

# SỬ DỤNG KỸ THUẬT CẢM BIẾN HUỖNH QUANG (DIFFERENTIAL FLUORESCENCE INDUCTION-DFI) ĐỂ PHÂN LẬP CÁC GEN THAM GIA VÀO QUÁ TRÌNH TẠO LẬP BIOFILM Ở *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

Nguyễn Thị Loan Anh<sup>1</sup>, Kim Hermans, Sigrid De Keersmaecker và Jos Vanderleyden

## ABSTRACT

*Biofilm has recently been proposed as the dominant lifestyle of bacteria in nature (Makin & Beveridge, 1996). Despite important contributions to modern life, this mode of living has gained more attention only recently. In this study, we employed the Differential Fluorescence Induction (DFI) strategy, utilizing a FACS screening to isolate biofilm inducible promoters in *Salmonella* Typhimurium biofilms as the first time. The strategy was designed with alternative positive/negative sorting rounds to get rid of constitutive promoters as well as to enrich for biofilm induced promoters. The screening was performed using a *S. Typhimurium* SL1344 promoter-probe library which contained around 20500 clones. The strategy was proven to be fit to the idea aiming and showed to be a promising technique used in analysis the genetics of biofilm communities.*

**Keywords:** *Salmonella Typhimurium, biofilm, Differential Fluorescence Induction (DFI), promoter probe library*

**Title:** *Genome-wide analysis of genes involved in Salmonella Typhimurium biofilm formation by the Differential Fluorescence Induction (DFI) technique*

## TÓM TẮT

*Biofilm (màng sinh học) gần đây được phát hiện là dạng tồn tại phổ biến của vi khuẩn trong môi trường (Makin & Beveridge, 1996). Tuy có vai trò quan trọng trong đời sống của vi khuẩn cũng như ảnh hưởng của nó lên hoạt động của con người, hiện tượng này chỉ nhận được nhiều sự chú ý của các nhà khoa học gần đây. Trong đề tài này, lần đầu tiên chúng tôi sử dụng kỹ thuật phân biệt cảm ứng huỳnh quang ứng dụng máy FACS để sàng lọc các promoter được hoạt hóa trong quá trình tạo lập biofilm của *S. Typhimurium*. Quá trình sàng lọc được thực hiện trên thư viện các promoter (promoter-probe library) của *S. Typhimurium* dòng SL1344 chứa khoảng 20500 dòng. Quy trình sàng lọc được thiết kế với những lần chọn lọc dương tính và âm tính xen kẽ nhau để loại bỏ những promoter cơ định và làm giàu các promoter chỉ được hoạt hóa trong quá trình thành lập biofilm.*

**Từ khóa:** *Salmonella Typhimurium, biofilm, cảm biến huỳnh quang, thư viện promoter*

## 1 GIỚI THIỆU

Vi khuẩn *Salmonella* Typhimurium có tên khoa học đầy đủ là *Salmonella enterica* loài phụ *enterica* kiểu huyết thanh Typhimurium. Vi khuẩn này là một trong những nhân tố gây các bệnh nhiễm độc thực phẩm thường gặp nhất. Nguy cơ gây bệnh của vi khuẩn này càng được tăng cường với khả năng tạo biofilm (màng sinh học)

<sup>1</sup> Bộ môn Sinh, Khoa Khoa Học Tự Nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

trên bề mặt sinh học và vô cơ. Màng sinh học được định nghĩa là những cộng đồng vi khuẩn sống trong các cấu trúc được tạo bởi các hợp chất cao phân tử do vi khuẩn tiết ra trong đó các vi khuẩn bám vào nhau và cả khối kết tập bám vào một bề mặt vô sinh hoặc hữu sinh (Costerton *et al.*, 1999). Vi khuẩn sống trong màng sinh học đã được chứng minh là được bảo vệ tốt hơn trong cấu trúc bởi chúng có khả năng chống chịu với các tác nhân gây hại như thuốc kháng sinh hoặc các thành phần của hệ thống miễn dịch tốt hơn so với trạng thái planktonic (tồn tại riêng lẻ của vi khuẩn). Cấu trúc vững chắc của màng sinh học giúp ngăn cản sự thâm nhập của các sinh vật gây hại đối với vi khuẩn bên trong, đồng thời làm giảm nồng độ của kháng sinh khi chúng thâm vào màng sinh học (Costerton *et al.*, 1999). Trạng thái sinh lý khác nhau của các vi khuẩn (hầu hết vi khuẩn ở trung tâm màng sinh học ở trạng thái “ngủ” (dormant)) cũng góp phần làm hạn chế tác động của các chất kháng sinh (Stewart & Franklin, 2008). Ngoài ra, mật số cao của vi khuẩn trong màng sinh học dẫn đến việc biến nạp của các gen kháng kháng sinh trong quần thể vi khuẩn. Khả năng kháng này giúp cho vi khuẩn tồn tại lâu dài và gây nhiễm trùng cả cơ thể dẫn đến nhiễm trùng mãn tính. Đây cũng là một trong những vấn đề chính của việc chữa trị các bệnh liên quan đến nhiễm trùng ngày nay. Đối với *S. Typhimurium*, khả năng tạo màng sinh học giúp vi khuẩn này chống chịu tốt hơn với các tác động của môi trường trong quá trình luân chuyển giữa các vật chủ (Okamura *et al.*, 2001; Brandl & Mandrell, 2002; Werber *et al.*, 2005) và do đó làm tăng nguy cơ gây nhiễm độc thực phẩm cũng như giảm hiệu quả điều trị.

Nhiều kỹ thuật đã được ứng dụng để nghiên cứu màng sinh học của các vi khuẩn như tạo thư viện đột biến bằng biến nạp transposon hay DNA microarrays. Tuy đạt được những kết quả nhất định nhưng các phương pháp này gặp rất nhiều hạn chế do tính không đồng nhất của các vi khuẩn trong cấu trúc màng sinh học (Lazazzera, 2005; An & Parsek, 2007). Trong đề tài này, chúng tôi ứng dụng kỹ thuật cảm biến huỳnh quang (Differential Fluorescence Induction technique-DFI) (Valdivia & Falkow, 1996) để phân tích di truyền của các gen được hoạt hóa trong quá trình tạo lập màng sinh học ở *S. Typhimurium*. DFI sử dụng các đoạn DNA vùng nhân đã được cắt nhỏ, chèn vào vị trí promoter của gen GFP (gen qui định protein phát huỳnh quang) không mang promoter của chính nó (promoterless GFP gene). Các promoter hoạt động chỉ trong quá trình tạo biofilm được chọn bằng máy FACS (FACS-Fluorescence-Activated Cell Sorter) dựa vào độ phát huỳnh quang của các dòng vi khuẩn.

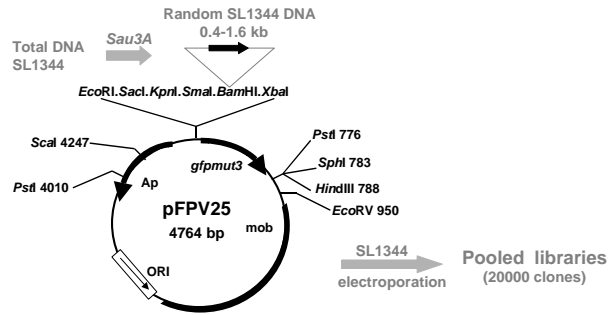
## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Nuôi cấy vi khuẩn

Vi khuẩn *S. Typhimurium* dòng SL1344 được nuôi trong môi trường Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989) hoặc trên môi trường LB chứa 1,5% agar. Trong một số trường hợp, chất kháng sinh được thêm vào với hàm lượng Ampicilin (Amp), 100 µg/ml và Streptomycine (Sm) 25 µg/ml.

### 2.2 Tạo thư viện promoter của *S. Typhimurium*

Plasmid pFPV25 có cấu tạo như hình 1 trong đó rpsM là promoter cơ định (biểu hiện trong mọi điều kiện) (Valdivia & Falkow, 1996).



Hình 1: Sơ đồ cấu tạo của plasmid pFPV25

DNA của *S. Typhimurium* đã được cắt bằng *Sau3A* và phân đoạn dựa vào kích thước bằng kỹ thuật điện di. Đoạn DNA từ 0.4-1.6 kb được thu hồi và nối vào vị trí *BamHI* ngay trước gen *gfpmut3* không có promoter (promoterless) trong pFPV25. Thư viện plasmid được chuyển vào *S. Typhimurium* bằng xung điện sau khi nhân lên trong *E. coli* TransformMax EC100, tạo ra thư viện chứa 20.500 dòng trong 41 quần thể (pool). Với kích thước trung bình của đoạn chèn là 1 kb, bộ gen của *Salmonella* được lặp lại khoảng 4.1 lần với giả định rằng bộ gen của *S. Typhimurium* SL1344 khoảng 5Mb. Với tỉ lệ này, xác suất để có bất kỳ trình tự DNA hiện diện trong thư viện là 98.5% (Clarke & Carbon, 1976).

### 2.3 Thí nghiệm tạo màng sinh học

Màng sinh học được tạo trong 2 hệ thống: đĩa petri khi mẻ vi khuẩn được sử dụng cho các vòng chọn lọc và đĩa microtiter 96 giếng với nắp có các cọc (peg-lid system, Nunc no. 269789) khi phân tích phổ điện huỳnh quang và xác định lượng biofilm tạo thành. Vi khuẩn nuôi qua đêm được pha loãng với tỉ lệ 1/100 trong 1/20 Tryptic Soy Broth có bổ sung Amp<sup>100</sup>. Biofilm được tạo ở đáy đĩa petri trong khi chúng được tạo trên bề mặt của các cọc trong đĩa peg. Các đĩa vi khuẩn tạo biofilm được ủ (không lắc) ở 16°C (hay 25°C) trong 24 (hay 48 h) tùy yêu cầu của từng thí nghiệm.

Đối với thí nghiệm xác định số lượng biofilm, lượng biofilm tạo thành trên các cọc của đĩa peg được ước lượng bằng cách nhuộm chúng với crystal violet và đo mật độ quang ở OD570 nm.

### 2.4 Phân tích phổ điện huỳnh quang bằng máy FACS

Huyền phù vi khuẩn được phân tích bằng máy FACSCalibur (Beckton Dickinson). Các thông số kỹ thuật được điều chỉnh để tương thích với yêu cầu của thí nghiệm của chúng tôi trong đó plasmid pFPV25 (Hình 1) không có promoter và pFPV25.1 chứa promoter cơ định *rspM* nằm trước *gfpmut3*, đã được sử dụng làm đối chứng âm và dương tương ứng. Tế bào vi khuẩn được phân biệt với các mảnh tế bào và các hạt trong môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng thông số về kích thước như là giới hạn bậc 1 và huỳnh quang như là giới hạn bậc hai.

## 2.5 Chiến lược làm gia tăng vùng khởi động chuyên biệt cho quá trình tạo lập màng sinh học với kỹ thuật DFI

Ở vòng chọn lọc dương tính, biofilm được tạo ở 25°C trong các đĩa petri bằng polystyrene với tỉ lệ pha loãng 1/100 của mẻ ủ qua đêm, trong môi trường 1/20 Tryptic Soy Broth được bổ sung Amp<sup>100</sup>. Sau 48h kích thích, biofilm được phân tích bằng máy FACS. Các vi khuẩn phát huỳnh quang lớn hơn giá trị của mẫu đối chứng âm (SL1344/pFPV25) được thu nhận lại (chọn lọc dương tính). 10.000 tế bào đã được tách ra và cho lên màng lọc 0.22 µm (để tập trung vi khuẩn) và sau đó được nuôi trong 10 ml môi trường LB bổ sung Amp<sup>100</sup> và Sm<sup>25</sup>. Thư viện vi khuẩn tạo ra ở giai đoạn này sau đó được pha loãng 1/100 trong 5 ml môi trường 1/20 TSB+ Amp<sup>100</sup>. Sau khi ủ qua đêm (25°C, hiếu khí, Amp<sup>100</sup>), 10.000 tế bào vi khuẩn ở dạng planktonic và không biểu hiện huỳnh quang đã được thu lại (chọn lọc âm tính). Quần thể vi khuẩn không biểu hiện huỳnh quang này lại được nuôi qua đêm và kích thích tạo biofilm; vi khuẩn biểu hiện huỳnh quang được thu nhận lại như mô tả bên trên (chọn lọc dương tính). Quy trình chọn lọc được thực hiện với 2 lần chọn lọc dương tính và 3 lần âm tính. Sau lần chọn lọc cuối cùng, quần thể vi khuẩn đã được làm giàu được ủ qua đêm và cấy ra đĩa để thu được những khuẩn lạc riêng rẽ. Những khuẩn lạc này được cấy chuyển qua đĩa microtiter 96 giếng để trừ hoặc phân tích di truyền như mô tả bên dưới. Quy trình trên cho phép chọn lọc những gen/promoter được hoạt hóa trong quá trình tạo màng sinh học.

## 2.6 Phân tích phổ diện huỳnh quang và trình tự của các promoter tham gia vào quá trình thành lập màng sinh học

Phổ diện huỳnh quang của từng dòng vi khuẩn được ghi nhận trong điều kiện sống tự do và trong cấu trúc biofilm bằng máy FACSCalibur (Becton Dickinson). Chương trình CELLQuestTM Pro (phiên bản 4.0.2.; Becton Dickinson) đã được sử dụng trong quá trình đo số lượng cũng như so sánh (overlay) để xác định những dòng nào chứa các gen/promoter được hoạt hóa (hay hoạt động mạnh hơn) trong quá trình tạo lập biofilm. Các dòng đã cho thấy sự biểu hiện huỳnh quang khác biệt trong hai điều kiện sống được chọn để phân tích trình tự của đoạn chèn. Những trình tự này được so sánh với trình tự đã được giải mã của *S. Typhimurium* bằng chương trình BLASTn (Altschul *et al.*, 1990).

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Chiến lược phân lập gen được hoạt hóa trong quá trình tạo lập màng sinh học của *Salmonella*

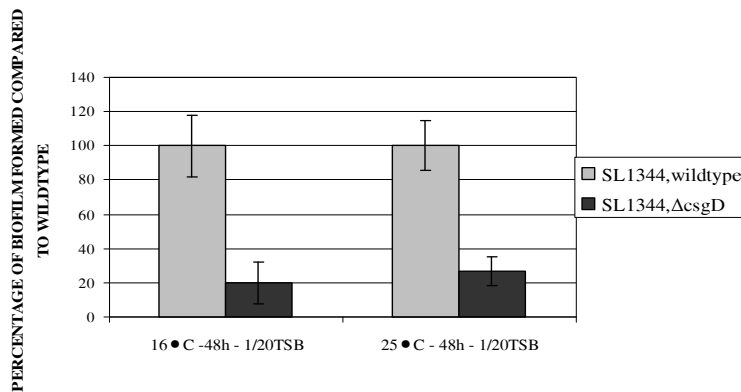
DFI được ứng dụng để xác định promoter/gen được hoạt hóa trong quá trình tạo lập biofilm trong cả bộ gen. Với những lần chọn lọc dương tính, những dòng chứa plasmid “rỗng” (không có đoạn chèn chứa trình tự promoter của GFP) được loại bỏ và những dòng vi khuẩn có biểu hiện huỳnh quang cao nhất (khoảng 0.3-5% số lượng vi khuẩn cả quần thể) được thu nhận lại. Quần thể vi khuẩn được thu nhận lại này được cho là mang cả các dòng vi khuẩn chứa promoter cơ định hoặc hoạt động trong quá trình thành lập biofilm. Tiếp sau đó, trong vòng chọn lọc âm tính, máy FACS cho phép lưu lại những vi khuẩn không biểu hiện huỳnh quang và như thế các dòng vi khuẩn chứa các promoter cơ định hoặc promoter bị bất hoạt trong

quá trình tạo biofilm loại bỏ. Qui trình chọn lọc dương tính/âm tính xen kẽ nhau này giúp làm giàu số vi khuẩn/ dòng mang các vùng khởi động chỉ được hoạt hóa trong lúc thành lập biofilm. Ngoài ra, với ứng dụng của máy FACS và kỹ thuật cảm biến huỳnh quang như trên, qui trình chọn lọc là một quá trình liên tục từ thư viện promoter ban đầu. Điều này giúp lưu giữ được nhiều nhất các dòng vi khuẩn mong muốn và tiết kiệm thời gian.

**3.2 Thí nghiệm chứng minh nguyên lý của kỹ thuật cảm biến huỳnh quang**

*csgD* được đề xuất bởi nhiều tác giả về các vai trò của nó trong hình thức sống thành tập đoàn (multicellular behaviour) của vi khuẩn thuộc nhóm enterobacteria như *E.coli* (Gualdi *et al.*, 2007) và *S. Typhimurium* ATCC14028 (Römling *et al.*, 2000). Những nghiên cứu tiếp theo trên gen này cho thấy nó hoạt động như một nhân tố điều hòa cơ bản (master regulator), thúc đẩy sự biểu hiện gen của cả hệ thống dẫn đến biểu hiện của kiểu hình rdar (Red, Dry And Rough, dạng kiểu hình của *Salmonella* khi sống thành tập đoàn, cũng được tìm thấy trong biofilm (Romling, 2005)). Các nghiên cứu cho thấy *csgD* và kiểu hình rdar được biểu hiện trong môi trường nghèo dinh dưỡng và nhiệt độ dưới 30°C (Romling *et al.*, 2000; Gerstel & Romling, 2001). Bởi vì khoảng cách di truyền rất gần giữa *E.coli*, *S. Typhimurium* ATCC 14028 và SL1344, chúng tôi giả định *csgD* cũng đóng vai trò quan trọng trong quá trình tạo lập biofilm của *S.Typhimurium* SL1344 (dòng *Salmonella* được sử dụng để tạo thư viện).

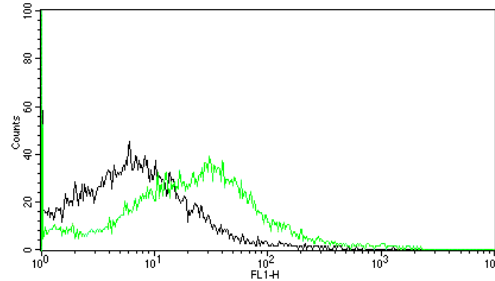
Đột biến gen *csgD* ở dòng SL1344 đã được tạo bằng protocol được đề xuất bởi Datsenko và Wanner (Datsenko & Wanner, 2000). Đột biến được xác nhận bằng PCR và phân tích trình tự (kết quả không được thể hiện). Sau đó, đột biến này được kiểm tra khả năng tạo biofilm ở 16°C và 25°C trong môi trường 1/20 TSB, sử dụng các đĩa peg (Hình 2). Kết quả cho thấy đột biến *csgD* tạo biofilm rất ít chứng tỏ nó thật sự đóng vai trò quan trọng trong quá trình tạo lập biofilm ở dòng SL1344.



**Hình 2: Kết quả xác định lượng biofilm tạo thành của S.Typhimurium dạng hoang dại (SL1344, cột xám) và đột biến gen *csgD* (SL1344, Δ *csgD*; cột đen) ở 16°C và 25°C**

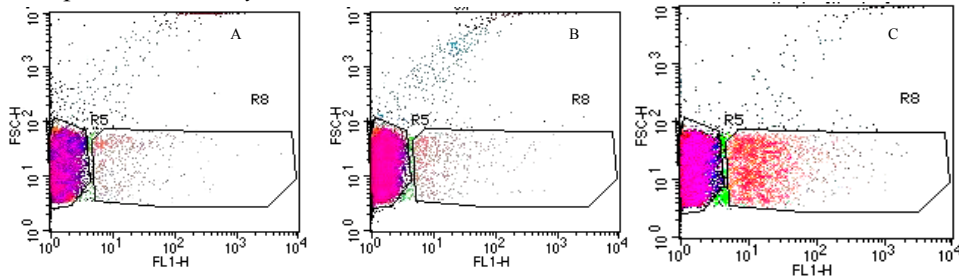
Như vậy, *csgD* có thể được sử dụng như một ví dụ để kiểm tra tính hiệu quả của kỹ thuật DFI trong việc phân lập các promoter (gen) có liên quan trong quá trình tạo biofilm ở *S. Typhimurium* SL1344. Đầu tiên, promoter của *csgD* được chèn

vào trước trình tự của *gfpmut3*. Plasmid này sau đó được biến nạp bằng xung điện vào *S. Typhimurium* dạng hoang dại và trộn lẫn một cách ngẫu nhiên vào các quần thể vi khuẩn (pool) khác của thư viện vi khuẩn. Ở cuối qui trình chọn lọc cả thư viện, chúng tôi đã có thể thu lại *csgD* như một trong các gen được hoạt hóa trong quá trình thành lập biofilm (Hình 3). Trong hình ta thấy trong điều kiện tạo lập màng sinh học, vi khuẩn tạo nhiều GFP protein hơn nên phổ diện huỳnh quang trong điều kiện này lệch về bên phải hơn so với trong môi trường sống tự do.



**Hình 3: Phổ diện huỳnh quang của vi khuẩn *S. Typhimurium* SL1344 chứa promoter *csgD* ở dạng sống tự do (đen) và trong môi trường tạo biofilm. Trục Y biểu diễn số lượng tế bào tương ứng với lượng huỳnh quang (FL1-H) đo được trên trục X**

**3.2.1 Chứng minh sự làm giàu quần thể vi khuẩn phát huỳnh quang bằng kết quả phân tích từ máy FACS**

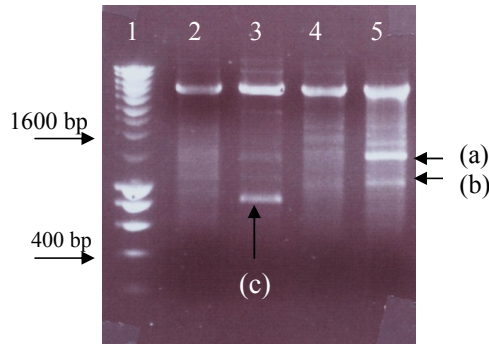


**Hình 4: Phổ diện huỳnh quang của quần thể vi khuẩn khi phân tích bằng máy FACS: (A) ở lần chọn lọc dương tính đầu, (B) lần chọn lọc dương tính thứ 2 (C) lần chọn lọc dương tính thứ 3. Trục Y biểu diễn kích thước của (khối) vi khuẩn (theo tỉ lệ log); trục X biểu diễn độ huỳnh quang. Vùng R5 chứa những vi khuẩn có kích thước tương tự như *Salmonella* nhưng không có huỳnh quang trong khi vùng R8 chứa các vi khuẩn có kích thước và độ phát huỳnh quang mong muốn**

Ở đầu của qui trình chọn lọc, thư viện vi khuẩn chứa nhiều loại trình tự đoạn chèn khác nhau: promoter cơ định, promoter được hoạt hóa hay ức chế trong quá trình thành lập biofilm và các đoạn DNA không mang trình tự của promoter. Ở giai đoạn này, ta thấy số lượng vi khuẩn phát huỳnh quang không nhiều (vùng R8, Hình 4A). Bằng việc thiết kế những vòng chọn lọc dương tính và âm tính xen kẽ nhau, số lượng các vi khuẩn chứa promoter hoạt động trong quá trình tạo biofilm ngày càng được làm giàu. Điều này có thể được thấy rõ khi so sánh qua số lượng vi khuẩn phát huỳnh quang qua các lần chọn lọc dương tính (vùng R8, Hình 4A, 4B và 4C). Điều này giúp tăng khả năng chọn được các dòng chứa promoter mong muốn để phân tích di truyền ở cuối qui trình sàng lọc.

3.2.2 Chứng minh sự làm giàu quần thể vi khuẩn phát huỳnh quang bằng phân tích kết quả cắt đoạn DNA chèn

Một cách khác để xác nhận sự làm giàu này là bằng phân tích kết quả cắt DNA (Hình 5). Plasmid được phân lập trước lần chọn lọc đầu tiên và sau lần chọn lọc sau cùng được cắt với enzyme cắt giới hạn thích hợp để tách lấy đoạn chèn. Như hình thể hiện, ở đầu của qui trình chọn lọc (giếng 1, 3), độ đa dạng về kích thước của các đoạn chèn rất cao trong khi càng về sau (giếng 2, 4) các đoạn DNA với kích thước nhất định đã được làm tăng cường. Điều này cho thấy qui trình này đã có hiệu quả trong việc chọn lọc có định hướng các đoạn DNA là promoter được hoạt hóa trong quá trình thành lập biofilm. Ở cuối qui trình này, chúng tôi chọn một cách ngẫu nhiên 96 dòng để kiểm tra phổ diện huỳnh quang trong 2 điều kiện: biofilm và dạng sống tự do (trong số 500 dòng ở quần thể ban đầu chưa sàng lọc). Hầu hết các ứng viên cho promoter được hoạt hóa chỉ trong quá trình thành lập biofilm đã được thu nhận lại hơn một lần trong quá trình sàng lọc. Điều này chứng tỏ số lượng dòng/vi khuẩn được chọn ngẫu nhiên để kiểm tra phổ diện huỳnh quang của các quần thể vi khuẩn đã được làm giàu là hợp lý và các “mẫu” này một ước lượng tốt để biết thông tin về các dòng trong từng quần thể đã được làm giàu.



Hình 5: DNA-agarose gel cho thấy sự làm giàu của các đoạn DNA chèn sau quá trình sàng lọc bằng máy FACS. Giếng 1: thang (Eurogentec). Giếng 2, 4: kết quả cắt bằng *EcoRI/XbaI* của quần thể 0.5-1 và 1.5-2 (tương ứng); trước khi sàng lọc. Giếng 3, 5: kết quả cắt bằng *EcoRI/XbaI* của quần thể 0.5-1 và 1.5-2 (tương ứng); ở cuối qui trình sàng lọc. Giếng 2 và 4 cho thấy các đoạn DNA chèn với nhiều kích thước (smear) trong khi ở giếng 3 và 5, một số đoạn chèn (promoter) đã được làm giàu ở cuối qui trình chọn lọc (a), (b), (c)

3.3 Phân tích trình tự của các promoter được hoạt hóa trong quá trình thành lập màng sinh học của *Salmonella*

Đối với các dòng vi khuẩn thể hiện phổ diện huỳnh quang khác nhau trong hai môi trường, plasmid của chúng được ly trích và trình tự của đoạn chèn (cả trình tự hoặc một phần đối với những đoạn chèn có kích thước lớn) được giải trình tự và so sánh với trình tự đã được chú giải *S. Typhimurium* LT2 (McClelland *et al.*, 2001) bằng phần mềm BLASTn (Altschul *et al.*, 1990). Các gen được phát hiện trong quá trình này sau đó sẽ được xác định vai trò thực sự trong quá trình tạo biofilm bằng cách tạo đột biến trên gen mục tiêu ở *S. Typhimurium* dạng hoang dại và kiểm tra khả năng tạo biofilm của những dòng này.

#### 4 KẾT LUẬN

Phương pháp phân tích cảm ứng huỳnh quang (DFI) được ứng dụng trong đề tài này đã chứng tỏ nó là một kỹ thuật mới với nhiều ưu điểm trong việc phân tích di truyền của các gen tham gia vào quá trình tạo lập biofilm. Với thiết kế thí nghiệm như trình bày trong bài, DFI chứng tỏ khả năng phân tích di truyền của các gen tham gia vào trên toàn bộ gen với số lượng nhiều (high-throughput capacity); phân tích di truyền các tế bào ở dạng đơn lẻ (single cell) giúp khắc phục được tính không đồng nhất (heterogeneity) của các tế bào trong biofilm. Việc phân tích di truyền trên toàn bộ gen cũng hứa hẹn sẽ giúp tìm ra được chức năng của các gen chưa được chú thích (annotated).

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers & D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* 215(3): 403-10.
- An, D. & M. R. Parsek (2007). "The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities." *Curr Opin Microbiol* 10(3): 292-6.
- Brandl, M. T. & R. E. Mandrell (2002). "Fitness of Salmonella enterica serovar Thompson in the cilantro phyllosphere." *Appl Environ Microbiol* 68(7): 3614-21.
- Clarke, L. and J. Carbon (1976). "A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome." *Cell* 9(1): 91-9.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart & E. P. Greenberg (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." *Science* 284(5418): 1318-22.
- Datsenko, K. A. & B. L. Wanner (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12): 6640-5.
- Gerstel, U. & U. Romling (2001). "Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfD promoter activity and expression of the multicellular morphotype in Salmonella typhimurium." *Environ Microbiol* 3(10): 638-48.
- Gualdi, L., L. Tagliabue & P. Landini (2007). "Biofilm formation-gene expression relay system in Escherichia coli: modulation of sigmaS-dependent gene expression by the CsgD regulatory protein via sigmaS protein stabilization." *J Bacteriol* 189(22): 8034-43.
- Lazazzera, B. A. (2005). "Lessons from DNA microarray analysis: the gene expression profile of biofilms." *Curr Opin Microbiol* 8(2): 222-7.
- Makin, S. A. & T. J. Beveridge (1996). "The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of Pseudomonas aeruginosa to surfaces." *Microbiology* 142 ( Pt 2): 299-307.
- McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston & R. K. Wilson (2001). "Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2." *Nature* 413(6858): 852-6.
- Okamura, M., Y. Kamijima, T. Miyamoto, H. Tani, K. Sasai & E. Baba (2001). "Differences among six Salmonella serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens." *Avian Dis* 45(1): 61-9.
- Romling, U. (2005). "Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae." *Cell Mol Life Sci* 62(11): 1234-46.
- Romling, U., M. Rohde, A. Olsen, S. Normark & J. Reinkoster (2000). "AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in Salmonella typhimurium regulates at least two independent pathways." *Mol Microbiol* 36(1): 10-23.



- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. e. Maniatis (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press, New York.
- Stewart, P. S. & M. J. Franklin (2008). "Physiological heterogeneity in biofilms." Nat Rev Microbiol 6(3): 199-210.
- Valdivia, R. H. & S. Falkow (1996). "Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction." Mol Microbiol 22(2): 367-78.
- Werber, D., J. Dreesman, F. Feil, U. van Treeck, G. Fell, S. Ethelberg, A. M. Hauri, P. Roggentin, R. Prager, I. S. Fisher, S. C. Behnke, E. Bartelt, E. Weise, A. Ellis, A. Siitonen, Y. Andersson, H. Tschape, M. H. Kramer & A. Ammon (2005). "International outbreak of *Salmonella* Oranienburg due to German chocolate" BMC Infect Dis 5(1): 7.