



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00938

(22) Data de depozit: 29/11/2016

(41) Data publicării cererii:  
30/05/2018 BOPI nr. 5/2018

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE  
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ  
CLUJ-NAPOCA, STR. MĂNĂȘTUR NR. 3-5,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:  
• SPÎNU MARINA, STR. GH. DIMA 22,  
BL. E3, AP. 7, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• BRUDAȘCĂ GHEORGHE FLORINEL,  
STR. FĂNTÂNELE NR. 34-36, BL. P3, SC. 6,  
AP. 56, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• ȘANDRU CARMEN DANA,  
STR. TIPOGRAFIEI NR. 13, AP. 25,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• NICULAE MIHAELA, STR. AVRAM IANCU  
NR. 158, BL. CORP D, ET. II, AP. 7,  
FLOREȘTI, CJ, RO;  
• PALL EMOKE, STR. FORTĂREȚEI NR. 3,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• VASIU AUREL,  
CALEA MĂNĂȘTUR 101/35, CLUJ-NAPOCA,  
CJ, RO;  
• GATI GABRIEL, STR. PLOPILOR, BL. 27B,  
AP. 13, FLOREȘTI, CJ, RO;  
• POP CRISTIAN, STR. PĂDURII NR. 2,  
BL. M16, AP. 18, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• GURZĂU ANCA ELENA, STR. CETĂȚII  
NR. 25A, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• GOGU BOGDAN MIRCEA,  
ALEEA BARAJUL SADULUI NR.7C,  
BL.M4A3, SC.A, ET.8, AP.35, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) MODEL DE EVALUAREA A POLUĂRII CU METALE GRELE  
ȘI MICROFLORĂ PATOGENĂ LA PĂSĂRI ȘI PEȘTI  
ÎN REZERVAȚIA BIOSFEREI DELTA DUNĂRII

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de determinare a contaminării cu metale grele și microfloră patogenă la fauna din lacuri și mlaștini, în special din Delta Dunării. Metoda conform invenției constă în următoarele etape: delimitarea unui areal santinelă cu risc toxicologic și microbial, și stabilirea a 5 puncte de monitorizare comune pentru apă, sediment și probe biologice, de preferință, zone joase cu canale închise, alegerea matricei, de preferință, sedimentul, pentru analiza concentrației de metale, flora microbială din *E. coli* și *Vibrio spp.*, stabilirea periodicității recoltării probelor, stabilirea biomarkerilor de expunere la metale la pești

bentonici și la păsări sălbatice nesedentare, stabilirea profilului de risc microbiologic la pești bentonici și la păsări migratoare și sedentare, stabilirea modului de recoltare, conservare, transport și analiză a probelor apă, sediment și probe biologice de la pești și păsări, și prelucrarea statistică a datelor de mediu și biotoxicologice pentru arealul santinelă, în vederea extrapolării pe întreaga suprafață contaminată toxicologic și microbial.

Revendicări: 3  
Figuri: 1



## Model de evaluare a contaminării cu metale grele și microfloră patogenă la pasari și pești în rezervația Biosferei Delta Dunării

Prezenta invenție se referă la un model de evaluare a contaminării cu metale grele și microbiene la fauna (păsări și pești) din Delta Dunării

Delta Dunării reprezintă un spațiu particular, cu caracteristici deosebite, în care se creează o interfață între gazde receptive/vectori/agenți etiologici chiar dacă Rezervația Biosfera Delta Dunării nu se numără printre cele mai întinse rezervații ale biosferei, ea aflându-se pe locul 5 între zonele umede ale Terrei și pe locul 2 în Europa, ca importanță ecologică este considerată a treia din lume. Delta Dunării adăpostește peste 3400 de specii de animale vertebrate și nevertebrate, cu numeroase unicate naționale, europene și mondiale. Păsările sălbatice, inclusiv speciile migratoare, dintre care un număr mare se regăsesc la nivelul Deltei Dunării, pot juca un rol semnificativ în transmiterea virusului influenței A (Swayne, 2006), a virusului West Nile (Rappole et al., 2000), precum și a unor bacterii enteropatogene (Tsiodras et al., 2008). Starea de purtător de salmonelle este recunoscută la palmipede ca și implicarea apei, potențială cale de transmitere a acestor germeni la nivelul Deltei Dunării, cu încărcătura antropică redusă dar încărcătura turistică sezonieră pronunțată. Pornind de la ipoteza că prezența microbiotei patogene cu potențial zoonotic (*E. coli*, *salmonella spp.*, *Vibrio spp.*) este determinată de modul de hrănire și poziția în lanțul trofic s-au ales ca specii țintă pești bentonici (caras *Carassius carassius*, crap *Ciprinus carpio*, somn *Silurus glanis*) și pelagici (salau *Stizostedion luciperca*, stiuca *Esox lucius*, biban *Perca fluviatilis*) (Vasilii, 1959) și păsări migratoare și sedentare. Rezistența antimicrobiană este o problemă în continuă ascensiune la nivel mondial și reprezintă o problemă medicală majoră (Osundiya și col., 2013). Apariția și răspândirea bacteriilor multirezistente în medii naturale constituie un impact grav asupra sănătății umane și animale (Wellington și col., 2013). Păsările sălbatice migratoare sau nu, au fost postulate și s-a demonstrat caracterul de santinele, rezervoare, distribuitoare ale rezistenței la antibiotice (Bonnedahland și col., 2014). Cele mai multe dintre aceste studii publicate sunt focalizate pe *Escherichia coli* și/sau *Enterococcus spp.* existând puține informații privind nivelul antibioticorezistenței speciilor de *Vibrio* izolate de la păsări sălbatice. Rezistența antimicrobiană a fost evaluată la tulpinile de *Vibrio cholerae* izolate din Dunăre în Slovacia.

Probele prelevate pentru examenele toxicologice de la pești și păsări au fost examinate în paralel prin teste microbiologice, pentru depistarea genurilor *E. coli* și *Vibrio* (protocol standardizat și recomandat de OIE), care reprezintă indicatori ai poluării fecale și cresc riscul enzootic reprezentat de mediu și fauna în Delta Dunării. În cazul depistării virusurilor West Nile și al bolii de Newcastle s-a aplicat testarea indirectă, pentru stabilirea seroprevalenței prin tehnica ELISA. Rezultatele testelor microbiologice și moleculare efectuate pe probe de apă și sediment au indicat poluarea microbiană accentuată a apei și sedimentului din punctele de prelevare (fig. 1), cu dominanța netă a *E. coli* și a numeroase specii de *Vibrio* (*V. cholerae/V. fluvialis*, *V. alginolyticus/V. metschnikovii*, *V. mimicus/V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*). Ambele genuri de bacterii au fost identificate la speciile de pești de consum, *E. coli* fiind multirezistente la antibiotice și shigatoxigene (sxt1 și sxt2 pozitive) (Spinu și col., 2016). Genul *Vibrio*, cu specii multirezistente la antibiotice a fost identificat și la păsări. Seroprevalența virusului West Nile a fost crescută comparativ cu cea a bolii de Newcastle.

Delta Dunării este citată ca o zonă în care concentrația metalelor grele în factorii de mediu (apa, sediment) este crescută sau în creștere datorită surselor de poluare antropice de pe cursul fluviului, actualmente nefiind raportate date care să depășească valorile admise de Comunitatea Europeană. Fiind acoperită de suprafețe mari de lacuri și mlaștini, Delta Dunării joacă rolul unui filtru. Aceste suprafețe sunt inundate frecvent de brațele Dunării și o mare parte din apele lor se întorc prin infiltrații în acvifer. Perioada de stagnare a apei în aceste lacuri și mlaștini poate ajunge până la 3-4 luni (Panin, 2003). Conform studiilor, distribuția verticală a metalelor grele din nămolul lacurilor din Delta Dunării prezintă emisii relativ recente cu o creștere graduală a concentrațiilor până în perioada anilor 90', urmată de o scădere continuă (Dinescu și Dului, 2001).

Prin acest mecanism de filtrare și sedimentare, metalele grele sunt adsorbite în namol, ducând la un nivel mai mare de contaminare comparativ cu alte secțiuni ale Dunării.

Metalele grele nu rămân definitiv în sedimente (Peng et al, 2009). Remobilizarea acestora poate fi relaționată în mod direct cu mecanismele de transport a sedimentelor, sedimentarea din zonele inundabile și regimul inundațiilor (Macklin et al, 2006).

Procesele complexe care influențează concentrația totală de metale dizolvate și concentrația de metale din particulele în suspensie și sedimente sunt influențate la rândul lor de o varietate de indicatori fizico-chimici (temperatura, pH, Eh, salinitate, potențialul redox, cantitatea de oxigen dizolvat și cantitatea de materie organică), rezultând un regim complex de reactivitate chimică între fazele solid și soluție. Aceste schimbări fizico-chimice ale caracteristicilor apei conduc la reacții heterogene de dizolvare/precipitare, adsorbție/desorbție, coagulare/sedimentare, iar metalele pot fi precipitate în sedimente, dizolvate din materiile în suspensie sau pot fi diluate în apa marină (Guieu & Martin, 2002; Peng et al, 2009). Așadar, sedimentele pot să joace atât rolul de agent de transport, mediu de stocare, cât și de potențială sursă de poluare a apelor (Peng et al, 2009).

În ceea ce privește predicția toxicității metalelor în sedimente, Simpson & Batley (2007) consideră ca sunt necesare îmbunătățiri semnificative ale măsurătorilor în laborator și teren, o mai bună evidență a parametrilor care influențează toxicitatea metalelor în sedimente, la fel ca și cuantificarea căilor de expunere la metale și contribuția relativă a fracției dizolvate și particulelor în apariția efectelor toxice. Predicția efectelor subletale și cronice ale metalelor necesită informații consistente deoarece concentrația toxică și metabolic disponibilă a metalelor variază în timp.

Cel mai important pericol în expunerea la metale este bioacumularea, toxicii fiind depozitați mult mai rapid decât sunt metabolizați sau eliminați. Gradul în care un organism este afectat de expunerea la metale grele depinde nu numai de toxicitatea metalului în sine, dar și de frecvența și durata expunerii, astfel ca de cele mai multe ori organismele vii se confruntă cu un risc crescut în cazul expunerii cronice. În particular, toxicitatea metalelor grele este rezultatul expunerii la concentrații scăzute pe termen lung, efectele datorate expunerii cronice fiind cu mult mai frecvente decât cele acute.

Metalele grele care prezintă nivelul de risc cel mai ridicat sunt plumbul (Pb), arsenul (As), cadmiul (Cd), mercurul (Hg) ele fiind metale toxice. Fiziopatologia intoxicației cu metale grele este similară. Cele mai multe metale grele se leagă de oxigen, azot și grupările sulfhidril din proteine, conducând la alterarea activității enzimatică. Efectele expunerii la metale grele se concretizează practic asupra tuturor

aparater și sistemelor din organism, susceptibilitatea fiind crescută la populațiile tinere: sistemul nervos central și periferic, aparatul digestiv, renal, cardiovascular, reproducător, hematopoeza și nu în ultimul rând sistemul imunitar, în sensul depresării lui. Implicarea metalelor grele în cancerogeneza este de asemenea cunoscută.

Evaluarea comprehensivă a contaminării cu metale (plumb, cadmiu, arsen și mercur) care pot periclita biodiversitatea Deltei Dunării, cunoscute ca având diverse efecte adverse la populațiile locale de pești și păsări, putând afecta inclusiv rata de reproducere, permite elaborarea unei metodologii specifice de evaluare a statusul ecotoxicologic și care să poată fi transferată ca metoda de lucru.

Rezultatele cercetărilor privind concentrația metalelor în apă a evidențiat o variabilitate marcată în timp și spațiu și chiar depășiri ale normelor legislative în vigoare, în timp ce sedimentele de asemenea încărcate cu metale intervin activ în transferul acestora în apa și în ciclul de contaminare apă-sediment-apă. Ca, urmare monitorizarea sedimentului în vederea cunoașterii gradului de expunere pe termen lung a faunei devine importantă chiar în situația în care concentrațiile de Pb, Cd, As și Hg ale mostrelor de sedimente analizate în acest studiu se încadrează în limitele inferioare sau chiar puțin mai jos față de limitele de concentrații menționate în literatura de specialitate pentru Dunare și Delta Dunării. S-au format patru zone distincte (Gati et al, 2016), în funcție de riscul ecologic calculat, aceste zone acoperind o suprafață de aproape 400 km<sup>2</sup>, însumând peste 140 km liniari de ape interconectate (Bratul Sf. Gheorghe, Delta secundara, canale). S-au înregistrat la pești unele depășiri ale normelor europene a concentrației în sânge a cadmiului și plumbului (biomarkeri de expunere). Bioindicatorii pentru As și Hg din sânge la pești au concentrații mult mai mari decât cele măsurate ca indicatori ai contaminării mediului. Aceste rezultate confirmă și întăresc observațiile noastre anterioare privind factorii de bioacumulare. Peștii cu cea mai mare expunere au fost recoltați din zonele 2 și 3 (zone cu risc mai mic), însă influență directă a indicatorilor de mediu se reflectă doar parțial în sângele peștilor. Acest fapt demonstrează că habitatul peștilor studiați este mult mai mare decât zonele individuale de risc stabilite. În plus, factorii de bioacumulare (BAF) calculați pentru probele noastre de pește au arătat un nivel destul de ridicat pentru mercur, urmat de plumb și cadmiu în cazul carasului, și un nivel ridicat de cadmiu, urmat destul de îndeaproape de mercur și plumb, în cazul salăului. Arsenul a arătat un BAF scăzut la ambele specii.

Ținând cont de aspectele prezentate considerăm ca:

a) evaluarea poluării cu metale grele la păsări și pești în rezervația Biosferei Delta Dunării trebuie să aibă ca element comun din punct de vedere al ecotoxicității mercurul din următoarele considerente:

- Mercurul a fost identificat atât în apă cât și în sedimente în tot arealul de studiu (Delta Dunării, fără complexul lagunar Razim-Sinoe), pentru matricea "apa" existând cele mai multe depășiri ale normelor de calitate în vigoare
- Variabilitatea concentrației metalelor în sedimente, în special a mercurului, a fost similară în toate cele patru zone de risc delimitate
- Mercurul se bioacumulează și are o toxicitate severă cunoscută pentru fauna. Bioacumularea la pești este dependentă de lanțul trofic.
- La păsările sălbatice nesedentare și la cele domestice cu acces la habitatele acvatice și semiumedele identificarea mercurului în sânge, ca biomarker de expunere, a avut frecvență cea mai mare după plumb.

b) evaluarea poluării cu floră microbiană cu risc zoonotic la nivel de habitat, la păsări și pești trebuie să aibă ca element comun genurile *Escherichia* și *Vibrio*, deoarece:

- *E. coli* și *Vibrio spp.* au fost identificate în apă, sediment, la păsări și pești în toate punctele de recoltare
- Bacteriile din aceste genuri au un potențial patogen exprimat la nivel de gazdă susceptibilă, inclusiv la nivel de consumator (potențial zoonotic)
- Antibiotice rezistența multiplă identificată în cazul ambelor genuri complică profilul de risc definit de genele care codifică virulența și toxinogeneza
- Prezența genei de rezistență la mercur este în cazul bacteriilor frecvent asociată cu cea a antibioticorezistenței, determinările microbiologice permițând în acest caz o mai bună interpretare a co-selecției bacteriilor rezistente precum și elaborarea unor măsuri mai eficiente de reducere a riscului

Modelul de evaluare a poluării cu metale grele și microbiene la păsări și pești în rezervația Biosferei Delta Dunării conține următoarele:

- Stabilirea punctelor de monitorizare: sunt comune pentru apă, sediment și probe biologice, punctele critice propuse pentru monitorizare fiind zonele joase, cu curgere lentă/canale închise, și punctele care au aport direct din Dunăre. Zona de elecție este delta secundară a Bratului Sfântu Gheorghe care poate fi considerată zonă santinelă pentru întreaga Delta. Sunt necesare 5 puncte de recoltare care pot fi amplasate conform figurii 1.
- Alegerea matricei de analizat: matricea propusă pentru evaluare este sedimentul pentru că descrie variabilitatea pe termen lung, cu atât mai mult în zonele în care în amonte nu există surse de poluare antropică cu metale. De asemenea sedimentul reflectă calitatea apei, sursă de expunere pentru pești și păsări cu habitat acvatic/semiumed. În principiu, concentrația metalului în sediment este mai mare decât în apa și mai mică decât la pești; *Escherichia* și *Vibrio spp.* se regăsesc mai mult în sediment decât la păsări și pești, dar mai puțin decât în apă.
- Periodicitatea recoltării probelor: recoltarea probelor se face de două ori/an, primăvara și vara
- Biomarkerii de expunere la metale se vor determina la pești (în cazul peștilor sunt relevanți doar în cazul peștilor bentonici – crap, caras și încerți în cazul păsărilor sălbatice nesedentare)
- Profilul de risc microbiologic se va determina la pești, îndeosebi bentonici și la păsările migratoare și sedentare
- Metodele de recoltare, conservare, transport și analiză: Probele de apă se prelevează de la o adâncime de cca. 20-30 cm în recipiente de polietilenă demineralizate cu capacitatea de 50 ml. Fiecare probă se prelevează în 4 recipiente, reprezentând probe pentru analiza metalelor grele și cea microbiologică, respectiv contraprobe ca măsuri de control. Probele de apă destinate analizei metalelor grele se conservă prin adăugarea de HNO<sub>3</sub>, atât acestea, cât și cele destinate analizei microbiologice fiind imediat refrigerate la 4°C. Probele de sediment se prelevează din zone apropiate de marginea albiilor și lacurilor, de la o adâncime de cca. 5 cm, în același tip și număr de recipiente ca și probele de apă. La fel, imediat după recoltare, probele de sediment cu ambele destinații se transportă și păstrează la o temperatură de 4°C până la efectuarea analizelor de laborator. Probe biologice se recoltează de la pești și păsări (oro-faringian



și cloacal), constând în tampoane cu mediu de transport (Deltalab, Eurotubo), pentru analiza microbiologică, iar de la pești, organe precum hepato-pancreas, splină, gonade, piele, solzi și aripioare, pentru analiza metalelor grele. Peștii recoltați se disecă la fața locului utilizând instrumente sterile de unică folosință, apoi cu ajutorul tampoanelor sterile se prelevează probe de microbiologie din branhiile și hepato-pancreas, care se refrigerază, iar organele interne (hepato-pancreas, gonade) și externe (piele, solzi, aripioare) se prelevează, stochează și congelează în recipiente de polietilenă demineralizate, separate. Prelucrarea și analiza probelor, analiza chimică și toxicologică - spectrofotometrie de absorbție atomică. Prelucrarea microbiologică prin cultivare pe medii cromogene și metode moleculare, PRC

- Prelucrarea statistică a datelor de mediu și ± biotoxicologice va avea în vedere aspecte de variabilitate în timp și spațiu și calculul factorilor de bioacumulare la pești

## BIBLIOGRAFIE

- Bonnedahland J, Järhult JD:** *Antibiotic resistance in wild birds.* Ups J Med Sci. 2014, 119 (2): 113–116.
- Dinescu L.C., Dului O.G.,** 2001, *Heavy metal pollution of some Danube Delta lacustrine sediments studied by neutron activation analysis,* Applied Radiation and Isotopes, Vol.54, No.5, pp.853-859;
- Gati G, Pop C, Brudașcă F, Gurzău AE, Spînu M,** 2016, The ecological risk of heavy metals in sediment from the Danube Delta. *Ecotoxicology.* 25(4):688-96. doi: 10.1007/s10646-016-1627-9. Epub 2016 Mar 5.
- Guieu C. And Martin J.M.,** 2002, *The Level and Fate of Metals in the Danube River Plume,* Estuarine, Coastal and Shelf Science, Vol.54 (2002), pp.501-512;
- Macklin M.G., Brewer P.A., Hudson-Edwards K.A., Bird G., Coulthard T.J., Dennis I.A., Lechler P.J., Miller J.R., Turner J.N.,** 2006, *A geomorphological approach to the management of rivers contaminated by metal mining,* Geomorphology, Vol.79(2006), pp.423-447;
- Osundiya OO, Oladele RO, Oduyebo OO:** *Multiple antibiotic resistance (mar) indices of Pseudomonas and Klebsiella species isolates in Lagos university teaching hospital* Afr. J. Clin. Exper. Microbiol 2013, 14 (3): 164-168.
- Panin Nicolae,** 2003, *The Danube Delta. Geomorphology and Holocene Evolution: a Synthesis/ Le delta du Danube. Géomorphologie et évolution Holocène: une synthèse,* Géomorphologie: relief, processus, environment, Octobre-Décembre, Vol.9, No.4, pp.247-262;
- Paștiu AI, Pap PL, Vágási CI, Niculae M, Páll E, Domșa C, Brudașcă FG, Spînu M.** *Wild Birds in Romania Are More Exposed to West Nile Virus Than to Newcastle Disease Virus.* Vector Borne Zoonotic Dis. 2016.16(3):176-80.
- Peng Jian-Feng, Song Yong-Hui, Yuan Peng, Cui Xiao-Yu, Qiu Guang-Lei,** 2009, *The remediation of heavy metals contaminated sediment,* Journal of Hazardous Materials, Vol.161, pp.633-640;
- Rappole JH, Derrickson SR, Hubalek Z.** 2000. *Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere.* Emerg Infect Dis;6:319-28.
- Simpson SL, Batley GE.,** 2007, *Predicting metal toxicity in sediments: a critique of current approaches.* Integr Environ Assess Manag., Vol.3, No.1, pp.18-31;

- Spinu M., A. E. Gurzau, G. F. Brudasca, C. D. Sandru, M. Niculae, E. Pall.** *A comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of E. coli strains isolated from aquatic sources: fish, sediment and water*, 16th International Congress On Infectious Diseases, Cape Town, South Africa
- Swayne DE.** 2006, *Occupational and consumer risks from avian influenza viruses*. Dev Biol (Basel);124:85-90.
- Tsiodras S., Kelesidis T., Kelesidis I.** 2008, Human infections associated with wild birds, Journal of Infection 56, 83-98
- Wellington Elizabeth MH, Alistair BA Boxall, Cross P, Feil EJ, Gaze WH, Hawkey PM, Johnson-Rollings AS, Jones DL, Lee NM, Otten W, Thomas CM, Williams AP:** 2013. *The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria*, Lancet Infect Dis, 13: 155–65.

## Revendicări

1. Model de evaluare a contaminării cu metale grele și microflora patogenă la păsări și pești în rezervația Biosferei Delta Dunării, caracterizat prin aceea că ofera o metodologie clară, simplă, cu costuri reduse de evaluare a statusului ecotoxicologic și microbial a mediului abiotic și faunei (păsări și pești)
2. Delimitarea a patru zone de risc toxicologic și microbial conform revendicării 1
3. Model de evaluare a contaminării cu metale grele și microflora patogenă la păsări și pești în rezervația Biosferei Delta Dunării, conform revendicării 1 caracterizat prin aceea că implementarea pe un areal santinelă, conduce la rezultate ce pot fi extrapolate la întreaga Delta a Dunării, cu excepția complexului lagunar Razim-Sinoe



**Figura 1 Zona santinelă (delta secundara a Bratului Sfântu Gheorghe) și punctele de monitorizare**

