



ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOLOGIE BUCUREȘTI

TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

**INTERACȚIUNEA UNOR BACTERII GRAM POZITIVE ȘI GRAM
NEGATIVE CU NANO- ȘI MICROMATERIALE SEMICONDUCTOARE:
ASPECTE FUNDAMENTALE ȘI APLICATIVE**

Coordonator științific:

Prof. dr. Ardelean Ioan

Doctorand:

Neagu Elena-Simona

București
-2019-

CUPRINS

INTRODUCERE	3
Scopul și obiectivele tezei	4
Structura tezei de doctorat	4
CONTRIBUȚII ORIGINALE	5
1. Evaluarea activității antimicrobiene a micro- și nanomaterialelor pe bază de seleniură de zinc (ZnSe) și dioxid de titan (TiO ₂)	5
1.1. Materiale și metode.....	5
1.2. Rezultate și discuții.....	7
1.2.1. Caracterizarea materialelor semiconductoare	7
1.2.1.1 Seleniura de zinc	8
1.2.1.2 Dioxidul de titan	8
1.2.2. Activitatea antibacteriană a dioxidului de titan Aeroxide 25	8
1.2.3. Activitatea antibacteriană a materialelor pe bază de seleniură de zinc..	10
2. Contribuții la identificarea mecanismelor care stau la baza efectului antibacterian al nanomaterialelor de seleniură de zinc	15
2.1. Materiale și metode.....	15
2.2. Rezultate și discuții.....	16
2.2.1. Analiza morfologică a probelor	18
2.2.2. Analiza spectrofluorimetrică de detecție a speciilor reactive de oxigen ...	18
2.2.3. Amplificarea prin PCR a genei pentru ARNr 16S din ADN extras din celulele tratate și netratate	19
2.2.4. Analiza rep-PCR din ADN extras din celule tratate și netratate	20
2.2.5. Analiza spectrofotometrică de verificare a integrității membranare	21
2.2.6. Analiza profilului proteic total prin tehnica SDS-PAGE	22
3. Potențialul aplicativ al unor nanomateriale pe bază de titanat de sodiu	23
CONCLUZII GENERALE.....	24
<i>Contribuții la cunoașterea științifică.....</i>	26
Bibliografie selectivă.....	27
Lista lucrărilor științifice publicate în tematica tezei de doctorat	31

CUVINTE CHEIE:

ANTIBACTERIAN

DIOXID DE TITAN

SELENIURĂ DE ZINC

NANOMATERIALE

MICROMATERIALE

SEMICONDUCTOR

Escherichia coli

Staphylococcus aureus

Virgibacillus halodenitrificans

INTRODUCERE

Nanomaterialele au devenit parte din viața cotidiană, fiind utilizate într-un număr impresionant de produse, precum cosmetice și produse de îngrijire personală, produse farmaceutice, pigmenți în vopsele, alimente, hârtie, biosenzori etc. Efectul acestora asupra mediului înconjurător a captat atenția cercetătorilor din domeniu, iar studiile în acest sens sunt în creștere continuă. Mai mult decât atât, este absolut necesară evaluarea proprietăților fizico-chimice ale nanomaterialelor, precum dimensiunea, forma, solubilitatea, structura cristalină, chimia suprafeței etc., și stabilirea rolului fiecărei caracteristici în manifestarea toxicității acestora (Gatoo și colab., 2014).

În prezent, o categorie specială de nanomateriale anorganice, cea a semiconductorilor, este intens studiată. Când dimensiunea materialelor este redusă la scară nanometrică, proprietățile fizico-chimice ale acestora se modifică radical în comparație cu omologii lor convenționali aflați în forma macroscopică (Tran și colab., 2011). Suprafața specifică și raportul suprafață/volum cresc semnificativ pe măsură ce dimensiunea materialului scade. Parametrii, precum mărimea, forma sau caracteristicile de suprafață, pot fi modificați în funcție de potențialul aplicativ (Seil și colab., 2013).

Astfel, aceste proprietăți noi ale nanomaterialelor semiconductoare prezintă un interes semnificativ atât pentru cercetarea științifică cât și pentru domeniul tehnologic, cu aplicații în nanofotonică, nanoelectronică, senzori, dispozitive de imagistică, cataliză, celule solare etc. (Suresh și colab., 2013).

Datorită proprietăților unice, o parte dintre aceste nanomateriale prezintă proprietăți antibacteriene, acționând asupra unui spectru larg de bacterii Gram-pozitive și Gram-negative. Nanomaterialele pot fi utilizate cu succes în lupta împotriva bacteriilor rezistente la antibiotice (Martinez și colab., 2019). Pe de altă parte însă, bacteriile sunt organisme esențiale pentru viață, datorită rolului extrem de important pe care acestea îl prezintă în circuitul biogeochimic al elementelor. Drept urmare, apare o “dualitate” în cercetarea bionanotehnologică. Un prim aspect este reprezentat de potențialul aplicativ al acestor nanomateriale fabricate, iar cel de-al doilea aspect este de a înțelege și limita impactul acestora asupra mediului înconjurător.

Scopul și obiectivele tezei

Lucrarea a avut ca scop identificarea unor micro- și nanomateriale semiconductoare cu proprietăți antibacteriene, selectarea structurilor care au prezentat efect inhibitor mărit asupra unor tulpini de bacterii Gram-pozitive și Gram-negative și stabilirea mecanismelor care stau la baza caracterului antibacterian. De asemenea, studiile au avut ca scop și identificarea potențialului aplicativ al unor nanomateriale pe bază de titanat de sodiu, în vederea folosirii pentru obținerea unor mortare prototip pentru intervenții de restaurare.

Cercetările experimentale au avut ca obiective principale:

1. Evaluarea activității antibacteriene a unor micro- și nanomateriale semiconductoare pe bază de seleniură de zinc (ZnSe) și dioxid de titan (TiO₂)
2. Studii privind identificarea mecanismelor care stau la baza efectului antibacterian al materialelor semiconductoare
3. Testarea potențialului bacteriostatic/bactericid al unor nanotuburi de dioxid de titan asupra unor tulpini de bacterii halofile/halotolerante izolate de pe pictura murală din Mănăstirile Humor (jud. Suceava) și Hurezi (jud. Vâlcea), implicate în procesul de biodeteriorare a monumentelor istorice.

Structura tezei de doctorat

Teza de doctorat este organizată în două părți principale, urmate de concluziile generale, bibliografie și lista publicațiilor în tematica tezei.

Prima parte a lucrării (Capitolele 1, 2 și 3) cuprinde un studiu bibliografic în care sunt prezentate generalități despre micro- și nanomaterialele cu proprietăți antibacteriene, rolul proprietăților fizico-chimice ale acestora în manifestarea caracterului antibacterian, precum și informații despre mecanismele care stau la baza activității antimicrobiene.

Cea de-a doua parte a lucrării (Capitolele 4, 5 și 6) conține rezultatele cercetărilor experimentale, interpretarea acestora, precum și concluziile obținute în urma studiilor efectuate. În cadrul capitolului 4 s-au inclus date care au vizat evaluarea activității antibacteriene a unor materiale pe bază de seleniură de zinc, sintetizate prin metoda hidrotermală, dar și a pulberii comerciale de dioxid de titan, Aeroxide P25, după o perioadă de iradiere de 1h. În capitolul 5 sunt prezentate studii experimentale cu privire la identificarea mecanismelor care stau la baza efectului antibacterian al nanomaterialelor pe bază de seleniură de zinc. Ultimul capitol cuprinde un studiu dedicat potențialului aplicativ al unor nanotuburi pe bază de titanat de sodiu, prin testarea efectului antibacterian a structurii oxidice asupra unor tulpini de bacterii halofile/halotolerante izolate de pe pictura murală din Mănăstirile Humor (jud. Suceava) și Hurezi (jud. Vâlcea), implicate în procesul de biodeteriorare a monumentelor istorice.

CONTRIBUȚII ORIGINALE

1. Evaluarea activității antimicrobiene a micro- și nanomaterialelor pe bază de seleniură de zinc (ZnSe) și dioxid de titan (TiO₂)

1.1 Materiale și metode

Materiale noi pe bază de seleniură de zinc (ZnSe) au fost utilizate pentru efectuarea testelor. Sinteza și caracterizarea acestora s-a realizat în cadrul Institutului de Chimie Fizică “Ilie Murgulescu” al Academiei Române. Un număr de 4 probe au fost introduse în teste și au fost notate astfel:

- Proba 1- ZnSe cu morfologie sferică
- Proba 2- ZnSe cu morfologie tip floare
- Proba 3- Pd/ZnSe cu morfologie tip floare (forma dopată a ZnSe)
- Proba 4- TiO₂-ZnSe cu morfologie tip floare (forma dopată a ZnSe)

Metoda de obținere a noilor structuri pe bază de ZnSe a fost cea hidrotermală, sinteza efectuându-se la temperatura de 120⁰C, prin folosirea unui amestec, în raport echimolar, de selenit de sodiu (Na₂SeO₃, 99% min, Alfa Aesar) și sulfat de zinc (ZnSO₄·7H₂O, 99,5%, Roth).

În calitate de agent reducător a fost folosită hidrazina ($N_2H_4 \cdot H_2O$ 98%, Alfa Aesar). În funcție de valoarea de pH, dar și a timpului de reacție au fost obținute materialele cu morfologia propusă (Neagu și colab., 2019).

Pentru efectuarea studiului experimental, s-au utilizat două tulpini bacteriene de referință, reprezentate de bacteria Gram-negativă *Escherichia coli* ATCC 25922 și bacteria Gram-pozitivă, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pentru a observa, prin comparație, răspunsul celulelor bacteriene după tratamentul cu probele de material. În teste a fost folosită și o tulpină de bacterie halotolerantă, Gram-pozitivă, *Virgibacillus halodenitrificans* (colecția IBB), izolată de pe suprafața unui cristal de sare din mina Unirea, Slănic Prahova.

Concentrațiile de materiale pe bază de seleniură de zinc folosite pentru experimente au fost de 0,05 mg/mL și 0,5 mg/mL, pentru probele 1, 2 și 4, și de 0,05 mg/mL pentru proba 3.

Mediile de cultură conținând celulele bacteriene tratate cu probele de material, au fost incubate în condiții de agitare (150 rpm), timp de 24 ore, la 37°C (*E. coli* și *S. aureus*) și 48 ore, la 28°C (*V. halodenitrificans*). Proba martor a fost reprezentată de cultura bacteriană netratată.

Efectul structurilor anorganice asupra tulpinilor *E. coli* și *S. aureus* a fost urmărit după 4, 6 și 24 ore de la tratament.

Testarea susceptibilității bacteriei halotolerante *V. halodenitrificans* la acțiunea materialelor s-a efectuat după 24 și 48 ore de la inoculare.

În cazul dioxidului de titan, 1 g de dioxid de titan a fost cântărit și transferat într-o placă Petri sterilă și supus iradierii la 365 nm, la o distanță de 5 mm, timp de 1h, cu ajutorul lămpii UV portabile VILBER LOURMAT VL-4.LC 230V/50/60 Hz. Imediat după iradiere, dioxidul de titan a fost pus în contact cu 20 mL mediu de cultură, iar suspensia rezultată a fost sonicată pe baie de apă, după care s-a adăugat inoculul bacterian. Celulele bacteriene, tratate și netratate au fost incubate, în condiții de agitare (150 rpm), în prezența dioxidului de titan, la temperaturile potrivite de creștere și timpii specificați. Intensitatea luminoasă din interiorul incubatorului a fost de 4,6 lucși.

La intervalele de timp indicate în protocol, au fost prelevate probe în vederea stabilirii efectului dioxidului de titan asupra celulelor bacteriene.

Metode clasice de microbiologie, optice și biochimice au fost utilizate pentru a determina eficiența micro- și nanomaterialelor semiconductoare.

1.2. Rezultate și discuții

1.2.1. Caracterizarea materialelor semiconductoare

1.2.1.1. Seleniura de zinc

Structurile de ZnSe cu morfologie sferică (Fig 1 a) se caracterizează prin dimensiuni micrometrice, în timp ce materialele în forma simplă, cât și dopată, cu morfologie tip floare (Fig 1 b,c), prezintă dimensiuni nanometrice (grosime <10 nm, lățime de 500 nm și lungime în domeniul micrometric (1-2 μm)).

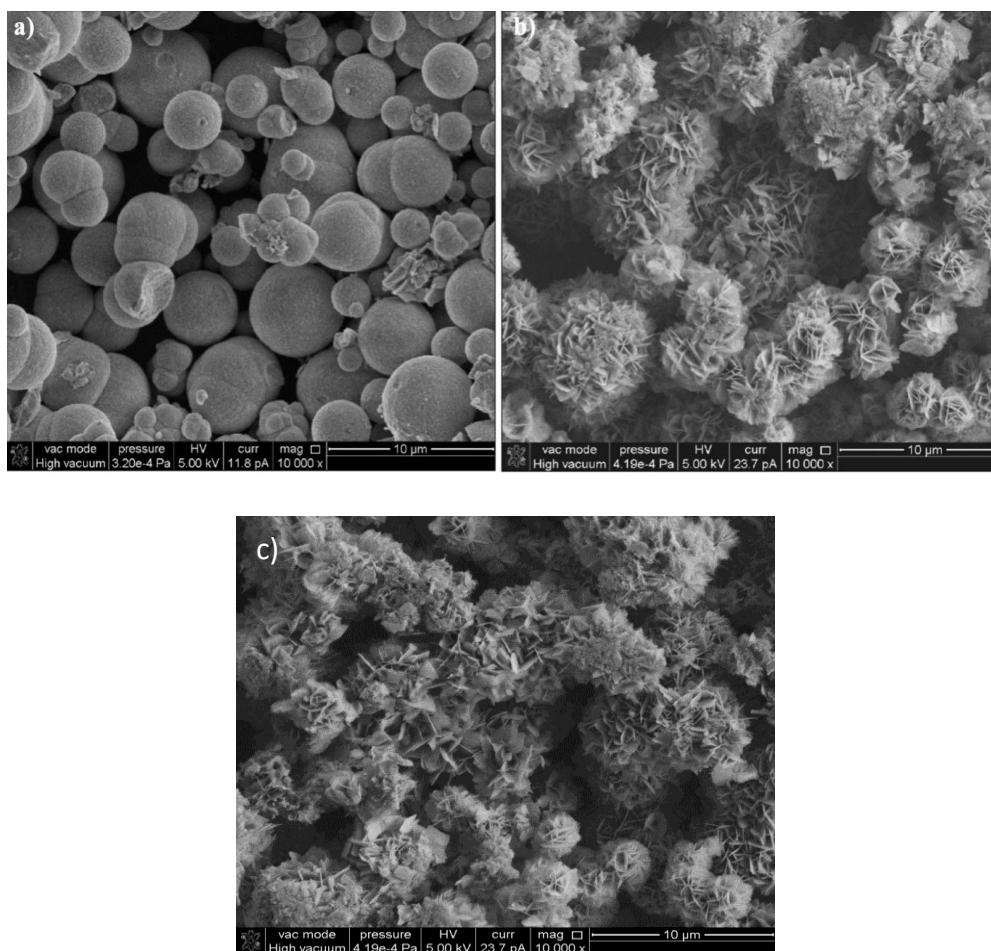


Fig. 1 Micrografii SEM ale structurilor de ZnSe sintetizate:

a) *sfere de ZnSe; b) ZnSe cu morfologie tip floare; c) TiO₂-ZnSe cu morfologie tip floare (Neagu și colab., 2019).*

1.2.1.2 Dioxidul de titan

Pulberea Aeroxide P25 este formată dintr-un amestec de rutil și anatas, în proporție de aproximativ 1:4. În conformitate cu specificațiile descrise de producător, dioxidul de titan prezintă următoarele caracteristici: morfologie sferică, 21 nm, suprafața specifică (35-65 m²/g), densitate (4,26 g/mL la 25⁰C).

1.2.2. Activitatea antibacteriană a dioxidului de titan Aeroxide P25

Din rezultatele prezentate în Tabelul 1 (a, b) se observă acțiunea inhibitorie a dioxidului de titan, iradiat timp de 1h, dar și neiradiat, asupra celulelor de *E. coli*, însă, efectul celor două forme ale nanopulberii este unul bacteriostatic.

Pentru tulpina de referință *S. aureus* s-a obținut un procent de reducere a coloniilor de 100%, după 4 și 6 ore de la expunerea celulelor la nano-TiO₂ P25 în forma neiradiată, în comparație cu proba martor, netratată (Tabel 2).

În cazul tulpinii *V. halodenitrificans*, a fost observat efect inhibitor mărit pentru cele două probe de dioxid de titan, acesta crescând odată cu timpul de expunere (Tabel 3 a, b). Însă, s-a remarcat o ușoară rezistență a bacteriei Gram-pozitive la acțiunea nanopulberii, în ambele forme testate, comparativ cu cele două tulpini de referință. De asemenea, s-au constatat diferențe în ceea ce privește aspectul coloniilor care s-au dezvoltat pe mediul de cultură, acestea fiind de dimensiuni mult mai mici comparativ cu proba martor.

Modificările morfologice ale coloniilor de *V. halodenitrificans* pot fi atribuite dioxidului de titan, care a acționat ca un factor de stres, bacteria dezvoltând un mecanism de adaptare după contactul cu materialul.

Tabel 1. (a) Estimarea numărului de colonii care s-au format pe mediul de cultură LB după 4, 6 și 24 ore de la incubarea celulelor de *E. coli* cu nano-TiO₂; (b) Procentul de reducere a numărului de colonii.

a)

	ufc/mL			
	T ₀	T _{4h}	T _{6h}	T _{24h}
TiO ₂ p25 iradiat 1h	4,8x10 ⁸	1x10 ⁸	9x10 ⁸	9,5x10 ¹⁰

$TiO_{2\ p25}$ neiradiat	$5,0 \times 10^8$	2×10^8	2×10^9	$5,1 \times 10^{10}$
<i>E. coli</i> (martor)	$4,9 \times 10^8$	$3,5 \times 10^9$	$9,3 \times 10^{10}$	$11,6 \times 10^{10}$

(b)

Reducerea numărului de colonii (%)	T_{4h}	T_{6h}	T_{24h}
$TiO_{2\ p25}$ iradiat 1h	97,14	99,03	18,1
$TiO_{2\ p25}$ neiradiat	94,28	97,84	56,03

Tabel 2. Estimarea numărului de colonii care s-au dezvoltat pe mediul de cultură LB după 4, 6 și 24 ore de la incubarea celulelor de *S. aureus* cu nano- TiO_2 .

	<i>ufc/mL</i>			
	T₀	T_{4h}	T_{6h}	T_{24h}
$TiO_{2\ p25}$ iradiat 1h	$5,0 \times 10^8$	$1,1 \times 10^5$	0	8×10^8
$TiO_{2\ p25}$ neiradiat	$5,1 \times 10^8$	4×10^4	0	0
<i>S. aureus</i> (martor)	$5,1 \times 10^8$	nd	nd	nd

nd-număr nedeterminat, coloniile nu au putut fi numărate

Tabel 3. (a) Estimarea numărului de colonii care s-au format pe mediul de cultură LB după 4, 6 și 24 ore de la incubarea celulelor de *V. halodenitrificans* cu nano- TiO_2 ; (b) Procentul de reducere a numărului de colonii.

(a)

	<i>ufc/mL</i>		
	T₀	T_{24h}	T_{48h}
$TiO_{2\ p25}$ iradiat 1h	$5,12 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
$TiO_{2\ p25}$ neiradiat	$5,1 \times 10^8$	$7,9 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
<i>V. halodenitrificans</i> (martor)	$5,18 \times 10^8$	$6,9 \times 10^8$	$9,2 \times 10^8$

(b)

Procentul de reducere a numărului de colonii (%)	T_{24h}	T_{48h}
$TiO_{2\ p25}$ iradiat 1h	76,8	86,9
$TiO_{2\ p25}$ neiradiat	88,5	98,4

1.2.3. Activitatea antibacteriană a materialelor pe bază de seleniură de zinc (ZnSe)

Rezultatele obținute după aplicarea metodei directe de apreciere a creșterii bacteriei *E. coli*, în prezența materialelor de seleniură de zinc, au demonstrat faptul că nanoflorile, în concentrație de 0,5 mg/mL au prezentat efect inhibitor asupra acesteia. S-a observat sensibilitatea tulpinii la acțiunea materialelor de seleniură de zinc în forma dopată cu dioxid de titan, fiind obținut un procent de reducere a numărului de colonii, după 4 și 6 ore de la incubare, de 98,8%, respectiv 99,6%, în comparație cu proba martor (Tabel 4).

Tabel 4. (a) Estimarea numărului de colonii dezvoltate pe mediul de cultură LB, în prezența materialelor, după 4, 6 și 24 ore de la inoculare, pentru tulpina *E. coli*; (b) Procentul de reducere a numărului de colonii.

(a)

Tulpina	Proba	ZnSe (mg/mL)	Unități formatoare de colonii (ufc/mL)				
			T0	T4h	T6h	T24h	
<i>E. coli</i>	1	0,05	$1,9 \times 10^6$	$1,9 \times 10^{10}$	5×10^{10}	$8,9 \times 10^{10}$	
		0,5	$1,5 \times 10^6$	$2,6 \times 10^{10}$	$5,1 \times 10^{10}$	$8,7 \times 10^{10}$	
	2	0,05	$1,9 \times 10^6$	$2,4 \times 10^{10}$	$4,9 \times 10^{10}$	$8,9 \times 10^{10}$	
		0,5	$1,5 \times 10^6$	$1,7 \times 10^{10}$	$3,6 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^{10}$	
	3	0,05	$1,3 \times 10^6$	$2,7 \times 10^{10}$	$4,8 \times 10^{10}$	$8,8 \times 10^{10}$	
	4	0,05	$1,2 \times 10^6$	$2,6 \times 10^{10}$	$4,9 \times 10^{10}$	$8,4 \times 10^{10}$	
		0,5	$1,7 \times 10^6$	3×10^8	$2,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	
	<i>E. coli</i> (martor)			$1,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^{10}$	$4,8 \times 10^{10}$	$8,7 \times 10^{10}$

(b)

Tulpina	Proba	ZnSe (mg/mL)	Reducerea numărului de colonii (%)		
			4h	6h	24h
	1	0,05	20,8	0	0

		0,5	0	0	0
<i>E. coli</i>	2	0,05	0	0	0
		0,5	25	27,1	85,1
	3	0,05	0	0	0
	4	0,05	0	0	0
		0,5	98,8	99,6	99,8

Datele obținute, după creșterea tulpinii bacteriene Gram-pozitive, *S. aureus*, în prezența structurilor oxidice, timp de 4, 6 și 24 ore în mediul de cultură LB, au demonstrat, de asemenea, sensibilitatea tulpinii la acțiunea nanoflorilor, atât în forma dopată, cât și în forma simplă. Prin urmare, seleniura de zinc nedopată, în concentrație de 0,5 mg/mL a prezentat efect inhibitor mărit asupra bacteriei, obținându-se o reducere a coloniilor, după 4, 6 și 24 ore de la tratament, de 98,9%, 98,63%, respectiv 99,1% (Tabel 5).

Tabel 5. (a) Estimarea numărului de colonii dezvoltate pe mediul de cultură LB, în prezența materialelor, după 4, 6 și 24 ore, pentru tulpina bacteriană *S. aureus*; (b) Procentul de reducere a numărului de colonii.

(a)		ZnSe (mg/mL)	Unități formatoare de colonii (ufc/mL)			
Tulpina	Proba		T0	T4h	T6h	T24h
<i>S. aureus</i>	1	0,05	$2,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^{10}$	$4,5 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^{11}$
		0,5	$2,7 \times 10^6$	$1,8 \times 10^{10}$	$4,8 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^{11}$
	2	0,05	$2,7 \times 10^6$	2×10^{10}	$4,4 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^{11}$
		0,5	$2,3 \times 10^6$	2×10^8	6×10^8	2×10^9
	3	0,05	$2,5 \times 10^6$	$1,4 \times 10^{10}$	$5,4 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^{11}$
	4	0,05	$2,7 \times 10^6$	9×10^9	$4,3 \times 10^{10}$	$2,1 \times 10^{11}$

	0,5	$2,4 \times 10^6$	$1,9 \times 10^9$	$8,1 \times 10^9$	$5,9 \times 10^9$
	<i>S. aureus (martor)</i>	$3,1 \times 10^6$	$1,9 \times 10^{10}$	$4,4 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^{11}$

(b)

Tulpina	Proba	ZnSe (mg/mL)	Reducerea numărului de colonii (%)		
			4h	6h	24h
<i>S. aureus</i>	1	0,05	26,3	0	0
	1	0,5	5,2	0	0
	2	0,05	0	0	0
	2	0,5	98,9	98,63	99,1
	3	0,05	10,5	0	0
	4	0,05	52,6	2,3	4,5
	4	0,5	90	81,6	97,3

Materialele testate, în concentrație de 0,05% au prezentat efect inhibitor scăzut asupra tulpinilor de referință, *E. coli* și *S. aureus*, observându-se o diminuare a numărului de colonii după 24 ore doar pentru tulpina *V. halodenitrificans*.

S-a remarcat sensibilitatea tulpinii Gram-pozitive *V. halodenitrificans* la acțiunea tuturor materialelor testate, indiferent de concentrația folosită (Tabel 6).

Tabel 6. (a) Estimarea numărului de colonii formate pe mediul de cultură MH, în prezența materialelor, la momentele T0, 24 ore și 48h, pentru tulpina de bacterie halotolerantă *V. halodenitrificans*; (b) Procentul de reducere a numărului de colonii.

(a)

Tulpina	ZnSe (mg/mL)	Unități formatoare de colonii (ufc/mL)			
		T0	T24h	T48h	
<i>V. halodenitrificans</i>	1	0,05	2×10^8	$2,3 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$
		0,5	$2,1 \times 10^8$	$8,9 \times 10^8$	$7,2 \times 10^7$
	2	0,05	$2,2 \times 10^8$	$1,8 \times 10^9$	$8,4 \times 10^8$
		0,5	$2,1 \times 10^8$	$1,03 \times 10^8$	$7,9 \times 10^6$
	3	0,05	$2,1 \times 10^8$	$2,1 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$
	4	0,05	$2,3 \times 10^8$	$2,2 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$
		0,5	$2,4 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$	4×10^8
	<i>V. halodenitrificans (martor)</i>		$2,5 \times 10^8$	$2,8 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$

(b)

Tulpina	Proba	ZnSe (mg/mL)	Reducerea numărului de colonii (%)	
			24h	48h
<i>V. halodenitrificans</i>	1	0,05	17,85	34,5
		0,5	68,21	97,5
	2	0,05	35,71	71
		0,5	96,32	99,7
	3	0,05	25	34,5
	4	0,05	21,42	0
		0,5	81,78	86,2

Rezultatele obținute au indicat un grad de inhibiție ridicat al probei de seleniură de zinc în forma nedopată, asupra tulpinilor de bacterii Gram-pozitive, comparativ cu tulpina Gram-negativă.

Activitatea antibacteriană a celor patru probe de nanoparticule de ZnSe de diferite concentrații a fost determinată și prin folosirea clorurii de 2,3,5-trifeniltetrazoliu (TTC) ca indicator cromogen și a fost exprimată ca $\mu\text{g/mL}$ trifenilformazan. Rezultatele obținute în cadrul acestui experiment au arătat o bună corelație cu cele obținute în cadrul testului anterior, metoda dovedindu-se eficientă în aprecierea viabilității celulare.

Rezultatele obținute prin metoda directă de analiză antibacteriană, dar și prin metoda biochimică de evaluare a viabilității celulare, au fost confirmate și de cele obținute prin metoda spectrofotometrică de analiză. Metoda însă nu poate fi aplicată în orice condiții, din cauza erorilor de citire care pot apărea, dezavantajul constând în faptul că acestea contribuie la turbiditatea probei.

Pe baza datelor obținute, dar și a celor raportate în literatura de specialitate, capacitatea antibacteriană a materialelor sintetizate, în special a nanostructurilor de ZnSe cu morfologie florală (0,5 mg/mL), în forma simplă (proba 2) și dopată cu dioxid de titan (proba 4), poate fi atribuită proprietăților fizico-chimice ale acestuia, compoziției și morfologiei semiconductorului respectiv, dar și microorganismului cu care interacționează. De asemenea, activitatea antibacteriană a materialelor testate a fost influențată și de timpul de contact cu microorganismele testate, dar și de concentrația de material folosită, numărul de unități formatoare de colonii (ufc/mL), scăzând pe măsură ce concentrația de material crește.

2. Contribuții la identificarea mecanismelor care stau la baza efectului antibacterian al nanomaterialelor pe bază de seleniură de zinc (ZnSe)

2.1 Materiale și metode

În urma studiilor de evaluare a activității antibacteriene a formei comerciale de dioxid de titan, Aeroxide P25, și a materialelor pe bază de seleniură de zinc (ZnSe) au fost selectate pentru următoarele teste structurile anorganice care au prezentat cea mai bună activitate antibacteriană. În comparație cu nano-TiO₂, unul dintre cel mai utilizat, cunoscut și intens studiat semiconductor, în special datorită proprietăților fotocatalitice, dovedindu-se un foarte bun agent antibacterian, seleniura de zinc, în prezent, cunoaște un interes crescut în ceea ce privește metodele de sinteză și caracterizare și foarte puține studii oferă informații legate de proprietățile antibacteriene ale acestuia. În vederea efectuării unor cercetări care vizează înțelegerea mecanismelor care stau la baza efectului inhibitor al materialelor, au fost selectate nanomaterialele de seleniură de zinc cu morfologie florală, în forma simplă, dar și dopată cu dioxid de titan, în concentrație de 0,5 mg/mL. Tulpina Gram-negativă, *E. coli* ATCC 25922 și tulpina Gram-pozitivă, *S. aureus* ATCC 25923 au fost folosite pentru efectuarea experimentelor.

Până în prezent, nu au fost relatate astfel de studii în literatura de specialitate.

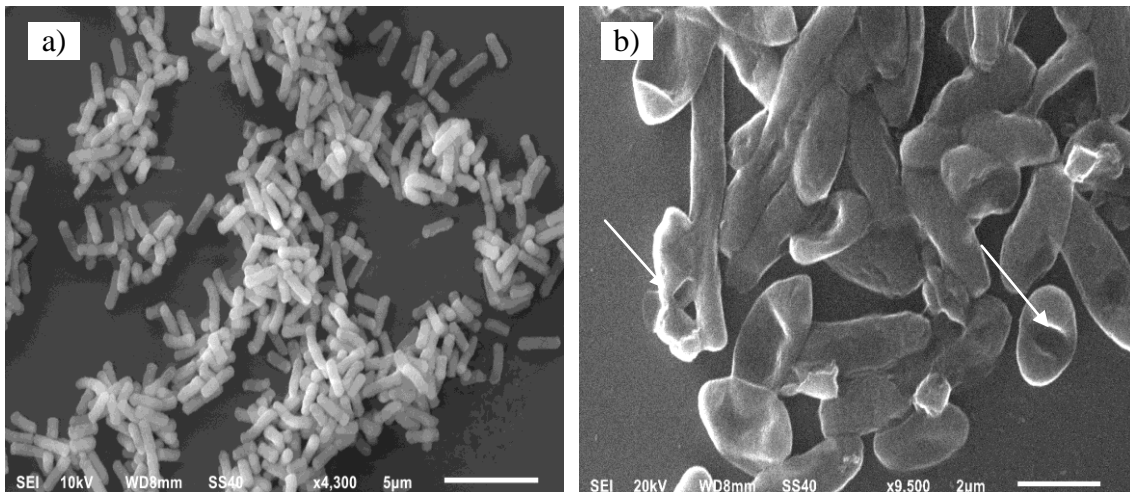
Astfel, după interacțiunea materialelor cu celulele bacteriene, timp de 4 ore, în mediul de cultură LB, în condiții de agitare (150 rpm), ne-am propus:

1. analiza posibilelor modificări morfologice pe care materialele le-ar putea induce celulelor, folosind microscopia electronică de baleiaj (SEM);
2. analiza spectrofluorimetrică de detecție a speciilor reactive de oxigen;
3. amplificarea prin PCR (reacția de polimerizare în lanț) a genei pentru ARNr 16S din ADN extras din celulele tratate și netratate;
4. analiza rep-PCR (reacția de polimerizare în lanț pe bază de secvențe repetitive) din ADN extras din celulele tratate și netratate;
5. analiza spectrofotometrică de verificare a integrității membranare;
6. analiza profilului proteic total din lizatul celular tratat și netratat, prin tehnica SDS-PAGE (electroforeza în mediu denaturant).

2.2 Rezultate și discuții

2.2.1. Analiza morfologică a probelor folosind microscopia electronică de baleiaj

Investigarea prin SEM a efectului materialelor pe bază de seleniură de zinc asupra celor două tulpini de bacterii selectate a demonstrat un răspuns diferit al celulelor la acțiunea nanoflorilor, imaginile susținând rezultatele obținute în urma testelor de evaluare a activității antibacteriene ale materialelor. Astfel, după 4 ore de la incubarea celulelor cu nanoflorile, au fost observate modificări semnificative ale celulelor de *E. coli* (deformări celulare, apariția unor “cratere” pe suprafața membranelor, eliberarea conținutului celular) (Fig. 2) comparativ cu celulele de *S. aureus* (Fig. 3), remarcându-se mecanisme diferite de acțiune în funcție de caracterul Gram al tulpinilor.



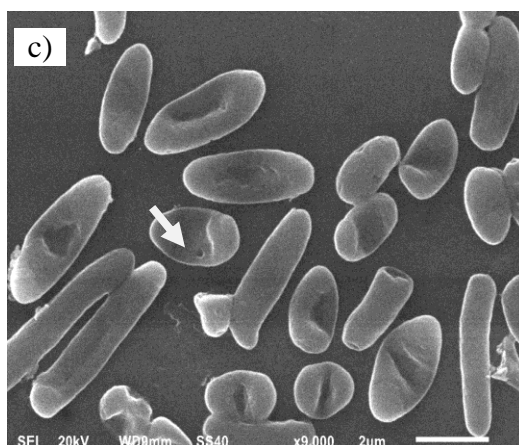


Fig. 2. Imagini SEM ale celulelor de *E. coli* netratate (a) și tratate cu ZnSe cu morfologie florală (b) și $TiO_2/ZnSe$ cu morfologie florală (c), după 4 ore de la incubare.

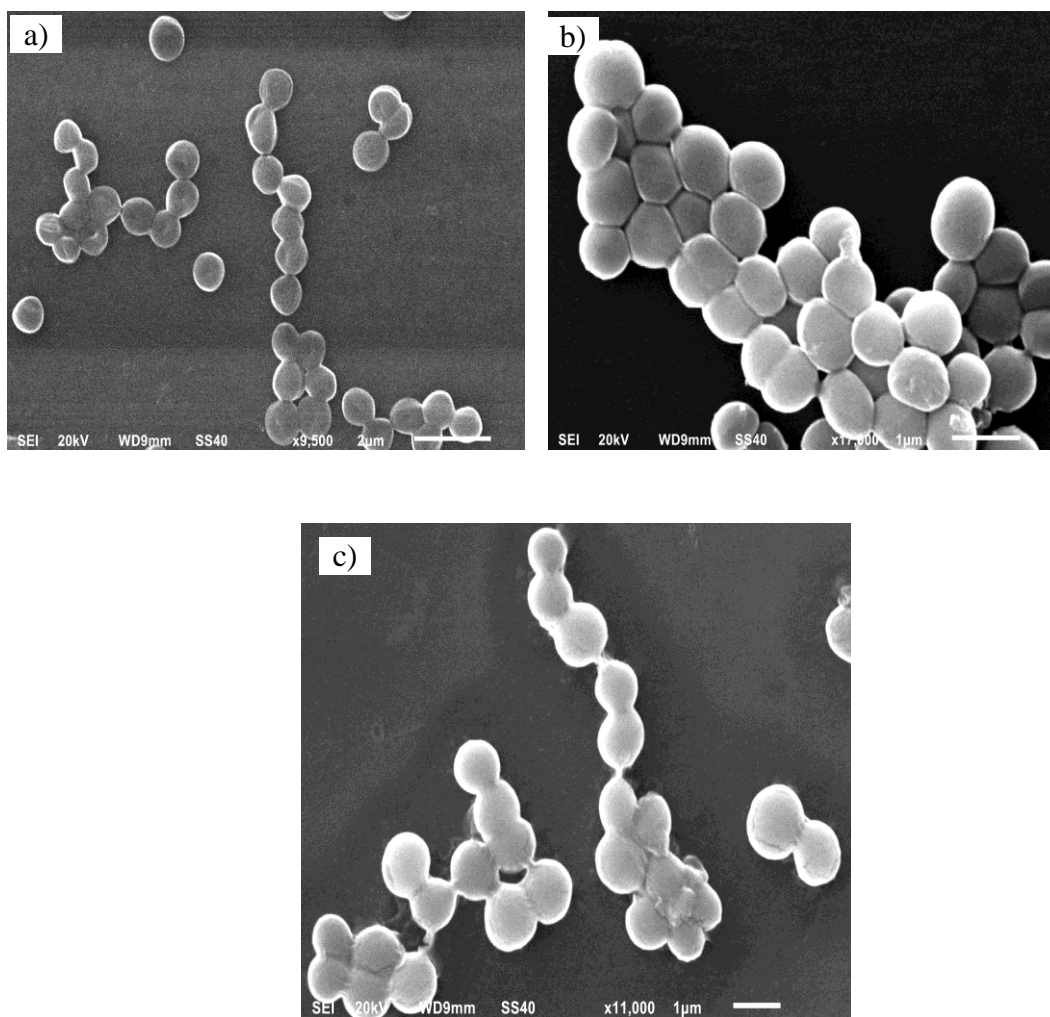


Fig. 3. Imagini SEM ale celulelor de *S. aureus* netratate (a) și tratate cu ZnSe cu morfologie florală (b) și $TiO_2/ZnSe$ cu morfologie florală (c), după 4 ore de la incubare.

2.2.2. Analiza spectrofluorimetrică de detecție a speciilor reactive de oxigen

Analiza spectrofluorimetrică de detecție a speciilor reactive de oxigen a indicat un nivel crescut al speciilor reactive de oxigen după 4 ore de la tratamentul celulelor cu ambele forme ale nanoflorilor de seleniură de zinc, în comparație cu probele martor, sugerând, prezența semnificativă a stresului oxidativ.

Cea mai mare intensitate a fluorescenței a fost obținută pentru celulele tratate de *S. aureus*, după 4 ore de la incubare (Fig. 4 c, d).

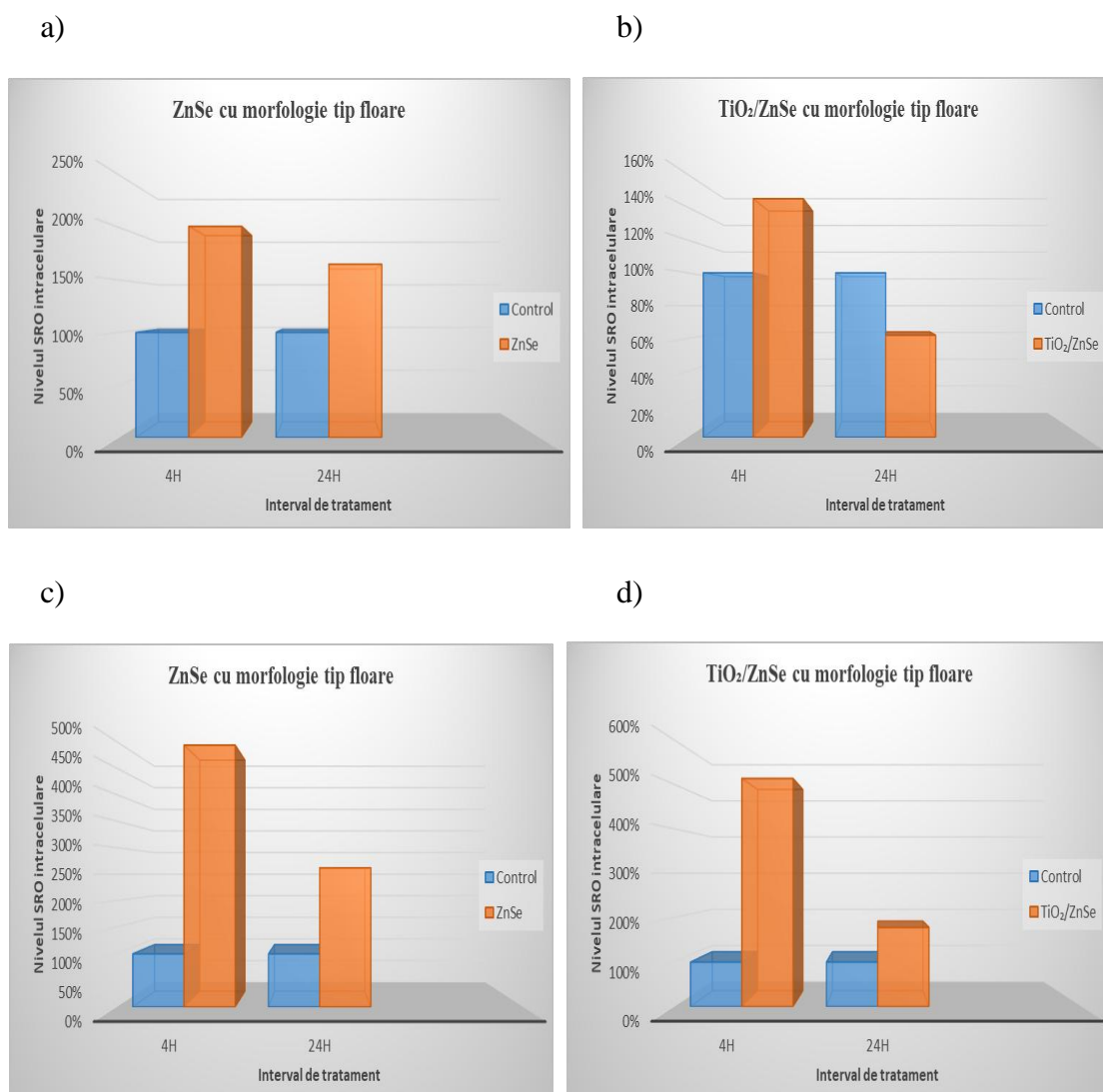


Fig. 4. Efectul materialelor pe bază de ZnSe cu morfologie florală asupra producerii speciilor reactive de oxigen în celulele de *E. coli* (a, b) și *S. aureus* (c, d).

2.2.3. Amplificarea prin PCR (reacția de polimerizare în lanț) a genei pentru ARNr 16S din ADN extras din celulele tratate și netratate

Analiza PCR pentru gena ARN 16S indică posibile modificări la nivelul ADN, în cazul celulelor de *E. coli* tratate cu forma dopată a seleniurii de zinc (Fig. 5 a-linia 3). În cazul celulelor de *S. aureus*, nu s-au constatat modificări la nivelul genei ARNr 16S, comparativ cu proba martor, obținându-se fragmente de aceeași lungime, de 1,5 kb (Fig. 5 b).

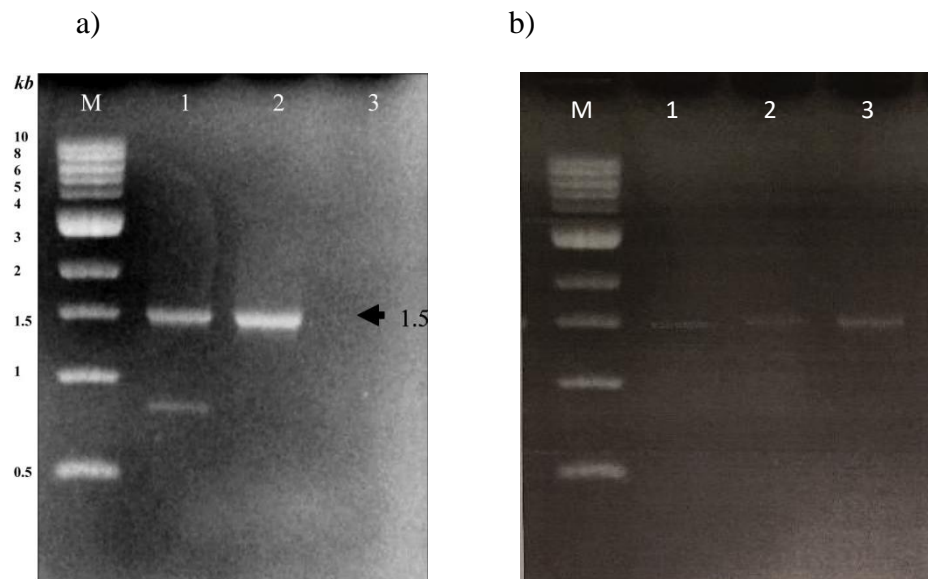


Fig. 5. Amplificarea PCR a genei ARNr 16S din ADN extras din:
a) celule de *E. coli* ATCC 25922. Linia 1: celule netratate de *E. coli*. Linia 2: *E. coli* tratat cu ZnSe cu morfologie tip floare. Linia 3. *E. coli* tratat cu TiO₂-ZnSe cu morfologie tip floare.
b) celule de *S. aureus* ATCC 25923. Linia 1: celule netratate de *S. aureus*. Linia 2: *S. aureus* tratat cu ZnSe cu morfologie tip floare. Linia 3. *S. aureus* tratat cu TiO₂-ZnSe cu morfologie tip floare. M: marker de masă moleculară 1kb (BioLabs).

2.2.4. Analiza rep-PCR (reacția de polimerizare în lanț pe bază de secvențe repetitive) din ADN extras din celulele tratate și netratate

Rezultatele obținute în urma analizei rep-PCR au demonstrat că expunerea celor două tulpini bacteriene la nanoflorile de seleniură de zinc sintetizate nu a avut ca rezultat modificări la nivelul secvențelor repetitive din structura genomului (Fig. 6 a, b).

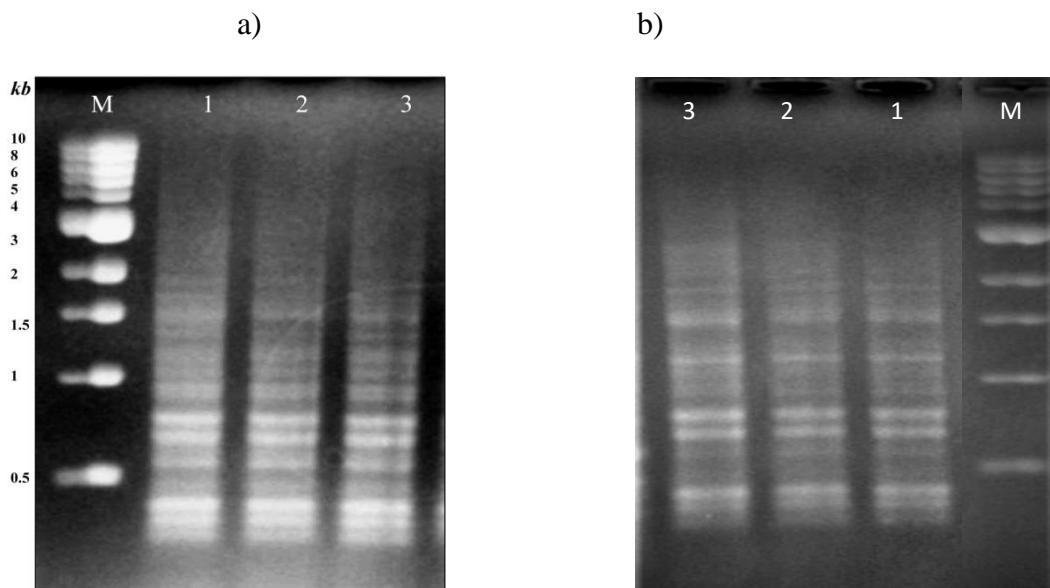


Fig. 6. Profilul rep-PCR al tulpinilor de:

- a) *E. coli* ATCC 25922. Linia 1: celule netratate de *E. coli*. Linia 2: *E. coli* tratat cu ZnSe cu morfologie tip floare. Linia 3. *E. coli* expus la $\text{TiO}_2\text{-ZnSe}$ cu morfologie tip floare.
- b) *S. aureus* ATCC 25923. Linia 1: celule netratate de *S. aureus*. Linia 2: *S. aureus* tratat cu ZnSe cu morfologie tip floare. Linia 3. *S. aureus* tratat cu $\text{TiO}_2\text{-ZnSe}$ cu morfologie tip floare. M: marker de masă moleculară 1kb (BioLabs).

2.2.5. Analiza spectrofotometrică de verificare a integrității membranare

Verificarea integrității membranare prin metoda spectrofotometrică a permis observarea unor diferențe între valorile absorbanței probei tratate și netratate de *E. coli*, ceea ce demonstrează eliberarea de acizi nucleici în mediul extracelular (Fig. 7a)

În cazul *S. aureus*, după 4 ore de la expunerea la nanomaterialele testate, nu au fost observate diferențe ale valorilor absorbăței în comparație cu proba martor (Fig. 7b).

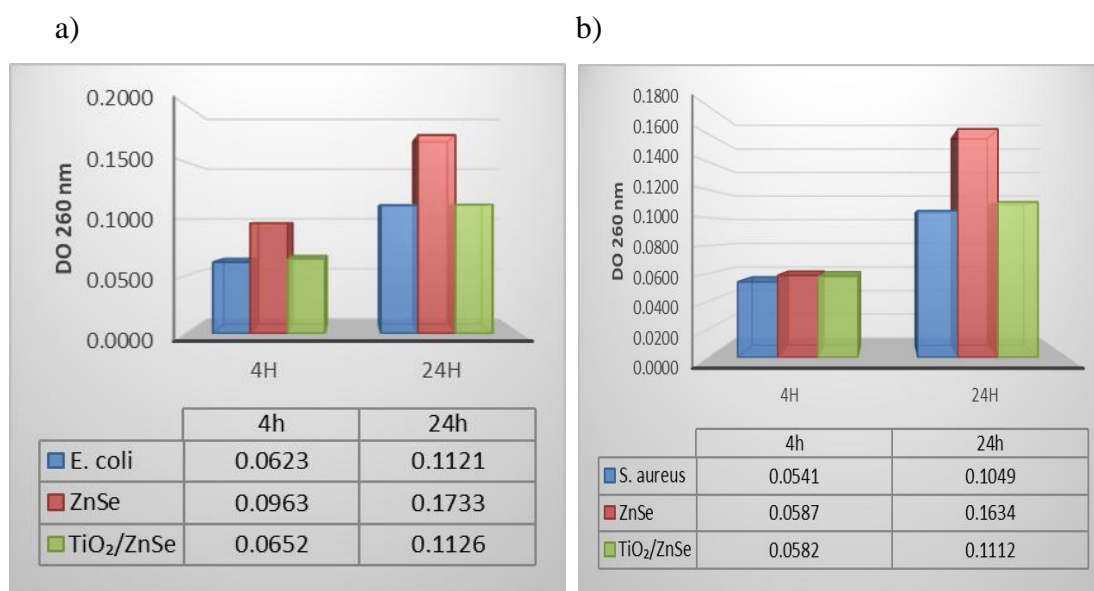


Fig. 7. Densitatea optică la 260 nm după 4 și 24 ore de la contactul celulelor: a) *E. coli* și b) *S. aureus*, cu materialele de seleniură de zinc.

2.2.6. Analiza profilului proteic total prin tehnica SDS-PAGE (electroforeza în mediu denaturant)

În urma tratamentului celulelor bacteriene testate cu nanomaterialele de seleniură de zinc cu morfologie florală, s-a constatat că profilul proteic total al tulpinilor de *S. aureus* și *E. coli* este identic cu cel al tulpinilor martor (Fig. 8, 9).

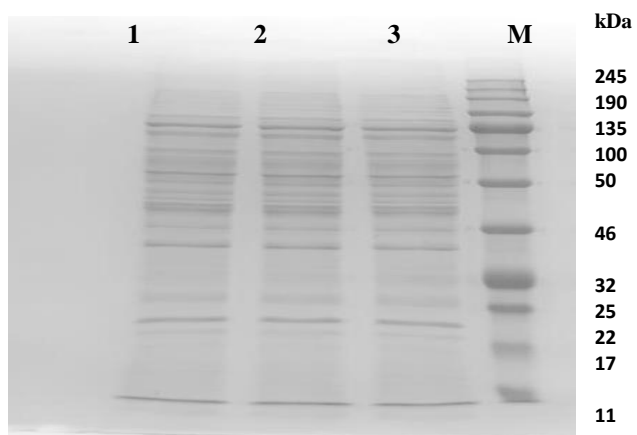


Fig. 8. Profilul proteic total pentru *S. aureus*: Linia 1. *S. aureus* netratat (control). Linia 2. *S. aureus* tratat cu 0,5 mg/mL ZnSe cu morfologie florală. Linia 3. *S. aureus* tratat cu TiO₂-ZnSe cu morfologie florală. Linia 4. Marker greutate proteine BioLabs.

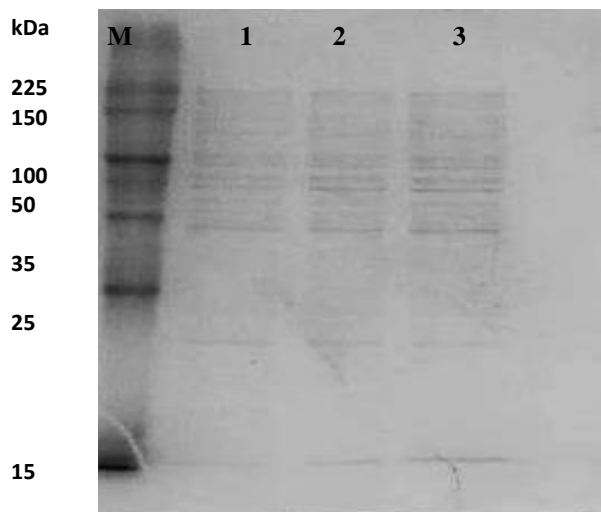


Fig. 9. Profilul proteic total pentru *E. coli*: Linia 1. Marker greutate proteine. Linia 2. *E. coli* netratat (control). Linia 3. *E. coli* tratat cu 0,5 mg/mL ZnSe. Linia 4. *E. coli* tratat cu 0,5 mg/mL TiO₂-ZnSe.

3. Potențialul aplicativ al unor nanomateriale pe bază de titanat de sodiu

Ultimul obiectiv al tezei a vizat urmărirea dinamicii dezvoltării unor tulpini de bacterii halofile izolate de pe pictura murală a Mănăstirilor Hurezi (*Garicola koreensis* și *Halobacillus naozhouensis*) și Humor (*Halobacillus hunanensis*), în prezența unor nanotuburi pe bază de titanat de sodiu, obținute prin metoda hidrotermală, sub aspectul identificării potențialului aplicativ. S-a încercat, astfel, identificarea unor nanomateriale cu efect antimicrobian, care ar putea fi folosite, cu succes, pentru fabricarea unor mortare pentru intervenții de restaurare care să împiedice colonizarea suprafeței acestora cu biodeteriogeni.

Nanotuburile pe bază de titanat folosite în cadrul acestui experiment au fost sintetizate în cadrul Institutului de Chimie Fizică “Ilie Murgulescu” al Academiei Române.

Nanomaterialele au fost obținute prin metoda hidrotermală de sinteză, pornind de la precursorul comercial Degussa P25 (Sigma-Aldrich) (Merciu și colab., 2009). Nanotuburile sintetizate au lungimi de 50 nm și un diametru de aproximativ 8-9 nm și au fost folosite în concentrație de 0,025% în mediul de cultură propice dezvoltării bacteriilor halofile. Evaluarea activității antibacteriene s-a realizat prin metoda spectrofotometrică de apreciere a creșterii tulpinilor bacteriene în prezența și absența nanotuburilor, prin măsurarea turbidității probelor la lungimea de undă de 660 nm, la momentele T_0 , T_{24h} , T_{48h} , T_{96h} , cu ajutorul cititorului de microplăci BMG FluoStar Omega, dar și prin folosirea metodei biochimice de apreciere a viabilității celulare, prin determinarea activității dehidrogenazice totale (calitativ și cantitativ), la interval de 24 ore.

Rezultatele preliminare obținute au demonstrat eficiența acestora asupra unor tulpini de bacterii, în special Gram negative. Răspunsul diferit al celulelor bacteriene poate fi atribuit diferențelor de structură de la nivelul peretelui celular, dar și compoziției și morfologiei nanostructurii oxidice. De asemenea, un alt factor important în manifestarea caracterului antibacterian al nanomaterialelor de titanat de sodiu îl constituie timpul de expunere.

După o caracterizare succintă a materialului, pentru a putea asocia o anumită proprietate fizico-chimică a acestuia cu răspunsul biologic și a ne asigura de reproductibilitatea rezultatelor, aceste nanostructuri fabricate ar putea fi introduse în componența diferitelor mortare, contribuind astfel la împiedicarea procesului de biodeterioare a monumentelor istorice.

CONCLUZII GENERALE

Lucrarea de față a vizat studiul interacțiunii unor bacterii Gram-pozitive și Gram-negative cu nano- și micromateriale semiconductoare sintetizate, având în vedere dinamica dezvoltării unor tulpini bacteriene în prezența acestor materiale, selectarea structurilor cu proprietăți antibacteriene în scopul identificării mecanismele care stau la baza acestei activități.

Pe baza datelor experimentale obținute, dar și a concluziilor parțiale formulate, în continuare vor fi prezentate concluziile generale.

- ✓ S-a demonstrat efectul antibacterian atât al nanopulberii de dioxid de titan Aeroxide P25 (neiradiat și după o perioadă de iradiere de 1 oră), cât și al materialelor pe bază de seleniură de zinc, obținute prin metoda hidrotermală
- ✓ Celulele bacteriene introduse în studiul experimental, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 și *V. halodenitrificans* au răspuns diferit la acțiunea semiconductorilor
- ✓ Datele obținute indică mecanisme diferite ale materialelor folosite asupra celulelor de bacterii Gram-pozitive și Gram-negative
- ✓ S-a remarcat efectul bacteriostatic al celor două forme ale nanopulberii de dioxid de titan asupra celulelor de *E. coli* ATCC 25922
- ✓ S-a constatat efectul bactericid al nano-TiO₂ asupra tulpinii Gram-pozitive *S. aureus* ATCC 25923
- ✓ Modificările morfologice observate în cazul coloniilor de *V. halodenitrificans* pot fi atribuite dioxidului de titan, care a acționat ca un factor de stres, tulpina bacteriană dezvoltând un mecanism de adaptare după contactul cu materialul
- ✓ S-a constatat că activitatea antibacteriană a nano-TiO₂ este influențată de condițiile experimentale, de timpul de expunere a celulelor bacteriene la probele de nanomaterial, dar depinde foarte mult și de tipul de tulpină bacteriană cu care intră în contact

- ✓ S-a demonstrat efectul antibacterian al nanoflorilor de seleniură de zinc, în formele dopată cu dioxid de titan și nedopată, în concentrație de 0,5 mg/mL
- ✓ S-a remarcat sensibilitatea tulpinii Gram-pozitive, *V. halodenitrificans* la acțiunea tuturor materialelor testate, indiferent de concentrația folosită, însă un efect bacterian puternic a fost obținut pentru nanoflorile de seleniură de zinc (0,5 mg/mL)
- ✓ Un grad de inhibiție mai ridicat al probei de seleniură de zinc în forma dopată a fost constatat în cazul tulpinilor Gram-pozitive (*S. aureus*, *V. halodenitrificans*), în comparație cu tulpina Gram-negativă (*E. coli*)
- ✓ S-a demonstrat că efectul antibacterian al materialelor pe bază de seleniură de zinc se datorează proprietăților de material, compoziției și morfologiei semiconductorului, timpului de expunere, concentrației de material, dar și tipului de bacterie cu care interacționează
- ✓ Identificarea în cantități mici de faze secundare pentru proba de seleniură de zinc în forma nedopată, ar putea fi un factor care ar contribui la reducerea viabilității celulare
- ✓ S-a demonstrat că principalul mod de acțiune al materialelor de seleniură de zinc, cu morfologie florală, asupra celor două tulpini de referință, *E. coli* ATCC 25922 și *S. aureus* ATCC 25923, se datorează generării de specii reactive de oxigen
- ✓ Rezultatul acțiunii materialelor asupra celulelor de *E. coli* a constat în distrugerea membranei plasmatică, cu eliberarea conținutului celular și posibil afectarea ADN-ului
- ✓ În cazul celulelor de *S. aureus*, presupunem că speciile reactive de oxigen au cauzat distrugerii ale componentelor intracelulare, fără a se observa eliberarea conținutului celular
- ✓ Nanotuburile de titanat de sodiu (0,025%), folosite în scopul identificării potențialului aplicativ, au demonstrat efect antimicrobian, acționând, în special, asupra tulpinilor bacteriene Gram-negative. Acestea pot constitui un candidat în împiedicarea procesului de biodeterioare a monumentelor istorice.

Contribuții la cunoașterea științifică

În acord cu obiectivele științifice ale lucrării de doctorat, originalitatea studiilor efectuate s-a concretizat prin câteva elemente de noutate, care aduc valoare științifică studiilor efectuate.

Astfel, au fost folosite materiale noi pe bază de seleniură de zinc, cu morfologie florală, obținute prin ruta de sinteză hidrotermală, care au demonstrat proprietăți antibacteriene, cu acțiune asupra tulpinilor de referință *E. coli* ATCC 25922 și *S. aureus* ATCC 25923, dar și asupra unei tulpini de bacterie halotolerantă, izolată din cristal de sare din Mina Unirea, *V. halodenitrificans*.

De asemenea, a fost demonstrat principalul mod de acțiune al acestor nanostructuri asupra tulpinilor bacteriene de referință, reprezentat de generarea de specii reactive de oxigen. Până în prezent, nu au fost identificate astfel de studii în literatura de specialitate.

În prezent, mecanismele antimicrobiene ale diferitelor nanomateriale sintetizate nu sunt încă complet elucidate. De exemplu, activitatea antibacteriană poate fi atribuită stresului oxidativ, așa cum a fost demonstrat și pentru semiconductorul de seleniură de zinc, în timp ce pentru alte materiale, mecanismul antimicrobian nu poate fi asociat cu reglarea metabolismului bacterian.

Lipsa standardelor reprezintă una dintre limitările studiilor existente asupra mecanismelor antimicrobiene ale nanomaterialelor sintetizate.

Diversitatea tulpinilor bacteriene, timpii de acțiune și caracteristicile diferitelor nano- sau microstructuri au fost și sunt examinate în diferite studii, ceea ce îngreunează compararea rezultatelor obținute în ceea ce privește activitatea antibacteriană.

Mai mult decât atât, o singură metodă nu îndeplinește toate condițiile pentru obținerea de informații despre mecanismele antibacteriene ale materialelor fabricate.

Deoarece diferite tipuri de nano- și microstructuri prezintă diferite efecte antibacteriene este propusă o analiză cuprinzătoare pentru studierea posibilelor mecanisme antibacteriene.

Bibliografie selectivă

1. Adams L.K., Lyon D.Y., Alvarez P.J.J. (2006). Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Res*, 40:3527–3532.
2. Albanese A., Tang P.S., Chan W.C.W. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 14:1-16.
3. Aruguete D.M., Hochella, M.F. (2010). Bacteria–nanoparticle interactions and their environmental implications. *Environ. Chem.*, 7, 3–9.
4. Armentano I., Arciola C.R., Fortunati E., et al. (2014). The interaction of bacteria with engineered nanostructured polymeric materials: a review. *Scientific World J.*, 2014:410423.
5. Adams L.K., Lyon D.Y., Alvarez P.J.J. (2006). Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Res*, 40:3527–3532.
6. Albanese A., Tang P.S., Chan W.C.W. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 14:1-16.
7. Aruguete D.M., Hochella, M.F. (2010). Bacteria–nanoparticle interactions and their environmental implications. *Environ. Chem.*, 7, 3–9.
8. Armentano I., Arciola C.R., Fortunati E., et al. (2014). The interaction of bacteria with engineered nanostructured polymeric materials: a review. *Scientific World J.*, 2014:410423.
9. Anastasescu C., Spătaru N., Culita D., Atkinson I., Spataru T., Bratan V., Munteanu C., Anastasescu M., Negrila C., Balint I. (2015). Chemically assembled light harvesting CuO_x-TiO₂ p–n heterostructures, *Chem. Eng. J.*, 281: 303-311.
10. Cavassin E.D., de Figueiredo L.F.P., Otoch J.P., Seckler M.M., de Oliveira R.A., Franco F.F., et al. (2015). Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. *J. Nanobiotechnol.*,13:64.
11. Block S.S., Seng V.P., Goswami D.W. (1997) Chemically enhanced sunlight for killing bacteria. *J. Sol. Energy Eng. Trans. ASME*, 119(1):85–91.
12. Buzea C., Blandino I.P., Robbie K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2:MR17-MR172.
13. Cabiscol E., Tamarit J., Ros J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Internatl. Microbiol.*, 3: 3-8.
14. Carp O., Huisman C.L., Reller A. (2004). Photoinduced reactivity of titanium dioxide. *Progress in Solid State Chemistry*, 32:33-177.
15. Baek Y.W. and An Y.J. (2011). Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *The Science of the Total Environment*, vol. 409(8):1603–1608.

16. Cheng C.L., Sun D.S., Chu W.C., Tseng Y.H., Ho H.C., Wang J.B., Chung P.H., Chen J.H., Tsai P.J., Lin N.T., Yu M.S., Chang H.H. (2009). The effects of the bacterial interaction with visible-light responsive titania photocatalyst on the bactericidal performance. *J. Biomed Sci.*, 16(7):10.
17. Choi O., Hu Z. (2008). Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environ. Sci. Technol.*, 42:4583–8.
18. Chung C.J., Lin H.I., Chou C.M., Hsieh P.Y., Hsiao C.H., Shi Z.Y., He J.L. (2009). Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* under various light sources on photocatalytic titanium dioxide thin film. *Surf. Coat. Technol.*, 203(8):1081–1085.
19. Cojoc R., Anastasescu C., Zaharescu M., Enache M., Neagu S. (2013). The growth of moderately halophilic bacteria in the presence of silica microtubes. *Drobeta – Seria Stiintele Naturii*, vol. XXIII, 40 – 51.
20. Erdem A., Metzler D., Cha D., Huang C.P. (2014.) Inhibition of bacteria by photocatalytic nano-TiO₂ particles in the absence of light. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, doi:10.1007/s13762-014-0729-2.
21. Espitia P.J.P., Soares N.F.F., Coimbra J.S.R., Andrade N.J., Cruz R.S., Medeiros E.A.A. (2012). Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. *Food Bioprocess Technol.*, 5:1447–1464.
22. Estebanez M.R., Morales B.O., Bacab M.C., Echegoyen C.G, Chab J.C, Sacarias J.E.P. Gaylarde C. (2018). Antimicrobial engineered nanoparticles in the built cultural heritage context and their ecotoxicological impact on animals and plants: a brief review. *Herit Sci.*, 6:52.
23. Foster H.A., Sheel D.W., Sheel P., Evans P., Varghese S., Rutschke N., Yates H.M. (2010). Antimicrobial activity of titania/silver and titania/copper films prepared by CVD. *J. Photochem. Photobiol. A.*, 216:283–289.
24. Gartner M., Anastasescu C., Zaharescu M., Enache M., Dumitru L., Stoica T., Stoica T.F., Trapalis C. (2009) The simulation in the real conditions of antibacterial activity of TiO₂(Fe) films with optimized morphology. *Nanostruct. Mater. Nanotechnol.*, 29 (8):67–76.
25. Gattoo M.A., Naseem S., Arfat M.Y., Mahmood A.D., Khusro Q., Zubair S. (2014). Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. *BioMed Research International*, Hindawi Publishing Corporation, doi:10.1155/2014/498420
26. Hans M., Erbe A., Mathews S., Chen Y., Solioz M., and Mucklich F. (2013). Role of copper oxides in contact killing of bacteria, *Langmuir*, 29(52): 16160–16166.
27. Gurr, J.-R., Wang A.S.S., Chen, C.H. & Jan, K.Y (2005). Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 213(1-2):66-73.

28. Hajipour M.J., Fromm K.M, Ashkarran A.A., de Aberasturi D.J., de Larramendi I.R., Rojo T., Serpooshan V., Parak W.J. and Morteza M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*. 30(10): 499-511.
29. Gomoiu I., Mohanu D., Mohanu I. (2017). Biopigmentația roz în trapeza Mănăstirii Hurezi. Editura U.N.A.R.T.E. ISBN 978-6-6-720-089-8.
30. Kumar A., Pandey A.K., Singh S.S., Shanker R., Dhawan A. (2011). Engineered ZnO and TiO₂ nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli*. *Free Radical Biol. Med.*, 51,1872–1881.
31. Lazăr V., Herlea V., Cernat R., Bulai D., Balotescu M.C., Moraru A. (2004). *Microbiologie generală - Manual de lucrări practice*. Editura Universității din București.
32. Lazăr V., Măruțescu L.C., Chifiriuc M.C. (2016). *Microbiologie generală și aplicată*. Editura Universității din București.
33. Leung Y.H., Ng A.M., Xu X., Shen Z., Gethings L.A., Wong M.T., Chan C.M., Guo M.Y., Ng Y.H., Djurišić A.B., Lee P.K., Chan W.K., Yu L.H., Phillips D.L., Ma A.P., Leung F. (2014). Mechanisms of antibacterial activity of MgO: non-ROS mediated toxicity of MgO nanoparticles towards *Escherichia coli*, *Small*, 10 (6), 1171.
34. Marchesi J.R., Sato T., Weightman A.J., Martin T.A., Fry J.C., Hiom S.J., Wade W.G.(1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 795.
35. Neagu S., Anastasescu C., Balint I., Zaharescu M., Ardelean I., Enache M. (2019). The response of *Escherichia coli* cells to the action of ZnSe based materials. *Revista Română de Materiale/Romanian Journal of Materials*, 49(3): 322-330.
36. Neagu S., Preda S., Anastasescu C., Zaharescu M., Enache M., Cojoc R. (2014). The functionalization of silica and titanate nanostructures with halotolerant proteases, *Rev. Roum. Chim.*, 59(2): 97-103.
37. Neagu S., Preda S., Zaharescu M., Kamekura M., Cojoc R., Enache M. (2018). The effect of titanate nanotubes towards moderately halophilic bacteria. *Romanian Biotechnological Letters*, 23(4): 13814-13822.
38. Nel A., Xia T., Mädler L., and Li N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311(5761): 622-627.
39. Padmavathy N., Vijayaraghavan R. (2008). Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles – an antimicrobial study. *Sci. Technol. Adv. Mat.*, 9(3):35004–35010.
40. Priyadharsini N., Thamilselvan M., Sangeetha S., Vairam S. (2016). Effect of neodymium substitution on structural, optical, magnetic and antibacterial activity of zinc selenide nanoparticles. *Journal of Ovonic Research*, 12(2), 87.
41. Simon-Deckers A., Loo S., Mayne-L'hermite M., et al. (2009). Size, composition and shape-dependent toxicological impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes toward bacteria. *Environ. Sci. Technol.*, 43(21):8423–8429.

42. Stancu M.M. (2019). Production of some extracellular metabolites by a solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain, Waste and Biomass Valorization, DOI:10.1007/s12649-018-0354-2.
43. Venkatasubbu G.D., Baskar R., Anusuya T., Seshan C.A., Chelliah R. (2016). Toxicity mechanism of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles against food pathogens. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 148: 600-606.
44. Ventosa A., Garcia M.T., Kamekura M., Onishi H., Ruiz-Berraquero F. (1989). *Bacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic *Bacillus* sp. Systematic and Applied Microbiology. Springer. Berlin, 12:162-166.
45. Versalovic J., Schneider M., Brujin F.J., Lupski J.R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction, Methods Mol. Cell. Biol., 5, 25.
46. Wang L., Hu C., Shao L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future, Int. J. Nanomed., 12, 1227.
47. Zarnea G., Popescu O.V. (2011). Dicționar de microbiologie generală și biologie moleculară. Edit. Academiei Române.
48. Zhang W., Li Y., Niu J.F., Chen Y.S. (2013). Photogeneration of reactive oxygen species on uncoated silver, gold, nickel, and silicon nanoparticles and their antibacterial effects. Langmuir. 29(15):4647–4651.

Lista lucrărilor științifice publicate în tematica tezei de doctorat

ARTICOLE

1. **Neagu S.**, Anastasescu C., Balint I., Zaharescu M., Ardelean I., Enache M. (2019). Răspunsul celulelor de *Escherichia coli* la acțiunea materialelor pe bază de ZnSe/ The response of *Escherichia coli* cells to the action of ZnSe based materials. Revista Română de Materiale/Romanian Journal of Materials, 49 (3): 322 – 330 (**0,661 IF**).
2. **Neagu S.**, Preda S., Zaharescu M., Kamekura M., Cojoc R., Enache M. (2018). The effect of titanate nanotubes towards moderately halophilic bacteria. Romanian Biotechnological Letters, 23(4): 13814-13822 (**0,59 IF**).
3. **Neagu S.**, Preda S., Anastasescu C., Zaharescu M., Enache M., Cojoc R. (2014). The functionalization of silica and titanate nanostructures with halotolerant proteases. Rev. Roum. Chim., 59, 97-103 (**0,411 IF**).
4. **Merciu S.**, Văcăroiu C., Filimon R., Popescu G., Preda S., Anastasescu C., Zaharescu M., Enache M. (2009). Nanotubes biologically active in media with high salt concentration, Biotechnol. & Biotechnol. Eq. – special issue, 23(2): 827 – 831 (**1,097 IF**).
5. Cojoc R., Anastasescu C., Zaharescu M., Enache M., **Neagu S.** (2013). The growth of moderately halophilic bacteria in the presence of silica microtubes. Drobeta – Seria Științele Naturii, vol. XXIII, 40 – 51.

CAPITOL DE CARTE

1. Enache M., **Neagu S.**, Anastasescu C., Cojoc R., Zaharescu M., 2014. The effects of silica nanostructures on halotolerant microorganisms isolated from rock salt crystal. In New Applications of Nanomaterial, Series in “Micro and nanoengineering”, A. Catrinel Ion, D. Dascălu, G. Cârjă, M.L. Ciurea eds., Ed. Academiei Române, 51-59, ISBN 978-973-27-2434-7.