

UNIVERSITATEA "OVIDIUS" CONSTANȚA
FACULTATEA DE "ȘTIINȚE ALE NATURII ȘI ȘTIINȚE
AGRICOLE"

Teză de doctorat

rezumat

STUDIUL BIOCHIMIC AL BACTERIEI
***Escherichia coli* IZOLATĂ DIN APA DE MARE ȘI**
UNELE IMPLICAȚII ÎN PATOLOGIA UMANĂ

Conducător științific,
Prof. Univ. Dr. CP I Natalia Roșoiu
Membru titular al Academiei
Oamenilor de Știință din România

Doctorand,
Emilia Trenchea (Pănuș)

CONSTANȚA 2012

Cuvinte cheie: *Escherichia coli*, mediu marin,
markeri fenotipici și genetici de antibioretistență,
markeri fenotipici și genetici de vitulență,
toxine formaroare de pori, PCR,
factori fizico-chimici.

CUPRINS

OBIECTIVELE ȘI SCOPUL LUCRĂRII	1
PARTEA I. STADIUL CUNOAȘTERII	3
CAPITOLUL 1. Mediul marin - rezervor de virulență și rezistență	3
1.1. Factorii ecologici care influențează natura și activitatea microorganismelor în mediile marine	4
1.2. Habitate și comunități specifice microbiotei marine	7
1.3. Marea - mediu natural pentru microorganisme	8
1.4. Poluarea mediului marin	10
CAPITOLUL 2. Implicațiile speciei <i>Escherichia coli</i> în patologia umană	16
2.1. Caracterizarea generală a Fam. <i>Enterobacteriaceae</i>	16
2.2. Caracterizarea generală a speciei <i>Escherichia coli</i>	22
2.3. Caractere morfologice, de cultură și biochimice	24
2.4. Rezistența la agenții fizici, chimici și biologici	24
2.5. Patogenitatea tulpinilor de <i>Escherichia coli</i>	25
2.6. Mecanismele moleculare de rezistență la substanțe antimicrobiene	52
PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALE	
Studiul fenotipic și genotipic al factorilor de rezistență și virulență al unui set de tulpini de <i>Escherichia coli</i> izolate din apa de mare și al unor posibile implicații în patologia umana	64
Introducere	64
CAPITOLUL 3. Materiale și metode	65
3.1. Prelevarea și transportul probelor analizate	65
3.2. Izolarea și identificarea tulpinilor de <i>Escherichia coli</i>	67
3.3. Studiul fenotipic al sensibilității la antibiotice și la săruri ale metalelor bivalente tranziționale	82
3.4. Evidențierea fenotipică a factorilor de virulență	88
3.5. Detectia genelor de rezistență și virulență	101
3.6. Studiul influenței factorilor fizico-chimici asupra expresiei factorilor solubili de virulență și a sensibilității la sărurile unor metale bivalente tranziționale a tulpinilor de <i>Escherichia coli</i> izolate din apa de mare	113
CAPITOLUL 4. Rezultate și discuții	116
4.1. Fenotipurile de rezistență la antibiotice ale tulpinilor de <i>Escherichia coli</i> izolate din apa de mare	116
4.2. Sensibilitatea tulpinilor de <i>Escherichia coli</i> izolate din apa de mare la săruri ale metalelor bivalente tranziționale	122
4.3. Spectrul de factori de virulență asociați peretelui celular și solubili, la tulpinile <i>Escherichia coli</i> izolate din apa de mare	125
4.4. Determinismul genetic al rezistenței și virulenței tulpinilor de <i>Escherichia coli</i> izolate din apa de mare	139
4.5. Rezultatele studiului influenței factorilor fizico-chimici asupra expresiei sensibilității la sărurile unor metale bivalente tranziționale și a factorilor de virulență, la tulpinile de <i>Escherichia coli</i> izolate din apa de mare	152
CONCLUZII	201
BIBLIOGRAFIE	204
LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE	220

OBIECTIVELE ȘI SCOPUL LUCRĂRII

Marea Neagră era în trecut una dintre cele mai productive mări, organismele pelagice și bentonice înregistrând o abundență remarcabilă (Antipa, 1941). Comparativ cu acea perioadă, structura ecosistemului a fost puternic afectată, înregistrându-se o semnificativă reducere a biodiversității (Gomoiu, 1981). Izolarea de oceanul mondial, asociată cu aportul fluvial semnificativ (Dunăre, Nipru, Nistru), au determinat expunerea Mării Negre la diverse presiuni antropice. Problemele generate de eutrofizare și poluare au început în a doua jumătate a anilor '70. Cantitățile mari de compuși anorganici și organici pătrunși anual în mare, atât prin râuri, cât și prin deversări de ape uzate menajere și industriale, au determinat modificări dramatice la toate nivelurile ecosistemului. Creșterea nutrienților și a substanțelor periculoase în apă au produs schimbări majore în ecosistemele costiere, având un impact semnificativ asupra diversității biologice și asupra activităților desfășurate în zona marină (pescuit, activități recreative) (Bologa et al., 1995; Petranu et al., 1999; Gomoiu, 2004).

Contaminarea fecală a apelor de suprafață constituie o amenințare serioasă de mediu și sănătate publică. În sistemele complexe, poluarea fecală poate proveni din mai multe surse, inclusiv evacuarea apelor uzate, scurgeri agricole și pluviale urbane. Identificarea și eliminarea sursei de contaminare nu este simplă, deoarece evaluarea poluării fecale, în general, se bazează pe un număr limitat de probe de apă de suprafață pentru a măsura densitatea indicatorilor fecali (Gordon et al. 2002; Byappanahalli et al., 2003).

Escherichia coli reprezintă o bacterie coliformă fecală, existentă în intestinul animal și uman. Prezența bacteriei *Escherichia coli* în apă este un indicator puternic de contaminare recentă cu dejecte animale sau ape menajere. În timpul ploilor, topirii zăpezilor sau alte tipuri de precipitații, această bacterie poate fi purtată în

golfuri, râuri, lacuri sau ape freatice; iar atunci când aceste ape sunt utilizate ca surse de apă potabilă și nu sunt tratate sau sunt inadecvat tratate, această bacterie poate ajunge în apa de băut (Llopis et al., 2004).

Numeroase studii au arătat că *Escherichia coli* poate rezista în bentos, fiind detectată ulterior în apele de suprafață. Poluările reziduale persistă chiar la temperaturi scăzute, caz în care nivelurile de coliformi fecali în apele uzate scad inițial rapid, dar apoi se stabilizează de la 1% până la 10% din totalul populației inițiale. În plus, *Escherichia coli* izolată din fosele septice s-a dovedit a fi mai puțin variată din punct de vedere genetic, constituind o clonă distinctă, spre deosebire de tulpinile de *Escherichia coli* izolate de la locuitorii din gospodăriile deservite de aceste sisteme.

Deși cele mai multe tulpini de *Escherichia coli* sunt nepatogene și trăiesc în intestinul omului sănătos și al animalelor, totuși unele tulpini de *Escherichia coli* pot exprima factori de virulență dobândiți de la specii patogene, factori responsabili de apariția unor forme clinice grave de infecție.

Bacteria *Escherichia coli* este și indicator sanitar, prezența sa în apă oferind unele indicații asupra contaminării și cu alte microorganisme enterice înalt patogene (*Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, sau chiar diferite enterovirusuri) având ca sursă habitatul intestinal (Bărzo, 1985).

Scopul acestui studiu constă în investigarea profilului de antibioretistență și a unor aspecte distinctive de virulență și patogenitate, atât din punct de vedere fenotipic, cât și genotipic, precum și a influenței factorilor fizico-chimici asupra acestora, la un lot de 100 tulpini de *Escherichia coli* izolate din apa de mare de la litoralul Mării Negre.

Pentru realizarea acestui scop au fost propuse următoarele obiective:

- izolarea și identificarea tulpinilor de *Escherichia coli* din apa de mare de la litoralul Mării Negre;
- studiul la nivel fenotipic al markerilor de rezistență la substanțe antimicrobiene –antibiotice și metale bivalente tranziționale, la tulpinile izolate;
- studiul capacității de aderență a tulpinilor de *Escherichia coli* la un substrat abiotic (polimeri din mase plastice) și biotic (celule HeLa);
- caracterizarea factorilor de virulență solubili la tulpinile de *Escherichia coli*;
- stabilirea unor corelații între aspectele fenotipice și genotipice de antibioretistență și virulență;
- studiul influenței unor parametri fizico-chimici: mediul de cultivare, temperatura de incubare, prezența/absența O₂, variații de pH, compoziția mediului de cultură; asupra aspectelor fenotipice de antibioretistență și a expresiei fenotipice a factorilor de virulență asociați peretelui celular (adezine) și solubili (enzime/toxine).

PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALE

STUDIUL FENOTIPIC ȘI GENOTIPIC AL FACTORILOR DE REZISTENȚĂ ȘI VIRULENȚĂ AL UNUI SET DE TULPINI DE *Escherichia coli* IZOLATE DIN APA DE MARE CU POSIBILE IMPLICAȚII ÎN PATOLOGIA UMANA

INTRODUCERE

Lucrarea de față a avut ca **scop** realizarea unui studiu complex la nivel fenotipic și genotipic al antibioretistenței și al gradului de virulență, precum și influența factorilor fizico-chimici asupra expresiei acestor caractere cu rol determinant în patogenitatea acestor tulpini, pe un lot semnificativ de tulpini de *Escherichia coli* izolate din apa de mare din zona litoralului Mării Negre.

Obiectivele studiate se referă la:

- izolarea și identificarea tulpinilor de *E. coli* din apa de mare din zona litoralului Mării Negre;
- studiul la nivel fenotipic al markerilor de rezistență la substanțe antimicrobiene antibiotice și metale bivalente tranziționale, la tulpinile izolate;
- studiul capacității de aderență a tulpinilor de *E. coli* la un substrat abiotic (polimeri din mase plastice) și biotic (celule HeLa);
- caracterizarea factorilor de virulență solubili la tulpinile de *E. coli*;
- stabilirea unor corelații între aspectele fenotipice și genotipice de antibioretistență și virulență;
- studiul influenței unor parametri fizico-chimici: mediul de cultivare, temperatura de incubare, prezența/absența O₂, variații de pH, compoziția mediului de cultură, asupra aspectelor fenotipice de antibioretistență și a expresiei fenotipice a factorilor de virulență asociați peretelui celular (adezine) și solubili (enzime/toxine).

CAPITOLUL 3. MATERIALE ȘI METODE

3.1. PRELEVAREA ȘI TRANSPORTUL PROBELOR ANALIZATE

Pentru analiza microbiologică, respectiv izolarea tulpinilor de *E. coli*, prelevarea și transportul probelor de apă de mare s-a efectuat respectând condițiile de aseptie, conform standardelor în vigoare.

3.1.1. PRELEVAREA PROBELOR ANALIZATE

Prelevarea probelor s-a efectuat din 10 stații, de la litoralul Mării Negre (fig. 23): Năvodari, Mamaia - două stații, Constanța, Eforie Nord, Eforie Sud, Costinești, Olimp-Neptun, Mangalia, Vama-veche; cu o frecvență bilunară, în sezon estival (mai-septembrie).

3.1.2. TRANSPORTUL PROBELOR ANALIZATE

Probele prelevate au fost transportate către laborator, cât mai repede posibil (maxim 6 ore) în lăzi refrigerate cu agenți frigorifici, menținându-se o temperatură de $5\pm 3^{\circ}\text{C}$. (EN ISO 19458, 2006).

3.2. IZOLAREA ȘI IDENTIFICAREA TULPINILOR DE *Escherichia coli*

3.2.1. IZOLAREA TULPINILOR DE *Escherichia coli*

Pentru izolarea tulpinilor de *E. coli* s-a utilizat tehnica membranei filtrante, volumul analizat fiind de 100 ml din proba ca atare și diluții zecimale succesive până la 10^{-2} . Pentru realizarea diluțiilor s-a folosit mediul *peptone salin diluent* (triptonă) cu următoarea compoziție (SR EN ISO 9308-1, 2000). După filtrare membrana a fost aplicată pe o placă Petri în diametrul de 50 mm, cu mediu *lactose-TTC* agar cu heptadecilsulfat de sodiu având următoarea compoziție (SR EN ISO 9308-1, 2000):

3.2.2. IDENTIFICAREA TULPINILOR DE *Escherichia coli*

Pentru identificarea bacteriei *E. coli* s-au utilizat următoarele teste:

- testul oxidazei;
- testul producerii de indol;
- alte teste de identificare biochimică (teste politrope, kituri API).

3. 3. STUDIUL FENOTIPIC AL SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE ȘI LA SĂRURI ALE METALELOR BIVALENTE TRANZIȚIONALE

3.3.1. EVALUAREA *IN VITRO* A EFICIENȚEI UNEI SUBSTANȚE CU ACȚIUNE ANTIMICROBIANĂ

Fenotipurile de rezistență la antibiotice ale tulpinilor de *E. coli* izolate din apa de mare au fost evidențiate prin testarea sensibilității la antibiotice utilizând tehnica antibiogrammei difuzimetrice Kirby-Bauer;

Antibioticele utilizate (discuri Oxoid) pentru testarea sensibilității la antibiotice au fost selectate din diferite grupe de antibiotice, conform indicațiilor NCCLS (2004) pentru *Enterobacteriaceae*: ampicilină (AMP 10μg); cefoxitin (FOX 30μg); ceftazidim (CAZ 30μg); ceftriaxonă (CRO 30μg); imipenem (IMP 10μg); ciprofloxacina (CIP 5μg), acid nalidixic (NA 30μg); gentamicină (G/CN10μg), amikacină (AK/AN 30μg), tobramicin (NN10μg); trimetoprim/sulfametoxazol (SXT 1.25μg/23.75μg), cloramfenicol (C 30μg), nitrofurantoin (F/M 300μg).

Pentru testarea sensibilității la diferite metale, s-au utilizat combinații complexe ale unor metale bivalente tranziționale: Zn, Mn, Cu, Co, Ni ($\text{MnC}_{12}\text{H}_{31}\text{N}_{10}\text{O}_5$, $\text{NiC}_{12}\text{H}_{28}\text{N}_{10}\text{O}_4$, $\text{CuC}_{12}\text{H}_{32}\text{N}_{10}\text{O}_6$, $\text{ZnC}_{12}\text{H}_{32}\text{N}_{10}\text{O}_6$).

3.3.2. DETECTAREA DIRECTĂ A β-LACTAMAZELOR

Producerea de β-lactamaze utilizând teste directe (hidroliza nitrocefalinului). Nitrocefalinul este disponibil sub formă de pudră purificată de la Becton Dickinson (Oxford, UK) sau discuri îmbibate cu antibiotic (OXOID).

3.4. EVIDENȚIEREA FENOTIPICĂ A FACTORILOR DE VIRULENȚĂ

3.4.1. ADERENȚA LA SUBSTRATUL INERT ȘI CELULAR

Spectrul factorilor de virulență asociați peretelui celular la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare, s-a evidențiat prin metode calitative și cantitative privind:

- studiul capacității de aderență la substrat inert/abiotic;
- studiul capacității de aderență la substrat celular/biotic;

3.4.1.1. Studiul capacității de aderență la un substrat inert

Abilitatea tulpinilor de *E. coli* de a produce polizaharide extracelulare și de a forma biofilme pe un substrat inert a fost investigată și în prezentul studiu, prin testul producerii factorului *slime*, utilizând metoda microtitrării (Christensen et al., 1982).

3.4.1.2. Studiul capacității de aderență la un substrat celular

Studiul capacității de aderență și invazie a bacteriilor la un substrat celular s-a realizat utilizând metoda Cravioto (adaptată după Lazăr, 2003), utilizând linia celulară HeLa din neoplasm de col uterin (ECACC # 93021013).

3.4.2. EVIDENȚIEREA FACTORILOR DE VIRULENȚĂ SOLUBILI

Analiza factorilor de virulență solubili, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare, s-a realizat prin teste enzimactice de evidențiere a prezenței/absenței: esculinazei, amilazei, enzimelor formatoare de pori (hemolizine - hemoliza spot și CAMP-like; lipază; lecitinază), lizindecarboxilazei, proteazelor (cazeinază, gelatinază), mucinazei, DN-azei.

3.5. DETECȚIA GENELOR DE REZISTENȚĂ ȘI VIRULENȚĂ

3.5.1. IZOLAREA, PURIFICAREA ȘI EVIDENȚIEREA ADN PLASMIDIAL

Pentru analiza genelor de rezistență și virulență la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare au fost parcurse etapele de:

- izolare,
- purificare

➤ evidențiere a ADN plasmidial.

Pentru izolarea, purificarea și evidențierea ADN plasmidial s-a utilizat tehnica Birnboim, Doly & Ish-Horowitz (Vassu et al., 2001).

3.5.2. EVIDENȚIEREA GENELOR DE REZISTENȚĂ LA DIVERSE CLASE DE ANTIBIOTICE LA TULPINILE DE *Escherichia coli* IZOLATE DIN APA DE MARE

Pentru evidențierea genelor ce codifică enzime inactivatoare ale antibioticelor β -lactamice și sulfamidelor s-au aplicat tehnici simplex și multiplex – PCR.

3.6. STUDIUL INFLUENȚEI FACTORILOR FIZICO-CHIMICI ASUPRA EXPRESIEI VIRULENȚEI ȘI REZISTENȚEI LA METALE BIVALENTE TRANZIȚIONALE A TULPINILOR DE *Escherichia coli* IZOLATE DIN APA DE MARE

Au fost utilizate metodele descrise anterior pentru determinarea sensibilității bacteriene față de combinațiile complexe ale unor metale bivalente tranziționale, Zn, Mn, Cu, Co, Ni și a factorilor de virulență, cu mențiunea faptului că experimentele au fost repetate în diferite condiții, în care a fost variat un anumit parametru fizic sau chimic.

3.6.1. STUDIUL INFLUENȚEI FACTORILOR FIZICI

A fost urmărită acțiunea temperaturii, presiunii parțiale a O_2 și valorii pH asupra expresiei factorilor de virulență și a rezistenței la metale bivalente tranziționale.

3.6.1.1. Studiul influenței temperaturii

Experimentele prezentate anterior s-au repetat la diferite temperaturi de incubare: 4°C, 22°C, 37°C, 44°C și la 56°C.

3.6.1.2. Studiul influenței prezenței/absenței O_2

Pentru studiul influenței absenței/prezenței O_2 variantele experimentale au fost incubate la: 4°C, 22°C, 37°C, 44°C și la 56°C, timp de 24 ore în condiții de aerobioză (prezență de O_2), și în condiții de anaerobioză (absență de O_2). Condițiile de anaerobioză s-au realizat prin adăugare de ulei de parafină.

3.6.1.3. Studiul influenței valorii de pH a mediului de cultură

Pentru studiul influenței valorii de pH, tulpinile bacteriene au fost cultivate în mediu cu pH ajustat la valoarea dorită, cu soluții de acid clorhidric soluție 10% pentru valoarea de pH 5.0, și hidroxid de sodiu soluție 0,1N pentru valoarea de pH 9.6.

3.6.2. STUDIUL INFLUENȚEI FACTORILOR CHIMICI

Compoziția unui mediu de cultură este foarte diversă și depinde de exigențele nutritive ale microorganismului ce urmează a fi cultivat.

3.6.2.1. Studiul influenței concentrației de glucoză din mediul de cultură

Pentru studiul influenței concentrației de glucoză din mediul de cultură, tulpinile au fost însămânțate în 1 ml bulion nutritiv cu concentrație de 1,5% și respectiv 3% glucoză.

3.6.2.2. Studiul influenței concentrației de NaCl din mediul de cultură

Pentru studiul influenței concentrației de NaCl din mediul de cultură, tulpinile bacteriene au fost însămânțate în 1 ml bulion nutritiv cu următoarele concentrații de sare: 0%, 0.5%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% și 10%.

CAPITOLUL 4

REZULTATE ȘI DISCUȚII

4.1. FENOTIPURILE DE REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICE ALE TULPINILOR DE *Escherichia coli* IZOLATE DIN APA DE MARE

Tulpinile de *E. coli*, izolate din apa de mare, au prezentat o mare sensibilitate la majoritatea antibioticelor la care au fost testate, și anume: imipenem (IMP) 99%, cefoxitin (FOX) 99%, nitrofurantoin (F/N) 99%, tobramicină (NN) 98%, ceftriaxonă (CRO) 98%, ceftazidim (CAZ) 97%, gentamicină (G) 96%, amikacină (AK) 96%, ciprofloxacina (CIP) 93%, cloramfenicol (C) 92%, acid nalidixic (NA) 92%, biseptol (SXT) 89%; fiind rezistente doar la ampicilina (AMP) 86% (rezistență cunoscută de altfel ca fiind constitutivă la membrii fam. *Enterobacteriaceae*) (fig. 40, 41).

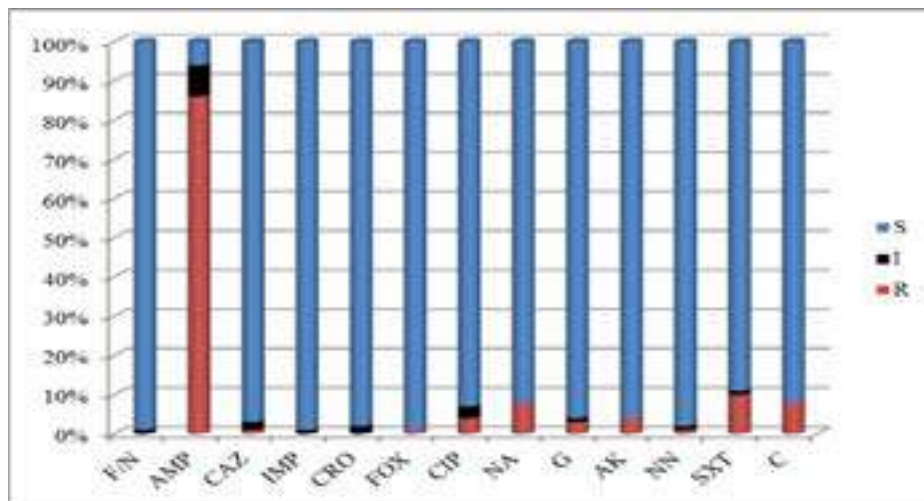


Figura 40. Reprezentarea grafică (%) a sensibilității/rezistenței la antibiotice, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare (S = sensibil, I = intermediar, R = rezistent).

Totuși, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare rezistente, s-a observat că tulpinile testate prezintă între 1 și 8 markeri de antibioretistență, asociațiile cele mai frecvente fiind (fig. 42):

- AMP + SXT (10%);
- AMP+C (9%);
- AMP+CIP (8%);
- AMP+ NA (7%).

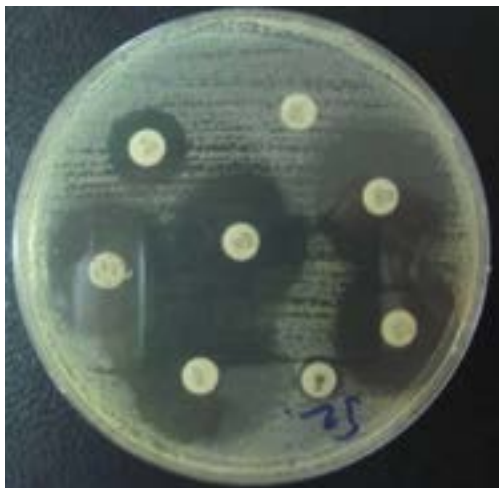


Figura 41. Antibiotograma unei tulpini de *E. coli* (nr. 52) izolată din apa de mare.

Studiul producerii de β – lactamaze prin testul rapid al hidrolizei nitrocefînului a arătat că 44% dintre tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare au exprimat β - lactamază constitutivă (fig. 43).

Aceste aspecte pledează pentru necesitatea studierii fenotipurilor de antibioretistență la tulpinile izolate din mediul înconjurător, având ca scop identificarea factorilor responsabili de răspândirea unor mecanisme de antibioretistență în mediul extern, cu potențial impact negativ asupra sănătății umane.

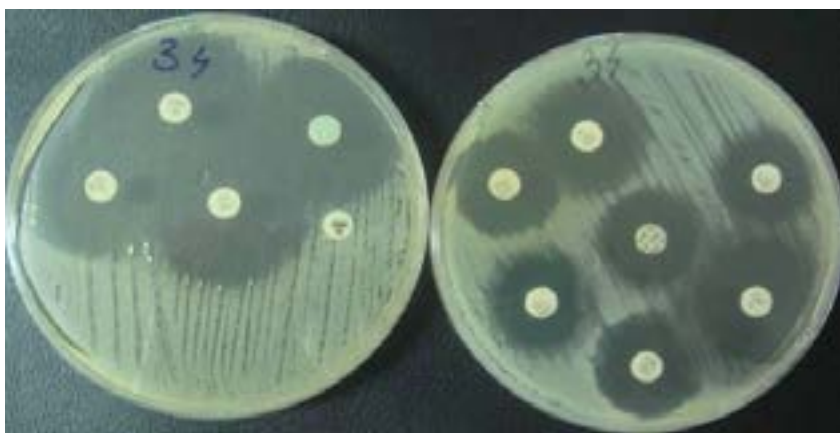


Figura 42. Fenotipuri de antibioretistență la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare (1 marker de rezistență- sus și 6 markeri de rezistență - jos).

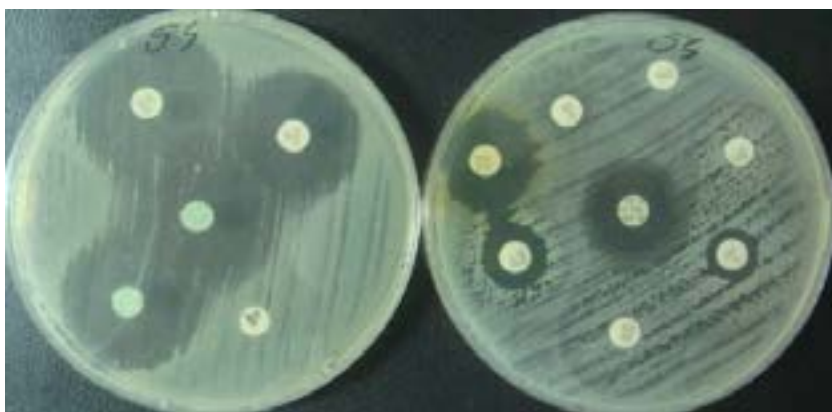


Figura 43. Punerea în evidență a β - lactamazelor prin testul rapid al hidrolizei nitrocefînului, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare (stânga- tulpini negativ, dreapta- tulpini pozitive)

4.2. SENSIBILITATEA TULPINILOR DE *Escherichia coli* IZOLATE DIN APA DE MARE LA SĂRURI ALE METALELOR BIVALENTE TRANZIȚIONALE

Prezentul studiu referitor la rezistența tulpinilor de *E. coli*, izolate din apa de mare, la săruri ale metalelor bivalente tranziționale (Zn, Mn, Cu, Co, Ni), a demonstrat că majoritatea tulpinilor testate sunt rezistente la sărurile acestor metale (fig. 44), Ni 99%, Mn 98%, Cu 98%, Co 95%, și Zn 72% (fig. 45).

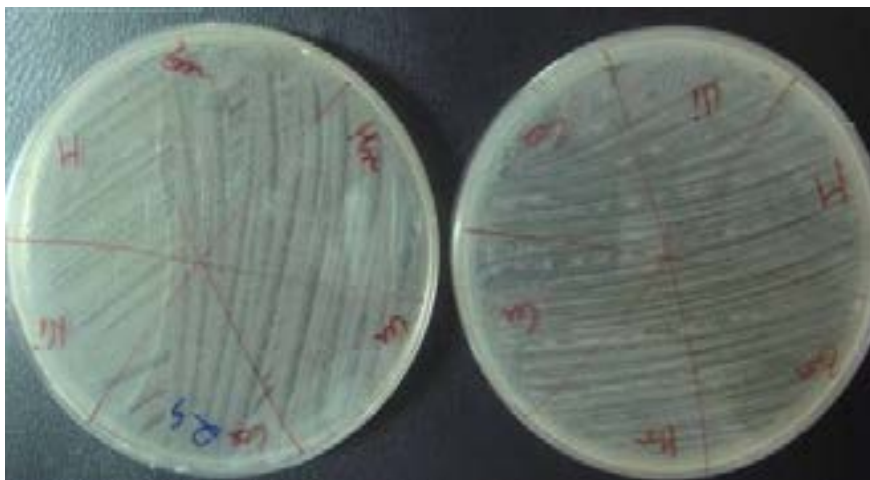


Figura 44. Testarea sensibilității tulpinilor de *E. coli* izolate din apa de mare la săruri ale metalelor bivalente tranziționale prin metoda adaptată difuzimetrică.

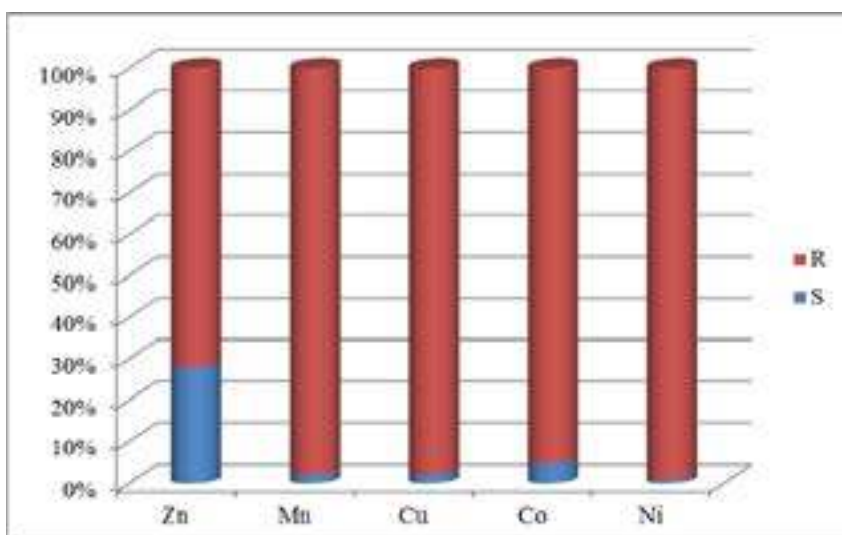


Figura 45. Reprezentarea grafică (%) a nivelurilor de sensibilitate/rezistență ale tulpinilor de *E. coli* izolate din apa de mare la sărurile metalelor bivalente tranziționale (S = sensibil, R = rezistent).

4.3. SPECTRUL DE FACTORI DE VIRULENȚĂ ASOCIAȚI PERETELUI CELULAR ȘI SOLUBILI, LA TULPINILE DE *Escherichia coli* IZOLATE DIN APA DE MARE

4.3.1. CAPACITATEA DE ADERENȚĂ LA UN SUBSTRAT ABIOTIC, A TULPINILOR DE *Escherichia coli* IZOLATE DIN APA DE MARE

Studiul capacității de aderență la un substrat inert/abiotic, prin testul producerii factorului slime, a arătat că tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare au colonizat substratul abiotic/inert (reprezentat de plastic) în proporție de 60% (fig. 46).

Capacitatea de aderență la un substrat inert reprezentat de plastic, a tulpinilor de *E. coli* izolate din apa de mare, s-a putut observa și în cursul metodei calitative de testare a aderenței la substratul celular, în urma cultivării tulpinilor bacteriene în mediu lichid, în plăci Petri cu diametru de 3,5 cm (fig. 47).

4.3.2. CAPACITATEA DE ADERENȚĂ LA UN SUBSTRAT BIOTIC, A TULPINILOR DE *Escherichia coli* IZOLATE DIN APA DE MARE

În urma acestui studiu s-a observat că un procent ridicat dintre tulpinile analizate (63%) au avut capacitatea de aderență la substratul celular - celule HeLa, prezentând indice de aderență de 30% cu *pattern-uri*: localizat, agregativ și difuz (fig. 48)



godeu cu tulpină de *E. coli* aderentă la substrat inert (plastic).

godeu cu tulpină de *E. coli* neaderentă la substrat inert (plastic).

Figura 46. Reprezentarea modelului experimental utilizat pentru testarea capacității tulpinilor de *E. coli*, izolate din apa de mare, de a coloniza substratul inert (reprezentat de plastic).



Figura 47. Imagine de microscopie optică cu tulpini de *E. coli*, izolate din apa de mare, ce aderă la substrat inert (placa de plastic), cu formare de agregate, în care bacteriile sunt dispuse ordonat (colorație Giemsa, x100).

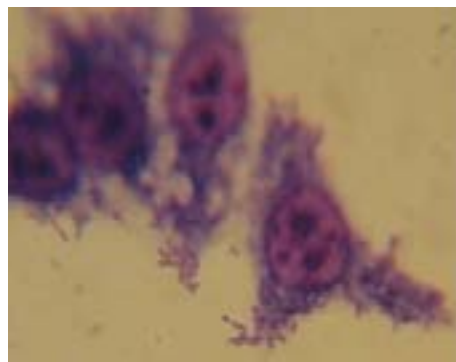
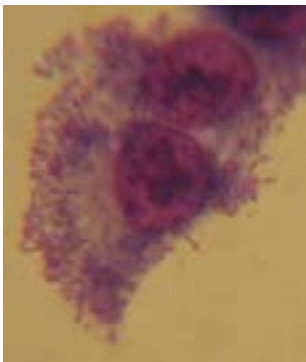


Figura 48. Imagine de microscopie optică a celulelor HeLa infectate cu tulpini de *E. coli* izolate din apa de mare, care aderă la celule în cultură (colorație Giemsa, x100).

4.3.3. RATA CANTITATIVĂ DE ADERENȚĂ ȘI INVAZIE A TULPINILOR DE *Escherichia coli* IZOLATE DIN APA DE MARE

În urma studiului cantitativ al capacității de aderență și invazie, la tulpinile de *E. coli*, izolate din apa de mare, s-a observat, în mod surprinzător, că un număr important de tulpini (70%) au prezentat și capacitatea de invazie a celulelor HeLa, demonstrând potențialul acestor tulpini de a invada și de a distruge celulele gazdei (fig. 49).

Capacitatea de invazie a tulpinilor de *E. coli* este demonstrată de constituirea unui patovar care reunește aceste tulpini, și anume patovarul enteroinvaziv. Tulpinile de EIEC pătrund în celulele epiteliale ale colonului, unde se multiplică, determinând leziuni ale mucoasei digestive. Rezultatele obținute de noi ar putea fi explicate prin faptul că celulele HeLa reprezintă o linie de origine epitelială.



Figura 49. Studiul cantitativ al capacității de invazie – stânga, respectiv al capacității de aderență și invazie – dreapta, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.3.4. EXPRESIA FACTORILOR DE VIRULENȚĂ SOLUBILI LA TULPINILE DE *Escherichia coli* IZOLATE DIN APA DE MARE

Rezultatele studiului producerii celor 10 factori de virulență solubili prin însămânțarea tulpinilor microbiene pe medii cu substrat specific încorporat au arătat că tulpinile testate au fost pozitive pentru producerea mucinazei 100% (fig. 50), lizin-decarboxilazei 93% (fig. 51), esculinazei 67% (fig. 52), hemolizinele fiind produse în procente mult mai scăzute (factofrul CAMP cu *Staphylococcus aureus* β - hemolitic ATCC 25923 – 7%, cele spot 6%) (fig. 53). Tulpinile testate sunt negative pentru ceilalți factori solubili testați, după cum se poate observa în figura 54.

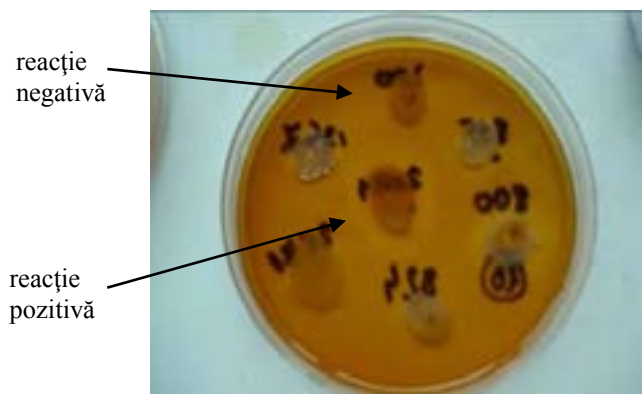


Figura 50. Evidențierea producerii mucinazei la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

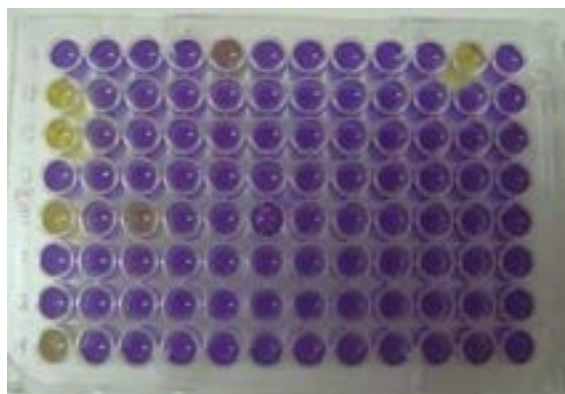


Figura 51. Producerea lizindecarboxilazei la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

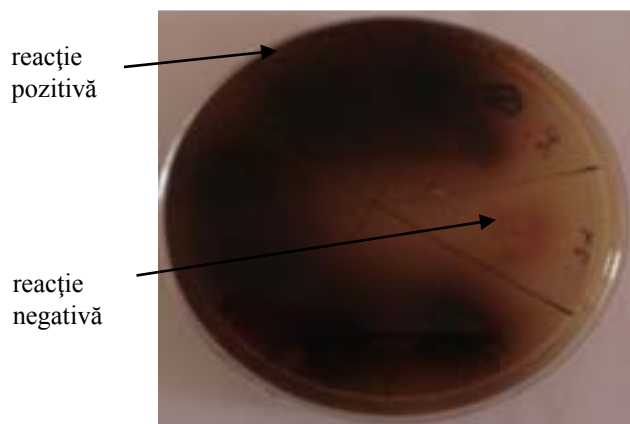


Figura 52. Evidențierea esculinazei cu producere de esculetol (precipitat de culoare neagră) la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

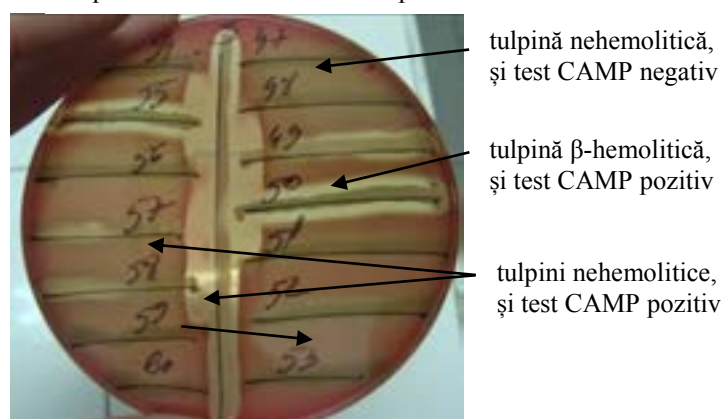


Figura 53. Producerea de hemolizine spot și test CAMP cu *Staphylococcus* β - hemolitic ATCC 25923 la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

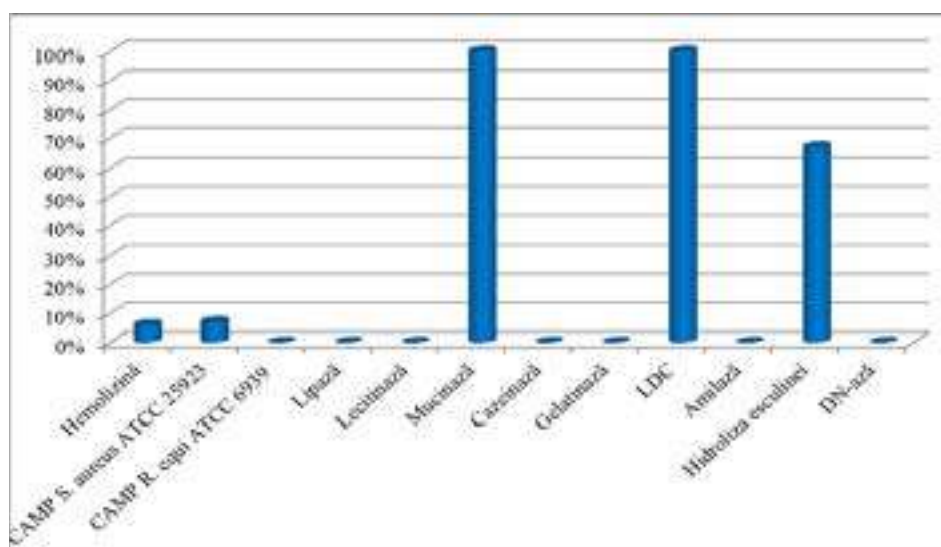


Figura 54. Reprezentarea grafică (%) a nivelului de pozitivitate a diferiților factori de virulență solubili la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.4. DETERMINISMUL GENETIC AL REZISTENȚEI ȘI VIRULENȚEI TULPINILOR DE *Escherichia coli* IZOLATE DIN APA DE MARE

4.4.1. STUDIUL PREZENȚEI ADN PLASMIDIAL

Studiul prezenței plasmidelor la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare a arătat că 25% dintre acestea au prezentat cel puțin o plasmidă cu greutate moleculară variabilă (fig. 56).

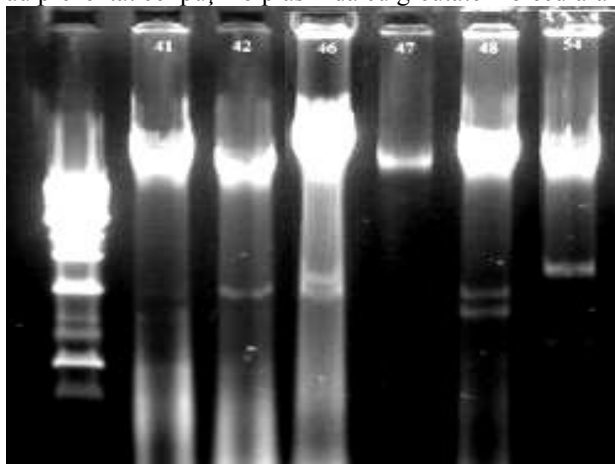


Figura 56. Profilul ADN migrat în gel de agaroză 0,7%, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.4.2. STUDIUL GENELOR DE REZISTENȚĂ

În cazul prezentului studiu toate tulpinile de *E. coli* rezistente la sulfamide au fost investigate pentru prezența genelor *sul1*, *sul2* și *sul3* prin PCR. Gena *sul1* a fost detectată la 55% din izolatele rezistente la sulfonamide, gena *sul2* la 22% din izolate, în timp ce gena *sul3* nu a fost pusă în evidență la izolatele marine (fig. 57). Investigarea prezenței genelor de rezistență la β -lactamaze: *bla*_{TEM1}, *bla*_{SHV1}, *bla*_{OXA1} și *bla*_{CTX-M} prin tehnici PCR a arătat că toate tulpinile au fost negative pentru prezența acestor gene.



Figura 57. Evidențierea prin migrare în gel de agaroză a ampliconilor genelor de rezistență la sulfamide, obținuți prin multiplex PCR, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare (benzile 1, 2 - probe amplificate cu primeri *sul2*; benzile 3, 4 - probe amplificate cu primeri *sul1*).

4.4.3. DETERMINISMUL GENETIC AL VIRULENȚEI LA TULPINILE DE *Escherichia coli* IZOLATE DIN APA DE MARE

În prezentul studiu tulpinile de *E. coli*, izolate din apa de mare au fost investigate prin tehnica PCR pentru prezența unor gene care codifică proteine implicate în aderență: *aggR*, activatorul transcripțional al genelor pentru expresia fimbriilor de tip I la *E. coli* enteroaggregative (EaggEC), a genelor pentru adevine afimbriale (*aafI* / II), și a genelor implicate în sinteza unor toxine - genele pentru enterotoxina termostabilă (*EAST* / I). Toate tulpinile au fost negative pentru prezența acestor gene.

În cazul prezentului studiu al expresiei fenotipice a factorilor de virulență solubili, dintre cei 10 factori de virulență solubili, 2 factori (lipaza și DN-aza) nu au putut fi evidențiați, în niciuna din condițiile de cultivare. Având în vedere faptul că unele gene pot exista fără a se exprima fenotipic, în cadrul prezentului studiu toate tulpinile au fost investigate pentru prezența genelor *EcpldA* și respectiv *Echeld* prin PCR. Gena *EcpldA* a fost detectată la 69%, iar gena *Echeld* a fost detectată la 73% din izolate (fig. 58).

Analiza densitometrică a imaginilor jpeg, utilizând software ImageJ 1.43 (NIH, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), a arătat că intensitatea benzii ampliconilor de 370 pb corespunzătoare helicazei (DN-aza) la tulpinile 65, 69, 79, 81 și 84 este de 2,12; 1,47; 3,04; 1,43 și respectiv 1,49 ori mai scăzută. Aceasta se datorează fie existenței mai multor populații clonale, unele prezentând gena și altele nu, fie reducerii numărului de copii per celulă. În plus, tulpinile 24, 67 și 77 pierd gena helicazei neobservându-se banda specifică la 370 pb (fig. 59).

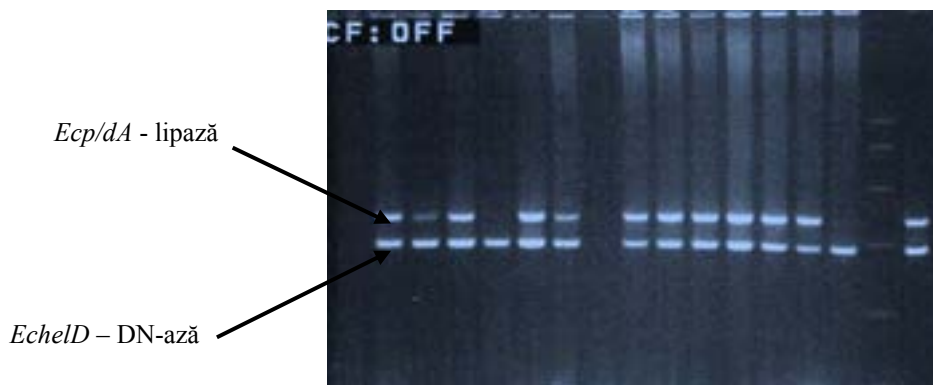


Figura 59. Migrarea ampliconilor PCR în gel de agaroză 2%, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.5. INFLUENȚA FACTORILOR FIZICO-CHIMICI ASUPRA EXPRESIEI SENSIBILITĂȚII LA SĂRURILE UNOR METALE BIVALENTE TRANZIȚIONALE ȘI A FACTORILOR DE VIRULENȚĂ, LA TULPINILE DE *Escherichia coli* IZOLATE DIN APA DE MARE

4.5.1. INFLUENȚA FACTORILOR FIZICI ȘI CHIMICI ASUPRA EXPRESIEI SENSIBILITĂȚII BACTERIENE LA SĂRURILE UNOR METALE BIVALENTE TRANZIȚIONALE

4.5.1.1. Influența consistenței mediului de cultură

Consistența mediului de cultură a bacteriilor (lichid vs solid) nu a influențat activitatea antimicrobiană a sărurilor metalelor bivalente tranziționale la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare, activitatea antimicrobiană fiind ușor crescută atunci când bacteriile au fost cultivate în mediu solid, excepție făcând sarea de Mn (fig. 60).

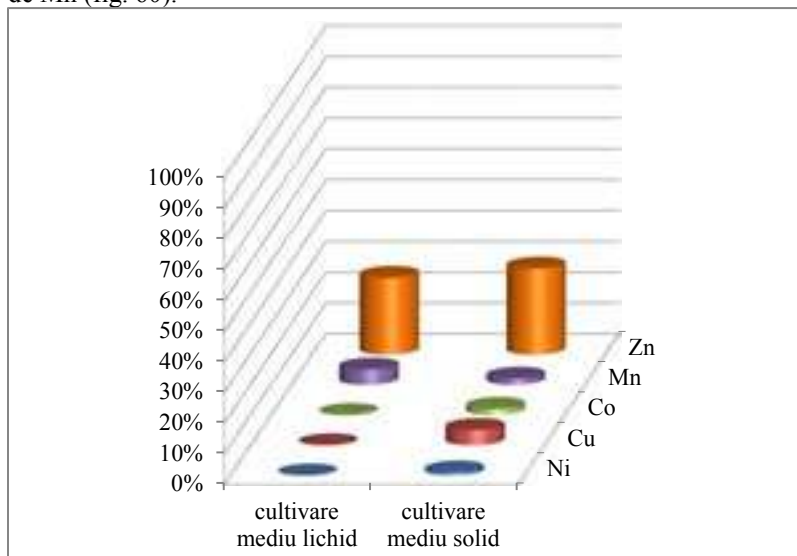


Figura 60. Influența consistenței mediului de cultură asupra activității antimicrobiene (%) a sărurilor metalelor bivalente tranziționale, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.5.1.2. Influența temperaturii, în condiții de aerobioză

Nivelurile de sensibilitate au fost cel mai bine exprimate la temperatura de 44°C, urmată de cea de 22°C. Singurul metal față de care s-a înregistrat un fenomen de rezistență totală, indiferent de temperatura de cultivare a bacteriilor a fost Ni (fig. 61).

La temperatura de 44°C și de 22°C doar Zn a manifestat un efect bactericid.

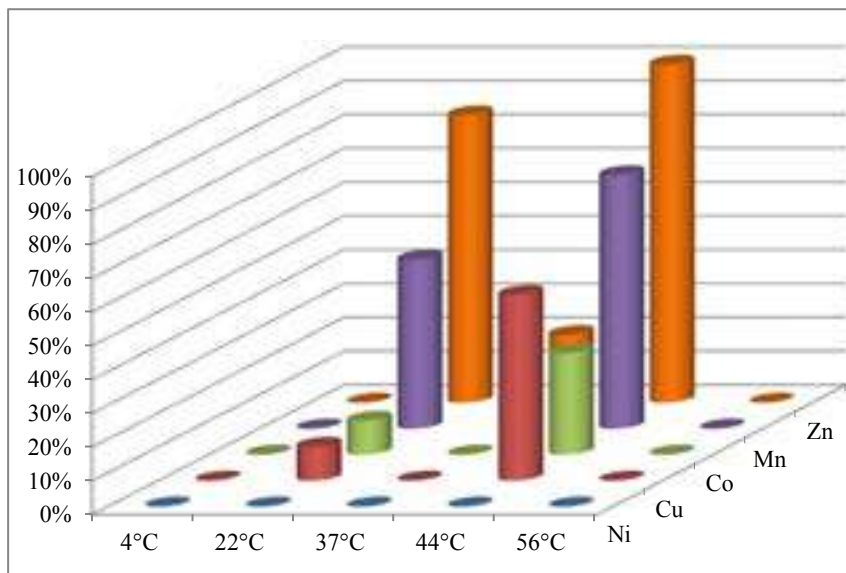


Figura 61. Influența temperaturii asupra activității antimicrobiene a sărurilor metalelor bivalente tranziționale (%), în condiții de aerobioză, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.5.1.3. Influența temperaturii, în condiții de anaerobioză

Se poate observa că nivelurile de sensibilitate au fost mai bine exprimate tot la 44°C, urmate apoi de cele la 22°C. Singurul metal față de care bacteriile au manifestat rezistență totală, indiferent de temperatura de incubare, a fost Ni (fig. 62).

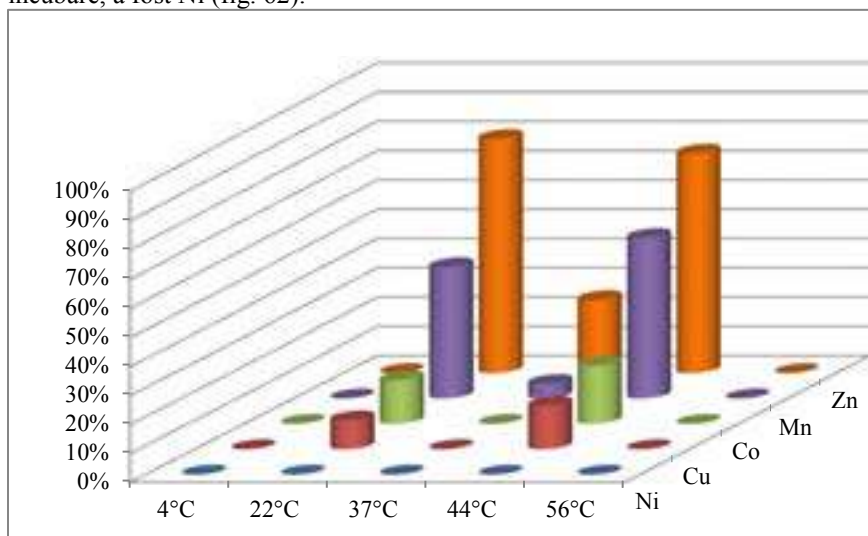


Figura 62. Influența temperaturii asupra activității antimicrobiene a sărurilor metalelor bivalente tranziționale (%), în condiții de anaerobioză, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.5.1.4. Influența prezenței/absenței oxigenului

Creșterea bacteriilor în condiții de aerobioză și anaerobioză a arătat că prezența/absența O₂ nu a influențat fenomenul de rezistență bacteriană față de sărurile studiate. Este de remarcă faptul că la 37°C, atât în condiții aerobe cât și anaerobe, activitatea antimicrobiană a Ni, Co și Cu, a fost complet eliminată, iar ratele de susceptibilitate la Mn și Zn s-au redus drastic (fig. 63).

4.5.1.5. Influența variației de pH a mediului de cultură

S-a putut observa că nivelurile de sensibilitate au fost cel mai bine exprimate la pH bazic, cele mai constante rezultate fiind observate pentru sărurile metalelor Cu, Co, și Zn (fig. 64). Sensibilitatea la Mn a crescut ușor la valori acide de pH în comparație cu cel neutru, în timp ce la pH bazic a crescut semnificativ sensibilitatea la Mn și Zn (fig. 64). Doar la pH bazic Ni a avut activitate antimicrobiană (fig. 64).

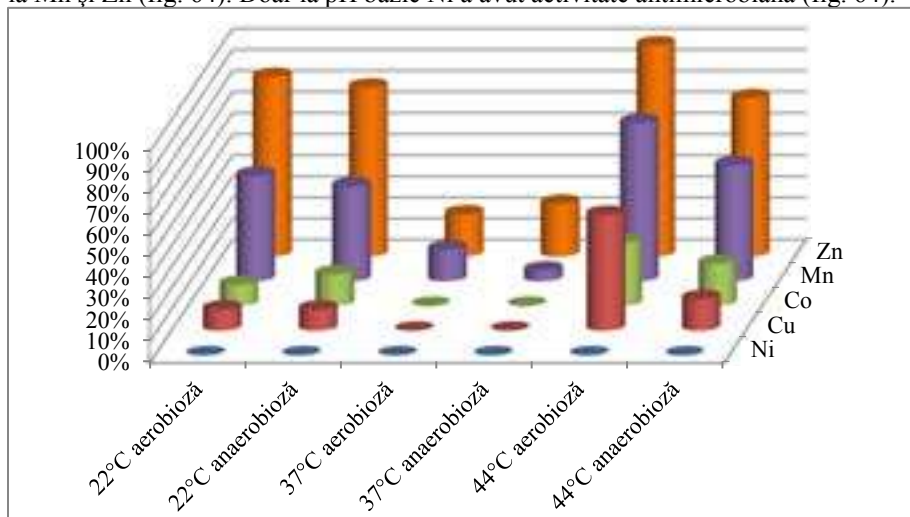


Figura 63. Influența prezenței/absenței O₂ asupra activității antimicrobiene a sărurilor metalelor bivalente tranziționale (%), la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

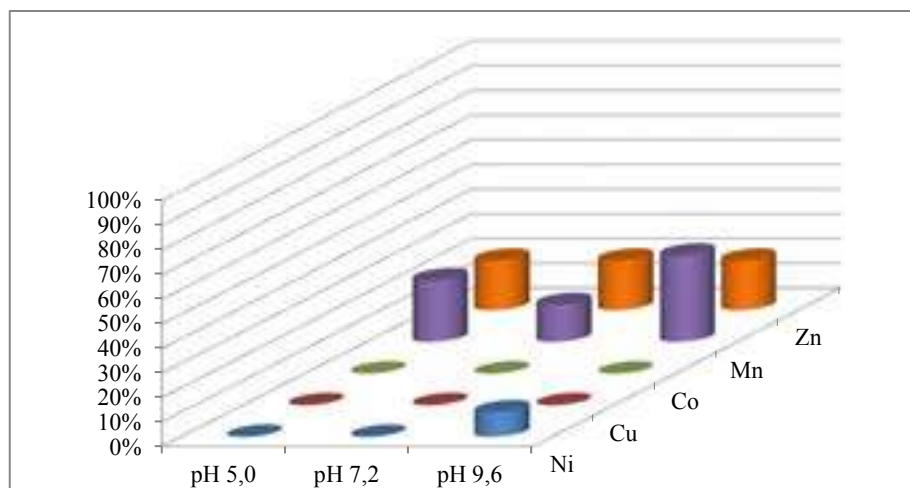


Figura 64. Influența variației de pH a mediului de cultură asupra activității antimicrobiene a sărurilor metalelor bivalente tranziționale (%), la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.5.1.6. Influența concentrație de glucoză din mediul de cultură

Concentrația ridicată de glucoză (3% *versus* 1,5%) a crescut semnificativ sensibilitatea bacteriilor față de sărurile de Mn, Zn, și doar cu 5 % pentru sărurile de Ni și Cu. Singurul metal ce nu a manifestat niciun fel de acțiune antimicrobiană atât la concentrații scăzute (1,5%) cât și la concentrații ridicate (3%) de glucoză, a fost Co (fig. 65).

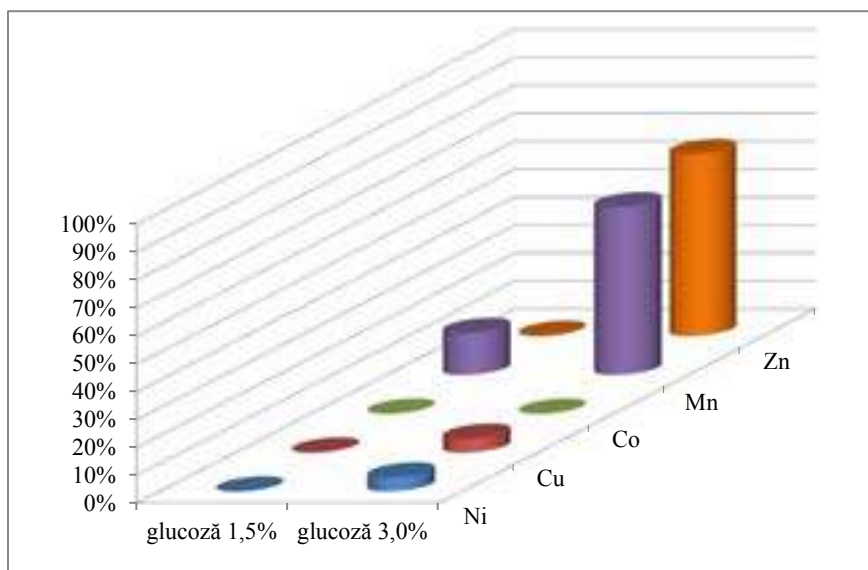


Figura 65. Influența variației concentrației de glucoză din mediul de cultură asupra activității antimicrobiene a sărurilor metalelor bivalente tranziționale (%), la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.5.1.7. Influența concentrației NaCl din mediul de cultură

Sensibilitatea microbiană față de sărurile metalelor bivalente tranziționale a fost puternic influențată de variațiile salinității mediului de cultură. Concentrațiile joase de NaCl (0% și 0,5%) precum și concentrația de 5% NaCl au indus același profil de sensibilitate (de exemplu sensibilitate față de Mn și Zn). La concentrațiile NaCl de 3%, 4%, 6%, 7%, au fost prezente modele de sensibilitate la 3 și chiar 4 markeri, cum ar fi săruri ale metalelor Zn, Mn și Cu sau Zn, Mn și Ni sau Zn, Mn, Ni și Cu. La concentrația cea mai înaltă de 10% NaCl s-au manifestat niveluri scăzute de sensibilitate la toate sărurile metalelor bivalente tranziționale testate (fig. 66).

Zn a avut acțiune bactericidă la concentrațiile de NaCl 3% și 4% din mediul de cultură (fig. 66).

Singura concentrație de NaCl în care Mn a avut acțiune bactericidă a fost cea de 3% (fig. 66).

Zn și Mn au manifestat acțiune antimicrobiană în prezența tuturor concentrațiilor de NaCl testate (fig. 66).

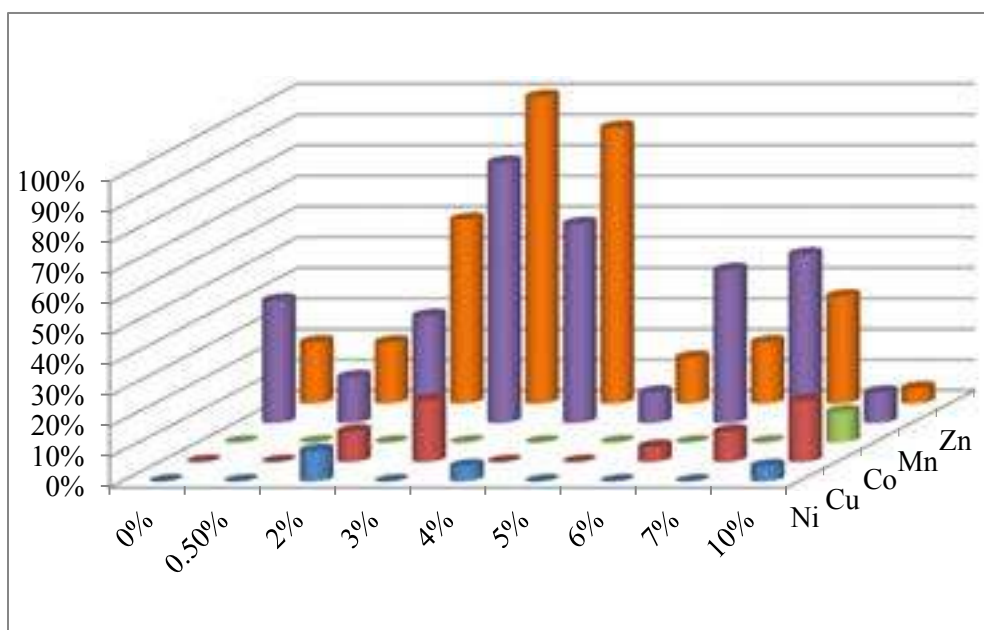


Figura 66. Influența variației concentrației de NaCl din mediul de cultură asupra activității antimicrobiene a sărurilor metalelor bivalente tranziționale (%), la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.5.2. INFLUENȚA FACTORILOR FIZICI ȘI CHIMICI ASUPRA CAPACITĂȚII DE ADERENȚĂ BACTERIANĂ LA UN SUBSTRAT CELULAR A TULPINILOR DE *Escherichia coli* IZOLATE DIN APA DE MARE

4.5.2.1. Influența consistenței mediului de cultivare

Creșterea bacteriilor în medii lichide a determinat aderența acestora pe substratul celular, reprezentat de celule HeLa, fapt ce arată că dezvoltarea bacteriilor în mediu lichid favorizează inițierea unui proces infecțios (fig. 67).

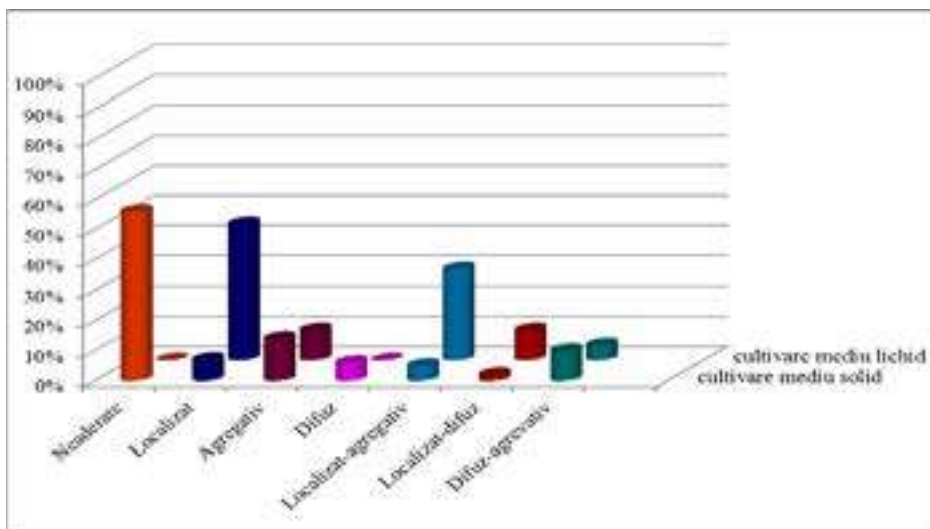


Figura 67. Influența consistenței mediului de cultură asupra capacității de aderență bacteriană la substratul celular HeLa (%), a tulpinilor de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.5.2.2. Influența temperaturii, în condiții de aerobioză

După cum se poate observa și în figura 68, capacitatea maximă de aderență bacteriană la substratul celular HeLa s-a exprimat la temperatura de 37°C. Indiferent de temperatura de incubare, cel mai frecvent *pattern* de aderență exprimat a fost cel localizat.

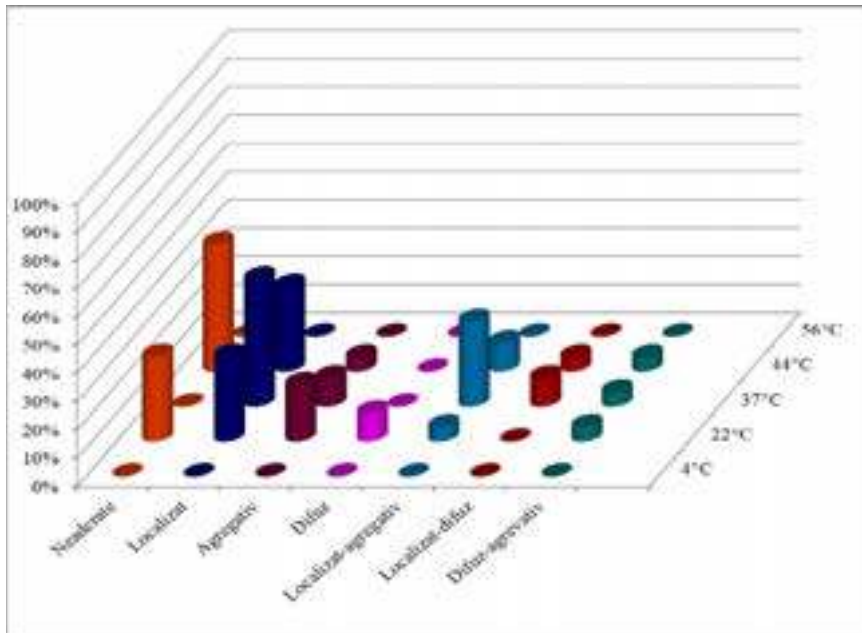


Figura 68. Influența temperaturii asupra capacității de aderență bacteriană la substratul celular HeLa (%), în condiții de aerobioză, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.5.2.3. Rezultatele studiului influenței temperaturii, în condiții de anaerobioză, asupra capacității de aderență bacteriană la un substrat celular

Așa cum se poate observa din figura 69, capacitatea de aderență bacteriană la substratul celular HeLa, în condiții de anaerobioză, cel mai bine s-a exprimat tot la temperatura de 37°C. Indiferent de temperatura de incubare, cel mai frecvent *pattern* de aderență exprimat a fost cel localizat.

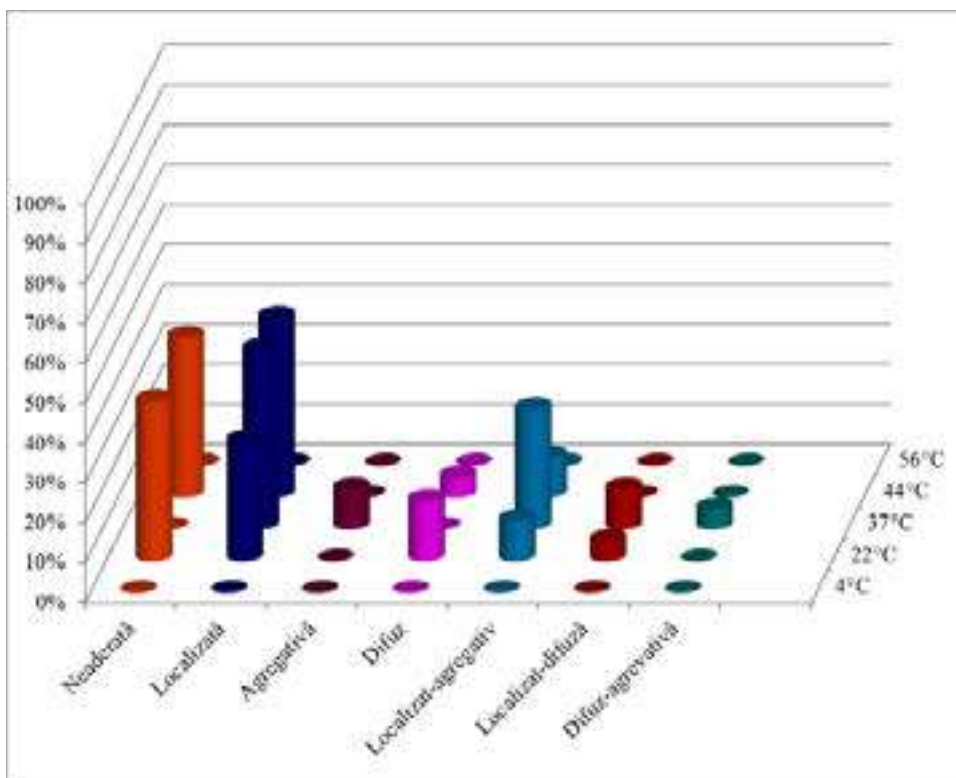


Figura 69.
Influența temperaturii asupra capacității de aderență bacteriană la substratul celular HeLa (%), a tulpinilor de *E. coli* izolate din apa de mare, în condiții de anaerobioză.

4.5.2.4. Influența prezenței/absenței O₂

Cultivarea bacteriilor în condiții de aerobioză și anaerobioză a arătat că prezența/absența O₂ nu influențează capacitatea de aderență a bacteriilor la substratul celular HeLa, atunci când tulpinile sunt cultivate la 37°C (fig. 70).

Este de remarcat faptul că, la 22°C, absența O₂ a indus o scădere a capacității de aderență bacteriană la substratul celular HeLa, iar *pattern*-ul agregativ nu s-a exprimat (fig. 70).

Cultivarea bacteriilor la temperatura de 44°C în condiții de anaerobioză a indus o ușoară scădere a capacității de aderență bacteriană la substratul celular HeLa, punându-se în evidență *pattern*-urile de aderență: localizat, difuz și localizat-agregativ (fig. 70).

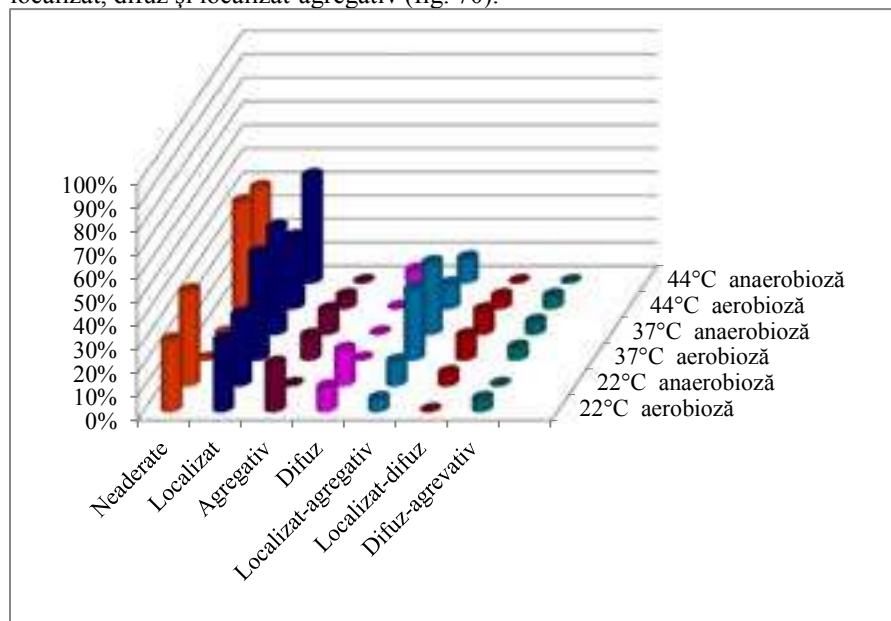


Figura 70. Influența prezenței/absenței O₂ asupra capacității de aderență bacteriană la substratul celular HeLa (%) la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.5.2.5. Influența variației de pH a mediului de cultură

După cum se poate observa în figura 71, singura condiție de cultivare a bacteriilor care reduce cu doar 15% capacitatea de aderență bacteriană la substratul celular HeLa este nivelul acid de pH a mediului de cultură.

Atât la pH acid, cât și la pH alcalin s-au exprimat toate *pattern*-urile de aderență.

Menținerea capacității de aderență la celulele HeLa și în condițiile unui pH alcalin evidențiază capacitatea tulpinilor de *E. coli* izolate din apa de mare de a iniția un proces infecțios, atât în condiții de pH fiziologic, cât și alcalin.

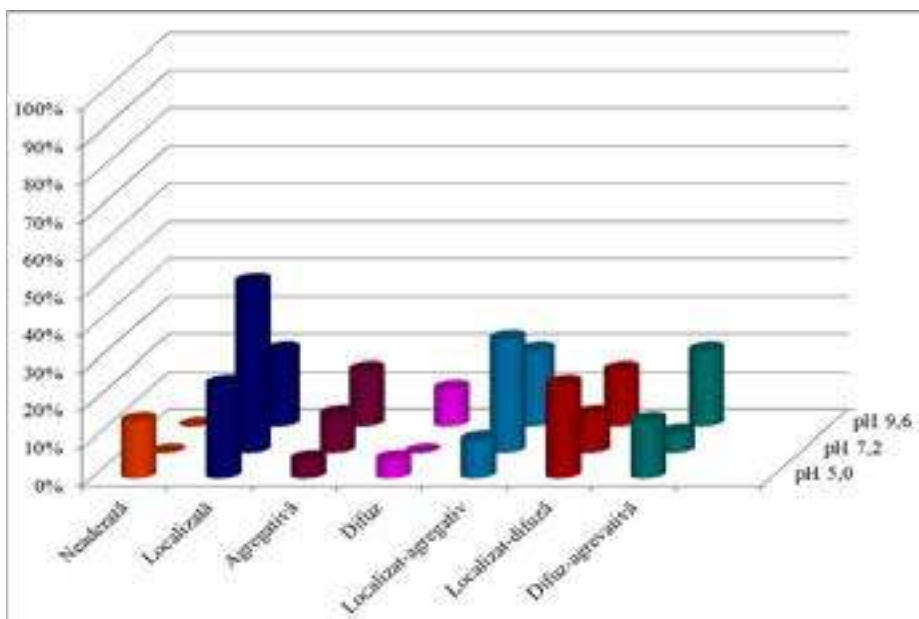


Figura 71. Influența variației de pH a mediului de cultură asupra capacității de aderență bacteriană la substratul celular HeLa (%), a tulpinilor de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.5.2.6. Influența concentrație de glucoză din mediul de cultură

Acest studiu a relevat faptul că, concentrația de glucoză din mediul de cultură nu are influențe semnificative asupra capacității de aderență bacteriană la substratul celular HeLa. *Pattern*-uri care nu s-au exprimat, la niciuna din cele două concentrații de glucoză, au fost cel agregativ și cel difuz-agregativ (fig. 72).

Concentrația scăzută de glucoză din mediul de cultură (1,5%) favorizează aderența bacteriană localizată la substratul celular HeLa (fig. 72).

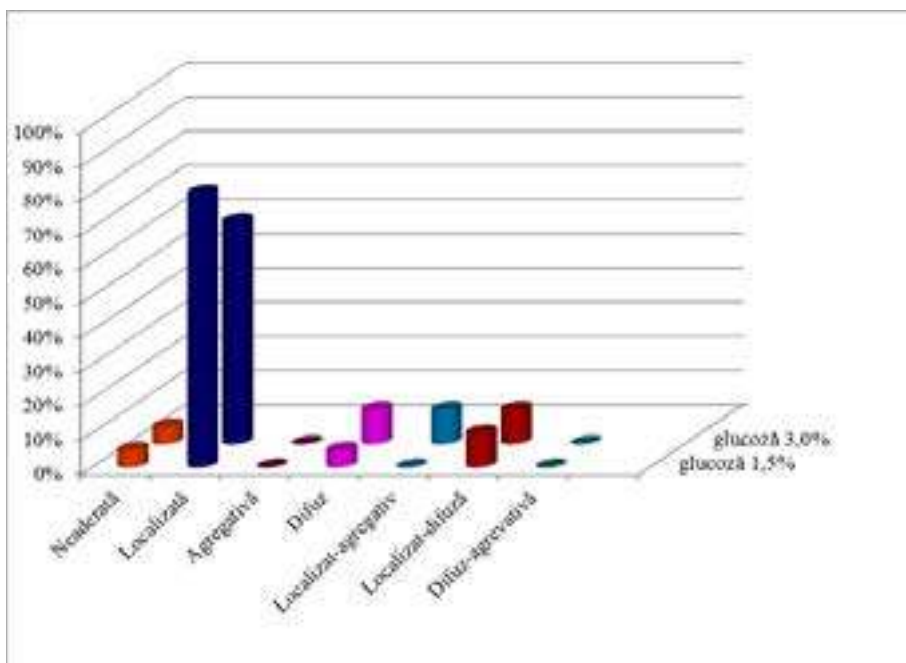


Figura 72. Influența concentrației de glucoză din mediul de cultură asupra capacității de aderență bacteriană la substratul celular HeLa (%), a tulpinilor de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.5.2.7. Influența concentrație NaCl din mediu de cultură

După cum relevă acest studiu, singura concentrație de NaCl care nu a influențat capacitatea de aderență bacteriană la substratul celular HeLa este cea de 0,5%, spre deosebire de concentrațiile de 4% și 5% care au influențat ușor capacitatea de aderență la substratul celular, iar concentrațiile de 2%, 6%, 7% și 10% au influențat major acest fenomen. Cel mai frecvent *pattern* exprimat a fost cel localizat, indiferent de concentrația de NaCl din mediul de cultură. Concentrațiile de NaCl care au permis expresia celor mai multe *pattern*-uri de aderență au fost cele de 0.5% și 5% cu 4 *pattern*-uri de aderență, concentrațiile de 0%, 3%, 4%, 6% NaCl cu 3

pattern-uri de aderență, concentrațiile de 2% și 10% NaCl cu 2 *pattern*-uri de aderență, iar singura concentrație de NaCl care a indus apariția unui singur *pattern* de aderență a fost cea de 7%. Singura concentrație de sare în care *pattern*-ul difuz s-a exprimat a fost cea de 3%. De asemenea, singura concentrație de sare în care *pattern*-ul difuz-agregativ s-a exprimat a fost cea de 0.5% (fig. 73).

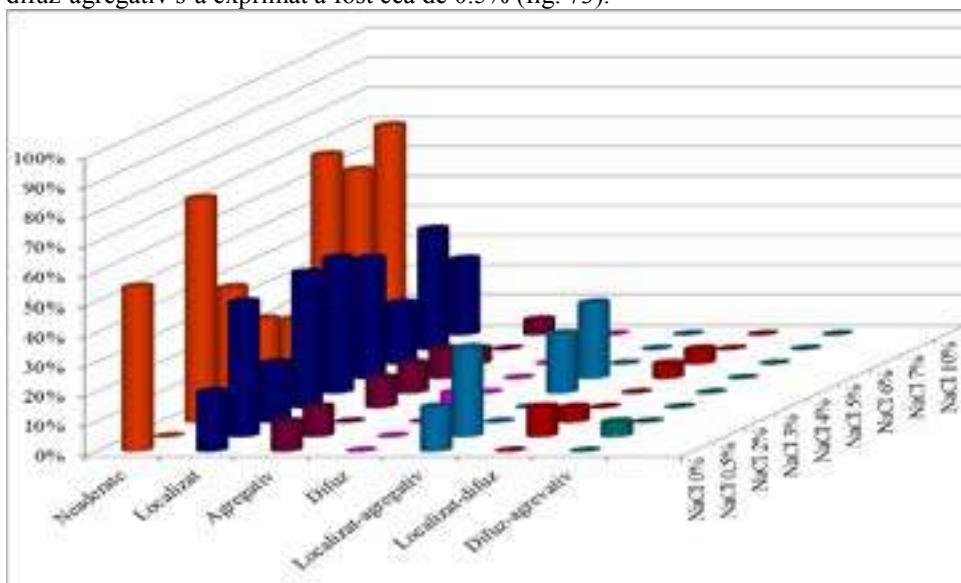


Figura 73.
Influența concentrației de NaCl din mediul de cultură asupra capacității de aderență bacteriană la substratul celular HeLa (%) a tulpinilor de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.5.3. INFLUENȚA FACTORILOR FIZICI ȘI CHIMICI ASUPRA EXPRESIEI FACTORILOR DE VIRULENȚĂ SOLUBILI, LA TULPINILE DE *escherichia coli* IZOLATE DIN APA DE MARE

4.5.3.1. Influența consistenței mediului de cultură

După cum se poate observa în figurile 74 și 75, din cei 10 factori de virulență solubili testați la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare, 8 dintre aceștia s-au exprimat cu niveluri ridicate, cel mai înalt nivel de expresie fiind observat pentru amilază, atunci când pentru obținerea culturilor primare s-a folosit mediul lichid.

Aceste rezultate demonstrează că atât capacitatea de invazie, cât și toxigeneza, la tulpinile de *E. coli* marine, sunt mult mai bine exprimate atunci când bacteriile se dezvoltă într-un mediu lichid.

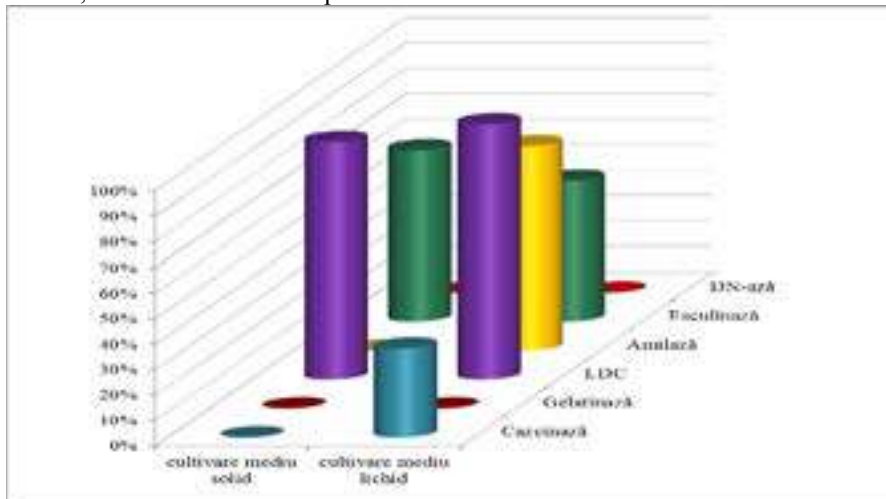


Figura 74. Influența consistenței mediului de cultură asupra nivelului expresiei fenotipice (%) a enzimelor implicate în procesul de invazie și supraviețuire, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare, în condiții de aerobioză.

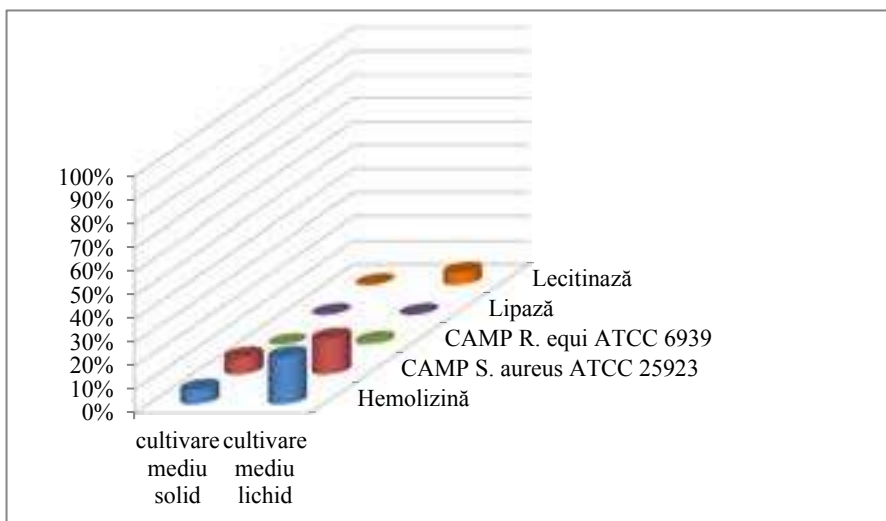


Figura 75. Influența consistenței mediului de cultură asupra nivelului expresiei fenotipice (%) a toxinelor formatoare de pori, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare, în condiții de anaerobioză.

4.5.3.2. Influența temperaturii, în condiții de aerobioză

În ceea ce privește temperatura de incubare, cel mai larg spectru al expresiei factorilor de virulență s-a observat la 37°C, la tulpinile incubate în condiții anaerobe (fig. 76, 77). Aceste rezultate ar putea explica patogenitatea tulpinilor de *E. coli* implicate în infecțiile intra-abdominale.

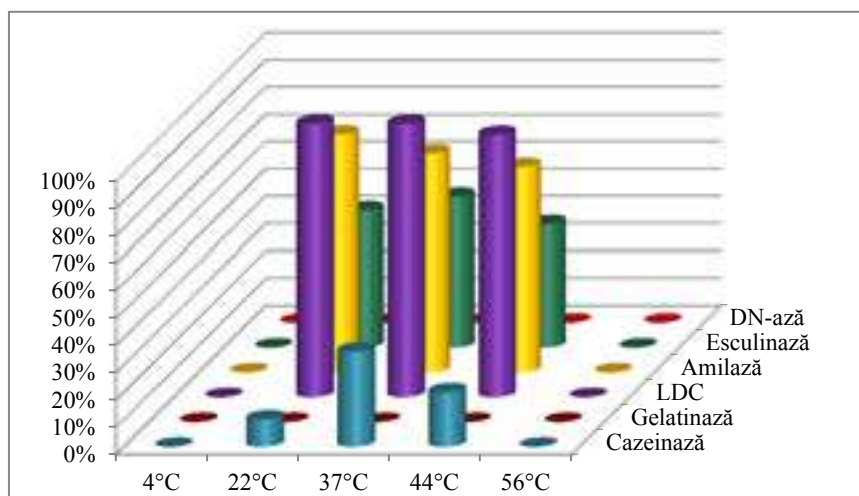


Figura 76. Influența temperaturii în condiții de aerobioză asupra nivelului expresiei fenotipice (%) a enzimelor implicate în procesul de invazie și supraviețuire, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

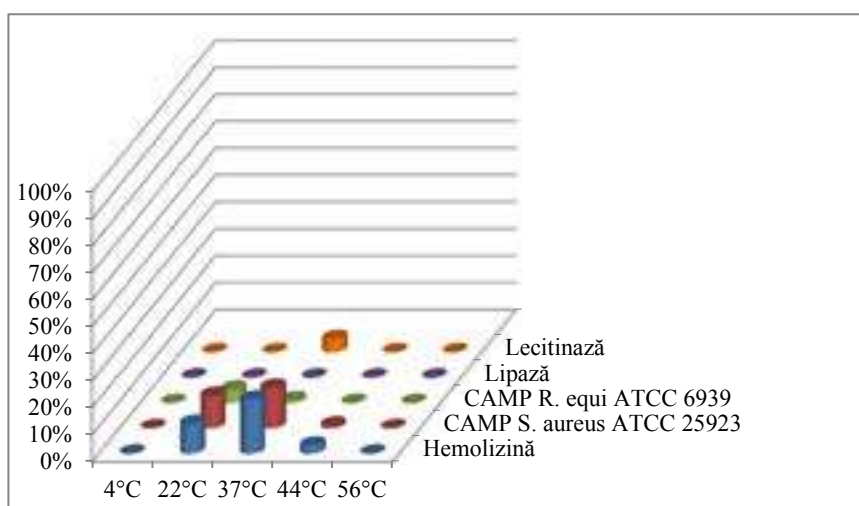


Figura 77. Influența temperaturii în condiții de aerobioză asupra nivelului expresiei fenotipice (%) a toxinelor formatoare de pori, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.5.3.3. Influența temperaturii, în condiții de anaerobioză

Și în condiții de anaerobioză, tot temperatura de 37°C a permis expresia celor mai mulți factori de virulență solubili, atât în cazul enzimelor implicate în procesul de invazie și supraviețuire, cât și în cazul celor formatoare de pori (fig. 78 și 79).

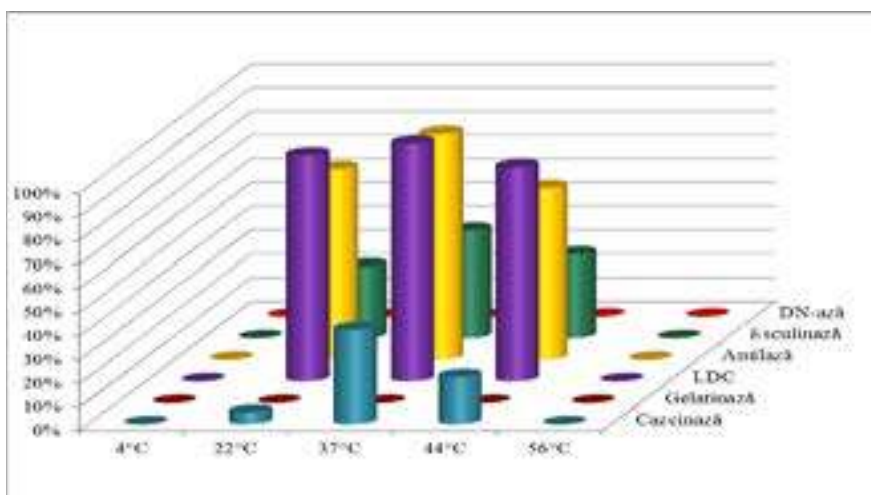


Figura 78. Influența temperaturii asupra nivelului expresiei fenotipice (%) a enzimelor implicate în procesul de invazie și supraviețuire, în condiții de anaerobioză, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

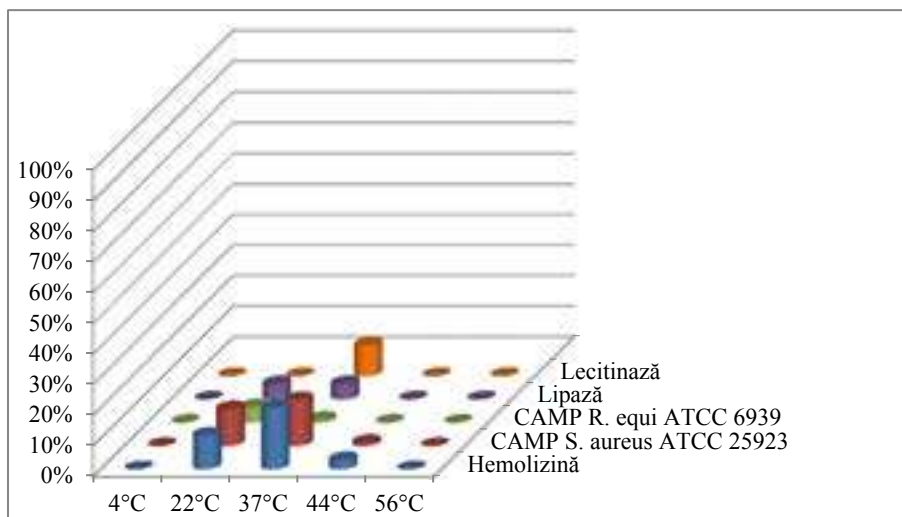


Figura 79. Influența temperaturii asupra nivelului expresiei fenotipice (%) a toxinelor formatoare de pori, în condiții de anaerobioză, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.5.3.4. Influența prezenței/absenței O₂

Expresia enzimelor implicate în procesul de invazie și supraviețuire este ușor inhibată în condiții de anaerobioză, indiferent de temperatura de incubare (fig. 80, 81).

4.5.3.5. Influența variației de pH a mediului de cultură

Lecitinaza a fost ușor exprimată doar la pH fiziologic (7,2), aceasta fiind și valoarea de pH la care s-au exprimat cei mai mulți factori de virulență solubili. Expresia cazeinazei și amilazei este favorizată de pH acid. Lizindecaboxilaza a fost singura enzimă asupra căreia variația de pH a mediului de cultură nu a produs modificări, exprimându-se în procent de 100% în toate variațiile de pH (fig. 82, 83). Variația de pH nu a influențat semnificativ expresia factorilor de virulență, care au prezentat un profil asemănător, cu o remarcabilă creștere a potențialului proteolitic, evidențiat prin nivelul ridicat al cazeinazei la pH 5 (fig. 82, 83).

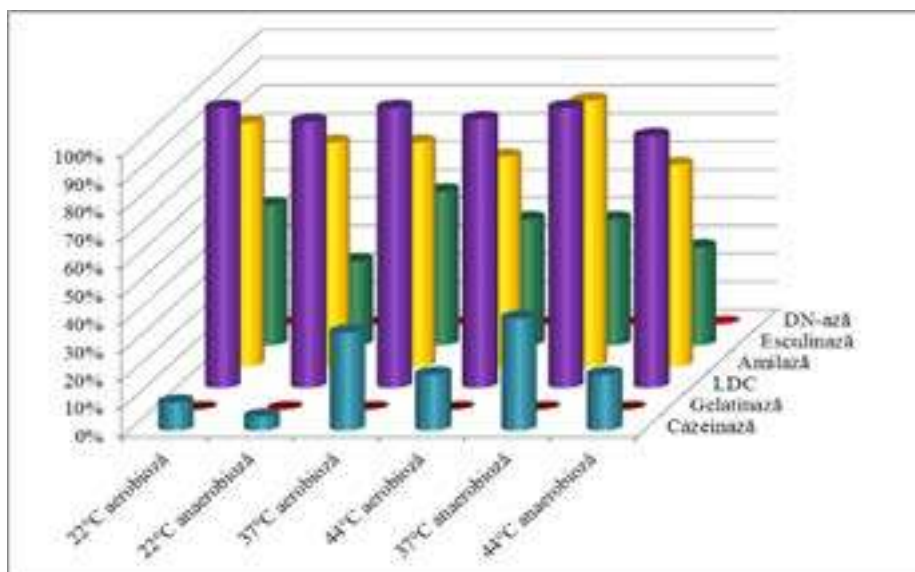


Figura 80. Influența prezenței/absenței O₂ asupra nivelului expresiei fenotipice (%) a enzimelor implicate în procesul de invazie și supraviețuire, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

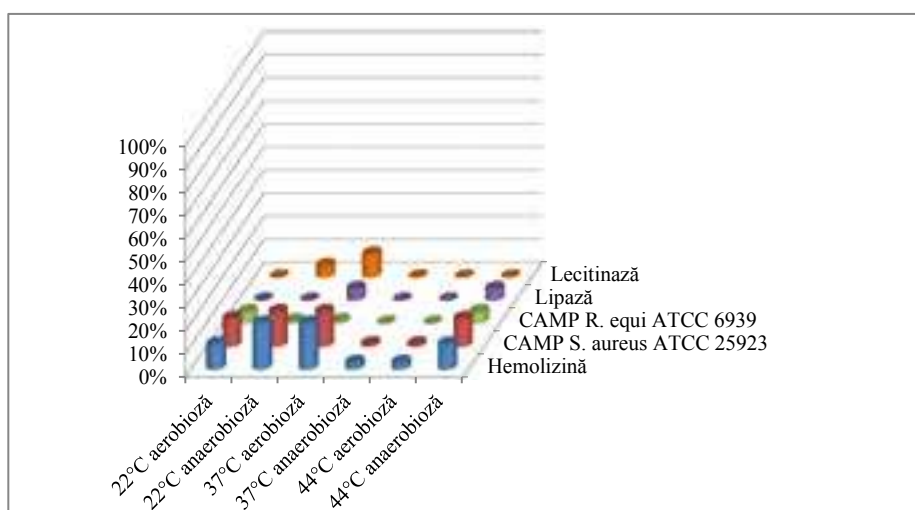


Figura 81. Influența prezenței/absenței O₂ asupra nivelului expresiei fenotipice (%) a toxinelor formatoare de pori, în condiții de anaerobioză, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

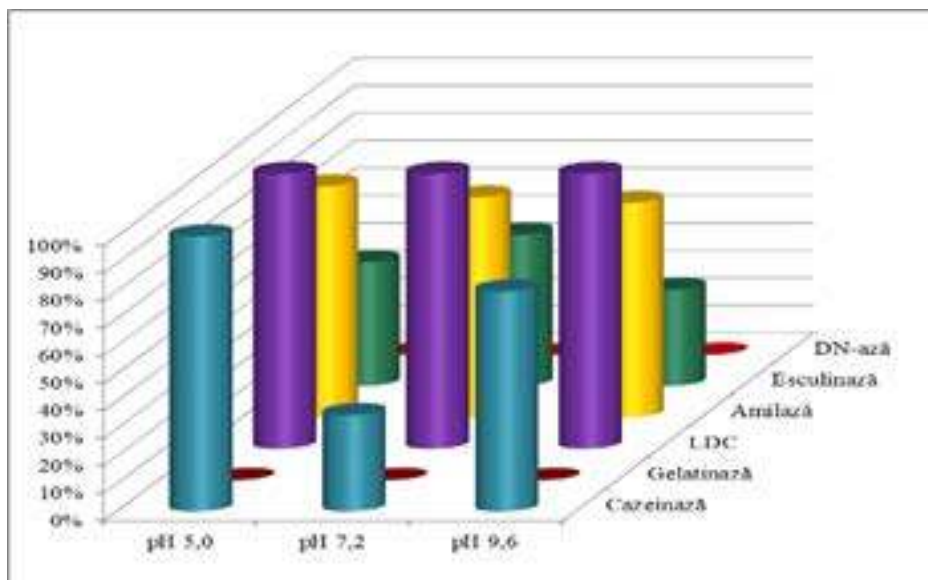


Figura 82. Influența variației de pH asupra nivelului expresiei fenotipice (%) a enzimelor implicate în procesul de invazie și supraviețuire, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

4.5.3.6. Influența concentrației de glucoză din mediul de cultură

În urma acestui studiu s-a observat că factorii de virulență solubili s-au exprimat mai bine la concentrații mai mici de glucoză (1,5%) (fig. 84 și 85).

Concentrația mai ridicată de glucoză (3%) din mediul de cultură a inhibat ușor expresia lizindecarboxilazei, amilazei (fig. 84), hemolizinei și a factorului CAMP cu *S. aureus* ATCC 25923 (fig. 85). Această concentrație de glucoză din mediul de cultură a indus influențe majore în expresia esculinazei (fig. 86) și cazeinazei (fig. 84).

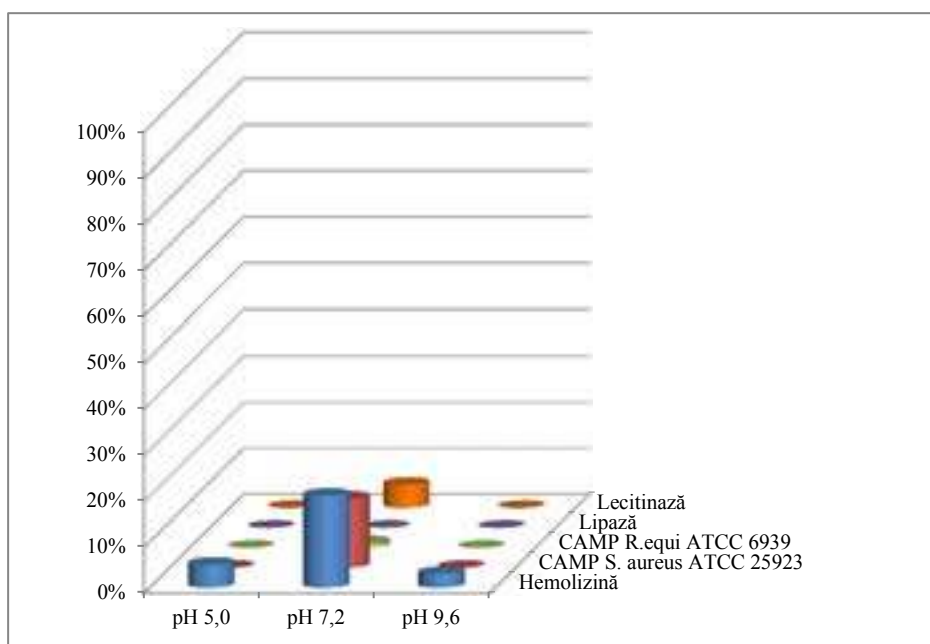


Figura 83. Influența variației de pH asupra nivelului expresiei fenotipice (%) a toxinelor formatoare de pori, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

Concentrația de glucoză de 1,5% a stimulat producerea de esculinază (fig. 86), ceea ce demonstrează faptul că la concentrație redusă de glucoză, bacteriile sintetizează enzime implicate în metabolizarea altor surse de C, cum este cazul esculinei, un heterozid complex, relevând potențialul acestor tulpini de a iniția un proces infecțios.

4.5.3.7. Influența concentrației NaCl

Variațiile concentrației NaCl din mediul de cultură au inhibat, în general, expresia factorilor de virulență solubili, cel mai mare procent al factorilor de virulență solubili exprimându-se la concentrațiile de NaCl de 6%, 2% urmat de 0,5% (fig. 87, 88).

Concentrația NaCl din mediul de cultură a influențat în mod semnificativ expresia esculinazei (fig. 89) și cazeinazei (fig. 87).

La concentrații ridicate de NaCl în mediul de cultură s-a observat o creștere a potențialului de virulență, cu un maxim atins la NaCl 6%, fapt ce demonstrează că osmolaritatea ridicată accentuează potențialul acestor tulpini de a iniția un proces infecțios.

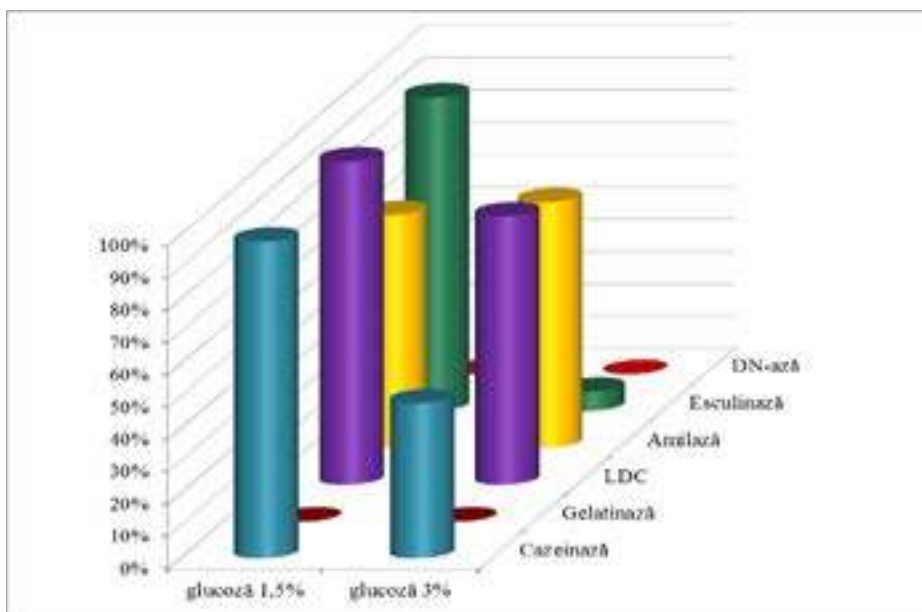


Figura 84. Influența concentrației de glucoză din mediul de cultură asupra nivelului expresiei fenotipice (%) a enzimelor implicate în procesul de invazie și supraviețuire, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

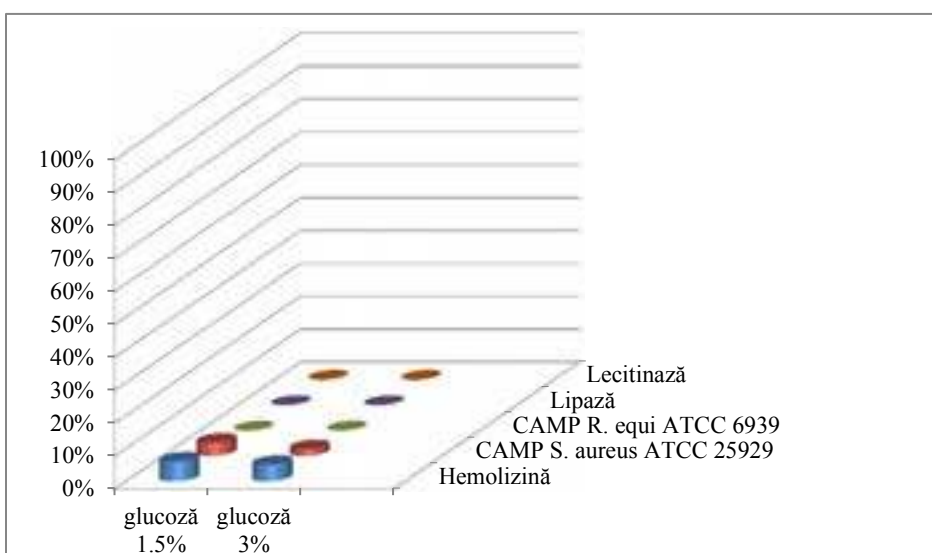
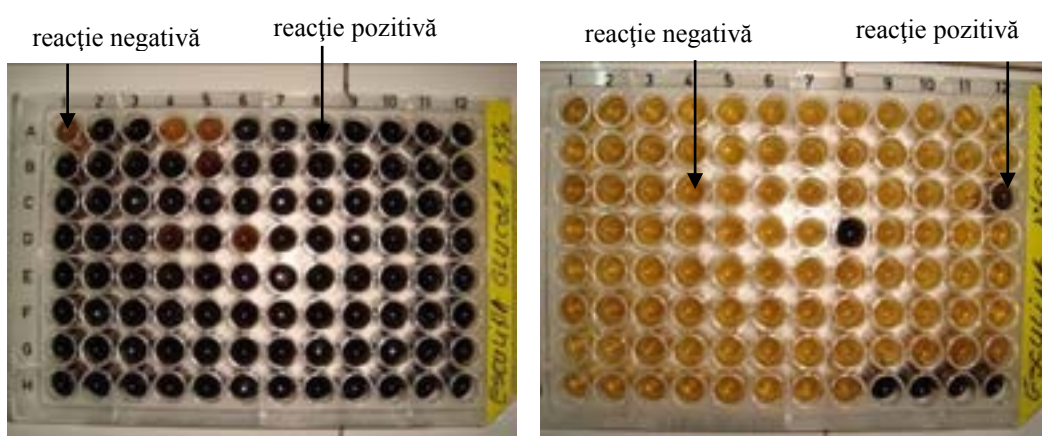


Figura 85. Influența concentrației de glucoză din mediul de cultură asupra nivelului expresiei fenotipice (%) a toxinelor formatoare de pori, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.



a. expresia esculinazei în prezența concentrației de 1,5% a glucozei în mediul de cultură.

b. expresia esculinazei în prezența concentrației de 3% a glucozei în mediul de

Figura 86. Influența concentrației de glucoză din mediul de cultură asupra expresiei esculinazei, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare (a și b).

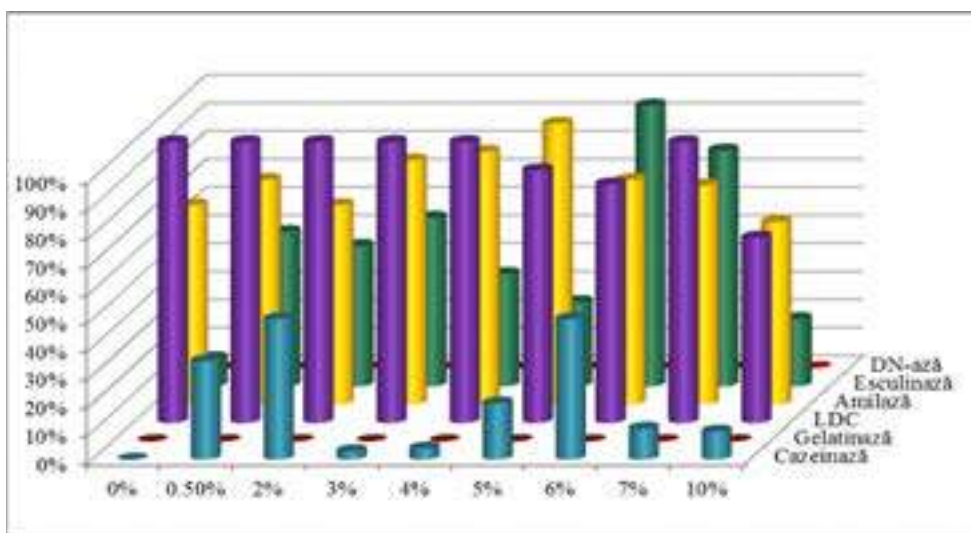


Figura 87. Influența concentrației NaCl din mediul de cultură asupra nivelului expresiei fenotipice (%) a enzimelor implicate în procesul de invazie și supraviețuire, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

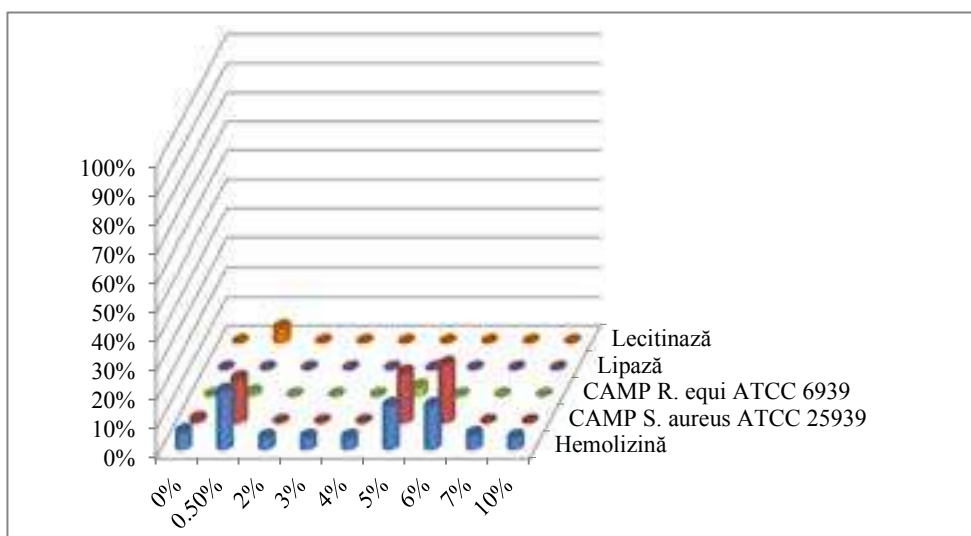


Figura 88. Influența concentrației NaCl din mediul de cultură asupra nivelului expresiei fenotipice (%) a toxinelor formatoare de pori, la tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare.

Din cei 10 factori de virulență solubili analizați doar amilaza, esculinaza, cazeinaza, lizindecarboxilaza și hemolizinele s-au exprimat la toate concentrațiile de NaCl utilizate, prezentând intensități diferite ale expresiei.

Factorii de virulență solubili cu expresia cea mai constantă în diferite condiții de mediu au fost: amilaza, esculinaza, cazeinaza, lizindecarboxilaza și hemolizinele.

O foarte slabă expresie s-a putut observa pentru lecitinază și factorul CAMP, atât pentru *S. aureus* ATCC 25923, cât și pentru *R. equi* ATCC 6939, indiferent de condițiile de incubare.

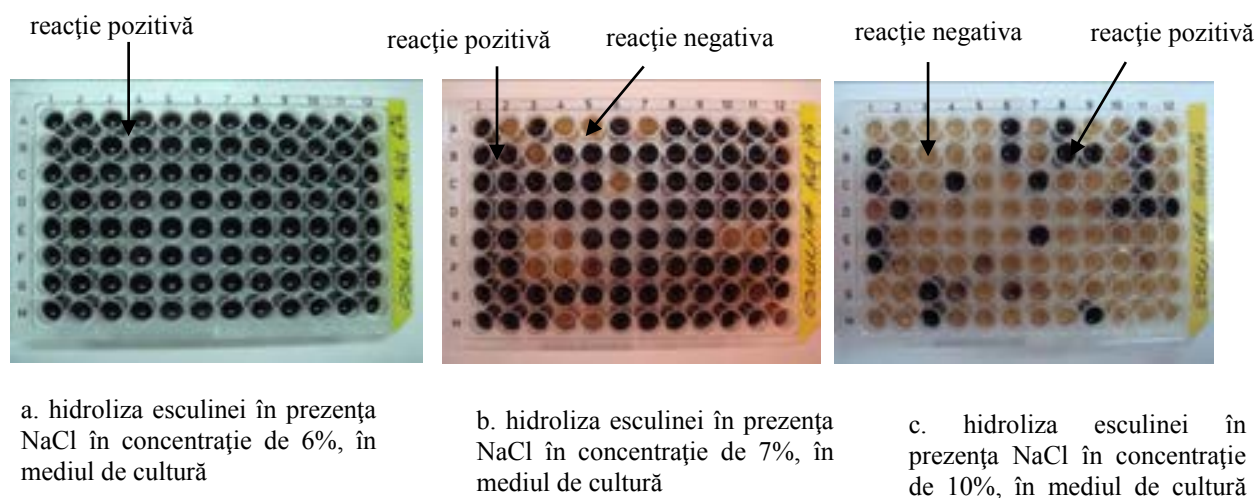


Figura 89. Influența concentrației NaCl din mediul de cultură asupra hidrolizei esculinei (a, b și c)

CONCLUZII

Din analiza datelor obținute în urma acestui complex studiu biochimic al tulpinilor de *Escherichia coli* izolate din apa de mare, dar cu potențiale implicații în patologia umană, putem formula următoarele concluzii:

1. Tulpinile de *E. coli* izolate din apa de mare au prezentat profiluri de rezistență și multirezistență, corelate cu prezența unor plasmide de diferite greutate moleculare.
2. Mecanismele de rezistență concomitentă la diferite clase de antibiotice ar putea fi mediate de prezența unor pompe de eflux nespecifice necesare adaptării și supraviețuirii la condiții de hipersalinitate.
3. Singurele gene de rezistență la antibiotice puse în evidență au fost *sul1* și *sul2*, care codifică pentru rezistența la biseptol.
4. Profilurile de sensibilitate ale tulpinilor de *Escherichia coli* izolate din apa de mare la metale bivalente tranziționale (Ni, Co, Cu, Mn și Zn) au variat în funcție de condiții experimentale (temperatură de cultivare, prezență/absență O₂, pH și concentrații de glucoză și NaCl în mediul de cultură), cea mai înaltă activitate antimicrobiană fiind manifestată de sărurile de Zn și Mn.
5. Cele mai înalte niveluri de sensibilitate s-au înregistrat la temperatura de 44°C, pH alcalin, concentrații mari de glucoză și salinitate medie, iar cele mai mici niveluri la temperatura de 37°C, pH neutru, concentrații mici de glucoză și salinitate scăzută.
6. Sarea de Zn au avut efect bactericid la temperaturile de 44°C și 22°C în condiții de aerobioză, la concentrațiile de 3% și 4% NaCl în mediul de cultură, și cea de Mn la concentrații NaCl de 3% în mediu.
7. Sarea de Ni a manifestat acțiune antimicrobiană în condiții de pH bazic (9,6) și la concentrații de NaCl de 2%, 4% și 10%, iar cea de Co la 22°C și 44°C atât în aerobioză cât și în anaerobioză și la concentrația de 10% NaCl în mediul de cultură.
8. Nivelurile ridicate de pozitivitate ale ratelor de aderență la suprafețe abiotice și biotice evidențiate la tulpinile de *Escherichia coli* izolate din apa de mare pledează pentru potențialul acestora de a coloniza suprafețe mucoase umane ori dispozitive protetice implantate, fiind astfel capabile să inițieze și să dezvolte un proces infecțios susținut de secreția enzimelor solubile implicate în virulență.
9. Capacitatea de aderență la un substrat celular reprezentat de celulele HeLa a fost influențată semnificativ de variația concentrației de NaCl din mediul de cultură.
10. *Pattern*-ul de aderență la substratul celular cel mai frecvent exprimat a fost cel localizat.
11. Capacitatea maximă de aderență la un substrat celular de 100% a fost evidențiată după cultivarea bacteriilor într-un mediu de cultură lichid cu pH bazic de 9,6 și în condiții fiziologice (pH 7,2 la 37°C, aerobioză).
12. Exprimarea unor *pattern*-uri de aderență variate a fost evidențiată la bacteriile cultivate în mediu de cultură cu pH acid de 5,0 și pH bazic de 9,6.
13. În ceea ce privește factorii de virulență solubili, expresia cea mai constantă în diferite condiții experimentale a fost obținută pentru lizindecarboxilază, amilază și hemolizină, iar variațiile cele mai mari pentru producerea de esculet (chelator de Fe) și cazeinază.
14. Cea mai ridicată expresie a factorilor de virulență s-a înregistrat la temperatura de 37°C, pH 7,2, la concentrație NaCl de 0.5% și glucoză de 1.5%.
15. Creșterea în condiții aerobe/anaerobe nu a influențat sensibilitatea la diferite săruri de metale bivalente tranziționale și nici expresia factorilor de virulență.
16. Enzimele implicate în procesul de invazie și supraviețuire s-au exprimat fenotipic cu frecvențe mai înalte decât toxinele formatoare de pori în toate condițiile experimentale.
17. Cultivarea pe medii lichide a favorizat, atât capacitatea de aderență la un substrat celular, cât și expresia enzimelor, atât a celor implicate în procesul de invazie și supraviețuire, cât și a toxinelor formatoare de pori.
18. Reacția PCR nu a evidențiat gene codificatoare de proteine implicate în aderență și în toxigenitate la patotipurile enterale clasice.
19. Prezența lipazei și DN-azei nu au putut fi evidențiate fenotipic în niciuna din condițiile experimentale utilizate, în schimb la tulpinile analizate au fost evidențiate genale pentru fosfolipază și helicază, ambele implicate în patogenitate (prin producerea de distrugerii masive de țesut, gangrene gazoase, infecții pulmonare și tegumentare, datorită destabilizării membranei celulei gazdă), capabile din punct de vedere teoretic a fi transferate între tulpini ale aceluiași gen și uneori chiar între specii și genuri diferite prin fenomenele de conjugare, transformare și transducție.
20. Studiul de față demonstrează că mediul marin reprezintă un sistem ecologic adecvat pentru existența și menținerea unui rezervor complex de antibiorezistență și de virulență, cu risc crescut de colonizare a organismelor în general și cu posibile implicații pentru sănătatea gazdei umane în special; condițiile fizico-chimice favorizante pentru inițierea unui proces infecțios cu origine exogenă fiind reprezentate de mediul lichid, hipersalin (NaCl 6%) temperatura de 37°C și pH acid (5,0).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Abskharon R.N., Hassan S.H., Gad El-Rab S.M., Shoreit A.A., Heavy metal resistant of *E. coli* isolated from wastewater sites in Assiut City, Egypt., Bull Environ Contam Toxicol., 81 (3), 309-915, (2008).
2. Agerso Y., Sandvang D., Class 1 Integrans and Tetracycline Resistance Genes in *Aalcaligenes*, *Aarthrobacter*, and *Pseudomonas spp.* Isolated from Pigsties and Mmanured Soil., Appl. Envirom. Microbiol., 71(12), 7941-7947, (2005).
3. Alouache S., Kada M., Messai Y., Estepa V., Torres C., Bakour R., Antibiotic Resistance and Extended-Spectrum β -Lactamases in Isolated Bacteria from Seawater of Algiers Beaches (Algeria)., Microbes Environ., (2011).
4. Alzieu C., Dragages et Environnement marin, état des connaissances, Edition IFREMER, (1999).
5. Andreumont A., Infections sur materiel d'infusion parenterale prolongee., Medicine et maladies infectieuses, 17, 323-325, (1987).
6. Andreumont A., Ecosisteme intestinal et antibiotherapie., La Lettre de l'Infectiologue, 5, 100-103, (1990).
7. Angelescu M., Terapia cu antibiotice., Ed. Medicală București, (1998).
8. Antipa G., Biologia Mării Negre., Editura Imprimeria Națională București (1941).
9. Aonofriesei F., Microbiologia mediului, "Ovidius" University Press Constanta, (2008).
10. Aoki T., The structure of the chloramphenicol resistance gene on a transferable R plasmid from the fish pathogen *Pasteurella piscicida*., Microbiol Immunol. 37 (9), 705-712, (1993).
11. Aslani M.M., Alikhani M.Y., Zavari A., Yousefi R., Zamani A.R., Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) isolates and their antibiotic resistance pattern., Int J Infect Dis.;15 (2), 136-139, (2011).
12. Avelino F., Saldaña Z., Islam S., Monteiro-Neto V., Dall'Agnol M., Eslava C.A., Girón J.A., The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* strains produce the *E. coli* common pilus when adhering to cultured epithelial cells., Int J Med Microbiol., 300 (7), 440-448, (2010).
13. Balotescu C.M., Parazitismul și statutul imunitar al gazdei. Paraziți oportuniști, Universitatea București, Facultatea de Biologie, (2004).
14. Barras F., Fontecave M., Cobalt stress in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: molecular bases for toxicity and resistance., Metallomics; 3 (11), 1130-1134, (2011).
15. Bărzoi D., Microbiologia produselor alimentare de origine animală, Ed. Ceres București, (1985).
16. Bîlbîe V., Pozsgî N., Bacteriologie medicală vol. I, II., Editura Medicală București, (1984).
17. Blot F., Nitenberg G., Chachaty E., Raynard B., Germann N., Antoun S., Laplanche A., Brun-Buisson C., Tancrede C., Diagnosis of catheter-related bacteraemia: a prospective comparison of the time to positivity of hub-blood versus peripheral-blood cultures, The Lancet, 354, 1071-1077, (1999).
18. Boisen N., Struve C., Scheutz F., Krogfelt K.A., Nataro J.P., New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afu/Dr/AAF family., Infect Immun., 76 (7), 3281-3292, (2008).
19. Bologa A.S., Bodeanu N., Petranu A., Țigănuș V., Zaitsev Y.P., Major modifications of the Black Sea benthic and planktonic biota in the last three decades., Les mers tributaires de Méditerranée, F. Briand (éd.), Bull. Inst. océanogr., Monaco, num. spec. 15, CIESM Scien., 1, 85-110, (1995).
20. Brooks G., Carroll K.C., Butel J., Morse S., Jawetz Melnick & Adelberg Medical Microbiology, 24th Edition, Mc Graw Hill – Lange International Edition, (2007).
21. Brown M.R.W., Gilbert P., Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents, J. Appl. Bacteriol., 74, 87S-97S, (1993).
22. Bryan G., A guide to the assessment of heavy metal contamination in estuaries using biological indicators., Marine Biological Association of the United Kingdom, 4, 91-110, (1985).
23. Buiuc D., Neguț M., Tratat de microbiologie medicală, Editura Medicală, (1999)
24. Buiuc D., Neguț M., Tratat de microbiologie medicală, Editura Medicală, (2008).
25. Burke M.M., Dubrey S.W., Khaghani A., Hawkins P.N., Yacoub M.H., Banner N.R., Long term results of heart transplantation in patients with amyloid heart disease. Heart, 85 (2), 202-207, (2001).
26. Burrows M.R., Sellwood R., Gibbons R.A., Haemagglutinating and Adhesive Properties Associated with the K99 Antigen of Bovine Strains of *Escherichia coli*., Journal of General Microbiology, 96, 269-275, (1976).
27. Burton R.W.G., Engelkirk G.P., Using antimicrobial agents to control microbial growth *in vivo*., Microbiology for the Health Sciences, 7th Edition., 226-248, (2002).
28. Bush K., Jacoby G.A., Medeiros A.A., A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure., Antimicrobial Agents Chemo-therapy, 39, 1211- 1233 (1995).
29. Byappanahalli M., Fowler M., Shively D., Whitman R., Ubiquity and persistence of *Escherichia coli* in a Midwestern coastal stream., Appl. Environ. Microbiol., 69, 4549-4555, (2003).
30. Caldwell D.E., Korber D. R., Lawrence J.R., Analysis of biofilm formation using 2D vs 3D digital imaging., J. Appl. Bacteriol., 74, 52S-66S, (1993).
31. Campbell R., Microbial ecology vol. V, Basic Microbiology, Wilkinson J. F. ed., Blackwell Sci. Publ., Oxford, (1977).

32. Cardonha A.M., Vieira R.H., Peirano G., Rodrigues Ddos P. Resistance to antibiotics and heavy metals from *Escherichia coli* isolated from sea water and pluvial galleries., Acta Cir Bras., 20 (1), 253-256, (2005).
33. Carneiro L.A., Lins M.C., Garcia F.R., Silva A.P., Mauller P.M., Alves G.B., Rosa A.C., Andrade J.R., Freitas-Almeida A.C., Queiroz M.L., Phenotypic and genotypic characterisation of *Escherichia coli* strains serogrouped as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from pasteurised milk., Int J Food Microbiol., 108 (1), 15-21, (2006).
34. Carpentier B., Les Biofilms dans l'industrie agro-alimentaire, Bull. Soc. Fr. Microbiol., 14 (2), 105-111, (1999).
35. Castonguay M.H., Van der Schaaf S., Koester W., Krooneman J., Van der Meer W., Harmsen H., Landini P., Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria., Res Microbiol., 157 (5), 471-478, (2006)
36. Cernat R., Herlea V., Coipan E., Lazăr V., Cotar A., Plasmid profile and fingerprinting of some heavy-metal and multiple antibiotic resistant *E. coli* strains isolated from river water, Bul. Societ. Nat. de Biologie Celulara., 30, 285, (2002).
37. Chen, T.P., Li P. Y., Integrated agriculture-aquaculture studied in Taiwan., R.S.V. Pullin and Z.H. Shehadeh (eds.). Proc. ICLARM-SEARCA Conf. Integ. Agri-Aquaculture Farming System, Manilla, Phillipines., 239-241, (1980).
38. Chen P.L., Yan J.J., Wu C.J., Lee H.C., Chang C.M., Lee N.Y., Wang L.R., Shih H.I., Lee C.C., Ko W.C., Salvage therapy with tigecycline for recurrent infection caused by ertapenem - resistant ESBL - producing *Klebsiella pneumoniae*, Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases, 68, 312-314, (2010).
39. Chifiriuc M.C., Mihăescu G., Lazăr V., Microbiologie și virologie medicală, Ed. Univ. din București, (2011).
40. Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H., Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces., Infect Immun., 37 (1), 318-326, (1982).
41. Coburn B., Sekirov I., Finalay B.B., Type III Secretion System and Disease., Clin. Micr. Reviews., 20 (4), 535-549 (2007).
42. Cooke M. D., Antibiotic Resistance Among Coliform and Fecal Coliform Bacteria Isolated from Sewage, Seawater, and Marine Shellfish, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 9 (6), 879-884, (1976).
43. Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng G.K., How bacteria stick., Scient. Amer., 238, 86-95, (1978).
44. Costerton J.W., Lashen E.S., Influence of biofilm on efficacy of biocides on corrosion-causing bacteria., National Association of Corrosion Engineers, 8, 13-17, (1984).
45. Coulanges V., Andre P., Vidon D.J., Esculetin antagonizes iron-chelating agents and increases the virulence of *Listeria monocytogenes*. Res. Microbiol., 147, 667-685, (1996).
46. Cromwell G.L. Why and how antibiotics are used in swine production., Anim. Biotechnol., 13 (1), 7-27, (2002).
47. Croxen M., Finlay B.B., Molecular mechanism of *Escherichia coli* pathogenicity, Nature Reviews Microbiology, 8, (2009).
48. Davis M.J., Fastidious bacteria. Methods in Phytobacteriology. Z. Klement, K. Rudolph and D. Sands. Budapest, Hungary, Akademiai Kiado., 75-85, (1990).
49. Debeleac L., Popescu-Drânda M.C., Microbiologie, Editura Medicală AMALTEA, (2003).
50. Depledge M.H., Rainbow P.S., Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates, Comp. Biochem. Physiol. 97, 1-7, (1990).
51. Diaz M.A., Cooper R.K., Cloeckaert A., Siebeling R.J., Plasmid-mediated high level gentamicin resistance among enteric bacteria isolated from pet turtles in Louisiana., Appl. Environ. Microbiol., 72 (1), 306-312, (2006).
52. Dibner J.J., Richards J.D., Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action., Poultry Science, 84 (4), 634-643, (2005).
53. Donlan R.M., Costerton J.W., Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms., Clinical Microbiol. Rev., 15, 167-193, (2002).
54. Dulguer M.V., Fabbicotti S. H., Bando S.Y., Moreira-Filho C.A., Fagundes-Neto U., Scaletsky I.C., Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea., J Infect Dis., 188 (11), 1685-1694, (2003).
55. Falagas M.E., Karageorgopoulos D.E., Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms., Journal of Hospital Infection, 73, 345-354 (2009).
56. Falagas M.E., Kastoris A.C., Kapaskelis A.M., Karageorgopoulos D.E., Fosfomycin for the treatment of multidrug resistant, including ESBL producing, *Enterobacteriaceae* infections a systematic review., Lancet Infectious Diseases, 10, 43-50, (2010).
57. Falcao J.P., Falcao D.P., Gomes T.A., Ice as a vehicle for diarrheagenic *Escherichia coli*., Int J Food Microbiol., 91 (1), 99-103 (2004).

58. Fedesa A., Antibiotics for animals: A Fedesa perspective on antibiotics, Animal Health and the Resistance Debate, 6; (2000).
59. Figura N., Guglielmetti P., Differentiation of motile and mesophilic *Aeromonas* strains into species by testing for a CAMP-like factor. J. Clin. Microbiol., 25, 1341-1342 (1987).
60. French G.L., Ling J., Chow K.L., Mark K.K., Occurrence of multiple antibiotic resistance and R-plasmids in Gram-negative bacteria isolated from faecally contaminated fresh-water streams in Hong Kong., Epidemiol Infect., 98 (3), 285-299, (1987).
61. Furushita M., Shiba T., Maeda T., Yahata M., Kaneoka A., Takahashi Y., Torii K., Hasegawa T., Ohta M., Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates, Appl Envir. Microbiol., 69 (9), 5336-5342, (2003).
62. Gabriel M.M., Sawant A.D., Simmons R.B., Ahern D.G., Effect of silver on adherence of bacteria to urinary catheters: *in vitro* studies, Curr. Microbiol., 30, 17-22, (1995).
63. Ghilardi A.C., Gomes T.A., Trabulsi L.R., Production of cytolethal distending toxin and other virulence characteristics of *Escherichia coli* strains of serogroup O86., Mem Inst Oswaldo Cruz., 96 (5), 703-708, (2001).
64. Gilbert P., Evans D.J., Brown M.R.W., Formation and dispersal of bacterial biofilms *in vivo* and *in situ*., J. Appl. Bacteriol., 74, 67S-78S, (1993).
65. Grant K.A., Belandia I.U., Dekker N., Richardson P.T., Park S.F., Molecular characterization of *pldA*, the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. Infection and Immunity, 65 (4), 1172-1180, (1997).
66. Gomoiu M.T., Some problems concerning ecological changes in the Black Sea., Cercetări Marine, 14, 109-127, (1981).
67. Gomoiu M-T., New Approaches in the Assessment of the Black Sea Ecosystems. GEO- ECO-MARINA, 9-10, (2003-2004).
68. Goni-Urriza M., Capdepuy M., Arpin C., Raymond N., Caumette P., Quentin C., Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas spp.*, Appl Environ Microbiol., 66 (1), 125-132, (2000).
69. Gordon D. M., Bauer S., Johnson J.R., The genetic structure of *Escherichia coli* populations in primary and secondary habitats., Microbiology, 148, 1513-1522, (2002).
70. Gündoğdu A., Long Y.B., Vollmerhausen T.L., Katouli M., Antimicrobial resistance and distribution of *sul* genes and integron-associated *intI* genes among uropathogenic *Escherichia coli* in Queensland, Australia., J Med Microbiol., 60 (11), 1633-1642, (2011).
71. Hall R. M., Collins C.M., Integrons and Mobile Gene Cassettes, Mol. Micr., 15, 593-600, (1995).
72. Hamada S., Slade H.D., Mechanism of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces *in vitro*., Bacterial adherence: Receptors and recognition, (Beachey, E.H., ed.). Series B, 6, Chapman&Hall, London, 105-135, (1980).
73. Hamilton W.A., Biofilms: microbial interactions and metabolic activities., Ecology of Microbiology Communities, Fletcher M., Gray T.R.G., Jones J.G. eds., The 41th Symposium of the Society for General Microbiology, Cambridge Univ. Press, 361-385, (1987).
74. Heinemann J.A., How antibiotics cause antibiotic resistance., Drug Discov. Today, 4 (2), 72-79, (1999).
75. Henderson D. A. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis, Journal of Clin Microbiology, 37(10), 3276-3280, (1999).
76. Horrevoets A.J.G., Hackeng T.M., Verheij H.M., Ruud Dijkman R., De Haas G.H., Kinetic characterization of *Escherichia coli* outer membrane phospholipase A using mixed detergent-lipid micelles, Biochemistry, 28 (3), 1139-1147, (1989).
77. Heuer H., Binh C.T., Jechalke S., Kopmann C., Zimmerling U., Krögerrecklenfort E., Ledger T., González B., Top E., Smalla K., IncP-1ε Plasmids are Important Vectors of Antibiotic Resistance Genes in Agricultural Systems: Diversification Driven by Class 1 Integron Gene Cassettes., Front Microbiol., 3, 2, (2012).
78. Iglewski B.H., Clark V.L., Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis. Vol. XI of The Bacteria: A Treatise on Structure and Function., Academic Press, Orlando, FL, (1990).
79. Ingole K.V., Jalgaonkar S.V., Fule R.P., Study of proteases and other enzymes of *Vibrio cholerae* 01 E2 Tor and 0139 serotypes isolated in Yavatmal (Maharashtra)., Indian J Pathol Microbiol., 41 (4), 419-422, (1998).
80. Isenberg H.D., Clinical Microbiology, Procedures Handbook; Second Edition, 1-3, (2004).
81. Ivan L., Monika D., Dagmar J., Jolana H., Włodzimierz M., Hanna R., Szymon B., Alois C. Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Bacteria, Including Strains with Genes Encoding the Extended-Spectrum Beta-Lactamase and *QnrS*, in Waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland., Applied and environmental microbiology, 76, (24), 8126-8134, (2010).

82. Iwane T., Urase T., Yamamoto K., Possible impact of treated wastewater discharge on incidence of antibiotic resistant bacteria in river water, Water Science & Technology, 43 (2), 91–99, (2001).
83. Jackson C.R., Fedorka C.P.J., Barrett J.B., Ladely S.R., Effects of tylosin use on erythromycin resistance in enterococci isolated from swine, Appl. Environ. Microbiol., 70 (7), 4205-4210, (2004).
84. Jannasch H. W., Microbes in the oceanic environment., Symposia of the Society for General Microbiology, Part II Kelly D. P., Carr N. G., eds., Pitman Press Batj., 79-122, (1984).
85. Johnson A. G., Molecular Adjuvants and Immunomodulators., Clin. Microbiol. Rev., 7 (3), 277-289, (1994).
86. Johnson A.P., Burns L., Woodford N., Threlfall E.J., Naidoo J., Cooke E.M., George R.C., Gentamicin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* encoded by genes of veterinary origin., J. Med. Microbiol., 40 (3), 221-226, (1994).
87. Jones C.H., Tuckman M., Keeney D., Ruzin A., Bradford P. A., Characterization and Sequence Analysis of Extended Spectrum β -Lactamase Encoding Genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* Isolates collected during Tigecycline Phase 3 Clinical Trials., Antimicrobial Agents Chemotherapy, 53, 465-475 (2009).
88. Kang C.I., Kim S.H., Park W. B., Lee K. D., Kim H. B., Kim E. C., Oh M. D.,Choe K.W. – Bloodstream Infections Due to Extended-Spectrum β -Lactamase - Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk Factors for Mortality and Treatment Outcome, with Special Emphasis on Antimicrobial Therapy, Antimicrobial Agents Chemotherapy, 48, 4574- 4581, (2004).
89. Karczmarczyk M., Walsh C., Slowey R., Leonard N., Fanning S., Molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from Irish cattle farms., Appl Environ Microbiol., 77 (20), 7121-7127, (2011).
90. Kehrenberg C., Weckenthin C., Schwarz S., Tn570, a transposon-like element from *Pasteurella multocida* mediating tetracycline resistance., Antimicrob. Agents Chemother., 42 (8), 2116-2118, (1998).
91. Kehrenberg C., Tham N. T. T., Schwarz S., New Plasmid-Borne Antibiotic Resistance Gene Cluster in *Pasteurella multocida*., Antimicrob. Agents Chemother., 47(9), 2978-2980, (2003).
92. Kelly B.G., Vespermann A., Bolton D.J., The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens, Food and Chemical Toxicology, 47, 5, 951-968, (2009).
93. Kelly B.G., Vespermann A., Bolton D.J., Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens, Food and Chemical Toxicology, 47, 5, 969-977, (2009).
94. Kiffer C.R.V., Kuti J.L., Eagye K.J., Mendes C., Nicolau D.P., Pharmacodynamic profiling of imipenem, meropenem and ertapenem against clinical isolates of extended-spectrum β - lactamase – producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* from Brazil, International Journal of Antimicrobial Agents, 28, 340–344, (2006).
95. Kim E.H., Aoki T., Sulfonamide resistance gene in a transferable R plasmid of *Pasteurella piscicida*., Microbiol. Immunol. 40 (5), 397-399, (1996).
96. Köhler C. D., Dobrindt U., What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*?, Int J Med Microbiol. 301 (8), 642-647, (2011).
97. Koomanachai P., Bulik C.C., Kuti J.L., Nicolau D. P., Pharmacodynamic Modeling of Intravenous Antibiotics Against Gram-Negative Bacteria Collected in the United States., Clinical Therapeutics, 32 (4), 766- 779, (2010).
98. Koczura R., Mokracka J., Jabłońska L., Gozdecka E., Kubek M., Kaznowski A., Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water. Sci Total Environ., 414, 680-685, 2012.
99. Kuhn F., Cottagnoud M., Acosta F., Flatz L., Entenza J., Cottagnoud P., Cefotaxime acts synergistically with levofloxacin in experimental meningitis due to penicillin-resistant pneumococci and prevents selection of levofloxacin resistant mutants *in vivo*., Antimicrob Agents Chemother., 47 (8), 2487-2491, (2003).
100. Laane R. W., Background concentrations of natural compounds in rivers, seawater, atmosphere and mussels. International workshop on background concentrations of natural compounds, Hague. Report DGW – 92.033, (1992).
101. Laroche E., Pawlak B., Berthe T., Skurnik D., Petit F., Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France)., FEMS Microbiol Ecol. 68, (1), 118-130, (2009).
102. Lartigue M.F., Poirel L., Pozart C., Réglier-Poupet H., Nordmann P., Ertapenem resistance of *E. coli*, Emergence Infectious Diseases, 13, 315-317, (2007).
103. Lazăr V., Balotescu C., Bulai D., Cernat R., Dinu C., Ionescu M., Tatut-Chițoiu D., Herlea V., Adherence ability to cellular and inert substrata and other virulence factors in opportunistic enterobacteria with different origins, Clin. Microbiol. Inf., 8, (1), 104, (2002).
104. Lazăr V., Cernat R., Balotescu C., Cotar A., Coipan E., Cojocaru C., Correlation between multiple antibiotic resistance and heavy-metal tolerance among some *E. coli* strains isolated from polluted waters., Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol., 47 (3-4), 155-160, (2002).

105. Lazăr V., Aderența microbiană, Editura Academica Ramana, (2003).
106. Lazăr V., Herlea V., Cernat R., Balotescu M. C., Bulai D., Moraru A., Microbiologie generală, Manual de lucrări practice, Editura Universității din București, (2004).
107. Lazăr V., Microbiologie medicală, Editura Universității din București (2007).
108. Lee C.H., Chu C., Liu J.W., Chen Y. S., Chiu C. J., Su L.H., Collateral damage of flomoxef therapy: *in vivo* development of porin deficiency and acquisition of *bla*_{DHA-1} leading to ertapenem resistance in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-3 and SHV-5- β -lactamases, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 60, 410-413, (2007).
109. Lenette E. H., Balows A., Hausler W. Jr., Truant J.P., Manual of Clinical Microbiology 3rd Ed. ASM Washington D.C., 220-225, (1980).
110. Leippe M., Müller-Eberhard H., The pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis, Toxicology, 87, 5-18, (1994).
111. Levine MM., Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans and animals, Ciba Found Symposium, 80, 142-160, (1981).
112. Lincoln R.J., Boxshall G. A., Clark P., F., A dictionary of ecology, evolution and systematics, Cambridge Univ. Press, (1982).
113. Lincoln E.P., Hall, T.W., Koopman, B., Zooplankton control in mass algal cultures., Aquaculture, 32, 331-337 (1983).
114. Livermore D.M., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini G. M., Arlet G., Ayala J, Coque T.M., Kern-Zdanowicz I., Luzzaro F., Poirel L. Woodford N., CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 59, 165-174, (2007).
115. Lopes M.F., Dosreis G.A., Experimental Chagas disease: phagocytosis of apoptotic lymphocytes deactivates macrophages and fuels parasite growth., Apoptosis, 5 (3), 221-224. (2000).
116. Llopis F., Grau I., Tubau F., Císnal M., Pattares R., Epidemiological and clinical characteristics of bacteremia caused by *Aeromonas spp.* as compared with *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Scand J Infect. Dis. 36, 335-341, (2004).
117. Louma S.N., Davis J.A., Requirements for modeling trace metal partitioning in oxidized., Marine Chemistry, 12, 159-181, (1983).
118. Lu L., Walker W. A., Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium, American Journal of Clinical Nutrition, 73 (6), 1124S-1130S, (2001).
119. Mahon C.R. , Maniselis G. Jr., Text Book of Diagnostic Microbiology, Philadelphia, Pennsylvania, USA: WB Saunders Company, (1995).
120. Mance G., Pollution threat of heavy metals in aquatic environments, Elsevier Applied Science Publishes London and New York, 1-372, (1987).
121. Marble M., Plasmid DNA associated with specific bands in PFGE patterns of antibiotic – resistant *Salmonella* serotype enteritidis., Antimicrobial Agents and Chemotherapy Record, 107, 5-7 (1999).
122. Matthews K.R., Mordough P.A., Bramley A.J., Invasion of bovine epithelial cells by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7., J Appl Microbiol., 82 (2):197-203, (1997),
123. Mănescu S., Microbiologie sanitară, Editura Medicală, (1989).
124. Mărculescu A., Cernea M., Nueleanu V., Oros N.A., Chereji R., Rezistența microbiană față de antibiotice., Medicamentul Veterinar / Veterinary Drug, 1 (1), 44-51, (2007).
125. McCoy J.J., Mann B.J., Petri W.A., Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around., Infect. Immun., 62, 3045-3050, (1994).
126. McDermott P.F., Zhao S., Wagner D.D., Simjee S., Walker R.D., White D.G. The food safety perspective of antibiotic resistance., Anim Biotechnol., 13 (1), 71-84 (2002).
127. McKee M. L., O'Brien A. D., Investigation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Adherence Characteristics and Invasion Potential Reveals a New Attachment Pattern Shared by Intestinal *E. coli*., Infection and Immunity, 63 (5), 2070–2074, (1995).
128. Mendonca V.M., Kaiser-Rogers K., Matson S.W., Double helicase II (uvrD)-helicase IV (helD) deletion mutants are defective in the recombination pathways of *Escherichia coli*., J Bacteriol., 175, (15), 4641-4651, (1993).
129. Moon J.Y., Park J.H., Kim Y.B., Molecular epidemiological characteristics of virulence factors on enteroaggregative *E. coli*., FEMS Microbiol Lett., 253 (2), 215-220, (2005).
130. Morita R.Y., Survival of bacteria in cold and moderate hydrostatic pressure environments with special reference to psychrophilic and barophilic bacteria., Symposia of the Society for General Microbiology. 26 “The survival of vegetative microbes”, Cambridge, Univ. Press., 279-298, (1976).
131. Mihăescu G., Chifiriuc C., Dițu L.-M., Microbiologie generală, Editura Universității București, (2007).
132. Mihăescu G., Chifiriuc M.C., Dițu L.M. Antibiotice și substanțe chimioterapeutice antimicrobiene. Ed. Acad. Romane, București, (2008).

133. Mispagel H., Gray J.T., Antibiotic resistance from wastewater oxidation ponds, Water Environ Res., 77 (7), 2996-3002, (2005).
134. Mitache M., Lazăr V., Bleotu C., Cernat R., Chifiriuc M.C., Phenotypic and genetic virulence and antibiotic resistance markers in *Escherichia coli*, strains isolated from hospital surfaces., Roum Arch Microbiol Immunol., 68 (3), 158-165 (2009).
135. Mitache M.M., Cercetări asupra procedurilor specifice privind controlul microbiologic al unităților sanitare în vederea asigurării cerințelor impuse de standardele ISO., Universitatea București, Facultatea de Biologie, (2010).
136. Murray P. R., Baron E.J., Pfaller M., Tenover F., Tenover F.C., Manual of clinical microbiology, Publisher ASM Press, 497-556, (1999).
137. Nestorescu N., Bacteriologie medicală, Editura Medicală București, (1961).
138. Nishi J., Yoshinaga M., Manago K., Kuroki H., Kamenosono A., Mogi A., Miyahara H., Baba Y., Ikeda T., Miyata K., The incidence of virulence genes in *Escherichia coli* strains from sporadic diarrhea children, Kansenshogaku Zasshi, 73 (11), 1104-1109, (1999).
139. Noble R.W., De Young A., Vitale S., Morante S., Cerdonio M., Studies on the linkage between spin equilibria and protein structure in carp ferric hemoglobin, Eur.J. Biochem., 168 (3), 563-567, (1987).
140. Oberlé K., Capdeville M.J., Berthe T., Budzinski H., Petit F., Evidence for a Complex Relationship between Antibiotics and Antibiotic-Resistant *Escherichia coli*: From Medical Center Patients to a Receiving Environment., Environ Sci Technol., 46 (3), 1859-68, (2012).
141. O'Callaghan C. H., Morris A., Kirby S. M., Shingler A. H., Novel method for detection of β -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1, 283-288 (1972).
142. Oros A.N., Contribuții la cunoașterea consecințelor poluării cu metale grele asupra ecosistemelor marine costiere de la litoralul românesc al Mării Negre, Universitatea "Ovidius" Constanța, Facultatea de Științe ale Naturii și Științe Agricole, (2009).
143. Oros A.N., Raport privind starea mediului marin și costier în anul 2010, Cercetări Marine., 41, 23-24, (2011).
144. Paterson D.L., Bonomo R.A., Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update., Clinical Microbiology Reviews., 18, 657-686, (2005).
145. **Pănuș E.**, Roșoiu N., Chifiriuc C., Israil A.M., Banu O., Lysinedecarboxylase expression assay in *Escherichia coli* strains isolated in Romanian Seaside from marine and drinking water, ARS Medica Tomitana, XIII, 2 (49), 15-18, (2007).
146. **Pănuș E.**, Balotescu Chifiriuc M.C., Bucur M., Cernat R., Mitache M., Nedelcu D., Bleotu C.L., Valeanu D., Lazăr V., Roșoiu N., Virulence, pathogenicity, antibiotic resistance and plasmid profile of *Escherichia coli* strains isolated from drinking and recreational waters, Roumanian Biotechnological Letters, 13, 3, 3695-3700, (2008). **Revistă cotate ISI cu factor de impact**
147. **Pănuș E.**, Chifiriuc M.C., Banu O., Mitache M., Bleotu C., Roșoiu N., Lazăr V., Comparative study of resistance and virulence markers in *Escherichia coli* strains isolated from hospital surfaces, clinical specimens and drinking/marine waters, Biointerface Research in Applied Chemistry, Open access journal, 1, 1, 024-030, (2011).
148. Petranu A., Apas M., Bodeanu N., Bologa A.S., Dumitrache C., Moldoveanu M., Radu G., Țigănuș Victoria., Status and evolution of the Romanian Black Sea coastal ecosystem., Environmental Degradation of the Black Sea: Challenges and Remedies, S. Besiktepe, U. Unluata, A.S. Bologa (Eds.), NATO Science Series, 2. Environm. Security, 56, Kluwer Acad. Publ., 175-195, (1999).
149. Perreten V., Boerlin P., A new sulphonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47, 1169-1172, (2003).
150. Pfeifer Y., Cullik A., Witte W., Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens., International Journal of Medical Microbiology, 300, 6, 371-379, (2010).
151. Pignato S., Coniglio M.A., Faro G., Weill F.X., Giammanco G., Plasmid-mediated multiple antibiotic resistance of *Escherichia coli* in crude and treated wastewater used in agriculture., Journal of Water and Health, 7 (2), 251-258, (2009).
152. Pitout J.D., Laupland K.B., Extended - spectrum beta - lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public health concern., Lancet Infectious Diseases, 8, 159-166, (2008).
153. Piva I.C., Pereira A.L., Ferraz L.R., Silva R.S., Vieira A.C., Blanco J.E., Blanco M., Blanco J., Giugliano L.G., Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasília, Brazil., J Clin Microbiol., 41 (5), 1827-1832, (2003).
154. Popa M. I., Microbiologie generală și microbiologie specială, Note de curs, Editura Concept Publishing Houge, (1999).
155. Prasannan M., Jesudason M.V., Kang G., Sridharan G., A study on some phenotypic virulence markers of enteropathogenic *Escherichia coli*, Indian J Med Res., 114, 95-98, (2001).

156. Pruzzo C., Crippa A., Bertone S., Pane L., Carli A., Attachment of *Vibrio alginolyticus* to chitin mediated by chitinbinding proteins., Microbiology, 142, 2181-2186 (1996).
157. Ramteke P.W., Tewari S., Serogroups of *Escherichia coli* from drinking water., Environ Monit Assess., 130 (1-3), 215-220, (2007).
158. Regua-Mangia A.H., Gomes T.A., Vieira M.A., Irino K., Teixeira L.M., Molecular typing and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro city, Brazil., J Med Microbiol., 58, (4), 414-422, (2009).
159. Ribera A., Roca I., Ruiz J., Gibert I., Vila J., Partial characterization of a transposon containing the tet (A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*, J. Antimicrob. Chemother., 52 (3), 477-480, (2003).
160. Roesijadi G., Robinson W.E., Metal Regulation in Aquatic Animals: mechanisms of Uptake, Accumulation and Release., Aquatic Toxicology. Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives. Ed. By Malins DC and Ostrander GK, Lewis Publishers CRC Press, 387-419 (1994).
161. Rogers J., Dowsett A.B., Dennis P.J., Lee J.V., Keevil C.W., Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora, Appl. Environ. Microbiol., 60, 1585-1592, (1994).
162. Rosa A.C., Mariano A.T., Pereira A.M., Tibana A., Gomes T.A., Andrade J.R., Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil., J Med Microbiol., 47 (9), 781-790, (1998).
163. Ross C. A., Mucinase activity of intestinal organisms., Journal of Pathology and Bacteriology, 7, 642-644, (1959).
164. Roşoiu N., Şerban M., Biochimie medicală, vol. II, Metabolism intermediar cu corelații clinice, Eidura Muntenia, (2005).
165. Rubinstein E., Antimicrobial resistance pharmacological solutions, Infection, 27, (2), S32-S34, (1999).
166. Ruppé E., Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi: l'avènement des CTX-M., Antibiotiques, 12, (1), 3-16, (2010).
167. Ryu S.H., Park S.G., Choi S.M., Hwang Y.O., Ham H.J., Kim S.U., Lee Y.K., Kim M.S., Park G.Y., Kim K.S., Chae Y.Z., Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood., Int J Food Microbiol., 152, (1-2), 14-18 (2012).
168. Sack R.B., Enterotoxigenic *Escherichia coli*: identification and characterization., J Infect Dis., 142 (2), 279-286 (1980).
169. Sannes M.R., Kuskowski. M.A., Johnson J.R., Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* strains isolated from urine of women with cystitis or pyelonephritis and feces of dogs and healthy humans., J. Am. Vet. Med. Assoc., 225 (3), 368-373, (2004).
170. Scaletsky I.C., Pedroso M.Z., Fagundes-Neto U., Attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* O18ab invades epithelial cells and causes persistent diarrhea., Infect Immun., 64 (11), 4876-4881, (1996).
171. Schmiel D. H. Miller V. L., Bacterial phospholipases and pathogenesis, Microbes Infect., 1, 1103-1112. (1999).
172. Shin J.S., Gao Z., Abraham S. N., Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells, Science, 289, 785-788, (2000).
173. Silveira W.D., Benetti F., Lancellotti M., Ferreira A., Solferini V.N., Brocchi M., Biological and genetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains., Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 43 (6), 303-310, (2001).
174. Simkiss K., Mason A.Z., Metal ions: metabolic and toxic effects., The Mollusca, Edited by Hochachka PW Academic Press, New York., 2, 101-164, (1983).
175. Sinclair J. F., O'Brien A. D., Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, J Biol. Chem., 277, 2876-2885, (2002).
176. Smith A.W., Chahal B., French G.L., The human gastric pathogen *Helicobacter pylori* has a gene encoding an enzyme first classified as a mucinase in *Vibrio cholerae*. Mol. Microbiol. 13 (1), 154-160, (1994).
177. Smith C.J., Kaper J.B., Mack D.R., Intestinal mucin inhibits adhesion of human enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells., J Pediatr Gastroenterol Nutr., 21 (3), 269-276, (1995).
178. Smith P. R., Farrell E., Dunican K., Survival of R+ *Escherichia coli* in Sea Water., Applied Microbiology, 27 (5), 983-984, (1974).
179. Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W., Biofilms as complex differentiated communities, Annu. Rev. Microbiol., 56, 187-209, (2002).
180. Swartz N. M., Minireview: Impact of antimicrobial agents and chemotherapy, from 1972 to 1998., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44, 8, 2009- 2016, (2000).
181. Todar K., Antimicrobial agents used in treatment of infectious disease, Textbook of Bacteriology, Wisconsin-Madison., (2002).

182. Tsai C.C., Chen S.Y., Tsen H.Y., Screening the enteroaggregative *Escherichia coli* activity and detection of the *aggA*, *aafA*, and *astA* genes with novel PCR primers for the *Escherichia coli* isolates from diarrhea cases in Taiwan., Diagn Microbiol Infect Dis., 46 (3), 159-165, (2003).
183. Toroglu E., Toroglu S., Microbial pollution of water in Golbasi lake in Adiyaman, Turkey., J Environ Biol., 30 (1), 33-38, (2009).
184. Toroglu S., Toroglu E., Dincer S., Kara C., Kertmen M., Resistances of antibiotics and heavy metals in *Enterobacteriaceae* spp. isolated from gills and intestines of *Acanthobrama marmid* (Heckel, 1843) from Sir Dam lake Turkey., J Environ Biol., 30 (1), 23-31, (2009).
185. Vassu T., Csutak O., Stoica I., Muşat F., Genetica microorganismelor și inginerie genetică microbiană. Note de curs și tehnici de laborator., Editura Petron Bucuresti, 2001.
186. Vishniac W., Limits of microbial productivity in the ocean., Symposia of the Society for General Microbiology, 21 "Microbes and biological productivity", Cambridge, Univ. Press. Londra, 355-366, (1971).
187. Walia S.K., Kaiser A., Parkash M., Chaudhry G.R., Self-transmissible antibiotic resistance to ampicillin, streptomycin, and tetracycline found in *Escherichia coli* isolates from contaminated drinking water., J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng., 39 (3), 651-662, (2004).
188. Wang W.X., Fisher N.S., Modeling Metal Bioavailability for Marine Musse (review), Rev Environ Contam Toxicol., 151, 39-65 (1997).
189. White A. P., McIver C.J., Rawlins W. D., Integrins and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*, AAC., 45, 2658-2661 (2001).
190. White S.L., Rainbow P.S., On the metabolic requirements for copper and zinc in molluscs and crustaceans., Mar Environ Res., 16, 215-229, (1985).
191. Whiting G.C., Rowbury R.J., Increased resistance of *Escherichia coli* to acrylic acid and to copper ions after cold-shock., Appl Environ Microbiol., 69 (7), 4087-4097, 2003.
192. Woodford N., Fagan E. J., Ellington M., Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases, JAC, 412, 154-155, (2005).
193. Wray C., Hedges R.W., Shannon K.P., Bradley D.E., Apramycin and gentamicin resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from farm animals., J Hygiene, 97 (3), 445-456, (1986).
194. Zarnea G., Microbiologie generală, Editura didactică și pedagogică Bucuresti, (1970).
195. Zarnea G., Tratat de Microbiologie generală, vol. I, Edit. Academiei Romane, Bucuresti, (1983).
196. Zarnea G., Tratat de Microbiologie generală, vol. II, Edit. Academiei Romane, Bucuresti, (1984).
197. Zarnea G., Tratat de Microbiologie generală, vol. IV, Edit. Academiei Romane, Bucuresti, (1990).
198. Zarnea G., Tratat de Microbiologie generală, vol. V, Edit. Academiei, Bucuresti, (1994).
199. xxx Centre de l'Enseignement de l'Institut Pasteur de Paris. Milieux de culture et techniques, Cours de Bacteriologie Medicale, (2000).
200. xxx Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, Seventh Edition. M7-A7, (2006).
201. xxx Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Sixteenth Informational Supplement M100-S16, 26 (3), Replaces M100-S15, 25 (1), (2006).
202. xxx Clinical and Laboratory Standards Institute, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard, Third Edition M27-A3 , 0(0), Replaces M27-A2 , 22 (15), (2007).
203. xxx Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, Ninth Edition M2-A9, (2009).
204. xxx EN ISO 19458, Water quality – Sampling for microbiological analysis, (2006).
205. xxx EUCAST (2009).
206. xxx National Committee for Clinical Laboratory Standards, Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents, Document M 26-A. NCCLS, Wayne PA, (2004).
207. xxx National Committee for Clinical Laboratory Standards, Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, Document M7-A5. NCCLS, Wayne, PA, (2004).
208. xxx SR EN ISO 7218, Microbiologia alimentelor și furajelor, Cerințe generale și ghid pentru examenele microbiologice, (2007).
209. xxx SR EN ISO 9308-1, Calitatea apei, Detectia și numărarea de Escherichia coli și de bacterii coliforme, Partea 1: Metoda prin filtrare pe membrană, (2000).
210. <http://emu.arsusd>
211. <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n5/images/nrmicro1391-f3.jpg>
212. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/ Bpathogenesis>
213. <http://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/Images/EPEC-pedestal-on-intestinal.jpg>
214. <http://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/Images/efacement.jpg>
215. <http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smacer/Bacteria%20Inv.htm>
216. <http://rsb.info.nih.gov/ij>

217. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/pathogenesis>
 218. http://129.109.115.69/microbook/images/fig7_2.jpg
 219. <http://www.ecl-lab.ca/en/ecoli/pathogenesis.asp>

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

A. Lucrări științifice publicate în reviste recunoscute C.N.C.S.I.S.

1. **Pănuș E.**, Roșoiu N., Chifiriuc C., Israil A. M., Banu O., Lysinedecarboxylase expression assay in *Escherichia coli* strains isolated in Romanian Seaside from marine and drinking water, ARS Medica Tomitana, XIII, 2(49), 15-18, (2007).
2. Mitache M.M., Chifiriuc M.C., Badea A., Geana O.L., Bucur M., Olar R., Badea M., **Pănuș E.**, Roșoiu N., Paul I., Sesan T., Lazăr V., Novel antipathogenic strategies against adherent enterobacterial strains isolated from the hospital environment, Roum.Arch.Microbiol. Immunol., 67 (1-2), 43-48, (2008). **Revistă indexată CNCIS B+, MedLine PubMed database.**
3. **Pănuș E.**, Balotescu Chifiriuc M.C., Bucur M., Cernat R., Mitache M., Nedelcu D., Bleotu C.L., Valeanu D., Lazăr V., Roșoiu N., Virulence, pathogenicity, antibiotic resistance and plasmid profile of *Escherichia coli* strains isolated from drinking and recreational waters, Roumanian Biotechnological Letters., 13, 3, 3695-3700, (2008). **Revistă cotate ISI cu factor de impact**
4. **Pănuș E.**, Chifiriuc M.C., Banu O., Mitache M., Bleotu C., Roșoiu N., Lazăr V., Comparative study of resistance and virulence markers in *Escherichia coli* strains isolated from hospital surfaces, clinical specimens and drinking/marine waters, Biointerface Research in Applied Chemistry., Open access journal, 1, (1), 24-30, (2011). **Revistă indexată ISSN 2069-5837 – 8 citări în reviste cotate ISI cu factor de impact.**
5. **Emilia Pănuș**, Coralia Bleotu, Natalia Roșoiu, Veronica Lazăr, Magda Mitache, Phenotypic and genetic investigation of virulence and antibioresistance hallmarks in *Escherichia coli* strains isolated from Black Sea water on Romanian coast. Biointerface Research in Applied Chemistry., Open access journal, 2, (2), 306-312, (2012). **Revistă indexată ISSN 2069-5837.**

B. Lucrări prezentate la manifestări științifice internaționale și publicate sub formă de rezumat

1. M. Ghelberg-Tălmăcel, M. Dinisov, C. Cristu, L. Carpus, **E. Trenchea**, E. Gorun, Studiu privind poluarea parazitologică a litoralului în zona Năvodari-Costinești (1997-2003), Revista de parazitologie, XIII, 134, (2003).
2. E. Gorun, V. Badea, R. Mihaianu, D. Carzaliu Meliu, M. Tălmăcel Ghelberg, M. Dinisov, C. Cristu, L. Carpus, **E. Trenchea**, Controlul medical periodic-măsură deosebit de eficientă privind identificarea și tratarea parazitozelor intestinale, Revista de parazitologie, XIII, 134, (2003).
3. **Pănuș E.**, Roșoiu N., Traicu V., The biochemical marshalling yard of *Enterobacteriaceae* for purpose to identify the presence of *Escherichia coli* in the brine of Romanian Seaside, RSBMB International Meeting, Constanța, Romania, Book of Abstracts, p.17, (2006).
4. **Pănuș E.**, Roșoiu N., The investigation of lysinedecarboxylase presence on the *Escherichia coli* stems from the brine samples from the Romanian seaside Black Sea, 29th Balkan Medical Week, Ecology, Man, Health, Golden Sands, Varna, Bulgaria, Book of Abstracts, P155, 86, (2006).
5. Balotescu C., **Pănuș E.**, Bucur M., Cernat R., Nedelcu D., Bleotu C., Văleanu D., Lazăr V., Virulence, pathogenicity, antibiotic resistance and plasmid profile of Escherichia coli strains isolated from drinking and recreational waters, Munchen, Germany published in CMI, vol. 13, suppl. No. 1 and International Journal of Antimicrobial Agents (IJAA), vol. 29, suppl. 2, 31.03.2007 - 03.04.2007, Munchen, Germany European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)& 25th International Congress of Chemotherapy (ICC), P 1249 (2007). **Revistă cotate ISI cu factor de impact 3.787.**
6. **Pănuș E.**, Roșoiu N., M.C., Nedelcu D., Bucur M., Study of the enzymatic profile of *E. coli* strains isolated from drinking and sea waters in Romania, FEBS Journal, Volume 274, Supplement 1, July 2007, pp.1-378, 32nd FEBS Congress, "Molecular Machines", Vienna, Austria, F1-111, 292, (2007). **Revistă cotate ISI cu factor de impact 4,220.**
7. **Pănuș E.**, Roșoiu N., Balotescu C., Banu O., Larion C., Comparative study of multidrug resistance markers & other virulence factors in enterobacterial strains isolated clinal samples and outside environment, La 17-eme Session des Journees Medicales Balkaniques, Craiova, Roumanie, Volume de resumes, 128, (2007).
8. **Pănuș E.**, Roșoiu N., Balotescu C., Bleotu C., Mitache M., Effect of different physico-mechanical factors upon the growth and expression of virulence in *Escherichia coli* strains isolated from drinking and sea water, FEBS Journal, Volume 275 (Supplement 1), July 2008, pp. 99-437, 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference "Biochemistry of Cell Regulation", Athens, Greece, PP8-138, 421, (2008). **Revistă cotate ISI cu factor de impact 4,220.**

9. Mitache M., Bucur M., **Pănuș E.**, Lazăr V., Balotescu C., Virulence profile of enterobacterial strains isolated from surfaces in the hospital environment FEBS Journal, Volume 275 (Supplement 1), July 2008, pp. 99-437, 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference "Biochemistry of Cell Regulation", Athens, Greece, pp. 99-437, (2008). **Revistă cotate ISI cu factor de impact 4,220.**
10. **Pănuș E.**, Roșoiu N., Balotescu M.C., Mitache M.M., Cotar A., Banu O., Delcaru C., Bleotu C., Comparative investigation of virulence and pathogenity hallmarks in *Escherichia coli* strains isolated from environmental and clinical samples, XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. XII. International Congress of Mycology, Istanbul, Turkey, Supplementary Abstract Book, BP-688, p.11, (2008).
11. Mitache M.M., Balotescu C.M., Oprea E., Geana O.L., Badea A., Bucur M., Olar R., Badea M., Smarandache D., Cotar A., Ionescu P., **Pănuș E.**, Lazăr V., Investigation of new synthetic compounds and ecological products with antimicrobial activity against *E. coli* strains isolated from hospital environment., XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. XII. International Congress of Mycology, Istanbul, Turkey, Supplementary Abstract Book, BP-703, p.18, (2008).
12. **Pănuș E.**, Bleotu C., Chifiriuc M.C., Roșoiu N., Lazăr V., Mitache M., Phenotypic and genetic investigation of virulence and antibioresistance hallmarks in *Escherichia coli* strains isolated from Black Sea waters on Romanian Coast, Helsinki, Finlanda published in CMI, vol. 15, suppl. No. 4 19th European Congress of Clinical microbiology and Infections Diseases (ECCMID), Helsinki Finland, P 1672, S477, (2009). **Revistă cotate ISI cu factor de impact 3.787.**
13. **Pănuș E.**, Roșoiu N., Bleotu C., Iordache C., Delcaru-Larion C., Drecea O., Bucur M., Martulescu L., Ditu L.M., Mitache M.M., Lazăr V., Chifiriuc M.C., Effect of different environmental parameters upon the expression of resistance features in *Escherichia coli* aquatic strains, FEBS Journal, Volume 276 (Supplement 1), July 2009, 34th FEBS Congress "Life's Molecular Interactions", Prague, Czech Republic, P8-126, 334, (2009). **Revistă cotate ISI cu factor de impact 4,220.**
14. **Pănuș E.**, Roșoiu N., Bleotu C., Dascălu L., Ditu L., Chifiriuc Balotescu M.C., Lazăr V., Iordache C., Larion C., Drecea O., Bucur M., Effect of different environmental parameters upon the expression of certain virulence factors and resistance features in *Escherichia coli* aquatic strains Viena, Austria published in CMI, vol. 16, suppl. No. 2 20th European Congress of Clinical microbiology and Infections Diseases (ECCMID), Vienna, Austria, P 1331, S377, (2010). **Revistă cotate ISI cu factor de impact 4,784.**
15. **Pănuș E.**, Bleotu C., Roșoiu N., Popa M., Dascălu L., Ditu L.M., Lazăr V., Chifiriuc M.C., Impact of different parameters upon the expression of certain virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from marine water, FEBS Journal, Volume 277 (Supplement 1), June 26-July 1, 2010, 35th FEBS Congress "Molecules of Life", Gothenburg, Sweden, 37-271, 103-104, (2010). **Revistă cotate ISI cu factor de impact 4,220.**
16. **Pănuș E.**, Roșoiu N., Bleotu C., Dascălu L., Popa M., Chifiriuc C.M., Expression of virulence hallmarks in *Escherichia coli* aquatic strains submitted to different stress conditions Milan, Italy published in CMI, vol. 17, suppl. No. 4 21th European Congress of Clinical microbiology and Infections Diseases (ECCMID), Milan, Italy, R 2518, S754, (2011). **Revistă cotate ISI cu factor de impact 4,784.**

C. Participări la congrese științifice naționale și internaționale

1. Reuniunea anuală a Societății de Microbiologie, (Târgoviște, România, 2002).
2. Simpozionul național de parazitologie (Constanța, România, 2003).
3. RSBMB International Meeting, (Constanța, România, 2006).
4. 29th Balkan Medical Week, Ecology, Man, Health, (Varna, Bulgaria, 2006).
5. 32nd FEBS Congress "MOLECULAR MACHINES", (Vienna, Austria, 2007).
6. La 17-eme Session des Journees Medicales Balkaniques, (Craiova, România, 2007).
7. 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference "Biochemistry of Cell Regulation", (Atena, Grecia, 2008).
8. XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. XII. International Congress of Mycology, (Istanbul, Turcia, 2008).
9. Reuniunea anuală Societății de Microbiologie, (Sibiu, România, 2008).
10. 34th FEBS Congress « Life's Molecular Interactions », (Praga, Republica Ceha, 2009).
11. 19th European Congress of Clinical microbiology and Infections Diseases (ECCMID), (Helsinki Finland, 2009).
12. 20th European Congress of Clinical microbiology and Infections Diseases (ECCMID), (Viena, Austria, 2010).
13. 35th FEBS Congress «Molecules of Life», (Gothenburg, Suedia, 2010).
14. Reuniunea anuală a Societății de Microbiologie, (Sinaia, România, 2010).
15. 21th European Congress of Clinical microbiology and Infections Diseases (ECCMID), (Milan, Italy, 2011).