الكشف عن المواد المثبطة لظاهرة Quorum Sensing باستخدام السلالة الكاشفة *Chromobacterium violaceum* 12472

رسمية عمر سلطان الجبوري أ.م.د. محسن أيوب عيسى العكيدي

جامعة الموصل / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

(قدم للنشر في ٢٠١٧/٥/٢١ ، قبل للنشر في ٢٠١٨/١/٧)

ملخص البحث:

استخدمت السلالة *Chromobacterium violaceum* 12472 في التحري عن قدرة ٢٧ مادة على تثبيط ظاهرة QS شملت مواد نباتية، وعسل، ومضادان حيويان فضلاً عن حامض السلسليك، وأظهرت النتائج أن المضادين الحيويين Ciprofloxacin وAzithromycin وحامض السلسليك Salicylic Acid وزيت الورد Rose Oil وبتراكيز واطئة بلغت ٠.٠٠٥ و ٨ و ٥٠٠ مايكروغرام/مل للمواد الثلاث الأولى و ٠.٠٣% لزيت الورد كانت مثبطة لـ QS، بينما أظهر مستخلص جذور بادرات الباقلاء والعسل فعالية طفيفة مثبطة لـ QS بتركيز ٥٠ ملغم/مل لكلٍ منهما ولم تظهر المواد المختبرة الأخرى فعالية تذكر.

Detection of Quroum Sensing Inhibitors Using the Indecator Strain *Chromobacterium violaceum* 12472

Abstract:

Chromobacterium violaceum 12472 was used to detect Quorum Sensing inhibition activity in 27 different materials, four of them were Quorum Sensing Inhibitors (QSIs), these were: Ciprofloxacin, Azithromycin, Salicylic Acid and Rose Oil in very low concentrations 0.05, 8, 500 µg/ml and 0.03% respectively, although Pisum sativum roots extract and local Honey showed little activity.

*البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الأول.

المقدمة

يعرف نظام Quorum Sensing (QS) بأنه آلية تنظيم التعبير الجيني على مستوى الاستنساخ المعتمد على الكثافة الجرثومية، إذ تقوم الخلايا بالتحسس ومراقبة حجم مجتمعها بإنتاج واستقبال إشارات كيميائية تمثل لغة التواصل بين جميع خلايا مجتمعها، وعند صول الكثافة الخلوية الى مستوى معين تقوم الإشارات الكيميائية بدور الحاث المشترك لجميع الخلايا لتبدأ عندها الخلايا باستنساخ منظومات جينية معينة في آن واحد، ويمكن أن تصل الزيادة الناتجة عن حث التعبير عن هذه الجينات الى مايقارب 1000 ضعف (Bjarnsholt & Givskov, 2007) .

اكتشف اول نظام QS في الجرثومة البحرية *Vibrio fischeri* التي تضيء عند وجودها بكثافة عالية في أعضاء الإضاءة لعدد من الحيوانات البحرية (Dworkin *et al.*, 2006) واكتشفت فيما بعد العديد من الأنظمة المناظرة لهذا النظام في أكثر من 70 نوعاً من الجراثيم السالبة لصبغة كرام منها النوع *Pseudomonas aeruginosa*، وتعتمد هذه الأنظمة على استخدام مركبات N-acyl lactones homoserine(AHLs) بوصفها إشارات كيميائية للتواصل بين الخلايا (Henke & Bassler, 2004).

يعود الفضل في اكتشاف وتشخيص العديد من أنظمة AHL QS المعروفة حالياً الى استخدام السلالات الكاشفة (أو ما يعرف بالمتحسسات الحيوية Biosensors) وهي سلالات تم تحويرها وراثياً لتكون قادرة على التحسس والاستجابة لمركبات AHLs الخارجية بإنتاجها لصفة مظهرية معينة (Steindler & Venturi, 2007)، فضلاً عن ذلك طور الباحثون سلالات قادرة على الكشف عن المواد المثبطة لل QS منها السلالة *Chromobacterium violaceum* 12472 التي تفقد الصبغة الارجوانية عند وجود مواد مثبطة لل QS (McLean *et al.*, 2008) .

ومنذ اكتشاف الدور المفتاحي لعملية QS في تنظيم إنتاج عوامل الضراوة وإحداث الإصابة المزمنة لعدد من الجراثيم الإنتهازية الممرضة (منها النوع *P.aeruginosa*) حظيت هذه الظاهرة باهتمام متزايد من الباحثين بوصفها هدفاً لتطوير نمط جديد من العقاقير ففي السنوات الأخيرة وثقَ الباحثون أن غلق مسار التواصل الذي تتوسط فيه الإشارة AHL يمثل طريقة كفوءة للتداخل مع استعمار السطوح وإضعاف ضراوة الجراثيم

الممرضة، إذ سجل الباحثون مركبات قادرة على ذلك الفعل أطلقوا عليها مصطلح العقاقير المضادة للإمراضية Antipathogenic Drugs (Rasmussen & Givskov, 2006).

لوحظت العوامل المضادة لظاهرة QS لاول مرة في الطحلب البحري الأحمر *Delisea pulchra* حين لاحظ الباحثون أن سطح الطحلب لا يُستعمَر أبداً بالجراثيم، وتوالت عمليات التحري عن العوامل المثبطة لل QS في النباتات الطبية والفطريات والمواد الكيميائية والعقاقير (Kai, 2018).

وقد انصب كثير من الاهتمام على دراسة أنظمة QS لجرثومة *P. aeruginosa* والعوامل المضادة لها خارج الجسم الحي وداخله باستخدام أنظمة الكشف المختلفة (Whiteley *et al*., 2018)، فهذه الجرثومة تعد المسبب الثاني لذات الرئة والثالث لخمج الجهاز البولي والسابع لتجرثم الدم المكتسب من المستشفى وهي من اهم الجراثيم المسببة لأخماج الحروق، وتؤدي الى العديد من المضاعفات (Rossolini & Mantengoli, 2005).

المواد وطرائق العمل

السلالة الكاشفة Indicator Strain (Biosensor)

جهزت السلالة المحورة وراثياً *Chromobacterium violaceum* 12472 من الدكتور روبرت ماكلين Robert McLean الأستاذ في جامعة تكساس الأمريكية.

النباتات والمواد المستخدمة في اختبار القدرة على تثبيط QS

جمعت النباتات المشار إليها في الجدول (١) المختارة لهذه الدراسة من الأسواق المحلية في محافظة نينوى بشكل مجفف، أما أوراق الآس وجذور بادرات البقوليات فقد جمعت من حدائق كلية الزراعة والغابات في جامعة الموصل وبعد تنظيفها من الأتربة جففت في الظل في درجة حرارة الغرفة، وقد تم التحقق من أنواعها بالاعتماد على المراجع العلمية المتخصصة في تصنيف النباتات (Townsed *et al*., 1980)، ويبين الجدول (1) تفاصيل المواد المستخدمة في هذا الاختبار.

الجدول (1) النباتات والمواد التي جرى اختبار قدرتها على تثبيط QS

ت	الاسم العام	الاسم العلمي	الجزء المستخدم
١.	الهندباء	*Taraxacum afficinalis*	الساق والأوراق
٢.	إكليل الجبل	*Rosmarinus officinalis*	الساق والأوراق
٣.	النعناع البري	*Mentha pulegium*	الأوراق
٤.	الحرمل	*Peganum harmala*	البذور
٥.	الكمون	*Cuminum cyminum*	البذور
٦.	الزعتر البري	*Thymus vulgaris*	الأوراق
٧.	الشاي الأخضر	*Camellia sinensis*	الأوراق
٨.	البابونج	*Matricaria recutita*	الأزهار
٩.	عرق السوس	*Glycyrrhiza glabra*	الجذور
١٠.	حبة البركة	*Nigella sative*	البذور
١١.	السنامكي	*Cassia angustifolia*	الأوراق
١٢.	الرشاد	*Lepidium sativum*	البذور
١٣.	الشومر	*Foeniculum vulgare*	البذور
١٤.	الكزبرة	*Coriandrum sativum*	البذور
١٥.	البندق	*Corylus avellana*	الثمار
١٦.	الفانيلا	*Vanilla planifolia*	مسحوق جاهز
١٧.	الآس	*Myrtus communis*	الأوراق

١٨.	الهيل	*Amomum aculeatum*	البذور
١٩.	الفاصوليا	*Phaseolus vulgaris*	جذور البادرات
٢٠.	البزاليا	*Pisum sativum*	جذور البادرات
٢١.	الباقلاء	*Vicia faba*	جذور البادرات
	المواد الأخرى	**المنشأ**	
٢٢.	(CIP) Cipofloxacin	(Turkey) Atamic Pharmaceuticals	
٢٣.	(SA) Salicylic Acid	(England) GPR	
٢٤.	(RO)Rose Oil	(England) Bloom Aromatics	
٢٥.	(AZT) Azithromycin	(Egypt) Riva Pharma	
٢٦.	عسل محلي	الأسواق المحلية	
٢٧.	عسل جبلي	الأسواق المحلية	

الكشف الحيوي عن المواد ذات الفعالية المثبطة لل QS Qourum Sensing Inhibitors (QSIs) باستخدام السلالة الكاشفة 12472:

تحضير المواد المختبرة:

A. المستخلصات النباتية: حضرت مستخلصات مائية بحسب طريقة الباحثين Vattem وجماعته (2007) إذ تم اضافة ١٠ مل ماء مقطر إلى 0.5 غم من كل مادة مجففة مطحونة (أوراق، بذور، جذور، ثمار) ليصبح التركيز ٥٠ ملغم/مل، وتم مزج الخليط باستخدام المحرك الكهربائي لمدة ١٥ دقيقة وأجري نبذ مركزي له بسرعة ٣٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق، اخذ الرائق ورشح بالمرشح الغشائي 0.2 مايكرومتر وحفظ في درجة حرارة ٤ °م لحين الاستخدام.

B. العسل: أذيب 0.5 غم من العسل الاعتيادي والجبلي في ١٠ مل ماء مقطر ثم رشح بالمرشح الغشائي 0.2 مايكروميتر وحفظ في درجة حرارة ٤ °م (Vattem *et al.*, 2007).

C. المضادات الحيوية وحامض السلسليك: حضرت تخافيف عشرية للمضادين سبروفلوكساسين (CIP) وأزيثرومايسين (AZT) للحصول على التخفيفين 0.05 و٨ مايكروغرام/مل على

التوالي (Skindersoe *et al*.,2008)، أما حامض السلسليك (SA) فقد استخدم بتركيز ٥٠٠ مايكروغرام/مل.

D. زيت الورد (RO) : أذيب زيت الورد في الإيثانول المطلق بنسبة ١:١ وخفف بالماء المقطر المعقم للحصول على التركيز 0.03 ٪ ورشح بالمرشح 0.2 مايكروميتر وحفظ في درجة ٤ °م (Szabo *et al*., 2010).

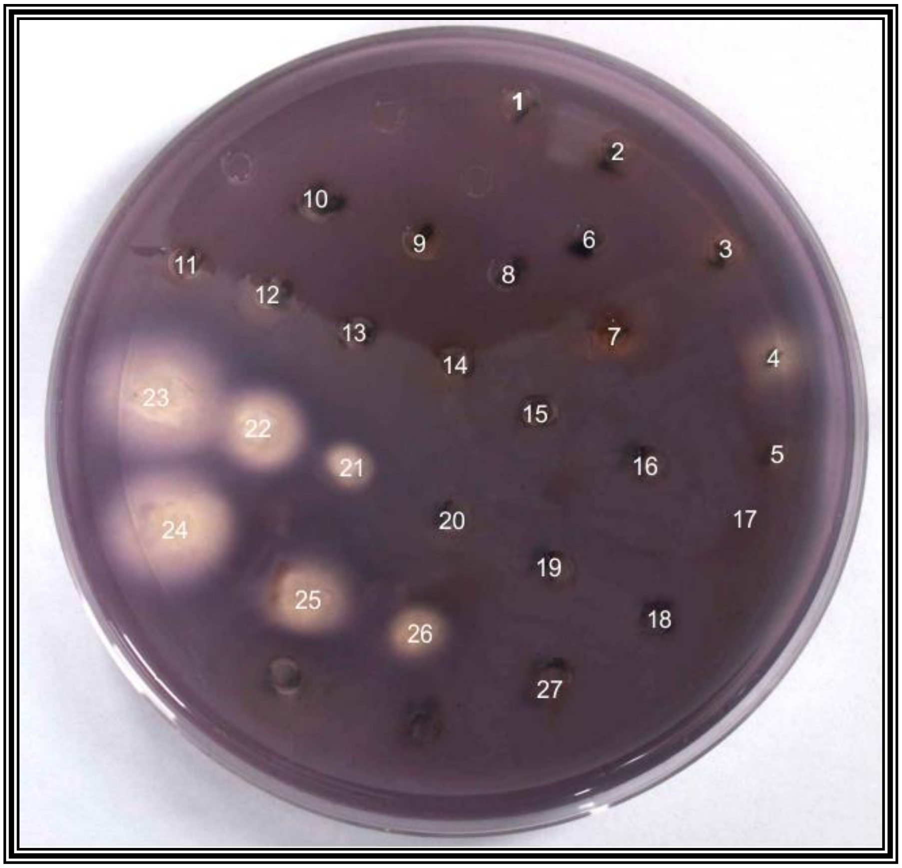
الكشف الحيوي عن قدرة المستخلصات على تثبيط ظاهرة QS باستخدام السلالة 12472 :

نقلت مستعمرة فتية للسلالة الكاشفة 12472 الى 10 مل من مرق LB المعقم للحصول على معلق جرثومي أضيف مباشرة الى 100 مل من وسط LB الحاوي على 0.5 ٪ أكار معقم مذاب ومبرد لدرجة 45 °م وتم صبه مباشرة في أطباق بتري معقمة. وبعد تصلب الأكار تم عمل حفر بقطر 6 ملم ووضع في كل حفرة 15 مايكروليتر من المواد الخاضعة للاختبار (المبينة في الجدول ١)، وحضنت الأطباق في درجة حرارة 30 °م لمدة 24 ساعة. في حالة وجود فعالية مثبطة لل QS تظهر هالة عديمة اللون كدرة غير رائقة تحوي مستعمرات صغيرة فاقدة للصبغة حول الحفرة، في حين أن ظهور هالة رائقة خالية من النمو تحيطها هالة كدرة عديمة اللون تحوي نمو جرثومي يعد دليلاً على ان المركب يعمل بتراكيز عالية بوصفة مضاداً حيوياً وبتراكيز واطئة يعمل QSI (McLean *et al*., 2008).

النتائج والمناقشة

يبين الشكل (1) والجدول (2) أن المضادين الحيويين الازيثرومايسين (25) والسبروفلوكساسين (22) بتراكيز 8 و 0.05 مايكروغرام/مل كانت مثبطة لظاهرة QS في السلالة الكاشفة 12472، وبدا ذلك واضحاً من اختفاء صبغة الفايولاسين وظهور هالة غير رائقة حول تلك المواد، أما حامض السلسليك (23) بتركيز 500 مايكروغرام/مل، وزيت الورد (24) بتركيز 0.03٪ فقد تبين إنهما مثبطان لنمو السلالة الكاشفة بتراكيز عالية وانهما مثبطان لل QS بتراكيز واطئة وتبين ذلك من ملاحظة هالة رائقة حولهما محاطة بهالة غير رائقة . ولم

تظهر المواد الأخرى أي تثبيط لـ QS باستثناء فعاليات طفيفة لمستخلص جذور بادرات الباقلاء (21) وكذلك العسل الاعتيادي (26)، إلا أن المستخلصات النباتية عموماً لم تُظْهر تثبيطاً واضحاً لـ QS كما هو مبيّن في الشكل (1) . وتتفق هذه النتائج مع ما وجده الباحثون Bjarnsholt وجماعته (2005)، الذين أشاروا إلى أن القليل من النباتات الراقية تنتج QSIs .



الشكل (1) الكشف عن المواد المثبطة لـ QS باستخدام السلالة 12472

(تمثل الأرقام في الشكل تسلسل واسم كل مادة كما وردت في الجدول 1)

كما تتفق مع نتائج الباحثين McLean وجماعته (2004) الذين وجدوا عند اختبارهم (50) نباتاً برّياً ومائياً أن نباتاً واحداً فقط أظهر فعالية مثبطة لـ QS، إلا أن الباحث Adonizio (2008) وجد عند اختباره (50) نباتاً من النباتات الطبية النامية في جنوب فلوريدا والمستخدمة لعلاج الأمراض الجرثومية التنفسية والجلدية أن ستاً منها فقط أظهرت فعالية مثبطة لـ QS، ووجد الباحثان Karamanoli و Lindow (2006) أن مركبات سطح الورقة لستّ نباتاتٍ من مجموع (52) نباتاً كانت QSIs.

الجدول (2) أقطار تثبيط المواد المختبَرة لـ QS وتثبيط نمو السلالة الكاشفة 12472 مقاسة بالـ mm

ت	المادة المختبَرة	التركيز	مثبط لـ QS (قطر منطقة التثبيط mm)	مثبط لنمو السلالة الكاشفة(قطر منطقة التثبيط mm)
٢١	مستخلص جذور الباقلاء	٥٠ ملغم/مل	٩	–
٢٦	العسل الاعتيادي	٥٠ ملغم/مل	١١	–
٢٥	Azithromycin	٨ مايكروغرام/مل	١٥	–
٢٢	Ciprofloxacin	٠.٠٥ مايكروغرام/مل	١٢	–
٢٣	Salicylic Acid	٥٠٠ مايكروغرام/مل	٢٥	١٢
٢٤	Rose Oil	٠.٠٣%	٢٣	١٠

عند مقارنة المواد المستخدمة في هذه الدراسة مع QSIs المعروفة نجد أنّ المضادين AZT و CIP يختلفان تركيبياً عن جميع QSIs الموصوفة لحد الآن، وهي جزيئات كبيرة لها أُلفة واطئة للاتحاد مع موقع الاستقبال للبروتين LasR بسبب كبر حجمها، لذلك يبدو أنها تُظهر تأثيرها بآليات تختلف عن آليات عمل QSIs الأخرى، مما يتيح إمكانيات جديدة ومهمة لدمج العلاج بـ QSIs ذات آليات العمل المختلفة (Skinersoe *et al.*, 2008)، كما قد ثبتت فائدة استخدام QSIs جنباً إلى جنب مع المركبات التقليدية القاتلة للجراثيم من خلال التجارب التي أجريت خارج الجسم الحي *In Vitro* (Rasmussen *et al.*, 2005a).

ان فهم الآلية المزدوجة لعمل المضاد الحيوي له أهمية كبيرة في إمكانية توظيف عمل المضاد لأضعاف وليس قتل الجراثيم مباشرةً مما يتيح للنظام المناعي للمضيف التخلص من الجراثيم المضعّفة، وعند العودة إلى أصل المضادات الحيوية نجد أن لأغلبها مصادر طبيعية مثل أحياء التربة، ويبدو من نظرة عامة أن الهدف البيئي من وجود المضادات الحرة في البيئة هو محاربة المنافسين إلا أن الملاحظ أن تراكيز المضادات الحرة في التربة تكون أقل بكثير من MICs، إذ وجد الباحثون Linares وجماعته (٢٠٠٦) أن المضادات (بتراكيز sub-MICs) لها تأثيرات تختلف تماماً عن تأثير الجرع العالية، فمثلاً قد تؤدي إلى تحفيز تكوين الغشاء الحيوي أو تغيير نمط الحركة أو تزيد السمية للخلايا Cytotoxicity أو تُغير التعبير عن عوامل الضراوة (Linares *et al.*, 2006).

واقترح الباحثون Skindersoe وجماعته (٢٠٠٨) إمكانية إعطاء المضادات الحيوية التي تعمل على التنظيم السلبي لل QS في جرثومة *P. aeruginosa* وبتراكيز sub-MICs إذ يكون الضغط الانتخابي أقل من أن يسبب ظهور المقاومة وتعمل على غلق مسار الـ QS وإضعاف نشاط الكائن الممرض.

هذه الخاصية المثيرة للاهتمام تسلط الضوء على إمكانية استخدام مركبات مشتقة من الطبيعة ذي خواص دوائية متعددة الأهداف، (أي: مضادات حيوية لها عدة وظائف)، إلا أن دراسة سابقة قام بها الباحثون Goh وجماعته (٢٠٠٢) بينت أن استخدام التراكيز sub-MICs للمضادات يحوّر نمط الاستنساخ للنبيت الطبيعي (Normal Flora) المفيد للإنسان مسبباً تأثيرات غير مرغوبة.

كما بين الباحثان Howe و Spencer (١٩٩٧) ان الاستخدام طويل الأمد لل AZT لعلاج التليف الكيسي يحسّن

وظائف الرئة ووزن المريض على الرغم من حقيقة أن هذا المضاد لا يمتلك فعالية مضادة لنمو جرثومة *P. aeruginosa* ، إذ يتراوح MIC له بين ١٢٨ و ٥١١ مايكروغرام/مل. إلا أن ذلك يؤدي إلى أن تصبح جرثومة *S. aureus* في هؤلاء المرضى مقاومة للماكروليدات. وهذا يؤكد ضرورة تطوير QSIs إضافية ليس لها فعالية قاتلة أو مثبطة للجراثيم.

يعد الـ AZT مضاداً حيوياً من مجموعة الماكروليد وليس له فعالية قاتلة أو مثبطة لنمو جرثومة *P. aeruginosa* ويعمل عن طريق ارتباطه بالوحدة الثانوية 50S للرايبوسوم الجرثومي وبهذا يثبط ترجمة mRNA، أما الـ CIP فهو مضاد حيوي من مجموعة Fluoroquinolone يستخدم ضد *P.aeruginosa* وهو يستهدف إنزيم DNA gyrase (Topoisomerase II) وبهذا يثبط بناء الـ DNA . (Hooper, 1999)

ويتوقع الباحثون Skindersoe وجماعته (٢٠٠٨) أن تكون الآلية التي يعمل بها المضادان AZT و CIP في تأثيرهما على QS هي أنهما يؤديان إلى إحداث التنظيم السلبي للتعبير الجيني للمنظومة *pprB* أكثر من خمسة أضعاف وهذه المنظومة مسؤولة عن نفاذية الغشاء الخلوي الجرثومي والنواقل الموجودة فيه مما يقلل نفاذية الغشاء فيقل ضخ الإشارة الحاثة 3-oxo-C_{12}-HSL وهذا يسبب اختزال مستوى التعبير عن الجينات المنظّمة بـ QS.

ومما يدعم هذه الفرضية أن المضادين المذكورين متخصصان في التأثير على الجينات الخاضعة لسيطرة الجين المنظّم *las* أكثر من الجينات الخاضعة للجين المنظّم *rhl* لأن الإشارة الحاثة للمنظومة *rhl* وهي C_4-HSL قادرة على الانتشار بحرّية عبر الغشاء وهي بخلاف الإشارة 3-oxo-C_{12}-HSL لا تعتمد على النقل الفعال (Wang *et al.*, 2003) .

أما حامض السلسليك فهو حامض عضوي صغير الجزيئة تنتجه النباتات، وظيفته حث الاستجابة الدفاعية ضد هجوم الكائنات الممرضة، وهو ناتج أيضي للاسبرين ومسؤول عن خواص هذا العقار المضادة للالتهاب في الإنسان، ويعتقد الباحثون Yang وجماعته (٢٠٠٩) أنه مثبط قوي للإشارة الحاثة المعتمدة على نظام PQS، وعلى الرغم من أنه ليس بقوة المثبطات المعروفة (مثل الفيورانون C-30 والباتيولين وحامض البنيسيلك) إلا أن حقيقة كونه عقاراً معروفاً يستخدم لعلاج الإنسان أصلاً هو أمر ذو أهمية في التطبيقات الإضافية وتطوير العقاقير المضادة للامراضية عموماً، إذ على الرغم من اكتشاف QSIs كفوءة تجريبياً إلا أنها ليست ذات قيمة دوائية بسبب سميتها العالية وعدم استقراريتها

(Rasmussen *et al.*, 2005a,b)، فمن المؤكد أن استخدام العقاقير المعروفة ضد QS أسهل من البحث عن مركبات أخرى، وان معرفة تخصصها يفتح آفاقاً جديدة لاستخدام أكثر من QSIs واحد في العلاج وبتراكيز واطئة، إذ يبدو أننا لم نعِ لحد الآن أهمية العقاقير المتوفرة حالياً .

أما زيت الورد فهذه أول دراسة تستهدف اختبار تأثيره المثبط لـ QS، إذ إن فكرة استخدام النباتات في العلاج ليست جديدة إذ أكدّ الباحثون أن النباتات تمتلك قابلية لا محدودة على تخليق المركبات الاروماتية، و تم عزل ما لا يقل عن ١٢٠٠٠ مركب منها ويُعتقد

أن هذا العدد يمثل أقل من ١٠% من مجموع ما تنتجه النباتات من مركبات اروماتية (Demuth & Lamont, 2005)، ووجد عدد من الباحثين أن بعض النباتات البرية لا تنتج فقط مركبات مناظرة (محاكية) للحاث الذاتي لتخريب نظام QS للجراثيم بل انها تستجيب للإشارات الجرثومية أيضاً (Adonizio *et al.*, 2006) أي انها ستكون مستودعات واعدة للمركبات المضادة لـ QS لذلك فإن التحري الكفوء عن هذه العوامل أصبح حتمياً .

وللبت في أهمية QSIs المختَبَرَة لابد من الاعتماد على دراسات متقدمة باستخدام احدث وسيلة لتحليل تخصص العقار هي Transcriptomics باستخدام تقنية DNA microarray وهي الوسيلة الجزيئية لدراسة التعبير الجيني العام التي من الممكن استخدامها لدراسة شبكات التنظيم الجيني المعقدة في الجراثيم والكائنات حقيقية النوى، إذ تسمح هذه التقنية بأخذ صور شمسية "Snapshots" لنمط التعبير الجيني خلال مراحل النمو والعلاج (Demuth & Lamont, 2005).

المصادر

Adonizio, A. L.(2008). Anti-Quorum Sensing agents from south Florida medicinal plants and their attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. Ph. D .Thesis. Florida International University .

Adonizio, A. L.; Downum K.; Bennett B. C.; and Mathee K. (2006). Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. J. Ethnopharmacol., 105(3):427-35.

Bjarnsholt, T. and Givskov, M.(2007). The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas*

Hooper, D. C. (1999). Mode of action of fluoroquinolones. Drugs, 58: 6-10.

Howe, R. A., and Spencer. R. C. (1997). Macrolides for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections? J. Antimicrob. Chemother., 40:153–155.

Kai, K. (2018). Bacterial quorum sensing in symbiotic and pathogenic relationships with hosts. Biosci. Biotechnol. Biochem.; 82: 363-71.

Linares, J. F.; Gustafsson, I.; Baquero, F. and Martinez. J. L. (2006). Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:19484–19489.

McLean, R. J. C.; Bryant, S. A.; Vattem, D. A.; Givoskov, M.; Rasmussen, T. B. and Balaban, N.(2008). Detection in vitro of quorum sensing molecules and their inhibitors. In: Balaban, N.(ed).Control of biofilm infections by signal manipulation. Springer., pp: 39-50.

McLean, R. J. C.; Pierson, L. S.; Fuqua, C. (2004). A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. J. Microbial. Methods, 58:351-360.

aeruginosa. Anal. Bioanal.Chem., 387: 409-414.

Bjarnsholt, T.; Jensen, P. Ø.; Burmølle. M. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leucocytes is quorum sensing depended. Microbiol., 151: 373–83.

Demuth, D. R. and Lamont, R. J. (2005). Bacterial Cell-to-Cell Communication:Role in Virulence and Pathogenesis. 1st ed., Cambridge University Press.UK.

Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, H. and Stackebrandt, E. (2006). The Prokaryotes, A Handbook on the biology of Bacteria. Vol. 2: Ecophysiology and Biochemistry. 3rd ed. Springer Science.

Goh, E. B.; Yim, G.; Tsui, W.; McClure, J.; Surette, M. G. and avies. J. (2002). Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 17025-17030.

Henke, J. M. and Bassler, B. L. (2004). Bacterial social engagements. Trends Cell Biol., 14: 648-656.

Skindersoe, M. E.; Alhede, M.; Phipps, R.; Yang, L.; Jensen, P. O.; Rasmussen, T. B.; Bjarnsholt, T.; Tolker–Nielsen, T.; Høiby, N. and Givskov, M. (2008). Effect of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* . Antimicrob. Agents Chemother., 52 (10): 3648 – 3663 .

Steindler, L. and Venturi, V. (2007). Detection of quorum sensing N-acylhomoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. FEMS Microbiol. Lett., 266:1-9.

Szabo, M. A. ; Varga, G. Z. ; Hohman, J. ; Schelz, Z. ; Szegedi E, Amara, L. and Molnar, J. (2010). Inhibition of quorum sensing signals by essential oils. Phytother. Res., 24(5):782-786.

Townsed, C. C.; Geuest , E.; Omar, S.A. and Al-Khayat, A. H. (1980). Flora of Iraq, Vol.8, Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Baghdad.

Vattem, D. A.; Mihalik, K.; Crixell, S. H. and McLean, R. J. C. (2007). Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. Fitoterapia, 78:302-310.

Wang, Y.; Ha, U.; Zeng, L. and Jin, S. (2003). Regulation of membrane permeability by a two-component regulatory system in *Pseudomonas*

Rasmussen, T. B. and Givskov, M. (2006). Quorum sensing inhibitors as anti-pathogenic Drugs. Int. J. Med. Microbiol., 296:149-161.

Rasmussen, T. B.; Bjarnsholt, T.; Skindersoe, M. E. Hentzer, M.; Kristoffersen, P.; Kote, M.; Nielsen, J.; Eberl, L. and Givskov, M. (2005a). Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. J. Bacteriol., 187:1799–1814.

Rasmussen,T. B.; Skindersoe, M. E.; Bjarnshott, T.; Phipps, R. K.; Christensen, K. B.; Jensen, P. O.; Andersen, J. B.; Koch, B.; Larsen, T. O.; Hentzer, M.; Eberl, L.; Hoiby, N. and Givskov, M. (2005b). Identify and effects of quorum sensing inhibitors produced by Penicillium species. Microbiol., 151:1325-1340.

Rossolini, G. M. and Mantengoli, E. (2005). Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa.* Clin. Microbiol. Infection., 11:17-32.

aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother., 47:95–101.

Whiteley, M.; Diggle, S. P. And Greenberg, E. P. (2018). Bactiral quorum sensing: the progress and promise of an emerging reserach area. Nature, 555: 126.

Yang,L.; Rybtke, M. T.; Jakobsen, T. M.; Hentzer, M.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M. and Tolker-Nielsen, T. (2009). Computer aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibitors. Antimicrob. Agents Chemother., 53(6):2432-2443.

Zhu, J.; Chai, Y.; Zhong, Z.; Li, S. and Winans, S. C. (2003). Agrobacterium bioassay strain for ultrasensitive detection of N-acylhomoserine lactone-type quorum sensing molecules: detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii* . Appl. Environ. Microbiol., 69(11):6949-6953.