creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:48009-200000289108

의학석사 학위논문

세균과 효모균의 균종별 바이오필름 형성능과 세정제 효과평가

Evaluation of biofilm formation and removal efficacy of three medical-device detergents by bacterial and yeast species.

울 산 대 학 교　대 학 원

의 학 과

박 근 열

세균과 효모균의 균종별 바이오필름 형성능과 세정제 효과평가

지 도 교 수　김 미 나

이 논문을 의학석사학위 논문으로 제출함

2020 년 2 월

울 산 대 학 교　대 학 원

의 학 과

박 근 열

박근열의 의학석사 학위 논문을 인준함

심사위원 성 흥 섭 인

심사위원 김 미 나 인

심사위원 황 상 현 인

울 산 대 학 교 대 학 원

2020 년 2 월

국문요약

배경: 바이오필름을 형성한 박테리아는 항생제나 소독제의 침투가 어려워서 이들에 대한 내성을 가진다. 바이오필름은 의료관련감염의 주요한 기전으로 알려져 있고, 특히 항균제로 치료하기 어렵고 항균제 내성균으로 변이를 촉진한다. 따라서 의료기구의 재사용 시 바이오필름을 제거하는 것이 중요하며, 이를 위해 음파파쇄, 혹은 세척 등의 물리적 방법과 세정제 등의 화학적 방법 등을 사용한다. 단백분해효소나 아밀라아제 등을 이용하는 효소계 세정제나 세균이 분비하는 탄수화물 복합체를 용해하는 활성을 가진 비효소계 세정제 등이 의료용 세정제로 승인되어 있다. 세정제의 바이오필름 제거능을 평가한 연구가 드물다. 이 연구는 임상적으로 중요한 세균 및 진균의 다양한 균종들에서 바이오필름 형성능이 있는 균주와 조건을 정립하고, 의료용 세정제들의 바이오필름 제거능을 평가하였다.

방법: *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Citrobacter freundii, Acinetobacter baumannii, Candida albicans, Candida auris, Trichosporon asahii, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Streptococcus agalactiae*를 포함하는 임상검체 분리주 35개와 American Type Culture Collection (ATCC) 및 외부에서 얻은 표준균주 9개를 폴리스티렌 마이크로플레이트에 배양하여 얻은 바이오필름을 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 흡광도를 측정하였다. 각 조건에서 흡광도 측정은 항상 3회 반복하여 평균과 표준편차를 구하였다. 매 측정시 배양액을 분주하지 않은 3개 정(well)들의 값을 평균하여 공시료(Sample blank)로 설정하였다. 높은 바이오필름 형성능을 보인 9주(그람양성구균 2주, 그람음성간균 4주, 효모균 3주)를 이용해 3% Bacto tryptic soy broth에 하룻밤 배양시킨 후 1:100으로 희석하여 마이크로플레이트에 3일간 배양 후 바이오필름을 형성시켰다. 바이오필름 제거능은

염소계 표백제(유한락스®)와 증류수를 양성대조군과 음성대조군으로 설정하고 효소계 세정제 2종(Empower®, Cidezyme®), 비효소계 세정제 1종(Matrix mint®)을 이용해 각각 실온에서 8분씩 3회 세척, 30분간 1회 세척, 37℃에서 30분간 1회 세척하는 조건들에 대해 증류수로 실온에서 8분간 1회 세척했을 때를 기저값으로 설정하여 비교하였다. 크리스탈 바이올렛으로 5분 간 염색 후 증류수로 2회 세척하고, 95% 에탄올에 30분 간 용출시켜 620nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 조건에서 흡광도를 기저값의 흡광도로 나누어 바이오필름 잔여 백분율을 구함으로써 바이오필름 제거능을 평가하였다. 3회 반복된 실험값의 평균과 표준편차를 이용해 스튜던트의 T 검정을 이용해 통계 분석하였다.

결과: 바이오필름의 총 생물량을 측정하였을 때, *P. aeruginosa* AMC1100009, *C. albicans* AMC99252, *T. asahii* AMC1802A11511, *C. auris* AMC1804C1704, *P. aeruginosa* AMC99241 순으로 형성능을 보였다. NaCl 를 4% 첨가하거나, 에탄올을 8%와 10% 첨가하였을 때 *S. aureus* 의 바이오필름 생성량이 유의하게 증가함을 확인할 수 있었다 (p= 0.02, 0.04, 0.04). 염소계 표백제는 모든 균종에서 뚜렷한 바이오필름 제거능을 보인 반면, 다른 세정제는 균종과 세척 조건에 따라 제거능이 달랐다. 효소계 세정제(Cidezyme, Empower)를 37℃에서 30 분 조건에서, *P. aeruginosa* ATCC27853, *E. coli* ATCC35218, *E. coli* AMC1910E6615, *C. albicans* ATCC14053, *C. auris* AMC1804C1704, *S. aureus* RN9120 에서 바이오필름의 제거율이 50% 이상이었다. Cidezyme 의 제거율은 66%, 82%, 52%, 82%, 71%, Empower 는 13%, 69%, 80%, 92%, 71%이었다. *K. penumoniae* AMC1910I244 는 Empower 의 제거율이 실온에서 8 분간 1 회, 2 회, 그리고 30 분간 1 회 조건에서: 각각 42%, 75%, 55%로 유의한 바이오필름 제거능을 보였으나, 37℃에서 30 분간 1 회 조건에서는 5%로 제거능을 보이지 않았다. *E. faecalis* AMC98901, *C. auris* AMC1804C1704, *T. asahii* AMC1802A11511 의 경우 30%

이상의 제거능을 보이는 세정제가 없었다. Matrix mint 는 모든 균주에서 세척능이 유의한 조건이 없었다.

결론: 동일 균종이라 할지라도 균주에 따라 바이오필름 형성능과 제거능은 차이가 있었다. 효소계 세정제가 비효소계 세정제에 비해 바이오필름 제거 효과가 우수하였으며, 37℃ 조건, 다회 세척할 때 제거능이 향상되었다. *E. faecalis, C. auris, T. asahii* 와 같은 균종들은 세정제에 의한 바이오필름 제거 효과가 유의하지 않았다. 바이오필름을 제거하는 세정제 효과는 특정 균주와 조건에서만 유의한 수준으로 나타나서 세정제 단독으로 바이오필름 제거를 기대할 수는 없었다.

중심단어: 바이오필름, 세정제, 형성능, 제거능

차 례

국문요약 i

표 목차 v

그림 목차 vii

서론 1

연구 대상 및 방법 4

1. 대상 균주 및 세정제 4

2. 균주 별 바이오필름 정량 측정 4

3. 세정제 사용 후 바이오필름 잔여량 측정 5

4. 자료 분석 및 통계 6

결과 7

1. 바이오필름 형성능 평가 및 제거능 평가를 위한 균주 선정 7

2. 세정제 효능 평가 8

고찰 10

결론 14

참고문헌 49

영문요약 53

표 목차

Table 1. List of study strains for biofilm forming capacity and detergent efficiency 15

Table 2. Manufacturer recommendation for use of study detergents 16

Table 3. Conditions for biofilm removal activity by study detergents 17

Table 4. Quantification of biofilm formation of gram-positive cocci, gram-negative rod, and yeasts using optical density at 620 nm.....18

Table 5. Removal of biofilms produced by *P. aeruginosa* ATCC27853 by treatment of study detergents..... 21

Table 6. Removal of biofilms produced by *E. coli* ATCC35218 by treatment of study detergents 24

Table 7. Removal of biofilms produced by a clinical isolate of *E. coli* by treatment of study detergents 27

Table 8. Removal of biofilms produced by a clinical isolate of *K. pneumoniae* biofilms by treatment of study detergents 30

Table 9. Removal of biofilms produced by a clinical isolate of *T. asahii* by treatment of study detergents 33

Table 10. Removal of biofilms produced by *C. albicans* ATCC14053 by treatment of study detergents 36

Table 11. Removal of biofilms produced by a clinical isolate of *C. auris* by treatment of study detergents 39

Table 12. Removal of biofilms produced by a clinical isolate of *E. faecalis* by treatment of study detergents 42

Table 13. Removal of biofilms produced by *S. aureus* RN9120 by treatment of study detergents 45

그림 목차

Figure 1. Biofilm formation of *S. aureus* RN9120 in response to alcohol and salt supplement 20

Figure 2. Removal efficacy of three detergents for *P. aeruginosa* ATCC27853 biofilms 23

Figure 3. Removal efficacy of three detergents for *E. coli* ATCC35218 biofilms.....26

Figure 4. Removal efficacy of three detergents for a clinical isolate of *E. coli* biofilms.....29

Figure 5. Removal efficacy of three detergents for a clinical isolate of *K. pneumoniae* biofilms.....32

Figure 6. Removal efficacy of three detergents for a clinical isolate of *T. asahii* biofilms 35

Figure 7. Removal efficacy of three detergents for *C. albicans* ATCC14053 biofilms.....38

Figure 8. Removal efficacy of three detergents for a clinical isolate of *C. auris* biofilms.....41

Figure 9. Removal efficacy of three detergents for a clinical isolate of *E. faecalis* biofilms.....44

Figure 10. Removal efficacy of three detergents for *S. aureus* RN9120 biofilms.....47

Figure 11. Residual biofilm percentage after treatment of study detergents for biofilm produced by various strains. 48

서론

미생물학자들은 1880년대부터 지난 세기까지 '순수 배양의 시대' (the pure culture period)라고 일컫는다.[1] 이는 박테리아나 진균이 자유롭게 떠돌아다니는 플랑크톤형(planktonic phenotype)이 의미있는 미생물의 형태로 인식했던 시대이다. 하지만, 미생물들은 함께 모여서 군집을 이루는 "바이오필름"형으로도 관찰된다. 바이오필름은 '스스로 생산하는 중합체 기질로 둘러 쌓인 미생물 세포들의 구조화된 군집'이다.[2] 바이오필름을 형성하기 위해 미생물들은 세포외 고분자 물질 (extracellular polymeric substances, EPS)를 분비하게 되는 데, EPS는 탄수화물, 단백질, 핵산 등에 의해 구성되어 있다고 알려져 있다.[3, 4] 다당류는 표면에 박테리아가 부착되고, 축적되는데 일부 기여한다. 숙주로부터 피브린, 혈소판, 면역글로불린 등의 요소와 미생물 그 자체 그리고 바이오필름의 기질이 합쳐져서 바이오필름의 형태를 띄게 된다. 바이오필름의 형성능은 박테리아와 진균이 모두 가지고 있으며, 하나의 바이오필름은 구성하는 균은 하나 혹은 그 이상의 균종이 관여할 수 있다.[5]

처음 군집된 형태의 미생물이 기술된 것은 1684년 Anthony van Leeuwenhoek가 치태 (scurf of the teeth)로 기술한 것이 처음이다. 1864년에는 유명한 미생물학자인 Louis Pasteur도 와인이 식초가 되는 데 미생물 집락이 관여함을 보고하였다.[6] 환경미생물학에서는 배의 침수된 표면에서 나타나는 바이오필름 등의 중요성이 90여년 전부터 이미 알려져 왔다.[5] 1970년대에 이르러서 낭성섬유증 등에서 *Pseudomonas aeruginosa*의 집락이 관찰되면서 그 중요성이 부각되었고, 의학계에서는 1985년에 John William Costerton이 처음으로 바이오필름이라는 용어를 사용하였다.[7]

이처럼 바이오필름에 대한 인식이 늦었기 때문에 균의 특성연구나 항생제 개발은 플랑크톤형의 미생물을 대상으로 연구되어 왔다. 대부분의 급성감염은 적절한 항생제를 통해 치료 가능하다.[8] 항생제에 반응하지 않는 만성감염은 상당수에서 현미경 검경으로 바이오필름을 증명할 수 있다.[1] 낭성섬유증 환자의 약 80%가

바이오필름 연관 만성 폐감염 상태이고 만성 창상 감염의 60% 이상이 바이오필름과 연관되어서 미국질병관리본부와 미국국립보건원에서 인체감염의 65-80%가 바이오필름과 연관되어 있다고 보고한 바 있다.[9, 10] 의료관련감염 중 가장 중요한 기구관련감염인 카테터 관련 혈류감염, 인공호흡기 연관 폐렴 그리고 카테터관련 요로감염 등은 모두 바이오필름 연관감염으로서 병원감염관리를 위해 바이오필름 형성을 예방하거나 제거하는 것은 매우 중요하다. 만성감염 상태에서 보이는 바이오필름은 병원체를 항생제 및 살균제로부터 보호해서 강한 내성을 갖게 하는 요인이다.[11] 바이오필름을 제거하는 방법으로 치태(plaque)는 칫솔질을 통해 제거할 수 있고, Pasteur는 단순히 끓여 제거하는 것을 고안했지만[1], 인체 내에서는 물리적 제거 자체가 어렵기 때문에 조기에 적극적인 항생제 예방요법을 실시하거나, 장기적인 억제 치료를 시도할 수가 있다. 그 외에 바이오필름 기질을 제거하기 위한 효소의 사용이나 정족수감지(quorum-sensing) 억제제를 이용해 항생제의 감수성을 높이는 방식 등도 제안되었다.[12]

바이오필름을 형성한 박테리아는 세정제에 의해 잘 제거되지 않는다. 실제로 내시경을 세척하고 멸균한 뒤에도 박테리아들이 살아있었다는 보고가 다수 있으며, 이는 바이오필름 때문일 것으로 추정된다. 바이오필름은 EPS로 이루어진 층에 의해 둘러싸여 자외선 조사, 항생제, 그리고 물리적 소독등에 미생물이 내성을 갖게 한다.[13] 병원용 기구들은 물리적 방법과 함께 화학적 방법을 이용해 바이오필름을 제거하는 것이 일반적인데, 단백분해효소, DNA 분해효소, 알지네이트 분해효소, 아밀라아제, 그리고 셀룰라제 등이 보고되어 있다.[13] 반면에 Matrix®같은 비효소계 세정제는 EPS의 탄수화물 복합체에 효과적이어서 *Escherichia coli*에 의한 바이오필름에 우수한 성능을 보였다.[14]

바이오필름 제거 효과가 있는 화학물질이나 세정제에 대한 연구들이 보고되어 있다. Chen 등은 SDS이나 NH_2Cl과 같은 화학물질이 *P. aeruginosa*와 *Klebsiella pneumoniae*의 바이오필름을 제거할 수 있다고 보고하였다.[15] 내시경에 생성된 *Enterococcus faecium*의 바이오 필름에 대해 충분한 제거력을 가진 세정제가

없다는 보고가 있었으며[16], *E. coli*의 바이오필름은 비효소계 세정제에 의해 가장 잘 제거된다는 보고들이 있었다.[14, 17, 18] 효소계 세정제에 대한 연구로 *Pseudomonas fluorescens*에 의한 바이오필름은 단백질의 비율이 높아서 단백분해효소를 포함한 세정제가 아밀라아제를 포함한 세정제보다 더 효과적이라는 보고가 있었다.[19] *Enterococcus faecalis*와 *P. aeruginosa*에 의한 바이오필름은 효소계 세정제에 의해 비교적 잘 제거되나, 충분한 수준에 이르지 못했다는 보고가 있었다.[20] 또한 이전의 세정제 개발 연구에서 단백분해효소와 다당류분해효소를 조합하였을 때 *P. aeruginosa*와 *Staphylococcus aureus*에 의한 바이오필름을 잘 제거하였다.[13] *Listeria monocytogenes*와 *E. coli*에 의한 바이오필름을 잘 제거하기 위해 적절한 농도의 단백분해효소와 Benzalkonium chloride를 병합하는 것이 효과적 이었다는 보고가 있다.[21] 최근에는 새롭게 개발된 계면활성제가 *E. coli*에 의한 바이오필름을 75% 까지 제거하였다는 보고가 있다.[22] 위에 언급한 바와 같이 바이오필름 제거에 효과적인 세정제를 개발하기 위해 새로운 계면활성제를 찾거나 다양한 효소를 조합하는 시도가 있다.[13, 22] 그러나 다양한 균종에 대해서 여러 온도, 시간 조건에서 다양한 세정제의 바이오필름 제거능을 평가한 문헌은 찾기 어렵다.

이 연구는 임상적으로 중요한 병원성 그람음성 및 그람양성 세균과 진균의 바이오필름 형성능을 평가하고, 국내에서 사용되는 의료용 세정제의 효능을 비교하기 위해 수행하였다.

연구 대상 및 방법

1. 대상 균주 및 세정제

가) 대상 균주

대상 균주는 본 기관에서 보관된 임상균주 35주 및 표준균주 9주를 이용하여 실험을 진행하였으며, 포함된 임상균주의 종명 이외의 정보는 수집하지 않았다. 실험한 균주의 목록은 표1과 같다.

나) 대상 세정제

사용한 세정제는 시중에서 판매되는 효소 세정제 Empower® (Metrex, Orange, CA), Cidezyme® (Johnson and Johnson Medical Inc, Arlington, Tex), 비효소계 세정제 Matrix mint® (Whiteley Medical, Sydney, Australia), 그리고 양성대조군으로 유한락스 레귤러®(유한크로락스, 경기도, 한국)를 이용하여 평가하였다. 사용한 농도는 제조사가 권장한 농도를 이용여 실험을 수행하였으며 그 상세한 내용은 표 2와 같다.

2. 균주 별 바이오필름 정량 측정

다양한 균주를 평가하기 위해 96 well 플레이트를 사용하였으며, 바이오필름의 정량은 총 생물량(total biomass), 박테리아 세포의 총량, 살아있는 박테리아 세포의 양, 단백질의 양을 측정하는 방식 등이 알려져 있으나, 형성능 및 제거능 평가에는 박테리아와 EPS를 모두 포함하는 총 생물량을 크리스탈 바이올렛을 이용해 측정하였다.[23)] 총 생물량을 측정하는 실험방식은 이전 보고된 논문들을 참조하였다.[13, 23-25)] 대상 균주를 3% Bacto tryptic soy broth (TSB) (Becton Dickinson)에 접종한 뒤 150 rpm 및 37℃ 조건에서 하루 밤 동안 진탕배양 한 후 10 μL를 1 mL의

TSB에 1:100으로 희석하였다. 까다로운 세균인 *S. agalactiae*는 gentamicin과 nalidixic acid가 첨가된 3% Todd Hewitt Broth를 이용하여 실험하였다. 희석된 배양액을 폴리스티렌 재질의 96 Well Tissue-Culture Plates (#353072, Falcon, BD Biosciences, Bedford, MA)에 200 μL씩 세번 분주하고 37℃에서 24시간 동안 일반배양기에서 배양하였다. 24시간 뒤 PBS를 이용해 250μL씩 2회 세척한 뒤 공기에 말렸다. 200μL의 크리스탈 바이올렛으로 5분간 염색한 후 각 well을 증류수를 이용해 두 번씩 세척한 후 말렸다. 95% 에탄올 200 μL를 이용해 30분간 용출시킨 후 바이오필름의 생성을 Evolis (Bio-Rad, Hercules, California)를 이용해 620nm에서 흡광도(OD)를 측정해 정량화하였다. 매 측정시 배양액을 분주하지 않고 동일한 방법으로 처리한 3개 정(well)들의 값을 평균해 Sample blank로 설정하였다.

*S. aureus*의 경우 배지의 조성, NaCl, 에탄올의 농도, 철분 부족, 산소 부족에 따라 바이오필름의 형성능이 다르다는 보고가 있다.[26-28] 바이오필름 형성능의 양성대조군으로 바이오필름 형성능이 증명된 *S. aureus* RN9120 균주를 이용하였다. 상기 조건 이외에 4% 에탄올과 4% NaCl을 각각 배지에 첨가하여 배양 후 바이오필름의 형성능을 측정하였다.

3. 세정제 사용 후 바이오필름 잔여량 측정

그람양성알균, 그람음성간균, 그리고 진균 중에 바이오필름 형성능이 증명된 균주를 선택하여 형성능평가와 동일하게 진탕배양하였다. 96 well 플레이트에 TSB를 이용해 1:100으로 희석된 균액을 100 μL씩 세번 분주 후 72시간 동안 배양한 뒤 95% 에탄올 200 μL를 이용해 세척 및 고정한 뒤 공기에 말리고, 표3과 같은 조건 하에 표2에서 제시된 세정제 및 증류수 200 μL를 사용해 세척하고 난 후 100μL의 크리스탈 바이올렛으로 5분간 염색한 후 각 well을 증류수를 이용해 두번씩 세척한 후 말렸다. 95% 에탄올 100 μL를 이용해 30분간 용출시킨 후 620nm에서 흡광도로 바이오필름의 남은 양을 측정하였다. 실험의 양성대조군으로 염소계 표백제를

음성대조군으로 증류수를 이용하였다. 증류수로 실온에서 8분간 1회 세척했을 때를 기저값으로 설정하여 비교하였다. 각 균주별 바이오필름 잔여율과 바이오필름 제거율을 구하는 식은 다음과 같다.

$$\% \text{ Residual} = \frac{OD_{620\ residual}}{OD_{620\ baseline}^{*}} \times 100$$

$$\% \text{ Removal} = 100 - \% \text{ Residual}$$

* OD_{620} after distilled water washing for 8minutes at room temperature

4. 자료 분석 및 통계

측정된 흡광도 값은 Blank Control의 값을 감산하여 표현하였다. 각 실험에서 흡광도 값은 3회 반복된 실험 값의 평균 및 표준편차 값을 나타냈다. 바이오필름 형성능 평가에서 측정된 흡광도의 평균값이 음성대조군보다 낮을 경우에는 0.000으로 처리하였다. 데이터의 처리는 Microsoft excel (version 1908)과 R (version 3.5.3)을 사용하였다. 각 대상 균주들의 바이오필름 형성능과 제거능의 비교는 스튜던트의 T 검정(독립표본, 양측)을 하였고,[13, 23] $P<0.05$인 경우 통계적으로 유의하다고 판단하였다. 각 세정제의 바이오필름 제거능 평가에서 각 실험 조건에서 증류수로 세척한 경우를 기준으로 비교하였다.

결과

1. 바이오필름 형성능 평가 및 제거능 평가를 위한 균주 선정

임상균주 35균주와 표준균주 9균주에 대해 시행한 흡광도로 측정된 폴리스티렌 플레이트에 대한 바이오필름의 총 생물량은 표4로 정리하였다. *P. aeruginosa* AMC100009, *C. albicans* ATCC14053, *Trichosporon asahii* AMC1802A11511, *C. auris* AMC1804C1704, *P. aeruginosa* AMC99241이 바이오필름을 잘 형성하는 균주였다. 그람음성간균 중에서는 *P. aeruginosa* AMC99241, AMC100009, 그리고 *E. coli* ATCC35218*가 흡광도가 1.00이 넘었고, 진균 중에서는 *Candida albicans* ATCC14053, AMC99252, *Candida auris* AMC1804C1704, *T. asahii* AMC1802A11511, AMC99235이 흡광도가 1.00보다 큰 값을 가졌다. 그람양성구균 중에서는 *E. faecalis* AMC98901이 흡광도 값이 0.50를 넘었다. *P. aeruginosa*와 진균류가 바이오필름을 형성능이 높음을 확인할 수 있었다. 반면 *Streptococcus agalactiae*, *Citrobacter freundii, S. aureus*는 흡광도 값이 0.50 이상 측정되는 균주가 없었다.

*S. aureus*의 바이오필름 형성능을 향상시키고자 RN9120균주를 이용해, 99% 에탄올을 TSB 부피의 2%, 4%, 6%, 8%, 10%를 TSB에 첨가하였을 때, 바이오필름 형성량이 증가했다. 8-10%에서는 유의하게 증가했고 2-4%에서는 유의하지 않았지만 증가하는 추세를 보였다. (각각, p= 0.0640, 0.0906, 0.2344, 0.0437, 0.0371). 유사하게, 4% 에탄올과 4% NaCl을 첨가했을 때는, 바이오필름의 4% NaCl을 첨가했을 때, 유의하게 증가함을 볼 수 있었다. (각각, p= 0.170, 0.017) (그림1)

이상의 형성능 평가에 근거하여 OD620이 0.50 이상인 균주를 제거능 평가를 위해 선정하였다. *P. aeruginosa* ATCC27853, *K. pneumoniae* AMC1910I244, *E. coli* ATCC35218, *E. coli* AMC1910E6615, *E. faecalis* AMC98901, *S. aureus* RN9120, *C. albicans* ATCC14053, *C. auris* AMC1804C1704, *T. asahii* AMC1802A11511 등 총 9주를 제거능 평가에 사용하였다(표4).

2. 세정제 효능 평가

위에서 선택한 9주에 대해서 세정효과에 대한 음성대조군으로서 생리식염수와 양성대조군으로서 염소계 표백제를 이용하여 표2와 표3에 주어진 조건에 따라 각각의 세정제를 이용했을 때 바이오필름의 남은 양을 측정하여 결과는 균종별로 표 및 그래프로 (표 5-13, 그림 2-10) 나타낸 후 전체적인 결과를 그림11에 같이 정리하였다.

음성대조군에서 제거율이 50% 이상인 경우가 있었다. *P. aeruginosa, C. albicans, S. aureus*는 8분간 3회 세척하거나, 실온에서 30분 세척한 경우 50% 이상의 제거능을 보였다. 양성대조군으로 설정한 염소계 표백제의 경우 상온에서 8분씩 3번 세척하였을 때, *K. pneumoniae*와 *C. albicans*를 제외하면 70% 이상의 높은 제거능을 보였다. 이 조건에서 *K. pneumoniae*는 44%, 그리고 *C. albicans*는 64%의 제거능을 보였다. 진균의 바이오필름은 실온에서 30분간 1회 세척한 경우 *C. albicans*는 전혀 제거되지 않았고 *T. asahii*나 *C. auris*는 49%, 42%의 제거율로 실온에서는 잘 제거되지 않았다. 37℃로 가온한 경우에는 30분간 1회 세척했을 때 *C. albicans*, *T. asahii*, *C. auris*가 각각 81%, 92%, 85%의 제거율을 보였다.

그람음성세균에 대한 제거능을 먼저 살펴보면, 우선 *P. aeruginosa*에 대해 Cidezyme의 경우 37℃에서 30분간 세척한 경우 66% 제거되어 통계적으로 유의하였다(표 5 및 그림 3). *E. coli* ATCC35218 균주의 경우 Cidezyme과 Empower에서 유의한 제거능을 보였다 (표 6 및 그림 4). *E. coli* AMC1910E6615 균주의 경우 Empower에서 8분간 2회, 3회 그리고 30분간 실온에서 세척했을 유의한 제거능을 보였다 (표 7 및 그림 5). *K. pneumoniae* AMC1910E6615 균주의 경우 Empower에서 8분간 2회, 3회 그리고 30분간 실온에서 세척했을 때 증류수에 비해 유의한 제거능을 보였다 (표 8 및 그림 6).

*T. asahii*는 각 조건에서 유의한 바이오필름 제거능을 가지는 세정제가 없었다 (표9 및 그림 7). *C. albicans*는 Cidezyme, Empower이 37℃에서 30분간 세척한 경우

각각 82%, 92%의 바이오필름을 제거하였다 (표 10 및 그림 8). *C. auris*의 경우에도 37℃로 가온한 경우 Cidezyme이 23%의 제거능을 보여 음성대조군에 비해 유의하게 높았지만 낮은 제거율을 보였다. (표 11 및 그림 9).

그람양성세균의 경우 *E. faecails*는 유의한 제거능을 보이는 세정제가 없었지만, *S. aureus*의 경우 Cidezyme의 경우에도 실온에서 30분 세척한 경우를 제외한 모든 조건에서, 그리고 Empower의 경우 37℃에서 30분간 세척한 조건에서 유의한 제거능을 보였다 (표 12, 13 및 그림 9, 10).

고찰

이 연구에서 바이오필름의 형성능은 균종 안에서도 균주별로 크게 다름을 확인할 수 있었다. 그람음성간균 중 *P. aeruginosa* 와 *C. albicans* 와 *T. asahii* 같은 진균이 바이오필름을 잘 형성하는 것을 알 수 있었다. 실제로 낭성섬유종 환자에서 바이오필름 감염의 원인으로 *P. aeruginosa* 는 잘 알려져 있으며,[5] 실험한 *모든 P. aeruginosa* 균주가 바이오필름을 잘 형성해 생체 내만이 아니라 생체 외에서도 강력한 바이오필름의 원인 균종임을 확인할 수 있었다. 하지만 균주간 형성능 차이가 커서 한 *P. aeruginosa* 임상 분리 1 주는 ATCC 표준균주에 비해 형성능이 약 네 배 높았다. 의학적으로 중요한 *Candida, Aspergillus, Cryptococcus, Trichosporon, Coccidioides,* 그리고 *Pneumocystis* 등의 진균류가 바이오필름을 형성하는 것으로 잘 알려져 있어서 [29] 이 연구에서 *C. albicans* AMC99149 를 제외한 모든 진균의 실험균주가 일관되게 높은 바이오필름의 형성능을 보였던것과 일치한다. 하지만, *C. albicans* 내에서도 한 임상분리주가 ATCC 표준균주에 비해 약 12%에 불과한 바이오필름 형성능을 보여서 균주별 차이가 컸다.

이 연구에서 *S. aureus* RN9120 도 에탄올 또는 NaCl 을 첨가하였을 때 통계적으로 유의하게 바이오필름 형성능이 증가하여 명백하게 바이오필름을 형성하였다. *S. aureus* RN9120 은 다른 연구에서 이미 바이오필름 형성능이 있는 것으로 밝혀진 균주이다.[28] 에탄올을 첨가하였을 때, 바이오필름의 형성능이 증가한다는 보고들이 있지만, 에탄올이 크리스탈 바이올렛의 투과도를 올려 측정을 부정확하게 할 수 있다는 의견이 있었다.[30, 31] 에탄올보다 4% NaCl 을 첨가하는 경우 바이오필름 형성이 더 뚜렷하게 증가하였다. 이전 보고에서 RN9120 배양 시 에탄올 이외의 다른 첨가물 중에서는 4% 혹은 6%의 NaCl 을 첨가하였을 때, 바이오필름의 형성능이 증가하고 바이오필름 연관 유전자인 *icaA* 의 발현이 증가한다는 보고가 있었다.[27]

이 실험에서 양성 대조군으로 이용한 염소계 표백제만이 모든 균종의 바이오필름에 대한 고른 제거능을 보였다. 염소계 표백제인 유한락스 레귤러의 물질안전보건자료에 따르면 pH 12 의 강한 염기성이며, 부식성을 가진다. 또한, 피부화상이나 눈에 심한

손상을 일으킬 수 있고, 수생 생물에 유독해 모든 상황에 사용할 수 없다는 한계를 가지고 있다. 모든 균주에 대해 가장 고른 제거능을 보인 유한락스조차도 8 분간 1 회 세척한 경우 *S. aureus* 이외에는 50% 이상 바이오필름의 양을 감소시키지 못했으며, 진균들은 30 분간 실온에서 세척한 경우 바이오필름 제거능이 50% 이하로 실제로 물리적 제거를 하지 않고 화학적 제거만으로는 바이오필름 제거에 한계가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

증류수 및 Matrix 를 제외한 세정제는 세척횟수를 늘릴수록 제거능이 향상되었다. 증류수를 3 회 세척한 경우에도 *E. faecalis* 와 *E. coli* ATCC3521 를 제외한 균주에서 40% 이상의 바이오필름이 제거되어 세정제를 갈아주는 행위에 의한 물리적 제거 또한 무시할 수 없는 수준이었다. 양성대조군인 유한락스 또한 3 회 세척하는 것이 1 회 침적하는 것에 비해 바이오필름을 더 효과적으로 제거하였다. 증류수로 세척하였을 때도 *E. coli* ATCC35218, *K. pneumoniae* 그리고 *E. faecalis* 의 바이오필름은 잘 제거되지 않는 특성을 보여 균종별로 바이오필름의 물리적 안정성에 차이를 보였다. 효소계 세정제를 사용한 경우 *P. aeruginosa, T. asahii, C. auris,* 그리고 *E. faecalis* 는 세척횟수를 증가시켜도 제거능이 향상되지 않았고, Matrix 를 1:100 희석하여 사용한 경우 1:20 희석에 비해 *P. aeruginosa, E. coli,* 그리고 *K. pneumoniae* 에서 3 회 세척 시 제거능이 향상되었다. 세정제의 농도와 물리적 세척에 의한 제거능력은 비례하지 않음을 시사한다. 통상적으로 세정제를 사용할 때 물리적 세척을 병행하기 때문에 이 연구에서 물리적 세척력은 배제하고 세정제의 화학적 바이오필름 제거능을 평가하고자 한 것은 비현실적인 조건이라고 할 수 있다. 실질적인 세척제 효과를 평가하려면 실제 상황과 유사한 물리적 세척 조건을 만들어서 세정제의 바이오필름 제거능을 평가하는 추가적인 실험도 필요할 것이다.

P. aeruginosa, E. coli ATCC35218, *E. coli* AMC1910E6615, *C. albicans, S. aureus* 의 경우 37℃에서 30 분 간 세척하였을 때 하나 이상의 효소계 세정제가 비교적 높은 세척능을 보였다. 이는 다른 연구에서 효소계 세정제를 이용해 *P. aeruginosa, S. aureus* 의 90% 이상의 바이오필름을 제거할 수 있었다는

연구결과 [13]나 *P. aeruginosa* 나 *E. faecalis* 에 대해 비효소제계 세정제에 비해 효소계 세정제 [20]가 뛰어난 제거능을 보였다는 연구결과와 일치한다. 이는 세정제에 포함된 효소가 특정 균주에 의해 형성되는 바이오필름의 성분을 제거하는 데 도움을 줄 수 있다는 점을 엿볼 수 있었다.

Pseudomonas fluorescens 에 의한 바이오필름은 단백질이 주로 많았으며, 단백분해효소를 가진 효소계 세정제가 효과적이었다는 보고가 있었다.[19] 효소계 세정제에 높은 세척능을 보인 균종의 바이오필름에서 실험한 세정제에 포함된 단백분해효소에 의해 제거되는 성분이 그 외의 균종에 의한 바이오필름에 비해 많았을 것이라 추측된다. 또한, 효소의 효능은 온도에 따라 다르므로, 온도조건에 따라 세정제의 효능이 차이가 있었던 것을 설명하는 데 도움이 된다. 결론적으로 주로 제거하고자 하는 바이오필름을 형성하는 균종에 따라서 적절한 온도조건에서 다른 효소제를 포함하는 세정제를 이용하는 것에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

테플론이나 PVC 재질에 형성된 *E. coli* 에 대해 실온에서 비효소계 세정제가 더 효과가 있다는 보고가 있었다.[14, 17, 18] 그러나, 비효소계 세정제의 경우는 우리 연구에서 증류수에 비해 더 나은 효과를 보이지 않았으며 이는 *E. coli* 를 표준균주와 임상균주를 모두 이용하였음에도 같은 현상을 보였다. 이 연구의 실험조건이 비효소계 세정제의 바이오필름 제거능을 평가하는 데 부적절했을 가능성이 있다.

염소계 표백제인 유한락스를 제외한 거의 모든 세정제들이 *E. faecalis, C. auris, T. asahii* 등의 균종에 효과를 보이지 못했다. *E. faecalis* 에 대해 효소계 세정제가 효능이 있었다는 보고가 있었으나 이 연구에서는 본 연구와 다른 세정제를 이용하여 단순히 비교하기 어렵다.[20] 또한 다른 균종의 제거에 대해서는 기존 연구가 없어 더 다양한 세정제를 이용한 후행 연구가 이루어져 추가적인 분석이 필요할 것으로 사료된다.

이 연구의 제한점으로 다음과 같은 점을 고려해야 한다. 첫째, 균종과 균주 별 바이오필름 형성능과 세정제 효과에 차이가 있기 때문에 이 연구결과로 모든

바이오필름 관련 상황에 일반화할 수 없다는 점이다. 둘째, 세정제에 의한 제거능 평가시 물리적으로 바이오필름을 제거를 촉진하는 것이 일반적인 의료기구 세척의 원리라는 점에서 실제 세척시와 유사한 물리적 환경을 조성해 추후 연구를 실시할 필요가 있다. 셋째, 균종 혹은 균주 그리고 환경에 따라 바이오필름의 구성이 다르기 때문에, 균주 별로 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 측정한 흡광도 값으로 바이오필름의 양을 측정하는데 한계가 있었다.

결론

동일 균종이라 할지라도 균주에 따라 바이오필름 형성능과 제거능은 차이가 있었다. 효소계 세정제가 비효소계 세정제에 비해 바이오필름 제거 효과가 우수하였으며, 37℃ 조건, 다회 세척할 때 제거능이 향상되었다. *E. faecalis, C. auris, T. asahii* 와 같은 균종들은 세정제에 의한 바이오필름 제거 효과가 유의하지 않았다. 바이오필름을 제거하는 세정제 효과는 특정 균주와 조건에서만 유의한 수준으로 나타나서 세정제 단독으로 바이오필름 제거를 기대할 수는 없었다.

Table 1. List of study strains for biofilm forming capacity and detergent efficiency

Species	Strain
Pseudomonas aeruginosa	ATCC27853*, AMC99241, AMC100009
Escherichia coli	ATCC25922, ATCC35218*, AMC1902A1157, AMC100003, AMC1910F2807, AMC1910E6615*, AMC1910F7284
Acinetobacter baumannii	AMC99341, AMC98894, AMC99233
Klebsiella pneumoniae	ATCC700603, AMC99317, AMC99340, AMC1910I244*
Citrobacter freundii	AMC1910F1138, AMC1910I254
Candida albicans	ATCC14053*, AMC99252, AMC99149
Candida auris	AMC1804C1704*, AMC1805C644, AMC1805C1859
Trichosporon asahii	AMC1802A11511*, AMC99235, AMC98906
Staphylococcus aureus	ATCC43300, AMC99330, AMC99240, AMC98878, RN6607, RN9120*
Enterococcus faecalis	ATCC29212, AMC98901*, AMC99660
Enterococcus faecium	AMC99321, AMC99175
Streptococcus agalactiae	AMC1608D4154, AMC16012D140, AMC1801D2282, KUH4154, KUH2639

CI denoted clinical isolate. Asterisked strains were tested for detergent efficacy.

Table 2. Manufacturer recommendation for use of study detergents

Detergent	Concentration	Mode of action	Components
Matrix mint®	1:20 (heavily soiled instrument) 1:100 (regular use)	Non-enzymatic detergent	Potassium hydroxide 0.1%, cationic surfactant <1%, EDTA, 2-(2-ethoxyethoxy) ethanol
Empower®	1:133	Enzymatic detergent	Propylene glycol, Trisodium Citrate Dihydrate, Proteinase subtilisin
Cidezyme®	1:125	Enzymatic detergent	Proteinase subtilisin
Yuhanrox regular®	1:100	Chlorine bleach	Sodium hypochlorite, Sodium hydroxide

Table 3. Conditions for biofilm removal activity by study detergents

Time (min)	No.	Temperature	Abbreviation
8	1	RT	8min * 1
8	2	RT	8min * 2
8	3	RT	8min * 3
30	1	RT	30min RT
30	1	37℃	30min 37℃

Table 4. Quantification of biofilm formation of gram-positive cocci, gram-negative rod, and yeasts using optical density at 620 nm

Strain		Mean OD_{620}* (±S.D.)	Removal study
P. aeruginosa	ATCC27853	0.6110 (±0.1318)	Enrolled
P. aeruginosa	AMC99241	1.1817 (±0.2531)	
P. aeruginosa	AMC100009	2.3247 (±0.2122)	
E. coli	ATCC25922	0.0363 (±0.1475)	
E. coli	AMC1902A1157	0.0000 (±0.0374)	
E. coli	AMC100003	0.0000 (±0.0270)	
K. pneumoniae	ATCC700603	0.0370 (±0.0265)	
K. pneumoniae	AMC99317	0.0453 (±0.4220)	
K. pneumoniae	AMC99340	0.1960 (±0.3452)	
C. albicans	ATCC14053	2.0490 (±0.2148)	Enrolled
C. albicans	AMC99252	1.1517 (±0.2636)	
C. albicans	AMC99149	0.2410 (±0.1695)	
C. auris	AMC1804C1704	1.1907 (±0.1143)	Enrolled
C. auris	AMC1805C644	0.5273 (±0.1444)	
C. auris	AMC1805C1859	0.7193 (±0.1584)	
T. asahii	AMC1802A11511	1.4377 (±0.3035)	Enrolled
T. asahii	AMC99235	1.1513 (±0.2178)	
T. asahii	AMC98906	0.9117 (±0.4959)	
A. baumannii	AMC99341	0.4307 (±0.3120)	
A. baumannii	AMC98894	0.3723 (±0.2484)	
A. baumannii	AMC99233	0.5547 (±0.1854)	
S. aureus	ATCC43300	0.3807 (±0.0810)	
S. aureus	AMC99330	0.2163 (±0.0222)	

Table 4 (Continued)

Strain		Mean OD_{620}* (±S.D.)	Removal study
S. aureus	AMC99240	0.2653 (±0.0873)	
S. aureus	AMC98878	0.1700 (±0.0589)	
S. aureus	RN6607	0.1027 (±0.0045)	
S. aureus	RN9120	0.1807 (±0.0232)	Enrolled
E. faecalis	ATCC29212	0.2380 (±0.0506)	
E. faecium	AMC99321	0.1267 (±0.0275)	
E. faecium	AMC99175	0.1003 (±0.0156)	
E. faecalis	AMC98901	0.6070 (±0.1386)	Enrolled
E. faecalis	AMC99660	0.2557 (±0.0358)	
S. agalactiae	AMC1608D4154	0.2633 (±0.0219)	
S. agalactiae	AMC16012D140	0.0000 (±0.0067)	
S. agalactiae	AMC1801D2282	0.0890 (±0.0444)	
S. agalactiae	KUH4154	0.0160 (±0.0212)	
S. agalactiae	KUH2639	0.0000 (±0.0105)	
E. coli	ATCC35218	1.0357 (±0.1754)	Enrolled
E. coli	AMC1910F2807	0.0280 (±0.0151)	
K. pneumoniae	AMC1910I244	0.6817 (±0.0626)	Enrolled
C. freundii	AMC1910F1138	0.0717 (±0.0379)	
C. freundii	AMC1910I254	0.0457 (±0.0376)	
E. coli	AMC1910E6615	0.8220 (±0.0438)	Enrolled
E. coli	AMC1910F7284	0.0310 (±0.0325)	

* OD_{620} denoted optical density measured at 620 nm

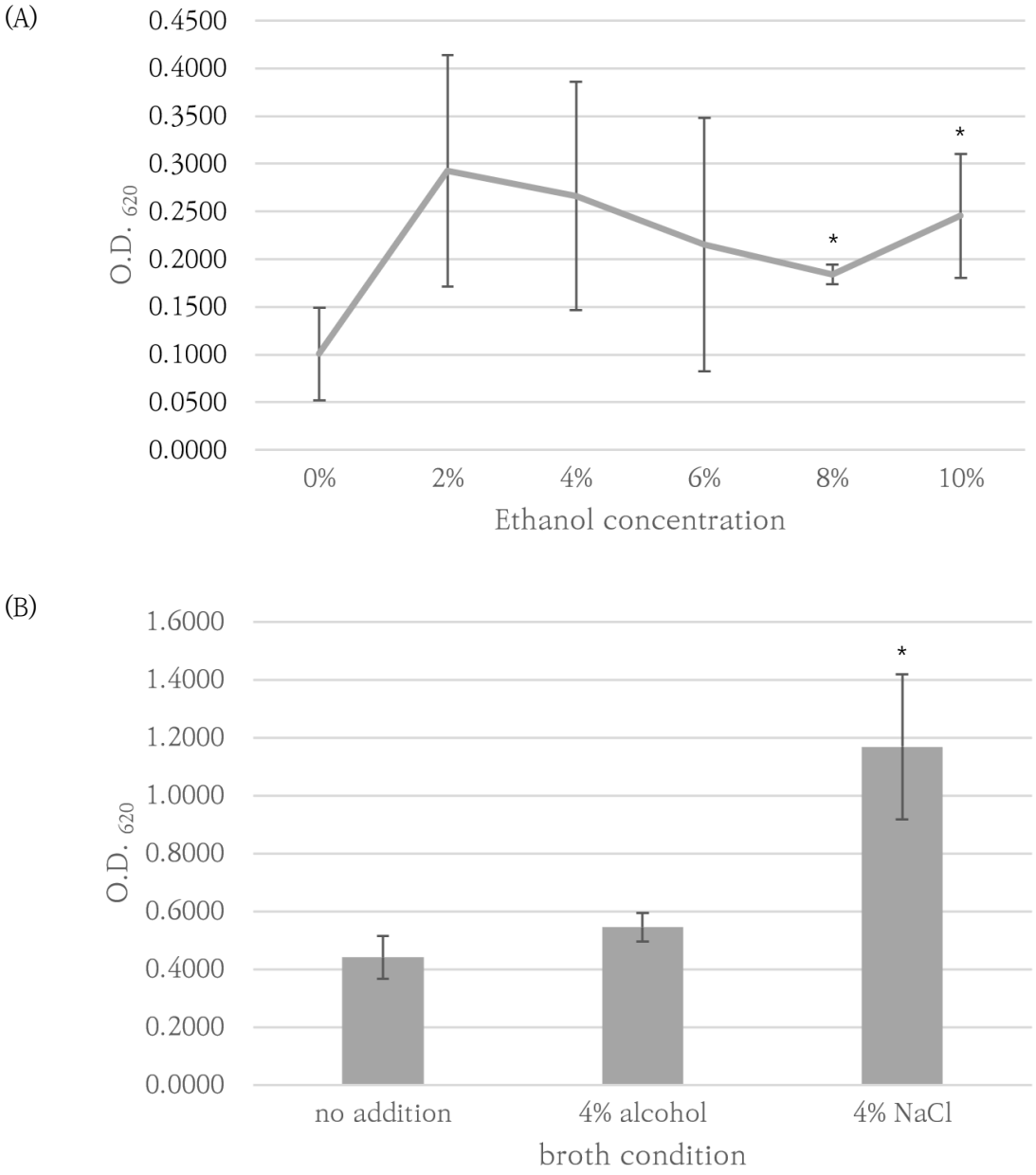

Figure 1. Biofilm formation of *S. aureus* RN9120 in response to alcohol (A) and salt supplement (B). OD values are the average of three independent experiments, and the standard error of the mean is expressed as error bars. * denoted statistically significance.

Table 5. Removal of biofilms produced by *P. aeruginosa* ATCC27853 by treatment of study detergents

Detergent	Condition	Mean	S.D.	% Residual	P-value
DW	8min * 1	0.6127	0.2109	100%	
	8min * 2	0.3460	0.0377	56%	
	8min * 3	0.1910	0.0079	31%	
	30min RT	0.2093	0.0421	34%	
	30min 37℃	0.5137	0.1192	84%	
Matrix 1:100	8min * 1	0.5167	0.1358	84%	0.544
	8min * 2	0.4583	0.0758	75%	0.083
	8min * 3	0.4530	0.1040	74%	0.012
	30min RT	0.5263	0.0385	86%	0.001
	30min 37℃	1.0267	0.2847	168%	0.045
Matrix 1:20	8min * 1	0.5510	0.0985	90%	0.670
	8min * 2	0.4460	0.0502	73%	0.051
	8min * 3	0.5130	0.0731	84%	0.002
	30min RT	0.4033	0.0588	66%	0.010
	30min 37℃	1.1120	0.3727	182%	0.057
Cidezyme	8min * 1	0.3963	0.0157	65%	0.151
	8min * 2	0.3363	0.0370	55%	0.767
	8min * 3	0.2483	0.0324	41%	0.041
	30min RT	0.3350	0.0118	55%	0.008
	30min 37℃	0.2070	0.0399	34%	0.013

Table 5. (Continued)

Detergent	Condition	Mean	S.D.	% Residual	P-value
Empower	8min * 1	0.8560	0.0766	140%	0.134
	8min * 2	0.7953	0.0465	130%	0.000
	8min * 3	0.7373	0.0309	120%	0.000
	30min RT	0.9707	0.0655	158%	0.000
	30min 37℃	0.5353	0.0229	87%	0.773
Chlorine	8min * 1	0.6407	0.1286	105%	0.854
bleach	8min * 2	0.2037	0.0267	33%	0.006
	8min * 3	0.1417	0.0431	23%	0.123
	30min RT	0.1917	0.0264	31%	0.571
	30min 37℃	0.0627	0.0445	10%	0.004

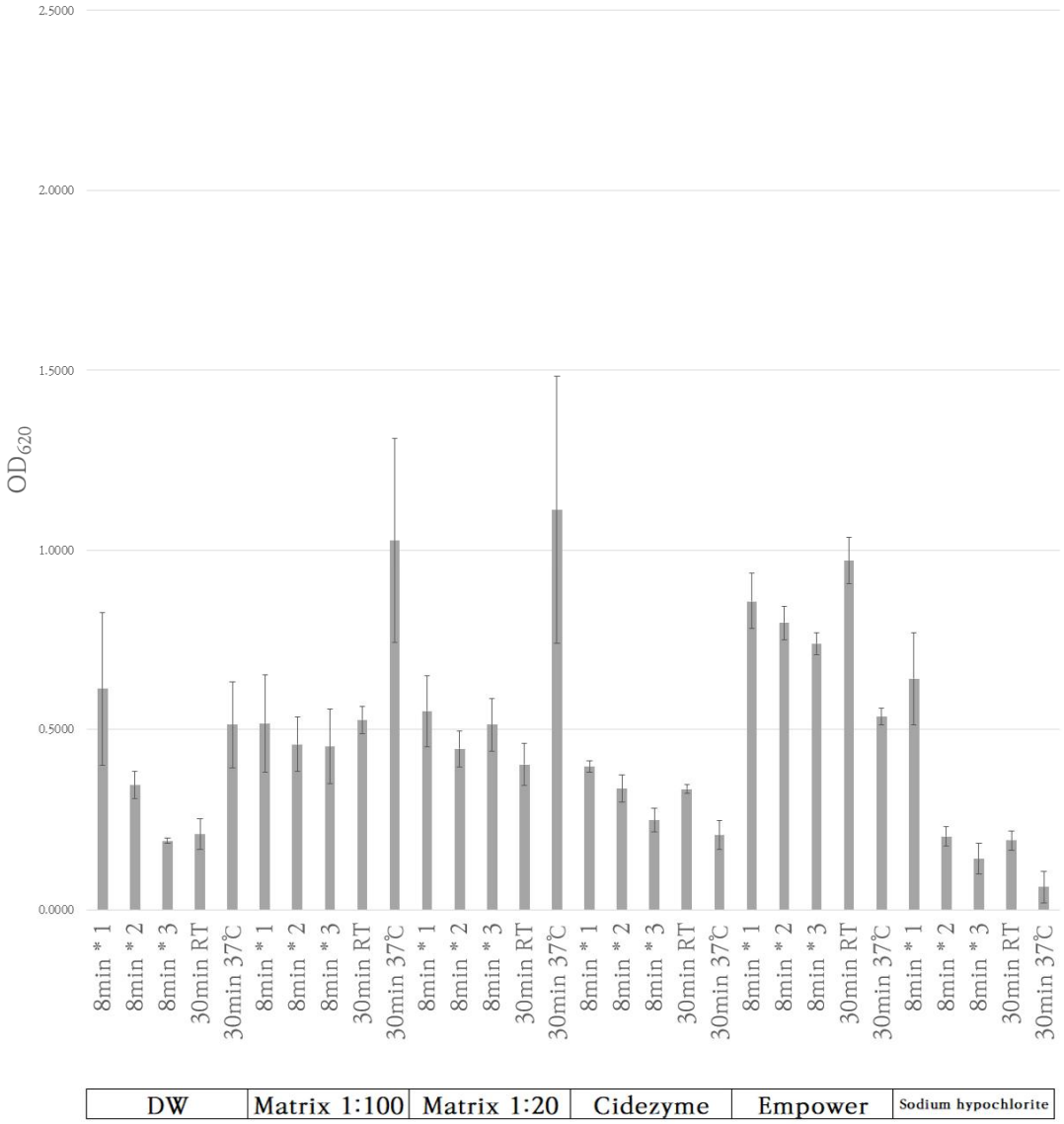

Figure 2. Removal efficacy of three detergents for *P. aeruginosa* ATCC27853 biofilms. OD values are the average of three independent experiments, and the standard error of the mean is expressed as error bars.

Table 6. Removal of biofilms produced by *E. coli* ATCC35218 by treatment of study detergents

Detergent	Condition	Mean	S.D.	% Residual	P-value
DW	8min * 1	0.3523	0.0200	100%	
	8min * 2	0.3450	0.0364	98%	
	8min * 3	0.2263	0.0386	64%	
	30min RT	0.3280	0.0204	93%	
	30min 37℃	0.4940	0.0101	140%	
Matrix 1:100	8min * 1	0.4320	0.0246	123%	0.024
	8min * 2	0.2943	0.0470	84%	0.295
	8min * 3	0.2556	0.0555	73%	0.573
	30min RT	0.5173	0.0245	147%	0.001
	30min 37℃	0.4483	0.0220	127%	0.056
Matrix 1:20	8min * 1	0.6053	0.0883	172%	0.017
	8min * 2	0.5680	0.2480	161%	0.277
	8min * 3	0.3843	0.1401	109%	0.199
	30min RT	0.3583	0.0659	102%	0.568
	30min 37℃	0.4816	0.0351	137%	0.658
Cidezyme	8min * 1	0.1740	0.0303	49%	0.002
	8min * 2	0.1186	0.0201	34%	0.002
	8min * 3	0.0903	0.0156	26%	0.010
	30min RT	0.0870	0.0164	25%	0.000
	30min 37℃	0.0640	0.0233	18%	0.000

Table 6. (Continued)

Detergent	Condition	Mean	S.D.	% Residual	P-value
Empower	8min * 1	0.2376	0.0237	67%	0.006
	8min * 2	0.0760	0.0430	22%	0.003
	8min * 3	0.0776	0.0427	22%	0.022
	30min RT	0.1126	0.0309	32%	0.001
	30min 37℃	0.0693	0.0134	20%	0.000
Chlorine	8min * 1	0.2560	0.0697	73%	0.133
bleach	8min * 2	0.1233	0.0107	35%	0.001
	8min * 3	0.1020	0.0306	29%	0.023
	30min RT	0.0323	0.0110	9%	0.000
	30min 37℃	0.0956	0.0232	27%	0.000

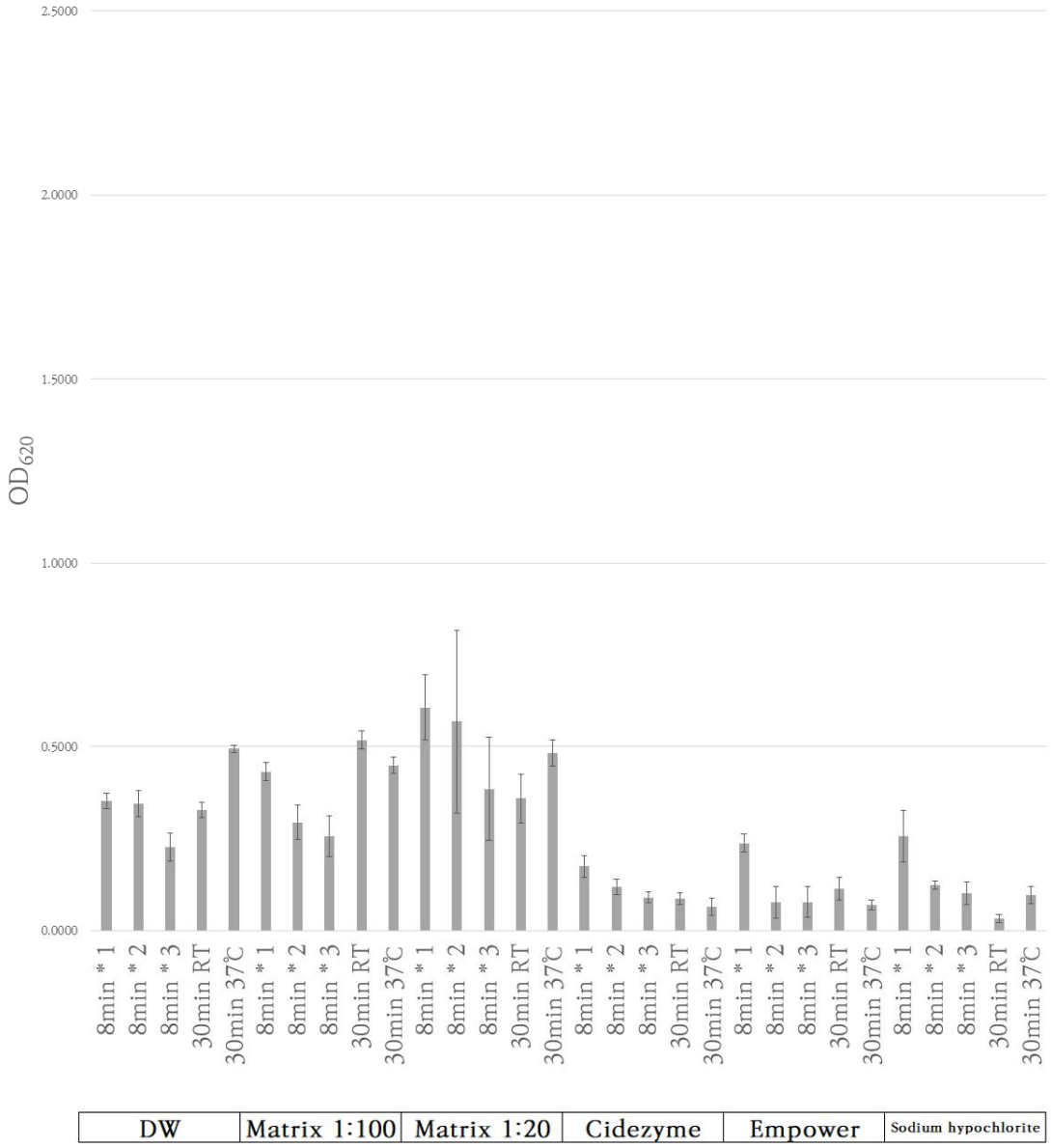

Figure 3. Removal efficacy of three detergents for *E. coli* ATCC35218 biofilm. OD values are the average of three independent experiments, and the standard error of the mean is expressed as error bars.

Table 7. Removal of biofilms produced by a clinical isolate of *E. coli* by treatment of study detergents

Detergent	Condition	Mean	S.D.	% Residual	P-value
DW	8min * 1	0.2960	0.0300	100%	
	8min * 2	0.2216	0.0227	75%	
	8min * 3	0.1243	0.0157	42%	
	30min RT	0.2196	0.0276	74%	
	30min 37℃	0.1716	0.0446	58%	
Matrix 1:100	8min * 1	0.7746	0.2818	262%	0.075
	8min * 2	0.2536	0.0215	86%	0.221
	8min * 3	0.2350	0.0274	79%	0.008
	30min RT	0.6590	0.1416	223%	0.013
	30min 37℃	0.4456	0.0170	151%	0.001
Matrix 1:20	8min * 1	0.6140	0.2061	207%	0.097
	8min * 2	0.4096	0.0825	138%	0.036
	8min * 3	0.2306	0.0181	78%	0.003
	30min RT	0.4016	0.0452	136%	0.008
	30min 37℃	0.3623	0.0814	122%	0.044
Cidezyme	8min * 1	0.2670	0.0197	90%	0.317
	8min * 2	0.2706	0.0118	91%	0.054
	8min * 3	0.1376	0.0059	47%	0.325
	30min RT	0.1596	0.0350	54%	0.130
	30min 37℃	0.1413	0.0135	48%	0.409

Table 7. (Continued)

Detergent	Condition	Mean	S.D.	% Residual	P-value
Empower	8min * 1	0.2630	0.0152	89%	0.238
	8min * 2	0.0853	0.0613	29%	0.042
	8min * 3	0.0090	0.0005	3%	0.000
	30min RT	0.1283	0.0091	43%	0.011
	30min 37℃	0.0920	0.0100	31%	0.069
Chlorine	8min * 1	0.4086	0.0526	138%	0.058
bleach	8min * 2	0.1723	0.0247	58%	0.106
	8min * 3	0.0630	0.0116	21%	0.011
	30min RT	0.0210	0.0090	7%	0.001
	30min 37℃	0.0873	0.0094	29%	0.059

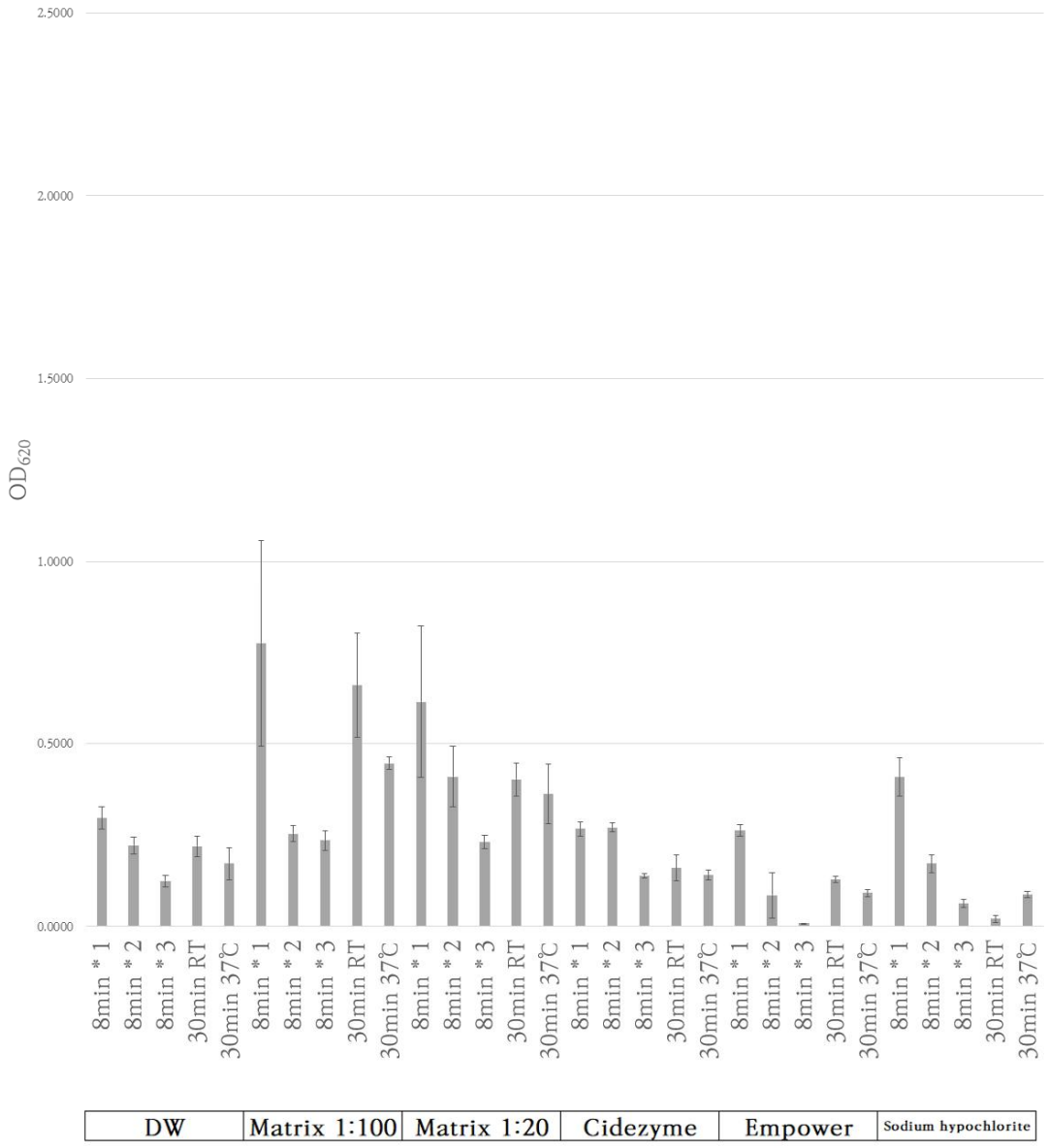

Figure 4. Removal efficacy of three detergents for a clinical isolate of *E. coli* biofilms. OD values are the average of three independent experiments, and the standard error of the mean is expressed as error bars.

Table 8. Removal of biofilms produced by a clinical isolate of *K. pneumoniae* by treatment of study detergents

Detergent	Condition	Mean	S.D.	% Residual	P-value
DW	8min * 1	0.2320	0.0425	100%	
	8min * 2	0.2546	0.0188	110%	
	8min * 3	0.1380	0.0162	59%	
	30min RT	0.2383	0.0218	103%	
	30min 37℃	0.2406	0.0289	104%	
Matrix 1:100	8min * 1	0.3446	0.0960	149%	0.203
	8min * 2	0.2253	0.0073	97%	0.109
	8min * 3	0.2243	0.0199	97%	0.009
	30min RT	0.5456	0.0147	235%	0.000
	30min 37℃	0.4403	0.0450	190%	0.006
Matrix 1:20	8min * 1	0.7086	0.0846	305%	0.002
	8min * 2	0.6050	0.0749	261%	0.003
	8min * 3	0.4700	0.0875	203%	0.006
	30min RT	0.5486	0.1327	237%	0.031
	30min 37℃	0.6230	0.0585	269%	0.001
Cidezyme	8min * 1	0.2430	0.0272	105%	0.773
	8min * 2	0.2253	0.0059	97%	0.103
	8min * 3	0.1806	0.0138	78%	0.047
	30min RT	0.1636	0.0455	71%	0.105
	30min 37℃	0.3140	0.0380	135%	0.096

Table 8. (Continued)

Detergent	Condition	Mean	S.D.	% Residual	P-value
Empower	8min * 1	0.2473	0.0181	107%	0.663
	8min * 2	0.1353	0.0096	58%	0.001
	8min * 3	0.0570	0.0104	25%	0.004
	30min RT	0.1040	0.0302	45%	0.007
	30min 37℃	0.2213	0.0226	95%	0.498
Chlorine	8min * 1	0.4203	0.0898	181%	0.055
bleach	8min * 2	0.1556	0.0123	67%	0.003
	8min * 3	0.1290	0.0299	56%	0.728
	30min RT	0.0253	0.0037	11%	0.000
	30min 37℃	0.0616	0.0131	27%	0.001

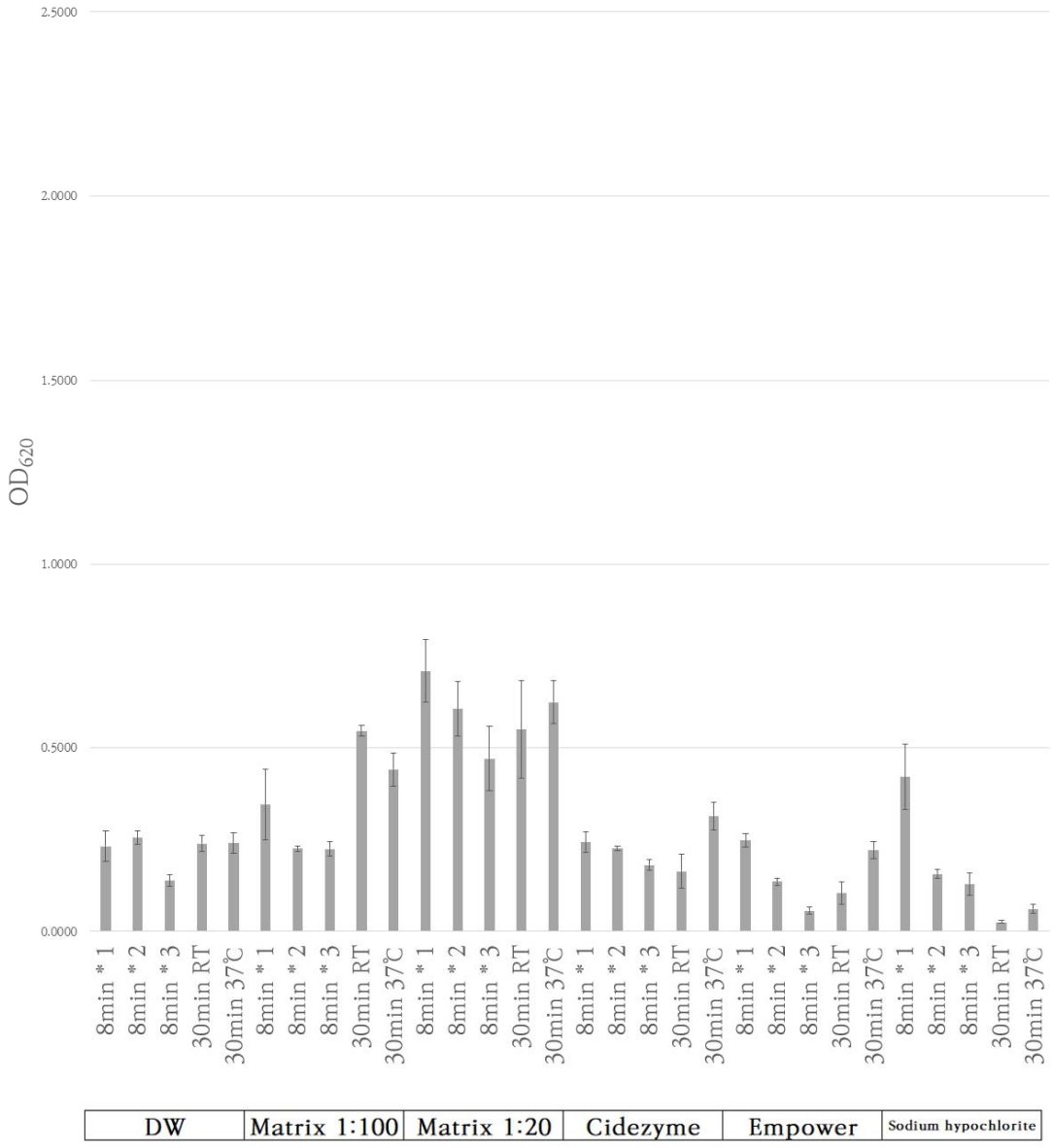

Figure 5. Removal efficacy of three detergents for a clinical isolate of *K. pneumoniae* biofilms. OD values are the average of three independent experiments, and the standard error of the mean is expressed as error bars.

Table 9. Removal of biofilms produced by a clinical isolate of *T. asahii* by treatment of study detergents

Detergent	Condition	Mean	S.D.	% Residual	P-value
DW	8min * 1	1.0140	0.1048	100%	
	8min * 2	0.6180	0.1362	61%	
	8min * 3	0.5390	0.1472	53%	
	30min RT	0.7963	0.1057	79%	
	30min 37℃	0.5810	0.1036	57%	
Matrix 1:100	8min * 1	1.1963	0.2795	118%	0.350
	8min * 2	1.0503	0.0688	104%	0.008
	8min * 3	1.1407	0.1005	112%	0.004
	30min RT	1.0270	0.1190	101%	0.066
	30min 37℃	1.0673	0.1605	105%	0.012
Matrix 1:20	8min * 1	1.3747	0.0344	136%	0.005
	8min * 2	1.2180	0.3142	120%	0.039
	8min * 3	1.2363	0.0637	122%	0.002
	30min RT	1.0863	0.1541	107%	0.055
	30min 37℃	1.3200	0.0815	130%	0.001
Cidezyme	8min * 1	1.9050	0.3004	188%	0.008
	8min * 2	1.6723	0.4758	165%	0.021
	8min * 3	1.4550	0.1041	143%	0.001
	30min RT	1.8327	0.1760	181%	0.001
	30min 37℃	0.7130	0.2576	70%	0.457

Table 9. (Continued)

Detergent	Condition	Mean	S.D.	% Residual	P-value
Empower	8min * 1	1.2830	0.4424	127%	0.363
	8min * 2	1.2913	0.1600	127%	0.005
	8min * 3	1.1967	0.0791	118%	0.002
	30min RT	1.2247	0.1069	121%	0.008
	30min 37℃	0.8910	0.2536	88%	0.122
Chlorine	8min * 1	1.1503	0.3959	113%	0.595
bleach	8min * 2	0.1927	0.0376	19%	0.006
	8min * 3	0.1397	0.0817	14%	0.015
	30min RT	0.5147	0.4139	51%	0.317
	30min 37℃	0.0860	0.0477	8%	0.002

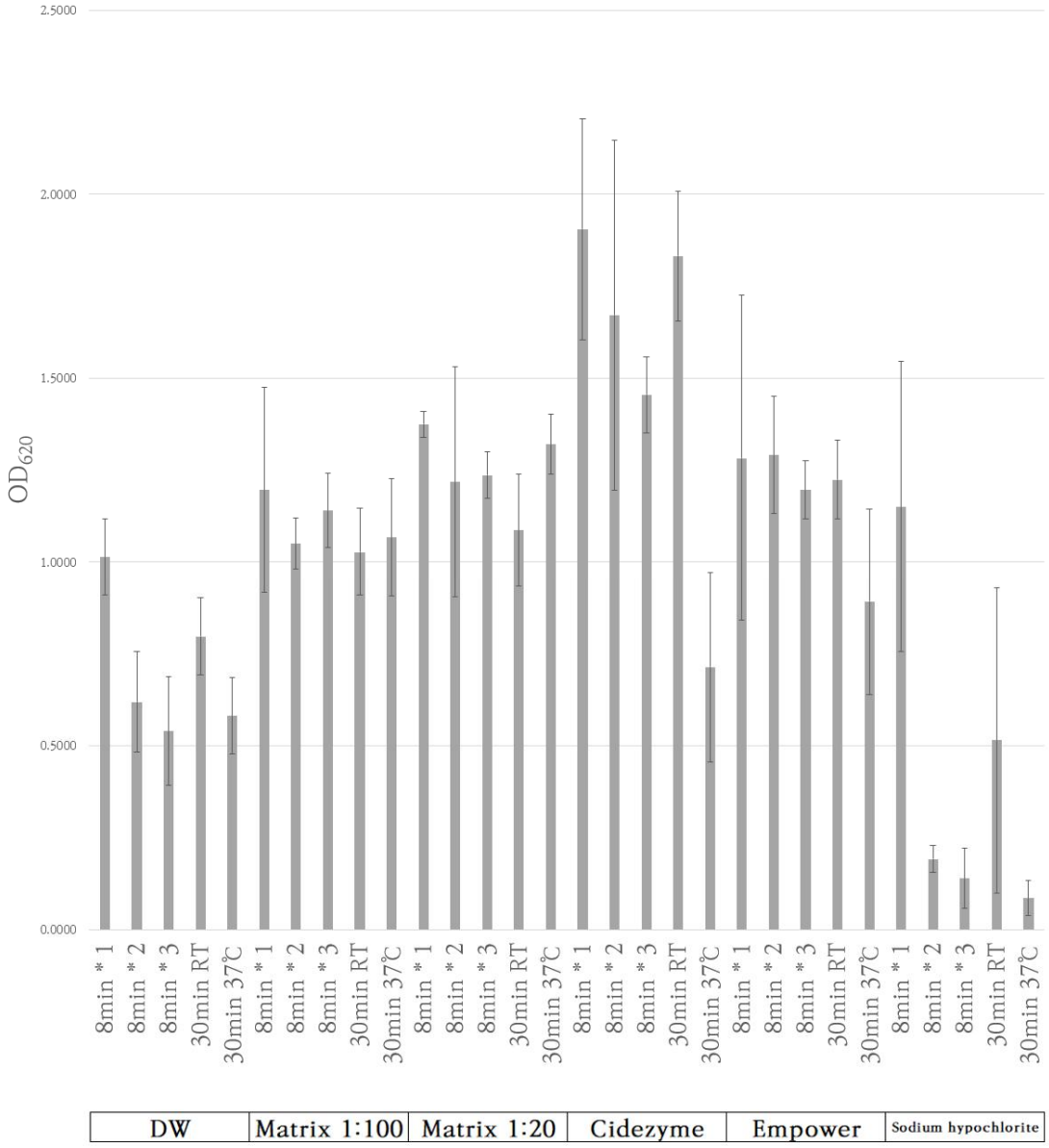

Figure 6. Removal efficacy of three detergents for a clinical isolate of *T. asahii* biofilms. OD values are the average of three independent experiments, and the standard error of the mean is expressed as error bars.

Table 10. Removal of biofilms produced by *C. albicans* ATCC14053 by treatment of study detergents

Detergent	Condition	Mean	S.D.	% Residual	P-value
DW	8min * 1	0.4217	0.1157	100%	
	8min * 2	0.1770	0.0491	42%	
	8min * 3	0.1047	0.0554	25%	
	30min RT	0.1240	0.0334	29%	
	30min 37℃	0.3210	0.0781	76%	
Matrix 1:100	8min * 1	0.5350	0.0555	127%	0.201
	8min * 2	0.4683	0.0354	111%	0.001
	8min * 3	0.6133	0.0632	145%	0.000
	30min RT	0.8190	0.1001	194%	0.000
	30min 37℃	0.6293	0.1938	149%	0.063
Matrix 1:20	8min * 1	0.4720	0.0090	112%	0.494
	8min * 2	0.4397	0.0473	104%	0.003
	8min * 3	0.5190	0.1953	123%	0.024
	30min RT	0.3697	0.1316	88%	0.035
	30min 37℃	0.3967	0.0382	94%	0.206
Cidezyme	8min * 1	0.5840	0.0879	138%	0.125
	8min * 2	0.3330	0.0108	79%	0.006
	8min * 3	0.2457	0.0722	58%	0.055
	30min RT	0.2530	0.0391	60%	0.012
	30min 37℃	0.0780	0.0184	18%	0.006

Table 10. (Continued)

Detergent	Condition	Mean	S.D.	% Residual	P-value
Empower	8min * 1	1.2327	0.3849	292%	0.025
	8min * 2	0.2790	0.0217	66%	0.030
	8min * 3	0.1243	0.0095	29%	0.577
	30min RT	0.2990	0.0796	71%	0.025
	30min 37℃	0.0320	0.0072	8%	0.003
Chlorine	8min * 1	0.4900	0.0728	116%	0.436
bleach	8min * 2	0.4030	0.0176	96%	0.002
	8min * 3	0.1520	0.0297	36%	0.262
	30min RT	0.4857	0.0748	115%	0.002
	30min 37℃	0.0803	0.0406	19%	0.009

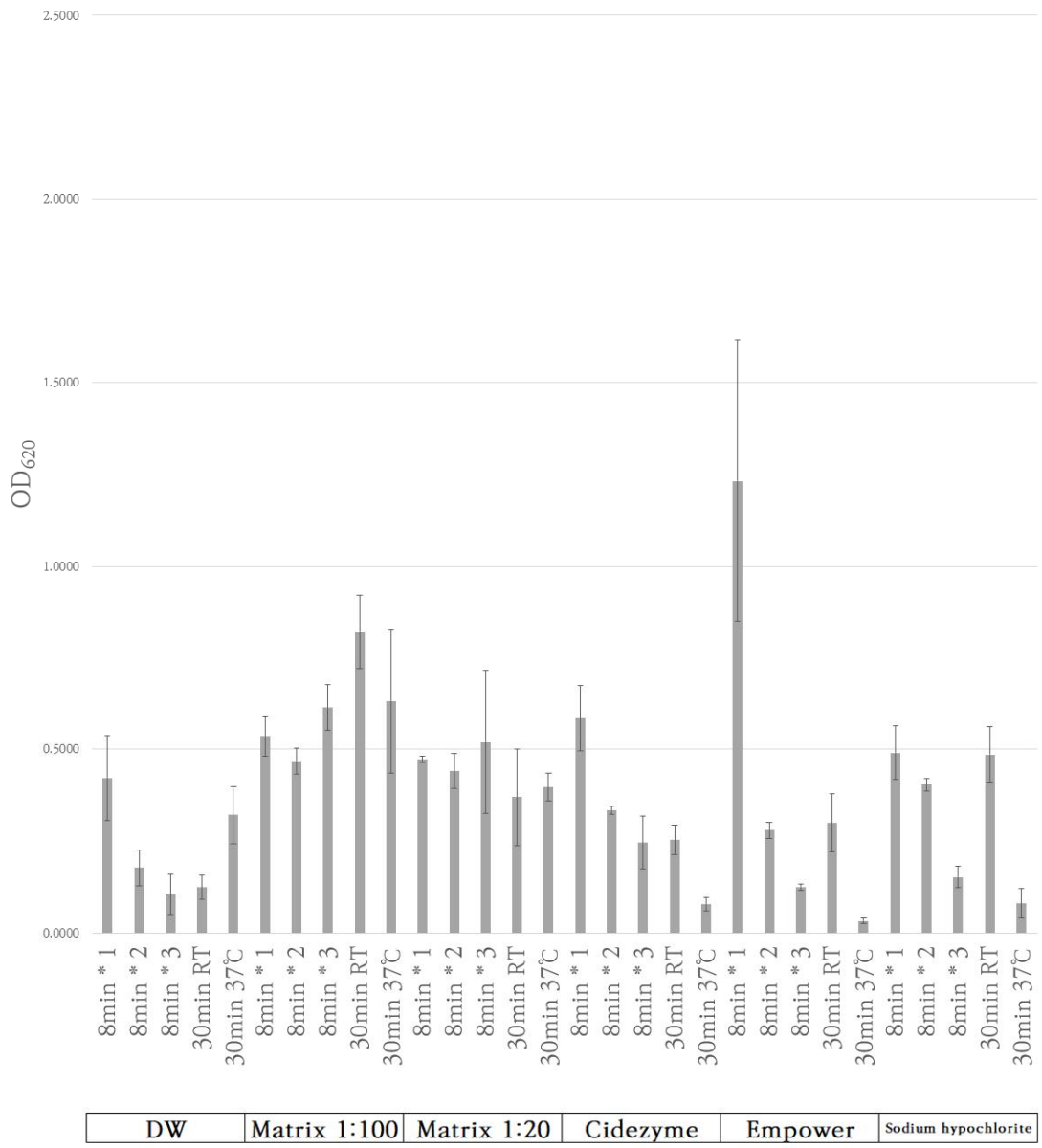

Figure 7. Removal efficacy of three detergents for *C. albicans* ATCC14053 biofilms. OD values are the average of three independent experiments, and the standard error of the mean is expressed as error bars.

Table 11. Removal of biofilms produced by a clinical isolate of *C. auris* by treatment of study detergents

Detergent	Condition	Mean	S.D.	% Residual	P-value
DW	8min * 1	1.3733	0.0975	100%	
	8min * 2	0.8767	0.0767	64%	
	8min * 3	0.6827	0.0320	50%	
	30min RT	1.0607	0.1895	77%	
	30min 37℃	1.4850	0.1828	108%	
Matrix 1:100	8min * 1	1.4393	0.1941	105%	0.626
	8min * 2	1.2037	0.1200	88%	0.016
	8min * 3	1.2567	0.0512	92%	0.000
	30min RT	1.3940	0.1486	102%	0.075
	30min 37℃	1.6553	0.0545	121%	0.197
Matrix 1:20	8min * 1	1.5520	0.0674	113%	0.059
	8min * 2	1.3403	0.0993	98%	0.003
	8min * 3	1.2857	0.4242	94%	0.070
	30min RT	1.3860	0.0564	101%	0.046
	30min 37℃	1.6523	0.0870	120%	0.226
Cidezyme	8min * 1	2.3870	0.4035	174%	0.013
	8min * 2	1.2997	0.0472	95%	0.001
	8min * 3	1.2557	0.3720	91%	0.056
	30min RT	1.8710	0.1349	136%	0.004
	30min 37℃	1.0570	0.1388	77%	0.032

Table 11. (Continued)

Detergent	Condition	Mean	S.D.	% Residual	P-value
Empower	8min * 1	2.1570	0.0265	157%	0.000
	8min * 2	1.5747	0.5427	115%	0.092
	8min * 3	1.7030	0.1847	124%	0.001
	30min RT	1.7893	0.4006	130%	0.046
	30min 37℃	1.8267	0.1832	133%	0.084
Chlorine	8min * 1	1.0167	0.3693	74%	0.181
bleach	8min * 2	0.4337	0.0480	32%	0.001
	8min * 3	0.0780	0.1071	6%	0.001
	30min RT	0.7927	0.0871	58%	0.090
	30min 37℃	0.2037	0.0637	15%	0.000

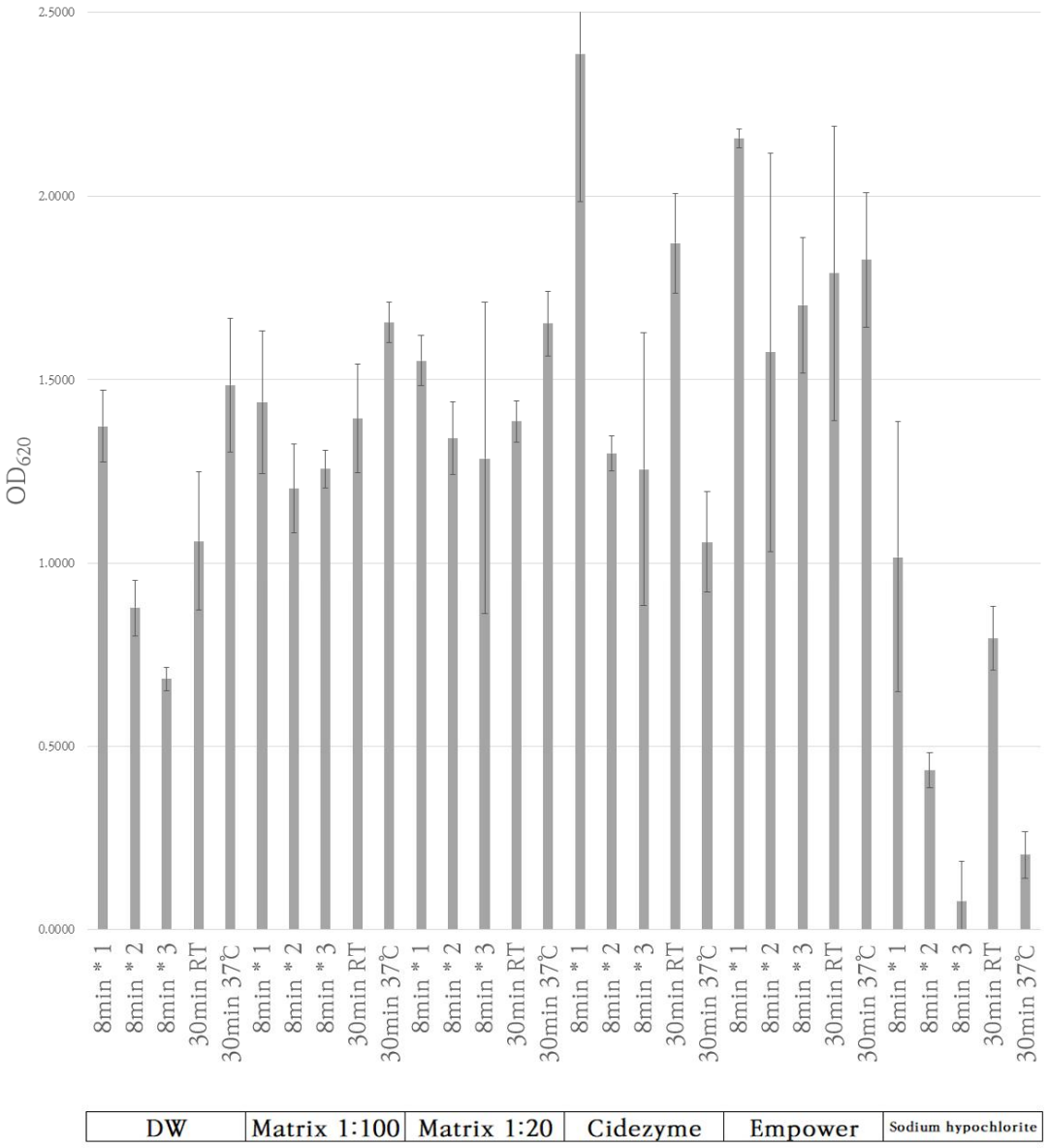

Figure 8. Removal efficacy of three detergents for a clinical isolate of *C. auris* biofilms. OD values are the average of three independent experiments, and the standard error of the mean is expressed as error bars.

Table 12. Removal of biofilms produced by a clinical isolate of *E. faecalis* by treatment of study detergents

Detergent	Condition	Mean	S.D.	% Residual	P-value
DW	8min * 1	0.4973	0.0508	100%	
	8min * 2	0.4483	0.0887	90%	
	8min * 3	0.4807	0.0096	97%	
	30min RT	0.3123	0.1496	63%	
	30min 37℃	0.4337	0.0907	87%	
Matrix 1:100	8min * 1	0.7797	0.0545	157%	0.003
	8min * 2	0.6367	0.0994	128%	0.071
	8min * 3	0.6187	0.0818	124%	0.044
	30min RT	0.7120	0.0613	143%	0.013
	30min 37℃	0.6103	0.0445	123%	0.039
Matrix 1:20	8min * 1	0.8803	0.0431	177%	0.001
	8min * 2	0.7210	0.0530	145%	0.010
	8min * 3	0.7753	0.0457	156%	0.000
	30min RT	0.7617	0.0219	153%	0.007
	30min 37℃	0.6420	0.0235	129%	0.018
Cidezyme	8min * 1	0.7310	0.1287	147%	0.043
	8min * 2	0.6173	0.0336	124%	0.037
	8min * 3	0.6027	0.0194	121%	0.001
	30min RT	0.6713	0.0807	135%	0.022
	30min 37℃	0.5110	0.0173	103%	0.220

Table 12. (Continued)

Detergent	Condition	Mean	S.D.	% Residual	P-value
Empower	8min * 1	0.6503	0.0301	131%	0.011
	8min * 2	0.5773	0.0558	116%	0.100
	8min * 3	0.5260	0.0337	106%	0.089
	30min RT	0.6023	0.0473	121%	0.033
	30min 37℃	0.4787	0.0486	96%	0.491
Chlorine	8min * 1	0.4413	0.2301	89%	0.702
bleach	8min * 2	0.0873	0.0118	18%	0.002
	8min * 3	0.0337	0.0051	7%	0.000
	30min RT	0.1893	0.0095	38%	0.228
	30min 37℃	0.0510	0.0149	10%	0.002

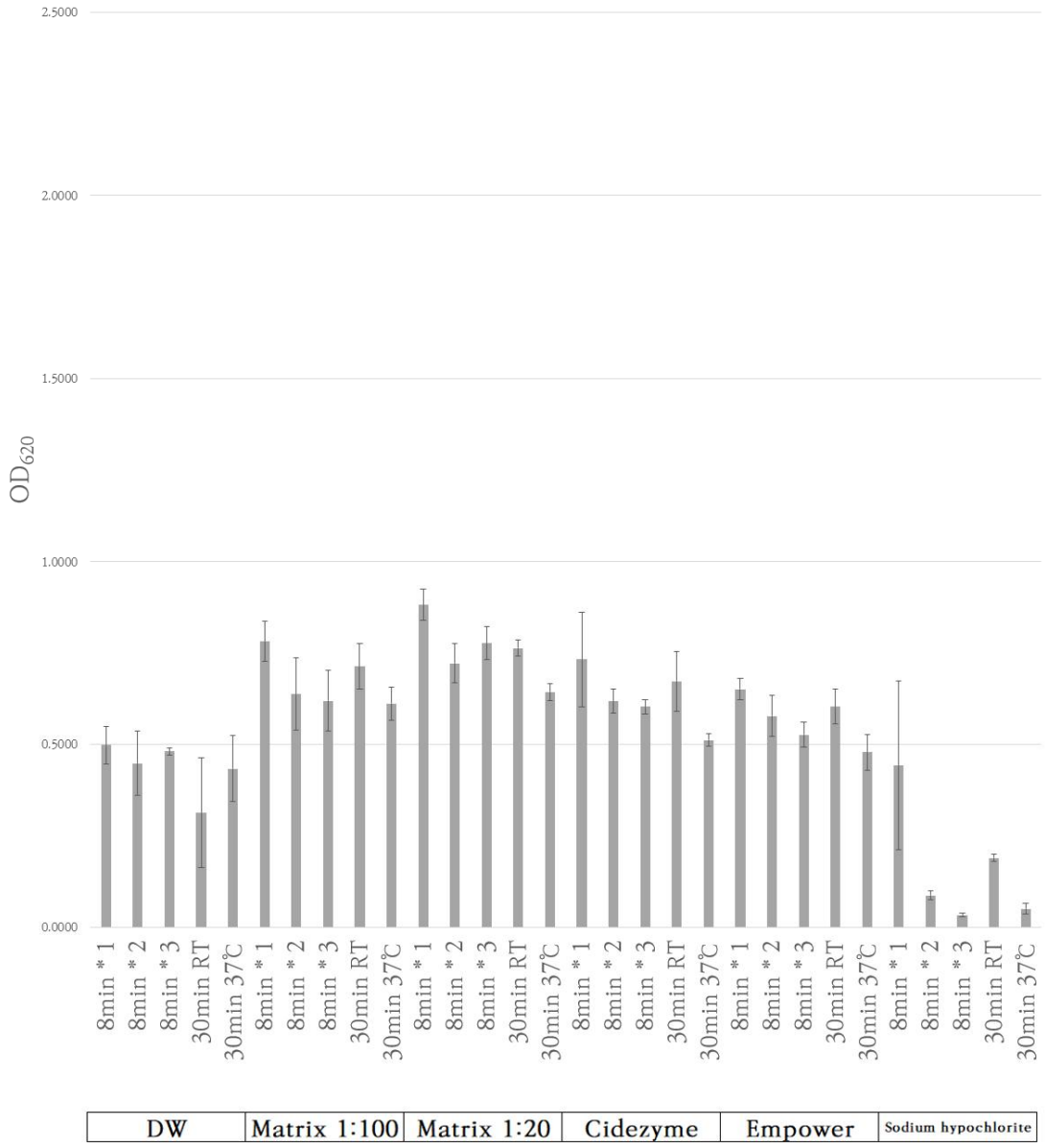

Figure 9. Removal efficacy of three detergents for a clinical isolate of *E. faecalis* biofilms. OD values are the average of three independent experiments, and the standard error of the mean is expressed as error bars.

Table 13. Removal of biofilms produced by S. aureus RN9120 by treatment of study detergents

Detergent	Condition	Mean	S.D.	% Residual	P-value
DW	8min * 1	0.9637	0.1195	100%	
	8min * 2	0.4993	0.0422	52%	
	8min * 3	0.3753	0.0240	39%	
	30min RT	0.4723	0.0265	49%	
	30min 37℃	0.8427	0.0792	87%	
Matrix 1:100	8min * 1	0.8800	0.1189	91%	0.439
	8min * 2	0.9580	0.0970	99%	0.002
	8min * 3	0.8967	0.0085	93%	0.000
	30min RT	0.9473	0.1012	98%	0.001
	30min 37℃	0.8107	0.0359	84%	0.559
Matrix 1:20	8min * 1	1.1533	0.2153	120%	0.253
	8min * 2	0.9227	0.1464	96%	0.009
	8min * 3	0.9203	0.0834	96%	0.000
	30min RT	0.9693	0.1132	101%	0.002
	30min 37℃	1.4003	0.3113	145%	0.040
Cidezyme	8min * 1	0.4717	0.0677	49%	0.003
	8min * 2	0.2510	0.0532	26%	0.003
	8min * 3	0.1143	0.0275	12%	0.000
	30min RT	0.8373	0.2566	87%	0.070
	30min 37℃	0.2750	0.0276	29%	0.000

Table 13. (Continued)

Detergent	Condition	Mean	S.D.	% Residual	P-value
Empower	8min * 1	1.3893	0.1537	144%	0.019
	8min * 2	0.6293	0.0330	65%	0.014
	8min * 3	0.5387	0.0549	56%	0.009
	30min RT	1.0403	0.1771	108%	0.005
	30min 37℃	0.2827	0.0253	29%	0.000
Chlorine	8min * 1	0.1100	0.0331	11%	0.000
bleach	8min * 2	0.0343	0.0085	4%	0.000
	8min * 3	0.0173	0.0104	2%	0.000
	30min RT	0.1553	0.0061	16%	0.000
	30min 37℃	0.2363	0.1404	25%	0.003

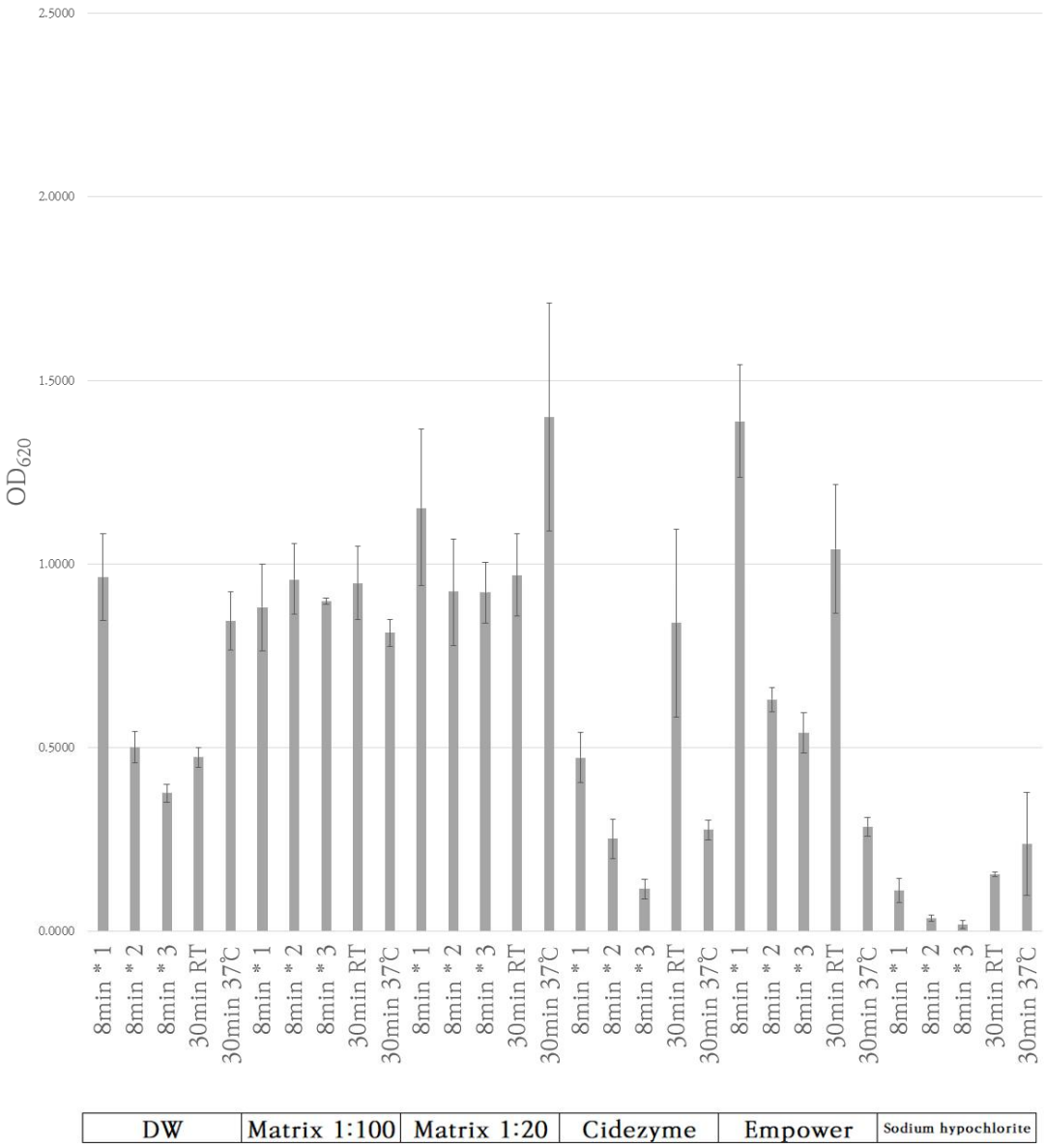

Figure 10. Removal efficacy of three detergents for *S. aureus* RN9120 biofilms. OD values are the average of three independent experiments, and the standard error of the mean is expressed as error bars

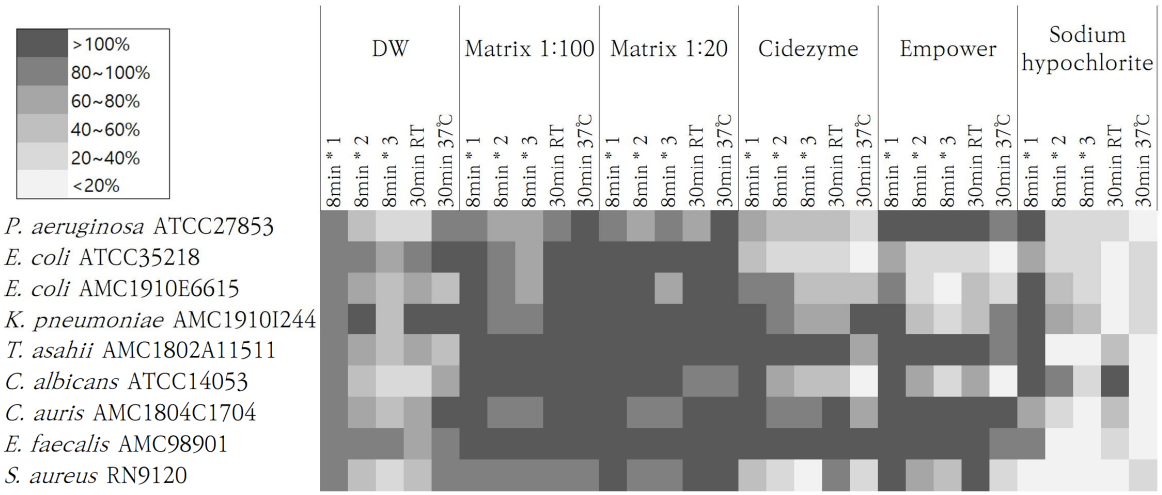

Figure 11. Residual biofilm percentage after treatment of study detergents for biofilm produced by various strains. The percentage was calculated by dividing OD_{620} of each strain after treatment by baseline OD_{620}.

참고문헌

1. Bjarnsholt T, Alhede M, Alhede M, Eickhardt-Sorensen SR, Moser C, Kuhl M, et al. The in vivo biofilm. Trends Microbiol. 2013;21(9):466-74.

2. Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, Hoiby N, Moser C, Costerton JW, et al. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012;65(2):127-45.

3. Johansen C, Falholt P, Gram L. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. Appl Environ Microbiol. 1997;63(9):3724-8.

4. Orgaz B, Kives J, Pedregosa AM, Monistrol IF, Laborda F, SanJosé C. Bacterial biofilm removal using fungal enzymes. Enzyme Microb Technol. 2006;40(1):51-6.

5. Hoiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. Clin Microbiol Infect. 2015;21 Suppl 1:S1-25.

6. Pasteur L, editor Mémoire sur la fermentation acétique. Annales scientifiques de l'École Normale Supérieure; 1864.

7. J W Costerton, K J Cheng, G G Geesey, T I Ladd, J C Nickel, M Dasgupta a, et al. Bacterial Biofilms in Nature and Disease. Annu Rev Microbiol. 1987;41(1):435-64.

8. Murray CJL, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. The Lancet. 1997;349(9064):1498-504.

9. Potera C. Forging a link between biofilms and disease. Science.

1999;283(5409):1837, 9.

10. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. Pathogens. 2013;2(2):288-356.

11. Gilbert P, McBain AJ. Biofilms: their impact on health and their recalcitrance toward biocides. Am J Infect Control. 2001;29(4):252-5.

12. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents. 2010;35(4):322-32.

13. Stiefel P, Mauerhofer S, Schneider J, Maniura-Weber K, Rosenberg U, Ren Q. Enzymes enhance biofilm removal efficiency of cleaners. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(6):3647-52.

14. Vickery K, Pajkos A, Cossart Y. Removal of biofilm from endoscopes: evaluation of detergent efficiency. Am J Infect Control. 2004;32(3):170-6.

15. Chen X, Stewart PS. Biofilm removal caused by chemical treatments. Water Res. 2000;34(17):4229-33.

16. Zühlsdorf B, Emmrich M, Floss H, Martiny H. Cleaning efficacy of nine different cleaners in a washer–disinfector designed for flexible endoscopes. J Hosp Infect. 2002;52(3):206-11.

17. Fang Y, Shen Z, Li L, Cao Y, Gu LY, Gu Q, et al. A study of the efficacy of bacterial biofilm cleanout for gastrointestinal endoscopes. World J Gastroenterol. 2010;16(8):1019-24.

18. Ren W, Sheng X, Huang X, Zhi F, Cai W. Evaluation of detergents and contact time on biofilm removal from flexible endoscopes. Am J Infect

Control. 2013;41(9):e89-92.

19. Molobela IP, Cloete TE, Beukes M. Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. Afr J Microbiol Res. 2010;4(14):1515-24.

20. da Costa Luciano C, Olson N, Tipple AF, Alfa M. Evaluation of the ability of different detergents and disinfectants to remove and kill organisms in traditional biofilm. Am J Infect Control. 2016;44(11):e243-e9.

21. Rodriguez-Lopez P, Puga CH, Orgaz B, Cabo ML. Quantifying the combined effects of pronase and benzalkonium chloride in removing late-stage *Listeria monocytogenes-Escherichia coli* dual-species biofilms. Biofouling. 2017;33(8):690-702.

22. Sun W, Wang Y, Zhang W, Ying H, Wang P. Novel surfactant peptide for removal of biofilms. Colloids Surf B Biointerfaces. 2018;172:180-6.

23. Stiefel P, Rosenberg U, Schneider J, Mauerhofer S, Maniura-Weber K, Ren Q. Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. Appl Microbiol Biotechnol. 2016;100(9):4135-45.

24. Mangwani N, Shukla SK, Kumari S, Das S, Rao TS. Effect of biofilm parameters and extracellular polymeric substance composition on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. Rsc Advances. 2016;6(62):S7540-S51.

25. Musleh RM, Jebur AQ. Crystal Violet Binding Assay for Assessment of Biofilm Formation by *Klebsiella pneumoniae* on Catheter, Glass and

Stainless-steel Surfaces. Iraqi Journal of Science. 2014;55(3B):1208-12.

26. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. Biomaterials. 2012;33(26):5967-82.

27. Lee S, Choi K-H, Yoon Y. Effect of NaCl on Biofilm Formation of the Isolate from *Staphylococcus aureus* Outbreak Linked to Ham. Korean J Food Sci Anim Resour. 2014;34(2):257-61.

28. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC, Jr., Wennersten C, Venkataraman L, Novick RP, et al. Accessory gene regulator (agr) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(5):1492-502.

29. Fanning S, Mitchell AP. Fungal Biofilms. PLoS Path. 2012;8(4):e1002585.

30. Redelman CV, Maduakolam C, Anderson GG. Alcohol treatment enhances *Staphylococcus aureus* biofilm development. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012;66(3):411-8.

31. Luther MK, Bilida S, Mermel LA, LaPlante KL. Ethanol and Isopropyl Alcohol Exposure Increases Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Infect Dis Ther. 2015;4(2):219-26.

Abstract

Background: Bacterial biofilms are highly resistant to antibiotics and disinfectants because of low penetrance to these agents. The biofilm is well-known risk factors of healthcare-associated infections, which facilitates antimicrobial resistance. Therefore, biofilm removal is essentially required for medical device cleaning. Both of mechanical methods such as sonication and flushing and chemical methods such as enzymatic and non-enzymatic detergents are used to remove bacterial biofilm. There are several commercially available medical cleaners against biofilm including enzymatic detergents (ex, proteinase, amylase) and non-enzymatic detergents such as Matrix which lyse carbohydrates EPS. There is lack of detergent efficacy studies against biofilm at various conditions with various pathogenic bacteria and fungi. This study is conducted to test biofilm-forming capacity of various strains, identify biofilm-facilitating conditions, and evaluate the removal efficacy of medical detergents.

Methods: For evaluating biofilm-forming capacity, 35 clinical isolates, seven American Type Culture Collection (ATCC) strains, and two established *S. aureus* strains were included. A total of 44 strains comprised *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Citrobacter freundii, Acinetobacter baumannii, Candida albicans, Candida auris, Trichosporon asahii, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium,* and *Streptococcus agalactiae*. Biofilms were cultured for one day on 96-well polystyrene microplates. Optic densities (OD) at 620nm were measured

quantitively as total biomass for crystal violet stained biofilm. All OD measurement were triplicated and mean and standard deviation of measurand were calculated. Three wells were stained without biofilm culture as sample blank for each measurement. With nine active biofilm-forming isolates (two gram-positive cocci, four gram-negative rods, and three yeasts), biofilms were produced with incubation for three days on the microplates with previously established condition. Three detergents including two enzymatic detergents (Empower®, Cidezyme®), and a non-enzymatic detergent (Matrix mint®) were evaluated for biofilm removal efficacy under each condition (8 minutes once, 8 minutes twice, 8 minutes thrice, and 30 minutes once at room temperature (RT), and 30 minutes once at 37℃). and chlorine bleach and distilled water were used as a positive control and a negative control, respectively. After 30 minutes elution using 95% ethanol, optic density at 620nm was measured as residual biofilm amount. The OD value after one-time 8-minute washing with distilled water were set as baseline OD value. For evaluating removal efficacy, each value was divided with baseline OD to calculate biofilm residual percentage. Data analysis were performed with student's t-test using mean and standard deviation value of triplicated measurements.

Result: *P. aeruginosa* AMC100009, *C. albicans* ATCC14053, *T. asahii* AMC1802A11511, *C. auris* AMC1804C1704, and *P. aeruginosa* AMC99241 produced profuse biofilms. Addition of 4% NaCl and 8% or 10% ethanol facilitated biofilm formations significantly. While chlorine bleach was effective against all strains, detergents had various removal efficiency depending on species and washing conditions. With *P. aeruginosa*, *E. coli* ATCC35218, *E. coli* AMC1910E6615, *C. albicans, C. auris, S. aureus* biofilms,

biofilm removal percentage with enzymatic detergents were higher than 50% at 37℃; 66%, 82%, 52%, 82%, 71% by Cidezyme, 13%, 69%, 80%, 92%, 71% by Empower. *K. penumoniae*–producing biofilms were significantly removed by various conditions (42-75%) but not by immersion for 30 minutes at 37℃ (5%). With *E. faecalis, C. auris,* and *T. asahii* biofilms, removal percentages of any detergents were no more than 30% under any conditions. Matrix mint did not significantly remove biofilms of all strain.

Conclusion: Biofilm-forming capacity and removal efficacy varied along species and strains of microorganisms. Enzymatic detergents had better performance for removing biofilms generally than non-enzymatic detergent. However, *E. faecalis, C. auris,* and *T. asahii* biofilms were not removed effectively by all tested detergents.

Keywords: biofilm, detergents, forming capacity, removal efficiency