



**UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI**  
**FACULTATEA DE BIOLOGIE**  
**ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

**-REZUMAT-**

**Conducător științific:**  
**Prof. Dr. GRIGORE MIHĂESCU**

**Îndrumător științific:**  
**Prof. Dr. MARIANA CARMEN CHIFIRIUC**

**Doctorand:**  
**ALINA ROXANA CATRANGIU (BANCIU)**

**2015**



MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI  
CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE

Proiect cofinanțat prin Programul NUCLEU - Cercetare de Mediu – Prioritate în dezvoltarea industrială durabilă bazată pe cunoaștere – Mediul și Industria – MEDIND 2012-2015

Denumirea obiectivului: Evaluarea poluării generate de activitățile industriale

Titlul proiectului: Determinarea profilului de rezistență la antibiotice a tulpinilor bacteriene din ecosistemele acvatice deltaice

Cod Proiect PN09-13 02 10

## TEZĂ DE DOCTORAT

-REZUMAT-

# DETERMINAREA POTENȚIALULUI PATOGENIC MICROBIAN AL DELTEI DUNĂRII

**Conducător științific:**

**Prof. Dr. GRIGORE MIHĂESCU**

**Îndrumător științific:**

**Prof. Dr. MARIANA CARMEN CHIFIRIUC**

**Doctorand:**

**ALINA ROXANA CATRANGIU (BANCIU)**



## CUPRINS

<b>INTRODUCERE.....</b>	<b>4</b>
<b>CAPITOLULI .....</b>	<b>6</b>
I.1. Legislația națională și europeană cu privire la supravegherea condițiilor de calitate ale ecosistemelor acvatice din Delta Dunării .....	6
I.2. Stadiul actual al cercetării în domeniul ecologiei bacteriene .....	8
I.2.1. Indicatori ai poluării fecale .....	10
I.2.1.1. Bacterii coliforme .....	10
I.2.1.2. Enterococi .....	14
I.3. Cadrul conceptual al cercetărilor .....	17
<b>CAPITOLUL II. Impactul microorganismelor asupra ecosistemelor acvatice .....</b>	<b>18</b>
II.1. Ecologia microorganismelor acvatice .....	18
II.2. Patogenitatea și virulența microorganismelor .....	21
II.2.1. Mediul acvatic – rezervor de patogenitate, virulență și rezistență la antibiotice .....	23
<b>CAPITOLUL III. Acțiunea antibioticelor asupra microorganismelor .....</b>	<b>30</b>
<b>SCOPUL ȘI OBIECTIVELE LUCRĂRII .....</b>	<b>33</b>
<b>CAPITOLUL IV. INVESTIGAREA POTENȚIALULUI PATOGEN AL MICROORGANISMELOR – INDICATORI DE POLUARE FECALĂ DIN ECOSISTEMUL ACVATIC AL BRAȚULUI SFÂNTUGHEORGHE.....</b>	<b>34</b>
<b>IV.1. Materiale și metode .....</b>	<b>34</b>
IV.1.1. a. Stabilirea secțiunilor de control pe cursul brațului Sfântu Gheorghe în funcție de sursele de poluare .....	34
IV.1.1.b. Analiza cantitativă a indicatorilor de poluare fecală .....	35
IV.1.1.1. Determinarea numărului probabil de bacterii coliforme totale și fecale .....	35
IV.1.1.2. Determinarea numărului probabil de enterococi .....	37
IV.1.1.3. Determinarea densității bacteriilor – indicatori de poluare fecală ai ecosistemului acvatic în diferite condiții	

de temperatură și pH .....	38
IV.1.2. Analiza calitativă a microorganismelor potențial patogene din probele colectate din brațul Sfântu Gheorghe .....	40
IV.1.2.1. Izolarea și identificarea microorganismelor potențial patogene din probele de apă de suprafață și sediment .....	40
IV.1.2.2. Testarea sensibilității tulpinilor microbiene izolate la antibiotice .....	42
IV.1.2.3. Evidențierea factorilor de virulență .....	43
IV.1.2.4. Evidențierea genelor de rezistență la antibiotice prin tehnica PCR .....	44
<b>IV.2. Rezultate și discuții .....</b>	<b>46</b>
IV.2.1. a. Harta punctelor de lucru pe brațul Sfântu Gheorghe .....	46
IV.2.1.b. Analiza cantitativă a bacteriilor coliforme și enterococilor în eșantioanele recoltate din brațul Sfântu Gheorghe în perioada 2013-2014 .....	47
IV.2.1.1. Apa de suprafață .....	48
IV.2.1.2. Sedimentul .....	62
IV.2.2. Influența temperaturii și valorii pH asupra densității populațiilor de bacterii coliforme și enterococi .....	75
IV.2.3. Izolarea și identificarea tulpinilor bacteriene cu potențial patogen din matricile de mediu .....	78
IV.2.4. Bacterii potențial patogene rezistente la antibiotice izolate din brațul Sfântu Gheorghe în perioada 2013-2014 .....	78
IV.2.5. Factori de virulență ai bacteriilor din eșantioanele de apă de suprafață și sediment din brațul Sfântu Gheorghe .....	89
IV.2.6. Gene de rezistență la bacterii potențial patogene din ecosistemul brațului Sfântu Gheorghe .....	92
<b>CONCLUZII GENERALE .....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXE .....</b>	<b>97</b>

<b>Anexa 1.</b> Tabel IDEXX Quanti-Tray/2000 MPN pentru interpretarea rezultatelor metodei de determinare a numărului probabil de bacterii coliforme totale și fecale din probe de apă de suprafață conform SR EN ISO 93308-2 .....	97
<b>Anexa 2.</b> Tabel McCrady pentru interpretarea rezultatelor metodei de determinare a numărului probabil de bacterii coliforme totale, fecale și enterococi din probe de sediment conform Ghidului de analiză ICIM .....	99
<b>LISTĂ ABREVIERI</b> .....	<b>100</b>
<b>BIBLIOGRAFIE</b> .....	<b>103</b>
<b>LUCRĂRI PUBLICATE ȘI COMUNICATE ÎN PERIOADA 2012-2015</b> .....	<b>116</b>

## INTRODUCERE

În condițiile agresiunii permanente a activităților umane asupra mediului, măsurile de protecție a mediului înconjurător constituie o necesitate stringentă la toate nivelurile societății.

Organismul uman este permanent influențat de o mulțime de factori externi, astfel încât, între organism și mediu, se creează un echilibru mobil, perturbarea căruia reprezintă condiția preliminară apariției maladiilor.

Prin activitatea sa complexă, omul intră în alcătuirea tuturor ecosistemelor majore ale ecosferei și influențează structura și funcționarea lor, transformând mediul și adaptându-l la nevoile sale. Tendința generală în evoluția ecosistemelor naturale este de sporire a intrărilor de energie în sistem, realizată prin creșterea diversității și stabilității ecosistemului față de factorii perturbatori. Strategia dezvoltării societății umane constă în realizarea unei maxime productivități a ecosistemelor, cu exploatarea tot mai intensă a resurselor naturale, impactul omului asupra mediului înconjurător fiind, adesea, nelimitat și necontrolat (Malschi, 2009).

Apa este elementul primordial al vieții și al desfășurării tuturor activităților și este o resursă naturală sensibilă la acțiunile umane. În prezent, satisfacerea nevoilor de apă pentru scopuri industriale, energetice, pentru alimentarea cu apă întâmpină dificultăți din ce în ce mai mari din cauza gradului avansat de poluare a apelor de suprafață cu apele reziduale. În condițiile urbanizării și industrializării impetuoase, civilizația contemporană se caracterizează printr-un proces îngrijorător de deteriorare a echilibrului ecologic și de poluare a resurselor de apă. Managementul resurselor de apă este pus în dificultate, nu atât din punct de vedere al cantității acestor resurse, cât mai ales, al calității lor (Cîrîină, 2011).

Apele naturale recepționează apele uzate încărcate cu deșeurile sau „pierderile” rezultate din activitățile umane, ceea ce alterează calitatea inițială a apei. 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 curentul apei (Cîrîină, 2011; Karamouz și colab., 2009).

Relația dintre creșterea densității populației și activitățile umane este bine cunoscută pentru efectele de schimbare ale mediului înconjurător. Riscurile maladiilor datorate agenților infecțioși vehiculați de apă au crescut. Microorganismele pătrund în toate tipurile de ecosisteme, fiind indigene, exogene, tranzitorii sau ocazional prezente în apă, ca urmare a contaminării cu

diferite surse de poluare. Ele supraviețuiesc în habitatele cel mai puțin adecvate vieții și metabolizează cele mai neobișnuite substraturi.

Apa este un factor natural esențial al echilibrului ecologic, din ce în ce mai expus poluării microbiene. Indicatorii de poluare fecală sunt utilizați, în special, pentru a evalua gradul de contaminare a corpurilor de apă și pentru a localiza originea acesteia. Sursa bacteriilor fecale din apele de suprafață este reprezentată, în principal, de apele uzate deversate. Apariția bacteriilor rezistente la antibiotice este previzibilă în orice mediu în care antibioticele sunt eliberate și, mai mult, frecvența identificării lor în mediul acvatic este în creștere.

Rezistența la antibiotice a bacteriilor din mediul acvatic trebuie să devină o preocupare majoră pentru sănătatea populației, având în vedere rapiditatea cu care aceasta se poate transmite (Mărculescu și colab., 2007; Karamouz și colab., 2009).

În mod direct sau indirect, sănătatea umană nu este influențată numai de consumul apei potabile. Prin intermediul apei, microorganismele trec dintr-un mediu acvatic în altul, ajungând în sursele principale de apă: apa de suprafață, apele de îmbăiere, apa subterană, apa potabilă. Dacă bacteriile sunt deja rezistente sau dezvoltă rezistență la antibiotice, este facilitată transmiterea caracterelor de rezistență și declanșarea patologiei hidrice infecțioase.

Una din cele mai importante surse de apă este fluviul Dunărea, de-a lungul căruia există stații de tratare a apei de suprafață și distribuție a apei potabile către consumatori. În Delta Dunării sunt zone în care apa brută a acestui fluviu este utilizată ca principală sursă de apă potabilă, fără aplicarea proceselor de dezinfecție, ceea ce constituie un argument pentru supravegherea calității ecosistemului acvatic.

## **SCOPUL ȘI OBIECTIVELE LUCRĂRII**

### ***Scopul***

Investigarea calității bacteriologice și evidențierea factorilor care contribuie la menținerea rezervorului de patogenitate și rezistență în ecosistemul acvatic al brațului Sfântu Gheorghe

### ***Obiectivele***

1. Localizarea unor secțiuni de control pe cursul brațului Sfântu Gheorghe în funcție de eventuale surse de poluare, în scopul evidențierii impactului acestora asupra densității bacteriilor potențial patogene în apele Deltei Dunării – Brațul Sfântu Gheorghe.
2. Monitorizarea periodică a gradului de poluare cu bacterii potențial patogene prin analiza cantitativă a indicatorilor de poluare fecală din apa de suprafață și sediment,
3. Izolarea și identificarea tulpinilor bacteriene cu potențial patogen din matricile de mediu,
4. Determinarea profilului de rezistență la antibiotice al tulpinilor bacteriene determinate,
5. Evidențierea fenotipică a factorilor de virulență,
6. Evidențierea genelor de rezistență la antibiotice.

Această lucrare este compusă din două părți, o parte teoretică și o parte originală și este structurată în 4 capitole.

Primul capitol abordează norme legislative naționale și internaționale pentru controlul calității ecosistemelor acvatice din Delta Dunării și reflectă stadiul actual al cercetărilor în domeniul supravegherii calității microbiologice a mediului acvatic și prevenirii riscului de răspândire a microorganismelor potențial patogene și rezistente la antibiotice.

Capitolul al II-lea descrie impactul microorganismelor asupra mediului acvatic prin relațiile pe care le stabilesc și prin capacitatea lor de patogenitate și virulență.

Capitolul al III-lea prezintă căile de acțiune a antibioticelor asupra microorganismelor.

Partea originală a lucrării prezintă metodologia utilizată în studiul experimental, rezultatele obținute și interpretarea acestora. Investigarea potențialului de patogenitate și rezistență la antibiotice al microorganismelor din mediul acvatic s-a efectuat prin metode specifice de determinare cantitativă a indicatorilor de poluare fecală și determinare calitativă a factorilor de virulență și rezistență la antibiotice ai tulpinilor izolate. Studiul experimental s-a realizat în perioada 2013-2014.

Arealul de studiu a fost brațul Sfântu Gheorghe, cel mai vechi și mai important braț al Deltei Dunării, pe traseul căruia s-au localizat 11 secțiuni de control, începând din zona predeltaică, Isaccea și terminând cu punctul de confluență cu Marea Neagră (fig. 1).

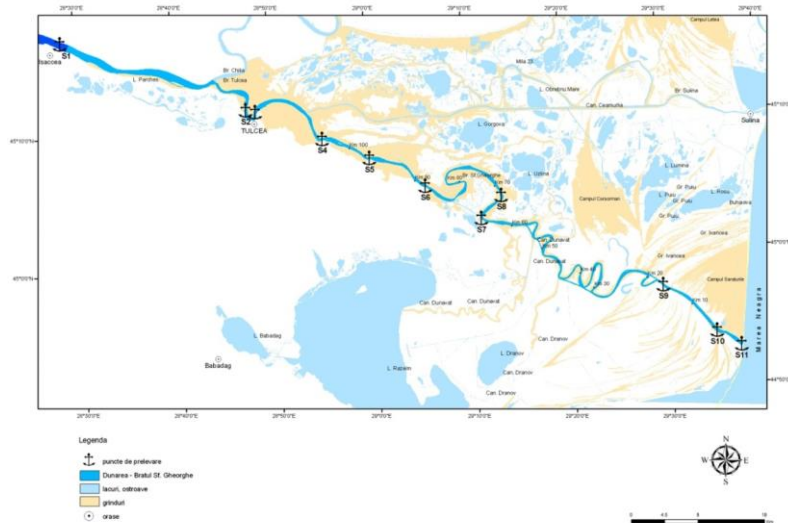


Fig. 1. Localizarea punctelor de prelevare a probelor de apă și sediment – vedere din satelit.

## **Material și metode**

Analizele bacteriologice și de biologie moleculară pentru probele de apă și sediment au fost efectuate în Laboratorul de Control Bacteriologic al Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Ecologie Industrială – ECOIND București și în Laboratorul de Microbiologie al Facultății de Biologie din cadrul Universității din București.

Analiza cantitativă a indicatorilor de poluare fecală din apa de suprafață și sediment, s-a efectuat prin următoarele metode:

- Determinarea numărului probabil de bacterii coliforme totale și termotolerante din pa de suprafață prin metoda numărului cel mai probabil – Colilert-18,
- Determinarea numărului probabil de enterococi din apa de suprafață prin metoda membranei filtrante, pe mediu de cultură solid specific,
- Determinarea numărului probabil de bacterii coliforme și enterococi din sediment prin metoda tuburilor multiple, tehnici recomandate de Ghidul ICIM.

Identificarea microorganismelor potențial patogene izolate din matricile de mediu s-a

realizat prin sistemul API, pe baza reacțiilor de metabolism. Tulpinile bacteriene au fost supuse testelor de evidențiere fenotipică a factorilor de virulență pe medii de cultură cu substrat enzimatic.

Determinarea spectrului de sensibilitate/ rezistență la antibiotice s-a efectuat prin metoda disc-difuzimetrică standardizată, conform criteriilor descrise în CLSI. Identificarea genelor ce codifică sinteza BLSE s-a realizat prin metoda PCR, utilizând primeri specifici descriși în literatura de specialitate.

## Rezultate și discuții

Studiul experimental a început în anul 2013, cu monitorizarea cantitativă lunară a bacteriilor indicatoare ale poluării fecale din apa de suprafață și sediment, iar pe baza rezultatelor din acest an, s-a constatat influența factorilor meteorologici asupra variației densității bacteriene, fapt pentru care, în 2014, au fost organizate patru campanii de prelevare și analiză.

Pentru a interpreta variația densității bacteriilor potențial patogene din ecosistemul acvatic, s-a calculat CBO<sub>5</sub> (Consumul Biochimic de Oxigen la 5 zile), parametru ce relevă încărcătura organică din mediul acvatic.

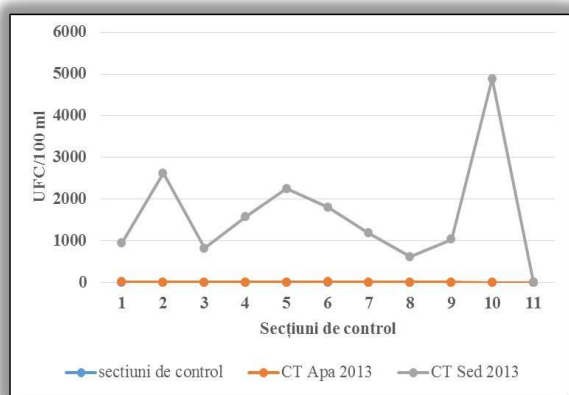


Fig. 2. Diagramă comparativă între variațiile valorilor medii ale densităților bacteriilor coliforme identificate în probele de apă și cele de sediment prelevate din cele 11 secțiuni de control localizate pe brațul Sfântu Gheorghe în anul 2013.

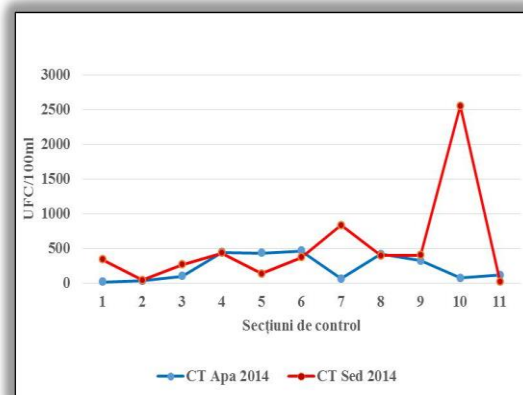


Fig. 3. Diagramă comparativă între variațiile valorilor medii ale densităților bacteriilor coliforme identificate în probele de apă și cele de sediment prelevate din cele 11 secțiuni de control localizate pe brațul Sfântu Gheorghe în anul 2014.

Raportul invers proporțional dintre densitatea medie a bacteriilor coliforme estimată în probele de apă de suprafață și cea din sediment poate specula existența a două populații distincte de bacterii coliforme care au condiții diferite de viață, în anumite secțiuni de control. În punctele în care densitatea coliformilor din apă este aproape egală cu cea din sediment, se poate pune baza pe curenții de apă zonali care antrenează cele două componente ale ecosistemului și odată cu acestea, și microorganismele prezente. Din diagrama fig. 2 reiese faptul că, în sediment, densitatea bacteriilor este semnificativ mai mare decât în apa de suprafață, deoarece sedimentul oferă microorganismelor condiții de atașare la materia organică și încărcătură organică mai mare rezultată din detritusul planctonic.

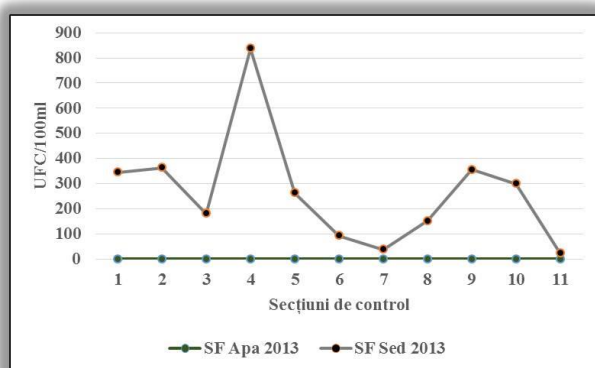


Fig. 4. Diagramă comparativă între variațiile valorilor medii ale densităților enterococilor identificate în probele de apă și cele de sediment prelevate din cele 11 secțiuni de control localizate pe brațul Sfântu Gheorghe în anul 2013.

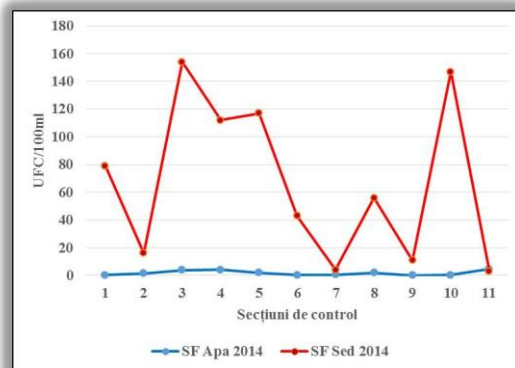
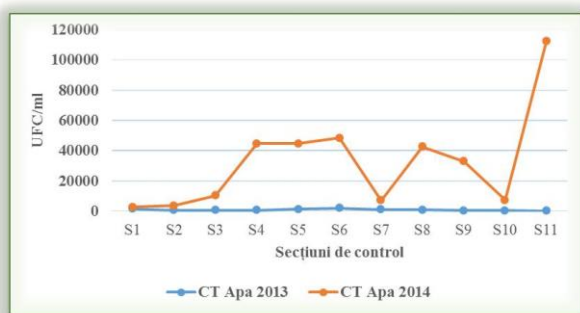
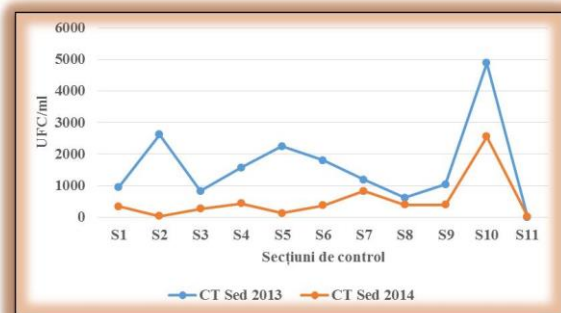


Fig. 5. Diagramă comparativă între variațiile valorilor medii ale densităților enterococilor identificate în probele de apă și cele de sediment prelevate din cele 11 secțiuni de control localizate pe brațul Sfântu Gheorghe în anul 2014.

Și în cazul enterococilor se poate constata încărcătura bacteriană mai mare în matricea de sediment față de cea din apă de suprafață, atât în anul 2013, cât și în 2014. În anumite secțiuni de control, curenții puternici zonali, determină interferența celor două matrici ale ecosistemului, astfel încât, microorganismele identificate în apa de suprafață au fost izolate și în sediment.



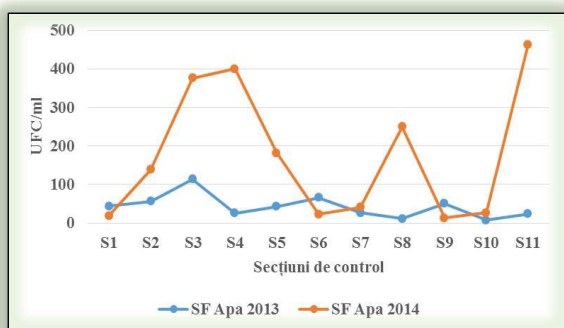
a.



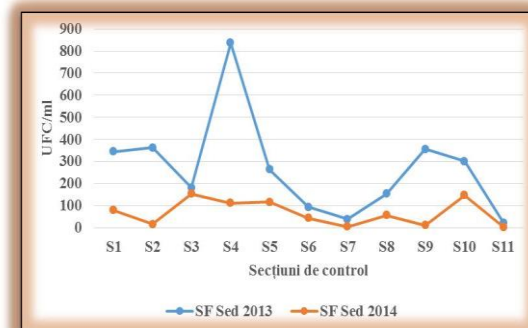
b.

Fig. 6. Ilustrația comparativă a variației spațiale a densităților bacteriilor coliforme în apa de suprafață (a.) și în sediment (b.) determinate în decursul anilor 2013 și 2014.

Din comparația densităților bacteriene în cei doi ani de monitorizare a probelor de apă de suprafață (fig. 6a), reiese că, în 2013, densitatea bacteriilor coliforme a fost semnificativ mai mică decât în 2014, iar densitatea coliformilor din sediment, în 2013, a fost mai mare decât în 2014 (fig. 6b).



a.



b.

Fig. 7. Ilustrația comparativă a variației spațiale a densităților enterococilor în apa de suprafață (a) și în sediment (b) determinate în decursul anilor 2013 și 2014.

La baza explicațiilor acestor rezultate stau condițiile meteorologice și suportul nutritiv din bentos care determină proporționalitatea indirectă a densității microorganismelor între apă și sediment.

Tendința de poluare cu enterococi a apei de suprafață (fig. 7a) este mai accentuată în 2014 față de 2013, iar densitatea cocilor din probele de sediment a fost mai mare în 2013 decât în 2014, variația spațio-temporală a încărcăturii enterococilor fiind cauzată de deversarea deșeurilor de la fermele zootehnice.

În perioada 2013-2014 au fost efectuate 658 de analize de izolare și identificare bacteriană, în final, determinându-se 46 specii de coliformi și 6 specii de coci. Cei mai frecvenți bacili Gram negativi identificați au fost: *Escherichia coli* – 132 tulpini, *Klebsiella oxytoca* – 114 tulpini, *Pseudomonas fluorescens* – 93 tulpini, *Pasteurella pneumotropica* – 86 tulpini, *Pantoea spp* – 42 tulpini.

Reprezentativ pentru grupul cocilor a fost *Aerococcus viridans* (83 tulpini), în timp ce *Enterococcus sp.* a fost izolat rar (4 tulpini).

Antibiogramele probelor din 2013 au evidențiat existența tulpinilor de bacili Gram negativi rezistente la antibiotice, prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2.

<b>Tulpini bacteriene</b>	<b>Rezistență la:</b>
<i>Enterococcus durans</i>	VA
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	AM
<i>Pseudomonas luteola</i>	AMC, AM
<i>Escherichia coli</i>	AMC, AM, TE, SXT, NA
<i>Enterobacter cloacae</i>	
<i>Vibrio fluvialis</i>	AMC, AM, CAZ, CRO, TE, SXT, NA
<i>Ewingella americana</i>	AMC, AM
<i>Raoutella ornithinolytica</i>	AMC, AM, CN, TE, SXT, NA
<i>Pseudomonas fluorescens (putida)</i>	AMC, AM, TE, C, SXT, NA
<i>Escherichia coli</i>	AMC, AM, TE, SXT, NA
<i>Klebsiella oxytoca</i>	AMC, AM, TE
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMC, AM
<i>Pantoea sp.</i>	AMC, AM, CN
<i>Citrobacter freundii</i>	AMC, CAZ, AM, IMP, C, NA, TE
<i>Serratia odorifera</i>	AM, TE, NA

Pentru tulpinile izolate în 2014, testele de rezistență la antibiotice au arătat că majoritatea tulpinilor de *Enterobacteriaceae* identificate în probele de apă de suprafață și sediment sunt rezistente la AMC și AM. Cu o frecvență mai mare au fost detectate *E. coli*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *C. freundii* care, pe lângă rezistența la  $\beta$ -lactamicele AMC și AM, au fost rezistente și la TE. În eșantionul de sediment din secțiunea de control S9 (Ivanca) a fost identificată o tulpină bacteriană nonfermentativă, rezistentă la toate antibioticele setului utilizat de noi, identificată ulterior ca *Ps. fluorescens* rezistent la AMC, AM, CAZ, CRO, FEP, SXT, C, NA, TE. Pe lângă speciile genului *Enterococcus*, au fost identificate multe tulpini de *Aerococcus viridans* rezistente la antibiotice și *E. faecalis*.

Deși în punctul S7 (Murighiol) densitatea bacteriilor coliforme nu a depășit valoarea medie, am izolat o tulpină de *Enterobacter gergoviae* rezistentă atât la  $\beta$ -lactamice, cât și la

SXT, NA, TE și C. Spre deosebire de apa de suprafață, sedimentul a avut o încărcătură bacteriană mai mare în secțiunea S7 (Murighiol), de unde s-a izolat și bacteria *Aeromonas hydrophila* rezistentă la AM, AMC, CAZ, CRO, FEP și SXT.

Identificarea microorganismelor potențial patogene rezistente la antibiotice indică prezența substanțelor antimicrobiene sau resturi ale acestora în mediul acvatic natural și face ca ecosistemul acvatic să devină rezervor de gene de virulență și rezistență la antibiotice.

Metodele fenotipice de evidențiere a factorilor de virulență sugerează potențialul înalt de patogenitate prin capacitatea bacteriilor de a produce enzime degradative (proteaze, DN-ază, toxine formatoare de pori – lecitinaze, lipaze, hemolizine). Testele au identificat prezența tulpinilor:

- amilază-pozitive: 38 *E. coli*, 34 *K. oxytoca*, 6 *C. freundii*,
- cazeinază-pozitive: 64 *E. coli*, 21 *K. oxytoca*, 2 *Pantoea spp.*,
- gelatinază-pozitive: 21 *E. coli*, 13 *Pseudomonas fluorescens*, 4 *Aeromonas hydrophila*,
- esculinază-pozitive: 16 *Pasteurella pneumotropica*, 5 *Pseudomonas luteola*, 2 *Pantoea spp.*, 2 *Aeromonas hydrophila*,
- lipază-pozitive: 16 *E. coli*, 7 *Pasteurella pneumotropica*,
- lecitinază-pozitive: 17 *E. coli*, 8 *Pantoea spp.*,
- hemolitice: 6 *Pseudomonas fluorescens*, 2 *Pseudomonas luteola*,
- DN-ază pozitive: 7 *Pseudomonas aeruginosa*.

Microorganismele potențial patogene și rezistente la antibiotice, frecvent izolate din apa de suprafață și din sedimentul brațului Sfântu Gheorghe, au fost analizate prin metode moleculare pentru evidențierea genelor codificatoare ale rezistenței la antibiotice.

Având în vedere că atât densitatea enterococilor din probele de mediu, cât și caracterele lor de virulență și rezistență nu au fost semnificative, am analizat tulpinile de bacili Gram negativi: *E. coli*, *K. oxytoca*, *C. freundii*, *Ewingella americana*, *P. pneumotropica*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. luteola*. Luând în considerare rezistența acestor microorganisme, în special, la antibioticele  $\beta$ -lactamice, am utilizat în tehnica PCR, primeri ai genelor de rezistență care codifică pentru BLSE. Astfel, pentru evidențierea secvențelor ADN care codifică rezistența enterobacteriaceelor, s-au utilizat primerii *tem*, *shv*, *ctx-M*, *oxa*, *cmv*, iar pentru evidențierea determinismului genetic al rezistenței *Pseudomonas spp.* au fost utilizați primerii *tem*, *shv* și

*pse*. Amplificarea și migrarea moleculelor de ADN bacterian, în gelul de agaroză, au evidențiat prezența genelor care codifică pentru BLSE.

Rezistența microorganismelor la aceste antibiotice cu spectru larg de acțiune, se diseminează în ecosistemul acvatic, fie prin deversarea resturilor de antibiotic odată cu apele uzate, fie prin deversarea bacteriilor deja rezistente care transmit acest caracter.

## **CONCLUZII GENERALE**

1. Studiul nostru a evidențiat aspecte ale prevalenței bacteriilor potențial patogene în ecosistemul acvatic al brațului Sfântu Gheorghe, areal protejat al Rezervației Biosferei Delta Dunării.
2. Asemănător cu alte ecosisteme acvatice de același tip, în ecosistemul acvatic al brațului Sfântu Gheorghe s-a dovedit că dinamica funcțiilor metabolice ale bacteriilor potențial patogene depinde de disponibilitatea nutrienților și condițiile climatice.
3. Variația condițiilor climatice sezoniere și de amplasament ale bazinului acvatic determină variația densității microorganismelor potențial patogene în ecosistemul brațului Sfântu Gheorghe, astfel încât, au fost înregistrate diferențe pentru aceeași zonă în perioade distincte de timp.
4. Analiza densității bacteriilor coliforme totale în apa de suprafață, pe parcursul anilor 2013 și 2014, a evidențiat diferențe în gradul de contaminare influențată, în special, de condițiile meteorologice și de activitățile antropice.
5. În 2013, cele mai mari valori ale densității coliformilor au fost înregistrate în sezonul cald, în S6 (Mahmudia), ca urmare a încărcăturii organice susținută de temperatura ridicată. Determinarea CBO corelat cu valorile conținutului de substanță organică, semnaleză o activitate microbiologică intensă în zona respectivă.
6. În 2014, condițiile de mediu au fost favorabile dezvoltării bacteriilor potențial patogene în apa de suprafață, în multe secțiuni de control, depășind densitatea din anul anterior.
7. Cel mai contaminat punct, în 2014, a fost S11 (confluența cu Marea Neagră), rezultat ce poate fi asociat cu încărcătura organică mare din sezonul cald și intensitatea mică a curenților marini datorită căreia, zona de confluență a celor două tipuri de apă nu a beneficiat de concentrație mare a salinității.

8. Curbele densității bacteriilor coliforme fecale din apa de suprafață, determinate în 2013-2014, au urmat tendințe asemănătoare cu ale coliformilor totali, însă la valori mai mici.
9. Mediile sezoniere ale densității enterococilor din apa de suprafață, evidențiază că, în 2013, cele mai mari valori au fost înregistrate în perioada de iarnă, corelate cu un aport suplimentar de materie organică rezultată din deșeurile animaliere deversate. Pentru sediment, gradul de poluare cu bacterii potențial patogene a scăzut în 2014.
10. Comparând densitatea bacteriilor potențial patogene în apa de suprafață și în sediment, considerăm că, în cele două nișe, populațiile bacteriene diferă prin capacitatea de supraviețuire. Sedimentul conferă suportul aderenței celulelor de particulele solide, formând biofilme mai rezistente la variațiile condițiilor de mediu.
11. Genul *Pseudomonas* cuprinde specii comune în apă și sol și în majoritatea habitatelor umane, având capacitate mare de diseminare, fapt pentru care, în perioada 2013-2014, au fost frecvent izolate tulpini de *Pseudomonas sp.*
12. Metodele fenotipice de evidențiere a factorilor de virulență sugerează potențialul înalt de patogenitate, mediat de enzimele degradative (proteaze), DN-ază, toxine formatoare de pori – lecitinaze, lipaze, hemolizine).
13. Antibiograma a relevat că  $\beta$ -lactamicele, în special, amoxicilină+acid clavulanic și ampicilina, au cea mai mică eficiență față de tulpinile izolate. Rezistența microorganismelor la aceste antibiotice cu spectru larg de acțiune, se diseminează în ecosistemul acvatic, fie prin deversarea resturilor de antibiotic odată cu apele uzate, fie prin deversarea bacteriilor deja rezistente care transmit acest caracter.
14. Analizele de biologie moleculară au dovedit prezența genelor de rezistență care codifică pentru BLSE, de tip *shv* la o tulpină de *E. coli* izolată din sediment și de tip *tem* la o tulpină de *Ps. luteola* izolată din apa de suprafață.
15. Pe parcursul experimentelor au fost identificate și tulpini bacteriene cu rezistență inductibilă în prezența antibioticului.
16. Tematica proiectului nostru răspunde și completează preocupările și cerințele naționale și internaționale în domeniul controlului calității apelor, aducând o contribuție științifică importantă la cunoașterea, protecția și utilizarea durabilă a resurselor de apă din Delta Dunării și implicit, la protecția sănătății populației.

- 17.** Elementele de noutate aduse de acest proiect sunt identificarea speciilor bacteriene potențial patogene din ecosistemul acvatic al brațului Sfântu Gheorghe, evaluarea potențialului de rezistență la antibiotice și monitorizarea în dinamică a acestor fenomene.
- 18.** Complexitatea lucrării constă în amploarea investigațiilor efectuate, în numărul mare al determinărilor cantitative și calitative, cu frecvență lunară în 2013 și sezonieră în 2014 și prelucrarea și diseminarea informațiilor astfel încât să servească drept suport autorităților implicate în domeniul calității apelor și protecției mediului și în domeniul sănătății publice.

## BIBLIOGRAFIE

1. Agerholm-Larsen L., RABEN a., Haulrik N., Hansen A. S., Astrup A., 2000, Effect of 8 week of probiotic milk products on risk factor for cardiovascular disease, *Eur J Clin Nutr* 54:288-2997.
2. Agerso Y, Petersen A. 2007, The tetracycline resistance determinant Tet 39 and the sulphonamide resistance gene sulII are common among resistant *Acinetobacter* spp. isolated from integrated fish farms in Thailand, *Journal Antimicrob Chemother* 59: 23-27.
3. Agerso Y., Sandvang D, 2005, Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. isolated from pigsties and manured soil, *Applied Environmental Microbiology* 71: 7941-7947.
4. Ajeegah G., Cioroi M., Craisler M., Constantin O., Palea M., Bahrim G., 2012, Bacteriological and environmental characterisation of the water quality in the Danube River Basin in Galați area of Roumania, *African Journal of Microbiology Research* 6(2): 292-301.
5. Al-Badaii F., Shuhaimi-Othman M., 2014, Water pollution and its impact on the prevalence of antibiotic resistant *E. coli* and total coliform bacteria: A study of the Semenyih River, Peninsular Malaysia, *Water Qual Expo Health* 7 (21): 417-423.
6. Alves P. I., Martins M. P., Somedo T., Figueiredo Marques J. J., Tenreiro R., Barreto Crespo M. T., 2004, Comparison of phenotypic and genotypic taxonomic methods for the identification of dairy enterococci, *Antonie van Leeuwenhoek* 85: 237-252.
7. Andersen S. R., 1993, Effects of waste water treatment on the species composition and antibiotic resistance of coliform bacteria, *Current Microbiology* 26: 97-103.
8. Antures P., Machado J., Peixe L., 2006, Characterisation of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal, *Journal Antimicrob Chemother* 58: 297-304.
9. Baquero F., Martinez J. L., Canton R., 2008, Antibiotics and antibiotic resistance in water environments, *Current Opinion in Biotechnology* 19: 260-265.
10. Beier C. R., Duke S. E., Ziprin R. L., Harvey R. B., Hume M. E., Poole T. L., Scott H. M., Highfield L. D., Alali W. Q., Andrews K., Anderson R. C., Nisbet D. J., Antibiotic

and disinfectant susceptibility profiles of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* (VRE) isolated from community wastewater in Texas, *Bull Environ Contam Toxicol* 80: 188-194.

11. Buiuc D., Neguț M., 2008, *Tratat de microbiologie clinică*, Buiuc D., Editura Medicală.
12. Burta L., Marusca P., Pelea D. , 2007, *Curs de microbiologie pentru Medicină dentară*, Burta L., Marusca P., Editura Universității din Oradea, pag. 29-49.
13. Cavalieri S. J., Harbeck R. J., McCarter Y. S., Ortez J. H.,  $\beta$ -lactamases, *Manual of antimicrobial susceptibility testing*, Coyle M. B., American Society for Microbiology, pag. 15-25.
14. Chifiriuc C., Mihăescu G., Lazăr V., 2011, *Microbiologie și virologie medicală*, Chifiriuc C., Editura Universității din București, pag. 388-394.
15. Choi S., Chiu W., Brown J., Becker S. J., Harwood V. J., Jiang S. C., 2003, Application of enterococci antibiotic resistance patterns for contamination source identification at Huntington Beach, California, *Marine Pollution Bulletin* 46: 748-755.
16. Cintas L. m., Casaus P., Herranz C, Havarstein L. S., Holo H., Hernandez P. E., 2000, Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed Enterocin Q, *Journal Bacteriol* 182: 6806-6814.
17. Cîrțînă D., 2011, Aspects regarding surface waters quality monitoring, *Annals of the Constantin Brancusi University of Targu Jiu, Engineering series* 1: 101-112.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, Approved standard Eleventh Edition, M02-A11 Vol 32 (1).
19. Cosentino S., Pisano M. B., Corda A., Fadda M. E., Piras C., 2004, Genotypic and technological characterization of enterococci isolated from artisanal Fiore Sardo Chese, *Journal Dairy Res* 71: 444-450.
20. Crump B. C., Kling G. W., Bahr M., Hobbie J. E., 2003, Bacterioplankton community shifts in an Arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source, *Appl Environ Microbiol* 69: 2253-2268.

21. CTCE SA. Piatra Neamț, Intralegis, Ord. Nr. 161/2006 pentru aprobarea normativului privind clasificarea calității apelor de suprafață în vederea stabilirii stării ecologice a corpurilor de apă.
22. Cuga V., Cernatoni A., Propunere de instrucțiuni metodologice pentru analiza chimică și microbiologică a sedimentelor din ecosistemele acvatice, ICIM, București.
23. Da Silva M. F., Vaz-Moreira I, Gonzales-Pajuelo M., Nunes O. C., Manaia C. M., 2007, Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant, FEMS Microbiol Ecology 60: 166-176.
24. Dada A. C., Ahmad A., Usup G., Heng L. Y., hamid R., 2013, High-level aminoglycoside resistance and virulence characteristics among Enterococci isolated from recreational beaches in Malaysia, Environ Monit Assess 185: 7427-7443.
25. Dang h. Y., Ren J., Song L. S., Sun S., An L. G., 2008, Dominant chloramphenicol-resistant bacteria and resistance genes in coastal marine waters of Jiaozhou Bay, China, World J Microb Biot 24 (2): 209-217.
26. Delsgaard A., Forslund A., Serichantalergs O., Sandvang D., 2000, Distribution and content of class 1 integrons in different Vibrio cholerae O-serotype strains isolated in Thailand, Antimicrob Agents Chemother 44: 1315-1321.
27. Di Cesare A., Luna G. M., Vignaroli C., Paquaroli S., Tota S., Paroncini P., Biavasco F., 2013, Aquaculture can promote the presence and spread of antibiotic resistant Enterococci in marine sediments, Plos One 8 (4): 1-8.
28. Duma R., Kinz L., 1968, Simple test for identifying penicillinase-producing staphylococci, Applied Microbiology 16(8): 1261-1262.
29. Dzidic S., Suskovic J., Kos B., 2008, Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects, Food Technol Biotechnol 46(1): 11-21.
30. EC, 2000, Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for the Community action in the field of water policy, Off J, L 327:1-72.
31. Einhorn A., Neuhauser M., Bearden D., Quinn J., Pendland S., 2002, Extended Spectrum Beta-lactamases: Frequency, Risk Factors and Outcomes, Pharmacotherapy: Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy 22(1): 14-20.

32. Ennahar S., Asou Y., Zendo T., Sonomoto K., Ishizaki A., 2001, Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81, *Int Journal Food Microbiol* 70: 291-301.
33. Falagas M., Karageorgopoulos D., 2009, Extended Spectrum Beta-lactamases producing organisms, *Journal of Hospital Infection*, 73(4): 345-354.
34. Fernandez L., Breidenstein E. B. M., Hancock R. E. W., 2011, Importance of adaptive and stepwise changes in the rise and spread of antimicrobial resistance, In P. L. Keen & M. H. M. M. Montforts Eds, *Antimicrobial resistance in the Environment*, John Willey & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 43-71.
35. Fernandez-Delgado M., Suarez P., 2009, Multiple antibiotic resistances of enteric bacteria isolated from recreational coastal waters and oysters of the Caribbean Sea, *Annals of Microbiology* 59 (3): 409-414.
36. Fisher M., Graham J. M., Graham L. E., 1998, Bacterial abundance and activity across sites within two northern Wisconsin Sphagnum bogs, *Microbial Ecology* 36: 259-269.
37. Foulquie Moreno M. R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., DeVuyst L., 2006, The role and application of enterococci in food and health, *Int Journal Food Microbiol* 106: 1-24.
38. Fraimow H. S., Tsigrelis C., 2011, Antimicrobial resistance in the intensive care unit: mechanisms, epidemiology, and management of specific resistant pathogens, *Critical Care Clinic* 27 (1): 163.
39. Genthner F. J., James J. B., Yates D. F., Friedman S. D., 2005, Use of composite data sets for source tracking enterococci in the water column and shoreline interstitial waters on Pensacola Beach, Florida, *Marine Pollution Bulletin* 50 (7): 724-732.
40. Guguianu E., 2013, Noțiuni de ecologie microbiană, *Microbiologie*, Guguianu E, Universitatea de Științe agricole și Medicină veterinară "Ion Ionescu De La Brad" Iași, pag. 71-98.
41. Guillaume G., Verbrugge D., Chasseur-Libotte M. I., Moens W., Collard J. M., 2000, PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A-E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium, *FEMS Microbiol Ecol* 32: 77-85.
42. Hafnerburg G., Kothe E., 2007, Microbes and metals: Interactions in the environment, *Journal of Basic Microbiology* 47: 453-467.

43. Herranz C., Mukhopadhyay S., Casaus P., Martinez J. M., Rodriguez J. M., Nes I. F., 1999, Biochemical and genetic evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-like strains isolated from fermented sausages, *Curr Microbiol* 39: 282-290.
44. Heuer H., Krogerrecklenfort E., Wellington E. M. H., Egan S., van Elsas J. D., van Overbeek L., Collard J. M., Guillaume G., Karagouni A. D., Nikolakopoulou T. L., Smalla K., 2002, Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer, *FEMS Microbiol Ecology* 42: 289-302.
45. Ibekwe A. M., Leddy M., B., Bold R. M., Graves A. K., 2012:, Bacterial community composition in low-flowing river water with different sources of pollutants, *FEMS Microbiol Ecol* 79: 155-166.
46. Ionica D., Zinevici V., 2007, , Institutul de Biologie București, accessed on 6 iunie 2015.
47. Junco M. T. T., Martin M. G., Toledo M. L. P., Gomez P. L., Barrasa J. L. M., 2001, Identification and antibiotic resistance of Faecal enterococci isolated from water samples, *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 203: 363-368.
48. Kacmaz B., Acsoy A., 2005, Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey, *International Journal of Antimicrobial Agents* 25 (6): 535-538.
49. Karamouz M., Khajehzadeh A., Kerachian C., Maksimovic C., 2009, Design of on-lineriver water quality monitoring system using the entropy theory: a case study – Environmental monitoring assessment 155: 63-81.
50. Kaye K. S., Engemann J. J., Fraimow H. S., Abrutyn E., 2004, Pathogens resistant to antimicrobial agents: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management, *Infect Dis Clin N Am* 18: 467-511.
51. Kent A. D., Jones S. E., Ynnarell A. C., Graham G. M., Lauster G. H., Kratz T. K., Triplett E. W., 2004, Annual patterns in bacterioplankton community variability in a humic lake, *Microbial Ecology* 48: 550-560.
52. Kimiran-Erdem A., Arslan E. O., Sanli-yurudu N. O., Zeybek Z., Dogruoz N., Cotuk A., 2007, Isolation and identification of enterococci from seawater samples: Assessment of their resistance to antibiotics and heavy metals, *Environmental Monitoring and Assessment* 125: 219-228.

53. Klare I., Konstabel C., Badstubner D., Werner G., Witte W., 2003, Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*, *International Journal of Food Microbiology* 88: 269-290.
54. Kummerer K., 2004, Resistance in the environment, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54: 511-520.
55. Langenheder S., Jurgens K., 2001, Regulation of bacterial biomass and community structure by metazoan and protozoan predation, *Limnol Oceanogr* 46: 121-134.
56. Lanthier M., Scott A, Zhang Y., Cloutier M., Durie D., Handerson V. C., Wilkes G., Lapen D. R., Topp E., 2010, Distribution of selected virulence genes and antibiotic resistance in *Enterococcus* species isolated from the south Nation River drainage basin, Ontario, Canada, *Journal of Applied Microbiology*, 110: 407-421.
57. Larsen B., Essmann M. K., Geletta S., Duff B., 2012, *Enterococcus* in surface waters from the Des Moines River (Iowa) watershed: location, persistence and vancomycin resistance, *International Journal of Environmental Health Research* 22 (4): 305-316.
58. Lee C., Chu C., Liu J. W., Chen Y., Chiu C., Su L., 2007, Collateral damage of flomoxef therapy: in vivo development of porin deficiency and acquisition of blaDHA-1 leading to ertapenem resistance in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-3 and SHV-5 betalactamases, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60: 410-413.
59. Lee C., Su L., Tang Y., Liu J., 2006, Treatment of ESBL – producing *Klebsiella pneumoniae* bacteriemia with carbapenems or flomoxef: a retrospective study and laboratory analysis of isolates, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58: 1074-1077.
60. Leroy F., Foulquie Moreno M. R., De Vuyst L., 2003, *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation, *Int. Journal Food Microbiol* 88: 235-240.
61. Levy S. B., 1997, Antibiotic resistance an ecological imbalance Antibiotic resistance: Origin, Evolution, Selection and spread, John Wiley & Sons, Ciba Foundation Symposium 207: 1-14.
62. Lister P. D., Wolter D. J., Hanson N. D., 2009, Antibacterial resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms, *Clinical Microbiology Reviews* 22 (4):582-610.

63. Lleo M. M., Bonato B., Benedetti D., Canepari P., 2005, Survival of enterococcal species in aquatic environments, *FEMS Microbiology Ecology* 54 (2): 189-196.
64. Lorian V., 2005, Lorian V., *Antibiotics in laboratory medicine*, Lippincott Williams & Wilkins, 144-156.
65. Maki D. G., Ager W. A., 1988, Enterococcal bacteremia: clinical features, the risk of enterocarditis, and management, *Medicine (Baltimore)* 67: 248-269.
66. Malik A., Grohmann E., Akhtar R., 2014, Environmental quality deterioration and human health, *Environmental deterioration and human health*, Malik A., Springer, pag. 3-264.
67. Malschi D., 2009, Impactul poluării și degradării factorilor de mediu asupra organismelor vii, *Elemente de biologie, ecofiziologie și microbiologie*, Malschi D., Editura Bioflux Cluj-Napoca, pag. 273-288.
68. Manopoulou E., Sarantinopoulos P., Zoidou E., Aktypis A., Moschopoulou E., Kandarakis I. G., 2003, Evolution of microbial population during traditional Feta cheese manufacture and ripening, *Int Journal Food Microbiol* 82: 153-161.
69. Matyar F., Kaya A., Dincer S., 2008, Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderum Bay, Turkey, *Science of the Total Environment* 407: 279-285.
70. Mărculescu A., Cernea M., Nueleanu V., Oros N. A., Chereji R., 2007, Resistance to antibiotics, *Veterinary drug* 1(1): 44-51.
71. Mendez J., Reimundo P., Perez-Pascual D., Navais R., Gomez E., Cascales D., Guijarro J. A., 2012, An overview of virulence-associated factors of Gram negative fish pathogenic bacteria, *Health and Environmental Aquaculture*, Edmir Daniel Calvalho, China, pag. 133-156.
72. Mendiratta D. K., Kaur H., Deotale V., Thamke D. C., Narang R., Narang P., 2008, Status of high-level aminoclycoside-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in a rural hospital of Central India, *Indian Journal of Medical Microbiology* 26: 369-371.
73. Mihăescu Gr., Chifiriuc M. C., Dițu L. M., 2007, Antibiotice și substanțe chimioterapice antimicrobiene, Mihăescu Gr., Chifiriuc M. C., Dițu L. M., Editura Academiei Române, pag. 39-49, 60-95.

74. Mihăescu Gr., Chifiriuc M. C., Dițu L. M., 2007, Microbiologie generala, Mihăescu Gr., Chifiriuc M. C., Dițu L. M., Editura Universității din București, pag. 154-166,421-437.
75. Moellering R. C., 1998, Vancomycin resistant Enterococci, *Clinical Infectious Diseases* 26: 1196-1199.
76. Mohapatra H., Mohapatra S. S., Mantri C. K., Colwell R. R., Singh D. V., 2008, *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strains isolated before 1992 from Varanasi, India are multiple drug resistant, contain *intSXT*, *dfr18* and *aadA5* genes, *Environ Microbiol* 10: 866-873.
77. Mondragon V. A., Llamaz-Perez D. F., Gonzales-Guzman G. E., Marquez-Gonzalez A. R., Padilla-Noriega R., Ma de Jesus Duran-Avelar, Franco B., 2011, Identification of *Enterococcus faecalis* bacteria resistant to heavy metals in surface waters of the Mololoa River in Tepic, Nayarit, Mexico, *Environ Monit Assess* 183: 329-340.
78. Monitorul Oficial nr. 417/2006, H. G. Nr. 567/2006 privind modificarea normelor de calitate pe care trebuie să le îndeplinească apele de suprafață utilizate pentru potabilizare NTPA-013, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr. 100/2002.
79. Moore J. E., Moore P. J. A., Millar B. C., Goldmith C. E., Loughrey A., Rooney P. J., Rao J. R., 2010, The presence of antibiotic resistant bacteria along the River Lagan, *Agricultural Water Management* 98: 217-221.
80. Moura A., Henriques I., Ribeiro R., Correia A., 2007, Prevalence and characterisation of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant, *Journal Antimicrob Chemother* 60: 1243-1250.
81. Mukhrjee S., Chakraborty R., 2006, Incidence of class 1 integrons in multiple antibiotic-resistant Gram-negative copiotrophic bacteria from the River Torsa in India, *Res Microbiol* 157: 220-226.
82. Munteanu C, Dumitrascu M., Iliuta A., 2011, Supravegherea și controlul calității apelor naturale, *Ecologie și protecția calității mediului*, Dumitrascu M., Iliuta A., Editura Balneara, pag. 53-59.
83. Muray A. E., Preston C. M., Massana R., Taylor L. T., Blakis A., Wu K., DeLong E. F., 1998, Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica, *Appl Environ Microbiol* 64: 2585-2595.

84. Nikolakopoulou T. L., Egan S., van Overbeek L. S., Guillaume G., Heuer H., Wellington E. M. H., van Elsas J. D., Cilloa, 2005.
85. Ordeanu V., 2012, Microbiologie generală și farmaceutică, Ordeanu V., Editura Universității de Medicină și Farmacie Carol Davila București, pag. 4-64.
86. Overdeest I., Willemsen I., Elberts S., Verhulst C., Kluytmans J., 2011, Laboratory detection of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Evaluation of two screening agar plates and two confirmation techniques, *Clinical Microbiology*, 519-522.
87. Pangallo D., Drahovska H., Harichova J., Karellova E., Chovanova K., Ferianc P., Turna J., Timko J., 2008, Assessment of environmental enterococci: bacterial antagonism, pathogenic capacity and antibiotic resistance, *Antonie van Leeuwenhoek* 94: 555-562.
88. Pangallo D., Drahovska H., Haricova J., Karellova E., Chovanova K., Aradska J., Ferianc F., Turna J., Timko J., 2008, Evaluation of different PCR-based approaches for the identification and typing of environmental enterococci, *Antonie van Leeuwenhoek* 93: 193-203.
89. Park J. C., Lee J. C., Oh J. Y., Jeong Y. W., Cho J. W., Joo H., S., Lee W. K., Lee W. B., 2003, Antibiotic selective pressure for the maintenance of antibiotic resistant genes in coliform bacteria isolated from the aquatic environment, *Water Science and Technology* 47 (3): 249-253.
90. Paterson D., Bonomo R., 2005, Extended-Spectrum-Beta-Lactamases: a clinical update, *Clinical Microbiology Reviews*, 657-686.
91. Patterson J. E., Sweeney A. h., Simms M., Carley N., Mangi R., Sabetta J., Lyons R. W., 1995, An analysis of 110 serious enterococcal infections, antibiotic susceptibility, and outcome, *Medicine (Baltimore)* 74: 191-200.
92. Peters J., Mac K., Wichmann-Schauer H., Klein G., Ellerbroek L., 2003, Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany, *International Journal of Food Microbiology* 88 (2-3): 311-314.
93. Pfeiffer Y., Cullic A., Witte W., 2010, Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram negative bacterial pathogens, *International Journal of Medical Microbiology* 300 (6): 371-379.

94. Poeta P., Antures T., Rodrigues J., 2005, *Enterococcus spp.* resistentes a vancomicina isolados de fezes de frangospombos, gamos e ratos, Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia 58 (3):412-414.
95. Savichtcheva O., Okabe S., 2006, Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives, Water Research 40: 2463-2476.
96. Schafer H., Bernard L., Courties C., 2001, Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations, FEMS Microbiol Ecol 34: 243-253.
97. Schmidt A. S., Bruun M. S., Dalsgaard I., Larsen J. L., 2001, Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment, Appl Environ Microbiol 67: 5675-5682.
98. Schwartz T, Kohlen W., Jansen B., Obst U, 2003, detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms, FEMS Microbiol Ecol 43: 325-335.
99. Serio A., Paparella A., Chaves-Lopez C., Corsetti A., Suzzi G., 2007, Enterococcus populations in Pecorino Abruzzese cheese: biodiversity and safety aspects, Journal Food Prot 70: 1561-1568.
100. Shankar V., Baghdayan A. S., Huycke M. M., Lindah G., Gilmore M. S., 1999, Infection-derived Enterococcus faecalis strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein, Infect Immun 67: 193-200.
101. Silva-Lopez M. F., Ribeiro T., Abrantes M., Figueredo-Marques J. J., Tenreiro R., Barreto-Crespo M., T., 2005, Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci, International Journal of Food Microbiology 103 (2): 191-198.
102. Slavcovici A, Cismaru C., 2012, Rezistența la antibiotice, Arhiva Săptămâna medicală nr 158 – Boli infecțioase, Acces disponibil în data 23,03,2015 pe [www.saptamanamedicala.ro/articole/Rezistenta-la-antibiotice.html](http://www.saptamanamedicala.ro/articole/Rezistenta-la-antibiotice.html).
103. Sommer U., Gliwicz Z. M., Lampert W., Duncan A., 1996, The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters, Arch Hydrobiol 106: 433-471.

104. Sood S., Malhotra M., Das K. B., Kapil A., 2008, Enterococcal infections and antimicrobial resistance, *Indian J Med Res* 128: 111-121.
105. SR EN ISO 19458 – Calitatea apei. Prelevare pentru analiză microbiologică.
106. SR EN ISO 9308-2 – Calitatea apei. Numărarea de *Escherichia coli* și de bacterii coliforme. Partea 2: Metoda numărului cel mai probabil.
107. SR EN ISO 7899-2 – Calitatea apei. Identificare și numărare a enterococilor intestinali. Partea 2: Metoda prin filtrare pe membrană.
108. SR EN ISO 1899-2 - [Calitatea apei. Determinarea consumului biochimic de oxigen după n zile \(CBO<sub>n</sub>\). Partea 2: Metoda pentru probe nediluate.](#) b
109. Suzuki S., Kobayashi T., Suehiro F., Tuyen C. B., Tana T. S., 2008, High occurrence rate of tetracycline (TC)-resistant bacteria and TC resistance genes relates to microbial diversity in sediment of Mekong River main waterway, *Microb Environ* 23: 149-152.
110. Szczepanowsky R., Krahn I., Linke B., Goesmann A., Puhler A., Schluter A., 2004, Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system, *Microbiology* 150: 3613-3630.
111. Szocs A., 2010, Caracterizarea regimului de oxigen al apei râurilor din bazinul superior și mijlociu al Mureșului, Volumul Conferinței Aerul și Apa componente ale mediului 2010, 394-403.
112. Tacconelli E., Cataldo M. A., 2008, Vancomycin-resistant Enterococci (VRE): transmission and control, *International Journal of Antimicrobial Agents* 31: 99-106.
113. Tenssdth T., Szczepanowsky R., Braun S., Puhler A., Schluter A., 2003, Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant, *FEMS Microbiol Ecol* 45: 239-252.
114. Togay S. O., Keskin A. C., Acik L, Temiz A., 2010, Virulence genes antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods, *Journal of Applied Microbiology*, 109: 1084-1092.
115. Toma-Săcărea F., 2005, *Bacteriologie generală*, Toma-Săcărea F., Editura Universității de Medicină și Farmacie Târgu-Mureș, pag. 44-70.

116. Toma-Săcărea F., 2006, Bacteriologie medicală, Toma-Săcărea F., Editura Universității de Medicină și Farmacie Târgu-Mureș, pag. 127-139.
117. Tomita H., Fujimoto S., Tanimoto K., Ike Y., 1996, Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the Enterococcus faecalis pheromone-responsive conjugative plasmid pY117, Journal Bacteriol 178: 3585-3593.
118. Tuckfield R. C., McArthur J. V., 2008, Spatial analysis of antibiotic resistance along metal contaminated streams, Microbial Ecology 55: 595-607.
119. Ungureanu A., Manolescu M., Stoicescu I., Tatulescu C., 2013, Factorii de patogenitate ai bacteriilor implicate în infecția de tract urinar, ECMB acces disponibil la data 23.03.2015 pe <http://www.ecmb.ro/article.php?story=20030113231415000>.
120. USEPA, 2012, Fecal bacteria: What are fecal bacteria and why are they important? Available at <http://water.epa.gov/type/rs/monitoring/vms511.cfm>, accessed 6 June 2013.
121. Van Hoek A. H. A. M., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A. P., Aarts H. J. M., 2011, Acquired antibiotic resistance genes: an overview, Frontiers in microbiology 2: 1-23.
122. Verhougstraete M. P., Rose J. B., 2014, Microbial investigations of water, sediment, and algal mats in the mixed use watershed of Saginaw Supplement 40: 75-82.
123. Vignesh S., Muthukumar K., James R. A., 2012, Antibiotic resistant pathogens versus human impacts: A study from three eco-regions of the Chennai coast, southern india, marine Pollution Bulletin 64: 790-800.
124. Volkman H., Schwartz T., Bischoff P., Kirchen S., Obst U., 2004, Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan), Journal Microbiol Methods 56: 277-286.
125. Wellington E. M. H., Baxall A. B.A., Cross P., Feil E. J., Gaze W. H., Hawey P. M., Johnson –Rollings A. S., Jones D. L., Lee N. M., Otten W., Thomas C. M., Williams A. P., 2013, The role of natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria, Lancet Infect Diseases 13: 155-165.
126. WHO, 2006, Working together for health – the world health report, pag. 108.

127. Wingender J., Flemming H. C., 2011, Biofilms in drinking water and their role as a reervoir for pathogens, *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214: 417-423.
128. Zhang X., Zhang T., Fong H. H. P., 2009, Antibiotic resistance genes in water environment, *Applied Microbiology and Biotechnology* 82: 397-414.