



Article

Nanoparticules d'argent biogéniques traitées deux fois à l'aide d'urée 8M Présentent une activité antibactérienne et antifongique supérieure à Homologues commerciaux synthétisés chimiquement

Terrence Ravine 1,* , Qunying Yuan  1 et Makenna Howell

¹ Département des sciences biomédicales, University of South Alabama, Mobile, AL 36688, États-

² Unis Sciences biologiques et environnementales, Alabama A&M University, Normal, AL 35762, États-

Unis * Correspondance : travine@southalabama.edu

Résumé : Des nanoparticules d'argent biogéniques (b-AgNP) ont été produites de manière extracellulaire à l'aide d'un lysat cellulaire d'*Escherichia coli* génétiquement modifié et subdivisées en trois groupes. Chaque groupe a reçu un traitement différent pour déterminer lequel éliminait le mieux le lysat cellulaire résiduel. Le premier groupe a été traité deux fois en utilisant uniquement de l'eau (eau × 2), le deuxième en utilisant de l'urée 8 M une fois (urée 8 M × 1) et le troisième en utilisant de l'urée 8 M deux fois (urée 8 M × 2). Par la suite, chaque groupe a été évalué pour sa capacité à inhiber la croissance de six agents pathogènes bactériens et de deux agents pathogènes fongiques. Les tests ont été réalisés en utilisant la méthode de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les c-AgNP produits commercialement ont été inclus à des fins de comparaison. Dans tous les cas, les b-AgNP (urée 8 M × 2) ont démontré la plus grande inhibition de la croissance microbienne. À l'inverse, les AgNP commerciaux n'ont montré aucune inhibition de la croissance à 10 µg/mL, la concentration la plus élevée testée. On pense que la plus grande activité antibactérienne des b-AgNP (8 M d'urée × 2) par rapport aux b-AgNP (8 M d'urée × 1) et aux b-AgNP (eau × 2) est due à un plus grand degré de biofonctionnalisation (revêtement). pendant les deux traitements séquentiels à l'urée 8M.



Citation : Ravine, T. ; Yuan, Q. ;

Howell, M. Les nanoparticules d'argent biogéniques traitées deux fois à l'aide d'urée 8M présentent une activité antibactérienne et antifongique supérieure à celle de leurs homologues commerciaux synthétisés chimiquement.

Nano 2022, 3, 187-201. <https://doi.org/10.3390/applnano3040014>

Rédacteur académique : Ramaraj Boopathy

Reçu : 27 septembre 2022

Accepté : 28 octobre 2022

Publié : 31 octobre 2022

Note de l'éditeur : MDPI reste neutre en ce qui concerne les revendications juridictionnelles dans les cartes publiées et les affiliations institutionnelles.



Copyright : © 2022 par les auteurs.

Licencié MDPI, Bâle, Suisse.

Cet article est un article en libre accès distribué selon les termes et conditions des Creative Commons

Licence d'attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Mots-clés : biogénique ; des nanoparticules d'argent ; 8M d'urée ; activité anti-microbienne; concentration minimale inhibitrice ; fonctionnalisés

1. Introduction

Des nanoparticules métalliques (NP) antimicrobiennes sont régulièrement incorporées dans divers matériaux pour empêcher les microbes tels que les bactéries et les champignons de les détruire. Par exemple, l'ajout de NP biocides aux textiles peut stopper/ralentir la détérioration des matériaux, prolongeant ainsi leur utilisation. Les nanoparticules d'argent (AgNP) sont très efficaces soit pour réduire le nombre de microbes contaminants, soit pour les éliminer complètement. Cela permet donc de limiter leur propagation. Les AgNP biocides ont été intégrées dans des pansements et des dispositifs médicaux tels que des implants dentaires, des implants cardiovasculaires et des sondes d'imagerie. D'autres applications médicales incluent l'utilisation des AgNP comme agents antibiofilm, agents antitumoraux et promoteurs de cicatrisation osseuse. De plus, les AgNP sont superposés sur des dispositifs optoélectroniques utilisés dans l'industrie électronique pour contrôler la croissance microbienne [1,2].

L'utilité des AgNP a conduit à une croissance explosive de l'industrie des nanobiotechnologies. Cela a provoqué une augmentation correspondante de la production d'AgNP. En 2011, on estimait que près de 280 tonnes d'AgNPs étaient produites à des fins commerciales ou industrielles [3]. Ce chiffre est passé à environ 500 tonnes de production mondiale annuellement. Ce chiffre inclut également les AgNP produits pour être utilisés dans l'industrie électronique. Le marché des nanoparticules d'argent était évalué à 1,5 milliard de dollars en 2020, et il est prévu qu'il atteindra 6,6 milliards de dollars d'ici 2030 [5].

La synthèse chimique représente une méthode majeure pour produire rapidement un grand nombre d'AgNP. Ce processus implique l'utilisation d'un agent réducteur puissant pour convertir un composé chimique tel que le nitrate d'argent (AgNO₃) en une particule métallique mesurant dans la gamme nanométrique. L'utilisation de nanomatériaux à base d'argent a été initialement entravée en raison de leur instabilité

de l'oxydation. Pour remédier à ce problème, un stabilisant est ajouté pour empêcher les AgNP de subir une oxydation rapide [2]. Bien que la synthèse chimique soit très efficace, elle produit également un grand volume de déchets chimiques nocifs qui finissent par se retrouver dans l'environnement. En conséquence, des méthodes alternatives de synthèse verte sont utilisées pour contribuer à réduire un volume toujours croissant de déchets chimiques associés à la production de nanomatériaux d'argent.

La synthèse verte peut se produire soit par des moyens chimiques, soit par biogénèse. Les deux processus produisent des AgNP qui ont moins d'impact environnemental [6]. La synthèse chimique verte implique l'utilisation de substances naturelles, telles que des extraits de plantes, pour produire des AgNP chimiquement synthétisés (c-AgNP), mais avec moins de déchets toxiques associés. Comme leur nom l'indique, les AgNP biogéniques (b-AgNP) sont produites soit en donnant un substrat d'argent à des bactéries vivantes ressemblant à des microbes, soit en utilisant des surnageants de culture microbienne, soit en utilisant des lysats de cellules entières de microbes [7]. Les b-AgNP produites par cette méthode semblent prometteuses dans la lutte contre les infections associées aux biofilms, puisque les biofilms ont tendance à héberger des agents pathogènes résistants aux antibiotiques [8].

Les AgNP contrôlent efficacement la croissance d'un large éventail de microbes, y compris les bactéries résistantes aux antibiotiques provoquant des infections. Néanmoins, leur utilisation est entravée par un niveau intrinsèque de toxicité pour l'homme et les risques environnementaux associés [9]. Bien que la demande d' AgNPs ne cesse de croître, aucun effort correspondant n'a été fait pour réduire leur impact sur l'environnement, quelle que soit leur méthode de synthèse. De même, d'autres nanoparticules métalliques ayant une activité antimicrobienne équivalente ou supérieure à celle des AgNP mais avec une toxicité réduite sont recherchées comme remplacement potentiel. Cependant, l'efficacité antimicrobienne démontrée des AgNP en fait un candidat de choix pour une utilisation continue jusqu'à ce qu'un substitut approprié soit trouvé. Par conséquent, il est hautement souhaité de produire des b-AgNP de longue durée présentant une action antimicrobienne à large spectre à une concentration de travail inférieure.

La nouveauté de cette étude implique deux résultats distincts. Premièrement, les différences d'efficacité antimicrobienne observées entre les b-AgNP et les c-AgNP testées démontrent que les b-AgNP sont supérieures aux c-AgNP pour contrôler la croissance microbienne. Deuxièmement, les différences observées entre l'efficacité antimicrobienne de chaque type de b-AgNP semblent être le produit d'une variation de leur traitement post-production. Nous rapportons maintenant que les b-AgNP présentent une excellente activité antimicrobienne à des concentrations nettement inférieures à celles des c-AgNP commerciaux.

2. Matériels et méthodes

2.1. Préparation des nanoparticules

Des lysats cellulaires de cellules *Escherichia coli* DH5 α recombinantes précédemment caractérisées ont été utilisés pour produire des b-AgNP [10, 11]. Ce faisant, une aliquote de 10 μ L de stocks de glycérol à 15 % de cellules *Escherichia coli* DH5 α a été transférée dans 10 ml de milieu LB contenant 100 μ g/mL de carbénicilline et cultivée pendant une nuit à 37 °C sur un incubateur shaker à 250 tr/min. La culture cellulaire d'une nuit a ensuite été centrifugée et les cellules ont été remises en suspension dans 100 ml de LB en présence de carbénicilline et réincubées à 37 °C tout en surveillant périodiquement la densité optique (DO).

Lorsque la DO600 a atteint 0,9, les cellules ont été centrifugées à 4 500 G pendant 15 min. Le culot cellulaire résultant a été lavé avec 25 ml de tampon phosphate de sodium 50 mM (pH 9) et remis en suspension dans 2 ml de tampon phosphate de sodium 50 mM (pH 9). Ensuite, les cellules ont été soniquées sur de la glace pendant trois cycles de 60 impulsions à un rendement de 20 %, avec un intervalle de 1 minute entre chaque cycle. Le lysat a été centrifugé pour éliminer les débris cellulaires. L'extrait intracellulaire soluble a été ajouté à 100 ml de tampon phosphate de sodium 50 mM (pH 9) contenant 1 mM EDTA. Ce mélange réactionnel acellulaire a été incubé à 37 °C sous agitation continue à 250 tr/min pendant 4 jours. Les b-AgNP ont ensuite été collectés par centrifugation à 5 000 tr/min pendant 15 min. Les culots ont été soniqués dans un tampon phosphate de sodium 50 mM (pH 9) pendant 1 min sur la glace et centrifugés à 3 000 G pendant 4 min.

Les b-AgNP récupérés ont été séparés en 3 groupes, chacun étant traité de manière quelque peu différente. Le premier groupe de b-AgNP en pellets a été remis en suspension dans du H₂O pur par sonication sur de la glace pendant 1 min. Les b-AgNP ont été collectés par centrifugation à 17 000 tr/min pendant 15 min à 4 °C. Cette étape de lavage a été répétée une fois, puis les b-AgNP ont été remises en suspension dans H₂O pure. Cet ensemble a été désigné comme b-AgNPs (eau $\times$ 2). Le

le deuxième groupe de b-AgNP a été soniqué dans de l'urée 8 M sur de la glace pendant 1 min, placé sur un orbital agitateur à 360 tr/min pendant 30 min à 37 °C, puis granulé par centrifugation à 17 000 × g pendant 20 mn. Le culot a été lavé deux fois avec H₂O pur et remis en suspension par sonication dans H₂O pur. Cet ensemble a été désigné par b-AgNP (8 M d'urée × 1). Le troisième groupe était traité de la même manière que les b-AgNP (urée 8 M × 1), mais comprenait une deuxième sonication dans 8 M urée du surnageant récupéré du premier lavage à l'urée 8M. Les b-AgNP ont été lavés avec du H₂O pur deux fois et remis en suspension dans du H₂O pur. Cet ensemble a été désigné comme b-AgNPs (8M d'urée ×2).

Des c-AgNP commerciaux ont été obtenus auprès d'Alfa Aesar (Cat # J67099) jusqu'à Fisher Scientific (Waltham, MA, États-Unis) et SkySpring Nanomaterials (Cat # 0115CY) ; (Houston, Texas, États-Unis). Les c-AgNP d'Alfa Aesar mesuraient 100 nm et étaient ajustés à 0,02 mg/mL dans du citrate de sodium 2 mM. Les nanomatériaux SkySpring mesuraient également 100 nm mais étaient reçus sous forme de poudre. Les b-AgNP (eau ×2), les b-AgNP (8M d'urée ×1) et Les échantillons de b-AgNP (urée 8 M × 2) ont tous été reçus en suspension dans de l'eau pure. Ils étaient ensuite lyophilisés à l'aide d'une unité de lyophilisation Labconco (Kansa City, MO, USA). Ensuite, la poudre de c-AgNP SkySpring et les b-AgNP lyophilisés ont été ajustés à Concentration de 0,02 mg/mL dans 2 mM de citrate de sodium pour correspondre aux c-AgNP d'Alfa Aesar. Des dilutions en série au double de chaque type d'AgNP ont été préparées dans 1,5 ml à fond conique ambré. tubes à microcentrifugeuse (VWR, Atlanta, GA, USA) utilisant de l'eau déminéralisée stérile. Toutes les dilutions ont été stockés à 4 °C jusqu'à ce qu'ils soient testés.

2.2. Microbes testés

Les bactéries étudiées comprenaient *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Souches résistantes aux antibiotiques (ARS) inclus *Staphylococcus aureus* ou SARM résistant à la méthicilline (ATCC 45300), *Enterococcus faecalis* ou ERV résistant à la vancomycine (ATCC 51299) et bêta-lactamase à spectre étendu *Escherichia coli* ou BLSE (Isolat du Patient). Les champignons testés comprenaient *Candida albicans* (ATCC 60193) et *Aspergillus fumigatus* (KM 8001) ; (Tableau 1). Les cultures mères ont été entretenues par passage périodique sur une gélose nutritive favorable à la croissance et incubé à 37 °C sous température ambiante conditions (pas de CO₂). Une seule colonie bien isolée d'une bactérie testée a été transférée dans un plaque de gélose fraîche et incubée 24 h avant chaque test. Les champignons ont été incubés pendant 48 heures avant tests antimicrobiens.

Tableau 1. Caractéristiques des bactéries et champignons testés (n = 8).

Caractéristiques	Microbes					
	Entérocoque fécalis ¹	<i>Escherichia coli</i> ²	<i>Pseudomonas</i> aërugineuse	<i>Staphylocoque</i> auréus ³	<i>Candidose</i> albicans	<i>Aspergille</i> fumigatus
Microbe taper	Bactérie	Bactérie	Bactérie	Bactérie	Champignon	Champignon
Coloration de Gram réaction	Positif	Négatif	Négatif	Positif	N / A	N / A
Morphologie	Sphérique (coque)	En forme de tige (bacille)	En forme de tige (bacille)	Sphérique (coque)	Levure (ovale)	Moule (filamenteux)
Métabolisme	Facultatif anaérobie	Facultatif anaérobie	Obliger aërobique	Facultatif anaérobie	Fermentation	Nutritif assimilation

¹ *Enterococcus faecalis* était une souche d'entérocoque résistante à la vancomycine (ERV). ² Inclus à la fois un spectre étendu souches d'*Escherichia coli* bêta-lactamase (BLSE) et d'*Escherichia coli* non BLSE. ³ Inclus à la fois un médicament sensible à la méthicilline (SASM) et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM).

Pour toutes les bactéries testées, 2 à 3 colonies bien isolées ont été transférées dans 3 ml de bouillon Muller-Hinton (MH) ajusté en cations (Remel, Lenexa, KS, USA) dans un tube stérile avec un verre. couvercle à pas de vis. La suspension a été ajustée pour correspondre à une norme de turbidité McFarland de 0,5 % en utilisant un densitomètre McFarland DEN-1 (Grant-Bio, Beaver Falls, PA, USA), ce qui donne

en $\sim 1,0 \times 10^8$ unités formant colonie (UFC)/mL⁻¹. Un échantillon ajusté a été préparé dans un bouillon MH pour donner environ $1,0 \times 10^6$ unités formant colonie (UFC)/mL⁻¹. Une dilution supplémentaire au 1:100 du 0,5%

Pour la levure *Candida albicans*, 4 à 6 colonies bien isolées ont été retirées d'une plaque de gélose nutritive de 48 h et placées dans un tube à vis en verre stérile contenant 3 ml de bouillon Muller-Hinton (MH) (Remel, Lenexa, KS, USA). La suspension a été ajustée pour correspondre à une norme de turbidité McFarland de 0, 5%, comme décrit précédemment pour les bactéries. Aucune dilution supplémentaire au 1/100 n'a été réalisée.

Pour la moisissure *Aspergillus fumigatus*, cinq plaques de gélose nutritive de 48 h contenant des colonies de moisissures en croissance active ont été inondées avec 5 ml de solution saline stérile à 0,9 %. Les colonies fongiques intactes ont été perturbées à l'aide d'un épandeur de cellules stérile (Fisher Scientific 14-665-231, Pittsburgh, PA, USA) en déplaçant vigoureusement l'épandeur d'avant en arrière sur toute la surface de la plaque, créant ainsi une suspension. Cette suspension a été transférée dans un tube à centrifuger conique de 50 ml (Fisher Scientific 12-565-271, Pittsburgh, PA, USA) et vigoureusement vortexée pendant 30 s au réglage le plus élevé du mélangeur. La solution résultante a été ajustée pour correspondre à une norme de turbidité McFarland à 0,5 %.

Le nombre de bactéries ou de champignons dans l'inoculum de départ de la CMI a été déterminé comme suit. Des dilutions en série au dixième ont été préparées de l'inoculum à turbidité ajustée dans une solution saline stérile à 0,9 %. Une aliquote de 100 µL (0,1 mL) de chaque dilution a été transférée dans une plaque de gélose nutritive séparée et étalée sur sa surface à l'aide d'un épandeur de cellules stérile. Les plaques ont été incubées pendant 24 ou 48 h, inspectées pour déterminer leur croissance et les colonies comptées. Les unités formant colonies (UFC)/mL⁻¹ ont été déterminées en comptant le nombre de colonies bactériennes ou fongiques présentes sur une plaque de dilution démontrant entre 10 et 100 colonies. Ce nombre a été multiplié par l'inverse de la dilution en série, puis multiplié par dix pour tenir compte du volume d'échantillon de 100 µL (0,1 mL) distribué dans chaque plaque de comptage.

2.3. Test de concentration minimale inhibitrice (CMI) Un

échantillon de 100 µL de chaque dilution de nanoparticules de test a été distribué dans des puits séparés d'une plaque de microtitrage à 96 puits (Figure 1). Chaque puits contenant une dilution de nanoparticules a reçu une aliquote de 100 µL de l'inoculum microbien testé. Cela a abouti à une dilution de 1:2 de chaque concentration de nanoparticules dans les puits de test, allant de 10 µg/mL à 0,04 µg/mL. Un contrôle de croissance négatif composé de 200 µL de bouillon MH, sans microbe, a été inclus pour détecter une contamination exogène potentielle du bouillon. Un contrôle de croissance positif distinct composé de 100 µL de seulement 2 mM de citrate de sodium (sans nanoparticules) plus 100 µL d'inoculum microbien a été utilisé pour voir si 2 mM de citrate de sodium seul contribuait à l'inhibition de la croissance. La plaque de microtitration inoculée a été recouverte d'un couvercle ajusté et les côtés enveloppés de Parafilm® pour empêcher la dessiccation de l'échantillon pendant l'incubation. La plaque a été placée dans un incubateur à agitation MaxQ 4450 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) et maintenue pendant 24 h (bactéries) ou 48 h (champignons) à 37 °C dans des conditions ambiantes. avec rotation constante à 100 tr/min.

Le milieu PMI 1640 additionné de 2 % de glucose est généralement utilisé pour les tests de CMI fongiques en laboratoire clinique [12,13]. Au lieu de cela, l'étude actuelle a utilisé le bouillon MH pour effectuer des tests CMI fongiques. Cela a permis une comparaison plus directe avec les résultats de la CMI bactérienne. Le bouillon MH favorise la croissance fongique et a été utilisé pour effectuer des tests sur tube germinatif de *Candida albicans* à la place du sérum [14]. De plus, un puits témoin contenant un inoculum de test de *Candida albicans* ou d'*Aspergillus fumigatus* sans nanoparticules a démontré une croissance appréciable dans chaque CMI réalisée.

En plus des tests CMI initiaux, les 3 b-AgNP et les c-AgNP Alfa Aesar ont été retestés un an plus tard en utilisant la même souche bactérienne *Staphylococcus aureus* (MSSA) sensible à la méthicilline. Cela a été fait pour déterminer la quantité d'activité antimicrobienne résiduelle, le cas échéant, présente après un stockage à long terme à 4 °C. Les SkySpring c-AgNP, qui n'avaient pas été acquis avant le test initial de la CMI, ont également été inclus dans le test de stabilité.

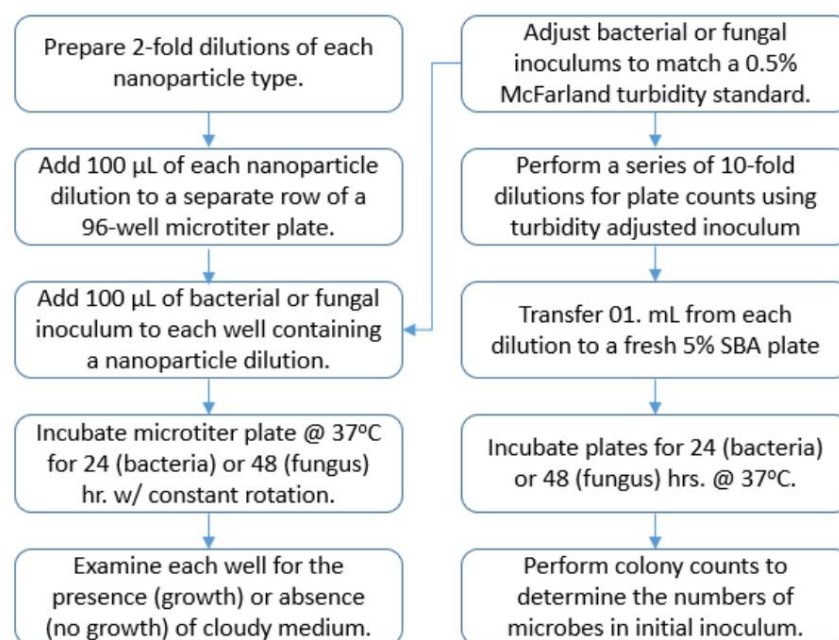


Figure 1. Schéma de test. Diagramme simplifié décrivant les étapes générales accomplies au cours du processus de test.

2.4. Spectroscopie

Le milieu PMI 1640 additionné de 2 % de glucose est généralement utilisé pour la CMI fongique. Un échantillonnage direct de chaque dose de 0,02 mg/mL dans une solution AgNPs de citrate de sodium 2 mM a été réalisé. L'étude antérieure a utilisé un bouillon MH pour effectuer à la fois la spectroscopie visible (vis) et infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) pour les tests CMI fongiques. Cela a permis une comparaison plus directe avec la CMI bactérienne. La vis-spectroscopie a été réalisée à l'aide d'un Thermo Scientific Evolution 350 UV-VIS spectromètre et logiciel Thermo Scientific « Insight 2 » est utilisé pour afficher les résultats obtenus. Le bouillon MH favorise la croissance fongique et a été utilisé pour réaliser un spectromètre *Candida albicans* et le test sur tube germinatif au lieu du sérum [14]. De plus, un puits de contrôle contenant soit *Candida* (Waltham, MA, USA). L'FT-IR a été réalisé à l'aide d'un Thermo Scientific Nicolet spectromètre et logiciel Thermo Scientific « Insight 2 » est utilisé pour afficher les résultats obtenus. Les AgNPs pour la croissance appréciable de l'énergie des rayons X dans chaque CMI.

Les analyses par spectroscopie dispersive (EDS) ont été remises en suspension dans de l'eau pure par sonication. En plus des tests initiaux de CMI, les 3 b-AgNP et les c-AgNP Alfa Aesar ont été refaits avant l'analyse. Un échantillon de transmission à balayage corrigé des aberrations Hitachi HD2700 (Hitachi, Tokyo, Japon) qui a été utilisé pour acquérir le spectre EDS. Cela a été fait pour déterminer la quantité d'activité antimicrobienne résiduelle, le cas échéant, présente après un stockage à long terme à 4 °C. Les c-AgNP SkySpring, qui en avaient 2,5. TEM

non acquis avant le test initial de la CMI, ont également été inclus dans le test de stabilité.

Les échantillons d'AgNPs à 0,02 mg/mL dans 2 mM de citrate de sodium ont été préparés pour la microscopie électronique à transmission (TEM) comme suit. Environ 5,0 mL de chaque échantillon a été centrifugé à l'aide d'une centrifugeuse Eppendorf 5810R (Enfield, CT, USA) à 3 000 × g.

2.4. Spectroscopie

L'échantillonnage direct de chaque solution de 0,02 mg/mL dans une solution AgNPs de citrate de sodium 2 mM a duré 5 minutes et les gros précipités ont été éliminés. Les échantillons ont été soniqués à une impulsion prédéfinie réalisée pour la spectroscopie visible (vis) et infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) cycle 5× à l'aide d'un sonicateur Fisher Scientific FB-120 équipé d'un modèle d'ultrasons C-18. La vis-spectroscopie a été réalisée à l'aide d'une sonde UV-VIS Thermo Scientific Evolution 350 (Newtown, CT, USA). Une aliquote de 2 mL de surnageant a ensuite été transférée dans un spectromètre et logiciel Thermo Scientific « Insight 2 » utilisés pour afficher le résultat - tube de microcentrifugation 2.0 et centrifugé à l'aide d'un Hermle Labnet Z 323 K (Gosheim, Germany) réglé à 17 000 × g pendant 30 min. Une aliquote de 1,5 mL de surnageant a été prélevée et 0,5 mL restants ont été vigoureusement vortexés et pipetés de haut en bas.

Les analyses par spectroscopie dispersive (EDS) ont été remises en suspension dans de l'eau pure par sonication avant l'analyse. Un échantillon de 2 µL de nanoparticules bien suspendues a été séparément appiqué sur une grille de cuivre (Carbon Grids, Microscopy Sciences). Grilles ont été laissés sécher complètement à l'air avant d'être inspectés. Examen TEM ultérieur

2.5. TEM

Les échantillons AgNPs à 0,02 mg/mL dans 2 mM de citrate de sodium ont été préparés pour le trans- 2.6. Dimensionnement des particules

microscopie électronique de mission (TEM) comme suit. Environ 5,0 mL de chaque échantillon ont été centrifugés à l'aide d'une centrifugeuse Eppendorf 5810R (Enfield, CT, USA) à 3 000 × g. La taille moyenne et la plage de distribution des AgNPs ont été mesurées à l'aide d'un modèle ZEN (Hitachi, Tokyo, Japon). Ces instruments utilisent des diaphragmes d'anneau de lumière (DAR) pour dissuader et les gros caractéristiques des particules de même. Un filtre ZetaSizer a été utilisé avant l'analyse de nanoparticules (Newtown, CT, États-Unis). Un échantillon de 2 µL de nanoparticules bien suspendues a été séparément appiqué sur une grille de cuivre (Carbon Grids, Microscopy Sciences). Grilles ont été laissés sécher complètement à l'air avant d'être inspectés. Examen TEM ultérieur

Waltham, MA, États-Unis). La durée du décompte variait entre 70 et 290 s. La valeur moyenne de le pic n°1 représentant l'intensité maximale a été utilisé pour indiquer le diamètre des particules (nm) et largeur (nm). Les mesures du potentiel zêta n'étaient pas prises en charge par ce modèle d'analyseur.

Des mesures directes des b-AgNP (urée 8 M × 2) et des c-AgNP Alfa Aesar ont été également réalisé à partir de microphotographies TEM à l'aide du logiciel ImageJ. Vingt au hasard des mesures ont été prises pour chaque type d'échantillon d'AgNPs.

3. Résultats

3.1. Test CMI

Les b-AgNP (urée 8 M × 2) ont démontré la plus grande activité antimicrobienne dans 8/8 (100%) microbes par test MIC (Tableaux 2 à 4). La CMI de b-AgNPs (urée 8M ×2) la plus basse de 0,31 µg/mL ont été enregistrés pour les bactéries *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et BLSE- *Escherichia coli* et la CMI la plus élevée de 2,50 µg/mL pour la moisissure *Aspergillus fumigatus*. À l'exception de la moisissure *Aspergillus fumigatus*, les trois types de b-AgNP étaient efficaces contre chaque souche bactérienne et fongique testée. Classés par ordre d'efficacité contre *Candida albicans* étaient des b-AgNP (8 M d'urée × 2) à 1,25 µg/mL, des b-AgNP (8 M d'urée × 1) à 2,50 µg/mL et b-AgNPs (eau ×2) à 5,00 µg/mL. En revanche, aucune activité antimicrobienne a été exposé par les c-AgNPs Alfa Aesar à 10 µg/mL, la concentration la plus élevée évaluée, chez 8/8 (100%) des microbes testés. Un résultat similaire de > 10 µg/mL a été noté pour SkySpring c-AgNP (SkySpring) inclus dans les tests fongiques et de stabilité. À eux seuls, les b-AgNP (8M urée ×2) La plage de CMI de 0,31 à 2,50 µg/mL représente une concentration efficace d'au moins 4 à 32X supérieur aux c-AgNP (> 10 µg/mL).

Tableau 2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des nanoparticules testées contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* après 24 h d'incubation à 37 °C dans l'air ambiant.

Nanoparticule	CMI (µg/mL)		
	<i>Escherichia coli</i> (5,0 × 10 ⁵)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (7,5 × 10 ⁵)	<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) (7,5 × 10 ⁵)
b-AgNP (eau × 2) b-AgNP	1,25	1,25	2,50
(8 M d'urée × 1) b-AgNP (8	1,25	1,25	1,25
M d'urée × 2) c-AgNP (Alfa	0,31	0,31	0,62
Aesar)	≥10,0	≥10,0	≥10,0

MSSA = *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline, () = unités formant colonie par mL⁻¹.

Tableau 3. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des nanoparticules testées contre la résistance aux antibiotiques souches d'*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* après 24 h d'incubation à 37 °C dans l'air ambiant.

Nanoparticule	CMI (µg/mL)		
	<i>Escherichia faecalis</i> (ERV) (0,6 × 10 ⁵)	<i>Escherichia coli</i> (BLSE) (5,0 × 10 ⁵)	<i>Staphylococcus aureus</i> (SARM) (5,5 × 10 ⁵)
b-AgNP (eau × 2) b-AgNP	2,50	1,25	2,50
(8 M d'urée × 1) b-AgNP (8	2,50	0,62	2,50
M d'urée × 2) c-AgNP (Alfa	1,25	0,31	0,62
Aesar)	≥10,0	≥10,0	≥10,0

VRE = entérocoque résistant à la vancomycine, BLSE = bêta-lactamase à spectre étendu, SARM = *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, () = unités formant colonie par mL⁻¹.

Tableau 4. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des nanoparticules testées contre la levure *Candida albicans* et la moisissure *Aspergillus fumigatus* après 48 h d'incubation à 37 °C dans l'air ambiant.

Nanoparticule	CMI (µg/mL)	
	<i>Candida albicans</i> (1,0 × 10 ⁵)	<i>Aspergillus fumigatus</i> (1,0 × 10 ⁵)
b-AgNP (eau × 2) b-AgNP	5h00	≥10
(8 M d'urée × 1) b-AgNP (8	2,50	≥10
M d'urée × 2) c-AgNP (Alfa	1,25	2,50
Aesar) c-AgNP (SkySpring)	≥10	≥10
	≥10	≥10

() = Unités formant colonies par mL⁻¹ ·

3.2. Spectroscopie

La vis-spectroscopie des c-AgNP Alfa Aesar produits commercialement a révélé la présence de deux pics d'absorbance. Le premier pic, observé à 418,6 nm, était très proche de 420 nm, une valeur cohérente avec les nanoparticules d'argent (Figure 2) [6]. Un deuxième pic plus large a été noté à 525,5 nm. Les b-AgNP (eau × 2) ont montré un pic à 406,6 nm, près du premier pic des c-AgNP d'Alfa Aesar, mais aucun pic similaire n'a été observé ni pour les b-AgNP (8 M d'urée × 1) , ni pour les b-AgNP (8 M urée ×2). Les trois types de b-AgNP ont présenté des pics regroupés autour de 570 nm, allant de 562,8 nm à 584,3 nm. Voir les données supplémentaires pour les spectres individuels et l'ajustement résiduel de Voigt (disponibles en ligne : <https://www.mathworks.com/matlabcentral/échange-de-fichiers/57603-voigt-line-shape-fit> (consulté le 25 octobre 2022)).

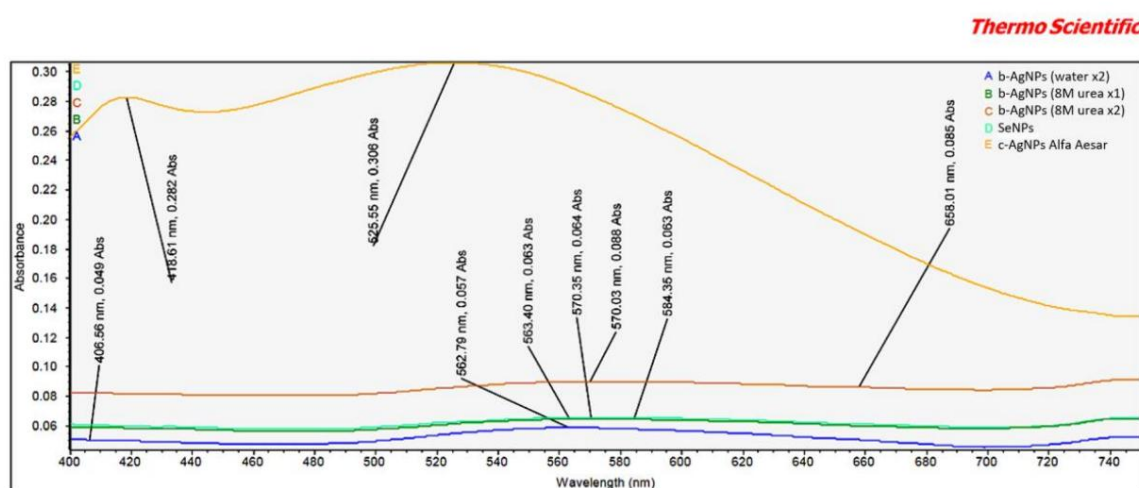


Figure 2. Spectres visibles des nanoparticules testées. Les pics d'absorbance sont indiqués pour les trois b-AgNP (A – C), les NP de sélénium non liés à l'étude en cours (D) et les c-AgNP d'Alfa Aesar (E).

L'analyse FT-IR des échantillons de b-AgNP (urée 8 M × 2) et d'échantillons de c-AgNP d'Alfa Aesar a montré des profils d'absorbance pour la plupart similaires, à l'exception de deux petits pics observés pour les c-AgNP d'Alfa Aesar à 2 359,87 cm⁻¹ et Longueurs d'onde de 2336,46 cm⁻¹ (Figure 3). Les deux pics se sont produits dans la région des longueurs d'onde moyennes de l'IR. Deux autres différences notées étaient des pics à 667,86 cm⁻¹ pour les c-AgNP d'Alfa Aesar et à 507,55 cm⁻¹ pour les b-AgNP (urée 8M × 2). Aucun des deux ne semble appartenir à une gamme de fréquences associée à un groupe fonctionnel caractéristique.

sont produits dans la région des longueurs d'onde moyennes de l'IR. Deux autres différences notées étaient des pics à 194 667,86 cm^{-1} pour les c-AgNP d'Alfa Aesar et 507,55 cm^{-1} pour les b-AgNP (urée 8M x2). Aucun des deux ne semble appartenir à une gamme de fréquences associée à un groupe fonctionnel caractéristique.

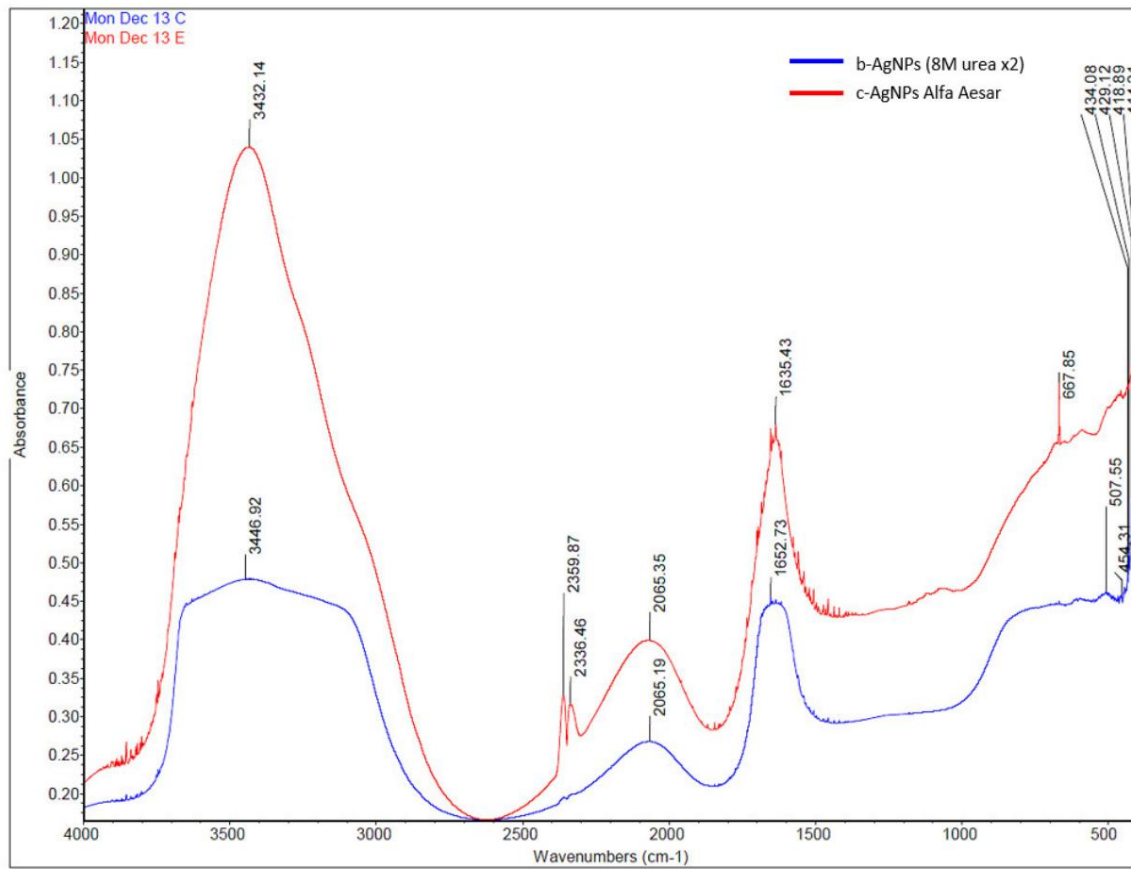


Figure 3: Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR): Modèles d'absorbance des C/AgNPb (C/bleu) AgNPs (Mûrée 2 x 8 M) et (E/pouffe) Alfa Aesar C/AgNPs.

EDS spectra EDS prélevés al'présignal Agé signal Agé simultanément à 0,2 mps de ank Evs de 3 KeV. Le spectre (Fig) (Fig) (C) correspond au plus court et était le plus pur Oite O d'signale d'intensité inférieure à 1 KeV. Des pics supplémentaires s'intensité variable, mais inférieurs à ceux de C ou Ag ont été observés. Et des pics se perdent dans le bruit puisqu'ils sont très petits pour O, N et P (classés par ordre décroissant S et CL).

3.3. TEM

Une comparaison directe des AgNP (8M d'urée $\times 2$) et des Alfa Aesar c-AgNPs TEM les microphotographies montraient principalement des AgNP en forme de sphère, mais également quelques différences entre elles. L'image AgNPs (8M d'urée $\times 2$) a non seulement révélé de nombreux NP uniques, vu à 12 000 $\times$, mais aussi la présence occasionnelle d'un petit agrégat (Figure 5). En revanche, vus à 3 000 $\times$, les c-AgNP étaient de taille plus cohérente sans des agrégats similaires. Examen des b-AgNPs (eau $\times 2$) et des b-AgNPs (8M urée $\times 1$) des photomicrographies (non présentées) montraient également des AgNP de forme sphérique ainsi que quelques petits agrégats.

3.4. Détermination de la taille

L'analyse Zetasizer a révélé que les c-AgNP d'Alfa Aesar étaient les plus cohérents dans taille mesurant ~ 129 nm (voir tableau 5). Cette valeur était proche de la taille de base annoncée de 100 nm avec une plage de 98 à 115 nm indiquée sur le certificat d'analyse ci-joint. Au contraire, une plus grande hétérogénéité a été observée entre les tailles des 3 b-AgNP. Inscrit dans l'ordre de taille croissant, les b-AgNP (8 M d'urée × 2) à ~ 156 nm, les b-AgNP (8 M d'eau × 2) à ~ 176 nm et b-AgNP (urée 8 M × 1) à ~ 329 nm. Il convient également de noter que les amas étaient visibles dans l'échantillon de b-AgNP (8 M d'urée × 1), ce qui peut avoir contribué à son a mesure de taille plus grande. Ces amas ne pouvaient pas être facilement dispersés par sonication. Il

Il convient également de mentionner qu'un échantillon provenant d'un lot plus récent de b-AgNP (8M d'urée $\times 2$) a été envoyé pour analyse de taille. Le pic 1 impliquait des particules de 147,4 nm avec une moyenne Z de 140,9 nm et un potentiel zêta de $-44,4$ mV. Le potentiel zêta indique de bons b-AgNP (8M d'urée $\times 2$) la stabilité. La mesure a été effectuée par DLS à l'aide d'un Malvern Zetasizer Nano ZS tandis que Les b-AgNP (urée 8 M $\times 2$) ont été mis en suspension dans de l'eau pure.

Appl. Nano 2022, 3, POUR EXAMEN PAR LES PAIRS

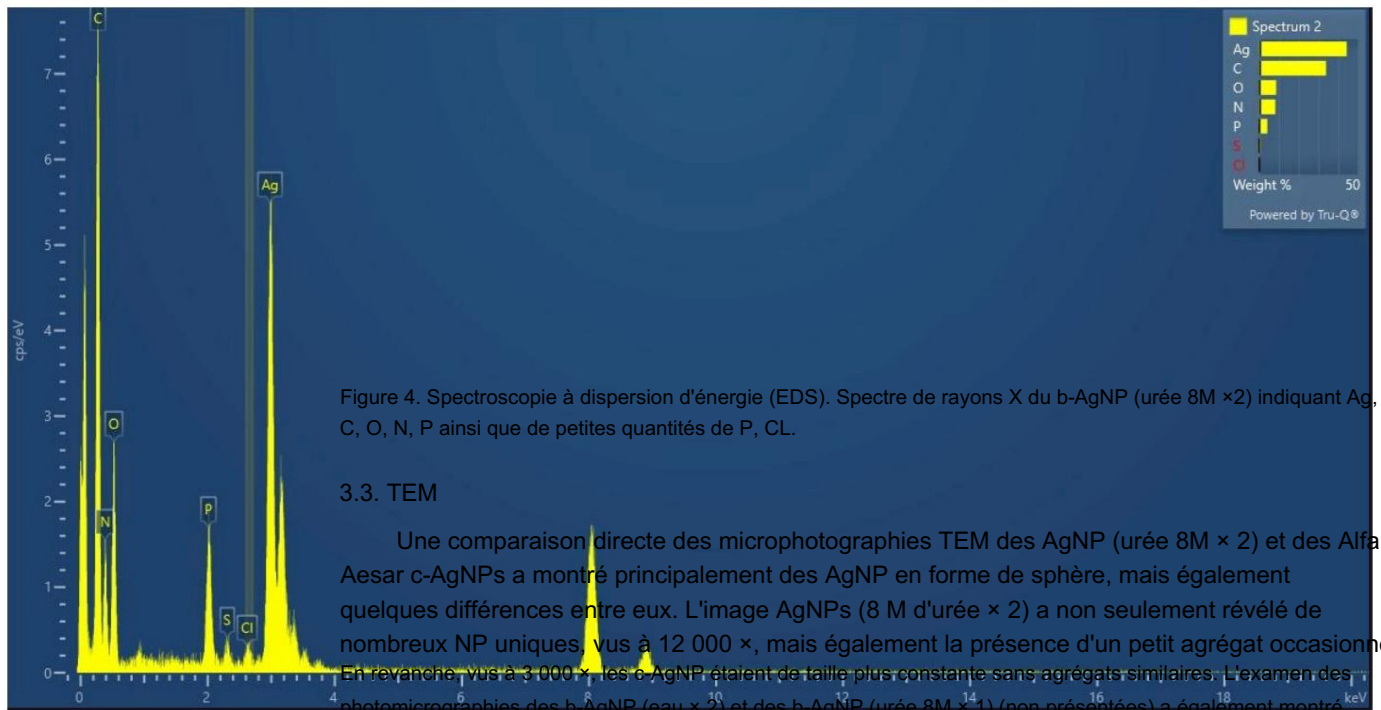


Figure 4. Spectroscopie à dispersion d'énergie (EDS). Spectre de rayons X du b-AgNP (urée 8M $\times 2$) indiquant Ag, C, O, N, P ainsi que de petites quantités de P, CL.

3.3. TEM

Une comparaison directe des microphotographies TEM des AgNP (urée 8M $\times 2$) et des Alfa Aesar c-AgNPs a montré principalement des AgNP en forme de sphère, mais également quelques différences entre eux. L'image AgNPs (8 M d'urée $\times 2$) a non seulement révélé de nombreux NP uniques, vus à 12 000 $\times$, mais également la présence d'un petit agrégat occasionnel (Figure 5A). En revanche, vus à 3 000 $\times$, les c-AgNP étaient de taille plus constante sans agrégats similaires. L'examen des photomicrographies des b-AgNP (eau $\times 2$) et des b-AgNP (urée 8M $\times 1$) (non présentées) a également montré des AgNP de forme sphérique ainsi que quelques petits agrégats. L'examen des photomicrographies des b-AgNP (urée 8M $\times 2$) indiquant la figure 4. Spectroscopie à dispersion d'énergie (EDS). Spectre de rayons X du b-AgNP (urée 8M $\times 2$) indiquant Ag, C, O, N, P ainsi que de petites quantités de P, CL.

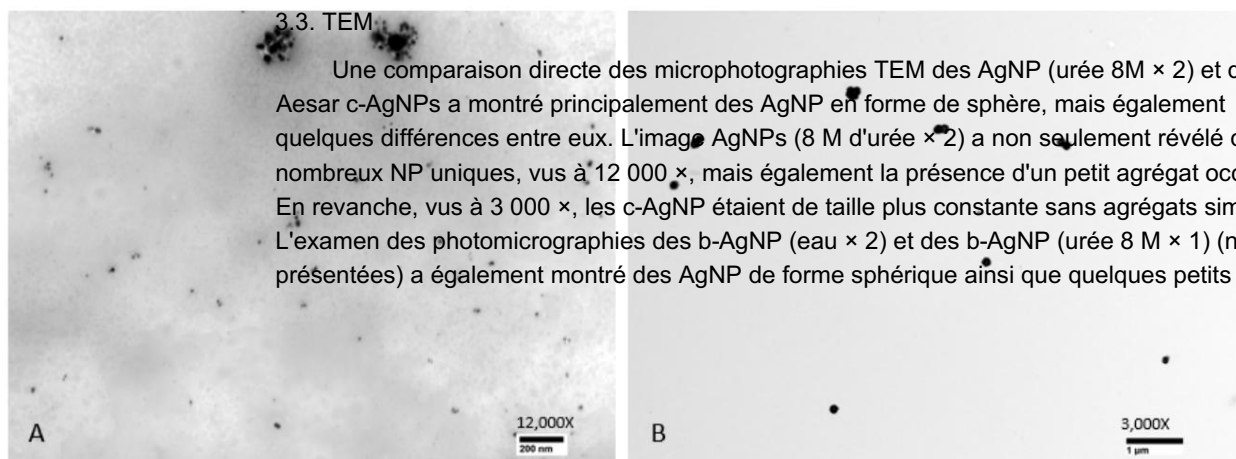


Figure 5. Micrographies électroniques à transmission. Préparations de nanoparticules de (A) b-AgNPs (urée 8M $\times 2$) à un grossissement de 12 000 $\times$ et (B) Alfa Aesar c-AgNP à un grossissement de 3 000 $\times$.

Figure 5. Micrographies électroniques à transmission. Préparations de nanoparticules de (A) b-AgNPs (urée 8M $\times 2$) à un grossissement de 12 000 $\times$ et (B) Alfa Aesar c-AgNPs à un grossissement de 3 000 $\times$.

Tableau 5. Mesures de particules par méthode DLS à l'aide d'un Malvern ZEN 1600 Zetasizer.

Nanoparticules	Taille	Largeur
AgNP (eau × 2)	176,3 nm	12,95 nm
AgNP (8M d'urée × 1)	329,8 nm	56,66 nm
AgNP (8M d'urée × 2)	156,1 nm	12,98 nm
AgNP (commercial)	129,2 nm	40,55 nm

Contrôle des particules de latex ThermoFisher (61 nm ± 4) = 65,2 nm.

L'analyse photomicrographique TEM à l'aide du logiciel ImageJ a révélé un diamètre moyen de b-AgNP (urée 8 M × 2) de 28,7 nm, dont la taille varie de 15,5 à 49,1 nm. Les mesures des agrégats de b-AgNP (urée 8 M × 2) variaient entre 148 et 170 nm. En revanche, les c-AgNP d'Alfa Aesar ont été déterminés comme mesurant 143,5 nm, allant de 103,3 à 179,91 nm. Les granulats n'ont pas été notés dans l'échantillon commercial.

4. Discussion

Collectivement, ces résultats indiquent que les b-AgNP produits à l'aide d'un lysat cellulaire sont bien des nanoparticules d'argent. La prise en charge est offerte par les résultats Vis-spectrum, FT-IR, TEM et EDS. En outre, les résultats suggèrent que le traitement des b-AgNP augmente deux fois leur activité antimicrobienne contre les micro-organismes.

Le vis-spectre a révélé deux éléments d'intérêt liés aux c-AgNP d'Alfa Aesar (Figure 2). Premièrement, les intensités maximales à 418,6 nm et 525,5 nm étaient nettement supérieures à celles observées pour les b-AgNP. Cela semble indiquer une différence relative de concentrations entre les b-AgNP et les c-AgNP d'Alfa Aesar. Cette découverte est bien corrélée aux différences similaires d'amplitude maximale entre ces deux AgNP démontrées par l'analyse FT-IR. Il soutient les b-AgNP, en particulier les b-AgNP (urée 8 M × 2), qui sont plus bioactifs que les c-AgNP d'Alfa Aesar lorsqu'ils sont utilisés à une concentration initiale plus faible. Deuxièmement, il y a eu un pic inattendu à 525,5 nm. Un examen de la fiche de données de sécurité (SDS) Alpha Aesar c-AgNP ci-jointe indiquait l'eau, le citrate de sodium (dihydraté) et l'argent comme composants [15]. L'importance de ce pic reste inconnue malgré une enquête adressée à Alfa Aesar.

Une autre découverte intéressante était un pic à 658,0 nm pour les b-AgNP (8 M d'urée × 2) qui était absent soit dans les b-AgNP (eau × 2), soit dans les b-AgNP (8 M d'urée × 1). D'une manière générale, l'absorption par les AgNP dépend de la taille et de la forme des particules, du milieu diélectrique et de l'environnement chimique [16]. Ejbarah a signalé des pics d'absorption de l'AgNP entre 420 et 480 nm. Ces mêmes pics ont été observés se déplacer vers une longueur d'onde plus longue à mesure que la taille des particules augmentait [17]. Barbar et coll. ont rapporté des pics d'absorption de 400 nm pour les c-AgNP fabriqués en utilisant différentes concentrations d'AgNO₃ et de stabilisants trisodiques 0,5 mM et borohydrure de sodium 0,3 mM [18]. Dans la présente étude, chacune des AgNP testées a été mise en suspension dans du citrate de sodium 2 mM, qui a un λ max proche de 210 nm [19]. Cette longueur d'onde inférieure tend à éliminer toute contribution possible du stabilisant citrate de sodium 2 mM aux pics.

La présence de plusieurs bandes d'absorbance détectées par FT-IR pour le b-AgNP (urée 8 M × 2) et le c-AgNP Alfa Aesar suggère que les deux ont des groupes fonctionnels apposés sur leurs surfaces (Figure 3). Par exemple, la large bande d'absorbance observée à 3 446,92 cm⁻¹ pour le b-AgNP (urée 8 M) représente soit un étirement de pic unique de NH, un étirement de OH lié à l'hydrogène, ou éventuellement les deux. Comme indiqué pour le spectre vis-à-vis, les hauteurs des pics de c-AgNP Alfa Aesar enregistrées par FT-IR étaient sensiblement plus élevées que les pics des b-AgNP (urée 8 M × 2).

La détection de C, O, N, P et de petites quantités de Cl et S par analyse EDS suggère la présence de matière organique (Figure 4). Une quantité mineure de P a été détectée, ce qui suggère que le nitrate d'argent n'a pas réagi avec le tampon phosphate pour précipiter sous forme de sel mais a plutôt formé des b-AgNP. La matière organique peut être un lysat cellulaire résiduel encore présent après le traitement du b-AgNP. Il est plus probable que certaines molécules organiques du lysat cellulaire se soient associées aux surfaces des AgNP lorsqu'elles étaient en contact les unes avec les autres. L'ajout d'urée 8M pendant le traitement peut avoir favorisé davantage l'enrobage ou la fonctionnalisation.

matière organique (Figure 4). Une quantité mineure de P a été détectée, ce qui suggère que le nitrate d'argent n'a pas réagi avec le tampon phosphate pour précipiter sous forme de sel, mais a plutôt formé des b-AgNP. La matière organique peut être un lysat cellulaire résiduel encore présent après le traitement du b-AgNP. Il est plus probable que certaines molécules organiques présentes, dans les ce L'état est devenu associé aux surfaces AgNP lorsqu'elles étaient en contact les unes avec les autres.

L'ajout d'urée 8 M pendant le traitement peut avoir favorisé davantage le revêtement ou la fonctionnalisation des b-AgNP avec des molécules de lysat cellulaire libres. Un groupe fonctionnel approprié exprimait les b-AgNP avec des molécules de lysat cellulaire libre. Un groupe fonctionnel approprié exp sur les surfaces AgNP est tout ce qui est nécessaire pour lier les biomolécules disponibles [1,9].

Les surfaces AgNP sont tout ce qui est nécessaire pour lier les biomolécules disponibles [1,9].

Examen des photomicrographies TEM des b-AgNP (8M d'urée × 2) et d'Alfa Aesar. Examen des photomicrographies TEM des deux b-AgNP (8M d'urée × 2) et d'Alfa Aesar. Les sar c-AgNP ont révélé la présence de petites particules dans la gamme de nanoparticules attendue. Les c-AgNP d'Aesar ont révélé la présence de petites particules dans la gamme de nanoparticules attendue. La seule différence notable entre les deux groupes étant les petits agrégats observés dans La seule différence notable entre les deux groupes étant les petits agrégats observés les photomicrographies des b-AgNPs (8M urée × 2) absentes dans celles de l'Alfa Aesar dans les photomicrographies des b-AgNPs (8M urée × 2) absentes dans celles de l'Alfa Aesar. Les agrégats ne semblent pas avoir d'impact négatif sur le b-AgNP (8M Aesar c-AgNP). Les agrégats ne semblent pas avoir d'impact négatif sur le b-AgNP urée × 2) activité antimicrobienne. Par mesure directe, les b-AgNP (urée 8 M × 2) présentaient une activité antimicrobienne (urée 8 M × 2). Par mesure directe, les b-AgNPs (8M urée × 2) étaient sensiblement plus petits que ceux détectés par les mesures du Zetasizer : 28,7 nm contre 156,1 nm, respectivement (Figure 6). Les mesures des agrégats allaient de 148 à 170 nm. Ce Cela suggère que les agrégats ont contribué davantage aux b-AgNP de 156,1 nm (urée 8M × 2). Cela suggère que les agrégats ont contribué davantage aux b-AgNP de 156,1 nm (urée 8M × 2) Les mesures du Zetasizer que celles des particules individuelles. Cette observation souligne les mesures du Zetasizer plus que les particules individuelles. Cette observation souligne le valeur de l'évaluation des résultats DLS en effectuant une mesure directe des AgNP à l'aide du SEM ou des photomicrographies TEM pour détecter les agrégats. Cela est particulièrement vrai lors de l'utilisation de photomicrographies antérieures ou TEM pour détecter des agrégats. Cela est particulièrement vrai lors d'une utilisation antérieure, instrumentation DLS moins sensible.

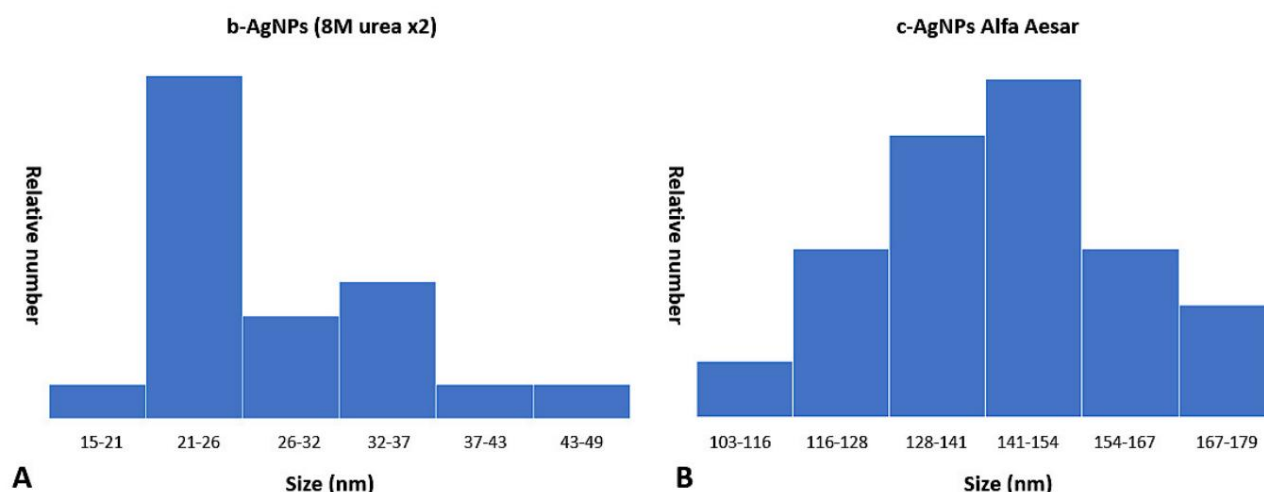


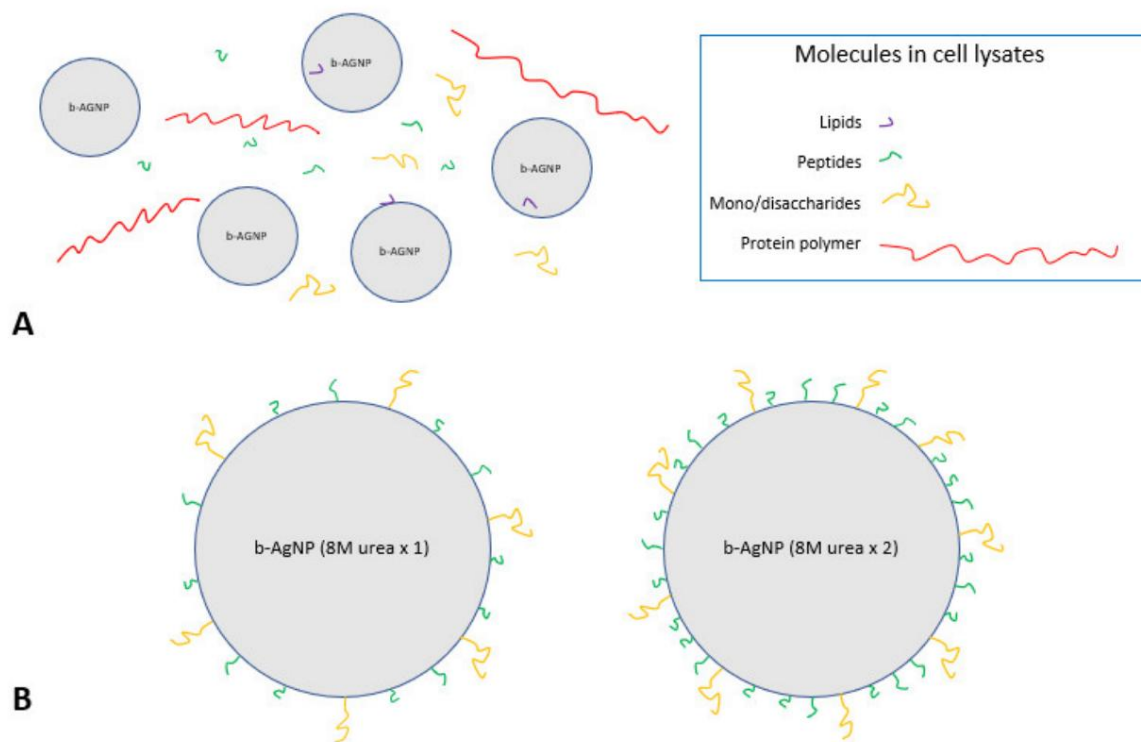
Figure 6. Histogrammes. Le panneau (A) montre la distribution de taille des AgNP préparés de la source de l'urée 8M et du diazole, et le panneau (B) montre les Alfa Aesar AgNP (mesures par TEM).

Concernant la bioactivité, les types de b-AgNP étaient efficaces contre 6/6 (100 %) bactéries sur 6 (100 %) selon les tests CMI (Tableau 3 à 5). Dans tous les tests, les b-AgNP (8 M d'urée × 2) étaient les plus efficaces pour contrôler la croissance bactérienne. Les b-AgNP (8 M d'urée × 1) et b- (eau × 2) ont montré des valeurs pour la plupart comparables. Ici, les b-AgNP (urée 8 M × 1) et b- (eau × 2) étaient d'efficacité égale chez 4/6 (~ 67 %) des bactéries testées. Les deux exceptions à cette efficacité égale étaient *Staphylococcus aureus* (MSSA) et *ESBL Escherichia coli*.

Ici, les b-AgNP (urée 8 M × 1) se sont révélés plus efficaces que les b-AgNP (eau × 2). De même, les trois b-AgNP ont également montré un bon contrôle de la croissance de la levure *Candida albicans*. Les b-AgNP (urée 8 M × 2) ont montré le meilleur contrôle avec une CMI de 1,25 µg/mL suivi par les b-AgNP (urée 8 M × 1) avec une CMI de 2,50 µg/mL, et les b-AgNP (eau × 2) avec une CMI de 5,0 µg/mL.

Une concentration CMI de 5,0 µg/mL était requise pour les b-AgNP (urée 8 M × 2) pour contrôler la croissance d'*Aspergillus fumigatus*. Très probablement, une concentration de CMI plus élevée était plus nécessaire pour la moisissure *Aspergillus fumigatus* que *Candida albicans* en raison de la présence de moisissures dormantes. spores fongiques. Les spores fongiques ont des couches épaisses qui les rendent généralement résistantes à la plupart agents antimicrobiens [20]. L'existence de spores dans l'inoculum d'essai aiderait également pour expliquer pourquoi les b-AgNP (eau × 2) et les b-AgNP (8 M d'urée × 1) étaient inefficaces à une CMI de 10 µg/mL. La valeur CMI inférieure de chacun des 3 b-AgNP était suffisante pour inhibe la levure *Candida albicans* car elle est incapable de former des spores. L'exigence d'un niveau plus élevé La concentration de la CMI des b-AgNPs peut également être due au fait que les champignons ont des caractéristiques différentes. parois cellulaires que les bactéries [21]. Collectivement, les résultats de la CMI bactérienne et fongique servent à

Appl. Nano 2022, 3, POUR EXAMEN PARES molécules solubles disponibles sont apparues dans le groupe b-AgNPs (urée 8M × 2) recevant deux¹³ LES PAIRS , des traitements séparés à l'urée 8M, améliorant ainsi son activité antimicrobienne à un niveau bien plus élevé. degré que les b-AgNP (urée 8 M × 1) ne recevant qu'un seul traitement à l'urée 8 M (Figure 7).



Des molécules organiques de composition, taille et complexité différentes peuvent fonctionnaliser les surfaces des nanoparticules. Ces biomolécules peuvent aller de petites molécules telles que les lipides, les peptides et des sucres à des polymères beaucoup plus gros, notamment des protéines, des enzymes et des vitamines, des acides nucléiques, des polyéthers, des alcools, des acides gras, notamment des acides gras à chaîne courte. La fonctionnalisation des surfaces de nanoparticule avec des biomolécules modifie leur composition de surface, leur structure globale mais laisse leurs propriétés globales intactes (24). L'attachement des molécules peut se produire via divers groupes chimiques, notamment l'acide carboxylique, l'acide phosphorique, l'acide aminé, l'amine primaire, l'alcool, le phosphate et les thiols. Théoriquement parlant, n'importe quel nombre de molécules peuvent être attachées à la surface des nanoparticules. À cet égard, les AgNP biofonctionnalisées présentent un grand potentiel pour servir de véhicules de distribution, y compris le transport d'agents chimiothérapeutiques et de gènes (25). De plus, il a été démontré que les AgNP biofonctionnalisés recouverts de chi-tosane ou d'albumine sérique bovine BSA sont efficaces dans le contrôle du streptocoque.

peut être attaché à la surface de la nanoparticule. À cet égard, les AgNP biofonctionnalisés présentent un grand potentiel pour servir de véhicules de livraison, y compris le transport de produits chimiothérapeutiques agents et gènes [25]. De plus, les AgNP biofonctionnalisés recouverts de chitosane ou l'albumine sérique bovine (BSA) se sont révélées efficaces dans le contrôle des streptocoques mutans, une bactérie associée aux biofilms de plaque causant des caries dentaires [26]. Les AgNP enrobés de chitosane sont également efficaces contre les bactéries Gram-négatives, présentent une faible cytotoxicité et peut être utile dans la libération prolongée de médicaments, comme l'agent antifongique itraconazole (27-29).

Les mécanismes proposés pour l'augmentation de l'activité antimicrobienne des b-AgNP (8M urée × 2) sont en outre liés à la taille des particules et au potentiel zêta déterminés. Concernant taille, les nanoparticules métalliques plus petites ont tendance à interagir davantage avec les membranes plasmiques des microbes conduisant à leur destruction [30]. À cet égard, les AgNP ≤ 100 nm de diamètre sont utilisés dans une large gamme d'applications, y compris les revêtements d'agents antimicrobiens pour les dispositifs biomédicaux, véhicules d'administration de médicaments, sondes d'imagerie, appareils de diagnostic et composants optoélectroniques. Cela est principalement dû à leur activité antimicrobienne bien connue et à leurs propriétés électriques exceptionnelles propriétés [1]. De plus, les nanoparticules doivent également être suffisamment petites pour traverser la paroi cellulaire externe du microbe avant d'entrer en contact avec la membrane plasmique sous-jacente. C'est hautement Il est peu probable que la paroi cellulaire externe des microbes testés ait empêché les AgNP d'atteindre la membrane plasmique sous-jacente. On ne peut pas expliquer facilement pourquoi les c-AgNP d'Alfa Aesar mesurant ~ 129 nm n'a pas démontré d'activité antimicrobienne alors que le plus grand Les b-AgNP (urée 8 M × 2) mesurant environ 156 nm l'ont fait. Cela suggère deux points distinctifs. D'abord, que les b-AgNP fonctionnalisés d'une taille supérieure à 100 nm peuvent également présenter des effets antimicrobiens considérables. activité. Deuxièmement, la taille des AgNP à elle seule n'était pas un facteur déterminant majeur de l'activité antimicrobienne. activité dans la présente étude, comme en témoigne le manque d'activité des c-AgNP d'Alfa Aesar contre tester les microbes. Le potentiel zêta mesuré de -44,4 mV pour les b-AgNP (8 M d'urée × 2) indique une bonne stabilité des particules même avec la présence de quelques petits agrégats tandis que en suspension dans l'eau.

Enfin, de nouveaux tests sur les AgNP réfrigérés ont indiqué que chacun des trois b-AgNP avait perdu très peu de puissance après un an de stockage dans des microtubes ambrés protégés de lumière (tableau 6). Une perte de puissance plus importante a été notée pour les b-AgNP (eau × 2) et les b-AgNP (8 M d'urée × 1) pour lesquels une diminution d'au moins 4 fois de leur efficacité a été notée. Cependant, la capacité des b-AgNP (urée 8 M × 2) à contrôler la croissance du MSSA était minime. affecté, passant d'une CMI de 0,62 µg/mL à 1,25 µg/mL, soit effectivement un doublement de sa concentration. Cette découverte suggère que le citrate de sodium 2 mM est un bon choix pour améliorer la stabilité à long terme des AgNP stockés.

Tableau 6. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des nanoparticules testées contre *Staphylococcus aureus* (MSSA) un an plus tard.

Nanoparticule	CMI (µg/mL)		
	Staphylococcus aureus (AMSA)	Staphylococcus aureus (AMSA)	Différence 1er contre 2e essai (±Dilutions)
	1er essai (7,5 × 10 ⁵)	2ème essai (3,0 × 10 ⁵)	
b-AgNP (eau × 2) b-	2,50	≥10	≥+2
AgNP (8 M d'urée × 1) b-	1,25	5.0	+2
AgNP (8 M d'urée × 2) c-	0,62	1,25	+1
AgNP (Alfa Aesar) c-	≥10,0	≥10	N / A
AgNP (SkySpring)	ND	≥10	N / A

() = Unités formant colonies par mL⁻¹, ND = Pas fait.

5. Conclusions

Traitement post-production des b-AgNP extracellulaires synthétisés par trois différents les traitements ont abouti à des solubilités variables qui ont permis de recouvrir leurs surfaces avec

lyser des biomolécules. La fonctionnalisation des b-AgNP s'est produite lorsque de petites molécules présentes dans les lysats de cellules bactériennes sont associées à leurs surfaces. Le plus grand degré de fonctionnalisation s'est produit dans les b-AgNP traités deux fois avec de l'urée 8M en raison d'une solubilité accrue, ce qui a conféré un plus grand degré d'activité antimicrobienne. Si cela est vrai, cela suggère que le traitement des b-AgNP avec deux traitements consécutifs à l'urée 8M peut favoriser une plus grande solubilité et stabilité dans une solution aqueuse, ce qui entraîne un meilleur contrôle de la croissance des microbes infectieux, au moins dans les conditions de test spécifiées. De plus, une plus grande fonctionnalisation dans les b-AgNP (urée 8M $\times$ 2) pourrait également avoir contribué à sa plus grande stabilité au fil du temps. Une observation importante était que les trois b-AgNP démontraient une plus grande capacité antibactérienne que les c-AgNP acquis auprès de deux sources commerciales. Dans tous les cas, les deux c-AgNP testés étaient incapables d'inhiber la croissance microbienne des bactéries et champignons testés à la concentration la plus élevée testée. En résumé, la concentration efficace plus faible, l'activité antimicrobienne à large spectre, la petite taille et la longue durée de conservation des b-AgNP (urée 8M $\times$ 2) en font d'excellents candidats à utiliser dans une variété d'applications conçues pour empêcher la croissance microbienne au lieu de tester les c-AgNP. Les autres avantages des AgNP (8 M d'urée $\times$ 2) comprennent des quantités moindres requises pour le contrôle des microbes, une diminution du risque de cytotoxicité humaine et une réduction des déchets de synthèse chimique qui finissent par se retrouver dans l'environnement.

Documents supplémentaires : Les informations complémentaires suivantes peuvent être téléchargées sur : <https://www.mdpi.com/article/10.3390/applnano3040014/s1>, Figure S1 : Les spectres individuels et l'ajustement résiduel de Voigt.

Contributions des auteurs : Conceptualisation, TR et QY ; Méthodologie, TR, QY et MH ; Validation , TR, QY et MH ; Analyse formelle, TR et QY ; Enquête, TR, QY et MH ; Ressources, TR et QY ; Écriture : TR et QY ; Rédaction – Révision et édition, TR, QY et MH ; Visualisation, TR et QY Supervision, TR et QY ; Administration du projet, TR Acquisition de financement, TR Tous les auteurs ont lu et accepté la version publiée du manuscrit.

Financement : Cette recherche a été financée en grande partie par une subvention CORS du Pat Capps Covey College of Allied Health Professions, University of South Alabama. Cette recherche a été financée par le Bureau de recherche du ministère de la Défense/Armée (DoD/ARO), numéro de subvention W911NF-18-1-0444.

Déclaration de disponibilité des données : les données sont disponibles sur demande.

Remerciements : Nous remercions Edward Durante du Département de chimie de l'Université de l'Alabama du Sud pour avoir effectué à la fois la spectroscopie Vis et l'analyse FT-IR, ainsi qu'Alexandra Stenson, du Département de chimie de l'Université de l'Alabama du Sud pour l'utilisation de son équipement de lyophilisation. Nous remercions grandement Silas Leavesley, Département de génie chimique et biomoléculaire, Université de l'Alabama du Sud, pour avoir produit les informations sur l'ajustement Voigt. Enfin, les auteurs souhaitent remercier Yong Ding du George Institute of Technology pour son aide dans la réalisation

Conflits d'intérêts : Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêts ou relation personnelle qui aurait pu sembler influencer le travail rapporté dans cet article.

Les références

1. Almatroudi, A. Nanoparticules d'argent : Synthèse, caractérisation et applications biomédicales. *Science de la vie ouverte*. 2020, 15, 819-839. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
2. Lee, SH; Jun, B.-H. Nanoparticules d'argent : synthèse et application pour la nanomédecine. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 865. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
3. Stensberg, MC; Wei, QS ; McLamore, ES; Porterfield, DM; Wei, A. ; Sepúlveda, MS Études toxicologiques sur les nanoparticules d'argent : défis et opportunités en matière d'évaluation, de surveillance et d'imagerie. *Nanomédecine* 2011, 6, 879-898. [\[Référence croisée\]](#)
4. Bouafia, A. ; Laouini, SE; Ahmed, ASA ; Soldatov, AV; Algarni, H. ; Chong, KF; Ali, GAM Les progrès récents sur les nanoparticules d'argent : synthèse et applications électroniques. *Nanomatériaux* 2021, 11, 2318. [\[CrossRef\]](#)
5. Taille du marché des nanoparticules d'argent, part – Prévisions de l'industrie, 2030. 2022. Disponible en ligne : <https://www.alliedmarketresearch.com/argent-nanoparticules-market-A06923> (consulté le 12 mai 2022).
6. Iravani, S. ; Korbekandi, H. ; Mirmohammadi, SV; Zolfaghari, B. Synthèse de nanoparticules d'argent : méthodes chimiques, physiques et biologiques. *Rés. Pharma. Sci.* 2014, 9, 385-406. [\[Pub Med\]](#)
7. Poulouse, S. ; Panda, T. ; Nair, PP; Théodore, T. Biosynthèse de nanoparticules d'argent. *J. Nanosci. Nanotechnologie*. 2014, 14, 2038-2049. [\[Référence croisée\]](#)

8. Gallo, G. ; Schillaci, D. Nanoparticules métalliques bactériennes pour développer de nouvelles armes contre les biofilms bactériens et les infections. Appl. Microbiol. Biotechnologie. 2021, 105, 5357-5366. [\[Référence croisée\]](#)
9. Wahab, MA; P'tit.; Li, H. ; Abdala, A. Nanocomposites à base de nanoparticules d'argent pour lutter contre les agents pathogènes infectieux : récents Avancées et perspectives d'avenir. Nanomatériaux 2021, 11, 581. [\[CrossRef\]](#)
10. Yuan, Q. ; Bomma, M. ; Colline, H. ; Xiao, Z. L'expression de la phytochélatine synthase de *Rhizobium tropici* chez *Escherichia coli* a entraîné une synthèse accrue de nanoparticules bactériennes de sélénium. J. Nanopart. Rés. 2020, 22, 1-13. [\[Référence croisée\]](#)
11. Yuan, Q. ; Bomma, M. ; Xiao, Z. Synthèse extracellulaire améliorée de nanoparticules d'or par des extraits solubles d'*Escherichia coli* Transformé avec le gène phytochélatine synthase de *Rhizobium tropici*. Métaux 2021, 11, 472. [\[CrossRef\]](#)
12. CLSI M37—Méthode de référence pour les tests de sensibilité aux antifongiques par dilution en bouillon des levures, 4e éd.; Institut des normes cliniques et de laboratoire : Wayne, PA, États-Unis, 2017. Disponible en ligne : <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m27/> (consulté le 15 août 2022).
13. CLSI M38 — Méthode de référence pour les tests de sensibilité aux antifongiques par dilution en bouillon des champignons filamenteux, 3e éd. Institut des normes cliniques et de laboratoire : Wayne, PA, États-Unis, 2017. Disponible en ligne : <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m38/> (consulté le 15 août 2022).
14. Mattei, AS; Alves, SH; Severo, CB; Guazzelli, LDS; Oliveira, FDM; Severo, LC Utilisation de bouillon Mueller-Hinton et de gélose dans le test sur tube germinatif. Rév. Inst. Méd. Trop. São Paulo 2014, 56, 483-485. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
15. Fiche de données de sécurité (FDS) : Nanoparticules d'argent, 100 nm, 0,02 mg/mL, fournies dans 2 mM de citrate de sodium (Cat No. : J67099). (modifié 27-février-2020). 2022. Disponible en ligne : <https://assets.thermofisher.com/> (consulté le 22 mai 2022).
16. Tang, S. ; Zheng, J. Activité antibactérienne des nanoparticules d'argent : effets structurels. Av. Santé. Maître. 2018, 7, 1701503. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
17. Ejbarah, RA Re : Quel est le spectre d'absorption du nanoargent ? 2022. Disponible en ligne : [https://www.researchgate.net/post/ Quel_is_the_absorption_spectrum_for_nano_silver/60024ec9cf130d4376035af2/citation/download](https://www.researchgate.net/post/Quel_is_the_absorption_spectrum_for_nano_silver/60024ec9cf130d4376035af2/citation/download) (consulté le 25 mai 2022).
18. Babar, R. ; Mazzei, L. ; Thanh, NTK ; Gavrilids, A. Synthèse de nanoparticules d'argent dans un réacteur microfluidique à flux coaxial. RSC Adv. 2015, 5, 95585-95591. [\[Référence croisée\]](#)
19. Krukowski, S. ; Karasiewicz, M. ; Kolodziejcki, W. Détermination spectrophotométrique UV pratique des citrates dans des solutions aqueuses avec des applications dans l'analyse pharmaceutique des formulations d'électrolytes orales. J. Anal. de drogue alimentaire. 2017, 25, 717-722. [\[Référence croisée\]](#)
20. Fink, S. ; Burmester, A. ; Hipler, U. ; Neumeister, C. ; Götz, MR ; Wiegand, C. Efficacité des agents antifongiques contre les spores fongiques : une étude in vitro utilisant la néphélométrie laser sur microplaque et un modèle de peau 3D artificiellement infecté. Microbiol. Ouvert le 11 2022 , e1257. [\[Référence croisée\]](#)
21. Tortora, GJ; Funke, BR; Case, CL (Eds.) Microbiologie : une introduction, 13e éd. ; Pearson Education : Boston, MA, États-Unis, 2019 ; p. 334.
22. Hua, L. ; Zhou, R. ; Thirumalai, D. ; Berne, BJ Dénaturation de l'urée par des interactions de dispersion plus fortes avec les protéines qu'avec l'eau implique un déroulement en 2 étapes. Proc. Natl. Acad. Sci. États-Unis 2008, 105, 16928-16933. [\[Référence croisée\]](#)
23. Reifsteck, F. ; Wee, S. ; Wilkinson, BJ Hydrophobicité–hydrophilie des staphylocoques. J. Méd. Microbiol. 1987, 24, 65-73. [\[Référence croisée\]](#)
24. Ravindran, A. ; Chandran, P. ; Khan, SS Nanoparticules d'argent biofonctionnalisées : avancées et perspectives. Surf sur les colloïdes. B Biointerfaces 2013, 105, 342-352. [\[Référence croisée\]](#)
25. Sarkar, K. ; Banerjee, SL; Kundu, PP; Madras, G. ; Chatterjee, K. Nanoparticules d'argent biofonctionnalisées à surface modifiée pour la délivrance de gènes. J. Mater. Chimique. B 2015, 3, 5266-5276. [\[Référence croisée\]](#)
26. Martínez-Robles, M. ; Loyola-Rodríguez, JP ; Zavala-Alonso, NV ; Martínez-Martínez, RE; Ruiz, F. ; Lara-Castro, RH ; Donohué- Comejo, A.; Reyes-López, SY ; Espinosa-Cristóbal, Propriétés antimicrobiennes LF des nanoparticules d'argent biofonctionnalisées sur les isolats cliniques de *Streptococcus mutans* et ses sérotypes. Nanomatériaux 2016, 6, 136. [\[CrossRef\]](#)
27. Hélander, I. ; Nurmiaho-Lassila, E.-L.; Ahvenainen, R. ; Rhoades, J. ; Roller, S. Chitosan perturbe les propriétés barrières de l'extérieur membrane des bactéries à Gram négatif. Int. J. Microbiol. alimentaire. 2001, 71, 235-244. [\[Référence croisée\]](#)
28. Wongpreecha, J. ; Polpanich, D. ; Suteewong, T. ; Kaewsaneha, C. ; Tangboriboonrat, P. Synthèse verte à grande échelle et en un seul pot de nanoparticules d'argent-chitosane avec une activité antibactérienne améliorée et une faible cytotoxicité. Glucides. Polyme. 2018, 199, 641-648. [\[Référence croisée\]](#)
29. Saruchi ; Kaur, M. ; Kumar, V. ; Ghfar, AA; Pandey, S. Une approche verte pour la synthèse du bionanocomposite de chitosane intégré à des nanoparticules d'argent en tant que dispositif potentiel pour la libération prolongée du médicament itraconazole et ses caractéristiques antibactériennes. Polymères 2022, 14, 1911. [\[CrossRef\]](#) [\[Pub Med\]](#)
30. Siddiqi, KS; Husen, A. ; Rao, RAK Une revue sur la biosynthèse des nanoparticules d'argent et leurs propriétés biocides. J. Nanobiotechnologie. 2018, 16, 14. [\[Réf. croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)