



MINISTERUL EDUCAȚIEI
UNIVERSITATEA PETROL-GAZE DIN PLOIEȘTI

B-dul. București nr. 39, 100680, Ploiești, România, www.upg-ploiesti.ro

Telefon +40 244 573 171

Fax +40 244 575 847



INSTITUȚIA ORGANIZATOARE DE STUDII UNIVERSITARE DE DOCTORAT
UNIVERSITATEA PETROL-GAZE DIN PLOIEȘTI
DOMENIUL FUNDAMENTAL – ȘTIINȚE INGINEREȘTI
DOMENIUL DE DOCTORAT – INGINERIE CHIMICA

TEZĂ DE DOCTORAT REZUMAT

Autor: ing. GHEORGHE VIOREL

Conducător științific: Prof.univ. dr. ing. VASILE MATEI

Ploiești 2024



INSTITUȚIA ORGANIZATOARE DE STUDII UNIVERSITARE DE DOCTORAT

UNIVERSITATEA PETROL-GAZE DIN PLOIEȘTI

DOMENIUL FUNDAMENTAL – ȘTIINȚE INGINEREȘTI

DOMENIUL DE DOCTORAT – INGINERIE CHIMICA

TEZĂ DE DOCTORAT REZUMAT

**Cercetari privind toxicitatea si ecotoxicitatea o-clor
benziliden malononitrilului, component al arsenalului
CBRN**

**Research on the toxicity and ecotoxicity of o-chloro
benzylidene maloninitrile, a component of the CBRN arsenal**

Autor: ing. GHEORGHE VIOREL

Conducător științific: Prof.univ. dr. ing. VASILE MATEI

Nr. Decizie 576 din 23.07.2024

Comisia de doctorat:

Președinte	Șef lucr. univ. dr. ing. Cristina Maria Dușescu-Vasile	de la	Universitatea Petrol-Gaze din Ploiești
Conducător științific	Prof. univ. dr. ing. Vasile Matei	de la	Universitatea Petrol-Gaze din Ploiești
Referent oficial	Prof. univ dr. ing. Dorin Bomboș	de la	Universitatea Petrol-Gaze din Ploiești
Referent oficial	Prof. univ dr. ing. Tiberiu- Dinu Danciu	de la	Universitatea Națională de Știință și Tehnologie POLITEHNICA din București
Referent oficial	Conf. univ dr. ing. Ionuț Banu	de la	Universitatea Națională de Știință și Tehnologie POLITEHNICA din București

Ploiești 2024

Cuprins

INTRODUCERE.....	14
CAPITOLUL 1.....	20
ARME CHIMICE ȘI AGENȚI REPREZENTATIVI AI ARSENALULUI CHIMIC DIN CADRUL CBRN	20
CAPITOLUL 2.....	29
METABOLISMUL MICROBIAN ȘI CATALIZA ENZIMATICĂ	29
2.1. Mecanismul de acțiune biochimică al compușilor toxici din cadrul CBRN	31
CAPITOLUL 3.....	33
AGENȚI CHIMICI REPREZENTATIVI AI ARSENALULUI CHIMIC DIN CADRUL CBRN	33
3.1. Toxicitatea compușilor organofosforici	33
3.2. Mecanismul de acțiune al agenților de sufocare și al agenților sangvini	34
3.3. Mecanismul de acțiune al agenților neurotoxici	35
3.4. Mecanismul de acțiune al substanțelor toxice de luptă neuromusculare	36
3.5. Toxicitatea substanțelor vezicante	37
3.6. Toxicitatea substanțelor de luptă iritante utilizate pentru controlul maselor	37
3.6.1. Toxicologia gazului CS	40
3.6.2. Toxicitatea o-clorbenziliden malononitrilului, remanența și metode de decontaminare.....	42
3.6.3. Evaluarea potențialului toxic a o-clorbenziliden malononitrilului și a metaboliților săi	45
3.6.4. Proprietăți chimice ale o- clor benziliden malononitrilului	46
3.6.5. Procedee de sinteză al gazului CS	48
3.6.6. Studii de toxicitate ale o-clor benziliden malononitrilului	48
CAPITOLUL 4.....	51
SINTETIZAREA ÎN LABORATOR A O-CLOR BENZILIDEN MALONONITRILULUI (CBM).....	51
4.1. Aspecte teoretice.....	51
4.2 Etapele procesului de sinteză ale o-clorbenzilidenului malononitrilului (CBM). Materii prime și instalația de laborator.	51
4.2.1. Reactivi și materiale necesare	52

4.2.2. Prezentarea instalației pentru sinteza o-clorobenziliden malononitrilului	53
4.2.3. Modul de lucru la sinteza o-clorobenziliden malononitrilului	53
4.2.4. Realizarea sintezei o-clorobenziliden malononitrilului.....	53
4.3. Elaborarea metodei de caracterizare a reactanților și a produsului de reacție	54
4.3.1. Descrierea programului experimental, trasarea curbei de calibrare, aparatura și parametri de operare	54
4.4. Rezultate și discuții.....	55
4.4.1. Trasarea curbelor de calibrare	55
4.4.2. Prezentarea rezultatelor	58
4.5. Concluzii.....	67
4.6. Cercetări experimentale cu privire la hidroliza CBM. Identificarea CBM și a produșilor de hidroliză (metaboliți).....	67
4.6.1. Aspecte teoretice	67
4.6.2. Descrierea procedurii experimentale.....	68
4.6.3. Experiment 1–Determinarea gradului de hidroliză a CBM solubilizat în clorura de metilen.....	68
4.6.3.1. Reactivi, mod de lucru	68
4.6.3.3. Concluzii	74
4.6.4. Experiment 2. Determinarea gradului de hidroliză a CBM în apă.	74
4.6.4.1. Reactivi, mod de lucru	74
4.6.4.2. Prezentarea rezultatelor experimentale	75
4.6.4.3. Concluzii	77
4.6.5. Experiment 3. Determinarea gradului de hidroliză a CBM în apă prin teste în flacoane separate	77
4.6.5.1. Reactivi, mod de lucru	77
4.6.5.2. Prezentarea rezultatelor experimentale	77
4.6.5.3. Concluzii:.....	83
CAPITOLUL 5.....	85
METODE DE DETERMINARE ALE TOXICITĂȚII CBM	85
5.1. Determinarea toxicității letale acute CL50 a o-clorobenziliden malononitrilului (CBM) asupra peștilor dulcicoli euritemi, <i>Barbus Capoeta Tetrazona</i>	85
5.1.1. Aspecte teoretice:.....	85
5.1.2. Descrierea programului experimental.....	86

5.1.3.Descrierea instalației micropilot și stabilirea condițiilor optime pentru determinarea ecotoxicologiei CBM cu ajutorul organismelor test	87
5.1.5. Concluzii	93
5.2. Studiu preliminar privind ecotoxicitatea CBM	94
5.2.1. Evaluarea pH-ului optim pentru biodegradarea compușilor cu nucleu aromatic în prezența ciliatului <i>Paramecium sp</i>	94
5.2.2. Descrierea programului experimental:.....	94
5.2.2.1. Pregătirea bioreactoarelor și testarea biodegradabilității compusului verde malachit.....	95
5.2.2.2. Stabilirea condițiilor optime pentru pregătirea materialului biologic	96
5.2.2.3. Rezultate experimentale și discuții.....	96
5.2.2.4. Concluzii	98
CAPITOLUL 6.....	100
ECOTOXICITATEA O-CLORBENZILIDEN MALONONITRILULUI (CBM), DETERMINAREA CE50 ȘI EVALUAREA RISCULUI TOXICOLOGIC ASUPRA CULTURILOR BIOLOGICE SCLP	100
6.1. Aspecte teoretice	100
6.2. Descrierea metodei experimentale pentru adaptarea și dezvoltarea mediilor specifice pentru fiecare microorganism	100
6.2.1. Aspecte teoretice	100
6.2.2. Prezentarea programului experimental, metoda de lucru, aparatura, reactivi	102
6.2.3. Rezultate experimentale și discuții	106
6.2.4. Concluzii	122
CAPITOLUL 7.....	123
EVALUAREA GRADULUI DE TOXICITATE A O-CLOR BENZILIDEN MALONONITRILULUI PRIN DETERMINAREA PRODUCȚIEI DE OXIGEN A CELULELOR ALGELOR <i>CHLORELLA PIRENOIDOSA</i>	123
7.1. Aspecte teoretice	123
7.2. Descrierea programului experimental.....	123
7.2.1. Adaptarea culturii algale și promovarea dezvoltării celulare a algei <i>Chlorella pirenoidosa</i> pe mediu selectiv	123
7.2.1.1. Rezultate și discuții.....	125
7.2.2. Evaluarea toxicității CBM asupra mediului acvatic prin determinarea producției de oxigen și estimarea EC50	129

7.2.2.1. Aparatura și mod de lucru.....	129
7.2.2.2. Rezultate și discuții.....	131
7.3. Concluzii:.....	133
CAPITOLUL 8.....	135
EVALUAREA TOXICITĂȚII CELULARE GENERATE DE O-CLOR BENZILIDEN MALONONITRIL PRIN DETERMINAREA PIGMENȚILOR FOTOSINTETICI	135
8.1.Măsurarea conținutului de clorofilă a <i>Chlorella pirenoidosa</i> dezvoltată în stres chimic generat de diferite concentrații de o-clor benziliden malononitril.....	135
8.1.1.Aspecte teoretice	135
8.1.2. Descrierea programului experimental, aparatura de laborator	136
8.1.3. Rezultate și discuții.....	137
8.1.4. Concluzii:.....	143
8.2.Determinarea metaboliților CBM în prezența algei <i>Chlorella pirenoidosa</i>	144
8.2.1. Descrierea programului experimental, reactivi, aparatura de laborator	144
8.2.2. Rezultate experimentale și discuții	145
8.3. Concluzii	147
CAPITOLUL 9.....	148
ANALIZAREA ȘI CARACTERIZAREA MATERIALULUI BIOLOGIC	148
9.1. Spectroscopie în infraroșu cu transformanta Fourieri (ATR-FTIR).....	148
9.1.1.Aspecte teoretice	148
9.1.2. Rezultate experimentale și discuții	149
9.1.3. Concluzii:.....	153
9.2. Analiza structurii de suprafață a celulelor microbiologice prin microscopie electronică cu scanare (SEM), microscopie electronică prin transmisie (TEM) și microscopie optică.....	154
9.2.1. Aspecte teoretice	154
9.2.2. Rezultate privind analiza prin spectroscopie SEM	154
9.2.3. Rezultate privind analiza prin spectroscopie TEM	155
9.2.4. Rezultate privind analiza microscopică prin cuantificare în câmp vizual utilizând camera de numărat Toma.....	157
9.2.5. Concluzii	158
CAPITOLUL 10.....	159
CONCLUZII GENERALE	159

10.1. Contribuții originale.....	161
CAPITOLUL 11.....	163
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE.....	163
CAPITOLUL 12.....	182
LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE.....	182
CAPITOLUL 13.....	183
Propuneri de continuare a cercetărilor.....	183

LISTĂ FIGURI

Fig. 1 Modul de pătrundere al toxicelor în organism.....	23
Fig. 2 Etapele de pătrundere ale toxicelor în organism.....	24
Fig. 3 Tabun (esterul etilic al acidului dimetilamidocianfosforic)	33
Fig. 4 Sarin (GB, $C_4H_{10}FO_2P$)	35
Fig. 5 Fosgen oximă-structura chimică	37
Fig. 6 Structura o-clor benziliden malononitril	51
Fig. 7 Reacția de sinteză a o-clor benziliden malononitril	52
Fig. 8 Instalația de lucru pentru sinteza CBM	53
Fig. 9 Etapele preparării probelor pentru analiza GC/MS.....	56
Fig. 10 Trasarea curbei de calibrare pentru o-clor benziliden malononitril (CBM).....	57
Fig. 11 Trasarea curbei de calibrare pentru o-clorbenzaldehydă 2-CB.....	58
Fig.12. EI cromatograma (a) o-clorobenzaldehida (C1) timp de retenție 6.10 min; (b) o-clorobenzil malononitril (C2) timp de retenție 11.31 min; (c) o-Clor benziliden malononitril (CBM-C3) timp de retenție, 11,93 (d) 2-(3-cloro benziliden) malononitril (C4), timp de retenție 12.82 min, (e) malononitril (C5) timp de retenție 2.52 min.....	62
Fig. 13. Spectrele de masă ale: (a) o-clorbenzaldehydă (C1); (b) o-clorbenzilmalononitril (C2); (c) 2-(3-clorobenziliden) malononitril (C4), (d) malononitril (C5) în comparație cu substanța chimică de referință din baza de date NIST.....	66
Fig. 14 Hidroliza o-clor benziliden malononitril	68
Fig. 15 Cromatogramele totale de ioni pentru extractele organice CSDCM01- CSDCM08 (2000 $\mu\text{g/ml}$ dizolvat complet în solvent) și timpii de retenție pentru fiecare componenta: CBM (a), 2-clorbenzaldehydă (b) malononitril (c).....	72

Fig. 16 Etapele preparării probelor pentru analiza GC/MS (extracția cu apă a CBM-ului solubilizat în DCM).....	73
Fig. 17 Cromatogramele totale de ioni pentru extractele organice HCS T0 - HCS T1440, (o-clorbenziliden malononitril (CBM) Tr 11,85 min)(a), (orto-clorbenzaldehydă Tr 6,10 minute) (b), (malononitril Tr 2,52 min) (c).....	76
Fig. 18 Cromatograma totală de ioni, probele concentrație teoretică 500 µg/ml în apă CHHYT0, CHHYT30, CHHYT60, CHHYT90, interval 2-3 minute, malononitril, timp de retenție 2,50 minute.....	78
Fig. 19 Cromatograma totală de ioni, probele (concentrație teoretică 500 µg/ml în apă) CHHYT0, CHHYT30, CHHYT60, CHHYT90, interval 5,60-6,60 minute, orto-clorbenzaldehydă, timp de retenție 6,10 minute.....	79
Fig. 20 Cromatograma totală de ioni, probele (concentrație teoretică 500 µg/ml în apă) CHHYT0, CHHYT30, CHHYT60, CHHYT90, interval 8,00-16,00 minute, o-clorbenziliden malononitril (CBM), timp de retenție 12,14 minute.....	79
Fig. 21 Spectrul de masă al o-clorbenziliden malononitril (CBM) ($C_{10}H_5ClN_2$, M 188 g/mol, CAS 2698-41-1) din extractul DCM, timp de retenție 11,99 minute, confirmat de spectrul de masă al substanței de referință din baza de date NIST.....	80
Fig. 22 Spectrul de masă al o-clorbenzaldehydei (C_7H_5ClO , M 140 g/mol, CAS 89-98-5) din extractul DCM, timp de retenție 6,09 minute, confirmat de spectrul de masă al substanței de referință din baza de date NIST.....	81
Fig. 23 Spectrul de masă al malononitril-ului ($C_3H_2N_2$, M 66 g/mol, CAS 109-77-3) din extractul DCM, timp de retenție 2,51 minute, confirmat de spectrul de masă al substanței de referință din baza de date NIST.....	82
Fig. 24 Etapele preparării probelor pentru analiza GC/MS,(extracția cu DCM a CBM-ului solubilizat în apă).....	83
Fig. 25 Prezentarea instalației micropilot pentru studiul toxicității CBM asupra peștilor euritemi	89
Fig. 26 Graficul variației greutateii corporale.....	90

Fig 27 Variația greutateii corporale.....	91
Fig. 28 Estimarea concentrației letale medii (CL50).....	93
Fig. 29 Structura colorantului verde malachit	94
Fig. 30 Curba de calibrare a verde malachit	96
Fig. 31 Prezentarea datelor experimentale privind variația pH-ului în intervalul de timp de testare în cele patru bioreactoare	97
Fig. 32 Variația densității optice în perioada de expunere în bioreactoare a colorantului verde malachit	98
Fig. 33 Densitatea optică a culturilor analizate în perioada de adaptare și dezvoltare celulară	110
Fig. 34 Stabilirea fazei de creștere exponențială a culturilor testate la lungimea de undă optimă	111
Fig. 35 Biomasa de celule care rezultă în urma cultivării pe mediu lichid	112
Fig. 36 Graficul variației creșterii densității celulare în mediile analizate <i>Chlorella sp.</i> , <i>Saccharomyces sp.</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Paramecium sp</i>	114
Fig. 37 Rata medie de creștere a fiecărei culturi analizate în funcție de concentrația CBM din mediul de reacție	115
Fig. 38 Rata de inhibiție celulară a fiecărei culturi analizate în funcție de concentrația CBM din mediul de reacție	116
Fig. 39 Rata de creștere celulară	117
Fig. 40 Procentul de inhibiție celulară	118
Fig. 41 Estimarea EC ₅₀	119
Fig. 42 Viabilitatea celulară în prezența diferitelor concentrații de CBM	121
Fig. 43 Randamentul de viabilitate	121
Fig. 44 Evoluția creșterii celulare și a viabilității celulelor algale pe perioada testării. Bara de eroare reprezintă deviația standard, (n=4)	126
Fig. 45 Curba de dezvoltare celulară(μ) a algei <i>Chlorella pirenoidosa</i>	126
Fig. 46 Evoluția pH-ului (A) și a conductivității (B) în perioada de dezvoltare celulară	127
Fig. 47 Variația în timp a DCW.....	128
Fig. 48 Procentul de viabilitate celulară în mediul de expunere la concentrații diferite de CBM.....	128

Fig. 49 Producția de oxigen (D_X) din cultura de alge <i>Chlorella pirenoidosa</i> . Barele de eroare reprezintă abaterea standard (n = 4)	132
Fig. 50 Inhibiția celulară a algei <i>Chlorella pirenoidosa</i> . Barele de eroare reprezintă abaterea standard (n = 4)	133
Fig. 51 Continutul de clorofila "a" (probe incubate).	138
Fig. 52 Randamentul ponderii clorofiliene în prezența CBM, - analiza chlorofilei "a" pentru probele (Ya) incubate /neincubate(A) și analiza chlorofilei "b" pentru probele (Yb)incubate/neincubate	139
Fig. 53 Curba de fluorescență în probele incubate 24 h, lungimea de undă 350 nm (a), 720 nm (b)	140
Fig. 54 Prezentare analiza 3D a fluorescenței probelor A (blank) față de fluorescența probei B (Proba F 150 $\mu\text{g/ml}$), după incubare 24 h	142
Fig. 55 Prezentare analiza 3D grafică a fluorescenței probelor blank față de fluorescența probei F (150 $\mu\text{g/ml}$ CBM), după incubare 24 h.	143
Fig. 56 Cromatogramele totale de ioni în regiunile 5-7 minute cu evidența a 6,10 minute de o-Clorobenzaldehidă în proba de referință, cod de probă S05CBM, lipsa peak-ului 6.10 minute pentru probele PA196EI- PA796EI.....	145
Fig. 57 Regiunea 11-14 minute, apariția peak-ului specific o-clor benziliden malononitril (CBM) în proba de referință cod S05CBM la minutul 11.86... ..	146
Fig. 58 Regiunea 2-3 minute, apariția peak-ului specific pentru malononitril în proba de referință cod S05CBM la minutul 2.52.	146
Fig. 59 Cromatogramele de ioni în regiunea extinsă de 14-19 minute fără relevarea unor substanțe de interes	147
Fig. 60 Caracterizare IR a algei <i>Chlorella pirenoidosa</i>	149
Fig. 61 Caracterizare IR a probei CBM 100 $\mu\text{g/ml}$	150
Fig. 62 Spectrul FTIR al extractului clorofilian(Chl); (A)- <i>Chlorrella sp.</i> incubată 24 h, înainte de extragerea pigmentului clorofilian, (B)- <i>Chlorrella pyrenoidosa</i> martor după analiza clorofilei, extractele	

clorofilene ale suspensiei algale contactată cu CBM: (C) (20 µg/mL), (D) (60 µg/mL), (E) (100 µg/mL), (F) (150 µg/mL)	152
Fig. 63 Variația transmitanței în jurul peak-ului 1045 cm ⁻¹	152
Fig. 64 Spectrul FTIR-diferență dintre proba ---PA10 martor <i>Chlorella</i> și proba ---PA7 (150 µg/ml CBM) după 24h de incubare (a) și diferență dintre cele doua probe incubate (b).....	153
Fig. 65 Analiza suprafeței a algei <i>Chlorella sp.</i> prin microscopie SEM -Structură de suprafață a celulelor algale <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (A)mag 250x,(B)magnitudine 5000x, (C)Cultură algală cu CBM după 24h contact* magnitudine 400X (60 µg/ml), (D 1200X) și detalii de suprafață (E) și (F)	155
Fig. 66 Imagine TEM a <i>Chlorella sp.</i> - detalii structura celulară: (A,B) (CBM, 15 day, 150 µg/ml) (C,D), Blank 15 day, (E,F, G,H), Blank 28 day.....	157
Fig. 67 Puritatea culturii <i>Chlorella pyrenoidosa</i> și prezentare (A),(B) faza de lag a creșterii celulare, aspect de biocoagulare (C),(D)faza de staționare a dezvoltării celulare.....	158

LISTA TABELE

Tabelul 1 Prezentarea toxoforului și a structurii chimice a unor substanțe toxice.....	27
Tabelul 2 Substanțe toxice de luptă iritante.....	39
Tabelul 3 Proprietățile fizice și chimice ale Gazului lacrimogen conform STH	47
Tabelul 4 Prepararea soluțiilor de concentrații exacte o-clor benziliden malononitril (CBM).....	56

Tabelul 5 Prepararea soluțiilor de concentrații exacte o-clorbenzaldehydă (2-CB).....	57
Tabelul 6 Componentele eșantionului CBM de concentrație 150 µg/mL preparată pentru curba de calibrare.....	59
Tabelul 7 Codurile probelor prelevate pentru analiza GC/MS.....	69
Tabelul 8 Ariile cromatografice pentru CBM și cei 2 produși de hidroliză (malononitril și 2- clor benzaldehydă).	69
Tabelul 9 Ariile peak-urilor cromatografice obținute în urma analizelor GC/MS.....	75
Tabelul 10 Ariile peak-urilor cromatografice obținute în urma analizelor GC/MS.....	78
Tabelul 11 Caracteristicile apei din acvariile fără pesti, după declorinare prin barbotare aer.....	89
Tabelul 12 Valorile probit corespunzătoare procentelor de mortalitate.....	91
Tabelul 13 Înregistrarea răspunsurilor letale conform SR13216.....	92
Tabelul 14 Rezultate obținute în urma măsurării densității optice	107
Tabelul 15 Conținutul de clorofilă în probele analizate.....	137

LISTĂ TABELE

Tabelul 1 Prezentarea toxoforului și a structurii chimice a unor substanțe toxice.....	39
Tabelul 2 Substanțe toxice de luptă iritante.....	40
Tabelul 3 Proprietățile fizice și chimice ale Gazului lacrimogen conform STH	47
Tabelul 4 Prepararea soluțiilor de concentrații exacte o-clor benziliden malononitril (CBM).....	56
Tabelul 5 Prepararea soluțiilor de concentrații exacte o-clorbenzaldehydă (2-CB).....	57
Tabelul 6 Componentele eșantionului CBM de concentrație 150 µg/mL preparată pentru curba de calibrare.....	59
Tabelul 7 Codurile probelor prelevate pentru analiza GC/MS.....	69
Tabelul 8 Ariile cromatografice pentru CBM și cei 2 produși de hidroliză (malononitril și 2- clor benzaldehydă).	69
Tabelul 9 Ariile peak-urilor cromatografice obținute în urma analizelor GC/MS.....	75
Tabelul 10 Ariile peak-urilor cromatografice obținute în urma analizelor GC/MS.....	78
Tabelul 11 Caracteristicile apei din acvariile fără pesti, după declorinare prin barbotare aer.....	89
Tabelul 12 Valorile probit corespunzătoare procentelor de mortalitate.....	91
Tabelul 13 Înregistrarea răspunsurilor letale conform SR13216.....	92
Tabelul 14 Rezultate obținute în urma măsurării densității optice	117
Tabelul 15 Conținutul de clorofilă în probele analizate.....	137

INTRODUCERE

Substanțele folosite pentru dotarea armelor chimice prezintă o serie de particularități care afectează mediul înconjurător, având o gamă largă de acțiune prin perturbarea echilibrului ecologic: pot infecta solul sau aerul, pot forma aerosoli prin fum sau ceață toxică. Astfel de substanțe pot avea o durată mare de acțiune, de la minute la săptămâni, motiv pentru care sunt folosite în atacuri militare.

Armele chimice de distrugere în masă sunt încadrate în literatură de specialitate în categoria de armelor de tip CBRN (Chimice, Biologice, Radiologice și Nucleare) și conțin substanțe chimice toxice, inclusiv agenți tradiționali de război chimic, toxine naturale și alte biomolecule, explozivi, propulsori, precursori ai unor astfel de substanțe chimice, microorganisme, etc.

Armele chimice reprezintă o categorie distinctă în cadrul armelor de tip CBRN. Prin definiție, armele chimice sunt sisteme de livrare a unor substanțe chimice periculoase din categoria celor care pot provoca moartea, rănirea gravă sau incapacitarea personalului militar și civil sau poluarea mediului înconjurător.

La sfârșitul secolului al-XIX-lea și începutul secolului XX, dezvoltarea industriei chimice a adus cu sine producerea în masă a numeroase substanțe toxice folosite în industria coloranților și a îngrășămintelor din agricultură și a fost urmată de folosirea în primul război mondial a unor gaze toxice cu efect dăunător asupra ființei umane, unul din primele gaze toxice folosite în primul război mondial fiind gazele lacrimogene [1-3].

Prin *Protocolul de la Geneva* (1925) a fost interzisă utilizarea în război a gazelor asfixiante, otrăvitoare sau a altor gaze precum și a metodelor bacteriologice de război. Interzicerea armelor chimice a fost reiterată prin *Convenția privind Interzicerea Dezvoltării, Producției, Stocării și Folosirii Armelor Chimice și Distrugerea acestora* care a fost adoptată la Geneva în 1993 și a intrat în vigoare în Aprilie 1997, această convenție fiind administrată de *Organizația pentru Interzicerea Armelor Chimice* (OAIC), (*Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons*) (OPCW).

Eforturile acestei Organizații (OAIC – OPCW) în scopul păstrării păcii, democrației și respectării drepturilor omului a fost răsplătită în anul 2013 prin acordarea Premiului Nobel pentru Pace. Un potențial

subiect de controversă îl constituie însă faptul că această convenție interzice folosirea gazelor lacrimogene (Art.1 pct.5) ca metodă de război dar permite folosirea acestor gaze în scop de control al mulțimilor de oameni, a demonstranților care participă la proteste (Art.2, pct.9 lit.d).

Teza de doctorat intitulată „Cercetări privind toxicitatea și ecotoxicitatea o-clor benziliden malononitrilului, component al arsenalului CBRN”, are ca obiectiv principal scopul de a fi un instrument util și la îndemâna tuturor celor interesați în abordarea subiectului privind utilizarea gazelor incapacitante și utilizarea acestor cercetări referitoare la substanța CBM (o-clor benziliden malononitril), în domeniul medical sau de protecție împotriva substanțelor chimice toxice [4].

Experimentele au fost efectuate în laboratoarele din cadrul *UNIVERSITĂȚII DE PETROL ȘI GAZE DIN PLOIEȘTI*: Laboratorul de analize fizico-chimice, Laboratorul de microbiologie, Laboratorul de spectroscopie, Laboratorul de chimie analitică, în cadrul *CENTRULUI DE CERCETARE ȘTIINȚIFICĂ PENTRU APĂRARE CBRN ȘI ECOLOGIE*, în laboratorul din cadrul *Secției de Tehnologii Chimice, Analize, Detecție, Decontaminare și Ecologie* din cadrul *AGENȚIEI DE CERCETARE PENTRU TEHNICĂ ȘI TEHNOLOGII MILITARE din București*.

Cercetările s-au desfășurat prin experimente utilizând unele medii biologice care se găsesc în habitatele din mediul înconjurător și fac parte din biocenoza firească din mediu. Prin testări am urmărit o evaluare a gradului de toxicitate la nivel celular, simulând o contaminare cu o-clor benziliden malononitril, poluant toxic introdus în apă de testare în concentrații stabilite. Aceste studii pot fi considerate ca fiind argumente justificative care să sublinieze efectul toxicologic al o-clor benziliden malononitrilului iar rezultatele obținute ar putea fi luate în considerare în managementul decontaminărilor zonele afectate.

Microorganismele analizate (culturi bacteriene, culturi algale, microorganisme ciliate, drojdii și pești euritemi) sunt indicatori sensibili ai schimbărilor de mediu datorită faptului că pot supraviețui și se pot dezvolta în ecosisteme de ape dulci și marine. Aceste microorganisme pot fi folosite pentru evaluarea riscului de mediu deoarece au capacitatea de a transforma substanțele care conțin elementele esențiale dezvoltării celulare, (azot și fosfor din apele contaminate), în biomasă și bioproduse. După înțelegerea limitelor de toleranță pentru expunerea la CBM în mediul acvatic, toxicitatea acestuia ar putea fi controlată prin suplimentarea florei acvatice cu microorganisme specifice care au rezistență mare la acest

agent toxic. Cunoașterea comportamentului substanțelor chimice în mediu este importantă pentru evaluarea riscurilor pe care substanțele chimice le pot genera în ecosisteme.

Teza este structurată în 13 capitole, are 183 pagini, conține 67 figuri, 15 tabele și 206 trimiteri bibliografice. Structura tezei este următoarea:

În *Capitolul 1* am prezentat agenții reprezentativi ai arsenalului CBRN, reactivitatea acestora și mecanismul de acțiune al armelor chimice de distrugere în masă. În acest capitol se prezintă o serie de substanțe chimice din compoziția armelor chimice, gruparea funcțională (toxofor) și gruparea auxiliară din molecula lor (auxotox), elemente care cauzează caracterul agresiv al armelor precum și mecanismul de acțiune a substanțelor toxice de luptă (STL).

În *Capitolul 2* am prezentat informații privind mecanismul de acțiune biochimică al compușilor toxici din cadrul CBRN asupra organismului uman și nocivitatea acestora, activitatea enzimatică de la nivelul celulei cu rol în desfășurarea proceselor vitale și în metabolismul celular în prezența substanțelor toxice de luptă.

Capitolul 3 prezintă proprietățile fizice și chimice a principalilor agenți chimici din cadrul CBRN: agenții neurotoxici, sangvini, neuroparalitici, a agenților vezicanți și a agenților incapacitanți pentru controlul maselor - agenții iritanți (lacrimogeni). În acest capitol este prezentată toxicologia gazului de luptă CS, istoricul utilizării acestui agent lacrimogen precum și reglementările legislative privind utilizarea componentei chimice (o-clorbenziliden malonitril) a acestui produs, evaluarea potențialului toxic al o-clorbenziliden malonitril și a metaboliților săi, toxicitatea generată de utilizarea acestei substanțe, remanența și metodele de decontaminare.

Pentru a înțelege mecanismul de acțiune al acestui produs s-au prezentat proprietățile chimice și fizice a produsului lacrimogen, reacțiile la care participă substanța vizată precum și procedeul chimic pentru obținerea gazului CS. De asemenea, în acest capitol s-a prezentat un studiu de caz privind toxicitatea gazului CS asupra unui grup de voluntari (militari și civili) care au fost expuși la aerosoli care conțineau o-clorbenziliden malonitril (componenta chimică a gazului CS) într-un tunel cu viteză controlată a vântului. În urma experimentelor s-au stabilit limitele de suportabilitate privind substanța lacrimogenă.

În *Capitolul 4* se prezintă modul de lucru pentru sintetizarea în laborator a o-clor benziliden malonitrilului (CBM), se descrie instalația utilizată și reactivii folosiți pentru obținerea substanței de interes. Confirmarea faptului că au fost obținute componentele chimice dorite, reactanții și produșii de reacție, au fost puși în evidență prin prezentarea și interpretarea rezultatelor experimentale obținute în

urma analizei GC-MC și prin confirmarea rezultatelor obținute cu spectrele de masă a substanțelor de referință din baza de date NIST. În acest capitol au fost efectuate și cercetări privind hidroliza CBM precum și identificarea metaboliților acestei substanțe. Pentru acest lucru s-au făcut determinări care au cuprins cercetări privind hidroliza CBM în clorură de metilen (DCM) și determinarea gradului de dizolvare (hidroliză) în apă.

În *Capitolul 5* sunt prezentate o serie de experimente privind toxicitatea letală acută, CL_{50} . Studiile au fost efectuate pe speciile de pești din Fam. *Cyprinidae*. Prin testele ecotoxicologice, s-a urmărit evoluția unor parametri comportamentali în stresul chimic generat de substanța iritantă.

Prin testele efectuate asupra peștilor s-a urmărit toxicitatea o-clor benziliden malononitrilului, prin expunerea peștilor dulcicoli euritemi, *Barbus Capoeta Tetrazona*, la concentrații diferite de substanță CBM, în condiții de laborator, urmărind modificările fiziologice și/sau anatomopatologice induse de expunerea în mediul acvatic contaminat. Aceste experimente au permis stabilirea intervalului și a limitelor de încredere care au condus la calcularea CL_{50} , pentru a obține informații legate de intervalul de concentrații pe care le pot suporta peștii analizați în perioade diferite de timp prin expuneri în concentrații graduale de CBM.

În a doua parte a testelor de toxicitate s-au studiat influența unei substanțe organice cu structură asemănătoare o-clor benziliden malononitrilului asupra unei culturi de protozoare. În cadrul studiului experimental a fost urmărită evoluția biodegradării colorantului 4-[(4-dimetilaminofenil)-fenil-metil]-N,N-dimetil-anilină), o substanță foarte toxică pentru mediile acvatice. Studiile au fost utile pentru a evalua dacă compușii toxici cu nucleu aromatic pot fi biodegradați folosind mediu biologic specific, utilizând microorganisme care se găsesc în biocenozele naturale, ușor de adaptat în laborator, cum este ciliatul *Paramecium sp.*. Mediul de cultură folosit pentru promovarea creșterii microorganismului ciliat a conținut substanțe pentru reglarea pH-ului și promotori de creștere ai biomasei.

Pentru cuantificarea ciliatului *Paramecium sp.* și pentru determinarea viabilității acestui organism, au fost efectuate teste specifice protozoarelor, cuantificarea făcându-se prin următoarele metode: a) numărare microscopică pe preparare umedă și b) frotiu de colorare gram. Experimentele au pus în evidență evoluția culturii biologice într-un mediu cu pH controlat, în 4 domenii diferite în intervalul de pH 4-12, la temperatura 25-300 C.

În *Capitolul 6* se prezintă o serie de experimente pentru a stabili limita de toxicitate a CBM asupra entităților microbiologice și pentru evaluarea performanțelor microbiologice privind biodegradarea substanței toxice. Experimentările au permis evaluarea caracterului toxicologic a o-clorbenziliden

malonitrilului asupra culturilor de microorganisme: *Saccharomyces sp.*, *Chlorella sp.*, *Lactobacillus sp.* și *Paramecium sp.* Testele au avut ca scop determinarea ratei de creștere, viabilitatea și inhibiția în prezența diferitelor concentrații de interes și capacitatea lor de a răspunde la acest stimul toxic.

Prin determinarea CEB50 s-a analizat concentrația efectivă medie privind efectul toxic generat de o substanță dizolvată în mediul acvatic și s-a putut analiza viabilitatea microorganismelor în contact cu substanța de interes. În urma studiilor efectuate s-a putut stabili influența toxicului CBM asupra entităților biologice inducând astfel concluzii pentru stabilirea potențialului nociv a CBM corelat cu evaluarea capacitii de adaptare și de a răspunde la acest stimul chimic considerat toxic.

Măsurarea inhibiției a fost cuantificată prin reducerea ratei de creștere celulară raportată la culturile martor. Măsurătorile concentrației celulare au fost efectuate folosind metoda numărării celulelor vii prin comparație cu metoda nefelometrică McFarland, utilizând standardele de turbiditate din microbiologie.

Densitatea celulară măsurată în culturile tratate cu concentrații diferite de CBM și culturile martor au fost determinate în același timp, prin teste paralele în care s-au variat concentrațiile substanței de testat și durata testului. Curbele de creștere celulară au fost determinate prin calcularea densității medii a dezvoltării celulare pe parcursul experimentului în prezența concentrațiilor stabilite de CBM.

În *Capitolul 7* s-au efectuat o serie de experimente care pun în evidență pragul de toxicitate și răspunsul algei verde *Chlorella pyrenoidosa* în stresul oxidativ indus de o-clor benziliden malonitril. În acest scop au fost efectuate teste microbiologice pentru a observa evoluția culturii de alge în condiții de stres chimic prin adăugarea de diferite concentrații de CBM la mediul de reacție comparând valorile rezultate cu o cultură martor tratată în aceleași condiții de lucru, dar fără substanța toxică.

Stresul chimic generat de o substanță chimică considerată toxică împiedică dezvoltarea celulară a algelor, distruge sistemul enzimatic al acestora, proces care generează moartea celulară. Experimentele efectuate evidențiază producția de oxigen generată de cultura algala *Chlorella pyrenoidosa* prin analizarea eficienței procesului de fotosinteză al algelor verzi în prezența toxicului din proba analizată. Metoda cuantifică rezultatele analitice ale testului de determinare a oxigenului în probele incubate 24 ore în condiții constante de temperatură și iluminare în prezența anumitor concentrații de CBM.

Pentru a înțelege mecanismele prin care acționează toxicul o-clor benziliden malonitril, au fost analizați o serie de parametri: dezvoltare celulară, greutatea celulelor uscate, productivitatea biomasei și activitatea de floculare, producția de oxigen, raportul de inhibiție, randamentul procentului de inhibiție și estimarea EC₅₀.

În *Capitolul 8* se prezintă studiul privind variația conținutului de pigmenți de clorofilă extras din mediile algale contactate cu substanță toxică, analiza fluorescenței extractului clorofilian prin măsurători ale pigmentului clorofilian extras și evaluarea spectrului de fluorescență cu ajutorul spectrofluorofotometrului RF-6000 3D. În acest capitol au fost analizați metaboliții CBM pentru a pune în evidență substanțele de interes rezultate în urma hidrolizei prin analiza GC-MC.

Capitolul 9 prezintă rezultatele obținute la caracterizarea extractului clorofilian, a substanței chimice de interes și analiza compoziției chimice a probelor care au conținut materialul biologic de tip *Chlorella pirenoidosa*. Cu ajutorul spectrofotometrului FTIR, prin scanare în regiunea de 4000–400 cm⁻¹ s-a urmărit identificarea grupărilor funcționale, a benzilor de absorbție caracteristice vibrațiilor de întindere și deformare a anumitor funcțiuni organice. De asemenea în acest capitol se prezintă rezultatele obținute în urma analizelor probelor biologice prin microscopia electronică (SEM) și microscopia electronică cu transmisie (TEM) pentru examinarea aspectului morfologic al celulelor biologice înainte și după contactare cu substanță CBM în diferite concentrații.

În *Capitolul 10* am evidențiat concluziile generale obținute în urma studiilor efectuate și am prezentat contribuțiile originale din teză. În *Capitolul 11* se prezintă referințele bibliografice studiate. În *Capitolul 12* lista lucrărilor publicate iar în *Capitolul 13* am prezentat propunerile de continuare a cercetărilor.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Abdul Wadood Khan et al., Recent Advances in Decontamination of Chemical Warfare Agents, Defence Science Journal, 2013, Vol.63, no.5, 487-496 DOI : [10.14429/dsj.63.2882](https://doi.org/10.14429/dsj.63.2882) .
2. L. Szinicz, History of chemical and biological warfare agents, Germany, Toxicology 2005, 214, 167–181, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.06.011>
3. Nicoleta Petrea et al., Experimental Survey Regarding the Dangerous Chemical Compounds from Military Polygons that Affect the Military Health and the Environment, Rev. Chim2018, (Bucharest), 69, No. 7, <https://doi.org/10.37358/RC.18.7.6386>
4. U.S. National Research Council, Committee on Review and Evaluation of the Army Non-Stockpile Chemical Materiel Disposal Program. Disposal of Chemical Agent Identification Sets. National Academies Press. Washington, D.C. 1999 The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/9731>. p. 16. ISBN 0-309-06879-7.

5. S. M. White, Chemical and biological weapons. Implications for anaesthesia and intensive care, REVIEW ARTICLE, British Journal of Anaesthesia 2002, 89 (2): 306±24, <https://doi.org/10.1093/bja/aef168>
6. Beer Singh et al., Decontamination of Chemical Warfare Agents, Defence Science Journal, 2010, Vol. 60, No. 4, pp. 428-441, <https://doi.org/10.14429/dsj.60.487>
7. K. Ganesan et al., Chemical warfare agents, J Pharm Bioall Sci, 2010, Vol 2 Issue 3, <https://doi.org/10.4103/0975-7406.68498>
8. Ramesh C. Gupta, Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents, 3rd Edition – March 31, 2020.
9. Hans Sanderson, Patrik Fauser, Environmental assessments of sea dumped chemical warfare agents, Scientific Report from DCE – Danish Centre for Environment and Energy, 2015, The report is available in electronic format (pdf) at <http://dce2.au.dk/pub/SR174.pdf>
10. Joseph J. DeFrank et al., Enzymatic decontamination: from concept to commercialization, U.S. Army Edgewood Chemical Biological Center Aberdeen Proving Ground, 2004.
11. Zbynek Prokop et al., Enzymes for Detection and Decontamination of Chemical Warfare Agents, Modern biocatalysis: advances towards synthetic biological systems: Chapter 18, 539-565, 2018
12. Tomas Capoun, Jana Krykorkova, Study of Decomposition of Chemical Warfare Agents using Solid Decontamination Substances, Toxics, 2019 7(4), 63; doi.org/10.3390/toxics7040063
13. Nancy B. Munro et al., The Sources, Fate, and Toxicity of Chemical Warfare Agent Degradation Environ Health Perspect. 1999 Dec; 107(12): 933–974. doi: [10.1289/ehp.99107933](https://doi.org/10.1289/ehp.99107933)
14. J. Nawala et al., Thermal and catalytic methods used for destruction of chemical warfare agents, International Journal of Environmental Science and Technology, 2019, doi.org/10.1007/s13762-019-02370-y
15. B.P. McNamara et al., Toxicology of riot control chemicals - CS, CN, and DM, Department of the Army Edgewood Arsenal, Research Laboratories, Medical Research Laboratory, Edgewood Arsenal, Maryland 21010, 1969
16. Radek Zboril et al. Treatment of chemical warfare agents by zero-valent iron nanoparticles and ferrate(VI)/(III) composite, Journal of Hazardous Materials 2012, 211– 212, 126– 130, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.10.094>
17. Varoon Singh et al. Magnetic hydrophilic–lipophilic balance sorbent for efficient extraction of chemical warfare agents from water samples, Journal of Chromatography A, 2016, 1434, 39–49, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.028>

18. Matthew Howard Ashmore, C. Paul Nathanail, A critical evaluation of the implications for risk based land management of the environmental chemistry of Sulphur Mustard, *Environment International* 2008, 34, 1192–1203, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.03.012>
19. Miroslav Labaška et al., Degradation of Chemical Warfare Agent Nitrogen Mustard using Ferrate (VI), *Toxics* 2023, 11(7), 559; doi.org/10.3390/toxics11070559
20. Masahiko Asada, A Path to a Comprehensive Prohibition of the Use of Chemical Weapons under International Law: From The Hague to Damascus, *Journal of Conflict & Security Law*, 2015, doi:10.1093/jcsl/krv025
21. M Brvar, Chlorobenzylidene malononitrile tear gas exposure: Rinsing with amphoteric, hypertonic, and chelating solution, *Human and Experimental Toxicology*, 2015, Vol. 35(2) 213–218, <https://doi.org/10.1177/0960327115578866>
22. Products, *Environmental Health Perspectives*, Volume 107, 933-974, Number 12, 1999, doi: 10.1289/ehp.99107933
23. Flavio Pereira et al., Effects of Riot Control Training on Systemic Microvascular Reactivity and Capillary Density, *Military Medicine*, 2018. 183, 11/12:e713,
24. Peter G. Blain, Tear gases and irritant incapacitants. 1-chloroacetophenone, 2-chlorobenzylidene malononitrile and dibenz-1,4-oxazepine, *Toxicological Reviews*, 2003, 22(2):103-10, doi: 10.2165/00139709-200322020-00005
25. Joseph J Hout et al., Identification of compounds formed during low temperature thermal dispersion of encapsulated o-chlorobenzylidene malononitrile (CS riot control agent), *J Occup Environ Hyg*, 2010, 7(6):352-7, doi: 10.1080/15459621003732721
26. André Richardt and Marc-Michael Blum, Decontamination of Warfare Agents. *Enzymatic Methods for the Removal of B/C Weapons*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008
27. Department Of Health And Human Services, NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards, Washington DC, DHHS (NIOSH) 2007 Publication No. 2005-149, <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2005-149/pdfs/2005-149.pdf>,
28. Office of Research and Development, National Homeland Security Research Center, *Environment Protection Agency (EPA), Building Decontamination Alternatives*, 2005, https://iwaste.epa.gov/rpts/bldg_decon_report0305.pdf,
29. R.C. Malhotra and Pravin Kumar, Chemistry and Toxicity of Tear Gases, *Def Sci J*, Vol 37, No 2, pp 281-296, 1987, DOI: 10.14429/dsj.37.5910

30. Daniele Costenaro et al., Tungsten oxide: a catalyst worth studying for the abatement and decontamination of chemical warfare agents, *Global Security, Health, Science and Policy*, 2017, Vol.2, Np. 1, 62–75, doi.org/10.1080/23779497.2017.1330662
31. Curtis Klaassen, Casarett și Doull's Toxicology, The basic science of poisons, McGraw-Hill Education, noiembrie 2018
32. M. Roszak et. all. Development of an Autochthonous Microbial Consortium for Enhanced Bioremediation of PAH-Contaminated Soil *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 13469. <https://doi.org/10.3390/ijms222413469>
33. Magdalena Anna Karaś et al., Selection of Endophytic Strains for Enhanced Bacteria-Assisted Phytoremediation of Organic Pollutants Posing a Public Health Hazard *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(17), 9557 <https://doi.org/10.3390/ijms22179557>
34. Vaicum, L.M. *Epurarea Apelor cu Namol Biologic. Bazele Biochimice*; Ed Academica:, Tirgu-Mures, Romania, 1981.
35. David P. Fidler, International Law and Weapons of Mass Destruction: End of the Arms Control Approach *Journal of Comparative & International Law* 39 (2004). <https://www.repository.law.indiana.edu/facpub/417>
36. M. Martellini Managing CBRN safety and security affected by cutting edge technologies, 2020, France, ISBN 978-9-030-28285-1 https://doi.org/10.1007/978-3-030-28285-1_1;
37. C-28/3, Report of the OPCW on the Implementation of the Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on their Destruction in 2022, OPCW.org, nov. 2023
38. Ladislaus Szinicz et al., Development of antidotes: Problems and strategies *Toxicology Volume* 233, Issues 1–3, 2007, Pages 23-30, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.07.008>
39. Beitong Zhu, Molecular engineered optical probes for chemical warfare agents and their mimics: Advances, challenges and perspectives *Coordination Chemistry Reviews Volume* 463, 2022, 214527 <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214527>
40. Markku Mesilaakso *Chemical Weapons Convention chemicals analysis: sample collection, preparation, and analytical methods*, 2005, Chichester, West Sussex, England; Hoboken, NJ : Wiley, ; ISBN: 0470847565 9780470847565
41. Herbert H. Hill, Jr.† and Stephen J. Martin *Conventional analytical methods for chemical warfare agents* *Pure Appl. Chem*, 2002., Vol. 74, No. 12, pp. 2281–2291.

42. Ron G. Manley Verification under the Chemical Weapons Convention. A reflective review* Pure Appl. Chem., Vol. 2002 74, No. 12, pp. 2235–2240
43. Antony Calder, Steven Bland, Chemical, biological, radiological and nuclear considerations in a major incident SURGERY Elsevier 2015, 33:9, 444, <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2015.07.006>
44. Varoon Singh et al. Analysis of chemical warfare agents in organic liquid samples with magnetic dispersive solid phase extraction and gas chromatography mass spectrometry for verification of the chemical weapons convention Journal of Chromatography A, Volume 1448, 27 May 2016, Pages 32-41, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.04.058>
45. Stewart, Charles D. Weapons of mass casualties and terrorism response handbook. Boston: Jones and Bartlett. p. 47, 2006, ISBN 0-7637-2425-4.
46. Ellison, D. Hank Handbook of Chemical and Biological Warfare Agents (Second ed.), CRC Press, p (2008), p 20-21. ISBN 978-0-849-31434-6
47. O'Neil et al., The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 14th. Whitehouse Station, NJ: Merk; 2006. ISBN13 978-0-911910-001, Journal of Medicinal Chemistry 50(3):590-590, 2007, DOI: [10.1021/jm068049o](https://doi.org/10.1021/jm068049o)
48. Rîșnoveanu, G.; Brunborg, G. *Legislative and Scientific Foundations for the Evaluation of Chemical Substances*; GUIDE University Publishing House: Bucharest, Romania, 2016.
49. Salem, M. Feasel, B. Ballantyne, S.A. Katz Riot Control Agents Encyclopedia of Toxicology (Third Edition) Reference Module in Biomedical Sciences 2014, Pages 137-154 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00922-2>
50. E J. Olajo, H. Salem Riot Control Agents: Pharmacology, Toxicology, Biochemistry and Chemistry, Journal Of Applied Toxicology, J. Appl. Toxicol. 21, 2001, 355–391 <https://doi.org/10.1002/jat.767>
51. Chauhan, S. et al. Chemical warfare agents. Environ. Toxicol. Pharmacol., 2008, 26, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.03.003>
52. Lillie, S.H., Hanlon, J.E., Kelly, J.M., Rayburn, B.B., Potential military chemical/biological agents and compounds. Army, Marine Corps, Navy, Air Force, 2017, <https://irp.fas.org/doddir/army/fm3-11-9.pdf>.
53. K. Blaho- Owens *Chemical Crowd Control Agents* [Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine](https://doi.org/10.1016/B0-12-369399-3/00077-X) 2005, 319-325 <https://doi.org/10.1016/B0-12-369399-3/00077-X>

54. C. Fernandez-Lopez et al. Nature-based approaches to reducing the environmental risk of organic contaminants resulting from military activities *Science of The Total Environment*, 2022, Volume 843, 157007 <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157007>
55. Ballantyne, B., Riot-control agents (biomedical and health aspects of the use of chemicals in civil disturbances), in *Medical Annual*, Scott, R.B. and Frazer, J. Eds., Wright and Sons, Bristol, 1977, 7. Available online: Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons, <https://www.opcw.org/our-work/what-chemical-weapon>
56. Blain, P.G. Tear Gases and Irritant Incapacitants. *Toxicol. Rev.* 2003, 22, 103–110, <https://doi.org/10.2165/00139709-200322020-00005>
57. Directive 2008/32/EC of the European Parliament and of the Council of 11 March 2008 amending Directive 2000/60/EC establishing a framework for Community action in the field of water policy, as regards the implementing powers conferred on the Commission. Directive 2000/60/EC Of The European Parliament And Of The Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy (OJ L 327, 22.12.2000, p. 1
58. Evaluation Report Enzymatic Decontamination of Chemical Warfare Agents United States Environmental Protection Agency Research Triangle Park, North Carolina 2771 EPA 600/R-12/033 | 2013. EPA, United Nations Environmental Protection Agency.
59. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH),
60. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances
61. G. Rîșnoveanu, G. Brunborg, *Fundamente legislative științifice pentru evaluarea substanțelor chimice* Ghid Editura Universitară București, 2016
62. Owens, E.J. and Punte, C.L., Human respiratory and ocular irritation studies utilizing o-chlorobenzylidene malononitrile aerosols, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1963, 24, 262.
63. Beswick, F.W., Holland, P., and Kemp, K.H., Acute effects of exposure to orthochlorobenzylidene malononitrile (CS) and the development of tolerance, *Br. J. Ind. Med.*, 1972., 298, 29
64. Marrs, T.C., Colgrave, H.V., Cross, N.L., Gazzard, M.F., and Brown, R.F.R., A repeated dose study of the toxicity of inhaled 2-chlorobenzylidene malononitrile (CS) aerosol in three species of laboratory animals, *Arch. Toxicol.* 1983, 183, 52,

65. Zucchetti, M.; Testoni, R. Toxicity and health effects of orthochloro-benzylidene-malononitrile (CS GAS). *Fresenius Environ. Bull.* 2017, 26, 151–155.
66. Gutentag, P.J., Hart, J., Owens, E.J., and Punte, C.L., The evaluation of CS aerosol as a riot control agent in man, Technical Report CWLR 2365, April 1960, U.S. Army Chemical Warfare Laboratories, Army Chemical Center, 1960.
67. Hellerich, A., Goldman, R.H., Bottiglieri, N.G., and Weimer, J.T., The effects of thermally-generated CS aerosols on human skin, Technical Report EATR 4075, Jan. 1967. U.S. Army Medical Research Laboratory, Edgewood Arsenal, MD.
68. Park, S. and Giammona, S.T., Toxic effects of tear gas on an infant following prolonged exposure, *Am. J. Dis. Child.*, 1972, 123, 245
69. ACGIH (American Conference of Government and Industrial Hygienists). *o-Chlorobenzylidene Malononitrile (CAS Reg. No. 2698-41-1)*; Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices; ACGIH: Cincinnati, OH, USA, 1991; pp. 275–278.
70. LaPorte, S.L.; Harianawala, A.; Bogner, R.H. The Application of Malononitriles as Microviscosity Probes in Pharmaceutical Systems. *Pharm. Res.* 1995, 12, 380–386.
71. Allison Fuchs et al., Ocular toxicity of mustard gas: A concise review, *Toxicology Letters* Volume 343, 1 June 2021, Pages 21-27, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.02.007>
72. Xichao Hu et al., Toward public security monitoring: A perspective of optical molecular probes for phosgene and mustard gas detection, *Dyes and Pigments*, 216, 2023, 111379, <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2023.111379>
73. Y. Tomioka, K. Ohkubo, H. Maruoka, A novel synthesis of indole derivatives by the reaction of N-arylhydroxamic acids with malononitrile, *J. Heterocycl. Chem.* 44 (2007) 419e424.
74. Karagama Y.G, et al., "Short-term and long-term physical effects of exposure to CS spray". *Journal of the Royal Society of Medicine*, 96(4): 172–174, [Volume 96, Issue 4](https://doi.org/10.1177/01410768030960040), 2003, <https://doi.org/10.1177/01410768030960040>
75. Hu, Howard, "Tear Gas—Harassing Agent or Toxic Chemical Weapon?". *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 262 (5): 660–3, [JAMA The Journal of the American Medical Association](https://doi.org/10.1001/jama.262.5.660) 262(5) 1989, 660-3 1989
76. B. Brône et al. Tear gasses CN, CR, and CS are potent activators of the human TRPA1 receptor *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008, Volume 231, Issue 2,, Pages 150-156 <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2008.04.005>

77. A.M.B. Zekri et al., Acute mass burns caused by o-chlorobenzylidene malononitrile (CS) tear gas, *Burns*, 1995, Volume 21, Issue 8, 586-589 [https://doi.org/10.1016/0305-4179\(95\)00063-h](https://doi.org/10.1016/0305-4179(95)00063-h)
78. OPCW SAB-25/WP.1 /27 March 2017 „Response to the Director-General's request to the Scientific Advisory Board to provide consideration on which Riot Control Agents (RCA) are subject to declaration under the Chemical Weapons Convention”
79. Brvar, M. Chlorobenzylidene Malononitrile Tear Gas Exposure: Rinsing with Amphoteric, Hypertonic, and Chelating Solution; Human and Experimental Toxicology Poison Control Centre, Division of Internal Medicine, University Medical Centre Ljubljana: Ljubljana, Slovenia., 2015.
80. Kaszeta, D. Restrict use of riot-control chemicals. *Nature* 2019, 573, 27–29.
81. Z. Zekri, A.M.B.; King, W.W.K.; Yeung, R.; Taylor, W.R.J. Acute mass burns caused by o-chlorobenzylidene malononitrile (CS) tear gas. *Burns* 1995, 21, 586–589.
82. Anderson, P.; Lau, G.; Taylor, W.; Critchley, J. Acute effects of the potent lacrimator o-chlorobenzylidene malononitrile (CS) tear gas. *Hum. Exp. Toxicol.* 1996, 15, 461–465.
83. Tsang, A.C.; Li, L.; Tsang, R.K. Health risks of exposure to CS gas (tear gas): An update for healthcare practitioners in Hong Kong. *Hong Kong Med. J.* 2020, 26, 151–153[
84. Riches, J.R.; Read, R.W.; Black, R.M.; Harrison, J.M.; Shand, D.A.; Tomsett, E.V.; Newsome, C.R.; Bailey, N.C.; Roughley, N.; Gravett, M.R.; et al. The development of an analytical method for urinary metabolites of the riot control agent 2-chlorobenzylidene malononitrile (CS). *J. Chromatogr. B* 2013, 928, 125–130.
85. Dimitroglou, Y.; Rachiotis, G.; Hadjichristodoulou, C. Exposure to the Riot Control Agent CS and Potential Health Effects: A Systematic Review of the Evidence. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2015, 12, 1397–1411.
86. Kluchinsky, T.A.; Savage, P.B.; Fitz, R.; Smith, P.A. Liberation of hydrogen cyanide and hydrogen chloride during high-temperature dispersion of CS riot control agent. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 2002, 63, 493–496.
87. Possible Lethal Effects of CS Tear Gas on Possible Lethal Effects of CS Tear Gas on Branch Davidians during the Branch Davidians during the FBI raid on the Mount Carmel Compound FBI Raid on the Mount Carmel Compound near Waco, Texas near Waco, Texas April 19, 1993. Available online: http://www.veritagiustizia.it/docs/gas_cs/CS_Effects_Waco.pdf

88. Z. Lin, W. Zhang, L. Wang, H. Yu, C. Wu, Mechanism of the synergistic toxicity of malononitrile and p -nitrobenzaldehyde with photobacterium phosphoreum, *Toxicol. Mech. Methods* 13 (2003) 241e245.
89. Rice, p.; Jones, D.; Stanton, D. A Literature Review of the Solvents Suitable for the Police CS Spray Device; Chemical & Biological Defence Establishment: Salisbury, UK, 1997.
90. Agrawal, Y.; Thornton, D.; Phipps, A. CS gas—Completely safe? A burn case report and literature review. *Burns* 2009, 35, 895–897, <https://doi.org/10.1016/j.burns.2008.06.007>
91. Salem, H.; Gutting, B.W.; Kluchinsky, T.; Boardman, C.; Tuorinsky, S.; Hout, J. Riot Control Agents. In *Encyclopedia of Toxicology*, 3rd ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2014; pp. 137–154.
92. Borusiewicz, R. Chromatographic analysis of the traces of 2-chlorobenzalmalononitrile with passive adsorption from the headspace on Tenax TA and Carbotrap 300. *Forensic Sci. Int.* 2019, 303, 109933, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.109933>
93. Analysis of the Toxicity Hazards of Methylene Chloride Associated with the Use of Tear Gas at the Branch Davidian Compound at Waco, Texas, on April 19, 1993. Available online: <https://www.apologeticsindex.org/pdf/lucier.pdf>
94. Park, S.-H.; Chung, E.-K.; Yi, G.-Y.; Chung, K.-J.; Shin, J.-A.; Lee, I.-S. A Study for Health Hazard Evaluation of Methylene Chloride Evaporated from the Tear Gas Mixture. *Saf. Health Work.* 2010, 1, 98–101
95. Pretorian, A., Grigoriu, N., Petre, R., Petrea, N., Non-lethal weapons based on composition of malodor-irritating used to accentuate stress or for discomfort features in modern battlefield, *Technical Military Magazine*, 2018, 1, pp. 13-20
96. Jung, Y.; Park, N.K.; Kang, S.; Huh, Y.; Jung, J.; Hur, J.K.; Kim, D. Latent turn-on fluorescent probe for the detection of toxic malononitrile in water and its practical applications. *Anal. Chim. Acta* 2019, 1095, 154–161, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.10.015>
97. Medical aspects of chemical and biological warfare - Borden institute, Textbook of Military Medicine, Walter Reed Army Medical Center, 6900 Georgia Ave., NW, Bldg 11 - Rm 1-117, Washington, DC, 1997, 20307-5001.
98. The 1993 Chemical Weapons Convention, The Harvard Sussex Program On Cbw Armament And Arms Limitation

99. Beatrice Maneshi and Jonathan E. Forman, The Intersection of Science and Chemical Disarmament, Science & Diplomacy, 21 September 2015.
100. Guidelines for Mass Casualty Decontamination during an HAZMAT/Weapon of Mass Destruction Incident: Volumes I and II), 2009, (U.S. Army ECBC)
101. Johnson HL, Ling CG, Gulley KH. Curriculum Recommendations for Disaster Health Professionals. The Pediatric Population. (National Center for Disaster Medicine & Public Health, Uniformed Services University of the Health Sciences. 2014)
102. N.A. Losadin, B.A. Curleandschii, G.B.Bejenari, Toxicologie militara, Moscova, Ed medicala, 2006
103. Fișa Tehnică de Securitate ALDRICH-M1407. Available online: <https://www.wuerth.ro/articole/fise-tehnice-securitate.html>
104. L. Leadbester, G.L. Sainsbury, U.Utley Ortho-Chlorobenzyliden malononitrile: A metabolite formed from Ortho-Chlorobenzyliden malononitrile(CS) Toxicology and applied pharmacology 1973, 25, 111-116
105. Grigoriu, N., Epure, G., Moșteanu, D., *Overview on analysis of free metabolites for detection of exposure to chemical warfare agents*, Scientifical Bulletin of "Nicolae Balcescu" Land Forces Academy 2015,, no. 1(39), 49 – 56
106. Henderson, R. Malononitrile Is toxic. *Science* 1968, 159, 482–482.
107. HSDB (Hazardous Substances Data Bank). [TOXNET Specialized Information Services](#). US National Library of Medicine; Bethesda, MD: 2005[Dec. 30, 2013]. 2- Chlorobenzalmalononitrile (CAS Reg. No. 2698-41-1)
108. Zhao X, Dughly O, Simpson J. Decontamination of the pediatric patient. Curr Opin Pediatr. 2016 Jun;28(3):305-9, <https://doi.org/10.1097/mop.0000000000000350>
109. Chemical and Biological Warfare: An Annotated Bibliography. Scarecrow Press. p. 30. ISBN 9780810832718. Eric Croddy (1997).
110. E.A. Lujnikov, G. Suhodolina B. Toxicologie clinica, M.I.A.2008
111. "Third report of the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons United Nations Joint Investigative Mechanism". 24 August 2016.
112. Dhivare, R.S.; Rajput, S.S. Malononitrile: A Versatile Active Methylene Group. *Int. Lett. Chem. Phys. Astron.* 2015, 57, 126–144, <http://dx.doi.org/10.56431/p-5354je>

113. Ren, Z.; Cao, W.; Tong, W. The Knoevenagel condensation reaction of aromatic aldehydes with malononitrile by grinding in the absence of solvents and catalysts. *Synth. Commun.* 2002, 32, 3475–3479.
114. US Army Chemical School. Chapter 3 in Potential Military Chemical/Biological Agents and Compounds. 2005. Military compounds and their properties. FM 3-11.9, MCRP 3-37.1B, NTRP, 3-11.32, AFTTP(I) 3.255. January 2005
115. SR EN ISO/CEI 17025:2018 – Cerințe generale pentru competența laboratoarelor de încercări și etalonări
116. Recommended Operating Procedures for Analysis in the Verification of Chemical Disarmament. The Ministry of Foreign Affairs of Finland, University of Helsinki, 2017
117. Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1) Current Step 4 version Parent Guideline dated 27 October 1994 (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005)
118. Viorel Gheorghe, C. G. Gheorghe, D. R. Popovici, S. Mihai, C. Calin, E. E. Sarbu, R. Doukeh, N. Grigoriu, C. N. Toader, C. Epure, V. Matei -*Synthesis, Purity Check, Hydrolysis and Removal of o-Chlorobenzyliden Malononitrile (CBM) by Biological Selective Media*, *Toxics* 2023, 11(8), 672
119. T. Reinaldo et al, Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review *J. Braz. Chem. Soc.* 20, (3), 2009, <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000300003>
120. NIST Chemistry Web Book, SRD 69; NIST: Gaithersburg, MD, USA, 2022.
121. G. Rîșnoveanu G. Brunborg Fundamente legislative și științifice pentru evaluarea substanțelor chimice GHID Ed universitară București, 2016
122. Valeriu Rusu. Dicționar medical. Editura Medicală. 2010
123. Acute Exposure Guideline Levels for Selected Airborne Chemicals: Volume 16. Committee on Toxicology; Board on Environmental Studies and Toxicology; Division on Earth and Life Studies; National Research Council, Washington (DC): [National Academies Press \(US\)](#); 2014 DOI: [10.17226/18707](#)
124. Viorel Gheorghe, C. G. Gheorghe, A Bondarev, C. N. Toader, M Bomboș *The contamination effects and toxicological characterization of o-chlorobenzylidene malononitrile*, *Rev. Chim.* 2020, 71, 67-75,

125. STANDARD SR 13216/1994 Ape de suprafață și ape uzate. Teste cu organisme acvatice. Determinarea toxicității letale acute a impurificatorilor și apelor uzate față de pești dulcicoli (euritermi), București
126. Dan Georgescu Ed didactică și pedagogică, Animale nevertebrate –morfofiziologie Ministerul Învățământului- București, 1997, ISBN 976-30-5817-3
127. Rusu, V. *Dicționar Medical*; Editura Medicală: București 2010.
128. Georgescu, D. *Animale Nevertebrate–Morfofiziologie*; Ministerul Învățământului; Ed Didactică și Pedagogică: București, România, 1997; ISBN 976-30-5817-3.
129. Stephan, C. E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84
130. Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. (1990). WRc Report No EEC 2600-M., 2000, <https://doi.org/10.1787/20745761>
131. Viorel Gheorghe, C. G. Gheorghe, D. R. Popovici, S. Mihai, R. E. Dragomir, R. Somoghi, Reduction of Oxygen Production by Algal Cells in the Presence of O-Chloro-benzylidene Malononitrile, *Bioengineering*, 2024, 11, (6), 623, <https://doi.org/10.3390/bioengineering11060623>
132. Viorel Gheorghe C. G. Gheorghe, A Bondarev, R Somoghi, Ecotoxicity of o-Chlorobenzylidene Malononitrile (CBM) and Toxicological Risk assessment for SCLP Biological Cultures (*Saccharomyces sp.*, *Chlorella sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Paramecium sp.*) *Toxics* 11 (3), 285, *Toxics* 2023, Volume 11, Issue 3, 285
133. Viorel Gheorghe, C. G. Gheorghe, A. Bondarev, V. Matei, M Bombos The Malachite Green Biodegradation in Bioreactors on Various pH Domains, *Rev. Chim*, 2019, 70 (8), 2996-2999,
134. C. G. Gheorghe, Viorel Gheorghe, A. Bondarev Environmental Bioremediation-the malachite green adsorption in bioreactors on various pH domains *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology* 9 (ISSN: 2157-7463), 86, Roma, 2018 DOI: 10.4172/2157-7463-C2-044
135. Koch, A. L. Growth Measurement IN: Methods for General and Molecular Bacteriology Gerhardt, American Society for Microbiology, 1994, Washington, DC. p. 248-277.
136. Chang, Y.-C.; Peng, Y.-P.; Chen, K.-F.; Chen, T.-Y.; Tang, C.-T. The effect of different in situ chemical oxidation (ISCO) technologies on the survival of indigenous microbes and the remediation

- of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Process. Saf. Environ. Prot.* 2022, 163, 105–115, <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.05.019>
137. E. Bertolazzi A Combination Formula of Michaelis-Menten-Monod Type Computers and Mathemats with Applications 50 (2005) 201-215, <https://doi.org/10.1016/j.camwa.2004.10.045>
 138. Viorel Gheorghe, C. G. Gheorghe, *Screening behavioral responses of certain microorganisms to CBM toxic used in military and law enforcement operations* 5 th International Colloquium Energy and Environmental Protection, Ploiesti, 2023
 139. Viorel Gheorghe, C. G. Gheorghe, A Bondarev, C. N. Toader, *Growth kinetic of SPLC-cultures for CBM and toxicological risk assesment* Catalysis, Chemical Engineering and Technology, 2023, Tokyo, Japan 15-th Edition,
 140. A Bondarev, C. G. Gheorghe, Viorel Gheorghe, M Bombos, *Removal of dyes from textile wastewater using sawdust as low-cost biosorbent* Revista de Chimie, 2020, 71 (3), 387-396,
 141. Koch, A.L. Growth measurement. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*; Gerhardt, P., I, Eds.; American Society for Microbiology: Washington, DC, USA, 1994; pp. 248–277.
 142. Koch, A.L. Turbidity measurements of bacterial cultures in some available commercial instruments. *Anal. Biochem.* 1970, 38, 252–259, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(70\)90174-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(70)90174-0)
 143. EN 28692:1993; Water Quality—Fresh Water Algal Growth Inhibition Test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum* (ISO 8692:1989)., 1989, Technical Committee : ISO/TC 147/SC 5 Biological methods esisoglou,
 144. I.; Tam, V.H.; Tomaras, A.P.; Nikolaou, M. Discerning in vitro pharmacodynamics from OD measurements: A model-based approach. *Comput. Chem. Eng.* 2022, 158, 107617, <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2021.107617>
 145. Zhu, S.; Zhu, B.; Huang, A.; Hu, Y.; Wang, G.; Ling, F. Toxicological effects of multi-walled carbon nanotubes on *Saccharomyces cerevisiae*: The uptake kinetics and mechanisms and the toxic responses. *J. Hazard. Mater.* 2016, 318, 650–662, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.07.049>
 146. Zarnea, G. *Microbiologie Generala*; Ed Didactica și Pedagogica: Bucuresti, Romania, 1970; pp. 1–46, 108–112.
 147. S. Je, Y. Yamaoka Biotechnological Approaches for Biomass and Lipid Production Using Microalgae *Chlorella* and Its Future Perspectives *J Microbiol Biotechnol.* 2022 Nov 28; 32(11): 1357–1372.

148. Peycheva, E.; Alexandrova, R.; Miloshev, G. Application of the yeast comet assay in testing of food additives for genotoxicity. *LWT Food Sci. Technol.* 2014, 59, 510–517, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.023>
149. Valicaa, M.; Pipiškaa, M.; Hostina, S. Effectiveness of *Chlorella vulgaris* inactivation during electrochemical water treatment. *Desalination Water Treat.* 2019, 138, 190–199, <http://dx.doi.org/10.5004/dwt.2019.23330>
150. Gheorghe, C.G.; Dutescu, C. Carbureanu, M. *Asphaltenes biodegradation in biosystems adapted on selective media*. Rev. Chim. 2016, 67, 2106–2110.
151. C.G. Gheorghe, O Pantea, V Matei, D Bombos, AF Borcea *Testing the Behaviour of Pure Bacterial Suspension (Bacillus Subtilis, Pseudomonas Aeruginosa and Micrococcus Luteus) in Case of Hydrocarbons Contaminators* Revista de Chimie, 2011, 62 (9), 926-929
152. C. G. Gheorghe, V. Matei “Lucrări practice de microbiologie și ecotoxicologie, Ed. UPG Ploiesti, 2012, ISBN
153. C. G. Gheorghe, A.F. Borcea, Pantea, O, V. Matei, D. Bombos *The Efficiency of Flocculants in Biological Treatment with Activated Sludge* Revista de chimie, 2011, 62 (10), 1023-1026
154. Gheorghe, C.G.; Pantea, O.; Matei, V.; Bombos, D.; Borcea, A.F. Testing of Bacterial and Fungal Resistance in the Water Pollution with Cationic Detergents. *Chem. J.* 2011, 62, 707–711.
155. Yan N., Fan C., Chen Y., Hu Z. The potential for microalgae as bioreactors to produce pharmaceuticals. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17-962, <https://doi.org/10.3390/ijms17060962>
156. T. Bito, et al. *Potential of Chlorella as a Dietary Supplement to Promote Human Health Nutrients*. 2020 Sep; 12(9): 2524. [10.3390/nu12092524](https://doi.org/10.3390/nu12092524)
157. Ouyang H. et al. *Effects of five heavy metals at sub-lethal concentrations on the growth and photosynthesis of Chlorella vulgaris* Environmental Chemistry 2012, Vol.57 No.25: 3363–3370 doi: 10.1007/s11434-012-5366-x
158. Gu, M.; Yin, et al. Construction of characterization parameters of algal photosynthetic inhibition method for detection of comprehensive toxicity in water. *Ecol. Indic.* 2022, 136, 108651, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108651>
159. Rajamanickam Ricky et al., Efficacy of ciprofloxacin and amoxicillin removal and the effect on the biochemical composition of *Chlorella vulgaris* Bioengineering 2022, 9 (4), 134, <https://doi.org/10.3390/bioengineering9040134>

160. Murdock, J.N.; Wetzel, D.L. FT-IR Microspectroscopy Enhances Biological and Ecological Analysis of Algae. *Appl. Spec-Troscopy Rev.* 2009, 44, 335–361. <http://dx.doi.org/10.1080/05704920902907440>
161. Surendhiran, D.; Vijay, M. Influence of bioflocculation parameters on harvesting *Chlorella salina* and its optimization using response surface methodology. *J. Environ. Chem. Eng.* 2013, 1, 1051–1056, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.08.016>
162. Parmar, P.; Kumar, R.; Neha, Y.; Srivatsan, V. Microalgae as next generation plant growth additives: Functions, applications, challenges and circular bioeconomy based solutions. *Front Plant Sci.* 2023, 14, 1073546, <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1073546>
163. Beauvais-Fluck, R.; Slaveykova, V.I.; Cosio, C. Cellular toxicity pathways of inorganic and methyl mercury in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Rep.* 2017, 7, 1–12.
164. Leadbeater, L.; Sainsbury, G.L.; Utley, D. Ortho-Chlorobenzylmalononitrile: A metabolite formed from or-tho-chlorobenzylidenemalononitrile (CS) Toxicol. *Appl. Pharmacol.* 1973, 25, 111.
165. Shaaban, M. Green Microalgae Water Extract as Foliar Feeding to Wheat Plants. *Pak. J. Biol. Sci.* 2001, 4, 628–632, <https://doi.org/10.3923/pjbs.2001.628.632>
166. Rani, S.; Gunjyal, N.; Ojha, C.S.P.; Singh, R. Review of challenges for algae based wastewater treatment: Strain selection, wastewater characteristics, abiotic, and biotic factors. *J. Hazard. Toxic Radioact. Waste* 2021, 25, [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)HZ.2153-5515.0000578](https://doi.org/10.1061/(ASCE)HZ.2153-5515.0000578)
167. Michalak, I.; Chojnacka, K. Algae as production systems of bioactive compounds. *Eng. Life Sci.* 2015, 15, 160–176, <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.201400191>
168. Liang, Y.; Beardall, J.; Heraud, P. Changes in growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition with culture age in batch cultures of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *Bot. Mar.* 2006, 49, 165–173, <http://dx.doi.org/10.1515/BOT.2006.021>
169. Li, J.; Wang, Y.; Fan, Z.; Tang, P.; Wu, M.; Xiao, H.; Zeng, Z. Toxicity of Tetracycline and Metronidazole in *Chlorella pirenoidosa*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2023, 20, 3623, <https://doi.org/10.3390/ijerph20043623>
170. Silva, A.; Figueiredo, S.A.; Sales, M.G.; Delerue-Matos, C. Ecotoxicity tests using the green algae *Chlorella vulgaris*—A useful tool in hazardous effluents management. *J. Hazard. Mater.* 2009, 167, 179–185, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.12.102>

171. Mayer, P.; Cuhel, R.; Nyholm, N. A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Res.* 1997, *31*, 2525–2531, [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00084-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00084-5)
172. Hausmann, K.; Allen, R.D. Chapter 7—Electron Microscopy of Paramecium (Ciliata). In *Methods in Cell Biology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2010; Volume 96, pp. 143–173.
173. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test Annex 5/2011; OECD: 2011.
174. "Jandarmeria: Gazele lacrimogene folosite la proteste provin exclusiv de la producători autorizați și certificați. Substanțele sunt folosite și de forțe de ordine europene". Mediafax. Bucharest. 15 August 2018.
175. Valicaa, M.; Pipiškaa, M.; Hostina, S. Effectiveness of Chlorella vulgaris inactivation during electrochemical water treatment. *Desalin. Water Treat* 2019, *138*, 190–199, <http://dx.doi.org/10.5004/dwt.2019.23330>
176. Vingiani, G.M.; De Luca, P.; Ianora, A.; Dobson, A.D.; Lauritano, C. Microalgal Enzymes with Biotechnological Applications. *Mar. Drugs* 2019, *17*, 459, <https://doi.org/10.3390%2Fmd17080459>
177. Xiong, J.-Q.; Kurade, M.B.; Jeon, B.-H. Ecotoxicological effects of enrofloxacin and its removal by monoculture of microalgal species and their consortium. *Environ. Pollut.* 2017, *226*, 486–493, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.044>
178. NR Kreig. "Phenotypic Characterization" Section 25.4.9 IN: *Methods for General and Molecular Bacteriology* Gerhardt, P et al (ed) American Society for Microbiology, 1994 Washington, DC. p. 607-654.
179. R. Ian Freshney, *Culture of Animal Cells: a manual of basic technique*, Fourth Edition 2005 ISBN: 0-471-34889,
180. SIMON P. MEUNIER R: "Microbiologie industrielle et genie biochimique, Ed. Masson Paris, 1970, pp. 21-43
181. ZARNEA G, *Microbiologie generala*, Ed. didactica și pedagogica, Bucuresti, 1970, pp.1-46 ; 108-112
182. IYan Gong et all. Ratiometric fluorescent strategy for malononitrile determination in organic and aqueous medium and biological imaging, *Dyes and Pigments*, 2021, Volume 184, 108859, <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108859>

183. Subashchandrabose, S.R.; Venkateswarlu, K.; Venkidusamy, K.; Palanisami, T.; Naidu, R.; Megharaj, M. Bioremediation of soil long-term contaminated with PAHs by algal–bacterial synergy of *Chlorella* sp. MM3 and *Rhodococcus wratislaviensis* strain 9 in slurry phase. *Sci. Total Environ.* 2019, 659, 724–731, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.453>
184. Chen, M.; Li, Y.; Jiang, X.; Zhao, D.; Liu, X.; Zhou, J.; He, Z.; Zheng, C.; Pan, X. Study on soil physical structure after the bioremediation of Pb pollution using microbial-induced carbonate precipitation methodology. *J. Hazard. Mater.* 2021, 411, 125103, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125103>
185. Kyril Turpaev, N. Welsh, Aromatic malononitriles stimulate the resistance of insulin-producing beta-cells to oxidants and inflammatory cytokines *European Journal of Pharmacology*, 2016, 784, 69–80, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.05.010>
186. Vishal Kumar Singh et al., Integration Approaches to Model Bioreactor Hydrodynamics and Cellular Kinetics for Advancing Bioprocess Optimisation, *Bioengineering*, 2024, 11, 546., <https://doi.org/10.3390/bioengineering11060546>
187. Ji Chen et al., Differential responses of ecosystem respiration components to experimental warming in a meadow grassland on the Tibetan Plateau, *Agricultural and Forest Meteorology*, 2016, Volume 220, Pages 21-29, <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2016.01.010>
188. Nasir, N.M.; Jusoh, A.; Manan, H.; Kasan, N.A.; Kamaruzzan, A.S.; Ghani, W.A.W.A.K.; Kurniawan, S.B.; Lananan, F. Utilization of microalgae, *Chlorella* sp. UMT LF2 for bioremediation of *Litopenaeus vannamei* culture system and harvesting using bio-flocculant, *Aspergillus niger*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2023, 47, 1025960, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102596>
189. Zhang, Y.; Chen, Z.; Li, X.; Wu, X.; Chen, L.; Wang, G. Photosynthesis Responses of Tibetan Freshwater Algae *Chlorella vulgaris* to Herbicide Glyphosate. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2022, 20, 386, <https://doi.org/10.3390%2Fijerph20010386>
190. Posadas, E.; del Mar Morales, M.; Gomez, C.; Acién, F.G.; Munoz, R. Influence of pH and CO₂ source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways. *Chem. Eng. J.* 2015, 265, 232–239, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.12.059>
191. Takáčová, A.; Bajuszová, M.; Šimonovičová, A.; Šut., S.; Nosalj, S. Biocoagulation of Dried Algae *Chlorella* sp. and Pellets of *Aspergillus Niger* in Decontamination Process of Wastewater, as a Presumed Source of Biofuel. *J. Fungi* 2022, 8, 1282, <https://doi.org/10.3390/jof8121282>

192. SR 13328; Wather quality. Aquatic organisms tests. Pollutants toxicity determinations compared to green algae ICS 1306040, Test de inhibitie a cresterii algelor. Test de inhibitie a cresterii algelor. Jurnalul Oficial al Uniunii Europene: Bucuresti, Romania, 1996.
193. Yu, H.; Du, X.; Zhao, Q.; Yin, C.; Song, W. Weighted gene Co-expression network analysis (WGCNA) reveals a set of hub genes related to chlorophyll metabolism process in chlorella (*Chlorella vulgaris*) response androstenedione. *Environ. Pollut.* 2022, 306, 119360, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119360>
194. Salouti, Ramin; et al., "Sulfur Mustard and Immunology; Trends of 20 Years Research in the Web of Science Core Collection: A Scientometric Review". *Iranian Journal of Public Health.* 49 (7): 1202–1210, 2020, <https://doi.org/10.18502%2Fijph.v49i7.3573>
195. Bastert J, Korting HC, Traenkle P, Schmalreck AF, Identification of Dermatophytes by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Mycoses* 1999, ISSN 09333. 42: 525-528, <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.1999.00513.x>
196. Porra, R.J.; Thompson, W.A.; Kriedemann, P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1989, 975, 384–394, [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0)
197. Wei, S.; Li, F.; Zhu, N.; Wei, X.; Wu, P.; Dang, Z. Biomass production of *C. pyrenoidosa* by filled sphere carrier reactor: Performance and mechanism. *Bioresour. Technol.* 2023, 383, 129195, <https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4414736>
198. Su, Y.; Cheng, Z.; Hou, Y.; Lin, S.; Gao, L.; Wang, Z.; Bao, R.; Peng, L. Biodegradable and conventional microplastics posed similar toxicity to marine algae *Chlorella vulgaris*. *Aquat. Toxicol.* 2022, 244, 106097, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106097>
199. Kumar, S.S.; Manoj, P.; Giridhar, P. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis, chlorophyll content and antioxidant properties of native and defatted foliage of green leafy vegetables. *J. Food Sci. Technol.* 2015, 52, 8131–8139, <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1959-0>
200. Hazeem, L.J.; et al., R. Investigation of the toxic effects of different polystyrene micro-and nanoplastics on microalgae *Chlorella vulgaris* by analysis of cell viability, pigment content, oxidative stress and ultrastructural changes. *Mar. Pollut. Bull.* 2020, 156, 111278, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111278>

201. Hirschmugl, C.J.; Bayarri, Z.E.; Bunta, M.; Holt, J.B.; Giordano, M. Analysis of the nutritional status of algae by Fourier transform infrared chemical imaging. *Infrared Phys. Technol.* 2006, 49, 57–63, <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2006.01.032>
202. Slovacek, R.E.; Hannan, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll a. *Limnol. Oceanogr.* 1977, 22, <https://doi.org/10.4319/lo.1977.22.5.0919>
203. Ribeiro Rodrigues, L.; Arenzon, A.; Raya-Rodriguez, M.; Fontoura, N. Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.* 2011, 3, 225–228, <http://dx.doi.org/10.5897/JECE2011.025>
204. Volgusheva, A.A.; et al., Acclimation Response of Green Microalgae *Chlorella Sorokiniana* to 2,3',4,4',6-Pentachlorobiphenyl. *Photochem. Photobiol.* 2023, 99, 1106–1114 <http://dx.doi.org/10.1111/php.13771>
205. Gao, Y.; Li, M.; Tian, X.; Xu, K.; Gong, S.; Zhang, Y.; Yang, Y.; Wang, Z.; Wang, S. Colorimetric and turn-on fluorescent chemosensor with large stokes shift for sensitively probing cyanide anion in real samples and living systems. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2022, 271, 120882 <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.120882>
206. Chorvatova, A.M.; Uherek, M.; Mateasik, A.; Chorvat, D. Time-resolved endogenous chlorophyll fluorescence sensitivity to pH: Study on *Chlorella* sp. algae. *Methods Appl. Fluoresc.* 2020, 8, 024007 <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab77f4>