



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00778

(22) Data de depozit: 25/11/2020

(41) Data publicării cererii:  
28/05/2021 BOPI nr. 5/2021

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" DIN  
CLUJ-NAPOCA,  
STR.MIHAIL KOGĂLNICEANU NR.1,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
TEHNOLOGII IZOTOPICE ȘI  
MOLECULARE, STR.DONAT NR.67-103,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:  
• POTARA MONICA,  
STR. POET GR. ALEXANDRESCU, NR.29,  
AP.24,  
CLUJ- NAPOCA, CJ, RO;  
• AȘTILEAN SIMION, CALEA MANĂȘTUR,  
NR.99, AP.39, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• TURCU IOAN, STR.TITU MAIORESCU,  
NR.7, AP.4, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• SZOKE-NAGY TIBERIU,  
STR. IOSIF VULCAN NR.3, AP.1, BISTRIȚA,  
BN, RO;  
• JAKAB ENDRE, STR.ULIULUI, NR.7,  
BL.D, AP.15, BACIU, CJ, RO;  
• JAKAB REKA ILONA, NR.1072D,  
SAT PRAID, COMUNA PRAID, HR, RO

(54) METODĂ RAPIDĂ DE DETECȚIE A BACTERIILOR  
PATOGENE PRIN SPECTROSCOPIE SERS

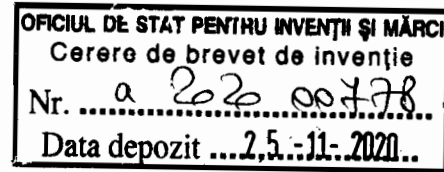
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de detecție a unor bacterii patogene din medii apoase. Metoda, conform invenției, constă în etapele de sinteză a unei suspensii coloidale de nanoparticule coloidale de aur acoperite cu chitosan, concentrarea prin două etape de centrifugare timp de 10 min la 8000 rpm, resuspendare în apă distilată, selectarea și cultivarea agenților patogeni din clasele *S.aureus* și *E.faecalis*, plasarea unui volum de 2 μl de agent patogen suspendat în apă distilată pe o plăcuță de sticlă cu uscare, adăugarea prin picurare a

unui volum de 2 μl de soluție coloidală cu uscarea probei la temperatura camerei, urmată de analiza spectrală și prelucrarea imaginilor, rezultând hărți de distribuție SERS din care este identificat profilul biochimic al agentului patogen, cu o rapiditate de detecție de aproximativ 30 min.

Revendicări: 2  
Figuri: 9





## Descrierea invenției

Invenția cu titlul **Metodă rapidă de detecție a bacteriilor patogene prin spectroscopie SERS** propune o metodă rapidă (~ 30 min) pentru detecția bacteriilor patogene din diferite medii apoase pe baza spectrelor vibraționale măsurate prin spectroscopie Raman amplificată de suprafață (surface enhanced Raman spectroscopy -SERS), utilizând ca substrat SERS activ suspensii coloidale de nanoparticule de aur învelite în chitosan.

Invenția este aplicabilă pentru detecția și identificarea bacteriilor patogene în mediul înconjurător (ex. apă potabilă, apa din lacuri, râuri sau piscine) sau mediul spitalicesc atât din probe lichide, cât și de pe diferite suprafețe.

Contaminarea cu microorganisme patogene (bacterii, virusuri) reprezintă una dintre cele mai proeminente probleme cu care se confruntă omenirea la începutul acestui mileniu. În condițiile în care tot mai multe tipuri de bacterii dezvoltă rezistență la metodele tradiționale de tratament, elaborarea unor metode capabile să detecteze, identifice și monitorizeze rapid contaminanții microbieni, a devenit un obiectiv extrem de important în contextul sănătății publice (*N. J. Ashbolt, Curr Envir Health Rpt (2015) 2, 95–106*). Metodele tradiționale de detecție (ELISA, PCR etc.) sunt complicate, consumatoare de timp și presupun costuri ridicate (*S. Umesha, H. M. Manukumar, Crit Rev Food Sci Nutr (2018) 58, 84-104*). Spectroscopia Raman amplificată de suprafață (SERS) este potrivită pentru dezvoltarea unor strategii de detecție eficiente, cu timp rapid de răspuns, cost redus de fabricare și portabilitate ridicată, fiind astfel o alternativă avantajoasă la metodele clasice de detecție (*Y. Liu, H. Zhou, Z. Hu, G. Yu, D. Yang, J. Zhao, Biosens Bioelectron (2017) 94, 131-140*). Totuși, implementarea cu succes a acestei metode pentru detecția microorganismelor patogene este condiționată în mod critic de utilizarea unui substrat SERS robust, stabil și reproductibil. Efectul SERS are la bază un mecanism de natură electromagnetică care conduce la amplificarea spectrului vibrațional al unei molecule care se găsește în contact cu o suprafață metalică nanostructurată în anumite configurații sau „puncte fierbinți” (hot-spoturi). Substratele SERS pe suport solid permit un control ridicat al distribuției de puncte fierbinți necesare pentru amplificarea semnalului Raman și prezintă avantajul reproductibilității în preparare. Totuși, de multe ori prepararea acestor tipuri de substrate presupune costuri ridicate și procedee complicate. Mai mult, aceste tipuri de substrate sunt în general adaptate pentru probe lichide. Suspensiile coloidale de nanoparticule de metal nobil prezintă o serie de avantaje pentru astfel de aplicații, cele mai importante fiind

flexibilitate în implementare pentru diferite tipuri de probe (lichide, suprafețe), cost redus și reproductibilitate în preparare, stabilitate în timp (P. A. Mosier-Boss, *Biosensors* (2017) 7, 51). S-a demonstrat ca biopolimerul chitosan prezintă o afinitate ridicată față de un spectru larg de bacterii, având capacitatea de a se atașa de membrana acestora datorită interacțiunilor electrostatice dintre grupările amino pozitive din lanțul polimeric și suprafața predominant negativă a membranei bacteriene. Această proprietate a fost exploatată cu succes pentru detecția colorimetrică a bacteriilor utilizând nanoparticule magnetice învelite în chitosan (T. N. Le, T. D. Tran, M. Il Kim, *Nanomaterials* (2020) 10, 92).

**Noutatea invenției** constă în utilizarea nanoparticulelor coloidale de aur învelite în chitosan în combinație cu spectroscopia și imagistica SERS pentru captarea agentului patogen din diferite medii, identificarea acestuia prin semnătura Raman specifică și “vizualizarea” distribuției acestuia pe suprafața contaminată prin reprezentarea hărților SERS.

Metoda de detecție conform patentului de față presupune realizarea următorilor pași:

- (1) colectarea unei probe (de ordinul microlitrilor) din mediul apos conținând agentul patogen
- (2) depunerea probei pe substratul activ SERS
- (3) achiziția spectrelor SERS atât local, cât și prin scanarea substratului SERS
- (4) identificarea profilului spectral al agentului patogen prin analiza spectrelor SERS
- (5) realizarea hărților de distribuție a agentului patogen pe suprafață

**Avantajele** metodei de detecție a bacteriilor patogene conform patentului de față, sunt următoarele:

- (1) **Flexibilitate in implementare:** metoda este funcțională și aplicabilă în mai multe variante de lucru: (i) picurarea pe substrat de sticlă a agentului patogen (2  $\mu$ l), uscarea la temperatura camerei, urmată de picurarea soluției coloidale (2  $\mu$ l) peste picătura uscată de agent patogen și apoi uscarea la temperatura camerei; (ii) incubarea agentului patogen în suspensia coloidală de nanoparticule de aur învelite în chitosan (2  $\mu$ l), urmată de picurarea amestecului pe substrat de sticlă (2  $\mu$ l), urmată de uscarea la temperatura camerei; (iii) picurarea pe substrat de sticlă a soluției coloidale de nanoparticule de aur învelite în chitosan (2  $\mu$ l), uscarea la temperatura camerei, urmată de picurarea agentului patogen (2  $\mu$ l) peste picătura uscată de nanoparticule de aur și apoi uscarea la temperatura camerei
- (2) **Rapiditate in detecție** (~ 30 min)
- (3) **Necesită volume mici de probă** (~ 2  $\mu$ l)

**(4) Cost redus de fabricare a substratului SERS**

**(5) Reproducibilitate și stabilitate**

Primul pas constă în sintetizarea și caracterizarea nanoparticulelor coloidale de aur învelite în chitosan. Protocolul de sinteză a suspensiei coloidale de nanoparticule de aur învelite în chitosan constă în încălzirea la temperatura de 80 °C sub agitare magnetică a unui amestec de soluție apoasă de chitosan de masă moleculară mare (de concentrație 2 mg/ml, dizolvat în 1% acid acetic) și clorură aurică ( $\text{HAuCl}_4$  de concentrație  $10^{-3}$  M). Formarea nanoparticulelor de aur este evidențiată vizual prin modificarea în timp a culorii amestecului de la incolor la roz și apoi roșu. După finalizarea reacției de sinteză suspensia coloidală se răcește la temperatura camerei. Soluția coloidală se păstrează în frigider, fiind stabilă pe durată îndelungată (cel puțin un an). În vederea măsurătorilor SERS este necesară îndepărtarea excesului de chitosan și concentrarea suspensiei coloidale prin două etape de centrifugare timp de 10 min la 8000 rpm fiecare și resuspendare în apă bidistilată. Proprietățile optice ale nanoparticulelor sintetizate au fost investigate prin măsurători spectroscopice de extincție UV-vis. Spectrele de extincție UV-vis ale suspensiei coloidale au fost înregistrate cu spectrofotometrul Jasco V-670 Uv-Vis-NIR cu rezoluția spectrală de 1 nm. Pentru măsurători s-au utilizat cuve de cuarț cu drumul optic de 2 mm. Suspensia coloidală obținută prezintă o singură bandă plasmonică localizată la 521 nm (Figura 1A) caracteristică nanoparticulelor de aur de formă sferică (*K.P. Jain, I.H. El-Sayed, L.K. Seok, M.A. El-Sayed, J Phys Chem B (2006) 110, 7238–7248*). Distribuția de potențial zeta a fost înregistrată la 25 °C cu echipamentul Malvern Zetasizer Nano ZS-90, obținându-se o valoare a potențialului zeta de + 49 mV (Figura 2B).

În următorul pas au fost selectați și cultivați agenții patogeni. Am optat pentru două clase de bacterii patogene foarte răspândite în mediul spitalicesc, și anume stafilococul auriu (*Staphylococcus aureus* - *S. aureus*) și enterococul fecal (*Enterococcus faecalis* - *E. faecalis*). Pentru obținerea preculturilor bacteriene, alicote conținând tulpinile bacteriene *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Enterococcus faecalis* depozitate la -80°C au fost dezghețate parțial pe gheață la temperatura camerei. După dezghețarea parțială a probelor, 1  $\mu\text{L}$  suspensie bacteriană a fost transferat folosind o spatulă sterilă într-un nou tub conținând 5 mL mediu lichid LB (Luria Broth), autoclavat în prealabil. După inoculare, probele au fost incubate peste noapte la 37°C. În vederea obținerii culturilor bacteriene pure, 10  $\mu\text{L}$  din cultura bacteriană crescută peste noapte au fost transferați peste 990  $\mu\text{L}$  tampon salin ( $\text{NaCl}$  0,9%) sterilizat în prealabil prin autoclavare. În acest fel s-a obținut diluția de  $10^{-2}$  (diluarea probei inițiale de 100 de ori).

Ulterior din proba rezultată s-au transferat alți 100  $\mu\text{L}$  peste 900  $\mu\text{L}$  tampon salin, procedeul repetându-se până la obținerea diluțiilor de  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  și  $10^{-7}$ . Ulterior 500  $\mu\text{L}$  din diluțiile  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  and  $10^{-7}$  au fost transferați imediat pe mediu solid LB cu agar. După etalarea probei pe mediu de cultură, proba a fost incubată 15 minute la temperatura camerei iar după aceea plăcile Petri au fost incubate la  $37^{\circ}\text{C}$  peste noapte (cel puțin 20 de ore). În vederea măsurătorilor SERS, coloniile bacteriene de pe plăcile Petri incubate peste noapte au fost selectate cu ansa, și resuspendate după caz în mediu lichid LB sau apă distilată, sterilizate în prealabil prin autoclavare. Coloniile bacteriene au fost resuspendate în mediul dorit până la o densitate optică echivalentă cu standardul 2 McFarland. Standardul de 2 McFarland este echivalentul unei concentrații bacteriene având o densitate relativă a celulelor de  $6 \times 10^8$  CFU (Unități formatoare de colonii)  $\times \text{mL}^{-1}$ . După obținerea densității dorite, probele au fost transferate în tuburi Eppendorf de 1,5 mL și păstrate la  $4^{\circ}\text{C}$  pentru analizele ulterioare.

Pasul următor a constat în picurarea pe plăcuțe de sticlă a unui volum mic (2  $\mu\text{l}$ ) de agent patogen (*S. aureus* sau *E. faecalis*) suspendat în apă distilată și uscarea la temperatura camerei. Peste picătura uscată de agent patogen a fost apoi picurată o soluție coloidală de nanoparticule sferice de aur învelite în chitosan (2  $\mu\text{l}$ ) urmată de uscarea la temperatura camerei. Măsurătorile SERS au fost realizate cu Microscopul Raman Confocal Alpha300R Witec GmbH, Ulm, Germania. Probele au fost excitate cu linia 633 nm emisă de un laser He-Ne, lumina fiind focalizată pe suprafața picăturii uscate printr-un obiectiv cu mărirea 100 X și apertura numerică  $\text{NA} = 0.9$ . Puterea laser la ieșirea din obiectiv a fost 4.5 mW. Lumina împrăștiată Raman a fost colectată printr-o fibră optică de 100  $\mu\text{m}$  diametru și transmisă spre analiză la un spectrometru echipat cu o cameră CDD (1024 X 128 pixeli, DV<sub>401</sub>-BV, Andor) care operează la  $-60^{\circ}\text{C}$ . Imaginile microscopice ale picăturilor uscate au fost capturate cu o cameră video color a aceluiași microscop, folosind pentru iluminare o sursă LED cu lumină albă. Pentru analiza spectrală și prelucrarea imaginilor a fost utilizat software-ul Witec Project Four Plus. Inițial au fost colectate spectre SERS din diferite spoturi de pe suprafața picăturilor uscate. Spectrele au fost înregistrate cu un timp de integrare de 10 s/spectru. Ulterior s-au selectat mai multe arii (20  $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ ) de pe suprafața picăturii uscate care au fost „scanate” spectroscopic prin colectarea spectrelor SERS spot cu spot (40 puncte  $\times$  40 linii) cu timpul de integrare de 0.5 s/spectru. Precizăm că în aceste condiții o scanare durează 15 min. Prin reprezentarea variației intensității unei benzi Raman specifice agentului patogen pe suprafața scanată, am obținut așa numitele hărți SERS prin care am vizualizat indirect prezența și distribuția bacteriilor pe suprafața de sticlă. Practic se realizează un contrast între zonele fără bacterii (zonele întunecate) și respectiv zonele cu bacterii (zonele luminoase). Prin analiza

spectrelor SERS am identificat profilul biochimic al agentului patogen. Pentru control am utilizat o picătură uscată de soluție coloidală de nanoparticule de aur învelite în chitosan (fără a fi adusă în contact cu agentul patogen) preparată și scanată în condiții similare cu cele descrise mai sus.

În Figura 2A este prezentată imaginea microscopică a unei picături uscate de nanoparticule de aur învelite în chitosan depusă peste picătura uscată de *S. aureus*. Spectrele SERS colectate din diferite spoturi de pe suprafața picăturii prezentate în Figura 3B facilitează identificarea agentului patogen *S. aureus*. Interpretarea benzilor SERS caracteristice *S. aureus* a fost făcută în acord cu datele din literatură (*X. Chen, M. Tang, Y. Liu, J. Huang, Z. Liu, H. Tian, Y. Zheng, M. Lamy de la Chapelle, Y. Zhang, W. Fu, Microchimica Acta (2019) 186, 102*). Harta SERS în Figura 3C realizată prin reprezentarea variației intensității benzii de la  $734\text{ cm}^{-1}$  pe suprafața scanată facilitează vizualizarea distribuției agentului patogen *S. aureus* pe suprafața de sticlă. Imaginea combinată prezentată în Figura 2D realizată prin suprapunerea hărții SERS din Figura C peste imaginea microscopică din Figura A permite vizualizarea zonei scanate de pe suprafața picăturii uscate. În Figura 3E este prezentat spectrul SERS mediu corespunzător hărții SERS (a) și, respectiv, spectre SERS extrase din diferite spoturi luminoase din harta SERS (b, c d). Menționăm că spectrul mediu (spectrul a) este obținut din media tuturor spectrelor înregistrate pe suprafața scanată (atât din zonele luminoase, cât și din zonele întunecate, fără semnal SERS) ceea ce face ca intensitatea semnalului să fie mai mică în comparație cu semnalul corespunzător zonelor luminoase (spectrele b, c și d). Pentru o mai bună comparație, spectrul a fost înmulțit cu patru ( $\times 4$ ).

În mod similar am procedat la identificarea și vizualizarea distribuției pe suprafața de sticlă a unui alt agent patogen, *E. faecalis*, rezultatele fiind prezentate în Figura 3.

Metoda de detecție conform patentului de față este aplicabilă pentru detecția și identificarea bacteriilor patogene din diferite medii (apa distilată, apa de la robinet, mediul de cultură a bacteriilor). Detecția și identificarea bacteriilor patogene din apa de la robinet este prezentată în Figura 4 (*S. aureus*) și Figura 5 (*E. faecalis*). Rezultatele privind detecția *S. aureus* din mediul de cultură sunt prezentate în Figura 6. Remarcăm că proteinele prezente în mediul de cultură nu împiedică captarea și detecția agentului patogen.

Unul dintre avantajele invenției de față este flexibilitatea în implementare, metoda de detecție fiind funcțională și aplicabilă în mai multe variante de lucru. Figura 7 prezintă detecția *S. aureus* din mediul de cultură realizată prin picurarea pe substrat de sticlă a soluției coloidale de nanoparticule de aur învelite în chitosan ( $2\ \mu\text{l}$ ), uscarea la temperatura camerei, urmată de picurarea agentului patogen ( $2\ \mu\text{l}$ ) peste picătura uscată de nanoparticule de aur și apoi uscarea

la temperatura camerei. O altă variantă de lucru presupune incubarea agentului patogen în suspensia coloidală de nanoparticule de aur învelite în chitosan (2  $\mu$ l), urmată de picurarea amestecului pe substrat de sticlă (2  $\mu$ l), urmată de uscarea la temperatura camerei. Rezultatele sunt prezentate în Figura 8 pentru detecția *S. aureus* suspendat în apă distilată.

În Figura 9 este prezentată imaginea microscopică a unei picături uscate de suspensie de nanoparticule de aur învelite în chitosan (fără a fi adusă în contact cu agentul patogen) (A), harta SERS obținută prin reprezentarea variației intensității benzii de la  $734\text{ cm}^{-1}$  pe suprafața scanată (B), imaginea combinată realizată prin suprapunerea hărții SERS peste imaginea microscopică (C), spectrul SERS mediu corespunzător hărții SERS (a) și spectre SERS extrase din diferite spoturi luminoase din harta SERS (b, c d) (D). Remarcăm că proba control (fără a fi adusă în contact cu agentul patogen) nu prezintă semnal SERS caracteristic care să se suprapună peste profilul spectral al agenților patogeni.

## Desene

**Figura 1.** Spectrul de extincție UV-vis (A) și potențialul zeta (B) al suspensiei coloidale de nanoparticule de aur învelite în chitosan

**Figura 2.** (A) Imaginea microscopică a substratului rezultat prin uscare după depunerea succesivă a două picături, prima conținând *S. aureus* suspendat în apă distilată, iar a doua suspensia coloidală; (B) Spectre SERS colectate din diferite spoturi de pe suprafața picăturii uscate; (C) Harta SERS obținută prin reprezentarea variației intensității benzii de la  $734\text{ cm}^{-1}$  pe suprafața scanată; (D) Imagine combinată realizată prin suprapunerea hărții SERS din figura C peste imaginea microscopică din figura A; (E) Spectrul SERS mediu corespunzător hărții SERS (a) și spectre SERS extrase din diferite spoturi luminoase din harta SERS (b, c d).

**Figura 3.** (A) Imaginea microscopică a substratului rezultat prin uscare după depunerea succesivă a două picături, prima conținând *E. faecalis* suspendat în apă distilată, iar a doua suspensia coloidală; (B) Spectre SERS colectate din diferite spoturi de pe suprafața picăturii uscate; (C) Harta SERS obținută prin reprezentarea variației intensității benzii de la  $734\text{ cm}^{-1}$  pe suprafața scanată; (D) Imagine combinată realizată prin suprapunerea hărții SERS din figura C peste imaginea microscopică din figura A; (E) Spectrul SERS mediu corespunzător hărții SERS (a) și spectre SERS extrase din diferite spoturi luminoase din harta SERS (b, c d).

**Figura 4.** (A) Imaginea microscopică a substratului rezultat prin uscare după depunerea succesivă a două picături, prima conținând *S. aureus* suspendat în apă de la robinet, iar a doua suspensia coloidală; (B) Harta SERS obținută prin reprezentarea variației intensității benzii de la  $734\text{ cm}^{-1}$  pe suprafața scanată; (C) Imagine combinată realizată prin suprapunerea hărții SERS din figura B peste imaginea microscopică din figura A; (D) Spectrul SERS mediu corespunzător hărții SERS (a) și spectre SERS extrase din diferite spoturi luminoase din harta SERS (b, c d).



**Figura 5.** (A) Imaginea microscopică a substratului rezultat prin uscare după depunerea succesivă a două picături, prima conținând *E. faecalis* suspendat în apă de la robinet, iar a doua suspensia coloidală; (B) Harta SERS obținută prin reprezentarea variației intensității benzii de la  $734\text{ cm}^{-1}$  pe suprafața scanată; (C) Imagine combinată realizată prin suprapunerea hărții SERS din figura B peste imaginea microscopică din figura A; (D) Spectrul SERS mediu corespunzător hărții SERS (a) și spectre SERS extrase din diferite spoturi luminoase din harta SERS (b, c d).

**Figura 6.** (A) Imaginea microscopică a substratului rezultat prin uscare după depunerea succesivă a două picături, prima conținând *S. aureus* suspendat în mediu de cultură, iar a doua suspensia coloidală; (B) Harta SERS obținută prin reprezentarea variației intensității benzii de la  $734\text{ cm}^{-1}$  pe suprafața scanată; (C) Imagine combinată realizată prin suprapunerea hărții SERS din figura B peste imaginea microscopică din figura A; (D) Spectrul SERS mediu corespunzător hărții SERS (a) și spectre SERS extrase din diferite spoturi luminoase din harta SERS (b, c d).

**Figura 7.** (A) Imaginea microscopică a substratului rezultat prin uscare după depunerea succesivă a două picături, prima conținând suspensia coloidală, iar a doua *S. aureus* suspendat în apă distilată; (B) Harta SERS obținută prin reprezentarea variației intensității benzii de la  $734\text{ cm}^{-1}$  pe suprafața scanată; (C) Imagine combinată realizată prin suprapunerea hărții SERS din figura B peste imaginea microscopică din figura A; (D) Spectrul SERS mediu corespunzător hărții SERS (a) și spectre SERS extrase din diferite spoturi luminoase din harta SERS (b, c d).

**Figura 8.** (A) Imaginea microscopică a substratului rezultat prin uscarea unei picături de suspensie coloidală incubată în prealabil cu *S. aureus* suspendat în apă distilată; (B) Harta SERS obținută prin reprezentarea variației intensității benzii de la  $734\text{ cm}^{-1}$  pe suprafața scanată; (C) Imagine combinată realizată prin suprapunerea hărții SERS din figura B peste imaginea microscopică din figura A; (D) Spectrul SERS mediu corespunzător hărții SERS (a) și spectre SERS extrase din diferite spoturi luminoase din harta SERS (b, c d).

**Figura 9.** (A) Imaginea microscopică a unei picături uscate de suspensie de nanoparticule de aur învelite în chitosan (fără a fi adusă în contact cu agentul patogen); (B) Harta SERS obținută prin reprezentarea variației intensității benzii de la  $734\text{ cm}^{-1}$  pe suprafața scanată; (C) Imagine

combinată realizată prin suprapunerea hărții SERS din figura B peste imaginea microscopică din figura A; (D) Spectrul SERS mediu corespunzător hărții SERS (a) și spectre SERS extrase din diferite spoturi luminoase din harta SERS (b, c d).

## Revendicări

1. Metodă de detecție spectroscopică a stafilococului auriu (*Staphylococcus aureus* - *S. aureus*) din diferite medii apoase utilizând ca substrat activ SERS nanoparticule coloidale de aur învelite în chitosan. Metoda constă în următoarele etape:

- (1) colectarea unei probe (de ordinul microlitrilor) din mediul apos conținând *S. aureus*
- (2) depunerea probei pe substratul activ SERS
- (3) achiziția spectrelor SERS atât local, cât și prin scanarea substratului SERS
- (4) identificarea profilului spectral al *S. aureus* prin analiza spectrelor SERS
- (5) realizarea hărților de distribuție a *S. aureus* pe suprafață

2. Metodă de detecție spectroscopică a enterococului fecal (*Enterococcus faecalis* - *E. faecalis*) din diferite medii apoase utilizând ca substrat activ SERS nanoparticule coloidale de aur învelite în chitosan. Metoda constă în următoarele etape:

- (1) colectarea unei probe (de ordinul microlitrilor) din mediul apos conținând *E. faecalis*
- (2) depunerea probei pe substratul activ SERS
- (3) achiziția spectrelor SERS atât local, cât și prin scanarea substratului SERS
- (4) identificarea profilului spectral al *E. faecalis* prin analiza spectrelor SERS
- (5) realizarea hărților de distribuție a *E. faecalis* pe suprafață

combinată realizată prin suprapunerea hărții SERS din figura B peste imaginea microscopică din figura A; (D) Spectrul SERS mediu corespunzător hărții SERS (a) și spectre SERS extrase din diferite spoturi luminoase din harta SERS (b, c d).

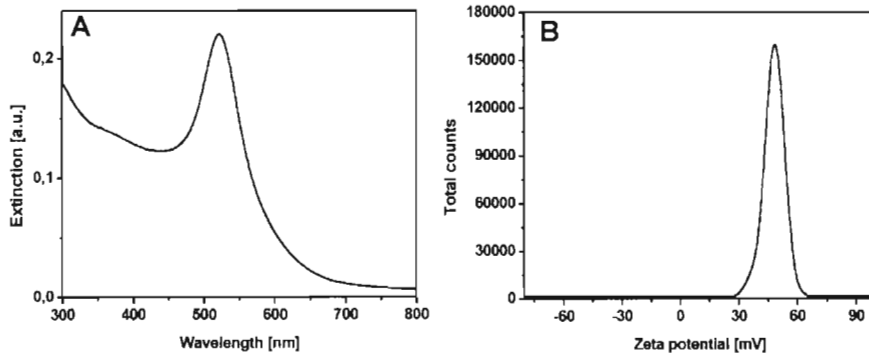


Figura 1

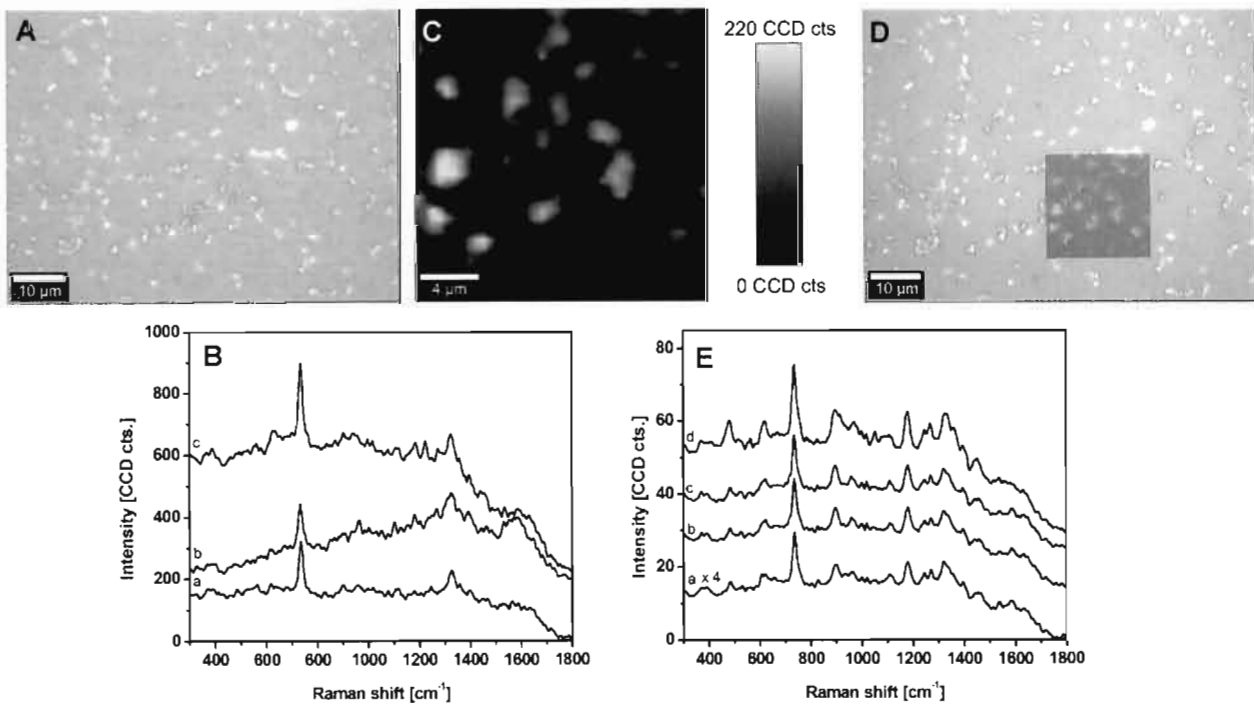


Figura 2

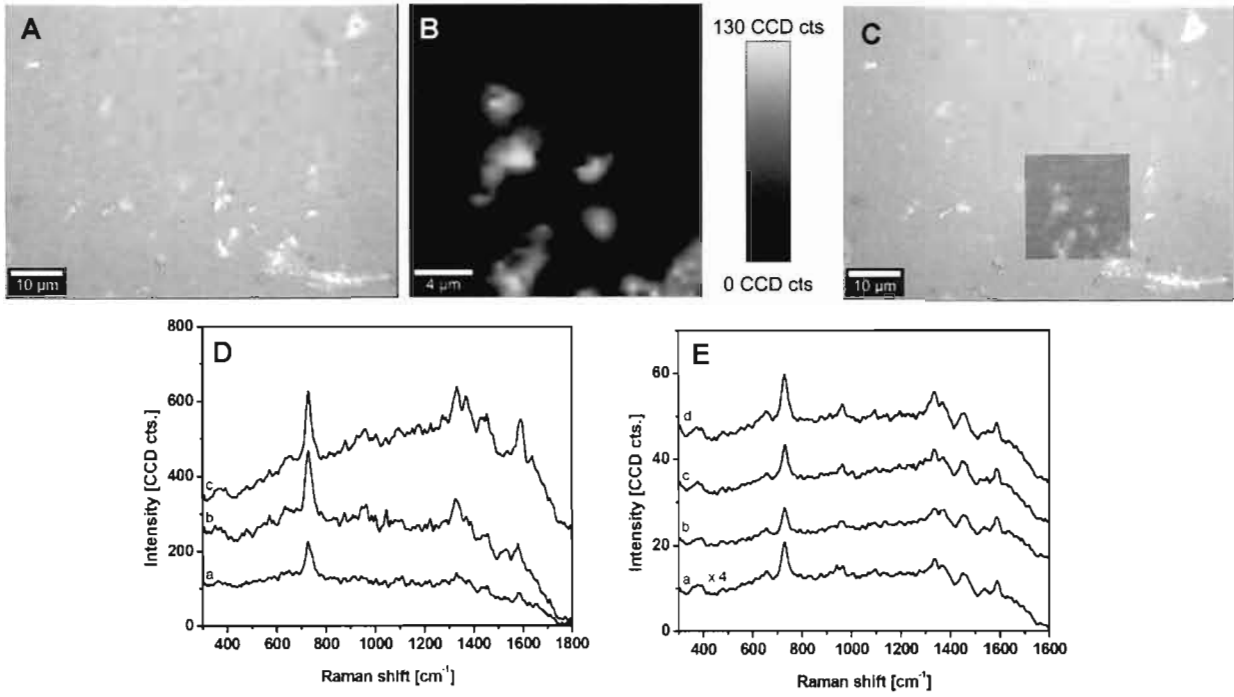


Figure 3

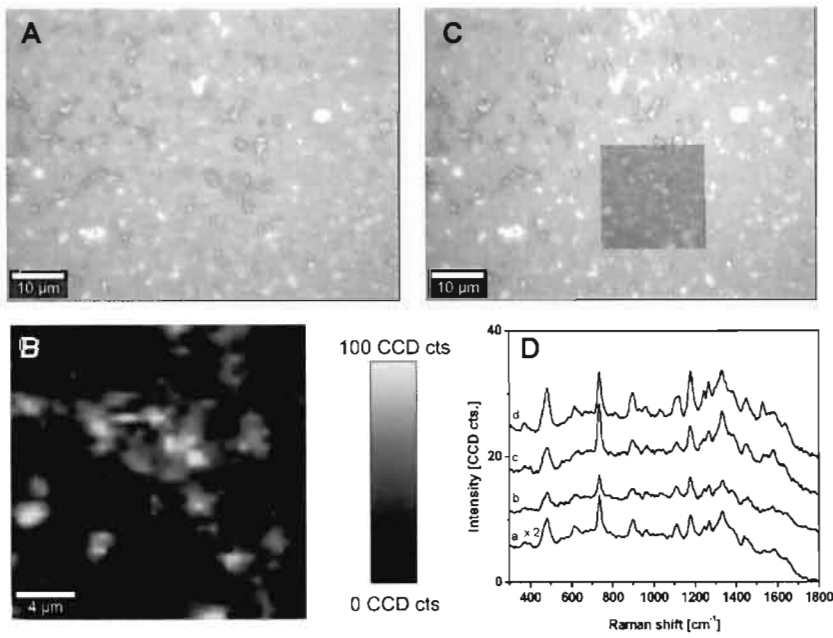


Figure 4

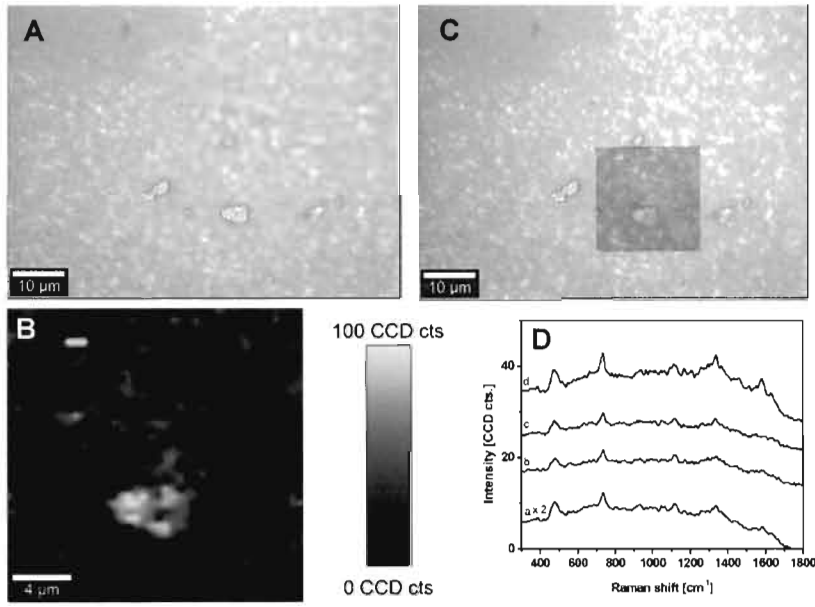


Figura 5

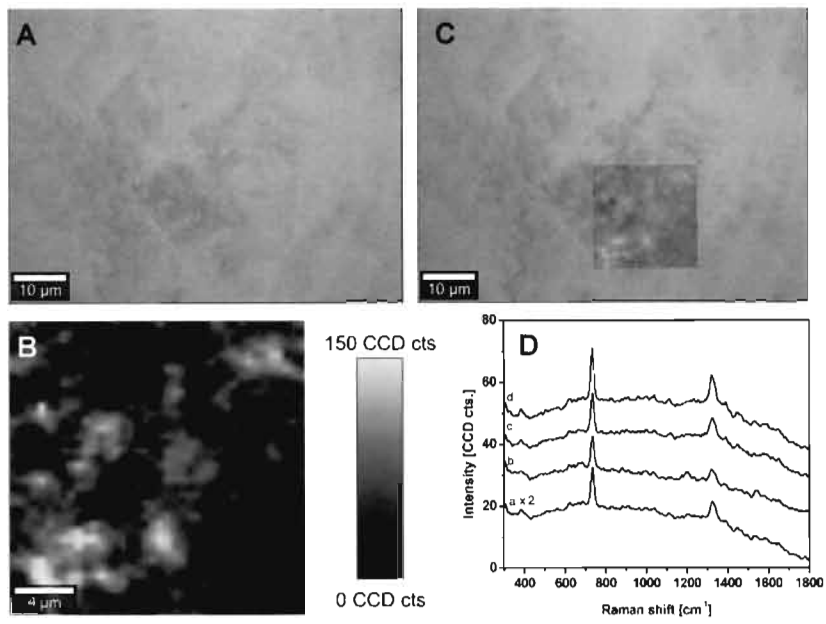


Figura 6

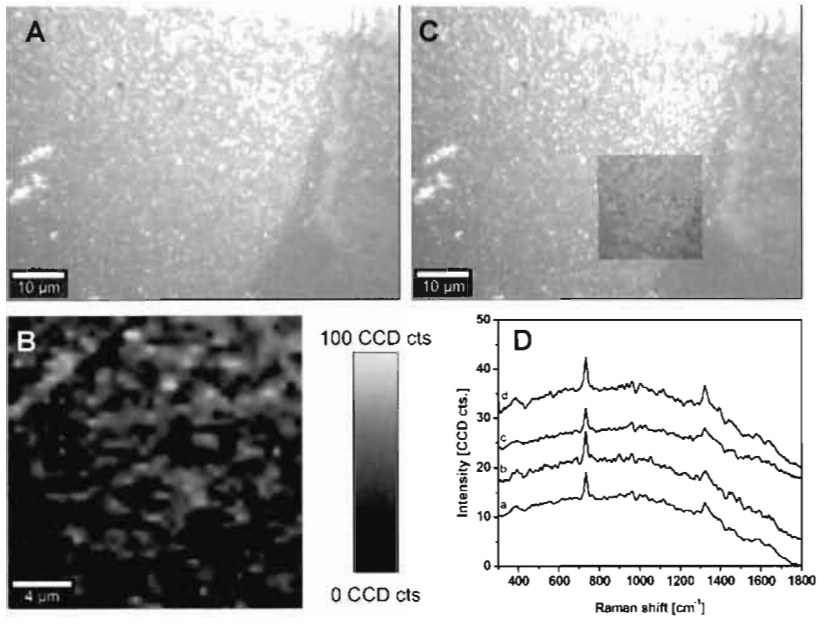


Figura 7

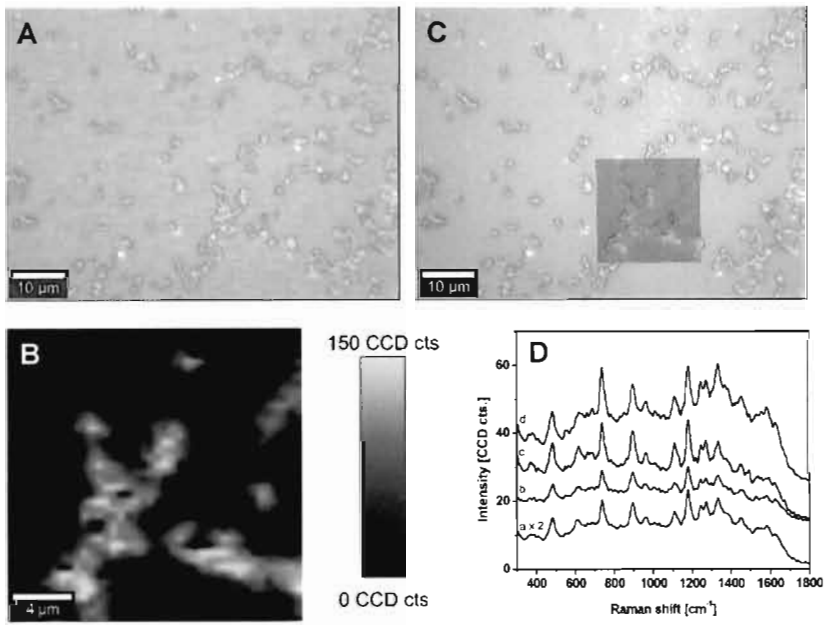


Figura 8

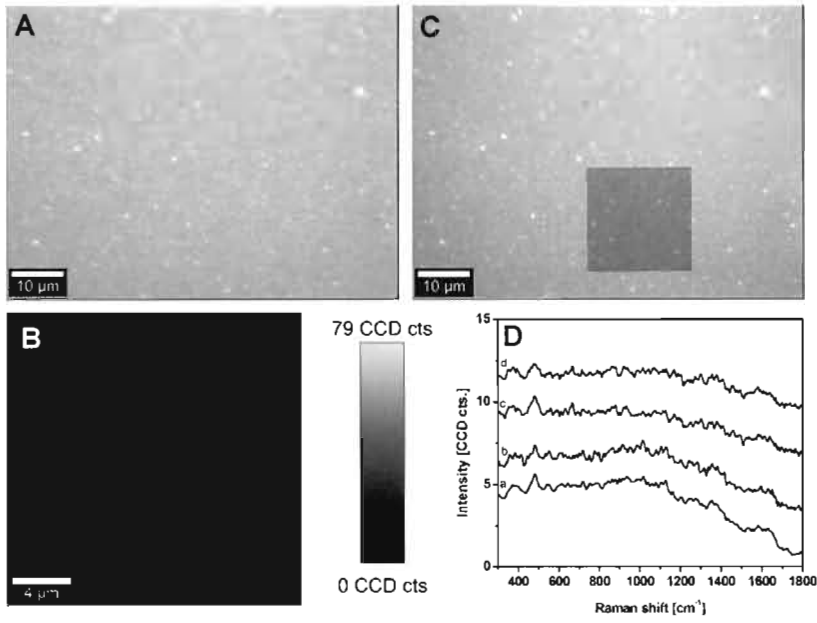


Figure 9