



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology

E-ISSN: 3060-7647

13rd Year, Vol. 13, No. 50, 2024 pp. 27-40

Received: 06/01/2024

Accepted: 27/05/2024

(Research Paper)

The synergistic effect of sulfated polysaccharides of green algae with antibiotics on quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*

Rashid Alijani Ardeshir* 

Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

R.alijani@ausmt.ac.ir

Mina Owrang

Assistant Professor of Laboratory Sciences, Faculty of Medical Sciences, Islamic Azad University, Sari Branch, Sari, Iran.
orangmina402@gmail.com

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative pathogenic bacterium commonly found in healthcare centers, and is known for its ability to form biofilms, its virulence controlled by quorum sensing systems (QS). The aim of this study was to investigate the antimicrobial synergistic potential of sulfated polysaccharides (SPs) extracted from the green alga *Enteromorpha intestinalis* and to examine the effect of SPs on the QS phenotype and biofilm formation ability of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. The extracted SPs combined with ceftazidime exhibited a significant antibiotic effect against *P. aeruginosa*, increasing its bactericidal activity up to nine times. In addition, concentrations below the minimum inhibitory concentration (MIC) of the extracted SPs (5 and 10 µg/ml) successfully reduced pyocyanin and rhamnolipid production, swimming motility, protease activity, and biofilm formation ability compared to the control group ($P < 0.05$). It appears that SPs extracted from green algae have significant potential as a coating agent for surgical equipment, effectively preventing hospital-acquired infections caused by the pathogenic bacterium *P. aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial, chromium sensing systems, green algae, anti-biofilm

* Corresponding Author

3060-7647/ © 2024 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



Alijani Ardeshir, R. & Owrang, M The synergistic effect of sulfated polysaccharides of green algae with antibiotics on quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbial Biology*, 2024; 13 (50): 27-40.
<http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2024.140364.1579>

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is commonly found in hospitals. Previous studies showed the high ability of this bacterium and the ATCC 10145 strain to form biofilms. Biofilm formation in this pathogen is a chromium sensing (QS) mediated process. Inhibition of QS systems can reduce bacterial QS as they are key players in pathogenicity. Due to the increasing prevalence of drug-resistant biofilms and their resistance to conventional antibiotics, there is an urgent need for natural compounds that can act as both QS inhibitors and biofilm inhibitors. Today, the marine environment is known for its diversity of organisms that produce useful bioactive compounds. In this case, algae have attracted particular attention due to their great diversity of bioactive compounds, especially sulfated polysaccharides (SPs). Sulfated polysaccharides are anionic molecules with a linear structure that are known to have antiviral, anti-inflammatory, antioxidant, immunomodulatory neuroprotective and antimicrobial properties. In addition, SPs have shown antibiofilm activity against biofilms formed by Gram-positive and Gram-negative bacteria. However, the potential of SPs as QS inhibitors has not been investigated in previous studies. The aim of this study was to investigate the anti-chromium sensing properties and biofilm formation of SPs extracted from the green algae *Enteromorpha intestinalis* against *P. aeruginosa*.

Materials and methods

E. intestinalis was harvested from the southern shores of the Caspian Sea (Babolsar-Iran), dried and powdered. To extract the SP, algae powder was extracted using water at 25°C with mechanical stirring for 15 h. The resulting mixture was filtered and the residue subjected to a second extraction using water with mechanical stirring for 45 min at 90 °C. After centrifugation, the resulting luminescents were precipitated using ethanol and then dried with a freeze dryer and stored. *P. aeruginosa* ATCC 10145 was obtained from the Iranian Biological Resource Center. The synergistic effects of sulfated polysaccharides with antibiotics were carried out using the macro-dilution method. Bacterial suspension and SPs were added separately to the serial dilutions of antibiotics. Then, 50 µL of each dilution was transferred to wells containing Mueller-Hinton agar medium and incubated at 37°C for 18-24 h. The minimum inhibitory concentration that did not result in visible bacterial growth in the tubes or inhibition zones in the plates was considered as MIC and MBC, respectively. To evaluate the inhibition of QS factors by SPs, phycocyanin was first quantified. Briefly, *P. aeruginosa* was cultured in PB medium with different concentrations of SPs (5 and 10 µg/ml) for 18 h. The supernatant from the overnight culture was extracted with chloroform (3 mL) and the resulting organic phase was re-extracted with nitrogen hydrochloride. The absorbance of the pink-blue phase was measured at a wavelength of 520 nm. Salt agar mineral medium containing 2% glucose, 0.05% cetyltrimethylammonium bromide and 0.02% methylene blue was used to evaluate rhamnolipid. Positive results were observed as a dark blue halo around the culture and evaluated using a transilluminator at a wavelength of 365 nm. To measure bacterial swimming, 0.5% LB agar plates were prepared with different concentrations of SPs (5 and 10 µg/ml). To evaluate exoprotease activity, *P. aeruginosa* was cultured with and without SPs extract (5 and 10 µg/ml). The cell-free supernatant was obtained by centrifugation. Then, 100 µl of the supernatant was mixed with azocasein in Tris-HCl solution containing CaCl₂. The reaction mixture was incubated at 37°C for 15 min, followed by the addition of 500 µL of trichloroacetic acid to stop the reaction. After centrifugation at 12,000 rpm for 10 min, the optical density of the supernatant was measured at 400 nm. The anti-biofilm properties of SPs were evaluated using the microtiter plate method. The optical

density of the dissolved biofilms was measured at a wavelength of 620 nm using a microtiter plate reader.


Results

The antibacterial activity of ceftazidime against *P. aeruginosa* was weak with a MIC of 970 µg/ml. However, when combined with SPs, ceftazidime showed strong antibacterial activity and the MIC of ceftazidime was reduced to 100 µg/ml. Similar results were obtained using the agar diffusion method, with the inhibition zones ranging from 80 mm to 30 mm. The results showed that treatment of *P. aeruginosa* bacteria with SPs concentrations of 5 and 10 µg/ml resulted in a significant decrease in phycocyanin and rhamnolipid production, as well as a decrease in swimming motility and protease activity compared to the control group ($P < 0.05$). The greatest decrease was observed at a concentration of 100 µg/mL of SPs. Treatment with SPs at a concentration of 5 µg/ml significantly impaired the ability of *P. aeruginosa* to form a biofilm, and this impairment increased at a dose of 10 µg/ml. Therefore, it caused a significant decrease in biofilm formation ability.

Discussion and conclusion

The present study showed the synergistic effect of the combination of sulfated polysaccharide extracted from green algae and antibiotic treatment, which led to a decrease in the minimum inhibitory concentration (MIC) of *P. aeruginosa*. This finding highlights the antimicrobial activity of sulfated polysaccharide. Ceftazidime inhibits cell wall synthesis, specifically by interfering with the transpeptidation reaction through covalent binding to the target site of penicillin-binding proteins (PBPs), and this binding ultimately stops the synthesis of peptidoglycan, leading to bacterial cell death. Algal compounds have good activity against antibiotic resistant pathogens. This sensitivity is attributed to the difference in cell wall structure of these bacteria as algal bioactive compounds are better able to penetrate the cell membranes of Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria. One of the strategies to combat antibiotic resistance in pathogenic bacteria is to prevent QS function. Inhibiting the synthesis of QS activators results the induction of degradative proteins in bacteria, leading to a reduction in the production of biofilm components and virulence enzymes such as proteases and pigments such as phycocyanin. On the other hand, inhibiting the production of virulent enzymes such as proteases in bacteria can prevent the destruction of the host's immunoglobulins, as a result, provide the possibility that the bacteria do not have a chance to escape from the host's defense mechanism. Pathogenic bacteria have a much higher pathogenicity in mass communication, i.e. in biofilms, and for these reasons, QS plays a key role in the behavior of QS and the formation of biofilms. Targeting QS mechanisms can change molecular signaling and lead to effective destruction of pathogenic bacteria, especially those that are resistant to traditional treatments. Therefore, treatments that target QS in bacteria can potentially have a longer shelf life and reduce the ability of bacteria to form biofilm as a solution to the basic challenge of antibiotic resistance. In general, the results of the present study showed that sulfated polysaccharides extracted from green algae can potentially act as a useful tool to control the pathogenicity of *P. aeruginosa* bacteria, which synergizes with common and targeted antibiotics. The results showed that SPs probably can prevent and treat bacterial diseases and, with further testing, may act as a natural treatment to eradicate bacterial biofilm infections instead of *P. aeruginosa* bacteria.

تأثیر سینترژیستی پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ه‌جلبک سبز با آنتی‌بیوتیک بر کروم سنسینگ و تشکیل بیوفیلم در باکتری سودوموناس آئروژینوزا

رشید علیجانی اردشیر*  : استادیار گروه زیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، مازندران، ایران
r.alijani@ausmt.ac.ir
مینا اورنگ : استادیار علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری، ساری، ایران.
orangmina402@gmail.com

چکیده

سودوموناس آئروژینوزا باکتری بیماری‌زای گرم منفی است که معمولاً در مراکز بهداشتی یافت می‌شود و به دلیل توانایی خود در تشکیل بیوفیلم‌ها و اینکه عوامل بیماری‌زای آن توسط سیستم‌های کروم سنسینگ (QS) کنترل می‌شود، مشهور است. هدف از مطالعه حاضر بررسی پتانسیل هم‌افزایی ضد میکروبی پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ه (SPs) استخراج‌شده از جلبک سبز اینترومورفا اینتستینالیس و همچنین بررسی اثر SPs بر فوتوپ Qs و توانایی تشکیل بیوفیلم در باکتری سودوموناس آئروژینوزا ATCC 10145 بود. SPs استخراج‌شده که با سفت‌زیدیم ترکیب شده بود، اثر آنتی‌بیوتیکی چشمگیری را در برابر باکتری سودوموناس آئروژینوزا نشان داد و فعالیت باکتری کشی آن را تا ۹ برابر افزایش داد. علاوه بر این، غلظت‌های زیر حداقل غلظت بازدارنده (MIC) SPs استخراج‌شده (۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تولید پیوسیانین و رامنولپید و همچنین تحرک شنا، فعالیت پروتئاز و توانایی تشکیل بیوفیلم را در مقایسه با گروه کنترل با موفقیت کاهش داد ($P < 0.05$). به نظر می‌رسد SPs استخراج‌شده از جلبک سبز پتانسیل درخور توجهی را به‌عنوان یک عامل پوششی برای تجهیزات جراحی داشته باشد و به‌طور مؤثر از عفونت‌های بیمارستانی ناشی از باکتری بیماری‌زای سودوموناس آئروژینوزا جلوگیری کند.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، ضد میکروبی، سیستم‌های کروم سنسینگ، جلبک سبز، ضد بیوفیلم

* نویسنده مسئول مکاتبات

علیجانی اردشیر، رشید، اورنگ، مینا. تأثیر سینترژیستی پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ه‌جلبک سبز با آنتی‌بیوتیک بر کروم سنسینگ و تشکیل بیوفیلم در باکتری

سودوموناس آئروژینوزا. زیست‌شناسی میکروبی. ۱۳ (۵۰): ۲۷-۴۰. <http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2024.140364.1579>

3060-7647 © 2024 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا^۱ یک باکتری گرم منفی است که معمولاً در بیمارستان‌ها یافت می‌شود (۱) و بسیاری از مطالعات گذشته نشان‌دهنده توانایی بالای این باکتری و سویه ATCC 10145 در تشکیل بیوفیلم است (۲-۴). تشکیل بیوفیلم‌ها همراه با سایر عوامل بیماری‌زا در این پاتوژن یک فرآیند با واسطه کروم سنسینگ (QS) است. سیستم‌های LasI-LasR و rhlI-rhlR QS با تنظیم ترشح اگزوتوکسین‌ها و اگزوانزیم‌ها مانند پروتئاز، آلژینات و مواد پلیمری خارج سلولی که به توسعه بیوفیلم کمک می‌کنند، قدرت بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا را کنترل می‌کنند (۵). رشد بیوفیلم‌ها متکی به تحرک جمعیت با واسطه QS است که توسط سیستم rhl و سایر سیستم‌های QS در سودوموناس آئروژینوزا کنترل می‌شود و نقش مهمی در توسعه عفونت دارند. مهار سیستم‌های QS می‌تواند حدت باکتریایی را کاهش دهد؛ زیرا آنها بازیگران کلیدی در بیماری‌زایی هستند (۶). در نتیجه، مطالعات متعدد مهارکننده‌های QS و مهارکننده‌های بیوفیلم را برای کاهش تشکیل بیوفیلم و عوامل بیماری‌زایی مرتبط بررسی کرده‌اند (۷، ۸). با توجه به شیوع روزافزون بیوفیلم‌های مقاوم به دارو و مقاومت آنها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های معمولی، نیاز فوری به ترکیبات طبیعی وجود دارد که می‌توانند هم به عنوان مهارکننده‌های QS و هم به عنوان مهارکننده‌های بیوفیلم عمل کنند.

امروزه محیط‌های دریایی با تنوع گسترده‌ای از ارگانسیم‌هایی شناخته شده‌اند که ترکیبات زیست‌فعال مفید تولید می‌کنند. در میان آنها جلیک‌های دریایی

به دلیل تنوع شیمیایی بسیار زیاد به طور ویژه‌ای شایان توجه قرار گرفته‌اند. ترکیبات جلیکی پتانسیل بالقوه‌ای در جهت کشف ترکیبات نوین ضد میکروبی برای مقابله با عفونت باکتریایی و انتشار گسترده مقاومت میکروبی دارند (۹). جلیک‌های دریایی به تولید طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه متنوع معروف‌اند که شامل آلکالوئیدها، پلی فنل‌ها، ترین‌ها، کریونیل‌ها، پلی ساکاریدهای سولفات^۳ (SPs)، فلوروتانین‌ها و استیلین‌ها هستند که بسیاری از آنها هالوژنه‌اند (۱۰). این ترکیبات می‌توانند به عنوان عوامل ضد میکروبی یا عوامل آنتی‌بیوفیلم جایگزین شوند. در میان ترکیبات جلیکی SPs کاربردهای متنوعی در مواد غذایی، سوخت، پزشکی، بیوتکنولوژی، صنایع دارویی و آرایشی و بهداشتی دارد (۱۱). پلی ساکاریدهای سولفات‌ها مولکول‌های آنیونی دارای ساختار خطی هستند که خواص ضد ویروسی، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان، تعدیل‌کننده ایمنی، محافظت‌کننده عصبی و پتانسیل ضد میکروبی آنها شناخته شده است (۱۲، ۱۳). علاوه بر این، SPs فعالیت آنتی‌بیوفیلمی را در برابر بیوفیلم‌های تشکیل شده توسط باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داده است (۱۴). با این حال، پتانسیل SPs به عنوان یک مهارکننده QS در مطالعات بررسی نشده است. هدف مطالعه حاضر بررسی خواص ضد کروم سنسینگ SPs استخراج شده از جلیک سبز اینترومورفا اینتستینالیس در برابر سودوموناس آئروژینوزا است. این ارزیابی شامل ارزیابی تأثیر SPs بر فنوتیپ وابسته به QS در باکتری سودوموناس آئروژینوزا و تشکیل بیوفیلم در این باکتری است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری جلبک دریایی سبز و استخراج پلی‌ساکارید سولفات‌ها

جلبک سبز اینترومورفا اینتستینالیس از سواحل جنوبی دریای کاسپین (بابلسر-ایران) برداشت شد (عرض جغرافیایی: $36^{\circ} 41' 54''$ N و طول جغرافیایی: $52^{\circ} 33' 23''$ E) و اصالت گیاه‌شناسی آن توسط کارشناسان دانشگاه فناوری‌های نوین آمل تأیید شد. ابتدا جلبک‌های دریایی چندین بار با آب شیرین، شسته و قسمت‌های نکروزه، جدا و دور ریخته شدند و سپس در دمای اتاق خشک شدند. جلبک‌های دریایی خشک‌شده با استفاده از آسیاب برقی پودر شدند. استخراج پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ها از جلبک‌ها با استفاده از روش سوزا و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد. به‌طور خلاصه، پودر جلبک با استفاده از ۱/۵ درصد وزنی آب در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با هم‌زدن مکانیکی به مدت ۱۵ ساعت استخراج شد. مخلوط حاصل فیلتر شد تا بقایای جلبک دریایی، جمع‌آوری و مایع رویی دور ریخته شود. باقی‌مانده به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد تحت یک استخراج دوم با استفاده از آب با هم‌زدن مکانیکی قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ برای حذف هر گونه باقی‌مانده، روش‌های حاصل با استفاده از اتانول (1:3 v/v) رسوب داده و سپس با خشک‌کن انجمادی خشک و ذخیره شدند (۱۵).

کشت باکتری

سودوموناس آئروژینوزا ATCC 10145 از مرکز ذخایر زیستی ایران در تهران، ایران تهیه شد. میکروارگانسیم به‌صورت کشت ذخیره در محلول گلیسرول ۵۰ درصد (پارس آزما، ایران) در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. قبل از هر آزمایش،

کشت منجمدشده در محیط LB مایع (سیگما، انگلستان) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت تا زمانی کشت داده شد که به 0.5 OD در ۵۹۵ نانومتر (1×10^7 CFU ml⁻¹) رسید.

اثر هم‌افزایی پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ها با آنتی‌بیوتیک

فعالیت ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم علیه سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از روش ماکرو رقت ارزیابی شد. به‌منظور تعیین حداقل غلظت‌های بازدارنده (MICs)، ابتدا آنتی‌بیوتیک در آب مقطر برای ایجاد غلظت ۱۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر حل شد. سپس غلظت ذخیره پلی‌ساکارید سولفات‌ها (SPs) از طریق یک فیلتر میلی پوره ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد. رقت‌های سریالی آنتی‌بیوتیک در محیط LB تهیه شد که از ۱ تا ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. لوله‌های آزمایش با درپوش استریل با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی حاوی 10^4 cfu/mL تلقیح شدند. علاوه بر این، ۵۰ میکرولیتر از هر رقت در چاهک‌هایی به قطر ۷ میلی‌متر روی محیط کشت مولر-هینتون آگار قرار داده شد. سپس تمام لوله‌ها و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوبه شدند. کمترین غلظت آنتی‌بیوتیکی که منجر به رشد قابل مشاهده باکتری‌ها در لوله‌ها یا نواحی مهارتی در پلیت‌ها نشان نداد به ترتیب به‌عنوان MIC و MBC ثبت شد. برای آزمایش ترکیب عصاره SPs با سفتازیدیم از همان روش‌هایی استفاده شد که در بالا ذکر شد. در این مورد، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی و SPs به‌طور جداگانه به رقت‌های سریالی آنتی‌بیوتیک اضافه شد. یک بار دیگر، ۵۰ میکرولیتر از هر رقت در چاهک‌های حاوی محیط کشت مولر-هینتون آگار، منتقل و سپس

۱۰ میکروگرم بر لیتر به آن اضافه شد. سوراخ‌هایی برای ایجاد چاه‌هایی با قطر ۴ میلی‌متر روی صفحات متین بلو آگار استفاده شد که سپس با ۳۰ میکرولیتر کشت تازه از جدایه‌های جداگانه بارگذاری شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۷۲ ساعت انکوبه شدند. نتایج مثبت به‌عنوان یک منطقه هاله آبی تیره در اطراف کشت، مشاهده و با استفاده از یک ترنس‌لومیناتور^۶ در طول موج ۳۶۵ نانومتر ارزیابی شد.

سنجش حرکت شنا باکتری

روش کایس و همکاران (۲۰۱۹) برای ارزیابی مهار تحرک باکتری در صفحات آگار نرم استفاده شد (۱۷). برای ارزیابی تحرک، صفحات آگار ۰/۵ درصد LB با غلظت‌های مختلف SPs (۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد. یک کشت ۵ میکرولیتری در مرکز هر پلیت به‌صورت نقطه‌ای تلقیح شد که متعاقباً به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شد. علاوه بر این، تحرک با استفاده از صفحات آگار ۰/۳ درصد LB، به‌دنبال همان روش ارزیابی شد. قطر منطقه ازدحام‌شده یا شناسه برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری و گزارش شد.

فعالیت آگزوپروتئاز

فعالیت آگزوپروتئاز با استفاده از روش تجزیه آزوکازین، براساس روش حسین و همکاران (۲۰۱۷) ارزیابی شد (۱۹). سودوموناس آئروژینوزا با بدون عصاره SPs (۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کشت داده شد. مایع رویی بدون سلول با سانتریفیوژ به دست آمد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی با آزوکازین ۰/۳ درصد (۱۰۰۰ میکرولیتر) در محلول ۰/۰۵ مولار Tris-HCl حاوی ۰/۵ میلی‌مولار CaCl₂ در pH ۷/۵ مخلوط شد. مخلوط واکنش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به

در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوباسیون شد. کمترین غلظت آنتی‌بیوتیکی که به رشد قابل مشاهده باکتری‌ها در لوله‌ها یا نواحی مهاری در پلیت‌ها منجر نشد، به ترتیب به‌عنوان MIC و MBC در نظر گرفته شد (۱۶).

مهار فاکتورهای حدت توسط SPs

کمی‌سازی پیوسیانین

استخراج پیوسیانین در محیط سودوموناس براث (PB) با استفاده از روش توضیح داده‌شده توسط کایس^۴ و همکاران (۲۰۱۹) انجام شد. محیط PB شامل MgCl₂ (۱/۴ گرم بر لیتر)، پپتون (۲۰ گرم بر لیتر) و K₂SO₄ (۱۰ گرم بر لیتر) بود (۱۷).

سودوموناس آئروژینوزا در محیط PB با غلظت‌های مختلف SPs (۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۱۸ ساعت کشت شد. مایع رویی (۵ میلی‌لیتر) از کشت یک شبه با کلروفرم (۳ میلی‌لیتر) استخراج شد و فاز آلی حاصل با ۰/۲ نیتروژن هیدروکلراید (۱/۲ میلی‌لیتر) مجدداً استخراج شد. جذب فاز آبی صورتی در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین غلظت پیوسیانین، جذب در ۱۷/۰۷۲ ضرب شد (۱۷).

ارزیابی رامنولیبید

تولید رامنولیبید با استفاده از روش پلیت آگار آبی (Bap) و به‌دنبال روش توضیح داده‌شده توسط بهات^۵ و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد (۱۸). تشخیص رامنولیبید با استفاده از محیط معدنی نمک آگار حاوی ۲ درصد گلوکز، ۰/۰۵ درصد ستیل تری متیل آمونیوم بروماید و ۰/۰۲ درصد متیلن بلو انجام شد. در هر تیمار از یک سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند تهیه‌شده از کشت باکتریایی ۲۴ ساعته استفاده شد که SPs استریل در غلظت‌های ۵ و

اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند. داده‌های ارائه‌شده در این مطالعه نشان‌دهنده مقادیر میانگین با انحراف معیار است. تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۴) برای مقایسه گروه کنترل با گروه‌های تحت تیمار، با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون *t* مستقل انجام شد. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ برای تعیین معنی‌داری آماری استفاده شد.

نتایج

فعالیت آنتی‌بیوتیکی SPs

فعالیت ضدباکتریایی سفتازیدیم در برابر سودوموناس آئروژینوزا با MIC ۹۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ضعیف بود. با این حال، هنگامی که با SPs ترکیب شد، سفتازیدیم فعالیت ضدباکتریایی قوی از خود نشان داد. MIC سفتازیدیم به ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش یافت. نتایج مشابهی با استفاده از روش انتشار آگار به دست آمد که مناطق بازدارندگی به ۳۰ میلی‌متر از ۸۰ میلی‌متر رسید (جدول ۱).

مدت ۱۵ دقیقه، انکوبه و به‌دنبال آن ۵۰۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید (۱۰ درصد وزنی بر حجم) اضافه شد تا واکنش متوقف شود. پس از سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، چگالی نوری مایع رویی در ۴۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تشکیل بیوفیلم

خواص ضدبیوفیلمی SPs با استفاده از روش میکروتیتر پلیت ارزیابی شد (۱۷). باکتری‌های کشت‌شده به مدت ۱۲ ساعت به چاهک‌های یک صفحه میکروتیتر ۹۶ چاهی تلقیح شدند. SPs در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد؛ درحالی‌که چاهک‌های کنترل (کنترل منفی) بدون تیمار باقی ماندند. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته، محیط آسپیره شد و چاهک‌ها سه بار با بافر فسفات استریل شسته شدند. سپس محلول کریستال ویولت (۰/۱ درصد) به چاهک‌ها، اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. رنگ اضافی با شست‌وشوی چاهک‌ها حذف شد و بیوفیلم‌ها در اتانول ۹۰ درصد حل شدند. چگالی نوری بیوفیلم‌های محلول در طول موج ۶۲۰ نانومتر با استفاده از صفحه‌خوان میکروتیتر

جدول ۱. حداقل غلظت‌های بازدارنده (MIC) سفتازیدیم در برابر سودوموناس آئروژینوزا ATCC 10145 در هر دو آزمایش لوله و پلیت، با و بدون افزودن پلی‌ساکارید سولفات استخراج‌شده (ردیف سوم جدول زیر نشان‌دهنده نتایج مربوط به جدول CLSI^۲ برای گونه سودوموناس آئروژینوزا بوده است و گزارشی درباره سویه مدنظر ما ارائه نشده است).

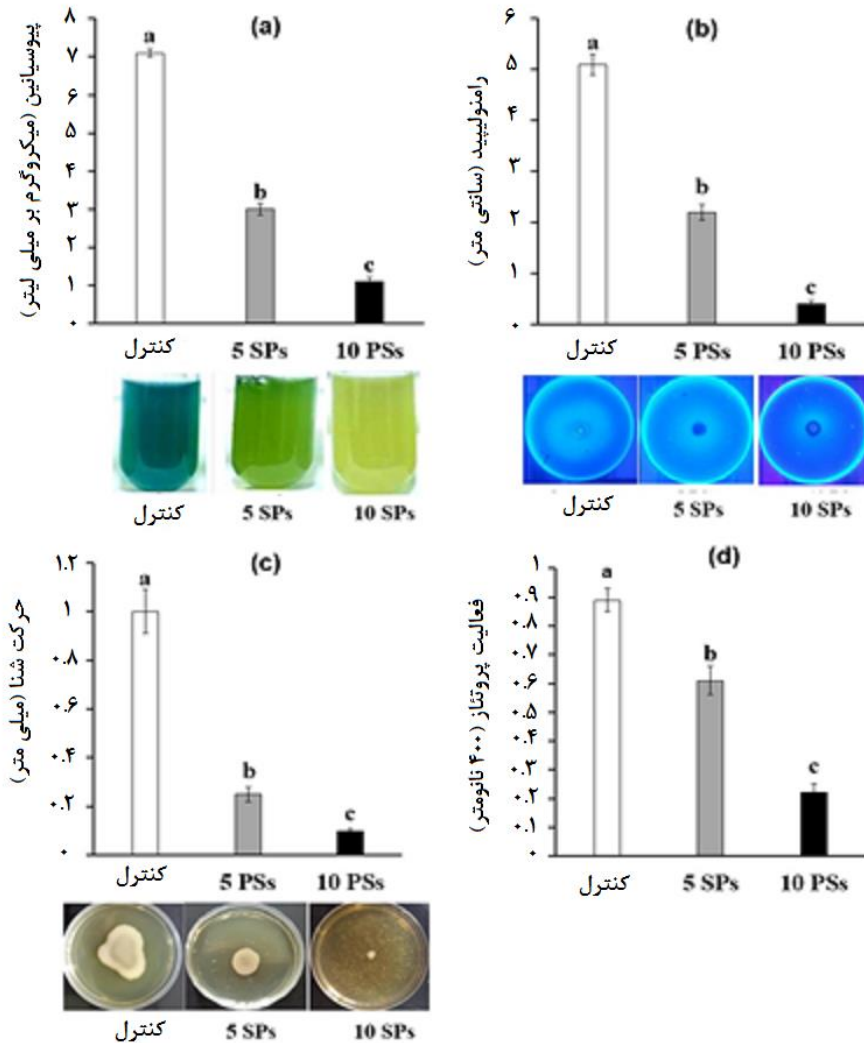
Table 1. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 in both tube and plate tests, with and without the addition of the extracted sulfated polysaccharide (the third row of the table below shows the results related to the CLSI table for *Pseudomonas aeruginosa* species and no report has been provided about the strain we are looking for).

قطر ناحیه بازدارندگی (میلی‌متر)	MIC (µg/ml)	آنتی‌بیوتیک	ردیف
۸۰	۹۸۰	سفتازیدیم (کنترل مثبت)	۱
۳۰	۱۰۰	پلی‌ساکارید سولفات+ سفتازیدیم	۲
۱۸	۸-۳۲	سفتازیدیم (براساس جدول CLSI)	۳

رامنولپید و همچنین کاهش تحرک شنا و فعالیت پروتئاز نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.05$) (شکل ۱). بیشترین کاهش در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر SPs مشاهده شد.

تأثیر SPs بر سیستم کروم سنسینگ

نتایج نشان دادند تیمار باکتری سودوموناس آئروژینوزا با غلظت‌های SPs ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر منجر به کاهش معنی‌دار تولید پیوسیانین و



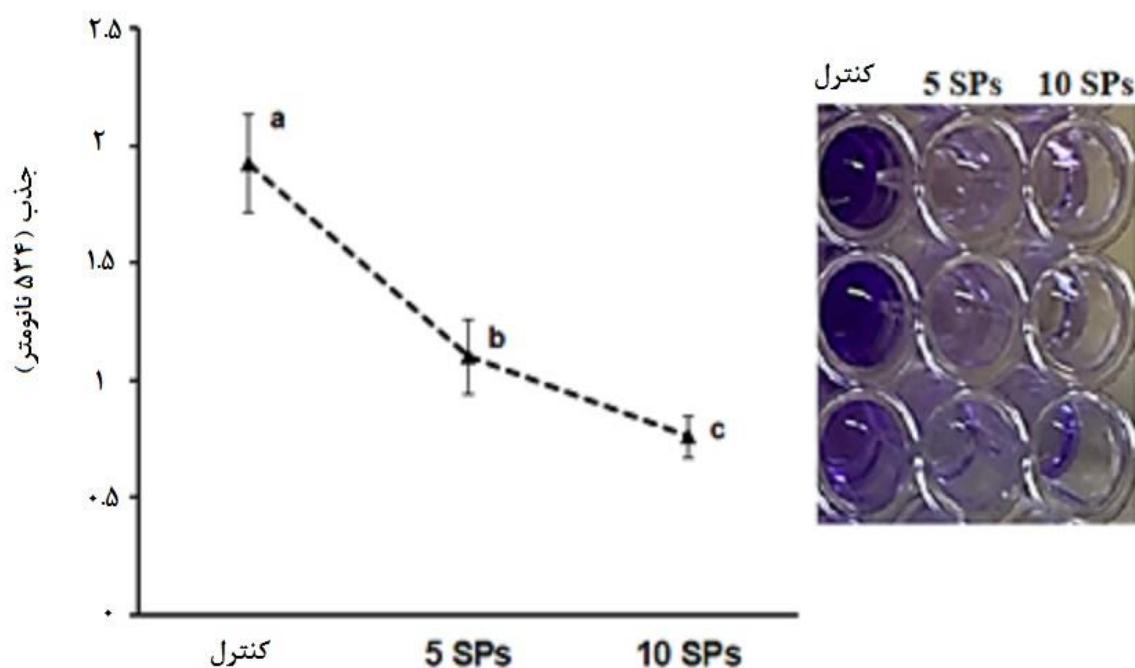
شکل ۱. تأثیر غلظت‌های زیر MIC پلی ساکاریدهای سولفات‌ه‌ استخراج‌شده از جلیک اینترومورفا اینتستینالیس (SPs) بر عوامل دخیل در کروم سنسینگ سودوموناس آئروژینوزا. (a): تولید پیوسیانین، (b): تولید رامنولپید، (c): تحرک شنا، (d): فعالیت پروتئاز. تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها با حروف مجزا مشخص شده است ($P < 0.05$) ($n=9$). تیمار کنترل شامل محیط کشت و باکتری بوده است (کنترل منفی).

Figure 1. Effect of sub-MIC concentrations of sulfated polysaccharides extracted from the algae *Enteromorpha intestinalis* (SPs) on factors involved in quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa*. (a): pyocyanin production, (b): rhamnolipid production, (c): swimming motility, (d): protease activity. Significant differences between groups are indicated by separate letters ($P < 0.05$) ($n=9$). The control treatment included culture medium and bacteria (negative control)

تأثیر SPs بر تشکیل بیوفیلم

تیمار SPs با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌طور چشمگیری ظرفیت تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا را مختل کرد و این اختلال با دوز ۱۰

میکروگرم بر میلی‌لیتر باز هم افزایش یافت (شکل ۲)؛ بنابراین، سبب کاهش چشمگیر در قابلیت تشکیل بیوفیلم شد ($P < 0.5$) (شکل ۲).



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های زیر MIC پلی‌ساکاریدهای سولفات‌شده از جلبک اینترومورفا اینتستینالیس (SPs) بر تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا. تیمار کنترل شامل محیط کشت و باکتری بوده است (کنترل منفی).

Figure 2. Effect of sub-MIC concentrations of sulfated polysaccharides extracted from the alga *Enteromorpha intestinalis* (SPs) on biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. The control treatment included culture medium and bacteria (negative control).

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، نتایج اثر هم‌افزایی ترکیب پلی‌ساکارید سولفات‌شده از جلبک سبز و درمان آنتی‌بیوتیکی را نشان دادند که منجر به کاهش حداقل غلظت مهاری (MIC) در سودوموناس آئروژینوزا شد. این یافته اثر ضد میکروبی پلی‌ساکارید سولفات‌ها را برجسته می‌کند. سفتازیدیم، یکی از اعضای گروه آنتی‌بیوتیک‌های β -لاکتام به‌طور گسترده

به‌عنوان یکی از مؤثرترین و بی‌خطرترین آنتی‌بیوتیک‌ها شناخته شده است. این گروه شامل آنتی‌بیوتیک‌های متعددی است که ساختار حلقه مشترک β -لاکتام دارند و می‌توانند بر اساس معیارهای مختلف به پنج زیرگروه اصلی طبقه‌بندی شوند (۲۰). نحوه عملکرد این آنتی‌بیوتیک‌ها مهار سنتز دیواره سلولی، به‌ویژه تداخل در واکنش ترانس‌پپتیداسیون از طریق اتصال کووالانسی به محل هدف پروتئین‌های متصل‌شونده به پنی‌سیلین

به صورت وابسته به دوز کاهش داد. نظیر مشاهدات مطالعه حاضر، در مطالعه و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند پلی ساکاریدهای سولفات استخراج شده از جلیک سبز کلامیدوموناس ریناردتی^۹ توانستند سبب تضعیف سیستم QS و کاهش تولید بیوفیلم در باکتری های سالمونلا اینتریکا^{۱۰} و ویبریو هارویی^{۱۱} شوند (۲۵). به طور مشابه، پلی ساکاریدهای استخراج شده از لاروس نویلیس^{۱۲} سبب مهار رشد و تشکیل بیوفیلم در باکتری های اینتروکوکوس فکالیس، اشیریشیا کولی، استافیلوکوکوس اپیدرمیس^{۱۳} و سودوموناس آئروژینوزا شد (۲۶)؛ هرچند مطالعه کنونی روی سویه سودوموناس آئروژینوزا ATCC 10145 صورت گرفته است و تعمیم آن به گونه های دیگر باکتریایی می تواند نتایج متفاوتی را ایجاد کند. مطالعات پیشین ثابت کردند باکتری ها از طریق فرایند ترکیب سلول-سلول، بیوفیلم را تشکیل می دهند؛ ارتباطی که به عنوان سیستم کروم سنسینگ (QS) شناخته می شود (۲۷). یکی از راهبردهای مبارزه با مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های پاتوژن، جلوگیری از عملکرد QS است. مهار سنتز فعال کننده های QS سبب القای پروتئین های تجزیه کننده در باکتری ها می شود که نتیجه آن کاهش تولید اجزای بیوفیلم و آنزیم های ویروانس نظیر پروتئازها و و رنگدانه ها نظیر پیوسیانین می شود (۲۸). همچنین، مهار تولید آنزیم های ویروانس نظیر پروتئازها در باکتری می تواند از تخریب ایمونوگلوبولین ها در میزبان جلوگیری کند و در نتیجه این امکان را فراهم می کند تا باکتری فرصتی برای فرار از مکانیسم دفاعی میزبان و ایجاد عفونت نداشته باشد (۲۹).

باکتری های پاتوژن در ارتباطات جمعی یعنی در بیوفیلم ها، بیماری زایی بسیار قوی تری دارند. با توجه به این دلایل، QS نقش کلیدی در رفتار حدت و تشکیل

(PBP) است و این اتصال در نهایت سنتز پپتیدوگلیکان را متوقف می کند و منجر به مرگ سلولی باکتریایی می شود (۲۱). توجه به این نکته مهم است که آنتی بیوتیک های β - لاکتام در برابر باکتری هایی مؤثرند که به طور فعال، در حال رشد و در فرایند سنتز دیواره های سلولی خود هستند (۲۲). مطالعات پیشین انواع مختلفی از ترکیبات جلیک دریایی را کشف کردند که در طب سنتی و همچنین در علوم نوین داروسازی به عنوان عواملی شناخته شده اند که به درمان عفونت های واقعی کمک می کنند (۲۳). بسیاری از آنها اثربخشی خوبی در برابر پاتوژن های مقاوم به آنتی بیوتیک دارند. نظیر نتایج مشاهده شده در مطالعه حاضر، اوویلا و ویشواکارما^۸ (۲۰۱۹) گزارش کردند SPSs استخراج شده از جلیک می تواند فعالیت ضد میکروبی قوی در برابر باکتری های پاتوژن گرم مثبت و گرم منفی نشان دهد (۱۴). مطالعات نشان دادند پلی ساکاریدها به طور چشمگیری استافیلوکوکوس، باسیلوس، پروتئوس و اشیریشیا کولی را مهار می کنند و به طور خاص، سودوموناس آئروژینوزا و باسیل فوزیفرم به پلی ساکاریدها حساس تر از بقیه باکتری ها هستند (۲۴). این حساس بودن به تفاوت در ساختار دیواره سلولی این باکتری ها نسبت داده می شود؛ زیرا ترکیبات زیست فعال جلیکی توانایی نفوذ در غشاهای سلولی باکتری های گرم مثبت را بیش از گرم منفی ها دارند و این سبب گشاد شدن منافذ غشایی و نشت بعدی ماکرومولکول های داخل سلولی مانند پروتئین و اسید نوکلئوتید می شود که در نهایت منجر به مرگ سلولی می شود (۲۵).

در مطالعه حاضر، SPSs به طور مؤثری تولید پیوسیانین، رامنولپیدها و پروتئاز را در سودوموناس آئروژینوزا، کاهش و همچنین تحرک شنا و تشکیل بیوفیلم را

پلی ساکاریدهای سولفات‌ها استخراج شده از جلبک سبز به‌طور بالقوه می‌توانند به‌عنوان یک عامل مفید در جهت کنترل بیماری‌زایی باکتری سودوموناس آئروژینوزا عمل کنند که با هم‌افزایی با آنتی‌بیوتیک‌های معمول و هدف قرار دادن QS سبب مهار رشد و تشکیل بیوفیلم در این باکتری می‌شود. نتایج نشان دادند SPS احتمالاً توانایی پیشگیری و درمان بیماری‌های باکتریایی را دارند و با آزمایشات بیشتر، می‌توانند به‌عنوان درمان طبیعی برای ریشه‌کنی عفونت‌های بیوفیلم باکتریایی جایگزین باکتری سودوموناس آئروژینوزا عمل کنند.

بیوفیلم دارد؛ از این رو، هدف قرار دادن QS روشی امیدوارکننده برای مقابله با مشکل بیماری‌زایی است. هدف قرار دادن مکانیسم‌های QS می‌تواند سیگنالینگ‌های مولکولی را تغییر دهد و سبب از بین رفتن مؤثر باکتری‌های پاتوژن به‌ویژه باکتری‌های مقاوم به درمان‌های سنتی شود (۲۵)؛ بنابراین، درمان‌هایی که QS را در باکتری‌ها هدف قرار می‌دهند، به‌طور بالقوه می‌توانند ماندگاری طولانی‌تری داشته باشند و سبب کاهش توانایی باکتری‌ها در تشکیل بیوفیلم به‌عنوان حل چالش اساسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی شوند (۳۰).

به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان دادند

References

- (1) Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in context*, 2018; 7. <https://doi.org/10.7573/dic.212527>
- (2) Pires D, Sillankorva S, Faustino A, Azeredo J. Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms. *Research in microbiology*, 2011; 162(8): 798-806. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.06.010>
- (3) Al-Kafaween MA, Hilmi ABM, Jaffar N, Al-Jamal HA, Zahri MK, Jibril FI. Antibacterial and Antibiofilm activities of Malaysian Trigona honey against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 and *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 2020; 13(1). <https://jjbs.hu.edu.jo/files/vol13/n1/Binder13n1.pdf#page=83>
- (4) Ivanova K, Fernandes MM, Mendoza E, Tzanov T. Enzyme multilayer coatings inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on urinary catheters. *Applied microbiology and biotechnology*, 2015; 99: 4373-85. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6378-7>
- (5) Moura-Alves P, Puyskens A, Stinn A, Klemm M, Gühlich-Bornhof U, Dorhoi A, et al. Host monitoring of quorum sensing during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Science*, 2019; 366(6472): eaaw1629. <https://doi.org/10.1126/science.aaw1629>
- (6) Chadha J, Harjai K, Chhibber S. Revisiting the virulence hallmarks of *Pseudomonas aeruginosa*: a chronicle through the perspective of quorum sensing. *Environmental Microbiology*, 2022; 24(6): 2630-56. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15784>
- (7) Aleksić I, Šegan S, Andrić F, Zlatović M, Moric I, Opsenica DM, et al. Long-chain 4-aminoquinolines as quorum sensing inhibitors in *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chemical Biology*, 2017; 12(5): 1425-34. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01149>
- (8) Gökalsın B, Aksoydan B, Erman B, Sesal NC. Reducing virulence and biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* by potential quorum sensing inhibitor carotenoid: zeaxanthin. *Microbial ecology*, 2017; 74: 466-73. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0949-3>
- (9) Buseti A, Thompson TP, Tegazzini D, Megaw J, Maggs CA, Gilmore BF. Antibiofilm activity of the brown alga *Halidrys siliquosa* against clinically relevant

- human pathogens. *Marine drugs*, 2015; 13(6): 3581-605.
<https://doi.org/10.3390/md13063581>
- (10) Surendhiran D, Li C, Cui H, Lin L. Marine algae as efficacious bioresources housing antimicrobial compounds for preserving foods-A review. *International Journal of Food Microbiology*, 2021; 358: 109416.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109416>
- (11) Seedeve P, Moovendhan M, Viramani S, Shanmugam A. Bioactive potential and structural characterization of sulfated polysaccharide from seaweed (*Gracilaria corticata*). *Carbohydrate polymers*, 2017; 155: 516-24.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.011>
- (12) Arokiarajan MS, Thirunavukkarasu R, Joseph J, Ekaterina O, Aruni W. Advance research in biomedical applications on marine sulfated polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022; 194: 870-81.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.142>
- (13) Liyanage N, Nagahawatta D, Jayawardena TU, Sanjeeva KKA, Jayawrdhana H, Kim J-I, et al. Sulfated Polysaccharides from Seaweeds: A Promising Strategy for Combatting Viral Diseases—A Review. *Marine Drugs*, 2023; 21(9): 461.
<https://doi.org/10.3390/md21090461>
- (14) Vishwakarma J, Vavilala SL. Evaluating the antibacterial and antibiofilm potential of sulphated polysaccharides extracted from green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Microbiology*, 2019; 127(4): 1004-17.
<https://doi.org/10.1111/jam.14364>
- (15) Souza BW, Cerqueira MA, Bourbon AI, Pinheiro AC, Martins JT, Teixeira JA, et al. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food Hydrocolloids*, 2012; 27(2): 287-92.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.10.005>
- (16) Muslim SN, Kadmy IMA, Ali ANM, Salman BK, Ahmad M, Khazaal SS, et al. Chitosan extracted from *Aspergillus flavus* shows synergistic effect, eases quorum sensing mediated virulence factors and biofilm against nosocomial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of biological macromolecules*, 2018; 107: 52-8.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.146>
- (17) Qais FA, Khan MS, Ahmad I. Broad-spectrum quorum sensing and biofilm inhibition by green tea against gram-negative pathogenic bacteria: Deciphering the role of phytocompounds through molecular modelling. *J Microbial pathogenesis*, 2019; 126: 379-92.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.030>
- (18) Bhat R, Dayamani K, Hathwar S, Hegde R, Kush A. Exploration on production of rhamnolipid biosurfactants using native *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 2015; 4(2).
<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20153309642>
- (19) Husain FM, Ahmad I, Al-Thubiani AS, Abulreesh HH, AlHazza IM, Aqil F. Leaf extracts of *Mangifera indica* L. inhibit quorum sensing-regulated production of virulence factors and biofilm in test bacteria. *J Frontiers in Microbiology*, 2017; 8: 727.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00727>
- (20) Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg-26*: AMGH Editora; 2014.
- (21) Guilfoile P, Alcamo IE. *Antibiotic-resistant bacteria*. Infobase Publishing; 2007.
- (22) Drlica K, Fong IW. *Antimicrobial Resistance and Implications for the Twenty-first Century*. Springer; 2008.
- (23) Mbosso EJT, Ngouela S, Nguedia JCA, Beng VP, Rohmer M, Tsamo E. In vitro antimicrobial activity of extracts and compounds of some selected medicinal plants from Cameroon. *Journal of*

- ethnopharmacology*, 2010; 128(2): 476-81.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.017>
- (24) Pierre G, Sopena V, Juin C, Mastouri A, Graber M, Maugard T. Antibacterial activity of a sulfated galactan extracted from the marine alga *Chaetomorpha aerea* against *Staphylococcus aureus*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2011; 16: 937-45.
<https://doi.org/10.1007/s12257-011-0224-2>
- (25) Vishwakarma J, VL S. Unraveling the anti-biofilm potential of green algal sulfated polysaccharides against *Salmonella enterica* and *Vibrio harveyi*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020; 104: 6299-314.
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10653-5>
- (26) Chmit M, Kanaan H, Habib J, Abbass M, Mcheik A, Chokr A. Antibacterial and antibiofilm activities of polysaccharides, essential oil, and fatty oil extracted from *Laurus nobilis* growing in Lebanon. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2014; 7: S546-S52. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60288-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60288-1)
- (27) Paluch E, Rewak-Soroczyńska J, Jędrusik I, Mazurkiewicz E, Jermakow K. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020; 104: 1871-1881.
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10349-w>
- (28) García-Lara B, Saucedo-Mora M, Roldán-Sánchez J, Pérez-Eretza B, Ramasamy M, Lee J, et al. Inhibition of quorum-sensing-dependent virulence factors and biofilm formation of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* strains by ZnO nanoparticles. *Letters in applied microbiology*, 2015; 61(3): 299-305.
<https://doi.org/10.1111/lam.12456>
- (29) Aravindraja C, Valliammai A, Viszwapriya D, Pandian SK. Quorum sensing mediated virulence inhibition of an opportunistic human pathogen *Serratia marcescens* from unexplored marine sediment of Palk Bay through function driven metagenomic approach. 2017.
<https://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/42350>
- (30) Rutherford ST, Bassler BL. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2012; 2(11): a012427.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427>

¹ *Pseudomonas aeruginosa*² Quorum sensing³ Sulphated polysaccharides⁴ Qais⁵ Bhat⁶ Transilluminator⁷ Clinical and Laboratory Standards Institute⁸ Vavilala and Vishwakarma⁹ *Chlamydomonas reinhardtii*¹⁰ *Salmonella enteric*¹¹ *Vibrio harveyi*¹² *Laurus nobilis*¹³ *Staphylococcus epidermidis*