Trus těchto zvířat tak představuje významný vektor šíření ARG. U vzorků 6A a 7A byla také jednou ze vstupních surovin kravská kejda, dále u vzorku 2A kejda prasat. I u těchto vzorků bude mít pravděpodobně vliv na výskyt ARG množství a druhy ATB využívané v těchto chovech.

Vzorky 1A, 3A, 9A a 10A pocházely z ČOV, kam může přitékat odpadní voda z domácností, zemědělských provozů, zdravotnických zařízení a pečovatelských domovů. Tyto zdroje mohou obsahovat stopová množství ATB a mikroorganismy nesoucí geny ARG, a tím přispívat k jejich akumulaci v digestátech. Tyto vzorky sloužily jako kontrola a srovnání pro vzorky z bioplynových stanic. U vzorků 7A a 11A nám bohužel nebyly poskytnuty informace o vstupních surovinách pro AD, takže nemůžeme výskyt ARG porovnat s ostatními vzorky. Víme pouze, že vzorky pocházejí ze zemědělských bioplynových stanic.

Výsledky detekce ARG jsou shrnuty v tabulce č. 20, která byla sestavena na základě analýzy snímků z ELFO. Ilustrativní příklady výsledků amplifikace genů *intl2*, *tetA*, *tetC*,

tetW, ermB a mefA jsou vyobrazeny na obrázcích 7 a 8. Kompletní dokumentace ostatních amplifikovaných genů je obsažena v Příloze II.

Tabulka 21 Výsledky detekce genů rezistence u DNA izolované z digestátů.

Název primeru	Skupina ATB	výsledek PCR
tetA	tetracykliny	pozitivní u všech digestátů s výjimkou 5A a 9A
tetC	tetracykliny	pozitivní u vzorků 1A, 2A, 3A, 9A, 10A
tetW	tetracykliny	pozitivní u všech vzorků digestátů
tetM	tetracykliny	negativní u všech vzorků digestátů
ermA	makrolidy	pozitivní u vzorků 2A, 3A, 8A
ermB	makrolidy	pozitivní u všech vzorků digestátů
Msr(A/B)	makrolidy	pozitivní u vzorku 3A
mefA	makrolidy	pozitivní u vzorků 1A, 2A, 3A, 4A, 6A, 7A, 8A, 9A
gyrA	fluorochinolony	negativní u všech vzorků digestátů
qepA	fluorochinolony	negativní u všech vzorků digestátů
qnrA	fluorochinolony	pozitivní u vzorku 6A, 12A, 13A
parC	fluorochinolony	pozitivní u vzorků 1A, 11A, 12A, 13A
VanA	vankomyciny	negativní u všech vzorků digestátů
VanB	vankomyciny	negativní u všech vzorků digestátů
VanD	vankomyciny	negativní u všech vzorků digestátů
blaTEM	betalaktamy	pozitivní u vzorků 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 11A, 12A, 13A
blaSHV	betalaktamy	negativní u všech vzorků digestátů
mecA	betalaktamy	negativní u všech vzorků digestátů
blaZ	betalaktamy	negativní u všech vzorků digestátů
mcr1	polymyxiny	negativní u všech vzorků digestátů
mcr2	polymyxiny	negativní u všech vzorků digestátů
sul1	sulfonamidy	pozitivní u všech vzorků s výjimkou 1A
sul2	sulfonamidy	pozitivní u všech vzorků digestátů
sul3	sulfonamidy	pozitivní u 1A
cat I	fenikol. ATB	negativní u všech vzorků digestátů
cat III	fenikol. ATB	negativní u všech vzorků digestátů
floR	fenikol. ATB	pozitivní u všech vzorků s výjimkou 5A
strA	aminoglykosidy	pozitivní u všech vzorků digestátů
strB	aminoglykosidy	pozitivní u všech vzorků digestátů
aadA2	aminoglykosidy	pozitivní u všech vzorků s výjimkou 8A
rpsL	aminoglykosidy	pozitivní u všech vzorků s výjimkou 1A, 2A, 3A
intl2	GMEs	pozitivní u všech vzorků s výjimkou 9A

Evropská agentura pro léčivé přípravky (European Medical Agency, EMA) vydala kategorizaci ATB pro použití ve veterinární medicíně v rámci EU. ATB jsou v tomto systému rozdělena do čtyř kategorií (A–D) na základě rizika vzniku antimikrobiální rezistence a jejich významu pro humánní medicínu. [57]

Kategorie A („Avoid“) zahrnuje ATB s nejvyšším rizikem rozvoje rezistence a jejich použití ve veterinární medicíně je zakázáno, s výjimkou individuální léčby zájmových zvířat (např. psů, koček, koní). Podle klasifikace EMA spadají tetracykliny a sulfonamidy do kategorie D („Prudence“), tedy skupiny antibiotik, jejichž použití je veterinárními lékaři obecně považováno za přijatelné v běžné praxi. Geny rezistence na tetracykliny (tet) a sulfonamidy (sul) jsou svým výskytem často spojovány s odpady z živočišné produkce [36]. Gen blaTEM je spojen především s rezistencí na peniciliny, které EMA zařazuje do kategorie D. Ostatní testované geny pro rezistenci k betalaktamovým ATB kódují rezistenci ke konkrétním ATB (např. cefalosporiny), které spadají do kategorie B. Tyto geny nebyly ve vzorcích detekovány. Testované geny spojené s rezistencí k aminoglykosidům především (strA a strB) byly široce detekovány ve vzorcích digestátů, tyto geny jsou spojeny s rezistencí na aminoglykosidy, které EMA většinou řadí do kategorií C nebo D v závislosti na konkrétním antibiotiku. Pro většinu běžně používaných aminoglykosidů ve veterinární medicíně platí, že patří spíše do kategorie D. Vysoká frekvence výskytu genů skupiny tet, sul, str a genu blaTEM v analyzovaných vzorcích odpovídá právě tomuto zařazení a jejich rozšířenému využití v chovech hospodářských zvířat. [57]

Makrolidy a fenikoly jsou klasifikovány jako kategorie C („Caution“), což znamená, že by měly být nasazeny pouze tehdy, není-li dostupná vhodná alternativa z kategorií D. Přesto byl gen ermB, související s rezistencí k makrolidům, detekován ve všech vzorcích digestátů, což naznačuje, že tyto látky mohou být využívány častěji než doporučuje regulace, nebo že geny rezistence přetrvávají dlouhodobě v prostředí. Podobně byl gen floR, asociovaný s fenikoly, nalezen téměř ve všech vzorcích (s výjimkou 5A), což rovněž podporuje obavy z přetrvávající environmentální zátěže rezistentními determinanty i u méně běžně používaných antibiotik. [57]

Fluorochinolony jsou zařazeny do kategorie B („Restrict“) a jejich použití by mělo být omezeno na specifické klinické případy, vždy s testem citlivosti. Přesto byly geny spojené s rezistencí vůči této skupině (parC a qnrA) detekovány ve vybraných vzorcích. parC byl přítomen např. ve vzorcích 12A a 13A, u nichž byla vstupní surovina tvořena mimo jiné hnojem z hobby chovu koní – sektoru, který není pod tak přísnou kontrolou jako produkční

zemědělství. Výskyt těchto genů může být důsledkem jak dřívějšího používání fluorochinolonů, tak jejich perzistence v životním prostředí. [57]

Naopak geny, jejichž přítomnost je spojena s antibiotiky přísně omezenými či zakázanými (např. vankomyciny – VanA, VanB, VanC, polymyxiny – mcr1, mcr2, některé betalaktamy – blaZ, mecA, nebo chloramfenikoly – catI, catIII) nebyly ve vzorcích digestátů detekovány nebo byly přítomny ve velmi nízké míře. Tyto výsledky odpovídají zařazení těchto antibiotik do kategorie A nebo B, kdy jejich použití ve veterinární medicíně je buď zakázáno, nebo silně omezeno. [57]

5.3 Geny detekované v digestátech pomocí qPCR

Pomocí qPCR byly získány hodnoty Ct (threshold cycle) pro jednotlivé vzorky digestátů. Tyto hodnoty poskytují informace o množství cílových genů rezistence přítomných ve vzorcích. Součástí výsledků jsou také amplifikační křivky, které potvrzují správný průběh reakce a specifitu amplifikace. Příklad amplifikačních křivek je znázorněn na Obrázku 9, který ukazuje průběh amplifikace v čase pro gen tetW ve vzorku digestátu 2A. Před samotným vyhodnocením dat bylo nezbytné zkontrolovat a případně upravit hodnoty prahové linie (threshold baseline), jelikož určité základní úrovně fluorescence jsou přítomny ve všech jamkách již před začátkem detekovatelné amplifikace. Tyto hodnoty se mohou mezi jamkami mírně lišit. Software pro qPCR využívá algoritmus pro odečtení prahové linie, který nastavuje všechny hodnoty baseline na stejnou hodnotu. Tímto způsobem jsou hodnoty Ct určovány ze stejného výchozího bodu, což zajišťuje konzistenci mezi vzorky. [54]

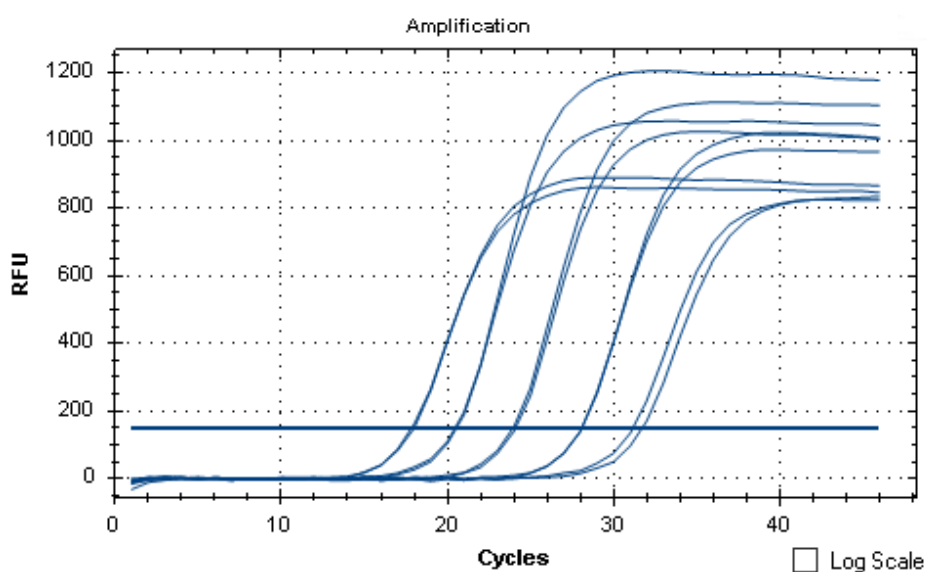
Nejdůležitějším výstupem qPCR jsou hodnoty Ct [54]. Pro každé ředění byly provedeny dvě reakce a výsledné hodnoty Ct byly zprůměrovány. V případech, kdy hodnoty mezi sebou výrazně nekorelovaly, byly odlehle výsledky vyřazeny. Kompletní přehled hodnot Ct je uveden v Příloze P III.

Pomocí qPCR byla sledována amplifikace DNA genů tetW, ermB, floR, sul2 a parC ve vzorcích 1A, 2A, 6A, 7A a 11A. Tyto geny byly vybrány s ohledem na pokrytí co největšího spektra skupin ATB a také na výsledky předešlé PCR analýzy, neboť u většiny těchto genů byl vysoký záchyt napříč vzorky digestátů.

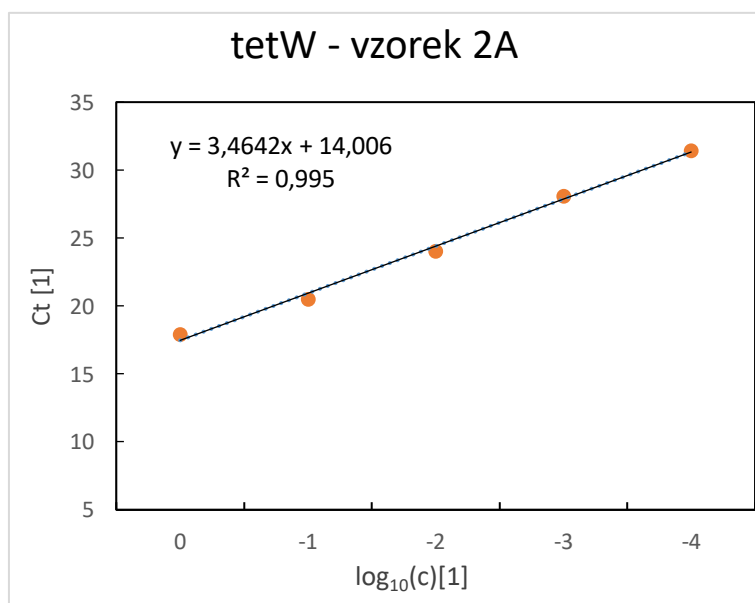
V programu Microsoft Excel byly z hodnot Ct (osa y) a desítkového logaritmu koncentrace (osa x) vytvořeny standardní křivky. Měřené body byly proloženy spojnici, ke které byla automaticky přiřazena rovnice přímky a korelační koeficient (R^2). Hodnota R^2 by

měla ideálně přesahovat 0,97, což potvrzuje kvalitu lineární závislosti mezi logaritmem koncentrace a hodnotami Ct. Na základě rovnice standardní křivky byla následně vypočtena reakční efektivita a provedena absolutní kvantifikace, tedy určení množství cílové sekvence DNA ve vzorku. [54, 55]

Hodnota R^2 ve všech případech přesáhla požadovanou mez 0,97. Efektivita qPCR by se ideálně měla pohybovat v rozmezí 90–110 % [55]. U většiny vzorků byly tyto hodnoty v akceptovatelném rozmezí. Pro ilustraci výsledků qPCR byl zvolen vzorek digestátu 2A a gen tetW. Na tomto příkladu jsou prezentovány amplifikační křivky (Obrázek 9) a rovnice regrese (Obrázek 10). Efektivita této reakce byla 94,4 % a R^2 0,99.



Obrázek 9 Amplifikační křivky qPCR genu tetW, vzorek 2A.



Obrázek 10 Graf standardní křivky genu tetW, vzorek 2A.

Efektivita qPCR pro geny *floR* a *parC* překročila hodnotu 110 %, což naznačuje možnou nespecifickou amplifikaci nebo suboptimální podmínky reakce. Z tohoto důvodu bude nutná další optimalizace qPCR protokolů pro tyto geny v rámci budoucí práce. Výsledné kvantifikace těchto dvou genů je proto třeba považovat za orientační. V následujících sloupcových grafech (Obr. 11–15) jsou porovnány hodnoty *Ct* jednotlivých 10krát ředěných vzorků DNA při amplifikaci jednotlivých genů rezistence.

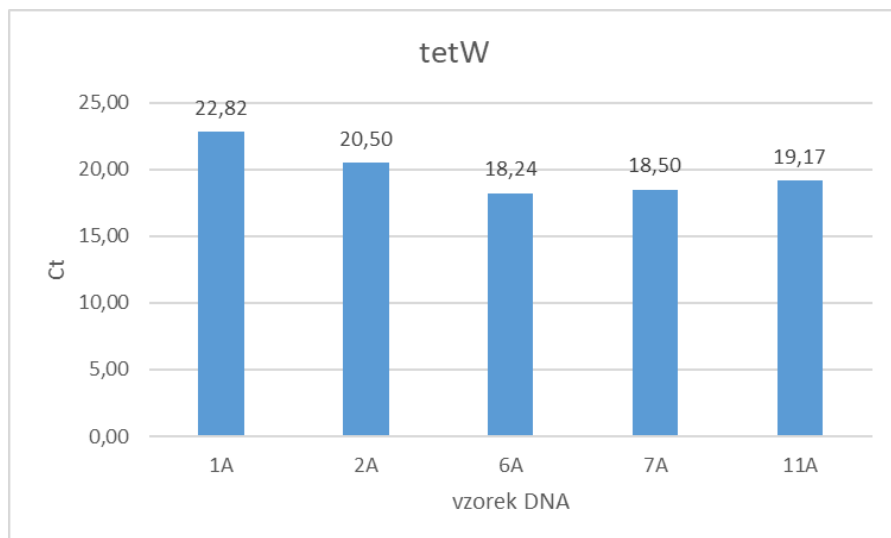
Na Obrázku 11 jsou znázorněny hodnoty *Ct* pro gen *tetW*. Obecně platí, že čím nižší je hodnota *Ct*, tím větší množství cílové DNA bylo ve vzorku přítomno na počátku reakce ^[55]. Hodnota *Ct* tedy úzce koreluje s koncentrací cílové DNA ve vzorku. Nejnižších hodnot *Ct* bylo dosaženo u vzorků 6A a 7A, což svědčí o nejvyšší koncentraci genu *tetW* napříč testovanými geny.

Obrázek 12 znázorňuje srovnání hodnot *Ct* při amplifikaci genu *ermB*. Většina hodnot *Ct* je poměrně nízká, což ukazuje na dostatečné množství cílového genu ve vzorcích. Nejnižších hodnot bylo dosaženo u vzorků 1A a 2A, což naznačuje, že ve jmenovaných vzorcích je nejvyšší koncentrace genu *ermB*.

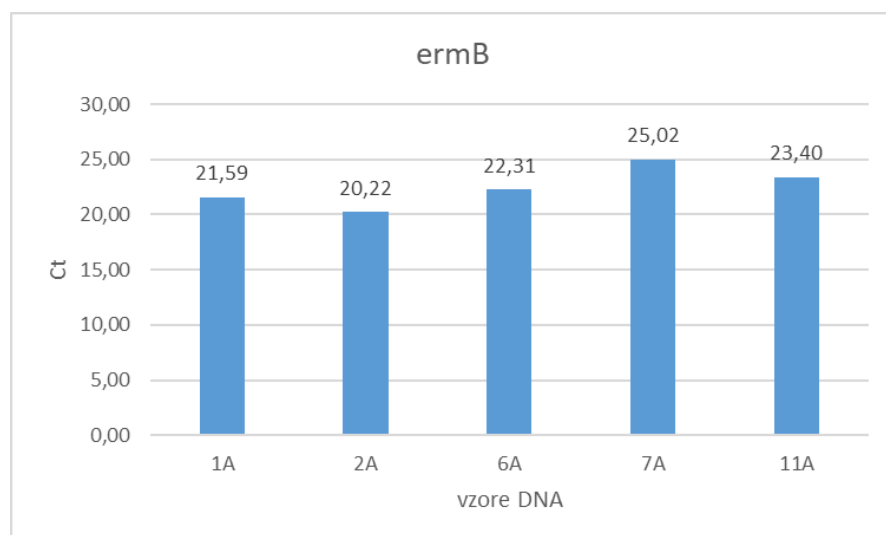
Na Obrázku 13 jsou zobrazeny výsledky amplifikace genu *floR*. Ve vzorcích 1A, 6A a 7A byly zaznamenány vysoké hodnoty *Ct*. qPCR pro amplifikaci tohoto genu vyžaduje optimalizaci, ovšem v předešlé PCR analýze byl záchyt genu *floR* ve vzorcích 1A, 6A a 7A velmi nízký, z toho důvodu jsou hodnoty *Ct* vyšší.

Obrázek 14 zobrazuje výsledky *Ct* pro gen *sul2*, přičemž vzorek 11A vykazuje nejnižší hodnotu *Ct*, což značí že ve vzorku je nejvyšší koncentrace genu *sul2*.

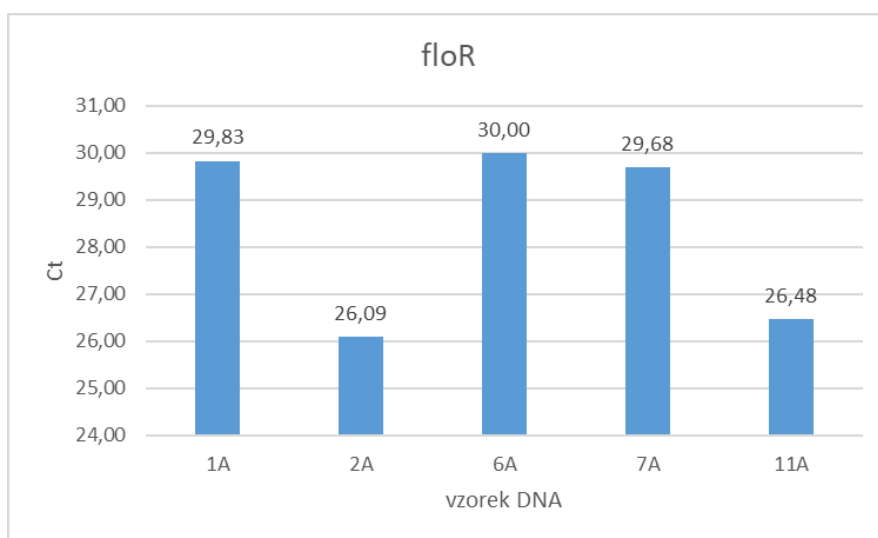
Na Obrázku 15 je znázorněno porovnání hodnot *Ct* pro gen *parC*. Hodnoty *Ct* jsou zde převážně střední ve srovnání s ostatními analyzovanými geny, což naznačuje průměrné množství cílové DNA ve vzorcích.



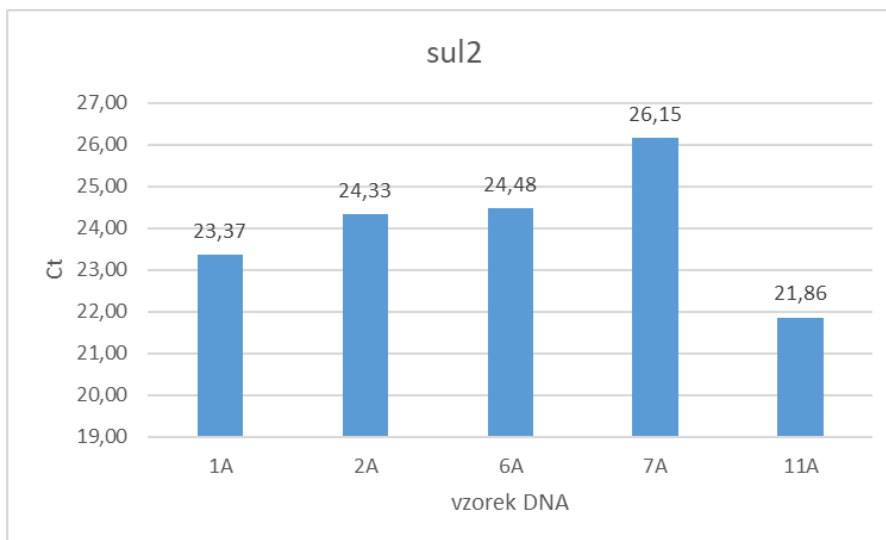
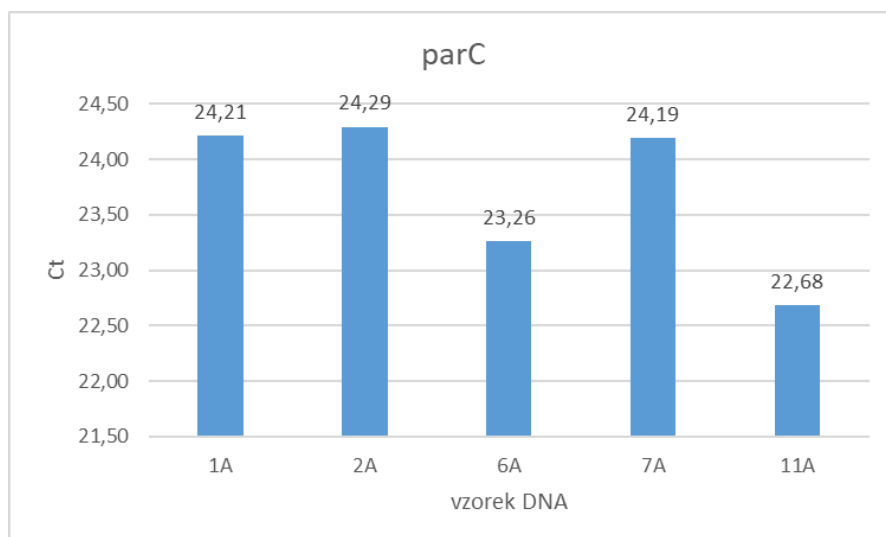
Obrázek 11 Graf porovnání hodnot Ct 10krát ředěné DNA, gen tetW.



Obrázek 12 Graf porovnání hodnot Ct 10krát ředěné DNA, gen ermB.



Obrázek 13 Graf porovnání hodnot Ct 10krát ředěné DNA, gen floR.

Obrázek 5 Graf porovnání hodnot Ct 10krát ředěné DNA, gen *sul2*.Obrázek 15 Graf porovnání hodnot Ct 10krát ředěné DNA, gen *parC*.

Výzkumná skupina Wolak a spol. se ve své studii zaměřila na výskyt ATB a ARG v digestátech pocházejících z bioplynových stanic a ČOV^[21]. Tetracykliny a sulfonamidy byly detekovány ve všech vzorcích digestátů, bez ohledu na typ vstupní suroviny. Nejvyšších koncentrací tetracyklinů bylo dosaženo v digestátech získaných z kravské kejdy. Naproti tomu fluorochinolony a makrolidy byly detekovány pouze ve vzorcích pocházejících z ČOV. Geny rezistence *sul1* a *sul2* vykazovaly napříč vzorky nejvyšší koncentrace. Ve všech vzorcích digestátů byly rovněž detekovány geny *tetA*, *tetM* a *ermF*. Zajímavým zjištěním této studie je, že zatímco sulfonamidová antibiotika byla detekována pouze ve vzorcích z ČOV, geny *sul* byly přítomny ve všech vzorcích, bez ohledu na původ substrátu^[21]. Geny skupin *tet*, *sul* a *erm* vykazovaly nejnižší Ct hodnoty v qPCR analýze, což naznačuje jejich významnou přítomnost v testovaných digestátech. Amplifikace těchto genů proběhla

v dostatečnou efektivitou, což také naznačuje vysokou přítomnost těchto genů ve vzorcích. Výzkum skupiny Haffiez a spol. se zaměřil na výskyt ARG v digestátech v průběhu celého procesu AD a prokázal vysoké koncentrace skupiny genů *tet*, *sul*, *erm*, *bla* a *intl*. Ze skupiny *tet* dominoval napříč vzorky gen *tetW*, zatímco u genů ze skupiny *sul* byl zaznamenán výrazně vyšší výskyt genu *sul1*, i když gen *sul2* byl rovněž detekován ve všech vzorcích. Zajímavý je také pokles koncentrace genu *ermB* v průběhu digesce ve srovnání s původními vstupními surovinami, což může naznačovat částečnou degradaci nebo snížení prevalence tohoto genu během AD procesu ^[58]. Výsledky této publikace korelují s výsledky bakalářské práce, neboť byly prokázány vysoké koncentrace genu *tetW*, také detekce genů *sul2* byla úspěšná u všech vzorků i když hodnoty Ct byly vyšší než u třeba genů *tetW* a *ermB*, což značí nižší koncentraci genu *sul2* ve vzorku.

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce byla detekce ARG v odpadních zemědělských produktech po anaerobní digestaci, které mohou významně přispívat ke vzniku a šíření rezistentních mikroorganismů a genů rezistence. Byly analyzovány vzorky 13 anaerobních digestátů z bioplynových stanic a ČOV, kde primární surovinou byly právě odpadní zemědělské produkty. Detekce byla provedena pomocí metod PCR a qPCR se zaměřením na výběr vhodných primerů, ověření jejich funkčnosti a optimalizaci amplifikačních reakcí pro další výzkum.

Vzhledem k existenci tisíců ARG a stovkám typů ATB bylo vybráno 32 genů rezistence (tetA, tetC, tetW, tetM, ermA, ermB, Msr(A/B), mefA, gyrA, qepA, qnrA, parC, VanA, VanB, VanD, blaTEM, blaSHV, mecA, blaZ, mcr1, mcr2, sul1, sul2, sul3, catI, catIII, floR, strA, strB, aadA2, rpsL, intl2) zodpovědných za rezistenci k 9 skupinám ATB (tetracykliny, makrolidy, fluorochinolony, vankomyciny, betalaktamy, polymyxiny, sulfonamidy, fenikoly a aminoglykosidy), jejichž výskyt je často spojován s odpady ze živočišné výroby.

Primery pro amplifikaci vybraných genů byly nejprve testovány metodou PCR na DNA izolované z rezistentních mikroorganismů kultivovaných na vybraných skupinách ATB. Pozitivní amplifikace byla zaznamenána pouze u genů sul2, strA a aadA2. Výrazně úspěšnější byla PCR analýza DNA izolované přímo z digestátových vzorků, kdy bylo úspěšně detekováno 19 z 32 sledovaných ARG. Ve všech vzorcích byly konzistentně detekovány geny tetW, ermB, sul2, strA a strB. Pro analýzu pomocí qPCR bylo následně vybráno 5 genů (tetW, ermB, floR, sul2 a parC) a 5 vzorků digestátů (1A, 2A, 6A, 7A a 9A). Vzorky byly mezi sebou srovnány na základě Ct hodnot. Množství jednotlivých genů rezistence se mezi jednotlivými digestáty lišilo, lze tedy předpokládat, že rozdíly ve složení vstupních substrátů nebo původu digestátu mohou ovlivňovat přítomnost a množství sledovaných genů rezistence.

Výsledky detekce ARG v digestátech odpovídají kategorizaci EMA, kdy nejčastěji se vyskytují geny spojené s ATB z kategorií D (tetracykliny, sulfonamidy, peniciliny) a C (makrolidy, fenikoly), což reflektuje jejich běžné používání ve veterinární praxi. Geny rezistence na ATB z přísně regulovaných kategorií A a B (např. vankomyciny, polymyxiny, některé betalaktamy) nebyly nebo byly jen výjimečně detekovány, což potvrzuje omezené využití těchto látek. Přetrvávání genů rezistence v environmentálních vzorcích poukazuje na

potřebu pokračujícího monitoringu a opatrného přístupu k používání ATB ve veterinární medicíně.

Součástí práce byla i amplifikace genu 16S rRNA rezistentních izolátů a jejich následná identifikace pomocí Sangerova sekvenování. Identifikace byla úspěšná u všech 51 izolátů a nejvíce zastoupenou taxonomickou skupinou byla čeleď *Bacillaceae*, což odpovídá očekávanému složení mikrobiálního konsorcia anaerobního digestátu.

Zjištěné výsledky potvrzují význam monitorování genů ARG v odpadních produktech, jako jsou anaerobní digestáty, které mohou představovat potenciální zdroj šíření rezistence do životního prostředí, především při jejich využití jako hnojiv na zemědělskou půdu. Vzhledem k častému výskytu ARG v těchto materiálech je důležité zavést systematický dohled a případně navrhnout technologická opatření ke snížení jejich výskytu v konečných produktech AD. Výsledky této práce tak mohou sloužit jako základ pro další výzkum v oblasti bezpečného nakládání s organickými odpady, pro tvorbu doporučení pro provozovatele bioplynových stanic a potenciálně i pro tvorbu budoucí legislativy zaměřené na omezení šíření antibiotické rezistence z antropogenních zdrojů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials*. Online. Springer Nature Link. 2013. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-013-4867-0#Sec7>. [cit. 2025-01-29].
- [2] TAXONOMY. *Taxonomy browser (root)*. Online. Nenalezený vydavatel. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>. [cit. 2025-04-13].
- [3] *Encyclopedia of Food Microbiology*. Second edition. Elsevier, 2014. ISBN 978-0-12-384733-1.
- [4] BARKA, Essaid Ait. *Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria*. Online. PMC. 2015. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4711186/>. [cit. 2025-04-13].
- [5] WANG, Yong. *Phylogenomics of expanding uncultured environmental Tenericutes provides insights into their pathogenicity and evolutionary relationship with Bacilli*. Online. BioMed Central. 2020. Dostupné z: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-020-06807-4>. [cit. 2025-04-13].
- [6] SPIROCHAETES, a phylum that includes medically important pathogens such as the causative agents of Lyme disease; BELAS, R.; Y. CHOI, et al.; F. GONZALEZ, B.E. Scharf; K.D. SMITH, et al. et al. *Review Diving into the complexity of the spirochetal endoflagellum*. Online. ScienceDirect. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X22002566>. [cit. 2025-04-13].
- [7] KIM, Mincheol a CHUN, Jongsik. 16S rRNA Gene-Based Identification of Bacteria and Archaea using the EzTaxon Server. Online. In: *New Approaches to Prokaryotic Systematics*. Methods in Microbiology. Elsevier, 2014, s. 61-74. ISBN 9780128001769. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.08.001>. [cit. 2025-02-18].
- [8] AUTOR, Nenalezený. *Basic Local Alignment Search Tool*. Online. Nenalezený vydavatel. 2025. Dostupné z: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. [cit. 2025-03-05].
- [9] JIN, Xin; ZHANG, Ling a CAO, Yo. Antibiotic resistance characterization, virulence factors and molecular characteristics of *Bacillus* species isolated from probiotic preparations in China. Online. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2024, roč. 2024, č. vol. 38, s.

1-400. ISSN 2213-7165. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.06.015>. [cit. 2025-04-21].

[10] ADAMSKI, Patrik; BYCZKOWSKA-ROSTKOWSKA, Zuzanna a GAJEWSKA, Joanna. *Prevalence and Antibiotic Resistance of Bacillus sp. Isolated from Raw Milk*. Online. PMC. 2023. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10143217/>. [cit. 2025-04-21].

[11] SUN, He; BJERKETORP, Joakim; LEVENFORS, Jolanta J. a SCHNÜRER, Anna. Isolation of antibiotic-resistant bacteria in biogas digestate and their susceptibility to antibiotics. Online. *Environmental Pollution*. 2020, roč. 266, č. 266, s. 1-9. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115265>. [cit. 2025-04-21].

[12] BUTIUC-KEUL, Anca; CARPA, Rahela a PODAR, Dorina. *Antibiotic Resistance in Pseudomonas spp. Through the Urban Water Cycle*. Online. SpringerLink. 2021. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-021-02389-w>. [cit. 2025-04-21].

[13] SHAH, Mohammad Monir; ODOYO, Eric a ICHINOSE, Yoshio. *Epidemiology and Pathogenesis of Providencia alcalifaciens Infections*. Online. PMC. 2019. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6685554/>. [cit. 2025-04-21].

[14] JAMIL, Radia T. *Proteus mirabilis Infections*. Online. NCBI Bookshelf. 2023. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442017/>. [cit. 2025-04-21].

[15] DUBEI, Saurabh; AGER-WICK, Eirill a PENG, Bo. *Characterization of virulence and antimicrobial resistance genes of Aeromonas media strain SD/21–15 from marine sediments in comparison with other Aeromonas spp.* Online. PMC. 2022. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9752117/>. [cit. 2025-04-21].

[16] APPELS, Lise; BAEYENS, Jan; DEGRÈVE, Jan a DEWIL, Raf. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. Online. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2008, roč. 34, č. 6, s. 755-781. ISSN 03601285. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.06.002>. [cit. 2025-04-21].

[17] NASIR, Ismail M.; MOHD GHAZI, Tinia I. a OMAR, Rozita. Anaerobic digestion technology in livestock manure treatment for biogas production: A review. Online. *Engineering in Life Sciences*. 2012, roč. 12, č. 3, s. 258-269. ISSN 1618-0240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/elsc.201100150>. [cit. 2025-04-21].

- [18] HOLM-NIELSEN, J.B.; AL SEADI, T. a OLESKOWICZ-POPIEL, P. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. Online. *Bioresource Technology*. 2009, roč. 100, č. 22, s. 5478-5484. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.046>. [cit. 2025-04-21].
- [19] GALLI, Alessandro a Annamaria PETRERA. Characteristics of by-product and animal waste: A Review. *Large Animal Review* [online]. 2014, 20(3), 111–114 [cit. 2025-04-13]. Dostupné z: <https://www.largeanimalreview.com/index.php/lar/article/view/56/57>
- [20] *Agricultural Waste*. Online. ScienceDirect Topics. 2023. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sciences/agricultural-waste>. [cit. 2025-04-13].
- [21] WOLAK, Izabela; BAJKACZ, Sylvia a HARNISZ, Monika. *Digestate from Agricultural Biogas Plants as a Reservoir of Antimicrobials and Antibiotic Resistance Genes—Implications for the Environment*. Online. PMC. 2023. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9915926/>. [cit. 2025-04-22].
- [22] YANG, Gaixiu; XIE, Shihao a YANG, Min. A critical review on retaining antibiotics in liquid digestate: Potential risk and removal technologies. Online. *Science of The Total Environment*. 2022, roč. 853, č. 158550, s. 1-12. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158550>. [cit. 2025-04-25].
- [23] *Biotechnology*. Second edition. AP Cell, 2017. ISBN 978-0-12-385015-7.
- [24] LEE, Wang Sik; LEE, Soohyun a KANG, Taejoon. *Detection of Ampicillin-Resistant E. coli Using Novel Nanoprobe-Combined Fluorescence In Situ Hybridization*. Online. PMC. 2019. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6567190/>. [cit. 2025-04-27].
- [25] GALHANO, Beatriz S P; FERRARI, Raffael G a PANZENHAGEN, Pedro. *Antimicrobial Resistance Gene Detection Methods for Bacteria in Animal-Based Foods: A Brief Review of Highlights and Advantages*. Online. PMC. 2021. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8146338/>. [cit. 2025-04-28].
- [26] *Genetics, From Genes to Genomes*. Seventh edition. McGraw Hill, 2021. ISBN 978-1-260-57582-8.

- [27] ATCEKEN, Nazente; YIGCI, Defne a OZDALGIC, Berin. *CRISPR-Cas-Integrated LAMP*. Online. PMC. 2022. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9688180/>. [cit. 2025-04-29].
- [28] MÜLLER, Vilhelm; RAJER, Fredrika a FRYKHOLM, Karolin. *Direct identification of antibiotic resistance genes on single plasmid molecules using CRISPR/Cas9 in combination with optical DNA mapping*. Online. Nature. 2016. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/srep37938>. [cit. 2025-04-29].
- [29] MA, Liping; XIA, Yu a LI, Bing. *Metagenomic Assembly Reveals Hosts of Antibiotic Resistance Genes and the Shared Resistome in Pig, Chicken, and Human Feces*. Online. PubMed. 2016. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26650334/>. [cit. 2025-04-30].
- [30] *How nanopore sequencing works*. Online. Oxford Nanopore Technologies. 2025. Dostupné z: <https://nanoporetech.com/platform/technology>. [cit. 2025-04-30].
- [31] JAKUB, Prudil a BADALÍKOVÁ, Barbora. *Výzkum bezpečného využití digestátu jako alternativního zdroje organické hmoty a makroprvků pro půdy*. Online. Nenalezený vydavatel. 2022. Dostupné z: https://www.vupt.cz/storage/app/media/Metodiky%20-%20od%20roku%202020/57_22Uplatnena_certifikovana%20metodika_Digest%C3%A1tl_final.pdf?utm_source=chatgpt.com. [cit. 2025-05-05].
- [32] LEE, Jiyoung; BAEK, Eunyong a AHN, Hyesun. *Development of a One-Step Multiplex qPCR Assay for Detection of Methicillin and Vancomycin Drug Resistance Genes in Antibiotic-Resistant Bacteria*. Online. MDPI. 2024. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2076-0817/13/10/853>. [cit. 2025-05-05].
- [33] FRIERI, Marianne; KUMAR, Krishan a BOUTIN, Anthony. Antibiotic resistance. Online. *Journal of Infection and Public Health*. 2017, roč. 10, č. 4, s. 369-378. ISSN 18760341. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>. [cit. 2025-05-06].
- [34] *Narizení EU COM(2020) 667*. Online. In: EUR-lex. 2020. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=COM%3A2020%3A667%3AFIN>. [cit. 2025-05-06].
- [35] *Antimicrobial consumption by food-producing animals in the EU (Indicator)*. Online. European zero pollution dashboards. 2024. Dostupné z: <https://www.eea.europa.eu/en/european-zero-pollution->

[dashboards/indicators/antimicrobial-consumption-in-food-producing-animals](#). [cit. 2025-05-06].

[36] HE, Liang-Ying; YING, Guang-Guo a LIU, You-Sheng. Discharge of swine wastes risks water quality and food safety: Antibiotics and antibiotic resistance genes from swine sources to the receiving environments. Online. *Environment International*. 2016, roč. 2016, č. 92-93, s. 210-219. ISSN 01604120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.023>. [cit. 2025-05-07].

[37] HE, Ya; YUAN, Qingbin a MATHIEU, Jacques. *Antibiotic resistance genes from livestock waste: occurrence, dissemination, and treatment*. Online. *Nature*. 2020. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41545-020-0051-0>. [cit. 2025-05-07].

[38] O52836 · TETW_BUTFI. Online. UniProt. 2024. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/O52836/entry>. [cit. 2025-05-05].

[39] ADESOJI, Ayodele. T. a CALL, Douglas R. Molecular analysis of florfenicol-resistant bacteria isolated from drinking water distribution systems in Southwestern Nigeria. Online. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2020, roč. 2020, č. vol. 23, s. 340-344. ISSN 22137165. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.10.005>. [cit. 2025-05-07].

[40] GILLINGS, Michael R. *Integrans: Past, Presence, and Future: Past, Present, and Future*. Online. PMC. 2014. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4054258/>. [cit. 2025-05-07].

[41] Q07282 · TCR5_ECOLX. Online. UniProt. 2024. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q07282/entry>. [cit. 2025-05-04].

[42] *Practical implications of erythromycin resistance gene diversity on surveillance and monitoring of resistance*. Online. Oxford Academic. 2018. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsec/article/94/4/fiy006/4810543>. [cit. 2025-05-05].

[43] *Mobile macrolide resistance genes in staphylococci*. Online. ScienceDirect. 2018. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147619X18300258>. [cit. 2025-05-05].

[44] *The role of Gene Mutations (gyrA, parC) in Resistance to Ciprofloxacin in Clinical Isolates of Pseudomonas Aeruginosa*. Online. National Library of Medicine. 2021. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8463757/>. [cit. 2025-05-05].

- [45] *Characterization of genetic structures of the QepA3 gene in clinical isolates of Enterobacteriaceae.* Online. Frontiers. 2015. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2015.01147/full>. [cit. 2025-05-05].
- [46] *Characterization of plasmid-mediated qnrA and qnrB genes among Enterobacteriaceae strains: quinolone resistance and ESBL production in Ismailia, Egypt.* Online. SpringerOpen. 2019. Dostupné z: <https://jmhg.springeropen.com/articles/10.1186/s43042-019-0026-1>. [cit. 2025-05-05].
- [47] *Etiologic Agents of Infectious Diseases.* Online. ScienceDirect. 2012. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/vancomycin-resistance>. [cit. 2025-05-05].
- [48] *Assessment of BlaTEM, BlaSHV, and BlaCTX-M genes of antibiotic resistance in Gram-negative bacilli causing urinary tract infections in Khartoum State: a cross-sectional study.* Online. BioMed Central. 2024. Dostupné z: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-024-09023-7>. [cit. 2025-05-10].
- [49] *Insights into the Mechanistic Basis of Plasmid-Mediated Colistin Resistance from Crystal Structures of the Catalytic Domain of MCR-1.* Online. National Library of Medicine. 2017. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5216409/>. [cit. 2025-05-06].
- [50] *Regulation Transcriptional of Antibiotic Resistance Genes (ARGs) in Bacteria Isolated from WWTP.* Online. National Library of Medicine. 2023. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10482803/>. [cit. 2025-05-04].
- [51] *Identification of strA-strB Genes in Streptomycin-Resistant Pseudomonas syringae pv. actinidiae Biovar 2 Strains Isolated in Korea.* Online. PMC. 2021. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8632614/>. [cit. 2025-05-10].
- [52] *Dissemination of Sulfonamide Resistance Genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese Salmonella enterica Strains and Relation with Integrins.* Online. National Library of Medicine. 2005. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC547296/>. [cit. 2025-05-06].

- [53] Vyhláška č. 203/2003 Sb. *Vyhláška o veterinárních požadavcích na mléko a mléčné výrobky*. Online. Zákony pro lidi. 2003. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-203>. [cit. 2025-05-10].
- [54] *Understanding Ct Values in Real-Time PCR*. Online. Behind the Bench. 2022. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/understanding-ct-values/>. [cit. 2025-05-11].
- [55] BUSTIN, Stephen A; BENES, Vladimir a GARSON, Jeremy A. *The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*. Online. OUP Academic. 2009. Dostupné z: <https://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>. [cit. 2025-05-11].
- [56] DEURENBERG, Ruud H. a STOBBERINGH, Ellen E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. Online. *Infection, Genetics and Evolution*. 2008, roč. 8, č. 6, s. 747-763. ISSN 15671348. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.007>. [cit. 2025-05-11].
- [57] SEZNAM NÁZVŮ LÉČIVÉHO(LÉČIVÝCH)PŘÍPRAVKU(Ů), LÉKOVÁ(É) FORMA(Y), KONCENTRACE, ZPŮSOB(Y) PODÁNÍ, ŽADATEL(É), DRŽITEL(É) ROZHODNUTÍ O REGISTRACI V ČLENSKÝCH STÁTECH. Online. Nenalezený vydavatel. 2019. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/cs/documents/referral/octegra-article-294-referral-annex-i-ii-and-iii_cs.pdf. [cit. 2025-05-13].
- [58] HAFFIEZ, Nervana. *Propagation of antibiotic resistance genes during anaerobic digestion of thermally hydrolyzed sludge and their correlation with extracellular polymeric substances*. Online. Nature. 2022. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-10764-1>. [cit. 2025-05-13].

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schématické znázornění fází anaerobní digesce. ^[16]	17
Obrázek 2 Ověření úspěšnosti amplifikace genu 16S rRNA se vzorky 1-22.	54
Obrázek 3 Ověření úspěšnosti amplifikace genu 16S rRNA se vzorky 23-46.....	54
Obrázek 4 Ověření úspěšnosti amplifikace genu 16S rRNA se vzorky 47-51.....	55
Obrázek 5 Výsledky gradientové PCR s primery blaTEM (blaT.) a parC.....	64
Obrázek 6 Výsledky gradientové PCR s primerem aadA2..	64
Obrázek 7 Amplifikace genů tetA, tetC, tetW a ermB se vzorky DNA 1A-10A.....	65
Obrázek 8 Amplifikace genu int12 se vzorky DNA 1A, 2A a 3A.	65
Obrázek 9 Amplifikační křivky qPCR genu tetW, vzorek 2A.	70
Obrázek 10 Graf standardní křivky vzorku 2A, gen tetW.	70
Obrázek 11 Graf porovnání hodnot Ct 10krát ředěné DNA, gen tetW.....	72
Obrázek 12 Graf porovnání hodnot Ct 10krát ředěné DNA, gen ermB.....	72
Obrázek 13 Graf porovnání hodnot Ct 10krát ředěné DNA, gen floR.	73
Obrázek 14 Graf porovnání hodnot Ct 10krát ředěné DNA, gen sul2.....	73
Obrázek 15 Graf porovnání hodnot Ct 10krát ředěné DNA, gen parC.....	72

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Seznam vzorků digestátů, jejich typ, původ a druh substrátu.	36
Tabulka 2 Schéma pipetování PCR reakční směsi pro 1 vzorek/25 µl.	43
Tabulka 3 Primery použité pro PCR.	43
Tabulka 4 Podmínky PCR reakce.	43
Tabulka 5 Rozpis složek reakce pro Sangerovo sekvenování.	45
Tabulka 6 Seznam primerů použitých pro optimalizaci PCR.....	46
Tabulka 7 Podmínky PCR reakce zkouška primerů rezistence.	48
Tabulka 8 Teplota annealingu pro optimalizační PCR s primerem blaTEM.	51
Tabulka 9 Teplota annealingu pro optimalizační PCR s primery parC a aadA2.	51
Tabulka 10 Schéma pipetování reakční směsi pro 1 vzorek/20 µl pro qPCR.	52
Tabulka 11 Schéma kroků termocykléru pro qPCR.....	52
Tabulka 12 Koncentrace DNA izolované z čistých kultur rezistentních mikroorganismů.	53
Tabulka 13 Koncentrace DNA fragmentů po purifikaci.	55
Tabulka 14 Souhrnný seznam identifikovaných rezistentních bakterií.....	56
Tabulka 14a Souhrnný seznam identifikovaných rezistentních bakterií, pokračování.	57
Tabulka 15 Seznam vybraných antibiotik a genů rezistence.	58
Tabulka 16 Vzorky izolátů vybraných pro zkoušku primerů skupiny T _a 50°C.....	60
Tabulka 17 Vzorky izolátů vybraných pro zkoušku primerů skupiny T _a 60°C.....	61
Tabulka 18 Výsledky detekce genů rezistence u vybraných DNA rezistentních bakterií.	62
Tabulka 19 Naměřené koncentrace DNA po izolaci z digestátů.	63
Tabulka 20 Výsledky detekce genů rezistence u DNA izolované z digestátů.....	67

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AD	anaerobní digesce
ARB	antibioticky rezistentní bakterie
ARG	geny antibiotické rezistence
bp	párů bazí
Cas	CRISPR-asociovaný protein
COVID-19	Coronavirus disease 2019
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Ct	treshold cyklus
ČOV	čistička odpadních vod
ddH ₂ O	destilovaná a deionizovaná voda
ddNTPs	dideoxyribonukleotidtrifosfáty
DHPs	protein dihydropteorát syntáza
dNTPs	deoxyribonukleotidtrifosfáty
dsDNA	dvouvláknová DNA
ELFO	horizontální gelová elektroforéza
EMA	Evropská agentura pro léčivé přípravky
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GTDB	Genom Taxonomy Database
LAMP	loop-mediated isothermální reakce
NASBA	Nucleic acid sequence-based amplification
NGS	sekvenování nové generace
MBR	membránový bioreaktor
MFS	major facilitator superfamily
MGEs	mobilní genetické elementy
PBP	penecilin-vázající protein

PCR	polymerázová řetězová reakce
qPCR	kvantifikační polymerázová řetězová reakce
R^2	korelační koeficient
RCA	replikace rotujícího kruhu
RPA	rekombinázová polymerázová amplifikace
rpm	otáček za minutu
rRNA	ribozomální RNA
RT-PCR	reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce
SARS	těžký akutní respirační syndrom
sgRNA	single guide RNA
ssDNA	jednovláknová DNA
T_a	teplota annealingu
TD-PCR	touch down PCR
WGS	celogenomové sekvenování

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Snímky ELFO, detekce genů rezistence ve vybraných rezistentních izolátech

Příloha P II: Snímky ELFO, detekce genů rezistence v anaerobních digestátech

Příloha P III: Tabulky s výsledky qPCR, hodnoty Ct