دور الغشاء الحيوي لعزلات *Pseudomonas aeruginosa* في مقاومة الأشعة فوق البنفسجية وتحديد التركيز المثبط الادنى لها من مضادات الحيوية

احمد محمد تركي[1] وعلي عدنان عبد[2] و ادهام علي عبد[3]

1-قسم علوم الحياة ,كلية العلوم- جامعة الانبار 2- مديرية تربية الانبار 3- قسم علوم التربة كلية الزراعة- جامعة الانبار

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة للتحري عن دور الغشاء الحيوي لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* لتاثير الاشعة فوق البنفسجية باستعمال عزلات السيطرة *E . coli* and *Staphylococcus aureus* الحساسة للاشعة فوق البنفسجية ومقاومة العزلات للمضادات الحيوية حيث أخضعت لاختبار حساسيتها الى 12 نوع من مضادات الحيوية التي تستخدم بشكل روتيني في علاج الالتهابات المختلفة لهذه البكتريا (streptomycin ، cephalothin ، Gentamycin ، cefotaxime ، nitrofurantion ، amoxicillin ، ampicillin ، rifampin ، lincomycin ، tetracycline ، erythromycin ، ciprofloxacin) . كما تم اختبار التركيز المثبط الأدنى (MIC) لستة أنواع من المضادات(streptomycin ، cefotaxime ، rifampin ، nitrofurantion ، Gentamycin ، amoxicillin) . واختبرت الفعالية البايولوجية للتداخل بين العزلات البكتيرية المنتخبة اتجاه أربعة أنواع بكتيرية أخرى هي (*Klebseilla pneumonia* , *Staphylococcus aureus* , *Enterobacter* , *Proteus*. أظهرت نتائج استخدام الأشعة فوق البنفسجية وبأطوال موجية مختلفة في قدرة العزلات المحلية الخمس على مقاومة هذه الأشعة وصولا إلى 180ثانية بالمقارنة مع العزلتين*Ecoli* و *Staph. aureus* اللتان كانت نسبة القتل لهما 100 % عند زمن تعريض 40 و 60 ثانية على التتابع. وأظهرت العزلات البكتيرية المحلية الخمس مقاومة عالية لأغلب مضادات الحيوية المختبرة إذ كانت جميعها مقاومة (Gentamycin ، lincomycin ، tetracycline ، erythromycin) لكنها حساسة اتجاه مضاد الحيوي Streptomycin أما بقية المضادات فقد تباينت عندها العزلات بكونها مقاومة أو حساسة اتجاهها. أظهرت نتائج اختبار الفعالية التثبيطية للعزلات البكتيرية الخمس اتجاه بعض العزلات البكتيرية الأخرى كفاءة العزلات المحلية الخمس في تثبيط نمو العزلات البكتيرية وقدرة الغشاء الحيوي المستخلص من العزلات المحلية الخمسة على تثبيط نمو العزلات المحلية الخمسة نفسها التي استخلص منها الغشاء إضافة إلى العزلات البكتيرية الأربع.

The role of Biofilm for *Pseudomonas aeruginosa* to resistance ultraviolet and MIC concentration for antibiotics

Ahmad, M. T. [1], A.A. Abed[2] and I. A. Abed[3]

1-College of Science Anbar University 2-Anbar husbandry Directorate 3- Coll. Agic. Anbar University

Summary

The present study is conducted to in restigate the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, the impact of ultraviolet on the bacterial isolates under study and the resistance of these isolates to ultraviolet are studied in comparison to two standard isolates (*E . coli* and *Staphylococcus aureus*) which are considered sensitive to ultraviolet . The natures of the resistance of the isolates, under study, are also being investigated against the different antibiotics. The isolates are subjected to a test to examine their sensitivity to (12) types of antibiotics used routinely in the treatment of various infection of these bacteria. They are (streptomycin , cephalothin ,Gentamycin , cefotaxime ,nitrofurantion ,ampicillin, amoxicillin, rifampin, lincomycin, tetracycline, erythromycin and ciprofloxacin).The lowest concentration installer (MIC) is also testified in accordance with six types of antibiotics (streptomycin, cefotaxime , rifampin , nitrofurantion , Gentamycin , amoxicillin).The biologic effectiveness of the overlap between the bacterial isolates , under study, is examined against four bacteria (*klebseilla pneumonia* , *Staphylococcus aureus* , *Enterobacter* , *Proteus*)

The result of using the ultraviolet with different wavelength show the ability of the five local isolates used to resistance of ultraviolet reaching (180 s.) in comparison to the isolates *E.coli* and *staph. aureus* in which the ratio of killing is %100 at a time of exposing 40 , 60 sec. respectively. The results indicated that the five local bacterial isolates have high resistance to the most tested antibiotics, It is shouted that all of them have resistance to

(erythromycin , tetracycline , lincomycin , Gentamycin) but they are sensitive towards antibiotic streptomycin . as for the other antibiotics , over can find that the isolates are varied of them for being resisting or sensitive towards them .The results of testing the inhabited effectiveness of the five bacterial isolates towards some other bacterial isolates show the efficiency of the five local isolates in the inhabitation of growth of the five studied bacterial isolates.

المقدمة

الغشاء الحيوي Biofilm عبارة عن تجمع لخلايا ميكروبية مرتبطة بقوة بسطح ما ومحاطة بفرشة خارج الخلية مؤلفة من متعدد السكريد بصورة أساسية ومواد أخرى غير خلوية مثل مكونات الدم وبلورات المعادن وجزيئات الطين حسب نوع البيئة التي يتطور فيها الغشاء الحيوي, حيث ينشأ الغشاء الحيوي على أنواع كثيرة من الأسطح مثل الأنظمة المائية الطبيعية والعدد الطبية والمواد المغروسة المصنعة والأنسجة الحية وتؤثر إفرازات المضيف من دم ولعاب وإفرازات الجهاز التنفسي في التصاق الأحياء المجهرية وتكوين الغشاء الحيوي على المواد الحية (1). يعد الالتصاق أول خطوة في تكوين الغشاء الحيوي وهو عملية معقدة تنظم بفعل الخصائص المختلفة لوسط النمو والمغذيات وسطح الخلايا وتختلف خلايا الأحياء المجهرية المكونة للأغشية الحيوية عن أجزائها العالقة بإحاطتها بالفرشة خارج خلوية وبأن معدلات نموها أقل من معدل نمو الخلايا العالقة والتعبير الجيني لها من نوع الزيادة والكبح(2 و 3). تمثل الأغشية الحيوية مجتمعات ميكروبية فعالة وظيفيا تنظم بفعل أشارات وتعد أنظمة دفاعية تحمي أفرادها من الافتراس والظروف البيئية المتطرفة وهذه تعرف بأسم فرضية التامين(4) . لقد أحدثت المضادات الحيوية تغير في علاج الأمراض المعدية ورافق ذلك أيضا سرعة ظهور مقاومة الجراثيم لها وفشلت الوسائل التقليدية لاكتشاف مضادات الحيوية في مواكبة تطور هذه المقاومة(5)، والمقاومة هي قدرة الكائن الحي الدقيق على النمو في وجود مستوى مرتفع من مضادات الميكروبات antimicrobial وتعد مجتمعات الأغشية الحيوية عموما أكثر مقاومة (لمضادات الحياة والعوامل ضد الميكروبية واليات دفاع المضيف) من الخلايا البكتيرية العالقة (Planktonic bacterial cells) للنوع البكتيري نفسه(6).إن المقاومة العالية والتي يظهرها الغشاء الحيوي لا يمكن أن تعزى لعامل واحد أو لخاصية واحدة منفردة وإنما تعود إلى عدة عوامل منها الخصائص التي تؤثر في نفاذية مضاد الحياة أو المادة ضد الميكروبية والفعالية الايضية لخلايا الغشاء الحيوي والتغاير بالطرز المظهرية ضمن الغشاء الحيوي المنفر(7) وبين(8). أن أسباب هذه المقاومة تعود إلى الوظائف الفسيولوجية للخلايا وعند تعريض الغشاء الحيوي لمضاد حياتي أو عامل ضد ميكروبي فأنه بعد أن قتل غالبية مجتمع الغشاء الحيوي، تبقى نسبة صغيرة جدا من المجتمع حية على الرغم من طول مدة التعرض للضغط من المادة ضد الميكروبية وهذه الخلايا المتبقية تسمى بالخلايا المقيمة (Persister) أي أنها ليست طفرة ولا تورث المقاومة المذكورة لأجيالها عند زوال الضغط المسلط. وقد وجده (9) بأن *P. aeruginosa* تقاوم الأشعة فوق البنفسجية من خلال الأغشية الحيوية المتكونة التي لا تسمح بنفاذ هذه الأشعة إلا بكميات قليلة جدا وبذلك فهي تحمي الخلايا من تأثيرها وهذه تعتبر آلية دفاع طبيعية لتقليل التأثيرات السلبية المترتبة على التعرض لهذه الأشعة . كما أكد (10) أمكانية استخدام الأشعة فوق البنفسجية في منع نمو بكتريا *P. aeruginosa* عند تعريضها لهذه الأشعة لمدة طويلة حيث إن هذه الأشعة تمنع تكون الأغشية الحيوية.

المواد وطرائق العمل

استخدمت خمسة عزلات محلية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* تحمل الارقام المحلية 6 و 49 و 69 و81 و94 منتجة للاغشية الحيوية (11) وتم دراسة :-

1- تأثير الأشعة فوق البنفسجية في بكتريا *Ps. aeruginosa*

تم استخدام الأشعة فوق البنفسجية وحسب ما ورد في (10) لمعرفة مقاومة البكتريا لهذه الأشعة مقارنة مع عزلتين قياسية حساسة للأشعة فوق البنفسجية هي (*St. aureus* ,*E coli*) تم الحصول عليهما من مختبرات الاجياء المجهرية لمستشفى الرمادي العام وكما يلي :-

لقح وسط المرق المغذي بالعزلات البكتيرية الخمسة كل على انفراد أضافه إلى عزلتي (*St. aureus* and *E.coli*) وحضنت لمدة 24 ساعة , اجريت عملية الطرد المركزي للعزلات المذكورة في الفقرة (1) بسرعة 3000 دوره.دقيقة$^{-1}$ لمدة 10 دقائق ثم أهمل الراشح واخذ الراسب ثم أضيفت 10 مل من المحلول المنظم إلى راسب الخلايا. وضعت تحت الأشعة فوق البنفسجية وعلى مسافة 30 سم عن مصدر الإشعاع ولمدد زمنية 20 و 40 و 60 و 80 و 100 و 120 و 140 و 160 و 180 ثانية وتم الحفظ في ظلام تام. ثم زرع النموذج المشع على وسط Nutrient agar لحساب عدد الخلايا المتبقية. و زرع نموذج من كل عزلة بدون التعرض للإشعاع لغرض المقارنة ومن ثم حسب عدد الخلايا النامية بالمقارنة مع العزلات المشععة .

2- محاليل مضادات الحيوية

حضرت المحاليل للمضادات الحيوية Streptomycin و Gentamycin و Cefotaxime وNitrofurantion و Amoxicillin و Rifampcim بإذابة 0.02 غم من مضاد الحيوي في 18 مل من الايثانول 50% ثم أكمل الحجم إلى 20 مل للحصول على تركيز نهائي 1 ملغم. مل$^{-1}$. استخدمت مرشحات دقيقه (Millipore filter) قطر فتحتها 0.22

مايكروميتر لتعقيم محاليل المضادات ، وحضنت بدرجه حرارة 4 م° لحين الاستخدام . أضيفت مضادات الحيوية من محاليلها الخزينة إلى الأوساط الزرعية الانتخابية وفقا للتراكيز المعتمدة في تحليل عوامل المقاومة الوراثية (12).

3- أقراص مضادات الحيوية Antibiotics

تم الحصول على أقراص مضادات الحيوية من مستشفى الرمادي التعليمي وهي من أنتاج شركه oxoid البريطانية والجدول (1) يوضح تراكيز هذه المضادات في الأقراص.

جدول (1) أقراص مضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية

N	Antibiotic	الرمز	التركيز مايكروغرام/ قرص
1	Streptomycin	S	10
2	Cephalothim	KF	30
3	Gentamicim	CN	10
4	Cefotaxime	CTX	30
5	Nitrofurantion	F	300
6	Amoxicillin	Ax	25
7	Ampicillin	Am	10
8	Rifampicin	Ra	5
9	Lincomycin	L	15
10	Tetracycline	TE	30
11	Erythromycin	E	15
12	Ciprofloxacin	CIP	5

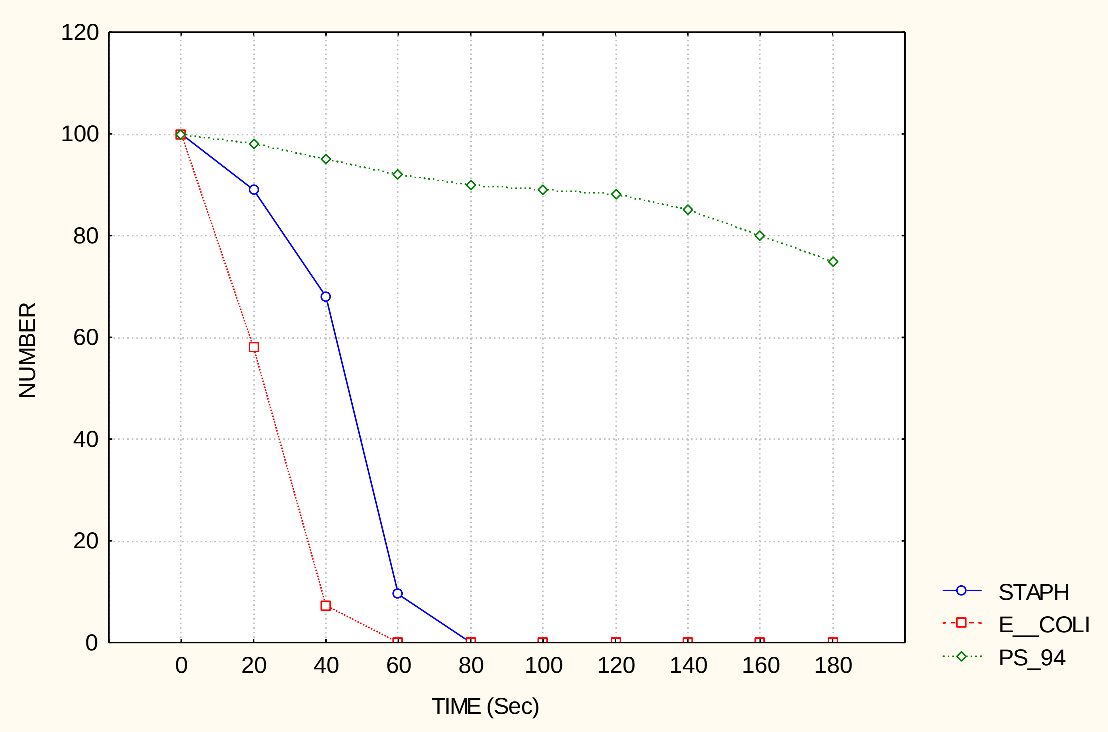
4- اختبار حساسية البكتريا لمضادات الحيوية

تم اختبار حساسية العزلات البكتيرية *P. aeruginosa* الخمسة مقارنة مع عزلات *Klebseilla pneumonia* , *Staphylococcus aureus* , *Enterobacter* التي تم الحصول عليها من مختبرات الاحياء المجهرية لمستشفى الرمادي واتبعت طريقه الأقراص (13) لاختبار حساسية العزلات اتجاه مضادات الحيوية المشار لها في جدول (1) . كما استعملت طريقة التخفيف بالا كار (قياس التركيز المثبط الأدنى MIC) واستخدمت في هذه الطريقة أطباق معقمة تحتوي على وسط مولار هنتون الذي أضيفت له تراكيز مختلفة من مضادات الحيوية بتخافيف متضاعفة إذ حضنت هذه الأطباق لمدة 18 -24 ساعة بدرجة حرارة 37 م° وسجل اقل تركيزاً من مضادات الحيوية والذي استطاع تثبيط نمو عزلات البكتريا إذ عد هو التركيز المثبط الأدنى (MIC (14).

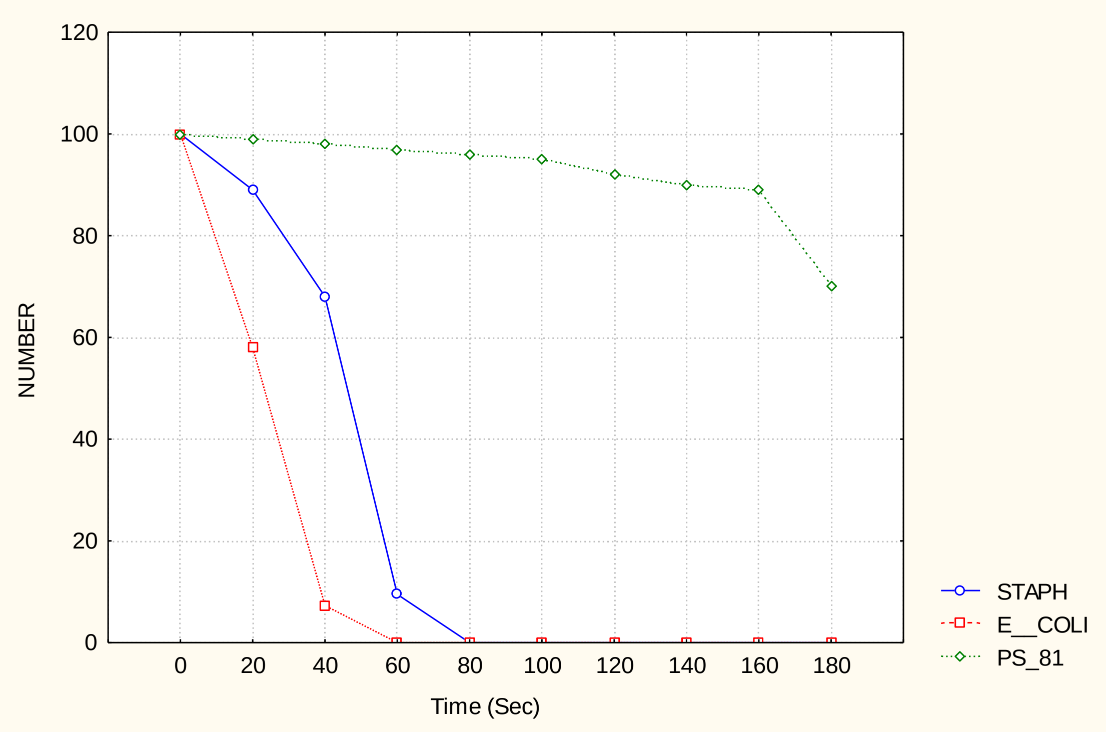
النتائج

مقاومة العزلات البكتيرية للأشعة فوق البنفسجية

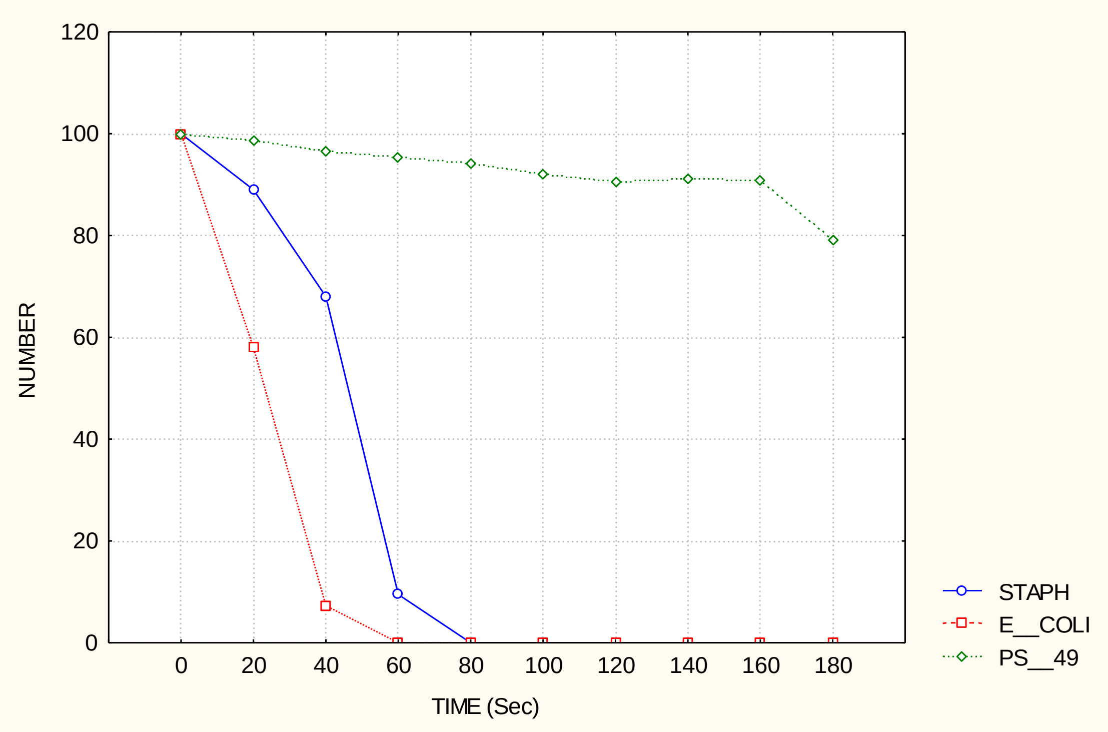
أظهرت نتائج تشعيع العزلات البكتيرية *P. aeruginosa* الخمسة مقارنة مع عزلتي *E. coli* و *St. aureus* باستخدام الأشعة فوق البنفسجية ولمدد تعريض (0 و 20 و 40 و 60 و 80 و 100 و 120 و 140 و 160 و 180) ثانية للحصول على المدة الزمنية القاتلة أو المثبطة لنمو هذه العزلات ولمعرفة مدى مقاومة هذه العزلات للأشعة فوق البنفسجية. وكانت عزلة *E . coli* حساسة جدا للأشعة فوق البنفسجية إذ توقف النمو وتم الحصول على نسبة قتل 100% عند زمن التعريض 40 ثانية . في حين كانت عزلة *St. aureus* أكثر مقاومة للأشعة فوق البنفسجية من عزلة *E . coli* حيث تم الحصول على نسبة قتل 100% عند زمن التعريض 60 ثانية وتعتبر هذه العزلات من العزلات الحساسة جدا للأشعة فوق البنفسجية وتستخدم عادة للمقارنة. وعند مقارنة عزلات *P. aeruginosa* مع عزلتي *E . coli* و *St . aureus* نجدها أظهرت مقاومة عالية لحد 180 ثانية للأشعة فوق البنفسجية ولكنها تباينت فيما بينها من حيث نسبة القتل. إذ كانت أعلى نسبة قتل تعود للعزلة *P. aeruginosa94* (شكل 1) . في حين كانت أقل نسبة قتل تعود للعزلة *P. aeruginosa81* (شكل 2) . فيما تظهر الأشكال (3 و 4 و 5) نسبة القتل في العزلات الثلاثة الأخرى التي تحمل الأرقام 94 ،6 ، 69 التي أبدت مقاومة عالية للأشعة فوق البنفسجية إذ قاومت تأثير هذه الأشعة إلى حد 180 ثانية ثم بدأت بالانحدار بعد هذه المدة الزمنية.



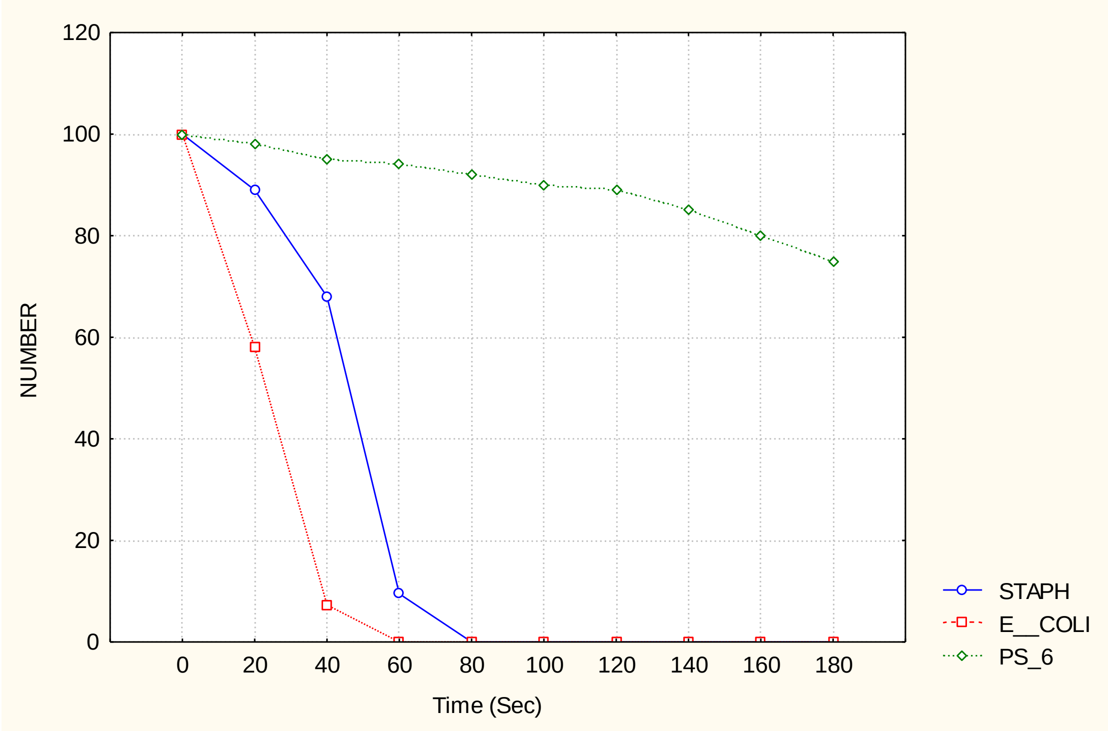
شكل رقم (1) : تأثير الاشعة فوق البنفسجية في نمو العزلة 94 *P. aeruginosa*



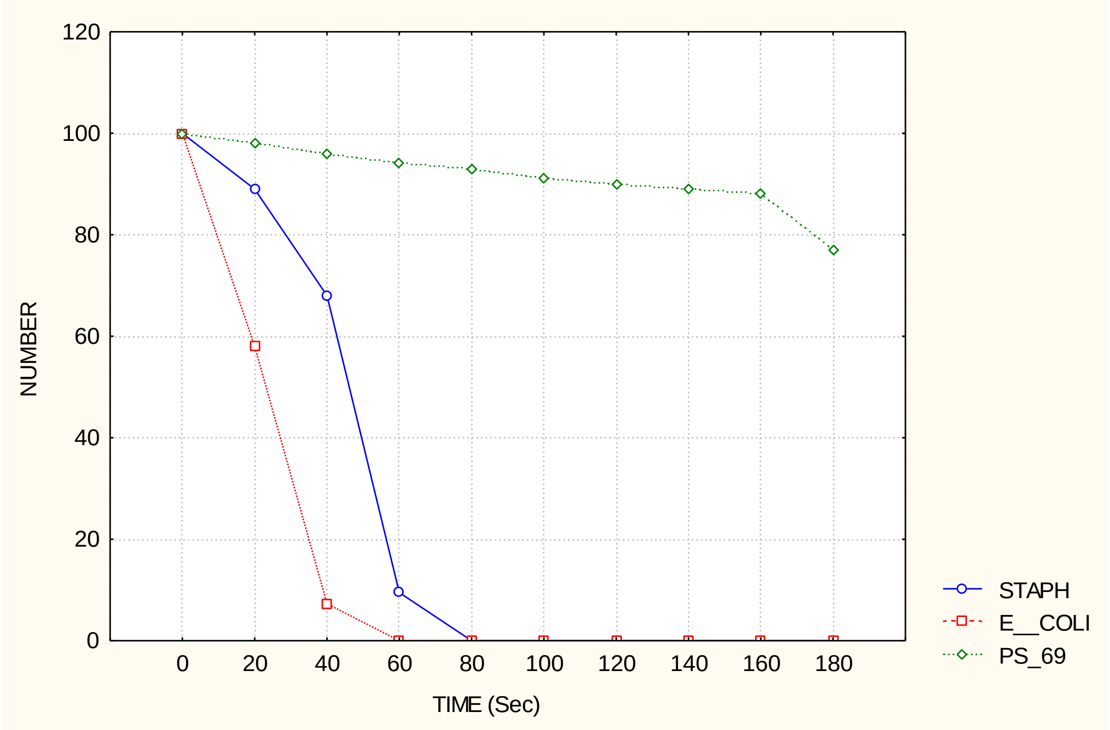
شكل رقم (2) : تأثير الاشعة فوق البنفسجية في نمو العزلة 81 *P. aeruginosa*



شكل رقم (3) : تأثير الاشعة فوق البنفسجية في نمو العزلة 49 *P. aeruginosa*



شكل رقم (4) : تأثير الاشعة فوق البنفسجية في نمو العزلة 6 *P. aeruginosa*



شكل رقم (5) : تأثير الاشعة فوق البنفسجية في نمو العزلة *P. aeruginosa* 69

تحديد التركيز المثبط الأدنى لمضادات الحياة Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

أظهرت نتائج تحديد تركيز المثبط الأدنى للمضادات الحيوية (streptomycin ، cefotaxime ، rifampin ، nitrofurantion ، Gentamycin ، amoxicillin) أن أعلى تركيز كان لمضاد cefotaxime هو 85 مايكروغرام. مل$^{-1}$ للعزلة *P. aeruginosa69* بينما كان أقل تركيز لمضاد rifampin هو 36 مايكروغرام. مل$^{-1}$ للعزلة *P. aeruginosa6* . أما بالنسبة للعزلات البكتيرية الأربعة الأخرى (*Kl. pneumonia* , *St. aureus* , *Enterobacter* , *Proteus*) فقد كان أعلى تركيز لمضاد nitrofurantion هو (600) مايكروغرام. مل$^{-1}$ للعزلة *Enterobacter* في حين كان أقل تركيز لمضاد Gentamycin هو (22) مايكروغرام. مل$^{-1}$ للعزلة *Enterobacter* . وفي هذا المجال فقد ذكر Bellido and Hancock(1993) أن هناك اختلافاً بين قيم(MIC) داخل الجسم الحي وبين قيمها داخل المختبر للزوائف الزنجارية (جدول 1).

جدول (1) قيم تركيز المثبط الأدنى من مضادات الحياة المستخدمة للعزلات البكتيرية

التسلسل	أسم المضاد	رمز المضاد	أسم العزلة البكتيرية المثبطة	تركيز المثبط الادنى (MIC) µg.ml^{-1}
1	**Rifampin**	**RA**	*P. aeruginosa* 49	**40**
2	**Cefotaxime**	**CTX**	*P. aeruginosa* 49	**45**
3	**Rifampin**	**RA**	*P. aeruginosa* 6	**36**
4	**Cefotaxime**	**CTX**	*P. aeruginosa* 6	**60**
5	**Rifampin**	**RA**	*P. aeruginosa* 81	**50**
6	**Cefotaxime**	**CTX**	*P. aeruginosa* 81	**65**
7	**Streptomycin**	**S**	*P. aeruginosa* 69	**50**
8	**Cefotaxime**	**CTX**	*P. aeruginosa* 69	**85**
9	**Rifampin**	**RA**	*P. aeruginosa* 69	**40**
10	**Streptomycin**	**S**	*P. aeruginosa* 94	**55**
11	**Rifampin**	**RA**	*P. aeruginosa* 94	**44**
12	**Nitrofurantion**	**F**	*Enterobacter*	**600**
13	**Gentamycin**	**CN**	*Enterobacter*	**22**
14	**Nitrofurantion**	**F**	*Proteus*	**400**
15	**Gentamycin**	**CN**	*Proteus*	**30**
16	**Nitrofurantion**	**F**	*Kleb. Pneumonia*	**500**
17	**Amoxicillin**	**AX**	*Kleb. Pneumonia*	**95**
18	**Nitrofurantion**	**F**	*Staph. Aureus*	**500**
19	**Gentamycin**	**CN**	*Staph. Aureus*	**25**

المناقشة

تبين من النتائج أن جميع عزلات *P. aeruginosa* المحلية الخمسة كانت مقاومة للأشعة فوق البنفسجية عند الزمن 160 ثانية وقد تم الحصول تقريبا على نسبة قتل 25% عند الزمن 180 ثانية مقارنة مع عزلتي *E . coli* و *St . aureus* وهذه المقاومة متأتية من امتلاك هذه العزلات للأغشية الحيوية التي تساعدها على تفادي تأثير الأشعة وبالتالي تعطيها خاصية الحماية ضد الأشعة فوق البنفسجية وبالتالي ارتفاع معدل البقاء على قيد الحياة. ووجد أنه يمكن استخدام الأشعة فوق البنفسجية لتطهير المعدات الطبية من الأغشية الحيوية عند تعريضها للأشعة لمدة طويلة من الزمن وصولا إلى 30 دقيقة أو أكثر ولوحظ أنه يمكن الحصول على نسبة قتل 99.99% (15) ، وتتوافق النتائج مع ما وجده (16) من أن *P. aeruginosa* المكونة للأغشية الحيوية تقاوم الأشعة فوق البنفسجية ولحد مدة 3 دقائق وفسر قابلية هذه البكتريا على المقاومة من خلال تكوينها للغشاء الحيوي الذي له القابلية على أكسدة هذه الأشعة وبالتالي حماية هذه البكتريا من تأثيرها.
وأظهرت قدرة الأشعة فوق البنفسجية على تثبيط نمو العزلات المحلية الخمسة لبكتريا*P. aeruginosa* بسبب قدرة هذه الأشعة في منع البكتريا من تكوين أغشيتها الحيوية إلا أن هذا التأثير قد تباين بتباين مدة التشعيع إذ كانت مدة التشعيع الأطول هي الأشد وطأة على نمو هذه البكتريا وان امتلاك العزلات المحلية للأغشية الحيوية قد منحتها صفة المقاومة لتأثير الأشعة ولمدة أطول مقارنة بالعزلتين *E . coli* و *St . aureus* حيث لم يظهر التأثير بشكل مباشر على النمو أثناء مدد التعريض الأقل على العكس منه في المدة الأطول من التعريض واتفق هذا مع ما أشار أليه الباحث (17) بأن تأثير هذه الأشعة يزداد مع ازدياد شدة التعريض ومدته.

المصادر

1-Donlan, RM. and Costerton, JW. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms . Clin . Microbial. Rev., 15: 167 - 193.

2- Vejborg , RM. and Klemn , P. (2008) . Blocking of bacterial biofilm formation by a fish protein coating APPL. Environ . Microbial . 74 (11) : 3551- 8 .

3- Lucas, RH. ; David, AD.; Michael JM. ; Zhaoying Z.; Roger AJ. and Samuel IM. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation . Nature,436:1171 -1175.

4- Blais R B.; Matthew T.; and Pradeep, KS. (2004). Self – generated diversity produces insurance effect. In biofilm communities.

5- Peter A. and Floyd, ER. (2007). Combating bacteria and durg resistance by inhibiting mechanisms of persistence and adaptation. Nature chemical Biology . 3: 549 – 556.

6- Stewart, P. and Costerton, JW. (2001). Antibiotic resistance of Bacteria in Biofilm. Lancet, 358 (9276): 135 – 8.

7- Parsek ,MR. and Greenberg , E.P. (2005) Sociomicrobiology : the connections between quorum sensing and biofilms . Trends microbial., 13 : 27 – 33.

8- Yun, W.; Suzanne EK. and Dianne KN. (2010). Endogenous phenazine Antibiotics promote anaerobic survival of *Psudomonas aeruginosa* Via Extracellular Electron Transfer. Journal of Bacteriology, 192(1) 365 – 369.

9- Mohamed OE. and Robert VM. (1999) Study of the response of a biofilm bacterial Community to UV radiation .Applied and Envir.l Mic., 65(5):2025- 2031.

10- Hadas, M. ; Eliora, R. and Anat, L . (2010). Best Ultraviolet – Wavelength for Keeping Water Free of Microorganisms Determined. J. Science Daily. www.sciencedaily.com

11- العيثاوي ،علي عدنان عبد منديل (2010) العوامل المؤثرة في قدرة عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من مصادر بيئية مختلفة في تكوين الغشاء الحيوي .رسالة ماجستير ، قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة الانبار .

12- Maniatis , T. ; Fritsch , F and Sambrook , J . (1982). Molecular Cloning : alaboratory manual .Cold spring harbour Laborstory . New york .

13-Prescott , L.M. ; Harley , J.P. and Klein , D.A . (1990). Microbiology.Firsted. WM.C. Brown U.S.A., Pp: 123,430,575

14- Koneman , EW . ; Allen, SD. ; Janda . WM. and Schreckenberger , P C . (1992) . Color Plates and text book of diagnostic microbiology. 4th ed .J.B. Lippincott Company Philadelphia.

15- Jimmy B.; Soren DL.; Michael T. ; Tanja B. and Annette G. . (2010) .Disinfection of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm contaminated tube Lumens with ultraviolet C light emitting diodes .J . Biofouling., 26(1): 31 – 38 .

16- Duffy, JE. (2005). Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to UV- A illumination over Photocatalytic and non – Photocatalytic surfaces .J. Cambridge. 2 (3): 155 – 163.

17- Anat L.; Eliora ZR. and Hadas M.(2010). Biofouling Control in Water by Various UVC Wavelengths and Doses. J . Biofouling., 26(3) :257 – 67.