Effect of Some Antibiotics in Quarum Sensing Factors of Locally Isolated *Pseudomons aeruginosa*

تأثير بعض المضادات الحيوية في عوامل الاستشعار لبكتريا *Pseudomons aeruginosa* المعزولة محلياً.

أ.م.د. ذكرى عدنان جواد حنين زهير علي طالبة ماجستير*
جامعة القاسم الخضراء/ كلية الطب البيطري جامعة كربلاء/ كلية العلوم/ قسم علوم الحياة
*البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الثاني/

المستخلص:

استخدمت 11 عزلة من بكتريا *P.aeruginosa* محلية معزولة من المرضى المصابين بخمج السبيل البولي ومشخصة وفق الاختبارات المظهرية والكيموحيوية ومؤكدة بنظام الـ Api 20 Eوتم اجراء اختبار حساسية العزلات للمضادات الحيوية شائعة الاستخدام وحددت المضادات الاكثر فاعلية وكانت ciprofloxacin (CIP)، amikacin (AK) و imipenem (IPM)على العكس من المضادات Ampicillinو Tetracycline الذين كانت البكتريا حساسة لهما.

تم ايجاد التركيز المثبط الادنى (Minimum inhibitory concentration) للمضادات الفعالة حيث كانت القيم لمضاد الـ CIP تتراوح بين (0.05-64)µg / ml ومضاد الـ (AK) بين (2-128) µg / ml ومضاد الـ (IMP) بين (2-32) µg / ml.

درست بعض عوامل الضراوة التي لها علاقة بالاستشعار البكتيري (Quarum sensing) فكانت جميع العزلات (100%) منتجة للسم حال الدم (Hemolysin) وانزيم حال البروتين (Protease) وكانت منتجة للغشاء الحيوي ولها القابلية على الالتصاق على سطوح الخلايا الظهارية بمعدل يتراوح ما بين (17-51.66) cell / epithelial cell فضلا عن اختبارخاصية كراهية الماء (Hydrophobicity) وفيما يخص حركة العج (Swarming) فقد كانت العزلات جميعها متحركة وتعج الوسط الزرعي بنسب متفاوتة حين تنمو في اوساط ذات نسب غراء بين % (1.5-2.0).

وعند اختبار فعالية المضادات الحيوية بتراكيزها المثبطة الدنيا في عوامل الضراوة المدروسة سلفا وجد ان لها فعالية ملحوظة حيث تدرجت فعاليتها CIP, AK and IMP على التوالي وبذلك فان تأثير االمضاد الحيوي لا يقتصر فقط على قتل او تثبيط نمو البكتريا وانما له تأثير مباشر في عوامل الضراوة لها وغير مباشر في سلوك تلك البكتريا وتكيفها لبيئاتها وعلاقات خلاياها بين بعضها البعض ومع البكتريا الاخرى مما له دور في استشعار البكتريا في بيئاتها.

Abstract:

Eleven local isolates of *P.aeruginosa* from patients suffering from urinary tract infection were used, isolates were identified according to morphological and biochemical tests. The identification was confermed by Api 20 E system. Antibiotic susceptibility testing was done for the isolates to determine the most effective against these isolates. Showed that the most effective antibiotic is ciprofloxacin (CIP) and amikacin (AK) and imipenem (IPM) while most of the isolates were resistant to Ampicillin and Tetracycline. The minimum inhibitory concentration for three different antibiotics were study , and showed MIC values of ciprofloxacin (0.25- 64) µg / ml. While MIC values of amikacin (2 -128) µg / ml. While for the imipenem ranging between (2-32) µg / ml.

Some associated virulence factors of isolates were studied, it is found that the production of Hemolysin by *Pseudomonas aeruginosa* as increased by (100)%, all isolates for two types of bacteria produced for the enzyme protease , also gave (100) %, a positive result for the production of biofilm.

As the selected isolates show the ability to adhesion on epithelial cell surfaces at a rate between (17-51.66) cell / epithelial cell, as well as bacterial cell surface hydrophobicity test. As for the test swarming movement, the study demonstrated the ability of bacteria to swarm on enriched agar plate (1.5-2.0) % agar,as was noted that there is an inverse relationship between the amount of agar and movement swarming fact agar solid hinder the movement of bacteria on the center of nutrient broth . Has also been an effective microbial antibiotics to three in the inhibition of growth and produce virulence factors bacterial isolates . The results indicated that the antibiotics used in the study its effectiveness against isolates studied and graduated effectiveness as follows:

Amikacin,Ciprofloxacin and Imipenem also showed antibiotic good effective in inhibiting virulence factors studied .

المقدمة:

ان نظام اتصال الخلايا البكتيرية ببعضها يسمى بالاستشعار(Quarum sensing (QS) وبواسطته تنظم الخلايا البكتيرية اتصالها مع بعضها البعض او مع البيئة الدقيقة المحيطة بها حيث تنتج تلك الخلايا جزيئات المحفزات الذاتية (Auto-Inducers) وهي اشارات كيميائية تعمل على زيادة التركيز على اساس الكثافة الخلوية [1] ومما تجدر الاشارة اليه ان هذه المحفزات تنظم الجينات المسؤولة عن التشفير للعديد من عوامل الضراوة المهمة في الاستشعار مثل تكوين الغشاء الحيوي Biofilm) (formationواستحثاث الحركة وغيرها مما يحقق لها تنسيق منتظم فيما بينها ومضائقها [2,3].

تستخدم البكتريا الممرضة الانتهازية مثل *P.aeruginosa* قابليتها على الاستشعار البكتيري لتنسّق تشكيلَ الأغشيّة الحيويّة الرّقيقة (Biofilms) ، وحركةَ العج، وإنتاجَ متعددات السكريد الخارجية (EPS) والتجمّعَ الخلوي وغيرها، يمكن أن تنمو هذه البكتريا في المضيف دون أن تؤذيَه، حتى يصلَ عددها إلى عتبة حديّة، تصبح أعدادُها عندها كافية للتغلّب على الجهاز المناعي للمُضيف. وحينئذ، تبدأ بالهجوم، فتشكّل غشاءً حيوياً رقيقا، ما يؤدّي إلى مرض المضيف، بينما يشكّل الغشاء الحيوي الرّقيق طبقة واقية تغطّي التجمّعات البكتيرية [4].

تمتلك بكتريا *P.aeruginosa* العديد من عوامل الضراوة،ومعظم الاخماج التي تحدث بهذه البكتريا تعود إلى قابليتها على الغزو(Invasion)،توليد السموم (Toxinogenic) وقابليتها على الالتصاق البكتيري والأستيطان (Attachment and colonization)،والغزو الموضعي (Local invasion) ،فضلا عن قابليتها العالية للأنتشار داخل جسم المضيف [5,6].

إن وجود الاهلاب (Pili) في هذه البكتريا يساعدها على الالتصاق بالخلايا الطلائية، حيث يتم هذا الالتصاق عن طريق الارتباط الخاص بمستقبلات المانوز أوالكالاكتوز أوحامض السياليك للخلايا الطلائية .ويتطلب استيطان بكتريا *p.aeruginosa* التصاق ألاهلاب (pili) والذي يساعده افراز البكتريا لأنزيمات الـ Protease التي تحطم الـ Fibronectin ممايسهل الارتباط بمستقبلات الاهلاب على الخلايا الطلائية [6].

تنتج السلالات المخاطية كميات كبيرة من الالجنيت (Alginate) الذي يعد عنصراً هاماً في تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm) ،إذ يعد الالجنيت عامل الألتصاق الذي يساعد البكتريا على الالتصاق باهداب الخلايا الطلائية الذي يعمل بالتعاون مع انزيم خارجي آخر وهو (Exoenzyme S) [6,7,8].

يهدف البحث للتعرف على امكانية استخدام المضادات الحيوية ليس فقط في تثبيط نمو البكتريا وحسب وانما في التأثير على تكيف البكتريا في بيئاتها من خلال التأثير في عوامل الضراوة المختلفة لاسيما تلك العوامل التي تشكل مجتمعة مايسمى بالاستشعار البكتيري.

المواد وطرائق العمل

جمعت العينات السريرية من المستشفى بعد الحصول على الموافقات اصوليا واخلاقيا حيث ان البحث مستل من رسالة ماجستير تم اقرارها رسميا من قبل اللجنه العلمية في قسم علوم الحياة وتمت المصادقة عليها من مجلس كلية العلوم أصوليا. استخدمت في هذا البحث 11 عزلة محلية من بكتريا *P.aeruginosa* حيث تم عزلها من مرضى مصابين بخمج السبيل البولي Urinary tract infection و شخصت العزلات البكتيرية إعتماداً على مصنف بيرجي [9] وذلك من خلال التعرف على الخصائص الزرعية والمظهرية وبإستخدام الاختبارات الكيموحيوية والفسلجية ووفق كل ماجاء به كل من [10,11]. كما وتم تأكيد التشخيص بأستخدام نظام Api 20E في تشخيص البكتريا المعوية(Bio- Merieux). أختبرت حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية المختلفة بطريقة وفقا لـ [12].

أتبعت طريقة التخافيف المضاعفة المتسلسلة لحساب التركيز المثبط الادنى للمضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة الحالية اعتماداً على الطريقة الموصوفة من قبل [13].

تم التحري عن قابلية العزلات البكتيرية المحلية قيد البحث على انتاج بعض عوامل الضراوة وهي :ظاهرة العج (Swarming) حيث اجري الاختبار وفق [14].،تكوين الغشاء الحيوي (Ability of bacterial isolates to form biofilm layer) واجريت بطريقتين الاولى الطريقة النوعية وفق [15] والتي تمت بصبغ الانابيب الزجاجية بعد تفريغها من المستنبت البكتيري وتجفيفها بصبغة البنفسج البلوري 0.1% ويستدل من تكوين الحلقة البنفسجية على وجود الغشاء الحيوي اما الطريقة الثانية فهي الكمية والتي اجريت [16] وبموجبها تم استخدام الايثانول كقاصر للحلقات البنفسجية وقياس الكثافة الضوئية للاغشية الحيوية المتكونة على طول موجي 630 نانوميتر.،قابلية التصاق البكتريا على الخلايا الطلائية للمجاري البولية حيث أتبعت طريقة (Adhesion assay) المذكورة من قبل [17] باستخدام عالق الخلايا الطلائية للانسان المتحصل عليها من الإدرارالوسطي (Mid-stream urine)لاشخاص اصحاء واجري الاختبار بمزج عالق الخلايا البكتيرية مع الخلايا الطلائية وعمل الشرائح وفحصها بالمجهر الضوئي.والخاصية الكارهة للماء Cell Surface Hydrophobicityاذ أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل [18] .

تم تحليل النتائج احصائياً وفق طريقة تحليل التباين (ANOVA) بأستخدام برنامج التحليل الاحصائي Statistical Analysis Systemوقورنت النتائج بأستعمال اختبار L.S.D [19].

النتائج والمناقشة:

تضمنت الدراسة إستعمال مضادات حيوية شائعة الأستعمال والتي شملت كل من مضاد Ampicillin (AM) و Imipenem (IPM) وCefotaxime (CTX) وCeftazidime (CAZ) التي تعمل على تثبيط الجدار الخلوي (Cell wall inhibition) أما المضادات الحيوية المثبطة لتصنيع الأحماض النووية (Nucleic acid synthesis inhibition) فشملت كلاً من مضاد(NA), Nalidixic acid Nitrofurantoin (F) و Ciprofloxacin (CIP).بينما كان عمل مضاد (Ak Amikacin) وTetracycline (TE) على تثبيط تصنيع البروتينات (Protein synthesis inhibition). في حين كان مضاد Polymyxin مثبطا للغشاء السايتوبلازمي للخلية البكتيرية .

أظهرت جميع العزلات مقاومة لأكثر من مضاد حيوي واحد (جدول1) ، ولعل الاستخدام الواسع والعشوائي أدى إلى ارتفاع المقاومة المتعددة ضد المضادات الحيوية ، ويعود السبب إلى امتلاك العزلات البكتيرية مقدرة على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESβLs) [20] .كما تعزى المقاومة لامتلاك البكتريا لأنظمة مضخات الدفق (Efflux-pump system) أومن خلال التحويرفي حاجزالنفاذية (Alteration in permeability barrier) للغشاء الخارجي وبالتالي يصعب دخول المضاد إلى داخل الخلية البكتيرية [21] . لاسيما ان العزلات أبدت حساسية عالية تجاه المضاد الحيوي Imipenem،

أما بالنسبة لمضادي Tetracycline و وCefotaxime فقد أظهرت النتائج مقاومة العزلات لهذين المضادين، في حين وجد [22] الذي أكد على أن المضاد الحيوي Cefotaxime ذوفعالية تثبيطية مطلقة % 100 لـ 50 عزلة من *P. aeruginosa* .وتعزى مقاومة العزلات لمضاد Cefotaxime نتيجة لأفرازها لأنزيمات السيفالوسبورينات (Cephalosporinase)المحطمة لهذا المضاد بالإضافة الى نفاذيته المحدودة داخل الخلية البكتيرية [23] . أما مقاومة مضاد Tetracycline فتعزى إلى وجود بلازميدات تشفر إلى آلية المضخة الباعثة(Efflux- pump)التي تعتبر أهم آليات المقاومة لهذا المضاد والتي لها القدرة على الانتقال بالاقتران أو عن طريق التنبيغ بالعاثي (Conjugation or transduction)، وتشفرهذه البلازميدات بالإضافة إلى ذلك إلى مقاومة مضادات Aminoglycosides و Chloramphenicol و Sulfonamideلذا تُعد مقاومة Tetracycline مؤشراً إلى المقاومة المتعددة لمضادات الحياة [24] . وقد أظهرت مضادات Aminoglycosides فعالية عالية جداً ضدالعزلات المدروسة حيث كانت العزلات حساسة لمضادات Amikacin بنسبة 100 %.كان مضاد Ciprofloxacin وهو من مجموعة Fluoroquinolones من المضادات الفعالة ضد العزلات المدروسة حيث بلغت نسبة الحساسية 98%

أظهرت العزلات قيد البحث مقاومة للمضاد Nitrofurantoin بنسبة 100% بالرغم من أن هذا المضاد قد استخدم منذ زمن بعيد بوصفه مضاداً فعالاً في علاج خمج السبيل البولي [24] ، إلا إن الإستعمال الواسع والعشوائي للمضاد في المستشفيات أدى إلى ظهور سلالات مقاومة للمضاد فضلاً عن سميته العالية ، وهذا يؤيد مع ما توصل اليه [25] إذ كانت نسبة المقاومة للمضاد Nitrofurantoin (85 %).في حين بلغت حساسية المضاد لبكتريا *P.aeruginosa* 90.9 % كما جاء في دراسة [26] .

وقد تم إختبار جميع عزلات *P.aeruginosa* تجاه عدد من المضادات الحيوية الشائعة الاستخدام في معالجة خمج السبيل البولي(UTI)، وأظهرت العزلات حساسية تجاهها ،وهي مضاد Amikacin وCiprofloxacin وImipenem وغيرها. وأعتمدت نقطة التوقف (Break point) الموضوعة من قبل [12]. يعرف التركيز المثبط الأدنى بأنه أقل تركيز يمنع النمو المرئي للبكتريا بعد حضانة 18 ساعة بدرجة حرارة 37م [27] وعد هذا التركيزكأساس لحساب الاستجابة اذ هوالتركيز الأمثل الذي يمكن أن يصله المضاد ليوفر أعلى حد للمعالجة [28] . وتم تحديد MICs بطريقة التراكيز المضاعفة المتسلسلة بطريقة الأطباق وكما ورد في طرائق العمل.

تختلف قيم MIC باختلاف الأجناس البكتيرية وأنواعها وسلالات النوع الواحد. تراوحت قيم MIC لعزلات بكتريا *P.aeruginos* a والتي ابدتها لمضاد (Ciprofloxacin) بين (0.25 - 8) مايكروغرام / مل (الجدول 2) ولوحظ إن أكفأ هذه المضادات هو Ciprofloxacin ،وهذا يتفق مع الكثير من الدراسات السابقة بوصف هذه المضادات علاجاً فعالاً ضد بكتريا *P.aeruginosa* [29.30] مع ان لها بعض الأضرار الجانبية فمضاد Gentamicin هو سام في حالات وجود خلل وظيفي في الكلية ،ومضاد Ciprofloxacin والمضادات الأخرى التي تنتمي الى مجموعة Fluroquinolones وجد إنها قد تسبب الغثيان، والصداع، واضطرابات المعدة والاستخدام الطويل لها قد يسبب اضراراً في المفاصل لذلك نادراً ما يعطى للأطفال [31].

الجدول (1) : حساسية عزلات (*P . aeruginosa*) المعزولة من الأشخاص المصابين بخمج السبيل البولي للمضادات الحيوية.

المضادات العزلات	CIP	AK	IPM	TE	Pb	CAZ	CTX	AM	NA	F
Pa 1	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R
Pa 2	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R
Pa 3	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R
Pa 4	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R
Pa 5	S	S	S	R	S	M	R	R	R	R

R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	Pa 6
R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	Pa 7
R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	Pa 8
R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	Pa 9
R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	Pa10
R	R	R	M	S	S	R	S	S	S	Pa 11

مقـــــاومة R.   متوسطة المقــــــاومة M .   حســــاســــةS.

CIP=Ciprofloxacin   AK=Amikacin   IPM=Imipenem
TE=Tetracycline   CAZ=Ceftazidim   CTX=Cefotoxime
Pb=Polymyxin   F =Nitrofurantoin   AM=Ampicillin

الجدول (2) : التراكيز المثبطة الدنيـا (MICs) لثلاثة مضادات حيوية مستخدمة ضد العزلات البكتيريــة قيد البحث.

MIC بالمايكروغرام / مليلتر			اسم المضاد رمز العزلة
الاميبينيم Imipenem	الاميكاسين Amikacin	السبروفلوكساسين Ciprofloxacin	
2	2	0.25	Pa 1
0.5	32	2	Pa 2
4	4	0.25	Pa 3
2	64	2	Pa 4
1	8	4	Pa 5
2	64	2	Pa 6
2	32	0.25	Pa 7
0.5	16	8	Pa 8
2	64	2	Pa 9
2	128	0.25	Pa 10
2	64	1	Pa 11

تتباين الوسائل المتبعة للكشف عن انتاج الغشاء الحيوي فيما بينها والتي تتمثل بطريقة الأنابيب (Tube Method) وطريقة المطياف الضوئي. إذ بينت نتائج الدراسة الحالية قابلية العزلات على انتاج الغشاء الحيوي وبكميات كبيرة، إذ يساهم الغشاء الحيوي في التصاق البكتريا في مكان الاصابة وهذا مهم لاحداث المرض [32,33] .

يوضح الجدولين (3 و 4) نتـــــائج اختبار الكشف عن تكـــوين الغشـــــاء الحيوي بأستخدام طريقـة المطياف الضوئي إذ بين [34] إن هذه الطريقة هي الأكثر حساسية وسهولة للكشف عن تكوين الغشاء الحيوي في سلالات العزلات المدروسة وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية ، وإن الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي يعتمد على عدة عوامل منها الطريقة المستخدمة للكشف و نـــوع الوسـط المستخدم وظـروف الحضن.كما أوضح [35] بأن طريقة المطياف الضوئي هي أداة مهمة في دراسة المراحل المبكرة في تكوين الغشاء الحيوي لأن هذه الطريقة تستخدم ظروفاً ثابتة، ويمكن أن تكون فعالة في تحديد ودراسة العديد من العوامل الاساسية لتكوين الغشاء الحيوي مثل :الاهداب و الاسواط واللاصقات و الانزيمات وغيرها،إضافة إلى الجينات التي تلعب دوراً مهماً في انتاج السكريات المتعددة الخارجية .كما ان نتائج الدراسة الحالية تتفق مع ماتوصل اليه [16] إذ بينّ بأنّ طريقة المطياف الضوئي باستخدام وسط مرق فول الصويا (TSB) مضافاًإليه 1% كلوكوز كانت الأكثر كفاءة ودقة من طريقة أحمر الكونغو في الكشف عن تكوين الغشـاء الحيوي والقدرة على الالتصـاق .وقد بين[36] أن البكتريا التي تنمو في الأغشية الحيوية تكون ذات اختلافات مظهرية متنوعة عن السلالة الأصلية التي تنمو في المزرعة بشكل حر،وتشمل هذه الاختلافات تغيرات في الحركة وزيادة انتاج LPS إضافة إلى زيادة مقاومة المضادات الحيوية.

أظهرت النتائج في طريقة الانابيب بأن انتاج الغشاء الحيوي كان بنسبة 100 % لكل من عزلات *P.aeruginosa* ،اما في طريقة المطياف الضوئي فقد تميزت أغلب عزلات بكتريا *P.aeruginosa* بأنها منتجة قوية للغشـــــاء الحيوي في الوسط المعزز بالكلوكوز، وتميزت هذه الطريقة بالسرعة والكفاءة العالية كما انها تتطلب حداًأدنى من المعدات .وكانت نتـــــائج هذه الدراسة متفقة مع ماوجده [37] .

الجدول (3) : إنتـــاج الغشـــــاء الحيوي من العـــزلات المدروســـة بالطريقـــة النوعيـة

العزلات البكتيريـــة	إنتـــاج الغشـــاء الحيوي
Pa 1	+
Pa 2	+
Pa 3	++
Pa 4	+
Pa 5	++

+ ذات انتاج متوسط للغشاء الحيوي ++ ذات انتاج قوي للغشاء الحيوي

الجدول (4) معدل قيم الأمتصاص لتكوين الغشاء الحيوي للعزلات المدروسة .

العزلات	معدل الكثافة الضوئيـة ± الانحراف المعياري
Pa 1	0.390±0.03
Pa 2	0.288 ±0.007
Pa 3	0.567±0.03
Pa 4	0.434±0.01
Pa 5	0.533±0.003
L.S.D.	0.044

L.S.D: أقل فرق معنوي عند مستوى إحتمالية (0.05)

تُعد قابلية البكتريا على الالتصاق من عوامل الضراوة المهمة في احداث أول خطوة في امراضية البكتريا،حيث تظهر النتيجة الموجبة من خلال حصول التصـــــاق الخلايا البكتيرية وبشدة على سطوح الخلايا الطلائية (المعزولـة من إدرار أشخاص غير مصابين بخمج السبيل البولي)، إذ ظهرت خلايا البكتريا بشكل مفرد أو بشكل تجمعـــات ملتصقة على الخلايا الطلائية حيث اظهرت العزلات المنتخبة القدرة على الالتصاق على سطوح الخلايا الظهـارية بمعدل يتراوح بين (17- 51.66) خلية بكتيرية / خلية ظهارية ، وكما هو موضح في الجدول (5) .

إن الالتصاق البكتيري مع أنسجة المضيف هو تداخل خاص بين سطح البكتريا ومستقبلات خلية المضيف ولابد من الاشارة الى الالتصاق الانتهازي (Opportunistic adherence) الذي يحدث بعد تغيير النسيج ببعض الطرق . وإن بكتريا *P. aeruginosa* ليست المستوطن الطبيعي للأنسجة الحيوانية ولاهي كائن ممرض طبيعي (Natural pathogen) إذ أنها تمثل بصورة عامة كائناً انتهازياً يسبب المرض في المضائف ذات النقص المناعي. وبسبب انتهازية هذه البكتريا فانها تلتصق مع الخلايا فقط بعد تحطيمها ، وبسبب قابليتها العالية على الالتصاق فأنها تعمل على تكوين المستعمرات البكتيرية . كما وان هنالك ارتباطاً وثيقاً بين حركة العج والالتصـــاق اذ أن الخلايا المسببة لحركـــة العـــج (Swarming cells) تزال من مجرى البول بسبب تدفق الإدرار وذلك لامتلاكها عدداً كبيراً من الأسواط التي تعيق الالتصاق [38] .

الجدول (5): معدلات التصاق العزلات قيد الدراســـة على الخلايـــا الطلائية البوليـــة.

العـزلات	معدل التصاق البكتريا /خلية طلائية
Pa 1	31.33 ± 0.19
Pa 2	34.33 ± 5.38
Pa 3	19.0± 0.57
Pa 4	17.0 ± 0.0
Pa 5	40.0±0.57
L.S.D.	2.76

L.S.D: أقل فرق معنوي عند مستوى إحتمالية (0.05)

أظهرت نتائج التحليل الاحصائي ANOVA Test للنتائج المبينة في الجدول (6) وجود فروقات معنوية بين العزلات المختبرة وتراكيزالأكـــــارالمضـــــاف إلى الوسط الزرعي كما توجد فروقات معنوية نتيجة للتداخل بين هذين العاملين . إذ لوحظ تثبيط واضح لظـاهرة العـج الذي تم تقديره بقياس أقطار حلقات النمو لظـــاهرة العجز

ان حركة العج لبكتريا *P. aeruginosa* هي عبارة عن تكيف معقد استجابة للظروف البيئية، أكد ذلك [39] عند تنميته للبكتريا في وسط الحركة (Swarm agar) الحاوي على 0.5% من مادة الآكار، حيث تتغير بواسطة هذا التكيف العديد من عوامل الضراوة ومقاومتها للمضادات الحيوية.

الجدول (6) : أقطار حركة العج لبكتريا *P. aeruginosa* النامية على وسط حاو على تراكيز متدرجة من الاكار .

العزلات		تركيز الأكـار في الوسط الزرعي (ملغم/مل)						المعدل
		2.0	1.9	1.8	1.7	1.6	1.5	
Pa1	معدلات أقطار حركة العج(ملم)	10.000	11.333	11.000	11.667	11.000	13.000	11.333
Pa2		10.667	12.000	13.000	11.667	12.000	13.667	12.167
Pa3		13.000	11.667	11.667	14.000	15.333	16.667	13.722
Pa4		10.000	9.667	11.000	11.667	13.000	14.000	11.556
Pa5		10.000	12.000	12.667	13.333	14.667	17.000	13.278
L.S.D(0.05)		2.808						1.146
المعدل		10.733	11.333	11.867	12.467	13.200	14.867	
L.S.D(0.05)		1.256						

تم في البحث استعمال الزايلين (Xylene) كمذيب عضوي لتقدير الخاصية الكارهة للماء وذلك بقياس الامتصاص الضوئي للطبقة المائية على طول موجي 600 نانوميتر بالاعتماد على طريقة الـ hydrocarbon adherence التي ذكرها [40] اذ يشيرالجدول (7) إلى ألفة البكتريا للطورالمذيب العضوي (Xylene) المستخدم في الدراسة الحالية إعتماداً على الخاصية الكارهة للماء لسطح العزلات البكتيرية، إذ إن ارتفاع الـ Hydrophobicity للبكتريا يجعلها أقل ألفة للطور المائي ،إذ يبين الجدول وجود اختلافات في سطح البكتريا من حيث الخاصية الكارهة للماء فكانت العزلات البكتيرية متباينة من حيث ألفتها للطورالمائي.

وقد أشارت الدراسات السابقة إلى وجود اختلافات واضحة في نسبة الشحنات السالبة والخاصية الكارهة للماء إعتماداً على نوع البكتريا وطبيعة جدارها الخلوي ونوع الوسط الزرعي الذي نمت عليه البكتريا.وقد بين [41] إن البكتريا التي تمتلك سكريات متعددة طويلة لها القابلية على الالتصاق في أنسجة المضيف بشكل كبير جداً، كما أشار الباحث نفسه إلى أن البكتريا تمتلك خاصية محبة للماء في طورها اللوغارتيمي أكثرمن طورالثبات ويعزى ذلك الى وجود السلاسل السكرية المتكونة بين جدار البكتريا والغشاء البلازمي بينما أشار [42] إلى أن السكريات المتعددة الدهنية تزيد من الخاصية المحبة للماء في حين تزيد الأسواط من الخاصية الكارهة للماء [43] وبشكل عام تكون البكتريا السالبة لصبغة غرام محبة للطور المائي [44].

الجدول (7) : النسبة المئوية للخاصية الكارهة للماء لسطح العزلات المدروسة المنماة على الوسط الزرعي المغذي السائل.

العـزلات	الخاصية الكارهة للماء (Hydrophobicity%)
Pa 1	61.36±0.72
Pa 2	58.18±1.46
Pa 3	30.53±0.33
Pa 4	56.73±1.87
Pa 5	45.51±76.29
L.S.D.	9.58

L.S.D: أقل فرق معنوي عند مستوى إحتمالية (0.05)

من المعروف إن إنتــاج الغشاء الحيوي من قبل العزلات البكتيرية يُعد من عوامل الضراوة المهمة في حالة إصابات المجاري البولية [45] وُجد من خــلال الدراسة إن لهذه المضادات تأثيراً في قابلية الخلايا في انتاج الغشـاء الحيوي ، فقد اظهر التحليل الاحصـــائي وجود فــروق معنويــة بين الأغشية الحيويـة للخلايا العالقة ومجتمعاتها والعائدة الى الكـــائن المجهري نفسه عند التعرض لتلك المضادات الحيوية .

إن نتائج هذا البحث متطابقة مع ماتوصل اليه [46]عندمـــا حددوا تأثير تراكيز المضادات الحيوية ضد الغشـــاء الحيوي و بينوا إن لمضــاد Ciprofloxacin تأثيراً قوياً في اختزال تكوين الغشاء الحيوي المنتج في جميع العزلات التي قاموا بدراستها.

إن انتاج الهيمولايسين والخمل Type 1 ترتبط إلى حـــد كبيرمع انتاج الغشـــــاء الحيوي وهذا يعزى إلى الاهمية البـــالغة التي تقدمهـا الخمل من هذا النوع في الخطوات الاساسية لتكوين الغشـاء الحيوي لطالما اعتبرالـ(Biofilm) عامل ضراوة أساسي يســـاهم في الإصابة المرتبطة بمختلف الأجهزة الطبية وتسبب عدوى المستشفيات . يتضح من النتائج الموضحة في الجدول(8) ان تأثير المضـــادات المستخدمة كان ايجابياً على تكوين الغشــاء الحيوي إذ بزيادة تركيز المضاد يقل مستوى تشكيل الغشاء [47] .

أُختبر تأثيرالتراكيز تحت المثبطة للمضادات الحيوية المستخدمة في الاختبار في قدرة بكتريا *P.aeruginosa*على الالتصاق بالخلايا الظهارية المبطنة للمجــاري البولية من خلال إضافة هذه التراكيز إلى الوسط المنماة فيه العزلات المدروسة .

تبين من نتائج الدراسة الحالية ان لمضاد Ciprofloxacin فعالية جيدة في تقليل معدلات التصاق الخلايا البكتيرية على سطوح الخلايا الطلائية ، وجـاءت النتائج متفقة مع [48] الذي أشارإلى أن تأثير التركيز تحت المثبط للمضـــاد المذكور قد خفض من قــابلية بكتريا *P.mirabilis* على الالتصاق بالخلايا الظهــارية . أما بالنسبة للمضـــاد الحيوي Amikacin فلقد كـانت الفعالية أقل في تثبيط الالتصاق البكتيري ، ويفسر تأثير الأميكــاسين المثبط للالتصاق الكتيري بقابلية هذا المضاد المثبط لتصنيع البروتين على إحداث نقصٍ في الاهــلاب (pili) التي تدخلُ في تركيب الخمل. وبالتـــالي تشكل خملٍ غير وظيفي . وجـاءت النتائج متفقة [49] ،وتشير دراسة [50] إلى أن الأميكـــاسين يُحدث تبدلاتٍ بنيويةٍ في الخليةً الكتيرية تتمثلُ بالخلايا الخيطية) (Filamentous ghostالتي تمتلك فرصةً للالتصاق ضعيفةً أومعدومةً وتؤثركلٍ هذه العوامل في تثبيط الالتصاق البكتيري.

يتبين من جدول التحليل الاحصـــائي (10) أن هنالك فروقاًمعنوية للتراكيز المستخدمة ، حيث اختلف تأثير التراكيز معنوياً عن معاملة السيطرة كما اختلف بعض منها فيما بينها معنوياً. سُجلت أعلى فعالية تثبيط للمضـــــادات IPM ,AK , CIP بتركيز(2/1) مايكروغرام / مل بمعدل قطر تثبيط قدره (2.667) (4.000)(5.000) ملم للمضادات المذكورة على التوالي لعزلات *P.aeruginosa* . وعند اجراء المقارنة الاحصائية لمعدلات اقطار التثبيط مع معاملة السيطرة نجد أن الفروقات المعنوية أوضحت بأنها متباينة بأختلاف التراكيز والعزلات المختبرة. بينما كــانت معدلات أقطارحركة العج للعزلات المدروسة باستخدام التركيز (8/1) مايكروغرام / مل قريبة نوعاًما من معدلات أقطار السيطرة.

وأظهرت نتائج الدراسة بأن للتراكيزتحت المثبطة للمضادات الحيوية القابلية على تثبيط حركة العج وبنسب متفاوتة. وعلى الرغم من أن هذه التراكيز ليس لها القـــابلية على قتل البكتريا ، لكنها تستطيع أن تحدث تغيرات في خواصهـــا الكيميـاوية وأيضاً تتداخل مع بعض الوظـــائف التي تقوم بهــا البكتريا [51] .

بين [52] في دراسة لهم عن تأثير التراكيز تحت المثبطة للمضادات الحيويــة المـــــاكروليدات على التعبير الجيني لإنتـــاج الأســـواط في بكتريا *P.mirabilis* و *P.aeruginosa*.

بأستـخدام طــــرائق التحليــــل الجزيئي(Molocular analysis) لاحظـــوا أن تثبيط حركة العج بوساطة هذه المضادات ذو علاقة وثيقة مع فقدان البكتريا قدرة التشفير لتصنيع بروتين الفلاجلين كما بينوا ان هذه التراكيز ذات فائدة في علاج الإصابات بهذه البكتريا ، إذ تكون آلية عملها بتأثيرها على عملية إنتاج الطاقة اللازمة لحركة الاسواط ،أومن خلال إيقاف عملية الترجمة لتصنيع هذا البروتين في تحت الوحدة الرايبيوسومة (50s).

ويثبط المضاد Amikacin نمو الكائن المجهري عن طريق ارتباطه بمستقبلات البروتين المحددة على الرايبوسوم ومنع البروتين، وهذه المضادات الحيوية يمكن أن تؤثر في نشاط الهيئات التنظيمية التي تتحكم في التعبير عن عوامل الضراوة وحركة العــج . وتتفق نتـــائج الدراسة مع [53] في دراسـه له وبأستخدام تراكيز منخفضة (0- 4) مايكروغرام /مل من Amikacin لم يلاحظ أي تأثير في ظـاهرة العج باستخدام هذه التراكيز ولكنه يثبط باستخدام تركيز عال (8- 16) مايكروغرام /مل منه.

الجدول (8) : تأثير التراكيز تحت المثبطة للمضـادات الحيوية في تكوين الغشاء الحيوي للعزلات المدروسة .

المضاد الحيوي / التركيز µg/ml	Ciprofloxacin (CIP)	Amikacin (AK)	Imipenem (IPM)
0	0.417	0.417	0.417
1/8	0.391	0.392	0.426
1/4	0.297	0.281	0.313
1/2	0.103	0.103	0.205
0.037 L.S.D (0.05)			

L.S.D: أقل فرق معنوي عند مستوى إحتمالية (0.05)

الجدول (9) : تـــأثير التراكيز تحت المثبطة للمضادات الحيويـــة في التصاق خلايـــا بكتريا *p. mirabilis* و *P.aeruginosa* بالخلايا الظهـــارية المبطنة للمســـالك البوليـــة.

Imipenem (IPM)	Amikacin (AK)	Ciprofloxacin (CIP)	المضاد الحيوي التركيز µg/ml
19.667	19.667	19.667	0
15.333	19.000	11.333	1/8
12.667	13.000	7.333	1/4
11.333	10.000	2.333	1/2
2.447 L.S.D (0.05)			

L.S.D: أقل فرق معنوي عند مستوى إحتمالية (0.05)

الجدول (10) : تـأثير التراكيز تحت المثبطة للمضادات الحيوية في حركة العج في بكتريا *P.aeruginosa* .

Imipenem (IPM)	Amikacin (AK)	Ciprofloxacin (CIP)	المضاد الحيوي التركيز µg/Ml
18.667	18.667	18.667	0
16.667	13.667	11.333	1/8
12.000	11.000	7.667	1/4
5.000	4.000	2.667	1/2
2.240 L.S.D (0.05)			

L.S.D: أقل فرق معنوي عند مستوى إحتمالية (0.05)

مما تقدم تبين ان للمضادات الحيوية بتراكيزها المثبطة الدنيا تأثير كبير في عملية الالتصاق وتكوين الغشاء الحيوي وكذلك في حركة العج وحيث ان هذه العوامل مترابطة مع بعضها ومؤثرة في تكيف البكتريا في بيئتها فبذلك تؤثرالمضادات الحيوية بصورة غير مباشرة في نظام اتصال البكتريا مع بعضها في بيئتها وما يسمى بالأستشعار البكتيري.

كمحصلة ومن خلال عدد كبير من البحوث المنشورة والتي تناولت موضوع الحد من ظاهرة الاستشعار باستخدام شتى الوسائل، وضع (54) شبكة معلوماتية حول الموضوع يسهل الوصول اليها واضافة الفرضيات البحثية.

المصادر:

1. Dixon, E.F. and Hall, R.H. (2015). Noisy neighbourhoods; quorum sensing in fungal-polymicrobial infections. Cell Microbiol. 17:1431-1441[Internet]. Available from http:// doi.wiley.com/10.1111/cmi.12490.
2. Grandclément, C.; Tanniées, M.; Moréra, S.; Dessaux, Y. and Faure, D.(2016). Quorum quenching: role in nature and applied development. FEMS Microbiol. Rev. 40:86-116.
3. Knecht, I., O´ Connor, G.; Mittal, R.; Liu, X.; Daftarian, P.; Deo, S. and Daunert, S. (2016). Serotonin activates bacterial quorum sensing and enhances the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in the host. EBioMedicine.9: 161-169.
4. Lewis Sauer, K.; Camper, A.; Ehrlich, G.; Costerton, J.and Davies, D. (2002). "*Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm". Journal of Bacteriology 184 (4): 1140 –1154.
5. Westman , E.L. ; Matewish , J.M. and Lam , J. S. (2010) . Pathogenesis of bacterial infections in animals. In: Edited by Gyles, C.L. ; Prescott , J. F. ; Songer , J.G. and Thoen , C.O. 4th ed. , John Wiley and sons, Inc. publication.
6. Hoiby , N. and Koch, C. (1998). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and Its Infection , Indian Journal of Medical Microbiology , 30 (1):76–80.

7. Todar , K. (2004) . *Pseudomonas aeruginosa* internet explorer . Todar's online text book of bacteriology .
8. Govan , J.R.W. (1996). *Pseudomonas , Stenotrophomonas, Burkholderia* . In : practical medical microbiology 14th ed. by : Collee , J.G. ; Mamion , B.P. ; Fraser, A.G. and Simmons ,A.P. : 413-423 .
9. Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994). Bergey's manual of determinative Bacteriology. 9th edition. USA.
10. Collee, J.G.; Marmion, B.P.; Fraser, A.G.and Simmons,A.(1996): Mackie and MacCartney Med.Micr. .14th ed., The ChurchillLivingstone. Inc. USA.
11. Macfaddin, J.F. (2000): Biochemical tests for identification of medical bacteria .1st ed., the Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
12. CLSI (2012). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition . 32(1). Clinical Laboratory standards institute .Wayne.PA, USA
13. Baron, E. j., and Finegold , S. M. (1994) : Microorganism encuntered in urinary tract in Baily & Scott's Diagnostic Microbiology (9th) ed. Mosby company U.S.A.
14. Liaw ,S.J.;Lia ,H.C.;Luh,K.T. and Wang ,W.B.(2000). Inhibition of virulence factor expression and swarming differentiation in *P.mirablis* by P-nitrophenylglycerol .J.Med.Microb.49(8):725-731.
15. Mathur , T.; Singhal , S.; Khan, S.; Upadhyay, D.J.; Fatma, T. and Rattan, A.(2006). Detection of biofilm formation among the clinical Isolates of *Staphylococci*: an evalution of three different Screening methods. Indian J. of Med. Micr. 24 (1):25-59.
16. Bose, S. ; Khodke, M. ; Basak, S. ;and Mallick, S. K. (2009). Detection of biofilm producing *Staphylococci* : need of the hour. J. Clin. Diag. Res., (3) : 1915-1920.
17. Forbes,B.A. ;Sahm, D.F. and Weissfeld ,A.S.(2002):"Baily&Scott s". Diagnostic Microbiology. 11th edition.Mosby,Company , Baltimore .USA.
18. Rosenberg, M.; Gubnick, D.and Rosenberg, E.(2008). Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell surface hydrophobicity. FEMS Microbiol .,(9):29-33.
19. Steel,R.G.D.;Torrie,J.H.and Dickie ,D.A.(1997).Principles and procedures of statistics-biometric approach.3rd edition Mcgraw-hill publishing company.Toronto.
20. Mariagrazia,P.;Bernardetta,S.;MariaRosaria,M.;Letizia,R.M.;Ciro,B.,Alessandro,Z.;Gian,M.,an d Gianfranco,A. (2000): TEM-72,a New Extended-spectrum beta-Lactamase detected in *Proteus mirabiis* and *Morganella morgani* in Italy,J. Antimicrobial Agent and Chemotherapy44(9):2537- 2539.
21. العبيدي، شهباء حميد مجيد (2001) . دراسة وراثية لمقاومة بكتريا *Pseudomonas eruginosa , Proteus spp*. المعزولة مـــن الجـروح والحروق لعدد من مضادات البيتالاكتام القديمة والحديثة.رسالة ماجستير- الجامعة المستنصرية.
22. Murray , P.R. (1980) . Activity of cefotaxime – aminoglycoside combinations against aminoglycoside –resistant *Pseudomonas*. Antimicrob.Agent . Chemother . 17 (3): 474-476.
23. Georgopapadakou, N. H., Bertasso,A.; Chan, K.K.; Chapman, J.S.; Cleeland,R.; Cumming ,L.M.;Dix,B.A.and Keith,D.D.(1989).Mode ofa ction of the dual-action cephalosporin Ro 23-9424. Antimicrob. Agents Chemother. 33(7):1067–1071.
24. Katzung, B.G. (2001). Basic and clinical pharmacology. 8th (ed) edition Lange Medical books, Mcgraw-Hill.774-801.
25. خلف ، صبحي حسين - كاظم، بشرى علي (2012) . دراسة عن تنميط جرثومة *Proteus mirabilis* المعزولة من اصابات المسالك البولية . مجلة بغداد للعلوم ، المجلد 9 ، العدد (2) ، الصفحة : 229 – 235 .
26. Kumar, V.; Sen, M. R.; Anupurba, S.; Prakash, P.and Gupta R.(2011).An observational study of metallo beta lactamase production in clinical isolates of *pseudomonas aeruginosa*: an experience at tertiary care hospital in north india. Indian j. Prev. Soc. Med; 42(2):173-176.
27. French, GL. ; Shannon, KP. And Simmons, N. (1996). Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and beta – Lactam – beta – Lactamase

inhibitor combinations hyperproduction of SHV-5 beta lactamase. J. Clin. Microbiol. 34 (2): 358-363.

28.Harnett,S.J.;Fraise,A.P.;Andrews,J.M.;Jevons,G.;Brenwald,N.P.andWise,R.(2004): Comparative study of the in vitro activity of a new fluoroquinolones,ABT-492. J.Antimicrobiol. Chemother.,53:783-792.

29. Vessillier, S. ; Delolne, F. ; Bernillon, J. ; Saulneir, J. and Wallach, J. (2001). Hydrolysis of glycin – containing elastin pentapeptides by LasA, Metallo-Beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* . Eur. J. Biochem. 268 : 1049 – 1057.

30. Hauser , A. and Padman, S. (2005) . Severe *Pseudomonas aeruginosa* infections : Tacking the conundrum of drug resistance . Postgard . Med . 117 (1) : 41-48 .

31. Brooks, G. F. ; Butel, J. S. and Morse, S. A. (1998). Medical Mirobiology 21st ed. Appleton and Lange. Stamford United States el America: 145 – 176 , 231 – 233.

32. Japoni, A.; Farshad, S. and Alborzi, A. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: Burn Infection, Treatment and Antibacterial Resistance. Iranian Red Crescent Medical Journal. 11(3):244-253.

33. Salih ,M.T. and AL-Ani ,N. F.(2013). Microbiological Aspects in Biofilm Produced by some Uropathogens Isolated from Patients with Indwelling Bladder Catheters. Raf. J. Sci. 24(1):1-16.

34. Samie, A. and Nkgau , T.F. (2012). Biofilm production and antibiotic susceptibility profile of *Escherichia coli* isolates from HIV and AIDS patients in the Limpopo Province. Afr. J. Biotechnol.,11(34): 8560-8570.

35. O'Toole, G.; Kaplan, H.B. and Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol., 54: 49-79.

36. Jesaitis, A.J. ; Franklin, M. J. ; Berglund, D. ; Sasaki, M.; Lord, CI.; Bleazard. J.B.; Duffy, J.E.; Beyenal, H.and Lewandowski, Z. (2003). Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Characterization of neutrophil and biofilm interactions. J. Immunol., 171(8):4329-4339.

37. Jones, B.D.; Locatel, C.V.; Johnson, D.E.;Warren,J.W. and Mobley, H.L. (1990). Construction of a urease-negative mutants of *Proteus mirabilis*: analysis of virulence in a mouse model of ascending urinary tract infectionInfect. and Immun. 58(4): 1120-1123.

38. Zunino ,P.; Geymonat ,L .; Allen ,A.G.; Leghani-Fajardo , C. and Maskell , D.J. (2000). Virulence of a *Proteus mirabilis* ATF isogenic mutant is not impaired in amouse model of ascending urinary tract infection. Immuno. Med. Micrrobiol .; 29(2) : 137-143 .

39. Overhage, J.; Bains, M.; Brazeas,M.D. and Hancock,E.W. (2008). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increase production of virulence factors and antibiotics resstance.J. Bacteriol. 190(8):2671-2679.

40. Rosenberg, M.; Gubnick, D.and Rosenberg, E.(2008). Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell surface hydrophobicity. FEMS Microbiol .,(9):29-33.

41. Lawson, A. J.; Chart, H.; Dassama, M. U. and Threlfall, E. J. (2002). Heterogencity in expression of lipopolysaccharide by strains of *Salmonella enterica* serotype typhimurium definitive phage type 104 and related phage types. Lett. Appl. Microbiol. 34(6): 428-32.

42. Oliveira, R.; Azeredo, J.; Teixeira, P. and Fonseca, A.P. (2001). The Role of Hydrophobicity in bacterial adhesion. Bioline :11-22.

43. Obuekwe, C. O.; Al-Jadi, Z. K. and Al- Saleh, E. S. (2007). Sequential hydrophobic partitioning of cells *pseudomonas aeroginosa* gives rise to variants of increasing cell surface hydrophobicity .FEMS Microbiology letter .270(2):214-219.

44. Dickson, J.S. and Koohmaraie, M. (1989). Cell surface charge characteristics and their relation ship to bacterial attachment to meat surface .App. Envir.Microbiology .55(4):832-836.

45. Angela,M.J.;Virgenia,C.L.;David,E.J.;Harry,L.T.M.(2004):Vazualiation of *Proteus mirabilis* Morphotypes in the Urinary Tract:the Elongated Swarmer cell is rarwly observed in Ascending urinary tract infectin ,J. Infec.and Immun., 71(6):3607-3613.

46. Wasfi,R.; AbdEl-Rahman,OA.;Mansour, L.E.;Hanora, A.S.; Hashem, A.M. and Ashour, M. S. (2012). "Antimicrobial activities against bioilm formed by *Proteus mirabilis* isolates from wound and urinary tract Infection , Indian Journal of Medical Microbiology , 30 (1):76–80.
47. Pruss, B., M.; Besemann,C.; Denton ,A. and Wolfe, A.J. (2006) A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 188: 3731-3739.
48. Jabalameli, F.; Malekadeh, F.; and Mirsalehian, A. (2005): Effects of Antibiotic on Adhesion and Invesion of *Proteus mirabilis* .J.Acta. medical Iranica 43(1):55-59.
49. AL Hmesh,M. and AL Amouri,M.(2013) . Empirical study of antiadherent of chemotherapeutic compounds used in the treatment of patient wih urethral catheters.Syrian cli.lab.association , 9(6) : 1-9.
50. Wojnicz , D. ; Klak , M . ; Adamski , R . and Jankowski , S.(2007). Influence of Subinhibitory Concentrations of Amikacin and Ciprofloxacin on Morphology and Adherence Ability of Uropathogenic Strains.Folia Microbiol. ,52 (4); 429-436.
51. Fonseca, A.P.;Extremina, C.;Fonseca, A.F. and Sousa J.C.(2004): Effect of subinhibitory concentation of Piperacillin / tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*, J.med.Microbiol. 53(9):903-910.
52. Kumiko, K.;Yoshitsugu, I.;Tado, H.;Takafumi, Y. and Michio, O.(2000): Effect of subinhibitory concentration of Macrolides on Expression of flagellin in *pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* , J. Antimicrob. Agenet Chemother. 44(10):2869- 2872.
53. Al-dulaimi ,A.A.(2009) . Inhibition of swarming and some virulence factors expression i n *Proteus mirabilis* by amikacin *in vitro* .Diala ,Journal ,(32).
54. Pérez-Pérez, M.; Gorge, P.; Rodrigues, G.P.; Pereira, M.O. and Lourenço. (2017). Quorum sensing inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: new insights through network mining. Biofouling,33(2): 128-142.