التحري عن قدرة بعض الأنواع البكتيرية على إنتاج المادة المخاطية Slime layer

إيمان محمود خضر
قسم علوم الحياة
كلية العلوم
جامعة الموصل
E-mail: micr_home@yahoo.com

(تاريخ الاستلام 6/ 6 /2012 ؛ تاريخ القبول 18 /7 / 2012)

الملخص

شملت الدراسة الحالية التحري عن قدرة بعض الأنواع البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة كرام على إنتاج المادة المخاطية التي تلعب دورا في تكوين الأغشية الحيوية وتؤدي إلى تعقيد الإصابة المرضية ومقاومة العلاج بالمضادات الحيوية، تضمنت الأنواع البكتيرية قيد الدراسة 35 عزلة بكتيرية شملت *Staphylococcus aureus* (14عزلة)، *Pseudomonas aeruginosa* (7 عزلات)، *Escherichia coli* (6 عزلات)، *Proteus mirabilis* (3 عزلات)، Salmonella (عزلتين)، *Enterobacter aerogenes*، *Klebsiella pneumoniae*، Serratia. استخدمت في هذه الدراسة 3 طرائق للتحري عن إنتاج المادة المخاطية وهي طريقة وسط اكار الكونغو الأحمر Congo red agar (CRA) ووسط اكار الكونغو الأحمر المحور modified CRA بالإضافة إلى طريقة طبق Microtiter (MTP). أظهرت النتائج عدم وجود اختلاف في نتائج وسط CRA Congo red agar ووسط mCRA modified Congo red agar وان طريقة طبق Microtiter (MTP) كانت الأكثر حساسية في التحري عن إنتاج المادة المخاطية إذ بلغت نسبة العزلات الموجبة في هذه الطريقة 51.429% مقارنة بطريقة CRA Congo red agar التي كانت نسبة العزلات الموجبة فيها 31.429% في حين تباينت نسب النتائج الضعيفة والسالبة في كلتا الطريقتين.

الكلمات الدالة: المادة المخاطية، الغشاء الحيوي، طبق Microtiter، البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام.

Investigating the Ability of some Bacterial Species to Produce Slime Layer

Iman M. Khudhur
Department of Biology
College of Science
University of Mosul

ABSTRACT

This study includes the investigation of the ability of some gram positive and gram negative bacterial species to produce slime layer which play a role in biofilm formation and complication of pathogenic infections and resistance to antibiotic therapy.

Thirty five bacterial isolates were used in this study, they include: *Staphylococcus aureus* (14 isolates), *Pseudomonas aeruginosa* (7 isolates), *Escherichia coli* (6 isolates), *Proteus mirabilis* (3 isolates), Salmonella spp. (2 isolates), *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, Serratia spp.

Three methods were used to detect slime layer production which include: Congo red agar medium (CRA), modified congo red agar method (mCRA), and Microtiter (MTP) method.

The results showed that there is no differences between Congo red agar and modified Congo red agar methods. Microtiter plate method was more sensitive for slime layer detection as the rate of production was 51.429% from all isolates as compared with 31.429% positive results in Congo red agar method. There are clear differences in moderate and negative results for both methods.

المقدمة

يعرف الـ glycocalyx بأنه المادة المخاطية المتكونة من معقد متعـدد الـسكريات الخارجيـة ذات المنشأ البكتيري، يدخل فيها أيضا مواد خارجية توجد في بيئة الكائن المجهري مثـل الأحمـاض النوويـة، البروتينات، المعادن، المغذيات ومواد الجدار الخلوي وغيرها. استخدم مصطلح المادة المخاطية Slime عام 1940 لوصف طبقة الغشاء الحيوي البكتيري Biofilm، كما تم استخدامه عام 1982 ليصف glycocalyx المنتجة من قبل السلالات ذات الالتصاق العالي لبكتريا *Staphylococcus epidermidis* التي عزلـت مـن الأدوات الطبية المغروسة في الجسم (Shumugaperumal, 2010).

سجلت أول ملاحظة عن الغشاء الحيوي عام 1933 من قبل Henrici الذي لاحظ أن بكتريا المـاء لا تكون طافية بشكل حر ولكنها تنمو على السطوح الغاطسة في الماء. يكون إنتاج الغشاء الحيوي عمليـة ذات خطوتين، تلتصق البكتريا فيها أولا على سطح بمساعدة مستضد الكبسول أو مستـضد الـسوط يتبـع ذلـك تضاعف لتكوين غشاء حيوي متعدد الطبقات، وتدخل عدة عوامل في تنظيم إنتاج الغشاء الحيوي مثل طبيعة السطح، البروتينات الـسطحية للبكتريـا، البروتينـات الخـارج خلويـة، اللاصـقات متعـدد الـسكريات

Polysaccharide adhesions، وجود المغذيات والايونات في الوسط، الأس الهيدروجيني والحرارة وغيرها (Bose, 2009 ; Gunawardana, 2010).

تكون البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام قادرة على تكوين الأغشية الحيوية، وتتواصل البكتريا مع بعضها في الغشاء الحيوي بواسطة إشارات كيميائية تدعى محفزات ذاتية auto inducers وتدعى عملية التواصل الكيميائية بـ Qourum sensing (ظاهرة الإحساس بالزحمة) وهي تسمح للبكتريا بالتحكم بالبيئة وتغيير التصرف استجابة لتغيرات مجتمع الغشاء الحيوي (Hassan *et al*., 2011;Venturi , 2006).

أما من الناحية الطبية فان الأغشية الحيوية تعد مجتمعات بكتيرية مرتبطة بالأسطح تتواجد داخل قالب من بوليمرات خارج خلوية تبدي أنماطاً مظهرية متغايرة للنمو، التعبير الجيني وإنتاج البروتين، ويمكن أن تؤدي إلى عواقب طبية واقتصادية (Mariana *et al* ., 2009) يساعد الغشاء الحيوي البكتريا في البقاء حية في الظروف القاسية داخل المضيف وتعد مسؤولة عن الإصابات المزمنة والمستعصية ومن هذه الأمراض التهاب شغاف القلب، التليف الكيسي، التهاب الأذن الوسطى، الإصابات المتعلقة بالأدوات الطبية، إصابات القثاطر، التهاب اللثة وتسوس الأسنان وغيرها (Khan *et al*., 2011 ; Stone *et al*., 2002) إذ تبدي البكتريا في الأغشية الحيوية درجة عالية من المقاومة للعوامل المضادة للجراثيم وجهاز مناعة المضيف (Dadawala *et al*., 2010) و تكون المقاومة في الغشاء الحيوي بمعدل أعلى من المقاومة في البكتريا حرة المعيشة، إذ قد تزداد المقاومة إلى 1000 ضعف، ولا تزال أسباب هذه المقاومة العالية للمضادات الحيوية ضمن الأغشية الحيوية غير واضحة بشكل كامل.

إن أكثر من 20 % من جينات البكتريا في الغشاء الحيوي يتم تعبيرها بصورة مختلفة والذي قد ينتج عنه حماية اكبر ضد خلايا البلعم الكبير، كما أن البكتريا تنمو ببطء وتكون فعاليتها الايضية بطيئة، وتنتج البكتريا مركبات ضمن الغشاء الحيوي تعادل تأثير المضادات الحيوية (Estrela and Abraham, 2010 ; Hassan *et al* ., 2011).

تتطلب السيطرة المثلى للأغشية الحيوية توضيح الأساس الجزيئي لمقاومتها العالية بتشخيص الطافرات المقاومة وتشخيص المركبات المضادة لفعالية الأغشية الحيوية (Benoit *et al*., 2010).

تهدف الدراسة الحالية إلى التحري عن قدرة بعض الأنواع البكتيرية الممرضة على إنتاج المادة المخاطية أو الغشاء الحيوي مختبرياً باستخدام طريقتين هما طريقة وسط أكار الكونغو الأحمر Congo Red Agar Method (CRA) ووسط أكار الكونغو الأحمر المحور modified CRA وطريقة طبق الحفر Microtiter plate method ومقارنة كفاءتها في التحري عنها.

المواد وطرائق العمل

1- البكتريا المدروسة

استخدمت في هذه الدراسة 35 عزلة من البكتريا الممرضة الموجبة والسالبة لصبغة كرام والمعزولـة في قسم علوم الحياة /كلية العلوم /جامعة الموصل من عينات مرضية مختلفة وقد تم تأكيد تشخيصها اسـتنادا إلى الطرائق المجهرية والزرعية والاختبارات البايوكيميائية الملائمة واعتمادا علـى Koneman وآخـرين (2006) وشملت كل من:

Staphylococcus aureus (14عزلة)، *Pseudomonas aeruginosa* (7 عزلات)، *Escherichia coli* (6 عـزلات)، *Proteus mirabilis* (3 عـزلات)، Salmonella spp. (عـزلتين)، *Enterobacter aerogenes* ، *Klebsiella pneumoniae*، Serratia spp. (عزلة واحدة لكل منها).

2- الأوساط

1- وسط CRA :

يتكون من أكار نقيع المخ والقلـب Brain Heart Infusion Agar (BHIA) (Difco) 52 غـرام، سكروز 36 غرام، صبغة الكونغو الأحمر CR 0.8 غرام في لتر من الماء المقطر، حـضر وسـط BHIA لوحده وعقم بالموصدة، عقم السكر بالترشيح، أما صبغة CR فتم تعقيمها بالموصدة بوصفها محلـولاً مائيـاً مركزاً وبعد تبريد وسط BHIA إلى 45-50 م أضيف إليه السكر وصبغة CR (Eftekhar and Adaei, 2011).

2- وسط CRA المحور:

يعد هذا الوسط تحويرا عن وسط CRA وتم فيه استبدال BHIA بوسط أكار الدم الأسـاس Blood Base Agar (BAB) (Oxoid) 40 غم، الكلوكوز بدلا من السكروز 10 غم، وصبغة CR 0.4 غم فـي لتر من الماء المقطر، عقم وسط BAB لوحده بالموصدة ثم أضيف إليه بعد تبريده كل من الكلوكوز والصبغة المعقمين (Mariana *et al*., 2009).

3- طبق Microtiter (MTP):

استخدم في هذه الطريقة طبق MTP المعقم المكون من 96 حفرة ذات قعـر مـسطح flat bottom ، وسط مرق نقيع الذرة Tryptic Soy Broth (TSB) (Alpha Biosciences)، محلول دارئ الفوسفات بـأس هيدروجيني pH =7.2، محلول مائي من صبغة الكريستال البنفسجي Crystal violet (CV) بتركيز 0.1% وايثانول بتركيز 95%.

3- طرائق العمل:

التحري عن إنتاج المادة المخاطية

درست قدرة البكتريا على إنتاج المادة المخاطية باستخدام طريقة وسط أكار الكونغو الأحمـر Congo Red Agar Medium (CRA) ووسط الكونغو الأحمر المحور modified CRA (mCRA) للتحري عـن الاختلافات التي قد تحدث في لون المستعمرات النامية ولون الوسط، بالإضافة إلـى طريقـة طبـق الحفـر Microtiter plate method (MTP).

لقحت العزلات البكتيرية قيد الدراسة على وسط CRA وCRA المحور وبواقع ثلاثة مكـررات لكـل عزلة وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة، ثم تركت الأطباق لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة الغرفة، بعد انتهاء التحضين تم تحديد النمط المظهري لإنتاج المادة المخاطية وقسمت العزلات إلى:

1- عزلات منتجة للمادة المخاطية بغزارة Strong positive: تظهر بشكل مستعمرات سوداء أو رماديـة مائلة إلى الأسود ذات تألق بلوري.
2- عزلات منتجة ضعيفة Weak or Moderate للمادة المخاطية: تكون مستعمراتها بنية ذات اسوداد في مركز المستعمرة.
3- عزلات غير منتجة للمادة المخاطية Negative: تظهر بشكل مستعمرات حمراء أو وردية مع تحـول لون الوسط إلى الأسود (Khan *et al*., 2011; Dag *et al* ., 2010).

طريقة MTP :

لقحت مزارع فتية من العزلات البكتيرية قيد الدراسة في وسط TSB وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة، خففت هذه المزارع بواقع 1:100 في وسط TSB جديد، نقل 200 µl من كل مزرعة بكتيرية إلى حفرتين من طبق MTP مع استخدام حفر سيطرة سالبة حاوية على وسط TSB لوحده، حضنت بدرجة 35م لمدة 22-24 ساعة، بعد ذلك أزيلت محتويات الحفر وغسلت 3 مرات بمحلـول دارئ الفوسـفات، جففـت بالهواء ثم صبغت الحفر بصبغة الكريستال البنفسجي CV 0.1% لمدة 30 دقيقة، بعدها غسلت الحفر بمـاء مقطر معقم وجففت، وبذلك يمكن تقدير قابلية البكتريا على الالتصاق كميا بملاحظة كمية الصبغة الملتـصقة في الحفر، ولتقدير قدرة البكتريا على إنتاج المادة المخاطية نوعيا تم استخلاص الصبغة الملتـصقة بـالحفر بإضافة 200 µl ايثانول 95%، ثم قيست الامتصاصية عند الطول الموجي 630 نانوميتر باسـتخدام جهـاز Microplate reader LT-4000 (UK)، استخدمت القيم التالية في الجدول (1) للتمييز بـين العـزلات قيـد الدراسة على أساس قدرتها على إنتاج المادة المخاطية:

الجدول 1: تحديد القدرة على إنتاج المادة المخاطية حسب الامتصاصية

الامتصاصية O.D	القدرة على الالتصاق	إنتاج المادة المخاطية
<0.120	لا يحدث التصاق	لا تنتج
0.240-0.120	ضعيف	ضعيف
>0.240	قوي	قوي

(Bose *et al*., 2009)

تم قياس الامتصاصية للحفر و طرحت قيمة السيطرة السالبة من كل القراءات وقسمت العزلات حسب الامتصاصية إلى موجبة، ضعيفة، سالبة لإنتاج المادة المخاطية.

النتائج والمناقشة

يوضح الجدول (2) نتائج اختبار الكشف عن إنتاج المادة المخاطية باستخدام وسط CRA و CRA المحور إذ لم يظهر أي اختلاف في لون المستعمرات واستجابتها بين هذين الوسطين لذلك عدت نتائجهما متطابقة، يتبين من الجدول (2) أن 31.429% من العزلات أبدت مستعمرات سوداء إلى رمادية ذات تألق بلوري وكانت أعلاها بكتريا *E.coli* كما في الصور (1) و(2) وبلغت نسبة العزلات ضعيفة الإنتاج للمادة المخاطية 42.857% وشملت بكتريا *S.aureus* فقط وكما موضح في الصورة (3)، أما العزلات السالبة فقد بلغت نسبتها 25.714% وشملت كل عزلات *P.aeruginosa* قيد الدراسة والتي لم تظهر أي استجابة لإنتاج المادة المخاطية على هذا الوسط بالإضافة إلى بكتريا *S.aureus*، *P.mirabilis*، *E.aerogenes*، Serratia وكما موضح في الصور (4)، (5) و(6).

لم يظهر أي اختلاف أو تغيير في لون المستعمرات والوسط بين CRA و mCRA وهذا لا يتفق مع دراسة Mariana وجماعته (2009) الذي أوضح أن المستعمرات السوداء على وسط CRA يمكن أن تفقد الصبغة وتصبح وردية على عكس الوسط المحور الذي تبقى فيه المستعمرات السوداء كما هي حتى بعد مرور ثلاثة أيام من التحضين بدرجة حرارة الغرفة.

وبملاحظة نتائج طريقة طبق MTP من الجدول (2) وبعد طرح قيمة معدل قراءة السيطرة السالب من معدل قراءات الامتصاصية للعزلات كما موضح في الجدول (3)، يظهر أن 51.429% من العزلات أبدت نتيجة موجبة لإنتاج المادة المخاطية وشملت 6 عزلات من *S.aureus* وجميع عزلات *P.aeruginosa* قيد الدراسة، عزلتين من *E.coli* وعزلات *P.mirabilis*، أما المنتجة الضعيفة للمادة المخاطية على طبق MTP فكانت نسبتها 14.286% شملت 3 عزلات *S.aureus*، عزلة Salmolella و Serratia. في حين بلغت نسبة العزلات السالبة 34.285%، وتبين الصور (7)،(8) و(9) التقدير الكمي والنوعي للعزلات على طبق المايكروتايتر و يبين الشكل (1) مقارنة بين النسب المئوية للنتيجة الموجبة والضعيفة والسالبة لكلا الطريقتين

ويظهر أن طريقة MTP كانت الأكثر حساسية في الكشف عن إنتاج المادة المخاطية مقارنة بطريقة CRA كما أن نسبة العزلات المنتجة الضعيفة كانت اقل من طريقة CRA.

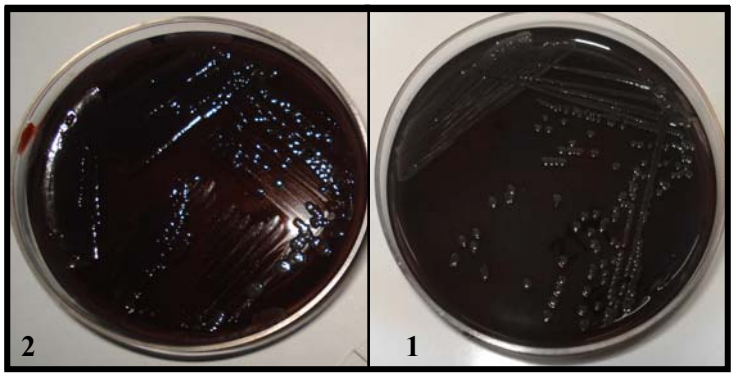
تختلف الطرائق المستخدمة للكشف عن إنتاج المادة المخاطية والقدرة على تكوين الغشاء الحيوي وتشمل بصورة رئيسية طريقة CRA وMTP، وأظهرت دراسة Mathur وآخرين (2006) عدم وجود علاقة بين الطريقتين وان طريقة MTP هي الأكثر حساسية وواقعية، كما بينت دراسة Samie و Nkgau (2012) أن طريقة MTP تعد الأكثر حساسية وسهولة في الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي بين سلالات *E.coli* وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية، وان الكشف عن إنتاج المادة المخاطية يعتمد على عوامل عديدة مثل طريقة التحري المستخدمة، نوع الوسط المستخدم وظروف التحضين، كما أن نتائج الدراسة الحالية تتفق مع دراسة Bose وآخرين (2009) إذ بين أن طريقة MTP باستخدام وسط TSB مضاف إليه 1% كلوكوز كانت الأكثر دقة من طريقة CRA في الكشف عن إنتاج المادة المخاطية والقدرة على الالتصاق.

الجدول 2: نتائج اختبار الكشف عن إنتاج المادة المخاطية للعزلات البكتيرية على وسـط CRA و طبـق MTP ونسبها المئوية.

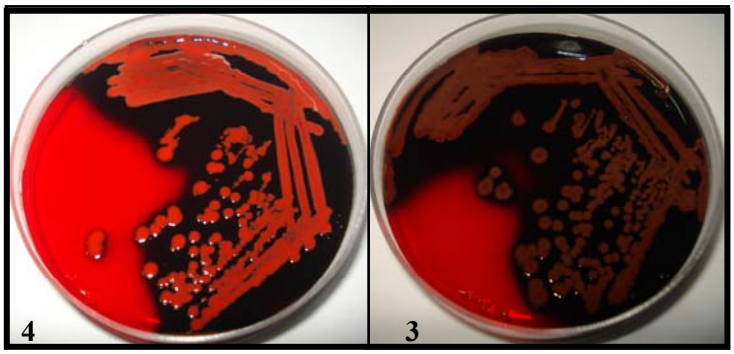
العزلات	CRA			MTP		
	+Ve	moderate	-Ve	+Ve	moderate	-Ve
S.*aureus* 1			+	+		
S.*aureus* 2		+				+
S.*aureus* 3		+				+
S.*aureus* 4		+			+	
S.*aureus* 5		+		+		
S.*aureus* 6		+		+		
S.*aureus* 7			+	+		+
S.*aureus* 8		+		+		
S.*aureus* 9		+				+
S.*aureus* 10			+	+		
S.*aureus* 11		+			+	
S.*aureus* 12			+			+
S.*aureus* 13		+				+
S.*aureus* 14			+		+	
P.aeruginosa 1			+	+		
P.aeruginosa 2			+	+		
P.aeruginosa 3			+	+		
P.aeruginosa 4			+	+		
P.aeruginosa 5			+	+		
P.aeruginosa 6			+	+		
P.aeruginosa 7			+	+		
E.coli 1	+					+
E.coli 2	+					+
E.coli 3	+					+
E.coli 4	+					+
E.coli 5	+			+		
E.coli 6	+			+		
P.mirabilis 1			+	+		
P.mirabilis 2	+			+		
P.mirabilis 3	+			+		
Salmonella 1	+					+
Salmonella 2	+				+	
E. aerogenes			+			+
K. pneumoniae	+					+
Serratia			+		+	
المجموع						
35	11	9	15	18	5	12
النسبة المئوية	%31.429	%42.857	%25.714	%51.429	%14.286	%34.285

الجدول 3: معدل قيم الامتصاصية للحفر وطرح قيمة السيطرة السالب منها.

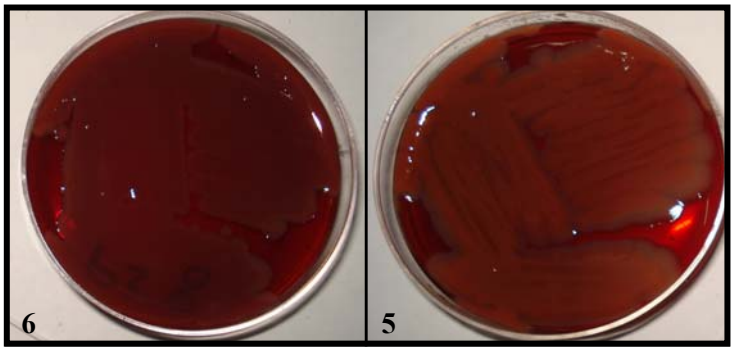
العزلات	معدل الكثافة الضوئية	معدل الكثافة الضوئية -معدل كثافة السيطرة
Control (Negative)	0.207	0.207
***S.aureus* 1**	0.709	0.502
***S.aureus* 2**	0.289	0.082
***S.aureus* 3**	0.255	0.048
***S.aureus* 4**	0.435	0.228
***S.aureus* 5**	0.721	0.514
***S.aureus* 6**	0.826	0.619
S.*aureus* 7	0.594	0.387
S.*aureus* 8	0.538	0.331
S.*aureus* 9	0.226	0.019
***S.aureus* 10**	0.523	0.316
***S.aureus* 11**	0.411	0.204
***S.aureus* 12**	0.232	0.025
***S.aureus* 13**	0.260	0.053
***S.aureus* 14**	0.408	0.201
***P.aeruginosa* 1**	0.568	0.361
***P.aeruginosa* 2**	0.794	0.587
***P.aeruginosa* 3**	0.498	0.291
***P.aeruginosa* 4**	0.643	0.436
***P.aeruginosa* 5**	0.74	0.533
***P.aeruginosa* 6**	0.801	0.594
***P.aeruginosa* 7**	0.603	0.396
***E.coli* 1**	0.263	0.056
***E.coli* 2**	0.298	0.091
***E.coli* 3**	0.288	0.081
***E.coli* 4**	0.217	0.010
***E.coli* 5**	0.517	0.31
***E.coli* 6**	0.724	0.517
***P.mirabilis* 1**	0.815	0.608
***P.mirabilis* 2**	0.658	0.451
***P.mirabilis* 3**	0.609	0.402
***Salmonella* 1**	0.258	0.051
***Salmonella* 2**	0.368	0.161
E. aerogenes	0.247	0.04
K. pneumoniae	0.289	0.082
Serratia	0.378	0.171



الصور 1،2: النتيجة الموجبة على وسط Congo red agar
***E.coli* -1 *P.mirabilis*-2**



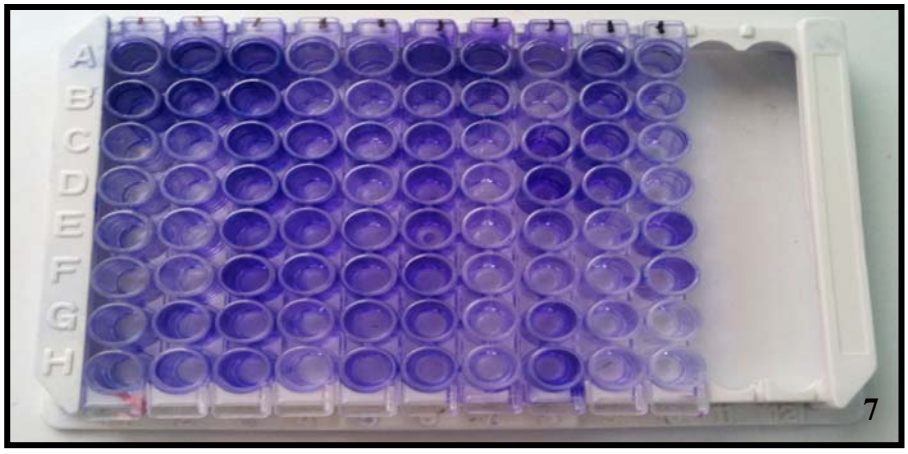
الصور 3،4: النتيجة الضعيفة و النتيجة السالبة على وسط CRA
***S.aureus* (8)-3 *S.aureus*(1)-4**



الصور 5،6: بكتريا *P.aeruginosa* على وسط CRA حاوي على سكر السكروز(5) و وسط CRA حاوي على سكرالكلوكوز(6)

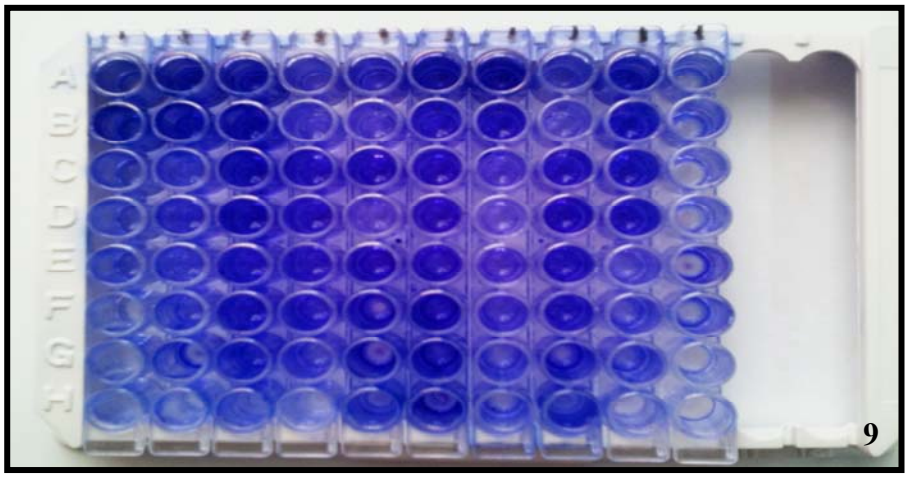
أما دراسة Eftekhar وآخرون (2011) فقد بينت أن كلا الطريقتين كانتا بالحساسية نفسها وأظهرت نتائج متشابهة في التحري عن إنتاج المادة المخاطية وبنسبة 91% لكليهما أما دراسة Dadawala وآخـرون (2010) فقد أوضحت وجود اختلاف في نتائج الطريقتين وان طريقة CRA كانت الأكفأ في التحـري عـن

إنتاج الغشاء الحيوي لعزلات *E.coli* إذ كانت 14 عزلة موجبة مقارنة بطريقة MTP التي أظهرت 10 عزلات فيها نتيجة موجبة وقد يعود فشل العزلتان لإنتاج الغشاء الحيوي مختبريا إلى التغاير في تعبير النمط المظهري لإنتاج المادة المخاطية الذي يكون عالي الحساسية للظروف المختبرية وهذا لا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية.



الصورة 7: الحفر بعد الصبغ بصبغة الكريستال البنفسجي وغسلها بالماء وتجفيفها(تقدير كمي)

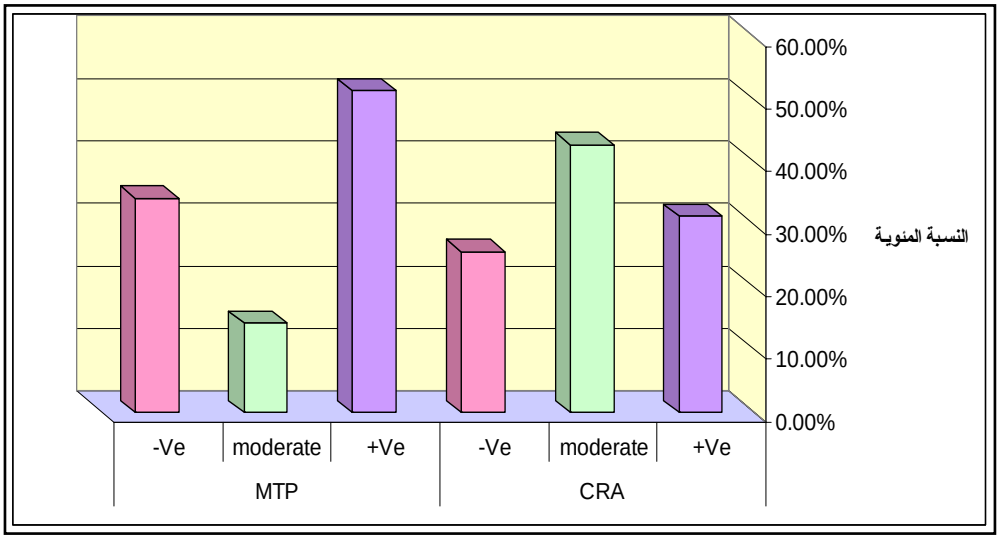
الصورة 8: تباين التصاق الصبغة بالحفر حسب النوع البكتيري



الصورة 9: الحفر بعد استخلاص الصبغة بالايثانول 95% وقياس الامتصاصية (تقدير نوعي).

وبين الباحث Seif El-Din وآخرون (2011) أن طريقة CRA تعد طريقة واقعية لتمييز النمط المظهري للعزلات المنتجة للمادة المخاطية و ذات الضراوة العالية وان معرفة هذا النمط قد يساعد في

التمييز بين المنتجات القوية والضعيفة للغشاء الحيوي والذي يعكس حدة الإصابة و يساعد في تحديد العـلاج الأولي، وان الاختلاف في درجة إنتاج الغشاء الحيوي يعزى إلى الاختلاف فـي إنتـاج لاصـقات متعـدد السكريات polysaccharide adhesion (PIA) و يعكس التغير في التنظيم الجيني. استخدمت طريقة CRA للتحري عن إنتاج المادة المخاطية لعزلات عديدة كونها طريقة سهلة الاستخدام وتعتمد على تعزيـز إنتـاج السكريات المتعددة الخارجية باستخدام وسط غني ولكن يمكن عدها قليلة الحـساسية والتخـصص نتيجـة الاختلافات التي قد تحدث في تكون الصبغة السوداء للمستعمرات، وقد يؤثر الاختلاف في الوسط الزرعـي المستخدم على نتائج هذه الطريقة (Murugan *et al*., 2011; Mariana *et al*., 2009).



الشكل 1: النسب المئوية لنتائج طريقتي CRA وMTP

يعتمد الالتصاق بدرجة كبيرة على الظروف البيئية والتغير في الوسط الزرعـي (Wang , 2008)، إذ أن وسط TSB المخفف 1:100 وغير المخفف يكون أعلى إنتاج للغشاء الحيوي مقارنة بالأوساط الأخـرى مثل Luria Broth وان تكوين الغشاء الحيوي بطريقة MTP يختلف مع السلالة ووسـط النمـو والمـستخدم (Patel and Sharma ,2010)، إذ تعد طريقة MTP أداة مهمة في دراسة المراحل المبكرة في تكون الغشاء الحيوي لان هذه الطريقة تستخدم ظروفاً ثابتة (ساكنة) ويمكن أن تكون فعالة في تحديد ودراسة العديـد مـن العوامل الضرورية لتكوين غشاء حيوي (مثل :الأهداب، الاسواط، اللاصقات، الإنزيمات وغيرها) بالإضافة إلى الجينات التي تلعب دور في إنتاج السكريات المتعددة الخارجية كما أن هذه الطريقة يمكن أن تستخدم مع أنواع بكتيرية مختلفة، تلتصق الجراثيم المتحركة على الجدران أو على قعر الحفر في حين أن الجراثيم غير المتحركة تلتصق على قعر الحفر (OToole, 2011).

تظهر البكتريا التي تنمو في الغشاء الحيوي اختلافات مظهرية متنوعة عن السلالة الأصلية التي تنمو في المزرعة بشكل حر، تشمل هذه الاختلافات تغيرات في الحركة، زيادة إنتاج السكريات المتعددة الخـارج خلوية أحيانا وزيادة المقاومة للمضادات الحيوية (Jesaitis *et al*., 2003).

المصادر

Benoit, M. R. ; Conant, C. G. ; Lonescu-Zanetti, C. ; Schwartz, M. ; Martin, A. (2010). New device for high -throughput viability screening of flow biofilms. *App. Envir. Microbiol*., **76**(13), 4136-4142.

Bose, S. ; Khodke, M. ; Basak, S. ; Mallick, S. K. (2009). Detection of biofilm producing Staphylococci : need of the hour. *J. Clin. Diag. Res*., **3**, 1915-1920.

Dadawala, A.I. ; Chauhanm, H. C. ; Chandelm, B. S. ; Ranaware, P. ; Patel, S. S. ; Khushboo, S. ; Ratod, P. H.; Shah, N. M. ; Kher, H. N. (2010). Assessment of *Escherichia coli* isolates for in virto biofilm production. *Vet. World*., **3**(8), 364-366.

Dag, I. ; Nurikiraz, O. Y. (2010). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in clinical Candida isolates. *Afr. J. Microbiol. Res.*, **4**(24), 2763-2768.

Eftekhar, F. ; Dadaei, T. (2011). Biofilm formation and detection of IcaAB genes in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Iranian J. Basic Med. Sci.*, **14**(2), 132-136.

Estrela, A. B. ; Abraham, W.R. (2010). Combining biofilm-controlling compounds and antibiotics as a promising new way to control biofilm infections. *Pharm.*, **3**, 1374-1393.

Gunawardana, J. (2010). "Bismuth-Ethanedithiol: Apotential Drug to Treat Biofilm Infections of Medical Devices Produced by *Staphylococcus epidermidis* and *Proteus mirabilis*". Boca Raton, Florida, USA, pp.1-25.

Hassan, A. ; Usman, J. ; Kaleem, F. ; Omair, M. ; Khalid, A. ; Iqbal, M. (2011). Detection and antibiotic susceptibility pattern of biofilm producing gram positive and gram negative bacteria isolated from a tertiary care hospital of Pakistan. *Malaysian J. Microbiol.*, **7**(1), 57-60.

Jesaitis, A.J. ; Franklin, M. J. ; Berglund, D. (2003). Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J. Immunol.*, **171**, 4329-4339.

Khan, F. ; Shukla, I. ; Rizvi, M. ; Mansoor, T. ; Sharma, S. C. (2011). Detection of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* .Does it have a role in treatment of MRSA infections ?. *Trends in Med. Res. Academic J.*, **6**(2), 116-123.

Koneman, E. W.; Winn, W. C.; Allen, S. D.; Procop, G. W.; Schreckenberger, P. C.; Janda, W. M. ; Woods, G. L. (2006). "Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology". 6th ed., Lippincott Williams and Wilkins. U.S.A, pp. 211-671.

Mariana, N. S. ; Salman, S. A.; Neela, V. ; Zamberi, S. (2009). Evaluation of modified congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, **3**(6), 330-338.

Mathur1, T. ; Singhal, S. ; Khan, S. ; Upadhyay1, D.J. ; Fatma. T. ; Rattan, A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: An

evaluation of three different screening methods. *Indian J. Med. Microbiol.*,**24**(1), 25-29.

Murugan, S. ; Devi, P. U. ; John, P. N. (2011). Antimicrobial susceptibility pattern of biofilm producing *Escherichia coli* of urinary tract infections. *Current Res. in Bacteriol.* , **4**(2), 73-80.

OToole, G.A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Visualized Exper.*, **47**(2437), 1-2.

Patel, J. ; Sharma, M. (2010). Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. *Inter. J. Food Microbiol.*, **139**, 41-47.

Samie, A. ; Nkgau , T.F. (2012). Biofilm production and antibiotic susceptibility profile of *Escherichia coli* isolates from HIV and AIDS patients in the Limpopo Province. *Afr. J. Biotechnol.*, **11**(34), 8560-8570.

Seif El-Din, S. S. ; El-Rehewy, M. S. ; Ghazaly, M. M. ; Abd-Elhamid, M.H.(2011). Biofilm formation by blood stream Staphylococcal isolates from febrile pediatric cancer patients at south Egypt cancer institute. *J. American Sci.* **7**(1), 674-686.

Shumugaperumal, T. (2010). "Biofilm Eradication and Prevention, A Pharmaceutical Approach to Medical Device Infections ". A John Wiley and Sons, Inc., Publication , Hoboken, New Jersey. pp. 4-5.

Stone, G. ; Wood, P. ; Dixon, L. ; Keyhan, M. ; Matin, A. (2002). Tetracycline rapidly reachs all the constituent cells of uropathogenig *Escherichia coli* biofilms. *Antim. Agents Chemoth.*, **46**(8), 2458-2461.

Venturi, V. (2006). Regulation of quorum sensing in pseudomonas. FEMS *Microbiol. Rev*., **30**, 274-291.

Wang, X. (2008). "Characterization of *Escherichia coli* Colonizing the Gastrointestinal Tract and Urinary Tract Catheters ". Karolinsk Institute, Stockholm, Sweden. 58p.