

Received: 2014.01.17
Accepted: 2014.06.06
Published: 2014.08.29

Źródła antybiotyków w środowiskach naturalnych i ich rola biologiczna

Sources of antibiotics in natural environments and their biological role

Agnieszka Zabłotni¹, Adam Jaworski²

¹Zakład Mikrobiologii Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

²Zakład Genetyki Drobnoustrojów, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, obecne miejsce pracy: Społeczna Akademia Nauk w Łodzi

Streszczenie

Antybiotyki są obecnie wykorzystywane na szeroką skalę nie tylko do zwalczania infekcji bakteryjnych, ale także do celów innych niż medyczne. Od wielu lat stosowane są jako stymulatory wzrostu trzody chlewnej, drobiu oraz w hodowlach ryb. W niezmienną postać trafiają do środowiska naturalnego, gdzie mogą pozostawać przez bardzo długi czas. Nadmierne wykorzystywanie antybiotyków jest przyczyną gwałtownego rozprzestrzeniania się lekooporności wśród bakterii chorobotwórczych i środowiskowych. Zarówno w tkankach organizmów wyższych jak i w wodach czy glebach, antybiotyki często osiągają stężenia określone jako subinhibicyjne – niższe niż stężenia hamujące wzrost drobnoustrojów. Stężenia takie w znaczący sposób wpływają na aktywność wielu genów bakteryjnych przez zmianę poziomu ich transkrypcji, ale także wzmacnianie częstości mutacji. Powoduje to nabywanie przez bakterie wielu zmian, będących przejawem odpowiedzi komórki na stres. Subinhibicyjne stężenia antybiotyków indukują także transfer mobilnych elementów genetycznych na drogach horyzontalnego transferu genów, co dodatkowo przyczynia się do rozprzestrzeniania genów lekooporności, również wśród szczepów środowiskowych. Przedstawione dane wskazują na konieczność ograniczania i stałego monitorowania ilości używanych antybiotyków, mogących stanowić niebezpieczne zanieczyszczenie środowiska.

Słowa kluczowe: antybiotyki • oporność • stężenia subinhibicyjne

Summary

Nowadays antibiotics are broadly used not only for treatment of bacterial infections but also in nonmedical applications. For many years they have been added as livestock and poultry growth supplements, and they are applied similarly in fish farming. In basically unchanged form they may get into the natural environment and remain there for a long time. Excessive use of antibiotics leads to widespread of antibiotic resistance among clinical and environmental bacterial strains. Subinhibitory concentrations of antibiotics, which do not inhibit growth of bacteria, are often found in soil, water or even in the tissue of different organisms. Such low concentrations affect many bacterial genes through changes in their transcription level and increase of the mutation rate, and as a consequence lead to many bacterial adaptations to environmental stresses. There is also evidence that subinhibitory concentrations of antibiotics induce transfer of mobile genetic elements through horizontal gene transfer pathways, and therefore enhance antibiotic resistance, also among environmental strains. The analyzed data suggest the necessity of restriction and regular monitoring of antibiotics, which may be considered as environmental pollutants.

Key words: antibiotics • resistance • subinhibitory concentrations

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1119027>

Word count: 4446

Tables: –

Figures: –

References: 93

Adres autorki: dr Agnieszka Zabłotni, Zakład Mikrobiologii Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul Banacha 12/16, 90 - 237 Łódź, e-mail: agzab@biol.uni.lodz.pl

WPROWADZENIE

Odkrycie antybiotyków w pierwszej połowie ubiegłego wieku i wprowadzenie ich do terapii chorób zakaźnych człowieka było jednym z największych, historycznych osiągnięć medycyny, które legło u podstaw opracowania sposobów ratowania życia i ochrony zdrowia milionów ludzi na całym świecie. Jednak w czasie 60 lat stopniowo narastał problem oporności bakterii na antybiotyki, wraz z rosnącą, a w końcu masową produkcją oraz powszechnym ich stosowaniem w medycynie, ale także w celach niemedycejskich, np. do hodowli w rolnictwie. Ocenia się bowiem, że roczna, światowa produkcja antybiotyków wynosi obecnie 100-200 tys. ton, a w latach 1940-2010 wyprodukowano, w skali świata, aż ponad 1 milion ton tych preparatów [7,71]. Zjawisko lekooporności, odkryte po raz pierwszy w połowie lat 30 ub.w. dla sulfonamidów, a w drugiej połowie lat 40 dla penicyliny i streptomycyny, stało się obecnie globalnym problemem i ogromnym zagrożeniem. Rozprzestrzenianie lekooporności obserwuje się mimo ogromnego postępu badań poznawczych jaki dokonał się w ostatnich 15-20 latach w dziedzinie genetyki i biologii molekularnej bakterii chorobotwórczych i środowiskowych, w tym szczególnie w genomice i metagenomice, proteomice czy inżynierii genetycznej. Wciąż jednak nie mamy wystarczającej wiedzy na temat różnych czynników środowiskowych, a także na temat złożoności wielu mechanizmów komórkowych i molekularnych, które są bezpośrednio lub pośrednio związane ze zjawiskiem oporności bakterii na antybiotyki naturalne, półsyntetyczne i syntetyczne, w tym także na antybiotyki najnowszej generacji. Wciąż nie mamy pełnej wiedzy na temat dróg i mechanizmów transmisji genów lekooporności w różnych niszach i populacjach bakterii chorobotwórczych oraz środowiskowych. Nie wiemy dokładnie, co czyni określone gatunki szczególnie podatnymi na nabywanie genów lekooporności, a jakie bariery ograniczają transmisję takich genów u innych gatunków. Nie ma także pełnej odpowiedzi na pytania - jakie czynniki środowiskowe i molekularne mechanizmy decydują o tym, że określone geny lekooporności podlegają transmisji z dużą częstotliwością, zaś inne ze znacznie mniejszą, dlaczego jedno z nich podlegają transmisji łącznie, a inne oddzielnie. Wciąż brak jest jednoznacznych dowodów na temat ekologicznej roli producentów antybiotyków oraz produkowanych przez nie różnych substancji antybiotycznych. Co więcej, narasta wiedza dowodząca, że antybiotyki w środowiskach naturalnych nie są wyłącznie bronią

w walce z konkurentami, lecz mogą spełniać także inne, ważne funkcje jako cząsteczki sygnałowe lub egzogenne źródła węgla i energii [25].

W oparciu o dane literaturowe w artykule dyskutowane będą wyniki doświadczalne oraz opinie specjalistów na temat wyżej sygnalizowanych, różnych aspektów zjawiska oporności bakterii na antybiotyki. Uwaga skoncentrowana zostanie na bardzo często poruszanych problemach dotyczących źródeł i biologicznych skutków związanych z obecnością antybiotyków w środowiskach naturalnych, a także skutków ich działania na bakterie w stężeniach subinhibicyjnych (subinhibitory concentration, SI). Na podstawie wyników opublikowanych w ostatnich kilku latach podjęto dyskusję - czy antybiotyki w subinhibicyjnych stężeniach działają wyłącznie jako czynniki selekcyjne w populacjach bakterii szczepy odporne, czy też mogą również aktywnie generować fenotypową i genetyczną zmienność bakterii, spełniając funkcję modulatorów metabolicznej aktywności, niekiedy zaś mutagenów lub stymulatorów wzmagających procesy horyzontalnej transmisji genów lekooporności.

ŹRÓDŁA I SKUTKI OBECNOŚCI ANTIBIOTYKÓW W ŚRODOWISKACH NATURALNYCH

Narastanie lekooporności wśród bakterii przez lata skupiało uwagę badaczy głównie na zagadnieniach związanych z klinicznymi aspektami tego zjawiska, bez jakościowej i ilościowej analizy obecności i znaczenia antybiotyków w środowisku. Dopiero w ciągu ostatnich kilku lat obserwuje się zwiększone zainteresowanie zagrożeniami jakie niesie skażenie środowiska różnymi lekami, w tym zwłaszcza antybiotykami. Obecność tych ostatnich stwierdza się w różnych ilościach w glebie, w wodach powierzchniowych, gruntowych, w osadach dennych, ale także w wodzie pitnej [50].

Obecność antybiotyków w wymienionych środowiskach jest skutkiem zarówno aktywności zasiedlających je producentów tych związków, jak i wynikiem określonych działań człowieka.

Sugeruje się, że antybiotyki są wytwarzane przez mikroorganizmy środowiskowe od 500 milionów lat, a ich niektóre chemiczne komponenty, np. niezwykle aminokwasy, mogą być nawet ewolucyjnie starsze. Współczesne osiągnięcia genomiki i metagenomiki w poznawaniu świata

mikroorganizmów środowiskowych wskazują, że populacje tych drobnoustrojów mają zdolność wytwarzania ogromnej liczby małych, biologicznie aktywnych cząsteczek chemicznych, zwanych parwomem (parvome), o bardzo zróżnicowanej aktywności. Dla przykładu, ogromna taksonomiczna grupa bakterii należąca do *Actinobacteria*, obejmująca bardzo różne rodzaje, wytwarza w warunkach naturalnych miliony aktywnych biologicznie molekuł, z których większości nie można, jak dotychczas, wykryć w warunkach hodowli laboratoryjnych. Zaledwie niewielka część z nich została dotychczas zidentyfikowana jako związki o charakterze antybiotyków [9,28,36,91]. Szacuje się, że wyizolowano i scharakteryzowano tylko 1% antybakteryjnych związków wytwarzanych w naturze i tylko 10% naturalnie wytwarzanych antybiotyków [33].

Głównym, naturalnym rezerwuarem drobnoustrojów zdolnych do syntezy antybiotyków jest gleba zasiedlana przez antybiotykotwórcze bakterie i grzyby [30,72]. Najbogatszym źródłem antybiotyków w glebie są promieniowce, zwłaszcza należące do rodzaju *Streptomyces*, którego przedstawiciele uznawani są za organizmy najbardziej aktywne w wytwarzaniu antybiotyków [9,89]. 70% znanych antybiotyków jest wytwarzanych przez ten rodzaj promieniowców [12,34]. Antybiotyki są wytwarzane także przez inne bakterie, takie jak: *Bacillus polymyxa*, *B. licheniformis*, *Pseudomonas fluorescens* oraz przez grzyby np. *Penicillium chrysogenum*, *Fusidium coccineum*, *F. griseum* [72,75]. Wspomniana wcześniej gleba nie jest jedynym środowiskiem, z którego izoluje się organizmy zdolne do syntezy związków antybakteryjnych. Poszukiwania nowych, aktywnych pod tym względem drobnoustrojów zaowocowały w ostatnich latach doniesieniami o izolacji takich szczepów również ze środowisk wodnych np. wód i osadów jeziora Tana w Etiopii [34] czy morskich wód u wybrzeża Indii [87].

Naturalnie produkowane antybiotyki (lub ich półsyntetyczne pochodne) stanowią zdecydowaną większość (ponad 80%) w ogólnej liczbie dostępnych w sprzedaży antybiotyków: 70 spośród 90 dostępnych w latach 1982-2002 [72,78].

Nie ma więc dzisiaj wątpliwości, że w środowiskach naturalnych znajduje się ogromna pula różnorodnych antybiotyków wytwarzanych przez zasiedlające je bakterie i grzyby. Trudno jest jednak ocenić w danej niszy ekologicznej ich stężenie i wszystkie spełniane przez nie funkcje biologiczne [4,67,93].

Oprócz antybiotyków wytwarzanych przez naturalnych producentów pula antybiotyków w środowisku w sposób znaczący powiększa się w wyniku kontaminacji gleb, wód czy ścieków antybiotykami wykorzystywanymi na bardzo szeroką skalę przez człowieka. Jakże są powody takiego ogromnego zapotrzebowania na antybiotyki, ich zużycia i w efekcie skażenia nimi środowiska? Od czasów odkrycia penicyliny przez Fleminga, antybiotyki są stosowane w medycynie oraz weterynarii do zwalczania chorób bakteryjnych ludzi oraz zwierząt. Alarmujące do-

niesienia o szerzeniu się lekooporności wśród patogenów bakteryjnych sprawiają, że obecnie aplikowanie antybiotyków przez klinicystów coraz częściej ma charakter terapii celowanej, stosowanej po zidentyfikowaniu czynnika etiologicznego danej jednostki chorobowej. Niestety, brak takiego racjonalnego postępowania obserwuje się w przypadku wykorzystywania antybiotyków - i to na bardzo szeroką skalę - w celach innych niż medyczne: w rolnictwie, do hodowli zwierząt, a zwłaszcza ryb [32,52]. Obecnie szacuje się, że zużycie antybiotyków w celach niemedyceńskich dwukrotnie przewyższa ich wykorzystanie w lecznictwie ludzi [1].

Stosowane w rolnictwie od lat 50 ub.w. antybiotyki miały za zadanie przede wszystkim profilaktykę i pobudzenie wzrostu oraz zwiększenie wydajności produkcji zwierząt hodowlanych, stąd nazwano je antybiotykowymi stymulatorami wzrostu (ASW) [24,31,76]. Opisana stymulacja spowodowana jest przez zwalczanie jelitowych patogenów zwierząt - w tym enterokoków - wywołujących przewlekły nieżyt jelit zwierząt hodowlanych, a w konsekwencji lepsze wchłanianie składników pokarmowych, a przez to lepsze wykorzystanie paszy i obniżenie kosztów jej zużycia. W krótkim czasie nagminnie stało się przepisywanie antybiotyków przez lekarzy weterynarii tylko w tym celu - bez wskazań leczenia schorzeń bakteryjnych (w Danii w latach 90 ub.w. 2/3 wszystkich antybiotyków stosowanych w hodowli świń i aż 90% w hodowli drobiu) [1]. Oprócz hodowli trzody chlewnej, bydła, królików i drobiu niektóre antybiotyki, np. oksytetracyklina, streptomycyna, stosowane są również w celach profilaktycznych w uprawach roślin i owoców oraz hodowli pszczoł [50,68]. Do antybiotyków najczęściej stosowanych w rolnictwie należały bądź wciąż należą: penicylina, chlorotetracyklina, oksytetracyklina (szeroko stosowane m.in. w Polsce), erytromycyna, awoparcyna, bacytracyna, wirginiamycyna, kolistyna i inne [76]. Bardzo często, antybiotyki stosowane w rolnictwie były tymi samymi, których używano w lecznictwie ludzi [4].

Szeroko i bardzo często w sposób niekontrolowany stosuje się antybiotyki również w hodowlach zwierząt wodnych, zwłaszcza ryb, małż i krewetek. Farmy ryb zakładane na przybrzeżnych, słonych wodach wielu krajów (USA, Kanada, Norwegia, Chile, Chiny, Tajlandia, Wietnam, Taiwan) mają niekiedy bardzo duże powierzchnie i prowadzą intensywne hodowle. Na farmach tych zużywa się w celach profilaktycznych ogromne ilości antybiotyków, które są bezpośrednio dodawane do wody, co lokalnie powoduje znaczny wzrost stężenia antybiotyków zarówno w toni wodnej, jak i w osadach dennych, bezpośrednio pod farmami i w ich okolicy. Tysiące ton antybiotyków, które co-rocennie aplikowane są na ograniczone przestrzenie wodnych farm, powodują zaleganie niewyobrażalnych ilości tych związków, przez niespodziewanie długi okres czasu. Jako przykład można w tym miejscu podać liczby dotyczące zużycia antybiotyków w Chile: w 2007 r. na wyprodukowanie 1 tony łososia zużywano tu 1500 razy i 8 razy więcej niektórych antybiotyków oraz fluorochinolonów niż odpowiednio w Norwegii i Kanadzie! Z 940 ton anty-

biotyków zużytych w podanym roku w celach weterynaryjnych, zdecydowaną większość stanowiły te zużyte do hodowli łososia. Z osadów dennych wraz z prądami wodnymi antybiotyki mogą się rozprzestrzeniać na znaczne odległości i tym samym zanieczyszczać wody, które nie stykają się z farmami [17,50,52,53,66].

Do środowiska trafiają także antybiotyki stosowane w hodowli bydła, trzody chlewnej lub drobiu. Wydalane przez zwierzęta, jako nawóz (obornik, gnojowica) wciąż bardzo często są rozprowadzane przez farmerów na pola [49,51,76]. W ten sposób zanieczyszczają glebę. Zależnie od grupy leków, składu mikroflory gleby i panujących warunków preparaty te mogą podlegać w środowisku biodegradacji, jednak wiele z nich (sulfonamidy, fluorochinolony, tetracykliny) ulega sorpcji na cząstkach gleby, co znacznie utrudnia i spowalnia te procesy. Antybiotyki pozostające w glebie mogą łatwo dostawać się do wód powierzchniowych. W obszarach rolnych zanotowano obecność antybiotyków nawet w wodach gruntowych, choć w zdecydowanie mniejszych stężeniach [10,88].

Co dzieje się z antybiotykami podawanymi w takiej ilości ludziom i zwierzętom? Czy związki te ulegają w całości przemianom metabolicznym? Co dzieje się z antybiotykami dodawanymi bezpośrednio do wody, które jak łatwo się domyślić, nie są w 100% spożyte przez zwierzęta? Przyjęta przez człowieka lub zwierzę dawka antybiotyku w procesach metabolicznych ulega degradacji w przedziale od 10-90%. Pozostała ilość leku w postaci niezmienionej, czyli wciąż aktywnej, wydalana jest z odchodami. Stąd, jeśli pochodzi od ludzi, trafia do ścieków komunalnych lub do szpitalnych systemów ściekowych. Brak wiedzy na temat zagrożeń zanieczyszczenia środowiska antybiotykami jest także niestety przyczyną spłukiwania do kanalizacji niewykorzystanych lub też przeterminowanych preparatów, co dodatkowo zwiększa ich ilość w ściekach. W licznych badaniach wykazano, że większość stosowanych antybiotyków nie ulega całkowitej eliminacji podczas tlenowych i beztlenowych procesów biodegradacji stosowanych w oczyszczalniach ścieków. Część antybiotyków może być w nich także usuwana metodami fizyko-chemicznymi (sorpcja, filtracja na węglu aktywnym, metoda fotokatalityczna), które są jednak metodami kosztownymi, a ponadto w różnym stopniu skutecznymi wobec poszczególnych grup leków [62,73]. Niezdegradowane lub niewyeliminowane antybiotyki wraz z oczyszczonymi ściekami dostają się następnie do wód powierzchniowych zanieczyszczając je. Migracja z prądem powierzchniowych wód płynących sprawia, że rozprzestrzeniają się one w środowisku i bywa że przenoszone są w miejsca, wydawałoby się zupełnie pozbawione możliwości ich występowania. Pozostające w środowisku naturalnym antybiotyki mogą też ulegać biodegradacji, stając się dla niektórych drobnoustrojów źródłem składników odżywczych. Szybkość degradacji w środowisku zależy od różnych czynników, takich jak np. jego skład – zwłaszcza skład mikroflory, temperatura, wilgotność [25,66]. Antybiotyki syntetyczne i półsyntetyczne np. fluorochinolony, mniej podatne na procesy bakteryjnego rozkładu, są usuwane ze środowiska w mniejszym

stopniu i często po znacznie dłuższym okresie czasu (ci profloksacyna – po 3 miesiącach, a kwas oksolinowy po 5 miesiącach i to tylko w 20%) [85]. Ponadto trzeba pamiętać, że mimo zachodzących procesów degradacji, niektóre środowiska naturalne w sposób ciągły są zasilane zanieczyszczeniami zawierającymi antybiotyki (odpływy oczyszczonych ścieków poszpitalnych, z gospodarstw hodowlanych) co powoduje ich stałe utrzymywanie się i rozprzestrzenianie.

Jakie są biologiczne skutki obecności antybiotyków w środowisku? Z punktu widzenia ekologii środowiska, jeśli stężenie antybiotyków lokalnie osiąga stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów, np. w wyniku wspomnianej sorpcji w glebie, nagromadzenia w osadach – może dochodzić do zmiany w składzie mikroflory danego środowiska. W ten sposób zakłócona zostaje równowaga biologiczna danego ekosystemu, co prowadzi do zaburzeń w cyklach krążenia w przyrodzie wielu pierwiastków chemicznych, w tym biogennych. Zmienione lub zablokowane zostają np. procesy samooczyszczania wód czy gleb. Nagromadzenie materii organicznej na skutek zmiany dynamiki rozwoju poszczególnych grup mikroorganizmów może doprowadzić do deficytów tlenowych, powstawania warunków beztlenowych i gromadzenia szkodliwych gazów, które stają się dodatkowym czynnikiem limitującym w środowisku [50].

Niebezpieczeństwem jest także obecność antybiotyków w produktach i surowcach pochodzących z różnych zwierząt hodowlanych, spożywanych przez człowieka. Bezpośrednie zagrożenie polega na wywoływaniu reakcji alergicznych (np. penicylina), rakotwórczych (oksytetracyklina, furazolidon), nefropatii (gentamycyna) oraz negatywnym wpływie na naturalną mikroflorę jelita człowieka [26,66,76]. Przedstawiciele środowisk rolniczych protestujący przeciwko ograniczaniu stosowania antybiotyków w celach hodowlanych twierdzą, że do eliminacji antybiotyków z tkanek zwierzęcych wystarczy stosowanie zasad właściwej praktyki weterynaryjnej i hodowlanej (dawkowanie leków zgodnie ze wskazaniami, przestrzeganie okresów karencji po podaniu leku). Jednak obecny stan wiedzy na temat stopnia degradacji leków w tkankach, ale też bardzo częstego niestosowania się hodowców do prawnych regulacji o zastosowaniu antybiotyków, potwierdza słuszność dążeń do ograniczania ich użycia.

Spśród wszystkich negatywnych konsekwencji wywołanych obecnością antybiotyków, do najbardziej niepokojących i zarazem najintensywniej badanych w ostatnim dziesięcioleciu należy narastająca lekooporność mikroorganizmów. Według klasycznej teorii, obecne w środowisku wzrostu drobnoustrojów antybiotyki selekcionują odporne mutanty, noszące geny lekooporności, w tym także geny dotąd nieznane [52,53]. Długo uważano, że jedynym powodem wzrostu liczby lekoopornych szczepów jest istnienie takiej presji selekcyjnej. Okazało się jednak, że nawet bakterie, które nie były poddawane działaniu antybiotyków stawały się odporne. Z czasem stało się pewnym, że przyczyną tego jest istnienie horyzontalnego

transferu genów (HTG) między drobnoustrojami, który za pomocą mobilnych elementów genetycznych może zachodzić również między gatunkami niespokrewnionymi ze sobą [4,7,11,78]. Szybkie rozprzestrzenianie się genów lekooporności wśród chorobotwórczych szczepów bakterii przekłada się na wzrost częstości zachorowań i zgonów ludzi. Według danych Europejskiego Centrum Prewencji i Kontroli Zakażeń (ECDC) oraz Europejskiej Agencji Leków (EMA) z 2009 r., w Unii Europejskiej rocznie ponad 25 tysięcy ludzi umiera na skutek chorób wywołanych przez lekooporne szczepy bakterii [44]. W ostatnich latach pojawia się również coraz więcej doniesień na temat przenoszenia genów lekooporności przez HTG także wśród drobnoustrojów środowiskowych oraz komensalnych, co oczywiście stanowi poważny problem w szeroko pojętym zjawisku lekooporności [19,20,43,64].

Przedstawione dane sprawiły, że rozpoczęto monitorowanie ilości zużycia antybiotyków przez człowieka. Postępowanie takie w dalszej kolejności doprowadziło do wprowadzania w niektórych krajach zakazu stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu. Pierwszym takim europejskim krajem była Szwecja (1986 r.). Ważnym krokiem w ograniczeniu użycia antybiotyków było wprowadzenie przez Unię Europejską w 1998 r. zakazu stosowania jako ASW tych leków, które stosowano w lecznictwie ludzi. Od 2006 r., we wszystkich krajach członkowskich Unii Europejskiej, obowiązuje zakaz stosowania jakichkolwiek antybiotykowych stymulatorów wzrostu [1,66,76]. Niestety w wielu pozaeuropejskich krajach stymulacja wzrostu zwierząt hodowlanych antybiotykami oraz źle rozumiana i prowadzona profilaktyka chorób zakaźnych nadal są prowadzone w sposób niekontrolowany. W USA nadal dla uzyskania 1 kg mięsa lub jaj używa się 300 mg antybiotyków [1]. Spośród około 16 tys. ton wyprodukowanych rocznie w tym kraju antybiotyków tylko około 30% jest stosowanych w leczeniu ludzi i zwierząt. Aktywność środowisk zainteresowanych ograniczeniem ilości stosowania w tym kraju antybiotyków, powoli zaczyna przynosić rezultaty w postaci konkretnych propozycji rozwiązań i regulacji możliwości użycia antybiotyków w rolnictwie [5]. Podobnie brak jest kontroli wykorzystywania antybiotyków w rolnictwie np. w Rosji, w Chile czy w Chinach [49]. Co groźniejsze, istnieją państwa, np. Sudan, w których antybiotyki są dostępne w aptekach bez recepty i są stosowane w leczeniu ludzi, zwierząt i w rolnictwie w sposób nieograniczony i zupełnie niezrozumiały dla chorych czy właścicieli farm [32].

SUBINHIBICyjne STĘŻENIA ANTIBIOTYKÓW JAKO MODULATORY AKTYWNOŚCI WIELU GENÓW BAKTERYJNYCH

Od lat dyskutowana jest rola jaką pełnią antybiotyki, zwłaszcza te pochodzące od naturalnych producentów. Ze względu na ich antybakteryjne właściwości pierwszą nasuwającą się hipotezą była oczywiście ta o ich roli w konkurencji między mikroorganizmami. Niewiele jest jednak doniesień, które potwierdzałyby słuszność takiej hipotezy, zwłaszcza że w wodach, glebach, osadach (na terenach niedotkniętych opisaną w poprzednim rozdziale

działalnością człowieka) stężenia antybiotyków są wielokrotnie niższe od stężeń hamujących wzrost drobnoustrojów, znanych z zastosowań klinicznych [50,54,66]. Również te związki, które wprowadzono do środowiska sztucznie przez człowieka, ulegają częściowej degradacji czy rozcieńczeniu i finalnie obecne są w środowisku w stężeniach, które określamy subinhibitoryjnymi. Subterapeutyczne stężenia antybiotyków nie są charakterystyczne tylko dla środowisk naturalnych. Takie wartości stężeń osiągają niekiedy w tkankach związki antybakteryjne stosowane do eradykacji bakteryjnych patogenów ludzi czy zwierząt. Przyczyną powstawania w leczonym organizmie miejsc, w których preparat nie osiąga MIC (minimalnego stężenia hamującego) może być np. niewłaściwe jego stosowanie – nieodpowiednio dobrana dawka, zbyt krótki czas podawania, niezgodne z zaleceniami przerwy między przyjmowaniem kolejnych dawek. Zdarza się również, że tkankowoswoisty antybiotyk, w innych tkankach i narządach nie osiąga stężenia inhibitoryjnego [90].

Zgromadzona w ostatnich latach wiedza pozwala postawić tezę, że antybiotyki obecne w środowiskach naturalnych w stężeniach subinhibitoryjnych spełniają również funkcję ważnych cząsteczek sygnałowych, regulujących homeostazę w populacjach bakterii [27,54,65,92]. Przeprowadzone analizy transkryptomów dowiodły, że większość badanych antybiotyków w subinhibitoryjnych stężeniach moduluje poziom transkrypcji 5-10% genów bakteryjnych. Co więcej, zmiany te dotyczą genów związanych z różnymi procesami komórkowymi (metabolizmem węglowodanów, syntezą białek) oraz genów o nieznanej jak dotąd funkcji, a nie tylko genów związanych z docelowymi tarczami działania poszczególnych antybiotyków. W populacjach bakterii dochodzi do pojawiania się nowych fenotypów o charakterze adaptacyjnym [28,37,54,79].

Działanie subinhibitoryjnych stężeń antybiotyków nie zawsze zwiększa poziom transkrypcji określonych genów. W zależności od rodzaju badanego antybiotyku, dla jednych genów obserwowano bardzo silną indukcję syntezy mRNA (10-100-krotne nasilenie), natomiast dla wielu innych znaczące hamowanie procesu transkrypcji [15,57,63,65,77,84]. Tak więc, niezależnie od docelowego miejsca działania, niskie dawki antybiotyków wpływają przez zmianę transkrypcji określonych genów na indukowanie w komórkach drobnoustrojów różnych typów odpowiedzi na stresy środowiskowe.

Ze zrozumiałych względów wiele uwagi poświęcono w ostatnich latach na analizę zmian w ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji różnych chorobotwórczych bakterii, ekspozowanych na działanie subinhibitoryjnych stężeń antybiotyków. Zaobserwowano wielokrotnie, że stężenia takie powodowały nadekspresję tych genów. Wykazano np., że subterapeutyczne stężenia antybiotyków β -laktamowych nasilają ekspresję określonych genów w komórkach *Staphylococcus aureus*, co powoduje wytwarzanie przez bakterie grubszego biofilmu [47,81]. Podobne skutki zauważono po zastosowaniu subinhibitoryjnych da-

wek imipenemu w stosunku do *Pseudomonas aeruginosa* [8]. Ekspozycja szczepów *S. aureus* na subinhibicyjne stężenia ciprofloksacyny powodowała indukcję genów adhezyn wiążących fibronektynę [56], a niskie dawki klindamycyny czy tetracykliny zwiększały wytwarzanie gronkowcowych modulin - cytokin rozpuszczalnych w fenolu (PSMs) [45]. Nadekspresja genów kodujących czynniki wirulencji niesie za sobą poważne konsekwencje z klinicznego punktu widzenia, gdyż może być powodem wzmożonej zjadliwości drobnoustrojów i zwiększania ryzyka zachorowań, a nawet śmiertelności pacjentów.

Nie zawsze jednak subinhibicyjne stężenia antybiotyków wpływają na bakterie w sposób, który opisano wyżej. Grimwood i wsp. zauważyli np. hamowanie ekspresji genów egzoenzymów u *P. aeruginosa* [38], z kolei inny zespół [46] donosił, że niskie dawki azytromycyny hamują ekspresję enzymów szlaku biosyntezy laktonów N-acylohomoseryny w komórkach drobnoustrojów tego gatunku. W tym ostatnim przypadku obserwowano więc zahamowanie zjawiska quorum sensing.

Ze względu na wzrost zainteresowania obecnością antybiotyków w środowiskach naturalnych i ich wpływem na szerzenie się zjawiska lekooporności, w ostatnich latach badaniom działania subinhibicyjnych stężeń antybiotyków poddano także szczepy środowiskowe. W badaniach tych również zauważono, że szczepy *P. aeruginosa* izolowane ze ścieków, po ekspozycji na subinhibicyjne dawki erytromycyny, roksitromycyny ale też sulfametoksazolu wytwarzały intensywniej biofilm [16]. Udowodniono, że opisane wyżej zmiany są skutkiem indukowania w komórkach drobnoustrojów różnych typów odpowiedzi na stresy środowiskowe, takich jak indukcja regulonów RpoS czy SOS [39,54]. Indukcja regulonu RpoS wpływa na powstawanie ogólnej odpowiedzi na stres. Ten rodzaj odpowiedzi wywołuje w komórce skutki inne niż odpowiedź specyficzna. W odpowiedzi specyficznej komórka bakteryjna włącza system naprawy uszkodzenia wywołanego działaniem określonego czynnika stresującego. W odpowiedzi ogólnej bakterie zyskują szerszy zakres oporności, co pozwala im w przyszłości unikać uszkodzeń, a nie eliminować powstałe. W wywoływaniu ogólnej odpowiedzi na stres pośredniczy podjednostka δ^S (białko RpoS, δ^{38}) polimerazy RNA. Podjednostka ta jest jedną z kilku podjednostek δ bakteryjnej polimerazy RNA i pierwotnie uważano, że przez rozpoznawanie promotorów genów fazy stacjonarnej kontroluje ich transkrypcję. Obecnie wiadomo, że regulon RpoS w warunkach stresu odpowiada za transkrypcję znacznie większej puli genów, nie tylko związanych z fazą stacjonarną. W komórkach *Escherichia coli* jest to związane m.in. z możliwością zastępowania, we wspomnianych warunkach, podstawowej jednostki δ^{70} (odpowiedzialnej np. za rozpoznawanie promotorów genów metabolizmu podstawowego) właśnie przez podjednostkę δ^S . Powoduje to transkrybowanie wielu genów kontrolowanych przez δ^S i umożliwia komórkom osiągnięcie zmian dotyczących kształtu, zmian w przebiegu szlaków metabolicznych, ale też wytwarzania czynników wirulencji.

Wszystkie te zmiany są wyrazem adaptacji do nowych, niekorzystnych warunków [21,39,42]. Badania ostatnich lat wykazały, że również subinhibicyjne stężenia różnych klas antybiotyków (β -laktamów, aminoglikozydów) oraz fluorochinolonów wpływają na wywoływanie ogólnej odpowiedzi na stres, w której pośredniczy podjednostka δ^S . W komórkach traktowanych antybiotykami w takich stężeniach obserwowano wzmożoną indukcję regulonu RpoS [39,54].

Bakteryjny system SOS jest systemem odpowiedzi komórek na zagrażające życiu uszkodzenia DNA (działanie UV, mitomycyna C oraz fluorochinolonów). Jest to regulon zbudowany z ponad 42 genów [40], odpowiedzialny za hamowanie replikacji chromosomu i podziałów komórkowych, naprawę DNA i rekonstrukcję widełek replikacyjnych. W warunkach fizjologicznego wzrostu geny tego regulonu znajdują się pod kontrolą białka represorowego LexA. Jednoniciowe regiony DNA pojawiające się w miejscach uszkodzeń są sygnałem dla białek sensorowych RecBCD lub RecFOR, które prezentują uszkodzenia białku RecA. Białko RecA ulega aktywacji i stymuluje autokatalizę białkowego represora LexA. Następuje derepresja genów regulonu SOS związanych z naprawą DNA, w tym genów kodujących naprawcze polimerazy DNA: II, IV i V, które są odpowiedzialne za wprowadzanie mutacji w DNA i pojawianie się adaptacyjnych fenotypów [6,23,58]. Narasta przekonanie, że również inne niż bezpośrednie uszkodzenia DNA, stresy, czynniki egzogenne i endogenne mogą pośrednio aktywować regulon SOS. Pierwszym przykładem endogennej, pośredniej indukcji tego systemu było wykazanie wpływu deficytu ATP w komórce, będącego wynikiem zahamowania ekspresji genu *cya* w głodzonych komórkach *E. coli* [82]. Donoszono również o indukcji regulonu SOS w warunkach szoku cieplnego [55]. Niezwykle interesującym fenomenem, nie do końca wyjaśnionym, jest indukcja systemu SOS *E. coli* w warunkach wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. Za indukcję regulonu SOS jest odpowiedzialna także endonukleaza Mrr, która generuje podwójne pęknięcia nici DNA [2]. Prawdopodobnie inna endonukleaza - TraI - wywołuje indukcję systemu SOS w głodzonych komórkach szczepów F', generując podwójne nacięcia nici w rejonie operonu *tra* plazmidu F, zintegrowanego z chromosomem *E. coli* [80]. Przypuszczalnie tym można tłumaczyć wcześniej opisane przez Cairnsa i wsp. mutacje adaptacyjne (rewertanty *lac⁻/lac⁺*), pojawiające się w niedzielających się komórkach *E. coli*, noszących w chromosomie zintegrowany plazmid F i zmutowany gen kodujący β -galaktozydazę [18].

Wykazano, że indukować system SOS może także wiele antybiotyków w stężeniach subinhibicyjnych. Bardzo dobrym przykładem tego zjawiska jest wpływ antybiotyków w takich stężeniach na indukcję syntezy toksyn Shiga w komórkach *E. coli*. Wspomniane toksyny są groźnym czynnikiem wirulencji enterokrwotocznych szczepów *E. coli* (EHEC). Uwolnienie toksyny z komórek bakteryjnych wywołuje groźne dla ludzi skutki, takie jak krwawe biegunki, które niestety, ze względu na powikłania, doprowadzają nawet do zgonu. Wykazano, że geny toksyn Shiga

(geny *stx*) są umiejscowione w materiale genetycznym profagów zintegrowanych z genomem bakteryjnym w cyklu lizogennym. Indukcja odpowiedzi SOS będąca reakcją na stres związany z działaniem na komórkę bakterii leków, takich jak: mitomycyna C, ciprofloksacyna, trimetoprim-sulfametoksazol czy norfloksacyna powoduje uruchomienie cyklu litycznego bakteriofaga i derepresję genów toksyn Shiga, a w konsekwencji wydzielanie ich z komórek bakterii [13,60,61].

Inny ważny system obrony odkryto w komórkach *E. coli* i *Klebsiella pneumoniae*, chroni on drobnoustroje przed działaniem antybiotyków β -laktamowych. W tym przypadku, bakterie wykorzystują do indukcji systemu SOS dwuskładnikowy system transdukcji sygnałów komórkowych DpiBA, w odpowiedzi na działanie β -laktamów. Prowadzi to do przejściowego zahamowania wzrostu bakterii, a w konsekwencji pozwala komórkom na przeżycie letalnych stężeń β -laktamów, bowiem antybiotyki te wykazują aktywność bójczą jedynie w stosunku do komórek będących w fazie podziałów komórkowych [3,54,69]. System DpiBA jest zbudowany z operonu *dpiBdpiA*, w którym efektorowe białko DpiA nie tylko reguluje transkrypcję własnego operonu, ale także ma zdolność wiązania się z sekwencją bogatą w pary AT w regionie inicjacji replikacji chromosomu *oriC*. Antybiotyki β -laktamowe indukują ekspresję białek DpiB i DpiA, co prowadzi do kompetycji w wiązaniu się białek DpiA i DnaA z regionem *oriC*. Wynikiem tego jest hamowanie replikacji chromosomu, indukcja systemu SOS, w tym genu *sfiA*, co zapobiega polimeryzacji białka FtsZ i formowaniu przegrody komórkowej, a w następstwie powoduje przejściowe zahamowanie wzrostu komórek [69,74]. Zablockowanie indukcji systemu SOS przez mutację genów *dpiA*, *recA* lub *sfiA* bardzo znacząco zwiększa wrażliwość komórek bakterii na działanie antybiotyków β -laktamowych, co otwiera możliwości opracowania nowych, specyficznych preparatów o wzmożonej skuteczności terapeutycznej. Opisany sposób indukcji odpowiedzi SOS jest więc, w odróżnieniu od indukcji wywoływanej działaniem fluorochinolonów, niezależny od bezpośrednich uszkodzeń DNA.

Przez lata uważano, że populacja bakterii reaguje na obecność antybiotyków selekcją preegzystujących mutantów, które w dalszej kolejności rozprzestrzeniają się w środowisku. Z czasem stało się jednak pewnym, że bakterie w sposób czynny uaktywniają mechanizmy mutagenyzy, zwłaszcza w warunkach stresowych, co pozwala im zyskać nowe przystosowanie. Indukcja systemu SOS przez subinhibicyjne stężenia antybiotyków niewątpliwie wzmacnia częstość mutacji genomu oraz horyzontalny transfer mobilnych elementów genetycznych [14,22]. Na przykładzie wielu drobnoustrojów wykazano silne, mutagenne działanie fluorochinolonów (np. ciprofloksacyna, kwas nalidyksowy), stosowanych w subinhibicyjnych dawkach. Użycie ciprofloksacyny pięciokrotnie zwiększało częstość pojawiania się mutantów *S. aureus* [70], opornych na rifampicynę mutantów *Streptococcus pneumoniae* [41] i opornych na karbapenemy mutantów *P. aeruginosa* [83]. Zastosowanie ciprofloksacyny we wspomnianych dawkach wywoływało podobne efekty w komórkach *Mycobacterium*

fortuitum, w których tempo mutacji rosło nawet 120-krotnie [35]. Zwiększenie częstości występowania mutantów w populacji bakterii obserwowano również po działaniu aminoglikozydów, jednak nie był to aż tak znaczący wzrost jak w przypadku działania fluorochinolonów czy opisywanych wcześniej β -laktamów [48].

Istnieją również dowody na silną stymulację przekazywania ruchomych elementów genetycznych w procesach horyzontalnego transferu genów, w komórkach traktowanych subinhibicyjnymi dawkami antybiotyków. Elementy, takie jak integrony czy transpozony zawierają geny oporności na antybiotyki. Zwiększenie częstości ich przekazywania, spowodowane indukcją odpowiedzi SOS, prowadzi do szerzenia się lekooporności. Zaobserwowano np., że integracyjne elementy koniugacyjne (ICEs) *Vibrio cholerae* zawierające geny oporności na streptomycynę, trimetoprim, chloramfenikol oraz sulfametoksazol ulegały przenoszeniu i insercjom ze znacznie zwiększoną częstością po uprzedniej hodowli w subinhibicyjnych dawkach ciprofloksacyny oraz mitomycyny C [11]. Fluorochinolony indukowały również transfer wyspy patogenności u *S. aureus* [86]. Antybiotyki z tej samej grupy okazały się również stymulatorami wewnątrzchromosomalnej rekombinacji w komórkach *E. coli* [59].

PODSUMOWANIE

Przedstawione dane skłaniają do zwrócenia uwagi na problem niewątpliwie nadmiernego stosowania antybiotyków oraz pojawiania się ich w różnych środowiskach w tzw. stężeniach subinhibicyjnych. Opisana wyżej skala bardzo często nieuzasadnionego stosowania antybiotyków sprawia, że rozprzestrzenianie się lekooporności wśród drobnoustrojów stało się obecnie problemem globalnym, a leki, które miały być naszym niezawodnym narzędziem walki z nimi, są w wielu przypadkach bezużyteczne. Ostatnie lata wywoływały dyskusję o tym jakie zmiany powodują w drobnoustrojach antybiotyki, które nie osiągają bójczych, ale subinhibicyjne stężenia. Publikowane doniesienia dowodzą, że antybiotyki w takich warunkach mogą, jako związki sygnałowe, modyfikować ekspresję bardzo wielu genów, niekoniecznie związanych z docelową funkcją antybiotyków. Dochodzi do pojawiania się wśród drobnoustrojów nowych fenotypów o znaczeniu adaptacyjnym, opornych na działanie różnych czynników, w tym lekoopornych. W komórkach bakterii pod wpływem subinhibicyjnych stężeń antybiotyków wzrasta częstość mutacji, ale też dochodzi do intensyfikacji przenoszenia genów między komórkami w wyniku horyzontalnego transferu, co powoduje rozprzestrzenianie się genów lekooporności. Narastająca na ten temat wiedza zwraca uwagę na konieczność ograniczenia ilości niewłaściwego i bezzasadnego stosowania antybiotyków, ale przede wszystkim stałego monitorowania ich źródeł w różnych środowiskach. Istnieją wciąż kraje, w których brak jest danych o wielkości zużycia antybiotyków lub dane takie pochodzące z różnych źródeł bywają tak rozbieżne, że stają się niewiarygodne. Wciąż spotyka się informacje o braku przestrzegania regulacji prawnych czy

nielegalnym handlu antybiotykami. Największym problemem wydaje się jednak brak świadomości o zagrożeniach płynących z zanieczyszczania środowisk antybiotykami oraz o nieodwracalnych zmianach w populacjach bakterii środowiskowych i klinicznych, wywoływanych podprogowymi dawkami tych preparatów. Stąd konieczne jest

prowadzenie w najbliższej przyszłości dalszych, pogłębionych badań nad działaniem subinhibicyjnych stężeń antybiotyków, ale także zaplanowanie i wprowadzenie na szeroką skalę właściwej edukacji społeczeństwa na temat postępowania z antybiotykami, ograniczania ich zużycia i właściwej ich utylizacji.

PIŚMIENICTWO

- [1] Aarestrup F.M.: Sustainable farming: get pigs of antibiotics. *Nature*, 2012; 486: 465-466
- [2] Aertsen A., Michiels C.W.: Mrr instigates the SOS response after high pressure stress in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 2005; 58: 1381-1391
- [3] Aertsen A., Michiels C.W.: Upstream of the SOS response: figure out the trigger. *Trends Microbiol.*, 2006; 14: 421-423
- [4] Allen H.K., Donato J., Wang H.H., Cloud-Hansen K.A., Davies J., Handelsman J.: Call of the wild antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010; 8: 251-259
- [5] Allen H.K., Levine U.Y., Looft T., Bandrick M., Casey T.A.: Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends Microbiol.*, 2013; 21: 114-119
- [6] Amundsen S.K., Taylor A.F., Smith G.R.: The RecD subunit of the *Escherichia coli* RecBCD enzyme inhibits RecA loading, homologous recombination, and DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 7399-7404
- [7] Andersson D.J., Hughes D.: Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010; 8: 260-271
- [8] Bagge N., Schuster M., Hentzer M., Ciofu O., Givskov M., Greenberg E.P., Høiby N.: *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004; 48: 1175-1187
- [9] Baltz R.H.: Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2008; 8: 557-563
- [10] Bartelt-Hunt S., Snow D.D., Damon-Powell T., Miesbach D.: Occurrence of steroid hormones and antibiotics in shallow groundwater impacted by livestock waste control facilities. *J. Contam. Hydrol.*, 2011; 123: 94-103
- [11] Beaber J.W., Hochhut B., Waldor M.K.: SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 2004; 427: 72-74
- [12] Berdy J.: Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.*, 2005; 58: 1-26
- [13] Bielaszewska M., Idelevich E.A., Zhang W., Bauwens A., Schauburg F., Mellmann A., Peters G., Karch H.: Effects of antibiotics on Shiga toxin 2 production and bacteriophage induction by epidemic *Escherichia coli* O104:H4 strain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012; 56: 3277-3282
- [14] Blázquez J., Couce A., Rodríguez-Beltrán J., Rodríguez-Rojas A.: Antimicrobials as promoters of genetic variation. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2012; 15: 561-569
- [15] Brazas M.D., Hancock R.E.: Using microarray gene signatures to elucidate mechanisms of antibiotic action and resistance. *Drug Discov. Today*, 2005; 10: 1245-1252
- [16] Bruchmann J., Kirchen S., Schwartz T.: Sub-inhibitory concentrations of antibiotics and wastewater influencing biofilm formation and gene expression of multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* wastewater isolates. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2013; 20: 3539-3549
- [17] Cabello F.C., Godfrey H.P., Tomova A., Ivanova L., Dölz H., Millan A., Buschmann A.H.: Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ. Microbiol.*, 2013; 15: 1917-1942
- [18] Cairns J., Foster P.L. Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. *Genetics*, 1991; 128: 695-701
- [19] Canton R.: Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2009; 15, Suppl.1: 20-25
- [20] Cattoir V., Poirel L., Aubert C., Soussy C.J.: Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg. Infect. Dis.*, 2008; 14: 231-237
- [21] Chiang S.M., Schellhorn H.E.: Evolution of the RpoS regulon: origin of RpoS and the conservation of RpoS-dependent regulation in bacteria. *J. Mol. Evol.*, 2010; 70: 557-571
- [22] Couce A., Blázquez J.: Side effects of antibiotics on genetic variability. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2009; 33: 531-538
- [23] Courcelle J., Khodursky A., Peter B., Brown P.O., Hanawalt P.C.: Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*, 2001; 158: 41-64
- [24] Cromwell G.L.: Why and how antibiotics are used in swine production. *Anim. Biotechnol.*, 2002; 13: 7-27
- [25] Dantas G., Sommer M.O., Oluwasegun R.D., Church G.M.: Bacteria subsisting on antibiotics. *Science*, 2008; 320: 100-103
- [26] Darwish W.S., Eldaly E.A., El-Abbasy M.T., Ikenaka Y., Nakayama S., Ishizuka M.: Antibiotic residues in food: the African scenario. *Jpn. J. Vet. Res.*, 2013; 61, Suppl.: S13-S22
- [27] Davies J.: Small molecules: the lexicon of biodiversity. *J. Biotechnol.*, 2007; 129: 3-5
- [28] Davies J., Ryan K.S.: Introducing the parvome: bioactive compounds in the microbial word. *ACS Chem. Biol.*, 2012; 7: 252-259
- [29] Davies J., Spiegelman G.B., Yim G.: The world of subinhibitory concentrations. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2006; 9: 445-453
- [30] D'Costa V.M., McGrann K.M., Hughes D.W., Wright G.D.: Sampling the antibiotic resistome. *Science*, 2006; 311: 374-377
- [31] Dibner J.J., Richards J.D.: Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Sci.*, 2005; 84: 634-643
- [32] Eltayb A., Barakat S., Marrone G., Shaddad S., Stålsby Lundborg C.: Antibiotic use and resistance in animal farming: a quantitative and qualitative study on knowledge and practices among farmers in Khartoum, Sudan. *Zoonoses Public Health*, 2012; 59: 330-338
- [33] Galan J.C., González-Candelas F., Rolán J.M., Cantón R.: Antibiotics as selectors and accelerators of diversity in the mechanisms of resistance: from the resistome to genetic plasticity in the β -lactamases world. *Front. Microbiol.*, 2013; 4: 9
- [34] Gebreyohannes G., Moges F., Sahile S., Raja N., Reetha D.: Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2013; 3: 426-435

- [35] Gillespie S.H., Basu S., Dickens A.L., O'Sullivan D.M., McHugh T.D.: Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* mutation rates. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2005; 56: 344-348
- [36] Gillings M.R.: Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome, and microbial pangenome. *Front. Microbiol.*, 2013; 4: 4
- [37] Goh E.B., Yim G., Tsui W., McClure J., Surette M.G., Davies J.: Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 17025-17030
- [38] Grimwood K., To M., Rabin H.R., Woods D.E.: Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme expression by subinhibitory antibiotic concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1989; 33: 41-47
- [39] Gutierrez A., Laureti L., Crussard S., Abida H., Rodriguez-Rojas A., Blazquez J., Baharoglu Z., Mazel D., Darfeuille F., Vogel J., Matic I.: β -lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity. *Nat. Commun.*, 2013; 4: 1610
- [40] Hastings P.J., Rosenberg S.M., Slack A.: Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.*, 2004; 12: 401-404
- [41] Henderson-Begg S.K., Livermore D.M., Hall L.M.: Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on mutation frequency in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006; 57: 849-854
- [42] Hengge-Aronis R.: Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the δ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2002; 66: 373-395
- [43] Hoiby N.: Ecological antibiotic policy. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2000; 46, Suppl. A: 59-62
- [44] Hryniewicz W.: Antybiotykooporność – co musimy zrobić dziś? *Pol. Merkuriusz Lek.*, 2011; 30: 305-309
- [45] Joo H.S., Chan J.L., Cheung G.Y., Otto M.: Subinhibitory concentrations of protein synthesis-inhibiting antibiotics promote increased expression of the agr virulence regulator and production of phenol-soluble modulins in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010; 54: 4942-4944
- [46] Kai T., Tateda K., Kimura S., Ishii Y., Ito H., Yoshida H., Kimura T., Yamaguchi K.: A low concentration of azithromycin inhibits the mRNA expression of N-acyl homoserine lactone synthesis enzymes, upstream of lasI or rhlI, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Pulm. Pharmacol Ther.*, 2009; 22: 483-486
- [47] Kaplan J.B., Izano E.A., Gopal P., Karwacki M.T., Kim S., Bose J.L., Bayles K.W., Horswill A.R.: Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *mBio.*, 2012; 3: e00198-e00212
- [48] Kohanski M.A., DePristo M.A., Collins J.J.: Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol. Cell.*, 2010; 37: 311-320
- [49] Kümmerer K.: Significance of antibiotics in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2003; 52: 5-7
- [50] Kümmerer K.: Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2004; 54: 311-320
- [51] Kwon J.W.: Mobility of veterinary drugs in soil with application of manure compost. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2011; 87: 40-44
- [52] Labella A., Gennari M., Ghidini V., Trento I., Manfrin A., Borrego J.J., Lleo M.M.: High incidence of antibiotic multi-resistant bacteria in coastal areas dedicated to fish farming. *Mar. Pollut. Bull.*, 2013; 70: 197-203
- [53] Laganà P., Caruso G., Minutoli E., Zacccone R., Santi D.: Susceptibility to antibiotics of *Vibrio* spp. and *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* strains isolated from Italian aquaculture farms. *New. Microbiol.*, 2011; 34: 53-63
- [54] Laureti L., Matic I., Gutierrez A.: Bacterial responses and genome instability induced by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Antibiotics*, 2013; 2: 100-114
- [55] Layton J.C., Foster P.L.: Error-prone DNA polymerase IV is regulated by the heat shock chaperone GroE in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 2005; 187: 449-457
- [56] Li D., Renzoni A., Estoppey T., Bisognano C., Francois P., Kelley W.L., Lew D.P., Schrenzel J., Vaudaux P.: Induction of fibronectin adhesins in quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* by subinhibitory levels of ciprofloxacin or by sigma B transcription factor activity is mediated by two separate pathways. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005; 49: 916-924
- [57] Linares J.F., Gustafsson I., Baquero F., Martinez J.L.: Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 19484-19489
- [58] Long J.E., Renzette N., Centore R.C., Sandler S.J.: Differential requirements of two *recA* mutants for constitutive SOS expression in *Escherichia coli* K-12. *PLoS One*, 2008; 3: e4100
- [59] López E., Blázquez J.: Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on intrachromosomal homologous recombination in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2009; 53: 3411-3415
- [60] Łoś J.M., Łoś M., Węgrzyn A., Węgrzyn G.: Altruism of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: recent hypothesis versus experimental results. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 2013; 2: 166
- [61] Łoś J.M., Węgrzyn G.: Enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* (EHEC) i bakteriofagi kodujące toksyny Shiga. *Post. Microbiol.*, 2011; 50: 175-190
- [62] Makowski A., Sobczak A., Wcisło D., Adamek E., Baran W., Nocoń W.: Fotokatalityczna degradacja ampicyliny w roztworach wodnych. *Proceedings of ECOpole*, 2009; 3: 81-86
- [63] Marr A.K., Overhage J., Bains M., Hancock R.E.: The Lon protease of *Pseudomonas aeruginosa* is induced by aminoglycosides and is involved in biofilm formation and motility. *Microbiology*, 2007; 153: 474-482
- [64] Marshall B.M., Ochieng D.J., Levy S.B.: Commensals: underappreciated reservoir of antibiotic resistance. *Microbe*, 2009; 4: 231-238
- [65] Martinez J.L.: Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, 2008; 321: 365-367
- [66] Martinez J.L.: Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.*, 2009; 157: 2893-2902
- [67] Mathew A.G., Cissell R., Liamthong S.: Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathog. Dis.*, 2007; 4: 115-133
- [68] McManus P.S., Stockwell V.O., Sundin G.W., Jones A.L.: Antibiotic use in plant agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2002; 40: 443-465
- [69] Miller C., Thomsen L.E., Gaggero C., Mosseri R., Ingmer H., Cohen S.N.: SOS response induction by β -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*, 2004; 305: 1629-1631
- [70] Nagel M., Reuter T., Jansen A., Szekat C., Bierbaum G.: Influence of ciprofloxacin and vancomycin on mutation rate and transposition of IS256 in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2011; 301: 229-236
- [71] Nikaido H.: Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, 2009; 78: 119-146
- [72] Pelaez F.: The historical delivery of antibiotics from microbial natural products – can history repeat? *Biochem. Pharmacol.*, 2006; 71: 981-990
- [73] Pereira J.H., Reis A.C., Queirós D., Nunes O.C., Borges M.T., Vilar V.J., Boaventura R.A.: Insights into solar TiO₂-assisted photocatalytic oxidation of two antibiotics employed in aquatic animal

production, oxolinic acid and oxytetracycline. *Sci. Total Environ.*, 2013; 463-464: 274-283

[74] Pérez-Capilla T., Baquero M.R., Gómez-Gómez J.M., Ionel A., Martín S., Blázquez J.: SOS-independent induction of *dinB* transcription by β -lactam-mediated inhibition of cell wall synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 2005; 187: 1515-1518

[75] Procópio R.E., Silva I.R., Martins M.K., Azevedo J.L., Araújo J.M.: Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz. J. Infect. Dis.*, 2012; 16: 466-471

[76] Przeniosło-Siwczyńska M., Kwiatek K.: Dlaczego zakazano stosowania w żywieniu zwierząt antybiotykowych stymulatorów wzrostu? *Życie Wet.*, 2013; 8: 104-108

[77] Rogers P.D., Liu T.T., Barker K.S., Hilliard G.M., English B.K., Thornton J., Swiatlo E., McDaniel L.S.: Gene expression profiling of the response of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007; 59: 616-626

[78] Schmieder R., Edwards R.: Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiol.*, 2012; 7: 73-89

[79] Shaw K.J., Miller N., Liu X., Lerner D., Wan J., Bittner A., Morrow B.J.: Comparison of the changes in global gene expression of *Escherichia coli* induced by four bactericidal agents. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2003; 5: 105-122

[80] Slack A., Thornton P.C., Magner D.B., Rosenberg S.M., Hastings P.J.: On the mechanism of gene amplification induced under stress in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.*, 2006; 2: e48

[81] Subrt N., Mesak L.R., Davies J.: Modulation of virulence gene expression by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2011; 66: 979-984

[82] Taddei F., Matic I., Radman M.: cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 11736-11740

[83] Tanimoto K., Tomita H., Fujimoto S., Okuzumi K., Ike Y.: Fluoroquinolone enhances the mutation frequency for meropenem-selected carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, but use of the high-potency drug doripenem inhibits mutant formation. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2008; 52: 3795-3800

[84] Tsui W.H., Yim G., Wang H.H., McClure J.E., Surette M.G., Davies J.: Dual effects of MLS antibiotics: transcriptional modulation and interactions on the ribosome. *Chem. Biol.*, 2004; 11: 1307-1316

[85] Turiel E., Bordin G., Rodríguez A.R.: Study of the evolution and degradation products of ciprofloxacin and oxolinic acid in river water samples by HPLC-UV/MS/MS-MS. *J. Environ. Monit.*, 2005; 7: 189-195

[86] Ubeda C., Maiques E., Knecht E., Lasa I., Novick R.P., Penadés J.R.: Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Mol. Microbiol.*, 2005; 56: 836-844

[87] Valli S., Suvathi S.S., Aysha O., Nirmala P., Vinoth K.P., Reena A.: Antimicrobial potential of *Actinomyces* species isolated from marine environment. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2012; 2: 469-473

[88] Vázquez M.M., Vázquez P.P., Galera M.M., García M.D.: Determination of eight fluoroquinolones in groundwater samples with ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction prior to high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta*, 2012; 748: 20-27

[89] Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F., van Sinderen D.: Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2007; 71: 495-548

[90] Wang P., Zhang X., Wang L., Zhen Z., Tang M., Li J.: Subinhibitory concentrations of ciprofloxacin induce SOS response and mutations of antibiotic resistance in bacteria. *Ann. Microbiol.*, 2010; 60: 511-517

[91] Yim G., Wang H.H., Davies J.: The truth about antibiotics. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2006; 296: 163-170

[92] Yim G., Wang H.H., Davies J.: Antibiotics as signalling molecules. *Philos. Trans. R. Soc. B.*, 2007; 362: 1195-1200

[93] Zhuang X., Gao J., Ma A., Fu S., Zhuang G.: Bioactive molecules in soil ecosystems: masters of the underground. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013; 14: 8841-8868

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.