

# DINAMICA POPULAȚIILOR BACTERIENE ÎN ECOSISTEMELE DELTAICE - STUDIU DE CAZ PE BRAȚUL SFÂNTU GHEORGHE

## MICROBIAL POPULATION DYNAMICS IN DELTAIC ECOSYSTEMS - CASE STUDY ON SFÂNTU GHEORGHE BRANCH

Alina CATRANGIU \*, \*\*, \*\*\*

Daniela NICULESCU \*

Irina LUCACIU \*

Catalina STOICA \*

Carmen CHIFIRIUC \*\*

Grigore MIHAESCU \*\*

**ABSTRACT.** The aquatic ecosystems - a perfect environment to propagate the characters of pathogenicity and virulence of the microorganisms, could be reservoirs of antibiotic resistance genes.

During January - June 2013, a program to investigate bacteriological water quality of St. Gheorghe branch has been created. The investigations were carried out systematically, by establishing 11 locations with anthropogenic potential risks that could influence the quality of aquatic ecosystems. The surface water and sediments samples were monthly collected and the bacteriological indicators with their antibiotic resistance profile were quantified and analyzed. The *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas sp.* strains with antibiotic resistance profile were identified and they were subjected to PCR technique to identify the genes encoding these resistance mechanisms. The natural resistance mechanisms to antibiotics were identified, but there was amplified a *tem* gene which encode for resistance to  $\beta$ -lactams.

**KEYWORDS:** Bacteria, antibiotic resistance genes, Danube Delta.

### 1. INTRODUCERE

Ecosistemul acvatic este mediul ideal de diseminare a caracterelor de patogenitate și virulență ale microorganismelor și poate deveni un rezervor de gene de rezistență la antibiotice. Contaminarea microbiologică a apei este o problemă actuală cu consecințe negative asupra sănătății populației, mai ales dacă ecosistemul este integrat într-o arie protejată precum Delta Dunării. Microorganismele pot pătrunde în toate tipurile de ecosisteme, iar atunci când dobândesc rezistență la antibiotice, sunt facilitate apariția patologiei infecțioase și transferul genelor de rezistență.

**Obiectivul studiului experimental** a fost reprezentat de realizarea investigațiilor microbiolo-

### 1. INTRODUCTION

The aquatic ecosystem is the perfect environment to propagate the characters of pathogenicity and virulence of the microorganisms and it can become a reservoir of antibiotic resistance genes.

The microbiological contamination of water is a current problem with negative effects on population health, especially when the ecosystem is integrated in a protected area such as the Danube Delta. Microorganisms can penetrate all types of ecosystems, but when they acquire antibiotic resistance, the transfer of antibiotic resistance genes and the emergence of diseases are facilitated.

The **aim of the experimental study** was to monitor the microbiological pollution of the aquatic eco-

\* Institutul - ECOIND, 71-73 Drumul Podu Dâmboviței, București - 6, România, [ecoind@incdecoind.ro](mailto:ecoind@incdecoind.ro)

\*\* Universitatea din București, Facultatea de Biologie, Splaiul Independenței 91-95, București, Sector 5, România, [www.bio.unibuc.ro](http://www.bio.unibuc.ro)

\*\*\* [alina.catrangiu@gmail.com](mailto:alina.catrangiu@gmail.com)

gice în Delta Dunării (*brațul Sfântu Gheorghe*) și monitorizarea diversității populațiilor bacteriene cu **scopul** de a evidenția tulpinile rezistente la antibiotice și genele codificatoare pentru mecanismele de rezistență.

Depășind limitele capacității productive de regenerare și de diluție proprii ecosistemelor acvatice, agenții poluanți proveniți atât din surse punctiforme cât și din surse difuze, se răspândesc rapid prin însuși curentul de scurgere al apei [1].

În Delta Dunării sunt zone în care apa fluviului este utilizată ca principală sursă de apă potabilă, fără aplicarea proceselor de dezinfecție.

De la înființarea Deltei Dunării ca Rezervație a Biosferei (1990), instituțiile naționale de specialitate au arătat interesul față de dezvoltarea relațiilor de cooperare cu Rezervația Biosferei Delta Dunării [2]. La nivel național există un cadru legislativ care stabilește principiile de conservare ale tuturor activităților de mediu și prezintă regulile pentru a îndeplini condițiile de calitate ale apei de suprafață. Indicatorii bacteriologici recomandați pentru monitorizarea calității apei sunt *bacteriile coliforme și enterococii intestinali*, însă calitatea microbiologică nu se rezumă la aceste microorganisme, ci depinde de propagarea caracterelor de patogenitate și virulență.

Ca areal de studiu s-a ales *brațul Sfântu Gheorghe*, cel mai vechi braț al Deltei Dunării, transportând 22% din volumul de apă și aluviuni. Programul de investigare a fost realizat luând în calcul impactul activităților antropice asupra ecosistemelor acvatice.

## 2. MATERIALE ȘI METODE

De-a lungul brațului Sfântu Gheorghe s-au localizat **11 puncte de prelevare**, având în vedere unele aspecte antropogene care ar putea influența calitatea ecosistemului acvatic (*figura 1*).

Investigațiile au fost efectuate lunar, pe secțiunile de control selectate, în cadrul campaniilor de prelevare a probelor de apă de suprafață și sediment, realizate în perioada Ianuarie - Iunie 2013.

Analizele au fost efectuate în Laboratorul Control bacteriologic la *INCD ECOIND* și, de asemenea, în *Laboratorul de Microbiologie al Universității din București*.

Prelevarea eșantianelor de apă și sediment a

system in the Danube Delta (*St. Gheorghe Branch*) and to identify antibiotic resistant bacteria and the genes which codify the resistance mechanisms.

By exceeding the limits of productive capacity, regeneration and dilution of the aquatic ecosystems, the pollutants originating from point and diffused sources are rapidly spread by the water streams itself [1].

In the Danube Delta are some areas where the population uses the surface water as drinking water source, without applying any treatment or disinfection processes.

Since the establishment of the Danube Delta as a Biosphere Reserve (1990), the international specialized institutions have shown their interest in developing the cooperation relations with the Danube Delta Biosphere Reserve [2]. At national level, there is a unitary legal framework that establishes the principles for all environmental activities preservation and outlines the rules to meet the quality requirements of the surface water. The bacteriological indicators recommended to be monitored are: *coliform bacteria and intestinal Enterococcus*, but the microbiological quality of water means more than these microorganisms, it means the propagation of the bacterial characters of pathogenicity and virulence.

As a reference area for this study, the *St. Gheorghe Branch* was chosen as emissary, the oldest branch that carries out 22% of the water and sediment total volume. The investigation program taking into account the anthropogenic activities impact on the aquatic ecosystems.

## 2. MATERIALS AND METHODS

There were established **11 sampling points**, considering some anthropogenic issues that could influence the aquatic ecosystem quality (*figure 1*).

The investigations were performed monthly, on the selected control sections, within the surface water and sediments sampling campaigns, carried out during January - June, 2013.

The analyses were performed in Bacteriological Control Laboratory from *INCD-ECOIND* and also, in *Microbiology Laboratory from University of Bucharest*.

Sterile containers for sampling of water and sediment were used [3].



**Fig. 1. Secțiunile de control pe Brațul Sfântu Gheorghe (S1 - Isaccea, S2 - Amonte Tulcea, S3 - Aval Tulcea, S4 - Nufăru, S5 - Bălteni, S6 - Mahmudia, S7 - Murighiol, S8 - Uzlina, S9 - Ivancea, S10 - St. Gheorghe port, S11 – confluența cu Marea Neagră).**

**Fig. 1. The sampling points on the Sfântu Gheorghe Branch (S1- Isaccea, S2 - Upstream Tulcea, S3 - Downstream Tulcea, S4 - Nufăru, S5 - Bălteni, S6 - Mahmudia, S7 - Murighiol, S8 - Uzlina, S9 - Ivancea, S10 - St. Gheorghe port, S11 - Black Sea confluence).**

fost realizată în condiții aseptice, fiind utilizate recipiente sterile [3].

Analiza probelor de apă de suprafață s-a efectuat prin metoda membranei filtrante, iar probele de sediment au fost analizate prin tehnica tuburilor multiple. Mediul solid *Chapman TTC agar* s-a utilizat pentru identificarea bacteriilor coliforme din apa de suprafață, iar *Bulion Lauril sulfat de sodiu* pentru eșantioanele de sediment [4, 5, 6].

Enterococii din probele de apă au fost identificați pe mediul solid *Slanetz and Bartley*, iar cei din sediment au fost determinați folosind *Bulion azidă de sodiu* [6, 7]. În eșantioanele de apă de suprafață s-a decelat și *Pseudomonas aeruginosa*, prezența acestuia fiind controlată prin metoda membranei filtrante [8].

Pentru obținerea culturilor pure, coloniile izolate au fost însămânțate pe mediu nutritiv, iar antibiogramele au fost realizate prin metoda disc-difuzimetrică pe mediu Muller-Hinton. Pentru testarea rezistenței la substanțe antibacteriene, s-au utilizat diferite tipuri de antibiotice:

- *Antibiotice generale (Kanamicină, Acid Nalidixic, Tetraciclină și Trimetoprim) și antibiotice B-lactamice (Amoxicilină cu Acid clavulanic, Ceftriaxonă, Ceftazidim, Ampicilină și Imipenem)*

The membrane filtration method was used to perform bacteriological analysis of surface water and multiple-tube technique for the sediment microorganism's analysis.

The coliform bacteria identification in surface water samples was performed by membrane filtration method on *Chapman TTC medium* and the identification of the coliform bacteria in sediment samples was performed by multiple-tube on *Sodium lauryl sulphate broth* [4, 5, 6].

The *Enterococcus* in surface water samples was identified through membrane filtration method on *Slanetz and Bartley* medium and the *Enterococcus* in sediment samples was performed by multiple-tube method [6, 7].

The presence of *Pseudomonas aeruginosa* was controlled only in the surface water samples and its identification was performed by membrane filtration method on *Pseudomonas agar base medium* [8]. To obtain isolated colonies it was used the agarose gel and the antibioresistance was specifically performed for each bacterial class on Muller-Hinton medium by using the disc-diffusion method.

Different antibiotics were used to identify the resistance of specific bacteria, as follows:

- *The general antibiotics (kanamycin, nalidixic*

pentru *Enterobacteriaceae*;

- Ampicilină, Vancomicină, Ciprofloxacin, Tetraciclină și Gentamicină pentru *Enterococcus*;
- Kanamicină, Ciprofloxacin și antibiotice  $\beta$ -lactamice (Imipenem, Cefepim, Ceftazidim și Piperacilină) pentru *Pseudomonas aeruginosa*.

Identificarea genelor care codifică pentru rezistența la antibiotice s-a efectuat aplicând metode de biologie moleculară. S-au selectat tulpini de *Enterobacteriaceae* și *Pseudomonas sp.* rezistente la antibioticele  $\beta$ -lactamice și s-au supus extracției ADN. Materialul genetic rezultat a fost utilizat în tehnica PCR. În acest proces au fost utilizați primerii *tem*, *shv*, *ctx-M*, *cmv* și *oxa* pentru tulpinile de *Enterobacteriaceae* și *tem*, *shv* și *pse* pentru *Pseudomonas sp.*

### 3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele analizelor cantitative ale indicatorilor bacteriologici din eșantioanele prelevate evidențiază dinamica populației bacteriene în diferite condiții de mediu. Datele numerice obținute sunt prezentate în figurile 2, 3, 4 și 5.

Analiza cantitativă a bacteriilor coliforme în probe de apă și sediment a indicat valori ridicate în lunile februarie și, respectiv, aprilie 2013.

Indicatorul bacteriologic *Enterococcus sp.* a înregistrat valori semnificativ mai mari în probele de

acid, tetracycline and trimethoprim) and  $\beta$ -lactam antibiotics (amoxicilline with clavulanic acid, ceftriaxone, ceftazidime, ampicilline and imipenem) were used for *Enterobacteriaceae*;

• The ampicillin, vancomycin, ciprofloxacin, tetracycline and gentamicin disks were used for *Enterococcus*;

• The kanamycin, ciprofloxacin and  $\beta$ -lactam antibiotics (imipenem, cefepim, ceftazidime and piperacillin) were tested for *Pseudomonas aeruginosa*.

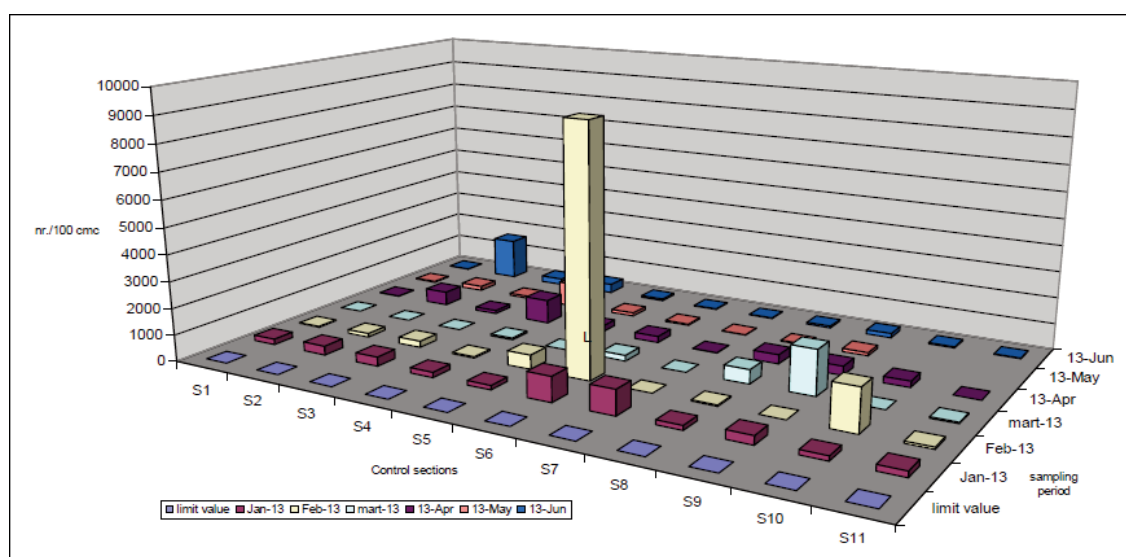
To identify the genes that determine the microorganisms resistant to antibiotics, the *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas sp.* strains resistant to the  $\beta$ -lactams were selected and subjected to DNA extraction used in PCR technique.

To point out the acquired resistance genes such as ESBL type, the primers: *tem*, *shv*, *ctx-M*, *cmv* and *oxa* were used for *Enterobacteriaceae* strains and the primers: *tem*, *shv* and *pse* were used for *Pseudomonas sp.* strains.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

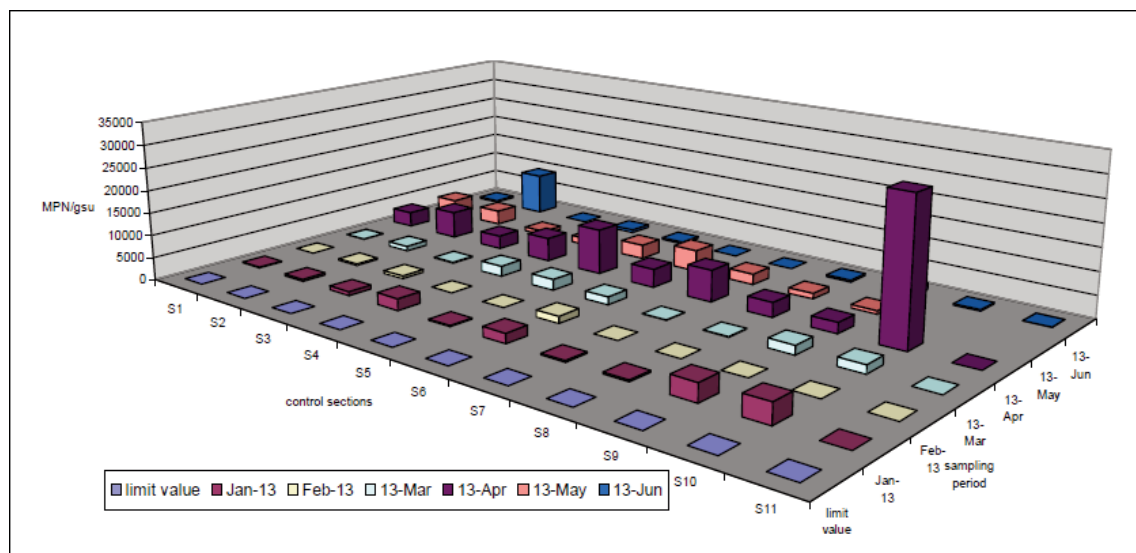
The microbiological indicators were quantitatively analyzed from surface water and sediment samples to observe the bacterial population dynamics in different environmental conditions.

The obtained results are present in figure 2, 3, 4 and 5. The quantitative analysis of coliform bacteria



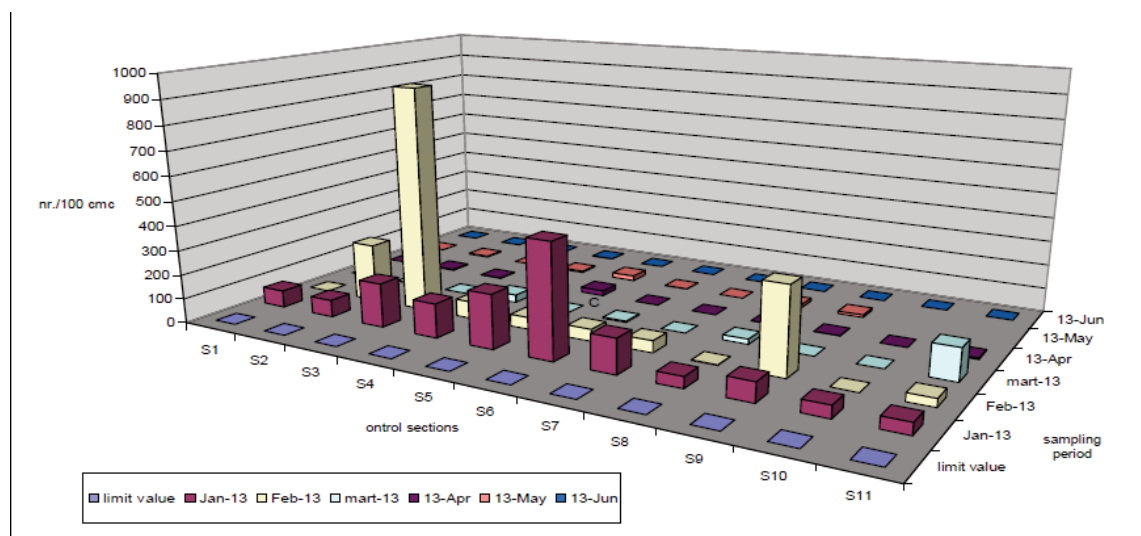
**Fig. 2. Variația spațio - temporală a indicatorului bacterii coliforme totale în probele de apă de suprafață prelevate din cele 11 secțiuni de control în perioada Ianuarie - Iunie 2013.**

**Fig. 2. Spatial and temporal variation of total coliforms indicator from surface water samples taken from the 11 control sections during January - June 2013.**



**Fig. 3. Variația spațio - temporală a indicatorului bacterii coliforme totale în probele de sediment prelevate din cele 11 secțiuni de control în perioada Ianuarie - Iunie 2013.**

**Fig. 3. Spatial and temporal variation of total coliforms indicator from sediment samples taken from the 11 control sections during January - June 2013.**



**Fig. 4. Variația spațio - temporală a indicatorului *Enterococcus sp.* în probele de apă de suprafață prelevate din cele 11 secțiuni de control în perioada Ianuarie - Iunie 2013.**

**Fig. 4. Spatial and temporal variation of *Enterococcus sp.* indicator from surface water samples taken from the 11 control sections during January - June 2013.**

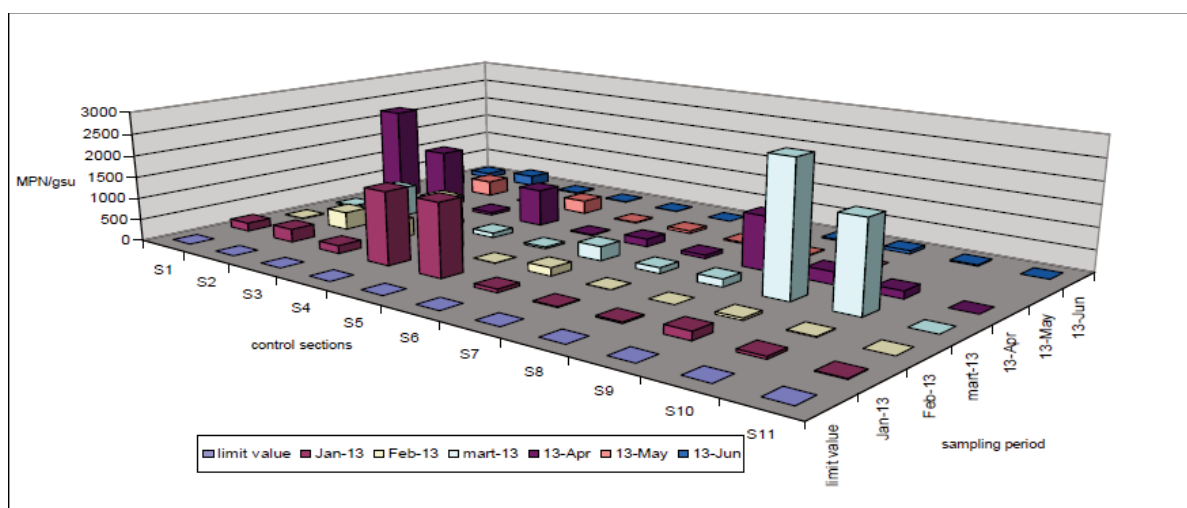
apă de suprafață, în ianuarie și februarie și a fost decelat sporadic în primele trei luni de prelevare, în probele de sediment.

Cuantificarea indicatorilor microbiologici în componentele ecosistemului acvatic nu este suficientă pentru a determina potențialul patogen bacterian. Bacteriile rezistente la antibiotice au devenit o preocupare constantă în toată Europa, diseminându-se și cauzând apariția continuă de noi

in water and sediment samples indicated high values in February and respectively April 2013.

*Enterococcus sp.* recorded significantly high values in surface water samples in January and February and was found sporadically in the first three months of sampling, in the sediment samples.

Quantification of microbiological indicators in aquatic ecosystem components is not sufficient to determine the pathogenic potential of any bacteria.



**Fig. 5. Variația spațio - temporală a indicatorului *Enterococcus sp.* în probele de sediment prelevate din cele 11 secțiuni de control în perioada Ianuarie - Iunie 2013.**

**Fig. 5. Spatial and temporal variation of *Enterococcus sp.* indicator from sediment samples taken from the 11 control sections during January - June 2013.**

fenotipuri de rezistență.

Antibiogramele tulpinilor determinate în probele de apă de suprafață și sediment au indicat atât prezența mecanismelor de rezistență naturală cât și a celor de rezistență dobândită.

Au fost identificate **4 bacterii rezistente la antibioticele B - lactamice:**

- *Ewingella americana* și *Pseudomonas aeruginosa* proba de apă din secțiunea de control S4 (Nufăru);

- *Pasteurella pneumotropica* în apa de suprafață din punctul de prelevare S7 (Murighiol);

- *Pseudomonas luteola* în apa prelevată din secțiunea S9 (Ivancea).

În prima jumătate a secolului trecut, producția de antibiotice a fost una dintre cele mai importante realizări ale medicinei. Utilizarea agenților antimicrobieni a redus mortalitatea și a contribuit substanțial la creșterea duratei de viață umană. Antibioticele sunt utilizate ca agenți terapeutici sau profilactici în medicina umană și, de asemenea, pe scară largă în practicile agricole.

De-a lungul timpului, mai multe specii de bacterii au dobândit mecanisme de rezistență la antibiotice care sunt rapid răspândite în mediul înconjurător și transmise pe orizontală [9].

Pentru a evidenția genele de rezistență enzimatică de tip BLSE, au fost utilizați primerii de gene *tem*, *shv*, *ctx-M*, *cmv* și *oxa* pentru tulpinile de en-

Antibiotic resistant bacteria have become a constant concern throughout Europe, spreading and causing continuous occurrence of new phenotypes of resistance. Isolated strains from surface water and sediment samples were subjected to antibiogram which indicated the presence of the mechanisms of acquired resistance.

There were identified **four B - lactams resistant bacteria**, as follows:

- *Ewingella americana* and *Pseudomonas aeruginosa* in water sample from S4 sampling point (Nufăru);

- *Pasteurella pneumotropica* in water sample from S7 sampling point (Murighiol);

- *Pseudomonas luteola* in water sample from S9 sampling point (Ivancea).

In the first half of the previous century, the production of antibiotics has been one of medicine's greatest achievements. The use of antimicrobial agents has reduced human's mortality and substantially contributed to human's increased life span. Antibiotics are used either as therapeutic or as prophylactic agents, also widely used in agricultural practices [9].

Over time, more bacterial species have acquired increasing antibiotic resistance mechanisms and those are rapidly spreading into environment.

To emphasize the enzymatic resistance genes as ESBL type, the primers of *tem*, *shv*, *ctx-m*, *cmv* and

terobacterii și primerii *tem*, *shv* și *pse* pentru *Pseudomonas aeruginosa*. Electroforeza în gel de agaroză a demonstrat prezența β-lactamazei TEM la *Pseudomonas aeruginosa* dintr-un eșantion de apă de suprafață (figura 6).

Rezistența naturală la antibioticele Ampicilină și Amoxicilină cu Acid clavulanic a fost evidențiată la *Ewingella americana*, *Pasteurella pneumotropica*, *Pseudomonas luteola*. Este posibil ca aceste bacterii să dețină gene de rezistență care sunt activate numai în prezența unui antibiotic inductibil.

*Pseudomonas aeruginosa* reprezintă un fenomen de rezistență la antibiotice și demonstrează practic toate mecanismele de rezistență bacteriană, atât enzimatice, cât și mutaționale [10]. Este cunoscut faptul că *Pseudomonas sp.* prezintă rezistență intrinsecă la numeroase antibiotice și are capacitatea de a dobândi gene codificatoare în prezența unor factori determinanți.

Cel mai frecvent mecanism de rezistență al acestor agenți cu potențial patogen este producerea de β-lactamaze și enzime implicate în metabolismul aminoglicozidelor [11].

*oxa* genes were used for the *Enterobacteriaceae* strains and the primers of *tem*, *shv* and *pse* genes for *Pseudomonas aeruginosa* strain.

The electrophoresis on agars gel showed the presence of *tem* β-lactamase at *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from surface water sample (figure 6).

The natural resistance to antibiotics such as ampicilin and augumentin was demonstrated for *Ewingella americana*, *Pasteurella pneumotropica*, *Pseudomonas luteola* bacterial strains. It is possible that these bacteria have resistance genes which are activated only in the presence of an inducible antibiotic.

*Pseudomonas aeruginosa* represents a phenomenon of antibiotic resistance and demonstrates practically all known enzymatic and mutational mechanisms of bacterial resistance [10]. It is known that *Pseudomonas sp.* has intrinsic resistance to many antibiotics and the ability to acquire gene encoding resistance determinants.

The most common resistance mechanism of these pathogens is the production of β-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes [11].

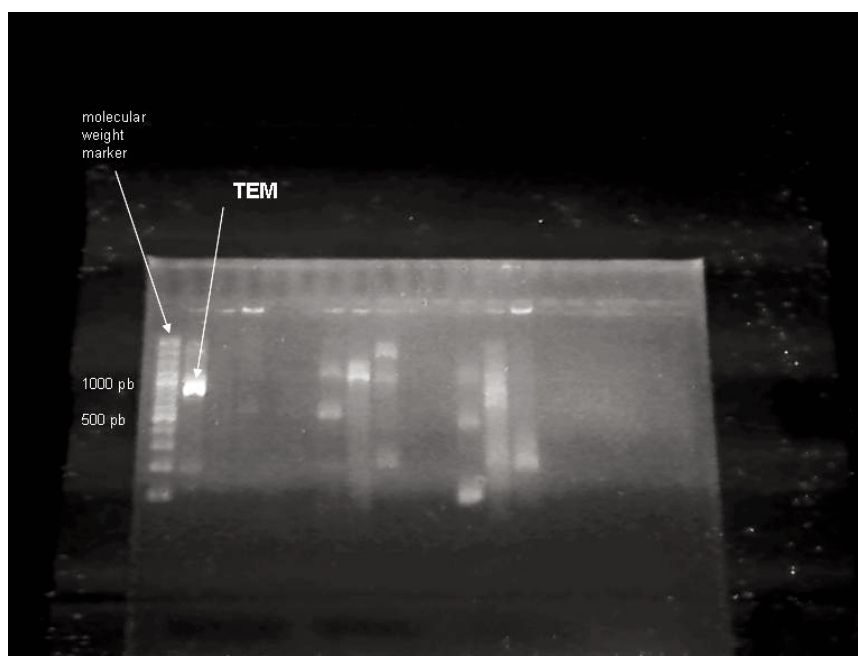


Fig. 6. Gena de rezistență *tem* la tulpină de *Pseudomonas aeruginosa* [apă de suprafață - S4 (Nufăru)].

Fig. 6. The *tem* resistance gene at *Pseudomonas aeruginosa* strain [water sample - S4 (Nufaru)].

#### 4. CONCLUZII

Potențialul ridicat de patogenitate și virulență detectat prin indicatori de poluare fecală în apa de suprafață a indicat o capacitate impresionantă de a dobândi și de a transmite caracterele genetice care definesc mecanismele de rezistență la antibiotice. Fenomenele de sinergism și antagonism și spectrele de rezistență rezultate din antibiograme au indicat varietatea de antibiotice  $\beta$ -lactamice la care microorganismele din ecosistemele acvatice au dezvoltat rezistență.

În perioada studiului efectuat în Delta Dunării, pe **Brațul Sf. Gheoghe**, s-a evidențiat rezistența naturală a microorganismelor la antibiotice și s-a identificat o genă *tem*, responsabilă de rezistența unei tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*. Așadar, a fost demonstrat faptul că rezistența la antibioticele  $\beta$ -lactamice a devenit un fenomen frecvent în mediul acvatic. În acest moment, este importantă diminuarea impactului social al efectului de rezistență la antibiotice prin cunoașterea caracteristicilor genetice care contribuie la acest fenomen. Utilizarea optimă a antibioticelor va reduce densitatea tulpinilor bacteriene rezistente la antibiotice și, prin urmare, va fi redus riscul de contaminare a populației.

#### BIBLIOGRAFIE (REFERENCES)

[1] M. Karamouz, A. Khajehzadeh, C. Kerachian: *Design of on-lineriver water quality monitoring systems using the entropy theory: a case study. Environmental monitoring assessment*, 55 (1-4), 2009.

[2] P. Gâștescu: *The Danube Delta Biosphere Reserve: geography, biodiversity, protection, management*, Journal Geography, 53, Bucharest, 2009.

[3] SR EN ISO 19458:2007: Water quality. Sampling for microbiological analysis.

[4] SR EN ISO 9308-1/2004: Water quality. Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 1: Membrane filtration method.

[5] SR EN ISO 9308-2/1990: Water quality. Detection and enumeration of coliform organisms, thermotolerant coliform organisms and presumptive *Escherichia coli*. Part 2: Multiple tube (most probable number) method.

#### 4. CONCLUSIONS

The high pathogenicity and virulence potential detected by fecal pollution indicators in the surface water indicated an impressive capacity to acquire and transmit the genetic characters that define the antibiotic resistance mechanisms. The synergism and antagonism phenomena and the resistance spectra resulting from antibiogram indicated large variety of  $\beta$ -lactam antibiotics to which the aquatic ecosystems microorganisms have developed resistance.

This study performed in the Danube Delta, on **Sf. Gheoghe Branch** emphasized both natural resistance and a *tem* gene which causes antibiotic resistance for *Pseudomonas aeruginosa*, because the  $\beta$ -lactam resistance became more common in aquatic environment.

At this point it is important to diminish the social impact of the antibiotic resistance effect by knowing the genetic characteristics which contribute to this phenomenon. The optimal use of antibiotics will reduce antibiotic resistant bacterial strains and consequently the risk of population contamination will be reduced.

[6] ICIM. Proposal to develop methodology sediment microbiology.

[7] SR EN ISO 7899/2:2002. Water quality. Detection and enumeration of intestinal enterococi. Part 2: Membrane filtration method.

[8] SR EN ISO 16266:2008: Water quality. Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* - Method by membrane filtration.

[9] A. H. A. M. van Hoek, D. Mevius, B. Guerra, P. Mullany, A. P. Roberts, H. J. M. Aarts: *Acquired antibiotic resistance genes: an overview*, Frontiers in Microbiology, 2, 2011.

[10] T. Strateva, D. Yordanov: *Pseudomonas aeruginosa a phenomenon of bacterial resistance*. Journal of medical microbiology, 58, Bulgaria, 2009.

[11] S. L. Pandrea, L. M. Junie: *Pseudomonas aeruginosa fenotipuri de rezistență la antibiotice*. Clujul Medical, 84 (1), Cluj-Napoca, 2011.