

臺北醫學大學口腔醫學院生醫材料暨工程研究所

碩士論文

Institute of Biomedical Materials & Engineering

College of Oral Medicine

Taipei Medical University

Master Thesis

赤蘚紅對細菌及酵母菌之光動力效應探討

Investigation of Erythrosine-mediated Photodynamic

Inactivation Against Bacteria and Yeast



研究生：曾鈺涵 撰

(Yu-Hang Tseng)

指導教授：蔡翠敏 博士

Advisor: Tsuimin Tsai, Ph.D.

中華民國九十九年六月

June, 2010

謝誌

歷經兩年的研究生活，本論文終於得以順利完成，而這一切將感謝所有曾經幫助過我的師長、同學、家人及朋友。首先要感謝恩師蔡翠敏博士的細心指導與鼓勵。在整個研究過程中，恩師總在百忙之中抽空指導，從研究方向的擬定至最後手稿的逐字修正，都給予莫大的幫助；除此之外，恩師更是我生活中的明燈，不時以身教來教導我做人處事的道理，同時也在日常生活中不吝給予關心和照顧。在此特向老師獻上我最深的謝意。論文口試期間，有幸得到陳進庭老師與蘇慶華老師等二位口試委員的指導，老師們以其豐富的學養，給予我適切的批評與鼓勵，指出初稿中一些重要的問題與疏失，使本論文較為完善與周延，心中亦充滿無限感念。當然也要感謝碩一時指導過我的柯恩生及王正怡老師，使我對微生物實驗的技術更加純熟、對研究的邏輯思考也有進步。

此篇論文得以順利完成，除了感念師恩外，也要感謝實驗室的夥伴們，在研究的過程中給予相當大的協助。感謝育才學長，您對研究的熱情、精準的態度是我們這些學弟妹的最佳典範，很開心在這兩年的歲月裡，可以見證和分享您成立一個家庭及為人父的喜悅，祝福您在未來的研究路途上，蓬勃發展、一路順遂。感謝北醫實驗室的學姊們(慈珊、敬慧、啟棟、珮玲學姐)，你們對實驗的努力亦是值得我學習的地方，帶我熟悉北醫的環境，更把我當妹妹般照顧，真是感激不盡，祝福你們在未來都能擁有自己的一片天空。感謝北醫的學妹們(玗頻、惠仙)，總是細心及貼心的為我準備東西，辛苦你們了！謝謝同屆的夥伴們(柏渝、柏均、博涵、佩馨)，你們對研究的認真及不懈，也是我該學習之處，你們的陪伴，讓實驗室熱鬧許多。感謝台大的學長姐(弘泰學長、澤嫻、珮琪、怡珍、育紋、雅怡學姐)，你們於實驗觀念上的教授及指導，使我銘記在心。感謝台大的學弟妹(明璇、世軒、正揚)，在繁重課務中，依然耐心幫忙完成實驗室各項雜務。也要感謝我的家人(爸、媽、哥、姐)，一路支持與關懷，讓我無後顧之憂，得以安心地完成學業。最後要感謝安家，從大學一路陪伴至今，適時給予支持與鼓勵，也耐心包容我的任性，祝福你在未來的學術生涯，能更上一層樓。

在此向所有指導過我、關心過我的師長、家人、同學、朋友們獻上最誠摯的謝意！！

曾 鈺 涵 謹識
台北醫學大學生工所
中華民國九十九年六月

中文摘要

光動力療法乃是結合光感物質及適當波長之光源，經由電子或能量轉移產生能進行無特異性目標攻擊之活性氧類 (reactive oxygen species)，以破壞腫瘤及病原體。為尋求解決日漸嚴重的抗藥性問題，使得光動力殺菌逐漸成為替代性治療微生物的方式。赤蘚紅 (Erythrosine)，為臨床牙科使用的牙菌斑顯示劑，具有低毒性、易結合至菌體之特性，並且已有文獻指出赤蘚紅對於革蘭氏陽性菌之 (*Streptococcus mutans*) 具有良好之光動力殺菌能力。在本實驗中，藉由赤蘚紅對轉糖鏈球菌具有光動力殺菌效果，探討作用於其他種革蘭氏陽性菌、革蘭氏陰性菌及酵母菌類之光動力殺菌的能力。實驗中針對革蘭氏陽性菌(金黃葡萄球菌、轉糖鏈球菌)、革蘭氏陰性菌(綠膿桿菌、大腸桿菌)及酵母菌(白色念珠菌)代表性菌株進行懸浮菌體及生物膜之光動力殺菌探討。實驗結果顯示當赤蘚紅濃度為 20 mM 以下，在不照光的情況，對於革蘭氏陽性菌、革蘭氏陰性菌及酵母菌的菌數影響不大，顯示赤蘚紅本身對菌體並不會造成傷害。當懸浮菌體在照光強度為 50 J/cm^2 下，使用赤蘚紅的濃度為 0.05 mM 時，可將革蘭氏陽性菌全部撲殺；而對於白色念珠菌則需將赤蘚紅的濃度提高至 4 mM，才可達到消滅全部菌體；革蘭氏陰性菌之效果則不顯著，但將赤蘚紅溶於0.1%醋酸之後再使用，則可促進對革蘭氏陰性菌的光動力殺菌效果。當菌體以生物膜形式存在時，研究發現白色念珠菌生物膜對光動力處理的耐受性較強，即使使用濃度為 20 mM 的赤蘚紅、再提高光照劑量至 100 J/cm^2 ，仍無明顯殺菌效果；金黃葡萄球菌及轉糖鏈球菌生物膜對光動力處理則較具感受性，以光照劑量為 50 J/cm^2 的條件下，使用濃度為 0.05 mM 的赤蘚紅即可將生物膜中的菌體全殺。此研究顯示赤蘚紅對革蘭氏陽性菌懸浮菌體及生物膜有良好之光動力殺菌效果，在未來的應用上極具潛力。

關鍵字：光動力療法、赤蘚紅、革蘭氏陽性菌、革蘭氏陰性菌、酵母菌

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) combines the photosensitizers (PSs) and visible light to produce a phototoxic response that results in oxidative damages to a variety of targets. In recent years, the growing resistance to antibiotics among pathogenic bacteria rendered antimicrobial photodynamic inactivation (PDI) as an alternative anti-infection treatment modality. Erythrosine, a clinical plaque disclosing agent, has been reported to have PDI efficacy against *Streptococcus mutans*. In this study, we investigated the effect of PDI on the viability of gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*), gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*) and yeast (*Candida albicans*) planktonic cells and biofilms using erythrosine as the photosensitizer.

The results in this study show that 20 mM of erythrosine has no dark toxicity to the gram-positive, gram-negative and yeast. For planktonic cells treated with PDI, using 0.05 mM of erythrosine and irradiation light dose of 50 J/cm², no viable cells gram-positive were detected. When concentration of erythrosine was raised to 4 mM, no viable cells of *Candida albicans* were detected. However, the gram-negative bacteria were not significantly effective to the treatment. When erythrosine was in 0.1% acetic acid, PDI against gram-negative bacteria was improved. *Candida albicans* biofilm shows high tolerance to PDI treatment and was not significantly effective to the treatment, even when 20 mM of erythrosine was used in combination with 100 J/cm² of light dose. Gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*) biofilms were sensitive to PDI treatment; increase the concentration of erythrosine to 0.05 mM and the light dose to 50 J/cm² could result in complete eradication of the bacteria. This study showed that erythrosine was a potential photosensitizer for PDI against gram-positive bacteria.

Keyword: Photodynamic inactivation, Erythrosine, Gram-positive, Gram-negative, Yeast.



目 錄

頁次

謝誌.....	i
中文摘要.....	ii
Abstract.....	iii
圖表目錄.....	vii
第一章、緒論.....	1
1-1 微生物的感染防治.....	1
1-1.1 常見的微生物感染.....	2
1-1.2 造成感染的細菌簡介以及所引起的疾病.....	3
1-1.3 抗生素治療.....	6
1-1.4 微生物的抗藥性機制.....	7
1-2 生物膜.....	8
1-2.1 生物膜的定義.....	8
1-2.2 生物膜的形成.....	8
1-2.3 生物膜的抗藥性機制.....	9
1-3 光動力作用.....	11
1-3.1 光動力作用之歷史及應用.....	11
1-3.2 作用原理與機制.....	12
1-4 赤蘚紅介紹.....	14
1-4.1 赤蘚紅的結構與特性.....	14
1-4.2 赤蘚紅的應用.....	14
1-4.3 赤蘚紅於光動力殺菌應用上之優勢.....	15
第二章、實驗動機與目的.....	16

第三章、材料與方法	17
3-1 菌種來源與保存	17
3-2 材料	18
3-3 儀器	19
3-4 實驗方法	20
3-4.1 懸浮菌體培養	20
3-4.2 赤蘚紅對懸浮菌體之光動力抑制	21
3-4.3 生物膜培養	21
3-4.4 赤蘚紅對生物膜之光動力抑制	22
3-4.5 赤蘚紅母液之配製	22
3-5 統計分析	22
第四章、結果與討論	23
4-1 光感物質與光動力實驗	23
4-1.1 赤蘚紅於磷酸緩衝液中之穩定性	23
4-1.2 赤蘚紅與菌體作用分析	23
4-2 赤蘚紅對懸浮菌體之光動力殺菌作用	24
4-2.1 革蘭氏陽性菌	24
4-2.2 革蘭氏陰性菌	26
4-2.3 酵母菌	29
4-3 赤蘚紅對生物膜之之光動力殺菌效果	30
4-3.1 生物膜之培養與定量	30
4-3.2 赤蘚紅光動力作用對生物膜之殺菌效果	31
第五章、結論	34
第六章、未來研究方針	35
第七章、附圖表	36
第八章、參考文獻	53

圖表目錄

圖目錄

圖一、赤蘚紅(Erythrosine)的結構.....	37
圖二、生物膜反應器及裝置.....	37
圖三、綠色發光二極體矩陣.....	38
圖四、赤蘚紅(10 μ M)在 PBS 溶液中之紫外光-可見光光譜.....	38
圖五、白色念珠菌與赤蘚紅(20 μ M)作用 10 及 30 分鐘，以螢光顯微鏡觀察之影像.....	39
圖六、白色念珠菌生物膜與赤蘚紅(20 mM)作用 10 分鐘，以雷射共軛焦顯微鏡觀察之影像.....	40
圖七、白色念珠菌與赤蘚紅(20 μ M)作用 10 及 30 分鐘後，以螢光光譜定量赤蘚紅吸附結果.....	41
圖八、赤蘚紅(0.01~1 mM)對金黃葡萄球菌懸浮細胞進行光動力作用之結果....	41
圖九、赤蘚紅(0.01~0.1 mM)對金黃葡萄球菌懸浮細胞進行光動力作用之結果.	42
圖十、赤蘚紅(0~1 mM)對轉糖鏈球菌懸浮細胞進行光動力作用之結果.....	42
圖十一、赤蘚紅(0~1 mM)對轉糖鏈球菌懸浮細胞進行光動力作用之結果.....	43
圖十二、赤蘚紅(0~20 mM)對綠膿桿菌懸浮細胞進行光動力作用之結果.....	43
圖十三、赤蘚紅(0~20 mM)對大腸桿菌懸浮細胞進行光動力作用之結果.....	44
圖十四、革蘭氏陽性菌(A)及革蘭氏陰性菌(B)細胞壁結構圖.....	45
圖十五、綠膿桿菌懸浮細胞在不同濃度的醋酸溶液(0~0.8%)環境下的影響.....	46
圖十六、大腸桿菌懸浮細胞在不同濃度的醋酸溶液(0~0.8%)環境下的影響.....	46
圖十七、綠膿桿菌懸浮細胞在不同濃度的醋酸溶液(0~0.8%)環境下，與赤蘚紅作用之暗毒性反應.....	47
圖十八、大腸桿菌懸浮細胞在不同濃度的醋酸溶液(0~0.8%)環境下，與赤蘚紅作用之暗毒性反應.....	47

圖十九、綠膿桿菌懸浮細胞在不同濃度的醋酸溶液(0~0.2%)環境下與不同赤蘚紅 濃度(0~10 mM)之光動力殺菌測試.....	48
圖二十、大腸桿菌懸浮細胞在不同濃度的醋酸溶液(0~0.2%)環境下與不同赤蘚紅 濃度(0~10 mM)之光動力殺菌測試.....	48
圖二十一、赤蘚紅(0~20 mM)對白色念珠菌懸浮細胞進行光動力作用之結果...	49
圖二十二、赤蘚紅(1~5 mM)對白色念珠菌懸浮細胞進行光動力作用之結果.....	49
圖二十三、金黃葡萄球菌生物膜之生長累積曲線.....	50
圖二十四、轉糖鏈球菌生物膜之生長累積曲線.....	50
圖二十五、白色念珠菌生物膜之生長累積曲線.....	51
圖二十六、赤蘚紅(0~10 mM)對金黃葡萄球菌生物膜進行光動力作用之結果...	51
圖二十七、赤蘚紅(0~10 mM)對轉糖鏈球菌生物膜進行光動力作用之結果.....	52
圖二十八、赤蘚紅(0~20 mM)對白色念珠菌生物膜進行光動力作用之結果.....	52

表目錄

表 一、醋酸濃度其相對應的酸鹼值.....	36
表 二、赤蘚紅對懸浮菌體達到光動力作用撲殺全部菌體的條件.....	36

第一章、緒論

1-1 微生物的感染防治

人類與自然界的各類微生物之間，長久以來存在著密切且亦敵亦友的關係。數千年前人類就會利用細菌發酵原理，製造酒和麵包等食物；在人體上的正常菌叢也扮演著健康平衡的重要角色¹。微生物也曾在人類史上造成了嚴重流行的傳染病，例如約在 1340 年代發生黑死病；1507 年天花等疾病，都曾造成嚴重疫情及死傷。直到 1928 年，英國生物學及藥學家 Alexander Fleming (1881-1995) 偶然發現青黴菌(*Penicillium notatum*) 可以生產一種殺死葡萄球菌(*Staphylococcus* spp.) 的物質—青黴素(Penicillin)，但是當時的純化技術尚未成熟，無法提煉足夠抗菌物質進行相關試驗。於 1930 年代末期，科學家 Howard Walter Florey 與 Emst Boris Chain 使用抗菌物質，其中包括 Penicillin 的粗培養液，注射於受細菌感染的老鼠上，證實 Penicillin 能保護動物體免於細菌感染的威脅²。隨著 1940 年代，Penicillin 及時在二次大戰中大量使用，挽救了數以萬計士兵的生命。而在此之後陸續有許多各類的抗生素相繼問世，有些抗生素是由原先自生物體的製造物再加以改良其化學結構以求增加療效，這些抗生素救了許多得到病菌感染的患者¹，然而隨著這些藥物的大量使用，抗藥性的問題也隨之而來。

由於細菌能藉著突變產生抗藥性，也具有其他的抗藥機制，例如可以透過質體的傳遞，獲得破壞抗生素的酵素或者把抗生素排出細胞外等抗藥機制。因此，撲殺病原菌以防止致病性微生物感染人類及解決抗藥性問題的產生，無疑是臨床醫學治療的一大挑戰也是首要目標。

1-1.1 常見的微生物感染

正常情況下人體各部位存在著一定數量的微生物，它們存在於人體的各個部位，對人體並無妨礙，因此被稱為「正常菌叢」。這些正常菌叢在絕大多數的情況下對人體無害甚至是有益的：(1) 它們可以協助人體抵抗病原菌的侵襲；通常外來的病原菌很難與人體上的正常菌叢競爭生存空間與營養，只有當正常菌叢遭受到破壞時，這些病原菌才有機可乘。(2) 它們可以刺激人體免疫系統的健全發展；這些正常菌叢的表面抗原蛋白可經常持續的刺激我們身體免疫系統處於激發與活化的狀態，因此面對於外來微生物侵襲時能快速產生防衛作用。(3) 此外一些腸道正常菌叢也可以合成大量維他命（如維他命 K 及維他命 B）提供身體吸收與利用，因此對人體的營養與健康有極大助益。

如同其他生態系的微生物，當人體身上某一部位的環境有所變化，其正常菌叢的組成與數量亦會隨之變遷；例如宿主的年齡、性別、健康狀況、食物種類、服用的藥物、甚至刷牙前後、洗手與否等都會影響其身上的正常菌叢。因此當人體的免疫力減弱（如糖尿病患者、白血病患、及愛滋病患等）或是正常菌叢遭受破壞時（如長期服用抗生素或使用殺菌性漱口水等），容易造成體內正常菌叢失衡或伺機性病原入侵，引起致命的感染。

一般而言，容易在人體不同部位形成生物膜感染的病菌，例如金黃葡萄球菌容易引起傷口或醫療器具感染；轉糖鏈球菌主要造成口腔齲齒的病原菌，嚴重時容易引起心內瓣膜炎；綠膿桿菌會引起肺囊泡纖維化肺炎等疾病；大腸桿菌經感染後，容易引發膽管感染；白色念珠菌主要會引起鵝口瘡或念珠菌症等疾病，而這些病菌為容易引起感染性疾病的主要病菌，亦是院內感染常見的病原菌³。在本實驗中，分別對酵母菌、革蘭氏陽性菌及革蘭氏陰性菌作為實驗菌株，酵母菌部份挑選白色念珠菌(*Candida albicans*)、革蘭氏陽性菌挑選金黃葡萄球菌、轉糖鏈球菌(*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus mutans*)及革蘭氏陰性菌則挑選綠膿桿菌、大腸桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*、*Escherichia coli*)為代表性菌株。

1-1.2 造成感染的細菌簡介以及所引起的疾病

白色念珠菌(*Candida albicans*)

白色念珠菌為絕對好氧性，可在相當廣泛pH值和溫度下，生長於普通培養基，產生圓形、具光澤、奶油樣白色菌落，念珠菌酵母型態為圓形或橢圓形，直徑 2~6 μm ，行出芽生殖，不具莢膜⁴。白色念珠菌平時主要分佈於人類的皮膚及口腔、腸胃道、尿道及陰道之黏膜，當在免疫力降低(懷孕、糖尿病、口服避孕藥、長期使用廣效抗生素、免疫抑制劑及類固醇等)或病人有免疫不全症狀時(例如：骨髓及器官移植、癌症化療、愛滋病患者)，則會轉變成具感染性且有致死性⁴。白色念珠菌為酵母樣黴菌，可形成菌絲或假菌絲，能產生芽生分生孢子(blastoconidia)，於適當條件下可以酵母型態或假菌絲型態存在，已有文獻指出白色念珠菌通常以菌絲的型態對生物體形成黏膜或全身性的感染⁵。

自 1940 年代抗生素使用，念珠菌感染的發生率呈急遽增加，近幾年來，院內感染報告顯示念珠菌感染菌血症出現增加之趨勢，且死亡率高達 40-60%⁶。念珠菌菌血症的危險因子包括病人本身的疾病及易罹病因子兩部分。本身疾病部分包括各種原因所造成的免疫功能低下；皮膚或腸道黏膜缺損，如燒傷病人、腹部開刀、嗜中性球低下、身體念珠菌大量增殖等。易罹病因子包括中央靜脈導管置入、全靜脈營養、長期使用廣效性抗生素(造成腸道菌種改變)等⁴。

金黃葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)

金黃色葡萄球菌屬於革蘭氏陽性球菌，營養需求不高，在普通培養基可生存良好，屬需氧或兼性厭氧菌，最適生長於37°C及pH 7.4的環境，生長於平板上的菌落型態具有光澤、圓形凸起，直徑大小為1~2 mm。金黃色葡萄球菌不具運動性，不產生孢子，普遍存在於環境及人體中，在一般的健康情況下並不會造成任何問題，當人體免疫系統下降時，則容易從呼吸道、傷口、靜脈導管及尿道等部位進行感染，嚴重者會導致感染至全身性的疾病，如肺炎、菌血症、心內膜炎、骨髓炎³等，此外也可造成食物中毒。臨床上葡萄球菌為最主要菌屬，是一種常見的病原菌，為醫院院內感染的重要病原菌之一。

轉糖鏈球菌(*Streptococcus mutans*)

轉糖鏈球菌屬於革蘭氏陽性球菌，適合兼性厭氧環境，在生理特性方面，轉糖鏈球菌並不具備完整的克氏循環(Krebs cycle)酵素與電子傳遞鏈系統⁷，因此必須藉著代謝糖類的糖解作用(Embden-Meyerhof pathway)來作能量來源。此外，轉糖鏈球菌還具有特殊的糖類磷酸根傳遞運輸系統(phosphotransferase system, PTS)，其可幫助攝取多種糖類進入細胞中進行代謝⁸，而產生乳酸及甲酸、乙酸、甲醇..等揮發性物質，當環境中的糖類減少時，PTS的活性反而增加，以提升轉糖鏈球菌在惡劣環境中與其他細菌競爭養分的能力，而增加其生存適應的能力。主要分佈於口腔，為造成齲齒的主要病原菌之一。一旦當轉糖鏈球菌進入血流中形成菌血症時，便有機會導致心臟瓣膜缺損的病人產生感染性心內膜炎，由此可知轉糖鏈球菌在齲齒和感染性心內膜炎方面扮演一個重要的角色⁹。

綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)

綠膿桿菌為革蘭氏陰性桿菌 (Gram-negative bacilli)，具端鞭毛 (polar flagella)，廣泛存在於環境中，亦可在養分不足的情況下（包含蒸餾水中）生長。綠膿桿菌能導致如肺部或泌尿道之感染、慢性中耳炎(chronic otitis media)、角膜膿瘍(corneal ulcer)、心內膜炎及菌血症，對免疫功能不全之病人容易造成伺機性感染(opportunistic infection)，例如囊腫纖維症(cystic fibrosis)¹⁰。

在治療上最為棘手的在於它的多重抗藥性機制，例如（1）產生酵素使治療藥物失去活性；（2）改變藥物結合位置(target site)的結構；（3）在膜上具有efflux pump 能將抗生素送出菌體外等機制。根據文獻指出綠膿桿菌細胞壁外具有一層通透性較低的外膜(outer membrane)是產生抗藥性的主因¹¹，這層外膜能篩選特定分子量以及親水性的物質進入菌體內，因此對大部份抗生素具有抗性，例如頭孢子素、碳醯胺基類抗生素(carbapenems)、胺基苷糖類抗生素(aminoglycosides)、多黏黴素(polymyxin)等皆具有抗性¹²，加上它能產生生物膜而有效阻擋免疫細胞及抗生素之攻擊^{13,14}，故臨床上便不斷尋求更有效的殺菌方法。

大腸桿菌(*Escherichia coli*)

大腸桿菌為革蘭氏陰性桿菌，短桿狀，是人體腸道內的伺機性正常菌叢，其最適生長溫度為 37°C，在腸道中通常不會致病，但如果侵入血液或其他器官組織，則會有致病性；也可能經由帶有致病基因的大腸桿菌藉由質體轉移，而使原本不引發疾病的大腸桿菌變得有致病性¹⁵。

1-1.3 抗生素治療

抗生素是指由細菌、黴菌或其他微生物在生活過程中所產生的具有抗病原體或其他活性的物質。自 1940 年青黴素被發現與應用至今，其他種藥物也陸續被發展出，例如鏈黴素(streptomycin)、四環素(tetracycline)、氯黴素(chloramphenicol)，目前應用於臨床的抗生素種類已有幾百種¹⁶。目前抗生素依功能上的不同可分為下列幾類¹⁷：

(1) 破壞細胞壁：

Polymyxin B與Colistin (Polymyxin E)藉由嵌入細胞膜形成通道，導致outer membrane結構受損，增加細胞膜的通透性，導致細胞內的重要物質自菌體流失^{18, 19}。

(2) 抑制細菌細胞壁合成：

細菌細胞質的濃度常大於細胞生存環境中溶液的濃度，由於滲透壓差使得細胞外的水分不斷擴散進入細胞。細胞壁的存在則可防止細胞因不斷膨脹而使得細胞膜破裂導致細菌死亡。細菌細胞壁的主要組成為形成網狀結構的聚糖(peptidoglycan)，而肽聚糖合成過程中需Penicillin binding proteins (PBPs)進行參與， β -lactam 類抗生素(例如：Imipenem與pencillin G)因與肽聚糖前驅物結構類似所以會和PBPs結合，影響PBPs參與肽聚糖合成。因此抑制PBPs會造成細胞壁結構不規則、受損或通透性改變，嚴重會導致細胞死亡。然而有些細菌會產生 β -lactamase破壞此類抗生素的 β -lactam ring產生對抗生素的抗藥性²⁰。

(3) 抑制蛋白質合成：

Gentamicin屬於aminoglycoside類抗生素，藉由進入細胞與30S ribosomal subunit結合，抑制t-RNA 的translation和造成mRNA的misreading，使細胞無法合成長生所需的蛋白質²¹。

(4) 抑制核酸合成：

Ciprofloxacin依結構分類屬於fluoroquinolones，此抗生素與DNA gyrase結合，抑制細菌chromosomal DNA的unwinding、阻斷DNA replication²²。

1-1.4 微生物的抗藥性機制

抗藥性菌株是指微生物通過抗生素的壓力而存活下來後，演化具抗藥性的突變種。一旦抗生素所造成的選擇壓力變大（如因抗生素的濫用），這些抗藥性菌株便能比其他菌株繁殖得更好，成為優勢族群。但產生抗藥性突變並不容易，故造成抗藥性菌株大量出現的主因是水平基因轉移(horizontal gene transfer)，意即不具抗藥性的細菌可自其他細菌獲得與抗藥能力有關的基因（不一定是經由突變而得）¹⁷。隨著抗藥性菌株的優勢增殖，抗藥基因傳播的機會也因此上升了，然而細菌抵抗抗生素的作用機制有下列數種方式^{17, 23}：

- (1) **改變抗生素之標的物**：細菌發生突變，使目標蛋白質產生單一氨基酸的改變，使抗生素無法與其結合而發揮作用。
- (2) **利用酵素改變抗生素的化學結構**：使進入細胞內抗生素失去活性，典型例子便是細菌具備 β -內醯胺酶(β -lactamase)這種酵素，可破壞 β -內醯胺(β -lactam)型抗生素（如盤尼西林）的環狀結構使其失去活性。
- (3) **主動外流方式排出抗生素**：為了防止抗生素累積在菌體內，細菌也會利用主動外流幫浦(active efflux pump)的作用將抗生素自菌體內排除。

1-2 生物膜

1-2.1 生物膜的定義

於自然環境中，微生物隨機附著於固體介質表面，藉由攝取流體中提供生長的養分，得以進行繁衍及分泌胞外聚合物(extracellular polymer substrate；EPS)，最後形成一層肉眼可見且具有黏性之非均質葦狀結構，即生物膜。

1-2.2 生物膜的形成²⁴

生物膜的形成過程大致可分五個階段：

- (1) **微生物與固體介質表面接觸(attachment)**：不論是在外界自然環境或感染寄主過程，菌體要黏附到生物性(biotic)或非生物性(abiotic)的表面時，首先都得克服表面的水流剪力(shear force)，讓菌體接近物體表面。
- (2) **吸附(adsorption)**：當微生物與介質表面接觸時，菌體可藉由鞭毛(flagella)、纖毛(fimbriae)或線毛(pili)等微細構造，暫時性的吸附到介質表面；同時微生物所分泌的胞外聚合物亦可幫助菌體固定在介質表面。
- (3) **形成微菌落(micro-colonization)**：當微生物吸附於適合生長之位置時，便利用流體中的養份進行繁衍、分泌胞外聚合物，加強菌體間的黏附能力，形成生物膜的初期結構。
- (4) **生物膜形成**：微菌落形成後，內部細菌開始增生，同時會分泌許多胞外聚合物，胞外聚合物不僅幫助細胞聚集還可提供物理上屏障，減低剪力作用對生物膜的傷害。細菌本體與胞外聚合物彼此堆疊，分化出許多中空的孔洞(pore)或水道(water channel)，提供養份或是代謝廢物的流動。由於此時生物膜開始增厚，每個區域所接觸到的養份、氧氣、溫度、酸鹼度及滲透壓皆會不同，所以各個區塊的細菌生長代謝速率就會有差異，造成了生物膜非均質化(heterogeneous)的特徵。

(5) **菌體脫附(detachment)**：胞外聚合物雖然提供微生物保護屏障，卻也阻礙養份及氧氣的攝取，造成生物膜內部環境不適合微生物生長。因此，微生物會分泌某些酵素將胞外聚合物分解，使部分微生物脫離生物膜，以懸浮細胞型態找尋更適合生長之環境。

1-2.3 生物膜的抗藥性機制

生物膜有較高的抗藥性，相較於懸浮狀態時高出500至1,000倍²⁵，雖然導致生物膜高抗藥性的原因尚未被研究透徹，目前認為與抗生素的穿透、生物膜內的形態及細胞的代謝作用有關²⁶。

(1) 物理性的障礙 (physical barrier)

生物膜的胞外聚合物提供一層物理屏障，會降低抗生素的穿透力，而帶負電的胞外聚合物也會吸附帶正電的抑菌劑（例如：Aminoglycoside），減少抑菌劑與細胞的直接作用²⁷。胞外聚合物也保護細胞逃過宿主免疫系統的攻擊³，並避免紫外光對菌體的傷害²⁸。

(2) 生理性的適應 (physiological adaptation)

生物膜形成後，其內部會形成養分梯度(nutrient gradient)；底層的細菌因養分缺乏，長期處於飢餓狀態，因此可能藉由調節基因表現及代謝作用來適應環境的改變，而這一演化特性似乎也影響了菌體對藥物感受性。目前研究顯示大部分的抗生素對活化的細胞較具影響力，而不活化的細胞則有較高的耐受性，因此可以躲過抗生素的攻擊^{29,30}。此外，氧氣及pH的變化亦會改變抗生素對菌體的作用^{31,32}，而滲透壓的改變會啟動細胞的滲透壓逆境反應(osmotic stress response)，降低細胞膜通透性，使抗生素更不容易穿透³³。

(3) 細胞間的聯繫 (cell-to-cell communication)

當細菌細胞密度到達某一程度時，細胞與細胞間會傳遞化學訊息而同時調節某些特定基因的表現，以改變生理活性；此種現象稱為定額感應(quorum sensing)。1970年Hasting等人發現當海螢光弧菌*Vibrio fischeri*的細胞密度到達某一閾值以上時，會出現集體發光的現象。定額感應不只出現在同種細菌間，在不同種的細菌間也會有細胞間的訊息傳遞，因此學者認為這種細胞間的聯繫會影響生物膜的抗藥性，雖然機制尚待研究，但目前認為與某些特定機制的啟動有關³⁴，如提高過氧化氫酶的活性等³⁶。



1-3 光動力作用

1-3.1 光動力作用之歷史及應用

早在一千多年前，埃及、印度及中國地區的人民即利用陽光來治療許多病症，譬如皮膚病、牛皮癬、白斑病或是癌症；而在十九世紀，丹麥醫師Niels Finsen以紅光阻止牛痘化膿，進一步使用紫外光治療結核病，開始發展光療法(phototherapy)，並以此獲得1903年諾貝爾獎³⁷。1898年，德國醫學院學生Oscar Raab進行研究啞紅(acridine red)對造成瘧疾的原生動物(草履蟲)的毒性時，意外發現光線的照射會增加啞紅對草履蟲的毒性，接著在1903年Raab的老師Von Tappeiner和與皮膚科醫師Jesionek延續Oscar Raab的實驗，他們將伊紅性染料(eosin dye)結合日光照射後對患有皮膚癌和狼瘡(lupus)的病人進行治療，並開始研究氧氣在此光動力作用中的角色，於1907年將此現象定名為光動力作用(photodynamic action)³⁷。在過去數十年間，光動力治療(photodynamic therapy；PDT)在腫瘤及癌症治療上已大有進展。光動力治療結合光感物質(photosensitizer)與特定波長激發光，利用光感物質對腫瘤的選擇性及光纖(fibre optics)直接引入腫瘤中，達到對腫瘤細胞的雙重選擇性³⁸。有別於傳統化學治療法(chemotherapy)的全身性治療，這種雙重選擇的特性不但減少對正常細胞的傷害，也使治療的成本大幅降低。在微生物防治方面，已應用於血液消毒^{39,40}、口腔感染^{41,42}、青春痘治療⁴³及手術前局部消毒^{38,39}等，而近年來大為流行的光觸媒(photocatalyst)，亦是利用此一概念殺滅環境中的病毒及其他微生物^{44,45}。

1-3.2 作用原理與機制

光動力治療的基本要素為光感物質、特定波長的光和氧氣⁴⁶。當原本處於基態的光感物質，經過照射特定波長的可見光後，光感物質藉由接收光子 (photons)，形成存在週期 (life-time: 1~100 ns) 極短的激發單態 (excited singlet state)；也可能於激發後，形成具兩個不成對電子軌域的激發三態 (excited triplet state)，可存在較長時間 (life-time \geq 500 ns)。激發三態產生的光化學反應機制主要可分為兩種路徑⁴⁷：

1. Type I reaction

形成激發三態的光感物質會與基質 (substrate) (如細胞膜、粒線體或核膜) 進行電子或氫離子的轉移而氧化目標物質，使其易與環境中的氧分子發生反應，即促使氧形成超氧陰離子，如：superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$)、hydroxyl radical ($OH\cdot$) 等氧化產物。

2. Type II reaction

激發三態的光感物質與周圍環境中氧分子發生碰撞，將能量轉移至氧分子，因而產生單態氧。單態氧極易與其他分子產生作用，在組織細胞中主要對蛋白質、核酸與脂質造成傷害。

光源

應用在光動力反應之光源需考量波長及強度，不同的光感物質需使用特定波長的光來激發，而波長與光感物質吸收光譜中的最大吸收峰有關。根據研究顯示，波長較長的光源，其穿透性也較好⁴⁸，例如以紅光可穿透皮膚組織深度為 0.5 cm (at~ 630 nm) 至 1.5 cm (at~700 nm)⁴⁹。

目前常使用的雷射光源為：氬-染料雷射 (Argon-dye laser)、金屬蒸氣雷射及二極體雷射 (Diode Laser) 等。以往普遍使用的光源為氬-染料雷射，因為此系統可藉由調整濾片而改變波長，因此可應用於不同光感物質的激發；然而體積龐大，且須外接冷卻系統，造成使用上的不便，再者，平日維修雷射裝置通常昂貴且維修經費高，有普及上的困難。近年來，不斷有新光源被開發出來，如發光二極體 (Light emitting diodes; LED)、白熱燈 (Incandescent lamps) 等。與傳統雷射光比較，

發光二極體設備較為輕巧，且不需外接冷卻系統，其性能穩定且具有高光電轉換效率、便宜、體積小、耗電量小、壽命長和低發熱幾項優點⁵⁰，加上單色性良好，可選擇特定波長光源進行激發，相當適合運用於光動力治療。

光感物質

雖然許多化合物均具有光感物質的特性，能被特定波長光源激發，但所選用的光感物質本身必須不具毒性、於光動力作用後能快速從體內清除、對目標細胞具高度親合性，亦即有高光動力產率(photodynamic yield)，能在短時間內於目標細胞周圍累積足夠量，經光源照射後產生大量自由基或單態氧。

適用於光動力治療之光感物質一般是具有芳香環的芳香族分子，由於其能夠維持較長時間的激發三態，故可增加光動力作用之效果。將光感物質以分子結構分類⁵¹⁻⁵³，可分為醌類(quinine)、啉類(acridine)，花青素類(cyanine)、雙氫葉吩類(chlorine)、巨環化合物(macrocyclic compounds)如紫質(porphyrin)及鈦青素(phthalocyanine)等。

氧氣

在光動力作用下，不論是 type I reaction 或 type II reaction，氧氣都扮演相當重要的角色。Type I reaction 是光感物質被激發後藉由電子轉移將電子傳到周圍分子，產生自由基後在與氧分子反應，生成活性氧物質(reactive oxygen species；ROS)，例如：超氧陰離子 (superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$)、過氧化氫(hydrogen peroxide, H_2O_2) 與氫氧自由基(hydroxyl radical, OH^{\cdot})等氧化產物對細胞造成傷害。而 type II reaction 是光感物質激發後，與組織內的基態氧分子進行能量轉移，產生對細胞具有毒性的單態氧(singlet oxygen, 1O_2)。氧氣是光動力作用不可或缺的要素，所以氧氣的多寡會影響光動力治療的效果。當組織中的氧氣被消耗而減少時，光動力治療的效果也會隨之降低。

1-4 赤蘚紅介紹

1-4.1 赤蘚紅的結構與特性

赤蘚紅 (2,4,5,7-tetraiodo-9-ocarboxyphenyl-6-hydroxy-3-isoxanthone or tetraiodofluorescein or iodescen) (結構參見圖一⁵⁴)，分子式為 $C_{20}H_6I_4Na_2O_5$ ，分子量 879.86 g/mol。赤蘚紅主要是利用化學方式進行合成的化合物，早期製備赤蘚紅有數種方式，一種為藉由將螢光素(fluorescein)進行碘化(Iodination)，使之形成具有兩個異構物(tautomeric forms)的結構，於高溫的稀釋過的醋酸溶液環境中加入碘(iodine)進行反應⁵⁵；另一種方式則將螢光素與碘化鈉(sodium iodide)置於相對較低溫的鹼性溶液下，與氨(ammonium)或過硫酸鉀(potassium persulphate)作用，形成赤蘚紅。但這兩種方式在製備過程中，容易形成帶有二碘或三碘結構的螢光素(並非具有四碘的赤蘚紅結構)，且製備成本不符經濟效益，因此後續大多以電化學方式進行製備赤蘚紅，電化學製備赤蘚紅的原理則是將帶有過量碘的螢光素，在鹼性溶液下進行電解⁵⁶。而早在1899年，已有科學家發表了利用電化學法的方式製備赤蘚紅的專利⁵⁷。

赤蘚紅在常溫下為褐色粉末，可溶解於水及酒精中，其水溶液呈現粉紅色，於水溶液狀態下穩定性高，最大吸收波長為525 nm。

1-4.2 赤蘚紅的應用

赤蘚紅於1906年通過美國食品暨藥物法(Food and Drugs Act)後，至今仍廣泛應用於食品中作為食品添加劑(食用色素)⁵⁸。赤蘚紅除了具有應用於食品方面的優點，近年來更於牙科方面普及使用，作為牙菌斑顯示劑的原料⁵⁹。牙菌斑是牢固附著於牙齒表面和口腔軟組織，表面帶黏性的膜狀物，以細菌為主體，包括食物殘渣和脫落的口腔組織等類脂物組成的一個小生態系統。牙菌斑生長初期面積較小難以發現，因此藉由牙菌斑顯示劑能有效地顯示出菌斑，便於我們了解口腔狀態，有利於自我評估刷牙效果，採取措施去除菌斑以保護牙齒。已有研究指出

牙菌斑顯示劑的染色原理是吸附作用⁵⁹，利用赤蘚紅與菌斑的結合力遠大於牙齒(磷灰石類)與赤蘚紅的結合力，故無菌斑處的赤蘚紅經漱口便能脫去顏色，而顯色的菌斑只能通過機械摩擦作用(刷牙)才能除去，目前赤蘚紅在臨床上濃度使用範圍為0.72~2% (相當於9~25 mM)⁶⁰。

1-4.3 赤蘚紅於光動力殺菌應用上之優勢

感光物質的選擇需考量到當施行於人體之光動力治療時，對人體的安全性及同時能產生最大抗癌或殺菌效果，並且對正常細胞之傷害低為首要選擇。赤蘚紅長久以來作為食品添加劑於食品中，且為臨床牙科常用的牙菌斑顯示劑，顯示在一定濃度下(0.72~2%)對細胞黏膜無刺激性且容易被人體代謝出體外，因此安全性高。此外赤蘚紅亦具有易結合至菌斑之特性，為實行光動力作用的優勢之一。2006年，Simon Wood及Daniel Metcalf的研究團隊指出赤蘚紅對於革蘭氏陽性菌之轉糖鏈球菌生物膜(*Streptococcus mutans* biofilm)具有良好之光動力殺菌能力⁶⁰⁻⁶²，證明其可吸收光能並進行能量及電子傳遞，具有光動力治療之潛力。以上優點拓展了赤蘚紅的可行性及實用性。

第二章、實驗動機與目的

近年來，由於抗生素的大量使用，已導致細菌產生抗藥性的現象日趨嚴重，為了改善及防止這種情況繼續惡化，開發研究新藥及新療法是絕對必要的。目前光動力作用為近年來新興之微生物防治方法，主要是光動力殺菌作用(Photodynamic inactivation; PDI)過程會產生單態氧類之活性自由基(ROS)，對細菌構造可進行無特異目標(non-specific targets)攻擊⁶³，因此，一般認為細菌不易對PDI產生抗性⁶⁴。在本實驗中，利用牙科臨床上常使用的牙菌斑顯示劑(Erythrosine)作為光感物質，藉由此物質可顯示出菌斑位置的特性、安全性高(可食用)，及文獻指出對於革蘭氏陽性菌之轉糖鏈球菌生物膜(*streptococcus mutans*)具有良好光動力殺菌效果⁶⁰，因此本研究將探討以赤蘚紅進行光動力抑制對其他種細菌的懸浮細胞及生物膜的影響。

實驗目標如下：

- ❖ 進行赤蘚紅定性分析
- ❖ 藉由光動力作用，探討赤蘚紅對革蘭氏陽性菌、陰性菌及真菌的殺菌效果
- ❖ 藉由光動力作用，探討赤蘚紅對革蘭氏陽性菌及真菌生物膜之殺菌效果
- ❖ 探討不同光動力條件對殺菌效果之影響

第三章、材料與方法

3-1 菌種來源與保存

- 菌種來源

菌種名/菌種編號	提供來源
白色念珠菌(<i>Candida albicans</i> MYA ^a -2876)	北醫醫科所蘇慶華教授
金黃葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC ^b 10780)	臺大微生所黃慶燦教授
轉糖鏈球菌(<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175)	北醫生工所楊正昌教授
綠膿桿菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853)	臺大微生所黃慶燦教授
大腸桿菌(<i>Escherichia .coli</i> ATCC 25922)	臺大微生所陳進庭教授

^a 美國菌種保存中心

^b 食品工業發展研究所生物資源保存中心

- 菌種保存方法

取培養至穩定期(Stationary phase)的懸浮菌液，以 PBS 清洗三次並回溶於含 25% (v/v)無菌甘油(Glycerol)的PBS中，分裝入1.5 mL微量離心管中，於-70°C下冷凍保存。實驗操作期間，每個月定期解凍重新活化一次，待凍菌回溶後，以接種環(Loop)沾取菌液在固態培養基上做四區劃線，至於37°C培養至隔夜，再取一個單一菌落接種於液態培養基中於37°C隔夜培養，隔日沾取菌液在固態培養基上做四區劃線，每週自固態培養基重新活化一次，成為每週實驗用之菌種，實驗期間則以適當之洋菜平板培養基保存於4°C下。

菌種 Stock 的固態保存，除了白色念珠菌培養於酵母萃取粉胰葡萄糖瓊脂平板培養基(Yeast Extract Peptone Dextrose broth agar；YPDA，含 1.5% Agar)，其餘菌種(包括金黃葡萄球菌、轉糖鏈球菌、綠膿桿菌及大腸桿菌)皆培養於胰大豆蛋白平板培養基(Tryptic soy broth agar；TSA，含 1.5% Agar)。

3-2 材料

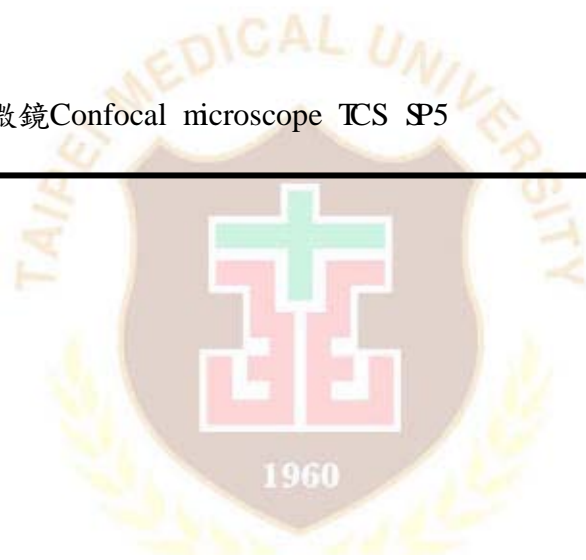
● 實驗材料來源

實驗類別	藥品名稱	來源
光感物質配製	赤蘚紅	Sigma
	兩面黑光石英比色槽	信德
	聚偏二氯乙烯過濾膜，孔徑0.22 μm PVDF filter	Milipore
懸浮菌體	胰大豆蛋白培養基Tryptic soy broth (TSB)	BD
殺菌實驗	酵母萃取粉腺葡萄糖瓊脂培養基	
	Yeast Extract Peptone Dextrose broth (YPD)	BD
	洋菜膠Agar, granulated	BD
	磷酸緩衝溶液phosphate buffer saline, pH 7.4	Biokit
	塑膠比色槽	信德
	平底微量滴定盤96-well microtiter plate	Costar
	微量離心管1.5 ml Eppendorff	需環
生物膜殺菌	反應塑膠盒(Polymethylpenten ; PMP)	永吉
實驗	鐵氟龍轉盤(rotor) 1960	
	316L不銹鋼錠片(disk)	

3-3 儀器

- 實驗儀器來源

儀器名稱	來源
• 紫外光-可見光光譜儀 UV-visible spectrophotometer DU-800	Beckman coulter
• 迴轉恆溫振盪培養箱 Orbital shaking incubator OS/500	
• 水平式無塵無菌操作台 3HT-24	海天
• 綠色發光二極體矩陣 Green Light LED (540±5 nm, 22 mW/cm ²) (圖三)	工業技術研究院
• 蒸氣高壓滅菌釜 Autoclave	永吉
• 轉動式幫浦	Masterflex
• 雷射共軛焦顯微鏡 Confocal microscope TCS SP5	Leica (Germany)



3-4 實驗方法

3-4.1 懸浮菌體培養

- 菌種培養條件

菌種名	培養基
白色念珠菌(<i>Candida albicans</i> MYA -2876)	YPD
金黃葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 10780)	TSB
轉糖鏈球菌(<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175)	TSB
綠膿桿菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853)	TSB
大腸桿菌(<i>Escherichia .coli</i> ATCC 25922)	TSB

金黃葡萄球菌、綠膿桿菌及大腸桿菌培養部份，以接種環自 4°C 保存的固態平板培養基中挑取單一菌落，接種至 3 mL TSB /螺旋試管中，於 37°C、轉速 150 rpm 恆溫震盪培養；隔夜取 100 μL 再接種至 100 mL TSB /三角錐形瓶中作為大量培養，同上述小量培養條件、培養約 16~18 小時，此時菌體生長達初穩定期 (Stationary phase)，為本實驗操作之原始菌液來源。白色念珠菌及轉糖鏈球菌培養部分，同樣以 Loop 自 4°C 保存的固態平板培養基中挑取單一菌落，接種至 30 mL 培養液(YPDB；TSB) /三角錐形瓶中，於 37°C、轉速 150 rpm 恆溫震盪培養 14、16 小時，此時菌體生長達初穩定期 (Stationary phase)，為本實驗操作之原始菌液來源。

取出 1 mL 菌液於 1.5 mL 微量離心管中(依實驗條件取數管)，進行離心 (8,000 rpm, 5 min)，離心後取出上清液，加入 1 mL 新鮮的磷酸緩衝液(PBS)，此動作重複循環三次。將菌液集中於 15 mL 離心管，混合均勻後依適當比例進行倍稀釋成 1 mL，進行吸光值測定，O.D.₆₀₀ 所得的值為 0.6 時，相對於菌液濃度約為 10⁸ CFU / mL (白色念珠菌約為 10⁷ CFU / mL)。

3-4.2 赤蘚紅對懸浮菌體之光動力抑制

使用 PBS 配製光感物質 Erythrosine stock 20 mM (經過濾後)，再以無菌 PBS 稀釋，由於與菌體 1:1 混合後濃度減半，故配製濃度需為最終目標濃度兩倍。將培養好的菌液經洗菌(8,000 rpm, 5 min, 去除上清液，加入等量 PBS。此動作重複三次)步驟後，取 100 μ L (10^8 CFU/mL；白色念珠菌為 10^7 CFU/mL)菌液，加入等體積之 PBS (控制組)或不同濃度光感物質(條件組)溶液均勻混合，於室溫及避光的環境下作 10 分鐘。作用後進行去除周圍光感物質(12,000 rpm, 1 min, 去除上清液，加入等量 PBS。進行清洗一次)，接著移至發光二極體矩陣 LED 燈源下進行照光，使用光源波長為 540 ± 10 nm，強度 22 mW/cm²，分別給予不同的照光能量強度，計算照光時間如下列公式 1。照光完畢後立即取出 100 μ L 原液，利用無菌 PBS 進行 10^{-1} ~ 10^{-6} 倍序列稀釋，接著將稀釋菌液取 10 μ L 滴於固體培養基上，於 37°C 下培養隔夜後進行菌落計數。定量分析活菌體存活率 (Survival fraction)是以光動力作用後生菌數密度(以適當培養基測定經序列稀釋後的菌落生成數)除以原始生菌數密度作為計算。計數各平板上之菌落數時選擇介於 3~30 CFU (Colony Forming Unit)，如菌落數低於 3，列為太少不計。

$$\text{Light dose (J/cm}^2\text{)} = \frac{\text{output power (mW/cm}^2\text{)} \times \text{irradiation time (sec)}}{1000} \quad (\text{公式 1})$$

3-4.3 生物膜培養

生物膜培養反應器為參考 Pitt 等人所設計改良的 rotating disk reactor⁶⁵；為一個 500 毫升聚丙烯材質容器(Nelgene, Rochester, NY)及鐵氟龍轉盤(rotor)組成反應器的主體，轉盤上裝置 24 片可取下的 316L 不銹鋼圓片(disks)⁶⁶。反應器如圖二所示⁶⁷。

將菌體懸浮培養至穩定期，取 1 mL 菌液與 150 mL 10% 適當液體培養基混合

置於生物膜反應器中，於室溫下靜置培養 24 小時。24 小時後，去除 150 mL 之培養液，以 1% 相同之液體培養基進行流動培養，轉動式幫浦(Masterflex ®, Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL, USA)之流速為 240 mL/hr (白色念珠菌轉速為 60 rpm/min，金黃葡萄球菌及轉糖鏈球菌則靜置流洗)。

3-4.4 赤蘚紅對生物膜之光動力抑制

取培養成生物膜後的不銹鋼圓片置於48-well微量滴盤中，加入300 µL不同濃度之赤蘚紅溶液，於室溫及避光的環境下作用10分鐘。作用後進行去除周圍光感物質(移除光感物質，加入等量PBS，進行清洗一次)，接著移至發光二極體矩陣LED燈源下進行照光，使用光源波長為 540 ± 10 nm，強度 22 mW/cm^2 ，分別給予不同的照光能量強度，進行光動力作用後取出disk至含有10 mL PBS的15 mL離心管中，劇烈震盪約30秒，將不銹鋼圓片上的生物膜菌體震盪下來，接著取1 ml的樣品於1.5 mL離心管中，經過續列稀釋後取10 µL滴於固體培養基上，於37°C下培養隔夜後進行菌落計數。實驗中以添加光感物質但未照光與未加光感物質也未照光之菌液為控制組。

3-4.5 赤蘚紅母液之配製

利用 PBS 配製 stock 濃度為 20 mM 之赤蘚紅，經均勻溶解後，再以 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 之無菌過濾膜進行過濾，避光儲存於 4°C 冰箱；實驗前將母液取出，置於室溫下回溫後，再以無菌 PBS 進行稀釋至目標濃度。

3-5 統計分析

各實驗結果均經三次獨立實驗測試後，所有結果數據以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 呈現，分析方法為 T-檢定(Student's t-test)，檢定實驗所得之組數間是否具有顯著差異。(* P < 0.05, ** P < 0.001, *** P < 0.0001。)

第四章、結果與討論

4-1 光感物質與光動力實驗

4-1.1 赤蘚紅於磷酸緩衝液中之穩定性

雖然赤蘚紅廣泛應用於食品添加劑及牙菌斑顯示劑中，但對於光動力殺菌方面，才剛開始起步，所以依然要先確定赤蘚紅於實驗環境下的穩定性，才可在未來探討赤蘚紅的光動力反應機制時，避免不確定因素。本實驗環境以磷酸緩衝溶液(PBS)為主，因此，將赤蘚紅溶於 PBS 中，於不同天數進行光譜分析。結果如圖四所示，赤蘚紅溶於 PBS 四周內，吸收波峰無位移或改變的情形，吸收強度也無呈現下降的狀況，顯示在 PBS 下穩定性高。

4-1.2 赤蘚紅與菌體作用分析

光動力作用過程中，考慮菌體與光感物質作用時間、光感物質濃度及照光時間三種變因均可能影響光動力殺菌效果，因此在進行光動力殺菌實驗前，測試光感物質是否具有與菌體結合的能力，以及與作用時間的關係。一般細菌體積較小，須用高倍顯微鏡(電子顯微鏡)才能看見，然而電子顯微鏡下的顯影為黑白色，無法辨別光感物質結合至菌體上的情形；而白色念珠菌體積較大，利用光學顯微鏡(螢光顯微鏡)即可觀察，因此作為此實驗的代表菌株。

在實驗中，以 10^7 CFU/mL 白色念珠菌與低濃度的赤蘚紅(20 μ M)在室溫下分別作用 10、30 分鐘，接著經離心(11,000 rpm, 1 min)後去除上清液，並以 1 mL 無菌 PBS 回溶，再次離心，最後於螢光顯微鏡下觀察，控制組則不加入光感物質。結果如圖五所示，相較於控制組，加入光感物質的組別於白光及螢光下，皆可明顯觀察到光感物質結合至菌體的細胞壁或菌體內；同樣實驗目的對於白色念珠菌生物膜而言，以雷射共軛焦顯微鏡(Confocal microscope)觀察也有相同的結果，如圖六所示，可明顯看出光感物質結合至菌體的細胞壁或進入菌體內。而作用

10 及 30 分鐘的組別經過定量後，顯示光感物質結合至菌體的量差異不大，如圖七所示。因此後續實驗中，作用時間的條件將以 10 分鐘進行實驗。

4-2 赤蘚紅對懸浮菌體之光動力殺菌作用

本實驗分別測定赤蘚紅對革蘭氏陽性菌(*S. aureus*, *S. mutans*)、革蘭氏陰性菌(*E. coli*, *P. aeruginosa*)及酵母菌(*C. albicans*)懸浮細胞之光動力殺菌效果。革蘭氏陰性菌部份，進一步探討酸性環境下赤蘚紅是否具有提高光動力殺菌效果。光動力作用過程中，將探討光感物質濃度及照光時間影響殺菌效果之兩種變因。

4-2.1 革蘭氏陽性菌

金黃葡萄球菌

目前針對 *S. aureus* 進行光動力殺菌實驗所使用的光感物質如下：protoporphyrin IX、Protoporphyrin diarginate⁶⁸、Methylene blue^{61, 69}、pL-ce6、TBO 及 Rose bengal⁷⁰。光感物質濃度使用範圍最高至 0.1 mM 即可達到減少約 6.3 log₁₀-unit 之菌數⁶¹，顯示金黃葡萄球菌與低濃度光感物質作用即可達到良好的光動力殺菌效果，因此在本實驗中，赤蘚紅濃度使用範圍將從 0~1 mM 開始進行試驗。圖八結果顯示，當金黃色葡萄球菌培養在 PBS 溶液的環境下與赤蘚紅進行作用後，分別以照光劑量 0 及 50 J/cm² 處理，在不照光的情況下，菌數變化不大，顯示赤蘚紅本身對菌體並不會造成傷害；在照光強度為 50 J/cm² 下，10 μM 赤蘚紅可達約 1 log 之殺菌效果，100 μM 則達完全殺菌。接著將赤蘚紅濃度範圍聚焦於 10 ~100 μM，在 50 J/cm² 光照劑量下，可觀察到菌數隨著赤蘚紅濃度增加有明顯降低的趨勢，50 μM 可達全殺。而光照劑量降低至 37.5 J/cm²，依然可觀察到殺菌效果會隨著赤蘚紅濃度提高而增加的趨勢；但相較於 50 J/cm² 的結果，在作用相同濃度赤蘚紅下的殺菌效果則降低，由此可知光照劑量是影響光動力殺菌的主要因素，且在一定濃度下的光感物質需要足夠的光照才可使光感物質被激發，如圖

九所示。

糖轉鏈球菌

2005年Tony P. Paulino等學者研究指出，利用手持式光聚集器(hand held photopolymerizer)的光源(400~500 nm)與0.5 μM 的Rose bengal進行光動力作用，發現殺菌效果可達100%⁶²。2007年亦有學者研究指出，當Toluidine blue O (TBO)濃度為100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，配合輸出功率為9.62 W/cm^2 的紅色發光二極體矩陣(light emitting diodes)照射2.18 J/cm^2 ，殺菌效果亦可達100%⁷¹。雖然在本實驗中所使用的光感物質與文獻不同，但根據文獻上所使用的光感物質濃度，推斷顯示在低濃度範圍下的光感物質即可對菌體產生光動力殺菌效果。因此本實驗中，赤蘚紅濃度範圍先從0~1 mM進行測試，首先在暗反應(不照光)的條件下，探討光感物質是否對菌體產生暗毒性反應；另一方面則以50 J/cm^2 光照劑量進行光動力殺菌測試。如圖十結果顯示，當轉糖鏈球菌培養在PBS溶液的環境下與赤蘚紅進行作用後，以照光劑量0及50 J/cm^2 處理，在不照光的情況下，菌數變化不大，顯示赤蘚紅本身對菌體並不會造成傷害；在照光強度為50 J/cm^2 下，10 μM 赤蘚紅約可降低1 log之菌數，而100 μM 即可將菌體全部殺滅。之後將赤蘚紅濃度範圍聚焦於0~100 μM ，並將光照劑量降低至25 J/cm^2 ，如圖十一所示，依然可觀察到菌數會隨著赤蘚紅濃度提高而有降低的趨勢；25 μM 可達到約2 log之殺菌效果，50 μM 赤蘚紅則達到約4 log之殺菌效果。如同金黃葡萄球菌的結果，在10~100 μM 範圍內的赤蘚紅，顯示光照劑量與光動力殺菌效果成正比。

4-2.2 革蘭氏陰性菌

於革蘭氏陰性菌部分，選用綠膿桿菌(*P. aeruginosa*)與大腸桿菌(*E. coli*)進行光動力殺菌實驗。首先將兩種菌株分別與 0~20 mM 的赤蘚紅作用，在不照光(0 J/cm²)的情況下，測試赤蘚紅是否具有毒性而影響菌數，結果如圖十二、圖十三所示，赤蘚紅在不照光的條件下對兩株菌體並無影響。接著以相同濃度(0~20 mM)的赤蘚紅進行照射 50 J/cm²，可發現光動力作用對 *P. aeruginosa* 及 *E. coli* 的殺菌效果皆不明顯，幾乎沒有影響。

本實驗中分別挑選革蘭氏陽性菌與陰性菌各兩株，而根據實驗結果，確認赤蘚紅之光動力作用對革蘭氏陽性菌具有良好效果，但對於革蘭氏陰性菌效果則不明顯。目前大部分的光感物質多只對革蘭氏陽性菌或陰性菌其中一種有光動力抑制效果，且大多是針對革蘭氏陽性菌有效。造成此種差別的原因被認為可能與細胞表面之結構有關^{38, 43, 72}；如圖十四所示⁷³，革蘭氏陽性菌的細胞壁雖然比革蘭氏陰性菌較厚，但因肽聚醣組成排列使其細胞壁孔徑較大、通透性較高，使光感物質較易接近並進入細胞內，因此大多數革蘭氏陽性菌對光動力作用較敏感；而雖然革蘭氏陰性菌細胞壁較薄，但細胞壁外層具有外膜，此外膜是由帶負電的脂多醣、脂蛋白等所組成的不對稱結構，提供一層屏障，有效阻擋疏水性或大分子物質進入細胞，並避免一些光感物質與細胞膜結合⁷²。另一方面則是革蘭氏陰性菌細胞壁上的外膜表面帶有大量負電荷，使得中性或負電性光感物質無法進入細菌內，造成光動力作用無法有效地對革蘭氏陰性菌產生作用。

目前已有文獻指出赤蘚紅在 pH > 4 的環境下，其結構帶有兩個負電荷；pH < 3.5 時則偏帶一個負電荷⁵⁴。在本實驗操作過程中，菌體處於 pH 7.4 的環境下，故推論在中性環境下，可能是赤蘚紅帶負電荷的緣故，使得其更難吸附於細胞壁甚至進入革蘭氏陰性菌體內，造成無法達到光動力殺菌作用。為解決光感物質吸附於革蘭氏陰性菌細胞壁上的問題，藉由在操作過程中，使赤蘚紅溶於酸性環境下與革蘭氏陰性菌作用，觀察是否提升吸附效果，進而提高光動力殺菌作用。2009

年已有文獻指出在3%醋酸溶液下，隨著細菌與醋酸溶液接觸時間越長，殺菌效果越明顯，而在較低濃度的醋酸環境下則有抑菌作用，對於醋酸導致菌體失去活性的機制尚不明確，目前推測可能原因為酸性環境下使得細菌細胞壁上脂質溶解、蛋白變性或凝固以及細胞壁外膜通透性改變⁷⁴。了解酸性環境下對革蘭氏陰性菌的影響後，對於醋酸濃度的選擇範圍則盡量低於3%，且不影響菌數為考量。實驗中首先利用0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8%醋酸溶液與革蘭氏陰性菌作用10分鐘後，觀察是否影響生菌數，結果如圖十五所示，綠膿桿菌與0~0.8%醋酸溶液作用十分鐘後，顯示0.2%以下的醋酸溶液對綠膿桿菌的菌數並無產生影響，當醋酸溶液的濃度提高至0.4及0.8%時，則會造成降低約4-log單位的菌數。對大腸桿菌的部份，結果如圖十六所示，同樣在0.2%以下的濃度對菌數無影響，0.4及0.8%部分則會降低約1~1.5-log單位的菌數，相較於綠膿桿菌，大腸桿菌對酸性環境較具耐受性。在實驗中所使用的醋酸濃度其相對應的酸鹼值如表一所示，由醋酸環境對革蘭氏陰性菌的結果也可間接了解pH值對菌體的影響，由此可推斷綠膿桿菌及大腸桿菌存在pH值低於4.55的環境下，就會開始被抑制。

上述結果已確定0.2%以下的醋酸濃度對革蘭氏陰性菌影響不大，因此在後續實驗中將以0、0.05、0.1、0.2%以下的醋酸濃度條件進行光動力實驗。在進行光動力實驗前，同樣先測試在酸性環境下赤蘚紅是否會對菌體產生暗毒性反應。在實驗中將不同濃度的赤蘚紅(0、1、5、10 mM)分別混合於0、0.05、0.1、0.2%的醋酸溶液，在不照光的情況下與革蘭氏陰性菌作用10分鐘，觀察赤蘚紅於酸性環境下是否對菌體會產生暗毒性之反應。結果圖十七所示，綠膿桿菌與赤蘚紅在酸性環境下進行作用後，顯示菌數無明顯下降；但在大腸桿菌部份則在0.2%的醋酸溶液下，1 mM濃度的赤蘚紅即可對菌體造成影響，降低約3個log單位的菌數，結果如圖十八所示。目前針對此結果尚無定論，推測可能是不同菌體之間對酸性環境的耐受度不同所致。

已知赤蘚紅在0.2%醋酸溶液環境下，對兩株菌有不同的暗毒性反應。在後續光動力實驗中，將以0、0.05、0.1及0.2%醋酸環境對綠膿桿菌進行光動力實

驗；大腸桿菌部份，則以 0、0.05 及 0.1% 進行。首先以 50 J/cm^2 光照條件進行測試，光感物質濃度同暗毒性測試時的濃度(0、1、5、10 mM)，綠膿桿菌的結果如圖十九所示，在 0.05% 醋酸溶液下進行光動力實驗顯示菌數無變化；0.1 及 0.2% 醋酸下菌數則明顯下降約 3 個 log 單位的菌數，顯示酸性濃度越高，促進光動力殺菌效果越明顯。大腸桿菌部份亦有類似的結果，在 0.05% 醋酸溶液下進行光動力實驗顯示菌數無變化，當醋酸濃度提高至 0.1% 時，經光動力處理過後的菌數則下降 2~3 個 log 單位的菌數，如圖二十所示。

因此從上述結果可得知赤蘚紅在 0.1% 的醋酸環境下與 1 mM 以上的赤蘚紅作用即可達到促進光動力殺菌效果。此結果似乎也間接證明赤蘚紅在酸性環境下，可增進與菌體結合的能力，進而達到提升光動力殺菌效果。可能原因為赤蘚紅在酸性環境下結構或帶電性改變，抑或在較高濃度的醋酸環境下，菌體已呈現虛弱的狀態，因此在接續進行光動力實驗時，較中性環境下更容易達到破壞細胞壁的功能。另外，在 0.1% 的醋酸環境下，1~10 mM 赤蘚紅的殺菌效果似乎是差不多，後續可以往低濃度嘗試；以及往高濃度(0.4 及 0.8%)醋酸進行光動力實驗，確認醋酸濃度為主要提升光動力殺菌效果的因素。

4-2.3 酵母菌

目前針對白色念珠菌在光動力殺菌上所使用的感光物質，主要以Methylene blue及Toluidine blue兩種為主，其他則尚有5-aminolaevulinic、chlorine e6、Rose bengal等⁶⁴。

由於白色念珠菌的體積較一般細菌大，細胞壁也較細菌厚(β -1,3-glucan, β -1,6-glucan及chitin所組成，厚度可達100~300 nm)，因此在感光物質及光照劑量上都較一般細菌高(尤其是革蘭氏陽性菌)。在本實驗中，利用接近目前臨床上所使用的最高濃度(25 mM)進行測試，感光物質濃度為0、0.1、0.5、1、5、10及20 mM。結果如圖二十一所示，在不照光的情況下，菌數無明顯差異，顯示在20 mM以下的濃度對菌體不會產生暗毒性；接著以50 J/cm²的光照劑量進行光動力實驗，可發現在1 mM以下時，菌數無下降趨勢，但在5 mM時，則可將全部菌體撲殺。因此，在感光物質濃度上聚焦於1~5 mM，更進一步探討殺菌的濃度範圍。如圖二十二所示，同樣在50 J/cm²的光照劑量下，3 mM的赤蘚紅即可降低約3個log單位的菌數；4 mM以上的濃度即可達到全殺。此結果說明白色念珠菌懸浮菌體與赤蘚紅作用後，藉由光動力處理而達到殺菌效果。

4-3 赤蘚紅對生物膜之之光動力殺菌效果

4-3.1 生物膜之培養與定量

本實驗選用兩種革蘭氏陽性菌(金黃色葡萄球菌及轉糖鏈球菌)及酵母菌(白色念珠菌)進行生物膜培養。生物膜的生長受菌體本身生長速率及外在環境條件影響，而在相同養分濃度下，液體流速會影響生物膜的累積；本實驗以1% TSB (白色念珠菌以 1% YPD)為培養基，並以240 mL/hr之流速進行流動培養，於不同時間點測定生物膜生長狀況。

4-3.1.1 金黃葡萄球菌生物膜之累積曲線

*S. aureus*進行流動培養0~72小時之生物膜生長狀況如圖二十三所示。當 *S. aureus*生物膜由 3.04×10^5 CFU/cm²隨著時間逐漸累積，培養至24小時之後達到穩定時期，細胞密度無明顯變化，活菌數約為 1.88×10^7 CFU/cm²。

4-3.1.2 糖轉鏈球菌生物膜之累積曲線

*S. mutans*進行流動培養0~72小時之生物膜生長狀況如圖二十四所示。*S. mutans*生物膜起始約由 7.01×10^5 CFU/cm²開始增加，培養到24小時之後達到穩定時期，生物膜密度無明顯變化，活菌數約為 1.53×10^8 CFU/cm²。

4-3.1.3 白色念珠菌生物膜之累積曲線

*C. albicans*進行流動培養0~72小時之生物膜生長狀況如圖二十五所示。當 *C. albicans*生物膜由 2.83×10^6 CFU/cm²隨著時間逐漸累積，培養至24小時之後達到穩定時期，細胞密度無明顯變化，活菌數約為 1.78×10^7 CFU/cm²。

4-3.2 赤蘚紅光動力作用對生物膜之殺菌效果

在赤蘚紅對懸浮菌體之光動力殺菌實驗中，發現金黃葡萄球菌、轉糖鏈球菌(革蘭氏陽性菌)於赤蘚紅濃度分別為50、25 μM 、照光強度50 J/cm^2 時可被完全撲殺；白色念珠菌(酵母菌)在赤蘚紅濃度為4 mM 、照射50 J/cm^2 的光照劑量也可達全殺，如表二所示；但對綠膿桿菌及大腸桿菌(革蘭氏陰性菌)而言，抑制效果則不彰；因此在探討光動力對生物膜之抑制作用時，僅選用革蘭氏陽性菌及酵母菌進行實驗。實驗中赤蘚紅使用濃度為提高至20 mM ，探討不同作用時間及提高照光強度之光動力殺菌效果。

4-3.2.1 金黃葡萄球菌菌生物膜之殺菌效果

於先前實驗中已知金黃葡萄球菌懸浮菌體經光動力處理後，其殺菌效果會隨著光感物質濃度及光照劑量增加而提升，因此在生物膜實驗部份，將赤蘚紅濃度提高至10 mM ，為懸浮實驗可達全殺濃度(0.05 mM)的200倍。赤蘚紅濃度分別為0、0.05、0.1、0.5、1、5及10 mM ，如圖二十六所示，在不照光的條件下與光感物質作用十分鐘後，菌數無變化；而想對在無赤蘚紅存在下，單純光照25、50 J/cm^2 ，也顯示不影響菌數，顯示赤蘚紅或光照單獨處理下皆不會影響菌數。光動力處理部份，於25及50 J/cm^2 光照條件下，作用0.05 mM 赤蘚紅即可達到全殺的效果。相對於懸浮菌體，金黃葡萄球菌生物膜所需的光照劑量較低，而光感物質濃度同樣在0.05 mM 即可達全殺。針對此結果，確切原因尚不清楚，但猜測金黃葡萄球菌生物膜較懸浮菌體更容易被撲殺的可能為：1.金黃葡萄球菌生物膜之胞外聚合物結構較鬆散，使得光感物質容易穿透至底層。2.金黃葡萄球菌生物膜為透明無色，光線照射時不易被遮蔽。

4-3.2.2 轉糖鏈球菌生物膜之殺菌效果

已知轉糖鏈球菌懸浮菌體經光動力處理後，其殺菌效果與光感物質濃度及光照劑量成正比關係。在生物膜實驗部份，將赤蘚紅濃度提高至10 mM，為懸浮實驗可達全殺濃度(0.025 mM)的400倍。赤蘚紅濃度分別為0、0.05、0.1、0.5、1、5及10 mM，如圖二十七所示，在不照光的條件下與光感物質作用十分鐘後，菌數無變化，而無赤蘚紅存在下，單純光照 50 J/cm^2 ，也顯示不影響菌數，顯示赤蘚紅或光照單獨處理下皆不會影響菌數。經光動力處理部份，於 50 J/cm^2 光照條件下，作用0.05 mM赤蘚紅即可達到全殺的效果。相對於懸浮菌體，轉糖鏈球菌生物膜所需的光感物質濃度只需提升兩倍即可達全殺，此結果與金黃葡萄球菌結果類似。另外，Simon Wood及Daniel Metcalf研究團隊在2006年指出，利用 $22 \mu\text{M}$ 赤蘚紅及400 W的白光光源，可使厚度為 $200 \mu\text{m}$ 的轉糖鏈球菌生物膜達到降低2個log單位的菌數。因此更可推論光動力作用對於革蘭氏陽性菌生物膜有良好殺菌效果的可能因素，與革蘭氏陽性菌生物膜之胞外聚合物結構有關。

4-3.2.2 白色念珠菌生物膜之殺菌效果

白色念珠菌懸浮菌體經光動力處理下可達全殺的條件：赤蘚紅濃度 4 mM，光照劑量為 50 J/cm²。在生物膜實驗中，將提高赤蘚紅濃度及光照劑量，如圖二十八，赤蘚紅濃度為 0、2.5、5、10 及 20 mM，菌體在不照光(0 J/cm²)的條件下與光感物質作用十分鐘後，菌數無變化，顯示赤蘚紅對白色念珠菌生物膜菌體並無影響；而光感物質不存在(0 mM)的情況下，菌體單獨照光，菌數也呈現無變化的現象，因此我們可以推判光感物質及光照兩個單獨存在的因素對菌體並不會產生影響。當光照劑量為 50 J/cm²時，可觀察到即使是在 20 mM 赤蘚紅環境下，菌數沒有明顯的下降趨勢；當光照劑量提高至 100 J/cm²時，依然無殺菌效果。

在此結果中，推論有下列幾項因素導致光動力作用對白色念珠菌生物膜效果不彰：(1)生物膜外層具有胞外聚合物，提供物理性屏障，使得赤蘚紅無法順利附著於生物膜底層的菌體。(2)光線照射遭胞外聚合物所遮蔽，使得光線無法直接穿透至底層。(3)生物膜底層之菌體對環境耐受性高。生物膜底層的細菌因養分缺乏，長期處於飢餓狀態，因此可能藉由調節基因表現及代謝作用來適應環境的改變。

在後續實驗中，可以嘗試將從三個層面進行探討：

- (1) 光感物質與菌體作用時間拉長，使菌體長時間處於光感物質環境中，達到光感物質完全滲透至生物膜底層。
- (2) 在光感物質方面，則可再提高濃度進行測試，或是使光感物質結構改變成具帶電性，以提高光感物質穿透胞外聚合物與菌體結合的能力。
- (3) 另外光源部份，則可使用高輸出功率的光源，或是以雷射光源進行分段式照光，以提高光動力殺菌效益。

第五章、結論

1. 赤蘚紅對於白色念珠菌、革蘭氏陽性菌之懸浮菌體皆具有良好的光動力殺菌效果，且殺菌能力隨著赤蘚紅濃度及光照劑量提高而增加；但對於革蘭氏陰性菌部份，光動力殺菌效果則不彰。
2. 赤蘚紅對於革蘭氏陽性菌之生物膜菌體亦具有良好的光動力殺菌效果；但對白色念珠菌而言，相較於懸浮菌體結果，生物膜部份呈現無殺菌效果。
3. 於 0.1% 醋酸環境下，赤蘚紅對於革蘭氏陰性菌都有提升光動力效果的現象。
4. 由以上結果可得知赤蘚紅是一種具有潛力的光感物質。



第六章、未來研究方針

利用赤蘚紅進行光動力殺菌之研究尚在起步階段，仍有許多問題有待深入研究，未來可繼續探討：

1. 酸性環境下之光動力殺菌作用

在本研究中，已初步證實單純0.2%以上醋酸濃度，即可對菌體產生影響，更在0.1%醋酸環境下可提升赤蘚紅對革蘭氏陰性菌的光動力殺菌效果。結果證明酸性環境在光動力作用中為一個重要的因素，它有可能是促進光感物質跟菌體結合，或可能是先對菌體造成傷害，而光動力則為加成破壞的作用，使菌體更容易被撲滅。目前此測試僅在懸浮菌體，應對生物膜也做同樣測試，並探討其作用機制。未來若應用於臨床治療，應先測試細胞對酸性環境的耐受性。避免過酸的環境下，對細胞產生傷害。

2. 提高白色念珠菌生物膜與革蘭氏陰性菌殺菌能力

無論是臨床感染性疾病治療或光動力殺菌實驗，白色念珠菌生物膜及革蘭氏陰性菌懸浮菌體一直是很難克服的問題。未來可以嘗試將光感物質與菌體作用時間延長，使菌體長時間處於光感物質環境中，達到光感物質完全滲透至生物膜底層。在光感物質方面，則可再提高濃度進行測試或使光感物質結構改變成具帶電性，抑或利用帶正電荷的物質(例如，chitosan、glucosamine、N-acetyl- glucosamine等)加促光動力殺菌效果，提高光感物質穿透胞外聚合物與光動力殺菌的能力。另外光源部份，則可使用高輸出功率的光源，或是以雷射光源進行分段式照光，以提高光動力殺菌效益。

3. 赤蘚紅之光動力潛力

本實驗僅探討原核及真核細菌之抑制效果，未來可研究赤蘚紅之光動力作用是否也能作為感染性疾病或腫瘤細胞的替代療法，以做更廣泛之臨床應用。

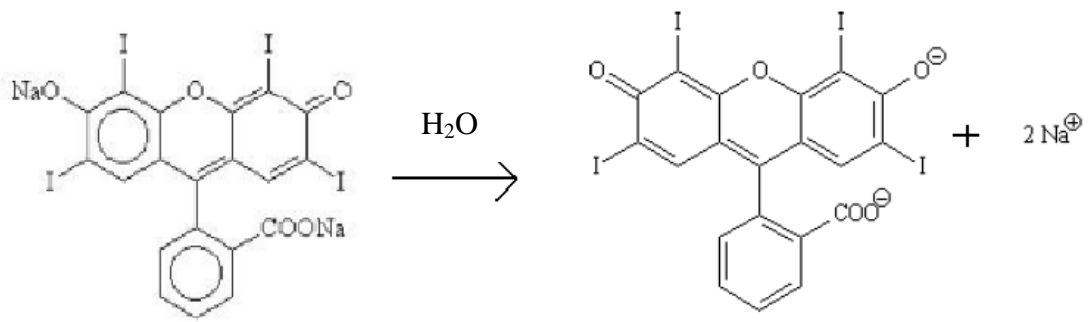
第七章、附圖表

Acetic acid (%)	pH 值
0	7.4
0.05	6.17
0.1	4.84
0.2	4.55
0.4	3.86
0.8	3.48

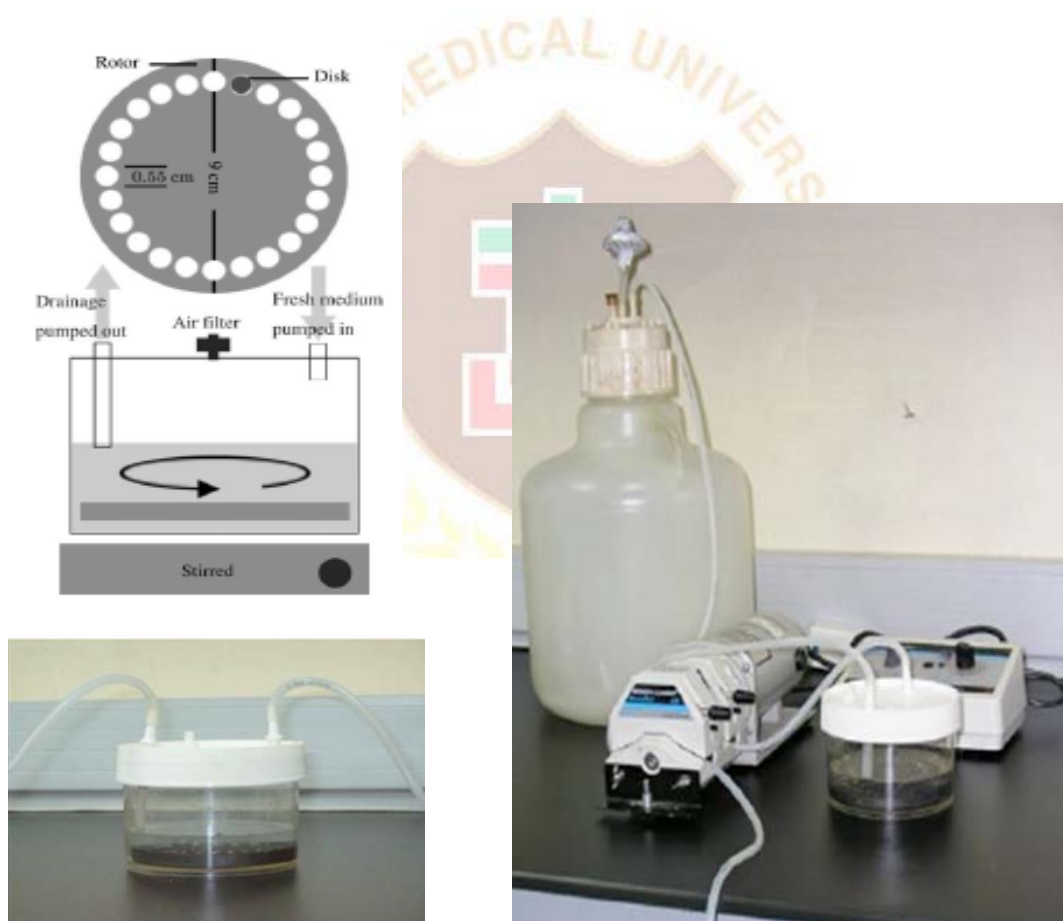
表一、醋酸濃度其相對應的酸鹼值

Strain		Light dose (J/cm ²)	Erythrosine concentration
Gram-positive	<i>S. aureus</i>	37.5	100 μM
		50	50 μM
	<i>S. mutans</i>	25	100 μM
		50	25 μM
Yeast	<i>C. albicans</i>	50	4 mM

表二、赤蘚紅對懸浮菌體達到光動力作用撲殺全部菌體的條件



圖一、赤蘚紅(Erythrosine)的結構⁵⁴



圖二、生物膜反應器及裝置⁶⁷

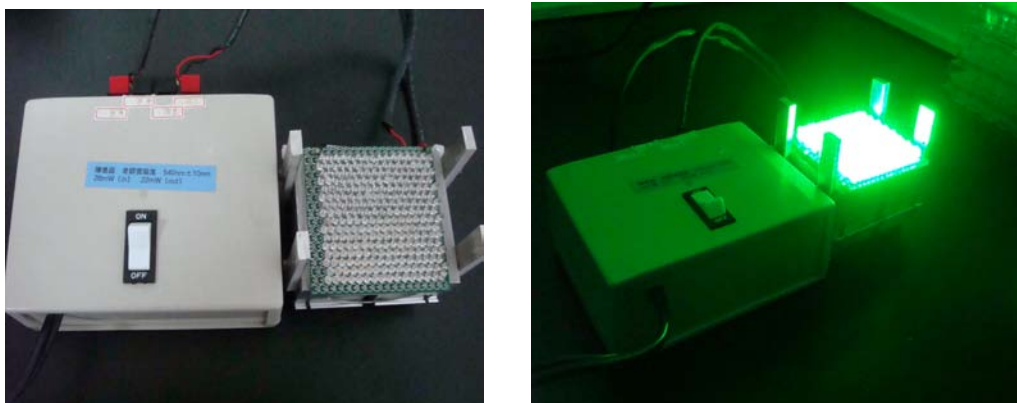


圖 三、綠色發光二極體矩陣

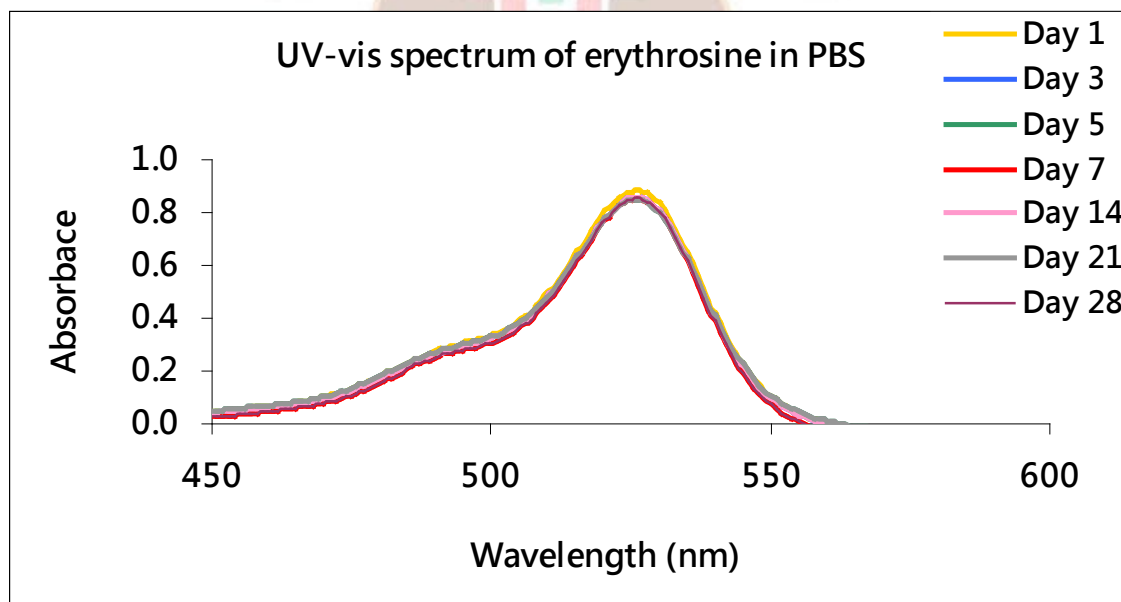


圖 四、赤蘚紅(10 μ M)在 PBS 溶液中之紫外光-可見光光譜。

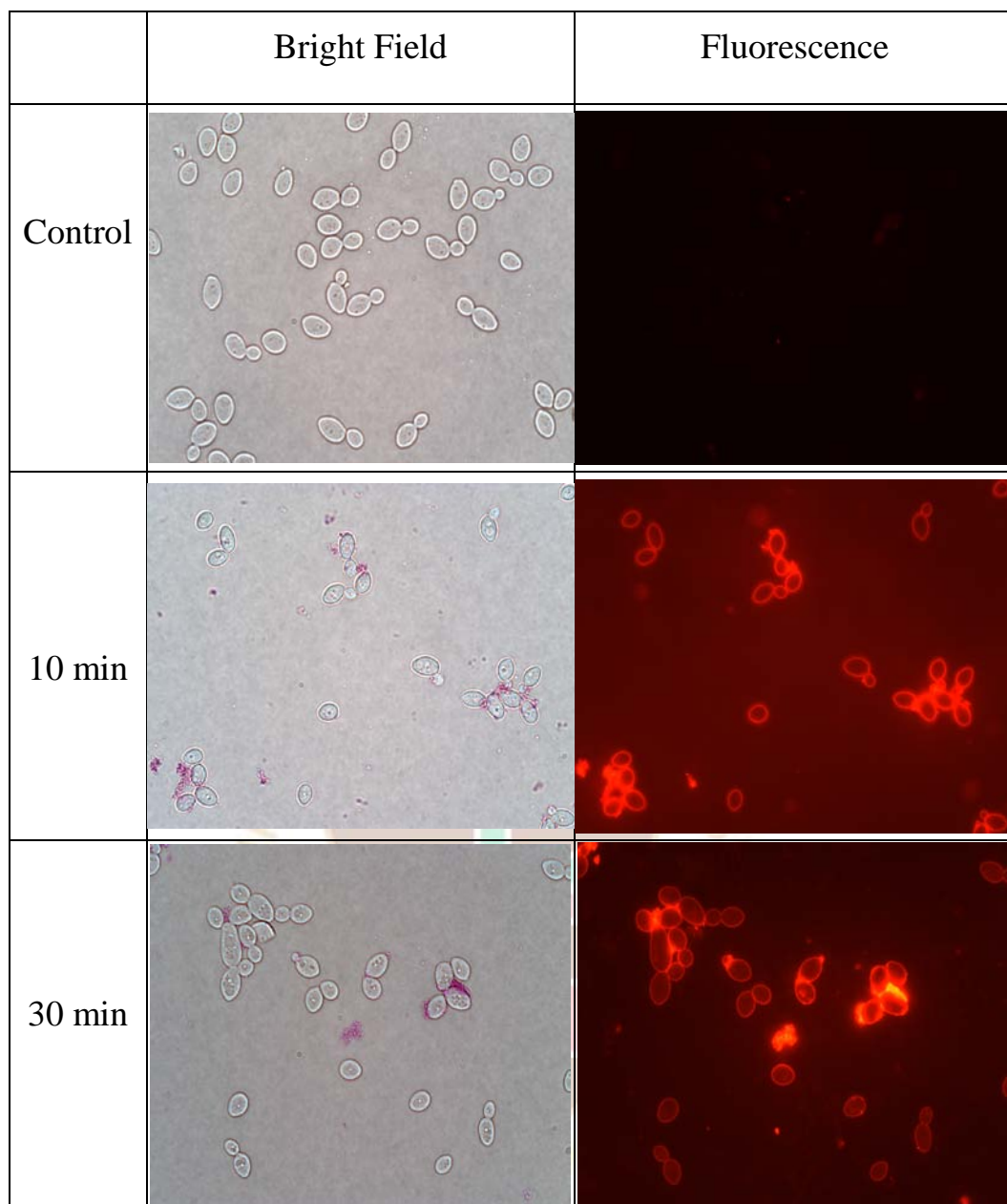
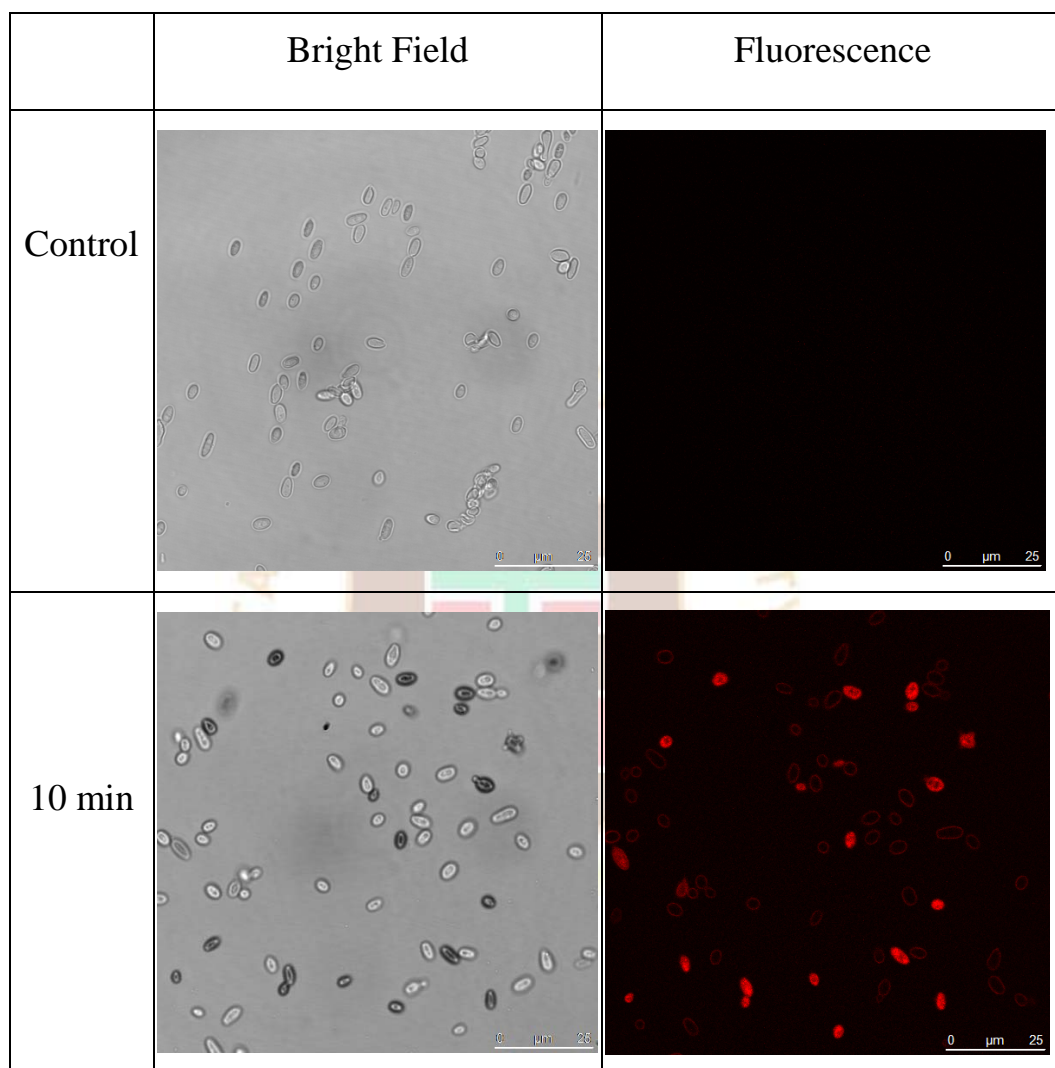


圖 五、白色念珠菌與赤蘚紅(20 μ M)作 10 及 30 分鐘，以螢光顯微鏡觀察之影像。



圖六、白色念珠菌生物膜與赤藓紅(20 mM)作用 10 分鐘，以雷射共軛焦顯微鏡觀察之影像。

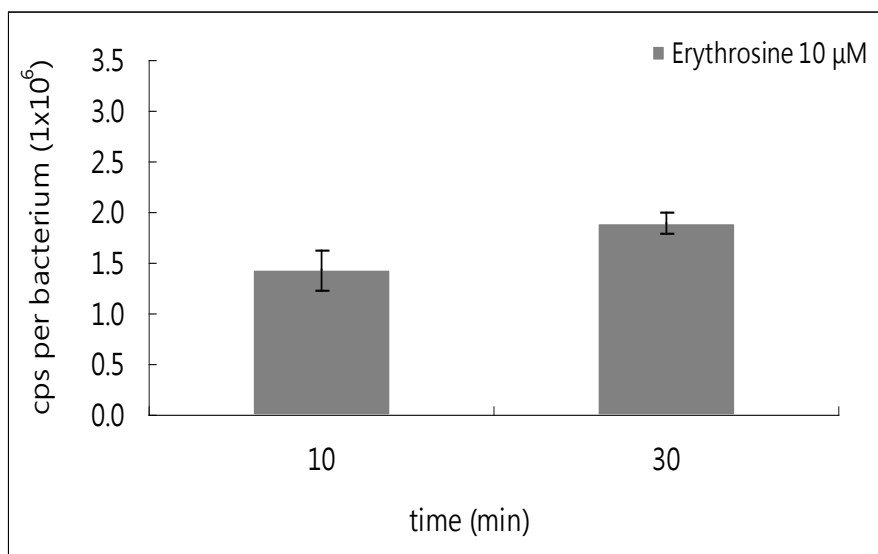


圖 七、白色念珠菌與赤蘚紅(20 μM)作用10及30分鐘後，以螢光光譜定量赤蘚紅吸附結果。

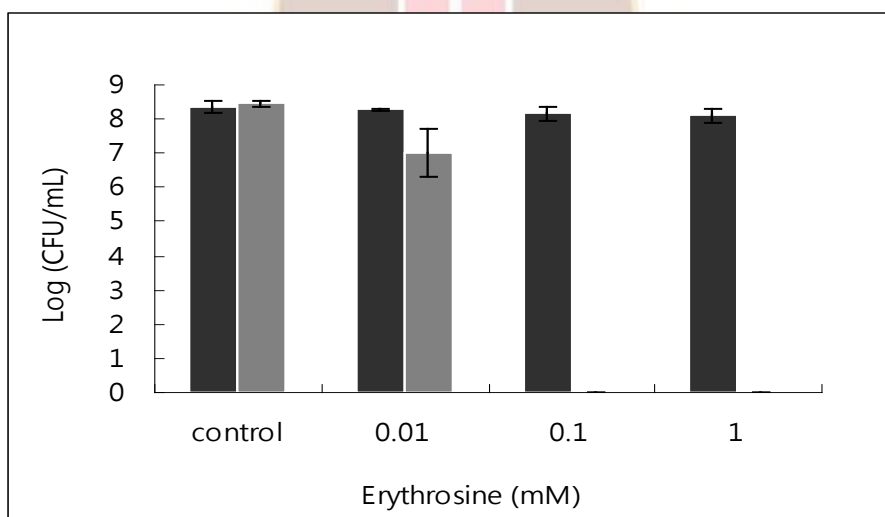
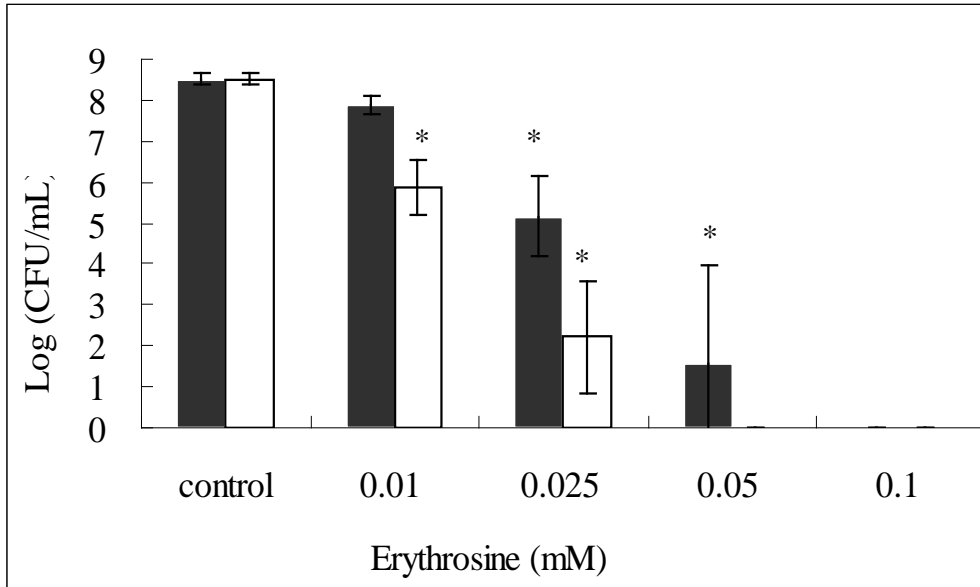
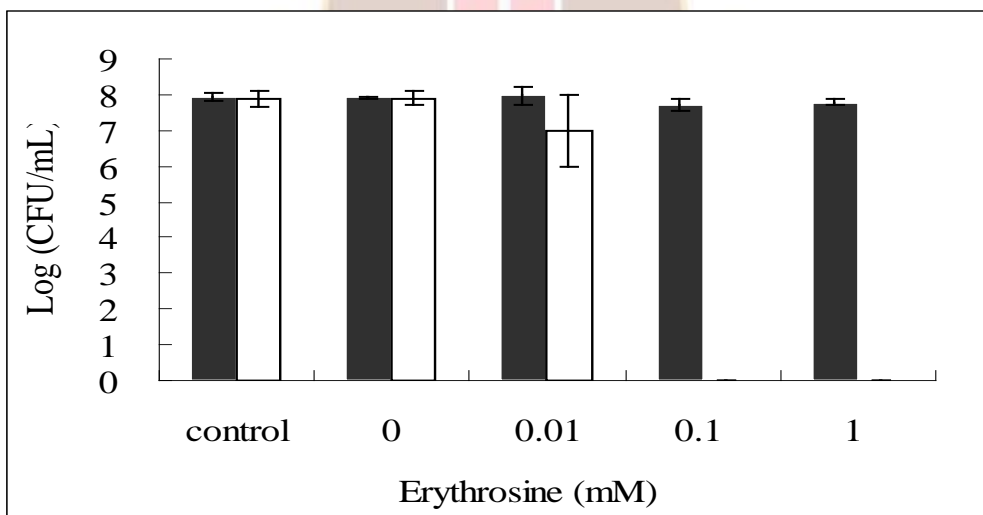


圖 八、赤蘚紅(0.01~1 mM)對金黃葡萄球菌懸浮細胞進行光動力作用之殺菌之結果。(金黃葡萄球菌： 10^8 CFU / mL；赤蘚紅：0.01、0.1、1 mM；光照劑量：0 (■)、50 (■) J/cm²)。所有數據均是三次獨立實驗的平均值。



圖九、赤藓红(0.01~0.1 mM)对金黄色葡萄球菌悬浮细胞进行光动力作用之杀菌结果。(金黄色葡萄球菌： 10^8 CFU / mL；赤藓红：0.01、0.025、0.05、0.1、1 mM；光照剂量：37.5 (■)、50 (□) J/cm²)。所有数据均是三次独立实验的平均值。



圖十、赤藓红(0~1 mM)对转糖链球菌悬浮细胞进行光动力作用之杀菌结果。(转糖链球菌： 10^8 CFU / mL；赤藓红：0、0.01、0.1 及 1 mM；光照剂量：0 (■)、50 (□) J/cm²)。所有数据均是三次独立实验的平均值。

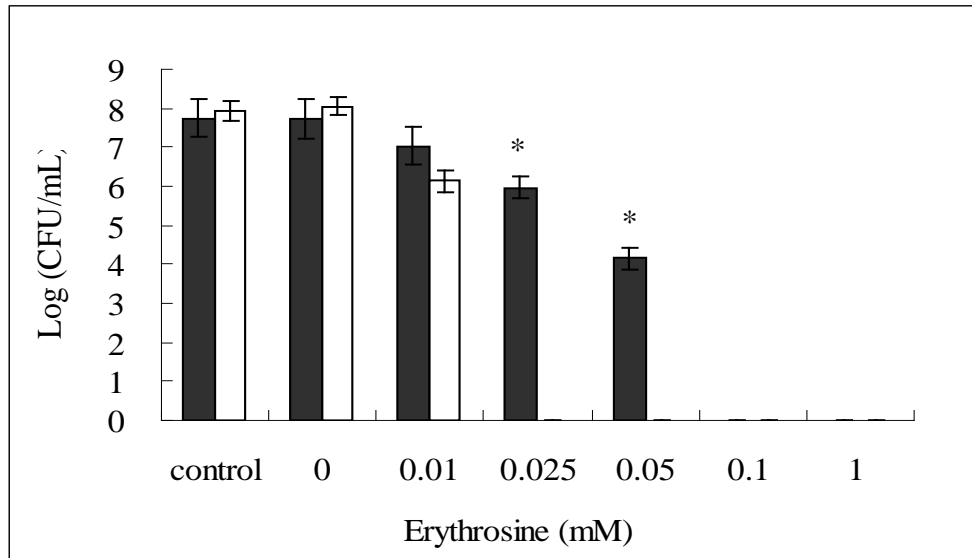


圖 十一、赤蘚紅(0~1 mM)對轉糖鏈球菌懸浮細胞進行光動力作用之殺菌結果。

果。(轉糖鏈球菌： 10^8 CFU / mL；赤蘚紅：0、0.01、0.025、0.05 及 1 mM；
光照劑量：25(■)、50(□) J/cm²)。所有數據均是三次獨立實驗的平均值。

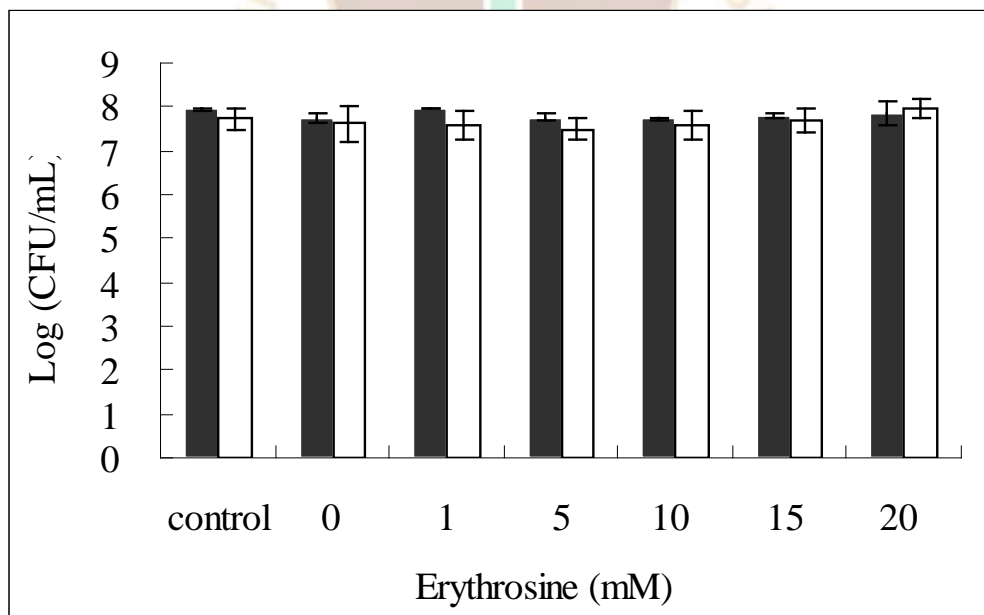


圖 十二、赤蘚紅(0~20 mM)對綠膿桿菌懸浮細胞進行光動力作用之殺菌結果。

(綠膿桿菌： 10^8 CFU / mL；赤蘚紅：0、1、5、10、15 及 20 mM；光
照劑量：0(■)、50(□) J/cm²)。所有數據均是三次獨立實驗的平均值。

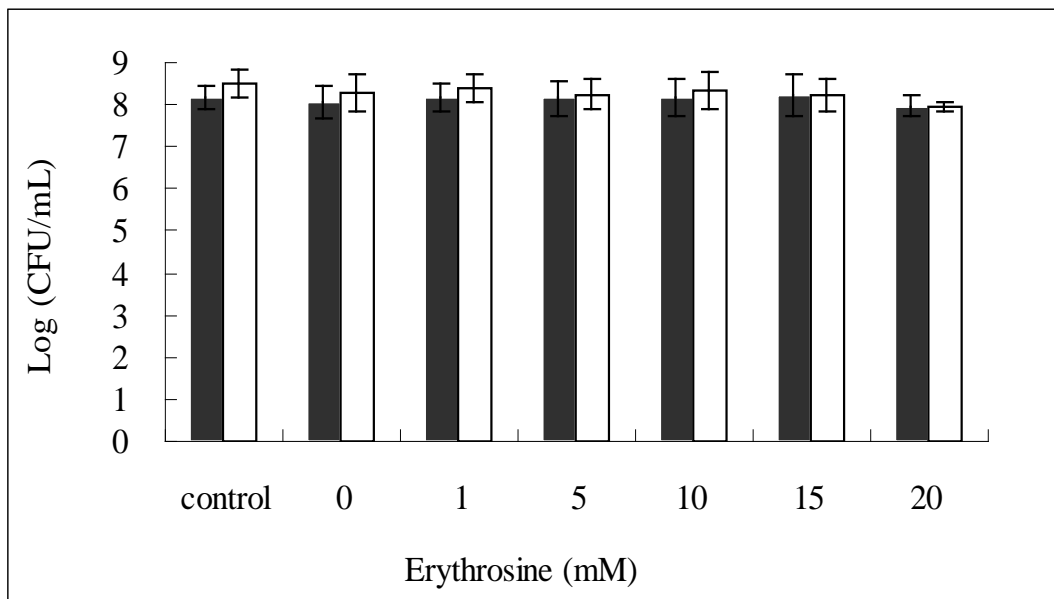
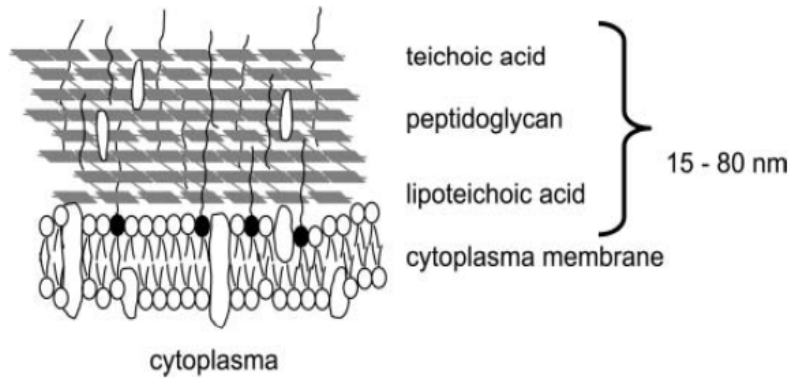
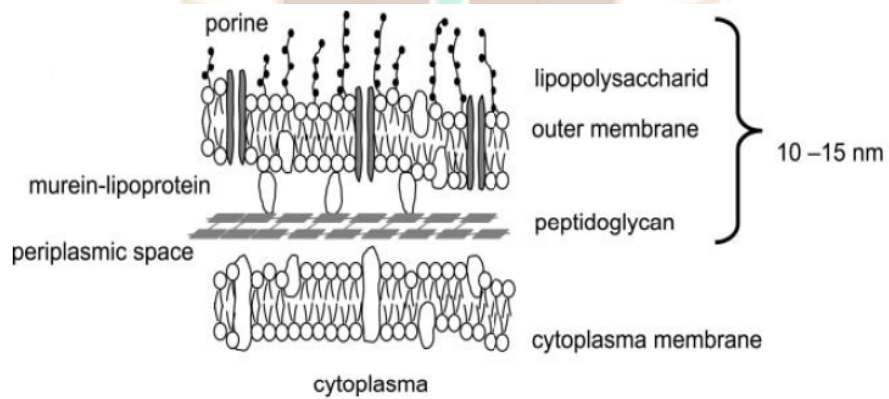


圖 十三、赤蘚紅(0~20 mM)對大腸桿菌懸浮細胞進行光動力作用之殺菌結果。(大腸桿菌： 10^8 CFU / mL；赤蘚紅：0、1、5、10、15 及 20 mM；光照劑量：0(■)、50(□) J/cm²)。所有數據均是三次獨立實驗的平均值。



(A) 革蘭氏陽性菌細胞壁結構



(B) 革蘭氏陰性菌細胞壁結構

圖 十四、革蘭氏陽性菌(A)及革蘭氏陰性菌(B)細胞壁結構圖

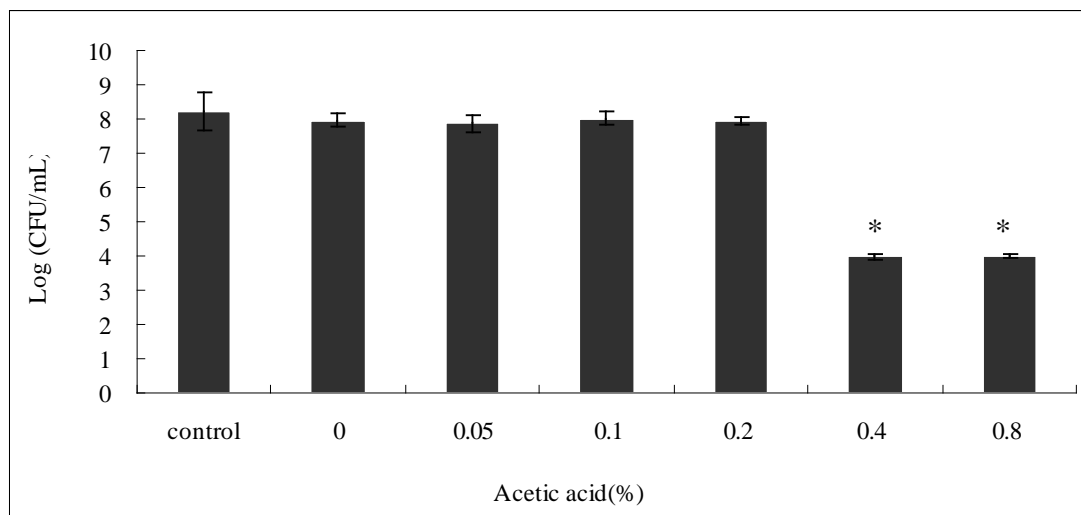


圖 十五、綠膿桿菌懸浮細胞在不同濃度的醋酸溶液(0~0.8%)環境下的影響。(綠膿桿菌： 10^8 CFU / mL；醋酸濃度：0、0.05、0.1、0.2、0.4 及 0.8%；作用時間：10 min)。所有數據均是三次獨立實驗的平均值。

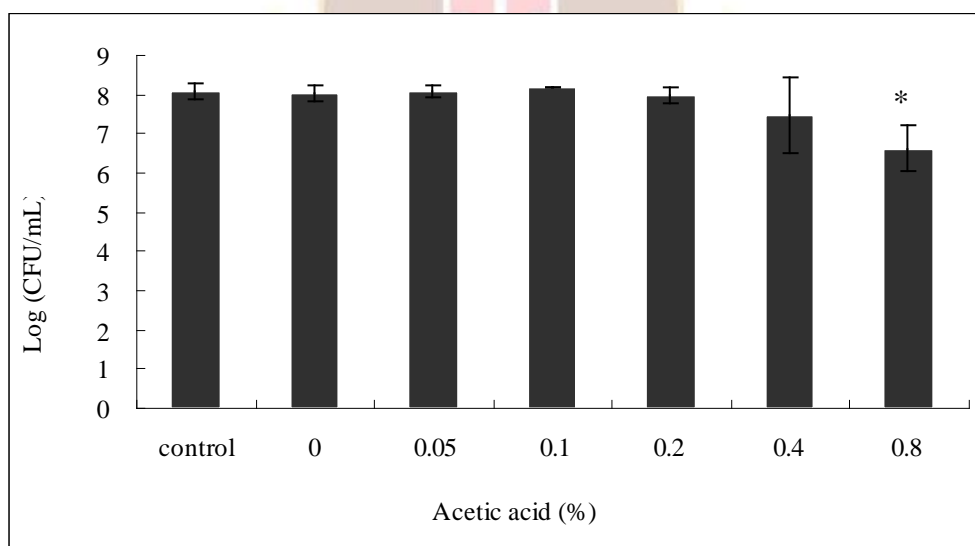


圖 十六、大腸桿菌懸浮細胞在不同濃度的醋酸溶液(0~0.8%)環境下的影響。(大腸桿菌： 10^8 CFU / mL；醋酸濃度：0、0.05、0.1、0.2、0.4 及 0.8%；作用時間：10 min)。所有數據均是三次獨立實驗的平均值。

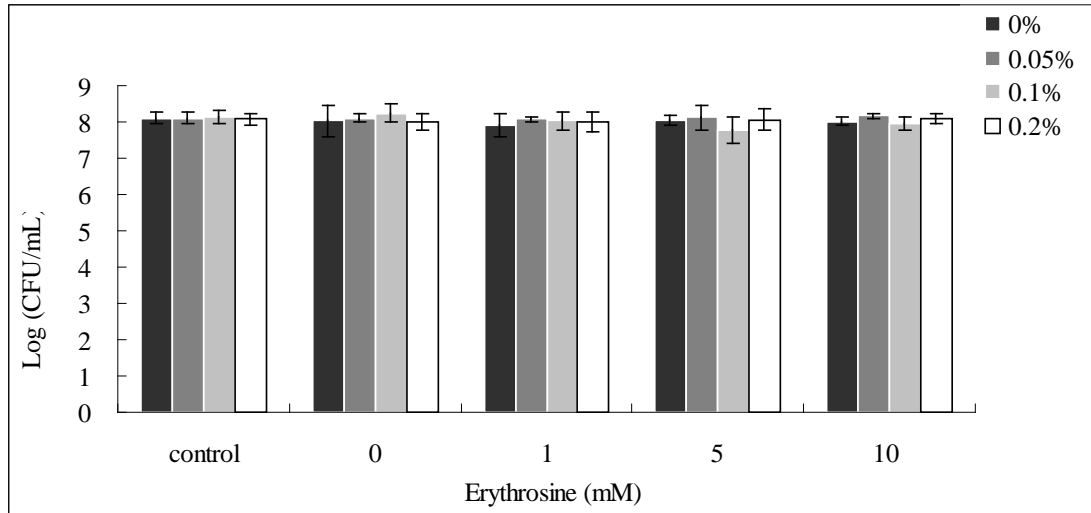


圖 十七、綠膿桿菌懸浮細胞在不同濃度的醋酸溶液(0~0.8%)環境下，與赤蘚紅作用之暗毒性反應。(綠膿桿菌： 10^8 CFU / mL；醋酸濃度：0、0.05、0.1 及 0.2%；赤蘚紅：0、1、5 及 10 mM；作用時間：10 min)。所有數據均是三次獨立實驗的平均值。

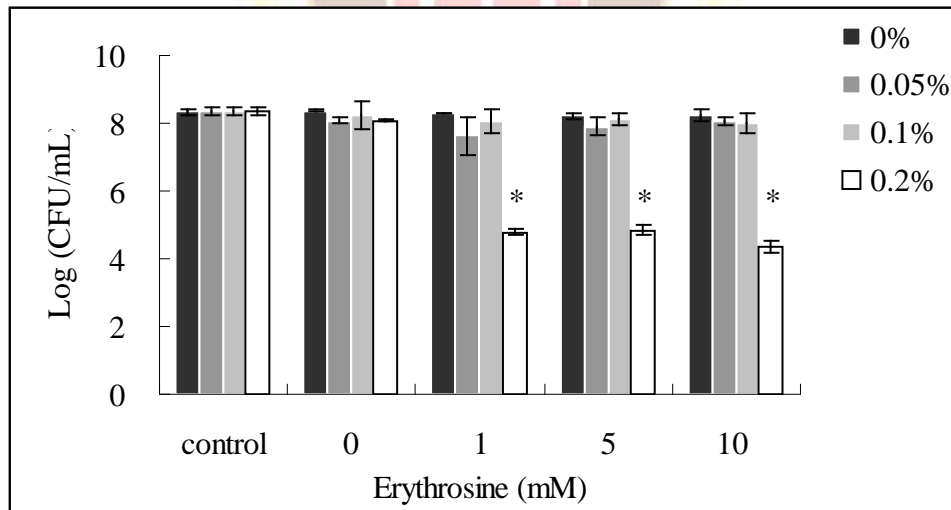


圖 十八、大腸桿菌懸浮細胞在不同濃度的醋酸溶液(0~0.8%)環境下，與赤蘚紅作用之暗毒性反應。(大腸桿菌： 10^8 CFU / mL；醋酸濃度：0、0.05、0.1 及 0.2%；赤蘚紅：0、1、5 及 10 mM；作用時間：10 min)。所有數據均是三次獨立實驗的平均值。

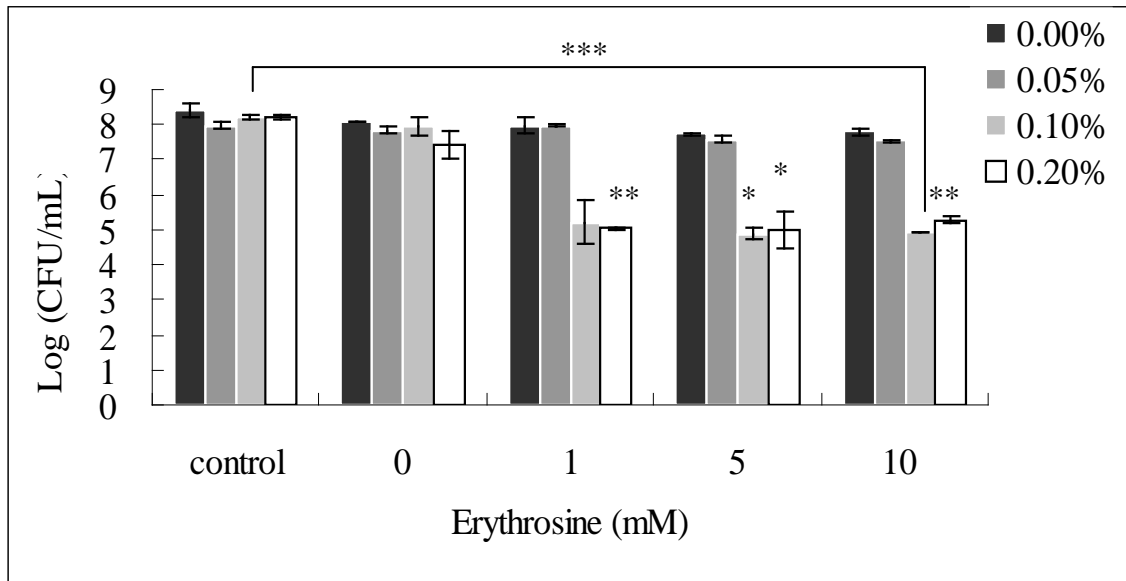


圖 十九、綠膿桿菌懸浮細胞在不同濃度的醋酸溶液(0~0.2%)環境下與不同赤蘚紅濃度(0~10 mM)之光動力殺菌測試。(綠膿桿菌： 10^8 CFU / mL；醋酸濃度：0、0.05、0.1 及 0.2%；赤蘚紅濃度：0、1、5、10 mM；光照劑量： 50 J/cm^2)。所有數據均是三次獨立實驗的平均值。

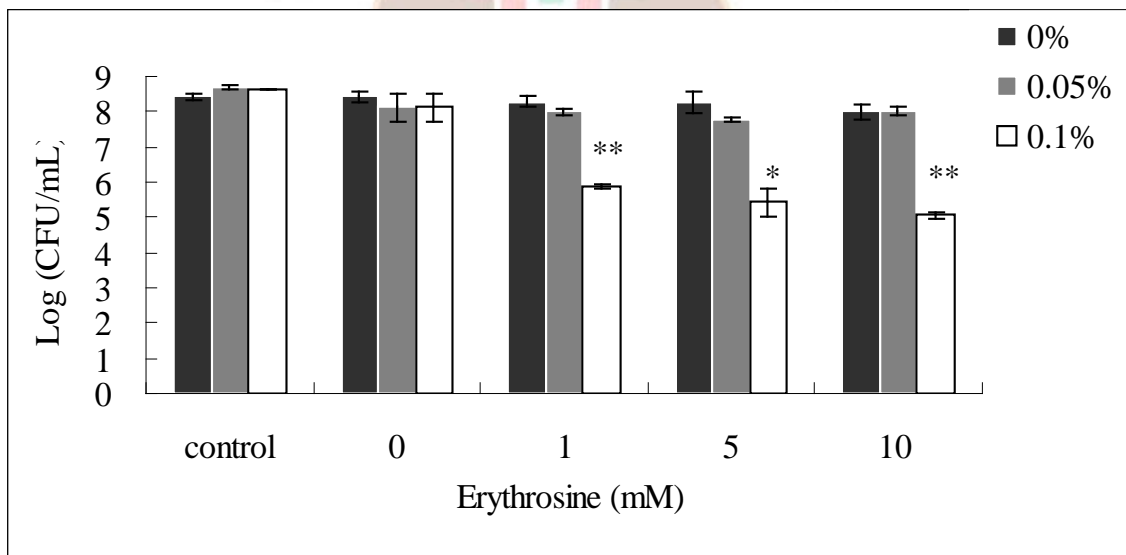


圖 二十、大腸桿菌懸浮細胞在不同濃度的醋酸溶液(0~0.2%)環境下與不同赤蘚紅濃度(0~10 mM)之光動力殺菌測試。(大腸桿菌： 10^8 CFU / mL；醋酸濃度：0、0.05 及 0.1%；赤蘚紅濃度：0、1、5、10 mM；光照劑量： 50 J/cm^2)。所有數據均是三次獨立實驗的平均值。

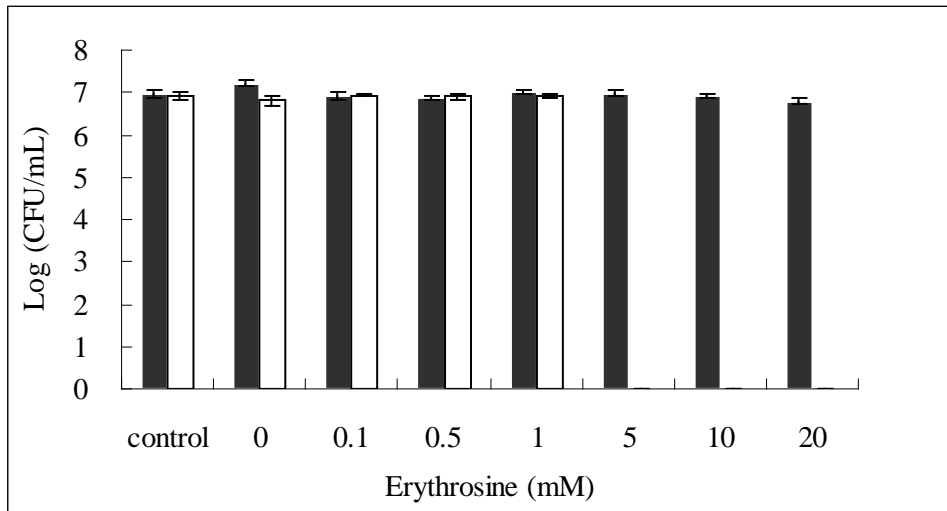


圖 二十一、赤蘚紅(0~20 mM)對白色念珠菌懸浮細胞進行光動力作用之殺菌

結果。(白色念珠菌： 10^7 CFU / mL；赤蘚紅：0、0.1、0.5、1、5、10 及 20 mM；光照劑量：0(■)、50(□) J/cm²)。所有數據均是三次獨立實驗的平均值。

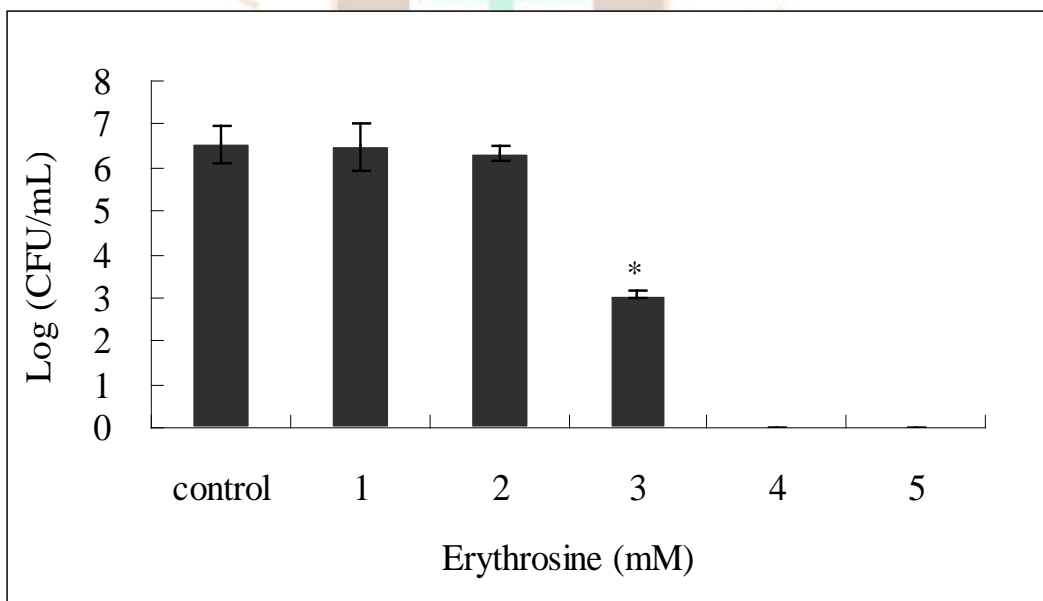
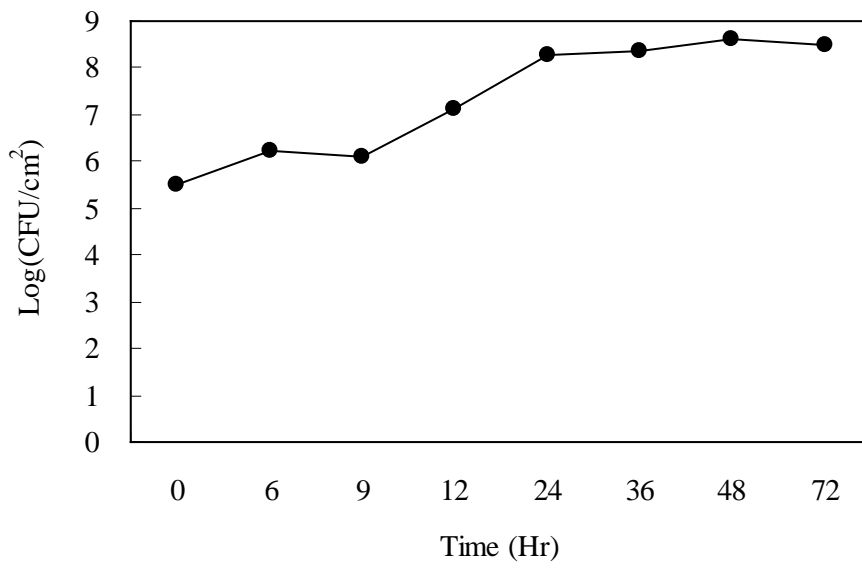
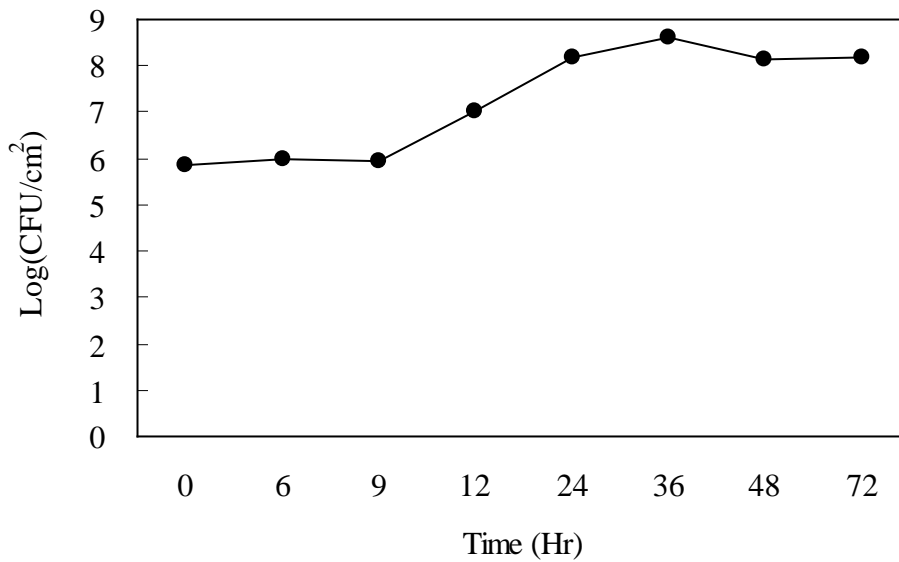


圖 二十二、赤蘚紅(1~5 mM)對白色念珠菌懸浮細胞進行光動力作用之殺菌

結果。(白色念珠菌： 10^7 CFU / mL；赤蘚紅：1、2、3、4 及 5 mM；光照劑量：50(■) J/cm²)。所有數據均是三次獨立實驗的平均值。



圖二十三、金黃葡萄球菌生物膜之生長累積曲線



圖二十四、轉糖鏈球菌生物膜之生長累積曲線

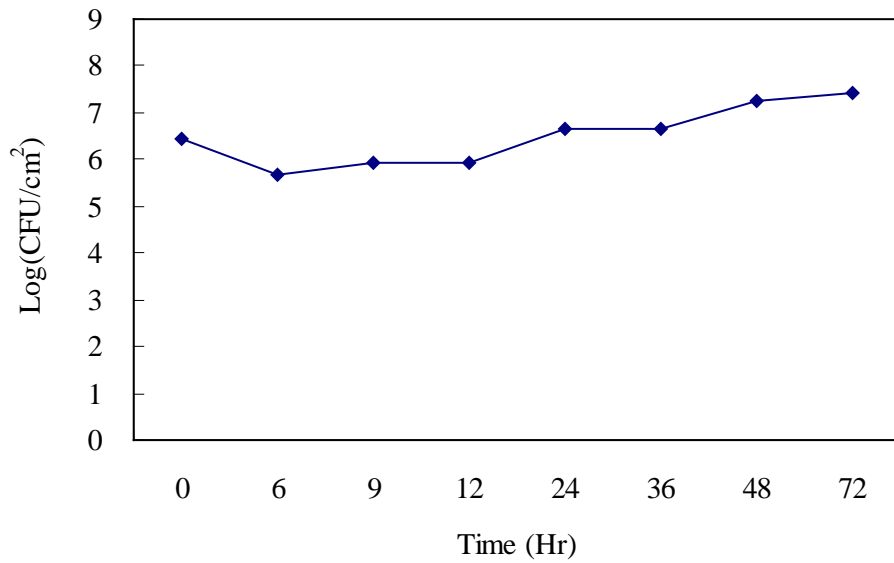


圖 二十五、白色念珠菌生物膜之生長累積曲線

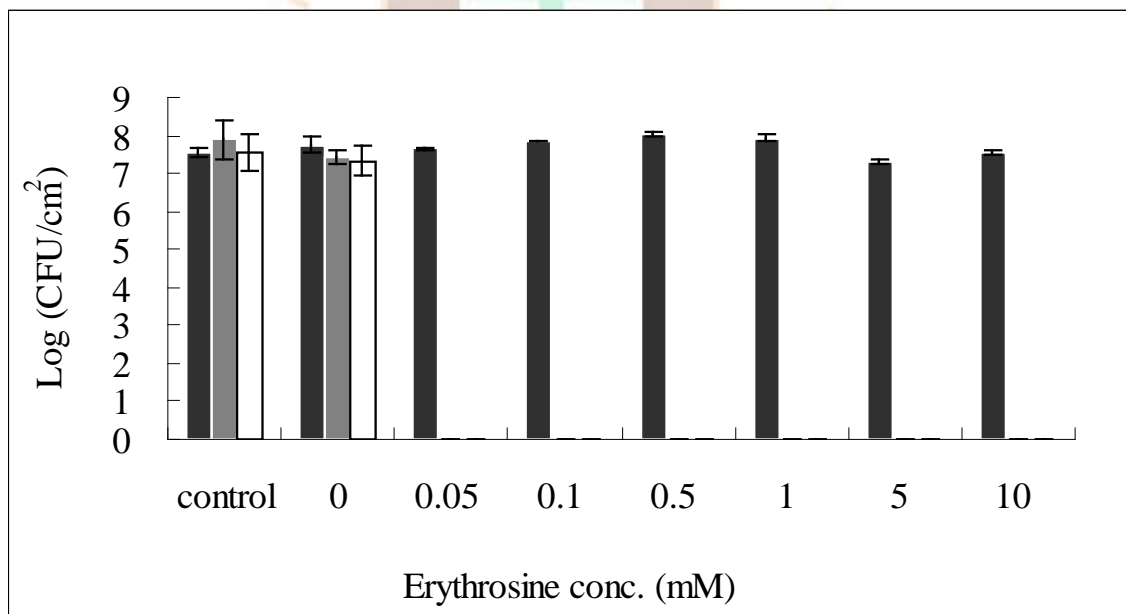


圖 二十六、赤蘚紅(0~10 mM)對金黃葡萄球菌生物膜進行光動力作用之殺菌結果。(金黃葡萄球菌： 10^8 CFU / mL；赤蘚紅：0、0.05、0.1、0.5、1、5 及 10 mM；光照劑量：0(■)、25(■)、50(□) J/cm²)。所有數據均是三次獨立實驗的平均值。

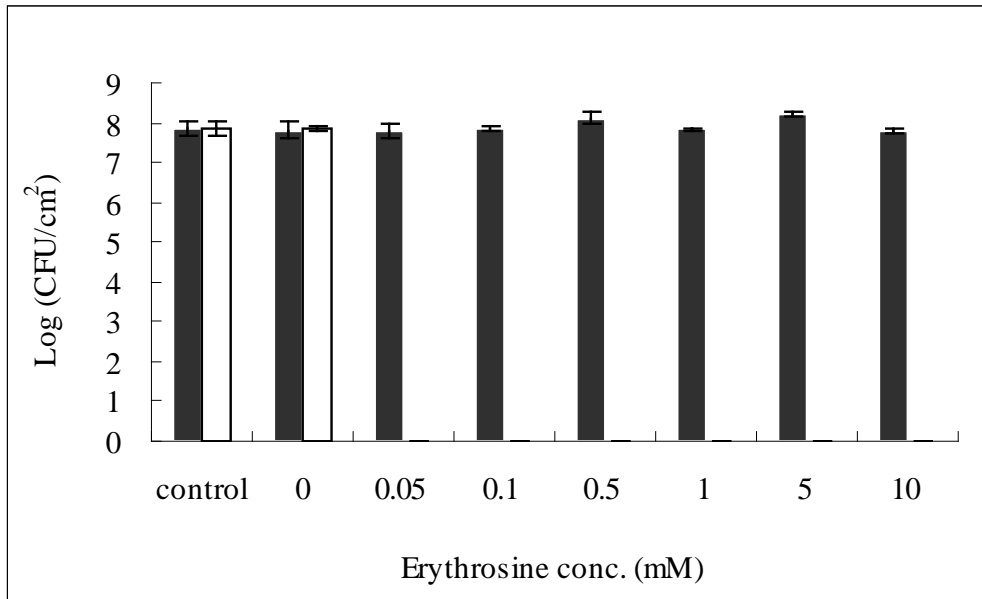


圖 二十七、赤蘚紅(0~10 mM)對轉糖鏈球菌生物膜進行光動力作用之殺菌

結果。(轉糖鏈球菌： 10^8 CFU / mL；赤蘚紅：0、0.05、0.1、0.5、1、5 及 10 mM；光照劑量：0(■)、50(□) J/cm²)。所有數據均是三次獨立實驗的平均值。

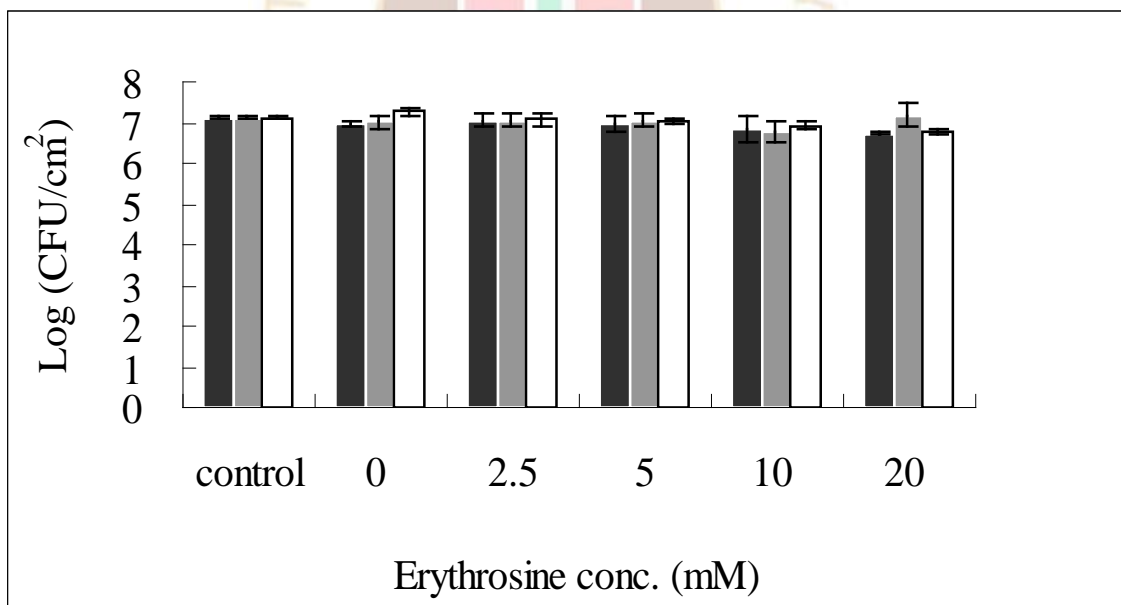


圖 二十八、赤蘚紅(0~20 mM)對白色念珠菌生物膜進行光動力作用之殺菌結

果。(白色念珠菌： 10^7 CFU / mL；赤蘚紅：0、2.5、5、10 及 20 mM；光照劑量：0(■)、50(■)、100(□) J/cm²)。所有數據均是三次獨立實驗的平均值。

第八章、參考文獻

1. Nester, E.W. *et al.*, Microbiology: A Human Perspective, 4th ed, WCB McGraw-Hill Publishers, Boston, MA, 2004.
2. Ronald Hare, The scientific activities of Alexander Fleming, other than the discovery of penicillin. *Medical History*, **27**: 347-372 (1983) .
3. J. W. Costerton, *et al.* Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent infection. *Science* **284**, 1318-1322 (1999).
4. P Quatresooz, C Pierard-Franchimont, JE Arrese, GE Pierard, Clinicopathologic presentations of dermatomycoses in cancer patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **22**, 907–917(2008)
5. Egberto Munin, Ligia Maria Giroldo, Leandro Proco'pio Alves, Maricilia Silva Costa. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **88**, 16–20 (2007).
6. 陳怡君. 院內感染念珠菌的臨床及分子流行病學研究, 衛生署研究計畫報告書(DOH-86-TD-044)。
7. Hamada, S. and Slade, H.D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Reviews* **44**, 331-384 (1980).
8. Lodge, J. and Jacobson, G.R. Starvation-induced stimulation of sugar uptake in *Streptococcus mutans* is due to an effect on the activities of preexisting proteins of the phosphotransferase system. *Infection and Immunity* **56**, 2594-2600 (1988).
9. Horaud, T. and Delbos, F. Viridans streptococci in infective endocarditis: Species distribution and susceptibility to antibiotics. *European Heart Journal* **5**, 39-44 (1984).
10. Gerald P. Bodey, Ricardo Bolivar, Victor Fainstein, Leena Jadeja. Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews of Infectious Diseases* **5**, 279-313 (1983).
11. Clement Mugabe, Majed Halwani, Ali O. Azghani, Robert M. Lafrenie, and Abdelwahab Omri. Mechanism of enhanced activity of liposome-entrapped aminoglycosides against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **50**, 2016–2022 (2006).
12. Lisa Saiman. Clinical utility of synergy testing for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis: 'the motion for'. *Paediatric Respiratory Reviews* **8**, 249-255 (2007).
13. Marisa I Gómez and Alice Prince. Opportunistic infections in lung disease:

- Pseudomonas* infections in cystic fibrosis. *Current Opinion in Pharmacology* **7**, 244-251 (2007).
14. Cynthia Ryder, Matthew Byrd and Daniel J Wozniak. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current Opinion in Microbiology* **10**, 644-648 (2007).
 15. Bergey, D.H., David Hendricks, Krieg, MoeIR., Holt, John G. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins (1984).
 16. Luke F. Chen, Teena Chopa, Keith S Kaye. Pathogens resistant to antibacterial agents. *Infectious Disease Clinics of North America* **23**, 817-845 (2009).
 17. Fred C. Tenover, Atlanta, Georgia. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control* **34**, 3-10 (2006).
 18. Evans, M.E., Feola, D. J. and Rapp, R. P. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *The Annals of pharmacotherapy*. **33**, 960-967 (1999).
 19. Zavascki, A.P., Goldani, L. Z., Li, J. and Nation, R. L. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. **60**, 1206-1215 (2007).
 20. Clissold, S.P., Todd, P. A. and Campoli-Richards, D. M. Imipenem/cilastatin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*. **33**, 183-241 (1987).
 21. Schroeder, R., Waldsich, C. and Wank, H. Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics. *The EMBO journal*. **19**, 1-9 (2000).
 22. Drlica, K. and Zhao, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **61**, 377-392 (1997).
 23. McManus MC. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *American Journal of Health-System Pharmacy*. **54**, 420-33 (1997).
 24. P. Stoodley, K. Sauer, D. G. Davies, J. W. Costerton. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology* **56**, 187-209 (2002).
 25. Brown M. R. and P. Gilbert. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *Journal of Applied Bacteriology*. **74**, Suppl: 87S-97S (1993).
 26. Parsek M. R. and C. Fuqua. Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *Journal of Bacteriology*. **186**, 4427-4440. (2004).
 27. Philip S Stewart, J William Costerton. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**, 135-138. (2001).
 28. Elasri M. O. and R. V. Miller. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**,

- 2025-2031 (1999).
29. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **45**, 999-1007 (2001).
 30. Spoering A. L. and K. Lewis. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of Bacteriology*. **183**, 6746-6751 (2001).
 31. Tack K. J. and L. D. Sabath. Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiosis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin. *Chemotherapy*. **31**, 204-210 (1985).
 32. Zhang T. C. and P. L. Bishop. Evaluation of substrate and pH effects in a nitrifying biofilm. *Water Environment Research*. **68**, 1107-1115 (1996).
 33. Prigent-Combaret C., O. Vidal, C. Dorel, and P. Lejeune. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **181**, 5993-6002 (1999).
 34. Shih P. C. and C. T. Huang. Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **49**, 309-314 (2002).
 35. Allison D. G and P. Gilbert. Modification by surface association of antimicrobial susceptibility of bacterial populations. *Journal of Industrial Microbiology*. **15**, 311-317 (1995).
 36. Hassett D. J., J. F. Ma, J. G. Elkins, *et al.* Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Journal of Molecular Microbiology*. **34**, 1082-1093 (1999).
 37. Ackroyd R., C. Kelty, N. Brown, and M. Reed. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. **74**, 656-69 (2001).
 38. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*. **42**, 13-28 (1998).
 39. Wainwright M. The emerging chemistry of blood product disinfection. *Chemical Society Review*. **31**, 128-136 (2002).
 40. Santus R., P. Grellier, J. Schrevel, J. C. Maziere, and J. F. Stoltz. Photodecontamination of blood components: advantages and drawbacks. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. **18**, 299-308 (1998).
 41. Soukos N. S., S. E. Mulholland, S. S. Socransky, and A. G. Doukas. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model.

- Lasers in Surgery and Medicine.* **33**, 161-168 (2003).
42. Soukos N. S., L. A. Ximenez-Fyvie, M. R. Hamblin, S. S. Socransky, and T. Hasan. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrobial Agent Chemotherapy.* **42**, 2595-2601 (1998).
 43. Ashkenazi H., Z. Malik., Y. Harth, and Y. Nitzan. Eradication of Propionibacterium acnes by its endogenous porphyrins after illumination with high intensity blue light. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* **35**, 17-24. (2003).
 44. Cho M., H. Chung, W. Choi, and J. Yoon. Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection. *Water Research.* **38**, 1069-1077 (2004).
 45. Sunada K., T. Watanabe, and K. Hashimoto. Bactericidal activity of copper-deposited TiO₂ thin film under weak UV light illumination. *Environmental Science & Technology.* **37**, 4785-4789 (2003).
 46. Hsi, R.A., Rosenthal, D.I. and Glatstein, E. Photodynamic Therapy in the Treatment of Cancer: Current State of the Art. *Drugs.* **57**, 725-734 (1999).
 47. Wainwright, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy.* **42**, 13-28 (1998).
 48. Maisch, T. Antimicrobial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers In Medical Science.* **22**, 83-91 (2007).
 49. Sharman, W.M., Allen, C.M. and Lier, J.E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today.* **4**, 507-517 (1999).
 50. Ackroyd R., C. Kelty, N. Brown, and M. Reed. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology.* **74**, 656-669 (2001).
 51. Bonnett R. Chemical aspects of photodynamic therapy. *Gordon and Breach Science Publishers.* (2000).
 52. Stapleton M. and L. E. Rhodes. Photosensitizers for photodynamic therapy of cutaneous disease. *Journal of Dermatological Treatment.* **14**, 107-112 (2003).
 53. Dongen G. A., G.W. Visser., and M. B. Vrouenraets. Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **56**, 31-52 (2004).
 54. E. Montero, M.A. Garcia, M.A. Villegas and J. Llopis. Spectral pH dependence of erythrosin B in sol-gel silica coatings and buffered solutions. *Boletin de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio.* **47**, 1-6 (2008).
 55. M. Gomberg and D. L. Tabern, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry.* **14**, 1115 (1922).
 56. D. Vasudevan, P. N. Anantharaman. Electrochemical synthesis of erythrosin

- from fluorescein. *Journal of Applied Electrochemistry*. **24**, 1188-1190 (1994).
57. *German Patent 108 838* (1899).
 58. Food Standards, Australia, New Zealand, 2008.
 59. Gong Yun, Fu Xiang-kai, Xie Bing. Preparation of several forms of plaque indicators. *Journal of Southwest China Normal University (Natural Science)* **27**, 918-921 (2002).
 60. Simon Wood, Daniel Metcalf, Deirdre Devine and Colin Robinson. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* **57**, 680–684 (2006).
 61. B.zeina, J.Greenman, W.M.Purcell and B.Das. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *British Journal of Dermatology*. **144**, 274-278 (2001).
 62. Tony P. Paulino, Karina F. Ribeiro, Geraldo Thedei Jr.,Anto^onio C. Tedesco, Pietro Ciancaglini. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*. **50**, 353-359 (2005).
 63. Kohen, R. and Nyska, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*. **30**, 620-650 (2002).
 64. Hamblin, M.R. and Hasan, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical and photobiological sciences*. **3**, 436-450 (2004).
 65. B. Pitts, A. Willse, G.A. McFeters, M.A. Hamilton, N. Zilver and P.S. Stewart. A repeatable laboratory method for testing the efficacy of biocides against toilet bowl biofilms. *Journal of Applied Microbiology*. **91**, 110-117 (2001).
 66. Hsiao-Yin Lin, Chin-Tin Chen, and Ching-Tsan Huang. Use of Merocyanine 540 for Photodynamic Inactivation of *Staphylococcus aureus* Planktonic and Biofilm Cells. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**, 6453–6458 (2004).
 67. Chia-Fen Lee , Chi-Jui Lee , Chin-Tin Chen , Ching-Tsan Huang. d-Aminolaevulinic acid mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm cultures. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **75**, 21–25 (2004).
 68. Mariusz Grinholc, Bozena Szramka, Katarzyna Olender and Alfreda Graczyk. Bactericidal effect of photodynamic therapy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain with the use of various porphyrin photosensitizers. *Journal of Acta Biochimica Polonica*. **54**, 665–670 (2007).
 69. Lilian s peloi, Rafael R.S Soares, Carlos E G Biondo, Vagner R Souza,Noboru

- Hioka and Elza Kimura. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *Journal of Bioscience*. **33**, 231–237 (2008).
70. Tatiana N. Demidova and Michael R. Hamblin. Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**, 2329–2335 (2005).
71. I.M. Bevilacqua, R.A. Nicolau, S. Khourel, A. Brugnera, G.R. Teodoro, R.A. Zangaro and M.T.T. Pacheco. The Impact of Photodynamic Therapy on the Viability of *Streptococcus mutans* in a Planktonic Culture. *Photomedicine and Laser Surgery* **25**, 513–518 (2007).
72. Padula M. and S. Boiteux. Photodynamic DNA damage induced by phycocyanin and its repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **32**, 1063-1071 (1999).
73. Annette Klein PB, Sigrid Karrer, Michael Landthaler, Rolf-Markus Szeimies. Photodynamic therapy in dermatology. *Journal of the German Society of Dermatology*. **6**, 839-46 (2008).
74. H. Ryssel, O. Kloeters, G. Germann, Th. Schafer, G. Wiedemann, M. Oehlbauer. The antimicrobial effect of acetic acid—an alternative to common local antiseptics? *Burns*. **35**, 695-700 (2009).

