

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI

FACULTATEA DE BIOLOGIE

ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE

**FLAVONOIDE SINTETICE CU SUBSTITUENȚI HALOGENAȚI -
SOLUȚII DE COMBATERE A FENOMENULUI DE REZISTENȚĂ
LA ANTIBIOTICE**

Rezumat teză de doctorat

Coordonator științific:

Prof. univ. dr. habil. Marius ȘTEFAN

Doctorand:

Cristina-Veronica MOLDOVAN

(căs. BALAEȘ-MOLDOVAN)

Iași, 2025

CUPRINS

LISTA ABREVIERILOR.....	8
INTRODUCERE	10
OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE STUDIULUI.....	11
PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	13
CAPITOLUL 1 – REZISTENȚA LA ANTIBIOTICE	13
1.1. MECANISME DE REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICE	13
1.1.1. Inactivarea enzimatică a antibioticului	14
1.1.2. Efluxul antibioticului din celula bacteriană	14
1.1.3. Modificarea țintei de acțiune	14
1.1.4. Împiedicarea pătrunderii antibioticului în celulele bacteriene	14
1.2. REZISTENȚA LA ANTIBIOTICE LA UNELE BACTERII CU IMPORTANȚĂ MEDICALĂ.....	14
1.2.1. <i>Enterococcus</i> spp.....	15
1.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.2.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
1.2.4. <i>Acinetobacter baumannii</i>	15
1.2.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
1.2.6. <i>Enterobacter</i> spp.	16
1.3. REZISTENȚA LA ANTIBIOTICE ÎN STAȚIILE DE EPURARE A APELOR UZATE	16
1.3.1. Rezistența la antibioticele β -lactamice	16
1.3.2. Rezistența la aminoglicozide	16
1.3.3. Rezistența la tetraciline.....	17
1.3.4. Rezistența la macrolide – lincosamide – streptogramină B	17
1.3.5. Rezistența la fluorochinolone	17
1.3.6. Rezistența la sulfamide și diaminopirimidine	18
CAPITOLUL 2. FLAVONOIDE SINTETICE – SOLUȚII PROMIȚĂTOARE PENTRU COMBATAREA FENOMENULUI DE ANTIBIOREZISTENȚĂ	18
2.1. ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A FLAVONOIDELOR	18
2.2. MECANISME DE ACȚIUNE A FLAVONOIDELOR.....	19
2.3. ACȚIUNEA SINERGICĂ A FLAVONOIDELOR CU ANTIBIOTICE CONVENȚIONALE.....	19
PARTEA a-II-a – CONTRIBUȚII PERSONALE.....	20

CAPITOLUL 3 – IZOLAREA DE BACTERII REZISTENTE LA ANTIBIOTICE DIN PROBE DE APĂ REZIDUALĂ ȘI PRODUSE PATOLOGICE	20
3.1. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE.....	20
3.1.1. Izolarea de tulpini bacteriene rezistente la antibiotice	20
3.1.2. Descrierea caracterelor macro-morfologice ale tulpinilor izolate	20
3.1.3. Examinarea microscopică a frotiurilor colorate Gram	20
3.1.4. Identificarea taxonomică cu ajutorul spectrometriei de masă MALDI-TOF.....	20
3.1.5. Determinarea concentrației minime inhibitorii folosind metoda diluțiilor în rata 2	20
3.1.6. Identificarea genelor de rezistență la antibiotice.....	21
3.1.7. Analiza bioinformatică a secvențelor genomice	21
3.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	21
3.2.1. Caracterizarea macro- și micro-morfologică a tulpinilor izolate din proba de apă reziduală.....	21
3.2.2. Identificarea taxonomică a tulpinilor bacteriene izolate	21
3.2.3. Analiza profilului taxonomic al tulpinilor bacteriene prezente în influentul stației de epurare a municipiului Iași	22
3.2.4. Evaluarea nivelului de rezistență la antibiotice.....	24
3.2.5. Evidențierea prezenței genelor de rezistență în probele de apă reziduală	25
CAPITOLUL 4. MECANISME IMPLICATE ÎN REZISTENȚA LA ANTIBIOTICE IDENTIFICATE LA TULPINILE BACTERIENE INVESTIGATE.....	27
4.1. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE.....	27
4.1.1. Aprecierea capacității de aderare a bacteriilor rezistente la diferite suporturi	27
4.1.2. Evaluarea producerii de enzime ce degradează antibioticele	27
4.1.3. Evidențierea prezenței pompelor de eflux cu ajutorul bromurii de etidiu	28
4.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	28
4.2.1. Evaluarea capacității de formare a biofilmelor	28
4.2.2. Evaluarea prezenței enzimelor implicate în degradarea antibioticelor.....	30
4.2.3. Identificarea prezenței pompelor de eflux	31
CAPITOLUL 5. EFICIENȚA UNOR FLAVONOIDE SINTETICE CA AGENȚI ANTIMICROBIENI.....	31
5.1. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE.....	31
5.1.2. Determinarea concentrației minime inhibitorii a flavonoidelor sintetice triciclice cu sulf prin metoda diluțiilor în rata 2.....	32
5.1.3. Determinarea concentrației minime bactericide	32
5.1.4. Evoluția unei populații bacteriene într-o cultură discontinuă asincronă.....	32

5.1.5. Aprecierea viabilității tulpinilor bacteriene prin metoda numărării coloniilor pe medii solide.....	33
5.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	33
5.2.1. Activitatea antimicrobiană a unor flavonoide sintetice triclice cu sulf.....	33
5.2.2. Efectul flavonoidelor sintetice cu sulf asupra creșterii unor tulpini bacteriene rezistente la antibiotice.....	35
5.2.3. Aprecierea efectului flavonoidelor sintetice triclice cu sulf asupra viabilității celulelor bacteriene	37
CAPITOLUL 6. MECANISME DE ACȚIUNE ALE FLAVONOIDEI BrCl	39
6.1. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE.....	39
6.1.1. Evaluarea permeabilității membranei celulelor bacteriene utilizând microscopia cu fluorescență.....	39
6.1.2. Evaluarea integrității celulelor bacteriene folosind microscopia electronică cu baleiaj	39
6.1.3. Evaluarea activității flavonoidei BrCl asupra aderării celulelor bacteriene din biofilm	39
6.1.4. Cuantificarea biomasei biofilmului bacterian format în prezența flavonoidei BrCl	39
6.1.5. Determinarea activității metabolice a celulelor din biofilm.....	39
6.1.6. Evaluarea efectului produs de flavonoida BrCl asupra biofilmului matur	40
6.1.7. Aprecierea efectului produs de flavonoida BrCl asupra hidrofobicității celulelor de <i>Acinetobacter</i> spp.....	40
6.1.8. Efectul flavonoidei BrCl asupra producerii de EPS.....	40
6.1.9. Determinarea efectului produs de flavonoida BrCl asupra motilității celulelor bacteriene.....	40
6.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	40
6.2.1. Efectul flavonoidei BrCl asupra integrității membranei celulelor bacteriene	40
6.2.2. Flavonoida BrCl induce modificări semnificative ale morfologiei celulelor de <i>S. aureus</i> și <i>E. coli</i>	42
6.2.3. Aderarea celulelor bacteriene de <i>Acinetobacter</i> spp. este influențată de flavonoida BrCl	42
6.2.4. Influența flavonoidei BrCl asupra inhibării biofilmului produs de specii ale genului <i>Acinetobacter</i>	44
6.2.5. Flavonoida BrCl reduce activitatea metabolică a celulelor din biofilmul produs de tulpina <i>A. pittii</i> Cl ₂ (3).....	47
6.2.6. Flavonoida BrCl distruge biofilmul matur produs de <i>A. baumannii</i> și <i>A. pittii</i>	48

6.2.7. Flavonoida BrCl reduce hidrofobicitatea suprafeței celulelor de <i>Acinetobacter</i> ..	50
6.2.8. Flavonoida BrCl influențează producerea de EPS	50
6.2.9. Flavonoida BrCl nu influențează motilitatea de tip <i>swarming</i> , <i>swimming</i> și <i>twitching</i>	51
CAPITOLUL 7. EFECTUL SINERGIC AL COMBINAȚIILOR FLAVONOIDE SINTETICE TRICICLICE CU SULF – ANTIBIOTICE.....	51
7.1. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE.....	51
7.1.1. Aprecierea efectului sinergic produs de combinațiile flavonide sintetice – antibiotice cu ajutorul metodei <i>checkerboard</i>	51
7.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	52
CAPITOLUL 8. DETERMINAREA POTENȚIALULUI CITOTOXIC ȘI ANTI-INFLAMATOR AL FLAVONOIDEI BrCl.....	55
8.1. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE.....	55
8.1.1. Evaluarea efectului produs de flavonoida BrCl asupra viabilității celulelor umane	55
8.1.2. Evaluarea efectului pro- și anti-inflamator determinat de flavonoida BrCl	55
8.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	55
8.2.1. Aprecierea efectului citotoxic al flavonoidei BrCl	55
8.2.2. Aprecierea efectului pro- și anti-inflamator determinat de flavonoida BrCl	56
CONCLUZII.....	57
PERSPECTIVE DE CONTINUARE A STUDIILOR	61
DISEMINAREA REZULTATELOR OBȚINUTE PE PARCURSUL SUDIILOR DOCTORALE	61
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	66

Mulțumiri

Odată cu finalizarea stagiului doctoral, doresc să adresez pe această cale sincere mulțumiri și gânduri de profundă recunoștință conducătorului de doctorat, domnului Prof. univ. dr. habil. Marius Ștefan pentru încrederea, răbdarea, înțelegerea și atenta îndrumare acordată în vederea realizării prezentei teze de doctorat.

Pentru disponibilitatea, suportul și sugestiile prețioase, adresez deosebite mulțumiri fiecărui membru din comisia de îndrumare: doamnei Prof. univ. dr. Simona Isabela Dunca, domnului Prof. univ. dr. habil. Marius Mihășan și domnului Prof. univ. dr. habil. Lucian Mihail Bîrsa.

Sincere mulțumiri doresc să adresez referenților științifici pentru bunăvoința de a analiza această lucrare.

Mulțumesc doamnei Biol. princ. dr. Simona Mătiuș din cadrul Laboratorului de analize medicale Praxis din Iași pentru amabilitatea de a ne oferi spre testare diverse tulpini bacteriene rezistente la antibiotice.

În aceeași măsură doresc să adresez sincere mulțumiri colectivului aflat sub îndrumarea domnului Prof. univ. dr. habil. Lucian Mihail Bîrsa din cadrul Facultății de Chimie a Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași pentru buna colaborare și pentru bunăvoința de a ne oferi spre testare flavonoidele sintetice triciclice cu sulf.

De asemenea, adresez deosebite mulțumiri domnului Prof. univ. dr. habil. Marius Mihășan și kolegi drd. Amada El-Sabeh pentru ajutorul acordat în vederea analizei datelor metagenomice.

Doamnelor CS II Gabriela Vochița și CS III Daniela Gherghel din cadrul Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Științele Biologice, filiala Iași le mulțumesc pentru sprijinul acordat în desfășurarea unor experimente.

Colegului drd. Ștefan Mihăiță Olaru îi mulțumesc pentru răbdarea de care a dat dovadă în realizarea fotografiilor la microscopul electronic cu baleiaj.

Totodată, doresc să adresez sincere mulțumiri grupului de cercetare îndrumat de doamna Prof. dr. Rozenn Ravallec și domnul Conf. dr. Benoît Cudennec de la Institutul Charles Viollette din cadrul Universității Lille din Franța pentru că au făcut posibilă realizarea deopotrivă a testelor de citotoxicitate și inflamație.

Mulțumesc doamnei Conf. dr. Anca Lucău-Dănilă din cadrul unității UMR-T, BioEcoAgro de la Universitatea Lille din Franța pentru bunăvoința de a mă coordona și de mă primi în laborator pe parcursul stagiului de practică ERASMUS+.

Domnului Ing. dr. Quentin Haguet de la Universitatea Lille din Franța doresc să îi mulțumesc pentru suportul acordat în identificarea speciilor bacteriene prin intermediul spectrometriei de masă MALDI-TOF.

Pentru amabilitatea și disponibilitatea de care a dat dovadă de fiecare dată, mulțumesc doamnei Mihaela Mișenschi.

Mulțumesc colegilor din grupul de cercetare BioActive pentru momentele frumoase pe care mi le-au oferit pe parcursul stagiului doctoral.

Nu în ultimul rând, doresc să le mulțumesc din suflet părinților și soțului pentru toată înțelegerea, răbdarea și susținerea morală necondiționată pe care mi le-au oferit în toți acești ani.

LISTA ABREVIERILOR

- ADN** – engl. *deoxyribonucleic acid* – acid dezoxiribonucleic
- ARNm** – engl. *messenger ribonucleic acid* – acid ribonucleic mesager
- ATCC** – engl. *American Type Culture Collection*
- CMB** – engl. *minimum bactericidal concentration* – concentrație minimă bactericidă
- CMI** – engl. *minimum inhibitory concentration* – concentrație minimă inhibitorie
- CSH** – engl. *cell surface hydrophobicity* – hidrofobicitatea suprafeței celulare
- DHFR** – engl. *dihydrofolate reductase* – dihidrofolat reductaza
- DHPS** – engl. *dihydropteroate synthase* – dihidropteroat sintaza
- DMSO** – engl. *dimethyl sulfoxide* – dimetilsulfoxid
- EPS** – engl. *extracellular polymeric substances* – substanțe polimerice extracelulare
- ESBL** – engl. *extended spectrum beta-lactamase* – beta-lactamaze cu spectru extins
- ESKAPE** – *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* și *Enterobacter* spp.
- FIC** – engl. *fractional inhibitory concentration* – fracția concentrației inhibitorii
- FICI** – engl. *fractional inhibitory concentration index* – indice de concentrație inhibitorie fracționată
- HOME-BIO** – engl. *sHOGun MEtagenomic analysis of BIOlogical entities*
- IC₅₀** – engl. *half-maximal inhibitory concentration*
- IL** – engl. *interleukin* – interleuchină
- KPC** – engl. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* – carbapenemaze produse de *Klebsiella pneumoniae*
- MBL** – engl. *metallo-β-lactamase* – metalo-β-lactamaze
- MDR** – engl. *multidrug-resistant bacteria* – tulpină multi-rezistentă
- MLS** – engl. *Macrolide-Lincosamide-Streptogramin antibiotics* – grupul macrolide, lincosamide, streptogramine
- MRSA** – engl. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* – *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină
- MSSA** – engl. *methicillin-susceptible Staphylococcus aureus* – *Staphylococcus aureus* sensibil la meticilină
- MTT** – engl. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*
- OMS** – engl. *World Health Organization* – Organizația Mondială a Sănătății
- PBP** – engl. *penicillin-binding proteins* – proteinele ce leagă molecula de penicilină
- PDR** – engl. *pandrug resistance* – tulpini pan-rezistente

rsCDM – engl. *rapid and simplified carbapenemase detection method* – metodă rapidă și simplificată de detecție a carbapenemazelor

SEAU – engl. *wastewater treatment plants* – stații de epurare a apelor uzate

TNF- α – engl. *tumour necrosis factor alpha* – factor de necroză tumorală α

UV – engl. *ultraviolet* – ultraviolete

XDR – engl. *extensively drug-resistant* – tulpini extensiv rezistente

INTRODUCERE

Bolile infecțioase produse de microorganismele patogene au reprezentat o cauză majoră a mortalității înregistrată în rândul populației umane din epoca pre-industrială, precum și în declanșarea unor epidemii și pandemii care au marcat istoria umanității. Descoperirea antibioticelor, diversificarea producției sub aspectul structurii chimice și utilizarea pe scară largă a compușilor antimicrobieni a permis tratarea a numeroase infecții bacteriene la mijlocul secolului trecut. Cu toate acestea, utilizarea extensivă a substanțelor antimicrobiene a determinat rapid apariția fenomenului de rezistență la antibiotice.

Cu fiecare clasă de antibiotice și tip de antibiotic nou dezvoltat, în decurs de unul-două decenii au apărut și tulpinile rezistente la compusul utilizat. Mai mult, pe măsura extinderii utilizării antibioticelor, au fost izolate tot mai multe tulpini de relevanță clinică rezistente la diferite substanțe, iar ulterior au fost evidențiate tulpini multi-rezistente (MDR), extensiv rezistente (XDR) și chiar pan-rezistente (PDR – tulpini rezistente la toate antibioticele disponibile și aprobate pentru uzul uman).

Acest fenomen a căpătat o amploare alarmantă în ultimii ani, stârnind îngrijorări majore în rândul practicienilor din domeniul medical, comunității științifice, societății civile și a factorilor de decizie. Organizația Mondială a Sănătății (OMS) consideră rezistența la antibiotice drept o problemă de importanță majoră la nivel mondial, riscurile constând în imposibilitatea tratării unor boli infecțioase importante.

Flavonoidele sunt compuși ce se găsesc în mod natural în plante, având o varietate impresionantă de structuri chimice. Studiile moderne privind activitatea chimică a unor flavonoide au evidențiat proprietăți antibacteriene remarcabile, datorate unor moduri de acțiune variate. Important de menționat este efectul sinergic pe care unele flavonoide îl prezintă în combinație cu antibioticele convenționale utilizate în terapia umană, ceea ce creează premisele elaborării unor strategii de tratament eficiente. De asemenea, datorită modificării structurii chimice, numeroase flavonoide sintetice sau semi-sintetice manifestă o activitate antibacteriană mult mai pronunțată față de germenii patogeni decât cele naturale.

Întrucât rezistența la antibiotice prezintă o importanță deosebită la nivel global în ceea ce privește sănătatea populației umane, în studiul de față ne-am îndreptat atenția asupra investigării prezenței bacteriilor rezistente în probe de apă reziduală, analizării mecanismelor de rezistență la microorganismele izolate și nu în ultimul rând asupra evaluării proprietăților antibacteriene ale unor flavonoide sintetice triciclice cu sulf, manifestate împotriva unor tulpini bacteriene rezistente. S-a avut în vedere și investigarea mecanismelor de acțiune ale flavonoidelor selectate, evaluarea efectului sinergic produs de combinațiile formate din flavonoide cu unele antibiotice convenționale, precum și investigarea potențialului citotoxic și

antiinflamator al unei flavonoide selectate (BrCl). Datele obținute sugerează un potențial important al flavonoidei BrCl ca soluție alternativă promițătoare în combaterea unor bacterii patogene rezistente.

OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE STUDIULUI

Obiectivul principal al acestui studiu a fost reprezentat de evaluarea activității antibacteriene a unor flavonoide sintetice triciclice cu sulf în vederea identificării de soluții eficiente pentru combaterea fenomenului de rezistență la antibiotice. În scopul îndeplinirii obiectivului principal au fost urmărite 7 obiective secundare, fiecare dintre acestea prezentând o serie de activități asociate.

1. Caracterizarea unor tulpini bacteriene rezistente la antibiotice

Activități asociate:

A.1.1. Izolarea de tulpini bacteriene din probe de ape reziduale urbane și din produse patologice

A.1.2. Analiza caracterelor macro- și micro-morfologice ale tulpinilor izolate

A.1.3. Determinarea nivelului de rezistență la antibiotice

A.1.4. Identificarea taxonomică a unor tulpini bacteriene izolate

2. Determinarea genelor de rezistență la antibiotice în probele de apă reziduală

Activități asociate:

A.2.1. Izolarea și aprecierea calității ADN-ului metagenomic

A.2.2. Analiza genelor implicate în rezistența la antibiotice

3. Evaluarea unor mecanisme de rezistență la antibiotice prezente la tulpinile bacteriene selectate

Activități asociate:

A.3.1. Aprecierea capacității unor tulpini bacteriene de a forma biofilme

A.3.2. Evidențierea producției de β -lactamaze

A.3.3. Evidențierea prezenței pompelor de eflux

4. Aprecierea potențialului antibacterian al unor flavonoide sintetice triciclice cu sulf împotriva unor tulpini bacteriene rezistente

Activități asociate:

A.4.1. Determinarea concentrației minime inhibitorii și a concentrației minime bactericide

A.4.2. Evaluarea influenței asupra creșterii bacteriene

A.4.3. Aprecierea efectelor asupra viabilității celulelor bacteriene

5. Determinarea mecanismelor de acțiune ale flavonoidei BrCl

Activități asociate:

A.5.1. Evaluarea integrității membranei celulelor bacteriene folosind tehnici de microscopie cu fluorescență și microscopie electronică cu baleiaj

A.5.2. Determinarea activității antibiofilm

6. Stabilirea efectului sinergic al flavonoidei BrCl cu diferite antibiotice

Activități asociate:

A.6.1. Determinarea efectului sinergic folosind metoda *checkerboard*

A.6.2. Evaluarea efectului sinergic produs de combinația flavonoide - antibiotice asupra viabilității celulelor bacteriene

7. Aprecierea potențialului citotoxic și antiinflamator al flavonoidei BrCl

Activități asociate:

A.7.1. Testarea influenței flavonoidei selectate asupra viabilității unor celule umane

A.7.2. Evaluarea efectului stimulator al flavonoidei asupra secreției de citochine pro-inflamatoare

Structura tezei de doctorat

Teza de doctorat este structurată în două părți:

Partea I. Considerații teoretice, alcătuită din două capitole ce prezintă o sinteză a literaturii de specialitate.

Partea a II-a. Contribuții personale, formată din 6 capitole, împărțite fiecare în *Generalități, Materiale și metode de cercetare și Rezultate și discuții*.

Teza se finalizează cu *Concluzii, Perspective de continuare a cercetărilor, Lista lucrărilor publicate de autor, Lista abstractelor publicate, Participări la conferințe internaționale, Participări la conferințe naționale, Proiecte de cercetare, Propunere brevet, Bibliografie și Anexe*.

PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL 1 – REZISTENȚA LA ANTIBIOTICE

Conform Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), rezistența microorganismelor la terapia antimicrobiană reprezintă una dintre cele mai mari probleme cu care se confruntă medicina secolului XXI. Rezistența la antibiotice, potrivit Centrului European pentru Prevenirea și Controlul Bolilor este definită ca o abilitate a microorganismelor (virusuri, bacterii, fungi) de a rezista acțiunii unui sau mai multor compuși cu acțiune antimicrobiană (Moldovan *et al.*, 2022). Antibio-rezistența apare în momentul în care microorganismele nu mai răspund la substanțele antimicrobiene la care au fost anterior sensibile și care s-au dovedit anterior eficiente în tratarea infecțiilor cauzate de aceste microorganisme patogene (Mancuso *et al.*, 2021). Fenomenul de rezistență la antibiotice conduce la o diminuare considerabilă a posibilităților de tratare a multor boli infecțioase produse de microorganismele patogene. Consumul excesiv alături de prescrierea neadecvată a antibioticelor reprezintă cauze importante ale fenomenului de rezistență (Ventola, 2015).

1.1. MECANISME DE REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICE

Mecanismele implicate în rezistența la antibiotice sunt împărțite în două categorii: mecanisme de rezistență naturală și mecanisme de rezistență dobândită (Uddin *et al.*, 2021).

Rezistența naturală la compușii cu activitate antimicrobiană poate fi deopotrivă intrinsecă (exprimată la nivel de specie) sau indusă (genele ce conferă rezistență sunt prezente în mod natural la bacterii, însă sunt exprimate doar în momentul în care microorganismul ia contact cu antibioticul) (Uddin *et al.*, 2021).

Rezistența dobândită la antibiotice poate să apară prin mutații ale ADN-ului cromozomial propriu sau datorită achiziției de material genetic pe mai multe căi (transfer orizontal de gene).

Unele dintre cele mai importante mecanisme de rezistență dobândită sunt: inactivarea enzimatică a antibioticelor, efluxul antibioticelor din celule, modificarea țintei de acțiune a antibioticelor și împiedicarea pătrunderii compușilor cu activitate antimicrobiană în interiorul celulelor bacteriene (Uddin *et al.*, 2021).

1.1.1. Inactivarea enzimatică a antibioticului

Principalele tipuri de enzime ce degradează antibioticele sunt reprezentate de β -lactamaze, acetil-transferaze și enzimele ce degradează aminoglicozidele (Giedraitienė *et al.*, 2011).

1.1.2. Efluxul antibioticului din celula bacteriană

Pompele de eflux reprezintă un complex de proteine implicate în transportul diferitelor molecule (antibiotice, detergenți, coloranți) din interiorul celulelor în mediul exterior (Blair *et al.*, 2014). Dintre pompele de eflux cunoscute, cele care prezintă implicații medicale importante aparțin familiei RND (Blair *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015).

1.1.3. Modificarea țintei de acțiune

Modificarea proteinelor ce leagă moleculele de penicilină (PBP) reprezintă un mecanism de rezistență întâlnit la bacteriile Gram-pozitive, dezvoltarea unei mutații la nivelul PBP-urilor conducând la scăderea afinității pentru antibioticele β -lactamice. Macrolidele, lincosamidele și streptogramina A (MLS) blochează sinteza proteinelor la bacteriile Gram-negative prin atașarea la subunitățile ribozomale 50S. Antibioticele glicopeptidice împreună cu precursorii peptidoglicanului (D-alanil-D-alanin) inhibă transpeptidarea și transglicozilarea din cadrul procesului de sinteză a peretelui celulei bacteriene (Giedraitienė *et al.*, 2011; Kapoor *et al.*, 2017; Peterson și Kaur, 2018).

1.1.4. Împiedicarea pătrunderii antibioticului în celulele bacteriene

Bacteriile au dezvoltat de-a lungul timpului mecanisme prin care împiedică antibioticele să își exercite efectul la nivel intracelular sau periplasmic, prin diminuarea absorbției moleculelor în interiorul celulelor datorată reducerii numărului de porine și/sau expresiei diferențiale ale acestora (Munita și Arias, 2016).

1.2. REZISTENȚA LA ANTIBIOTICE LA UNELE BACTERII CU IMPORTANȚĂ MEDICALĂ

Principala cauză a infecțiilor intra-spitalicești la nivel mondial o reprezintă un grup de microorganisme patogene numit generic ESKAPE – *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp. ce constituie o adevărată provocare pentru medicina modernă, din cauza capacității crescute ale acestora de a dobândi rezistență la

antibiotice (Santajit și Indrawattana, 2016). Din acest motiv, OMS consideră tulpinile bacteriene menționate ca fiind o amenințare globală la adresa sănătății publice, pentru care este nevoie urgentă de identificarea unor noi compuși antimicrobieni eficienți (Ayobami *et al.*, 2022).

1.2.1. *Enterococcus* spp.

Enterococii sunt bacterii Gram-pozitive, asociate frecvent cu infecțiile urinare, endocarditele infecțioase, meningite, peritonite, infecții ale plăgilor chirurgicale, infecții biliare, abcese hepatice, bacteremii (Pânzaru, 2003; O'Driscoll și Crank, 2015). Enterococii prezintă rezistență crescută antibioticele β -lactamice, trimetoprim/sulfonamide, chinolone, aminoglicozide, glicopeptide și clindamicină (French, 2005; O'Driscoll și Crank, 2015).

1.2.2. *Staphylococcus aureus*

Stafilococul auriu este un microorganism patogen oportunist ce colonizează pielea și membrana mucoasei nazale (Oliveira *et al.*, 2018). Stafilococii dobândesc rapid rezistență la eritromicină, ampicilină, tetraciclină și vancomicină (Dorneanu și Vremeră, 2011; Huemer *et al.*, 2020).

1.2.3. *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae este o bacterie Gram-negativă capsulată, răspunzătoare de unele infecții nosocomiale și comunitare, precum infecții ale tractului urinar, infecții pulmonare, abces hepatic, infecții de cateter și septicemie (Moya și Maicas, 2020; Mancuso *et al.*, 2021). Tulpinile de *K. pneumoniae* manifestă rezistență la chinolone și fluorochinolone, polimixine și tigeciclină,

1.2.4. *Acinetobacter baumannii*

Tulpinile de *A. baumannii* sunt responsabile de o varietate de infecții, printre care se numără infecțiile respiratorii și cele ale tractului urinar (Huemer *et al.*, 2020). Conform Mancuso *et al.* (2021), tulpinile de *A. baumannii* pot dezvolta rezistență la imipenem, meropenem, carbapeneme și fluorochinolone.

1.2.5. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa este o bacterie patogenă oportunistă, ce determină creșterea mortalității și morbidității în rândul pacienților diagnosticați cu fibroză chistică și a indivizilor

imunocompromiși. (Pang *et al.*, 2019). Tulpinile de *P. aeruginosa* pot prezenta rezistență la aminoglicozidele, chinolonele și antibioticele β -lactamice (Hancock și Speert, 2000).

1.2.6. *Enterobacter* spp.

Reprezentanții genului *Enterobacter* sunt specii nefastidioase, Gram-negative, uneori capsulate, ce pot provoca infecții în rândul persoanelor imunocompromise, asemănătoare cu cele determinate de *K. pneumoniae* (Santajit și Indrawattana, 2016). Tulpinile de *Enterobacter* manifestă rezistență la majoritatea antibioticelor utilizate în terapie, cu excepția tigericinei și a colistinei (Santajit și Indrawattana, 2016).

1.3. REZISTENȚA LA ANTIBIOTICE ÎN STAȚIILE DE EPURARE A APELOR UZATE

Apele uzate și stațiile de epurare a apelor uzate (SEAU) reprezintă rezervoare importante pentru selecția de bacterii rezistente la antibiotice (Novo *et al.*, 2013), fiind considerate printre cele mai însemnate surse antropogene de diseminare a genelor ce conferă rezistență la antibiotice (Michael-Kordatou *et al.*, 2018).

1.3.1. Rezistența la antibioticele β -lactamice

Antibioticele β -lactamice constituie o clasă de compuși cu spectru extins ce prezintă în structura lor un inel β -lactamic, responsabil pentru activitatea antibacteriană (Pazda *et al.*, 2019). Cu toate că penicilinele reprezintă unele dintre cele mai utilizate substanțe cu efect antibacterian din sectorul medical și veterinar (Pazda *et al.*, 2019), prezența acestora în apele uzate și nămolul activ este destul de rar raportată, datorită instabilității și sensibilității la hidroliză a inelului β -lactamic (Hirsch *et al.*, 1999). Mecanismele prin care bacteriile dobândesc rezistență la antibioticele β -lactamice constau în diminuarea permeabilizării membranei exterioare pentru compușii antimicrobieni, fenomen datorat scăderii numărului de porine, modificarea PBP și inactivarea antibioticului prin intermediul β -lactamazelor (van Hoek *et al.*, 2011).

1.3.2. Rezistența la aminoglicozide

Aminoglicozidele reprezintă o clasă de compuși naturali sau semisintetici cu activitate atât asupra bacteriilor Gram-pozitive, cât și a celor Gram-negative (Krause *et al.*, 2016). Utilizarea aminoglicozidelor în practica medicală este de cele mai multe ori restricționată din cauza efectelor adverse și a potențialului toxic pe care îl manifestă. Contaminarea apelor, în

ciuda consumului redus de aminoglicozide, a fost detectată atât în influentul, cât și în efluentul unor stații de epurare (Mutuku *et al.*, 2022). Rezistența la aminoglicozide se datorează prezenței pompelor de eflux supraexprimate, a scăderii permeabilității membranei celulelor bacteriene, alterării ribozomale, precum și a inactivării compusului antimicrobian prin intermediul enzimelor ce degradează moleculele de antibiotic (van Hoek *et al.*, 2011).

1.3.3. Rezistența la tetraciclina

Tetraciclina este compusă cu spectru extins ce inhibă sinteza proteică prin blocarea ARNm (Kaufman, 2011). Daghrir și Drogui (2013) au identificat prezența tetraciclinelor atât în medii acvatice (ape reziduale, ape de suprafață, ape freatiche) cât și terestre (sol, sediment). Mecanismele prin care microorganismele dobândesc rezistență la tetraciclină sunt reprezentate de inactivarea enzimatică, prezența pompelor de eflux și protecția proteinelor ribozomale (van Hoek *et al.*, 2011).

1.3.4. Rezistența la macrolide – lincosamide – streptogramină B

Macrolidele, lincosamidele și streptogramina B (MLS) afectează stadiul incipient al sintezei proteice (translocția) (Kapoor *et al.*, 2017). Dintre acești compuși, reprezentanții clasei macrolidelor sunt cei mai frecvent detectați în influentul și efluentul stațiilor de epurare, fapt datorat consumului crescut din sectorul uman și veterinar, precum și a stabilității ridicate în mediu (Mutuku *et al.*, 2022, Ngigi *et al.*, 2019). Mecanismele ce conferă rezistență la antibioticele aparținătoare grupului MLS se datorează prezenței ARNr metilazei codificată de gena *erm* și a pompelor de eflux supraexprimate (van Hoek *et al.*, 2011).

1.3.5. Rezistența la fluorochinolone

Fluorochinolonele sunt antibiotice sintetice cu spectru extins, ce interferează cu sinteza ADN-ului bacterian prin inhibarea a două enzime: topoizomeraza II (ADN giraza) și topoizomeraza IV, enzime esențiale implicate în replicarea ADN-ului (Dowling *et al.*, 2011). Datorită proprietăților hidrofile pe care le manifestă, fluorochinolonele se pot răspândi cu ușurință în mediile acvatice, concentrațiile cele mai ridicate fiind raportate în efluenții ce provin de la spitale, precum și în influenții stațiilor de epurare a apelor uzate (Mutuku *et al.*, 2022). Rezistența la fluorochinolone se datorează scăderii permeabilității membranei externe corelată cu diminuarea numărului de porine, supraexpresia pompelor de eflux și mutații ale girazei și topoizomerazei IV (van Hoek *et al.*, 2011).

1.3.6. Rezistența la sulfamide și diaminopirimidine

Sulfamidele prezintă o structură analogă cu acidul *p*-aminobenzoic, fiind implicate în inhibarea dihidropteroat sintazei (DHPS), proteină cu rol în ultima etapă a biosintezei folatului necesar producției de timidină și în dezvoltarea celulelor bacteriene. Conform Mutuku *et al.* (2022), sulfamidele sunt destul de frecvent întâlnite în influentul și efluentul stațiilor de epurare. Mecanismul prin care microorganismele dobândesc rezistență la sulfamide și trimetoprim este reprezentat de mutații ale genei *folP* și *folA* ce codifică enzima DHPS, respectiv DHFR (van Hoek *et al.*, 2011).

CAPITOLUL 2. FLAVONOIDE SINTETICE – SOLUȚII PROMIȚĂTOARE PENTRU COMBATERICA FENOMENULUI DE ANTIBIOREZISTENȚĂ

Flavonoidele (lat. *flavus* = galben) reprezintă un grup de substanțe fenolice naturale de tip C₆-C₃-C₆, derivați ai 2-fenilbenzopiranului (flavan) sau ai 3-fenilbenzopiranului (izoflavan) – Figura 2.1, ce se întâlnesc cu precădere în fructe, legume, cereale, ritidomul copacilor, tulpini, flori, ceai și vin (Byalka *et al.*, 2004; Mișcalencu *et al.*, 2008).

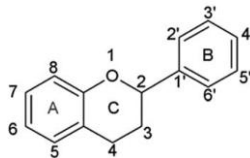


Figura 2.1. Structura de bază a flavonoidelor (după Panche *et al.*, 2016)

Pe lângă proprietățile importante pe care le îndeplinesc la nivelul diferitelor organe ale plantelor (oferă culoare florilor, protejează frunzele de agenții patogeni, dar și de radiațiile UV-B, sunt implicate în controlul proceselor de respirație, fotosinteză, morfogeneză etc.), flavonoidele manifestă și o serie de funcții importante din punct de vedere medical, printre care se numără și o activitate antimicrobiană promițătoare (Sârbu *et al.*, 2019).

2.1. ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A FLAVONOIDELOR

Flavonoidele extrase din frunzele de *Laurus nobilis* (kaempferol 3-*O*- α -L-(2'',4''-di-*E*-*p*-cumaroil)-ramnozida și kaempferol 3-*O*- α -L-(2''-*Z*-*p*-cumaroil-4''-*E*-*p*-cumaroil)-ramnozida) manifestă activitate importantă asupra tulpinilor de *S. aureus* metilino-rezistente; 2'-(OH)-calcona, 2',4'-(OH)₂-calcona și 2',4-(OH)₂-calcona prezintă activitate asupra tulpinilor

de *S. aureus* MSSA și MRSA; miricetina prezintă o activitate antimicrobiană puternică asupra unor tulpini de *Burkholderia cepacia*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus* spp. rezistent la vancomicină și *P. aeruginosa*; tomentodiplaconul; unele flavonoide prenilate, izolate din rădăcinile de *Eriosema chinense* Vogel (eriosemaona A, lupinifolinolul, flemichina D, dehidrolupinifolinolul și lupinifolinul) inhibă dezvoltarea unor tulpini de *M. tuberculosis*; izoflavona, genisteina, laburnetina, luteolina și epiafzelechina obținute din extractele de *Ficus cordata* prezintă eficiență asupra tulpinilor de *M. tuberculosis*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Citrobacter freundii*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* și *S. typhimurium*; unii derivați ai calconelor (4'-carboxi-3-bromo-calcona, 4'-carboxi-3,5-dicloro-calcona, 4'-carboxi-2-cloro-calcona, carboxi-3-nitro-calcona etc.), 4-tioflavonelor și 4-iminoflavonelor prezintă o activitate importantă asupra tulpinilor bacteriene de *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Shigella flexneri*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* și *S. enterica* (Alcaez *et al.*, 2000; Tsuchiya și Iinuma, 2000; Xu și Lee, 2001; Otsuka *et al.*, 2008; Pistelli și Giorgi, 2012; Xie *et al.*, 2015; Shamsudin *et al.*, 2022).

2.2. MECANISME DE ACȚIUNE A FLAVONOIDELOR

Activitatea antimicrobiană manifestată în mod direct de către flavonoide poate fi pusă pe seama a 5 mecanisme: alterarea membranei citoplasmatic (Ikigai *et al.*, 1993; Tsuchiya și Iinuma, 2000; Cushnie și Lamb, 2011), inhibarea sintezei acizilor nucleici (Bernard *et al.*, 1997; Plaper *et al.*, 2003; Navarro-Martínez *et al.*, 2005), inhibarea metabolismului energetic (Haraguchi *et al.*, 1998), blocarea sintezei peretelui celular (Wu *et al.*, 2008) și inhibarea sintezei membranei celulare (Cushnie și Lamb, 2011).

În ultimii ani, au fost identificate noi mecanisme de acțiune ale compușilor în cauză: inhibarea atașării celulelor bacteriene la diferite suporturi și a formării de biofilme, modificarea permeabilității celulelor bacteriene, inhibarea procesului de *quorum-sensing*, inhibarea pompelor de eflux, inhibarea căii de sinteză a acizilor grași, inhibarea motilității bacteriene, inhibarea toxinelor bacteriene (Farhadi *et al.*, 2018; Biharee *et al.*, 2020).

2.3. ACȚIUNEA SINERGICĂ A FLAVONOIDELOR CU ANTIBIOTICE CONVENȚIONALE

Literatura de specialitate menționează mai multe combinații formate din flavonoide, precum baicaleina, apigenina sau cvercetină și diverse antibiotice β-lactamice, tetraceline sau aminoglicozide, ce conduc la sensibilizarea diferitor tulpini de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* rezistente la antibiotice (Fujita *et al.*, 2005; Eumkeb *et al.*, 2010; An *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013; Mun *et al.*, 2015; Akilandeswari și Ruckmani, 2016).

PARTEA a-II-a – CONTRIBUȚII PERSONALE

CAPITOLUL 3 – IZOLAREA DE BACTERII REZISTENTE LA ANTIBIOTICE DIN PROBE DE APĂ REZIDUALĂ ȘI PRODUSE PATOLOGICE

3.1. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

3.1.1. Izolarea de tulpini bacteriene rezistente la antibiotice

Izolarea tulpinilor bacteriene rezistente la antibiotice s-a realizat pe medii de cultură selective, suplimentate cu antibiotice în concentrații care permit dezvoltarea doar a bacteriilor care prezintă rezistență la antibioticul respectiv (Esiobu *et al.*, 2002).

3.1.2. Descrierea caracterelor macro-morfologice ale tulpinilor izolate

Tulpinile izolate au fost descrise macroscopic ținându-se cont de aspectul coloniilor, formă, margine, profil, aderență și culoarea coloniilor în funcție de mediu de cultură utilizat (Dunca *et al.* 2004).

3.1.3. Examinarea microscopică a frotiurilor colorate Gram

Descrierea micro-morfologică a tulpinilor izolate s-a realizat pe frotiuri colorate Gram, urmărindu-se la microscopul optic forma celulelor bacteriene, gruparea, afinitatea tinctorială, precum și prezența sau absența sporilor (Dunca *et al.* 2004).

3.1.4. Identificarea taxonomică cu ajutorul spectrometriei de masă MALDI-TOF

Identificarea taxonomică a unui număr de 79 de tulpini bacteriene rezistente s-a realizat în cadrul Institutului Charles Viollette, Universitatea Lille, Franța, în cadrul stagiului de practică Erasmus+.

3.1.5. Determinarea concentrației minime inhibitorii folosind metoda diluțiilor în rata 2

Stabilirea CMI s-a realizat cu ajutorul diluțiilor în rata 2, în plăci sterile pentru microtitrare sau în eprubete. Pentru evaluarea CMI s-a utilizat resazurina (Sarker *et al.*, 2007).

3.1.6. Identificarea genelor de rezistență la antibiotice

Pentru identificarea genelor de rezistență la antibiotice prezente în probele de apă reziduală, un pas important a constat în izolarea ADN-ului metagenomic și aprecierea calității acestuia. Ulterior, ADN-ul extras și cuantificat a fost secvențiat folosind serviciile companiei MacroGen Europe BV (Amsterdam, Olanda).

3.1.7. Analiza bioinformatică a secvențelor genomice

Analiza bioinformatică a secvențelor genomice s-a realizat cu ajutorul sistemului HOME-BIO (engl. *sHOtgun MEtagenomic analysis of BIOlogical entities*).

3.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

3.2.1. Caracterizarea macro- și micro-morfologică a tulpinilor izolate din proba de apă reziduală

În urma prelevării și însămânțării probelor de apă pe medii selective de cultură au fost izolate 190 de tulpini bacteriene rezistente. Din punct de vedere al aspectului macro-morfologic, majoritare au fost coloniile de tip S, ce au prezentat formă rotundă/filamentoasă, margini regulate (rareori ondulate), consistență vâscoasă, culoare, profil și mărime variabilă. Analiza microscopică a evidențiat faptul că bacteriile izolate s-au prezentat sub formă de coci, bacili și cocobacili. S-a observat că celulele bacteriene se găsesc cel mai adesea fie izolate, fie grupate în diplo-, mai rar în lanțuri scurte sau ciorchine. Cu câteva excepții, majoritatea tulpinilor au fost nesporulate.

3.2.2. Identificarea taxonomică a tulpinilor bacteriene izolate

Din totalul de 79 de tulpini propuse pentru identificare, un număr de 53 de bacterii au putut fi determinate până la nivel de specie. Dintre acestea, cea care a predominat printre izolatele identificate a fost *Aeromonas caviae*, urmată de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Roultella ornithinolytica* și *Klebsiella oxytoca* – Figura 3.1.

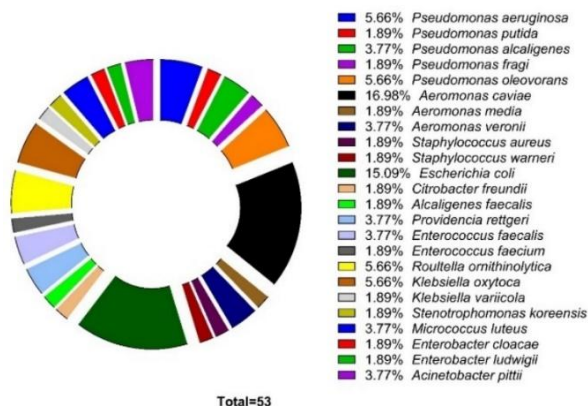


Figura 3.1. Identificarea taxonomică a tulpinilor bacteriene testate

3.2.3. Analiza profilului taxonomic al tulpinilor bacteriene prezente în influentul stației de epurare a municipiului Iași

În cele 4 probe de apă reziduală testată, domeniul predominant a fost Bacteria (>98). Dintre cele 20 de încrângături observate, majoritare au fost Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria și Verrucomicrobia – Figura 3.2.

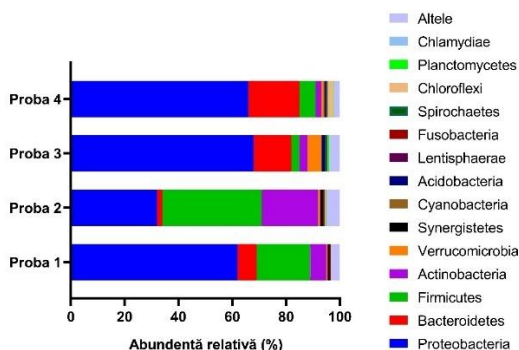


Figura 3.2. Abundența relativă a încrângăturilor identificate în influentul stației de epurare a municipiului Iași. Abundența relativă reprezintă nr. de *read*-uri alocate pentru fiecare taxon bacterian raportat la nr. total de *read*-uri atribuite domeniului Bacteria.

Primele 20 de familii a căror abundență relativă este egală sau mai mare decât valoarea 1% sunt reprezentate în Figura 3.3. Dintre acestea, se remarcă familiile

Comamonadaceae și *Pseudomonadaceae*. Bine reprezentate au fost și familiile *Caulobacteraceae*, *Flavobacteriaceae*, *Microbacteriaceae*, *Campylobacteraceae*, *Carnobacteriaceae*, *Bifidobacteriaceae* și *Eubacteriaceae*.

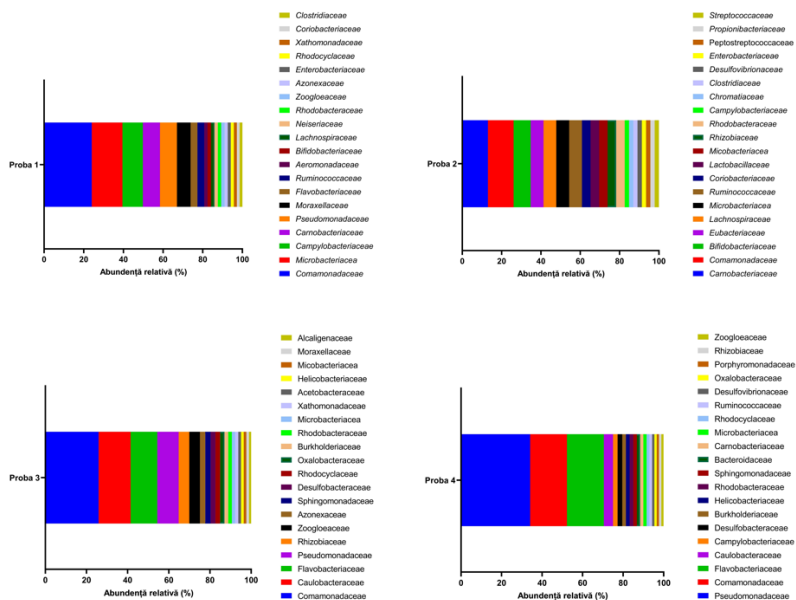


Figura 3.3. Familii identificate în influentul stației de epurare a municipiului Iași, cu abundență $\geq 1\%$. Abundența relativă reprezintă nr. de *read*-uri alocate pentru fiecare taxon bacterian raportat la nr. total de *read*-uri atribuite acestor familii.

Speciile patogene prioritare (conform raportului Organizației Mondiale a Sănătății, 2024) identificate în studiul de față au prezentat o frecvență diferită. Pentru probele analizate, procentajul cel mai ridicat a fost observat pentru *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* și *A. baumannii* – Figura 3.4.

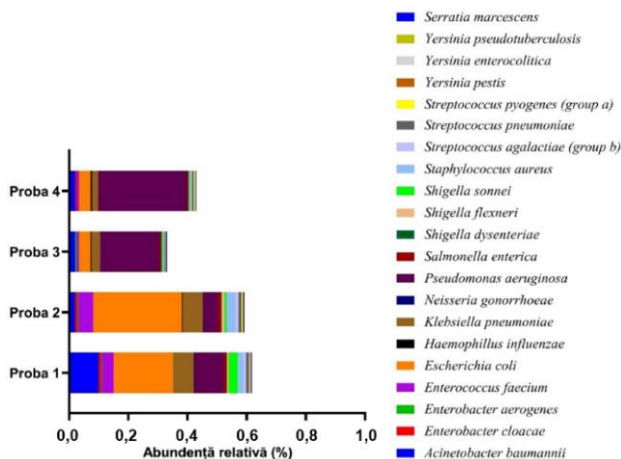


Figura 3.4. Prezența bacteriilor patogene prioritare (după OMS, 2024) în probe de apă analizate.

Abundența relativă reprezintă nr. de *read*-uri alocate pentru fiecare taxon bacterian raportat la nr. total de *read*-uri atribuite domeniului Bacteria.

3.2.4. Evaluarea nivelului de rezistență la antibiotice

A. Aprecierea prevalenței rezistenței la anumite antibiotice utilizate la izolare

În urma datelor obținute, putem afirma că cele mai numeroase au fost tulpinile bacteriene izolate pe mediu de cultură suplimentat cu tetraciclină (51/190), cloramfenicol (41/190) și ampicilină (36/190), antibiotice cu spectru extins, administrate frecvent în diferite sectoare de activitate umană (Romero-Soto *et al.*, 2018; Popescu *et al.*, 2022).

B. Determinarea concentrațiilor minime inhibitorii pentru ampicilină, cloramfenicol și tetraciclină

Valorile CMI obținute au variat destul de mult, atât în funcție de tulpina testată, cât și de antibioticul utilizat pentru izolare. Cele mai mari valori ale CMI au fost notate pentru ampicilină, urmate de cloramfenicol și gentamicină. Niveluri crescute de rezistență au fost detectate pentru tulpinile de *E. coli* (ampicilină/cloramfenicol – 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$, tetraciclină – 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$), bacterii importante din punct de vedere medical, întâlnite în apele reziduale – Tabelul 3.1.

Tabel 3.1. Valorile concentrațiilor minime inhibitorii ale antibioticelor utilizate pentru izolarea unor bacterii rezistente din probe de apă reziduală

Tulpină bacteriană	Antibiotic testat	Concentrație minimă inhibitorie ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Temperatură de cultivare de 28 °C		
<i>Raoultella ornithinolytica</i> A ₂ (3)	ampicilină	2048
<i>Acinetobacter pittii</i> Cl ₂ (3)	cloramfenicol	256
Temperatură de cultivare de 37 °C		
<i>Escherichia coli</i> A ₃ (2)	ampicilină	512
<i>Escherichia coli</i> A ₅ (2)	ampicilină	64
<i>Escherichia coli</i> Cl ₁ (3)	cloramfenicol	128
<i>Escherichia coli</i> T ₂ (3)	tetraciclină	32
<i>Aeromonas caviae</i> A ₄ (2)	ampicilină	2048
<i>Micrococcus luteus</i> Cl ₆ (3)	cloramfenicol	≤ 32

3.3.5. Evidențierea prezenței genelor de rezistență în probele de apă reziduală

În toate cele patru probe de apă a fost observată o proporție ridicată a genelor ce conferă rezistență față de diferite tipuri de antibiotice (Figura 3.5), cele mai des întâlnite fiind genele de rezistență pentru aminoglicozide, carbapeneme + cefalosporine + penami (antibiotice β -lactamice) și tetraciclina, iar într-o proporție mai redusă pentru macrolide și fenicoli. Pentru alte categorii de gene (gene ce conferă rezistență pentru glicopeptide, monobactami, sulfamide etc.) s-au înregistrat abundențe mici. Cele mai multe tulpini bacteriene izolate din probele de apă uzată au prezentat rezistență la ampicilină (antibiotic β -lactamic), tetraciclina, cloramfenicol (fenicoli), eritromicină (macrolide) și gentamicină (aminoglicozide), respectiv la aceleași clase de antibiotice pentru care s-au evidențiat cele mai crescute abundențe relative ale genelor de rezistență.

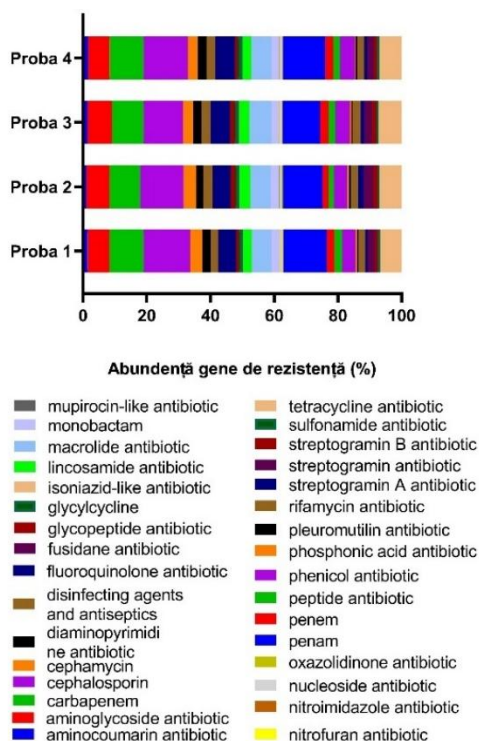


Figura 3.5. Abundența relativă a genelor de rezistență determinate în probele de apă reziduală.

Abundență relativă reprezintă nr. de *read*-uri alocate genelor care codifică rezistența la o anumită clasă de antibiotice raportat la nr. total de *read*-uri atribuite acestora.

Din punct de vedere al mecanismelor de rezistență implicate, abundența cea mai crescută a fost detectată pentru genele ce codifică sinteza enzimelor de degradare a antibioticelor, a pompelor de eflux, respectiv modificarea *situs*-ului de acțiune, demonstrând astfel că cele trei mecanisme sunt cele mai întâlnite în cazul probelor de apă uzată analizate – Figura 3.6.

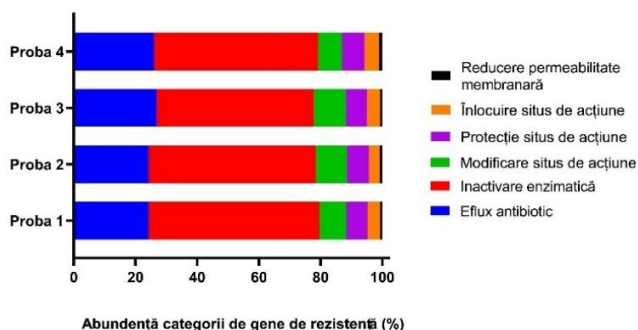


Figura 3.6. Abundența genelor de rezistență în funcție de mecanismele pe care le codifică. Abundența relativă reprezintă nr. de *read*-uri alocate genelor care codifică rezistența la antibiotice printr-un anumit mecanism raportat la nr. total de *read*-uri atribuite acestora.

CAPITOLUL 4. MECANISME IMPLICATE ÎN REZISTENȚA LA ANTIBIOTICE IDENTIFICATE LA TULPINILE BACTERIENE INVESTIGATE

4.1. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

4.1.1. Aprecierea capacității de aderare a bacteriilor rezistente la diferite suporturi

Evaluarea capacității tulpinilor testate de a adera la un suport abiotic s-a realizat prin cuantificarea biomasei biofilmului format în plăci cu 96 de godeuri cu ajutorul colorantului cristal violet (Stepanović *et al.*, 2000). Aprecierea capacității tulpinilor bacteriene de a adera la un suport biotic s-a realizat prin analiza microscopică a modului de atașare a celulelor procariote (colorate cu soluție Giemsa) la suprafața celulelor epiteliale HeLa ECACC 93021013 (Kim și Lee, 2017).

4.1.2. Evaluarea producerii de enzime ce degradează antibioticele

A. Evidențierea secreției de β -lactamaze cu spectru extins

Mediile de cultură utilizate pentru evaluarea prezenței β -lactamazelor cu spectru extins au fost suplimentate cu un amestec de compuși cromogeni ce determină colorarea diferită a coloniilor bacteriene dezvoltate, în funcție de capacitatea de secreție a diferitelor enzime.

B. Evaluarea prezenței β -lactamazelor utilizând testul dublu-disc pentru sinergism

Pentru confirmarea prezenței enzimelor menționate, s-au utilizat discuri cu antibiotice de concentrații recomandate, ce permit determinarea fenotipică a β -lactamazelor cu spectru extins prin observarea sinergismului dintre cefalosporinele de generația a III-a și amoxicilină-acid clavulanic (Georgios *et al.*, 2014).

C. Determinarea producției de carbapenemaze

Determinarea producției de carbapenemaze s-a realizat în urma cultivării bacteriilor pe medii cromogene speciale, ce inhibă dezvoltarea tulpinilor non-rezistente la carbapeneme

D. Evaluarea prezenței carbapenemazelor utilizând testul rsCDM

Determinarea și diferențierea carbapenemazelor produse de reprezentanții ordinului *Enterobacterales* s-a realizat utilizând discuri cu imipenem sau meropenem suplimentate cu 3 inhibitori diferiți de β -lactamaze (Liao *et al.*, 2022).

4.1.3. Evidențierea prezenței pompelor de eflux cu ajutorul bromurii de etidiu

Evaluarea prezenței pompelor de eflux supraexprimate s-a realizat cu ajutorul bromurii de etidiu, compus fluorogen ce pătrunde în celule și se lega de moleculele de ADN (Martins *et al.*, 2011).

4.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

4.2.1. Evaluarea capacității de formare a biofilmelor

A. Aprecierea capacității de aderare la un substrat inert

Tulpinile izolate din apa reziduală au fost testate pentru capacitatea de formare a biofilmului pe o perioadă de 24, 48 și 72 h. Rezultatele obținute arată că o tulpină selectată a fost puternic aderentă – *A. pittii* Cl₂ (3), în timp ce 2 tulpini – *E. coli* A₅ (2) și *E. coli* T₂ (3) au prezentat o aderență moderată și respectiv slabă – Tabelul 4.1. O îmbunătățire a formării biofilmului de la 48 la 72 h a fost constatată pentru tulpinile *A. caviae* A₄ (2) și *M. luteus* Cl₆ (3). Pentru tulpina *E. coli* Cl₁ (3) a fost observată o detașare a celulelor bacteriene la 72 h.

Tabel 4.1. Clasificarea tulpinilor bacteriene izolate din ape uzate în funcție de capacitatea de formare a biofilmelor

Tulpină bacteriană	Aderență		
	24 h	48 h	72 h
37 °C			
<i>Escherichia coli</i> A ₃ (2)	+	++	++
<i>Escherichia coli</i> A ₅ (2)	++	++	++
<i>Escherichia coli</i> T ₂ (3)	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> Cl ₁ (3)	+	-	-
<i>Aeromonas caviae</i> A ₄ (2)	++	++	+++
<i>Micrococcus luteus</i> Cl ₆ (3)	-	-	+
28 °C			
<i>Acinetobacter pittii</i> Cl ₂ (3)	+++	+++	+++
<i>Roultella ornithinolytica</i> A ₂ (3)	++	+++	+++

„+++” – puternic aderentă, „++” – moderat aderentă, „+” – slab aderentă, „-” – neaderentă

Dintre tulpinile izolate din produse patologice, tulpina *A. baumannii* medbio3-2013 a prezentat cea mai puternică aderență față de substratul inert utilizat – Figura 4.1.

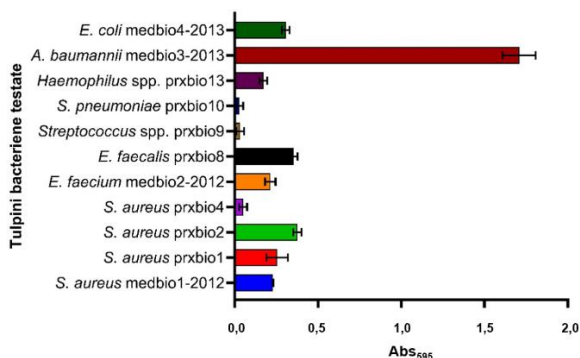


Figura 4.1. Cuantificarea biomasei biofilmului format de tulpinile bacteriene izolate clinic. Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

B. Evaluarea capacității tulpinilor testate de atașare la un substrat celular

Rezultatele obținute au permis evidențierea capacității tulpinii *E. coli* A₅ (2) de a se atașa de celulele eucariote, tipul de aderare fiind agregativ (Figura 4.2). În ceea ce privește celulele de *A. caviae* A₄ (2) și *E. coli* A₅ (2), tipul de aderare a fost localizat, respectiv agregativ.

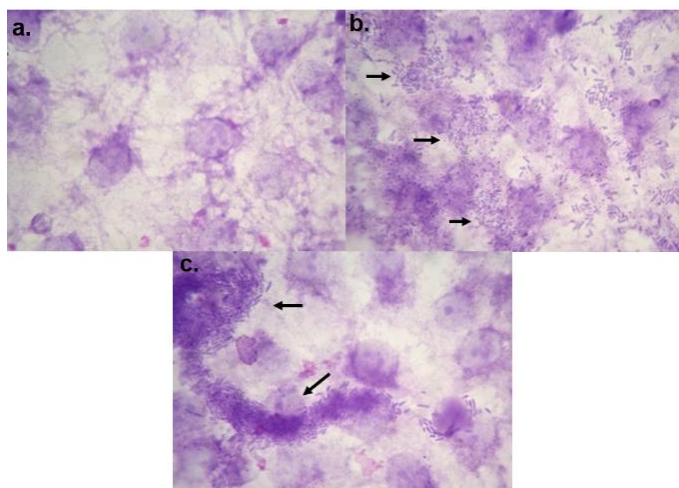


Figura. 4.2. Tiparul de aderență a unor tulpini rezistente selectate:

a. tulpină neaderentă (*E. coli* A₃ (2), *E. coli* Cl₁ (3), *E. coli* T₂ (3)); b. tulpină aderență, aderență de tip localizat (*A. caviae* A₄ (2)); c. tulpină aderență, aderență de tip agregativ (*E. coli* A₅ (2)). Săgețile indică modul de aranjare al celulelor bacteriene la monostratul celular utilizat (putere de mărire 1000x).

4.2.2. Evaluarea prezenței enzimelor implicate în degradarea antibioticelor

Din datele prezentate în Tabelul 4.2 se remarcă faptul că dintre tulpinile testate, majoritare au fost cele producătoare de β -lactamaze cu spectru extins. În ceea ce privește prezența carbapenemazelor, rezultatele obținute au permis observarea unui procentaj mult mai redus al acestora la tulpinile evaluate (33%), comparativ cu producerea de ESBL (67%). Enzimele de tip MBL și KPL au fost observate doar la tulpina *K. pneumoniae* medbio6-2013.

Tabel 4.2. Aprecierea capacității tulpinilor selectate de a produce enzime ce degradează antibioticele

Tulpini bacteriene	Enzime produse		
	ESBL	Oxa ₄₈ / Modificare porine	KPC + MBL
<i>Escherichia coli</i> medbio4-2013	+	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> medbio5-2013	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> medbio6-2013	-	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> prxbio11	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> prxbio12	+	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> medbio3-2013	-	-	-
* <i>Escherichia coli</i> A ₃ (2)	+	-	-
* <i>Escherichia coli</i> A ₅ (2)	-	+	-
* <i>Escherichia coli</i> Cl ₁ (3)	+	-	-
* <i>Escherichia coli</i> Cl ₁ (2)	-	-	-

Tulpini bacteriene	Enzime produse		
	ESBL	Oxa ₄₈ / Modificare porine	KPC + MBL
* <i>Escherichia coli</i> T ₂ (3)	+	+	-
* <i>Acinetobacter pittii</i> Cl ₂ (3)	-	-	-
* <i>Aeromonas caviae</i> A ₄ (2)	+	-	-

„-“ – lipsa enzimelor ce degradează moleculele de antibiotice, „+“ – prezența enzimelor ce degradează moleculele de antibiotice, * tulpini bacteriene izolate din probele de apă reziduală

4.2.3. Identificarea prezenței pompelor de eflux

În urma cultivării tulpinilor selectate pe mediu de cultură suplimentat cu bromură de etidiu, s-a evidențiat prezența fluorescenței la o concentrație de numai 0,25 mg L⁻¹, indicele de eflux calculat sugerând o activitate scăzută a pompelor de eflux față de compusul selectat – Figura 4.3.

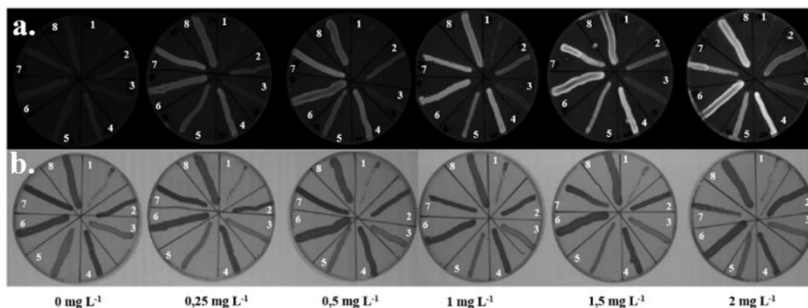


Figura 4.3. Evidențierea prezenței pompelor de eflux la tulpini bacteriene izolate:

a. imagini obținută în lumină UV (1 – *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; 2-8 – tulpini bacteriene testate – *Pseudomonas aeruginosa* medbio7-2013, *Acinetobacter pittii* Cl₂ (3), *Escherichia coli* A₃ (2), *Escherichia coli* A₅ (2), *Escherichia coli* T₂ (3), *Escherichia coli* Cl₁ (2), *Escherichia coli* Cl₁ (3)); b. imagine obținută fără lumină UV pentru observarea dezvoltării tulpinilor bacteriene.

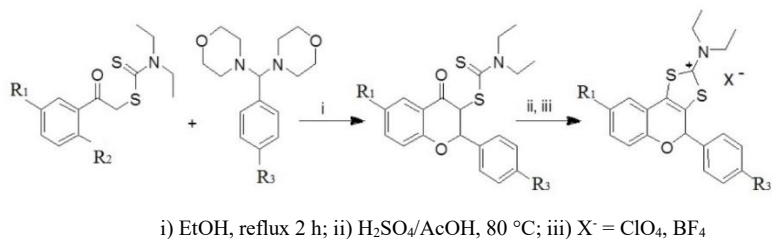
CAPITOLUL 5. EFICIENȚA UNOR FLAVONOIDE SINTETICE CA AGENȚI ANTIMICROBIENI

5.1. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

5.1.1. Sinteza flavonoidelor tricyclice cu sulf

Flavonoidele tricyclice cu substituenți halogenați au fost sintetizate de către colectivul condus de Prof. univ. dr. habil. Lucian Bîrsa, din cadrul Facultății de Chimie a Universității

„Alexandru Ioan Cuza” din Iași. Procesul de obținere al acestor compuși a avut loc în mai multe etape (Figura 5.1), structura și puritatea flavonoidelor sintetice (> 99%) fiind stabilite prin analize caracteristice, precum rezonanță magnetică nucleară, spectrometrie de masă și în infraroșu, analiză elementală (Bahrin *et al.*, 2014).



R ₁	R ₃
Br	F
	Br
	Cl
	I

Figura 5.1. Schema generală de sinteză a flavonoidelor triciclice cu substituenți halogenați (Bahrin *et al.*, 2014)

5.1.2. Determinarea concentrației minime inhibitorii a flavonoidelor sintetice triciclice cu sulf prin metoda diluțiilor în rata 2

Determinarea CMI s-a realizat conform secțiunii 3.1.5. *Determinarea concentrației minime inhibitorii folosind metoda diluțiilor în rata 2.*

5.1.3. Determinarea concentrației minime bactericide

Stabilirea CMB s-a realizat în urma cultivării pe medii solide a celulelor bacteriene ce au fost expuse la diferite concentrații de agent antibacterian evaluat.

5.1.4. Evoluția unei populații bacteriene într-o cultură discontinuă asincronă

Pentru evaluarea efectului produs de flavonoidele sintetice asupra dinamicii multiplicării bacteriilor s-au realizat culturi discontinue asincrone.

5.1.5. Aprecierea viabilității tulpinilor bacteriene prin metoda numărării coloniilor pe medii solide

Metoda urmărește aprecierea viabilității celulelor bacteriene tratate cu diferiți compuși antimicrobieni prin numărarea coloniilor dezvoltate pe un mediu de cultură solid (Bag *et al.*, 2012).

5.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

5.2.1. Activitatea antimicrobiană a unor flavonoide sintetice triciclice cu sulf

Rezultatele obținute, prezentate în Tabelul 5.1, indică faptul că cea mai importantă activitate antibacteriană o manifestă flavonoida BrCl împotriva majorității izolatelor provenite atât din mediul clinic, cât și din influentul stației de epurare a municipiului Iași. Valorile CMI pentru flavonoida BrCl au variat în ceea ce privește bacteriile Gram-pozitive, concentrațiile fiind cuprinse între 0,24 și 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cele mai mici valori ale CMI înregistrate pentru bacteriile Gram-negative au fost cuprinse între de 0,48 $\mu\text{g mL}^{-1}$ și 3,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Valorile CMI obținute pentru flavonoida BrF au fost cuprinse între 15,62 și 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pentru bacteriile Gram-pozitive, respectiv 15,62 și 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pentru tulpinile Gram-negative. Pentru celelalte 2 flavonoide sintetice, cea mai mică valoare a CMI înregistrată pentru bacteriile Gram-pozitive a fost de 0,97 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (flavonoida BrBr) și 0,48 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (flavonoida BrI). Pentru bacteriile Gram-negative, valorile CMI determinate au variat între 1,95 și 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pentru flavonoida BrBr și 3,9 și 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pentru flavonoida BrI.

Tabel 5.1. Valorile concentrațiilor minime inhibitorii determinate în prezența flavonoidelor

Tulpini testate	Concentrație minimă inhibitorie ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	Flavonoide				DMSO	Antibiotic referință
	BrCl	BrF	BrBr	BrI		
<i>Staphylococcus aureus</i> medbio1-2012	0,48	15,62	0,97	0,48	> 125	7,8 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i> prxbio1	1,95	-	-	0,97	> 125	3,9 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i> prxbio2	7,81	-	-	-	250	7,8 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i> prxbio3	0,48	-	-	-	250	1,9 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i> prxbio4	0,24	-	-	-	250	3,9 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i> prxbio5	0,24	-	-	-	250	7,8 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i> prxbio6	7,81	-	-	-	250	7,8 ^c

Tulpini testate	Concentrație minimă inhibitoare ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	Flavonoide				DMSO	Antibiotic referință
	BrCl	BrF	BrBr	BrI		
<i>Staphylococcus aureus</i> prxbio7	0,48	-	-	-	250	7,8 ^c
<i>Streptococcus</i> spp. prxbio9	3,9	-	-	-	250	< 0,9 ^c
<i>Streptococcus pneumoniae</i> prxbio10	0,48	-	-	-	250	3,9 ^c
<i>Enterococcus faecium</i> medbio2-2012	7,81	62,5	31,25	62,5	> 125	< 0,9 ^c
<i>Enterococcus faecalis</i> prxbio8	31,25	-	-	-	125	7,8 ^c
<i>Acinetobacter baumannii</i> medbio3-2013	3,9	15,62	7,81	3,9	> 125	< 0,9 ^g
<i>Acinetobacter pittii</i> Cl ₂ (3)	15,62	125	7,81	31,25	125	-
<i>Escherichia coli</i> medbio4-2013	3,9	125	31,25	7,81	> 125	< 0,9 ^g
<i>Escherichia coli</i> A ₃ (2)	125	125	125	125	125	-
<i>Escherichia coli</i> A ₅ (2)	125	125	62,5	125	125	-
<i>Escherichia coli</i> T ₂ (3)	62,5	125	62,5	62,5	125	-
<i>Enterobacter cloacae</i> medbio5-2013	125	-	-	125	125	< 0,9 ^g
<i>Klebsiella pneumoniae</i> medbio6-2013	125	125	15,62	15,62	> 125	> 125 ^g
<i>Klebsiella pneumoniae</i> prxbio11	125	-	-	-	125	< 0,9 ^g
<i>Klebsiella pneumoniae</i> prxbio12	125	-	-	-	125	< 0,9 ^g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> medbio7-2013	31,25	-	-	62,5	> 125	< 0,9 ^g
<i>Salmonella enterica</i> medbio8-2013	125	-	-	62,5	> 125	< 0,9 ^g
<i>Haemophilus</i> spp. prxbio13	0,48	-	-	-	250	0,9 ^g
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	3,9	-	-	-	125	7,8 ^c
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-1705	125	-	-	-	250	3,9 ^g

^c = cloramfenicol; ^g = gentamicină, ,, - ”= absența testării concentrației minime inhibitorii

Referitor la concentrațiile minime bactericide prezentate în Tabelul 5.2, cele mai mici valori au fost înregistrate în cazul bacteriilor Gram-pozitive, pentru toate flavonoidele sintetice testate. Pentru bacteriile Gram-negative, cele mai reduse valori ale CMB au fost cuprinse între 0,48 și 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ – flavonoida BrI și BrF.

Tabel 5.2. Valorile concentrațiilor minime bactericide determinate în prezența flavonoidelor

Tulpini testate	Concentrație minimă bactericidă (μg mL ⁻¹)				
	Flavonoide				Antibiotic referință
	BrCl	BrF	BrBr	BrI	
<i>Staphylococcus aureus</i> medbio1-2012	1,95	15,62	0,97	0,48	31,25 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i> prxbio1	7,81	-	-	0,97	125 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i> prxbio2	15,62	-	-	-	125 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i> prxbio3	0,97	-	-	-	62,5 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i> prxbio4	0,97	-	-	-	15,62 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i> prxbio5	0,48	-	-	-	62,5 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i> prxbio6	250	-	-	-	125 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i> prxbio7	0,97	-	-	-	62,5 ^c
<i>Streptococcus</i> spp. prxbio9	7,81	-	-	-	> 125 ^c
<i>Streptococcus pneumoniae</i> prxbio10	0,97	-	-	-	31,25 ^c
<i>Enterococcus faecium</i> medbio2-2012	31,25	> 250	62,5	> 250	15,62 ^c
<i>Enterococcus faecalis</i> prxbio8	62,5	-	-	-	> 125 ^c
<i>Acinetobacter baumannii</i> medbio3-2013	15,62	125	31,25	125	< 0,9 ^g
<i>Acinetobacter pittii</i> Cl ₂ (3)	15,62	125	31,25	125	-
<i>Escherichia coli</i> medbio4-2013	15,62	250	125	62,5	< 0,9 ^g
<i>Escherichia coli</i> A ₃ (2)	125	125	125	125	-
<i>Escherichia coli</i> A ₅ (2)	125	125	125	125	-
<i>Escherichia coli</i> T ₂ (3)	125	125	125	125	-
<i>Enterobacter cloacae</i> medbio5-2013	125	-	-	> 250	< 0,9 ^g
<i>Klebsiella pneumoniae</i> medbio6-2013	125	250	62,5	125	> 125 ^g
<i>Klebsiella pneumoniae</i> prxbio11	125	-	-	-	< 0,9 ^g
<i>Klebsiella pneumoniae</i> prxbio12	125	-	-	-	< 0,9 ^g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> medbio7-2013	31,25	-	-	250	< 0,9 ^g
<i>Salmonella enterica</i> medbio8-2013	125	-	-	125	< 0,9 ^g
<i>Haemophilus</i> spp. prxbio13	0,48	-	-	-	125 ^g
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	3,9	-	-	-	62,5 ^c
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-1705	125	-	-	-	15,62 ^g

^c = cloramfenicol; ^g = gentamicină, „-” = absența testării concentrației minime bactericide

5.2.2. Efectul flavonoidelor sintetice cu sulf asupra creșterii unor tulpini bacteriene rezistente la antibiotice

Flavonoidele BrCl, BrBr, BrI au determinat un efect bacteriostatic dependent de doză și de timpul de expunere, asupra tuturor tulpinilor bacteriene izolate. În ceea ce privește tulpina *S. aureus* medbio1-2012, flavonoida BrCl a produs o întârziere a creșterii de până la 6 ore la concentrații echivalente cu CMI și 2 × CMI - Figura 5.1 - a. Flavonoidele BrBr și BrI au produs

un efect bacteriostatic de până la 21 h la o concentrație echivalentă cu $2 \times \text{CMI}$ - Figura 5.1 – b, c, în timp ce o concentrație echivalentă cu CMI a determinat o inhibare a creșterii de până la 9 h.

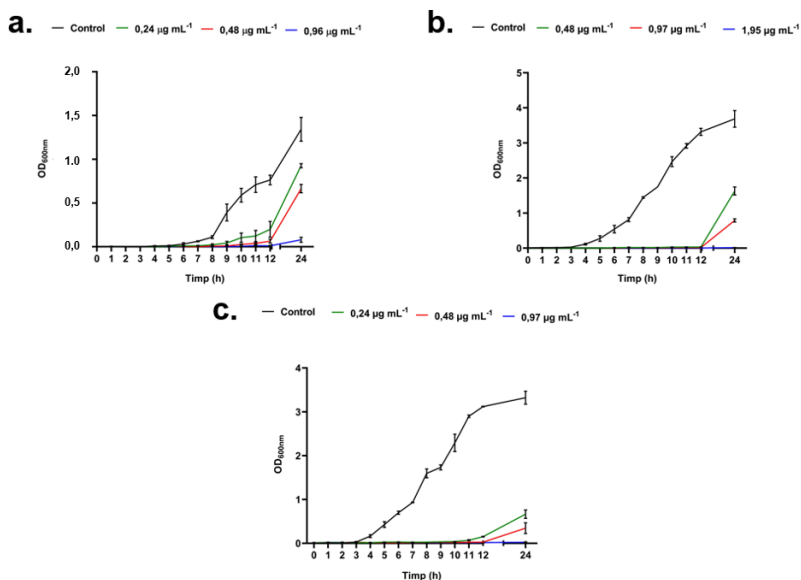


Figura 5.1. Dinamica creșterii tulpinii *S. aureus* medbio1-2012 în prezența flavonoidelor: a. BrCl (CMI = 0,48 µg mL⁻¹); b. BrBr (CMI = 0,97 µg mL⁻¹); c. BrI (CMI = 0,48 µg mL⁻¹). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

În cazul tulpinii *S. aureus* prxbio1, flavonoida BrCl utilizată în concentrație echivalentă cu CMI și $2 \times \text{CMI}$, a determinat un efect bacteriostatic pentru mai bine de 20 h (Figura 5.2 – a). Testată împotriva tulpinii *E. faecium* medbio2-2012, aceeași flavonoidă în concentrații echivalente cu CMI și $2 \times \text{CMI}$, a condus la o prelungire a fazei de lag de până la 4 ore în comparație cu controlul, în timp ce o concentrație echivalentă cu $\frac{1}{2}$ CMI a produs o inhibare a creșterii de până la 1 h – Figura 5.2 – b. În cazul tulpinii *A. baumannii* medbio3-2013, flavonoida BrCl a determinat apariția unei efect inhibitor de până la 8 și, respectiv 9 h în prezența unor concentrații echivalente cu CMI ($p = 0,0009$) și $2 \times \text{CMI}$ ($p = 0,008$) – Figura 5.2 – c.

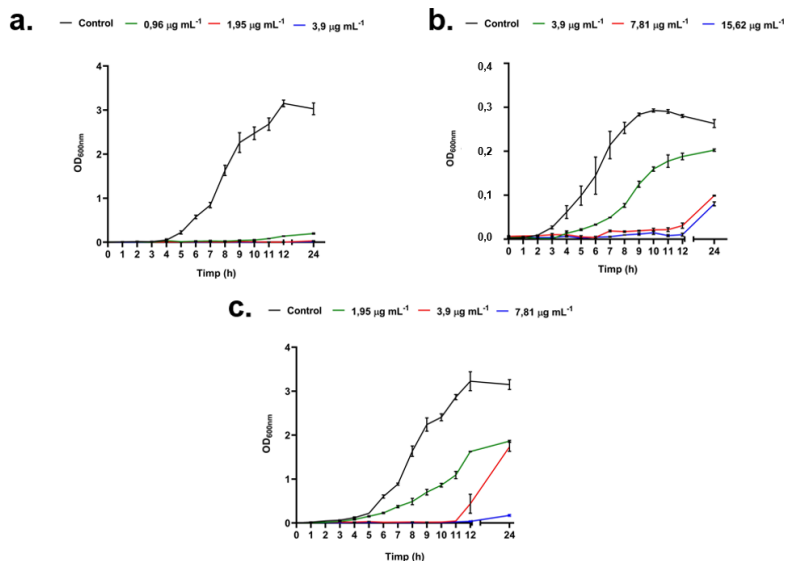


Figura 5.2. Dinamica creşterii unor tulpini bacteriene în prezenţa flavonoidei BrCl: a. *S. aureus* prxbio1 (CMI = 1,95 µg mL⁻¹); b. *E. faecium* medbio2-2012 (CMI = 7,81 µg mL⁻¹); c. *A. baumannii* medbio3-2013 (CMI = 3,9 µg mL⁻¹). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

5.2.3. Aprecierea efectului flavonoidelor sintetice triciclice cu sulf asupra viabilităţii celulelor bacteriene

O reducere totală a viabilităţii celulelor după 3 ore de la incubarea acestora în prezenţa flavonoidei BrCl, în concentraţie de 1,95 şi 7,81 µg mL⁻¹, a fost înregistrată pentru tulpinile de *S. aureus* medbio1-2012 (Figura 5.3 – a) şi *S. aureus* prxbio1 (Figura 5.3 – b), respectiv după numai o oră de la incubarea celulelor de *E. faecium* medbio2-2012 în prezenţa flavonoidei BrCl, la o concentraţie de 31,25 µg mL⁻¹ (Figura 5.3 – c).

Expunerea celulelor de *A. baumannii* medbio3-2013 la flavonoida BrCl, la o concentraţie echivalentă cu CMB (15,62 µg mL⁻¹), a determinat o pierdere semnificativă ($p < 0,0001$) a viabilităţii celulare după jumătate de oră, în comparaţie cu celulele din control (Figura 5.4 – a).

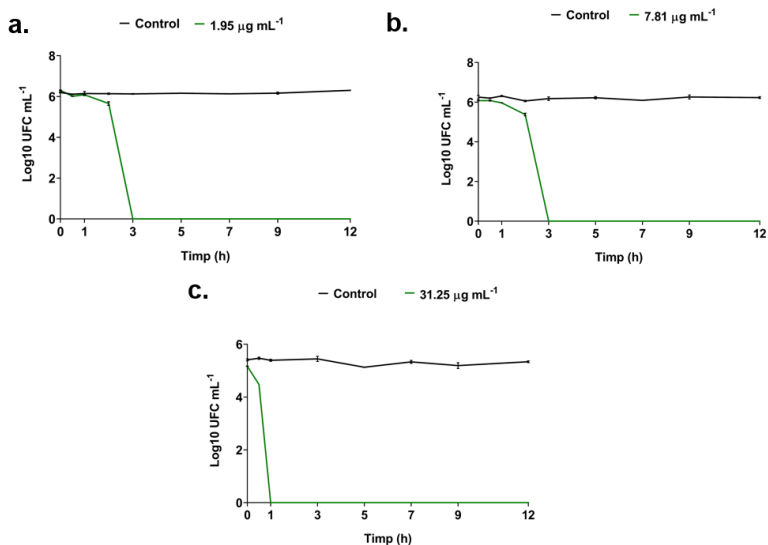


Figura 5.3. Flavonoida BrCl afectează viabilitatea celulară: a. *S. aureus* medbio1-2012 (CMB = 1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$); b. *S. aureus* prxbio1 (CMB = 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$); c. *E. faecium* medbio2-2012 (CMB = 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

În cazul celulelor de *E. coli* medbio4-2013, un efect bactericid pronunțat a fost înregistrat după numai 2 ore de incubare. Acest efect, ca și în cazul celorlalte tulpini testate, s-a menținut pentru mai bine de 24 h (Figura 5.4 – b).

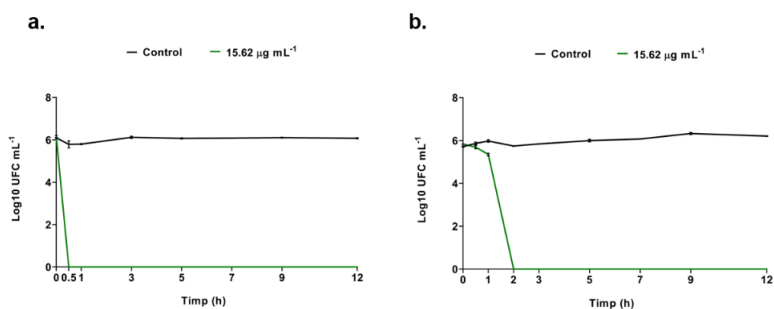


Figura 5.4. Aprecierea viabilității celulare în prezența flavonoidului BrCl: a. *A. baumannii* medbio3-2013 (CMB = 15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$) și b. *E. coli* medbio4-2013 (CMB = 15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

CAPITOLUL 6. MECANISME DE ACȚIUNE ALE FLAVONOIDEI BrCl

6.1. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

6.1.1. Evaluarea permeabilității membranei celulelor bacteriene utilizând microscopia cu fluorescență

Celulele bacteriene cu membrană intactă sunt impermeabile pentru fluorocromii de tip bromură de etidiu și iodură de propidiu, permeabilizarea fiind posibilă doar atunci când membranele sunt lezate sau distruse. În prezența coloranților menționați, celulele a căror membrană este distrusă sau prezintă modificări ale permeabilității, permit pătrunderea și atașarea fluorocromilor de acizii nucleici, ceea ce determină apariția fluorescenței de culoare roșie (Lambert *et al.*, 2001).

6.1.2. Evaluarea integrității celulelor bacteriene folosind microscopia electronică cu baleiaj

Pentru observarea morfologiei celulelor bacteriene incubate în prezența flavonoidei BrCl s-a utilizat microscopia electronică cu baleiaj.

6.1.3. Evaluarea activității flavonoidei BrCl asupra aderării celulelor bacteriene din biofilm

Metoda presupune evaluarea efectului pe care flavonoida BrCl îl manifestă asupra aderării celulelor din biofilm prin cuantificarea biomasei acestuia cu ajutorul colorantului cristal violet (Sandasi *et al.*, 2010).

6.1.4. Cuantificarea biomasei biofilmului bacterian format în prezența flavonoidei BrCl

Metoda presupune evaluarea efectului pe care flavonoida BrCl îl manifestă asupra formării biofilmului prin cuantificarea biomasei acestuia cu ajutorul colorantului cristal violet. Efectul flavonoidei BrCl asupra morfologiei celulelor din biofilm s-a apreciat utilizând microscopia electronică cu baleiaj (Sandasi *et al.*, 2010).

6.1.5. Determinarea activității metabolice a celulelor din biofilm

Determinarea activității metabolice a celulelor din biofilmul bacterian format în prezența flavonoidei BrCl s-a realizat cu ajutorul sării de tetrazoliu (MTT) (Li *et al.*, 2023).

6.1.6. Evaluarea efectului produs de flavonoida BrCl asupra biofilmului matur

Efectul flavonoidei BrCl asupra biofilmului matur s-a determinat utilizând colorarea cu cristal violet (Sandasi *et al.*, 2010).

6.1.7. Aprecierea efectului produs de flavonoida BrCl asupra hidrofobicității celulelor de *Acinetobacter* spp.

Efectul flavonoidei BrCl asupra hidrofobicității celulelor bacteriene s-a realizat utilizând ca hidrocarbură *p*-xilenul (Zoueki *et al.*, 2010).

6.1.8. Efectul flavonoidei BrCl asupra producerii de EPS

Conținutul total de carbohidrați produs în prezența flavonoidei BrCl s-a determinat cu ajutorul metodei fenol – acid sulfuric (Nielsen, 2017).

6.1.9. Determinarea efectului produs de flavonoida BrCl asupra motilității celulelor bacteriene

Efectul produs de flavonoida BrCl asupra motilității de tip *swarming* și *swimming* s-a apreciat prin măsurarea diametrului distanței de migrare a celulelor bacteriene pe mediu agarizat. Efectul flavonoidei BrCl asupra motilității de tip *twitching* s-a apreciat prin măsurarea zonei colorate cu cristal violet.

6.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

6.2.1. Efectul flavonoidei BrCl asupra integrității membranei celulelor bacteriene

Incubarea celulelor de *S. aureus* (Figura 6.1 – a) și *E. coli* (Figura 6.1 – b) în prezența unei concentrații de flavonoidă echivalente valorii CMB ($1,95 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectiv $15,62 \mu\text{g mL}^{-1}$), a condus la înregistrarea un procentaj cuprins între 75 și 90% celule fluorescente după numai 30 de minute, în timp ce după 150 de minute, procentajul de celule fluorescente a fost de 100%.

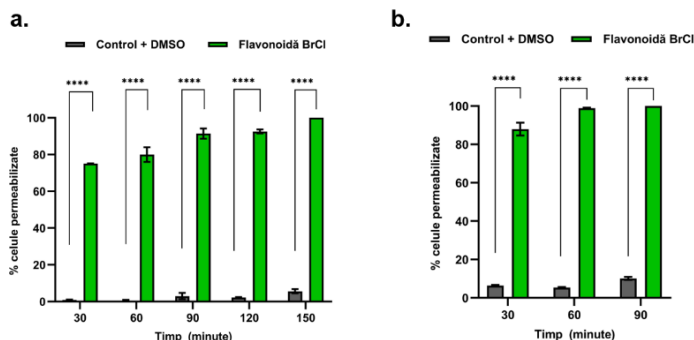


Figura 6.1. Efectul flavonoidei BrCl asupra membranelor celulare: a. *S. aureus* medbio1-2012 (CMB = 1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$); b. *E. coli* medbio4-2013 (CMB = 15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$) ($p < 0,05$; ** = $p < 0,0001$). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.**

În ceea ce privește timpul de pătrundere a fluorocromilor în celulele bacteriene, rezultatele obținute au scos în evidență apariția primelor celule fluorescente de culoare roșie după numai 2 minute pentru *S. aureus*, respectiv 3 minute pentru *E. coli* de la contactul cu flavonoida BrCl – Figura 6.2. Numărul acestor celule a devenit aproape 100% după 10 minute de expunere.

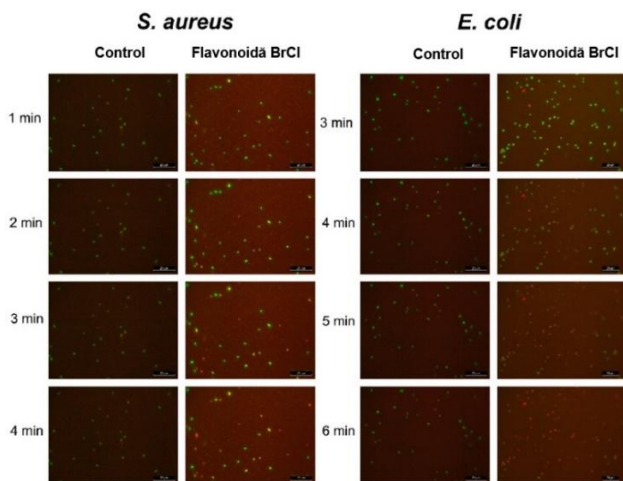


Figura 6.2. Dinamica permeabilizării membranelor celulelor de *S. aureus* medbio1-2012 (CMB = 1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$) și *E. coli* medbio4-2013 (CMB = 15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$) în prezența flavonoidei BrCl: fluorescență de culoare roșie – celule cu membrană lezată/distrușă; fluorescență de culoare verde – celule vii cu membrană intactă. Din motive tehnice, pentru tulpina *E. coli* medbio4-2013 nu a fost posibilă obținerea unor imagini relevante înainte de 3 minute.

6.2.2. Flavonoida BrCl induce modificări semnificative ale morfologiei celulelor de *S. aureus* și *E. coli*

Analiza imaginilor obținute la microscopul electronic a evidențiat că flavonoida BrCl, în concentrații echivalente cu CMB, induce apariția unor modificări morfologice majore după 6 ore de incubare (celule cu aspect deformat, perforate și cu suprafața încrețită), în comparație cu controlul (celule intacte, cu formă regulată și suprafață netedă) – Figura 6.3. Modificările morfologice ireversibile evidențiate la microscopul electronic cu baleiaj, susțin ipoteza prin care flavonoida BrCl țintește membranele celulare, inducând modificări ale structurii acestora, urmate de liza celulară, mecanismul de acțiune indicat fiind probabil unul primar de tip membranar.

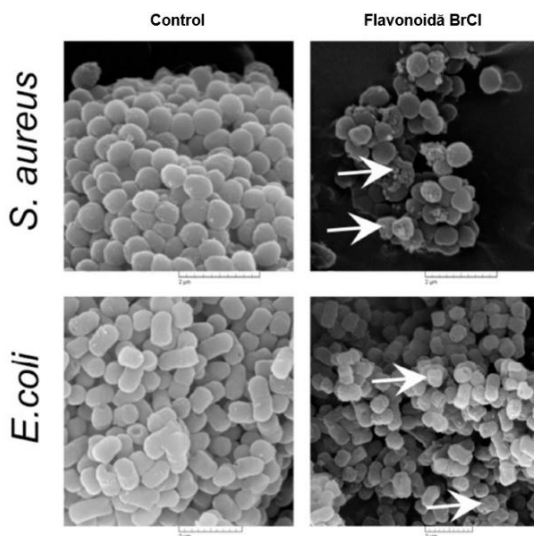


Figura 6.3. Imagini electronomicroscopice prezentând efectul flavonoidelor BrCl asupra morfologiei celulelor de *S. aureus* medbio1-2012 și *E. coli* medbio4-2013 expuse la concentrații echivalente cu CMB. Săgețile indică alterări morfologice și resturi celulare.

6.2.3. Aderarea celulelor bacteriene de *Acinetobacter* spp. este influențată de flavonoida BrCl

În urma experimentelor efectuate s-a observat că atât pentru tulpina *A. baumannii* medbio3-2013 (Figura 6.4 – a), cât și pentru tulpina *A. pittii* Cl₂ (3) (Figura 6.4 – b), timpul minim necesar aderării celulelor este de 15 minute.

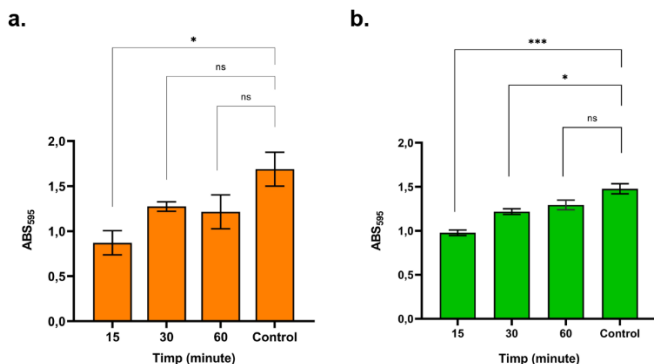


Figura 6.4. Determinarea timpului minim necesar pentru aderarea celulelor bacteriene în procesul de formare a biofilmului: a. *A. baumannii* medbio3-2013 și b. *A. pittii* Cl₂ (3). Celulele din control au fost incubate timp de 24 h, fără schimbarea mediului de cultură. Asterixul reprezintă diferența semnificativă dintre probă și control ($p < 0,05$; *** – $p = 0,0008$; * – $p > 0,0039$; ns – diferențe nesemnificative). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

După cum se poate observa în Figura 6.5 – a, aderarea celulelor de *A. baumannii* medbio3-2013 a fost inhibată semnificativ la doar trei din concentrațiile de flavonoidă testate, în comparație cu controlul suplimentat cu DMSO. La concentrații echivalente cu CMI ($3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) și $\frac{1}{2}$ CMI ($1,95 \mu\text{g mL}^{-1}$) s-a observat o inhibare a aderenței de până la 94% (Figura 6.5 – b).

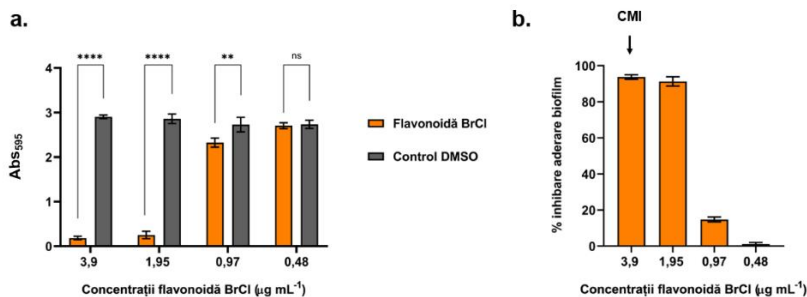


Figura 6.5. Efectul inhibitor al flavonoidului BrCl asupra aderenței celulelor de *A. baumannii* medbio3-2013: a. cuantificarea biomasei biofilmului bacterian cu ajutorul colorantului cristal violet (CMI = $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$); b. procentajul de inhibare al aderenței. După o incubare de 15 minute, celulele neaderate sunt îndepărtate din godeuri prin spălare. Biomasa biofilmului s-a determinat după 24 ore de incubare în mediu MHB ($p < 0,05$; **** – $p < 0,0001$; ** – $p = 0,0021$; ns – diferențe nesemnificative). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

O activitate anti-aderare dependentă de doză a fost observată și în cazul tulpinii *A. pittii* Cl₂ (3) (Figura 6.6 – a). Administrată într-o concentrație de 15,62 μg mL⁻¹ (echivalentă valorii CMI), flavonoida testată a indus o inhibare importantă a aderării celulelor bacteriene, procentajul de inhibare înregistrat fiind de aproximativ 78% (Figura 6.6 – b).

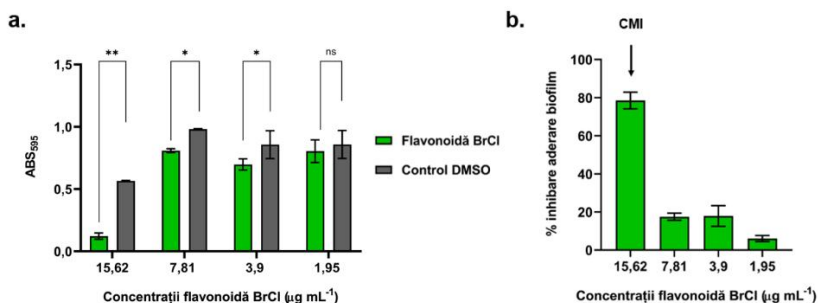


Figura 6.6. Efectul inhibitor al flavonoidei BrCl asupra aderării celulelor de *A. pittii* Cl₂ (3): a. cuantificarea biomasei biofilmului bacterian prin colorare cu cristal violet; b. procentajul de inhibare al aderării (CMI = 15,62 μg mL⁻¹). După o incubare de 30 minute, celulele neaderate sunt îndepărtate din godeuri prin spălare. Biomasa biofilmului s-a determinat după 24 ore de incubare în mediul MHB ($p < 0,05$; ** – $p = 0,0012$; * – $p > 0,0197$; ns – diferențe nesemnificative). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

6.2.4. Influența flavonoidei BrCl asupra inhibării biofilmului produs de specii ale genului *Acinetobacter*

Concentrațiile de flavonoidă BrCl ce au condus la apariția unui efect inhibitor semnificativ ($p < 0,0001$) al biofilmului produs de tulpina *A. baumannii* medbio3-2013 au fost cuprinse între 3,9 și 62,5 μg mL⁻¹ (Figura 6.7 – a). O concentrație echivalentă cu ½ CMI a produs o inhibare a biofilmului bacterian într-un procentaj de numai 30%, în timp ce pentru celelalte concentrații utilizate, inclusiv CMI, procentajul de inhibare al biofilmului a fost mai mare de 90% (Figura 6.7 – b).

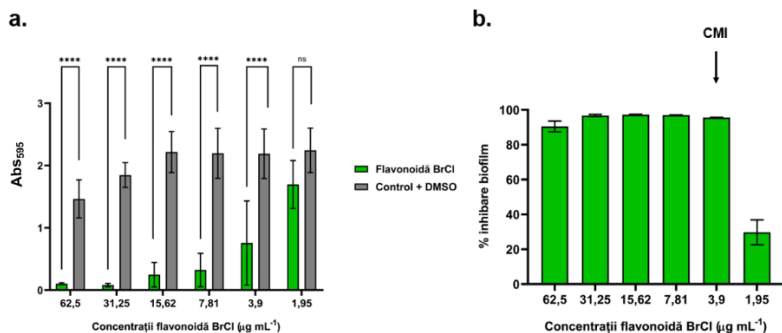


Figura 6.7. Activitatea antibiofilm a flavonoidei BrCl împotriva tulpinii *A. baumannii* medbio3-2013:

a. cuantificarea biomasei biofilmului bacterian prin colorare cu cristal violet; **b.** procentajul de inhibare al formării biofilmului (CMI = $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) ($p < 0,05$; **** – $p < 0,0001$; ns – diferențe nesemnificative). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

O activitate inhibitorie mult mai pronunțată a flavonoidei sintetice (Figura 6.8 – a) a fost observată în cazul celei de-a doua tulpini bacteriene testate. În acest caz, așa cum reiese din Figura 6.8 – b, la concentrații sub-inhibitorii ale flavonoidei BrCl cuprinse între 7,81 și $1,95 \mu\text{g mL}^{-1}$, s-a observat un procentaj de inhibare a formării biofilmului de până la 88%.

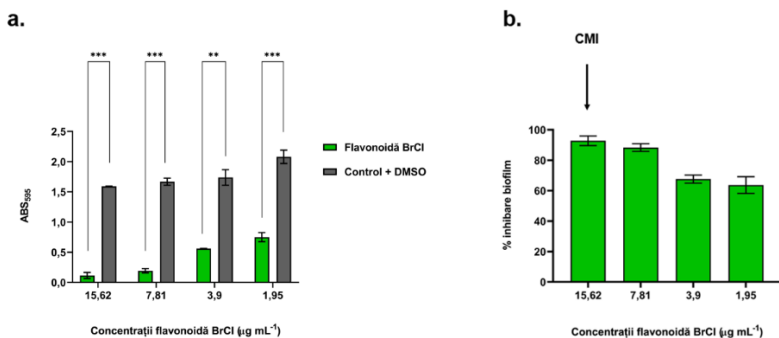


Figura 6.8. Activitatea antibiofilm a flavonoidei BrCl împotriva tulpinii *A. pittii* Cl₂ (3):

a. cuantificarea biomasei biofilmului bacterian cu ajutorul colorantului cristal violet; **b.** procentajul de inhibare al formării de biofilm (CMI = $15,62 \mu\text{g mL}^{-1}$) ($p < 0,05$; ** – $p = 0,001$; *** – $p < 0,0005$). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

Utilizată în concentrații sub-inhibitorii, flavonoida BrCl a prezentat un efect inhibitor cu până la 40% mai pronunțat în comparație cu ciprofloxacina.

Cele mai importante efecte produse de ciprofloxacina au fost observate la concentrațiile echivalente cu CMI și ½ CMI (Figura 6.9 – a), unde formarea biofilmului bacterian a fost inhibată cu până la 94% față de control. Pentru concentrațiile echivalente cu ¼ CMI și ⅛ CMI, biofilmul format de tulpina *A. pittii* Cl₂ (3) a fost inhibat într-o proporție de până la 33% (Figura 6.9 – b).

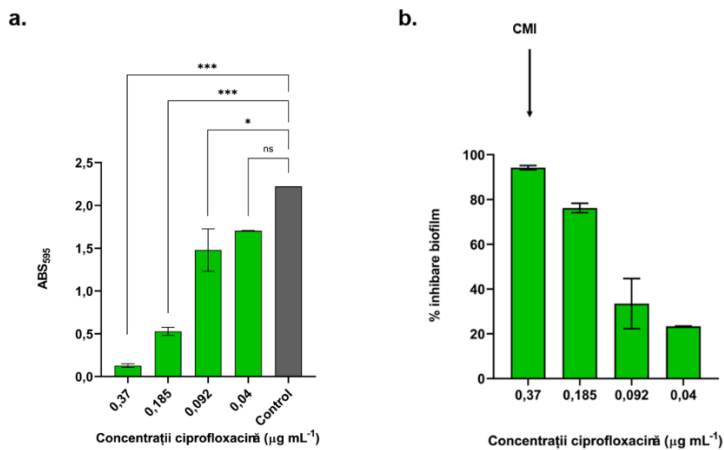


Figura 6.9. Activitatea antibiofilm a ciprofloxacinei împotriva tulpinii *A. pittii* Cl₂ (3): **a.** cuantificarea biomasei biofilmului bacterian cu ajutorul colorantului cristal violet; **b.** procentajul de inhibare al formării de biofilm (CMI = 0,37 µg mL⁻¹) ($p < 0,05$; *** – $p < 0,0002$; * – $p = 0,016$; ns – diferențe nesemnificative). Celulele din control au fost incubate timp de 24 h, în absența ciprofloxacinei. Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

Cu ajutorul microscopiei electronice cu baleiaj s-a observat că flavonoida BrCl, utilizată în concentrație echivalentă cu ½ CMI (7,81 µg mL⁻¹), a condus la o diminuare semnificativă a numărului de celule din biofilmul bacterian produs de tulpina *A. pittii* Cl₂ (3) în comparație cu controlul utilizat (mediu de cultură suplimentat cu DMSO) - Figura 6.10.

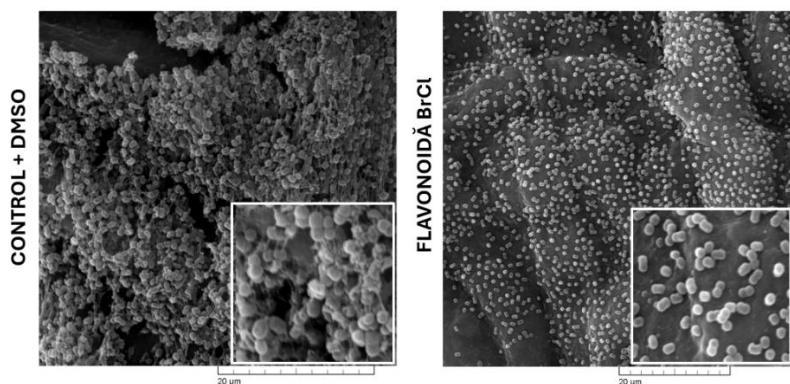


Figura 6.10. Imagini electronomicroscopice prezentând efectul flavonoidei BrCl asupra biofilmului produs de tulpina *A. pittii* Cl₂ (3). Biofilmele bacteriene au fost formate timp de 48 h în prezența unei concentrații de flavonoidă BrCl echivalentă cu ½ CMI (7,81 µg mL⁻¹).

6.2.5. Flavonoida BrCl reduce activitatea metabolică a celulelor din biofilmul produs de tulpina *A. pittii* Cl₂ (3)

După cum se poate observa în Figura 6.11 – a, activitatea metabolică a celulelor bacteriene a fost redusă cu aproximativ 95% la concentrații ale flavonoidei BrCl echivalente cu CMI și ½ CMI (15,62 și 7,81 µg mL⁻¹) în comparație cu controlul suplimentat cu DMSO. La o concentrație de 3,9 µg mL⁻¹, activitatea metabolică a celulelor a fost redusă într-o proporție de până la 28% (Figura 6.11 – b).

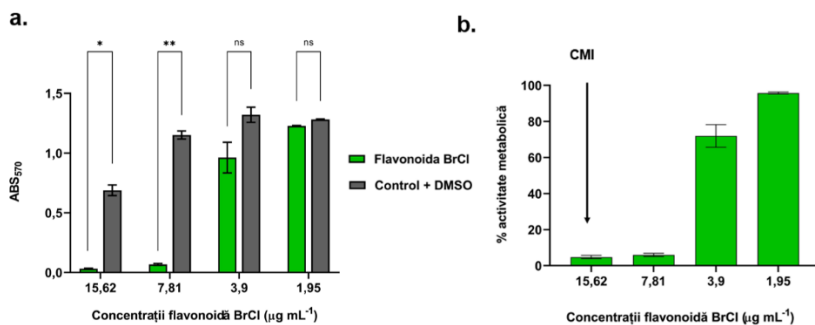


Figura 6.11. Activitatea metabolică a celulelor de *A. pittii* Cl₂ (3) după 24 ore de incubare în prezența flavonoidei BrCl: a. cuantificarea spectrofotometrică a formazanului format; b. procentajul de inhibare al activității metabolice (CMI = 15,62 µg mL⁻¹) (p < 0,05; ** – p = 0,0059; * – p = 0,021; ns – diferențe nesemnificative). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

Un efect similar a fost observat și în cazul ciprofloxacinii (Figura 6.12 – a). De această dată, pentru toate concentrațiile utilizate (CMI, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ și $\frac{1}{8}$ CMI) a fost înregistrată o reducere semnificativă a activității metabolice a celulelor ($p < 0,05$).

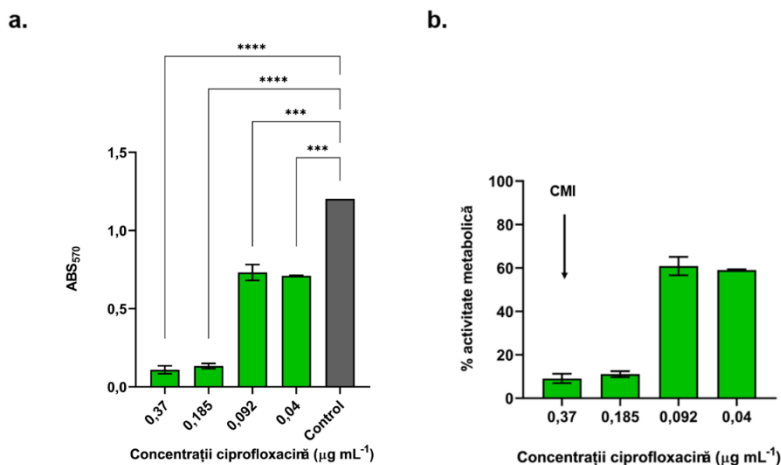


Figura 6.12. Activitatea metabolică a celulelor de *A. pittii* Cl₂ (3) după 24 ore de incubare în prezența ciprofloxacinii (CMI = $0,37 \mu\text{g mL}^{-1}$): a. cuantificarea spectrofotometrică a formazanului format; b. procentajul de inhibare al activității metabolice ($p < 0,05$; *** – $p = 0,0002$; **** – $p < 0,0001$). Celulele din control au fost incubate timp de 24 h, în absența ciprofloxacinii. Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

6.2.6. Flavonoida BrCl distruge biofilmul matur produs de *A. baumannii* și *A. pittii*

Flavonoida BrCl distruge biofilmul matur format de tulpina *A. baumannii* medbio3-2013 – Figura 6.13. Efectul antibiofilm a fost înregistrat inclusiv la concentrații echivalente valorii CMI și $\frac{1}{2}$ CMI, pentru care procentajul de distrugere a fost de până la 60% (Figura 6.3 – a). Pentru tulpina *A. pittii* Cl₂ (3), biofilmul preformat a fost distrus într-o proporție de până la 32% – Figura 6.13 – b.

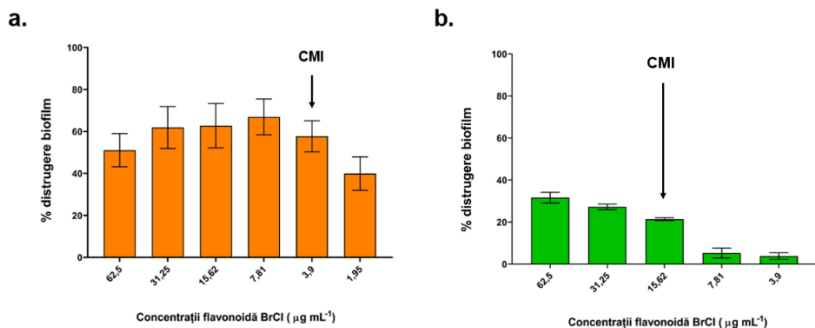


Figura 6.13. Potențialul flavonoidei BrCl de a distruge biofilmul matur format de: a. *A. baumannii* medbio3-2013 (CMI = 3,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$); b. *A. pittii* Cl₂ (3) (CMI = 15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Biofilmul a fost preformat timp de 24 de ore în absența flavonoidei testate. Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

În mod asemănător, ciprofloxacina a condus la apariția unui efect antibiofilm semnificativ ($p > 0,03$) la concentrații cuprinse între 6 și 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 6.14 – a). Ciprofloxacina distruge biofilmul produs de tulpina *A. pittii* Cl₂ (3) într-un procentaj de până în 37%, valoare relativ asemănătoare cu cea înregistrată în cazul flavonoidei BrCl (31%) administrată în concentrație echivalentă cu $4 \times$ CMI. (Figura 6.14 – b).

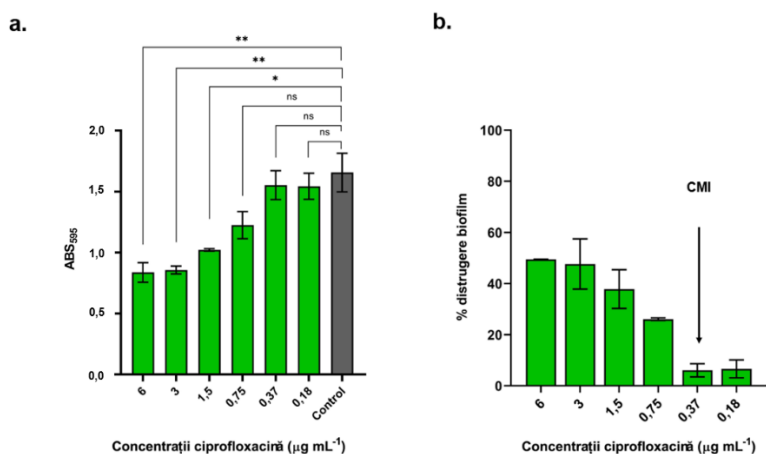


Figura 6.14. Potențialul ciprofloxacinei de a distruge biofilmul matur produs de *A. pittii* Cl₂ (3) (CMI = 0,37 $\mu\text{g mL}^{-1}$): a. cuantificarea biomasei biofilmului bacterian cu ajutorul colorantului cristal violet; b. procentajul de distrugere al biofilmului ($p < 0,05$; ** – $p > 0,030$; * – $p = 0,012$; ns – diferențe nesemnificative). Biofilmul a fost preformat timp de 24 de ore în absența antibioticului testat. Celulele din control au fost incubate ulterior în absența ciprofloxacinei. Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

6.2.7. Flavonoida BrCl reduce hidrofobicitatea suprafeței celulelor de *Acinetobacter*

O concentrație echivalentă cu $\frac{1}{2}$ CMI a determinat o reducere a CSH-ului cu până la 28,1% , în comparație cu celulele puse în contact cu solventul DMSO – Figura 6.15.

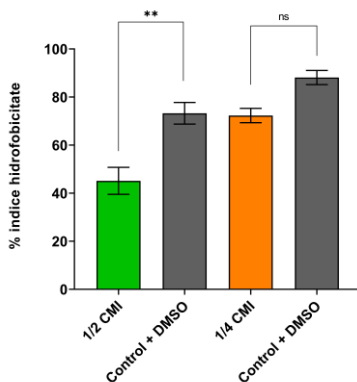


Figura 6.15. Aprecierea hidrofobicității suprafeței celulelor de *A. pittii* Cl₂ (3) în prezența flavonoidei BrCl ($\frac{1}{2}$ CMI = $7,81 \mu\text{g mL}^{-1}$; $\frac{1}{4}$ CMI = $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) ($p < 0,05$; ** – $p = 0,059$; ns – diferențe nesemnificative). Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

6.2.8. Flavonoida BrCl influențează producerea de EPS

Flavonoida BrCl, administrată într-o concentrație echivalentă cu $\frac{1}{2}$ CMI ($7,81 \mu\text{g mL}^{-1}$), reduce cu aproximativ 55% conținutul total de carbohidrați din probă în comparație cu controlul suplimentat cu DMSO – Figura 6.16.

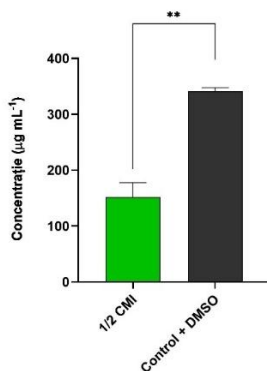


Figura 6.16. Efectul flavonoidei BrCl în concentrație echivalentă cu $\frac{1}{2}$ CMI ($7,81 \mu\text{g mL}^{-1}$) asupra conținutului total de carbohidrați produși de către tulpina *A. pittii* Cl₂ (3) ($p < 0,005$; ** – $p = 0,0059$).

Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

6.2.9. Flavonoida BrCl nu influențează motilitatea de tip *swarming*, *swimming* și *twitching*

Testată împotriva tulpinii *P. aeruginosa* medbio7-2013 și *A. pittii* Cl₂ (3), flavonoida BrCl, în concentrație echivalentă cu $\frac{1}{2}$ ($15,62 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectiv $7,81 \mu\text{g mL}^{-1}$) și $\frac{1}{4}$ CMI ($7,81 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectiv $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) nu a prezentat activitate anti-*swarming*, anti-*swimming* și anti-*twitching*, diferențele înregistrate între probă și control nefiind semnificative din punct de vedere statistic.

CAPITOLUL 7. EFECTUL SINERGIC AL COMBINAȚIILOR FLAVONOIDE SINTETICE TRICICLICE CU SULF – ANTIBIOTICE

7.1. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

7.1.1. Aprecierea efectului sinergic produs de combinațiile flavonide sintetice – antibiotice cu ajutorul metodei *checkerboard*

Metoda *checkerboard* se bazează pe testarea combinațiilor a doi compuși antimicrobieni rezultate în urma a două diluții seriate în rata 2 ale acestora. Prin testarea combinațiilor rezultate se urmărește evidențierea efectului produs de interacțiunea dintre cele două substanțe: efect sinergic, aditiv, indiferent și antagonic (Hemaiswarya *et al.*, 2008).

7.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Efectele combinației flavonoidă BrCl – penicilină

Rezultatele obținute (Tabelul 7.1) au evidențiat prezența a cinci efecte sinergice (flavonoidă BrCl în concentrație cuprinsă între 0,12 - 0,007 $\mu\text{g mL}^{-1}$ și penicilina în concentrație de 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabel 7.1. Indicele de concentrație inhibitorie fracționată înregistrat pentru combinația flavonoidă BrCl și penicilină împotriva tulpinii *S. aureus* medbio1-2012

Tulpină bacteriană	Concentrație minimă inhibitorie (μg mL ⁻¹)				FICI	Efect
	Separat		În combinație			
	Flavonoidă BrCl	Penicilină	Flavonoidă BrCl	Penicilină		
<i>Staphylococcus aureus</i> medbio1-2012	0,48	128	0,96	8	2,06	Indiferent
			0,48	16	1,125	Indiferent
			0,24	32	0,75	Aditiv
			0,12	32	0,5	Sinergic
			0,06	32	0,375	Sinergic
			0,03	32	0,312	Sinergic
			0,015	32	0,281	Sinergic
			0,007	32	0,264	Sinergic

*FICI = indice de concentrație inhibitorie fracționată

Efectele combinației flavonoidă BrCl – ciprofloxacină

Intervalul de concentrație al flavonoidei BrCl și ciprofloxacină a fost cuprins între 0,48 și 0,0002 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectiv 156,25 și 1,22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabelul 7.2). De această dată, cele mai numeroase efecte identificate au fost cele indifferente, urmate de efectele aditive. Nu au fost înregistrate efecte sinergice în cazul combinațiilor testate.

Tabel 7.2. Indicele de concentrație inhibitorie fracționată al flavonoidei BrCl și al antibioticului ciprofloxacină împotriva tulpinii *S. aureus* medbio1-2012

Tulpină bacteriană	Concentrație minimă inhibitorie (μg mL ⁻¹)				FICI	Efect
	Separat		În combinație			
	Flavonoidă BrCl	Ciprofloxacină	Flavonoidă BrCl	Ciprofloxacină		
Staphylococcus aureus medbio1-2012	0,48	156,25	0,48	9,76	1,06	Indiferent
			0,48	4,88	1,03	Indiferent
			0,48	2,44	1,015	Indiferent
			0,48	1,22	1,007	Indiferent
			0,24	39,06	0,74	Aditiv
			0,24	19,53	0,62	Aditiv
			0,12	78,12	0,74	Aditiv
			0,06	78,12	0,615	Aditiv
			0,06	156,25	1,125	Indiferent
			0,03	156,25	1,06	Indiferent

Tulpină bacteriană	Concentrație minimă inhibitorie (µg mL ⁻¹)				FICI	Efect
	Separat		În combinație			
	Flavonoidă BrCl	Ciprofloxacină	Flavonoidă BrCl	Ciprofloxacină		
			0,015	156,25	1,031	Indiferent
			0,007	156,25	1,015	Indiferent
			0,003	156,25	1,007	Indiferent
			0,001	156,25	1,003	Indiferent
			0,0009	156,25	1,001	Indiferent
			0,0004	156,25	1,0009	Indiferent
			0,0002	156,25	1,0004	Indiferent

*FICI = indice de concentrație inhibitoare fracționată

Efectele combinației flavonoidă BrCl – tetraciclină

Pe lângă cei doi compuși antimicrobieni evaluați (penicilină, ciprofloxacina), s-a urmărit și interacțiunea dintre flavonoida BrCl și tetraciclină, antibiotic cu spectru extins ce inhibă sinteza proteică prin blocarea ARNm, însă nu a putut fi observat niciun efect sinergic – Tabelul 7.3.

Tabel 7.3. Indicele de concentrație inhibitoare fracționată al combinației flavonoidă BrCl și tetraciclină împotriva tulpinii de *S. aureus* medbio1-2012

Tulpină bacteriană	Concentrație minimă inhibitoare (µg mL ⁻¹)				FICI	Efect
	Separat		În combinație			
	Flavonoidă BrCl	Tetraciclină	Flavonoidă BrCl	Tetraciclină		
Staphylococcus aureus medbio1-2012	0,48	19,531	0,48	4,882	1,025	Indiferent
			0,48	2,441	1,012	Indiferent
			0,48	1,222	1,06	Indiferent
			0,48	0,61	1,031	Indiferent
			0,48	0,305	1,015	Indiferent
			0,48	0,152	1,007	Indiferent
			0,24	9,76	0,999	Aditiv
			0,12	19,531	1,25	Indiferent
			0,06	19,531	1,125	Indiferent
			0,03	19,531	1,06	Indiferent
			0,015	19,531	1,031	Indiferent
			0,07	19,531	1,015	Indiferent
			0,003	19,531	1,007	Indiferent
			0,001	19,531	1,003	Indiferent
			0,0009	19,531	1,001	Indiferent
			0,0004	19,531	1,0009	Indiferent
			0,0002	19,531	1,0004	Indiferent

*FICI = indice de concentrație inhibitoare fracționată

Efectele combinației flavonoidă BrBr – penicilină

Efectul antimicrobian al flavonoidei BrBr a fost urmărit în combinație cu penicilina, împotriva aceleași tulpini de *S. aureus* rezistente la meticilină. Rezultatele obținute, prezentate

în Tabelul 7.4, au evidențiat absența unor efecte sinergice, singurele înregistrate fiind efectele aditive (FICI = 0,503 – 0,747) și indiferente (FICI = 1,001 – 1,01).

Tabel 7.4. Indicele de concentrație inhibitorie fracționată al flavonoidei BrBr și al antibioticului penicilină împotriva tulpinii *S. aureus* medbio1-2012

Tulpină bacteriană	Concentrație minimă inhibitorie (µg mL ⁻¹)				FICI	Efect
	Separat		În combinație			
	Flavonoidă BrBr	Penicilină	Flavonoidă BrBr	Penicilină		
Staphylococcus aureus medbio1-2012	0,97	128	0,015	64	0,515	Aditiv
			0,03	64	0,503	Aditiv
			0,06	64	0,561	Aditiv
			0,12	64	0,623	Aditiv
			0,24	64	0,747	Aditiv
			0,48	32	0,744	Aditiv
			0,48	16	0,619	Aditiv
			0,48	8	0,556	Aditiv
			0,48	4	0,525	Aditiv
			0,97	2	1,01	Indiferent
			0,97	1	1,007	Indiferent
			0,97	0,5	1,003	Indiferent
			0,97	0,25	1,002	Indiferent
			0,97	0,125	1,001	Indiferent

*FICI = indice de concentrație inhibitorie fracționată

Efectele combinației flavonoidă BrI – penicilină

În cazul combinației flavonoida BrI (concentrații cuprinse între 0,97 și 0,007 $\mu\text{g mL}^{-1}$) și penicilină (concentrații cuprinse între 256 și 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$) testată împotriva tulpinii *S. aureus* medbio1-2012 nu s-a observat o potențare a activității antibioticului în prezența compusului sintetic cu sulf pentru niciuna dintre variantele analizate – Tabelul 7.5.

Tabel 7.5. Indicele de concentrație inhibitorie fracționată al flavonoidei BrI și al antibioticului penicilină împotriva tulpinii *S. aureus* medbio1-2012

Tulpină bacteriană	Concentrație minimă inhibitorie (μg mL ⁻¹)				FICI	Efect
	Separat		În combinație			
	Flavonoidă BrI	Penicilină	Flavonoidă BrI	Penicilină		
Staphylococcus aureus medbio1-2012	0,48	128	0,007	64	0,514	Aditiv
			0,015	64	0,531	Aditiv
			0,03	64	0,506	Aditiv
			0,06	64	0,512	Aditiv
			0,12	64	0,75	Aditiv
			0,24	32	0,75	Aditiv
			0,48	16	1,125	Indiferent
			0,48	8	1,062	Indiferent
			0,97	4	2,031	Antagonic
			0,97	2	2,015	Antagonic
0,97	1	2,007	Antagonic			

Tulpină bacteriană	Concentrație minimă inhibitoare (μg mL ⁻¹)				FICI	Efect
	Separat		În combinație			
	Flavonoidă BrI	Penicilină	Flavonoidă BrI	Penicilină		
			0,97	0,5	2,003	Antagonic
			0,97	0,25	2,001	Antagonic
			0,97	0,125	2,0009	Antagonic

*FICI = indice de concentrație inhibitoare fracționată

CAPITOLUL 8. DETERMINAREA POTENȚIALULUI CITOTOXIC ȘI ANTI-INFLAMATOR AL FLAVONOIDEI BrCl

8.1. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

8.1.1. Evaluarea efectului produs de flavonoida BrCl asupra viabilității celulelor umane

Metoda se bazează pe determinarea spectrofotometrică a activității hidrogenazelor mitocondriale ce reduc sarea de tetrazoliu la formazan (culoare oranj) (Präbst *et al.*, 2017).

8.1.2. Evaluarea efectului pro- și anti-inflamator determinat de flavonoida BrCl

Secreția de citochine de tip TNF- α și IL10 se cuantifică spectrofotometric folosind metoda ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

8.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

8.2.1. Aprecierea efectului citotoxic al flavonoidei BrCl

Macrofagele prezintă o sensibilitate ridicată la flavonoida BrCl, în special la concentrații mai mari de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, valoarea IC_{50} înregistrată fiind de $5,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ – Figura 8.1 – a.

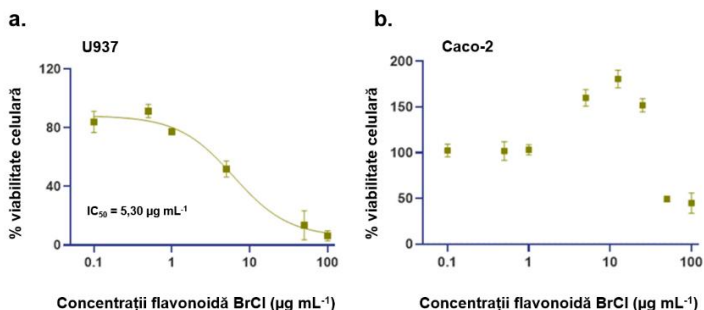


Figura 8.1. Efectul flavonoidelor BrCl asupra viabilității unor linii celulare umane: a) U937 și b) Caco-2. Celulele au fost incubate timp de 24 h în prezența flavonoidelor BrCl, în concentrații cuprinse între 0,1 și 100 µg mL⁻¹. Viabilitatea celulară a fost determinată în urma măsurării activității hidrogenazei mitocondriale cu ajutorul compusului CCK-8. Mediile sunt prezentate ca ± deviația standard (N = 2; n = 6). Concentrația de flavonoidă necesară producerii unei inhibiții de 50% a viabilității celulare, notată ca IC₅₀, a fost determinată cu ajutorul funcției de analiză a regresiei neliniare din programul GraphPad Prism.

8.2.2. Aprecierea efectului pro- și anti-inflamator determinat de flavonoida BrCl

Flavonoida testată exercită un efect pro-inflamator, datorită creșterii secreției de citochină TNF-α (cu aproximativ 44%), respectiv reducerea producției de citochină IL10 (cu aproximativ 59%), la toate concentrațiile evaluate, însă nu într-o manieră dependentă de doză – Figura 8.2.

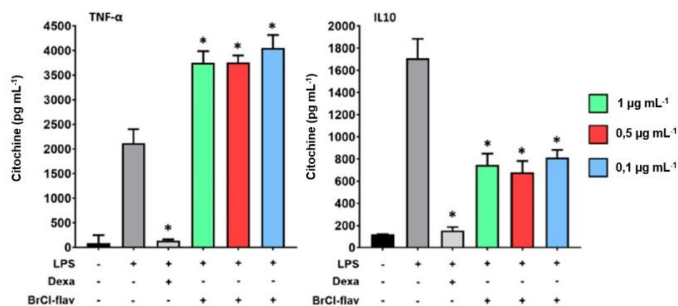


Figura 8.2. Efectul flavonoidelor BrCl asupra secreției induse de LPS a factorului de necroză tumorală α (TNF-α) și a interleuchinei 10 (IL10) de macrofagele U937. Producția de citochine a fost măsurată după 4 ore de incubare în mediu de cultură (coloană de culoare neagră), mediu de cultură + LPS (50 µg mL⁻¹) (coloană de culoare gri închis), mediu de cultură + LPS (50 µg mL⁻¹) + dexametazonă (20 µM) (coloană de culoare gri deschis), mediu de cultură + LPS (50 µg mL⁻¹) + diferite concentrații de flavonoidă BrCl (1 µg mL⁻¹ – coloană de culoare verde; 0,5 µg mL⁻¹ – coloană de culoare roșie și 0,1 µg mL⁻¹ – coloană de culoare albastră) (* = p < 0,05). Barele reprezintă deviația standard a mediei.

CONCLUZII

1. Rezistența la antibiotice a bacteriilor patogene a devenit o problemă majoră, care are consecințe globale asupra sănătății umane.
2. Apele uzate și stațiile de epurare a apelor uzate reprezintă rezervoare importante pentru selecția de gene și bacterii rezistente la antibiotice.
3. Flavonoidele naturale și cele obținute prin sinteză chimică manifestă o activitate importantă asupra tulpinilor bacteriene rezistente, fiind considerate o alternativă viabilă la antibioticele tradiționale.
4. Activitatea antimicrobiană a flavonoidelor se datorează mai multor mecanisme de acțiune, printre care se numără și lezarea membranei celulare, respectiv inhibarea formării biofilmelor.
5. Identificarea taxonomică a tulpinilor izolate din probele de apă reziduală a evidențiat prezența unui număr ridicat de tulpini ce aparțin speciilor *Aeromonas caviae*, *Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa*. O proporție mult mai redusă (2%) a fost observată în cazul tulpinilor de *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium* și *Staphylococcus aureus*.
6. Cele mai bine reprezentate au fost încrengăturile Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes și Actinobacteria. Abundența ridicată a proteobacteriilor în eșantioanele analizate este corelată direct cu prezența în materiile fecale, dar și cu capacitatea ridicată de supraviețuire în condițiile caracteristice apelor reziduale.
7. În probele de apă colectate au fost mai numeroase bacteriile rezistente la tetraciclină, cloramfenicol și ampicilină - antibiotice cu spectru extins, administrate frecvent la nivelul diferitelor sectoare de activitate umană
8. Cele mai ridicate valori ale concentrației minime inhibitorii înregistrate în cazul tulpinilor testate au fost obținute pentru ampicilină ($2048 \mu\text{g mL}^{-1}$), cloramfenicol ($512 \mu\text{g mL}^{-1}$) și gentamicină ($78,12 \mu\text{g mL}^{-1}$).
9. Dintre genele de rezistență identificate, mai frecvente au fost cele pentru aminoglicozide, antibiotice β -lactamice, tetraciclina, macrolide și fenoli. Mai mult, cele mai numeroase tulpini izolate au prezentat rezistență la ampicilină (antibiotic β -lactamic), tetraciclina, cloramfenicol (fenicoli), eritromicină (macrolide) și gentamicină (aminoglicozide), putându-se stabili o legătură între rezultatele obținute în urma izolării tulpinilor rezistente pe medii selective și cele obținute în urma secvențierii.
10. Genele de rezistență implicate în sinteza de β -lactamaze, respectiv în activitatea pompelor de eflux și modificarea situs-ului de acțiune au fost cele mai abundente, demonstrând astfel că cele trei mecanisme implicate în rezistență sunt cele mai întâlnite în cazul probelor analizate.

11. Dintre tulpinile provenite din probele de apă reziduală, 2 dintre acestea (*Aeromonas caviae* A₄ (2) și *Acinetobacter pittii* Cl₂ (3)) au manifestat aderență ridicată față de substratul inert utilizat. Dintre tulpinile izolate din mediul clinic, doar *Acinetobacter baumannii* medbio3-2013 (bacterie ce face parte din categoria celor considerate critic prioritare) a produs cea mai mare cantitate de biofilm ($Abs_{595} = 1,7$).
12. În ceea ce privește capacitatea tulpinilor rezistente selectate de a adera la celulele aparținătoare liniei HeLa (linie ce servește drept model pentru testele de adeziune ce implică diferite bacterii de importanță medicală), doar *Aeromonas caviae* A₄ (2) și *Escherichia coli* A₅ (2) au prezentat un mod de atașare de tip localizat, respectiv agregativ. Incapacitatea celorlalte tulpini evaluate de a adera la celulele epiteliale utilizate poate fi corelată atât cu aderența redusă la un suport abiotic, cât și cu afinitatea redusă față de celulele liniei HeLa. Dintre tulpinile rezistente evaluate, 6 au fost producătoare de β -lactamaze cu spectru extins (ESBL), 2 au fost producătoare de OXA₄₈ și o tulpină a secretat ambele categorii de enzime – *Escherichia coli* T₂ (3). Enzimele de tip MBL și KPL au fost observate doar la tulpina *Klebsiella pneumoniae* medbio6-2013.
13. Screening-ul fenotipic al prezenței pompelor de eflux la tulpinile bacteriene testate a condus la înregistrarea unei activități scăzute a acestor canale față de bromura de etidiu (colorant frecvent utilizat pentru punerea în evidență a pompelor de eflux de tip RND, prezente mai ales în cazul speciilor din familia *Enterobacteriaceae*).
14. Evaluarea activității antibacteriene a flavonoidelor sintetice tricyclice cu sulf s-a realizat împotriva mai multor specii ce aparțin genului *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella* și *Haemophilus*. În urma rezultatelor obținute, s-a demonstrat că flavonoida BrCl a prezentat cele mai importante proprietăți antibacteriene, valorile CMI determinate fiind $\leq 7,81 \mu\text{g mL}^{-1}$ pentru bacteriile Gram-pozitive și $\leq 125 \mu\text{g mL}^{-1}$ pentru bacteriile Gram-negative.
15. Flavonoida BrCl a prezentat o activitate antibacteriană de până la 32 ori mai mare în comparație cu cloramfenicolul (antibiotic de referință) pentru mai multe tulpini de *Staphylococcus aureus*, precum și pentru tulpinile *Streptococcus pneumoniae* prxbio10 și *Haemophilus* spp. prxbio13. O activitate comparabilă cu cea a gentamicinei a fost înregistrată împotriva tulpinii *Klebsiella pneumoniae* medbio6-2013.
16. Flavonoidele BrCl, BrBr și BrI au determinat apariția unui efect bacteriostatic dependent de doză și de timpul de expunere. La valori ale CMI cuprinse între 0,48 și $7,81 \mu\text{g mL}^{-1}$, compuşii testați au condus la o întârziere a creșterii de până la 20 h. Concentrații echivalente cu $2 \times \text{CMI}$ au produs un efect bacteriostatic de până la 21 h.
17. Flavonoida BrCl, în concentrații de 1,95 și $7,81 \mu\text{g mL}^{-1}$, a manifestat un efect bactericid asupra tulpinilor de *Staphylococcus aureus* după 3 ore de la expunere, în timp ce o

concentrație de $15,62 \mu\text{g mL}^{-1}$ a produs un efect similar după doar 0,5 și 2 h împotriva tulpinilor *Acinetobacter baumannii* medbio3-2013 și *Escherichia coli* medbio4-2013. O reducere totală a viabilității a fost observată după numai o oră de incubare a celulelor de *Enterococcus faecium* medbio2-2012 în prezența unei concentrații de $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ flavonoidă.

18. Expunerea celulelor de *Staphylococcus aureus* medbio1-2012 și *Escherichia coli* medbio4-2013 la o concentrație echivalentă CMB a determinat modificarea permeabilității și integrității membranare. Aceste efecte au putut fi observate cu ajutorul microscopiei cu fluorescență după numai 30 de minute de la contactul cu flavonoida BrCl.
19. Folosind microscopia electronică cu baleiaj s-a observat că flavonoida BrCl a provocat alterări morfologice majore la nivelul celulelor bacteriene evaluate. Modificările morfologice ireversibile evidențiate susțin ipoteza conform căreia mecanismul de acțiune al flavonoidei BrCl presupune țintirea membranelor celulare, inducând modificări ale structurii acestora, urmate de liza celulară.
20. Aderarea celulelor de *Acinetobacter baumannii* medbio3-2013 a fost inhibată într-o proporție de până la 94% la concentrații ale flavonoidei BrCl echivalente cu CMI ($3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) și $\frac{1}{2}$ CMI ($1,95 \mu\text{g mL}^{-1}$). O activitate anti-aderare a fost observată și în cazul tulpinii *Acinetobacter pittii* Cl₂ (3). De această dată, flavonoida BrCl utilizată în concentrație de $15,62 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CMI), a indus o inhibare importantă a aderării celulelor bacteriene, procentajul de inhibare înregistrat fiind de aproximativ 78%.
21. Un procentaj de inhibare al biofilmului produs de tulpinile *Acinetobacter baumannii* medbio3-2013 și *Acinetobacter pittii* Cl₂ (3), de până la 97%, a fost observat la concentrații cuprinse între 62,5 și $0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ flavonoidă BrCl.
22. În comparație cu ciprofloxacina (antibiotic din clasa chinolonelor utilizat ca opțiune de tratament în infecțiile produse de tulpinile de *Acinetobacter* spp rezistente), flavonoida BrCl administrată în concentrații sub-inhibitorii ($\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ și $\frac{1}{8}$ CMI) a prezentat un efect inhibitor cu până la 40% mai pronunțat.
23. Cu ajutorul microscopiei electronice cu baleiaj, s-a observat că administrarea flavonoidei BrCl în concentrație echivalentă cu $\frac{1}{2}$ CMI ($7,81 \mu\text{g mL}^{-1}$), a condus la o diminuare semnificativă a celulelor din biofilmul bacterian. Cu toate acestea, la concentrația sub-inhibitorie testată, flavonoida BrCl nu induce și apariția de modificări la nivelul morfologiei celulelor sau a dimensiunilor acestora.
24. În prezența concentrațiilor echivalente cu CMI și $\frac{1}{2}$ CMI ($15,62$ și $7,81 \mu\text{g mL}^{-1}$), flavonoida BrCl reduce activitatea metabolică a celulelor din biofilm cu până la 95%. Aceasta activitate este oarecum comparabilă cu cea a ciprofloxacinei, între procentajele înregistrate pentru cei doi compuși diferențele fiind de numai 11%.

25. Un procentaj de distrugere al biofilmului produs de tulpinile *Acinetobacter baumannii* medbio3-2013 și *Acinetobacter pittii* Cl₂ (3), de până la 67%, a fost observat la concentrații cuprinse între 62,5 și 0,97 μg mL⁻¹ flavonoidă BrCl.
26. Pe lângă efectul antibiofilm înregistrat, flavonoida BrCl determină și o reducere a hidrofobicității celulare de până la 28%, în comparație cu controlul utilizat.
27. De asemenea, flavonoida BrCl administrată într-o concentrație echivalentă cu ½ CMI (7,81 μg mL⁻¹) reduce cu aproximativ 55% conținutul total de carbohidrați produs de tulpina *Acinetobacter pittii* Cl₂ (3). În acest context, presupunem că posibilul mecanism prin care are loc inhibarea aderării celulelor de *Acinetobacter pittii* ar putea fi pus pe seama reducerii hidrofobicității suprafeței celulare, factor determinant în aderența și colonizarea suprafețelor, respectiv inhibarea producerii de exopolizaharide.
28. Flavonoida BrCl, testată în concentrații echivalente cu ½ și ¼ CMI (7,81, respectiv 3,9 μg mL⁻¹), nu afectează motilitatea de tip *swarming*, *swimming* și *twitching* a tulpinilor testate.
29. În combinație cu penicilina, flavonoida BrCl determină apariția mai multor efecte sinergice împotriva tulpinii *Staphylococcus aureus* medbio1-2012, valorile concentrațiilor minime inhibitorii pentru cei 2 compuși înregistrând o scădere de 4 până la 68 de ori. În cazul combinațiilor formate din flavonoidă BrCl și ciprofloxacina/tetraciclină, flavonoidă BrBr/BrI și penicilină nu au fost înregistrate efecte sinergice.
30. Potențialul citotoxic a fost evaluat asupra mai multor linii celulare umane ce ar putea intra în contact cu flavonoida BrCl după administrarea pe cale orală. Dintre acestea, monocitele diferențiate în macrofage au prezentat cea mai mare sensibilitate (IC₅₀ = 5,3 μg mL⁻¹). Pentru linia epitelială intestinală, valoarea IC₅₀ nu a putut fi determinată, întrucât flavonoida BrCl a determinat o creștere a viabilității celulelor eucariote.
31. De asemenea, s-a observat că pentru unele tulpini bacteriene evaluate (*Staphylococcus aureus* MRSA, *Streptococcus pneumoniae* prxbio10, *Streptococcus* spp. prxbio9, *Haemophilus* spp. prxbio13, *Escherichia coli* medbio4-2013 și *Acinetobacter baumannii* medbio3-2013), valoarea concentrației minime inhibitorii (CMI ≤ 3,9 μg mL⁻¹) a fost mai scăzută față de valoarea IC₅₀ determinată pentru linia U937 (IC₅₀ = 5,30 μg mL⁻¹).
32. Flavonoida BrCl exercită un efect pro-inflamator, datorită creșterii secreției de citochină TNF-α, respectiv reducerea producției de citochină IL10, însă nu într-o manieră dependentă de doză.
33. Rezultatele obținute sugerează că flavonoida BrCl prezintă un potențial antibacterian important împotriva unor bacterii rezistente la antibiotice, putând fi utilizată cu succes în dezvoltarea de noi agenți antimicrobieni.

PERSPECTIVE DE CONTINUARE A STUDIILOR

Rezultatele obținute până în prezent cu privire la activitatea antibacteriană a flavonoidelor sintetice triciclice cu sulf ne încurajează să continuăm cercetările în următoarele direcții:

1. Investigarea efectelor sinergice ale combinațiilor dintre flavonoide și antibioticele convenționale asupra inhibării, respectiv distrugerii biofilmului bacterian.
2. Observarea cu ajutorul microscopiei confocale cu scanare laser a arhitecturii biofilmului bacterian format în prezența flavonoidelor sintetice triciclice cu sulf.
3. Investigarea potențialului flavonoidelor de a induce apariția unor specii reactive de oxigen.
4. Evaluarea efectului inhibitor al flavonoidelor asupra activității enzimatică a β -lactamazelor.
5. Aprecierea efectului produs de flavonoide asupra mecanismelor de blocare a porinelor.
6. Testarea potențialului flavonoidelor triciclice cu sulf pentru inhibiția pompelor de eflux supra-exprimate (ex. MexAB-OprM).
7. Investigarea activității flavonoidelor asupra celulelor bacteriene ce au aderat la un suport celular.
8. Evaluarea capacității celulelor bacteriene de a dobândi rezistență la flavonoidele triciclice cu sulf.

DISEMINAREA REZULTATELOR OBȚINUTE PE PARCURSUL SUDIILOR DOCTORALE

Articole publicate *in extenso* din domeniul tezei de doctorat

A. Articole publicate in reviste indexate WOS

1. **Cristina-Veronica Moldovan**, Loredana-Elena Mantea, Mihaela Savu, Piter Jones, Laura Gabriela Sarbu, Marius Stefan, Mihail Lucian Birsa (2024) – *Novel tricyclic flavonoids as promising anti-MRSA agents*. Pharmaceuticals **17**(10): 1276, <https://doi.org/10.3390/ph17101276> (IF 4,3).
2. Loredana-Elena Mantea, **Cristina-Veronica Moldovan**, Mihaela Savu, Laura Gabriela Sarbu, Marius Stefan, Mihail Lucian Birsa (2024) – *An eco-friendly method to synthesize potent antimicrobial tricyclic flavonoids*. Antibiotics **13**(9): 798, <https://doi.org/10.3390/antibiotics13090798> (IF 4,3).

3. **Cristina-Veronica Moldovan**, Mihaela Savu, Elodie Dussert, Haïrati Aboubacar, Laura Gabriela Sarbu, Simona Matiut, Benoît Cudennec, François Krier, Rozenn Ravallec, Lucian Mihail Birsă, Marius Ștefan (2022) – *Synthetic flavonoid BrCl-flav - an alternative solution to combat ESKAPE pathogens*. Antibiotics **11**(10): 1389, <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101389> (IF 4,8).

B. Articole publicate în reviste indexate BDI

1. Awawou Manouore Njoya, Jean Samuel Eheth, Yves Poutoum Yogne, Claire Stéphane Metsopkeng, **Cristina-Veronica Moldovan**, Sylvie Chinche Belengfe, Laure Ngando, Marguerite Kamdem Simo, Paul Alain Nana, Edith Brunelle Mouafo Tamnou, Estelle Masseret, Télésphore Sime-Ngando and Moïse Nola (2022) – *Proteus bacteria species from hospital sewage and Mfoundi River in Yaounde (Cameroon, Central Africa): Comparison of the diversity, abundance and susceptibility against some β -lactams, quinolones and aminoglycosides antibiotics*. Journal of Advances in Microbiology Research **3**(2): 34-46, <https://doi.org/10.22271/micro.2022.v3.i2a.47>.

Articole publicate *in extenso* în timpul studiilor doctorale

Articole publicate în reviste indexate WOS

1. Gabriela Vochița, Anca Niculina Cadinoiu, Delia Mihaela Rață, Leonard Ionuț Atanase, Marcel Popa, Athar Mahdieh, Cosmin-Teodor Mihai, Alexandru Stache, **Cristina-Veronica Moldovan**, Elena Simona Băcăiță, Iustina Condriuc, Daniela Gherghel (2024) – *Comparative in vitro study between biocompatible chitosan-based magnetic nanocapsules and liposome formulations with potential application in anti-inflammatory therapy*. International Journal of Molecular Sciences **25**(15): 8454, <https://doi.org/10.3390/ijms25158454> (IF 4,9).

Articole publicate în rezumat

1. **Cristina-Veronica Moldovan**, Amada El-Sabeh, Marius Mihășan, Marius Ștefan (2023) – *Identification of antibiotic resistance genes in sewage of Iasi municipal wastewater treatment plant using bioinformatic tools*. 4th International World of Microbiome Conference, p. 128, link-ul către volumul de abstracte: <https://microbiome.kenes.com/wp-content/uploads/sites/38/2023/10/WOM23-Abstracts.pdf>.

2. **Cristina-Veronica Moldovan**, Lucian Mihail Birsă, Marius Ștefan (2022) – *Antimicrobial activity of synthetic flavonoids against multidrug resistant bacteria*. FEMS Conference on Microbiology, p. 70, *link-ul* către volumul de abstracte: <https://acrobat.adobe.com/link/track?uri=urn%3Aaaid%3Aasc%3AUS%3A8d1278c7-8f23-3e24-9ac9-8164b981a9b9>.
3. **Cristina-Veronica Moldovan**, Marius Ștefan (2022) – *Activitatea antibacteriană a flavonoidei BrCl asupra unor tulpini rezistente la antibiotice*. Annual Scientific Session of Naturalist Students, p. 18, *link-ul* către volumul de abstracte: http://www.bio.uaic.ro/?page_id=12649.
4. **Cristina-Veronica Moldovan**, Lucian Mihail Birsă, Marius Ștefan (2022) – *Antibacterial activity of synthetic BrCl-flavonoid.*, J. Exp. Molec. Biol. **23**(2): 66, <https://doi.org/10.47743/jemb-2022-84>
5. **Cristina-Veronica Moldovan**, Marius Ștefan (2021) – *Efectele antimicrobiene ale unei flavonoide sintetice asupra unor tulpini bacteriene rezistente la antibiotice*. Annual Scientific Session of Naturalist Students, pp. 12-13, *link-ul* către volumul de abstracte: http://www.bio.uaic.ro/?page_id=6790.
6. Andreea Mihaela Mlesnița, **Cristina-Veronica Moldovan**, Fakhri Kallabi, Marius Ștefan, Marius Mihășan (2021) – *Antibiotic residence of Paenarthrobacter nicotinovorans – an in-silico and in-vitro study*. J. Exp. Molec. Biol. **22**(2): 50, <https://doi.org/10.47743/jemb-2021-58>.
7. **Cristina-Veronica Moldovan**, Marius Ștefan (2021) – *Study of the mechanisms of antibiotic resistance of bacteria isolated from the influent of a wastewater treatment plant*. J. Exp. Molec. Biol. **22**(2): 51, <https://doi.org/10.47743/jemb-2021-58>.
8. **Cristina-Veronica Moldovan**, Marius Ștefan (2020) – *Efectele antibacteriene ale unei flavonoide sintetice împotriva unei tulpini de Staphylococcus aureus rezistente la penicilină*. Annual Scientific Session of Naturalist Students, p. 8, *link-ul* către volumul de abstracte: http://www.bio.uaic.ro/?page_id=3268.
9. **Cristina-Veronica Moldovan**, Marius Ștefan (2020) – *Antibacterial effects of a synthetic flavonoid against penicillin-resistant strain of Staphylococcus aureus*. Victor Babes National Institute of Pathology, Annual Scientific Meeting & 13th National Pathology Symposium, *link-ul* către volumul de abstracte: https://www.ivb.ro/wp-content/uploads/2022/09/VolumRezumat_IVB20201.pdf.

Participări la conferințe internaționale

1. **Cristina-Veronica Moldovan**, Amada El-Sabeh, Marius Mihășan, Marius Ștefan – *Identification of antibiotic resistance genes in sewage of Iasi municipal wastewater treatment plant using bioinformatic tools*. 4th International World of Microbiome Conference, 26-28 octombrie 2023, Sofia, Bulgaria.
2. **Cristina-Veronica Moldovan**, Lucian Mihail Birsa, Marius Ștefan – *Antimicrobial activity of synthetic flavonoids against multidrug resistant bacteria*. FEMS Congress of European Microbiologists, 10th edition, 30 iunie – 2 iulie 2022, Belgrad, Serbia.
3. **Cristina-Veronica Moldovan**, Lucian Mihail Birsa, Marius Ștefan – *Antibacterial effects of a synthetic flavonoid against antibiotic resistant bacteria*. FEMS Congress of European Microbiologists, 9th edition, 20-24 iunie 2021, Hamburg, Germania (Virtual).

Participări la conferințe naționale

1. **Cristina-Veronica Moldovan**, Ștefan-Mihăiță Olaru, Lucian-Mihail Birsa, Marius Ștefan – *Antibiofilm activity of BrCl-flav against Acinetobacter pittii*. New Trends in Biology: from molecules to complex systems, 25-26 octombrie 2024, Iași, România.
2. Mihaela Savu, **Cristina-Veronica Moldovan**, Loredana-Elena Mantea, Lucian-Mihail Birsa, Marius Ștefan – *A new class of tricyclic flavonoids with antimicrobial activity*. New Trends in Biology: from molecules to complex systems, 25-26 octombrie 2024, Iași, România.
3. **Cristina-Veronica Moldovan**, Amada El-Sabeh, Marius Mihășan, Marius Ștefan - *Identification of antibiotic resistance genes in the influent of Iasi municipal wastewater treatment plant using a bioinformatic approach*. 2023 RoBioInfo Conference, 11-13 mai 2023, București, România.
4. **Cristina-Veronica Moldovan**, Lucian Mihail Birsa, Marius Ștefan - *Antibacterial activity of synthetic BrCl-flavonoid*. New Trends in Biology: from molecules to complex systems, 27-28 octombrie 2022, Iași, România (Virtual).
5. **Cristina-Veronica Moldovan**, Lucian Mihail Birsa, Marius Ștefan - *Antibacterial activity of BrCl-flav against multidrug resistant bacteria*. International Conference and XXXIX Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology, 21-23 octombrie 2022, Cluj-Napoca, România (Virtual).
6. **Cristina-Veronica Moldovan**, Marius Ștefan - *Activitatea antibacteriană a flavonoidei BrCl asupra unor tulpini rezistente la antibiotice*. Annual Scientific Session of Naturalist Students, 6th edition, 21 mai 2022, Iași, România (Virtual).

7. Andreea Mihaela Mlesnița, **Cristina-Veronica Moldovan**, Fakhri Kallabi, Marius Ștefan, Marius Mihășan – *Antibiotic residence of Paenarthrobacter nicotinovorans – an in-silico and in-vitro study*. New Trends in Biology: from molecules to complex systems, 28-29 octombrie 2021, Iași, România (Virtual).
8. **Cristina-Veronica Moldovan**, Marius Ștefan - *Study of the mechanisms of antibiotic resistance of bacteria isolated from the influent of a wastewater treatment plant*. New Trends in Biology: from molecules to complex systems, 28-29 octombrie 2021, Iași, România (Virtual).
9. **Cristina-Veronica Moldovan**, Marius Ștefan - *Efectele antimicrobiene ale unei flavonoide sintetice asupra unor tulpini bacteriene rezistente la antibiotice*. Annual Scientific Session of Naturalist Students, 5th edition, 22 mai 2021, Iași, România (Virtual), **Premiul 1: Biologie aplicată și Experimentală**.
10. **Cristina-Veronica Moldovan**, Marius Ștefan - *Antibacterial effects of a synthetic flavonoid against penicillin-resistant strain of Staphylococcus aureus*. National Symposium on Pathology, Victor Babes National Research and Development Institute, 13th edition, 5 – 7 noiembrie 2020, București, România (Virtual), **Premiul al 2-lea: Short communication – Young Researchers Session**.
11. **Cristina-Veronica Moldovan**, Marius Ștefan - *Efectele antibacteriene ale unei flavonoide sintetice împotriva unei tulpini de Staphylococcus aureus rezistente la penicilină*. Annual Scientific Session of Naturalist Students, 4th edition, 31 octombrie 2020, Iași, România (Virtual).

Membru în echipa unor proiecte de cercetare

1. Contract nr. 550PED/2020. Proiect experimental - demonstrativ: *Tricyclic 1,3-dithiolium flavonoids – New weapons to combat antibiotic resistance*. Acronim: TrisFlav. Cod proiect: PN-III-P2-2.1-PED-2019-2235 (octombrie 2020 – noiembrie 2022).
2. Contract nr. 15/2020. Proiect bilateral (România-Norvegia): *Active targeted drug delivery systems based on peptide-functionalized magnetic nanoparticles for the treatment of inner ear diseases*. Acronim: TargEar. Cod proiect: RO-NO-2019-0187 (ianuarie 2023 – mai 2023).

Propunere de brevet

1. Titlul propunerii de brevet: *Procedeu de obținere a unei noi flavonoide sintetice cu proprietăți antibacteriene*. Cererea de brevet a fost înregistrată la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci (OSIM), având numărul A/00697 din data de 31.10.2022.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Akilandeswari K., Ruckmani K. (2016) - *Synergistic antibacterial effect of apigenin with β -lactam antibiotics and modulation of bacterial resistance by a possible membrane effect against methicillin resistant Staphylococcus aureus*. Cell. Mol. Biol. **62**(14): 74-82.
2. Alcaráz L.E., Blanco S.E., Puig O.N., Tomás F., Ferretti F.H. (2000) - *Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains*. J. Theor. Biol. **205**(2): 231-40.
3. An J., Zuo G.Y., Hao X.Y., Wang G.C., Li Z.S. (2011) - *Antibacterial and synergy of a flavanonol rhamnoside with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Phytomedicine **18**: 990-993.
4. Ayobami O., Brinkwirth S., Eckmanns T., Markwart R. (2022) - *Antibiotic resistance in hospital-acquired ESKAPE-E infections in low- and lower-middle-income countries: a systematic review and meta-analysis*. Emerg. Microbes Infect. **11**(1): 443-451.
5. Bag A., Bhattacharyya S.K., Pal N.K., Chattopadhyay R.R. (2012) - *In vitro antibacterial potential of Eugenia jambolana seed extracts against multidrug-resistant human bacterial pathogens*. Microbiol. Res. **167**(6): 352 - 7.
6. Bahrin L.G., Apostu M.O., Birsă L.M., Stefan M. (2014) - *The antibacterial properties of sulfur containing flavonoids*. Bioorg. Med. Chem. Lett. **24**: 2315-2318.
7. Bernard F.X., Sablé S., Cameron B., Provost J., Desnottes J.F., Crouzet J., Blanche F. (1997) - *Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV*. Antimicrob Agents Chemother. **41**(5): 992-8.
8. Biharee A., Sharma A., Kumar A., Jaitak V. (2020) - *Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance*. Fitoterapia **146**: 104720.
9. Blair J.M.A., Richmond G.E., Piddock L.J.V. (2014) - *Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance*. Future Microbiol. **9**(10): 1165-1177.
10. Bylka W., Matlawska I., Pilewski N.A. (2004) - *Natural flavonoids as antimicrobial agents*. JANA **7**(2): 24-31.

11. Cushnie T.P.T., Lamb A. J. (2011) - *Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids*. Int. J. Antimicrob. Agents **33**: 99-107.
12. Daghrir R., Drogui P. (2013) - *Tetracycline antibiotics in the environment: a review*. Environ. Chem. Lett. **11**: 209-227.
13. Dorneanu O.S., Vremeră T. (2011) - *Staphylococcus aureus: clasic versus modern*, Editura Gr. T. Popa, UMF, Iași, România, pp.: 1, 38, 40.
14. Dowling A., O'Dwyer J., Adley C.C. (2011) - *Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance*. Nurs. Stand. **25**(42):49-55.
15. Dunca S., Ailiesei O., Nimițan E., Ștefan M. (2004) - *Microbiologie aplicată*. Editura Tehnopress, Iași, pp. 74-76; 210-213.
16. Esiobu N., Armenta L., Ike J. (2002) - *Antibiotic resistance in soil and water environments*. IJEHR **12**: 133-144.
17. Eumkeb G., Sakdarat S., Siriwong S. (2010) - *Reversing β -lactam antibiotic resistance of Staphylococcus aureus with galangin from Alpinia officinarum Hance and synergism with ceftazidime*. Phytomedicine **18**(1): 40-5.
18. Farhadi F., Khameneh B., Iranshahi M., Iranshahy M. (2018) - *Antibacterial activity of flavonoids and their structure-activity relationship: An update review*. Phytother. Res. **33**: 13-40.
19. French G.L. (2005) - *Clinical impact and relevance of antibiotic resistance*. Adv. Drug. Deliv. Rev. **57**(10): 1514-27.
20. Fujita M., Shiota S., Kuroda T., Hatano T., Yoshida T., Mizushima T., Tsuchiya T. (2005) - *Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and beta-lactams against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Microbiol. Immunol. **49**(4): 391-6.
21. Georgios M., Egki T., Effrosyni S. (2013) - *Phenotypic and molecular methods for the detection of antibiotic resistance mechanisms in gram negative nosocomial pathogens* în Saxena S.K., *Trends in Infectious Diseases*, Editura IntechOpen, New York, 139-162.
22. Giedraitienė A., Vitkauskienė A., Naginienė R., Pavilionis A. (2011) - *Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria*. Medicina (Kaunas) **47**(3): 137-146.
23. Hancock R.E., Speert D.P. (2000) - *Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and impact on treatment*. Drug Resist. Updat. **3**(4): 247-255.
24. Haraguchi H., Tanimoto K., Tamura Y., Mizutani K., Kinoshita T. (1998) - *Mode of antibacterial action of retrochalcones from Glycyrrhiza inflata*. Phytochemistry **48**(1): 125-9.
25. Hemaiswarya S., Kruthiventi A.K., Doble M. (2008) - *Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases*. Phytomedicine **15**: 639-652.

26. Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K.L. (1999) - *Occurrence of antibiotics in the aquatic environment*. Sci. Total Environ. **225**(1-2): 109-118.
27. Huemer M., Mairpady Shambat S., Brugger S.D., Zinkernagel A.S. (2020) - *Antibiotic resistance and persistence - implications for human health and treatment perspectives*. EMBO Rep. **21**(12): e51034.
28. Ikigai H., Nakae T., Hara Y., Shimamura T. (1993) - *Bactericidal catechins damage the lipid bilayer*. BBA **1147**(1): 132-136.
29. Kapoor G., Saigal S., Elongavan A. (2017) - *Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians*. J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol. **33**(3): 300-305.
30. Kaufman G. (2011) - *Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance*. Nurs. Stand. **25**(42): 49-55.
31. Kim D.Y., Lee J.C. (2017) - *Adherence assay of uropathogenic Escherichia coli in vivo and in vitro*. Urogenic Tract Infect. **12**(3): 122-129.
32. Krause K.M., Serio A.W., Kane T.R., Connolly L.E. (2016) - *Aminoglycosides: an overview*. Cold. Spring. Harb. Perspect. Med. **6**(6): a027029.
33. Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P.J., Nychas G.-J.E. (2001) - *A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol*. J. Appl. Microbiol. **91**(3): 453-462.
34. Li H., Addo K., Yu Y., Xiao X. (2023) - *Cuminaldehyde inhibits biofilm formation by affecting the primary adhesion of Staphylococcus aureus*. S. Afr. J. Bot. **156**: 13-20.
35. Li X.Z., Plésiat P., Nikaido H. (2015) - *The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in gram-negative bacteria*. Clin. Microbiol. Rev. **28**(2): 337-418.
36. Mancuso G., Midiri A., Gerace E., Biondo C. (2021) - *Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens*. Pathogens **10**(10): 1310.
37. Martins M., Viveiros M., Couto I., Costa S.S., Pacheco T., Fanning S., Pagès J.M., Amaral L. (2011) - *Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method*. In vivo **25**: 171-178.
38. Michael-Kordatou I., Karaolia P., Fatta-Kassinos D. (2018) - *The role of operating parameters and oxidative damage mechanisms of advanced chemical oxidation processes in the combat against antibiotic-resistant bacteria and resistance genes present in urban wastewater*. Water Res. **129**: 208-230.
39. Mișcalencu D., Caraene G., Mailat F., Nichita C. (2008) - *Efectele biologice benefice ale flavonoidelor*, Editura Universității București, București, pp. 9-14.
40. Moldovan C.-V., Savu M., Dussert E., Aboubacar H., Sarbu L.G., Matiut S., Cudennec B., Krier F., Ravallec R., Birsă L.M., Stefan M. (2022) - *Synthetic flavonoid BrCl-Flav - An alternative solution to combat ESKAPE pathogens*. Antibiotics (Basel) **11**(10): 1389.

41. Moya C., Maicas S. (2020) - *Antimicrobial Resistance in Klebsiella pneumoniae Strains: Mechanisms and Outbreaks*. Proc. **66**(1): 11.
42. Mun S.H., Lee Y.S., Han S.H., Lee S.W., Cha S.W., Kim S.B., Seo Y.S., Kong R., Kang D.H., Shin D.W., Kang O.H., Kwon D.Y. (2015) - *In vitro potential effect of morin in the combination with β -lactam antibiotics against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Foodborne Pathog. Dis. **12**(6): 545-50.
43. Munita J.M., Arias C.A. (2016) - *Mechanisms of antibiotic resistance*. Microbiol. Spectr. **4**(2): VMBF-0016-2015.
44. Mutuku C., Gazdag Z., Melegh S. (2022) - *Occurrence of antibiotics and bacterial resistance genes in wastewater: resistance mechanisms and antimicrobial resistance control approaches*. World J. Microbiol. Biotechnol. **38**(9): 152.
45. Navarro-Martínez M.D., Navarro-Perán E., Cabezas-Herrera J., Ruiz-Gómez J., García-Cánovas F., Rodríguez-López J.N. (2005) - *Antifolate activity of epigallocatechin gallate against Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob. Agents Chemother. **49**(7): 2914-20.
46. Ngigi A.N., Magu M.M., Muendo B.M. (2019) - *Occurrence of antibiotics residues in hospital wastewater, wastewater treatment plant, and in surface water in Nairobi County, Kenya*. Environ. Monit. Assess **192**: 18.
47. Nielsen S.S. (2017) - *Food Analysis Laboratory Manual*, 3rd edition, Editura Springer, Mason, Ohio, SUA, pp.:137-141.
48. Novo A., André S., Viana P., Nunes O.C., Manaia C.M. (2013) - *Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater*. Water Res. **47**: 1875-1887.
49. O'Driscoll T., Crank C.W. (2015) - *Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management*. Infect. Drug Resist. **8**: 217-30.
50. Oliveira D., Borges A., Simões M. (2018) - *Staphylococcus aureus toxins and their molecular activity in infectious diseases: Review*. Toxins (Basel) **10**(6): 252.
51. Otsuka N., Liu M.H., Shiota S., Ogawa W., Kuroda T., Hatano T., Tsuchiya T. (2008) - *Anti-methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) compounds isolated from Laurus nobilis*. Biol. Pharm. Bull. **31**(9): 1794-7.
52. Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R. (2016) - *Flavonoids: an overview*. J. Nutr. Sci. **5**:e47.
53. Pang Z., Raudonis R., Glick B.R., Lin T.J., Cheng Z. (2019) - *Atibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies*. Biotechnol. Adv. **37**(1): 177-192.

54. Pazda M., Kumirska J., Stepnowski P., Mulkiewicz E. (2019) - *Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems - A review*. Sci. Total Environ. **697**: 134023.
55. Pânzaru C. (2003) - *Streptococii și enterococii în Buiuc D.T. - Microbiologie medicală. Ghid pentru studiul și practica medicinei*, ediția a VI-a, Editura Gr. T. Popa, UMF, Iași, România, pp.: 161-173.
56. Peterson E., Kaur P. (2018) - *Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria and clinical pathogens*. Front. Microbiol. **9**: 2928.
57. Pistelli L., Giorgi I. (2012) - *Antimicrobial properties of flavonoids* în Patra A. - *Dietary phytochemicals and microbes*, Editura Springer, Dordrecht, pp. 9-70.
58. Plaper A., Golob M., Hafner I., Oblak M., Solmajer T., Jerala R. (2003) - *Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **306**(2): 530-6.
59. Popescu G.A., Șerban R., Niculcea A., Leuștean M., Pistol A. (2022) - *Consumul de antibiotice, rezistența microbiană și infecții asociate asistenței medicale în România - 2020*, Institutul Național de Sănătate Publică, România, pp. 11-17.
60. Präbst K., Engelhardt H., Ringgeler S., Hübner H. (2017) - *Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin*. Methods Mol. Biol. **1601**: 1-17.
61. Romero-Soto I.C., Dia O., Leyva-Soto L.A., Drogui P., Buelna G., Díaz-Tenorio L.M., Ulloa-Mercado R.G., Gortáres-Moroyoqui P. (2018) - *Degradation of chloramphenicol in synthetic and aquaculture wastewater using electrooxidation*. J. Environ. Qual. **47**(4): 805-811.
62. Sandasi M., Leonard C.M., Viljoen A.M. (2010) - *The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. **50**(1): 30-35.
63. Santajit S., Indrawattana N. (2016) - *Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens*. Biomed. Res. Int. **2016**: 2475067.
64. Sarker S.D., Nahar L., Kumarasamy Y. (2007) - *Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals*. Methods **42**(4): 321-324.
65. Sârbu L.G., Bahrin L.G., Babii C., Ștefan M., Bîrsa M.L. (2019) - *Synthetic flavonoids with antimicrobial activity: a review*. J. Appl. Microbiol. **127**: 1282-1290.
66. Shamsudin N.F., Ahmed Q.U., Mahmood S., Ali Shah S.A., Khatib A., Mukhtar S., Alsharif M.A., Parveen H., Zakaria Z.A. (2022) - *Antibacterial effects of flavonoids and*

- their structure-activity relationship study: a comparative interpretation.* Molecules **27**(4): 1149.
67. Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B., Švabić-Vlahović M. (2000) - *A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation.* J. Microbiol. Methods **40**: 175-179.
 68. Tsuchiya H., Iinuma M. (2000) - *Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from Sophora exigua.* Phytomedicine **7**(2): 161-5.
 69. Uddin T.M., Chakraborty A.J., Khusro A., Zidan R.M., Mitra S., Emran T.B., Dhama K., Ripon K.H., Gajdács M., Sahibzada M.U.K., Hossain J., Koirala N. (2021) - *Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects.* J. Infect. Public Health. **14**(12): 1750-1766.
 70. van Hoek A.H.A.M., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A.P., Aarts H.J.M. (2011) - *Acquired antibiotic resistance genes: an overview.* Front. Microbiol. **2**: 203.
 71. Ventola C.L. (2015) - *The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats.* P. T. **40**(4): 277-83.
 72. Wang S.Y., Sun Z.L., Liu T., Gibbons S., Zhang W.J., Qing M. (2013) - *Flavonoids from Sophora moorcroftiana and their synergistic antibacterial effects on MRSA.* Phytother. Res. **28**(7): 1071-6.
 73. World Health Organisation (2024) - *WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance.* Geneva: World Health Organization.
 74. Wu D., Kong Y., Han C., Chen J., Hu L., Jiang H., Shen X. (2008) - *D-Alanine:D-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin.* Int. J. Antimicrob. Agents **32**(5): 421-6.
 75. Xie J.H., Dong C.J., Nie S.P., Li F., Wang Z.J., Shen M.Y., Xie M.Y. (2015) - *Extraction, chemical composition and antioxidant activity of flavonoids from Cyclocarya paliurus (Batal.) Iljinskaja leaves.* Food Chem. **186**: 97-105.
 76. Xu H.X., Lee S.F. (2001) - *Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria.* Phytother. Res. **15**(1): 39-43.
 77. Zoueki C.W., Tufenkji N., Ghoshal S. (2010) - *A modified microbial adhesion to hydrocarbons assay to account for the presence of hydrocarbon droplets.* J. Colloid. Interface Sci. **344**(2): 492-496.