

# 재조합 *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 균주를 이용한 quorum Sensing Autoinducer 검색에 용매와 계면활성제가 미치는 영향

고경표<sup>1</sup> · 김연희<sup>1</sup> · 김정선<sup>2</sup> · 박성훈<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 공과대학 화학공학과  
<sup>2</sup>동서대학교 응용생명공학부

Effect of Solvents and Surfactants on the Whole-cell Bioassay for Screening Quorum Sensing Autoinducers Using the Recombinant *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 Strain. Kyong-Pyo Koh<sup>1</sup>, Yeon-Hee Kim<sup>1</sup>, Jung Sun Kim<sup>2</sup> and Sunghoon Park<sup>1\*</sup>. <sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea, <sup>2</sup>Department of Biotechnology, Dongseo University, Busan 617-716, Korea

**Abstract** The Liquid Culture Assay using a recombinant *Agrobacterium tumefaciens* strain has been developed as a means for quorum sensing autoinducer screening. However, the low aqueous solubility of marine natural product extracts used as potential autoinducers has been a hindrance in the screening process. Although the addition of organic solvents and/or surfactants could increase aqueous solubility, errors in data interpretation including false positive results could be a serious problem. Therefore, determining the best possible solvent and surfactant at the optimum concentration is crucial. Evaluating methanol, ethanol, 1-propanol, DMSO and DMF at concentration ranges of 0~10% revealed < 2% methanol to be most favorable when tested for  $\beta$ -gal activity and growth inhibition of the recombinant *A. tumefaciens* strain. On the other hand, among surfactants tested, Triton X-100 was similarly effective in increasing the delivery of autoinducers for activity at less than 0.05% concentration.

**Key words :** Quorum sensing, bioassay, *Agrobacterium tumefaciens* NTL4, solvent, surfactant

## 서 론

단세포 미생물인 대부분의 박테리아들은 개체 간 상호 신호전달 체계를 소유하고 있다. 이들 개체 간 신호전달은 미생물에서 집단적으로 나타나는 특유의 생리적 활성 (virulence, luminescence, sporulation, biofilm formation, swarming 등)과 밀접한 관계를 갖고 있으며 이들은 세포 농도의 변화에 반응하여 유전자 발현을 조절하는 신호전달 기전, 즉 "quorum sensing" 기전의 지배를 받는다 [5,11]. 신호전달 기전의 핵심요소 물질은 autoinducer인 N-Acyl Homoserine Lactone (AHL)으로 세포 내부에서 합성되어 세포 외부로 확산되었다가 세포농도가 높아짐에 따라 외부의 AHL이 임계 농도에 도달하게 되면 다시 세포 내

부로 들어와 전사활성단백질 (transcription activator) 과 결합하여 여러 가지 유전자의 발현을 촉진시킨다 [11].

미생물 간의 신호전달현상은 비교적 최근에 연구가 활성화되었으며, 생리적 활성을 제어한다는 기전 때문에 응용측면에서 많은 관심을 끌고 있다. 즉 미생물의 virulence를 막거나 미생물이 생성하는 생물막 (biofilm) [8,10]을 제어하는 좋은 target가 될 수 있으며 새로운 선박 방오도료나 항생제 병용물질등의 개발도 가능하다 [2].

Quorum sensing을 이용한 미생물 억제제 개발에서 가장 주목을 받는 것은 AHL 유사물질의 개발이다 [3,6]. 그러나, 호주 해안에 서식하는 홍조류인 *Delisea Pulchra* [7,9] 에서 furanone 계열의 antifoul-

\* Corresponding author

Phone: +82-51-510-2395, Fax: +82-51-515-2716  
 E-mail: parksh@pusan.ac.kr

ing물질을 분리, 합성한 결과외의 AHL 유사물질의 개발은 미미한 실정이다.

AHL 유사물질의 개발을 위해서는 효율적인 검색 시스템이 중요하다. 최근 *A. tumefaciens* NTL4를 이용한 Liquid culture assay가 해양천연물 시료로부터 quorum sensing autoinducer를 검색할 수 있는 편리한 생물학적 분석방법으로 개발되었다 [4]. 이 방법은  $\beta$ -galactosidase의 발현정도를 살아 있는 세포를 사용하여 측정하는 것이다. 따라서 세포의 성장과 유전자 발현, 그리고  $\beta$ -galactosidase활성 모두가 활성검색에 영향을 미친다. 대부분의 경우 해양천연물이나 합성물질 시료들은 수용액에 대해 낮은 용해도를 갖고 있어 유기용매 혹은 계면활성제의 첨가가 필수적이다. 그러나 유기용매나 계면활성제 자체가 세포성장이나 유전자 발현 혹은 효소활성에 검색결과의 정확한 해석을 방해할 수 있으므로 적절한 조건의 확립이 매우 중요하다.

따라서 본 연구에서는 일반적으로 생물분석에 많이 사용되는 용매 5종과 계면활성제 3종을 0~10% 농도 범위내에서 *A. tumefaciens* NTL4 균주의 생장에 미치는 영향과  $\beta$ -galactosidase activity에 미치는 영향을 살펴봄으로써 Liquid culture assay의 최적조건을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기기

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactoside, Sigma, USA) 용액은 용매로 DMF (dimethyl formamide, Sigma, USA)를 사용하여 40 mg/ml의 농도로 준비하여 멸균된 0.2  $\mu$ m syringe filter (Acrodisc syringe filter, Gelman, USA)로 여과시킨 후 -20°C에서 보관하였다. Liquid culture assay의 positive control로 사용될 autoinducer인 AHL은 OHL (N-Octanoyl-DL-Homoserine Lactone, HPLC grade, Fluka, USA)을 구입하여 사용하였으며, AT minimal medium을 이용하여 만든 1% DMF (dimethyl formamide, Sigma, USA)에 용해시켜 필요한 농도를 만든 후 -20°C에 보관하였다.

Methanol, ethanol, 1-propanol, DMF, DMSO, 그리고 Tween 20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate Tween 20), Tween 80 (Polyoxyethylene Sorbitan

Monolaurate Tween 80)과 Triton X-100은 모두 가장 높은 순도의 시약을 Sigma사에서 구입하여 사용했다.

$\beta$ -Galactosidase 활성으로 인한 blue color response의 측정에는 Victor<sup>2</sup> Multilabel Counter (1420-011) (Wallac, Finland)가 사용되었다.

### 균주 및 배양조건

사용된 reporter strain은 미국 인디애나 대학의 Clay Fuqua 교수로부터 제공받은 것으로 그 특징은 다음과 같다. 재조합 *A. tumefaciens* NTL4(pCF218)(pCF372)는 Ti plasmidless로서, TraR protein을 encoding한 plasmid (pCF218)와 transcriptional fusion protein을 encoding한 *traI-lacZ* fusion 형태의 plasmid (pCF372)를 지닌다. 이 균주는 *traI-lacZ* fusion을 통해 AHL 합성 단백질인 TraI가 불활성화 되어 신호전달물질인 OOHL (N-(3-oxooctanoyl)-HSL)을 생산하지 못하기에, 외부에서 유입되어지는 AHL 물질에 반응하는 AHL sensor system으로 이용되어진다. 또 LacZ 단백질의 성질을 이용해, X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, Sigma, USA)을 통한  $\beta$ -galactosidase activity를 측정할 수 있으며, 각 plasmid에는 tetracycline과 spectinomycin에 내성을 지니는 gene이 존재한다 [1].

Reporter strain인 재조합 *A. tumefaciens* NTL4(pCF218)(pCF372)는 균주 내 plasmid들의 안정성을 위해 Tc (4.5  $\mu$ g/ml)와 Sp (50  $\mu$ g/ml)이 포함된 AT minimal medium에 16시간 배양하였고, 이를 다시 1:10으로 희석하여 AT minimal medium에 접종하여 흡광도(파장=600nm) 값이 0.9~1.3인 late exponential phase까지 배양하였다. 이후 배양된 reporter strain을 AT minimal medium에 2% 농도로 희석하였다.

### 용매, 계면활성제 시료의 준비

용매로는 methanol, ethanol, 1-propanol, DMF, DMSO를 사용하였다. 농도범위는 0%-10% (v/v)로 하여 AT medium에 용해시켜 필요한 농도를 만들어 세포성장 및  $\beta$ -galactosidase의 blue color 반응에 대한 영향을 살펴보았다. 계면활성제는 Tween 20, Tween 80, 그리고 Triton X-100가 사용되었다. 최종 농도 범위는 10, 5, 3, 1, 0.5, 0.1, 0.05% 이었고 실험은 용매의 경우와 동일한 방법으로 수행하였다.

**용매, 계면활성제를 이용한 growth inhibition assay**

2% *A. tumefaciens* NTL4(pCF218)(pCF372)을 멸균된 96-well microplate에 동일하게 270 $\mu$ l 씩 분주한 후, 미리 농도별로 제조된 용매 및 계면활성제를 각각 30 $\mu$ l 씩 분주하여 부피가 300 $\mu$ l 되도록 준비하였다. 그 후에 30 $^{\circ}$ C 호기 상태로 배양하면서 Victor<sup>2</sup> Multilabel Counter (1420-011)(Wallac, Finland)를 이용해 600nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

**용매, 계면활성제를 이용한 liquid culture assay**

Kim 등 [4]이 보고한 바와 같이 blue color response에 대한 용매 및 계면활성제의 영향을 살펴보기 위해 X-gal 용액을 40  $\mu$ g/ml 로 첨가한 reporter strain culture를 제조하였고, 멸균된 96-well microplate에 동일하게 240  $\mu$ l 씩 분주한 후 신호전달물질인 10<sup>4</sup> nM OHL을 30  $\mu$ l 씩 분주하였다. 그리고  $\beta$ -galactosidase에 대한 농도별 영향을 살펴보기 위해 제조된 용매 또는 계면활성제를 동일하게 30  $\mu$ l 씩 넣어 30 $^{\circ}$ C 호기 상태로 배양하면서 Victor<sup>2</sup> Multilabel Counter (1420-011)(Wallac, Finland)를 이용해 blue color의 변화를 흡광도로 측정하였다.

**결과 및 고찰**

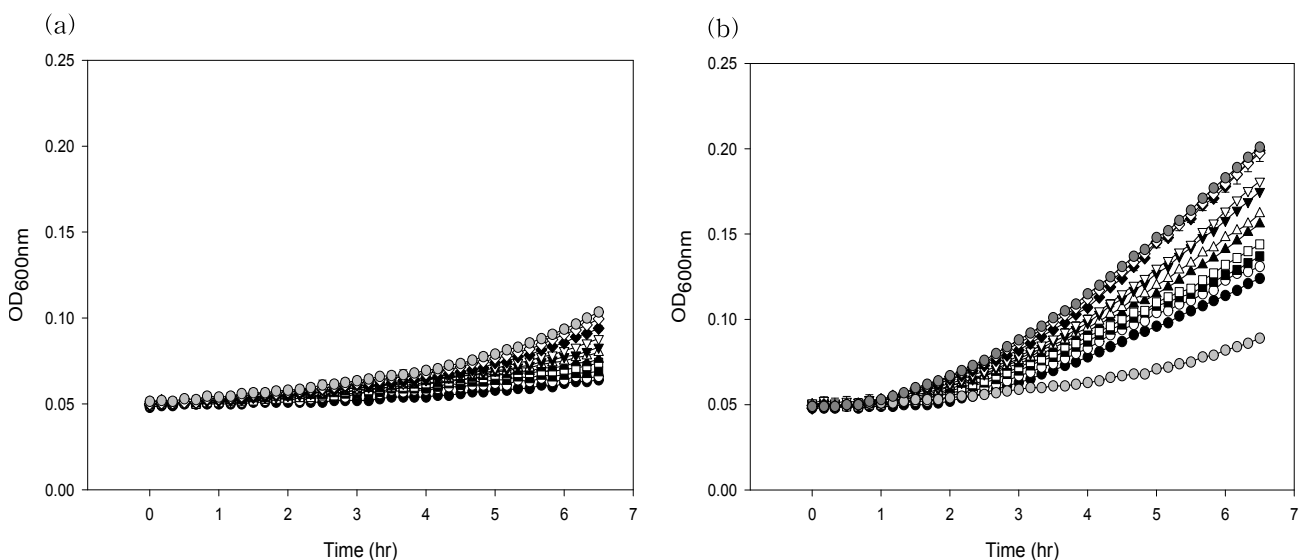
**용매의 영향**

**Methanol의 농도에 따른 영향**

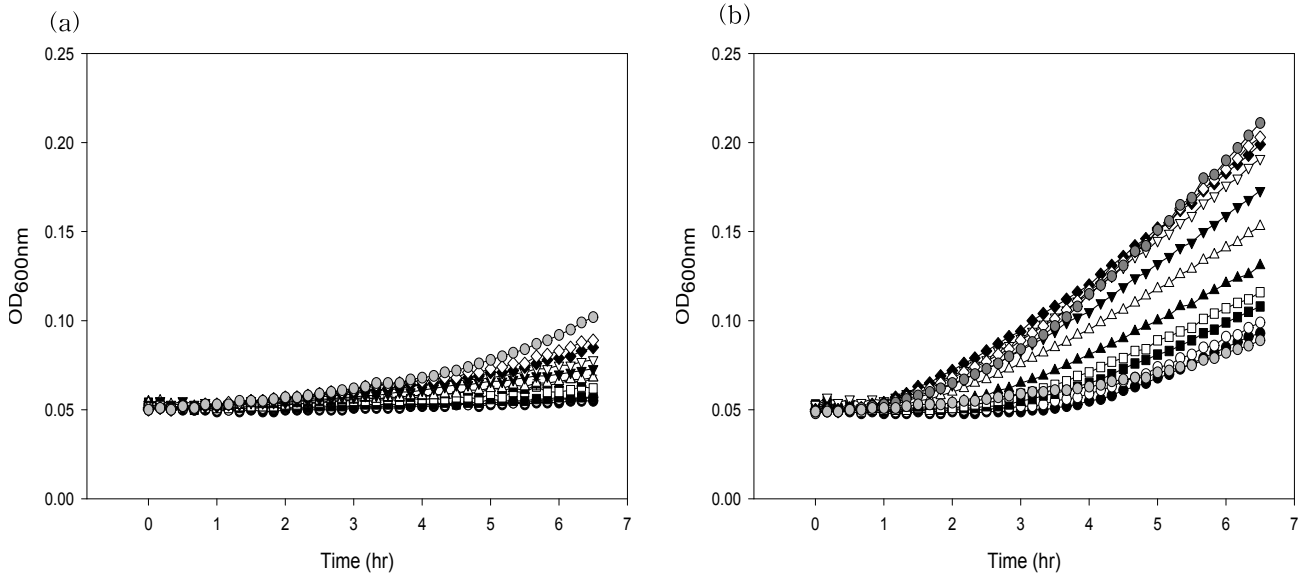
Methanol이 *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 균주의 성장에 미치는 영향을 살펴본 결과 2% 이하의 농도에서는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다 (Fig. 1(a)).  $\beta$ -Galactosidase activity로 인한 발색에 미치는 영향 또한 Fig. 1(b)에서 보는 바와 같이 2% 이하의 농도에서는 영향을 주지 않았다. 그러나, 그 이상의 농도에서는 methanol의 농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 autoinducer인 OHL의 활성을 감소시킬 수 있었다. 세포 성장 역시 농도가 증가하면서 저해 정도가 증가되었으며 세포 성장 자체가 저해되면 blue color 반응도 감소하였다.

**Ethanol의 농도에 따른 영향**

Methanol과 화학적 성질이 유사하면서 methylene기가 하나 더 추가된 ethanol의 경우 1% 농도 이하에서는 세포 성장에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다 (Fig. 2(a)).  $\beta$ -Galactosidase activity, 즉 blue color 반응의 경우 Fig. 2(b)에서 보는 바와 같이 3% 까지



**Fig. 1.** (a) Effect of methanol on cell growth of the reporter strain. *A.tumefaciens* NTL4 was grown in the presence of different concentrations of methanol. The plots indicate (●) 0%, (◇) 1%, (◆) 2%, (▽) 3%, (▼) 4%, (△) 5%, (▲) 6%, (□) 7%, (■) 8%, (○) 9%, (●) 10% methanol. (b) Effect of methanol on  $\beta$ -galactosidase activity of the reporter strain.  $\beta$ -galactosidase activity of the reporter strain responding to (◇) 1%, (◆) 2%, (▽) 3%, (▼) 4%, (△) 5%, (▲) 6%, (□) 7%, (■) 8%, (○) 9%, (●) 10% methanol and 0% methanol with OHL (●) and (●) without OHL.



**Fig. 2.** (a) Effect of ethanol on cell growth of the reporter strain. *A.tumefaciens* was grown in the presence of different concentrations of ethanol. The plots indicate (●) 0%, (◇) 1%, (◆) 2%, (▽) 3%, (▼) 4%, (△) 5%, (▲) 6%, (□) 7%, (■) 8%, (○) 9%, (●) 10% ethanol. (b) Effect of ethanol on  $\beta$ -galactosidase activity of the reporter strain.  $\beta$ -galactosidase activity of reporter strain responding to, (◇) 1%, (◆) 2%, (▽) 3%, (▼) 4%, (△) 5%, (▲) 6%, (□) 7%, (■) 8%, (○) 9%, (●) 10% ethanol with OHL and 0% ethanol with (●) or without (○) OHL.

큰 영향이 없었고, positive control 과 유사한 결과를 보였다. 이는 2% 이하에서 세포 성장과 발색 기전이 유사한 반응을 보인 methanol과는 다소 다른 결과이다. Ethanol 1~3% 농도에서 세포 성장은 저해되지만 사멸하지는 않으며,  $\beta$ -galactosidase의 발현이나 활성은 영향을 받지 않는 것으로 판단된다.

### 1-Propanol의 농도에 따른 영향

Methanol이나 ethanol 보다 분자량이 더 큰 1-propanol을 사용한 경우, Fig. 3(a)에서 보는 바와 같이 1% 이하에서는 세포 성장에 영향이 없었다. Fig. 3(b)의  $\beta$ -galactosidase activity 활성의 경우 methanol이나 ethanol을 사용했을 때보다 현격한 저해가 나타났다. 1% 농도를 제외한 모든 농도에서 현저한 활성의 저하가 있었고 그 정도는 농도 의존적이었다. 특히 4% 농도에서는 이미 세포사멸은 물론 발색도 소실되었다.

### DMF와 DMSO의 영향

DMF 와 DMSO의 경우, Fig. 4(a)와 (b)에서 보는 바와 같이 1%의 농도에서도 blue color 반응의 현격한 저하가 나타났다. 이는 세포 성장 뿐만 아니라 enzyme의 생성과 활성에 영향을 준다는 뜻이다. 해

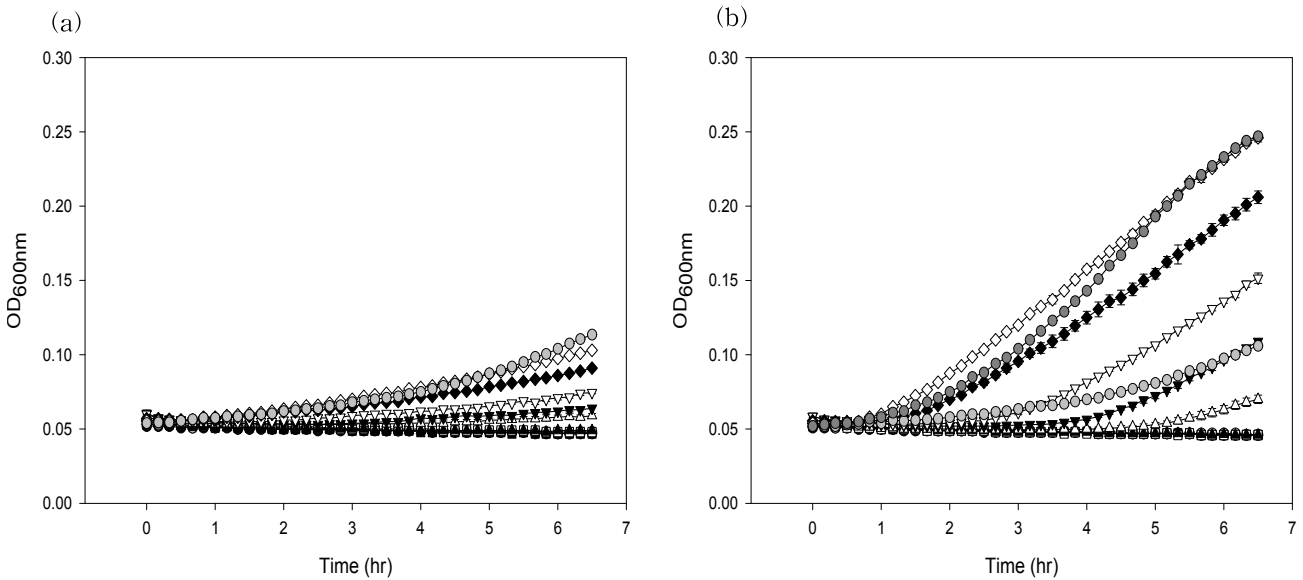
양천연물 추출물을 1%이하의 DMSO로 용해시키는 것은 쉽지 않으며 따라서 DMF나 DMSO가 본 검색 시스템에는 적절치 않다고 판단된다. 일반적인 bio-assay의 경우 DMSO를 5%까지 사용하는 것을 감안할 때 Fig. 4의 결과는 다소 의외이다.

### 계면활성제의 영향

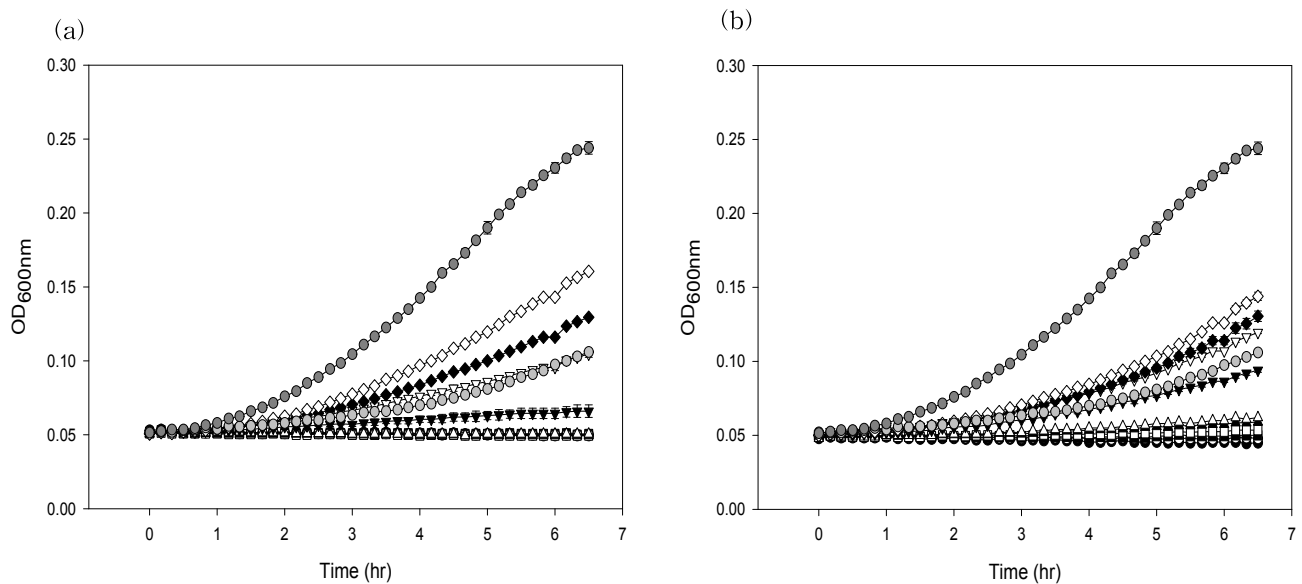
계면활성제는 주로 친유성과 친수성의 결합을 돕는데 사용된다. 따라서 해양천연물 추출물에 함유된 활성관련 유기화합물의 세포내 전달과 수용액에서의 용해도 증가를 돕는다. *A.tumefaciens* NTL4 세포의 성장과  $\beta$ -galactosidase 활성에 대한 영향을 Tween 과 Triton을 사용하여 조사하였다.

### Tween 20의 영향

Tween 20을 1%, 0.5%, 0.1% 농도 가했을 때 control (0%, grey circle) 비슷한 세포 성장을 나타내었다 [Fig. 5(a)]. 3~10%의 고농도에서는 계면활성제의 점성으로 인해, stock solution 제조에 어려움이 있었고 세포 성장도 저해되었다. 세포 성장에 영향을 미치지 않았던 1% 농도에서도 Tween 20은  $\beta$ -galactosidase 활성을 저해하였고 0.1% 이하의 저농도만 사용이 가능하다고 판단되었다(Fig. 5(b)).



**Fig. 3.** (a) Effect of 1-propanol on cell growth of the reporter strain. *A.tumefaciens* was grown in the presence of different concentrations of 1-propanol. The plots indicate (●) 0%, (◇) 1%, (◆) 2%, (▽) 3%, (▼) 4%, (△) 5%, (▲) 6%, (□) 7%, (■) 8%, (○) 9%, (●) 10% 1-propanol. (b) Effect of 1-propanol on β-galactosidase activity of the reporter strain. β-galactosidase activity of reporter strain responding to, (◇) 1%, (◆) 2%, (▽) 3%, (▼) 4%, (△) 5%, (▲) 6%, (□) 7%, (■) 8%, (○) 9%, (●) 10% 1-propanol with OHL and 0% 1-propanol with (●) or without (○) OHL.



**Fig. 4.** (a) Effect of DMF on β-galactosidase activity of the reporter strain. β-galactosidase activity of reporter strain responding to, (◇) 1%, (◆) 2%, (▽) 3%, (▼) 4%, (△) 5%, (▲) 6%, (□) 7%, (■) 8%, (○) 9%, (●) 10% DMF with OHL and 0% DMF with (●) or without (○) OHL. (b) Effect of DMSO on β-galactosidase activity of the reporter strain. β-galactosidase activity of reporter strain responding to, (◇) 1%, (◆) 2%, (▽) 3%, (▼) 4%, (△) 5%, (▲) 6%, (□) 7%, (■) 8%, (○) 9%, (●) 10% DMSO with OHL and 0% DMSO with (●) or without (○) OHL.

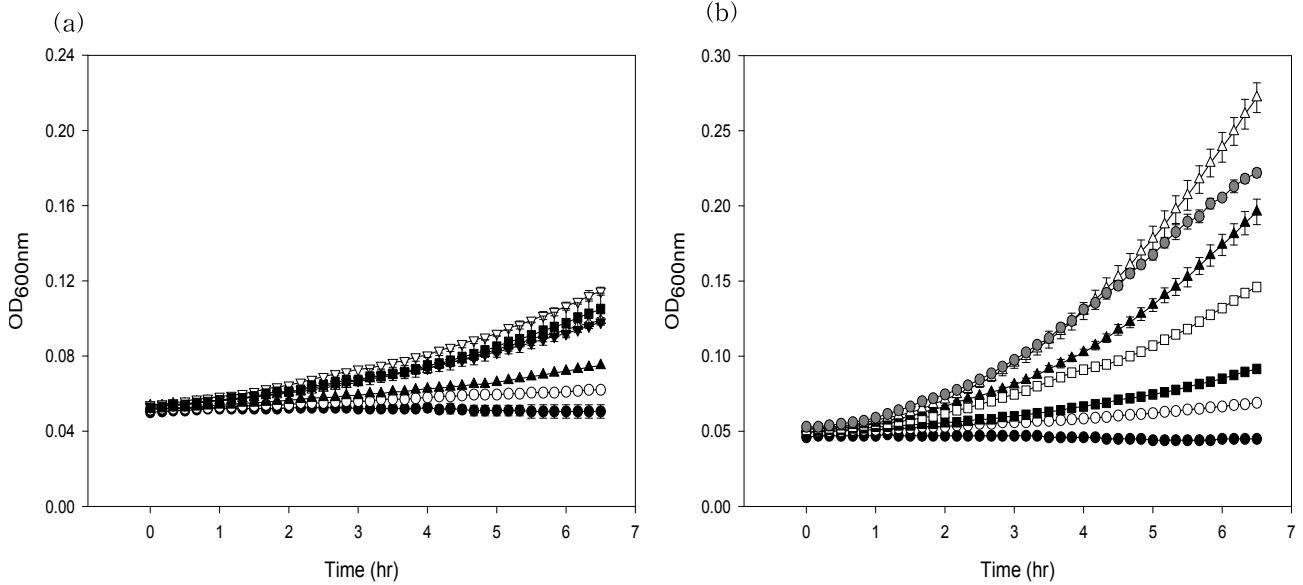
### Tween 80의 영향

Tween 80의 경우도 Tween 20을 사용했을 때와 유사한 결과를 보였다(Fig. 6 (a,b)). 0.1% 이하의 농도에서만 사용이 가능하였고 점성의 문제는 Tween 20과 유사했다. 농도 의존적인 특성은 Tween 20보다

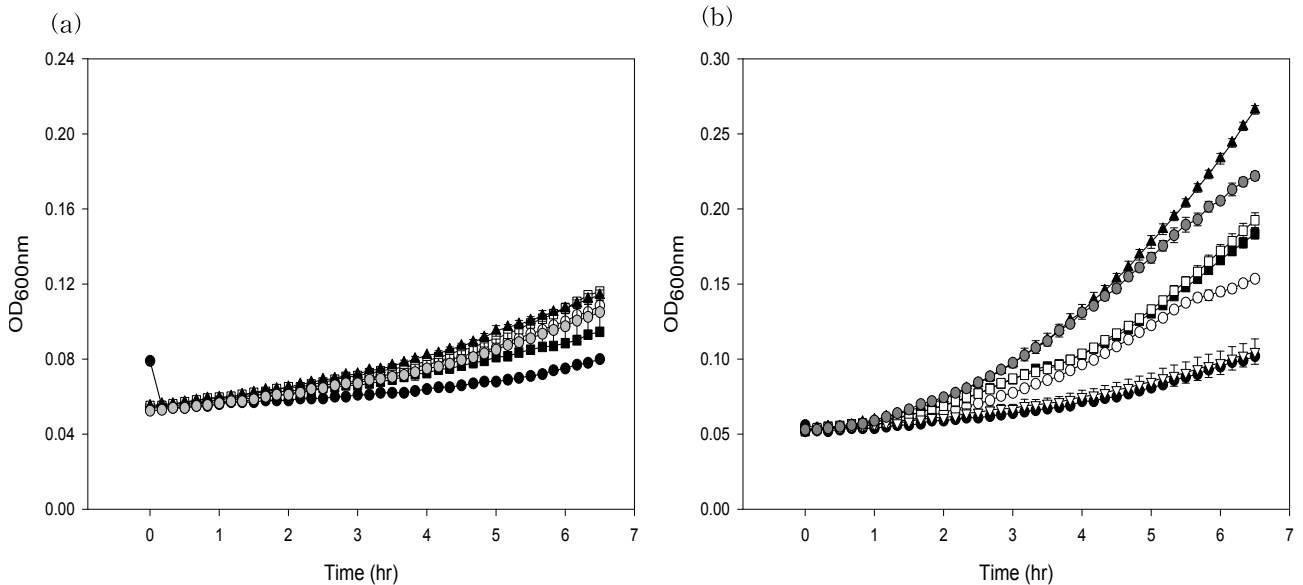
다소 약하게 나타났다.

### Triton X-100의 영향

Triton X-100 도 앞서 조사한 Tween의 경우와 유사하였다. 점성, 세포성장 억제, β-galactosidase 활성



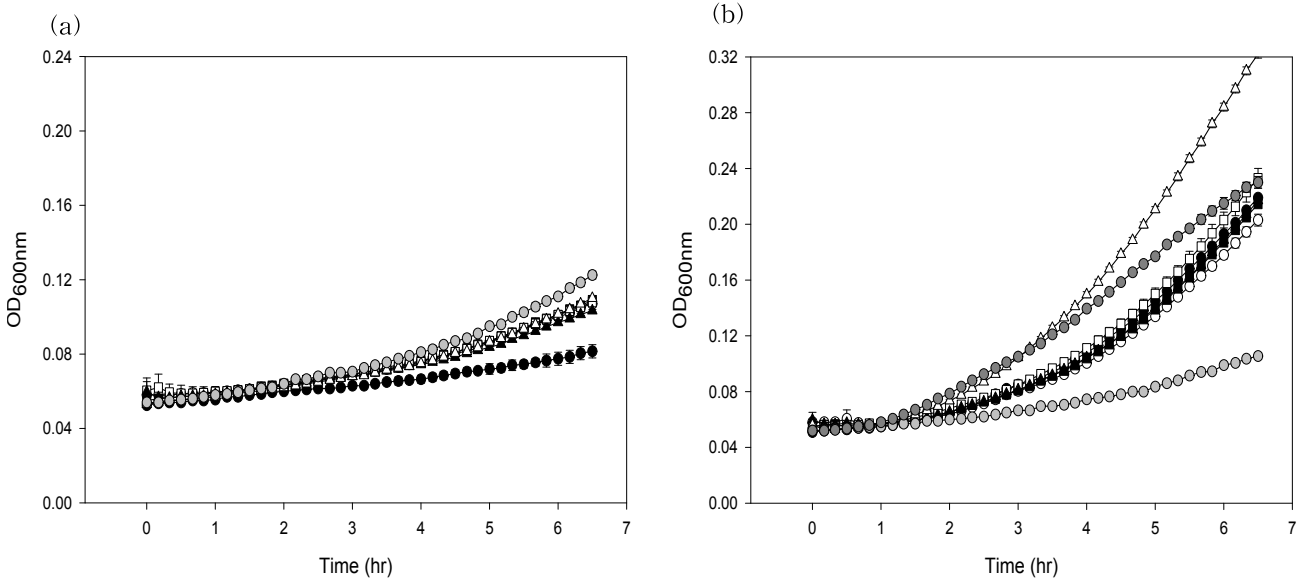
**Fig. 5.** (a) Effect of Tween 20 on cell growth of the reporter strain. *A. tumefaciens* was grown in the presence of different concentrations of Tween 20. The plots indicate ( $\nabla$ ) 0.1%, ( $\blacktriangledown$ ) 0.5%, ( $\triangle$ ) 1%, ( $\blacktriangle$ ) 3%, ( $\circ$ ) 5%, ( $\bullet$ ) 10% and ( $\blacksquare$ ) 0% Tween 20 as a negative control. (b) Effect of Tween 20 on  $\beta$ -galactosidase activity of reporter strain.  $\beta$ -galactosidase activity of reporter strain responding to ( $\triangle$ ) 0.1%, ( $\blacktriangle$ ) 0.5%, ( $\square$ ) 1%, ( $\blacksquare$ ) 3%, ( $\circ$ ) 5%, ( $\bullet$ ) 10% Tween 20 with OHL and ( $\bullet$ ) OHL  $10^3$ nM without Tween 20 as a control.



**Fig. 6.** (a) Effect of Tween 80 on cell growth of the reporter strain. *A. tumefaciens* was grown in the presence of different concentrations of Tween 80. The plots indicate ( $\blacktriangle$ ) 0.1%, ( $\square$ ) 0.5%, ( $\blacksquare$ ) 3%, ( $\circ$ ) 1%, ( $\bullet$ ) 10% and ( $\bullet$ ) 0% Tween 80 as a negative control. (b) Effect of Tween 80 on  $\beta$ -galactosidase activity of the reporter strain.  $\beta$ -galactosidase activity of reporter strain responding to ( $\blacktriangle$ ) 0.1%, ( $\square$ ) 0.5%, ( $\blacksquare$ ) 1%, ( $\circ$ ) 3%, ( $\bullet$ ) 10% Tween 80 with OHL and 0% Tween 80 ( $\bullet$ ) with OHL or ( $\nabla$ ) without OHL as a control.

억제 등으로 인해 0.05% 이하의 농도에서만 사용이 가능함을 알 수 있었다. 그러나, Triton X-100의 경우 Tween 80이나 Tween 20에 비해 배양 후 3시간 쯤부터  $\beta$ -galactosidase activity가 더 높게 나타났다. 이는

Triton X-100이 autoinducer인 OHL을 *A. tumefaciens* NTL4 세포내로 전달하는 효율을 증가시킨데 따른 결과로 추정된다.



**Fig. 7.** (a) Effect of Triton X-100 on cell growth of the reporter strain. *A. tumefaciens* was grown in the presence of different concentrations of Triton X-100. The plots indicate (△) 0.05%, (▲) 0.1%, (□) 0.3%, (■) 0.5%, (○) 1%, (●) 3% and (○) 0% Triton X-100 as a negative control. (b) Effect of Triton X-100 on β-galactosidase activity of reporter strain. β-galactosidase activity of reporter strain responding to (△) 0.05%, (▲) 0.1%, (□) 0.3%, (■) 0.5%, (○) 1%, (●) 3% Triton X-100 with OHL and 0% Triton X-100 (○) with OHL or (○) without OHL as a control.

**결 론**

Liquid culture assay에 사용되는 *A. tumefaciens* NTL4 균주 세포내로 효율적으로 autoinducer를 전달하기 위해 적절한 용매 및 계면활성제를 선정할 필요가 있다. 해양천연물 추출물들은 미량의 활성물질을 함유하며, 수용액에 잘 용해하지 않는 물리적인 성질 때문에 생물학적 검색 시스템에 장애가 될 수 있다. 본 연구에서는 흔히 사용되는 DMF나 DMSO가 liquid culture assay에는 적합하지 않음을 보여주었다. 대신 alcohol 종류 중 가장 분자량이 적은 methanol을 2% 이하의 농도에서 사용하는 것이 적절하였다. 계면활성제의 경우 점성으로 인해 저농도의 사용이 바람직하였고 Tween 계열보다는 Triton X-100을 0.05% 이하로 사용하는 것이 생물학적 분석 효율을 높여줄 것이라고 판단되었다.

**요 약**

재조합 *Agrobacterium tumefaciens* 균주를 사용한 Liquid Culture Assay는 quorum sensing autoinducer를 검색하는 생물학적 분석 방법으로 개발되었다. 그러나 이 시스템에 사용되는 해양천연물 시료들이 일반

적으로 낮은 수용액에 대한 용해도를 갖기 때문에 활성검색에 걸림돌이 되고 있다. 시료의 용해도는 유기용매 혹은 계면활성제의 첨가로 증가될 수 있으나, 유기용매나 계면활성제 자체가 검색결과의 정확한 해석을 방해할 수 있으므로 적절한 조건의 확립이 매우 중요하다. Methanol, ethanol, 1-propanol, DMSO와 DMF를 0~10% 농도 범위에서 재조합 *A. tumefaciens* 균주에 대한 세포 성장에 미치는 영향과 β-galactosidase activity에 미치는 영향을 살펴본 결과 methanol 2%이하의 농도가 가장 적합하였으며, 계면활성제의 경우, Tween 20, Tween 80보다는 Triton X-100이 약 0.05% 농도에서 세포내로의 활성물질의 전달효율을 높이는데 효과적이었다

**감사의 글**

본 연구는 BK21과 산업자원부 지역산업공동기술 개발사업(project number : 10022125-2005-01)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

**참 고 문 헌**

1. Fuqua C. and Winans S. C. 1996. Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent

- transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *J. Bacteriol.* **178**, 435-440.
- Hellio C., De La Broise D., Dufossé L., Le Gal Y. and Bourgougnon N. 2001. Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Mar. Environ. Res.* **52**, 231-247.
  - Hong Y. K. 1998. Biotechnology and molecular characterization of useful seaweeds. *Algae* **13**(2), 251-260.
  - Kim Y. H., Kim J. S. and Park S. H. 2005. Development of a sensitive bioassay method for quorum sensing inhibitor screening using a recombinant *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **8**, 101-105.
  - Miller M. B. and Bassler B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 165-199.
  - Persson, T., Givskov M. and Nielsen J. 2005. Quorum sensing inhibition: Targeting chemical communication in Gram-negative bacteria. *Curr. Med. Chem.* **12**, 3103-3115.
  - Rasmussen T. B., Manefield M., Andersen J.B., Eberl L., Anthoni U., Christophersen C., Steinberg P., Kjelleberg S. and Givskov M. 2000. How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology* **146**, 3237-3244.
  - Reid G. 1999. Biofilms in infectious disease and on medical devices. *Int. J. Antimicrob. Agents* **11**, 223-226.
  - Ren D., Sims J. J. and Wood T. K. 2002. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Lett. Appl. Microbiol.* **34**, 293-299.
  - Shirtliff M. E., Mader J. T. and Camper A. K. 2002. Molecular interactions in biofilms. *Chem. Biol.* **9**, 859-871.
  - Withers H., Swift S. and Williams P. 2001. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 186-193.