



بیوسنتز نانوذرات اکسید روی (ZnO) با استفاده از عصاره چای سبز و تاثیر ضدبیوفیلمی آن بر سویه های سودوموناس آئروجینوسا جدا شده از عفونت زخم

بهروز شجاعی سعدی^۱، شیما چهری^۲، مهلا اسماعیلی^{۳*}

^۱مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران. ^۲استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران. ^۳دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: به دلیل فعالیت ضد میکروبی نانوذرات و عدم ایجاد مقاومت می‌توانند گزینه‌های مناسبی به منظور مقابله با تشکیل بیوفیلم باکتریایی باشند. هدف از این مطالعه بیوسنتز نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره چای سبز و تعیین میزان تأثیر آن بر تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا جدا شده از عفونت زخم بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی نانوذرات بیوسنتز شده توسط آنالیزهای پراش اشعه ایکس، طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس، میکروسکوپ الکترونی روبشی و عبوری بررسی شدند. تعیین فعالیت ضد میکروبی و حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات با روش میکروبراث دایلوژن انجام شد. فعالیت ضدبیوفیلمی با تشکیل بیوفیلم به روش اتول بررسی شد.

یافته‌ها: بیوسنتز نانوذرات توسط آنالیزها تأیید گردید. اندازه نانوذرات در محدوده ۱۰ تا ۹۰ نانومتر با متوسط زیر ۴۰ نانومتر تعیین شد. نانوذرات در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت ضد میکروبی داشتند و حداقل غلظت مهارکنندگی ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۲۵ تا ۹۰ درصد تشکیل بیوفیلم را مهار کردند. اثرات ضد میکروبی و ضدبیوفیلمی نانوذرات با افزایش غلظت آن‌ها افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: بیوسنتز نانوذرات با عصاره مزایای متعددی مانند سادگی، ثبات مناسب، عدم صرف انرژی، صرف زمان کم‌تر، ضایعات غیرسمی، صرفه اقتصادی و قابلیت سنتز در مقیاس بزرگ را دارد. با توجه به خواص ضد میکروبی و ضدبیوفیلمی کاربرد این نانوذرات به عنوان پوشش در تجهیزات پزشکی و صنایع غذایی پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: نانوذرات اکسید روی، عصاره چای سبز، بیوفیلم، حداقل غلظت مهارکنندگی، سودوموناس آئروجینوسا.

پذیرش برای چاپ: آبان ماه ۹۷

دریافت مقاله: مهر ماه ۹۷

مقدمه

تازه قطبی با نیازهای غذایی حداقل و یک پاتوزن فرصت طلب است (۱). این باکتری شایع‌ترین جنس گونه سودوموناس بوده که عامل عفونت‌های ریوی، عفونت‌های اولیه پوستی، مجاری ادراری، گوش و سایر عفونت‌های فرصت طلب به شمار می‌رود.

سودوموناس آئروجینوسا (*Pseudomonas aeruginosa*)، باسیل گرم منفی، هوازی اجباری، غیر تخمیری، متحرک با یک

* آدرس برای مکاتبه: اراک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۹۳۷۴۸۸۰۴۱۲ پست الکترونیک: esmaeili.microbiology@gmail.com



دارند باعث تماس بیشتر با محیط و در نتیجه تأثیر ضدباکتریایی بیشتر خواهند شد (۲). فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی بیشتر از نانوذرات اکسید مس و دی‌اکسید تیتانیوم می‌باشد (۷).

در بین روش‌های گوناگون ساخت نانوذرات، روش‌های بیولوژیکی بسیار ساده و دوست‌دار محیط زیست هستند. روش‌های زیستی، جایگزینی آسان و مناسبی برای سایر روش‌های فیزیکی و شیمیایی می‌باشند و مزایایی مانند هزینه کم‌تر، سازگاری با محیط زیست، امکان تولید آسان در مقیاس بالا و عدم استفاده از دما و فشار بالا را دارند. به همین دلیل استفاده از عصاره گیاهان به عنوان منابع پایدار در دسترس، در تهیه نانوذرات فلزی زیست‌سازگار توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود معطوف نموده است (۸).

با توجه به مشکل مقاومت به چند آنتی‌بیوتیک در باکتری‌های سودوموناس آئروجینوسا تشکیل دهنده بیوفیلم و نبود ترکیب مناسب برای از بین بردن این عفونت‌های مقاوم و این‌که تا کنون مطالعه‌ای در زمینه تهیه نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره گیاهی و بررسی تأثیر این نانوذرات بر جدایه‌های بالینی و بیوفیلم حاصل از آن‌ها انجام نشده است بررسی جدایه‌ها و تأثیر نانوذرات بیوسنتز شده بر آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر نانوذرات اکسید روی بیوسنتز شده با استفاده از عصاره چای سبز بر میزان تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا جدا شده از عفونت زخم بود.

مواد و روش‌ها

الف) تهیه عصاره چای سبز: ابتدا برگ‌های چای سبز برای حذف گرد و خاک سطحی، ۲ بار و هر بار به مدت ۳۰ ثانیه با آب دیونیزه شست و شو داده شدند. سپس برگ‌ها را در دمای اتاق قرار داده تا خشک شدند. ۵۰ گرم از برگ‌های خشک کاملاً پودر شد. سپس به ازای هر گرم پودر برگ، ۷ سی‌سی آب دیونیزه اضافه شد به طوری‌که آب دیونیزه روی پودر را به طور کامل پوشانند. در نهایت عصاره در ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت

به علاوه به عنوان دومین عامل عفونت‌های سوختگی و سومین عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی پس از استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) و اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) می‌باشد (۲). توانایی این باکتری در تولید عوامل بیماری‌زایی فراوان و تشکیل بیوفیلم باعث شده که در زمره مهم‌ترین پاتوژن‌ها قرار گیرد (۱).

بیوفیلم‌ها (Biofilms) اجتماعات پیچیده باکتریایی متصل به سطوح هستند که توسط یک ماتریکس خارج سلولی تولید شده توسط باکتری‌ها ایجاد می‌شوند. این ماتریکس از DNA، پروتئین‌ها و آگزوپولی‌ساکاریدها تشکیل شده است (۳). بیوفیلم عامل ۶۵٪ از عفونت‌های انسانی می‌باشد. مشخصه تمام بیوفیلم‌ها مقاومت قابل توجه و طولانی مدت به روش‌های حذف فیزیکی و بیوشیمیایی مانند آنتی‌بیوتیک‌هاست که دلیل آن تراکم بالای سلول‌های باکتری در این ساختار و ممانعت از عدم ورود آنتی‌بیوتیک به مرکز بیوفیلم و همچنین بیرون راندن آنتی‌بیوتیک‌ها از بیوفیلم است (۴). زمانی که باکتری در معرض استرس قرار بگیرد، درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها و یا کمبود مواد غذایی سبب تشکیل بیوفیلم می‌شود. این فرم مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارد به طوری که باکتری‌های موجود در بیوفیلم تا هزار برابر مقاوم‌تر از سلول‌های منفرد هستند (۵). تشکیل بیوفیلم توانایی محافظت در برابر سیستم ایمنی میزبان و عوامل ضد میکروبی مختلف را ایجاد می‌کند (۶).

عوامل ضد میکروبی بر اساس ترکیب شیمیایی به دو دسته آلی و غیرآلی تقسیم‌بندی می‌شوند. بسیاری از نواقص عوامل ضد میکروبی آلی باعث محدودیت استفاده آنها و مورد توجه قرار گرفتن عوامل غیرآلی از جمله نانوذرات اکسید فلزات مانند دی‌اکسید تیتانیوم، اکسید روی، اکسید منیزیم و اکسید مس شده که در تحقیقات مختلف استفاده از آن‌ها به عنوان عوامل ضد میکروبی توصیه شده است. این نانوذرات بسیار فعال بوده و در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و منفی فعالیت مهاری و باکتری‌کشی قابل توجهی نشان می‌دهند (۷).

اعتقاد بر این است که نانوذرات فلزی علاوه بر اثر مهاری ذرات، به دلیل اندازه کوچک و نسبت سطح به حجم بالایی که

آگار، مکانکی آگار، ستریماید آگار، سیمون سیترات (مرک، آلمان) و رشد در ۴۲ درجه سلیسیوس مورد بررسی قرار گرفتند (۱۰).

ه) تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) نانوذرات اکسید روی: آزمایش ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی با غلظت‌های مختلف علیه باکتری‌های استاندارد و ۲۱ جدایه مقاوم سودوموناس آئروجینوسا بررسی شد. برای انجام این آزمایش غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای نانوذرات تهیه شد. برای این منظور ۰/۱ گرم از پودر نانوذرات بیوستز شده به طور دقیق توزین و به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد به منظور پراکنده شدن مناسب آن‌ها، از دستگاه شیکر به مدت ۳۰ دقیقه استفاده گردید. بعد از حل شدن کامل نانوذرات، از غلظت اولیه نانوذرات اکسید روی (۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و تهیه سریال رقت، غلظت‌های ۵۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آماده شد (۲). حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات بیوستز شده با استفاده از روش میکروبراث دایلوژن تعیین گردید. سوسپانسیون باکتری سودوموناس آئروجینوسا با جذب نوری (OD) معادل ۰/۱ تهیه شد. در میکروپلیت ۹۶ چاهکی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت TSB (مرک، آلمان) و ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده با رقت 10^{-3} CFU/ml و ۴۰ میکرولیتر از استوک تهیه شده از نانوذرات با غلظت‌های مختلف ریخته شد. کنترل‌ها شامل کنترل مثبت که فقط ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت TSB به همراه ۴۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری و فاقد نانوذرات، کنترل منفی فقط ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت TSB و کنترل نانوذرات هم فقط ۴۰ میکرولیتر غلظت‌های مختلف نانوذرات و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت TSB در نظر گرفته شد. این آزمایش با سه بار تکرار انجام و میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شد. سویه‌های استاندارد سودوموناس آئروجینوسا ATCC27853 و PAO1 تهیه شده از بخش میکروب شناسی بیمارستان امیرالمؤمنین اراک در این آزمایش به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. جذب نوری هر یک از چاهک‌ها با دستگاه الیزاریدر مدل

۱۵ دقیقه سانترفیوژ شد و محلول رویی توسط کاغذ واتمن شماره ۱ صاف گردید. عصاره فیلتر شده تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سلیسیوس در تاریکی نگهداری شد.

ب) بیوستز نانوذرات اکسید روی: به منظور سنتز سبز نانوساختارهای اکسید روی، ۱۰۰ سی سی عصاره به صورت قطره قطره به ۱۰۰ سی سی محلول ۰/۱ مولار زینک استات دی‌هیدرات (مرک، آلمان) با نسبت ۱:۱ با هم‌زدن ثابت در دمای ۷۰-۸۰ درجه سلیسیوس اضافه شد. مخطوط واکنش در شرایط با دمای ۷۰-۸۰ درجه سلیسیوس و هم‌زدن ثابت تا به دست آمدن ژل تقریباً چسبنک سبز مایل به سیاه قرار گرفت. ژل حاصل به منظور تولید پودر نانوذرات اکسید روی در آون ۹۰ درجه سلیسیوس قرار گرفت. سپس پودر به دست آمده در کوره ۴۰۰ درجه سلیسیوس به مدت ۲ ساعت کلسینه شد که منجر به تولید پودر سفید رنگی شد. پودر سفید رنگ حاصله نانوساختارهای اکسید روی بود که برای بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنالیز شدند (۹).

ج) تعیین مشخصات نانوذرات اکسید روی: برای بررسی حضور و نوع ساختار کریستالی نانوساختارهای سنتز شده با استفاده از عصاره، پودر نانوساختارهای به دست آمده بلافاصله بعد از کلسینه شدن با استفاده از دستگاه پراش اشعه ایکس مدل PANalitical, X PERTPRO ساخت کشور هلند با زاویه پراش ۲ تا در محدوده ۲۰-۸۰ و دستگاه طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس مدل SIGMA ساخت شرکت ZEISS کشور آلمان انجام شد. شکل، اندازه و پراکنش اندازه نانوساختارهای بیوستز شده به وسیله دستگاه عکس برداری الکترونی عبوری و عکس برداری الکترونی روبشی ساخت شرکت HITACHI کشور ژاپن بررسی شدند.

د) تشخیص جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا: ۳۰ نمونه جدا شده از عفونت زخم بیماران بستری در بیمارستان امیرالمؤمنین اراک با توجه به ناحیه عفونی با استفاده از سواب به صورت عمقی در بازه زمانی ۴ ماه نمونه‌گیری و جمع‌آوری شد. که با انجام آزمون‌های رنگ آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، SIM، TSI (مرک، آلمان)، OF (های‌مدیا، هند)، MR/VP، کشت در بلاد

۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسیدروی بیوستز شده با عصاره چای سبز است اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شد (به صورت ۳ تایی در سه چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه برای هر نمونه). پس از طی این مدت (بعد از گذشت ۲۴ ساعت) میکروپلیت‌ها برگردانده شدند تا محیط کشت موجود در هر چاهک خالی گردد سپس در سه مرحله به چاهک‌ها ۳۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS) استریل (سیگما، آمریکا) اضافه شد و چاهک‌ها با این بافر سه مرتبه شستشو داده شدند تا باکتری‌هایی که بیوفیلم تشکیل ندادند از چاهک‌ها خارج شوند. بعد از این مرحله میکروپلیت‌ها به مدت ۱ ساعت در ۶۰ درجه سلیسیوس انکوبه و خشک شدند. به منظور تثبیت باکتری به هر چاهک در دمای اتاق ۱۵۰ میکرولیتر متانول به مدت ۲۰ دقیقه اضافه شده و پس از ۲۰ دقیقه میکروپلیت‌ها برگردانده و خالی شدند. سپس به منظور رنگ‌آمیزی ۱۵۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۱ درصد (۰/۱ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه شد و میکروپلیت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه بدون حرکت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس قرار گرفتند. پس از آن میکروپلیت‌ها برگردانده شدند و رنگ داخل چاهک‌ها خارج گردید و چاهک‌ها با آب مقطر به طور ملایم شستشو شدند. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۳۰ درصد اسیداستیک به هر چاهک اضافه شد تا رنگ باند شده با باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم خارج شود سپس جذب نوری میکروپلیت در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه الایزا خوانش (مدل ELx800 ساخت کشور ژاپن) ثبت شد. یک ردیف از میکروپلیت به عنوان کنترل نانوذرات در نظر گرفته شد که فقط ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های مختلف نانوذرات و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت TSB در چاهک‌ها ریخته شد. یک ردیف هم به عنوان کنترل منفی (کنترل محیط کشت) در نظر گرفته شد که فقط ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت TSB در چاهک‌ها ریخته شد و یک ردیف هم به عنوان کنترل مثبت فاقد ترکیبات ضد میکروبی در نظر گرفته شد که فقط ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت TSB به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی و فاقد نانوذرات اکسیدروی

ELx800 ساخت کشور ژاپن اندازه‌گیری شد. سپس بعد از ۱۸ ساعت جذب نوری چاهک‌های میکروپلیت مجدد اندازه‌گیری شد و نتایج خوانده شد. در پایان پایین‌ترین غلظتی از نانوذرات که در آن هیچ‌گونه رشدی از باکتری مشاهده نشد (فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری) به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد و به صورت میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید (۱۱).

و) تشکیل بیوفیلم: آزمایش توانایی تشکیل بیوفیلم با روش میکروپلیت تیترا بر اساس روش اتول ۲۰۱۱ (O'Toole) انجام شد (۱۲). ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری یک شب انکوبه شده در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت TSB گلوکزدار اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس انکوبه شد. روز بعد میکروپلیت‌ها با سرم فیزیولوژی استریل شسته شده و اضافه آن دور ریخته شد. سپس با کریستال ویوله ۰/۱ درصد رنگ شده و بعد از ۱۵ دقیقه رنگ دور ریخته شد و پس از ۳ بار شستشو با اسید استیک رنگ باقیمانده فیکس شد. نهایتاً نتایج در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه الایزا مدل ELx800 ساخت کشور ژاپن خوانده شد. از جدایه PAOI به عنوان کنترل مثبت و از محیط کشت فاقد باکتری برای کنترل منفی آزمایش استفاده و جذب چاهک حاوی محیط کشت به عنوان OD (C) در نظر گرفته شد (۴).

ز) تأثیر نانوذرات اکسیدروی بر مهار تشکیل بیوفیلم: به منظور بررسی تأثیر ضدبیوفیلمی نانوذرات تشکیل بیوفیلم به روش اتول ۲۰۱۱ (O'Toole) انجام شد (۱۲). ابتدا جدایه‌های سودوموناس آئروچینوسا در محیط کشت TSB کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلیسیوس انکوبه شدند. باکتری‌های کشت داده شده بعد از ۲۴ ساعت با TSB که حاوی ۱٪ گلوکز است رقیق شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده از هر یک از جدایه‌های میکروبی مورد بررسی به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه استریل از جنس پلی‌استایرن که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت TSB گلوکزدار و ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های

۵۶، ۶۷ و ۶۹ دیده می‌شوند که به ترتیب با سطوح کریستالی ۱۰۰، ۰۰۲، ۱۰۱، ۱۰۲، ۱۱۰، ۱۱۲ و ۲۰۱ مرتبط است. الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات با الگوی مرجع (JCPDS شماره ۳۶-۱۴۵۱ برای اکسید روی) مطابقت دارد. تمام پیک‌های مشاهده شده در این طیف مربوط به فاز ساختاری هگزاگونال ورتسایت (شش وجهی متقارن) و همه خطوط پراش گویای سنتز نانوذرات اکسیدروی است و هیچ پیک ناخالصی و یا وجود فاز دیگری غیر از اکسید روی را بیان نمی‌کند.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورفولوژی عمدتاً مستطیلی و در بعضی موارد مربعی، شش وجهی، میله‌ای و بیضی شکل را برای نانوذرات اکسید روی نشان داد. در تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نیز حضور نانوذرات با ساختار مستطیلی به روشنی قابل مشاهده است. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری محدوده اندازه نانوذرات را ۱۰ تا ۹۰ نانومتر با متوسط اندازه زیر ۴۰ نانومتر نشان داد. شکل ۲ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و عبوری را نشان می‌دهد.

تجزیه و تحلیل طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDAX)، حضور فلز روی را در نانو ساختارهای اکسید روی بیوستز شده با استفاده از عصاره چای سبز تأیید کرد. ترکیب حاصل از تجزیه و تحلیل طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس حضور سیگنال‌های قوی از روی، اکسیژن و سیگنال کمی ضعیف‌تر از کربن را نشان داد. حضور کربن در نمونه نشان دهنده دخالت گروه‌های عاملی کربن در عصاره چای سبز و نقش این عوامل در سنتز نانو ساختارهای اکسید روی است. سیگنال کربن

در چاهک‌ها ریخته شد. همچنین سویه استاندارد سودوموناس آئروجینوسا PAO1 به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت. بعد از به دست آوردن جذب نوری، طبق فرمول زیر درصد مهار تشکیل بیوفیلم جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسیدروی تعیین شد (۱۳).

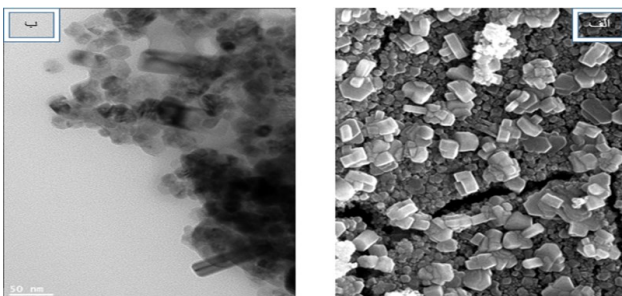
درصد مهار رشد بیوفیلم = (جذب کنترل رشد هر باکتری - جذب نمونه حاوی باکتری - جذب نمونه بدون باکتری) / جذب کنترل رشد هر باکتری

ح) آنالیز آماری: در این پژوهش، تمام آزمایشات با حداقل سه بار تکرار انجام شد و بررسی‌های آماری نتایج با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) در سطح معنی‌داری ($p < 0.05$) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای انجام آنالیز آماری از نسخه بیست و چهارم نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

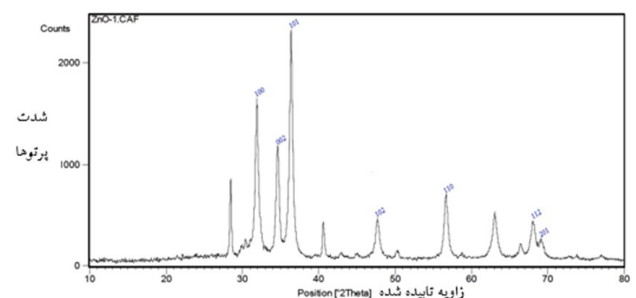
یافته‌ها

الف) تشخیص جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا: از ۳۰ نمونه عفونت زخم جمع آوری شده از بیماران ۲۱ نمونه توسط تست‌های بیوشیمیایی انجام شده به عنوان سودوموناس آئروجینوسا تأیید شدند.

ب) نتایج بیوستز نانوذرات اکسید روی توسط عصاره چای سبز: الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) نانوذرات اکسید روی بیوستز شده با عصاره چای سبز در شکل ۱ نشان داده شده است. پیک‌ها در موقعیت ۲ تا در زاویه‌های ۳۱، ۳۴، ۳۶، ۴۷،



شکل ۲: تصاویر (الف) میکروسکوپ الکترونی روبشی و (ب) میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات اکسید روی بیوستز شده توسط عصاره چای سبز در دمای ۷۰ درجه سلیسیوس و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر عصاره.

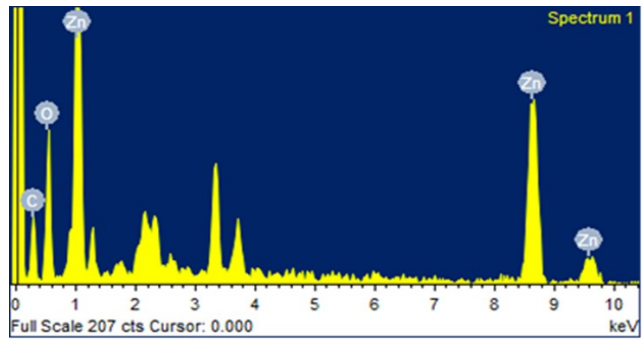


شکل ۱: الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات اکسید روی بیوستز شده توسط عصاره چای سبز.

میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در این پژوهش در نظر گرفته شد. شکل ۴ نتایج تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات اکسید روی علیه جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا را نشان می‌دهد.

د) تشکیل بیوفیلم: سنجش بیوفیلم در ۲۱ جدایه بالینی نشان داد که ۱۸ جدایه (۹۰٪) قادر به تشکیل بیوفیلم در چاهک‌های میکروپلیت بودند.

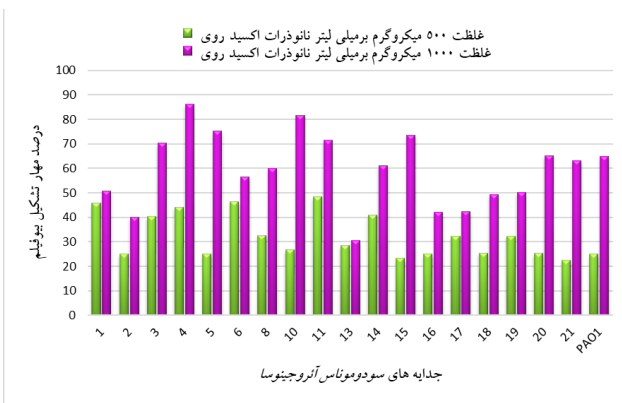
ه) آزمون تأثیر نانوذرات اکسید روی بر تشکیل بیوفیلم: غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی تأثیر قابل توجهی بر مهار تشکیل بیوفیلم نداشت. اما غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی تشکیل بیوفیلم در جدایه‌ها را با موفقیت مهار کردند و غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با مهار بیش از ۵۰ درصد تشکیل بیوفیلم در بیش از نیمی از جدایه‌ها (۱۳ جدایه از ۱۸ جدایه مورد بررسی) بیشترین مهارکنندگی را در تشکیل بیوفیلم در جدایه‌ها نشان داده است. همچنین در این پژوهش با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی بیوستتر شده، مهار تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های مورد بررسی افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر اثرات ضدبیوفیلمی نانوذرات اکسید روی بیوستتر شده با افزایش غلظت آن‌ها افزایش یافته و وابسته به دوز می‌باشد. شکل ۵ نتایج درصد مهار تشکیل بیوفیلم جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی را نشان می‌دهد. همچنین آنالیز آماری نشان داد که بین میانگین مهار بیوفیلم در



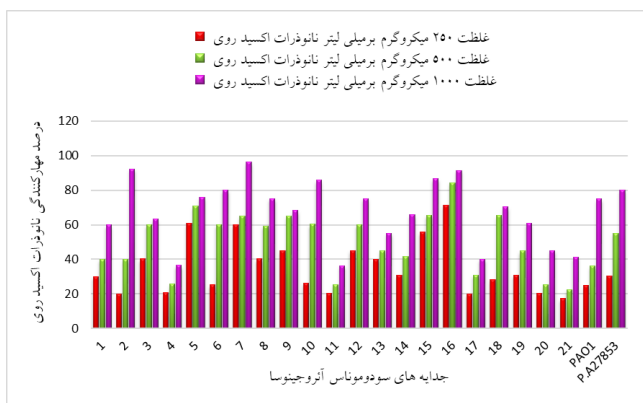
شکل ۳: الگوی طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس نانوذرات اکسید روی بیوستتر شده توسط عصاره چای سبز.

مشاهده شده می‌تواند ناشی از حضور کربوهیدرات‌هایی مانند استیوول و گلیکوزید در سطح نانو ساختارهای اکسید روی باشد. شکل ۳ الگوی طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس نانوذرات را نشان می‌دهد.

ج) تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) نانوذرات اکسید روی: همه جدایه‌های مورد بررسی در هر سه غلظت ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی بیوستتر شده با استفاده از عصاره چای سبز مهار شدند. در غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعداد ۴ جدایه بیش از ۵۰ درصد مهار شدند و در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیش از نیمی از جدایه‌های مورد بررسی (تعداد ۱۱ جدایه از ۲۱ جدایه) مهار بیش از ۵۰ درصد را نشان دادند و در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعداد ۱۶ جدایه بیش از ۵۰ درصد علیه سویه‌های سودوموناس آئروجینوسا مؤثر بوده و موجب مهار رشد آن‌ها شده است. بنابراین با توجه به مهار بالای ۵۰ درصد بیش از نیمی از جدایه‌ها و مشاهده کدورت، غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر



شکل ۵: درصد مهار تشکیل بیوفیلم جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی.



شکل ۴: تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات اکسید روی علیه جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا.

همچنین سوترادار و ساها (Sutradhar & Saha) در سال ۲۰۱۵ نانوذرات اکسید روی را با استفاده از عصاره چای سبز با اندازه بین ۲۰ تا ۵۰ نانومتر و متوسط اندازه ۲۶ نانومتر سنتز نمودند (۱۸). در سال ۲۰۱۷ دانموژی (Dhanemozhi) و همکاران متوسط اندازه نانوذرات اکسید روی را بیوستز شده با عصاره چای سبز را ۵۴/۸۴ نانومتر تعیین کردند (۱۹).

ناوا (Nava) و همکاران در سال ۲۰۱۷ نانوذرات اکسید روی را با استفاده از مقادیر مختلفی از عصاره چای سبز سنتز نمودند در مطالعه آن‌ها اندازه نانوذرات در نمونه دارای کم‌ترین مقدار عصاره ۱۷/۴۷ نانومتر و نمونه دارای بیشترین مقدار عصاره ۹/۰۴ نانومتر و متوسط اندازه $۸ \pm ۰/۵$ نانومتر گزارش شد. همچنین نانوذرات حاصل دارای ساختار هگزاگونال ورتسایت مطابق با استاندارد (JCPDS شماره ۳۶-۱۴۵۱) بودند (۲۰).

دلایل تفاوت جزئی اندازه نانوذرات بیوستز شده در مطالعه حاضر با سایر پژوهش‌ها را می‌توان به تفاوت در مقادیر عصاره مورد استفاده و محتوای پلی‌فنل‌ها، آمینو اسیدها، پروتئین‌ها و لیپیدهای موجود در عصاره در طی بیوستز نانوذرات مرتبط دانست که به طور مؤثری در اندازه، شکل، یکنواختی، کنترل رشد و تثبیت نانوذرات نقش دارند.

در مطالعه حاضر نانوذرات اکسید روی بیوستز شده با استفاده از عصاره چای سبز، در سه غلظت ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید و اثرات ضد میکروبی آن‌ها به روش میکروبراث دایلوژن بر جدایه‌های مورد بررسی ارزیابی شد. نتایج حاصل اثرات ضد میکروبی این نانوذرات را در هر سه غلظت تأیید کرد و نشان داد که اثرات ضد میکروبی با افزایش غلظت نانوذرات افزایش یافته و وابسته به دوز می‌باشد. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

پادماواسی (Padmavathy) و ویجی ارقاوان (Vijayaraghavan) در تحقیقی در سال ۲۰۰۸ حداقل غلظت مهارکنندگی این نانوذرات در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۱، ۱، ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار را به ترتیب ۰/۸، ۸، ۸۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۴۰۰۰ و ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند (۲۱).

غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی بیوستز شده توسط عصاره چای سبز تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بنابراین میانگین مهار بیوفیلم در دو غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی برابر نیست.

بحث

عفونت‌های بیمارستانی از جمله معضلات و مشکلات مهم پزشکی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه محسوب می‌شود. سودوموناس آئروجینوسا سومین عامل عفونت‌های بیمارستانی است و یکی از مهم‌ترین باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های مختلف می‌باشد. به نظر می‌رسد که تشکیل بیوفیلم و قدرت بقای باکتری در محیط اطراف و انتقال آن به بیماران توسط عوامل مختلف، مهم‌ترین عامل شیوع این عفونت‌ها در این مراکز می‌باشد (۶). از این رو با توجه به هزینه‌بر و وقت‌گیر بودن درمان بیماری‌های عفونی، مشکلات مرتبط با درمان، پدیده جهش‌های ژنتیکی و افزایش مقاومت‌های دارویی و اثرات جانبی آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی نیاز به معرفی جایگزین‌های دارای خاصیت ضد میکروبی وجود دارد (۱۴). استفاده از نانوذرات اکسید فلزی به منظور مقابله با عفونت‌های باکتریایی به عنوان روش جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند مؤثر باشد زیرا نانوذرات، بدون افزایش مقاومت دارویی، باعث مهار باکتری‌ها می‌شوند (۱۵). با توجه به معایب و مشکلات استفاده از روش‌های فیزیکی و شیمیایی به منظور از بین بردن و کاهش این اثرات، امروزه روش تولید زیستی نانوذرات معرفی گردیده است (۱۶). در این مطالعه نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره چای سبز در محدوده ۱۰ تا ۹۰ نانومتری و با متوسط اندازه زیر ۴۰ نانومتر با ساختار هگزاگونال ورتسایت مطابق با استاندارد (JCPDS شماره ۳۶-۱۴۵۱ برای اکسید روی) بیوستز شدند. سنتیل کومار و سیواکومار (Senthilkumar & Sivakumar) در سال ۲۰۱۴ نانوذرات اکسید روی را با استفاده از عصاره چای سبز در اندازه ۱۶ نانومتر و مطابق با ساختار هگزاگونال ورتسایت مطابق با استاندارد (JCPDS شماره ۳۶-۱۴۵۱) بیوستز نمودند (۱۷).

اثرات ضدبیوفیلمی نانوذرات با افزایش غلظت آن‌ها افزایش یافت و وابسته به دوز بود.

دیویدی (Dwivedi) و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴ مهارکنندگی تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروجینوسا توسط نانوذرات اکسید روی را بررسی نمودند نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد این نانوذرات در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تشکیل بیوفیلم در این باکتری را به خوبی مهار کردند و بیشترین مهارکنندگی در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات رخ داد. آن‌ها بیان کردند نانوذرات اکسید روی به عنوان عوامل ضد میکروبی و ضدبیوفیلمی بالقوه عمل می‌کنند و کنترل مؤثر آن‌ها بر تشکیل بیوفیلم کاملاً روشن و واضح است (۲۵). در سال ۲۰۱۴ وینسنت (Vincent) و همکاران فعالیت ضدبیوفیلمی خوبی برای نانوذرات اکسید روی در مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های سودوموناس آئروجینوسا تشکیل دهنده بیوفیلم قوی در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند و بیشترین مهار را در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اعلام نمودند (۲۶). در مطالعه لی (Lee) و همکاران در سال ۲۰۱۴ این نانوذرات به طور قابل توجهی مانع از تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروجینوسا شدند به گونه‌ای که در غلظت یک میلی‌مولار این نانوذرات تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروجینوسا بیش از ۹۵ درصد مهار شد و این مهارکنندگی به صورت وابسته به دوز بود و با افزایش غلظت نانوذرات افزایش یافت (۲۷).

ایشید (Eshed) و همکاران در سال ۲۰۱۴ پوششی از نانوذرات اکسید روی و اکسید مس بر روی دندان درست کردند و نتایج تحقیق آن‌ها حاکی از آن بود که این پوشش ۷۰ تا ۸۸ درصد تشکیل بیوفیلم را کاهش می‌دهد (۲۸). حسنی سنگانی (Hassani Sangani) و همکاران در سال ۲۰۱۵ اعلام کردند این نانوذرات در غلظت ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیش از ۹۴ درصد مهار تشکیل بیوفیلم در ۱۵ جدایه بالینی سودوموناس آئروجینوسا نشان دادند (۲۹).

نتایج مطالعه گارسایالارا (García-Lara) و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که نانوذرات اکسید روی در غلظت یک

یوسف (Yousef) و دنیل (Danial) در سال ۲۰۱۲ حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات اکسید روی برای سودوموناس آئروجینوسا را ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر اعلام نمودند (۲۲).

سعادت و همکاران در سال ۱۳۹۱ در مطالعه‌ای حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات اکسید روی برای سودوموناس آئروجینوسا ۰/۰۰۰۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند (۲۳). در مطالعه دیگری در سال ۱۳۹۱ حسین‌زاده و همکاران، حداقل غلظت مهارکنندگی این نانوذرات برای سودوموناس آئروجینوسا را ۱۵۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین و اشاره کردند با افزایش غلظت نانوذرات خاصیت ضد میکروبی افزایش می‌یابد (۷). رجایی و همکاران در مطالعه‌شان در سال ۱۳۹۴ با هدف بررسی خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی بر مهار رشد سودوموناس آئروجینوسا بیان کردند که فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی با افزایش غلظت و کاهش اندازه نانوذرات افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر این اثرات وابسته به دوز می‌باشد (۲).

افلاطونیان و همکاران در سال ۱۳۹۶ نانوذرات اکسید روی را با استفاده از بذر زیره به روش سنتز نمودند و در مطالعه آن‌ها حداقل غلظت مهارکنندگی این نانوذرات برای سویه‌های سودوموناس آئروجینوسا ۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (۲۴). به طور کلی نتایج مطالعات یاد شده نتایج مطالعه حاضر را تأیید می‌کند و دلیل تفاوت مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی در مطالعات مختلف ممکن است به دلیل تفاوت در مقادیر غلظت‌های مورد مطالعه، روش‌های آماده سازی نانوذرات، اندازه نانوذرات و تفاوت در سوش‌های باکتری‌های مورد مطالعه باشد. در زمینه بررسی تأثیر نانوذرات اکسید روی بر تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا در مطالعه حاضر غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی تشکیل بیوفیلم در جدایه‌ها را به خوبی مهار کردند و بیشترین مهارکنندگی در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رخ داد. به طور کلی در این مطالعه نانوذرات اکسید روی بیوستتر شده ۲۵ تا ۹۰ درصد در جدایه‌ها و ۶۵ درصد در سویه استاندارد PAOI، تشکیل بیوفیلم را مهار کردند. همچنین

نتیجه گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد بیوستتر نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره چای سبز بدون نیاز به صرف انرژی و مواد اولیه گران قیمت از نظر اقتصادی با صرفه‌تر از روش‌های شیمیایی و فیزیکی بوده و سازگار با محیط زیست می‌باشد همچنین دارای مزایای متعددی مانند سادگی روش ساخت، ثبات خوب، مصرف زمان کم‌تر، ضایعات غیرسمی و قابلیت سنتز در مقیاس بزرگ است. به علاوه این نانوذرات به طور مؤثری دارای فعالیت ضد میکروبی و ضدبیوفیلمی علیه جدایه‌های *Sudomonas aeruginosa* جدا شده از عفونت زخم می‌باشند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری پرسنل بیمارستان امیرالمؤمنین اراک در این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

میلی‌مولار اثر مهاری قوی در تشکیل بیوفیلم به میزان ۲۶ تا ۱۰۰ درصد در سویه‌های بالینی و محیطی *Sudomonas aeruginosa* و در سویه استاندارد PAOI، به میزان ۹۴ درصد داشتند (۳۰).

در مطالعه آخیل (Akhlil) و همکاران در سال ۲۰۱۶ فعالیت ضدبیوفیلمی نانوذرات اکسید روی در غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب باعث کاهش ۲، ۴، ۱۱ و ۲۵ درصدی در تشکیل بیوفیلم *Sudomonas aeruginosa* در تاریکی شدند و این مقادیر در حضور نور به ۴، ۸، ۱۶ و ۲۵ درصد برای هر غلظت افزایش یافت (۳۱).

نتایج مطالعه حاضر با موارد یاد شده در سایر مطالعات مطابقت دارد و دلایل تفاوت درصد مهار بیوفیلم توسط نانوذرات می‌تواند به تفاوت در مقادیر غلظت‌ها، روش‌های آماده سازی و اندازه نانوذرات یا تفاوت در سوش‌های باکتری‌های مورد بررسی مرتبط باشد.

References

1. Aghaei SS, Javadi A, Sharifi Y, Morovvati A. Detection of exotoxin A, Y, T, U, S genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to third-generation cephalosporins in clinical samples of hospitalized patients in hospitals of Qom City, Iran. Qom Univ Med Sci J. 2016; 10 (1): 48-55. [In Persian].
2. Rajaie S, Mohammadi Sichani M, Yousefi MH. Study on the inhibitory activity of zinc oxide nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wounds. Qom Univ Med Sci J. 2015; 9(1-2): 30-37. [In Persian].
3. Saghar Hendiani. 2013. Comparison of antibiofilm activity of silver nanoparticles and some antimicrobial agents against biofilm producing *Acinetobacter spp.* M.Sc. Basic Science Alzahra University. [In Persian].
4. Tabasi M, Javadinia Sh, Masoumi Asl H, Nemati A, Azizian R, Alipour M, Tabatabaei A. Survey of Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients with Urinary Tract Infection. Iran J Infect Dis Trop Med. 2017; 22(77): 63-68. [In Persian].
5. Ghotaslou R, Salahi Eshlaqghi B. Biofilm of *Pseudomonas Aeruginosa* and New Preventive Measures and Anti- Biofilm Agents. J Rafsanjan Univ Med Sci. 2013; 12 (9) :747-768. [In Persian].
6. Rajabpour M, Arabestani M R, Yousefi mashof R, Alikhani M Y. MIC determination of

- Pseudomonas aeruginosa* strains were isolated from clinical specimens of patients admitted to educational hospitals in Hamedan (90-91). Iran J Med Microbiol. 2013; 7(3): 18-25. [In Persian].
7. Hoseinzadeh E, Samarghandi M, Alikhani M, Asgari G, Roshanaei G. Effect of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on death kinetic of Gram-negative and positive bacterium. J Babol Univ Med Sci. 2012; 14(5): 13-19. [In Persian]
 8. Khalili H, Baghbani-arani F. Green synthesized of silver nanoparticles using *Artemisia tschernieviana* extract and evaluation of cytotoxicity effects on human colon cancer (HT29) and normal (HEK293) cell lines. J Ilam Univ Med Sci. 2017; 25(2): 91-100. [In Persian]
 9. Dobrucka R, Długaszewska J. Biosynthesis and antibacterial activity of ZnO nanoparticles using *Trifolium Pratense* flower extract. Saudi J Biol Sci. 2016; 23(4): 517-523.
 10. Pourzerehki N, Naserpour Farivar T, Peymani A. Presence of alginate among multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples in Qazvin and Tehran hospitals. J Clin Res Paramed Sci. 2014; 3(4): 257-263. [In Persian]
 11. Emrani Sh, Zhiani R, Dafe Jafari M. The biosynthesis of silver nanoparticles using plants of *Glycyrrhiza glabra* and *Mentha piperata* and its antimicrobial effect on some bacteria that cause tooth decay. J Rafsanjan Univ Med Sci. 2018; 16(10): 953-968. [In Persian]
 12. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. J Vis Exp. 2011; 30(47): 1-2.
 13. 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. [In Persian]
 14. Hosseini S. 2010. The comprative evaluation of inhibitory activity of biocide SDS & Nano particle ZnO on biofilm formation of *Candida albicans*. M.Sc. Medical Science Tarbiat Modares University. [In Persian]
 15. Nabipour Y, Rostamzad A, Ahmadi S. The evaluation of antimicrobial properties of zink and silver nanoparticles on pathogenic bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. J Ilam Univ Med Sci. 2015; 23(5): 173-181. [In Persian]
 16. Rezaei A, Pournali P, Yahyaei B. Assessment of the cytotoxicity of gold nanoparticles produced by *Bacillus cereus* on hepatocyte and fibroblast cell lines. J Mol Cel Res. 2016; 29(3): 291-301. [In Persian]
 17. Senthilkumar SR, Sivakumar T. Green tea (*Camellia sinensis*) mediated synthesis of zinc oxide (ZnO) nanoparticles and studies on their antimicrobial activities. Int J Pharm Pharm Sci. 2014; 6(6): 461-465.
 18. Sutradhar P, Saha M. Synthesis of zinc oxide nanoparticles using tea leaf extract and its application for solar cell. Bull Mater Sci. 2015; 38(3): 653-657.
 19. Dhanemozhi AC, Rajeswari V, Sathyajothi S. Green synthesis of zinc oxide nanoparticle using green tea leaf extract for supercapacitor application. Mater Today Proc. 2017; 4(2): 660-667.
 20. Nava OJ, Luque PA, Gómez-Gutiérrez CM, Vilchis-Nestor AR, Castro-Beltrán A,

- Mota-González ML, Olivas A. Influence of *Camellia sinensis* extract on zinc oxide nanoparticle green synthesis. *J Mol Struct*. 2017; 11(34): 121-125.
21. Padmavathy N, Vijayaraghavan R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles an antimicrobial study. *Sci Technol Adv Mater*. 2008; 9(3): 1-7.
 22. 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 (El Monte)*. 2012; 2(4): 38-42.
 23. Saadat M, Roudbar Mohammadi S, Yadegari M, Eskandari M, Khavari-nejad R. An assessment of antibacterial activity of ZnO nanoparticles, Catechin, and EDTA on standard strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Jahrom Univ Med Sci*. 2012; 10(1): 13-19. [In Persian]
 24. Hoseinzadeh E, Samargandi M R, Alikhani M Y, Roshanaei G, Asgari G. Antimicrobial efficacy of zinc oxide nanoparticles suspension against gram negative and gram positive bacteria. *Iran J Health Environ*. 2012; 5(3): 331-342. [In Persian]
 25. Dwivedi S, Wahab R, Khan F, Mishra YK, Musarrat J, Al-Khedhairi AA. Reactive oxygen species mediated bacterial biofilm inhibition via zinc oxide nanoparticles and their statistical determination. *PloS one*. 2014; 9(11): 1-9.
 26. Vincent MG, John NP, Narayanan PM, Vani C, Murugan S. In vitro study on the efficacy of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles against metallo beta-lactamase and biofilm producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Pharm Sci*. 2014; 4(7): 41.
 27. Lee JH, Kim YG, Cho MH, Lee J. ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiol Res*. 2014; 169(12): 888-896.
 28. 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): 1382-1390.
 29. Hassani Sangani M, Nakhaei Moghaddam M, Forghanifard MM. Inhibitory effect of zinc oxide nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Nanomed J*. 2015; 2(2): 121-128.
 30. García-Lara B, Saucedo-Mora MÁ, Roldán-Sánchez J., Pérez-Eretza B, Ramasamy M, Lee J, García-Contreras R. Inhibition of quorum-sensing-dependent virulence factors and biofilm formation of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* strains by ZnO nanoparticles. *Lett Appl Microbiol*. 2015; 61(3): 299-305.
 31. Akhil K, Jayakumar J, Gayathri G, Khan SS. Effect of various capping agents on photocatalytic, antibacterial and antibiofilm activities of ZnO nanoparticles. *J Photochem Photobiol B*. 2016; 160: 32-42.



Biosynthesis of ZnO nanoparticles using green tea extract and determination of its antibiofilm effect on *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from wound infection

Behrooz Shojaee Sadi¹, Shima Chehrei², Mahla Esmaeili³

¹Instructor, Department of Biology, Faculty Of Basic Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.

²Assistant Professor, Department of Biology, Faculty Of Basic Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.

³M.Sc., student, Department of Biology, Faculty Of Basic Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Owing to the antimicrobial activity of ZnO nanoparticles without causing resistance, such substances could be considered as an appropriate alternative to prevent bacterial biofilm formation. The aim of this study was to the biosynthesis of ZnO nanoparticles using green tea extract and determination of its effect on biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* isolates separated from wound infection.

Materials & Methods: In this cross-sectional study, biosynthetic nanoparticles were evaluated by X-ray diffraction, energy dispersive X-ray analysis, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. Determination of antimicrobial activity and minimum inhibitory concentration of nanoparticles were done by micro broth dilution method. The antibiofilm activity was investigated using biofilm formation by O'Toole 2011 method.

Results: The biosynthesis of nanoparticles was confirmed by analysis. The size of the nanoparticles was determined in the range of 10 to 90 with an average of less than 40 nm. The nanoparticles had anti-microbial activities in concentrations of 250, 500 and 1000 ug/mL and minimum inhibitory concentration of 500 ug/mL was reported. The antimicrobial and antibiofilm effects of the nanoparticles rose with increasing the concentrations.

Conclusion: The biosynthesis of nanoparticles with the extract has a variety of benefits such as simplicity, good stability, without energy consumption, less time-consuming, non-toxic wastes, economical efficiency, and large scale synthesis capability. According to the antimicrobial and antibiofilm properties, the use of these nanoparticles as coatings in medical equipment and food industries is recommended.

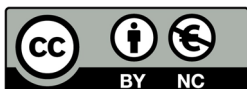
Keywords: Zinc oxide nanoparticles, Green tea extract, Biofilm, Minimum inhibitory concentration, *Pseudomonas aeruginosa*.

Correspondence to: Mahla Esmaeili

Tel: +98 9374880412

E-mail: esmaeili.microbiology@gmail.com

Journal of Microbial World 2019, 12(1): 27-38.



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.