



Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně



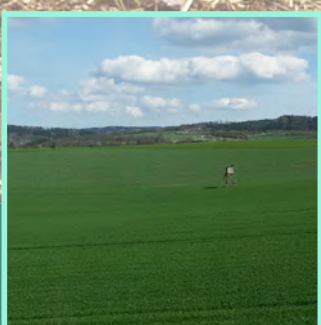
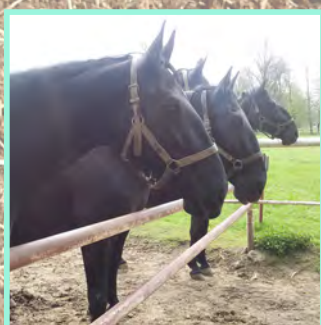
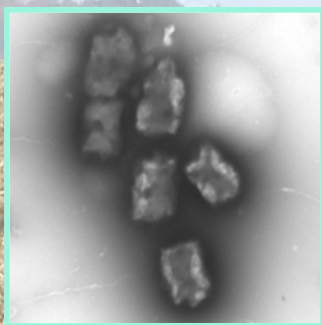
Výzkumný ústav veterinárního lékařství



Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv



Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická



ANTIMIKROBIÁLNÍ REZISTENCE V PŮDĚ A PŘÍPADNĚ DALŠÍCH ČÁSTECH ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Závěrečná zpráva
mandatorního-funkčního úkolu MZe č. 10/2019

Brno, listopad 2019



Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně



Výzkumný ústav veterinárního lékařství



Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv



Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická

ANTIMIKROBIÁLNÍ REZISTENCE V PŮDĚ A PŘÍPADNĚ DALŠÍCH ČÁSTECH ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Závěrečná zpráva mandatorního-funkčního úkolu MZe č. 10

Brno, listopad 2019

Autoři:

Mgr. Šárka Poláková, Ph.D. (ÚKZÚZ)

Doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D. (VÚVeL)

Mgr. Tereza Gelbíčová, Ph.D. (VÚVeL)

Mgr. Lucie Pokludová, Ph.D. (ÚSKVBL)

Ing. Dana Studená (ÚSKVBL)

Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D. (FCH VUT)

Ing. Pavlína Landová (FCH VUT)

Ing. Petra Suková (FCH VUT)

Obsah

1. Úvod.....	5
2. Analýza rizika pro vybrané skupiny antimikrobik v návaznosti na jejich spotřeby u zvířat chovaných v České republice.....	6
2.1. Data o spotřebě antimikrobik v ČR – sumarizace pro účely sledování zátěže životního prostředí	6
2.1.1 Komentář k zastoupení farmakologických skupin	9
2.1.2 Spotřeba antimikrobik stratifikovaná na cílové druhy zvířat	10
2.1.3 Analýza rizika pro vybrané skupiny antimikrobik v návaznosti na jejich spotřeby	12
2.1.3.1 Osud a chování antibakteriálních látek v rámci ošetřování hospodářských zvířat.....	12
2.1.3.2 Rezidua plynoucí z přímého ošetření hospodářských zvířat	13
2.1.3.3 Osud a chování vybraných antibakteriálních látek obsažených ve veterinárních léčivých přípravcích v půdě	13
2.1.3.4 Rychlost degradace antibiotik v půdě.....	14
2.1.3.5 Sorpční koeficient.....	16
2.1.3.6 Mikrobiální degradace.....	16
2.1.3.7 Další faktory ovlivňující degradaci antimikrobik v půdě	17
2.2 Analýza jednotlivých vybraných skupin látek, transfer ze zvířat do půdy a zhodnocení setrvání látek v půdě	18
2.3 Závěrečná rozvaha s ohledem na používání vybraných antimikrobik a potenciál perzistovat v půdě	25
3. Analytika reziduí antimikrobik v půdě	28
3.1. Úvod	28
3.1.1. Fyzikálně-chemické parametry	28
3.1.2. Degradace	29
3.2. Analytická metoda stanovení antimikrobik v půdách	29
3.2.1. Extrakce.....	29
3.2.1.1. Matriční efekt	30
3.2.2. Přechištění extraktu	30
3.2.3. Analytická koncovka	31
3.2.4. Vybrané výsledky.....	31
4. Charakteristika půd v ČR	34
4.1. Půdní živiny a pH.....	34
4.2. Rizikové prvky	37
4.3. Zrnitost	39
4.4. Organická hmota	40
4.5. Vstupy do půdy významné z hlediska AMR.....	41

4.6.	Systémy sledování kvality půdy	45
4.7.	Možnosti využití stávajících systémů k výzkumu, příp. monitoringu rezistence k antimikrobikům	47
5.	Rezistence k antimikrobikům.....	48
5.1.	Úvod	48
5.1.1.	Mikroorganismy, antimikrobika a mechanismy rezistence	48
5.1.2.	Rozvoj a šíření rezistence v životním prostředí.....	49
5.2.	Cíle pilotní studie	51
5.3.	Materiál a metody	51
5.3.1.	Vyšetřované vzorky	51
5.3.2.	Metagenomická analýza	52
5.4.	Výsledky a diskuze.....	53
5.4.1.	Geny rezistence k antimikrobikům.....	53
5.4.2.	Složení půdního mikrobiomu	55
5.5.	Závěry pilotní studie.....	57
6.	Závěry	59
7.	Hypotézy Akčního plánu Národního antibiotického programu.....	61
8.	Cíle a finanční rozvaha AP NAP	62
9.	Literatura	63

1. ÚVOD

Léčba infekčních onemocnění lidí i zvířat pomocí přípravků obsahujících antimikrobika je dnes samozřejmostí. S šíří využívání (a nadužívání) těchto látek jde však ruku v ruce vznik rezistence k antimikrobikům (AMR). Vzhledem k šíření AMR a problémům, které může výskyt AMR působit jak v humánní, tak veterinární medicíně je rezistence k antimikrobikům v současné době považována za globální hrozbu. Jednou z cest, jak výskyt AMR v prostředí omezit, je uvědomělé používání antimikrobik. Studie zabývající se touto problematikou jsou nejen ve světě, ale i u nás vzácné a nejsou prováděny komplexně.

Koncem ledna 2019 byl schválen Akční plán Národního antibiotického programu České republiky (AP NAP) na období 2019–2022, který v rámci cíle I. (Surveillance antibiotické rezistence) definuje (kromě jiného) ve veterinární oblasti úkoly, jichž je potřeba dosáhnout. Mezi těmito úkoly je jeden zaměřený na problematiku sledování rezistence k antimikrobikům v půdě (I.1.5). Hlavním účelem tohoto konkrétního úkolu je především zformulovat opatření pro sledování AMR v půdě a pokud možno začlenit sledování AMR do pravidelného monitoringu půdy.

Předkládaná zpráva je prvním výstupem uvedeného úkolu I.1.5. V podstatě se jedná o podrobnou analýzu situace v ČR shrnující informace o spotřebách veterinárních antimikrobik a analytických možnostech jejich stanovení v půdě, informace o vybraných půdních parametrech zemědělských půd a možnostech sledování AMR prostřednictvím různých, již funkčních systémů sledování kvality půdy a samozřejmě informace o samotné rezistenci k antimikrobikům, včetně prvních předběžných výsledků.

Zpráva vznikla ve spolupráci Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (UKZÚZ), Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v. v. i (VÚVeL), Ústavu pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv (ÚSKVBL) a Vysokého učení technického, Fakulty chemické (FCH VUT). Odběry vzorků půd v roce 2019 provedené za účelem stanovení AMR byly realizovány podle metodiky vytvořené ve spolupráci s Ústavem půdní biologie BC AVČR.

Komplexní přístup k řešení sledované problematiky je unikátní a věříme, že přispěje k objasnění role půdy/životního prostředí na šíření rezistence k antimikrobikům.

Antimikrobní látky (antimikrobika) jsou látky působící proti mikroorganismům, tj. proti bakteriím (antibiotika, chemoterapeutika), virům (antivirotika), houbám (antimykotika) a parazitům (antiparazitika).

Rezistence k antimikrobikům je schopnost mikroorganismu odolat účinku antimikrobik, ke kterým byl původně vnímavý.

2. ANALÝZA RIZIKA PRO VYBRANÉ SKUPINY ANTIMIKROBIK V NÁVAZNOSTI NA JEJICH SPOTŘEBY U ZVÍŘAT CHOVANÝCH V ČESKÉ REPUBLICE

2.1. Data o spotřebě antimikrobik v ČR – sumarizace pro účely sledování zátěže životního prostředí

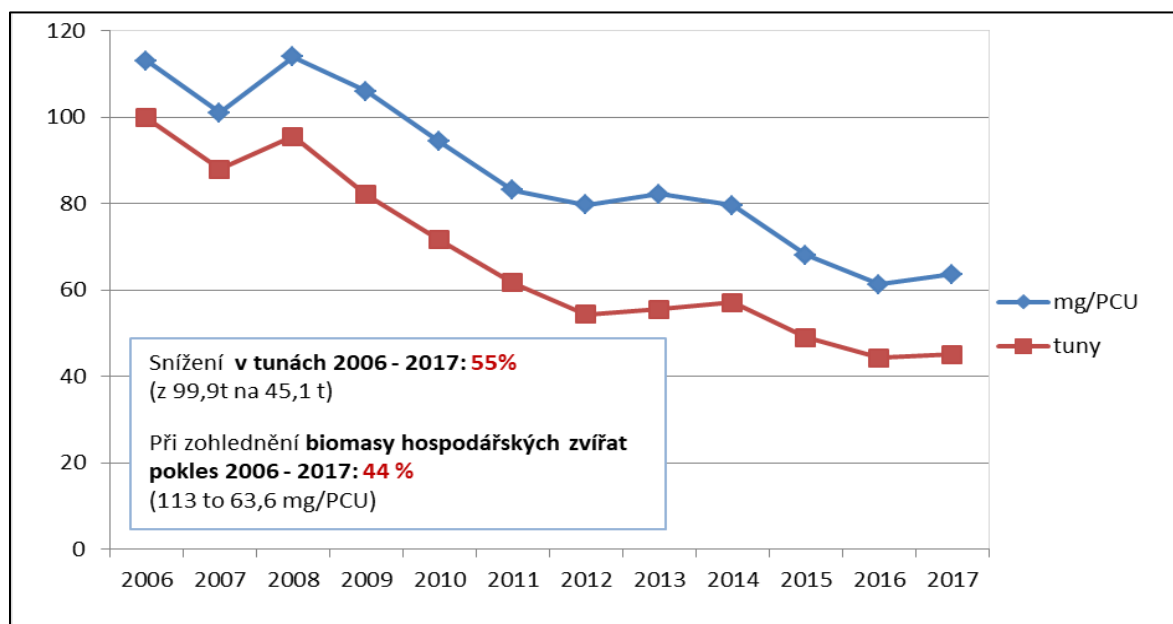
Údaje o spotřebách antimikrobik v této zprávě vycházejí z dat, která shromažďuje a analyzuje v souladu s právními předpisy platnými v České republice (především zákona o léčivech) Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv. Aktivita Ústavu v této oblasti je dlouhodobá (stabilní systém funguje od roku 2003) a proto lze sledovat i vývojové trendy, které vykazují signifikantní pokles celkových spotřeb antimikrobik (obrázek 1) podaných jako veterinární léčivé přípravky zvířatům, a to jak v celkových hmotnostních objemech (tuny), tak v celkovém hmotnostním objemu vztaženém na populačně korekční jednotku (PCU)¹, která reprezentuje populace a biomasu hospodářských zvířat chovaných a poražených za dané období v ČR. Trendy ve spotřebách v rámci jednotlivých skupin antimikrobik (i trendy celkové) v hmotnostních objemech jsou patrné z tabulky 1.

Níže uváděné údaje o spotřebách byly vypočteny z dat o objemech prodeje veterinárních léčivých přípravků (dále VLP) obsahujících antimikrobika od distributorů (resp. z výkazů jejich jednotlivých distribučních skladů) a o objemech zamíchaných medikovaných premixů výrobců medikovaných krmiv, kteří jsou schváleni v souladu se zákonem o léčivech v platném znění.

Jsou získávána data o prodeji jednotlivých balení všech VLP (která jsou identifikována pomocí kódů balení). V případě premixů jsou kompletována data o kvantitě konkrétního VLP (zde medikovaného premixu) zamíchaného do medikovaného krmiva určeného pro hospodářská zvířata. Systém sběru dat je stabilizovaný a jeho výhodou je, že se dostává na úroveň blízkou koncovému spotřebiteli. Nevýhodou zůstává skutečnost, že bez získání dalších údajů nelze přesně stratifikovat prodeje VLP na jednotlivé druhy zvířat, kterým byla léčiva finálně podána (ve spolupráci s koncovými uživateli byly nicméně, pro rok 2016, získány kvalifikované odhady takové stratifikace – viz zde níže).

¹ PCU = Population Correction Unit, je vypočítávána vynásobením počtu žijících zvířat za sledované období (dojnice, ovce, prasnice a koně) a poražených zvířat (skot masný, kozy, prasata, ovce masné, drůbež, králíci a krůty) jejich konsensuálně stanovenou hmotností, která připadá v době potenciálního použití antimikrobik v úvahu. Tato jednotka byla odsouhlasena v rámci projektu ESVAC a její výpočet je podrobně vysvětlen na straně 19 a 20 zprávy (EMA, 2018) a dále v Annexu III, Tabulce A13 a A14 téže zprávy.

Obrázek 1: Trendy v celkové spotřebě veterinárních antimikrobik ČR, 2006–2017: vyjádření v absolutních hmotnostních objemech (tuny) a s korekcí na populace hospodářských zvířat (mg/PCU)



Při další práci s daty o spotřebách je vhodné se vyhnout jednoduchým srovnáním, neboť jednotlivá antimikrobika mají různá dávkovací schémata (tj. proměnné množství mg léčivé látky/kg živé hmotnosti potenciálně léčených zvířat), a tak se z údajů o celkových spotřebách nedá jednoduchou aritmetikou přesně vyjádřit frekvence podání, či expozice zvířat určitým druhům látek a je obtížné vyčíslit, která antimikrobika jsou tzv. **nejčastěji** podávána.

Stran srovnávání dat je tedy potřebné **vždy zvažovat účel a výstupy** takových srovnání. Pokud se soustředíme na farmakologické skupiny antimikrobik a místo, jaké zaujímají v celkových objemech spotřeb, je vhodné hodnotit spotřeby z pohledu **hmotnostních objemů**, kdy jsou tato data přínosná zejména z pohledu možné **celkové zátěže pro životní prostředí**, která se v současnosti stále více dostává do popředí zájmu. Je nutno vzít v úvahu, že část či většina léčivé látky (u různých látek se poměry liší), která byla podána zvířeti, podléhá metabolizaci a že následně jsou vyloučeny buď mikrobiologicky stále aktivní metabolity, nebo částečně i původní látka, či metabolity inaktivní. Riziko zátěže pro životní prostředí je nutno zvažovat i s ohledem např. na možnosti biodegradability, či naopak akumulace v prostředí (a to v různých jeho složkách – zejména v půdě (zde velmi záleží na charakteru půd a jejich fyzikálně/chemických charakteristikách) a v povrchových vodách). Navíc rovněž část prodaných balení může zůstat nespotřebována a být následně „neškodně likvidována“. Při zvažování zátěže pro životní prostředí z důvodu použití veterinárních léčivých přípravků (včetně antimikrobik) je však potřeba zohlednit i další vstupy do životního prostředí (antimikrobika a biocidy – humánní medicína; látky antimikrobní, pesticidní, herbicidní či biocidní povahy vstupující do prostředí ať již prostřednictvím zemědělských technologií, ale i dalších oblastí výroby a služeb). Pokud bychom, dle ATC vet klasifikace, jako antiinfektivum zvažovali i oxid zinku bylo by potřebné kalkulovat i s původem této sloučeniny mimo podání prostřednictvím veterinárních léčivých přípravků (jiné složky zemědělské produkce, ale i průmyslové výroby).

Tabulka 1: Celkové spotřeby antimikrobik dle farmakologických skupin ve VLP – souhrnně všechny léčivé formy, ČR, 2010–2017 (kilogramy).

Skupina antimikrobik	2010 [kg]	2011 [kg]	2012 [kg]	2013 [kg]	2014 [kg]	2015 [kg]	2016 [kg]	2017 [kg]
Tetracykliny ^a	28 206,58	28 006,53	20 018,10	19 302,82	19 999,52	16 862,10	15 014,41	13 037,05
Peniciliny ^b	17 766,90	12 166,56	12 653,13	14 132,42	13 589,16	12 691,95	11 783,68	12 544,10
Sulfonamidy ^c	10 279,18	9 728,51	8 620,64	9 308,82	9 122,54	7 436,34	7 097,49	7 534,53
Diterpeny (Pleuromutiliny) ^d	4 276,80	2 806,89	3 156,92	2 737,45	3 379,77	2 745,19	2 521,29	2 969,10
Makrolidy ^e	4 007,50	2 475,29	3 855,98	2 622,17	4 108,68	2 684,20	2 381,96	2 511,05
Aminoglykosidy ^f	2 439,16	2 325,52	1 745,45	2 430,50	1 651,58	1 829,62	1 395,17	1 852,85
(Fluoro)chinolony	1 174,07	1 244,50	1 294,22	1 320,91	1 277,15	1 235,40	1 237,92	1 358,92
Amfenikoly	815,53	274,62	377,06	312,04	324,08	324,1	275,71	942,75
Trimethoprim a deriváty	738,48	690,28	764,59	958,77	1 384,52	1 183,11	725,27	820,93
Polymyxiny	673,53	421,71	615,99	769,32	736,50	690,84	589,93	418,20
Cefalosporiny	633,55	557,32	472,71	766,47	797,54	849,5	904,51	777,25
Ostatní	326,60	674,50	410,32	397,87	377,37	196,76	163,29	107,70
Linkosamidy	254,62	226,21	299,94	343,80	235,13	169,5	140,99	120,95
Imidazolové deriváty	41,04	41,63	33,39	43,72	39,40	39,25	43,72	51,37
Ansamyciny	2,88	4,43	42,50	54,41	49,09	52,1	48,42	49,16
Celkem	71 636,42	61 644,50	54 360,95	55 497,63	57 072,02	48 989,96	44 323,76	45 095,91

^a tetracykliny (tetracyklin, chlortetracyklin, oxytetracyklin, doxycyklin)

^b peniciliny celkově (citlivé i rezistentní k beta-laktamázám, s rozšířeným spektrem účinku – zde včetně amoxicilinu z VLP obsahujících kombinace amoxicilin/kyselina klavulanová)

^c sulfonamidy celkově (u sulfonamidů potencovaných – zde včetně sulfonamidu z VLP obsahujících kombinace sulfonamid/trimethoprim).

^d diterpeny (tj. pleuromutiliny – tiamulin, valnemulin)

^e makrolidy a příbuzné látky (erytromycin, gamithromycin, spiramycin, tildipirosin, tilmikosin, tulathromycin, tylosin, tylvalosin)

^f aminoglykosidy a příbuzné látky (apramycin, dihydrostreptomycin, framycetin, gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin a spektinomycin)

2.1.1 Komentář k zastoupení farmakologických skupin

Při zohlednění farmakologických skupin jsou v České republice, co do hmotnostních objemů po dlouhá léta stabilní s největší spotřebou (2010–2017) tři skupiny antimikrobik:

- tetracykliny (zde nejvyšší objem tvoří chlortetracyklin),
- peniciliny (zde nejvyšší spotřeby jsou alokovány na amoxicilin) a
- sulfonamidy (zde nejvyšší spotřeby tvoří sulfadimidin) (tabulka 1).

Tyto tři skupiny se v roce 2017 podílely ze 71 % na celkových spotřebách všech antimikrobik v hmotnostních objemech a v objemech vztažených na populace hospodářských zvířat tvořily dokonce 74 % z celkových spotřebovaných antimikrobik. Přehled trendů spotřeb uvádí tabulka 1.

Spotřeba ve skupině tetracyklinů má stálý klesající trend – naposledy signifikantní meziroční (2016–2017) pokles o 13 % (přepočet z vyjádření v tunách), či pokles o 11,6 % (přepočet z vyjádření v mg/PCU). ČR patří mezi země, kde je dlouhodobě nejvyšší spotřeba tetracyklinů a vysoká spotřeba sulfonamidů používaných v lékových formách k medikaci skupin zvířat, na rozdíl od zemí severských (SE, NO, FI), kde převažují spotřeby úzkospektrých penicilinů s výrazným trendem individualizace léčby (vysoký podíl injekčně podávaných antimikrobik). Fakt dlouhodobé vysoké spotřeby tetracyklinů a sulfonamidů se určitým způsobem promítá rovněž do profilů rezistence bakterií (komensálních i patogenních), kde je zjišťována poměrně vysoká míra rezistence, zejména k tetracyklinům u izolátů z různých druhů hospodářských zvířat a rovněž jsou často zjišťovány různé typy genů *tet* a *sul* kódujících rezistenci k antibiotikům těchto skupin. Při zohlednění vlastností těchto látek, konkrétně schopnosti poměrně dlouhé perzistence, např. při vyloučení těchto látek exkrementy zvířat do životního prostředí, se zástupci obou skupin řadí mezi látky, jejichž rezidua (ať již přímo matečných sloučenin, či mikrobiologicky aktivních metabolitů) by mělo smysl monitorovat v rámci sledování zátěže půdy a vody (povrchové i podzemní, případně sedimentů ve vodních nádržích).

Ačkoliv v hmotnostních objemech je skupina penicilinových antibiotik, s nejvyšším podílem zastoupení amoxicilinu, na celkově druhém místě s mírně stoupajícím trendem spotřeb, z pohledu zátěže pro životní prostředí ve srovnání se sulfonamidy, tetracykliny či fluorochinolony je „méně nebezpečnou skupinou“ pro nestabilitu penicilinových antimikrobik (včetně amoxicilinu) ve vnějším prostředí.

V rámci skupin makrolidů, diterpenů (pleuromutilinů) a aminoglykosidů (včetně aminocyklitolu spektinomycinu) ve sledovaném období 2010–2017 objemy spotřeb kolísají a nevykazují lineárně se snižující trend (tabulka 1). I v této skupině tvoří hlavní část objemů spotřeb VLP v lékových formách určených k medikaci skupin zvířat.

V souvislosti se skupinou makrolidů, je vhodné poukázat zejména na skutečnost, že tato skupina je považována za kriticky významná antimikrobika dle klasifikace světové zdravotnické organizace (WHO) z pohledu potřeby zachování účinnosti těchto látek pro léčbu onemocnění lidí, a i zde by tedy mělo být velmi dbáno na snížení spotřeb na míru, která je nezbytná pro racionální a odůvodněné používání u zvířat. Ve skupině aminoglykosidů se nově objevují kromě dříve podávaných VLP obsahujících spectinomycin (aminocyklitol), dále dihydrostreptomycin, streptomycin, gentamicin, kanamycin, či framycetin i perorálně podávaná VLP apramycin a neomycin (jedná se o nové či obnovené registrace VLP s těmito látkami v rámci ČR).

Z pohledu zátěže pro životní prostředí by bylo možno říci, že za nejvíce zátěžové z této výše komentované skupiny antimikrobik lze považovat aminoglykosidy, následované mnohem lépe

degradovatelnými pleuromutiliny (s hlavním zástupcem tiamulinem) a jako nejméně problematické v této skupině by bylo možno označit makrolidy.

Další skupinou dle míry spotřeby jsou fluorochinolony. Tato skupina, reprezentovaná především perorálně podávaným enrofloxacinem, je z pohledu zátěže pro životní prostředí poměrně rizikovou.

Tabulka 2: Míra degradace vybraných antimikrobik v půdě (Toutain et al., 2014)

Farmakologická skupina Antimikrobikum	Míra degradace v %	Dny
Tetracykliny		
Chlortetracyklin	24	84
Tetracyklin	50	48
Oxytetracyklin	0	180
Cefalosporiny		
Ceftiofur	60	1
Sulfonamidy	0	28
Aminoglykosidy	0	30
Pleuromutiliny		
Tiamulin	50	26
Makrolidy		
Tylosin	50	2
Polypeptidy		
Bacitracin	77	30
Fluorochinolony		
Enrofloxacin	<1	56

2.1.2 Spotřeba antimikrobik stratifikovaná na cílové druhy zvířat

Jak již bylo uvedeno v úvodu této zprávy, s daty o prodejkách z roku 2016 byl vypracován rovněž kvalifikovaný odhad stratifikující spotřeby antimikrobik u potravinu produkujících zvířat, u kterých máme k dispozici i data o počtech zvířat z EUROSTAT, TRACES či národních statistik.

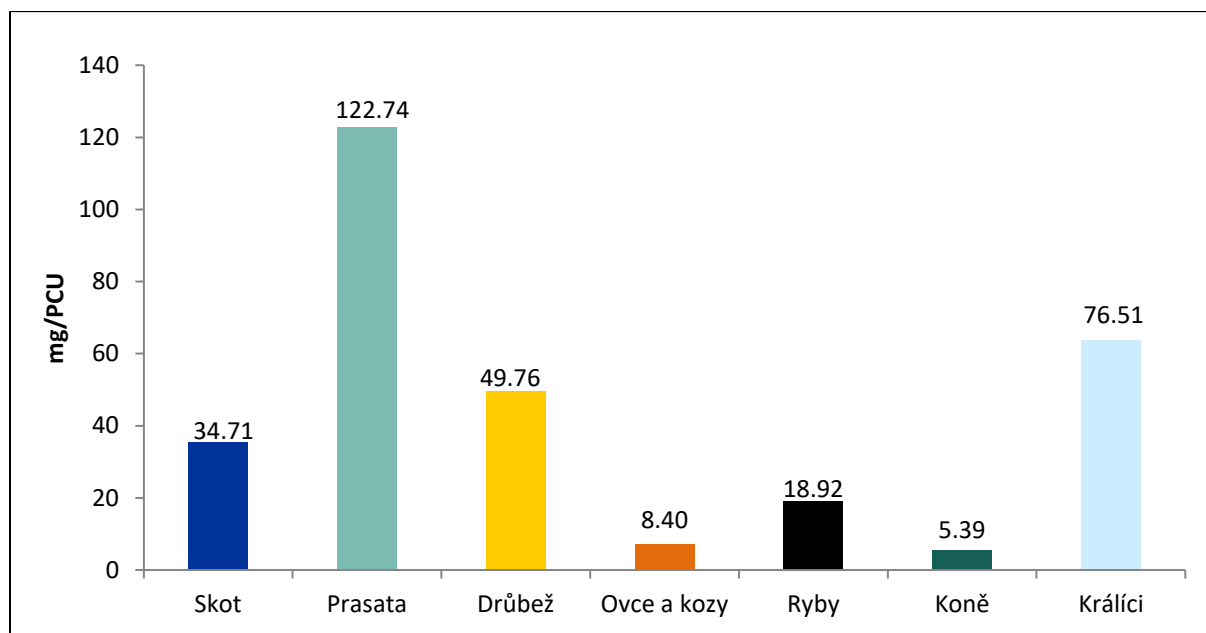
Bylo využito extrapolace dat z datových souborů reprezentujících skutečná používání VLP s antimikrobiky u majoritních druhů zvířat, vybraných minoritních druhů zvířat a dále údajů z předpisů pro medikovaná krmiva, dále byla začleněna analýza VLP registrovaných pro jeden druh cílových zvířat, či v případě více druhů byly výsledky z datových souborů extrapolovány, aby odrážely proporcionalitu použití. I přes tuto kombinaci přístupů, jsme si vědomi, že se stále jedná pouze o **kvalifikované odhady**, nelze tedy vyvozovat zcela přesné závěry. Přesto se však domníváme, i dle dalších indicií (inspekční činnosti a předchozích pilotních projektů sledování používání antimikrobik na jednotlivých farmách), že se data v elementárních charakteristikách velmi blíží reálnému stavu.

Na obrázku 2 je uveden **odhad spotřeb vztažený na biomasu/populaci²** pro cílové druhy skot, prasata, drůbež, ovce a kozy, ryby, koně a králíky. Pro lepší představu a pochopení grafu je vhodné se zabývat také daty o podávaných lékových formách (viz obrázek 3), kdy lze obecně

² Jedná se o PCU (viz pozn pod čarou v kapitole 2.1) avšak specificky rozdělenou na druhy (a v rámci druhů dále na kategorie zvířat). Např. drůbež se skládá ze součtů kura domácího a krůt a poražené drůbeže exportu a importu (počty x hmotnosti); např. prasata jsou tvořena kategorií poražených prasat (počty x hmotnost), poražená a výkrmová prasata (exporty a importy – počty x hmotnost), žijící prasnice (počty x hmotnost). Obdobně další species zvířat. Ryby jsou vyjádřeny pouze v tunách.

řící, že druhy zvířat medikované prostřednictvím krmiva, ať již medikovaného premixem, nebo smíchaného s VLP v lékové formě perorálního prášku, spotřebovávají největší množství léčivých látek (vychází to i z faktu, že tyto lékové formy ve většině případů potřebují podávat léčivou látku ve vyšší dávce na kg živé hmotnosti než např. VLP injekční). Další formou hromadné medikace je medikace pitné vody, častá je rovněž medikace mléka/mléčné náhražky – opět je presumpcí vyšších objemů spotřebovaných antimikrobik. Vzhledem k tomuto faktu pak vychází dle stratifikovaných dat nejvyšší spotřeby u prasat, králíků, drůbeže a skotu (resp. perorálně podávané u neruminujících telat).

Obrázek 2: Stratifikace spotřeb (z celkového množství prodaných VLP odpovídajících lékových forem a způsobu podání) na jednotlivé druhy hospodářských zvířat ČR – 2016 (mg/PCU).



Na obrázku 3 je uveden odhad spotřeb pro cílové druhy skot, prasata, drůbež, ovce a kozy, ryby, koně a králíky – rozdělení je podle hmotnostních objemů (tedy tun léčivých látek spotřebovaných u výše uvedených druhů zvířat) a zohledňujících i rozvrstvení použitých lékových forem.

U skotu tedy převažuje léková forma injekční a perorální (předpoklad perorálního podání neruminujícím telatům), následují intramamární a intrauterinní VLP. V rámci této skupiny zvířat lze sledovat poměrně rovnoměrné rozvrstvení skupin antimikrobik a bylo by možno zvažovat zátěž půdy antimikrobiky vylučovanými exkrementy a to zejména: oxytetracyklin, aminoglykosidy (DHSTM), fluorochinolony, sulfonamidy/trimethoprim, a ačkoliv jsou podávány rovněž beta-laktamy (peniciliny základní, ampicilin, amoxicilin, ceftiofur, cefoperazon, cefchinom) – vzhledem k jejich krátkodobé stabilitě (resp. nestabilitě) nelze předpokládat jejich výskyt ve formě reziduí v půdě.

U prasat jednoznačně převažují perorální prášky do krmiva a vody, dále pak premixy, a v malé míře se na spotřebách podílejí injekční VLP (především aplikované u selat a prasnic). Ze skupin antimikrobik zásadních z pohledu zátěže půdy zde budou tvořit majoritu tetracykliny a sulfonamidy, v menší míře pak aminoglykosidy, následované dalšími látkami ze skupin pleuromutilinů, makrolidů a nejméně zřejmě fluorochinolonů.

U drůbeže je v dnešní době naprostá majorita VLP použita jako perorální prášky podávané prostřednictvím napájecí vody. Nicméně jelikož je drůbež (nejčastěji brojleři *Gallus gallus*) dávkována v časných stádiích věku (nejfrekventovaněji první týden věku) odpovídá tomu

i „pozice“ drůbeže v obrázku 2. Zde za jednoznačně největší zátěž lze považovat fluorochinolony, následované sulfonamidy s trimethoprimem, případně v mnohem menší míře tetracykliny (zejména doxycyklin).

Ani u jedné z majoritních skupin nebyla zmiňována betalaktamová antimikrobika (hojně podávané aminopeniciliny (amoxicilin), peniciliny či cefalosporiny). Tyto látky, jak již bylo uvedeno výše, jsou málo stabilní ve vnějším prostředí a rychle degradují.

U králíků je mírná převaha podání v lékové formě premix, nicméně jsou zastoupeny i perorální prášky. Vzhledem k celkovému počtu králíků v ČR však nelze považovat riziko zátěže pro životní prostředí za zásadní.

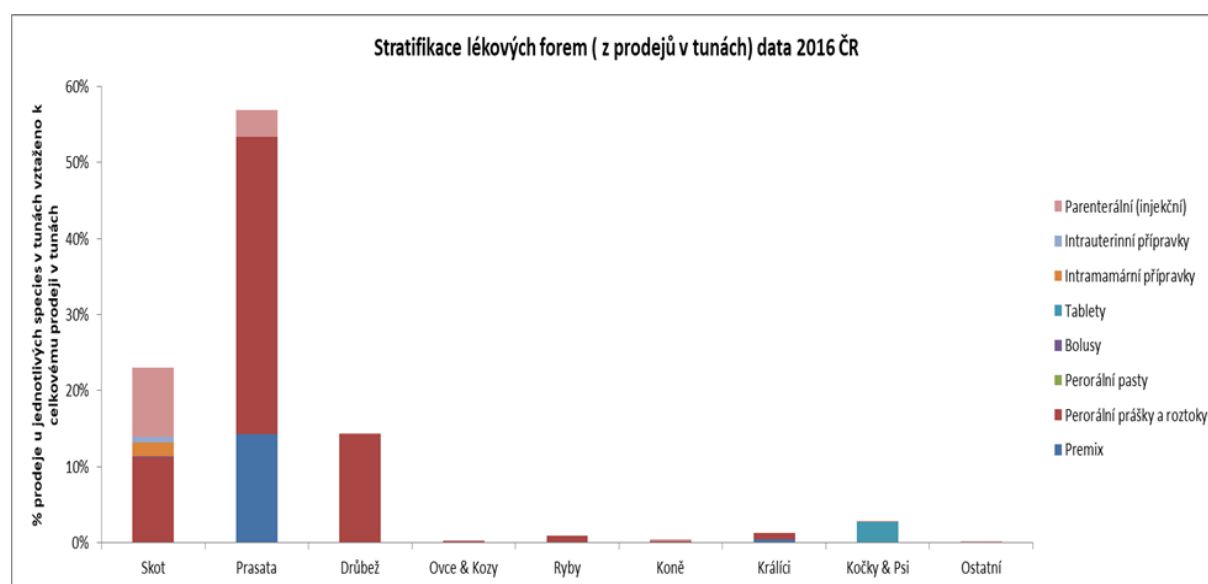
Na obrázku 3 jsou oproti obrázku 2 zařazeny mimo zvířat potravinových rovněž zvířata v zájmovém chovu – psi a kočky, kde je nejvyšší míra spotřeby tablet, následovaná injekčními VLP (míra rizika z pohledu zátěže půdy minimální).

U koní se jedná zejména o injekční VLP a perorální pasty (míra rizika z pohledu zátěže půdy minimální).

U ryb podání medikovaného krmiva (granuláty, které jsou shrnuty do položky „oral powders“, ač by spíše měly figurovat jako forma premix) – zde míra rizika především pro povrchové vody v nádržích s rybami, kterým byla podána medikace (a to včetně sedimentů těchto nádrží, včetně rybníků).

Do kategorie „ostatní“ spadají podání minoritním druhům (např. bažanti).

Obrázek 3: Stratifikace spotřeb na jednotlivé druhy hospodářských zvířat ČR – 2016 (mg/PCU) s vizualizací míry podávání jednotlivých lékových forem.



2.1.3 Analýza rizika pro vybrané skupiny antimikrobik v návaznosti na jejich spotřeby

2.1.3.1 Osud a chování antibakteriálních látek v rámci ošetřování hospodářských zvířat.

Pokud nebudeme brát v úvahu zdroje kontaminace životního prostředí léčivy např. z vypouštění splaškových vod z ČOV, vypouštění odpadních vod z výrobních závodů, aplikací kalů z ČOV

či nesprávnou likvidací samotných léčiv vyhozením do komunálního odpadu, či ošetření domácích mazlíčků, pak za možný významný zdroj reziduí léčiv v životním prostředí lze považovat exkrementy ošetřených hospodářských zvířat.

2.1.3.2 Rezidua plynoucí z přímého ošetření hospodářských zvířat

V rámci léčby hospodářských zvířat se mohou rezidua léčivých látek samotných, případně jejich degradačních produktů (metabolitů) dostávat do terestrického prostředí predominantně rozmetáním statkového hnoje nebo kejdy na zemědělskou půdu nebo přímou exkrecí zvířat na pastviny.

Rezidua těchto látek tak mohou ovlivňovat terestrické necílové druhy zvířat přímo, nebo akvatické necílové druhy nepřímo, a to díky transportu látek přes půdu do vody, a to včetně jejich absorpce na půdní částice a organickou hmotu.

2.1.3.3 Osud a chování vybraných antibakteriálních látek obsažených ve veterinárních léčivých přípravcích v půdě

Mnoho antimikrobik jsou semi-syntetické deriváty nebo syntetická analoga v přírodě se přirozeně vyskytujících (např. produkováných bakteriemi, či mikromycetami přímo v půdě) antibiotik, které přetrvávají v životním prostředí. Jejich existence či dokonce perzistence tedy může být vysvětlena tak, že i půdní mikroorganismy se snaží udržet určitou rovnováhu ekologického systému, v němž žijí a jsou tedy schopny produkovat antimikrobika proti jiným „konkurenčním“ bakteriím. V humánní a veterinární medicíně jsou antimikrobika používána pro léčbu nemocí způsobených mikroorganismy, jako jsou bakterie a houby, nicméně jak již bylo uvedeno výše, řada z nich byla „převzata“ od přirozených producentů nacházejících se v půdě (streptomycety, penicilia, bacily apod.). Za environmentálních podmínek se molekuly antibiotik vyskytují ve formě neutrální, kyselé nebo zásadité, případně také jako zwitteriony, a proto se jejich fyzikálně chemické a biologické vlastnosti mohou měnit v závislosti na měnícím se pH. Mezi tyto vlastnosti patří například rozdělovací koeficient oktanol/voda ($\log K_{ow}$) nebo distribuční koeficient ($\log K_d$) (Kümmerer 2008).

Antibakteriální látky obsažené ve veterinárních léčivých přípravcích jsou v tělech hospodářských zvířat velmi málo metabolizovány a zpravidla jsou přítomny v exkrementech ošetřených zvířat ve vysokém procentuálním zastoupení. Bylo publikováno, že v některých případech až 80 % antibiotik podávaných perorálně hospodářským zvířatům prochází jejich organismem v nezměněné podobě (Sarmah et al. 2006). Metabolismus antibakteriálních látek ve zvířatech je závislý jak na chemické povaze dané farmakologické skupiny antimikrobik, tak na jednotlivých látkách v rámci samotné skupiny (viz výše údaje v tabulce 2). Obecně k minimální metabolizaci (méně než 20%) dochází u tetracyklinových a makrolidových antibiotik, ke střední metabolizaci (20–80%) u linkosamidů a azolových antibiotik a vysoké u sulfonamidů. U aminoglykosidových antibiotik je metabolizace v rámci skupiny minimální až vysoká a u fluorochinolonů je střední až vysoká (Kümmerer 2008).

Na zemědělskou půdu se rozmetá jak kejda, tak hnůj z ošetřených zvířat zpravidla na jaře a na podzim. Hnůj i kejda jsou skladovány až do doby aplikace na půdu a během této doby může docházet k rozkladu reziduí antibiotik. Většina látek patřících mezi sulfonamidy, aminoglykosidy, beta-laktamy a také například jeden z makrolidů – tylosin mají poločas rozkladu zhruba 30 dní anebo nižší, proto mohou být signifikantně degradovány již během skladování hnoje. Naproti tomu například makrolid roxithromycin a také tetracykliny mají delší poločas rozkladu, několik měsíců. Rychlost degradace v hnoji je závislá na typu hnoje. V tabulce 3 jsou uvedeny poločasy rozkladu pro jednotlivé skupiny antibakteriálních látek

v různých druzích hnoje, a v tabulce 4 jsou uvedeny poločasy rozkladu antibakteriálních látek v půdě. (Kümmerer 2008).

Tabulka 3: Poločasy rozkladu vybraných antimikrobik v různých druzích exkrementů zvířat (Kümmerer 2008)

Skupina	Látka	Matrice	DT50 (dny)
Makrolidy	Tylosin	Prasečí kejda	< 2
	Erythromycin	Kejda	41
	Roxithromycin	Kejda	130
Sulfonamidy	Sulfachloropyridazin	Trus brojlerů	< 8
		Trus nosnic	< 90
		Prasečí kejda	> 8
Tetracykliny	Chlortetracyklin	Směs půdy a trusu drůbeže	> 30
	Oxytetracyklin	Hnůj skotu	< 30
Další	Amprolium	Trus nosnic	> 8
		Trus brojlerů	> 90
	Tiamulin	Kejda	> 180

Tabulka 4: Poločasy rozkladu vybraných veterinárních antimikrobik v půdě (Kümmerer 2008)

Látka	Poločas rozpadu (dny)
Amoxicilin	< 1
Ceftiofam	22,2–49
Danofloxacin	87–143
Enrofloxacin	> 152
Erythromycin	20
Florfenicol	< 103
Oleandomycin	27
Oxytetracyklin	16–18
Salinomycin	5
Sulfachloropyridazin	2,8–3,5
Sulfachloropyridin	21,3
Sulfadimidin	18,6
Tiamulin	16
Trimethoprim	< 103
Tylosin	4,1–4,2
Tylosin A	7
Tylosin D	8
Virginamycin	> 64

Degradační produkty mohou mít stejnou toxicitu nebo mohou být toxičtější na necílové organismy než mateřská látka a jejich sorpční chování může být úplně odlišné, např. anhydrotetracyklin, metabolit tetracyklinu, je mobilnější než tetracyklin a je tedy větší pravděpodobnost, že by vodní útvary mohly být vystaveny metabolitu (Kümmerer 2008).

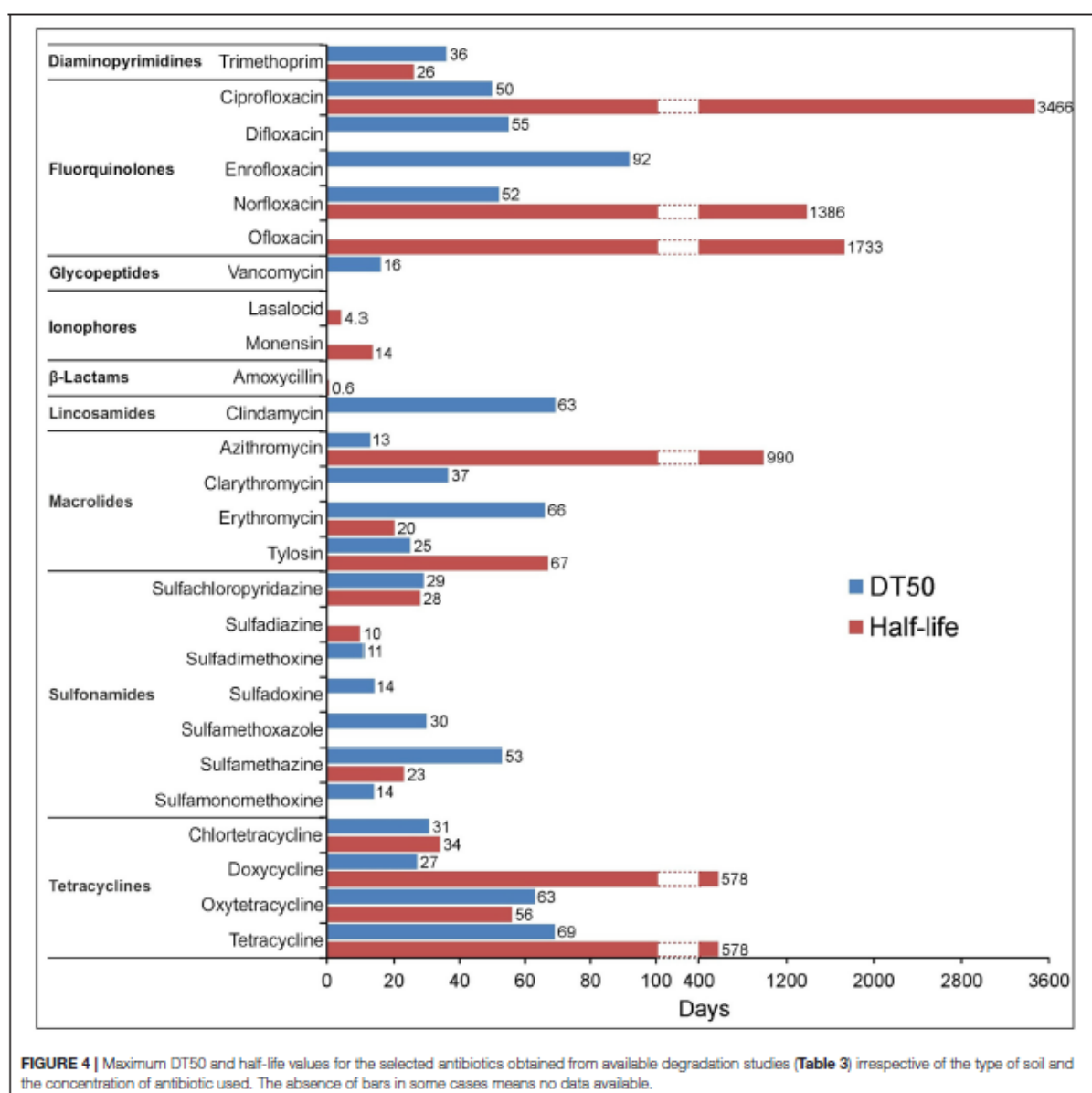
2.1.3.4 Rychlost degradace antibiotik v půdě

Jakmile se uvolní antibiotika do půdy, stávají se součástí různých abiotických a/nebo biotických procesů včetně transformace/degradace, sorpce-desorpce, zachycením rostlinami, odplavením z půdy nebo transportem do podzemních vod. Hydrolýza hraje také významnou roli, například beta-laktamová antibiotika jsou velmi citlivá na hydrolýzu, zatímco makrolidy a sulfonamidy

jsou méně citlivé k hydrolýze. Fotolýza také přispívá k degradaci antibiotik (například chinolonů a tetracyklinů), která jsou na povrchu půdy během aplikace hnoje nebo kejdy. Při vstupu reziduí antibiotik do půdy je hlavním procesem, který určuje jejich perzistenci, sorpce na organickou hmotu a degradace/transformace. Perzistence reziduí antibiotik je ovlivňována řadou různých faktorů, jako jsou například fyzikálně chemické vlastnosti rezidua, charakteristika půdy, klimatické faktory jako je teplota, srážky a vlhkost. Transformace nebo degradace antibiotika v půdě závisí na molekulární struktuře a fyzikálně chemických vlastnostech antibiotika. Přehled fyzikálně-chemických vlastností různých antibakteriálních látek je uveden v referenci Cycon' et al. (2019).

Vzhledem k tomu, že mnoho abiotických a biotických faktorů ovlivňuje degradaci antibiotik, různé skupiny těchto látek se liší v rychlosti degradace v půdě. Toto dokazuje velký rozsah poločasů rozkladu v půdě mezi <1 a 3466 dní (obrázek 4).

Obrázek 4: Poločasy rozkladu antimikrobik v půdě (Cycon' et al. 2019)



Ve studiích bylo zjištěno, že například, amoxicilin byl snadno rozložitelný s poločasem rozkladu 0,43–0,57 dní, v další studii bylo zjištěno, že chlortetracyklin v množství 10 mg/kg

půdy byl rychle degradován s DT50 pod 1 den. Detailnější informace ohledně rychlosti degradace různých antibiotik a zjištěných DT50 hodnot v různých typech půd prezentuje Cycon' et al. (2019).

V rámci jedné skupiny antibiotik se hodnota DT50 signifikantně liší, a to pravděpodobně z důvodu různého složení půdy, dávkování antimikrobik a podmínkami dané studie. Fluorochinolony, makrolidy a tetracykliny jsou obecně charakterizovány vysokými hodnotami DT50 nebo poločasy rozpadu.

2.1.3.5 Sorpční koeficient

Sorpční koeficient Koc je významným parametrem pro odhady distribuce antimikrobik v životním prostředí. Antimikrobika s Koc > 4000 l/kg jsou shledávána jako imobilní a degradují v půdě velmi pomalu (velmi perzistentní), doba pro degradaci z 50 % původní dávky je více než 60 dní. Antimikrobika s hodnotami Koc < 15 l/kg jsou vysoce mobilní a snadno podléhají degradaci (DT50 pod 5 dní). Relativně nízká perzistence některých antimikrobik v půdě může souviset s jejich nízkou afinitou k různým organickým a neorganickým půdním složkám. Naproti tomu tetracykliny, fluorochinolony, makrolidy a sulfonamidy se vzhledem ke svým vlastnostem silně vážou na půdní složky a vytváří stabilní rezidua. V jedné ze studií bylo zjištěno, že výtěžnost sulfadiazinu již první den experimentu byla jen 27 % a 45 % původní dávky 10 respektive 100 mg/kg půdy. Obdobně například sulfadimidin aplikovaný v koncentracích 20 a 100 mg/kg půdy byl silně vázán na půdní částice a zjištěná koncentrace tohoto antibiotika byla 62,1 a 31,5 µg/kg půdy na začátku experimentu a 255,5 a 129,8 µg/kg půdy k 56. dni pokusu. Vazbou antimikrobik na částice půdy nebo výskytem ve formě komplexů nelze sorbovaná antimikrobika často detekovat a mohou ztratit antibakteriální aktivitu (Kümmerer 2008). Obecně platí, že k nárůstu sorpce kationtových forem antimikrobik dochází s klesajícím pH (např. sulfonamidy, makrolidy).

U látek s širším spektrem působení, lze důvodně předpokládat i ztrátu účinku na další mikroorganismy. Některé studie totiž naznačují, že sorpce může redukovat, ale ne nezbytně eliminovat antimikrobiální aktivitu (Halling-Sørensen et al. 2003). Například tetracykliny a tylosin jsou sice pevně vázány v půdě na částice jílu, ale i přes to si zachovávají aktivitu (Chander et al. 2005).

Některá antimikrobika mají schopnost se silně vázat v půdě, perzistovat po dobu i několika let a to způsobuje, že nemohou degradovat nebo degradují velmi pomalu. Ve studiích degradace v půdě, s preferencí provedení studie s radioaktivně značenými látkami (dle OECD 307), se díky tomu při extrakcích také stávají součástí tzv. neextrahovatelných reziduí (NER) nebo vázaných reziduí. Není však zcela jasné, zda tato neextrahovatelná rezidua (NER) jsou nebo nejsou biologicky dostupná necílovým druhům včetně mikroorganismů v půdě.

2.1.3.6 Mikrobiální degradace

Další možností, která přispívá k vymizení antimikrobik v půdě, je také mikrobiální degradace, což bylo potvrzeno výsledky z mnoha studií provedených na sterilních a nesterilních půdách (Cycon' M. et al. 2019). Hodnoty DT50 antimikrobik v půdě byly mnohem nižší v půdách s mikroorganismy ve srovnání s DT50 získaných za sterilních podmínek. Jako příklad lze uvést erytromycin aplikovaný na půdu v dávce 0,1 mg/kg půdy, který v nesterilní půdě vymizel mnohem rychleji (6,4 dní) v porovnání se sterilními podmínkami (40,8 dní). Také například u sulfachlorpyridazinu, dávkovaného v množství 10 mg/kg půdy došlo k degradaci třikrát rychleji v půdách s mikroorganismy (poločas 20–26 dní) ve srovnání se sterilními půdami (poločas 68–71 dní). Studiemi bylo potvrzeno, že mikrobiální aktivita hraje hlavní roli

v biotransformaci sulfadiazinu v půdách s DT50 8,48; 8,97 a 10,22 dní v nesterilní půdě a 30,09; 26,55 a 21,21 dnů ve sterilní půdě pro koncentrace 4, 10 a 20 mg/kg půdy. Podobný vliv byl sledován i u dalších antimikrobik jako je norfloxacin, sulfamethoxazol, sulfadimidin a tetracyklin (Cycon'et al. 2019).

2.1.3.7 Další faktory ovlivňující degradaci antimikrobik v půdě

Degradace antimikrobik závisí nejen na katabolické aktivitě půdních mikroorganismů, ale také do značné míry na vlastnostech půdy, jako například obsahu organické hmoty, pH, vlhkosti, teplotě, kyslíku a struktuře půdy. Jedny z nejvýznamnějších parametrů, které ovlivňují chování veterinárních léčiv včetně antimikrobik v půdě jsou textura půdy a pH.

Degradace antimikrobik v půdě také silně závisí na jejich koncentraci v půdě. Na základě doložených výsledků lze potvrdit, že vysoká koncentrace antimikrobika může prodloužit perzistenci v půdě vlivem inhibice půdních mikroorganismů. Nicméně může také docházet k fenoménu, kdy se půdní mikroorganismy pre-adaptují, a to v případě, že dochází k opakované aplikaci na půdy s historickou aplikací daného antimikrobika. Tento fenomén byl sledován například u makrolidů, chlortetracyklinu, sulfadimidinu a tylosinu.

Rychlost degradace antimikrobiálních léčiv v půdě mohou ovlivnit aplikace různých organických látek jako je hnůj, kejda, kaly nebo kompost do půdy (Cycon'et al. 2019).

Opakovaná aplikace organických hnojiv s obsahem reziduí antibakteriálních látek na stejná místa, kde nemusí docházet k účinné degradaci těchto látek a jejich rezidua jsou v těchto místech stále přítomna, může vést k nepřetržitému vystavení půdních mikrobů reziduí antimikrobik a vzniku populací bakterií rezistentních na antimikrobika. To může mít potenciálně nepříznivé účinky na životní prostředí, zejména pokud jsou zbytky organických hnojiv s rezidui (či přímo již s rezistentními bakteriemi) transportovány povrchovým odtokem nebo rezidua antimikrobik vyluhováním přes půdu a dostávají se do blízkých vod (Sarmah et al. 2006).

Některá antimikrobika, která se vyskytují v horních vrstvách půdy, mohou být absorbována rostlinami (Du, Liu 2012). Bylo například zjištěno, že chlortetracyklin a sulfadimidin jsou absorbovány pěstovanou zeleninou – kukuřicí, cibulí, zelím, resp. kukuřicí, hlávkovým salátem a bramborami. Koncentrace obou antimikrobiálních látek v rostlinách vzrůstala se zvyšující se koncentrací antimikrobika v hnoji aplikovaném na půdu (Kümmerer 2008). Ve studii Boxall et al. (2006) byla zjištěna rezidua florfenikolu, levamisolu a trimethoprimu v hlávkovém salátu, zatímco diazinon, enrofloxacin, florfenikol, a trimethoprim byly zjištěny v kořenech mrkve.

V půdě může u antimikrobik docházet k částečné nebo kompletní mineralizaci samotné mateřské látky, nebo může docházet k tomu, že antimikrobikum a jeho metabolity jsou zcela mineralizovány mikroorganismy, a tudíž kompletně eliminovány. Může také docházet jen k částečné degradaci, případně tyto látky v půdě přetrvávají. K eliminačnímu procesu antimikrobik může dojít formou adsorpce, mineralizace, hydrolýzy, fotolýzy. Eliminace antimikrobik je možná také bio-, nebo foto-degradací. Eliminace závisí například na teplotě, což bylo ověřeno ve studii se sedmi antimikrobiky. Bylo zjištěno, že 5 ze 7 antimikrobik bylo degradováno po inkubaci při 30 °C, zatímco jen 2 ze 7 byly eliminovány při inkubaci při 4 °C (Kümmerer 2004).

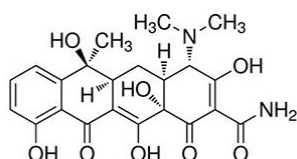
Některá antimikrobika jsou poměrně perzistentní látky jak za laboratorních podmínek, tak i v polních studiích. Nejsou dobře biologicky rozložitelná, a to ani za anaerobních podmínek (Kümmerer 2004).

2.2 Analýza jednotlivých vybraných skupin látek, transfer ze zvířat do půdy a zhodnocení setrvání látek v půdě

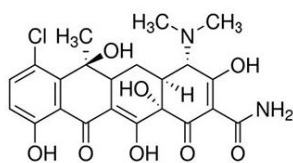
Na základě vysokých publikovaných spotřeb veterinárních léčivých přípravků s obsahem konkrétních antimikrobiálních látek s předpokládanou perzistencí, resp. pomalým rozkladem v půdním prostředí, navrhuje ke zvážení pro další sledování celkem 9 látek z různých typů antimikrobik pro sledování rezistence k antimikrobikům v zemědělsky využívané půdě. Sledovat rezidua těchto látek v půdě, v návaznosti na kvantitativní data ke spotřebám a rovněž v návaznosti na níže uvedené údaje o perzistenci v půdě se jeví jako důvodné u 9 látek (je však třeba rovněž zvažovat typ hospodářství a chovaná zvířata i s ohledem na stratifikaci spotřeb). Jedná se o zástupce tetracyklinové řady antimikrobik – **chlortetracyklin**, spotřeby doxycyklinu a oxytetracyklinu jsou výrazně nižší (bylo by vhodné je vybrat spíše v návaznosti na cílové druhy zvířat; samotný tetracyklin je používán naprosto minimálně), jedno beta-laktamové antibiotikum – **amoxicilin**, tři zástupci skupiny sulfonamidů – **sulfadimidin**, **sulfamethoxazol** a **sulfadiazin**, jeden zástupce polypeptidů – **kolistin** a dvě fluorochinolonová antimikrobika – **enrofloxacin** a **ciprofloxacin** (ciprofloxacin není ve veterinární medicíně registrován v žádném z přípravků, nicméně nejvíce podávaný enrofloxacin se u řady cílových druhů zvířat ve značném rozsahu metabolizuje na ciprofloxacin, s vysokou mírou setrvávání v půdě). A jako zástupce makrolidů **tylosin**. Důvodem pro výběr těchto devíti látek kromě vyšších spotřeb v rámci České republiky je také to, že se velmi často používají při léčbě hospodářských zvířat, jejichž hnůj nebo kejda se pravidelně aplikují na zemědělské půdy jako významná a nepostradatelná hnojiva organického původu. V případě výskytu mikrobiologicky aktivních reziduí těchto látek může docházet k selekčnímu tlaku s dopadem na rozvoj rezistence v půdě, mohou se také projevit nežádoucí účinky u necílových druhů organismů v důsledku jakýchkoliv (tedy i mikrobiologicky inaktivních) reziduí těchto látek ať již přímo v půdě, nebo sekundárně splachem či vyplavováním do vod.

Chlortetracyklin, jako nejvíce používaný zástupce tetracyklinů

Tetracykliny jako jsou například chlortetracyklin a tetracyklin, jsou bakteriostatická antibiotika, která se v tělech ošetřených hospodářských zvířat minimálně nebo téměř vůbec nemetabolizují, vylučují se z těla v moči a trusu v nezměněné nebo mikrobiologicky inaktivní formě. U tetracyklinů byly stanoveny celkem 4 epimery, které jsou v rovnováze s rodičovskými komponenty (EMA 1995a). Velké množství prací je věnováno samotnému tetracyklinu, pro úplnost data uvádíme, i když dle spotřeb tohoto antimikrobika v České republice se domníváme, že by nemusel být zařazen do vlastního sledování reziduí přímo v půdě. Z pohledu sledování rezistence (detekce genů obsahujících např. domény *tet*) lze důvodně předpokládat vysoký výskyt těchto domén v bakteriálních populacích (jelikož na selekci, ko-selekci se podílejí všichni zástupci tetracyklinové farmakologické skupiny a na ko-selekci i jiné látky (biocidy)).



Tetracyklin



Chlortetracyklin

Jak již bylo uvedeno v předešlém textu, tetracykliny obecně jsou látky, jejichž sorpci ovlivňuje mobilita (tj. rozpustnost ve vodě, koeficient oktanol-voda, obsah organického uhlíku v matrici) a schopnost se ukládat (sorpční koeficient) apod. Fyzikálně chemické vlastnosti chlortetracyklinu prezentuje řada publikací (Thiele-Bruhn 2003; Halling-Sørensen et al. 2005; Sarmah et al. 2006; Cycon' et al. 2019).

Rezidua tetracyklinů se nacházejí například v říční vodě (cca 1 µg/l), v trusu a hnoji z ošetřených zvířat, nebo také v zemědělských půdách, kde byly například tetracykliny zjištěny v množství 450–900 µg/kg. V tabulce 5 jsou uvedeny maximální hlášené koncentrace vybraných tetracyklinů v hnoji, kalech a půdě (Cycon'et al. 2019). Dle reference BIO Intelligence Service (2013) byly zjištěné koncentrace tetracyklinu v půdách v rozmezí 2,5–553,0 µg/kg (max. koncentrace ~ 0,6 mg/kg, medián 0,1 mg/kg) a chlortetracyklinu 0,9–1079,0 µg/kg (max. koncentrace ~1,0 mg/kg, medián 55 µg /kg).

Tabulka 5: Maximální hlášené koncentrace, které byly zjištěny v hnoji, kalech a v půdě (Cycon'et al. 2019)

Tetracykliny	Hnůj (µg/kg)	Kaly (µg/kg suš.)	Půda (µg/kg)
Tetracyklin	98 000	-	2 683
Chlortetracyklin	764 000	-	12 900
Tetracykliny	-	8 326	-

Biodegradace tetracyklinů a chlortetracyklinu v půdě je poměrně pomalá, tetracykliny perzistují v polních půdách přes 6 měsíců, ale nejsou detekovány v hlubších vrstvách půdního profilu (Kümmerer 2004). Tetracykliny jsou přítomné v kejďě v koncentracích až 20 mg/l (Hamscher et al. 2002).

Osud tetracyklinů v půdě je velmi variabilní i v rámci půdních vrstev. V polní studii (Hamscher et al. 2002), kde byla půda hnojena kejdou s přítomností tetracyklinu v množství 4 mg/kg a chlortetracyklinu 0,1 mg/kg kejdy se nejvyšší průměrná koncentrace ve vzorcích půdy pohybovala v průměru 86,2 µg tetracyklinu/kg v horní vrstvě půdy v prvních 10 cm (0–10 cm), 198,7 µg tetracyklinu/kg ve vrstvě 10 až 20 cm a 171,7 µg tetracyklinu /kg ve vrstvě 20–30 cm. Chlortetracyklin byl zjištěn ve všech třech vrstvách v množství 4,6 až 7,3 µg chlortetracyklinu/kg.

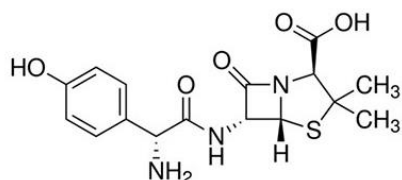
Tetracykliny jsou relativně stabilní v kyselém prostředí, ale ne v alkalických podmínkách a jak v kyselém, tak v alkalickém prostředí vytváří soli (Halling-Sørensen et al. 2002), jsou citlivé na fotodegradaci a mají tendenci se vázat na částice v půdě nebo se formovat do komplexů s přítomnými ionty. Tetracykliny mohou tvořit komplexy s Ca²⁺ nebo třeba Mg²⁺ (Kümmerer 2008).

Ve srovnání s většinou sulfonamidů mohou být tetracykliny silněji absorbovány půdními částicemi v nepřítomnosti biodegradace a v důsledku toho jsou v prostředí více perzistentní.

Amoxicilin

Amoxicilin je semisyntetický aminopenicilin s širokým spektrem baktericidní účinnosti.

Beta-laktamový kruh beta-laktamových antibiotik může být otevřen beta-laktamázou, bakteriálním enzymem, nebo také chemickou hydrolýzou, což znamená, že většinu těchto antibiotik lze těžko detekovat v životním prostředí (Kümmerer 2004).



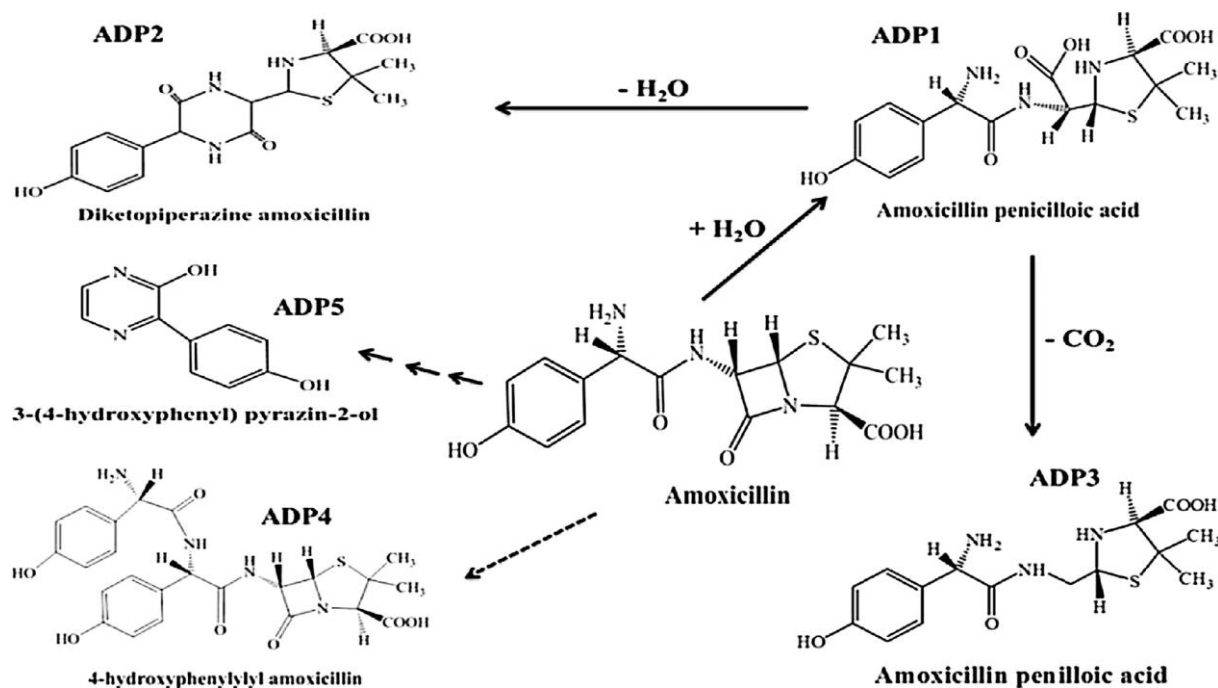
Fyzikálně chemické vlastnosti amoxicilinu prezentuje řada publikací (Thiele-Bruhn 2003; Boxall et al. 2006; Cycon' et al. 2019).

Z dostupné literatury je známo, že aminopeniciliny, jako amoxicilin, jsou metabolizovány.

Amoxicilin a jeho degradační produkty byly sledovány během kompostování hnoje od ošetřených prasat (Liu et al. 2018). Ze studie vyplývá, že amoxicilin se velmi rychle rozkládá na penicilovou kyselinu amoxicilinu (ADP1), penicilovou kyselinu amoxicilinu (ADP3) a diketopiperazin amoxicilinu (ADP2), což podporuje i reference Gozlan et al., 2013. Všechny metabolity degradovaly za vzniku stabilního 3-(4-hydroxyphenyl) pyrazin-2-ol (ADP5), který je nealergenní a méně toxický oproti předešlým degradačním produktům. V jiné studii se testovaly transformační produkty amoxicilinu za laboratorních podmínek, kde bylo prokázáno, že amoxicilin podstupuje velmi rychlou abiotickou hydrolýzu, otevírá se tak beta-laktamový kruh a vzniká hlavní metabolit APA – penicilová kyselina amoxicilinu. APA je dále degrádována.

Z uvedených informací v citovaných referencích vyplývá, že k degradaci amoxicilinu v půdě dochází poměrně rychle s poločasem rozkladu do 1 dne.

Obrázek 5: Možné hlavní degradační kroky amoxicilinu během aerobního kompostování

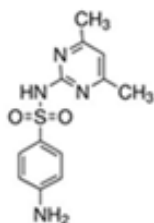


Sulfonamidy – sulfadiazin, sulfamethoxazol a sulfadimidin

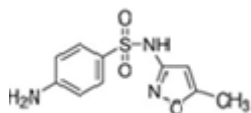
Sulfonamidy jsou velkou skupinou bakteriostatických antimikrobik (účinkují na bakterie, ale i např. protozoa), která obsahuje velké množství látek s dobře zavedeným používáním (studie jsou proto často datovány i desítky let zpět), jejichž toxikologické vlastnosti nejsou plně známy. Komise pro veterinární léčivé přípravky zvážila dostupná toxikologická data, která naznačují, že metabolity sulfonamidů jsou stejné toxicity jako mateřská látka (EMA 1995b).

Sulfonamidy (SA) jsou relativně málo rozpustné ve vodě, typická je dvojitá pKa, která indikuje protonaci aminoskupiny při pH 2–3 a deprotonaci části $R\text{SO}_2\text{NHR}_2$ při pH 5–11. Amfoterní sulfonamidy se chovají jako slabé kyseliny a tvoří soli v silně kyselých nebo silně zásaditých roztocích. Většina sulfonamidů se substitucí na amino-N mají výrazně sníženou antibakteriální aktivitu (Thiele-Bruhn 2003). Fyzikálně chemické vlastnosti sulfonamidů prezentuje řada publikací (Thiele-Bruhn 2003; Boxall et al. 2006; Sarmah et al. 2006; Leal et al. 2013; Wang et al. 2015; PubChem).

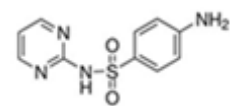
Sulfonamidy se velmi málo absorbují v tkáních zvířat a zhruba z 50 % jsou vylučovány v podobě mateřské látky a z 30 % v podobě acetyl konjugátů. V půdách s nízkým obsahem organického uhlíku a vysokým pH mají velký migrační potenciál dostat se do podzemních vod (Wang et al. 2015).



Sulfadimidin



Sulfamethoxazol



Sulfadiazin

Sulfonamidy jsou přítomné v hnoji v koncentracích 40 mg/l (Thiele-Bruhn 2003). V tabulce 6 jsou uvedeny maximální hlášené koncentrace vybraných sulfonamidů v hnoji a půdě (Cycon' et al. 2019).

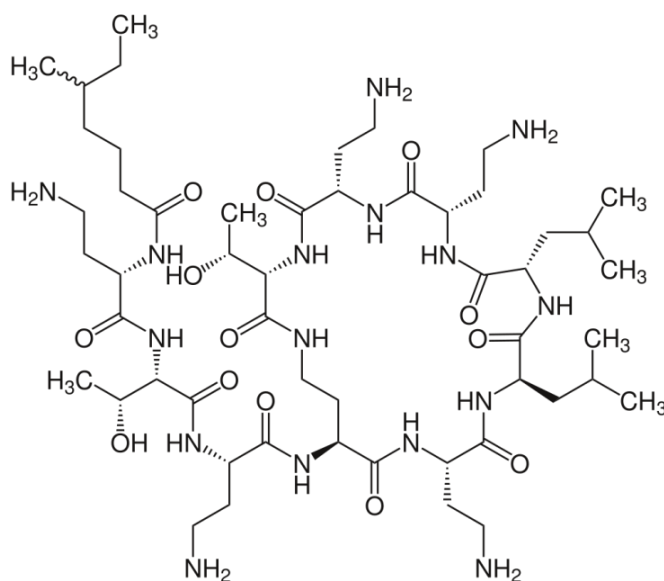
Tabulka 6: Maximální hlášené koncentrace, které byly zjištěny v hnoji a v půdě (Cycon' et al. 2019).

Sulfonamidy	Hnůj (µg/kg)	Půda (µg/kg)
Sulfadimidin	20 000	200–25 000
Sulfamethoxazol	-	54,5
Sulfadiazin	91 000	85,5

Půdy, na které se aplikovala kejda s obsahem sulfadimidinu, obsahovaly sulfadimidin i 7 měsíců po aplikaci. Bylo také zjištěno, že sulfadimidin byl především silně sorbován v půdě; během 2 hodin bylo pouze 55 % detekováno a po 32 dnech jen 1 %. Autoři to v článku komentují tak, že analyticky není přítomen, vázaná rezidua nepodléhají degradaci, ale eliminaci, nicméně je nejasné, zda za abiotických nebo biotických podmínek mohou být uvolněny (Kümmerer 2004).

Kolistin

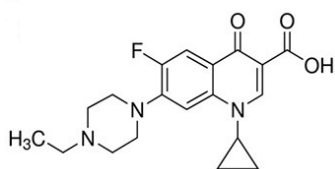
Je také nazýván polymyxin E, jedná se o bazické polypeptidové antibiotikum, baktericidního charakteru, které tvoří směs cyklických polypeptidů kolistinu A a B. Kolistin se používá u prasat, skotu, drůbeže, králíků, ovcí a koz. Při parenterálním podání se kolistin vylučuje z těla zvířat močí, ve faeces nebyla rezidua kolistinu zjištěna. Perorálně podávaný kolistin se vylučuje ve faeces, kde je pevně vázán (EMA 2002a). Fyzikálně chemické vlastnosti kolistinu prezentuje například PubChem.



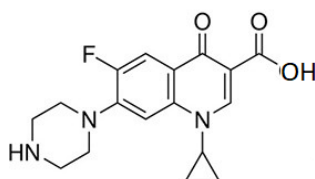
Nejsou k dispozici veřejně dostupné informace ohledně osudu a chování kolistinu v půdách. Lze jen potvrdit, že SPC (Souhrn údajů o přípravku) veterinárního léčivého přípravku Colfive 5 000 000 IU/ml koncentrát pro perorální roztok pro telata, prasata, jehňata, kuřata a krůty obsahuje pod bodem 5.3 informaci, že léčivá látka, kolistin-sulfát, je velmi perzistentní v půdách (SPC Colfive). Kritériem pro tvrzení, že je látka „velmi perzistentní“ je DT50 vyšší než 180 dní v půdě, nebo DT50 je vyšší než 60 dní ve vodě, případně DT50 v systému voda/sediment je vyšší než 180 dní (EMA/CVMP/ERA/52740/2012).

Enrofloxacin a ciprofloxacin

Fluorochinolony jako je enrofloxacin a ciprofloxacin jsou baktericidní antimikrobika. Enrofloxacin se používá k léčbě skotu, ovcí, koz, prasat, drůbeže a králíků. V tělech léčených zvířat dochází k metabolizaci enrofloxacinu za vzniku hlavního metabolitu ciprofloxacinu a dalších metabolitů, které jsou však minoritní.



Enrofloxacin



Ciprofloxacin

Z těl léčených zvířat se enrofloxacin a hlavní metabolit ciprofloxacin vylučuje v moči a faeces. Obě látky jsou silně vázané na hnůj skotu (kolem 76 až 77 %), ale v trusu drůbeže je enrofloxacin pouze slabě vázán (EMA 2002, 1998). V tabulce 7 jsou uvedeny maximální hlášené koncentrace enrofloxacinu a ciprofloxacinu v hnoji, kalech a půdě (Cycon' et al. 2019).

Enrofloxacin je antibiotikum, které se nepoužívá v humánní sféře, tj. je výhradně určené pro veterinární použití. Jak je již zmíněno, jeho hlavním metabolitem je ciprofloxacin, který se ale na rozdíl od enrofloxacinu používá jako léčivá látka v humánní medicíně. V humánní léčbě ciprofloxacinem vzniká hlavní metabolit oxociprofloxacin, který se vylučuje močí (EMA 2002).

Chinolony jsou poměrně chemicky stabilní látky, odolávají hydrolýze a vzrůstajícím teplotám, ale degradují při UV světle (Thiele-Bruhn 2003). Fyzikálně chemické vlastnosti fluorochinolonů, enrofloxacinu, ciprofloxacinu prezentuje řada publikací (Thiele-Bruhn 2003; Boxall et al. 2006; Sarmah et al. 2006; Cycon' et al. 2019). Rozpustnost, hydrofobicita, distribuce a sorpce ciprofloxacinu jsou závislé na pH. Ve srovnání s většinou sulfonamidů mohou být chinolony silněji absorbovány půdními částicemi v nepřítomnosti biodegradace, a v důsledku toho jsou v prostředí více perzistentní.

Tabulka 7: Maximální hlášené koncentrace, které byly zjištěny v hnoji, kalech a v půdě (Cycon' et al. 2019)

Fluorochinolony	Hnůj (µg/kg)	Kaly (µg/kg suš.)	Půda (µg/kg)
Enrofloxacin	1 420	-	5 600
Ciprofloxacin	45 000	426 a 8 905	1 347,6

Tylosin

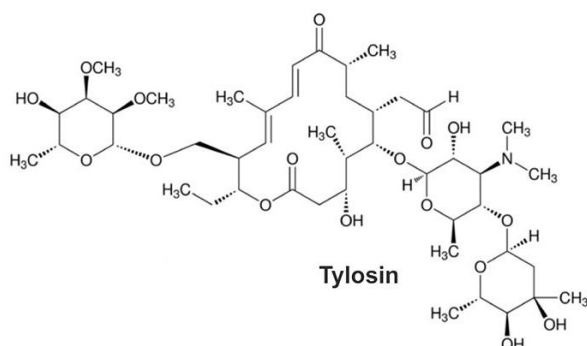
Tylosin je makrolidové antibiotikum s bakteriostatickým účinkem, který je produkován plísní *Streptomyces fradiae*.

Tylosin je složen převážně z tylosinu (faktor A) a třech minoritních faktorů jako je desmycosin (faktor B), macrocin (faktor C) a relomycin (faktor D). Většina mikrobiální aktivity je spojována s tylosinem faktor A. Tylosin faktor B, C a D a metabolit dihydrodesmycosin mají okolo 50 %, 70 %, 30 % a 15 % aktivity tylosinu A.

Tylosin se používá k léčbě prasat, skotu a drůbeže. V tělech léčených zvířat dochází k významné metabolizaci tylosinu. Metabolická cesta je jak u prasat, tak u skotu – telat podobná, avšak s kvantitativními rozdíly v metabolitech. V případě perorálního podání tylosinu prasatům se v jedné ze studií tylosin vylučoval z 99 % ve stolici a z 1 % v moči. Tylosin se vylučoval formou metabolitů tylosin faktor D (33 %), tylosin faktor A (6 %) a dihydrodesmycosin. V jiné studii (GLP) na prasatech se tylosin vylučoval z 94 % ve stolici a z 6 % v moči formou tylosinu D (43 %) a dihydrodesmycosinu (44 %).

V případě intramuskulárního injekčního podání telatům se výkaly vyloučilo méně než 50 % tylosinu. Ve stolici telat bylo zjištěno 29,8 % tylosinu A, 11,4 % tylosinu faktor D, 25,2 % tylosinu faktor C, 10,8 % demethyl-tylosinu faktor D a v moči telat bylo zjištěno 70 % cysteinyl-tylosinu A (EMA 1997). V tabulce 8 jsou uvedeny maximální hlášené koncentrace tylosinu v hnoji a půdě (Cycon' et al. 2019).

Tylosin je antibiotikum, které se nepoužívá v humánní sféře, tj. je výhradně určené pro veterinární použití (nicméně humánní sféra má například josamycin, ze stejné skupiny tzv. makrolidů s 16-členným kruhem, ale jeho používání je, oproti jiným makrolidům víceméně omezené).



Fyzikálně chemické vlastnosti makrolidů prezentuje řada publikací (Halling-Sørensen et al. 2005; Kumar et al. 2005; Boxall et al. 2006; Sarmah et al. 2006; Cycon' et al. 2019).

Zhruba 80–90 % mateřské látky je tvořeno tylosinem A (Sarmah et al. 2006).

Tabulka 8: Maximální hlášené koncentrace, které byly zjištěny v hnoji a v půdě (Cycon' et al. 2019).

Makrolidové antibiotikum	Hnůj (µg/kg)	Půda (µg/kg)
Tylosin	7 000–8 100	1 250

2.3 Závěrečná rozvaha s ohledem na používání vybraných antimikrobik a potenciál perzistovat v půdě

Tetracykliny

Dle dat o spotřebách je nejvíce používanou látkou chlortetracyklin (přibližně okolo 70 % spotřeb tetracyklinových antimikrobik v ČR v letech 2014–2018). Tato látka by tedy měla být zařazena do sledování reziduí.

Dalšími látkami, které by teoreticky mohly být zařazeny, jsou doxycyklin (podíl na celkových spotřebách tetracyklinových antimikrobik, v rozmezí 17–20 %), zde spíše sledování jen pro půdy, na které byl aplikován materiál (kejda, hnůj, podestýlka) zejména z chovů prasat (případně drůbeže).

V případě oxytetracyklinu, je tato látka podávána převážně v injekční formě, pokud by byla předmětem sledování, pravděpodobně se zaměřit spíše na půdy, kde byl aplikován hnůj z farem dojného skotu.

Ačkoliv je velké množství dat o samotné molekule tetracyklinu, tetracyklin, ač je v ČR registrován, tvoří z pohledu celkové kvantity naprosté minimum spotřeb (maximálně okolo 0,4–1 % spotřeb tetracyklinových antimikrobik) v letech 2014–2018.

Závěrečná rozvaha tetracykliny:

- sledovat chlortetracyklin (rezidua matečné substance eventuálně epimerů v půdě)
- sledovat výskyt rezistence (např. geny *tet*) či další dle odborné rozvahy³

Amoxicilin

I přes skutečnost, že betalaktamová antibiotika charakteru penicilinů (především včetně aminopenicilinů – amoxicilinu) vykazují velkou spotřebu ve veterinární oblasti, data o stabilitě amoxicilinu (resp. rychlosti rozkladu na produkty, kterými jsou kyseliny, kde již není přítomen mikrobiologicky aktivní beta-laktamový kruh) svědčí o tom, že se nepředpokládá výskyt v půdě již v řádu dnů, po aplikaci hnojiva, kejdy, podestýlky.

Závěrečná rozvaha peniciliny (amoxicilin):

- nesledovat amoxicilin v rámci plošného monitoringu vzorků (případně pouze potvrdit, že by bylo možné jej v půdě detekovat v krátkém časovém intervalu – ihned po aplikaci, a následně po jednom až několika dnech potvrdit nepřítomnost, ale další plošná sledování neprovádět)
- sledovat výskyt rezistence zejména s ohledem na širokospektré betalaktamázy (ESBL), kde intenzivní selekce souvisí spíše s cefalosporiny vyšších generací.

Sulfonamidy

Z pohledu celkové spotřeby sulfadimidin tvoří více než polovinu celkové spotřeby sulfonamidů), sulfamethoxazol jej následuje s přibližně čtvrtinovou celkovou spotřebou

³ Odbornou rozvahou se myslí nejen další typy genů, ale rovněž lze zvažovat, pokud jsou známy např. genové kazety, Inc plasmidy, či jiné mobilní genetické elementy, včetně těch, kde je znám vysoký podíl určitého genu a potenciál ko-selekce AMR k dalším antimikrobikům

vztaženou na celou skupinu sulfonamidů, s poměrně velkým odstupem je míra podávání sulfadiazinu (přibližně devítina celkové spotřeby sulfonamidů). Dále byly používány v signifikantně nižším množství následující sulfonamidy (seřazeno od nejvyšší po nejnižší spotřebu): sulfaklozin, ftalylsulafthiazol, sulfadimethoxin, sulfadoxin, sulfamerazon. Sulfonamidy přicházejí v úvahu pro použití zejména u prasat (největší kvantita), významně méně u kura domácího (zde medikace v napájecí vodě) a nejméně u skotu (perorálně minimálně, telata; minimálně v injekční formě – dospělý skot).

Je vhodné upozornit, že je často podávána kombinace sulfonamidu s trimethoprimem (v daných fixních kombinacích je poměr sulfonamidů 5 : 1 trimethoprimu).

Závěrečná rozvaha sulfonamidy:

- sledovat sulfadimidin, sulfamethoxazol a sulfadiazin a jejich rezidua v půdě
- sledovat výskyt rezistence (např. geny *sul*, či *dfr* (trimethoprim) či další dle odborné rozvahy

Kolistin

Oficiální statistiky hovoří o velmi nízké spotřebě kolistinu v ČR. Látka však dle omezených dostupných dat má schopnost po perorálním podání (v ČR jediné registrované) setrvávat v exkrementech a následně v půdě. Jelikož kolistin byl dle posledního hodnocení EMA – AMEG zařazen spolu s fluorochinolony a cefalosporiny 3. a 4. generace mezi antimikrobika, jimž je potřeba věnovat zvláštní pozornost a minimalizovat jejich používání a sledovat dopady takového používání, bude zařazen do sledování, i přes nízké spotřeby v ČR. Použití lze předpokládat u prasat, v minimálním množství v chovech drůbeže a s ještě menším rozsahu u telat skotu.

Závěrečná rozvaha kolistin:

- sledovat rezidua kolistinu (polymyxin E různé formy) v půdě, zejména v okolí chovů prasat, kde byla aplikována kejda
- sledovat výskyt rezistence (např. geny *mcr*) či další dle odborné rozvahy

Fluorochinolony

Do této skupiny patří u hospodářských zvířat používaný enrofloxacin a marbofloxacin. Naprostou většinu spotřeb fluorovaných chinolonů za posledních 5 let lze v ČR alokovat na enrofloxacin. U řady hospodářských zvířat se enrofloxacin metabolizuje na mikrobiologicky účinný ciprofloxacin. Jelikož se jedná o skupinu antimikrobik s indikačním omezením (z důvodu kritického významu pro humánní medicínu), je žádoucí jí se věnovat.

Závěrečná rozvaha fluorochinolony:

- sledovat rezidua enrofloxacinu a jeho metabolitu ciprofloxacinu v půdě, zejména v okolí chovů drůbeže, v menší míře prasat, a to zejména tam, kde byla zapracována podestýlka z chovů drůbeže a kejda z chovů prasat
- sledovat výskyt rezistence (např. geny *par*, *gyr*, *qep*, *oqx*) či další dle odborné rozvahy (PMQR)

Makrolidy – tylosin

Makrolidy a příbuzné látky zaujímají ve spotřebách antimikrobik v ČR v posledních 3 letech páté místo. Je to skupina, kde jsou látky registrované a používané pouze jako injekční VLP – gamithromycin, tildipirosin, tulathromycin, jako injekční i perorální jsou dostupná VLP obsahující tilmikosin, erytromycin, tylosin a spiramycin, a konečně pouze v perorální lékové formě je registrovaný a používaný tylvalosin. Z pohledu spotřeb a hmotnostního množství tvoří největší část VLP s tylosinem. Tuto látku lze detekovat rovněž v exkrementech zvířat a následně také v půdě. Z pohledu WHO jsou makrolidy zařazeny mezi kriticky významná antimikrobika, a přestože nemají v ČR nastaven režim indikačního omezení, jsou z pohledu selekce rezistence poměrně důležitými látkami, a to jak v humánní, tak veterinární oblasti. Mohou totiž působit selekční tlak na rozvoj a šíření rezistence k makrolidům a jim chemicky analogickým sloučeninám ze skupin azalidů a triamilide, ale také ze skupin linkosamidů a streptograminů.

Závěrečná rozvaha makrolidy:

- sledovat rezidua tylosinu zejména v kejďě prasat a tam, kde byla kejda aplikována na půdu
- sledovat výskyt rezistence (zejména MLSB, *erm* geny) případně dalších typů genů a rezistence *vga* (A), *vga* (B), *msr* (A), *mef* (A), *mef* (B) a *mef* (C), *mph*, případně další geny dle prioritizace a uvážení

3. ANALYTIKA REZIDUÍ ANTIMIKROBIK V PŮDĚ

3.1. Úvod

Analýza antimikrobik v životním prostředí se v minulých letech soustředila především na vodní ekosystémy, a to jak na výskyt v odpadních vodách, tak ve vodách povrchových. S rozšířením problematiky výskytu na antibiotika rezistentních bakterií se pozornost obrací i k dalšímu potenciálnímu zdroji rezistence. Tím je aplikace statkových hnojiv a kalů z čistíren odpadních vod na zemědělskou půdu. V těchto matricích se předpokládá vysoký výskyt reziduí veterinárních a humánních léčiv, včetně antibiotik (Kuppusamy et al. 2018; Pan, Chu 2017; Tasho, Cho 2016). Dostupné studie se zaměřují na analýzu jednotlivých složek – hnojiva z chovu prasat, drůbeže a skotu, kaly z čistíren odpadních vod, zemědělská půda. Analýza pevných vzorků tohoto typu sebou přináší spoustu komplikací (Aga et al. 2016).

3.1.1. Fyzikálně-chemické parametry

Půda je komplexní a složitá matrice. Obsahuje velké množství různých huminových látek, jílových minerálů, anorganických iontů. Liší se svými vlastnostmi, jako jsou obsah organické hmoty, pH, vlhkost, struktura, kationto-výměnná kapacita, obsah N, koncentrace kationtů (K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} a dalších), složení mikrobiálního společenstva. Všechny jmenované vlastnosti mohou mít vliv na sorpci, formy výskytu, distribuci a degradaci léčiv v půdním profilu po aplikaci hnojiva. Nesmíme také zapomenout na vnější klimatické podmínky, které hrají svou důležitou úlohu při výše uvedených procesech (Cycoń et al. 2019; Aga et al. 2016).

Ve studiích zaměřujících se na monitoring výskytu antimikrobik v pevných environmentálních matricích se využívá především multireziduálních metod (Aga et al. 2016; Díaz-Cruz et al. 2003). Tyto metody pro sledování velkého množství analytů v jedné analýze s sebou přináší několik výhod. Zejména je snížena potřebná doba pro zpracování vzorku a jeho analýzu a tím se i snižují ekonomické náklady. Hlavní nevýhodou takovýchto metod je, že jednotlivé skupiny léčiv se liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, a výsledná optimalizovaná multireziduální metoda je tak vždy jakýmsi kompromisem mezi selektivitou, přesností a citlivostí. Metoda musí splňovat potřebné statistické parametry (výťažnost, limity detekce a kvantifikace, opakovatelnost atd.), ale je velice nepravděpodobné, že budou pro všechny analyty stejně dobré, výhodné. Např. některá antimikrobika mohou mít výťažnosti extrakce výborné, jejich stanovení není ovlivňováno přítomnou maticí, u jiných antimikrobik tomu může být přesně naopak (Aga et al. 2016).

Na rozdíl od organických polutantů neutrální povahy, mobilita antimikrobik v půdě nemůže být přímo vztažena k hodnotě jejich K_{ow} nebo rozpustnosti ve vodě, jelikož je mnoho antimikrobik polárního charakteru, který řídí jejich sorpci v půdě. Např. látky charakteru organických bází, mohou být sorbovány na jíl (kationtová výměna) při pH nižším, než je jejich disociační konstanta pK_a díky tvorbě kationických můstků. Při sorpci některých antimikrobik se může uplatnit i více mechanismů. Např. tetracykliny mají tři různé hodnoty pK_a , mohou existovat ve formě kationtu, zwitteriontu a aniontu a mohou být sorbovány na půdní částice různými mechanismy s ohledem na pH půdy (Aga et al. 2016). Dalšími využívanými charakteristikami, které umožňují předvídat chování antimikrobik v půdě, jsou distribuční koeficienty K_d , K_{oc} a poločas degradace $T_{1/2}$ (Cycoń et al. 2019).

Vlastnosti půdy a fyzikálně-chemické vlastnosti různých skupin antimikrobik jsou určující pro postupy, které jsou využity při jejich stanovení v pevných matricích – půdách.

3.1.2. Degradace

Antimikrobika přítomná v půdách mohou být degradována nebo transformována abiotickou nebo biotickou cestou. Mezi nejdůležitější abiotické reakce patří fotochemická degradace (k té dochází pouze v povrchové vrstvě půdy), hydrolýza, oxidace nebo redukce. Hydrolytické a oxidačně-redukční reakce budou potom velmi závislé na množství přítomné vody a pH prostředí (Jechalke et al. 2014). Biotická degradace a transformace je ovšem hlavním procesem přeměny antimikrobik v půdě. Biodegradace je závislá na mnoha faktorech jako je koncentrace O₂, pH, teplota, vlhkost, mikrobiální populace, dostupnost nutrientů, stupeň adaptace, chemická struktura sloučenin a buněčný transportní mechanismus (Cycoń et al. 2019; Kuppusamy et al. 2018). Dostupné publikace se až na výjimky (Sollicet et al. 2016, 2015) nezabývají analýzou produktů degradace (metabolitů) antimikrobik v reálných vzorcích půdy.

Samostatnou otázkou zůstává analýza biodostupné frakce antimikrobik přítomných v půdě. Některé skupiny (tetracykliny, fluorochinolony) vykazují velké sorpční a komplexační vlastnosti na půdních částicích (Gros et al. 2019; Kodešová et al. 2016, 2015;). Tím je omezena jejich pohyblivost v půdním profilu, ale také jsou méně dostupné pro biodegradaci mikroorganismy.

3.2. Analytická metoda stanovení antimikrobik v půdách

3.2.1. Extrakce

Po odběru půdy jsou vzorky standardně vysušeny lyofilizací a uchovávány při teplotě + 4 až po -20°C.

Jako extrakčních technik se nejčastěji využívá extrakce ultrazvukem (USE) (Gros 2019; Albero 2018; Kodešová 2016; Golovko 2016; Sollicet 2016), extrakce kapalina-pevná látka (LSE), extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku (PLE, PSE) (Andreu 2019) a mikrovlnná extrakce (MAE) (Sturini 2010).

Extrakce ultrazvukem se využívá pro svou jednoduchost, malé množství použitého rozpouštědla a uspokojivé výsledky pro všechny skupiny antibiotik. PLE je také často používanou metodou, protože umožňuje extrakci několika vzorků současně, je plně automatizovaná a vykazuje dobrou opakovatelnost. Nevýhodou je větší objem získaného extraktu, může také docházet k ucpávání kapilár extraktoru, jelikož je nutné využívat vody (různé modifikace pH) jako extrakčního media.

V publikacích využívajících USE byla použita obvykle navážka 2 g půdy a frakce menší než 2 mm (Gros et al. 2019; Golovko et al. 2016). Je možné navažovat i větší množství půdy, to má za následek nejen extrakci většího množství analytů, ale také komplikaci se zvýšením koncentrace koextrahované matrice.

Složení extrakčního rozpouštědla se v publikacích liší podle skupin sledovaných analytů. Platí, že v případě monitoringu především tetracyklinů v půdách se ke vzorku přidává Na₂EDTA v pevném skupenství (Albero et al. 2018) nebo jako roztok 0.1M EDTA (Sollicet et al. 2016; Martínez-Carballo et al. 2007). Dále autoři využívají McIlvainův pufr o různém pH (pufr složený z kyseliny citrónové a hydrogenfosforečnanu sodného, pH 2,2–8,0) a methanol (MeOH) nebo acetonitril (ACN) (většinou v poměru pufr:organické rozpouštědlo, 1:1) (Guo et al. 2016; X. G. Hu et al. 2008; Martínez-Carballo et al. 2007). Objem použitého extrakčního činidla se pohybuje okolo 10 ml a extrakce je opakována 2krát až 3krát. Další typy extrakčního

činnidla mohou být ACN:fosfátový pufr o pH 3,2 (Albero et al. 2018); ACN:0,1M HCOOH (Golovko et al. 2016; Kodešová et al. 2016), ACN:voda (Tetzner et al. 2016).

Zajímavou možností extrakčního postupu se jeví využití metody (Gros et al. 2019; Guo et al. 2016; Bourdat-Deschamps et al. 2014) Tato metoda je rychlá, s menší spotřebou chemikálií, kombinující zároveň extrakci i přečištění.

Při extrakci a analýze tetracyklinů musí být ověřeno, že nedochází k přechodu původního analytu do jeho epimerní formy. Tento jev může zkreslovat konečné výsledky (Sollicet et al. 2016, 2015).

3.2.1.1. Matriční efekt

Koextrahované látky ze vzorku půdy mohou způsobit při analýze nežádoucí komplikace (Andreu et al. 2009; Gros et al. 2019; Leal et al. 2013; Yi et al. 2015). Při LC/MS analýze dochází k potlačení nebo naopak zvýšení odezvy signálu analytu, což má za následek zhoršení limitů metody, podhodnocené nebo naopak nadhodnocené výsledky. Součástí optimalizace postupu musí být vždy ověření matričních efektů (blanky s přidavkem standardů, matriční kalibrace). Nevýhodou je, že pro různé typy půd může být tento efekt rozdílný.

Z tohoto důvodu je k validaci metody je nutné využití vnitřních standardů (IS), které se přidávají ke vzorku půdy ještě před extrakcí a výsledky se kvantifikují s ohledem na vnitřní standardy. Jako vnitřních standardů se nejčastěji používá značených analogů sledovaných analytů ^2H , ^{13}C , ^{15}N (Aga et al. 2016; Yi et al. 2015).

3.2.2. Přečištění extraktu

Kvůli koextrakci látek ze vzorků půdy mnoho autorů přistupuje k čistícímu kroku, při kterém je hojně využívána extrakce na tuhou fázi (SPE). V některých publikacích nebylo přečištění provedeno vůbec a autoři počítali se zvýšeným matričním efektem (Golovko et al. 2016; Kodešová et al. 2016; Stoob et al. 2006). V případě SPE se často využívá kombinace dvou typů SPE kolonek (W. Hu et al. 2012; Andreu et al. 2009; Uslu et al. 2008) (rozdíl v selektivitě stacionární fáze) nebo přečištění pomocí jedné SPE kolonky (Sun et al. 2017; Guo et al. 2016; Pamreddy et al. 2013; Ding et al. 2011). Vzorek je po extrakci nanesen na první kolonu (zpravidla fáze se silným aniontoměničem, např. SAX, MAX), která je přímo spojena s druhou SPE kolonou se sorbentem typu HLB. Jestliže je k extrakci použito organické rozpouštědlo, je vzorek před SPE zředěn na větší objem vodou, aby nedocházelo při nanášení vzorku na HLB sorbent k eluci cílových analytů. Na aniontoměničové kolonce dochází k zachycení huminových látek a vlastní analyty (antimikrobika) jsou pak sorbovány na druhé kolonce. Po promytí a vysušení je provedena eluce z HLB kolonky směsí rozpouštědel (ACN, MeOH, 0,1M HCOOH, voda, atd.). Objem je redukován a případně je vzorek znovu rozpuštěn ve směsi rozpouštědel vhodných pro LC/MS analýzu. Další možností je přímé spojení SPE (online SPE) s LC/MS (Tetzner et al. 2016; Bourdat-Deschamps et al. 2014).

Celková výtěžnost extrakce a čistícího kroku je důležitým parametrem, ale v případě multireziduální analýzy, kde se analyty výrazně liší ve svých fyzikálně-chemických vlastnostech, není někdy možné dosáhnout akceptovatelných výtěžností u všech cílových analytů. V dostupných publikacích se tyto výtěžnosti pohybují po optimalizacích metod většinou mezi 50–120 % v závislosti na matici a analytu (Sollicet et al. 2016).

3.2.3. Analytická koncovka

Pro stanovení léčiv je dle jejich polární povahy vhodná tandemová technika kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. V posledních letech se stala již standardní metodou pro tento typ analýzy kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem typu trojitý kvadrupól. Jeho výhodou je výborná selektivita a přesnost při kvantifikaci. Nevýhodou je, že je to hmotnostní spektrometr s nízkým rozlišením, a to může ve složitých vzorcích způsobit nesprávnou identifikaci látky. Další možností je měření s využitím hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením. Opodstatněné je to především při studiu vzniku a distribuci degradačních produktů (metabolitů) antibiotik v půdě (Sollic et al. 2016).

Nejvíce používanou kolonou pro stanovení antibiotik je kolona se stacionární fází na bázi C18 (BEH C18 (Tetzner et al. 2016), Luna C18 (Ding et al. 2011), Eclipse XDB C18 (Guo et al. 2016) atd.). Eluce je prováděna v gradientu s použitím methanolu nebo acetonitrilu a 0.01M HCOOH. Pro kvantifikaci MS/MS je využito SRM nebo MRM s kvantifikačním a kvalifikačním iontem pro každý standard (Gros et al. 2019; Golovko et al. 2016; Guo et al. 2016; Leal et al. 2013; Ding et al. 2011; Andreu et al. 2009; Białk-Bielińska et al. 2009; Martínez-Carballo et al. 2007). Kvantifikace je prováděna metodou vnitřního standardu. Limity kvantifikace se pohybují kolem 1 µg/kg půdy v závislosti na typu půdy a antibiotika.

Některé vybrané metody stanovení jsou uvedeny v tabulce 9.

3.2.4. Vybrané výsledky

Ucelený výzkum výskytu antibiotik na zemědělských půdách nebyl v rámci Evropské unie proveden. Více dostupných publikací pochází z oblasti Asie. V rámci České republiky byl proveden monitoring skupinou Golovka et al. (2016). Bylo sledováno větší množství léčiv ve 13 různých typech půd (předchozí podrobná charakteristika, hnojení kaly z ČOV nebo sedimenty z rybníků), mezi kterými byla i antibiotika. Ve většině sledovaných vzorků půd původem z ČR byla všechna antibiotika pod limitem kvantifikace metody (MLQ okolo 1ng/g). V Rakousku byl proveden výzkum v roce 2007 na 30 vzorků půd. V 17 % vzorků byla nalezena rezidua enrofloxacinu a jeho metabolitu ciprofloxacinu. Koncentrace trimethoprimu se pohybovaly pod kvantifikačním limitem metody (Martínez-Carballo et al. 2007). V publikaci sledující vertikální distribuci antibiotik po aplikaci hnojiv bylo konstatováno, že s hloubkou koncentrace klesá. Nejvyšší množství antibiotik zůstává v povrchové vrstvě asi do hloubky 10 cm (Gros 2019). Tetracykliny a fluorochinolony zůstávají vázány převážně na pevnou složku půdy (okolo 99 %), do půdní vody se dostávají pouze v nízkých koncentracích (Sollic et al. 2016). Podle laboratorních experimentů (Albero 2018) má vliv na distribuci mezi pevnou a kapalnou složku půdy střídání sucha a závlahy (možná spojitost s problematikou sucha).

Tabulka 9: Vybrané metody stanovení léčiv v pevných maticích, především půdě

Léčiva	Typ vzorku	Příprava vzorku		Analytická technika	LOQ (ng/g)	Reference
		Extrakce Množství vzorku Technika Extrakční činidlo	Přečištění Technika Druh sorbentu Eluční činidlo			
91 léčiv včetně makrolidů, sulfonamidů	Sediment Čistírenský kal Půda	2 g USE ACN/voda 1/1 v/v s 0,1% FA ACN/IPA/voda 3/3/4 v/v/v s 0,1% FA	-	LC-MS/MS HESI +/- SRM	1–3,2	(Golovko et al. 2016)
Sulfonamidy Tetracykliny Chinolony Makrolidy	Půda hnůj	0,5 g hnoje/2 g půdy USE ACN/citrátový pufr pH=4 2 opakování	Tandemová SPE SAX, HLB MeOH	LC-MS/MS ESI+ MRM	LOD 0,23–5 půda 0,35–13 hnůj	(Li et al. 2015)
Sulfonamidy Tetracykliny Fluorochinolony	Půda	3 g USE MeOH/EDTA – Mcllvainův pufr pH=6 3 opakování	SPE C18 H ₂ O; 0,01M kys. šťavelová	LC-MS/MS ESI+ MRM Fluorochinolony LC-MS ESI+ SIM	100	(Martínez-Carballo et al. 2007)
	Kejda	10 g USE ACN + acetátový pufr 3 opakování	n-hexan			
Tetracykliny Beta-laktamy Sulfonamidy Makrolidy Linkosamidy Diaminopyrimidin	Půda Hnůj (voda – zde dále nepopisováno)	2 ml hnoje/2 g půdy USE Mcllvainův pufr pH=5 s 0,1M EDTA	SPE Strata-X MeOH s 0,1% HCOOH	LC-HRMS HESI+ MRM	Hnůj 12–53 Půda 3,3–25	(Sollicet et al. 2016)
Sulfonamidy	Půda	2 g Míchání ACN/voda 1/1 v/v	Online SPE HLB voda	LC-MS/MS ESI+ MRM	0,5	(Tetzner et al. 2016)

AMR v půdě a případně v dalších částech životního prostředí

Fluorochinolony Tetracykliny Sulfonamidy Linkosamidy	Půda	2 g + přídavek Na ₂ EDTA USE ACN/fosfátový pufr pH=3,2 1/1 v/v 3 opakování	-	LC-MS/MS ESI+ MRM	1–25	(Albero et al. 2018)
Fluorochinolony Tetracykliny Sulfonamidy Makrolidy	Půdní voda Prasečí kejda Kal z ČOV (kapalná fáze odebrána u všech)	QuEChERS	Online SPE HLB	LC-MS/MS ESI+ MRM	kal 4–159 Kejda 5–272	(Bourdat-Deschamps et al. 2014)
Tetracykliny	Půda	PLE = PSE 5 g půdy + Disperzní matrice: 5 g mořského písku propláchnutý 0,1 M EDTA-Na ₂ Extrakční činidlo: MQ voda (pH 7,0–6,8) při 70 °C	Tandemová SPE (SAX silný anion exchange + Strata-X) Eluce ATB ze Strata-X pomocí MeOH	LC-MS/MS ESI+ SRM	1–5	(Andreu et al. 2009)
Fluorochinolony	Půda	MAE (20 min, 80 °C) 0,5 – 1 g (fortifikovaná půda) + 8 ml 20% (w/v) Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O and 2% (v/v) NH ₃	Speciální krok čištění neuveden, jen centrifuga 10 min při 4500 rpm. Před analýzou okyselení H ₃ PO ₄ v poměru (1:5)	HPLC-FLD	2–13 ug/kg	(Sturini et al. 2010)

4. CHARAKTERISTIKA PŮD V ČR

Celková výměra půdního fondu České republiky k 31. 12. 2017 činila 7887 tis. ha, z toho zemědělská půda 4205 tis. ha (53,3 %). Zemědělský půdní fond se dále dělí na šest kultur, z nichž je nejvíce zastoupena orná půda (2959 tis. ha, 70,4 %) a trvalé travní porosty (1007 tis. ha, téměř 24 %). Zbýlých necelých 6 % se dělí mezi zahrady, ovocné sady, vinice a chmelnice (ČSÚ, 2018).

Zemědělskou půdu lze charakterizovat mnoha způsoby. Záleží především na úhlu pohledu autora. Z hlediska rezistence k antimikrobiálním látkám bude vhodné zaměřit se na obsahy živin (nejčastěji zmiňovanými jsou fosfor a draslík), hodnotu půdní reakce (pH), obsah rizikových prvků (zejména mědi a zinku), zrnitost půd a organickou hmotu. V odborné literatuře se právě tyto parametry uvádí jako hlavní faktory zvyšující selekční tlak na mikroorganismy (Armalyté et al. 2019; McCann et al. 2019; Kümmerer et al. 2008). Byla také doložena pozitivní korelace mezi výskytem určitých AR genů a zvýšeným obsahem rizikových prvků v půdě, zejména Cu a Zn, což ale může souviset se zvýšeným obsahem těchto prvků v chlévském hnoji (Graham et al. 2016; Kyselková et al. 2015).

4.1. Půdní živiny a pH

Půdní živiny jsou prvky nezbytné ke zdárnému růstu a vývoji rostlin. Rozlišujeme makroživiny, bez nichž rostlina nemůže dokončit svůj vývoj a nedají se nahradit jinou živinou – fosfor (P), draslík (K), hořčík (Mg), vápník (Ca) a síra (S) a mikroživiny, které jsou pro rostliny nezbytné, avšak pouze v určitých nízkých koncentracích, neboť jejich vysoké obsahy mohou na rostliny naopak působit toxicky – železo (Fe), mangan (Mn), zinek (Zn), měď (Cu), bór (B) a molybden (Mo).

Dalším významným půdním parametrem je reakce půdy, vyjádřená pomocí pH. Reakce půdy ovlivňuje prakticky všechny fyzikální, fyzikálně-chemické i biologické procesy v půdě. Na hodnotě půdní reakce závisí např. mobilita prvků a látek v půdním roztoku, a tedy jejich přístupnost živým organismům (Vaněk et al. 1998)

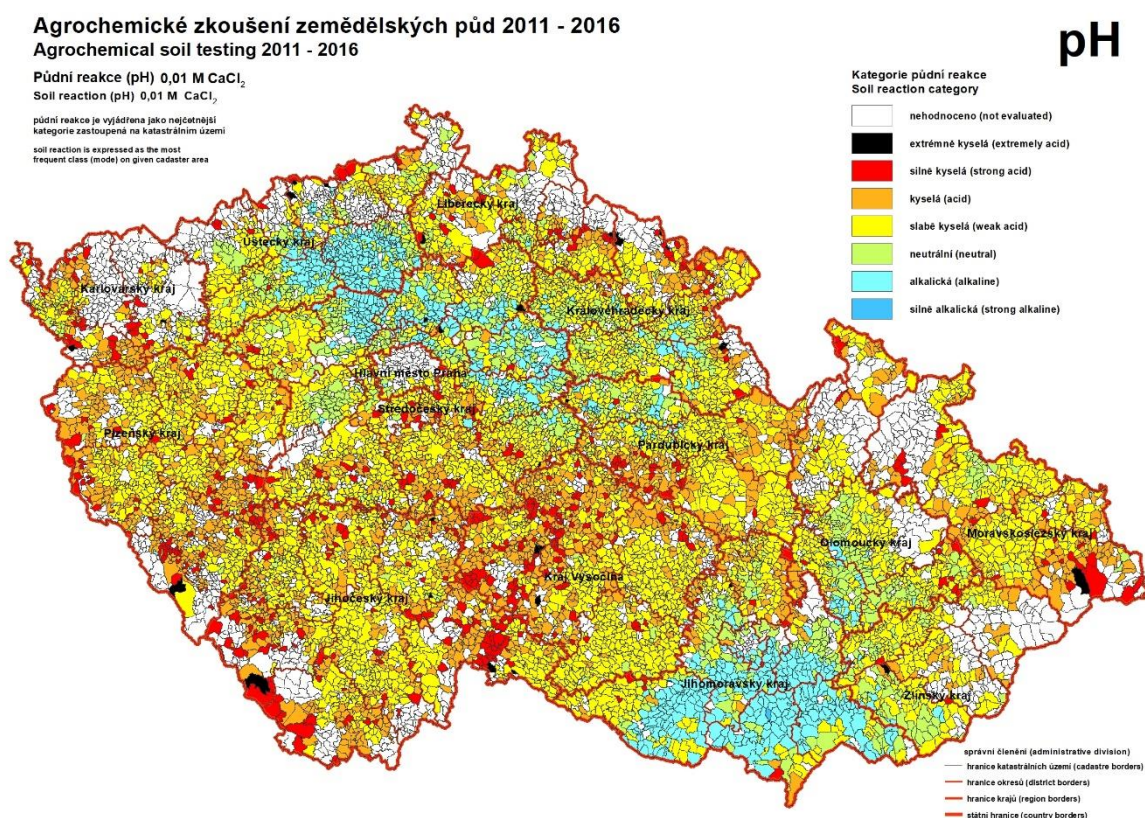
Nejrozsáhlejším systémem sledování obsahů přijatelných živin v České republice je bezesporu Agrochemické zkoušení zemědělských půd (AZZP).

Podle výsledků posledního cyklu vzorkování AZZP činí průměrná hodnota výměnné **půdní reakce zemědělské půdy** 6,1 pH. Pozemky s půdní reakcí < 5,5 (kyselé půdy) tvoří téměř 30 % výměry zemědělské půdy a téměř 40 % výměry zaujímají pozemky se slabě kyselou půdní reakcí, tj. s pH = 5,6–6,5. Půdy neutrální (pH = 6,6–7,2) a alkalické (pH > 7,2) zaujímají pouhých 17 %, resp. 13,6 %. V případě **orné půdy** se půdní reakce pohybuje v rozmezí 5,9–6,8, průměr 6,2 pH a kyselé půdy zaujímají 26,4 % výměry. Největší podíly kyselých půd se nachází v krajích Karlovarském, Jihočeském, Plzeňském a Vysočina (Smatanová, Sušil 2018). Podle dlouhodobých výsledků AZZP dochází k neustálému mírnému poklesu pH v zemědělských půdách, i když trend již nemá tak negativní charakter jako v letech 1995–2005. Přesto v průběhu posledního cyklu došlo ke zvýšení podílu půd v kategoriích extrémně a silně kyselé (Smatanová et al. 2017).

Silně kyselé a kyselé půdy se nacházejí především v podhorských a horských oblastech, na Vysočině a v okrese Jindřichův Hradec, v oblasti vytyčené obcemi Plzeň, Klatovy a Strakonice, a v jižní části Středočeského kraje.

Pokles výměnné půdní reakce zemědělských půd byl potvrzen také v rámci dlouhodobého monitoringu zemědělských půd.

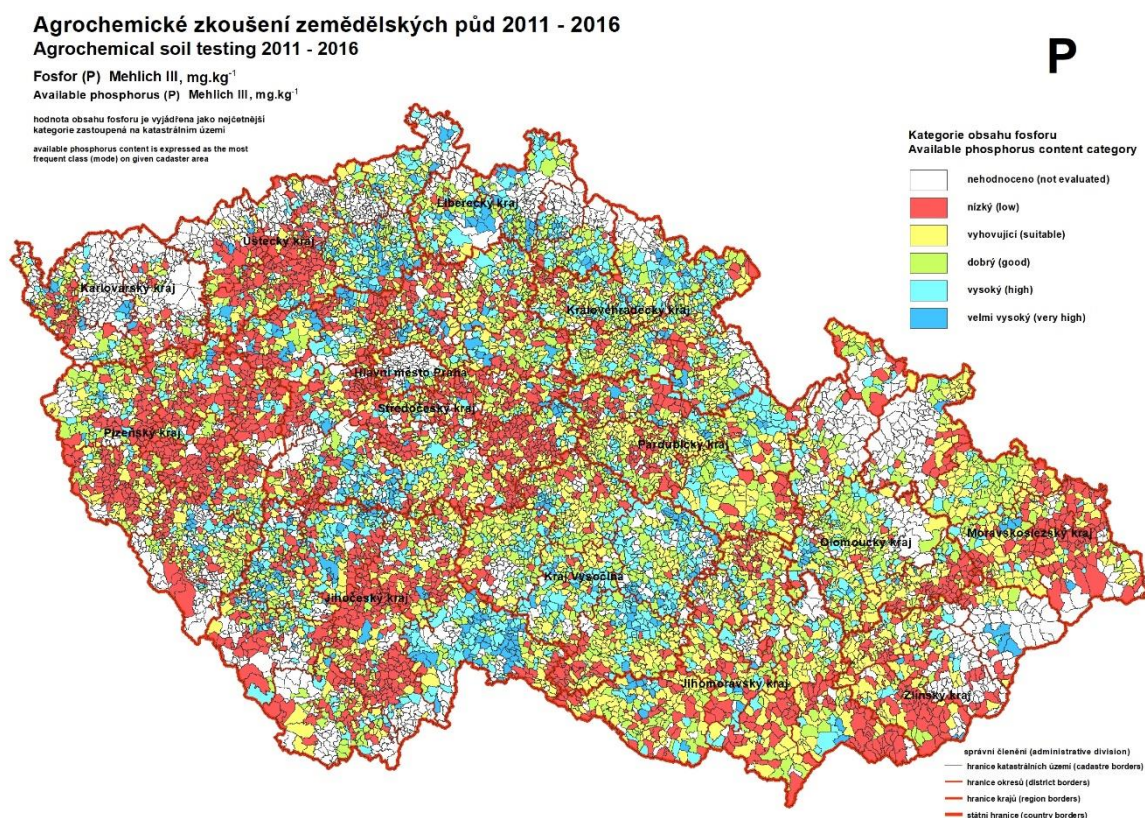
Obrázek 6: Půdní reakce (pH)



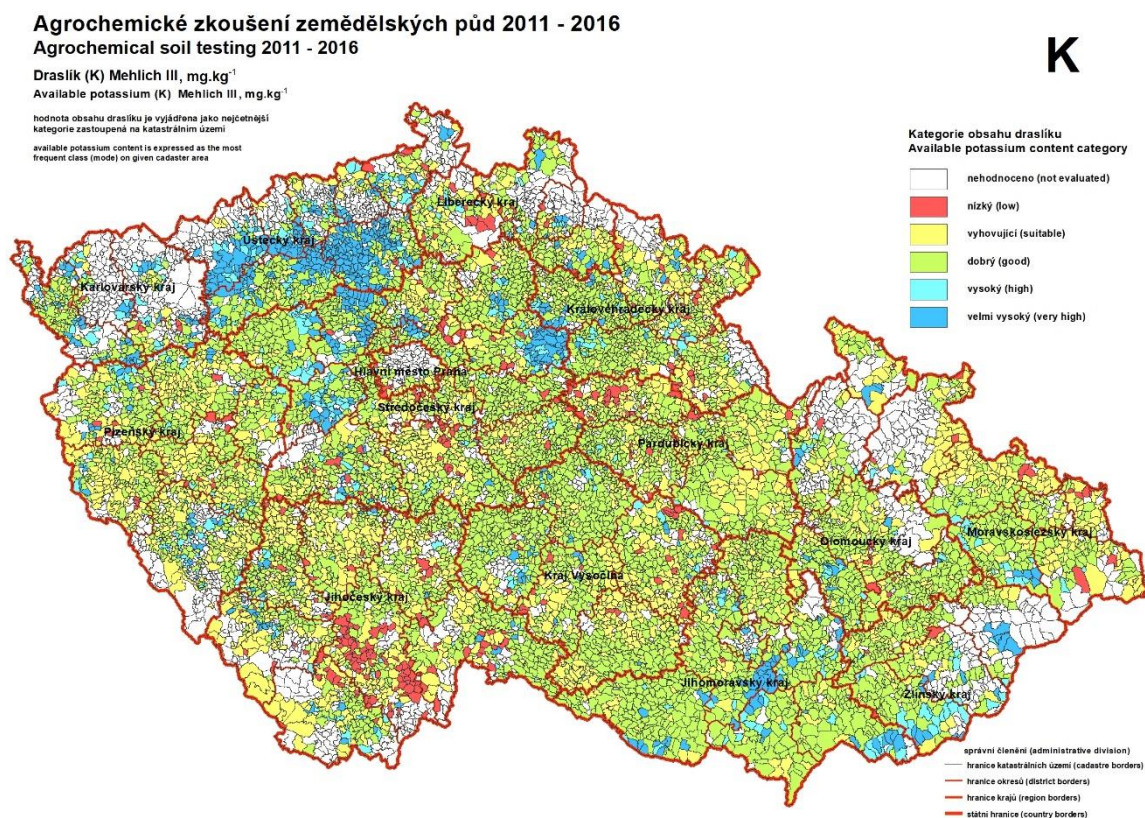
Průměrný obsah **fosforu v orné půdě** stanovený na základě výsledků z posledního cyklu AZZP činí 91 mg/kg. Zhruba čtvrtina výměry (26,3 %) orné půdy trpí nedostatečným obsahem fosforu. Největší podíl ploch s nízkým obsahem fosforu se nachází v kraji Karlovarském, Plzeňském a Zlínském. Téměř polovina pozemků (49,4 %) vykazuje vyhovující a dobrý obsah fosforu v půdě a na téměř čtvrtině výměry (24,3 %) byly zjištěny vysoké a velmi vysoké obsahy fosforu, a to zejména v kraji Libereckém, Vysočina a Ústeckém (Smatanová, Sušil 2018). Ve srovnání s předcházejícími výsledky došlo k mírnému zhoršení (snížení) obsahu fosforu na orných půdách, konkrétně bylo zjištěno zvýšení výměry orné půdy spadající do kategorie nízkého obsahu fosforu o 1,93 % (Smatanová et al. 2017).

Podle informací z posledního cyklu AZZP se obsah přístupného **draslíku v orných půdách** ČR pohybuje v rozmezí 191–454 mg/kg, přičemž průměrný obsah činí 253 mg/kg. Nízkým obsahem draslíku trpí přibližně 7 % výměry orné půdy, zejména kraje Jihočeský (12,5 %) a Moravskoslezský (12,1 %). Vysoký a velmi vysoký obsah byl naopak zjištěn na 22,2 % výměry, především v kraji Ústeckém (65,6 %) a Jihomoravském (31,5 %) (Smatanová, Sušil 2018). Proti minulému cyklu AZZP došlo ke zvýšení průměrného obsahu cca o 13 mg/kg. Nárůst obsahů draslíku byl pozorován ve všech krajích (maximum v Ústeckém kraji) s výjimkou tří – kraje Zlínského, Moravskoslezského a Karlovarského, kde obsah draslíku klesl (Smatanová et al. 2017).

Obrázek 7: Obsah fosforu v zemědělských půdách ČR



Obrázek 8: Obsah draslíku v zemědělských půdách ČR



Sledování obsahu přístupných živin v rámci dlouhodobého monitoringu půd ukázalo na narůstající procenta ploch v kategoriích s méně uspokojivým obsahem a pokles v kategoriích s obsahem optimálním, a to jak v případě fosforu, tak draslíku (Prášková, Němec 2016).

4.2. Rizikové prvky

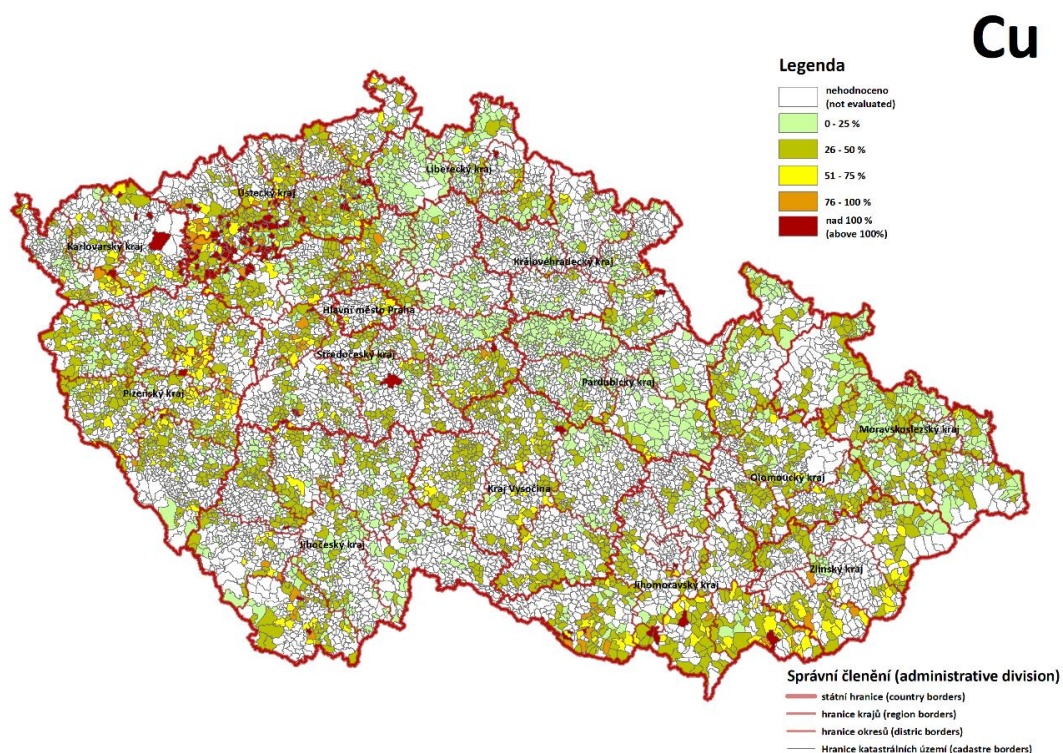
Problematika rizikových prvků v půdě, kontaminace a typů zátěží půd je velmi široká. Zde bude prostor věnován zinku a mědi, protože to jsou dva prvky nejčastěji zmiňované v literatuře jako faktory vyvolávající selekční tlak na bakterie. Zinek i měď jsou rizikové prvky, zároveň je řadíme mezi esenciální jak pro rostliny, tak pro živočichy. Jsou důležitou a nepostradatelnou složkou krmných směsí, určených pro výživu hospodářských zvířat, v jejichž organismu se podílí na řadě enzymatických procesů a podporují vyhovující fyziologický stav i buněčnou imunitu. Část přijaté dávky mikroelementů není trávicím traktem zvířete využita (zejména zinku), zůstává ve statkových hnojivech a může působit jako významný vstup do půdy. Fungicidních vlastností mědi se zase využívá k ochraně révy, chmele, ale i rajčat, jablek a dalšího ovoce a zeleniny a také toto využití mědi může působit jako významný vstup do půdy. Přes značnou toxicitu mědi pro vodní organismy, výskyt volné mědi většinou nepředstavuje v ekosystémech velký problém, protože se komplexně váže v půdě, čímž se značně snižuje její toxicita.

Zvýšené obsahy **mědi** v půdě jsou důsledkem především antropogenní kontaminace (spalování uhlí, metalurgický průmysl). Zvýšené vstupy mědi do půdy jsou významné zejména v oblasti severomoravského regionu, dále Prahy a jejího okolí (Němeček et al. 2010). Na základě prostorových dat získaných v rámci probíhajícího programu Registr kontaminovaných ploch (Poláková et al. 2014) je patrné, že v zemědělských půdách se největší procento vzorků přesahujících požadované obsahy mědi v České republice (preventivní hodnotu) nachází v krajích Karlovarském, Ústeckém a Jihomoravském. Důvodem jsou, kromě zmíněné antropogenní zátěže, pravidelné aplikace přípravků na ochranu rostlin na bázi mědi do porostů chmele a vinic. Průběžné zvyšování obsahů mědi v půdách s uvedeným způsobem využití byl potvrzen v rámci probíhajícího dlouhodobého monitoringu půd ČR. Navíc obsahy mědi jsou ve svrchním půdním horizontu (ornici) v důsledku antropogenních vstupů, a to jak emisí, tak přípravků u všech kultur (využití pozemků) vyšší než v podorničním horizontu, u vinic a chmelnic významně (Poláková et al. 2016).

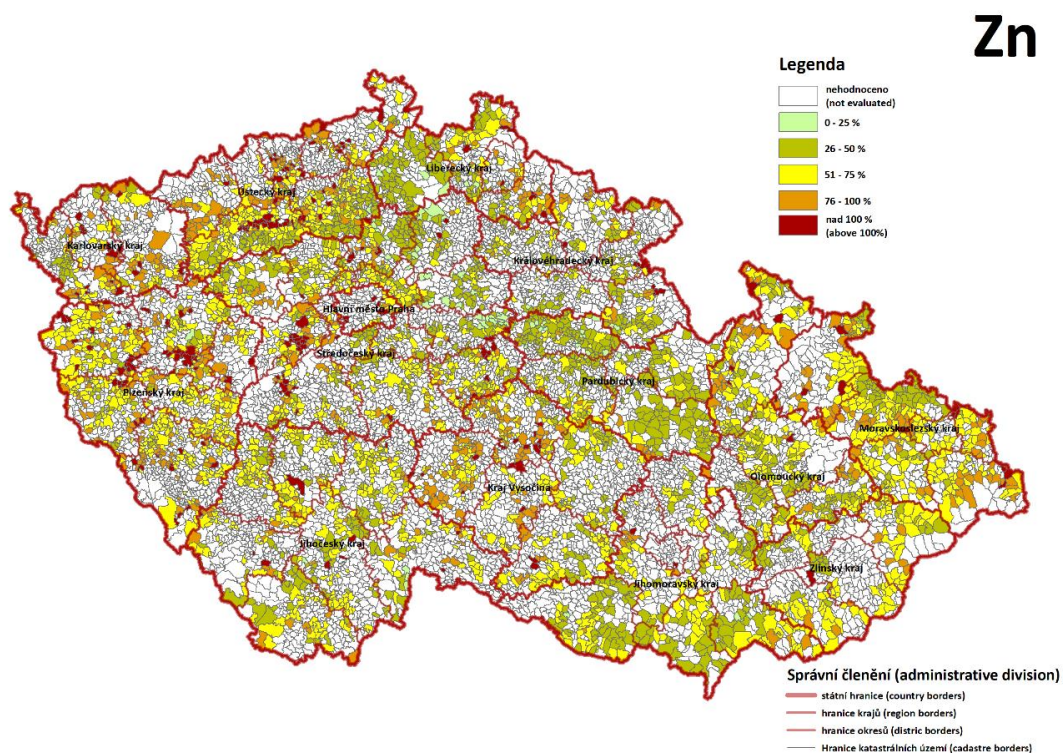
Zvýšené obsahy **zinku** se v půdě objevují většinou v důsledku kombinované (antropogenní a geogenní) zátěže. K nejpostiženějším patří severočeský a severomoravský region, Praha a oblasti říčních niv, ale také okolí Kutné Hory, Příbrami a Berouna (Němeček et al. 2010). Data z Registru kontaminovaných ploch potvrzují největší procenta vzorků překračujících preventivní hodnoty v krajích Ústeckém, Karlovarském a Plzeňském, nicméně plochy se zvýšenými obsahy jsou roztroušeny mozaikovitě po celém území ČR. Z dlouhodobého monitoringu dále vyplývá, že obsahy zinku průběžně rostou prakticky na celé ploše republiky (Poláková et al. 2016).

Je potřeba mít na paměti, že zvýšené obsahy zinku a mědi v půdě mohou být důsledkem jak průmyslové výroby, tak aplikace statkových hnojiv, případně aplikace přípravků na ochranu rostlin na bázi mědi či aplikace kalů.

Obrázek 9: Obsah mědi v zemědělských půdách ČR vyjádřený jako procento preventivní hodnoty



Obrázek 10: Obsah zinku v zemědělských půdách ČR vyjádřený jako procento preventivní hodnoty



4.3. Zrnitost

Zrnitost je významná půdní vlastnost, od které se odvíjí další půdní vlastnosti. V českých podmínkách se pro určení zrnitosti, resp. druhů zemin tradičně používá Novákova klasifikace. Tato klasifikační metoda pracuje s procentuálním zastoupením částic menších než 0,01 mm a rozděluje půdu do sedmi půdních druhů (tabulka 10). Pro běžnou práci pak stačí rozlišovat tři půdní druhy: půdy lehké s obsahem jílnatých částic pod 20 %, střední půdy a půdy těžké s obsahem jílnatých částic vyšším než 45 %.

Tabulka 10: Novákova klasifikace druhů půd (Novák 1953)

% zastoupení jílnatých částic	Označení druhu zeminy	Zkrácená kategorizace
> 75	Jíl	Těžká půda
60–75	Jílovitá	
45–60	Jílovitohlinitá	
30–45	Hlinitá	Střední půda
20–30	Písčitolhinitá	
10–20	Hlinitopísčitá	Lehká půda
0–10	Písčitá	

Jak je uvedeno hned v úvodu, zrnitost má přímý dopad na mnoho půdních vlastností. Zejména půdy s velmi nízkým či naopak vysokým zastoupením jílnatých částic jsou charakteristické určitými projevy/znaky. Jaké jsou tedy specifické znaky jednotlivých druhů půd? Pro půdy písčité (s obsahem jílnatých částic do 10 %) platí:

- jsou to půdy s malou fyziologickou hloubkou,
- na svém povrchu se přehřívají, jsou teplotně značně rozkolísané. To souvisí s vysokým obsahem vzduchu – půdy jsou silně provzdušněné, s vysokou aerací,
- mají vysokou propustnost pro srážkovou vodu (nízká vododržnost půdy),
- mají nízkou sorpční schopnost, což platí jak pro živiny, tak pro vodu; půda je nesoudržná, sypká,
- mají většinou vysokou aciditu,
- ve většině případů mají velmi nízký obsah přijatelných forem živin,
- jsou náchylné k erozi, jak k vodní, tak k větrné.

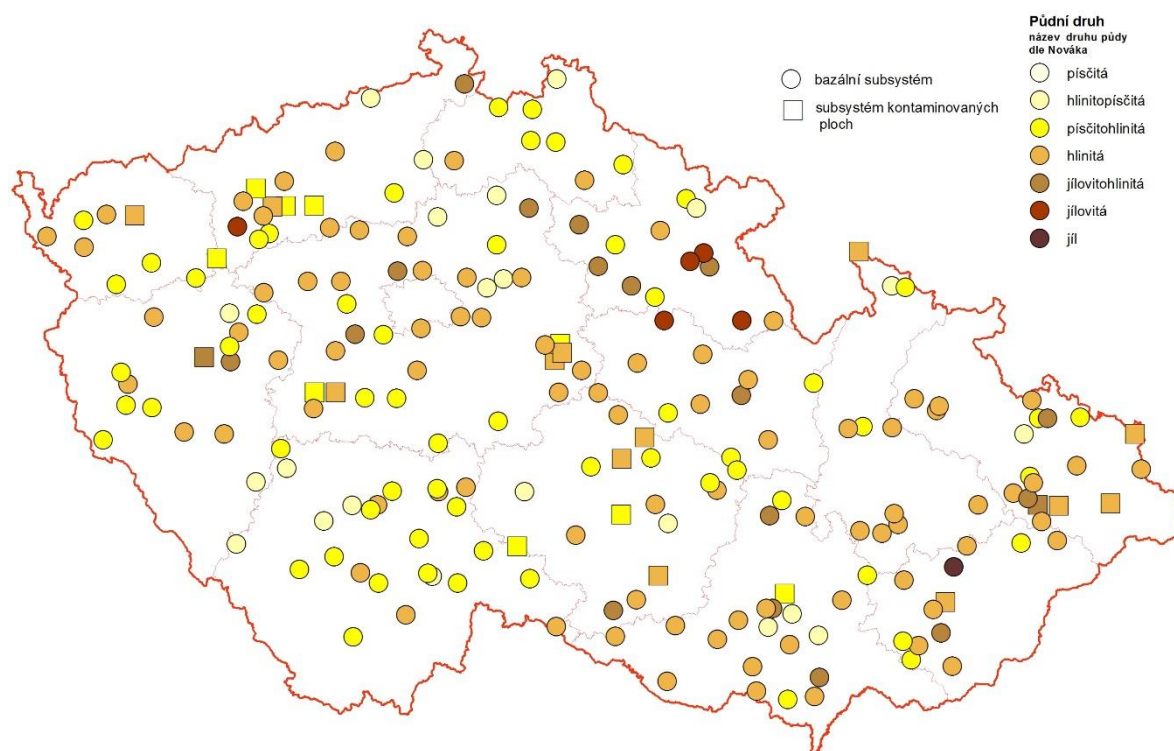
Specifickými znaky jílovitých půd (s obsahem jílnatých částic nad 45 %) jsou:

- jsou to půdy s extrémními stanovištními podmínkami – zamokření se střídá s vysycháním, půda má vysokou uléhavost v povrchových a nízkou aeraci zejména v nižších horizontech,
- na svém povrchu mají nízké teploty,
- mají nízkou propustnost pro srážkovou vodu, vysoký povrchový odtok a díky koloidnímu poutání vykazují vodu velmi těžko fyziologicky přístupnou,
- mají vysokou sorpční schopnost a k vyplavování živin z půdy dochází pouze v omezené míře, na druhu stranu mohou být živiny pro některé rostliny fyziologicky nedostupné,
- jsou biologicky málo aktivní, což vede k nízké, případně nedokonalé humifikaci.

U půd zrnitostně středních se neočekávají žádné projevy extrémů (Rejšek, Vácha 2018).

Z celkové výměry zemědělské půdy v ČR zaujímají lehké půdy 19 %, půdy střední 59 % a půdy těžké 17 %. Zbývajících 5 % připadá na kamenité a silně šterkovité půdy, zcela nevhodné pro zemědělskou produkci (Jandák et al. 2001). V síti Bazálního monitoringu půd je rozložení půdních druhů následující – lehké půdy 27 %, půdy střední 55 % a půdy těžké 18 % (Poláková et al. 2017).

Obrázek 11: Kategorie zrnitosti na plochách Bazálního monitoringu půd



4.4. Organická hmota

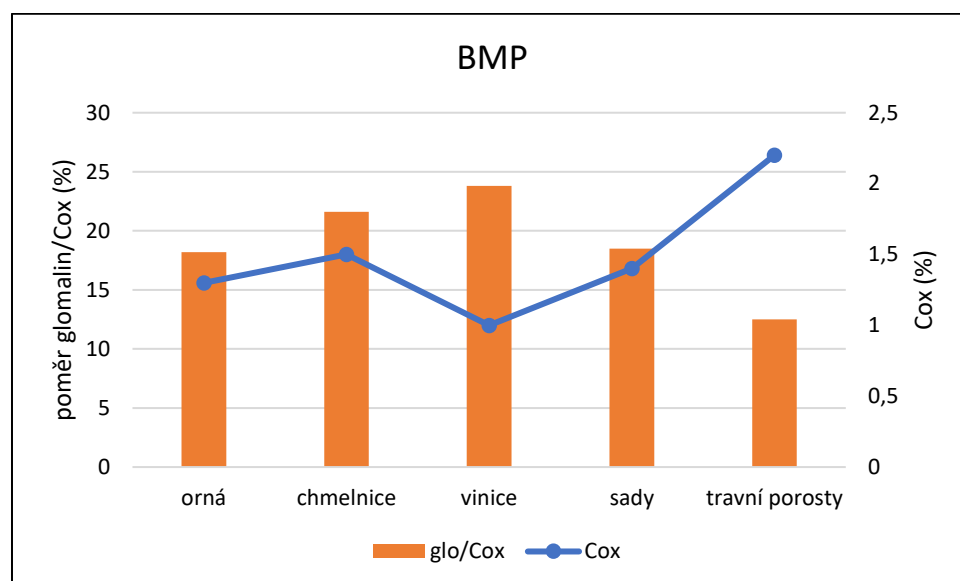
Půdní organická hmota (OH) je významná součást půdy a její kvalita ovlivňuje mnoho půdních vlastností, např. zvyšuje sorpční schopnost půdy, což dále souvisí s množstvím a přístupností či pohyblivostí prvků v půdě, zvyšuje pufrovitost půdy, podporuje vznik drobtovité struktury půdy, čímž zlepšuje vodní a vzdušný režim půdy. Je tvořena jak živými organismy, tak jejich odumřelými těly v různém stupni rozkladu. Odumřelá organická hmota je mineralizována až na základní „stavební“ jednotky a poté (a zároveň současně) v procesu humifikace se syntetizují různě složité organické sloučeniny.

K vyjádření obsahu a kvality organické hmoty slouží různé parametry. Zřejmě nejrozšířenější je stanovení oxidovatelného uhlíku (Cox), což je parametr popisující spíše kvantitu, než kvalitu organické hmoty, dále je to stanovení organického uhlíku (Corg) nebo celkového uhlíku (Ctot). Pro určení kvality OH se využívá poměr huminových a fulvokyselin (HK:FK) nebo barevný kvocient Q4/6. V 90. letech 20. století se objevil nový parametr popisující OH, a to glomalin, což je velmi stabilní sloučenina. Doporučuje se hodnotit vzájemný poměr glomalinu a Cox, který může být citlivým indikátorem změn půdního uhlíku (Rillig et al. 2003).

V České republice se již provádí screeningové stanovení Cox a glomalinu v několika tisících vzorcích ročně v rámci Agrochemického zkoušení zemědělských půd, zatím však nelze hovořit o plošném pokrytí území republiky. Tyto informace o OH jsou od tohoto roku (2019) rozšířeny o stanovení kvalitativních parametrů (Ctot, Ntot, Q4/6). Informace o organické hmotě vyjádřené pomocí parametrů Cox a glomalin nechybí ani z lokalit nacházejících se v Bazálním monitoringu půd, a také v tomto systému došlo od letošního roku k navýšení počtu parametrů charakterizujících OH o kvalitativní veličiny.

Za běžnou hodnotu Cox je u orných půd považováno rozpětí 1–2 %, u travních porostů jsou obsahy mírně vyšší. Hodnoty Cox nad 3 % jsou pak typické zejména pro minerální horizonty lesních půd.

Obrázek 12: Mediánové hodnoty Cox (%) a podíl glomalinu a Cox na monitorovacích plochách v systému Bazální monitoring půd



4.5. Vstupy do půdy významné z hlediska AMR

Z hlediska výskytu antimikrobik a/nebo rezistentních bakterií se jako významné vstupy do půdy jeví aplikace statkových hnojiv pocházejících z živočišné výroby a přímá aplikace kalů ČOV.

Za **statková hnojiva** jsou podle zákona o hnojivech č. 156/1998 Sb. považována hnojiva vznikající jako vedlejší produkt při chovu hospodářských zvířat, nebo produkt při pěstování kulturních rostlin, nejsou-li dále upravována. Aplikace statkových hnojiv se řídí podmínkami uloženými zákonem o hnojivech a obsahy rizikových prvků v hnojivu musí splňovat požadavky stanovené vyhláškou č. 474/2000 Sb., o stanovení požadavků na hnojiva, ve znění pozdějších předpisů.

Jedná se hnojiva objemová, která se na půdu aplikují ve velkých množstvích (tuny až desítky tun na hektar). Hlavní složkou sušiny jsou organické látky (sacharidy, celulóza, hemicelulóza, bílkoviny, auxiny atd.), které jsou pro půdu a půdní úrodnost naprosto nezbytné, a nelze je nahradit.

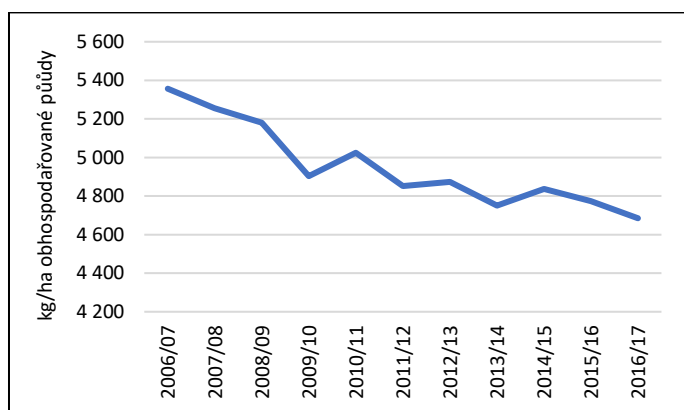
Pozitivní působení statkových hnojiv na půdu lze shrnout do několika bodů (Richter, Hlušek 1994):

1. Jsou to univerzální hnojiva obsahující kromě organických látek také živiny, mikroorganismy a biologicky aktivní látky.
2. Zvyšují biologickou činnost půdy.
3. Ovlivňují další půdní vlastnosti, např. sorpční a iontovýměnné procesy – zvyšují sorpční schopnosti půdy a její pufovritost. Dále podporují tvorbu drobtovité struktury a upravují poměr vzduchu a vody v půdě.
4. Umožňují lepší využití živin z průmyslových hnojiv i z půdní zásoby.
5. Zvyšují schopnost půdy jímat vodu.

Z těchto důvodů je nutné vnímat používání statkových hnojiv jako ryze pozitivní jev.

Podle údajů ČSÚ se spotřeba statkových hnojiv v sezóně 2016/17 pohybovala přibližně kolem 4,7 t/ha a v posledních deseti letech neustále klesá (ČSÚ 2018). Skutečná výměra, na kterou jsou statková hnojiva aplikována, není v současné době známá.

Obrázek 13: Spotřeba statkových hnojiv (ČSÚ 2018)

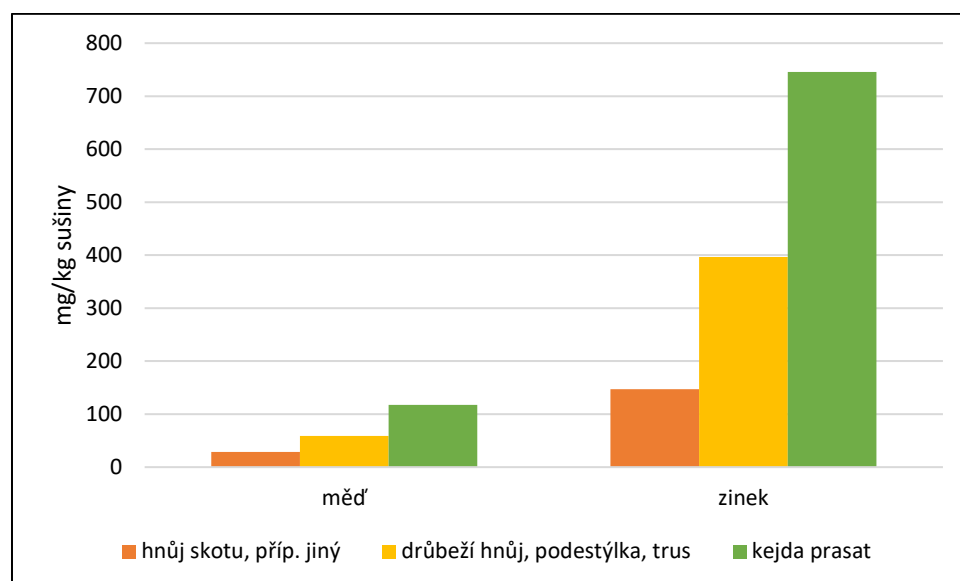


ÚKZÚZ v letech 2017 až 2018 odebral a analyzoval v rámci cílených kontrol 40 vzorků statkových hnojiv. Účelem těchto kontrol bylo ověřit, zda nedochází k překračování povolených limitů obsahu rizikových prvků. U některých vzorků bylo překročení limitů skutečně zjištěno a následně bylo se zemědělským podnikatelem zahájeno správní řízení. Důvodem těchto překročení obsahů rizikových prvků je s největší pravděpodobností používání medikovaných krmiv (především přídavek zinku a/nebo mědi) v nadlimitní míře, resp. i z preventivních důvodů. Obsahy vybraných prvků v nich a rozdíly mezi základními typy shrnuje následující tabulka a obrázek 14.

Tabulka 11: Deskriptivní statistika obsahů mědi a zinku ve statkových hnojivech.

	Hnůj skotu, příp. jiný		Drůbeží hnůj, podestýlka, trus		Kejda prasat	
	Cu	Zn	Cu	Zn	Cu	Zn
min	4	32	40	348	59	289
max	176	869	99	612	1450	2931
med	29	147	59	397	118	746
prům	39	201	64	448	64	987
limit	150	600	150	600	250	1200

Obrázek 14: Medián obsahů mědi a zinku ve statkových hnojivech

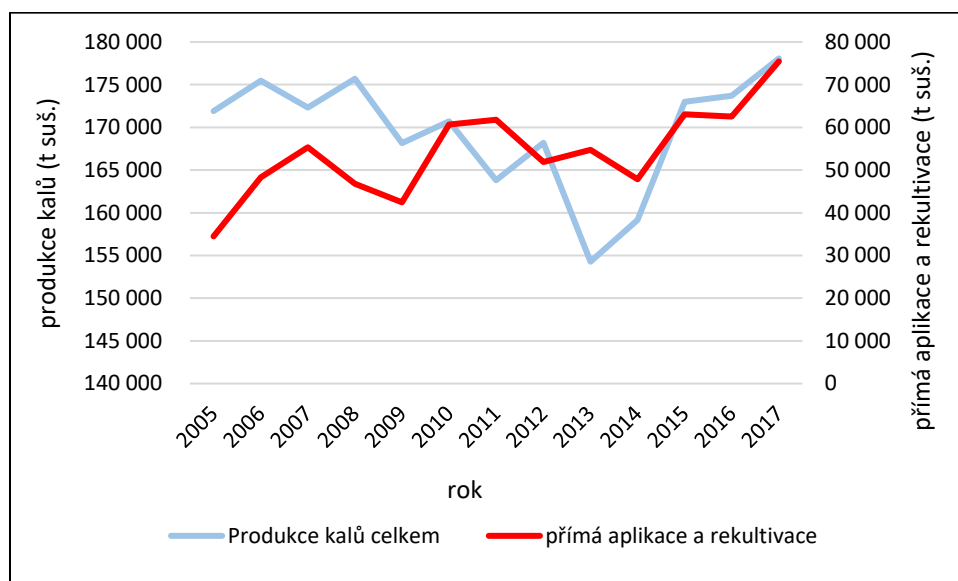


Plošná informace o aplikacích statkových hnojiv v České republice chybí, resp. není k dispozici. Zemědělství podnikatelé jsou povinni vést evidenci hnojení pro případnou kontrolu, tato evidence však není ve všech případech zaznamenávána takovým způsobem, aby se informace daly zpracovávat statisticky plošně pro celou republiku. V § 9 zákona č. 156/1998 Sb., o hnojivech, je ukotvena povinnost vedení evidence o použitých hnojivech a pomocných látkách na zemědělskou půdu. V § 9 vyhlášky č. 377/2013 Sb., o skladování a způsobu používání hnojiv, a její příloze č. 2 jsou pak podrobněji definovány údaje, které je zemědělec v evidenci povinen uvádět. Zákon ani vyhláška však nestanovují formu vedení evidence, která může být různá (např. písemně v sešitech, v komerčních programech...), z toho důvodu jsou údaje z evidence obtížně zpracovatelné. Vhodným systémem, který by umožňoval s daty tohoto typu (vyčíslení ploch, na které se statková hnojiva aplikovala (ve zvoleném měřítku); znázornění ploch v mapě apod.) pracovat, by mohla být aplikace Evidence přípravků a hnojiv (EPH) na Portálu farmáře a následné zobrazení v mapové vrstvě v Evidenci půdy v LPIS.

Čistírenské kaly jsou vedlejšími produkty čištění odpadních vod na ČOV. Zatímco vyčištěná voda je vypouštěna do vodotečí, v kalu je zakoncentrována většina kontaminantů a s kalem je nakládáno jako s odpadem. Likvidace kalu probíhá různými způsoby, nejčastějšími jsou přímé aplikace na půdu včetně rekultivací a kompostování. I když produkce kalů v ČR kolísá, aplikace na půdu měla do roku 2017 rostoucí tendence a v podstatě na stejné úrovni je kompostování kalů (ČSÚ 2018). Skládání kalů je zakázáno.

Mezi látky nacházející se v neupraveném kalu patří hormony, zbytky léčiv a drog, patogenní mikroorganismy včetně bakterií rizikových z hlediska rezistence k antibiotikům, rizikové prvky včetně nanoform, nebezpečné látky (např. bromované zpomalovače hoření, nonylfenoly, ftaláty, dioxiny a furany, polycyklické aromatické uhlovodíky, perfluoralkylové sloučeniny a další). Na druhou stranu kaly obsahují velké množství organické hmoty a živin (Kuraš 2018; Proksová et al. 2018; Zimová, Matějů 2018).

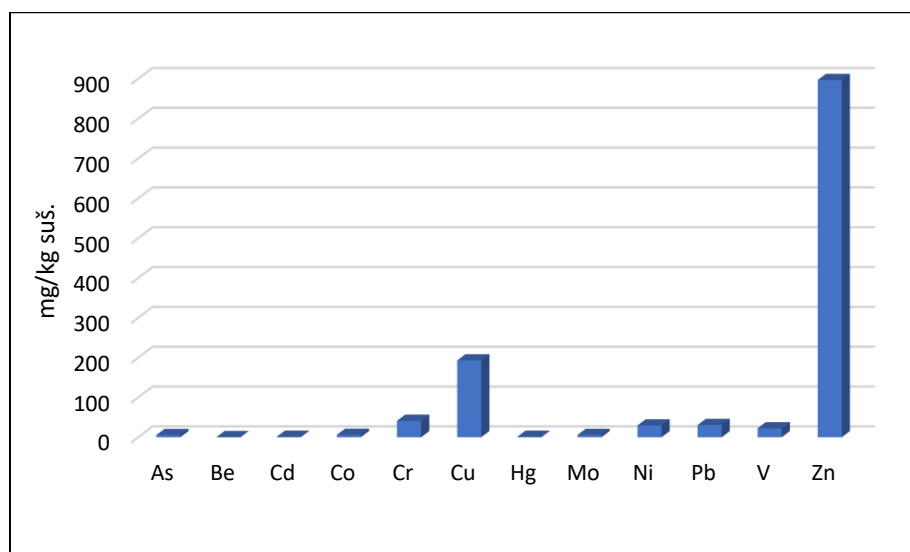
Obrázek 15: Produkce kalů ČOV v České republice a přímá aplikace na půdu a rekultivace (ČSÚ 2018)



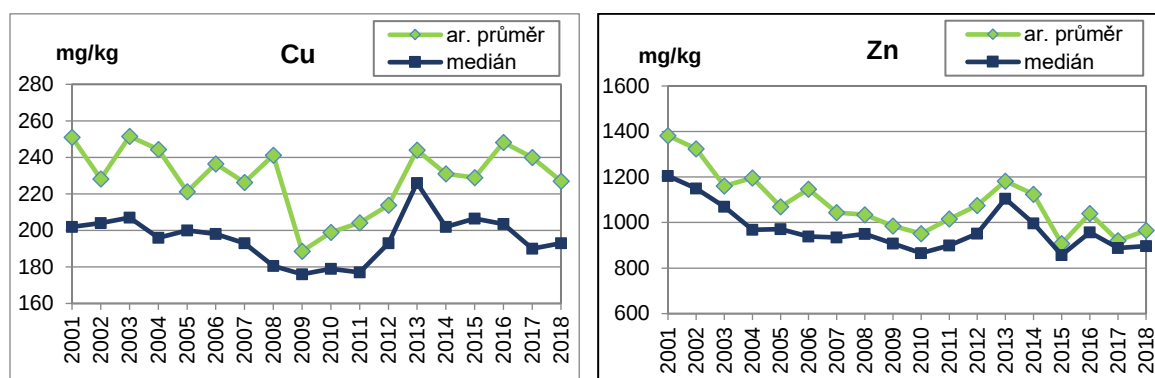
Z pohledu této práce jsou významné přímé aplikace na půdu, při kterých by mohlo docházet k šíření rezistentních bakterií v systému kal-půda-rostlina. Aplikace na zemědělskou půdu se řídí podmínkami vyhlášky č. 437/2016 Sb., o podmínkách použití kalů na zemědělské půdě. Uvedená vyhláška upravuje nejen způsob aplikace, ale také obsahy rizikových prvků a látek, včetně mikrobiologických kritérií v kalech a v půdě.

Dlouhodobé monitorování obsahů vybraných prvků a látek v kalech provádí Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Monitoring kvality kalů je zaměřen především na ty ČOV, jejichž produkce směřuje celá, nebo zčásti na zemědělskou půdu. Plošná zátěž patogenními organismy se v rámci monitoringu nesleduje, pouze screenigově proběhlo ověření dodržení mikrobiologických kritérií v 8 kalech (z osmi ČOV). Pro názorné vyjádření rozdílů mezi obsahy prvků v kalech je zde uveden následující obrázek s mediánovými obsahy prvků zjištěnými v roce 2018 a dále obrázek znázorňující vývoj obsahů mědi a zinku v kalech ČOV.

Obrázek 16: Střední hodnoty (mediány) obsahů sledovaných prvků v kalech ČOV, 2018 (mg/kg suš.)



Obrázek 17: Změny středních obsahů mědi (Cu) a zinku (Zn) v kalech



Z obrázku 16 je jasné vidět, že z hlediska výše obsahů dosahují měď a zinek v porovnání s ostatními prvky nejvyšších hodnot. Z hlediska přestoupení mezních hodnot koncentrací prvků v kalech je však největším problémem sledovaných kalů kadmium (k překročení limitu došlo v 3,8 % případů), je však těsně následováno mědí (3,7 % nadlimitních výskytů) a zinkem (2,5 %).

O skutečných vstupech prvků a látek do půdy prostřednictvím kalů nejsou dostupné informace, k dispozici jsou pouze údaje o plánovaných aplikacích kalů na půdu. V případě, že bude schválen zákon o odpadech, mohla by se tato situace změnit – v zákoně je ustanovení, které zmocňuje UKZÚZ schvalovat programy aplikace kalů na půdu, tudíž budou k dispozici informace o reálných koncentracích rizikových prvků a látek v kalech aplikovaných na půdu.

4.6. Systémy sledování kvality půdy

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský provozuje tři systémy sledování kvality půdy, a to Agrochemické zkoušení zemědělských půd (AZZP), Registr kontaminovaných ploch (RKP) a Bazální monitoring půd (BMP). Agrochemické zkoušení zemědělských půd je svým způsobem jistý druh monitoringu zaměřený na plošné sledování změn půdní úrodnosti v České republice. RKP obsahuje informace o obsazích rizikových prvků v zemědělských půdách České republiky, přičemž informace jsou získávány jednorázově a nedochází k opakovaným odběrům z jednoho pozemku. Databáze obsahuje analytické výsledky z více než 60 tis. půdních vzorků. Na druhé straně v databázi Bazálního monitoringu půd lze najít výsledky a informace k „pouhým“ 214 lokalitám, ale odběry na těchto lokalitách jsou pravidelně opakovány a v tomto souboru lze sledovat změny půdních vlastností v čase.

Agrochemické zkoušení zemědělských půd je systém pravidelného zjišťování parametrů půdní úrodnosti, zejména obsahů přístupných živin v půdě a půdní kyselosti na všech pozemcích zemědělského půdního fondu. K základním informacím o obsazích živin jsou u vybraných půdních vzorků zjišťovány také hodnoty Cox a obsahy mikroelementů (Cu, Mo, Mn, Zn, Fe). V rámci AZZP je každý rok prozkoušena cca 1/6 zemědělského půdního fondu, což činí necelých 80 tis. vzorků. Odebírán je pouze svrchní horizont (s výjimkou vinic), jeho mocnost se liší v závislosti na kultuře. Jeden směsný vzorek je tvořen celkem 30 individuálními vzorky. Plocha odběru jednoho vzorku činí 7–10 ha v případě orné půdy či trvalých travních porostů, v případě vinic, chmelnic a sadů 2–3 ha. Systém poskytuje informace o trendech v oblasti půdní úrodnosti.

Základem **databáze RKP** jsou výsledky analýz cca 35 tis. půdních vzorků. Tento základ byl a je každoročně doplňován dalšími výsledky. Půdní vzorky jsou odebírány v rámci

Agrochemického zkoušení zemědělských půd. Vzorky pro základní databázi RKP byly vybrány tak, aby v hlavních výrobních oblastech připadl alespoň jeden vzorek na 100 ha. Ve vzorcích byly stanoveny obsahy vybraných rizikových prvků ve výluhu 2M HNO₃. Stanovení touto metodou bylo ukončeno v roce 2009. Databáze obsahuje výsledky analýz více než 54 tis. vzorků. V roce 1998 bylo zahájeno stanovení prvků po extrakci lučavkou královskou a provádí se dodnes. Doposud jsou v databázi rozborů přibližně 14 tis. vzorků analyzovaných touto metodou. Výstupy RKP jsou např. kartogramy obsahů prvků v půdě (viz zde obsah Cu, Zn), nebo tabulkové zpracování (obsahy prvků v různých správních celcích, překročení limitů, ...).

Bazální monitoring zemědělských půd je systém dlouhodobého sledování vybraných půdních vlastností. Systém byl založen v roce 1992 na 190 pozorovacích plochách a v roce 1995 byl rozšířen o dalších 27 ploch. V současné době tvoří síť BMP 214 lokalit. Z hlediska obhospodařování byly plochy vybrány tak, aby co nejvíce kopírovaly procentuální zastoupení kultur v ČR. V monitoringu tedy zaujímá největší podíl orná půda (73 %), následují travní porosty (20 %). Ostatní kultury – vinice, chmelnice, sady – jsou zastoupeny v jednotkách procent. Pozorovací plochy jsou obdélníky o délce stran 25 a 40 metrů, každá plocha má známé zeměpisné souřadnice.

Z ploch se pravidelně odebírají půdní (i rostlinné) vzorky, celkem podle tří odběrových schémat:

1. **Jednorázové odběry** jsou prováděny při výkopu pedologické sondy. Odebírají se neporušené půdní vzorky, tzv. fyzikální válečky ke stanovení vybraných fyzikálních vlastností půd (např. momentní vlhkost, objemová hmotnost redukováná, pórovitost), a porušené půdní vzorky, ke stanovení chemických a fyzikálně-chemických vlastností půd (zrnitost, kationtová výměnná kapacita, prvková analýza). Tato stanovení jsou provedena na všech pozorovacích plochách sítě monitoringu. Nedílnou součástí tohoto procesu je podrobný popis půdního profilu (stanovení půdního typu).
2. **Základní odběry jsou prováděny v šestileté periodě.** Zjišťovány jsou především (agro)chemické vlastnosti půd (pH, obsah živin a mikroprvků, kationtová výměnná kapacita, Cox, prvková analýza). **Odběry v základní periodě probíhají na všech pozorovacích plochách monitoringu.**
3. **Každoroční odběry** jsou zaměřeny na sledování stavu a vývoje znečištění půd organickými polutanty (PCB, PAH, HCH, HCB, DDT, současně používané pesticidy), a na možnou kontaminaci potravinového řetězce prostřednictvím zemědělských plodin (odběry rostlin). Tyto odběry probíhají na vybraných souborech pozorovacích ploch.

Kromě toho se u všech ploch provádí evidence hnojení (jak minerálními, tak organickými hnojivy), včetně aplikovaných dávek a evidence použitých přípravků na ochranu rostlin.

Odebírá se ornice i podorníčí, odběrová hloubka horizontu závisí na typu kultury.

V této kapitole si zaslouží být zmíněny také **přesné polní zkoušky** prováděné ÚKZÚZ na zkušebních stanicích po celé České republice. Tyto přesné polní zkoušky slouží k posuzování vztahů mezi intenzitou hnojení, výnosy, obsahem živin v půdě a příjmem živin rostlinami. Výsledkem polních zkoušek jsou poznatky o různých systémech hnojení, jejich vlivu na výnosy, kvalitu produkce a půdní vlastnosti (Smatanová 2016). V průběhu polních zkoušek jsou získávána podrobná analytická data o kvalitě půdy, na stanicích se monitoruje chod počasí.

V současné době probíhá několik dlouhodobých polních zkoušek. Z hlediska sledování výskytu genů rezistentních vůči antimikrobiálním látkám jsou zajímavé dvě – dlouhodobá zkouška

s organickým hnojením a dlouhodobá zkouška ověřující digestáty. V rámci zkoušky s organickým hnojením se na všech zkušebních stanicích 2x během šestiletého osevního sledu aplikuje na vybraných variantách chlévský hnůj a na dvou stanicích vyhnilý kal z ČOV. V rámci zkoušky ověřující digestáty je na vybraných variantách 5x za šestiletý osevní sled aplikovaná kejda.

4.7. Možnosti využití stávajících systémů k výzkumu, příp. monitoringu rezistence k antimikrobikům

V případě vyhledávání oblastí vhodných k výzkumu podle výživových hledisek je vhodné využít informací poskytovaných prostřednictvím Agrochemického zkoušení zemědělských půd. Navíc systém poskytuje informace o obsazích mědi a zinku, i když jen v určitém procentu vzorků.

Registr kontaminovaných ploch je v rámci výzkumu AMR možné použít k vytipování oblastí se zvýšenými obsahy prvků v půdě, nicméně o vytipovaných pozemcích nejsou dostupné žádné historické informace vyjma těch na LPIS.

Naopak BMP poskytuje možnosti sledování výskytu AMR na lokalitách se známou historií – jsou známy změny půdních parametrů v čase, způsoby a dávky hnojení, použití přípravků na ochranu rostlin, osevní sled. Využití systému BMP pro monitoring, či výzkum AMR by umožnilo zpracování výsledků s ohledem na dlouhodobé využívání lokalit.

Nevýhodou BMP může být nepravidelné hnojení statkovými hnojivy, což je pro rozvoj AMR velmi významný faktor. K výzkumu výskytu rezistentních bakterií na pozemcích hnojených statkovými hnojivy by bylo možné využít systémy dlouhodobých přesných polních zkoušek, zejména zkoušku s organickým hnojením a zkoušku ověřující digestáty. V rámci těchto zkoušek je na vybrané varianty aplikován chlévský hnůj a kejda. Jelikož se jedná o přesné polní zkoušky, jsou k dispozici detailní informace o půdě, hospodaření, počasí a vyhodnocení dat by tedy bylo možné s ohledem na historii plochy.

Další možností pro výzkum AMR by bylo vytipování farmy s živočišnou výrobou, která bude ochotná spolupracovat. V případě podrobného šetření na pozemcích po aplikaci kalů není vhodné použít systém BMP (na monitorovaných lokalitách jsou evidované pouze tři aplikace celkem) a možnosti využití polních zkoušek je omezené, ovšem na druhé straně ÚKZÚZ disponuje informacemi o provedených aplikacích kalů, což umožňuje vhodné pozemky vytipovat.

5. REZISTENCE K ANTIMIKROBIKŮM

5.1. Úvod

Rozsáhlá antropogenní činnost na území České republiky a provázanost zemědělské činnosti s životním prostředím dává předpoklad pro možnost šíření genů rezistence i prostřednictvím půd, zejména intenzivně obdělávaných. Multioborový přístup je proto výzvou, která by mohla přinést unikátní poznatky o roli půd případně i dalších částí životního prostředí v šíření rezistence k antimikrobikům.

5.1.1. Mikroorganismy, antimikrobika a mechanismy rezistence

Bakterie včetně patogenních si v průběhu let používání byly schopny vyvinout různé mechanismy rezistence k současnosti využívaným antimikrobikům. Rezistence bakterií k antimikrobikům se rozlišuje na přirozenou a získanou. Přirozená rezistence se dělí na vnitřní (vždy dochází k její expresi nezávisle na vystavení antibiotiku) a indukovanou (geny se přirozeně vyskytují u bakteriálního druhu, ale k expresi rezistence dochází až po vystavení antibiotiku). K získané rezistenci k antimikrobikům může docházet v důsledku mutací vlastní chromosomální DNA, nebo získáním genetického materiálu. Mechanismus přenosu genů rezistence dělíme na vertikální (z mateřské na dceřinou bakteriální buňku) a horizontální přenosem genů rezistence mezi bakteriemi pomocí mobilních elementů – např. v rámci stejného druhu, rodu, čeledě). Na horizontálním přenosu se mohou podílet různé mobilní genetické elementy např. plasmidy, transpozony, nebo bakteriofágy (Reygaert 2018). Zejména horizontální přenos genů rezistence má významnou roli v šíření rezistence k antimikrobikům.

Mezi nejvyužívanější skupinu antimikrobních látek patří beta-laktamová antibiotika (peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy). Nejběžnějším mechanismem obrany bakterií proti antibiotikům je produkce enzymů např. produkce beta-laktamázy, kódovaných geny, které se mohou vyskytovat na chromozomu i plasmidech. Ty, které zajišťují rezistenci k cefalosporinům nové generace, jsou označovány jako ESBL (extended-spectrum beta-lactamases) a zahrnují zástupce skupiny enzymů TEM, SHV, CTX-M a OXA. V současnosti se objevily také beta-laktamázy účinné proti karbapenemům, vyskytují se primárně u bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a dělí se do několika skupin (např. IMP-1, VIM-1, NDM-1) (Reygaert 2018). Často se jedná o multirezistentní bakterie vyvolávající jen těžko léčitelné infekce.

Antibiotikem poslední volby k léčbě infekcí vyvolaných multirezistentními gramnegativními bakteriemi se stal kolistin (polymyxin E). Dlouhou dobu byla rezistence ke kolistinu považována pouze za chromozomálně vázanou, ale od roku 2015 bylo popsáno devět různých variant genů *mcr* (*mcr-1* až *mcr-9*), které jsou mezi bakteriemi šířeny horizontální cestou přenosu, zejména plasmidy. V současnosti bylo zaznamenáno celosvětové rozšíření gramnegativních bakterií, především *Escherichia coli*, s genem *mcr-1* u zvířat, v potravinách, vnějším prostředí i u lidí (Skov, Monnet 2016).

V souvislosti s chovem hospodářských zvířat a kontaminací vnějšího prostředí je významná také problematika výskytu MRSA (meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*). U hospodářských zvířat se vyskytují zejména kmeny klonálního komplexu CC398 označené jako skupina Livestock-Associated MRSA (LA-MRSA). Případy přenosu těchto kmenů mezi lidmi a zvířaty byly již popsány. Otázkou zůstává, do jaké míry se na šíření MRSA, ale také dalších klinicky významných typech rezistence jako jsou ESBL, karbapenemázy či horizontálně šířené geny *mcr*, podílí půdní ekosystém.

5.1.2. Rozvoj a šíření rezistence v životním prostředí

Rezistence bakterií k antimikrobikům představuje významnou hrozbu pro humánní i veterinární medicínu. Půda je zdrojem mikroorganismů, včetně bakterií rezistentních k antimikrobiálním látkám a genů rezistence k antimikrobikům, jejichž výskyt může být ovlivněn chovem hospodářských zvířat, aplikací hnoje, závlahových, odpadních vod a kalů i pohybem volně žijících zvířat. Také půda může hrát důležitou roli v perzistenci bakterií rezistentních k antimikrobiálním látkám ve vnějším prostředí (Graham et al. 2019). Využívání antimikrobik v terapii nebo v zemědělství je považováno za jedno z nejvýznamnějších rizik rozvoje rezistence, na jejím šíření se ale může podílet také přirozený výskyt environmentálních rezervoárů ARG (Antibiotic Resistance Genes specifické geny rezistence k antibiotikům) a jejich transferabilita (přenositelnost mezi bakteriemi) (Nesme, Simonet 2015). Klíčovou výzvou je rovněž porozumění vztahu mezi šířením genů rezistence z antropogenních zdrojů oproti genům rezistence již přítomných v prostředí (Graham et al. 2019).

Ve veterinární medicíně jsou antibiotika používána k léčbě a profylaxi. Používání antibiotik jako stimulatorů růstu a produkce je v Evropské unii od roku 2006 zakázáno. Nicméně doplňky do krmiv pro hospodářská zvířata obsahující některé prvky např. měď, zinek a arsen mohou také vytvářet selekční tlak na rozvoj rezistence. Zinek rovněž používán přímo jako VLP a to v různých lékových formách (perorální prášek, premix pro medikaci krmiva i injekční VLP). Měď a zinek jsou schváleny a podávají se jako doplňky do krmiv a mají antimikrobní vlastnosti. Kombinace antimikrobik a kovů (např. Cu, Co, Zn, Cd, Ni, As) ve znečištěném prostředí může vést ke ko-selekcí ARG a vyššímu výskytu multirezistentních bakterií (Xiong et al. 2018). Podobně mohou působit i biocidní látky.

Půda je jeden z největších rezervoárů mikrobiální diverzity a podporuje výměnu genetického materiálu pomocí horizontálního přenosu genů, který přispívá k šíření genů rezistence k antimikrobikům (Nesme, Simonet 2015). Globální šíření a akumulaci rezistence k antimikrobikům v environmentálních zdrojích dokládá i výskyt genů rezistence v odlehlých lokalitách bez souvislosti s využíváním antimikrobik. Geny kódující rezistenci ke klinicky významným antimikrobním látkám (např. beta-laktamům, aminoglykosidům), včetně genu *bla_{NDM-1}* kódujícího rezistenci ke karbapenemům, byly prokázány i v půdě v polárních oblastech (McCann et al. 2019).

Na kontaminaci půdy bakteriemi rezistentními k antimikrobním látkám se mohou podílet i odpadní vody prostřednictvím vodního ekosystému. V rozsáhlé studii zaměřené na metagenomickou analýzu neošetřených odpadních vod byly zjištěny rozdíly ve variabilitě genů rezistence k antimikrobikům mezi Evropou/Severní Amerikou/Oceánií a Afrikou/Asií/Jižní Amerikou, které korelovaly se socio-ekonomickými, zdravotními a environmentálními faktory. Nejvyšší výskyt genů rezistence byl zjištěn v Brazílii a zemích Afriky, zatímco nejnižší v Oceánii (Nový Zéland a Austrálie). Nejrozšířenější byly geny rezistence vůči makrolidům, tetracyklinům, aminoglykosidům, beta-laktamům a sulfonamidům. Kromě toho byly detekovány také geny *bla_{CTX-M}* kódující širokospektré beta-laktamázy, *bla_{NDM}* zodpovědný za rezistenci ke karbapenemům a geny *mcr* kódující rezistenci ke kolistinu (Hendriksen et al. 2019). V nedávné studii byl gen *mcr-1*, kódující rezistenci ke kolistinu prokázán také v populaci fágů z odpadní vody z chovu prasat v Číně (Wang et al. 2018b), a poukazuje tak na další možnost šíření genů rezistence do půdního ekosystému.

Složení mikrobiální komunity a rezistenci k antimikrobikům v půdách mohou ovlivňovat různé přístupy v zemědělské produkci. V dánské studii byl prokázán vyšší výskyt genů kódujících širokospektré beta-laktamázy (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA}*, *bla_{CTX-M}*) v půdách ošetřených chlévskou mrvou ve srovnání s půdami, kde byla využívána anorganická hnojiva (Graham et al. 2016). V Číně byl v orné půdě po aplikaci drůbeží podestýlky prokázán výskyt genů

kódujících aminoglykosidy, tetracykliny a sulfonamidy (Wang et al. 2018a). Kumar et al. (2018) ve své studii prokázal, že aplikace hnoje z chovu prasat představuje významný zdroj meticilin rezistentních stafylokoků v orné půdě. V litevské studii naopak nebyl zjištěn rozdíl ve složení mikrobiální komunity a genů rezistence k antimikrobikům mezi půdami z ekologického a konvenčního způsobu hospodaření. Geny rezistence ke klinicky významným antibiotikům (beta-laktamy, aminoglykosidy, tetracyklin, erytromycin a rifampicin) byly detekovány pouze v malé míře (Armalyte et al. 2019).

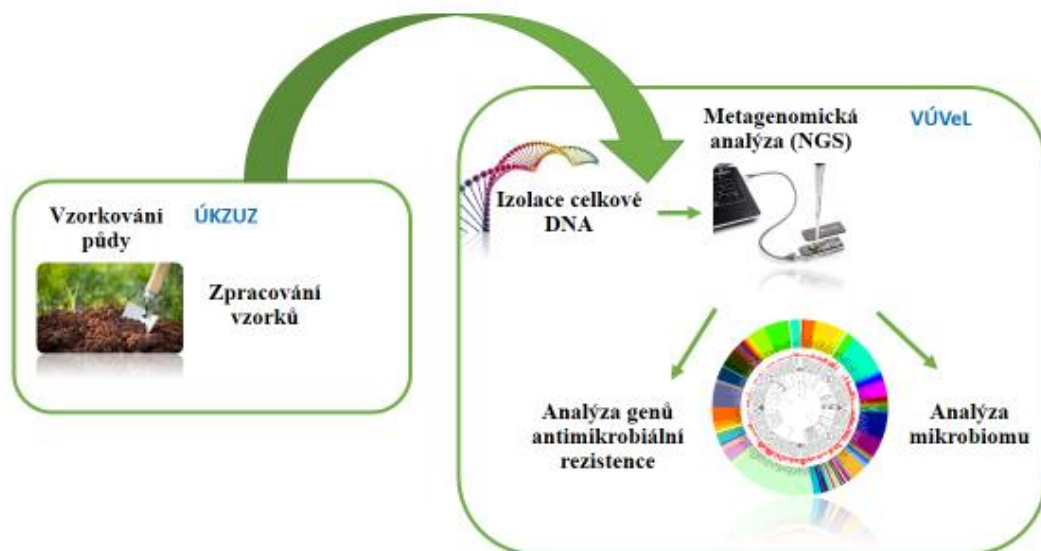
Rozdíly ve výskytu bakterií rezistentních k antimikrobním látkám a genů rezistence v půdách v různých zemích mohou být dány jak lokalitou (spotřebou antimikrobik, způsoby hospodaření), charakterem odebíraných půd, ale i metodickým přístupem. **Metagenomika** je vhodný alternativní přístup umožňující v jednom vzorku současně detekovat tisíce genů rezistence k antimikrobiálním látkám, ale i přítomné bakteriální rody či druhy. V porovnání s konvenčními technikami metagenomika umožňuje odhalení potenciálních rezervoárů genů antimikrobiální rezistence u nekultivovatelné mikrobiální komunity v prostředí (de Castro et al. 2014). Metagenomika však poskytuje omezené informace týkající se hostitele (druhu bakterie) genů. Další metodologie jako jsou **techniky založené na PCR a kultivaci bakterií** mohou významně doplnit stávající informace. Kultivace bakterií nesoucích geny rezistence k antimikrobikům umožňuje jejich detailní typizaci, včetně identifikace a popisu mobilních genetických elementů.

V České republice doposud nebyla provedena komplexní studie zaměřená na sledování rezistence k antimikrobikům v půdách. I v České republice však již byl prokázán vliv užívání antibiotik u hospodářských zvířat na kontaminaci půdy. Profylaktické podávání antibiotik např. chlortetracyklinu telatům vedlo v minulosti také ke kontaminaci přilehlých půd, včetně orné půdy, ve které geny rezistence k tetracyklinům byly detekovatelné až po dobu tří měsíců od aplikace hnoje (Kyselková et al. 2015).

5.2. Cíle pilotní studie

Cílem letošní pilotní studie bylo u souboru vybraných zemědělských půd provést metagenomickou analýzu zaměřenou na:

- detekci genů rezistence k antimikrobikům,
- určení zastoupení půdního mikrobiomu.



5.3. Materiál a metody

5.3.1. Vyšetřované vzorky

V rámci pilotní studie bylo vyšetřeno 21 vzorků zemědělské půdy odebraných z různých lokalit ČR v roce 2019. Při výběru lokalit bylo zohledněno zejména pH půdy a zrnitost půdy. Základní charakteristiku vyšetřovaných vzorků půd a použití organického hnojení uvádí tabulka 12. Vzorky byly odebrány z pozorovacích ploch Bazálního monitoringu půd Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským, zamrazeny a ve zmraženém stavu dopraveny na Výzkumný ústav veterinárního lékařství, oddělení bakteriologie k metagenomické analýze.

Tabulka 12: Soubor vyšetřovaných půd odebraných v roce 2019 a aplikace organického hnojení

Číslo vzorku VÚVeL	Původní označení ÚKZUZ	Využití půdy	Výměnné pH	Organické hnojení	Rok poslední aplikace hnojiva
LEV1404/19	2020BP	orná půda	6,8	ano	2016
LEV1405/19	3008BP	orná půda	6,9	ano	2016
LEV1406/19	3010B	orná půda	4,8	ano	2017
LEV1407/19	3021B	orná půda	5,7	ano	2017
LEV1408/19	3024B	orná půda	5,0	ano	2015
LEV1409/19	3901KO	orná půda	5,9	ano	2018
LEV1410/19	4010B	orná půda	5,3	ano	2015
LEV1411/19	4014B	orná půda	5,4	ano	2018
LEV1412/19	4025B	travní porost	4,9	ne	-
LEV1413/19	5004B	orná půda	6,7	ano	2013
LEV1414/19	5005BO	orná půda	5,9	ano	2015
LEV1415/19	5012B	orná půda	5,5	ano	1995
LEV1416/19	6005B	travní porost	4,8	ano	2018
LEV1417/19	6007B	orná půda	7,0	ne	-
LEV1418/19	6025B	travní porost	5,6	ano	2018
LEV1419/19	7010B	travní porost	5,4	ne	-
LEV1420/19	7045BO	orná půda	7,2	ano	2014
LEV1421/19	8004B	orná půda	5,7	ano	2018
LEV1422/19	8011B	travní porost	5,4	ano	2016
LEV1423/19	8013B	orná půda	6,9	ano	2018
LEV1424/19	8906KO	orná půda	5,6	ne	-

5.3.2. Metagenomická analýza

Po rozmrazení bylo z každého vzorku odebráno 25 g k metagenomické analýze. Celková půdní DNA byla izolovaná pomocí kitu DNeasy PowerSoil (Qiagen, Německo) dle instrukcí výrobce. Sekvence byla provedena pomocí platformy Oxford Nanopore Technologies (ONT) na přístroji MinION.

Ze získaných dat byla poté provedena taxonomická klasifikace půdního mikrobiomu pomocí Kaiju (<http://kaiju.binf.ku.dk/server>) s využitím databáze NCBI BLAST nr + euk (dle přednastavených parametrů), která obsahuje non-redundantní proteinovou databázi bakterií, archeí, virů, hub a mikrobiálních eukaryot.

V programu EPI2ME byly hledány geny rezistence k antimikrobikům. Tento program využívá databázi CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database, <https://card.mcmaster.ca/>). V rámci pilotní studie byla v první fázi hodnocena přítomnost rezistentních genů z hrubých sekvenačních dat na základě detekce proteinových homologů. Tyto proteiny rezistence k antimikrobiálním látkám nezahrnují mutace jako determinanty rezistence, tedy jsou samy o sobě zodpovědné za rezistenci.

5.4. Výsledky a diskuze

5.4.1. Geny rezistence k antimikrobikům

Pilotní studie u 21 vzorků převážně orné půdy ($n = 16$) a travních porostů ($n = 5$) prokázala na základě metagenomické analýzy hrubých sekvenčních dat přítomnost zejména přirozených mechanismů rezistence k antimikrobikům (tabulka 13). Nejčastěji byl detekován mechanismus rezistence označený jako *Streptomyces cinnamoneus* EF-Tu mutants vedoucí k rezistenci ke skupině elfamycinových antimikrobik, a to u 48 % vzorků (10/21). Elfamyciny jsou molekuly, které inhibují elongační faktor (EF) Tu, který je nezbytnou součástí bakteriální syntézy proteinů. Tento přirozený mechanismus rezistence byl poprvé popsán u *S. cinnamoneus* (Cappellano et al. 1997). Streptomycety jsou vláknité, grampozitivní bakterie přirozeně se vyskytující v půdě, které běžně produkují řadu antimikrobiálních látek (Robertsen et al. 2018).

Většina dalších mechanismů rezistence zahrnovala efluxní pumpy, které často zprostředkovávají rezistenci k více než jedné skupině antimikrobik. V této studii se jednalo zejména o fluorochinolony, aminoglykosidy a novobiocin. Z genů kódujících efluxní pumpy byl nejčastěji detekován gen *ceoB* (19 %; 4/21) a gen *mdtB* (19 %; 4/21). CeoB je součástí CeoAB-OpcM efluxní pumpy v cytoplazmatické membráně. Tento mechanismus rezistence k fluorochinolonom a aminoglykosidům byl poprvé popsán u bakteriálního druhu *Burkholderia cepacia*, dříve *Pseudomonas cepacia*. Burkholderie podobně jako pseudomonády se vyznačují přirozenou vnitřní rezistencí k různým antimikrobiálními látkám (Guglierame et al. 2006). Gen *mdtB* kóduje protein, který je součástí efluxní pumpy MdtABC (multidrug efflux pump) popsané u *E. coli* a je spojován s rezistencí k novobiocinu (Nagakubo et al. 2002). Novobiocin patří mezi aminokumarinová antibiotika produkovaná streptomycetami běžně přítomnými v půdním ekosystému.

V pěti vzorcích byly sekvenací prokázány geny rezistence k beta-laktamům a pouze ojediněle k tetracyklinům (tabulka 13). Ve vzorku orné půdy pod číslem LEV1409/19 bylo prokázáno nejvíce genetických determinant kódujících rezistenci k antimikrobikům, včetně genu *mexQ*. MexQ je vnitřní membránový transportér, který je součástí širokospektré efluxní pumpy MexMN-OprM popsané u *Pseudomonas aeruginosa*, zodpovídající za rezistenci k beta-laktamům i karbapenemům, tetracyklinům, makrolidům, amfenikolům, trimethoprimu a akriřavinu (Mima et al. 2005). Ve vzorku orné půdy LEV1417/19 byla detekována beta-laktamáza JOHN-1 popsaná u environmentální bakterie *Flavobacterium johnsoniae*, která hydrolyzuje většinu beta-laktamů včetně karbapenemů (Naas et al. 2003). Sekvence genů kódujících beta-laktamázy LRA-3 a LRA-12, které byly detekovány u tří vzorků, byly poprvé popsány na základě metagenomické analýzy půd z izolovaného území Aljašky (Allen et al. 2009). Uvedená studie ukazuje, že půda, i za absence selekčního tlaku v důsledku antropogenní činnosti, může být zdrojem determinant rezistence k beta-laktamům. Podobně výsledky této pilotní studie dokládají, že vyšetřované vzorky půd běžně nesou geny kódující přirozenou rezistenci k antimikrobikům.

Tabulka 13: Detekované geny rezistence

Číslo vzorku VÚVeL	Počet readů	Označení detekovaného mechanismu rezistence dle databáze CARD	Rezistence
LEV1404/19	322 000	<i>Streptomyces cinnamoneus</i> EF-Tu mutants <i>vanSO</i> - antibiotic resistance gene cluster	elfamycin vankomycin
LEV1405/19	847 000	<i>ceoB</i> - efflux pump <i>mexF</i> - efflux pump	fluorochinolony, aminoglykosidy fluorochinolony, chloramfenikol, trimethoprim
LEV1406/19	402 00	<i>mdtB</i> - efflux pump <i>mdtN</i> – efflux pump	novobiocin puromycin, akriflavin, tetrafenylarsonium chlorid
LEV1407/19	398 000	LRA-3 - antibiotic inactivation enzyme rifampin phosphotransferase	beta-laktamy rifampin
LEV1408/19	210 000	<i>ceoB</i> - efflux pump	fluorochinolony, aminoglykosidy
LEV1409/19	854 000	<i>ceoB</i> - efflux pump	fluorochinolony, aminoglykosidy
		LRA-3 - antibiotic inactivation enzyme	beta-laktamy
		<i>mdtB</i> - efflux pump	novobiocin
		<i>Streptomyces cinnamoneus</i> EF-Tu mutants <i>mexQ</i> – efflux pump	elfamycin makrolidy, amfenikoly, trimethoprim, beta-laktamy, tetracykliny, akriflavin
LEV1410/19	878 000	<i>mdtB</i> - efflux pump	novobiocin
		<i>oqxB</i> – efflux pump	fluorochinolony, tetracykliny
		<i>Streptomyces cinnamoneus</i> EF-Tu mutants	elfamycin
LEV1411/19	927 000	<i>Streptomyces cinnamoneus</i> EF-Tu mutants	elfamycin
LEV1412/19	35 000*	ND	
LEV1413/19	114 000	<i>Streptomyces cinnamoneus</i> EF-Tu mutants	elfamycin
LEV1414/19	76 000*	ND	
LEV1415/19	510 000	<i>Streptomyces cinnamoneus</i> EF-Tu mutants	elfamycin
LEV1416/19	22 000*	ND	
LEV1417/19	1 181 000	JOHN-1 beta-lactamase	beta-laktamy
LEV1418/19	25 000*	ND	
LEV1419/19	548 000	<i>Streptomyces cinnamoneus</i> EF-Tu mutants	elfamycin
		<i>mexN</i> - efflux pump	amfenikoly
LEV1420/19	1 044 000	<i>Streptomyces cinnamoneus</i> EF-Tu mutants	elfamycin
		<i>vanRO</i> - antibiotic resistance gene cluster	vankomycin
LEV1421/19	803 000	<i>Streptomyces cinnamoneus</i> EF-Tu mutants LRA-12 - antibiotic inactivation enzyme	elfamycin beta-laktamy
LEV1422/19	60 000*	ND	
LEV1423/19	897 000	<i>ceoB</i> - efflux pump	fluorochinolony, aminoglykosidy
		<i>mdtB</i> - efflux pump	novobiocin
LEV1424/19	465 000	<i>Streptomyces cinnamoneus</i> EF-Tu mutants	elfamycin
		<i>vanSO</i> - antibiotic resistance gene cluster	vankomycin
		rifampin phosphotransferase	rifampin

ND – nedetekováno; *malý počet sekvenčních readů – pod 100 000

Naproti tomu ve vyšetřovaných vzorcích půd nebyly analýzou hrubých sekvenačních dat prokázány geny kódující získanou rezistenci k antimikrobikům, které jsou šířeny prostřednictvím mobilních genetických elementů, a to ani ve vzorcích z lokalit, na kterých proběhla aplikace statkových hnojiv na podzim 2018. Geny rezistence kódující ESBL (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} a *bla*_{OXA}), karbapenemy vyskytující se primárně u *Enterobacteriaceae* skupin IMP-1, VIM-1, NDM-1, nebo horizontálně šířené geny rezistence ke kolistinu (*mcr-1* až *mcr-9*) nebyly v rámci pilotní studie detekovány. Pouze u jednoho vzorku orné půdy (LEV1410/19) byl detekován gen *oqx*B, který kóduje jednu z komponent OqxAB efluxní pumpy u *Enterobacteriaceae*. Zatímco u klebsií se typicky nachází na chromozomu, u *E. coli* je vázaná na plasmidech, které umožňují horizontální šíření této genetické determinanty kódující rezistenci k ciprofloxacinu (Kim et al. 2009).

S výjimkou čtyř vzorků půd (dvou orných půd a dvou travních porostů) byly všechny půdy v průběhu let vystaveny aplikaci organického hnojení (hnůj, močůvka, kejda). Rok odběru vyšetřovaných vzorků (2019) se však nekryje s rokem poslední aplikace organických hnojiv na odebíraných plochách půd (tabulka 12). Dosažené výsledky neumožnily potvrdit souvislost mezi aplikací organických hnojiv a výskytem genetických determinantů horizontálně šířené rezistence. U pěti vzorků nebyly genetické determinanty rezistence k antimikrobikům detekovány (tabulka 13). Jednalo se převážně o vzorky travních porostů (4 vzorky z 5 vyšetřovaných), u kterých byl sekvenací získán pro vyhodnocení nízký počet readů (pod 100 000), přičemž se jedná o hnojené i nehnojené lokality. Nižší počet readů u některých vzorků může být důsledkem použitého metodického přístupu.

5.4.2. Složení půdního mikrobiomu

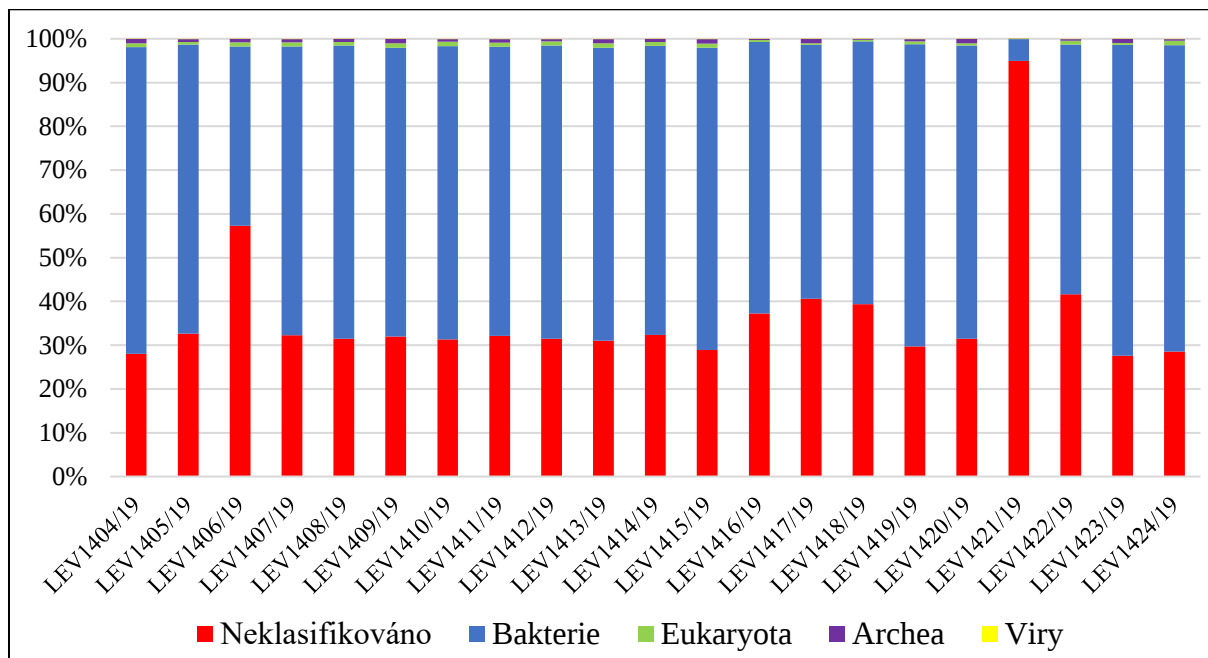
Z celkové DNA vzorků orných půd a travních porostů nebylo na základě použitých analytických nástrojů klasifikováno v průměru 36 % (28–57 %) získaných sekvencí. Pouze u jednoho vzorku orné půdy bylo neklasifikováno až 95 % sekvencí. Bakterie tvořily průměrně 62 % mikrobiomu. Eukaryota (0,8 %), archea (0,7 %) a viry (0,04 %) tvořily minimální podíl (obrázek 18).

Mezi dominantní bakterie patřila skupina bakterií *Fibrobacteres*, *Chlorobi*, *Bacteroidetes* (FCB skupina), *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* (PVC skupina), *Acidobacteria*, *Proteobacteria* a *Terrabacteria* (obrázek 19). Nejčastěji byla detekována FCB skupina bakterií, která tvořila v průměru 33 % (7–47 %) bakterií ve vyšetřovaných vzorcích. Na druhém místě byly *Acidobacteria* (průměr 21 %, rozmezí 9–35 %) a *Proteobacteria* (průměr 21 %, rozmezí 10–30 %). Následovaly *Terrabacteria* (v průměru 12 % bakterií) a skupina *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* (v průměru 8 % bakterií). Výskyt acidobacterií ve vyšetřovaných vzorcích ve většině případů odpovídal aciditě půd. Vzorky půd (n = 4) s nejnižšími hodnotami pH (4,75–5,03) měly také nejvyšší zastoupení acidobacterií (27–35 %).

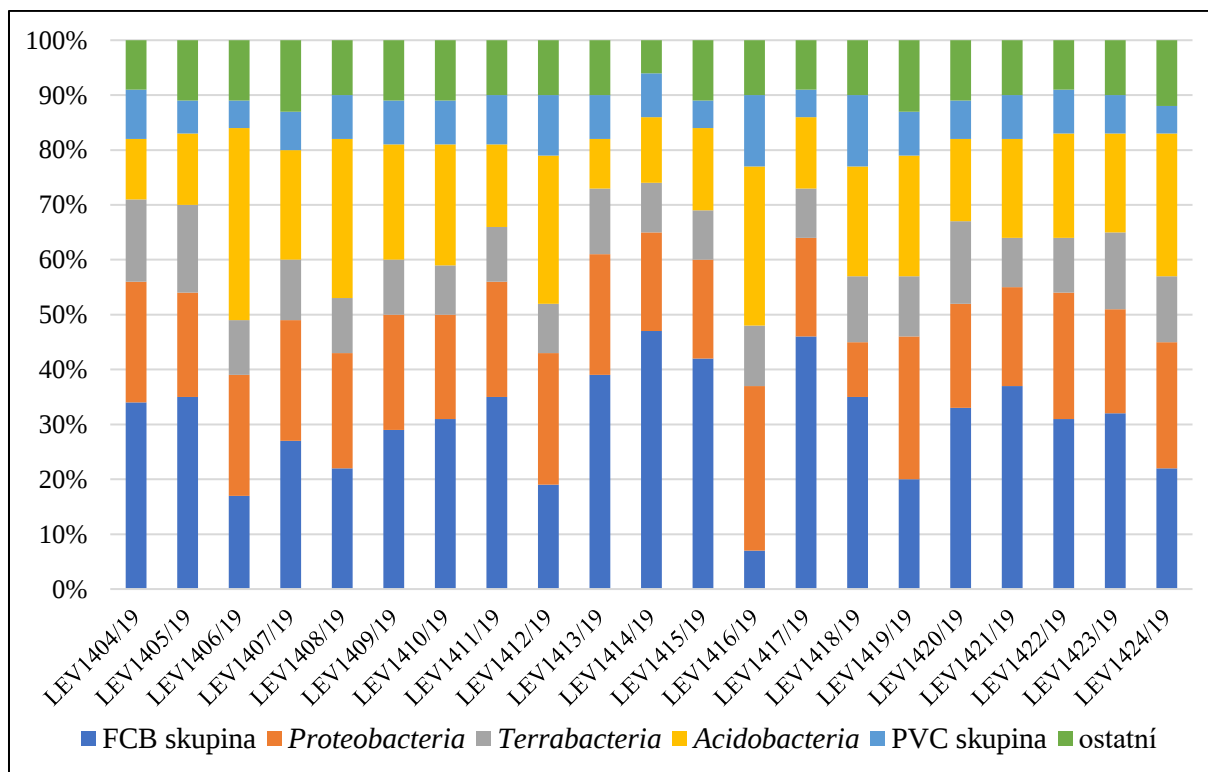
Nepřítomnost horizontálně šířených genů kódujících ESBL, karbapenemy, nebo rezistenci ke kolistinu pravděpodobně koreluje s velice nízkou detekcí sekvenačních úseků odpovídajících bakteriím čeledi *Enterobacteriaceae*. Enterobakterie byly prokázány pouze na úrovni 0,1–

0,3 % všech bakterií v daných vzorcích a od 2 do 4 % všech zástupců třídy *Gammaproteobacteria* (tabulka 14).

Obrázek 18: Podíl neklasifikovaných, buněčných organismů a virů ve vyšetřovaných vzorcích půd



Obrázek 19: Zastoupení nejčastějších skupin bakterií v mikrobiomu vyšetřovaných vzorků půd



Tabulka 14: Procentuální zastoupení *Enterobacteriaceae* ze všech bakterií, *Gammaproteobacteria* a *Enterobacterales* určených ve vyšetřovaných vzorcích půd

Číslo vzorku VÚVeL	Zastoupení <i>Enterobacteriaceae</i> (%) z:		
	<i>Bacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacterales</i>
LEV1404/19	0,1	3	46
LEV1405/19	0,1	3	42
LEV1406/19	0,1	4	54
LEV1407/19	0,1	3	42
LEV1408/19	0,1	3	38
LEV1409/19	0,1	3	41
LEV1410/19	0,1	3	44
LEV1411/19	0,1	3	46
LEV1412/19	0,3	6	57
LEV1413/19	0,1	2	41
LEV1414/19	0,1	3	59
LEV1415/19	0,1	3	36
LEV1416/19	0,1	3	49
LEV1417/19	0,1	3	43
LEV1418/19	0,2	4	51
LEV1419/19	0,1	3	46
LEV1420/19	0,1	3	42
LEV1421/19	0,1	3	40
LEV1422/19	0,1	2	48
LEV1423/19	0,1	3	47
LEV1424/19	0,1	2	41

5.5. Závěry pilotní studie

Předkládaná pilotní metagenomická studie přináší nekultivační pohled na přítomnost genetických determinant rezistence k antimikrobikům a zastoupení skupin mikroorganismů v zemědělských půdách odebraných v ČR. Výsledky prokázaly výskyt genetických determinant kódujících zejména přirozené mechanismy rezistence k antimikrobikům. Analýzou hrubých sekvenačních dat nebyly detekovány geny kódující získanou rezistenci, které jsou šířeny prostřednictvím mobilních genetických elementů. Tato skutečnost může souviset i s velice nízkým zastoupením bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* ve vyšetřovaných vzorcích. Dosažené výsledky mohou být ovlivněny typem vzorkování, uchováním vzorků před vlastní laboratorní analýzou, nízkým množstvím vzorků půd a použitou metodou zpracování dat.

Výskyt mobilních genetických elementů je nejkritičtější faktorem pro šíření rezistence u bakterií, a proto v dalších etapách doporučujeme zaměřit se na sledování horizontálně šířených genů rezistence k antimikrobikům zejména u *Enterobacteriaceae*.

Pro detailnější pochopení studované problematiky by mělo být provedeno:

- odběr vzorků půd v různých časových intervalech po aplikaci organických hnojiv;
- ověření vlivu mražení odebraných vzorků půd před jejich analýzou na kvalitu získaných dat;
- asemblování hrubých sekvenačních dat metagenomu a jejich analýza dalšími vhodnými software;

- iv) modelový pokus sledování variability genů rezistence v závislosti na způsobu hospodaření s půdou (včetně anamnestických dat o použití antimikrobik na farmách odkud pochází organické hnojivo);
- v) porovnání dat metagenomické analýzy s výsledky kvantitativní a kvalitativní kultivace a detekce specifických genů rezistence u *Enterobacteriaceae*.

6. ZÁVĚRY

Na základě údajů o spotřebách veterinárních léčiv v ČR a údajů o jejich možné perzistenci navrhuje do dalšího sledování zahrnout tyto skupiny látek (vč. látek samotných, preferované analyty zvýrazněny): tetracykliny (**chlortetracyklin**, doxycyklin, oxytetracyklin), sulfonamidy (**sulfadimidin**, **sulfamethoxazol**, **sulfadiazin**), polypeptidy (**kolistin**), fluorochinolony (**enrofloxacin** a jeho metabolit **ciprofloxacin**) a zástupce makrolidů (**tylosin**). Ke zvážení zůstává, zda sledovat beta-laktamy, konkrétně **amoxicilin** – látku vykazující ve veterinární oblasti vysokou spotřebu, ale v půdním prostředí nestabilní.

Analytické stanovení uvedených skupin a látek v půdě, případně ve statkových hnojivech, by při současném stavu vědění a pokroku mělo být proveditelné. U vlastních analýz bude vždy potřeba zvážit, jestli analýzy dělat jako multikomponentní, kde je poté větší variabilita ve výtěžnostech extrakce a limitech metody v závislosti na rozdílech ve fyzikálně-chemických vlastnostech analytů, nebo bude vhodnější se věnovat analytům po menších skupinách. To zvýší náklady na analýzu. Vše se zřejmě bude odvíjet od potřebných LOD nebo LOQ pro dané analyty. Pro vlastní analýzu je vhodné využití tandemové hmotnostní spektrometrie LC/MS/MS a LC/HRMS.

V rámci metagenomické studie budou získány informace o celkovém výskytu genů rezistence k antimikrobikům ve vzorcích půd. Na základě získaných dat bude dále upřesněno spektrum sledovaných typů rezistence zejména se zaměřením na horizontálně přenosnou rezistenci u *Enterobacteriaceae*. Tyto analýzy budou prováděny kultivačními metodami v kombinaci s molekulárně biologickými.

V roce 2019 byly v rámci pravidelného vzorkování v síti Bazálního monitoringu půd odebrány půdní vzorky k metagenomické analýze a určení zastoupení půdního mikrobiomu. Na základě provedené studie doporučujeme provést:

- i) odběr vzorků půd v různých časových intervalech po aplikaci organických hnojiv;
- ii) ověření vlivu mražení odebraných vzorků půd před jejich analýzou na kvalitu získaných dat;
- iii) asemblování hrubých sekvenačních dat metagenomu a jejich analýza dalšími vhodnými softwary;
- iv) modelový pokus sledování variability genů rezistence v závislosti na způsobu hospodaření s půdou (včetně anamnestických dat o použití antimikrobik na farmách odkud pochází organické hnojivo);
- v) porovnání dat metagenomické analýzy s výsledky kvantitativní a kvalitativní kultivace a detekce specifických genů rezistence u *Enterobacteriaceae*.

Vzhledem k tomu, že na plochách Bazálního monitoringu půd hospodaří komerční zemědělské subjekty, což znamená, že způsob hnojení (např. statkovými hnojivy) odráží současné tendence zemědělské výroby, může tento systém poskytovat informace o obecném rozsahu výskytu genů AMR. K podrobnějšímu sledování, resp. výzkumu výskytu genů AMR v závislosti na aplikaci statkových hnojiv bude vhodnější využít přesné polní zkoušky provozované ÚKZÚZ, či pilotní studie na vybraných farmách.

Finanční rozklad k FÚ č. 10 AMR v půdě a případně dalších částech životního prostředí

Komplexní zpracování poznatků o výskytu a rezistenci bakterií k antimikrobiálním látkám v půdách, návrh metodiky zpracování vzorků pro pilotní metagenomickou studii zaměřenou na složení půdního mikrobiomu a výskyt genů AMR (VÚVeL).	49 000 Kč
Rešeršní práce shrnující vhodné analytické postupy stanovení veterinárních léčiv v půdních vzorcích (FCH VUT)	30 000 Kč
Zpracování podkladů z dostupné odborné literatury ohledně spotřeb veterinárních léčiv; konzultační činnosti s kolegy v zahraničí (ÚSKVBL)	30 000 Kč
Spotřební materiál	34 000 Kč
Náklady na odběr půdních vzorků	11 000 Kč
Chemikálie a laboratorní pomůcky	96 000 Kč
Celkem	250 000 Kč

Relevantní daňové doklady jsou k dispozici v účetnictví ÚKZÚZ.

7. HYPOTÉZY AKČNÍHO PLÁNU NÁRODNÍHO ANTIBIOTICKÉHO PROGRAMU

Tým autorů si dovolil konkrétně definovat hypotézy AP NAP, které by bylo vhodné v průběhu trvání Akčního plánu buď potvrdit nebo vyvrátit.

- Údaje o prodeji/spotřebě antimikrobik v chovech hospodářských zvířat lze využít k analýze rizika za účelem predikce zátěže půdy z důvodu výskytu reziduí antimikrobiálních látek použitých v chovech hospodářských zvířat
- Na základě spektra nejvíce zatěžujících a perzistujících látek antimikrobní povahy pocházejících z VLP by mělo být možno analyzovat, kterým profilům rezistence bakterií v půdě by bylo vhodné se věnovat prioritně.
- Do budoucna (od roku 2024) by měla data o používání antimikrobik z úrovně hospodářství umožnit lépe cílené analýzy rizik.
- Dostupné extrakční a chromatografické metody umožňují spolehlivou detekci reziduí antimikrobik a degradovaných produktů v půdě.
- Výskyt bakterií rezistentních k antimikrobikům a obsah antimikrobiálních látek je ovlivněn fyzikálně-chemickými příp. jinými vlastnostmi půd.
- Variabilitu výskytu rezistentních bakterií a genů rezistence ovlivňují vlastnosti půdy a způsob hospodaření s půdou.

8. CÍLE A FINANČNÍ ROZVAHA AP NAP

Akční plán Národního antibiotického programu definuje cíle úkolu I.1.5 Antimikrobiální rezistence v půdě a případně dalších částech životního prostředí takto:

Analýzou problematiky v podmínkách ČR **zformulovat opatření pro sledování AMR v půdě** a případně v dalších částech životního prostředí (formou schváleného analytického dokumentu k řešení problematiky AMR v půdě, rostlinách, a případně dalších částech životního prostředí). V souladu se schváleným analytickým dokumentem **zakomponování problematiky sledování AMR do programu monitoringu půd v ČR**, či obdobné opatření.

AP NAP definuje také termíny plnění úkolu, a to takto:

- 2019–2020: přípravná fáze (analýza, pilotní programy, závěry, příp. metodické postupy)
- 2020 +: realizace programu dle analýzy a výsledků z přípravného období

Na základě požadavků úkolu I.1.5 byly rozpracovány dílčí cíle (tabulka), včetně předpokládaných finančních nákladů a návrhu podílejících se organizací.

Tabulka 15: Dílčí cíle vedoucí k naplnění úkolu I.1.5, včetně odhadu finančních nákladů na jejich splnění a podílejících se organizací.

Cíle	Odhad finančních nákladů (v tis. Kč.)	Navržené podílející se organizace
definovat reprezentativní/proporcionální soubor vzorků půd	100	VÚVeL ÚKZÚZ
sledovat rezidua antimikrobik (příp. jejich degradačních produktů) v půdě	300	ÚSKVBL FCH VUT
sledovat zastoupení půdního mikrobiomu, genů rezistence (ARGs) a bakterií rezistentních k antimikrobikům	600	VÚVeL
analyzovat a interpretovat získaná data v závislosti na využívání antimikrobiálních látek, výskytu genů rezistence k antimikrobiálním látkám a složení mikrobiální komunity v půdách (s ohledem na typ a rozsah zemědělské činnosti, způsoby hospodaření s půdou)	200	ÚKZÚZ VÚVeL ÚSKVBL
vyvinout vhodnou metodu k detekci reziduí antimikrobik v půdě (příp. ve statkových hnojivech)	200	FCH VUT
na základě modelové studie na vybrané farmě definovat rizika výskytu rezistentních bakterií v půdě	200	ÚSKVBL

9. LITERATURA

- Aga, D. S.; Lenczewski, M.; Snow, D.; Muurinen J.; Brett Sallach, J.; Wallace, J. S. Challenges in the Measurement of Antibiotics and in Evaluating Their Impacts in Agroecosystems: A Critical Review. *Journal of Environmental Quality* **2016**, 45 (2) 407–419. <https://doi.org/10.2134/jeq2015.07.039>.
- Albero, B.; Tadeo, J. L.; Escario, M.; Miguel, E.; Pérez, R. A. Persistence and Availability of Veterinary Antibiotics in Soil and Soil-Manure Systems. *Science of the Total Environment* **2018**, 643, 1562–1570. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.314>.
- Alistair, B. A.; Boxall, P. J.; Smith, E. J.; Sinclair, C. J.; Stutt, E., Levy, L. S. Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, 54 (6), 2288–2297.
- Allen, H. K.; Moe, L. A.; Rodbumrer, J.; Gaarder, A.; Handelsman, J. Functional metagenomics reveals diverse beta-lactamases in a remote Alaskan soil. *ISME J.* **2009**, 3(2), 243–251. doi: 10.1038/ismej.2008.86.
- Andreu, V.; Vazquez-Roig, P.; Blasco, C.; Picó, Y. Determination of Tetracycline Residues in Soil by Pressurized Liquid Extraction and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, 394 (5), 1329–1339. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2635-x>.
- Armalytė, J.; Skerniškytė, J.; Bakienė, E.; Krasauskas, R.; Šiugždinienė, R.; Kareivienė, V.; Kerzienė, S.; Klimienė, I.; Sužiedėlienė, E.; Ružauskas, M. Microbial diversity and antimicrobial resistance profile in microbiota from soils of conventional and organic farming systems. *Front Microbiol.* **2019**, (10), 1–12. doi: 10.3389/fmicb.2019.00892.
- Białk-Bielińska, A.; Kumirska, J.; Palavinskis, R.; Stepnowski, P. Optimization of Multiple Reaction Monitoring Mode for the Trace Analysis of Veterinary Sulfonamides by LC-MS/MS. *Talanta* **2009**, 80 (2), 947–53. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.08.023>.
- Bourdat-Deschamps, M.; Leang, S.; Bernet, N.; Daudin, J. J.; Nélieu, S. Multi-Residue Analysis of Pharmaceuticals in Aqueous Environmental Samples by Online Solid-Phase Extraction-Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Optimisation and Matrix Effects Reduction by Quick, Easy, Cheap, Effective. *Journal of Chromatography A* **2014**, 1349, 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.006>.
- Cappellano, C.; Monti, F.; Sosio, M.; Donadio, S.; Sarubbi, E. Natural kirromycin resistance of elongation factor Tu from the kirrothricin producer *Streptomyces cinnamoneus*. *Microbiology*. **1997**, 143 (Pt 2), 617–624. doi: 10.1099/00221287-143-2-617.
- Cycoń, M.; Mroziak, A.; Piotrowska-Seget, Z. Antibiotics in the Soil Environment—Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity. *Frontiers in Microbiology* **2019** 10 (MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00338>.
- de Castro, A. P.; Fernandes Gda, R.; Franco, O. L. Insights into novel antimicrobial compounds and antibiotic resistance genes from soil metagenomes. *Front Microbiol.* **2014**, 5:489. doi: 10.3389/fmicb.2014.00489.
- Díaz-Cruz, M. S.; López De Alda, M. J.; Barceló, D. Environmental Behavior and Analysis of Veterinary and Human Drugs in Soils, Sediments and Sludge. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2003**, 22 (6), 340–351. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00603-4](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00603-4).
- Ding, Y.; Zhang, W.; Gu, C.; Xagorarakis, I.; Li, H. Determination of Pharmaceuticals in Biosolids Using Accelerated Solvent Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass

Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218 (1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.112>.

Du, L.; Liu, W. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA, **2012**, 32 (2), pp. 309–327. 10.1007/s13593-011-0062-9. hal-00930539.

EMA (2002a), Colistin, summary report (2), EMEA/MRL/815/02-FINAL. https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/colistin-summary-report-2-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf (naposledy navštíveno 8.listopadu 2019).

EMA (1998), Enrofloxacin, summary report (1). https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/enrofloxacin-summary-report-1-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf (naposledy navštíveno 8.listopadu 2019).

EMA (2002b), Enrofloxacin (Extension to all food producing species), summary report (5), EMEA/MRL/820/02-FINAL. https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/enrofloxacin-extension-all-food-producing-species-summary-report-5-committee-veterinary-medicinal_en.pdf (naposledy navštíveno 8.listopadu 2019).

EMA (1995a), Oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline, summary report (3), EMEA/MRL/023/95. https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/oxytetracycline-tetracycline-chlortetracycline-summary-report-3-committee-veterinary-medicinal_en.pdf (naposledy navštíveno 8.listopadu 2019).

EMA (1995b), Sulphonamides (2), summary report, EMEA/MRL/026/95. https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/sulfonamides-summary-report-2-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf (naposledy navštíveno 8.listopadu 2019).

EMA (1997), Tylosin, Summary report (3), EMEA/MRL/205/97-FINAL. https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/tylosin-summary-report-3-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf (naposledy navštíveno 8.listopadu 2019).

Golovko, O.; Koba, O.; Kodesova, R.; Fedorova, G.; Kumar, V.; Grabic, R. Development of Fast and Robust Multiresidual LC-MS/MS Method for Determination of Pharmaceuticals in Soils. *Environmental Science and Pollution Research* **2016**, 23 (14), 14068–77. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6487-6>.

Gozlan, I.; Rotstein, A.; Avisar, D. Amoxicillin-degradation products formed under controlled environmental conditions: Identification and determination in the aquatic environment. *Chemosphere* **2013**, 91 (7), 985–992.

Graham, D. W.; Bergeron, G.; Bourassa, M. W.; Dickson, J.; Gomes, F.; Howe, A.; Kahn, L. H.; Morley, P. S.; Scott, H. M.; Simjee, S.; Singer, R. S.; Smith, T. C.; Storrs, C.; Wittum, T. E. Complexities in understanding antimicrobial resistance across domesticated animal, human, and environmental systems. *Ann N Y Acad Sci.* **2019**, 1441 (1), 17–30. doi: 10.1111/nyas.14036.

Graham, D. W.; Knapp, C. W.; Christensen, B. T.; McCluskey, S.; Dolfing, J. Appearance of β -lactam resistance genes in agricultural soils and clinical isolates over the 20th Century. *Sci Rep.* **2016**, 6, 21550. doi: 10.1038/srep21550.

Gros, M.; Mas-Pla, J.; Boy-Roura, M.; Geli, I.; Domingo, F.; Petrović, M. Veterinary Pharmaceuticals and Antibiotics in Manure and Slurry and Their Fate in Amended Agricultural Soils: Findings from an Experimental Field Site (Baix Empordà, NE Catalonia). *Science of the Total Environment* **2019**, 654, 1337–1349. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.061>.

Guglierame, P.; Pasca, M. R.; De Rossi, E.; Buroni, S.; Arrigo, P.; Manina, G.; Riccardi, G. Efflux pump genes of the resistance-nodulation-division family in *Burkholderia cenocepacia* genome. *BMC Microbiol.* **2006**, 20, 6:66. doi: 10.1186/1471-2180-6-66.

Guo, C.; Wang, M.; Xiao, H.; Huai, B.; Wang, F.; Pan, G.; Liao, X.; Liu, Y. Development of a Modified QuEChERS Method for the Determination of Veterinary Antibiotics in Swine Manure by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2016**, 1027, 110–1118. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.05.034>.

Halling-Sørensen, B.; Jacobsen A. M.; Jensen, J.; Sengeløv, G.; Vaclavik, E.; Ingerslev, F. Dissipation and effects of chlortetracycline and tylosin in two agricultural soils: a field-scale study in southern Denmark. *Environ Toxicol Chem.* **2005**, 24 (4), 802–810.

Halling-Sørensen, B.; Sengeløv, G.; Ingerslev, F.; Jensen, L. B. Reduced Antimicrobial Potencies of Oxytetracycline, Tylosin, Sulfadiazin, Streptomycin, Ciprofloxacin, and Olaquinox Due to Environmental Processes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **2003**, 44, 0007–0016.

Hamscher, G.; Sczesny, S.; Höper, H.; Nau, H. Determination of Persistent Tetracycline Residues in Soil Fertilized with Liquid manure by High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry; *Anal. Chem.* **2002**, 74, 1509–1518.

Hendriksen, R. S.; Munk, P.; Njage, P.; van Bunnik, B.; McNally, L.; Lukjancenko, O.; Röder, T.; Nieuwenhuijse, D.; Pedersen, S. K.; Kjeldgaard, J.; Kaas, R. S.; Clausen, P. T. L. C.; Vogt, J. K.; Leekitcharoenphon, P.; van de Schans, M. G. M.; Zuidema, T.; de Roda Husman, A. M.; Rasmussen, S.; Petersen, B. Global Sewage Surveillance project consortium, Amid, C., Cochrane, G., Sicheritz-Ponten, T., Schmitt, H., Alvarez, J. R. M., Aidara-Kane, A., Pamp, S. J., Lund, O., Hald, T., Woolhouse, M., Koopmans, M. P., Vigre, H., Petersen, T. N., Aarestrup, F. M. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nat Commun.* **2019**, 10 (1), 1124. doi: 10.1038/s41467-019-08853-3.

Hu, W.; Ma, L.; Guo, C.; Sha, J.; Zhu, X.; Wang, Y. Simultaneous Extraction and Determination of Fluoroquinolones, Tetracyclines and Sulfonamides Antibiotics in Soils Using Optimised Solid Phase Extraction Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **2012**, 92 (6), 698–713. <https://doi.org/10.1080/03067319.2010.520122>.

Hu, X. G.; Luo, Y.; Zhou, Q. X.; Xu, L. Determination of Thirteen Antibiotics Residues in Manure by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography. *Fenxi Huaxue/ Chinese Journal of Analytical Chemistry* **2008**, 36 (9), 1162–1166. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(08\)60063-8](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(08)60063-8).

Chander, Y.; Kumar, K.; Goyal, S. M.; Gupta, S. C. Antibacterial activity of soil-bound antibiotics. *Journal of environmental quality* **2005**, 34, 1952–1957.

Jandák, J.; Prax, A.; Pokorný, E. *Půdoznalství*. MZLU, Brno, 2001.

Jechalke, S.; Heuer, H.; Siemens, J.; Amelung, W.; Smalla, K. Fate and Effects of Veterinary Antibiotics in Soil. *Trends in Microbiology* **2014**, 22 (9), 536–45. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005>.

Kartogramy agrochemického zkoušení zemědělských půd – za období 2011–2016. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Web site. <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/hnojiva-a-puda/publikace/agroch-zkouseni-zemedelskych-pud/> (accessed Sept 02, 2019).

Kartogramy obsahů vybraných rizikových prvků v zemědělských půdách České republiky. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Web site. <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/hnojiva-a-puda/publikace/bezpecnost-pudy-zpravy/registr-kontaminovanych-ploch/> (accessed Sept 20, 2019).

Kim, H. B.; Wang, M.; Park, C. H.; Kim, E. C.; Jacoby, G. A.; Hooper, D. C. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**, 53 (8), 3582–3584. doi: 10.1128/AAC.01574-08.

Kodešová, R.; Grabic, R.; Kočárek, M.; Klement, A.; Golovko, O.; Fér, M.; Nikodem, A.; Jakšík, O. Pharmaceuticals' Sorptions Relative to Properties of Thirteen Different Soils. *Science of the Total Environment* **2015**, 511, 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.088>.

Kodešová, R.; Kočárek, M.; Klement, A.; Golovko, O.; Koba, O.; Fér, M.; Nikodem, A.; Vondráčková, L.; Jakšík, O.; Grabic, R. An Analysis of the Dissipation of Pharmaceuticals under Thirteen Different Soil Conditions. *Science of the Total Environment* **2016**, 544, 369–381. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.085>.

Kumar, D.; Pornsukarom, S.; Sivaraman, G. K.; Thakur, S. Environmental dissemination of multidrug methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* after application of manure from commercial swine production systems. *Foodborne Pathog Dis.* **2018**, 15 (4), 210–217. doi: 10.1089/fpd.2017.2354.

Kümmerer K. *Pharmaceuticals in the Environment – Sources, Fate and Risks*, 2nd ed.; Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2004.

Kümmerer K. *Pharmaceuticals in the Environment – Sources, Fate, Effects and Risks*, 3rd revised and enlarged ed. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2008.

Kuppusamy, S.; Kakarla, D.; Venkateswarlu, K.; Megharaj, M.; Yoon, Y. E.; Lee, Y. B. Veterinary Antibiotics (VAs) Contamination as a Global Agro-Ecological Issue: A Critical View. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **2018**, 257 (January), 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.01.026>.

Kuraš, M. Výhody termického zpracování čistírenských kalů. *Odpady* **2018**, 8, 24–25.

Kyselková, M.; Jirout, J.; Vrchotová, N.; Schmitt, H.; Elhottová, D. Spread of tetracycline resistance genes at a conventional dairy farm. *Frontiers in Microbiology* **2015**, (6), 1–14.

Leal, R. M. P.; Alleoni, L. R. F.; Tornisiello, V. L.; Regitano, J. B. Sorption of Fluoroquinolones and Sulfonamides in 13 Brazilian Soils. *Chemosphere* **2013**, 92 (8), 979–85. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.018>.

Liu, N.; Han, H.; Yin, H.; Han, L.; Huang, G. Variations in the fate and risk analysis of amoxicillin and its degradation products during pig manure aerobic composting. *Journal of Hazardous Materials* **2018**, 346, 234–241.

Martínez-Carballo, E.; González-Barreiro, C.; Scharf, S.; Gans, O. Environmental Monitoring Study of Selected Veterinary Antibiotics in Animal Manure and Soils in Austria. *Environmental Pollution* **2007**, 148 (2), 570–79. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.11.035>.

McCann, C. M.; Christgen, B.; Roberts, J. A.; Su, J.-Q.; Arnold, K. E.; Gray, N. D.; Zhu, Y.-G.; Graham, D. W. Understanding drivers of antibiotics resistance genes in High Arctic soil ecosystems. *Environmental International* **2019**, 125, 497–504.

Mima T.; Sekiya H.; Mizushima T.; Kuroda T.; Tsuchiya T. Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas*

aeruginosa. *Microbiol Immunol*. 2005, 49 (11), 999–1002. doi: 10.1111/j.1348-0421.2005.tb03696.x.

Naas, T.; Bellais, S.; Nordmann, P. Molecular and biochemical characterization of a carbapenem-hydrolysing beta-lactamase from *Flavobacterium johnsoniae*. *J Antimicrob Chemother*. **2003**, 51 (2), 267–273. doi: 10.1093/jac/dkg069.

Nagakubo, S.; Nishino, K.; Hirata, T.; Yamaguchi A. The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC. *J Bacteriol*. **2002**, 184 (15), 4161–4167. doi: 10.1128/jb.184.15.4161-4167.2002.

Němeček, J.; Vácha, R.; Podlešáková, E. *Hodnocení kontaminace půd v ČR*, 1st ed.; VÚMOP, v.v.i.: Praha, 2010.

Nesme, J.; Simonet, P. The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environ Microbiol*. **2015**, 17 (4), 913–930. doi: 10.1111/1462-2920.12631.

Pamreddy, A.; Hidalgo, M.; Havel, J.; Salvadó, V. Determination of Antibiotics (Tetracyclines and Sulfonamides) in Biosolids by Pressurized Liquid Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2013**, 1298, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.014>.

Pan, M.; Chu, L. M. Fate of Antibiotics in Soil and Their Uptake by Edible Crops. *Science of the Total Environment* **2017**, 599–600, 500–512. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.214>

Pereira Leal, R. M.; Alleoni, L. F. F.; Tornisiello, V. L.; Regitano, R. B. Sorption of fluoroquinolones and sulfonamides in 13 Brazilian soils. *Chemosphere* **2013**, 92979–92985.

Poláková, Š.; Kubík, L.; Němec, P. *Registr kontaminovaných ploch, celkové obsahy rizikových prvků v zemědělských půdách, průběžná zpráva (1998–2013)*. ÚKZÚZ, Brno, 2014.

Poláková, Š.; Kubík, L.; Prášková, L.; Malý, S.; Němec, P.; Staňa, J. *Monitoring zemědělských půd v České republice, 1992–2013, Monitoring of agricultural soils in the Czech Republic, 1992–2013*, ÚKZÚZ, Brno, 2017. ISBN 978-80-7401-136-8.

Poláková, Š.; Němec, P.; Prášková, L.; Kubík, L.; Sušil, A. *Bazální monitoring zemědělských půd, obsah rizikových prvků, 1995–2013*, ÚKZÚZ, Brno, 2016.

Prášková, L.; Němec, P. *Bazální monitoring zemědělských půd, půdní reakce a obsah živin, 1995–2013*, ÚKZÚZ, Brno, 2016.

Proksová, E.; Vejmelková, D.; Říhová Ambrožová, J. Výskyt antibiotické rezistence na čistírně odpadních vod. *Odpadové fórum* **2018**, 18 (11), 24–25.

PubChem: Colistin: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Colistin>

PubChem: Sulfamethoxazole (compound): <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfamethoxazole#section=Clinical-Laboratory-Methods>

Rejšek, K.; Vácha, R. *Nauka o půdě*. Agriprint, s.r.o., Olomouc, 2018. ISBN 978-80-87097-82-1.

Reygaert, W.C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol*. **2018**, 4 (3), 482–501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482.

Richter, R.; Hlušek, J. *Výživa a hnojení rostlin, I. obecná část*. Vysoká škola zemědělská v Brně, Brno, 1994.

Rillig, M. C.; Ramsey, P. W.; Morris, S.; Paul, E. A. Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. *Plant and soil* **2003**, (253), 293–299.

Robertsen H.L., Weber T., Kim H.U., Lee S.Y. Toward systems metabolic engineering of *Streptomyces* for secondary metabolites production. *Biotechnol J.* 2018, 13 (1). doi: 10.1002/biot.201700465.

Sarmah, A. K.; et al. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* **2006**, 65, 725–759.

Skov, R.L.; Monnet, D.L. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill.* **2016**, 21 (9), 30155. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155.

Smatanová, M. Vzorkování pro potřeby přesných polních zkoušek. In *Vzorkování III potraviny, zemědělství, předměty běžného užívání*, 1st ed.; Koplík, R., Poláková, Š., Šrámek, I., Šviráková, E., Eds.; Ing. Václav Helán – 2 THETA Český Těšín: Český Těšín, 2016; pp 228–233. ISBN 978-80-86380-80-3.

Smatanová, M.; Němec, P.; Sušil, A. Porovnání vývoje agrochemických vlastností půd za období 2005–2010 a 2011–2016, 2017. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Web site. <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/hnojiva-a-puda/publikace/agroch-zkouseni-zemedelskych-pud/azzp-publikace-neviditelny/porovnani-vyvoje-agr-20052010-20112016.html> (accessed Sept 02, 2019).

Smatanová, M.; Sušil, A. Výsledky agrochemického zkoušení zemědělských půd za období 2012–2017, 2018. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Web site. <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/hnojiva-a-puda/agrochemicke-zkouseni-zemed-pud/azzp-neviditelny/azzp-2012-2017.html> (accessed Sept 02, 2019).

Sollic, M.; Roy-Lachapelle, A.; Gasser, M. O.; Coté, C.; Génereux, M.; Sauvé, S. Fractionation and Analysis of Veterinary Antibiotics and Their Related Degradation Products in Agricultural Soils and Drainage Waters Following Swine Manure Amendment. *Science of the Total Environment* **2016**, 543, 524–535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.061>.

Sollic, M.; Roy-Lachapelle, A.; Sauvé, S. Quantitative Performance of Liquid Chromatography Coupled to Q-Exactive High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) for the Analysis of Tetracyclines in a Complex Matrix. *Analytica Chimica Acta* **2015**, 853 (1), 415–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.10.037>.

Song, W.; Guo, M. Residual Veterinary Pharmaceuticals in Animal Manures and Their Environmental Behaviors in Soils. *Applied Manure and Nutrient Chemistry for Sustainable Agriculture and Environment* **2014**, 23–52.

Statistická ročenka České republiky – 2018. <https://www.czso.cz/csu/czso/statisticka-rocenka-ceske-republiky-2018> (accessed Aug 29, 2019).

Stoob, K.; Singer, H. P.; Stettler, S.; Hartmann, N.; Mueller, S. R.; Stamm, C. H. Exhaustive Extraction of Sulfonamide Antibiotics from Aged Agricultural Soils Using Pressurized Liquid Extraction. *Journal of Chromatography A* **2006**, 1128 (1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.06.048>.

Sun, J.; Zeng, Q.; Tsang, D. C. W.; Zhu, L. Z.; Li, X. D. Antibiotics in the Agricultural Soils from the Yangtze River Delta, China. *Chemosphere* **2017**, 189, 301–8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.040>.

Tasho, R. P.; Cho, J. Y. Veterinary Antibiotics in Animal Waste, Its Distribution in Soil and Uptake by Plants: A Review. *Science of the Total Environment* **2016**, 563–564 (3), 366–76. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.140>.

Tetzner, N. F.; Maniero, M. G.; Rodrigues-Silva, C.; Rath, S. On-Line Solid Phase Extraction-Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry as a Powerful Technique for the Determination of Sulfonamide Residues in Soils. *Journal of Chromatography A* **2016**, 1452 (2016), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.034>.

Thiele-Bruhn, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **2003**, 166, 145–167.

Uslu, M. Ö.; Yediler, A.; Balçioğlu, I. A.; Schulte-Hostede, S. Analysis and Sorption Behavior of Fluoroquinolones in Solid Matrices. *Water, Air, and Soil Pollution* **2008**, 190 (1–4), 55–63. <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9580-0>.

Vaněk, V.; Balík, J.; Němeček, R.; Pavlíková, D.; Tlustoš, P. *Výživa a hnojení polních plodin, ovoce a zeleniny*. Farmář – Zemědělské listy, Praha, 1998. ISBN 80-902413-1-X.

Vyhláška č. 437/2016 Sb., o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady a změně vyhlášky č. 341/2008 Sb., o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady a o změně vyhlášky č. 294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady (vyhláška o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady)

Vyhláška č. 474/2000 Sb., o stanovení požadavků na hnojiva

Wang, M.; Liu, P.; Xiong, W.; Zhou, Q.; Wangxiao, J.; Zeng, Z.; Sun, Y. Fate of potential indicator antimicrobial resistance genes (ARGs) and bacterial community diversity in simulated manure-soil microcosms. *Ecotoxicol Environ Saf.* **2018a**, 147, 817–823. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.09.055.

Wang, M.; Xiong, W.; Liu, P.; Xie, X.; Zeng, J.; Sun, Y.; Zeng, Z. Metagenomic insights into the contribution of phages to antibiotic resistance in water samples related to swine feedlot wastewater treatment. *Front Microbiol.* **2018b**, 9:2474. doi: 10.3389/fmicb.2018.02474.

Wang, N.; Guo, X.; Xu, J.; Hao, L.; Kong, D.; Gao, S. Sorption and transport of five sulfonamide antibiotics in agricultural soil and soil–manure systems; *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **2015**, 50, 23–33.

Xiong, W.; Sun, Y.; Zeng, Z. Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. *Environ Sci Pollut Res Int.* **2018**, 25 (19), 18377–18384. doi: 10.1007/s11356-018-1852-2.

Yi, X.; Bayen, S.; Kelly, B. C.; Li, X.; Zhou, Z. Improved Detection of Multiple Environmental Antibiotics through an Optimized Sample Extraction Strategy in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, 407 (30), 9071–9083. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9074-7>.

Yi, X.; Lin, C.; Ong, E. J. L.; Wang, M.; Zhou, Z. Occurrence and Distribution of Trace Levels of Antibiotics in Surface Waters and Soils Driven by Non-Point Source Pollution and Anthropogenic Pressure. *Chemosphere* **2019**, 216, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.087>.

Zákon č. 156/1998 Sb., o hnojivech, pomocných půdních látkách, pomocných rostlinných přípravcích a substrátech a o agrochemickém zkoušení zemědělských půd (zákon o hnojivech)

Zímová, M.; Matějů, L. Evropa se kloní k nevyužívání kalů na zemědělské půdě. *Odpady* **2018**, 8, 19–20.