

**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI**  
**FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE**  
**Departamentul de Biologie Moleculară și Biotehnologie**



**COMUNITĂȚI DE MICROORGANISME**  
**ÎN BIOFILMELE DIN STAȚIA DE TRATARE**  
**ȘI REȚEAUA DE DISTRIBUȚIE A APEI POTABILE**  
**DIN JUDEȚUL CLUJ**

*REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT*

**ANCUȚA-CRISTINA BĂȚINAȘ (căs. FARKAS)**

**Conducător științific:**  
**Prof. univ. dr. MIHAIL DRĂGAN BULARDA**

**Cluj-Napoca**  
**2012**

## CUPRINS

<b>Lista abrevierilor .....</b>	<b>1</b>
<b>Introducere .....</b>	<b>2</b>
<b>Scopul lucrării .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Biofilmul – o nouă paradigmă în microbiologie.....</b>	<b>4</b>
1.1. Istoric și etape în studiul biofilmelor .....	4
1.2. Caracteristici distinctive ale biofilmelor .....	8
1.2.1. <i>Formarea și dezvoltarea biofilmelor</i> .....	8
1.2.2. <i>Arhitectura biofilmului</i> .....	9
1.2.3. <i>Ecologia biofilmelor</i> .....	10
1.2.4. <i>Reglarea genică</i> .....	10
1.2.5. <i>Transferul de gene</i> .....	11
1.2.6. <i>Quorum sensing</i> .....	12
1.2.7. <i>Stabilitatea biofilmului</i> .....	14
1.3. Controlul biofilmelor .....	16
<b>2. Impactul biofilmelor asupra calității apei potabile.....</b>	<b>18</b>
2.1. Biofilmele asociate apei potabile – aspecte microbiologice .....	18
2.1.1. <i>Monitorizarea calității apei potabile</i> .....	21
2.1.2. <i>Bacterii în apa potabilă și în biofilme</i> .....	23
2.1.3. <i>Protozoare în apa potabilă și în biofilme</i> .....	26
2.1.4. <i>Virusuri în apa potabilă și în biofilme</i> .....	27
2.1.5. <i>Fungi în apa potabilă și în biofilme</i> .....	28
2.1.6. <i>Cianobacterii și alge în apa potabilă și în biofilme</i> .....	29
2.2. Biofilmele asociate apei potabile – aspecte chimice .....	30
2.2.1. <i>Probleme estetice ale apei potabile</i> .....	30
2.2.2. <i>Microorganismele – interacțiuni la suprafață, biocoroziune</i> .....	33
<b>3. Investigarea biofilmelor din stația de tratare și rețeaua de distribuție a apei potabile din Județul Cluj .....</b>	<b>35</b>
3.1. Dezvoltarea durabilă. Calitatea apei supuse potabilizării în România .....	35
3.2. Apa potabilă în Cluj .....	37
3.3. Premise. Localizarea punctelor de prelevare .....	42
<b>4. Materiale și metode.....</b>	<b>45</b>
4.1. Prelevarea și pregătirea probelor pentru analize .....	45
4.2. Metode microbiologice .....	47

4.2.1. <i>Determinarea numărului total de germeni, a indicatorilor de contaminare fecală și a patogenilor oportuniști</i> .....	48
4.2.1.1. Numărul total de germeni (NTG) .....	48
4.2.1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	49
4.2.1.3. Enterococii intestinali .....	50
4.2.1.4. <i>Clostridium perfringens</i> .....	51
4.2.1.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	52
4.2.1.6. <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	52
4.2.1.7. <i>Legionella pneumophila</i> .....	53
4.2.1.8. Alte metode și medii de cultură utilizate .....	58
4.2.2. <i>Grupe ecofiziologice de bacterii</i> .....	59
4.2.3. <i>Identificarea fenotipică cu ajutorul kiturilor API</i> .....	62
4.2.4. <i>Asigurarea calității în laboratorul de microbiologie</i> .....	66
4.3. Analize enzimatiche .....	68
4.4. Analize fizico-chimice .....	69
4.5. Estimarea biomasei prin metoda colorării cu cristal violet .....	70
4.6. Evaluarea efectului dezinfectanților asupra bacteriilor din biofilm.....	71
4.7. Metode folosite în prelucrarea statistică a datelor .....	73
4.8. Investigarea rezistenței bacteriene la biocide și antibiotice prin metode moleculare .....	76
4.8.1. <i>Proveniența și obținerea izolatelor</i> .....	76
4.8.2. <i>Screeningul PCR</i> .....	77
4.8.3. <i>Confirmarea rezultatelor</i> .....	80
4.8.4. <i>Identificarea speciilor pe baza secvenței genei ARNr 16S</i> .....	80
<b>5. Rezultate și discuții</b> .....	<b>82</b>
5.1. Analize microbiologice .....	82
5.1.1. <i>Numărarea bacteriilor viabile și cultivabile din biofilme</i> .....	82
5.1.2. <i>Indicatori de contaminare fecală și patogeni oportuniști</i> .....	88
5.1.2.1. <i>Escherichia coli</i> în biofilme.....	92
5.1.2.2. Enterococii intestinali în biofilme.....	93
5.1.2.3. <i>Clostridium perfringens</i> în biofilme .....	93
5.1.2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> în biofilme.....	98
5.1.2.5. <i>Aeromonas hydrophila</i> în biofilme.....	98
5.1.2.6. <i>Legionella pneumophila</i> în biofilme.....	101
5.1.3. <i>Grupe ecofiziologice de bacterii în biofilme</i> .....	105
5.1.4. <i>Participarea la scheme de intercomparare internaționale</i> .....	122
5.1.5. <i>Activitatea enzimatică în biofilmele asociate apei potabile</i> .....	123
5.2. Factori ce pot influența comunitățile de bacterii din biofilmele formate în stația de tratare a apei .....	131
5.2.1. <i>Caracteristici fizico-chimice ale apei</i> .....	132
5.2.2. <i>Caracteristici fizico-chimice ale biofilmelor</i> .....	132

5.2.3. <i>Analize de corelație ale încărcăturii bacteriene din biofilme</i> .....	135
5.2.4. <i>Influența substratului și a etapei de tratare asupra populațiilor de bacterii din biofilme</i> .....	141
5.3. Modelări <i>in vitro</i> ale biofilmelor.....	142
5.3.1. <i>Influența concentrației nutrienților și a temperaturii asupra acumulării biomasei</i> .....	142
5.3.2. <i>Efectul dezinfectanților asupra bacteriilor din biofilm</i> .....	146
5.4. Determinări moleculare. Prezența integronilor din clasa 1 și a genelor ce codifică rezistența la agenți antimicrobieni .....	154
5.4.1. <i>Detecția integronilor clasa 1 și a casetelor de gene</i> .....	156
5.4.2. <i>Identificarea izolatelor pozitive</i> .....	160
5.4.3. <i>Semnificația pentru sănătatea umană a bacteriilor purtătoare de gene de rezistență</i> .....	162
<b>Concluzii</b> .....	<b>165</b>
<b>Perspective</b> .....	<b>167</b>
Anexa 1 .....	168
Anexa 2 .....	170
Anexa 3 .....	173
<b>Bibliografie</b> .....	<b>174</b>
<b>Lista publicațiilor</b> .....	<b>199</b>

**Cuvinte cheie:** biofilm  
apă potabilă  
activitate microbiană  
patogeni oportuniști  
dezinfecțanți  
gene de rezistență

## Introducere

Accesul la apă potabilă este esențial pentru sănătate, constituie un drept fundamental al omului și reprezintă o componentă a politicii în slujba sănătății publice. În decembrie 2003 Organizația Națiunilor Unite a declarat perioada 2005-2015 ca Decada Internațională „Apă pentru Viață” (WHO, 2008).

Cantitatea și calitatea apei disponibile consumului uman sunt elemente de cuantificare a calității vieții, iar utilizarea rațională a resurselor ținând cont de capacitatea de suport a ecosistemelor în care trăim constituie indicatori de durabilitate ai societății. Gestionarea corectă și protecția surselor de apă, aplicarea celor mai eficiente metode de tratare și managementul distribuției sunt termenii cheie ai strategiilor ce se doresc a fi implementate pe întreg Globul. Preocupările actuale de îmbunătățire a proceselor și tehnologiilor în vederea creșterii productivității sunt evidente în sectorul apei, la fel ca și în industria alimentară, cu scopul de a oferi cel mai indispensabil produs de consum unei populații aflate în continuă creștere.

Apa potabilă nu este doar un lichid destinat hidratării, ci interacționează cu toate componentele industriale, agricole, economice, sociale și culturale ce caracterizează societatea umană. Însă importanța supremă a accesului la o apă potabilă sigură este legată de sănătatea omului. Apa potabilă constituie un vehicul foarte important în diseminarea microorganismelor ce interacționează cu organismului uman.

Analizele de rutină efectuate în monitorizarea calității vizează masa apei și nu pot surprinde diversitatea speciilor ce populează acest ecosistem, nici complexitatea și fluctuația proceselor care se desfășoară aici. Biofilmul, în schimb, poate constitui o sursă adecvată pentru investigarea microbiotei acvatice, găzduind o mare concentrație dar și o varietate de microorganisme, ce pot supraviețui timp îndelungat, protejate în matricea polimerică.

Aderarea microorganismelor la suprafețe și acumularea biofilmelor în sistemele de apă generează pe de o parte probleme de natură tehnică, iar pe de altă parte pot deteriora calitatea apei. Biofilmele asociate apei potabile constituie un rezervor de microorganisme: bacterii, virusuri, protozoare, fungi și alge. Acestea se acumulează și se multiplică în biofilm, iar ulterior pot contamina apa prin dispersie. De aceea, informații suplimentare privind compoziția specifică și genofondul consorțiilor microbiene ar putea servi la prevenirea unor eventuale riscuri microbiologice.

## Scopul lucrării

Scopul acestei lucrări îl constituie cercetarea biofilmelor asociate apei, în procesele de captare, tratare și distribuție a apei potabile din județul Cluj. Obiectivele principale sunt de a aduce noi informații referitoare la compoziția și activitatea microbiotei indigene, dar și la dinamica proceselor bacteriene ce se desfășoară într-un sistem de apă. Acesta este primul studiu desfășurat în România în vederea investigării comunităților microbiene atașate suprafețelor și organizate în biofilme, aflate în contact cu apa potabilă.

Ipoteza complexității structurale și funcționale a biofilmelor din stația de tratare a apei și din sistemele de distribuție a condus la abordarea a două direcții de interes: pe de o parte a efectului potențial în degradarea calității apei, iar pe de altă parte a impactului asupra infrastructurii.

A fost studiată variabilitatea spațială și temporală a activității microbiene, din punct de vedere al prezenței unor specii de bacterii. Au fost vizate microorganisme ce oferă informații nespecifice despre microbiota biofilmelor (număr total de germeni), dar și specii care indică sau reprezintă un potențial risc asupra sănătății umane (indicatori de contaminare fecală și patogeni oportuniști). Totodată, investigarea activităților enzimaticice și fiziologice are ca țintă detectarea eliberării unor compuși metabolici ce pot avea efecte nedorite: deteriorarea calității apei, generarea și întreținerea biocoroziunii.

A fost urmărită și influența procesului de tratare asupra comunităților de microorganisme atașate. Au fost monitorizate biofilme din diverse etape de tratare, concomitent cu înregistrarea parametrilor fizico-chimici și microbiologici în apă. Au fost realizate modelări experimentale pentru investigarea influenței concentrației nutrienților și a temperaturii asupra dezvoltării biofilmelor. De asemenea, a fost urmărit efectul unor dezinfectanți asupra consorțiilor bacteriene atașate și protejate în matricea biofilmului.

În contextul unor probleme presante datorate multirezistenței bacteriene, la nivel global, comunitatea științifică internațională manifestă un interes deosebit în ceea ce privește apariția și diseminarea genelor ce codifică rezistența la dezinfectanți și antibiotice. În acest sens, analiza prin metode moleculare a microbiotei biofilmelor a urmărit verificarea prezenței unor elemente genetice responsabile de rezistență la agenți antimicrobieni și de propagarea acesteia în populațiile de bacterii.

### **1. Biofilmul – o nouă paradigmă în microbiologie**

Bacteriile dezvoltă, în general, două modalități de comportament: plutirea liberă a planctonului, formă în care organismele unicelulare plutesc sau înoată independent într-un mediu lichid și cea în care celulele sunt ferm atașate unele de altele, de obicei aderând la suprafața unui substrat, formând o structură solidă (Costerton și colab., 1987; Flemming, 2009). Biofilmul reprezintă o comunitate structurată de microorganisme sesile, care își

dezvoltă o matrice polimerică aderentă la o suprafață vie sau inertă (Zarnea și Popescu, 2011). Aceste structuri emergente se caracterizează, de asemenea, prin heterogenitate structurală și funcțională, comunicare intercelulară prin *quorum sensing* și compoziție în general plurispecifică (Costerton, 1994; Donlan, 2002; Dreeszen, 2003).

Biofilmele sunt ubicuitare în medii naturale și antropice. Morfologia și amprentarea biochimică prin intermediul biofilmelor utilizate ca biomarkeri au identificat astfel de structuri robuste fosilizate, cu o vechime de 3,8 miliarde de ani, în roci terestre (Westall și colab., 2000). Materii provenite din spațiul cosmic sunt de asemenea analizate în căutarea unor dovezi privind evidențe ale unor forme de viață extraterestră (Toporski și colab., 2003).

Descoperirile recente au demonstrat faptul că microorganismele sunt esențiale în aproape orice procese desfășurate pe planeta noastră (Maloy și Schaechter, 2006). Conceptul de biofilm reprezintă o nouă paradigmă în microbiologie: 99% din bacteriile de pe Terra trăiesc asociate în consorții complexe, atașate suprafețelor (Costerton și colab., 1987), iar abordarea lor indică noi perspective de cercetare. Diferențierea celulară, specializarea indivizilor și comportamentul social au lansat ipoteza că biofilmele reprezintă sisteme multicelulare primitive (Webb, 2007). Studiul biofilmelor devine astfel un domeniu interdisciplinar și multidisciplinar, antrenând microbiologi, ingineri, medici, ecologi, specialiști în evoluționism, microscopie, geneticieni, chimiști, fizicieni, matematicieni, igienisti, toxicologi din întreaga lume (Costerton și Wilson, 2004; West și colab., 2007).

## **2. Impactul biofilmelor asupra calității apei potabile**

Fenomenul acumulării biofilmelor (biofouling) are loc, fără excepție, în toate sistemele de producere, stocare și distribuție a apei, în ciuda mediului relativ nefavorabil datorită oligotrofiei, temperaturilor scăzute, prezenței dezinfectanților și condițiilor hidraulice (Moritz, 2011). Depozitele provin din materiile în suspensie transportate de apă, din activitatea microbiană și din reacțiile fizico-chimice de la interfață și din masa apei (Echverría și colab., 2009).

Într-o rețea de distribuție se estimează că aproximativ 95%, este localizată atașat suprafețelor, în timp ce doar 5% din microorganisme se află în masa apei. De aceea, un procent infim poate fi prelevat și detectat în analizele de rutină (Flemming și colab., 2002). Biofilmele îndeplinesc un rol esențial, de barieră biologică în procesul de tratare a apei, fiind capabile să rețină particule (inclusiv microorganisme patogene) și să îndepărteze nutrienții (Fonseca și colab., 2001, Långmark și colab., 2004; LeChevallier și Au, 2004; Tellen și colab., 2010). Bacteriile sesile asociate în biofilme manifestă proprietăți de bioacumulare și biodegradare superioare celulelor planctonice (Araya și colab., 2003).

Pe de altă parte, acumularea biofilmelor în sistemele de apă potabilă poate induce deteriorarea calității apei (O'Connor și O'Connor, 2001; Skraber și colab., 2005; Lee și colab., 2006; Wingender și Flemming, 2011) și coroziunea (Videla și Characklis, 1992; Beech și Flemming, 2000; Coetsier și Cloete, 2005). Scăderea randamentului proceselor de

purificare a apei și a celor de încălzire sau răcire, reducerea eficienței transportului apei și agentului termic sunt alte consecințe ale colonizării microbiene la suprafețele asociate apei.

Evaluarea cantitativă și prescriptivă reprezintă tendința actuală în abordarea biofilmelor. Predicția comportamentului bacterian în sistemele de apă potabilă necesită înțelegerea detaliată a efectelor pe care le au în procesele de atașare, detașare, supraviețuire, multiplicare și viabilitate microbiană, cele trei tipuri de factori abiotici și biotici: natura și caracteristicile substratului, compoziția biofilmului, inclusiv interacțiunile microorganismelor și proprietățile apei.

### 3. Investigarea biofilmelor din stația de tratare și rețeaua de distribuție a apei potabile din Județul Cluj

#### Dezvoltarea durabilă. Calitatea apei supuse potabilizării în România

Strategia Națională pentru Dezvoltare Durabilă a României, întocmită în anul 2008, stabilește obiective concrete, orientate spre îmbunătățirea calității vieții oamenilor și a relațiilor dintre ei, în armonie cu mediul natural (Popovici și colab., 2008). În cadrul acestei strategii, dezvoltarea durabilă se referă la trei elemente: epuizarea resurselor, aspecte ecologice și de mediu și calitatea vieții.

În anul 2008, Indicele Societății Durabile, calculat pentru 37 de țări ale Europei, în funcție de 22 de indicatori, plasează România pe locul 23, cu un scor general de 5,7. Indicatorii care fac referire la apă au o contribuție importantă (Tabelul 1). Și totuși, statisticile indică faptul că 43% din populația României nu are acces la apă potabilă sigură și controlată, alimentarea realizându-se din surse proprii (fântâni și puțuri forate). Insuficiența apei în țara noastră nu se datorează resurselor limitate, ci contaminării acestora, în principal datorită poluării antropice (Popovici și colab., 2008; Mureșan și colab., 2010; Roșu și colab., 2010).

Indicatorul	România		Scorul maxim Europa - 37 țări		Scorul minim Europa - 37 țări	
	Scorul	Locul	Scorul	Statul	Scorul	Statul
3. Apă potabilă suficientă <sup>a</sup>	5,7	37	10	Danemarca	5,7	România
8. Calitatea apelor de suprafață <sup>b</sup>	2,9	37	9,1	Norvegia	2,9	România
16. Utilizarea resurselor regenerabile de apă	8,9	18	10,0	Islanda	0,0	Malta

Tabel 1. Indicatorii care fac referire la apă și situația României în anul 2008 (după Popovici și colab., 2008).

a - 43% din populația țării nu are acces la o sursă sigură de apă; b - date din anul 2003.

Strategiile asigurării unei ape potabile de calitate populației deservite de către operatorii din industria apei includ: selecția celor mai bune surse, protecția bazinelor ce servesc ca surse de apă, realizarea unor procese de tratare eficiente și managementul distribuției apei.

## Apa potabilă în Cluj-Napoca

Producătorul și furnizorul de apă potabilă în zona Clujului este Compania de Apă Someș SA, care asigură servicii de captare, tratare, transport și distribuție a apei potabile, pe de o parte, precum și de colectare, transport, epurare și evacuare a apelor uzate pe de altă parte. Având o tradiție de peste un secol de la înființarea Uzinelor de Apă și Canalizare, compania este primul operator regional licențiat clasa I din România care deservește două județe: Cluj și Sălaj, furnizând apă potabilă unui număr de aproape 700.000 de locuitori în 8 municipii și orașe și 112 localități rurale.

Apa potabilă a Clujului provine în cea mai mare parte din surse de suprafață, de o calitate superioară, reprezentate de o suită de lacuri de acumulare situate în bazinul superior al Someșului Mic (Fig. 1), componentă a bazinului hidrografic Someș-Tisa.



Fig. 1 Principalele surse de apă potabilă ale Clujului: A – Lacul Gilău; B – Lacul Someșul Cald; C – Lacul Tarnița; D – Râul Someșul Rece; E – Râul Agârbiciu.

Barajele construite în cascadă pe râurile Someșul Cald, Someșul Rece și Someșul Mic permit acumularea unui volum imens de apă și îndeplinesc multiple roluri: asigurare a apei potabile și industriale, energetic, atenuare a inundațiilor, sisteme de irigații, recreațional, pescuit sportiv și alimentarea unor păstrăvării. Din anul 2008, lacurile Fântânele-Beliș și Tarnița au fost incluse în lista căilor navigabile interioare ale României, prin HG 665/2008, aspect controversat, întrucât ele fac parte dintr-un bazin strategic, reprezentând principala sursă de apă potabilă ce alimentează Clujul și zonele adiacente.

Stația de Tratare a Apei localizată în Gilău funcționează din anul 1973, dispunând de trei surse alternative de apă brută: Lacul Gilău, Lacul Someșul Cald, din anul 2000 și Lacul Tarnița, din anul 2009. Apa brută se încadrează în categoria de calitate A1 pentru majoritatea

parametrilor fizico-chimici și microbiologici, iar apa finală corespunde normelor în vigoare (din datele laboratorului și date publice).

Procesul de tratare a fost permanent îmbunătățit la rândul său, aliniindu-se standardelor actuale. Etapele parcurse în scopul potabilizării apei (Fig. 2) sunt următoarele:

- micrositare pentru îndepărtarea impurităților grosiere;
- dezinfecție primară sau preclorinare;
- adăugare de reactivi, după caz (sulfat de aluminiu pentru coagulare, carbonat de calciu pentru corecția pH-ului și polielectrolit ca agent de floclare);
- decantare prin sedimentare;
- filtrare rapidă prin filtre de nisip în dublu curent;
- dezinfecție finală prin clorinare;
- stocare în rezervoare și distribuție în funcție de consum.



Fig. 2 Procesul de tratare al apei în Cluj: M – micrositare; P – preclorinare; R – adăugare reactivi; D – decantare; F – filtrare rapidă prin filtre de nisip în dublu curent; C – dezinfecție finală prin clorinare; S – stocare în rezervoare; L – laborator.

### **Premise. Localizarea punctelor de prelevare**

Activitatea microbiană este unul din factorii importanți în procesul de purificare al apei (Hendel și colab., 2001). Calitatea apei este astfel dependentă de compoziția specifică și de fiziologia comunităților microbiene pe parcursul proceselor de tratare, stocare și transport al apei potabile.

Biofilmele formate în mod natural au fost prelevate din următoarele puncte (Fig. 3):

**I. Captare:** din conducta de aducțiune a apei din Lacul Someșul Cald, de tip HOBAS (fibră de sticlă ranforsată), cu o vechime de 10 ani;

**II. Tratare:** din etapa de decantare, de pe substrat de beton și oțel, precum și din etapa de filtrare, de pe granulele de nisip;

**III. Distribuție și stocare:** - din sistemul de distribuție în zona străzii Maramureșului, dintr-o conductă din oțel, funcționând din anii 1972-1973.

- din rezervoarele Zorilor I, Zorilor II și Baciului - rezervoare din beton cu capacitatea de 2.500 m<sup>3</sup>. Din aceste puncte s-au prelevat probe de sediment de pe fundul rezervoarelor, la golirea acestora, întrucât pe pereții verticali nu se înregistrează acumulări de biofilm.



Fig. 3 Punctele de prelevare a probelor de biofilm: I. Stația de Tratare Gilău; II. Conducta aducțiune Lac Someșul Cald; III. Sistem de distribuție str. Maramureșului; IV. Rezervor Zorilor I; V. Rezervor Zorilor II; VI. Rezervor Baciului.

## 4. Materiale și metode

### Prelevarea și pregătirea probelor pentru analize

Probele de biofilm au fost recoltate prin raclare, din puncte de prelevare prestabilite, urmând același protocol pe toată durata studiului. Toate procedurile aferente colectării, procesării și execuției, corespunzătoare analizei microbiologice au fost efectuate în condiții sterile.

Biofilmele au fost colectate după următorul protocol, pentru a surprinde o probă reprezentativă:

- Prestabilirea mai multor zone de prelevare din decantor, filtrul de nisip, rezervor sau conductă;
- Recoltarea unor cantități excedentare de biofilm, respectiv de sediment;
- Transportul în laborator;
- Omogenizarea și eșantionarea probelor.

Simultan cu investigarea biofilmelor din stația de tratare a fost realizată și monitorizarea condițiilor oferite de masa apei, prin prelevarea unor probe de apă brută, în vederea determinării parametrilor fizico-chimici, chimici și microbiologici.

Toate analizele microbiologice, fizico-chimice și chimice au fost efectuate într-un laborator acreditat din cadrul stației de Tratare a Apei a Companiei de Apă Someș SA Cluj-Napoca. Analizele enzimologice și determinările moleculare au fost efectuate în laboratoarele Facultății de Biologie și Geologie a Universității Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca.

## Metode microbiologice

Analizele microbiologice au fost efectuate prin tehnici convenționale de cultivare, urmărind dezvoltarea microorganismelor viabile și cultivabile, prin inocularea probelor de biofilm sau a diluțiilor corespunzătoare în medii de cultură generale sau selectiv-diferențiale. În acest scop au fost pregătite serii de diluții succesive, până la  $10^{-9}$ , în apă peptonată sterilă.

Au fost utilizate trei metode de cultivare:

- **inocularea în medii cu agar** fie prin încorporarea inoculului în masa mediului (număr total de germeni, NTG), fie prin distribuția acestuia la suprafața agarului solid (bacterii mangan oxidante).
- **metoda membranei filtrante**: filtrarea suspensiilor de biofilm prin membrane sterile din esteri de celuloză, cu porozitatea de  $0,45 \mu\text{m}$ , urmată de plasarea acestora pe medii de cultură specifice (enterococi intestinali, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*).
- **metoda tuburilor multiple**: inocularea probelor din cel puțin trei diluții succesive în serii a câte 5 eprubete (germeni coliformi și *Escherichia coli*, bacterii amonificatoare, denitrificatoare, sulf reducătoare, sulf oxidante, sulfat reducătoare și fier reducătoare).

După inocularea și incubarea respectând condițiile necesare creșterii fiecărei specii/grup țintă, au fost numărate coloniile tipice pe mediile solide, respectiv au fost urmărite reacțiile specifice creșterii în bulioane și au fost efectuate teste biochimice specifice în vederea confirmării (Krumbein și Altman, 1973; Alexander, 1982; Cușa, 1996; Drăgan-

Bularda, 2000; Atlas, 2004). A fost efectuată și identificarea fenotipică cu ajutorul kiturilor API.

Analiza activităților microbiene ce caracterizează biofilmele asociate apei potabile a inclus și determinări enzimatică, evaluându-se activitatea dehidrogenazică, fosfatazică și catalazică (Drăgan-Bularda, 2000).

Evaluarea influenței temperaturii și a concentrației nutrienților asupra comunităților autohtone de bacterii din biofilmele stației de tratare s-a realizat cu ajutorul tehnicii colorimetrice a determinării densității biofilmului (estimarea biomasei prin metoda colorării cu cristal violet).

În scopul evaluării efectului dezinfectanților asupra bacteriilor din biofilm a fost testat gradul de recuperare, respectiv abilitatea de creștere pe medii de cultură a populațiilor de bacterii dintr-un biofilm martor, comparativ cu cea a bacteriilor din biofilme supuse acțiunii unor soluții de dezinfectanți (Tabelul 2). Efectul antimicrobian al fiecărui dezinfectant a fost estimat prin calcularea valorii de reducere logaritmică a creșterii bacteriene (log reduction value = LRV), pentru fiecare tip de microorganism țintă (Hamilton, 2010).

<b>Componente active</b>	<b>Nume comercial</b>	<b>Producător</b>
Dicloroizocianurat de sodiu	Clorom	G&M, România
Hipoclorit de sodiu	Hipoclorit de sodiu	Penta, Cehia
<i>N</i> -cloro- <i>p</i> -toluen sulfonamidă	Chloramina-T	Sintofarm, România
Dioxid de clor	TwinOxide	TwinOxide, Olanda
	Floran:	Mosslein, Germania
Acid sulfamic	Topix 40% vol	
Acid clorhidric	Filtrasan 40% vol	
Apă oxigenată, Acid acetic, Acid peracetic	Oxis 20% vol	

Tabel 2. Dezinfectanții testați pentru efectul antibacterian asupra bacteriilor din biofilm.

### **Investigarea rezistenței bacteriene la biocide și antibiotice prin metode moleculare**

Prezența în microbiota biofilmelor asociate apei potabile a elementelor genetice ce codifică rezistența bacteriană la agenți antimicrobieni, a fost investigată prin metode moleculare.

Au fost selecționate 96 de izolate: 58 (60%) colonii preluate de pe medii de cultură ce ținesc bacterii inofensive, caracteristice mediului înconjurător, respectiv 38 (40%) colonii preluate de pe medii de cultură ce ținesc indicatori de contaminare fecală și bacterii oportuniste patogene.

Au fost țintite următorii determinanți genetici: integroni clasa 1, gena integrază (*intI1*) și casetele de gene specifice (*qacG*, *qacH*, *qacE*), gene ce codifică rezistența la

compuși cuaternari cu amoniu (*qacE*, *qacEΔ1*), gena ce codifică rezistența la sulfonamidă (*sulI*) și modulul de transpoziție (*tni*) al integronilor clasa 1 în transposoni. Estimându-se o mare variabilitate fenotipică în cadrul populațiilor bacteriene autohtone, au fost testate 23 de combinații a celor 33 de amorse alese (Tabelul 3).

Simbol	Amorse	Zona țintă	Lungimea fragmentului (pb)	Referințe
P1	MRG284 MRG285	Casete – integron clasa 1	variabilă 400-2000	Gillings și colab., 2009
P2	MRG284 MRG286	Casete – integron clasa 1	variabilă 400-2000	
P3	HS915 HS916	<i>intI1</i>	≈350	Márquez și colab., 2008
P4	HS458 HS459	5'CS-3'CS <i>intI1</i>	1300	Holmes și colab., 2003
P5	HS714 HS715	<i>intI1</i> +IRi	≈500	
P6	HS463a HS464	<i>intI1</i>	473	Stokes și colab., 2006;
P7	HS722 HS715	<i>oriV</i> + <i>intI</i>	1320	
P8	HS714 HS726	<i>intI1</i>	1320	
P9	<i>intF</i> <i>intR</i>	<i>intI1</i>	497	Chuanchuen și colab., 2007
P10	HS464 HS721	<i>intI1</i> + IRi	1520	
P11	HS458 HS723	<i>intI1</i>	2100	Stokes și colab., 2006
P12	HS714 HS463a	<i>intI1</i>	-	
P13	<i>qacEF</i> <i>qacEΔ1R</i>	Casete <i>qac</i>	363	Chuanchuen și colab., 2007
P14	<i>qacEF</i> <i>qacER</i>	Casete <i>qac</i>	363	
P15	<i>qacEF</i> <i>suIR</i>	Casete <i>qac</i> , <i>sulI</i>	1112	
P16	MRG287 MRG288	Familia <i>qacG</i>	281	
P17	MRG289 MRG290	Familia <i>qacH</i>	235	
P18	MRG291 MRG292	Familia <i>qacE</i>	193	Gillings și colab., 2009
P19	MRG287 MRG293	Casete <i>qacG</i>	354	
P20	MRG289 MRG294	Casete <i>qacH</i>	301	
P21	MRG291 MRG295	Casete <i>qacE</i>	277	
P22	HS549 HS550	<i>sulI</i>	1100	Stokes și colab., 2006;
P23	HS724 HS725	<i>tniAB</i>	520	

Tabel 3. Combinațiile de amorse utilizate și fragmentele țintă urmărite în investigarea prezenței genelor codificatoare ale rezistenței bacteriene.

Protocolul parcurs a constat în următoarele etape:

- izolarea coloniilor pure pe diverse medii agarizate;
- efectuarea testelor biochimice de identificare;
- selecția izolatelor testate;
- verificarea prezenței genelor țintă cu ajutorul reacției polimerazice în lanț (PCR), utilizând amorse specifice;
- purificarea ampliconilor;
- secvențializarea produșilor de amplificare;
- confirmarea prezenței elementelor genetice responsabile de rezistența antimicrobiană prin analiza similarității cu secvențele din baza de date GenBank NCBI.

În scopul determinării speciilor bacteriene în care a fost identificată prezența elementelor genetice responsabile de rezistența la agenți antimicrobieni, a fost efectuată identificarea pe baza secvenței genei 16S a ARN ribosomal.

Etapele parcurse în identificarea moleculară:

- amplificarea fragmentelor țintă din gena codificatoare a ARNr 16S prin PCR, utilizând amorse bacteriene universale (16S-8F și 16S-1493R);
- purificarea ampliconilor;
- secvențializarea produșilor de amplificare;
- identificarea secvențelor obținute prin analiza similarității cu secvențele din baza de date GenBank NCBI.

Secvențializarea a fost realizată prin metoda Sanger cu ajutorul secvențiatorului automat 3730XL Applied Biosystems, la MacroGen Inc., Olanda.

## **5. Rezultate și discuții**

### **5.1. Analize microbiologice**

#### ***Numărarea bacteriilor viabile și cultivabile din biofilme***

Evoluția NTG cultivabili, reprezentat de unitățile formatoare de colonii per gram de biofilm (UFC/g), în biofilmele stației de tratare este reprezentată în Fig. 4. S-a observat o dezvoltare similară a microbiotei pe cele trei substraturi (beton, oțel și nisip), cu densități fluctuante și dezvoltare sezonieră, valorile maxime fiind înregistrate în cursul verii iar cele minime toamna și iarna. Biofilmele din decantor, indiferent de tipul substratului, au susținut comunități microbiene cu o evoluție similară și valori apropiate, în timp ce biofilmele din filtrul de nisip au fost mai sărace în microorganisme.

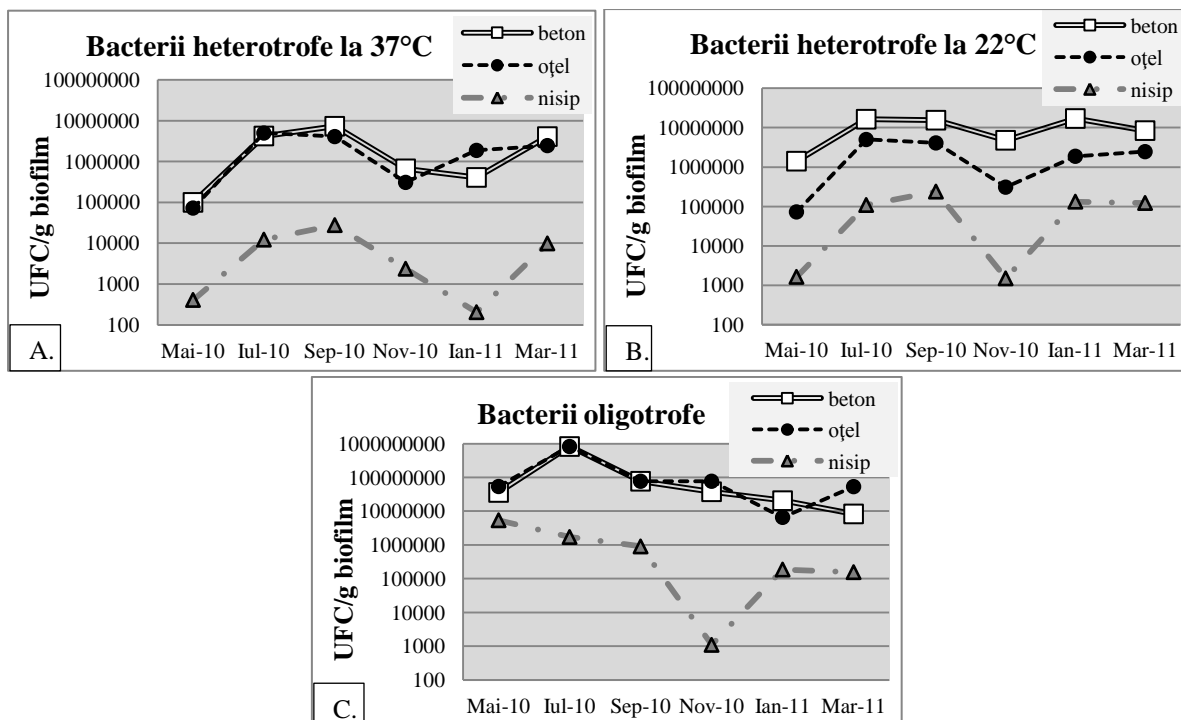


Fig. 4. Evoluția numărului total de germeni în biofilmele stației de tratare, pe trei substraturi: beton, oțel și nisip.  
 A – Bacterii heterotrofe mezofile dezvoltate la 37°C în agar cu extract de drojdie, incubare 48h;  
 B – Bacterii heterotrofe mezofile dezvoltate la 22°C în agar cu extract de drojdie, incubare 72h;  
 C – Bacterii oligotrofe și heterotrofe dezvoltate la 22°C în R2A agar, incubare 5 zile.

Pentru o imagine de ansamblu asupra dinamicii microbiotei atașate suprafețelor pe parcursul proceselor de captare, tratare și distribuție a apei potabile în Cluj, au fost comparate mediile NTG în biofilmele dezvoltate înaintea, în timpul și după procesul de tratare al apei (Fig. 5). Aplicarea unor proceduri corecte de tratare și dezinfecție a apei se estimează că are o eficiență de reducere a microbiotei planctonice cu peste 99% (Le Chevallier și Au, 2004). În biofilmele investigate se poate observa o descreștere a numărului de bacterii, dar mai puțin vertiginoasă, pe parcursul etapelor de tratare a apei și în rețeaua de distribuție.

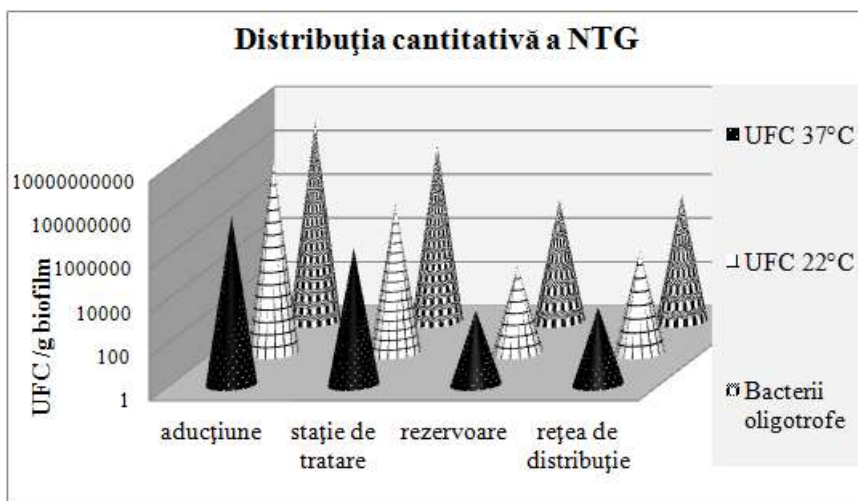


Fig. 5. Comparație între încărcăturile microbiene ale biofilmelor înaintea, în timpul și după procesul de tratare – valori medii înregistrate în 2010-2012.

## **Semnificația numărului total de germeni în biofilmele asociate apei potabile**

Cu toate că doar un mic procent din microorganismele metabolice active sunt capabile să crească *in vitro*, pe medii de cultură comune, estimarea numărului total de germeni oferă informații generale, nespecifice, în ceea ce privește încărcătura microbiană din biofilme și permite evaluarea potențialului acestui rezervor de microorganisme de a contamina apa.

Prezența numărului total de germeni în apa potabilă și în biofilmele asociate nu reprezintă neapărat un risc infecțios și un motiv de îngrijorare în ceea ce privește sănătatea consumatorilor (Glasmacher și colab., 2003). Populațiile de bacterii non-patogene nu trebuie neglijate însă, deoarece ele joacă rolul primordial în formarea biofilmelor (LeChevallier, 2003).

### ***Indicatori de contaminare fecală și patogeni oportuniști***

Rezultatele monitorizării indicatorilor de contaminare fecală și a bacteriilor oportuniste patogene în biofilmele asociate apei potabile indică faptul că pseudomonadele, coliformii și aeromonadele predomină în consorțiile de microorganisme atașate suprafețelor, pe întreaga perioadă anului. Enterococii intestinali și clostridiile sulfid reducătoare, deși prezenți, au fost detectați în proporții extrem de mici, comparativ cu densitățile speciilor abundente.

Variația sezonieră a populațiilor de *Escherichia coli* și enterococi intestinali în biofilmele stației de tratare se caracterizează prin creștere, probabil datorită unui grad de contaminare mai ridicat al apei brute, în timpul lunilor călduroase și prin reducerea populațiilor pe timpul iernii. Evoluția sezonieră a populațiilor de *C. perfringens* în biofilme se caracterizează prin episoade de contaminare intermitentă, care au dus la înregistrarea unor vârfuri atât în luna iulie 2010, cât și în ianuarie 2011. Pseudomonadele au atins un maxim de dezvoltare în timpul iernii, iar aeromonadele au fost abundente în biofilme toamna (Fig. 6).

Bacterii din genul *Legionella* nu au fost detectate în nici una din probele de biofilm testate, indiferent de metoda aplicată. Rezultatul este surprinzător, speciile din genul *Legionella* fiind descrise ca apariții obișnuite în biofilmele asociate apei, deși foarte pretențioase în ceea ce privește condițiile nutritive *in vitro* (Garrity și colab., 2005). Constatările recente sugerează persistența acestor bacterii în biofilme, mai ales în forma viabilă dar necultivabilă (Moritz, 2011). Astfel, pentru detecția *Legionella* sp. în biofilmele asociate apei potabile din Cluj, o nouă abordare ar fi indicată, cu utilizarea unor metode independente de cultivare.

Pentru obținerea unei imagini de ansamblu asupra dinamicii indicatorilor de contaminare fecală și a patogenilor oportuniști în consorțiile atașate suprafețelor, pe parcursul proceselor de captare, tratare și distribuție a apei potabile în Cluj, au fost ilustrate comparativ mediile obținute pentru acești parametri în biofilme (Fig. 7). În ansamblu, se poate observa o descreștere a numărului de bacterii per gram de biofilm, după tratarea apei, în rețeaua de distribuție, mai puțin evidentă în cazul speciilor *A. hydrophila* și *P. aeruginosa*.

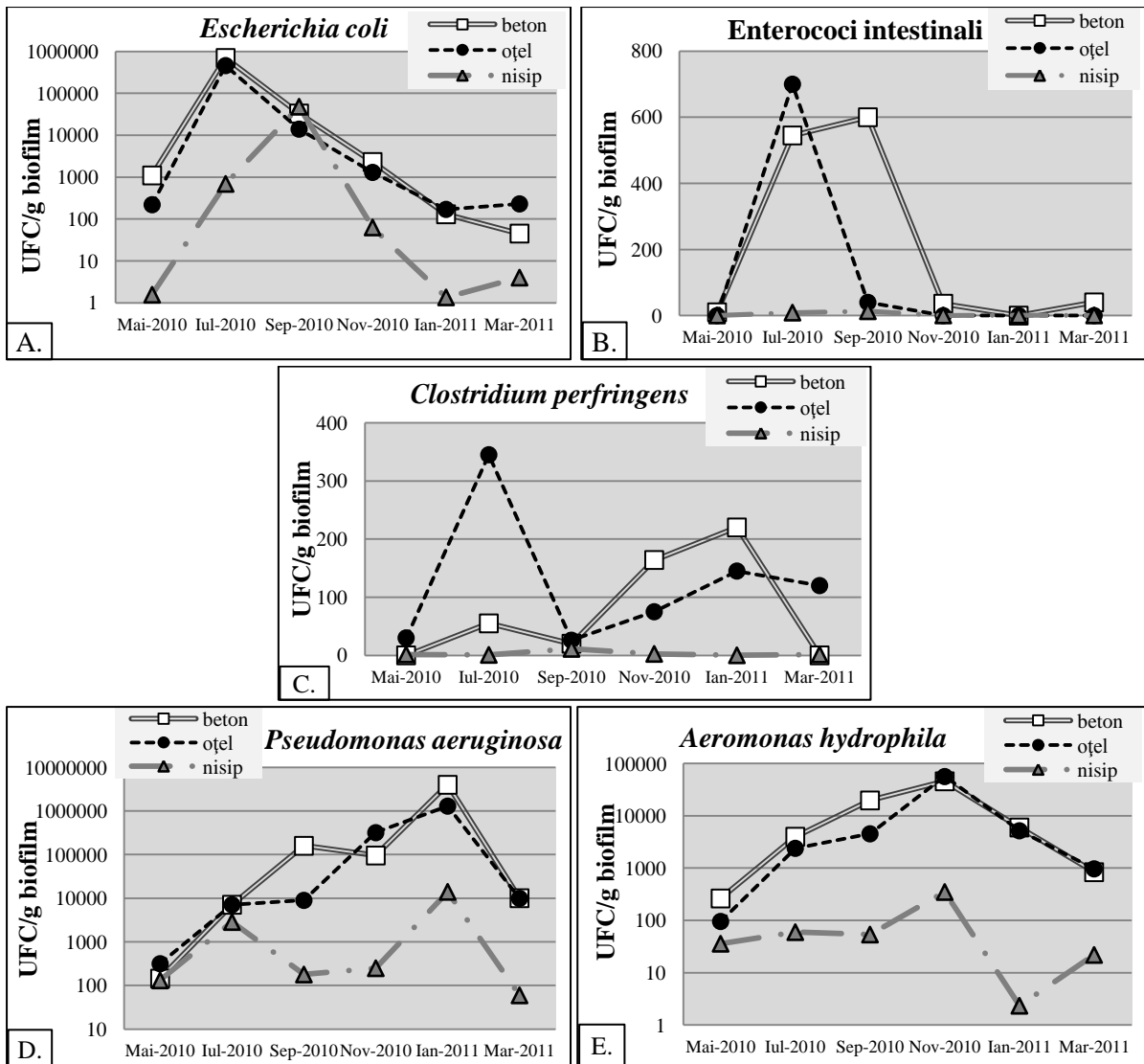


Fig. 6. Evoluția indicatorilor fecali și a patogenilor oportuniști în biofilmele stației de tratare, pe trei substraturi: beton, oțel și nisip.

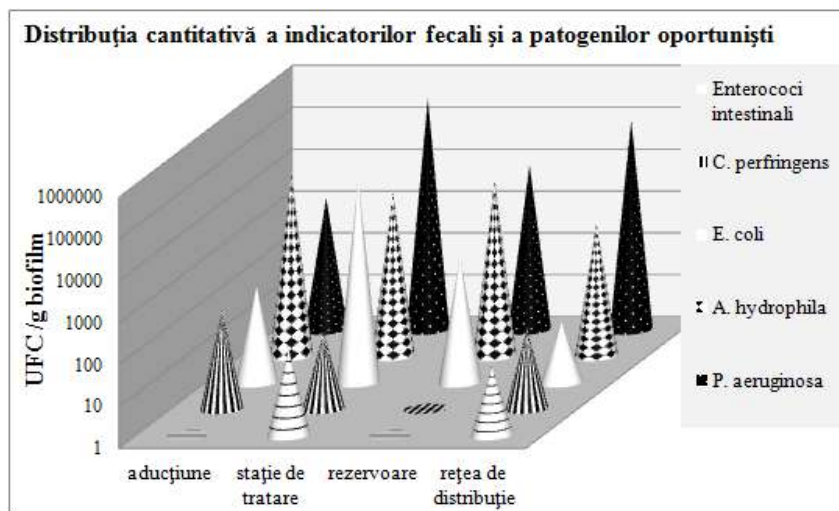


Fig. 7 Comparație între încărcătura indicatorilor fecali și a patogenilor oportuniști în biofilme analizate înainte, în timpul și după procesul de tratare – valori medii înregistrate în 2010-2012.

## Semnificația prezenței indicatorilor de contaminare fecală și a patogenilor oportuniști în biofilmele asociate apei potabile

Biofilmele provenite din instalațiile de captare, tratare și distribuție a apei potabile investigate în acest studiu s-au dovedit a găzdui consorții microbiene foarte active, care au generat încărcături mari de bacterii cultivabile, cu excepția celor din genul *Legionella*.

Detectarea populațiilor de indicatori fecali în biofilmele asociate apei are o semnificație multiplă: pe de o parte reprezintă ei înșiși un potențial risc din punct de vedere al sănătății consumatorilor, iar pe de altă parte indică posibila prezență a altor bacterii, virusuri sau protozoare patogene.

Dispersia bacteriilor oportuniste patogene găzduite în biofilme poate duce la contaminarea fazei apoase, existând riscul transportului acestor microorganisme odată cu fluxul de apă și a colonizării instalațiilor în aval. Aceste aspecte necesită investigații suplimentare.

### *Grupe ecofiziologice de bacterii în biofilme*

În toate categoriile de biofilme investigate s-au dovedit preponderente procesele de amonificare, reducere a fierului și oxidare a manganului. Toate celelalte populații de microorganisme, și anume bacterii denitrificatoare și grupele de bacterii implicate în circuitul sulfurii se regăsesc în efective mult mai mici, reprezentând procentual mai puțin de 0,1% din totalul germenilor detectați în biofilme.

Indicatorul bacteriologic al calității biofilmelor (IBCB) indică o reducere a activității microbiene pe timpul sezonului rece (Fig. 8), precum și în direcția de curgere a apei.

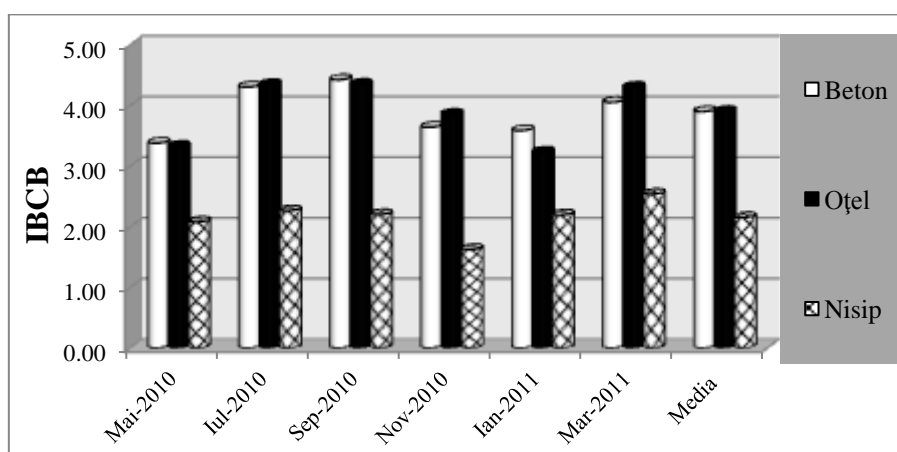


Fig. 8. Evoluția IBCB în biofilmele stației de tratare, pe trei substraturi: beton, oțel și nisip.

Dinamica grupelor ecofiziologice de bacterii în consorțiile atașate suprafețelor, pe parcursul proceselor de captare, tratare și distribuție a apei potabile în Cluj, a fost ilustrată comparativ (Fig. 9). Se poate observa o descreștere a numărului de bacterii după tratarea apei, în rețeaua de distribuție, mai puțin evidentă în cazul bacteriilor amonificatoare, sulf oxidante și fier reducătoare.

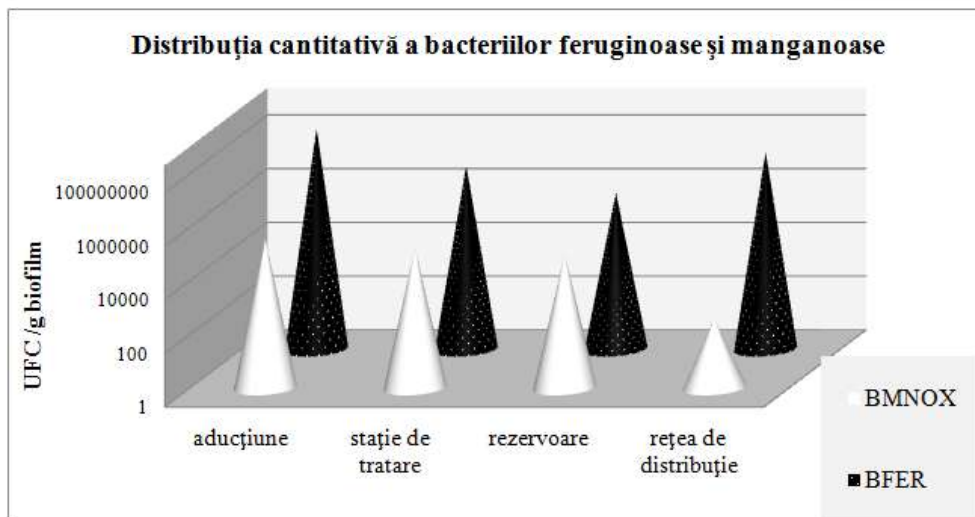
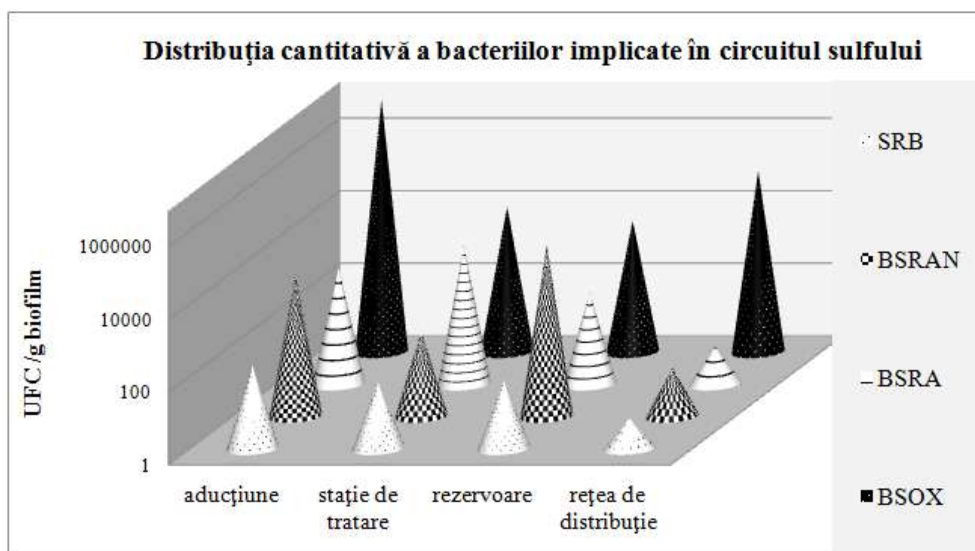
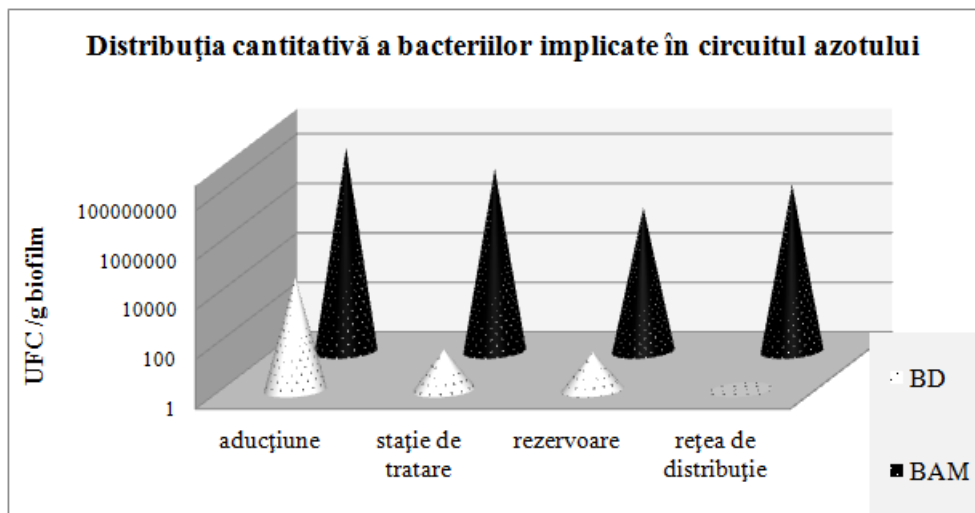


Fig. 9. Comparație între încărcătura bacteriilor aparținând unor grupe ecofiziologice în biofilme analizate înaintea, în timpul și după procesul de tratare – valori medii înregistrate în 2010-2012: bacterii amonificatoare (BAM), denitrificatoare (BD), sulfat reducătoare (SRB), sulf reducătoare anaerobe (BSRAN), sulf reducătoare aerobe (BSRA), sulf oxidante (BSOX), fier reducătoare (BFER) și mangan oxidante (MNOX).

Identificarea fenotipică cu ajutorul kiturilor API (bioMérieux) a unor colonii izolate de pe medii de cultură agarizate a fost efectuată pentru toate cele opt grupe fiziologice de bacterii investigate în biofilmele asociate apei potabile din Cluj. Bacteriile capabile de amonificare, reducere a sulfului și fierului s-au dovedit a aparține genurilor *Aeromonas*, *Burkholderia* și *Pseudomonas*. Izolatele implicate în oxidarea manganului aparțin speciilor *Bacillus cereus*, *B. mycoides*, *B. subtilis* și *Paenibacillus polymyxa*.

### **Semnificația distribuției pe grupe ecofiziologice de bacterii în biofilmele asociate apei potabile**

Diversitatea microbiană și intensitatea activităților desfășurate în biofilmele asociate apei potabile au ca rezultat eliberarea unor metaboliți precum acizi organici și anorganici, amoniu, hidrogen sulfurat, precum și acumularea unor enzime extracelulare. Astfel de compuși fie interacționează cu materialele suprafețelor colonizate, provocând biocoroziunea, fie sunt eliberați în masa apei, producând deteriorarea estetică a calității acesteia.

Monitorizarea calității apei potabile în Cluj (din datele laboratorului și date publice) indică faptul că proprietățile apei, mai exact concentrațiile amoniului, nitraților, nitriților, sulfatilor și fierului nu sunt influențate în mod negativ de către comunitățile de bacterii prezente în biofilme. Reclamațiile relativ rare ale consumatorilor în privința proprietăților organoleptice ale apei sunt asociate cu stagnarea apei în conducte și cu o infrastructură învechită, mai ales în interiorul clădirilor.

Observațiile macroscopice asupra depunerilor din stația de tratare indică faptul că biocoroziunea are loc în special pe suprafețele din oțel, unde se formează tuberculi de rugină. Pe pereții din beton are loc în schimb o acumulare masivă de biomasă, în special în timpul sezonului cald. Preponderența activităților de amonificare și de oxidoreducere a metalelor indică potențialul biofilmelor asociate apei potabile în colmatarea și corodarea sistemelor de distribuție în Cluj. Și totuși, rata coroziei poate să nu se coreleze perfect cu cea a bacteriilor implicate în biocoroziune, detectate în biofilme sau în apă, ci mai degrabă cu intensitatea metabolică a activității acestora (Beech, 2003). Comunitățile microbiene asociate apei potabile în sistemele din Cluj s-au dovedit a fi foarte active și au generat o creștere semnificativă pe medii de cultură *in vitro*.

În privința speciilor care au fost identificate ca implicate în procesele fiziologice investigate, semnificativă este confirmarea prezenței masive a bacteriilor din genurile *Aeromonas*, *Pseudomonas* și *Bacillus*.

### ***Activitatea enzimatică în biofilmele asociate apei potabile***

În concordanță cu valorile absolute ale activităților enzimatică (dehidrogenazică, fosfatazică și catalazică), indicele de calitate enzimatică a biofilmelor (IECB) a înregistrat valori maxime în decantor, în biofilmul dezvoltat pe substrat de oțel, pe timpul iernii, iar valorile minime au fost obținute pentru filtrul de nisip, pe timpul verii (Fig. 10). Două

explicații pot fi aduse în legătură cu această situație: acumularea extracelulară a enzimelor, în matricea biofilmului și intrarea celulelor într-o stare de stres fiziologic.

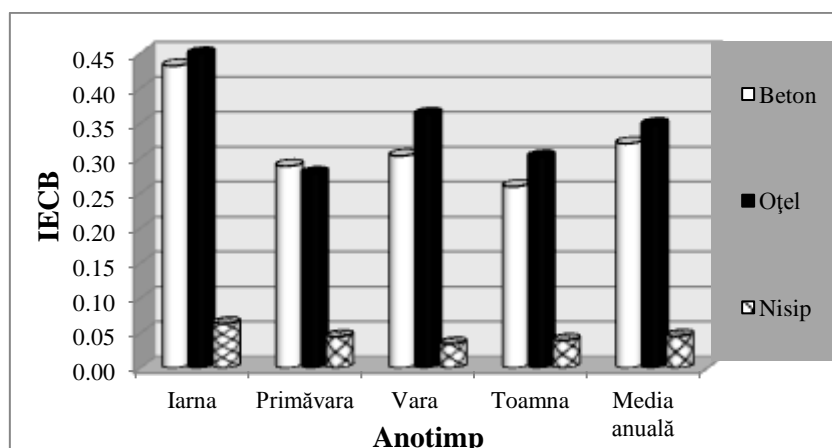


Fig. 10. Indicatorii enzimatici de calitate a biofilmelor din stația de tratare, pe trei substraturi: beton, oțel și nisip, pe parcursul anului 2011.

### Semnificația activității enzimatică în biofilmele din stația de tratare

Activitatea enzimelor bacteriene în biofilme are efecte atât pozitive cât și negative asupra infrastructurii și implicit asupra calității apei potabile. Biofilmele pot fi exploatate în procesul de purificare a apei, în virtutea proprietăților de biodegradare și bioacumulare. Pe de altă parte, activitatea microbiană poate genera biocoroziunea conductelor.

Enzimele extracelulare afectează compoziția și proprietățile matricii exopolimerice, influențând dezvoltarea biofilmului (Tielen și colab., 2010).

În studiul de față, activități enzimatică intense au fost remarcate în decantor și mai reduse în filtrul de nisip. Procesul de decantare este static, permițând formarea biofilmelor și acumularea depunerilor, comparativ cu filtrarea prin patul de nisip în dublu curent, un proces dinamic. Reducerea activităților enzimatică în timpul transformării apei din apă de suprafață în apă potabilă reflectă o ameliorare a stării sale trofice (Emtiazi și colab., 2004).

Reducerea activității dehidrogenazice în filtrul de nisip, atât din punct de vedere al intensității, dar mai ales a ponderii în activitatea enzimatică totală sugerează o scădere a activității microbiene în decursul procesului de tratare. În același timp, se poate observa că nu se înregistrează diferențe drastice ale nivelului activității catalazice din biofilmele decantorului comparativ cu a celor din filtru. Totodată, ponderea activității catalazice a crescut în biofilmele din filtrul de nisip, comparativ cu cea conferită de comunitățile decantorului. Această creștere a ponderii activității catalazice pe parcursul etapelor de tratare indică intensificarea stresului oxidativ la care sunt supuse bacteriile, catalazele fiind oxidoreductaze cu rol în protecția celulei față de stimulii externi (Bonnineau și colab., 2010). În cazul biofilmelor formate în decursul procesului de tratare, stresul oxidativ este reprezentat de procedurile de tratare și de prezența unor substanțe chimice, cum sunt dezinfectanții.

## **Factori ce pot influența comunitățile de bacterii din biofilmele formate în stația de tratare a apei**

Studiind omogenitatea dispersiei eșantioanelor, analiza variației indică omogenitatea populațiilor de bacterii investigate, coeficientul de variație fiind întotdeauna mai mic de 3%.

Rezultatele analizei corelației germenilor din biofilmele stației de tratare cu proprietățile fizico-chimice ale apei și ale biofilmului, precum și testele de semnificație statistică indică faptul că biofilmele din decantor au evoluat asemănător, iar diferențe mai mari au fost între populațiile de bacterii atașate în etapa de decantare comparativ cu cele dezvoltate în etapa de filtrare.

Se poate astfel concluziona că substratul imersat nu a influențat semnificativ dezvoltarea bacteriilor monitorizate, ci mai degrabă procesul de tratare a exercitat astfel de influențe. Aceste rezultate au o importanță deosebită în ceea ce privește capacitatea celor trei tipuri de materiale aflate în contact cu apa de a susține dezvoltarea bacteriilor care pot deteriora calitatea apei potabile și infrastructura.

### **Modelări *in vitro* ale biofilmelor**

#### **Efectul dezinfecanților asupra bacteriilor din biofilm**

Pe baza valorilor medii de reducere logaritmică, cel mai eficient produs de inactivare bacteriană s-a dovedit a fi agentul de curățare mixt Floran, urmat de dicloroizocianuratul de sodiu, hipocloritul de sodiu, cloramina T și dioxidul de clor (Tabelul 4). Floranul are capacitatea de a reduce viabilitatea bacteriană într-un domeniu procentual de la 96,66% (LRV = 1,477) în cazul SRB, până la 99,99994% (LRV = 6,227) în cazul bacteriilor amonificatoare.

Comparând rezultatele obținute în experimente similare, dar care au avut drept țintă celulele suspendate în masa apei, cu valorile de reducere logaritmică din studiul de față, este evidentă capacitatea biofilmului de a oferi protecție populațiilor de bacterii găzduite. Reducerea impactului antimicrobian poate fi explicată prin reducerea penetrării dezinfecanțului în matricea biofilmului (deBeer și colab., 1994). O altă explicație ar fi ipoteza dozei antimicrobiene subletale, care poate avea ca efect inițierea răspunsului adaptativ la stres în celulele bacteriene. Efectele utilizării agenților antimicrobieni în doze subletale sunt semnificative din perspectiva sănătății publice, incluzând apariția unor variante rezistente, accentuarea virulenței la speciile patogene și intrarea celulelor în starea de viabil dar necultivabil (Wesche și colab., 2009).

Intensificarea activității bacteriilor denitrificatoare în biofilme, după expunerea cupanelor la dezinfecție bazată pe compuși cu clor, precum și amplificarea reducerii sulfatilor în urma acțiunii cloraminei T sunt fenomene care pot avea la bază efecte hormetice (Calabrese, 2008; Kaplan, 2011).

Tipul bacteriilor	LRV (bacterii/g biofilm)				
	1	2	3	4	5
NTG	0,969	0,826	0,929	1,108	4,523
<i>E. coli</i>	0,287	0,298	0,155	0,345	3,097
Enterococi intestinali	3,305	3,305	3,305	0,305	3,305
<i>C. perfringens</i>	1,045	0,744	1,046	0,920	4,523
<i>P. aeruginosa</i>	0,955	0,141	0,026	0,288	5,687
<i>A. hydrophila</i>	0,777	0,245	0,562	0,667	5,023
BAM	2,004	2,004	2,004	2,004	6,227
BD	-0,096	-0,176	0,203	-0,032	2,199
BSRA	0,600	0,362	0,607	0,277	3,125
BSRAN	0,889	0,442	0,889	0,298	1,889
SRB	0,125	0,125	-0,114	0,477	1,477
BSOX	1,684	2,373	1,124	1,114	4,036
BFER	2,580	2,506	1,301	1,010	4,386
BMNOX	0,577	0,503	0,346	0,418	1,928
<b>Media LRV</b>	<b>1,122</b>	<b>0,979</b>	<b>0,885</b>	<b>0,657</b>	<b>3,673</b>

Tabel 4. Valori de reducere logaritmică (LRV) obținute în urma dezinfecției biofilmelor cu:  
1 – Dicloroizocianurat de sodiu; 2 – Hipoclorit de sodiu; 3 – Cloramina T; 4 – Dioxid de clor; 5 – Floran.

Pentru asigurarea calității apei potabile este esențială selecția celor mai potrivite proceduri de tratare. Regenerarea biofilmelor în urma aplicării unui tratament inefficient duce la selecția unor populații de bacterii rezistente, care devin recalcitrante la o dezinfecție ulterioară (Simões și colab., 2004). Îmbunătățirea performanțelor în realizarea dezinfecției prin clorinare se pot obține prin îndepărtarea mecanică a biofilmelor înainte de sanitizare și prin aplicarea denzinfectiei de șoc, eventual prin alternarea a două tipuri de agenți. De asemenea, studiul de față arată că investigarea compoziției consorțiilor microbiene și a proceselor fiziologice desfășurate în biofilmele aflate în contact cu apa ajută la selecția metodei și a compușilor în vederea realizării unei dezinfecții optime.

În concluzie, se poate sublinia faptul că nici un agent pe bază de clor nu a reușit să inactiveze complet indicatorii de contaminare fecală sau bacteriile oportuniste patogene. Cu atât mai mult este necesară implementarea unui plan de siguranță al apei, care să includă măsuri de control a biofilmelor, acest rezervor de contaminare pentru apa potabilă.

## Determinări moleculare

### Prezența integronilor clasa 1 și a genelor ce codifică rezistența la agenți antimicrobieni

Șapte combinații de amorse din cele 23 de perechi testate au produs rezultate pozitive la reacția polimerazică în lanț (PCR). Au fost identificate nouă izolate din cele 96 testate (9,375%) ca purtătoare ale integronilor clasa 1 și/sau ale casetelor de gene ce codifică rezistența la agenți antimicrobieni (Tabelul 5).

Prezența integronilor clasa 1 a fost investigată cu ajutorul a două combinații de amorse, care țintesc integronul în totalitate, de la situsul *attI1* până după fragmentul *attC* al ultimei casete din serie (Gillings și colab., 2009). Rezultatele PCR au fost negative.

Diverse fragmente din cadrul genei codificatoare a integrazei *intI1* au fost evidențiate (Fig. 11), în cazul a opt izolate (8,33%). Investigarea prezenței familiilor de gene *qac*, codificatoare ale pompelor de eflux a indicat doar prezența genei *qacEΔ1* în nouă (9,375%) dintre izolatele testate. Prezența genei *sul1* a fost identificată în trei izolate (3,125%). În aceleași izolate a fost decelată prezența înlănțuită a genelor *qacEΔ1* și *sul1* (Fig. 11).

Izolata nr.	Combi-nația de amorse / fragmentele țintă						
	P3	P5	P6	P9	P13	P15	P22
	<i>intI1</i>	<i>intI1</i>	<i>intI1</i>	<i>intI1</i>	<i>qacEΔ1</i>	<i>qac,sul1</i>	<i>sul1</i>
14					x		
84	x	x			x		
88	x				x		
91	x	x			x		
92	x				x		
93	x				x		
94		x		x	x	x	x
95	x	x	x	x	x	x	x
96	x		x	x	x	x	x

Tabel 5. Izolate bacteriene din biofilmele din stația de tratare în care au fost identificată prezența integronilor clasa 1 și a genelor codificatoare a rezistenței la agenți antibacterieni.

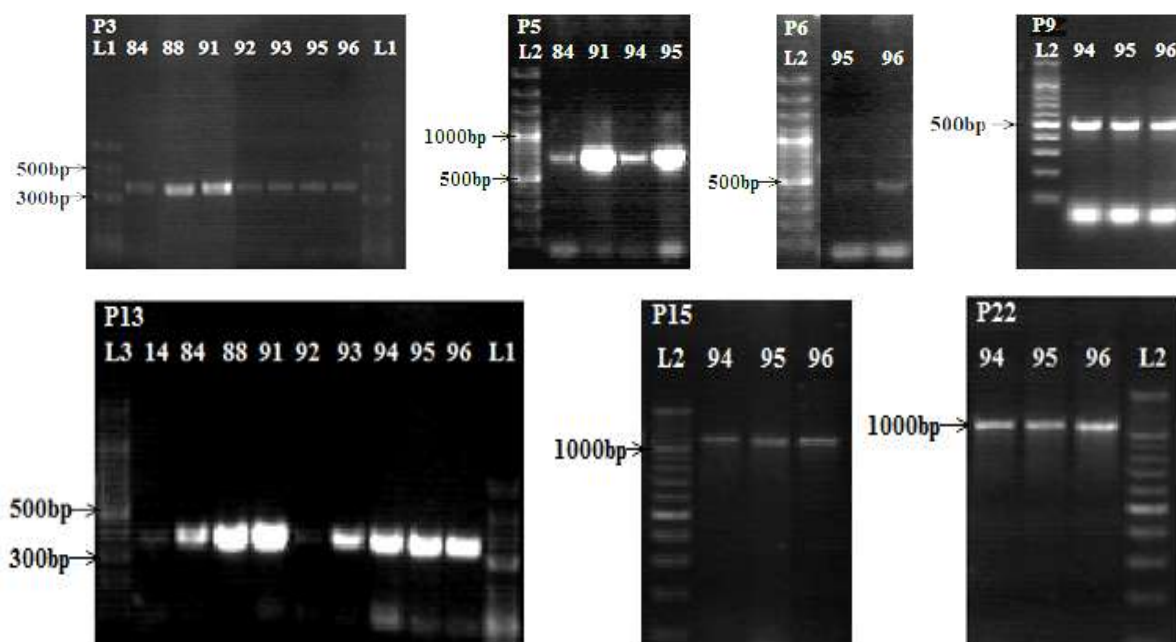


Fig. 11. Amplificări PCR țintind gena integrazei *intI1* (P3, P5, P6, P9). Markerii moleculari: L1 = 700pb (Fermentas SM1203), L2 = 1500pb (Fermentas SM0623), L3 = 1000pb (Fermentas, SM1133). Ampliconii au fost separați în gel de agaroză 1,5% w/v în 1 x tampon TAE și vizualizați cu bromură de etidium 0,5μg/ml.

Transferul orizontal al casetelor de rezistență specifice integronilor a fost sugerat ca mecanism de asociere între genele integrazei și transpozazei (Dawes și colab., 2010). Totuși, în izolatele testate nu s-au identificat dovezi ale înlănțuirii genelor integronului cu gene de transpoziție. Aceste rezultate sugerează că fie alte tipuri de transpozoni ar putea fi implicați (Labbate și colab., 2008), fie integronii clasa 1 detectați sunt localizați în cromosomii bacteriilor gazdă (Stokes și colab., 2006; Gillings și colab., 2008).

Un procent de 60% din izolatele testate au fost selectate de pe medii de cultură generale, ținând bacterii caracteristice mediilor naturale, și doar 40% au provenit de pe medii specifice cultivării bacteriilor de risc. Cu toate acestea, o majoritate covârșitoare a celulelor purtătoare de integroni clasa 1, respectiv casete de gene codificatoare ale rezistenței s-au dovedit a fi bacterii cu origine potențial fecală. Testele biochimice suplimentare și caracterizarea profilului fenotipic cu ajutorul kiturilor API a confirmat ipoteza că prezența elementelor genetice de rezistență este conectată contaminării fecale (Tabelul 6). Identificarea moleculară a izolatelor pozitive, pe baza genei ARNr 16S (Fig. 12) a indicat câteva mici discrepanțe la nivel de specie.

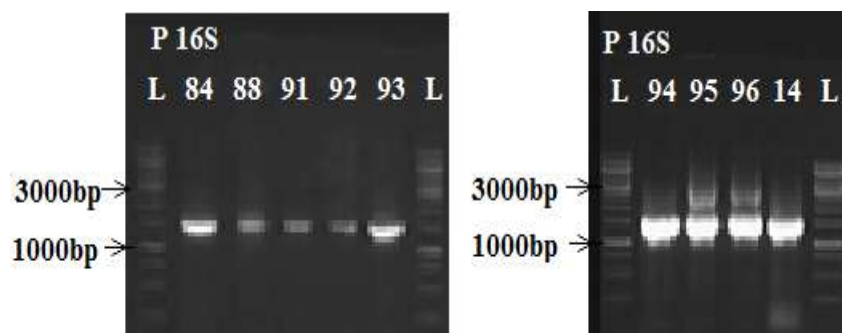


Fig. 12. Amplificări PCR ținând gena 16S ARNr. Markeri moleculari: L = 1000pb (Fermentas SM0311).

Rezultatele identificării moleculare pe baza genei ARNr 16S arată că doar una din cele nouă izolate (11,11%) pozitive pentru determinări genetici ai rezistenței aparține unei specii caracteristice mediului ambiant, identificată ca *Pseudomonas fragi*. Opt izolate (88,88%) reprezintă fie specii de bacterii enterice, fie specii ce pot fi atribuite unei origini de natură umană sau animală (Garrity și colab., 2005). Acestea au fost identificate astfel: *Clostridium barati*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus saccharolyticus*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus vitulinus* și *S. warneri*.

Poluarea microbiologică de natură fecală a surselor de apă brută din Cluj a fost demonstrată anterior (Lumperdeanu și Drăgan-Bularda, 2002; Curticăpean și Drăgan-Bularda, 2007; Muntean și colab., 2010; Farkas și colab., 2010a; b). Activitățile antropice constituie de asemenea un factor de selecție, contribuind la intensificarea frecvenței transferului genetic lateral și influențând evoluția bacteriilor (Stokes și Gillings, 2011).

În scopul controlului perpetuării genelor de rezistență existente sau a altora noi, sunt necesare abordări suplimentare ale mecanismelor de diseminare în consorțiile de bacterii ale apei potabile precum și ale biofilmelor asociate. Potențialul genofondului din acest mediu

strategic nu trebuie subestimat, chiar dacă nu toate tulpinile deținătoare de integroni exprimă fenotipic rezistența la agenți antimicrobieni (Roe și colab., 2003).

Izolata nr.	Identificare biochimică	Identificare fenotipică API	Identificare moleculară ARNr 16S
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. putida</i> API 20NE 64,5%	<i>P. fragi</i> 99%
84	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>C. perfringens</i> API 20A 97,7%	<i>C. barati</i> 95%
88	Organism coliform	Profil inacceptabil API 20STREP -	<i>Staphylococcus vitulinus</i> 99%
91	<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> API 20E 91,8%	<i>Escherichia fergusonii</i> 99%
92	<i>Escherichia coli</i>	<i>Raoultella ornithinolytica</i> API 20E 99,9%	<i>Klebsiella oxytoca</i> 99%
93	Organism coliform	<i>Klebsiella oxytoca</i> API 20E 98,6%	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 99%
94	Enterococ intestinal	<i>Enterococcus faecalis</i> API 20STREP 55,5%	<i>Enterococcus faecalis</i> 99%
95	Enterococ intestinal	Profil inacceptabil API 20STREP -	<i>Staphylococcus warneri</i> 99%
96	Enterococ intestinal	<i>Enterococcus faecium</i> API 20STREP 99%	<i>Enterococcus saccharolyticus</i>

Tabel 6. Identificarea izolatelor bacteriene din biofilmele din stația de tratare în care au fost detectată prezența integronilor clasa 1 și a casetelor de gene codificatoare a rezistenței la agenți antibacterieni.

Investigând semnificația aportului tulpinilor rezistente de *Escherichia coli* odată cu apa potabilă contaminată, Coleman (2008) a arătat că admisia bacteriilor rezistente a fost cu 40% mai mare în cazul consumatorilor de apă contaminată, comparativ cu cea a subiecților care au băut apă necontaminată sau apă conținând tulpini sensibile de *E. coli*.

În plus față de rezistența mediată genetic, mai sunt și alți factori ce contribuie la supraviețuirea bacteriilor în apa potabilă clorinată: agregarea, atașarea, inaniția sau insuficiența dezinfecției (LeChevallier și colab., 1988). Nesusceptibilitatea biofilmelor la biocide este uneori considerată de către unii autori a fi mai degrabă o toleranță datorată unei adaptări fiziologice, decât prezenței determinantilor genetici (Bridier și colab., 2011). Studiul de față dovedește că genele ce codifică rezistența la agenți antimicrobieni sunt prezente în Consorțiile de biofilme formate pe parcursul procesului de tratare.

Este puțin probabil ca procesul de potabilizare să fi contribuit la selecția unor variante rezistente în cadrul stației de tratare a apei Clujului. Dezinfecția primară prin clorinare se aplică intermitent, cu o frecvență trimestrială. Utilizarea responsabilă a biocidelor, conform unor proceduri corect concepute și implementate nu este descurajată, aceasta contribuind la realizarea unor beneficii reale (Gilbert și McBain, 2003), cum este cazul purificării apei potabile.

## Concluzii

- Lucrarea de față a analizat Consorțiile de microorganisme specifice biofilmelor formate în stația de tratare și în rețeaua de distribuție a apei potabile din Județul Cluj, în perioada anilor 2010-2012. Este primul studiu de investigare a comunităților bacteriene atașate într-un sistem public de apă din România.
- Biofilmele studiate s-au dovedit a fi Consorții microbiene extrem de active, caracterizate printr-o prezență în număr mare a bacteriilor cultivabile: număr total de germeni, indicatori de contaminare fecală, patogeni oportuniști, precum și bacterii aparținând unor grupe ecofiziologice.
- Variabilitatea structurală și temporală a activității microbiene indică o situație dinamică la nivelul populațiilor de bacterii ce colonizează biofilmele în etapele de captare, tratare și distribuție a apei. Se remarcă o reducere a efectivelor populațiilor de bacterii per gram de biofilm în sistemele de apă, de la captare în aval, ceea ce sugerează faptul că procesul de tratare acționează nu numai asupra microbiotei planctonice ci și a Consorțiilor atașate.
- Indicatorii de contaminare fecală au fost detectați în toate biofilmele investigate, cu câteva excepții: enterococii intestinali nu au fost prezenți în biofilmele conductei de aducțiune și nici în sedimentele rezervoarelor, iar bacteriile aparținând speciei *Clostridium perfringens* au lipsit din sedimentele rezervoarelor. Efective numeroase ale populațiilor de *Escherichia coli* au fost detectate în toate biofilmele analizate, în special în cele dezvoltate în stația de tratare.
- Dintre bacteriile oportuniste patogene, cele aparținând speciei *Aeromonas hydrophila* au fost numeroase în biofilmele conductei de aducțiune, iar specia *Pseudomonas aeruginosa* a dominat în biofilmele stației de tratare.
- Nu au fost detectate bacterii *Legionella pneumophila* și nici alte specii aparținând genului *Legionella* în nici una din probele de biofilm investigate, indiferent de metoda aplicată.
- Dinamica proceselor fiziologice desfășurate în biofilmele investigate indică preponderența amonificării în toate etapele de potabilizare și distribuție a apei în județul Cluj, urmată de reducerea fierului și oxidarea manganului. Bacteriile denitrificatoare și grupele de bacterii implicate în circuitul sulfului se regăsesc în procente mai mici de 0,1% din totalul germenilor detectați în biofilme.

- Identificarea biochimică cu ajutorul kiturilor API (bioMérieux) relevă faptul că bacteriile implicate în procesele de amonificare, reducere a sulfului și fierului aparțin genurilor *Aeromonas*, *Burkholderia* și *Pseudomonas*. Izolatele implicate în oxidarea manganului aparțin speciilor *Bacillus cereus*, *B. mycoides*, *B. subtilis* și *Paenibacillus polymyxa*.
- Indicatorul bacteriologic al calității biofilmelor (IBCB) indică o accentuare a potențialului microbial al biofilmelor în decursul sezonului cald, precum și o diminuare a acestuia în sensul de curgere al apei.
- Investigarea proceselor enzimatică relevă activități dehidrogenazice, fosfatazice și catalazice intense, în special în timpul iernii, posibil datorită acumulării enzimelor în matricea biofilmelor.
- Prelucrarea statistică a datelor obținute indică faptul că materialul substratului imersat nu are o influență certă asupra compoziției consorțiilor de bacterii din biofilm. Toate cele trei tipuri de materiale aflate în contact cu apa (beton, oțel și nisip) au capacitatea de a susține dezvoltarea bacteriilor care pot deteriora calitatea apei potabile și pot degrada infrastructura. Procesul de tratare influențează însă dinamica microbiotei atașate.
- Modelarea experimentală a biofilmelor provenite din stația de tratare indică faptul că apa brută aduce în decantor îndeosebi bacterii heterotrofe mezofile și bacterii oligotrofe. Procesul de tratare contribuie la selecția populațiilor de bacterii oligotrofe psihrofile.
- Evaluarea experimentală a efectului dezinfectanților asupra populațiilor de bacterii din biofilme, prin estimarea reducerii logaritmice a paisprezece tipuri de bacterii a indicat faptul că produsul cel mai eficient este agentul mixt Floran, având efecte atât de dezintegrare a matricii biofilmului, cât și o putere mare de reducere a viabilității microbiene. Dintre dezinfectanții pe bază de clor, cel mai eficient în reducerea germenilor s-a dovedit a fi dicloroizocianuratul de sodiu, urmat de hipocloritul de sodiu, cloramina T și dioxidul de clor.
- Un procent de 9,375% dintre izolatele bacteriene testate au fost identificate ca purtătoare ale integronilor clasa 1 și ale casetelor de gene ce codifică rezistența la compuși cuaternari cu amoniu, respectiv la sulfonamidă. Rezultatele identificării moleculare pe baza genei ARNr 16S arată că majoritatea bacteriilor care dețin determinanți genetici ai rezistenței reprezintă fie specii de bacterii enterice, fie specii ce pot fi atribuite unei origini de natură umană sau animală: *Clostridium barati*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus saccharolyticus*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus vitulinus* și *S. warneri*.

## Perspective

Prezența corelată a celor trei indicatori de contaminare fecală (*Escherichia coli*, enterococi intestinali și *Clostridium perfringens*) trage un semnal de alarmă asupra unui posibil risc patogen reprezentat de biofilme. Detectarea populațiilor de indicatori fecali în biofilmele asociate apei are o semnificație multiplă: pe de o parte reprezintă ei înșiși un potențial risc din punct de vedere al sănătății consumatorilor, iar pe de altă parte indică posibila prezență a altor bacterii, virusuri sau protozoare patogene.

Rezultatele studiului de față confirmă ipoteza că prezența în microbiota apei a bacteriilor purtătoare de elemente genetice codificatoare ale rezistenței la biocide și/sau antibiotice poate fi atribuită contaminării fecale și activităților antropice.

Dispersia bacteriilor oportuniste patogene *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila* și *Pseudomonas aeruginosa* găzduite în biofilme, precum și perpetuarea și diseminarea elementelor genetice de rezistență la agenții antimicrobieni duce la contaminarea fazei apoase, existând riscul transportului acestor microorganisme odată cu fluxul de apă, colonizării instalațiilor interioare și expunerii consumatorilor.

Asigurarea calității apei potabile a Clujului, și protecția infrastructurii impun implementarea efectivă a unor măsuri, aplicabile și în cazul altor sisteme de apă potabilă din România, precum:

- Protecția surselor de apă;
- Controlul biofilmelor;
- Respectarea protocoalelor de curățare și dezinfecție;
- Menținerea integrității sistemului de distribuție;
- Conceperea și implementarea unui plan de siguranță al apei.

Monitorizarea de rutină a parametrilor fizico-chimici și microbiologici impuși de legislație oferă extrem de puține informații despre microbiota apei potabile, fiind imposibil de estimat și prevenit un eventual risc reprezentat prezența unor germeni patogeni.

Includerea analizei periodice a biofilmelor recoltate din puncte strategice în planul de siguranță al apei constituie o alternativă viabilă care ar asigura alinierea la recomandările Organizației Mondiale a Sănătății.

## Bibliografie selectivă

- Alexander, M. 1982. Most probable number method for microbial populations. În: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.) Methods of soil analysis, Part 2, Chemical and microbiological properties. 2<sup>nd</sup> ed. American Society of Agronomy, Madison, pp. 815-820.
- Araya, R., Tani, K., Takagi, T., Yamaguchi, N., Nasu, M. 2003. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. FEMS Microbiology Ecology, 43: 111-119.
- Atlas, R.M. 2004. Handbook of Microbiological Media. 3<sup>rd</sup> ed. CRC Press, New York.
- Beech I.B., Flemming H.C. 2000. Microbiological fundamentals. În: Beech, I., Bergel, A., Mollica, A., Flemming, H.C., Scotto, V., Sand, W. (Eds.) Simple methods for the investigation of the role of biofilms in corrosion. Biocorrosion, 00-02: 3-15.
- Beech, I.B. 2003. Sulfate-reducing bacteria in biofilms on metallic materials and corrosion. Microbiology Today, 30: 115-117.
- Bonnineau, C., Bonet B., Corcoll N., Guasch H. 2010. Catalase in fluvial biofilms: a comparison between different extraction methods and example of application in a metal-polluted river. Ecotoxicology, 20: 293-303.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Dubois-Brissonet, F. 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. Biofouling, 27(9): 1017-1032.
- Calabrese E.J. 2008. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. Environmental Toxicology and Chemistry, 27: 1451-1474.
- Chuanchuen, R., Khemtong, S., Padungtod, P. 2007. Occurrence of *qacE/qacEΔ1* genes and their correlation with class 1 integrons in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 38(5): 855-862.
- Coetser S.E., Cloete T.E. 2005. Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. Critical Reviews in Microbiology, 31: 213-232.
- Coleman, B.L. 2008. The role of drinking water as a source of transmission of antimicrobial resistant *Escherichia coli*. Teză de Doctorat, University of Toronto, Department of Public Health Sciences, Toronto, Canada.
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Gessey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. Annual Reviews in Microbiology, 41: 435-464.
- Costerton, J.W. 1994. Structure of biofilms. În: Geesey, G.G., Lewandowski, Z., Flemming, H.C. (Eds.) Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. CRC Press, pp. 1-15.
- Costerton, J.W., Wilson, M. 2004. Introducing biofilms. Biofilms. Cambridge University Press, UK, pp. 1-4.
- Curticăpean, M.C., Drăgan-Bularda, M. 2007. The microbial distribution from water and sediment of Tarnița dam reservoir. Studia UBB Biologia, 52: 67-78.
- Cușa, V. 1996. Instrucțiuni metodologice pentru analiza microbiologică a sedimentelor acvatice. Institutul de Cercetări și Ingineria Mediului, București, pp. 2-30.
- Dawes, F.E., Kuzevski, A., Bettelheim, K.A., Hornitzsky, M.A., Djordjevic, S.P., Walker, M.J. 2010. Distribution of class 1 integrons with IS26-mediated deletions in their 3'-conserved segments in *Escherichia coli* of human and animal origin. PLoS One, 5(9): e12754.
- de Beer D., Srinivasan R., Stewart P.S. 1994. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. Applied and Environmental Microbiology, 60: 4339-4344.

- Donlan, R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9): 881-890.
- Drăgan-Bularda, M. 2000. *Microbiologie generală. Lucrări practice*, Editura Universității Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, pp.70, 175-192; 218-232.
- Dreeszen, P.H. 2003. *Biofilm*. Edstrom Industries, INC, pp. 2-18.
- Echverría, F., Castaño, J.G., Arroyave, C., Peñuela, G., Ramírez, A., Morató, J. 2009. Characterization of deposits formed in a water distribution system. *Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería*, 17: 275-281.
- Emtiazi, F., Schwartz, T., Marten, S.M., Krolla-Sidenstein, P., Obst, U. 2004. Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration. *Water Research*, 38: 1197-1206.
- Farkas, A., Bocoș, B., Țigan, Ș., Ciatarăș, D., Drăgan-Bularda, M., Carpa, R. 2010a. Surveillance of two dam reservoirs serving as drinking water sources in Cluj, Romania. *Balkans Regional Young Water Professionals Conference Proceedings*, Belgrad, pp. 91-97.
- Farkas, A., Ciatarăș, D., Bocoș B., Țigan, Ș. 2010b. Monitoring of water source Gilău and its affluent Someșul Rece during 2005-2009. *Applied Medical Informatics*, 26(1-2): 27-34.
- Flemming, H.C. Percival, S.L., Walker, J.T. 2002. Contamination potential of biofilms in water distribution systems. *Water Supply*, 2(1): 271-280.
- Flemming, H.C. 2009. Why microorganisms live in biofilms and the problem of biofouling. În: Costerton, J.W. (Ed.) *Springer series on Biofilms*, Vol. 4. Marine and industrial biofouling. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, p 3-11.
- Fonseca, A.C., Summers, R.S., Hernandez, M.T. 2001. Comparative measurements of microbial activity in drinking water biofilters. *Water Research*, 35(16): 3817-3824.
- Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Bergey's Manual Trust, USA.
- Gilbert, P., McBain, A.J. Rickard AH. 2003. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. *International Journal of Biodeterioration and Biodegradation*, 51: 245-248.
- Gillings, M.R., Krishnan, S., Worden, P.J., Hardwick, S.A. 2008. Recovery of diverse genes for class 1 integron-integrases from environmental DNA samples. *FEMS Microbiology Letters*. 287: 56-62.
- Gillings, M.R., Xuejun, D., Hardwick, S.A., Holley, M.P. 2009. Gene cassettes encoding resistance to quaternary ammonium compounds: a role in the origin of clinical class 1 integrons? *The ISME Journal*, 3: 209-215.
- Glasmacher, A., Engelhart, S., Exner, M. 2003. Infections from HPC organisms in drinking-water amongst the immunocompromised. În: Bartram, J., Cotruvo, J., Exner, M., Fricker, C., Glasmacher, A. (Eds.) *Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety*. IWA Publishing, Londra, UK, pp. 137-145.
- Hamilton, M.A. 2010. The log reduction measure of disinfectant efficacy. Center for Biofilm Engineering, (<http://www.biofilm.montana.edu/files/CBE/documents/KSA-SM-07.pdf>).
- Hendel, B., Marxsen, J., Fiebig, D., Preuß, G. 2001. Extracellular enzyme activities during slow sand filtration in a water recharge plant. *Water Research*, 35(10): 2484-2488.
- Holmes, A.J., Gillings, M.R., Nield, B.S., Mabbutt, B.C., Helena Nevalainen, K.M., Stokes, H.W. 2003. The gene cassette metagenome is a basic resource for bacterial genome evolution. *Environmental Microbiology*, 5(5): 383-394.
- Kaplan J.B., Jabbouri, S., Sadovskaya, I. 2011. Extracellular DNA-dependent biofilm formation by

- Staphylococcus epidermidis* RP62A is response to subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. *Research in Microbiology*, 162(5): 525-541.
- Krumbein W.E., Altman H.J. 1973. A new method for the detection and enumeration of manganese oxidizing and reducing microorganisms. *Helgolander Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 15: 347-356.
- Labbate, M., Chowdhury, P.R., Stokes, H.W. 2008. A class 1 integron present in a human commensal has a hybrid transposition module compared to Tn402: evidence of interaction with mobile DNA from natural environments. *Journal of Bacteriology*, 190 (15): 5318-5327.
- Långmark J., Storey, M.V., Ashbolt, N.J., Stenström, T.A. 2004. Artificial groundwater treatment: biofilm activity and organic carbon removal performance. *Water Research*, 38: 740-748.
- LeChevallier, M.W., Cawthon, C.D., Lee, R.G. 1988b. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(3): 2492-2499.
- LeChevallier, M.W. 2003. Conditions favouring coliform and HPC bacterial growth in drinking-water and on water contact surfaces. În: Bartram, J., Cotruvo, J., Exner, M., Fricker, C., Glasmacher, A. (Eds.) *Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety*. IWA Publishing, London, UK, pp. 177-197.
- LeChevallier M.W., Au K.K. 2004. *Water treatment and pathogen control*. IWA Publishing, London, ([http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/en/watreatpath.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/en/watreatpath.pdf)).
- Lee, D.G., Kim, S.J., Park, S.J. 2006. Effect of reservoirs on microbiological water qualities in a drinking water distribution system. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16:1060-1067.
- Lumperdeanu, M.C., Drăgan-Bularda, M. 2002. Bacteriological and enzymological researches on the water and sediment in the Gilău dam reservoir – Cluj County. *Contribuții Botanice*, 37: 239-249.
- Maloy, S., Schaechter, M. 2006. The era of microbiology: a Golden Phoenix. *International Microbiology*, 9: 1-7.
- Márquez, C., Labbate, M., Raymondo, C., Fernández, J., Gestal, A.M., Holley, M., Borthagaray, G., Stokes, H.W. 2008. Urinary tract infections in South American population: dynamic spread of class 1 integrons and multidrug resistance by homologous and site-specific recombination. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10): 3417-3425.
- Moritz, M.M. 2011. *Integration of hygienically relevant bacteria in drinking water biofilms on domestic plumbing materials*. Teză de Doctorat. Biofilm Centre. Duisburg-Essen University, Germania, pp. 2; 21-24; 123-126; 134-137.
- Muntean, V., Maier, C.G., Carpa, R., Mureșan, C., Farkas, A. 2010. Microbiological and enzymological study on sediments and water of the river Someșul Mic upstream the Gilău treatment Plant. *Studia UBB, Biologia*, 55(1): 131-138.
- Mureșan, C., Farkas, A., Vele, D., Chakirou, C. 2010. Studiu asupra surselor proprii de apă – fântâni și izvoare – din județul Cluj. *Provocările Noilor Tehnologii în Managementul Apei*. Arad, Asociația Română a Apei. Fascicula conferinței, pp. 7-18.
- O'Connor, T.L., O'Connor, T.J. 2001. Water quality deterioration in distribution systems. *Water Engineering and Management*, 148: 16-19.
- Popovici, C., Veraart, R., van de Kerk, G. 2008. România, către o societate durabilă. *Fundația pentru o Societate Durabilă*, (<http://www.romaniadurabila.net/romania%20catre%20o%20societate%20durabila.pdf>).

- Roe, M.T., Vega, E, Pillai, S.D. 2003. Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. *Emerging Infectious Diseases*, 9(7): 822-826.
- Roșu, C., Costan, C., Arghiuș, V., Costin, D., Baciu, C. 2010. Water quality in Cluj's private drinking water wells. *Studia UBB Ambientum*, 55(1-2): 119-126.
- Simões M., Pereira M.O., Vieira M.J. 2004. Biofilm recovery after treatment with an anionic and cationic surfactant at sublethal concentrations. *Biofilms Conference 2004: Structure and Activity of Biofilms*, Las Vegas, USA, pp. 200-204.
- Skraber, S., Schijven, J., Gantzer, C., de Roda Husman, A.M. 2005. Pathogenic viruses in drinking water biofilms: a public health risk? *Biofilms*, 2: 105-117.
- Stokes, H.W., Nesbø, C.L., Holley, M., Bahl, M.I., Gillings, M.R., Boucher, Y. 2006. Class 1 integrons potentially predating the association with Tn402-like transposition genes are present in a sediment microbial community. *Journal of Bacteriology*, 188(16): 5722-5730.
- Stokes, H.W., Gillings, M.R. 2011. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5): 790-819.
- Tellen, V., Nkeng, G., Dentel, S. 2010. Improved filtration technology for pathogen reduction in rural water supplies. *Water*, 2: 285-306.
- Tielen, P., Rosenau, F., Wilhelm, S., Jaeger, K.E., Flemming, H.C., Wingender, J. 2010. Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 156: 2239-2252.
- Toporski, J., Steele, A., McKay, D.S. 2003. Bacterial biofilms in astrobiology: the importance of life detection. În: Krumbein, W.E., Paterson, D.M., Zavarzin, G.A. Fossil and recent biofilms: a natural history of life on earth. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Olanda, pp. 429-446.
- Videla H.A., Characklis, W.G. 1992. Biofouling and microbially influenced corrosion. *International Biodegradation and Biodeterioration*, 29: 195-207.
- Webb, J.S. 2007. Differentiation and dispersal in biofilms. În: Kjelleberg, S., Givskov, M. (Eds.) *The biofilm mode of life: mechanisms and adaptations*. Horizon Bioscience, Norfolk, UK, pp. 165-174.
- Wesche A.M., Gurthler J.B., Marks B.P., Ryser E.T. 2009. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 5: 1121-1138.
- West, S.A., Diggle, S.P., Buckling, A., Gardner, A., Griffin, A.S. 2007. The social lives of microbes. *The Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 38: 53-77.
- Westall, F., Steele, A., Toporski, J., Walsh, M., Allen, C., Guidry, S., McKay, D., Gibson, E., Chafetz, H. 2000. A 3.8 b.y. history of bacterial biofilms and their significance inn the search for extraterrestrial life. 31st Annual Lunar and Planetary Science, Texas, USA. Abstract 1707.
- Wingender, J., Flemming, H.C. 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213(3): 190-197.
- WHO 2008. *Guidelines for drinking-water quality*, Vol. 1: 3<sup>rd</sup> ed., Recommendations, Geneva, pp. 1-294.
- Zarnea, G., Popescu, O.V. 2011. *Dicționar de microbiologie generală și biologie moleculară*. Editura Academiei Române, București, pp. 187-188.

## Lista publicațiilor

### Articole din subiectul tezei de doctorat

1. **Farkas, A.**, Bocoș B., Țigan, S., Mureșan, C., Chira R. 2009. Experimental biofilms with drinking water treatment plant origin; evaluation of nutrient concentration and temperature influences upon their development. *Analele Universității din Oradea. Fascicula Biologie*, 16(2): 66-69. **Revistă categoria B+**

2. **Farkas, A.**, Ciatarăș, D. 2010. Biofilmele din stația de tratare a apei: grupe fiziologice de bacterii implicate în coroziune. *Romaqua*, 74: 10-21. **Revistă categoria C**

3. **Farkas, A.**, Ciatarăș, D., Bocoș, B., Țigan, Ș. 2012. Biofilms impact on drinking water quality. În: Vouduris, K., Voutsas, D. (Eds.) *Ecological Water Quality - Water Treatment and Reuse*. In-Tech, Rijeka, Croatia, pp. 141-160. **Capitol de carte**

4. **Farkas, A.**, Drăgan-Bularda, M., Ciatarăș, D., Bocoș B., Țigan Ș. 2012. Opportunistic pathogens and faecal indicators in drinking water associated biofilms in Cluj, Romania. *Journal of Water and Health*, doi:10.2166/wh.2012.148. **IF = 1,367**.

5. **Farkas, A.**, Carpa, R., Muntean, V., Drăgan-Bularda, M. 2012. Spatial and temporal variations of enzymatic activity in biofilms occurring into a drinking water treatment plant in Cluj, Romania. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Biologia*, 57(1): 83-98. **Revistă categoria B+**

6. **Farkas, A.**, Drăgan-Bularda, M. 2012. Biofilmul: o nouă paradigmă în microbiologie, *Revista de Studii și Cercetări – Biologie. Muzeul Județean Bistrița (în curs de apariție)*. **Revistă categoria D**

### Alte articole publicate

1. **Farkas, A.**, Chira, R., Bocoș, B., Țigan, Ș. 2009. Dezvoltarea durabilă și apa supusă potabilizării. Studiu de caz: monitorizarea în anul 2008 a unei ape de suprafață utilizată pentru potabilizare în județul Cluj. *Romaqua*, 61: 37-42. **Revistă categoria C**

2. **Farkas, A.**, Ciatarăș, D., Bocoș B., Țigan, Ș. 2010. Monitoring of water source Gilău and its affluent Someșul Rece during 2005-2009. *Applied Medical Informatics*, 26(1-2): 27-34. **Revistă categoria B+**

3. **Farkas, A.**, Bocoș B., Țigan, Ș., Ciatarăș, D., Drăgan-Bularda, M., Carpa, R. 2010. Surveillance of two dam reservoirs serving as drinking water sources in Cluj, Romania. Balkans Regional Young Water Professionals Conference Proceedings, Aprilie 2010, Belgrad, Serbia, pp. 91-97.

4. Muntean, V., Maier, C. G., Carpa, R., Mureșan, C., **Farkas, A.** 2010. Microbiological and enzymological study on sediments and water of the river Someșul Mic upstream the Gilău (Cluj County) treatment plant. Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Biologia, 55(1): 131-138. **Revistă categoria B+**

5. Mureșan C., **Farkas A.**, Vele D., Chakirou, C. 2010. Studiu asupra surselor proprii de apă (fântâni și izvoare) din județul Cluj. Romaqua, 73: 38-42. **Revistă categoria C**

6. **Farkas, A.**, Bogătean, M., Ciatarăș, D., Bocoș, B., Țigan, Ș. 2011. The new water source of Cluj brings improvements in raw water quality. Danube – Black Sea Regional Young Water Professionals Conference Proceedings, București, pp. 3-9.