

„AOȘR-TEAMS-III” EDIȚIA 2024-2025
„ TRANSFORMAREA DIGITALĂ ÎN ȘTIINȚE”

Domeniul: Științe biologice

RAPORT INTERMEDIAR III



***Contaminarea microbiană a apelor recreaționale: un algoritm
de supraveghere și intervenție punctuală bazat pe inteligența
artificială cu relevanță pentru sănătatea publică***

Echipa de implementare:

Șef lucr. dr. Andra-Cristina BOSTĂNARU-ILIESCU

Drd. Robert CAPOTĂ

Drd. Paula LORENTȚ (CUCU)

Drd. Mălina Maria ȘURUBARU

RAPORT INTERMEDIAR III

pentru perioada August – Iunie 2025

1. Titlul proiectului: *Contaminarea microbiană a apelor recreaționale: un algoritm de supraveghere și intervenție punctuală bazat pe inteligența artificială cu relevanță pentru sănătatea publică*

Raporul intermediar III include:

- *Screening-ul microbiologic periodic al apei și nisipului, cu evaluarea fenotipurilor de rezistență.*
- *Analiza formării biofilmului pe nisipul din zonele de plajă.*
- *Dezvoltarea unui instrument interactiv asistat de inteligența artificială (Machine learning) pentru recunoașterea și cuantificarea indicatorilor microbieni din apă și nisip*

Cuvinte cheie: *apele recreaționale, nisipul de coastă, enterococii, coliformii termotoleranți, levurile, rezistență antimicrobiană, biofilmul, inteligența artificială (AI)*

1.1. Domeniul științific: Științe biologice

1.2. Echipa de implementare:

- Director de proiect: Șef lucr. dr. Andra-Cristina BOSTĂNARU-ILIESCU
- Membru: Drd. Robert CAPOTĂ
- Membru: Drd. Paula LORENȚ (CUCU)
- Membru: Drd. Mălina Maria ȘURUBARU

Colaboratori:

- Prof. univ. dr. Mihai MAREȘ, Microbiologie și Micologie clinică și micotoxicologie
- Dr. João BRANDÃO, Microbiology at National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, National representative to the European Microbiology Experts sub-Group (for the European Bathing and Drinking Water Directives), Centre for Environmental and Marine Studies (CESAM), Human and Environmental Health Laboratory (HuEHL)
- Drd. Dana CIAUȘU-SLIWA, Microbiologie-Imunologie

1. Scopul proiectului

Studierea vieții microbiene din apele și nisipurile recreaționale a fost, până de curând, un domeniu complet ignorat în România, în ciuda creșterii semnificative a utilizării acestor ecosisteme în scopuri turistice și de agrement. Absența unor date concrete privind calitatea microbiologică a acestor medii reprezintă o vulnerabilitate majoră în contextul sănătății publice.

Începând cu anul 2020, odată cu înființarea primului grup național de cercetare dedicat studierii microorganismelor din mediile recreaționale, am inițiat un program sistematic de investigare a calității microbiologice a litoralului românesc. Ulterior, din 1 martie 2025, acest demers a fost extins la nivel internațional prin formarea consorțiului CLIME – *CLinically Important Microorganisms in the Environment*, având ca obiectiv analiza microorganismelor cu relevanță clinică prezente în medii naturale. Activitățile s-au concentrat în mod special pe Marea Neagră, una dintre cele mai vizitate destinații turistice din România, dar și un ecosistem marin de o complexitate ecologică deosebită, cu o biodiversitate semnificativă și un patrimoniu natural de importanță strategică pentru regiunea Europei de Sud-Est.

Marea Neagră, deși oferă oportunități esențiale pentru dezvoltarea durabilă prin turism și transport maritim, se confruntă cu o presiune ecologică fără precedent. În ultimele decenii, activitățile umane intense au dus la dezechilibre ecologice majore. Fenomene precum eutrofizarea (creșterea excesivă a algelor, cauzată de aportul ridicat de nutrienți), hipoxia (scăderea oxigenului dizolvat), pescuitul excesiv, dar și introducerea de specii invazive au alterat profund structura și funcționalitatea ecosistemului marin. În paralel, schimbările climatice contribuie la creșterea temperaturii apei și la intensificarea fenomenelor meteorologice extreme, amplificând astfel potențialul de răspândire și supraviețuire a unor microorganisme patogene sau rezistente la tratamente antimicrobiene.

Pe acest fundal, utilizarea apei și a nisipului de pe litoral în scop recreațional cu activități precum scăldatul, plaja, sporturile acvatice, expune tot mai mulți oameni la riscuri infecțioase insuficient înțelese și slab monitorizate în România. Contactul direct cu aceste medii, în special de către copiii mici, persoanele imunocompromise sau turiștii nerezidenți, poate favoriza apariția unor infecții cutanate, respiratorii, gastrointestinale sau fungice, inclusiv infecții cu tulpini rezistente la antimicrobiene. Lipsa reglementărilor clare și a sistemelor de supraveghere microbiologică aplicate și pentru nisipul de pe plajă (nu doar pentru apă) reprezintă o lacună semnificativă în politicile actuale de sănătate publică.

În acest context, demersul nostru științific urmărește nu doar umplerea unui gol de cunoaștere, ci și crearea unei baze de date naționale privind contaminarea microbială a mediilor recreaționale costiere, cu accent pe rezistența la antimicrobiene și prezența biofilmelor, două aspecte critice, dar adesea neglijate, în analiza riscului epidemiologic asociat zonelor de coastă.

Microorganismele oportuniste și patogene pot contamina habitatele apelor recreaționale prin mai multe surse, inclusiv:

- ✓ materii fecale eliminate direct pe plajă de către oameni, păsări sau animale,
- ✓ afluxul de ape de suprafață,
- ✓ scurgeri de ape pluviale sau de ape subterane contaminate anterior (Figura 1).

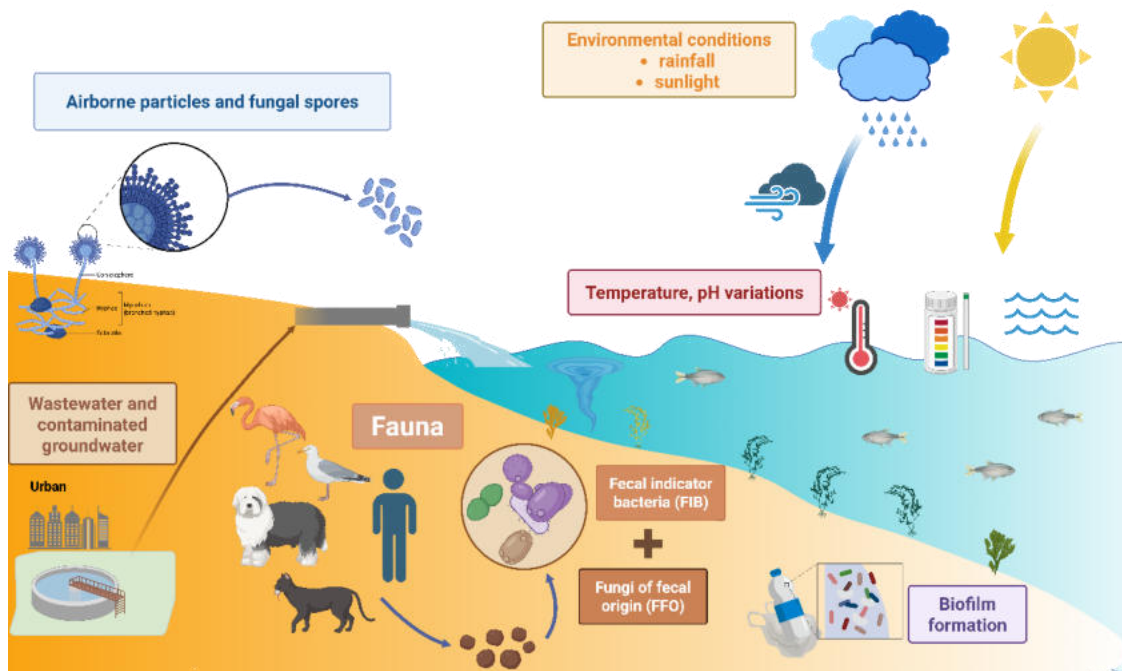


Figura 1 – Diagrama conceptuală care ilustrează procele cheie ce influențează microbiota în zona de lângă țărm (Bostănanu-Iliescu, et. al., 2025)

Odată introduse în mediu, aceste microorganisme pot persista și chiar prolifera în habitate extraintestinale, cum ar fi macrofitele acvatice, sedimentele și biofilmele microbiene. Aceste medii oferă condiții favorabile pentru supraviețuirea și multiplicarea lor, facilitând reintroducerea periodică a agenților patogeni în coloana de apă.

În ultimii ani, pe plajele litoralului Mării Negre au fost raportate numeroase cazuri de enterocolită bacteriană severă, afectând atât copiii, cât și adulții. În acest context, prezentul proiect a avut ca obiectiv principal supravegherea epidemiologică a plajelor, prin monitorizarea următorilor indicatori microbiologici:

- ✓ coliformii termotoleranți,
- ✓ enterococii,
- ✓ levurile și dermatofiții.

Contaminarea microbiană a fost evaluată utilizând atât metode convenționale, cât și tehnici moderne, care urmează a fi analizate în etapa finală a proiectului cu ajutorul inteligenței artificiale, conform unui algoritm de supraveghere epidemiologică dezvoltat în cadrul proiectului.

În ultimii ani, Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a revizuit standardele microbiologice pentru garantarea siguranței apelor recreaționale. Totodată, OMS recomandă monitorizarea atât a

apei, cât și a nisipului de pe plaje, în vederea detectării contaminării bacteriene, inclusiv a agenților patogeni enterici și fungici. Prin urmare, scopul general al proiectului este de a realiza o evaluare calitativă și cantitativă a coliformilor termotoleranți, enterococilor, levurilor oportuniste și patogene, precum și a dermatofiților, alături de analiza profilului de rezistență antimicrobiană al izolațiilor cu potențial patogen.

2. Obiectivele proiectului

Obiectivele proiectului din cadrul acestei etape au vizat activități cu un caracter original, care răspund cerințelor actuale privind monitorizarea microbiologică a mediului costier și prevenirea riscurilor pentru sănătatea publică:

Obiectivul 1: Recoltarea și pregătirea probelor de apă și nisip

Studiul de față a luat în considerare mai mulți parametrii fungici în ceea ce privește contaminarea nisipului și apei din 23 de plaje de pe litoralul românesc al Mării Negre. Pentru a investiga abundența și diversitatea fungilor din nisip și apă de mare, au fost prelevate probe din plaje situate atât în zonele urbane, cât și neurbane.

În vederea izolării levurilor din probele de apă a fost utilizat un sistem portabil multifuncțional de recoltare a apei, bazat pe concentrarea microorganismelor prin ultrafiltrare. De asemenea, zona de recoltare a fost extinsă la patru puncte diferite pe fiecare plajă, pentru a asigura o acoperire mai relevantă a contaminanților bacterieni și fungici (levurici).

Obiectivul 2: Screening microbiologic periodic al apei și nisipului

- Monitorizarea parametrilor microbieni: coliformii termotoleranți, enterococii, levurile și fungii filamentoși cu semnificație clinică;
- Realizarea evaluării cantitative a încărcăturii bacteriene și fungice;
- Izolarea și identificarea agenților patogeni din probele analizate;
- Determinarea profilului de rezistență la antimicrobiene pentru izolatele bacteriene și fungice;
- Investigarea prezenței și răspândirii genelor de rezistență antimicrobiană (AMR) în mediu, cu accent pe rezistența la azoli în cazul speciilor din cadrul genului *Candida*.

Obiectivul 3: Evaluarea biofilmului din nisipul de pe plaje

- Analiza formării și caracteristicilor biofilmului pe substraturi de nisip cu dimensiuni granulometrice și compoziții chimice diferite.

- Dezvoltarea unui model conceptual matematic care descrie eliberarea bacteriilor și levurilor din nisip, cu scopul de a estima riscul asupra sănătății umane.

Obiectivul 4: Dezvoltarea unui instrument interactiv asistat de inteligența artificială (Machine learning) pentru recunoașterea și cuantificarea indicatorilor microbieni din apă și nisip

- ✓ Implementarea unui sistem automat de detecție și enumerare a indicatorilor bacterieni (*coliformii termotoleranți și enterococii*) în probele de apă marină și nisip, cu procesare realizată în aceeași zi cu recoltarea, pentru creșterea acurateții datelor microbiologice.
- ✓ Acesta a constat în dezvoltarea unui instrument interactiv bazat pe inteligență artificială (Machine Learning), destinat detecției și clasificării godeurilor pozitive obținute în microplăci.
- ✓ Integrarea acestui instrument în fluxul de lucru de laborator, pentru automatizarea și standardizarea interpretării rezultatelor, reducând astfel eroarea umană și timpul de analiză.

3. Materiale și metode

Activitatea 1 – Recoltarea și pregătirea probelor de apă și nisip din 23 de plaje de pe litoralul Mării Negre

Activitatea a constat în prelevarea și pregătirea probelor de apă și nisip dintr-un număr de 22 de plaje situate de-a lungul litoralului Mării Negre și în zona Lacului Neptun I. Strategia de eșantionare a fost fundamentată pe criterii de selecție specifice, incluzând recoltarea din patru tipuri de microhabitate: zona uscată a plajei, zona de nisip umed influențată de valuri, zona unei plaje de coastă și cea a unei plaje interioare.

Prelevarea probelor s-a realizat atât în areale urbane, cât și non-urbane (conform Figurei 2), cu o frecvență ridicată în sezonul estival. Simultan, au fost monitorizați parametrii meteorologici relevanți, respectiv temperatura aerului și umiditatea relativă (HR), pentru a corela eventualele variații cu condițiile de mediu înregistrate pe parcursul campaniilor de eșantionare.

Pregătirea și incubarea probelor. Etapele de pregătire și incubare a probelor au fost realizate conform metodologiei descrise anterior în cadrul proiectului Mycosands (Brandão J., Bostănanu-Ilieșcu A.C., 2021), utilizând metoda clasică inclusă în ghidurile internaționale pentru monitorizarea apelor recreaționale.



Figura 2 - Distribuția geografică a punctelor de eșantionare folosind cartografierea cu QGIS (Versiunea 3.10.0-A Coruța). Punctele din cadrul formelor indică locurile de prelevare a probelor de apă și nisip

Pe lângă această abordare convențională, a fost integrată o altă tehnică de procesare a probelor de apă, constând în utilizarea unui sistem portabil de concentrare bazat pe ultrafiltrare (Figura 3). Acest dispozitiv oferă multiple avantaje, dintre care cele mai importante sunt:

- detecția sporită a agenților patogeni, inclusiv în cazul unei concentrații microbiene scăzute;
- cuantificarea precisă a levurilor, contribuind la o evaluare microbiologică mai fidelă;
- reducerea variabilității inter-probă, aspect esențial pentru acuratețea programelor de monitorizare pe termen lung.

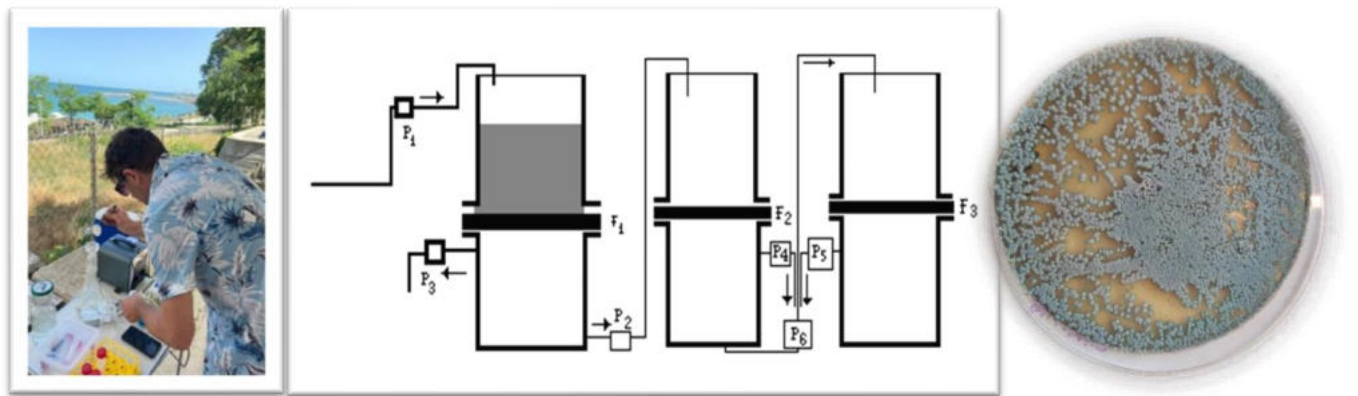


Figura 3 - Diagrama sistemului de ultrafiltrare și concentrarea agenților patogeni din apă

Volumele adecvate din fiecare probă de apă au fost filtrate aseptice prin membrane cu porozitatea de $0,45 \mu\text{m}$, utilizând un sistem de filtrare cu vid (Sartorius, Marea Britanie). Membranele obținute au fost plasate pe medii selective și incubate în două regimuri, în funcție de indicatorul microbiologic urmărit: pentru detectarea prezumtivă a speciei *Escherichia coli*, incubarea s-a realizat inițial la 44°C .

Activitatea 2 – Screening periodic pentru evaluarea microbiologică a apei și nisipului

Evaluarea microbiologică a fost realizată prin determinarea următorilor indicatori: coliformii termotoleranți, enterococii, levurile și funghi filamentoși cu semnificație clinică. Analiza cantitativă a fost efectuată în conformitate cu standardul ISO 13528:2015, pentru determinarea valorilor totale cu un nivel de încredere de 95%. Interpretarea rezultatelor analitice s-a realizat conform recomandărilor Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), respectiv: 60 MPN/g pentru enterococi (metoda numărului cel mai probabil – MPN), echivalent cu 200 CFU/100 mL în apă, asociat unui risc de îmbolnăvire sub 5%; pentru levuri, pragul considerat a fost de 90 CFU/g, indiferent de specie. Estimarea valorilor MPN pentru *Escherichia coli* și *Enterococcus spp.* s-a realizat utilizând medii fluorogene și microplăci standardizate MUD, în conformitate cu standardele EN ISO 9308-3:1999 și EN ISO 7899-1:1999.

Izolarea și identificarea coliformilor termotoleranți, enterococilor, levurilor și dermatofitelor. Izolarea microorganismelor a fost realizată prin metode fenotipice, utilizând medii selective, neselective și cromogene specifice: RAPID'*E.coli*2 Agar (Bio-Rad) și RAPID'*Enterococcus* Agar (Bio-Rad) pentru bacterii, respectiv Sabouraud Dextrose Agar (SDA) și agar Mycosel (suplimentat cu cicloheximidă și cloramfenicol) pentru funghi. Identificarea microorganismelor izolate s-a efectuat prin metode proteomice și moleculare: spectrometrie de masă de tip MALDI-TOF MS și secvențiere a regiunii ITS (Internal Transcribed Spacer). Incubarea plăcilor pentru levuri a fost realizată timp de 5 zile pe mediul SDA, iar pentru dermatofite, timp de 21 de zile pe mediul Mycosel, la temperatura de $27,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Activitatea 3 – Evaluarea profilului de rezistență la antimicrobiene. Determinarea susceptibilității antimicrobiene a markerilor bacterieni a fost realizată prin metoda difuzimetrică Kirby-Bauer.

Testarea pentru producerea de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) și *AmpC* a fost efectuată utilizând discuri impregnate cu cefpodoximă (10 μg), cefotaximă (30 μg) și ceftazidimă (30 μg). Interpretarea diametrelor zonelor de inhibiție s-a realizat conform criteriilor stabilite de Comitetul European pentru Testarea Susceptibilității la Antimicrobiene (EUCAST), pentru a clasifica izolatele ca susceptibile sau rezistente.

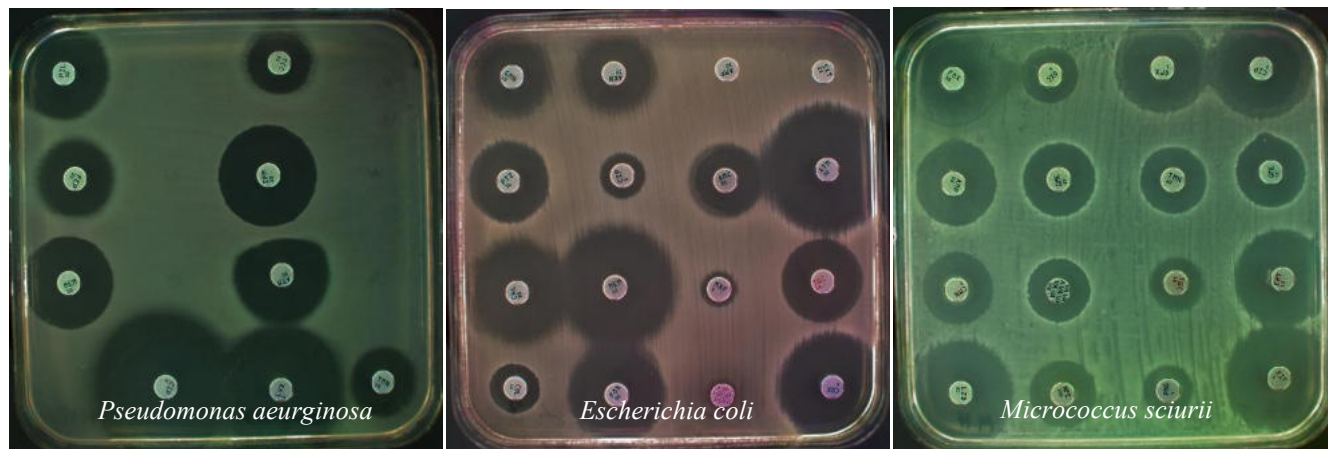


Figura 4 - Interpretarea profilului de rezistență susceptibilității antimicrobiene a markerilor bacterieni a fost realizată după standardul EUCAST

Activitatea 4 - Evaluarea biofilmului format pe nisipul de plajă. Pentru investigarea influenței dimensiunii particulelor de nisip și a compoziției chimice asupra formării biofilmului, au fost utilizate fracții granulometrice distincte (<125 μm, 125–250 μm, >500 μm), sterilizate anterior (Figura 5). Nisipul a fost distribuit în godeuri sterile, urmat de inocularea cu suspensii standardizate de microorganisme marine (10⁷ ufc/mL).

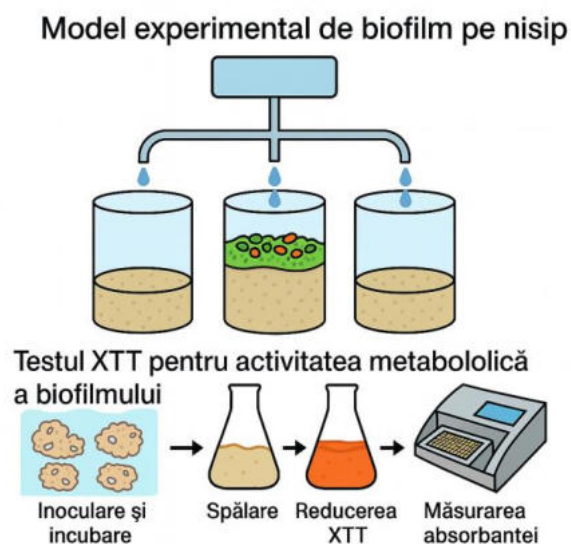


Figura 5 – Schema experimentală de formare a biofilmului pe nisip

După adăugarea apei marine sterile, probele au fost incubate în condiții controlate pentru a permite dezvoltarea biofilmului. Ulterior perioadei de incubare, nisipul a fost spălat ușor cu soluție salină sterilă pentru a îndepărta celulele neaderente. Evaluarea activității metabolice a biofilmului s-a realizat utilizând testul XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazoliu-5-carboxanilidă), care cuantifică activitatea enzimatică a celulelor viabile prin conversia reactivului XTT într-un compus colorat (portocaliu). Reactivul a fost adăugat în fiecare godeu, iar probele au fost incubate timp de 2–4 ore, la o temperatură cuprinsă între 30–37°C, în întuneric. Absorbanta a fost măsurată spectrofotometric la 492 nm, iar valorile optice obținute (DO) au fost considerate direct proporționale cu densitatea și viabilitatea biofilmului.

Activitatea 5 - Dezvoltarea unui instrument interactiv asistat de inteligență artificială pentru analiza indicatorilor microbiologici din apă și nisip

Obiectivul principal al acestei activități a fost dezvoltarea unui instrument software interactiv, implementat în limbajul de programare Python, destinat detecției și cuantificării automate a indicatorilor microbiologici (coliformi și enterococi) din probe de apă și nisip, cu relevanță directă pentru evaluarea riscului microbiologic clinic.

Soluția propusă integrează un model de învățare automată (Machine Learning) pentru detecția și clasificarea godeurilor fluorescente din imaginile obținute prin citirea microplăcilor, corelată cu un modul interactiv de control vizual care permite validarea, ajustarea și corectarea manuală a rezultatelor.

Instrumentul este deosebit de util în fluxurile de lucru din laboratoarele de microbiologie, în special în contexte unde este necesară o precizie ridicată în identificarea și cuantificarea indicatorilor microbiologici, utilizate în monitorizarea siguranței microbiologice a apei marine și a nisipului de pe plaje.

4. Rezultate și discuții

S-a observat o creștere sezonieră a încărcăturii fungice în unele plaje, probabil asociată cu activitatea umană și surse specifice de poluare. Numărul total de ciuperci filamentoase a variat între mai puțin de 10 și peste 1750 UFC/L de apă. Această variație amplă în concentrația fungilor filamentoși indică o influență semnificativă a factorilor externi asupra nivelului de contaminare fungică din mediul marin costier. Creșterea sezonieră sugerează că temperatura, umiditatea,

frecvența turiștilor și aportul de nutrienți/poluare din surse punctiforme (ape reziduale, scurgeri de pe plaje urbanizate etc.) ar putea favoriza proliferarea fungilor.

Valorile ridicate, de peste 1750 UFC/L, pot semnala riscuri potențiale pentru sănătatea publică, în special în cazul persoanelor cu imunitate scăzută sau cu răni deschise care vin în contact cu apa contaminată (Figura 6). În acest context, este importantă monitorizarea continuă a calității microbiologice a apei și identificarea surselor de contaminare.

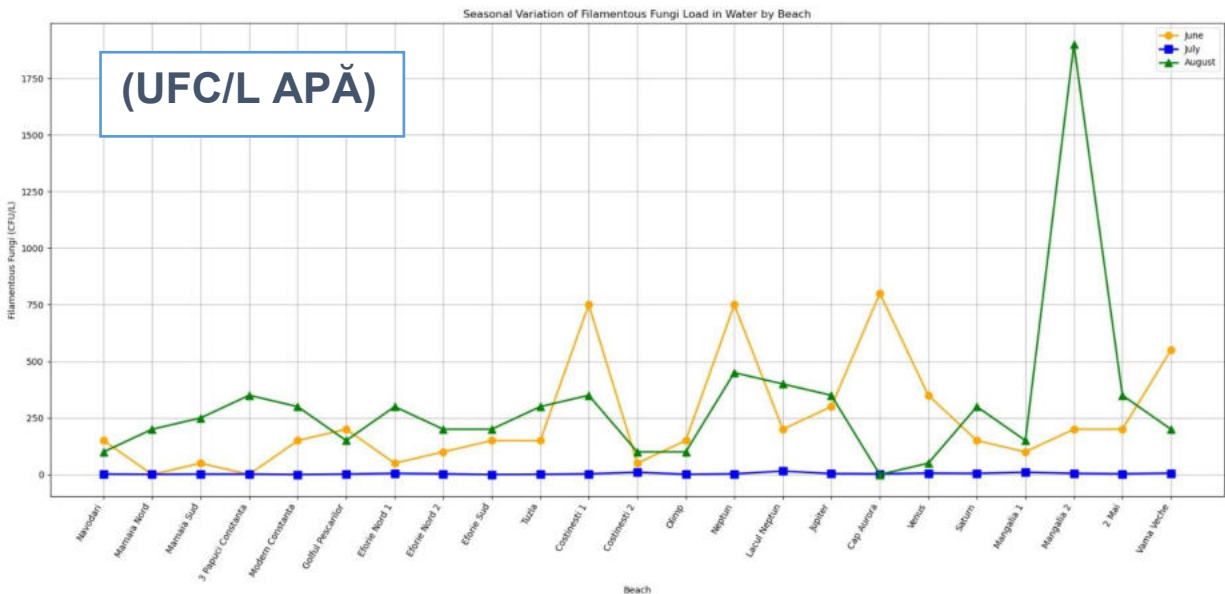


Figura 6 – Numărul total de fungi filamentoși din probele de apă (UFC/L)

Inițial, în timpul procesării probelor de apă, s-au obținut valori cuprinse între 0 și 35 UFC/mL de apă de mare. Totuși, după filtrarea apei, încărcătura microbiană a crescut semnificativ, variind între 50 și 750 UFC/L. Diferența observată între valorile obținute înainte și după filtrare indică eficiența procesului de concentrare microbiană prin filtrare, metodă care permite detectarea mai precisă a contaminării microbiene, în special în cazul probelor cu încărcătură inițială scăzută.

Valorile inițiale între 0 și 35 UFC/mL pot sugera o aparentă calitate bună a apei, însă după filtrare când microorganismele sunt concentrate într-un volum redus, cresc semnificativ (50–750 UFC/L), indicând o contaminare reală, anterior subdeterminată (Figura 7). Această observație subliniază importanța folosirii tehnicilor de filtrare pentru o detecție sensibilă a microorganismelor, mai ales în medii marine, unde diluția naturală poate masca prezența agenților patogeni. Valorile ridicate post-filtrare pot avea implicații în evaluarea riscurilor pentru sănătatea publică în zonele de înbăiere sau pentru protecția ecosistemelor acvatice.

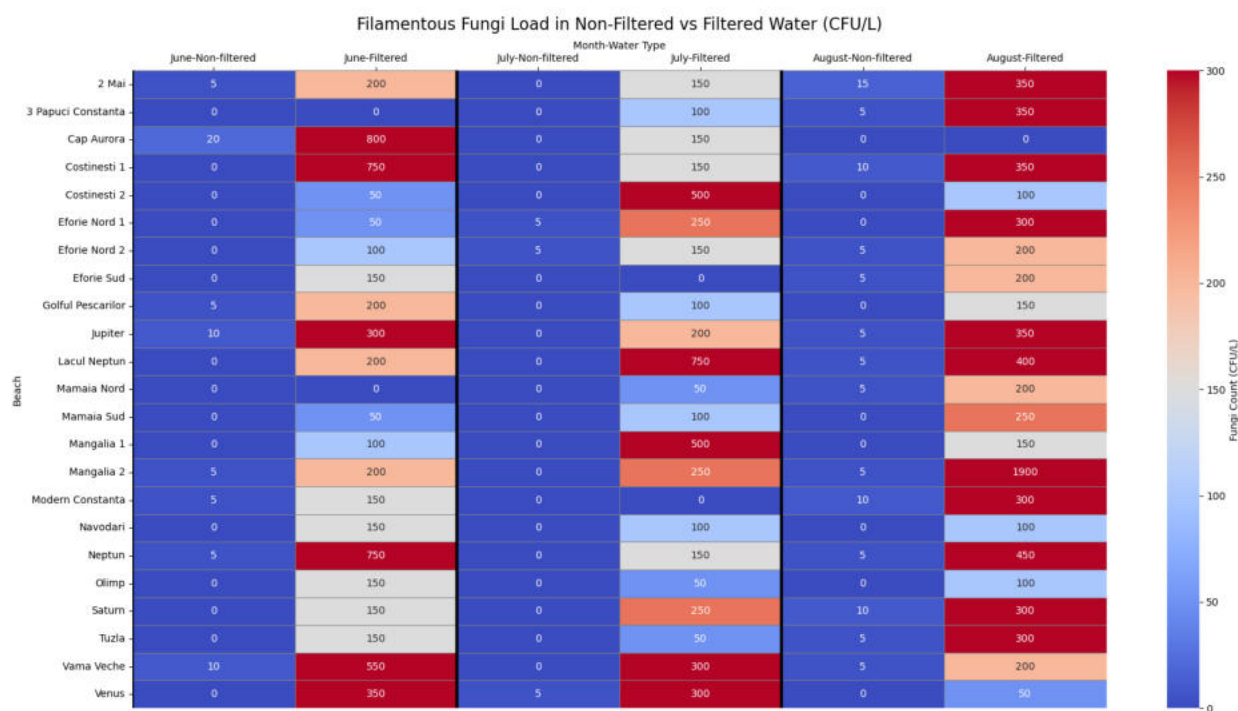


Figura 7 – Compararea numărului total de fungi filamentoși cuantificați prin metoda Mycosand și prin filtrarea probelor de apă

O situație similară a fost observată și în cazul levurilor. Numărul total de levuri a variat între mai puțin de 10 și 7100 UFC/L de apă (Figura 8).

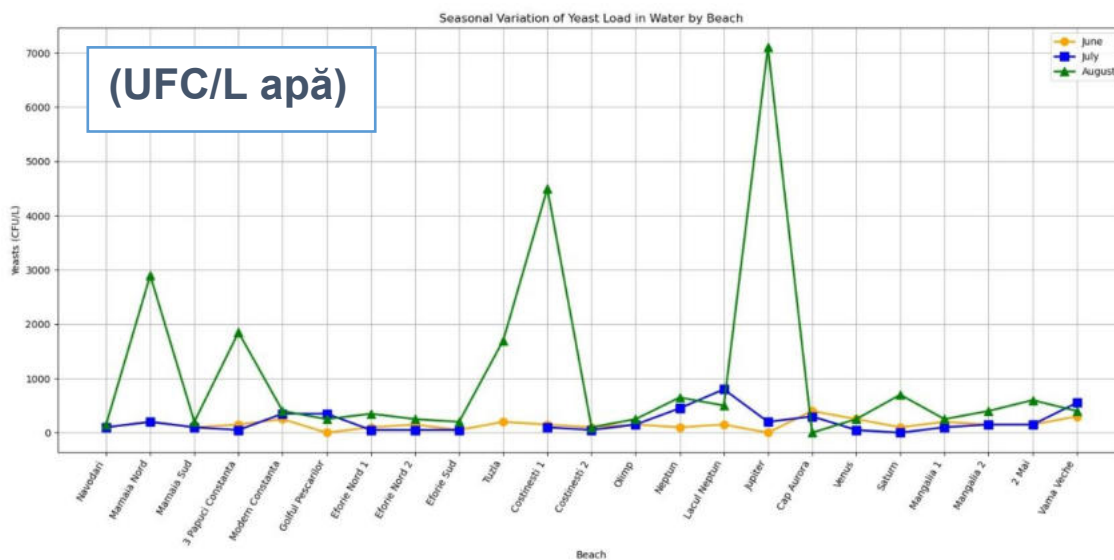


Figura 8 – Numărul total de levuri din probele de apă (UFC/L)

Valorile foarte variabile ale concentrației de levuri în probele de apă de mare (sub 10 până la 7100 UFC/L) indică o prezență neuniformă, influențată probabil de factori locali, cum ar fi intensitatea activității umane, poluarea organică și condițiile climatice (temperatură, salinitate, curenți).

Concentrațiile scăzute (<10 UFC/L) sugerează zone cu impact minim asupra microbiotei fungice, în timp ce valorile extrem de ridicate (până la 7100 UFC/L) pot reflecta o contaminare puternică, posibil de origine antropogenică (ape uzate, deșeuri organice, scurgeri de pe plajele aglomerate etc.).

Prezența levurilor în concentrații ridicate poate reprezenta un indicator al poluării organice și poate influența echilibrul ecologic al zonei marine, având totodată implicații asupra sănătății umane, în special pentru pacienții imunosupresați.

Aceste rezultate evidențiază necesitatea monitorizării continue a calității microbiologice a apelor de înbăiere, dar și adoptarea unor măsuri de prevenire a poluării în zonele costiere.



Figura 9 – Compararea numărului total de levuri cuantificați prin metoda Mycosand și prin filtrarea probelor de apă

Inițial, în timpul procesării probelor de apă, s-au obținut valori cuprinse între 0 și 200 UFC/mL de apă de mare. După filtrare, însă, încărcătura microbiană a crescut semnificativ, variind între 50 și 7100 UFC/L (Figura 9).

Această creștere semnificativă a încărcăturii microbiene după procesul de filtrare evidențiază eficiența metodei de ultrafiltrare în concentrarea microorganismelor din probele de apă marină. Valorile inițiale (0–200 UFC/mL) pot subestima prezența reală a microorganismelor, în special în medii diluate, cum este apa mării.

După aplicarea filtrării, care permite acumularea microorganismelor într-un volum redus, numărul coloniilor detectate a crescut până la 7100 UFC/L, ceea ce reflectă o contaminare microbiană mult mai mare decât s-ar fi presupus inițial. Totodată, rezultatele pot indica prezența unor surse locale de poluare, cum ar fi deversările de ape uzate sau activitățile turistice intense, care pot contribui la creșterea încărcăturii biologice a apei.

Prin utilizarea mediului selectiv CHROMagar și incubarea la 37°C, am reușit izolarea selectivă a levurilor cu relevanță clinică, care au apărut în număr mai redus comparativ cu cele care ar fi putut crește la 30°C pe un mediu non-selectiv (Figura 10).

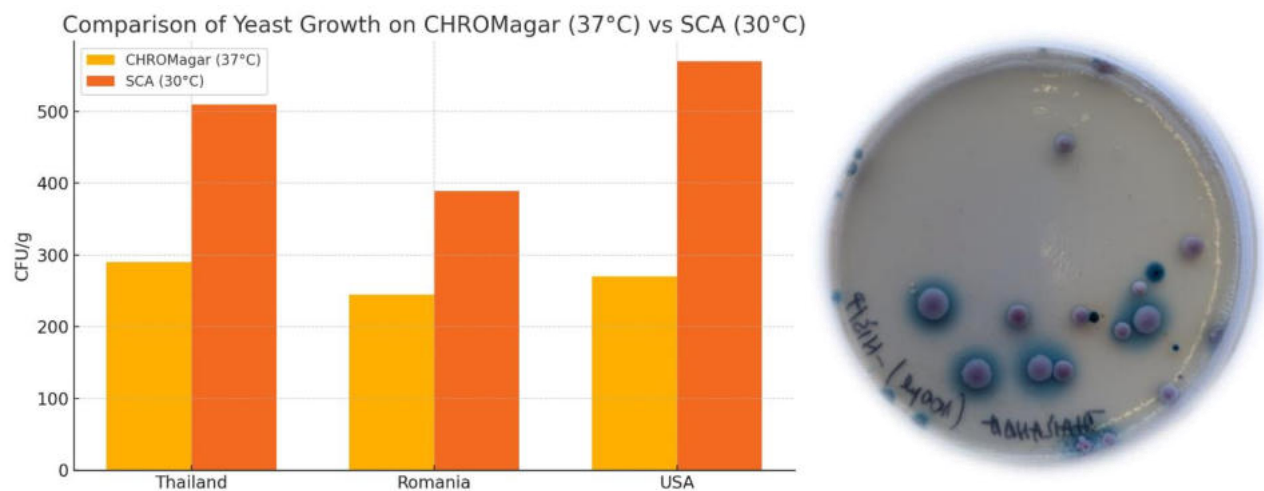


Figura 10 - Compararea levurilor izolate pe CHROMagar (37°C) și SCA (30°C)

Aceste rezultate sugerează că incubarea la 37°C, favorizează selecția speciilor patogene, adaptate mediului uman, în timp ce temperatura mai scăzută (30°C) și utilizarea unui mediu neselectiv permit dezvoltarea unui spectru mai larg de levuri, inclusiv specii saprofite sau cu relevanță redusă clinic. Mediul CHROMagar aduce un avantaj suplimentar prin capacitatea sa de a diferenția specii de *Candida* pe baza culorii coloniilor, facilitând astfel identificarea preliminară

și selecția tulpinilor de interes clinic. Această abordare metodologică îmbunătățește specificitatea izolării în context diagnostic și poate contribui la reducerea riscului de suprainfectare sau colonizare cu specii comensale.

Speciile cel mai frecvent izolate și identificate din probele de apă au fost: *Candida krusei*, *Candida albicans* și *Candida parapsilosis* (Figura 11). Prezența acestor specii de *Candida* în apa testată indică un potențial risc microbiologic, mai ales în contextul în care unele dintre aceste specii sunt recunoscute pentru patogenitatea lor oportunistă. *Candida albicans* este una dintre cele mai frecvent întâlnite specii implicate în infecții umane, în special la pacienții imunocompromiși. *Candida krusei* este notabilă pentru rezistența intrinsecă la fluconazol, ceea ce o face relevantă din punct de vedere clinic. *Candida parapsilosis* este adesea asociată cu infecții nosocomiale, în special în cazul utilizării cateterelor sau altor dispozitive invazive.

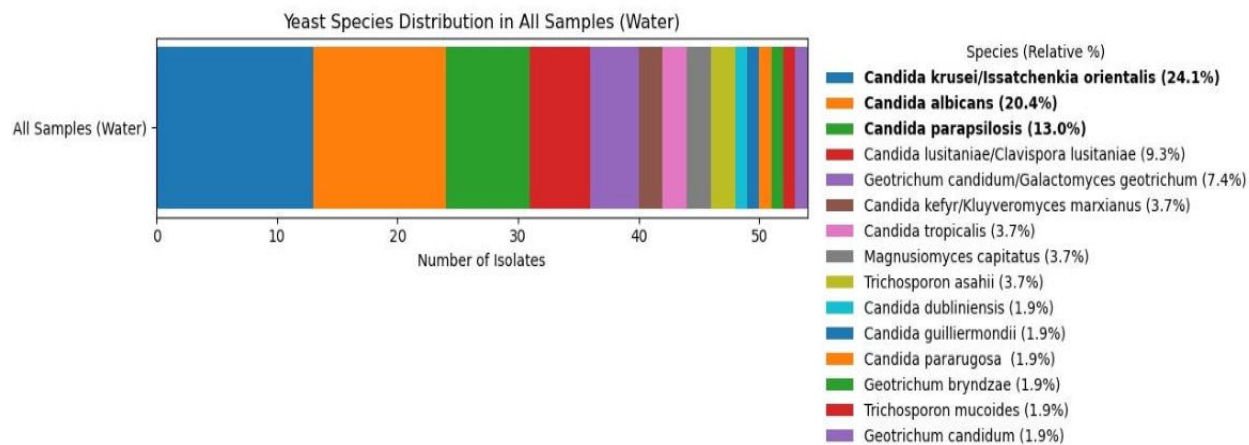


Figura 11 – Principalele specii de levuri identificate din probele de apă

Detecția acestor specii în surse de apă recreativă potențial utilizate de oameni poate sugera o contaminare fecaloidă, o igienă precară a sistemului de distribuție sau o sursă de apă netratată corespunzător. Rezultatele subliniază necesitatea unei monitorizări constante și a unor măsuri de control pentru prevenirea riscurilor de sănătate publică.

Luând în considerare atât probele de apă, cât și cele de nisip, speciile de levuri cu frecvență comună ridicată au fost: *Candida parapsilosis*, *Candida lusitaniae*, *Candida krusei* și *Candida albicans* (Figura 12).

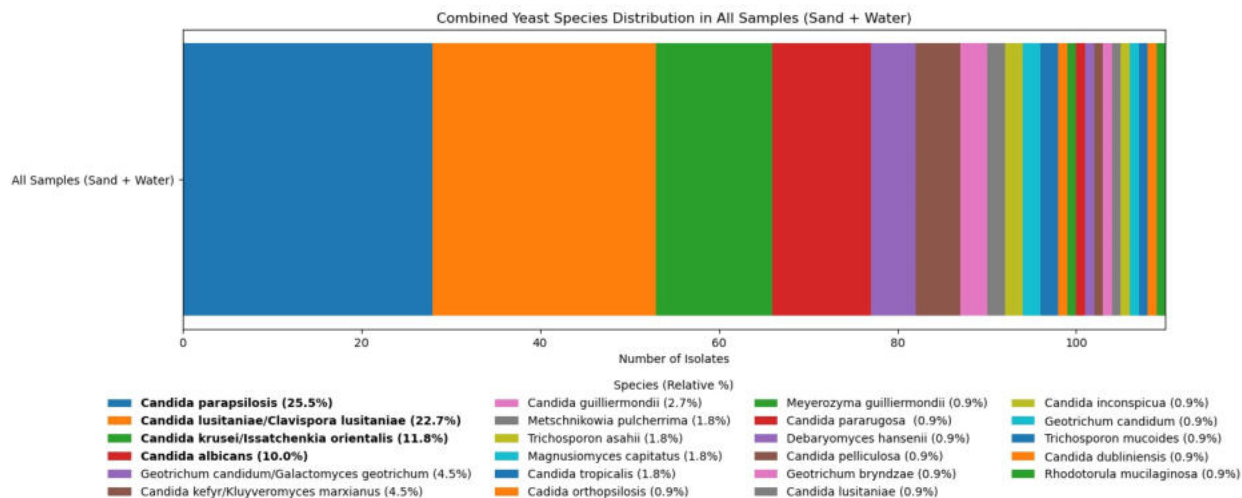


Figura 12 – Principalele specii de levuri identificate în probele de apă și nisip

Identificarea speciilor comune în ambele medii, apă și nisip, oferă informații valoroase privind adaptabilitatea fungilor la condiții variate de umiditate, temperatură și compoziție substratală. Prezența aceluiași specii în ambele surse indică faptul că acestea au o capacitate ridicată de supraviețuire și diseminare în mediile costiere, fiind potențial indicatori biologici ai contaminării antropice sau ai unui dezechilibru ecologic.

Mai mult, frecvența ridicată a unor specii comune sugerează că aceste microorganisme ar putea beneficia de aporturi recurente de nutrienți (de exemplu, resturi organice, poluare cu deșeuri, activitate umană intensă), care le favorizează dezvoltarea simultan în apă și nisip. Această suprapunere între surse justifică necesitatea unei abordări integrate în monitorizarea fungilor de pe litoral, întrucât analiza unui singur mediu (doar apă sau doar nisip) ar putea conduce la o subestimare a riscului real microbiologic.

Mai multe izolate de mediu ale genului *Pseudomonas*, inclusiv *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. mendocina* și *P. monteilii*, au fost recoltate din medii acvatice și costiere din România și Grecia în august 2024. Aceste izolate au fost testate pentru **susceptibilitate antimicrobiană** folosind metoda difuzimetrică.

Antibioticele evaluate au inclus piperacilină, acid ticarcilin-clavulanic, cefepim, imipenem, meropenem, aztreonam, ciprofloxacina, levofloxacina și tobramicina. Interpretarea conform pragurilor EUCAST v13.0 a arătat că izolatele au păstrat în general susceptibilitatea la carbapeneme și aminoglicozide, în timp ce fenotipuri intermediare sau rezistente au fost observate ocazional pentru beta-lactamine precum ticarcilina-clavulanat și aztreonam.

Susceptibilitatea la fluorochinolone a variat în funcție de specie și de locul de origine, izolatele de *P. monteilii* și *P. mendocina* prezentând zone de inhibiție mai largi comparativ cu tulpina clinică de *P. aeruginosa* (Figura 13).

Profilurile antimicrobiene observate sunt caracteristice speciilor non-clinice de *Pseudomonas*, care posedă adesea mecanisme de rezistență intrinsecă, dar nu au dobândit gene de rezistență semnificative prin transfer genetic orizontal.

Aceste date susțin distincția ecologică între populațiile de *Pseudomonas* din medii de mediu și cele nosocomiale, subliniind necesitatea monitorizării rezervoarelor naturale pentru apariția noilor determinanți ai rezistenței. Rezultatele contribuie la eforturile de supraveghere One Health prin stabilirea unor profiluri de susceptibilitate de bază în ecosistemele acvatice și costiere cu intervenție umană minimă.

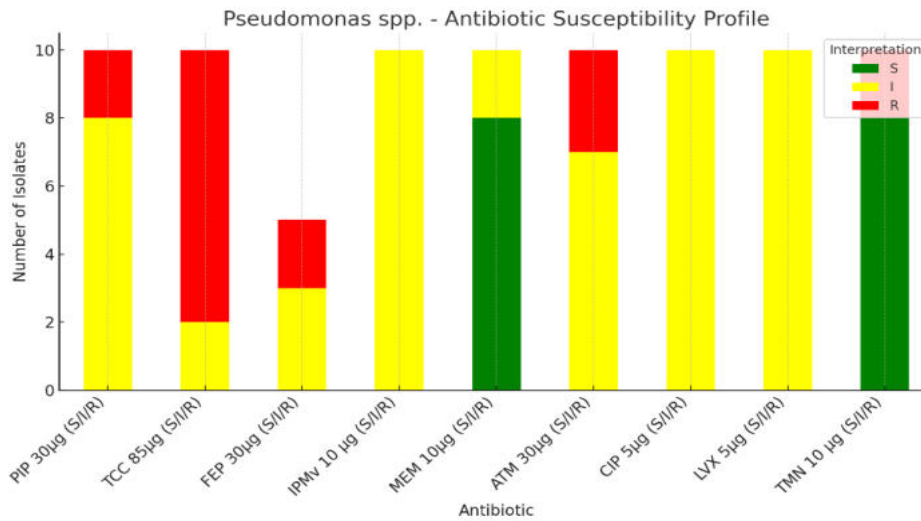


Figura 13 – Profilul de susceptibilitate al speciilor de *Pseudomonas*

Aceste rezultate evidențiază diferențele clare dintre tulpinile clinice și cele de mediu ale genului *Pseudomonas*. În timp ce tulpinile de mediu manifestă rezistență intrinsecă moderată, ele nu par să fi dobândit gene majore de rezistență prin mecanisme de transfer orizontal, ceea ce sugerează o presiune antimicrobiană scăzută în mediile naturale.

Observația că *P. monteilii* și *P. mendocina* prezintă zone de inhibiție mai mari decât *P. aeruginosa* sugerează o susceptibilitate mai mare la fluorochinolone, posibil datorită lipsei expunerii anterioare la antibiotice. Totodată, menținerea susceptibilității față de carbapeneme și

aminoglicozide indică faptul că aceste antibiotice își păstrează eficiența împotriva izolațiilor de mediu.

Aceste constatări întăresc importanța includerii mediilor naturale în programele de supraveghere microbiologică și antimicrobiană, pentru a înțelege mai bine circulația potențială a rezistenței între medii naturale și clinice.

Un izolat de mediu al speciei *Acinetobacter lwoffii*, recoltat din nisip de plajă din afara României în august 2024, a fost evaluat pentru susceptibilitatea antimicrobiană folosind metoda difuziei în disc. Identificat prin MALDI-TOF (Zybio), izolatul a prezentat susceptibilitate completă la toți agenții antimicrobieni testați, inclusiv meropenem (28 mm), imipenem (36 mm), gentamicină (25 mm), tobramicină (19 mm), levofloxacină (35 mm) și trimetoprim-sulfametoxazol (35 mm). Ciprofloxacina a prezentat o zonă de inhibiție de 38 mm, care, conform pragurilor EUCAST v13.0 pentru *Acinetobacter spp.*, corespunde categoriei „sensibil cu expunere crescută” (I) (Figura 14).

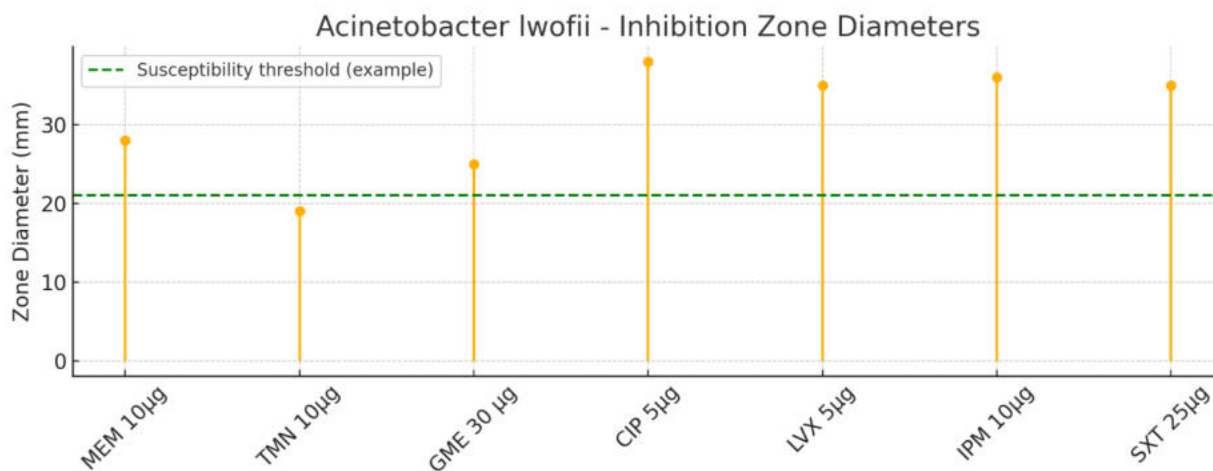


Figura 14 – Profilul de susceptibilitate al speciei de *Acinetobacter lwoffii*

Aceste rezultate sunt în concordanță cu ecologia cunoscută a speciei *A. lwoffii*, o specie non-*baumannii*, tipic asociată cu habitatele naturale de mediu, mai degrabă decât cu mediile clinice. Profilul fenotipic al izolatului confirmă absența trăsăturilor de rezistență dobândite, susținând ipoteza conform căreia mediile naturale, precum plajele nepoluate, pot reprezenta rezervoare de tulpini sensibile la antimicrobiene.

Izolate de mediu ale speciilor *Staphylococcus epidermidis* și *Mammaliicoccus sciuri* au fost colectate din medii de plajă din România și Grecia (Mamaia, Jupiter și Thasos) în august 2024. Aceste tulpini, prelevate din nisip și zone de țărm, au fost supuse testării susceptibilității antimicrobiene utilizând metoda difuziei în disc (Figura 15) .

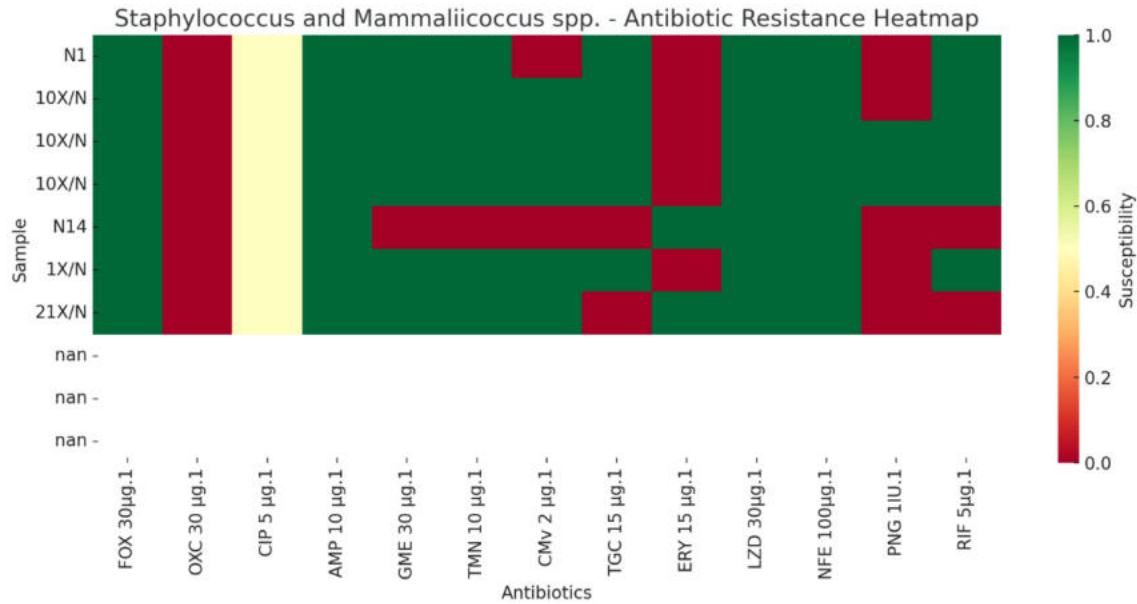


Figura 15 –Profilul de susceptibilitate al speciilor de *Staphylococcus* și *Mammaliicoccus* spp.

Panelul antimicrobian a inclus agenți-cheie pentru cocii Gram-pozitivi: cefoxitină (FOX), oxacilină (OXC), fluorochinolone (OFX, CIP), aminoglicozide (gentamicină, tobramicină), β -lactamine (ampicilină), precum și antibiotice de ultimă instanță, precum linezolid (LZD), vancomicină (VAN), tigeciclină (TGC) și rifampicină (RIF).

Interpretarea conform pragurilor EUCAST v13.0 a arătat că izolatele de *S. epidermidis* au fost, în general, sensibile la fluorochinolone și linezolid, dar au prezentat rezistență constantă la oxacilină și macrolide (eritromicină), sugerând o posibilă rezistență mediată de gena *mecA*.

Izolatele de *M. sciuri* au prezentat profiluri mai eterogene, incluzând cazuri de rezistență la tobramicină, cloramfenicol și vancomicină, deși aceste rezultate pot reflecta trăsături intrinseci de rezistență sau artefacte metodologice, deoarece standardele de interpretare pentru speciile *Mammaliicoccus* nu sunt pe deplin stabilite.

Rezultatele subliniază diversitatea fenotipurilor de rezistență chiar și în rândul stafilococilor coagulazo-negativi din medii naturale. Deși adesea considerați comensali sau

saprofite, acești microorganisme pot acționa ca rezervoare de rezistență transmisibilă, în special în zonele costiere cu activitate umană sau animală. Acest fapt susține importanța integrării izolațiilor non-clinici în cadrele de supraveghere One Health pentru rezistența antimicrobiană.

Modelul experimental de biofilm permite identificarea condițiilor fizice și chimice optime pentru formarea biofilmului pe nisip. Acest lucru este esențial în:

- Monitorizarea calității microbiologice a plajelor;
- Studiul colonizării bacteriene naturale sau contaminante;
- Analiza riscului patogen din zonele de coastă.
-

Tabelul 1

Modelul experimental de biofilm pe nisipul de plajă

Variabilă independentă	Niveluri experimentale
Dimensiunea granulelor	Nisip fin, mediu, grosier
Compoziție chimică	Cuarț pur, nisip natural mixt, nisip cu argilă
Timp de incubare (opțional)	24 h, 48 h, 72 h

Instrument interactiv asistat de inteligență artificială pentru analiza microbiologică a apei și nisipului. Instrumentul propus integrează inteligența artificială într-un flux de lucru destinat analizei imaginilor digitale ale microplăcilor, în scopul identificării și clasificării godeurilor fluorescente (Figura 16). Acesta este aplicabil în evaluarea indicatorilor microbiologici din probe de apă și nisip.

Procesul începe cu încărcarea imaginii microplăcii, urmată de decuparea manuală a zonei relevante pentru a asigura acuratețea detecției. Imaginea prelucrată este apoi analizată de un model de detecție YOLOv8, antrenat pe platforma Roboflow, care identifică individual godeurile.

Clasificarea godeurilor se realizează automat, în funcție de intensitatea semnalului fluorescent, utilizând un prag de luminozitate ajustabil. Rezultatele sunt prezentate sub formă vizuală, afișând atât imaginea originală, cât și varianta adnotată cu godeurile colorate corespunzător stării (pozitiv/negativ).

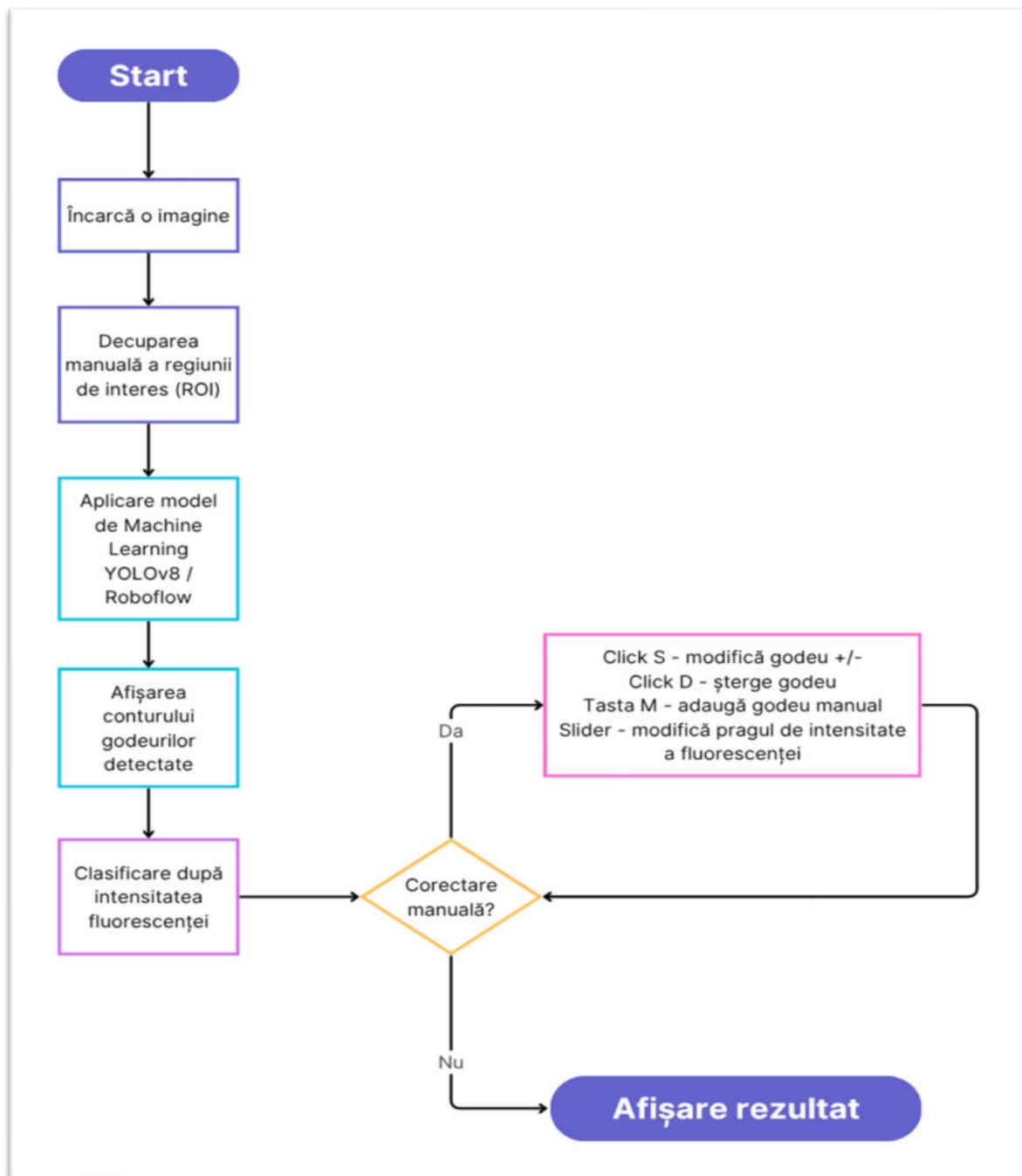


Figura 16 - Descrierea generală a fluxului de lucru – Instrument interactiv asistat de inteligență artificială pentru analiza indicatorilor microbiologici din apă și nisip

Pentru corectarea manuală a rezultatelor, utilizatorul are la dispoziție următoarele funcționalități:

- modificarea stării unui godeu (click stânga);
- ștergerea unui godeu (click dreapta);

- adăugarea unui godeu nou (tasta „M”, cu ajustarea dimensiunii prin scroll);
- anularea ultimei acțiuni (tasta „U”).

Această abordare combină avantajele automatizării cu flexibilitatea intervenției umane, oferind un instrument eficient și adaptabil pentru analiza microbiologică asistată digital.

Funcționalități implementate. Instrumentul dezvoltat oferă un set de funcționalități interactive și automate, concepute pentru a asigura un control precis asupra procesului de detecție și clasificare a godeurilor fluorescente din imaginile microplăcilor (Figura 17). Interfața, realizată cu ajutorul bibliotecii OpenCV, facilitează o interacțiune intuitivă cu imaginea procesată și cu rezultatele analizei.

Structura interfeței este organizată în trei panouri vizuale principale:

- imaginea originală decupată;
- imaginea cu godeurile detectate și clasificate;
- un panou informativ care sintetizează datele obținute.

```
1 import os
2 import cv2
3 import numpy as np
4 from inference import get_model
5 from PIL import Image, ImageDraw, ImageFont
6
7 # Set Roboflow API key
8 os.environ["ROBOFLOW_API_KEY"] = "hJzmwTjzNLwPFzcECi5"
9
10 # Load model
11 model = get_model(model_id="microplates-polygons/3")
12
13 # Image path
14 image_path = r"C:\Users\rober\Desktop\microplaci test threshold\20250321_084758.jpg"
```

Figura 17 - Inițializarea procesului algoritmic

Mediul de lucru și dependențele software. Proiectul a fost dezvoltat și testat într-un mediu virtual denumit MICROPLACI, configurat cu următoarele biblioteci și instrumente:

OpenCV (cv2): pentru afișarea imaginilor, detectarea interacțiunilor cu mouse-ul și desenarea conturilor godeurilor;

- NumPy: pentru operații matriciale și calcule privind intensitatea luminoasă;

- Pillow (PIL): pentru generarea panoului informativ și afișarea textului cu fonturi personalizate;
- Roboflow SDK (inference): pentru integrarea modelului YOLOv8, antrenat specific pentru detecția godeurilor de microplacă;
- Matplotlib: utilizat opțional pentru vizualizări suplimentare sau în scopuri de testare.

Detecție automată și clasificare:

- Imaginea microplăcii este încărcată și, dacă este necesar, rotită pentru aliniere optimă.
- Utilizatorul selectează manual regiunea de interes (ROI).
- Modelul YOLOv8, accesat prin API-ul Roboflow și antrenat pe imagini etichetate manual, este aplicat pe ROI pentru a detecta godeurile. Coordonatele generate sunt convertite în contururi circulare suprapuse imaginii.
- Pentru fiecare godeu detectat, se extrage zona corespunzătoare, iar intensitatea medie a luminozității (în tonuri de gri) este calculată. Clasificarea ca pozitiv sau negativ se face în funcție de un prag de luminozitate ajustabil.
- Rezultatele sunt afișate vizual: contur verde pentru godeuri pozitive și contur roșu pentru cele negative (Figura 18).

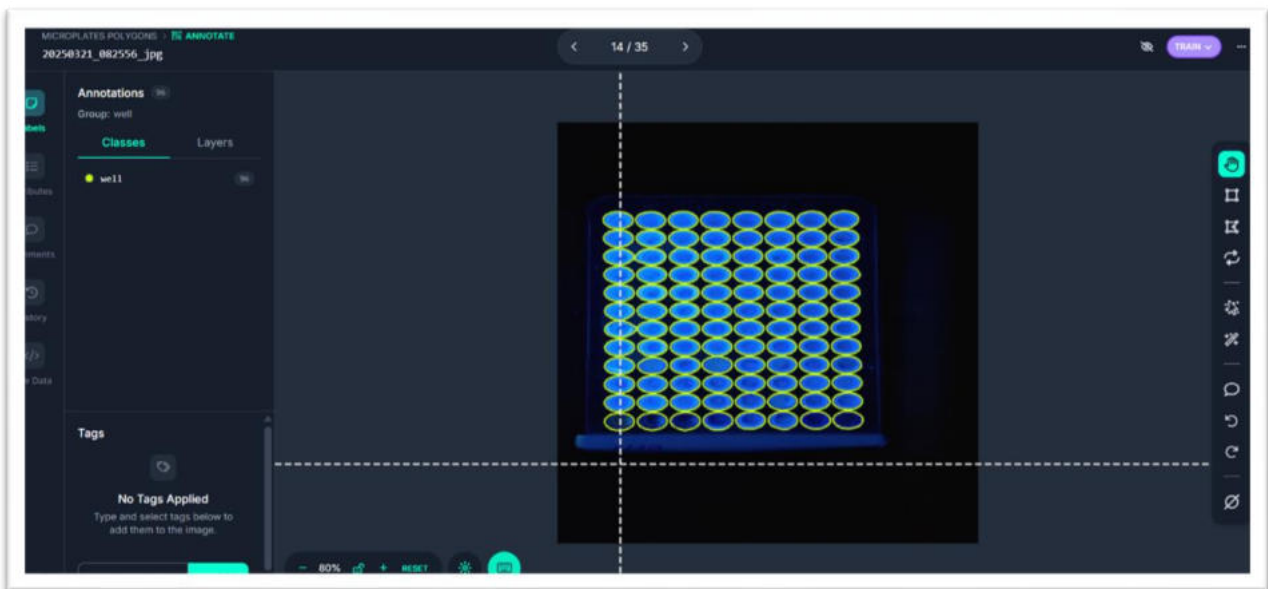


Figura 18 - Etichetarea individuală a godeurilor în platforma Roboflow

Au fost marcate 35 de imagini cu microplăci, fiecare conținând 96 de godeuri. Aceste imagini au fost apoi utilizate pentru a antrena un model de Machine Learning capabil să recunoască într-o imagine încărcată de utilizator locația și conturul godeurilor (Figura 19-20).

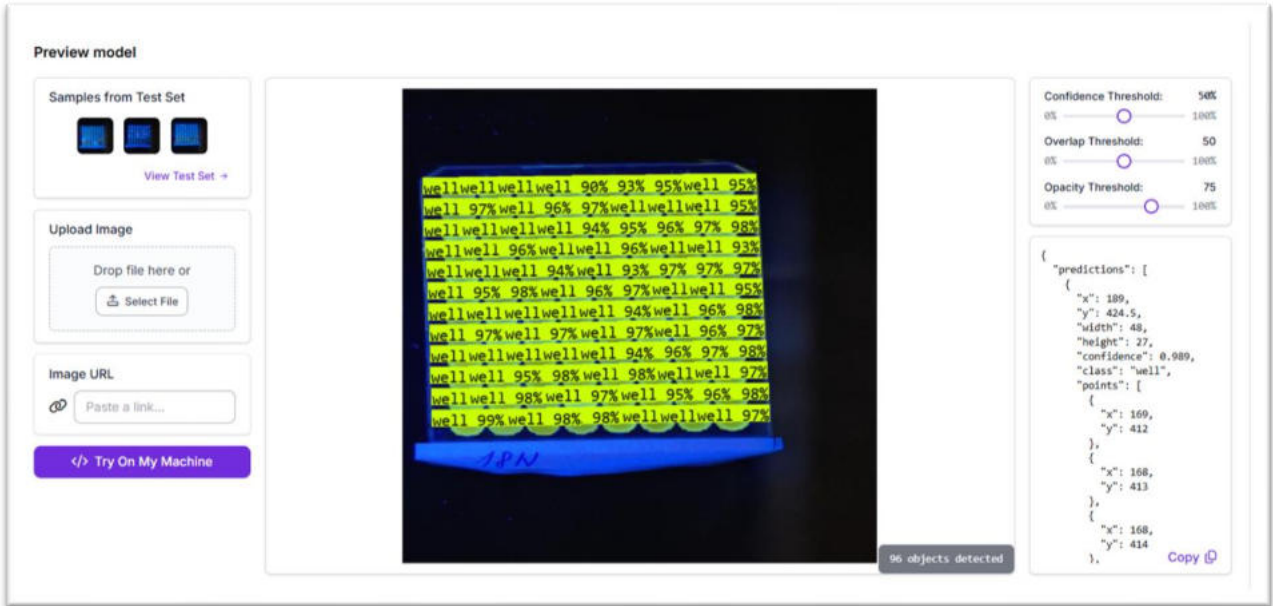


Figura 19 - Evaluarea performanței modelului antrenat

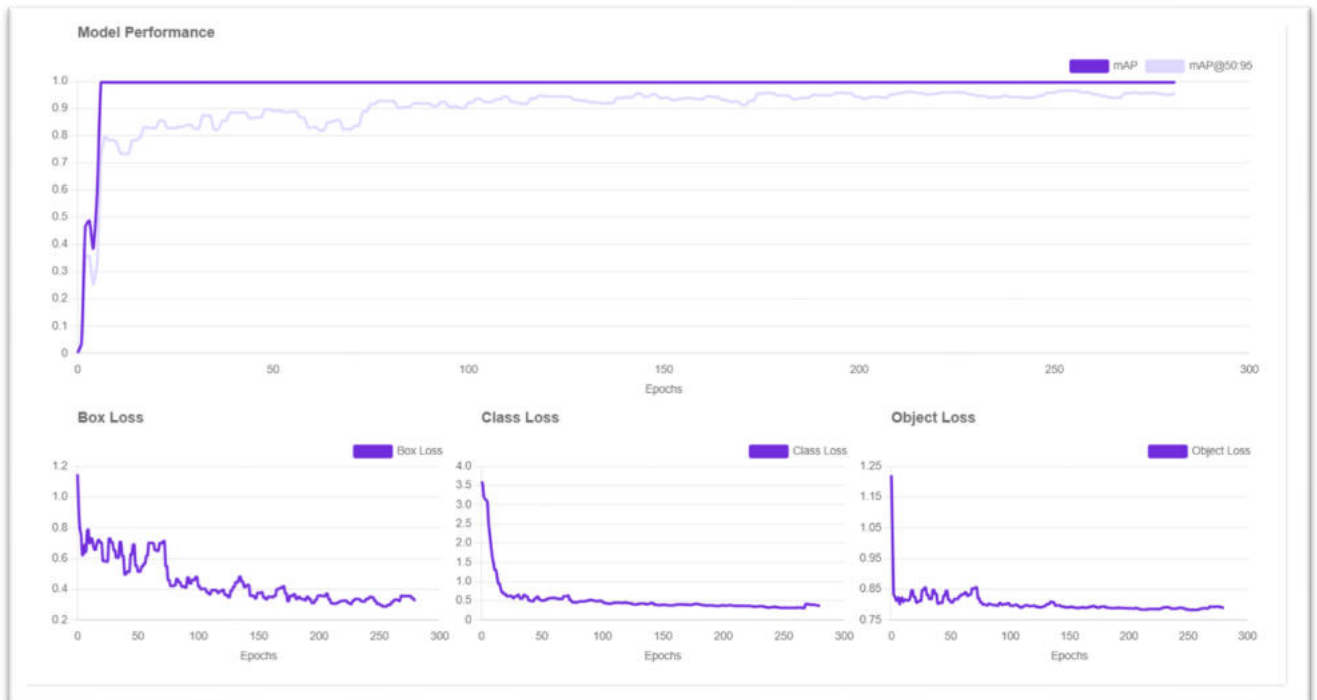


Figura 20 – Parametri de evaluare a performanței modelului antrenat

Vizualizare și informare în timp real Sistemul oferă o interfață de vizualizare în timp real, structurată în trei panouri afișate simultan:

- Imaginea decupată originală, fără elemente grafice suprapuse;
- Imaginea procesată, cu godeurile detectate și adnotate vizual în funcție de clasificare (pozitiv/negativ);
- Panoul informativ, generat cu biblioteca PIL, care conține următoarele date:
 - ✓ Numărul total de godeuri detectate;
 - ✓ Numărul de godeuri clasificate ca pozitive;
 - ✓ Estimarea încărcăturii bacteriene (UFC/mL), calculată proporțional cu numărul de godeuri pozitive (Figura 21).

Această componentă asigură atât transparența procesului analitic, cât și suportul pentru interpretarea rapidă a rezultatelor microbiologice.

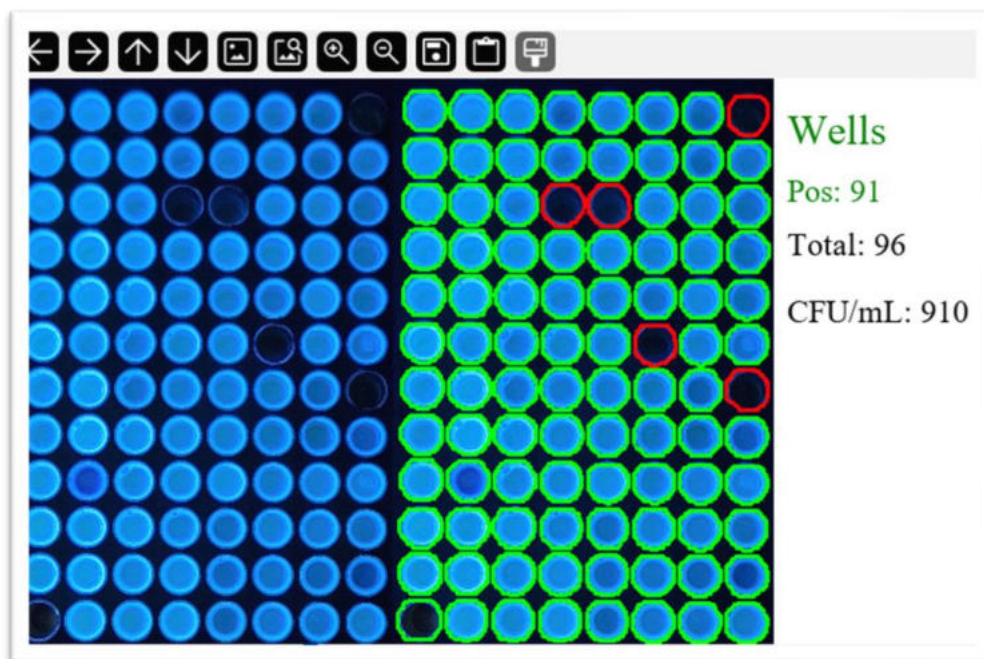


Figura 21 - Afișarea simultană a celor trei panouri – panoul central este interactiv

Interacțiune și corectare manuală. Instrumentul permite intervenția utilizatorului pentru validarea și ajustarea rezultatelor detecției automate, prin următoarele acțiuni:

- Click stânga: modifică starea unui godeu (pozitiv ↔ negativ);
- Click dreapta: marchează un godeu pentru ștergere;

- Tasta „M”: activează modul de adăugare manuală a unui godeu, cu plasare prin cursor și ajustarea razei folosind roțița mouse-ului (scroll);
- Tasta „U”: anulează ultima acțiune efectuată (funcție de tip *undo*).

Control suplimentar. Funcționalități suplimentare includ (Figura 22):

- Ajustarea pragului de clasificare (slider „Threshold”);
- Rotația imaginii (taste A/D);
- Navigare între imagini (tasta N);
- Închidere aplicație (tasta Q).

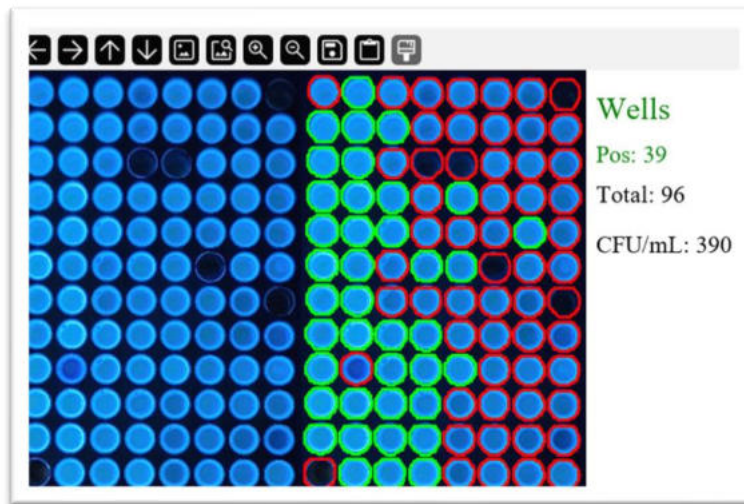


Figura 22 - Ajustarea valorii pragului de clasificare pentru detecția godeurilor pozitive

Provocări întâmpinate și soluții propuse. Dezvoltarea instrumentului a implicat depășirea unor provocări tehnice și de interfață, abordate prin soluții orientate spre precizie, flexibilitate și utilizare intuitivă.

Variabilitatea imaginilor de intrare. Imaginile diferă semnificativ în ceea ce privește luminozitatea, contrastul și orientarea, afectând acuratețea detecției și clasificării.

Soluție: introducerea decupării manuale a ROI-ului și a funcției de rotire a imaginii pentru aliniere corectă.

Praguri de clasificare inflexibile

Un prag static nu acoperă variațiile de expunere din imagini.

Soluție: implementarea unui slider interactiv pentru ajustarea în timp real a pragului de clasificare.

Deteții incorecte sau incomplete. Modelul YOLOv8 poate rata godeuri sau detecta multiple contururi pentru același obiect.

Soluție: integrarea unui sistem de corectare manuală (modificare, ștergere, adăugare, undo).

Necesitatea unei vizualizări clare Interpretarea rezultatelor trebuie să fie rapidă și intuitivă.

Soluție: interfață cu trei panouri:

- imaginea originală decupată;
- imaginea cu godeurile adnotate (verde/roșu);
- panou informativ cu numărul de godeuri pozitive, totalul valid și estimarea UFC/mL.

Referințe bibliografice

1. Boggild, A.K., Libman, M., Greenaway, C., McCarthy, A.E., 2016. Committee to Advise on Tropical M, Travel. CATMAT statement on disseminated strongyloidiasis: prevention, assessment and management guidelines. *Can. Commun. Dis. Rep.* ¼ Releve des maladies transmissibles au Canada 42, 12e19.
2. Brandao, J., Solo-Gabriele, H.M., Gordon, B., Ferguson, A.C., 2015. Recreational ~ environment - pathogenic fungi in public places, information gaps in assessing public health risk. In: Viegas, C., Pinheiro, C., Verissimo, C., Sabino, R., Brandao, J., Viegas, S. (Eds.), *Environmental Mycology in Public Health*. Elsevier.
3. Brandao, J., Verissimo, C., Rosado, M.L., Falc ~ ao, M.L., Giraldes, A., Rosado, C., et al., ~ 2002. Qualidade microbiologica de areias de praias litorais, relat ~ orio final. In: Ambiente Id, editor. *Associação Bandeira Azul da Europa (ABAE) ~*. Britton, E., Hales, S., Venugopal, K., Baker, M.G., 2010. The impact of climate vari ability and change on cryptosporidiosis and giardiasis rates in New Zealand. *Water Health* 8, 561e571.
4. Brown, J.S., Stein, E.D., Ackerman, D., Dorsey, J.H., Lyon, J., Carter, P.M., 2013. Metals and bacteria partitioning to various size particles in Ballona creek storm water runoff. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 320e328. Brown, K.I., Boehm, A.B., 2016. Transport of fecal indicators from beach sand to the surf zone by recirculating seawater: laboratory experiments and numerical modeling. *Environ. Sci. Technol.* 50, 12840e12847.
5. Brown, K.I., Graham, K.E., Boehm, A.B., 2017. Risk-based threshold of gull-associated fecal marker concentrations for recreational water. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 4, 44e48.
6. Brown, S.J., Caesar, J., Ferro, C.A.T., 2008. Global changes in extreme daily temper ature since 1950. *J. Geophys. Res. Atmos.* 113, 11.
7. Burge, C.A., Eakin, C.M., Friedman, C.S., Froelich, B., Hershberger, P.K., Hofmann, E.E., et al., 2014. Climate change influences on marine infectious diseases: implications for management and society. In: Carlson, C.A., Giovannoni, S.J. (Eds.), *Annual Review of Marine Science*, 6. 6. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 249e277.
8. Cosgrove, S.E., Carmeli, Y., 2003. The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. *Clin. Infect. Dis.* 36, 1433e1437

9. Eichmiller, J.J., Borchert, A.J., Sadowsky, M.J., Hicks, R.E., 2014. Decay of genetic markers for fecal bacterial indicators and pathogens in sand from lake superior. *Water Res.* 59, 99e111
10. Gast, R.J., Gorrell, L., Raubenheimer, B., Elgar, S., 2011. Impact of erosion and accretion on the distribution of enterococci in beach sands. *Cont. Shelf Res.* 31, 1457e1461.
11. Zhang, Q., Eichmiller, J.J., Staley, C., Sadowsky, M.J., Ishii, S., 2016. Correlations between pathogen concentration and fecal indicator marker genes in beach environments. *Sci. Total Environ.* 573, 826e830.