

Evaluation of the Inhibitory Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Biofilm Formation of Some Foodborne Bacterial Pathogens

Maryam Abbasvali¹, Azizollah Ebrahimi Kahrizsangi², Fatemeh shahriari³

1. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
3. Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2016/10/26
Accepted: 2017/10/02
Available online: 2017/11/20

Article Subject:

Antimicrobial Substances

IJMM 2017; 11(5): 115-124

Corresponding author:

Maryam Abbasvali

Department of Food Hygiene
and Quality Control, Faculty
of Veterinary Medicine,
Shahrekord University,
Shahrekord, Iran

Tel: 038-32324427

Email:

abbasvali@sci.sku.ac.ir

Abstract

Background and Aims: One of the most important factors in food industry is the formation of microbial biofilm which can be the potential source of food products contamination with food spoilage and foodborne pathogenic bacteria. This study was conducted to evaluate the inhibitory effects of zinc oxide nanoparticles on biofilm formation of some foodborne bacterial pathogens.

Materials and Methods: This research was carried out in 2015. Minimum inhibitory concentration (MIC) of zinc oxide nanoparticles for *E. coli* (ATCC 35218), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) and *Bacillus cereus* (ATCC 14579) was determined by using 96-well microplate and resazurin reduction method. Biofilm formation inhibition was assessed with microtiter plate method based on crystal violet staining and measurement of optical density using microplate reader.

Results: MIC of zinc oxide nanoparticles for the above mentioned bacteria was respectively 1, ≤ 0.5 , 1 and 2 mg/mL. The inhibition percentages of biofilm formation at the MIC of the nanoparticles were 90.20, 85.69, 83.65 and 61.96, respectively.

Conclusions: In this study, zinc oxide nanoparticle showed the ability to inhibit the formation of biofilm even in sub inhibitory concentrations or Sub-MICs. No significant difference ($P > 0.05$) was observed in the biofilm inhibitory effects of ZnO nanoparticles at MIC and $1/2$ MIC between *E. coli* and *S. aureus*. Results of this study showed the inhibitory effects of zinc oxide nanoparticles on biofilm formation of the studied foodborne bacterial pathogens. According to the importance of these bacteria in public health, ZnO nanoparticle can be used as a cleaning agent for the surfaces, apparatus and production lines in food plants in order to prevent foodborne bacterial biofilm formation.

KeyWords: Biofilm, Foodborne bacterial pathogen, Inhibitory effect, Zinc oxide nanoparticle

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Abbasvali M, Ebrahimi Kahrizsangi A, Shahriari F. Evaluation of the Inhibitory Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Biofilm Formation of Some Foodborne Bacterial Pathogens . Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (5) :115-124

بررسی اثر مهاری نانو ذره اکسید روی در تشکیل بیوفیلم برخی باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد

مریم عباس‌والی^۱، عزیزاله ابراهیمی کهریزسنگی^۲، فاطمه شهریار^۳

۱. گروه بهداشت و کنترل کیفیت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳. دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: یکی از مسائل مهم در صنعت غذا، تشکیل بیوفیلم میکروبی است که می‌تواند منبع بالقوه آلودگی و عامل انتقال باکتری‌های عامل فساد و بیماری‌زای غذازاد باشد. این مطالعه با هدف بررسی اثر مهاری نانو ذره اکسید روی در تشکیل بیوفیلم برخی باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد انجام گرفته است.

مواد و روش کار: در این مطالعه که در سال ۱۳۹۴ انجام شد، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد نانو ذره اکسید روی علیه *اشریشیا کلی* (ATCC 35218)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 6538)، *سالمونلا تیفی موریوم* (ATCC 14028) و *باسیلوس سرئوس* (ATCC 14579)، به روش Broth Microdilution و احیای رزازورین اندازه‌گیری شد. اثر مهاری نانو ذره اکسید روی بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها به روش میکروتیتر پلیت از طریق رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله و اندازه‌گیری جذب نوری ارزیابی شد.

یافته‌ها: حداقل غلظت مهارکنندگی رشد برای باکتری‌های بررسی شده بالا، به ترتیب ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و درصد مهار تشکیل بیوفیلم در حداقل غلظت مهارکنندگی رشد، به ترتیب ۹۰/۲۰، ۸۵/۶۹، ۸۳/۶۵ و ۶۱/۹۶ درصد محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: نانو ذره اکسید روی در غلظت‌های پایین‌تر از حداقل غلظت مهارکنندگی رشد نیز توانایی مهار تشکیل بیوفیلم را نشان داد و در باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی*، با غلظت نصف حداقل غلظت مهارکنندگی رشد در مقایسه با غلظت برابر با حداقل غلظت مهارکنندگی رشد آن، تفاوت آماری معنی‌داری را در توانایی مهار تشکیل بیوفیلم نشان نداد ($P > 0/05$). نتایج، اثر ضد میکروبی نانو ذره اکسید روی در مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد بررسی شده را تأیید کرد. با توجه به اهمیت این باکتری‌ها در سلامت جامعه، می‌توان برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم، از این ترکیب برای پاک‌سازی سطوح، دستگاه‌ها و خطوط تولید در کارخانه‌های مواد غذایی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: اثر مهاری، باکتری بیماری‌زای غذازاد، بیوفیلم، نانو ذره اکسید روی

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۰۵

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۱۰

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۸/۲۹

موضوع:

مواد ضد میکروبی

IJMM 1396; 11(5): 115-124

نویسنده مسئول:

مریم عباس‌والی

گروه بهداشت و کنترل کیفیت مواد

غذایی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تلفن: ۰۳۸-۳۲۳۲۴۴۲۷

پست الکترونیک:

abbasvali@sci.sku.ac.ir

مقدمه

و ماتریکس خارج سلولی تشکیل می‌دهند که شامل همه انواع مواد تولیدشده در آن‌ها مانند پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهاست. این توده‌ها در برابر دوزهای بالای آنتی‌بیوتیک مقاومت می‌کنند. بیوفیلم ممکن است بر طیف گسترده‌ای از سطوح، از جمله سیستم‌های آبی طبیعی، بافت‌های بدن، دستگاه‌های پزشکی و صنعتی، سیستم آب آشامیدنی و تقریباً هر سطحی تشکیل شود. بیوفیلم‌ها می‌توانند به صورت بی‌ضرر، بیماری‌زا و یا تولیدکنندهٔ توکسین در داخل ماتریکس مطرح باشند (۴). بیوفیلم در زمینه‌های زیست‌محیطی، صنعتی و بالینی اهمیت دارد (۵).

حفظ ایمنی مادهٔ غذایی و کیفیت آن در دورهٔ ماندگاری،

مسئله‌ای است که متخصصین صنعت غذا و مسئولین سلامت

بیوفیلم (Biofilm)، اجتماع یا ماتریکس پیچیده‌ای از میکروارگانیسم‌ها و تولیدات میکروبی آن‌هاست که به سطحی متصل شده است (۱). بیوفیلم‌های باکتریایی در سال ۱۹۷۸ توسط کاسترتون (Costerton) شرح داده شدند. باکتری‌های تشکیل‌دهندهٔ بیوفیلم می‌توانند از اجتماع یک گونهٔ واحد یا چند گونهٔ متفاوت باشند (۲). زمانی که سلول‌های جدا از هم به سطح متصل شوند، بیوفیلم باکتریایی تشکیل می‌شود. ظرفیت سلول برای انجام این واکنش اولیه به عوامل محیطی مانند دما، pH و عوامل ژنتیکی بستگی دارد که فعالیت‌های جنبشی، حساسیت به محیط، پیونددهنده‌ها و پروتئین‌های دیگر باکتری را رمزگذاری می‌کنند (۳). توده‌های باکتریایی کاملاً به یکدیگر متصل می‌شوند

اهمیت دارد. ظهور مقاومت باکتری‌ها در برابر ترکیبات ضد میکروبی به‌وضوح نشان می‌دهد که استراتژی جدیدی برای کنترل بیوفیلم مورد نیاز است.

پیشرفت‌های اخیر در زمینه نانو تکنولوژی، به‌ویژه توانایی ساخت نانو ذرات در شکل‌ها و سایزهای مختلف منجر به ایجاد دسته وسیعی از عوامل ضد میکروبی شده است. مواد در ابعاد نانو، نسبت سطح به حجم بیشتری در مقایسه با ذرات بزرگ‌تر همان ترکیب شیمیایی دارند و همین موجب می‌شود تا از نظر بیولوژیکی فعال‌تر باشند (۶).

نانوذرات از طریق واکنش الکترواستاتیکی به غشای باکتری متصل می‌شوند و با ایجاد اختلال در آن، غشای باکتری را به‌صورت کامل تخریب می‌کنند (۹). یکی از مکانیسم‌های ضد میکروبی نانوذرات، واکنش با آمین و گروه‌های کربوکسیل لایه پپتیدوگلیکان دیواره باکتری‌هاست که موجب آسیب دیدن دیواره سلولی آن‌ها می‌شود (۱۰). البته مکانیسم القای فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید فلزی به‌طور کامل شناخته نشده است، اما میزان رهاسازی یون و متعاقباً تولید اکسیژن داخل سلولی (ROS: reactive oxygen species) دلیل اصلی فرض می‌شود (۱۱، ۱۲).

در این پژوهش اثر ضد میکروبی نانوذره اکسید روی و تأثیر آن در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم میکروب‌های بیماری‌زای غذازاد اش‌ریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی موریوم و باسیلوس سرئوس بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که در سال ۱۳۹۴ انجام گردید، نانوذره اکسید روی (US Research Nanomaterials, Inc. USA) با درجه خلوص ۹۹ درصد و اندازه ذرات ۱۰-۳۰ نانومتر از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان (مشهد، ایران) خریداری شد.

باکتری‌های مورد استفاده در این مطالعه شامل سوش‌های استاندارد اش‌ریشیا کلی (ATCC 35218)، سالمونلا تیفی موریوم (ATCC14028)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 6538) و باسیلوس سرئوس (ATCC 14579) بودند که همگی از گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز تهیه شدند. سوش باکتری‌ها در محیط کشت Tryptic Soy Broth (TSB، مرک، آلمان) حاوی ۳۰ درصد گلیسرین در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری می‌شدند. در زمان آزمایش، سوش‌ها در دمای محیط انجمادزدایی شدند و پس از کشت در TSB و گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس،

کشورها همواره بدان توجه کرده‌اند و بی‌توجهی یا کم‌توجهی به آن می‌تواند صدمات جبران‌ناپذیری را به جامعه وارد کند. امروزه در همه جای دنیا، بیماری‌های ناشی از مصرف غذاهای آلوده یک مشکل اساسی به شمار می‌رود. با توجه به لزوم تأمین امنیت غذایی جامعه، تولید مواد غذایی سالم، ایمن و باکیفیت یکی از اهداف اصلی تولیدکنندگان مواد غذایی است. غذاهای فاسدشده، افزون بر آسیب به سلامت مصرف‌کننده، به تولیدکننده نیز از لحاظ اقتصادی زیان می‌رسانند (۶).

در صنایع غذایی، اتصال باکتری‌های بیماری‌زا و فاسدکننده مواد غذایی با سطوح در تماس با مواد غذایی در فرآیندهای تولید و بسته‌بندی و نهایتاً، تشکیل بیوفیلم‌های میکروبی می‌تواند منبع بالقوه آلودگی محصولات و فرآورده‌های غذایی و انتقال بیماری‌ها باشد (۷). میکروارگانیسم‌ها می‌توانند در نتیجه تماس با سطوح آلوده به آسانی انتقال یابند. از آنجایی که سطوح در تماس با مواد غذایی در ماشین‌آلات صنایع غذایی، بیشتر از جنس استیل ضدزنگ است، استفاده پی‌درپی از این سطوح باعث ایجاد خراشیدگی و زبری می‌شود و بخشی از مواد غذایی روی این سطوح باقی می‌ماند و باعث افزایش توانایی باکتری‌ها در اتصال، رشد و تشکیل بیوفیلم می‌شود که در برابر عوامل پاک‌کننده و ضدعفونی‌کننده مقاوم است. رشد این میکروارگانیسم‌ها روی تجهیزات و مواد غذایی باعث ایجاد آلودگی میکروبی در محصول می‌شود و در نتیجه به کاهش مدت‌زمان ماندگاری محصول و افزایش شیوع بیماری‌های ناشی از غذا می‌انجامد. مشکل دیگر بیوفیلم، تشکیل آن در مکان‌هایی مانند مبدل‌های حرارتی ماشین‌آلات صنایع غذایی است که باعث کاهش راندمان انتقال حرارتی می‌شود. افزون بر این، برخی از میکروارگانیسم‌های موجود در بیوفیلم، موجب خوردگی سطوح فلزی می‌شوند. سلول‌های بیوفیلم در مقایسه با سلول‌های آزاد، به عوامل باکتری‌کش و مواد ضدعفونی‌کننده مقاومت بیشتری نشان می‌دهند و رشد باکتری‌ها به‌صورت بیوفیلم بر سطوح، شستشو و از بین بردنشان را مشکل می‌کند (۸). در صنایع غذایی شناسایی راه‌های جلوگیری از تشکیل بیوفیلم، روی سطوح در تماس با مواد غذایی و نیز راه‌های از بین بردن آن بسیار مهم است و برای سلامت عمومی جامعه حائز اهمیت می‌باشد. پاک‌سازی و ضدعفونی مؤثر دستگاه‌ها و خطوط تولید در کارخانه‌های مواد غذایی، دو امر مهم و اساسی در کنترل بیوفیلم در صنعت غذا است. در این زمینه استفاده از ترکیبات ضد میکروبی که مانع از تشکیل بیوفیلم باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد می‌شوند، بسیار

(شامل ۱۶۰ میکرولیتر TSB، ۳۰ میکرولیتر محلول رزازورین و ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری) و کنترل منفی (شامل ۱۰۰ میکرولیتر استوک نانو ذره، ۷۰ میکرولیتر محیط کشت و ۳۰ میکرولیتر محلول رزازورین) در نظر گرفته شد. برای هر باکتری و هر کنترل سه تکرار در نظر گرفته شد.

میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور گرمخانه‌گذاری شد، سپس نتایج قرائت شد. تغییر رنگ رزازورین از بنفش به صورتی تا بی‌رنگ مورد مشاهده قرار گرفت و با رنگ کنترل نانوذره و کنترل هر باکتری مقایسه شد. در پایان برای هر باکتری، MIC به‌عنوان کمترین غلظت از نانوذره که مانع رشد آن باکتری شده بود، تعیین شد.

آزمایش بیوفیلیم

سنجش توانایی ایجاد بیوفیلیم توسط باکتری‌های مورد مطالعه با میکروپلیت‌های ۹۶ حفره‌ای ته‌صاف و به روش توضیح‌داده‌شده توسط Tendolkar و همکاران انجام شد (۱۴). بدین منظور باکتری‌های مورد استفاده در محیط کشت TSB به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. در هر ردیف ۱۲ تایی از میکروپلیت، ۸ چاهک به هر کدام از باکتری‌ها اختصاص داده شد و ۴ چاهک باقی‌مانده به کنترل منفی (حاوی ۲۰۰ میکرولیتر TSB خالص و بدون باکتری) اختصاص یافت. ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون رقیق‌شده از هر باکتری با غلظت 10^6 CFU/mL به همراه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت TSB در هر چاهک ریخته شد و میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از گذشت این مدت، میکروپلیت‌ها برگردانده شدند تا محیط کشت موجود در هر چاهک خالی شود، سپس چاهک‌ها سه بار با بافر فسفات استریل شسته شدند تا باکتری‌هایی که بیوفیلیم تشکیل نداده‌اند، خارج شوند. پس از آن میکروپلیت‌ها به‌صورت وارونه به مدت یک ساعت در دمای اتاق رها شدند تا خشک شوند. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کریستال ویوله ۰/۲ درصد به هر چاهک افزوده شد و میکروپلیت، ۱۵ دقیقه بدون حرکت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. آنگاه رنگ داخل چاهک‌ها خارج شد و پس از شستشو با بافر فسفات استریل، میکروپلیت‌ها در دمای اتاق خشک شدند. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۳۰٪ اسید استیک به هر چاهک افزوده شد تا رنگ باندشده با باکتری‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلیم استخراج شود.

در ادامه جذب نوری این محلول در طول موج ۵۹۵ نانومتر با میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شد و مطابق روش توضیح‌داده‌شده

مجدداً در محیط‌های کشت اختصاصی، شامل مک کانکی آگار (MacConkey agar)، سالمونلا شینگلا آگار (Salmonella Shigella agar)، برد پارکر آگار (Baird-Parker agar) و باسیلوس سرئوس سلکتیو آگار (Bacillus cereus Selective Agar) کشت و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. یک روز پیش از آزمایش، یک پرگنه خالص از هر باکتری برداشته شد و به محیط TSB افزوده شد. در روز آزمایش، با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل رقت مورد نیاز از سوسپانسیون باکتری تهیه شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (Minimum Inhibitory Concentration) نانوذره با استفاده از معرف رنگی رزازورین

برای این کار از میکروپلیت ۹۶ حفره‌ای استریل و روش Sarker و همکاران (۱۳)، البته با اندکی تغییرات، استفاده شد. در آغاز ۳۰۰ میلی‌گرم معرف رنگی رزازورین در ۴۰ میلی-لیتر آب مقطر حل و کاملاً یکنواخت شد. سپس با فیلتر سر سرنگی، استریل و به لوله استریل منتقل شد.

برای تهیه استوک نانوذره با غلظت ۱۶ mg/mL، ۱۶۰ mg از پودر نانوذره اکسید روی با محیط کشت TSB، به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد، آنگاه سوسپانسیون حاصل، در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه Sonicator همگن شد.

برای تهیه استوک هر باکتری، از باکتری‌های گرمخانه‌گذاری شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، یک میلی‌لیتر درون ۹ میلی‌لیتر نرمال سالین استریل ریخته شد و چندین بار رقیق‌سازی شد تا غلظت 10^7 CFU/mL به دست آمد.

برای تعیین MIC نانوذره اکسید روی علیه چهار گونه باکتری، ابتدا در میکروپلیت ۹۶ حفره‌ای از غلظت ۱۶ mg/mL نانوذره در محیط کشت TSB رقت‌سازی دودویی با حجم ۱۰۰ میکرولیتر تهیه شد. به‌علاوه در یک چاهک هم نانوذره با غلظت ۱۶ mg/mL ریخته شد. سپس به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^7 CFU/mL، ۳۰ میکرولیتر محلول رزازورین و ۶۰ میکرولیتر محیط کشت TSB افزوده شد. در نهایت غلظت نانوذره در هر چاهک به ترتیب ۸، ۴، ۲، ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و غلظت باکتری 10^5 CFU به دست آمد.

کنترل‌های لازم شامل کنترل محیط کشت (شامل ۱۷۰ میکرولیتر TSB و ۳۰ میکرولیتر محلول رزازورین)، کنترل مثبت

۱۰^۶ به اضافه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بود. ۴ چاهک انتهایی این ردیف هم برای کنترل محیط کشت در نظر گرفته شد که فقط ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت در آن ریخته شد. میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار یافت. پس از طی این مدت، محیط کشت موجود در هر چاهک خالی شد، سپس چاهک‌ها ۳ بار با بافر فسفات استریل شسته شدند. پس از آن میکروپلیت‌ها به صورت وارونه به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند تا خشک شدند. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کریستال ویوله ۰/۲ درصد به هر چاهک افزوده شد و میکروپلیت ۱۵ دقیقه بدون حرکت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از آن رنگ داخل چاهک‌ها خارج شد و دوباره شستشو با بافر فسفات استریل انجام گرفت و میکروپلیت‌ها در دمای اتاق خشک شدند. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۳۰٪ اسید استیک به هر چاهک افزوده شد تا رنگ باندشده با باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم استخراج شود. سپس جذب نوری این محلول در طول موج ۵۹۵ نانومتر با میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شد.

محاسبه درصد مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی
درصد مهار تشکیل بیوفیلم هر باکتری در حضور غلظت-
های مختلف نانوذره اکسید روی مطابق فرمول زیر محاسبه شد
(۱۶).

$$\text{درصد مهار تشکیل بیوفیلم} = \frac{\text{جذب نمونه بدون باکتری} - \text{جذب نمونه حاوی باکتری}}{\text{جذب کنترل رشد هر باکتری}}$$

آنالیز آماری

در این پژوهش آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد و نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($P < 0/05$) انجام پذیرفت. برای مقایسه تأثیر نانوذره بر مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های گرم مثبت و منفی، از آزمون تی استیودنت (student's t test) استفاده شد. برای این منظور نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ به کار گرفته شد.

توسط Stepanovic و همکاران، توانایی تشکیل بیوفیلم ارزیابی شد (۱۵). برای این کار میانگین جذب نوری کنترل منفی‌ها با سه برابر انحراف از معیار جذب نوری کنترل منفی‌ها جمع شد. عدد حاصل، معیار طبقه‌بندی مقادیر جذب نوری به‌دست‌آمده یا ODC (Optical Density cut-off value) نامیده شد. بر اساس آن، باکتری‌ها از نظر تشکیل بیوفیلم به چهار دسته تقسیم شدند؛
الف: باکتری‌هایی که بدون بیوفیلم هستند؛ جذب نوری این دسته کوچک‌تر و مساوی با ODC است (ODC of no biofilm < ODC of producer).

ب: باکتری‌هایی که تولید ضعیف بیوفیلم دارند؛ جذب نوری این دسته بزرگ‌تر از ODC و کوچک‌تر و مساوی با دو برابر آن است (ODC < 2 × ODC of weak biofilm producer).

پ: باکتری‌هایی که تولید متوسط بیوفیلم دارند؛ جذب نوری این دسته بزرگ‌تر از دو برابر ODC و کوچک‌تر و مساوی با چهار برابر آن است (2 × ODC < OD of moderate biofilm < 4 × ODC of producer).

ت: باکتری‌هایی که دارای بیوفیلم قوی هستند؛ جذب نوری این دسته بزرگ‌تر از چهار برابر ODC است (OD of strong biofilm producer > 4 × ODC).

تأثیر نانوذره اکسید روی در مهار تشکیل بیوفیلم

باکتری‌های مورد استفاده در محیط کشت TSB به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند، سپس با استفاده از رقت‌سازی سری، استوک باکتری با غلظت ۱۰^۶CFU/mL تهیه شد. هر میکروپلیت برای دو باکتری مورد استفاده قرار گرفت و برای هر باکتری استوک نانوذره با غلظت ۴ برابر MIC (4MIC) تهیه شد. در هر ردیف، ۱۰۰ میکروپلیت از محیط کشت TSB درون چاهک‌ها ریخته شد، سپس در چاهک اول، ۱۰۰ میکروپلیت از استوک نانوذره با غلظت ۴MIC ریخته شد و رقت‌سازی سری دوتایی انجام گرفت و در پایان، غلظت نانوذره در چاهک‌ها به ترتیب MIC، 2MIC، 1/2MIC، 1/4MIC و 1/8MIC شد. در هر چاهک ۱۰۰ میکروپلیت از استوک باکتری با غلظت ۱۰^۶CFU/mL ریخته شد. این مراحل برای هر باکتری در ۳ ردیف (۳ تکرار) انجام شد. یک ردیف از میکروپلیت به‌عنوان کنترل نانوذره در نظر گرفته شد که تنها محیط کشت و غلظت‌های مختلف نانوذره در چاهک‌ها ریخته شد. در یک ردیف هم ۴ چاهک اول به‌عنوان کنترل رشد باکتری اول و ۴ چاهک دوم به‌عنوان کنترل رشد باکتری دوم در نظر گرفته شد که حاوی ۱۰۰ میکروپلیت باکتری با غلظت CFU/mL

یافته‌ها

تعیین MIC نانوذره با استفاده از معرف رنگی

رزازورین

کمترین غلظت (میلی گرم در میلی لیتر) مهارکننده نانوذره اکسید روی بر باکتری‌های مورد بررسی در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. کمترین غلظت (میلی گرم در میلی لیتر) مهارکننده نانوذره اکسید روی بر باکتری‌های بررسی شده

MIC	باکتری
۱	اشریشیا کلی
≤ 0.5	استافیلوکوکوس اورئوس
۱	سالمونلا تیغی موریوم
۲	باسیلوس سرئوس

سنجش توانایی ایجاد بیوفیلم توسط باکتری‌های

مورد مطالعه

جدول شماره ۲ جذب نوری باکتری‌ها و کنترل منفی را در طول موج ۵۹۵ نانومتر نشان می‌دهد.

جدول ۲. جذب نوری باکتری‌ها و کنترل منفی در طول موج ۵۹۵ نانومتر

نمونه	جذب نوری
اشریشیا کلی	0.1808 ± 0.071
استافیلوکوکوس اورئوس	0.1552 ± 0.053
سالمونلا تیغی موریوم	0.1511 ± 0.014
باسیلوس سرئوس	0.1435 ± 0.034
کنترل منفی	0.1359 ± 0.014

اعداد میانگین \pm انحراف از معیار به دست آمده از جذب نوری ۸ تکرار از نمونه های بررسی شده را نشان می‌دهند.

برای سنجش توانایی ایجاد بیوفیلم توسط باکتری‌های مورد مطالعه، میانگین جذب نوری کنترل منفی با سه برابر انحراف از معیار جذب نوری کنترل منفی جمع شد و عدد حاصل، معیار طبقه بندی مقادیر جذب نوری به دست آمده یا ODC (Optical Density cut-off value) نامیده شد. سپس با مقایسه جذب نوری هر باکتری با مقادیر مختلف ODC، ($ODc = 0.401$)، $2ODc =$

0.802 و $4ODc = 1.604$)، باکتری‌ها از نظر توانایی تشکیل بیوفیلم به دو دسته ضعیف و متوسط تقسیم شدند (جدول شماره ۳).

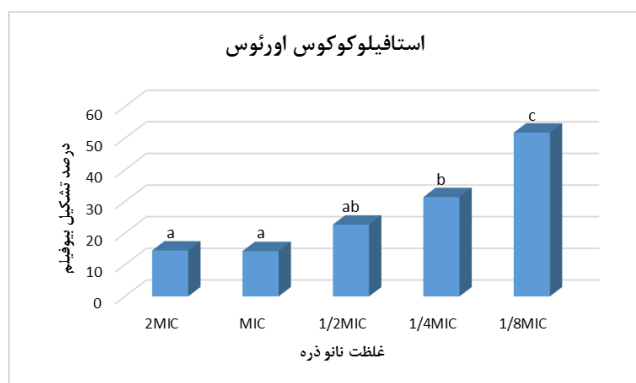
جدول ۳. طبقه بندی باکتری‌ها از نظر تشکیل بیوفیلم بر اساس ODC (Optical Density cut-off value)

باکتری	قدرت تشکیل بیوفیلم
اشریشیا کلی	متوسط
استافیلوکوکوس اورئوس	ضعیف
سالمونلا تیغی موریوم	ضعیف
باسیلوس سرئوس	ضعیف

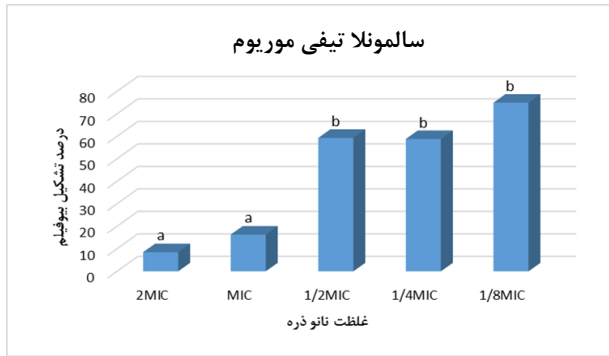
درصد تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های مورد مطالعه

در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی

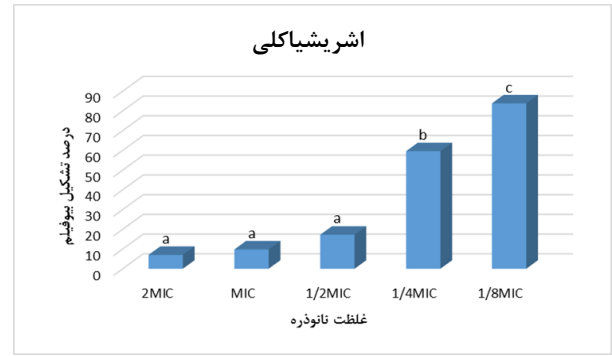
درصد تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های مورد مطالعه در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی در نمودارهای ۱ تا ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که در نمودارها مشاهده می‌شود، با کاهش غلظت نانوذره، توانایی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها افزایش یافت، ولی این افزایش در غلظت MIC $1/2$ در باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی در مقایسه با غلظت MIC و $2MIC$ تفاوت آماری معنی داری را نشان نداد ($P > 0.05$)؛ زیرا حضور نانوذره با غلظت MIC $1/2$ ممکن است رشد باکتری‌ها را مهار نکند، ولی موجب بروز اختلالاتی در توانایی تشکیل بیوفیلم توسط آن‌ها شود.



نمودار ۱. درصد تشکیل بیوفیلم توسط باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در حضور غلظت‌های مختلف از نانوذره اکسید روی. حروف غیرمشابه نشانگر تفاوت آماری معنی دار هستند.



نمودار ۴. درصد تشکیل بیوفیلم توسط باکتری سالمونلا تیفی موربوم در حضور غلظت‌های مختلف از نانوذرة اکسید روی. حروف غیرمشابه نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار هستند.

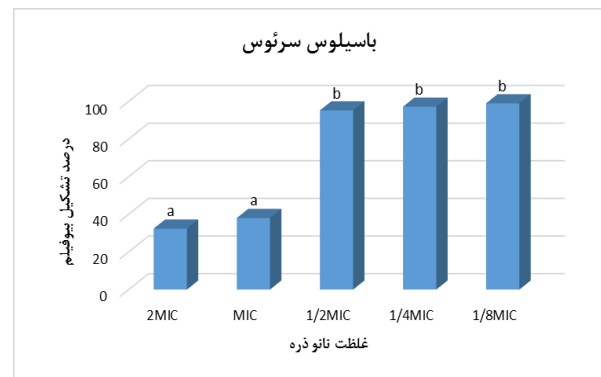


نمودار ۲. درصد تشکیل بیوفیلم توسط باکتری اشربیشیا کلی در حضور غلظت‌های مختلف از نانوذرة اکسید روی. حروف غیرمشابه نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار هستند.

درصد مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها در حضور

غلظت‌های مختلف نانوذرة اکسید روی

درصد مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرة اکسید روی در جدول شماره ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول دیده می‌شود، نانوذرة اکسید روی در غلظت‌های زیر MIC (Sub inhibitory concentration) یا Sub-MIC نیز توانایی مهار تشکیل بیوفیلم را داشت و حتی در باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشربیشیا کلی، غلظت 1/2MIC نانوذره در مقایسه با غلظت MIC و 2 MIC آن، تفاوت آماری معنی‌داری را در توانایی مهار تشکیل بیوفیلم نشان نداد ($P > 0.05$).



نمودار ۳. درصد تشکیل بیوفیلم توسط باکتری باسیلوس سرئوس در حضور غلظت‌های مختلف از نانوذرة اکسید روی. حروف غیرمشابه نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار هستند.

جدول شماره ۴. میانگین درصد مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرة اکسید روی

1/8 MIC	1/4 MIC	1/2 MIC	MIC	2 MIC	باکتری
16/17 ± 7/21 ^{cB}	40/41 ± 18/84 ^{bB}	82/75 ± 18/86 ^{aA}	90/20 ± 0/25 ^{aA}	92/98 ± 5/85 ^{aA}	اشربیشیا کلی
48/22 ± 10/5 ^{cA}	68/59 ± 2/50 ^{bA}	77/30 ± 2/46 ^{abA}	85/69 ± 9/42 ^{aA}	85/50 ± 2/91 ^{aA}	استافیلوکوکوس اورئوس
25/02 ± 1/51 ^{bB}	41/15 ± 7/97 ^{bB}	40/66 ± 7/22 ^{bB}	83/65 ± 15/22 ^{aAB}	91/47 ± 4/80 ^{aA}	سالمونلا تیفی موربوم
1/04 ± 0/36 ^{cC}	2/82 ± 1/88 ^{bC}	4/80 ± 1/30 ^{bC}	61/96 ± 16/15 ^{aB}	67/60 ± 4/40 ^{aB}	باسیلوس سرئوس

اعداد میانگین سه تکرار ± انحراف از معیار هستند. حروف غیرمشابه کوچک و بزرگ به ترتیب نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار در هر ردیف و ستون هستند.

در غلظت 2MIC، در بقیه موارد تفاوت آماری معنی‌داری دیده نشد.

درصد مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرة اکسید روی در جدول شماره ۵ نشان داده شده است. مطابق نتایج، به‌غیر از درصد مهار

جدول شماره ۵. میانگین ± انحراف معیار، درصد مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرة اکسید روی

1/8 MIC	1/4 MIC	1/2 MIC	MIC	2 MIC	باکتری
20/60 ± 6/72 ^a	40/78 ± 12/94 ^a	61/70 ± 26/35 ^a	86/93 ± 10/29 ^a	92/23 ± 4/85 ^a	گرم منفی
24/63 ± 26/68 ^a	35/70 ± 36/08 ^a	41/05 ± 39/74 ^a	72/82 ± 17/18 ^a	76/55 ± 10/35 ^b	گرم مثبت

حروف غیرمشابه نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار در هر ستون هستند.

بحث

اکسید روی در حال حاضر توسط اداره غذا و داروی آمریکا (FDA) به عنوان یک ماده ایمن (GRAS, Generally Recognized as Safe) به رسمیت شناخته شده و به عنوان افزودنی غذایی استفاده می شود (۱۷).

نانوذره اکسید روی در مقایسه با پودر اکسید روی اثر ضد میکروبی بیشتری بر باکتری های بیماری زای غذازاد دارد و اندازه کوچک نانوذرات سنتز شده نقش بسزایی در تشدید اثر ضد میکروبی آن ها دارند (۱۹، ۱۸)؛ بنابراین در پژوهش پیش رو، از نانوذره اکسید روی استفاده شد.

مکانیسم اصلی تأثیر نانوذرات بر باکتری ها از طریق آسیب به DNA، پروتئین و تخریب دیواره سلولی است (۲۰). نانوذره اکسید روی دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی است. رفتار فوتوکاتالیستی اکسید روی می تواند منجر به تولید انواع اکسیژن فعال شود که قادر به از بین بردن غشای سلول باکتریایی است (۲۱). نانوذره اکسید روی یکپارچگی غشای سلول باکتریایی را مختل می کند، باعث کاهش سطح آبگریزی سلول می شود و تنظیم رونویسی از ژن های مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو را کاهش می دهد (۲۲).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانوذره اکسید روی بر باکتری های بیماری زای غذازاد گرم مثبت و گرم منفی مورد مطالعه اثر ضد میکروبی دارد. کمترین غلظتی از نانوذره که توانست رشد هر باکتری را مهار کند، برای باکتری *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی*، *موریوم* و *باسیلیوس سرئوس*، به ترتیب ۱، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد.

Emami-Karvani و همکاران، در پژوهش خود، MIC نانوذره اکسید روی را برای *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۱ و ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر گزارش کردند (۲۳) که این نتیجه با نتیجه تحقیق ما همخوانی دارد.

Akiyama و همکاران در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که *استافیلوکوکوس اورئوس* به دلیل تفاوت ترکیبات دیواره سلولی اش نسبت به *اشریشیا کلی*، در مقابل استرس های شیمیایی مانند حضور آنتی بیوتیک، از حساسیت بالاتری برخوردار است (۲۴). در مطالعه ما نیز *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با *اشریشیا کلی* حساسیت بیشتری نسبت به نانوذره اکسید روی نشان داد.

Mostafa در مطالعه ای MIC نانوذره اکسید روی را برای *باسیلیوس سرئوس*، کمتر از ۱۰ و برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، کمتر از ۵ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش کرد (۲۵). در مطالعه حاضر نیز MIC نانوذره برای *باسیلیوس سرئوس* بیشتر از *استافیلوکوکوس اورئوس* بود.

در مطالعه Sinha و همکاران، باکتری گرم منفی *انترو باکتر* حساسیت بیشتری را در مقایسه با باکتری گرم مثبت *باسیلیوس سوبتیلیس* نشان داد. آن ها علت مقاوم بودن باکتری گرم مثبت *باسیلیوس سوبتیلیس* را به وجود لایه پپتیدوگلیکانی ضخیم در این باکتری نسبت دادند (۲۶). در مطالعه پیش رو نیز *باسیلیوس سرئوس* با بیشترین MIC (۲ میلی گرم در میلی لیتر)، مقاوم ترین باکتری در برابر نانوذره اکسید روی بود.

تفاوت MIC در مطالعات مختلف ممکن است به دلیل تفاوت در روش های آماده سازی نانوذره، اندازه نانوذره و تفاوت در سوش های باکتری های مورد مطالعه باشد (۲۷). حساسیت باکتری ها به نانوذرات فقط به ساختار دیواره سلولی مربوط نمی شود، بلکه ممکن است به پراکسیداسیون چربی و تولید گونه های فعال اکسیژن نیز مربوط باشد.

در مطالعه ای تأثیر روی در جلوگیری از رشد و تشکیل بیوفیلم توسط بعضی باکتری های بیماری زا در خوک بررسی شد و نتایج آن نشان داد که غلظت های nonbactericidal روی، توانایی مهار تشکیل بیوفیلم به وسیله بعضی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی بیماری زا در خوک همچون *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی* موریوم را داراست (۲۸). این مطالعه نشان داد که افزودن غلظت های sub-bactericidal روی (ZnO , $ZnCl_2$) به طور مؤثری تشکیل بیوفیلم توسط *سالمونلا تیفی* موریوم را مهار می کند که این اثر مهاري وابسته به دوز است. به علاوه تشکیل بیوفیلم توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* را نیز به طور ضعیفی مهار می کند (۲۸).

در مطالعه حاضر پس از تأیید اثر ضد میکروبی نانوذره اکسید روی بر چهار باکتری بیماری زای غذازاد مورد مطالعه، تأثیر آن بر مهار تشکیل بیوفیلم آن باکتری ها نیز بررسی شد. نتایج نشان داد که نانوذره اکسید روی در غلظت های MIC و 2MIC توانایی بالایی در مهار تشکیل بیوفیلم به وسیله *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی* موریوم دارد و از نظر آماری هیچ گونه تفاوت آماری معنی داری در میانگین درصد مهار تشکیل بیوفیلم توسط این باکتری ها در حضور نانوذره اکسید روی مشاهده نشد. در مطالعه حاضر درصد مهار تشکیل بیوفیلم

غلظت‌های کمتر از MIC نیز تا حدودی توانست تشکیل بیوفیلم را مهار کند. در این تحقیق، درصد تشکیل بیوفیلم توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* در مجاورت غلظت‌های MIC و $1/2$ MIC از نانوذره اکسید روی تفاوت آماری معنی‌داری را نشان ندادند (نمودارهای شماره ۱ و ۲)، این نتیجه بیانگر آن است که اگرچه حضور نانوذره اکسید روی در غلظت کمتر از MIC ممکن است مانع از رشد باکتری نشود، اما با ایجاد اختلالاتی در توانایی ایجاد بیوفیلم در باکتری، تشکیل بیوفیلم توسط آن را کاهش می‌دهد که البته این مسئله نیاز به تحقیق بیشتری دارد.

نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر بیانگر اثر ضد میکروبی نانوذره اکسید روی در مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد مورد مطالعه بود که می‌تواند راهکار مناسبی در استفاده از نانو اکسید روی، برای پاک‌سازی سطوح، دستگاه‌ها و خطوط تولید در کارخانه‌های مواد غذایی ایجاد کند. از آنجایی که تاکنون مطالعات زیادی در رابطه با تأثیر نانوذره اکسید روی بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد صورت نگرفته است، با توجه به اهمیت این باکتری‌ها در سلامت جامعه، انجام مطالعات بیشتر توصیه می‌شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد به خاطر حمایت‌های مالی‌ای که در انجام این تحقیق کرده‌اند، سپاسگزارند.

تعارض منافع

میان نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

نسبت به مطالعه فوق بیشتر بود که این مسئله را می‌توان به علت استفاده از پودر نانوذره اکسید روی به جای پودر اکسید روی دانست که تأثیر بیشتری در مهار تشکیل بیوفیلم باکتریایی دارد. نانوذره اکسید روی در مقایسه با پودر اکسید روی اثر ضد میکروبی بیشتری بر باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد دارد؛ اندازه کوچک نانوذرات سنتز شده نقش بسزایی در تشدید اثر ضد میکروبی آن‌ها دارند (۱۸، ۱۹).

تاکنون تحقیقات کمی در مورد تأثیر نانوذره اکسید روی بر مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها گزارش شده است (۲۹، ۳۰، ۳۱)، و مطالعات درباره تأثیر این نانوذره بر مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد محدود است.

Eshed و همکاران پوششی از نانوذره اکسید روی و اکسید مس بر روی دندان درست کردند و نتایج تحقیق آن‌ها حاکی از آن بود که این پوشش ۷۰ تا ۸۰ درصد تشکیل بیوفیلم را کاهش می‌دهد و مکانیسم این پوشش را نفوذ در باکتری و تولید رادیکال اسیژن داخل سلولی که موجب افزایش پراکسیداسیون چربی و در نتیجه مرگ سلول می‌شود، بیان کردند (۳۲).

Akhil و همکاران فعالیت ضد میکروبی و ضد بیوفیلیمی نانوذره اکسید روی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* MTCC3160 و *سودوموناس آئروژینوزا* MTCC1688 را ارزیابی کردند. نتیجه پژوهش آن بود که این نانوذره، فعالیت ضد میکروبی و ضد بیوفیلیمی خوبی دارد (۳۳).

در پژوهش حاضر، بین غلظت‌های MIC و 2MIC نانوذره اکسید روی، تفاوت آماری معنی‌داری در کاهش ایجاد بیوفیلم باکتری‌های مورد مطالعه دیده نشد. درصد مهار تشکیل بیوفیلم در غلظت MIC نانوذره علیه *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موربوم* و *باسیلوس سرئوس*، به ترتیب ۹۰/۲۰، ۸۵/۶۹، ۸۳/۶۵ و ۶۱/۹۶ درصد محاسبه شد. نانو اکسید روی در

References

- Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol 2001; 9 (1): 34-9.
- Lear G, Lewis GD, editors. Microbial biofilms: current research and applications. Horizon Scientific Press; 2012.
- Costerton JW. Overview of microbial biofilms. J Ind Microbiol 1995; 15(3): 137-40.
- Costerton JW, Irvin RT, Cheng KJ. The bacterial glycocalyx in nature and disease. Ann Rev Microbiol 1981; 35 (1): 299-324.
- Parsek MR, Fuqua C. Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. J Bacteriol 2004; 186 (14): 4427-40.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int J Food Microbiol 2004; 94 (3): 223-53.
- Bryers JD. Biofilms II: process analysis and application. Wiley, New York 2000; 327-360.
- Dunsmore DG, Twomey A, Whittlestone WG, Morgan HW. Design and performance of systems for cleaning product-contact surfaces of food equipment: a review. J Food Protect 1981; 44 (3): 220-40.

9. Whitesides GM. Nanoscience, nanotechnology, and chemistry. *Small* 2005; 1(2):172-9.
10. Bogdanović U, Lazić V, Vodnik V, Budimir M, Marković Z, Dimitrijević S. Copper nanoparticles with high antimicrobial activity. *Mater Lett* 2014; 128: 75-8.
11. Beranová J, Seydlová G, Kozak H, Benada O, Fišer R, Artemenko A, Konopásek I, Kromka A. Sensitivity of bacteria to diamond nanoparticles of various size differs in gram-positive and gram-negative cells. *FEMS Microbiol Lett* 2014; 351 (2):179-86.
12. Huh AJ, Kwon YJ. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Control Release* 2011; 156 (2):128-45.
13. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 2007; 42 (4):321-4.
14. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 2004; 72 (10):6032-9.
15. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura GD, Djukić S, Ćirković I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis* 2007; 115 (8):891-9.
16. Nikolić M, Vasić S, Đurđević J, Stefanović O, Čomić L. Antibacterial and anti-biofilm activity of ginger (*Zingiber Officinale* (Roscoe)) ethanolic extract. *Kragujevac J Sci* 2014; 36:129-36.
17. Espitia PJ, Soares ND, dos Reis Coimbra JS, de Andrade NJ, Cruz RS, Medeiros EA. Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. *Food Bioprocess Tech* 2012; 5(5):1447-64.
18. Esmailzadeh H, Sangpour P, Khaksar R, Shahraz F. The effect of ZnO nanoparticles on the growth of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Technol Nutr* 2014; 11(3): 21-28. [in Persian]
19. Mohammadbeigi P, Sodagar M, Mazandarani M, Hoseini SS. An investigation of antibacterial activity of ZnO nanoparticle on *Streptococcus iniae* and *Escheria coli*. *Qom Univ Med Sci J* 2016:55-63.
20. Zhang L, Jiang Y, Ding Y, Daskalakis N, Jeuken L, Povey M, O'Neill AJ, York DW. Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against *E. coli*. *J Nanopart Res* 2010; 12(5):1625-36.
21. Li X, Xing Y, Jiang Y, Ding Y, Li W. Antimicrobial activities of ZnO powder-coated PVC film to inactivate food pathogens. *Int J Food Sci Tech* 2009; 44(11):2161-8.
22. Pati R, Mehta RK, Mohanty S, Padhi A, Sengupta M, Vaseharan B, Goswami C, Sonawane A. Topical application of zinc oxide nanoparticles reduces bacterial skin infection in mice and exhibits antibacterial activity by inducing oxidative stress response and cell membrane disintegration in macrophages. *Nanomed-Nanotechnol* 2014; 10(6):1195-208.
23. Emami-Karvani Z, Chehrizi P. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on gram-positive and gram-negative bacteria. *Afr J Microbiol Res* 2011; 5(12):1368-73.
24. Akiyama H, Yamasaki O, Kanzaki H, Tada J, Arata J. Effects of zinc oxide on the attachment of *Staphylococcus aureus* strains. *J Dermatol Sci* 1998; 17(1):67-74.
25. Mostafa AA. Antibacterial activity of Zinc oxide nanoparticles against toxigenic *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* isolated from some Egyptian food. *Int J Microbiol Res* 2015; 6(2):145-54.
26. Sinha R, Karan R, Sinha A, Khare SK. Interaction and nanotoxic effect of ZnO and Ag nanoparticles on mesophilic and halophilic bacterial cells. *Bioresource Technol* 2011; 102 (2):1516-20.
27. Yousef JM, Danial EN. In vitro antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of zinc oxide and nano-particle zinc oxide against pathogenic strains. *J Health Sci* 2012; 2(4):38-42.
28. Wu C, Labrie J, Tremblay YD, Haine D, Mourez M, Jacques M. Zinc as an agent for the prevention of biofilm formation by pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol* 2013;115(1):30-40.
29. Lee JH, Kim YG, Cho MH, Lee J. ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiol Res* 2014; 169(12):888-96.
30. Vijayakumar S, Vinoj G, Malaikozhundan B, Shanthi S, Vaseeharan B. Plectranthus amboinicus leaf extract mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles and its control of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilm and blood sucking mosquito larvae. *Spectrochim Acta A* 2015; 137:886-91.
31. Dhillon GS, Kaur S, Brar SK. Facile fabrication and characterization of chitosan-based zinc oxide nanoparticles and evaluation of their antimicrobial and antibiofilm activity. *Int Nano Lett* 2014; 4(2):1-1.
32. Eshed M, Lellouche J, Gedanken A, Banin E. A Zn-doped CuO nanocomposite shows enhanced antibiofilm and antibacterial activities against streptococcus mutans compared to nanosized CuO. *Adv Funct Mater* 2014; 24(10):1382-90.
33. Akhil K, Jayakumar J, Gayathri G, Khan SS. Effect of various capping agents on photocatalytic, antibacterial and antibiofilm activities of ZnO nanoparticles. *J Photoch Photobio B* 2016; 160:32-42.