



## بررسی تاثیر خصوصیات سطح بر تشکیل بیوفیلم و نحوه پیشگیری از بیوفولینگ

علی بهرامی<sup>۱\*</sup>، وحید مومنی<sup>۲</sup>، مجتبی خانی<sup>۳</sup>

۱- استادیار، گروه مهندسی شیمی بیوتکنولوژی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۵۸۷۵-۱۷۷۴

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی شیمی بیوتکنولوژی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۱۳۶۵-۱۱۱۵۵

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی شیمی بیوتکنولوژی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۵۸۷۵-۱۷۷۴

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۱۹ تاریخ بازبینی نهایی: ۹۳/۲/۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۳ در دسترس بصورت الکترونیک: ۹۳/۱/۳۰

### چکیده

رسوب زیستی (بیوفولینگ) مشکلی است که توسط بیوفیلم‌های میکروبی ایجاد می‌شود. لایه لجن ایجاد شده روی سطوح به عنوان نمایش معمول از پدیده‌ای به نام بیوفولینگ می‌باشد. رسوب‌دهی بیولوژیکی در طیف گسترده‌ای از فرآیندهای صنعتی اتفاق می‌افتد و در همه آن‌ها به خصوص بعضی از فرآیندهای گران‌قیمت ایجاد مشکلاتی می‌کند. به‌طور مثال می‌توان به مشکلات موجود در مبدل‌های حرارتی اشاره کرد که در آن‌جا ایجاد رسوب ماکروارگانیسیم‌ها موجب کاهش بازده انتقال حرارت و افزایش مقاومت اصطکاکی در برابر جریان می‌شود. تشکیل بیوفیلم وابسته به شرایط محیطی در برگزیده و خواص زیرلایه است. هنگامی که یک بیوفیلم تشکیل می‌شود عوامل زیادی در زنده ماندن و مقاومت سلول‌ها اثرگذار است. چسبندگی سلول‌ها به سطوح لازم‌ه کلونیزه‌شدن آن‌هاست. با این حال میکروارگانیسیم‌های اتصال یافته به سطوح ممکن است نتوانند تکثیر یابند و فقط به تنهایی روی سطوح زنده بمانند، برای مثال در مرز جامد-گاز (هوا) بدون اینکه تشکیل بیوفیلم دهند زنده می‌مانند. احتباس سلول‌های اتصال یافته یک مورد کلیدی در بهداشت سطوح و کنترل بیوفیلم است. عواملی که تاثیرگذار در این حس‌شدن و حفظ سلول‌ها در بیوفیلم هستند با عواملی که تاثیرگذار در تشکیل بیوفیلم روی سطوح هستند متفاوت است و شامل خواص زیرلایه، حضور مواد آلی، وجود میکروارگانیسیم‌های قدرتمند در اتصال و البته شرایط محیطی می‌باشند. اکثر نشریات بر روی سطوح جامد-مایع تمرکز می‌کنند و در مورد سطوح مرزی جامد-گاز و تحقیقات وابسته به بیوفیلم‌های این محیط‌ها به مقدار زیادی بی‌توجهی شده است. هدف از این مقاله مروری بررسی این عوامل تاثیرگذار و شناخت راهکارهای موثر برای مقابله با این عوامل برای پیشگیری از ایجاد بیوفولینگ روی سطوح می‌باشد.

### واژه‌های کلیدی

بیوفیلم، خصوصیات زیرلایه، پلیمر، رنگ، زبری زیرلایه.





## The Effect of Substratum Properties on the Survival of Attached Microorganisms and Preventing from Biofouling

Ali. Bahrami<sup>1\*</sup>, Vahid. Momeni<sup>2</sup>, Mojtaba. Khani<sup>3</sup>

1- Assistant Professor, Chemical engineering Biotechnology, Malek Ashtar university, P. O. Box: 1774-15875

2- MSc Student, Chemical Engineering Biotechnology, Sharif University, P. O. Box: 11155-11365

3- MSc Student, Chemical Engineering Biotechnology, Malek Ashtar university, P. O. Box: 1774-15875

### Abstract

Microbial biofouling is a problem of microbial biofilms slime on surfaces is the usual manifestation of a phenomenon called "biofouling". It occurs in a wide range of industrial processes and in all of them it is a nuisance, sometimes a very expensive one. An example is the interference with heat exchangers, where both macro- and microfouling contribute to losses in heat transfer and to increases in fluid friction resistance. Biofilm formation is dependent on the surrounding environmental conditions and substratum parameters. Once a biofilm forms many factors may influence cell survival and resistance. Cell adhesion to a surface is a prerequisite for colonization. However, attached microorganisms may not be able to multiply, and may merely be surviving on the surface, for example, at a solid-air interface, rather than forming a biofilm. Retention of attached cells is a key focus in terms of surface hygiene and biofilm control. Factors that affect this retention may differ from those affecting biofilm formed on the solid-liquid interface: the nature of the substratum, presence of organic material, the vitality of the attached microorganism, and of course the surrounding environment. The majority of publications focus on the solid-liquid interface; literature addressing the solid-air interface is considerably less substantia. this paper reviews these effecting factors and Knowledge of management strategies to these factors as preventing surfaces from biofouling.

### Keywords

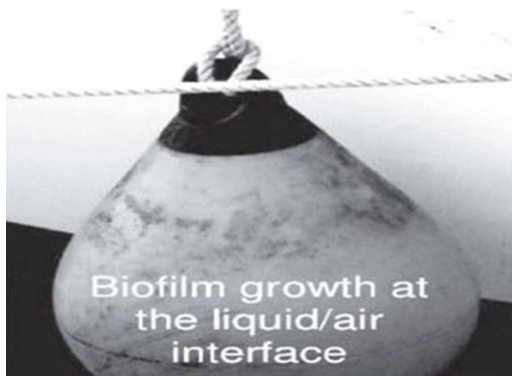
Biofilm, Substratum Properties, Substratum Roughness.



\*Corresponding author: [a\\_bahrami@mut.ac.ir](mailto:a_bahrami@mut.ac.ir)

## ۱- مقدمه

تاثیرگذار است، اما با این حال خصوصیات سطح سلول نیز باید در نظر گرفته شود. سلول‌ها حاوی ترکیبات شیمیایی مختلف و سطوح متفاوتی هستند و بنابراین خواص شیمیایی و فیزیکی شیمیایی متفاوتی دارند. علاوه بر این، این خصوصیات ممکن است بر اثر تغییر محیط نیز تغییر کنند. هنگامی که زیرلایه در محیط آبی با مواد آلی پوشیده می‌شود به عنوان یک فیلم تهویه برای سلول‌ها، علاوه بر پلیمر خارج سلولی<sup>۲</sup> (EPS) می‌باشد. پلیمر خارج سلولی نیز نقش مهمی را در چسبندگی اولیه سلول‌ها ایفا می‌کند. در مرز جامد-گاز (هوا) در یک محیط باز، انتقال اولیه سلول‌ها به سطح ممکن است در یک لحظه و در جایی که سطح به وسیله تماس مستقیم با مواد رسوبی آلوده شده باشد اتفاق افتد. علی‌رغم این پیچیدگی‌ها در اتصال اولیه سلول‌ها، تلاش در راستای کاهش، تاخیر و جلوگیری از این اتصال اولیه، به نظر می‌رسد که اولویت بیشتری در کنترل عواقب شکل‌گیری بیوفیلم داشته باشد، برای مثال این کار را می‌توان با اصلاح سطح انجام داد. دیدگاه‌های زیادی در ارتباط با پدیده اصلاح سطح شامل تغییر در شکل سطح (در مقیاس نانو، میکرو، ماکرو)، شیمی سطح (تشکیل خود به خودی تک لایه‌ها) و خواص فیزیکی شیمیایی سطح (سطوح به شدت آب‌گریز) وجود دارد. اما با این وجود همه سطوح دیر یا زود توسط ارگانیسم‌ها اشغال می‌شوند، در ادامه به این خصوصیات اشاره می‌کنیم [۲].



شکل ۱- جسم شناور پلاستیکی (راهنمای دریایی) که بیوفیلم روی آن در حال رشد می‌باشد و مثالی از رسوب‌گیری مواد در سطوح جامد-مایع-هوا می‌باشد [۲].

## ۳- خصوصیات فیزیکی شیمیایی سطح

بسیاری از فعل و انفعالات فیزیکی شیمیایی بین میکروارگانیسم و سطوح جامد در متون بیان شده است [۳]. اگر خصوصیات فیزیکی شیمیایی یک سطح بتواند به خوبی کنترل و تعیین شود در آن صورت اتصال و بقای سلول‌ها و تشکیل بیوفیلم می‌تواند به راحتی مدیریت شود. اطلاعات ضد و نقیضی در مورد تاثیر پیچیده خصوصیات فیزیکی شیمیایی سطح در اتصالات میکروبی در متون آمده است [۴]. چسبندگی سلول‌های رویشی [۵]، اسپوره‌های باکتریایی [۶] و باکتری‌های آب شیرین [۷] با افزایش آب‌گریزی سطح افزایش می‌یابد و دیگر ارگانیسم‌ها مانند اسپور

اتصالات میکروبی، چسبندگی، حفظ سلول‌ها و در نتیجه تشکیل بیوفیلم‌ها از نگرانی‌های عمده در مکان‌هایی هستند که بیوفیلم‌ها نقش کلیدی را در زنده ماندن میکروارگانیسم‌ها و مقاومت آن‌ها به طیف وسیعی از عوامل خارجی برای مثال پروتوزاها، شرایط محیطی، و یا عوامل شیمیایی ایفا می‌کنند. سازوکار این مقاومت‌ها به چنین عوامل خارجی، بسیار متنوع هستند. دونلان و کاسترتون<sup>۱</sup> [۱] بیوفیلم را به عنوان یک جامعه میکروبی تعریف می‌کنند که به وسیله اتصال برگشت‌ناپذیر سلول‌ها به زیرلایه و سطوح مرزی دیگر مشخص می‌شوند و سلول‌ها در مواد پلیمری خارج سلولی که خودشان تولید کرده‌اند جمع می‌شوند. سلول‌های موجود در بیوفیلم ممکن است حاوی گونه‌های اصلاح شده با توجه به نرخ رشد و رونویسی ژن باشند. مواد پلیمری خارج سلولی که سلول‌ها را احاطه کرده است بیشتر نخواهد شد مگر اینکه شرایط مناسب برای سلول به منظور تولید این مواد ایجاد شود. سلول‌های اتصال یافته، در سطوح مرزی جامد-گاز همچون سطوح جامد-مایع وجود دارند. در تماس قرار گرفتن متناوب زیرلایه با رطوبت برای مثال در هنگام تمیز کردن سطوح بهداشتی، و یا سطوح خارجی در تماس با باران و یا سطوح خمیده که ایجاد سطح جامد-گاز-مایع می‌کند (شکل ۱) به وجود آمدن رسوب روی آنان را قطعی می‌کند. چسبندگی لازمه تجمع یافتن است. میکروارگانیسم‌ها می‌توانند در لایه نازکی از فیلم آب زنده بمانند، اما میکروارگانیسم‌های اتصال یافته ممکن است نتوانند تکثیر یابند به خصوص زمانی که رطوبت کم باشد. بنابراین ممکن است بسیاری از این عوامل که در زنده ماندن سلول‌ها در بیوفیلم‌ها تاثیرگذار هستند برای سلول‌هایی که روی سطوح بدون رطوبت هستند مناسب نباشد. بنابراین بسیاری از عوامل خارجی مانند ماهیت زیرلایه و شرایط زیست محیطی به طور موثری در زنده ماندن سلول‌ها تاثیرگذارند [۲]. در مقاله حاضر سعی شده است تا با مروری بر این خصوصیات زیرلایه که تاثیرگذار بر محبوس شدن و حفظ سلول‌ها هستند و معرفی راه‌کارهای موثر از تشکیل بیوفیلم و متعاقباً ایجاد بیوفولینگ جلوگیری کرد.

## ۲- چسبندگی اولیه به سطوح

بخش عمده‌ای از متون بر روی مقاومت و چسبندگی سلول‌هایی که به سطوح اتصال یافته‌اند اختصاص داده شده است. با این وجود به نظر می‌رسد که یک رویکرد فعال، هدف گرفتن میکروارگانیسم‌ها به منظور جلوگیری از اتصال اولیه و بقا روی سطح می‌باشد. چسبندگی اولیه سلول‌ها به سطوح به وسیله تعدادی از عوامل کنترل می‌شود. در محیط‌های آبی جامد-مایع سلول‌ها خود را در ابتدا به وسیله نیروهای طبیعی مانند نفوذ، گرانش و حرکت براونی به سطح نزدیک می‌کنند، اما در مجاورت سطح نیروهای فیزیکی شیمیایی، الکترواستاتیک، واندروالسی و هیدروژنی بر نزدیک شدن سلول‌ها به سطوح و متعاقباً اتصال آن‌ها تاثیرگذار می‌باشند. خصوصیات فیزیکی شیمیایی، شیمیایی و شکل سطح (از نظر ناهمواری) بر اتصال سلول‌ها

<sup>2</sup> Exteracellular Polymeric Substance

<sup>1</sup> Donlan and Costerton

#### ۴- خصوصیات شیمیایی مواد

خصوصیات شیمیایی مواد توسط عناصری که در نهایت ملکول‌های سطح را تشکیل می‌دهند معین می‌شود. شیمی به صورت خصوصیات شیمیایی موادی که مستقیماً در اتصالات میکروبی و بقای سلول‌ها تاثیر گذارند، تعریف می‌شود [۱۴]. طیف وسیعی از سطوح خاص، در جایی که اتصالات میکروبی و تشکیل بیوفیلم رایج هستند، استفاده می‌شوند. خصوصیات شیمیایی سطح ناگزیر بر این فعل و انفعالات تاثیر گذارند. بنابراین انتخاب مواد به کار رفته در سطوح باید بر اساس خصوصیات مورد نظر سطح (به طور مثال غوطه‌وری/ در معرض قرار گرفتن، رسوب‌گیری کم، سایش کم، غیرسمی بودن، هزینه پایین و غیره) انجام شود [۱۴].

#### ۴-۱- فلزات

اتصال سلول‌ها و در نتیجه تشکیل بیوفیلم می‌تواند روی فلزاتی مانند آلومینیم [۱۵]، فولاد ضدزنگ [۱۶]، مس [۱۷] و غیره اتفاق افتد. با این حال برخی از فلزات مانند آلومینیم و مس برای باکتری‌ها سمی هستند [۱۸]. مقاومت باکتریایی به بعضی فلزات مانند استات سرب (ترکیب منواکسید سرب با اسید استیک) به علت وجود زیاد این مواد در زیست‌کش‌ها یا گندزداها بوده در حالی که مقاومت به سولفات مس به علت استفاده آن به عنوان کشنده جلبک‌ها [۱۹] توسط هیراماتسو و همکارانش<sup>۴</sup> نسبت داده شده است. با توجه به افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها به بعضی فلزات و مقدار رطوبت تدریجی لازم برای عمل فعالیت ضد میکروبی، ادغام طیف وسیعی از فلزات در سطوح ضدباکتریایی گزارش شده است [۲۰]. شرایط مکانی این سطوح اعم از غوطه‌وری، خشکی یا خیس متناوب، به وضوح فعالیت‌های ضد میکروبی این سطوح را تحت تاثیر قرار می‌دهد. امروزه نقره و مس توجه زیادی را به علت اثر ضد میکروبی‌شان به خود جلب کرده‌اند. ترکیبات ضد میکروبی نقره و مس در سیستم‌های توزیع آب برای غیرفعال کردن پاتوژن‌ها گاهی اوقات به کار گرفته می‌شوند، با این حال مقاومت باکتریایی نسبت به نقره و دیگر فلزات ممکن است منجر به محدود شدن تاثیر این مواد ضدباکتریایی شود [۲۱]. براساس گزارشات موجود توسط استار و جونز<sup>۵</sup> [۲۲] مس هم باعث افزایش نرخ رشد برخی باکتری‌ها و همچنین کاهش رشد برخی جمعیت‌های میکروبی می‌شود [۲۳]. آلیاژهای مس نیز فعالیت ضدباکتریایی بیشتری در مقایسه با برنج و فولاد ضدزنگ نشان داده‌اند [۲۴]، و با افزایش مس زمان زنده ماندن سلول‌ها نیز کاهش می‌یابد [۲۵]. به منظور کشتن سلول‌ها بهتر است از سطوح حاوی مس به صورت محدود، در تمیز کردن سطوح همراه با عوامل ضد میکروبی دیگر استفاده شود [۲۶] زیرا تجمع مواد غیر میکروبی و واکنش عامل تمیزکننده با مس و مواد رسوبی از تاثیر مواد ضد میکروبی روی سطوح باز و بسته می‌کاهد [۲۷]. در واقع توانایی هر

اینترومورفا<sup>۱</sup> [۸]. نشان داده‌اند که ترجیحاً به سطوح آب‌گریز اتصال می‌یابند. توسط کرسون و آلسوپ<sup>۲</sup> [۹] نشان داده شده است که اتصال سلول‌ها به پلاستیک‌های آب‌گریز بسیار سریع اتفاق می‌افتد در حالی که اتصال سلول‌ها به سطوح آب‌دوست مانند اکسیدهای فلزی، شیشه و فلزات با افزایش زمان تماس افزایش می‌یابد [۱۰]. انرژی آزاد سطحی زیرلایه در اتصال اولیه سلول‌ها بسیار مهم شناخته شده است اما فعل و انفعالات موجود در این موضوع بسیار پیچیده هستند. تشکیل بیوفیلم متقارن با افزایش عناصر باردار حاوی بار مثبت غیرآلی در سطح بوده [۱۱] و بار سطحی مثبت زیرلایه نشان داده است که مانع رشد سطحی باکتریایی شده، علی‌رغم اینکه تاثیر مثبت در چسبندگی اولیه دارد [۱۲].

بیشترین نرخ جدا شدن بیوفیلم‌های دریایی یا باکتریایی از سطوح در انرژی آزاد سطحی ۲۷-۲۰ mN/m اتفاق می‌افتد [۱۳]. توزیع انرژی سطحی زیرلایه وابسته به ساختمان سطح بوده و بر اثر عیوب سطحی مانند ترک یا خلل و فرج تغییر می‌کند البته این عیوب سطحی بر انرژی سطحی فیلم تهویه نیز اثرگذار است. توسط پرینگل و فلچر<sup>۳</sup> بیان شده است که شدت آب‌گریزی سطوح تغییر کرده که این تغییر در دقایق ابتدایی تماس سطح با مایع احاطه‌کننده، زمانی که فیلم اولیه‌ای از ملکول‌های آلی روی سطح ایجاد می‌شود نمودار می‌گردد [۱۷]. وجود این فیلم به وضوح در اتصالات میکروبی تاثیرگذار است و این احتمال می‌باشد که این فیلم تهویه بعضی از خصوصیات زیرلایه را نیز کاهش دهد. این فعل و انفعالات مربوط به اتصال سلول‌ها در سطوح باز، مانند مواقعی که تماس بین سلول‌ها و زیرلایه با خیسی کم باشد و یا انتقال بین سطوح در تماس مستقیم باشد و یا انتقال از طریق هوا انجام شود نمی‌باشد، با این حال بقای سلول‌ها روی سطوح بر اثر نیروهای منسجم و منطقه تماس بین سلول و زیرلایه تاثیر خواهند دید. در محیط‌های آبی فیلم تهویه حاوی ملکول‌های کوچک و یون‌ها، قبل از اتصال باکتریایی ایجاد شده و بنابراین این فیلم، ایجادکننده یک لایه اتصال بین سلول و سطح می‌باشد. فهم درست همه این فعل و انفعالات برای کنترل رسوب‌دهی سطوح ضروری می‌باشد. استفاده از سطوح ضد رسوبی امکان‌پذیر است، اما از آن جا که هر محیط رسوبی منحصر به فرد می‌باشد باید تمامی این محیط‌ها به صورت جداگانه بررسی شوند و اقدامات کنترلی در مورد آنان لحاظ شود. طول عمر و هزینه محصولات ضد رسوبی ایجاد شده باید در کنار مزیتی که آن ماده ضد رسوبی دارد، سنجیده شود. امکان اینکه بتوان از رسوب‌گیری به طور کامل جلوگیری کرد وجود نداشته، اما اگر بتوان رسوب را به تاخیر انداخت می‌توان گفت که به منفعتهای زیست محیطی، اقتصادی و سلامتی رسیده‌ایم [۱۸].

<sup>4</sup> Hiramatsu et al

<sup>5</sup> Starr and Jones

<sup>1</sup> Enteromorpha

<sup>2</sup> Carson and Allsopp

<sup>3</sup> Pringle and Fletcher

زیست‌کش‌ها بسته به بستر بیوفیلم، خصوصیات مواد و محیط اطراف تعیین می‌شود. زیست‌کش‌ها را می‌توان با محصور کردن آن‌ها در سطوح پلیمری، در انتشار آنان تاخیر ایجاد کرد و در نتیجه اثر ضد میکروبی مورد نظر را افزایش داد [۳۴]. پوشش‌ها و ملکول‌هایی که از منابع طبیعی استخراج شده‌اند برای جلوگیری از بقای میکروارگانیسم‌ها روی سطوح توصیه شده‌اند. در سطوح باز تلفیق عوامل ضد میکروبی مانند زیست‌کش‌ها (برای مثال مهارکننده‌های میکروبی) و فلزات (برای مثال استفاده از فناوری BioCote یا Agion) برای رسیدن به خصوصیات ضد میکروبی استفاده شده‌اند اما به هر حال سازوکار عمل زیست‌کش برای مثال نیاز به رطوبت، مدت زمان، طیف میکروبی همه از عوامل مهم در نتیجه‌گیری نهایی از اثرات زیست‌کش می‌باشند. از عوامل مهمی که با توجه به توسعه تلفیق زیست‌کش‌ها و سطح باید نظر گرفته شوند، شامل جنبه‌های فیزیکی و محیطی می‌باشند. تاثیر تلفیق زیست‌کش‌ها در سطح بستگی به توانایی زیست‌کش در جدا شدن از توده مواد و نفوذ به داخل محیط دارد. این یک موضوع مهم می‌باشد، چرا که اگر خصوصیات پیوندی، پراکندگی، ترکیب زیست‌کش صحیح نباشد در آن صورت نرخ انتشار زیست‌کش ممکن است خیلی سریع و یا اینکه خیلی آرام (ناموثر) باشد و یا اینکه انتشار به هیچ وجه وجود نداشته باشد. به طور معمول استفاده از زیست‌کش‌ها خیلی سریع پایان می‌یابد زیرا همیشه مقدار نامحدود زیست‌کش‌ها در دسترس نمی‌باشد. بسیاری از رنگ‌های ضد میکروبی برای کاهش اتصال میکروارگانیسم‌های زنده به سطوح غوطه‌ور در آب مانند کشتی‌ها، قایق‌ها و سازه‌های آبی استفاده شده‌اند. دو نمونه از زیست‌کش‌های رایج Triazine Herbicide Irgarol 1051 و Diuron می‌باشد که برای مهار فتوسنتز جلبکی طراحی شده‌اند. توسط لامبرت و همکارانش<sup>۷</sup> نشان داده شده است که به علت ورود برخی از ترکیبات به فاز مایع، محدوده ای از غلظت این ترکیبات در محیط خطرات زیادی را برای گونه‌های گیاهی *Nodiflorum* و *Chara vulgaris* ایجاد می‌کند [۳۵]. با توجه به مفهومی که از زیست‌کش‌ها تا به حال ارائه شده این ترکیبات در تجمع و حذف مواد آلی روی سطح و در محیط آبی دخالتی ندارند، و نتیجه استفاده از آن‌ها مهار یا کشتن ماکروارگانیسم‌ها و میکروارگانیسم‌هایی که به سطوح اتصال یافته‌اند می‌باشد و هیچ اثری بر انتقال مواد آلی به سطوح نخواهند داشت. بنابراین لایه‌هایی از مواد آلی به تدریج و در طی زمان روی سطح ساخته خواهند شد و به طور بالقوه اثر زیست‌کش را کاهش می‌دهند. اگر زیست‌کش به‌طور منظم در توده مواد پخش نشود آن وقت مناطقی از سطح برای اتصال میکروارگانیسم‌های قوی و مقاوم فراهم خواهد شد. هنگامی که این اتصال ایجاد می‌شود، کلونیزه شدن میکروبی و در نتیجه تشکیل بیوفیلم اتفاق می‌افتد و به علت این ناهمگونی در پخش زیست‌کش، مناطقی که غلظت زیست‌کش در آن زیاد است افزایش می‌یابد. بنابراین اگر چه سطوح آزادکننده زیست‌کش یک راه حل جزئی برای استفاده از سطح در زمان کوتاه می‌باشد ولی در زمان‌های زیاد این

<sup>7</sup> Lambert et al

عامل ضد میکروبی در یک سطح بسته به توانایی این عامل در نفوذ از زیرلایه به داخل بیوفیلم دارد. در مقابل هر عامل ضد میکروبی که توسط تماس مستقیم اثر می‌کند فقط در مقابل سلول‌های سطحی بیوفیلم اثرگذار است. تاثیر سطوح ضد میکروبی فقط در یک بازه زمانی قابل پیش‌بینی بوده و هنگامی که فیلم تهویه (مواد آلی) روی سطوح ایجاد می‌شود خصوصیات سطح تغییر خواهد کرد. این تغییر در خصوصیات سطوح موجب کاهش تماس مستقیم سطح با ارگانیسم‌های رسوب‌دهنده می‌شود و در نتیجه اثرات ضد رسوبی سطح را کاهش می‌دهد. ایکسنر و همکارانش<sup>۱</sup> این موضوع را در لوله‌های مسی حاوی مواد ضد میکروبی در مکان‌هایی که بیوفیلم‌ها هستند بررسی و بیان کردند، هنگامی که سطح رسوب می‌گیرد خواص ضد میکروبی کاهش می‌یابد مگر آنکه سطوح به طور منظم تمیز شوند [۲۸].

#### ۴-۲- پلیمر

پلیمرهای ترکیبی حاوی افزودنی‌های شیمیایی مانند آنتی‌اکسیدان، پایدارکننده‌ها، روان‌سازها و رنگدانه‌ها به منظور افزایش خصوصیات شیمیایی و فیزیکی مواد به سطوح اضافه می‌شوند [۲۹]. با این حال ممکن است این افزودنی‌ها به محیط زیست وارد گردد و به عنوان منبع غذایی میکروارگانیسم‌های حاضر باشند، برای مثال فسفر باعث افزایش تشکیل بیوفیلم روی پلی‌ونیل کلراید در آب‌های محدود به فسفر شده است [۳۰]. در چندین مورد تحقیق نشان داده شده است که مواد پلاستیکی می‌توانند باعث افزایش رشد بیوفیلم شوند. توسط نیکوئیت و همکارانش<sup>۲</sup> پیشنهاد شده است که رشد روی لوله‌های پلاستیکی قابل مقایسه با فولاد، آهن و سیمن می‌باشد [۳۱]. بک من و ادوین<sup>۳</sup> از سلول‌های آکواباکتریوم<sup>۴</sup> تحت رشد پیوسته روی فولاد ضدزنگ و سطوح پلی‌اتیلن با چگالی متوسط (MDPE)<sup>۵</sup> استفاده کردند و یافتند که چگالی سلول‌های بیوفیلم روی سطوح پلی‌اتیلن چهار برابر بیشتر از فولاد ضدزنگ است. هنگامی که لوله‌های مختلف با ضد عفونی‌کننده‌های کلرومونوکلرآمین آزمایش شدند نشان داده شد که مواد سیمنی کمتر از مواد پلاستیکی در معرض باکتری‌ها قرار می‌گیرند (مومبا و ماکالا)<sup>۶</sup> [۳۲]. نرمی نسبی سطوح پلیمری آن‌ها را مستعد آسیب دیدگی سطح می‌کند که بر شکل سطح (زبری) و از این رو رسوب‌گرفتنی و قابلیت تمیز شدن این سطوح تاثیر می‌گذارد [۳۳]. با این حال مطالعات طولانی مدت و کامل برای ارزیابی اثر سایش سطح و رسوب‌گیری تمامی سطوح با مواد هیومیک (مواد آلی طبیعی)، روغن یا مواد معدنی ضروری می‌باشد. در ادامه تلاش برای جلوگیری و کاهش اتصال و زنده ماندن سلول‌ها روی سطح، عوامل ضد میکروبی با هم تلفیق شده و در داخل پلیمرها به کار برده شده‌اند. نرخ انتشار یون‌های فلزی و

<sup>1</sup> Exner

<sup>2</sup> Niquette

<sup>3</sup> Bachmann and Edyvean

<sup>4</sup> Aquabacterium

<sup>5</sup> Medium Density Polyethylene

<sup>6</sup> Momba and Makala



متأسفانه برخی از مواد استفاده شده در رنگ‌ها مانند (مس و ترکیبات حاوی قلع با هیدروکربن) می‌توانند برای برخی از گونه‌های غیر هدف نیز مانند برخی صدف‌های خوراکی [۴۱] و موجودات دریایی [۴۲، ۴۳] سمی باشند. استفاده از رنگ‌های ضد رسوبی در برخی از کشورهای اروپایی مانند سوئد، دانمارک، آلمان، فرانسه ممنوع شده است. این موضوع باید ذکر شود که اگر چه از مس به‌طور گسترده‌ای در ترکیبات رنگ‌ها در اروپا استفاده شده ولی سوئد استفاده از آن را در رنگ‌های ضد رسوبی بر روی وسایل آبی در امتداد سواحل سوئد و دریای بالتیک ممنوع کرده است. با این حال نشان داده شده است که ترکیبات خالی از سم که حاوی مس، قلع سه بوتیله و Irgarol نباشد و به تازگی هم توسعه یافته‌اند، همچنان برای برخی از ارگانسیم‌های دریایی سمی می‌باشد [۴۴]. روی سطوحی که به‌طور کامل در آب نباشند، در سطح خارجی آن‌ها یک ناحیه مرزی جامد-گاز (هوا)- مایع ایجاد می‌شود و این شستشوی فیزیکی که با انتشار خصوصیات ضد میکروبی مورد نظر همراه می‌شود کمک به کاهش رسوب روی سطح می‌کند. در سطوح داخلی تمیز شدن آسان اهمیت بیشتری تا خصوصیات ضد میکروبی ویژه دارد و در محیط‌های بهداشتی نیز ممکن است برخی از اثرات زیست‌کش مطلوب باشد، بنابراین مصرف رنگ‌های فتوکاتالیزوری در حال افزایش می‌باشد. پرتو UV نیز یک راه موثر است اما یک روش فتوشیمیایی موقت می‌باشد که نیازمند به یک منبع تابش خاص با طول موج UV در محدوده (۲۵۴-۱۸۵) nm می‌باشد. فتوکاتالیز یک روش جایگزین برای ضد عفونی مستقیم از طریق UV می‌باشد و اثر ضد میکروبی در طول موج‌های بالا و توسط خورشید و نورهای مصنوعی ایجاد می‌شود. گروه وسیعی از نیمه هادی‌ها مانند دی اکسید تیتانیوم، اکسید قلع و اکسید روی، مواد فتوکاتالیزوری مناسبی با جذب نور UV در طول موج‌های بالا (۴۰۰-۳۲۰) nm [۴۵] می‌باشند. دی اکسید تیتانیوم به همراه برخی فلزات فعالیت فتوکاتالیزوری مناسبی را نشان داده‌اند که موجب تخریب مواد آلی و میکروارگانسیم‌ها می‌شود [۴۶]. تلاش‌هایی توسط آلن و هکارانش<sup>۳</sup> در جهت اثربخشی نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم روی تخریب باکتری‌ها انجام شده است [۴۷]. یکی از رنگ‌های فتوکاتالیزوری که در حال حاضر در بازار موجود می‌باشد Aoinn است. با این حال اطلاعات بر روی اثر این مواد محدود می‌باشد. پیش‌بینی اثر بخشی فعالیت رنگ‌های فتوکاتالیزوری به دلیل فعل و انفعالات اجزای رنگ با مواد شیمیایی بسیار پیچیده می‌باشد [۴۸].

#### ۵- ناهمواری (زبری) زیر لایه

برخی از اصطلاحات مهندسی برای تعریف ناهمواری سطح استفاده شده است اما  $R_a$  (میانگین فاصله دره‌ها و قله‌ها در امتداد خط مرکزی)<sup>۴</sup> یک مشخصه جهانی برای ناهمواری سطح می‌باشد که در بسیاری از مقالات از این ضریب استفاده شده است [۴۹، ۵۰].

سطوح به علت تجمع مواد آلی از ارزش‌های محدودی برخوردارند، البته این موضوع فقط مختص مرز جامد-مایع می‌باشد [۳۵].

#### ۴-۳- رنگ‌ها

پوشش‌ها و رنگ‌هایی که برای استفاده در کشتی‌ها یا اجزای زیر آب استفاده می‌شوند مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات شامل الیاف، رنگ، توسعه‌دهنده‌ها، حلال‌ها، رقیق‌کننده‌ها و افزودنی‌ها (به‌طور مثال زیست‌کش‌ها) می‌باشد [۳۶]. هدف از استفاده از رنگ‌های ضد میکروبی عمدتاً جلوگیری از توسعه رسوب‌های ماکروارگانسیم‌ها به خصوص صدف‌ها می‌باشد. از آن‌جا که میکروارگانسیم‌ها روی سطوح می‌توانند اتصال دیگر ارگانسیم‌ها را افزایش دهد، بنابراین جلوگیری از توسعه بیوفیلم میکروبی ممکن است اتصال و تجمع ماکروارگانسیم‌ها را روی سطح کاهش دهد [۳۷]. بنابراین امتحان روش‌های جدید برای بقا و مقاومت میکروارگانسیم‌ها و ماکروارگانسیم‌ها ضروری می‌باشد. همانند پلیمرها، ماهیت پیچیده رنگ‌ها و اجزای آن‌ها نیز بر فعالیت مواد ضد میکروبی و زیست‌کش‌ها تاثیر می‌گذارد و در انتها فعالیت ضد میکروبی خود رنگ نیز تاثیر خواهد دید. برای ایجاد خصوصیات ضد میکروبی موثر از زیست‌کش‌های آلی مانند ایرگارول<sup>۱</sup> همراه با مس برای کنترل ارگانسیم‌های رسوب‌دهنده مقاوم به مس استفاده می‌شود [۳۸]. توسط سند برگ و همکارانش<sup>۲</sup> نشان داده شده است که نرخ انتشار رنگ از مس تنها به ترکیب مس و خواص حلالیت آن بستگی ندارد بلکه به خصوصیات ساختمانی رنگ نیز بستگی دارد [۳۹]. لایه زیرین نیز ممکن است بر خصوصیات ضد رسوبی رنگ‌ها تاثیرگذار باشد. تنگ و کونی نشان دادند که استفاده از سطوح پوشش‌دار به همراه رنگ‌ها تعداد گونه‌های *Pseudomonas Aeruginosa* روی فولاد ضد زنگ را کاهش می‌دهد اما اثر کمی بر روی سلول‌ها روی پشم شیشه یا آلومینیم دارد. با این حال زمانی که آن‌ها مس یا قلع سه بوتیله را به عنوان پوشش سطحی به رنگ اضافه کردند توسعه اولیه بیوفیلم‌ها برای ۷۲-۹۶ ساعت مهار شد. بیوفیلم‌هایی که بر روی سطوح پوشش داده شده با مس یا قلع سه بوتیله تشکیل شد مقادیر زیادی EPS (زئینه خارج سلولی) را سلول‌ها تولید نمی‌کنند و بنابراین بیوفیلم ممکن است حاوی سلول‌های مقاوم به قلع سه بوتیله یا مس باشد و این مقدار بیوفیلم فقط به واسطه آن‌ها تولید شده باشد [۳۷].

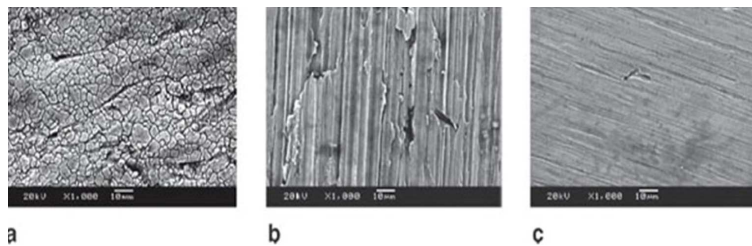
تلاش‌های زیادی در جهت استفاده از محصولات طبیعی استخراج شده به عنوان عامل ضد رسوبی در رنگ‌ها شده است. چهار نوع باکتری جدا شده از محیط زیست دریایی برای تولید این محصولات طبیعی استفاده شده‌اند که به ده رنگ که حاوی آب هستند اضافه شدند [۴۰]. پنج تا از رنگ‌ها نشان دادند که مانع از ته‌نشینی لاروهای صدف‌ها می‌شوند. جالب است که بدانید تولیدکنندگان این رنگ‌های ترکیبی نیازی نیست که محتویات رنگ‌های زیر ۱٪ وزنی را مشخص کنند. رنگ‌های ضد رسوبی ممکن است شامل مقادیر قابل توجهی عناصر فلزی و غیر فلزی باشند.

<sup>3</sup> Allen et al

<sup>4</sup> The average of the peak and valley distances measured along a centre line

<sup>1</sup> Irgarol

<sup>2</sup> Sandberg et al



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی از سطح فولاد ضدزنگ که شیار در آن ایجاد شده و نشان‌دهنده ماندن میکروارگانیسم‌ها در شیارها می‌باشد. شکل a مربوط به سطح با شیارهایی در مقیاس ماکرو و شکل b مربوط به سطحی با شیارهایی در مقیاس میکرو و شکل c مربوط به سطحی با شیارهایی در مقیاس نانو می‌باشد [۵۲].

مشاهدات با ارزیابی نیروهای چسبندگی توسط میکروسکوپ اتمی تایید شده است [۵۸].

### ۶- نتیجه‌گیری

اتصال میکروارگانیسم‌ها روی زیرلایه، کلید توسعه بیوفیلم در مرز جامد-مایع است. همچنین یک پتانسیل قوی برای انتقال ارگانیسم‌ها در سطوح مرزی جامد-گاز (هوا) می‌باشد. اگر چه معنی رسوب‌دهی سلول‌ها روی سطوح این دو سیستم متفاوت است ولی خصوصیات زیرلایه مانند خصوصیات شیمیایی و خصوصیات شکلی سطح و حضور لایه تهویه‌ای شامل مواد آلی یا غیر آلی روی سطح برای ایجاد بیوفیلم در هر دو سیستم ضروری می‌باشد. خصوصیات شیمیایی و فیزیکی شیمیایی زیرلایه در زمان ابتدایی اتصال سلول‌ها و چسبندگی آن‌ها روی سطوح تاثیر گذار است، اما هنگامی که بیوفیلم تشکیل می‌شود زیرلایه تاثیر کمی بر توسعه بیوفیلم دارد. ناهمواری سطح می‌تواند تاثیر به سزایی به خصوص زمانی که جریان وجود دارد در ماندن سلول‌ها روی سطح داشته باشد. اصلاح سطوح به منظور تولید سطوح ضد رسوبی به عنوان یک قسمت مستقل، نیاز به تمرکز بر روی مدیریت مواد آلی و رسوب سلولی به منظور جلوگیری، کنترل یا تاخیر در محبوس شدن و تکثیر سلول‌ها دارد و باید سطوح به گونه‌ای اصلاح شوند که با داشتن خصوصیات مورد نظر جلوی رسوب سلول‌ها را بگیرند. تمیزکننده‌هایی که مورد استفاده قرار می‌گیرند باید به گونه‌ای باشند که بر نیروهای موجود در چسبندگی مواد آلی و سلول‌های پیشگام در اتصال غلبه کنند. طیف وسیعی از روش‌های اصلاح سطوح با توجه به عوامل موثر بر فعل و انفعالات بین سلول‌ها و زیرلایه بررسی شده‌اند. رویکرد چند رشته‌ای بین زیست شناسان، شیمی دانان، فیزیک دانان و مهندسان سبب شده است تا سطوح خوبی طراحی شوند که هم از نظر اقتصادی قابل دوام و سازگار با محیط باشند و هم قادر به کنترل رسوب میکروبی در حد بهینه باشند. دیدگاه‌های امیدبخشی شامل سطوح فوق آب‌گریز وجود داشته که در این سطح خصوصیات شکلی و شیمیایی سطح موجب می‌شود تا زاویه تماس به ۱۸۰ درجه نزدیک شود. توسعه سطوحی که به صورت شیمیایی اصلاح شده‌اند سودمند می‌باشد، اما در استفاده از گونه‌های شیمیایی که مضر برای محیط زیست باشد باید اجتناب کرد. طراحی سطوح ضد رسوبی باید به صورت منحصر به فرد انجام شود، به همین خاطر اگر چه در ابتدا زمان‌بر است اما ممکن است منجر به برنامه‌های موفق و صرفه‌جویی قابل توجهی در هزینه‌ها شود.

یک مورد قابل توجه در توصیف خصوصیات شکلی سطح<sup>۱</sup> این است که چندین مقیاس می‌تواند برای مشخص کردن سطح مواد از نظر موجی بودن، زبری و شکل سطح استفاده شود. بنابراین بعد مشخصه سطحی باید در کنار بعد ارگانیسم مورد بررسی قرار گیرد. افزایش در زبری سطح، ماندن میکروارگانیسم‌ها روی سطح را افزایش می‌دهد [۵۱]. اما هنوز مشکلاتی در مورد صحت این پدیده، به علت وجود مقیاس‌های شکلی مختلف سطح (مانند ماکرو، نانو، میکرو) و روش آزمایش انجام شده وجود دارد [۵۲]. صیقلی کردن سطوح مزیت‌هایی را در کم کردن چسبندگی اولیه باکتری‌ها نشان داده است [۵۳] اما در زمان‌های طولانی تأثیری بر توسعه بیوفیلم‌های حاوی باکتری‌های بالغ ندارد [۵۴]. مکان‌هایی که مشخصه‌های سطحی کوچک‌تر از میکروارگانیسم دارند (مانند سطوح نانو)، خصوصیات شکلی سطح تأثیری بر ماندن میکروارگانیسم‌ها روی سطح ندارد. هیلبرت و همکارانش<sup>۲</sup> با آزمایش روی فولاد ضدزنگ که به  $R_a = 0.1 - 0.9 \mu m$  هموار شده بود، نتیجه گرفتند که تغییر در زبری سطح تأثیری بر چسبندگی میکروارگانیسم‌ها ندارد. پیشنهاد شده است که در مقیاس سطحی ماکرو ( $R_a < 10 \mu m$ ) ناهمواری سطح مشکل عمده‌ای را در چسبندگی باکتری‌ها ایجاد نکند، زیرا مشخصه‌های سطح بسیار بزرگتر از سلول‌های باکتری هستند. با این حال برخی اسپورهای قارچی، جلبک، پروتوزواها و ارگانیسم‌های بزرگتر مانند ارگانیسم‌های دریایی که در محیط دریایی هستند و موجب رسوب می‌شوند از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشند. تأثیر زبری سطح بر روی اتصال اسپورهای جلبکی [۵۵] و لاروهای بی‌مهره‌گان [۵۶] نشان داده شده است. شکل ۲ تصویری از فولاد ضدزنگ می‌باشد که نشان‌دهنده سطوح شیاردار و میزان احتباس میکروارگانیسم‌ها می‌باشد [۵۲]. بسیاری از دانشمندان از محدوده وسیعی از سطوح با مشخصه‌های شکلی متفاوت در مقیاس کوچک (شیارها [۵۷] و حفره‌ها) استفاده کرده‌اند تا ارزیابی مناسبی از شکل سطح بر اتصال سلول‌ها داشته باشند. برای مثال وایت و همکارانش<sup>۳</sup> با ارزیابی طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها با اندازه‌های مختلف نشان دادند که ابعاد مشخصه سطح با توجه به اندازه سلول‌ها و سپس ماندن آن‌ها روی سطح مهم می‌باشد و در نتیجه اندازه سلول‌ها هم باید در ارزیابی سطوح مورد توجه قرار گیرد، حداکثر احتباس و ماندن میکروبی زمانی اتفاق می‌افتد که مشخصه‌ها با اندازه قطر میکروارگانیسم‌ها قابل مقایسه باشد. تمامی این

<sup>1</sup> Surface topography

<sup>2</sup> Hilbert et al

<sup>3</sup> Whitehead et al

## ۷- مراجع

1. R. Donlan, W. Costerton, "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms", *Clin Micro Rev* 15: 167-193, **2002**.
2. J. Verran, D. L. Rowe, R. D. Boyd, "The effect of Nanometer dimension topographical features on the Hygienic surface of Stainless steel", *J. Food Prot* 64 (7), 1183-1187, **(2001a)**.
3. C. J. P. Boonaert, P. G. Rouxhet, Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties", *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2548-2554. **2000**.
4. G. Chen, K. A. Strevett, "Impact of surface thermodynamics on bacterial transport", *Environ. Microbio.* 3 (4), 237-245, **2001**.
5. E. Sinde, J. Carballo, "Attachment of salmonella spp. and listeria monocytogenes to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of Commercial sanitizers", *Food. Microbiol* 17 (4), 439-447, **2000**.
6. U. Husmark, U. Ronner, "Adhesion of bacillus cereus spores to different solid surfaces: cleaned or Conditioned with Various food agents", *Biofouling* 7, 57-65, **1993**.
7. J. H. Pringle, M. Fletcher, "Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces", *Appl. Environ. Microbiol* 45, 811-817, **1983**.
8. M. E. Callow, A. R. Jennings, A. B. Brennan, C. E. Seegert, A. Gibson, L. Wilson, A. Feinberg, R. Baney, J. A. Callow, "Microtopographic cues for settlement of zoospores of the green fouling alga enteromorpha", *Biofouling* 18 (3), 237-245, **2002**.
9. J. Carson, D. Allsopp, "The enumeration of marine periphytic bacteria from a temperal sampling series", In: Becker OG, Allsopp D (eds.) *Biodeterioration: proceedings of the fourth international biodeterioration symposium*. Pitman, London, 193-198, **1980**.
10. S. Dexter, "Influence of substratum critical surface tension on bacterial adhesion - in situ studies", *Coll. Interface. Sci.* 70, 346-354, **1979**.
11. A. Carlen, K. Nikdel, A. Wennerberg, K. Holmberg, J. Olsson, Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin", *Biomater.* 22, 481-487, **2001**.
12. B. Gottenbos, D. W. Grijpma, H. C. Van der Mei, J. Feijen, H. J. Busscher, "Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering gram-positive and gram-negative bacteria", *J. Antimicrob Chemo* 48 (1), 7-13, **2001**.
13. K. Becker, "Detachment studies on microfouling in natural biofilms on substrata with different surface tensions", *Int. Biodeter. Biodeg* 41 (1), 93-100, **1998**.
14. J. Verran, K. Whitehead, "Factors affecting microbial adhesion to stainless steel and other materials used in medical devices", *Int. J. Art Organs* 28 (11), 1138-1145, **2005**.
15. J. S. Nickels, R. J. Bobbie, D. F. Lott, R. F. Martz, P. H. Benson, D. C. White, "Effect of manual brushcleaning on biomass and community structure of micro-fouling film formed on aluminum and titanium surfaces exposed to rapidly flowing seawater", *Appl. Environ. Microbiol* 41 (6), 1442-1453, **1981**.
16. M. W. Mittelman, D. E. Nivens, C. Low, D. C. White, "Differential adhesion, activity, and carbohydrate protein ratios of pseudomonas-atlantica monocultures attaching to stainless-steel in a linear shear gradient", *Microb. Ecol.* 19 (3), 269-278, **1990**.
17. G. G. Geesey, P. J. Bremer, "Applications of fourier-transform infrared spectrometry to studies of copper corrosion under bacterial biofilms", *Marine. Tech. Soc. J.* 24, 36-43, **1990**.
18. S. V. Avery, N. G. Howlett, S. Radice, "Copper toxicity towards saccharomyces cerevisiae: dependence on plasma membrane fatty acid composition", *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3960-3966, **1996**.
19. U. Husmark, U. Ronner, "Adhesion of bacillus cereus spores to different solid surfaces: cleaned or conditioned with various food agents", *Biofouling* 7: 57-65, **1993**.
20. J. Kielemoes, F. Hammes, W. Verstraete, "Measurement of microbial colonisation of two types of stainless steel", *Environ Tech* 21 (7), 831-843, **2000**.
21. T. E. Cloete, "Biofouling control in industrial water systems: what we know and what we need to know", *Mater. Corros - Werkstoffe Korrosion* 54 (7), 520-526, **2003**.
22. T. J. Starr, M. E. Jones, "The effect of copper on the growth of bacteria isolated from marine environments", *Limnol Oceanog* 2 (1), 33-36, **1957**.
23. R. B. Jonas, "Acute copper and cupric ion toxicity in an estuarine microbial community", *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (1), 43-49, **1989**.
24. I. De Veer, K. Wilke, H. Ruden, "Bacteria reducing properties of copper containing and noncopper containing materials: II. relationship between microbicide effect on copper containing materials and copper ion concentration after contamination with moist and dry hands", *Zentralblatt Hygiene Umweltmedizin* 195, 516-528, **1994**.
25. S. A. Wilks, H. Michels, C. W. Keevil, "The survival of escherichia coli on a range of metals surfaces", *Int. J. Food Microbiol* 105, 445-454, **2005**.
26. J. Kielemoes, W. Verstraete, "Influence of copper alloying of austenitic stainless steel of multi species biofilm development", *Lett. Appl. Microbiol* 33, 148-152, **2001**.
27. P. Airey, J. Verran, "Potential use of copper as a hygienic surface; problems associated with cumulative soiling and cleaning", *J. Hosp. Inf.* 67 (3), 271-277, **2007**.
28. M. Exner, G-J Tuschewitzki, E. Thofern, "Investigations on wall colonization of copper pipes in a central disinfection dosing system", *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig B* 177, 170-181, **1983**.
29. D. Brocca, E. Arvin, H. Mosbæk, "Identification of organic compounds migrating from polyethylene pipelines into drinking water", *Water Res.* 36 (15), 3675-3680, **2002**.
30. M. J. Lehtola, I. T. Miettinen, P. J. Martikainen, "Biofilm formation in drinking water affected by low concentrations of phosphorus", *Can J Microbiol* 48, 494-499, **2002**.
31. P. Niquette, P. Servais, R. Savoie, "Impacts of pipe materials on densities of fixed bacterial biomass in a drinking water distribution system", *Water Res.* 34 (6), 1952-1956, **2000**.
32. M. N. B. Momba, N. Makala, "Comparing the effect of various pipe materials on biofilm formation in chlorinated and combined chlorine-chloraminated water systems", *Water SA* 30 (2), 175-182, **2004**.
33. J. Verran, M. Jones, "Problems of biofilms in the food and beverage industry", In: J. Walker, S. Surmann, J. Jass (eds.) *Industrial biofouling detection, prevention and control*. Wiley, Chichester, 145-173, **2000**.
34. J. Lukaszczyk, M. Kluczka, "Modification of the release of biocides bound to carboxylic exchange resin I. Encapsulation by the ISP method and by Evaporation from Aqueous suspension", *Polimery* 40 (10), 587-590, **1995**.
35. S. J. Lambert, K. V. Thomas, A. J. Davy, "Assessment of the risk posed by the antifouling booster biocides Irgarol 1051 and diuron to freshwater macrophytes", *Chemosphere* 63, 734-743, **2006**.
36. B. T. Watermann, B. Daehne, S. Sievers, R. Dannenberg, J. C. Overbeke, J. W. Klijnsstra, O. Heemken, "Bioassays and selected chemical analysis of biocide-free antifouling coatings", *Chemosphere* 60 (11), 1530-1541, **2005**.
37. R. J. Tang, J. J. Cooney, "Effects of marine paints on microbial biofilm development on three materials", *J. Ind Microbiol Biotech* 20 (5), 275-280, **1998**.



38. N. Voulvoulis, M. D. Scrimshaw, J. N. Lester, "Analytical methods for the determination of 9 antifouling paint booster biocides in estuarine water samples", *Chemosphere* 38 (15), 3503-3516, **1999**.
39. J. Sandberg, I. O. Wallinder, C. Leygraf, M. Virta, "Release and chemical speciation of copper from anti-fouling paints with different active copper compounds in artificial seawater", *Mater. Corros - Werkstoffe Korrosion* 58 (3), 165-172, **2007**.
40. J. G. Burgess, K. G. Boyd, E. Armstrong, Z. Jiang, L. M. Yan, M. Berggren, U. May, T. Pisacane, A. Granmo, D. R. Adams, "The development of a marine natural product-based antifouling paint", *Biofouling* 19 (Suppl.), 197-205, **2003**.
41. P. Gibbs, G. Bryan, "Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, caused by Imposex induced by Tributyltin from antifouling paints", *J. Marine. Biol. Assoc UK* 66, 767-777, **1986**.
42. V. Axiak, M. Sammut, P. Chircop, A. Vella, B. Mintoff, "Laboratory and field investigations on the effects of organotin (tributyltin) on the oyster, *Ostrea edulis*. *Sci Total Environ* 171: 117-120, **1995**.
43. G. de Boeck, G. Nilsson, U. Elofsson, A. Vlaeminck, R. Blust, "Brain monoamine levels and energy status in common carp (*Cyprinus carpio*) after exposure to sublethal levels of copper", *Aquat Toxicol* 33, 265-277, **1995**.
44. J. Karlsson, B. Eklund, "New biocide-free Anti-fouling paints are Toxic", *Marine Poll Bull* 9 (5-6), 456-464, **2004**.
45. A. Erkan, U. Bakir, G. Karakas, "Photocatalytic microbial inactivation over Pd doped SnO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> thin films", *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 184 (3), 313-321, **2006**.
46. A. Vohra, D. Y. Goswami, D. A. Deshpande, S. S. Block, "Enhanced photocatalytic inactivation of bacterial spores on surfaces in air", *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 32 (8), 364-370, **2005**.
47. N. S. Allen, M. Edge, G. Sandoval, J. Verran, J. Stratton, J. Maltby, "Photocatalytic coatings for environmental applications", *photochem. Photobiol.* 81, 279-290, **2005**.
48. L. Caballero, K. A. Whitehead, N. S. Allen, J. Verran, "Inactivation of *Escherichia coli* on immobilized TiO<sub>2</sub> using fluorescent light", *J. Photochem Photobiol A: Chemistry* 202, 92-98, **2008**.
49. J. Verran, C. J. Maryan, "Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography", *J. Prosthet. Dent* 77 (5), 535-539, **1997**.
50. J. Verran, R. Boyd, K. Hall, R. H. West, "Microbiological and chemical analyses of stainless steel and ceramics subjected to repeated soiling and cleaning treatments", *J. Food Prot* 64 (9), 1377-1387, **2001b**.
51. L. Boulange-Petermann, J. Rault, M-N. Bellon-Fontaine, "Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness", *Biofouling* 11 (3), 201-216, **1997**.
52. J. E. Duddridge, A. M. Prichard, "Factors affecting the adhesion of bacteria to surfaces. In: *Microbial corrosion*" proceedings from the Joint National Physical Laboratory and Metal Society conference. The Metals Society, London, 28-35, **1983**.
53. J. W. Arnold, D. H. Boothe, G. W. Bailey, "Parameters of treated stainless steel surfaces important for resistance to bacterial contamination", *Trans ASAE* 44: 347-356, **2001**.
54. A. P. Hunt, J. D. Parry, "The effect of substratum roughness and river flow rate on the development of a freshwater biofilm community", *Biofouling* 12, 287-303, **1998**.
55. M. Fletcher, J. A. Callow, "The settlement, attachment and establishment of marine algal spores", *Br Phycol J* 27, 303-329, **1992**.
56. K. A. Whitehead, J. S. Colligon, J. Verran, "The production of surfaces of defined topography and chemistry for microbial retention studies using ion beam sputtering technology", *Int. Biodeter Biodegradation* 54, 143-151, **2004**.
57. A. Packer, P. Kelly, K. A. Whitehead, J. Verran, "Effects of defined linear features on surface hygiene and cleanability", paper presented at the 50th SVC annual technical conference, Kentucky, **2007**.
58. K. A. Whitehead, J. Verran, "The effect of surface topography on the retention of microorganisms: a review", *Food Bioprod. Process.* 84, 253-259, **2006**.