المجلة الطبية البيطرية العراقية 35 (1): 167 – 173 ، 2011

استعمـــال المطهـــرات ضـــد الفطريـــات المعزولـــة مـــن المنـــازل

رسل محمد البحرانـي
كلية العلوم ، قسم علوم الحياة ، جامعة بغداد

قبل للنشر في نيسان 2011

الخلاصة

شملت الدراسة 100 عينة اخذت من مواقع مختلفة لمنازل تقع في منطقة علي الصالح في بغداد، وقد تم عزل 6 انواع من الفطريات وكان اكثر الفطريات شيوعا هو الفطر *Aspergillus fumigatus* بنسبة تردد 25.84% وظهور 23% و *Penicilium* بنسبة تردد 21.34% وظهور 19% و *Mucor* بنسبة تردد 20.22% وظهور 18% و *Candida albicans* بنسبة تردد 15.73% وظهور 14% و *Rhizopus* بنسبة تردد 13.48% وظهور 12% و *Aspergillus niger* بنسبة تردد 3.37% وظهور 3%. وقد تم دراسة حساسية الفطريات المعزولة تجاه المطهرات فقد استخدمت ثلاثة مطهرات هي Chloroxylenol المعروف تجاريا بديتول (Dettol) و Chlorhexidine المعروف تجاريا بهبتين (Hibitane) و Sodium hypochlorite المعروف تجاريا بقاصر (Bleach)، وقد تم دراسة تاثير ثلاث تراكيز من كل مطهر (5، 2.5، 1.25)%، وعند استخدام التحليل الاحصائي (ANOVA) لتباين الاختلافات المعنوية واختبار دنكنة لتباين اي المطهرات او التراكيز اكفأ من غيرها لوحظ ان المطهرات بتراكيز 5% كانت اكفأ من التراكيز (2.5 و 1.25)%. كما ان مطهر الديتول كان اكفأ معنويا من المطهرين القاصر والهبتين.

Uses the Disinfectants against fungi isolated from the homes

Rusol Muhammed Al Bahrani
***** /University Of Baghdad, College Of Science, Biology Department

Summary

The study included 100 samples collected from different locations of the homes were located in the area of Ali Saleh in Baghdad 6 species were isolated from fungi and the most common genus or species of fungi isolated were *Aspergillus fumigatus* by frequency ratio of 25.84%, and occurrence ratio of 23%, *Penicilium* by frequency ratio of 21.34%, and occurrence ratio of 19%, *Mucor* by frequency ratio 20.22%, and the occurrence ratio of 18%, *Candida albicans* by frequency ratio of 15.73%, the occurrence ratio of 14%, *Rhizopus* frequency ratio by 13.48%, the occurrence ratio of 12% and *Aspergillus niger* frequency ratio by 3.37% and the occurrence ratio of 3%. Then the sensitivity test of disinfectants were studied against fungi isolated by using three disinfectants Chloroxylenol known commercially by (Dettol), Chlorhexidine commercially known by (Hibitane) and Sodium hypochlorite commercially known by (Bleach), and a study for the effected of three concentrations of each disinfectant (5, 2.5, 1.25)%, and the use of statistical analysis (ANOVA) to contrast the differences and Dnken test to the variation in any disinfectant or the most efficient concentrations of other disinfectants were observed that concentrations of 5% was the most efficient of concentrations than (2.5%) and (1.25%). As the disinfectant Dettol was significantly the most efficient from Bleach and Hibitane.

Corresponding to Email [nakm2004@yahoo.com]

المقدمــة

ان لمعظم الفطريات علاقة بحياة انسان، فهي توجد في الطبيعة وتؤدي دورا اساسيا في تحطيم واعادة تدوير المواد العضوية، كما وان لبعض الفطريات القدرة عل انتاج مضادات حياتية Antibiotics وسهوم فطرية لمأيضيات ثانوية (1). وتعد المطهرات Disinfectants من اهم المواد التي تستعمل لتقليل اعداد المسببات المرضية (2) فالتطهير هي عملية ازالة الجراثيم المرضية (قتلها او تثبيط نموها) من المادة او الاداة لمنع انتقال الامراض وهي عملية اقل من التعقيم (Sterilization) والتي هي عملية فيزياوية او كيمياوية تشمل التخلص من كل الجراثيم بما فيها الابواغ (البكتريا، الفطريات، الفايروسات) (3، 4، 5). اما الحفظ (Preservation) فهي عملية تتضمن منع تكاثر الجراثيم في الاغذية والمواد العلاجية (6). تتاثر عملية التطهير بعوامل عديدة منها تركيز الجراثيم، درجة الحرارة، تركيز المطهر، الاس الهيدروجيني، زمن التعرض، اضافة الى تاثير المطهر بوجود المواد العضوية وبعض المواد الطبيعية لذا توجب اختيار مطهر كيمياوي مناسب لتطهير مكان محدد (7).

المواد وطرائق العمل

الاوساط Media

1. وسط الـ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) من شركة Oxoid / England ويضاف الى الوسط مضادات حيوية (8) و (9) مثل:

* Procaine Penicillin اذ تكون كميته 0.4 ملغم / لتر (IV 400.000 Vial يذوب في 4 مل من الماء المقطر المعقم).
* Streptomycin وتكون كميته المضافة الى الوسط SDA هي 2 ملغم / لتر (1 غم يذوب في 5 مل من الماء المقطر المعقم)، ويستخدم وسط SDA في تشخيص الخمائر.

2. Sabouraud Dextrose Broth من شركة Oxoid / England ويستخدم هذا الوسط لتحديد التركيز المثبط الادنى MIC Minimal Inhibitory Concentration .

3. وسط تخمير السكريات Sugar fermentation Media

حضر حسب طريقة (10) اذ استخدم الوسط (Pepton water) واضيف له (2)% من الكاربوهيدرات و(5) % من خلاصة الخميرة بالإضافة إلى بروموثايمول الازرق كدليل للاس الهيدروجيني ثم وضع الوسط في انابيب زجاجية ووضع فيه انابيب دراهام (Durham's tube) بشكل مقلوب وذلك لتجميع الغاز المنتج. أضيف (0.2) مل من عالق الخميرة الى الوسط الزرعي الذي يحتوي على السكريات وحضنت الانابيب بدرجة (37) مْ وقرأت النتيجة بعد (24-72) ساعة إذ لوحظ تغير لون الوسط من اللون الازرق الى الاصفر وانتاج الغاز .

4. وسط اليوريا Urea media

اجري هذا الاختبار وفقاً لما ورد في (11) اذ اخذت انبوبتي اختبار حاوية على وسط اليوريا باستعمال أبرة تلقيح، لقحت الانبوبتين بالخمائر على ان تكون المستعمرات بعمر (3) ايام وحضنت بدرجة حرارة (27-30) مْ ولمدة (2-3) اسابيع بعدها أي تغير في لون الوسط يسجل من يومين الى ثلاثة اسابيع ، فالتحلل التام لليوريا يحول لون الوسط من الاصفر الى الاحمر او الوردي الغامق وفي التحلل الجزئي لليوريا نلاحظ تغير لون الوسط من الاصفر الى الوردي الفاتح وفي حالة عدم القدرة على تحليل اليوريا فان لون الوسط يبق اصفراً .

5. وسط اكار طحين الذرة Corn Meal Agar Media (CMAM)

حضر هذا الوسط وفقاً لما ورد في (12) وذلك بأذابة (20) غم طحين الذرة ، (15) غم اكار في كمية من الماء المقطر ثم وضع في الحمام المائي بدرجة (52) مْ ولمدة ساعة ثم رشح بواسطة ورق الترشيح بعدها عقم بالمؤصدة، وهي من الصفات التشخيصية المميزة لنوع C. *albicans* وذلك بتنميته على وسط CMA بدرجات حرارية 28 م^{o} لمدة لاتتجاوز عشرة ايام، اذ يلاحظ تكونه سبورات كروية كبيرة وهي السبورات الكلاميدية المرتبطة بالغزل الفطري الكاذب.

- تكوين الانبوب الجرثومي Germ tube Production

تم اضافة 0.5 مل من مصل الانسان في انبوبة اختبار، ثم أخذ جزء من المستعمرة ومزجت مع المصل في انبوبة الاختبار، ووضعت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م لمدة تتراوح من 2 – 4 ساعة، ثم أخذ جزء من هذا العالق بوساطة ماصة باستور Pasture Pipette ووضعت على شريحة زجاجية ومن ثم نقوم فحصت تحت المجهر وملاحظة تكون الانبوب الجرثومي (13).

- العينات Samples

تم جمع 100 عينة باخذ مسحات من مواقع مختلفة لارضيات وجدران المنازل وعزلت الفطريات وتم تشخيصها بوساطة الفحص المجهري اعتمادا على (14) و (15) و (16). وبوساطة التفاعلات البايوكيميائية لتشخيص الخمائر (17) وكما موضح في الجدول رقم (1).

جدول (1) التفاعلات البايوكيميائية لتشخيص الخمائر

Species	GT	UR	Fermentation of			
			G	S	L	M
Candida albicans	+	-	+	-	-	+
C. guilliermondii	-	-	+	+	-	-
C. itermedia	-	-	+	+	-	+
C. kefyr (C. Pseudotropicall)	-	-	+	+	+	-
C. krusei	-	+	+	-	-	-
C. parapsilosis	-	-	+	-	-	-
C. stellattodea	+	-	-	-	-	-
C. tropicalis	-	-	+	-	-	+
C. zeylamodes	-	-	+	+	-	+
Coyptococcus difflueas	-	+	-	-	-	+
Cr. Laurentii	-	+	-	-	-	-
Rhodotrule glutinis	-	+	-	-	-	-
R. rubra (R. mucilayinosa)	-	+	-	-	-	-
Saccharomyces cerevisiae	-	+	-	-	-	-
Torulopsis candida (C. famata)	-	-	+	+	-	+
T. slabrata (C. glabrata)	-	-	-	-	-	-
Trichosporon beigeieii	-	-	+	+	-	-
(Tr. Cutaneum)	-	+	-	-	-	-
Tr. capitatum	-	-	-	-	-	-

- المطهرات الكيميائية

تم اختيار ثلاث مطهرات وكما موضح في الجدول رقم (2).

جدول (2) يبين المطهرات الكيميائية

الاسم العلمي	الاسم التجاري	التركيز التجاري (غم /100مل)	الاس الهيدروجيني PH	الشركة المصنعة ومنشاها
Chlorhexidine	**Hibitane (هيبتين)**	**4**	**5.87**	**شركة الرحمة (الاردن)**
Chloroxylenol	**Dettol (ديتول)**	**5**	**10.19**	**شركة سامراء (العراق)**
Sodium Hypochlorite	**Bleach (قاصر)**	**5.25**	**11.38**	**شركة كلوركس (السعودية)**

اختبار الحساسية للمطهرات تجاه الفطريات المعزولة

Fungi Sensitivity Test of Disinfectants Against Isolated

حدد التركيز المثبط الادنى لثلاث مطهرات باتباع طريقة التخافيف المتسلسلة Serial Dilution Method لايجاد التركيز المثبط الادنى MIC ، وتم حساب النسبة المئوية للتثبيط بقياس قطر المستعمرة للمعاملات نسبة الى معاملة السيطرة وحسب المعادلة التالية :-

النسبه المئوية للتثبيط = (قطر مستعمرة السيطرة – قطر المستعمرة المعاملة) × 100

- النسبة المئوية للتردد Frequency Percentage

حسبت النسبة المئوية لتردد الانواع المعزولة من المنازل بتطبيق المعادلة الاتية (18) :-

$$\text{النسبة المئوية للتردد} = \frac{\text{عدد عزلات النوع الواحد}}{\text{العدد الكلي لعزلات جميع الانواع}} \times 100$$

- النسبة المئوية للظهور Occurrence Percentage

حسبت النسبة المئوية لظهور كل نوع من الانواع المعزولة ووفقاً للمعادلة الاتية (18) :-

$$\text{النسبة المئوية للظهور} = \frac{\text{عدد العينات التي ظهر فيها النوع الواحد}}{\text{العدد الكلي للعينات}} \times 100$$

- التحليل الاحصائي Statistical Analysis

استخدم جدول تحليل التباين (Analysis of Variance = ANOVA table) وفقاً لـ (19) في تحليل النتائج بمستوى معنوية ($P \leq 0.05$) واختبار دنكن Duncan وفقاً لـ (20).

النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص

تم عزل 6 أنواع من الفطريات من مواقع مختلفة لمنازل تقع في منطقة علي الصالح في بغداد وكما موضح في الجدول (3).

جدول (3) يبين عدد العزلات والنسب المئوية للاعفان والخمائر المعزولة من المنازل.

الموقع	عدد العينات	عدد العينات التي أظهرت نمواً	%	عدد العزلات	الاعفان والخمائر المعزولة
الحديقة	20	18	90	30	1- *Mucor* 2- *Rhizopus*
الكراج	20	16	80	26	1- *Aspergillus fumigatus* 2- *Penicillium* 3- *Candida albicans*
المطبخ	20	14	70	15	1- *Aspergillus fumigatus* 2- *Penicillium* 3- *Candida albicans*
غرفة المعيشة	20	12	60	13	1- *Aspergillus fumigatus* 2- *Aspergillus niger* 3- *Penicillium* 4- *Candida albicans*
غرفة النوم	20	5	25	15	1- *Candida albicans*
العدد الكلي	100	65	65	89	

نلاحظ من الجدول (3) ان حدائق المنازل سجلت اعلى نسبة تلوث فطري وهي 90% والسبب قد يعود لما توفره التربة من عناصر غذائية لنمو الفطريات، تليها كراجات المنازل 80% والسبب قد يعود لتماسها المباشر مع الشارع وما يحويه الشارع من نفايات وما تحمله عجلات السيارات من ملوثات

مختلفة المصادر، تليها المطابخ 70%، ان ارتفاع نسبة التلوث في المطابخ امر متوقع لعدم اتباع اساليب النظافة الصحيحة وارتفاع نسبة الرطوبة نتيجة لوجود مصادر المياه فيها واحتفاظ المكان بعامل الرطوبة يعد من اهم العوامل التي تزيد من احتمالية التلوث بالفطريات (21) وهي حالة تستدعي الانتباه إذ أن وجود الفطريات في اماكن اعداد الاغذية أخطر من وجودها في اماكن اخرى، إذ أن انتقال هذه الجراثيم الى الاغذية مما يسهل وصولها للاجهزة الداخلية (22)، تليها غرف المعيشة 60% والسبب قد يعود لقضاء افراد المنزل او ضيوفهم الذين قد يحملون من الخارج انواع من الفطريات معظم الوقت في هذه الغرفة ، كما وان فتح النوافذ قد يسمح لدخول الهواء الخارجي والغبار الى الداخل، اما غرف النوم فقد سجلت أقل نسبة تلوث فطري والسبب قد يعود الى قصر الفترة التي يقضيها افراد المنزل في هذه الغرفة.

تردد وظهور الفطريات

نلاحظ من خلال جدول (4) ان اعلى نسبة تردد وظهور هو للفطر *Aspergillus fumigatus* (25.84%) و (23%) على التوالي والسبب قد يعود الى قدرته العالية على انتاج الانزيمات والايضيات الثانوية والتي تمكنهم من استغلال المصادر الغذائية المختلفة، كما ان له قابلية على تحمل مديات واسعة من التطهيرات البئية (23)، يليه الفطر *Penicillium* اذ سجل نسبة تردد (12.34%) وظهور (19%) وهذا ما وجده (24) في امريكا في دراسته إذ عزل فيها هذا الفطر بنسبة تردد (20.1%)، وتختلف نسبة الظهور عما وجده (25) في الاردن إذ كانت نسبة الظهور في دراسته (8.9%). اما الفطر *Aspergillus niger* فحصل على أوطآ نسبة تردد وظهور (3.37%) و(3%) على التوالي.

جدول (4) النسب المئوية لتردد وظهور الفطريات المعزولة من المنازل

الانواع الفطرية	التردد	الظهور
Aspergillus fumigates	**25.84**	**23**
Penicillium	**21.34**	**19**
Mucor	**20.22**	**18**
Candida albicans	**15.37**	**14**
Rhizopus	**13.48**	**12**
Aspergillus niger	**3.37**	**3**
العدد الكلي	**100**	**89**

اختبار حساسية الفطريات المعزولة تجاه المطهرات

اشارت النتائج الموضحة في الجداول (5) و (6) و (7) ان نسب التثبيط كانت متباينة بشكل معنوي تحت مستوى احتمالية 0.05 حسب نوع وتركيز المطهر والنوع الفطري، حيث استخدم تحليل التباين (ANOVA) لتباين الاختلافات المعنوية واستخدم اختبار دنكن لتبيان اي المطهرات او التراكيز اكفأ من غيرها إذ نلاحظ ان المطهرات بتركيز 5% كانت أكفأ معنويا من حيث التأثير مما لو استخدمت بتراكيزها المخففة 2.5 و 1.25 وهذه النتيجة تتفق مع (26) بان المطهرات يقل تاثيرها كلما استخدمت بتراكيز مخففة وان تخفيف المطهرات دون اتباع اي قواعد صحيحة للتخفيف بل يستخدم ماء الحنفية في التخفيف الذي قد يكون حاويا على الجراثيم التي بدورها تبطل مفعول هذه المطهرات (27).

كما ان مطهر الديتول كان أكفأ معنويا من المطهرين القاصر والهبتين وتعود الفاعلية القاتلة للديتول باعتباره احد المركبات الفينولية لتاثيره على بروتينات الخلية وتثبيطه للانزيمات (28) و (29)، وتعود الفاعلية القاتلة للقاصر باعتباره احد الهالوجينات المألوفة والواسعة الاستعمال لتاثيره على الحامض النووي DNA إذ يعمل على تثبيط عملية تصنيعه (30) و (31) و (32).

اما مطهر الهبتين فالتراكيز العالية منه تسبب ترسب البروتينات والاحماض النووية (33) و (34)، ويعد الهبتين أقل تأثيرا على الفطريات من الديتول والقاصر والسبب قد يعود الى كثرة استعماله في المنازل وان كثرة استعمال مطهر دون آخر يؤدي الى شيوع عامل المقاومة نتيجة حدوث طفرات وراثية لتعدد الاستعمال (35).

جدول (5) نسبة التثبيط في التراكيز الثلاث لمطهر الديتول

نسبة التثبيط %	التركيز غم/100مل	نسبة التثبيط %	التركيز غم/100مل	نسبة التثبيط %	التركيز غم/100مل	الانـوع الفطرية	
80	1.25	83.3	2.5	90	5	*Candida albicans*	1
77.1	1.25	80.2	2.5	83	5	*Aspergillus niger*	2
70	1.25	73.3	2.5	76	5	*Aspergillus fumigatus*	3
66	1.25	68.6	2.5	70	5	*Penicilium*	4
65.1	1.25	67	2.5	68.5	5	*Mucor*	5
61.1	1.25	63	2.5	66	5	*Rhizopus*	6

جدول (6) نسبة التثبيط في التراكيز الثلاث لمطهر القاصر

نسبة التثبيط %	التركيز غم/100مل	نسبة التثبيط %	التركيز غم/100مل	نسبة التثبيط %	التركيز غم/100مل	الانـوع الفطرية	
72.1	1.25	75.3	2.5	77	5	*Candida albicans*	1
80	1.25	81.2	2.5	83	5	*Aspergillus niger*	2
66.8	1.25	67.1	2.5	68	5	*Aspergillus fumigatus*	3
55	1.25	58.6	2.5	60	5	*Penicilium*	4
47	1.25	49	2.5	50.8	5	*Mucor*	5
45.7	1.25	51	2.5	55	5	*Rhizopus*	6

جدول (7) نسبة التثبيط في التراكيز الثلاث لمطهر الهبتين

نسبة التثبيط %	التركيز غم/100مل	نسبة التثبيط %	التركيز غم/100مل	نسبة التثبيط %	التركيز غم/100مل	الانـوع الفطرية	
73.2	1.25	75.6	2.5	17	5	*Candida albicans*	1
70	1.25	71.8	2.5	72.1	5	*Aspergillus niger*	2
57	1.25	59.5	2.5	60.1	5	*Aspergillus fumigatus*	3
50	1.25	53.1	2.5	56	5	*Penicilium*	4
38.3	1.25	39	2.5	40	5	*Mucor*	5
40.4	1.25	46	2.5	48.8	5	*Rhizopus*	6

References

1- Hay RL (2000). Fungal infections and mycoses. In: Leding-ham, J.G.G. and Warrel, D.A. (eds). Concise Oxford textbook of Medicine. Published in the United States by Oxford Univ. Press, Inc. New York.

2- Lowbury ED (1992). Special problems in hospital antiseptis In: principles and practices of Disinfection, preservation and sterilization, Oxford Blackwell. Scientific publication.

3- Pelczar MJ Chan EC and Krieg NR (1986). Microbiology. 5th ed. McGraw-Hill book Company.

4- Prescott LM Harleg JP and Klein DA (1990). Microbiology. W.M.C. Brown Publishers.

5- Atlas RM (1995). Principles of Microbioliology. Mosby- Yearbook

6- McDonnell G and Russell AD (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity Action and Resistance. Clin. Microb. Rev. 12(1): 147-179.

7- Wilson G (1983). Bacterial resistance disinfection and sterilization, P:70-96. In:Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Vitrology and Immunity., Vol.1, 7th ed. Edward Arnold.

8- Milne LJR (1996). Fungi. In: Collee JG Maromion BP Fraser AG and Simmon A (eds). Practical Medical Microbiology, 14th (eds). Churchill Living Stone Edin-burgh.

9- Guardia JA Bourgoingine J Bourgoinie J and Diego J (2000). Renal mucormycosis in the HIV patient. Amer. J. kidney. Dis. 35: 241-E245.

10- Cruikshank R Duquid TP Marmion B P & Swain R H (1973). Medical Mirobology. 12th ed.Vol.1.the English language book Society&Churchill Livingston.

11- Colle JG Fraser AG Marmion BP & Simmon AS (1996). Practical Medical Microbiology. Hunchill Livingstone.

12- Koneman EW Robert GD and Wright SE. (1978). practical Mycology. The Williams & Wilkins Company. Baltimore, USA.
13- Baron EJ Peterson LR and Finegold SM (1994). Bailey and scott's diagnostic micrabiology. 9th ed. Mosby year book Inc.
14- McGinnis MR (1980). Laboratory handbook of medical mycology. Academic press, New York. p. 356.
15- Bailey C and Scotts J (1986). Diagnostic Microbiology .1st ed. Printed in USA.
16- Ellis DH (1994).Clinical Mycology. The Human Opportunistic Myosis. Pfizer, New York.
17- Hoog GS and Guarro, J. (1995) Atals of clinical fungi University Ropiran. Press. London& Spain.
18- Krebs CJ (1978). Ecology: The Experimental Analysis Distribution and Abundance. Harper and Row Publisher, New York.
19- Shelver W (1984) Biological statistical. Translate by Ahmed Abdul Rahim Ali and Saif Aldeen. Basrah University.
20- Wayne WD (1983). Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Science. 3rd Ed. U.S.A., 206-237.
21- Roufed R (2002). The dispersion of air borne. Trans, Br. Mycol. Soc. 28:26-27.
22- Somask RH (2000). Occurrence of moulds in modern living and working environments. Eur. J. Epidemiol. 1:54-61.
23- Al Anni Soudad Abed Al Satar (1997). Isolate and diagnoses of apportunistic fungi from Basrah hospitals with study of effected some disinfectans MSC science collage, Basrah university.
24- Reuf DR (2000).The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different candida species. Clinical Infections Disease, 24: 1122-8.
25- Saied FA (2001). A Study about Nosocomial Infection in some Hospitals. A Thesis, p: 40-45.
26- Redal KM (1999). Secular trends in the epidemiology of Nosocomical fungal infections in the United States, Journal of Infectious Disease, 16:197-210.
27- Kelff SR Plebeq JG and Mallie M (2002). Nosocomial Fungus Infection. J Med Vet Mycol. 33: 404-409. Klepser, Pharm, D. and Michael ,E. (2004). Future candidates in the search for New Anti Fungal Agent. Current Secince, Inc. 1-7.
28- Russell AD and Furr JR (1977). The antibacterial activity of a new chloroxylenol formulation containing ethylenedimaine tetraacetic acid J Appl. Bacteriol., 43:253-260.
29- Bruch MK (1996). Chloroxyleno: an old – new antimicrobial, P:265-294. IN: Handbook of disinfectants and antiseptics. Ascenzi, J.M.(Ed.). Marcel Dekker, Inc., NewYork, N.Y.
30- Shih KL and Leader berg J (1976). Effects of chloramine on *Bacillus subtilis* deoxy ribonucleic acid.J.Bacteriol.,125:934-945.
31- Dennis WH Olivieri VP and Kruse CW (1979). The reaction of nucleotides with aqueous hypochlorous acid. Water Res., 13:357-362.
32- Dukan S and Touati D (1996). Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*. resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress J Bacteriol 178:6145-6150.
33- Hugo WB and Longworth AR (1966). The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic content, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. J. Pharm. Pharmacol., 18:569-578.
34- Longworth AR (1971). Chlorhexidine, P:95-106. In: Inhibition and destruction of microbial cell. Academic press, Ltd., London, England.