

Anti-fungus Impacts of Graphene Oxide Nanosheets and Reduced Graphene Oxide on *Candida albicans* Biofilm Formation

Shima Firozi Rad¹, Reza Habibipour^{2*}, Leila Moradi Haghgou³

1. M.Sc., Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Hamadan Branch, Islamic Azad University, Hamadan, Iran
2. Ph.D., Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Hamadan Branch, Islamic Azad University, Hamadan, Iran
3. M.Sc., Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Hamadan Branch, Islamic Azad University, Hamadan, Iran

Received: 2019/10/20

Accepted: 2020/02/15

Abstract

Introduction: *Candida albicans* is the most common fungus pathogen in terms of biofilm colonization and formation. Considering that the biofilm-producing *Candida* species show less sensitivity to anti-fungus medicines, hence the treatment should be accomplished through other anti-fungus factors with high effect and low cytotoxicity. In parallel with this, the present study investigated the *C. albicans* biofilm formation in the presence of Graphene Dioxide and Reduced Graphene Oxide Nano-sheets.

Materials and Methods: Graphene Dioxide and Reduced Graphene Oxide Nano-sheets synthesis were done through the Hummer Method using natural graphite. After 24 hours of incubating of *C. albicans* with different concentrations of 0, 20, 40, 60, 80, 100 ppm of Nano-sheets, biofilm formation was investigated through the ELISA method, and results were analyzed by SPSS ver.18 software ($p < 0.01$).

Results: Graphene Oxide Nano-sheets was more effective to control *C. albicans* biofilm compared to Reduced Graphene Oxide ($p < 0.01$). The most effective concentration in biofilm formation was 100 ppm and the best time was 48 and 24 hours for Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide respectively ($p < 0.01$).

Conclusion: According to the obtained results, Graphene Oxide Nano-sheets and Reduced Graphene Oxide can be proposed for further investigations to control *Candida albicans*.

***Corresponding Author:** Reza Habibipour

Address: 2. Ph.D., Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Hamadan Branch, Islamic Azad University, Hamadan, Iran

Tel: 08134481308

E-mail: Habibipour@iauh.ac

Keywords: *Candida albicans*, Biofilm, Graphene Oxide Nano-sheets, Reduced Graphene Oxide, Candidiasis

How to cite this article: Firozi Rad S., Habibipour R., Moradi Haghgou L. Anti-fungus Impacts of Graphene Oxide Nanosheets and Reduced Graphene Oxide on *Candida albicans* Biofilm Formation, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2021; 28(4):489-501.

Introduction

Various microorganisms that have the ability to form biofilm on surfaces can accumulate and colonize on medical devices which causes major challenges in treatment. A biofilm is a form of colonization of microbial community that is irreversibly attached to a biotic or abiotic surface and consist of matrix of primarily polysaccharide material and microorganisms. *Candida* spp infections are the most prevalent opportunistic fungus pathogen, with ability to form superficial biofilms on biotic and abiotic materials. This not only stabilizes fungal infections but can also lead to other fungal diseases by facilitating the adhesion of other microorganisms. At present, biofilms gain great attentions due to their high immune, antibiotic, pesticides, and radiation resistances. According to the National Institutes of Health, approximately 80% of nosocomial infections are caused by biofilm, indicating its important role in causing infectious diseases.

In recent decades, the number of patients susceptible to infection with opportunistic microorganisms such as *Candida* strains, especially in patients with weakened immune systems, has increased significantly in many countries, in which *Candida albicans* and other *Candida* species play an important role in this phenomenon and causes skin, mucosal and systemic diseases. *C. albicans* and other strains of *Candida* by 61% of reports of nosocomial fungal infections rank fourth most important cause of chronic fungal infections. Identifying and introducing factors that can inhibit the formation of biofilms or prevent growth, has been considered as one of the scientific strategies to battle its issues. Nanoparticle-based solutions for biofilm prevention and treatment are among the most appealing strategies. Nanotechnology is the synthesis of materials in nanometer dimensions. A group of these structures, called nanoparticles, has at least one dimension less than 100 nanometers.

Due to the low toxicity of nanoparticles in the ecosystem, their use to fight pathogenic microorganisms makes it as a good choice. The use of Graphene Oxide (GO) and reduced Graphene Oxide nanosheets (rGO) became as a central point of scientific interest due to its unique properties such as carbon bilayer thickness, lightness, strength, flexibility, hydrophobicity, high thermal conductivity, possibility of

controlling all of these properties through chemical functionalization and biocompatibility and make it feasible to apply in electronic devices and drug delivery. These properties have led to a promising approach to the design of advanced drug delivery systems and the introduction of a new range of graphene-based therapies. Recent research at the Chinese Academy of Sciences has shown that graphene can be used to make antibacterial and antifungal paper. The researchers found that graphene derivatives, such as rGO and graphene oxide, inhibited microbial and fungal growth. This finding is important because previous studies have shown that graphene, and especially graphene oxide, is biocompatible, so that biological cells can grow well on graphene substrates, while other nanoparticles, such as silver. Known as antibacterial agents, they often have cytotoxic effects.

Therefore, in this study, the effect of rGO and GO nanosheets on the formation of *Candida albicans* biofilm was investigated.

Methodology

Culture: A standard lyophilized *Candida albicans* strain (PTCC 5207) purchased from the Organization of Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), the organism was sub-cultured on Potato Dextrose Agar (PDA) medium and incubated at 25 °C.

Preparation of Reduced Graphene Oxide and Graphene Oxide Nano-sheets: Synthesis of nano-sheets out natural graphite of was performed by Hammer method. Briefly, first a mixture of two grams of graphite, one gram of sodium nitrate (NaNO₃), added to 100 mL of concentrated sulfuric acid (95-97%) into a balloon and then transferred to an ice bath and stirred for 30 minutes. Then eight grams of potassium permanganate powder (KMnO₄) was gradually added to the balloon. At this stage, the reaction temperature was less than 10 °C. The reaction vessel was transferred to a water bath at 35 °C and stirred for three hours. About 200 ml of double distilled water was added to the reaction and the temperature was kept constant at 98 °C for one hour. The formation of burnt brown color was a sign of the successful completion of the manufacturing process. In the next step, 400 ml of

double distilled water added to the system. In order to terminate the oxidation and elimination KMnO_4 and also to remove the remaining organic compounds, 30 ml of 30% H_2O_2 solution was added. The precipitate was carefully separated by centrifuge (12000 rpm) and washed with hydrochloric acid (5 wt%). This precipitate was the GO nano-sheets that were washed twice with distilled water. Washing continued until the pH of the effluent was equal to the pH of the water used for washing. After precipitation of GO nano-sheets. A portion of GO was dissolved in absolute ethanol using ultrasonic and converted to rGO using hydrazine method. The precipitates obtained in both stages were dissolved in water by ultrasonic device and used immediately. To ensure the structure of the nanosheets, the resulting sample was examined by Raman spectroscopy. To investigate the surface morphology and structure of GO and rGO nanosheets SEM electron microscopy have been used.

Biofilm formation assessment: Biofilm formation was measured by colorimetric micro-titer method. Briefly, concentrations of 0, 20, 40, 60, 80, and 100 ppm of Reduced Graphene Oxide and Graphene oxide nanosheets added to wells containing *C. albicans* suspension equivalent to 0.5 McFarland medium in three replicates. The microplate was placed in an incubator at 25 °C for 24 hours. After incubation period the contents of the wells were first emptied and washed three times with 300 μL of physiological saline. After drying the microplate at room temperature, 300 μL of methanol was added into the wells to fix biofilms (for 30 minutes). Then the wells were emptied and dried at room temperature. 150 μL of 0.1% crystal violet was added and rinsed under running water after five minutes. Finally, 150 microliters of 33% acetic acid was poured into each well and the absorption of each well was read by Elisa reader at 360 nm.

Calculation of biofilm formation: Biofilm formation was calculated according to the following formula in which ODC (Optical Density Control) is equivalent to the average light absorption of control wells and ODT (Optical Density Treatment) is equal to the average light absorption of treatment wells.

$$\text{ODT} \leq \text{ODC} = \text{no biofilm formation}$$

$$\text{ODC} < \text{ODT} \leq (2 \times \text{ODC}) = \text{weak biofilm formation}$$

$$(2 \times \text{ODC}) < \text{ODT} \leq (4 \times \text{ODC}) = \text{Medium biofilm formation}$$

$$(4 \times \text{ODC}) < \text{ODT} = \text{strong biofilm formation}$$

Biofilm formation kinetics: kinetics of biofilm formation, were carried out exactly the same as previously described and the biofilm amount were read after 48 and 72 hours.

Evaluation of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum Fungicidal concentration (MFC): To evaluate MIC and MFC the culture and the treatments, were performed as described above. After one day of incubation, the first turbid well was considered as MIC. Subsequently, 20 μL of each well of MIC was cultured on PDA medium and incubated for 24 hours at 25 °C. The lowest concentration of nanosheets which produced no measurable growth on the plate, were considered as MFCs.

Statistical analysis: Statistical analysis of the data obtained from the experiments was performed with SPSS Version 18.0 statistic software package ($p < 0.01$). To analyze the data, three-way analysis of variance between the subjects and Tukey post hoc test were used to compare the binary mean with respect to the proposed factors.

Result

The shift in phonon-Stokes energy due to laser excitation produced two distinct peaks in the Raman spectrum of graphene nanosheets (Figure 1). Meantime, the band intensity at 1350 cm^{-1} area (band D) was higher than 1585 cm^{-1} area (band G) indicating the successful oxidation of the graphite structure. The G-peak indicates the vibration mode inter the main sheet, while the presence of the D band indicates the existence of a structural defect in graphene nanosheets, which may be due to the method used in the preparation of Graphene Oxide. Based on the SEM micrograph, synthesized graphene nanosheets had smooth and wavy surfaces (Figure 1). The vertices of these sheets had fractures that is of the features of graphene prepared by chemical methods, especially through Hammer method. In general, the findings of the Raman spectrum analysis was similar to those reported by other studies.

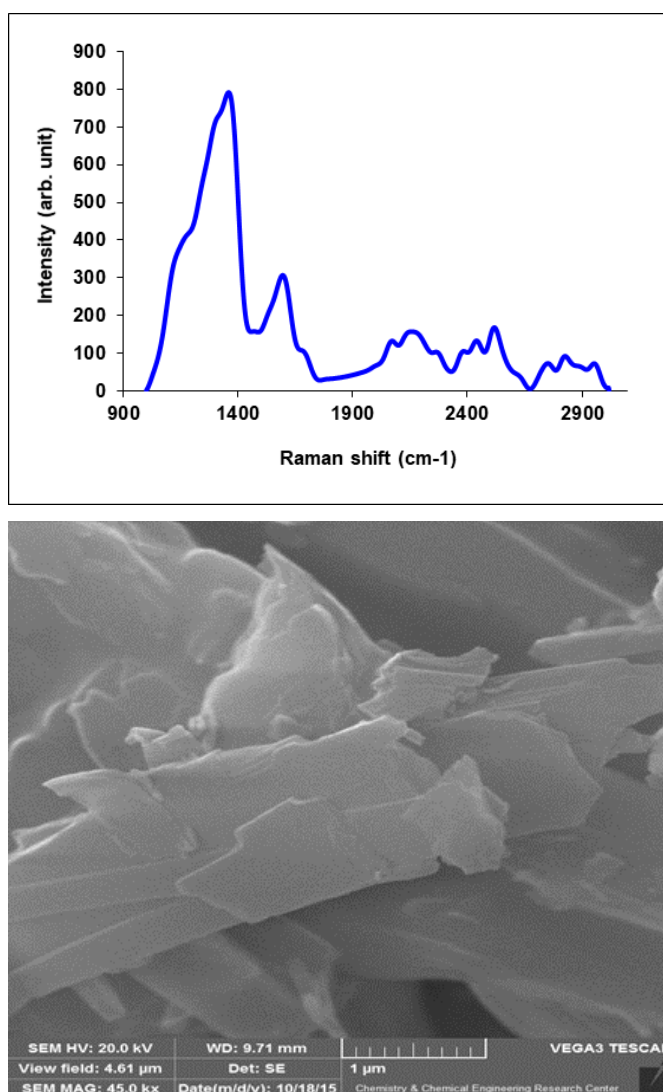


Figure 1. Raman spectrum of graphene nanosheets (left) and GO SEM image (right)

The variable of nanosheets type had a significant effect on OD of *C. albicans* biofilm ($p < 0.01$), so that graphene-oxide nanosheets had lower average turbidity (OD) compared to rGO nanosheets. This indicates its greater inhibitory effect on fungal biofilm formation.

As it was expected the effect of concentration on OD of *C. albicans* biofilm was significant as well ($P < 0.01$). As though, there was a direct relationship between the concentration of nanosheets and the percentage of removal of fungal biofilm, so that with increasing the concentration of nanosheets, the growth of fungi also decreased. The highest turbidity was observed in negative control and the lowest turbidity was observed in 100 ppm concentration (Figure 2).

The effect of time on OD of *C. albicans* biofilm was significant ($p < 0.01$) (Figure 2). Based on this, the best time for the effect of nanosheets on inhibitory fungus determined as 48 hours.

The effect of mutual interaction of nanosheets and time; concentration and time, and nanosheets and concentration on OD of *C. albicans* biofilm was significant as well ($P < 0.01$) (Figure 2). The highest inhibitory effect of GO nanosheets on biofilm formation observed after 48 hours, while the rGO nanosheets had the greatest effect in 24 hours. On the other hand, nanosheets at a concentration of 100 ppm after 24 hours showed better inhibitory effect on *C. albicans* biofilm.

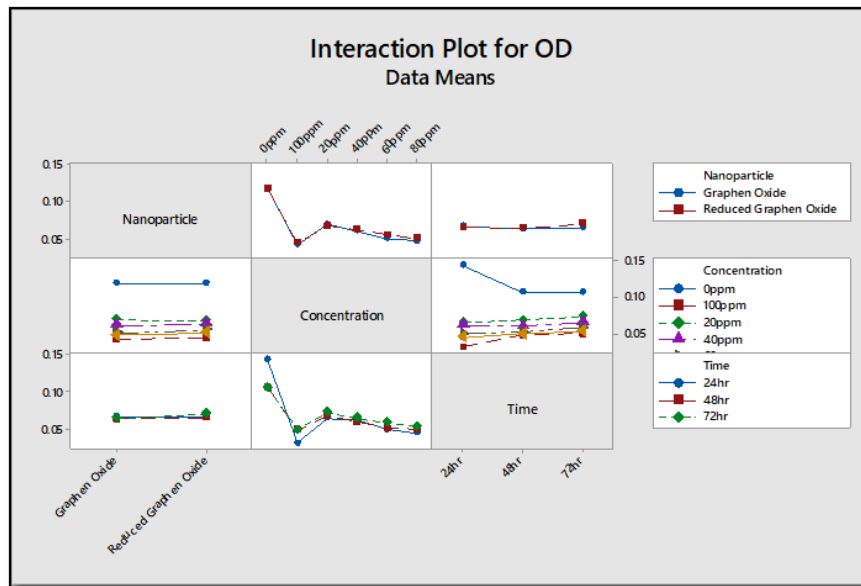


Figure 2. Interaction plot of the effects of concentration, nanoparticles and time factors on biofilm formation

Discussion

The biochemical application of graphene-based materials has increased rapidly in the last few years. This is due to the unique properties of planar two-dimensional structure, large chemical surface area, high mechanical and chemical stability, low cytotoxicity and good biocompatibility. Sawangphruk et al., reported successful antifungal efficacy of rGO against *A. niger*, *A. oryzae*, and *F. oxysporum*. The findings of previous studies proved that the two-dimensional plates of GO and rGO nanosheets effectively stop the growth of bacteria and fungi. So the result of this study was in parallel with this finding. Guilio et al by AFM images confirmed that GO could entrap *C. albicans* with a thin layer of GO selectively without being toxic to the cells. Moreover, another reported main antifungal activity of GO is reported due to its sharp edges that can cause plasma membrane damages, local perturbation of cell membrane, reduced cell membrane potential, and electrolytes leakage. Here the presence of the D band as an indicator of structural defect in graphene nanosheets may confirm this suggestion.

Indeed, the strong capacity of GO is because of containing more reactive groups which solubilize in various polymeric environments by specific interactions grants its wide and carbon-rich but hydrophilic surface features. The nature of the *C. albicans* cell wall (4% chitin (NAG) and 80 to 90% glucans and mannans) leads to

hydrogen bond interactions between carbonyl and hydroxyl groups abundant in polysaccharides and GO and π - π interactions between the DNA and RNA that finally interrupts its aggregation and adhesion on the surfaces which is the start point of biofilm formation. On the other hand, the anti-biofilm effect is due to synergic effects of the reduction of microbial growth and inhibition of the adhesion. This effect was approved by the enumeration of viable and cultivable cells (MIC and MFC) compared to untreated samples.

Studies indicate that the antifungal effect depends on the type of nanosheets so that in the present study graphene-oxide nanosheets had lower OD compared to rGO nanosheets. This finding approves previous reports about the greater inhibitory effect of GO due to the proper dispersion which forms thin sheets that easily traps microorganisms, while rGO aggregation leads to reduced antimicrobial activity. Another reason is because of surface modulation and surface properties differences.

It has also been shown that there is a direct relationship between the concentration and the percentage of fungal inhibition, which is in the line with other studies. In this work, we have evaluated the effect of GO and rGO nanosheets on the anti-biofilm effect over time, and tardive effects on biofilm formation (after 24, 48, and 72 hrs), which were consistent with the results of the other researchers.

Conclusions

The rapid increase in infections oriented from biofilms change to be one of the most potential threats to healthcare systems which put overloads cost to overcome its consequences. To conquer this challenges, nanoscience as a non-traditional strategy have been explored extensively. Based on literatures Graphene-based nanoparticles show astonishing result to combat biofilms formation. Beside, being a renewable, ecofriendly, cheap, easier procedure to synthase, and other positive criteria compared to other nanomaterials appealed us to perform this project. The results of this study showed that all three variables of nanosheet types, concentration and time have a significant effect on inhibiting biofilm of *Candida albicans* ($p < 0.01$), but the concentration variable showed a greater

effect than other variables. The use of GO and rGO Nanosheets sounds to be a good candidate of a novel family of fungicidal compounds, though it needs more knowledge about exact mechanism of inhibition and their side effects on organism and ecosystems.

Acknowledgment

The authors would like to thank all those who helped us in this research, especially Dr. Asghar Seif and Mr. Abbas Farmani.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

اثر ضدقارچی نانوصفحات گرافن اکساید و گرافن اکساید احیاشده بر تشکیل بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس

شیما فیروزی راد^۱، رضا حبیبی پور^{۲*}، لیلا مرادی حقگو^۳

۱. کارشناس ارشد میکروبی شناسی، گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران
۲. استادیار گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران
۳. مربی گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۰۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: قارچ *Candida albicans* متداول ترین عامل بیماری زایی قارچی از نظر کلونیزاسیون و تشکیل بیوفیلم است. با توجه به این که گونه های کاندیدایی تولیدکننده بیوفیلم، حساسیت کمتری نسبت به داروهای ضدقارچی نشان می دهند؛ درمان باید از طریق سایر فاکتورهای ضدقارچ با اثر زیاد و سمیت سلولی کم صورت گیرد. در این راستا، پژوهش حاضر، تشکیل بیوفیلم *C. albicans* در حضور نانوصفحات دی اکسید گرافن و اکسید گرافن کاهش یافته را بررسی کرده است.

مواد و روش ها: ساخت نانوصفحات با استفاده از گرافیت طبیعی، به روش هامر انجام شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون اثر نانوصفحات غلظت های ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ ppm بر تشکیل بیوفیلم *C. albicans* از طریق روش ELISA بررسی شد و نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS ver.18 ($P < 0.01$) تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: نانوصفحات گرافن اکسید در مقایسه با گرافن اکساید احیا شده در مهار بیوفیلم *C. albicans* مؤثرتر بود ($P < 0.01$). مؤثرترین غلظت در تشکیل بیوفیلم 100 ppm و بهترین زمان ماند برای گرافن اکسید و گرافن اکسید احیا شده به ترتیب ۴۸ و ۲۴ ساعت بود ($P < 0.01$).

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده می توان نانوصفحات گرافن اکساید و گرافن اکساید احیاشده را برای بررسی های بیش تر به منظور مهار *C. albicans* پیشنهاد کرد.

* نویسنده مسئول: رضا

حبیبی پور

نشانی: همدان، شهرک شهید مدنی، بلوار امام خمینی (ره)، بلوار پروفیسور موسیوند، مجتمع دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، کدپستی: ۶۵۱۸۱۸۸۹۸۵
تلفن: ۰۸۱-۳۴۴۸۱۳۰۸
رایانامه:

Habiby.reza@gmail.com
Habibipour@iauh.ac

شناسه ORCID: 0000-0002-1632-2624

شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0002-3441-1719

کلیدواژه ها:

کاندیدا آلبیکنس، بیوفیلم، گرافن اکساید، گرافن اکساید احیاشده، کاندیدیازیس

مقدمه

کلونیزه شوند که این امر معضلات اساسی در درمان ایجاد می کند. بیوفیلم، نوعی کلونیزه شدن جامعه میکروبی است که به طور غیرقابل بازگشت به یک سطح زنده یا غیرزنده متصل می شود و از ماتریس مواد اولیه پلی ساکراید و میکروارگانیزم ها تشکیل شده است. در دهه های اخیر، تعداد بیماران مستعد ابتلا به میکروارگانیزم های فرصت طلب مانند سویه های کاندیدا، به ویژه در بیماران با سیستم ایمنی ضعیف، در بسیاری از کشورها به طور

طبق گزارش های منتشر شده مؤسسه ملی بهداشت، تقریباً ۸۰ درصد از عفونت های بیمارستانی ناشی از بیوفیلم است که نشان دهنده نقش مهم آن در ایجاد بیماری های عفونی است (۱-۳). میکروارگانیزم های مختلفی که توانایی تشکیل بیوفیلم روی سطوح را دارند می توانند روی دستگاه های پزشکی تجمع یابند و

Copyright © 2021 Sabzevar University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution- Non Commercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Published by Sabzevar University of Medical Sciences.

است؛ بنابراین سلول‌های بیولوژیکی می‌توانند بر بسترهای گرافن به‌خوبی رشد کنند، در حالی که سایر نانوذرات مانند نقره که به‌عنوان عوامل ضدباکتری شناخته می‌شوند، اغلب دارای اثرات سیتوتوکسیک هستند (۱۴)؛ بنابراین، در این مطالعه، تأثیر نانوذرات rGO و GO در تشکیل بیوفیلم *Candida albicans* بررسی شد.

۲. مواد و روش‌ها

این پژوهش مربوط به پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد به شماره ۵۹۳۳۰۵۰۷۹۴۲۰۰۹ دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان می‌باشد.

کشت سویه قارچی مورد آزمون: در این مطالعه تجربی، از نمونه استاندارد کاندیدا آلبیکنس تهیه شده از سازمان تحقیقات میکروبی و صنعتی ایران به‌صورت لیوفیلیزه با کد PTCC:۵۰۲۷ استفاده شد. این سویه استاندارد ابتدا بر روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) ۱ کشت داده شد. به‌منظور انجام آزمایش‌ها از نمونه قارچی حاصل از سوسپانسیون با کدورتی معادل نیم‌مک‌فارلند تهیه و استفاده گردید.

روش ساخت نانوصفحات گرافن اکساید و گرافن اکساید

احیا شده: ساخت نانوصفحات با غلظت ۱۰۰۰ ppm با استفاده از گرافیت طبیعی، به روش هامر انجام شد. برای تهیه نانوصفحات، ابتدا مخلوطی از دو گرم گرافیت، یک گرم نیترات سدیم (NaNO_3) و صد میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ را درون بالن ریخته و پس از انتقال آن به یک حمام یخ به مدت زمان ۳۰ دقیقه هم زده شد. در طول این مدت، دمای سیستم در یک درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد. سپس مقدار هشت گرم پودر پرمنگنات پتاسیم (KMnO_4) به آرامی درون بالن موردنظر اضافه شد. در این مرحله، دمای ظرف واکنش کم‌تر از ۱۰ درجه سانتی‌گراد کنترل شد. ظرف واکنش به حمام آب با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شد و به مدت سه ساعت هم زده شد. حدود ۲۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر به ظرف واکنش افزوده شد و دمای آن به مدت یک ساعت تحت ۹۸ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد. تشکیل رنگ قهوه‌ای سوخته نشان از انجام موفقیت‌آمیز فرایند ساخت بود. در مرحله بعد ۴۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر به سیستم افزوده شد و به‌منظور احیای پرمنگنات پتاسیم و همچنین حذف ترکیبات آلی باقی‌مانده در ظرف واکنش، ۳۰ میلی‌لیتر محلول آب‌اکسیژنه ۳۰ درصد به آن اضافه شد. در این مرحله، تغییر رنگ از قهوه‌ای تیره به رنگ زرد روشن مشاهده شد. رسوب به‌دست‌آمده بین دوره‌های ۸۰۰۰ تا

قابل توجهی افزایش یافته است (۵-۴) که باعث بیماری‌های پوستی، مخاطی و سیستمیک می‌شود (۶). عفونت‌های *Candida spp* شایع‌ترین پاتوژن قارچ فرصت‌طلب است که توانایی ایجاد بیوفیلم‌های سطحی روی مواد بیوتیک و غیرزنده را داد. این پاتوژن نه تنها عفونت‌های قارچی را تثبیت می‌کند بلکه می‌تولند با تسهیل چسبندگی سایر میکروارگانیسم‌ها به بیماری‌های قارچی دیگری نیز منجر شود. در حال حاضر، بیوفیلم‌ها به دلیل مقاومت در برابر ایمنی، آنتی‌بیوتیک، سموم دفع آفات و مقاومت در برابر اشعه، توجه زیادی به‌دست می‌آورند (۲). کلندیدا آلبیکنس، چهارمین عامل مهم عفونت‌های مزمن قارچی است که قادر به ایجاد بیماری‌های جلدی، جلدی-مخاطی و سیستمیک در افراد با نقص سیستم ایمنی می‌باشد که در نواحی مختلف جغرافیایی یافت می‌شود. حدود ۶۱ درصد از گزارش‌های عفونت‌های قارچی بیمارستانی مربوط به کاندیدا آلبیکنس و دیگر سویه‌های کاندیدا می‌باشد (۷). شناسایی و معرفی عواملی که می‌توانند از تشکیل بیوفیلم‌ها جلوگیری کنند یا از رشد جلوگیری کنند به‌عنوان یکی از راهکارهای علمی برای مقابله با مسائل آن در نظر گرفته شده است (۸). راه‌حل‌های مبتنی بر نانوذرات برای پیشگیری و درمان بیوفیلم، از جذاب‌ترین استراتژی‌ها هستند. فناوری نانوسنتز مواد در ابعاد نانومتر است. گروهی از این ساختارها، نانوذرات نامیده می‌شوند حداقل دارای یک بعد کمتر از ۱۰۰ نانومتر هستند (۹).

با توجه به سمیت کم ذرات نانو در اکوسیستم، استفاده از آنها برای مقابله با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا آن را به‌عنوان گزینه مناسبی ایجاد می‌کند (۱۱-۱۰). استفاده از اکسید گرافن (GO) و نانورق‌های اکسید گرافن (rGO) به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد آن از جمله ضخامت لایه‌لایه کربن، سبک بودن، مقاومت، انعطاف‌پذیری، آگریزی، هدایت حرارتی بالا، امکان کنترل به‌عنوان یک نقطه مرکزی مورد علاقه علمی قرار گرفت. همه این خواص از طریق عملکرد شیمیایی و سازگاری زیستی و استفاده از آن در دستگاه‌های الکترونیکی و تحویل دارو را عملی می‌کند (۱۲). این خصوصیات منجر به رویکرد امیدوارکننده‌ای در زمینه طراحی سیستم‌های پیشرفته دارورسانی و معرفی طیف جدیدی از درمان‌های مبتنی بر گرافن شده است (۱۳). تحقیقات اخیر در آکادمی علوم چین نشان داده است که می‌توان از گرافن برای تهیه کاغذ ضدباکتری و ضدقارچ استفاده کرد. محققان دریافتند مشتقات گرافن مانند rGO و اکسید گرافن رشد میکروبی و قارچی را مهار می‌کنند. این یافته به این دلیل مهم است که مطالعات قبلی نشان داده‌اند که گرافن و به‌خصوص اکسید گرافن، سازگار بیولوژیکی

میکرولیتتر متانول به درون چاهک‌ها ریخته شد. پس از ۳۰ دقیقه چاهک‌ها خالی و در دمای اتاق خشک گردید. پس از خشک شدن چاهک‌ها، ۱۵۰ میکرولیتتر رنگ کریستال‌ویوله ۰/۱ درصد اضافه و بعد از پنج دقیقه با آب روان شستشو شد. در نهایت، درون هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتتر اسیداستیک ۳۳ درصد ریخته و میزان جذب هر چاهک در طول موج ۳۶۰ نانومتر توسط دستگاه الایزایدر قرائت شد (۳، ۱۳).

محاسبه میزان تشکیل بیوفیلم: وضعیت تشکیل بیوفیلم در چاهک‌ها نیز طبق فرمول زیر محاسبه گردید که در آن ODC² معادل میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل و ODT³ معادل میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار می‌باشد (۳).

عدم تشکیل بیوفیلم = ODC ≤ ODT

قدرت تشکیل بیوفیلم ضعیف = ODC < ODT ≤ (2 × ODC)

قدرت تشکیل بیوفیلم متوسط = (2 × ODC) < ODT ≤ (4 × ODC)

قدرت تشکیل بیوفیلم قوی = ODT < (4 × ODC)

بررسی کینتیک تشکیل بیوفیلم: به منظور بررسی کینتیک تشکیل بیوفیلم تیمارهای مرحله قبل، تحت شرایط کاملاً مشابه مجدداً تکرار گردید و در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت به روش توضیح داده شده فوق، قرائت گردیدند. بدین ترتیب، تأثیر هر یک از تیمارها بر روند تشکیل بیوفیلم در این سه بازه زمانی که نشان‌دهنده کینتیک رشد می‌باشد بررسی شد (۱۳).

بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت

کشدگی (MFC): به منظور مطالعه حداقل غلظت مهارکنندگی تیمارها کشت‌ها به صورت روش توضیح داده شده فوق، صورت پذیرفت. پس از یک روز گرم‌خانه‌گذاری، اولین چاهک فاقد کدورت به عنوان MIC در نظر گرفته شد. متعاقباً از هر چاهکی که به عنوان MIC مطرح بود ۲۰ میکرولیتتر روی محیط کشت PDA به صورت خطی کشت داده شد. پس از گرم‌خانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد پلیت‌های فاقد رشد به عنوان MFC در نظر گرفته شد (۳).

آنالیزهای آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده حاصل از قرائت دستگاه با نرم‌افزار SPSS ۱۸ (p < 0.01) انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از تحلیل واریانس سه‌طرفه بین آزمودنی و از آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه دوه‌دوی میانگین میزان کدورت به تفکیک عوامل طرح‌شده استفاده شد.

۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه دستگاه سانتریفوژ به دقت جدا شد و با استفاده از اسیدکلریدریک (پنج درصد وزنی) شستشو شد. این رسوب، همان نانوصفحات گرافن اکساید بود که با آب دوبار تقطیر شستشو شد. شستشو تا جایی ادامه پیدا کرد که pH آب خروجی از آن با pH آب مورد استفاده برای شستشو برابر گردید. پس از رسوب‌گیری نانوصفحات گرافن اکساید بخشی از آن با استفاده از دستگاه اولتراسونیک در اتانول مطلق حل شد و با استفاده از روش هیدرازین به گرافن‌اکساید احیا شده تبدیل شد. رسوب‌های به دست آمده در هر دو مرحله قبل و بعد از احیا توسط هیدرازین توسط دستگاه اولتراسونیک در آب حل شد و بلافاصله مورد استفاده قرار گرفتند (۱۵-۱۶). به منظور حصول اطمینان از ساختار نانوصفحات، نمونه حاصل شده توسط طیف‌سنجی رامان بررسی قرار گردید. همچنین به منظور بررسی مورفولوژی سطح و ساختار نانوصفحات گرافن‌اکساید و گرافن‌اکساید احیا شده از میکروگراف میکروسکوپ الکترونی نگاره SEM استفاده شد.

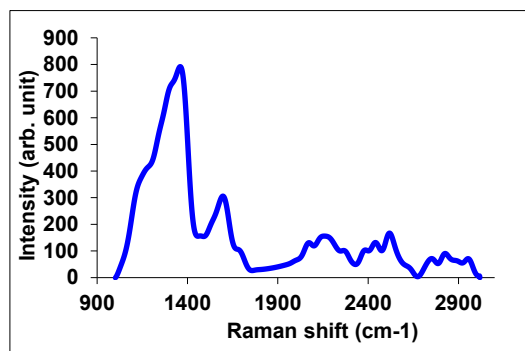
اندازه‌گیری میزان تشکیل بیوفیلم: به منظور اندازه‌گیری میزان بیوفیلم از روش میکروتیتراپلیت و محیط آبگوشت کشت سیب‌زمینی دکستروز (PDB) ۱ استفاده شد. به طور خلاصه ابتدا غلظت‌های ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ ppm نانوصفحات گرافن اکساید و گرافن اکساید احیا شده با استفاده از محاسبات نسبتی رقیق‌سازی با آب مقطر تهیه گردید. به منظور بررسی تأثیر این نانوصفحات بر قارچ کاندیدا آلبیکس از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. چاهک حاوی ۳۰۰ میکرولیتتر محیط کشت و فاقد نانوصفحات (غلظت صفر) به عنوان شاهد، چاهک حاوی ۱۸۰ میکرولیتتر محیط کشت و ۱۲۰ میکرولیتتر آب به عنوان کنترل منفی و چاهک حاوی ۱۸۰ میکرولیتتر محیط کشت و ۱۰۰ میکرولیتتر آب و ۲۰ میکرولیتتر سوسپانسیون مخمری نیز به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. چاهک‌های حاوی ۱۸۰ میکرولیتتر محیط کشت، ۱۰۰ میکرولیتتر از غلظت‌های مختلف نانوصفحات و ۲۰ میکرولیتتر سوسپانسیون مخمری معادل محیط نیم‌مک‌فارلند نیز به عنوان تیمارها در نظر گرفته شدند. تمامی موارد فوق هر یک در سه تکرار انجام شد و میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

تشکیل بیوفیلم در چاهک‌های میکروپلیت از طریق روش رنگ‌سنجی با کریستال‌ویوله بررسی شد. به طور خلاصه ابتدا محتویات چاهک‌ها خالی و با سه مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتتر سرم فیزیولوژی شستشو شدند. پس از خشک شدن میکروپلیت در دمای اتاق، به منظور تثبیت بیوفیلم‌های تشکیل شده ۳۰۰

۳. یافته‌ها

ناحیه 1585 cm^{-1} (باند G) بود. پیک G نشان‌دهنده حالت ارتعاشی درون صفحه‌ای اصلی می‌باشد. وجود باند D نشان از وجود نقص ساختاری در نانوصفحات گرافنی می‌باشد که می‌تواند به دلیل استفاده از روش مورد استفاده در تهیه گرافن باشد.

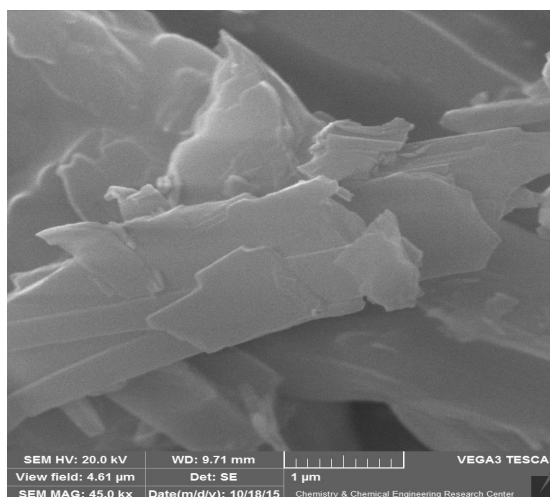
تغییر انرژی فونون استوکس ناشی از تحریک لیزر دو پیک اصلی در طیف رامان نانوصفحات گرافنی ایجاد کرد (نمودار ۱). در این بین، شدت باندی ناحیه 1350 cm^{-1} (باند D)، بیشتر از شدت باند



نمودار ۱. طیف رامان نانوصفحات گرافن

از ویژگی‌های گرافن تهیه شده به روش‌های شیمیایی، به‌ویژه روش هامر می‌باشد.

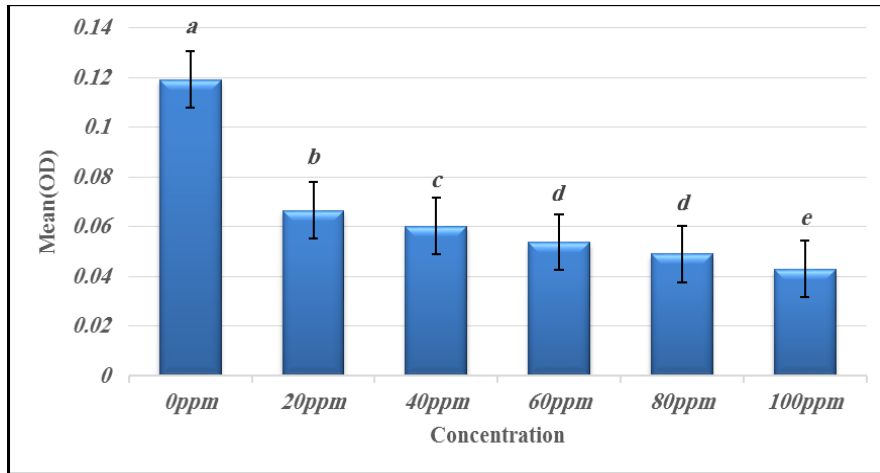
براساس میکروگراف SEM، نانوصفحات گرافنی سنتز شده در این تحقیق، سطوحی صاف و موج‌دار داشتند (شکل ۱). رؤس این صفحات دارای شکستگی‌هایی بود که این نوع ساختار سطحی



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره مربوط به گرافن اکسید ساخته شده

سطح خطای یک درصد ($P < 0.01$) معنادار گردید. یعنی بین غلظت نانوصفحات و درصد حذف بیوفیلیم قارچی ارتباط مستقیم وجود داشت؛ به طوری که با افزایش غلظت نانوصفحات، رشد قارچ نیز کاهش داشت. بیشترین کدورت در کنترل منفی و کمترین کدورت در غلظت 100 ppm دیده شد (نمودار ۲).

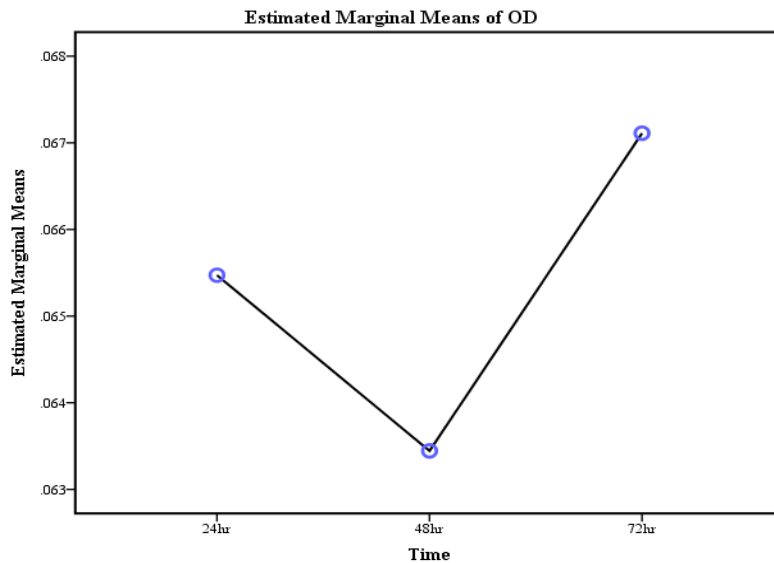
متغیر نوع نانوصفحه بر میزان کدورت قارچ کاندیدا آلبیکنس، تأثیر معناداری ($p < 0.01$) داشت؛ به طوری که نانوصفحه گرافن-اکساید در مقایسه با نانوصفحه گرافن-اکساید احیا شده، متوسط میزان کدورت (OD) کم‌تری داشت. این امر بیانگر اثر مهمی بیشتر آن بر مهار قارچ بود. تأثیر غلظت بر میزان کدورت در قارچ کاندیدا آلبیکنس، در



نمودار ۲. مقایسه دوبه‌دوی سطوح شش‌گانه عامل غلظت نانوذره با استفاده از آزمون توکی

تعیین گردید؛ زیرا در این زمان نانوصفحات دارای متوسط میزان کدورت (OD) کمتری نسبت به زمان ماند ۲۴ و ۷۲ ساعت بود.

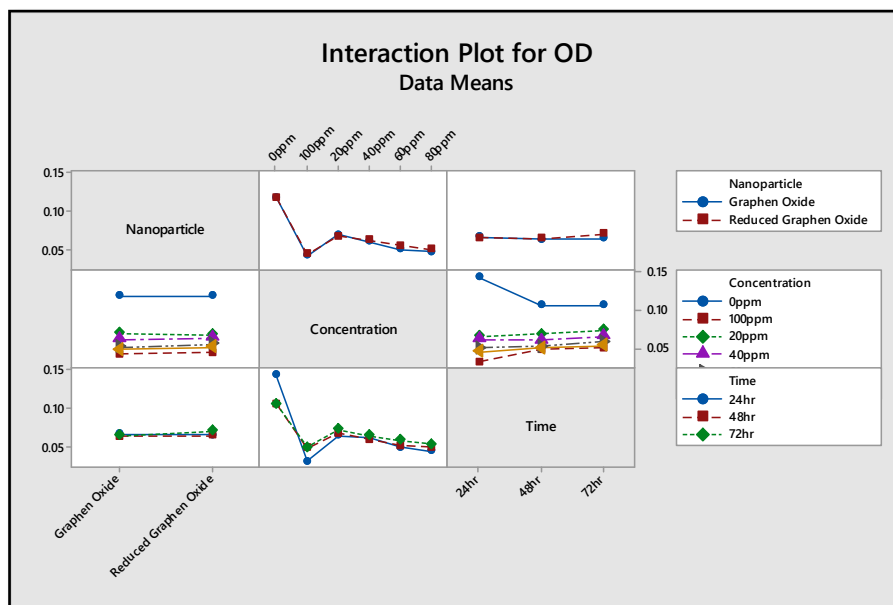
تأثیر زمان ماند بر میزان کدورت در قارچ کاندیدا آلبیکنس در سطح خطای یک درصد ($p < 0.01$) معنادار شد (نمودار ۳). بر این اساس، بهترین زمان تأثیر نانوصفحات بر مهار قارچ زمان ماند ۴۸



نمودار ۳. متوسط میزان کدورت قارچ کاندیدا آلبیکنس به تفکیک سطوح عامل زمان ماند

اکساید احیا شده در زمان ماند ۲۴ ساعت دارای بیشترین تأثیر بود. از طرفی نانوصفحات در غلظت ۱۰۰ ppm با زمان ماند ۲۴ ساعت با کمترین میزان کدورت نشان از اثر مهاری بر قارچ کاندیدا آلبیکنس داشت.

اثر تقابلی نانو ذره با زمان ماند، اثر تقابلی غلظت با زمان ماند و اثر تقابلی نانوذره با غلظت بر میزان جذب کدورت در قارچ کاندیدا آلبیکنس، در سطح خطای یک درصد ($P < 0.01$) معنادار شد (نمودار ۴). بیشترین تأثیر نانوصفحه گرافن اکساید در مهار قارچ در زمان ماند ۴۸ ساعت مشاهده شد، در حالی که نانوصفحه گرافن-



نمودار ۴. بررسی اثرهای تقابلی عوامل میزان غلظت، نانوذره و زمان ماند بر میزان کدورت

۴. بحث و نتیجه‌گیری

کاربرد بیوشیمیایی مواد مبتنی بر گرافن در چند سال گذشته به سرعت افزایش یافته است. این امر به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد ساختار دو بعدی مسطح، سطح وسیع شیمیایی، پایداری مکانیکی و شیمیایی بالا، سمیت سلولی کم و زیست سازگاری خوب آنها است. ساوانپروک و همکاران، اثر ضدقارچی موفق rGO را در برابر *A. niger*، *A. oryzae* و *F. oxysporum* گزارش کردند. یافته‌های مطالعات پیشین ثابت کرد که صفحات دو بعدی نانو ورق‌های GO و rGO به‌طور مؤثری رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها را متوقف می‌کنند؛ بنابراین نتیجه این مطالعه به‌موازات این یافته بود (۱۸، ۱۷، ۱۲، ۲). گولیو و همکارانش توسط تصاویر AFM تأیید کردند که GO می‌تولند *C. albicans* را با یک لایه نازک از GO به‌طور انتخابی بدون اینکه برای سلول‌ها سمی باشد، به دام بیندازد. علاوه بر این، در گزارش دیگری فعالیت اصلی ضدقارچی GO به دلیل لبه‌های تیز آن است که می‌تواند باعث آسیب به غشای پلازما، برهم‌زدن یکپارچگی موضعی غشای سلول، کاهش پتانسیل غشای سلول و نشت الکترولیت‌ها شود. در این تحقیق وجود بلند D به‌عنوان شاخص نقص ساختاری در صفحات نانوغرافن ممکن است این نظریه را تأیید کند (۱۹). در حقیقت، ظرفیت قوی GO به دلیل وجود سطح گسترده، آبدوستی و گروه‌های واکنشی بیشتر است که منجر به حلالیت بهتر

آن در محیط‌های مختلف پلیمری شود. همچنین ماهیت دیواره سلولی *C. albicans* که متشکل از ۴ درصد کیتین (NAG) و ۸۰ تا ۹۰ درصد گلوکان و مانان است که منجر به فعل و انفعالات پیوند هیدروژن بین گروه‌های کربونیل و هیدروکسیل موجود در پلی‌ساکاریدها و فعل و انفعالات GO و π - π بین DNA و RNA می‌شود که در نهایت، تجمع و چسبندگی آن بر سطوح را که نقطه شروع تشکیل بیوفیلم است، مختل می‌کند. از طرف دیگر، تأثیر ضدبیوفیلم به دلیل تأثیرات هم‌افزایی در کاهش رشد میکروبی و مهار چسبندگی است. این اثر با شمارش سلول‌های زنده و قابل کشت MIC و MFC در مقایسه با نمونه‌های تیمار نشده تأیید شد (۱۹).

همچنین تحقیقی با عنوان ورقه ضدباکتری بر پایه گرافن به‌طور خلاصه مشخص کرد که نانومواد مبتنی بر گرافن موادی با خاصیت ضدباکتری و ضدقارچی بالا و سمیت سلولی پایین هستند (۲۰). یافته‌های این مطالعه حاکی از آن است که اثر ضدقارچی، به نوع نانوصفحات وابسته است که این نتیجه با یافته‌های حاصل از پژوهش بسیاری از محققان، مطابقت دارد (۱۸-۱۶)؛ به‌طوری که در مطالعه حاضر نانوغرافن‌های اکسید گرافن دارای OD کمتری در مقایسه با صفحات نانو rGO بودند. این یافته گزارش‌های قبلی در مورد اثر بازدارندگی بیشتر GO را به دلیل پراکندگی مناسب که صفحات نازکی را تشکیل می‌دهد که به راحتی میکروارگانیسم‌ها را به دام می‌اندازد، تأیید می‌کند در حالی که تجمع rGO منجر به کاهش فعالیت ضد میکروبی می‌شود. دلیل دیگر به‌واسطه تعدیل سطح و

مقایسه با سایر نانومواد ما را به انجام این پروژه ترغیب کرد. نتایج این مطالعه نشان داد که هر سه متغیر انواع ورق نانو، غلظت و زمان، تأثیر مهمی در مهار بیوفیلم *Candida albicans* دارند. اما در این بین، متغیر غلظت، تأثیر بیشتری نسبت به سایر متغیرها نشان داد. به نظر می‌رسد استفاده از ورق‌های نانو GO و rGO گزینه مناسبی برای خانواده جدید از ترکیبات قارچ‌کش باشد، اگرچه نیاز به دانش بیشتری در مورد مکانیسم دقیق مهار و عوارض جانبی آنها بر ارگانسیم‌ها و اکوسیستم‌ها دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه کسانی که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند به‌خصوص آقایان دکتر اصغر سیف و عباس فرمانی تشکر و قدردانی می‌کنیم.

References

- [1]. Mohammed H, Kumar A, Bekyarova E, Al-Hadeethi Y, Zhang X, Chen M, Ansari MS, Cochis A, Rimondini L. Antimicrobial mechanisms and effectiveness of graphene and graphene-functionalized biomaterials. A scope review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020; 8:465.
- [2]. Fallatah H, Elhaneid M, Ali-Boucetta H, Overton TW, El Kadri H, Gkatzionis K. Antibacterial effect of graphene oxide (GO) nano-particles against *Pseudomonas putida* biofilm of variable age. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019; 26(24):25057-70.
- [3]. Golipour, F., Habibipour, R., Moradi Haghgou, L. The Study of Effect of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION or Fe₃O₄ Nanoparticles) on *Candida albicans* Biofilm Formation. *Medical laboratory Journal*, 2019, 13(6). Available: <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=814220>.
- [4]. Mohammad MR, Hussien AM, Ghanim RR. Synthesis of Graphene Oxide Using Simplified Hummer's Method for Antibacterial Application. *InIOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 2019; 518(6):. 062012IOP Publishing.
- [5]. Rajeevan S, Thomas M, Appalaraju B. Characterization and antifungal susceptibility pattern of *Candida* species isolated from various clinical samples at a tertiary care Centre in South India. *Indian J Microbiol Res*. 2016; 3(1):53-7.
- [6]. Joshi AS, Singh P, Mijakovic I. Interactions of gold and silver nanoparticles with bacterial biofilms: Molecular interactions behind inhibition and resistance. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(20):7658.
- [7]. Ramasamy M, Nanda SS, Lee JH, Lee J. Construction of alizarin conjugated graphene oxide composites for inhibition of *Candida albicans* biofilms. *Biomolecules*. 2020; 10(4):565.
- [8]. Palmieri V, Bugli F, Cacaci M, Perini G, Maio FD, Delogu G, Torelli R, Conti C, Sanguinetti M, Spirito MD, Zanoni R. Graphene oxide coatings prevent *Candida albicans* biofilm formation with a controlled release of curcumin-loaded nanocomposites. *Nanomedicine*. 2018; 13(22):2867-79.
- [9]. Guo Z, Xie C, Zhang P, Zhang J, Wang G, He X, Ma Y, Zhao B, Zhang Z. Toxicity and transformation of graphene oxide and reduced graphene oxide in bacteria biofilm. *Science of the total environment*. 2017; 580:1300-8.
- [10]. Xie C, Lu X, Han L, Xu J, Wang Z, Jiang L, Wang K, Zhang H, Ren F, Tang Y. Biomimetic mineralized hierarchical graphene oxide/chitosan scaffolds with adorability for immobilization of nanoparticles for biomedical applications. *ACS applied materials & interfaces*. 2016; 8(3):1707-17.
- [11]. Kumar P, Huo P, Zhang R, Liu B. Antibacterial properties of graphene-based nanomaterials. *Nanomaterials*. 2019; 9(5):737.
- [12]. Alimardani V, Abolmaali SS, Borandeh S. Antifungal and antibacterial properties of graphene-based nanomaterials: a mini-review. *Journal of Nanostructures*. 2019; 9(3):402-13.
- [13]. Habibipour R, Moradi-Haghgou L, Farmany A. Green synthesis of AgNPs@ PPE and its *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation activity compared to pomegranate peel extract. *International journal of nanomedicine*. 2019; 14:6891.
- [14]. Tashan H, Khosravi-Darani K, Yazdian F, Omid M, Sheikhpour M, Farahani M, Omri A. Antibacterial properties of graphene based nanomaterials: an emphasis on molecular mechanisms, surface engineering and size of sheets. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. 2019; 16(2):159-72.
- [15]. Mohammad MR, Hussien AM, Ghanim RR. Synthesis of Graphene Oxide Using Simplified Hummer's Method for Antibacterial Application. *InIOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 2019; 518(6): 062019. IOP Publishing.
- [16]. Zaaba NI, Foo KL, Hashim U, Tan SJ, Liu WW, Voon CH. Synthesis of graphene oxide using modified hummers method: solvent influence. *Procedia engineering*. 2017; 184:469-77.
- [17]. Olivares E, Badel-Berchoux S, Provot C, Jaulhac B, Prévost G, Bernardi T, Jehl F. The BioFilm Ring Test: a rapid method for routine analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation kinetics. *Journal of clinical microbiology*. 2016; 54(3):657-61.
- [18]. Papageorgiou DG, Kinloch IA, Young RJ. Mechanical properties of graphene and graphene-based nanocomposites. *Progress in Materials Science*. 2017; 90:75-127.
- [19]. Di Giulio M, Zappacosta R, Di Lodovico S, Di Campli E, Siani G, Fontana A, Cellini L. Antimicrobial and antibiofilm efficacy of graphene oxide against chronic wound microorganisms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018; 62(7): e00547-18.