

Article complet

Les nanoparticules d'argent comme agent antimicrobien : une étude de cas sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* comme modèles de bactéries Gram-positives et Gram-négatives

(Reçu le 12 juillet 2016 ; accepté le 18 juillet 2016 ; date de publication anticipée J-STAGE : 24 janvier 2017)

Eman Zakaria Gomaa*

Département des sciences biologiques et géologiques, Faculté d'éducation, Université Ain Shams, Le Caire, Égypte

Français La recherche actuelle s'est concentrée sur la caractérisation et l'activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent (AgNP) produites par *Bacillus licheniformis* NM120-17. La synthèse a été initialement observée par un changement de couleur du jaune pâle au brun, confirmé par spectroscopie UV-Vis. Les AgNP ont été caractérisées par MET, EDAX et FTIR. Les nanoparticules synthétisées se sont révélées sphériques et uniformément réparties, avec une taille comprise entre 9 et 27,5 nm. Les activités antibactériennes et le mécanisme d'action des AgNP ont été étudiés par rapport à *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* en mesurant les courbes de croissance, la fuite de protéines et de sucres réducteurs, l'activité de la déshydrogénase de la chaîne respiratoire, ainsi que la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) bactéricides. Les résultats expérimentaux ont montré que 50 mg/ml d'AgNP pouvaient inhiber complètement la croissance des cellules bactériennes, détruire la perméabilité des membranes bactériennes et diminuer l'activité de certaines enzymes membranaires, provoquant ainsi la mort des bactéries. Ces nanomatériaux non toxiques, faciles à préparer et économiques, pourraient convenir à la formulation de nouveaux types de matériaux bactéricides.

Mots clés : activité antibactérienne ; *Escherichia coli* ; nanoparticules d'argent (AgNP) ; *Staphylococcus*

et Sakthivel, 2010). Leur taille extrêmement petite et leur grande surface par rapport à leur volume les rendent utiles pour des applications dans divers domaines, tels que les antibactériens (Souza et al., 2004), la thérapeutique (Wang et al., 2011), les cosmétiques, la microélectronique (Tomsic et al., 2009), les encres conductrices et les adhésifs (Akaighe et al., 2011).

Français Les nanoparticules d'argent (AgNP) sont généralement synthétisées par réduction chimique (Peterson et al., 2007), irradiation (Shao et Yao, 2006) et ablation laser (Tsuji et al., 2002), qui sont à faible rendement, énergivores, difficiles à mettre à l'échelle, produisant souvent des niveaux élevés de déchets dangereux, et peuvent nécessiter l'utilisation de solvants organiques et d'agents réducteurs toxiques (Wani et al., 2013). La synthèse verte de nanoparticules a gagné en importance significative ces dernières années et est devenue l'une des méthodes les plus privilégiées pour obtenir des nanoparticules biocompatibles, rentables, propres, non toxiques, facilement mis à l'échelle pour une synthèse à grande échelle et respectueuses de l'environnement (Dobrucka et Dlugaszewska, 2015). Diverses bactéries (Chaudhari et al., 2012 ; Saifuddin et al., 2009), champignons (Gade et al., 2008 ; Vigneshwaran et al., 2007) et sources végétales (Masurkar et al., 2011 ; Raut et al., 2010) ont été utilisées pour réaliser la synthèse verte de nanoparticules d'argent.

Le développement de pathogènes résistants, voire multirésistants, est devenu un problème majeur (Schaller et al., 2004). Les recherches sur l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent se sont multipliées (Durán et al., 2010 ; Gade et al., 2008). Dans cet article, les souches de *S. aureus* et d'*E. coli* ont été sélectionnées comme modèles de bactéries Gram-positives et Gram-négatives afin de comprendre l'activité antibactérienne et le mécanisme d'action des AgNP produits par *B. licheniformis* NM120-17 aux niveaux cellulaire et subcellulaire.

Introduction

La recherche en nanotechnologie émerge comme une technologie de pointe qui est interdisciplinaire avec la physique, la chimie, la biologie, la science des matériaux et la médecine (Narayanan

Matériels et méthodes

Souches bactériennes et réactifs. Tous les produits chimiques et milieux

*Auteur correspondant : Eman Zakaria Gomaa, Département des sciences biologiques et géologiques, Faculté d'éducation, Université Ain Shams, Le Caire, Égypte.

Courriel : emann7778@yahoo.com

Aucun des auteurs de ce manuscrit n'a de relation financière ou personnelle avec d'autres personnes ou organisations qui pourraient influencer de manière inappropriée leur travail.

Les organismes utilisés étaient de la plus haute pureté et achetés auprès de Sigma-Aldrich. Les organismes d'essai utilisés pour le test antibactérien étaient *Bacillus subtilis* NCTC10400, *Bacillus cereus* ATCC1589, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, pneumonie de *Klebsiella* ATCC10031, *Salmonella typhi* NCIMB9331, *Escherichia coli* ATCC10536 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 comme souches indicatrices. Toutes ces souches ont été obtenues auprès de la Fermentation Bio-technology and Applied Microbiology (FERM-BAM) Centre, Université Al-Azhar, Le Caire, Égypte. La bactérie les souches ont été maintenues par sous-culture périodique sur gélose nutritive et conservée à 4 °C avant utilisation. Toutes les solutions ont été préparées à partir d'eau déionisée ultrafiltrée de haute pureté. eau.

Isolément et criblage de bactéries productrices d'AgNP.

Un total de 17 échantillons différents de sols rhizosphériques de maïs, le blé et le riz ont été récoltés dans les champs agricoles de Gouvernorats du Caire, Kaluobia, Gizeh, Helwan et Dakahlia (Gomaa, 2012). Un échantillon (1 g) a été mis en suspension dans 100 ml de tampon phosphate 50 mM (pH 7,0), dilué en série dans le même tampon, et étalé sur gélose LB contenant (g/l) : tryptone, 10 ; extrait de levure, 5 ; NaCl, 10 et agar, 15) (Kalimuthu et al., 2008). Les plaques ont été incubées à 37 °C. pendant 2 à 3 jours. Après la période d'incubation, la bactérie les colonies ont été subcultivées dans le même milieu pour obtenir des colonies pures, qui ont été isolées et stockées à –80°C.

Le criblage des bactéries productrices de nanoparticules d'argent a été réalisée selon la méthode décrite par Gurunathan et coll. (2009). En bref, les isolats bactériens ont été cultivée d'abord en aérobie à 37 °C dans un milieu LB pendant 24 h. les cellules ont été récoltées par centrifugation à 10 000 × g pendant 20 min, et remis en suspension dans du milieu LB stérile pour obtenir une densité optique de 1,0 à 600 nm (DO600). Après incubation, la culture a été centrifugée (10 000 × g pendant 20 min) et le surnageant a été mélangé avec 1 mM de nitrate d'argent dans un Rapport 1:1. Le pH final du mélange réactionnel a été ajusté à 8,5 (Darroudi et al., 2010 ; Deepak et al., 2011). Les solutions résultantes ont été maintenues sous agitation conditions (200 tr/min) à 37 °C dans l'obscurité jusqu'à ce qu'un changement de couleur du jaune pâle au brun foncé a été observé.

Identification de la souche. Un isolat montrant l'efficacité le synthétiseur d'AgNPs a été identifié par l'ARNr 16S séquençage selon la méthode de Rochelle et al. (1995). Le séquençage génétique a été réalisé par Macrogen (Corée du Sud). Les séquences d'ADN ont été alignées à l'aide de Gene Communication Mapper® v.4.1 et Data Collection v.3.1 Patch1. Le gène de l'ARNr 16S bactérien a été amplifié à l'aide de amorces universelles suivantes pour les eubactéries : amorce directe 27 F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') et inversement amorce 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'). Le séquençage a été réalisé en utilisant le terminateur Big Dye Kit de séquençage cyclique (Applied BioSystems). Séquençage les produits ont été résolus sur un modèle Applied Biosystems Système de séquençage d'ADN automatisé 3730XL (Appliqué BioSystems). L'analyse de séquence a été réalisée à partir de séquences de la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI), États-Unis, à l'aide du Basic Local Outil de recherche d'alignement pour les nucléotides (BLASTN), (Altschul et al., 1997).

Techniques de caractérisation.

Analyse spectrale UV-visible : Argent synthétisé

les nanoparticules ont été confirmées par une analyse spectrale UV-visible à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 5000 UV-Vis-NIR (Varian, Australie).

Taille des particules : Distributions granulométriques de ces échantillons ont également été obtenus en utilisant le Zeta sizer Nano ZS (Malvern Instruments, Southborough, Royaume-Uni) utilisant un angle de détection de 90° et un laser He-Ne de 60 mW fonctionnant à une longueur d'onde de 633 nm.

Microscopie électronique à transmission (MET) et énergie

Analyse des spectres de rayons X dispersifs (EDX) : les études sur la morphologie, la taille et la distribution des nanoparticules ont été réalisée à l'aide d'un microscope électronique à transmission (Tecnai G20, Super twin, double tilt, FEI, Pays-Bas). L'analyse TEM a été réalisée à l'aide d'un microscope PHILIPS Instrument CM 200 fonctionnant à une tension d'accélération de 200 kV avec une résolution de 0,23 nm. Analyse EDX a été réalisée à l'aide du JEOL JSM 7600F.

Diffraction des rayons X et infrarouge à transformée de Fourier analyse par spectroscopie (FT-IR) : La formation et la qualité des composés ont été vérifiées par diffraction des rayons X Spectre (DRX). La FT-IR (spectre Perkin Elmer, Jasco-6100) a été utilisée pour identifier les biomolécules associées avec la synthèse de nanoparticules d'argent par des bactéries. Les nanoparticules d'argent séchées ont été broyées avec du KBr pastilles et mesurées dans la gamme de longueurs d'onde de 4000 à 400 cm⁻¹.

Activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent. L'efficacité antibactérienne des nanoparticules d'argent a été vérifiée par la méthode de diffusion en puits d'agar (Perez). et al., 1990). Chaque expérience a été réalisée en triple et le diamètre moyen des zones d'inhibition était enregistré.

Courbes de croissance bactérienne et détermination de la CMI . croissance de bactéries exposées à diverses concentrations de La poudre d'AgNPs (0, 25, 50 et 100 mg/ml) a été mesurée pendant 16 h en prenant les mesures de la densité optique (DO) à 600 nm à intervalles de 2 h. La concentration minimale inhibitrice (CMI) des AgNP a été déterminée à l'aide de la plaque méthode de comptage (Magana et al., 2008). Les valeurs de CMI étaient interprétées comme la dilution la plus élevée (concentration la plus faible) de l'échantillon qui n'a montré aucune croissance.

Effet des AgNP sur la fuite de protéines et la réduction sucres des membranes cellulaires bactériennes. La fuite de protéines et des sucres réducteurs à travers les membranes a été déterminée. La concentration en AgNP a été ajustée à 50 mg/ml et la concentration de cellules bactériennes était de 105 UFC/ml. Chaque culture a été incubée dans un incubateur à agitation à 37 °C pendant 6 h. Des expériences témoins ont été réalisées. sans AgNP. Les protéines et les sucres réducteurs étaient déterminés par les méthodes décrites par Lowry et al. (1951) et Miller (1959), respectivement.

Effet des AgNP sur l'activité enzymatique des voies respiratoires déshydrogénases à chaîne simple. L'activité déshydrogénase était déterminé selon la méthode d'Iturriaga et al. (2001). Dans des conditions physiologiques, incolore Le chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT) est réduit par la déshydrogénase de la chaîne respiratoire bactérienne en une eau rouge foncé.

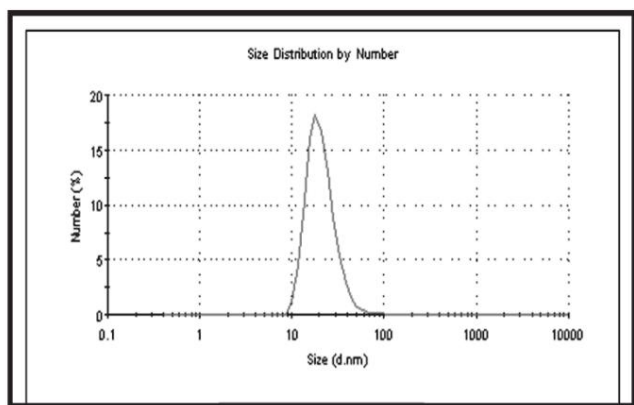


Fig. 1. Distribution granulométrique des nanoparticules d'argent synthétisées par *B. licheniformis*.

iodonitrotétrazolium formazan (INF) ter-insoluble ; ainsi, l'activité déshydrogénase peut être déterminée par la variation de la valeur spectrophotométrique de l'INF. L'activité déshydrogénase a ensuite été calculée en fonction de l'absorbance spectrophotométrique maximale de l'INF à 490 °C. nm.

Détection des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO formées par les AgNP ont été identifiées à l'aide de diacétate de 2',7'-dichlorofluorescéine (DCFDA) (Kye et al., 1999).

Le ROS a été détecté à 485/20 nm de longueur d'onde d'excitation de fluorescence et à 528/20 nm de longueur d'onde d'émission à l'aide d'un lecteur multi-détection de fluorescence.

Analyse statistique. Toutes les expériences ont été répétées au moins trois fois. Les résultats ont été présentés sous forme de moyennes $\pm$ écart type. Toutes les données expérimentales ont été comparées à l'aide du test t de Student. Une valeur p inférieure à 0,05 était considérée comme statistiquement significative.

Résultats et discussion

Criblage de bactéries productrices de nanoparticules d'argent

Trente souches bactériennes ont été isolées dans des champs agricoles de différentes localités d'Égypte. Le criblage des bactéries productrices de nanoparticules d'argent a été principalement réalisé en observant le changement de couleur du surnageant de culture, après mélange avec du nitrate d'argent, du jaune pâle au brun foncé. Seuls 10 % des isolats (3 souches) présentaient une couleur brun foncé. Afin de confirmer la formation de nanoparticules d'argent (AgNP), les surnageants ont été analysés par un spectre d'absorption UV-Vis dans la plage de 300 à 700 nm. Parmi ceux-ci, un seul isolat présentait un pic d'absorption centré à 420 nm, caractéristique des AgNP, et a donc été sélectionné pour une étude plus approfondie (données non présentées). Pour confirmer l'identification de l'isolat sélectionné, une analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S a été réalisée. L'alignement des séquences à l'aide du logiciel BLASTN pour la comparaison jusqu'à 1 500 pb a indiqué que la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche *Bacillus licheniformis* NM120-17 présente une forte homologie (98 %) avec celle de *Bacillus licheniformis* NRRL B-14262.

La couleur brune caractéristique résulte de l'excitation de la résonance plasmonique de surface dans les nanoparticules métalliques d'argent et fournit une signature pratique de leur

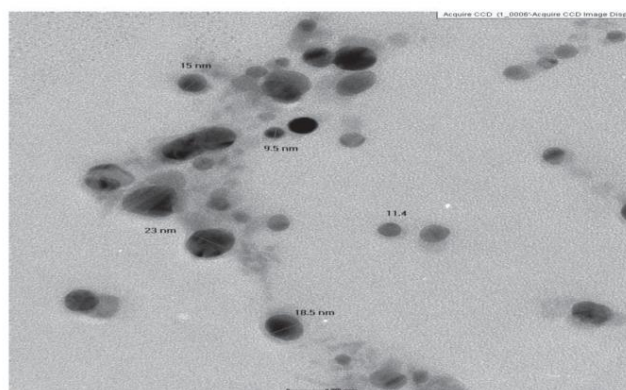
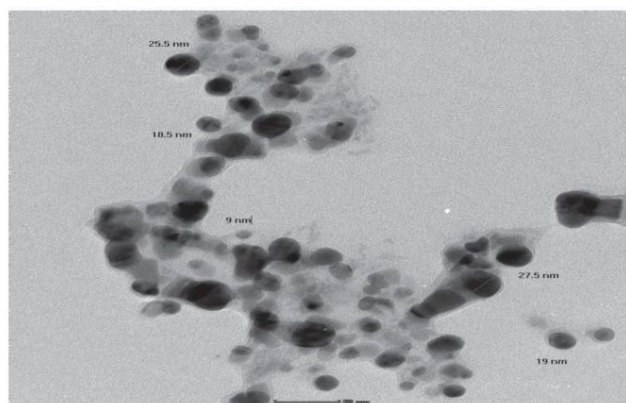


Fig. 2. Images TEM de nanoparticules d'argent synthétisées par *B. licheniformis*.

Les barres d'échelle mesurent respectivement 50 nm et 20 nm. L'encart montre la zone sélectionnée du diagramme diffractométrique des nanoparticules d'argent synthétisées.

Formation (El-Naggar et al., 2014). Les nanoparticules métalliques possèdent des électrons libres, ce qui entraîne une bande d'absorption de résonance plasmonique de surface (SPR), due à la vibration combinée des électrons des nanoparticules métalliques en résonance avec une onde lumineuse. Une seule bande de résonance plasmonique de surface (SPR) correspond aux nanoparticules sphériques, tandis que deux bandes SPR ou plus correspondent aux molécules anisotropes (Pal et al., 2007 ; Saifuddin et al., 2009).

L'observation de ce pic net et clair, attribué à un plasmon de surface, a été bien documentée pour diverses nanoparticules métalliques dont les tailles s'étendent de 2 à 100 nm (Kowshik et al., 2003).

La biosynthèse des nanoparticules d'argent par *B. licheniformis* NM120-17 s'est produite en 24 h, ce qui est relativement rapide et a nécessité moins de temps que pour les souches précédemment publiées (Chaudhari et al., 2012 ; Kalimuthu et al., 2008 ; Kalishwaralal et al., 2010). Une substance polymère extracellulaire a joué un rôle essentiel dans la réduction des ions argent et la stabilisation des nanoparticules lors de l'utilisation de l'extrait acellulaire (Padman et al., 2014). Le mécanisme le plus largement admis de la biosynthèse de l'argent est la présence de l'enzyme nitrate réductase. Cette enzyme convertit le nitrate en nitrite et l'électron est transféré à l'ion argent ; celui-ci est alors réduit en argent (Ag^+ en Ag^0).

(Vaidyanathan et al., 2010). Il est à noter que le pH du surnageant de culture a été ajusté à 8,5 avec de la soude. Le pH alcalin augmente la vitesse de réaction de synthèse et favorise la synthèse de nanoparticules de plus petite taille (Deepak et al., 2011). De plus, en milieu alcalin

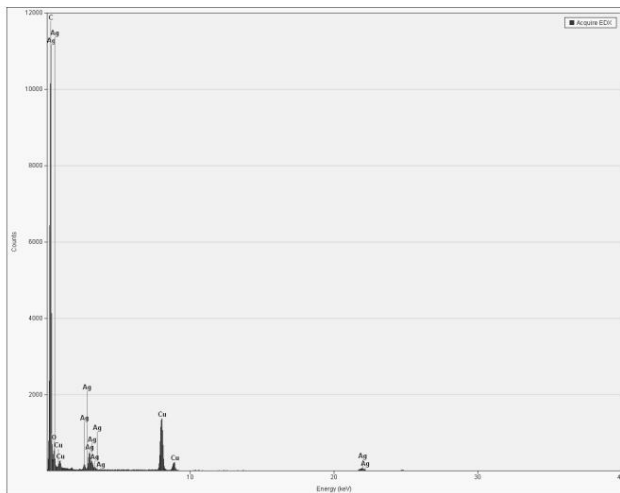


Fig. 3. Spectre EDX des nanoparticules d'argent synthétisées par B. licheniforme.

conditionne la capacité de l'enzyme responsable de la la synthèse des nanoparticules d'argent augmente.

Caractérisation des nanoparticules d'argent

Distribution granulométrique. La distribution granulométrique par intensité donne un motif en forme de cloche qui indique la large distribution de la taille des nanoparticules dans la formulation de l'échantillon, comme indiqué dans la Fig. 1. La taille des nanoparticules d'Ag La dispersion était comprise entre 10,1 nm et 68,06 nm. La taille moyenne des particules (d 50) devrait être de 18,17 nm.

Microscopie électronique à transmission (MET) et énergie
Analyse des spectres de rayons X dispersifs (EDX). La morphologie, la taille et la distribution des nanoparticules ont été observées. par micrographies TEM (Fig. 2). La morphologie de les nanoparticules étaient de nature sphérique et uniformément distribuées. La taille des nanoparticules d'argent variait de 9 à 27,5 nm et la taille moyenne a été estimée à 17 nm. La présence d'argent élémentaire dans la solution de nanoparticules synthétisées biologiquement a été confirmée par Analyse EDX (Fig. 3) où une forte absorption optique des pics ont été observés à environ 3 keV, ce qui est typique de l'absorption des nanocristallites d'argent métallique en raison de la résonance plasmonique de surface. Quelques signaux plus faibles Des émissions de C et d'O ont également été enregistrées, ce qui peut être dû aux émissions de rayons X de l'organisme (Mouxing et al., 2006).

Études de DRX. Une analyse par diffraction des rayons X a été réalisée pour confirmer la nature cristalline de l'argent. nanoparticules. Le diagramme de DRX a montré un certain nombre de réflexions qui peuvent être indexées sur la base de la structure cubique à faces centrées de l'argent. Une comparaison de nos Le spectre XRD avec l'étalon a confirmé que l'argent les particules formées dans nos expériences étaient sous la forme de nanocristaux, comme en témoignent les trois pics de diffraction distincts à 2 valeurs de $30,91^\circ$, $34,50^\circ$ et $46,30^\circ$ qui sont indexées comme les réflexions de Bragg (111), (200) et (220), respectivement, et qui peuvent être indexées en fonction de la structure cubique à faces centrées de l'argent (Fig. 4). des pics pointus confirment clairement la nature cristalline du nanoparticules synthétisées, ce qui est en bon accord avec rapports antérieurs (Anuj et Ishnava, 2013). Les données non attribuées

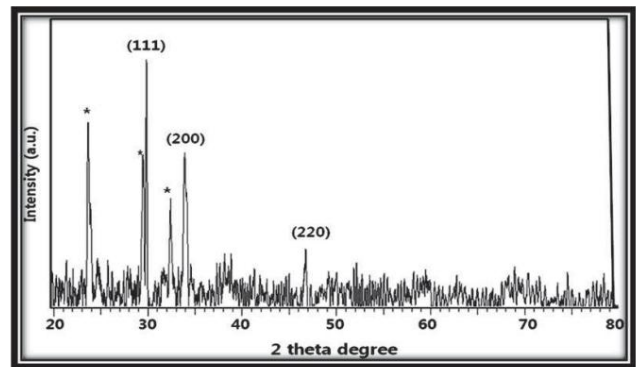


Fig. 4. Diagramme de DRX des nanoparticules d'argent synthétisées par B. licheniforme.

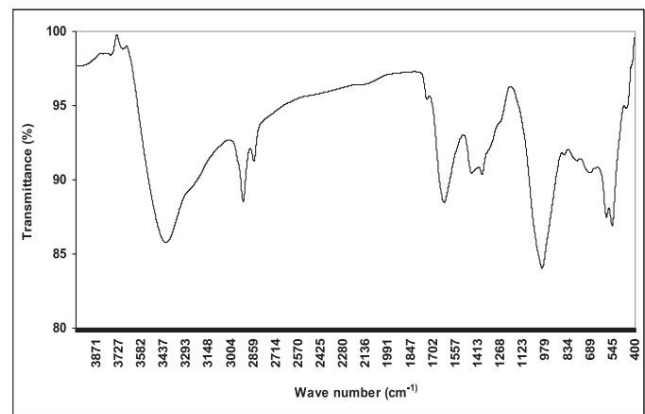


Fig. 5. Spectre FTIR des nanoparticules d'argent synthétisées par B. licheniforme.

pics présents dans le spectre, notés (*), indiqués la présence de moins de biomolécules d'agents stabilisants d'enzymes ou de protéines dans l'extrait bactérien acellulaire (Daizy, 2009).

Spectroscopie FT-IR. La mesure FT-IR a été réalisée identifier les biomolécules possibles pour le coiffage et les Stabilisation efficace des nanoparticules d'argent synthétisées par bouillon bactérien. Les pics sont à 3 423 et 2 924 cm^{-1} a révélé la présence d'une courbure NH, indiquant la groupes amines primaires et secondaires des protéines (Fig. 5). De même, les bandes à 1629 et 1453 cm^{-1} correspondent à les groupes amines primaires et secondaires de la flexion NH et les vibrations d'étirement du carbonyle des protéines, respectivement (Sawle et al., 2008). Par conséquent, l'étude FTIR a ont montré que les groupes carbonyles des résidus d'acides aminés, comme Tout comme les peptides des protéines, ils possèdent une plus forte capacité de liaison aux métaux (Sathyavati et al., 2010). Il est fort probable que les protéines forment une couche recouvrant le nanoparticules et agissent comme agents de coiffage pour l'argent formation de nanoparticules pour éviter l'agglomération des nanoparticules ; stabilisant ainsi les particules (Mallikarjuna et al., 2011). De plus, la bande à 1739 cm^{-1} correspond aux vibrations d'étirement C=O du groupe aldéhyde. Par conséquent, les observations indiquent que les bioréductions du nitrate d'argent sont liées à l'oxydation de groupes hydroxyles dans le filtrat des cellules bactériennes (Sangi et Verma, 2009). L'ensemble des observations suggère que les paramètres biologiques

Tableau 1. Activité antibactérienne des nanoparticules d'argent produites par Bacillus licheniformis contre les micro-organismes testés.

Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
	Surnageant de B. licheniformis	AgNO3 AgNPs	Streptomycine (témoin positif)
Bacillus subtilis NCTC10400	-	3 ± 0,2	10 ± 0,12
Bacillus cereus ATCC1589	-	9 ± 0,15	13 ± 0,05
Staphylococcus aureus ATCC29213	-	8 ± 0,13	17 ± 0,16
Pneumonie à Klebsiella ATCC10031	-	3 ± 0,01	7 ± 0,14
Salmonella typhi NCIMB9331	-	5 ± 0,00	12 ± 0,02
Escherichia coli ATCC10536	-	7 ± 0,31	15 ± 0,3
Pseudomonas aeruginosa ATCC10145	-	6 ± 0,01	9 ± 0,08

Les valeurs sont des moyennes ± ET de 3 expériences distinctes.
— Aucune zone d'inhibition.

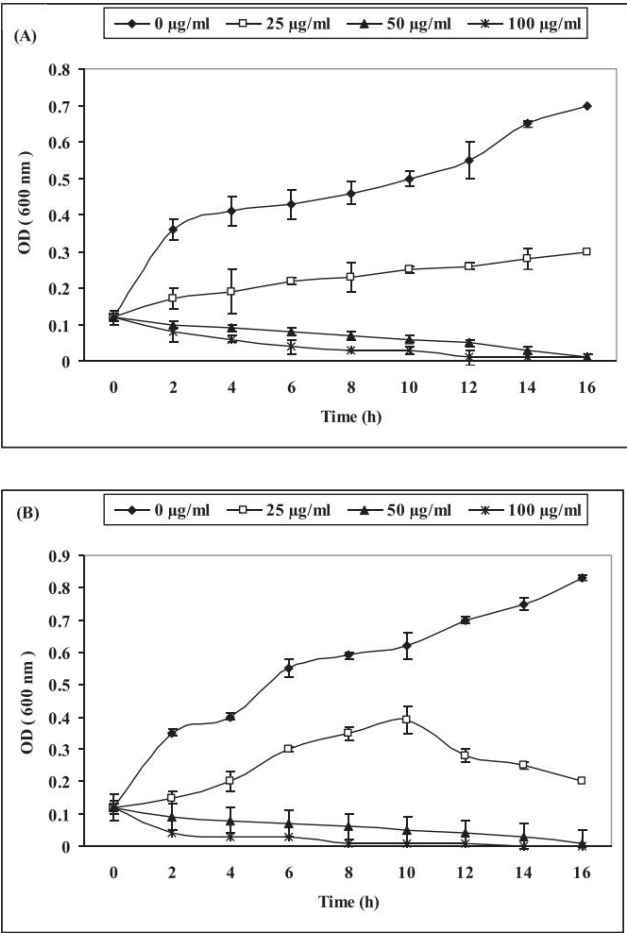


Fig. 6. Courbes de croissance des cellules S. aureus (A) et E. coli (B) exposées à différentes concentrations (g/ml) d'AgNPs dans des conditions normales.

Les données sont la moyenne d'expériences en triple. Les barres d'erreur représentent écarts types de lectures en triple.

les molécules pourraient éventuellement être la raison de la formation et la stabilisation des nanoparticules métalliques dans la bactérie filtrat cellulaire.

Activité antibactérienne des nanoparticules d'argent. Argent les nanoparticules ont été évaluées pour leur effet antimicrobien activités contre un large éventail d'organismes pathogènes en utilisant la méthode de diffusion en puits d'agar. Après l'incubation temps, des zones claires ont été observées contre tous les organismes testés-

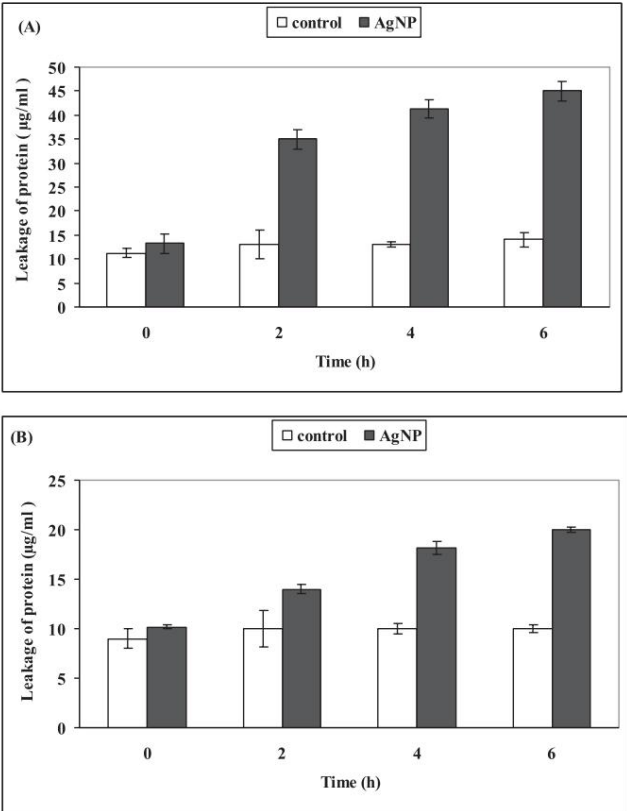


Fig. 7. Fuite de protéines des cellules S. aureus (A) et E. coli (B) exposés aux AgNP.

Le groupe AgNPs a été traité avec des AgNPs à une concentration de 50 mg/ml, et le témoin n'a pas été traité. Les données présentées sont la moyenne à partir d'expériences en triple. Les barres d'erreur représentent les écarts types de lectures en triple.

ismes par AgNPs et ont été enregistrés en millimètres (tableau 1). La sensibilité la plus élevée a été observée dans le cas de Staphylococcus aureus (17 mm), suivi d' Escherichia coli. (15 mm), puis Bacillus cereus (13 mm). L'efficacité de Les nanoparticules d'argent peuvent être attribuées à l'extrême petite taille et grande surface par rapport à leur volume (Pal et al., 2007). Ceci indique que les nanoparticules d'argent ont un excellent effet biocide et un potentiel de réduction croissance bactérienne dans les applications pratiques.

Courbe de croissance de S. aureus et E. coli exposés aux AgNP
Courbes de croissance des cellules bactériennes traitées avec différents

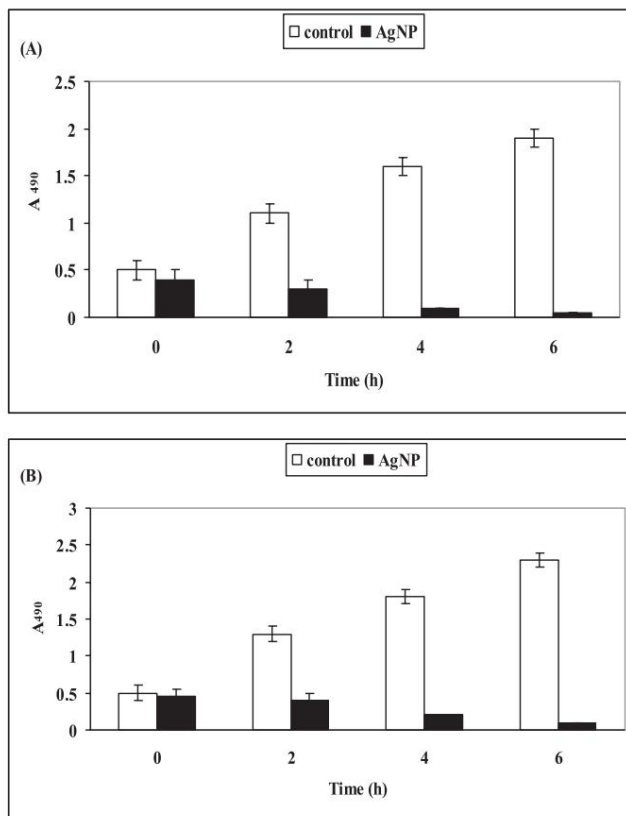


Fig. 8. Effet des AgNP sur les déshydrogénases de la chaîne respiratoire chez *S. aureus* (A) et *E. coli* (B) exposées aux AgNP.

Le groupe AgNPs a été traité avec des AgNPs à une concentration de 50 mg/ml, et le témoin n'a pas été traité. Les données présentées sont la moyenne à partir d'expériences en triple. Les barres d'erreur représentent les écarts types de lectures en triple.

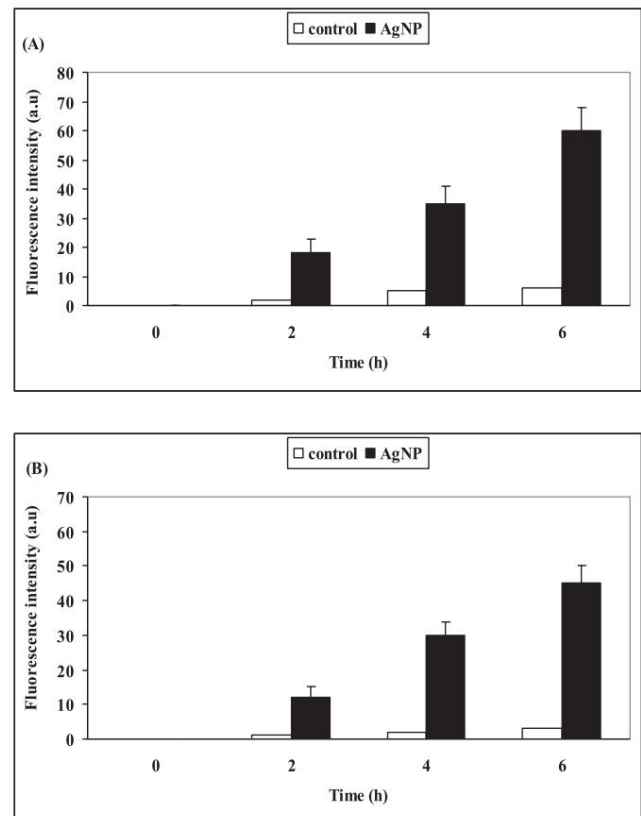


Fig. 9. Formation de ROS dans les cellules *S. aureus* (A) et *E. coli* (B) exposées aux AgNP.

Le groupe AgNPs a été traité avec des AgNPs à une concentration de 50 mg/ml pendant 0 h, 2 h, 4 h ou 6 h. Les données présentées sont la moyenne de l'expérience en triple. Les barres d'erreur représentent les écarts types des lectures en triple.

Les concentrations d'AgNP ont indiqué que les AgNP pouvaient inhiber la croissance et la reproduction des cellules bactériennes (Fig. 6A et B). La croissance bactérienne des cellules traitées avec 25 mg/ml d'AgNPs était légèrement inférieure à celle des cellules dans le groupe témoin, tandis que la croissance des cellules bactériennes traitées avec 50 et 100 mg/ml ont été fortement inhibées. Il est intéressant de noter qu'après comparaison de la croissance bactérienne courbes, les courbes de croissance des bactéries traitées aux AgNPs ont indiqué une inhibition de la croissance plus rapide d'*E. coli* que de *S. aureus*. Lorsque la concentration d'AgNP était de 50 mg/ml, aucune croissance de *S. aureus* et d'*E. coli* n'a pu être détectée, ce qui indique que la CMI des AgNPs pour *S. aureus* et *E. coli* était 50 mg/ml.

Effet des AgNP sur la fuite membranaire des protéines et des sucres réducteurs. Résultats cités dans les figures 7A et B ont indiqué que les AgNP pourraient améliorer la fuite de protéines en augmentant les perméabilités membranaires de *S. aureus* et *E. coli*. Initialement, la fuite de protéines des membranes des cellules bactériennes traitées avec des AgNPs était presque la même que celle des cellules du groupe témoin. Au début, la fuite de protéines des cellules dans l'expérience de contrôle était de 11,23 et 9,0 mg/ml, tandis que la fuite de protéines provenant de cellules traitées avec des AgNPs était de 13,25 et 10,14 mg/ml pour les cellules de *S. aureus* et d'*E. coli*, respectivement. La fuite des protéines dans les cellules de *S. aureus* et d'*E. coli* traitées aux AgNP pendant 4 h, les valeurs ont atteint respectivement 41,28 et 18,16 mg/ml.

6 h après l'incubation, la fuite de protéines des cellules traitées avec les AgNP ont considérablement augmenté ; cependant, il n'y avait pas de changement dans la quantité de fuite de protéines des cellules dans le groupe témoin. Notamment, des quantités plus élevées de protéines ont fui à travers les membranes de *S. aureus* par rapport à celles à travers les membranes d'*E. coli*, ce qui suggère que la sensibilité antibactérienne du *S. aureus* Gram-positif était supérieure à celle des *E. coli* Gram-négatifs.

De plus, il est révélé que les AgNP pourraient améliorer la fuite membranaire des sucres réducteurs (données non présentées). Au début, presque aucune fuite de sucres réducteurs n'a été détectée à partir des cellules bactériennes lors de l'expérience témoin. Après un traitement aux AgNP pendant 6 heures, la fuite a diminué. La quantité de sucres réducteurs était jusqu'à 100,5 et 60,22 mg/ml, respectivement, mais n'était que de 40,50 et 20,00 mg/ml l'expérience témoin. Ces résultats expérimentaux ont montré que les AgNP amélioraient apparemment la perméabilité des membranes cellulaires bactériennes. On pourrait donc en déduire que la turbulence de la perméabilité membranaire serait un facteur important. facteur d'inhibition de la croissance bactérienne. Mais il reste un mystère où les dommages ont lieu, sur le lipopolysaccharide ou les protéines membranaires de la membrane externe.

Effet des AgNP sur la déshydrogénase de la chaîne respiratoire. L'effet des AgNP sur l'activité déshydrogénase de la chaîne respiratoire des cellules de *S. aureus* et d'*E. coli* est montré dans les Fig. 8A et B. L'activité de l'enzyme dans le con-

42	GOMAA
L'activité du groupe témoin a augmenté considérablement avec le temps, tandis que son activité a diminué dans les cellules traitées aux AgNP. Ces résultats indiquent que l'activité de la déshydrogénase de la chaîne respiratoire pourrait être inhibée par les AgNP. On suppose que les AgNP peuvent franchir la barrière de perméabilité de la membrane externe, du peptidoglycane et du périplasme, et détruire les déshydrogénases de la chaîne respiratoire, inhibant ainsi la respiration des cellules (Li et al., 2010). Formation de ROS à partir de cellules bactériennes traitées aux AgNP. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des sous-produits naturels du métabolisme des organismes respirants. Si de faibles concentrations peuvent être contrôlées par les défenses antioxydantes des cellules, telles que le rapport glutathion/disulfure de glutathion (GSH/GSSG), une production excessive de ROS peut entraîner un stress oxydatif (Nel et al., 2006). La génération supplémentaire de radicaux libres peut attaquer les lipides membranaires et entraîner une dégradation des fonctions membranaires et mitochondriales, ou endommager l'ADN (Mendis et al., 2005). Il a été rapporté que l'activité antibactérienne des AgNP est liée à la formation de radicaux libres (Kim et al., 2007). De plus, les radicaux libres générés par les AgNP induisent des lésions membranaires des cellules bactériennes. Les ROS peuvent exister naturellement dans des zones intracellulaires et extracellulaires (Danilczuk et al., 2006). Dans certaines conditions, des niveaux élevés de ROS peuvent augmenter le stress oxydatif dans les cellules. Le stress oxydatif peut non seulement endommager la membrane cellulaire, mais aussi les protéines, l'ADN et les systèmes intracellulaires tels que le système respiratoire. Dans cette étude, les ROS ont été mesurés à l'aide de DCFDA. Après 6 h d'incubation, une production significativement accrue de ROS a été détectée dans le groupe de <i>S. aureus</i> et d'<i>E. coli</i> traités aux AgNPs, mais pas dans le groupe témoin (Fig. 9A et B). Ces résultats indiquent que les AgNPs peuvent former des ROS avec l'eau et, par conséquent, la membrane cellulaire bactérienne, la structure protéique et le système intracellulaire peuvent être endommagés en raison des ROS formés par les AgNPs.	Aperçu de la biogenèse bactérienne des nanoparticules d'argent, de leur production industrielle et de leur transposition à grande échelle. Dans <i>Metal Nanoparticles in Microbiology</i>, éd. par Rai, M., Duran, N., Berlin, pp. 17–35. Dobrucka, R. et Dlugaszewska, J. (2015) Activités antimicrobiennes des nanoparticules d'argent synthétisées en utilisant un extrait aqueux d' <i>Arinicae anthodium</i>. <i>Ind. J. Microbiol.</i>, 55, 168–174. Durán, N., Marcato, PD, Ingle, A., Gade, A., et Rai, M. (2010) Synthèse de nanoparticules d'argent médiée par des champignons, procédés de caractérisation et applications. <i>Prog. Mycol.</i>, 425–449. El-Naggar, NE, Abdelwahed, NAM et Darwesh, OMM (2014) Fabrication de nanoparticules d'argent antimicrobiennes biogéniques par <i>Streptomyces aegyptia</i> NEAE 102 comme nano-usine écologique. <i>J. Microbiol. Biotechnol.</i>, 244, 453–464. Gade, A., Bonde, P., Ingle, AP, Marcato, PD, Durán, N. et al. (2008) Exploitation d' <i>Aspergillus niger</i> pour la synthèse de nanoparticules d'argent. <i>J. Biobased Mater. Bioenergy</i>, 2, 243–247. Gomaa, EZ (2012) Production de chitinase par <i>Bacillus thuringiensis</i> et <i>Bacillus licheniformis</i> : leur potentiel dans la lutte biologique antifongique. <i>J. Microbiol.</i>, 50, 103–111. Gurunathan, S., Kalishwaralal, K., Vaidyanathan, R., Deepak, V., Pandian, SRK et al. (2009) Biosynthèse, purification et caractérisation de nanoparticules d'argent à l'aide d' <i>Escherichia coli</i>. <i>Colloid Surf. B</i>, 74, 328–335. Iturriaga, R., Zhang, S., Sonek, GJ, et Stibbs, H. (2001) Détection de l'activité enzymatique respiratoire dans les kystes de <i>Giardia</i> et les oocystes de <i>Cryptosporidium</i> à l'aide de colorants redox et de techniques d'immunofluorescence. <i>J. Microbiol. Méthodes</i>, 46, 19–28. Kalimuthu, K., Babu, RS, Venkataraman, D., Bilal, M. et Gurunathan, S. (2008) Biosynthèse de nanocristaux d'argent par <i>Ba-cillus licheniformis</i>. <i>Surf colloïdal. B</i>, 65, 150-153. Kalishwaralal, K., Barathmanikant, S., Pandian, SRK, Deepak, V., et Gurunathan, S. (2010) Les nanoparticules d'argent empêchent la formation de biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Staphylococcus epidermidis</i>. <i>Colloid Surf. B</i>, 79, 340–344. Kim, JS, Kuk, E., Yu, KN, Kim, JH, Park, SJ et al. (2007) Effets antimicrobiens des nanoparticules d'argent. <i>Nanomed. Nanotechnologie</i>, 3, 95–101. Kowshik, M., Ashtaputre, S., Kharrazi, S., Vogel, W., Urban, J. et al. (2003) Synthèse extracellulaire de nanoparticules d'argent par une souche de levure tolérante à l'argent MKY3. <i>Nanotechnologie</i>, 14, 95–100. Kye, IS, Jeon, YS, No, JK, Kim, YJ, Lee, KH et al. (1999) Activité réactive de piégeage de l'oxygène des polyphénols du thé vert. <i>J. Corée Gerontol.</i>, 9, 10–17. Li, WR, Xie, XB, Shi, QS, Zeng, HY, Ou-Yang, YS et al. (2010) Activité antibactérienne et mécanisme des nanoparticules d'argent sur <i>Escherichia coli</i>. <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i>, 85, 1115–1122. Lowry, OH, Rosebrough, N., Farr, AL, et Randall, RJ (1951) Mesure des protéines avec le réactif au phénol de Folin. <i>J. Biol. Chem.</i>, 193, 265–275. Magana, SM, Quintana, P., Aguilar, DH, Toledo, JA, Angeles-Chavez, C. et al. (2008) Activité antibactérienne des montmorillonites modifiées avec de l'argent. <i>J. Mol. Catal. A, Chem.</i>, 281, 192–199. Mallikarjuna, K., Narasimha, G., Dillip, GR, Praveen, B., Shreedhar, B. et al. (2011) Synthèse verte de nanoparticules d'argent à partir d'extrait de feuille d'ocimum et leur caractérisation. <i>Digest J. Nanomat. Biostruc.</i>, 6, 181–186. Masurkar, SA, Chaudhari, PR, Shidore, VB et Kamble, SP (2011) Biosynthèse rapide de nanoparticules d'argent à l'aide de citrates de <i>Cymbopogon</i> (citronnelle) et son activité antimicrobienne. <i>Nano. Micro. Lett.</i>, 3, 189–194. Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H., et Kim, S. (2005) Étude des effets antioxydants in vitro des peptides de gélatine de la peau de calmar géant <i>Dosidicus gigas</i>. <i>J. Life Sci.</i>, 77, 2166–2178. Miller, G. (1959) Utilisation du réactif d'acide dinitrosalicylique pour la détermination des sucres réducteurs. <i>Anal. Chem.</i>, 31, 426–429. Mouxing, FU, Qingbiao, LI, Daohua, SUN, Yinghua, LU, Ning, HE et al. (2006) Procédé de préparation rapide de nanoparticules d'argent par bioréduction et leur caractérisation. <i>Chinese J. Chem. Eng.</i>, 141, 114–117. Narayanan, K. et Sakthivel, N. (2010) Synthèse biologique de nanoparticules métalliques par des microbes. <i>Adv. Colloid Interface Sci.</i>, 153, 1–13. Nel, A., Xia, T., Madler, L., et Li, N. (2006) Potentiel toxique des matériaux riaux à l'échelle nanométrique. <i>Science</i>, 311, 622–627.
Références	
Akaighe, N., Mac Cusprie, RI, Navarro, DA, Aga, DS, Banerjee, S. et al. (2011) Formation de nanoparticules d'argent induite par l'acide humique dans des conditions environnementales pertinentes. <i>Environ. Sci. Technol.</i>, 45, 3895–3901. Altschul, SF, Thomas, LM, Alejandro, AS, Zhang, J., Zhang, Z. et al. (1997) Gapped BLAST et PSI-BLAST, une nouvelle génération de programmes de recherche de bases de données protéiques. <i>Nucleic Acids Res.</i>, 25, 3389– 3402. Anuj, SA et Ishnava, KB (2013) Synthèse végétale de nanoparticules d'argent en utilisant de la poudre de tige séchée de <i>Tinospora cordifolia</i>, son activité antibactérienne et comparaison avec les antibiotiques. <i>Int. J. Pharm. Biol. Sci.</i>, 44, 849–863. Chaudhari, PR, Masurkar, SA, Shidore, VB et Kamble, SP (2012) Effet des nanoparticules d'argent biosynthétisées sur l'extinction du biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> et la prévention de la formation de biofilm. <i>Int. J. Pharm. Biol. Sci.</i>, 3, 222–229. Daizy, P. (2009) Biosynthèse de nanoparticules d'Au, d'Ag et d'Au-Ag à partir d'extrait de champignon comestible. <i>Spect. Acta Part A, Mol. Biomol. Spect.</i>, 73, 374–381. Danilczuk, M., Lund, A., Saldo, J., Yamada, H. et Michalik, J. (2006) Résonance de spin électronique en conduction de petites particules d'argent. <i>Spect. Acta Partie A, Mol. Biomol. Spect.</i>, 63, 189–191. Darroudi, M., Ahmad, MB, Abdullah, AH, Ibrahim, NA, et Shameli, K. (2010) Effet de l'accélérateur dans la synthèse verte de nanoparticules d'argent. <i>Int. J. Mol. Sci.</i>, 11, 3898–3905. Deepak, V., Kalishwaralal, K., Pandian, SR et Gurunathan, S. (2011)	

- Padman, AJ, Henderson, J., Hodgson, S., et Rahman, KSM (2014) Synthèse biomédiée de nanoparticules d'argent à l'aide d' *Exiguobacterium mexicanum*. *Biotechnol. Lett.*, 36, 2079–2084.
- Pal, S., Tak, YK, et Song, JM (2007) L'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent dépend-elle de la forme de la nanoparticule ? Une étude de la bactérie Gram-négative *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 276, 1712-1720.
- Perez, C., Paul, M., et Bazerque, P. (1990) Dosage des antibiotiques par la méthode de diffusion en puits d'agar. *Acta Biol. Med. Exp.*, 15, 113–115.
- Peterson, MSM, Bouwman, J., Chen, A. et Deutsch, M. (2007) Matériaux métallo-diélectriques inorganiques fabriqués à l'aide de deux méthodes en une seule étape basées sur le procédé de Tollen. *J. Colloid Interface Sci.*, 306, 41–49.
- Raut, R., Lakkakula, JR, Kolekar, N., Mendhulkar, VD et Kashid, SB (2010) Synthèse extracellulaire de nanoparticules d'argent à l'aide de feuilles séchées de *Pongamia pinnata* (L) pierre. *Nano Micro. Lett.*, 2, 106-113.
- Rochelle, PA, Will, JAK, Fry, JC, Jenkins, GJS, Parkes, RJ et al. (1995) Extraction et amplification des gènes d'ARNr 16S à partir de sédiments marins profonds et d'eau de mer pour évaluer la diversité des communautés bactériennes. Dans *Nucleic Acids in the Environment*, éd. par Trevors, J. T. et van Elsas, JD, Springer, Berlin, pp.
- Saifuddin, N., Wong, CW, et Nuryasumira, AA (2009) Biosynthèse rapide de nanoparticules d'argent à l'aide de surnageant de culture de bactéries avec irradiation par micro-ondes. *EJ. Chem.*, 6, 61–70.
- Sangi, R. et Verma, P. (2009) Synthèse biomimétique et caractérisation de nanoparticules d'argent recouvertes de protéines. *Bioresour. Technol.*, 100, 501–504.
- Sathyavati, R., Krishna, MB, Rao, SV, Saritha, R. et Rao, DN (2010) Biosynthèse de nanoparticules d'argent à partir d'extrait de feuille de *Coriandrum sativum* et leur application en optique non linéaire. *Sci. Lett.*, 31, 138–143.
- Sawle, BD, Salimath, B., Deshpande, R., Bedre, MD, Prabhakar, B. K. et al. (2008) Biosynthèse et stabilisation de l'au et de l'au-Ag Nanoparticules d'alliage par le champignon *Fusarium semitectum*. *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 9, 35–42.
- Schaller, M., Laude, J., Bode, H., Hamm, G., et Kortling, HC (2004) Toxicité et activité antimicrobienne d'un pansement hydrocolloïde contenant des particules d'argent dans un modèle ex vivo d'infection cutanée. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 17, 31–36.
- Shao, K. et Yao, J. (2006) Préparation de nanoparticules d'argent par une méthode sans matrice. *Mater. Lett.*, 60, 3826–3829.
- Souza, GIH, Marcato, PD, Durn, N., et Esposito, E. (2004) Utilisation de *Fusarium oxysporum* dans la biosynthèse de nanoparticules d'argent et ses activités antibactériennes. IXe réunion nationale de microbiologie environnementale, Curitiba, PR, Brésil.
- Tomsic, B., Simoncic, B., Orel, B., Zerjav, M., et Schroers, HJ (2009) Activité antimicrobienne de l'AgCl incorporé dans une matrice de silice sur tissu de coton. *Carbohydr. Polym.*, 75, 618–626.
- Tsuji, T., Iryo, KN, Watanabe, N., et Tsuji, M. (2002) Préparation de nanoparticules d'argent par ablation laser en solution, influence de la longueur d'onde du laser sur la taille des particules. *Appl. Surf. Sci.*, 202, 80–85.
- Vaidyanathan, R., Gopalram, S., Kalishwaralal, K., Deepak, V., Pandian, SR et al. (2010) Synthèse améliorée de nanoparticules d'argent par optimisation de l'activité de la nitrate réductase. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 75, 335–341.
- Vigneshwaran, N., Ashtaputre, NM, Varadarajan, PV, Nachane, R. P., Paralikal, KM et al. (2007) Synthèse biologique de nanoparticules d'argent à l'aide du champignon *Aspergillus flavus*. *Mater. Lett.*, 61, 1413–1418.
- Wang, XF, Li, SF, Yua, HG, et Yu, JG (2011) Synthèse par échange d'anions in situ et activité photocatalytique de nanobâtonnets à noyau-coquille de nanoparticules Ag₈W₄O₁₆/AgCl. *J. Mol. Catal. A. Chem.*, 334, 52– 59.
- Wani, IA, Khatoon, S., Ganguly, A., Ahmed, J., et Ahmad, T. (2013) Caractérisation structurale et propriétés antimicrobiennes des nanoparticules d'argent préparées par la méthode de microémulsion inverse. *Colloid Surf. B*, 101, 243–250.