

## The Role of Culture Medium Composition in Regulating Biofilm Formation and Growth of *Candida Albicans* Cells

Elham Aboualigalehdari<sup>1</sup> , Somayeh Mohammadi<sup>2</sup> , Maryam Erfaninejad<sup>3</sup> , Fatemeh Pourmotahari<sup>4</sup> , Mahnaz Fatahinia<sup>5,6\*</sup> 

<sup>1</sup> Dept of Parasitology, School of Allied Medical Sciences, Ilam University of Medical sciences, Ilam, Iran

<sup>2</sup> Student Research Committee, Ilam University of Medical Sciences, Iran

<sup>3</sup> Dept of Basic Medical Sciences, Shoushtar Faculty of Medical Sciences, Shoushtar, Iran

<sup>4</sup> Dept of Community Medicine and Public Health, School of Medicine, Dezful University of Medical Sciences, Dezful, Iran

<sup>5</sup> Dept of Medical Mycology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

<sup>6</sup> Infectious and Tropical Diseases Research Center, Health Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

### Article Info

#### Article type:

Research Article

#### Article History:

Received: Nov. 15, 2025

Received in revised form:

Apr. 28, 2026

Accepted: May. 30, 2026

Published Online: Jul. 27, 2026

#### \* Correspondence to:

Mahnaz Fatahinia

Dept of Medical Mycology,  
School of Medicine, Ahvaz  
Jundishapur University of  
Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Email:

fatahinia25@gmail.com

### ABSTRACT

**Introduction:** Invasive fungal infections, especially with *Candida albicans*, are a major worldwide health problem. This opportunistic fungus can be pathogenic in immune suppression states or broad-spectrum drug use. It causes both localised and systemic infections. Moreover, *C. albicans* biofilm formation enhances drug resistance and causes recurrent infections.

**Materials & Methods:** In this experimental study we compared the adhesion and biofilm formation of *C. albicans* isolates in Sabouraud Dextrose Broth (SDB) and RPMI-1640 media. Yeast suspensions of standardised concentration were inoculated in flat-bottom 96-well microplates and incubated for 48 h. Biofilm formation was assessed using crystal violet staining and optical density measurements. Data were analyzed using the non-parametric Mann-Whitney test.

**Results:** Biofilm formation was significantly higher in RPMI-1640 compared to SDB, whereas planktonic growth was more pronounced in SDB.

**Conclusion:** Our results showed that RPMI-1640 medium with complex nutrients and low glucose concentration was optimal for biofilm formation, whereas SDB with high glucose concentration was better for planktonic growth. The findings underscore the importance of choosing an appropriate culture medium for biofilm studies and could have implications for optimisation of standard treatments against *C. albicans* infections.

**Keywords:** *Candida albicans*, biofilm, culture medium, drug resistance, RPMI-1640

**Cite this paper:** Aboualigalehdari E, Mohammadi S, Erfaninejad M, Pourmotahari F, Fatahinia M. The Role of Culture Medium Composition in Regulating Biofilm Formation and Growth of *Candida Albicans* Cells. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2026;34(3):95-106.

### Introduction

Invasive fungal infections are a major cause of morbidity and mortality worldwide, especially in immunocompromised individuals, and continue to represent a substantial burden on healthcare systems despite advances in antifungal therapy (1). *Candida albicans* is considered the most common etiologic agent of both superficial and invasive candidiasis among the opportunistic fungal pathogens, due to its ability to colonise mucosal surfaces and to rapidly

adapt to host environment changes (2). *C. albicans* is a normal component of the microbiota of the oral cavity, the gastrointestinal tract and the female genital tract. However, disruption of host immune defences, prolonged use of broad-spectrum antibiotics, corticosteroid therapy or other predisposing conditions can promote the shift from a harmless commensal organism to an invasive pathogen that causes localised or disseminated infections involving multiple organs (2).

The remarkable ability of *C. albicans* to form



© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

biofilms on host tissues and medical devices has made the clinical management of candidiasis more difficult (3). Biofilms are highly structured microbial communities that are embedded in an extracellular polymeric matrix that protects fungal cells against antifungal agents, immune responses from the host and environmental stress. Biofilm-associated infections are therefore often persistent, recurrent and difficult to eradicate, often leading to treatment failure and increased health care costs (4). The choice of a suitable culture medium is an important methodological issue in laboratory studies aiming to assess biofilm formation and antifungal susceptibility, as environmental conditions have a great impact on biofilm development (5). Therefore, the present study aimed to compare the biofilm formation of *Candida albicans* isolates in Sabouraud Dextrose Broth (SDB) and RPMI-1640 culture media and to determine the effect of culture medium composition on biofilm formation and planktonic growth under in vitro conditions.

## Methods

This experimental in vitro study was performed in the Mycology Laboratory of the Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences. A total of 101 previously identified *Candida albicans* isolates, recovered from oral specimens of patients living with HIV and individuals undergoing chemotherapy, were included in the study. Species identification had been confirmed using conventional morphological methods and molecular analysis by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The reference strain *Candida albicans* ATCC 10231 was used as the quality control strain throughout the experiments.

Yeast suspensions were prepared at a final concentration of  $1 \times 10^6$  CFU/mL in RPMI-1640 after 24-h initial culture in Sabouraud Dextrose Broth (SDB) at 30°C. The ability to form biofilm was analysed in sterile flat-bottom 96-well microplates. Each well was seeded with 200 µL of the standardised suspension and incubated at 37°C for 48 hours. After incubation, the wells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) to gently remove the non-adherent cells. The adherent biofilms were stained with 0.1% crystal violet for 15 min and the bound dye was solubilised in 96% ethanol. Biofilm biomass was measured by optical density (OD) at 595 nm using a microplate reader.

Statistical analysis was performed with SPSS version 26. The formation of biofilm was compared between two culture media using the Mann–Whitney U test and a P value of less than 0.05 was

considered statistically significant.

## Results

Among the 101 *C. albicans* isolates, moderate biofilm formation was the most prevalent category in both culture media, representing 51.0% of isolates in RPMI-1640 and 50.0% in SDB. Weak biofilm formation was observed in 24.5% and 26.5% of isolates cultured in RPMI-1640 and SDB, respectively, and strong biofilm formation was observed in 24.5% and 23.5% of isolates, respectively. Comparison of the categories of biofilm formation showed no statistical difference between the two media ( $P = 0.965$ ).

However, the quantitative analysis showed that the biofilm formation was significantly higher in RPMI-1640 than in SDB. In RPMI-1640 the median (IQR) optical density was 2.50 (1.40-79.02) and in SDB it was 0.30 (0.00-21.48). A statistically significant difference was found by Mann–Whitney U test ( $P < 0.05$ ). Box plot analysis also showed higher optical density values in isolates grown in RPMI-1640 than in SDB. These results suggest that *C. albicans* isolates formed more biofilm in RPMI-1640 under the experimental conditions used in this study.

## Conclusion

The results of the present study demonstrated that the composition of the culture medium influenced the degree of biofilm formation by *C. albicans* in vitro. The distribution of the categories of qualitative biofilm formation was not significantly different between RPMI-1640 and SDB, but the quantitative analysis revealed significantly more biofilm production in RPMI-1640. These findings indicate that the type of culture medium may affect the quantified biofilm formation and thus should be considered when designing experimental studies and when comparing results among different studies. Improved reproducibility and comparability of biofilm research may also be achieved through standardised culture conditions. Future studies are suggested to evaluate biofilm formation in a larger number of clinical isolates, include other clinically important *Candida* species and investigate the molecular mechanisms involved in biofilm development under different culture conditions.

## Authors' Contribution

Conceptualization, Methodology, Validation: ABG, ME, MF, Formal Analysis, Investigation: ABG, MF, SM, FP, Resources, Software, Data Curation: ABG, Writing–Original Draft Preparation, Writing–Review & Editing, Visualization,

Supervision, Project Administration: ABG, ME, SM.

### **Ethical Statement**

This study was approved by the Ethics Committee of Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran (IR.AJUMS.REC.1404.309). The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and scientific misconduct.

### **Conflicts of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

### **Funding**

This study was supported by the Vice Chancellor for Research and Technology of Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences under approved research project No. OG-0408.

### **Acknowledgment**

The authors would like to thank the Department of Medical Mycology, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, for providing the laboratory facilities and technical support that made this study possible.

## نقش ترکیب محیط کشت در تنظیم بیوفیلم سازی و رشد سلول های کاندیدا آلبیکنس

الهام ابوعلی گله داری<sup>۱</sup>، سمیه محمدی<sup>۲</sup>، مریم عرفانی نژاد<sup>۳</sup>، فاطمه پورمطهری<sup>۴</sup>، مهناز فتاحی نیا<sup>۵\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

<sup>۲</sup> کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

<sup>۳</sup> گروه علوم پایه پزشکی، دانشکده علوم پزشکی شوشتر، شوشتر، ایران

<sup>۴</sup> گروه پزشکی اجتماعی و بهداشت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول، دزفول، ایران

<sup>۵</sup> گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

<sup>۶</sup> مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

#### نوع مقاله: پژوهشی

**مقدمه:** عفونت های قارچی مهاجم به ویژه ناشی از *کاندیدا آلبیکنس*، یکی از چالش های مهم سلامت جهانی هستند. این قارچ فرصت طلب در شرایط ضعف ایمنی یا مصرف داروهای گسترده می تواند به عامل بیماری زا تبدیل شود و عفونت های موضعی و سیستمیک ایجاد کند و همچنین توانایی *کاندیدا آلبیکنس* در تشکیل بیوفیلم، مقاومت دارویی و عود مکرر عفونت ها را افزایش می دهد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۲۴

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۵/۰۲/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۰۹

تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۵/۰۵

**مواد و روش ها:** در مطالعه تجربی حاضر، چسبندگی و تشکیل بیوفیلم ایزوله های *کاندیدا آلبیکنس* در دو محیط کشت سابرو دکستروز براث (SDB) و RPMI-1640 مقایسه گردید. سوسپانسیون مخمری با غلظت مشخص در میکروپلیت ۹۶ خانه تصاف قرار داده شد و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، بیوفیلم ها با روش رنگ آمیزی کریستال ویوله و اندازه گیری جذب نوری ارزیابی گردید. تحلیل داده ها با آزمون من-ویتنی انجام شد.

#### نویسنده مسئول:

مهناز فتاحی نیا

**یافته های پژوهش:** میزان تشکیل بیوفیلم در محیط RPMI-1640 به طور معناداری بالاتر از محیط SDB بود، در حالی که رشد پلاتکتونیک در SDB بیشتر مشاهده شد.

**بحث و نتیجه گیری:** نتایج نشان داد، محیط RPMI-1640 با ترکیبات مغذی پیچیده و غلظت پایین گلوکز، شرایط بهینه ای برای شکل گیری بیوفیلم فراهم می کند، در حالی که محیط غنی از گلوکز رشد پلاتکتونیک را تقویت می سازد. این یافته ها اهمیت انتخاب محیط کشت مناسب برای مطالعات بیوفیلم و بهبود راهکارهای درمانی را تأکید می نماید.

**واژه های کلیدی:** *کاندیدا آلبیکنس*، بیوفیلم، محیط کشت، مقاومت دارویی، RPMI-1640

Email:  
fatahinia25@gmail.com

**استاد:** ابوعلی گله داری الهام، محمدی سمیه، عرفانی نژاد مریم، پورمطهری فاطمه، فتاحی نیا مهناز. نقش ترکیب محیط کشت در تنظیم بیوفیلم سازی و رشد سلول های *کاندیدا آلبیکنس*. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، مرداد ۱۴۰۵؛ ۳۴(۳): ۹۵-۱۰۶.

## مقدمه

عفونت‌های قارچی مهاجم به عنوان یک نگرانی مهم برای سلامت جهانی به شمار می‌روند (۱). کاندیدا یکی از مخمرهای فرصت طلب است که به عنوان عامل اصلی عفونت‌های قارچی در انسان شناخته می‌شود (۲). این ارگانیسم به طور طبیعی در نواحی مختلف بدن مانند دهان، دستگاه گوارش و واژن وجود دارد؛ اما در شرایطی از جمله ضعف دستگاه ایمنی، مصرف آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف یا تغییرات هورمونی می‌تواند به یک عامل بیماری‌زا تبدیل گردد (۳). این ویژگی به کاندیدا اجازه می‌دهد تا بیماری‌هایی با تظاهرات بالینی متنوع ایجاد کند (۴) و حتی به عفونت‌های سیستمیک منجر شود که اندام‌هایی مانند خون، قلب، مغز، ریه‌ها و استخوان‌ها را درگیر می‌کند. این عفونت‌ها در موارد شدید می‌توانند تهدیدکننده زندگی باشند (۵). کاندیدایازیس به عنوان یک چالش سلامت عمومی، الگوی شیوع جغرافیایی متمایزی دارد. در ایران، مطالعات مختلف شیوع ۲۰-۳۰ درصد عفونت کاندیدایازیس ولوواژینال را در زنان بالغ گزارش کرده‌اند که در گروه‌های پرخطر مانند افراد مبتلا به دیابت، بیماران تحت درمان‌های طولانی مدت آنتی‌بیوتیکی یا کورتیکواستروئیدی به طور معناداری بیشتر است (۶، ۷).

بیش از ۲۰ گونه کاندیدا می‌توانند باعث ایجاد بیماری کاندیدایازیس شوند که در این میان، *C. albicans* شایع‌ترین آن‌ها است (۸، ۹). به طور کلی، درمان عفونت‌های کاندیدا معمولاً با داروهای ضدقارچ مانند Clotrimazole، Nystatin و Fluconazole است و برای عفونت‌های سیستمیک، درمان با داروهای خوراکی یا داخل وریدی مانند کاسپوفونگین و آمفوتریسین B ضروری است (۱۰)؛ اما یکی از ویژگی‌های مهم و کلیدی کاندیدا آلیکنس، توانایی آن‌ها در تشکیل بیوفیلیم است. بیوفیلیم‌ها تجمعی از ارگانیسم‌ها هستند که به سطوح مختلف از جمله غشاهای مخاطی و سطوح پزشکی و ایمپلنت‌ها می‌چسبند. بیوفیلیم‌ها با تشکیل ماتریکس خارج سلولی، پناهگاهی امن برای ارگانیسم‌ها ایجاد می‌کنند که مقاومت به دارو و گریز از دستگاه ایمنی را تسهیل می‌نمایند (۱۱-۱۴). این ساختارها

نه تنها درمان‌های رایج ضدقارچی را بی‌اثر می‌سازند، بلکه با عود مکرر عفونت و ایجاد مقاومت‌های دارویی، چالش‌های مدیریت بالینی را تشدید می‌کنند (۱۵)؛ زیرا این عفونت‌ها علی‌رغم درمان‌های آنتی‌بیوتیکی و سازوکارهای دفاعی طبیعی بیمار ادامه می‌یابند و معمولاً با آسیب‌شناسی مداوم و پیشرفته مشخص می‌شوند که عمدتاً ناشی از پاسخ التهابی اطراف بیوفیلیم است (۱۶). چالش درمان عفونت‌های کاندیدایی مقاوم در بیمارستان‌ها، نیاز به توسعه مدل‌های آزمایشگاهی دقیق‌تر را برجسته می‌سازد (۱۷). این مطالعه تشکیل بیوفیلیم کاندیدا آلیکنس را در دو محیط کشت سابرو دکستروز براث (محیط اسیدی و غنی از دکستروز) و RPMI 1640 (شبه‌ساز شرایط فیزیولوژیک بدن انسان) مقایسه می‌کند تا نتایج قابل تعمیم به عفونت‌های واقعی در بدن انسان باشند (۱۸). محیط SDB با تأمین انرژی سریع از طریق دکستروز، رشد سریع قارچ را تقلید می‌کند (۱۹)، در حالی که محیط RPMI 1640 با حفظ pH خنثی و ترکیبات مشابه مایعات بدن، تعاملات میزبان-قارچ و پاسخ به دارو را دقیق‌تر منعکس می‌نماید (۲۱، ۲۰). انجام این مطالعه به علت نقش مهم گونه‌های کاندیدا در عفونت‌های شایع انسانی و تأثیر مستقیم بیوفیلیم در افزایش مقاومت دارویی ضرورت دارد. بررسی تأثیر محیط‌های کشت مختلف بر تشکیل بیوفیلیم، به درک دقیق‌تر رفتار این قارچ‌ها در شرایط آزمایشگاهی کمک می‌کند. این آگاهی می‌تواند زمینه‌ساز تفسیر صحیح نتایج آزمایشگاهی و بهبود طراحی مطالعات مرتبط با درمان عفونت‌های کاندیدیایی باشد.

## مواد و روش‌ها

نوع مطالعه و ایزوله‌های بررسی شده: این مطالعه به صورت تجربی آزمایشگاهی (in vitro) با کد اخلاق IR.AJUMS.REC.1404.309 انجام شد.

در این مطالعه، ۱۰۱ ایزوله کاندیدا آلیکنس موجود در گروه قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز استفاده گردید. این ایزوله‌ها پیش‌تر از نمونه‌های دهانی بیماران مبتلا به HIV و بیماران تحت شیمی‌درمانی جداسازی شده و هویت آن‌ها با بهره‌گیری از

روش‌های استاندارد مورفولوژیکی و مولکولی، شامل کشت روی محیط کروم آگار، بررسی ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی و تعیین هویت مولکولی به روش PCR-RFLP بر اساس دستورالعمل‌های استاندارد مرجع و با استفاده از سویه استاندارد *Candida albicans* ATCC 10231، به عنوان کنترل مثبت تأیید شده بود.

آماده‌سازی سوسپانسیون مخمری: برای تهیه سوسپانسیون مخمری، ایزوله‌های *کاندیدا آلیکنس* ابتدا در محیط سابرو دکستروز براث کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت، در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. پس از رشد، سلول‌ها دو بار با بفر فسفات سالین (PBS) استریل شستشو داده شدند؛ سپس سوسپانسیون مخمری با غلظت نهایی ۱۰۶ CFU/mL با استفاده از محیط RPMI-1640 تهیه گردید.

آماده‌سازی محیط‌های کشت: محیط RPMI-1640 با حل کردن ۱۰/۴ گرم پودر RPMI و ۳۴/۵۲ گرم پودر MOPS در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل تهیه شد. pH محلول با استفاده از NaOH یک مولار روی ۷ تنظیم گردید و حجم نهایی با افزودن آب مقطر استریل به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محیط کشت پس از فیلتراسیون با فیلتر ۰/۴۵ میکرون، در شرایط استریل نگهداری گردید. محیط سابرو دکستروز براث (SDB) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده تهیه شد.

تشکیل بیوفیلم: برای ارزیابی تشکیل بیوفیلم، از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه ته‌صاف استفاده گردید. در هر چاهک، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری تهیه‌شده افزوده شد. نمونه‌ها به صورت تریپلیکیت انجام گرفتند. کنترل‌ها شامل کنترل محیط (بدون سلول)، کنترل منفی و کنترل مثبت با سویه مرجع *Candida albicans* ATCC 10231 در نظر گرفته شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند تا تشکیل کامل بیوفیلم صورت گیرد. پس از پایان انکوباسیون، محیط کشت هر چاهک تخلیه شد و چاهک‌ها سه بار با PBS استریل شستشو داده شدند تا سلول‌های غیرچسبیده حذف گردند.

رنگ‌آمیزی کریستال ویوله و اندازه‌گیری جذب نوری: بیوفیلم‌های تشکیل‌شده با استفاده از محلول کریستال ویوله ۰/۱ درصد، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق رنگ‌آمیزی شدند؛ سپس رنگ اضافی خارج گردید و چاهک‌ها مجدداً با PBS شستشو داده شدند. پس از خشک شدن میکروپلیت‌ها در دمای اتاق، برای حل کردن رنگ متصل شده به بیوفیلم، ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد به هر چاهک افزوده گردید. جذب نوری محلول حاصل در طول موج ۵۹۵ نانومتر، با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شد.

طبقه‌بندی توانایی تشکیل بیوفیلم: برای تعیین حد آستانه تشکیل بیوفیلم (ODc)، ابتدا میانگین جذب نوری کنترل منفی محاسبه گردید و سپس سه برابر انحراف معیار آن به این مقدار افزوده شد. بر اساس مقدار ODc، ایزوله‌ها از نظر توانایی تشکیل بیوفیلم به چهار گروه تقسیم گردیدند: ۱. مخمرهایی که بیوفیلم تشکیل نمی‌دهند. جذب نوری این دسته کمتر یا مساوی ODc است؛ ۲. مخمرهایی که بیوفیلم ضعیف تولید می‌کنند. جذب نوری این دسته بزرگ‌تر از ODc و کمتر یا مساوی دو برابر آن است؛ ۳. مخمرهایی که بیوفیلم متوسط تولید می‌کنند. جذب نوری این دسته بزرگ‌تر از دو برابر ODc و کمتر یا مساوی چهار برابر آن است؛ ۴. مخمرهایی که بیوفیلم قوی تشکیل می‌دهند. جذب نوری این دسته بزرگ‌تر از چهار برابر ODc است. میزان چسبندگی، شدت و مقدار بیوفیلم برای هر محیط کشت ثبت شد.

تحلیل آماری: داده‌ها با استفاده از شاخص میانه و فاصله بین چارک‌ها (IQR) توصیف گردیدند. طبیعی بودن توزیع داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. با توجه به نرمال نبودن داده‌ها، مقایسه میزان تشکیل بیوفیلم بین دو محیط کشت SDB و RPMI-1640 با استفاده از آزمون ناپارامتریک من-ویتنی انجام گردید. همه تحلیل‌های آماری با نرم‌افزار SPSS vol.26 صورت گرفت و سطح معنی‌داری  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد. نمودار جعبه‌ای با استفاده از نرم‌افزار R vol.4.2.2 ترسیم گردید.

### یافته‌های پژوهش

در این مطالعه، توانایی تشکیل بیوفیلم ۱۰۱ ایزوله

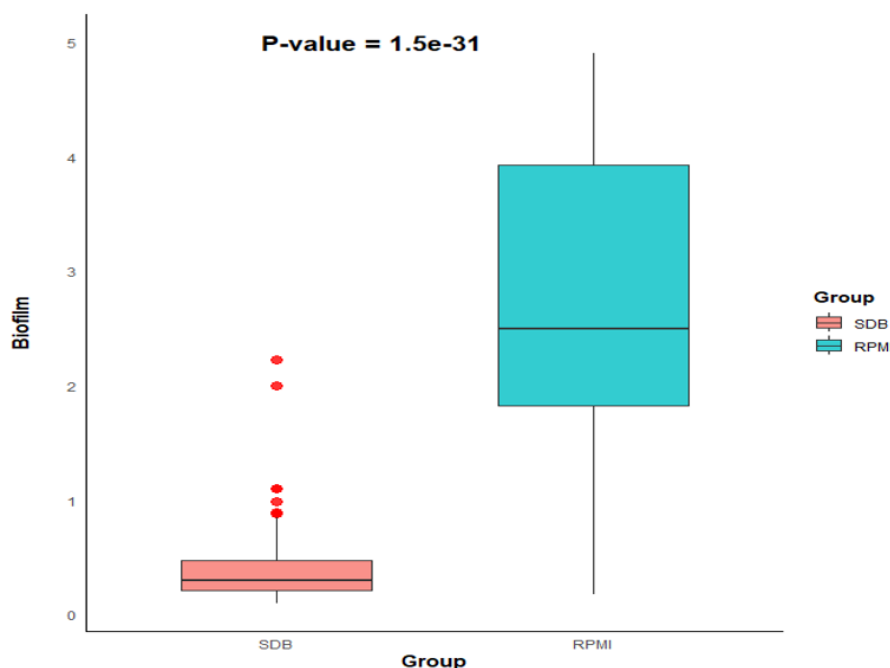
RPMI-1640 برابر با ۲/۵۰ (۷۹/۰۲-۱/۴) و در محیط SDB برابر با ۰/۳ (۲۱/۴۸-۰/۰) بود.

مقایسه آماری داده‌ها با استفاده از آزمون ناپارامتریک من-ویتنی نشان داد که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ). بررسی توزیع داده‌های جذب نوری نشان داد، پراکندگی مقادیر بیوفیلم در محیط RPMI-1640 بیشتر از محیط SDB است. نمودار جعبه‌ای (شماره ۱) اختلاف واضح میان دو محیط کشت را از نظر میزان تشکیل بیوفیلم نشان می‌دهد، به‌طوری‌که مقادیر بالاتر جذب نوری عمدتاً در محیط RPMI-1640 مشاهده شدند. به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد، ایزوله‌های *کاندیدا آلیکنس* در شرایط آزمایشگاهی، در محیط RPMI-1640 تمایل بیشتری به تشکیل بیوفیلم نسبت به محیط سابرو دکستروز براث دارند.

*کاندیدا آلیکنس* در دو محیط کشت سابرو دکستروز براث (SDB) و RPMI-1640 بررسی شد. بررسی توزیع طبقات شدت بیوفیلم نشان داد که بیشترین فراوانی در هر دو محیط، مربوط به گروه بیوفیلم متوسط است و الگوی توزیع در دو محیط مشابه است (جدول شماره ۱). با وجود اینکه در تحلیل کمی جذب نوری، اختلاف معنی‌داری میان RPMI و SDB مشاهده گردید، مقایسه طبقه‌بندی شدت بیوفیلم اختلاف آماری معنی‌داری نشان نداد ( $P = 0.965$ ). این موضوع نشان می‌دهد، تفاوت مشاهده‌شده بیشتر در سطح مقدار کمی (OD) بیوفیلم است و الزاماً به تغییر در طبقه‌بندی شدت تشکیل بیوفیلم (ضعیف، متوسط و قوی) منجر نشده است. نتایج اندازه‌گیری جذب نوری (OD) نشان داد، میزان تشکیل بیوفیلم در محیط RPMI-1640 به‌طور معنی‌داری بالاتر از محیط SDB است. میانه (IQR) جذب نوری بیوفیلم در محیط

جدول شماره ۱. مقایسه فراوانی طبقات شدت تشکیل بیوفیلم ایزوله‌های *کاندیدا آلیکنس* در دو محیط کشت RPMI-1640 و SDB

|              |              |                | Group |       | P-value |
|--------------|--------------|----------------|-------|-------|---------|
|              |              |                | RPMI  | SDB   |         |
| Classbiofilm | Low          | Count          | 25    | 27    | 0.965   |
|              |              | % Within Group | 24.5% | 26.5% |         |
|              | Intermediate | Count          | 52    | 51    |         |
|              |              | % Within Group | 51.0% | 50.0% |         |
|              | High         | Count          | 25    | 24    |         |
|              |              | % Within Group | 24.5% | 23.5% |         |



نمودار شماره ۱. مقایسه توزیع جذب نوری بیوفیلم ایزوله‌های *کاندیدا آلیکنس* در دو محیط کشت SDB و RPMI-1640. نقاط قرمز رنگ نشان‌دهنده مقادیر غیرطبیعی بیوفیلم هستند که به علت خطاهای آزمایشگاهی، ناهنجاری‌های آماری، یا تغییرات خاص در داده‌ها شناسایی شدند.

توزیع ایزوله‌ها بر اساس شدت تشکیل بیوفيلم (ضعیف، متوسط و قوی) در دو محیط کشت یادشده مقایسه گردید ( $P=0.965$ ).

### بحث و نتیجه گیری

کاندیدا آلیکس یک قارچ شایع است که در نواحی مختلف بدن انسان مانند دهان، حلق، دستگاه گوارش و پوست زندگی می‌کند و در حدود ۵۰ درصد از افراد سالم، بخشی از فلور طبیعی میکروبیوتای آنان را تشکیل می‌دهد. این گونه می‌تواند به عفونت‌های موضعی و سیستمیک منجر شود که در برخی موارد تهدیدکننده زندگی هستند (۴). یکی از ویژگی‌های کلیدی این قارچ، توانایی آن در تغییر شکل و تشکیل بیوفيلم‌ها است که در پاتوژنز نقش مهمی دارد (۲۲). این ویژگی به انتقال آن‌ها از حالت کامنسال به پاتوژن کمک می‌کند. به‌طور کلی، بیوفيلم‌ها به‌عنوان جوامع میکروبی سه‌بعدی، روی سطوح زنده میزبان یا وسایل پزشکی تشکیل می‌شوند و در یک ماتریکس از پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی محصور هستند که به آن‌ها ساختاری پایدار و محافظت‌کننده می‌دهد. این تغییرات همراه با تشکیل ماتریکس پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، به میکروب‌ها کمک می‌کند تا به یکدیگر بچسبند و ساختاری پایدار ایجاد نمایند؛ همچنین ماتریکس به‌عنوان یک محافظ عمل می‌کند و از میکروارگانیسم‌ها در برابر دستگاه ایمنی بدن یا داروها محافظت می‌نماید که در نهایت، به بقا و بیماری‌هایی آن‌ها کمک می‌کند و محیطی ایمن برای بقای خود ایجاد نمایند. تأثیرات این بیوفيلم‌ها بر سلامت عمومی قابل توجه است؛ زیرا سلول‌های آزادشده از آن‌ها می‌توانند به جریان خون وارد شوند و عفونت‌های سیستمیک خطرناکی ایجاد کنند که نرخ مرگ‌ومیر بالایی دارند (۱۵، ۲). در این مطالعه، تأثیر دو نوع محیط کشت معمولی بر رشد پلانکتونیک، چسبندگی و تشکیل بیوفيلم و شدت تشکیل بیوفيلم بررسی شد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تفاوت معنی‌داری در شدت تشکیل بیوفيلم ایزوله‌های کاندیدا آلیکس، میان محیط‌های کشت RPMI-1640 و SDB وجود ندارد ( $P=0.965$ ). این موضوع نشان می‌دهد، در شرایط آزمایش

حاضر، تغییر ترکیب پایه محیط کشت تأثیر چشمگیری بر توزیع طبقات شدت بیوفيلم سازی نداشته است. توانایی تشکیل بیوفيلم در کاندیدا آلیکس عمدتاً یک ویژگی وابسته به تنظیمات پیچیده ژنتیکی، مسیرهای سیگنالینگ سلولی و بیان ژن‌های مرتبط با ماتریکس خارج سلولی است و ممکن است نسبت به تغییرات محدود در ترکیب محیط رشد، پایداری نسبی داشته باشد؛ به‌عنوان مثال، مطالعه راماجه و همکاران نشان داد که کاندیدا آلیکس می‌تواند در محیط RPMI نیز، بیوفيلم ساختاری منسجمی ایجاد کند؛ اما شدت و معماری بیوفيلم بیشتر تحت تأثیر عامل‌های فیزیکی سویه قرار دارد (۲۳). به‌طور کلی، یافته‌های مطالعه حاضر با این دیدگاه همسو است که شرایط تغذیه‌ای محیط می‌تواند بر شروع و رشد بیوفيلم اثرگذار باشد؛ اما اختلافات جزئی در ترکیب محیط کشت الزاماً به تغییر معنی‌دار در شدت بیوفيلم‌سازی منجر نمی‌شود.

نتایج نشان داد، رشد پلانکتونیک در محیط SDB بیشتر از محیط RPMI بود. محیط سابرو دکستروز براث حاوی غلظت بالاتری از گلوکز است که به‌عنوان منبع کربن اصلی برای متابولیسم قارچی عمل می‌کند؛ به‌بیان‌دیگر، در محیط‌های غنی از گلوکز مانند سابرو دکستروز براث، سلول‌ها انرژی کافی برای تقسیم سریع دارند و کمتر به سوی راهبردهای بقای جمعی (بیوفيلم) حرکت می‌کنند. در مقابل، RPMI 1640 تنها حاوی ۲ گرم گلوکز در لیتر است. محدودیت گلوکز ممکن است سلول‌ها را به سوی استفاده از مسیرهای متابولیک جایگزین (مانند اکسیداسیون اسیدهای چرب) سوق دهد که انرژی کمتری تولید می‌کند و رشد پلانکتونیک را کاهش می‌دهد. این موضوع ممکن است باعث شود که سلول‌ها برای بقا و رشد خود، به تشکیل بیوفيلم نیاز بیشتری داشته باشند؛ همچنین محیط کشت RPMI 1640 با داشتن ترکیباتی مانند فسفات، گلوکاتیون، ویتامین‌های گروه B (نظیر B12 و بیوتین) و اسیدهای آمینه خاص (مانند گلوتامیک اسید و آل-آرژنین)، ممکن است، سیگنال‌دهی سلولی مرتبط با تشکیل بیوفيلم را تقویت کند. در مقابل، محیط سابرو دکستروز براث بدون این ترکیبات پیچیده است

بیوفیلم‌های ASM و RPMI مشاهده شد (۲۶)؛ بنابراین، محیط کشت نقش مهمی در مورفولوژی و رشد بیوفیلم کاندیدا دارد (۲۷). در پژوهش دیگری که تان و همکاران در سال ۲۰۱۶، در استرالیا انجام دادند، تأثیر شرایط کشت بر تشکیل بیوفیلم کاندیداهای غیر آلیکس شامل کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا کروزو و کاندیدا پاراپسیلوزیس بررسی گردید. این مطالعه نشان داد، شرایط کشت از جمله نوع محیط RPMI 1640، محیط عصاره مخمر-پیتون-دکستروز (YPD) و محیط آگار عصاره مغز و قلب (BHI) و متغیرهایی مانند غلظت تلقیح و مدت انکوباسیون، تأثیر چشمگیری بر تشکیل بیوفیلم دارد. به‌طور خاص، محیط‌های YPD و BHI به تولید بیوفیلم‌های قوی‌تر با فعالیت متابولیکی بالاتر منجر شدند؛ همچنین استفاده از تلقیح بزرگ‌تر و دوره انکوبه طولانی‌تر، به افزایش تشکیل بیوفیلم کمک کرد. این یافته‌ها بر اهمیت نظر گرفتن عوامل محیطی در مطالعات بیوفیلم‌های کاندیدای غیر آلیکس تأکید می‌کند (۲۸).

تحقیق دربارهٔ بیوفیلم کاندیدا آلیکس و تأثیر محیط‌های کشت مختلف مانند ساپرویدکستروز براث و RPMI 1640، اهمیت بالایی در میکروبیولوژی و پزشکی دارد. با توجه به افزایش عفونت‌های ناشی از این قارچ، بررسی شرایط محیطی مؤثر بر رشد آن می‌تواند به شناسایی بهترین محیط کشت برای تشکیل بیوفیلم کمک کند و در نتیجه، به توسعهٔ درمان‌های مؤثرتر منجر شود. بیوفیلم‌ها معمولاً نسبت به داروها مقاوم‌تر هستند و درک بهتر از شرایط تشکیل آن‌ها می‌تواند به شناسایی سازوکارهای مقاومت دارویی یاری رساند. این اطلاعات به پزشکان و محققان کمک می‌کند تا روش‌های درمانی بهتری را انتخاب کنند؛ همچنین نتایج این تحقیقات می‌تواند دستورالعمل‌های آزمایشگاهی را برای مطالعهٔ بیوفیلم‌ها و ارزیابی آثار ضدقارچی بهبود بخشند. کاندیدا آلیکس به‌عنوان یکی از عوامل رایج عفونت‌های بیمارستانی شناخته می‌شود و تحقیقات در این حوزه می‌تواند به پیشگیری از این عفونت‌ها و کاهش مرگ‌ومیر مرتبط کمک کند. با توجه به اینکه هر محیط کشت می‌تواند تأثیرات متفاوتی بر رشد میکروارگانیسم‌ها داشته باشد، بررسی این

و به‌عنوان یک محیط حداقلی، فشار کمتری برای تغییر فاز میکروارگانیسم‌ها به حالت بیوفیلم ایجاد می‌نماید. از سوی دیگر، تفاوت در دستگاه بافری و pH این دو محیط نیز نقش کلیدی ایفا می‌کند، به‌طوری که RPMI 1640 با pH قلیایی (۷/۷-۲/۴) و استفاده از بافر بی‌کربنات، در مقایسه با ساپرویدکستروز براث که pH اسیدی‌تر (۵/۶) دارد، می‌تواند بر فعالیت آنزیم‌های متابولیک گلوکز و بیان فاکتورهای حدت تأثیرگذار باشد؛ بنابراین، بیوفیلم در RPMI 1640 بیشتر تشکیل می‌شود؛ زیرا این محیط شرایط بهتری برای چسبیدن و تشکیل ساختارهای پیچیده دارد (۲۴).

در تحقیقی که ویراسیکرا و همکاران انجام دادند، تأثیر انواع محیط‌های کشت بر رشد، چسبندگی و تشکیل کاندیدا آلیکس و کاندیدا تروپیکالیس بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد، محیط کشت RPMI 1640 به علت شباهت بیشتر به شرایط فیزیولوژیک بدن انسان، به تشکیل بیوفیلم قوی‌تر و چسبندگی بیشتری نسبت به محیط‌های ساپرویدکستروز براث و محیط پایهٔ نیتروژن مخمر منجر می‌شود. این یافته‌ها تأکید می‌کند که انتخاب نوع محیط کشت می‌تواند تأثیر چشمگیری بر ویژگی‌های رشد و بیوفیلم قارچ‌های بیماری‌زا داشته باشد (۲۰)؛ همچنین ویژگی‌های تغذیه‌ای و فیزیولوژیک محیط RPMI می‌تواند موجب تقویت بیان عامل‌های مرتبط با چسبندگی و بیوفیلم سازی شود (۲۵).

همچنین مطالعهٔ دیگری که ارزمی و همکاران در همان سال، در استرالیا انجام دادند، به بررسی اثر تعاملات چندمیکروبی میان کاندیدا آلیکس، اکتینومایسس و استرپتوکوکوس موتانس بر تشکیل بیوفیلم پرداخته است. در این تحقیق، برای بررسی بیوفیلم‌های هر گونه به‌صورت جداگانه، از محیط بزاق مصنوعی (ASM) و RPMI-1640 استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد، بیوفیلم‌های رشدیافته در محیط RPMI نسبت به محیط ASM، زیست‌تودهٔ بالاتری داشتند. علاوه بر این، بیوفیلم‌های ایجادشده در محیط RPMI-1640 فعالیت متابولیک بالاتری نشان دادند، درحالی که بیوفیلم‌های رشدیافته در ASM بدون فعالیت متابولیک قابل توجه بودند. تفاوت معنی‌داری در فعالیت متابولیک میان

تأثیرات برای انتخاب بهترین شرایط مطالعه بیوفیلم‌ها ضروری است. در نهایت، این تحقیقات نه تنها به پیشرفت علم میکروبیولوژی کمک می‌کند، بلکه تأثیرات عملی مهمی در درمان عفونت‌ها دارد و می‌تواند به افزایش دانش ما درباره رفتار کاندیدا آلبیکنس منجر شود.

با وجود نتایج، این مطالعه با محدودیت‌هایی همراه بود که می‌تواند بر تفسیر یافته‌ها اثر بگذارد. تعداد ایزوله‌ها محدود بود و نتایج بر اساس شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی تفسیر می‌گردند؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود، در پژوهش‌های آینده با افزایش تعداد نمونه‌ها و بررسی گسترده‌تر گونه‌های کاندیدا، نقش محیط‌های کشت در تشکیل بیوفیلم با دقت بیشتری بررسی گردد.

در این مطالعه، تشکیل بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس در دو محیط کشت سابرو دکستروز براث و RPMI-1640 مقایسه شد. نتایج نشان داد که محیط RPMI-1640 به علت داشتن ترکیبات مغذی پیچیده‌تر و غلظت پایین‌تر گلوکز، شرایط مناسب‌تری برای تحریک بیان ژن‌های مرتبط با چسبندگی و تشکیل بیوفیلم فراهم می‌کند، درحالی‌که محیط SDB با غلظت بالای گلوکز بیشتر، رشد پلانکتونیک را تقویت می‌نماید. این یافته‌ها اهمیت انتخاب محیط کشت مناسب را در مطالعات بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس نشان می‌دهد و می‌تواند به بهبود راهکارهای درمانی و پژوهشی مرتبط با کنترل عفونت‌های ناشی از این پاتوژن کمک کند.

### سپاس‌گزاری

نویسندگان از گروه قارچ شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز به دلیل فراهم کردن امکانات آزمایشگاهی و ارائه حمایت‌های فنی لازم برای انجام این پژوهش صمیمانه قدردانی می‌کنند.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که در ارتباط با این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

### کد اخلاق

این پژوهش با تأیید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز و با کد اخلاق

IR.AJUMS.REC.1404.309 انجام شد. در تمامی مراحل پژوهش، اصول اخلاق در پژوهش رعایت شد و نویسندگان از هرگونه جعل داده، دستکاری یا تحریف داده‌ها، سرقت علمی و سایر مصادیق سوءرفتار پژوهشی اجتناب کردند.

### حمایت مالی

این پژوهش با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز و در قالب طرح پژوهشی مصوب به شماره OG-0408 انجام شد.

### مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی: الهام ابوعلی گله‌داری، مریم عرفانی‌نژاد و مهناز فتاحی‌نیا

روش‌شناسی: الهام ابوعلی گله‌داری، مریم عرفانی‌نژاد، مهناز فتاحی‌نیا و سمیه محمدی

اعتبارسنجی: ندارد

تجزیه و تحلیل داده‌ها: فاطمه پورمطهری

تحقیق: الهام ابوعلی گله‌داری، مریم عرفانی‌نژاد و

مهناز فتاحی‌نیا

نرم‌افزار: ندارد

منابع: الهام ابوعلی گله‌داری و مریم عرفانی‌نژاد

گردآوری و مدیریت داده‌ها: ندارد

نگارش پیش‌نویس اولیه: الهام ابوعلی گله‌داری، مریم

عرفانی‌نژاد و سمیه محمدی

بازنگری و ویرایش متن: الهام ابوعلی گله‌داری و

مریم عرفانی‌نژاد

مصورسازی: ندارد

نظارت: سمیه محمدی

مدیریت پروژه: الهام ابوعلی گله‌داری.

## References

- Gaffar NR, Valand N, Girija UV. Candidiasis: Insights into Virulence Factors, Complement Evasion and Antifungal Drug Resistance. *Microorganisms*. 2025;13:272. doi: 10.3390/microorganisms13020272.
- Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog Dis*. 2016;74:ftw018. doi: 10.1093/femspd/ftw018.
- Parambath S, Dao A, Kim HY, Zawahir S, Alastruey Izquierdo A, Tacconelli E, et al. *Candida albicans*—A systematic review to inform the World Health Organization Fungal Priority Pathogens List. *Med Mycol*. 2024;62:myae045. doi: 10.1093/mmy/myae074.
- Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, et al. *Candida albicans*—the virulence factors and clinical manifestations of infection. *J Fungi*. 2021;7:79. doi: 10.3390/jof7020079.
- Abdullah AT, Al-Hawash AB, Dhari FM. Evaluation of The Effect of Aqueous Garlic Extract Against *Candida Albicans* and *Candida Krusei* Isolated From The Vagina. *IJHSM*. 2025;2:10.21070/ijhsm. doi: 10.21070/ijhsm.v2i1.80.
- Pristov K, Ghannoum M. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25:792-8. doi: 10.1016/j.cmi.2019.03.028.
- Erfaninejad M, Zarei Mahmoudabadi A, Maraghi E, Hashemzadeh M, Fatahinia M. Epidemiology, prevalence, and associated factors of oral candidiasis in HIV patients from southwest Iran in post-highly active antiretroviral therapy era. *Front Microbiol*. 2022;13:983348. doi: 10.3389/fmicb.2022.983348.
- Maryoush SS, Ajah HA, Abdulrazaq RA. Detection of Some Virulence Factors from *Candida* spp. Isolated from Vaginal and Oral Candidiasis in Iraqi Patients. *Clin Lab*. 2025;71 doi: 10.7754/Clin.Lab.2024.240304.
- Sachivkina N, Podoprigha I, Bokov D. Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida glabrata* biofilms, and response to farnesol. *Vet World*. 2021;14:1608. doi: 10.14202/vetworld.2021.1608-1614.
- Rafiq NB. Candidiasis. *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2023.
- Kumar A, Yadav B, Roy A, Mishra P, Poluri KM, Gupta P. Biochemical Insights into synergistic *Candida* Biofilm disintegrating ability of p-cymene inclusion complex and miconazole. *Eur J Pharmacol*. 2025;177365. doi: 10.1016/j.ejphar.2025.177365.
- Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect*. 2016;18:310-21. doi: 10.1016/j.micinf.2016.01.002.
- Xia C, Liu R, Zhang S, Shen J, Wang Z. Fluconazole-induced changes in azole resistance and biofilm production in *Candida glabrata* in vitro. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2025;111:116683. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2025.116683.
- Zarnowski R, Horton MV, Johnson CJ, Vang PC, Uram J, Fernando LDP, et al. Dual function of *Candida auris* mannosyltransferase, MTN5, in biofilm community protection from antifungal therapy and the host. *mBio*. 2025:e00346-25. doi: 10.1128/mbio.00346-25.
- Ponde NO, Lortal L, Ramage G, Naglik JR, Richardson JP. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. *Crit Rev Microbiol*. 2021;47:91-111. doi: 10.1080/1040841X.2020.1843400.
- Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi G, Coenye T, Donelli G, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:S1-S25. doi: 10.1016/j.cmi.2014.10.024.
- Dhasarathan P, AlSalhi MS, Devanesan S, Subbiah J, Ranjitsingh A, Binsalah M, et al. Drug resistance in *Candida albicans* isolates and related changes in the structural domain of Mdr1 protein. *J Infect Public Health*. 2021;14:1848-53. doi: 10.1016/j.jiph.2021.11.002.
- Sardi J, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida A, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013;62:10-24. doi: 10.1099/jmm.0.045054-0.
- Ding X, Liu Z, Su J, Yan D. Human serum inhibits adhesion and biofilm formation in *Candida albicans*. *BMC Microbiol*. 2014;14:1-9. doi: 10.1186/1471-2180-14-80.
- Weerasekera MM, Wijesinghe GK, Jayarathna TA, Gunasekara CP, Fernando N, Kottegoda N, et al. Culture media profoundly affect *Candida albicans* and *Candida tropicalis* growth, adhesion and biofilm development. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111:697-702. doi: 10.1590/0074-02760160294.
- Costa PdS, Prado A, Bagon NP, Negri M, Svidzinski TIE. Mixed fungal biofilms: From mycobiota to devices, a new challenge on clinical practice. *Microorganisms*.

- 2022;10:1721. doi: 10.3390/microorganisms10091721.
22. Pereira R, dos Santos Fontenelle RO, De Brito E, De Moraes S. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. J Appl Microbiol. 2021;131:11-22. doi: 10.1111/jam.14949.
23. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:2475-9. doi: 10.1128/AAC.45.9.2475-2479.2001.
24. Weerasekera M. Culture media profoundly affect *Candida albicans* and *Candida tropicalis* growth, adhesion and biofilm development. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111:697-702. doi: 10.1590/0074-02760160294.
25. Abdulghani M, Zore G. Optimization of in vitro Biofilm Growth of *Candida albicans*. Indian J Microbiol. 2025;65:1361-5. doi: 10.1007/s12088-024-01220-x.
26. Arzmi MH, Alnuaimi AD, Dashper S, Cirillo N, Reynolds EC, McCullough M. Polymicrobial biofilm formation by *Candida albicans*, *Actinomyces naeslundii*, and *Streptococcus mutans* is *Candida albicans* strain and medium dependent. Med Mycol. 2016;54:856-64. doi: 10.1093/mmy/myw042.
27. Arévalo-Jaimes BV, Admella J, Blanco-Cabra N, Torrents E. Culture media influences *Candida parapsilosis* growth, susceptibility, and virulence. Front Cell Infect Microbiol. 2023; 13:1323619. doi: 10.3389/fcimb.2023.1323619.
28. Tan Y, Leonhard M, Ma S, Schneider-Stickler B. Influence of culture conditions for clinically isolated non-albicans *Candida* biofilm formation. J Microbiol Methods. 2016;130:123-8. doi: 10.1016/j.mimet.2016.09.011.