**مقاله تحقیقی**

# بررسی تاثیر pH اسیدی و قلیایی بر تشکیل بیوفیلم سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس

**ابوالفضل سجده، سحر هنرمند جهرمی*، فاطمه نوربخش**

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پیشوا، ورامین، ایران,

***مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی: sahar_hj2@yahoo.com، تلفن همراه: ۰۹۱۲۴۳۶۴۲۵۷

**محل انجام تحقیق: آزمایشگاه جامع تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی**

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۸

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۱- شماره ۱- بهار ۱۳۹۵

## چکیده

بیوفیلم ها از عوامل مهم مشکلات بیماری های عفونی هستند. پاتوژن ها به فرم بیوفیلم در برابر عوامل محیطی بسیار مقاوم بوده در نتیجه پتانسیل بیماریزایشان افزایش می یابد. استافیلوکوکوس اورئوس از شایع ترین پاتوژن های عامل عفونت های بیمارستانی است که درمان آنتی بیوتیکی آنها دشوار است. بیوفیلم قوی این باکتری از دلایل اصلی برای پاتوژنز ، تداوم و پتانسیل بقا آن است. شرایط محیطی که باکتری تحت آن رشد و گسترش می یابد می تواند رفتار فیزیولوژی سلول های پلانکتونی مانند رشد ، تشکیل بیوفیلم ، مقاومت و تولید سم را تحت تاثیر قرار دهد. تشکیل بیوفیلم تحت تاثیر عوامل محیطی مانند pH ، درجه حرارت ، ترکیب شیمیایی سوبسترا و غلظت اکسیژن می باشد. هدف از این تحقیق بررسی تاثیر pH بر تشکیل بیوفیلم سویه های استافیلوکوکوس اورئوس است. تعداد ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های بالینی بیماران با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی شناسایی و جدا سازی شدند. قدرت تشکیل بیوفیلم سویه ها تحت تاثیر pH های اسیدی و قلیایی و با روش میکروتیتر پلیت تعیین گردید. آنالیز آماری داده ها با روش ANOVA و تست مقیاس تعقیبی Tukey انجام گرفت. شدت تولید بیوفیلم در pH۷ و pH۹ بالاترین میزان ، ۷۱ ٪ و ۷۸ ٪ می باشد. در حالیکه در pH3 و pH12 کمترین میزان ۳۵ ٪ گزارش شد. با توجه به معنی دار شدن تجزیه واریانس بین pH های مختلف از نظر تشکیل بیوفیلم اختلاف معنی داری وجود دارد. نتایج مطالعه نشان داد که تشکیل بیوفیلم تحت تاثیر فاکتور محیطی است و در شرایط اسیدی یا قلیایی شدید کاهش می یابد.

**واژگان کلیدی:** فاکتور محیطی ، بیوفیلم ، میکروتیتر پلیت ، استافیلوکوکوس اورئوس

## مقدمه

تشکیل بیوفیلم توسط باکتری ها از مهمترین مفاهیم در حوزه بیماریهای باکتریایی و کنترل آنها است (۱). بیوفیلم ها جمعیت های میکروبی هستند که به یکدیگر بر روی سطوح می چسبند و توسط یک ماتریکس پلیمری خارج سلولی که خود می سازند احاطه می شوند (۲). میکروارگانسیم های تشکیل دهنده بیوفیلم می توانند کمبود مواد غذایی ، تغییرات pH و رایکال های اکسیژن را بهتر از ارگانیسم های پلانکتونی تحمل کنند (۳). مطالعات نشان داده که عفونت های مرتبط با بیوفیلم باعث ایجاد بیماری های مزمنی می شوند که به پاسخ ایمنی میزبان مقاوم هستند (۴). مهمترین بیماری های مرتبط با بیوفیلم باکتریایی استئومیلیت، پریودنتیت و عفونت

اطراف ایمپلنت ها ، عفونت مزمن زخم ، رینوسینوزیت مزمن ، اندوکاردیت ، عفونت چشمی وعفونت های بیوفیلمی چند میکروبی می باشند (۵) و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس شایع ترین علل عفونت بیمارستانی و عفونت از طریق دستگاه های پزشکی بوده که دارای قابلیت تشکیل بیوفیلم هستند (۶). ابزارهای جراحی ، لوله های تزریق سرم ، چاقوی جراحی و کاتتر منابع عمومی رشد بیوفیلم باکتری و عفونت های پس از آن هستند (۷). اگر چه استافیلوکوکوس اورئوس همیشه پاتوژن نیست ، اما به عنوان یکی از علل شایع عفونت های پوستی مثل جوش ، کورک ، کفگیرک ، گل مژه و آبسه ، بیماری های تنفسی مانند سینوزیت ، مسمومیت غذایی و بیماری های تهدید کننده زندگی مانند پنومونی ، مننژیت ، استئومیلیت ، اندوکاردیت ، سندرم شوک سمی و سپتی سمی شناخته شده است (۸). سویه های مرتبط با بیماری اغلب با تولید سموم پروتئینی قوی و بیان پروتئین های سطحی سلولی متصل شونده به ماتریکس سلولی و تولید بیوفیلم باعث ترویج عفونت می شوند (۹). استافیلوکوکوس اورئوس یا توسط میزبان با ایجاد پاسخ ایمنی ذاتی حذف می شود و یا به پروتئین ماتریکس خارج سلولی متصل شده و تشکیل بیوفیلم می دهد. بدیهی است که شرایط محیطی که باکتری تحت تاثیر آن شرایط رشد و توسعه می یابد می تواند تا حد زیادی رفتار سلول های پلانکتونی ، رشد، مقاومت، تولید توکسین و تشکیل بیوفیلم را تحت تاثیر قرار دهد(۱۰). در میان این عوامل درجه حرارت ، مواد مغذی ، عناصر فلزی ، فشار اسمزی ، فعالیت آب ، pH و مواد ضد میکروبی اهمیت زیادی دارد (۱۱). اگرچه تاثیر شرایط محیطی بر رفتار باکتریایی به طور وسیعی بر روی جمعیت های پلانکتونی مورد مطالعه قرار گرفته اما به دلیل نقش اساسی بیوفیلم در صنایع ، محیط و پزشکی اطلاعات بیشتری درباره تاثیر این فاکتورها و کنترل آنها جهت تشکیل بیوفیلم مورد نیازاست (۱۲). باکتریها دارای پمپ های پروتون متصل به غشاء هستند که پروتون ها را از سیتوپلاسم برای تولید شیب الکتروشیمیایی ، یعنی نیروی موتور پروتون انتقال می دهند (۱۳). تغییرات بزرگ در pH محیط خارجی می تواند چنین مکانیسم هایی را از بین برده و منجر به از بین رفتن میکروارگانیسم ها شود (۱۴). هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثر فاکتور pH محیطی بر قدرت تشکیل بیوفیلم سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی است.

## مواد و روش ها

### جداسازی و شناسایی ایزوله های استافیلوکوکوس *اورئوس*

در این مطالعه تحلیلی مقایسه ای تعداد ۱۰۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های بالینی ادرار، خلط ، خون ، کاتتر و زخم بیماران مراجعه کننده به بیمارستان میلاد تهران جمع آوری شد. به منظور تهیه کشت خالص ، نمونه ها روی محیط آگار خوندار حاوی ۵٪ خون گوسفند کشت داده شده و در دمای۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. جهت تایید هویت جدایه ها تست های تشخیصی مانند رنگ آمیزی گرم ، تست کاتالاز ، کواگولاز ، DNAse و مقاومت به دیسک نووبیوسین انجام شدند. پس از شناسائی و جداسازی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس ، در محیط BHI حاوی گلیسرول ۱۵٪ تلقیح و در فریزر منفی ۸۰ درجه نگهداری شدند.

### بررسی تولید بیوفیلم به روش کمی میکروتیتر پلیت

کشت شبانه‌روزی از جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس یوروپاتوژن در محیط تریپتیکاز سوی آگار ( Merck, Germany) همراه با ۲٪ گلوکز انجام شد. کشت‌های باکتریایی رقیق شدند و سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند در محیط تریپتیکاز سوی برات تهیه شد. ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه‌شده از هر سویه باکتری به درون ۳ چاهک از پلیت ۹۶ خانه پلی استیرنی منتقل شد. پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس‌ازاین مدت پلیت ها خالی‌شده و با محلول بافر فسفات (PBS ,pH 7) دومرتبه شستشو داده شدند. بعد از خشک شدن، چاهک‌ها با الکل متانول ۹۵٪ درصد به مدت ۱۵ دقیقه تثبیت شدند و سپس با رنگ کریستال ویوله (۱٪) به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پلیت ها خالی‌شده و با آب مقطر استریل شسته شدند. چاهک‌ها جهت بررسی نتایج با دستگاه خوانش

(ELISA reader Citation 3, Biotek.USA) و در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر، با ۱۰۰ میکرولیتر محلول اسید استیک گلاسیال ۳۳٪ پر شدند (۱۵). قدرت بیوفیلم سویه ها به صورت قوی (OD570 ≥ 1) ، (ضعیف 0.1 ≤) و منفی (OD570 < 1) تعیین شد. برای هر سویه سه تکرار انجام شد. سویه *Staphylococcus aureus* ATCC25923 به عنوان کنترل مثبت انتخاب شد.

### بررسی تاثیر تغییرات pH بر تشکیل بیوفیلم سویه های استافیلوکوکوس اورئوس

جهت بررسی تاثیر pH بر درجه تشکیل بیوفیلم سویه های مورد مطالعه ، pH محیط TSB به صورت ۳ ، ۵ ، ۹ و ۱۲ تنظیم شد. برای عمل اسیدی کردن از استیک اسید ۱ نرمال و برای عمل قلیایی کردن از هیدروکسید سدیم ۱ نرمال استفاده شده است. عمل خنثی سازی (pH7) نیز با خود محیط TSB صورت گرفت. برای بررسی هر pH روش میکروتیتر پلیت برای همه ایزوله ها با سه تکرار انجام شد. pH کنترل pH۷ در نظر گرفته شد.

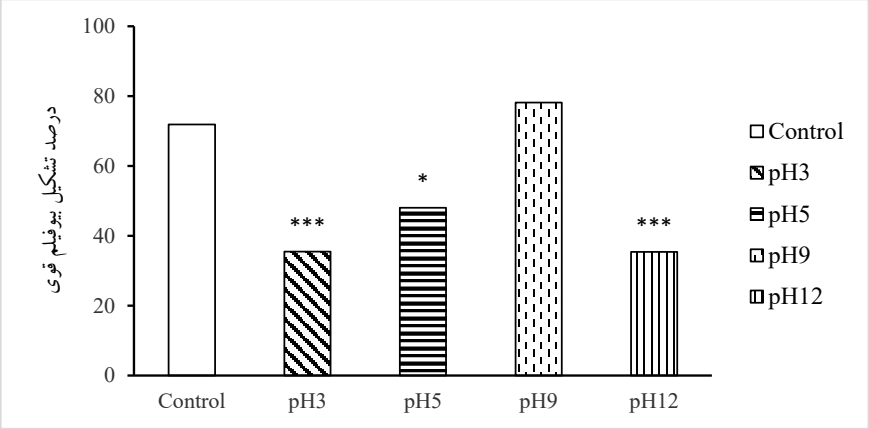
### آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری بوسیله نرم افزار SPSS v20 انجام شد. برای تجزیه واریانس از روشOne way ANOVA استفاده شد. مقایسه میانگین داده ها با استفاده از آزمون مقایسه میانگین Tukey صورت گرفت. سطح احتمال کمتر از ۵ درصد به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

### نتایج

نتایج تاثیر تغییرات **pH** بر تشکیل بیوفیلم سویه های استافیلوکوکوس اورئوس به روش کمی میکروتیتر پلیت پس از انجام روش میکروتیتر پلیت برای هر pH ، پلیت ها توسط الایزا ریدر با طول موج ۵۷۰ نانومتر مورد خوانش قرار گرفتند و سویه ها بر اساس قدرت بیوفیلم به سه گروه : قوی، متوسط و منفی تقسیم شدند. در pH کنترل که ۷ در نظر گرفته شد، ۷۱ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس بیوفیلم قوی داشتند ، ۲۸/۱ درصد بیوفیلم متوسط و هیچ سویه ای فاقد قدرت بیوفیلم مشخص نشد. با تغییر pH محیط به pH۳ پس از انجام روش میکروتیتر پلیت و خوانش نتایج، ۳۵/۵ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس بیوفیلم قوی و ۶۳/۵ درصد بیوفیلم متوسط تشکیل دادند و ۱ درصد فاقد قدرت بیوفیلم بودند. نتایج تغییر pH محیط به pH۵ نشان داد که ۴۸ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس بیوفیلم قوی و ۵۰ درصد بیوفیلم متوسط تشکیل دادند، تنها ۲ درصد فاقد قدرت بیوفیلم بودند. با تغییرpH محیط از ۷ به pH۹ ، ۷۸/۱ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس بیوفیلم قوی و ۲۱/۹ درصد بیوفیلم متوسط تشکیل دادند، هیچ سویه ای فاقد قدرت تشکیل بیوفیلم شناسایی نشد. افزایش pH محیط به ۱۲ نشان داد که ۳۵/۴ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس بیوفیلم قوی و ۶۴/۶ درصد بیوفیلم متوسط تشکیل دادند.

نتایج نشان داد که شدت تشکیل بیوفیلم در pH۷ و pH۹ بالاترین میزان ۷۱/۹ درصد و ۷۸/۱ درصد است. در حالیکه درpH۳ و pH۱۲ کمترین میزان ۳۵ و ۳۵/۴ درصد و سپس برای pH۵ میزان شدت تشکیل بیوفیلم ۴۸ درصد گزارش شد (شکل ۱). آنالیز آماری توسط روش ANOVA نشان داد که بین pH و تشکیل بیوفیلم سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه ارتباط معنا داری وجود دارد (P=۰/۰۰۰۰). نتایج مقایسه میانگین داده ها در pH های مختلف، خطای استاندارد برای هر دو میانگین را ۰/۱۵۱۹ نشان داد. بین pH۹ و pH کنترل اختلاف معناداری ازنظر تشکیل بیوفیلم وجود ندارد (p>۰/۰۵)، ولی در pH۳ ، pH۵ و pH۱۲ اختلاف معناداری با pH کنترل از نظر تشکیل بیوفیلم سویه ها وجود دارد (p<۰/۰۵).




شکل ۱- تاثیر pH بر تشکیل بیوفیلم قوی سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس. *P<0.05, ***p<0.001 اختلاف از گروه کنترل (pH 7) را نشان می دهد.

**بحث**

تشکیل بیوفیلم فرآیند پیچیده ای است که در نتیجه اتصال اولیه میکروارگانیسم ها به یک سطح و سپس افزایش جمعیت چسبنده موجود در مواد پلیمری خارج سلولی ایجاد می شود. چسبندگی میکروبی به سطوح ، تحت تاثیر عوامل بسیاری از جمله خواص فیزیکوشیمیایی هر دو سطح باکتریایی و سوبسترایی و همچنین عوامل محیطی قرار می گیرد (۱۶). در این تحقیق تاثیرفاکتور محیطی pH بر روی بیوفیلم ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که شدت تشکیل بیوفیلم در pH۷ و pH ۹ بالاترین میزان ۷۱ درصد و ۷۸ درصد است. در حالیکه درpH۳ و pH۱۲ کمترین میزان ۳۵ و ۳۶ درصد گزارش شد. آنالیز آماری نشان داد که بین تغییرات pH و تشکیل بیوفیلم سویه ها ارتباط معناداری وجود دارد(۰/۰۰۰۰۱). مقایسه قدرت تشکیل بیوفیلم سویه های مورد مطالعه در pH های مختلف نسبت به pH کنترل نشان داد که در pH۳ و pH۵ توانایی کمتری برای تشکیل بیوفیلم وجود دارد. این نتایج با نتیجه مطالعه Memple و Chaieb که نشان دادند تشکیل بیوفیلم سویه های استافیلوکوکوس اورئوس در pH۳ ممانعت می شود ، شباهت دارد (۱۷و۱۸). Hamadi و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش دادند که اتصال سلولی به سطوح شیشه ای در pH ۴ تا ۶ به شدت بالا است ولی در pH۲ یا pH۳ و مقادیر pH قلیایی ضعیف می شود (۱۹).

Shukla و همکاران در سال ۱۹۹۵به مقایسه تاثیر دما و pH بر تولید بیوفیلم در دو گروه مختلف عوامل بیماری زا مانند *سودوموناس آئروجینوزا* و *کلبسیلا پنومونیه* و گونه های ویبریو پرداختند. آنها گزارش دادند درpH ۸/۵ سویه های سودوموناس آئروجینوزا افزایش تولید بیوفیلم داشتند. در کلبسیلا پنومونیه هم تولید بیوفیلم به طور مشابه تحت تاثیر قرار گرفت به طوریکه در۸/۵ pH تولید به ۱۵۱ تا ۳۱۹ درصد رسید. تولید قابل توجه بیوفیلم در pH بالاتر نیز درویبریو کلرا مشاهده شد. افزایش تولید بیوفیلم در۸/۵ pH در مقابل ۵/۵ معنی دار بود(p=۰/۰۰۱) (۲۰). Karol و همکاران طی تحقیقی که بر روی باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* انجام دادند ، نشان دادند با محدودیت مقدار گلوکز در pH ثابت ۷/۵ ، تشکیل بیوفیلم این باکتری نسبت به سویه های پلانکتونی آن متفاوت است که این امر می تواند تشکیل پلاک دندانی را تحت تاثیر قراردهد (۲۱). Harjai در سال ۲۰۰۵ تولید بیوفیلم در *سودوموناس ائروجینوزا* را در pH بالاتر از ۸ بیشتر از۶-۵ pH توصیف کرد و این امر را به تولید آلژینات بیشتر نسبت داد (۲۲). Tress و همکاران نشان دادند که قابلیت چسبندگی سویه های *لیستریا* مونوسیتوژنز در۵ pHبیشتر از ۷ کاهش یافته است (۲۳). Lebber وهمکاران در سال ۲۰۰۷ اثر فاکتورهای محیطی را روی تشکیل بیوفیلم سویه های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوزوس* مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که تشکیل بیوفیلم باکتری در

شرایط In Vitro تحت تاثیر فاکتورهای محیط کشت و شرایط محیطی مانند pH اسیدی ، اسمولاریته بالا و حضور املاح قرار می گیرد (۲۴). سال ۲۰۱۴ Nostra و همکاران رشد و تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکی را در محیط های کشت زمانی که در معرض اسید های آلی ضعیف مانند استات و لاکتات قرار می گیرند نسبت به زمانی که در معرض اسید های غیر آلی قوی مانند اسید هیدروکلریدریک مطالعه می شوند مورد بررسی قرار دادند و گزارش دادند که اثرات اسیدی بر تغییرات pH به سمت ۶-۵ باعث کاهش قابل توجهی در تشکیل بیوفیلم می شود (۲۵). Tang در سال ۲۰۱۲ گزارش داد که افزایش یا کاهش شدید pH به طور مستقیم منجر به کاهش تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* می شود و عنوان کرد تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* تحت تاثیر فاکتورهای محیطی مانند pH و دما است (۲۶). Ramli و همکاران در سال 2012 اثر pH و دما را بر تشکل بیوفیلم سویه های بالینی *بورخولدریا سودومالی* مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که تشکیل بیوفیلم در محیط LB در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و در حضور مقدار mM۲ گلوکز و pH۷/۲ افزایش می یابد (۲۷). Chagnot و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که چسبندگی حداکثر باکتری *اشریشیا کولای* O157:*H7* به پروتئین های عضلانی در pH۷ رخ داده است در حالیکه هیچ چسبندگی باکتریایی خاص قابل توجهی در pH۵/۵ مشاهده نمی شود (۲۸). Di Bonaventura و همکاران سال ۲۰۰۷ رابطه مشابهی بین افزایش pH و تولید بیوفیلم در *سالمونلا مالتوفیلیا* گزارش دادند (۲۹).

دلایل مختلفی برای تاثیر تغییرات pH بر تشکیل بیوفیلم مطرح شده است. گزارشات نشان داده که pH اسیدی ممکن است منجر به حذف پروتئین سطحی شود که منجر به چسبندگی و تشکیل بیوفیلم باکتری می شود (۳۰). تغییرات در pH منجر به تفکیک یا پروتونه شدن الکترولیت ها می شود ، تعاملات الکترواستاتیک بین سوبسترا و باکتری را از طریق تغییر در بار سطحی شان تعدیل می کند. بدیهی است که بارهای اسیدهای تیکوئیک (TA) باکتری های گرم مثبت نقش کلیدی در مرحله اولیه تشکیل بیوفیلم را ایفا می کنند (۳۱). اسیدهای تیکوئیک ، فراوان ترین پلی آنیون ها ی پیوند شده به لیپیدهای غشاء سیتوپلاسمی و پپتیدوگلیکان به نام های اسید لیپوتیکوئیک و اسید تیکوئیک دیواره هستند (۳۲و۳۳). هر دو این پلیمرها دارای محتوای بسیار متغیر از جایگزین های استر دی - آلانیل هستند که با معرفی گروه های آمینه پایه (بار مثبت) بار آنیونی خالص اسیدهای تیکوئیک را خنثی می کنند و منجر به ظرفیت بالاتر کلونی سازی می شوند (۳۴). این درجه دی آلانیلاسیون اسیدهای تیکوئیک در معرض تغییر بواسطه عوامل محیطی هستند.

به طور کلی این تحقیق نشان داد که تشکیل بیوفیلم باکتریایی در pH اسیدی و قلیایی شدید مانند pH۳ و pH۱۲ کاهش می یابد. در pH خنثی و قلیایی مانند pH۹ میزان تشکیل بیوفیلم در بالاترین حد است. با توجه به اینکه اغلب در بیمارستان ها برای تمیز کردن ابزار پزشکی و سطوح ، از ضد عفونی کننده های مبتنی بر pH اسیدی و قلیایی استفاده می کنند ، بررسی اثر این فاکتور محیطی مهم جهت انتخاب یک ضدعفونی کننده مناسب که مانع تشکیل بیوفیلم باکتریایی شود اهمیت ویژه ای دارد.

## تقدیر و تشکر

از همکاری صمیمانه جناب آقای امید حسینی کارشناس آزمایشگاه جامع تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی در انجام این تحقیق که پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین -پیشوا است، تشکر و قدر دانی می شود.

## منابع مورد استفاده

1. O'Gara, J. P., Humphreys, H. 2001. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. J Med Microbiol 50: 582-7.
2. Donlan, R. M., Costerton, J. W., 2002. Biofilms: survival mechanisms ofclinically relevant microorganisms. Clin Microbial Rev 15: 167-193.
3. Jefferson, K. K., 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? FEMS Microbiol Lett 236: 163–173.

4. Prabhakara, R., Harro, J. M., Leid J. G, Harris, M., Shirtliff, M. E., 2011. Murine Immune Response to a Chronic *Staphylococcus aureus* biofilm Infection. Infect Immun 79: 1789-96.
5. Wenzel, R. P., Edmond, M. B., 2001. The impact of hospital acquired bloodstream infections. Emerg Infect Dis 7: 174-7.
6. Vuong, C., Otto, M., 2002. *Staphylococcus epidermidis* infections. Microbes Infect 4: 481–489.
7. Hussain, M., Wilcox, M. H., White, P. J., 1993. The slime of coagulase- negative *staphylococci*: biochemistry and relation to adherence. FEMS Microbiol Rev 10: 191-207.
8. Ogston, A., 1984. On Abscesses. Classics in Infectious Diseases. Infect Dis 6 (1): 122-28.
9. Resch, A., Leicht, S., Saric, M., Pasztor, L., Jakob, A., Gotz, F., 2006. Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. Proteomics 6: 1867-77.
10. Simoes, L. C., Simoes, M., Oliveira, R., Vieira, M. J., 2007. Potential of the adhesion of bacteria isolated from drinking water to materials. J Basic Microbiol 47: 174–83.
11. Doyle, R. J., 2000. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. Microbes Infect 2: 391–400.
12. García-Gonzalo, D., Pagán, R., 2015. Influence of environmental factors on bacterial biofilm formation in the food industry: A Review. Post Doc Journal 3(6): 3-13.
13. Booth, I. R., 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. Microbiol Rev 49: 359–78.
14. Olsen, E. R., 1993. Influence of pH on bacterial gene expression. Mol Microbiol 8: 5–14.
15. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol 22: 996-1006.
16. Simoes, L. C., Simoes, M., Oliveira, R., Vieira, M. J., 2007. Potential of the adhesion of bacteria isolated from drinking water to materials. J Basic Microbiol 47: 174–83.
17. Memple, M., Schmidt, T., Weidinger, S., Schnopp, C. H., Foster, T., Ring J., Abeck, D., 1998. Role of *Staphylococcus aureus* surface-associated proteins in the attachment to cultured HaCa T keratinocytes in a new adhesion assay. J Invest Dermatol 111: 452-456.
18. Chaieb, K., Chaieb, O., Zmantar, T., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., 2007. In vitro effect of pH and ethanol on biofilm formation by clinical *ica*-positive *Staphylococcus epidermidis* strains. Annals Microbiol 31: 437-442.
19. Hamadi, F., Latrache, H., Mabrrouki, M., Elghmari, A., Outzourhit, A., Ellouali, M., 2005. Effect of pH on distribution and adhesion of *Staphylococcus aureus* to glass. J Adhesion Sci Technol 19: 73-85.
20. Shukla, B. N., Singh D. V., Sanyal, S. C., 1995. Attachment of non-culturable toxigenic *Vibrio cholerae O1 and non-O1 and Aeromonas spp*. to the aquatic arthropod Gerris spinolae and plants in the River Gangi, Varanasi. FEMS Immunol Med Microbiol 12: 113–120.
21. Karol, M., Hamilton, I. R.., 2004. Effect of acid stress on the physiology of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. Microbiology 150: 735-742.
22. Harjai, K., khandwaha, R. K., mittal, R. Y., Gupta, V., Sharma, S., 2005. Effect of pH on production of virulence factors by biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. Folia Microbiol 50: 99–102.
23. Tresse, O., Lebret, V., Benezech, T., Faille, C., 2006. Comparative evaluation of adhesion, surface properties, and surface protein composition of *Listeria monocytogenes* strains after cultivation at constant pH of 5 and 7. J Appl Microbiol 101: 53-62.
24. Lebeer, S., Tine, L. A., Verhoeven, M. P., Vanderleyden, V. J., Sigrid, C., 2007. Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. Apply Environ Microbiol 73: 6768-6775.
25. Nostro, A., Cellini, L., Ginestra , G., D'Arrigo, M., Di Giulio, M., Marino, A., Blanco, A. R., Favaloro, A., Bisignano, G., 2014. *Staphylococcal* biofilm formation as affected by type acidulant. APMIS 122: 648-53.
26. Tang. J., Chen. G., Liu. J., Rongsheng, R. Z., lianghong, A., Chen, Y., 2012. Effects of different cultivation conditions on *staphylococcus aureus* biofilm formation and diversity of adhesion genes. Gournal Food Dasety 32(2): 210-218.
27. Ramli, N. S. K., Guan, C. E., Nathan, S. H., Vadivelu, J ., 2012. The Effect of environmental conditions on biofilm formation of *Burkholderia pseudomallei* Clinical Isolates. PLOS ONE 7(9): 441-450.
28. Chagnot, C., Agus, A., Renier, S., Peyrin, F., Talon, R.., Astruc, T., Desvaux, M., 2013. In vitro colonization of the muscle extracellular matrix components by *Escherichia coli O157:H7*: the influence of growth medium, temperature and pH on initial adhesion and induction of biofilm

29. formation by collagens I and III. PLoS ONE: 8: 586-593.
30. Di Bonaventura, G., Stepanovic, S., Picciani, C., Pompilio, A., Piccolomini, R., 2007. Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. Folia Microbiol 52: 86–90.
31. Park, S. E., Jiang, S., Wessels, M. R., 2012. CsrRS and environmental pH regulate *group B Streptococcus* adherence to human epithelial cells and extracellular matrix. Infect Immun 80: 3975–3984.
32. Doyle, R. J., 2000. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. Microbes Infect 2: 391–400.
33. Endl, J., Seidl, H. P., Fiedler, F., Schleider, K. H., 1983. Chemical composition and structure of cell wall teichoic acids of *staphylococci*. Arch Microbiol 135: 215–23.
34. Vergara-Irigaray, M., Maira-Litran, T., Merino, N., Pier, G. B., Penades, J. R., Lasa, I., 2008. Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the *Staphylococcus aureus* cell surface. Microbiology 154: 865–77.
35. Neuhaus, F. C., Baddiley, J., 2003. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 67: 686–723