جامعة الموصل
كلية العلوم

# التحري المظهري والجيني عن الغشاء الحيوي في جرثومتي *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* المعزولتين من إصابات مختلفة

عمر غياث محمد قاسم حياوي

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة / الاحياء المجهرية

بإشراف

الأُستاذ المُساعد الدكتور محسن أيوب عيسى العكيدي

1440هـ 2018م

# الخُلاصة

أُجريت الدراسة الحالية للتحري عن قابلية تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm) في جرثومتي *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* المعزولتين من عينات مرضية مُختلفة باستخدام الطرائق المظهرية والجزيئية. إذ جُمعت 344 عينة من المرضى الراقدين والوافدين الى مُستشفى آزادي/ وحدة البكتيريولوجي/محافظة كركوك للمدة بين شباط–نيسان 2016.

أظهرت نتائج العزل والتشخيص الحصول على (16) عُزلة لجرثومة *Staph.aureus* توزعت بين(10) عزلات للإصابات الجلدية و(3)عزلات لإصابات الجهاز التنفسي و (عزلة واحدة) لكل من إصابات الدم ، المجاري البولية والإصابات المهبلية. .كما تم الحصول على (10) عزلات لجرثومة *Pseudo.aeruginosa* توزعت بين (6) عزلات من الإصابات الجلدية و عزلتين من إصابات الدم وعزلة واحدة لكل من إصابات الجهاز التنفسي ، والإصابات المهبلية.

تبين من نتائج التحري المظهري أن أفضل طريقة للتحري النوعي عن تكوين الغشاء الحيوي في جراثيم *Staph.aureus* هي طريقة أحمر الكونغو، إذ أعطت جميع العزلات (100%) نتيجة موجبة للنمو على وسط أكار الكونغو Congo Agar (CA) فيما أعطت (63%) من العزلات نتائج موجبة قوية على وسط الكونغو السائل Congo Broth(CB) . بالمُقابل فإن أفضل طريقة للتحري النوعي عن تكوين الغشاء الحيوي في جراثيم *Pseudo.aeruginosa* هي طريقة الأنبوب Tube Method (TM) إذ أبدت (90%) من العزلات قابلية واضحة على إنتاج الغشاء الحيوي بهذه الطريقة.

فيما تُعد طريقة صفيحة الزرع النسيجي TCP (Tissue Culture Plate) طريقة كمية يُمكن بواسطتها تقدير الكتلة الحيوية للغشاء الحيوي وقد أعطت نتائج لاتقل أهمية عن الطرائق أعلاه ، إذ أبرزت مقارنة مهمة بين الجرثومتين أبدت فيها (31%) و(60%) من عزلات النوع *Staph.aureus* والنوع *Pseudo.aeruginosa* على التوالي قابلية تراوحت بين متوسطة–قوية على تكوين الغشاء بالمُقابل فإن (69%) و (40%) من عزلات النوع *Staph.aureus* والنوع *Pseudo.aeruginosa* على التوالي أبدت قابلية ضعيفة على تكوين الغشاء باستخدام هذه الطريقة.

كذلك أعطت صور المجهر الضوئي باستخدام صبغة السفرانين والمجهر الفلورسيني باستخدام صبغة الأكردين البرتقالية انطباعا واضحا عن الشكل والتركيب الذي يكون عليه الغشاء الحيوي بعد 24 و48 ساعة بالأخص في جرثومة *Staph.aureus* . كما أظهرت نتائج التحري عن الحركة في عزلات جرثومة *Pseudo.aeruginosa* قابلية جميع العزلات على القيام بالحركة السابحة (السوطية) وقابلية (80%) من العزلات على القيام بالحركة الاهتزازية (الشُعيرية) وهي عوامل مُهمة في بناء الغشاء الحيوي.

أظهرت نتائج التحري الجيني باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المُتسلسل المُتعدد Multiplex PCR عن الجينات المسؤولة عن إنتاج مادة مُتعددة السكريات البينية اللاصقة في النوع *Staph.aureus* مُتمثلة بالأوبرون *icaADBC* امتلاك (94%) ، (75%) و (13%) للجينات *icaA* ، *icaD* و *icaB* على التوالي ، فيما لم تُثبت النتائج امتلاك أية عزلة للجين *icaC* . كما تم التحري عن العديد من جينات اللواصق التي تعرف بمصطلح MSCRAMMs أهمها: *bbp*، *eno* ، *ebpS* ، *clfA*، *clfB* ، *cna* ، *fnbA*، *fnbB*، *fib* وقد أظهرت النتائج امتلاك النسب الآتية من العزلات لهذه الجينات : *bbp* (0%)، *eno* (94%) ، *ebpS* (56%) ، *clfA* (94%)، *clfB* (12%) ، *cna* (81%) ، *fnbA* (69%)، *fnbB* (19%)، *fib* (19%).

توافقت النسب العالية للتحري عن الجينات *icaA* و *icaD* في عزلات النوع *Staph.aureus* الى حد كبير مع النسب العالية للنتائج الموجبة لتجربة أحمر الكونغو مما يدل على الدور الذي يلعبه هذان الجينان في إنتاج السكريات الخارجية اللاصقة للخلايا.

كما أظهرت نتائج التحري الجيني باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المُتسلسل المُتعدد Multiplex PCR عن الجينات المسؤولة عن إنتاج عوامل الالتصاق *PilA*، *PilT*، *SadB* في جرثومة *Pseudo.aeruginosa* امتلاك النسب الآتية من العزلات لهذه الجينات:(90%)*PilA*، (90%)*PilT*، (80%) *sadB* فيما أظهرت نتائج التحري عن الجينات المسؤولة عن إنتاج القشور السطحية (Pellicles) وهي *PelA* و *PelB* انتشارها في (70%) و (90%) من العزلات على التوالي. كما أظهرت نتائج التحري عن الجينات *RhlI* ، *rhlA*، *lasB* وهي الجينات التي غالبا ماتشترك في تصنيع الدهون السُكرية Rhamnolpid المحكومة بنظام التحسس للنصاب أظهرت امتلاك النسب الآتية من العزلات لهذه الجينات: *RhlI* (90%) ، *rhlA* (90%)، *lasB* (70%).

كما أظهرت عزلات النوع *Pseudo.aeruginosa* الفاقدة للجينات *PelA* (الخاص بانتاج السُكريات الخارجية) و *sadB* (بالأخص عندما يُرافقه فقدان في الجين *PilA* ) ضعفا في الغشاء الحيوي الذي تكونه بالمقارنة مع العزلات الموجبة لهذه الجينات.

University of Mosul
College of Sciences

# Phenotypic and Genotypic Investigation of "Biofilm" In *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Different Infections

**Omar Gheyath Mohammed Kassim Hayyawi**

Ph. D. Thesis

**Biology/Microbiology**

**Supervised by**

**Assist. Prof.**
**Dr. Muhsin Ayoub Essa Al-Oqaidy**

**1440 A.H** **2018 A.C.**

# Abstract

The objective of this study was to evaluate the ability of each of two bacterial species *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different clinical specimens to form biofilm using different phenotypic and genotypic methods. Thirty hundred forty-four specimens were collected, during February-April-2016, from resident and outcome patients of Azady hospital (Kirkuk)-Bacteriology unit.

Results showed the isolation and identification of (16) isolates of *Staph.aureus*. These isolates were distributed as follow: (10) from skin infections, (3) from respiratory tract infections, and only one isolate were obtained from blood, urinary tract and vaginal infections. As for *Pseudo.aeruginosa* (10) isolates were diagnosed and distributed between: skin infection (6) isolates, blood infection (2) isolates, and only one isolate from respiratory tract and vagina infections.

Results of phenotypic evaluation of biofilm formed by these bacterial species indicated that the best method for biofilm estimation in *Staph.aureus* was the Congo red agar and Congo red broth methods since (100%) and (63%) of isolates gave strong positive results for each method respectively. In comparison to that *Pseudo.aeruginosa* isolates gave best results for biofilm estimation using tube method since (90%) of the isolates produce clear ability to form biofilm using this method.

Tissue culture plate method TCP was considered as a quantitative method for the biomass measurement of biofilm and also it may be considered as a good indicator value for comparison between both bacterial species. (31%) and (60%) of *Staph.aureus* and *Pseudo.aeruginosa* gave medium to strong ability while (69%) and (40%) of each species showed poor ability to form biofilm respectively.

Light and Fluorescent microscope using safranin and acridine orange, respectively, gave a clear behavior, especially for *Staph.aureus*, of the biofilm shape and structure after 24 and 48 hrs. of growth.

The motility test indicated that all the isolates of *Pseudo.aeruginosa* have the ability to move by swimming (flagellar) motility in comparison with (80%) of these isolates have the ability to move using twitching (pili mediated) motility. Both types of movements are considered as important factors for the building of biofilm.

Screening for the genes responsible for polysaccharide intercellular adhesins in *Staph.aureus* represented by *icaADBC* operon using multiplex PCR technique revealed that: 94%, 75% & 13% of the isolates having *icaA, icaD & icaB* respectively, while no isolate gave positive result for *icaC* gene. Also the screening of many adhesion genes common under the name MSCRAMMs involved: *bbp,eno ,ebpS, clfA, clfB, cna ,fnbA, fnbB, & fib*, revealed the distribution of these genes between the isolates as follow: *bbp* (0%),*eno*(94%) ,*ebpS*(56%), *clfA* (94%), *clfB* (12%) ,*cna* (81%) ,*fnbA* (69%), *fnbB* (19%) *& fib* (19%). The high percentages of *Staph.aureus* isolates containing the genes *icaA, icaD* were compatible to certain extent with the high percentage of positive results obtained for the Congo red experiments which indicate the role of both genes in the production of the polysaccharide intercellular adhesins.

Also the screening for the genes responsible for the production of adhesion factors in *Pseudo.aeruginosa PilA, PilT,& sadB* using multiplex PCR technique proved that the percentage of the isolates containing these genes were (90%), (90%) & (80%) respectively while the results for the genes responsible for the production of the polysaccharide pellicles including: *PelA & PelD* indicated that (70%) and (90%) of the isolates contain each gene respectively. Investigating on the genes mostly required for manufacturing of liposugar (Rhammnolipid), controlled by quorum

sensing system, indicating that the following percentage of isolates: (90%), (90%) and (70%) were positive for the genes: *RhlI, rhlA, lasB* respectively.

Isolates of *Pseudo.aeruginosa* with no *PelA* gene and *sadB* gene were found to be poor in biofilm formation especially when accompanied with the absence of *PilA* gene in comparison with other isolates having these genes.