

استخدام تراكيز مختلفة لبعض المطهرات في معالجة الغلاف الحيوي (Biofilm) المتشكل من الجراثيم المعزولة من أنظمة مناهل الدواجن *In vitro*

الدكتور فهيم عبد العزيز*

الدكتورة لينة الامير**

بشرى العيسى***

(تاريخ الإيداع 21 / 2 / 2016. قبل للنشر في 9 / 5 / 2016)

□ ملخص □

هدف البحث إلى اختبار فعالية تراكيز مختلفة من بعض المطهرات في معالجة وإزالة غلاف حيوي (Biofilm) مشكل مخبرياً بوساطة الأنواع الجرثومية المعزولة من أغلفة حيوية متشكلة في أنظمة مناهل بعض مزارع الدجاج (البياض، لحم). استخدمت في الدراسة بعض المركبات المتداولة بشكل واسع في عمليات التطهير في قطاع الدواجن مثل: (مركبات رباعيات الأمونيوم QUAT، برمغنات البوتاسيوم $KMnO_4$ كلوريد البنزلكونيوم benzalkonium chloride BC)، ودرس تأثيرها على الغلاف الحيوي المتشكل مخبرياً من ثلاث أنواع جرثومية (المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus*، الإشريكية القولونية *E. coli*، العُطيفة الصائميه *Campy. jejuni*) كل على حده (غلاف حيوي وحيد النوع)، ومن الأنواع الثلاثة (غلاف حيوي متعدد الأنواع)، وفي مرحلتين (72، 168) ساعة وتم قياس النتائج بجهاز (الإليزا).

أظهرت النتائج اختلاف تأثير تراكيز المطهرات في خفض كثافة الغلاف الحيوي المتشكل خلال (72، 168) ساعة لكل العزلات المدروسة، فقد أثرت مركبات رباعيات الأمونيوم بشكل فعال في خفض كثافة الغلاف الحيوي بنوعيه (وحيد النوع، متعدد الأنواع) لكل العترات بشكل كبير وكانت أعلى تأثير بالتركيز MIC (Minimum Inhibitory Concentration) إذ كانت قراءات الكثافة الضوئية OD للخلايا المنتصفة بالحفر لمدة 72 ساعة بالدرجة 24 كالتالي: $OD_{staph} = 0.087$ و $0.037 = OD_E$ و $0.014 = OD_{cam}$ و $0.116 = OD_{mixing}$ وانخفضت الفاعلية بتناقص التراكيز إلى أن وصلت القراءات إلى أدنى قيمة لها عند التركيز $MIC_{1/8}$.

كما بيّنت النتائج أن أعلى تأثير لبرمغنات البوتاسيوم كان عند التركيز MIC فأشارت قراءات الـ OD للأغلفة الحيوية المشكّلة بالدرجة 24 لمدة 72 ساعة إلى $OD_{staph} = 0.087$ و $0.037 = OD_E$ و $0.014 = OD_{cam}$ و $0.116 = OD_{mixing}$. كما لوحظ انخفاض ضئيل بفاعليته في معالجة الأغلفة الحيوية المشكّلة بكل النوعين وبالشروط المختبرية، وقد أظهر كلوريد البنزلكونيوم تأثيراً منخفضاً في معالجة الأغلفة الحيوية بكل تراكيزه المستخدمة وكان أفضل تأثير له عند التركيز MIC إذ كانت قراءات OD (0.097، 0.051، 0.037، 0.097) للعترات (staph، E، cam، Mixing) على التوالي المشكّلة لغلاف حيوي خلال 72 ساعة بالدرجة 24م وأعطى أدنى تأثير له في انقاص كثافة الأغلفة الحيوية للعترات السابقة المشكّلة للغلاف حيوي خلال 168 ساعة بالدرجة 37م عند التركيز $MIC_{1/8}$ (0.399، 0.2880، 0.241، 0.391).
الكلمات المفتاحية: غلاف حيوي، جراثيم، مطهرات، طبق المعايرة المكروية الميكرونتير، دواجن.

* أستاذ - قسم الإنتاج الحيواني - كلية الزراعة - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

** أستاذ مساعد/رئيس قسم التقانات الحيوية الغذائية والصناعية - الهيئة العامة للتقانة الحيوية - دمشق - سورية.

*** طالبة دراسات عليا (دكتوراه) - قسم الإنتاج الحيواني - كلية الزراعة - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

The Effect of different concentrations of some Disinfectants in treatment of the biofilm formed by bacteria isolated from poultry watering systems *In Vitro*

Dr. Fahem Abdelaziz*
Dr. Lina Alamir**
Bushra ALissa***

(Received 21 / 2 / 2016. Accepted 9 / 5 / 2016)

□ ABSTRACT □

The research aimed to test the effect of different concentration of some disinfectants in the biofilm formation by some of bacteria isolated from biofilms in poultry watering systems in poultry farms (broiler flocks, laying hens). We had studied the efficacy of three of commercial disinfectants used in poultry farms, Quaternary ammonium compounds QUAT, Benzalkonium chloride (BC), Potassium Permanganate (KMnO₄) on the biofilm forming by three bacteria species, isolated (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni*) separately the (single-species biofilms), and three species together (multispecies biofilm.) of the effectiveness of different concentrations of the tested disinfectants was evaluated by using the microtiter plate assay and then the OD was measured at 630 nm using the ELISA reader. The results indicated that the tested disinfectant were different in their the efficacy in decreasing the biofilm density that formed during 3 days, 7 days for all the studied isolates. the results also showed that has QUAT affected effectively the reducing the density of biofilm by the both types (species, multi-species) for all strains, where mainly heavily the highest effect was for the MIC concentration. Our results also showed that the highest effect of KMnO₄ was at MIC concentration. It also noted that the lowest effectiveness for the removal of biofilms at both tested conditions. The BC showed a little effect in biofilm removing at each sustained concentration and had the best effect with MIC concentration and gave the slightest effect on the biofilm at MIC 1/8 concentration.

Key words: Biofilm, Bacteria, Disinfectants, Micro Titer Plate, Poultry.

*Professor, Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.

**Associate Professor in the National Commission of Biotechnology , Damascus, Syria

***Postgraduate Student, Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.

مقدمة

اعتقد أن إضافة المطهرات التقليدية إلى مياه الشرب تجعله خالياً من الأحياء الدقيقة المختلفة الضارة والمسببة للأمراض، لكن لسوء الحظ لا يتم الأمر بهذه البساطة، إذ بإمكان بعض الجراثيم اختراق العديد من أنظمة المياه، وحالما يتم ذلك يصعب عندها إزالتها والقضاء عليها، فهي تتجذب باتجاه السطوح التي يكون فيها مستوى المغذيات العضوية مرتفعاً، وبسبب صغر حجمها يحدث انجرافها وانسلاها مع المياه الجارية عبر النظام، ولتقنع ذلك تفرز مادة لزجة تثبتها على السطح وتمكنها من التقاط المغذيات المحمولة مع تيار الماء وتشكل ما يدعى بالغلاف الحيوي (Robin, Biofilm 2001) الذي يُعرف بأنه م جموعات كثيفة ومنظمة من الكائنات الحية الدقيقة المحبوسة داخل قالب من المواد البوليميرية خارج الخلية (Extracellular Polymeric Substances) أو المطرس (matrix) تنتجها تلك الجراثيم وتشجع النمو التآزري (Synergic Growth)، وتكون ملتصقة ببعضها البعض من جهة، وملتصقة إلى السطوح الحيوية والسطوح الخاملة من جهة أخرى توفر بيئة مناسبة ومواد مغذية وتؤمن حمايتها من الإجهاد البيئي (Donlan and Costerton, 2002; Simoes *et al.*, 2010) مما يسمح بنمو وتكاثر الأحياء الدقيقة بأعداد هائلة قد تصل إلى جرعات خطيرة تسبب الأمراض المعدية المختلفة لقطعان الطيور (Davey and O'Toole, 2000).

تعد المطهرات ذات قدرة على تثبيط نمو الكائنات الحية الدقيقة، وتحدث تأثيراً قاتلاً للكائنات الدقيقة التي قد تدخل في أنظمة توزيع مياه الشرب في حال المعالجة غير الكافية للماء الخام في شبكة خط أنابيب توزيع المياه وخزانات المياه، على الرغم من أن المعايير المقبولة لفاعلية المواد المطهرة تحدد من خلال الانخفاض المستمر في عدد خلايا الجراثيم القابلة للحياة ضمن الغلاف الحيوي، إلا أن التركيز المستخدم من هذه المواد مؤشر هام في استمرار فاعلية المطهرات وعامل حاسم للمساهمة في التدمير الكامل للخلايا الجرثومية المختبئة ضمن الغلاف الحيوي (Simoes *et al.*, 2009; Marin., 2009).

أثبتت العديد من الدراسات أن الخلايا الجرثومية ضمن الغلاف الحيوي الجرثومي أكثر مقاومة للمضادات الميكروبية بالمقارنة مع نظرائها من العوالق (Olson *et al.*, 2002; Walters *et al.*, 2003; Frank *et al.*, 2007; Allan *et al.*, 2011) وهذا قد يفسر فشل المطهرات في القضاء عليها ضمن الغلاف الحيوي وزيادة مقاومتها في حال استخدامها بتركيز غير كافية لمعالجته وإزالته، أو في خلق مقاومة عنيدة لدى الأحياء الدقيقة المتواجدة والنامية ضمنه (Corcoran., 2013; Araújo *et al.*, 2011; Houari., 2007).

بيّنت دراسة سابقة أن استخدام تراكيز مختلفة مع أزمنة تلامس مختلفة من أجل تقييم فعالية مركب رباعي الأمونيوم، وكلوريد الصوديوم ضد الأغلفة الحيوية المشكّلة من مجموعة من الجراثيم شملت الزائفة الزنجارية *P. aeruginos*، المكورات العنقودية *S. aureus*، الإشريكية القولونية *E. coli*، السلمونيلة التيفية *S. Typhimurium* لم تكن كافية ولم تستطع اختراق الطبقة الهلامية البوليميرية التي شكلت حماية للخلايا ضمن الغلاف الحيوي وهذا ما يفسر التلوث المتكرر Recurring Contamination للتجهيزات والمعدات (Toté *et al.*, 2010).

استخدم كلوريد بنزالكونيوم بتركيز 0.02% (الموصى به من الشركة المصنعة) فأدى إلى انخفاض قليل في عدد خلايا السلمونيلة المشكّلة للغلاف الحيوي خلال 48 ساعة (Vestby *et al.*, 2010)، كما انخفضت كفاءته في معالجة الأغلفة الحيوية بأعمار متقدمة (Zinebet *et al.*, 2014)، بينما أظهرت دراسة أخرى أن كفاءة العلاج بالمطهرات تتناقص كلما كانت الأغلفة الحيوية ناضجة وسميكة (Purkrtová *et al.*, 2011)، وقد درس

عدد من الباحثين العوامل التي تُعزز بقاء البكتيريا في أنابيب المياه المكلورة Chlorinated water ووجدوا أن الغلاف الحيوي والجراثيم المتصهفة (Encapsulated Bacteria) مع توافر شروط نمو مناسبة (وسط نمو، درجة حرارة، رطوبة) تسهم في زيادة مقاومة الجراثيم للكلورين وفسروا أن عديد السكاريد الخارجي (EPS) يعمل كحاجز فيزيائي physical barrier ومسؤول عن فشل اختراق المضادات الميكروبية (Antimicrobial) للغلاف الحيوي الجرثومي (John *et al.*, 2006). من المؤكد أن منع المعقمات والمطهرات من النفوذ عبر طبقة الغلاف الحيوي الجرثومي السميكة يحد من الفاعلية العلاجية لتلك المواد خلال عمليات التطهير والتعقيم الروتينية (Simoes) (2005).

عند تعريف الخلايا الجرثومية المختبئة ضمن غلاف حيوي ناضج (Mature Biofilm) إلى المطهرات بجرعات شبه مميتة (Sub-Lethal Doses) لمدة غير كافية من الزمن، فإن هذه الخلايا العميقة المحمية داخل مطرس (Matrix) الغلاف الحيوي قد تتكيف مع هذا الاجهاد مما يؤدي إلى خلق مقاومة لدى تلك الخلايا تجاه المطهرات المستخدمة (Monds and O'Toole, 2009).

يعد اختبار كفاءة المطهرات ودراسة آليات عملها في قتل الجراثيم ذات أهمية كبيرة، لضمان سلامة تجهيزات المناهل وترتبط بعدة عوامل تؤثر في فاعليتها منها: نوع الكائنات الدقيقة، وعددها، تركيز المواد المطهرة، زمن تماسها مع الكائنات الدقيقة، درجة الحرارة المثالية في التأثير، درجة الـ PH أو القلوية الملائمة لعمل المادة المطهرة والاتصال المباشر ما بين كامل سطح الجسم والمادة المطهرة (Jeffery *et al.*, 2008).

أهمية البحث وأهدافه:

اكتسبت الجراثيم بمرور الزمن مقاومة للمطهرات والمعقمات بمختلف أنواعها ولازالت هذه المقاومة في تزايد مستمر رغم تزايد أنواع المطهرات وشدة فاعليتها مما يشكل إحدى الصعوبات التي تواجه عمليات التطهير والتعقيم في مزارع الدواجن وغيرها ويقلل من فعالية مواد التطهير المستخدمة في المعالجة وكفاءة الإجراءات المنفذة لإزالة تامة للغلاف الحيوي الجرثومي، ولأهمية ذلك هدف البحث إلى اختبار تأثير تراكيز مختلفة من بعض المطهرات المستخدمة على نطاق واسع في مجال صناعة الدواجن في معالجة الغلاف الحيوي في المختبر، وتحديد أفضل المطهرات وتركيزها الفعال ضد الجراثيم المدروسة وفق الشروط المختبرة للحصول على نظام فعال ضد الخلايا الجرثومية المستعمرة لأنابيب المناهل باستعمال تراكيز منخفضة من المطهرات.

طرائق البحث و مواد:

مواد البحث

العزلات الجرثومية Bacterial strains

استخدمت في هذه الدراسة ثلاث عترات جرثومية مكونة من *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Campylobacter jejuni* معزولة من أغلفة حيوية متشكلة في أنابيب المناهل في عدد من مزارع الدواجن صنفت في دراسة سابقة (العيسى وآخرون، 2015).

الأوساط الزرعية المستخدمة:

• المرق المغذي (NB0) Nutrient Broth

- آجار المخ والقلب (BHIA) Brain Heart Infusion Agar
- مرق فول الصويا التريسيني (TSB) Tryptic Soy Broth المضاف له غلوكوز 1% : حُضر الوسط بإذابة 15 غ (TSB) في 500 مل ماءً مقطراً، وتم بسترة الغلوكوز في حمام مائي في درجة حرارة 60 م لمدة 15 دقيقة، ثم أضيف إلى الوسط المحضر المعقم والمبرد بنسبة 1%
- صفيحة (طبق) المعايرة المكروية المايكرو تيتير (MTP) Micro titer plate المعقمة والمكونة من 96 حفرة Well ذات قعر مسطح flat bottom وهو طبق بسيط يسمح بقياس قدرة الجراثيم على الالتصاق لتكوين غلاف حيوي في المراحل المبكرة، وذلك إما عبر فحص نوعي أو كمي مخبري، من خلال تهيئة الظروف المثلى لتشكيل الغلاف (مواد مغذية، ودرجة الحرارة، ومدة التحضين)، واستخدمت في هذه الطريقة المواد الآتية:
- مرق فول الصويا التريسيني (TSB)
- صبغة الكريستال البنفسجية (CV) Crystal violet: بتركيز 1%.
- محلول إيثانول 95 % وأحواض مائية مناسبة لغسل الصفيحة وماصة أوتوماتيكية micropipette وسواثر زجاجية مناسبة.
- جهاز إليزا (قارئ المايكرو تيتير) (ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay) ذو طول موجة 630 نانومتر.
- **المطهرات المختبرة Tested Disinfectants**: تم استخدام ثلاث أنواع من المطهرات المستخدمة على نطاق واسع في قطاع صناعة الدواجن، وهي (مركبات رباعيات الأمونيوم QUAT بتركيز 0.125-1024 مغ/لتر، كلوريد البنزالكونيوم (BC) benzalkonium chloride بتركيز 0.02%، برمغنات البوتاسيوم (KMnO₄) تركيزه 0.5 غ / 10000 لتر.
- تحديد التراكيز المثبطة الدنيا للعترات الجرثومية المدروسة:
- حددت التراكيز المثبطة الدنيا للجراثيم Minimum Inhibitory Concentration (MIC) بواسطة طريقة التمديد بالمرق Broth Dilution Method وفق (Corcoran, 2013; Mazzola *et al.*, 2009)، ويعرض الجدول (1) التراكيز المثبطة الدنيا MIC للمطهرات المختبرة.

الجدول (1) التراكيز المثبطة الدنيا MIC للمطهرات المختبرة حسب العترات الجرثومية المدروسة.

KMnO ₄	BC	QUAT	المطهرات العترات الجرثومية
0.125-128	40 mg/L	125	<i>S. aureus</i>
1024	0.047	0.25	<i>E. coli</i>
<75	0.063- 4 0.016-4 6.7	0.031	<i>C. jejuni</i>
0.125	16.7	0.01%	<i>S. aureus + E. coli + C. jejuni</i>

_ تشكيل الغلاف الحيوي من قبل العترة الجرثومية المدروسة باستخدام MTP

تم تشكيل أغلفة حيوية مخبرياً بوساطة ثلاث أنواع جرثومية (المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus*، الإشريكية القولونية *E. coli*، العُطيفة الصائمية *Campy. jejuni*) كل على حده (غلاف حيوي أحادي النوع) ، ومن الأنواع الثلاثة (غلاف حيوي متعدد الأنواع)، وفي مرحلتين (72، 168) ساعة عند درجتي حرارة مختلفتين (24م ، 37م) وفقاً لطريقة Corcoran (2013).

_ اختبار تأثير التراكيز المختلفة من المطهرات المستخدمة في التجربة:

أضيف 200 ميكرو لتر من المطهرات المختبرة المجهزة مسبقاً بتراكيز مختلفة ($1/8 \text{ MIC}$, $1/4 \text{ MIC}$, $1/2 \text{ MIC}$, MIC) إلى الصفائح مع ملاحظة الإبقاء على حفر عيارية (Control) دون إضافة أي تركيز من المطهرات، ثم تُركت الصفائح المعالجة بالمطهرات لمدة 10 دقائق، بعد انتهاء فترة المعالجة بالمطهرات وُضعت الصفائح في جهاز (الإليزا) لقراءة نتائج المعالجة، بعدها حُددت النسبة المئوية لفاعلية المطهر بحساب مقدار التناقص في قيمة الكثافة الضوئية والتي تعكس بالمقابل التناقص في عدد الجراثيم الملتصقة، وللتأكد فيما إذ كانت المطهرات قضت كلياً على الجراثيم أُضيف (200 ميكرو لتر) من وسط TSB المغذي جديد ومعقم لكل حفرة من الصفائح المعالجة بالمطهرات المختبرة ثم حُضنت بالدرجة 37 م لمدة 24 ساعة، وعند وجود غشاوة في الحفر فهو مؤشر على أن خلايا الغلاف الحيوي قد نجت من المعالجة بدليل معاودتها للنمو ثانيةً في المرق الطازج، أما عدم النمو (عدم وجود غشاوة) في الحفر يُشير إلى قتل كامل للخلايا الجرثومية بالمطهرات (بالمقارنة مع الحفر العيارية بدون مطهر).

النتائج والمناقشة:**أولاً: نتائج تشكيل غلاف حيوي من قبل العترة المدروسة (*in vitro*):**

بيّن الجدول (2) قيم الكثافة الضوئية OD للغلاف الحيوي المشكل خلال الزمن (72، 168) ساعة عند درجتي الحرارة (24 م و 37 م).

الجدول (2): قيم الكثافة الضوئية OD للغلاف الحيوي المشكل بوساطة العترة المدروسة

خلال زمنين (72 و 168) ساعة وعند درجتي الحرارة (24 و 37) م

تقييم الكثافة	OD للحفر خلال 168 ساعة		OD للحفر خلال 72 ساعة		العترة الجرثومية Strain
	37 م	24 م	37 م	24 م	
منتجة قوية	<u>0.699</u>	0.368	0.386	0.259	<i>S. aureus</i>
منتجة ضعيفة	0.146	0.166	0.162	0.103	<i>E. coli</i>
منتجة قوية	0.292	0.280	0.224	0.204	<i>C. jejuni</i>
منتجة قوية	<u>0.788</u>	0.360	0.450	0.279	<i>S. aureus + E. coli</i> <i>C. jejuni +</i> (Mixing)

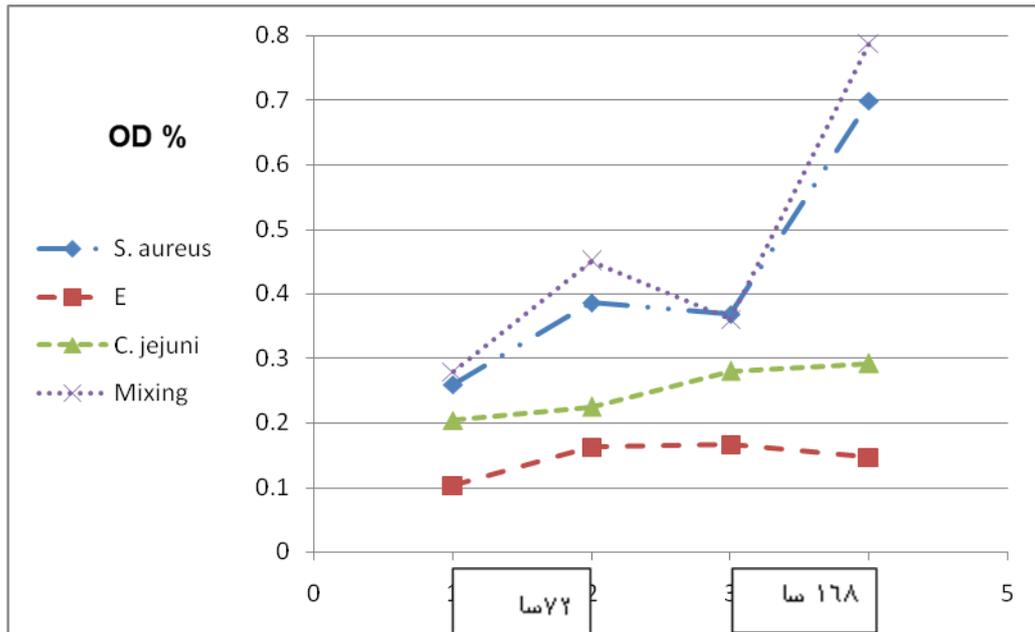
أظهرت نتائج الجدول (2) أن جميع العترات الجرثومية المختبرة كان لها قدرة على تشكيل غلاف حيوي، إلا أنها أبدت تفاوتاً في كثافة الأغلفة الحيوية المنتجة، فقد أظهرت قراءات OD للعنقودية الذهبية بأنها كانت منتجة بكثافة للغلاف الحيوي خلال 72 ساعة بدرجة الحرارة 24 م° $OD_{staph} = 0.259$ وبالدرجة 37 م° $OD_{staph} = 0.36$ وخلال 168 ساعة بنفس درجتي الحرارة 24 م° و 37 م° ($OD_{staph} = 0.0368$ ، $OD_{staph} = 0.699$) وتوقفت على العزلات الأخرى في كلتا الحالتين ، وتوافقت هذه النتائج مع دراسة لـ Zmantar وزملائه (2010) إذ أظهرت العنقودية الذهبية قابلية عالية للالتصاق وتشكيل غلاف حيوي وبالتالي التسبب في الإصابة الحادة والتهابات المكورات العنقودية الذهبية وقد ذكر Lotfi وزملائه (2014) أن لدى العنقودية الذهبية قدرة كامنة على تشكيل غلاف حيوي على السطوح الحيوية وغير الحيوية.

أما الإشريكية القولونية فقد أظهرت انخفاضاً كبيراً في كثافة الغلاف الحيوي خلال 72 ساعة عند درجة الحرارة 24 م° $DE = 0.103$ وعند الدرجة 37 م° $OD_E = 0.162$ بالمقارنة مع الغلاف الحيوي المشكل خلال 168 ساعة بالدرجتين 24 م° و 37 م° ($OD_E = 0.166$ ، $OD_E = 0.146$)، وفُسرَت هذه النتائج بحسب SALA وزملائها (2012) بأن الإشريكية القولونية تُظهر ردات فعل مختلفة جداً عند تغير شروط النمو والظروف البيئية.

كما صُنفت العُطيفة الصائمية *C. jejuni* بأنها منتجة بكثافة فكانت قراءات OD_{cam} خلال 72 ساعة (0.204، 0.224) بالدرجتين 24 م° و 37 م° على التوالي وخلال 168 ساعة (0.280، 0.292) بنفس درجتي الحرارة في كل الظروف المدروسة بالرغم من أنها جرائم لا هوائية ، وفُسرَت عدة دراسات هذا السلوك بأن الصائمية لديها قدرة على تطوير غلاف حيوي أسرع في ظل الظروف الهوائية بوجود أوكسجين (O_2) بنسبة 20% مما في الظروف اللاهوائية بالشروط (10% CO_2 ، 5% O_2) مما يفسر قدرة هذه الكائنات الدقيقة على التكيف مع ظروف الوسط المحيط وبالتالي المحافظة على بقائها، مما يزيد من خطرها (Joshua *et al.*, 2006; Siringan *et al.*, 2011)، ويعد تشكيل الغلاف الحيوي بوساطة العُطيفات إحدى آليات المحافظة على البقاء، إذ أن العُطيفة لها قدرة على تشكيل ثلاثة أنواع متميزة من الغلاف الحيوي فتظهر في البيئة السائلة كجليدة Pellicle وملتصقة بالسطح (Surface-Attached) وتجمعات غير ملتصقة (Unattached Aggregate) بشكل ندف (Type Floc)، هذا وتعد العُطيفة الصائمية من الأنواع السائدة (Predominant Species) بين الأنواع الأخرى في مزارع الفروج (Avrain *et al.*, 2003). وما يزيد الأمر خطورة أنه يمكن لأنواع العُطيفة البقاء على قيد الحياة في منتجات الدواجن الطازجة والمجمدة (Hoong *et al.*, 2008).

أظهرت النتائج أن الأنواع الجرثومية مجتمعة (Mixing) شكلت غللاً حيوياً أكثر (أكبر قيمة 0.788 خلال الفترة 168 ساعة بالدرجة 37 م°) مقارنة مع الأغلفة الحيوية التي شكلتها تلك الجراثيم منفردة كماً من خلال ملاحظة كمية الصبغة الملتصقة في الحفر، ونوعياً من خلال قراءات الكثافة الضوئية للجراثيم الملتصقة فعلى ما يبدو أن هذه الجراثيم أبدت تآزراً إيجابياً وغلبت صفة التعاون فيما بينها وبالتالي أنتجت غلاف حيوي أكثر، ولو كان خلاف ذلك لنتج غلاف حيوي أقل كثافة مقارنة مع ما أنتجته كل بكتريا على حده فقد ذكر Burmølle وزملائه (2006) أن هذه الآليات وغيرها تنتج عن الأثر التآزري للجراثيم المتعاونة مع السلالات التي كانت غير قادرة على تشكيل غلاف حيوي بمفردها. أما في حالة التفاعلات السلبية (Negative Interactions) للتآزر بين الجراثيم المتعاونة ضمن الغلاف الحيوي المتعدد الأنواع تنتج إحدى الجراثيم سموماً بكتيرية (Bacterio Toxins) أو تخفض درجة الحموضة pH لتمنع شركائها من الاستمرار في النمو والالتصاق. كما ذكرت ذات الدراسة أن

الأنواع الجرثومية تكون غلاف حيوي أكثر كثافةً مما تكونه جراثيم من نوعين أو من نوع واحد . وذكر Hoong وزملائه (2008) أن هناك أدلة بأن العُطيفة الصائمية تؤثر إيجاباً في تشكل الغلاف الحيوي في حال وجودها مع جراثيم أخرى. وقد تكون هذه الآثار بسبب أنشطة نظام الإشارات (Quorum Sensing Activities) أو التدخلات التنافسية للأنواع (Interspecies Competition). ويظهر الشكل (1) الاختلاف في كثافة الغلاف الحيوي المشكل بواسطة العترات المدروسة بعد التحضين لمدة (72،168) ساعة بالدرجتين 24م° و 37م°.



الشكل (1) الاختلاف في كثافة الغلاف الحيوي المشكل بواسطة العترات المدروسة بعد التحضين لمدة (72،168) ساعة عند الدرجتين 24م° و 37م°

ثالثاً: نتائج اختبار كفاءة المطهرات في معالجة الغلاف الحيوي (*in vitro*):

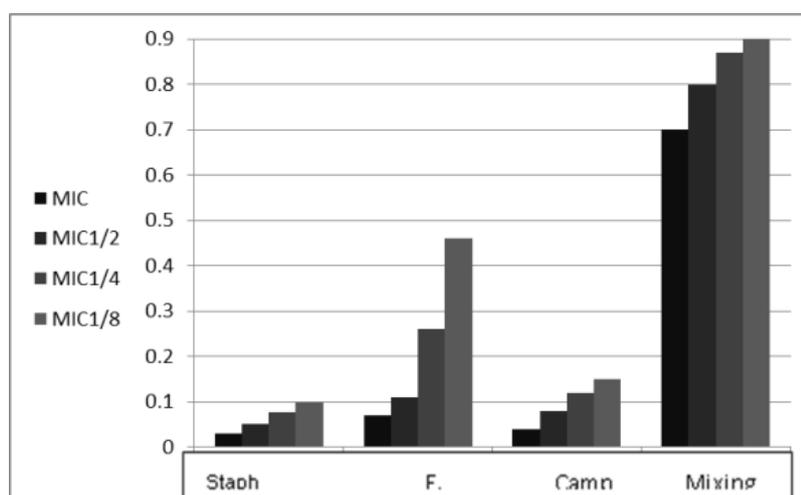
تأثير مركبات رباعيات الأمونيوم في معالجة الغلاف الحيوي المشكل مخبرياً:

أظهرت النتائج المبينة بالجدول (3) أن استخدام مركبات رباعيات الأمونيوم أثرت بشكل فعال في خفض كثافة الغلاف الحيوي بنوعيه (الأحادي النوع، المتعدد الأنواع) لكل العترات بشكل كبير، وكان أعلى تأثير عند التركيز MIC إذ كانت قراءات الكثافة الضوئية OD للخلايا الملتصقة بالحفر لمدة 72 ساعة بالدرجة 24 كالاتي: $OD_{staph} = 0.017$ و $OD_{E} = 0.05$ و $OD_{cam} = 0.03$ و $OD_{Mixing} = 0.057$ وانخفضت الفاعلية بتناقص التراكيز إلى أن وصلت قراءات الـ OD إلى أدنى قيمة لها عند التركيز $MIC_{1/8} \cdot OD_{staph} = 0.087$ و $D.E = 0.137$ و $OD_{cam} = 0.14$ و $OD_{Mixing} = 0.116$ لدى العترات الجرثومية الملتصقة عند نفس الشروط.

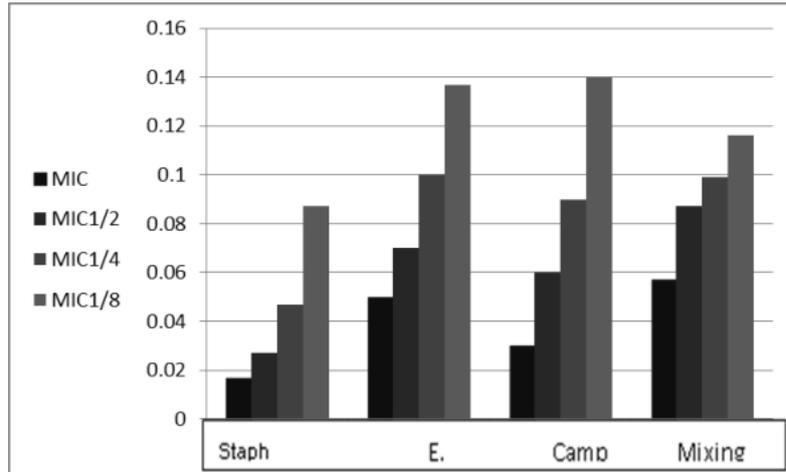
الجدول (3) تأثير مركبات رباعيات الأمونيوم المقاسة في معالجة الغلاف الحيوي المتشكل خلال 72 ساعة بالدرجتين 24م و37م

غلاف حيوي المتشكل بعمر 72 ساعة								تركيز مطهر QUAT
عند الدرجة 37 م				عند الدرجة 24 م				
OD.Mixing	OD.cam	OD.E	OD.staph	OD.Mixing	OD.cam	OD.E	OD.staph	
<u>0.79</u>	0.04	0.07	0.01	<u>0.057</u>	0.03	0.05	0.017	MIC
<u>0.99</u>	0.08	0.11	0.050	<u>0.087</u>	0.06	0.07	0.027	MIC _{1/2}
<u>1.115</u>	0.120	0.26	0.077	<u>0.099</u>	0.09	0.10	0.047	MIC _{1/4}
<u>1.130</u>	0.150	0.46	0.098	<u>0.116</u>	0.14	0.137	0.087	MIC _{1/8}

كما تشير قراءات الـ OD (وضع تحتها خط) إلى انخفاض التأثير في الغلاف الحيوي المتعدد الأنواع بالمقارنة مع الغلاف الحيوي المتشكل من الأنواع الجرثومية منفردة، ويعرض الجدول (4) تأثير مركبات رباعيات الأمونيوم المقاسة في معالجة الغلاف الحيوي المتشكل خلال 168 ساعة عند درجتي الحرارة، ويوضح الشكل (2) تأثير تراكيز QUAT بالدرجة 24م (72 ساعة) والشكل (3) تأثير تراكيز QUAT بالدرجة 37م (72 ساعة).



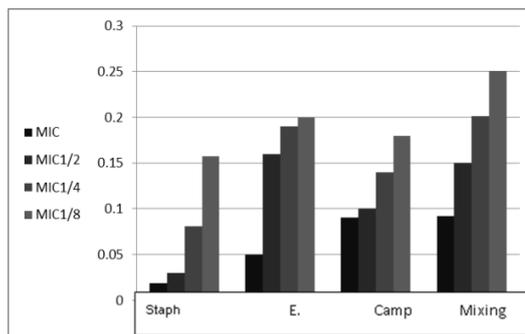
الشكل (2) تأثير تراكيز QUAT على الغلاف الحيوي المتشكل بوساطة العترات المدروسة بالدرجة 24م (72 ساعة)



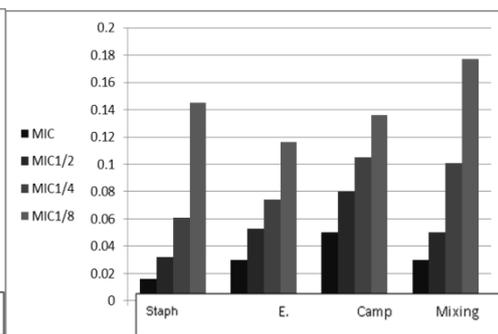
الشكل (3) تأثير تراكيز QUAT على الغلاف الحيوي المتشكل بواسطة العترات المدروسة بالدرجة 37م (72 ساعة)

الجدول (4) تأثير مركبات رباعيات الأمونيوم المقاسة في معالجة الغلاف الحيوي بواسطة العترات المدروسة المتشكل خلال 168 ساعة بالدرجتين 24م و37م

غلاف حيوي المتشكل بعمر 168 ساعة								تركيز مطهر QUAT
عند الدرجة 37 م				عند الدرجة 24 م				
OD. Mixing	OD. cam	OD. E	OD. staph	OD. Mixing	OD. cam	OD. E	OD. staph	
<u>0.092</u>	0.09	0.05	0.019	<u>0.03</u>	0.05	0.03	0.016	MIC
<u>0.15</u>	0.1	0.16	0.03	<u>0.05</u>	0.08	0.35	0.032	MIC 1/2
<u>0.201</u>	0.14	0.19	0.081	<u>0.101</u>	0.105	0.47	0.061	MIC 1/4
<u>0.251</u>	0.18	0.2	0.157	<u>0.177</u>	0.136	0.116	0.145	MIC 1/8



الشكل (5) تأثير تراكيز QUAT بالدرجة 37م (168 ساعة)



الشكل (4) تأثير تراكيز QUAT بالدرجة 24م (168 ساعة)

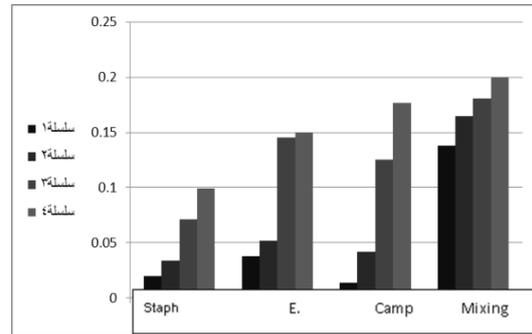
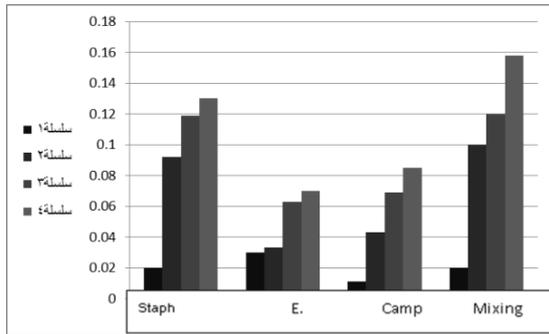
-تأثير برمنغنات البوتاسيوم في معالجة الغلاف الحيوي المتشكل مخبرياً:

كشفت النتائج المبينة بالجدول (5) أن أعلى تأثير لبرمنغنات البوتاسيوم كان عند التركيز MIC، فأشارت قراءات الـ OD للأغلفة الحيوية المشكّلة بالدرجة 24 لمدة 72 ساعة إلى $OD_{staph} = 0.087$ و $0.037 =$

OD.E و OD.cam 0.014 و OD Mixing = 0.116، كما لوحظ انخفاض ضئيل بفاعليته في معالجة الأغلفة الحيوية المشكّلة (أحادية النوع، متعددة الأنواع) وفق الشروط المختبرة، إذ تمكنت برمنغنات البوتاسيوم بالتركيز MIC 1/4 من خفض كثافة الغلاف الحيوي بنسبة أعلى من المطهرات الأخرى لدى نفس التركيز، كما أشارت النتائج أن استخدام برمنغنات البوتاسيوم بالتركيز المنخفضة MIC 1/4 أثر سلباً وساهم بشكل واضح في خفض كثافة الغلاف الحيوي المتشكل لكل العزلات المدروسة، وقد يعزى ذلك لقدرته على المرور ضمن الطبقات البوليميرية خارج الخلوية وتوليد الجذور الحرة (Generate Free Radicals Degrading) لعديد السكاريد الخارجي التي تشكل حاجزاً لحماية الجراثيم المنغمسة ضمنها (Barraud *et al.*, 2015)، وذكرت Zineb وزملائها (2014) بأن معالجة الأغلفة الحيوية تعتمد على عدة عوامل كالعنصر النشط في المطهر (Active Principle)، تركيز المطهر وزمن التلامس (Contact Time) والسلالات المختبرة (Tested Strains)، وما يحدث في بعض الأحيان تثبيط للعناصر النشطة في المطهر كتثبيط للأوكسدة بوجود البروتينات أو تفاعل كيميائي لبعض المواد الكيميائية مع المواد البوليميرية للغلاف الحيوي (Ebrahimi *et al.*, 2015). كما يظهر الجدول (6) تأثير برمنغنات البوتاسيوم في معالجة الغلاف الحيوي المتشكل خلال 168 ساعة بالدرجتين (24م) و(37م).

الجدول (5) تأثير برمنغنات البوتاسيوم في معالجة الغلاف الحيوي المتشكل خلال 72 ساعة بالدرجتين (24م) و(37م)

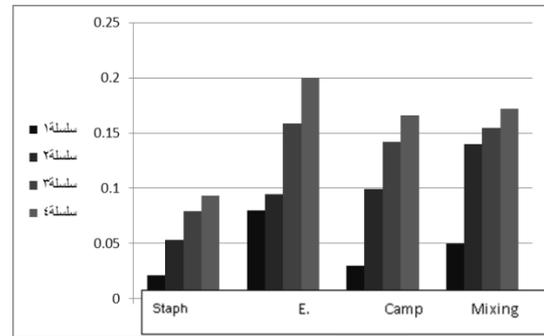
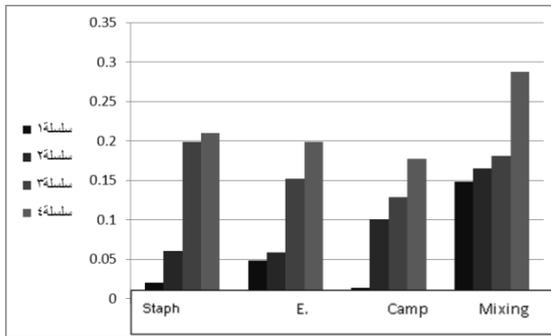
غلاف حيوي مشكل بعمر 72 ساعة								تركيز مطهر KMnO 4
عند الدرجة 37 م				عند الدرجة 24 م				
OD Mixing	OD.ca m	OD.E	OD.sta ph	OD Mixing	OD.ca m	OD.E	OD.sta ph	
<u>0.138</u>	0.014	0.038	0.020	<u>0.02</u>	<u>0.020</u>	0.03	0.011	MIC
<u>0.165</u>	0.042	0.052	0.034	<u>0.10</u>	0.092	0.033	0.043	MIC1/2
<u>0.181</u>	0.125	0.145	0.071	<u>0.120</u>	0.119	0.094	0.069	MIC 1/4
<u>0.2</u>	0.177	0.150	0.099	<u>0.158</u>	0.13	0.12	0.143	MIC1/8



الشكل (6) تأثير KMnO4 في معالجة غلاف حيوي بالدرجة 24 م بعمر 72 سا الشكل (7) تأثير KMnO4 في معالجة غلاف بالدرجة 37م بعمر 72 سا غلاف

الجدول (6) تأثير برمنغنات البوتاسيوم في معالجة الغلاف الحيوي المتشكل خلال 168 ساعة بالدرجتين (24م) و(37م)

غلاف حيوي بعمر 168 ساعة								تركيز مطهر KMnO4
عند الدرجة 37 م				عند الدرجة 24 م				
OD Mixing	OD.cam	OD.E	OD.staph	OD Mixing	OD.cam	OD.E	OD.staph	
<u>0.148</u>	0.014	0.048	0.020	<u>0.05</u>	0.030	0.08	0.021	MIC
<u>0.165</u>	0.101	0.059	0.061	<u>0.140</u>	0.099	0.093	0.053	MIC1/2
<u>0.181</u>	0.129	0.152	0.199	<u>0.155</u>	0.142	0.159	0.079	MIC 1/4
<u>0.288</u>	0.177	0.199	0.210	<u>0.1720</u>	0.166	0.2	0.093	MIC1/8



الشكل (8) تأثير KMnO4 في معالجة غلاف حيوي بالدرجة 24 م بعمر 168 ساعة الشكل (9) KMnO4 في معالجة غلاف حيوي بالدرجة 37 م بعمر 168 سا

-تأثير كلوريد البنزلكونيوم في معالجة الغلاف الحيوي المشكل مخبريا:

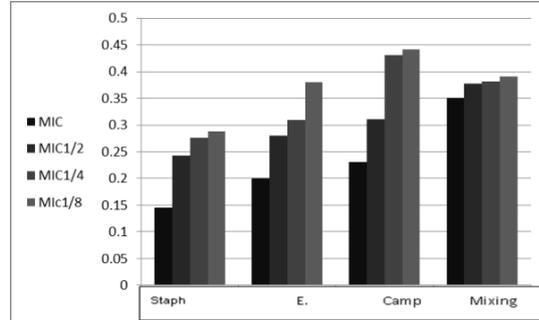
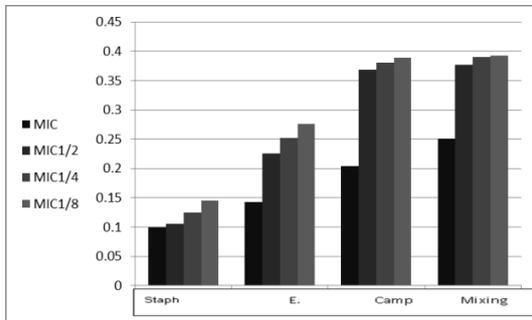
أظهر كلوريد البنزلكونيوم تأثير منخفض في معالجة الأغلفة الحيوية بكل تراكيزه المستخدمة وكان أفضل تأثير عند التركيز الأعلى MIC إذ يظهر الجدول (7) قراءات OD (0.0149، 0.064، 0.048، 0.099) للعترات (Mixing، cam، E، staph) على التوالي المشكلة لغلاف حيوي خلال 72 ساعة بالدرجة 24م وأعطى أدنى تأثير له في خفض كثافة الأغلفة الحيوية عند التركيز MIC1/8 (0.129، 0.15، 0.177، 0.193) للعترات السابقة المشكلة للغلاف حيوي خلال 168 ساعة بالدرجة 37 م، وفسرت هذه النتيجة بأن الكلور ذو فاعلية جيدة في معالجة الأغلفة الحيوية المتكونة حديثاً (Young Biofilms) خلال بضع ساعات في حين تنخفض كفاءته في معالجة الأغلفة الحيوية بأعمار متقدمة (Zineb *et al.*, 2014)، ويبين الجدول الجدول (8) تأثير كلوريد البنزلكونيوم في معالجة الغلاف الحيوي المتشكل خلال 168 ساعة.

الجدول (7) تأثير كلوريد البنزالكونيوم في معالجة الغلاف الحيوي المتشكل خلال 72 ساعة بالدرجتين (24م) و(37م)

غلاف حيوي بعمر 72 ساعة								تراكيز مطهر BC
عند الدرجة 37 م				عند الدرجة 24 م				
OD Mixing	OD.ca m	OD.E	OD.sta ph	OD Mixing	OD.ca m	OD.E	OD.sta ph	
<u>0.097</u>	0.08	0.051	0.037	<u>0.149</u>	0.064	0.048	0.099	MIC
<u>0.107</u>	0.083	0.06	0.044	<u>0.185</u>	0.072	0.059	0.101	MIC1/2
<u>0.109</u>	0.104	0.061	0.057	<u>0.189</u>	0.125	0.145	0.109	MIC 1/4
<u>0.116</u>	0.113	0.074	0.087	<u>0.193</u>	0.177	0.15	0.129	MIC1/8

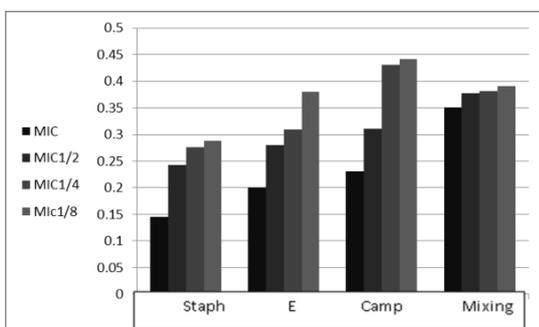
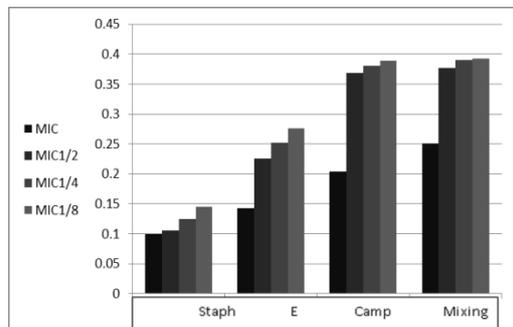
الجدول (8) تأثير كلوريد البنزالكونيوم في معالجة الغلاف الحيوي المتشكل خلال 168 ساعة بالدرجتين (24م) و(37م)

غلاف حيوي بعمر 168 ساعة								تراكيز مطهر BC
عند الدرجة 37 م				عند الدرجة 24 م				
OD Mixing	OD.ca m	OD.E	OD.sta ph	OD Mixing	OD.ca m	OD.E	OD.sta ph	
<u>0.351</u>	0.231	0.2	0.145	<u>0.251</u>	0.204	0.143	0.099	MIC
<u>0.377</u>	0.311	0.28	0.242	<u>0.377</u>	0.369	0.225	0.105	MIC1/2
<u>0.382</u>	0.431	0.31	0.276	<u>0.39</u>	0.381	0.252	0.125	MIC 1/4
<u>0.391</u>	0.441	0.38	0.288	<u>0.393</u>	0.389	0.276	0.145	MIC1/8



الشكل (11) تأثير BC في معالجة غلاف حيوي بالدرجة 37م بعمر 72ساعة

الشكل (10) تأثير BC في معالجة غلاف حيوي بالدرجة 24 م بعمر 72ساعة



الشكل (13) تأثير BC في معالجة غلاف حيوي بالدرجة 37م بعمر 168ساعة

الشكل (12) تأثير BC في معالجة غلاف حيوي بالدرجة 24 م بعمر 168ساعة

لا بد من الإشارة إلى أن نتائج خفض كثافة الغلاف الحيوي بعمر 72 ساعة أفضل من نتائج المعالجة للغلاف الحيوي بعمر 168 ساعة، بالنسبة للمطهرات المستخدمة وبكل التراكيز على السواء، ويعود ذلك إلى أن التأثيرات التي تسببها المضادات الميكروبية كالتبدلات الشكلية وتبدل مكونات السطح الخارجي للخلية الجرثومية مرتبطة بكون الخلية في حالتها الحرة (Planktonic) في بداية تشكّل الغلاف الحيوي، ولكن مع مرور الزمن تتحول الخلايا إلى حالة الغلاف الحيوي الناضج وتنتج عديدات السكاريد خارج الخلية بشكل أكبر والتي تجعل تأثيرها على هذه الخلايا أضعف (Anderl *et al.*, 2003).

أظهر الغلاف الحيوي متعدد الأنواع مقاومة عالية لجميع المطهرات المستخدمة بكل التراكيز في حين لم تلاحظ هذه المقاومة لدى أي من الأغلفة الحيوية المكونة من الأنواع الجرثومية منفردة ويرر Corcoran في دراسته عام (2013) ذلك بأن الغلاف الحيوي المتعدد يمثل حاجزاً محكماً أمام انتشار المطهرات مما يؤثر على معدل نقل جزيئات المضادات إلى الخلايا المغموسة ضمن المواد البوليميرية خارج الخلية فيما لو قورن مع الغلاف الحيوي الأحادي النوع.

لوحظت أيضاً زيادة في مقاومة الغلاف الحيوي المتعدد الأنواع بعمر 168 ساعة بالمقارنة مع نظيره بعمر 72 ساعة وذكر (2003) Alamoury بأن عمر تكوين الغلاف الحيوي عامل مؤثر في مقاومته لل مضادات الميكروبية، أو قد يكون ناجم أساساً عن تكيف فيزيولوجي للخلايا البكتيرية ضمن الغلاف الحيوي (النمو اللاطئ) أو (Sessile Growth)، ندرة المغذيات (Nutrient Stresses)، التماس مع تراكيز شبه مميّنة ومتكررة من المطهرات (Shakeri *et al.*, 2007) (Repeated Sub-Lethal Concentrations). وبحسب Bridier وزملائه (2011)، ويمكن تفسير الزيادة في مقاومة الغلاف الحيوي المتعدد الأنواع بسبب زيادة كثافة الخلايا بالمقارنة مع كثافة خلايا الغلاف الحيوي وحيد النوع بالإضافة إلى الأسباب الأخرى كالصعوبة في اختراق المواد البوليميرية المحيطة بالخلايا وتختلف باختلاف الأنواع الجرثومية الموجودة مع بعضها ضمن نفس الغلاف الحيوي وبحسب SALA وزملائه (2012) بل أن التأثير التآزري للأنواع الجرثومية المعزولة من نفس المصدر يزيد من مقاومة الخلايا الجرثومية حتى لو كانت كثافة الغلاف الحيوي منخفضة. كما أن التآزر أو التفاعل بين الأنواع الجرثومية المختلفة المكونة للغلاف الحيوي غالباً يؤدي إلى تغيير في فيزيولوجيا تلك الأنواع وقد يكون محفزاً أساسياً لمقاومتها للمضادات الجرثومية (Zang *et al.*, 2011). هذه المقاومة المتزايدة للمعالجة قد تتجم عن التنوع الميكروبي ضمن الغلاف الحيوي (Bridier *et al.*, 2011).

أشارت قراءات العكارة في المرق المغذي العقيم المحضنة لمدة 24 ساعة على درجة حرارة 37م° والمبيّنة بالجدول (8) إلى أن الخلايا ضمن الأغلفة الحيوية المشكّلة بكافة الشروط المخبرية المحددة لا تزال نشطة، وكانت قادرة على تحمل المعاملة بالمطهر ويمكن تفسير السبب بأنه لا يمكن منع الجراثيم من تشكيل غلاف حيوي في المختبر فيما لو سمح لها بالالتصاق واستخدام الاتصالات بين الخلايا (Intercellular Communication) بما يعرف بنظام الاشارات الكيميائية (Quorum Sensing) الهام جداً لأنه محفز قوي لعملية التشكل (Aswathanarayan and RaiVitta 2013). إن المقاومة للمضادات الميكروبية قد تُكتسب كاستراتيجية في الغلاف الحيوي المتعدد الخلايا التي تعتمد على تبادل الإشارات الكيميائية بين الخلايا في عملية تعرف بنظام الإشارات وإن التدخل بهذه الآلية يعد من التقنيات الواعدة لتعطيل نظام الإشارات Quorum Sensing

Inhibitors (QSIs) المنع اتصال الخلايا البكتيرية ويمكن أن توفر نهجاً جديداً في تثبيط الجراثيم ومنعها من تكوين غلاف حيوي (Aswathanarayan and RaiVitta 2013; Zineb *et al.*, 2014).

الجدول (9) تقييم النمو بعد المعاملة بالمطهرات المختبرة خلال الفترات الزمنية المدروسة

برمنغنات البوتاسيوم		كلوريد البنزالكونيوم		رباعيات الأمونيوم		العترات الجرثومية
45	10	45	10	45	10	
+	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
+	+	+	+	+	+	<i>E. coli</i>
+	+	+	+	+	+	<i>C. jejuni</i>
+	+	+	+	+	+	<i>S. aureus + E. coli</i> + <i>C. jejuni</i>

+ : نمو جرثومي

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات

- تتباين قدرة الجراثيم المدروسة في تشكيل غلاف حيوي، وأن معظم العترات المدروسة كانت مكونة له.
- يختلف تأثير المطهرات في إزالة الغلاف الحيوي تبعاً لتراكيزها فيزداد كلما ازدادت التراكيز.
- يزداد تأثير المطهر كلما قصرت مدة تشكل الغلاف الحيوي.
- يختلف تأثير تراكيز المطهرات في إزالة ومعالجة الغلاف الحيوي وحيد النوع والمتعدد الأنواع بحسب نوع الجراثيم ونوع المطهر المعالج به.
- ارتباط كفاءة المطهرات الكيميائية المستخدمة مخبرياً (KMnO₄, QUAT, BC) بالتراكيز ومدة التأثير ومدة بقاء الغلاف في أنظمة الشرب.

التوصيات

- التعقيم المستمر بالمطهرات المعروفة لمياه الشرب المقدمة للطيور في الخزانات للحد من التلوث الحيوي وتواجد الميكروفلورا فيها.
- دراسة بعض جوانب الغلاف الحيوي في تقنيات صناعة الدواجن وأثره على منتجات الدواجن والصحة العامة.
- اعتماد برنامج تقييم ومراقبة منتظمة في مزارع تربية الدواجن لاختبار فاعلية المطهرات التجارية المتاحة تجاه الميكروبات للكشف المبكر في حال حدوث تطور في مقاومتها أو انخفاض في حساسية الجراثيم تجاه المطهرات.
- ينصح باستخدام أنابيب شرب غير دائمة وقابلة للاستبدال.

المراجع

- 1- العيسى، بشرى. عبد العزيز، فهيم. الأمير، لينة. عزل وتشخيص بعض الجراثيم المتأثرة في تشكيل الغلاف الحيوي (Biofilm) في أنظمة مناهل مزارع الدواجن . قبل البحث للنشر في مجلة جامعة البعث، المجلد / 37 / 2015م
2. ALAMOURY. A. MOUSTAFA .M *POSTANTIBIOTIC*AVRAIN, L., HUMBERT, F., L'HOSPITALIER, R. . *Antimicrobial resistance in Campylobacter from broilers: association with production type and antibiotic use.* *Veterinary Microbiology* (2003) 97, 267–76.
3. ALLAN N.D, OMAR. A, HARDINGM.W. and OLSON. M. E. *A rapid, high-throughput method for culturing, characterizing and biocide efficacy testing of both planktonic cells and biofilms.* In novotech Inc., 2011. Suite101 94 St., Edmonton,
4. ANDERL J. N; ZALLER J. AND ROE F, *Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in klebsiella pneumoniae biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin*, *JAC*.2003, 47: 1251-1256.
5. ARAÚJO P., LEMOS M., MERGULHÃO F., MELO L. AND SIMÕES M. *Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* AMéndez Vilas (Ed) 2011, pp.826- 835
6. ASWATHANARAYAN AND RAIVITTAL JAMUNA BAI RAVISHANKAR .2013 *Microbial biofilms and their control by various antimicrobial strategies Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.) FORMATEX p.124-133
7. AVRAIN, L., HUMBERT, F., L'HOSPITALIER, R. . *Antimicrobial resistance in Campylobacter from broilers: association with production type and antibiotic use.* *Veterinary Microbiology* (2003) 97, 267–76.
8. BARRAUD NICOLAS, J. KELSO MICHAEL, RICE SCOTT A. and KJELLEBERG STAFFAN. *Current: A Key Mediator of Biofilm Dispersal with Applications in Infectious Diseases .Pharmaceutical Design, Nitric Oxide.* 21, 2015, 31-42
9. BRIDIER A., BRIANDET R. THOMAS V. AND DUBOIS-BRISSONNET . F..*Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review* Vol. 27, No. 9, October, 2011, 1017–1032
10. BURMØLLE. M., WEBB JEREMY S., RAO DHANA, HANSEN LARS H., SØRENSEN SØREN J., AND KJEL LEBERG S. *Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms .Applied and environmental microbiology*, Vol. 72, 2006, No. 6, p. 3916–3923
11. CORCORAN MARY . *Salmonella enterica - biofilm formation and survival of disinfection treatment on food contact surfaces.* A Thesis Presented to the National University of Ireland, Galway for the Degree of Doctor of Philosophy, Discipline of Bacteriology, School of Medicine, National University of Ireland Galway. Ph.D. Thesis – 2013, Volume 1
12. DAVEY, M. E., AND G.O. O' TOOLE. *Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics.* *Microbiol. Mol. Bio. Revs* 2000.64(4): 847-86770.
13. DONLAN, R.M and COSTERTON, J.W. *Biofilms survival mechanisms of clinically relevant microorganisms.* *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, 15(2),167-193.

14. EBRAHIMI, A., HEMATI, M., SHABANPOUR, Z., DEHKORDI. H., BAHADORAN S. KHOSHNOOD, S., KHUBANI. S., *Effects of Benzalkonium Chloride on Planktonic Growth and Biofilm Formation by Animal Bacterial Pathogens* Jundishapur J. Microbiol. February; 8(2): 2015.e16058.
15. MAZZOLA P- G, JOZALA A- F, NOVAES L. C. DE L, MORIEL P, THEREZA CHRISTINA VESSONI PENNA. Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 45, 2009 n. 2, abr./jun.,
16. FRANK, [KRISTI L](#); REICHERT, [EMILY J](#); PIPER, [KERRY E](#) AND PATEL, [ROBIN](#). *In Vitro Effects of Antimicrobial Agents on Planktonic and Biofilm Forms of Staphylococcus lugdunensis Clinical Isolates*. Antimicrob Agents Chemother. Mar, 2007, 51(3): 888–895
17. HOONG KOON TEH, STEVE FLINT, NIGEL FRENCH. *Biofilm Formation By Campylobacter jejuni In Controlled Mixed-Microbial Populations* International Journal of Food Microbiology. 2008.143: 118–124.
18. HOUARI A, DI MARTINO P. *effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation*. *LettApplMicrobiol*. 2007;**45**(6):652–6.
19. JEFFERY, K. PATRICK, B. DALE, O. STEPHEN, AND A. B. ,LILLIAN. *Disinfection and Sterilization in Health care facilities*. Centers for disease control and prevention , *Health infection control practices advisory committee (HICPAC)*, 2008
20. JOSHUA ,G. W. P C. GUTHRIE-IRONS, A. V. KARLYSHEV AND B. W. WREN MEDICINE, *Biofilm formation in Campylobacter jejuni Keppel Street, London WC1E 7HT, UK* Microbiology, No 152, 2006, 387–396.
21. JOHN G. THOMAS, MS, PhD; LINDSAY A. NAKAISHI, B. S. *Managing the complexity of a dynamic biofilm Production on Its Resistance to Chlorine*. Center for Food Safety Science and Technology University of Georgia, Griffin, American Dental Association, JADA, 2006, Vol. 137
22. LOTFI G., HAFIDA H., NIHEL K. ABDELMONAIM K., NADIA A., FATIMA N AND WALTER Z. *Detection of biofilm formation of a collection of fifty strains of Staphylococcus aureus isolated in Algeria at the University Hospital of Tlemcen* Journal of Bacteriology Research Vol. 6(1), 2014.pp. 1-6
23. MARIN, C., HERNANDIZ, A., LAINEZ, M., *Biofilm development capacity of Salmonella strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants*. *Poultry Science*. 2009.88(2): 424-431.
24. MONDS, r. and g. O'TOOLE. *The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review*. Trends in Microbiology. 2009. 17: 73 - 87.
25. OLSON, MERLEE; CERI, HOWARD; MORCK, DOUGLASW; BURET, ANDRE G; READ, RONALD R. *Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics* . Can J Vet Res. April; 2002, 66(2): 86–92
26. PURKRTOVÁ S., BABULÍKOVÁ J., KARPÍŠKO V., DEMNEROVÁ K. AND PAZLAROVÁ J. *Antimicrobial Factors Effects on Biofilm Formation in Staphylococcus aureus*. Special Issue: Vol. 29, 2011, S1–S10
27. ROBIN K. KING. *The presence of Bacterial pathogens in recirculating Aquaculture system biofilm and their response to various sanitizers*. Ph.D thesis in Food Science and Technology, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. 2001.

28. SALA. CLA DIA, ADRIANA MORARI, OLIMPIA COLIBAR, ATTILA ALEXANDRU MORVAY. *Antibiotic resistance of gram negative bacteria isolated from meat surface biofilm*. Romanian Biotechnological Letters, 2012, Vol.17, No.4.
29. SHAKERI, S., R. K. KERMANSHAHI, M. M. MOGHADDAM, AND G. EMTIAZI. 2007. *Assessment of biofilm cell removal and killing and biocide efficacy using the microtiter plate test*. Biofouling 23:79–86.
30. SIMOES M, BENNETT RN, ROSA EAS. *Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms*. Natural Product Reports, 26 (6): 2009. 746-757.
31. SIMOES, M ., SIMOES, L. C., AND VIEIRA, M. J. *A review of current and emergent biofilm control strategies* LWT – Food Science and Technology 43 (2010) 573–583.
32. SIMONE C. M; JAÍNE D. G; OLIVEIRA S; HILSDORF P. *formation of biofilms by staphylococcus aureus on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected Chemical Sanitizers*. Brazilian Journal of Microbiology, 2003. 38:538-543.
33. TOTÉ K., HOREMANS T., BERGHE D.V., MAES L., COS P. *Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Appl Environ Microbiol. 2010;76:3135-3142.
34. VESTBY, L.K., J. LOˆ NN-STENSRUD, T. MØRETRØ, S. ANGRUD, A. AAMDAL-SCHEIE2, T. BENNECHE AND L.L. NESSE *A synthetic furanone potentiates the effect of disinfectants on Salmonella in biofilm*. Journal of Applied Microbiology. 2010.108(3): 771-778. 13.
35. WALTER M; FRANK R.; BUGNICOURT A; FRANKLIN M. *Contribution of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low growth rate, metabolic activity to tolerance of Pseudomonas aeruginosa biofilm to ciprofloxacin and tobramycin*. Antimicrob Agents Chemother; 2003. 47(1): 317-323
36. ZINEB G; AL MOSTAFA M; YOUSSEF G; ABDELLATIF E; OUFRID S; ABDELLAH H; SAAD K. I; IMDAGHRI N; TIMINOUNI M. *Anti-Adhesion and Anti-Biofilm Effectiveness of Disinfectants Used In Hemodialysis against both Staphylococcus Warneri and Staphylococcus Sciuri Biofilms*. ISSN : 2014. 2248-9622,
37. ZMANTAR, T; KOUIDHI, B; MILADI, H; MAHDOUANI, K; BAKHROUF A . *A Microtiter plate assay for Staphylococcus aureus biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation*. New Microbiologica, 33, 2010, pp137-145,
38. ZANG. L., Y. LIU, H. WU, N. HOIBY, S. MOLIN, Z. SONG, *Current understanding of multispecies biofilms*. Int. J of oral science, 3, 2011. 74, 81