Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 10:37 +0330 on Wednesday January 17th 2018

Arak Medical University Journal (AMUJ)
2012; 15(60): 27-34

Original Article

Comparative evaluation of the effects of TiO2 nanoparticles and its photocatalystic form on the formation of fungal biofilms

Haghighi F(M.Sc)[1], Roudbar Mohammadi S(Ph.D)[1*], Mohammadi P(Ph.D)[2], Eskandari M(M.Sc)[3]

1- Department of Medical Mycology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Department of Biology, Alzahra University, Tehran, Iran
3- Department of Nanomaterial Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 27 Feb 2011 , Accepted: 18 May 2011

Abstract

Background: *Candida albicans* is the fourth common cause of chronic fungal infections that cause both mucosal and deep tissue infections. Nowadays, mortality and morbidity due to *C .albicans* infections via medical devices, such as catheter and implants, are increasing. Therefore, finding new methods of combating such infectious agents seems necessary. In this study antifungal effects of titanium dioxide nanoparticles and photocatalyst TiO2 nanoparticles on *C .albicans* biofilms were investigated.

Materials and Methods: In this experimental study, TiO2 nanoparticles were synthesized and exposed to UV ray with 370 nm wavelength. Biofilms of *C. albicans* were developed on flat-bottomed 96-well microtiter plates, and antifungal effects of TiO2 and photocatalyst TiO2 nanoparticles were evaluated. Data were analyzed by t-test using SPSS software.

Results: MIC50 of photocatalyst TiO2 nanoparticles was 1.9 µg/ml and its MIC90 was 2.74 µg/ml while MFC was determined to be 3.37 µg/ml. Biofilms inhibitory concentration of TiO2 nanoparticles, photocatalyst TiO2 nanoparticles, and fluconazole for susceptible strains were 5.14, 4.54, and 4 µg/ml, respectively. These values for the fluconazole resistant strains were 5.35, 4.88, and 8 µg/ml, respectively.

Conclusion: Photocatalyst TiO2 nanoparticles showed a suitable antifungal property against *C. albicans* biofilms compared with fluconazole. Thus it can be a new strategy in prevention of fungal biofilms, especially those formed on the surface of medical devices.

Keywords: *Candida albicans*, Fungal biofilms, Photocatalyst, TiO2 nanoparticles

*Corresponding author:
Address: Department of Mycology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: sh.mohammadi@modares.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 10:37 +0330 on Wednesday January 17th 2018

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال 15، شماره 1 (شماره پیاپی 60)، فروردین و اردیبهشت 1391، 34-27

ارزیابی مقایسه‌ای اثر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و نوع فتوکاتالیستی آن بر تشکیل بیوفیلم قارچی

فرنوش حقیقی[1]، شهلا رودبار محمّدی [2*]، پریسا محمّدی[3]، مهدی اسکندری[4]

1- کارشناس ارشد قارچ شناسی پزشکی، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

2- استادیار، دکترای تخصصی قارچ شناسی، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

3- استادیار، دکترای تخصصی میکروب شناسی، گروه زیست شناسی دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

4- دانشجوی دکترای مهندسی نانو مواد، گروه مهندسی نانو مواد، دانشگاه فنی مهندسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 89/11/8 تاریخ پذیرش: 90/2/28

چکیده

زمینه و هدف: کاندیدا آلبیکنس چهارمین عامل مهم عفونت‌های مزمن قارچی است که مخاط را درگیر نموده و ایجاد عفونت در بافت‌های عمقی می‌نماید. امروزه مرگ و میر ناشی از عفونت‌های بیوفیلم کاندیدایی که از طریق استفاده از ابزارهای پزشکی مانند کاتترها و ایمپلنت‌ها رو به افزایش است. لذا یافتن روش‌های نوین مبارزه با عوامل چنین عفونت‌های قارچی ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه تلاش شد تا اثر ترکیبات ضد قارچی نانو ذرات دی‌اکسیدتیتانیوم و دی‌اکسیدتیتانیوم فتوکاتالیست بر روی بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس ارزیابی گردد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی نانو ذره دی‌اکسیدتیتانیوم سنتز شده در معرض پرتو فرابنفش با طول موج370 نانومتر قرار گرفت. بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس در پلیت‌های 96 خانه‌ای تشکیل شد و اثر ضد کاندیدایی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم و دی‌اکسیدتیتانیوم فتوکاتالیست بر روی آن بررسی شد. داده‌های جمع آوری شده با استفاده از آزمون آماری تی تست و نرم افزار SPSS تحلیل شد.

یافته‌ها: حداقل غلظت مهارکنندگی50، دی‌اکسیدتیتانیوم فتوکاتالیست 1/9 میکروگرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت مهارکنندگی90، 2/74 میکروگرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی 3/37 میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید. غلظت مهارکنندگی بیوفیلم دی‌اکسیدتیتانیوم و دی‌اکسیدتیتانیوم فتوکاتالیست و فلوکونازول برای سویه حساس به فلوکونازول به ترتیب 54/14، 4/5 و 4 میکروگرم در میلی‌لیتر و هم‌چنین برای سویه مقاوم به فلوکونازول به ترتیب 88/35، 4/5 و 8 میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

نتیجه‌گیری: نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم فتوکاتالیست اثر مطلوبی در حذف بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس در مقایسه با داروی فلوکونازول نشان داد. از این رو می‌تواند راه‌کاری جدید جهت پیشگیری از تشکیل بیوفیلم قارچی به ویژه بیوفیلم‌های مرتبط با ابزارهای پزشکی باشد.

واژگان کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، بیوفیلم قارچی، فتوکاتالیست، نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم

***نویسنده مسئول:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه قارچ شناسی پزشکی

Email: sh.mohammadi@modares.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 10:37 +0330 on Wednesday January 17th 2018

مقدمه

امروزه تکنولوژی مدرن امکان استفاده از وسایل جدید پزشکی را فراهم آورده است. استفاده از کاتترهای وریدی، ادراری، دریچه‌های پروستتیک، مفاصل مصنوعی و پروتزها و سایر ایمپلنت‌ها در علوم پزشکی متداول می‌باشند. گزارشات نشان می‌دهد که حداقل نیمی از عفونت‌های بیمارستانی در ارتباط با وسایل پزشکی می‌باشند که عواقب این گونه عفونت‌ها در برخی موارد بسیار وخیم بوده به طوری که به برداشت و حذف این وسایل پزشکی می‌انجامد و حتی در مراحل پیشرفته منجر به مرگ و میر بیماران می‌شود(1، 2).

میکروارگانیسم‌های مختلف که توانایی تشکیل بیوفیلم را بر روی سطوح دارند می‌توانند بر روی ابزارهای پزشکی تجمع یابند و با کلنیزاسیون و ایجاد عفونت مشکلات خاصی را در درمان ایجاد کنند. از جمله این میکروارگانیسم‌ها گونه‌های کاندیدا هستند که توانایی تشکیل بیوفیلم بر روی مواد سنتتیک را دارا می‌باشند. این امر نه تنها موجب پایداری عفونت‌های قارچی می‌شود بلکه می‌تواند با تسهیل چسبندگی سایر میکروارگانیسم‌ها منجر به بیماری‌های قارچی گردد(2، 3).

بخش اعظم اجتماع میکروبی موجود در طبیعت را بیوفیلم‌ها تشکیل می‌دهند که تحت شرایط مختلف می‌توانند مفید یا مضر واقع شوند(3). امروزه بیوفیلم‌ها بسیار مورد توجه قرار دارند، زیرا در پزشکی می‌توانند مشکل ساز باشند، که این مسئله ناشی از ویژگی‌های بیوفیلم‌ها از جمله مقاومت بالا در برابر سیستم ایمنی، مقاومت آنتی بیوتیکی و مقاومت در برابر بیوسایدها و پرتو ها می‌باشد(4).

طبق گزارش سازمان ملی بهداشت آمریکا (National Institutes of Health)، حدود 80 درصد عفونت‌های بیمارستانی توسط بیوفیلم‌ها ایجاد می‌شوند که این امر بیانگر نقش مهم آن در ایجاد بیماری‌های عفونی می‌باشد(5).

به لحاظ ساختاری، بیوفیلم‌ها اجتماع مستقل و پیچیده‌ای از ارگانیسم‌های تجمع‌یافته بر روی سطوح می‌باشند. این گونه ارگانیسم‌ها در یک بستر پلی‌ساکاریدی محصور می‌شوند که بر روی هر سطحی به ویژه سطوح مرتبط با سیستم‌های آبی - صنعتی و وسایل پزشکی تشکیل می‌شوند(1، 2).

انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌ها قادرند در ساختار بیوفیلمی رشد کنند. بیوفیلم‌ها می‌توانند متشکل از یک جمعیت تک گونه‌ای یا اجتماعی از چندین گونه میکروبی باشند. بیوفیلم‌ها منبع عفونت‌های سیستمیک مقاوم به درمان می‌باشند که عفونت‌های متعددی مثل عفونت‌های مجرای ادراری، عفونت‌های کاتتری، عفونت‌های گوش میانی کودکان، پلاک‌های دندانی و عفونت‌های دریچه قلبی از آنها گزارش شده است(2).

شناسایی و معرفی عواملی که بتواند مانع تشکیل بیوفیلم گردد و یا رشد آن را مهار کند امروزه مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. از جمله این عوامل می‌توان به نانوذرات اشاره کرد(6). دی‌اکسیدتیتانیوم به علت توانایی فتوکاتالیستی بسیار بالا بیش از هر ماده دیگری در پژوهش‌ها مورد استفاده قرار گرفته است(7).

دی‌اکسیدتیتانیوم دارای سه ساختار کریستالی آناتاز(Anatase)، روتال (Rutile) و بروکیت (Brookite) می‌باشد، اما پایدارترین فاز دی‌اکسیدتیتانیوم در فشار و دمای معمول ساختار آناتاز بوده و دو فاز دیگر نیمه پایدار می‌باشند(8).

برخی از ویژگی‌های این ماده که موجب برتری آن نسبت به سایر ذرات شده است شامل مقاومت شیمیایی بالا، غیر سمی بودن آن، طول عمر بالای این ماده، در دسترس بودن و هزینه کم آن است(9).

با توجه به توانایی کاندیدا آلبیکنس در تشکیل بیوفیلم قارچی و نقش مهم آن در شیوع عفونت‌های بیمارستانی و از طرف دیگر با در نظر گرفتن تکنولوژی رو به رشد علم نانومواد، در این مطالعه اثر ضد قارچی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر روی بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس مورد ارزیابی قرار گرفت.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 10:37 +0330 on Wednesday January 17th 2018

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی که در طی سال‌های 89-88 انجام شد، از دو سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس، سویه حساس ATCC10231، تهیه شده از بخش قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و سویه مقاوم ATCC 76615، تهیه شده از مرکز دارویی دانشگاه ارتش شانگهای چین استفاده شد. با استفاده از لام نئوبار سوسپانسیون سلولی به غلظت 1×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر در بافر فسفات سالین(PBS) از هر یک از سویه‌ها تهیه گردید. سنتز نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم به روش حقیقی انجام شد(10).

جهت تهیه نانوذرات فتوکاتالیست ابتدا محلول دی‌اکسیدتیتانیوم سنتز شده در داخل بشر ریخته شد و لامپ فرابنفش با طول موج370 نانومتر، 56 میکرووات بر سانتی‌متر مربع در داخل لوله شیشه‌ای قرار داده شد. سپس میزان پرتو خروجی فرابنفش با استفاده از دستگاه دیجیتال (SIBATA مدل UV3 چین) اندازه‌گیری شد. مقدار اندازه‌گیری شده معادل 54 میکرووات بر سانتی‌متر مربع بود. سپس لامپ فرابنفش به مدت 60 دقیقه در داخل محلول دی‌اکسیدتیتانیوم قرار داده شد.

حداقل غلظت مهار کنندگی مواد به روش حقیقی انجام شد(10). این مرحله با استفاده از رقت‌های 5-0/5 میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم و دی‌اکسیدتیتانیوم فتوکاتالیست و 128-0/125 میکروگرم بر میلی‌لیتر از فلوکونازول به عنوان کنترل مثبت انجام شد.

سوسپانسیونی به غلظت 1×10^6 در محیط YNB (Yeast Nitrogen Base، Himedia هند) حاوی 100 میلی‌مولار گلوکز تهیه شد و به مقدار 100میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی فوق در هر چاهک پلیت 96 خانه‌ای ریخته شد. سپس پلیت در انکوباتور شیکردار (مدل Stuart Scientific انگلیس) 37 درجه سانتی‌گراد با دور 75 در دقیقه به مدت 90 دقیقه قرار گرفت تا سلول‌ها به کف چاهک متصل شوند. به منظور جداسازی سلول‌های اتصال نیافته و آزادزی هر چاهک با 100 میکرولیتر بافر فسفات سالین با اسیدیته استاندارد 7/4 شستشو داده شد و عمل شستشو سه بار تکرار شد. به دنبال آن 200 میکرولیتر محیط YNB حاوی 100 میلی‌مولار گلوکز به هر چاهک افزوده گردید و به مدت 48 ساعت در انکوباتور شیکردار نگهداری شد. پس از طی زمان مورد نظر بیوفیلم تشکیل شده مجدداً با 100 میکرولیتر بافر سالین شستشو داده شد. سپس رقت‌های 5- 0/5 میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم و دی‌اکسیدتیتانیوم تابش دیده به هر چاهک پلیت افزوده گردید و حجم هر چاهک با استفاده از محیط RPMI- 1640 (شرکت Gibco) به 100 میکرولیتر رسانیده شد.

پس از تشکیل بیوفیلم در چاهک های پلیت 96 خانه‌ای به منظور بررسی تعداد سلول‌های زنده بیوفیلم از رنگ حیاتی تترازولیوم(شرکت سیگما) استفاده گردید. بدین ترتیب ابتدا 50 میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی هر چاهک جمع‌آوری شده به همراه 50 میکرولیتر محیط YNB غنی شده با گلوکز و هم‌چنین 20 میکرولیتر محلول تترازولیوم به مدت 4 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سپری شدن زمان مورد نظر و شستشو با بافر مذکور، 100 میکرولیتر محلول 0/5 درصد دی متیل سولفوکساید (DMSO) به تمام چاهک‌های کنترل و آزمون افزوده گردید و مجدداً به مدت 10 دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. بعد از طی زمان گرماگذاری با استفاده از دستگاه الایزا ریدر(مدل Memmert آلمان) جذب نوری پلیت در 540 نانومتر اندازه‌گیری گردید(11).

سپس اعداد جذب نوری در فرمول زیر جایگذاری گردید تا درصد مهار رشد مشخص گردد.

[100×(OD_{540} مربوط به کنترل مثبت / OD_{540} مربوط به بیوساید)]-100 = درصد مهار رشد

تمامی داده‌ها با استفاده از آزمون آماری تی تست و نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها

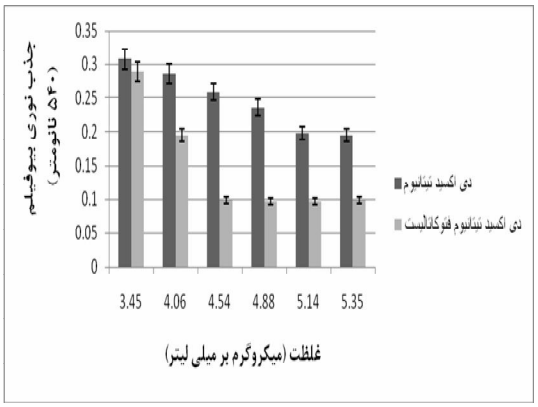
نتایج به دست آمده از روش تترازولیوم (MTT) و بر اساس فرمول(1) نشان داد که مقدار بیوفیلم زمانی که از

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 10:37 +0330 on Wednesday January 17th 2018

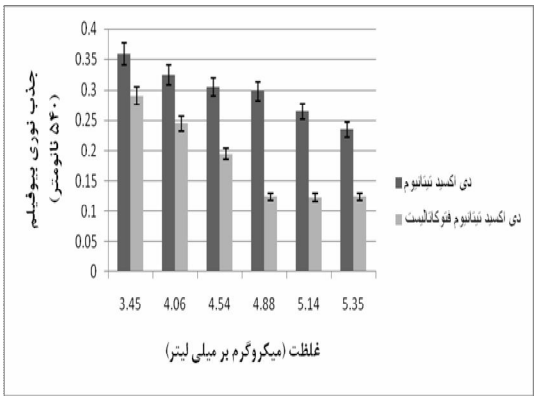
دی‌اکسیدتیتانیوم استفاده شد، 57 درصد کاهش یافت که این مقدار اختلاف معنی‌داری($p< 0/05$) با گروه کنترل نشان داد و زمانی که از دی‌اکسیدتیتانیوم فتوکاتالیستی استفاده شد، مقدار بیوفیلم به72 درصد کاهش یافت که نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری($p< 0/05$) بود. در این مطالعه غلظت مهارکنندگی بیوفیلم فلوکونازول برای سویه حساس با توجه به حداقل غلظت مهارکنندگی آن 0/5 میکروگرم در میلی‌لیتر،4 میکروگرم در میلی‌لیتر بود. هم‌چنین در خصوص سویه مقاوم به فلوکونازول غلظت مهارکنندگی بیوفیلم با توجه به حداقل غلظت مهارکنندگی آن 1 میکروگرم در میلی‌لیتر، 8 میکروگرم در میلی‌لیترتعیین شد.

بررسی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم تابش یافته با لامپ فرابنفش با طول موج370 نانومتر، با استفاده از روش استاندارد میکرودایلوشن نشان داد که قدرت مهارکنندگی دی‌اکسیدتیتانیوم زمانی که تابش می‌یابد از غلظت 4/06 میکروگرم در میلی‌لیتر به غلظت 3/37 میکروگرم در میلی‌لیتر در خصوص سویه حساس و از غلظت 4/55 میکروگرم درمیلی‌لیتر به غلظت 3/65 میکروگرم در میلی‌لیتر در خصوص سویه مقاوم کاهش می‌یابد. در نتیجه این کاهش غلظت نشان می‌دهد به دنبال فتوکاتالیست نمودن نانوذرات خاصیت ضد قارچی آن افزایش می‌یابد(جدول 1).

با استفاده از مقادیری معادل دو برابر غلظت مهارکنندگی از این دو نوع نانو ذرات جهت بررسی توانایی کاهش تشکیل بیوفیلم بر دو سویه حساس و مقاوم کاندیدا آلبیکنس نشان داده شد که قدرت ضد قارچی نانوذرات تابش دیده در تمامی غلظت‌های به کار گرفته شده نسبت به نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم بالاتر بوده است. با توجه به اطلاعات به دست آمده مناسب‌ترین غلظت مهارکنندگی بیوفیلم برای سویه حساس دی‌اکسیدتیتانیوم 4/54 و برای سوش مقاوم 4/88 تعیین شد(نمودار1و2).



نمودار1. جذب نوری بیوفیلم سویه حساس تیمار شده با دو نوع نانوذره



نمودار2. جذب نوری بیوفیلم سویه مقاوم تیمار شده با دو نوع نانوذره

بحث

کاندیدا آلبیکنس شایع‌ترین قارچ ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی است که با توجه به عوامل بیماری‌زا این قارچ می‌تواند عفونت‌های سیستمیک و مهاجم ایجاد نماید و مرگ و میر قابل توجهی را موجب شود. از جمله عوامل کاندیدا آلبیکنس، توانایی تشکیل بیوفیلم است که به دنبال اتصال کاندیدا به سطوح رخ داده و از آنجایی که بیوفیلم های میکروبی عموماً دارای مقاومت دارویی بالایی می‌باشند، شناسایی و معرفی عواملی که بتواند مانع تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح مختلف به ویژه سطوح تجهیزات پزشکی گردند از جمله اقدامات اساسی جهت پیش‌گیری از تشکیل بیوفیلم و جلوگیری از انتشار عفونت‌های قارچی بیمارستانی است(2، 12). در این تحقیق از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم و هم‌چنین از دی‌اکسیدتیتانیوم تابش یافته

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 10:37 +0330 on Wednesday January 17th 2018

دارای خاصیت فتوکاتالیستی جهت جلوگیری از تشکیل بیوفیلم استفاده گردید.

سون و همکاران با مطالعه بر روی خاصیت ضد میکروبی دی‌اکسیدتیتانیوم و اکسید روی اظهار کردند که با اثر ماده مذکور بر روی سوسپانسیون سلولی قارچ‌های کاندیدا آلبیکنس و ساکارومیسس سرویزیه و آسپرژیلوس نایجر و باکتری‌های اشرشیاکولی، پسودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس سه گونه باکتریایی در عرض 40 دقیقه از بین رفتند، در حالی که گونه‌های قارچی در عرض 120 دقیقه تحت شرایط یکسان با پرتو لامپ سدیمی 400 وات از بین رفتند(13).

لونن و همکاران با بررسی تأثیر فتوکاتالیستی نوری دی‌اکسیدتیتانیوم بر قارچ کاندیدا آلبیکنس و فوزاریوم سولانی بعد از 8 ساعت تابش اشعه فرابنفش در طول موج 400-300 نانومتر در 200 وات بر متر کاهش حداقل 410 گرمی در حیات سلول‌های قارچی را گزارش نمودند(14). آکیبا و همکاران با بررسی اثرات ضد قارچی سطوح پوشش داده شده با دی‌اکسیدتیتانیوم فتوکاتالیست دریافتند که بعد از 60 دقیقه و سپس 90 دقیقه تابش کاهش چشم‌گیری در تعداد سلول‌های زنده کاندیدا آلبیکنس مشاهده گردید(15). باتین و همکاران با مطالعه بر روی نانوساختار دی‌اکسیدتیتانیوم و تأثیرآن بر روی بیوفیلم میکروبی نشان دادند که تخریب غشاء سلولی در سلول‌های آزادزی بیشتر از سلول‌های بیوفیلم می‌باشد(16).

جدول 1. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نانوذرات دی اکسیدتیتانیوم و دی اکسیدتیتانیوم فتوکاتالیست بر سویه‌های حساس و مقاوم کاندیدا آلبیکنس

سویه های کاندیدا آلبیکنس	مهارکننده ها	محدوده غلظت ها (میکروگرم بر میلی لیتر)	میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (میکروگرم بر میلی لیتر) حداقل غلظت مهارکنندگی 50	حداقل غلظت مهارکنندگی 90	میزان حداقل غلظت کشندگی (میکروگرم بر میلی لیتر)
	دی‌اکسیدتیتانیوم	0/5 – 5	2/2	3/51	4/06
سویه حساس	دی‌اکسیدتیتانیوم فوتوکاتالیست	0/5 -5	1/9	2/74	3/37
	دی‌اکسیدتیتانیوم	0/5 – 5	2/73	4/06	4/55
سویه مقاوم	دی‌اکسیدتیتانیوم فوتوکاتالیست	0/5 -5	2/46	3/1	3/65

از آنجائی که در سطح بالینی با جدایه‌های حساس و مقاوم روبرو هستیم لذا در این مطالعه از هر دو سویه حساس و مقاوم به فلوکونازول جهت مقایسه توانایی تشکیل بیوفیلم استفاده گردید. سویه‌های مقاوم قارچی معمولاً در ایجاد بیوفیلم‌های مقاوم به دارو مهم‌تر از سویه‌های حساس می‌باشند(17). جهت ارزیابی تشکیل و یا عدم تشکیل بیوفیلم روش‌های متعددی مانند استفاده از میکروسکوپ لیزری نگاره کنفوکال، روش فلورسانس هیبریداسیون در محل یا استفاده از نوکلئوتیدهای نشان دار وجود دارد(18). چنانچه قابل دسترس بودن هر یک از این روش‌ها و قابلیت تکرارپذیری آنها و هم‌چنین حساس بودن روش‌ها را در نظر بگیریم می‌توان از تعدادی از تست‌ها جهت ارزیابی بیوفیلم استفاده کرد. یکی از روش‌های متداول و استاندارد بررسی تشکیل بیوفیلم ارزیابی مقدار زنده بودن سلول‌ها پس از تیمار با مواد مورد نظر است، که بدین منظور می‌توان از رنگ حیاتی MTT استفاده کرد(19).

تست MTT یک روش رنگ سنجی نیمه کمی است که حیات سلول‌ها را اندازه‌گیری می‌کند. این آزمون بر اساس شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم به وسیله آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز که فقط در سلول‌های زنده فعال موجود می‌باشد انجام می‌شود که نتیجه آن ماده ارغوانی رنگ نامحلولی به نام فرومازان است که با استفاده از حلالی نظیردی متیل سولفوکساید، تغییر رنگ و تغییر جذب نوری آن اندازه‌گیری می‌گردد(19، 20). اندازه‌گیری جذب نوری انعکاسی از میزان زنده بودن

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 10:37 +0330 on Wednesday January 17th 2018

سلول‌ها است که درصد سلول‌های زنده نیز با استفاده از فرمول (1) محاسبه گردید. آزمون MTT در این مطالعه نشان داد که با پرتودهی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در مقایسه با نانوذره پرتودهی نشده قدرت مهار تشکیل بیوفیلم با اختلاف معنی‌داری از 57 درصد به 72 درصد افزایش یافت که در این صورت با استفاده از پرتو فرابنفش با طول موجی کوتاه تر از 385 نانومتر انرژی فاصله ترازهای نانوذرات پرتودیده با 3/2 الکترون ولت به حالت برانگیختگی در می‌آید، که این برانگیختگی موجب اثر بخشی مناسب تر نانوذرات می‌شود(21).

نتیجه گیری

با توجه به اثرات ضد میکروبی و قابل توجه نانو ذرات پیشنهاد می‌گردد با استمرار این گونه مطالعات در آینده بر روی مدل‌های مختلف حیوانی محل اثر این ترکیبات را در سلول‌های باکتریایی و قارچی شناسایی نمود و با به دست آوردن اطلاعات بیشتر در خصوص سایر خواص ضد میکروبی چنین ترکیباتی امید آن می‌رود که بتوان از آنها در زدودن آلودگی‌های میکروبی سطوح و به ویژه در موارد بالینی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته قارچ شناسی پزشکی و با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد.

منابع

1. Kumar A, Prasad R. Biofilms. Journal of Medical Education and Research. 2006;8(1):14-7.
2. Kojic EM, Darouiche RO. Candida infections of medical devices. Clinical microbiology reviews. 2004;17(2):255-67.
3. Butterfield PW, Bargmeyer AM, Camper AK, Biederman JA. Modified enzyme activity assay to determine biofilm biomass. Journal of microbiological methods. 2002;50(1):23-31.
4. Prakash B, Veeregowda B, Krishnappa G. Biofilms: a survival strategy of bacteria. Current Science. 2003;85(9):1299-307.
5. Kerksiek K. A life in slime – biofilms rule the world. Infectionresearch news and perspectives. 2008; 9: 1571–8.
6. Habimana O, Steenkeste K, Fontaine-Aupart MP, Bellon-Fontaine MN, Kulakauskas S, Briandet R. Diffusion of nanoparticles in biofilms is altered by bacterial cell wall hydrophobicity. Applied and environmental microbiology. 2011;77(1): 367-368
7. Jeena V, Robinson RS. Green oxidations:Titanium dioxide induced tandem oxidation coupling reactions. Beilstein Journal of Organic Chemistry. 2009; ; 5(24):1-4.
8. Augugliaro V, Loddo V, López-Muñoz MJ, Márquez-Álvarez C, Palmisano G, Palmisano L, et al. Home-prepared anatase, rutile, and brookite TiO2 for selective photocatalytic oxidation of 4-methoxybenzyl alcohol in water: reactivity and ATR-FTIR study. Photochem Photobiol Sci. 2009;8(5):663-9.
9. Enyashin AN, Seifert G. Structure, stability and electronic properties of TiO2 nanostructures. physica status solidi (b). 2005;242(7):1361-70.
10. Haghighi F, Roudbar Mohammadi Sh, Mohammadi P, Eskandari M. The evaluation of antifungal activity of titanium dioxide nanoparticles and ethylene diamine tetra_acetic acid on growth inhibition standard strain of Candida albicans. Quarterly Journal of Yasuj University.2010; 15(2):134-41.[Persian]
11. Krom BP, Cohen JB, McElhaney Feser GE, Cihlar RL. Optimized candidal biofilm microtiter assay. Journal of microbiological methods. 2007;68(2):421-3.
12. Nett JE, Andes D. Review of techniques for diagnosis of catheter-related Candida biofilm infections. Current Fungal Infection Reports. 2008;2(4):237-43.
13. Seven O, Dindar B, Aydemir S, Metin D, Ozinel M, Icli S. Solar photocatalytic disinfection of a group of bacteria and fungi aqueous suspensions with TiO2, ZnO and Sahara desert dust. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 2004;165(1-3):103-7.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 10:37 +0330 on Wednesday January 17th 2018

14. Lonnen J, Kilvington S, Kehoe S, Al-Touati F, McGuigan K. Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water. Water research. 2005;39(5):877-83.
15. Akiba N, Hayakawa I, Keh E, Watanabe A. Antifungal Effects of a Tissue Conditioner Coating Agent with TiO~ 2 Photocatalyst. Journal of medical and dental sciences. 2005;52(4):223-7.
16. Battin TJ, Kammer F, Weilhartner A, Ottofuelling S, Hofmann T. Nanostructured TiO2: transport behavior and effects on aquatic microbial communities under environmental conditions. Environmental science & technology. 2009;43(21):8098-104.
17. Perumal P, Mekala S, Chaffin WLJ. Role for cell density in antifungal drug resistance in Candida albicans biofilms. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007;51(7):2454-63.
18. Schaudinn C, Carr G, Gorur A, Jaramillo D, Costerton J, Webster P. Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM–SEM). Journal of Microscopy. 2009; 235(2):124-7.
19. Plumb JA. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Methods in molecular medicine. 2004; 88: 165-70.
20. Gordon O, Slenters TV, Brunetto PS, Villaruz AE, Sturdevant DE, Otto M, et al. Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010;54(10):4208-18.
21. Mori K. Photo-Functionalized Materials Using Nanoparticles: Photocatalysis. Kona. 2004: 205-14.