

ANTI-BIOFILM FORMING AND ANTI-QUORUM SENSING ACTIVITIES OF  
*Streptomyces* AGAINST SELECTED PATHOGENS FROM  
URINARY CATHETER

KHANSA MOHAMMED YOUNIS  
P 68178

THESIS SUBMITTED IN FULFILMENT FOR THE DEGREE OF  
DOCTOR OF PHILOSOPHY

FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY  
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA  
BANGI

2017

AKTIVITI ANTI PEMBENTUKAN BIOFILEM DAN ANTI PENDERIAAN  
KUORUM *Streptomyces* TERHADAP PATOGEN TERPILIH  
DARIPADA KATETER URIN

KHANSA MOHAMMED YOUNIS  
P 68178

TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEHI IJAZAH  
DOKTOR FALSAFAH

FAKULTI SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA  
BANGI

2017

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the potential of secondary metabolites of *Streptomyces* as bacterial anti biofilm and anti-quorum sensing agents against biofilm forming uropathogens. From a total of 100 isolates from urinary catheters, six isolates were selected as target pathogens based on multi-antibiotic resistance and strong biofilm formation on sterile urinary catheters. The actinomycetes used in this study were from Marine Microbiology Lab, UKM and Iraqi's isolates. A total of 114 actinomycetes were screened for antibacterial against the target pathogens and anti quorum sensing using *Serratia marcescens* SMJ-11 as a reporter strain. One isolate designated as sdLi displayed broad spectrum anti biofilm and strongest anti-quorum sensing activity against target pathogens. This isolate was identified as *Streptomyces rochei* based on morphological and biochemical characterisation followed by phylogenetic analysis of 16S rRNA gene. Biofilm development was reduced by 92% for *Pseudomonas aeruginosa*, 90% for *Candida albicans*, 78% for *Klebsiella pneumoniae*, 77% for *Enterobacter cloacae*, 73% for *Proteus mirabilis*, and 57% for *Escherichia coli* after treatment using lyophilised sdLi culture supernatant. Spread plate test showed that the sdLi supernatant interfered only with the biofilm forming ability of the target bacteria and the cells were viable after treatment. SEM and light microscopy observations of Foley urinary catheter and cover glass exposed to the target pathogens showed that there was a lack of biofilm formation and the presence of only a few single cells after treatment. Minimum inhibitory concentration assay (MIC) of ethyl acetate extract against *P. mirabilis* UCBA4 showed that sub-MIC concentrations attenuated biofilm formation, studied virulence factors and decreased pH value of the test medium. Reverse transcription-PCR (RT-PCR) analysis of non-treated *Proteus mirabilis* UCBA4 showed there was an amplification with clear bands of expression products of the QS-regulated genes (LuxS, Pmr, RsbA, ureR and 16sRNA) during 16 and 18 h incubation periods. Only faint bands were visible from the treated cells. SdLi ethyl acetate crude extract was purified using flash column chromatography column and thin-layer chromatography profile demonstrate the presence of six fractions, of which KHA4 and KHA5 were the most bioactive in anti-quorum sensing activity. Fraction KHA5 was identified as Bis (2-ethylhexyl) phthalate using gas chromatography-mass spectrometry analysis. Bioassay-guided fractionation, TLC-bioautography and Fourier transform infrared spectrophotometry showed that fraction KHA4 contained three compounds, of which compounds KHA4-2 and KHA4-3 were strongest in anti-quorum sensing activity. Nuclear magnetic resonance and liquid chromatography-mass spectrometry analyses showed that KHA4-2 is N-(2-hydroxy tetrahydrofuran-3-yl) undecanamide and KHA4-3 is (S)-4-hydroxy-2-(3 oxotridecanamido) butanoic acid. Results of this study showed that *S. rochei* sdLi is a very promising candidate for the development of anti quorum sensing and anti biofilm forming compounds against uropathogens.

# AKTIVITY ANTI PEMBENTUKAN BIOFILEM DAN ANTI PENDERIAAN KUORUM *Streptomyces* TERHADAP PATOGEN TERPILIH DARIPADA KATETER URIN

## ABSTRAK

Tujuan kajian ini adalah untuk menentukan potensi metabolit sekunder *Streptomyces* sebagai agen anti pembentukan biofilem dan anti-penderiaan kuorum terhadap bakteria uropatogen yang membentuk biofilem. Daripada sejumlah 100 pencilan yang diasingkan daripada kateter urin, enam pencilan telah dipilih sebagai patogen sasaran berdasarkan kerintangan terhadap pelbagai antibiotik dan pembentukan biofilm yang kuat pada kateter urin yang steril. Aktinomiset yang digunakan dalam kajian ini adalah daripada koleksi kultur Makmal Mikrobiologi Marin dan yang dipencilkan dari Iraq. Sebanyak 114 pencilan aktinomiset telah disaring aktiviti anti-bakteria dan anti-penderiaan kuorum terhadap patogen sasaran dan *Serratia marcescens* strain SMJ-11. Satu pencilan yang dikodkan sebagai sdLi menunjukkan aktiviti spectrum yang luas dan penderiaan kuorum yang paling tinggi terhadap patogen sasaran. Pencilan ini dikenali sebagai *Streptomyces rochei* berasaskan ciri morfologi dan kimi serta diikuti dengan analisis filogenetik gen 16S rRNA gene. Pengurangan pembentukan biofilem sebanyak 92% bagi *Pseudomonas aeruginosa*, 90% bagi *Candida albicans*, 78% bagi *Klebsiella pneumoniae*, 77% bagi *Enterobacter cloacae*, 73% bagi *Proteus mirabilis*, dan 57% bagi *Escherichia coli* telah diperolehi selepas perlakuan menggunakan genangan sejukbeku kultur sdLi. Ujian piring sebaran menunjukkan genangan sdLi hanya mengganggu keupayaan pembentukan biofilem oleh bakteria sasaran dan sel terus mandiri selepas rawatan. Pemerhatian menggunakan SEM dan mikroskop cahaya ke atas kateter urin Foley dan kaca penutup yang terdedah kepada patogen sasaran menunjukkan tiada pembentukan biofilem dan terdapat hanya beberapa sel tunggal selepas perlakuan. Asai kepekatan perencatan minimum (MIC) menggunakan ekstrak dalam etil asetat terhadap *P.mirabilis* UCBA4 menunjukkan kepekatan sub-MIC mengurangkan pembentukan biofilem, menindas penghasilan faktor virulen yang diuji dan menurunkan pH medium ujian. Analisis PCR transkripsi terbalik (RT-PCR) yang tidak diberi perlakuan *P.mirabilis* menunjukkan ada amplifikasi dengan jalur amplifikasi yang jelas bagi amplifikasi produk ekspresi gen-gen yang dikawal atur oleh sistem QS (LuxS, Pmr, RsbA, ureR dan 16S rRNA) semasa jangkamasa eraman 16 dan 18 jam. Hanya jalur kabur kelihatan daripada sel yang diberi perlakuan. Daripada sel-sel yang diberi perlakuan terdapat hanya jalur-jalur yang kabur. Ekstrak kasar etil asetat pencilan sdLi telah dituliskan menggunakan kromatografi turus kilat. Profil kromatografi lapisan tipis ekstrak tulen menunjukkan kehadiran enam pecahan, yang mana pecahan KHA4 dan KHA5 mempunyai aktiviti anti-penderiaan kuorum yang paling tinggi. Pecahan KHA5 telah dicamkan sebagai bis (2-etilheksil) *phthalate* menggunakan analisis kromatografi gas-spektroskopi jisim. Pemecahan berpandukan asai, bioautografi-TLC dan spektrofotometri inframerah ubahan Fourier menunjukkan pecahan KHA4 mengandungi tiga sebatian yang mana sebatian KHA4-2 dan KHA4-3 mempunyai aktiviti anti-penderiaan kuorum yang paling kuat. Analisis ayunan magnet nuklear dan kromatografi cecair-spektroskopi jisim menunjukkan sebatian KHA4-2 adalah N-(2-hidroksitetrahidrofur-3-yl) undekanamida dan KHA4-3 adalah asid (S)-4-hidroksi-2-(3-oksotridekanamido) butanoik. Hasil daripada kajian ini menunjukkan *S. rochei* adalah calon yang sangat berpotensi untuk pengembangan bahan anti penderiaan kuorum dan anti pembentuk biofilem terhadap uropatogen.