



Evaluation the effects of zinc oxide nanoparticles and *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) biosurfactant on biofilm formationn of pathogenic bacteria

Zahra Hosseini ¹, Fatemeh Noorbakhsh ², Raheleh Safaei javan ³

¹ Student of MSc, Department of Microbiology, Biological Science college, Varamin-pishvabbranch, Islamic Azad university, Varamin-Pishva, Iran. ² Associate professor, Department of Microbiology, Biological Science college, Varamin-pishvabbranch, Islamic Azad university, Varamin-Pishva, Iran. ³ Associate professor Department of Biochemistry and Biophysics, Biological Science college, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Recent advances in nanotechnology, particularly the ability to nanoparticles in various shapes and sizes, along with the use of natural bacterial products like biosurfactants, have led to the development of a broad range of antimicrobial agents. This study aimed to investigate the anti-biofilm activity of zinc oxide nanoparticles and the biosurfactant produced by *Lactobacillus plantarum* against pathogenic bacteria.

Materials and methods: This study was conducted on 4 pathogenic bacteria (10 strains of each bacterium) of *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*. Biosurfactant was extracted from *Lactobacillus plantarum* bacteria. The minimum inhibitory concentration of the biosurfactant *Lactobacillus plantarum* and zinc oxide nanoparticles was determined to measure the antimicrobial potential by serial dilution method. Anti-biofilm potential of bacteria was measured using the microtiter plate method.

Results: For *S. aureus*, no significant difference in biofilm formation was observed between zinc oxide nanoparticles and the biosurfactant. Both exhibited statistically similar anti-biofilm properties. However, significant differences were observed in the inhibition of biofilm formation for *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *A. baumannii*. While zinc oxide nanoparticles had limited capability to prevent biofilm formation, the biosurfactant from *Lactobacillus plantarum* exhibited a remarkable anti-biofilm effect, with statistically significant differences in anti-biofilm properties.

Conclusion: The findings indicated that zinc oxide nanoparticles are less effective than the biosurfactant from *Lactobacillus plantarum* in inhibiting biofilm formation in *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *A. baumannii*. These results highlight the potential of these materials in modulating bacterial biofilm formation and cellular activities.

Key words: anti-biofilm activity, zinc oxide nanoparticles, *Lactobacillus plantarum* biosurfactant, pathogenic bacteria.

Received: 15 September 2024

Revised: 5 November 2024

Accepted: 2 December 2024

Correspondence to: Fatemeh Noorbakhsh

Tel: +98 9122043654

E-mail: nilloofar_noorbakhsh@yahoo.com

Journal of Microbial World 2024, 17 (3): 198 - 210

DOI: <https://doi.org/10.82363/jmw.2024.1201624>



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



بررسی اثر نانوذرات اکسید روی و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم (لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم) بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌های بیماری‌زا

زهرا حسینی^۱، فاطمه نوربخش^{۲*}، راحله صفایی‌جوان^۳

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین- پیشوا، ایران. ^۲ دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین- پیشوا، ایران. ^۳ دانشیار، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین- پیشوا، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: پیشرفت‌های اخیر در زمینه نانوتکنولوژی، به‌ویژه توانایی ساخت نانوذرات در شکل‌ها و اندازه‌های مختلف و همچنین استفاده از محصولات طبیعی باکتری‌ها مانند بیوسورفکتانت‌ها، دامنه وسیعی از عوامل ضد میکروبی ایجاد شده است. هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضد بیوفیلمی نانوذرات اکسید روی و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر باکتری‌های بیماری‌زا بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی بر روی ۴ (از هر باکتری ۱۰ سویه) باکتری بیماری‌زای *اشریشیا کلی*، *اسینتوباکتر بومانی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شد. از باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم بیوسورفکتانت استخراج شد. حداقل غلظت بازدارنده از رشد این بیوسورفکتانت و نانوذرات اکسید روی در سنجش پتانسیل ضد میکروبی به روش تعیین رقت‌های متوالی استفاده شد. سنجش پتانسیل ضد بیوفیلمی بر باکتری‌های مذکور به روش میکروتیتر پلیت انجام شد.

یافته‌ها: بین تشکیل و عدم تشکیل بیوفیلم در گروه‌های نانو اکسید روی و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نانوذره اکسید روی و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم از لحاظ آماری دارای خاصیت ضد بیوفیلمی هستند. بین تشکیل و عدم تشکیل بیوفیلم در گروه‌های نانو اکسید روی و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم به ترتیب در باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *اسینتوباکتر بومانی* تفاوت معنی‌داری وجود دارد. به‌طوری‌که نانوذرات اکسید روی قابلیت چندان در عدم تشکیل بیوفیلم ندارد در حالیکه بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم دارای قابلیت قابل توجهی در عدم تشکیل بیوفیلم است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد بیوسورفکتانت‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم در توقف تولید بیوفیلم در *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *اسینتوباکتر بومانی* موثر است. نتایج اهمیت این مواد را در تنظیم تشکیل بیوفیلم باکتریایی و فعالیت‌های سلولی نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: فعالیت ضد بیوفیلمی، نانوذره اکسید روی، بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم، باکتری‌های بیماری‌زا.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۹/۱۲

ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۸/۱۵

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۶/۲۵

مقدمه

باکتری‌ها ایجاد می‌شوند (۱). چسبیدن باکتری‌ها به سطوح مسئله مهمی در اکولوژی، بیوتکنولوژی، آلودگی زیستی و تیمار فاضلاب است (۲). بیوفیلم‌ها مشکلات شایعی مانند عفونت‌های مجاری ادراری و وابسته به کاتتر، عفونت‌های گوش میانی، تشکیل پلاک دندان، التهاب لثه و آلودگی لنزهای

بیوفیلم‌ها اجتماعات پیچیده باکتریایی متصل به سطوح هستند که توسط یک ماتریکس خارج سلولی تولید شده توسط

(* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران.
تلفن: ۰۹۱۲۲۰۴۳۶۵۴ پست الکترونیک: niloofar_noorbakhsh@yahoo.com



تماسی را ایجاد می‌کنند (۳).

بیوسورفکتانت‌ها (BS) دسته‌ای از سورفکتانت‌های طبیعی با منشأ میکروبی هستند (۴)، که همانند سورفکتانت‌های سنتزی، ملکول‌هایی دوگانه دوست هستند و خصوصیات مطلوبی نظیر خاصیت پاک‌کنندگی، امولسیون‌کنندگی، کف‌کنندگی و ترک‌ندگی سطوح جامد را دارند (۵). نشان داده شده است که بیوسورفکتانت لاکتوباسیل‌ها، پاتوژن‌های غذایی را مهار می‌کنند، دارای خواص ضدبیوفیلم و ضدچسبندگی و همچنین دارای فعالیت‌های ضدویروسی و ضدسرطانی هستند (۶و۷). لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*L. plantarum*)، گونه‌ای پرکاربرد از لاکتوباسیل‌ها است. این زیرگروه از باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) شامل پروکاریوت‌های موجود در طیف وسیعی از محیط‌های متنوع از جمله؛ دستگاه گوارش (GIT) پستانداران، مخاط واژن، ماتریس‌های غذایی، خاک و سوبه‌های مرتبط با سبزیجات می‌باشد (۸). فعالیت ضد میکروبی و ضدویروسی اعمال شده توسط میکروارگانیسم‌های مفید، مانند لاکتوباسیلوس پلانتاروم، به انواع مولکول‌ها (اسیدهای آلی، پپتیدها، اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه (SCFA) و سایر متابولیت‌ها بستگی دارد (۹) که با مکانیسم‌های متفاوتی عمل می‌کنند و گاهی اوقات، اثرات سینرژیک یا هم‌افزایی در برابر باکتری‌های هدف ایجاد می‌کنند (۱۰و۱۱).

نانوذره اکسید روی دارای خاصیت ضدباکتری بر طیف گسترده‌ای از گونه‌های باکتریایی است که توسط بسیاری از محققین مورد بررسی قرار گرفته است (۱۲). این نانوذرات دارای اثرات ضد میکروبی بوده (۱۳) و نسبت به نانوذرات نقره مزایایی دارند، از جمله این مزیت‌ها می‌توان به قیمت پایین‌تر، ظاهر سفید رنگ و توانایی بلوکه کردن اشعه فرابنفش اشاره کرد (۱۴).

امروزه کاربرد نانوذرات در حذف باکتری‌های بیماری‌زا بسیار مورد توجه است. افزایش عفونت توسط باکتری‌های بیماری‌زا سبب مشکلات اجتماعی و اقتصادی بسیاری شده است و از سویی دیگر پیشرفت مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، محققین را به سمت استفاده از نانوتکنولوژی سوق

داده است (۱۲). در این پژوهش به بررسی فعالیت ضد میکروبی و ضدبیوفیلمی در مواجهه با نانوذرات اکسید روی و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر باکتری‌های بیماری‌زا پرداخته خواهد شد.

مواد و روش‌ها

(الف) جمع‌آوری نمونه: در این مطالعه ۴ نوع باکتری بیماری‌زا /شریشیاکلی، /سیتوباکتر بومانی، /سودوموناس آئروژینوزا و /استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های ادرار ۸۵ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان میلاد تهران جدا شد و از هر باکتری ۱۰ سوبه مورد بررسی قرار گرفت.

نمونه‌ها در محیط کشت بلاد آگار (Merck، آلمان) کشت و سپس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت یک شب گرمخانه‌گذاری شدند تا باکتری‌ها جدا شوند. رنگ‌آمیزی گرم بر روی کلنی‌های حاصل انجام شد.

سوبه‌های گرم منفی مطابق با دستورالعمل‌های (Manual of Clinical Microbiology) شناسایی و تحت آزمایش‌های افتراقی قرار گرفتند. این آزمایش‌ها شامل تست ایندول، مک کانکی آگار، اتوزین متیل بلو آگار، سیمون سترات آگار، تست اوره‌آز، تست TSI، MR-VP، تست‌های تخمیر قند، کاتالاز و تست اکسیداز بود (۱۵). برای جداسازی باکتری /استافیلوکوکوس اورئوس از تست کاتالاز، کوآگولاز، مانیتول سالت آگار، تست نوویوسین و تست DNase استفاده شد.

(ب) جداسازی بیوسورفکتانت از لاکتوباسیلوس: سوبه باکتریایی لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC8014 از انستیتو پاستور ایران تهیه و بر روی محیط جامد MRS (deMan, Rogosa and Sharpe) آگار کشت داده شد.

برای تولید، استخراج و خالص‌سازی بیوسورفکتانت‌ها، کشت‌های باکتریایی ابتدا در محیط MRS براث کشت و در انکوباتور شیکر در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. محیط کشت حاوی باکتری‌های رشد یافته سانتریفیوژ گردید و مایع رویی از رسوب باکتریایی جدا شد. pH مایع رویی به دست آمده با استفاده از اسید

جدا شده طبق استاندارد CLSI 2021 انجام گردید (۱۷).
(و) بررسی اثر ضد میکروبی بیوسورفکتانت و نانوذره اکسید روی: اثر ضد میکروبی بیوسورفکتانت و نانوذره اکسید روی به روش میکرو دیالیشن برات با استفاده از میکرو پلیت ۹۶ خانه انجام شد. ابتدا رقت‌های سریالی از بیوسورفکتانت و ZnONP در محیط کشت مولر هیتون برات تهیه شد. سپس، به هر چاهک از میکرو پلیت، به طور جداگانه ۱۰۰ میکرو لیتر از هر غلظت افزوده شد.

غلظت‌های مختلف بیوسورفکتانت (۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶، ۰/۷۸، ۰/۳۹، ۰/۱۹، ۰/۰۹۷، ۰/۰۴۸، ۰/۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر) و غلظت‌های مختلف ZnONP (۴۰۹۲، ۲۰۴۶، ۱۰۲۳، ۵۱۱/۵، ۲۵۵/۷۵ میکرو گرم در میلی لیتر) بود.

در انتها به چاهک‌ها ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^6 اضافه شد. در ادامه برای اطمینان از صحت انجام آزمون از چاهک‌های کنترل مثبت (محیط کشت و باکتری) و کنترل منفی (محیط کشت، بیوسورفکتانت/ محیط کشت، نانوذره) نیز استفاده شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. بعد از گذشت این مدت چاهک‌ها از نظر رشد و عدم رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. کمترین غلظت از ماده که مانع رشد میکروارگانیسم بود به عنوان حداقل غلظت بازدارنده رشد گزارش شد.

(ز) بررسی تشکیل بیوفیلم: ابتدا محیط کشت Tryptic Soy Broth (TSB) حاوی ۲٪ گلوکز تهیه و استریل گردید. برای تهیه سوسپانسیون باکتری، سویه‌های مورد مطالعه در مقداری از محیط TSB حاوی ۲٪ گلوکز به کدورت نیم مک فارلند رسانده شد. در انتها در یک پلیت ۹۶ خانه به هر چاهک سوسپانسیون باکتری یاد شده اضافه شد. ۳ چاهک کنترل منفی که در آن باکتری اضافه نشده بود (عدم رشد باکتری در نتیجه عدم تشکیل بیوفیلم) و ۳ چاهک کنترل مثبت که حاوی باکتری بود (رشد باکتری و تشکیل بیوفیلم) در پلیت استفاده شد. سپس پلیت‌ها ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردید.

کلریدریک ۱ نرمال روی ۲ تنظیم شد و به دنبال آن یک شب در یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد تا رسوب بیوسورفکتانت ایجاد شود. رسوب قهوه ای حاصل، حاوی بیوسورفکتانت، با سانتریفیوژ جدا شد. برای خالص سازی نسبی، ۱۰ میلی لیتر از مخلوط کلروفرم- متانول (۲:۱ v/v) به رسوب اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر هم زده شد. سپس این مخلوط سانتریفیوژ شد و پس از آن مایع رویی به طور کامل در انکوباتور در دمای ۴۰ درجه سلسیوس خشک شد. در نهایت بیوسورفکتانت به صورت رسوب سفید رنگ به دست آمد (۱۶).

(ج) نانوذره اکسید روی: این نانوذره از شرکت Arminano (ایران با شماره کاتالوگ ZNP402) تهیه شد. این نانوذره دارای ساختار کریستالی ۶ وجهی است و ذرات آن به صورت کروی و دارای ابعاد ۵۰ تا ۱۰۰ نانومتر هستند.

(ه) تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی: برای انجام تست حساسیت میکروبی از روش دیسک دیفیوژن یا انتشار دیسک استفاده شد. نوع محیط کشت در اندازه هاله عدم رشد و میزان نفوذ آنتی بیوتیک تاثیر به سزایی دارد. محیط مولر هیتون آگار به عنوان محیط انتخابی برای این آزمایش به کار رفت. تست تعیین حساسیت با دیسک آنتی بیوتیک‌های (پادتن طب ایران) نیترو فورانتوئین (۳۰۰ میکرو گرم)، کانامایسین (۳۰ میکرو گرم)، جنتامایسین (۱۰ میکرو گرم)، آمیکاسین (۱۵ میکرو گرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکرو گرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکرو گرم)، توبرامایسین (۱۰ میکرو گرم)، اریترومایسین (۱۵ میکرو گرم)، ریفاپیسین (۵ میکرو گرم)، لینزولید (۱۰ میکرو گرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکرو گرم)، کلیندامایسین (۲ میکرو گرم)، وانکومایسین (۳۰ میکرو گرم)، تری متوپریم (۵ میکرو گرم)، سفوکسیتین (۳۰ میکرو گرم)، آزیترومایسین (۵ میکرو گرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکرو گرم)، لووفلوکساسین (۵ میکرو گرم)، پپراسیلین (۱۰۰ میکرو گرم)، کولیستین (۱۰ میکرو گرم)، جنتامایسین (۱۰ میکرو گرم) و مروپنم (۱۰ میکرو گرم)، آمپی سیلین - سولباکتام (۱۰/۱۰ میکرو گرم)، تری متوپریم - سولفامتوکسازول (۱/۲۵ میکرو گرم) بر روی نمونه‌های

آزمون Shapiro-wilk برای بررسی نرمال بودن توزیع میانگین‌ها استفاده شد و نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه (one-way analysis of variance) مورد بررسی قرار گرفت و اطلاعات به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین نمایش داده شده و سطح معنی داری در آزمون‌ها ۰/۰۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

الف) نتایج تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی: تمامی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس/مقاومت کاملی در برابر اگزاسیلین نشان دادند. علاوه بر این، ۸۰ درصد سویه‌ها به آزیترومایسین، سیپروفلوکساسین و کلیندامایسین (هر کدام ۸ سویه)، ۷۰ درصد سویه‌ها به تتراسایکلین (۷ سویه)، ۵۰ درصد سویه‌ها به ریفامپین (۵ سویه) و ۲۰ درصد سویه‌ها به نیتروفرانتوئین (۲ سویه) مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان دادند. جالب توجه است که هیچ یک از سویه‌ها به تری متوپریم، وانکومایسین، لینزولید یا کلرامفنیکل مقاومت نشان ندادند. سویه سودوموناس آئروژینوزا ۱۰۰ درصد مقاومت به سیپروفلوکساسین و مروپنم نشان داد. علاوه بر این، میزان مقاومت ۹۰ درصد برای آمیکاسین، جنتامایسین و پیراسیلین (۹ سویه) و ۱۰۰ درصد برای لوفلوکساسین (۱۰ سویه) ذکر شد. هشت سویه (۸۰ درصد) نسبت به سفنازیدیم مقاومت نشان دادند، ۹۰ درصد باکتری‌ها نسبت به کولیستین حساسیت نشان دادند. ده سویه /سیتوباکتر بومانی به سیپروفلوکساسین (CIP)، تتراسایکلین، پیراسیلین، سفنازیدیم، مروپنم (MER) و کوتریموکسازول (TRI/MEX) ۱۰۰ درصد مقاومت نشان دادند. علاوه بر این، ۲ سویه به کولیستین و ۴ سویه به آمپی سیلین/سولباتام مقاومت نشان دادند. ۹۰ درصد از سویه‌های /شریشیا کلی به داروهای سیپروفلوکساسین و کانامایسین مقاومت نشان دادند. ۶۰ درصد سویه‌ها (۶ سویه) به آمیکاسین، تتراسایکلین و مروپنم مقاومت نشان دادند، در حالی که ۷۰ درصد سویه‌ها (۷ سویه) به جنتامایسین و توبرامایسین مقاومت نشان دادند. هیچ گونه‌ای از /شریشیا کلی مقاومت به نیتروفرانتوئین نشان نداد (نمودار ۱).

برای تجزیه و تحلیل نتایج از روش ODc استفاده شد. میانگین OD و انحراف استاندارد چاه‌های کنترل منفی برای محاسبه ODc تعیین شد. سپس ODc با استفاده از فرمول محاسبه شد $ODc = \text{میانگین OD چاه‌های کنترل منفی} + (3 \times \text{انحراف استاندارد چاه‌های کنترل منفی})$ (۱۸).

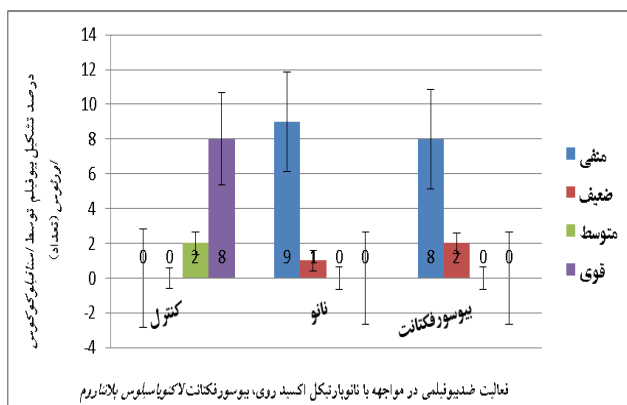
پس از محاسبه ODc یا OD Cutf چاهک‌های مورد مطالعه را طبق جدول زیر (جدول ۱) طبقه بندی گردید:

جدول ۱: میزان ODc یا OD Cutf چاهک‌های مورد مطالعه.

$OD > 4 \times ODc$	بیوفیلم قوی
$2 \times ODc < OD \leq 4 \times ODc$	بیوفیلم متوسط
$ODc < OD \leq 2 \times ODc$	بیوفیلم ضعیف
$OD \leq ODc$	بیوفیلم منفی

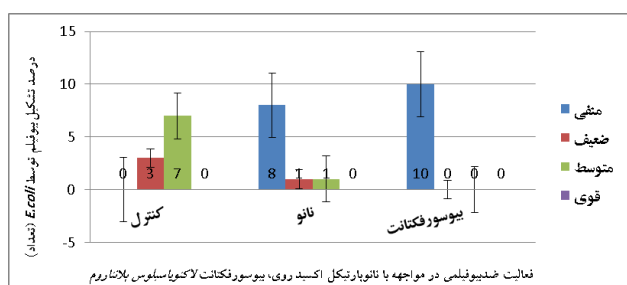
ح) تعیین حداقل غلظت بازدارنده بیوسورفکتانت و نانوذره برای تشکیل بیوفیلم: برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده بیوفیلم، اثر بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتروم و نانوذره اکسید روی بر روی ۱۰ سویه بیوفیلم قوی با استفاده از میکروتیتراپل پتی استرنی بررسی و تعیین شد. ابتدا به تمامی چاهک‌های مورد مطالعه ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مولر هینتون براث افزوده شد. سپس به چاهک‌های ردیف اول ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت MIC بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتروم اضافه شد. در انتها ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^6 (۱/۱۰۰) کدورت نیم مک فارلند) به تمامی چاهک‌های مورد مطالعه افزوده شد. برای هر پلیت یک چاهک کنترل مثبت (محیط کشت و سوسپانسیون باکتری) و یک چاهک کنترل منفی (محیط کشت و بیوسورفکتانت) استفاده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه تیمار شدند. تمامی این مراحل برای نانوذره اکسید روی نیز انجام شد. نهایتاً، کدورت تمام چاهک‌ها با استفاده از دستگاه الیزا در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانش شدند.

ط) روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام گردید. از



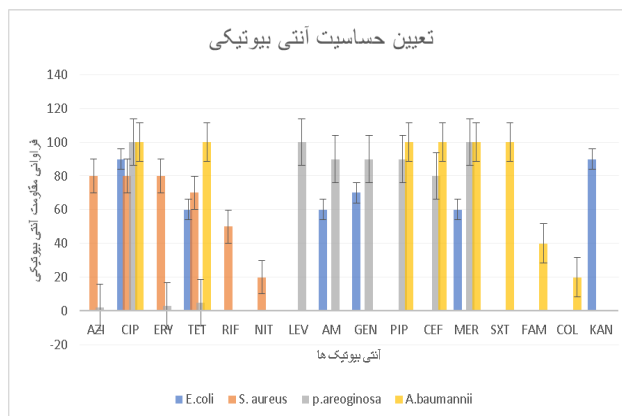
نمودار ۲: فعالیت ضدبیوفیلمی نانوذرات اکسید روی، بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس.

د) اثر نانوذره نقره و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر تشکیل بیوفیلم در اشریشیا کلی: بر اساس نتایج، از نمونه‌های شاهد/اشریشیا کلی، ۷۰ درصد جدایه‌ها دارای درجه متوسط تشکیل بیوفیلم بودند، در حالی که ۳۰ درصد سویه‌ها بیوفیلم ضعیفی تشکیل دادند. در حضور نانوذره نقره ۸۰٪ سویه‌ها بیوفیلم تشکیل ندادند و ۱۰٪ سویه‌ها بیوفیلم ضعیف و ۱۰٪ سویه‌ها بیوفیلم متوسط تشکیل دادند. در حضور بیوسورفکتانت ۱۰۰٪ سویه‌ها بیوفیلم تشکیل ندادند (نمودار ۳). در باکتری اشریشیا کلی در تشکیل بیوفیلم (متوسط، ضعیف و منفی) بین نمونه‌های تیمار شده با نانوذرات و بیوسورفکتانت و کنترل تغییرات آماری معنی‌داری نشان داده شد ($P < 0.05$).



نمودار ۳: فعالیت ضدبیوفیلمی نانوذرات اکسید روی و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر اشریشیا کلی.

ه) اثر نانوذره نقره و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا: نتایج نشان داد که ۲۰ درصد از جدایه‌ها در بین نمونه‌های کنترل باکتری سودوموناس آئروژینوزا تشکیل بیوفیلم قوی داشتند، در حالی

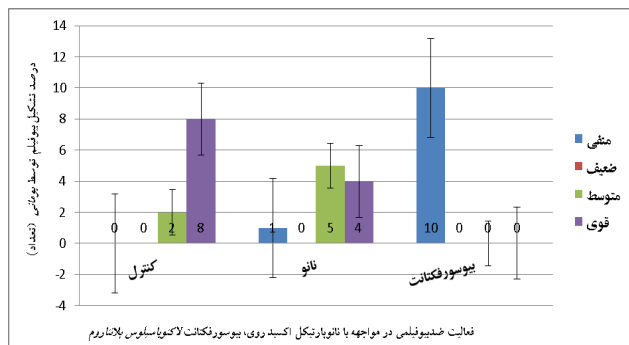


نمودار ۱: الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، اسیتوباکتر بومانی، اشریشیا کلی.

ب) نتایج MIC نانوذره نقره و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم: حداقل غلظت مهار (MIC) نانوذرات اکسید روی در همه باکتری‌ها ۴۰۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت مهار بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم، در استافیلوکوکوس اورئوس، برای ۴۰٪ سویه‌ها ۶/۲۵ و برای ۵۰٪ سویه‌ها ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، در باکتری اشریشیا کلی در محدوده ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، برای سودوموناس آئروژینوزا ۲۰٪ سویه‌ها ۳/۱۲، ۵۰٪ سویه‌ها ۶/۲۵ و ۳۰ درصد سویه‌ها ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای اسیتوباکتر بومانی برای ۴۰٪ سویه‌ها ۶/۲۵ و ۶۰٪ سویه‌ها ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر متغیر بود.

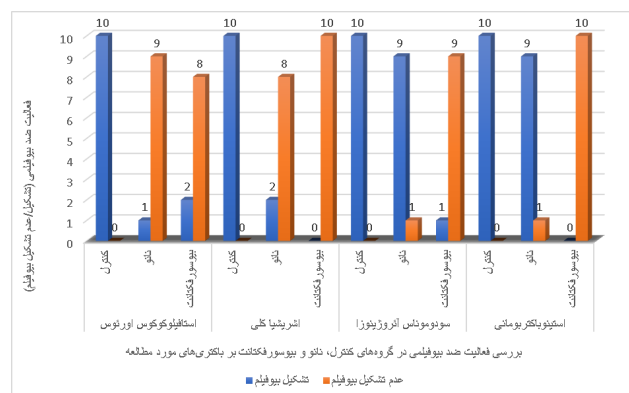
ج) اثر نانوذره نقره و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر تشکیل بیوفیلم در استافیلوکوکوس اورئوس: نتایج نشان داد که ۸۰ درصد جدایه‌ها در بین نمونه‌های شاهد/استافیلوکوکوس اورئوس تشکیل بیوفیلم قوی داشتند و ۲۰ درصد بیوفیلم متوسط تشکیل دادند. در حضور نانوذره نقره ۹۰٪ سویه‌ها بیوفیلم تشکیل ندادند و ۱۰٪ سویه‌ها بیوفیلم ضعیف تشکیل دادند. در حضور بیوسورفکتانت ۸۰٪ سویه‌ها بیوفیلم تشکیل ندادند و ۲۰٪ سویه‌ها بیوفیلم ضعیف تشکیل دادند (نمودار ۲). در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در تشکیل بیوفیلم (قوی و متوسط) بین نمونه‌های تیمار شده نانوذرات و بیوسورفکتانت و کنترل تغییرات آماری معنی‌داری نشان داده شد ($P < 0.05$).

آماري معنی‌داری بین بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و نانو اکسید روی از نظر قابلیت ضدبیوفیلم آن‌ها وجود ندارد. هر دو از نظر آماری خواص ضدبیوفیلم قابل توجهی نشان می‌دهند.



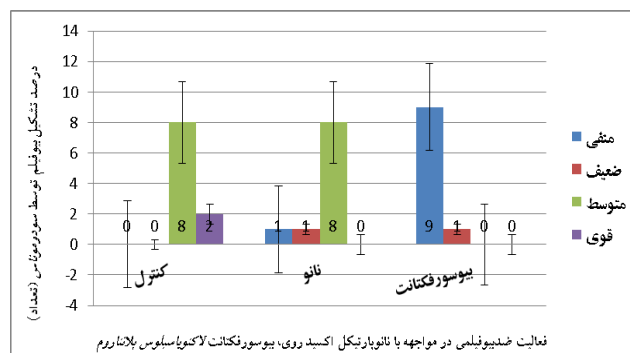
نمودار ۵: بررسی فعالیت ضدبیوفیلمی در مواجهه با نانوذرات اکسید روی و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر/اسیتوباکتر بومانی.

علاوه‌براین، تفاوت‌های معنی‌داری در تشکیل و عدم تشکیل بیوفیلم در بین گروه‌های کنترل، نانو اکسید روی و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم در/اشریشیا کلی ($P=0.000$)، سودوموناس آئروژینوزا ($p=0.000$)، و باکتری اسیتوباکتر بومانی ($p=0.003$) مشاهده شد. در نتیجه، نانوذرات اکسید روی کارایی محدودی در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم نشان می‌دهند. در مقابل، بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم توانایی قابل توجهی برای مهار تشکیل بیوفیلم از خود نشان می‌دهد که نشان دهنده تمایز آماری قابل توجهی در خواص ضدبیوفیلم آن‌ها است.



نمودار ۶: فعالیت ضدبیوفیلمی در مواجهه با نانوذرات اکسید روی و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم در گروه‌های کنترل، نانو اکسید روی و بیوسورفکتانت بر باکتری‌های مورد مطالعه.

که ۸۰ درصد سطح متوسطی از تشکیل بیوفیلم را نشان دادند. در حضور نانوذره نقره ۱۰٪ سویه‌ها بیوفیلم تشکیل ندادند و ۱۰٪ سویه‌ها بیوفیلم ضعیف و ۸۰٪ سویه‌ها بیوفیلم متوسط تشکیل دادند. در حضور بیوسورفکتانت ۹۰٪ سویه‌ها بیوفیلم تشکیل ندادند و ۱۰٪ سویه‌ها بیوفیلم ضعیف تشکیل دادند (نمودار ۴). در باکتری سودوموناس آئروژینوزا تشکیل بیوفیلم (قوی، متوسط و منفی) بین نمونه‌های تیمار شده با نانوذرات و بیوسورفکتانت و کنترل تغییرات آماری معنی‌داری نشان داده شد ($P<0.05$).



نمودار ۴: فعالیت ضدبیوفیلمی در مواجهه با نانوذرات اکسید روی و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر/سودوموناس آئروژینوزا.

و) اثر نانوذره نقره و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر تشکیل بیوفیلم برای اسیتوباکتر بومانی: نتایج نشان داد که ۲۰ درصد سویه‌ها در نمونه کنترل تشکیل بیوفیلم متوسط و ۸۰ درصد آن‌ها بیوفیلم قوی داشتند. در حضور نانوذره نقره ۱۰٪ سویه‌ها بیوفیلم تشکیل ندادند و ۵۰٪ سویه‌ها بیوفیلم متوسط و ۴۰٪ سویه‌ها بیوفیلم قوی تشکیل دادند. در حضور بیوسورفکتانت ۱۰۰٪ سویه‌ها بیوفیلم تشکیل ندادند (نمودار ۵). در باکتری اسیتوباکتر بومانی تشکیل بیوفیلم (قوی و منفی) بین نمونه‌های تیمار شده با نانوذرات و بیوسورفکتانت و کنترل تغییرات آماری معنی‌داری نشان داده شد ($P<0.05$).

ز) بررسی فعالیت ضدبیوفیلم بر باکتری‌های مورد مطالعه در گروه کنترل، نانو و بیوسورفکتانت: بین گروه‌های شاهد، نانو اکسید روی و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تفاوت معنی‌داری در تشکیل یا عدم تشکیل بیوفیلم وجود دارد ($P=0.016$). اساساً تفاوت

بحث

به دلیل مقاومت بیش‌تر باکتری‌ها در برابر ترکیبات ضد عفونی کننده در شرایط تشکیل بیوفilm، بیوفilm‌های باکتری‌های بیماری‌زا مشکلات زیادی از نظر درمان به وجود می‌آورند (۱۹).

پیشرفت‌های اخیر در زمینه نانوتکنولوژی، به ویژه توانایی ساخت نانو ذرات در شکل‌ها و سایزهای مختلف منجر به ایجاد دسته‌ی 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 (۲۰). از این رو هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضد میکروبی و ضد بیوفilmی در مواجهه با نانوذرات اکسید روی و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر باکتری‌های بیماری‌زا بود.

نتایج ضد میکروبی مطالعه حاضر حداقل غلظت مهارتی (MIC) نانوذرات اکسید برای باکتری‌های مورد مطالعه ۴۰۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت مهارتی بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم، برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، باکتری اشریشیا کلی و سینتوباکتر بومانی در محدوده ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا ۶/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود.

جمیل مطالعه‌ای طراحی کرد که این مطالعه با هدف خالص سازی بیوسورفکتانت تولید شده از لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا شده از نمونه‌های بالینی زنان سالم عراقی انجام شد. نتایج نشان داد که بیوسورفکتانت در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا با ناحیه بازدارندگی به ترتیب ۲۷ میلی‌متر و ۳۳ میلی‌متر در محیط‌های BCDFTM اثر بازدارندگی بیشتری دارد. در حالی که بیوسورفکتانت خالص شده با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تولید شده در محیط MSM بر استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب با ناحیه بازدارندگی ۲۱ میلی‌متر و ۱۸ میلی‌متر اثر داشت (۲۱).

مدهو (Madhu) و همکاران بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس

پلانتاروم CFR 2194، (جدایه‌ای از کانجیکا) را از یک محصول تخمیری برنج جدا کردند، و نشان داند فراکسیون‌های آبی بیوسورفکتانت تولید شده فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی را در برابر گونه‌های بیماری‌زا اشریشیا کلی ATCC 31705، *Yersinia enterocolitica* MTCC 108، *E. coli* MTCC 859 و *Staphylococcus* 22 دارد (۲۲). نتایج این پژوهش با مطالعات دیگر همراستا بوده و نشان داد، بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر روی باکتری‌های بیماری‌زا خاصیت ضد میکروبی دارد. بیوسورفکتانت‌ها خواص سطحی باکتریایی را تغییر می‌دهد که باعث می‌شود سلول‌ها و خواص چسبندگی آن‌ها را کاهش دهد، این ترکیبات همچنین با برهم زدن مستقیم یکپارچگی غشای پلاسمایی یا دیواره سلولی، سلول‌های میکروبی را از بین می‌برند.

گروه Alekshish به بررسی اثر نانوذرات اکسید روی بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس پرداخته است. حداقل غلظت مهارتی (MIC) نانوذرات بر استافیلوکوکوس اورئوس ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. در این مطالعه نشان داده شد نانوذرات اکسید روی از طریق تولید گونه‌های واکنش‌دهنده اکسیژن (ROS) و ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول‌های باکتریایی منجر به اختلال در ساختار دیواره سلولی و مرگ باکتری می‌شود (۲۳).

همچنین در مطالعه دیگری به بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی بر استافیلوکوکوس اورئوس پرداخته شده است. در این تحقیق نیز نانوذرات اکسید روی با غلظت‌های متفاوت به محیط کشت افزوده شد و MIC معادل ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. مکانیسم مولکولی این نانوذره با افزایش تولید ROS و ایجاد آسیب‌های DNA و پروتئین‌های سلولی عمل کرده و منجر به مهار رشد و تخریب دیواره سلولی باکتری می‌شود (۲۴).

نتایج ضد بیوفilmی مطالعه حاضر نشان می‌دهد که فعالیت بیوفilmی (قوی و متوسط) در باکتری‌های مورد مطالعه دارای تفاوت آماری معنی‌داری بوده است. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که بین تشکیل و عدم تشکیل بیوفilm در گروه‌های

خواص ضدباکتریایی و ضدچسبندگی هم افزایی آن‌ها در برابر بیوفیلم‌های تشکیل شده توسط سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس پیشنهاد کرد. از نظر مکانیکی، نقره با پوشش RL (۳۵ نانومتر) و نانوذرات Fe_3O_4 (۴۸ نانومتر) گونه‌های اکسیژن فعال تولید می‌کنند که به فعالیت ضدبیوفیلمی کمک می‌کنند. وجود پوسته RL بر روی نانوذرات به طور قابل توجهی چسبندگی سلول را با اصلاح آگزیزی سطح و در نتیجه افزایش خاصیت ضدبیوفیلم نانوذرات در برابر هر دو سویه ذکر شده کاهش می‌دهد (۲۷).

در مطالعه Hayat، نشان داده شده که نانوذرات اکسید روی به طور قابل توجهی باعث کاهش رشد و بقای استافیلوکوکوس اورئوس شده و بیوفیلم‌های آن را تخریب می‌کنند. مکانیسم مولکولی اثر این نانوذرات شامل ایجاد گونه‌های واکنش‌دهنده اکسیژن (ROS) در سلول‌های باکتری است که باعث آسیب اکسیداتیو به پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA شده و منجر به نابودی باکتری و بیوفیلم آن می‌شود. همچنین، نفوذپذیری غشا باکتریایی توسط این نانوذرات افزایش می‌یابد و این امر ورود بیشتر آن‌ها به سلول و تخریب سریعتر ساختارهای سلولی را تسهیل می‌کند (۲۸).

در پژوهشی دیگر که توسط گروه Banerjee انجام شد، اثرات نانوذرات اکسید روی بر تشکیل و پایداری بیوفیلم‌های استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها نشان دادند که این نانوذرات می‌توانند بیوفیلم‌ها را در مراحل ابتدایی تشکیل مهار و همچنین بیوفیلم‌های موجود را تخریب کنند. مکانیسم مولکولی این اثرات به تاثیرات فیزیکی و شیمیایی نانوذرات بر روی دیواره سلولی باکتری و مهار مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با تشکیل بیوفیلم نسبت داده شد. همچنین این مطالعه بیان کرد که نانوذرات اکسید روی با ممانعت از تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی (EPS)، که جزء اصلی ساختار بیوفیلم هستند، مانع از تشکیل پایدار بیوفیلم می‌شوند (۲۹).

از نقطه نظر مولکولی یون روی یک فلز کمیاب مهم برای متابولیسم میکروارگانیسم‌ها است که در مکان‌های فعال

کنترل، نانو اکسید روی و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تفاوت معنی‌داری ($p=0.016$) وجود داشته است. یعنی هر دوی نانو اکسید روی و بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم از لحاظ آماری دارای خاصیت ضدبیوفیلمی هستند و تفاوت آماری بین آن‌ها وجود ندارد، اما برای باکتری‌های اشریشیا کلی ($p=0.000$)، سودوموناس آئروژینوزا ($p=0.000$) و اسینتوباکتریومانی ($p=0.003$) اینگونه نبود، بطوری که نانو ذرات اکسید روی قابلیت چندانی در عدم تشکیل بیوفیلم ندارد اما بیوسورفکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم دارای قابلیت قابل توجهی در عدم تشکیل بیوفیلم داشته است.

مطالعه گروه یان (Yan) با هدف ارزیابی فعالیت‌های ضد میکروبی و ضد بیوفیلم سوپرناتانت باکتریایی (BS) جدا شده از باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB)، از جمله *Lactobacillus plantarum* و *Pediococcus acidilactici* برابر استافیلوکوکوس اورئوس CMCC 26003 در شرایط آزمایشگاهی انجام شد که طبق نتایج به‌دست آمده بیوسورفکتانت حاصل از باکتری‌ها بر روی استافیلوکوکوس اورئوس اثرات بیوفیلمی و ضد میکروبی قوی از خود نشان دادند (۲۵).

از نقطه نظر مولکولی بیوسورفکتانت‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم نقش مهمی در مهار رشد میکروب‌های بیماری‌زا از طریق مکانیسم‌های مولکولی خاص دارند. مکانیسم مولکولی زیربنایی فعالیت ضد میکروبی بیوسورفکتانت‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم عمدتاً شامل اختلال در غشای سلولی میکروب‌های بیماریزا است. بخش‌های آگزیز بیوسورفکتانت‌ها می‌توانند به لایه‌های لیپیدی غشای سلولی میکروبی وارد شوند. وقتی بیوسورفکتانت‌ها خودشان را وارد غشای سلولی می‌کنند، یکپارچگی و ساختار غشا را مختل می‌کنند. این اختلال می‌تواند منجر به نشت اجزای سلولی، از دست دادن پتانسیل غشا و در نهایت مرگ سلولی شود (۲۶).

گروه Khalid یک روش آسان برای سنتز NPs با پوشش رامنولپید (RL) نقره (Ag) و اکسید آهن (Fe_3O_4) و مکانیسم

آنزیم‌های مختلف یافت می‌شود. علاوه بر این، یون روی در

تنظیم تکثیر سلولی، تمایز و حفظ ساختار غشایی سلول‌ها نقش دارد (۳۰). در ابتدا، یون روی به مقدار زیاد می‌تواند با فلزات دیگر رقابت کند و باعث عدم تطابق فلز در پروتئین‌های غیرهدف متصل شونده به فلز شود، که منجر به دناتوره شدن پروتئین، غیرفعال شدن آنزیم و حتی مرگ سلولی می‌شود. ثانیاً، هنگامی که یون روی بیش از حد به باکتری‌ها برسد، می‌توانند توسط نیروهای کولانسی به طور محکم روی سطح سلول جذب شوند. سپس، یون روی به غشای سلولی نفوذ کرده و باعث پارگی آن و به دنبال آن خروج سیتوپلاسمی می‌شود که در نهایت منجر به مرگ سلولی همراه با تولید مقادیر زیادی ROS می‌شود. در مقایسه با یون روی معمول، نانوذرات اکسید روی (ZnO-NPs) دارای مزایای خاصی هستند که آن‌ها را قادر می‌سازد تا به راحتی از غشای سلولی عبور کنند (۳۱). این اثر عمدتاً به اندازه ذرات کوچک و انرژی سطح بالای آن‌ها مربوط می‌شود. مانند سایر NPs، ZnO-NPs با از بین بردن غشای سلولی و همچنین القای استرس اکسیداتیو و تولید ROS، باکتری‌ها را از بین می‌برند. جالب توجه است که در پژوهش حاضر، ZnO-NP نسبت به باکتری‌های گرم منفی فعالیت بالاتری در برابر باکتری‌های گرم مثبت نشان داد، که ممکن است مربوط به تفاوت‌های ترکیب دیواره سلولی آن‌ها باشد (۳۲).

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که قابلیت تشکیل بیوفیلم در باکتری‌ها متفاوت است. نانوذره اکسید روی و بیوسورفاکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم در مقابل باکتری استافیلوکوکوس/ارئوس خاصیت ضدبیوفیلمی نشان می‌دهند. اما در مواجهه با اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، واسیتوباکتر بومانی، نانو اکسید روی اثر چندانی در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم ندارد، در حالی که بیوسورفاکتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم در ممانعت از تشکیل بیوفیلم بسیار موثر است. این نتایج نشان‌دهنده اهمیت این ترکیبات در کنترل بیوفیلم و رفتارهای سلولی

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا و همکاری آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی انجام شده است و همچنین از کارشناس محترم میکروبیولوژی آزمایشگاه تشکر می‌گردد.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Moraes TM, Kushima H, Moleiro FC, Santos RC, Rocha LRM, Marques MO, et al. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chemico-Biological Interactions*. 2009;180(3):499-505.
2. Ali Akbar Moradian E, Mohammad S, Masumeh Malek J. Antimicrobial activity of *rosmarinus officinalis* on vancomycin-resistant *staphylococcus aureus* isolated from Imam Reza Hospital Patients of Mashhad. 2015.
3. Singh S, Datta S, Narayanan KB, Rajnish KN. Bacterial exo-polysaccharides in biofilms: Role in antimicrobial resistance and treatments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2021;19(1):1-19.
4. Grata K, Nabrdalik M. Antifungal activity of bacterial species *Bacillus* against *Alternaria* sp. *Proceedings of ECOpole*. 2013;7(1):75-80.
5. Vecino X, Rodríguez-López L, Ferreira D, Cruz JM, Moldes AB, Rodrigues LR. Bioactivity of glycolipopeptide cell-bound biosurfactants against skin pathogens. *International journal of biological macromolecules*. 2018;109:971-9.
6. Satpute SK, Kulkarni GR, Banpurkar AG, Banat IM, Mone NS, Patil RH, et al. Biosurfactant/s from *Lactobacilli* species: Properties, challenges and potential biomedical applications. *Journal of basic microbiology*. 2016;56(11):1140-58.
7. Seddik HA, Bendali F, Gancel F, Fliss I, Spano G, Drider D. *Lactobacillus plantarum* and its probiotic and food potentialities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2017;9:111-22.
8. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2014.
9. Esposito S, Soto-Martinez ME, Feleszko W, Jones MH, Shen K-L, Schaad UB. Nonspecific immunomodulators for recurrent respiratory tract infections, wheezing and asthma in children: a systematic review of mechanistic and clinical evidence. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2018;18(3):198.
10. das Neves Selis N, de Oliveira HBM, Leão HF, Dos Anjos YB, Sampaio BA, Correia TML, et al. *Lactiplantibacillus plantarum* strains isolated from spontaneously fermented cocoa exhibit potential probiotic properties against *Gardnerella vaginalis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *BMC microbiology*. 2021;21(1):1-15.
11. Rhee KY, Gardiner DF. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal activity in the treatment of gram-positive bacterial infections. *Clinical infectious diseases*. 2004;39(5):755-6.
12. Prabhurajeshwar C, Chandrakanth K. Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in-vitro by probiotic *Lactobacilli* strains isolated from commercial yoghurt. *Clinical Nutrition Experimental*. 2019;23:97-115.

13. Choudhary M, Shrivastava R, Vashist J. *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation: Association with Antimicrobial Resistance and Prolonged Survival under Desiccation. *Current Microbiology*. 2022;79(12):361.
14. Zhang J, Chen J, Zhang C, Yi H, Liu D, Liu D. Characterization and antibacterial properties of chitosan–polyvinyl alcohol-3-phenyllactic acid as a biodegradable active food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*. 2022;34:100963.
15. Wayne A. Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 20th Informational Supplement CLSI document. 2017.
16. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. *Candida* biofilms associated with CVC and medical devices. *Mycoses*. 2012;55:46-57.
17. Humphries R, Bobenchik AM, Hindler JA, Schuetz AN. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100. *Journal of clinical microbiology*. 2021;59(12):10.1128/jcm. 00213-21.
18. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2011(47).
19. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS microbiology letters*. 2004;236(2):163-73.
20. Sahoo S, Parveen S, Panda J. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine in Cancer*. 2017:775-806.
21. Jameel A, Haider N. Study the antimicrobial and antiadhesive activity of purified biosurfactant produced from *Lactobacillus plantarum* against pathogenic bacteria. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*. 2021;52(5):1194-206.
22. Madhu AN, Prapulla SG. Evaluation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194. *Applied biochemistry and Biotechnology*. 2014;172:1777-89.
23. Aleksh M, Ismail ZB, Albiss B, Nawasrah S. In vitro antibacterial effects of zinc oxide nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: An alternative approach for antibacterial therapy of mastitis in sheep. *Veterinary world*. 2018;11(10):1428.
24. Chai Q, Wu Q, Liu T, Tan L, Fu C, Ren X, et al. Enhanced antibacterial activity of silica nanorattles with ZnO combination nanoparticles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Science bulletin*. 2017;62(17):1207-15.
25. Yan X, Gu S, Cui X, Shi Y, Wen S, Chen H, et al. Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* against *Staphylococcus aureus* CMCC26003. *Microbial pathogenesis*. 2019;127:12-20.

26. Thakur B, Kaur S, Tripathi M, Upadhyay SK. Exploring the potential of lactic acid bacteria and its molecular mechanism of action in the development of biosurfactants: Current finding and future outlook. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 2023;1-32.
27. Khalid HF, Tehseen B, Sarwar Y, Hussain SZ, Khan WS, Raza ZA, et al. Biosurfactant coated silver and iron oxide nanoparticles with enhanced anti-biofilm and anti-adhesive properties. *Journal of hazardous materials*. 2019;364:441-8.
28. Hayat S, Ashraf A, Zubair M, Aslam B, Siddique MH, Khurshid M, et al. Biofabrication of ZnO nanoparticles using *Acacia arabica* leaf extract and their antibiofilm and antioxidant potential against foodborne pathogens. *PLoS One*. 2022;17(1):e0259190.
29. Banerjee S, Vishakha K, Das S, Dutta M, Mukherjee D, Mondal J, et al. Antibacterial, anti-biofilm activity and mechanism of action of pancreatin doped zinc oxide nanoparticles against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 2020;190:110921.
30. Jafarirad S, Mehrabi M, Divband B, Kosari-Nasab M. Biofabrication of zinc oxide nanoparticles using fruit extract of *Rosa canina* and their toxic potential against bacteria: A mechanistic approach. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;59:296-302.
31. Sirelkhatim A, Mahmud S, Seenii A, Kaus NHM, Ann LC, Bakhori SKM, et al. Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-micro letters*. 2015;7:219-42.
32. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food control*. 2007;18(5):414-20.