خاموشی حدنصاب حسگری باکتری‌ها توسط عصارهٔ گیاهان و تأثیر آن بر بیماری‌زایی باکتری *Pectobacterium carotovorum*

اسماعیل محمودی

گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان، خوراسگان، اصفهان، ایران

مسئول مکاتبات: اسماعیل محمودی، پست الکترونیک: e.mahmoudi@khuisf.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۷/۱۲ ۵ (۱)۵۹-۷۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۰۶

چکیده

باکتری‌ها از یک مکانیسم مولکولی پیشرفته به‌نام حدنصاب حسگری یا quorum sensing برای تنظیم بیان ژن‌ها و برنامه‌ریزی فعالیت‌های اجتماعی در جمعیت استفاده می‌کنند. این پدیده همراه با تولید مولکول‌های کوچک پیام‌رسان مانند اسیل هموسرین لاکتون است و فرآیندهای بیولوژیک بسیار مهمی از جمله تولید بیوفیلم، آنتی‌بیوتیک و فاکتورهای بیماری‌زایی را تنظیم می‌کند. بعضی گیاهان به‌دلیل ارتباط طولانی مدت با باکتری‌ها قادر به تولید ترکیباتی هستند که فعالیت‌های وابسته به حدنصاب حسگری باکتری‌ها را سرکوب می‌کنند. در این پژوهش فعالیت مختل‌کنندگی سیستم حدنصاب حسگری در عصارهٔ متانولی ۲۵ گونه گیاهی با استفاده از باکتری گزارش‌گر *Chromobacterium violaceum* CV026 در حضور پنج میلی‌گرم در لیتر مولکول سیگنال C6-AHL در محیط کشت لوریا برتانی ردیابی شد. نتایج نشان داد عصاره‌های گیاهان گشنیز *Coriandrum sativum*، شیرین‌بیان *Glycyrrhiza glabra*، منداب *Eruca sativa*، ختمی *Althea officinalis* و کرفس‌کوهی *Kelussia odoratissima*، تولید رنگ‌دانه ویولاسئین در باکتری *C. violaceum* CV026 را سرکوب کرده و باعث تشکیل پرگنه‌های روشن باکتری گزارش‌گر در اطراف چاهک عصاره‌ها شدند. عصاره‌های کرفس‌کوهی و منداب با اثر تخریبی در فعالیت پروتئین‌های LuxI و LuxR باکتری گزارش‌گر، بیشترین تأثیر را در سرکوب حدنصاب حسگری داشتند. در این پژوهش غده‌های ضدعفونی شده سیب‌زمینی با سوسپانسیون 10^6 cfu/ml باکتری *Pectobacterium carotovorum* و عصاره‌های گیاهی تلقیح و به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس و رطوبت نسبی ۸۰ درصد قرار داده شدند. نتایج نشان داد غده‌های تیمار شده با عصارهٔ گیاهان شیرین‌بیان و منداب کاهش شدید علائم پوسیدگی نرم (بیش از ۶۰ درصد) را نشان دادند. این گیاهان حاوی ترکیباتی هستند که با اختلال در حدنصاب حسگری، تولید آنزیم‌های پکتینولیتیک را در باکتری پکتوباکتریوم مختل می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های پکتینولیتیک، N-اسیل هموسرین لاکتون، حدنصاب حسگری، *Chromobacterium violaceum* CV026

مقدمه

در سال‌های اخیر دانش و یافته‌های بشر در مورد دنیای باکتری‌ها باعث کشف ارتباطات شبه چندسلولی و رفتارهای اجتماعی در جمعیت آن‌ها شده است. باکتری‌ها قادر به بروز رفتارهای دسته‌جمعی هستند که نتیجه آن هماهنگ شدن آن‌ها با یکدیگر و دوری از رفتارهای فردی است. این پدیده که حدنصاب حسگری (Quorum Sensing, QS) نامیده می‌شود، در نتیجه تولید مولکول‌های کوچک پیام‌رسانی است که با انتشار در بین جمعیت باکتری‌ها، باعث هماهنگ شدن آن‌ها در بیان ژن‌ها در جهت بروز رفتارهای اجتماعی می‌شود (Smith *et al.*, 2006; Fuqua *et al.*, 2001). اسیل هموسرین لاکتون یا AHL فراوان‌ترین نوع مولکول‌های سیگنال در بسیاری از باکتری‌های گرم منفی است. باکتری‌ها از مکانیسم حدنصاب حسگری برای حرکت، شناگری، تشکیل بیوفیلم، تولید فاکتورهای بیماری‌زایی، تولید آنزیم‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، سیدروفورها، رنگدانه‌ها و سایر فرایندهای بیولوژیک که نیاز به هماهنگی درون جمعیتی دارد، استفاده می‌کنند (Whitehead *et al.*, 2001). به‌طور کلی هدف باکتری‌ها از این مکانیسم، افزایش جمعیت تا محدوده‌ای است که با بیان به‌موقع و کنترل شده ژن‌ها،

توانایی خود را در کسب فضا، غذا و رقابت با سایر میکروارگانیسم‌ها افزایش دهند (Mahmoudi *et al.*, 2014; Williams *et al.*, 2007). از آن‌جایی که مکانیسم حدنصاب حسگری فرآیندی حیاتی برای باکتری‌ها به‌شمار می‌آید، هرگونه اختلال در این فرآیند می‌تواند به‌عنوان روشی نوین و کارآمد در راستای کاهش آلودگی‌های باکتریایی انسان، حیوانات و گیاهان مطرح باشد. در حقیقت با هدف قرار دادن حد نصاب حسگری می‌توان روش‌های حفاظتی و درمانی جدید برای بیماری‌های میکروبی ابداع کرد (Sperandio, 2007; Cirou *et al.*, 2010). اصطلاح ضد حدنصاب حسگری (Quorum Quenching) برای توصیف تمام فرآیندهایی به‌کار می‌رود که موجب مختل شدن حدنصاب حسگری می‌شوند (Dong *et al.*, 2007). استراتژی‌های ضد حدنصاب حسگری با هدف کشتن باکتری‌ها به‌وجود نیامده‌اند، بلکه به‌طور انتخابی محدودیت بیشتری برای بقاء باکتری نسبت‌به داروهای زیست‌کش ایجاد می‌کنند و از این روش‌ها می‌توان علیه پدیده رو به گسترش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده کرد (Uroz *et al.*, 2009).

یکی از جدیدترین مکانیسم‌های شناخته شده در این زمینه توانایی بعضی از گیاهان در تولید ترکیباتی است که می‌توانند مکانیسم QS باکتری‌ها را مختل نماید. آلوده شدن گیاهان به باکتری‌های بیماری‌زا بستگی به تبادل مولکول‌های سیگنال بین سلول باکتری‌ها در محیط گیاه است. در این بین گیاهان سیگنال‌های باکتریایی را دریافت کرده و با شیوه‌های پیچیده نسبت‌به آن واکنش می‌دهند. در واقع گیاهان ترکیباتی تولید می‌نمایند که رفتار سیگنال‌های باکتریایی را تقلید کرده و موجب اختلال در تعادل QS باکتری‌ها می‌شوند (Mahmoudi, 2015; Keshavan *et al.*, 2005).

مطالعات متعددی در زمینه فعالیت سرکوب کننده QS باکتری‌ها توسط گیاهان انجام گرفته است. عصاره‌های سیر، زیتون سیاه فلوریدایی *Bucida buceras*، شیشه‌شور، یونجه باغی، توت‌فرنگی وحشی، سویا، گوجه‌فرنگی، یونجه، برنج، نخودفرنگی و وانیل دارای بازدانده‌های قوی QS هستند (Choo *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2003; Fray, 2002). بیشتر ترکیبات مؤثر و فعال این عصاره‌ها هنوز شناسایی نشده است اما ترکیب ال-کاناوانین به‌عنوان یکی از بازدارنده‌های مهم QS در عصارهٔ یونجه زراعی به اثبات رسیده است. همچنین وجود این مولکول در دیگر گیاهان لگومینوز نیز ثابت شده است (Keshavan *et al.*, 2005). از مهم‌ترین ترکیبات بازدارنده حدنصاب حسگری می‌توان به ترکیبات فورانونی هالوژن‌دار حاصل از جلبک قرمز *Delisea pulchra* (Greville) Montagne اشاره نمود (Manefield *et al.*, 2002). همچنین بررسی‌ها نشان داده است که گیاهان *Scutellaria baicalensis* Georgi و *Melicope lunu-ankenda* می‌توانند به‌ترتیب موجب کاهش ویولاسئین (رفتاری کاملاً وابسته به QS) در باکتری *Chromobacterium violaceum* CV026 و نیز مهار فاکتورهای بیماری‌زایی تحت کنترل QS در *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 شوند (Song *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2012). گیاهان ترخون، تربچه و گیاه دارویی ختمی دارای خاصیت قوی ضد حدنصاب حسگری علیه باکتری‌های کروموباکتریوم و پکتوباکتریوم می‌باشند که در غلظت‌های پایین باعث سرکوب فنوتیپ‌های وابسته به QS در این باکتری‌ها می‌شوند (Mahmoudi, 2015). همچنین آنالیز عصارهٔ گیاه شوید *Anethum graveolens* L.، با کروماتوگرافی گازی نشان می‌دهد که ترکیبات مختلفی در این گیاه وجود دارند که احتمالاً اوژنول نقش مهم‌تری در فعالیت ضد QS این گیاه دارد (Khan *et al.*, 2009; Makhfian *et al.*, 2015). با توجه به اهمیت اختلال در سیستم حدنصاب حسگری به‌عنوان روش نوین و کارآمد در مبارزه با باکتری‌های بیماری‌زا، این پژوهش با هدف یافتن گیاهان با خاصیت سرکوب‌کنندگی QS در جهت کنترل بیماری‌زایی باکتری *P. carotovorum* روی غده‌ی سیب‌زمینی و توسعه راه‌کارهای کنترل بیولوژیک آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و عصاره‌گیری

در این پژوهش ۲۵ گونهٔ گیاهی از خانواده‌های مختلف مورد بررسی قرارگرفت. گیاهان از مناطق مختلف

جمع‌آوری و پس از شناسایی توسط آزمایشگاه گیاه‌شناسی، در دمای اتاق خشک و آسیاب شدند. برای عصاره‌گیری ۱۰۰ گرم از پودر گیاهی خشک شده توسط ترازوی دیجیتال توزین و با ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول درون فلاسک ارلن‌مایر مخلوط شد. پس از پوشاندن دهانهٔ فلاسک‌ها با ورقه‌ی آلومینیومی، به‌مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه شیکر با سرعت ۹۰ دور در دقیقه قرار داده شد. بعد از این‌که حلال و گیاه همگن شد، محلول توسط کاغذ صافی واتمن فیلتر شد و محلول‌های صاف شده در دستگاه تبخیر قرار داده شد تا حلال آن‌ها از عصاره جدا شود. در این مرحله تمام حلال به‌کار برده شده با استفاده از دستگاه روتاری جداسازی شد. به‌طوری که فقط عصارهٔ خالص و تغلیظ شده به‌دست آمد. سپس ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر متانول به عصاره‌ها اضافه و از فیلتر میلی پور ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. محلول عبور کرده از فیلتر در میکروتیوب‌های سترون ریخته و در فریزر ۲۰- درجهٔ سلسیوس برای آزمایشات بعدی نگهداری شد.

سویه‌های باکتریایی و محیط‌های کشت

باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش، *Chromobacterium violaceum* CV026 و *Pectobacterium carotovorum* بود. سویه *C. violaceum* CV026 به‌عنوان بیوسنسور و سویه ردیاب مولکول‌های سیگنالی باکتری‌ها استفاده شد (McClean *et al.*, 1997). این سویه از مرکز بین المللی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی ایتالیا تهیه و استفاده شد. سویه CV026 در محیط کشت لوریا برتانی (LB) و در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس رشد داده و به‌صورت کشت ۲۴ ساعته مورد استفاده قرار گرفت. باکتری *P. carotovorum* از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه بیماری‌های گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان، تهیه و به‌عنوان عامل تولیدکننده مولکول‌های سیگنال طبیعی استفاده شد. از اسیل هموسرین لاکتون C6-HSL (شرکت سیگما-آلدریچ، امریکا) به‌عنوان مولکول سیگنال استاندارد و القاءکننده تولید رنگ‌دانه ویولاسئین در باکتری CV026 استفاده شد.

خاصیت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی

سطح تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت LB با ۱۰۰ میکرولیتر از کشت تازه باکتری *Pseudomonas fluorescens* با جمعیت 10^8 CFU/ml مایه‌کوبی شد. سپس دیسک‌های کاغذی سترون به‌قطر شش میلی‌متر آغشته به هر یک از عصاره‌های گیاهی روی این تشتک‌ها قرار داده شد. برای تسهیل در انتشار عصاره‌ها در آگار، ابتدا تشتک‌های پتری به‌مدت دو ساعت در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس و سپس به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس قرار داده شد. قطر هاله‌ی بازدارنده رشد اطراف دیسک‌ها (منطقه بدون پرگنه باکتری به‌علاوه قطر دیسک) به‌عنوان شاخص فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها اندازه‌گیری شد. از دیسک‌های آغشته به حلال متانول برای کنترل منفی و از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

خاصیت ضد حدنصاب حسگری عصاره‌های گیاهی

تولید رنگ‌دانه بنفش ویولاسئین در باکتری *C. violaceum* CV026 تحت کنترل حدنصاب حسگری می‌باشد. این سویه قادر به تولید AHL نیست و در حضور مولکول‌های سیگنال خارجی (از نوع AHL) رنگ‌دانه بنفش در پرگنه خود تولید می‌کند (Mc Clean *et al.*, 1997). در این آزمایش، باکتری گزارش‌گر به‌صورت چمنی روی محیط LB حاوی مولکول سیگنال C6-HSL (پنج میلی‌گرم در لیتر) کشت داده شد. سپس چاهک‌هایی به‌قطر یک میلی‌متر درون محیط کشت ایجاد شد. مقدار ۱۵ میکرولیتر از عصاره‌های گیاهی درون چاهک‌ها ریخته و تشتک‌های پتری به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. برای هر عصارهٔ گیاهی، چهار چاهک به‌عنوان تکرار در نظر گرفته شد. پس از این مدت تشتک‌های پتری مورد بررسی قرارگرفتند. رشد پرگنه‌های باکتری گزارشگر بدون تولید رنگ‌دانه بنفش (با هالهٔ روشن) در اطراف چاهک‌ها بیان‌گر تجزیه‌ی مولکول سیگنال توسط عصارهٔ گیاهی می‌باشد. لذا قطر هالهٔ روشن اطراف هر چاهک به‌عنوان شاخص تجزیه‌کننده AHLs

اندازه‌گیری شد. از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک کانامایسین به‌عنوان شاهد استفاده شد.

اثر بر پروتئین‌های LuxR/LuxI باکتری توسط عصاره‌ها

برای بررسی تأثیر عصارهٔ گیاهان با خاصیت ضد حدنصاب حسگری بر پروتئین‌های گیرنده AHL (LuxR) و یا پروتئین‌های تولیدکننده AHL (LuxI)، این آزمایش به‌روش نشت در آگار و حلقه‌های متمرکز (Chenia, 2013) با اندکی تغییر انجام شد. بدین منظور چاهک‌هایی به قطر دو میلی‌متر در تشتک پتری حاوی محیط لوریا برتانی آگار ایجاد شده و ۱۵ میکرولیتر از عصاره گیاهانی که در آزمون قبلی خاصیت ضد QS آن‌ها اثبات شد، به چاهک اضافه شد. برای آزمون سرکوب LuxI، باکتری *P. carotovorum* به‌عنوان تولیدکنندهٔ طبیعی AHL با فاصلهٔ کمی از چاهک و به‌صورت حلقوی کشت شده و در فاصلهٔ دورتر از آن، باکتری اندیکاتور CV026 به‌عنوان گیرنده‌ی AHL کشت شد. برای آزمون سرکوب LuxR، جای باکتری تولیدکننده AHL و باکتری گیرنده AHL در اطراف چاهک عوض شد. تشتک‌های پتری تلقیح شده به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند و پس از این مدت، عدم تولید و یا تولید رنگ‌دانه بنفش در باکتری اندیکاتور به‌عنوان نتیجه سرکوب و یا عدم سرکوب LuxR/LuxI در نظر گرفته شد.

تأثیر عصاره‌های ضد QS در بیماری‌زایی *P. carotovorum* روی غده‌های سیب‌زمینی

یکی از جنبه‌های کاربردی گیاهان مختل کننده QS، استفاده از آن‌ها به‌منظور کنترل بیماری‌های باکتریایی می‌باشد. در این پژوهش تأثیر عصارهٔ این گیاهان روی بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی غده‌های سیب‌زمینی مورد بررسی قرارگرفت. بدین منظور غده‌های سیب‌زمینی رقم آگریا پس از شست‌شو و ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم یک درصد، با ۱۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری *P. carotovorum* (10^6cfu/ml) همراه با ۱۵ میکرولیتر عصارهٔ گیاهان شیرین‌بیان و منداب به‌طور جداگانه، که قبلاً خاصیت ضد QS آن‌ها به اثبات رسیده بود، مایه‌زنی شدند. سپس غده‌های تیمار شده به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس و رطوبت نسبی ۸۰ درصد قرارداده شدند. بعد از این مدت، غده‌ها برش داده شد و میزان پوسیدگی نرم غده‌ها اندازه‌گیری و مقایسه‌ی میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام شد. از باکتری *P. carotovorum* به‌تنهایی و عصارهٔ گیاهی به تنهایی به‌عنوان شاهد استفاده شد.

تجزیه‌ی آماری

تجزیه و تحلیل آماری تمام آزمون‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS V17 انجام شد. مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد و رسم نمودار با نرم افزار Excel.10 صورت گرفت.

نتایج

بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی

در آزمون خاصیت ضدمیکروبی، عصارهٔ گیاهان فرفیون، موسیر، رازیانه و مریم‌گلی از رشد پرگنه‌های باکتری *Pseudomonas fluorescens* جلوگیری نمودند و با شدت‌های مختلف فعالیت ضد میکروبی نشان دادند. بیشترین قطر هاله‌ی بازدارندهٔ رشد در این آزمون برای عصارهٔ گیاهان رازیانه و فرفیون به‌ترتیب برابر ۰/۲± ۹/۴ و ۰/۵± ۶/۸ میلی‌متر بود. با توجه به این که خاصیت ضد حدنصاب حسگری در آزمایش بعدی در گیاهان منداب، شیرین بیان، ختمی، گشنیز و کرفس‌کوهی به اثبات رسید، آزمون ضد میکروبی آن‌ها مجدداً و به‌صورت مجزا مورد بررسی قرارگرفت. در این آزمایش، دیسک‌های کاغذی حاوی ۲۰ میکرولیتر از عصاره‌های خالص شده گیاهان منداب، ختمی و گشنیز فاقد خاصیت بازدارندگی رشد و باکتری‌کشی علیه سودوموناس بودند اما عصاره‌های شیرین‌بیان و کرفس‌کوهی با همین غلظت، هاله بازدارنده رشد نشان دادند. با بررسی میکروسکوپی هاله اطراف دیسک‌ها مشخص شد که پرگنه باکتری در اطراف آن تشکیل نشد و عصارهٔ این گیاهان در نزدیکی دیسک دارای خاصیت باکتری‌کشی بود.

بررسی خاصیت ضد QS عصاره‌ها

در این روش توانایی عصاره الکلی ۲۵ گونه گیاهی از خانواده‌های مختلف در سرکوب فنوتیپ وابسته به QS در باکتری گزارشگر CV026 (تولید رنگ‌دانه بنفش ویولاسئین) مورد ارزیابی قرارگرفت که بدین منظور از محیط کشت‌های دو لایه با پوشش محیط کشت LBA استفاده شد. در این روش حلال متانول به‌عنوان کنترل منفی و دیسک‌های استاندارد کانامیسین (۵۰ میلی‌گرم درلیتر) به‌عنوان کنترل مثبت و برای مشاهده مناطق بازدارنده رشد باکتریایی استفاده شد. نتایج نشان داد از بین ۲۵ عصارهٔ گیاهی مورد استفاده در این پژوهش، عصارهٔ گیاهان شیرین بیان، ختمی، منداب، گشنیز و کرفس‌کوهی خاصیت اختلال در QS باکتری گزارشگر و ممانعت از تولید رنگ‌دانه ویولاسئین در پرگنه‌های این باکتری را نشان دادند (جدول ۱). اضافه کردن ۱۵ میکرولیتر از عصارهٔ الکلی گیاهان فوق به چاهک باعث تشکیل هالهٔ شفاف اطراف چاهک شد. بررسی‌های میکروسکوپی هالهٔ اطراف چاهک‌ها نشان داد که پرگنه‌های باکتری CV026 در این ناحیه به‌صورت بی‌رنگ رشد کردند و در اطراف این ناحیه روشن، پرگنه‌های بنفش باکتری گزارشگر به‌فراوانی مشاهده شد (شکل ۱). وجود پرگنه‌های بی‌رنگ باکتری گزارشگر بیان‌گر تجزیه‌ی مولکول سیگنالی C6-AHL در اطراف چاهک توسط عصارهٔ گیاهی و در نتیجه عدم تولید رنگ‌دانه در پرگنه باکتری می‌باشد. نکته قابل توجه در نتایج این بخش، خاصیت باکتری‌کشی عصارهٔ گیاهان فرفیون، موسیر، رازیانه و مریم‌گلی بود و این‌که این گیاهان هیچ‌گونه تأثیری در حدنصاب حسگری باکتری‌های مورد بررسی نداشتند. در مطالعات میکروسکوپی هیچ‌گونه پرگنه باکتری CV026 در محل هالهٔ بازدارندگی رشد مشاهده نشد که بیان‌گر فعالیت باکتری‌کشی قوی این عصاره‌ها بود.

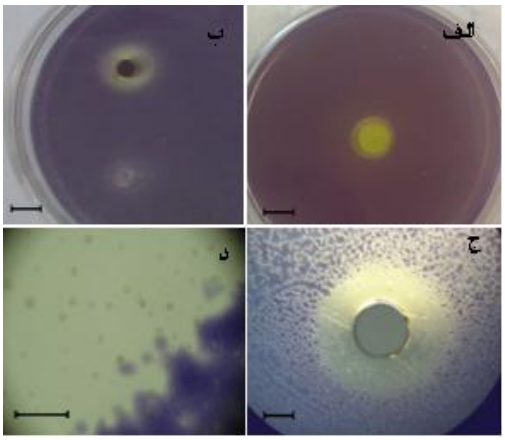
جدول ۱- سرکوب حدنصاب حسگری و ممانعت از تولید رنگ‌دانه بنفش ویولاسئین در باکتری *Chromobacterium violaceum* CV026 توسط عصاره‌های گیاهی.

Table 1. Quorum quenching and violacein pigment production inhibition in *Chromobacterium violaceum* CV026 by plant extracts.

Common name	Scientific name	Violacein inhibition	Common name	Scientific name	Violacein inhibition
Sainfoin	*Onobrychis sativa* Lam.	-	Parsley	*Petroselinum crispum* Mill.	-
Fennel	*Foeniculum vulgare* Mill.	-	Lentil	*Lens culinaris* L.	-
Lambsquarters	*Chenopodium album* L.	-	Euphorbia	*Euphorbia macroclada* Boiss.	-
Sage	*Salvia officinalis* L.	-	Basil	*Ocimum basilicum* L.	-
Mountainous Celery	Kelussia odoratissima Mozaff.	+	Okra	*Abelmoschus esculentus* L.	-
Beet	*Beta vulgaris* L.	-	Coriander	*Coriandrum sativum* L.	+
Rocket	*Eruca sativa* Mill.	+	Eggplant	*Solanum melongena* L.	-
Amaranth	*Amaranthus blitum* L.	-	Pepper	*Capsicum annuum* L.	-
Marshmallow	*Althea officinalis* L.	+	Olive	*Olea europaea* L.	-
Common bean	*Phaseolus vulgare* L.	-	Broadleaf	*Allium ampeloprasum* L.	-
Mung bean	*Vicia radiate* L.	-	Chickpea	*Cicer arietinum* L.	-
Yarrow	*Achillea millefolium* L.	-	Pea	*Pisum sativum* L.	-
Liquorice	*Glycyrrhiza glabra* L.	+			

سرکوب مکانیسم تولید و گیرندگی AHL (LuxI/LuxR) توسط عصاره‌ها

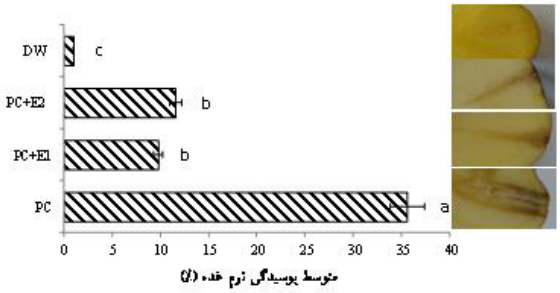
یکی از روش‌های اختلال در سیستم حدنصاب حسگری باکتری‌ها، اختلال در فرایند تولید و یا گیرندگی مولکول‌های سیگنال توسط عوامل ضد QS است که از طریق اختلال در پروتئین‌های دو جزیی LuxI/LuxR انجام می‌شود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که از بین چهار گیاه شیرین بیان، ختمی، منداب و گشنیز که خاصیت ضد QS آن‌ها در سرکوب تولید رنگ‌دانه ویولاسئین در CV026 به‌اثبات رسید، عصارهٔ گیاهان شیرین‌بیان، منداب و گشنیز و کرفس‌کوهی قادر به اختلال در عملکرد LuxI بودند و تولید رنگ‌دانه در باکتری اندیکاتور را به‌شدت کاهش دادند.



شکل ۱- اختلال در حدنصاب حسگری باکتری CV026 *Chromobacterium violaceum* توسط عصاره‌های گیاهی. ممانعت از تولید رنگ‌دانه ویولاسئین به‌صورت تشکیل هاله روشن با پرگنه‌های بی‌رنگ در اطراف چاهک، به‌عنوان فعالیت ضد حدنصاب حسگری عصارهٔ متانولی گیاهان درنظرگرفته شد. الف) دیسک آنتی‌بیوتیک کانامایسین ۵۰µg/ml؛ ب) بالا: عصارهٔ منداب (*Eruca sativa*) با تشکیل هاله‌ی روشن، پایین: متانول به‌عنوان حلال و کنترل منفی؛ ج و د) رشد پرگنه‌های بی‌رنگ باکتری CV026 در محل هاله‌ی اطراف چاهک عصارهٔ منداب. خط مقیاس: الف، ب) ۵ mm؛ ج) ۱۰ mm؛ د) ۱۰ µm.

Fig. 1. Interference with quorum sensing (QS) in *Chromobacterium violaceum* strain CV026 by plant extracts. Inhibition of violacein pigmentation and production the creamy halo of bacteria surrounding the well containing the extract indicate the anti-QS effect. A) the kanamycine antibiotic disc (50 µg ml^{-1}) as growth inhibitor control. B) up: Rocket (*Eruca sativa)* extract with clear halo. down: Methanol as negative control. C, D) The growth of CV026 white colonies in halo around the well contacting *E. sativa* extract. Bars: A, B) 5 mm; C) 10 mm, D) 10 µm.

در این آزمون عصارهٔ ختمی و منداب توانستند در فعالیت پروتئین گیرنده AHL (LuxR) اختلال ایجاد کنند. نکته‌ی جالب توجه این‌که عصارهٔ منداب و کرفس‌کوهی خاصیت دوگانه در سرکوب فعالیت هر دو پروتئین LuxI و LuxR داشتند (جدول ۲).



شکل ۲- تأثیر عصارهٔ متانولی گیاهان مختل‌کننده حدنصاب حسگری در بیماری‌زایی *P. carotovorum* و پوسیدگی نرم غده‌های سیب‌زمینی. کاهش معنی‌دار پوسیدگی نرم در غده‌هایی که با مخلوط ۱۵ عصارهٔ گیاهی و سوسپانسیون باکتری *P. carotovorum* آلوده شده‌اند. PC: *P. carotovorum*؛ PC+E1: سوسپانسیون پکتوباکتریوم و عصارهٔ منداب (*Eruca sativa*)؛ PC+E2: سوسپانسیون پکتوباکتریوم و عصارهٔ شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*)؛ DW: آب مقطر سترون.

Fig. 2. Effect of methanolic extract of anti-QS plants on tissue maceration and pathogenisity of *P. carotovorum.* Significant decreasing of potato soft rot in co-inoculation of potato tubers with *P. carotovorum* (15 µl of 10^6 cfu/ml suspension) and plant extract (15 µl). PC: *P. carotovorum*, PC+E1: bacterial suspension and rocket (*Eruca sativa*). extract, PC+E2: bacterial suspension and *Glycyrrhiza glabra* extract, DW: distilled water.

آزمون تأثیر عصارهٔ گیاهی بر پوسیدگی نرم غده‌های سیب‌زمینی

در این پژوهش از عصارهٔ گیاهان منداب و شیرین‌بیان با خاصیت سرکوب حدنصاب حسگری، برای کاهش بیماری‌زایی *P. carotovorum* روی غده‌های سیب‌زمینی استفاده شد. نتایج نشان داد اضافه کردن ۱۵ میکرولیتر از عصارهٔ گیاهی به سوسپانسون باکتری پکتوباکتریوم باعث کاهش شدید و معنی‌دار علائم پوسیدگی نرم روی سیب‌زمینی شد (شکل ۲). براساس مشاهدات چشمی و اندازه‌گیری درصد پوسیدگی نرم بافت، عصاره‌های شیرین‌بیان و منداب باعث کاهش حدود ۶۰ درصدی نسبت به شاهد (تلقیح غده با پکتوباکتریوم) شدند. در این پژوهش غده‌های سیب‌زمینی تلقیح شده با باکتری تنها علائم پوسیدگی را تا سه برابر غده‌های آلوده شده با باکتری همراه عصارهٔ گیاهی نشان دادند.

جدول ۲- اختلال در پروتئین‌های LuxI/LuxR و سرکوب حدنصاب حسگری توسط عصاره‌های گیاهی.

Table 2. Quorum sensing inhibition with madulation of LuxI/LuxR by plant extracts.

Plant extract	LuxR	LuxI
Althea officinalis	-	-
Glycyrrhiza glabra	-	+
Eruca sativa	+	+
Coriandrum sativum	-	+
Kelussia odoratissima	+	+

بحث

اختلال در سیستم حدنصاب حسگری باکتری‌ها از مکانیسم‌های مهم در ارزیابی اثر مواد طبیعی و غیرشیمیائی علیه بیمارگرهای باکتریایی و رفع مشکلات ناشی از پیدایش مقاومت در اثر استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در جمعیت‌های باکتریایی می‌باشد. از آن‌جایی که بیماری‌زایی یا عوامل وابسته به بیماری‌زایی بسیاری از باکتری‌ها تحت کنترل حدنصاب حسگری می‌باشند، یافتن هرگونه ترکیبات طبیعی با خاصیت بازدارندگی QS می‌تواند به‌عنوان روشی نوین در کنترل طبیعی باکتری‌های بیماری‌زا و کاهش آلودگی‌ها مطرح باشد (Mahmoudi *et al.*, 2014). به‌همین دلیل پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر ۲۵ عصاره از گونه‌های مختلف گیاهی روی خاصیت QS باکتری *C. violaceum* CV026 انجام گرفت و نتایج نشان داد که گیاهان شیرین بیان، گشنیز، ختمی، کرفس کوهی و منداب دارای خاصیت مختل کنندگی QS می‌باشند. با توجه به عدم وجود گزارش‌های مبنی بر بررسی خاصیت ضد حدنصاب حسگری گیاهان مذکور، این مطالعه اولین گزارش از خاصیت ضد QS در گیاهان شیرین بیان، کرفس کوهی و منداب می‌باشد. کرفس کوهی از گیاهان معطر و دارویی ایران است و خواص دارویی و ضدمیکروبی فراوانی از این گیاه گزارش شده است (Rabbani *et al.*, 2011). مطالعات Tiwary *et al.* (2017) نشان می‌دهد عصارهٔ گیاهان *Fragaria nubicola* و *Osbeckia nepalensis* در غلظت‌های مختلف باعث کاهش تولید رنگ‌دانه ویولاسئین در کروموباکتریوم شدند، اما در رشد پرگنه‌های این باکتری و هم‌چنین باکتری *P. aeruginosa* MTCC2297 تأثیری نداشته‌اند. در پژوهش حاضر فعالیت باکتری‌کشی برای تمام عصاره‌های گیاهی علیه باکتری *P. fluorescens* انجام گرفت و از میان ۲۵ گیاه مورد بررسی، عصارهٔ گیاهان رازیانه، مریم گلی، فرفیون و موسیر این ویژگی را با شدت‌های مختلف نشان دادند. اما هیچ‌کدام از این گیاهان فعالیت سرکوب کنندگی برای حدنصاب حسگری باکتری کروموباکتریوم نداشتند.

در سال‌های اخیر مطالعات زیادی روی عوامل و ترکیبات مهارکننده مکانیسم QS صورت گرفته است. براساس مشاهدات Manefield *et al.* (2002)، ترکیبات فورانونی حاصل از جلبک قرمز *D. pulchra* با جایگزینی مولکول‌های سیگنالی در گیرنده‌های پروتئینی، موجب عدم بیان ژن‌های وابسته به QS می‌گردند. نتایج حاصل از مطالعه Keshavan *et al.* (2005) مشخص نمود که مادهٔ ال-کاناوانین در گیاه یونجه (*Medicago sativa*) باعث ایجاد اختلال در مکانیسم حدنصاب حسگری سویه *Sinorhizobium meliloti* می‌شود. هم‌چنین عصاره‌های گیاهی *Lilium brownii* و *Angelica sinensis* به‌ترتیب

موجب ۱۷/۲±۰/۳ و ۱۳/۵±۰/۳ درصد بازدارندگی تولید ویولاسئین در سویه CV026 شدند (Yeo & Tham, 2012). ترکیبات موجود در عصارهٔ وانیل دارای خاصیت مختل‌کنندگی QS می‌باشند. به‌طوری که این گیاه توانست موجب کاهش ۸۷/۷۳ تا ۹۸/۴۱ درصدی تولید ویولاسئین در باکتری CV026 شود (Choo *et al.*, 2006). ارزیابی‌های Song *et al.* (2012) نشان داد که عصارهٔ اتانولی *Scutellaria basicalensis* Georgi علاوه بر کاهش ویولاسئین، باعث مهار بیماری‌زایی باکتری *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* می‌شود. وجود مقادیر زیادی از تری‌ترپن‌ها و فلاونوئیدها در عصارهٔ گیاهان *Astible rivularis*، *Fragaria nubicola* و *Osbeckia nepalensis* باعث خاموشی شدید حدنصاب حسگری در *C. violaceum* MTCC2656 و *P. aeruginosa* و کاهش فعالیت‌های وابسته به QS مانند تحرک، شناگری و تولید رنگ‌دانه در این باکتری‌ها شده است (Tiwary *et al.*, 2017).

در مطالعه حاضر خاصیت ضد QS گیاهان شیرین‌بیان، گشنیز، ختمی و منداب با جلوگیری از تشکیل ویولاسئین در سویه گزارشگر و تولید هالهٔ کرمی رنگ اثبات شد. این درحالی است که گیاهان مذکور فاقد خاصیت باکتری‌کشی بودند و فقط برای گیاه شیرین‌بیان در غلظت‌های بالا خاصیت باکتری‌کشی دیده شد. هم‌چنین نتایج به‌دست آمده در این مطالعه کاهش خاصیت بیماری‌زایی جدایه *P. carotovorum* توسط عصارهٔ گیاهی را به‌دلیل ایجاد اختلال در مکانیسم حدنصاب حسگری به اثبات رسانید. به‌طوری که در آزمون مقایسه میانگین‌ها، اختلاف معنی‌داری در تولید علائم پوسیدگی نرم بین غده‌های تلقیح شده با باکتری به‌همراه عصارهٔ گیاهی و غده‌های تلقیح شده با باکتری تنها وجود داشت. در حقیقت شدت تولید علائم پوسیدگی نرم در تیمارهای حاوی عصاره‌های گیاهی بسیار کمتر از تیمار باکتری تنها بود. از آن‌جا که مکانسیم بیماری‌زایی *Pcc* تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی دیوارهٔ سلولی گیاه (به‌ویژه پکتینازها) و تحت کنترل QS می‌باشد، کاهش علائم بیماری در اثر حضور عصاره‌ها به‌معنی تأثیر عصارهٔ گیاهان منداب و شیرین‌بیان در سیستم حدنصاب حسگری باکتری پکتوباکتریوم و سرکوب آن می‌باشد. این ویژگی قبلاً در کاهش تولید میزان ویولاسئین توسط سویه‌ی CV026 نیز به اثبات رسیده بود. نتایج این پژوهش با مطالعات Rodrigues *et al.* (2016) و Tolmacheva *et al.* (2014) در زمینه‌ی خاموشی فنوتیپ‌های وابسته به QS توسط عصاره‌های فنلی گیاهان مطابقت دارد.

یکی از اهداف اختلال در حدنصاب حسگری، پروتئین‌های تولیدکننده و گیرنده مولکول‌های سیگنالی مربوط به تیپ LuxI/LuxR هستند. در این فرایند از اتصال مولکول سیگنال QS با گیرنده‌ی پروتئینی آن جلوگیری به‌عمل می‌آید و در نتیجه QS مختل می‌شود. علاوه براین، چون خود مولکول سیگنال AHL در پایداری و حفظ ساختمان پروتئین گیرنده نقش دارد، رقابت میان عوامل بازدارنده و مولکول AHL باعث افزایش تجزیه شدن پروتئین گیرنده می‌شود. این پدیده در طبیعت به‌وسیلهٔ چندین ترکیب گیاهی انجام می‌گیرد که می‌توان از آن‌ها به‌منظور اختلال در QS استفاده کرد (Makhfian *et al.*, 2015). در برخی از گیاهان ترکیباتی وجود دارد که از طریق رقابت با مولکول‌های سیگنالی AHL در اتصال به گیرنده LuxI، باعث سرکوب QS در باکتری‌ها می‌شوند. در این پژوهش عصارهٔ گیاهان شیرین‌بیان، منداب و گشنیز اثرات بازدارندگی از فعالیت LuxI در باکتری پکتوباکتریوم نشان دادند. هم‌چنین عصارهٔ ختمی توانست در فعالیت LuxR پکتوباکتریوم اختلال ایجاد کند. از یافته‌های جالب این مطالعه تأثیر دوگانه عصارهٔ گیاه منداب در سرکوب هر دو LuxI و LuxR است که پیش از این نیز در بعضی گیاهان مانند *Mangifera indica* (Shukla & Bhathena, 2016) و *Kigelia africana* (Chenia, 2013) گزارش شده است.

مهم‌ترین کلاس ترکیبات بازدارنده‌ی QS فورانون‌ها هستند. این ترکیبات اولین‌بار از جلبک قرمز *D. pulchara* جداسازی شدند و از تشکیل بیوفیلم باکتریایی جلوگیری کردند (Rasmussen & Givskov, 2006). این مولکول از طریق اتصال با گیرنده‌ی پروتئینی تیپ LuxR باعث کاهش

پایداری و نیمهٔ عمر این گیرنده می‌شود و از فعالیت AHL روی این گیرنده جلوگیری می‌کند (Manefield *et al.*, 2002). علاوه بر این از فورانون‌ها و مشتقات شیمیایی آن‌ها برای جلوگیری از آلودگی‌های زیستی نیز استفاده می‌شود. بعضی از پپتیدهای حلقوی باکتریایی (مانند سیکلو آلا- وال) نیز قادر به اختلال در QS هستند. پنی‌سیلیک اسید و پاتولین که به‌وسیلهٔ قارچ‌ها تولید می‌شوند نیز می‌توانند در مکانیسم QS اختلال ایجاد کنند (Rasmussen & Givskov, 2006). گیاهان زیادی مانند جو، شبدر، خلر و لوبیا از تجمع AHL با زنجیره‌های اسیل طولانی تر از C_6 تا C_{10} در محیط خود جلوگیری می‌کنند (Delalande *et al.*, 2005). تمام موجوداتی که به‌عنوان تجزیه کننده AHL شناسایی شده‌اند به‌نحوی با جوامع بزرگ باکتریایی تولید کننده AHL در ارتباط‌اند (Hu *et al.*, 2003).

باکتری‌ها از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای گیاهان و جانوران هستند که گزارش‌های مقاوم شدن آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات باکتری‌کش در حال افزایش می‌باشد. لذا دستیابی به روش‌های نوین مبارزه با آن‌ها که خطرات زیست محیطی پایینی داشته باشند و احتمال پیدایش مقاومت به آن‌ها در جمعیت‌های باکتریایی نیز کم باشد، از اهداف مهم باکتری شناسان گیاهی و جانوری است. حدنصاب حسگری از فرایندهای حیاتی باکتری‌هاست که هدف قرار دادن آن می‌تواند در پیدایش استراتژی‌های نوین مدیریت آن‌ها نقش اساسی داشته باشد. گیاهان به‌دلیل تعامل طولانی مدت با باکتری‌ها برای تعدیل جمعیت باکتری‌های مرتبط با خود، حاوی ترکیبات تقلیدکننده یا تجزیه‌کنندهٔ مولکول‌های سیگنال باکتری‌ها می‌باشند که شناسایی آن‌ها می‌تواند در طراحی و تولید نسل جدید باکتری‌کش‌ها اهمیت فراوانی داشته باشند.

سپاس‌گزاری

این پژوهش با حمایت‌های مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) و در قالب طرح پژوهشی انجام گرفته است. هم‌چنین از همکاری پروفسور Vittorio Venturi (مرکز بین المللی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی ایتالیا) برای تهیهٔ باکتری گزارشگر CV026 تشکر می‌شود.

References

Chenia, Y.H.2013. Anti-quorum sensing potential of crude *Kigelia africana* fruit extracts. Sensors, 13: 2802-2817.

Choo, J.H., Rukayadi, Y. & Hwang, J.K. 2006. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. Letter of Applied Microbiology, 42: 637-641.

Cirou, A., Uroz, S., Chapelle, E., Latour, N.O., Faure, D. & Dessaux, Y. 2009. Quorum sensing as a target for novel biocontrol strategies directed at *Pectobacterium*. pp. 121-131. In: Gisi, U., Chet, I. & Gullino, M. (eds.), Recent Developments in Management of Plant Diseases. Plant Pathology in the 21st Century (Contributions to the 9th International Congress), Vol. 1. Springer, Dordrecht.

Delalande, L., Faure, D., Raffoux, A., Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Elasri, M., Carlier, A., Berruyer, R., Petit, A., Williams, P. & Dessaux, Y. 2005. N-hexanoyl-L-homoserine lactone, a mediator of bacterial quorum-sensing regulation, exhibits plant-dependent stability and may be inactivated by germinating *Lotus corniculatus* seedlings. EMS Microbiological Ecology, 52:13-20.

Dong, Y.H., Wang, L.Y. & Zhang, L.H. 2007. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 362:1201-1211.

Fray, R.G. 2002. Altering plant-microbe interaction through artificially manipulating bacterial quorum sensing. Annal Botany (Lond), 89: 245-253.

Fuqua, C., Parsek, M.R. & Greenberg, E.P. 2001. Regulation of gene expression by cell-to cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. Annual Review of Genetics, 35: 439-468.

Gao, M., Teplitski, M., Robinson, J.B. & Bauer, W.D. 2003. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. Molecular Plant Microbe Interaction, 16: 827–834.

Hu, J.Y., Yang, F., Lin, Y.H., Zhang, H.B., Ong, S.L., Dong, N., Xu, J.L., Ng, W.J. & Zhang, L.H. 2003. Microbial diversity and prevalence of virulent pathogens in biofilms developed in a water reclamation system. Research in Microbiology, 154: 623–629.

Jafra, S., Jalink, H., van der Schoor, R. & van der Wolf, J.M. 2006. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains show diversity in production of and response to *N*-acyl homoserine lactones. Journal of Phytopathology, 154: 729–739.

Keshavan, N.D., Chowdhary, P.K., Haines, D.C. & González, J.E. 2005. L-Canavanine made by *Medicago sativa* interferes with quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. Journal of Bacteriology, 187: 8427-8436.

Khan, M.S.A., Zahin, M., Hasan, S., Husain, F.M. & Ahmad, I. 2009. Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. Letters in Applied Microbiology, 49: 354–360.

Makhfian, M., Hasanzadeh, N., Larijani, A. & Mahmoudi, E. 2015. Anti quorum sensing properties of *Anetum graveolens*, Essential Oil of Bearing Plant, 18: 687–696.

Mahmoudi, E. 2015. Signaling molecules from *Lactuca sativa* induced quorum sensing phenotypes in Bacteria. Journal of Research in Plant Protection, 52(2): 166–171.

Mahmoudi, E., Tarzaban, S. & Khodaygan, P. 2014. Dual behaviors of plant against bacterial quorum sensing: Inhibition or Excitation. Journal of Plant Pathology, 96: 295–301.

Manefield, M., Rasmussen, T.B., Henzter, M., Andersen, J.B., Steinberg, P., Kjelleberg, S. & Givskov, M. 2002. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. Microbiology, 148: 1119–1127.

McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S. & Williams, P. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. Microbiology, 143: 3703–3711.

Rabbani, M., Sajjadi, S.E. & Sadeghi, M. 2011. Chemical composition of the essential oil from *Kelussia odoratissima* Mozaff. and the evaluation of its sedative and anxiolytic effects in mice. Clinics, 66: 843–848.

Rasmussen, T.B. & Givskov, M. 2006. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. The Journal of Microbiology, 152: 895–904.

Rodrigues, A.C., de Dliveria, A.D., da Silva, E.R., Sacramentd, N.T.B., Bertoldi, M.C. & Pinto, U.M. 2016. Anti-quorum sensing activity of phenolic extract from *Eugenia brasiliensis* (Brazilian cherry). Food Science and Technology, 36(2): 337–343.

Shukla, V. & Bhathena, Z. 2016. Broad Spectrum Anti-quorum sensing activity of tannin-rich crude extracts of indian medicinal plants. Scientifica, Article ID 5823013, 8 p.

Smith, D., Wang, J.H., Swatton, J.E., Davenport, P., Price, B., Mikkelsen, H., Stickland, H., Nishikawa, K., Gardiol, N., Spring, D.R. & Welch, M. 2006. Variations on a theme: diverse *N*-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing mechanisms in gram-negative bacteria. Science Progress, 89: 167-211.

Song, C., Ma, H., Zhao, Q., Song, S. & Jia, Z. 2012. Inhibition of quorum sensing activity by ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* georgi. Plant Pathology and Microbiology, 7: 1–4.

Sperandio, V. 2007. Novel approaches to bacterial infection therapy by interfering with bacteria to bacteria signaling. Expert Review of AntiInfection Therapy, 5: 271–276.

Tan, L.Y., Yin, W.F. & Chan, K.G. 2012. Silencing quorum sensing through extracts of melicope lunu-ankenda. Sensors, 12: 4339–4351.

Tiwary, B.K., Ghosh, R., Moktan, S., Ranjan, V.K., Dey, P., Choudhury, D., Dutta, S., Deb, D., Das, A.P. & Chakraborty, R. 2017. Prospective bacterial quorum sensing inhibitors from Indian medicinal plant extracts. Letters in Applied Microbiology, 65: 2–10.

Tolmacheva, A.A., Rogozhin, E.A. & Deryabin, D.G. 2014. Antibacterial and quorum sensing regulatory activities of some traditional Eastern-European medicinal plants, Acta Pharmacology. 64: 173–186.

Uroz, S., Dessaux, Y. & Oger, P. 2009. Qourum sensing and Qourum quenching: The Yin and Yang of bacterial communication. Chemistry and Biochemistry, 10: 205–216.

Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J. & Salmond, G.P. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiological Review, 25: 365–404.

Williams, P., Winzer, K., Chan, W.C. & Cámara, M. 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. Philosophy Trans R Society, London Biological Science, 362: 1119–1134.

Yeo, S.S.M. & Tham, F.Y. 2012. Anti-quorum sensing and antimicrobial activities of some traditional Chinese medicinal plants commonly used in South-East Asia. Malaysian Journal of Microbiology, 8: 11–20.

Anti-quorum sensing activity in plant extracts and its effect on the virulence of *Pectobacterium carotovorum*

Esmaeil Mahmoudi

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Corresponding author: Esmail Mahmoudi, email: e.mahmoudi@khuisf.ac.ir

Received: Oct., 03, 2016 5 (1) 59-70 Accepted: Dec., 27, 2017

Abstract

Bacteria use a unique sophisticated mechanism named as Quorum Sensing (QS) for regulation of diverse physiological processes in consent with their population activities and gene expression. This phenomenon depends on the synthesis and perception of small signal molecules such as acyl-homoserine lactones (AHLs) which regulates the important functions including motility, antibiotic and pigment production, biofilm formation, and production of virulence determinants in many bacteria. The presence of Anti-QS activity in methanolic extract of 25 plants was assessed through inhibition of violacein pigmentation in *Chromobacterium violaceum* CV026 growing on LB agar plates at the presence of 5 mg/l C_6-homoserin lactone. The results revealed that the QS inhibition activity was observed in the leaves and stem extracts of coriander (*Coriandrum sativum*), licorice (*Glycyrrhiza glabra),* rocket (*Eruca sativa*), hollyhock (*Althea officinalis*) and mountainous celery (*Kelussia odoratissma*) which repress violacein production in *C. violaceum* CV026 via formation of clear hallo with colorless bacterial colonies around the plant extracts. In addition, the methanolic extracts of *Glycyrrhiza glabra* and *Eruca sativa* were also able to inhibit QS-regulated virulence in *Pectobacterium carotovorum* and severely decreased soft rot symptoms on potato tubers. Both LuxI and LuxR activity were affected by crude extracts of rocket and mountainous celery suggesting that the phytochemicals target both QS signal and receptor. The overall results suggest that plants have mimic quorum-sensing signals, which could be serving as potential sources to disrupt quorum sensing in associated bacteria and inhibited secretion of pectolytic enzymes in *Pectobacterium*.

Keywords: *Chromobacterium violaceum* CV026, N- Acylhomoserin Lactone, Quorum quenchin, pectinolytic enzymes