

مقاله تحقیقی

بررسی تاثیر pH اسیدی و قلیایی بر تشکیل بیوفیلم سوبه 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

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 سوبه های استافیلوکوکوس اورئوس است. تعداد ۱۰۰ سوبه استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های بالینی بیماران با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی شناسایی و جدا سازی شدند. قدرت تشکیل بیوفیلم سوبه 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 pH ۹ و pH ۷ بالاترین میزان، ۷۱٪ و ۷۸٪ می باشد. در حالیکه در pH ۳ و pH ۱۲ 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 دهنده بیوفیلم می توانند کمبود مواد غذایی، تغییرات pH و رایکال های اکسیژن را بهتر از ارگانسیم های پلانکتونی تحمل کنند (۳). مطالعات نشان داده که عفونت های مرتبط با بیوفیلم باعث ایجاد بیماری های مزمن می شوند که به پاسخ ایمنی میزبان مقاوم هستند (۴). مهمترین بیماری های مرتبط با بیوفیلم باکتریایی استئومیلیت، پریدونتیت و عفونت

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

بررسی تأثیر 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 دمای ۳۷ 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 نوویوسین انجام شدند. پس از شناسایی 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 شبانه روزی از جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس یوروپاتوزن در محیط تریپتیکاز سوی آگار (Merck, Germany) همراه با ۲٪ گلوکز انجام شد. کشت های باکتریایی رقیق شدند و سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند در محیط تریپتیکاز سوی برات تهیه شد. ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده 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. پس از این مدت پلیت ها خالی شده و با محلول بافر فسفات (PBS, pH 7) دمرتبه شستشو داده شدند. بعد از خشک شدن، چاهک ها با الکل متانول ۹۵٪ درصد به مدت ۱۵ دقیقه تثبیت شدند و سپس با رنگ کریستال ویوله (۱٪) به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شدند. پلیت ها خالی شده و با آب مقطر استریل شسته شدند. چاهک ها جهت بررسی نتایج با دستگاه خوانش

اطراف ایمپلنت ها، عفونت مزمن زخم، رینوسینوزیت مزمن، اندوکاردیت، عفونت چشمی و عفونت 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 نیاز است (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

و سويه ها بر اساس قدرت بيوفيلم به سه گروه : قوی، متوسط و منفي تقسيم شدند. در pH کنترل که ۷ در نظر گرفته شد، ۷۱ درصد سويه های استافيلوکوکوس اورئوس بيوفيلم قوی داشتند ، ۲۸/۱ درصد بيوفيلم متوسط و هيچ سويه ای فاقد قدرت بيوفيلم مشخص نشد. با تغيير pH محیط به pH۳ پس از انجام روش ميكروتيتير پليت و خوانش نتايج، ۳۵/۵ درصد سويه های استافيلوکوکوس اورئوس بيوفيلم قوی و ۶۳/۵ درصد بيوفيلم متوسط تشکيل دادند و ۱ درصد فاقد قدرت بيوفيلم بودند. نتايج تغيير pH محیط به pH۵ نشان داد که ۴۸ درصد سويه های استافيلوکوکوس اورئوس بيوفيلم قوی و ۵۰ درصد بيوفيلم متوسط تشکيل دادند، تنها ۲ درصد فاقد قدرت بيوفيلم بودند. با تغيير pH محیط از ۷ به pH۹ ، ۷۸/۱ درصد سويه های استافيلوکوکوس اورئوس بيوفيلم قوی و ۲۱/۹ درصد بيوفيلم متوسط تشکيل دادند، هيچ سويه ای فاقد قدرت تشکيل بيوفيلم شناسایی نشد. افزايش pH محیط به ۱۲ نشان داد که ۳۵/۴ درصد سويه های استافيلوکوکوس اورئوس بيوفيلم قوی و ۶۴/۶ درصد بيوفيلم متوسط تشکيل دادند.

نتايج نشان داد که شدت تشکيل بيوفيلم در pH۷ و بالاترين ميزان ۷۱/۹ درصد و ۷۸/۱ درصد است. در حالیکه در pH۳ و pH۱۲ کمترین ميزان ۳۵/۴ و ۳۵ درصد و سپس برای pH۵ ميزان شدت تشکيل بيوفيلم ۴۸ درصد گزارش شد (شکل ۱). آناليز آماری توسط روش ANOVA نشان داد که بين pH و تشکيل بيوفيلم سويه های استافيلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه ارتباط معناداری وجود دارد (P=۰/۰۰۰۰). نتايج مقايسه ميانگين داده ها در pH های مختلف، خطای استاندارد برای هر دو ميانگين را ۰/۱۵۱۹ نشان داد. بين pH۹ و pH کنترل اختلاف معناداری از نظر تشکيل بيوفيلم وجود ندارد (p>۰/۰۵)، ولی در pH۳ ، pH۵ و pH۱۲ اختلاف معناداری با pH کنترل از نظر تشکيل بيوفيلم سويه ها وجود دارد (p<۰/۰۵).

(ELISA reader Citation 3, Biotek.USA) و در طول موج ۵۷۰ نانومتر، با ۱۰۰ ميكروليتر محلول اسيد استيک گلاسيال ۰.۳۳٪ پر شدند (۱۵). قدرت بيوفيلم سويه ها به صورت قوی ($OD_{570} \geq 1$) ، (ضعيف $0.1 \leq$) و منفي ($OD_{570} < 1$) تعيين شد. برای هر سويه سه تکرار انجام شد. سويه *Staphylococcus aureus* ATCC25923 به عنوان کنترل مثبت انتخاب شد.

بررسی تاثیر تغييرات pH بر تشکيل بيوفيلم سويه های استافيلوکوکوس اورئوس

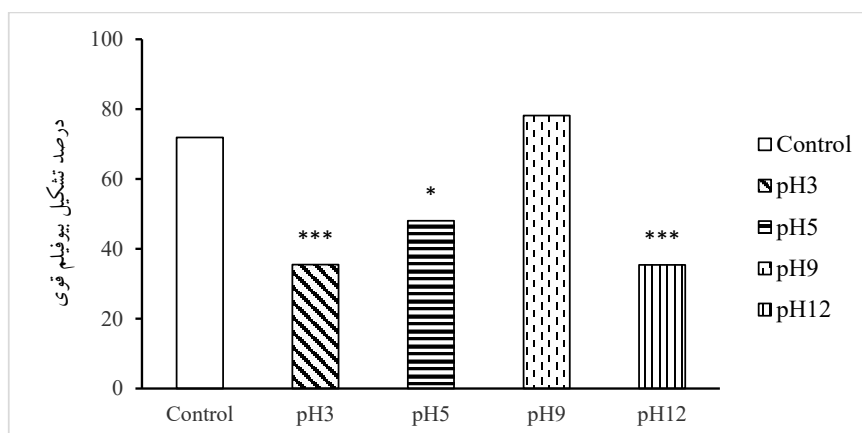
جهت بررسی تاثیر pH بر درجه تشکيل بيوفيلم سويه های مورد مطالعه ، pH محیط TSB به صورت ۳ ، ۵ ، ۹ و ۱۲ تنظيم شد. برای عمل اسیدی کردن از استيک اسيد ۱ نرمال و برای عمل قليایی کردن از هيدروکسید سدیم ۱ نرمال استفاده شده است. عمل خنثی سازی (pH7) نیز با خود محیط TSB صورت گرفت. برای بررسی هر pH روش ميكروتيتير پليت برای همه ايزوله ها با سه تکرار انجام شد. pH کنترل در pH۷ نظر گرفته شد.

آناليز آماری

تجزيه و تحليل آماری بوسیله نرم افزار SPSS v20 انجام شد. برای تجزيه واریانس از روش One way ANOVA استفاده شد. مقايسه ميانگين داده ها با استفاده از آزمون مقايسه ميانگين Tukey صورت گرفت. سطح احتمال کمتر از ۵ درصد به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

نتايج

نتايج تاثیر تغييرات pH بر تشکيل بيوفيلم سويه های استافيلوکوکوس اورئوس به روش کمی ميكروتيتير پليت پس از انجام روش ميكروتيتير پليت برای هر pH ، پليت ها توسط اليزا ريدير با طول موج ۵۷۰ نانومتر مورد خوانش قرار گرفتند



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.

Shukla و همکاران در سال ۱۹۹۵ به 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 در pH ۸/۵ سویه های سودوموناس آئروجینوزا افزایش تولید بیوفیلم داشتند. در کلبسیلا پنومونیه هم تولید بیوفیلم به طور مشابه تحت تاثیر قرار گرفت به طوری که در pH ۸/۵ تولید به ۱۵۱ تا ۳۱۹ درصد رسید. تولید قابل توجه بیوفیلم در pH بالاتر نیز در ویبریو کلرا مشاهده شد. افزایش تولید بیوفیلم در pH ۸/۵ در مقابل ۵/۵ معنی دار بود ($p = 0.001$) (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 دندان را تحت تاثیر قرار دهد (۲۱). Harjai در سال ۲۰۰۵ تولید بیوفیلم در سودوموناس آئروجینوزا را در pH بالاتر از ۸ بیشتر از ۶-۵ 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 مونوسیژنز در ۵ pH بیشتر از ۷ کاهش یافته است (۲۳). Lebbber و همکاران 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

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 سوبسترای و همچنین عوامل محیطی قرار می گیرد (۱۶). در این تحقیق تاثیر فاکتور محیطی pH بر روی بیوفیلم ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که شدت تشکیل بیوفیلم در pH ۷ و ۹ بالاترین میزان ۷۱ درصد و ۷۸ درصد است. در حالیکه در pH ۳ و ۱۲ 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 ($P < 0.0001$). مقایسه قدرت تشکیل بیوفیلم سویه های مورد مطالعه در pH های مختلف نسبت به pH کنترل نشان داد که در pH ۳ و ۵ pH 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 pH ۳ ممانعت می شود، شباهت دارد (۱۷ و ۱۸). 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 pH ۲ یا ۳ و مقادیر pH قلبیایی ضعیف می شود (۱۹).

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 های پیوند شده به لیپیدهای غشاء سیتوپلاسمی و پپتیدوگلیکان به نام های اسید لیپوتیکوئیک و اسید تیکوئیک دیواره هستند (۳۲ و ۳۳). 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 آلانیل سیون 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 pH ۱۲ و pH ۳ کاهش می یابد. در pH خنثی و قلیایی مانند pH ۹ 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 ضد عفونی 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.

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 ۵-۶ 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 ۲۰۱۲ اثر pH و دما را بر شکل بیوفیلم سوبه 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 ۲ mM گلوکز و pH ۷/۲ افزایش می یابد (۲۷). Chagnot و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که چسبندگی حداکثر باکتری / شریشیا کولای O157:H7 به پروتئین های عضلانی در pHV رخ داده است در حالیکه هیچ چسبندگی باکتریایی خاص قابل توجهی در pH ۵/۵ 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 pH منجر به تفکیک یا پروتونه شدن الکترولیت ها می شود، تعاملات الکترواستاتیک بین سوبسترا و باکتری را از طریق

منابع مورد استفاده

- O'Gara, J. P., Humphreys, H. 2001. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. J Med Microbiol 50: 582-7.
- Donlan, R. M., Costerton, J. W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbial Rev 15: 167-193.
- 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., Shirliff, 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., Leuret, 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