



ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biologie

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**BIOSINTEZA DE NANOPARTICULE DE METALE NOBILE DE
CĂTRE MICROORGANISME, ASPECTE FUNDAMENTALE ȘI
APLICATIVE**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
CSI Dr. Cristina Ligia PURCĂREA

DOCTORAND:
Adrian GHINEA

2025

CUPRINS

LISTĂ CU ABREVIERI	Error! Bookmark not defined.
INTRODUCERE	Error! Bookmark not defined.
CAPITOLUL I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	Error! Bookmark not defined.
1.1. Clasificarea generală a metodelor de sinteză a nanoparticulelor metalice	Error! Bookmark not defined.
1.2. Metode fizice de sinteză.....	Error! Bookmark not defined.
1.3. Metode chimice de sinteză.....	Error! Bookmark not defined.
1.4. Sinteza biologică a nanoparticulelor	Error! Bookmark not defined.
1.5. Mecanisme biologice implicate în formarea NPM	Error! Bookmark not defined.
1.6. Tehnici moderne și hibride de sinteză	Error! Bookmark not defined.
1.7. Considerații privind scalabilitatea, costul și sustenabilitatea metodelor de sinteza a NPM.....	Error! Bookmark not defined.
1.8. Utilizarea bacteriilor în sinteza NPM	Error! Bookmark not defined.
1.9. Bacterii model utilizate în sinteza NPM	Error! Bookmark not defined.
1.10. Aplicații ale NP sintetizate de <i>S. oneidensis</i> în diverse domenii	Error! Bookmark not defined.
SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI.....	Error! Bookmark not defined.
CONTRIBUȚII PERSONALE.....	Error! Bookmark not defined.
CAPITOLUL II – MATERIALE ȘI METODE	Error! Bookmark not defined.
2.1. Tulpini bacteriene utilizate	Error! Bookmark not defined.
2.2. Cultivarea tulpinilor bacteriene.....	Error! Bookmark not defined.
2.3. Biosinteza NPM prin procesul de respirație anaerobă	Error! Bookmark not defined.
2.4. Sinteza NP-Ag utilizând mediul epuizat de <i>S. oneidensis</i> MR-1..	Error! Bookmark not defined.

2.5. Spectrofotometrie UV-VIS	Error! Bookmark not defined.
2.6. Spectrofluorimetrie	Error! Bookmark not defined.
2.7. Microscopie electronică de transmisie (TEM).....	Error! Bookmark not defined.
2.8. Microscopia în câmp întunecat și imagistica hiperspectrală (DMHI) .	Error! Bookmark not defined.
2.9. Analiza statistică a formei și dimensiunii NPM	Error! Bookmark not defined.
2.10. Obținerea mutantelor de <i>S. oneidensis</i> MR-1	Error! Bookmark not defined.
2.11. Electroforeza ADN în gel de agaroză	Error! Bookmark not defined.
2.12. Electroforeza SDS-PAGE.....	Error! Bookmark not defined.
2.13. Determinarea activității redox, a mutantelor obținute, prin metoda metil oranj...	Error! Bookmark not defined.
2.14. Activitatea de reducere a coloranților de către NPM sintetizate.	Error! Bookmark not defined.
2.15. Activitatea antimicrobiană a NPM sintetizate	Error! Bookmark not defined.
2.16. Activitatea antioxidantă a NPM sintetizate.....	Error! Bookmark not defined.
REZULTATE	Error! Bookmark not defined.
CAPITOLUL III - BIOSINTEZA NANOPARTICULELOR METALICE CU <i>SHEWANELLA ONEIDENSIS</i> MR-1	
3.1 Obținerea NPM cu <i>S. oneidensis</i> MR-1 prin procesul de respirație anaerobă.....	Error! Bookmark not defined.
3.2. Efectul luminii asupra sintezei de NPM.	Error! Bookmark not defined.
3.3. Sinteza NP-Ag utilizând mediul epuizat de <i>S. oneidensis</i> MR-1..	Error! Bookmark not defined.
CAPITOLUL IV - OBȚINEA UNOR MUNTANTE DE <i>SHEWANELLA ONEIDENSIS</i> MR-1 ÎN VEDEREA ÎMBUNĂTĂȚIRII ABILITĂȚILOR REDOX A ACESTORA	
	Error! Bookmark not defined.

4.1. Inducerea de mutații în celulele de *Shewanella oneidensis* MR-1 **Error! Bookmark not defined.**

4.2.. Evaluarea potențialului reducător al mutantelor obținute **Error! Bookmark not defined.**

CAPITOLUL V - APLICAȚIILE NANOPARTICULELOR DE PLATINĂ, PALADIU, AUR ȘI ARGINT BIO-SINTETIZATE**Error! Bookmark not defined.**

5.1. Reducerea coloranților**Error! Bookmark not defined.**

5.2. Efectul antibacterian al NPM.....**Error! Bookmark not defined.**

5.3. Efectul antioxidant al NPM**Error! Bookmark not defined.**

CONCLUZIILE GENERALE ALE TEZEI**Error! Bookmark not defined.**

DISEMINAREA REZULTATELOR..... 45

BIBLIOGRAFIE**Error! Bookmark not defined.**

INTRODUCERE

În ultimele decenii, nanotehnologia a devenit unul dintre cele mai promițătoare și dinamice domenii ale cercetării științifice, generând soluții inovatoare în biomedicină, industrie, electronică, agricultură și protecția mediului. Această ascensiune se datorează în mare parte dezvoltării și aplicării nanomaterialelor, dintre care nanoparticulele (NP) ocupă un loc central datorită proprietăților lor fizico-chimice unice și versatilității funcționale (Daniel și Astruc, 2004; Jeevanandam și colab., 2018; Altammar 2023).

NP sunt particule cu dimensiuni cuprinse între 1 și 100 nm, care prezintă proprietăți diferite de materialul brut (Potocnik, 2011; Batista și colab., 2015). Acestea includ o suprafață specifică foarte mare, efecte cuantice de scară, comportament optic și magnetic modificat și o reactivitate chimică crescută față de materialele echivalente în stare masivă (Buzea și colab., 2007; Chen și colab., 2010; Amendola și Meneghetti, 2013). Aceste proprietăți le conferă capacități avansate în interacțiunea cu moleculele biologice, metalele grele, substanțele toxice și radiațiile, deschizând multiple direcții de aplicabilitate.

NP pot fi clasificate în funcție de compoziția chimică (metalice, nemetalice, hibride), natura elementului sau compusului (nobile, tranziționale, oxizi metalici), metoda de sinteză (fizică, chimică, biologică) și domeniu de aplicabilitate. Nanoparticulele metalice (NPM) sunt în mod particular valoroase în aplicațiile biomedicale și de mediu datorită reactivității lor chimice, stabilității și posibilității de funcționalizare cu molecule bioactive (Suresh și colab., 2011; Dykman și Khlebtsov, 2012). Dintre acestea, nanoparticulele de aur (NP-Au), argint (NP-Ag), platină (NP-Pt) și paladiu (NP-Pd), sunt deosebit de importante din punct de vedere al proprietăților optice (plasmonică), catalitice și biologice.

Proprietățile NPM sunt datorate dimensiunilor extrem de mici și suprafeței foarte mari a acestora, din acest motiv, pot interacționa diferit cu alte substanțe sau cu lumina, decât particulelele metalice la scala macro (Chen și colab., 2010; Zou și colab., 2021).

Metodele convenționale de sinteză a nanoparticulelor – chimice și fizice – deși sunt eficiente și relativ controlabile, au dezavantaje majore: costuri ridicate, generarea de substanțe toxice, utilizarea de solvenți organici și cerințe energetice ridicate (Narayanan și Sakthivel, 2010; Khan și colab., 2017). Astfel, a apărut o tendință accentuată de obținere a nanoparticulelor prin sinteza biologică (biosinteza), considerată o alternativă ecologică și sustenabilă. Aceasta implică utilizarea de plante, fungi, alge sau bacterii pentru reducerea ionilor metalici și stabilizarea nanoparticulelor (Iravani, 2014; Keat și colab., 2015; Kora și Rastogi., 2015). Un exemplu de microorganism utilizat în obținerea NP este *Shewanella oneidensis* MR-1, o bacterie Gram-negativă cu metabolism versatil, capabilă să reducă o gamă largă de compuși metalici (Beliaev și colab., 2001; Pirbadian și colab., 2014).

Interesul tot mai accentuat la nivel global pentru NPM biosintetizate reflectă necesitatea de a dezvolta soluții inovatoare și sustenabile pentru problemele complexe din domeniul medical, protecția mediului și industriile tehnologice avansate (Alsaba et al., 2020; Rafeeq et al., 2022; Haleem și colab., 2023). În contextul creșterii preocupărilor legate de impactul negativ al metodelor tradiționale de sinteză asupra mediului și sănătății umane, metodele biologice se impun drept alternative promițătoare, sigure și ecologice. Biosinteza NPM prin utilizarea microorganismelor și extractelor biologice nu doar minimizează folosirea agenților chimici toxici și a energiei intensive, dar oferă și o compatibilitate biologică ridicată a produselor finale, ceea ce le face ideale pentru aplicații biomedicale, farmaceutice și ecologice (Li și colab., 2017; Peng și colab., 2018).

Acest cadru conceptual amplu justifică dezvoltarea unor cercetări care să vizeze elucidarea mecanismelor biologice fundamentale implicate în biosinteza NPM, optimizarea condițiilor experimentale și a parametrilor de producție, precum și evaluarea eficacității, stabilității și siguranței nanomaterialelor obținute în condiții reale de utilizare.

În acest context, lucrarea de față se încadrează în această direcție de cercetare, abordând într-o manieră integrativă și multidimensională biosinteza nanoparticulelor de aur (Au), argint (Ag), platină (Pt) și paladiu (Pd) folosind tulpina bacteriana *Shewanella oneidensis* MR-1. Selecția acestei bacterii se bazează pe capacitatea sa naturală de reducere a ionilor metalici, făcând-o un model biologic atractiv și relevant pentru producția sustenabilă de nanomateriale.

CAPITOLUL I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1.1. Clasificarea generală a metodelor de sinteză a nanoparticulelor metalice

Sinteza nanoparticulelor metalice (NPM) reprezintă un domeniu central al nanotehnologiei moderne, cu implicații directe în dezvoltarea unor materiale funcționale avansate pentru aplicații biomedicale, catalitice, de mediu și industriale. Procesul de sinteză determină nu doar formarea nanoparticulelor, ci și dimensiunea, forma, distribuția, stabilitatea și funcționalitatea acestora, motiv pentru care alegerea metodei este un pas esențial în proiectarea materialului final (Iravani, 2011; Jeevanandam și colab., 2018).

Din punct de vedere conceptual, metodele de obținere a nanoparticulelor pot fi clasificate în două paradigme fundamentale: top-down și bottom-up.

Metodele top-down fragmentează materialele masive până la scară nanometrică prin procedee fizico-mecanice/litografice—frezare mecanică (ball milling), litografie cu fascicul de electroni, ablație laser—oferind acces la metale greu de sintetizat chimic și un control bun al purității, dar cu costuri ridicate, echipamente specializate, risc de contaminare abrazivă și, uneori, control limitat al mărimii/formei (Ng și colab., 2013; Heim, 2011). Prin contrast, bottom-up auto-asamblează specii atomice/ionice în nanoparticule prin reducere chimică/fizică/biologică—incluzând reacții redox în soluție, procese de vapori (depunere, evaporare—condensare) și sinteze verzi cu plante, bacterii, fungi sau enzime—permițând control superior al dimensiunii, formei și funcționalizării și acoperind o plajă largă de metale/alii (Amendola și Meneghetti, 2013; Iravani, 2014). În practică, metodele de sinteză se grupează în trei clase operaționale: fizice, chimice și biologice.

1.2. Metode fizice de sinteză

Metodele fizice de sinteză a NPM reprezintă una dintre cele mai vechi și studiate categorii de tehnici pentru obținerea nanomaterialelor. Aceste metode implică forțe fizice directe — precum căldură, radiații, presiune sau frecare — pentru a fragmenta materialele bulk

sau pentru a condensa vapori metalici în particule nanometrice. Fiind încadrate în general în paradigma „top-down”, ele permit obținerea de nanoparticule de înaltă puritate, fără implicarea reactivilor chimici potențial toxici (Jeevanandam și colab., 2018; Baig și colab., 2021).

1.3. Metode chimice de sinteză

Metodele chimice de sinteză reprezintă una dintre cele mai utilizate și studiate căi pentru obținerea NPM, datorită versatilității, scalabilității și controlului relativ precis asupra dimensiunii și formei particulelor. Aceste metode se bazează în principal pe reacții de reducere a ionilor metalici în soluție, în prezența unor agenți reducători și stabilizatori care previn aglomerarea și permit stabilizarea coloidală a nanoparticulelor formate (Iravani, 2011; Jeevanandam și colab., 2018). Principiul general al sintezei chimice presupune transformarea sărurilor metalice (de exemplu, AgNO_3 , HAuCl_4 , H_2PtCl_6 , PdCl_2) în atomi metalici zero-valenți (Ag^0 , Au^0 , Pt^0 , Pd^0), care ulterior generează nuclee ce cresc prin agregare și formează nanoparticule. Procesul se desfășoară în prezența a două componente esențiale, respectiv a agenților reducători (care asigură transformarea ionilor metalici în forma cristalină) și a agenților de stabilizare (capping agents) care se leagă de suprafața nanoparticulelor și previn aglomerarea sau reacțiile secundare (Schmidt, 2001; Arulmozhi și Mythili., 2013).

Una dintre cele mai mari limitări ale sintezei chimice este toxicitatea reactivilor reziduali, care pot persista pe suprafața nanoparticulelor chiar după spălări multiple. Acești compuși pot afecta celulele vii, induc stres oxidativ sau inflamație, ceea ce limitează utilizarea directă a nanoparticulelor în aplicații biomedicale fără funcționalizare suplimentară (Iravani, 2014; Siddiqi și Husen., 2016).

1.4. Sinteza biologică a nanoparticulelor

Spre deosebire de metodele convenționale, sinteza biologică nu necesită utilizarea de agenți reducători toxici sau solvenți organici periculoși. Aceasta se bazează pe capacitatea naturală a sistemelor biologice de a reduce metalele prin intermediul unor molecule bioactive

precum enzime, proteine, flavonoide, terpenoide, aminoacizi sau cofactori redox (Ahmad și colab., 2016; Khan și colab., 2017; El-Rafai, și colab., 2018). Procesul se desfășoară, de regulă, în condiții blânde de reacție, ceea ce prezintă un avantaj important pentru aplicații în biomedicină, farmacologie sau industria alimentară.

Bacteriile sunt capabile să sintetizeze nanoparticule fie intracelular, prin mecanisme enzimatice în citoplasmă sau perete celular, fie extracelular, prin secreția de compuși redox activi (He și colab., 2007; Irvani, 2011; Ardelean, 2015; Moisesescu și colab., 2014). Specii precum *Shewanella oneidensis* MR-1 (Burgos și colab., 2008), *Geobacter sulfurreducens* (Yates și colab., 2013), *Pseudomonas stutzeri* (Haefeli și colab., 1984; Hussein și colab., 2007) sau *Escherichia coli* (Attard și colab., 2012), *Stenotrophomonas maltophilia* (Nangia și colab., 2009) au fost documentate ca fiind eficiente în reducerea sărurilor metalice și în formarea nanoparticulelor de Ag, Au, Pd, Pt și ZnO.

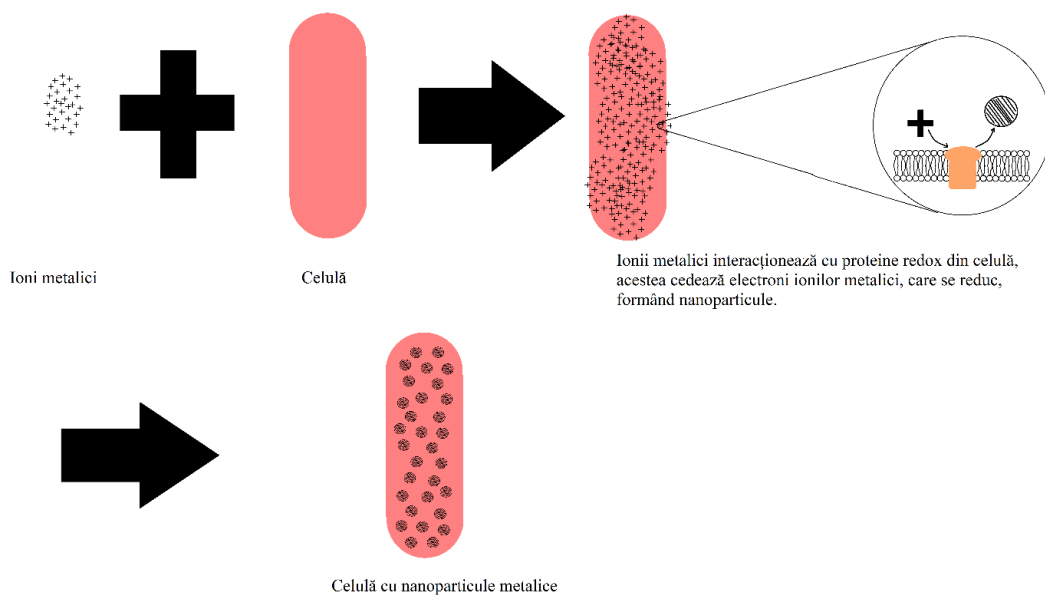


Figura 1. Sinteza NP prin intermediul celulelor bacteriene (McMillan și colab., 2012).

1.5. Mecanisme biologice implicate în formarea NPM

Sinteza biologică a NPM se bazează pe interacțiunea dintre ionii metalici și componentele celulare sau extracelulare ale organismelor vii, care determină reducerea, nucleația și stabilizarea particulelor la scară nanometrică. Există o serie de etape comune în

procesul de formare a NP biologice, atât în sinteza intracelulară, cât și în cea extracelulară (Iravani, 2011; Ahmad și colab., 2016).

Etapele generale ale sintezei biologice cuprind:

1. Interacțiunea ionilor metalici cu sistemul biologic prin introducerea acestora într-un sistem biologic activ (celule sau extracte), unde interacționează cu moleculele bioactive.
2. Reducerea ionilor metalici prin reacția cu molecule reducătoare de tip flavine, enzime, glutatation, proteine cu grupări tiol, care transformă ionii în atomi metalici (ex. $\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$).
3. Formarea și stabilizarea nanoparticulelor prin generarea de nuclee metalice care formează agregate stabilizate de moleculele biologice atașate de suprafață (ex. polizaharide, peptide, aminoacizi), care previn coalescența.

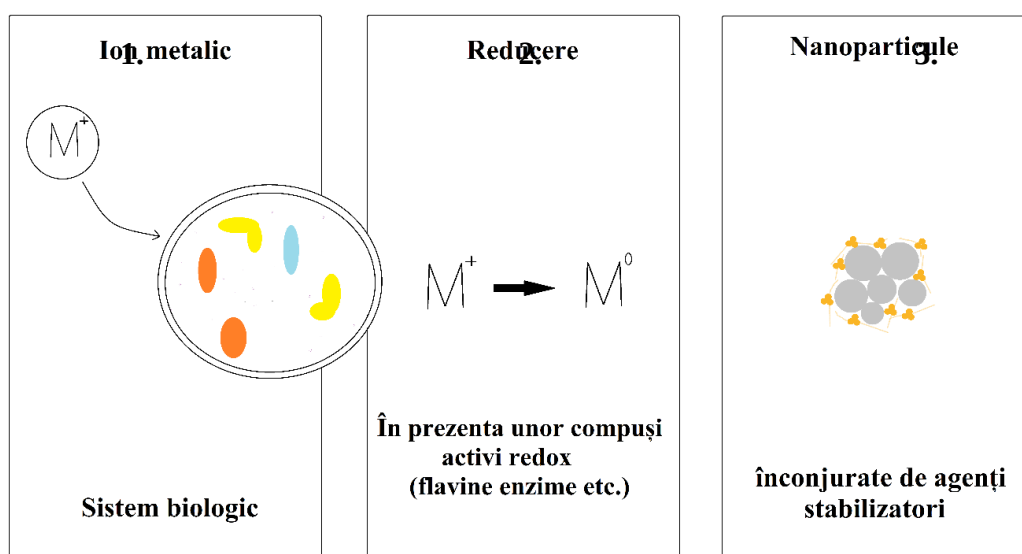


Figura 2. Etapele biosintezei nanoparticulelor metalice: (1) adsorbția ionilor metalici pe membrana celulară; (2) reducerea ionilor metalici în prezența unor compuși redox-activi; (3) formarea și stabilizarea nanoparticulelor (Das și colab., 2022).

În această lucrare se discută în special despre reducerea ionilor metalici prin mediatori redox secretați extracelular, în mediu, și despre reducerea ionilor prin procesul de respirație anaerobă

În procesul respirației anaerobe, e^- cedați de substratul organic oxidabil sunt preluați de catena de respirație celulară și sunt transferați unui acceptor final, care este fie un singur compus organic (ex. fumaratul), fie un compus oxigenat (ex. nitrat, sulfat, carbonat) sau ioni metalici. Transferul e^- de-a lungul catenei respiratorii este cuplat cu fosforilările oxidative membranare (Lazăr și colab., 2017).

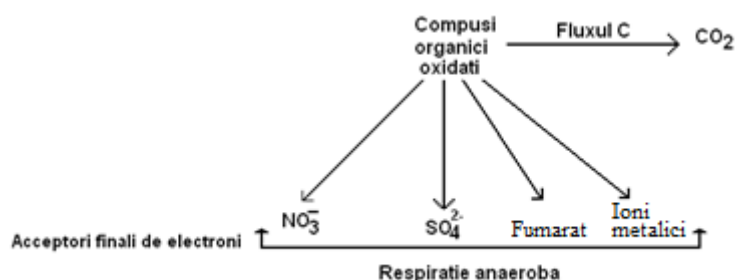


Figura 3. Acceptorii finali de electroni în respirația anaerobă. Catabolismul compușilor organici produce CO_2 (Lazăr și colab., 2017)

1.6. Tehnici moderne și hibride de sinteză

Pe măsură ce domeniul nanotehnologiei a evoluat, a apărut o nevoie tot mai stringentă pentru metode de sinteză care să combine avantajele strategiilor convenționale (chimice și fizice) cu sustenabilitatea și biocompatibilitatea sintezei biologice. Astfel, au fost dezvoltate metode moderne și hibride, în care principii din mai multe categorii sunt integrate pentru a obține NPM cu proprietăți fizico-chimice optimizate și funcționalitate avansată (Eze și Nwabor., 2020). Aceste tehnici emergente permit obținerea de nanoparticule cu dimensiuni controlate, stabilitate crescută, puritate ridicată și compatibilitate biologică, utilizând în același timp condiții experimentale mai blânde și procese mai ecologice (Iravani, 2014; Jeevanandam și colab., 2018;).

1.6.1. Sisteme hibride biochimice

O direcție importantă în sinteza NPM o constituie combinarea agenților biologici cu catalizatori chimici sau factori fizici (ex. temperatură, pH, lumină), pentru a spori viteza de

reacție, controlul dimensiunii și funcționalitatea suprafeței. Exemple ale acestora includ utilizarea extractelor vegetale în combinație cu căldură sau radiații UV pentru accelerarea sintezei (Zayadi și Bakar, 2020), utilizarea de bacterii sau fungi în prezența unor concentrații sub-letale de agenți reducători chimici (Narayanan și Sakthivel, 2010) sau reducerea parțială chimică urmată de stabilizare cu proteine biologice, pentru a obține nanoparticule cu dublă acoperire (chimică + biologică) (Ahmad și colab., 2016). Aceste metode permit reducerea cantității de reactivi chimici utilizați, îmbunătățind în același timp uniformitatea nanoparticulelor și stabilitatea coloidală.

1.6.2. Utilizarea mediului de cultură epuizat („spent medium”)

Un progres semnificativ în sinteza biologică a NPM este reprezentat de utilizarea mediului de cultură epuizat (supernatant) care conține metaboliți redox activi secretați de microorganisme (Saif, 2022; Boldt și colab., 2023). Această strategie este considerată o metoda inovatoare de sinteză extracelulară.

Beneficiile acestei abordări vizează eliminarea necesității menținerii viabilității celulare, evitarea contaminării bacteriene a nanoparticulelor și posibilitatea automatizării și scalării industriale (Eze și Nwabor, 2020). Un exemplu notabil este bacteria *Shewanella oneidensis* MR-1 al cărei mediu epuizat conține flavine și alte molecule redox care pot reduce ioni de Ag^+ , Au^{3+} , Pd^{2+} și Pt^{4+} , generând nanoparticule stabile și biologic active (Marsili și colab., 2008; Pirbadian și colab., 2014).

1.6.3. Sinteza asistată de lumină

Unele sinteze biologice ale NPM pot fi stimulate sau accelerate de expunerea la lumină, în special în prezența compușilor fotosensibili (flavine, clorofile, polifenoli). Această tehnică implică activarea moleculelor cu rol redox sub lumină albă sau UV, generarea de electroni sau specii reactive de oxigen care reduc ionii metalici și controlul asupra formei și dimensiunii nanoparticulelor prin ajustarea intensității și duratei iluminării (Thatoi și colab., 2016; Hunag și colab., 2019).

1.7. Considerații privind scalabilitatea, costul și sustenabilitatea metodelor de sinteză a NPM

În contextul aplicării nanomaterialelor la scară largă, alegerea metodei de sinteză a NPM trebuie să țină cont nu doar de eficiența științifică și de calitatea produsului final, ci și de posibilitatea de scalare industrială, costurile asociate și impactul asupra mediului. Aceste aspecte devin critice mai ales în industrii precum biomedicina, farmaceutica, cosmetica și remedierea mediului, unde siguranța, fiabilitatea și sustenabilitatea sunt esențiale (Iravani, 2011; Jeevanandam și colab., 2018).

Ținând cont de costurile echipamentelor, reactivilor și al etapelor de operare și purificare (Singh și colab 2002; Iravani, 2014; Thanh și colab., 2014; Hasan, 2015; Balachandran și colab., 2022; Hachem și colab., 2022), aplicarea metodelor fizice, chimice sau biologice pentru obținerea NPM poate duce la costuri totale foarte diferite (Tabel 1).

Tabelul 1. Analiza costurilor celor trei categorii de sinteze a nanoparticulelor

Tip metodă	Cost echipamente	Cost reactivi	Cost operare	Cost purificare	Total estimat
Fizică	Foarte ridicat	Scăzut	Ridicat	Redus	Foarte ridicat
Chimică	Mediu	Ridicat	Mediu	Ridicat	Ridicat
Biologică	Redus	Scăzut	Scăzut	Redus	Redus–mediu

Astfel, implicarea echipamentelor scumpe în cazul metodei fizice determină costuri foarte ridicate pentru utilizarea acestei metode, în timp ce cheltuielile medii și ridicate în cazul metodei chimice pentru toate etapele conduc la costuri relativ ridicate, deși mai scăzute decât pentru metoda fizică (Tabel 1). În schimb, sinteza biologică, în special cu extracte vegetale sau bacterii nepatogene, este asociată cu costuri reduse, datorită utilizării de materii prime naturale, disponibilității largi a agenților reducători biologici și necesarului energetic redus (Sharma și colab., 2012; Veisi și colab., 2017).

1.8. Utilizarea bacteriilor în sinteza NPM

În comparație cu plantele sau fungii, bacteriile prezintă avantaje importante în procesele de biosinteză care includ un timp de reacție mai scurt datorită ciclului de viață rapid, ușurința în manipularea genetică, care permite modificarea traiectoriilor metabolice pentru optimizarea sintezei, capacitatea de a crește, rapid, în medii de cultură diverse, inclusiv în condiții extreme (anaerobioză, săruri metalice toxice) și posibilitatea sintezei intracelulare și extracelulare, oferind flexibilitate în alegerea metodei de procesare ulterioară (Qamar și Ahmad 2021).

De asemenea, numeroase specii bacteriene dispun de mecanisme naturale de rezistență la metale grele, care includ transformarea ionilor metalici în forme mai puțin solubile sau toxice mediată de acumularea intracelulară sau precipitarea extracelulară sub formă de NP (Beliaev și Saffarini., 1998). Aceste abilitati au fost valorificate pentru sinteza diverselor NPM precum cele de argint (NP-Ag), aur (NP-Au), platină (NP-Pt), paladiu (NP-Pd), zinc (NP-ZnO), cupru (NP-CuO) și seleniu (NP-Se) (Iravani, 2014).

Sinteza bacteriană poate fi intracelulară, în care NP sunt formate în interiorul celulei, adesea prin reducere enzimatică sau captare metalică în peretele celular, sau *extracelulară*, în care NP se formează în mediul de cultură, ca urmare a secreției de metaboliți redox activi (enzime, flavine, proteine) (Hasan, 2015).

Sinteza extracelulară este, în general, preferată pentru aplicații industriale, deoarece elimină necesitatea distrugerii biomasei pentru extracția NP, reducând astfel costurile de procesare și facilitând purificarea (Eze și Nwabor, 2020).

Utilizarea bacteriilor nu este limitată doar la sinteza NPM, ci se extinde și la funcționalizarea acestora, prin prezența biomoleculelor de suprafață (ex. polizaharide, glicoproteine), care oferă stabilitate coloidală și pot servi ca platforme pentru legarea țintită în aplicații biomedicale (Dykman și Khlebtsov, 2012; Kora și Rastogi, 2015;).

Astfel, bacteriile reprezintă un sistem biosintetic complex și versatil, care oferă o combinație unică de eficiență biologică, sustenabilitate și posibilitate de control al procesului de sinteză a diferitelor NPM, fiind totodată esențiale în dezvoltarea acestei direcții nanotehnologice verzi, de utilizare de metode nepoluante.

Spre deosebire de metodele fizico-chimice convenționale, sinteza bacteriană a NPM se desfășoară în condiții blânde de temperatură și pH, nu necesită solvenți toxici și oferă produse

stabile, funcționalizate natural de componente celulare. Aceste avantaje plasează biosinteza bacteriană în centrul cercetărilor actuale privind nanotehnologia verde.

1.9. Bacterii model utilizate în sinteza NPM

Datorită adaptabilității lor metabolice și capacității de a interacționa cu metale grele, bacteriile au fost din ce în ce mai studiate și utilizate ca platforme biologice pentru sinteza de NPM. Diversitatea fiziologică și biochimică a bacteriilor permite utilizarea lor atât în sinteze intracelulare, cât și extracelulare, iar capacitatea lor de a reduce metale toxice în forme inerte sau funcționale le conferă un avantaj semnificativ față de alte sisteme biologice (Narayanan și Sakthivel, 2010; Iravani, 2011).

Multe specii bacteriene au fost validate experimental ca fiind eficiente în biosinteza NPM (Iravani, 2014): *Aeromonas* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium thermoaceticum*, *Corynebacterium* sp., *Desulfobacteraceae*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfovibrio magneticus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Geobacillus* sp., *Geovibrio ferrireducens*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella pneumonia*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Magnetospirillum magnetotacticum*, *Nocardiopsis* sp., *Plectonema boryanum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas capsulata*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Serratia nematodiphila*, *Shewanella algae*, *Shewanella putrefaciens*, *Thermoanaerobacter ethanolicus* etc. Acestea sunt denumite adesea „bacterii model”, deoarece au fost intens caracterizate și oferă mecanisme bine înțelese de reducere a ionilor metalici.

Genul *Shewanella* este intens studiat pentru sinteza NPM datorită transferului extracelular de electroni (EET) și capacității de a reduce ioni metalici diverși, inclusiv Fe^{3+} , Mn^{4+} , U^{6+} , Ag^+ , Au^{3+} , Pd^{2+} și Pt^{4+} (Kotloski și Gralnick, 2013; Pirbadian și colab., 2014; Egan-Morriss și colab., 2022). Dintre specii, *Shewanella oneidensis* MR-1, Gram-negativă, facultativ anaerobă, nepatogenă și metabolic versatilă, este modelul preferat (Rajput și colab., 2021; Yu și colab., 2022). Reducerea metalelor este mediată de rețele EET bazate pe citocromi multihemici periplasmici și de membrană externă (MtrA/MtrB/MtrC, OmcA, CymA)

și porine specializate (MtrB), care fac legătura între metabolismul respirator și acceptorii metalici extracelulari (Beliaev și colab., 2001; Beliaev și Saffarini, 1998; Maier și Myer, 2004; Shi și colab., 2007, 2016; Coursolle și Gralnick, 2012; Fonseca și colab., 2021; Paquette și colab., 2023). Flavinele secretate—riboflavină și FMN—acționează ca mediatori redox, inițiază nuclearea și stabilizează NP, rol demonstrat electrochimic (von Canstein și colab., 2008; Marsili și colab., 2008; Kotloski și Gralnick, 2013). Producția în „spent medium” oferă purificare facilă și scalabilitate (Khan și colab., 2020; Boldt și colab., 2023). Localizarea NP variază în funcție de condiții și metal: localizare extracelulară; pe peretele celular/periplasmă; sau intracelular (Shi și colab., 2016; Kato și colab., 2012; Ghosh și colab., 2021; Chavez și colab., 2025; Klaus și colab., 1999).

1.10. Aplicații ale NP sintetizate de *S. oneidensis* în diverse domenii

S. oneidensis MR-1 posedă un set complex și bine reglat de mecanisme de reducere a metalelor, care includ lanțuri respiratorii extinse, secreție de mediatori redox extracelulari și adaptări structurale ale membranei (Rajput și colab., 2021). Aceste caracteristici îi conferă un rol cheie în sinteza NPM într-un mod sustenabil, controlat și reproductibil. Înțelegerea acestor mecanisme oferă o bază solidă pentru valorificarea acestei bacterii în aplicații industriale și biomedicale ale nanotehnologiei verzi.

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

Scopul tezei este explorarea potențialului redox al tulpinii bacteriene *S. oneidensis* MR-1 pentru producerea de NP de metale nobile. Studiul s-a axat pe trei direcții de cercetare vizând (1) obținerea NPM prin utilizarea atât a culturilor bacteriene, cât și a mediului celular epuizat („spent medium”), (2) optimizarea proprietăților redox ale bacteriei *S. oneidensis* MR-1 prin inducerea de mutații în genele responsabile de procesele redox și (3) evaluarea potențialului antioxidant, antimicrobian și de reducerea a coloranților organici.

Obiectivele generale ale cercetării au fost astfel definite încât să reflecte complexitatea și natura interdisciplinară a subiectului abordat, precum și problemele actuale ale protocoalelor deja existente:

- Obținerea NPM (Au, Ag, Pt, Pd) utilizând cultura bacteriană *S. oneidensis* MR-1 și mediul epuizat („spent medium”) rezultat în urma creșterii acestei bacterii;
- Analiza comparativă a expunerii la lumină versus întuneric în biosinteza NP;
- Caracterizarea NP biosintetizate prin tehnici avansate precum spectroscopia UV-Vis, microscopia electronică de transmisie (TEM) și imagistică hiperspectrală (HSI);
- Obținerea unor celule mutante îmbunătățite redox, care ar putea fi folosite în viitoare experimente;
- Evaluarea aplicabilității NPM biosintetizate în ecologie, prin reducerea coloranților organici;
- Testarea activității antimicrobiene și antioxidante ca direcții viitoare de explorat în medicină.

Prin atingerea acestor obiective, lucrarea își propune să contribuie la dezvoltarea unui cadru biotehnologic robust și durabil, capabil să producă nanomateriale eficiente și sigure, cu un impact pozitiv asupra mediului și a sănătății umane.

CONTRIBUȚII PERSONALE

CAPITOLUL II – MATERIALE ȘI METODE

2.1. Tulpini bacteriene utilizate

S. oneidensis MR-1 (LMG 19005), *Escherichia coli* WM3064, *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

2.2. Cultivarea tulpinilor bacteriene

Tulpina *S. oneidensis* MR-1 (LMG 19005) a fost pre-cultivată aerob în 250 ml de mediu LB (Kim și colab., 2017), conținând extract de drojdie (5 g/L), clorură de sodiu (10 g/L) și triptonă (10 g/L).

Tulpinile de *E. coli* WM3064 și *S. oneidensis* MR-1 utilizate pentru obținerea de mutante cu proprietăți redox îmbunătățite au fost cultivate la 37°C și respectiv 30°C în mediu LB suplimentat cu kanamicină (50 μg/mL) în cazul *E. coli*, în condiții de agitare la 150 rpm.

Tulpinile utilizate pentru testarea efectului antibacterian (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538) au fost cultivate în mediul LB timp de 24 ore la 37°C, cu agitare la 200 rpm.

2.3. Biosinteza NPM prin procesul de respirație anaerobă

În experimentele efectuate, acceptorii finali de electroni în procesul de respirație anaerobă a fost reprezentat de ionii de Pt, Pd și Au.

Biomasa bacteriană, obținută utilizând mediu LB, a fost spălată cu soluție de bicarbonat, prin centrifugare și resuspendare și incubată în soluție tampon cu lactat de sodiu sau formiat de sodiu, după caz, cu ionii metalici de interes, în condiții de anaerobioză, în condiții de întuneric sau de lumină, în funcție de experiment.

2.4. Sinteza NP-Ag utilizând mediul epuizat de *S. oneidensis* MR-1

Celulele de *S. oneidensis* au fost cultivate pe mediu LB, o perioadă mai îndelungată de timp, până la 7 zile. S-au îndepărtat celulele din mediu prin centrifugare și filtrare, urmând ca în acesta să se adauge AgNO₃, și să fie incubat la lumină sau la întuneric, după caz.

2.5. Spectrofotometrie UV-VIS

Biosinteza NP-Pt a fost monitorizată cu ajutorul unui spectrofotometru Specord 210 Plus (Analytik Jena) în intervalul de absorbție 220–800 nm în cuve UV-Vis cu o lungime a traseului optic de 1 cm.

2.6. Spectrofluorimetrie

Spectrele de fluorescență ale nanoparticulelor de Pt sintetizate au fost determinate cu ajutorul unui spectrofluorimetru FP8300 (Jasco), utilizând următorii parametri: PMT 500 V, Ex 335 nm, domeniul spectral al fluorescenței înregistrate (λ_{em}): 350–500 nm la 350-500.

2.7. Microscopie electronică de transmisie (TEM)

Celulele de *S. oneidensis* MR-1, cu NPM, au fost fixate peste noapte la 4°C în PBS cu 2,5% glutaraldehidă, apoi deshidratate într-o serie de etanol (10, 30, 50, 70, 90 și de două ori 100%, fiecare schimbare durând 15 minute), acest proces fiind urmat de vizualizarea la TEM.

Pentru determinarea dimensiunii și formei NPM extrase conform metodei descrise în secțiunea 2.7.1, acestea au fost pregătite pentru vizualizarea la TEM, prin dispersarea lor în apă ultrapură (MilliQ).

2.8. Microscopia în câmp întunecat și imagistica hiperspectrală (DMHI)

Celulele au fost pregătite la fel ca pentru TEM (fixate cu glutaraldehidă 2,5% și deshidratate cu soluții seriale de etanol), apoi au fost examinate folosind un obiectiv de imersie în ulei de 100X.

2.9. Analiza statistică a formei și dimensiunii NPM

Analiza dimensiunii și formei NPM s-a efectuat utilizând software-ul ImageJ (<https://imagej.net/ij/>). Procedura a constat în: (i) digitalizarea conturilor NPM, (ii) calcularea diametrului fiecărei particule ca medie aritmetică între lungime și lățime și (iii) determinarea factorului de formă (raportul lățime/lungime, W/L), valorile apropiate de 1 indicând particule sferice, iar valorile mai mici sugerând forme alungite sau neregulate.

2.10. Obținerea mutantelor de *S. oneidensis* MR-1

În cadrul studiului, pentru îmbunătățirea capacității redox a bacteriei *S. oneidensis* MR-1 au fost obținute mutante prin introducerea de mutații aleatorii în genele codificând citocromii implicați în transferul extracelular de electroni (EET), respectiv *mtrC*, *omcA* și *cymA*.

REZULTATE

CAPITOLUL III - BIOSINTEZA NANOPARTICULELOR METALICE CU *SHEWANELLA ONEIDENSIS* MR-1

3.1 Obținerea NPM cu *S. oneidensis* MR-1 prin procesul de respirație anaerobă

3.1.1. Biosinteza și caracterizarea NP-Pd

Reducerea Pd(II) la Pd(0) de către *Shewanella oneidensis* MR-1 este sugerată vizual prin tranziția culorii suspensiei celulare de la roz la maro deschis (24 h) și apoi maro închis (72 h), indicând și accelerarea reducerii în timp; observațiile au fost coroborate prin UV-Vis și fluorimetrie. Pentru analize spectrale fiabile, extracția NP din biomasa celulară este necesară, deoarece celulele intacte distorsionează spectrele. În UV-Vis, soluția de PdCl₂ 1 mM prezintă un maxim la ~400 nm (Pd(II)), în timp ce suspensia de NP-Pd arată absorbție globală scăzută și absența vârfului la 400 nm, sugerând reducerea Pd(II) la Pd(0), în acord cu literatura (Sriramulu și Sumathi, 2018; Veisi și colab., 2017).

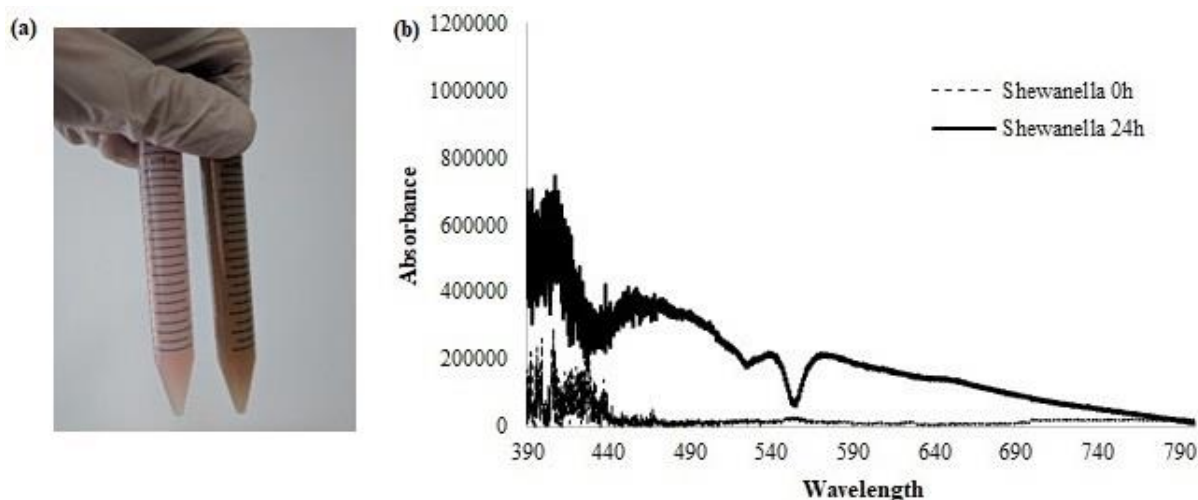


Figura 4. a) Aspectul celulelor de *S. oneidensis* MR-1 cultivate anaerob, în absența (stânga) și în prezența (dreapta) de Pd(II). b) Spectrele UV-Vis ale celulelor de *S. oneidensis* MR-1 cultivate anaerob în prezența Pd(II), la momentul inițial (0 ore) și după 24 de ore.

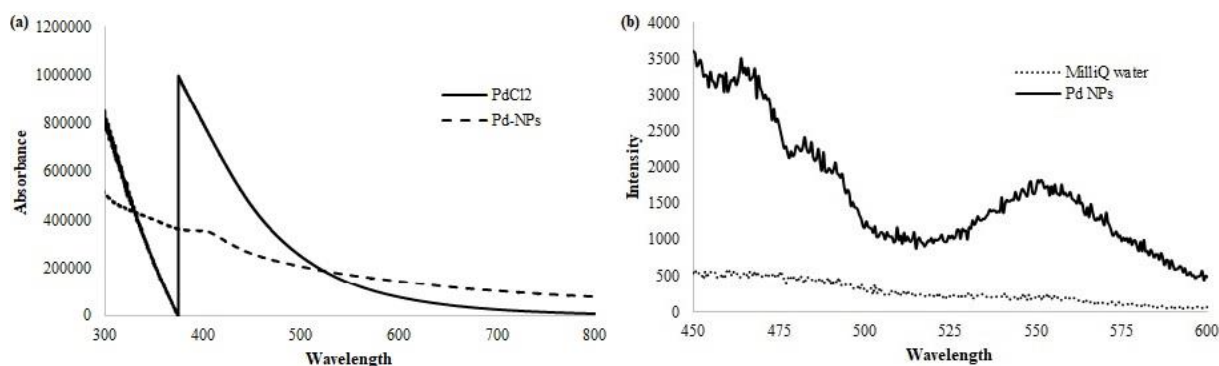


Figura 5. (a) Spectre UV-VIS și (b) spectre fluorimetrice ale unei soluții apoase de NP-Pd extrase din *S. oneidensis* MR-1, comparate cu spectrul soluției de PdCl₂ și cu cel al apei deionizate, respectiv.

Fluorimetric, spectrele NP-Pd izolate diferă clar de matricea apoasă și de PdCl₂ ; la excitație 260 nm (500 V), PdCl₂ prezintă o emisie îngustă la ~521 nm, distinctă ca poziție și intensitate față de emisia NP-Pd (Li și colab., 2015; 2017). Pentru comparație, nanoclusterele Pd sintetizate chimic au λ_{exc} maxim ~420 nm și λ_{em} optim ~500 nm (Peng și colab., 2018). Sunt necesare caracterizări suplimentare (de ex. TEM) pentru a corela emisia cu dimensiunea și forma NP-Pd produse de *S. oneidensis* MR-1.

Microscopul cu camp întunecat îmbunătățit hiperspectral (HEDFM) evidențiază NP-Pd biosintetizate de *S. oneidensis* MR-1 predominant la exteriorul celulei și asociate cu membrana, ca pete luminoase—indicând un rol al proteinelor extracelulare/legate de membrană în reducerea Pd(II) (Ng și colab., 2013). Localizarea observată concordă cu literatura: NP <10 nm în periplasm; NP ≥50 nm aderente la membrana externă (de Windt și colab., 2005; Dundas și colab., 2018). Analiza hiperspectrală pe celule alese aleator arată diferențe clare: celulele martor au un maxim ~600 nm, în timp ce celulele cu NP-Pd prezintă o bandă mai largă cu maxim 450–500 nm și un umăr ~600 nm, mai pronunțat la martor—modificări compatibile cu formarea/atașarea NP-Pd (Fig. 6a–c).

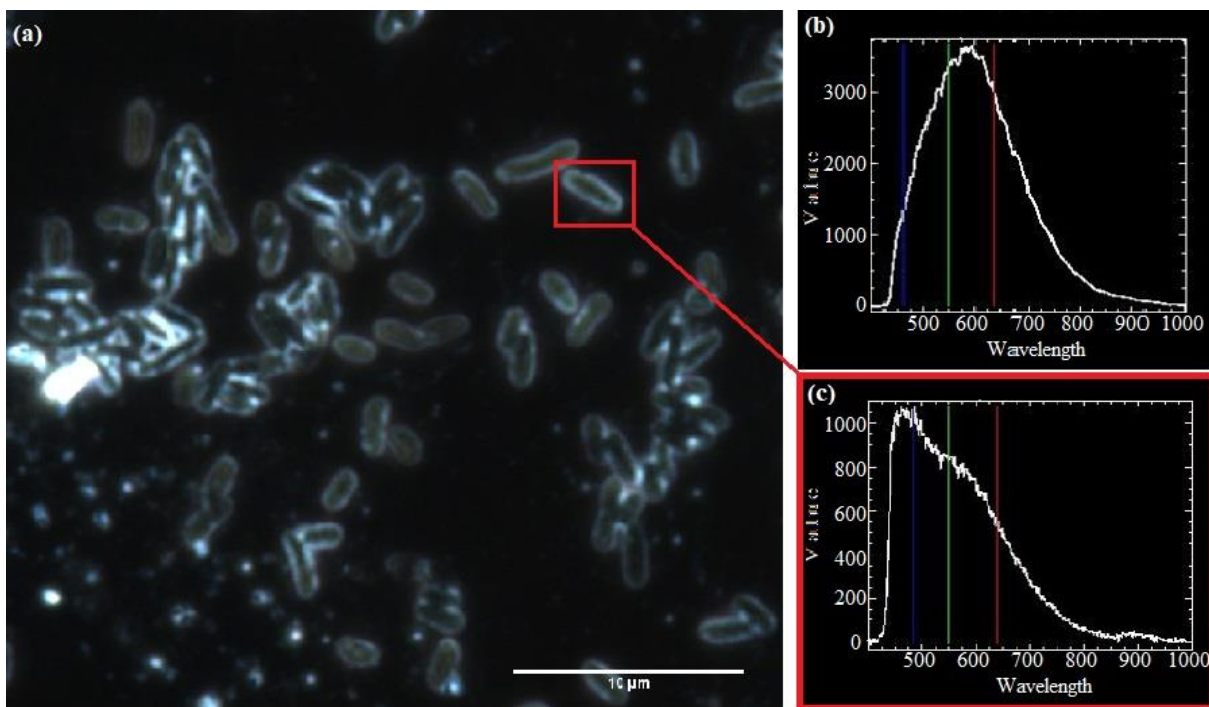


Figura 6. (a) Imagine hiperspectrală în câmp întunecat îmbunătățit a celulelor bacteriene cu NP-Pd; (b) Spectrul celulelor de control și (c) al celor cu NP-Pd.

3.1.2. Biosinteza și caracterizarea NP-Pt

Protocolul pentru NP-Pd a fost adaptat la platina(IV), folosind *S. oneidensis* MR-1. Formarea NP-Pt a fost indicată vizual prin trecerea culorii suspensiei din galben-pal la negru și, după centrifugare, a biomasei din roz la maro-negricios—nuanță tipică pentru Pt(0) (Fig. 7a). Evoluția procesului a fost urmărită prin creșterea absorbției pe parcursul a 10 zile (Fig. 7b); deși bio-reducerea a fost mai lentă decât în alte studii (probabil din cauza urmelor de O_2), celulele au redus și depozitat NP-Pt în prezența formiatului ca donator de electroni. Martorii nu au prezentat modificări de culoare, sugerând absența sintezei de NP-Pt.

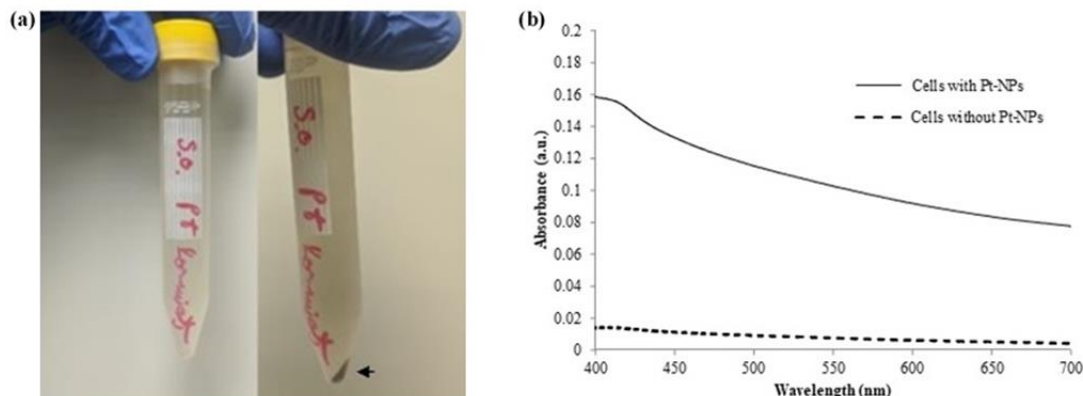


Figura 7. (a) *S. oneidensis* MR-1 în tampon bicarbonat cu 1 mM H_2PtCl_6 la începutul experimentului (stânga) și după 10 zile (dreapta). (b) Spectrele de absorbție ale celulelor cu și fără NP-Pt în tampon bicarbonat, după 10 zile de incubare.

Reducerea $\text{Pt(IV)} \rightarrow \text{Pt(0)}$ a fost monitorizată UV-Vis: soluția H_2PtCl_6 prezintă un maxim ~ 260 nm (Pt(IV)), iar dispariția acestuia în suspensia de NP-Pt indică formarea Pt(0) (Nishanthi și colab., 2019; Riddin și colab., 2010; Charde și colab., 2023) (Fig. 8a). Fluorimetric, cu FP8300 (PMT 500 V, Ex 335 nm, 350–500 nm), apa are un vârf ~ 380 nm, iar NP-Pt arată o intensificare a emisiei între 390–430 nm, cu maxim ~ 430 nm (Fig. 8b). Comportamentul este coerent cu literatura: NP de Pt afișează de regulă o bandă plasmonică slabă în UV (≈ 200 – 280 nm, ca „shoulder”), în timp ce particulele ultrasml (< 2 nm) pot emite intens în albastru (≈ 400 – 480 nm), ceea ce explică creșterea observată 390–490 nm (Demishkevich și colab., 2023; Wang și colab., 2022; Chu și colab., 2025).

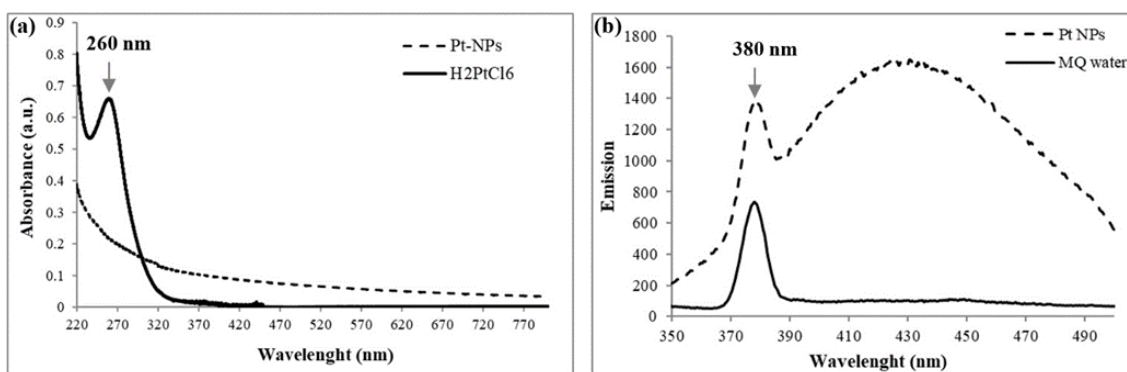


Figura 8. (a) Spectrul UV-VIS al soluției H_2PtCl_6 care prezintă absorbanța maximă caracteristică la 260 nm și spectrul de absorbție al NP-Pt extrase. (b) Emisia plasmonică a NP-Pt.

Analiza spectrală evidențiază diferențe clare între martor și celule platinizate: martorul prezintă un vârf mai pronunțat ~600 nm, în timp ce celulele cu NP-Pt afișează o bandă lărgită cu maxim 600–700 nm și un „umăr” la 500–600 nm (Fig. 9b–c). Împreună cu UV–Vis/fluorimetrie și TEM, datele confirmă reducerea Pt(IV)→Pt(0) în tampon bicarbonat, cu formiat drept donor de electroni. Pentru validare structurală și compozițională completă sunt necesare HR-TEM, SAED, EDS și XRD.

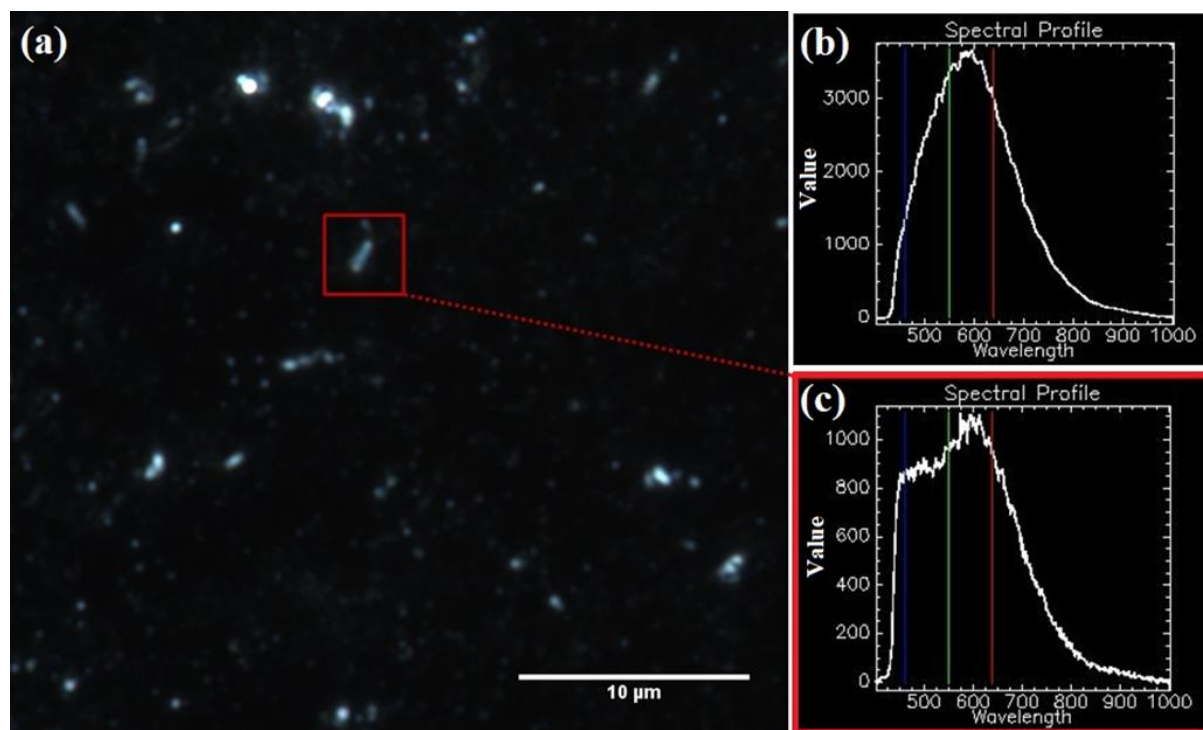


Figura 9. (a) Imagine hiperspectrală îmbunătățită în câmp întunecat a celulelor bacteriene cu NP-Pt; (b) Graficul spectrului bacteriilor de control (fără NP) și (c) al celulei cu NP-Pt .

După cum se arată, imaginea TEM prezentată în Fig. 10a, *S. oneidensis* MR-1 este o bacterie de formă cilindrică, având aproximativ 0.4 μm lățime și 1.7 μm lungime.

În urma expunerii celulelor la soluția de H₂PtCl₆, culoarea a virat spre negru, datorită formării NP-Pt pe suprafața acestora.

În scopul mai bune observări a dimensiunii și formei NP-Pt, o parte din ele au fost extrase de pe celule și vizualizate la TEM în câmp luminos și întunecat. Figura 10b și c arată un grup de nanoparticule aproape sferice, cu dimensiuni între 15 și 65 nm, și un diametru mediu de 36 nm (Fig. 10a insert). Comparând imaginea în câmp luminos din Fig. 10b cu echivalentul său în câmp întunecat din Fig. 10c, NP apar ca pete individuale mult mai luminoase, ca monodisperse și cristale discrete, revelând natura cristalină a NP-Pt extrase.

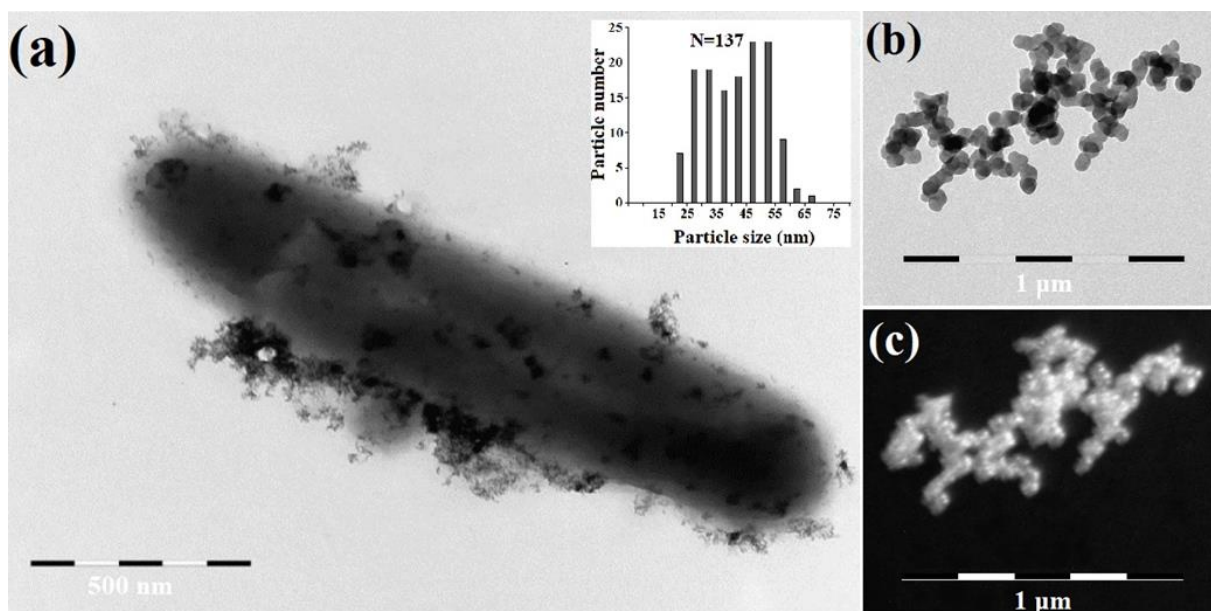


Figura 10. Evidențierea NP-Pt prin microscopie TEM. (a) Imagine TEM în câmp luminos a unei celule de *S. oneidensis* MR-1 după expunerea la o soluție apoasă de 1 mM $\text{H}_2 \text{PtCl}_6$. NP-Pt apar sub forma unor agregate electronodense (de culoare neagră) atașate de suprafața celulei. Distribuția dimensiunilor NP-Pt extrase (insert). (b) Imagine TEM a nanoparticulelor NP-Pt în câmp luminos; (c) imagine TEM corespunzătoare în câmp întunecat a NP-Pt bio-sintetizate.

3.2. Efectul luminii asupra sintezei de NPM.

Un factor important care poate avea efect asupra activității enzimelor implicate în procesul de reducere al metalelor este lumina (Huang și colab., 2019).

Iluminarea cu lumină albă (400–700 nm) a accelerat și intensificat formarea NP-Au, NP-Pd și NP-Pt comparativ probele păstrate la întuneric. După 24 de ore la lumină, probele cu aur au devenit roz, iar cele cu paladiu și platină au început să se înnegrească, în timp ce la întuneric modificările au apărut abia după 48 de ore. La șase zile, probele la lumină prezentau pentru aur o colorație mov închis, iar pentru paladiu și platină o colorație neagră; în întuneric, aurul a rămas roz deschis, doar o probă cu platină a devenit neagră, iar paladiul s-a înnegrit mai puțin intens. Aceste diferențe cromatice indică o reducere metalică mai eficientă în prezența luminii și confirmă formarea nanoparticulelor (Amendola și colab., 2017; He și colab., 2005).



Figura 11. Examinarea vizuală a virării culorii după 144 h de incubare a probelor de (a) Pt la întuneric; (b) Pt la lumină; (c) Au la lumină; (d) Au la întuneric; (e) Pd la lumină; (f) Pd la întuneric; (g) Pt la momentul inițial; (h) Au la momentul inițial (i) Pd la momentul inițial.

Măsurătorile UV–Vis evidențiază diferențe clare între probele cu celule și martorii anorganici, confirmând formarea nanoparticulelor doar în prezența *S. oneidensis* MR-1. Pentru paladiu, probele cu celule prezintă o bandă pronunțată la 390–400 nm, specifică NP-Pd, cu intensitate mai mare în condiții de lumină (≈ 740000 a.u.) decât la întuneric (≈ 680000 a.u.), ceea ce indică o formare mai abundentă a particulelor sub iluminare (Kalu și colab., 2012; Ganesan și Ramasubbu, 2015; Koduru și colab., 2017). Pentru platină, vârful caracteristic soluției de $\text{H}_2 \text{PtCl}_6$ la $\sim 260\text{--}265$ nm este prezent la T0 dar se aplatizează în probele incubate la lumină, semnalând reducerea Pt(IV) la Pt(0), în timp ce la întuneric rămâne parțial, ceea ce indică o reducere incompletă (Georgieva și Andonovsky, 2003). Pentru aur, probele incubate la lumină prezintă un maxim plasmonic deplasat la ~ 565 nm, compatibil cu dependența de mărime și morfologie a rezonanței plasmonice de suprafață, pe când la întuneric nu se observă bandă distinctă—probabil din cauza unei concentrații mai scăzute de NP-Au (He și colab., 2005; Chen și colab., 2008a; Amendola și colab., 2017).

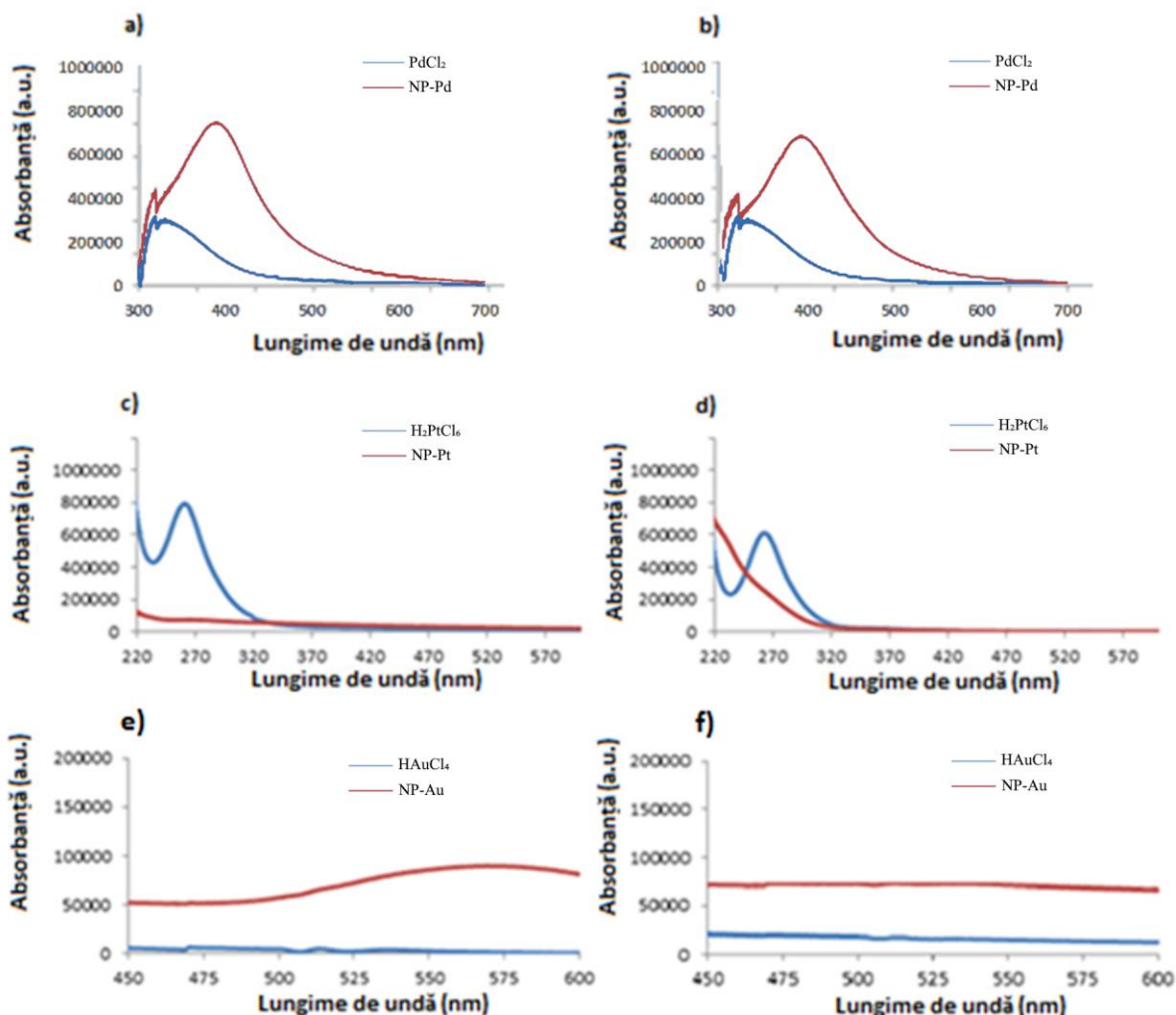


Figura 12. Spectrul de absorbție UV-Vis (a) al soluției de Pd incubată la lumină și (b) la întuneric, (c) al soluției de Pt incubată la lumină și (d) la întuneric și (e) al soluției de Au incubată la lumină, respectiv (f) la întuneric, față de soluțiile martor la momentul inițial.

Din Figura 13a, b se poate observa că atât în cazul celulelor cu Pt, expuse la lumină, cât și în cazul celor incubate la întuneric, NP sintetizate se află localizate pe membrana celulară externă, internă, precum și în spațiul periplasmic. Probe incubate cu Pd la lumină (Fig. 13e) au prezentat o localizare a NP preponderent pe membrana celulară. Această distribuție este asemănătoare cu cea observată și în cazul NP de Pt și Au. În ceea ce privește NP-Pd sintetizate în întuneric (Fig. 13f), s-a constatat o distribuție diferită, cu un număr mai redus de NP pe unitatea de suprafață, dar cu dimensiuni medii mai mari comparativ cu cele obținute la lumină. Aceste diferențe între rezultatele obținute la întuneric sau la lumină, ar putea fi atribuite aceluiași

mecanism implicat în reducerea ionilor de aur la lumină de către *S. oneidensis* MR-1 descris de Huang și colab. (2019).

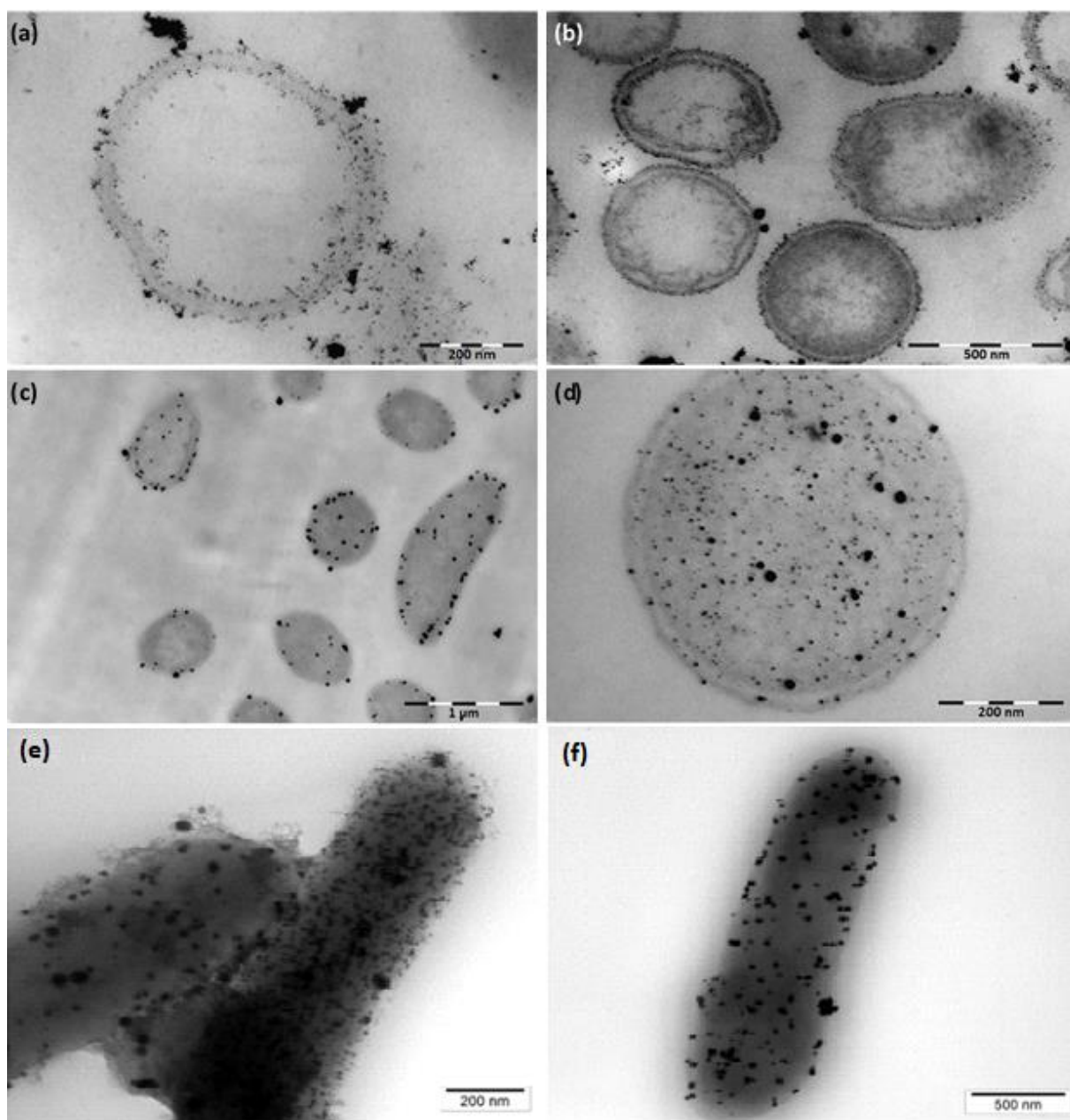


Figura 13. Imagini TEM ale celulelor de *S. oneidensis* MR-1 din probele (a) Pt lumină; (b) Pt întuneric; (c) Au lumină; (d) Au întuneric.

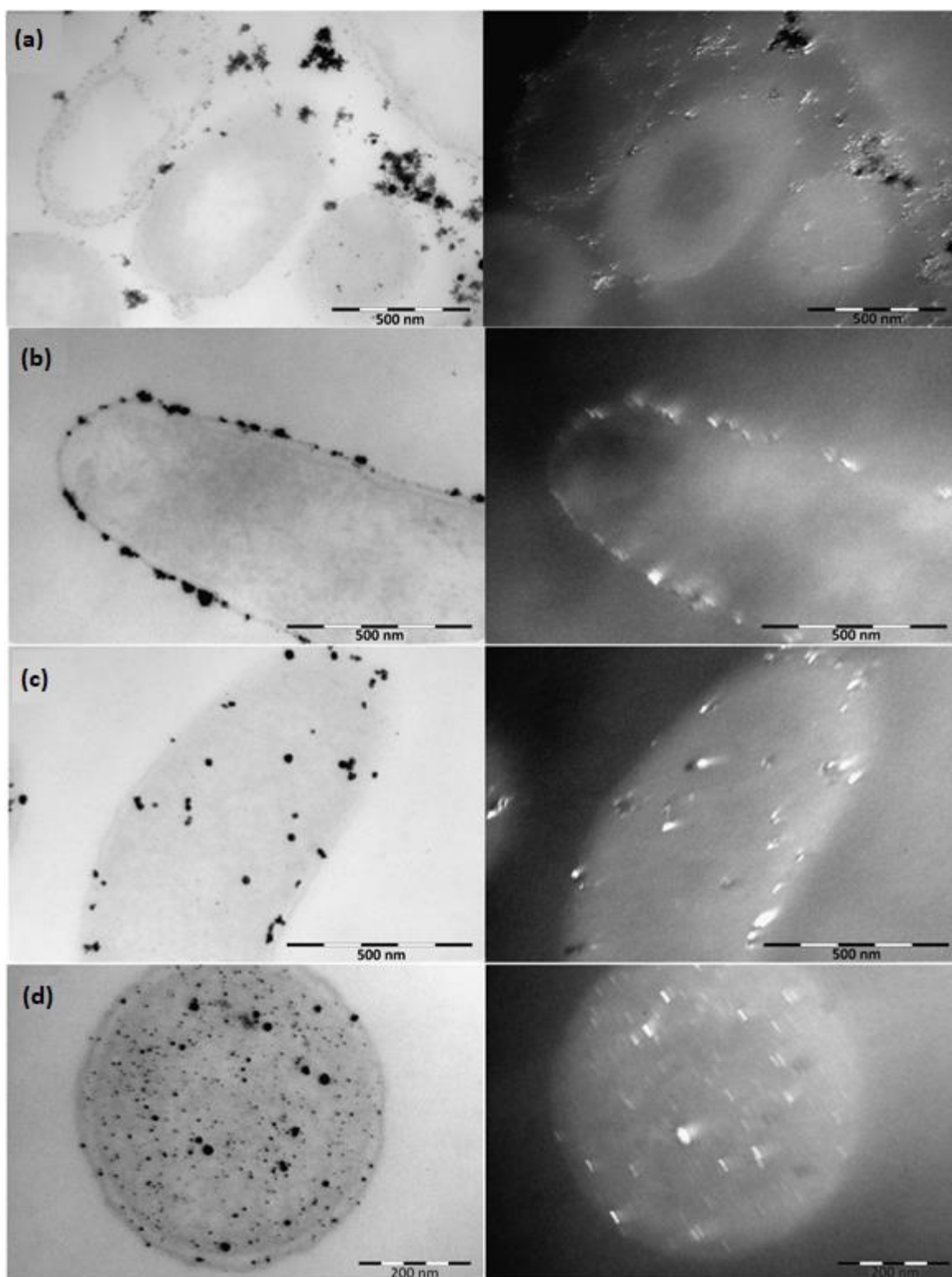
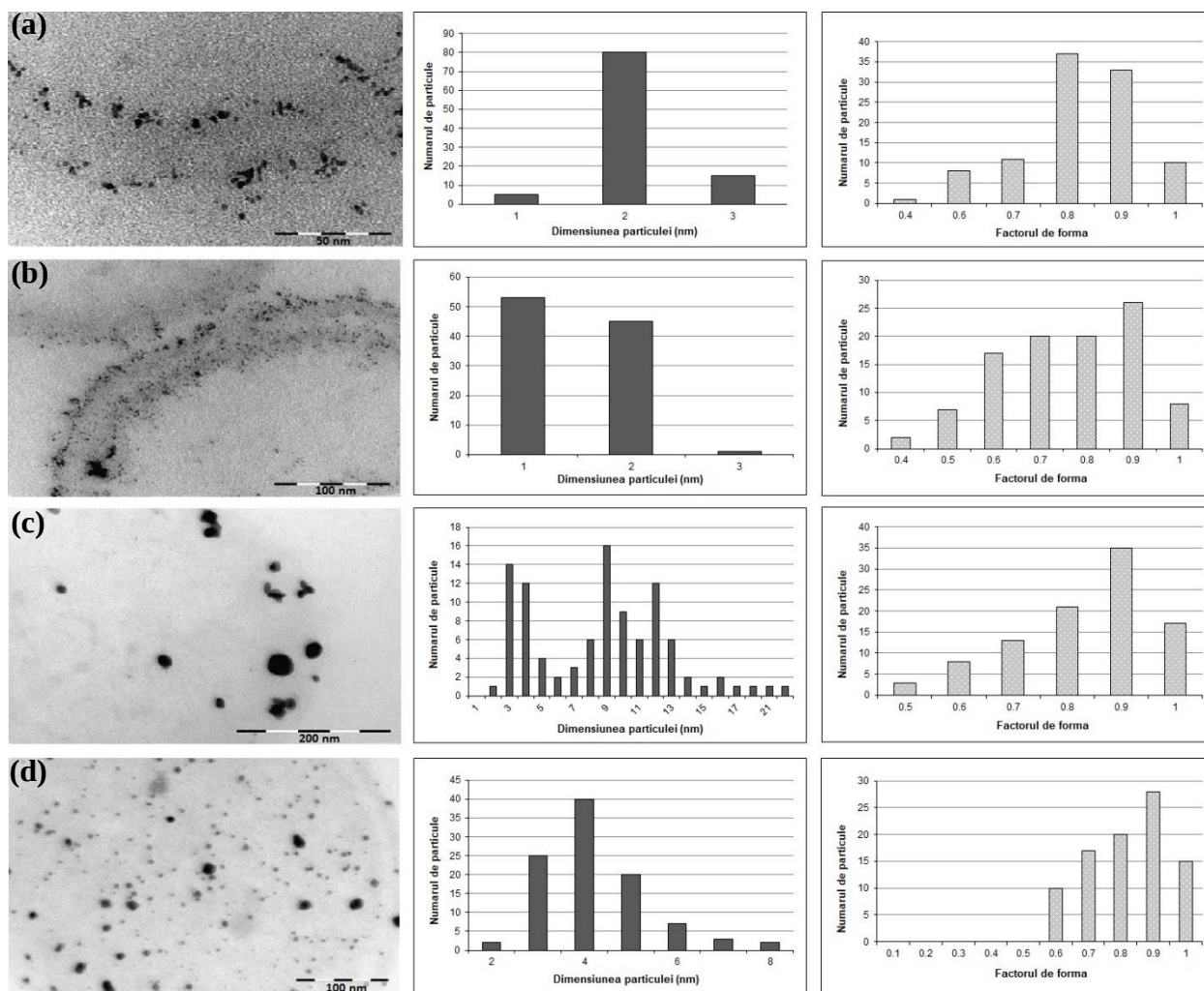


Figura 14. Imagini TEM în câmp luminos (stânga) și câmp întunecat (dreapta) ale celulelor de *S. oneindensis* MR-1 din probele (a) Pt lumina; (b) Pt întuneric; (c) Au lumina; (d) Au întuneric.

Măsurătorile realizate în ImageJ au arătat că NP-Pt obținute sunt de dimensiuni foarte mici, diametrul mediu al acestor NP fiind de 2 nm în cazul NP-Pt sintetizate la lumină (Fig. 15 a) și de aproximativ 1 nm în cazul celor sintetizate la întuneric (Fig. 15 b), aceste valori fiind apropiate de dimensiunile raportate în literatura de specialitate (ex.: 5 nm) (Maes și colab., 2017; Tuo și colab., 2017; Xu și colab., 2019). În ceea ce privește morfologia sferică a NP-Pt, aceasta este de asemenea foarte similară cu cea raportată de Tuo și colab. (2017).



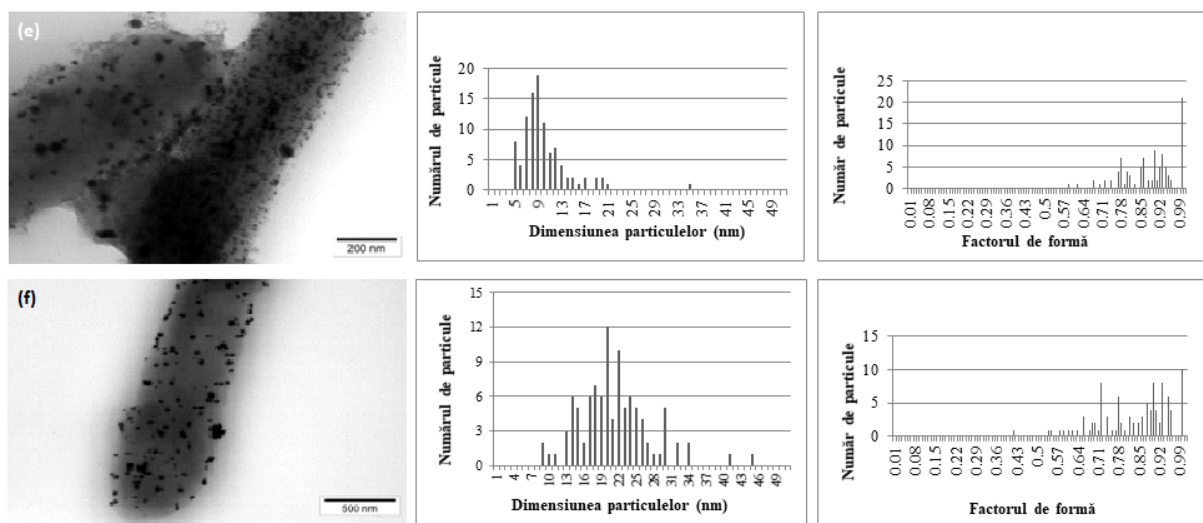


Figura 15. Distribuțiile de mărimi și de formă ale NP-Pt incubate (a) la lumină și (b) la întuneric, ale NP-Au incubate la (c) lumină și (d) la întuneric, respectiv ale NP-Pd incubate la lumină (e) și (f) la întuneric, sintetizate de către celulele de *S. oneidensis* MR-1.

3.3. Sinteza NP-Ag utilizând mediul epuizat de *S. oneidensis* MR-1

Metoda mediului epuizat valorifică biomoleculele redox-active secretate de *S. oneidensis* fără a fi necesară menținerea viabilității bacteriene, ceea ce simplifică procesul și îmbunătățește scalabilitatea. Studii recente arătat că mediile epuizate provenite de la culturi bacteriene și fungice pot media eficient sinteza NP-Ag (Eze și Nwabor, 2020).

În concordanță cu date anterioare care indica că o creștere a absorbției între 390 și 450 nm în cazul Ag (Kelly și colab., 2003; Evanoff și Chumanov, 2005; Paramelle și colab., 2014), analizele de spectrofotometrie ale NP obținute în acest studiu au indicat o creștere a absorbției între 400 și 450 nm, corespunzătoare formării unor NP-Ag. Aceste rezultate sunt în concordanță cu sinteza NP mediată bacterian, unde NP-Ag produse în medii epuizate prezintă vârfuri de absorbție UV-Vis în jurul valorii de 430 nm (Boldt și colab., 2023).

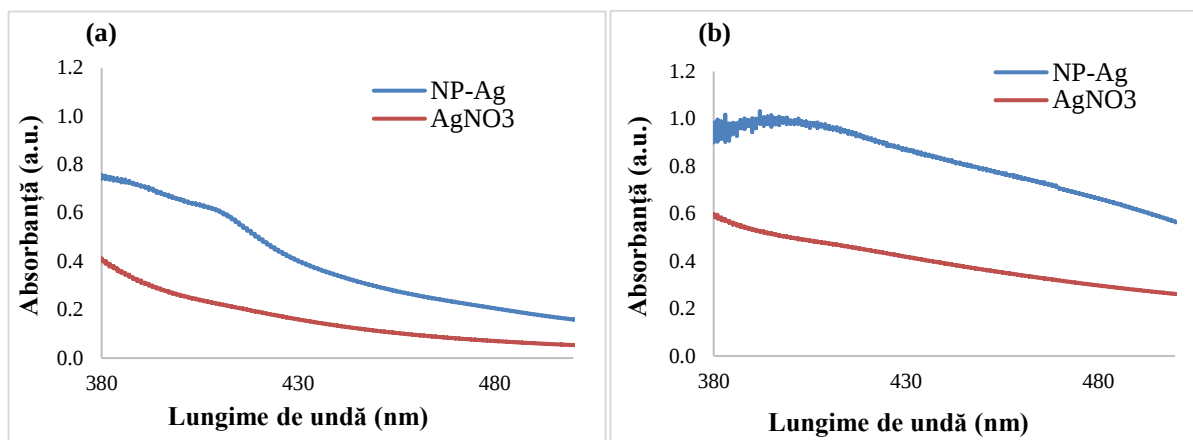


Figura 16. Spectrul de absorbție al probelor de mediu LB epuizat, cu AgNO₃ incubat la a) întuneric, b) lumină, față de soluțiile martor la momentul inițial .

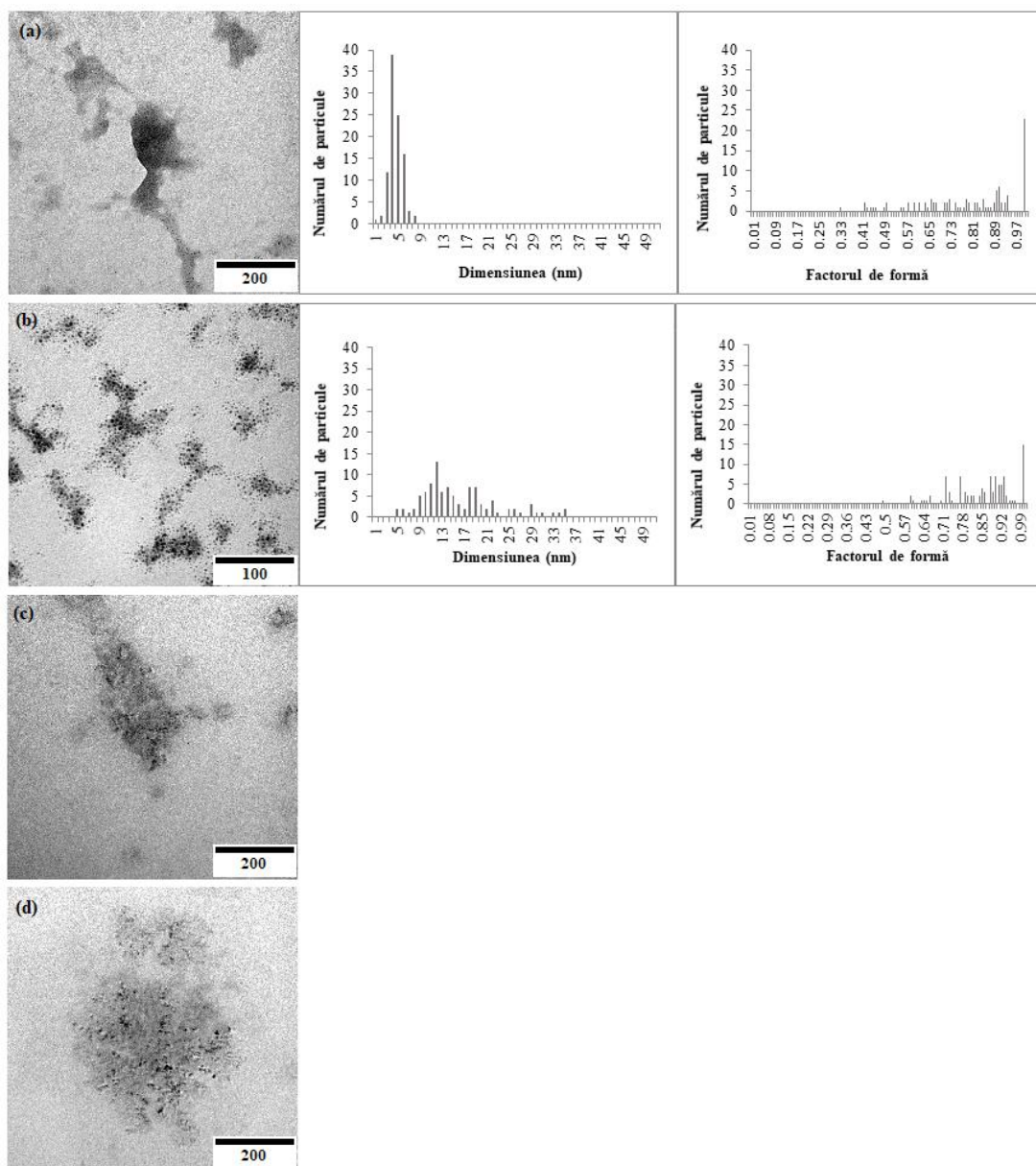


Figura 17. Imagini TEM, dimensiunea și factorul de formă ale NP-Ag obținute cu mediul LB epuizat la întuneric (a) și la lumină (b) și imagini cu probele martor (AgNO₃ în mediu LB proaspăt) la întuneric (c) și la lumină (d).

Confirmarea sintezei NP-Ag s-a realizat utilizând tehnica TEM. Analiza imaginilor TEM a evidențiat NP bine definite, cu morfologie sferică, formate atât în condiții de lumină, cât și de întuneric (Fig. 17). Cu toate acestea, au fost observate diferențe semnificative în distribuția dimensiunilor nanoparticulelor. NP-Ag obținute în condiții de lumină au fost semnificativ mai mari, cu un diametru mediu de 15,63 nm. (Fig.17); NP-Ag obținute în întuneric au prezentat dimensiuni mai mici, cu un diametru mediu de 4 nm (Fig. 17).

CAPITOLUL IV - OBȚINEA UNOR MUNTANTE DE *SHEWANELLA ONEIDENSIS* MR-1 ÎN VEDEREA ÎMBUNĂTĂȚIRII ABILITĂȚILOR REDOX A ACESTORA

În acest studiu s-a urmărit obținerea unor mutante cu abilități redox îmbunătățite. Plasmida pBBR1MCS a fost utilizată pentru exprimarea controlată a genelor relevante, pentru compararea capacității redox cu cea a bacteriei *S. oneidensis* MR-1 și a mutantelor sale

4.1. Inducerea de mutații în celulele de *Shewanella oneidensis* MR-1

În vederea optimizării activității redox a tulpinii *S. oneidensis* MR-1, au fost generate mutante ale celor trei gene implicate în reacții redox *cymA*, *mtrC* și *omcA*, utilizând procedeul Error-prone PCR.

Concentrațiile produselor PCR au fost: *cymA* 98,7 ng/μL; *mtrC* 90,0 ng/μL; *omcA* 72,6 ng/μL; vectorul pBBR 62,4 ng/μL.

Într-o primă etapă, analiza electroforetică (Fig. 18) a pus în evidență linearizarea plasmidei pBBR tratate cu enzimele de restricție *EcoRI* și *BamHI* (~5.148 pb) și absența fragmentelor ADN corespunzătoare genelor *omcA*, *mtrC* și *cymA*, indicând că procesul de clonare nu a fost realizat cu succes. Ulterior, după optimizarea concentrației primerilor (de la 0,8 μM la 1,2 μM), au fost amplificate fragmentele genice *cymA* (~561 pb), *mtrC* (~1.723 pb) și *omcA* (~2.202 pb), iar asamblarea NEBuilder cu pBBR linearizată a condus la obținerea clonelor corespunzătoare (Fig. 18–19). ADN-ul recombinant a fost purificat pentru etapele următoare.

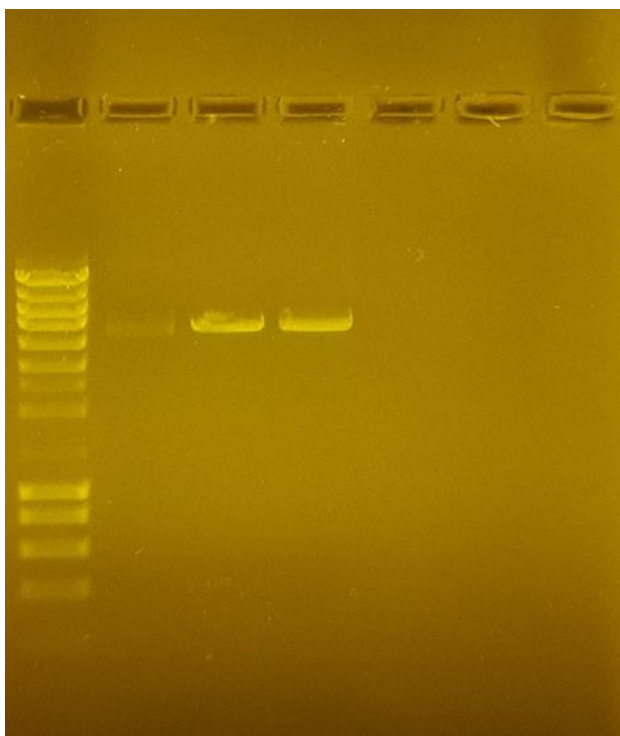


Figura 18. Electroforeza în gel de agaroză a plasmidei pBBR nedigerate (linia 2), digerată cu *EcoRI* (linia 3) și *BamHI* (linia 4). Produsul PCR pentru gena *cymA* (linia 5), *mtrC* (linia 6) și *omcA* (linia 7). Markerul de greutate moleculară NZYTech (linia 1).

În urma optimizării concentrației primerilor (de la 0,8 μM la 1.2 μM), au fost amplificate fragmentele genice *cymA* (~561 pb), *mtrC* (~1723 pb) și *omcA* (~2202 pb) (Myers și Myers, 1997; Beliaev și colab., 2001; Johs și colab., 2010), iar digestia cu enzimele de restricție *EcoRI/BamHI* a plasmidelor rezultate a confirmat obținerea clonelor corespunzătoare (fig. 18 și fig. 19).

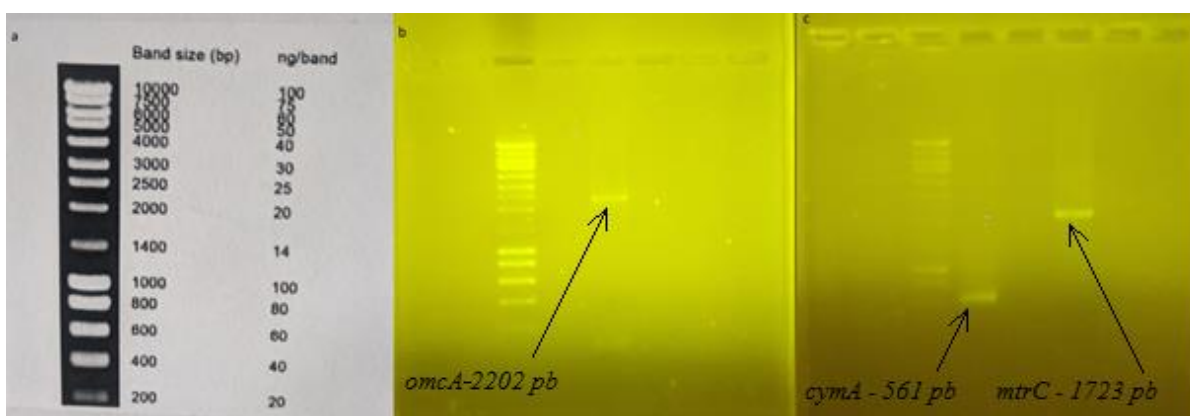


Figura 19. Analiza electroforetica a fragmentelor de ADN rezultate prin amplificare Error-prone PCR. (a) Marker molecular NZYTech; (b) gena *omcA* (2202 pb) – linia 5 (c); gena

cymA (561 pb) – linia 4 și gena *mtrC* (1723 pb) – linia 6 (Markerul de greutate moleculară se regăsește în linia 3 în figurile (b) și (c)).

4.1. 2. Exprimarea genelor mutante *cymA* și *omcA* în *Shewanella oneidensis* MR-1

Exprimarea a fost realizată la 30°C, în mediu LB cu kanamicină (50 µg/mL), timp de 24 h. În aceste condiții, analiza SDS-PAGE a confirmat prezența proteinei recombinante CymA (~20,8 kDa) în cazul mutantelor și al tulpinii native. În schimb, OmcA (~85 kDa) nu a fost detectabilă în tulpinile transformate, sugerând o exprimare inefficientă, posibil din cauza stabilității reduse a ARNm-ului sau a plierii incorecte a proteinei. Analiza SDS-PAGE a confirmat prezența proteinei recombinante CymA (20,8 kDa) în cazul mutantelor și al tulpinii native (Myers și Myers, 1997; Johs și colab., 2010).

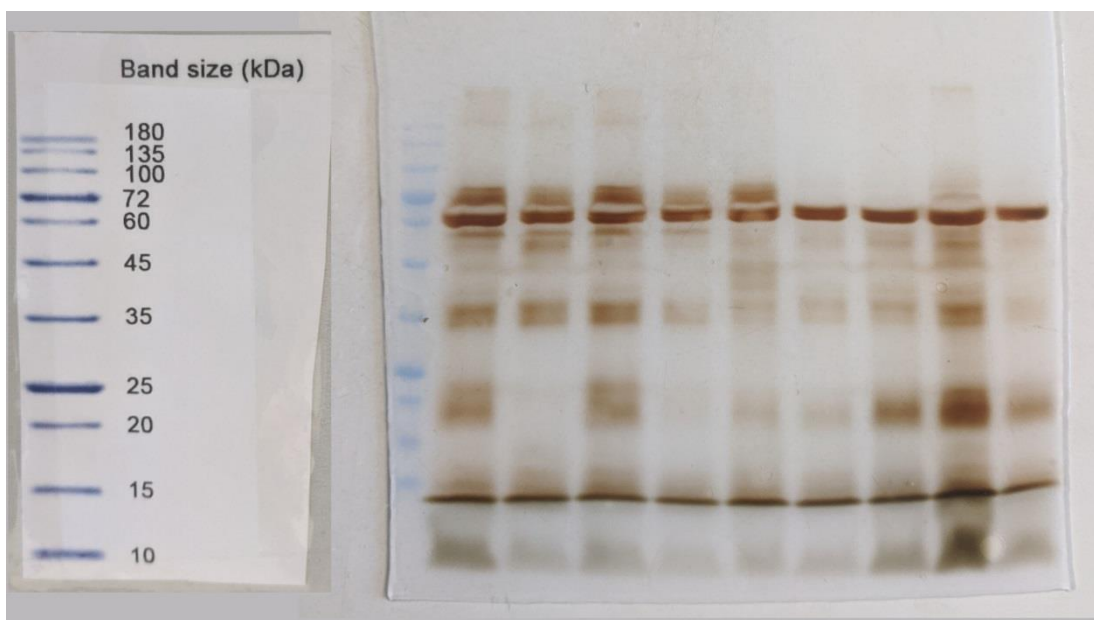


Figura 20. Pista 1: marker; 2: CymA nativ; 3: ΔCymA + pBBR (control negativ); 4–5: CymA mut 14/28; 6: OmcA nativ; 7: ΔOmcA ΔMtrC + pBBR (control negativ); 8: OmcA mut A.

4.2.. Evaluarea potențialului reducător al mutantelor obținute

Rezultatele obținute în cazul mutantelor *cymA* au indicat o activitate redox îmbunătățită comparativ cu gena nativă, în particular pentru mutantele 14, 16 și 28, observându-se o rată mai rapidă de reducere a colorantului (Fig. 21). În cazul mutantelor *omcA*, activitatea redox a fost mai redusă decât a bacteriei transformate cu gena nativă, ceea ce indică o eficiență mai scăzută a transferului extracelular de electroni pentru aceste mutante (fig. 22).

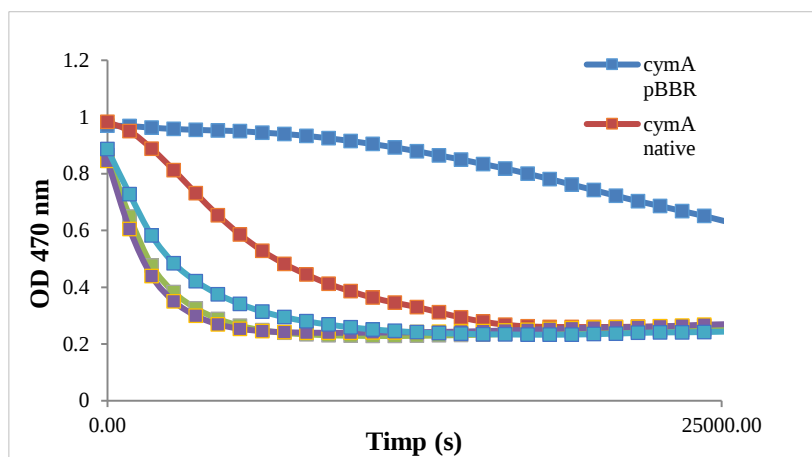


Figura 21. Activitatea redox a mutantelor *S. oneidensis cymA* (mutantele 14, 16, 28).

Tulpinile de *S. oneidensis* transformate cu gena *cymA* nativă (*cymA native*), vectorul pBBR (*cym pBBR*) și mutantele 14, 16, 28 ale genei *cymA*.

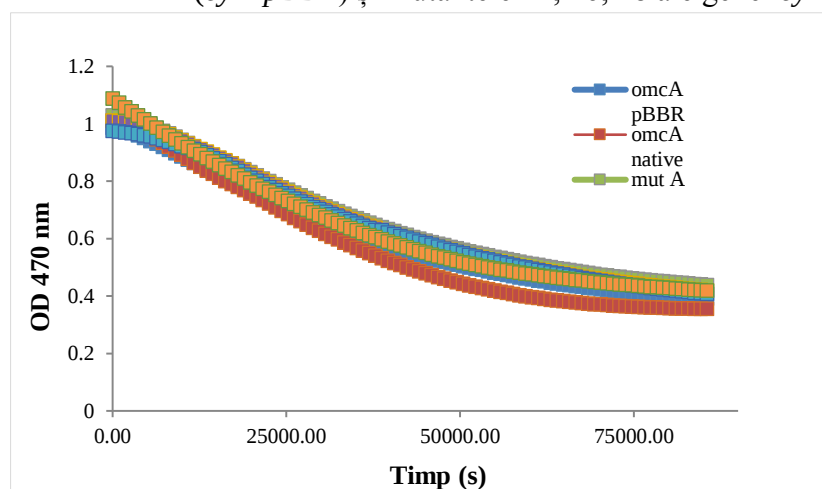


Figura 22. Activitatea redox a mutantelor *S. oneidensis OmcA* (mut A, B, C, I). Tulpinile de *S. oneidensis* transformate cu gena *omcA* nativă (*omcA native*), vectorul pBBR (*omcA pBBR*) și mutantele B, C și I ale genei *omcA*.

CAPITOLUL V - APLICAȚIILE NANOPARTICULELOR DE PLATINĂ, PALADIU, AUR ȘI ARGINT BIO-SINTETIZATE

În cadrul experimentelor abordate, în acest capitol sunt investigate potențialele aplicații ale nanoparticulelor obținute experimental, urmărind trei direcții principale: (i) degradarea catalitică a unor doi coloranți azoici, roșu de Congo (CR) și metil oranj (MO), și un colorant cationic din clasa tiazinei, albastru de metilen (MB) (ii) evaluarea activității antibacteriene împotriva tulpinilor de *E. coli* și *S. aureus*, și (iii) determinarea capacității antioxidante prin testul DPPH.

5.1. Reducerea coloranților

Reacția de degradare a coloranților MB, CR și MO a fost testată atât pe NP-Pt și NP-Au obținute la lumină, cât și pe cele obținute la întuneric. Probele au conținut 4 μL suspensie de NPM (1 mg/ μL), 4 μL colorant (1 mM), 6 μL borohidruă de sodiu (100 mM) și 185 μL apă ultrapură (MilliQ). Proba martor nu a conținut NPM. În cazul MB, NP-Pt au prezentat cele mai bune performanțe catalitice, cu procente de decolorare de 89.74% (NP-Pt sintetizate sub influența luminii) și 87.18% (NP-Pt obținute la întuneric).

În contrast, NP-Au deși mai puțin eficiente în reducerea MB, s-au dovedit superioare în cazul CR. Probele tratate cu NP-Au, în special cele obținute la întuneric, au înregistrat o decolorare de 82.11%, comparativ cu doar 18.42% pentru NP-Pt obținute sub influența luminii.

Pentru MO, toate tipurile de NPM au înregistrat procente reduse de decolorare (între 4.65% și 11.63%).

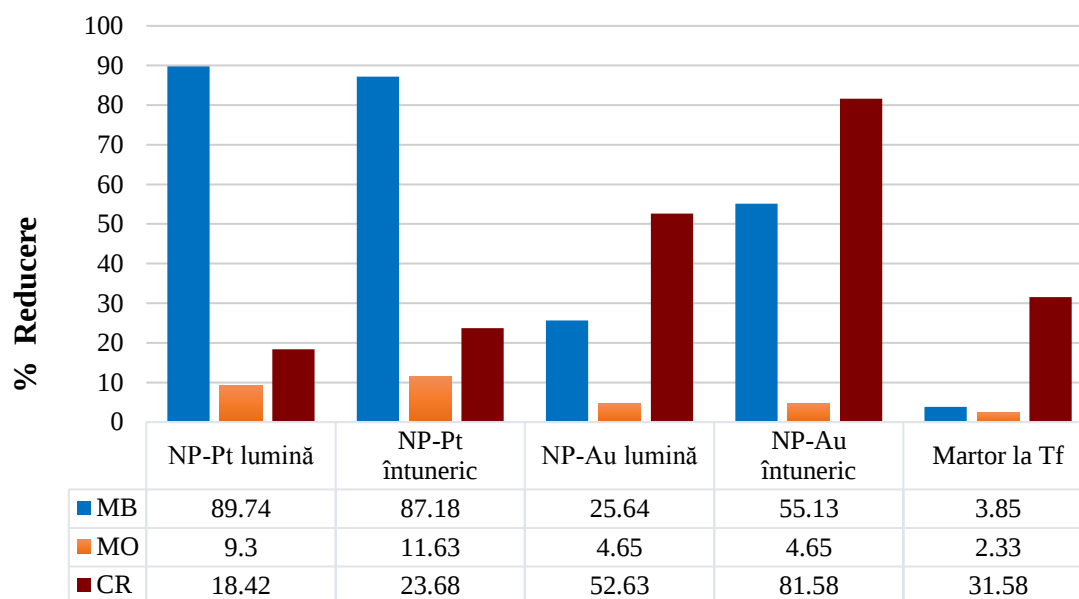


Figura 24. Procentul de reducere al MB ($\lambda = 662$ nm), MO ($\lambda = 465$ nm) și CR ($\lambda = 497$ nm) în prezența: NP-Pt sintetizate sub influența luminii, NP-Pt sintetizate la întuneric, NP-Au sintetizate sub influența luminii, NP-Au sintetizate la întuneric și a soluției martor la timpul final (Tf).

5.2. Efectul antibacterian al NPM

Acest studiu investighează activitatea antibacteriană a NP-Ag, NP-Au, NP-Pd și NP-Pt sintetizate biogen împotriva tulpinii Gram-negative *E. coli* (ATCC 25922) și Gram-pozitive *S. aureus* (ATCC 6538). Valorile concentrației minime inhibitoare (CMI) au fost determinate utilizând metoda diluțiilor (Klančnik și colab., 2010), în timp ce inhibarea creșterii bacteriene a fost evaluată prin măsurători ale densității optice (OD600) (Shamaila și colab., 2016; Franzolin și colab., 2022).

Rezultatele obținute pentru *S. aureus* confirmă rezistența relativ crescută a bacteriilor Gram-pozitive, însă și aici s-au evidențiat diferențe între tipurile de NPM testate. NP-Au a demonstrat și aici o activitate mai pronunțată (100%, 67,2% și 4,4%), iar NP-Pd au prezentat un profil comparabil, cu valori de 90,1% la concentrația maximă și 54,6% la cea medie, menținând totodată o inhibiție semnificativă la doza minimă (27,7%). NP-Ag au manifestat un

efect mai redus asupra *S. aureus* (99,8%, 23,5% și 11,2%), în timp ce NP-Pt s-au dovedit a avea cel mai redus efect antibacterian (64,1%, 17,5% și 1%).

Tabelul 6. Efectul antibacterian al diferitelor tipuri de NPM biosintetizate, la doze mici, medii și mari, asupra *S. aureus* și *E. coli*.

NPM	% Inhibiție <i>E.coli</i>			% Inhibiție <i>S. aureus</i>		
	Concentrație			Concentrație		
	Maximă 2 mg/L	Medie 0,125 mg/L	Minimă 0,008 mg/L	Maximă 2 mg/L	Medie 0,125 mg/L	Minimă 0,008 mg/L
NP-Ag	100	37,8	3,5	99,8	23,5	11,2
NP-Au	100	87	28,9	100	67,2	4,4
NP-Pd	99,5	11,9	0,1	90,1	54,6	27,7
NP-Pt	96,1	28,8	6	64,1	17,5	1

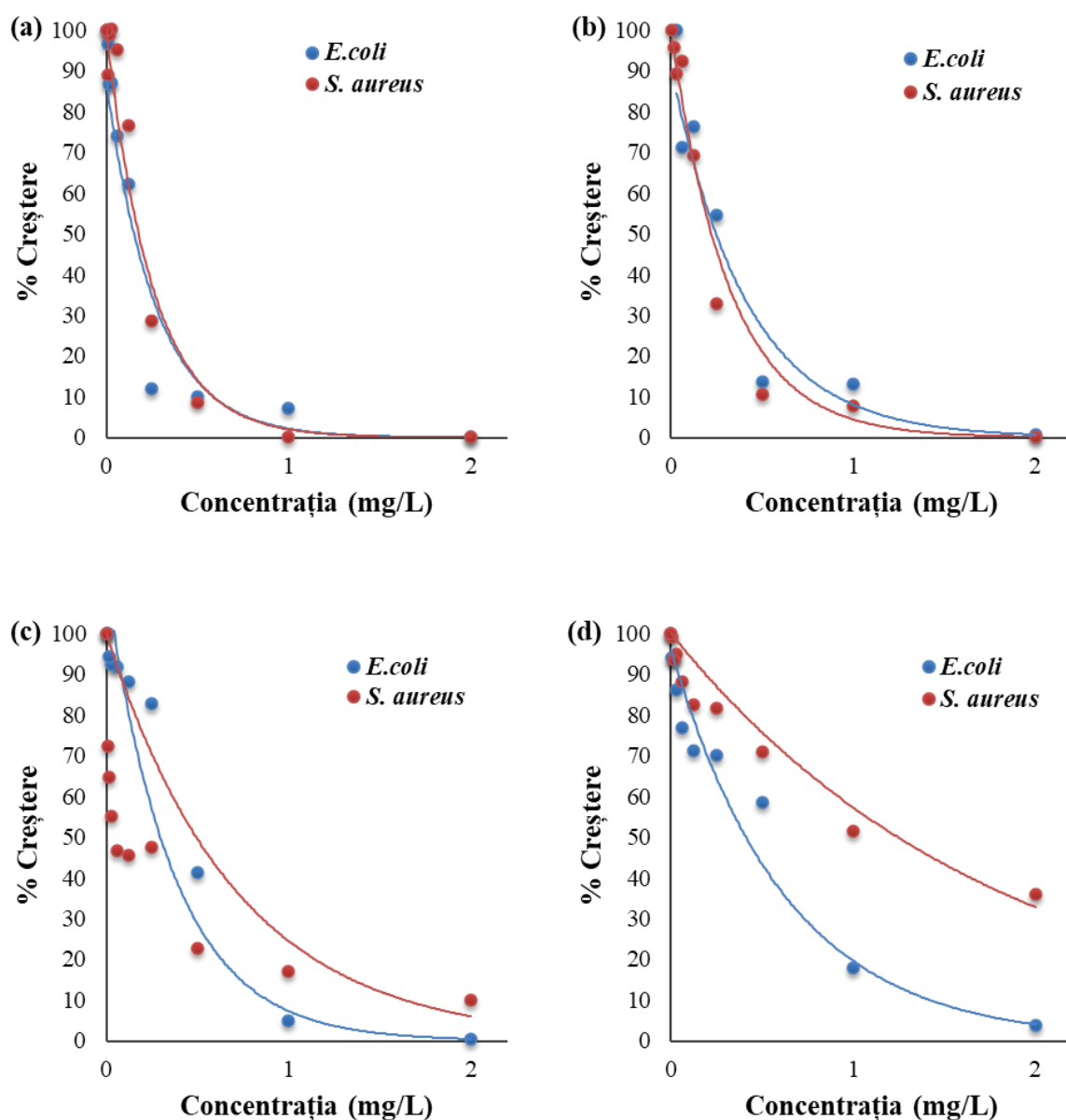


Figura 26. Efectul concentrației diferitelor tipuri de NPM biosintetizate asupra creșterii bacteriene: (a) NP-Ag, (b) NP-Au, (c) NP-Pd, (d) NP-Pt. Valorile au fost corectate cu martorul pozitiv (LB + inocul + gentamicină) și normalizate la martorul negativ (LB + inocul, fără NP = 100% creștere).

Se poate observa că NP-Ag și NP-Au prezintă cel mai ridicat potențial antibacterian, însă profilurile lor de activitate diferă: NP-Ag sunt mai eficiente la concentrații mari, în timp ce

NP-Au își mențin efectul inhibitor și la doze mai reduse. NP-Pd se remarcă printr-o eficiență selectivă asupra bacteriilor Gram-pozitive, iar NP-Pt au demonstrat o activitate limitată.

5.3. Efectul antioxidant al NPM

Activitatea antioxidantă a NPM sintetizate biogenic (NP de Au, Ag, Pd și Pt) a fost evaluată utilizând testul DPPH, o metodă colorimetrică folosită pentru determinarea capacității de neutralizare a radicalilor liberi. Procentul de eliminare a radicalilor DPPH a fost calculat în raport cu un martor negativ (soluție DPPH fără NPM) și cu un control pozitiv (acid ascorbic) (Fig. 27).

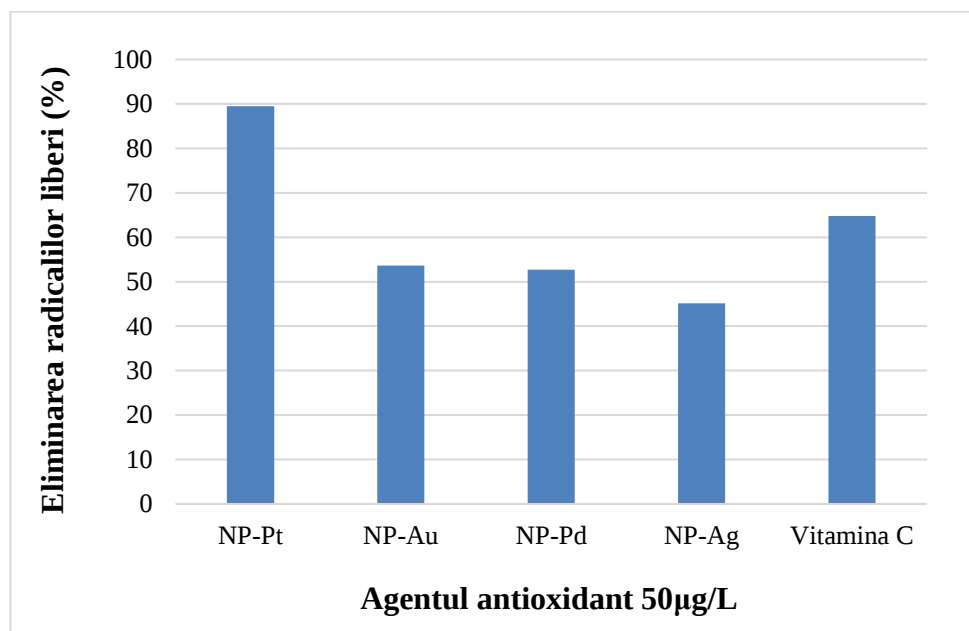


Figura 27. Activitatea antioxidantă a diferitelor tipuri de NPM biosintetizate comparativ cu cea a vitaminei C (control pozitiv) și.

NP-Au și NP-Pd au prezentat o activitate antioxidantă intermediară (53.63% și, respectiv, 52.72%). NP-Ag au prezentat cea mai scăzută activitate antioxidantă dintre NPM analizate (45.11%). Deși acidul ascorbic a prezentat o activitate antioxidantă superioară în raport cu majoritatea NP testate, NP-Pt s-au dovedit a fi o alternativă excelentă, cu o eficiență chiar mai mare (89.51%).

CONCLUZIILE GENERALE ALE TEZEI

Această lucrare de doctorat a valorificat capacitatea bacteriei *S. oneidensis* MR-1 de a biosintetiza NPM (Au, Ag, Pd și Pt), și a analizat proprietățile acestor nanomateriale, relevante pentru o gamă largă de aplicații.

Experimentele au fost concepute având la baza analiza versatilității metodei biologice de sinteză utilizată pentru obținerea NP de Au, Pt, Pd și Ag. Pentru NP-Ag, a fost folosită metoda mediului epuizat, considerând toxicitatea crescută a azotatului de argint asupra bacteriilor; această abordare reprezintă o alternativă simplificată și economică și pune în evidență importanța alegerii adecvate a mediului de biosinteză, fenomen descris și de Suresh și colab., în 2010.

Elementele de noutate ale lucrării constau în: (i) obținerea de NP din mai multe metale nobile (Au, Pt, Pd și Ag) mediată de *S. oneidensis* MR-1, în condițiile în care pentru NP-Pt și NP-Pd literatura este relativ restrânsă; (ii) producerea NP-Ag folosind mediul epuizat al culturilor de *S. oneidensis* MR-1; (iii) investigarea influenței luminii asupra sintezei de NP-Pd, NP-Pt și NP-Ag mediată de *S. oneidensis* (fenomen documentat anterior preponderent pentru aur); (iv) testarea NPM obținute prin ambele rute (lumină vs. întuneric) și explorarea efectului mutațiilor în gene implicate în procesele redox, în vederea îmbunătățirii performanței redox a bacteriei.

Studiile privind influența luminii, au arătat că biosinteza în prezența iluminării este mai eficientă decât la întuneric, abordare frecvent întâlnită în literatura de specialitate. NP obținute sub influența luminii au prezentat proprietăți asemănătoare celor obținute la întuneric, prin urmare, metoda nu prezintă dezavantaje legate de calitatea NP.

Rezultatele experimentelor de inginerie genetică au evidențiat posibilitatea obținerii de mutante cu proprietăți redox superioare tulpinii sălbatice, deschizând perspective valoroase pentru aplicații biotehnologice. Mai mult, importanța selecției metalului în funcție de proprietățile sale a fost pusă în evidență atât de testele privind efectul antibacterian și antioxidant, precum și de cele de reducere a coloranților, aspecte cu importanță atât în domeniul medical și biotehnologic, dar și în domeniul ecologiei, inclusiv în bioremediere.

Prin tehnici de caracterizare spectroscopică și microscopică, am realizat o analiză detaliată a nanoparticulelor produse, evidențiind relația dintre dimensiunea acestora și proprietățile funcționale.

Evaluările funcționale din cadrul experimentelor au indicat faptul că NP-Pt prezintă o performanță catalitică superioară în reducerea MB, iar NP-Au s-au dovedit mai eficiente în degradarea roșului de Congo.

Activitatea antioxidantă și antibacteriană a NP sintetizate a fost de asemenea demonstrată. Astfel, NP-Pt s-au dovedit a fi chiar mai eficiente decât acidul ascorbic în eliminarea radicalilor liberi, iar NP-Ag au prezentat cel mai puternic efect antibacterian dintre toate NP testate asupra tulpinilor de *E. coli* și *S. aureus*.

În ansamblu, această cercetare oferă o investigație multidisciplinară asupra metodelor de obținere a NP cu ajutorul tulpinii bacteriene *S. oneidensis* MR-1 și a optimizării acestui proces în vederea explorării potențialelor aplicații ale NPM rezultate. O astfel de abordare ar putea contribui la dezvoltarea unor sisteme automate de biosinteză a NPM și la valorificarea lor eficientă, deschizând perspective pentru dezvoltarea pentru aplicații cu impact în domeniul medical, alimentar, farmaceutic și de protecție a mediului.

DISEMINAREA REZULTATELOR

Articole publicate în domeniul tezei

Lucrări publicate în reviste indexate ISI (web of Science):

1. Iacob, M.T., Ghinea, A., Morosanu, A.-M., Ardelean, I., Stamatina, S.N. și Moiescu, C. (2025) ‘Batteries to the rescue: the formation of Pt bioelectrocatalysts with *Shewanella oneidensis* MR-1 and commercial batteries’, RSC Applied Interfaces, in press. (Equal contribution: Iacob and Ghinea.)

Lucrări publicate în reviste indexate în baze de date internaționale:

1. **Ghinea, A.**, Moiescu, C., Iacob M.T., Morosanu A.M., & Ardelean I. 2021. *Bioreductive synthesis of platinum nanoparticles by Shewanella oneidensis MR-1*. Oltenia, Studii si Comunicari Seria Stiintele Naturii, 37(1): 192-198.
2. Moiescu, C., **Ghinea, A.**, Iacob, M.-T., Bălan, A., Stamatina, Ș. & Ardelean, I.I., 2019. *Palladium nanoparticle synthesis by Shewanella oneidensis MR-1*. Oltenia. Studii și Comunicări. Științele Naturii, 35(1): 183-188. ISSN 1454-6914.
3. Iacob, M.-T., **Ghinea, A.**, Moiescu, C., Bălan, A., Stamatina, Ș. & Ardelean, I.I., 2019. *The evaluation of bacterial cultures redox potential in microbial fuel cells with different configurations*. Oltenia. Studii și Comunicări. Științele Naturii, 35(2): 156–160. ISSN 1454-6914.
4. **Ghinea, A.**, Moiescu, C., Moroșanu, A.-M. & Ardelean, I.I., 2022. *The influence of light on the biosynthesis of Pt and Au nanoparticles by Shewanella oneidensis MR-1*. Current Trends in Natural Sciences, 11(22), pp. 278–288.
<https://doi.org/10.47068/ctns.2022.v11i22.032>
5. Brevet de invenție nr. RO 136027 B1, BOPI nr. 12 / 30.12.2024, cu titlul: Electrocatalizatori platinici obținuți prin conversia bioelectrochimică a catalizatorilor auto uzați și procedeu de obținere a acestora. Autori: Stamatina Serban Nicolae, Moiescu Cristina, Iacob Matei Tom, **Ghinea Adrian**, Diac Cornelia, Maxim Florentina Iuliana, Ardelean Ioan, Nichita Cornelia, Stamatina Ioan.

Misiune științifică pe termen scurt (STSM)

1. Ghinea, A. (2021). Short-Term Scientific Mission (STSM) – Scientific Report. COST Action CA19123 (PHOENIX). Host: ITQB NOVA, Lisbon, Portugal, September 19–

October 2, 2021. e-COST ID: ECOST-STSM-Request-CA19123-48718. Document submitted to COST; available upon request.

Articole publicate in alte domenii

Capitole de carte:

1. Moisescu, C., Ardelean, A.-V., Stamatina, Ș., **Ghinea, A.**, Iacob, M.-T., Voinea, S., Stamatina, I. & Ardelean, I.I., 2024. *Biological fuel cells with oxygenic photosynthetic microorganisms for wastewater treatment: State of the art and perspectives in bioanode*. In: N. Sahu & S. Sridhar, eds. *Algal biotechnology: Applications for industrial development and human welfare*. 1st ed. CRC Press, pp. 66–83 . DOI: 10.1201/9781003219194-6.
2. Stamatina, Ș., Iacob, M.-T., Moisescu, C., Ardelean, A.-V., **Ghinea, A.**, Voinea, S., Stamatina, I. & Ardelean, I.I., 2024. *Biological fuel cells with oxygenic photosynthetic microorganisms for wastewater treatment: State of the art and perspectives in biocathode*. In: N. Sahu & S. Sridhar, eds. *Algal biotechnology: Sustainable energy solutions*. 1st ed. CRC Press, pp.101–110. DOI: 10.1201/9781003219156-10.

Conferinte

1. **Ghinea, A.**, Ardelean, I.I., Iacob, M.-T., Bălan, A., Stamatina, Ș. & Moisescu, C., 2020. *The bioreductive synthesis of platinum nanoparticles by Shewanella oneidensis MR-1*. The Scientific International Conference Museum and Scientific Research, 17 September 2020.
2. Iacob, M.-T., Ardelean, I.I., **Ghinea, A.**, Moisescu, C., Bălan, A. & Stamatina, Ș., 2020. *Microbial fuel cells as devices for online monitoring of Shewanella oneidensis growth under aerobic conditions*. The Scientific International Conference Museum and Scientific Research, 17 September 2020.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Ahmad, A., Wei, Y., Syed, F., Tahir, K., Rehman, A.U., Khan, A.U., Ullah, S., Zaid, M., Raza, M. și Khan, F.U., 2016. Isatis tinctoria mediated synthesis of amphotericin B-bound silver nanoparticles with enhanced photoinduced antileishmanial activity. *RSC Advances*, 6(31), pp.25493–25503.
2. Alsaba, M.T., Al Dushaishi, M.F. și Abbas, A.K., 2020. A comprehensive review of nanoparticles applications in the oil and gas industry. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*, 10, pp.1389–1399. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13202-019-00825-z>.
3. Altammar KA. A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. *Front Microbiol.* 2023 Apr 17;14:1155622. doi: 10.3389/fmicb.2023.1155622
4. Amendola, V. și Meneghetti, M. 2013. What controls the composition and the structure of nanomaterials generated by laser ablation in liquid solution? *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(9), 3027–3046. <https://doi.org/10.1039/c2cp42895d>
5. Amendola, V., Pilot, R., Frascioni, M., Maragò, O.M. și Iati, M.A., 2017. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 29(20), p.203002. DOI: 10.1088/1361-648X/aa60f3.
6. Ardelean I.I. 2015. Metallic nanoparticle synthesis by cyanobacteria: fundamentals and applications. În: Sahoo D. Seckbach J. (eds) *The Algae World. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. 26, Springer, Dordrecht.
7. Arulmozhi, K.T. și Mythili, N., 2013. Studies on the chemical synthesis and characterization of lead oxide nanoparticles with different organic capping agents. *AIP Advances*, 3(12), p.122122. Available at: <https://doi.org/10.1063/1.4858419>.
8. Attard G., Casadesús M., Macaskie L.E., Deplanche K. 2012. Biosynthesis of platinum nanoparticles by *Escherichia coli* MC4100: can such nanoparticles exhibit intrinsic surface enantioselectivity? *Langmuir*. American Chemical Society Publisher. New York. 28: 5267-5274.
9. Baig, N., Kammakam, I., Falath, W. 2021. Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances*, 2(6), 1821–1871. <https://doi.org/10.1039/D0MA00807A>
10. Balachandran, A., Sreenilayam, S.P., Madanan, K., Thomas, S. și Brabazon, D., 2022. Nanoparticle production via laser ablation synthesis in solution method and printed electronic application – A brief review. *Results in Engineering*, 16, p.100646. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2022.100646>.
11. Batista C. A. S., Larson R. G., Kotov N. A. 2015. Nonadditivity of nanoparticle interactions. *Science*. 350(6257):1242477.
12. Beliaev, A. S., Saffarini, D. A., McLaughlin, J. L., Hunnicutt, D. 2001. MtrC, an outer membrane decahaem c cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Molecular Microbiology*, 39(3), 722–730. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02257.x>

13. Beliaev, A. S., Saffarini, D. A., McLaughlin, J. L., Hunnicutt, D. 2001. MtrC, an outer membrane decahaem c cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefasciens* MR-1. *Molecular Microbiology*, 39(3), 722–730. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02257.x>
14. Boldt, A., Walter, J., Hofbauer, F., Stetter, K., Aubel, I., Bertau, M., Jäger, C.M. and Walther, T. 2023. Cell-free synthesis of silver nanoparticles in spent media of different *Aspergillus* species. *Engineering in Life Sciences*, 23(2), pp. 69–80. <https://doi.org/10.1002/elsc.202200052>
15. Buzea, C., Pacheco, I.I. și Robbie, K., 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), pp.MR17–MR71. DOI: 10.1116/1.2815690.
16. Charde, R.P., van Devener, B. și Nigra, M.M. 2023. Surfactant- and ligand-free synthesis of platinum nanoparticles in aqueous solution for catalytic applications. *Catalysts*, 13(2), 246. doi:10.3390/catal13020246.
17. Chavez, M.S., MacLean, M.A., Sukenik, N., Yadav, S., Marks, C., El-Naggar, M.Y.. 2025. Synthesis of Palladium Nanoparticles by Electrode-Respiring *Geobacter sulfurreducens* Biofilms, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 11(1), 298–307. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.4c01183>
18. Chen H., Wei G., Ispas Adriana, Hickey S. G., Eychmuller A. 2010. Synthesis of palladium nanoparticles and their applications for surface-enhanced Raman scattering and electrocatalysis. *The Journal of Physical Chemistry C*. (50): 21976-21981.
19. Chen, H., Kou, X., Yang, Z., Ni, W. și Wang, J., 2008a. Shape- and size-dependent refractive index sensitivity of gold nanoparticles. *Langmuir*, 24(10), pp.5233–5237. DOI: 10.1021/la800305j. (a)
20. Chu, H.-W., Demissie, G.G., Huang, C.-C. și Anand, A. 2025. Protein-templated metal nanoclusters for chemical sensing. *Frontiers in Analytical Science*, 5:1510588.
21. Coursolle D., Gralnick J. A. 2012. Reconstruction of extracellular respiratory pathways for iron(III) reduction in *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Frontiers in Microbiology*, 3:56.
22. Daniel, M.-C. și Astruc, D., 2004. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*, 104(1), pp.293–346. DOI: 10.1021/cr030698+.
23. Das, D., Bhattacharyya, S., Bhattacharyya, M. și Mandal, P. 2022. Green chemistry inspired formation of bioactive stable colloidal nanosilver and its wide-spectrum functionalised properties for sustainable industrial escalation. *Results in Chemistry*, 4, 100533. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100533>
24. De Windt W., Aelterman P, Verstraete W. 2005. Bioreductive deposition of Palladium (0) nanoparticles on *Shewanella oneidensis* with catalytic activity towards reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls. *Environ. Microbiol.* 7(3): 314-25.
25. Dundas C. M., Graham A. J., Romanovicz D. K., Keitz B. K. 2018. Extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis* controls Pd nanoparticle phenotype. *ACS Synthetic Biology*. 7(12): 2726-2736.
26. Dykman, L.A. și Khlebtsov, N.G., 2012. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chemical Society Reviews*, 41(6), pp.2256–2282. DOI: 10.1039/C1CS15166E.

27. Egan-Morriss, C., Kimber, R.L., Powell, N.A., Lloyd, J.R. 2022. Biotechnological synthesis of Pd-based nanoparticle catalysts, *Nanoscale Advances*, 4(3), 690–705. <https://doi.org/10.1039/D1NA00686J>
28. El-Rafai, A.A., G. Ghoneim, D.A. și El-Rafai, N.A., 2018. Eco-friendly synthesis of metal nanoparticles using ginger and garlic extracts as biocompatible novel antioxidant and antimicrobial agents, 8(1), pp.71–81. DOI: 10.1007/s40097-018-0255-8.
29. Evanoff, D. D. Jr.; Chumanov, G. 2005. Synthesis and Optical Properties of Silver Nanoparticles and Arrays. *ChemPhysChem*, 6(7), 1221–1231.
30. Eze, F.N. și Nwabor, O.F., 2020. Valorization of Pichia Spent Medium via One-Pot Synthesis of Biocompatible Silver Nanoparticles with Potent Antioxidant, Antimicrobial, Tyrosinase Inhibitory and Reusable Catalytic Activities. *Materials Science și Engineering C*, 111, p.111104. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111104.
31. Fonseca, B.M., Soares, R.M., Paquete, C.M. și Louro, R.O. 2021. Bacterial power: an alternative energy source. *Enzymes for Solving Humankind's Problems*, 215–246. doi:10.1007/978-3-030-58315-6_8.
32. Franzolin, M.R., Courrol, D.S., de Oliveira Silva, F.R. și Courrol, L.C., 2022. Antimicrobial activity of silver and gold nanoparticles prepared by photoreduction process with leaves and fruit extracts of *Plinia cauliflora* and *Punica granatum*.
33. Ganesan, V. și Ramasubbu, M. 2015. Environmental benign route in the synthesis of palladium nanoparticles using leaves of *Acalypha indica* L. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 6, pp.603–610.
34. Georgieva, M., Andonovski, B. 2003. Determination of platinum(IV) by UV spectrophotometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375(6), 836–839. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-1783-7>
35. Ghosh, S., Ahmad, R., Banerjee, K., AlAjmi, M.F., Rahman, S. 2021. Mechanistic aspects of microbe-mediated nanoparticle synthesis, *Frontiers in Microbiology*, 12, 638068. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.638068>
36. Hachem, K., Ansari, M.J., Saleh, R.O., Kianfar, E., și Hammid, A.T., 2022. Methods of chemical synthesis in the synthesis of nanomaterial and nanoparticles by the chemical deposition method: A review. *BioNanoScience*, 12, pp.1032–1057. Disponibil la: <https://doi.org/10.1007/s12668-022-00996-w>.
37. Haefeli C., Franklin C., Hardy K. 1984. Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from a silver mine. *J. Bacteriol.* 158(1): 389-392.
38. Haleem, A., Javaid, M., Singh, R.P., Rab, S. și Suman, R., 2023. Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. *Global Health Journal*, [online] Available at: <https://doi.org/10.1016/j.glohj.2023.02.008>
39. Hasan, S., 2015. A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types. *Research Journal of Recent Sciences*, 4(ISC-2014), pp.9–11. Disponibil la: <https://www.isca.me/rjrs/archive/special-ISC-2014/3.ISCA-ISC-2014-Poster-3BS-63.pdf>.
40. He S., Guo Z., Zhang Y., Zhang S., Wang J., GU N. 2007. Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodospseudomonas capsulata*. *Materials Letters. Elsevier. London*. 61(18): 3984-3987.

41. He, Y.Q., Tian, Z.Q., Shi, J.Y., Jiang, X.X., Huang, L.Q. și Yang, X.Y., 2005. A study on the sizes and concentrations of gold nanoparticles by spectra of absorption and scattering. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61(13–14), pp.2861–2866. DOI: 10.1016/j.saa.2005.03.015.
42. Heim C. 2011. Microbial Biomineralization. In: *Encyclopedia of Geobiology*. Encyclopedia of Earth Sciences Series. Springer, Dordrecht. 586 pp.
43. Huang, B.C., Hu, C.W., Liao, C.H., Hsueh, Y.H. și Chen, Y.C., 2019. Photo-induction in *Shewanella oneidensis* MR-1 stimulates formation of Au NP. *Scientific Reports*, 9(1), p.7589. DOI: 10.1038/s41598-019-44023-2.
44. Hussein M. I., El-Aziz M. A., Badr Y., Mahmoud M. A. 2007. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. Elsevier. London. 67(3-4): 1003-1006.
45. Iravani, S., 2011. Green synthesis of metal nanoparticles using plants.
46. Iravani, S., 2014. Biosynthesis of nanoparticles: A green approach. *Iranian Journal of Biotechnology*, 12(2), pp.1–28. DOI: 10.5812/ijb.13591.
47. Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y.S., Dufresne, A. și Danquah, M.K., 2018. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9, pp.1050–1074. DOI: 10.3762/bjnano.9.98.
48. Johs A., Shi L., Droubay T., Ankner J. F., Liang L. 2010. Characterization of the decaheme c-type cytochrome OmcA in solution and on hematite surfaces by small angle x-ray scattering and neutron reflectometry. *Biophysical journal*, 98(12), 3035–3043. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.03.049>
49. Kalu, E., Daniel, M. și Bockstaller, M. 2012. Synthesis, characterization, electrocatalytic and catalytic activity of thermally generated polymer-stabilized metal nanoparticles. *International Journal of Electrochemical Science*, 7, pp.5297–5313. doi:10.1149/MA2010-01/13/779.
50. Kato, S., Hashimoto, K., Watanabe, K., 2012. Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(25), pp.10042–10046.
51. Keat C. L., Aziz A., Eid A. M., Elmarzugi N. A. 2015. Biosynthesis of nanoparticles and silver nanoparticles. *Bioresources and Bioprocessing*. 2: 47.
52. Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. 2003. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(3), 668–677.
53. Khan, F.A., Zahoor, M., Khan, A., Ullah, R. și Wahab, A., 2017. A comprehensive review on synthesis, properties and applications of various types of nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2017, Article ID 8143853. DOI: 10.1155/2017/8143853.
54. Khan, M.R., Fromm, K.M., Rizvi, T.F., Giese, B., Ahamad, F., Turner, R.J., Füeg, M. și Marsili, E., 2020. Metal nanoparticle–microbe interactions: synthesis and antimicrobial effects. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Published online 17 March. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201900419>

55. Klaus T, Joerger R, Olsson E, Granqvist CG (November 1999). "Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96 (24): 13611–13614. Bibcode:1999PNAS...9613611K. doi:10.1073/pnas.96.24.13611. PMC 24112. PMID 10570120
56. Koduru, M., Borelli, D.P.R., Park, S. și Kim, H. 2017. Synthesis and catalytic activity of alkylamine-capped ultra-small palladium nanoparticles for organic pollutant degradation. *Journal of Cluster Science*, 28, pp. 1–12. doi:10.1007/s10876-017-1262-5.
57. Kora, A.J. și Rastogi, L., 2015. Facile green synthesis of palladium nanoparticles using gum ghatti (*Anogeissus latifolia*): catalytic and biological applications. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(2), pp.1036–1043. DOI: 10.1016/j.jece.2015.03.016.
58. Kotloski, N. J., Gralnick, J. A. 2013. Flavin Electron Shuttles Dominate Extracellular Electron Transfer by *Shewanella oneidensis*. *MBio*, 4(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.00553-12>
59. Lazăr V, Măruțescu L. G., Chifiriuc M. C.. 2017. *Microbiologie Generală și Aplicată*. Editura Universității din București.
60. Li H., Sun D. E., Liu Z. H. 2015. Ultrasensitive biosensing platform based on the luminescence quenching ability of plasmonic palladium nanoparticles. *Chem. Eur. J.* 21: 4944–4948.
61. Li H., Yang D., Li P., Zhang Q., Zhang W., Ding X., Mao J., Wu J. 2017. Palladium Nanoparticles-Based Fluorescence Resonance Energy Transfer Aptasensor for highly sensitive detection of Aflatoxin M₁ in milk. *Toxins*. 9(10): 318.
62. Li H., Yang D., Li P., Zhang Q., Zhang W., Ding X., Mao J., Wu J. 2017. Palladium Nanoparticles-Based Fluorescence Resonance Energy Transfer Aptasensor for highly sensitive detection of Aflatoxin M₁ in milk. *Toxins*. 9(10): 318.
63. Maes, S., Props, R., Fitts, J. P., de Smet, R., Vanhaecke, F., Boon, N., Hennebel, T. 2017. Biological recovery of platinum complexes from diluted aqueous streams by axenic cultures. *PLoS ONE*, 12(1), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169093>
64. Maier, T.M. și Myers, C.R., 2004. The outer membrane protein Omp35 affects the reduction of Fe(III), nitrate, and fumarate by *Shewanella oneidensis* MR-1. *BMC Microbiology*, 4, p.23.
65. Marsili, E., Baron, D. B., Shikhare, I. D., Coursolle, D., Gralnick, J. A., Bond, D. R. 2008. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), 3968–3973. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710525105>
66. McMillan, D.G.G., Marritt, S.J., Butt, J.N. și Jeuken, L.J.C. 2012. Menaquinone-7 is specific cofactor in tetraheme quinol dehydrogenase CymA. *Journal of Biological Chemistry*, 287(17), 14215–14225. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.348813>
67. Moisescu C., Ardelean I. I., Benning L. G. 2014. The effect and role of environmental conditions on magnetosome synthesis. *Frontiers in Microbiology*. 5: 49.

68. Myers Charles și Myers Judith. (1997). Cloning and sequence of *cymA*, a gene encoding a tetraheme cytochrome c required for reduction of iron(III), fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of bacteriology*. 179. 1143-52. 10.1128/jb.179.4.1143-1152.1997.
69. Nangia Y., Wangoo N., Goyal N. Shekhawat G., Suri C. R. 2009. A novel bacterial isolate *Stenotrophomonas maltophilia* as living factory for synthesis of gold nanoparticles. *Microb. Cell. Fact.* BioMed Central Ltd. London. 8: 39.
70. Narayanan K. și Sakthivel N. 2010. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science* 156(1-2): 1-13.
71. Ng, C.K., Tan, T.K.C., Song, H., și Cao, B., 2013. Reductive formation of palladium nanoparticles by *Shewanella oneidensis*: role of outer membrane cytochromes and hydrogenases. *RSC Advances*, 5(70), pp.56433–56440.
72. Nishanthi R., Malathi S., Palani P. 2019. Green synthesis and characterization of bioinspired silver, gold and platinum nanoparticles and evaluation of their synergistic antibacterial activity after combining with different classes of antibiotics. *Mater. Sci. Eng. C. Elsevier*. London. 96: 693–707.
73. Paquete, C.M., Hapke, H., Martins, M., 2023. Elucidation of the electron transfer mechanisms of hydrogen production from light by *Shewanella oneidensis* - cadmium sulfide biohybrid system. *Cell Reports Physical Science*, 4(3), 100269.
74. Paramelle, D.; Sadovoy, A.; Gorelik, S.; Free, P.; Hobley, J.; Fernig, D. G. 2014. A Rapid Method to Estimate the Concentration of Citrate-Capped Silver Nanoparticles from UV-Visible Light Spectra. *Analyst*, 139, 4855–4861.
75. Peng Y., Wang P., Luo L., Liu L., Wang F. 2018. Green synthesis of fluorescent palladium nanoclusters. *Materials*. 11(2): 191.
76. Peng Y., Wang P., Luo L., Liu L., Wang F. 2018. Green synthesis of fluorescent palladium nanoclusters. *Materials*. 11(2): 191.
77. Pirbadian, S., Barchinger, S. E., Leung, K. M., Byun, H. S., Jangir, Y., Bouhenni, R. A., Reed, S. B., Romine, M. F., Saffarini, D. A., Shi, L., Gorby, Y. A., Golbeck, J. H., El-Naggar, M. Y. 2014. *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), 12883–12888. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410551111>
78. Potocnik J. *Off J Eur Communities: Legis*. 2011; L275:38–40. doi: 10.3000/19770677.L_2011.275.eng.
79. Qamar, S.U.R. și Ahmad, J.N., 2021. Nanoparticles: Mechanism of biosynthesis using plant extracts, bacteria, fungi, and their applications. *Journal of Molecular Liquids*, 337, p.116040. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116040>.
80. Rafeeq, H., Hussain, A., Ambreen, A., Khan, A.A., Al-Zaqri, N. și Shkir, M., 2022. Functionalized nanoparticles and their environmental remediation potential: a review. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 12, pp.1007–1031. [online] Available at: <https://doi.org/10.1007/s40097-021-00468-9>.

81. Rajput, V.D., Minkina, T., Kimber, R.L., Singh, V.K., Shende, S., Behal, A., Sushkova, S., Mandzhieva, S. și Lloyd, J.R., 2021. Insights into the biosynthesis of nanoparticles by the genus *Shewanella*. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(22), e01205-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.01205-21>
82. Saif, S., Adil, S. F., Chaudhry, A., Khan, M. 2022. Microbial synthesis of magnetic nanomaterials. In *Agri-Waste and Microbes for Production of Sustainable Nanomaterials* (pp. 323–356). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823575-1.00020-2>
83. Schmidt, H., 2001. Nanoparticles by chemical synthesis, processing to materials and innovative applications. *Applied Organometallic Chemistry*, 15(5), pp.331–343. Available at: <https://doi.org/10.1002/aoc.169>.
84. Shamaila, S., Zafar, N., Riaz, S., Sharif, R., Nazir, J. și Naseem, S., 2016. Gold nanoparticles: an efficient antimicrobial agent against enteric bacterial human pathogen. *Nanomaterials*, 6(4), p.71. DOI: 10.3390/nano6040071
85. Sharma, V. K., Yngard, R. A., și Lin, Y. 2012. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145(1–2), 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.09.002>
86. Shi, L., Dong, H., Reguera, G., Beyenal, H., Lu, A., Liu, J., Yu, H-Q. și Fredrickson, J.K. 2016. Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 651–662. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.93>
87. Shi, L., Squier, T.C., Zachara, J.M. și Fredrickson, J.K. 2007. Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multiheme c-type cytochromes. *Molecular Microbiology*, 65(1), 12–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05783.x>
88. Siddiqi K. S. și Husen A. 2016. Green synthesis, characterization and uses of Palladium/Platinum nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*. 11: 482.
89. Singh, Y., Javier, J.R.N., Ehrman, S.H., și Magnusson, M.H., 2002. Approaches to increasing yield in evaporation/condensation nanoparticle generation. *Journal of Aerosol Science*, 33(9), pp.1309–1325. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-8502\(02\)00072-1](https://doi.org/10.1016/S0021-8502(02)00072-1).
90. Sriramulu M. și Sumathi S. 2018. Biosynthesis of palladium nanoparticles using *Saccharomyces cerevisiae* extract and its photocatalytic degradation behaviour. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* 9(2): 025018-025024.
91. Suresh A. K., Doktycz M. J, Wang W., Moon J., Gu B., Meyer 3rd H. M, Hensley D. K., Allison D. P., Phelps T. J., Pelletier D. A. 2011. Monodispersed biocompatible silver sulfide nanoparticles: Facile extracellular biosynthesis using the γ -proteobacterium, *Shewanella oneidensis*. *Acta Biomaterialia*. 7(12): 4253-4258.
92. Thanh, N.T.K., Maclean, N. și Mahiddine, S., 2014. Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. *Chemical Reviews*, 114(15), pp.7610–7630.
93. Thatoi, P., Kerry, R.G., Gouda, S., Das, G., Pramanik, K., Thatoi, H. și Patra, J.K., 2016. Photo-mediated green synthesis of silver and zinc oxide nanoparticles using aqueous extracts of two mangrove plant

- species, *Heritiera fomes* and *Sonneratia apetala*, and investigation of their biomedical applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 163, pp.311–318.
94. Tuo, Y., Liu, G., Dong, B., Yu, H., Zhou, J., Wang, J., Jin, R. 2017. Microbial synthesis of bimetallic PdPt nanoparticles for catalytic reduction of 4-nitrophenol. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(6), 5249–5258. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8276-7>
 95. Veisi H., Hemmati S., Qomi M. 2017. Aerobic oxidation of benzyl alcohols through biosynthesized palladium nanoparticles mediated by Oak fruit bark extract as an efficient heterogeneous nanocatalyst. *Tetrahedron Letters*. 58(44): 4191-4196.
 96. von Canstein, H., Ogawa, J., Shimizu, S., Lloyd, J.R., 2008. Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3), pp.615–623. <https://doi.org/10.1128/AEM.01387-07>
 97. Wang W, Nadagouda MN, Mukhopadhyay SM. 2022. Advances in Matrix-Supported Palladium Nanocatalysts for Water Treatment. *Nanomaterials (Basel)*. Oct 13;12(20):3593. doi: 10.3390/nano12203593. PMID: 36296782; PMCID: PMC9612339.
 98. Xu, H., Xiao, Y., Xu, M., Cui, H., Tan, L., Feng, N., Liu, X., Qiu, G., Dong, H., Xie, J. 2019. Microbial synthesis of Pd–Pt alloy nanoparticles using *Shewanella oneidensis* MR-1 with enhanced catalytic activity for nitrophenol and azo dyes reduction. *Nanotechnology*, 30(6), 065607. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aaf2a6>
 99. Yates M. D., Cusick R. D., Logan B. E. 2013. Extracellular palladium nanoparticle production using *Geobacter sulfurreducens*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. American Chemical Society Publisher. New York. 1(9): 1165-1171.
 100. Yu, K., Huang, Z., Xiao, Y. & Wang, D., 2022. *Shewanella* infection in humans: epidemiology, clinical features and pathogenicity. *Virulence*, 13(1), pp.1515–1532. Available at: <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2117831>.
 101. Zayadi, R. A., & Bakar, M. F. A. 2020. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* extracts and evaluation of their antioxidant activities. *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 1116–1122. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.09.004>
 102. Zou, L., Zhu, F., Long, Z., Huang, Y. 2021. Bacterial extracellular electron transfer: a powerful route to the green biosynthesis of inorganic nanomaterials for multifunctional applications. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00868-7>