University of Mosul
College of Dentistry

Study on biofilm formation by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Suhad Mwaffaq Hamdoon Yehya Azzawi

Ph. D. / Thesis
In
Oral Microbiology

Supervised By
Dr. Ghada Y. Abdul-Rahman
Assistant Professor

2017 A.D. 1438A.H.

ABSTRACT

The purpose of this study was the examination of biofilms formed by isolated *Aggrigatibacter actinomycetemcomitans* using different methods after different times elapses (4, 18, 24, 48) hrs and with different glucose concentrations (0, 0.5, 1) g glucose . The evaluation of tetracycline & *Glycyrrhiza glabara* extract effect on mature biofilm, planktonic and biofilm cells to search for compounds that have double effect (antibacterial & antibiofilm). Forty five plaque samples were collected from sub-gingival area using paper point (Diadent) and placed in brain heart infusion broth, for identification of bacteria two methods were used, the first was traditional culture alone (Dentaid-1 agar), the second method was culture and molecular method together using commercial PCR kit from (Genekam biotechnology.Germany). Twenty one isolates of *A. actinomycetemcomitans* (46.6%) were obtained by anaerobic culture alone and 31 isolates (68.8%) produce positive reaction using culture &PCR identification kit by detecting 360 bp (amplicon). Sixteen isolate showed rough colonies with star shape inner structure and were difficult to be removed from agar surface, while 5 isolates have smooth surface colonies, lack the star shape inner structure and easy to be removed from agar surface. Assessment of biofilm formation using crystal violet assay showed that sixteen isolates (76%) gave absorbance more than 0.1 nm which were classified as biofilm forming and 5 isolates (24%) gave absorbance less than 0.1 nm and classified as planktonic isolates. The study showed significant difference between the two identification methods (0.034) using Mann-Whitney Test in which identification by culture-enhanced PCR were preferable. The result showed a significant effect of the environmental factors: age of culture (4, 18, 24, 48) hrs and glucose concentration (0, 0.5, 1) g glucose

on the biofilm formation of biofilm former isolates of *A.actinomycetemcomitans* by measuring the absorbance using spectrophotometer. Examination with scanning electron microscope and by light microscope showed larger size of micro colonies with increasing the amount of exopolysaccharides and more complex structure of biofilm with increasing the time and glucose concentration. Tetracyclin and *Glycyrrhiza glabara* ethanolic extract (50µl of 1mg/ml) had significant effect on 24 hrs biofilm of *A.actinomycetemcomitans* by measuring absorbance using crystal violet assay and imaging the biofilm with scanning electron microscope and light microscope. The study showed that the mean inhibition zone diameter (mm) for planktonic isolates of *A. actinomycetemcomitans* produced by ethanolic *Glycyrrhiza glabra* extract were : (11, 19.2, 22.4) mm diameter on planktonic cells and (6.8, 7.6, 10.8) mm on biofilm cells for: (50- 100- 250) µg concentration of extract respectively. These measurements were greater than the mean inhibition zone diameter of aqueous extract at the same concentrations(10, 12.6, 13.6) mm diameteron planktonic cells & (6.2, 7, 7.2) mm on biofilm cells respectively, the ethanolic extract at 250 µg concentration produced mean of inhibition zone (22.4 mm) diameter was compatible to the mean of inhibition zone produced by tetracycline at (25 µg) concentrations which was (22.2, 23.2) mm diameter respectively on planktonic cells and (10.6 mm) on biofilm cells . In this study examination of biofilm by Fourier Transform Infrared spectroscope after (18, 24, 48) hrs showed OH band (3300-3400cm^{-1}) which is abundant in quorum sensing molecules and exopolysaccharides produced by bacteria during biofilm development in which the best band was noted after 24hrs biofilm (3357cm^{-1}) which was changed to (3263 cm^{-1}) after application of 1mg/ml *Glycyrrhiza glabara* ethanolic extract.

جامعة الموصل
كلية طب الأسنان

دراسة تكوين الطبقة الحيوية لجرثوم ***Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

سهاد موفق حمدون يحيى عزاوي

أطروحة دكتوراه
طب الأسنان / الجراثيم الفموية

باشراف
الدكتورة غادة يونس عبدالرحمن
أستاذ مساعد

1438 هـ 2017م

الخلاصة

هدفت الدراسة إلى فحص تكوين الطبقة الحيوية لجرثوم *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* مختبرياً باستخدام طرق مختلفة لفترات زمنية متباينة (4 , 18 ,24 , 48) ساعة بإضافة تراكيز مختلفة من مادة الكلوكوز بتراكيز (0, 0,5 , 1) غم كلوكوز وقد تم أيضاً تقييم تأثير المضاد الحيوي التيتراسايكلين (tetracyclin) ومستخلص نبات السوس على الطبقة الحيوية الناضجة والخلايا الحرة والملتصقة للبحث عن المركبات التي تمتلك تأثير مزدوج (مضاد جرثومي ومضاد للطبقة الحيوية).تم جمع 45 عينة من الصفيحة الجرثومية تحت اللثوية باستخدام الرؤوس الورقية المعقمة حجم (مايكرومتر50) نوع (Diadent) في الجيوب السنية للمرضى ثم وضعت في وسط نقيع االمخ والقلب, ولتحديد نوع البكتريا تم استخدام طريقتين :الاولى الوسط الزرعي التقليدي لوحده (Dentiad).الطريقة الثانية كانت بإستخدام الوسط الزرعي مع الكشف الجزيئي بإستخدام طقم تفاعل البلمرة المتسلسل التجاري من شركة (Genekam biotechnology) الالمانية حيث تم الحصول على واحد و عشرون عزلة (46,6%) من عزلات جرثومة *A.actinomycetemcomitans* بإستخدام طريقة الوسط الزرعي اللاهوائي لوحده,و واحد و ثلاثون عزلة (68,8%) بطريقة الوسط الزرعي مع تفاعل البلمرة المتسلسل وذلك بتحديد زوج القواعد 360 (bp) و عند التشخيص وجد ان ستة عشر عزلة اتصفت بمستعمرات خشنة السطح مع تركيب داخلي يشبه النجمة و كانت من الصعب إزالتها من سطح الوسط الزرعي ,بينما خمسة من العزلات اتصفت بمستعمرات ملساء السطح و تفتقر شكل النجمة للتركيب الداخلي للمستعمرة ومن السهل إزالتها من سطح الوسط الزرعي. و قد بين تقدير تكوين الطبقة الحيوية بطريقة الصبغة البلورية البنفسجية أن ستة عشر عزلة أعطت امتصاص اكثر من 0,1 نانوميتر حيث وصفت كعزلات مكونة للطبقة الحيوية بينما خمسة عزلات أعطت امتصاص اقل من 0,1نانوميتر وصفت كعزلات غير مكونة للطبقة الحيوية. وقد أوضحت الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية بين طريقتي تحديد نوع البكتريا بمقدار 0,034 بإستخدام اختبار **Mann-Whitney**, حيث تبين أن طريقة الوسط الزرعي مع طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل هي المفضلة و أوضحت النتائج تأثير معنوي لبعض العوامل البيئية مثل الوقت بفترات زمنية (4 ,18,24 ,48) ساعة و تراكيز سكر الكلوكوز(0, 0،5, 1) غم كلوكوز على تكوين الطبقة الحيوية

للعــزلات المكونـــة للطبقـــة الحيويـــة لجرثومـــة *A.actinomycetemcomitans* وذلـــك بقيــاس الامتصــاص بواسـطة المطيــاف الضــوئي و الفحـص بــالمجهر الماسـح الالكترونــي و المجهـر الضــوئي و التــي أظهـرت حجـم أكبـر للمسـتعمرات المجهريــة(microcolonies) و زيــادة كميــة متعــدد الســكريات الخــارجي(EPS) وأوضـــحت الدراســة تــأثير معنــوي للمضـــاد الحيـــوي التيتراســـايكلين(tetracyclin) و مســـتخلص الســـوس الكحـــولي 50(مــايكرولتر) بتركيــز 1ملغـم / مـل علــى الطبقــة الحيويــة ذات عمـر 24ســاعة لجرثومــة *A.actinomycetemcomitans* و ذلـــك بواســـطة قيـــاس الامتصـــاص بطريقـــة تقـــدير الصـــبغة البلوريـــة البنفســـجية و تصـــوير الطبقـــة الحيويـــة بواســـطة المجهـــر الماســـح الالكترونــي و المجهـر الضــوئي.كما بينـت الدراسـة أن معـدل أقطــار منطقـة التثبـيط مقاسـة بـــالملمتر (mm) للعـــزلات الحـــرة لجرثـــوم*A.actinomycetemcomitan* التـــي أنتجهـــا مســـتخلص الســـوس كانـــت أقطارهـــا(11 ,19,2 ,22,4) ملـــم وللعـــزلات الملتصـــقة (6,8-10,8-7,6) ملــم للتراكيــز(50 ,100,250) مــايكروغرام مــن المســتخلص الكحــولي علــى التوالي.هــذه القياســات كانــت أعلــى مــن معــدل أقطــار منطقــة التثبــيط للمســتخلص المــائي للســوس وبــنفس التراكيــز حيــث كانــت الأقطــار(10 ,12,6,13,6) ملــم للخلايــا الحــرة (6,2-7-7,2)ملـم للخلايــا الملتصــقة علــى التــوالي. حيــث أن المســتخلص الكحــولي بتركيــز 250مــايكروغرام أعطــى معــدل قطــر لمنطقــة التثبــيط (22,4ملـم) مقــارب لمعــدل أقطــار منطقــة التثبــيط التـــي أنتجهـــا التيتراســـايكلين(tetracyclin) بتركيــز25مــايكروغرام و التـــي كانــت مــابين قطــر(22,2-23,2) ملـم علــى التــوالي للخلايــا الحــرة و (10,6 ملــم) للخلايــا الملتصــقة.في هــذه الدراســة بــين فحــص الطبقــة الحيويــة بواســطة مطيــاف الاشــعة تحــت الحمـــــراء (FTIR)بعـــــد(18,24,48) ســـــاعة, بينـــــت حزمـــــة هايدروكســـــيل (OH) مــابين3300-3400 سـم$^{-1}$ الموجـودة بغـزارة فـي جزيئـات آليـة التواصـل الكيميـائي و متعـدد السـكريات التــي أنتجتهــا البكتيريــا خــلال تكــوين الطبقــة الحيويــة التــي لوحظــت خلالهــا احســن حزمــة بعــد 24ســاعة مــن تكــوين الطبقــة الحيويــة وكانــت(3357 ســم $^{-1}$)و التــي تحولت الى(3263 سم$^{-1}$)بعد إضافة 1ملغم/مل من المستخلص الكحولي لنبات السوس.