

**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI**  
**FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE**  
**ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE INTEGRATIVĂ**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

**EVALUAREA RĂSPÂNDIRII ANTIBIOTICELOR, A REZISTENȚEI LA  
ANTIBIOTICE ȘI A CONTAMINANȚILOR BACTERIENI ÎN MEDII  
ACVATICE SELECTATE DIN ROMÂNIA**

**- Rezumat -**

**Conducător științific**

**PROF. DR. NICOLAIE DRAGOȘ**

**Doctorand**

**SZEKERES EDINA-KRISZTA**

**CLUJ-NAPOCA**

**2018**

# Cuprins

Lista abrevierilor	iii
Mulțumiri	iv
Summary	v
Rezumat	vii
Összefoglaló	ix
Capitolul I: Introducere generală	1
1. Antibiotice: scurt istoric, clasificare și moduri de acțiune	1
1.1 De la metaboliți naturali la contaminanți emergenți	3
1.2 Nivelul de contaminare cu antibiotice a mediilor naturale	6
2. Rezistență la antibiotice	7
3. Mecanisme de rezistență la antibiotice	9
3.1 Rezistența intrinsecă	9
3.2 Rezistența dobândită	10
3.2.1 Plasmide	11
3.2.2 Transpozoni	12
3.2.3 Integroni	13
4. Genetica rezistenței la antibiotice	15
5. Rezistența la antibiotice în mediu și impactul antropogen	16
6. Programe și politici de supraveghere cu accent pe Europa și România	19
7. Abordări experimentale pentru detectarea reziduurilor de antibiotice și a rezistenței la antibiotice	25
7.1 Extracție în fază solidă și detecție prin spectrometrie de masă	25
7.2 Tehnici pentru detecția bacteriilor rezistente la antibiotice	26
7.3 PCR și PCR cantitativ în timp real	27
7.4 Metagenomică	28
Capitolul II: Obiectivele tezei	29
Capitolul III: Abundența antibioticelor, a genelor de rezistență la antibiotice și compoziția comunității bacteriene în efluenții de apă uzată din diferite spitale din România	31
1. Introducere	31
2. Materiale și metode	32
2.1 Procedura de eșantionare	32
2.2 Cuantificarea antibioticelor în apele reziduale din spitale	33
2.3 Extracția de ADN	33
2.4 Evaluarea preliminară și cuantifierea ARG	34
2.5 Amplificarea genelor ARNr 16S, secvențializare, și analiza secvențelor	36
3. Rezultate și discuții	37
3.1 Concentrațiile de antibiotice în apele reziduale din spitale	37
3.2 Cuantificarea ARG	40
3.3 Compoziția comunităților	46
3.4 Proces convențional de epurare a apelor uzate din spitale	49
4. Concluzii	53
Capitolul IV: Investigarea antibioticelor, a genelor de rezistență la antibiotice și a contaminanților microbieni în apele subterane în relație cu proximitatea zonelor urbane	54

1. Introducere	54
2. Materiale și metode	56
2.1 Punctele de prelevare, colectarea probelor și extracția de ADN	56
2.2 Evaluarea cantitativă a conținutului de antibiotice din probele de apă subterană	59
2.3 Cuantificarea ARG și a populației bacteriene totale prin PCR în timp real	59
2.4 Secvențializare cu eficiență ridicată și procesarea datelor	60
2.5 Analiză statistică	61
3. Rezultate și discuții	62
3.1 Concentrația antibioticelor în probele de apă subterană	62
3.2 Detecția genelor de rezistență	64
3.3 Compoziția comunităților bacteriene, indiciatori de fecal și patogeni oportuniști	67
3.4 Corelații între ARG și profilul comunităților procariote	70
3.5 Aspecte specifice legate de poluare	73
4. Concluzii	74
Chapter V: Discuții generale	76
Chapter VI: Concluzii și perspective	82
Lista publicațiilor	85
Lista participărilor la conferințe	86
Bibliografie	88
Anexe	103

## Lista abrevierilor

<b>AMR</b> – rezistență antimicrobiană	<b>FD</b> – desorbție în câmp electric
<b>ARB</b> – bacterii rezistente la antibiotice	<b>FEDESA</b> - Federația Europeană a sănătății animalelor
<b>ARG</b> – gene de rezistență la antibiotice	<b>HGT</b> - transferul orizontal de gene
<b>DDD</b> – doze zilnice definite	<b>LC</b> - cromatografie de lichide
<b>DNA</b> - acidul dezoxiribonucleic	<b>MGE</b> - element genetic mobil
<b>EEA</b> - Spațiu Economic European	<b>MIC</b> - concentrația minimă inhibitoare
<b>EARS-Net</b> - Rețeaua europeană de supraveghere a rezistenței antimicrobiene	<b>MLSB</b> - macrolide-lincosamide-streptogramine-B
<b>ECDC</b> - Centrul european de prevenire și control al bolilor	<b>MRSA</b> - <i>Staphylococcus aureus</i> rezistent la metilicilină
<b>EMA</b> - Agenția europeană de evaluare a medicamentelor	<b>MS</b> - spectrometria de masă
<b>ESAC-Net</b> - Supravegherea Europeană a Consumului de Antimicrobiene	<b>OTU</b> - unități taxonomice operaționale
<b>ESVAC</b> - Supraveghere Europeană a Consumului de Antimicrobiene de Uz Veterinar	<b>qPCR</b> – PCR cantitativ
<b>EU</b> – Uniunea Europeană	<b>SOS</b> – un mecanism tipic procariotelor de reparare a defectelor de ADN
<b>EUCAST</b> - Comisia Europeană privind Testarea Sensibilității Antimicrobiene	<b>SPE</b> - extracție în fază solidă
<b>FCA</b> - fluorochinolonă, chinolonă, florfenicol, cloramfenicol și amphenicol	<b>WHO</b> - Organizația Mondială a Sănătății
	<b>WWTP</b> – stație de epurare

**Cuvinte cheie:** antibiotice, gene de rezistență la antibiotice, compoziția comunităților bacteriene, ape reziduale de la spitale, ape subterane

## **Capitolul I: Introducere generală**

De la introducerea lor în uz clinic, agenții antimicrobieni, cum ar fi antibioticele, au avut un impact semnificativ asupra sănătății umane și a animalelor, și au clădit calea medicinei moderne a bolilor infecțioase. Inițial, acești compuși au fost produși în mediul natural, de ciuperci și bacterii capabile de a suprima alte microorganisme, dovedind astfel că moleculele antimicrobiene ar fi existat cu mult timp înainte de descoperirea lor de către om.

Cele mai frecvente clase și grupuri de antibiotice sunt:  $\beta$ -lactamicele (peniciline, cefalosporine, carbapenemue), sulfonamidele, aminoglicozidele, glicopeptidele, macrolidele, tetraciclonele și chinolonele. Așa cum a observat Davies și colab. (2006) antibioticele au o acțiune dependentă de concentrație, la concentrații mari funcționând ca arme bacteriene în ”războiul teritorial”, însă la concentrații scăzute funcționează ca molecule de semnalizare. În rolul de molecule de semnalizare, antibioticele controlează homeostazia comunităților prin reglarea exprimării genelor implicate în motilitate, răspunsului la stres, pigmentare, producția de metaboliți, formarea biofilmelor, virulența și colonizarea. Modul în care moleculele de antibiotice sunt utilizate în mediul lor natural fluctuant sugerează că genele de rezistență la antibiotice (ARG) pot avea de asemenea un rol protector în gazdele lor producătoare de antibiotice (anume, să regleze răspunsul celulelor la aceste molecule și să protejeze împotriva supraproducției lor).

Rezistența la antibiotice este capacitatea microorganismelor de a tolera efectele antibioticelor și de a crește în prezența acestor agenți terapeutici. Răspândirea largă a rezistenței la antibiotice în bacterii comensale și patogene divergente din punct de vedere taxonomic este un eveniment recent, care a urmat utilizarea masivă a antibioticelor în medicină, agricultură și horticultură. Mecanismul principal prin care genele de rezistență sunt mobilizate și transferate din rezervorul genomic natural existent este transferul orizontal de gene (HGT) mediat de elemente genetice mobile (MGE). Răspunsul adaptiv la stresul antibiotic declanșează o creștere în frecvență a ambelor mecanisme de dobândire a rezistenței, adică a ratei de mutații și a evenimentelor de recombinare și HGT. Elementele genetice ale mecanismelor de rezistență sunt localizate preponderent pe MGE, cu mai puțin de 5% fiind codificate cromozomial. Prima se numește rezistență dobândită obținută prin HGT, iar cea din urmă este rezistența intrinsecă naturală a bacteriilor, care poate fi transferată numai prin căi verticale.

Plasmidele sunt printre cei mai importanți factori în transferul orizontal al ARG deoarece acestea pot încorpora alte MGE în structura lor. Astfel, genele de rezistență pot fi inserate într-un integron, care poate face parte dintr-un transpozon, care la rândul lui poate fi încorporat și transportat de un plasmid. Integronii de clasa 1 sunt cele mai răspândite tipuri de integroni. Ei au fost găsiți predominant în cadrul clinic și au fost corelați cu majoritatea casetelor de rezistență, cu peste 80 de diferite casete genice descrise în această clasă. Distribuția lor pe scară largă se datorează faptului că aceștia sunt de obicei încorporați în plasmide sau transpozoni. Majoritatea integronilor de clasa 1 au un capăt 3' conservat constând din *qacEΔ1* (conferă un nivel scăzut de rezistență la compușii cuaternari) care este deleția funcțională a casetei *qacE*, urmată de gena *sulI* (rezistență la sulfonamidă) și *orf5* (un cadru deschis de citire cu o funcție necunoscută). Presiunea antropogenă are un rol semnificativ în diseminarea integronilor de clasa 1 deci pot fi considerați ”poluanți” în medii naturale.

ARG au fost identificate în diverse medii, cum ar fi permafrostul antic, apa subterană și apa potabilă, agricultura și zootehnia, apele uzate și apele de suprafață. Un factor important care favorizează răspândirea MGE printre bacterii și care promovează fixarea lor este co-selecția. Determinanții de rezistență pentru un poluant antropogenic mediază co-selecția rezistenței celorlalți fixați pe același element mobil. Așadar, cu cât mai mulți determinanți ai rezistenței sunt prezenți pe un element, cu atât mai probabil co-selecția va asigura un avantaj selectiv, mai ales considerând probabilitatea mare de expunere la cel puțin un agent selectiv, în special în zonele cu un nivel ridicat de impact uman. Selecția rezistenței la dezinfectanți și metale grele fixează ARG legate de aceleași MGE. Situația mediilor acvatice este din ce în ce mai îngrijorătoare deoarece acestea acționează nu doar ca un mediu potrivit pentru interacțiunile complexe dintre agenții selectivi, MGE și determinanții de rezistență ai bacteriilor comensale și naturale, dar și ca o cale de răspândire a organismelor rezistente la antibiotice înapoi la populațiile umane și animale prin consumul apei potabile.

În ultimul deceniu, în UE a fost înregistrată o creștere generală a consumului de antibiotice. În Europa în 2016, consumul de antibiotice a comunității a variat între 10,4 și 36,3 DDD la 1000 de locuitori pe zi pentru Olanda și, respectiv, pentru Grecia. Deoarece consumul ridicat de antibiotice în statele membre a UE a dus la un nivel mai ridicat de rezistență, în cazul României, utilizarea eronată a antibioticelor se reflectă într-un nivel crescut de rezistență microbiană, în majoritatea cazurilor, depășind media pentru UE/SEE. Rapoartele anuale EARS-Net plasează România, în mod repetat, între primele cinci țări problematice cu cele mai ridicate procente de bacterii rezistente din cadrul comunității și sănătății publice.

## Capitolul II: Obiectivele tezei

Scopul acestei lucrări a fost de a explora apariția și abundența genelor de rezistență la antibiotice și determinanții rezistenței, cum ar fi reziduurile de antibiotice, elementele genetice mobile și contaminanții microbieni în medii acvatice urbane și peri-urbane pe teritoriul României.

Obiective specifice:

- de a evalua nivelul general de antibiotice, gene de rezistență la antibiotice, precum și compoziția comunității bacteriene în apele reziduale din spitale;
- de a evalua potențialul de înlăturare a contaminanților al unui proces cu nămol activ și dezinfecție prin clorinare în scopul de a investiga impactul pe care o astfel de metodă convențională de epurare poate avea asupra efluenților poluați;
- de a investiga relația dintre nivelul markerilor de rezistență la antibiotice și a poluării antropice în medii acvatice subterane localizate la diverse distanțe față de zonele urbane;
- de a identifica gene marker de rezistență care pot fi folosite ca indicatori specifici ai activității antropice și care pot fi aplicate mai departe pentru evaluarea poluării asociate de rezistență.

## Capitolul III: Abundența antibioticelor, a genelor de rezistență la antibiotice și compoziția comunității bacteriene în efluenții de apă uzată din diferite spitale din România

*[Acest capitol a fost publicat ca: Szekeres, E., Baricz, A., Chiriac, C.M., Farkas, A., Opreș, O., Soran, M.-L., Andrei, A.-S., Rudi, K., Balcázar, J.L., Dragos, N., Coman, C. Abundance of antibiotics, antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wastewater effluents from different Romanian hospitals (2017) în Environmental Pollution: doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.054]*

### 1. Introducere

Având în vedere că în Europa 20-30% din pacienți primesc antibiotic în timpul spitalizării, efluenții din spitale pot fi considerați puncte "hotspot" pentru transferul lateral de gene facilitând transferul inter- și intraspecific al determinanților rezistenței la antibiotice și al factorilor de virulență. Efluenții spitalelor reprezintă o sursă majoră de poluanți precum antibiotice, metale grele și dezinfectanți care sunt eliberați în sistemele de canalizare și/sau în apele de suprafață, adesea fără tratament prealabil. Doar câteva țări recomandă epurarea acestor ape uzate înainte ca ele să fie deversate în corpuri de apă și nu sunt prevăzute restricții nici în Directiva europeană 91/271/ECC pentru această categorie specială de deșeuri. Pe deasupra, legislația actuală a UE nu include

reglementări specifice nici pentru prezența ARG și a bacteriilor rezistente în aceste ape, și nici pentru pragul de concentrație al acestora.

Scopul acestui studiu a fost de a determina prezența și abundența antibioticelor, a ARG, precum și compoziția comunității bacteriene în apa reziduală din diferite spitale situate în județul Cluj, România. Am folosit abordări independente de cultivare pentru a oferi o mai bună înțelegere asupra compoziției și funcției comunității bacteriene. Unul dintre spitalele selectate aplică un proces de epurare cu nămol activ și dezinfecție prin clorinare înainte de a elibera efluentul în colectorul municipal. Au fost colectate probe de apă reziduală tratată și netratată pentru a determina potențialul de înlăturare a poluanților studiați.

## 2. Materiale și metode

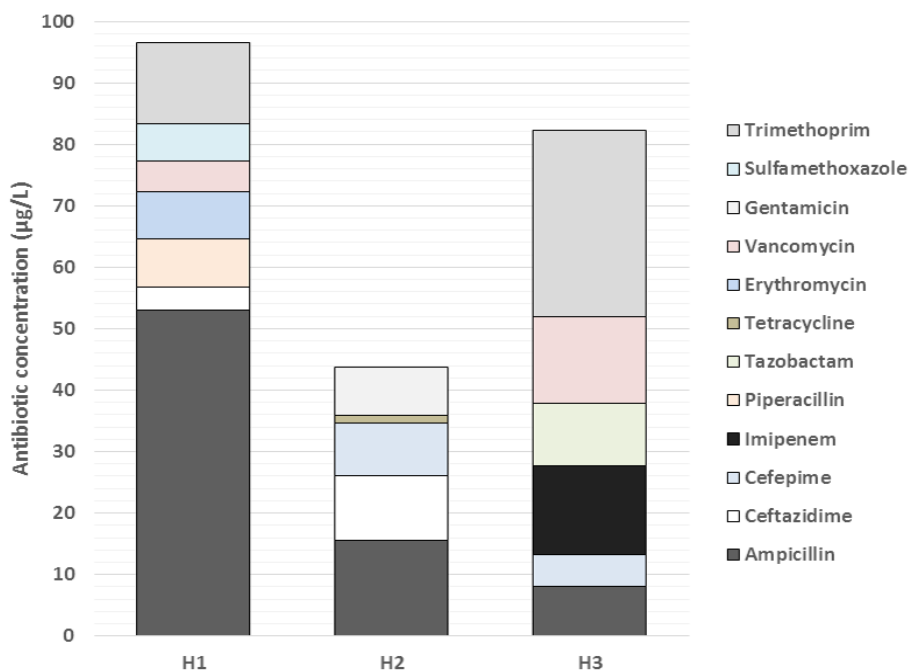
- **Probele de apă reziduală au fost colectate** în iunie 2015, în triplicat, de la spitale din diferite orașe a județului Cluj, România. Dintre spitalele selectate spitalul 1 (H1) are un profil oncologic și un număr de 535 de paturi; spitalul 2 (H2) este un spital mic, general cu 113 de paturi care oferă servicii pentru 30.000 de locuitori; spitalul 3 (H3) are un profil general cu 453 de paturi pentru 43.472 de locuitori. Efluentul din H1 este epurat cu un proces convențional cu nămol activ și clorinare înainte de a fi deversat în colectorul municipal. Probele de apă reziduală (H1) și tratată (H1TWW) au fost colectate în scopuri comparative.
- **Cuantificarea antibioticelor** a fost efectuat utilizând un sistem de cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) echipat cu detector cu șir de diode și spectrometrie de masă.
- Pentru a colecta biomasa microbiană, probele au fost filtrate, în triplicat, prin membranele filtrante din esteri ai celulozei cu dimensiune a porilor de 0,2 μm (Fioroni, Franța) (câte 150 mL pentru fiecare). Filtrele au fost tăiate în bucăți mici și utilizate pentru **extracție totală de ADN** folosind un kit comercial numit ZR Soil Microbe DNA kit (ZymoResearch, SUA).
- Șaisprezece gene au fost **cuantificate** din cele 36 de gene testate în procesul de **evaluare preliminară**, din care 14 gene conferă rezistență la diferite clase de antibiotice cum ar fi β-lactamice (*blaVIM*, *blaSHV*), aminoglicozide (*aacC2*), cloramfenicol (*catA1*, *floR*), MLSB (*ermA*, *mefA*), sulfonamide (*sulI*, *sulII*) și tetraciline (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetO* și *tetC*), o genă din regiunea conservată 3' a integronului de clasa 1 care conferă rezistență la compușii cuaternari de amoniu (*qacEΔ1*) și un element de transpozon (*tnpA*). De asemenea, a fost cuantificată și gena ARNr 16S pentru

normalizarea abundenței genelor țintă și pentru a evalua populația bacteriană totală din probele de apă reziduală din spitale.

- ADN-ul genomic a fost extras în triplicat, replicatele au fost unite, și **secvențializate** pe o platformă Illumina, vizând regiunea V3-V4 a genei ARNr 16S amplificată anterior utilizând primeri universali pentru bacterii PRK341F/PRK806R.

### 3. Rezultate și discuții

Mai mulți compuși antibiotici au fost detectați în apele reziduale colectate din cele trei spitale din județul Cluj (România) cu concentrații diferite, cuprinse între 3,36 și 53,05  $\mu\text{g/L}$  (Figura 1). Cele mai abundente clase de antibiotice au fost  $\beta$ -lactamicele, glicopeptidele și trimetoprimul. Ampicilina a fost depistată în toate probele de apă reziduală cu cea mai mare concentrație în H1 (53,05  $\mu\text{g/L}$ ). Variațiile în antibioticele administrate la fiecare unitate, numărul de paturi, cantitatea de apă consumată sau tipul de servicii medicale furnizate pot fi reflectate în prezența antibioticelor identificate pentru probele de apă reziduală din spitale.

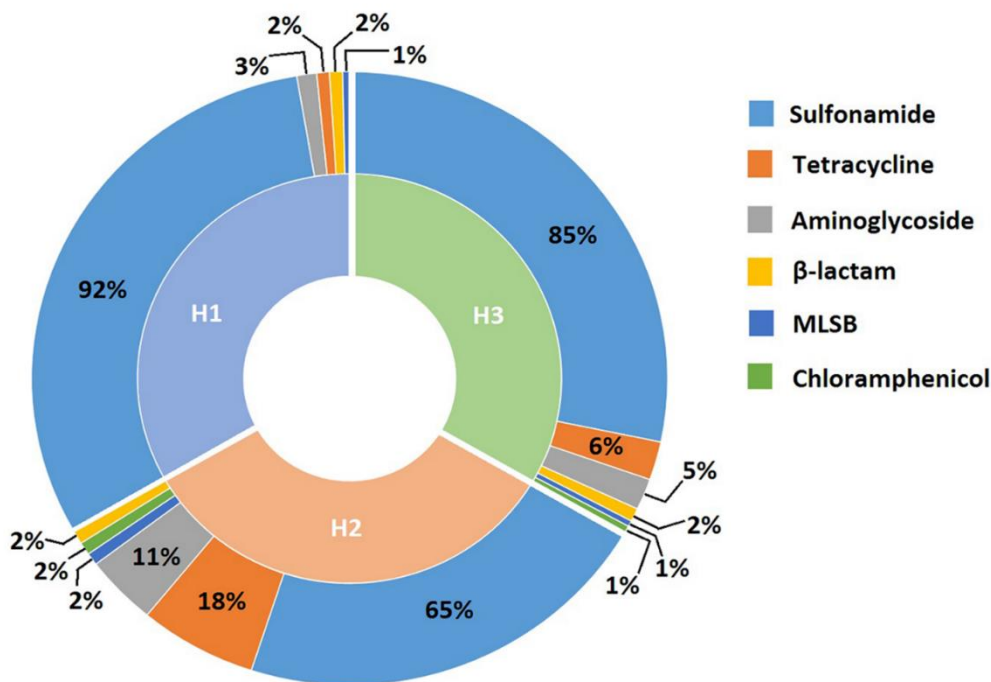


**Figura 1.** Concentrațiile de antibiotice detectate în probele de apă reziduală din spitale. Spitalul 1 (H1) are un profil oncologic, în timp ce spitalul 2 (H2) și spitalul 3 (H3) au un profil general.

Numărul total de bacterii (număr de copii de gene ARNr 16S) a variat în probele investigate de la  $5,46 \times 10^7$  până la  $1,15 \times 10^8$  număr de copii per mL de probă de apă reziduală. Dintre ARG



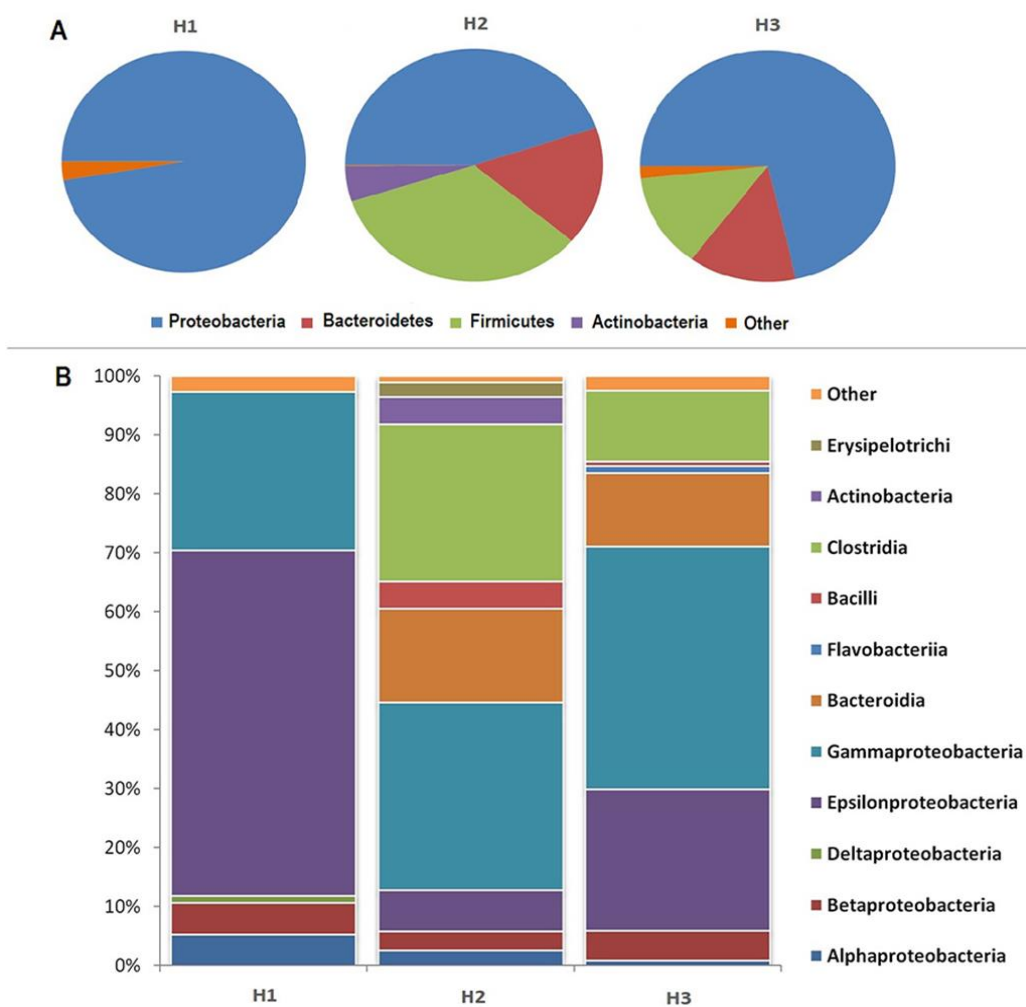
detectate, gena *sulI* care conferă rezistență la sulfonamide a avut cea mai mare abundență relativă, variind între  $5,33 \times 10^{-2}$  în H2 și  $1,94 \times 10^{-1}$  copii/copii al genei ARNr 16S în H1. Studii anterioare au stabilit o abundență relativă a ARG mai mare de  $10^{-4}$  copii/copii al genei ARNr 16S pentru mediile cu un nivel ridicat de contaminare. Prin urmare, este justificat să presupunem că probele de apă reziduală din acest studiu au un nivel ridicat de poluare cu ARG. Abundența tipurilor de ARG (Figura 2) a arătat un tipar similar cu clasele corespunzătoare de antibiotice, unde  $\beta$ -lactamicele au avut cea mai mare concentrație în H1, aminoglicozidele în H2, sulfonamidele în H1 și tetraciclinele în H2. Un studiu recent a demonstrat că frecvența genei *sulI* este corelată pozitiv cu nivelul de urbanizare, iar gena *qacE1/qacEΔ1* prezintă un rol adaptativ la mai multe habitate. În cadrul acestei studiu, genele *sulI* și *qacEΔ1* au avut frecvență similară și un număr mare de copii în toate probele de apă uzată din spitale, cu valori cuprinse între  $1,94 \times 10^{-1}$  și  $4,89 \times 10^{-2}$  copii/copii al genei ARNr 16S în proba H1. Aceste gene, de obicei, sunt asociate cu structura integronică de clasa 1 care poate fi localizată pe MGE, indicând astfel o frecvență înaltă a HGT.



**Figura 2.** Procentul de tipuri de ARG în cele trei probe de apă reziduală.

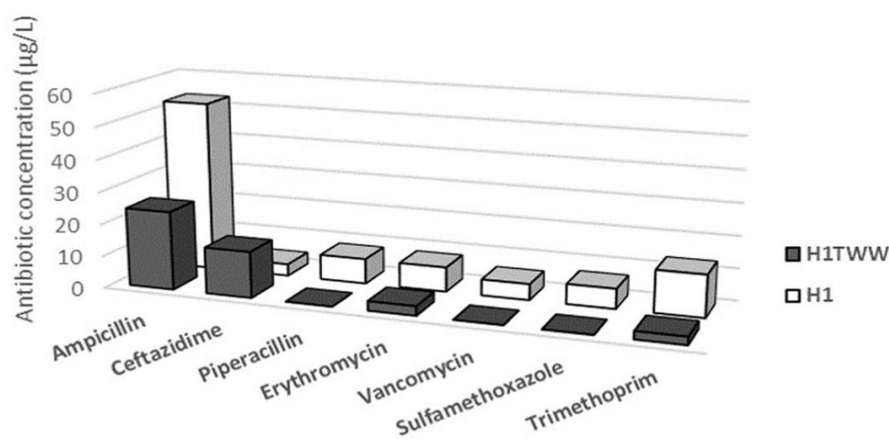
Clasificarea filogenetică a secvențelor a fost realizată cu ajutorul modulului de clasificare din QIIME care a grupat majoritatea secvențelor în 4 filumuri diferite (Figura 3A). În proba H1, 97,27% din secvențe au fost atribuite filumului Proteobacteria. În cazul probei H2 filumurile Proteobacteria (44,7%), Firmicutes (33,68%) au fost dominante urmate de Bacteroidetes (16,4%) și Actinobacteria

(4,9%). Comunitatea probei H3 a fost compus din 3 filumuri, Proteobacteria (71,4%), Bacteroidetes (13,7%) și Firmicutes (13,1%). Această compoziție taxonomică s-a dovedit a fi omniprezentă în efluenții de apă reziduală din spitale, în stațiile de epurare a apelor uzate municipale și în ape reziduale netratate din diverse locații geografice. Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria, Clostridia și Bacilli pot fi asociate în mod specific cu medii acvatice poluate cu antibiotice. Așa cum se poate observa în Figura 3B, microbiota efluenților investigați a fost dominată de Epsilonproteobacteria (58,6% în H1, 6,9% în H2 și 23,9% în H3) și Gammaproteobacteria (26,9% în H1, 31,8% în H2 și 41,1% în H3). Deltaproteobacteria (1,2% în H1, 0,2% în H2 și 0,5% în H3) au fost găsite într-o proporție mai redusă. Clasa Clostridia (16,5% în H2 și 12% în H3) a fost găsit cu o abundență mai mare în apele reziduale din spitalele cu profil general. Alte clase abundente în proba H2 au fost Bacteroidia (15,8%) precum și Bacilli (4,6%) și Actinobacteria (4,6%).



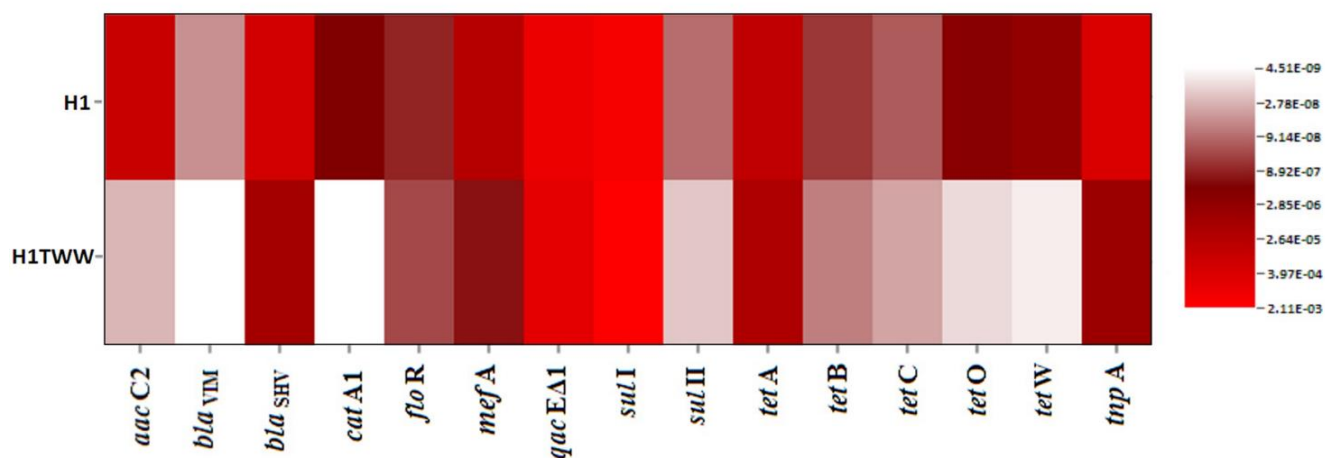
**Figura 3.** Compoziția comunității bacteriene la nivel de filum (A) și de clasă (B) a probelor de apă reziduală din spitale.

H1 a fost singurul dintre spitalele studiate care aplică un proces de epurare a apelor reziduale înainte de a elibera efluentul în colectorul municipal. În acest studiu, concentrațiile de antibiotice au fost reduse cu 55-81% după procesul de tratare a apelor uzate (Figura 4). Trimetoprimul a fost redus cu 81%, urmat de eritromicină cu 62% și ampicilină cu 55%. Piperacilina, vancomicina și sulfometoxazolul nu au fost detectate în probele tratate de apă reziduală (H1TWW). În mod deosebit, concentrația de ceftazidim a crescut cu aproximativ 74% în apele reziduale tratate în comparație cu apele reziduale brute din spitale.



**Figura 4.** Concentrația antibioticelor în apa reziduală brută (H1) și apa reziduală tratată (H1TWW) din spitale.

Deși procesul de epurare a apelor reziduale nu este conceput special pentru a reduce nivelul de poluanți cum ar fi ARG, abundența acestora a fost redusă semnificativ în apele reziduale tratate (Figura 5). Concentrația relativă a ARG s-a dovedit a fi cu 1-3 ori mai mică ( $\sim 10^{-7}$ ) după tratament, cu excepția genelor *tetA*, *blaSHV* și *suI* care au fost eliminate doar într-o măsură mică. De asemenea, s-a observat o schimbare în abundența comunității bacteriene, cu o ușoară creștere a Proteobacteriilor (de la 97,5% la 98,7%) și a Bacteriodetes (de la 0,1% la 0,5%).



**Figura 5.** Concentrația relativă a genelor de rezistență la antibiotice în apa reziduală brută (H1) și apa reziduală tratată (H1TWW) din spitale.

#### Capitolul IV: Investigarea antibioticelor, a genelor de rezistență la antibiotice și a contaminanților microbieni în apele subterane în relație cu proximitatea zonelor urbane

[Acest capitol a fost publicat ca: Szekeres, E., Chiriac, C.M., Baricz, A., Szőke-Nagy, T., Lung, I., Soran, M.-L., Rudi, K., Dragos, N., Coman, C. Investigating antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial contaminants in groundwater in relation to the proximity of urban areas (2018) în *Environmental Pollution*: doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.107]

##### 1. Introducere

În multe țări, apele subterane reprezintă cea mai importantă sursă publică de apă și, de asemenea, o sursă de apă potabilă. Astfel, evaluarea și monitorizarea calității acestor medii ar trebui să primească o atenție deosebită. Datorită amplitudinii și impactului poluării chimice și biologice, precum și a lipsei tehnologiilor de epurare, reabilitarea resurselor contaminate de apă subterană este dificilă. Acviferele urbane sunt deosebit de vulnerabile la poluarea antropică datorită activităților urbane intense și a industriei. Rareori a fost investigat, pe plan mondial, cum afectează aceste activități antropice directe și indirecte profilul ARG și alte aspecte legate de medii acvatice subterane, parțial datorită dificultăților implicate și a costurilor ridicate. Selecția unor indicatori specifici pentru condiții locale de mediu ar putea contribui la evaluarea completă și consecventă a acestor contaminanți emergenți, care ar permite ca politicile interne de supraveghere și protecție a apelor subterane să combată riscurile legate de antibiotice și rezistență la antibiotice în sănătatea umană și în mediul natural.

Scopul acestei lucrări a fost de a evalua, folosind abordări independente de cultivare, distribuția reziduurilor de antibiotice, ARG, MGE și contaminarea microbială în mediile acvatice subterane localizate la diverse distanțe față de zonele urbane, de asemenea, de a determina aspectele specifice legate de activitatea antropică. Ipoteza principală a presupus că apele subterane din imediata vecinătate a zonelor urbane sunt mai vulnerabile la contaminarea cu antibiotice, cu microorganisme provenite din ape reziduale și ARG care pot reprezenta o amenințare asupra sănătății umane. De asemenea, am investigat dacă anumite gene ar putea fi folosite ca indicator (marker) al activității antropice și care ar putea urmări tiparul poluării mediului acvatic subteran.

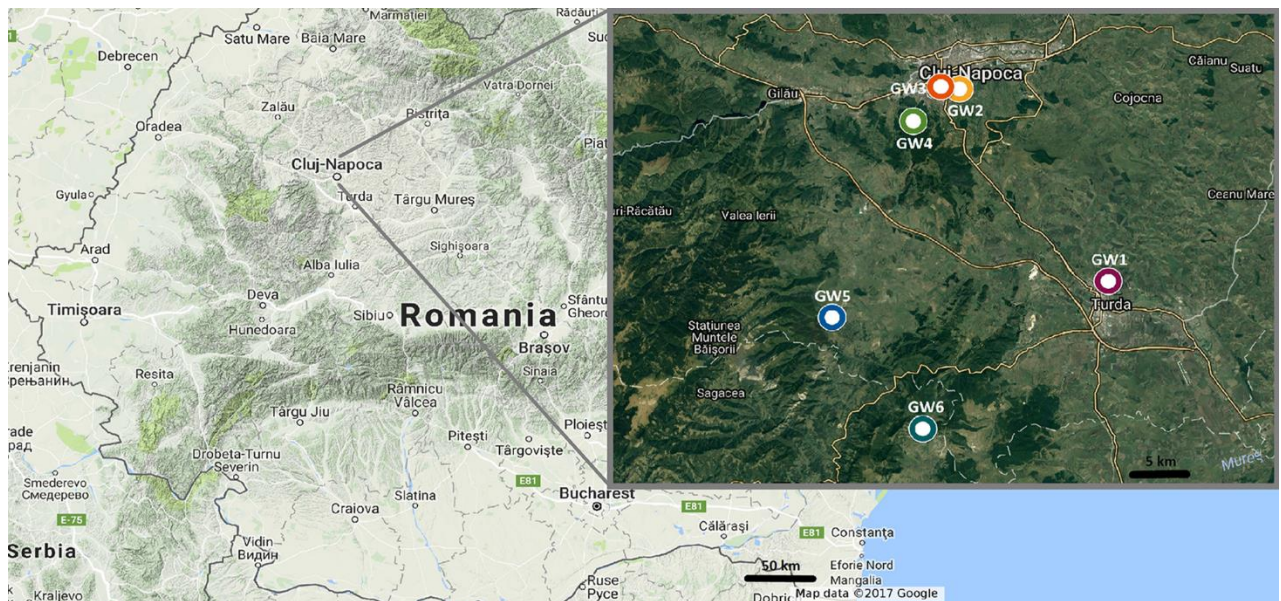
## 2. Materiale și metode

- Selecția locațiilor de eșantionare a fost axată pe zone considerate susceptibile la contaminare cu ape reziduale de origine animală sau umană, dar și pe zone mai izolate, considerate *a priori* medii intacte (neafectate), din Cluj-Napoca și din împrejurimi (Figura 6). Punctele de prelevare a apelor subterane de mică adâncime din acest experiment au fost fântâni (fântâni deschise cu acces direct la suprafață și coloană de apă stagnantă; denumite probe de "fântână") și foraje (fântâni închise; denumite probe de "foraj") cu diverse utilizări, cum ar fi irigarea, utilizări în scopuri domestice și ca apă potabilă. **Probele de apă subterană au fost colectate** la fiecare locație cu sticle curate și sterile de polietilenă în perioada de iunie-iulie 2015. Probele au fost transportate la laborator pe gheață și prelucrate imediat.
- Probele prelevate în triplicat au fost unite și filtrate sub vid prin membrane filtrante din esteri ai celulozei cu dimensiune ai porilor de 0,2 μm (Fioroni, Franța). Au fost obținute câte trei filtre pentru fiecare probă, iar din fiecare filtru **s-a extras ADN-ul** folosind un kit comercial numit ZR Soil Microbe DNA kit (ZymoResearch, SUA).
- **Evaluarea cantitativă a antibioticelor** din probele de apă subterană a fost efectuată pe un instrument de cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) echipat cu detector cu șir de diode și spectrometrie de masă (Shimadzu, Japonia).
- **Cuantificarea absolută** a fost efectuată pentru 14 gene a căror prezență a fost confirmată în evaluarea preliminară. Aceste gene codifică rezistență la diverse clase de antibiotice (aminoglicozide, β-lactam, cloramfenicol, MLSB, sulfonamide și tetraciclină), rezistență antiseptică și MGE.

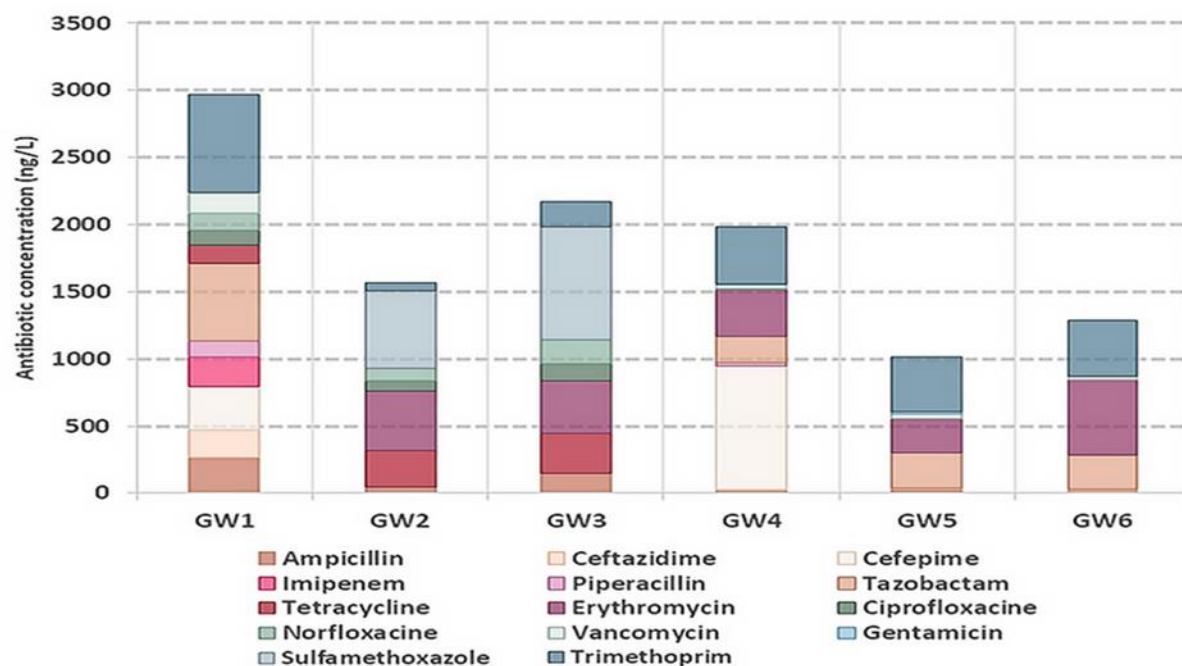
- Pentru a caracteriza structura și compoziția comunităților microbiene procariote, a fost amplificată regiunea V3-V4 a genei ARNr 16S folosind primeri universali PRK341F (CCTACGGGRBGCASCAG) și PRK806R (GGACTACYVGGGTATCTAAT) care pe urmă au fost **secvențializate** folosind o platformă Illumina MiSeq.

### 3. Rezultate și discuții

Mai mulți compuși antibiotici au fost detectați și cuantificați în probele de apă subterană cu concentrații între limita de detecție și 917 ng/L pentru cefepim în proba GW4 (Figura 7). În ansamblu, cele mai abundente clase de antibiotice au fost trimetoprim, macrolide, sulfonamide și  $\beta$ -lactam, urmate de tetraciclone și fluorochinolone. A fost recomandată valoarea limită de 100 ng/L între concentrațiile scăzute și cele crescute de antibiotice în apele subterane. Astfel, nivelul crescut al acestor micropoluanti, în special în GW1 și GW3 (Figura 7), reprezintă un factor de risc asociat cu persistența, bioacumularea și toxicitatea acestora.

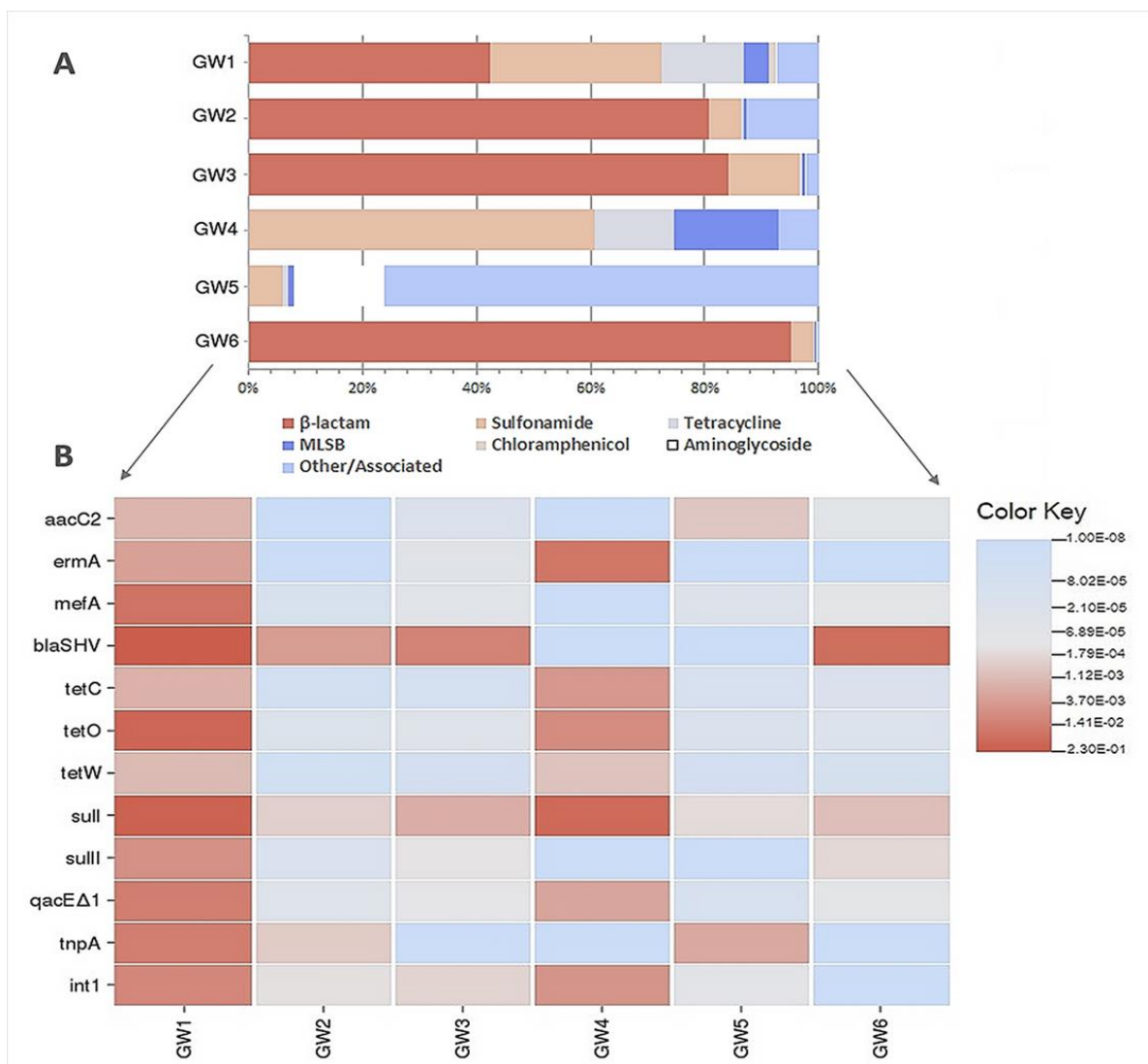


**Figura 6.** Locațiile fântânilor și forajelor eșantionate în acest studiu din apropierea orașului Cluj-Napoca și din zonele înconjurătoare (în partea de nord-vest a României).



**Figura 7.** Concentrația de antibiotice detectată în probele de apă subterană.

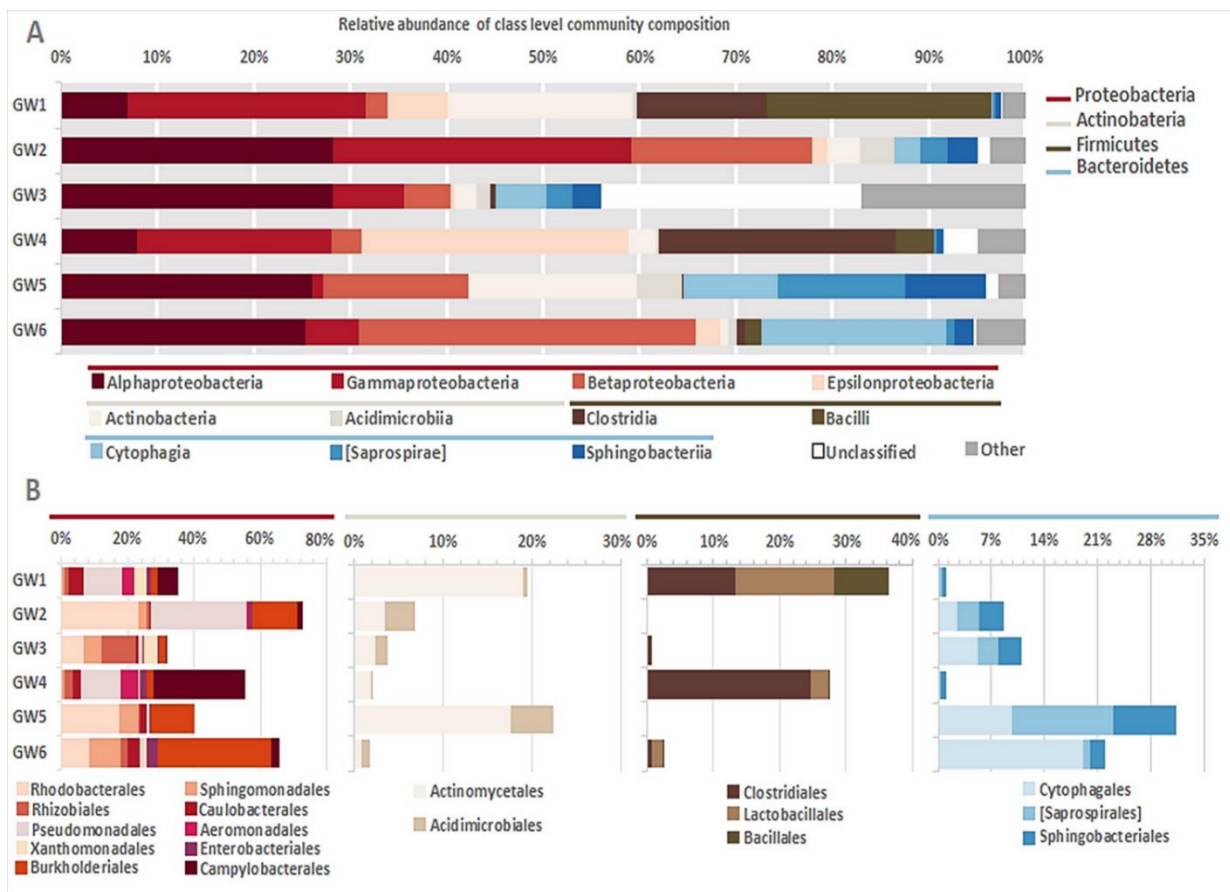
Din totalul de 37 de gene testate în etapa de evaluare prealabilă au fost cuantificabile 11 ARG care codifică rezistența la aminoglicozide (*aacC2*),  $\beta$ -lactamice (*blaSHV*), cloramfenicol (*floR*), MLSB (*ermA*, *mefA*), sulfonamide (*sulI*, *sulII*) și tetracicline (*tetA*, *tetC*, *tetO* și *tetW*). De asemenea, a fost identificată o genă de rezistență antiseptică (*qacE $\Delta$ 1*) și două gene asociate cu mobilizarea ARG (*tnpA* și *int1*) (în continuare această grupă va fi denumită alte/asociate). Prezența ADN-ului bacterian în probele de apă subterană a fost verificată prin amplificarea genei ARNr 16S care a variat între  $2,51 \times 10^3$  și  $5,01 \times 10^6$  număr de copii per mL de apă subterană. Abundența relativă a ARG a variat de la  $6,61 \times 10^{-7}$  până la  $2,30 \times 10^{-1}$  copii/copii al genei ARNr 16S în probele investigate. În general, ordinea frecvenței tipurilor de ARG în probele de apă subterană a fost  $\beta$ -lactam > sulfonamide > tetraciclină > alte/asociate > MLSB > cloramfenicol > aminoglicozid (Figura 8).



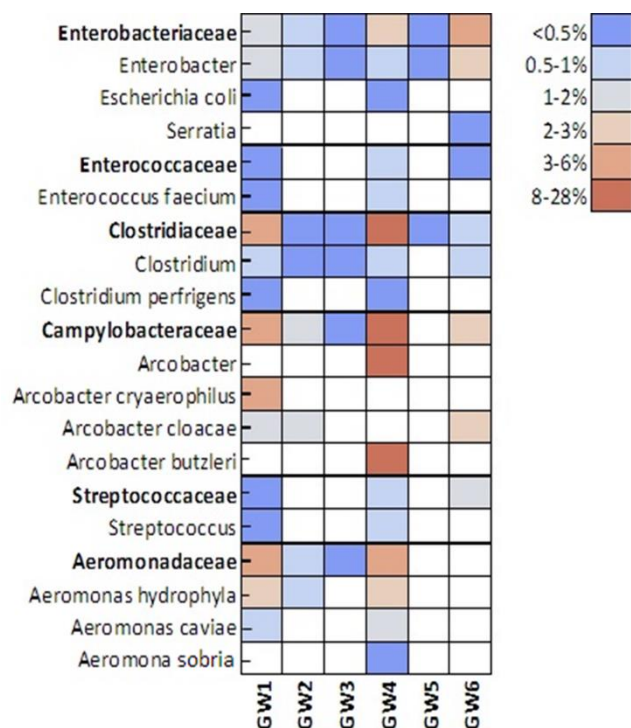
**Figura 8.** (A) Procentul de ARG care conferă rezistență la familiile de antibiotice (axa x) în probele de apă subterană (axa y). (B) Harta concentrației relative (copii ale genei țintă/ copii al genei ARNr 16S) a ARG măsurate în toate cele șase probe de apă subterană.

Clasificarea taxonomică a OTU-ilor a evidențiat prezența a 26 de filumuri bacteriene. Filumurile abundente (>1% din populație) au inclus Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes și Actinobacteria (Figura 9). Mai multe secvențe de ARNr 16S au fost afiliate cu indicatorii de fecale, cum ar fi *Escherichia coli* (mai puțin de 0,5%), *Enterococcus faecium* (mai puțin de 0,5% în GW1 și 0,7% în GW4), *Aeromonas hydrophyla* (2% în GW1 și 2,5% în GW2), *Aeromonas caviae* (0,7% în GW1 și 1,2% în GW4) și *Streptococcus* (mai puțin de 0,5%) care au fost întâlnite cu un număr relativ mai mare de secvențe în GW1 și GW4, împreună cu OTU-urile asociate cu *Clostridium perfringens* și genul *Faecalibacterium* (Figura 10).



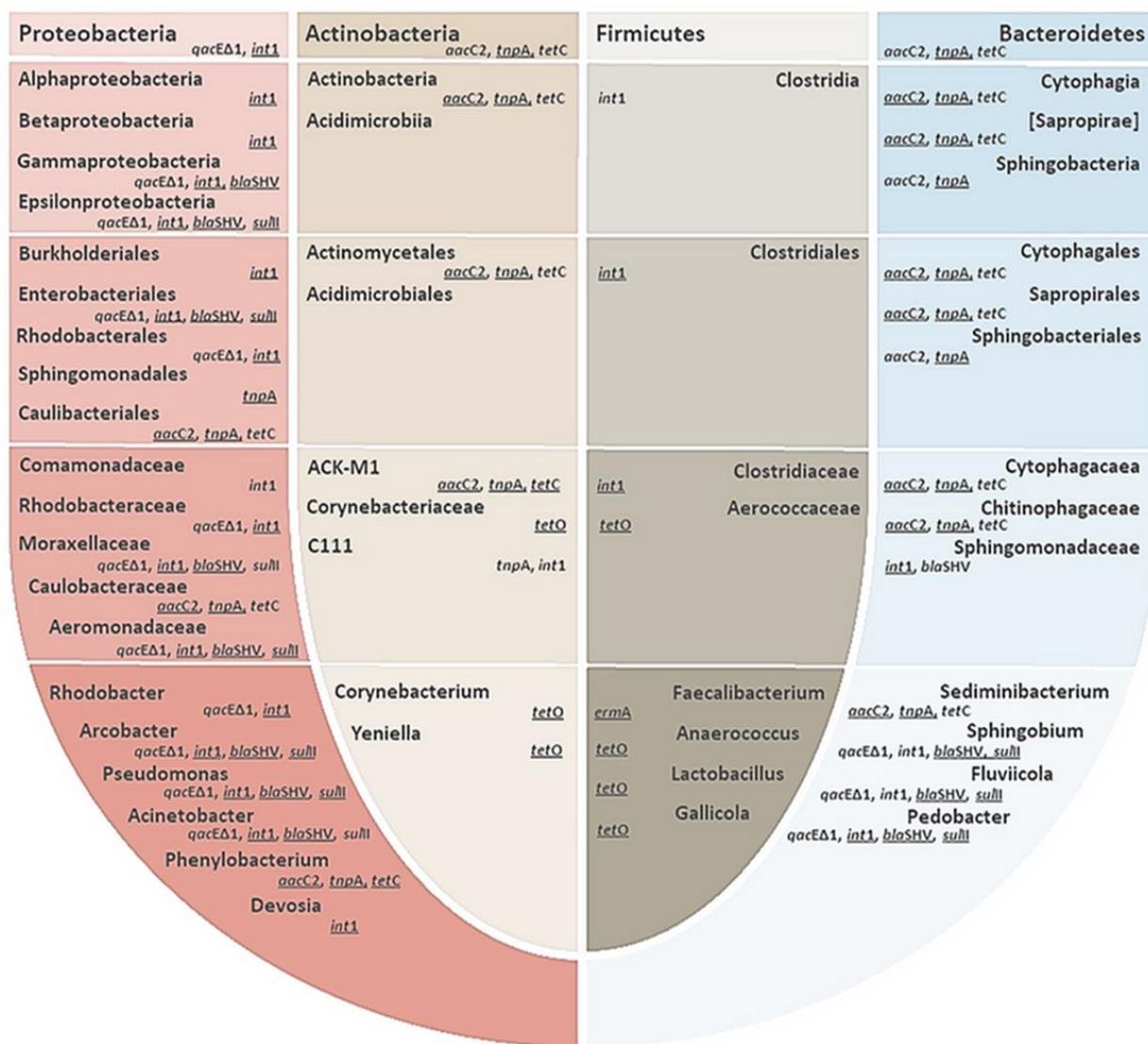


**Figura 9.** O defalcare taxonomică a comunităților bacteriene la nivel de clasă (A) și ordine (B) în probele de apă subterană. Clasele și ordinele care aparțin aceluiași filum dominant sunt colorate corespunzător. Culorile pentru fiecare filum dominant sunt afișate în colțul din dreapta sus, paleta de culoare roșie pentru clasele și ordinele aparținând filumului Proteobacteria, bej pentru Actinobacteria, maro pentru Firmicutes și albastru pentru Bacteroidetes. Doar grupurile taxonomice cu o abundență totală de peste 1% au fost incluse în grafic.



**Figura 10.** Intervalele de abundență relativă a bacteriilor potențial patogene și a indicatorilor fecali în probele investigate. Clasificarea la nivel de familie este evidențiată cu caractere îngroșate.

Co-selecția a genelor de rezistență și a elementelor genetice mobile sugerează prezența HGT în aceste medii acvatice și indică rolul MGE în persistența și proliferarea fenotipurilor de rezistență. Corelația dintre prevalența ARG, MGE și a structurii comunităților microbiene la nivel de filum arată o legătură cu Proteobacteria, Bacteroidetes și Actinobacteria (Figura 11). Toate cele trei prezintă o corelație slabă ( $p < 0,05$ ) cu ARG, dar o legătură puternică ( $p < 0,01$ ) cu MGE. Se pare că Proteobacteria au fost principalii purtători de integroni, iar Bacteroidetes și Actinobacteria au prezentat o legătură cu transpozaze. Prezența simultană a genelor asociate cu integroni de clasa 1 (*int1*) și a genelor de rezistență *qacEΔ1*, *sulI*, *tet* (*tetC*, *tetO*, *tetW*) în bacteriile din probele de apă subterană a fost susținută de descoperiri anterioare care au documentat tiparele de coexistență în diferite medii acvatice ale acestor ARG și a integronilor. Numai prezența simultană a acestor șase gene arată o legătură cu diferitele grade de contaminare (cu antibiotice, ARG și agenți patogeni), sugerând posibilitatea de a le folosi ca indicatori pentru detectarea poluării asociate cu rezistența la antibiotice.



**Figura 11.** Corelații semnificative a comunităților microbiene cu ARG. Valorile de  $p < 0,01$  au fost considerate ca fiind corelații puternice (evidențiat prin subliniere) iar valorile  $p < 0,05$  ca fiind corelații slabe. Paleta de culori a filumurilor bacteriene corespunde cu figura 9: clasele și ordinele care aparțin aceluiași filum dominant sunt colorate corespunzător, paleta de culoare roșie pentru clasele și ordinele aparținând filumului Proteobacteria, bej pentru Actinobacteria, maro pentru Firmicutes și albastru pentru Bacteroidetes.

## Capitolul V: Concluzii

- Cele mai răspândite clase de antibiotice detectate în efluenții din spitale au fost  $\beta$ -lactamicele, glicopeptidele și trimetoprimul, cu concentrații mari de ordinul  $\mu\text{g/L}$  și cu o rată de înlăturare de 55-81% după epurarea apei reziduale. În apele subterane testate în această lucrare trimetoprimul, macrolidele și sulfonamidele au fost cele mai abundente clase de antibiotice.
- În general, genele de rezistență au arătat o abundență relativă ridicată, dintre care genele *sulI* și *qacEΔ1* au fost cele mai răspândite în toate probele de apă reziduală investigate. Deoarece aceste gene fac parte din regiunea conservată 3' a integronului clinic de clasa 1 și considerând că epurarea apelor uzate nu a scăzut concentrația acestor gene, se presupune că integroni de clasa 1 sunt eliberați permanent în mediile acvatice naturale. De asemenea, prezența simultană a genelor asociate cu integronul de clasa 1 (*int1*, *qacEΔ1* și *sulI*) și a genelor *tetC*, *tetO* și *tetW* poate fi utilizată ca indicator al poluării antropice în mediile acvatice subterane.
- O mare abundență a bacteriilor Epsilonproteobacteria, Clostridia și Bacilli (asociate anterior cu poluare cu antibiotice) au fost observate în efluenții din spitale, împreună cu un nivel crescut ale unor patogeni oportuniști și indicatori ai contaminării cu fecale. Epurarea apelor reziduale din spitale a crescut abundența familiei *Enterobacteriaceae*, un grup de bacterii cunoscut pentru capacitatea sa de rezistență la antibiotice. În probele de apă subterană din zone poluate a fost observată o diversitate crescută a speciilor de bacterii. Mai mult, a fost observată o compoziție filogenetică distinctă constând din OTU-uri afiliate la diverși patogeni oportuniști și bacterii indicatori ai contaminării cu fecale.
- Metoda convențională de epurare a apelor reziduale, care a fost aplicată înainte de eliberarea efluenților din spitale în rețeaua municipală de ape uzate, a arătat o eficiență moderată de îndepărtare a poluanților emergenți studiați.
- În ansamblu, antibiotice, ARG și MGE au fost răspândite nu numai în ecosistemele acvatice subterane din apropierea zonelor urbane dar și în cele la distanțe semnificative față de orașul Cluj-Napoca. Rezultatele obținute susțin ideea că, cel mai probabil, activitățile antropice locale sunt cele care afectează prezența contaminanților asociați cu rezistență în apele subterane, nu și distanța față de oraș. Corelațiile dintre ARG, MGE și grupurile taxonomice au identificat potențiale gazde a ARG, precum și posibilele modele de mobilizare a acestor gene în mediile acvatice subterane.

## Bibliografie selectivă:

Baquero, F., Martínez, J.-L., Cantón, R., 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 260–265.

Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., Larsson, D.G.J., 2018. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 42.

Berendonk, T.U., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.-N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., Martinez, J.L., 2015. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 310–317.

Chen, Q.-L., Li, H., Zhou, X.-Y., Zhao, Y., Su, J.-Q., Zhang, X., Huang, F.-Y., 2017. An underappreciated hotspot of antibiotic resistance: The groundwater near the municipal solid waste landfill. *Sci. Total Environ.* 609, 966–973.

Davies, J., Spiegelman, G.B., Yim, G., 2006. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 445–453.

D'Alessio, M. and Ray, C., 2016. Pharmaceuticals and groundwater resources In: Fares, A., (ed) *Emerging issues in groundwater resources*. Springer, Switzerland, pp.101-144.

Gillings, M.R., 2017. Lateral gene transfer, bacterial genome evolution, and the Anthropocene. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1389, 20–36.

Griebler, C., Lueders, T., 2009. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biol.* 54, 649–677.

Hocquet, D., Muller, A., Bertrand, X., 2016. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *J. Hosp. Infect.* 93, 395–402.

Kothari, A., Wu, Y.-W., Charrier, M., Rajeev, L., Rocha, A.M., Paradis, C.J., Hazen, T.C., Singer, S.W., Mukhopadhyay, A., 2017. Plasmid DNA analysis of pristine groundwater microbial communities reveal extensive presence of metal resistance genes. In press.

Lien, L.T.Q., Hoa, N.Q., Chuc, N.T.K., Thoa, N.T.M., Phuc, H.D., Diwan, V., Dat, N.T., Tamhankar, A.J., Lundborg, C.S., 2016. Antibiotics in wastewater of a rural and an urban hospital before and after wastewater treatment, and the relationship with antibiotic use—a one year study from Vietnam. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13(588), 1-13.

López-Serna, R., Jurado, A., Vázquez-Suñé, E., Carrera, J., Petrović, M., Barceló, D., 2013. Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona, Spain. *Environ. Pollut.* 174, 305–315.

Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H., Carlson, K.H., 2006. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in Northern Colorado. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7445–7450.

Stalder, T., Barraud, O., Jové, T., Casellas, M., Gaschet, M., Dagot, C., Ploy, M.-C., 2014. Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *ISME J.* 8, 768–777.

Vaz-Moreira, I., Nunes, O.C., Manaia, C.M., 2014. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 761–778.

Xu, L., Ouyang, W., Qian, Y., Su, C., Su, J., Chen, H., 2016. High-throughput profiling of antibiotic resistance genes in drinking water treatment plants and distribution systems. *Environ. Pollut.* 213, 119–126.

Zhang, X.-X., Zhang, T., Fang, H.H.P., 2009a. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 397–414.