الكشف عن ظاهرة استشعار النصاب Quorum Sensing في جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* باستخدام بعض السلالات الكاشفة القياسية

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

جامعة الموصل / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

(قدم للنشر في ٢٠١٨/٥/٢٩ ، قبل للنشر في ٢٠١٩/١/٧)

ملخص البحث:

أجري هذا البحث بهدف دراسة ظاهرة استشعار النصاب Quorum Sensing (QS) في جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من خمج الحروق وبيئة المستشفيات ومقارنتها بعزلات بيئية حيث استخدمت السلالات الكاشفة (Biosensors) التي تكشف عن إشارات الحاث الذاتي N-acyl homoserine lactones (AHLs). استخدمت في هذه الدراسة السلالة *Agrobacterium tumefaciens* KYC55 التي تكشف عن وجود AHLs بإنتاج إنزيم بيتا كلاكتوسايديز وتحول كاشف X-Gal إلى لون أزرق، وكذلك استخدمت السلالة *Chromobacterium* violaceum CV026 التي تنتج صبغة الفايولاسين Violacein البنفسجية استجابة لمركبات AHLs. تبين من نتائج الكشف عن مركبات AHLs لتسعَ عشرة عزلة للنوع *P. aeruginosa* معزولة من المرضى وأثاث الردهة والمياه والتربة أن جميع العزلات مُنتجة بدرجات متباينة لمركبات AHLs باستخدام السلالة KYC55، في حين أن ٢٦.٣% من العزلات أظهرت إنتاجاً لمركبات AHLs باستخدام السلالة CV026 .

Detection of Quroum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* Using Some Indicator Strains

Abstract:

This research aimed to study Quorum Sensing (QS) in Pseudomonas aeruginosa isolated from burn wound infections and hospital environment in comparison with environmental isolates, using the indicator strains (Biosensors) that detect the autoinducer signals (N-acyl homoserine lactones AHLs). The Biosensors used in this study were: Agrobacterium tumefaciens KYC55 which produce β-galactosidase that trun X-Gal to blue color in the presence of AHLs and Chromobacterium violaceum CV026 which produce violacein pigment in the presence of AHLs. Detection of AHLs in nineteen P. aeruginosa isolates of different sources (patients, ward, water & soil) revealed that all of them were AHLs producers using KYC55 while CV026 detect AHLs in 26.3% of isolates.

المقدمة

يعبر عن العديد من عوامل الضراوة لجرثومة *Pseudomonas aeruginosa* بآلية تعرف بظاهرة استشعار النصاب Quorum Sensing (QS) أو التواصل الخلوي Cell to Cell Communication، وهي عملية التنظيم الجيني على مستوى الاستنساخ المعتمد على الكثافة الخلوية، إذ تنتج الخلايا وتستقبل مركبات تعرف بإشارات الحاث الذاتي Autoinducer Signals تمكّن الخلية من التحسس للكثافة الخلوية وعند وصولها إلى تركيز معين تحث جميع الخلايا في آن واحد أن تسلك سلوك المجتمع المتعاون (Schuster & Greenberg, 2006; Kai, 2018).

تم تشخيص ودراسة نظامين كاملين من أنظمة QS في جرثومة *P.aeruginosa* هما *las* و *rhl*، كل نظام يتألف من بروتين منظّم للاستنساخ (هو LasR في النظام *las* وRhlR في النظام *rhl*) وجزيئات الحاث الذاتي الثابتة وهي 3-oxo-C_{12}-HSL)3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone) في النظام *las* و C_4-HSL)N-butanoyl-homoserine lactone) في النظام *rhl* (Fuqua *et al.*, 1994; Whiteley *et al.*, 2018).

يحوي كل بروتين منظم موقعي ارتباط احدهما موقع ارتباط الحاث الذاتي والثاني يمثل منطقة الارتباط بشريط الـ DNA ، وحالما ترتبط البروتينات المنظمة LasR و RhlR بجزيئة الحاث الذاتي الخاصة بها تقوم بتحوير تعبير الجين الهدف افتراضياً بارتباطها بوحدات الـDNA المعروفة بـ (Las boxes) الواقعة قبل موقع بدء استنساخ الجينات الخاضعة لسيطرة QS (Whiteley *et al.*, 2001; Kiratisin *et al.*, 2002; Lamb *et al.*, 2003).

يسيطر النظام *las* على جينات إنتاج الايلاستيز*lasB* (Gambello & Iglewski, 1991) والبروتييز *las* *A*) والسم الخارجي (*tox* A) والبروتييز القلوي *apr* (Gambello *et al.*, 1993) والمسار الإفرازي *xcpR* و *xcpP* (Chapon-Harve *et al.*, 1997).

أما النظام *rhl* فهو ينظم استنساخ جينات إنتاج الرامنولبيد (*rhlB*, *rhlA*) والبايوسيانين وبروتينات ارتباط

اللكتين *lec A* (Ochsner Pearson *et al*., 1997) ;&Reiser, 1995.

يعود الفضل في تشخيص أنظمة استشعار النصاب المعتمدة على اشارات الحاث الذاتي AHL QS المعروفة حالياً الى استخدام السلالات الكاشفة أو المجسات الحيوية Biosensors القادرة على التحسس والاستجابة لمركبات AHLs، فهذه السلالات لا تنتج اشارات الحاث الذاتي AHLs وتحوي جين إنتاج بروتين منظم فعال (من عائلة LuxR) الى جنب المهد الهدف الذي ينظّم استنساخ الجينات الكاشفة إيجابياً مثل جينات الوميض الحيوي، إنزيم بيتا-كلاكتوسايديز، بروتين الوميض الأخضر Gfp Green Fluorescent Protein، وصبغة الفايولاسين (Steindler & Venturi, 2007).

المواد وطرائق العمل

السلالات الكاشفة Indicator Strains (Biosensors)

جهزت السلالتان المحورتان وراثياً *Agrobacterium tumefaciens* KYC55 و*Agrobacterium tumefaciens* R10 من الدكتور جون زو John Zhu الأستاذ المساعد في جامعة بنسلفانيا، فيلادلفيا، USA.

في حين جهزت السلالات *Chromobacterium violaceum* CV026 و *Chromobacterium violaceum* 31532 من الدكتور روبرت ماكلين Robert McLean الأستاذ في جامعة تكساس الأمريكية.

العزلات الجرثومية

خضعت للاختبار 19 عزلة للنوع *Pseudomonas aeruginosa* معزولة من بيئات مختلفة 9 منها معزولة من أخماج الحروق ومنمطة مصلياً عزلت من المرضى الراقدين في ردهات الحروق في مستشفى الزهراوي التعليمي في مدينة الموصل، وعزلة من أثاث الردهة وثلاث عزلات من مياه الشرب، وست عزلات من التربة (تم عزلها في دراسات سابقة). زرعت جميع العزلات على وسط أكار بايوسيانوسيل Pyocyanosel agar (المجهز من شركة Bio Mérieux) وحضنت في درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة.

الكشف الحيوي عن إنتاج اشارات الحاث الذاتي AHLs (Autoinducer Bioassay)

طريقة التخطيط المتوازي باستخدام السلالة الكاشفة *Agrobacterium tumefaciens* KYC55:

قبل إجراء الكشف تم تهيئة السلالة الكاشفة للحث وذلك بنقل مستعمرة الى 10 مل من وسط مرق Luria-Bertani (LB) المحضر حسب طريقة Sambrook وجماعته (1989) المضاف له Spectinomycin و Gentamicin وTetracycline بتركيز 100 و100 و١٠ مايكروغرام/مل على التوالي، وحضنت في درجة حرارة 30°م (وهي الدرجة الملائمة لنمو السلالة الكاشفة) لمدة ست ساعات.

أجري الكشف باستخدام وسط أكار *Agrobacterium tumefaciens* (AT) المحضر حسب طريقة Zhu وجماعته (2003) من دون إضافة مضادات حيوية، إذ زرعت السلالة الكاشفة والعزلة المختبرة على سطح الأكار بشكل خطين متوازيين تفصلهما مسافة لا تزيد عن 1 سم. وحضنت الأطباق في درجة حرارة 30°م لمدة 24-48 ساعة. وعند إنتاج العزلة المختبرة جزيئات AHLs فإنها تنتشر خلال الأكار وتؤدي الى تفعيل إنتاج إنزيم بيتا-كلاكتوسايديز في السلالة الكاشفة. أجري الكشف عن إنتاج إنزيم بيتا-كلاكتوسايديز بإضافة قطرات بحجم 50 مايكروليتر من كاشف X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside) بتركيز ٢٠ ملغم/مل على السلالة الكاشفة وتركت الأطباق لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة ولوحظت النتيجة.

أما معاملات السيطرة فقد اشتملت على زرع السلالة الكاشفة مع السلالة *Agrobacterium tumefaciens* R10 الحاوية على البلازميد pCF218 (Zhu *et al.*, 2003)، النامية على وسط LB المضاف له Tetracycline (100 مايكروغرام/مل) للكشف الموجب، ومع السلالة الكاشفة نفسها للكشف السالب (Stickler, *et al.*, 1998; McLean *et al.*, 2004).

طريقة التخطيط المتعامد باستخدام السلالة الكاشفة *Chromobacterium violaceum* CV026:

زرعت السلالة *Chromobacterium violaceum* CV026 بشكل خط على وسط أكار LB

ثم زرعت العزلة المختبرة بشكل متعامد معها مع ترك مسافة صغيرة بينهما . في حالة إنتاج العزلة المختبرة لجزيئات AHLs فإنها تنتشر في الأكار وتحفز السلالة الكاشفة على إنتاج صبغة الفايولاسين. حضنت الأطباق في درجة حرارة 30°م لمدة 24-48 ساعة ولوحظت النتيجة. استخدمت السلالة *Chromobacterium violaceum* 31532 في الكشف الموجب في حين تم استخدام السلالة الكاشفة *Chromobacterium violaceum* CV026 نفسها في الكشف السالب (McClean *et al.*, 1997; McLean *et al.*, 2004) .

النتائج والمناقشة

نتائج الكشف عن إنتاج اشارات الحاث الذاتي AHLs باستخدام السلالة الكاشفة *Agrobacterium tumefaciens* KYC55 بانتاج انزيم بيتا-كلاكتوسايديز:

انتخبت عزلات *P. aeruginosa* غير المنتجة لإنزيم بيتا-كلاكتوسايديز وذلك بعد اجراء اختبار ONPG حسب طريقة Baron وFinegold (١٩٩٠) للتأكد من عدم انتاجها للانزيم المذكور ويبين الجدول (1) أن جميع عزلات النوع *P. aeruginosa* التي خضعت للاختبار البالغ عددها (19) عزلة قد أعطت نتيجة موجبة وشملت تسع عزلات من أخماج الحروق، وعزلة من الردهات، وثلاث عزلات من المياه وست عزلات من التربة، إلا أنها تباينت في شدة اللون وسرعة ظهوره، إذ أظهرت عزلة مرضية واحدة إنتاجاً عالياً للمركب، في حين اظهرت عزلات التربة جميعها إنتاجاً عالياً لجزيئات الحاث الذاتي، ويبين الشكل (1) النتيجة الموجبة للكشف إذ يبدو واضحاً أن عزلات جرثومة *P. aeruginosa* أثناء نموها في الوسط الغذائي تنتج جزيئات AHLs تنتشر بدورها في الوسط وتصل السلالة الكاشفة المزروعة بالقرب منها، وتؤدي إلى تحفيز التعبير الجيني للجين الكاشف *lacZ* وإنتاج إنزيم بيتا – كلاكتوسايديز الذي يحلل الكاشف X-Gal إلى ناتج ذي لون أزرق، وقد استخدمت السلالة R10 في الكشف الموجب؛ لأنها حاوية على البلازميد pCF218 ومنتجة لجزيئات AHLs (Zhu *et al.*, 2003)، في حين استخدمت السلالة الكاشفة *Agrobacterium tumefaciens* KYC55 نفسها في الكشف السالب لأنها فاقدة لنظام استشعار النصاب QS ولا تنتج اشارات الحاث الذاتي.

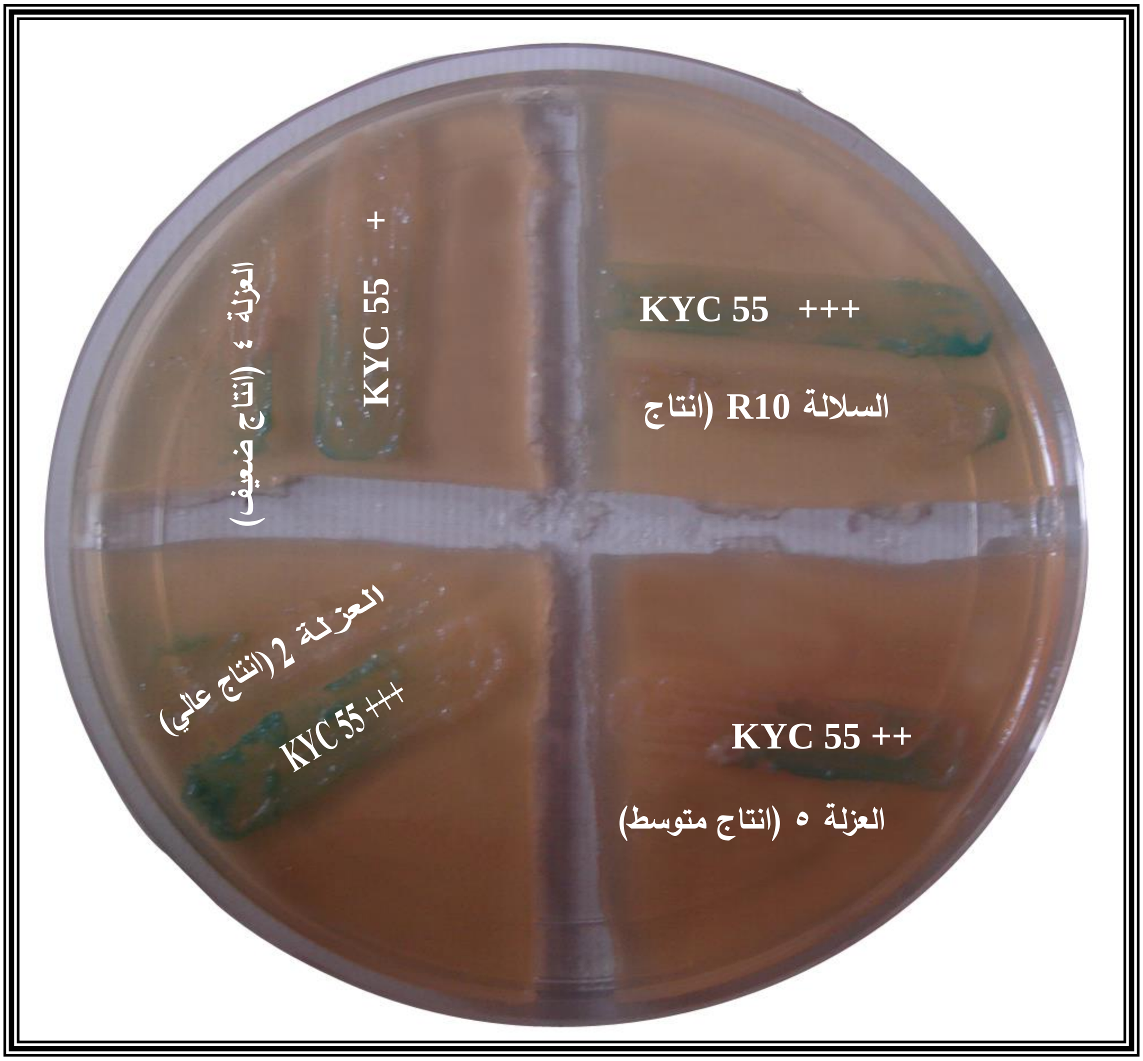
الجدول (1) نتائج الكشف الحيوي عن إنتاج اشارات الحاث الذاتي AHLs من عزلات *P. aeruginosa* المختلفة باستخدام السلالتين الكاشفتين KYC55 و CV026 .

رقم العزلة	مصدر العزل	نتائج الكشف باستخدام السلالة KYC55 بالتحري عن بيتا-كلاكتوسايديز	نتائج الكشف باستخدام السلالة CV026 بانتاج صبغة الفايولاسين
٢	أخماج الحروق (O:1)	+++	+++
٤	أخماج الحروق (O:1)	+	–
٥	أخماج الحروق (O:1)	++	+
٦	أخماج الحروق (O:1)	+	+
٧	أخماج الحروق (O:2)	+	–
٩	أخماج الحروق (O:2)	++	–
١١	أخماج الحروق (O:2)	+	–
١٢	أخماج الحروق (O:2)	+	–
١٣	أخماج الحروق (O:15)	+	+++
١٥	الردهة	++	–
١٧	مياه الشرب	+	–
١٨	مياه الشرب	+	+++
١٩	مياه الشرب	+	–
٢٠	التربة	+++	–
٢١	التربة	+++	–

٢٢	التربة	+++	–
٢٣	التربة	+++	–
٢٤	التربة	+++	–
٢٥	التربة	+++	–
Agrobacterium tumefaciens R10 (السيطرة الموجبة للسلالة KYC55)	...	+++	...
KYC55 (السيطرة السالبة للسلالة KYC55)	...	–	...
Chromobacterium violaceum 31532 (السيطرة الموجبة للسلالة CV026)	...	...	+++
CV026 (السيطرة السالبة للسلالة CV026)	...	...	–

+++ : إنتاج عالي لمركبات AHLs   + : إنتاج ضعيف لمركبات AHLs

++ : إنتاج متوسط لمركبات AHLs   – : غير منتجة لمركبات AHLs

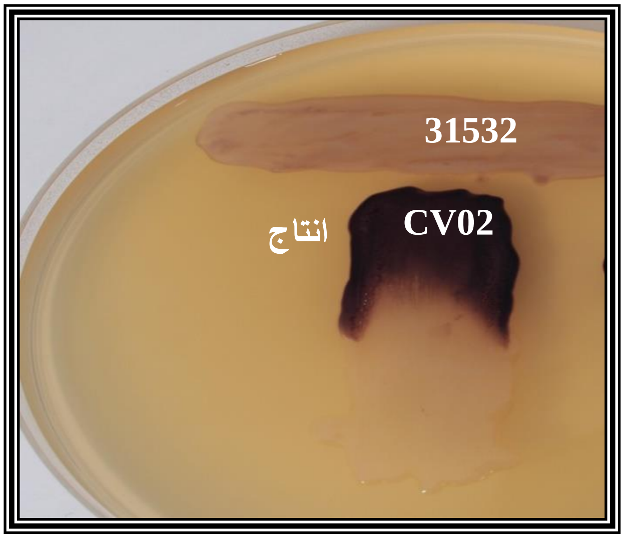


الشكل (١) الكشف عن اشارات الحاث الذاتي AHLs باستخدام السلالة *Agrobacterium tumefaciens* KYC55 بانتاج انزيم بيتا–كلاكتوسايديز

نتائج الكشف عن إنتاج اشارات الحاث الذاتي AHLs باستخدام السلالة الكاشفة *Chromobacterium violaceum* CV026 من خلال انتاج صبغة الفايولاسين:

بينت نتائج الكشف باستخدام CV026 أن خمس عزلات فقط من مجموع تسع عشرة عزلة أعطت نتيجة موجبة شملت عزلتين مرضيتين أظهرت إنتاجاً عالياً (إحداهما تعود للنمط المصلي O:1 والأخرى O:15) وإحدى عزلات المياه أظهرت إنتاجاً عالياً أيضاً، في حين لم تُظهر أي من عزلات التربة إنتاجاً لجزيئات الحاث الذاتي باستخدام هذه السلالة الكاشفة كما مبين في الجدول (1).

يبين الشكل (2) معاملة السيطرة الموجبة التي تم الحصول عليها بتلقيح السلالة *Chromobacterium violaceum* 31532 بشكل متعامد مع السلالة الكاشفة CV026 لأن الأولى معروفة بإنتاجها للمركب C_6-HSL الذي تستجيب له CV026 أفضل من استجابتها لباقي جزيئات الحث الذاتي مظهرةً إنتاجاً عالياً لصبغة الفايولاسين، في حين يبين الشكل (3) النتيجة الموجبة التي أظهرتها العزلة المرضية ذات النمط المصلي (O:1).

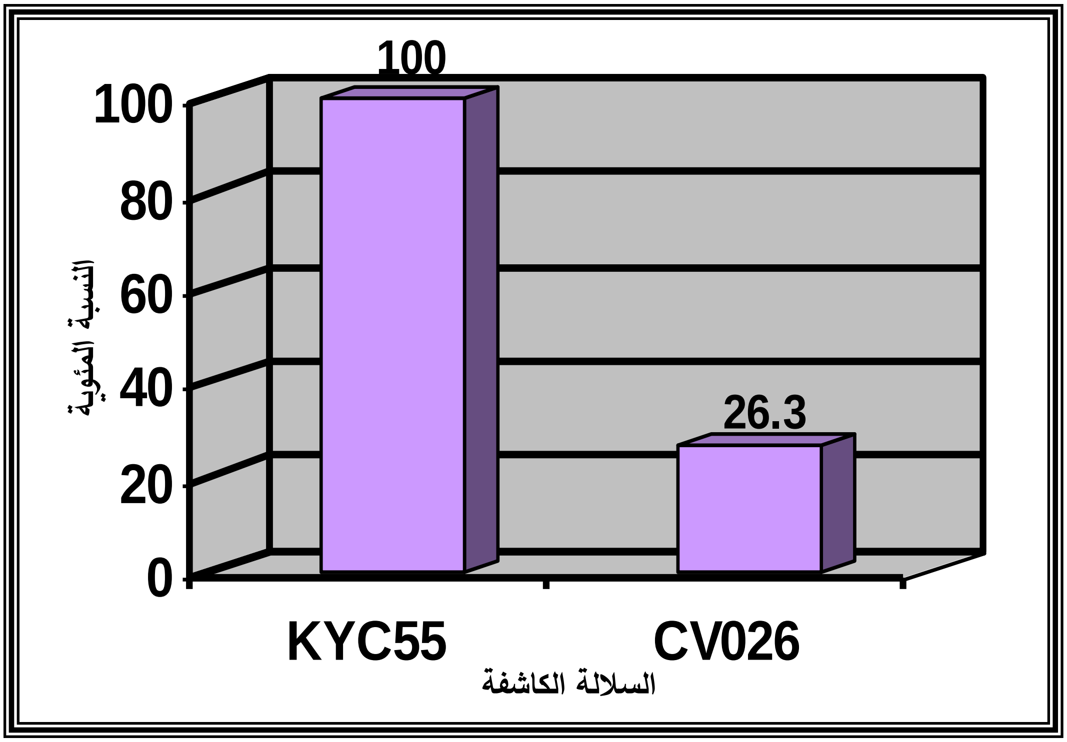


الشكل (٢) الكشف عن اشارات الحاث الذاتي AHLs للسلالة البرية *Chromobacterium violaceum* 31532 باستخدام السلالة الكاشفة *Chromobacterium violaceum* CV026 وذلك بانتاج صبغة الفايولاسين

الشكل (٣) الكشف عن اشارات الحاث الذاتي AHLs للعزلات المختبرة التابعة للنوع

P. aeruginosa* باستخدام السلالة CV026 *Chromobacterium violaceum

ويظهر التباين واضحاً في نتائج الكشف باستخدام السلالتين الكاشفتين للعزلات نفسها (الشكل 4) ويعود ذلك إلى اختلاف أنظمة الكشف في تحسسها تجاه مركبات AHLs المختلفة، إذ أكد الباحثان Steindler و Venturi (2007) أن السلالة CV026 تكشف بشكل جيد عن المركبات الثلاثة 3-oxo-C_6-HSL و C_8-HSL و 3-oxo-C_8-HSL إلا أنها تستجيب بشكل أفضل للمركب C_6-HSL.



الشكل (4) النسبة المئوية لعزلات *P. aeruginosa* المنتجة لاشارات الحاث الذاتي

AHLs باستخدام السلالتين الكاشفتين KYC55 *Agrobacterium tumefaciens* و

***Chromobacterium violaceum* CV026**

أمّا السلالة KYC55 فإنها تكشف بشكل جيد عن مدى أوسع بكثير من مركبات AHLs فهي تكشف عن جميع مركبات 3-oxo-HSL فضلاً عن C_6-HSL و C_8-HSL و C_{10}-HSL وC_{14}-HSL وكذلك المركبات 3-hydroxy-C_6-HSL و 3-hydroxy-C_8-HSL و 3-hydroxy-C_{10}-HSL إلا أنها تستجيب أو تتحسس بشكل أفضل للمركب 3- oxo -C_8-HSL وهذا ما يفسر استجابة السلالة وظهور نتيجة موجبة للعزلات جميعها التي خضعت للاختبار.

ووجد الباحث Zhu وجماعته (2003) عدم قدرة السلالة CV026 عن الكشف عن أي من مركبات 3-hydroxy، ولا تتحسس لأغلب مركبات 3-oxo إلا أن

السلالة KYC55 لها تحسس عالٍ لمدى أوسع من جزيئات AHLs المكتشفة لحد الآن، وستكون أداة مفيدة للكشف عن التراكيز الواطئة جداً من AHLs .

وقد وجد الباحثون Stickler وجماعته (1998) بعد إجراء الكشف الحيوي عن AHLs باستخدام السلالة الكاشفة A136 *Agrobacterium tumefaciens* لتسع عشرة عزلة *P. aeruginosa* معزولة من التهابات المجاري البولية أن أربع عشرة عزلة أظهرت نتائج موجبة علماً أن السلالة المذكورة هي أقل تحسساً لمركبات AHLs من السلالة المستخدمة في الدراسة الحالية (KYC55).

كما وجد الباحثون Zhu وجماعته (2002) أن (١٧) عزلة *P. aeruginosa* مسببة لالتهاب قرنية العين كانت جميعها منتجة للـ AHLs ، إلا أنها تباينت في كمية المركب الحاث ونوعه باستخدام السلالتين A136 *Agrobacterium tumefaciens* و CV026 ، ولوحظت مستويات عالية من AHLs في العزلات المنتجة للبروتييز بخلاف العزلات السامة للخلايا .

وقام الباحثون Erickson وجماعته (٢٠٠٢) بقياس مستوى جزيئات الحاث الذاتي في عينات القشع لثلاثة وعشرين مريضاً بالتليف الكيسي، وقد لوحظت مستويات فعالة حيوياً للمركبين $3\text{-oxo-}C_{12}\text{-HSL}$ و $C_4\text{-HSL}$ ، وقاموا بقياس ناتج الجين المولد للحاث الذاتي *lasI* ووجدوا أنه غالباً ما يُعبّر عنه في رئات مرضى التليف الكيسي، وأكدّت النتائج أن أنظمة QS فعالة وقد تسيطر على التعبير عن عوامل الضراوة في رئات هؤلاء المرضى، واستخدمت في هذه الدراسة العزلات الكاشفة *E. coli* MGU (pKDT17) و *P. aeruginosa* PAO-JP2 (pECP61.5) اللتان تنتجان إنزيم بيتا – كلاكتوسايديز استجابة للحاث الذاتي، في حين استخدمت السلالة A136 في اختبار كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC لتشخيص أنواع AHLs في القشع .

أما الباحثون Cha وجماعته (١٩٩٨) فقد استخدموا أربعة أنظمة كاشفة خضعت لها (١٠٦) عزلات تعود لأجناس معزولة من النبات، وتبين أن السلالة *Agrobacterium tumefaciens* NT1 هي الأكثر تحسساً، وأن (٦٢) عزلة كانت منتجة لجزيئات الحاث الذاتي، وعند إجراء اختبار TLC تبين أن هناك أجناساً تنتج نوعاً واحداً من جزيئات الحاث الذاتي

في حين أنتجت أنواع أخرى سبعة مركبات ظهرت في اختبار كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC .

في حين وجد الباحثون Elasri وجماعته (٢٠٠١) أن (٥٤) عزلة من مجموع (١٣٧) عزلة *P. aeruginosa* معزولة من النبات والتربة منتجة لجزيئات الحاث الذاتي باستخدام ثلاثة أنظمة كاشفة، ولوحظ أن إنتاج AHLs أكثر شيوعاً في بكتريا النبات ولم تُلاحظ أي علاقة بين الأنماط الجينية لجرثومة *Pseudomonas syringae* وقابليتها لإنتاج AHLs .

ووجد الباحثون Wang وجماعته (٢٠٠٦) أن العديد من جراثيم العائلة المعوية لا تنتج أي AHLs في الظروف المختبرية، إذ من مجموع (٥٣) عزلة كانت تسع عزلات منتجة فقط باستثناء جنس Serratia، إذ تم تشخيص نظام QS جوال محمول على عناصر وراثية قافزة في *S. marcescens* ومن المحتمل أن يحدث نقل أفقي لجينات تخليق AHLs في الجراثيم المعوية خلال استعمار المعي واحتمال أنه حدث في العزلات المرضية إذ لوحظ احتواؤها على جينات تخليق AHLs، وقد تكون هذه الطريقة في نقل جينات استشعار النصاب QS ضرورية لتمكين أنواع معينة من الهرب من بيئتها الطبيعية (بوصفها كائنات متعايشة) وأن تسبب إصابة مرضية بفعل استشعار النصاب QS .

المصادر:

Baron, E.J. and Finegold, S.M.(1990). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 8th ed. Mosby Comp., USA.

Cha, C. G. P.; Chen, Y.C.; Shaw, P.D. and Farrand, S.K. (1998). Production of acylhomoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. Mol. Plant Microbe Interact., 11: 1119-1129.

Chapon-Herve, V.; Akrim, M.; Latifi. A. (1997). Regulation of the xcp secretion pathway by multiple quorum-sensing modulans in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol., 24(6): 1169–78.

Elasri, M.; Delorme, S.; Lemanceau, P.; Stewart, G., B.; Glickmann, E.; Oger, P. M. and Dessaux, Y. (2001). Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas spp.*

of elastase expression. J. Bacteriol., 179: 3000-3009.

Gambello, M.; Kaye S. and Iglewski B. H. (1993). LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (apr) and an enhancer of exotoxin A expression. Infect. Immun., 61: 1180–4.

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

Kiratisin, P.; Tucker K. D. and Passador L. (2002). LasR, a transcriptional activator of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, functions as a multimer. J. Bacteriol., 184(17): 4912–19.

Lamb, J. R.; Patel, H.; Montminy, T.; Wagner V. E. and Iglewski B. H. (2003). Functional domains of the RhlR transcriptional regulator of *Pseudomonas*

than among soil borne *Pseudomonas* spp. Appl. Environ. Microbiol., 67(3):1198-1209.

Erickson, D. L.; Endersby, R.; Kirkham, A.; Stuber, K.; Vollman, D. D.; Rabin, H. R.; Mitchell, I. and storey, D.G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems may control virulence factor expression in the lungs of patient with cystic fibrosis. Infect. Immun., 70(4):1783-1790.

Fuqua, W.; Winans S. and Greenberg E. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR\ LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. J. Bacteriol., 176: 269-75.

Gambello, M. J. and Iglewski, B.H (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator

control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. J. Bacteriol., 179:5756–5767.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold spring Harbor Laboratory press., New York.

Schuster, M. and Greenberg, E. P. (2006). A network of networks : quorum sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Med. Microbiol., 296:73-81.

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

Stickler, D. J.; Morris, N. S.; Mclean, R. J. and Fuqua, C. (1998). Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum sensing singal molecules in situ and in vitro. Appl. Environ. Microbiol., 64(9): 3486-3490.

aeruginosa. J. Bacteriol., 185(24): 7129–39.

McClean, K. H.; Winson, M. K.; Fish, L. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. Microbiol., 143: 3703–11.

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.

Ochsner, U. A. and Reiser. J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:6424–6428.

Pearson, J. P.; Pesci, E. C. and Iglewski, B. H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in

Wang, H.; Cai, T.; Weng, M.; Zhou, J.; Cao, H.; Zhong, Z. and Zhu, J. (2006).Conditional production of acyl homoserine lactone type quorum sensing signals in clinical isolates of entrobacteria. J. Med. Microbiol., 55:1751-1753.

Whiteley, M.; Bangera, M. G.; Bumgarner, R. E. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Nature, 413: 860–4.

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.

Zhu , H.; Thuruthyil, S. J. and Willcox, M. D. P. (2002). Determination of quorum sensing signal molecules virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from contact lens induced microbial keratitis. J. Med. Microbiol., 51: 1063-1070.

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.