

WYSTĘPOWANIE ZJAWISKA KOSELEKCJI W ŚRODOWISKACH POZAKLINICZNYCH

Agata Goryluk-Salmonowicz⁺¹, Magdalena Popowska²¹Katedra Biochemii i Mikrobiologii, Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie²Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w sierpniu, zaakceptowano w listopadzie 2019 r.

Streszczenie: Szczepy bakterii wieloopornych to obecnie największy problem zdrowotny na świecie. Liczne światowe organizacje zajmujące się zdrowiem publicznym apelują o konieczności ograniczenia rozprzestrzeniania się antybiotykooporności z wszelkich możliwych źródeł. Z danych literaturowych wiadomo, że takimi środowiskami źródłowymi mogą być obszary użytkowane rolniczo, gdzie powszechnie stosowano antybiotyki i sole metali ciężkich do promocji wzrostu roślin i zwierząt. Dodatkowo, wśród źródeł izolacji bakterii wieloopornych znalazły się również naturalne zbiorniki wodne, czy gleby nie użytkowane rolniczo. W ostatnich latach, bakterie odporne na antybiotyki i jednocześnie metale ciężkie, zaczęto pozyskiwać z gleb zanieczyszczonych metalami oraz z roślin zasiedlających takie gleby. Wydaje się zatem, że metale ciężkie, stanowiące zanieczyszczenie środowiska, mogą być czynnikiem selekcyjnym promującym rozprzestrzenianie się oporności na antybiotyki. Zjawisko koselekcji bakteryjnych genów oporności dotyczy najczęściej braku wrażliwości bakterii na antybiotyki oraz metale ciężkie. O zjawisku koselekcji mówimy, gdy różne geny warunkujące oporność na różne czynniki stresowe występują na tym samym ruchomym elemencie genetycznym lub, gdy te same geny warunkują oporność na różne czynniki stresowe. Niniejszy artykuł przedstawia aktualny stan wiedzy na temat tego zjawiska obserwowanego u bakterii izolowanych ze środowisk pozaklinicznych.

1. Wprowadzenie. 2. Mechanizmy koselekcji. 2.1. Mechanizm oporności krzyżowej. 2.2. Współoporność. 2.3. Współregulacja. 3. Czynniki promujące rozprzestrzenianie się zjawiska koselekcji. 4. Występowanie zjawiska koselekcji w środowiskach pozaklinicznych. 4.1. Obszary użytkowane rolniczo. 4.2. Tereny nieużytkowane rolniczo. 4.3. Naturalne zbiorniki wodne. 4.4 Endosfera roślinna. 5. Współwystępowanie genów oporności w różnych genomach środowiskowych. 6. Podsumowanie

OCCURRENCE OF THE CO-SELECTION PHENOMENON IN NON-CLINICAL ENVIRONMENTS

Abstract: Multi-resistant bacterial strains currently present the main health problem worldwide. Numerous public health organizations call for the prevention, and control the spread, of antibiotic resistance from any sources. From the literature data, it is well known that agricultural areas are a source of antibiotic resistance because of the use of antibiotics and heavy metals to promote plant and animal growth. Moreover, natural water reservoirs and soil not used for agriculture are also sources of multi-drug resistant bacteria. In recent years bacteria resistant to antibiotics and heavy metals have been isolated from heavy-metal contaminated soils and from metallophytes. Therefore, it seems that heavy metals, an environmental pollutant, may also be a selection factor that promotes the spread of antibiotic resistance. The co-selection phenomenon of resistant genes is most often connected with the lack of bacterial susceptibility to antibiotics and heavy metals. Co-selection occurs when different resistant genes that enable resistance to different stress conditions are located on the same mobile genetic elements, or when the same genes determine resistance to different stress conditions. This article presents the current state of knowledge about the co-selection phenomenon observed in bacteria isolated from nonclinical environments.

1. Introduction. 2. Co-selection mechanisms. 2.1. Cross-resistance. 2.2. Co-resistance. 2.3. Co-regulation. 3. Factors promoting spread of co-selection. 4. Occurrence of co-selection in non-clinical environments. 4.1. Areas used for agriculture. 4.2. Areas not used agriculturally. 4.3. Natural water reservoirs. 4.4. Plant endosphere. 5. Co-occurrence of resistant genes in different environmental genomes. 6. Summary

Słowa kluczowe: endofity, koselekcja, metalofity, oporność na antybiotyki**Key words:** endophytes, co-selection, metallophytes, antibiotic resistance

1. Wprowadzenie

Od wielu lat, na całym świecie obserwowany jest bardzo intensywny rozwój gospodarki, w tym sektora przemysłowego i rolniczego. Wraz z postępującym rozwojem dochodzi jednak do zanieczyszczenia środowisk takich jak gleba, wody gruntowe i powierzchniowe oraz powietrze. Generowane odpady i ścieki charakteryzują się wysoką zawartością metali ciężkich. Wśród najbardziej istotnych źródeł zanieczyszczenia środowiska

wymienia się: przemysł metalurgiczny i chemiczny, składowanie odpadów, stosowanie nawozów sztucznych i osadów ściekowych w rolnictwie, a także rozwój transportu [72]. Liczne badania wskazały, iż skażenie środowiska metalami ciężkimi istotnie wpływa na rozprzestrzenianie się zjawiska antybiotykooporności [4, 6, 90]. Jest to szczególnie ważne, biorąc pod uwagę, że antropogeniczne skażenia metalami ciężkimi jest obecnie kilkukrotnie wyższy niż poziom antybiotyków w środowisku. Metale ciężkie nie ulegają rozkładowi,

* Autor korespondencyjny: dr Agata Goryluk-Salmonowicz, Katedra Biochemii i Mikrobiologii, Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: agata_goryluk_salmonowicz@sggw.pl

przez co wywierają długotrwałą presję selekcyjną, a tym samym przyczyniają się do nabywania i rozprzestrzeniania wśród mikroorganizmów mechanizmów oporności na metale ciężkie występujące w wysokich stężeniach [4, 93]. Najczęściej izolowanymi i opisywanymi w literaturze naukowej drobnoustrojami opornymi na metale ciężkie i antybiotyki, są bakterie zasiedlające glebę [19]. Rozpoczęcie badań metagenomicznych ujawniło, że pula znanych genów niosących oporność na antybiotyki, stanowi znikomy procent w stosunku do genów antybiotykooporności znajdujących się w glebie [2]. Zbiór wszystkich genów oporności na antybiotyki występujących w danym środowisku nazwano rezystomem (resistome) [21, 101]. W skład rezystomu mogą wchodzić zarówno geny występujące w genomach bakterii patogennych, niepatogennych, jak i prekursorów genów oporności czy geny kryptyczne. W roku 2009 opracowano bazę danych zawierającą sekwencje genów oporności na antybiotyki, w której zdeponowano 20 000 genów [50].

Intensywnie prowadzone od ponad 20 lat badania genetycznych determinant oporności na metale ciężkie ujawniły pewną zależność. Geny oporności na metale ciężkie, wykrywane u mikroorganizmów środowiskowych, bardzo często występują razem z genami antybiotykooporności i lokalizowane są na tych samych mobilnych elementach genetycznych (MGE, Mobile genetic elements). Zjawisko to nazwano koselekcją genów [4]. Zjawisko koselekcji zaobserwowano również u bakterii patogennych izolowanych od ludzi i zwierząt. W grupie bakterii chorobotwórczych mających plazmidy niosące geny oporności na antybiotyki oraz metale ciężkie, znalazły się takie rodzaje jak: *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus* oraz *Yersinia* [75]. To niepokojące zjawisko skłoniło naukowców do dalszych badań. Wykazano, że ekspresja różnych genów oporności jest często zależna od tego samego czynnika. Jak dotąd, nie jest jednak znana rola koselekcji genów dla danej wspólnoty mikroorganizmów zasiedlającej środowiska pozakliniczne. W 2016 roku, Andrea Di Cesare na łamach czasopisma *Journal of Limnology*, podkreślił, że niezbędne są badania podstawowe wyjaśniające znaczenie zjawiska koselekcji genów oporności w środowisku naturalnym [23]. W 2013 roku, Steve Bernier zasugerował, że antybiotyki najprawdopodobniej działają jako regulatorowe cząstki sygnałowe [6]. Zrozumienie problemu od strony genetycznej wymaga jednak dalszych badań. Naukowcy podejrzewają, że występowaniu antybiotykooporności sprzyjają determinanty oporności na jony metali ciężkich, które działają prawdopodobnie jako czynnik promujący antybiotykooporność. Zapewne współwystępowanie genów oporności na jony metali ciężkich i antybiotyki na MGE sprzyja rozpowszechnianiu oporności na antybiotyki oraz metale

ciężkie, nawet w przypadku występowania tylko jednego czynnika selekcyjnego: jonu metalu ciężkiego albo antybiotyku.

O istotności problemu rozprzestrzeniania się oporności na antybiotyki alarmuje Światowa Organizacja Zdrowia [100]. W raporcie opublikowanym w kwietniu 2014 roku ogłoszono, iż ze względu na problem utraty skuteczności terapii antybiotykowych, najważniejszym zadaniem jest poznanie i zredukowanie wszelkich niekontrolowanych źródeł rozprzestrzeniania się antybiotykooporności [100]. Badania ostatnich kilku lat ujawniają nowe środowiska występowania bakterii niosących jednocześnie oporność na antybiotyki i metale ciężkie. Wśród nich są zarówno tereny użytkowane rolniczo, jak i miejsca nieużytkowane, naturalne zbiorniki wodne oraz, jak ostatnio wykazano, komórki roślinne [22, 25–27, 38, 43, 45, 64, 65, 68, 98].

2. Mechanizmy koselekcji

Koselekcja (co-selection) to zjawisko zaobserwowane wśród mikroorganizmów, polegające na jednoczesnej selekcji genetycznych determinant oporności na antybiotyki, w obecności genów warunkujących oporność na metale ciężkie czy biocydy [4, 96, 81]. Mechanizm koselekcji polega na występowaniu różnych genów oporności w obrębie tego samego ruchomego elementu genetycznego, lub na występowaniu genetycznych determinant oporności warunkujących jednoczesną oporność na antybiotyki oraz metale ciężkie czy biocydy [4, 23]. MGE są przekazywane innym komórkom bakterii na drodze horyzontalnego transferu genów (HGT, horizontal gene transfer) z wykorzystaniem procesów takich jak koniugacja, transformacja czy transdukcja [8, 61]. To, czy nowa informacja genetyczna zostanie wyrażona a tym samym utrzymana w komórce bakteryjnej, zależy od obecności presji selekcyjnej w środowisku życia bakterii [48]. Mechanizmy oporności bakterii na metale ciężkie są znane. Zostały podzielone na pięć rodzajów [42]. Pierwszy mechanizm polega na niespecyficznym wiązaniu metalu przez różne metabolity bakteryjne jak na przykład egzopolisacharydy, występujące na powierzchni komórki i niedopuszczeniu ich do wnikięcia do wnętrza komórki. Drugi mechanizm opiera się na wprowadzaniu zmian w strukturze ściany i błony komórkowej bakterii w obecności metali ciężkich, co również uniemożliwia ich wnikięcie do wnętrza komórki. Trzeci mechanizm polega na usuwaniu metalu z wnętrza komórki dzięki aktywnym pompom, a cały system nazwano systemem Efflux (efflux system). Uczestniczą tu ATP-zależne ATP-azy typu P oraz białkowe transportery działające na zasadzie wymiany jonów na drodze gradientu chemiosmotycznego [42]. U licznych

mikroorganizmów występują również mechanizmy oparte na enzymatycznej detoksyfikacji jonów metali. Ostatni znany u bakterii mechanizm oporności na jony metali ciężkich polega na wewnątrzkomórkowym wiązaniu jonu przy udziale niskocząsteczkowych peptydów, takich jak na przykład metalotioneiny [7, 73]. Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki, również są dobrze znane. Należą do nich: enzymatyczna inaktywacja antybiotyku, strukturalne zmiany miejsca działania antybiotyku, zmniejszenie przepuszczalności bakteryjnych osłon komórkowych i niedopuszczenie antybiotyku do wnikięcia wewnątrz komórki, aktywne usuwanie antybiotyku z komórki bakteryjnej oraz ominięcie zablokowanego szlaku metabolicznego [69, 71].

Na początku XXI wieku zaczęto opisywać bakterie, u których stwierdzano oporność zarówno na antybiotyki, jak i metal ciężki. Jeden z pierwszych przykładów koselekcji opisano w 2003 roku [28]. Wyizolowano wówczas bakterie, u których geny oporności na rtęć, spektynomycynę i streptomycynę, były zlokalizowane na wspólnym elemencie genetycznym. Z badanych bakterii wyizolowano transpozony Tn21 i Tn21-like niosące geny oporności. Bakterie pochodziły zarówno ze środowiska szpitalnego jak i naturalnego, były reprezentowane przez Gram-dodatnie i Gram-ujemne bakterie patogene i niepatogene [28, 4]. Dalsze badania pozwoliły na wstępną charakterystykę mechanizmów koselekcji spotykanych u bakterii zasiedlających różne środowiska. Wyróżniono trzy główne mechanizmy koselekcji: oporność krzyżową, współoporność oraz współregulację.

2.1. Mechanizm oporności krzyżowej

Mechanizm oporności krzyżowej (cross-resistance) występuje wówczas, gdy geny warunkujące oporność na jeden antybiotyk, jednocześnie warunkują oporność na inny antybiotyk lub metal ciężki [4]. Mechanizm taki zaobserwowano na przykładzie *Listeria monocytogenes*. U bakterii tego gatunku gen *mdrL* koduje pompę MdrL (Multidrug efflux transporter of *Listeria*) odpowiadającą za oporność na metale, takie jak cynk, kobalt i chrom, biocydy, takie jak czwartorzędowe związki amoniowe i bromek etydyny oraz antybiotyki, takie jak erytromycyna, josamycyna i klindamycyna [63]. W innych badaniach zlokalizowano system DsbA-DsbB (Disulfide Bond formation system) występujący u *Burkholderia cepacia*. Badania fenotypowe wykazały, że DsbA-DsbB uczestniczy w systemie efluksyjnym eksportu m.in. metali ciężkich. Mutanty bez funkcjonalnego układu DsbA-DsbB były bardziej wrażliwe na działanie wielu antybiotyków i metali, w tym β -laktamów, kanamycyny, erytromycyny, nowobiocyny, ofloksacyny, laurylosiarczanu sodu (SDS), kadmu oraz cynku [39]. Z kolei Conroy i wsp. [16] zbadali system

GesABC występujący u bakterii z rodzaju *Salmonella*. Wykazano, że system jest odpowiedzialny nie tylko za wypompowywanie związków złota z komórki ale również odpowiada za ochronę bakterii przed fluorochinolonomi, chloramfenikolem i biocydami.

2.2. Współoporność

Współoporność (co-resistance) definiowana jest jako występowanie dwóch lub większej liczby genów położonych na tym samym MGE, nadających bakterii oporność na co najmniej dwa różne czynniki stresogenne [14]. Zjawisko współoporności pozwala na rozprzestrzenianie się genów pomiędzy bakteriami. W ostatnich latach pojawiły się liczne prace opisujące występowanie zjawiska współoporności u bakterii, a geny nadające fenotyp oporności zlokalizowano na MGE. Zjawisko współoporności bardzo często opisywane jest w przypadku integronów klasy 1, niosących zarówno geny oporności na antybiotyki, jak i gen oporności na czwartorzędowe sole amoniowe [12, 23, 30]. Plazmidy niosące jednocześnie różne geny oporności również są często izolowane. W 2010 roku Osman i wsp. [74] pozyskali bakterie z naturalnych zbiorników wodnych, które wykazały oporność na antybiotyki oraz metale ciężkie, takie jak chrom i kobalt. Geny odpowiedzialne za fenotyp oporności zlokalizowano na dwóch plazmidach o wielkości 11 kb i 5 kb. Plazmidy zsekwencjonowano i zlokalizowano na nich transportery jonów metali ciężkich. Z kolei w roku 2016 portugalscy naukowcy pozyskali szczepy *Salmonella* zawierające plazmidy IncX4/IncHI2 niosące geny oporności na kolistynę oraz na miedź [10]. W tym samym roku zsekwencjonowano plazmid IncH12 *Klebsiella pneumoniae* H11 i zlokalizowano w nim geny odpowiedzialne za oporność na metale ciężkie: cynk, kadm, kobalt, miedź, nikiel, ołów, rtęć, tellur; biocydy oraz antybiotyki: chloramfenikol, erytromycynę, kanamycynę, β -laktamy, sulfonamidy i streptomycynę [108]. W celu potwierdzenia obecności różnych genów warunkujących oporność bakterii, na tym samym plazmidzie, badacze często wykorzystują technikę leczenia z plazmidu badanego szczepu (plasmid curing). Na przykład, Das i wsp. [19] pozyskali szczepy *E. coli* oraz *P. aeruginosa* odporne na szereg antybiotyków i metali ciężkich. Z badanych szczepów wyizolowali plazmidy. Po inkubacji bakterii w warunkach stresowych w obecności SDS szczepy utraciły fenotyp oporności, co potwierdziło obecność genów oporności na plazmidzie. W przypadku szczepu *E. coli* potwierdzono plazmidową lokalizację genów warunkujących oporność na chloramfenikol, trimetoprym, kadm i rtęć. Natomiast dla szczepów *P. aeruginosa* potwierdzono występowanie na plazmidzie genów warunkujących oporność na ampicylinę, chloramfenikol, trimetoprym, cefpodoksym, cefoksytynę, kadm i rtęć [20].

2.3. Współregulacja

Współregulacja (co-regulation/co-expression) występuje u bakterii wtedy, gdy ekspresja genów kodujących oporność na antybiotyk ulega zmianie po ekspozycji bakterii na metal ciężki. Mechanizm tej oporności polega na skoordynowanej odpowiedzi na stres, poprzez powiązanie transkrypcyjne lub translacyjne obu oporności [4]. W 2007 roku opisano dwukomponentowy system regulacyjny kodowany przez *cscRS* wykryty u szczepów *P. aeruginosa*. Badania wykazały, że w obecności cynku dochodzi do transkrypcji operonu *czcCBA*, który koduje pompę typu RND, co zapewnia oporność na cynk, kadm i kobalt, a jednocześnie zmniejsza ekspresję poriny OprD, przez którą imipenem wnika do bakterii [9]. Z kolei w 2009 roku opisano zjawisko współregulacji u *E. coli*. Wykazano, iż obecność miedzi oraz chromu wpływa na białko regulacyjne SoxS aktywując dodatkowo system Efflux AcrAB, co z kolei powoduje dodatkową tolerancję bakterii na antybiotyki takie jak chloramfenikol, tetracyklina, nowobiocyna, nafcylina i oksacylina [37].

3. Czynniki promujące rozprzestrzenianie się zjawiska koselekcji

Głównym środowiskiem występowania bakterii wielolekoopornych (MDR, Multi-Drug Resistant) są szpitale, co jest następstwem stosowania w lecznictwie antybiotyków oraz soli metali ciężkich. Obecność bakterii opornych na antybiotyki i metale ciężkie notowana jest również na obszarach użytkowanych rolniczo. Związane jest to ze stosowaniem antybiotyków i soli metali ciężkich jako czynników promujących wzrost roślin i zwierząt hodowlanych [13, 41, 55].

Gleby rolne są często nawożone osadami ściekowymi, w składzie których wykryto czynniki promujące rozprzestrzenianie się determinant oporności. Malik i wsp. [53] badał próbki takich gleb pobranych w Północnych Indiach. Wyizolował szczepy bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, które oprócz szerokiego spektrum oporności na metale ciężkie, wykazały również niewrażliwość na ampicylinę, erytromycynę i sulfadiazynę (Tab. I). W wielu krajach do nawadniania pól stosuje się ścieki oczyszczone, które są źródłem zarówno bakterii opornych na antybiotyki (ARB, Antibiotic Resistant Bacteria), w tym patogennych, jak i genów oporności na antybiotyki (ARG, Antibiotic Resistance Genes). Badania różnego rodzaju ścieków (ścieki surowe, bioreaktor biologiczny, ścieki oczyszczone) przeprowadzone w Polsce wykazały niecałkowitą eliminację ARB oraz ARG w procesie oczyszczania biologicznego ścieków oraz obecność w ściekach oczyszczonych wielu bakterii

MDR, w tym patogenów wykazujących oporność na β -laktamy [77, 78, 80]. Badania prowadzone w innych krajach również potwierdzają obecność bakterii MDR w ściekach oczyszczonych [54, 56, 86, 89].

Gospodarstwa rolne są rezerwuarem bakterii opornych na antybiotyki i metale ciężkie. Stosowanie antybiotyków w hodowli zwierząt sprzyja pojawianiu się oporności w środowiskach rolniczych [11, 82, 84, 85]. Obornik stał się rezerwuarem bakterii MDR i związków antybiotycznych, a jego zastosowanie w nawożeniu gleb uprawnych znacząco zwiększyło liczebność ARG i promuje utrzymywanie się populacji bakterii MDR w glebie [3]. Lokalizacja genów oporności na MGE, do których należą m.in. plazmidy i elementy transpozycyjne, sprzyja rozprzestrzenianiu się genów oporności niezależnie od pierwotnego gospodarza [29, 83].

Od ponad dziesięciu lat stosowanie antybiotyków jako dodatków do pasz dla zwierząt hodowlanych zostało znacznie ograniczone, a w niektórych sektorach zupełnie zakazane [88]. Jednakże stosowanie innych związków o podobnym działaniu nie zostało objęte surowymi ograniczeniami. Wśród nich znajdują się sole metali ciężkich, głównie cynku, miedzi oraz srebra.

Stosowanie soli metali ciężkich w rolnictwie jest zjawiskiem powszechnym. Dodawane do pasz, wykazują działanie bakteriobójcze, grzybobójcze i wzmacniają oporność zwierząt. Tlenek cynku ZnO był niegdyś stosowany profilaktycznie w hodowli prosiąt jako alternatywa dla antybiotyków i w celu uzyskania szybkiego przyrostu masy mięśniowej oraz prawidłowego rozwoju układu nerwowego [70]. Dodatkowo, cynk wykazywał działanie przeciwbiegunkowe. W następstwie wieloletniego, regularnego stosowania cynku soli cynku w wysokich dawkach w paszach dla zwierząt coraz częściej w gospodarstwach zaczęły pojawiać się zakażenia powodowane przez bakterie odporne na komercyjnie stosowane antybiotyki. Badania ostatnich kilku lat wyjaśniły to zjawisko, związane z koselekcją genów oporności na antybiotyki u bakterii towarzyszących zwierzętom hodowlanym [1, 13, 55].

Od około 2004 roku zaczęto regulować poziom cynku i innych metali ciężkich w paszach dla zwierząt, a mieszanki paszowe podlegają cyklicznym kontrolom [70]. Siarczan miedzi (CuSO_4) dzięki właściwościom bakteriobójczym i grzybobójczym również był stosowany na szeroką skalę w hodowli zwierząt [95]. Obecnie, stosowany jest głównie do kąpieli racic w mleczarniach oraz jako czynnik promujący wzrost w hodowlach trzody chlewnej i drobiu. W klatkowej hodowli kur jest dodawany do paszy w celu obniżenia zawartości cholesterolu w jajach [95, 109]. Z kolei srebro koloidalne jest wykorzystywane jako środek dezynfekcyjny o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciugrzybiczym przede wszystkim w uprawie roślin [46].

4. Występowanie zjawiska koselekcji w środowiskach pozaklinicznych

4.1. Obszary użytkowane rolniczo

Liczne badania potwierdzają, iż stosowanie soli metali ciężkich w hodowli zwierząt sprzyja pojawianiu się szczepów bakterii opornych na antybiotyki. Przykłady badań potwierdzających obecność bakterii MDR w gospodarstwach rolnych przedstawiono w Tabeli I. Na początku XXI wieku ukazała się praca Hasman i wsp. [38], którzy badali mikrobiotę zwierząt hodowlanych. Pozyskane szczepy MDR wyizolowano wówczas m.in. z trzody chlewnej. Bakterie zaklasyfikowano do gatunku *E. faecium*. Wykazywały one oporność na miedź oraz niewrażliwość na erytromycynę i wankomycynę. Co więcej, badacze potwierdzili eksperymentalnie obecność wszystkich determinant oporności na tym samym plazmidzie koniugacyjnym. Zaproponowano, iż obecność bakterii opornych na miedź była następstwem stosowanych w chlewni dodatków do paszy zawierających siarczany miedzi [38].

Oprócz zwierząt hodowlanych, kolejnym powszechnym rezerwuarem bakterii MDR okazały się nawozy zwierzęce. Do gleb użytkowanych rolniczo nawożo-

nych nawozami zwierzęcymi, licznie przedostają się pozostałości metali ciężkich oraz antybiotyków, co negatywnie wpływa na jakość i bezpieczeństwo żywności. W ostatnich latach prowadzone są badania dotyczące charakterystyki szczepów środowiskowych wyizolowanych z takich gleb. W Turcji, w miejscowości Kirşehir, prowadzono badania gleby ogrodowej nawożonej obornikiem [27] (Tab. I). Pozyskano wówczas bakterie zaklasyfikowane do gatunków: *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli* oraz *P. aeruginosa*. Wszystkie szczepy wykazały oporność na sole metali ciężkich, takich jak ołów, kobalt, cynk i miedź. Ponadto, większość szczepów była niewrażliwa na antybiotyki – aztreonam, klindamycynę oraz wankomycynę. Co więcej, szczepy zidentyfikowane jako *P. aeruginosa* wykazały oporność na amikacynę, ceftazydym i cyprofloksacynę, natomiast szczepy *E. coli* były odporne na ceftazydym i cefuroksym.

Podobne zjawisko zaobserwowano w akwakulturze. Bakteriami MDR powszechnie izolowanymi z ryb są patogenne szczepy z rodzaju *Aeromonas* [78, 79]. Bakterie z tego rodzaju zostały między innymi wyizolowane z siedmiu różnych hodowli pstrąga tęczowego w Australii [1]. Pozyskane szczepy były odporne na metale ciężkie oraz badane antybiotyki (Tab. I). Wszystkie szczepy były odporne na amoksylicynę i cefalotin,

Tabela I
Profil oporności bakterii izolowanych z obszarów użytkowanych rolniczo

Rodzaj/gatunek bakterii	Źródło izolacji bakterii	Oporność bakterii na antybiotyki	Oporność bakterii na metale ciężkie	Piśmiennictwo
<i>Aeromonas</i> sp.	Hodowla pstrąga tęczowego (Australia)	amoksylicyna, cefalotin, ceftiofur, florfenikol, streptomycyna, tetracyklina, sulfametoksazol, tykarcylina	chrom, cynk, kadm, kobalt, mangan, miedź, ołów	[1]
<i>A. aquariorum</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>A. veronii</i> , <i>A. caviae</i> , <i>A. jandami</i>	Hodowla węgorza, hodowla karpia (Korea)	amikacin, amoksylicyna, kwas klawulanowy, ampicylina, cefpodoksym, ceftiofur, chloramfenikol, enrofloksacyna, imipenem, gentamycyna, piperacylina, marbofloksacyn, tobramycyna, nitrofurantoina, trimetoprim, sulfametoksazol tetracyklina	kadm	[107]
<i>A. salmonicida</i>	Hodowla łososia atlantyckiego (Kanada)	florfenikol, spektynomycyna, streptomycyna, sulfonamidy, tetracyklina	rtęć	[66]
<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i>	Gleba ogrodowa (Turcja)	aztreonam, ceftazydym, cefuroksym, klindamycyna, wankomycyna	cynk, kobalt, miedź, ołów	[27]
<i>Enterococcus faecium</i>	Hodowla trzody chlewnej (Dania)	erytromycyna, wankomycyna	miedź	[38]
<i>E. coli</i>	Gleba ogrodowa (Turcja)	aztreonam, ceftazydym, cefuroksym, klindamycyna, wankomycyna	cynk, kobalt, miedź, ołów	[27]
<i>P. aeruginosa</i>	Gleba ogrodowa (Turcja)	amikacyna, aztreonam, ceftazydym, cefuroksym, cyprofloksacyna, klindamycyna, wankomycyna	cynk, kobalt, miedź, ołów	[27]
<i>Pseudomonas</i> sp.	Hodowla pstrąga tęczowego (Australia)	amoksylicyna, cefalotin, ceftiofur, chloramfenikol, florfenikol, streptomycyna, nitrofurantoina, trimetoprim	chrom, cynk, kadm, mangan, miedź, ołów	[1]
<i>Pseudomonas</i> sp.	Gleba uprawna (Północne Indie)	ampicylina, erytromycyna, sulfadiazyna	chrom, cynk, miedź, nikiel, ołów, rtęć	[53]

większość szczepów na tykarcylinę, tetracyklinę oraz streptomycynę, podczas gdy tylko niektóre szczepy na ceftiofur, florfenikol i sulfametoksazol. We wzmiankowanych badaniach wyizolowano też bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, u których również powszechnie występowała oporność na amoksycylinę, cefalotynę, ceftiofur, chloramfenikol, florfenikol, streptomycynę, nitrofurantoinę oraz trimetoprym. Podobne badania prowadził McIntosh i wsp. [66], który z hodowli łososia atlantyckiego w Kanadzie wyizolował szczepy *A. salmonicida* odporne na florfenikol, tetracyklinę, sulfonamidy, spektynomycynę i streptomycynę oraz na rtęć (Tab. I). Obecność determinant warunkujących taki fenotyp bakterii zlokalizowano na plazmidach nazwanych pRAS3 o wielkości ok. 11 800 pz. W 2014 roku Yi i wsp. [107] również wyizolowali szczepy bakterii rodzaju *Aeromonas* wykazujące oporność na szereg antybiotyków, w tym amoksycylinę z kwasem klawulanowym, a jednocześnie oporność na kadm. Badacze sugerowali występowanie koselekcji genów antybiotykooporności i oporności na metal, a kadm uznano za czynnik promujący to zjawisko. Wśród badanych ryb, z których izolowano szczepy, znalazły się m.in. karpie i węgorze. Pozyskano następujące gatunki: *A. veronii*, *A. aquarium*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. jandami* i *A. allosaccharophila* (Tab. I). Szczepy tych bakterii wykazały brak wrażliwości na szereg antybiotyków, w tym ampicylinę (99% szczepów), piperacylinę (84%), tetracyklinę (83%), enrofloksacynę (80%), amoksycylinę z kwasem klawulanowym (59%), sulfametoksazol z trimetoprimem (54%), ceftiofur (54%), imipenem (44%), marbofloksacylinę (43%), nitrofurantoinę (40%), chloramfenikol (34%), cefpodoksym (26%), tobramycynę (24%), gentamycynę (15%), amikacin (4%). Wśród bakterii wyizolowanych z karpia i węgorza, najpowszechniej występowały szczepy niewrażliwe na amoksycylinę z kwasem klawulanowym oraz chloramfenikol.

4.2. Tereny nieużytkowane rolniczo

W środowisku naturalnym, na terenach nie użytkowanych przez człowieka, również występują mikroorganizmy odporne na antybiotyki oraz metale ciężkie. Przykładem takiego miejsca są położone powyżej 4000 m n.p.m. podmokłe tereny Andów. Panują tam ekstremalne warunki, takie jak silne promieniowanie UV, wysoka zawartość metali ciężkich (głównie arsenu) oraz wysokie zasolenie. W roku 2008 z próbek gleb pobranych w Andach pozyskano kolekcję szczepów wykazujących silną antybiotykooporność oraz niewrażliwość na promieniowanie UV-B [22]. Wśród nich zidentyfikowano *S. saprophyticus* i *Micrococcus* sp. Większość szczepów wykazała oporność na arsen (III) w stężeniu 10 mM. Ponadto, stwierdzono oporność bakterii na antybiotyki: azytromycynę, erytromycynę,

klarytromycynę, roksytromycynę, streptomycynę, chloramfenikol, gentamycynę, kanamycynę, tetracyklinę i ampicylinę oraz wysokie minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii (2 µg/ml) w przypadku makrolidów. Wyniki przeprowadzonych badań wskazały, że w ekstremalnych środowiskach antybiotykooporność jest również powszechna pomimo braku presji selekcyjnej związanej z obecnością antybiotyków. Kolejnym przykładem terenów nieużytkowanych rolniczo, z których wyizolowano bakterie MDR, są torfowiska w USA. W roku 2009 grupa naukowców badała próbki gleb (o przekroju 2 m) pochodzących z dwóch torfowisk w Hrabstwie Kennebec w stanie Maine, USA [98]. Z różnych głębokości warstwy korowej wyizolowano bakterie i badano je pod kątem oporności na antybiotyki i rtęć oraz obecności genu *merA*, który odpowiada za występowanie reduktazy rtęciowej, redukującej toksyczne jony Hg^{2+} do postaci pierwiastkowej Hg^0 . Mechanizm ten jest najczęstszym bakteryjnym systemem oporności na rtęć. Gen *merA* lokalizowany jest w obrębie operonu *mer*, który często występuje na MGE, takich jak transpozony i plazmidy, dzięki czemu jest łatwo przenoszony między różnymi gatunkami bakterii [98]. Co więcej, jak już wcześniej wykazano, razem z operonem *mer* przenoszone są też geny oporności na antybiotyki [99]. Wśród izolatów pozyskanych z torfowisk najczęściej występowały bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, *Rahnella* i *Paenibacillus*. Obecność genu *merA* stwierdzono u 73% izolatów ze stanowiska pierwszego i 67% izolatów z drugiego torfowiska. Oprócz oporności na rtęć u wielu izolatów stwierdzono również tolerancję na antybiotyki β-laktamowe, aminoglikozydy i cefemy. Z kolei w roku 2014 prowadzone były badania gleb pochodzących z miasta Juja w Kenii [65]. Z gleb wyizolowano bakterie i charakteryzowano je pod kątem wrażliwości na antybiotyki i metale ciężkie. Wszystkie pozyskane izolaty wykazały oporność na augmentin i cefuroksym, natomiast większość izolatów była oporna na ampicylinę oraz kotrimoksazol. Większość izolatów była również niewrażliwa na co najmniej trzy antybiotyki. Co więcej, bakterie wykazały oporność na metale ciężkie, takie jak cynk, kadm i rtęć. Wśród zidentyfikowanych szczepów, znalazły się gatunki *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*.

Pewna grupa naukowców postawiła pytanie, czy antybiotykooporność była również zjawiskiem powszechnym we wcześniejszych latach, kiedy antybiotyki nie były stosowane na skalę masową. Knapp i wsp. [47] badali występowanie genów niosących oporność na antybiotyki w glebach zarchiwizowanych w Instytucie Jamesa Huttona w Aberdeen w Szkocji. Pierwsza seria gleb składała się z 46 losowo wybranych próbek zbieranych w Szkocji od 1940 roku do wczesnych lat 70. Druga seria gleb składała się z próbek zebranych w 2008 roku, z działek eksperymentalnych w Hartwood,

North Lanarkshire i Auchincruive w South Ayrshire. Na działki te, w latach 1994–98, rozprowadzono osady ściekowe zawierające miedź w ilości do 200 mg/kg. Wyniki badań wykazały obecność we wszystkich badanych próbach genów kodujących oporność na antybiotyki, takie jak erytromycyna, karbapenemy i tetracyklina oraz na metale ciężkie, takie jak chrom, miedź i nikiel. Co więcej, wykazano wspólne występowanie następujących determinant oporności: tetracykliny, erytromycyny i miedzi; tetracykliny, karbapenemów i chromu oraz tetracykliny i niklu. Podczas badań próbek gleb pobranych w 2008 roku zanieczyszczonych osadami ściekowymi, wykryto większą częstość występowania genów antybiotykooporności, w porównaniu z glebami pobieranymi w latach 1940–1970. Badacze sugerują, iż zjawisko to może być związane ze wzrostem konsumpcji antybiotyków obserwowanym od końca XX wieku, co w następstwie doprowadziło do wzrostu ilości determinant warunkujących wielolekooporność w osadach ściekowych rozprowadzanych na badanym terenie [47].

4.3. Naturalne zbiorniki wodne

Presja selekcyjna wywierana przez zanieczyszczenia wód powierzchniowych, w tym jonami metali ciężkich czy antybiotykami, sprzyja HGT i przekazywaniu genów oporności, również bakteriom patogennym. Stanowi to duże zagrożenie dla zdrowia publicznego [43]. O koselekcji genów oporności w wodach rzecznych donosi wiele źródeł. Na przykład, z wód powierzchniowych rzeki Mololoa w Tepic w Meksyku wyizolowano szczepy *E. faecalis* odporne na metale ciężkie i antybiotyki [68]. Wszystkie izolaty wykazywały oporność na rtęć. W przypadku pozostałych metali 86% szczepów wykazało oporność na chrom, a 42% na kadm. Ogólny model wrażliwości na antybiotyki był następujący: cyprofloksacyna (100,0% szczepów opornych), kanamycyna (84,2%), wankomycyna (15,7%), gentamycyna (13,15%) i ampicylina (7,8%) [68]. Obecność bakterii MDR wykryto również w rzece Jamuna (Indie) [53]. Z wody pozyskano szczepy rodzaju *Pseudomonas* odporne na cały szereg metali ciężkich oraz niewrażliwe na polimyksynę B oraz tetracyklinę. Badacze potwierdzili obecność genów warunkujących wielolekooporność na plazmidach koniugacyjnych.

W 2014 roku pobrano próbki wody z rzeki Kızılırmak-Kırıkkale w Turcji, aby zbadać współwystępowanie bakteryjnej oporności na metale ciężkie i antybiotyki [43]. Profile oporności określono stosując 26 antybiotyków i 17 metali ciężkich. Spośród 290 szczepów, 24 wykazywało oporność na metale ciężkie i antybiotyki. Oporność na ołów, cynę, nikiel, bar, glin, stront, srebro i lit wahała się między 50 a 92%. Ponad 50% izolatów wykazywało oporność na cefalosporyny, chinolony, sulfonamidy i aminoglikozydy. W tym samym

roku zbadano również próbki wody z Błękitnego Nilu na terenie Etiopii [45]. Metalooporne izolaty należały do rodzajów *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Neisseria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*. Minimalne stężenie metali ciężkich (kadm, chrom, nikiel, cynk, ołów, rtęć i miedź) hamujące wzrost szczepów wynosiło od 200 do 2300 µg/ml. Izolaty były odporne na wiele antybiotyków, takich jak: chloramfenikol, cefoksytyna, kotrimoksazol, erytromycyna, cyprofloksacyna, gentamycyna, kwas naldyksowy, tetracyklina i wankomycyna. Obserwowano statystycznie istotną korelację między opornością na metal i opornością na antybiotyk wśród szczepów bakteryjnych [45].

Bardzo bogatym rezerwuarem szczepów bakterii MDR okazały się również wody morskie. W roku 2010 tureccy naukowcy zbadali wodę pobraną z Zatoki Iskenderun (Morze Śródziemne, Turcja) [64]. Pozykali szczepy bakterii rodzaju *Aeromonas* i *Pseudomonas*, które wykazały oporność na antybiotyki i metale ciężkie. Wysoki odsetek izolatów *Aeromonas* wykazywał brak wrażliwości na cefazolin i sulfametoksazol z trimetoprimem. Wśród izolatów *Pseudomonas* często występowała oporność na nitrofurantoinę (86,2% izolatów), cefazolin (84,8% izolatów) i cefuroksym (71,7% izolatów). Dodatkowo, większość izolatów wykazywała tolerancję na różne stężenia metali ciężkich, a minimalne stężenia hamujące wahały się od 25 do powyżej 3200 µg/ml. *Aeromonas* sp. i *Pseudomonas* sp. wykazały również wysoką oporność na miedź, odpowiednio 98,3% i 75,4% oraz niską oporność na ołów, odpowiednio 1,7% i 7,2%. W 2012 roku Matyar [63] badał także izolaty pobrane ze wschodniego wybrzeża Morza Śródziemnego. Zbadano wrażliwość 255 Gram-ujemnych izolatów bakteryjnych na 16 różnych antybiotyków i pięć metali ciężkich. Najczęstszymi gatunkami izolowanymi ze wszystkich próbek były *Citrobacter koseri* (9,0%), *E. coli* (8,2%) i *Pantoea agglomerans* (8,2%). Wyniki wykazały wysoką częstość występowania oporności na ampicylinę (74,0%), streptomycynę (70,0%) i cefazolinę (48,3%). Badane szczepy wykazały również tolerancję na metale ciężkie, takie jak chrom (3,0%), kadm (78,0%), mangan (3,5%), miedź (68,9%) oraz ołów (1,9%) [64].

4.4. Endosfera roślinna

Mikroorganizmy zasiedlające wewnętrzne tkanki oraz przestrzenie międzykomórkowe roślin, nie wywołujące oznak patogenezы, nazwano endofitami [36]. Endofity izolowane są powszechnie z roślin zielnych [31–33, 87]. Pierwsze prace dotyczące izolacji mikroorganizmów endofitycznych niosących oporność na metale ciężkie zaczęły pojawiać się około roku 2004. Wtedy to swoje badania opublikował Idris i wsp. [44],

który wyizolował bakterie endofityczne z wnętrza rośliny będącej hiperakumulatorem niklu – *Thlaspi goesingense* Halácsy. Badania prowadzono na terenach wschodniej Austrii, gdzie ogólna zawartość niklu w kilogramie gleby wynosiła 2,5 mg. W jednym gramie nadziemnych części roślinnych oznaczono od $2,2 \times 10^3$ do $5,6 \times 10^2$ jtk bakterii opornych na nikiel. Badacze zaklasyfikowali izolaty do klasy *Alfaproteobacteria* oraz do bakterii Gram-dodatnich. 42% izolatów wykazało wysoki stopień podobieństwa do gatunku *Methylobacterium mesophilicum*, a 37% do *Sphingomonas* sp. Pozostałe izolaty wykazały podobieństwo do rodzajów: *Rhodococcus*, *Curtobacterium* i *Plantibacter*. El-Deeb i wsp. [25, 26] wyizolowali endofityczne bakterie zaklasyfikowane do rodzaju *Enterobacter* z rośliny wodnej *Eichhornia crassipes* występującej powszechnie w Egipcie. Badane szczepy bakterii wykazały oporność na metale ciężkie (cynk, kadm i ołów) oraz były zdolne do wzrostu w obecności ampicyliny (100 µg/ml), kanamycyny (100 µg/ml) oraz tetracykliny (20 µg/ml). Co ciekawe, z uzyskanych bakterii udało się wyizolować plazmidy i w wyniku dalszych badań potwierdzono, że plazmid o wielkości 98 kb determinował oporność bakterii na cynk, kadm oraz ampicylinę i kanamycynę. Z kolei w roku 2008 opublikowano badania dotyczące izolacji bakterii endofitycznych z roślin rzepaku (*Brassica napus*) rosnących na przedmieściach Nanjing w Chinach [91]. Na terenach, z których pobierano rośliny, oznaczono najwyższą zawartość ołowiu (216,5 mg/kg) oraz cynku (204,5 mg/kg). Z roślin rzepaku pozyskano bakterie odporne m.in. na ołów, wśród których dominowały szczepy oznaczone jako *Microbacterium* sp. oraz *P. fluorescens*. Dalsza charakterystyka wykazała, że bakterie mogą promować wzrost roślin, ponieważ produkują hormony roślinne, prowadzą do rozpuszczenia ołowiu, produkują siderofory oraz produkują deaminazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego. Co więcej, wykazano, że bakterie nie są wrażliwe na badane antybiotyki, takie jak ampicylina, kanamycyna, spektynomycyna oraz streptomycyna. Szczepy endofityczne rosły w obecności takich czynników stresowych, jak: ampicylina (100 µg/ml), kanamycyna (20 µg/ml) i spektynomycyna (20 µg/ml). Dodatkowo, szczep *P. fluorescens* rósł w obecności streptomycyny (20 µg/ml). Kolejna praca w której eksperymentalnie potwierdzono brak wrażliwości endofitów na antybiotyki ukazała się w 2015 roku [52]. Badaniom poddano roślinę będącą hiperakumulatorem cynku i kadmu, *Sedum plumbizincicola*. Wśród wyizolowanych bakterii zidentyfikowano *Achromobacter* sp., *Bacillus* sp., *B. pumilus* oraz *Stenotrophomonas* sp. Endofity wykazały oporność na cynk, kadm i ołów oraz brak wrażliwości na antybiotyki.

W latach 2009–2018 opublikowano kolejne prace badawcze dotyczące izolacji bakterii endofitycznych

z endosfery roślin rosnących na terenach skażonych metalami ciężkimi (Tab. II). Wśród przebadanych metalofitów znalazły się takie gatunki jak: olsza twarda (*Alnus firma*), smagliczka (*Alyssum serpyllifolium*), komelina pospolita (*Commelina communis*), elszolcja (*Elsholtzia splendens*), tytoń szlachetny (*Nicotiana tabaccum* L.), rdest (*Polygonum pubescens*), orliczka (*Pteris vittata*), psianka czarna (*Solanum nigrum* L.) oraz kukurydza zwyczajna (*Zea mays*). Z roślin izolowano najczęściej bakterie klasyfikowane jako *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Microbacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Rahnella* sp., *Serratia* sp., *Stenotrophomonas* sp. (Tab. II) [25, 26, 40, 44, 51, 52, 62, 91, 92, 94, 97, 109].

5. Współwystępowanie genów oporności w różnych genomach środowiskowych

Technika analizy DNA izolowanego bezpośrednio z badanego środowiska, rozwój metod sekwencjonowania nowej generacji (NGS, Next Generation Sequencing) oraz rozwój narzędzi bioinformatycznych służących do analizy danych umożliwił poznanie niezbadanych dotąd środowisk. Badania metagenomiczne dowiodły występowania genów oporności na antybiotyki i metale ciężkie lub biocydy m.in. w takich środowiskach jak naturalne zbiorniki wodne oraz ścieki [5, 15, 17, 18, 24, 35, 102–106]. Ponadto, stosując zaawansowane narzędzia bioinformatyczne, potwierdzono współwystępowanie genów ARG oraz MRG (metal resistance genes) w różnych genomach środowiskowych [103, 104].

Zespół naukowców pod kierunkiem Yuyi Yang opublikował niedawno wyniki analizy metagenomicznej jezior i wód morskich [105, 106]. Badacze pracowali na 122 metagenomach pochodzących z jezior (92 genomy) oraz wód morskich (30 genomów). Dane pozyskano z bazy SRA (Sequence Read Archive). Pozyskane sekwencje następnie analizowano w bazach danych SARG (Structured Antibiotic Resistance Database) oraz BacMet (Antibacterial Biocide & Metal Resistance Genes Database) [75, 76]. Celem badań była analiza współwystępowania ARG i MRG w morzach i jeziorach oraz określenie wpływu stratyfikacji termicznej wody w jeziorach i położenia geograficznego jezior na liczbę i skład ARG i MRG. Co więcej, badano rozmieszczenie ARG i MRG w morzach w strefie przybrzeżnej, w strefie wód głębokich i w wodach Antarktydy. Badane genomy pochodziły z następujących regionów: Antarktyki, Brazylii, Finlandii, Kanady, Malawi, Rosji, Rwandy, Szwecji i USA. W próbach pochodzących ze wszystkich badanych środowisk dominowały sekwencje genów oporności wielolekowej oraz genów oporności na bacytracynę (warianty genu *bacA*). W przy-

Tabela II
Profil oporności bakterii endofitycznych

Rodzaj/gatunek bakterii endofitycznej	Źródło izolacji bakterii	Oporność bakterii na antybiotyki	Oporność bakterii na metale ciężkie	Piśmiennictwo
<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Sedum plumbizincicola</i>	nb	cynk, kadm, ołów	[52]
<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Elsholtzia splendens</i>	nb	miedź	[94]
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Alnus firma Sedum plumbizincicola</i>	nb	cynk, kadm, ołów	[52, 92]
<i>B. pumilus</i>	<i>Sedum plumbizincicola</i>	nb	cynk, kadm, ołów	[52]
<i>Curtobacterium</i> sp.	<i>Thlaspi goesingense</i> Halácsy	nb	nikiel	[44]
<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Eichhornia crassipes</i>	ampicylina, kanamycyna, tetracyklina	cynk, kadm, ołów	[25, 26]
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	<i>Thlaspi goesingense</i> Halácsy	nb	nikiel	[44]
<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Brassica napus</i>	ampicylina, kanamycyna, spektynomycyna	cynk, kadm, miedź, nikiel, ołów	[91]
<i>Plantibacter</i> sp.	<i>Thlaspi goesingense</i> Halácsy	nb	nikiel	[44]
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Alyssum serpyllifolium</i>	nb	nikiel	[52]
<i>P. fluorescens</i>	<i>Brassica napus</i>	ampicylina, kanamycyna, spektynomycyna, streptomycyna	cynk, kadm, ołów	[91]
<i>Rahnella</i> sp.	<i>Polygonum pubescens</i> <i>Zea mays</i>	nb	cynk, kadm, ołów	[40]
<i>Rhodococcus</i> sp.	<i>Thlaspi goesingense</i> Halácsy	nb	nikiel	[44]
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Pteris vittata</i>	nb	wanad	[97]
<i>Sphingomonas</i> sp.	<i>Thlaspi goesingense</i> Halácsy	nb	nikiel	[44]
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Sedum plumbizincicola</i>	ampicylina, chloramfenikol, kanamycyna, streptomycyna, tetracyklina	cynk, kadm, ołów	[52]

nb – nie badano

padku MRG, dominowały geny oporności na arsen, rtęć oraz miedź. W genomach pochodzących z jezior wykryto większą liczbę ARG w porównaniu z genomami pochodzącymi z mórz. Analizy wykazały, iż przybrzeżna woda morska wykazuje większą bioróżnorodność oraz liczbę ARG i MRG w porównaniu z wodą głębokich oceanów, czy antarktyczną wodą morską. Z kolei stratyfikacja termiczna nie wpłynęła na liczbę ARG. Jednakże w epilimnionie zaobserwowano większą różnorodność ARG oraz więcej MRG niż w głębszych strefach jezior. Wykazano również, iż położenie geograficzne ma istotny wpływ na różnorodność genów oporności, natomiast nie wpływa na ich ilość. Analiza korelacji Spearmana pozwoliła oszacować prawdopodobieństwo współwystępowania genów ARG i MRG w badanych genomach środowiskowych. W przypadku jezior wyodrębniono 14 grup genów wspólnie występujących, natomiast dla wody morskiej wyodrębniono 2 grupy. W obrębie 14 grup wyznaczono m.in. wspólnie występujące warianty genu *bla*_{TEM} (oporność na β-laktamy), warianty genu *mer* (oporność na rtęć), geny *cusR* (oporność na miedź) i *silR* (oporność na srebro) oraz współwystępowanie genów warunkujących wielolekooporność i oporność na metale ciężkie. Z kolei w przypadku analizy genomów morskich, współwystępowanie wykryto m.in. w przypadku wariantów genów nadających oporność na bacytracynę, chloramfenikol,

polimyksynę, sulfonamidy i tetracyklinę [105, 106].

Po roku 2013 pojawiły się liczne prace potwierdzające występowanie ARG oraz MRG w ściekach [17, 34, 49, 67]. Co więcej, zidentyfikowano w ściekach ruchome elementy genetyczne, które mogą promować rozprzestrzenianie determinant oporności wśród bakterii [67].

W 2013 roku w Hongkongu prowadzono badania na terenie dwóch oczyszczalni ścieków bytowo-gospodarczych, w których dziennie oczyszczanych jest 230 000 m³ ścieków – oczyszczalnia Shatin oraz 93 000 m³ ścieków – oczyszczalnia Shek Wu Hui [49]. Z pobranych prób izolowano DNA plazmidowe i wykonano sekwencjonowanie z wykorzystaniem sekwencjonatora HiSeq2000 (Illumina). Uzyskane odczyty sekwencjonowania filtrowano i analizowano *in silico* z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych oraz ogólnie dostępnych baz danych, takich jak ARDB (Antibiotic Resistance Genes Database), BacMet [50, 76]. Badacze uzyskali 6 metagenomów plazmidowych, w których zlokalizowali 48 989 odczytów pasujących do ARG oraz 16 435 odczytów MRG. Wykryto 18 typów ARG, z czego najbardziej powszechnym typem były geny oporności na tetracyklinę (29% odczytów), następnie geny oporności na chinolony (17% odczytów), β-laktamy (12% odczytów), aminoglikozydy (10% odczytów) i makrolidy-linkozamidy-streptograminy

(10% odczytów). W przypadkach MRG, najpowszechniej zidentyfikowanymi typami genów były geny oporności na cynk (22% odczytów) i miedź (20% odczytów), a rzadziej występującymi geny oporności na kobalt (11% odczytów) oraz arsen (11% odczytów).

6. Podsumowanie

Właściwości antybiotyków oraz metali ciężkich spowodowały włączenie ich do różnych obszarów działalności ludzkiej, takich jak medycyna, weterynaria, czy rolnictwo. Następstwem wieloletniego stosowania na szeroką skalę tych związków był wzrost ich stężenia w środowisku i tym samym, wywieranie stałej presji selekcyjnej wobec poszczególnych mikroorganizmów wchodzących w skład mikrobiomów występujących w danym środowisku. Dane literaturowe wskazują, że warunki stresowe panujące na terenach zanieczyszczonych, mogą promować rekombinacje genetyczne i HGT, co sprzyja powstawaniu nowych mechanizmów oporności i rozprzestrzenianiu się ARG [57, 59]. Plazmidy mogą zawierać także geny, zapewniające zdolność do przeżycia w obecności związków toksycznych takich jak np. substancje ropopochodne, detergenty, metale ciężkie i pestycydy, co ze względu na rosnące wciąż zanieczyszczenie środowiska faworyzuje przeżycie bakterii niosących takie plazmidy [57, 58, 60, 61, 83]. Dowiedziono, że zanieczyszczenie metalami ciężkim sprzyja selekcji szczepów opornych [4, 57]. Wykazano również, że oporność krzyżowa na metale ciężkie i antybiotyki związana z koselekcją genów czyli obecnością na plazmidzie genów oporności na antybiotyki i metale, powoduje utrzymanie się oporności na antybiotyki, nawet w przypadku ich nieobecności w środowisku skażonym metalami [57]. Jak się okazało zjawisko to niesie ze sobą zagrożenia dla zdrowia a nawet życia ludzkiego. Powszechne stosowanie antybiotyków oraz soli metali ciężkich w medycynie spowodowało pojawienie się szczepów bakterii MDR, co jest obecnie jednym z największych problemów zdrowotnych na świecie. Z kolei stosowanie antybiotyków i soli metali ciężkich w rolnictwie spowodowało pojawienie się i włączenie bakterii MDR do łańcucha pokarmowego. Występowanie szczepów MDR w różnych środowiskach pozaklinicznych to problem z jakim aktualnie się spotykamy. Tereny zanieczyszczone metalami ciężkimi oraz przede wszystkim rośliny zasiedlające takie tereny, tzw. metalofity, to nowe źródło izolacji szczepów bakterii opornych na antybiotyki i metale ciężkie. Je również należy rozpatrywać jako potencjalne zagrożenie dla człowieka ponieważ mogą stanowić źródło szczepów MDR. Metalofity wykorzystywane w procesach fitoekstrakcji powinny być traktowane jako materiał toksyczny. Powinny zatem zostać poddane

suszeniu i spaleniu w specjalnych miejscach przeznaczonych na utylizację odpadów toksycznych. Jedynie takie postępowanie nie dopuści do wygenerowania przez człowieka kolejnego niekontrolowanego źródła antybiotykooporności. Co więcej, odkrycie endofitów metalofilnych zwróciło uwagę na ich ogromny potencjał aplikacyjny i możliwość wykorzystania do intensyfikacji procesów fitoekstrakcji. Rozpatrywana jest możliwość przenoszenia genów oporności na metale ciężkie pozyskiwanych z endofitów metalofilnych do roślin-hiperakumulatorów. W przypadku wdrożenie na skalę światową takich rozwiązań i nieodpowiedniego sposobu utylizacji materiału roślinnego, może dojść do wzbogacenia środowiska w kolejną pulę genów determinujących antybiotykooporność.

O problemie bakteryjnej oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (AMR, antimicrobial resistance) dyskutowała Organizacja Narodów Zjednoczonych ONZ, która w październiku 2016 roku zatwierdziła uchwałę dotyczącą konieczności zredukowania spożycia antybiotyków i ograniczenia czynników sprzyjających rozprzestrzenianiu się AMR. Zwalczanie antybiotykooporności to jedno z głównych założeń tzw. strategii „One Health” (One Health approach). Strategia One Health zaleca do monitorowania środowiska i prowadzenia wspólnych badań przez specjalistów z wielu dziedzin, takich jak zdrowie publiczne, weterynaria czy ochrona środowiska. Przykładem programów międzynarodowych, w ramach których prowadzone są badania dotyczące antybiotykooporności są: program JPIAMR (Joint Programming Initiative on Microbial Resistance) i tu np. INART (Intervention of antimicrobial resistance transfer into the food chain), czy BiodivERSA (Biodiversity and its influence on animal, human and plant health). Wspólnym celem ma być projektowanie i wdrażanie programów informacyjnych, badawczych oraz ustawodawstwo służące poprawie zdrowia publicznego. Jako priorytetowe działania, obok zwalczanie antybiotykooporności ustalono wzrost bezpieczeństwa żywności oraz kontrolę chorób odzwierzęcych.

Piśmiennictwo

1. Akinbowale O.L., Peng H., Grant P., Barton M.D.: Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **30**, 177–182 (2007)
2. Alanis A.J.: Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch. Med. Res.* **36**, 697–705 (2005)
3. Aminov R.I.: The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ. Microbiol.* **11**, 2970–2988 (2009)
4. Baker-Austin C., Wright M., Stepanauskas R., McArthur J.: Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* **14**, 176–182 (2006)
5. Bengtsson-Palme J., Boulund F., Fick J., Kristiansson E., Larsson D.G.: Shotgun metagenomics reveals a wide array of antibiotic

- resistance genes and mobile elements in a polluted lake in India. *Front. Microbiol.* **5**, 1–15 (2014)
6. Bernier S.P., Surette M.G.: Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments. *Front. Microbiol.* **4**, 1–14 (2013)
 7. Bruins M.R., Kapil S., Oehme F.W.: Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**, 198–207 (1999)
 8. Burmeister A.R.: Horizontal gene transfer. *Evolution, medicine, and public health*, **1**, 193–194 (2015)
 9. Caille O., Rossier C., Perron K.: A copper-activated two component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **189**, 4561–4568 (2007)
 10. Campos J., Cristiano L., Peixe L., Antunes P.: MCR-1 in multi-drug-resistant and copper-tolerant clinically relevant *Salmonella* 1, 4,[5], 12:i:- and S. Rissen clones in Portugal, 2011 to 2015. *Eurosurveillance*, **21**, 1–5 (2016)
 11. Cantas L., Shah S.Q.A., Cavaco L.M., Mania C., Walsh F., Popowska M., Garelick H., Bürgmann H., Sørum H.: A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Front. Microbiol.* **4**, 1–14 (2013)
 12. Carattoli A.: Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet. Res.* **32**, 243–259 (2001)
 13. Chang Q., Wang W., Regev-Yochay G., Lipsitch M., Hanage W.P.: Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evol. Appl.* **8**, 240–247 (2015)
 14. Chapman J.S.: Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *Int. Biodeter. Biodegr.* **51**, 271–276 (2003)
 15. Chauhan N. S., Nain S., Sharma R.: Identification of arsenic resistance genes from marine sediment metagenome. *Indian. J. Microbiol.* **57**, 299–306 (2017)
 16. Conroy O., Kim E.H., McEvoy M.M., Rensing C.: Differing ability to transport nonmetal substrates by two RND-type metal exporters. *FEMS Microbiol. Lett.* **308**, 115–122 (2010)
 17. Czekalski N., Díez E. G., Bürgmann H.: Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. *ISME J.* **8**, 1381–1390 (2014)
 18. Czekalski N., Sigdel R., Birtel J., Matthews B., Bürgmann H.: Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes. *Environ. Int.* **81**, 45–55. (2015)
 19. Cytryn E., Markiewicz Z., Popowska M.: Antibiotics and antibiotics resistance genes dissemination in soils. (w) Antibiotics and antibiotics resistance genes in soils. Soil Biology, red. Hashmi M., Strezov V., Varma A. (red) tom 51, Springer, Cham, 2017
 20. Das S. N., Mandal S., Mandal M.: Plasmid mediated antibiotic and heavy metal co-resistance in bacterial isolates from mahandanda river water (Malda, India). *Transl. Med. (Sunnyvale)*. **6**, 2161–1025 (2016)
 21. D'costa V. M., McGrann K.M., Hughes D. W., Wright G.D.: Sampling the antibiotic resistome. *Science*, **311**, 374–377 (2006)
 22. Dib J., Motok J., Zenoff V. F., Ordoñez O., Farias M. E.: Occurrence of resistance to antibiotics, UV-B, and arsenic in bacteria isolated from extreme environments in high-altitude (above 4400 m) Andean wetlands. *Curr. Microbiol.* **56**, 510–517 (2008)
 23. Di Cesare A., Eckert E., Corno G.: Co-selection of antibiotic and heavy metal resistance in freshwater bacteria. *J. Limnol.* **75**, 59–66 (2016)
 24. Edwardson C. F., Hollibaugh J. T.: Metatranscriptomic analysis of prokaryotic communities active in sulfur and arsenic cycling in Mono Lake, California, USA. *ISME J.* **11**, 2195–2208 (2017)
 25. El-Deeb B.A., El-Sharouny H.M., Fahmy N.: Plasmids incidence, antibiotic and heavy metal resistance patterns of endophytic bacteria isolated from aquatic plant, *Eichhornia crassipes*. *J. Bot.* **33**, 151–171 (2006)
 26. El-Deeb B.: Plasmid mediated tolerance and removal of heavy metals by *Enterobacter* sp. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **5**, 47–53 (2009)
 27. Erdem B., Dayangaç A., Şahin İ.: The presence of metals and antibiotics resistant bacteria in arable manure soils. *Acta Phys. Pol. A*, **132**, 570–571 (2017)
 28. Essa A., Julian D., Kidd S., Brown N., Hobman J.: Mercury resistance determinants related to Tn21, Tn1696, and Tn5053 in enterobacteria from the preantibiotic era. *Antimicrob. Agents Ch.* **47**, 1115–1119 (2003)
 29. Frost L.S., Leplae R., Summers A.O., Toussaint A.: Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 722–732 (2005)
 30. Gaze W. H., Zhang L., Abdouslam N.A., Hawkey P.M., Calvo-Bado L., Royle, J., Wellington E. M.: Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *ISME J.* **5**, 1253 (2011)
 31. Goryluk A., Rekosz-Burlaga H., Błaszczuk M.: Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Chelidonium majus* L. *Pol. J. Microbiol.* **58**, 355–361 (2009)
 32. Goryluk-Salmonowicz A., Piorek M., Rekosz-Burlaga H., Studnicki M., Błaszczuk M.: Endophytic detection in selected european herbal plants. *Pol. J. Microbiol.* **65**, 369–375 (2016)
 33. Goryluk-Salmonowicz A., Orzeszko-Rywka A., Piórek M., Rekosz-Burlaga H., Otlowska A., Gozdowski D., Błaszczuk M.: Plant growth promoting bacterial endophytes isolated from Polish herbal plants. *Acta Sci. Pol-Hortoru.* **17**, 101–110 (2018)
 34. Guo J., Li J., Chen H., Bond P. L., Yuan Z.: Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. *Water Res.* **123**, 468–478 (2017)
 35. Hao S., Yang P., Han M., Xu J., Yu S., Chen C., Ning K.: Data-mining of antibiotic resistance genes provides insight into the community structure of ocean microbiome. *BioRxiv*, DOI:10.1101/246033 (2018)
 36. Hardoim P.R., van Overbeek L.S., van Elsas J.D.: Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* **16**, 463–471 (2008)
 37. Harrison J.J., Tremaroli V., Stan M.A., Chan C.S., Vacchi-Suzzi C., Heyne B.J., Parsek M.R., Ceri H., Turner R.J.: Chromosomal anti-oxidant genes have metal ion-specific roles as determinants of bacterial metal tolerance. *Environ. Microbiol.* **11**, 2491–2509 (2009)
 38. Hasman H., Aarestrup F.M.: TcrB, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. *Antimicrob. Agents Ch.* **46**, 1410–1416 (2002)
 39. Hayashi S., Abe M., Kimoto M., Furukawa S., Nakazawa T.: The DsbA-DsbB disulfide bond formation system of *Burkholderia cepacia* is involved in the production of protease and alkaline phosphatase, motility, metal resistance, and multidrug resistance. *Microbiol. Immunol.* **44**, 41–50 (2000)
 40. He H., Ye Z., Yang D., Yan J., Xiao L., Zhong T., Yuan M., Cai X., Fang Z., Jing Y.: Characterization of endophytic *Rahnella* sp. JN6 from *Polygonum pubescens* and its potential in promoting growth and Cd, Pb, Zn uptake by *Brassica napus*. *Chemosphere*, **90**, 1960–1965 (2013)
 41. Hobman J.L., Crossman L.C.: Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *J. Med. Microbiol.* **64**, 471–497 (2015)
 42. Issazadeh K., Jahanpour N., Pourghorbanali F., Raeisi G., Faekhondeh J.: Heavy metals resistance by bacterial strains. *Ann. Biol. Res.* **4**, 60–63 (2013)

43. Içgen B., Yılmaz F.: Co-occurrence of antibiotic and heavy metal resistance in Kızılırmak river isolates. *B. Environ. Contam. Tox.* **93**, 735–743 (2014)
44. Idris R., Trifonova R., Puschenreiter M., Wenzel W.W., Sessitsch A.: Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl. Environ. Microb.* **70**, 2667–2677 (2004)
45. Kalayu G., Ahemad M.: Incidence of heavy metal and antibiotic resistance in bacterial isolates from Blue Nile river water in Ethiopian region. *Int. J. Environ. Stud.* **71**, 546–569 (2014)
46. Karimi A., Sadeghi G., Vaziry A.: The effect of copper in excess of the requirement during the starter period on subsequent performance of broiler chicks. *J. Appl. Poultry Res.* **20**, 203–209 (2011)
47. Knapp C.W., McCluskey S.M., Singh B.K., Colin D.C., Hudson G., Graham W.D.: Antibiotic resistance gene abundances correlate with metal and geochemical conditions in archived Scottish soils. *PLoS One*, **6**, 1–6 (2011)
48. Levy S.B., Marshall B.: Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* **10**, S122 (2004)
49. Li A. D., Li L. G., Zhang T.: Exploring antibiotic resistance genes and metal resistance genes in plasmid metagenomes from wastewater treatment plants. *Front. Microbiol.* DOI: 10.3389/fmicb.2015.01025 (2015)
50. Liu B., Pop M.: ARDB – antibiotic resistance genes database. *Nucleic Acids Res.* **37**, D443–D447 (2009)
51. Luo S.L., Chen L., Chen J.L., Xiao X., Xu T.Y., Wan, Y., Rao C., Liu C., Liu Y., Lai C., Zeng G.: Analysis and characterization of cultivable heavy metal-resistant bacterial endophytes isolated from Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their potential use for phytoremediation. *Chemosphere*, **85**, 1130–1138 (2011)
52. Ma Y., Oliveira R.S., Nai F., Rajkumar M., Luo Y., Rocha I., Freitas H.: The hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola* harbors metal-resistant endophytic bacteria that improve its phytoextraction capacity in multi-metal contaminated soil. *J. Environ. Manage.* **156**, 62–69 (2015)
53. Malik A., Aleem A.: Incidence of metal and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from the river water, agricultural soil irrigated with wastewater and groundwater. *Environ. Monit. Assess.* **178**, 293–308 (2011)
54. Manaia C.M., Rocha J., Scaccia N., Marano R., Radu E., Biancullo F., Cerqueira F., Fortunato G., Iakovi des I.C., Zammit I., Kampouris I., Vaz-Moreira I., Nunes O.C.: Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. *Environ. Int.* **115**, 312–324 (2018)
55. Manyi-Loh C., Mamphweli S., Meyer E., Okoh A.: Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. *Molecules*, **23**, 795 (2018)
56. Marano R., Cytryn E.: The mobile resistome in wastewater treatment facilities and downstream environments. (w) Antimicrobial resistance in wastewater treatment processes, red. Keen PL I Fugere R. John Wiley I Sons, 2017, s. 129–155
57. Martínez J.L.: Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, **321**, 365–367 (2008)
58. Martínez J.L.: The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* **276**, 2521–2530 (2009)
59. Martínez J.L., Baquero F.: Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Upsala J. Med. Sci.* **119**, 68–77 (2014)
60. Martínez J.L., Coque T.M., Baquero F.: What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 116–123 (2015)
61. Martínez J.L.: Ecology and evolution of chromosomal gene transfer between environmental microorganisms and pathogens. *Microbiol. Spectr.*, **6**, 110–124 (2018)
62. Mastretta C., Taghavi S., Van Der Lelie D., Mengoni A., Galardi F., Gonnelli, C., Vangronsveld, J.: Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. *Int. J. Phytoremediat.* **11**, 251–267 (2009)
63. Mata M., Baquero F., Perez-Diaz J.: A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **187**, 185–188 (2000)
64. Matyar F., Akkan T., Uçak Y., Eraslan B.: *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). *Environ. Monit. Assess.* **167**, 309–320 (2010)
65. Mbudambula N.L., Kinyua D.M.: Antibiotic resistance of metal tolerant bacteria isolated from soil in Jula, Kenya. *Sci. Confer. Proc.* (2014)
66. McIntosh D., Cunningham M., Baijing J., Fekete F., Parry E., Clark S., Zalinger Z., Glig I., Danner R., Johnson K., Beattie M. Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254. *J. Antimicrob. Chemoth.* **61**, 1221–1228 (2008)
67. Michael I., Rizzo L., Mc Ardell C. S., Manaia C. M., Merlin C., Schwartz T., Fatta-Kassinos D.: Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water research*, **47**, 957–995 (2013)
68. Mondragón V.A., Llamas-Pérez D.F., González-Guzmán G.E., Márquez-González A.R., Padilla-Noriega R., de Jesús Durán-Avelar M., Franco B.: Identification of *Enterococcus faecalis* bacteria resistant to heavy metals and antibiotics in surface waters of the Mololoa River in Tepic, Nayarit, Mexico. *Environ. Monit. Assess.* **183**, 329–340 (2011)
69. Munita J.M., Arias C.A.: Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.* **4**, 1–37 (2016)
70. Nielsen F.H.: History of zinc in agriculture. *Adv. Nutr.* **3**, 783–789 (2012)
71. Nikonorow E., Baraniak A., Gniadkowski M.: Oporność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* na antybiotyki β -laktamowe wynikająca z wytwarzania β -laktamaz. *Post. Mikrobiol.* **52**, 261–271 (2013)
72. Ociepa-Kubicka A., Ociepa E.: Toksyczne oddziaływanie metali ciężkich na rośliny, zwierzęta i ludzi. *Inżynieria i ochrona środowiska*, **15**, 169–180 (2012)
73. Oleńska E., Małek W.: Mechanizmy oporności bakterii na metale ciężkie. *Post. Mikrobiol.* **4**, 363–371 (2013)
74. Osman O., Tanguichi H., Ikeda K., Park P., Tanabe-Hosoi S., Nagata S.: Copper-resistant halophilic bacterium isolated from the polluted Maruit Lake, Egypt. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 1459–1470 (2010)
75. Pal C., Bengtsson-Palme J., Rensing C., Kristiansson E., Larsson D.J.: BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucleic Acids Res.* **42**, D737–D743 (2014)
76. Pal C., Bengtsson-Palme J., Kristiansson E., Larsson D.: Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics*, **16**, 1–14 (2015)
77. Piotrowska M., Popowska M.: The prevalence of antibiotic resistance genes among *Aeromonas* species in aquatic environments. *Ann. Microbiol.* **64**, 921–934 (2014)
78. Piotrowska M., Przygodzińska D., Matyjewicz K., Popowska M.: Occurrence and variety of β -lactamase genes among *Aeromonas* spp. isolated from urban wastewater treatment plant. *Front. Microbiol.* **8**, 1–12 (2017)

79. Piotrowska M., Rzczycka M., Ostrowski R., Popowska M.: Diversity of antibiotic resistance among bacteria isolated from sediments and water of carp farms located in a Polish nature reserve. *Pol. J. Environ. Stud.* **26**, 239–252 (2017)
80. Piotrowska M., Kowalska S., Popowska M.: Diversity of β -lactam resistance genes in gram-negative rods isolated from a municipal wastewater treatment plant. *Ann. Microbiol.* 1–11 (2019)
81. Poole K.: Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 55S–64S (2002)
82. Popowska M.: Antybiotykooporność w środowisku naturalnym – przyczyny i konsekwencje. *Kosmos*, **66**, 81–91 (2017)
83. Popowska M., Krawczyk-Balska A.: Broad-host-range IncP-1 plasmids and their resistance potential. *Front. Microbiol.* **4**, 1–8 (2013)
84. Popowska M., Miernik A., Rzczycka M., Łopaciuk A.: The impact of environmental contamination with antibiotics on levels of resistance in soil bacteria. *J. Environ. Qual.* **39**, 1679–1687 (2010)
85. Popowska M., Rzczycka M., Miernik A., Krawczyk-Balska A., Walsh F., Duffy B.: Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance and associated resistance genes. *Antimicrob. Agents Ch.* **56**, 1434–1443 (2012)
86. Pruden A., Larsson D.G., Amézquita A., Collignon P., Brandt K.K., Graham D.W., Lazorchak J.M., Suzuki S., Silley P., Snape J.R., Topp E., Zhang T., Zhu Y.G.: Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ. Health Perspect.* **121**, 878–885 (2013)
87. Rekosz-Burlaga H., Borys M., Goryluk-Salmonowicz A.: Cultivable microorganisms inhabiting the aerial parts of *Hypericum perforatum*. *Acta Sci. Pol-Hortoru.* **13**, 117–129 (2014)
88. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) 1831/2003 z dnia 22 września 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt.
89. Schlüter A., Szczepanowski R., Pühler A., Top E.M.: Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 449–477 (2007)
90. Seiler C., Berendonk T. U.: Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.* **3**, 399 (2012)
91. Sheng X.F., Xia J.J., Jiang C.Y., He L.Y., Qian M.: Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environ. Pollut.* **156**, 1164–1170 (2008)
92. Shin M.N., Shim J., You Y., Myung H., Bang K.S., Cho M., Kamala-Kanna S., Oh B.T.: Characterization of lead resistant endophytic *Bacillus* sp. MN3-4 and its potential for promoting lead accumulation in metal hyperaccumulator *Alnus firma*. *J. Hazard. Mater.* **199**, 314–320 (2012)
93. Stepanauskas R., Glenn T., Jagoe C., Tuckfield R., Lindell A., McArthur J.: Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 3671–3678 (2005)
94. Sun L.N., Zhang Y.F., He L.Y., Chen Z.J., Wang Q.Y., Qian M., Sheng X.F.: Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresource Technol.* **101**, 501–509 (2010)
95. Thomsen P.T.: Efficacy of copper sulfate hoof baths against digital dermatitis- where is the evidence? *J. Dairy Sci.* **98**, 2539–2544 (2015)
96. Wales A., Davies R.: Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics*, **4**, 567–604 (2015)
97. Wang L., Lin H., Dong Y., He Y., Liu C.: Isolation of vanadium-resistance endophytic bacterium PRE01 from *Pteris vittata* in stone coal smelting district and characterization for potential use in phytoremediation. *J. Hazard. Mater.* **341**, 1–9 (2018)
98. Wardwell L.H., Jude B.A., Moody J.P., Olcerst A.I., Gyure R.A., Nelson R.E., Fekete F.A.: Co-selection of mercury and antibiotic resistance in sphagnum core samples dating back 2000 years. *Geomicrobiol. J.* **26**, 238–247 (2009)
99. Wireman J., Liebert C.A., Smith T., Summers A.O.: Association of mercury resistance with antibiotic resistance in the gram-negative fecal bacteria of primates, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4494–4503 (1997)
100. World Health Organization: Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization (2014)
101. Wright G. D.: The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 175–186 (2007)
102. Yang Y., Liu W., Xu C., Wei B., Wang J.: Antibiotic resistance genes in lakes from middle and lower reaches of the Yangtze River, China: effect of land use and sediment characteristics. *Chemosphere*, **178**, 19–25 (2017a)
103. Yang Y., Xu C., Cao X., Lin H., Wang J.: Antibiotic resistance genes in surface water of eutrophic urban lakes are related to heavy metals, antibiotics, lake morphology and anthropic impact. *Ecotoxicology*, **26**, 831–840 (2017b)
104. Yang Y., Song W., Lin H., Wang W., Du L., Xing W.: Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: A review and meta-analysis. *Environ. Int.* **116**, 60–73 (2018)
105. Yang Y., Liu G., Song W., Ye C., Lin H., Li Z., Liu W.: Plastics in the marine environment are reservoirs for antibiotic and metal resistance genes. *Environ. Int.* **123**, 79–86 (2019)
106. Yang Y., Li Z., Song W., Du L., Ye C., Zhao B., Cao X.: Metagenomic insights into the abundance and composition of resistance genes in aquatic environments: Influence of stratification and geography. *Environ. Int.* **127**, 371–380 (2019)
107. Yi S.W., Kim D. C., You M. J., Kim B. S., Kim W. I., Yi S. W., Shin, G.W.: Antibiotic and heavy-metal resistance in motile *Aeromonas* strains isolated from fish. *Afr. J. Microbiol. Res.* **8**, 1793–1797 (2014)
108. Zhai Y., He Z., Kang Y., Yu H., Wang J., Du P., Zhang Z., Hu S., Gao Z.: Complete nucleotide sequence of pH11, an IncHI2 plasmid conferring multi-antibiotic resistance and multi-heavy metal resistance genes in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Plasmid*, **86**, 26–31 (2016)
109. Zhang F., Li Y., Yang M., Li W.: Content of heavy metals in animal feeds and manures from farms of different scales in northeast China. *Int. J. Environ. Res. Pub.* **9**, 2658–2668 (2012)

