



Republic of Iraq  
Ministry of Higher Education  
and Scientific Research  
University of Diyala  
College of Science  
Department of Biology



## **The inhibition effect of antibiotics on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa***

A Thesis

Submitted to the College of Science, University of Diyala in  
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master Degree of  
Science in Biology

By

**Neyaf Majid Ali Alageedi**

B.Sc. Biology / College of Science / University of Diyala, 2018

Supervised by

**Dr. Kareem Ibrahim Mubarak**

Assistant Professor

**2021 A.D.**

**1442 A.H.**

## 1.Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* is an omnipresent gram-negative aerobic bacterium, an opportunistic pathogen widely spread and causes nosocomial infections (Al-Mayali and Salman, 2020) as well as fatal infections in immunocompromised individuals especially those patients with cancer, post-surgery, severe burns or infected by human immunodeficiency virus (HIV) (Gomila *et al.*, 2018) despite the advent of newer and stronger antibiotics (Amoon *et al.*, 2018).

These bacteria cause several types of infection including wound, gastrointestinal, urinary, and respiratory tract infections. The infections by these bacteria are increasing worldwide due to the survival, adaptation, and resistance mechanisms of different types of antimicrobials (Abdallah and Jabur, 2021). Also, infection with *P.aeruginosa* is particularly difficult to treat due to many intrinsic and acquired mechanisms of antibiotics resistance (Wijaya, 2021).

The wide spectrum of infection caused by bacteria depends on the presence of many virulence factors such as biofilms. Biofilms are defined as sessile and organized communities of mono or multispecies bacteria that adhere to biotic or abiotic surfaces (Costa *et al.*, 2021) and their ability to form biofilms on both biotic and abiotic surfaces is an important factor contributing to the pathogenesis of *P.aeruginosa* (Saffari *et al.*, 2017). Biofilms own advantage in several infections and greatly enhances the ability of bacteria to resist antibiotics and harsh environmental conditions (Sameet *et al.*, 2020). Biofilm formation is an important mechanism for the survival of *P. aeruginosa* and its relationship with antimicrobial resistance represents a challenge for patient therapeutics (Costa – Limaa *et al.*, 2018).

The matrix of bacterial biofilm consists of various polymers such as Exopolysaccharides, proteins, and extracellular DNA (eDNA). Exopolysaccharides, pyocyanine, rhamnolipids, and functional proteins are all factors that contribute to the development of *P. aeruginosa* biofilm stability, and protection (Hynen *et al.*, 2021 and Newman *et al.*, 2017).

A core component of biofilm formation in *P. aeruginosa* is the biosynthesis of exopolysaccharides known as polysaccharide encoding locus (*pel*) and polysaccharide synthesis locus (*psl*), these are the most essential exogenous polysaccharides exploited in the formation of biofilms in the bacteria (Moradali and Rham, 2019). Past studies have suggested an important role for the *psl* gene cluster in initiating biofilm formation in *P. aeruginosa*. The *Psl* operon contains 15 genes (*pslA-O*) involved in the synthesis of an exopolysaccharide (EPS) that is important for the formation of a biofilm for this bacteria. Biofilm formation by *P. aeruginosa* requires or includes multiple gene expressions. Another important gene for the formation of biofilm, development, and maintenance is the *Pel* gene. This gene is composed of seven gene operons (*pelA-G*) and is involved in pellicle and biofilm formation (Zimmer *et al.*, 2013).

Understanding the effects of antibiotics on biofilms is of paramount importance in clinical practice due to the increased resistance toward antibiotics and dissemination of resistance in biofilms.

### الخلاصة

جمعت مائتي عينة من مصادر مختلفة (بول ، جروح ، اذن ، حروق ، قشع) من المستشفيات الحكومية في بعقوبة / ديالى، خلال فترة الدراسة من ايلول / 2020 الى كانون الثاني / 2021. تم زرع العينات على اوساط انتقائية وتفاضلية ، تم التعرف على 26 عزلة من بكتيريا *P. aeruginosa* من خلال خصائص المستعمرات والفحص المجهرى والاختبارات البيوكيميائية. أكد التعرف على 26 عزلة من *P.aeruginosa* بواسطة نظام VITEK-2 المضغوط.

هذه العزلات أعطت نتيجة إيجابية لاختبارات الأوكسيديز والكاتاليز واختبار استهلاك السترات، وأظهرت قدرتها على النمو على وسط MacConkey agar و وسط Pseudomonas agar و وسط Blood agar وتسببت في انحلال الدم ( $\beta$ )، النمو عند 42 درجة مئوية، والقدرة على إنتاج الصباغ. بينما أعطت نتائج سلبية لاختبار الاندول واختبار الميثيل الأحمر واختبار فوجيس-بروسكاور وتخمير اللاكتوز والنمو عند 4 درجات مئوية. اختبار TSI ، غير مخمر لأي نوع من أنواع السكريات الثلاثة (الجلوكوز ، اللاكتوز ، السكروز) ، لا يشكل ثاني أكسيد الكربون ولا ينتج H<sub>2</sub>S.

نتائج الكشف المظهري لبعض عوامل الضراوة أظهرت ان جميع العزلات أنتجت الهيموليزين ، الحركة ، الليبز ، الصباغ ، البروتيز ، الجيلاتينز واليوريز بنسب 100% ، 100% ، 96.15% ، 76.9% ، 65.38% ، 57.69% و 11.53% على التوالي.

تكوين الاغشية الحيوية كشفت بالطريقة الكمية باستخدام صفيحة ميكروتيتر بإنتاجية مختلفة بين قوية ومتوسطة وغير ملتصقة ، وأظهرت النتائج أن 26/24 (92.30%) من العزلات أنتجت الاغشية الحيوية من بينها 38.4% من العزلات كانت منتجة للاغشية الحيوية بصورة قوية و 53.8% منتجة للاغشية الحيوية بصورة متوسطة، بينما اثنتان فقط من العزلات 7.6% غير منتجة للاغشية الحيوية.

تم إجراء اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية لـ 26 عزلة مقابل 13 نوعًا مختلفًا من المضادات الحيوية باستخدام طريقة Kirby Bauer Disc Diffusion. أظهرت النتائج أن أقل نسبة مقاومة للمضادات الحيوية كانت ضد Piperacillin / Tazobactam (3.8%) ونسبة مقاومة أعلى ضد Ticarcillin / Clavulanic acid (69.2%) بينما بلغت نسبة المقاومة لكل من Aztreonam و Cefepime و Meropenem و Netilmicin (38.4%). Ceftazidime ، Ciprofloxacin ، Levofloxacin و Tobramycin (34.6%). بينما كانت نسبة مقاومة المضادات

## Aims of the study

The study aims to explore the formation of biofilms and the effect of antibiotics on their formation and investigates the genes responsible for biofilm formation in *P. aeruginosa* by the following steps:

1. Isolation and identification of *P.aeruginosa* from clinical specimens and detection of some virulence factors in the isolates
2. Investigate the resistance of the isolates to several antibiotics and determine their minimum inhibitory concentration (MIC) among the clinical isolates
3. Phenotypic and molecular detection of some biofilm formation degree.
4. Study the effect of sub-minimum inhibitory concentration (sub-MIC) of some antibiotics on the biofilm formation in *P.aeruginosa* isolates

### الخلاصة

جمعت مائتي عينة من مصادر مختلفة (بول ، جروح ، اذن ، حروق ، قشع) من المستشفيات الحكومية في بعقوبة / ديالى، خلال فترة الدراسة من ايلول / 2020 الى كانون الثاني / 2021. تم زرع العينات على اوساط انتقائية وتفاضلية ، تم التعرف على 26 عزلة من بكتيريا *P. aeruginosa* من خلال خصائص المستعمرات والفحص المجهرى والاختبارات البيوكيميائية. أكد التعرف على 26 عزلة من *P.aeruginosa* بواسطة نظام VITEK-2 المضغوط.

هذه العزلات أعطت نتيجة إيجابية لاختبارات الأوكسيديز والكاتاليز واختبار استهلاك السترات، وأظهرت قدرتها على النمو على وسط MacConkey agar و وسط Pseudomonas agar و وسط Blood agar وتسببت في انحلال الدم ( $\beta$ )، النمو عند 42 درجة مئوية، والقدرة على إنتاج الصباغ. بينما أعطت نتائج سلبية لاختبار الاندول واختبار الميثيل الأحمر واختبار فوجيس-بروسكاور وتخمير اللاكتوز والنمو عند 4 درجات مئوية. اختبار TSI ، غير مخمر لأي نوع من أنواع السكريات الثلاثة (الجلوكوز ، اللاكتوز ، السكروز) ، لا يشكل ثاني أكسيد الكربون ولا ينتج H<sub>2</sub>S.

نتائج الكشف المظهري لبعض عوامل الضراوة أظهرت ان جميع العزلات أنتجت الهيموليزين ، الحركة ، الليبز ، الصباغ ، البروتيز ، الجيلاتينز واليوريز بنسب 100% ، 100% ، 96.15% ، 76.9% ، 65.38% ، 57.69% و 11.53% على التوالي.

تكوين الاغشية الحيوية كشفت بالطريقة الكمية باستخدام صفيحة ميكروتيتر بإنتاجية مختلفة بين قوية ومتوسطة وغير ملتصقة ، وأظهرت النتائج أن 26/24 (92.30%) من العزلات أنتجت الاغشية الحيوية من بينها 38.4% من العزلات كانت منتجة للاغشية الحيوية بصورة قوية و 53.8% منتجة للاغشية الحيوية بصورة متوسطة، بينما اثنتان فقط من العزلات 7.6% غير منتجة للاغشية الحيوية.

تم إجراء اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية لـ 26 عزلة مقابل 13 نوعًا مختلفًا من المضادات الحيوية باستخدام طريقة Kirby Bauer Disc Diffusion. أظهرت النتائج أن أقل نسبة مقاومة للمضادات الحيوية كانت ضد Piperacillin / Tazobactam (3.8%) ونسبة مقاومة أعلى ضد Ticarcillin / Clavulanic acid (69.2%) بينما بلغت نسبة المقاومة لكل من Aztreonam و Cefepime و Meropenem و Netilmicin (38.4%). Ceftazidime ، Ciprofloxacin ، Levofloxacin و Tobramycin (34.6%). بينما كانت نسبة مقاومة المضادات