

ŞCOALA DOCTORALĂ INTERDISCIPLINARĂ

Facultatea: Ştiinţa şi Ingineria Materialelor

Ing. Ioana GHIUŢĂ (căs. Popescu)

**CERCETĂRI PRIVIND BIOSINTEZA NANOPARTICULELOR
METALICE UTILIZÂND MICROORGANISME**

**RESEARCHES ON THE BIOSYNTHESIS OF METAL
NANOPARTICLES USING MICROORGANISMS**

REZUMAT / ABSTRACT

Conducător ştiinţific

Prof. dr. ing. Daniel MUNTEANU

BRAŞOV, 2018

D-lui (D-nei)

COMPONENTA

Comisiei de doctorat

Numită prin ordinul Rectorului Universităţii Transilvania din Braşov
Nr. 9015 din 14.12.2017

PREŞEDINTE:	Prof. dr. ing. Pisu Teodor MACHEDON Decanul Facultăţii de Ştiinţa şi Ingineria Materialelor
CONDUCĂTOR ŞTIINŢIFIC:	Prof. dr. ing. Daniel MUNTEANU Universitatea Transilvania din Braşov
REFERENŢI:	Prof. dr. ing. Andreas ANAYIOTOS Cyprus University of Technology, Cipru Prof. dr. ing Joseph KOST Ben-Gurion University from Negev, Israel Prof. dr. ing. Mircea Horia ȚIEREAN Universitatea Transilvania din Braşov

Data, ora şi locul susţinerii publice a tezei de doctorat: 19 ianuarie 2018, ora 10, sala UII3.

Eventualele aprecieri sau observaţii asupra conţinutului lucrării vor fi transmise electronic, în timp util, pe adresa ioana.ghiuta@unitbv.ro

Totodată, vă invităm să luaţi parte la şedinţa publică de susţinere a tezei de doctorat.

Vă mulţumim.

CUPRINS (lb. română)

	Pg. teza	Pg. rezumat
LISTA DE NOTAȚII	5	7
LISTA DE ABREVIERI	5	7
INTRODUCERE	7	8
Introducere în tematica tezei de cercetare	7	8
Scopul tezei de doctorat	8	9
Motivația, noutatea și importanța temei de cercetare	8	10
1. CAPITOL 1 Nanotehnologii și nanomateriale; metode de obținere, domenii de aplicare	10	12
1.1 Abordări de tip “top-down”	12	13
1.1.1 Măcinarea mecanică	12	-
1.1.2 Ablația Laser	16	-
1.1.3 Sono-fragmentare	18	-
1.1.4 Pulverizarea	20	-
1.2 Abordări de tip “bottom-up”	21	13
1.2.1 Precipitare chimică/electrochimică	21	-
1.2.2 Sinteză din stare de vapori	24	-
1.2.3 Procesul Sol-Gel	25	-
1.2.4 Piroлиза Laser	26	-
1.3. Sinteza verde a nanoparticulelor metalice.....	28	15
1.3.1. Sinteza verde utilizând extracte de plante	29	15
1.3.2. Sinteza verde a nanoparticulelor utilizând microorganisme	30	15
1.3.3 Aplicații ale nanoparticulelor obținute prin biosinteză	32	16
1.4. Concluzii.....	33	17
2. CAPITOLUL II - Metode de analiză și caracterizare a proprietăților structurale și morfologice ale nanoparticulelor metalice	35	18
2.1 Spectroscopia în Ultra Violet și Vizibil (UV-vis).....	36	-
2.2 Difracția de raze X (XRD)	38	-
2.3 Microscopia Electronică de Baleiaj (SEM)	41	-
2.4 Microanaliza de Raze X cu Energie Dispersivă (EDX)	42	-
2.5 Microscopie Electronică prin Transmisie (TEM).....	44	-
2.6 Difracție de electroni în arie selectată (SAED)	46	-
2.7 Dispersia dinamică a luminii (DLS).....	47	-

2.8. Microscopia cu Forță Atomică (AFM).....	48	-
2.8. Concluzii.....	49	19
3. CAPITOLUL III – Cercetări privind obținerea prin bio-sinteză și caracterizarea nanoparticulelor de tip ZnO	51	20
3.1 Contribuții la studiul particulelor de ZnO.....	51	20
3.2 Sinteza nanoparticulelor și a structurilor de tip micro-flori ale ZnO.....	53	20
3.2.1. Bacteriile și condițiile de cultură.....	53	20
3.2.2. Biosinteza ZnO NPs utilizând <i>Enterobacter sp. LA9</i>	53	20
3.3 Caracterizarea structurilor obținute și interpretarea datelor. Echipamente utilizate.....	54	21
3.3.1 Rezonanța plasmonică de suprafață a nanoparticulelor de ZnO.....	54	21
3.3.2 Analiza structurală și morfologică a particulelor prin Microscopie Electronică de Baleiaj.....	54	22
3.3.3 Determinarea compoziției chimice prin microanaliză de raze X dispersive.....	56	22
3.4 Concluzii.....	57	23
4. CAPITOLUL IV – Cercetări privind obținerea prin bio-sinteză și caracterizarea nanoparticulelor de tip Ag	58	24
4.1 Contribuții la studiul nanoparticulelor de Ag.....	58	24
4.2 Sinteza nanoparticulelor de argint.....	59	24
4.2.1. Bacteriile și condițiile de cultură.....	59	24
4.2.2. Biosinteza AgNps utilizând <i>B. amyloliquefaciens 1853</i> și <i>B. subtilis 10833</i>	59	24
4.3 Caracterizarea structurilor obținute și interpretarea datelor. Echipamente utilizate.....	62	27
4.3.1 Rezonanța plasmonică de suprafață a nanoparticulelor de Ag (UV-vis).....	62	27
4.3.2 Analiza structurală și morfologică a particulelor prin Microscopie Electronică de Baleiaj (SEM). Determinarea compoziției chimice prin microanaliză de raze X dispersive (EDX).....	64	29
4.3.3. Investigații structurale prin analiza cu Difrakție de raze X (XRD).....	68	30
4.3.4 Distribuția pe mărimi a nanoparticulelor obținute în substanța coloidală X (DLS).....	69	31
4.4 Activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor de argint.....	71	32
4.5 Concluzii.....	75	35
5. CAPITOLUL V – Cercetări privind obținerea prin bio-sinteză și caracterizarea nanoparticulelor de tip AgCl	76	36
5.1 Contribuții la studiul nanoparticulelor de AgCl.....	76	36
5.2 Sinteza nanoparticulelor de clorură de argint.....	77	36
5.2.1. Microorganisme și condiții de cultură.....	77	36
5.2.2. Biosinteza nanoparticulelor AgCl utilizând <i>Rhodotorula Mucilaginosa</i> , <i>Enterobacter Faecalis</i> , <i>Pantoea</i> și <i>Raoultella Planticola</i>	77	36
5.3 Caracterizarea structurilor obținute și interpretarea datelor. Echipamente utilizate.....	78	37

5.3.1 Rezonanța plasmonică de suprafață a nanoparticulelor de AgCl (UV-vis)	78	37
5.3.2 Investigații structurale prin analiza cu Difracție de Raze X (XRD).....	81	38
5.3.3 Caracterizarea structurală a nanoparticulelor utilizând Microscopia Electronică prin Transmisie (TEM), Difracția de electroni în arie selectată (SAED).....	84	39
5.3.4 Analiza structurală și morfologică a particulelor prin Microscopie Electronică de Baleiaj.(SEM). Determinarea compoziției chimice prin microanaliză de raze X dispersive (EDX).....	91	42
5.3.5 Diametrele medii ale nanoparticulelor, determinate din secțiuni transversale ale imaginilor AFM	99	44
5.4 Activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor de clorură de argint.....	104	46
5.5 Concluzii.....	110	49
6. CAPITOLUL VI - Concluzii finale. Contribuții originale. Direcții viitoare de cercetare. Diseminarea rezultatelor	111	50
6.1. Concluzii finale	111	50
6.2. Contribuții originale	113	51
6.3. Diseminarea rezultatelor.....	114	52
6.4..Direcții viitoare de cercetare.....	117	53
 BIBLIOGRAFIE.....	 131	 55
 ANEXE	 131	 -
Anexa 1 – Model standard de difracție cu raze X pentru Ag.....	132	-
Anexa 2 – Model standard de difracție cu raze X pentru AgCl.....	133	-
Anexa 3. Micrografie AFM pentru nanoparticule biosintetizate de <i>Rhodotorula Mucilaginoso</i>	134	-
Anexa 4. Micrografie AFM pentru nanoparticule biosintetizate de <i>Raoultella Planticola</i>	135	-
Anexa 5. Micrografie AFM pentru nanoparticule biosintetizate de <i>Pantoea</i>	136	-
Anexa 6. Micrografie AFM pentru nanoparticule biosintetizate de <i>Enterococcus Faecalis</i>	137	-
Anexa 7. Detecția sensibilă la fază AFM pentru nanoparticule biosintetizate de <i>Rhodotorulla mucilaginoso</i>	138	-
Anexa 8 Detecția sensibilă la fază AFM pentru nanoparticule biosintetizate de <i>Raoultella planticola</i>	139	-
Anexa 9. Detecția sensibilă la fază AFM pentru nanoparticule biosintetizate de <i>Pantoea</i>	140	-
Anexa 10. Detecția sensibilă la fază AFM pentru nanoparticule biosintetizate de <i>Enterococcus faecalis</i>	141	-
 Rezumat (RO/ENG).....	 142	 58
 Curriculum Vitae RO.....	 143	 59
Curriculum Vitae ENG.....	143	60

MULȚUMIRI

După intensa perioadă de activitate științifică în cadrul studiilor universitare de doctorat, doresc să îmi îndrept recunoștința spre câțiva oameni minunați care m-au ajutat să ajung la finalul acestui stadiu, care de cele mai multe ori reprezintă doar începutul unei etape importante.

În primul rând, mă simt onorată să-mi exprim gratitudinea față de domnul Prof. univ. dr. ing. Daniel Munteanu, care, în calitate de îndrumător științific, m-a determinat să îmi dezvolt o gândire critică și creativă, specifică cercetătorului contemporan. Sprijinul oferit pe parcursul anilor de studiu mi-a întărit hotărârea de la începutul acestora, când am considerat că este un profesor magistral pentru desfășurarea activității de conducător de doctorat.

Pe această cale doresc să le mulțumesc coordonatorilor, de care am avut norocul să fiu îndrumată în timpul celor două mobilități desfășurate în timpul studiilor de doctorat:

✿ domnului Prof. univ. dr. ing. Andreas Anayiotos, de la Universitatea Tehnologică din Cipru, Limasol, pentru încrederea acordată și sprijinul oferit. Îi mulțumesc pentru dezvoltarea echilibrată bazată pe selectarea priorităților.

✿ domnului Conf. dr. ing. Ioannis Vyrides, de la Universitatea Tehnologică din Cipru, Limasol, pentru fereastra oportunității de a jongla cu elementele fascinante ale nanotehnologiei. De asemenea, doresc să îi mulțumesc și pentru optimismul integrat în timpul colaborării.

✿ domnului Prof. univ. dr. ing. Joseph Kost, de la Universitatea Ben-Gurion, din Negev, Beersheva, Israel, pentru susținere, pentru caracterul profesional și pentru dezvoltarea progresivă a aptitudinii de a lucra în echipă.

Doresc să mulțumesc în mod eminent doamnei Dr. ing. Rodica Wenkert de la Spitalul Universitar Soroka, din Beersheva, Israel, pentru elementele implementate în nuanțarea lucrării, pentru sfaturile altruiste și pentru umoristica aplicată cercetării științifice.

Mulțumesc în mod special domnului Prof. dr. ing. Ștrul Moisa pentru îndrumarea morală și sprijinul neprecupețit. Mulțumesc pentru lecțiile valoroase oferite, care prin perseverența și desăvârșirea transiterii mi-au influențat alegerile într-o manieră pozitivă.

Doresc să mulțumesc colectivului departamentului de Știința Materialelor, din cadrul Universității Transilvania, pentru susținerea, înțelegerea și îndrumarea acordate pe perioada studiilor. În mod deosebit sunt recunoscătoare comisiei de îndrumare, Prof. dr. ing. Aurel Crișan, Prof. dr. ing. Ioan Miloșan, Prof. dr. ing. Bela Varga, care a reprezentat echipa perfectă pentru numele ce o reprezintă. Le mulțumesc pentru sfaturile oferite cu răbdare și înțelepciune. De asemenea, îi mulțumesc domnului Ș.L. dr. ing. Daniel Cristea pentru îndrumarea continuă și sfaturile competente oferite în majoritatea etapelor desfășurate pe parcursul cercetării. Apreciez în mod deosebit colaborarea și interacțiunile de care am avut parte. De asemenea, doresc să mulțumesc și domnului Prof. dr. ing. Pisu Teodor Machedon și domnului Prof. dr. ing. Mircea Țierean pentru suportul și implicarea în susținerea publică a tezei.

În mod deosebit, doresc să îmi manifest aprecierea față de soțul meu pentru răbdarea și susținerea permanentă acordată în realizarea prezentei lucrări. Mulțumesc familiei pentru educația oferită și sprijinul în dezvoltarea acesteia.

LISTA DE NOTAȚII

- ✿ Ag NPs – nanoparticule de argint
- ✿ AgCl NPs – nanoparticule de clorură de argint
- ✿ ZnO NPs - nanoparticule de oxid de zinc
- ✿ B.s. - Bacillus subtilis
- ✿ B.a. - Bacillus amyloliquefaciens
- ✿ R.m. - Rhodotorulla mucilaginosa
- ✿ P. –Pantoea
- ✿ R.p. – Raoultella Planticola
- ✿ E.f. –Enterococcus faecalis
- ✿ Top-down - Metoda de sus în jos
- ✿ Bottom-up – Metoda de jos în sus

LISTA DE ABREVIERI

- ✿ ICP-MS – Plasmă Cuplată Inductiv, Spectroscopie de Masă
- ✿ UV—vis – Spectroscopie în ultra-violet și vizibil
- ✿ SEM – Analiză prin microscopie electronică de baleiaj / microscop electronic de baleiaj
- ✿ TEM - Analiză prin microscopie electronică prin transmisie / microscop electronic prin transmisie
- ✿ AFM - Analiză prin microscopie cu forță atomică / microscop cu forță atomică
- ✿ DLS – DLS –Difuzia Dinamică a luminii
- ✿ SAED – Difracție de electroni în arie selectată
- ✿ XRD –Difracție de raze X
- ✿ FTIR – Spectroscopia cu infraroșu de transformare Fourier
- ✿ RAMAN – Spectroscopie Raman
- ✿ XPS –Spectrometrie de Fluorescență de radiații X
- ✿ EDSX – Analiză prin spectroscopie dispersivă de raze X
- ✿ NADPH – Nicotinamidă adenină Nicotinamică Fosfat de Hidrogen
- ✿ NADP – Nicotinamid Adenin Dinucleotid Fosfat

INTRODUCERE

1. Introducere în tematica tezei de cercetare

Termenul de nanotehnologie ("nano-technology") a fost folosit pentru prima dată în domeniul științific în anul 1974. În acea perioadă, profesorul Norio Taniguchi definea nanotehnologia ca fiind o tehnologie de producție cu o acuratețe foarte ridicată și de dimensiuni ultra-fine, și anume, precizia și finețea fiind de ordinul nanometrilor [208]. Cu toate acestea, primele mențiuni în legătură cu procesele tehnologice la scară nano, create și aplicate în mod deliberat, însă denumite ulterior nanotehnologie, se regăsesc în binecunoscuta lectură "There's Plenty of Room at the Bottom" a fizicianului Richard Feynman. Pe 29 decembrie 1959 la American Physical Society at the California Institute of Technology acesta își prezintă viziunea conform căreia fizica și ingineria ar putea contribui la dezvoltarea nanotehnologiei. Din dorința ca informațiile deținute în diferite volume de Enciclopedie să poată fi stocate într-un bibliotecă mică cât un vârful de ac, Feynman descria începutul unei noi ere tehnologice ce avea să se concretizeze prin construirea de "mașini" moleculare care să prezinte capacitatea de a lucra cu o precizie foarte ridicată la nivel atomic [67].

Ce este mai exact nanotehnologia? Această întrebare nu a reușit să își definească în termeni preciși răspunsul, ce pare a avea multiple variante, de aceea, definiția nanotehnologiei reprezintă una dintre confuziile generate de acest domeniu. Cele mai frecvent întâlnite definiții ale nanotehnologiei gravitează în jurul studiului tehnologiei care dezvoltă la scară nanometrică, în condiții controlabile, nu doar obținerea nanomaterialelor, ci și funcționalitatea acestora [28].

Nanoparticulele au captat interesul cercetătorilor în ultimii ani, datorită proprietăților lor speciale, care sunt net superioare aceluiași materiale, dar în formă brută. Aceste formațiuni cu dimensiuni în jurul valorii de 100 nm, sunt considerate a fi principalul ingredient în dezvoltarea nanotehnologiilor. S-a demonstrat că potențialul nanoparticulelor este unul de mare amploare, utilizându-se favorabil în domenii precum, medicină, electronică, optică, inclusiv în sectorul catalizatorilor [14].

Pentru o înțelegere mai convenabilă a termenului "nano", sunt întâlnite în mod frecvent comparațiile făcute cu firul de păr uman, care în mod obișnuit prezintă diametrul de 80.000 nm. O altă paralelă folosită este cu o coală de hârtie, care are aproximativ 100.000 nm grosime [103]. De asemenea cu rol comparativ, un fir de ADN uman prezintă dimensiuni de 2,5 nm în lungime [230]. În nanotehnologie, o particulă este definită ca un obiect mic care se comportă ca o unitate întregă în ceea ce privește transportul și proprietățile sale. Termenul "nanoparticulă" nu se aplică moleculelor individuale, referindu-se de obicei la materiale anorganice [250].

Nanoparticulele metalice au fascinat oamenii de știință de aproape o jumătate de secol, fiind utilizate în științele biomedicale și inginerie. Ele sunt un punct de interes datorită potențialului lor imens în domeniul nanotehnologiei. Astăzi aceste materiale pot fi sintetizate și modificate cu diferite grupări chimice funcționale care le permit să fie conjugate cu anticorpi, liganzi și medicamente de interes, deschizând astfel o gamă largă de aplicații potențiale în biotehnologie [147].

2. Scopul tezei de doctorat

Scopul prezentei lucrări îl reprezintă studiul nanoparticulelor metalice, reliefat de sinteza, caracterizarea și aplicabilitatea acestora, realizate în vederea dezvoltării și îmbunătățirii inergismului activității antimicrobiene, în combinație cu anumite medicamente comerciale.

Teza își propune ca **obiectiv principal** îmbunătățirea proprietăților antimicrobiene ale nanoparticulelor obținute prin metoda de sinteză verde mediată de microorganismele.

Obiectivele specifice ale temei de cercetare urmăresc:

- Analiza critică a stadiului actual privind metodele de obținere a nanoparticulelor realizate prin abordări top-down, respectiv abordări bottom-up.
- Sinteza nanoparticulelor metalice utilizând reducători și agenți de stabilizare naturali oferți de diferite culturi microbiene.
- Îmbunătățirea proprietăților și a performanței nanoparticulelor obținute prin modificarea parametrilor de proces (temperatură, perioada de incubație, concentrație molară, etc.).
- Evaluarea activității antimicrobiene a nanoparticulelor obținute
- Dezvoltarea sinergismului dintre nanoparticule și diferite antibiotice.

Obiectivele menționate mai sus înfățișează conținutul unei lucrări interdisciplinare, care asemenea nanotehnologiei, întrunește elemente din domeniile chimiei, fizicii și al biologiei.

3. Motivația, noutatea și importanța temei de cercetare

Fondul pe baza căruia este structurată teza este justificat în primul rând de progresul exponențial al nanotehnologiei susținut de tendințele naționale și internaționale, la aceasta venind cu o completare care vizează domeniul de aplicare medical. De asemenea, caracterul interdisciplinar al lucrării este sprijinit de beneficiile utilizării sintezei verzi a nanoparticulelor, cum ar fi: costul redus de sinteză, elementele nepoluante implicate, cât și posibilitatea relativ ușoară pentru implementarea la scară industrială, acestea nefiindu-i necesari parametri speciali de proces (temperaturi, presiuni, consum energetic ridicat, etc.).

Elementele de noutate întâlnite în prezenta lucrare sunt în principal reprezentate de microorganismele care au fost folosite pentru medierea procesului de sinteză a nanoparticulelor, cât și de anumiți parametri de proces care au influențat proprietățile finale ale materialelor obținute la scară nanometrică.

Conform Web of Science, studiind subiectul nanotehnologiei, pentru ultimii 5 ani, cele mai întâlnite domenii de cercetare sunt Știința Tehnologiei și Știința Materialelor care surclasează sfera cercetărilor în Inginerie, Chimie, Fizică și Biologie. Tipul celor mai uzuale documente realizate pe topicul menționat anterior se concretizează în articole științifice, urmate de cărți, brevete de invenție, respectiv știri. La nivelul României, domeniul Științei Materialelor vizează în mod deosebit dezvoltarea nanotehnologiilor.

Un aspect deosebit de important al temei descrise îl reprezintă abilitatea de a obține și de a influența proprietățile materialelor de dimensiuni nanometrice datorită dimensiunii și formei acestora. Acest lucru a dus la o extindere a domeniilor de aplicare a nanoparticulelor în aproape toate industriile și cercetările științifice.

Lucrarea de doctorat este compusă din 6 (șase) capitole și 10 anexe. Pe parcursul realizării tezei am apelat la aproximativ 250 de resurse bibliografice, acestea cuprinzând în mare parte articole publicate în reviste de specialitate, respectiv cărți.

Primul capitol (I), Nanotehnologii și nanomateriale; metode de obținere, domenii de aplicare, își propune evidențierea și clasificarea unor metode de sinteză a nanoparticulelor metalice. Acestea sunt descrise succint în vederea focusării pe elementele principale ce definesc fiecare metodă în parte, astfel încât să existe o selecție mai simplă a acestora în funcție de disponibilități sau de rezultate urmărite. Clasificarea acestora se realizează în primul rând după principiile abordărilor de sus în jos (top-down), respectiv de jos în sus (bottom-up). Se evidențiază metoda sintezei verzi, dezvoltată în prezenta lucrare, cu avantajele și dezavantajele acesteia.

Cel de-al doilea capitol (II), Metode de analiză și caracterizare a proprietăților structurale și morfologice ale nanoparticulelor metalice, oferă o perspectivă asupra principiilor metodelor de caracterizare a nanoparticulelor utilizate în vederea realizării lucrării de doctorat.

În cel de-al treilea capitol (III), Cercetări privind obținerea prin bio-sinteză și caracterizarea nanoparticulelor de tip ZnO, s-au sintetizat ZnO NPs folosind supernatantul bacteriei *Enterobacter tulpina* LA9 în combinație cu hexahidrat de azotat de zinc în concentrație de 2 mM, utilizat ca precursor în procesul de sinteză a nanoparticulelor de oxid de zinc. Soluțiile sintetizate conținând nanoparticule au fost caracterizate prin spectroscopie în ultraviolet- vizibil (UV-vis), rezultând un peak la 368 nm. Analiza de spectroscopie cu raze X de dispersie a energiei (EDX) a confirmat compoziția elementară a nanoparticulelor de oxid de zinc. Microscopia electronică de baleiaj (SEM) a prezentat ZnO NPs cu formă sferică, cu un diametru de aproximativ 100 nm și structuri de tip microflori, după o perioadă de incubație mai lungă a eșantioanelor. În această parte a tezei s-a demonstrat importanța parametrilor de proces și influența acestora asupra rezultatelor obținute.

Cel de-al patrulea capitol (IV), Cercetări privind obținerea prin bio-sinteză și caracterizarea nanoparticulelor de tip Ag, este dedicat prezentării biosintezei nanoparticulelor de argint, folosind AgNO_3 ca precursor, de către două specii de *Bacillus*, și anume *Bacillus amyloliquefaciens* și *Bacillus subtilis*. După etapele cuprinse în procesul de sinteză, absorbțiile soluțiilor coloidale de culoare maro, ce conțin nanoparticule, au fost evaluate prin spectrofotometrie în ultraviolet-vizibil (UV-vis), care au prezentat valorile de vârf al absorbției la 418 nm și 414 nm, corespunzătoare rezonanței plasmonice de suprafață a nanoparticulelor de argint. Analize precum, spectroscopia de raze X cu energie dispersivă (EDX), microscopia electronică de baleiaj (SEM) și dispersia dinamică a luminii (DLS) au confirmat formarea de nanoparticule sferice de argint cu un diametru mediu mai mic de 140 nm. Difracția cu raze X (XRD) a confirmat prezența cristalelor de argint, cu structuri cubice cu fețe centrate, cu cel mai înalt vârf al intensității la $2\theta = 38,12^\circ$, care corespunde cu planurile de difracție (111). Activitatea antibacteriană a fost observată după 24 de ore de incubare împotriva bacteriilor

gram negative: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, precum și gram pozitive: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*. Mai mult, activitatea antifungică a fost evaluată împotriva *Candida albicans*. Zona de inhibare a fost observată în mod clar pe plăcile care conțin nanoparticule de argint, fie separate, fie în combinație cu antibiotice, demonstrând astfel potențialul lor efect antibacterian.

În cel de-al cincelea capitol (V), Cercetări privind obținerea prin bio-sinteză și caracterizarea nanoparticulelor de tip AgCl, am prezentat rezultatele cercetărilor privind biosinteza nanoparticulelor de clorură de argint. Acestea au fost sintetizate utilizând microorganismele *Rhodotorula Mucilaginosa*, *Enterobacter Faecalis*, *Pantoea* și *Raoultella Planticola* și soluție apoasă de AgNO_3 , ca precursor. Rezonanța plasmonică a soluției conținând nanoparticule a arătat prin spectrofotometrie UV-vizibilă (UV-vis) un maxim de absorbție la aproximativ în jurul valorii de 440 nm. Microscopia electronică de scanare (SEM), microscopia electronică de transmisie (TEM), spectroscopia cu energie dispersivă și analizele de difracție cu raze X (XRD), microscopia de forță atomică (AFM) și difracția de electroni în arie selectată (SAED) au confirmat prezența nanoparticulelor sferice de clorură de argint cu o structură cristalină cubică cu fețe centrate și o dimensiune medie a particulelor de aproximativ 10-50 nm. De asemenea, în acest studiu am demonstrat că nanoparticulele de clorură de argint au capacitatea de a inhiba creșterea diferitelor microorganisme, ca, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus Pyogenes*, *Salmonella* sau *Bacillus amiloliquefaciens*[89].

În finalul lucrării, în cel de-al șaselea capitol (VI), sunt prezentate concluziile finale. contribuțiile originale, direcțiile viitoare de cercetare, precum și diseminarea rezultatelor obținute în timpul studiilor de doctorat.

Elementele de noutate întâlnite în procesele de sinteză prezentate în teză constituie o bază importantă în dezvoltarea unor viitoare cercetări în domeniul nanotehnologiei.

CAPITOLUL I

NANOTEHNOLOGII ŞI NANOMATERIALE; METODE DE OBŢINERE, DOMENII DE APLICARE

Sinteza nanoparticulelor metalice este o arie activă a cercetării academice și, mai semnificativ, a aplicării în domeniul nanotehnologiei. Au fost dezvoltate mai multe metode pentru sinteza acestor materiale. Tehnicile pentru sintetizarea nanoparticulelor pot fi împărțite în procese în fază solidă, în fază lichidă și în fază gazoasă [81].

Datorită dimensiunilor materialelor la scară nano, comportamentul lor se schimbă remarcabil. Proprietățile materialelor sunt influențate în primul rând de creșterea raportului suprafață / volum, care determină o creștere a suprafeței totale și a fracțiunii entităților, așa cum se arată în Figura 1.1. Proprietățile electrice, magnetice, solubilitatea sau reactivitatea sunt superioare față de cele ale acelorași materiale cu dimensiuni mai mari ale particulelor [11].

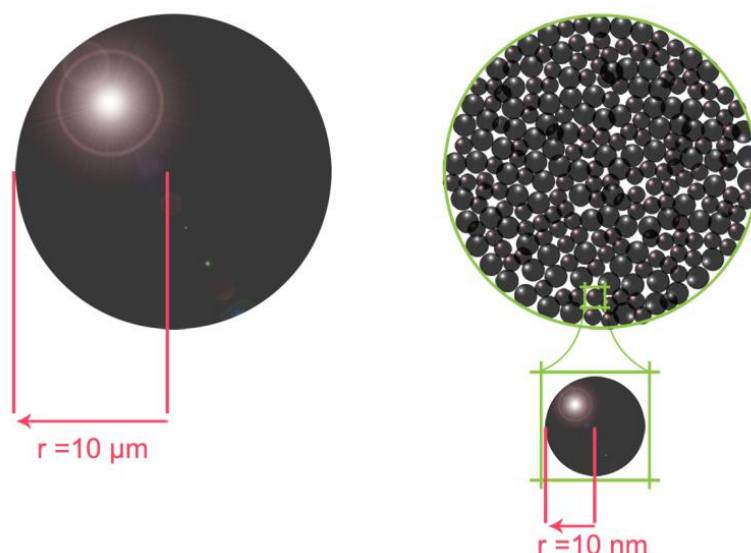


Figura 1.1 Reprezentarea schematică a modificării raportului suprafață / volum între o microsferă (stg) și același volum al microsferii, dar compus din nanoparticule (dr) [26]

În ultimii ani, sinteza nanoparticulelor a dobândit interes datorită aplicării potențiale în mai multe domenii, cum ar fi medicina, industria catalizatorilor, și biosenzori [189],[211]. Printre cele mai importante și mai bine studiate tipuri de nanoparticule metalice s-au găsit metalele nobile (aurul și argintul), sulfura de cadmiu, cupru, oxidul de zinc și dioxidul de titan [104],[116],[182] [193],[215], .

Materialele nanocristaline pot fi sintetizate fie prin consolidarea atomilor / moleculelor / grupurilor de atomi sau descompunerea materialului de dimensiuni mari, către dimensiuni mai mici. În Figura 1.2. sunt reprezentate schematic câteva din metodele de sinteză a structurilor nanometrice care includ atât abordările de tip "top-down" (de sus în jos), cât și cele de tip "bottom-up" (de jos în sus) [5],[146].

Metodele de sinteză a nanoparticulelor pot implica, în general, fie o abordare top-down, fie o abordare bottom-up, la rândul lor metodele fiind clasificate ca în Figura 1.3.

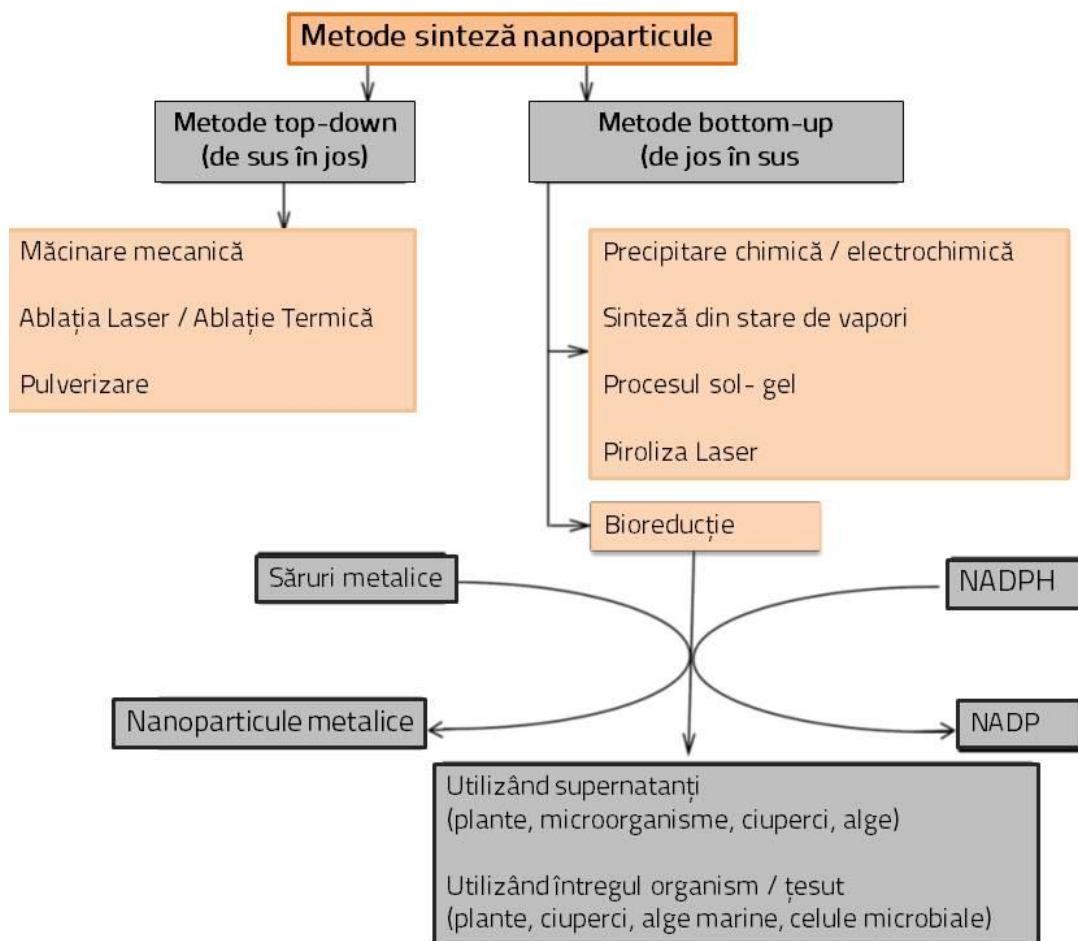


Fig. 1.3 Diferite abordări pentru fabricarea nanoparticulelor [5],[146].

1.1 Abordări de tip "top-down"

În această categorie, sinteza top-down, nanoparticulele sunt obținute prin reducerea dimensiunilor sistemelor macroscopice până la dimensiuni nanometrice. Reducerea în dimensiuni a particulelor se poate realiza prin diferite proceduri fizice sau chimice, atunci când se aplică o sursă de energie, care poate fi mecanică, chimică sau termică. De asemenea, poate fi utilizată și o altă formă de energie, cum ar fi iradierea cu laser [5], [92].

1.2 Abordări de tip "bottom-up"

În procesele de sinteză "bottom-up", manipularea individuală a atomilor și moleculelor, prin procese de autoasamblare, conduce la formarea nanostructurilor. Această abordare se poate concretiza și prin aplicarea metodelor biologice. Precursorul utilizat este de obicei un lichid sau gaz care este ionizat,

disociat, sublimat sau evaporat și apoi condensat pentru a forma nanoparticule amorfe sau cristaline [61], [92], [48].

Avantajele acestor tehnici constau în compoziția chimică omogenă, o variație scăzută a dimensiunii particulelor, respectiv numărul defectelor de la suprafață a nanoparticulelor, considerabil mai scăzut decât în cazul abordărilor top-down [92].

1.3 Sinteza verde a nanoparticulelor metalice

În ultimii ani, sinteza biologică a apărut ca o alternativă atrăgătoare la metodele tradiționale de producere a nanoparticulelor. Biosinteza implică abordări ecologice bazate pe metode verzi care utilizează entități biologice unicelulare și multicelulare, cum ar fi: bacterii, actinomicete, ciuperci, plante și drojdii sau extracte de plante [144].

Pe lângă utilizarea microbilor și a plantelor, metodele verzi de sinteză includ în prezent diferite abordări prin folosirea unor materiale biologice ca mierea, amidonul sau acidul ascorbic. Acestea au fost utilizate până în prezent pentru a sintetiza nanoparticule de aur, argint, paladiu, carbon și platină [19].

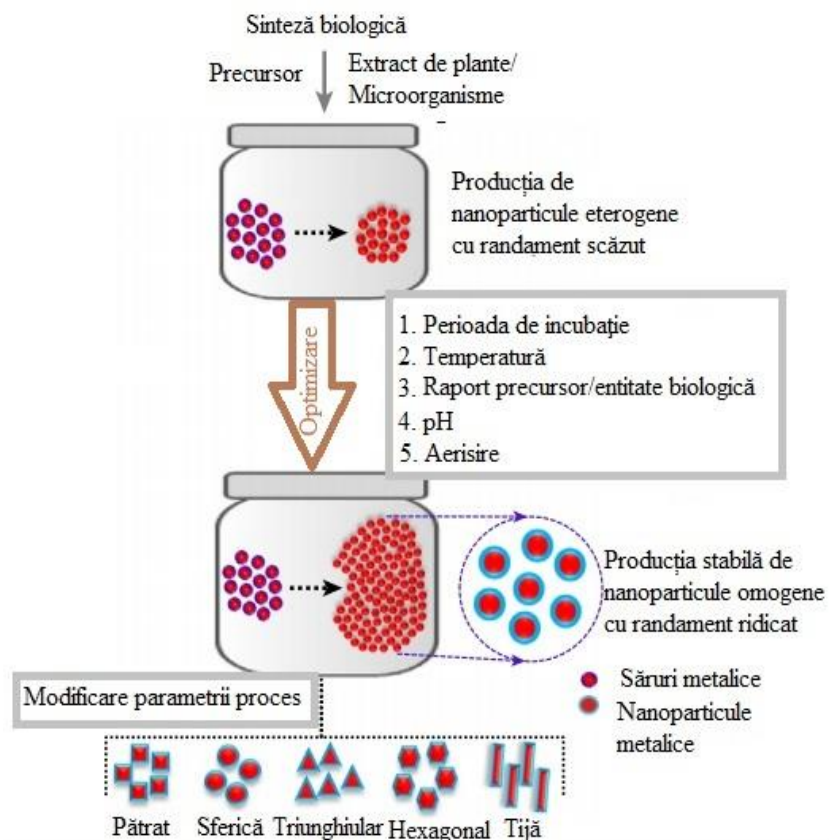


Figura 1.16 Parametrii pentru producerea nanoparticulelor biologice monodispersate, stabile și cu randament ridicat [195]

Cu toate că microorganismele și extractele de plante pot fi folosite pentru a sintetiza nanoparticule metalice, este foarte important ca procesul să fie optimizat pentru producerea nanoparticulelor

omogene de dimensiuni și forme similare. Acest lucru se poate face prin ajustarea parametrilor de control, cum ar fi concentrația precursorilor, raportul de amestecare dintre extractul biologic și sarea de metal, valoarea pH-ului, temperatura, timpul de incubare și aerarea [210],[78].

1.3.1 Sinteza verde utilizând extracte de plante

Plantele au fost considerate o cale mai ecologică pentru sintetizarea biologică a nanoparticulelor metalice. Acestea prezintă potențial în hiper-acumulare și reducere biologică a ionilor metalici.

Extractele de plante conțin alcaloizi bioactivi, acizi fenolici, polifenoli, proteine, zaharuri și terpenoide care au un rol important în reducerea inițială a ionilor metalici și apoi la stabilizarea acestora. Variația în compoziția și concentrația acestor biomoleculi active între diferitele plante și interacțiunea lor ulterioară cu ionii de metal contribuie la diversitatea dimensiunilor și formelor de nanoparticule produse [144], [210].

Produsele naturale sau cele derivate din produse naturale, cum ar fi extracte din mai multe plante sau părți de plante, ceai, cafea, banane, aminoacizi simpli, precum și vinul, zahărul de masă și glucoza, au fost utilizate ca reductoare și ca agenți de acoperire în timpul prezentei metode de sinteză [210].

De asemenea, experimente recente au dezvăluit potențialul reducător al extractelor de frunze, extractelor de semințe, extractelor de rădăcini, bulbilor și latexului de plante, acestea fiind utilizate pentru a sintetiza nanoparticule de aur, argint și paladiu [19].

1.3.2 Sinteza verde a nanoparticulelor utilizând microorganisme

Microbii produc materiale anorganice, fie intra- sau extra-celular, adesea în dimensiuni nanometrice, cu o morfologie rafinată. Detoxifierea microbiană se poate realiza fie prin biomineralizare extracelulară, biosorbție, complexare sau precipitare, fie intracelulară prin bioacumulare [38].

Bioreducția constă în reducerea chimică a ionilor metalici în forme mai stabile din punct de vedere biologic. Multe organisme au capacitatea de a utiliza reducerea metalului disimilator, în care reducerea ionului de metal este cuplată cu oxidarea unei enzime. Acest lucru are ca rezultat nanoparticule metalice stabile și inerte care pot fi apoi îndepărtate în siguranță dintr-o probă contaminată [152].

Locația cea mai versatilă a biosintezei nanoparticulelor este cea a celulelor biologice și membrana celulară a acestora. Biosinteza este fenomenul care are loc prin reacția biologică sau enzimatică [46].

Există două tipuri de biosinteză, în funcție de locul în care are loc procesul, și anume intra- sau extracelular. Sinteza intracelulară are loc în celulă, în timp ce sinteza extracelulară are loc datorită enzimelor secretate de celule [73]. Producția extracelulară de nanoparticule metalice are mai multe aplicații comerciale în diverse domenii întrucât polidispersia este preocuparea majoră. Este important să se optimizeze condițiile proceselor biologice pentru obținerea unor nanomateriale monodispersate [46].

1.3.3 Aplicații ale nanoparticulelor obținute prin biosinteză

Nanotehnologia este un domeniu de cercetare în plină dezvoltare, având un impact puternic în toate sferile vieții umane, motiv pentru care sinteza nanoparticulelor pe cale biologică devine o alternativă mai sigură și mai bună la metodele convenționale [240].

Nanomaterialele sunt folosite cu succes în domeniul nanomedicinii, care prezintă continue perspective de îmbunătățire a diagnosticului și tratamentului bolilor umane. Nanoparticulele dispersate sunt de obicei folosite în nanobiomedicină ca etichete biologice fluorescente, medicamente și agenți de eliberare a genelor și în aplicații precum biodetecția agenților patogeni, ingineria tisulară, distrugerea tumorilor prin încălzire și îmbunătățirea contrastului RMN. A fost explorată utilizarea lor și în aplicații cum ar fi livrarea medicamentelor, tratamentul cancerului, terapia genică și analiza ADN [220], [179].

Nanoparticulele au fost folosite pe scară largă pentru a îmbunătăți diferitele reacții ca reductoare și / sau catalizatori în domeniul chimiei datorită suprafeței lor specifice mari. Nanoparticulele sintetizate prin procese biologice au o reactivitate catalitică mai mare și o suprafață specifică mai mare [46], [239].

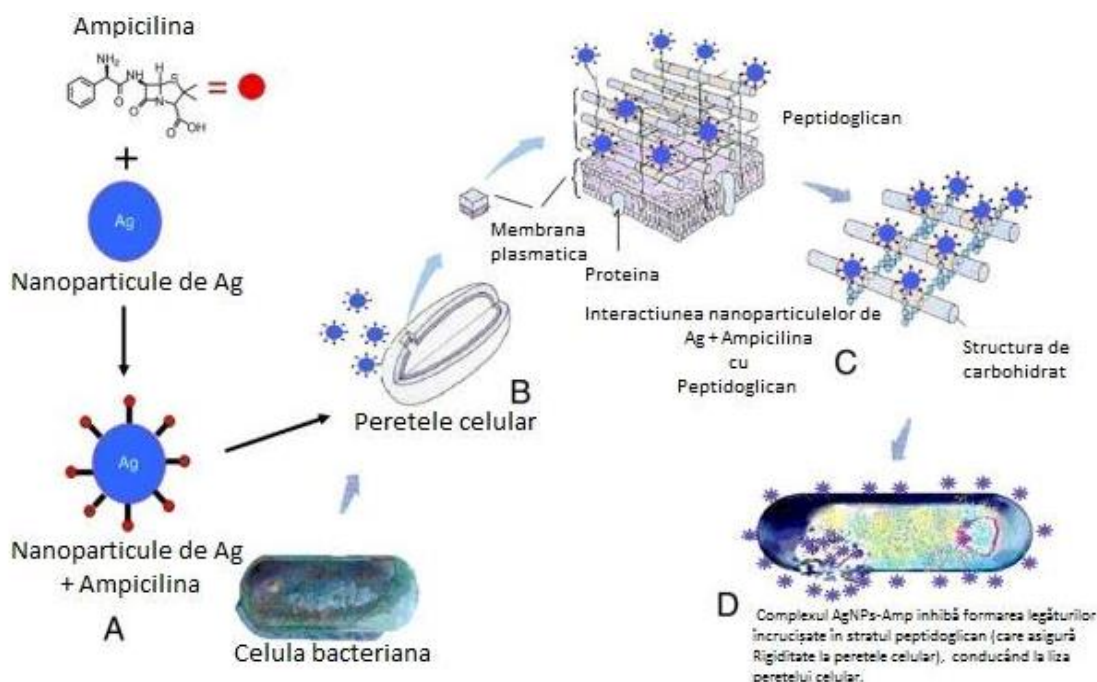


Fig. 1.17 Activitatea sinergică a AgNP cu ampicilină (Amp) împotriva bacteriilor [65].

Multe dintre organismele rezistente la antibiotice prezintă o sensibilitate la antibioticele combinate cu nanoparticulele metalice. Fayaz a prezentat o posibilă explicație pentru îmbunătățirea mecanismului sinergic antibacterian (figura 1.17) [51], [65], unde apar următoarele fenomene:

- formarea nanoparticulelor de argint de bază cu ampicilină.
- Interacțiunea dintre AgNPs-Amp peste peretele celular al bacteriilor.

- Complexul AgNPs-Amp inhibă formarea legăturilor încrucişate în stratul peptidoglican (care asigură rigiditatea peretelui celular), conducând la liza peretelui celular.
- Complexul AgNPs-Amp previne deplasarea ADN-ului

1.4 Concluzii

- Metodele de sinteză „top-down” se caută a fi înlocuite, sau îmbunătăţite, din cauza imperfecţiunilor în structură la suprafaţă. Aceasta reprezintă o limitare majoră deoarece chimia suprafeţei şi alte proprietăţi fizice ale nanoparticulelor sunt strâns dependente de structura suprafeţei.
- Abordările “bottom-up” s-au dovedit a fi mai favorabile, motiv pentru care au fost dezvoltate o multitudine de tehnici de sinteză a nanoparticulelor urmând principiul auto-asamblării.
- Tehnicile de sinteză a nanomaterialelor, atât prin abordări “top-down”, cât şi “bottom-up” au revoluţionat utilizarea nanomaterialelor în diferite domenii. Potenţialul nanoparticulelor de a prezenta dimensiuni şi forme stabile din punct de vedere ecologic, creşte cererea producerii la scară industrială.
- Biosinteza nanoparticulelor metalice este un domeniu interdisciplinar (“bio-nanotehnologia”) care necesită colaborarea dintre fizicieni, chimişti, biologi şi ingineri. Exploatarea resurselor naturale şi implementarea acestor metode de sinteză biologică s-a dovedit a avea multiple avantaje, cum ar fi: protejarea mediului, simplitatea implementării în producţie, eficienţa din punct de vedere al costurilor.
- lipsa unei sinteze chimice complexe ulterioare, lipsa de contaminanţi toxici şi capacitatea de sinteză rapidă utilizând numeroase plante medicinale şi microorganisme.
- Rata de producţie prin biosinteză şi monodispersitatea particulelor sunt continuu îmbunătăţite. Trecerea de la bacterii la ciuperci ca mijloc de dezvoltare a “nanofabricilor” naturale, reprezintă un avantaj suplimentar în ceea ce priveşte sinteza nanoparticulelor utilizând microorganisme.
- Căile biochimice implicate în sinteza nanoparticulelor trebuie să fie studiate cu atenţie, iar genele specifice şi enzimele implicate trebuie să fie caracterizate. Acest lucru ne va ajuta să avem un control mai bun asupra parametrilor care definesc proprietăţile unei nanoparticule, cum ar fi dimensiunea, forma şi monodispersitatea.
- Ingineria genetică poate fi, de asemenea, utilizată pentru a face posibilă utilizarea organismului a cărui creştere este cunoscută în detaliu şi poate fi manipulată în interesul nostru.
- Cercetările viitoare privind sinteza microbiană a nanoparticulelor cu proprietăţi unice sunt de o mare importanţă pentru aplicaţiile din domeniul medicinei, agriculturii şi electronicii.

CAPITOLUL II

METODE DE ANALIZĂ ŞI CARACTERIZARE A PROPRIETĂŢILOR STRUCTURALE ŞI MORFOLOGICE A NANOPARTICULELOR METALICE

Nanoparticulele metalice şi-au găsit aplicaţii timp de secole în vopsele şi pigmenţi, însă, în prezent s-a demonstrat promisiunea dezvoltării următoarei generaţii de dispozitive electronice şi medicinale, senzori chimici şi medicamente. În ultimele decenii s-au înregistrat multe progrese atât în sinteza cât şi în caracterizarea acestor sisteme [100].

Sinteza nanoparticulelor metalice este urmată de proprietăţile lor bazate pe caracterizare, cum ar fi dimensiunea, forma, morfologia suprafeţei şi dispersia. În cazul abordărilor chimice, cât şi verzi, sărurile metalelor ionice se reduc şi rezultă o schimbare a culorii în amestecul de reacţie, care este prima indicaţie a faptului că se formează nanoparticulele. Cu toate acestea, este necesară o caracterizare detaliată pentru a evidenţia formarea acestora.

Printre cele mai frecvent utilizate tehnici de caracterizare a nanoparticulelor metalice biosintetizate se regăsesc şi următoarele: spectroscopia în ultraviolet-vizibil şi vizibil (UV-vis), difracţia cu raze X (XRD), microscopia electronică de baleiaj (SEM), spectroscopia de raze X cu energie dispersivă (EDX), microscopia electronică de transmisie (TEM), difracţia de electroni în arie selectată (SAED), spectroscopia Raman (RAMAN), microscopia de forţă atomică (AFM), dispersia dinamică a luminii spectrometria cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS) [199],[75].

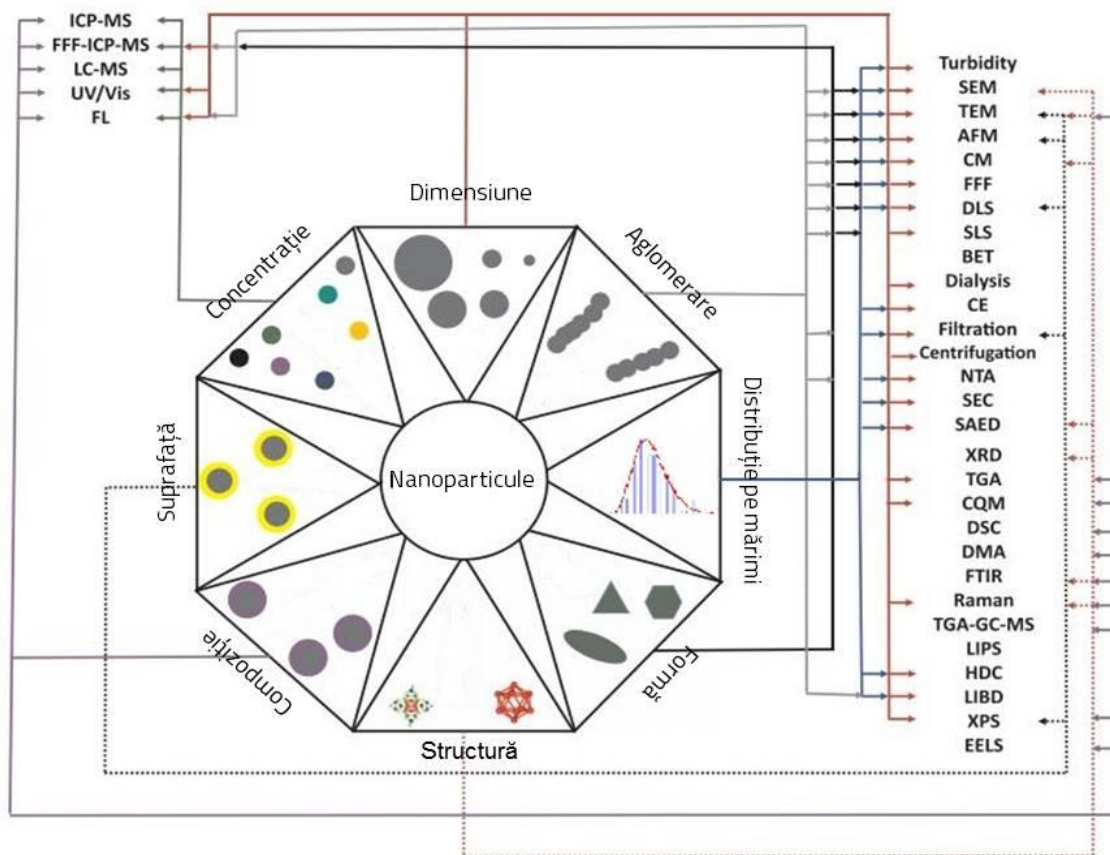


Figura 2.1 Metode de caracterizare a materialelor [199].

În figura 2.1 sunt prezentate diferite metode de caracterizare a parametrilor chimici și fizici (concentrația, mărimea, aglomerarea, distribuția mărimii, forma, structura, compoziția și suprafața) utilizate pentru a explora lumea "nano" și metodele analitice folosite pentru dimensionare și cuantificare în fiecare caz [199].

2.8 Concluzii

- Dezvoltarea rapidă și producția de nanomateriale pentru utilizarea în nanomedicină indică cererea și înțelepciunea pentru reglementarea fabricării și utilizării nanomaterialelor. Tehnicile robuste pentru caracterizarea nanomaterialelor sunt fundamentale pentru orientările de reglementare pentru asigurarea siguranței nanomaterialelor în general și a nanomedicinii, în special.
- Descrierea succintă a fiecărei tehnici, împreună cu punctele sale forte și limitări, ne oferă o imagine pentru selectarea tehnicilor adecvate pentru caracterizarea unor particule cu aplicații potențiale în nanomedicină.
- Spectroscopia UV-vis este o metodă simplă și rentabilă pentru determinarea concentrației de specii absorbante, dacă este aplicată compușilor puri și utilizată cu curba standard corespunzătoare. O curbă standard care se referă la absorbție poate fi dezvoltată pentru orice compus și este utilizată pentru a determina concentrația probelor care conțin același compus.
- SEM și TEM oferă avantaje unice pentru caracterizarea foarte detaliată a nanoparticulelor. Diferența principală dintre rezultatele celor două tehnici este modul în care imaginile nanoparticulelor sunt obținute. Este importantă înțelegerea beneficiilor oferite de fiecare tehnică înainte de a decide ce tehnică trebuie utilizată.
- DLS este o metodă stabilă utilizată pe larg pentru măsurarea dimensiunii particulelor, pentru o gamă cu adevărat diversă de tipuri de probe. Alături de dimensiunea particulelor, sistemele de dispersie a luminii pot determina, de asemenea, greutatea moleculară, încărcarea de proteine și potențialul zeta. Există o variație a sensibilității considerabile de la sistem la sistem, definind dimensiunea particulelor sau moleculelor care pot fi măsurate corect, la fel ca și capacitatea de măsurare la concentrații ridicate.
- Difrakția cu raze X este o tehnică pentru analizarea structurii cristaline a materialelor. Fasciculul cu raze X lovește un cristal, împrăștiind un fascicul într-o manieră caracterizată de structura cristalină. Se pot analiza chiar și structuri complexe prin difracție cu raze X, cum ar fi ADN-ul și proteinele.

CAPITOLUL III

CERCETĂRI PRIVIND OBȚINEREA PRIN BIOSINTEZĂ ȘI CARACTERIZAREA NANOPARTICULELOR DE TIP OXID DE ZINC

3.1 Contribuții la studiul particulelor de ZnO

Nanoparticulele de oxid de zinc au aplicații diverse în domeniile electronicii, senzorilor chimici, produselor de îngrijire personală și industriei alimentare. În acest studiu, s-au sintetizat ZnO NPs folosind supernatantul bacteriei *Enterobacter tulpina LA9* în combinație cu hexahidrat de azotat de zinc în concentrație de 2 mM, utilizat ca precursor în procesul de sinteză a nanoparticulelor de oxid de zinc.

Soluțiile sintetizate conținând nanoparticule au fost caracterizate prin spectroscopie în ultraviolet-vizibil, rezultând un peak la 368 nm. Analiza de spectroscopie cu raze X de dispersie a energiei a confirmat compoziția elementară a nanoparticulelor de oxid de zinc. Microscopia electronică de baleiaj a prezentat ZnO NPs cu formă sferică, cu un diametru de aproximativ 100 nm și structuri tip microflori, după o perioadă de incubație mai lungă a eșantioanelor [79].

Acesta este primul studiu care evidențiază sinteza biologică a microflorilor ZnO-NP în prezența bacteriei *Enterobacter*.

3.2 Sinteza nanoparticulelor și a structurilor de tip micro-flori de oxid de zinc

3.2.1 Bacteriile și condițiile de cultură

Enterobacter sp. LA9 a fost izolat din situs contaminat cu ulei și caracterizat prin ARN 16S la Departamentul Științei și Tehnologiei Mediului din cadrul Universității Tehnologice din Cipru. *Enterobacter sp. LA9* a prezentat o producție ridicată de polizaharide extracelulare (mai mare de 1500 mg de greutate uscată EPS / L) și activitate de emulsificare (mai mare de 70% în uleiul de măsline). Coloniile pure ale izolatului au fost inoculate pe plăci Petri conținând extract de drojdie de 1 g / l; 18 g / l agar-agar; 5 g / l nitrat de sodiu; 0,2 g / L glucoză. Plăcile inoculate s-au incubat la 33 °C, timp de 48 de ore. Pentru precursor s-a folosit hexahidrat de azotat de zinc de la Sigma-Aldrich.

3.2.2 Biosinteza ZnO NPs utilizând *Enterobacter sp. LA9*

Cultura de *Enterobacter sp. LA9* a fost crescută în mediu lichid conținând 5 g / l NaCl, 6 g / L glucoză, 1,8 g / l extract de drojdie, 1 g / l H₂KO₄P, 0,6 g / l peptonă, 1 g / l NaNO₃, cultură care a fost utilizată pentru sinteza de nanoparticule. După 2 zile de păstrare a culturii în incubator la 33 °C, la 100 rpm, supernatantul (cultura lichidă) a fost separat de biomasa solidă prin centrifugare la 4000 rpm, 10 °C timp de 30 min și trecut prin filtru de 0,45 μm.

Soluția conținând 2 mM de precursor $Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O$ a fost preparată utilizând apă sterilă distilată, încălzită în cuptor la 80 °C timp de 30 de minute și pusă pe agitator orbital timp de 2 ore la 100 rpm. Probele au fost preparate în raport 1 : 9 (supernatant : precursor).

Probele au fost păstrate în flacoane conice în incubator la 33 °C, 100 rpm. După 72 de ore, soluția a fost uscată în cuptor la 80 °C. După această etapă, soluția a fost spălată de cinci ori cu apă distilată sterilă pentru a îndepărta impuritățile. În final, peletele brute au fost apoi resuspendate în 5 ml apă distilată sterilă. S-au adăugat 4 ml de soluție într-un recipient ceramic și s-au menținut în cuptor peste noapte.

Primul semn al formării ZnO-NPs poate fi observat în Fig. 3.1a, unde depunerea albă de pe fundul flaconului indică prezența acestui tip de nanoparticule [17]. Este important să se țină seama de faptul că acest semn poate fi înșelător, deoarece particulele pot avea o dimensiune mai mare, deci nu sunt neapărat considerate nanometrice, în timp ce prezintă aceeași depunere albă.

3.3 Caracterizarea structurilor obținute și interpretarea datelor. Echipamente utilizate.

3.3.1 Rezonanța plasmonică de suprafață a nanoparticulelor de ZnO (UV-visibil)

Posibila formarea a soluției de ZnO-NP a fost monitorizată prin eșantionare periodică. Spectrele UV-vis ale soluțiilor de 1 ml au fost monitorizate ca o funcție a timpului de reacție pe un spectrofotometru Lambda 25 în domeniul 300–700 nm (rezoluție de 1 nm).

Figura 3.1b reprezintă variația absorbției soluției preparate, ca funcție a lungimii de undă de radiație. Creșterea timpului de incubare, de la 48 la 72 de ore, rezultă într-o creștere a absorbției soluției. Un vârf la o lungime de undă de 368 nm poate fi observat, indicând formarea de nanoparticule de oxid de zinc [79].

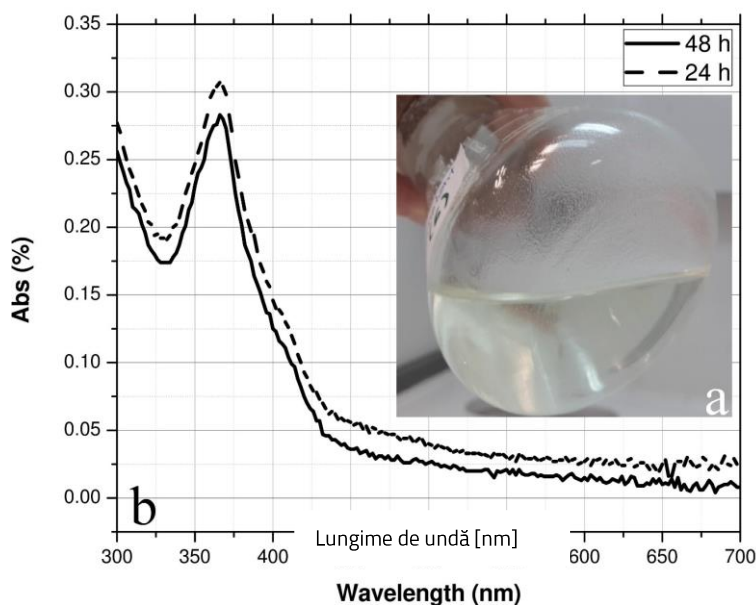


Figura 3.1 Spectroscopia UV-visibil a soluției care conține nanoparticule de ZnO

3.3.2 Analiza structurală și morfologică a particulelor prin Microscopie Electronică de Baleiaj (SEM)

Pentru a evalua dimensiunea particulelor și morfologia acestora, s-a utilizat un microscop electronic de baleiaj Quanta 200 Scanning Electron Microscope (SEM, FEI, Hillsboro, OR) echipat cu o platformă pentru Spectroscopie de energie dispersivă cu raze X (EDX) care a permis analiza compoziției chimice. Provoacă în ceea ce privește biosinteza nanoparticulelor includ producția optimă și timpul minim pentru a obține dimensiunea și forma dorită, pentru a spori stabilitatea nanoparticulelor și optimizarea microorganismelor specifice pentru aplicații specifice. Figura 3.2.a prezintă nanoparticulele de oxid de zinc de formă sferică (cea mai comună formă a nanoparticulelor metalice) sintetizate de *Enterobacter sp. LA9*. Se poate observa că dimensiunea este predominant mai mică de 100 nm.

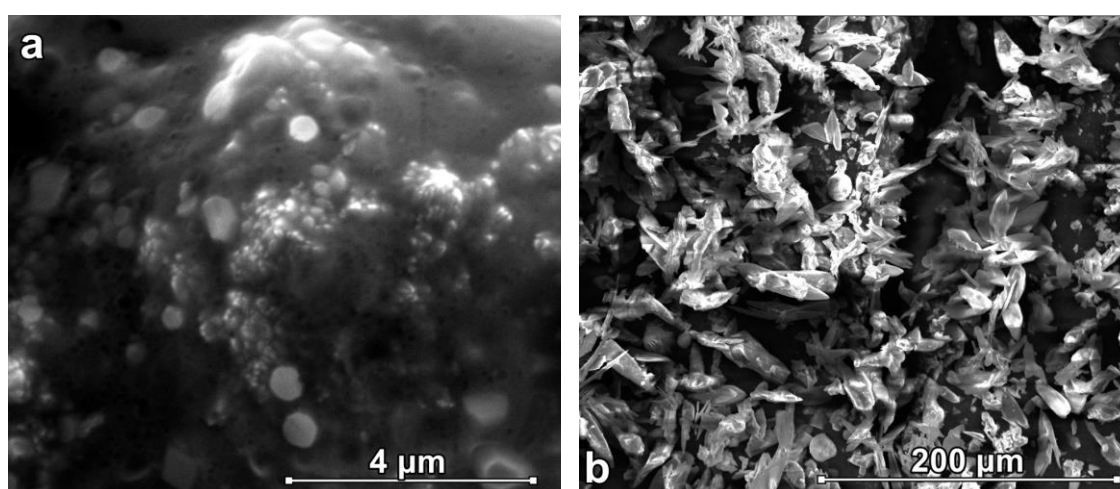


Figura 3.2.a Micrografiile SEM ale nanoparticulelor ZnO: forma sferică (a); structuri în formă de microflori (b).

3.3.3 Determinarea compoziției chimice prin microanaliză energie dispersivă cu raze X (EDX)

Analiza EDX a confirmat compoziția chimică pentru nanoparticulele de oxid de zinc (Figura 3.3.a) și pentru micro-florile de oxid de zinc (Figura 3.3.b) biosintetizate utilizând *Enterobacter sp. LA9*. Ambele spectre înregistrate prezintă semnale puternice pentru Zn și O.

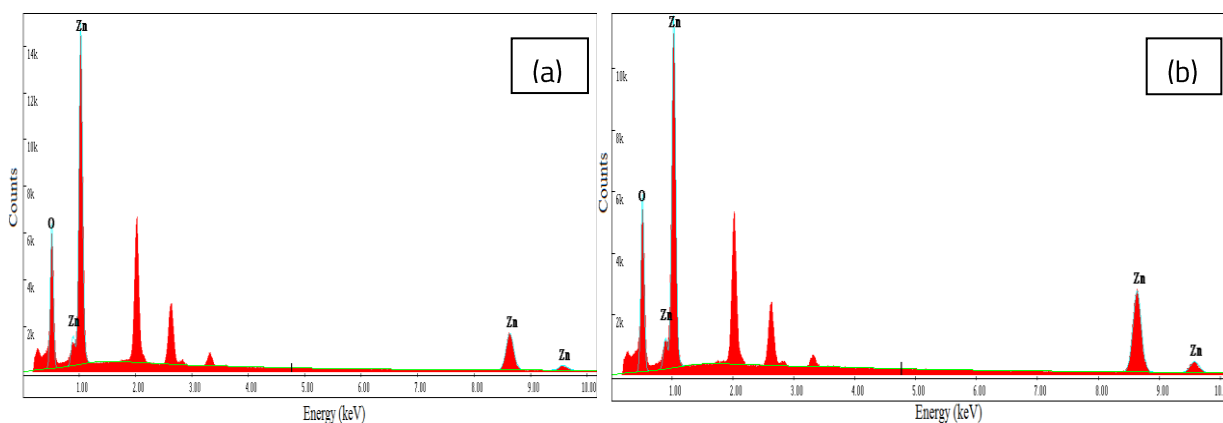


Figura 3.3. Spectrele EDS ale nanoparticulelor de oxid de zinc (a); oxid de zinc sub formă de micro-flori (b).

Pentru a obține diferite proprietăți și caracteristici ale nanoparticulelor de oxid de zinc s-a modificat un parametru în momentul procesului de sintetizare. Au fost observate rezultate semnificativ diferite atunci când probele au fost incubate timp de 48 de ore în loc de 72 de ore. Cu toate că a fost prezentă depunerea albă, și vârful a fost în jurul valorii cu aceeași lungime de undă, dimensiunea și forma erau total diferite.

Meghana Ramani și colaboratorii [167] au demonstrat sinteza structurilor de tip microflori de ZnO din nanoparticule printr-o cale chimică umedă. În acest caz, forma de ZnO a evoluat din nanoparticule în pachete de micro-flori.

Nanoparticulele de oxid de zinc au fost obținute prin schimbarea parametrului: timpul de incubare al probelor incluzând azotatul de zinc (Fig. 3.2.b). Această morfologie a materialelor ZnO ar putea fi de interes major, în principal datorită bunei sale activități fotocatalitice, având în vedere suprafața semnificativ mai mare, comparativ cu particulele sferice [222].

1.4. Concluzii

- Acesta este primul studiu care subliniază faptul că nanoparticulele și structurile de microflori de oxid de zinc pot fi obținute prin mediere de către supernatantul bacteriei *Enterobacter sp. LA9* în prezența precursorului $Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O$.
- Începerea formării nanoparticulelor de oxid de zinc este puțin mai greu de identificat din cauza depozității albe ușor vizibile cu ochiul liber.
- Transformarea nanoparticulelor de oxid de zinc în microflori, schimbând un singur parametru (timpul de incubare), este propusă ca o metodă de producție cu costuri reduse, care ar putea lărgi intervalul de posibile aplicații.
- Metoda de sinteză utilizată este prietenoasă cu mediul înconjurător.
- Nanoparticulele de oxid de zinc au aplicații importante în domeniul cosmeticelor, dintre care cremele cu protecție solară prezintă interes cercetătorilor.

CAPITOLUL IV

CERCETĂRI PRIVIND OBTINEREA PRIN BIOSINTEZĂ ŞI CARACTERIZAREA NANOPARTICULELOR DE TIP Ag

4.1 Contribuții la studiul nanoparticulelor de Ag

Acest capitol este dedicat prezentării biosintezei nanoparticulelor de argint, folosind AgNO_3 ca precursor, de către două specii de *Bacillus*, și anume *Bacillus amyloliquefaciens* și *Bacillus subtilis*.

După etapele cuprinse în procesul de sinteză, absorbțiile soluțiilor coloidale de culoare maro, ce conțin nanoparticule, au fost evaluate prin spectrofotometrie în ultraviolet-vizibil (UV-vis), care au prezentat valorile de vârf al absorbției la 418 nm și 414 nm, corespunzătoare rezonanței plasmonice de suprafață a nanoparticulelor de argint [75].

Analize precum, spectroscopia de raze X cu energie dispersivă (EDX), microscopia electronică de baleiaj (SEM) și dispersia dinamică a luminii (DLS) au confirmat formarea de nanoparticule sferice de argint cu un diametru mediu mai mic de 140 nm. Difracția cu raze X (XRD) a confirmat prezența cristalelor de argint, cu structuri cubice cu fețe centrate, cu cel mai înalt vârf al intensității la $2\theta = 38,12^\circ$, care corespunde cu planurile de difracție (111).

Activitatea antibacteriană a fost observată după 24 de ore de incubare împotriva bacteriilor gram negative: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, precum și gram pozitive: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*. Mai mult, activitatea antifungică a fost evaluată împotriva *Candida albicans*. Zona de inhibare a fost observată în mod clar pe plăcile care conțin nanoparticule de argint, fie separate, fie în combinație cu antibiotice, demonstrând astfel potențialul lor efect antibacterian.

4.2 Sinteza nanoparticulelor de argint

4.2.1 Bacteriile și condițiile de cultură

Bacillus amyloliquefaciens 1853 și *Bacillus subtilis* 10833 utilizate în acest studiu au fost furnizate de Universitatea Tehnologică din Cipru. Bacteriile au fost cultivate în următorul mediu solid: 1 g / l extract de drojdie; 18 g / l agar-agar; 5 g / l nitrat de sodiu; 0,2 g / l glucoză (toate furnizate de Scharlau Chemicals), care a fost sterilizat la 128°C în volumul de 100 ml apă distilată. Culturile au fost inoculate în mediul solid în plăci Petri cu diametrul de 55 mm din 12 ml de mediu, iar după gelificare au fost inoculate cu 1 μl din fiecare bacterie și incubate ulterior la 33°C timp de 48 de ore.

4.2.2 Biosinteza AgNps utilizând *B. amyloliquefaciens* 1853 și *B. subtilis* 10833

Pentru a sintetiza nanoparticulele de argint, 1 µl de tulpini bacteriene au fost proaspăt inoculate în flacoane conice conţinând 100 ml mediu lichid (0,6 g / l extract de drojdie, 1 g / l nitrat de sodiu, 3 g / l glucoză) la 33 °C timp de 48 h.

După 48 de ore, culturile au fost centrifugate la 4000 rpm timp de 30 min utilizând o centrifugă cu rotor unghiulară. 10 ml de supernatant au fost amestecate cu 90 ml de precursor (soluție apoasă 1 mM AgNO₃). Precursorul a fost mai întâi autoclavat (sterilizat) la 128 °C timp de 30 de minute. Procedura este prezentată schematic în Fig. 4.1.

Supernatantul și precursorul, în cazul de față, azotatul de argint, au fost păstrate pentru control. Probele au fost incubate timp de 48 ore la 33 °C (pentru a asigura activitatea enzimatică maximă a extractului) și 150 rpm. În plus, a fost pregătită o mostră de control care conține precursorul și mediul lichid proaspăt, fără bacterii, pentru a evalua comportamentul acestuia în ceea ce privește sinteza nanoparticulelor. Proba de control a fost ținută în aceleași condiții cu probele care conțin supernatant.

Pentru purificarea Ag NPs biosintetizate, probele au fost centrifugate la 4000 rpm timp de 30 min. Peletele colectate au fost spălate cu 25 ml apă distilată și uscate la 80 °C până când lichidul s-a evaporat. Această ultimă etapă a fost efectuată de 4 ori, apoi probele au fost uscate într-o etuvă la 200 °C timp de 6 ore.

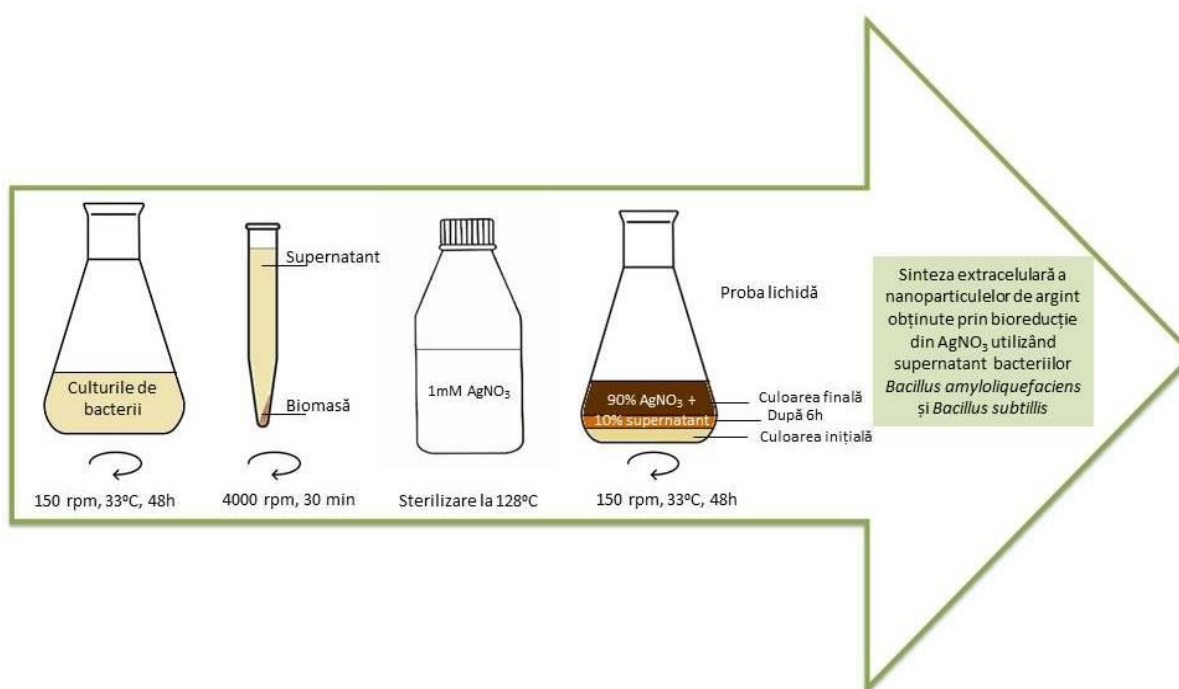


Figura 4.1. Procedura de sinteză a nanoparticulelor de argint, care utilizează supernatantul ca reductor și azotatul de argint ca precursor [75].

Mecanismul de sinteză a nanoparticulelor metalice de Ag ar putea fi următorul:

Ionii Ag⁺ sunt reduși în atomi Ag⁰ în prezența extractelor enzimatiche apoase din supernatantul de specii Bacillus, așa cum este descris în ecuația 4.1:



(ec. 4.1)

Punctul de pornire pentru formarea nanoparticulelor de argint a fost observat după 6 ore, când culoarea probelor apoase precursor-extract de bacterii a început să se schimbe de la galben pal până la maro deschis, datorită fenomenului de rezonanță a plasmonică de suprafață [2]. După 48 de ore de incubare, culoarea finală a probelor a fost schimbată până la maroniu (figura 4.2). Acesta a fost primul semn al sintezei extracelulare a nanoparticulelor de argint, luând în considerare faptul că numai supernatantul culturilor a fost utilizat.



Fig. 4.2 Variația culorii soluției coloidale, în funcție de perioada de incubare.

Reducerea azotatului de argint ar putea fi produsă de constituenții supernatantului celular. Peptidele sau proteinele pot fi responsabile de reducerea ionilor Ag^+ și de formarea ulterioară a nanoparticulelor de argint. S-a demonstrat că sinteza nanoparticulelor de argint poate fi mediată de enzima alfa-amilază, ambele specii de *Bacillus* utilizate fiind bine cunoscute ca producători de astfel de enzime [37], [75].

Până în prezent s-a raportat că *B. amyloliquefaciens* (LSSE 62) este capabil să sintetizeze AgNPs în prezența iradierii solare [227]. Mai mult decât atât, biosinteza AgNPs folosind supernatantul *B. subtilis* (ATCC 6633) a fost raportată [178], durata estimată a procesului de 5 zile fiind semnificativ mai lungă decât cea din rezultatele prezentate aici [75].

O indicație a reacției complete (adică biotransformarea întregii cantități de Ag^+ din soluția precursor în AgNPs) a fost evaluată prin metoda titrării Mohr [106] folosind 10 ml de soluție apoasă standard de 1 mM KCl, 0,5 ml de 0,25 M Indicatorul K_2CrO_4 și soluția precursor AgNO_3 , respectiv soluția coloidală de AgNP ca titrant. În timp ce în cazul soluției precursor AgNO_3 (1 mM, cu un factor de 0,980) s-a observat în soluție culoarea de precipitat roșu-cărămiziu a Ag_2CrO_4 (Figura 4.3), în cazul soluțiilor coloidale de AgNP sintetizate cu cele două supernatante bacteriene, nu a avut loc precipitarea, ceea ce indică o reducere completă a Ag^+ la Ag^0 . Sensibilitatea metodei Mohr este $[\text{Ag}^+] = 1,35 \times 10^{-5} \text{ M}$ [40], astfel încât se poate presupune că reacția de reducere este practic completă (extractul enzimatic bacterian este în exces) [67], [75].

Având în vedere bio-reducerea completă a Ag^+ , s-ar putea considera că aceeași concentrație de AgNPs există atât în soluțiile coloidale de *Bacillus amyloliquefaciens*, cât și în soluțiile coloidale *Bacillus subtilis*, și anume $8,82 \times 10^{-4}$ moli AgNPs / l sau 0,09513 mg AgNPs / ml.

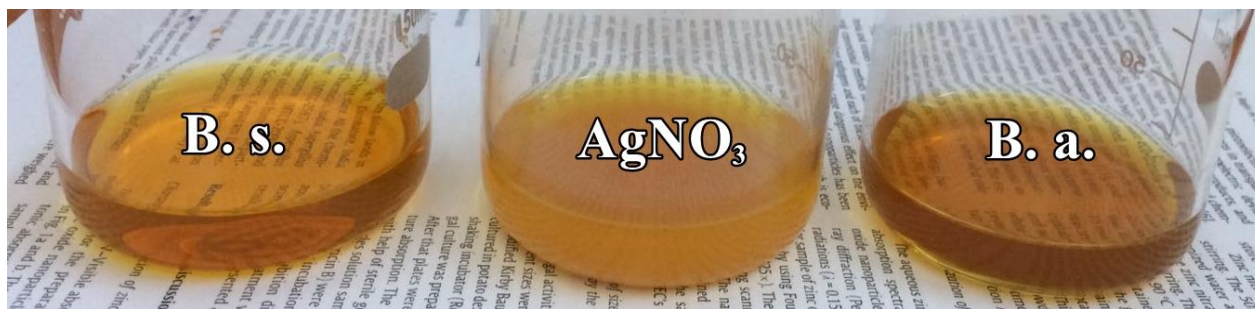


Fig. 4.3 Imagini fotografice ale soluției precursore după titrare și, respectiv, a soluțiilor coloidale de Ag NPs. Lipsa de precipitat este un indicator pentru reducerea completă a Ag^+ la Ag^0

4.3. Caracterizarea structurilor obținute și interpretarea datelor.

Echamente utilizate

4.3.1 Rezonanța plasmonică de suprafață a nanoparticulelor de Ag

Spectrele de absorbție UV-vis au fost obținute prin utilizarea unui cititor de microplăci Infinite 200 de la Tecan, utilizând 250 μ l de soluție apoasă, plasată pe plăcile de polistiren transparent de la Greiner 96. Spectrele UV-vis au fost măsurate în intervalul 300-600 nm cu o dimensiune a treptei de lungime de undă de 2 nm, la o temperatură de 25 °C.

Figura 4.4 prezintă spectrele UV-vis ale soluțiilor care conțin AgNPs obținute cu supernatantul speciilor *Bacillus*. Vârfurile de rezonanță plasmonică de suprafață au fost observate la 418 nm și 414 nm pentru argintul redus de *Bacillus amyloliquefaciens* și, respectiv, *Bacillus subtilis*. Aceste vârfuri corespund rezonanței plasmonice a nanoparticulelor de argint, conform altor rapoarte, care prezintă un vârf în dreptul valorii de 420nm [75].

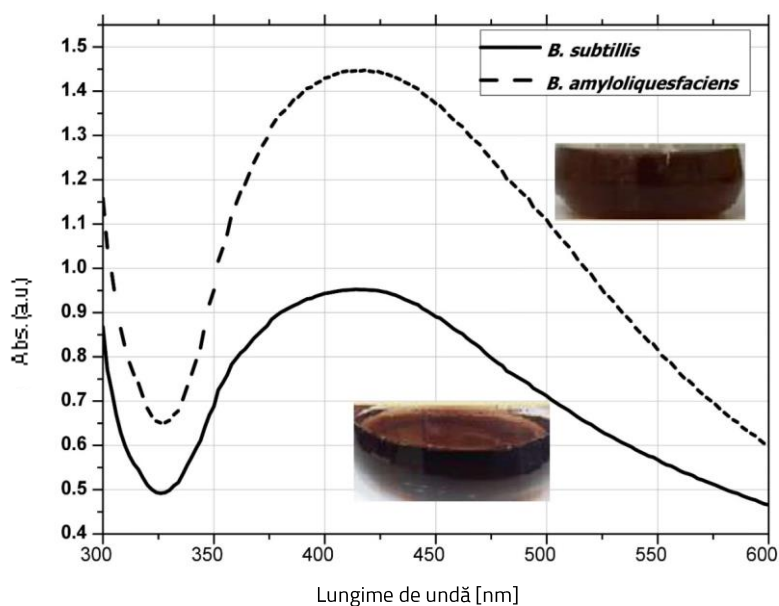


Figura 4.4 Spectrele de absorbție UV-vis ale soluțiilor de AgNP coloidale care prezintă vârfuri de rezonanță plasmonică similare.

Unele diferențe în ceea ce privește poziția vârfurilor de absorbantă maximă pentru soluțiile de nanoparticule de argint obținute utilizând aceleași specii de *Bacillus*, dar diferiți parametri de proces, inclusiv iradierea solară și cuptorul cu microunde, au fost raportate. Prin utilizarea *B. amyloliquefaciens* poziția vârfului de absorbantă maximă a scăzut de la 423 nm la 418 nm [178] în timp ce poziția vârfurilor de absorbantă maximă a coloizilor AgNPs folosind *B. subtilis* a fost prezentată ca având valori mai mari de la 410 nm la 414 nm [214], [75]. Aceste aspecte arată primul semn al diferitelor rezultate privind geometria (forma, dimensiunea) nanoparticulelor. În general, o lungime de undă mai mare pentru poziția de vârf de absorbție ar indica formarea de particule mai mari [75], [164],

Din figura 4.4 se poate observa că la aproximativ aceeași concentrație de AgNPs s-ar putea înregistra diferite valori de intensitate pentru absorbția la lungimea de undă maximă de absorbție, soluția coloidală de AgNPs sintetizată cu *B. amyloliquefaciens* având o intensitate de absorbție mai mare cu 35% decât în cazul soluției obținute cu ajutorul *B. subtilis*. Acest lucru ar putea fi explicat prin teoria împrăștierii multiple, care corelează valorile absorbției experimentale (A) cu raza particulelor (R), densitatea particulelor pe unitatea de volum (N), conform ecuației 4.2 [95]:

$$A = \frac{\pi R^2 Q_{ext} d_0 N}{2.303} \quad (\text{ec. 4.2})$$

În ecuația 4.2 Q_{ext} este coeficientul de extincție (presupus constant pentru un tip de NP) și d_0 este lungimea căii optice a spectrofotometrului (menținută constantă pentru toate măsurătorile).

Raza medie geometrică a nanoparticulelor (R_{mean}) a fost determinată din DLS (fig. 4.10a și 4.10.b) cu ec. 4. 3.:

$$R_{mean} = \frac{\sum_{i=1}^n (I_{DLS,i} \cdot R_{DLS,i})}{\sum_{i=1}^n I_{DLS,i}} \quad (\text{ec.4.3})$$

unde $I_{DLS,i}$ reprezintă intensitățile relative ale dispersiei luminoase (DLS) și $R_{DLS,i}$ raza NP corespunzătoare atribuită fiecărui DLS maxim.

Densitatea nanoparticulelor pe unitatea de volum (N) a fost calculată prin metoda propusă de Turkevich după cum urmează:

$$N = \frac{m_{Ag,synt}}{\rho_{Ag} \cdot V_{NP}} \quad (\text{ec. 4.4})$$

unde $m_{Ag,synt}$ reprezintă masa ionilor de argint din soluția precursor (9.513 mg), ρ_{Ag} reprezintă densitatea de argint (10.49 g/cm³) și V_{NP} , volumul unei singure nanoparticule (presupusă sferică).

$$V_{NP} = \frac{4\pi R_{mean}^3}{3} \quad (\text{ec. 4.5})$$

$R_{mean} = 31,11$ nm și $N = 7,19 \times 10^{11}$ pentru nanoparticulele sintetizate cu *B. amiloliquesfaciens*, în timp ce pentru *B. subtilis* $R_{mean} = 58,54$ nm și $N = 1,07 \times 10^{11}$. Deoarece valoarea produsului $R_{mean} \times N$ este

cu 72% mai mare pentru *B. amiloliquesfaciens*, se aşteaptă valori mai ridicate pentru absorbţie pentru această soluţie AgNPs coloidală, în conformitate cu spectrul experimental UV-vis.

4.3.2 Analiza structurală și morfologică a particulelor prin Microscopie Electronică de Baleiaj (SEM). Determinarea compoziției chimice prin microanaliză de raze X dispersive (EDX)

Un microscop electronic de scanare JSM 7400f (SEM) a fost utilizat pentru analiza morfologiei de suprafață și a compoziției chimice prin spectroscopia dispersiei energetice (EDX). Pulberea de nanoparticule de argint a fost montată pe suportul de probă folosind bandă de carbon adezivă pe două fețe. Tensiunea de accelerare a fost fixată la 10kV.

Analiza elementară cantitativă arată că, conținutul de argint este predominant. Celelalte elemente prezentate în spectrul EDS (figura 4.6.) apar mai ales din cauza impurificării probelor din două surse: în primul rând datorită benzii de carbon utilizate pentru montarea nanoparticulelor pe suportul de probă, în al doilea rând din cauza posibilelor rămășițe din mediile folosite pentru creșterea bacteriilor. Această ultimă situație poate fi evitată fie prin reducerea cantității de glucoză și nitrat de sodiu în mediul lichid, fie prin efectuarea unui proces de calcinare, înainte de montarea eșantionului. S-a constatat că AgNPs au o formă sferică cu valori ale dimensiunilor, în concordanță cu rezultatele DLS, conform micrografelor SEM (Fig.4.8. Fig. 4.9.).

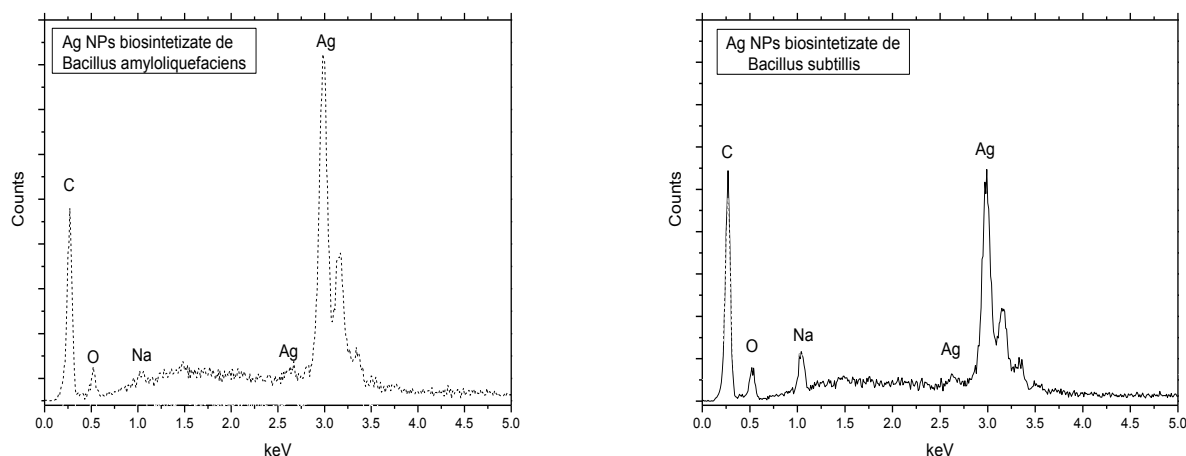


Fig.4.6 Spectrele de raze X de dispersie energetică pentru nanoparticulele de argint sintetizate în prezența *B. amyloliquefaciens* și *B. subtilis*

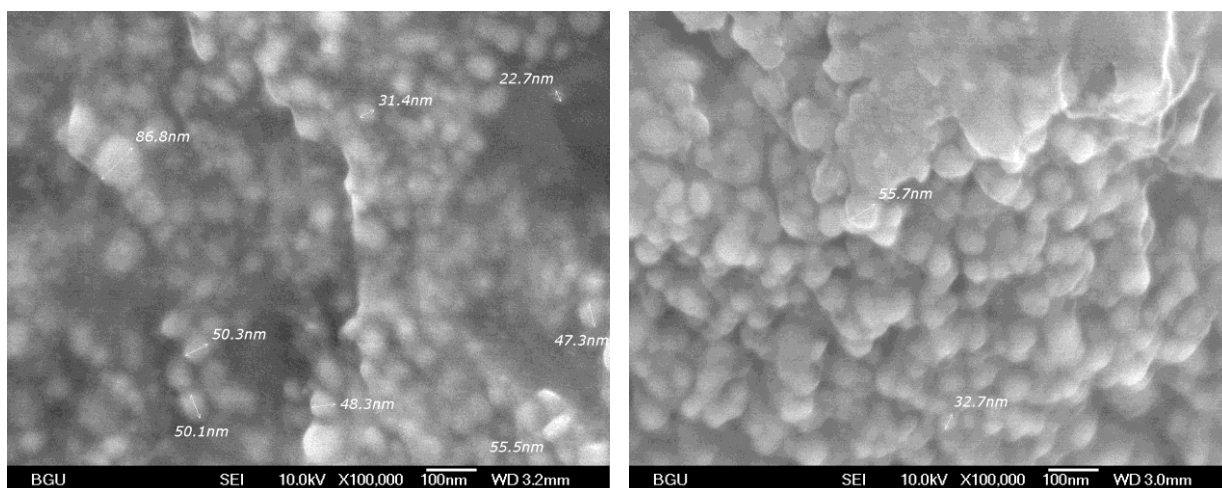


Fig. 4.7 Nanoparticule de argint biosintetizate
în prezența supernatantului bacteriei *Bacillus amyloliquefacie*, respectiv *Bacillus subtilis*

4.3.3 Investigații structurale prin analiza cu Difracție de raze X

Natura cristalină a nanoparticulelor de argint a fost analizată prin XRD utilizând un difractometru de pulbere cu raze X Philips PW 1050/70 cu monocromat de grafit folosind $\text{CuK}\alpha 1$ ($\lambda = 1,54\text{\AA}$), la o tensiune de 40 kV, un curent de 28 mA, în interval de scanare $20\text{--}60^\circ$, în geometria Bragg-Brentano.

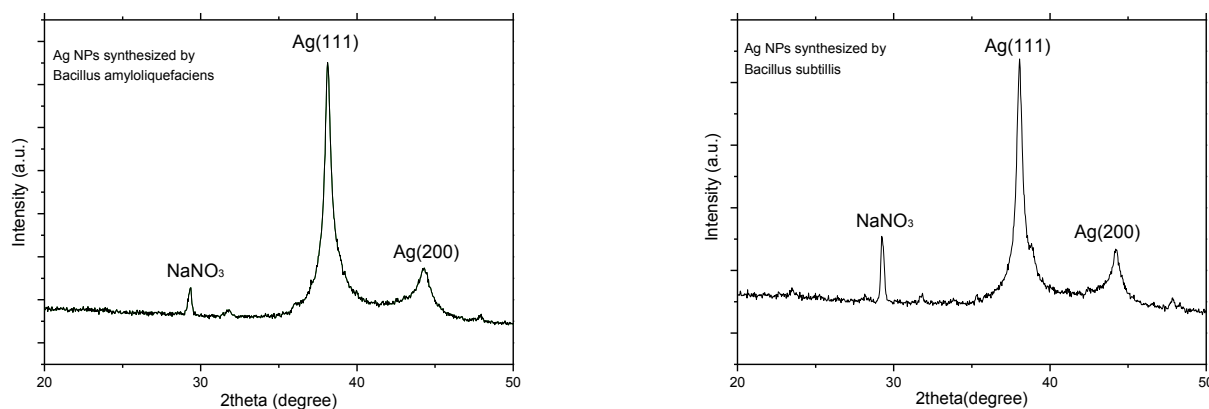


Fig.4.9 Difractograme ale nanoparticulelor de argint biosintetizate

Difracția cu raze X a fost realizată pentru a obține informații despre structura materialului cristalin. În cazul spectrului care variază între $2\theta = 10^\circ \div 60^\circ$ (figura 4.9.), se pot observa 2 picuri pentru fiecare probă, la $2\theta = 38,09^\circ$ și $2\theta = 44,25^\circ$, care coincid cu planele de difracție (111) și (200) pentru argint cu structură cristalină cubică cu fețe centrate (00-004-0783). Al treilea vârf prezent în ambele difractograme, la $2\theta = 29,28^\circ$ corespunde azotatului de sodiu (00-079-2056). Motivele pentru prezența acestui compus, precum și modalitățile de eliminare a acestuia au fost menționate anterior. După deconvoluția celor două modele de difracție cu o funcție Pearson7, au fost obținute poziția exactă a vârfului, intensitatea și FWHM.

Folosind ecuația Debye-Scherrer, mărimea cristalitului a fost calculată pentru toate vârfurile de difracție corespunzătoare argintului. Nanoparticulele de argint sintetizate utilizând *B. amyloliquefaciens* 1853 pentru orientarea (111) au o mărime medie a cristalitului de 10,93 nm, în timp ce pentru orientarea (200) mărimea medie a cristalitului este de 6,55 nm.

Probele obținute cu *B. subtilis* 10833 prezintă dimensiuni cristalite puțin mai mari de 23.11 nm și 9.53 nm, pentru picurile (111) și (200), respectiv.

4.3.4 Distribuția pe mărimi a nanoparticulelor obținute în substanță coloidală

Distribuția mărimii nanoparticulelor a fost investigată prin dispersarea luminii dinamice (DLS) în probe lichide. Au fost utilizați un goniometru compactor CGS-3 și un corelator LSE-5003. Rezultatele au fost obținute după 15 cicluri la un unghi de 90 ° și 26 ° C.

Graficul DLS al nanoparticulelor de argint coloid obținute utilizând *B. amyloliquefaciens* (figura 4.10. a) arată că coloidul include 2 populații de nanoparticule. Dimensiunea medie a primei populații este de 0.506 nm / rază, iar cea de-a doua este de aproximativ 36.93 nm / rază, susținând rezultatele obținute din analizele SEM.

Ag NPs obținute utilizând *B. subtilis* (figura 4.10. b) prezintă o mărime medie a fiecărei populații de 0,918, 5,433 și 67,89 nm / rază. Pe lângă susținerea observațiilor SEM, rezultatele DLS arată că și prin această metodă pot fi sintetizate particule mai mici.

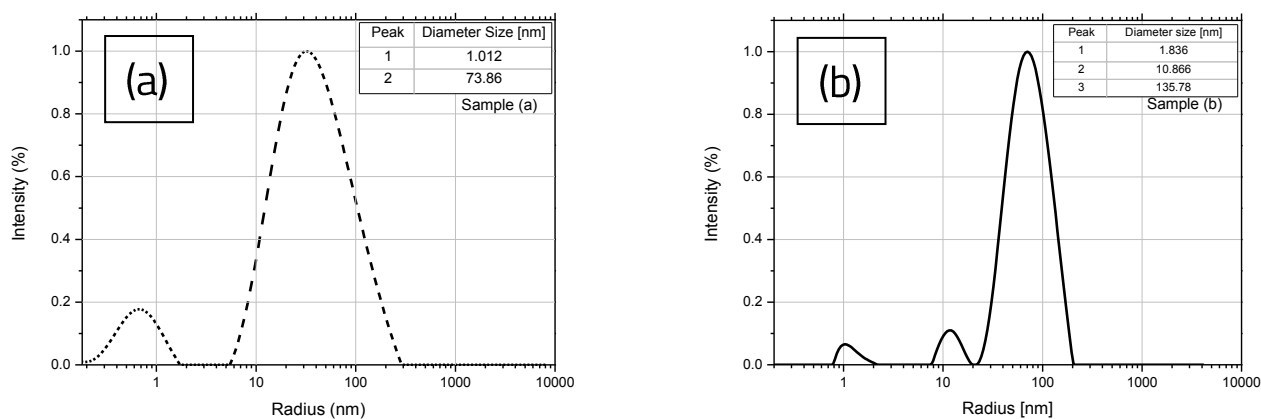


Fig.4.10. Rezultatele DLS pentru distribuția mărimii particulelor de AgNPs, sintetizate prin metode de chimie verde utilizând supernatantul din

(a) *Bacillus amyloliquefaciens*

(b) *Bacillus subtilis*

4.4 Activitatea antimicrobiană a AgNPs

Au fost selectate cinci tulpini microbiene și o tulpină de ciuperci pentru studii de activitate antimicrobiană. Tulpinile au fost crescute pe agar MacConkey și Sabouraud timp de 24 de ore pentru a obține culturi proaspete. După aceasta, câteva colonii din fiecare cultură au fost suspendate în 3 ml de NaCl și s-au folosit pentru teste suplimentare. Mediul solid utilizat pentru activitatea antimicrobiană a fost compus din extract de drojdie de 1 g / l; 18 g / l agar-agar; 5 g / l nitrat de sodiu; 0,2 g / l glucoză.

Activitatea nanoparticulelor de argint a fost evaluată împotriva *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Streptococcus pyogenes* și *Candida albicans* (figura 4.11). Potențialul nanoparticulelor de argint cu privire la activitatea antimicrobiană a fost determinat utilizând metoda difuziei pe disc (așa cum este descris în CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute: M02-A11 standard (Standarde de performanță pentru testele de susceptibilitate a discului antimicrobian)), prin impregnarea a 15 μ l de soluție care conține AgNP pe fiecare disc cu diametrul de 6 mm realizat din filtre de microfibră din sticlă de la WhatmanTM.

Mai mult, s-a investigat efectul sinergetic al nanoparticulelor de argint în combinație cu diferite antibiotice împotriva microorganismelor, utilizând discuri de 6 mm conținând Ciprofloxacin 5 μ g pentru bacterii și Fluconazol 25 μ g pentru ciuperci, impregnate cu soluție de 15 μ l AgNPs.

Discurile conținând Ciprofloxacin 5 μ g și Fluconazol 25 μ g au fost utilizate pentru control. Discurile au fost plasate pe suprafața culturii care conține plăci Petri. După 24 de ore de incubare la 35 ° C, zona de diametru de inhibare a fost măsurată și comparată cu probele de control. S-au efectuat o serie de trei teste de activitate antibacteriană, iar diametrul zonei de inhibare a fost măsurat cu șubler digital și s-a calculat deviația standard.

Rezultatele activităților antibacteriene și antifungice ale ambelor soluții conținând nanoparticule de argint împotriva a cinci tulpini bacteriene și o tulpină de ciuperci, utilizând metoda difuziei pe disc, pot fi observate în figurile 4.12, 4.13 și 4.14. Figura 4.12 prezintă variația diametrului zonei de inhibare, pentru discurile care conțin AgNPs, discurile antibiotice de control și AgNP-urile împreună cu antibioticele.

Deși există o diferență clară între activitatea discurilor infundate de Ag NPs și probele de control în cazul celor 5 tulpini de bacterii, activitatea antimicrobiană în cazul *C. albicans* este semnificativ mai mare comparativ cu antibioticul de control. Discurile Fluconazol nu au prezentat activitate antimicrobiană asupra tulpinii *C. albicans*. În combinație cu Ag NPs, zona de inhibare a fost măsurabilă. Efectul benefic al AgNP-urilor asupra activității antibiotice a fost calculat ca procent de creștere a efectului antibacterian, prezentată în figura 4.13 [75].

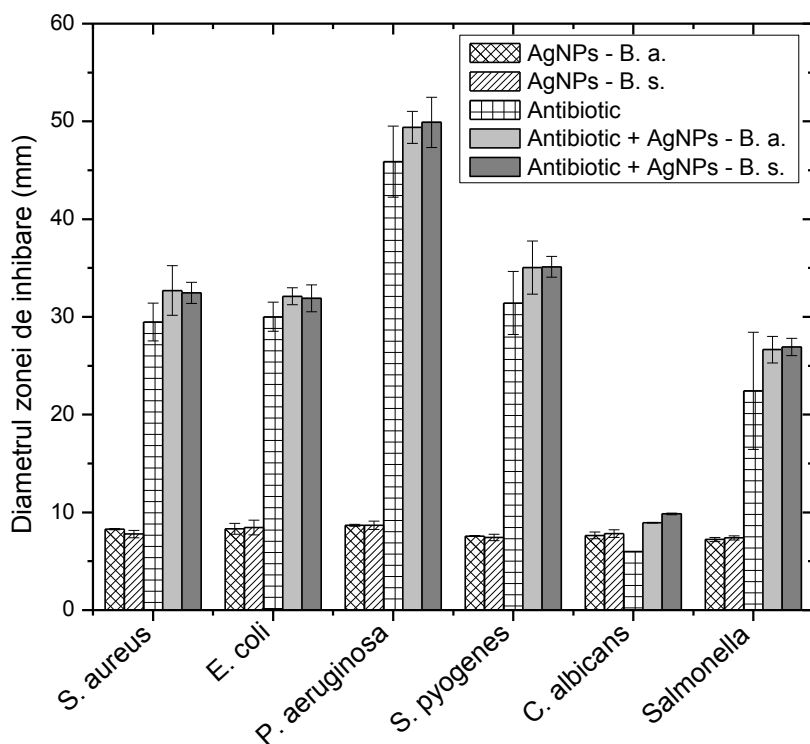


Figura 4.12. Variația diametrului de inhibare pentru tulpinile testate, pentru discurile AgNPs, discurile antibiotice și efectul sinergismului dintre AgNPs + antibiotice.

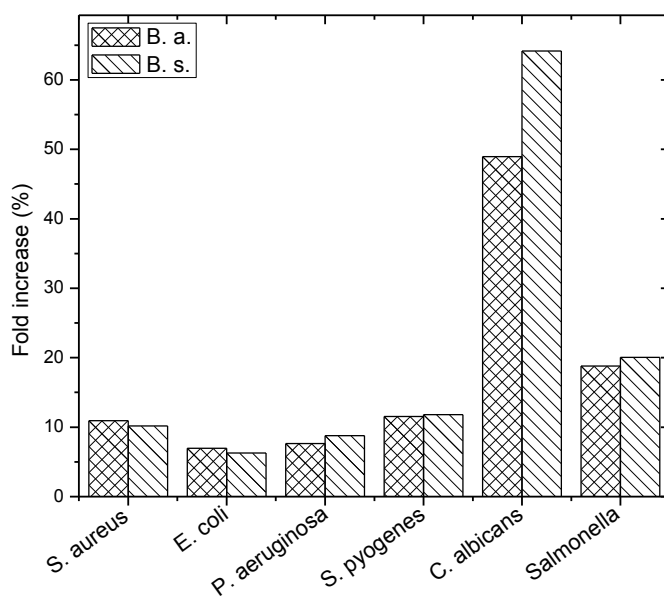


Figura 4.13 Creșterea procentuală a efectului antibacterian al antibioticelor cu AgNP împotriva tulpinilor de testare, calculată cu ecuația $((b/a) \times 100 \%)$, unde b reprezintă diametrul zonei de inhibare pentru combinația AgNPs + antibiotic și reprezintă diametrul zonei de inhibare pentru discul antibiotic [65],[75]

În timp ce se utilizează diferite specii de microorganisme pentru sinteza nanoparticulelor, rezultatele pot varia în funcție de mărimea și forma lor. Această observație este relevantă chiar și atunci când se utilizează aceeași specie, dar diferiți parametri ai procesului, cum ar fi pH-ul precursorilor, timpul de incubare, concentrația precursorilor.

S-a raportat că Ag NPs se atașează la membrana celulară a bacteriei și penetrează, de asemenea, în interiorul bacteriilor. Membrana bacteriană conține proteine care conțin sulf și nanoparticulele de argint interacționează cu aceste proteine în celulă, precum și cu compușii care conțin fosfor, cum ar fi ADN-ul.

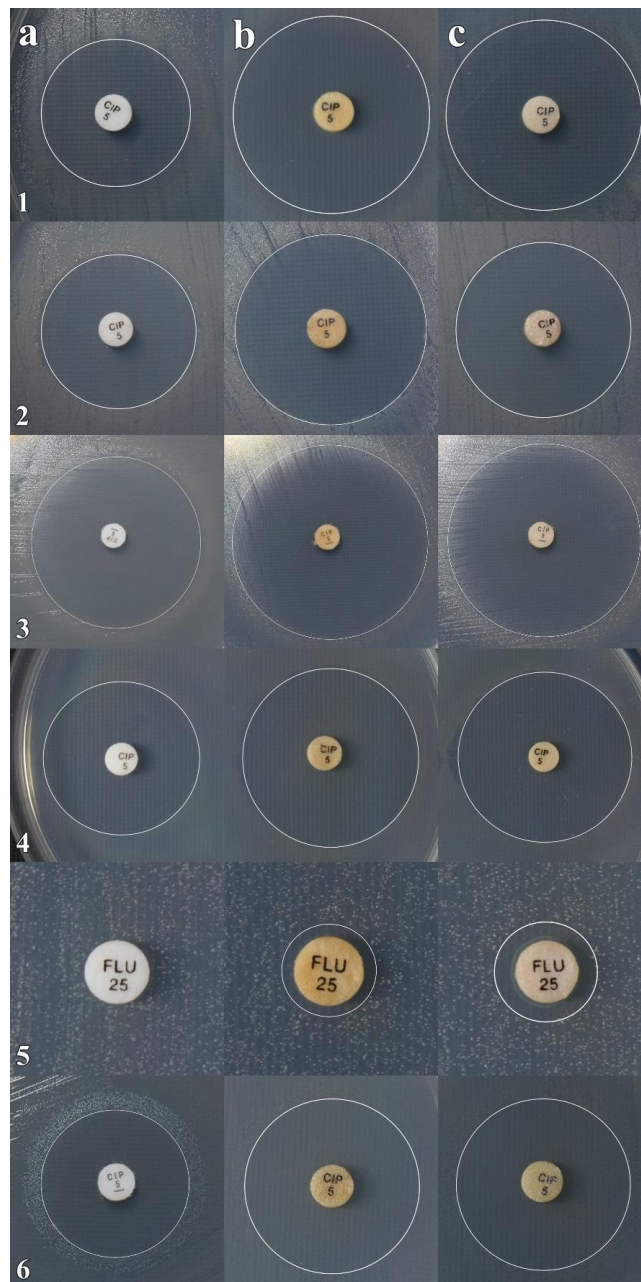


Fig. 4.14. Imaginile zonei de inhibare a
S. aureus (1), *E. coli* (2), *P. aeruginosa* (3),
S. pyogenes (4), *C. albicans* (5) și *Salmonella* (6) :
 a - antibiotic, b - antibiotic + Bs AgNPs, c - antibiotic + B.a. AgNPs

4.5 Concluzii

- *B. amyloliquefaciens* 1853 și *B. subtilis* 10833 prezintă capacitatea de a sintetiza nanoparticule de argint extracelular prin bioreducție din soluția de precursor AgNO₃ 1 mM.
- În timpul analizei UV-vizibile s-au observat vârfuri pentru ambele soluții coloidale la 418 nm, respectiv 414 nm. Analiza SEM a arătat forma sferică a nanoparticulelor cu dimensiuni mai mici de 100 nm. Analiza difracției cu raze X a confirmat faptul că cel mai înalt vârf corespunde planului de difracție (111). Distribuția mărimii DLS confirmă rezultatele SEM în ceea ce privește dimensiunea nanoparticulelor.
- AgNPs sintetizate utilizând *B. amyloliquefaciens* 1853 și *B. subtilis* 10833 au prezentat o activitate antibacteriană și antifungică semnificativă, fie independentă, fie în asociere cu antibiotice.
- Avantajul metodei de sinteză propusă constă în eficiența sa economică (disponibilitatea largă a tulpinilor *B. amyloliquefaciens* și *B. subtilis* și abordarea de sinteză într-o singură etapă, constând în reducerea ionilor de argint prin extracția enzimatică fără bacterii).
- Dezavantajele potențiale ale metodei noastre pot include durata mare a sintezei (48 ore), problemele de reproductibilitate (datorită comportamentului diferit în activitățile enzimatică ale tulpinilor bacteriene, prezența impurităților care pot inhiba activitatea bacteriană, menținerea atentă a condițiilor de sinteză identice). Prin metoda propusă, concentrațiile numerice ale nanoparticulelor de argint în intervalul $1-7,10^{11}$ au fost obținute la concentrații de masă de 0,095 mg / l, similare cu alte produse comerciale nanoparticule de argint.
- Cercetările ulterioare în acest domeniu vor fi axate pe perfecționarea duratei de sinteză prin utilizarea altor tulpini bacteriene și evaluarea stabilității pe termen lung a soluțiilor coloidale în medii diferite, care este de o importanță majoră pentru aplicațiile practice.
- Abordarea de sinteză propusă prezintă potențial promițător în domeniul optic (indicele de refracție al materialelor / culorilor prin încorporarea nanoparticulelor), în aplicații biochimice (teste biosenzorice, etichete biologice), precum și în fabricarea cernelurilor conducătoare și a vopselelor electrotermale.

CAPITOLUL V – CERCETĂRI PRIVIND OBTINEREA PRIN BIOSINTEZĂ ŞI CARACTERIZAREA NANOPARTICULELOR DE TIP AgCl

5.1 Contribuții la studiul nanoparticulelor de AgCl

În acest capitol am prezentat rezultatele cercetărilor privind biosinteza nanoparticulelor de clorură de argint. Acestea au fost sintetizate utilizând microorganismele *Rhodotorula Mucilaginosa*, *Enterobacter Faecalis*, *Pantoea* și *Raoultella Planticola* și soluție apoasă de AgNO_3 , ca precursor.

Rezonanța plasmonică a soluției conținând nanoparticule a arătat prin spectrofotometrie UV-vizibilă (UV-vis) un maxim de absorbție la aproximativ în jurul valorii de 440 nm. Microscopia electronică de scanare (SEM), microscopia electronică de transmisie (TEM), spectroscopia cu energie dispersivă și analizele de difracție cu raze X (XRD), microscopia de forță atomică (AFM) și difracția de electroni în arie selectată (SAED) au confirmat prezența nanoparticulelor sferice de clorură de argint cu o structură cristalină cubică cu fețe centrate și o dimensiune medie a particulelor de aproximativ 10-50 nm [76], [74].

S-a demonstrat că nanoparticulele de clorură de argint au capacitatea de a inhiba creșterea diferitelor microorganisme, inclusiv bacteriile și ciupercile, care le face adecvate pentru aplicațiile antimicrobiene [80].

În acest studiu am demonstrat că nanoparticulele de clorură de argint au capacitatea de a inhiba creșterea diferitelor microorganisme, ca, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus Pyogenes*, *Salmonella* sau *Bacillus amiloliquefaciens*[80].

5.2 Sinteza nanoparticulelor de clorură de argint

5.2.1 Microorganisme și condiții de cultură

Rhodotorula Mucilaginosa, *Enterobacter Faecalis*, *Pantoea* și *Raoultella Planticola* utilizate în acest studiu au fost furnizate de la Soroka University Medical Center din Beersheva, Israel (figura 6.1.). Microorganismele au fost cultivate în mediu solid, agar Sabouraud furnizat de Scharlau Chemicals și incubate la 35 ° C timp de 48 de ore.

5.2.2 Biosinteza nanoparticulelor AgCl utilizând *Rhodotorula Mucilaginosa*, *Enterobacter Faecalis*, *Pantoea* și *Raoultella Planticola*

Pentru a sintetiza nanoparticulele de clorură de argint, 1 μl de tulpini microbiene au fost inoculate în eprubete de testare conținând 15 ml mediu de creștere, și anume agar cu Infuzie Creier-Cord, de la Sigma Aldrich. Mediile lichide au conținut inimă de vită (infuzie de la 250 g), 5 g / l; viruși de vițel (perfuzie de la 200 g), 12,5 g / l; fosfat de hidrogen disodic, 2,5 g / l; D (+) - glucoză, 2 g / l; peptonă,

10 g / l; clorură de sodiu, 5 g / l. Cultura lichidă a fost păstrată în termostat la 35 ° C timp de 24 de ore, urmată de centrifugare la 4000 rpm timp de 30 de minute.

Supernatantul și biomasa au fost testate în paralel. În prima situație s-au utilizat 5 ml de supernatant, în timp ce pentru al doilea set s-a menținut biomasa cu adăugarea a 5 ml de apă distilată. Următoarea etapă a fost similară prin adăugarea a 5 ml cultură peste 40 ml de precursor Ag NO₃, la concentrații de 1 mM, respectiv 2 mM și 3 mM (pentru probele cu *Rhodotorulla*). Cultura, supernatantul și biomasa + apa distilată și precursorii au fost păstrate pentru control. Probele au fost ținute în termostat setat la 35 ° C, timp de 48 de ore.

După incubarea în termostat timp de 48 de ore la 35 ° C, culoarea finală a coloizilor care conțineau biomasa microorganismelor, s-a schimbat de la galben deschis la maroniu.

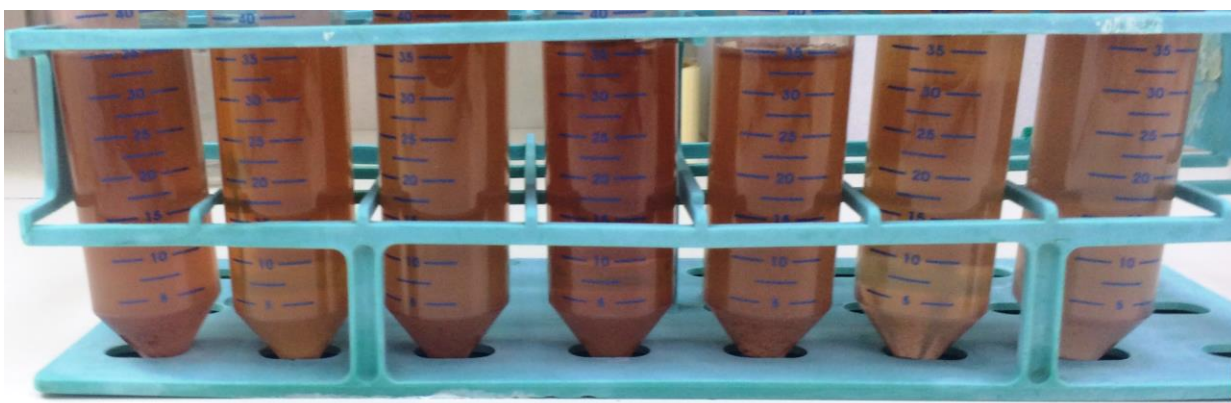


Fig. 5.2 Coloizi cu nanoparticule de AgCl biosintetizate

Schimbarea culorii este o indicație pentru formarea nanoparticulelor. În figura 5.2, se poate observa diferența nuanțelor de maro în funcție de concentrația precursorului, în cazul *Rhodotorula Mucilaginosa*. Probele de control au rămas neschimbate.

5.3 Caracterizarea structurilor obținute și interpretarea datelor. Echipamente utilizate

5.3.1 Rezonanța plasmonică de suprafață a nanoparticulelor de AgCl

Având în vedere indicația optică (schimbarea culorii), s-au măsurat spectrele de absorbție UV-vizibil ale soluțiilor de nanoparticule coloidale (prezentate în figura 5.3). Analiza spectrală ultraviolet-vizibil a fost efectuată utilizând spectrofotometrul Jasco V-630. Spectrele au fost măsurate în intervalul 200-600 nm cu o dimensiune a treptei lungimii de undă de 1,5 nm.

Figurile 5.3, respectiv 5.4, corespund spectrelor de absorbție UV vizibil al soluțiilor care conțin AgCl NPs sintetizate utilizând microorganismele prezentate la punctul 5.1. Dintre acestea, spectrele specifice analizei nanoparticulelor sintetizate în prezența *Raoultella Planticola* și *Rhodotorula Mucilaginosa* au prezentat picurile de absorbție maximă în jurul valorii 440 nm, specifică nanoparticulelor de AgCl. Spectrele pentru *Enterobacter Faecalis* și *Pantoea* sunt mult mai largi și

nedefinite corespunzător. Se consideră că aceste bacterii au abilitatea de a reduce ionii de Ag^+ , însă se pune problema unui coloid polidispersat.

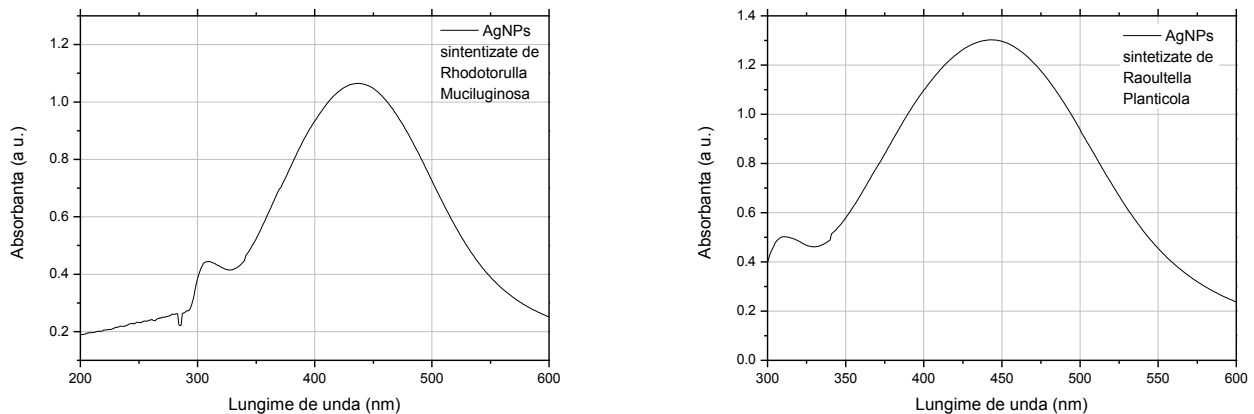


Fig. 5.3 Spectrele UV-vizibil ale coloizilor cu nanoparticule AgCl, biosintetizate de *Rhodotorula Mucilaginosa*, respectiv *Raoultella Planticola*

Mai multe articole de specialitate au oferit rezultate similare în ceea ce privește spectrul de absorbție. Rapoartele au confirmat că vârfurile de aproximativ 440 nm coincid cu rezonanța plasmonică a nanoparticulelor de clorură de argint [4], [5].

5.3.2. Investigații structurale prin analiza cu Difracție de Raze X

Natura cristalină a nanoparticulelor de clorură de argint a fost analizată prin XRD utilizând un difractometru Philips PW 1050/70 cu pulbere cu monocromat de grafit folosind $CuK\alpha 1$ ($\lambda = 1,54\text{\AA}$), la o tensiune de 40 kV, un curent de 28 mA, în gama de scanare $10 \div 80^\circ$, în geometria Bragg-Brentano. Structura cristalină a nanoparticulelor sintetizate, obținută prin difracția cu raze X, este confirmată de vârfurile de difracție prezentate în figura 5.5, care corespund planelor (111), (200) și (220), (311),(222), (440) specifice structurii cubice cu fețe centrate ale cristalului de AgCl [11].

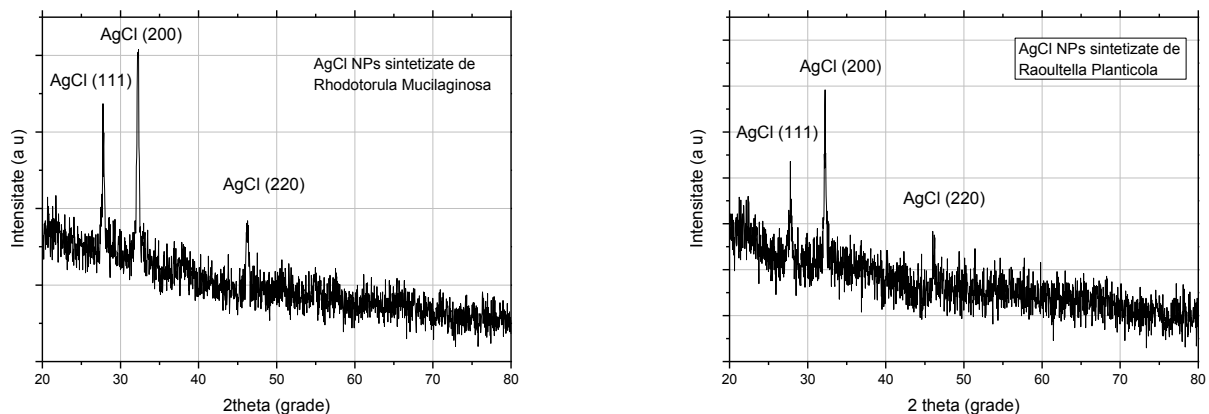


Fig. 5.5.. Spectrele de difracție cu raze X pentru nanoparticulele AgCl *Rhodotorula Mucilaginosa*, respectiv *Raoultella Planticola*

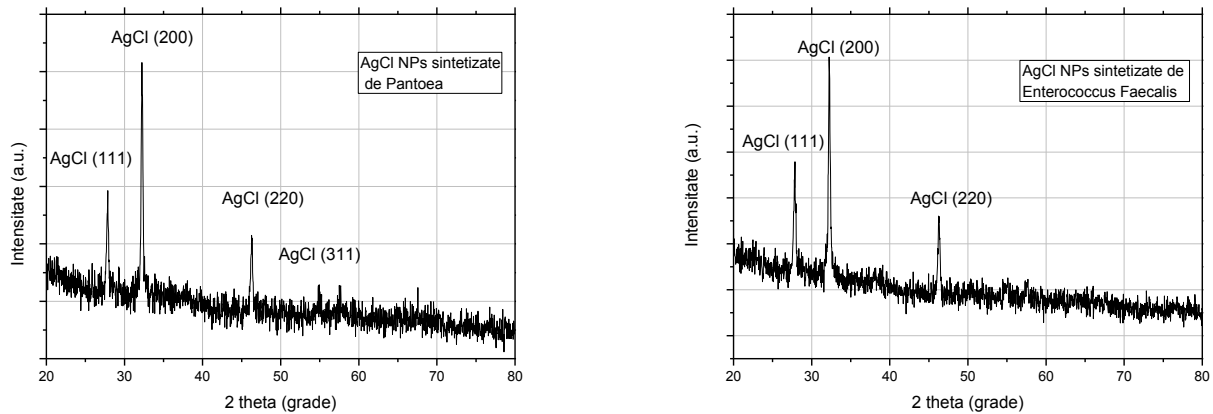


Fig. 5.6.. Spectrele de difracție cu raze X pentru nanoparticulele AgCl sintetizate de *Pantoea*, respectiv *Enterococcus Faecalis*

5.3.3 Caracterizarea structurală a nanoparticulelor utilizând Microscopia Electronică prin Transmisie (TEM) și Difracția de electroni în arie selectată (SAED)

Analizele TEM și SAED au fost realizate cu un microscop modelul Tecnai 12 Twin (FEI), operând la 100kV. Acest microscop este echipat cu un goniometru complet computerizat (cu ± 60 grade de înclinare eucentrică) și două camere CCD MultiScan (Gatan 791 și unghi larg Gatan 794) care permit înregistrarea imaginilor de înaltă calitate.

Pregătirea probelelor: O picătură de soluție coloidală conținând nanoparticule de clorură de argint a fost plasată pe o sită de cupru, cu diametrul de 3 mm, acoperită cu carbon, specială pentru analizele TEM. După aceea, probele au fost lăsate să se evapore. Suprafețele sitelor au fost curățate anterior folosind un aparat de curățare cu plasmă, de la Harrick Plasma.

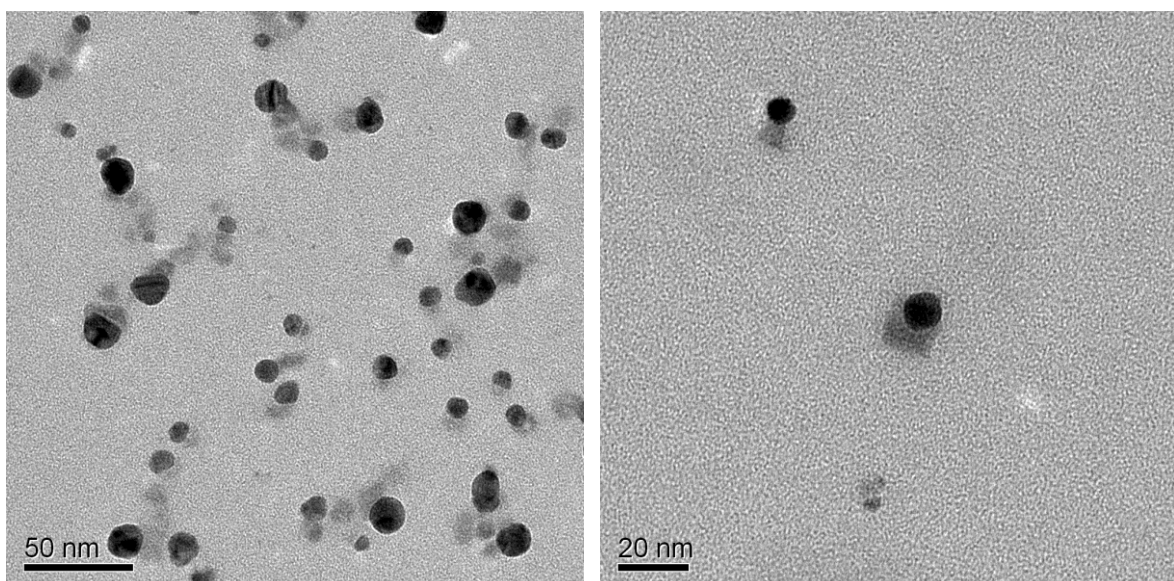


Fig. 5.8 Imagini TEM ale nanoparticulelor sintetizate de *Rhodotorulla Mucilaginoso*

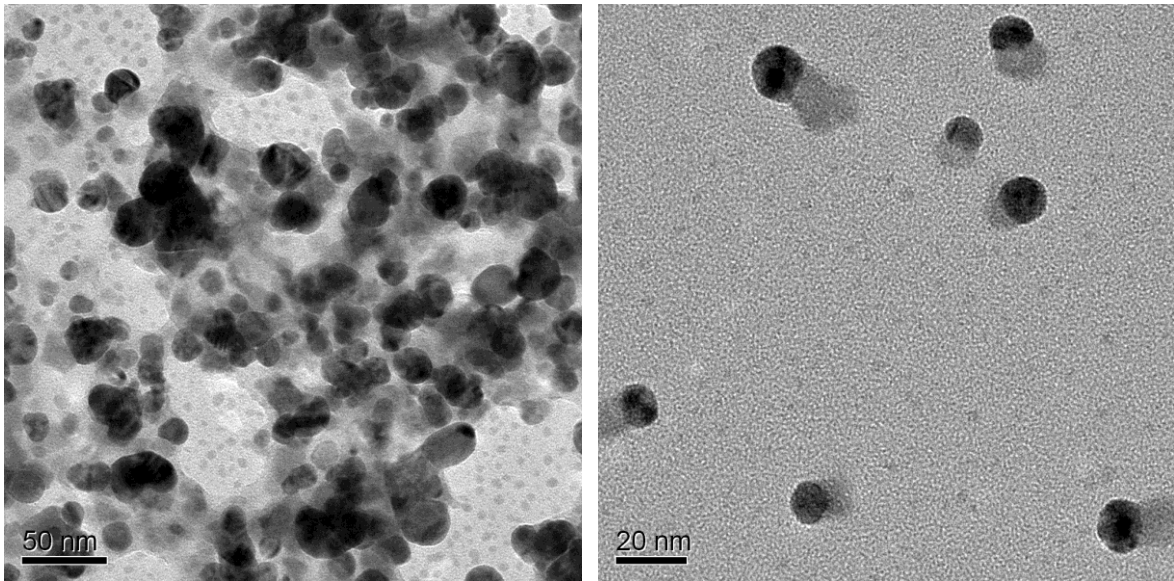


Fig. 5.9 Imagini TEM ale nanoparticulelor sintetizate de *Raoultella Planticola*

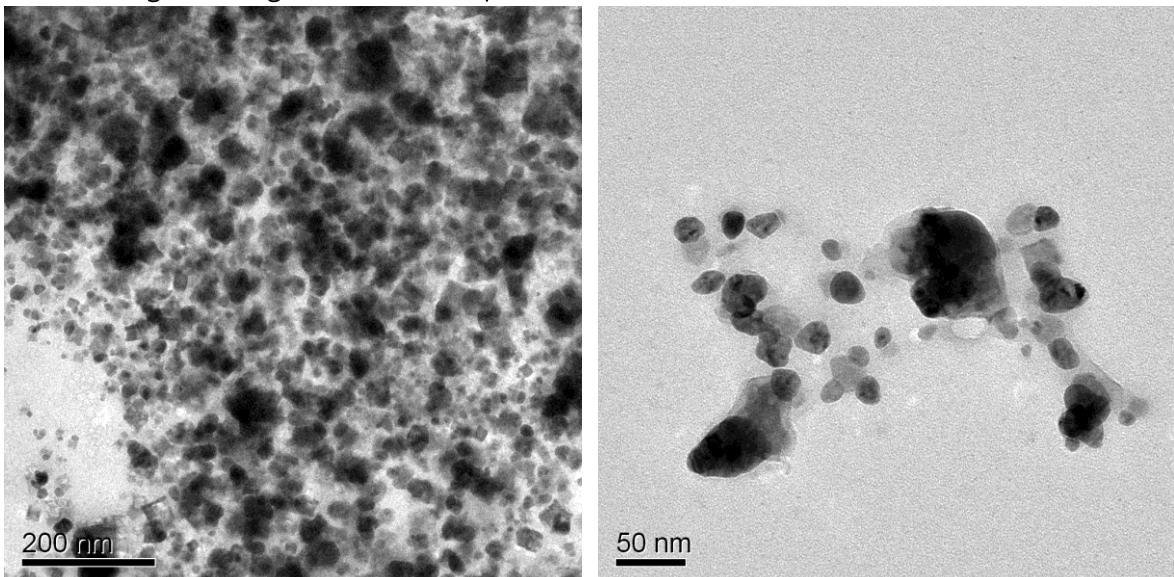


Fig. 5.10 Imagini TEM ale nanoparticulelor sintetizate de *Pantoea*

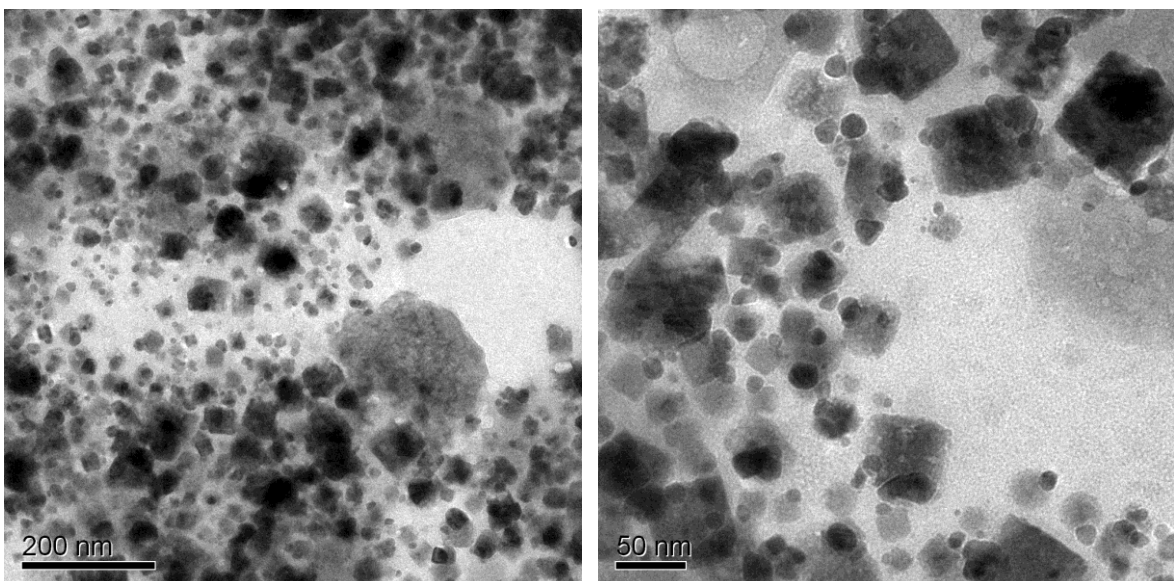


Fig. 5.11 Imagini TEM ale nanoparticulelor sintetizate de *Enterococcus Faecalis*

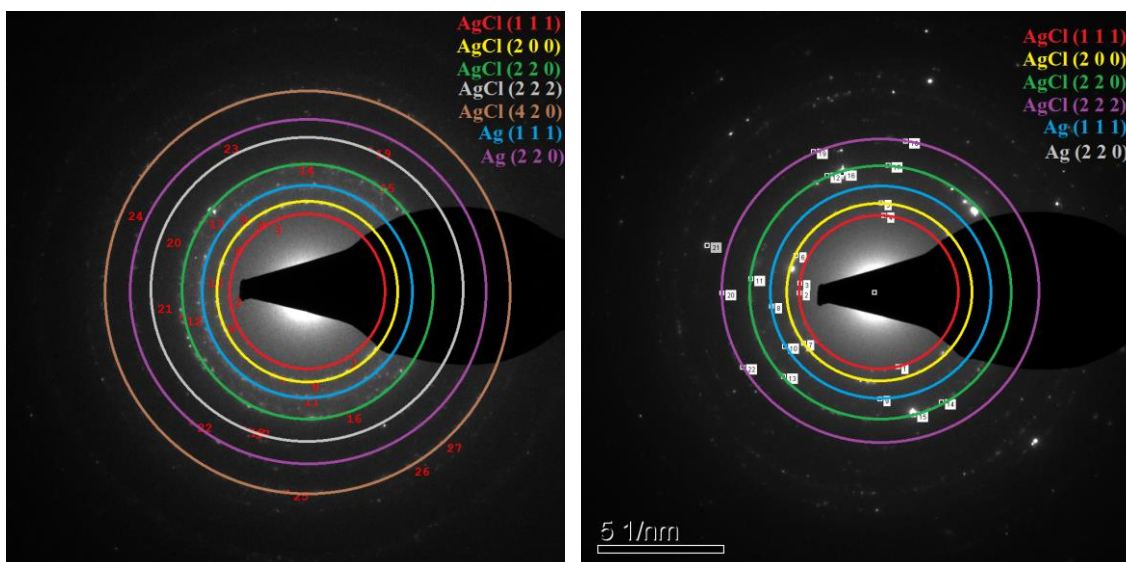


Fig. 5.12 Modelele de difracție de electroni în arie selectată a nanoparticulelor de AgCl, respectiv Ag sintetizate în prezența microorganismelor *Rhodotorula Mucilaginosa* (a) și *Raoultella Planticola* (b)

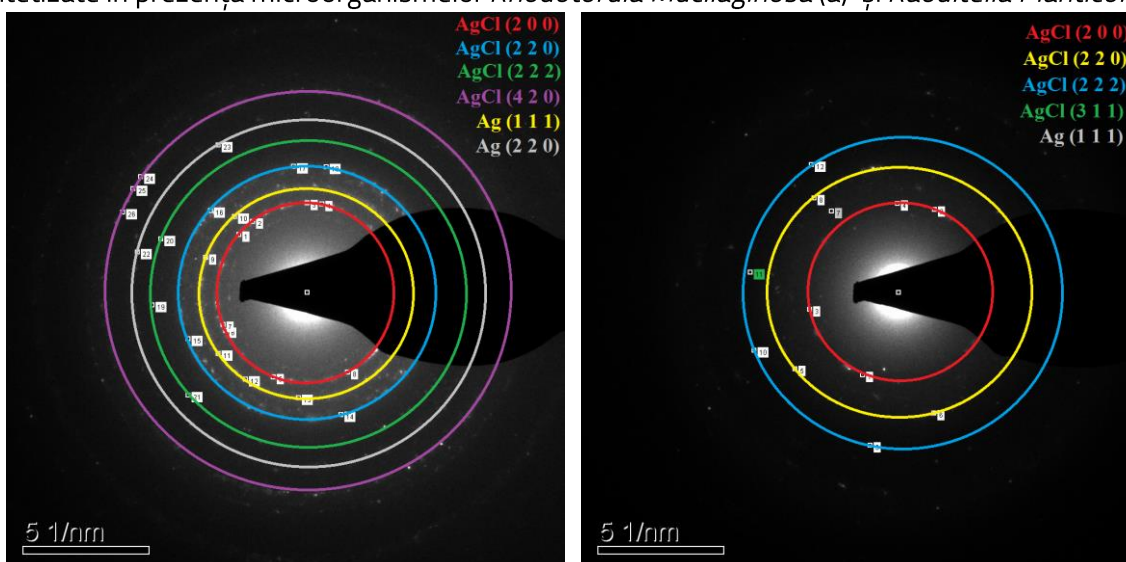


Fig. 5.13 Modelele de difracție de electroni în arie selectată a nanoparticulelor de AgCl, respectiv Ag sintetizate în prezența microorganismelor *Pantoea* (a) și *Enterococcus Faecalis* (b)

Nanoparticulele de clorură de argint sintetizate cu ajutorul *Rhodotorulla Muciluginosa* au dimensiunile de aproximativ 15 nm (figura 5.8-a, 5.8-b), conform analizei TEM. Monodispersitatea acestora conduce către o departajare a rezultatelor oferite de celelalte microorganisme. AgCl NPs sintetizate în prezența *Raoultella Planticola* prezintă, de asemenea dimensiuni foarte mici, în domeniul 10-30 nm (5.9-a, 5.9-b).

Pantoea și *Enterococcus Faecalis* au mediat sinteza nanoparticulelor de clorură de argint într-o plajă mult mai largă, dimensiunile acestora ajungând până la valoarea de 50 nm (figura 5.10.a, 5.10.b, 5.11-a, 5.11-b.) Forma sferică a nanoparticulelor poate fi observată din imaginile obținute la TEM.

Figurile 5.12, respectiv 5.13. prezintă modelele de difracție de electroni a zonei selectate pentru cristalele de AgCl, respectiv Ag ale probelor obținute prin sinteză verde mediată de microorganisme. Modelele de difracție confirmă rezultatele obținute prin analiza XRD, prezentate la punctul 5.1. Inelele

concentrice indică faptul că nanoparticulele sunt cristaline. De asemenea, distanţele interplanare prezente în modelele de difracţie sunt corespund indexării structurilor cub cu feţe centrate ale cristalitelor de clorură de argint și argint.

Se poate observa că planele predominante sunt (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0), (3 1 1), (2 2 2), (4 0 0) și (4 2 0) corespunzătoare cristalelor de AgCl care prezintă puncte mai accentuate (luminoase) în structura acestora. Planele corespunzătoare cristalelor de Ag cele mai întâlnite în configurația nanoparticulelor sintetizate utilizând microorganisme sunt (1 1 1), respectiv (2 2 0).

Creșterea concentrației de clorură de sodiu (sau a unui alt precursor folosit pentru sinteza nanoparticulelor pe bază de Cl) ar putea diminua prezența cristalelor de argint, formând configurația dorită de AgCl.

5.3.4 Analiza structurală și morfologică a particulelor prin Microscopie Electronică de Baleiaj (SEM). Determinarea compoziției chimice prin microanaliză de raze X dispersive

Pentru caracteristicile morfologice și compoziția chimică a fost utilizat un microscop electronic de scanare JSM 7400f (SEM) cu o platformă pentru spectroscopia dispersiei energetice (EDS) (figura 5.14). Coloidul de nanoparticule de clorură de argint plasat pe sita de cupru de la analizele TEM a fost pulverizat cu un strat subțire de platină (figura 5.14(A)) pentru a asigura o conductibilitate mai bună. După aceasta probele au fost montate pe o bandă dublu-adezivă (figura 5.14.(B)). Tensiunea de accelerare a fost fixată la 10kV. Stratul de platină depus pe probele pregătite și folosite pentru analiza TEM, în vederea analizei SEM, a constat în 2 sesiuni de pulverizare a câte 10 secunde.

Analizele SEM (figurile 5.15, 5.16, 5.17, 5.18) au confirmat prezența particulelor nano-scalate și au arătat forma sferică a acestora. După cum se poate observa pe micrografiile SEM, nanoparticulele de clorură de argint au dimensiuni cuprinse între 10-50 nm. Raportul privind dimensiunea particulelor / eficacitatea antimicrobiană a fost raportat anterior, particulele mai mici, datorită suprafeței lor mult mai mari, sunt de așteptat să prezinte o eficacitate antibacteriană mult mai mare.

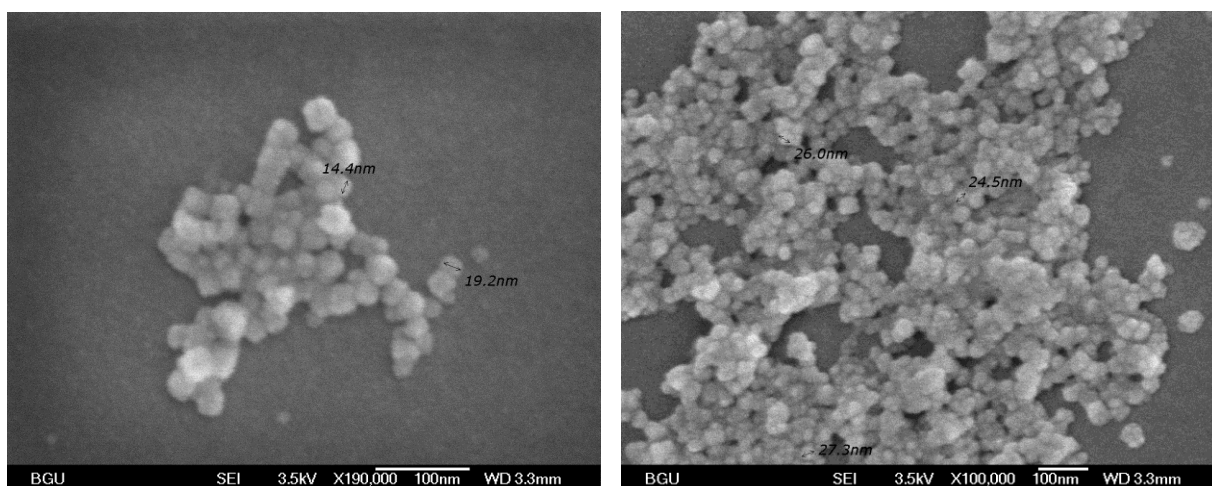


Fig. 5.15. Imagini SEM ale nanoparticulelor sintetizate de *Rhodotorulla Mucilaginosa*, respectiv de *Raoultella Planticola*

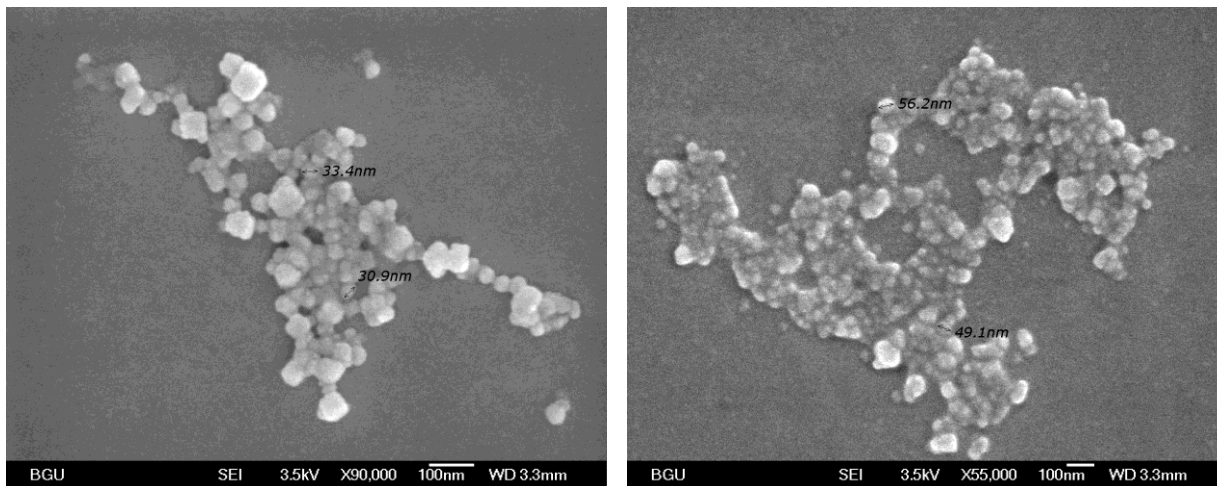


Fig. 5.17. Imagini SEM ale nanoparticulelor sintetizate de *Pantoea*, respectiv de *Enterococcus Faecalis*

Spectrele EDS prezentate în figurile 5.19 și 5.20 prezintă prezența elementelor principale, și anume Ag și Cl. Analiza EDS a relevat, de asemenea, alte elemente care pot fi găsite pe eșantioane datorită etapelor de preparare (grilă de cupru, bandă de carbon, film subțire de platină).

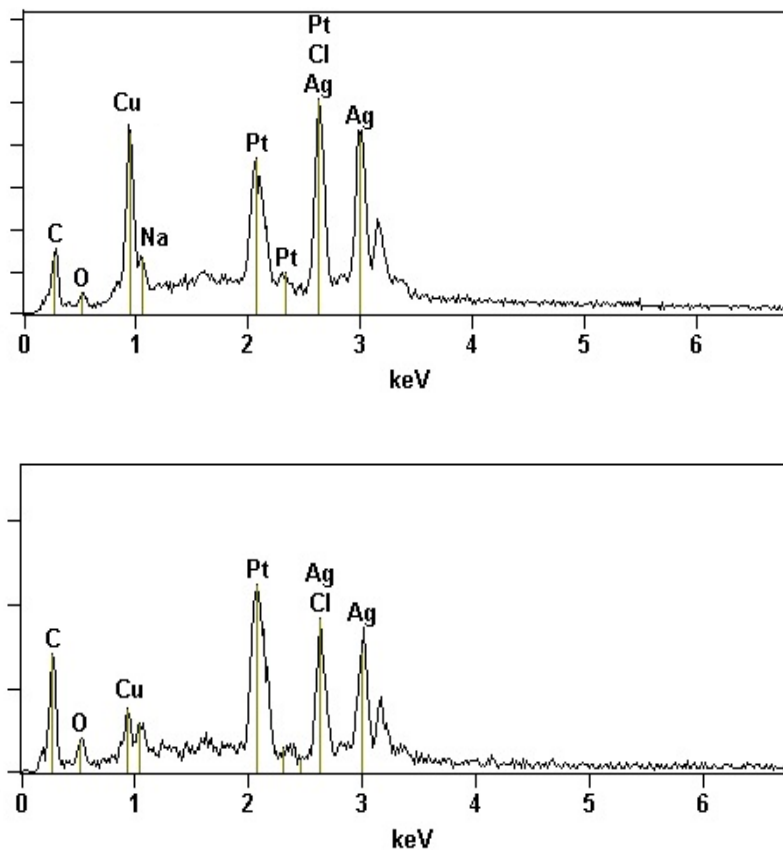


Fig.5.19. Spectrele EDS ale AgCl NPs biosintetizate în prezența *Rhodotorulla Mucilaginos*a, respectiv, *Raoutella Planticola*

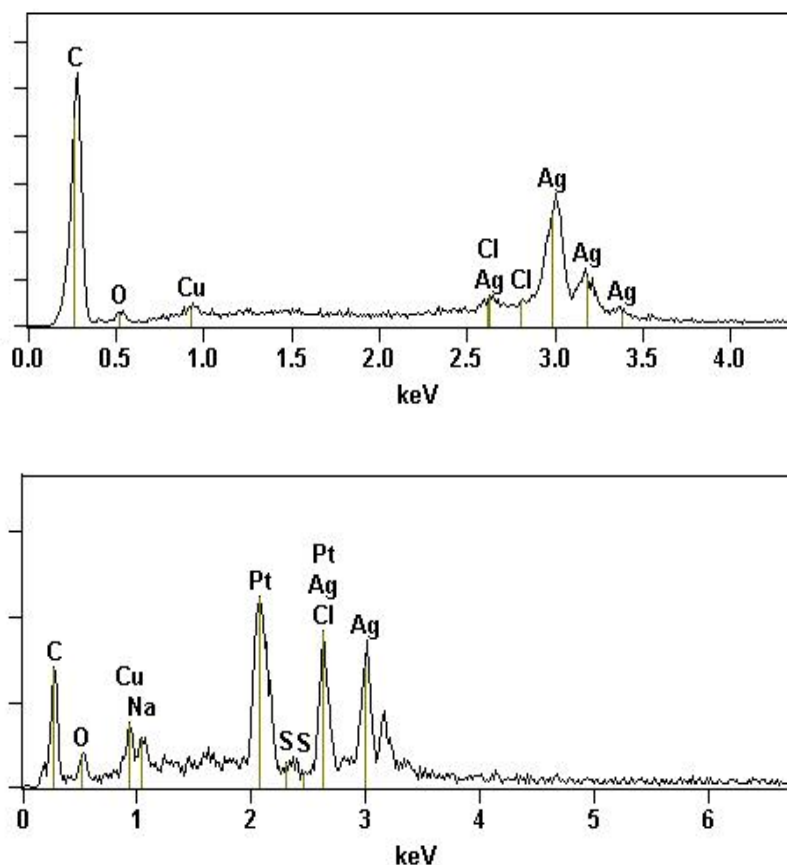


Fig. 5.20 Spectrele EDS ale AgCl NPs biosintetizate în prezența *Pantoea* respectiv, *Enterococcus Faecalis*

O explicație pentru prezența nanoparticulelor de clorură de argint se poate baza pe interacțiunea dintre azotatul de argint și bacteriile, care a fost cultivat anterior în mediul Brain Heart Infusion care conține clorură de sodiu.

5.3.5 Diametrele medii ale nanoparticulelor, determinate din secțiunii transversale ale imaginilor AFM

Pentru a obține informații suplimentare referitoare la morfologia și mărimea nanoparticulelor biosintetizate am folosit un microscop cu forță atomică modelul MFP-3D-BIO. Acesta oferă o sensibilitate foarte mare și imagini și măsurători exacte posibile pe o platformă optică inversată. Sensorii de nanopozitive cu buclă închisă pe toate cele trei axe asigură imagini fără distorsiuni pe eșantioane, la fel de mici ca și proteinele și la fel de mari ca celulele - atât în aer cât și în lichid.

Probele de nanoparticule de clorură de argint reduse de *Rhodotorula Mucilaginosa*, *Raoultella Planticola*, *Pantoea* și *Enterococcus Faecalis* au fost centrifugate la 2000 rpm, timp de 10 min, iar peleta obținută a fost spălată cu apă deionizată pentru a îndepărta orice biomasă posibilă. Peletul a fost redispersat într-o cantitate mică de apă deionizată prin ultrasonicare și utilizat pentru acoperirea

prin picurare pe un substrat Si, apoi a fost lăsat să se usuce. Probele au fost analizate utilizând modul non-contact AFM. Datele privind înălțimea au fost colectate la o frecvență de scanare de 2,4 Hz.

Nanoparticulele de clorură de argint biosintetizate au fost scanate utilizând AFM pentru a înțelege configurația exactă a nanoparticulelor biosintetizate, în special pentru a verifica dacă nanoparticulele de argint au dimensiuni mai mult sau mai puțin omogene și au forma sferică.

Figurile 5.21, 5.22, 5.23, 5.24 prezintă imagini AFM reprezentative ale nanoparticulelor de clorură de argint sintetizate în prezența microorganismelor. Pentru nanoparticulele biosintetizate în prezența *Rhodotorula Mucilaginosa*, *Raoultella Planticola* se pot observa nanoparticulele de formă sferică în domeniile 5-25 nm. Pentru nanoparticulele biosintetizate în prezența *Pantoea* și *Enterococcus Faecalis* se poate observa un număr de nanoparticule sferice care se suprapun reciproc, a căror formă sferică este totuși vizibilă, iar dimensiunile sunt ceva mai mari la aproximativ 40-60 nm. AgClNPs sunt prezentate atât în perspectivă, cât și în vederea de sus. Informațiile 3D sunt încorporate în ambele vederi. În perspectivă, natura 3D a imaginii este evidentă. În vederea de sus, intensitatea culorii reflectă înălțimea nanoparticulelor.

Pentru secțiunile transversale, dimensiunile nanoparticulelor sunt redată pe axa Z (dimensiunile nefiind afectate întrucât sunt realizate în modul non-contact), axa X reprezentând distanța de scanare a probei.

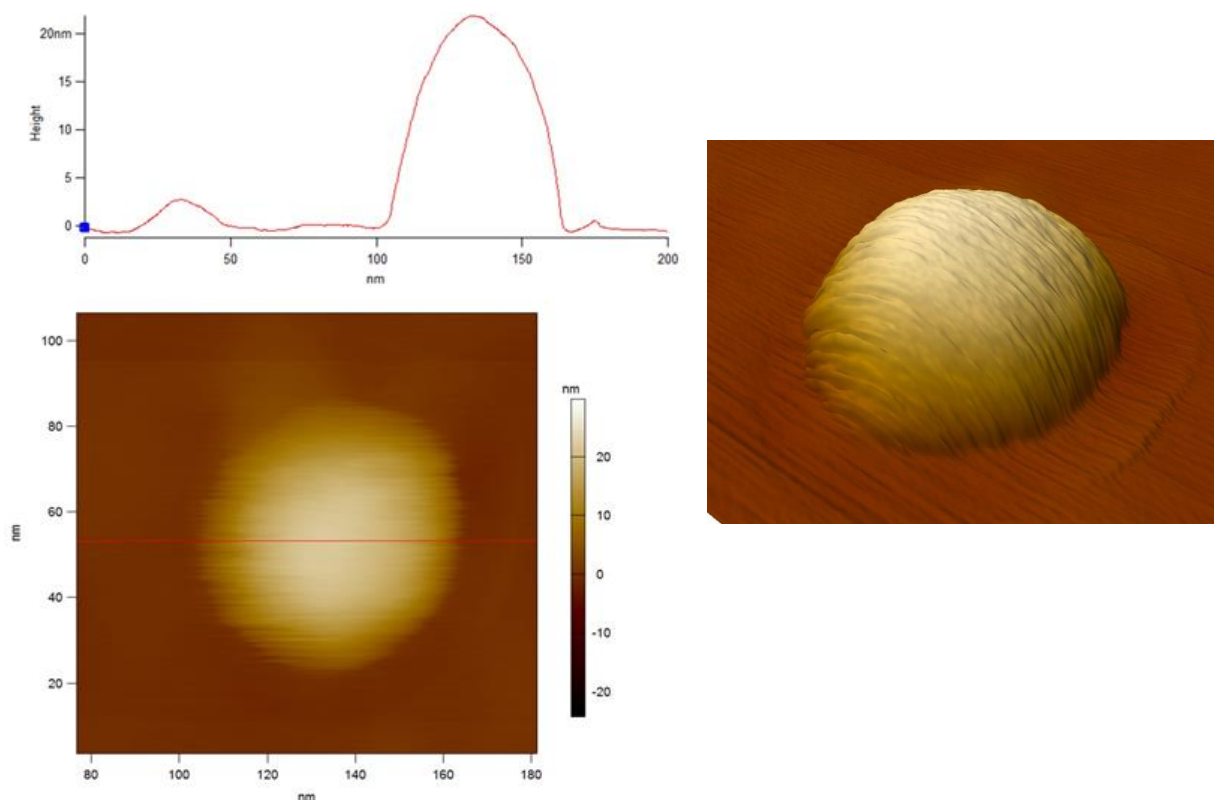


Fig. 5.21 Secțiune transversală, respectiv reprezentarea 3D a AgCl NPs biosintetizate în prezența *Rhodotorulla Mucilaginosa*

5.4 Activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor de clorură de argint

Au fost selectate patru tulpini bacteriene pentru studii de activitate antimicrobiană. Tulpinile utilizate pentru testarea aplicativității au fost crescute în mediu solid compus din extract de drojdie de 1 g / l; 18 g / l agar-agar; 5 g / l nitrat de sodiu; 0,2 g / l glucoză. Câteva colonii din fiecare cultură au fost suspendate în 3 ml de NaCl și s-au folosit pentru teste suplimentare.

Activitatea nanoparticulelor de clorură de argint a fost evaluată împotriva *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella*, *Bacillus amyloliquefaciens*. Potențialul nanoparticulelor de clorură de argint cu privire la activitatea antimicrobiană a fost determinat utilizând metoda difuziei pe disc (așa cum este descris în CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute: M02-A11 standard (Standarde de performanță pentru testele de susceptibilitate a discului antimicrobian)), prin impregnarea a 15 μ l de soluție care conține AgCl NPs pe fiecare disc cu diametrul de 6 mm realizat din filtre de microfibră din sticlă de la Whatman™. Mai mult, s-a investigat efectul sinergetic al nanoparticulelor de clorură de argint în combinație cu diferite antibiotice împotriva microorganismelor, utilizând discuri de 6 mm conținând Ciprofloxacina 5 μ g (CIP 5), Vancomicina 30 μ g (VA 30), Eritromicina 15 μ g (E 15), impregnate cu soluție de 15 μ l AgCl NPs.

Discurile conținând Ciprofloxacina 5 μ g, Vancomicina 30 μ g, Eritromicina 15 μ g au fost utilizate pentru control. Discurile au fost plasate pe suprafața culturii conținute de plăcile Petri. După 24 de ore de incubare la 33 ° C, zona de diametru de inhibare a fost măsurată și comparată cu probele de control. S-au efectuat o serie de trei teste de activitate antibacteriană, iar diametrul zonei de inhibare a fost măsurat cu șubler digital și s-a calculat deviația standard.

Rezultatele activităților antibacteriene și antifungice ale ambelor soluții conținând nanoparticule de argint împotriva a patru tulpini bacteriene utilizând metoda difuziei pe disc, pot fi observate în figurile 5.25, 5.26 și 5.27. Figura 5.25 prezintă variația diametrului zonei de inhibare, pentru discurile care conțin AgCl NPs, discurile antibiotice de control și AgCl NPs împreună cu antibioticele. Se poate observa că pentru tulpina *Staphylococcus aureus* s-au folosit două tipuri de antibiotice (Ciprofloxacina 5 μ g, Eritromicina 15 μ g) pentru a determina sinergismul dintre acestea și AgCl NPs. De asemenea pentru *Staphylococcus pyogenes* s-au folosit tot două tipuri de antibiotice, de data aceasta, Vancomicina 30 μ g, Eritromicina 15 μ g. Pentru *Samonella* și *Bacillus amyloliquefaciens* s-a determinat sinergismul utilizând doar Ciprofloxacina 5 μ g.

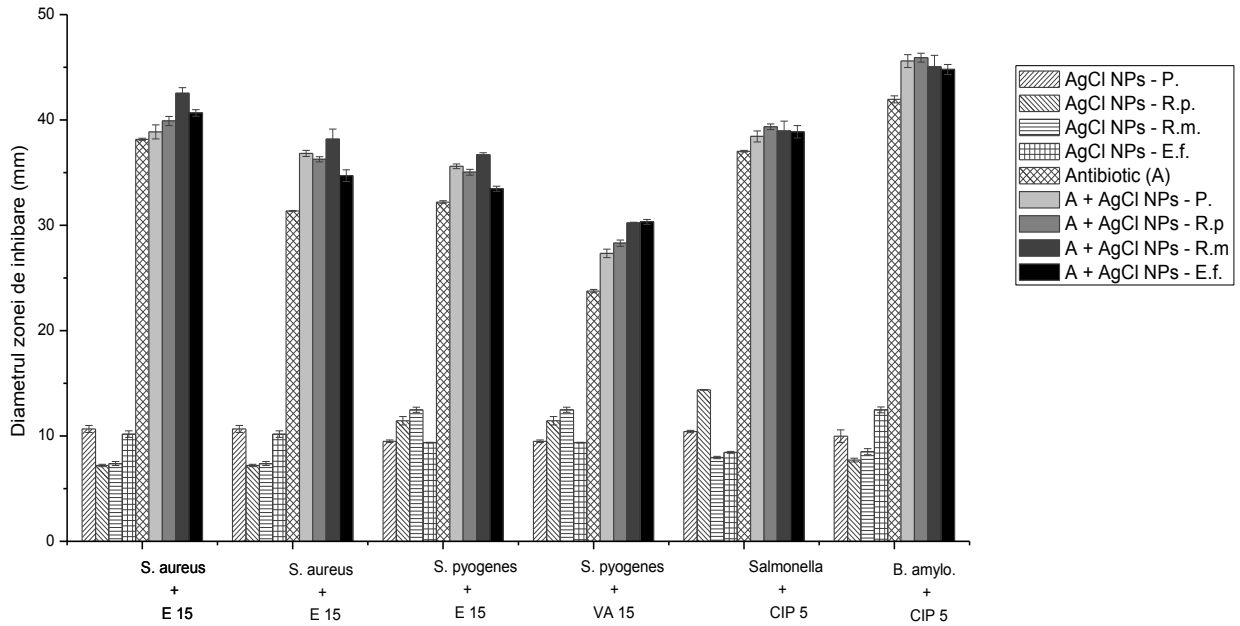


Figura 5.25 Variația diametrului de inhibare pentru tulpinile testate, pentru discurile AgCl NPs, discurile antibiotice și efectul sinergismului dintre AgCl NPs + antibiotice.

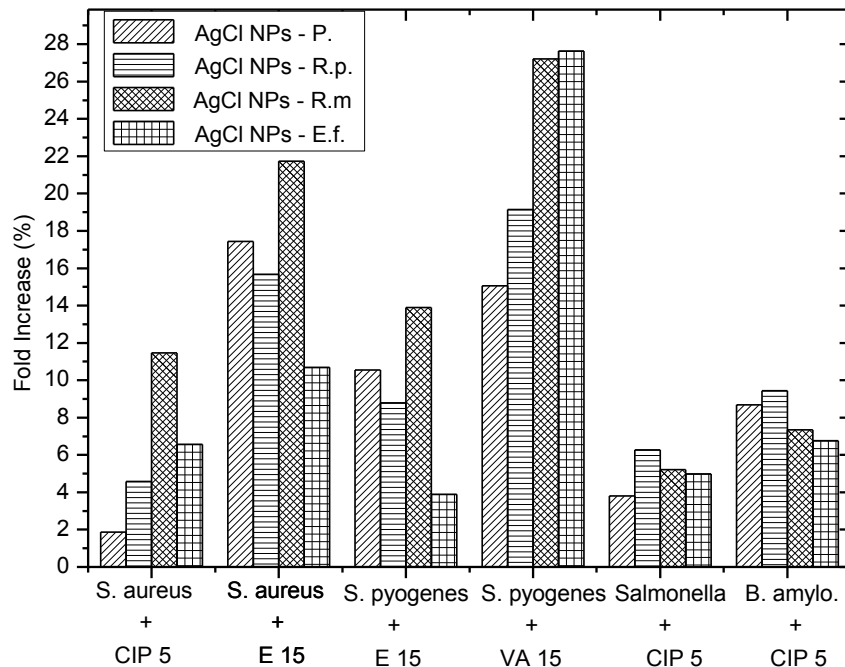


Figura 5.26 Creșterea procentuală a efectului antibacterian al antibioticelor cu AgCl NPs împotriva tulpinilor de testare, calculată cu ecuația $((ba) / a) \times 100 (\%)$, unde b reprezintă diametrul zonei de inhibare pentru combinația AgNPs + antibiotic și reprezintă diametrul zonei de inhibare pentru discul antibiotic

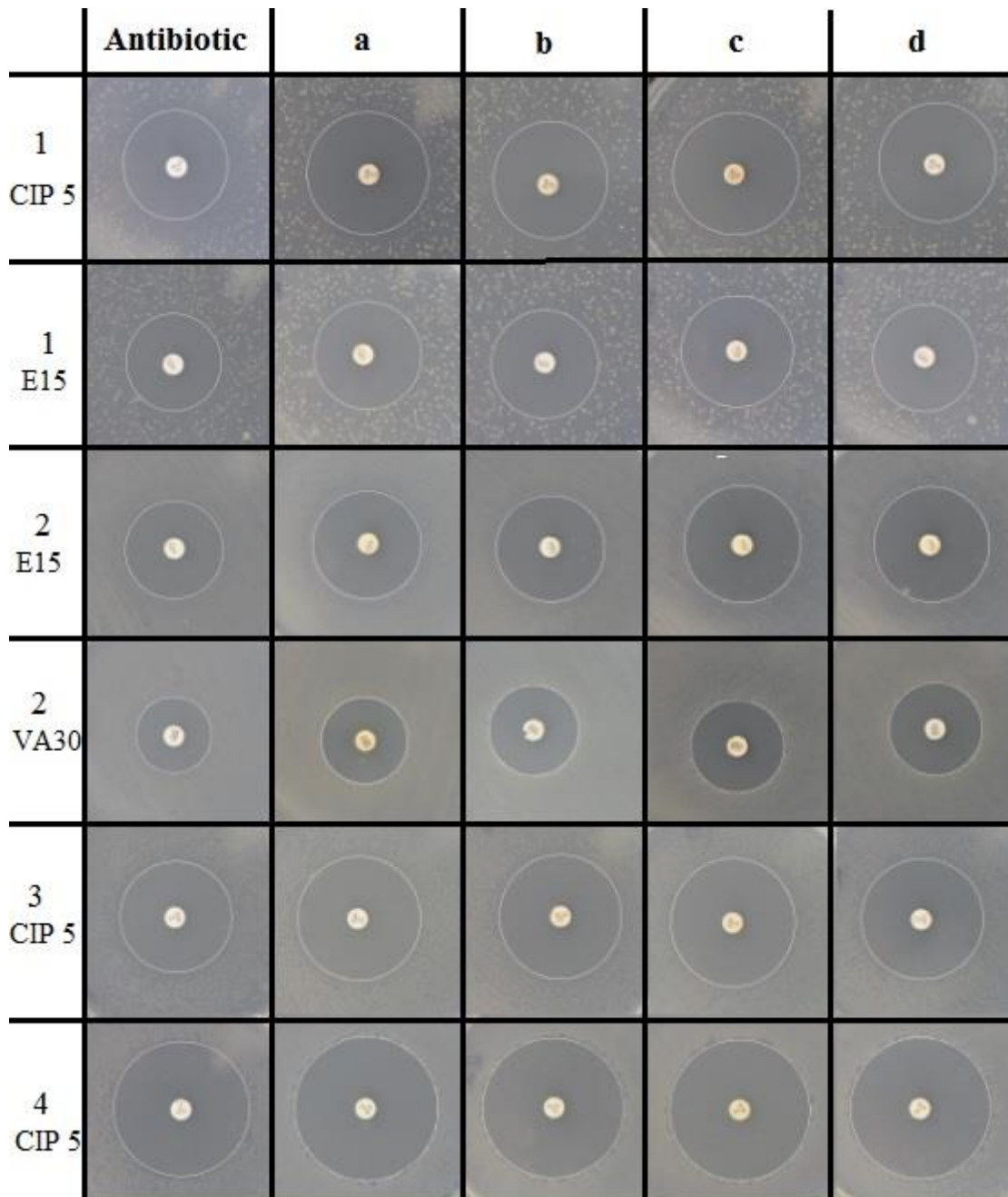


Fig. 5.27 Imaginile zonei de inhibare a (1) *Staphylococcus aureus*, (2) *Streptococcus pyogenes*, (3) *Salmonella*, (4) *Bacillus amyloliquefaciens*, în prezența antibioticelor Eritromicină (E15), Ciprofloxacin (CIP 15), respectiv Vancomicin (VA 30).

Sinergismul dezvoltat între antibiotic și nanoparticulele de clorură de argint.

- a – AgCl NPs sintetizate în prezența *Pantoea*
- b – AgCl NPs sintetizate în prezența *Raoultella Planticola*
- c- AgCl NPs sintetizate în prezența *Rhodotorula Mucilaginosa*
- d - AgCl NPs sintetizate în prezența *Enterococcus Faecalis*

Activitatea antimicrobiană a discurilor impregnate doar cu soluțiile conținând nanoparticule de clorură de argint au dezvoltat activitate antimicrobiană semnificativă pentru cele sintetizate în prezența bacteriei *Raoultella Planticola* (soluția b). Sinergismul dintre antibiotice și nanoparticule a prezentat rezultate importante în cazul în care utilizării Eritromicinei în combinație cu AgCl NPs sintetizate de *Rhodotorulla Mucilaginosa*. Activitatea s-a determinat împotriva bacteriei *Staphylococcus aureus*.

Nanoparticulele de clorură de argint bio-reduce au fost găsite a fi active în stoparea și inhibarea creșterii *S. Aureus*, *S. Pyogenes*, *Salmonella* și *Bacillus amilolyquefaciens*.

5.5 Concluzii

- Nanoparticulele de clorură de argint au fost sintetizate prin bio-reducere. S-a demonstrat că extractele enzimatiche apoase de fungi *Rhodotorulla Mucilaginosa*, *Enterobacter Faecalis*, *Pantoea* și *Raoultella Planticola*, sunt capabile să sintetizeze nanoparticule de clorură de argint.
- Este important să subliniez faptul că precursorul folosit a fost AgNO_3 , motiv pentru care trebuie avut în vedere că compoziția mediilor de creștere folosită pentru microorganisme este foarte importantă pentru rezultatele finale. De exemplu, Barin Heart Infusion utilizată pentru cultivarea ciupercilor prezente, deoarece conține clorură de sodiu, poate fi principalul factor care a dus la formarea de nanoparticule de clorură de argint prin reducerea precursorului AgNO_3 în prezența biomasei de *Rhodotorulla Mucilaginosa*, *Enterobacter Faecalis*, *Pantoea* și *Raoultella Planticola*.
- S-a constatat că nanoparticulele de clorură de argint bioreduce de *Rhodotorulla Mucilaginosa* scad în dimensiune cu creșterea concentrației precursorilor. Metoda de sinteză low-cost este întărită de etapele ecologice ale procedurii. Activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor de clorură de argint confirmă potențialul ridicat al acestora.
- Testele pentru activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor de clorură de argint au generat rezultate importante împotriva microorganismelor ca *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella* și *Bacillus amylolyquefaciens*.

CAPITOLUL VI

CONCLUZII FINALE. CONTRIBUȚII ORIGINALE.

DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE. DISEMINAREA REZULTATELOR.

6.1 Concluzii finale

- Tehnicile de sinteză a nanomaterialelor, atât prin abordări "top-down", cât și "bottom-up" au revoluționat utilizarea nanomaterialelor în diferite domenii. Potențialul nanoparticulelor de a prezenta dimensiuni și forme stabile din punct de vedere ecologic crește cererea producerii la scară industrială.
- Abordările "bottom-up" s-au dovedit a fi mai favorabile, motiv pentru care au fost dezvoltate o multitudine de tehnici de sinteză a nanoparticulelor urmând principiul auto-asamblării.
- Biosinteza nanoparticulelor metalice este un domeniu interdisciplinar ("bio-nanotehnologia") care necesită colaborarea dintre fizicieni, chimiști, biologi și ingineri. Exploatarea resurselor naturale și implementarea acestor metode de sinteză biologică s-a dovedit a avea multiple avantaje, cum ar fi: protejarea mediului, simplitatea implementării în producție, eficiența din punct de vedere al costurilor.
- Rata de producție prin biosinteză și monodispersitatea particulelor sunt continuu îmbunătățite. Trecerea de la bacterii la ciuperci ca mijloc de dezvoltare a "nanofabricilor" naturale, reprezintă un avantaj suplimentar în ceea ce privește sinteza nanoparticulelor utilizând microorganisme.
- Căile biochimice implicate în sinteza nanoparticulelor trebuie să fie studiate cu atenție, iar genele specifice și enzimele implicate trebuie să fie caracterizate. Acest lucru ne va ajuta să avem un control mai bun asupra parametrilor care definesc proprietățile unei nanoparticule, cum ar fi dimensiunea, forma și dispersitatea.
- Acesta este primul studiu care subliniază faptul că nanoparticulele și structurile de microflori de oxid de zinc pot fi obținute prin mediere de către supernatantul bacteriei *Enterobacter sp. LA9* în prezența precursorului $Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O$.
- Transformarea nanoparticulelor de oxid de zinc în microflori, schimbând un singur parametru (timpul de incubare), este propusă ca o metodă de producție cu costuri reduse, care ar putea lărgi intervalul de posibile aplicații.
- *B. amyloliquefaciens 1853* și *B. subtilis 10833* prezintă capacitatea de a sintetiza nanoparticule de argint extracelular prin bioreducție din soluția de precursor $AgNO_3$ 1 mM.
- Ag NPs sintetizate utilizând *B. amyloliquefaciens 1853* și *B. subtilis 10833* au prezentat o activitate antibacteriană și antifungică semnificativă, fie independentă, fie în asociere cu antibiotice.

- Avantajul metodei de sinteză propuse constă în eficiența sa economică (disponibilitatea largă a tulpinilor *B. amyloliquefaciens* și *B. subtilis* și abordarea de sinteză într-o singură etapă, constând în reducerea ionilor de argint prin extracția enzimatică fără bacterii).
- Dezavantajele potențiale ale metodei pot include durata mare a sintezei (48 ore), problemele de reproductibilitate (datorită comportamentului diferit în activitățile enzimatică ale tulpinilor bacteriene, prezența impurităților care pot inhiba activitatea bacteriană, menținerea atentă a condițiilor de sinteză identice). Prin metoda propusă, concentrațiile numerice ale nanoparticulelor de argint în intervalul $1-7,10^{11}$ au fost obținute la concentrații de masă de 0,095 mg / l, similare cu alte produse comerciale nanoparticule de argint.
- Abordarea de sinteză propusă prezintă potențial promițător în domeniul optic (indicele de refracție al materialelor / culorilor prin încorporarea nanoparticulelor), în aplicații biochimice (teste biosenzorice, etichete biologice), precum și în fabricarea cernelurilor conducătoare și a vopselelor electrotermale.
- Nanoparticule de clorură de argint au fost sintetizate prin bio-reducere. S-a demonstrat că extractele enzimatică apoase de fungi *Rhodotorula Mucilaginosa*, *Enterobacter Faecalis*, *Pantoea* și *Raoultella Planticola*, sunt capabile să sintetizeze nanoparticule de clorură de argint.
- S-a constatat că nanoparticulele de clorură de argint bioreduse de *Rhodotorula Mucilaginosa* scad în dimensiune cu creșterea concentrației precursorilor. Metoda de sinteză low-cost este întărită de etapele ecologice ale procedurii. Activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor de clorură de argint. Testele pentru activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor de clorură de argint au generat rezultate importante împotriva microorganismelor ca *Staphyococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella* și *Bacillus amyloliquefaciens*.

6.2. Contribuții originale

- Realizarea lucrării de doctorat a constat în stagii de cercetare desfășurate la universități partenere aflate în Cipru, respectiv, Israel. Pentru a asigura o linie ascendentă, neîntrepută în dezvoltarea prezentei teme, am adus valoare acesteia, prin optimizarea unor parametri de proces, în funcție de disponibilitatea la momentul respectiv în locul unde îmi desfășuram cercetarea. Astfel, rezultatele obținute, prin modificarea parametrilor ca: timpul de incubare, temperatură, pH, tipul microorganismului, concentrația precursorului sunt doar elementele esențiale care au pus amprenta unor contribuții originale.
- Utilizarea microorganismelor ca: *Enterobacter*, pentru sinteza nanoparticulelor de ZnO, *Rhodotorulla Muciluginasa*, *Enterobacter Faecalis*, *Pantoea*, respectiv *Raoultella Planticola*, pentru sinteza nanoparticulelor de AgCl reprezintă contribuții originale aduse în domeniul sintezei verzi a nanoparticulelor utilizând microorganisme.

- Dezvoltarea sinergismului privind activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor de argint împotriva unei tulpini *Candida albicans*, rezistentă la antibioticul Fluconazole.
- Valorificarea și optimizarea rezultatelor obținute prin diferite metode de caracterizare a nanoparticulelor.

6.3 Diseminarea rezultatelor

Trasarea traiectoriei de cercetare în timpul studiilor de doctorat s-a realizat prin publicarea rezultatelor în jurnale de specialitate, cât și prin prezentarea unor lucrări în cadrul unor conferințe naționale, respectiv internaționale. Publicarea științifică privind diseminarea rezultatelor activității de cercetare oferă informații referitoare la orientarea eterogenă dezvoltată pe parcursul programului de cercetare.

Lucrări publicate în reviste de specialitate – ISI

- **Ghiuță, I.**, Cristea, D., Croitoru, C., Kost, J., Wenkert, R., Vyrides, I. Anayiotos, A., Munteanu, D. Characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles, biosynthesized using Bacillus species, Applied Surface Science (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.09.163>.
- Jinga, V., Mateescu, A.O., Cristea, D., Mateescu, G., Burducea, I., Ionescu, C., Crăciun, I., **Ghiuță, I.**, Samoliă, C., Ursuțiu, D., Munteanu, D., Compositional, morphological and mechanical investigations of monolayer type coatings obtained by standard and reactive magnetron sputtering from Ti, TiB₂ and WC, **Applied Surface Science**, Volume 358, Part B, 15 December 2015, Pages 579–585.

Lucrări publicate în reviste de specialitate – BDI / B+

- **Ghiuță, I.**, Cristea, D., Miloșan, I., Munteanu, D.: Synthesis of Metallic Nanoparticles Mediated by Microbes, RECENT, vol. 53pp. 177-183, 2017.
- **Ghiuță, I.**, Cristea, D., Munteanu, D.: Synthesis methods of metallic nanoparticles - an overview, Bulletin of the Transilvania University of Brasov, vol. x, 2017, Series I – Engineering Sciences, ISSN 2065-2119, pp. x
- **Ghiuta, I.**, Cristea, D., Tint, D., Munteanu, D.: Surface Modification of Metallic Biomaterials Used as Medical Implants and Prostheses, Bulletin of the Transilvania University of Brasov, Vol. 8 (57) No.2- 2015, Series I – Engineering Sciences, ISSN 2065-2119, pp. 159-164
- Cristea, D., **Ghiuță, I.**, Munteanu, D.: Tantalum Based Materials for Implants and Prostheses Applications, Bulletin of the Transilvania University of Brasov, Vol. 8 (57) No.2- 2015, Series I – Engineering Sciences, ISSN 2065-2119, pp. 151-158;

Lucrări in extenso publicate în Proceedings

- Pătru, M., Cristea, D., **Ghiuță, I.**, Munteanu, D.: The effect of Ti /AlN interlayers on the mechanical and tribological behavior of DLC coatings, European Conference on Heat Treatment 2015 22nd IFHTSE Congress, 20 – 22 Mai Venetia, Italia.

Participare la Conferințe Internaționale

- **Ghiuță I.**, Cristea D., Munteanu D., Biosynthesis of metallic nanoparticles using microorganisms, 10th International Conference on Materials Science & Engineering, Braşov, Romania
- **Ghiuță, I.**, D. Cristea, I. Vyrides, A. Anayiotos, D. Munteanu: Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using Enterobacter, 10th International Conference on Materials Science & Engineering, Braşov, Romania
- **Ghiuță, I.** ,Kost, J., Wenkert, R., Munteanu, D.: Green synthesis of silver chloride nanoparticles using Rhodotorula Mucilaginosa, 5th International Conference on Powder Metallurgy & Advanced Materials, Cluj, România
- **Ghiuță, I.** Cristea, D., Wenkert, R., Munteanu, D.: Precursor concentration influence on the morphology and antimicrobial activity of silver chloride nanoparticles. In: Book of Abstracts, 5th International Conference on Powder Metallurgy & Advanced Materials, Cluj, România, 2017.
- **Ghiuță I**, Cristea D, Țiņț D, Munteanu D., Surface modification of metallic biomaterials used as medical implants and prostheses, New Trends on Sensing - Monitoring - Telediagnosis for Life Sciences, Braşov, România, NT-SMT-LS September 3-5, 2015
- Cristea D., **Ghiuță I.**, Munteanu D., Thin film coatings for implants and prostheses applications, New Trends on Sensing - Monitoring - Telediagnosis for Life Sciences, Braşov, România, NT-SMT-LS September 3-5, 2015
- D. Cristea, L. Cunha, **I. Ghiuță**, N.P. Barradas, E. Alves, D. Munteanu: Photocatalytic Behaviour of Magnetron Sputtered Tantalum Oxynitride Thin Films, International Conference on Materials Science and Engineering - BRAMAT 2015, 05-07 Martie 2015, Braşov, România.
- Patru, M., D. Cristea, **I. Ghiuță**, D. Munteanu , The Effect of AlN/Ti Interlayers on the Mechanical and Tribological Behaviour of DLC Coatings; European Conference of Heat Treatment 2015 & 22nd IFHSTE Congress, 20-22 May 2015, Venice, Italy

Participare la Conferințe Naționale

- **Ghiuță I**, Stenturi metalice folosite în cardiologia intervențională, Conferința Națională Creativitate și Inventică, 6 iunie 2015

6.4 Direcții viitoare de cercetare

Luând în considerare situațiile întâlnite pe parcursul studiilor, s-au conturat diverse direcții de cercetare. Multe dintre ele s-au concretizat și au fost prezentate în lucrare, însă câteva definesc direcțiile viitoare de cercetare ale subiectului:

- Testarea comportamentului nanoparticulelor de oxid de zinc obținute prin metode verzi prin adăugarea acestora în rețetele unor creme cu protecție solară. De asemenea, se dorește dezvoltarea pe aceeași direcție a nanoparticulelor de dioxid de titan.
- Extinderea cercetărilor privind combinarea metodei de sinteză utilizând microorganisme, cu alte metode, cum ar fi: sonofragmentarea, ablația laser, etc.
- Optimizarea parametrilor de proces ai sintezei verzi utilizând microorganisme în vederea obținerii unor soluții cu nanoparticule mono-disperse, excluzând utilizarea stabilizatorilor chimici.
- Identificarea enzimelor secretate de microorganisme, care sunt răspunzătoare de bioreducția ionilor metalici. Se urmărește dezvoltarea și implementarea acestora în procesele de biosinteză a nanoparticulelor.
- Aprofundarea cercetărilor și realizarea unei comparații complexe referitoare la utilizarea diferitelor metode de sinteză a nanoparticulelor și testarea proprietăților unice deținute de acestea. Identificarea metodei optime din punct de vedere cost, timp, performanță. De asemenea, trebuie ținut cont și procentul eco în dezvoltarea metodei.
- Dezvoltarea sintezei verzi a nanoparticulelor metalice prin utilizarea diferitelor extracte de plante. De asemenea, se dorește a se realiza o paralelă între activitatea animicrobiană dezvoltată de nanoparticule obținute prin sinteză verde mediată de microorganisme, cât și sinteză verde mediată de extracte de plante.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1] Abhijeet, M. Meryam, S.: Alpha-Amylase Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles, *Science of Advanced Materials*, vol. 4, iss. 1, pp. 143-146, 2012.
- [4] Ahmad, A., et al.: Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus* species. In: *Nanotechnology*, vol. 14, no. 7, 2003.
- [5] Ahmed, S., et al.: A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. In: *Journal of Advanced Research*, ISSN: 2090-1232, vol. 7, is. 1, pp. 17–28, 2016.
- [11] Armarego, W. L. F.: *Nanomaterials and Nanotechnology, Purification of Laboratory Chemicals*, Butterworth-Heinemann pp.1065–1106, 2017.
- [14] Asokan, A. et al., Preparation and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles and a Study of the Anti-microbial Property of Cotton Fabric Treated with the Particles, *JTATM 6* (2010) 723-729.
- [17] Bai, H.-J. Z.-M. Zhang, J. Gong, Biological synthesis of semiconductor zinc sulfide nanoparticles by immobilized *Rhodobacter sphaeroides*, *Biotechnol Lett.* 28, 1135–1139, 2006.
- [19] Balasooriya, E.R., et al.: Review Article Honey Mediated Green Synthesis of Nanoparticles: New Era of Safe Nanotechnology. In: *Journal of Nanomaterials*, vol. 2017, Article ID 5919836, 10 pages, 2017.
- [26] Berta Domènech, et al.: Bifunctional Polymer-Metal Nanocomposite Ion Exchange Materials. In: *Ion Exchange Technologies*, Editors: Ayben Kilislioglu, pp.35-72, 2012.
- [28] Bhushan, B.: Introduction to Nanotechnology. In: Bhushan B. (eds) *Springer Handbook of Nanotechnology*. ISSN: 2522-8692 Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1-12, 2010.
- [37] Carvalho, J.F., et al.: Synthesis of magnetite nanoparticles by high energy ball milling. In: *Applied Surface Science*, ISSN: 0169-4332, vol. 275, pp. 84– 87, 2013.
- [38] Castro, L., et al.: Mechanism and Applications of Metal Nanoparticles Prepared by Bio-Mediated Process. In: *Reviews in Advanced Sciences and Engineering (RASE)*, ISSN: 2157-913X, vol. 3, pp. 1–18, 2014.
- [40] Chauhan, R. A. Reddy, J. Abraham, Biosynthesis and antimicrobial potential of silver and zinc oxide nanoparticles using *Candida diversa* strain JA1, *Der Pharma Chemica*, vol. 6, iss. 3, pp. 39-47, 2014.
- [46] Chokriwal, A. et al.: Biological Synthesis of Nanoparticles Using Bacteria and Their Applications. In: *American Journal of Pharmatech Research (Am. J. PharmTech Res)*, ISSN: 2249-3387, vol. 4, iss. 6, pp. 38-61, 2014.
- [48] Cunningham, A. and T. Bürgi: Bottom-up Organisation of Metallic Nanoparticles. In: C. Rockstuhl, T. Scharf (eds.), *Amorphous Nanophotonics, Nano-Optics and Nanophotonics*, pp. 1-37, 2013.
- [51] Dar, M.A., Ingle, A., Rai, M., Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cryphonectria* sp. evaluated singly and in combination with antibiotics. In: *Nanomedicine*, ISSN: 1549-9642, vol. 9, iss. 1, pp. 105-114, 2013.
- [61] Edson Roberto Leite, Nanocrystals Assembled from the Bottom Up. In: *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* Edited by H. S. Nalwa, vol 6, pp. 537–554, 2004.
- [65] Fayaz, A.M., et al.: Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. In: *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, ISSN: 1549-9642, vol. 6, iss. 1, pp. 103-109, 2010.
- [67] Feynman, Richard P.: There's Plenty of Room at the Bottom. In: *Caltech Engineering and Science*, ISSN 0013-7812, vol. 23, no. 5, pp. 22-36, 1960.
- [73] Gericke, M., Pinches, A.: Biological synthesis of metal nanoparticles. In: *Hydrometallurgy*, ISSN: 0304-386X, vol. 83, iss. 1-4, pp. 132–140, 2006.

- [74] **Ghiuță, I.** Cristea, D. Munteanu, D. Biosynthesis of metallic nanoparticles using microorganisms. In: Book of abstract, 10th International Conference on Materials Science & Engineering, Braşov, Romania, 2017.
- [75] **Ghiuță, I.** Cristea, D., Croitoru, C., Kost, J., Wenkert, R., Vyrides, I. Anayiotos, A., Munteanu, D. Characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles, biosynthesized using *Bacillus* species, *Applied Surface Science* 2017,
- [76] **Ghiuță, I.** Cristea, D., Kost, J., Wenkert, R., Munteanu, D.: Green synthesis of silver chloride nanoparticles using *Rhodotorula Mucilaginosa*, In: Book of abstract, 5th International Conference on Powder Metallurgy & Advanced Materials, Cluj, România, 2017
- [77] **Ghiuță, I.** Cristea, D., Wenkert, R., Munteanu, D.: Precursor concentration influence on the morphology and antimicrobial activity of silver chloride nanoparticles. In: Book of Abstracts, 5th International Conference on Powder Metallurgy & Advanced Materials, Cluj, România, 2017.
- [78] **Ghiuță, I.**, Cristea, D. Vyrides, I. Anayiotos, A. Munteanu D.: Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Enterobacter*. In: Book of abstract, 10th International Conference on Materials Science & Engineering, Braşov, Romania, 2017
- [79] **Ghiuță, I.**, Cristea, D., Munteanu, D.: Synthesis methods of metallic nanoparticles - an overview, *Bulletin of the Transilvania University of Brasov, Series I – Engineering Sciences*, ISSN 2065-2119, vol. 10, iss. 59, no. 2, pp. 133, 140, 2017.
- [80] **Ghiuță, I.**, Cristea, D., Miloşan, I., Munteanu, D.: Synthesis of Metallic Nanoparticles Mediated by Microbes, *RECENT*, vol. 53pp. 177-183, 2017.
- [81] Ghorbani, H.R. et al.: A Review of Methods for Synthesis of Al Nanoparticles. In: *Oriental Journal of Chemistry (OJC)*, ISSN: 2231-5039, vol. 30, is. 4, pp. 1941-1949, 2014.
- [92] Habiba K, Makarov VI, Weiner BR, Morell G.: *Fabrication of Nanomaterials by Pulsed Laser Synthesis. Manufacturing Nanostructures*, Publisher: One Central Press (OCP), Editors: Waqar Ahmed, Nasar Ali, pp. 263-291, 2014.
- [95] Haiss, W. Thanh N.T.K., Aveyard, J. Fernig, D.G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra, *Anal. Chem.* vol. 79, pp. 4215–4221, 2007.
- [100] Heiligtag, F.J., Niederberger, M.: The fascinating world of nanoparticle research. In: *Materials Today*, vol. 16, iss. 7-8, pp. 262-271, 2013.
- [103] Hu, W. et al., In situ synthesis of silver chloride nanoparticles into bacterial cellulose membranes, *Mater. Sci. Eng. C.* vol. 29, pp. 1216–1219, 2009.
- [104] Husseiny, M.I., et al.: Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy (SAA)*, ISSN 1386-1425, vol. 67, p. 1003–1006, 2007.
- [106] Iacoban, J. C. Macoveanu, M. A Comparison of Argentometric Titration and Spectrophotometric Determination of Chloride Concentration in Precipitation Samples, *Roum. Biotechnol. Lett.* vol. 10, pp. 2105–2109, 2005.
- [111] Javed Musarra, A. Production of antimicrobial silver nanoparticles in water extracts of the fungus *Amylomyces rouxii* strain KSU-09, *Bioresour. Technol.* vol. 101, pp. 8772–8776, 2010.
- [116] Jha, A.K., Prasad, K., Kulkarni, A.R.: Synthesis of TiO₂ nanoparticles using microorganisms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* . ISSN 0927-7765, vol.71 p. 226–229, 2009.
- [144] Mishra, V., et al.: A Review on Green Synthesis of Nanoparticles and Evaluation of Antimicrobial Activity. *International Journal of Green and Herbal Chemistry (IJGHC)*, ISSN: 2278-3229, vol.3, no.1, pp. 081-094, 2013.
- [146] Mittal, A.K., Chisti, Y., Banerjee, U.C.: Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts, *Biotechnol. Adv.*, ISSN: 0734-9750, vol. 31, is. 2, pp. 346-56, 2013.

- [147] Mody, V.V.: Introduction to metallic nanoparticles. In: Journal of Pharmacy and Bioallied Science (J. Pharm. Bioallied Sci.), ISSN: 0975-7406, vol. 2, is. 4, pp. 282–289, 2010.
- [152] Pantidos, N., Horsfall, L.E.: Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi and Plants. In: Journal of Nanomedicine and Nanotechnology (J Nanomed Nanotechnol), ISSN: 2157-7439, vol. 5, iss. 5, pp. 233-242, 2014.
- [164] Rai M.; Yadav; A. Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, Biotechnology Advances vol. 27, pp. 76-83, 2009.
- [167] Ramani, M. S. Ponnusamy, C. Muthamizhchelvan, From zinc oxide nanoparticles to microflowers: A study of growth kinetics and biocidal activity, Mater. Sci. Eng., C vol. 32, pp. 2381–2389, 2012.
- [178] Saifuddin, N. Wong, C. W. Nur Yasumira A. A.: Rapid Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Culture Supernatant of Bacteria with Microwave Irradiation, E-J. Chem. vol. 6, iss. 1, pp. 61-70, 2009.
- [179] Salata, O.V.: Applications of nanoparticles in biology and medicine, Journal of Nanobiotechnology, ISSN: 1477-3155, vol. iss.3, 6 pages, 2004.
- [182] Sanghi, R., Verma, P.: A facile green extracellular biosynthesis of CdS nanoparticles by immobilized fungus. In: Chemical Engineering Journal, ISSN 1385-8947, vol. 155, p. 886–891, 2009.
- [189] Shamsuzzaman, et al.: Biological synthesis of ZnO nanoparticles using *C. albicans* and studying their catalytic performance in the synthesis of steroidal pyrazolines. In: Arabian Journal of Chemistry, ISSN 1878-5352, vol. 10, suppl. 2, p. 1530–1536, 2017.
- [193] Singh, G., et al.: Synthesis of ZnO nanoparticles using the cell extract of the cyanobacterium, *Anabaena* strain L31 and its conjugation with UV-B absorbing compound shinorine. In: Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, ISSN 1011-1344, vol. 138 p. 55–62, 2014.
- [195] Singh, P., Zhang, D., Yang, D.-C.: Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. In: Trends in Biotechnology, ISSN: 0167-7799, vol. 34, iss. 7, pp. 588-599, 2016.
- [199] Soriano, L. M., Zougagh, M., Valcárcel, M., Ríos, Á.: Analytical Nanoscience and Nanotechnology: Where we are and where we are heading. In: Talanta, ISSN: 1873-3573 vol. 177, pp. 104-121, 2018.
- [208] Taniguchi, N.: On the Basic Concept of 'Nano-Technology'. In: Proceedings of the International Conference on Production Engineering (Proc. Intl. Conf. Prod. Eng.), Tokyo, Part II, Japan Society of Precision Engineering, 1974.
- [210] Teimuri-Mofrad, R., et al: Green synthesis of gold nanoparticles using plant extract: Mini-review. In: Nanochemistry Research (Nanochem. Res.), ISSN: 2423-818X, vol. 2, iss. 1, Winter and Spring, pp. 8-19, 2017.
- [215] Tsibakhashvili, N., et al.: Synthesis of Silver Nanoparticles Using Bacteria. In: Nano Studies, ISSN 1987-8826, vol. 2, p. 179-182, 2010.
- [216] Tsuzuki, T., Commercial scale production of inorganic nanoparticles. In: International Journal of Nanotechnology (IJNT), ISSN online: 1741-8151, vol. 6, iss. 5-6, pp. 567-578, 2009.
- [220] Vadlapudi, V., et al.: Synthesis of Green Metallic Nanoparticles (NPs) and Applications. In: Oriental Journal of Chemistry, ISSN: 2231-5039, vol. 29, no. 4, pp. 1589-1595, 2013.
- [222] Wahab, R. Photocatalytic activity of zinc oxide micro-flowers synthesized via solution method, Chem. Eng. J. vol. 168, pp. 359–366, 2011.
- [230] Wiggins, P. A. et al.: High flexibility of DNA on short length scales probed by atomic force microscopy. In: Nature Nanotechnology (Nat. Nanotechnol.), ISSN: 1748-3395, vol 1, pp. 137–141, 2006.
- [249] ***<https://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/tem/> accesat la 17.04.2017
- [253] ***<http://www.indiastudychannel.com/resources/146681-Principle-working-and-applications-of-UV-spectroscopy.aspx>, accesat la 08.01.2017

Rezumatul tezei

Scopul tezei de doctorat îl reprezintă studiul nanoparticulelor metalice, reliefat de sinteza, caracterizarea și aplicabilitatea acestora, realizate în vederea dezvoltării și îmbunătățirii activității antimicrobiene. Pentru sinteza de nanoparticule au fost utilizate diferite microorganisme capabile să înlocuiască reducătorii și stabilizatorii chimici. Astfel, s-a demonstrat că bacterii ca *Enterobacter* și *Bacillus* sunt capabile să medieze sinteza de nanoparticule de oxid de zinc, respectiv de argint. De asemenea, microorganisme precum *Rhodotorulla*, *Raoultella*, *Pantoea* și *Enterococcus* au fost folosite pentru sinteza nanoparticulelor de clorură de argint. Rezultatele obținute au fost optimizate prin adaptarea unor parametri de proces, ca timpul de incubare, temperatură sau concentrația molară a precursorului. Nanoparticulele au fost caracterizate atât din punct de vedere morfologic, cât și structural. Pe parcursul studiilor a fost testată activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor biosintetizate și a fost demonstrată capacitatea acestora de a dezvolta sinergismul în prezența unor antibiotice.

Abstract

The aim of the PhD thesis is the study of metal nanoparticles, highlighted by the synthesis, characterization and applicability of these particles, with the purpose of developing and improving their antimicrobial activity. For the synthesis of nanoparticles, various microorganisms capable of replacing chemical reducers and stabilizers have been used. Thus, it has been shown that bacteria such as *Enterobacter* and *Bacillus* are capable of mediating the synthesis of zinc oxide and silver nanoparticles. Moreover, microorganisms such as, *Rhodotorulla*, *Raoultella*, *Pantoea* and *Enterococcus* have been used for the synthesis of silver chloride nanoparticles. The results obtained were optimized by adapting some process parameters, such as incubation time, temperature, or molar concentration of the precursor. The nanoparticles have been characterized both morphologically and structurally. During the studies, the antimicrobial activity of biosynthesized nanoparticles was tested and their ability to develop synergism in the presence of antibiotics was demonstrated.

Ghiuță Ioana

ioana.ghiuta@unitbv.ro



EXPERIENȚĂ PROFESIONALĂ

Universitatea Transilvania din Braşov, Facultatea de Știința și Ingineria Materialelor, *Cadru asociat*, 2017 – prezent

EDUCAȚIE ȘI FORMARE PERSONALĂ

Perioada	Octombrie 2014 – Ianuarie 2018
Numele instituției de învățământ	Universitatea Transilvania din Braşov, Facultatea de Știința și Ingineria Materialelor
Poziția ocupată	Doctorand
Titlul tezei	Cercetări privind biosinteza nanoparticulelor metalice utilizând microorganisme
Subiecte aprofundate	Sinteza nanoparticulelor metalice, Caracterizarea nanoparticulelor metalice.
Perioada	Ianuarie 2017 – Iunie 2017
Numele instituției de învățământ	Ben-Gurion University from Negev, Beer-Sheva, Israel
Poziția ocupată	Student-Doctorand (Erasmus)
Perioada	Octombrie 2015 – Decembrie 2015
Numele instituției de învățământ	Cyprus University of Technology, Limasol, Cipru
Poziția ocupată	Student-Doctorand (Erasmus)
Perioada	2012-2014
Numele instituției de învățământ	Universitatea Transilvania din Braşov, Facultatea de Știința și Ingineria Materialelor
Specializarea	Ingineria și Managementul Materialelor Avansate Metalice, Ceramice și Compozite
Diploma obținută	Diplomă de master în Domeniul Ingineriei Materialelor
Subiecte aprofundate	Metode de caracterizare a materialelor, Managementul calității
Perioada	2008-2012
Numele instituției de învățământ	Universitatea Transilvania din Braşov, Facultatea de Știința și Ingineria Materialelor
Specializarea	Inginerie Economică în Domeniul Mecanic
Diploma obținută	Diplomă de Inginer în Domeniul Inginerie și Management
Subiecte aprofundate	Știința Materialelor, Nanomateriale, Tratamente Termice, Proiectare CAD, Economie
Perioada	2008-2011
Numele instituției de învățământ	Universitatea Spiru Haret, Facultatea de Științe Juridice și Administrative, Braşov
Specializarea	Administrație Publică
Diploma obținută	Licențiat în Științe Administrative
Subiecte aprofundate	Drept civil, drept penal, Economie
Perioada	2013-2014
Numele instituției de învățământ	Universitatea Transilvania din Braşov
Curs Postuniversitar	Poluarea, Protecția și Managementul Mediului
Diploma obținută	Certificat de atestare a competențelor profesionale
Perioada	2008-2011
Numele instituției de învățământ	Universitatea Transilvania din Braşov
Curs; Diploma obținută	Modul Psihopedagogic – Certificat de absolvire

Ghiuță Ioana

ioana.ghiuta@unitbv.ro



PROFESSIONAL EXPERIENCE

Transilvania University of Brasov, Faculty of Materials Science and Engineering, *Assistant, 2017 – present*

EDUCATION AND PERSONAL TRAINING

Period	October 2014 – January 2018
Name of the educational institution	Transilvania University of Brasov, Faculty of Materials Science and Engineering
Role	PhD
Thesis title	Research on the biosynthesis of metallic nanoparticles using microorganisms
In-depth topics	Synthesis of metallic nanoparticles, Characterization of metallic nanoparticles
Period	January 2017 – June 2017
Name of the educational institution	Ben-Gurion University from Negev, Beer-Sheva, Israel
Role	PhD-Student - (Erasmus)
Period	October 2015 – December 2015
Name of the educational institution	Cyprus University of Technology, Limassol, Cyprus
Role	PhD-Student-(Erasmus)
Period	2012-2014
Name of the educational institution	Transilvania University of Brasov, Faculty of Materials Science and Engineering
Specialization	Engineering and management of advanced, metallic, ceramic and composite materials.
Title of qualification awarded	Master degree in Materials Engineering,
In-depth topics	Characterization methods of materials. Quality Management
Period	2008-2012
Name of the educational institution	Transilvania University of Brasov, Faculty of Materials Science and Engineering
Specialization	Economical Engineering in Mechanical Field
Title of qualification awarded	Engineer in the field of Engineering and Management
In-depth topics	Materials Science, Nanomaterials, Thermic treatments, CAD Projection, Economics
Period	2008-2011
Name of the educational institution	Spiru Haret University, Faculty of Juridic and Administrative Sciences, Brasov
Specialization	Public Administration
Title of qualification awarded	Licensed in Administrative Sciences
In-depth topics	Civil rights, Criminal Law, Economics
Period	2013-2014
Name of the educational institution	Transilvania University of Brasov
Postgraduate course	Pollution, Protection and Management of the Environment
Title of qualification awarded	Certificate for professional competences
Period	2008-2011
Name of the educational institution	Transilvania University of Brasov,
Course; Obtained diploma	Psychopedagogical module - Certificate of graduating