

UJI *IN VITRO* BAKTERI ANTI QUORUM SENSING PENDEGRADASI ACYL HOMOSERINE LACTONE *Aeromonas hydrophila*

Hessy Novita^{*)#}, Iman Rusmana^{**)}, Munti Yuhana^{**)}, Fachriyan Hasmi Pasaribu^{**)}, dan Angela Mariana Lusiastuti^{*)}

^{*)} Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar

^{**)} Institut Pertanian Bogor

ABSTRAK

Anti quorum sensing (AQS) adalah proses inaktivasi atau degradasi molekul sinyal *quorum sensing* (QS) yaitu *acyl homoserine lactone* (AHL) tanpa memengaruhi pertumbuhan bakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan uji kultur bersama dan uji penghambatan faktor virulensi secara *in vitro* antara bakteri AQS dengan *Aeromonas hydrophila* sebagai patogen yang menyebabkan *Motile Aeromonad Septicaemia* (MAS) pada ikan air tawar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa uji *in vitro* dengan kultur bersama antara bakteri AQS *Bacillus* sp. dan *A. hydrophila* tidak ada penghambatan pertumbuhan pada kedua bakteri, tetapi bakteri AQS dapat menghambat produksi faktor virulensi dari *A. hydrophila* yaitu protease dan hemolisin. AQS merupakan salah satu strategi yang potensial untuk diaplikasikan dalam pengendalian penyakit infeksius atau bakteri patogen resisten antibiotik pada budidaya ikan air tawar.

KATA KUNCI: *Anti Quorum Sensing* (AQS); *Motile Aeromonad Septicaemia* (MAS); faktor virulensi; kultur bersama; *Aeromonas hydrophila*

ABSTRACT: *In Vitro Assay of anti quorum sensing bacteria degrading acyl homoserine lactone of Aeromonas hydrophila.* By: Hessy Novita, Iman Rusmana, Munti Yuhana, Fachriyan Hasmi Pasaribu, and Angela Mariana Lusiastuti

Anti quorum sensing (AQS) was process of inactivation or degradation of Quorum sensing signal molecules of acyl homoserine lactone (AHL) without affecting growth of the bacteria. The aim of the reseach was to study *in vitro* assay of co-culture and inhibition of virulence factors between AQS bacteria which *Aeromonas hydrophila* as pathogen caused motile aeromonad septicaemia (MAS) in fresh water fish. The result showed that *in vitro* assay of co culture between AQS bacteria *Bacillus* sp. and *A. hydrophila* without inhibited of growth in both bacteria but bacteria AQS could suppressed production *A. hydrophila* virulence factors, protease, and hemolysin. The AQS is one of potential strategies to inhibit QS for application to control of infectious diseases or antibiotic resistant bacterial pathogens in fresh water aquaculture.

KEYWORDS: *Anti Quorum Sensing* (AQS); *Motile Aeromonad Septicaemia* (MAS); virulence factor; co culture; *Aeromonas hydrophila*

PENDAHULUAN

Quorum sensing merupakan mekanisme komunikasi di antara sel bakteri secara interseluler, tergantung pada kepadatan jumlah sel yang berperan penting dalam regulasi ekspresi gen. Bakteri memanfaatkan *quorum sensing* untuk regulasi pembentukan biofilm, faktor virulensi, sintesis antibiotik, sporulasi, dan

bioluminesen (Galloway *et al.*, 2011). *Quorum sensing* diperantarai oleh suatu molekul sinyal ekstraseluler yaitu *autoinducer*. Molekul *autoinducer* akan dideteksi dan direspons oleh sel ketika konsentrasinya di lingkungan tinggi. Bakteri menghasilkan *autoinducer* dengan jenis yang bervariasi. Bakteri Gram negatif menghasilkan *autoinducer* yang disebut *N-Acyl Homoserine Lactone* (AHL) (Hentzer *et al.*, 2002).

Mekanisme *quorum sensing* digunakan oleh bakteri patogen ikan untuk mengekspresikan gen virulen pada saat menginfeksi ikan (Soto *et al.*, 2006). Strategi pengendalian bakteri patogen ikan pada umumnya

Korespondensi: Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar. Jl. Sempur No. 1, Bogor 16154, Indonesia.
Tel.: + (0251) 8313200
E-mail: hesta_biotek@yahoo.com

dilakukan dengan menggunakan antibiotik. Namun penggunaan senyawa tersebut secara terus-menerus akan menimbulkan sifat resisten pada bakteri. Alternatif yang dapat dilakukan untuk mengendalikan bakteri patogen yaitu menggunakan *quorum quenching* atau Anti-QS. Anti-QS merupakan senyawa atau molekul yang dapat mendegradasi *autoinducer* pada bakteri, sehingga dapat mencegah terjadinya QS pada bakteri. Prinsip pengendalian patogenitas bakteri Gram negatif dengan AQS ialah mencegah akumulasi AHL. Pencegahan akumulasi AHL dilakukan dengan mendegradasi AHL oleh bakteri. Salah satu enzim pendegradasi AHL ialah *N-acyl homoserin lactonase* (AHL-laktonase) (Molina *et al.*, 2003). AHL-laktonase mendegradasi ikatan lakton pada molekul AHL. Cincin homoserin lakton tanpa adanya ikatan lakton tidak dapat difungsikan lagi. Mekanisme QS terhambat dan gen-gen patogenetik tidak diekspresikan oleh bakteri patogen (Dong *et al.*, 2002).

Hentzer & Givskov (2003) menyatakan bahwa aplikasi *quorum quenching* atau AQS sangat menguntungkan karena dapat mengurangi munculnya sifat resisten pada bakteri, tanpa memengaruhi kelangsungan hidup sel secara individual, tetapi lebih kepada sifat virulen dari populasi secara keseluruhan. Konsentrasi molekul AHL merupakan faktor utama yang memengaruhi ekspresi gen virulen sehingga degradasi molekul AHL menjadi sasaran utama dari *quorum quenching* atau *anti quorum sensing*. Bakteri dari kelompok Gram positif seperti *Bacillus* sp., *Lysinibacillus*, memiliki aktivitas degradasi AHL yang tinggi dan berpotensi sebagai agen biokontrol karena spesialisasi dari sifat kompetennya. Homolog enzim laktonase telah berhasil diidentifikasi pada *B. cereus* and *B. thuringiensis*, yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi AHL (Anzhou *et al.*, 2013).

Alternatif pengendalian bakteri patogen pada ikan dapat dilakukan dengan mengganggu sistem QS dengan penghambatan biosintesis molekul sinyal melalui senyawa analog. Aplikasi senyawa antagonis QS misalnya furanon terhalogenasi, inaktivasi secara kimia terhadap sinyal QS, dan biodegradasi molekul sinyal oleh enzim (Defoirdt *et al.*, 2004). Degradasi molekul sinyal AHL oleh enzim merupakan cara yang efektif dalam menghambat proses QS. Beberapa enzim pendegradasi AHL yaitu AHL laktonase dan AHL asilase. Enzim tersebut disandikan oleh gen yang berbeda-beda pada masing-masing spesies. AHL laktonase dan AHL asilase dapat dihasilkan oleh bakteri Gram positif maupun Gram negatif (Defoirdt *et al.*, 2004). Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan uji *in vitro* antara bakteri AQS *Bacillus* sp. dengan *Aeromonas hydrophila* melalui uji kultur bersama dan uji penghambatan faktor virulensi. Potensi bakteri pendegradasi *N-acyl*

homoserine lactones (AHL) sebagai agen biokontrol dalam pengendalian bakteri patogen pada ikan budidaya dan aplikasi bakteri pendegradasi AHL diharapkan juga dapat mengurangi dampak penggunaan antibiotik yang dapat membuat bakteri bersifat resisten. Pemanfaatan bakteri AQS merupakan langkah awal untuk mengaplikasikan bakteri tersebut sebagai agen biokontrol pada budidaya ikan dalam menekan bakteri patogen sehingga diharapkan dapat menciptakan akuakultur yang ramah lingkungan.

BAHAN DAN METODE

Kultur Bakteri

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas bakteri AQS yaitu *Bacillus* sp., *Chromobacterium violaceum*, *Aeromonas hydrophila* (isolat koleksi Instalasi Penelitian dan Pengembangan Pengendalian Penyakit Ikan, Depok). Semua isolat diremajakan pada media TSB (*Trypticase Soy Broth*) dan diperbanyak TSA (*Trypticase Soy Agar*). Inkubasi kultur *Bacillus* sp. dilakukan selama 48 jam pada suhu 30°C. sedangkan inkubasi *C. violaceum* (sampai kultur berwarna ungu) dan *A. hydrophila* dilakukan selama 24 jam pada suhu 30°C.

Verifikasi Aktivitas Degradasi AHL

Kultur cair *Bacillus* sp. umur 48 jam disentrifugasi selama 30 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Sebanyak 100 µL supernatan diteteskan pada *Paper disc* (diameter 6 mm) yang diletakkan di permukaan media TSA semi-padat yang telah diinokulasi dengan 1% kultur cair *C. violaceum*. Cawan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Kontrol negatif dibuat dengan cara meneteskan media TSB steril sebagai pengganti supernatan. *Paper disc* yang dikelilingi oleh zona tidak berwarna ungu menunjukkan adanya aktivitas penghambatan QS (McClean *et al.*, 1997).

Uji *In Vitro* Bakteri AQS dengan *A. hydrophila*

Kultur Bersama Bakteri AQS dengan *A. hydrophila*

Bakteri AQS (*Bacillus* sp.) yang menghasilkan senyawa AQS diuji kemampuannya dalam menghambat QS *A. hydrophila* dengan metode kultur bersama. Kultur bersama bakteri AQS dan *A. hydrophila* dilakukan berdasarkan metode Gram *et al.* (1999). Secara terpisah, *Bacillus* sp. dan *A. hydrophila* dikultur di TSB (*Trypticase Soy Broth*) 100 mL pada suhu 30°C dan dinkubasi selama 24 jam pada inkubator bergoyang pada 120 rpm. *A. hydrophila* dalam 100 mL TSB, dengan kepadatan 10⁶ CFU/mL ditambahkan 100 mL TSB *Bacillus* sp. dengan kepadatan masing-masing 10⁵, 10⁶,

10⁷ CFU/mL berdasarkan hasil TPC. Kultur bersama diinkubasi pada 30°C dalam inkubator bergoyang (120 rpm) selama 24 jam. Hasil kultur disebar pada media TSA dan diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam. Koloni bakteri dihitung dengan metode *total plate count* (TPC) dan dibandingkan dengan kultur tunggal *A. hydrophila* yang dihitung sebagai *total Aeromonas count* (TAC). Dan masing-masing kultur tunggal bakteri AQS dan *A. hydrophila* juga digores berdampingan untuk melihat sifat antagonis kedua bakteri tersebut.

Uji Penghambatan Faktor Virulensi *A. hydrophila*

Untuk melihat kemampuan bakteri AQS dalam menekan faktor virulensi pada *A. hydrophila*, dilakukan uji protease dan hemolisin. Supernatan dari kultur bersama antara bakteri AQS dan *A. hydrophila* dengan cara disentrifugasi selama 30 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Sebanyak 100 µL supernatan ditetaskan pada *paper disk* kemudian diletakkan pada permukaan media agar darah untuk uji hemolisin dan pada media *skim milk* 2% untuk uji protease. Hal yang sama juga dilakukan terhadap supernatant *A. hydrophila* (tanpa penambahan bakteri AQS) untuk membandingkan aktivitas virulensinya.

HASIL DAN BAHASAN

Aktivitas Degradasi AHL

Bakteri AQS *Bacillus* sp. diverifikasi kembali kemampuannya dalam mendegradasi AHL pada *Chromobacterium violaceum* sebagai bioindikatornya. Aktivitas degradasi AHL ditandai dengan zona tidak berwarna ungu di sekitar *paper disc* pada kultur *C. violaceum* (Gambar 1). Aktivitas degradasi AHL oleh bakteri AQS tersebut menghasilkan zona degradasi AHL sebesar 24 mm.

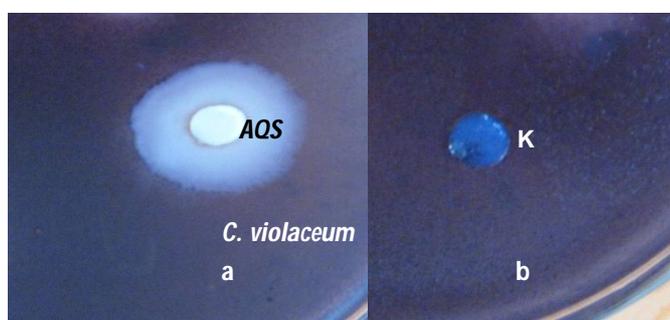
Difusi AHL laktonase yang terkandung dalam supernatan bakteri AQS dari *paper disc* ke media di

sekitarnya menyebabkan degradasi senyawa AHL dari *C. violaceum* sehingga *C. violaceum* yang tumbuh di sekitar *paper disc* tidak dapat berkomunikasi yang menyebabkan pigmen *violacein* tidak dapat diproduksi. AHL-laktonase secara spesifik menghidrolisis cincin lakton pada molekul AHL (Wang *et al.*, 2004). Salah satu strategi untuk mendegradasi molekul sinyal AHL adalah dengan enzim, antara lain AHL laktonase, AHL asilase, oksidoreduktase, dan paraoksonase (Uroz *et al.*, 2005). Enzim ini berperan sebagai senyawa anti QS.

Kultur Bersama Bakteri AQS dengan *A. hydrophila*

Penghambatan AHL dengan metode kultur bersama antara bakteri AQS dan *A. hydrophila* adalah untuk melihat interaksi kedua bakteri melalui aktivitas antagonis dan kompetisi di mana hasil uji kultur bersama kedua bakteri menunjukkan bahwa adanya interaksi dan pertumbuhannya terus meningkat selama 24 jam dalam lingkungan dan nutrisi yang terbatas dengan bertambahnya konsentrasi. *Total plate count* (TPC) kedua bakteri pada kultur bersama dan *total aeromonas count* (TAC) yang dapat dilihat pada Tabel 1. Tetapi *A. hydrophila* pada percobaan kultur tunggal walaupun dapat tumbuh optimal selama 24 jam karena tidak adanya kompetisi nutrisi dan ruang tapi setelah 48 jam, baik kultur bersama dan kultur tunggal dari *A. hydrophila* mengalami penurunan pertumbuhan. Hal ini disebabkan karena keterbatasan nutrisi dalam media sebagai lingkungan tumbuhnya.

Pada Tabel 1 menunjukkan bahwa *Bacillus* sp. mendegradasi AHL yang akan digunakan oleh bakteri patogen seiring dengan bertambahnya konsentrasi perlakuan pada uji kultur bersama secara *in vitro* (Tabel 1). Hasil dari degradasi AHL dari *A. hydrophila* dimanfaatkan oleh bakteri AQS sebagai sumber C dan N untuk mempertahankan pertumbuhannya sehingga tidak terjadi kompetisi nutrisi dan ruang dari kedua



Gambar 1. Verifikasi aktivitas degradasi AHL *C. violaceum* oleh (a) bakteri AQS *Bacillus* sp. (b) kontrol negatif media TSB

Figure 1. Verification of activity AHL degradation *C. violaceum* by (a) AQS bacteria *Bacillus* sp. (b) negative control TSB medium

Tabel 1. *Total plate count* (TPC) dan *total aeromonas count* (TAC) pada kultur bersama bakteri AQS dan *A. hydrophila*

Table 1. *The total plate count* (TPC) and *total aeromonas count* (TAC) in the co culture system AQS bacteria and *A. hydrophila*

Pelakuan Treatments	TPC (CFU/mL)		TAC (CFU/mL)	
	24 jam (hours)	48 jam (hours)	24 jam (hours)	48 jam (hours)
1 x 10 ⁵	6.54 x 10 ⁷	5.34 x 10 ⁷	4.35 x 10 ⁶	1.15 x 10 ⁷
1 x 10 ⁶	7.54 x 10 ⁸	5.25 x 10 ⁸	4.25 x 10 ⁸	2.25 x 10 ⁸
1 x 10 ⁷	7.32 x 10 ⁹	4.8 x 10 ⁹	3.55 x 10 ⁹	2.33 x 10 ⁹

bakteri tersebut. Sedangkan pada bakteri *A. hydrophila*, kemampuannya untuk menghasilkan faktor virulensi terhambat tapi masih dapat tumbuh secara optimal.

Hasil uji antagonis antara bakteri AQS *Bacillus* sp. dengan *A. hydrophila* yang ditumbuhkan dengan cara menggoreskannya secara berdampingan tidak menunjukkan penghambatan pertumbuhan yang dapat dilihat pada Gambar 2 di mana tidak adanya zona bening antara kedua bakteri tersebut. Uji ini dapat menunjukkan apakah isolat bakteri AQS dapat menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* atau tidak. Seperti pada penelitian ini, evaluasi aktivitas AQS *in vitro* merupakan persyaratan yang harus dilakukan sebelum dilakukan evaluasi aktivitas AQS secara *in vivo*. Adanya senyawa AQS mengindikasikan adanya produksi enzim pendegradasi AHL pada *Bacillus* sp.

Bakteri AQS dapat menghasilkan enzim yang digunakan sebagai strategi pertahanan terhadap patogen. Bakteri AQS mampu memanfaatkan dan mendegradasi enzim AHL sebagai sumber tunggal karbon dan nitrogen. Anzhou *et al.* (2013) menyatakan bahwa produksi AHL-laktonase oleh *Bacillus* sp. merupakan salah satu bentuk strategi bertahan hidup dalam lingkungan stres karena fluktuasi kondisi fisik dan ketersediaan nutrisi yang terbatas. *Bacillus* sp. menggunakan aktivitas anti-QS agar mendapatkan lebih banyak nutrisi, melalui penggangguan sinyal AHL

sebagai bentuk kompetisi dengan bakteri lain atau degradasi molekul AHL sebagai sumber energi. Bakteri *Bacillus* sp. merupakan bakteri Gram positif yang mampu membentuk endospora pada kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan sehingga dapat bertahan hidup. Kemampuan dalam membentuk endospora menjadikan *Bacillus* sp. banyak digunakan dalam industri secara komersil karena dapat bertahan lama dan beradaptasi dengan formula dan bahan-bahan kimia yang diaplikasikan dalam akuakultur (Bai *et al.*, 2003).

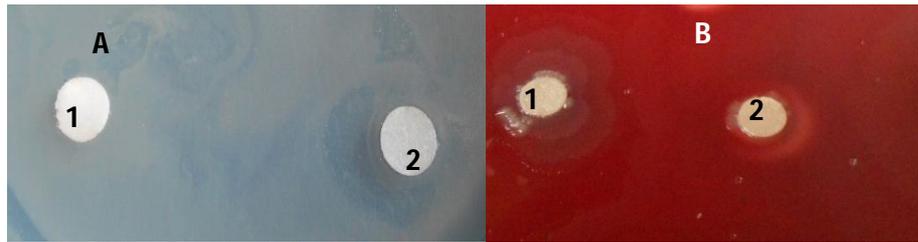
Uji Penghambatan Faktor Virulensi *A. hydrophila*

Hasil inaktivasi AHL menunjukkan bahwa bakteri AQS *Bacillus* sp. dapat menghambat QS pada *C. violaceum*, dan karena itu, supernatan dari AQS dilakukan pengujian penghambatan faktor virulensi dengan *A. hydrophila*. *A. hydrophila* dengan kemampuannya untuk mengeluarkan beberapa enzim hemolisin dan protease ke lingkungan, yang dikaitkan dengan virulensi patogen oportunistik *A. hydrophila*. Ekspresi faktor virulensi ini berada di bawah kendali sistem QS. Dengan demikian, dampak dari supernatan AQS dalam menghambat proteolitik dan aktivitas hemolitik *A. hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 3. Degradasi AHL dari *Bacillus* sp. dalam percobaan kultur bersama memiliki efek pada faktor-faktor virulensi



Gambar 2. Hasil kultur bersama bakteri AQS dan *A. hydrophila* (Ah)

Figure 2. *Result of co culture between AQS bacteria and A. hydrophila* (Ah)



Gambar 3. Aktivitas protease (A) dan hemolisin (B) pada media skim milk dan agar darah, (1) AQS + Ah, (2) Ah (*A. hydrophila*)

Figure 3. Activity of protease (A) and hemolysis (B) in skim milk and blood agar medium (1) AQS + Ah, (2) Ah (*A. hydrophila*)

yang dihasilkan oleh *A. hydrophila*. Pelemahan beberapa faktor virulensi (seperti protease, biofilm, dan hemolisin) setelah kultur bersama dengan bakteri pendegradasi AHL juga dilaporkan oleh Chan *et al.* (2009).

Aktivitas protease dengan penambahan supernatan AQS mengakibatkan penghambatan dalam aktivitas protease, sedangkan dari supernatan *A. hydrophila* tanpa supernatan AQS setelah 24 jam menghasilkan hidrolisis protease dengan zona bening di sekitar *paper disc* yang menunjukkan aktivitas proteolitik (Gambar 3A). Begitu juga dengan supernatan dari bakteri AQS dapat menekan aktivitas β -hemolytic dari *A. hydrophila*, pada media agar darah yang menunjukkan penghambatan aktivitas hemolitik *A. hydrophila* (Gambar 3B). Uji faktor virulensi *A. hydrophila* oleh bakteri AQS menunjukkan bahwa bakteri AQS mampu menekan atau menghambat produksi faktor virulensi yaitu protease dan hemolisin dari *A. hydrophila*. Aktivitas bakteri AQS menyebabkan sinyal AHL dari *A. hydrophila* untuk mencapai *quorum* terganggu dan tidak dapat berkomunikasi sehingga menyebabkan faktor virulensi tidak dapat diproduksi.

A. hydrophila adalah bakteri oportunistik yang penting pada patogen ikan dengan *hemorrhagic septicemia* di mana sistem QS yaitu dengan AhyR/I, yang analog dengan LuxR/I pada *A. hydrophila* menunjukkan bahwa C4-HSL adalah molekul sinyal utama dan mengatur ekspresi faktor virulensi, pematangan biofilm, dan ekstraseluler protease (Bi *et al.*, 2007). Bakteri gram negatif yang patogen pada ikan seperti *Vibrio* sp. dan *A. hydrophila* menggunakan AHL sebagai molekul sinyal (Bruhn *et al.*, 2005), dan strategi *quorum quenching* atau AQS efisien mengontrol patogen ini (Czajkowski & Jafra, 2009).

Aplikasi bakteri AQS di bidang perikanan dapat dimanfaatkan untuk menekan penggunaan antibiotik yaitu mengembangkan penggunaan probiotik dengan mekanisme AQS pendegradasi AHL sebagai biokontrol

yang dapat diberikan melalui pakan yang dibioenkapsulasi maupun melalui media budidaya. Mekanisme anti-QS berpotensi sebagai salah satu metode alami untuk mengendalikan patogen karena anti-QS memiliki cara kerja yang selektif untuk menghambat mikroba patogen daripada penggunaan antibiotik yang dapat memunculkan sifat resisten pada patogen (Anzhou *et al.*, 2013).

KESIMPULAN

Hasil uji *in vitro* kultur bersama antara bakteri AQS *Bacillus* sp. dan *A. hydrophila* tidak ada penghambatan pertumbuhan pada kedua bakteri dan bakteri AQS dapat menekan produksi faktor virulensi dari *A. hydrophila* yaitu protease dan hemolisin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Instalasi Penelitian dan Pengembangan Pengendalian Penyakit Ikan, Depok, yang telah memberikan banyak bantuan pada penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

- Anzhou, M., Di, L., Xuliang, Z., & Guoqiang, Z. (2013). Quorum quenching in culturable phyllosphere bacteria from tobacco. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 14607-14619.
- Bai, Y., Zhou, X., & Smith, D.L. (2003). Enhanced soybean plant growth resulting from co inoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop. Sci.*, 43, 1774-1781.
- Bi, Z.X., Liu, Y.J., & Lu, C.P. (2007). Contribution of AhyR to virulence of *Aeromonas hydrophila* J-1. *Res. Vet. Sci.*, 83, 150-156.
- Bruhn, J.B., Dalsgaard, I., Nielsen, K.F., Buchholtz, C., Larsen, J.L., & Gram, L. (2005). Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in gram-negative fish pathogenic bacteria. *Dis. Aquat. Organ.*, 65, 43-52.

- Chan, K.G., Yin, W.F., Sam, C.K., & Koh, C.L. (2009). A novel medium for the isolation of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 247-251. doi: 10.1007/s10295-008-0491-x.
- Czajkowski, R., & Jafra, S (2009). Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta Biochim. Pol.*, 56, 1–16.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P., & Verstraete, W. (2004). Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture*, 240(1-4), 69-88. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.06.03.
- Dong, Y.H., Gusti, A.R., Zhang, Q., Xu, J.I., & Zhang, L.H. (2002). Identification of quorum quencing N-acyl homoserine lactones from *Bacillus* Species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(4), 1754-1759.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., & Nielsen, T.F. (1999). Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 969–973.
- Galloway, W.R.J.D., Hodgkinson, J.T., Bowden, S.D., Welch, M., & Spring, DR. (2011). Quorum sensing in gram-negative bacteria: small-molecule modulation of ahl and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem. Rev.*, 111, 28-67. doi:10. 1021/cr100109t.
- Hentzer, M., Givskov, M., & Parsek, M.R. (2002). Targeting quorum sensing for treatment of chronic bacterial biofilm infections. *Lab. Medicine*, 33, 295-303.
- Hentzer, M., & Givskov, M. (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.*, 112, 1300-1307. doi: 10.1172/JCI200320074.
- McClellan, 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.A.B., & 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.
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimann, C., Duffy, B., & Defago, G. (2003). Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 45, 71-81. doi: 10.1016/S0168-6496(03)00125-9.
- Soto, M.J., Sanjuan, J., & Olivares, J. (2006). Rhizobia and plant pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology*, 152, 3167-3174. doi: 10.1099/mic.0.29112-0.
- Uroz, S., Chhabra, S.R., Camara, M., Williams, P., Oger, P., & Dessaux, Y. (2005). N-acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiology*, 151(10), 3313-3322. doi: 10.1099/mic.0.27961-0.
- Wang, L.H., Weng, L.X., Dong, Y.H., & Zhang, L.H. (2004). Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quencing N-acyl homoserine lactone Lactonase (AHL-laktonase). *J. Biochem.*, 279(14), 13645-13651.