

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Tereza Patrmanová

Geny antibiotické rezistence u půdních aktinobakterií

Antibiotic resistance genes in soil actinobacteria

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Jan Kopecký, Ph.D.

Praha, 2016

Ráda bych poděkovala svému školiteli Ing. Janu Kopeckému, Ph.D. a rovněž RNDr. Markétě Marečkové, Ph.D. za cenné rady a připomínky během vypracovávání této bakalářské práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11.5.2016

.....
Podpis

Abstrakt

Aktinobakterie jsou důležitou součástí půdních ekosystémů, kde se podílí na rozkladu organické hmoty. Pro tyto bakterie je tak důležitý sekundární metabolismus, který jim umožňuje produkovat bohatou škálu různých látek. Mezi tyto látky se řadí antibiotika, z nichž si své místo v klinické praxi našly i aminoglykosidy. Tato antibiotika jsou významná díky širokému spektru účinku vůči gramnegativním a grampozitivním bakteriím. Jejich používání však v současné době nese rizika, spočívající především v jejich toxicitě, ale také v rozvoji antibiotické rezistence u bakterií, která snižuje jejich účinnost. Aktinobakterie se jako producenti aminoglykosidů musí chránit i před těmito látkami, což dokazuje pestrost typů rezistence, z nichž nejprostudovanější je enzymatická inaktivace. Aktinobakterie si v evoluci vytvořily různé mechanismy, které přispívají k odolnosti vůči látkám s antimikrobiálním účinkem. Geny kódující odolnost k antibiotikům mají v půdním prostředí široké zastoupení. To je ovlivněno mnoha faktory, zejména selekcí bakterií v půdě kontaminované antibiotiky a také kontaktem se zástupci pocházejícími z lidských a živočišných odpadů. Důležitou roli zde hraje horizontální přenos genetické informace, který umožňuje rozšíření genů rezistence mezi fylogeneticky nepříbuznými bakteriemi.

Klíčová slova: rezistence, Actinobacteria, půdní DNA, enzymy, HGT

Abstract

Actinobacteria are important members of the soil ecosystems, where they are involved in organic matter decomposition. It is worth mentioning that their secondary metabolism allows them to produce a variety of different compounds. These compounds include antibiotics, among them aminoglycosides have a place in clinical practice. These antibiotics are significant due to a broad spectrum of activities against both gram-negative and gram-positive bacteria. However, their use currently carries a risk, mainly their toxicity and development of antibiotic resistance in bacteria. Resistance is the cause of low effectiveness of some of those antibiotics. Actinobacteria as aminoglycoside producers must protect themselves from these compounds, so a variety of resistance types was developed, out of which enzymatic inactivation is the most studied one. Actinobacteria have evolved several mechanisms, which contribute to a resistance to the agents with antimicrobial effects. Genes encoding antibiotic resistance are abundant in soil environment. Their variability is influenced by many factors, especially the selection of bacteria in soil contaminated with antibiotics and also with strains originating from human and animal waste. Significant role has a horizontal gene transfer, which allows distribution of resistance genes between phylogenetically unrelated bacteria.

Key words: resistance, Actinobacteria, soil DNA, enzymes, HGT

Seznam použitých zkratk

AAC	Aminoglycoside acetyltransferase	Aminoglykosid acetyltransferáza
AG	Aminoglycoside	Aminoglykosid
AME	Aminoglycoside modifying enzyme	Aminoglykosid modifikující enzym
AMP	Adenosine monophosphate	Adenosinmonofosfát
ANT	Aminoglycoside nucleotidyltransferase	Aminoglykosid nukleotidyltransferáza
APH	Aminoglycoside phosphotransferase	Aminoglykosid fosfotransferáza
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintrifosfát
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
EDP-I	Energy-dependent phase I	Fáze závislá na energii I
EDP-II	Energy-dependent phase II	Fáze závislá na energii II
HGT	Horizontal gene transfer	Horizontální přenos genetické informace
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysacharid
mRNA	Messenger RNA	Mediátorová RNA
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
PBP	Penicillin binding protein	Penicilin vázající protein
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid	Ribozomální ribonukleová kyselina
SAM	S-Adenosyl methionine	S-Adenosylmethionin
tRNA	Transfer ribonucleic acid	Transferová ribonukleová kyselina

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Aktinobakterie.....	2
2.1	Morfologie	2
2.2	Ekologie.....	2
3	Sekundární metabolity aktinobakterií	3
3.1	Antibiotika	4
3.1.1	Aminoglykosidy	5
4	Rezistence	8
4.1	Mechanismy rezistence.....	9
4.1.1	Modifikace nebo nahrazení cílového místa.....	9
4.1.2	Snížená permeabilita membrány	10
4.1.3	Vylučování antibiotika z buňky (eflux)	10
4.1.4	Inaktivace antibiotika	11
4.2	Rezistence k aminoglykosidům	11
4.2.1	Redukce intracelulární koncentrace	11
4.2.2	Modifikace cílového místa	11
4.2.3	Enzymatická modifikace	13
4.3	Geny rezistence v půdním prostředí	16
4.4	Přenos genů rezistence.....	18
5	Závěr	20
6	Seznam použité literatury.....	21

1 Úvod

Objev antibiotik byl průlomovým okamžikem v dějinách lidstva, který způsobil převrat v léčení infekčních chorob. I desítky let po této události jsou tyto látky hojně využívány v oblasti medicíny včetně veterinárního lékařství, ale také zemědělství. I přes možné nežádoucí účinky jsou dnes antibiotika používána k léčbě širokého spektra bakteriálních onemocnění po celém světě. Se zvyšující se spotřebou těchto léků ovšem dochází ke vzniku rezistence u bakterií. Sám objevitel penicilinu Alexander Fleming varoval, že nedostatečným dávkováním člověk vystavuje bakterie ve svém těle nízké koncentraci antibiotika, která nemusí být letální, ale může vést k vytvoření rezistence (*Nobel Lectures, physiology or medicine 1942-1962, 1964*). I přes tento poznatek je i ve 21. století odolnost bakterií vůči antibiotikům celosvětovým problémem. Vznik a přenos rezistence je přirozeným dějem, který člověk ale výrazně urychluje. Důsledkem je nízká efektivita léčiv, z níž vyplývají větší náklady na terapii.

Významnými producenty antibiotik jsou kosmopolitně rozšířené aktinobakterie, které se pravidelně vyskytují v půdních společenstvech. Bývají většinou saprofytické, a proto mají klíčovou roli při rozkladu organické hmoty. Zároveň produkují extracelulární enzymy a tisíce sekundárních metabolitů včetně antibiotik (Atlas, 1996). Jednou ze skupin antibiotik produkovaných aktinobakteriemi jsou aminoglykosidy, které jsou účinné proti velkému množství gram pozitivních a gram negativních bakterií, a využívají se i k léčbě protozoárních onemocnění (Durante-Mangoni et al., 2009).

Půda je jedním z prostředí, kde dochází ke vzniku a přenosu antibiotické rezistence. Ta může být přirozená nebo získaná. Zatímco přirozená rezistence vzniká přirozeně bez ohledu na předchozí kontakt s antibiotikem, rezistence získaná je dána selekčním tlakem v prostředí po působení dané látky a je vytvářena genetickou mutací nebo přenosem genu z jiné bakterie (Alanis, 2005). Aktinobakterie si vyvinuly několik mechanismů rezistence, díky kterým se brání působení antibiotik.

Cílem této práce je shromáždit poznatky o půdních aktinobakteriích a jejich vysoké metabolické diverzitě. Hlavním zaměřením je popis produktů sekundárního metabolismu, především ze skupiny aminoglykosidových antibiotik, a příslušných rezistencí.

2 Aktinobakterie

Aktinobakterie (*Actinobacteria*) jsou významným kmenem domény *Bacteria* osidlující především terestrické a vodní ekosystémy. Tento kmen se podle Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Whitman *et al.*, 2012) skládá z 6 tříd, z nichž největší dostala název *Actinobacteria* a obsahuje 15 řádů. Jedná se o grampozitivní bakterie obsahující vysoký podíl cytosinu a guaninu v DNA (až 73% u *Streptomyces* a *Frankia*) (Ventura *et al.*, 2007). Najdeme zde ovšem i zástupce s nízkým počtem těchto bází, například *Tropheryma whipplei* se zastoupením GC párů menším než 50% (Raoult *et al.*, 2003). Většina aktinobakterií je aerobních.

2.1 Morfologie

Morfologie těchto bakterií je velmi rozmanitá. Mají rozličné formy, vytvářejí buňky kulovitého či tyčinkovitého tvaru, běžně se u nich vyskytují i hyfy nebo složité větvená mycelia (Atlas, 1996). Díky schopnosti tvořit tyto vláknité útvary se na první pohled podobají houbám, což aktinobakteriím dalo také název aktinomycety odvozený od řeckého slova aktis (v překladu paprsek) a mykes (houba) (Das *et al.*, 2008). Mycelia jsou různých barev a velikostí. Mohou být substrátová či vzdušná a na konci obou typů vláken se mohou v nepříznivých podmínkách tvořit spory. Spory jsou produkovány jednotlivě, v párech, v řetízcích či ve strukturách zvaných sporangia (například u rodu *Frankia*), bývají opatřené bičíkem nebo jsou bez bičíku (Vaillant-Gaveau *et al.*, 2015). Charakteristickým znakem je i tvorba široké škály pigmentů. Této vlastnosti se mimo jiné využívá při bližším taxonomickém zařazení bakterií - zkoumá se zbarvení vzdušného mycelia, tvorba melanoidních či jiných pigmentů nebo pigmentace spodní strany kolonií na ztuženém médiu (Sharma, 2014).

2.2 Ekologie

Velkou část aktinobakterií najdeme v půdě, kde se jejich množství pohybuje mezi 10^6 a 10^9 buňkami na gram půdy (Goodfellow & Williams, 1983). Jejich výskyt je zde ovšem ovlivňován různými faktory, například teplotou, pH, vlhkostí půdy nebo vegetačním pokryvem. Ve většině případů se jedná o mezofilní bakterie (mají optimum růstu mezi 25 a 30°C), které preferují neutrální a mírně zásadité půdy (pH 6 až 9) s nízkou vlhkostí. Také přítomnost organické hmoty stimuluje aktinobakterie k růstu (Vaillant-Gaveau *et al.*, 2015). Někteří zástupci se adaptovali na extrémní podmínky - patří sem druhy vyskytující se v prostředí s vysokou nebo naopak nízkou teplotou, nízkým či vysokým pH, zvýšenou salinitou

nebo nedostatkem vody v půdě (Zenova *et al.*, 2011). Běžnými zástupci půdní mikroflóry jsou bakterie rodu *Streptomyces*, které mohou v některých ekosystémech tvořit více než 90% všech kultivovatelných aktinomycet izolovaných z půdy (Xu *et al.*, 1996). Aktinobakterie byly také izolovány z vodního prostředí. Ve sladké vodě jsou často přítomny rody *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Streptomyces* a *Thermoactinomyces* (Sigeo, 2005). Oceán je bohatým ekosystémem s vysokou biodiverzitou, a proto i skupina *Actinobacteria* má zde své zástupce. Nacházejí se ve vodě, sedimentech (i hlubokomořských), mořských řasách, rybách, měkkýších nebo v přisedlých živočiších (Manivasagan *et al.*, 2014). Bakterie jsou v tomto prostředí často přizpůsobeny extrémním podmínkám, jsou zde vystaveny vysokému tlaku, anaerobním podmínkám, nízké teplotě (pod 0°C) nebo naopak teplotě nad 100°C společně s nízkým pH, která je typická pro hydrotermální průduchy (Lam, 2006). Z aktinobakterií bychom v oceánech našli například rody *Rhodococcus* (Nesterenko *et al.*, 1982), *Streptomyces* (Moran *et al.*, 1995), *Salinispora* (Mincer *et al.*, 2005), *Salinibacterium* (Han *et al.*, 2003) nebo *Verrucosipora* (Riedlinger *et al.*, 2004).

Kromě půdy a vodního prostředí se řada zástupců vyskytuje ve vzduchu, a to jak ve vnitřních prostorech budov, tak venku (Lee *et al.*, 2008). Aktinobakterie jsou také častými symbionty rostlin (*Frankia*), patogeny rostlin i živočichů včetně člověka (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*) nebo komenzály (*Bifidobacterium*) (Vaillant-Gaveau *et al.*, 2015).

3 Sekundární metabolity aktinobakterií

Sekundární metabolity jsou látky, které nejsou nezbytné pro přežití organismů, jež je vytvářejí (nemají jasnou roli v životním cyklu, přímo se nepodílejí na základních životních procesech jako například růstu či dělení buněk). Mohou ale svým producentům poskytovat výhodu ve formě ochrany či vyšší odolnosti. Produkty sekundárního metabolismu aktinobakterií působí proti bakteriím, virům, houbám, parazitům a mohou inhibovat enzymy. Některé metabolity mají imunosupresivní, protinádorové nebo neuroprotektivní účinky, a proto jsou využívány i při léčbě některých vážných onemocnění (shrnutí v Solecka *et al.*, 2012). Ve většině případů se jedná o nízkomolekulární látky, jejichž molekulová hmotnost nepřesahuje 3000 Da (Bérdy, 2005).

Pro aktinobakterie jsou často charakteristické velké lineární nebo cirkulární genomy, z nichž je 5 až 10% genů zapojeno do sekundárního metabolismu (Baltz, 2008). Například Ikeda a kolektiv (2003) sekvenoval lineární chromozom *Streptomyces avermitilis* a zjistil, že

z celkového množství více než 9 Mbp je 594 kbp (6,6%) věnováno proteinům, které se účastní biosyntézy sekundárních metabolitů.

3.1 Antibiotika

Antibiotika jsou látky s rozmanitou chemickou strukturou a různými mechanismy účinku produkované organismy. Tato přírodní antibiotika mohou být chemicky modifikována a dát tak vznik semisyntetickým derivátům. Sloučeniny s antibakteriálním účinkem lze připravit i uměle v laboratoři - například sulfonamidy (Jagdale *et al.*, 2015) či chinolony (Jayashree *et al.*, 2010).

V roce 2002 bylo známo více než 50 000 metabolitů vytvářených mikroorganismy, z toho přibližně 16 500 sloučenin byla antibiotika. Okolo poloviny z tohoto množství jsou produkty aktinobakterií. Významnou skupinou aktinomycet je rod *Streptomyces*, který syntetizuje více než 6 550 antibiotik. Z celkového počtu více než 50 000 mikrobiálních metabolitů má ovšem v medicíně využití asi 160 sloučenin, tedy pouze 0,3% (Bérdy, 2005).

Producenti antibiotik mezi aktinobakteriemi jsou v půdě kosmopolitně rozšířeni. Zástupci skupiny *Actinobacteria* tvoří většinou 10 až 50% všech bakterií nalezených v různých půdních ekosystémech (Smith *et al.*, 2006; Shange *et al.*, 2012; Bevivino *et al.*, 2014). Nejčastěji se jedná o producenty streptomycinu, tetracyklinu nebo actinomycinu, zatímco biosyntetická dráha erythromycinu a vankomycinu je nalezena u aktinobakterií relativně méně často (ve frekvenci $5 \cdot 10^{-6}$ a $1,5 \cdot 10^{-5}$). Velká část antibiotik, která již byla objevena, se vyskytuje jen ve frekvenci $1-2 \cdot 10^{-7}$ (Baltz, 2007). Nalezení antibiotik v půdním prostředí není snadné i z důvodu jiných faktorů. Přímá detekce je možná pouze v prostředí s bohatým zdrojem živin (kořeny, semena atd.) (Anukool *et al.*, 2004) a je často ztížena adsorpcí některých antibiotik na půdní částice (Rabolle & Spliid, 2000). Situace je také znesnadněna tím, že asi 1% bakterií se dá v laboratoři kultivovat klasickými technikami (Pham & Kim, 2012). Zbýlých 99% mikroorganismů tak může být zdrojem ojedinělých antibiotik. Vyhledávání nových sekundárních metabolitů se v dnešní době zaměřuje i na bakterie žijící ve slané vodě. I přesto, že jsou v mořských sedimentech aktinomycety přítomny v množství asi 10 000násobně menším než v půdě (Baltz, 2008), jsou jejich zástupci producenty důležitých chemických sloučenin, které se dosud v půdním prostředí nenašly. Mezi tyto sloučeniny se řadí i abyssomicin, který byl izolován z bakterie rodu *Verrucosipora* pocházející z Japonského moře. Tato látka inhibuje u mikroorganismů biosyntetickou dráhu kyseliny para-aminobenzoové, která je prekurzorem kyseliny listové (Riedlingera *et al.*, 2004).

Klasifikace antibiotik probíhá podle různých aspektů. Nejčastěji se používá systém třídění podle jejich chemické struktury. Antibiotika se ale také mohou dělit podle svého účinku, a to na dvě skupiny: bakteriostatická a baktericidní. Zatímco bakteriostatická antibiotika pouze zastavují buněčný růst, baktericidní způsobují smrt buněk. V medicíně se také často využívají pojmy širokospektrá a úzkospektrá antibiotika. Druhá skupina na rozdíl od látek s širokým spektrem účinku působí pouze na omezenou skupinu mikroorganismů. Podle mechanismu působení pak antibiotika tvoří několik skupin (Mary *et al.*, 2011):

- Antibiotika inhibující syntézu buněčné stěny (například peniciliny)
- Antibiotika narušující buněčnou membránu, ovlivňující její propustnost (například polymyxin) (Raimundo *et al.*, 2012))
- Antibiotika inhibující proteosyntézu vazbou na 30S nebo 50S ribozomální podjednotku (tetracykliny, makrolidy atd.)
- Antibiotika inhibující metabolické dráhy (například sulfonamidy)
- Antibiotika narušující syntézu nukleových kyselin (například chinolony)

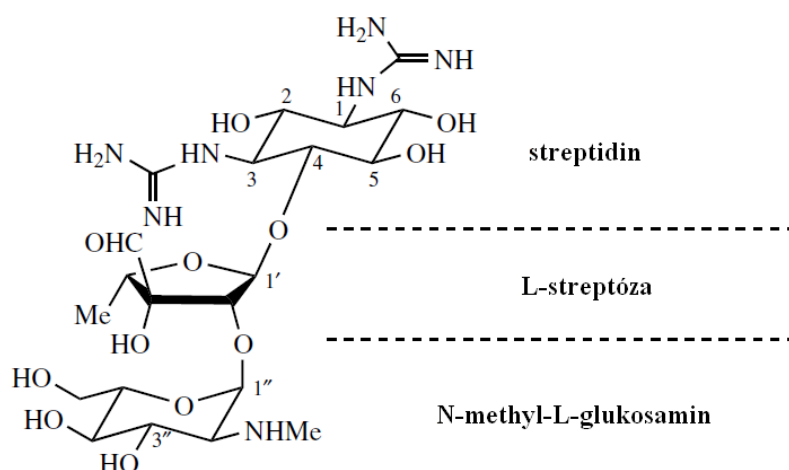
3.1.1 Aminoglykosidy

Aminoglykosidy (AG) jsou širokospektrá antibiotika, která vykazují aktivitu proti celé řadě bakterií. Využívají se především k léčbě infekcí způsobených gramnegativními bakteriemi, mezi které se mimo jiné řadí *Escherichia coli*, dále pak bakterie rodu *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Serratia* nebo *Pseudomonas* (Vakulenko & Mobashery, 2003). Mají baktericidní účinek, který je závislý na koncentraci podávaného antibiotika a také dlouhý postantibiotický efekt (jev, kdy dochází k potlačení růstu bakterií i po poklesu hladiny terapeutika pod minimální inhibiční koncentraci) (Levison & Levison, 2009). Prvním objeveným aminoglykosidovým antibiotikem byl v roce 1943 streptomycin izolovaný z bakterie *Streptomyces griseus* (Schatz *et al.*, 1944). Ten byl prvním léčivem účinným proti tuberkulóze způsobené bakterií *Mycobacterium tuberculosis*. Streptomycin je v přírodě velmi rozšířeným antibiotikem – je nalezen asi u 1% náhodně izolovaných půdních aktinobakterií (Baltz, 2008).

Přírodní aminoglykosidová antibiotika jsou produkty bakterií rodu *Streptomyces*, v tom případě mají v názvu koncovku –mycin (například streptomycin, neomycin nebo tobramycin), nebo rodu *Micromonospora* s označením antibiotik končícím –micin (gentamicin, sisomicin atd.) (Dewick, 2002). Tyto koncovky však nejsou specifické pouze pro aminoglykosidy, má je řada jiných antibiotik (například makrolidové antibiotikum erythromycin).

Mezi aminoglykosidy se řadí i semisyntetické deriváty těchto látek – do této skupiny patří třeba amikacin odvozený od kanamycinu, netilmicin odvozený od sisomicinu nebo isepamicin, který je derivátem gentamicinu (Kondo & Hotta, 1999).

Aminoglykosidy jsou ve vodě rozpustné bazické sloučeniny s kladným nábojem (v neutrálním pH), díky čemuž se mohou vázat na záporně nabitě sloučeniny, jako jsou lipopolysacharidy, DNA, RNA či fosfolipidy (Jana & Deb, 2006). Kvůli svému polárnímu charakteru se obtížně vstřebávají z trávicího traktu, a tak většinou nejsou podávány orálně, ale parenterálně (intramuskulárně či intravenózně) nebo lokálně pomocí očních kapek (Forge & Schacht, 2000). Aminoglykosidy jsou nízkomolekulární látky, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje mezi 300-600 Da (Nikolaus & Strehlitz, 2014). Z chemického hlediska se jedná o aminocukry glykosidycky vázané na aminocyklitolový kruh, kterým je ve většině případů streptamin nebo 2-deoxystreptamin (Busscher *et al.*, 2005). Strukturně se tak mohou dělit do tří skupin: 2-deoxystreptaminy, které mají cukry navázané v pozici 4 a 6 (například gentamicin, tobramycin nebo amikacin); 2-deoxystreptaminy s cukry ve 4. a 5. pozici (neomycin, paromomycin) a ostatní aminoglykosidy, mezi které se mimo jiné řadí streptomycin (Jana & Deb, 2006). Molekula streptomycinu je tvořena aminocyklitolem zvaným streptidin glykosidicky vázaným k cukru streptóze a N-methylglukosaminu (Granados & Meza, 2005) (obr. 1).

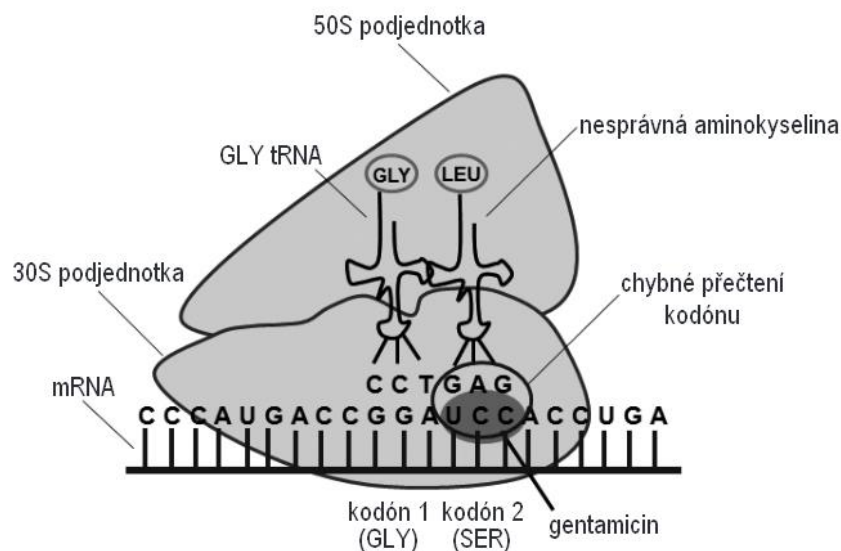


Obr. 1: Struktura streptomycinu (převzato a upraveno z Dewick, 2002) .

Průnik aminoglykosidu do cílové bakteriální buňky probíhá ve třech krocích. Nejdříve se antibiotikum váže na záporně nabitě látky, nejčastěji jimi bývají lipopolysacharidy, fosfolipidy a proteiny vnější membrány u gramnegativních nebo teichoové kyseliny a fosfolipidy u grampozitivních bakterií (Ramirez & Tolmasky, 2011). Při průchodu vnější membránou se uplatňuje proces zvaný self-promoted uptake (Hancock *et al.*, 1991). Při tomto

ději dochází k přemístění vápenatých a hořečnatých kationtů, které za normálních okolností spojují sousední lipopolysacharidy a stabilizují tak jejich strukturu pomocí elektrostatických interakcí (George *et al.*, 2009). Důsledkem je narušení vnější membrány a zvýšení její propustnosti. Následuje krok, který je na rozdíl od první fáze závislý na dostatečném příjmu energie. Ta je získávána transportem elektronů v dýchacím řetězci (z tohoto důvodu mohou být některé anaerobní bakterie rezistentní vůči aminoglykosidům) (Anderson *et al.*, 2012). Tento úsek dostal název energy-dependent phase I (EDP-I) a obecně při něm dochází k přenosu malého množství antibiotika přes cytoplazmatickou membránu, které následně vyvolá nesprávnou proteosyntézu a vznik proteinů, které při zabudování do membrány způsobí snížení její kompaktnosti (Ramirez & Tolmasky, 2011). Toto poškození spouští fázi energy-dependent phase II (EDP-II), která způsobí rychlý transport dalšího množství aminoglykosidu do cytoplazmy, což má za následek usmrcení buňky (Vakulenko & Mobashery, 2003). V cytoplazmě se antibiotikum váže na 30S podjednotku ribozomu. Různé typy aminoglykosidů se ovšem vážou na různá místa v molekule rRNA a mechanismus jejich účinku může být odlišný. Velká část (například neomycin, paromomycin, kanamycin, gentamicin) se připojuje na A-místo 16S ribozomální RNA, tedy na místo určené pro vazbu aminoacyl-tRNA (Wong *et al.*, 1998) (obr. 2). Následkem je nesprávné přečtení mRNA, dochází tak k inhibici elongace polypeptidického řetězce a k tvorbě aberantních proteinů. Existují ale i další mechanismy, díky kterým molekula aminoglykosidu účinně likviduje bakterie. Jedním z nich je kupříkladu inhibice složení 30S ribozomální podjednotky po působení paromomycinu či neomycinu (Mehta & Champney, 2003).

Aminoglykosidová antibiotika jsou díky nízké ceně stále hojně využívaným prostředkem k léčbě některých onemocnění. Přesto se od jejich užívání ustupuje z důvodu možného vzniku rezistence k těmto antibiotikům a také kvůli jejich toxicitě. Jejich vedlejší účinky spočívají především v poškození ledvin nebo sluchového ústrojí (De Jager & van Altena, 2002).



Obr. 2: Vazba gentamicinu na ribozom. Gentamicin se váže na 30S podjednotku ribozomu, čímž způsobí chybné přečtení (misreading) kodónů a tvorbu nesprávných proteinů (převzato a upraveno z Kaneko *et al.*, 2016).

4 Rezistence

Antibiotická rezistence je odolnost organismů vůči působení antibiotika. Doklady o rezistenci u bakterií existují už z dob, kdy antibiotika nebyla masově využívána. Penicilináza, enzym schopný inaktivovat penicilin, byla izolována z bakterie *Escherichia coli* v roce 1940 (Abraham & Chain, 1940), tedy před globálním používáním penicilinu k léčbě infekcí ve 40. letech 20. století. Celosvětovým problémem je také multirezistence (multidrug resistance) některých bakterií, tedy typ rezistence, kdy daný kmen vykazuje odolnost vůči více typům antibiotik. U bakterie *Staphylococcus aureus* rezistentní vůči methicilinu (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* neboli MRSA) byla kromě methicilinu prokázána necitlivost vůči beta-laktamovým antibiotikům, ale také linkosamidům (clindamycinu), makrolidům (erythromycinu), aminoglykosidům (například gentamicinu, tobramycinu či kanamycinu), tetracyklinům a fluorochinonům (Shokravi *et al.*, 2015; Frazee *et al.*, 2005). Fenomén mnohočetné rezistence se vyskytuje převážně v nemocnicích u pacientů s oslabeným imunitním systémem, může ale ohrožovat i zdravé jedince.

Přirozená (primární) rezistence zajištěna přirozenými vlastnostmi bakterií. Daná bakterie může postrádat cílové místo pro napojení antibiotika. Některé gramnegativní bakterie jsou rezistentní vůči makrolidům kvůli tomu, že tato antibiotika jsou tak velká, že neprojdou skrz buněčnou stěnu bakterie. Aminoglykosidy jsou zase mnohdy přirozeně neúčinné vůči

anaerobům, protože pro přenos vyžadují elektron-transportní systém závislý na kyslíku (Giguère *et al.*, 2013). Získaná (sekundární) rezistence vzniká důsledkem selekčního tlaku působícího na bakterie v přítomnosti antibiotika. Selekcce může probíhat ve vnějším prostředí (například v půdě či odpadní vodě), ale také uvnitř člověka léčeného antibiotiky. Tento typ rezistence se vytváří více procesy, které zahrnují bodové mutace, které mohou být dále předány vertikálním přenosem, a nebo horizontálním přenosem (HGT) větších částí DNA mezi různými bakteriálními druhy, tedy konjugací, transformací nebo transdukcí.

4.1 Mechanismy rezistence

Bakterie si vyvinuly řadu mechanismů, díky kterým se brání působení antibiotika. Dosud bylo popsáno několik základních typů antibiotické rezistence: modifikace nebo nahrazení cílového místa, snížená membránová permeabilita, vylučování látky z buňky pomocí membránových pump a inaktivace antibiotika modifikací nebo degradací (pomocí enzymů).

4.1.1 Modifikace nebo nahrazení cílového místa

Některé bakterie jsou schopny modifikovat zásahové místo antibiotika, čímž zabrání účinku dané sloučeniny. Příkladem je stafylokok MRSA, který je rezistentní vůči beta-laktamovým antibiotikům. U této bakterie dochází k expresi genu *mecA*, který kóduje transpeptidázu PBP2A (penicillin binding protein 2A) vykazující na rozdíl od ostatních PBP nízkou afinitu k danému antibiotiku (Pinho *et al.*, 2001). V přítomnosti PBP2A (neboli PBP2^c) se tak buňka stává rezistentní a beta-laktamy neinhibují syntézu buněčné stěny. Některé aktinobakterie (převážně rodu *Streptomyces*) jsou producenty beta-laktamových antibiotik (Núñez *et al.*, 2003; Bussari *et al.*, 2008) a vyžadují tudíž obranné mechanismy, kterými se chrání před účinky těchto látek. Podílí se na nich hlavně PBP s nízkou afinitou k beta-laktamům (Ishida *et al.*, 2006). Genový klastř pro biosyntézu těchto antibiotik obsahuje kromě genů kódujících PBP také geny pro beta-laktamázy. Role těchto enzymů na rozvoji rezistence u aktinobakterií zatím není plně vysvětlena (Ogawara, 2015).

Některé aktinobakterie vlastní geny *erm*, které kódují rRNA methyltransferázy. Tyto enzymy zajišťují rezistenci k makrolidům, linkosamidům a streptogaminu B způsobenou metylací adeninu nacházející se na 23S rRNA (Pfister *et al.*, 2005). Geny *erm* se často nacházejí na plazmidech nebo transpozonech. Mohou tak být přenášeny horizontálním přenosem, a to nejen mezi aktinobakteriemi, ale i mezi fylogeneticky nepodobnými skupinami bakterií (Park *et al.*, 2010).

4.1.2 Snížená permeabilita membrány

Rezistence může být důsledkem neschopnosti antibiotika projít skrz membránu, čímž se nemůže navázat cílové místo. Tento typ rezistence je účinný například proti antibiotiku polymyxinu u *Pseudomonas aeruginosa* a dalších gramnegativních bakterií. Mechanismem je modifikace lipidu A lipopolysacharidu (LPS) na vnější membráně, důsledkem čehož se redukuje záporný náboj povrchu bakterie (Fernández *et al.*, 2013). Tím se pozitivně nabitý polymyxin hůře váže na membránu a nemůže vstoupit do buňky.

4.1.3 Vylučování antibiotika z buňky (efflux)

Častým mechanismem rezistence je aktivní vypuzování antibiotika z intracelulárního prostoru bakterie pomocí pump. Velká část efluxních pump vylučuje pouze určitý typ antibiotika, někteří zástupci ale vykazují necitlivost vůči více typům léčiv díky proteinovým transportérům zvaným multidrug efflux pumps, pomocí kterých jsou bakterie schopny vypuzovat i strukturně odlišná antibiotika (Zhang *et al.*, 2011). Rezistence k tetracyklinu pomocí pump byla prokázána u řady grampozitivních a gramnegativních bakterií. Zajišťují ji geny *tet*, které kromě proteinů nutných k efluxu kódují také proteiny, které chrání ribozomy před působením tetracyklinu a také enzymy inaktivující tuto sloučeninu (Roberts, 2005). Zdrojem energie při vypuzování tetracyklinu z buňky je protonmotivní síla (Lomovskaya & Watkins, 2001). Geny kódující rezistenci k tetracyklinu (*tet*) a oxytetracyklinu (*otr*) byly nalezeny i u rodu *Streptomyces* (Chopra & Roberts, 2001). Zvláště pak geny *tet(K)* a *tet(L)* kódující proteiny potřebné k vylučování antibiotik z buňky jsou rozšířeny u grampozitivních bakterií, kromě některých zástupců rodu *Streptomyces* byly také například nalezeny u rodu *Mycobacterium* či *Nocardia* (Pang *et al.*, 1994; Doran *et al.*, 1997). Tyto geny se často nacházejí na plazmidech (mohou být také inkorporovány do chromozomu), a proto se mohou podílet na přenosu rezistence k tetracyklinu pomocí konjugace, a to nejen v půdním prostředí (Roberts & Schwarz, 2009). U aktinobakterie *Streptomyces lividans* byly také objeveny geny kódující systémy efluxních pump vylučující více typů antibiotik. Studie autorů Lee a kol. z roku 2007 ovšem ukázala, že kvůli represi velké části těchto genů je v laboratoři většina zástupců citlivá k testovaným antibiotikům. Tento efluxní systém tedy zřejmě není dostačující pro export antibiotik. Je tedy pravděpodobné, že hlavní úlohou většiny těchto pump je vypuzování toxických látek tvořených uvnitř bakterií během buněčného růstu.

4.1.4 Inaktivace antibiotika

Důležitým mechanismem, díky kterému se bakterie účinně brání látkám s antibiotickým účinkem, je inaktivace dané sloučeniny. Tuto činnost provádí třeba beta-laktamázy, které jsou kódovány geny *bla* (Chen *et al.*, 2003). Tyto enzymy, jejichž geny se nacházejí na chromozomu nebo plazmidu, ruší účinky beta-laktamových antibiotik hydrolýzou beta-laktamového kruhu (Torimiro *et al.*, 2013). Některé bakterie jsou schopné produkovat beta-laktamázy s širokým spektrem účinku. Díky rezistenci vůči více typům beta-laktamových antibiotik jsou tak závažným problémem v klinické praxi. K potlačení účinků antibiotik bakterie využívají také přenos specifických chemických skupin na danou sloučeninu. K tomu jsou potřeba enzymy, které modifikují antibiotikum a ztíží mu tak vazbu na cílové místo.

4.2 Rezistence k aminoglykosidům

Zvyšující se spotřeba aminoglykosidových antibiotik a jejich nesprávné užívání je hnací silou pro vznik a přenos genů, které bakterie chrání před účinky těchto látek. Zvláště pak aktinobakterie jako producenti těchto antibiotik jim musí čelit. Do dnešní doby bylo popsáno několik mechanismů antibiotické rezistence k AG. Obecně se dají rozdělit do tří skupin: (1) nedostatečné množství antibiotika v buňce způsobené redukovanou permeabilitou membrány, sníženým transportem či aktivním efluxem, (2) modifikace vazebného místa mutací ribozomálních proteinů nebo metylací 16S rRNA nebo (3) inaktivace pomocí enzymů.

4.2.1 Redukce intracelulární koncentrace

Aktivní vypuzování antibiotika z buňky neboli eflux je mimo jiné příčinou rezistence vůči AG u gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Bylo u ní popsáno několik typů pump, mezi něž se řadí i systém MexXY-OprM, který je klíčovým prostředkem obrany vůči aminoglykosidovým antibiotikům (Hocquet *et al.*, 2003). Nepropustnost membrány pro antibiotika je jiným způsobem překonávání vlivu AG na *P. aeruginosa*, a to velmi často u pacientů s cystickou fibrózou (Macleod *et al.*, 2000).

4.2.2 Modifikace cílového místa

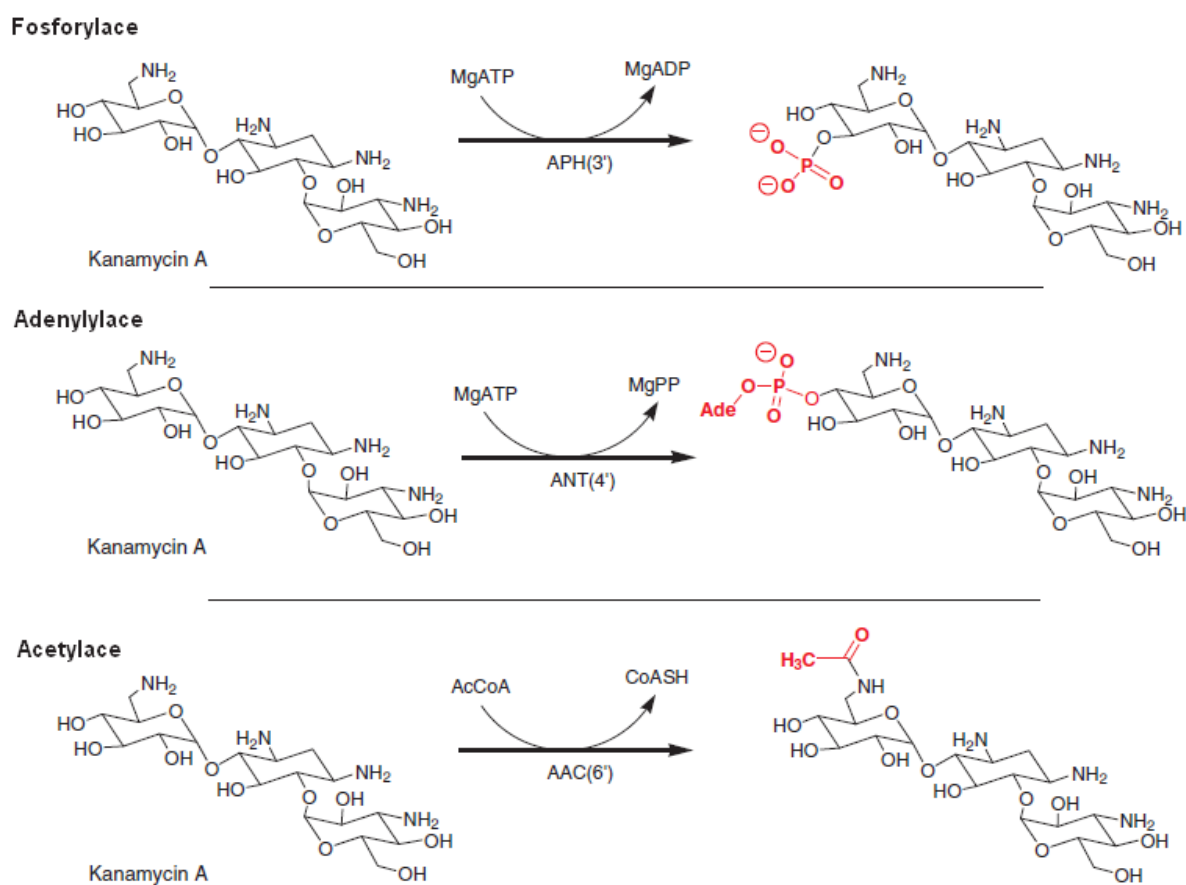
Jinou možností necitlivosti vůči AG je modifikace cílového místa mutací ribozomálních proteinů. Necitlivost k streptomycinu pomocí mutace ribozomu je klinicky důležitá u bakterie *Mycobacterium tuberculosis*. Zástupci rodu *Mycobacterium* obsahují jeden nebo dva rRNA operony (*rrn*) (Menendez *et al.*, 2002), samotný původce tuberkulózy má v genomu pouze

jednu kopii tohoto operonu (Verma *et al.*, 1999). K rozvoji antibiotické rezistence stačí tedy jediná mutace genu, který je součástí tohoto operonu. Mechanismem je změna v genu *rrs*, který kóduje 16S rRNA 30S ribozomální podjednotky. Tehdy dochází k mutaci v okolí nukleotidů s pořadím 530 nebo 912 (Cooksey *et al.*, 1996), čímž se streptomycin váže s nižší afinitou. Další možností obrany vůči AG je bodová mutace v genu *rpsL* kódujícím ribozomální protein S12, konkrétně v kodónu 43 nebo 88, následkem čehož je lysin nahrazen jinou aminokyselinou (argininem, threoninem, popřípadě glutaminem) (Cuevas-Córdoba *et al.*, 2013). Mezi tento typ rezistence se také řadí metylace bakteriální 16S ribozomální RNA. Důležitou roli zde hrají metyltransferázy, které pomocí metylace specifických a pro vazbu aminoglykosidů důležitých nukleotidů modifikují 16S rRNA, čímž brání napojení AG na ribozom (Doi & Arakawa, 2007). Tyto S-adenosyl-L-methionin (SAM)-dependentní metyltransferázy působí na dvě specifické oblasti, nukleotid G1405 v pozici N7 nebo A1408 v pozici N1 (Macmaster *et al.*, 2010). Mezi metyltransferázy, které katalyzují přenos metylové skupiny na adenin se řadí KamB izolovaný z bakterie *Streptoalloteichus tenebrarius* (Zelinskaya *et al.*, 2012) nebo Kama ze *Streptomyces tenjimariensis* (Wachino *et al.*, 2007). V obou případech se jedná o aktinobakterie produkující aminoglykosidy a modifikací 16S rRNA vytvářejí rezistenci například ke kanamycinu, neomycinu a apramycinu (Witek & Conn, 2014). V genomu *S. tenebrarius* se také nachází gen pro KgmB, metyltransferázu, která stejně jako například transferáza Sgm z bakterie *Micromonospora zionensis* způsobuje metylaci guaninu G1405 (Vojnović *et al.*, 2010). Důsledkem těchto modifikací je rezistence ke kanamycinu, gentamicinu a jiným AG tvořeným 2-deoxystreptaminem s cukry v poloze 4 a 6 (Witek & Conn, 2014). Ačkoliv byly 16S rRNA metyltransferázy objeveny hlavně u aktinomycet produkujících aminoglykosidy, podobné geny byly nalezeny i u jiných, klinicky významných zástupců. Yokoyama a kolektiv identifikoval gen *rmtA* z *Pseudomonas aeruginosa*, jehož produktem je protein RmtA (Yokoyama *et al.*, 2003). Tento protein vykazuje poměrně malou strukturní podobnost s metyltransferázami izolovaných z aktinobakterií tvořících AG (sekvence aminokyselin se shodovala v 35% s transferázou GrmB z aktinomycety *Micromonospora rosea* a v 34% se Sgm produkovanou *M. zionensis*), přesto je také účinným prostředkem k navození vysoké míry rezistence k odlišným aminoglykosidům. U bakterie *Serratia marcescens* byla popsána 16S rRNA metyltransferáza RmtB, vykazující silnou podobnost s RmtA (82%) (Doi *et al.*, 2004). Jiným příkladem je protein ArmA, který byl nalezen u enterobakterie *Klebsiella pneumoniae* (Galimand *et al.*, 2003). Tyto geny jsou většinou asociovány s plazmidy a mohou tak být přeneseny do jiných bakterií pomocí HGT. Částečná podobnost primární sekvence RmtA s metyltransferázami z aktinobakterií a hlavně vysoký podíl GC párů v genu *rmtA* (55%)

naznačuje, že s největší pravděpodobností došlo k horizontálnímu přenosu z aktinomycet produkujících AG (Yokoyama *et al.*, 2003). Naopak obsah guaninu a cytosinu v genu *armA* je poměrně nízký (30%), což vyvrací předchozí tvrzení (Galimand *et al.*, 2003). Tento gen tedy bakterie zřejmě nezískaly od producentů AG přímo nebo v nedávné minulosti.

4.2.3 Enzymatická modifikace

Inaktivace antibiotik pomocí enzymů je nejčastější mechanismus rezistence k aminoglykosidům. Tyto enzymy (v angličtině zvané aminoglycoside modifying enzymes, zkráceně AME) katalyzují reakce modifikující aminové nebo hydroxylové skupiny antibiotika. Výsledkem těchto reakcí je snížená schopnost AG vázat se na A-místo 16S rRNA, která tak u bakterií navodí rezistenci (Llano-Sotelo *et al.*, 2002). Byly popsány tři třídy enzymů modifikujících aminoglykosidy: aminoglykosid acetyltransferázy (AAC), aminoglykosid fosfotransferázy (APH) a aminoglykosid nukleotidyltransferázy (ANT) známé také jako aminoglykosid adenyltransferázy. Tyto enzymy katalyzují tři typy reakcí (obr. 3).



Obr. 3: Mechanismy enzymů inaktivující aminoglykosidy (převzato a upraveno z Magalhães & Blanchard, 2009).

4.2.3.1 Aminoglykosid acetyltransferázy

Aminoglykosid N-acetyltransferázy jsou největší skupinou AME. Tyto proteiny katalyzují přenos acetylové skupiny z acetylkoenzymu A na aminoskupiny AG (Magnet *et al.*, 2003). Řadí se zde enzymy, které acetylují aminoskupiny 2-deoxystreptaminu v pozici 1 a 3, a také enzymy, které způsobují acetylaci aminoskupin 6-aminohexózy v pozici 2' a 6' (Vakulenko & Mobashery, 2003). Podle toho se dělí na čtyři skupiny: AAC(1), AAC(2'), AAC(3) a AAC(6').

AAC(1) je málo prostudovanou skupinou acetyltransferáz. Byla popsána u bakterie *Escherichia coli* (Lovering *et al.*, 1987), ale Sunada a kolektiv úspěšně izoloval tento enzym i z jednoho kmene půdní aktinomycety (Sunada *et al.*, 1999). Tato acetyltransferáza ale na rozdíl od AAC(1) z *E.coli* vykazovala pouze slabou schopnost acetylace apramycinu.

AAC(2') jsou dalším typem acetyltransferáz vyskytující se u omezených skupin bakterií. Přestože gen pro AAC(2')-Ia byl popsán u enterobakterie *Providencia stuartii* (Franklin & Clarke, 2001), většina enzymů této skupiny byla izolována z mykobakterií. Patří sem acetyltransferázy kódované geny *aac(2')-Ib*, *-c*, *-d* a *-e* objevené u různých zástupců rodu *Mycobacterium* (Aínsa *et al.*, 1996; Aínsa *et al.*, 1997). Enzymy kódované těmito geny ale na rozdíl od AAC(2')-Ia nezpůsobují výraznou rezistenci vůči AG (Vakulenko & Mobashery, 2003). Dosavadní studie ukázaly, že jsou geny *aac(2')* kódovány chromozomálně.

Do dnešní doby bylo identifikováno 10 skupin náležících do AAC(3), označující se AAC(3)-I až AAC(3)-XI. Geny kódující AAC(3)-V se ukázaly být identické s AAC(3)-II, a proto byla skupina s označením V vyřazena (Shaw *et al.*, 1993). Pro studium aktinomycet jsou důležité acetyltransferázy AAC(3)-VII až AAC(3)-X, které se podařilo izolovat právě z této skupiny bakterií. Cílem jedné práce z roku 2015 byla identifikace genů rezistence u *Corynebacterium striatum* odolné vůči gentamicinu a tobramycinu (Galimand *et al.*, 2015). Výsledkem analýzy genomu této aktinobakterie byl objev dosud nepopsané aminoglykosid acetyltransferázy, která dostala označení AAC(3)-XI.

Rezistenci ke klinicky nejvýznamnějším aminoglykosidům zajišťují AAC(6'). Součástí této skupiny enzymů jsou AAC(6')-I a AAC(6')-II. AAC(6')-I jsou hojně rozšířenými enzymy, zatím poslední objevenou acetyltransferázou je chromozomálně kódovaná AAC(6')-Ial z enterobakterie *Serratia marcescens* (Tada *et al.*, 2016). Jeden z typů AAC(6')-I byl také charakterizován u kmene *Streptomyces albulus* (Hamano *et al.*, 2004). Ten vykazoval poměrně výraznou podobnost s aminoglykosid 6'-acetyltransferázou ze *Streptomyces kanamyceticus* (61%). AAC(6')-II je jednou z nejčastějších acetyltransferáz u *Pseudomonas aeruginosa*, kde je její hlavní úlohou zajištění rezistence ke gentamicinu a tobramycinu (Vaziri *et al.*, 2011).

4.2.3.2 Aminoglykosid fosfotransferázy

Druhou největší skupinou enzymů inaktivujících AG jsou aminoglykosid O-fosfotransferázy. Rezistence pomocí APH je zajištěna přenosem fosforylové skupiny z ATP na hydroxylovou skupinu AG (shrnutí v Wright & Thompson, 1999). Do dnešní doby bylo popsáno sedm skupin: APH(2[‘]), APH(3[‘]), APH(3^{‘‘}), APH(4), APH(6), APH(7[‘]) a APH(9).

Je známo sedm typů fosfotransferáz modifikujících hydroxylovou skupinu AG v pozici 3[‘], a to konkrétně APH(3[‘])-I až APH(3[‘])-VII. Gen kódující APH(3[‘])-I byl po sekvenaci plazmidu pTP10 popsán u patogenní aktinobakterie *Corynebacterium striatum* rezistentní ke kanamycinu, neomycinu, livodomycinu, paromomycinu a ribostamycinu (Tauch *et al.*, 2000). Byl lokalizován na transpozonu Tn5715.

Gen *aph(3[‘])-Ic*, jehož produktem je enzym fosforylující streptomycin, byl izolován z *Mycobacterium fortuitum* (Ramón-García *et al.*, 2006). Podobné geny byly identifikovány i u *Streptomyces griseus*. Ovšem některé izoláty *M. fortuitum* neobsahovaly tento gen, a přesto vykazovaly rezistenci k streptomycinu. Je tedy pravděpodobné, že mají i jiné obranné mechanismy, kterými se chrání před tímto aminoglykosidem.

Gen pro APH(6)-Ia (zvaný též *strA* nebo *aphD*) a APH(6)-Ib (*sph*) byl nalezen u producentů streptomycinu, *Streptomyces griseus* a *Streptomyces glaucescens* (Distler *et al.*, 1987; Vöggtli & Hütter, 1987). Tyto enzymy jsou klíčové pro obranu těchto bakterií před účinky vlastních antibiotik. Důležitou roli při nastolení rezistence vůči streptomycinu hraje také gen *aph(6)-Id*, který sousedí s genem *aph(3[‘])-Ib*, dvojice genů dostala označení *strA-strB*. Tyto geny se u bakterií izolovaných z lidí a zvířat často nacházejí na nekonjugativních plazmidech, u izolátů z rostlin bývají lokalizovány na transpozonech umístěných na konjugativních plazmidech (Sundin & Bender, 1996). Studie zaměřená na *Streptomyces griseus* prokázala, že gen *strA* kódující APH(6[‘]) zajišťující rezistenci k streptomycinu má stejného předka jako gen v klastru pro biosyntézu tohoto AG (Laskaris *et al.*, 2010). Tyto dva geny se tedy zřejmě současně vyvíjely v půdě.

Aktinobakterie *Streptomyces hygroscopicus* je nositelem genu pro APH(7[‘]), jenž inaktivuje aminoglykosid zvaný hygromycin B (Berthold *et al.*, 2002).

4.2.3.3 Aminoglykosid nukleotidyltransferázy

Aminoglykosid O-nukleotidyltransferázy katalyzují přenos AMP z molekuly ATP na hydroxylové skupiny aminoglykosidů v pozici 2[‘], 3[‘], 4[‘], 6 nebo 9, čímž činí tato antibiotika neaktivní (Vakulenko & Mobashery, 2003). Jejich geny se často nacházejí na plazmidech, transpozonech a integronech.

ANT(2[']) je skupinou nacházející se u řady gramnegativních bakterií, včetně *Pseudomonas aeruginosa*. U této bakterie je gen pro ANT(2['])-I spolu s geny kódujícími aminoglykosid acetyltransferázou často nejrozšířenějším nástrojem k rozvoji rezistence k AG pomocí AME (Vaziri *et al.*, 2011).

Geny pro ANT(3[']) byly nalezeny u gramnegativních i grampozitivních bakterií. Plazmid patogenní aktinomyce *Corynebacterium resistens* DSM 45100 izolované z krve pacientů s leukémií obsahuje několik genů rezistence, z nichž jedním je *aadA1a* kódující ANT(3['])-Ia (Schröder *et al.*, 2012). Nukleotidyltransferázy se ovšem nevyskytují pouze u klinických izolátů. Produkt genu *aadA2*, aminoglykosid-3[']-adenylyltransferáza, byl nalezen na plazmidu pCG4 půdní bakterie *Corynebacterium glutamicum* (Nešvera *et al.*, 1998). Tento enzym vyvolává rezistenci k streptomycinu a spectinomycinu.

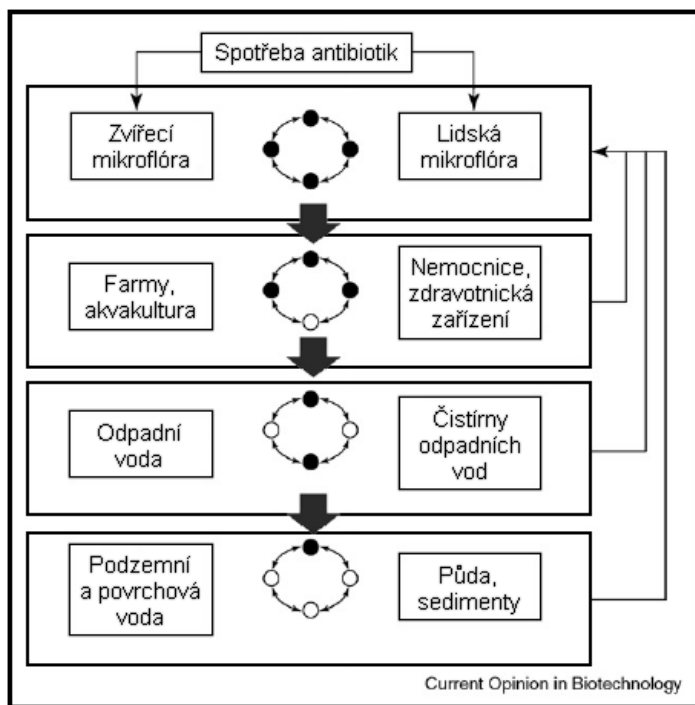
Adenylyltransferázy ANT(4[']), ANT(6) a ANT(9) se často nacházejí u grampozitivních bakterií, například rodu *Enterococcus* nebo *Staphylococcus* (Kobayashi *et al.*, 2001; Overesch *et al.*, 2011).

4.3 Geny rezistence v půdním prostředí

Půda je heterogenní prostředí, které je rezervoárem pro řadu organismů včetně bakteriálních společenstev. Přirozeně se zde vyskytují půdní aktinomyce syntetizující antibiotika. Spolu s antibiotickou produkcí však tyto bakterie vyžadují geny rezistence, které znemožňují usmrcení vlastních buněk vlivem sloučenin s antimikrobiálním účinkem. Odolnost k antibiotikům je ale také důležitá pro bakterie neschopné tvořit tyto látky. Klíčovým faktorem pro vznik a přenos těchto genů v půdním prostředí je kompetice mezi mikroorganismy, která zvyšuje šanci na přežití rezistentních zástupců v těchto podmínkách. Některé aktinobakterie vykazují necitlivost k více typům antibiotik. Dokládá to studie autorů D'Costa a kol. (2006). Náplní práce byla izolace 480 kmenů půdních bakterií rodu *Streptomyces*, z nichž všechny byly rezistentní v průměru k 7 až 8 antibiotikům z 21 testovaných.

Antropogenní vlivy jsou důležitým faktorem při vzniku genů rezistence a jejich rozšíření mezi bakteriemi. Obecně se antibiotická rezistence může rozvinout ve 4 genetických reaktorech (Baquero *et al.*, 2008) (obr. 4). Prvním jsou mikrobiální populace uvnitř lidí a zvířat, které jsou vystaveny účinkům antibiotik. Následuje reaktor, který zahrnuje nemocnice, lékařská zařízení a farmy. Třetí se skládá z odpadní vody a jiných odpadů produkovaných lidmi a zvířaty, kde může probíhat výměna genetické informace. Poslední místo, ve kterém se vyvíjí rezistence, zahrnuje půdní a vodní prostředí. Zde se organismy střetávají s bakteriemi pocházejícími

z předchozích reaktorů. Ke vzniku rezistence tedy přispívá nejen selekční tlak po kontaktu s antibiotikem používaným v medicíně nebo zemědělství, ale i HGT mezi půdními a potencionálně patogenními bakteriemi pocházejících z nemocnic a jiných zařízení. Geny rezistence se ovšem v půdě vyvíjely i před používáním antibiotik v klinické praxi, Costa a kolektiv (2011) analyzovali geny zajišťující rezistenci k beta-laktamům, tetracyklinům a glykopeptidovým antibiotikům ze sedimentů v permafrostu. Staří sedimentů určili na 30 000 let. Evoluce rezistence je tudíž u bakterií dlouhodobým procesem.



Obr. 4: Čtyři genetické reaktory antibiotické rezistence. Bakterie pocházející z lidí a zvířat (černé kruhy) se střetávají s bakteriemi z vnějšího prostředí (bílé kruhy), díky čemuž si mohou vyměňovat genetickou informaci (převzato a upraveno z Baquero *et al.*, 2008).

Je tedy zřejmé, že půdní ekosystém je bohatým zdrojem antibiotik a genů rezistence. Problémem při znečištění půdy antibiotiky je adsorpce k půdním částicím, čímž se zpomaluje jejich degradace. Tento proces může být ovlivňován i jinými faktory, například nízkou teplotou (Dolliver & Gupta, 2008), charakterem půdy nebo vlastnostmi a koncentrací antibiotika (Pan & Chu, 2016). Bylo prokázáno, že antibiotika mohou mít i po navázání na částice půdy antimikrobiální aktivitu (Chander *et al.*, 2005). Na místech, která jsou trvale zahlcována antibiotiky, jsou tak bakterie neustále v kontaktu s těmito sloučeninami. Půdní rezistom (soubor všech genů, které mikroorganismům udělují rezistenci) pak může být rozsáhlý.

4.4 Přenos genů rezistence

Kromě vertikálního přenosu z mateřské na dceřinné buňky je klíčovým procesem při šíření antibiotické rezistence horizontální přenos genetické informace. Jsou známy tři typy horizontálního přenosu: transformace, transdukce a konjugace. Při transformaci dochází k přenosu volné DNA do recipientní buňky, která může být následně integrována do chromozomu. V prostředí může být molekula DNA vázána na půdní částice, což jí zajistí ochranu před degradací nukleázami (Demanèche *et al.*, 2001). Transdukce spočívá ve vnesení genetické informace do bakterie prostřednictvím bakteriofága. Fágy schopné generalizované transdukce (přenášející libovolné geny, z chromozomu i plazmidu) byly mimo jiné nalezeny i u půdních bakterií rodu *Streptomyces* (Burke *et al.*, 2001). Nejdůležitějším typem šíření genů rezistence pomocí HGT je ovšem konjugace. Jejím mechanismem je vzájemný kontakt dvou bakterií zprostředkovaný pili, při kterém dochází k přenosu genetické informace. Hlavní roli zde hrají plazmidy, ve většině případů kruhové molekuly DNA, které se mohou replikovat nezávisle na chromozomu.

Na distribuci genů kódujících antibiotickou rezistenci se podílí převážně plazmidy, transpozony a integrony. Přenos pomocí plazmidů může být v půdním prostředí ovlivněn různými faktory, mezi které se řadí teplota, vlhkost, pH, množství organické hmoty a také obsah jílu v půdě (Richaume *et al.*, 1989). Plazmidy byly popsány u různých druhů aktinomycet, ovšem ne všechny obsahují geny, které bakterie chrání před antibiotiky. Na druhou stranu součástí některých plazmidů jsou geny, které udělují rezistenci k různým typům antibiotik.

Transpozony jsou úseky DNA, které jsou schopné měnit svou lokalizaci v rámci genomu. Mohou se integrovat do chromozomu, ale také plazmidu, díky čemuž se mohou přenášet do jiných bakterií pomocí konjugace nebo transformace. Transpozon Tn5432 umístěný na plazmidu byl popsán u klinického izolátu bakterie *Corynebacterium xerosis* (Tauch *et al.*, 1995). Součástí transpozonu byl gen *ermCX* kódující rezistenci k erythromycinu.

Nedílnou součástí horizontálně přenášené rezistence jsou integrony. Tyto elementy umí zachytit exogenní genové kazety pomocí místně specifické rekombinace (Mazel, 2006). Mohou být lokalizovány na chromozomu, plazmidu nebo transpozonu. V současnosti je popsáno pět tříd integronů účastnících se přenosu antibiotické rezistence, z nichž neprostudovanější jsou integrony 1. třídy (class 1 integrons). Jejich přítomnost byla potvrzena například u půdní bakterie *Corynebacterium glutamicum*, u které navozuje rezistenci k streptomycinu a spectinomycinu (Nešvera *et al.*, 1998). Výskyt integronů 1. třídy je však v prostředí ovlivněn

mnoha faktory, mezi něž se řadí znečištění vody a půdy lidskou aktivitou, vlastnosti krajiny a klimatické podmínky (Amos *et al.*, 2015).

5 Závěr

Aktinobakterie jsou globálně rozšířené grampozitivní bakterie, které díky svému působení na Zemi získaly důležité postavení mezi mikroorganismy. Mnoho půdních zástupců je schopno syntetizovat antibiotika, stejně tak je ale řada kmenů schopna vykazovat odolnost vůči těmto látkám. Rezistence je výsledkem různých procesů odehrávajících se v bakteriální buňce. V půdě jsou organismy často vystaveny látkám s antimikrobiálními účinky, takže variabilita genů rezistence je v tomto prostředí vysoká. Aktinobakterie vykazují několik mechanismů odolnosti k antibiotikům, mezi něž se řadí modifikace cílového místa, aktivní vylučování, snížená permeabilita membrány nebo přímo inaktivace antibiotika. Právě inaktivace je rozšířeným mechanismem u bakterií necitlivých k aminoglykosidům. Tyto produkty aktinomycet rodu *Streptomyces* a *Micromonospora* mohou být modifikovány aminoglykosid N-acetyltransferázami, aminoglykosid O-fosfotransferázami či aminoglykosid O-nukleotidyltransferázami. Není výjimkou, že geny kódující tyto enzymy se nacházejí na elementech přispívajících k jejich rozšíření – plazmidech, transpozonech nebo integronech. Tři typy horizontálního přenosu genetické informace (transformace, transdukce a konjugace) mají významný podíl v šíření antibiotické rezistence mezi bakteriemi odlišného původu.

Půdní prostředí je ekosystémem, který je zdrojem pestré škály mikroorganismů. Předpokládá se, že pouze 1% bakterií je kultivovatelné pomocí klasických metod. Je tedy důležité zaměřit na zbylých 99% bakteriálních zástupců, jež mohou být zdrojem nových sekundárních metabolitů a genů kódujících rezistenci. Studium půdních aktinobakterií má tedy v současné době velký potenciál, který je potřeba plně využít.

6 Seznam použité literatury

- Abraham, E. P., & Chain, E. B. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, *146*, 837.
- Aínsa, J. A., Martín, C., Gicquel, B., & Gomez-Lus, R. (1996). Characterization of the chromosomal aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase gene from *Mycobacterium fortuitum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *40*(10), 2350–2355.
- Aínsa, J. A., Pérez, E., Pelicic, V., Berthet, F.-X., Gicquel, B., & Martín, C. (1997). Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase genes are universally present in mycobacteria: characterization of the aac(2')-Ic gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the aac(2')-Id gene from *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular Microbiology*, *24*(2), 431–441.
- Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*, *36*, 697–705.
- Amos, G. C. A., Gozzard, E., Carter, C. E., Mead, A., Bowes, M. J., Hawkey, P. M., ... Wellington, E. M. H. (2015). Validated predictive modelling of the environmental resistome. *The ISME Journal*, *9*(6), 1467–1476.
- Anderson, R., Groundwater, P., Todd, A., & Worsley, A. (2012). *Antibacterial agents: chemistry, mode of action, mechanisms of resistance and clinical applications*.
- Anukool, U., Gaze, W. H., & Wellington, E. M. H. (2004). In situ monitoring of streptothricin production by *Streptomyces rochei* F20 in soil and rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(9), 5222–5228.
- Atlas, R. M. (1996). *Principles of microbiology*.
- Baltz, R. H. (2007). Antimicrobials from actinomycetes: back to the future. *Microbe*, *2*(3), 125–131.
- Baltz, R. H. (2008). Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Current Opinion in Pharmacology*, *8*(5), 557–563.
- Baquero, F., Martínez, J.-L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, *19*(3), 260–265.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, *58*(1), 1–26.
- Berthold, P., Schmitt, R., & Mages, W. (2002). Gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist*, *153*(4), 401–412.

- Bevivino, A., Paganin, P., Bacci, G., Florio, A., Pellicer, M. S., Papaleo, M. C., ... Dalmastrì, C. (2014). Soil bacterial community response to differences in agricultural management along with seasonal changes in a Mediterranean region. *PLoS ONE*, 9(8).
- Burke, J., Schneider, D., & Westpheling, J. (2001). Generalized transduction in *Streptomyces coelicolor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11), 6289–6294.
- Bussari, B., Saudagar, P. S., Shaligram, N. S., Survase, S. A., & Singhal, R. S. (2008). Production of cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* NT4 using solid-state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(1), 49–58.
- Busscher, G. F., Rutjes, F. P. J. T., & Delft, F. L. Van. (2005). 2-Deoxystreptamine: central scaffold of aminoglycoside antibiotics. *Chemical Reviews*, 105(3), 775–791.
- Cooksey, R. C., Morlock, G. P., McQueen, A., Glickman, S. E., & Crawford, J. T. (1996). Characterization of streptomycin resistance mechanisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in New York City. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(5), 1186–1188.
- Costa, V. M. D., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., ... Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457–461.
- Cuevas-Córdoba, B., Cuellar-Sánchez, A., Pasissi-Crivelli, A., Santana-Álvarez, C. A., Hernández-Illezcas, J., & Zenteno-Cuevas, R. (2013). rrs and rpsL mutations in streptomycin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mexico. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 46(1), 30–34.
- D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., & Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science*, 311(5759), 374–377.
- Das, S., Lyla, P. S., & Khan, S. A. (2008). Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 26(2), 166–177.
- De Jager, P., & van Altena, R. (2002). Hearing loss and nephrotoxicity in long-term aminoglycoside treatment in patients with tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 6(7), 622–627.
- Demanèche, S., Jocteur-Monrozier, L., Quiquampoix, H., & Simonet, P. (2001). Evaluation of biological and physical protection against nuclease degradation of clay-bound plasmid DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 293–299.
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*.

- Distler, J., Ebert, A., Mansouri, K., Pissowotzki, K., Stockmann, M., & Piepersberg, W. (1987). Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity. *Nucleic Acids Research*, *15*(19), 8041–8056.
- Doi, Y., & Arakawa, Y. (2007). 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases*, *45*(1), 88–94.
- Doi, Y., Yokoyama, K., Yamane, K., Wachino, J., Shibata, N., Yagi, T., ... Arakawa, Y. (2004). Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(2), 491–496.
- Dolliver, H., & Gupta, S. (2008). Antibiotic losses in leaching and surface runoff from manure-amended agricultural land. *Journal of Environmental Quality*, *37*(3), 1227–1237.
- Doran, J. L., Pang, Y., Mdluli, K. E., Moran, A. J., Victor, T. C., Stokes, R. W., ... Nano, F. E. (1997). *Mycobacterium tuberculosis* efpA encodes an efflux protein of the QacA transporter family. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, *4*(1), 23–32.
- Durante-Mangoni, E., Grammatikos, A., Utili, R., & Falagas, M. E. (2009). Do we still need the aminoglycosides? *International Journal of Antimicrobial Agents*, *33*(3), 201–205.
- Fernández, L., Álvarez-Ortega, C., Wiegand, I., Olivares, J., Kocíncová, D., Lam, J. S., ... Hancock, R. E. W. (2013). Characterization of the polymyxin B resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(1), 110–119.
- Forge, A., & Schacht, J. (2000). Aminoglycoside antibiotics. *Audiology and Neurotology*, *5*(1), 3–22.
- Franklin, K., & Clarke, A. J. (2001). Overexpression and characterization of the chromosomal aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase of *Providencia stuartii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(8), 2238–2244.
- Frazer, B. W., Lynn, J., Lambert, L., & Lowery, D. (2005). High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in emergency department skin and soft tissue infections. *Annals of Emergency Medicine*, *45*(3), 311–320.
- Galimand, M., Courvalin, P., & Lambert, T. (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *47*(8), 2565–2571.
- Galimand, M., Fishovitz, J., Lambert, T., Barbe, V., Zajicek, J., Mobashery, S., & Courvalin, P. (2015). AAC(3)-XI, a new aminoglycoside 3-N-acetyltransferase from *Corynebacterium striatum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(9), 5647–5653.

- George, S., Hamblin, M. R., & Kishen, A. (2009). Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8(6), 788–795.
- Giguère, S., Prescott, J. F., & Dowling, P. M. (2013). *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*.
- Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 37(1), 189–216.
- Granados, O., & Meza, G. (2005). Streptidine, a metabolic derivative produced after administration of streptomycin in vivo, is vestibulotoxic in rats. *Histology and Histopathology*, 20(2), 357–364.
- Hamano, Y., Hoshino, Y., Nakamori, S., & Takagi, H. (2004). Overexpression and characterization of an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase with broad specificity from an ϵ -poly-L-lysine producer, *Streptomyces albulus* IFO14147. *The Journal of Biochemistry*, 136(4), 517–524.
- Han, S. K., Nedashkovskaya, O. I., Mikhailov, V. V., Kim, S. B., & Bae, K. S. (2003). *Salinibacterium amurskyense* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family *Microbacteriaceae* from the marine environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 2061–2066.
- Hancock, R. E. W., Farmer, S. W., Li, Z., & Poole, K. (1991). Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(7), 1309–1314.
- Hocquet, D., Vogne, C., Garch, F. El, Vejux, A., Gotoh, N., Lee, A., ... Plésiat, P. (2003). MexXY-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(4), 1371–1375.
- Chander, Y., Kumar, K., Goyal, S. M., & Gupta, S. C. (2005). Antibacterial activity of soil-bound antibiotics. *Journal of Environmental Quality*, 34(6), 1952–1957.
- Chen, Y., Succi, J., Tenover, F. C., & Koehler, T. M. (2003). β -lactamase genes of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain. *Journal of Bacteriology*, 185(3), 823–830.
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232–260.

- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., & Shiba, T. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology*, *21*(5), 526–531.
- Ishida, K., Hung, T. V., Liou, K., Lee, H. C., Shin, C., & Sohng, J. K. (2006). Characterization of pbpA and pbp2 encoding penicillin-binding proteins located on the downstream of clavulanic acid gene cluster in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnology Letters*, *28*(6), 409–417.
- Jagadale, M., Khanapure, S., Salunkhe, R., Rajmane, M., & Rashinkar, G. (2015). Sustainable synthesis of sulfonamides using supported ionic liquid phase catalyst containing Keggin-type anion. *Applied Organometallic Chemistry*, *30*(3), 125–131.
- Jana, S., & Deb, J. K. (2006). Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *70*(2), 140–150.
- Jayashree, B. S., Thomas, S., & Nayak, Y. (2010). Design and synthesis of 2-quinolones as antioxidants and antimicrobials: a rational approach. *Medicinal Chemistry Research*, *19*(2), 193–209.
- Kaneko, M., Emoto, Y., & Emoto, M. (2016). A simple, reproducible, inexpensive, yet old-fashioned method for determining phagocytic and bactericidal activities of macrophages. *Yonsei Medical Journal*, *57*(2), 283–290.
- Kobayashi, N., Alam, M., Nishimoto, Y., Urasawa, S., Uehara, N., & Watanabe, N. (2001). Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*. *Epidemiology & Infection*, *126*(2), 197–204.
- Kondo, S., & Hotta, K. (1999). Semisynthetic aminoglycoside antibiotics: development and enzymatic modifications. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *5*(1), 1–9.
- Lam, K. S. (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, *9*(3), 245–251.
- Laskaris, P., Tolba, S., Calvo-Bado, L., & Wellington, L. (2010). Coevolution of antibiotic production and counter-resistance in soil bacteria. *Environmental Microbiology*, *12*(3), 783–796.
- Lee, L.-F., Chen, Y.-J., Kirby, R., Chen, C., & Chen, C. W. (2007). A multidrug efflux system is involved in colony growth in *Streptomyces lividans*. *Microbiology*, *153*, 924–934.

- Lee, T., Grinshpun, S. A., Martuzevicius, D., Adhikari, A., Crawford, C. M., Luo, J., & Reponen, T. (2008). Relationship between indoor and outdoor bioaerosols collected with a button inhalable aerosol sampler in urban homes. *Indoor Air*, 16(1), 37–47.
- Levison, M. E., & Levison, J. H. (2009). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. *Infectious Disease Clinics of North America*, 23(4), 791–815.
- Llano-Sotelo, B., Azucena, Jr., E. F., Kotra, L. P., Mobashery, S., & Chow, C. S. (2002). Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site. *Chemistry & Biology*, 9(4), 455–463.
- Lomovskaya, O., & Watkins, W. J. (2001). Efflux pumps: their role in antibacterial drug discovery. *Current Medicinal Chemistry*, 8(14), 1699–1711.
- Lovering, A. M., White, L. O., & Reeves, D. S. (1987). AAC(1): a new aminoglycoside-acetylating enzyme modifying the C1 aminogroup of apramycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 20(6), 803–813.
- Macleod, D. L., Nelson, L. E., Shawar, R. M., Lin, B. B., Lockwood, L. G., Dirks, J. E., ... Garber, R. L. (2000). Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(3), 1180–1184.
- Macmaster, R., Zelinskaya, N., Savic, M., Rankin, C. R., & Conn, G. L. (2010). Structural insights into the function of aminoglycoside-resistance A1408 16S rRNA methyltransferases from antibiotic-producing and human pathogenic bacteria. *Nucleic Acids Research*, 38(21), 7791–7799.
- Magalhães, M. L., & Blanchard, J. S. (2009). Aminoglycosides: mechanisms of action and resistance. In *Antimicrobial Drug Resistance* (pp. 171–181).
- Magnet, S., Smith, T.-A., Zheng, R., Nordmann, P., & Blanchard, J. S. (2003). Aminoglycoside resistance resulting from tight drug binding to an altered aminoglycoside acetyltransferase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(5), 1577–1583.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., & Sivakumar, K. (2014). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine. *Microbiological Research*, 169(4), 262–278.
- Mary, G., Soares, S., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Cortelli, S. C., Duarte, M., & Feres, M. (2011). Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *Journal of Applied Oral Science*, 20(3), 295–309.

- Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), 608–620.
- Mehta, R., & Champney, W. S. (2003). Neomycin and paromomycin inhibit 30S ribosomal subunit assembly in *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology*, 47(3), 237–243.
- Menendez, M. C., Garcia, M. J., Navarro, M. C., Gonzalez-y-Merchand, J. A., Rivera-Gutierrez, S., Garcia-Sanchez, L., & Cox, R. A. (2002). Characterization of an rRNA operon (rrnB) of *Mycobacterium fortuitum* and other mycobacterial species: implications for the classification of mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, 184(4), 1078–1088.
- Mincer, T. J., Fenical, W., & Jensen, P. R. (2005). Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7019–7028.
- Moran, M. A., Rutherford, L. T., & Hodson, R. E. (1995). Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10), 3695–3700.
- Nesterenko, O. A., Nogina, T. M., Kasumova, S. A., Kvasnikov, E. I., & Batrakov, S. G. (1982). *Rhodococcus luteus* nom. nov. and *Rhodococcus maris* nom. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32(1), 1–14.
- Nešvera, J., Hochmannová, J., & Pátek, M. (1998). An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiology Letters*, 169(2), 391–395.
- Nikolaus, N., & Strehlitz, B. (2014). DNA-aptamers binding aminoglycoside antibiotics. *Sensors*, 14(2), 3737–3755.
- Nobel Lectures, physiology or medicine 1942-1962*. (1964). Elsevier.
- Núñez, L. E., Méndez, C., Braña, A. F., Blanco, G., & Salas, J. A. (2003). The biosynthetic gene cluster for the β -lactam carbapenem thienamycin in *Streptomyces cattleya*. *Chemistry & Biology*, 10(4), 301–311.
- Ogawara, H. (2015). Penicillin-binding proteins in Actinobacteria. *The Journal of Antibiotics*, 68(4), 223–245.
- Overesch, G., Büttner, S., Rossano, A., & Perreten, V. (2011). The increase of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the presence of an unusual sequence type ST49 in slaughter pigs in Switzerland. *BMC Veterinary Research*, 7, 1–9.

- Pan, M., & Chu, L. M. (2016). Adsorption and degradation of five selected antibiotics in agricultural soil. *Science of the Total Environment*, 545-546, 48–56.
- Pang, Y., Brown, B. A., Steingrube, V. A., Wallace Jr., R. J., & Roberts, M. C. (1994). Tetracycline resistance determinants in *Mycobacterium* and *Streptomyces* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(6), 1408–1412.
- Park, A. K., Kim, H., & Jin, H. J. (2010). Phylogenetic analysis of rRNA methyltransferases, Erm and KsgA, as related to antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Letters*, 309(2), 151–162.
- Pfister, P., Corti, N., Hobbie, S., Bruell, C., Zarivach, R., Yonath, A., & Böttger, E. C. (2005). 23S rRNA base pair 2057–2611 determines ketolide susceptibility and fitness cost of the macrolide resistance mutation 2058A→G. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14), 5180–5185.
- Pham, V. H. T., & Kim, J. (2012). Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends in Biotechnology*, 30(9), 475–484.
- Pinho, M. G., Filipe, S. R., Lencastre, H. de, & Tomasz, A. (2001). Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 183(22), 6525–6531.
- Rabolle, M., & Spliid, N. H. (2000). Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. *Chemosphere*, 40(7), 715–722.
- Raimundo, M., Martins, M., Domingues, M. M., Ina, R. G., Castanho, M. A. R. B., & Santos, N. C. (2012). Biophysical characterization of polymyxin B interaction with LPS aggregates and membrane model systems. *Peptide Science*, 98(4), 338–344.
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2011). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13(6), 151–171.
- Ramón-García, S., Otal, I., Martín, C., Gómez-Lus, R., & Aínsa, J. A. (2006). Novel streptomycin resistance gene from *Mycobacterium fortuitum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), 3920–3922.
- Raoult, D., Ogata, H., Audic, S., Robert, C., Suhre, K., Drancourt, M., & Claverie, J.-M. (2003). *Tropheryma whippelii* twist: a human pathogenic Actinobacteria with a reduced genome. *Genome Research*, 13(8), 1800–1809.

- Riedlinger, J., Reicke, A., Zahner, H., Krismer, B., Bull, A. T., Maldonado, L. A., & Warde, A. C. (2004). Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosipora* strain AB-18-032. *The Journal of Antibiotics*, 57(4), 271–279.
- Richaume, A., Angle, J. S., & Sadowsky, M. J. (1989). Influence of soil variables on in situ plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Rhizobium fredii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(7), 1730–1734.
- Roberts, M. C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 245(2), 195–203.
- Roberts, M. C., & Schwarz, S. (2009). Tetracycline and Chloramphenicol Resistance Mechanisms. In *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance* (pp. 183–194).
- Shange, R. S., Ankumah, R. O., Ibekwe, A. M., Zabawa, R., & Dowd, S. E. (2012). Distinct soil bacterial communities revealed under a diversely managed agroecosystem. *PLoS ONE*, 7(7).
- Sharma, M. (2014). Actinomycetes: source, identification, and their applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2), 801–832.
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., & Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews*, 57(1), 138–163.
- Shokravi, Z., Mehrad, L., & Ramazani, A. (2015). Detecting the frequency of aminoglycoside modifying enzyme encoding genes among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BioImpacts*, 5(2), 87–91.
- Schatz, A., Bugle, E., & Waksman, S. A. (1944). Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Experimental Biology and Medicine*, 55(1), 66–69.
- Schröder, J., Maus, I., Meyer, K., Wördemann, S., Blom, J., Jaenicke, S., ... Tauch, A. (2012). Complete genome sequence, lifestyle, and multi-drug resistance of the human pathogen *Corynebacterium resistens* DSM 45100 isolated from blood samples of a leukemia patient. *BMC Genomics*, 13(1).
- Sigee, D. C. (2005). *Freshwater microbiology: Biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment*.

- Smith, J. J., Tow, L. A., Stafford, W., Cary, C., & Cowan, D. A. (2006). Bacterial diversity in three different antarctic cold desert mineral soils. *Microbial Ecology*, 51(4), 413–421.
- Solecka, J., Zajko, J., Postek, M., & Rajnisz, A. (2012). Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Central European Journal of Biology*, 7(3), 373–390.
- Sunada, A., Nakajima, M., Ikeda, Y., Kondo, S., & Hotta, K. (1999). Enzymatic 1-N-acetylation of paromomycin by an actinomycete strain #8 with multiple aminoglycoside resistance and paromomycin sensitivity. *The Journal of Antibiotics*, 52(9), 809–814.
- Sundin, G. W., & Bender, C. L. (1996). Dissemination of the strA-strB streptomycin-resistance genes among commensal and pathogenic bacteria from humans, animals, and plants. *Molecular Ecology*, 5(1), 133–143.
- Tada, T., Miyoshi-Akiyama, T., Shimada, K., Dahal, R. K., Mishra, S. K., Ohara, H., ... Pokhrel, B. M. (2016). A novel 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase, AAC(6')-Ial, from a clinical isolate of *Serratia marcescens*. *Microbial Drug Resistance*, 22(2), 103–108.
- Tauch, A., Kassing, F., Kalinowski, J., & Pühler, A. (1995). The *Corynebacterium xerosis* composite transposon Tn5432 consists of two identical insertion sequences, designated IS1249, flanking the erythromycin resistance gene ermCX. *Plasmid*, 34(2), 119–131.
- Tauch, A., Krieff, S., Kalinowski, J., & Pühler, A. (2000). The 51,409-bp R-plasmid pTP10 from the multiresistant clinical isolate *Corynebacterium striatum* M82B is composed of DNA segments initially identified in soil bacteria and in plant, animal, and human pathogens. *Molecular Genetics and Genomics*, 263(1), 1–11.
- Torimiro, N., Moshood, A. A., & Eyiolawi, S. A. (2013). Analysis of beta-lactamase production and antibiotics resistance in *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Infectious Diseases and Immunity*, 5(3), 24–28.
- Vaillant-Gaveau, N., Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., ... Clément, C. (2015). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(January 2016), 1–43.
- Vakulenko, S. B., & Mobashery, S. (2003). Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 430–450.
- Vaziri, F., Peerayeh, S. N., Nejad, Q. B., & Farhadian, A. (2011). The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (aac(6')-I, aac(6')-II, ant(2'')-I, aph(3')-VI) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinics*, 66(9), 1519–1522.

- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., & van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *71*(3), 495–548.
- Verma, A., Sampla, A. K., & Tyagi, J. S. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* rrn promoters: differential usage and growth rate-dependent control. *Journal of Bacteriology*, *181*(14), 4326–4333.
- Vögtli, M., & Hütter, R. (1987). Characterisation of the hydroxystreptomycin phosphotransferase gene (sph) of *Streptomyces glaucescens*: nucleotide sequence and promoter analysis. *Molecular Genetics and Genomics*, *208*(1), 195–203.
- Vojnović, S., Ilić-Tomic, T., Morić, I., & Vasiljević, B. (2010). Analysis of secondary structure within Sgm and KgmB mRNA. *Archives of Biological Sciences*, *62*(3), 515–524.
- Wachino, J., Shibayama, K., Kurokawa, H., Kimura, K., Yamane, K., Suzuki, S., ... Arakawa, Y. (2007). Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *51*(12), 4401–4409.
- Whitman, W., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M., Ludwig, W., & Suzuki, K. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*.
- Witek, M. A., & Conn, G. L. (2014). Expansion of the aminoglycoside-resistance 16S rRNA (m1A1408) methyltransferase family: expression and functional characterization of four hypothetical enzymes of diverse bacterial origin. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1844*(9), 1648–1655.
- Wong, C.-H., Hendrix, M., Priestley, E. S., & Greenberg, W. A. (1998). Specificity of aminoglycoside antibiotics for the A-site of the decoding region of ribosomal RNA. *Chemistry & Biology*, *5*(7), 397–406.
- Wright, G. D., & Thompson, P. R. (1999). Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Frontiers in Bioscience*, *1*, 9–21.
- Xu, L., Li, Q., & Jiang, C. (1996). Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(1), 244–248.
- Yokoyama, K., Doi, Y., Yamane, K., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., ... Arakawa, Y. (2003). Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*, *362*(9399), 1888–1893.

- Zelinskaya, N., Rankin, C. R., Macmaster, R., Savic, M., & Conn, G. L. (2012). Expression, purification and crystallization of adenosine 1408 aminoglycoside-resistance rRNA methyltransferases for structural studies. *Protein Expression and Purification*, 75(1), 89–94.
- Zenova, G. M., Manucharova, N. A., & Zvyagintsev, D. G. (2011). Extremophilic and extremotolerant actinomycetes in different soil types. *Eurasian Soil Science*, 44(4), 417–436.
- Zhang, Y., Xiao, M., Horiyama, T., Zhang, Y., Li, X., Nishino, K., & Yan, A. (2011). The multidrug efflux pump MdtEF protects against nitrosative damage during the anaerobic respiration in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(30), 26576–26584.