



國立臺灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所

碩士論文

Institute of Food Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master's Thesis

Pantoea vagans M17 之群體感應調節對

運動性和生物膜形成的影響

Impact of quorum sensing regulation on

the motility and biofilm formation of *Pantoea vagans* M17

李湘怡

Hsiang-Yi Li

指導教授：羅翊禎 博士

Advisor: Yi-Chen Lo, Ph. D.

中華民國 113 年 8 月

August 2024



國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

MASTER'S THESIS ACCEPTANCE CERTIFICATE
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

Pantoea vagans M17 之群體感應調節對運動性和生物膜形成的影響

Impact of quorum sensing regulation on

the motility and biofilm formation of *Pantoea vagans* M17

本論文係李湘怡(R11641003)在國立臺灣大學食品科技研究所完成之碩士學位論文，於民國 113 年 7 月 23 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

The undersigned, appointed by the Institute of Food Science and Technology on 23rd July 2024 have examined a Master's Thesis entitled above presented by Hsiang-Yi Li (R11641003) candidate and hereby certify that it is worthy of acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

林旭陽

林旭陽 博士
衛生福利部食品藥物管理署北區管理中心 副主任

李月嘉

李月嘉 博士
國立臺灣大學食品科技研究所 助理教授

王如邦

王如邦 博士
國立臺灣大學食品安全與健康研究所 助理教授

林乃君

林乃君 博士
國立臺灣大學農業化學系 教授

羅翊禎

羅翊禎 博士
國立臺灣大學食品科技研究所 教授(指導教授)

所長 潘敏雄

潘敏雄 特聘教授

誌謝



首先，感謝我的指導教授羅翊禎老師。在兩年學習的過程中，無論是實驗的難關、報告的緊張，老師皆細心且耐心地指引方向並給予鼓勵，讓我更勇敢面對路途中的未知。謝謝羅老師的關懷與栽培，一點一滴都化為我茁壯的養分。接著，感謝口試委員們於百忙之中悉心審閱論文，並提供珍貴的建議與指導，使我的研究更臻於完善。謝謝口試委員們的付出，令我更加成長。此外，感謝陳錦樹老師與劉沛茶老師，於大學時期指導專題研究並給予諸多勉勵。再來，感謝衛生福利部國家中醫藥研究所的廖家慶老師，熱心提供實習機會且撥冗與我討論，並感謝賴映系學姊的用心教導。接著，感謝農業化學系的林乃君老師，慷慨分享實驗技術並贈予實驗材料。此外，感謝台灣島津科學儀器股份有限公司提供獎學金，並謝謝薩卜博士與黃郁芳經理，積極協助樣品分析並處理相關事宜。

感謝我的夥伴筱婷與語捷，一路上有妳們的陪伴是我的幸運。也感謝實驗室的學姊長與其他夥伴們：偉君、雅嵐、心柔、元睿、子瑜、子欣、婷云、恩池、奕慧、琦芳、沛蓁、以霖、元亨、毓寬、維心、湘筠、欣唐、瑜庭與采緹。你們傳授實驗經驗並提供解決辦法，仔細與我討論並給予實際建議，讓我獲得不同的觀點與嘗試方向。感謝你們協助分擔實驗室的事務，也在各種層面提供許多幫助。日常的聊天與關心，也使我的研究生活更加豐富與有趣。此外，感謝室友、朋友、其他實驗室的夥伴與家人，在我焦慮時提供安慰、在我猶豫時提供力量，讓我知道自己並非獨自在努力。你們的支持與陪伴賦予我勇氣與信心迎向挑戰。

最後，感謝一切讓我有動力持續前行的人事物，於此致上我真誠的謝意。

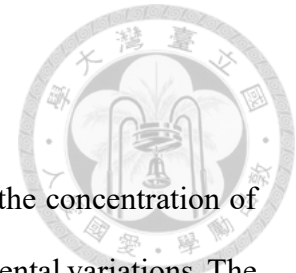
中文摘要



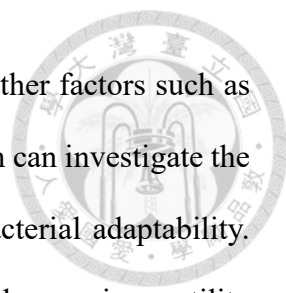
群體感應 (quorum sensing, QS) 允許細菌感知自誘導劑的變化，在細菌間溝通並因應環境變動。自誘導劑的濃度反映族群密度，細菌據以調節基因表現並展現特定集體行為，包含生物膜生成與表面移行。這兩個表型可能促進細菌導致食品腐敗。研究表示 *Pantoea* spp. 的 QS 系統以 *N*-酰基-L-高絲氨酸內酯 (*N*-acyl-L-homoserine lactones, AHLs) 作為自誘導劑。實驗室先前從腐敗香瓜中篩選出 *Pantoea vagans* M17，具明顯生物膜生成與表面移行能力。為探討 *P. vagans* M17 的 QS 系統，本研究先利用多重序列比對確認 *P. vagans* M17 的合成酶 *PagI* 及受體 *PagR* 序列，與 *P. vagans* C9-1 的序列高度相似，且含有保守胺基酸。同時，以 HPLC-MS/MS 鑑定 *P. vagans* M17 產生的 QS 自誘導劑為 *N*-butyryl-L-homoserine lactone (BHL)，並添加 BHL 與潛在的 QS 抑制劑 2(5H)-呋喃酮。在 *P. vagans* M17 的培養液中，BHL 濃度隨著培養時間增加而上升。添加 40 - 140 ppm 的 BHL 雖不影響 *P. vagans* M17 生長，但可以提升 24 小時的生物膜生成。添加 8 - 40 mM 的範圍之 2(5H)-呋喃酮減緩 *P. vagans* M17 生長，而當濃度達 32 mM 以上則會抑制生物膜生成。添加 BHL 與 2(5H)-呋喃酮於養分較缺乏之 M9 培養基，可以分別促進與降低 *P. vagans* M17 表面移行的能力。此外，在第 6 與 24 小時，BHL 與 2(5H)-呋喃酮抑制 *pagI* 的表現。*pagR* 與鞭毛蛋白基因 *fliC2* 的表現情況不受兩者改變。2(5H)-呋喃酮會抑制並延後生物膜調節基因 *bssSI* 的表達。這些結果顯示，*P. vagans* M17 的 QS 對生物膜生成及表面移行的調控具有重要性，但其效果會受到環境中營養成分等因素影響。後續研究可以探討 QS 與環境的交互作用對細菌的適應性之貢獻，以及 QS 對生物膜及表面移行的其他重要因子之影響。對 QS 系統更深入的了解，有助於未來尋找合適的方法進行抑制，以減緩細菌導致的食品腐敗並促進食品安全。

關鍵字：群體感應、自誘導劑、*Pantoea vagans* M17、生物膜、表面移行

Abstract



Quorum sensing (QS) is used by bacteria to detect changes in the concentration of autoinducers, communicate with each other, and respond to environmental variations. The concentration of autoinducers reflects population density, enabling bacteria to regulate gene expression and exhibit specific collective behaviors including biofilm formation and swarming motility. These two phenotypes may contribute to food spoilage. Studies have shown that the QS system of *Pantoea* spp. utilizes *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) as autoinducers. Previously, *Pantoea vagans* M17, isolated from spoiled cantaloupe, was found to have strong biofilm formation and swarming motility. To investigate the QS system of *P. vagans* M17, we used multiple sequence alignment to confirm that the sequences of AHL synthase PagI and receptor PagR in *P. vagans* M17 were highly similar to those in *P. vagans* C9-1 and contained conserved amino acids. Using HPLC-MS/MS, the autoinducer produced by *P. vagans* M17 was identified as *N*-butyryl-L-homoserine lactone (BHL). BHL and the potential QS inhibitor 2(5H)-furanone were further added to observe their impact. Concentration of BHL in the culture medium of *P. vagans* M17 increased with cultivation time. Exogenous addition of 40 to 140 ppm of BHL did not affect the growth of *P. vagans* M17 but enhanced 24-hour biofilm formation. 2(5H)-furanone suppressed growth within the range of 8 to 40 mM, and inhibited biofilm formation above 32 mM. Addition of BHL and 2(5H)-furanone to the nutrient-deficient M9 medium significantly promoted and diminished the swarming motility of *P. vagans* M17, respectively. Furthermore, BHL and 2(5H)-furanone reduced the expression of *pagI* at 6 and 24 hours. The expression of *pagR* and the flagellin gene *fliC2* were not affected by either compound. 2(5H)-furanone decreased and postponed the expression of the biofilm regulatory gene *bssS1*. These findings suggest that QS is pivotal in governing

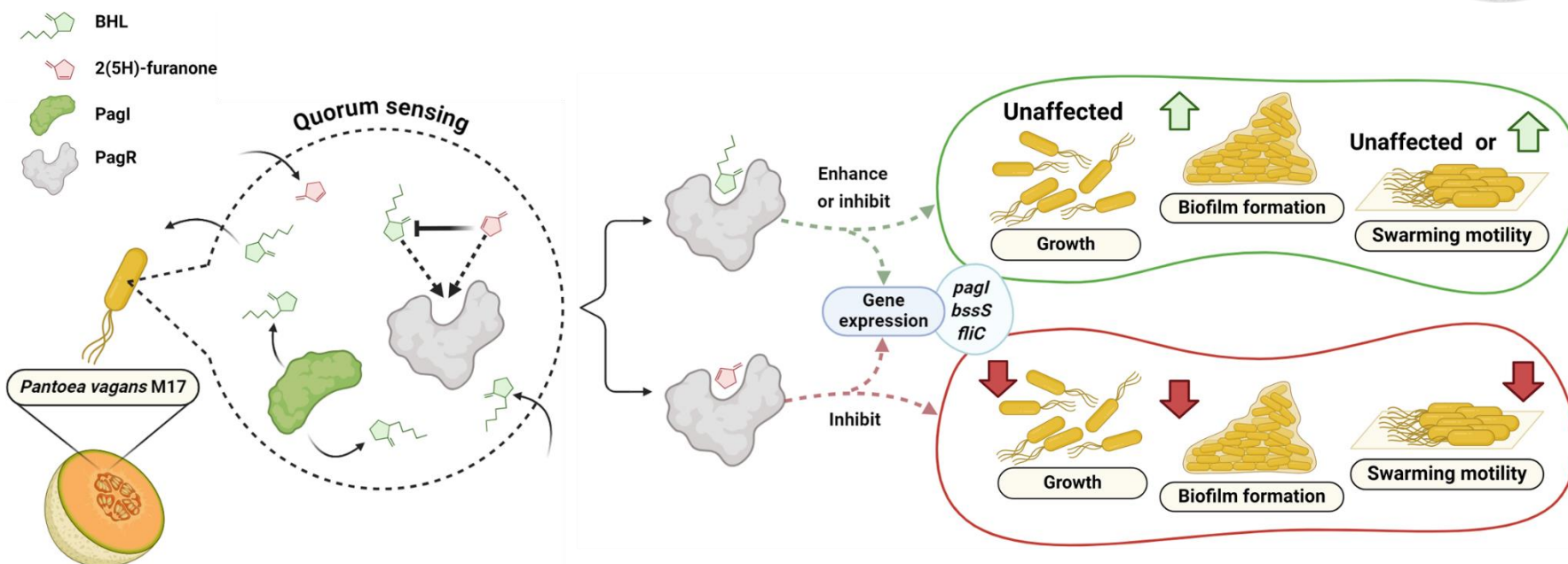


biofilm formation and swarming motility in *P. vagans* M17, while other factors such as environmental nutrients may influence the regulation. Future research can investigate the contribution of interactions between QS and the environment to bacterial adaptability. Besides, the effects of QS on other key factors in biofilm formation and swarming motility are worth further study. A comprehensive understanding of QS is expected to aid in devising strategies to mitigate food spoilage caused by bacteria and enhance food safety.

Keywords: quorum sensing, autoinducer, *Pantoea vagans* M17, biofilm, motility



Graphic abstract



Created in Biorender

目次



論文口試委員會審定書	i
誌謝	ii
中文摘要	iii
Abstract.....	iv
Graphic abstract.....	vi
目次	vii
圖次	x
表次	xi
附錄次	xii
第一章、前言	1
第二章、文獻回顧	2
第一節、 <i>Pantoea</i> spp.	2
第二節、群體感應與其調控之相關表型	4
一、群體感應功能與機制	4
二、群體感應系統之特性分析	6
三、生物膜與表面移行	8
四、第六型分泌系統	11
第三節、群體淬滅	14
第四節、群體感應與生物膜形成及表面移行之關係	16
第三章、研究目的與實驗架構	18
第四章、材料與方法	20
第一節、實驗材料	20
一、實驗菌株	20



二、藥品	20
三、質體、引子與限制酵素	22
四、藥品原液、培養基與溶劑之配製	23
第二節、儀器設備與套裝軟體	28
一、儀器與設備	28
二、套裝軟體	30
第三節、實驗方法	31
一、菌株群體感應蛋白質序列比對	31
二、菌株群體感應基因刪除	31
三、菌株自誘導劑鑑定	34
四、菌株表型分析	36
五、基因表現量分析	38
第五章、實驗結果與討論	44
第一節、 <i>P. vagans</i> M17 中群體感應蛋白質之鑑定	44
第二節、 <i>P. vagans</i> M17 群體感應基因刪除突變株之建構	52
一、帶有基因上、下游同源片段的重組質體建構	52
二、 <i>sacB</i> 的無標記基因刪除	53
第三節、 <i>P. vagans</i> M17 中自誘導劑定性與定量	55
一、 <i>P. vagans</i> M17 主要產生之自誘導劑為 BHL	55
二、 <i>P. vagans</i> M17 分泌之 BHL 含量隨著培養時間增加而上升.....	65
第四節、群體感應對 <i>P. vagans</i> M17 生長、生物膜生成與表面移行之影響	68
一、群體感應抑制劑減緩 <i>P. vagans</i> M17 之生長	68
二、 <i>P. vagans</i> M17 之生物膜生成受到群體感應調控	73
三、群體感應對 <i>P. vagans</i> M17 表面移行之影響	81
第五節、群體感應對 <i>P. vagans</i> M17 基因表現之影響	90

一、引子效率與專一性	90
二、BHL 與 2(5H)-呋喃酮減少 <i>P. vagans</i> M17 中 <i>pagI</i> 之表現	94
三、2(5H)-呋喃酮減少且延後 <i>P. vagans</i> M17 中 <i>bssS1</i> 之表現	98
四、BHL 與 2(5H)-呋喃酮會調節 <i>P. vagans</i> M17 中 <i>hcp1</i> 與 <i>clpV1</i> 之表現	102
第六章、結論與展望	106
第七章、參考文獻	107
第八章、附錄	127

圖次



圖 3-1、實驗架構。	19
圖 5-1、LuxI 與 LuxR 同系物之多重序列比對。	47
圖 5-2、LuxI 與 LuxR 同系物之親緣關係樹。	50
圖 5-3、AHLs 標準品在 product ion scan 模式下之總離子層析圖。	59
圖 5-4、AHLs 標準品二次離子之質譜。	60
圖 5-5、BHL、HHL 標準品與樣品在 multiple reaction monitoring 模式下之總離子層析圖。	61
圖 5-6、AHLs 標準品與樣品在 precursor ion scan 模式下之總離子層析圖。	62
圖 5-7、樣品二次離子之質譜。	63
圖 5-8、群體感應相關化合物之結構。	70
圖 5-9、群體感應自誘導劑對 <i>P. vagans</i> M17 生長之影響。	71
圖 5-10、群體感應抑制劑 2(5H)-呋喃酮對 <i>P. vagans</i> M17 生長之影響。	72
圖 5-11、群體感應自誘導劑對 <i>P. vagans</i> M17 生物膜生成與浮游微生物之影響。	78
圖 5-12、群體感應抑制劑 2(5H)-呋喃酮對 <i>P. vagans</i> M17 生物膜生成與浮游微生物之影響。	79
圖 5-13、群體感應相關化合物對 <i>P. vagans</i> M17 生物膜生成之影響。	80
圖 5-14、不同化合物對 <i>P. vagans</i> M17 表面移行之影響。	85
圖 5-15、群體感應相關化合物的濃度對 <i>P. vagans</i> M17 表面移行之影響。	87
圖 5-16、群體感應相關化合物對 <i>P. vagans</i> M17 表面移行型態之影響。	89
圖 5-17、即時聚合酶連鎖反應之引子效率。	92
圖 5-18、 <i>P. vagans</i> M17 之 <i>pagI</i> 與 <i>pagR</i> 相對表現量。	96
圖 5-19、 <i>P. vagans</i> M17 之 <i>bssS1</i> 與 <i>fliC2</i> 相對表現量。	100
圖 5-20、 <i>P. vagans</i> M17 之 <i>hcp1</i> 與 <i>clpV1</i> 相對表現量。	104

表次



表 4-1、以 TSB 為基礎之表面移行培養基組成	26
表 4-2、以 M9 為基礎之表面移行培養基組成	27
表 4-3、DMSO、BHL、2(5H)-呋喃酮與 C-30 之添加比例	41
表 4-4、本研究中用於即時聚合酶連鎖反應之基因列表	42
表 4-5、本研究中用於即時聚合酶連鎖反應之引子序列	43
表 5-1、 <i>P. vagans</i> M17 與 <i>Pantoea</i> spp. 及 <i>Pseudomonas</i> spp. 之 LuxI 同系物成對比較	48
表 5-2、 <i>P. vagans</i> M17 與 <i>Pantoea</i> spp. 及 <i>Pseudomonas</i> spp. 之 LuxR 同系物成對比較	49
表 5-3、有無添加 BHL 之 <i>P. vagans</i> M17 樣品中基峰絕對強度比較	64
表 5-4、不同生長階段 <i>P. vagans</i> M17 樣品之 BHL 定量	67
表 5-5、即時聚合酶連鎖反應之引子效率與專一性	93

附錄次



附錄 1、用於基因選殖之質體 pK18 mobsacB。	127
附錄 2、本研究用於建構基因刪除突變株之引子	128
附錄 3、基於 <i>sacB</i> 的基因刪除流程。	129
附錄 4、DMSO 對 <i>P. vagans</i> M17 生長之影響。	131
附錄 5、不同 DMSO 濃度下 <i>P. vagans</i> M17 之生長情況	132
附錄 6、 <i>P. vagans</i> M17 RNA 之凝膠電泳結果。	134
附錄 7、PCR 產物之凝膠電泳結果。	135
附錄 8、重疊延伸 PCR 溫度調整之凝膠電泳結果。	136
附錄 9、經限制酵素反應後 vector 與 insert 之凝膠電泳結果。	137
附錄 10、菌落 PCR 與質體經限制酵素反應後之凝膠電泳結果。	138
附錄 11、本研究建構之重組質體 pK18 mobsacB-pagR。	139
附錄 12、本研究建構之重組質體 pK18 mobsacB-pagI。	140
附錄 13、確認 <i>P. vagans</i> M17 中 <i>pagR</i> 或 <i>pagI</i> 刪除之菌落 PCR 結果	141
附錄 14、確認 <i>pagR</i> 刪除之菌落 PCR 凝膠電泳結果。	142
附錄 15、確認 <i>pagI</i> 刪除之菌落 PCR 凝膠電泳結果。	143
附錄 16、OHHL、OOHL 標準品與樣品在 multiple reaction monitoring 模式下之總離子層析圖。	144
附錄 17、有無添加 BHL 之 <i>P. vagans</i> M17 樣品之總離子層析圖。	145
附錄 18、 <i>P. vagans</i> M17 之生長曲線。	146
附錄 19、BHL 標準品校準曲線。	147
附錄 20、不同生長階段 <i>P. vagans</i> M17 樣品之 BHL 定量。	148
附錄 21、較低濃度的群體感應抑制劑 2(5H)-呋喃酮對 <i>P. vagans</i> M17 生長之影響。	149

附錄 22、2(5H)-呋喃酮濃度較低時 <i>P. vagans</i> M17 之生長情況	150
附錄 23、較低濃度的群體感應抑制劑 2(5H)-呋喃酮對 <i>P. vagans</i> M17 生物膜生成之影響。	152
附錄 24、不同 2(5H)-呋喃酮濃度下 <i>P. vagans</i> M17 之生長情況	153
附錄 25、群體感應抑制劑 C-30 對 <i>P. vagans</i> M17 生長之影響。	155
附錄 26、不同 C-30 濃度下 <i>P. vagans</i> M17 之生長情況	156
附錄 27、群體感應抑制劑 C-30 對 <i>P. vagans</i> M17 生物膜生成與浮游微生物之影響。	158
附錄 28、群體感應相關化合物對 <i>P. vagans</i> M17 生物膜週期之影響。	159
附錄 29、 <i>P. vagans</i> M17 生物膜生成與浮游微生物生長情況	160
附錄 30、群體感應相關化合物對 <i>P. vagans</i> M17 浮游微生物活性之影響。	161
附錄 31、 <i>P. vagans</i> M17 在含有不同化合物的不同培養基之表面移行面積	162
附錄 32、 <i>P. vagans</i> M17 在含有不同濃度群體感應相關化合物的 TSB 培養基之表面移行面積	163
附錄 33、 <i>P. vagans</i> M17 中目標基因相對表現量	164

第一章、前言



在食品儲藏過程中，腐敗性細菌的污染會縮短食品貨架期並導致浪費。許多細菌會響應環境的變動展現不同表現型態，其中生物膜生成與表面移行為群體感應調控的重要表型，且可能與細菌造成食品腐敗相關。前人的研究指出 *Pantoea* spp. 能夠分泌群體感應系統的自誘導劑，並且曾經於不同食品中檢測到自誘導劑，推測該系統與食品腐敗間具有關聯性。先前實驗室進行臺灣網紋洋香瓜的儲藏性試驗，從中分離出 *Pantoea* spp.。其中的 *Pantoea vagans* M17 具有明顯生物膜生成與表面移行能力，同時接菌試驗亦顯示其對截切香瓜品質造成不良影響。*P. vagans* M17 具有群體感應關鍵基因，然尚未鑑定菌株產生之自誘導劑，其群體感應系統與生物膜生成或表面移行的關係也仍不清楚。因此本研究旨在了解 *P. vagans* M17 之群體感應系統，以及其對於生物膜生成與表面移行之影響。

第二章、文獻回顧



第一節、*Pantoea* spp.

Pantoea spp. 屬於腸桿菌目 (Enterobacterales) 中的歐文菌科 (Erwiniaceae)，為革蘭氏陰性細菌，好氧或兼性厭氧、具有移動力，不具莢膜且不產生孢子。最適生長溫度為 28 °C 至 30 °C。短桿狀，菌落為米白色至黃色，具有圓形、光滑且凸起的表面 (Brady et al., 2009; Mani & Nair, 2021)。目前 *Pantoea* spp. 包含約 25 個種，廣泛存在於環境中，可以從許多宿主與生態區位 (environmental niche) 中分離，例如動植物、昆蟲、人類、水源與土壤等 (Lv et al., 2022)。

Pantoea spp. 的部分菌種被視為特定植物的附生菌或病原菌。文獻指出 *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* 會導致玉米細菌性枯萎病 (Stewart's wilt disease)，該菌株透過傷口進入玉米植株後，移動至木質部導管並產生大量胞外多醣 (extracellular polysaccharides) 阻礙水份運輸，致葉片枯黃與損傷等病癥 (Carrier et al., 2009; von Bodman et al., 1998)。經 *P. stewartii* subsp. *stewartii* 感染的玉米植株，其木質部內壁有明顯的菌體與絲狀物質貼附，也觀察到塔狀的三維生物膜 (biofilm) 生成 (Koutsoudis et al., 2006)。*Pantoea agglomerans* YS19 為從特定水稻品種中分離出的優勢菌株，具有良好的固氮能力，並能產生如吲哚乙酸等植物激素。在無氮源的情況下，接種 *P. agglomerans* YS19 的稻苗在生長十二天後，鮮重 (fresh weight) 較控制組增加了 63.4 %。控制組在三十五天後始枯萎死亡，接種菌株的稻苗於六十天後仍處於良好生長狀態 (Feng et al., 2006)。

Braun-Kiewnick 等人 (2000) 曾進行田間試驗，將 *Pantoea agglomerans* Eh 460 懸浮液噴灑於晚乳熟期 (late milk stage) 的大麥植株頂部，三天後再噴灑會造成大麥穀粒枯萎病 (kernel blight) 的 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 懸浮液。結果顯示，與噴灑水的控制組相比，噴灑 *P. agglomerans* Eh 460 分別減少兩個大麥品種 58 % 與 65 % 的穀粒枯萎病感染。因此 *Pantoea* spp. 可以被用作生物防

治劑 (biocontrol agent)。此外，能夠生產抗菌物質的 *Pantoea vagans* C9-1 與 *Pantoea agglomerans* E325，已分別被開發成商業的生物防治劑產品，對於 *Erwinia amylovora* 導致蘋果樹與梨樹等仁果類果樹的火燒病 (fire blight)，能夠有效控制感染 (Lv et al., 2022; Smits et al., 2010)。

Pantoea spp. 也是人類的伺機性病原菌 (opportunistic pathogen)，可能影響多種器官並導致如敗血性關節炎、心內膜炎、腦膜炎與呼吸道感染等症狀 (Nadarasah & Stavrinides, 2014)。常見感染人體的途徑主要有二：植物的棘刺在皮膚造成傷口並使細菌進入人體；或是免疫低下的個體在醫院內接觸污染的設備導致 (Dutkiewicz et al., 2016)。在 *Pantoea* spp. 導致的新生兒感染中，易致呼吸衰竭並具高致死率，其中 *P. agglomerans* 與 *Pantoea dispersa* 為最常見的兩個種 (Mani & Nair, 2021)。

多種複雜的系統與機制共同協調 *Pantoea* spp. 之致病性或是毒力因子 (virulence factor) 的產生，而相關基因或蛋白質的表現，可能受到轉錄或轉譯後修飾、群體感應 (quorum sensing)、二元信號轉導系統 (two component signal transduction systems) 等影響 (Li et al., 2019; Merighi et al., 2003; Ramamurthy et al., 2022)。其中，群體感應會調控胞外多醣、生物膜、移動性、分泌系統 (secretion system)、毒素與酵素等多種毒力因子之產生或表現，近年來受到許多研究關注 (Daniels et al., 2004; Papenfort & Bassler, 2016; Pena et al., 2019; Williams, 2007)。



第二節、群體感應與其調控之相關表型

一、群體感應功能與機制

群體感應 (quorum sensing, QS) 為細菌中常見的機制，能夠感知環境的變化並在細菌間進行溝通。隨著族群密度提升，細菌增加特定訊號分子，或稱自誘導劑 (autoinducer) 的合成與釋放。當自誘導劑在外部環境中累積並達閾值 (threshold)，即代表相對應的族群密度或是群體。接著自誘導劑與受體形成複合物，調節受體與啟動子 (promoter) 的結合狀態，改變 QS 目標基因的表現。基因表現的變化，能夠協調個體細菌產生合作行為，例如：面對競爭者時，提高抗生素抗性基因的表現，以同步啟動防禦機制。此外，細菌會共同增加毒力因子的生產與釋放，以抵抗外在威脅。QS 也會促進胞外酵素的分泌，以增加細菌對養分的攝取 (Papenfort & Bassler, 2016; Whitehead et al., 2001; Williams, 2007)。對共生性細菌而言，QS 導致的型態切換可能對宿主有益或有害。在環境中，QS 對於生物污垢 (biofouling) 形成、氮循環或污染物降解等皆有所貢獻 (Hense & Schuster, 2015)。

不同細菌有不同的 QS 系統與對應之自誘導劑，但主要以革蘭氏陽性細菌與革蘭氏陰性細菌分成三類。革蘭氏陽性細菌使用二元系統調節基因表現，包含跨膜的感測器激酶受體 (sensor kinase receptor) 與位在細胞質的轉錄因子；主要產生的自誘導劑為寡肽 (oligopeptide)，又稱為 autoinducing peptide (Papenfort & Bassler, 2016; Williams, 2007)。在革蘭氏陰性細菌中最常見的自誘導劑為 *N*-酰基-L-高絲氨酸內酯 (*N*-acyl-L-homoserine lactones, AHLs)，又稱為 I 型自誘導劑 (autoinducer-1)。其受體同時具有轉錄活化功能，位於細胞質內 (Stevens et al., 2011; Whitehead et al., 2001)。此外，部分革蘭氏陽性細菌與革蘭氏陰性細菌會分泌 II 型自誘導劑 (autoinducer-2)。其在不同細菌中形成的結構相異，但皆含有 2-甲基-2,3,3,4-四羥基四氫呋喃 (2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran)，且共同前驅物為 4,5-二羥基-2,3-戊烷雙酮 (4,5-

dihydroxy-2,3-pentanedione, DPD)。II 型自誘導劑能在不同的細菌物種間傳遞，即使細菌本身無法合成，也有可能藉由二元系統感測其他細菌產生的 II 型自誘導劑，並調節自身基因表現 (Hense & Schuster, 2015; Papenfort & Bassler, 2016)。

細菌的 QS 與自誘導 (autoinduction) 的概念，係在探討 *Vibrio fischeri* 的生物發光 (bioluminescence) 調節過程中逐漸成形。研究發現調控生物發光之 *lux* 操縱組 (operon) 相關基因，在 *V. fischeri* 對數期 (logarithmic phase) 前期與中期的表現有遲滯 (lag) 現象，然在對數後期與生長停滯期 (stationary phase) 前期會快速增加。此外，將菌株培養至生長停滯期的上清液加入對數前期的細菌培養液中，可以誘導生物發光 (Fuqua et al., 1994)。 *V. fischeri* 的 *lux* 系統因此被視為研究 QS 機制之模型。 *V. fischeri* 的 *lux* operon 包含八個基因，構成兩個反向轉錄的單元。其中一個單元僅含有 *luxR*，另一單元涵蓋 *luxI* 在內的其他 *lux* 基因。生物發光所需的酵素及受質，由 *luxI* 與 *luxR* 以外的其他基因負責。 *luxI* 表現的蛋白質為 AHLs 合成酶，催化 S-腺苷甲硫胺酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM) 與醯基-醯基載體蛋白 (acyl-acyl carrier protein, acyl-ACP) 合成為 AHLs。AHLs 可能留在細菌的細胞質內，藉由被動運輸擴散，或由細菌分泌至外部環境。當族群密度低時，*luxI* 以基礎水平進行轉錄，AHLs 累積緩慢且總濃度低，無法誘發 QS。隨著族群密度增加，AHLs 濃度達到閾值。 *luxR* 的產物作為 AHLs 的受體與轉錄調節蛋白質，利用 N 端與 AHLs 結合形成複合物，並可能因構形改變而變得活躍。該複合物以 C 端與 *luxI* 上游的啟動子區域中，稱為 *lux*-box 之序列結合，活化包含 *luxI* 在內的其他 *lux* 基因之轉錄。由 AHLs-LuxR 複合物活化轉錄並表現之 LuxI，其合成的 AHLs 將結合並活化更多 LuxR，確保 AHLs 的產生與生物發光持續進行，形成正向的自誘導迴路。 *luxR* 的表現在 AHLs 濃度低時被誘導，在濃度充足時被抑制，藉以限制 QS 的活性上限 (Fuqua et al., 1994; Papenfort &

Bassler, 2016; Whitehead et al., 2001; Williams, 2007)。

在不同細菌中，QS 除了調控 *luxI* 與 *luxR* 同系物 (homologue) 之表現，AHLs 的結合也會改變 LuxR 同系物對於其他啟動子的結合情況，並導致相關基因轉錄之活化或是去抑制 (derepression)。舉例來說，產生孢子、抗生素、毒素、胞外酵素、多醣、生物膜、界面活性劑 (surfactant)、運動性與分泌系統等表型相關之基因，皆會受到 QS 調控 (Daniels et al., 2004; Papenfort & Bassler, 2016; Pena et al., 2019; Williams, 2007)。

二、群體感應系統之特性分析

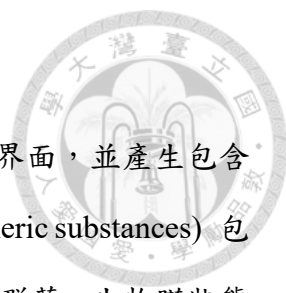
細菌中可能存在多個不同的 QS 系統。以革蘭氏陰性細菌而言，對於不同 QS 系統的探討，主要建立在以下的基礎之上：一、將菌株中潛在的 LuxI 與 LuxR 同系物，與源自己知細菌且功能清楚的同系物進行多重序列比對 (multiple sequence alignment) 並建立親緣關係樹 (phylogenetic trees)。藉由比較同系物間的一致性、保守程度，基因起源與細菌演化多樣性的先後順序等，增進對 QS 系統的了解。二、將菌株培養至特定時間點或吸光值，獲得上清液後進行液相萃取。接著利用層析法 (chromatography) 分離樣品中的不同成分，搭配質譜法 (mass spectrometry) 等分析方法，鑑定菌株產生的 AHLs (Beck von Bodman & Farrand, 1995; Chalupowicz et al., 2008; Jiang et al., 2015; Morohoshi et al., 2007)。舉例來說，*Pseudomonas aeruginosa* 具有四個不同的 QS 途徑，並以階層式調控整合細菌的反應。四個 QS 中有兩個屬於 *lux* 系統，分別稱為 *las* 以及 *rhl*，兩系統中對應的 *luxI* 同系物 (*lasI* 與 *rhlI*) 與 *luxR* 同系物 (*lasR* 與 *rhlR*) 序列皆具有顯著的同源性。*las* 以及 *rhl* 系統產生的自誘導劑分別為 *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (OdDHL) 以及 *N*-butyryl-L-homoserine lactone (BHL) (de Kievit, 2009; Papenfort & Bassler, 2016; Pearson et al., 1994; Pearson et al., 1995)。不同的 QS 系統可能各自調節

相關基因與表型，如 *las* 系統調控蛋白酶的表現、*rhl* 系統調節鼠李糖脂 (rhamnolipids) 的產生等；或是共同調節如生物膜的生成 (Yan & Wu, 2019)。

文獻表明不同 *Pantoea* spp. 皆具至少一組 *lux* 系統的同系物，例如 Chalupowicz 等人 (2008) 曾將 *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophilae* 中潛在的同系物 *pagI* 與 *pagR*，與其他細菌中已知的同系物進行多重序列比對，結果顯示其與 *Serratia* spp. 之一致性大於 40 %。也有研究比對 *P. stewartii* DC283 中潛在的同系物，並將菌株中 *lux* 系統的基因分別命名為 *esaI* 與 *esaR* (Beck von Bodman & Farrand, 1995)。Morohoshi 等人 (2007) 比對 *Pantoea ananatis* SK-1 中的 *eanI* 與 *eanR*，發現兩者與 *esaI* 以及 *esaR* 之序列一致性達 90 % 以上。

AHLs 為一系列革蘭氏陰性細菌中最常見的自誘導劑，其核心結構為環化的高絲氨酸內酯 (homoserine lactone)，鏈結不同長度、飽和度或官能基的酰基 (acyl) 側鏈。側鏈的長度可能為 4 至 18 個碳，通常為偶數；第三個碳原子上有機會出現羥基或酮基的取代；且可能具有雙鍵 (Daniels et al., 2004; Stevens et al., 2011)。為鑑定 *Pantoea* spp. 產生之 AHLs，先前文獻曾萃取不同 *Pantoea* spp. 培養後的上清液，並將樣品以薄層層析法 (thin layer chromatography) 展開，利用特定的細菌作為生物感測器 (biosensor) 顯色，以初步判定 *Pantoea* spp. 產生之 AHLs 的可能種類與身分 (Chalupowicz et al., 2008; Jatt et al., 2014; Morohoshi et al., 2007)。也有許多研究以液相層析-質譜法 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 或液相層析-串聯質譜法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)，分析萃取後的樣品，再對照不同 AHLs 標準品的母離子與子離子之質荷比 (mass to charge ratio, m/z) 資訊，以判定 AHLs 的身分 (Beck von Bodman & Farrand, 1995; Chalupowicz et al., 2008; Jiang et al., 2015; Patel et al., 2016; Yunus et al., 2014)。

三、生物膜與表面移行



生物膜，係細菌不可逆地 (irreversibly) 群聚於特定交界面，並產生包含多醣、蛋白質與 DNA 的胞外聚合物質 (extracellular polymeric substances) 包覆聚合的菌體，形成動態、多樣化、三維結構且具保護性的群落。生物膜狀態的細菌可以與其他微生物有效競爭空間與養分，並抵禦不利的環境條件，如乾燥、清洗、抗生素或殺菌劑等。細菌在生物膜狀態之基因表現與浮游狀態不同；此外，細菌在生物膜內可能透過接合 (conjugation) 或轉型 (transformation) 等作用，以質體形式獲取或交換 DNA (Bai et al., 2021)。生物膜的動態循環主要包含三個階段：附著 (attachment)、成熟與分散 (dispersion)。附著過程受到固體介面的不同材質、液體介面的流體動力學與細菌表面特性等複雜的因素影響，其中細菌表面的親疏水性質、鞭毛、菌毛 (pili)、胞外多醣與附著蛋白等，都被指出具有重要性。在初始附著後，細菌逐漸累積、堆疊並發展為成熟的生物膜，形成多層的毯狀 (mat)、柄狀 (stalk) 或蕈菇狀 (mushroom) 等結構。生物膜的分散可能源自環境中的沖蝕 (erosion)、剪切 (shearing) 或磨損 (abrasion) 等物理作用，或是生物膜內養分或氧氣耗盡導致的崩塌 (sloughing) 等。分散的細胞可能保有生物膜狀態的特徵，或轉化為浮游狀態，重新尋找新的界面附著，再次開啟下一輪循環週期 (Bai et al., 2021; Donlan, 2002)。

許多文獻指出 QS 與生物膜的關聯。例如有不同研究曾藉由報告菌株 (reporter strain) 的反應，表明在河床上的石頭表面形成的生物膜，以及進行膀胱導管插入術 (bladder catheterization) 的患者其尿導管內的生物膜中，皆有 AHLs 存在 (McLean et al., 1997; Stickler et al., 1998)。也有文獻表示生物膜內的細菌可能透過 QS 改變生長、抗生素抗性與致病性等相關基因之表現 (Landini et al., 2010; Riedel et al., 2009)。Li 等人 (2001) 指出處於生物膜狀態的 *Streptococcus mutans* 藉由 QS 增加對於外源性 DNA 的攝取，其對於帶有抗生素抗性基因的質體或染色體 DNA 之吸收效率，為浮游微生物的數十



至數百倍。*P. aeruginosa* $\Delta lasI$ 突變株形成的生物膜厚度僅為野生型的 20%，細菌聚集程度較低，且對洗滌劑更敏感。添加其自誘導劑 OdDHL 培養後的結果顯示，生物膜的厚度與細菌分布情況皆恢復為與野生型相似的水平 (Davies et al., 1998)。將 *P. ananatis* SK-1 中的 *eanI* 刪除後，突變菌株的生物膜生成量減少為野生型的 60%，且添加自誘導劑能夠使突變菌株以劑量效應增加生物膜產量 (Morohoshi et al., 2007)。*P. stewartii* DC283 $\Delta esaI$ 突變株與 $\Delta esaI\Delta esaR$ 突變株形成的生物膜缺乏明顯的三維結構，且對於介面的覆蓋度以及胞外聚合物質的產量也與野生型有所不同 (Koutsoudis et al., 2006)。

此外，某些特定基因的表現被認為與 QS 對生物膜的調控相關。研究表示，在有添加葡萄糖的 LB 中，*Escherichia coli* K12 的 *bssS* 突變株，其生物膜產量較野生型提升三倍。但在 LB 中，野生型與突變株的生物膜產量沒有差異。基因體微陣列 (microarray) 結果顯示在葡萄糖存在時，突變株中與異化代謝物抑制作用 (catabolite repression) 相關的基因表現下降約 2 倍 (Domka et al., 2006)。作者推測這導致 cyclic AMP (cAMP) 濃度提升，而其他文獻已證實 cAMP 增加會促進 *lsr* operon 之表現，其負責將 II 型自誘導劑向細菌內輸入 (Wang et al., 2005)。Domka 等人 (2006) 發現當葡萄糖存在時，*lsr* operon 中三個基因的表現，在 *bssS* 突變株較野生型提升了 4 至 6 倍。且在生長停滯期，突變株的胞外 II 型自誘導劑濃度較對數期下降，顯示自誘導劑可能被細菌攝取，因而增加生物膜生成。此外，已知 *rpoS* 會抑制生物膜形成。同篇文獻發現 *bssS* 突變株中 *rpoS* 表現被抑制 3.7 倍。這可能也導致突變株的生物膜生成量增加。因此，作者認為 *bssS* 作為全面調節因子 (global regulator)，藉由不同調控作用，在葡萄糖存在時展現抑制生物膜的效果。然而，有文獻指出處於生物膜狀態的細菌會誘導 *bssS* 表現。Hancock and Klemm (2007) 發現，在不同 *E. coli* 菌株生物膜中，*bssS* 的表現量增加為浮游狀態的 6.3 或 18.6 倍。相比於浮游細菌，在 LB 中培養兩天的 *Citrobacter werkmanii* BF-6

生物膜，*bssS* 的表現量提升約 40 倍 (Zhou et al., 2017)。作者先前研究則發現，在含有氯化鈉的 LB 中培養四天，*C. werkmanii* BF-6 生物膜細菌中的 *bssS* 表現較浮游細菌提升約 24 倍 (Zhou et al., 2013)。

細菌的表面移行 (swarming) 為一種鞭毛驅動的運動方式。多個單一細菌聚集後平行排列為筏狀 (rafts) 群體，在半固體表面快速移動。表面移行通常需要增加細菌個體間的交互作用、增長細胞長度、分化出更多鞭毛、提升水合作用 (hydration)，並克服摩擦力與表面張力等 (Daniels et al., 2004; Partridge & Harshey, 2013)。表面移行使細菌在表面快速擴展、向營養源移動、遠離潛在傷害、避免抗生素的作用、參與生物膜生成，或是定殖於宿主植物的木質部等以進行感染 (Vicario et al., 2015)。先前研究表示，表面移行與生物膜生成具相關性。表面移行的高細菌密度可能導致細菌短暫地無法移動並抵抗鞭毛旋轉，誘發生物膜形成的開端 (Worlitzer et al., 2022)。鞭毛介導的運動性，被認為與生物膜附著階段形成的單層細菌相關 (O'Toole & Kolter, 1998)。也有文獻指出，與具有運動能力者相比，缺乏運動能力的 *Pseudomonas fluorescens* 無法均勻且快速地附著，生物膜形成速度也較緩慢。鞭毛在細菌附著的早期階段具有重要作用，可能是因為鞭毛協助克服與表面相關的排斥力 (Korber et al., 1989)。

界面活性劑可以降低細菌與表面間的表面張力，且細菌通常以 QS 調控界面活性劑的產生與分泌 (Kearns, 2010)。*P. aeruginosa* 進行表面移行時，所需的界面活性劑為鼠李糖脂，其合成酶基因 *rhlA* 與 *rhlB* 的表現受 *rhl* 系統調節 (Yan & Wu, 2019)。*Bacillus subtilis* 與 *Serratia liquefaciens* 的界面活性劑也受到各自的 QS 系統調控 (Partridge & Harshey, 2013)。除了界面活性劑之外，文獻指出 QS 也會調控鞭毛基因或蛋白的表現。有研究表明，刪除 *E. coli* 中 II 型自誘導劑的合成酶基因 *luxS*，鞭毛蛋白 *FliC* 的表現量下降 (Sperandio et al., 2002)。研究顯示，*P. stewartii* subsp. *stewartii* DC283 的 *esal* 突變株與 *fliC* 突變株皆失去表面移行能力，顯示 QS 與鞭毛蛋白對於表面移

行的重要性 (Herrera et al., 2008)。相較於無法產生自誘導劑的 *E. coli* DH5 α ，能夠產生自誘導劑的 *E. coli* ATCC 25404 中 *fliC* 的表現增加了 17.2 倍；添加 60 $\mu\text{g/mL}$ 的 QS 抑制劑 (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone，會導致 *E. coli* ATCC 25404 的 *fliC* 表現減少 26.3 倍 (Ren et al., 2004)。Sheng 等人 (2016) 也發現，葡萄籽萃取物作為潛在的 QS 抑制劑，能夠減少不同產志賀毒素 *E. coli* 之 II 型自誘導劑引發的生物發光，且可以將 *FliC* 表現量減少至無法偵測的程度。

四、第六型分泌系統

細菌的分泌系統之主要功能為運送不同蛋白質，如：水解酵素、黏附素、細菌素、DNase 等，從細菌細胞質或周質 (periplasm) 至膜外環境，以獲取營養、佔據生態區位、與其他微生物競爭等；或是進一步將蛋白質送入目標細胞中，以破壞細胞結構、干擾免疫系統、導致感染或死亡等 (Green & Mecsas, 2016; Maphosa et al., 2023)。

目前已知有十一種分泌系統，其中如第二型、第三型與第六型分泌系統是植物或動物病原菌中的關鍵致病因素。植物病原菌的第二型分泌系統會分泌果膠酶、纖維素酶等以分解植物細胞壁，以獲取營養並破壞其完整性，且這被認為有助於第三型分泌系統組裝並運輸特定蛋白至宿主植物中 (Maphosa et al., 2023; Pena et al., 2019)。而第六型分泌系統 (type VI secretion system, T6SS) 在革蘭氏陰性細菌中相當保守，在已定序的基因組中，約 25 % 含有 T6SS 的相關基因 (Singh & Kumari, 2023)。T6SS 透過接觸依賴性的方式轉運效應蛋白 (effector protein) 至細菌或真核細胞內。許多效應蛋白的目標為細菌的細胞膜、細胞壁或細胞骨架。T6SS 也被指出可能與細菌間的溝通、混合菌株生物膜內的競爭、對真核細胞的毒力等具關連性 (Green & Mecsas, 2016; Sana et al., 2012; Sana et al., 2013; Teschler et al., 2022)。T6SS 具有與噬菌體相似的結構與



分泌機制，其組成中至少 13 個蛋白質被認為係核心成分且具保守性。其結構主要分為：膜複合物 (membrane complex)、底板 (baseplate)、帶鞘的注射器 (sheathed syringe) 與棘刺 (spike) (Green & Mecsas, 2016; Pena et al., 2019; Singh & Kumari, 2023)。膜複合物定錨於細菌細胞膜，提供底板的組裝平台。接著，收縮鞘在底板組裝並附著，進一步包覆由溶血素共調節蛋白 (hemolysin co-regulated protein, Hcp) 以六聚體的環狀結構堆疊形成的管狀注射器。收縮鞘藉由收縮與推入，將帶有效應蛋白的管狀注射器，透過前端的棘刺蛋白穿刺目標細胞，將效應蛋白送入其中。鞘收縮與推入時所需的能量由作為 ATPase 的 ClpV 提供，並在完成後拆卸與回收鞘的組成成分，為下一輪的收縮進行準備 (Douzi et al., 2016; Pena et al., 2019; Singh & Kumari, 2023)，因此一般認為 T6SS 能夠影響細菌的種間競爭。

Hcp 在 T6SS 中具保守性，其構成管狀注射器且可能為效應蛋白，被視為 T6SS 的標誌 (De Maayer et al., 2011; Yao et al., 2023; Zhao et al., 2024)。有研究發現 Hcp 藉調節腫瘤壞死因子訊號路徑之基因表現以影響 *Salmonella enteritidis* 之感染與促發炎能力 (Zheng et al., 2020)。當 *hcp* 被刪除，*Agrobacterium tumefaciens* C58 在馬鈴薯塊莖形成腫瘤的能力下降 (Wu et al., 2008)。刪除 *Pantoea ananatis* LMG 2665^T 一型 T6SS 的 *hcp* 會顯著減少感染洋蔥葉子的能力，與不同細菌的競爭能力也降低 (Shyntum et al., 2015)。此外，Hcp 被指出對生物膜的生成具貢獻性。Sauer 等人 (2002) 發現，與浮游狀態相比，Hcp 在 *P. aeruginosa* 的生物膜後期表現提升 300 倍。*Vibrio parahaemolyticus* 的 *hcp* 突變株之生物膜生成能力有缺陷，不具明顯的三維結構 (Enos-Berlage et al., 2005)。

ClpV 同樣為 T6SS 中保守的核心成分之一，屬於 AAA+ 蛋白質 (ATPases associated with various cellular activities)，為 T6SS 提供能量 (Douzi et al., 2016; Förster et al., 2014)。文獻表示 ClpV 對 Hcp 的分泌具必要性，相



較於野生型 *Vibrio cholerae* V52，*clpV* 突變株的上清液中並無觀察到 Hcp，但突變株的細胞萃取物內之表現量與野生型相仿。將 *clpV* 補回突變株可以恢復上清液中 Hcp 的表現 (Bönemann et al., 2009)。Mougous 等人 (2006) 也發現一型 T6SS 的 ClpV 對於 *P. aeruginosa* 分泌 Hcp 之必須。此外，刪除 *clpV* 導致 *V. cholerae* V52 對 *E. coli* 之殺滅能力下降 (Zheng et al., 2011)。 *P. aeruginosa* PAO1 二型或三型 T6SS 的 *clpV* 突變株對秀麗隱桿線蟲的毒力降低，且對海拉細胞的侵入能力減少 (Sana et al., 2012; Sana et al., 2013)。

文獻發現在不同 *Pantoea* spp. 中，有至多三種 T6SS 基因簇存在 (De Maayer et al., 2011; Smits et al., 2011; Yao et al., 2023)。特定 T6SS 會影響 *P. ananatis* 與其他革蘭氏陰性細菌的競爭力，也對洋蔥葉子、玉米苗與馬鈴薯塊莖等的致病性有貢獻 (Shyntum et al., 2015; Zhao et al., 2024)。此外，文獻表明 T6SS 的表達與細菌生長密切相關，QS 對調控其表現有一定程度的影響 (Pena et al., 2019; Singh & Kumari, 2023)。研究指出，刪除 *P. aeruginosa* 的 *lasR*，會改變三種 T6SS 中 *hcp* 的表現 (Lesic et al., 2009)。在 *P. aeruginosa* 中，二型與三型 T6SS 的表現會隨著菌株生長與吸光值一同增加。在 *rhII* 或 *lasR* 突變株中，兩種 T6SS 的表現明顯下降；添加相應的 AHL 或補回 *lasR* 後能夠增加其表現 (Sana et al., 2012; Sana et al., 2013)。Zhang 等人 (2011) 也觀察到，*Yersinia pseudotuberculosis* 中四型 T6SS 的表現在對數期增加，於生長停滯期達最大值；刪除 *luxI* 同系物 *ypsI* 與 *ytbI* 會減少 T6SS 表現量，添加對應的 AHLs 能夠恢復之。四型 T6SS 中 Hcp 的表現也隨著菌株吸光值增加而提升，在生長停滯期的表現程度最高。此外，在 *Y. pseudotuberculosis* 中表現 AHLs 水解酶基因 *aiiA*，發現 T6SS 與 Hcp 的表現皆下降。

第三節、群體淬滅

由於 QS 對於毒力因子的調控具有重要性，抑制 QS 被視為有潛力的新型抗菌策略。群體淬滅 (quorum quenching) 係指以化學或酵素方法干擾自誘導劑調節的 QS，以減少其調控的相關表型、毒力因子或感染能力等 (Lade et al., 2014; Sikdar & Elias, 2020)。群體淬滅的應用曾在不同領域中被探討，例如醫學、農業、海產養殖、食品保存、生物防治等 (Paluch et al., 2020; Rahman et al., 2017; Tiwari et al., 2016; Wang et al., 2022)。

目前針對革蘭氏陰性細菌之群體淬滅方法，可以概略分為三類。一、阻礙 AHLs 合成以降低其濃度。acyl-ACP 為合成 AHLs 所需受質之一，而二氯苯氧氯酚 (triclosan) 能抑制烯酰基-酰基載體蛋白還原酶 (enoyl-ACP reductase) 活性，減少其產物 acyl-ACP 之產生 (Dong et al., 2007)。也有研究指出柚皮素 (naringenin) 能減少 *P. aeruginosa* 中 *lasI* 和 *rhII* 之表現，導致 OdDHL 與 BHL 的產量下降 (Lade et al., 2014; Paluch et al., 2020)。二、破壞 AHLs 結構或使其失去活性，無法與受體結合。藉由來自細菌、古細菌或真核生物等的不同酵素破壞 AHLs 結構。例如內酯酶 (lactonase) 能夠破壞 AHLs 內酯環 (lactone ring)；酰基胺酶 (acylases) 水解酰基胺鍵，將 AHLs 降解為脂肪酸與高絲氨酸內酯；氧化還原酶 (oxidoreductase) 可以在酰基側鏈上加入羥基或還原酮基，使 AHLs 失去活性 (Lade et al., 2014; Sikdar & Elias, 2020)。三、利用 AHLs 的結構類似物 (analogues) 作為抑制劑 (inhibitor)，干擾 AHLs 與受體結合或者是減少受體濃度。例如源自葡萄柚果汁與萃取物的天然呋喃香豆素 (furocoumarin)，與 AHLs 的環狀結構相似，能抑制 *Salmonella Typhimurium*、*E. coli* 與 *P. aeruginosa* 的生物膜生成 (Bai & Rai, 2011)。來自紅藻 (*Delisea pulchra*) 的鹵化呋喃酮化合物 (halogenated furanone compounds)，具有與內酯環相似的呋喃酮結構，為最早被發現的 QS 抑制劑之一 (Eberl et al., 1999; Givskov et al., 1996; Ren et al., 2001)。除了與 AHLs 競爭受體的結合位點，鹵化呋喃酮被指出會使 LuxR 不穩定並加速其周轉 (turnover)，減弱其

結合 DNA 並啟動轉錄的能力 (Sauer et al., 2002)。

研究證實從紅藻中萃取出的 4-bromo-5-(bromomethylene)-3-(1-hydroxybutyl)-2(5H)-furanone，在與自誘導劑 *N*-(3-oxooctanoyl)-L-homoserine lactone (OOHL) 同時添加的情況下，能夠減少 *E. coli* MT102 菌株中 OOHL 誘導的 LuxR 依賴性螢光表現。此外，與該呋喃酮共同培養 5 至 60 分鐘不等，*E. coli* XL-1 Blue 中 LuxR 的表現量與未添加的控制組相比皆有減少 (Manefield et al., 2002)。也有研究表明，將紅藻產生的 4-bromo-5-(dibromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone 分別以 30 至 100 $\mu\text{g/mL}$ 不等的濃度添加於 AB minimal 培養基中，*S. liquefaciens* 的表面移行面積明顯減少。在培養基中含有 20 μM 該呋喃酮的條件下，將 BHL 添加濃度由 2 μM 增加至 20 μM ，能夠將菌株 24 小時的表面移行半徑由接近 0 mm 提升為約 35 mm (Givskov et al., 1996)。陸續有研究探討相關的呋喃酮衍生物作為 QS 抑制劑之效果，例如 7.5 mM 的 2(5H)-呋喃酮 (2(5H)-furanone) 為 *P. aeruginosa* 的最小抑制濃度，該濃度可減少不同 *P. aeruginosa* 菌株 64 % 至 89 % 的表面移行 (Otton et al., 2017)。0.2 與 1 mg/mL 的 2(5H)-呋喃酮可以分別降低 *Aeromonas hydrophila* 17 % 與 32 % 的生物膜生成量 (Ponnusamy et al., 2010)。此外，有許多文獻使用 (Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-2(5H)-furanone (簡稱 C-30) 探討群體淬滅效果，Muñoz-Cázares 等人 (2022) 發現當 C-30 的終濃度為 10 μM 或 50 μM ，對於 *P. aeruginosa* PA14 野生型或臨床分離菌株之生長沒有影響，但對生物膜生成有 25 % 至 90 % 不等的抑制效果。在不影響生長的情況下，使用 10 μM 的 C-30 會導致 *P. aeruginosa* PAO1 產生較薄的生物膜，且對於抗生素的敏感性增加 (Hentzer et al., 2003)。研究顯示 0.1 μM 或 0.5 μM 的 C-30 皆可以明顯減少 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 在 24 與 48 小時的生物膜產量，且生物膜結構較鬆散 (Zhao et al., 2015)。也有文獻指出，以 50 μM 的濃度添加 C-30，發現其會完全抑制 *P. aeruginosa* PA14 的表面移行 (Maeda et al., 2012)。



第四節、群體感應與生物膜形成及表面移行之關係

普遍認為 QS 對於細菌的生物膜形成與表面移行具有正面調節作用，但是有研究顯示，刪除 *eanR* 的 *P. ananatis* SK-1，其生物膜與胞外多醣產量與野生型相似 (Morohoshi et al., 2007)。也有文獻表示在 2 到 14 天培養期間的不同時間點下，缺乏 *lasI* 的 *P. aeruginosa* PAO1 形成的生物膜之平均厚度及粗糙度與野生型沒有差異，且在不同培養基中皆觀察到相似情況 (Heydorn et al., 2002)。將 *Shewanella woodyi* MS32 的 *luxI* 同系物刪除，發現在不同培養基中，其附著程度、生物膜生成量與結構皆與野生型無差異 (Hayek et al., 2020)。這顯示在某些情況下，QS 在不同細菌中可能不會參與生物膜形成。

Shrout 等人 (2006) 指出，野生型 *P. aeruginosa* ATCC 15692 在葡萄糖為單獨碳源時，形成聚集的生物膜。但在以琥珀酸或麩胺酸為單獨碳源時，形成的生物膜十分平坦。而該菌株在三種碳源單獨存在時，產生的自誘導劑含量相近。這代表不同碳源存在下，細菌不一定會藉由 QS 影響生物膜的結構；或是營養條件可能藉由改變 QS 的其他調節作用影響生物膜，而非改變自誘導劑的分泌程度。進一步研究發現， $\Delta lasI \Delta rhII$ 突變株在以琥珀酸為單獨碳源時形成聚集的生物膜，且添加 BHL 與 OdDHL 能夠使其恢復野生型的結構。然而，在以葡萄糖或麩胺酸為單獨碳源時，野生型與突變型菌株形成的生物膜結構十分相似。作者也發現在含有琥珀酸的培養基上，野生型菌株的表面移行能力良好，但無法觀察到 $\Delta lasI \Delta rhII$ 突變株的移動。在另外兩種碳源單獨存在時，野生型與突變型菌株的表面移行能力沒有明顯變化。這顯示出 QS 對於生物膜形成與表面移行之調節，根據提供的碳源不同而改變。此外，無法合成鼠李醣脂之 $\Delta rhI \Delta rhIB$ 突變株，其表面移行能力減弱，然相較於 $\Delta lasI \Delta rhII$ 突變株仍較明顯。這代表 QS 可能藉由調節鼠李醣脂以外的其他因子影響表面移行，然其中的機制尚未明瞭。

此外，也有研究探討環境中流體的流動情況 (flow regiment) 不同時，*lasI* 突變對於 *P. aeruginosa* PAO1 形成的生物膜之影響。結果表明在層流 (laminar flow)



情況下，野生型與 *AlasI* 突變株皆形成平坦的生物膜，且厚度與表面覆蓋度在 6 天內皆沒有差異，但是突變株的生物膜缺乏波紋狀結構 (ripple-structure)。在擾流 (turbulent flow) 情形下，兩者形成的生物膜表面覆蓋度增加，且會形成聚集的斑塊狀 (patches) 或絲狀的流線型結構 (filamentous streamers)。然而野生型與突變型菌株形成的生物膜沒有明顯差異。作者提出在不同的流動情況下，QS 或自誘導劑並非生物膜形成所必須，但 QS 可能對於生物膜結構的異質性 (structural heterogeneity) 具有貢獻 (Purevdorj et al., 2002)。

從上述文獻發現，QS 對於生物膜形成與表面移行之調節作用相當複雜，且會受到不同因素如：環境中的營養成分、液體流動情況等改變。本研究探討單一培養情況下，*Pantoea* sp. 的 QS 對於生物膜生成與表面移行之影響，期望可以作為後續深入了解 QS 在不同環境下對不同表型的調控效果之基礎。

第三章、研究目的與實驗架構



實驗室先前從截切香瓜中分離出 *Pantoea vagans* M17，其具有較強的生物膜生成與表面移行能力，且接種後會對截切香瓜品質造成不良影響。生物膜生成與表面移行能力被認為受到 QS 調節，然而目前仍不明白 *P. vagans* M17 之 QS 系統。此外，*P. vagans* M17 的 QS 系統與兩個表型間的關係仍不清楚。因此，本研究的目的為了解 *P. vagans* M17 之 QS 系統，以及其對於生物膜生成與表面移行之影響，並進一步觀察相關基因表現是否產生改變。

本研究的實驗架構主要涵蓋四個部分 (圖 3-1)：

一、*P. vagans* M17 之 LuxI 與 LuxR 同系物確認。藉由序列比對與親緣關係樹的建立，觀察同系物間的相似性與保守程度。

二、嘗試以基因重組方式獲得 *P. vagans* M17 之 *luxI* 與 *luxR* 突變菌株，以了解 *luxI* 與 *luxR* 基因功能。

三、*P. vagans* M17 之 AHLs 鑑定。將萃取所得樣品以 HPLC-MS/MS 分析，確定 AHLs 之成分。

四、探討 *P. vagans* M17 之 QS 對表型與基因表現之影響。將鑑定出之 AHLs 以及潛在的抑制劑，分別與菌株共同培養，以觀察 QS 對於生長、生物膜生成與表面移行的作用。並探討 AHLs 以及潛在的抑制劑，對於 QS、生物膜、鞭毛與 T6SS 相關基因表現之影響。

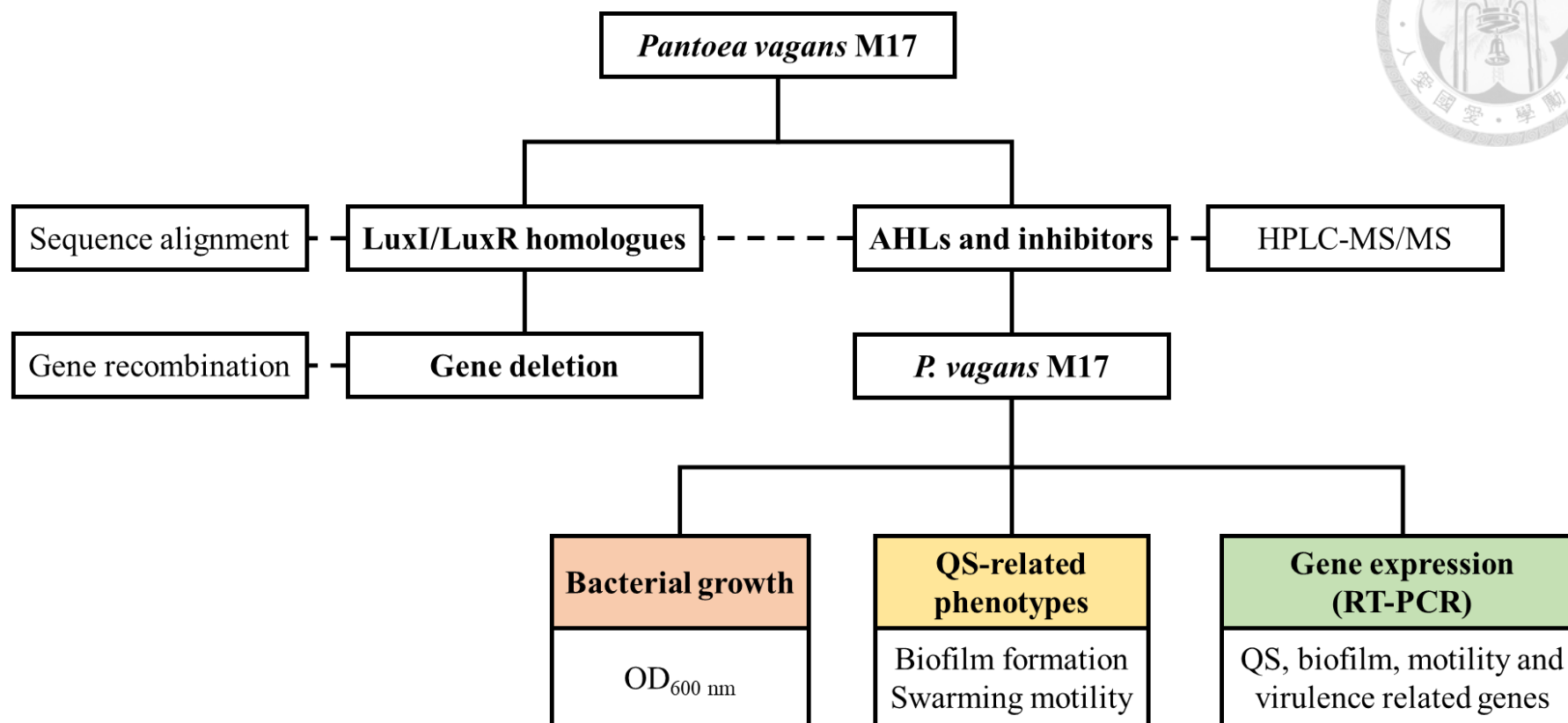


圖 3-1、實驗架構。

Figure 3-1. Experimental flow chart.



第四章、材料與方法

第一節、實驗材料

一、實驗菌株

本研究探討菌株為 *P. vagans* M17，為先前本實驗室進行截切網紋洋香瓜的儲藏性試驗時，從 25 °C 下儲藏 96 小時的第二批次香瓜中分離出。該菌株具有較強的生物膜生成能力與表面移行能力，接菌試驗顯示其對香瓜品質會造成不良影響 (吳奕蓉，2021；鄧婷云，2022)。

二、藥品

1. 微生物培養材料

- (1) Agar、D-glucose、sodium chloride 與 tryptone，購買自 Bioshop Canada (Burlington, VT, USA)。
- (2) M9 minimal salts, 5× 與 tryptic soy broth，購買自 BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)。
- (3) L-malic acid 與 yeast extract，購買自 Thermo Fisher Scientific (San Jose, CA, U.S.A.)。

2. 化學藥品

- (1) Acetate (純度 $\geq 99.8\%$) 與 ethanol (純度 $\geq 99.8\%$)，購買自 Honeywell (Charlotte, NC, USA)。
- (2) Ampicillin 與 glycerol (純度至少 99.7%)，購買自 Bioshop Canada (Burlington, VT, USA)。
- (3) Crystal violet、magnesium sulfate 與 sucrose (純度至少 99.5%)，購買自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。
- (4) Dimethyl sulfoxide (純度 99.5%)，購買自 ITW Reagents (Glenview,



IL, USA)。

- (5) Disodium hydrogen phosphate，購買自昭和化學株式會社 (Tokyo, Japan)。
- (6) Ethyl acetate，購買自 Macron Fine Chemicals (Phillisburge, NJ, U.S.A)。
- (7) Kanamycin，購買自 Bioman Scientific Co., Ltd. (New Taipei, Taiwan)。
- (8) Methanol (HPLC grade)，購買自 Duksan Reagents (Ansan, Korea)。
- (9) Phenol:chloroform，購買自 VWR chemicals (Radnor, PA, USA)。
- (10) Potassium chloride，購買自 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)。
- (11) Potassium phosphate monobasic，購買自和光純藥工業株式會社 (Osaka, Japan)。
- (12) Sodium acetate (anhydrous)，購買自 Merck (Cork, Ireland)。

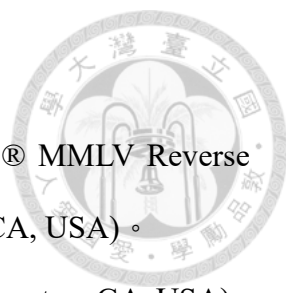
3. 標準品

N-Butyryl-L-homoserine lactone (純度 $\geq 97\%$)、*N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (純度 $\geq 96\%$)、*N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (純度 $\geq 98\%$)、*N*-(3-oxooctanoyl)-L-homoserine lactone (純度 $\geq 97\%$)、2(5H)-furanone (純度 98%) 與 (Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-2(5H)-furanone (純度 $\geq 97\%$)，購買自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。

4. 分生實驗材料與商業套組

- (1) 1 kb DNA ladder、100 bp DNA ladder 與 RNase out，購買自 Bioman Scientific Co., Ltd. (New Taipei, Taiwan)。
- (2) 10 mM dNTP mix，購買自 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)。
- (3) 5× Phusion GC buffer、10× DreamTaq buffer、10× DreamTaq green buffer、DreamTaq DNA polymerase、50 mM EDTA、10X reaction buffer with MgCl₂ for DNase I、DNase I、RNA Gel Loading Dye (2X)、10 mM dNTP mix、random hexamer 與 water (nuclease-free)，購買自 Thermo

Fisher Scientific (San Jose, CA, USA)。

- 
- (4) 5X first strand buffer、100 mM DTT 與 SMART® MMLV Reverse Transcriptase，購買自 TaKaRa Bio Inc. (San Jose, CA, USA)。
 - (5) Agarose，購自 Cambrex Bio Science Rockland (Thomaston, GA, USA)。
 - (6) Bacterial lysis buffer、lysozyme、GENEzol™ Tri RNA Pure kit、Genephlow Gel/PCR kit 與 Presto mini plasmid kit，購買自 Geneaid Biotech (New Taipei, Taiwan)。
 - (7) Diethyl pyrocarbonate、ethidium bromide，購買自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。
 - (8) KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal，購買自 U-Vision biotech (Taipei, Taiwan)。
 - (9) Phusion® High-fidelity DNA polymerase、T4 DNA ligase 與 10× Buffer for T4 DNA ligase with 10 mM ATP，購買自 New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)。
 - (10) RNase，購買自 Bioshop Canada (Burlington, VT, USA)。
 - (11) TAE buffer，購買自 UniRegion Bio-Tech (Hsinchu, Taiwan)。

三、質體、引子與限制酵素

1. 質體

質體 pK18 mobsacB (Schäfer et al., 1994)，帶有對 kanamycin 具抗性的可篩選標記基因，以及反向篩選標記 (counter-selectable marker) *sacB* 基因 (附錄 1)。分讓自國立臺灣大學農業化學系林乃君老師實驗室。

2. 引子 (Primer) 列表

本研究用於確認 QS 基因之存在以及基因刪除之引子列於附錄 2。

3. 限制酵素與緩衝液

EcoRI-HF、BamHI-HF 與 rCutSmart™ buffer，購買自 New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)。



四、藥品原液、培養基與溶劑之配製

1. BHL 原液 (stock solution)

秤取 4.0 mg BHL 粉末，加入 150 μ L dimethyl sulfoxide (DMSO) 以及 850 μ L 逆滲透水攪拌均勻，配製成 4000 ppm (23.37 mM) 之原液。以 0.22 μ m 濾膜過濾，於 -30 $^{\circ}$ C 儲存備用。

2. 2(5H)-呋喃酮原液

取 56.8 μ L 2(5H)-呋喃酮，加入 100 μ L DMSO 以及 440 μ L 逆滲透水攪拌均勻，再以逆滲透水定容至 1 mL，配製成 800 mM 之原液。以 0.22 μ m 濾膜過濾，於 -30 $^{\circ}$ C 避光儲存備用。

3. (Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-2(5H)-furanone (簡稱 C-30) 原液

秤取 1.2 mg C-30 粉末，加入 100 μ L DMSO 以及 900 μ L 逆滲透水攪拌均勻，配製成 4800 μ M 之原液。以 0.22 μ m 濾膜過濾，於 -30 $^{\circ}$ C 儲存備用。

4. 平板計數培養基 (Plate count agar, PCA)

秤取 0.75 g glucose、1.5 g tryptone、1.5 g yeast extract 與 4.5 g agar，加入 300 mL 的逆滲透水攪拌均勻，於 121 $^{\circ}$ C 下滅菌 20 分鐘，倒入培養皿中。當需要配製含有蔗糖之 PCA 時，蔗糖添加濃度為 20 % (w/v)。

5. 溶菌肉湯培養液 (Lysogeny broth, LB) 與溶菌肉湯培養基 (lysogeny broth agar, LB agar)

秤取 2.5 g yeast extract、5.0 g tryptone、5.0 g sodium chloride (LB agar 則額外加入 1.5 % 的 agar)，加入 500 mL 的逆滲透水攪拌均勻，於 121 $^{\circ}$ C 下滅菌 20 分鐘，密封備用 (LB agar 則倒入培養皿中)。當需要配製



含有抗生素的 LB 或 LB agar 時，ampicillin 終濃度為 100 $\mu\text{g/mL}$ ；kanamycin 終濃度為 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

6. 胰化酪大豆蛋白培養液 (Tryptic soy broth, TSB)

秤取 9.0 g tryptic soy broth powder，加入 300 mL 的逆滲透水攪拌均勻，於 121 $^{\circ}\text{C}$ 下滅菌 20 分鐘，密封備用。

7. 表面移行培養基 (Swarming agar plate)

本研究使用之表面移行培養基主要以 TSB 為基礎 (配方參考表 4-1)，在探討培養基效應時另外使用以 M9 為基礎之培養基 (配方參考表 4-2)。碳源原液的配製為預先將 D-葡萄糖配製為 1 M 原液，L-蘋果酸配製為 50 mM 原液。兩者皆以 0.22 μm 濾膜過濾。

以 TSB 為基礎之培養基的配製，為將 0.4 % agar TSB 於 121 $^{\circ}\text{C}$ 下滅菌 20 分鐘，置於 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中 10 分鐘待其溫度平衡 (確保每次配製出的培養基之溫溼度等條件相似)，再依照表 4-1 之比例添加 L-蘋果酸、BHL 或 2(5H)-呋喃酮原液。在探討培養基效應時，除控制組外皆添加 0.13 mL 之 1 M D-葡萄糖原液。以 M9 為基礎之培養基的配製，為將 1.88 % M9 及 0.67 % agar 培養基於 121 $^{\circ}\text{C}$ 下滅菌 20 分鐘，置於 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中 10 分鐘待其溫度平衡，再依照表 4-2 之比例添加經 0.22 μm 濾膜過濾之 0.1 M MgSO_4 、D-葡萄糖、L-蘋果酸、BHL 或 2(5H)-呋喃酮原液。混合均勻後，即可得到 0.4 % agar 的培養基，再取 8 mL 注入直徑 5.5 cm 的培養皿中，製備成含有不同藥品及濃度的表面移行培養基。最後，靜置凝固 1 小時即可將菌液點至培養基表面。

8. 0.1 % 結晶紫溶液 (Crystal violet solution)

精秤 1.0000 g 結晶紫粉末至避光容器，加入 1000 mL 的二次水，攪拌隔夜或一天至溶液均勻，避光保存。實際使用前以 0.45 μm 濾膜過濾。

9. 磷酸鹽緩衝溶液 (Phosphate buffer saline, PBS)

秤取 0.2 g disodium hydrogen phosphate、0.2 g potassium chloride、1.15 g potassium phosphate monobasic 與 8.01 g sodium chloride，與適量逆滲透水攪拌均勻後定容至 1000 mL，於 121 °C 下滅菌 20 分鐘，密封備用。

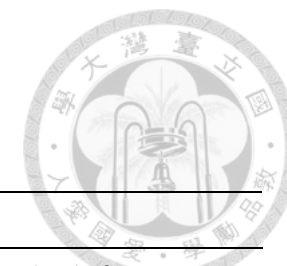


表 4-1、以 TSB 為基礎之表面移行培養基組成

Table 4-1. TSB-based swarming agar plate

		Groups							
		Control	L-Malic acid	BHL			2(5H)-furanone		
Target concentration in medium (mM)	L-Malic acid	-	5	-	-	-	-	-	-
	BHL	-	-	0.234	0.467	0.701	-	-	-
	2(5H)-furanone	-	-	-	-	-	16	24	32
Stock solution addition volume (mL)	0.4 % agar TSB	26	23.4	25.74	25.48	25.22	25.48	25.22	24.96
	50 mM L-malic acid	-	2.6	-	-	-	-	-	-
	23.37 mM BHL	-	-	0.26	0.52	0.78	-	-	-
	800 mM 2(5H)-furanone	-	-	-	-	-	0.52	0.78	1.04
Total volume (mL)		26							

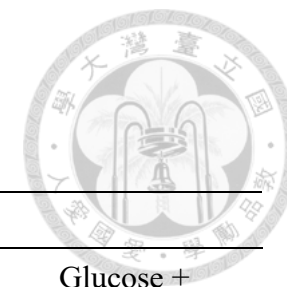


表 4-2、以 M9 為基礎之表面移行培養基組成

Table 4-2. M9-based swarming agar plate

		Groups			
		Glucose	Glucose + L-malic acid	Glucose + BHL	Glucose + 2(5H)-furanone
Target concentration in medium (mM)	D-Glucose	5	5	5	5
	L-Malic acid	-	5	-	-
	BHL	-	-	0.701	-
	2(5H)-furanone	-	-	-	32
Stock solution addition volume (mL)	1.88 % M9, 0.67 % agar	15.6	15.6	15.6	15.6
	1000 mM D-glucose	0.13	0.13	0.13	0.13
	50 mM L-malic acid	-	2.6	-	-
	23.37 mM BHL	-	-	0.78	-
	800 mM 2(5H)-furanone	-	-	-	1.040
	Sterile water	10.27	7.67	9.49	9.23
	0.1 M MgSO ₄	0.052	0.052	0.052	0.052
Total volume (mL)		26			

第二節、儀器設備與套裝軟體

一、儀器與設備

1. 4 °C 冰櫃 (refrigerator), KCCO2, TSK ; -30 °C 冷凍櫃 (biomedical freezer), MDF-U537 ; -80 °C 冷凍櫃 (ultra low temperature freezer), MDF-U54V, 皆購買自三洋電機有限公司 (Osaka, Japan)。
2. ELISA reader, Synergy HT, 購買自 Biotek (Winooski, VT, USA)。
3. Microplate reader, Epoch 2 Gen 6, 購買自 Biotek (Winooski, VT, USA)。
4. Polymerase Chain Reaction (PCR) 溫度控制器 (PCR thermal cycler), My Cycle™, 購買自 BIO-RAD (Hercules, CA, USA)。
5. StepOnePlus™ 即時聚合酶連鎖反應儀 (RT-PCR system), 購買自 Applied Biosystems (Waltham, MA, USA)。
6. 分光光度計 (spectrophotometer), Biomate 3S ; 微量分光光度計, Thermo-NanoDrop 1000, 皆購買自 Thermo Fisher Scientific (San Jose, CA, USA)。
7. 加熱電磁攪拌器 (hotplate stirrer), HTS-1003, 購買自 LMS (Leuven, Belgium)。
8. 全自動影像分析儀, Synbiosis ProtoCOL3, 購買自 Synoptics Ltd. (Cambridge, England)。
9. 抽氣櫃 (fume hood), HF-1500, 購買自 Hi Point (Kaohsiung, Taiwan)。
10. 高壓滅菌釜 (autoclave), TM-328, 購買自東明儀器有限公司 (Taipei, Taiwan)。
11. 恆溫培養箱 (incubator), LE-519 ; 震盪培養箱 (orbital shaker), TS-400P/F/T, 皆購買自需璟實業有限公司 (Taipei, Taiwan)。
12. 恆溫循環水槽 (heating circulating water bath), D-606, 購買自登盈儀器有限公司 (New Taipei, Taiwan)。
13. 烘箱 (oven), UL 40, 購買自 Memmert (Büchenbach, Germany)。

- 
14. 桌上型離心機 (centrifuge), Model 5804, 購買自 Eppendorf (Hamburg, Germany)。高速離心機 (high speed centrifuge), Legend Micro 17, 購買自 Thermo Fisher Scientific (San Jose, CA, USA)。高效離心機 (high-performance centrifuge), Avanti J-26 XP, 購買自 Beckman Coulter (Brea, CA, USA)。
 15. 超純水製造機 (ultra-pure water system), PPII-15UV, 由 ELGA Lab Water (High Wycombe, UK) 製造。
 16. 無菌操作台 (laminar flow), Model 4T, 購買自無安儀器有限公司 (Taipei, Taiwan)。
 17. 電子天平 (balance), Adventurer ARB120, 精密度 0.01 g, 購買自 Ohaus (Pine Brook, NJ, USA)。分析天平 (precision balance), ER180A, 精密度 0.1 mg, 購買自 A&D Sciencetech (Tokyo, Japan)。
 18. 電泳槽 (electrophoresis system), Mini-PROTEAN, 購買自 BIO-RAD (Hercules, CA, USA)。Mupid-2plus, 購買自 ADVANCE (Tokyo, Japan)。
 19. 紫外線攝影系統 (UV image system), DGIS-8, 購買自 DigiGel (CA, USA)。
 20. 微型電穿孔儀 (electroporator), MicroPulserTM Electroporator, 購買自 BIO-RAD (Hercules, CA, USA)。
 21. 減壓濃縮機 (rotary evaporator), Rotavapor R-3; 真空幫浦 (vacuum pump), V-700; 真空控制器 (controller), V-850, 皆購買自 Buchi (Flawil, Switzerland)。
 22. 超高效能液相層析儀 (ultra-high performance liquid chromatograph), Nexera; 質譜儀 (mass spectrometer), liquid chromatograph triple quadrupole mass spectrometer LCMS-8045, 皆由 Shimadzu (Kyoto, Japan) 製造。
 23. 層析管柱, Packed column 5C₁₈-AR-II (4.6 ID x 250 mm), 由 Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) 製造。

- 
24. 微量盤震盪機 (microplate shaker), MixMate, 購買自 Eppendorf (Hamburg, Germany)。
 25. 震盪機 (vortex), MS-P2626, MS-NOR, 購買自利政科技股份有限公司 (Taoyuan, Taiwan)。

二、套裝軟體

1. 分子生物學軟體：SnapGene (<https://www.snapgene.com/>)，提供自 Dotmatics (Boston, MA, USA)。
2. 胺基酸序列比對軟體：MEGA_11.0.13 (<https://www.megasoftware.net/>)，提供自 Pennsylvania State University (State College, PA, USA)。
3. 序列呈現軟體：Boxshade 3.21 (<http://www.vifabio.de/en/iqfBio/detail/386>)，提供自 Swiss Institute of Bioinformatics (Switzerland)。
4. 液相層析質譜儀資料管理軟體：LabSolutions (<https://www.shimadzu.com.tw/products/software-informatics/index.html>)，提供自 Shimadzu (Kyoto, Japan)。
5. 數據統計軟體：SPSS Statistics 22 (<https://www.ibm.com/support/pages/downloading-ibm-spss-statistics-22>)，提供自 International Business Machines Corporation (Armonk, NY, USA)。
6. 繪圖軟體：Paint.net 5.0.12. (<https://www.getpaint.net/index.html>)，提供自 dotPDN LLC (Seattle, WA, USA)。



第三節、實驗方法

一、菌株群體感應蛋白質序列比對

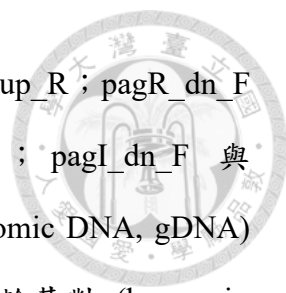
本實驗室先前自截切香瓜分離 *P. vagans* M17，將菌株樣品委託基龍米克斯生物科技股份有限公司（臺北，臺灣）以 PacBio SMRTbell™ 技術進行全基因體定序、組裝及注釋。基因組裝時以 *Pantoea vagans* LMG24199 的基因體序列 (GenBank ID.CP038853.1) 為參考基因組 (reference genome) (鄧婷云，2022)。根據 *P. vagans* M17 全基因定序資料，先前已藉聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 確認菌株中 QS 基因 *pagI* (*luxI* 同系物) 與 *pagR* (*luxR* 同系物) 的存在 (李奕慧，2023)。為了解 *P. vagans* M17 之 *PagI* 與 *PagR*，與其他同系物的相似性，本研究收集在美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的 GenBank 資料庫中 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)，具有登錄號碼 (accession number) 的八個同系物 (五個屬於 *Pantoea* spp.，三個屬於 *Pseudomonas* spp.)，利用序列比對軟體 MEGA_11.0.13 透過 unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) 的聚類方法，針對胺基酸序列進行多重序列比對。比對後的結果圖以序列呈現軟體 Boxshade 3.21 繪製。接著以 MEGA_11.0.13 建立親緣關係樹，藉由 p-distance 計算序列之間的一致性，以代表演化距離 (evolutionary distances)；並執行一千次自我重複抽樣法 (bootstrap test)，以評估親緣關係樹中每個分支節點 (node) 的可信度 (Huson et al., 2010)。

二、菌株群體感應基因刪除

1. 重組質體建構

(1) 基因上下游片段融合

為獲得 *P. vagans* M17 之 QS 基因 *pagR* 與 *pagI* 的上游與下游同源片段，根據全基因體定序資料，設計能夠黏合基因上、下游序



列的四組引子對 (附錄 2) : pagR_up_F 與 pagR_up_R ; pagR_dn_F 與 pagR_dn_R ; pagI_up_F 與 pagI_up_R3 ; pagI_dn_F 與 pagI_dn_R。以 *P. vagans* M17 基因組 DNA (genomic DNA, gDNA) 為模板，利用 PCR 分別擴增四段 550 至 750 鹼基對 (base-pair, bp) 的片段。透過凝膠電泳確認片段長度無誤，以 spin column 純化 PCR 產物。

再來需分別融合兩基因的上、下游同源片段。以 *pagR* 為例，由於設計引子時，pagR_up_R 的 5' 端序列與 pagR_dn_F 互補，可利用此特性將第一、二組引子對擴增出的產物 (即 *pagR* 的上、下游片段) 以相同莫耳數混合，即可作為模板，利用引子 pagR_up_F 與 pagR_dn_R 以重疊延伸 PCR (overlap extension PCR) 融合上、下游片段，獲得 1236 bp 的產物。另一個基因 *pagI* 以相同流程進行，最終獲得 1348 bp 的上、下游片段融合產物。透過凝膠電泳確認片段長度無誤，利用 spin column 純化 PCR 產物。

(2) 接合、轉型與定序

為獲得重組質體，分別將載體 pK18 mobsacB 與上、下游片段融合產物，以限制酵素 EcoRI 與 BamHI 於 37 °C 反應隔夜，利用 spin column 純化反應後的載體片段與融合產物。將載體片段作為 vector、融合產物作為 insert，以 vector : insert = 1 : 10 (w/w) 之比例混合均勻，加入 T4 DNA ligase 後於 25 °C 反應兩小時以進行接合反應 (ligation)。接合產物透過熱震法 (heat shock) 轉型至勝任細胞 *E. coli* DH5 α 中保存，並將菌液塗佈至含有 kanamycin 的 LB agar 於 37 °C 培養隔夜進行篩選。成功生長的菌落續以引子對 M13 (F) 與 pagR_up_F (*pagI* 使用的引子對為 M13 (F) 與 pagI_up_F)，藉由菌落 PCR (colony PCR) 確認擴增出之質體片段大小是否符合預期。

最後使用限制酵素 EcoRI 與 BamHI 剪切質體，再次確認片段大小正確，即可交由基龍米克斯生物科技股份有限公司進行定序。



2. 群體感應基因刪除

本研究嘗試之基因刪除方法參考自國立臺灣大學農業化學系林乃君老師實驗室 (廖婕伶, 2021; 劉佳容, 2022), 流程如附錄 3 所示。

(1) 電穿孔勝任細胞之製備

將 *P. vagans* M17 以 30 °C、75 rpm 於 5 mL TSB 培養隔夜，以 1:100 的比例將菌液加入新鮮的 TSB，繼代培養至 OD_{600 nm} 達 0.8 至 1.0。後續步驟皆於冰上進行。將菌液於 4 °C 冷卻至少半小時，以 1200 × g 離心 10 分鐘，去除上清液後，取 25 mL 已於冰上預冷之滅菌 10% 甘油潤洗並打散菌體，再次離心並去除上清液。取 10 mL 甘油潤洗、離心並去除上清液，此步驟重複兩次。去除上清液後，將菌體均勻回溶於殘留在管內的 10% 甘油中。將菌液以每管 50 μL 分裝於微量離心管中，以液態氮急速冷凍，避免冰晶使菌體破裂。保存於 -80 °C 備用，即完成勝任細胞之製備。

(2) 電穿孔轉型

將裝有 50 μL 勝任細胞的微量離心管置於冰上保持活性，加入質體 (1 μL, ≡ 300 ng/μL) 混合均勻，注入已於冰上預冷之滅菌電穿孔樣品管 (gap size 2 mm)，輕敲使溶液沉降到底部。將樣品管放入微型電穿孔儀，以 2.5 kV 電壓進行約 5 毫秒電擊。電擊完立即放回冰上冷卻，盡速以 950 μL TSB 快速且溫和地回溶，並盡量將所有菌液取出至微量離心管，以 30 °C、75 rpm 培養一小時修復菌體。接著將菌液適當稀釋，塗佈至含有 kanamycin 之 PCA 培養 (30 °C) 隔夜進行篩選。理論上隔天可觀察到成功吸收質體的菌落生長。

(3) 同源重組

將重組質體送入 *P. vagans* M17 後，理論上可藉兩次同源重組 (homologous recombination) 完成無標記 (markerless) 之基因刪除 (附錄 3)。質體進入細菌後進行第一次同源重組，此時以 kanamycin 初步篩選成功生長的菌落。再來由於載體 pK18 mobsacB 上帶有反向篩選標記 (counter-selectable marker) *sacB* 基因，其表現出聚果糖蔗糖酶 (levansucrase)，能夠分解蔗糖並合成高分子量的果糖聚合物 levans。當 levans 堆積於革蘭氏陰性細菌的周質時，可能影響營養物質輸送而對細菌造成生存壓力 (Li et al., 2013; Pelicic et al., 1996)。利用此特性，將菌落塗佈於高含量 (20 %) 蔗糖的 PCA，促使菌落進行第二次同源重組以排出帶有 *sacB* 的多餘質體片段，此為第二步篩選。接著以 kanamycin 進行第三步篩選，再次確認菌落已排出多餘質體片段，對 kanamycin 不具抗性。

完成兩次同源重組後，細菌基因型可能為野生型 (wild type)，或刪除基因的突變型 (mutant)，故以引子對 pagR_up_F 與 pagR_dn_R (*pagI* 使用的引子對為 pagI_up_F 與 pagI_dn_R)，藉由菌落 PCR 確認擴增出之片段大小，理論上即可獲得刪除基因的突變菌株。

三、菌株自誘導劑鑑定

1. 粗萃取物樣品製備

將 *P. vagans* M17 以 30 °C、75 rpm 於 25 mL TSB 培養隔夜，以 1:10 的比例將菌液加入新鮮的 TSB 繼代培養。定性用樣品在繼代培養 51 小時至生長停滯期後期時收集。定量用樣品分別繼代培養 0、4、24 或 51 小時，分別對應於生長的初期、對數期、生長停滯期與生長停滯期後期的四個階段。繼代培養不同時長的菌液，以 10000 × g 於 4 °C 離心

20 分鐘，取出上清液，以等體積 (250 mL) 之乙酸乙酯進行液-液萃取，靜置分層後將乙酸乙酯層減壓濃縮至乾。萃取與減壓濃縮之步驟共重複三次。粗萃取物於 4 °C 保存，進行分析前再以 500 μ L 甲醇回溶，並以 0.22 μ m 濾膜過濾。

2. 液相層析串聯質譜儀 (HPLC-ESI-MS/MS) 分析條件

使用管柱為 Packed column 5C₁₈-AR-II (4.6 ID $\times$ 250 mm)，管柱溫度 40 °C。移動相 A 為含 0.1 % 甲酸的水溶液，B 為含 0.1 % 甲酸的乙腈溶液。進樣體積為 5 μ L，流速為 0.5 mL/min。偵測器為三重四極柱 (triple quadrupole)。移動相沖提梯度及質譜分析條件如下所示。

移動相沖提梯度：

Time (minutes)	Mobile phase percentage (%)	
	A	B
0	97	3
70	60	40
80	0	100
85	0	100
86	97	3
90	97	3

質譜分析條件：

Parameter	Description
Mode	Positive
Collision energy	11 V
Dwell time	100 msec



四、菌株表型分析

根據附錄 4 與附錄 5，DMSO 於培養液的終濃度 $\leq 0.6\%$ 時，對於 *P. vagans* M17 的生長情況不會造成顯著差異。本研究在添加 BHL 或 2(5H)-呋喃酮原液至培養液或培養基中觀察表型時，皆控制 DMSO 的終濃度在 0.6% 以下 (表 4-3)，以排除 DMSO 對於菌株的影響。

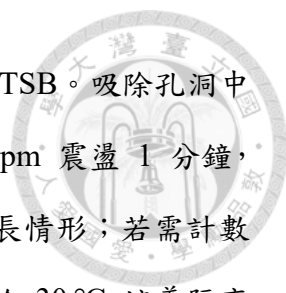
1. 生長曲線

將 *P. vagans* M17 以 30°C 、75 rpm 於 4.5 mL TSB 培養隔夜，測定其 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ，計算所需菌液體積並加入新鮮的 5 mL TSB，調整至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.3$ ，繼代培養 1.5 小時。再次測定菌液 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 並計算所需菌液體積，離心並去除上清液，控制組直接以新鮮的 1 mL TSB 回溶；實驗組根據表 4-3 加入新鮮的適量 TSB 回溶，再添加不同體積的 BHL 或呋喃酮溶液，使最終菌液濃度皆維持在 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.1$ ，體積皆為 1 mL。各組別取 200 μL 菌液加入無菌之 96 孔盤，放入 Microplate reader 內以 30°C 、180 cpm 培養 25 小時，連續測定 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 觀察各組菌株生長情況。空白對照組為未接菌的 TSB。

2. 生物膜生成能力

此試驗以結晶紫染色法定量生物膜。將 *P. vagans* M17 以 30°C 、75 rpm 於 4.5 mL TSB 培養隔夜，測定其 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ，計算所需菌液體積並加入新鮮的 5 mL TSB，調整至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.3$ ，繼代培養 1.5 小時。再次測定菌液 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 並計算所需菌液體積，離心並去除上清液，控制組直接以新鮮的 1 mL TSB 回溶；實驗組根據表 4-3 加入新鮮的適量 TSB 回溶，再添加不同體積的 BHL 或呋喃酮溶液，使最終菌液濃度皆維持在 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.1$ ，體積皆為 1 mL。

各組別取 130 μL 菌液加入無菌之 96 孔盤，於 30°C 靜置培養 24



小時或試驗所需測定的時長。空白對照組為未接菌的 TSB。吸除孔洞中的菌液至新的無菌 96 孔盤，以微量盤震盪機於 1000 rpm 震盪 1 分鐘，以 ELISA reader 測定 OD_{600 nm} 以觀察浮游微生物生長情形；若需計數活菌數，再將菌液經無菌水稀釋 10⁶ 後塗佈於 PCA，於 30 °C 培養隔夜後計數。接著在去除菌液的每個孔洞中加入 200 μL PBS 清洗未附著於孔壁的細菌。將 96 孔盤倒置於 50 °C 烤箱烘烤 15 分鐘使孔洞乾燥並固定生物膜，再於每孔加入 150 μL 已過濾之 0.1 % 結晶紫溶液，避光靜置 5 分鐘，使帶正電的結晶紫結合帶負電的細菌與生物膜以染色。吸除結晶紫溶液，於每孔加入 400 μL 二次水清洗多餘的染劑，重複清洗兩次後，空白對照組應呈透明無色。將 96 孔盤倒置於 50 °C 烤箱烘烤 15 分鐘，再於每孔加入 200 μL 33 % 醋酸溶液，於 1000 rpm 震盪 1 分鐘，使醋酸溶解結晶紫並均勻混合兩者。最後測定 OD_{590 nm} 以定量生物膜。

3. 表面移行能力

將 *P. vagans* M17 以 30 °C、75 rpm 於 4.5 mL TSB 培養隔夜，測定其 OD_{600 nm}，計算所需菌液體積並加入新鮮的 5 mL TSB，調整至 OD_{600 nm} = 0.3，繼代培養 1.5 小時。再次測定菌液 OD_{600 nm} 並計算所需菌液體積，離心並去除上清液，以 1 mL 無菌水回溶使最終菌液濃度為 OD_{600 nm} = 0.3，體積為 1 mL。進行試驗當日會新鮮配製表面移行培養基，以控制溫濕度等條件一致。滅菌後的培養基置於 50 °C 烘箱中 10 分鐘待其溫度平衡，再取 8 mL 注入直徑 5.5 cm 的培養皿，靜置凝固 1 小時後，取 1.5 μL 菌液點於培養基表面的正中央。待菌液乾燥後，以正置方式於 30 °C 靜置培養 24 小時。以全自動影像分析儀拍照記錄菌落形態以及菌株的移行面積，再利用繪圖軟體 Paint.net 5.0.12，分別圈選菌株移行面積與培養基總面積，將兩者相除後以表面移行百分比 (percentage of plate

swarmed) 表示菌株表面移行能力。

$$\text{Percentage of plate swarmed} = \frac{\text{菌株移行面積}}{\text{培養基總面積}} \times 100$$



五、基因表現量分析

1. 引子效率與專一性確認

本研究用於即時聚合酶連鎖反應 (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR) 之引子的設計標準包含：一、引子長度介於 18 至 20 鹼基。二、熔化溫度 (melting temperature, T_m) 在 55 至 58 °C 之間。三、GC 含量落在 50 至 60 %。四、避免四個以上同樣鹼基連續出現，致引子間自行配對。五、避免髮夾 (hairpin) 結構與二聚體 (dimer) 產生，減少對 RT-PCR 效能的干擾。針對所有分析的基因 (表 4-4) 所設計之不同引子對，將與 NCBI 資料庫中的 *P. vagans* LMG 24199 (NCBI Taxonomy ID 470934) 基因序列進行主要比對，並選擇相似度較高者用於後續試驗 (表 4-5)。其中的 *bssSI*，本實驗室先前研究以 *ycePI* 稱呼之 (李奕慧, 2023)。本研究基於以下兩點，將該基因改以 *bssSI* 稱呼：一、將該胺基酸序列與參考菌株 *P. vagans* LMG 24199 比對，結果顯示具有 100 % 一致性之序列名稱為 *bssS*。二、文獻指出，由於該基因會藉調控訊號分泌影響生物膜生成，因此建議改用 *bssS* (regulator of biofilm through signal secretion) 取代 *yceP* (Domka et al., 2006)。故本研究中以 *bssSI* 稱呼該基因。此外，針對 *bssSI* 之分析，本研究所使用之引子序列與先前研究一致 (李奕慧, 2023) (表 4-5)。

接著確認引子效率與專一性。PCR 的效率 (efficiency) 定義為在一個 PCR 循環中被複製的目標片段之占比。在適當設計且樣品內無干擾基質存在的試驗中，引子擴增目標片段的效率應至少 90 % (Svec et al.,

2015)。本研究以 *P. vagans* M17 gDNA 為模板，製作標準曲線以評估引子的效率。調整 gDNA 濃度為 10 ng/μL，再系列稀釋為 1、0.1、0.01 ng/μL，以 RT-PCR 分析。配製混合液 (master mix)，包含 10 μM 的前置引子與反置引子各 0.2 μL、10 μL KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal 與 4.6 μL 無核酸酶水。前述四個濃度的 gDNA 溶液，分別取 5 μL 與混合液均勻混合。利用 StepOnePlus™ 的 RT-PCR 儀器進行 40 個循環的反應，引子貼合 (annealing) 溫度設定為 60 °C。反應完成後根據所得循環閾值 (threshold cycle, Ct)，繪製 Ct 與濃度對數值的散佈圖，理應呈現負斜率 (slope) 之線性關係。根據以下公式計算效率：

$$\text{Efficiency (\%)} = (10^{-(1/\text{slope})} - 1) \times 100$$

此外，藉由熔化曲線 (melting curve) 試驗所對應之 PCR 產物的 T_m ，確認引子專一性。

2. 樣品收集與基因表現量分析

將 *P. vagans* M17 以 30 °C、75 rpm 於 4.5 mL TSB 培養隔夜，測定其 $OD_{600\text{ nm}}$ ，計算所需菌液體積並加入新鮮的 5 mL TSB，調整至 $OD_{600\text{ nm}} = 0.3$ ，繼代培養 1.5 小時。再次測定菌液 $OD_{600\text{ nm}}$ 並計算所需菌液體積，離心並去除上清液，控制組直接以新鮮的 TSB 回溶；實驗組加入新鮮的適量 TSB 回溶，再添加 BHL 或 2(5H)-呋喃酮溶液，使最終菌液濃度皆維持在 $OD_{600\text{ nm}} = 0.1$ 。後續需培養 0 小時者，菌液體積為 10 mL；需培養 2、6 或 24 小時者，菌液體積皆為 8 mL。將調整後的菌液在 30 °C、75 rpm 分別培養 0、2、6 或 24 小時 (分別對應生長初期、對數中期、生長停滯期前期與生長停滯期的四個階段)，測定菌液 $OD_{600\text{ nm}}$ 並收集 10^9 CFU。離心並去除上清液，以無菌水洗淨沉澱細菌，再次離心並去除上清液，接著迅速冷凍並儲存於 -80 °C。收集完各時間點的樣品後再

一併萃取 RNA，各時間點皆進行三重複試驗。

使用 GENEzol™ Tri RNA Pure kit 萃取樣品 total RNA，RNA 品質以微量分光光度計測定之吸光值確認，其 OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 介於 1.8 至 2.0，OD_{260 nm}/OD_{230 nm} 接近 2.0。取 2000 ng RNA 加入 DNase I 以去除殘留的 DNA，再加入 50 mM EDTA 終止 DNase I 作用。取約 1000 ng RNA 加入等體積的 2x RNA loading dye 反應，再以凝膠電泳檢查 RNA 的完整性，確認 23S rRNA 與 16S rRNA 條帶皆完整存在 (附錄 6)。

接著將 RNA 以 SMART® MMLV Reverse Transcriptase 反轉錄為互補 DNA (complementary DNA, cDNA)，以 RT-PCR 分析樣品中管家基因與目標基因之表現量。依照前述比例配製混合液，將 cDNA 濃度調整為 5 ng/μL，取 5 μL 與混合液均勻混合。利用前述的儀器與條件進行反應。本研究使用比較性 Ct 法 (也稱為 2^{-ΔΔCt} 法) 呈現目標基因的相對表現 (relative expression)，管家基因 (housekeeping gene) 為 *gyrBI*，校正樣品 (calibrator sample) 為在 TSB 中培養 0 小時的樣品 (Livak & Schmittgen, 2001)。以下列公式計算 ΔΔCt：

$$\Delta Ct = Ct_{(\text{target gene})} - Ct_{(\text{housekeeping gene})}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{sample})} - \Delta Ct_{(\text{calibrator sample})}$$

最後再轉換為 2^{-ΔΔCt}，呈現目標基因在不同樣品中的相對表現量。

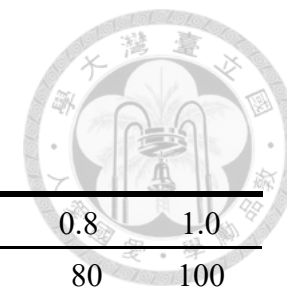


表 4-3、DMSO、BHL、2(5H)-呋喃酮與 C-30 之添加比例

Table 4-3. Addition ratio of DMSO, BHL, 2(5H)-furanone, and C-30 to bacterial culture

Concentration of DMSO in bacterial culture (%)	0.1	0.15	0.2	0.4	0.5	0.6	0.8	1.0
DMSO concentration (%)	10	15	20	40	50	60	80	100
DMSO addition volume (μL)	10	10	10	10	10	10	10	10
TSB addition volume (μL)	990	990	990	990	990	990	990	990
Concentration of BHL in bacterial culture (ppm)	40	60	80	100	120	140	-	-
BHL stock solution (4000 ppm) addition volume (μL)	10	15	20	25	30	35	-	-
TSB addition volume (μL)	990	985	980	975	970	965	-	-
Correspondent DMSO concentration in bacterial culture (%)	0.15	0.225	0.3	0.375	0.45	0.525	-	-
Concentration of 2(5H)-furanone in bacterial culture (mM)	8	16	24	32	40	-	-	-
2(5H)-furanone stock solution (800 mM) addition volume (μL)	10	20	30	40	50	-	-	-
TSB addition volume (μL)	990	980	970	960	950	-	-	-
Correspondent DMSO concentration in bacterial culture (%)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	-	-	-
Concentration of C-30 in bacterial culture (μM)	0.5	1	2	3	6	12	24	48
C-30 solution concentration (μM)	50	100	200	300	600	1200	2400	4800
C-30 solution addition volume (μL)	10	10	10	10	10	10	10	10
TSB addition volume (μL)	990	990	990	990	990	990	990	990
Correspondent DMSO concentration in bacterial culture (%)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1



表 4-4、本研究中用於即時聚合酶連鎖反應之基因列表

Table 4-4. List of genes used for RT-PCR in this study

Genes	Protein names	Functions	References
<i>gyrB1</i>	DNA gyrase subunit B	Affect DNA topological changes	Brady et al., 2008; Huang, 1996
<i>pagI</i>	AHLs synthase PagI	AHLs biosynthesis	Chalupowicz et al., 2008; Smits et
<i>pagR</i>	Transcriptional activator PagR	AHLs binding and transcription activation	al., 2010
<i>bssS1</i>	Biofilm regulator BssS	Involvement of biofilm formation	Domka et al., 2006
<i>fliC2</i>	Flagellin	Flagellin domain protein	Herrera et al., 2008
<i>hcp1</i>	hemolysin co-regulated protein, Hcp	Inner tube component and secreted effectors of T6SS	Shyntum et al., 2015; Smits et al.,
<i>clpV1</i>	T6SS ATPase ClpV	Disassembly and recycling of the contracted sheath	2011

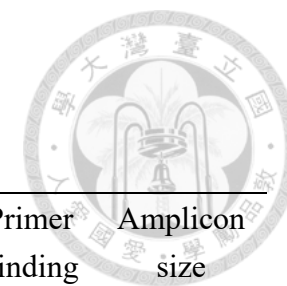


表 4-5、本研究中用於即時聚合酶連鎖反應之引子序列

Table 4-5. Primers used for RT-PCR in this study

Genes	Species	Primer sequences (5' to 3') ¹		T _m (°C)	Gene length (bp)	Primer binding site ²	Amplicon size (bp)
		Forward	Reverse				
<i>gyrB1</i>	<i>P. vagans</i> M17	GTGCGCGATTTTCGAGTATGA	CCATCACGCTTGTCTTCCAG	55.97/	2409	+535 ~ +632	98
	<i>P. vagans</i> LMG 24199	-----	-----	56.03			
<i>pagI</i>	<i>P. vagans</i> M17	ATGCGGTGCACGATTCATAG	GGGCATATCGGTAGGGAGAC	55.90/	639	+201 ~ +300	100
	<i>P. vagans</i> LMG 24199	--- T -----	--- A -----	56.15			
<i>pagR</i>	<i>P. vagans</i> M17	CTGGATGCGTTCTTTGAGGA	ACGATAATGACGGGATCGA	54.98/	693	+55 ~ +213	159
	<i>P. vagans</i> LMG 24199	-----	-----	55.40			
<i>bssS1</i>	<i>P. vagans</i> M17	ATGATGATCCGCCTGCACTC	TCGAGATAAACTGCCTTGCC	57.31/	255	+79 ~ +187	109
	<i>P. vagans</i> LMG 24199	-----	-----	55.06			
<i>fliC2</i>	<i>P. vagans</i> M17	CTATATCCCGGCAGGCTCAA	TCCTGCCAGATGTTTACCGT	56.05/	1527	+603 ~ +705	103
	<i>P. vagans</i> LMG 24199	-----	A-- G----- C-- G-----	56.03			
<i>hcp1</i>	<i>P. vagans</i> M17	CAGTGACCTCTCTGTTGACG	TCTTCTAACGTGATGCGAGC	55.00/	483	+159 ~ +308	150
	<i>P. agglomerans</i> AR5	-- A----- T-----	----- C-----	55.20			
<i>clpV1</i>	<i>P. vagans</i> M17	TGACTCAGGACATCGTTGCT	AGCGAGGCGTAAACCCAT	56.08/	2610	+200 ~ +314	115
	<i>P. vagans</i> LMG 24199	----- C	----- A-- A-----	56.30			

¹ Results shaded in gray represent pairwise comparison results of primers sequences to *P. vagans* LMG 24199 or *P. agglomerans* AR5.

² The nucleotide at the transcription start site of each gene was designated as “+1”, and assigned the primer binding sites accordingly.

第五章、實驗結果與討論



第一節、*P. vagans* M17 中群體感應蛋白質之鑑定

圖 5-1 表明，*P. vagans* M17 的 PagI 以及 PagR 序列，與源自 *Pantoea* spp. 的五個序列具有較多一致或相似的氨基酸殘基 (residues)。成對比較胺基酸序列的結果顯示 *P. vagans* M17 的序列與 *P. vagans* C9-1 為 100 % 一致；若相比於 *P. agglomerans* YS19 或 *P. agglomerans* pv. *gypsophilae* 的同系物，有約 79 % 至 82 % 的一致性；與 *P. stewartii* subsp. *stewartii* DC283 以及 *P. ananatis* SK-1 比較，一致性落在 36 % 至 43 % (表 5-1、表 5-2)。相反地，將 *P. vagans* M17 的序列與源自 *Pseudomonas* spp. 的 Las 或 Rhl 系統之序列比較，一致或相似的氨基酸殘基明顯減少 (圖 5-1)；從表 5-1 與表 5-2 也觀察到 *P. vagans* M17 的序列與 Rhl 系統序列之一致性約為 22 % 或 31 %，與 Las 系統的一致性介於 18 % 至 26 %。藉由胺基酸序列比對，我們發現 *P. vagans* M17 與 *P. vagans* C9-1 中的 LuxI 與 LuxR 同系物序列具有高度保守性。

目前已知 LuxI 同系物具有十個保守胺基酸序列 (Chalupowicz et al., 2008; Parsek et al., 1997)，先前研究指出對這些胺基酸的核酸序列進行單點突變時，部分胺基酸的突變結果可能影響 LuxI 作為合成酶的功能，導致合成出的 AHLs 濃度低至無法偵測 (< 5 nM) (Hanzelka et al., 1997)。也有文獻表示含有這十個保守序列的範圍，可能為醯基轉移酶 (acyltransferase) 區域 (Zaghlool & Al-Khayyat, 2015)。LuxR 同系物具有五個保守序列 (Chalupowicz et al., 2008; Whitehead et al., 2001)，前三個序列位處的範圍應可對照到 AHLs 的結合區域；後二個序列坐落的範圍應為 LuxR 與 AHLs 形成複合物之後，與 DNA 結合的區域 (Shadel et al., 1990; Zaghlool & Al-Khayyat, 2015)。從圖 5-1 發現，*P. vagans* M17 的 PagI 以及 PagR 序列包含目前已知的保守胺基酸序列，且菌株的兩段序列與已知菌株 *P. vagans* C9-1 的序列完全一致，代表 PagI 以及 PagR 有高機率即為 QS 相關的兩個蛋白

質。

為了進一步了解演化關係，根據成對比較序列的一致性建立親緣關係樹。圖 5-2 中橫向的樹枝 (branch) 長短代表親緣關係遠近，每個分支節點旁邊的數字代表以自我重複抽樣法所得結果會涵蓋該分支節點的百分比，大於 70 % 代表該節點的分支是可信的 (Huson et al., 2010)。圖 5-2 指示出 *Pantoea* spp. 與 *Pseudomonas* spp. 序列之間的親緣關係較遠；在相同菌屬內 (如 *Pantoea* spp.) 的不同菌種間 (如 *P. stewartii* subsp. *stewartii* DC283 與 *P. ananatis* SK-1) 仍具有不同程度的分歧。相同菌種的序列保守性較高，然不同菌株的序列之間可能具有高度一致性 (如 *P. vagans* M17 與 *P. vagans* C9-1)，或是具有差異 (如 *P. agglomerans* YS19 與 *P. agglomerans* pv. *gypsophilae*)。即使是同一菌株，不同的 QS 系統間仍非完全保守 (如 *P. aeruginosa* PAO1 中的 *rhl* 系統與 *las* 系統)。但前人研究曾比對十五株 *P. agglomerans* 菌株的 *LuxI* 與 *LuxR* 序列，發現不論為內生性 (endophytic)、植物病原性或從臨床分離等不同菌株間，皆沒有歧異 (discrimination)。代表在演化過程中序列具高度保守性，指示出 AHLs 訊號傳遞途徑對於細菌在各種環境中的適應與生存之重要性 (Jiang et al., 2015)。

先前將 *P. vagans* M17 進行全基因定序時，片段重疊群 (contig) 組裝後的比對結果與 *P. vagans* C9-1 即具有 99 % 的相似度 (鄧婷云, 2022)。此外，*P. vagans* 原先被認為屬於 *P. agglomerans*，在 2009 年時根據管家基因 *gyrB* 的序列，才將其劃分為不同物種 (Brady et al., 2009)。本研究多重序列比對的結果符合預期，與實驗室先前研究以及文獻中描述的親緣關係能夠相互呼應。此外，透過比對結果也再次確認 *P. vagans* M17 中的 QS 基因為 *pagI* 與 *pagR*。



(A)

```
1.....10.....20.....30.....40.....50.....60
M17_Pagl MSSAIFFLRDYDQLSVEEANELYRLRRKTFRRRLDWEVEC--IDGMEKDFFDNKNNTTY
Pagl-1 MSSAIFFLRDYDQLSVEEANELYRLRRKTFRRRLDWEVEC--IDGMEKDFFDNKNNTTY
Pagl-2 MNSAIEFFFLRDYDAFPPELSTELYRLRRKTFRRRLDWEVEC--IDGMEKDFFDNKNNTTY
Pagl-3 MNSAIEFFFLRDYDAFPPELSTELYRLRRKTFRRRLDWEVEC--IDGMEKDFFDNKNNTTY
EsaL ---MELFDVSYELQTTTSEELYKLRKTESDRLGWEVTC--SQGMESDEFDGPGETRY
EanL ---MELFDVSYELQTTTSEELYKLRKTESDRLGWEVTC--SQGMESDEFDGPGETRY
Lasl-1 ---NIVQIGRRREFDKKLLGEGHRLRAQVFNERKGVVSV--IDGMEIDGFDALSPYY
RhlL ---MIELLSESLGLSAAMIAELGRYRHQVFIKLGWVVSTSRVDRQDFDHPQTRY
Lasl-2 ---NYITTGTRLTLPTELWQALLLYRYVVEKLGWVHC--AVGEELDQFDRDDTVY

61.....70.....80.....90.....100.....110.....120
M17_Pagl LGLVHD--GQLLCG--ARFIDSTQPTMMSEIFHKYFSVCRLLPTDPCCEITRLFLDKRR
Pagl-1 LGLVHD--GQLLCG--ARFIDSTQPTMMSEIFHKYFSVCRLLPTDPCCEITRLFLDKRR
Pagl-2 LGLVHN--GQLLCG--ARFIDSTQPTMMSEIFHEYFEGSGLLPTDPCCEISRRLFLDKRR
Pagl-3 LGLVHN--GQLLCG--ARFIDSTQPTMMSEIFHEYFEGSGLLPTDPCCEISRRLFLDKRR
EsaL LGLGCE--GQLVCS--VRFTSLDRPNMIHTFHQCFSDVH--LPA--YGTESRRFFVDKARA
EanL LGLGCE--GQLVCS--VRFTSLDRPNMIHTFHQCFSDVH--LPA--YGTESRRFFVDKARA
Lasl-1 LLIQEDTPEAQEGCWRIIDTGPYMLKNTFFELLHGKE--APCSPHIWEISRFA--NSGQK
RhlL IVAMS--RQGGCGCARLPPTDAYLLKDVFA--YLCSEI--PPSDPSVWEISRYAASAADD
Lasl-2 VIAIRQ--GPHVGVARLPPHKKPYLLKENFPQVLGGQV--LPHSAHIWEISRFAAVDLQQ

121.....130.....140.....150.....160.....170.....180
M17_Pagl DAAKLDGL--PASKALFLAMIFCMKKKYGMVAVVSRGMYAIFRHANWKTETVIQKGFSE
Pagl-1 DAAKLDGL--PASKALFLAMIFCMKKKYGMVAVVSRGMYAIFRHANWKTETVIQKGFSE
Pagl-2 DSAGLHGL--PASKVFLFLAMIFYCMKKNYRGMVAVASRGMYAIFRHANWKIEVIQKGLSE
Pagl-3 DSAGLHGL--PASKVFLFLAMIFYCMKKNYRGMVAVASRGMYKI-----EVIQKGLSE
EsaL RALLGEHY--FISQVFLFLAMNWAQNNAYGNITYTVSRMLKILTRSGWQIKVKEAFLT
EanL RELGGEHY--FVSQVFLFLAMNWAQNNAYHIYTVTVSRMLKILTRSGWQISVVKEAFLT
Lasl-1 GLGFS---DCLEAMRAARYSLQNDIQTLTVTVTVGVEKMMIRAGLDVSRFGPHLKI
RhlL PQL-----AMKFFWSSQCAWYLGASVVAVTTAMERYFVRNGVILQRLGPPQKV
Lasl-2 QFTGHSLSSENAVALLEHVLTVAAACHKVRQLITVSPPGTRLLRNAGDAHCEGRLTVI

181.....190.....200.....210.....220.....230...
M17_Pagl KGEDIIYYIFMPA---NSNVIEDIILKDKHS---DWLREKLOHLCHL---
Pagl-1 KGEDIIYYIFMPA---NSNVIEDIILKDKHS---DWLREKLOHLCHL---
Pagl-2 KGEVIYYIFMPA---SMSIVEDIITRDKAS---GWLREMSRHLRHL---
Pagl-3 KGEVIYYIFMPA---SMSIVEDIITRDKAS---GWLREMSRHLRHL---
EsaL EKEIYLLTLTPAGQDDKQQLGGDVVSRGTGCPPVAVTTWPLTFV-----
EanL EKEIYLLTLTPAGEADKQQLGGDIARTGCAPVAVTTWPLTFV-----
Lasl-1 GIEAVALRIELNAKTQIALYGGVLEQRLLA-----VS-----
RhlL KGETIIVAIISFPFA---YQERGLEMLIR-YHP-----EWLQGVPLSAV---
Lasl-2 EGHKIMA-----NWSLPEPLADREVA
```

(B)

```
1.....10.....20.....30.....40.....50.....60
M17_PagR ---MKDTYYNDQINSLIK--DELDAFFEDYQGIIYAYAIMNK--KD
PagR-1 ---MKDTYYNDQINSLIK--DELDAFFEDYQGIIYAYAIMNK--KD
PagR-2 ---MKDTYYNDQINSLLIQ--SELDAFFEDYKGIYAYAIMNK--KD
PagR-3 ---MKDTYYNDQINSLLIQ--NELDAFFEDYKGIYAYAIMNK--KD
EsaR ---MFSFLENQTFDTIQ--TYRKLSPGLSGFYAYTVSK--AN
EanR ---MFSFLENQTFDTIQ--TYRKLSPGLSGFYAYTVSK--AN
LasR-1 ---MAVDGLELESSESGK EWSAILKMASLGFSGKILGLPKDSQD
RhlR MRNDGGFLLWVGLRSEMGPIDSGGFVAV E--REVRRLGFDY--YAYVRHTIPTF
LasR-2 ---MVNWHNARLPKLDGESEITSFEMII--NHTYELGFY---CSLSSQSST

61.....70.....80.....90.....100.....110.....120
M17_PagR PSQMIIINNPA--WFDYLERKYQFIDPVIIRGLRCVEDFWENEVILSGYNLTR--IFN
PagR-1 PSQMIIINNPA--WFDYLERKYQFIDPVIIRGLRCVEDFWENEVILSGYNLTR--IFN
PagR-2 PSQMIIINNPA--WFDYLERKYQFIDPVIIRGLRCVEDFWENNVLISGGYNLTR--IFN
PagR-3 PSQMIIINNPA--WFDYLERKYQFIDPVIIRGLRCVEDFWENNVLISGGYNLTR--IFN
EsaR PSNLIISYPPEWIRYRANNQLTDPVITAFRTSFAWENITLMSDLRRT--IFS
EanR PSNLIISYPPEWIRYRANNQLTDPVITAFRTSFAWENITLMSDLRRT--IFS
LasR-1 YEAFLIISYPPEWIRYRANNQLTDPVITAFRTSFAWENITLMSDLRRT--IFS
RhlR RPKTEHGTYPKAWLRYPQNYGADFAINLSSSMVVQSDS---DOQHMN
LasR-2 QKPIFNPNPEWELSYKQAHFDDEFTHCKTSVLPILWESKT-----ANTPKHE

121.....130.....140.....150.....160.....170.....180
M17_PagR ESFYQNIIRGQTFFPLHDYLNLLVLSVIGKKFDFDHRH---RAKFMSEFLIHLH--QKT
PagR-1 ESFYQNIIRGQTFFPLHDYLNLLVLSVIGKKFDFDHRH---RAKFMSEFLIHLH--QKT
PagR-2 ESFYQNIIRGQTFFPLHDYLNLLVLSVIGKKFDFDHRH---RAKFMSEFLIHLH--QKT
PagR-3 ESFYQNIIRGQTFFPLHDYLNLLVLSVIGKKFDFDHRH---RAKFMSEFLIHLH--QKT
EsaR LSKQYNIIVGFTFVLHDHNNLALLSVIIGKNDQATAEQRLAAEQTMQMLIDFN--EQM
EanR LSKQYNIIVGFTFVLHDHNNLALLSVIIGKNDQATAEQRLAAEQTMQMLIDFN--EQM
LasR-1 HASAAGVYGLTLMPLHGARGELALSVEAENRAANF--MESVLPITWMLKDYALSG
RhlR HARDGUCVCGATLFRAPNLLSLSVARDQONISSFE--EIRLIRCMELIT--QKL
LasR-2 LAQSCGVHLGWAQAHQDQGVFSMLVRSRGEVSPERLY--EKAQVWLCHAH--AVV

181.....190.....200.....210.....220.....230.....240
M17_PagR LNLYSQHQK--KNA-----FLSPREQLKQVSGKTYAIAIALSLAERTVKFHMKG
PagR-1 LNLYSQHQK--KNA-----FLSPREQLKQVSGKTYAIAIALSLAERTVKFHMKG
PagR-2 LNLYSQHQK--KNA-----FLSPREQLKQVSGKTYAIAIALSLAERTVKFHMKG
PagR-3 LNLYSQHQK--KNA-----FLSPREQLKQVSGKTYAIAIALSLAERTVKFHMKG
EsaR YRLAGTEGEL--AFALNQSADKTISSRENELYWASGKTYAIAIALSLAERTVKFHMKG
EanR YRLAGTEGEL--APTQVQNAKTISSRENELYWASGKTYAIAIALSLAERTVKFHMKG
LasR-1 AGLAFEPVSRPV-----VLSRENELYWASGKTYAIAIALSLAERTVKFHMKG
RhlR TDLEHPMLMS--NPV-----CLSHRETEILQWADGKSGEIAIALSLAERTVKFHMKG
LasR-2 AKKADAPDIKAPS-----KLARETEILKWSAGKTASEIAIALSLAERTVKFHMKG

241.....250.....260.....270...
M17_PagR NVMKKLGVNNARHAIKLGAEELRLN-----
PagR-1 NVMKKLGVNNARHAIKLGAEELRLN-----
PagR-2 NVMKKLGVNNARHAIKLGAEELRLN-----
PagR-3 NVMKKLGVNNARHAIKLGAEELRLN-----
EsaR NVVKLGVSNAQCAILGVELDLRPAASAAR
EanR NVVKLGVSNAQCAILGVELDLRPAASAAR
LasR-1 NVVKLGVSNAQCAILGVELDLRPAASAAR
RhlR NVQKNEAPNKLAAAYNALGL-----
LasR-2 STFKKLGVHNKIQANRRANAGLF-----
```

圖 5-1、LuxI 與 LuxR 同系物之多重序列比對。(A) 為不同菌株間 LuxI 之序列比較。(B) 為不同菌株間 LuxR 之序列比較。黑色與灰色分別代表一致與相似的胺基酸。由紅色方形框起的序列為保守胺基酸。序列上方的數字對應胺基酸的位置。

Figure 5-1. Multiple sequence alignments of LuxI and LuxR homologue proteins. Sequences aligned were (A) LuxI and (B) LuxR homologue proteins from *P. vagans* M17 and other *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. Black and gray shading represent identical and similar amino acids, respectively. Residues framed by red were conserved sequences. The topmost numbers correspond to the locations of the amino acid residues. Sequence alignment was performed with MEGA_11.0.13 and presented with Boxshade 3.21. The sequences used in the alignments were PagI-1 (accession number ADI78211) or PagR-1 (accession number ADI78210) from *Pantoea vagans* C9-1, PagI-2 (accession number AIC38371) or PagR-2 (accession number AIC38370) from *Pantoea agglomerans* YS19, PagI-3 (accession number ABO93631) or PagR-3 (accession number ABO93630) from *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophilae*, EsaI (accession number AAA82096) or EsaR (accession number AAA82097) from *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* DC283, EanI (accession number BAF69064) or EanR (accession number BAF69065) from *Pantoea ananatis* SK-1, LasI-1 (accession number AAG04821) or LasR-1 (accession number AAG04819) from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, RhlI (accession number AAG06864) or RhlR (accession number AAG06865) from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, and LasI-2 (accession number KWV78153) or LasR-2 (accession number KWV80327) from *Pseudomonas fluorescens* strain Ps_20.

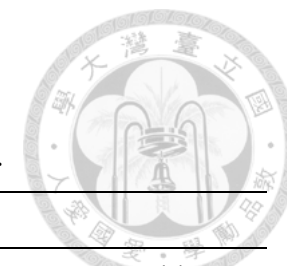


表 5-1、*P. vagans* M17 與 *Pantoea* spp. 及 *Pseudomonas* spp. 之 LuxI 同系物成對比較

Table 5-1. Pairwise identity of LuxI homologue proteins from *P. vagans* M17 and other *Pantoea* and *Pseudomonas* spp.

Amino acid sequence identity (%)								
Protein	M17_PagI	PagI-1	PagI-2	PagI-3	EsaI	EanI	LasI-1	RhII
PagI-1	100.00	-	-	-	-	-	-	-
PagI-2	80.65	80.65	-	-	-	-	-	-
PagI-3	79.35	79.35	96.13	-	-	-	-	-
EsaI	43.23	43.23	40.00	40.65	-	-	-	-
EanI	41.94	41.94	39.35	40.00	93.55	-	-	-
LasI-1	18.71	18.71	24.52	25.81	22.58	23.23	-	-
RhII	22.58	22.58	23.23	23.87	24.52	25.16	29.68	-
LasI-2	21.94	21.94	23.87	24.52	20.00	20.00	28.39	32.90

The sequence identity was calculated with MEGA_11.0.13. The sequences used in the identity calculation were PagI-1 from *P. vagans* C9-1 (accession number ADI78211), PagI-2 from *P. agglomerans* YS19 (accession number AIC38371), PagI-3 from *P. agglomerans* pv. *gypsophila* (accession number ABO93631), EsaI from *P. stewartii* subsp. *stewartii* DC283 (accession number AAA82096), EanI from *P. ananatis* SK-1 (accession number BAF69064), LasI-1 from *P. aeruginosa* PAO1 (accession number AAG04821), RhII from *P. aeruginosa* PAO1 (accession number AAG06864), and LasI-2 from *P. fluorescens* strain Ps_20 (accession number KWV78153).



表 5-2、*P. vagans* M17 與 *Pantoea* spp. 及 *Pseudomonas* spp. 之 LuxR 同系物成對比較

Table 5-2. Pairwise identity of LuxR homologue proteins from *P. vagans* M17 and other *Pantoea* and *Pseudomonas* spp.

Amino acid sequence identity (%)								
Protein	M17_PagR	PagR-1	PagR-2	PagR-3	EsaR	EanR	LasR-1	RhlR
PagR-1	100.00	-	-	-	-	-	-	-
PagR-2	82.19	82.19	-	-	-	-	-	-
PagR-3	81.28	81.28	98.17	-	-	-	-	-
EsaR	37.90	37.90	37.44	36.53	-	-	-	-
EanR	36.99	36.99	36.53	36.07	96.35	-	-	-
LasR-1	26.94	26.94	26.03	26.03	27.85	27.85	-	-
RhlR	31.05	31.05	28.31	28.31	24.66	24.66	30.59	-
LasR-2	23.74	23.74	24.20	24.66	24.20	24.66	28.77	27.85

The sequence identity was calculated with MEGA_11.0.13. The sequences used in the identity calculation were PagR-1 from *P. vagans* C9-1 (accession number ADI78210), PagR-2 from *P. agglomerans* YS19 (accession number AIC38370), PagR-3 from *P. agglomerans* pv. *gypsophila* (accession number ABO93630), EsaR from *P. stewartii* subsp. *stewartii* DC283 (accession number AAA82097), EanR from *P. ananatis* SK-1 (accession number BAF69065), LasR-1 from *P. aeruginosa* PAO1 (accession number AAG04819), RhlR from *P. aeruginosa* PAO1 (accession number AAG06865), and LasR-2 from *P. fluorescens* strain Ps_20 (accession number KWV80327).

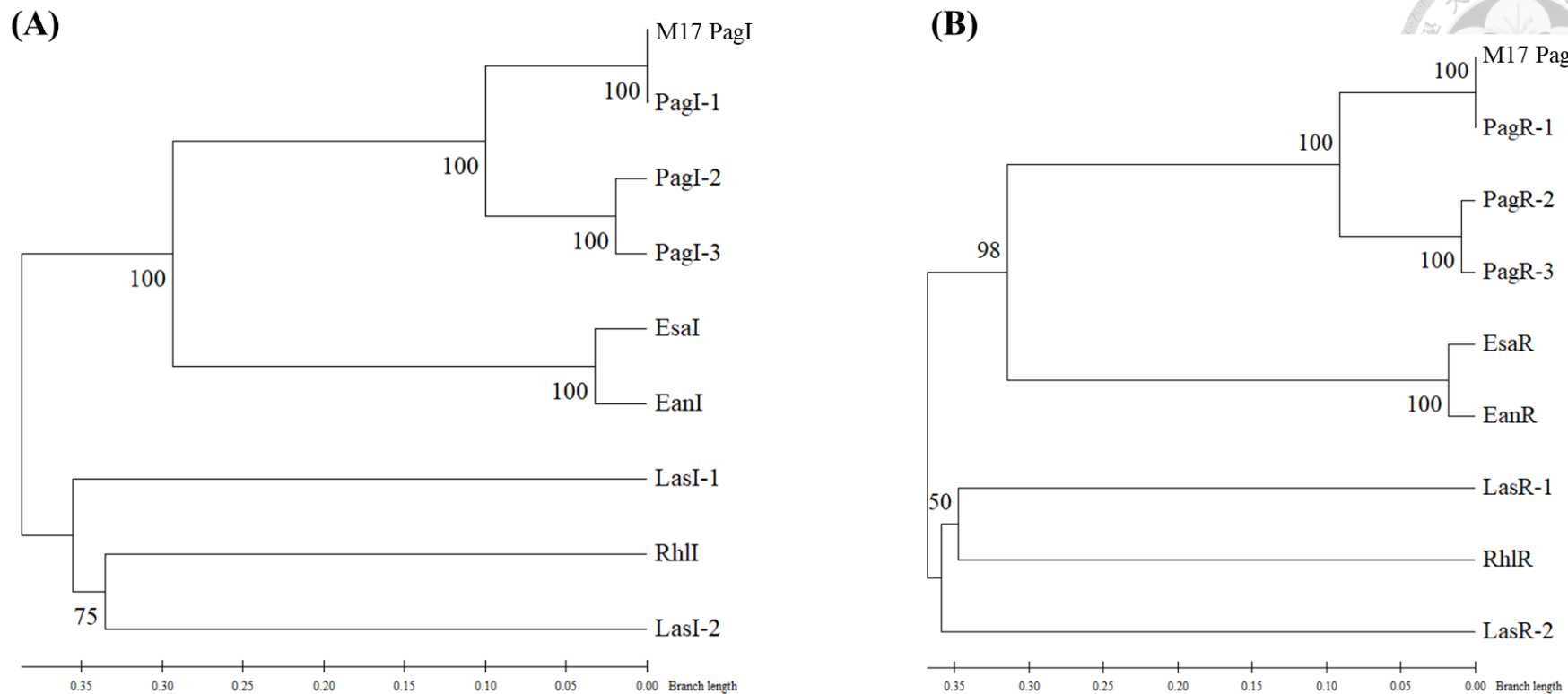
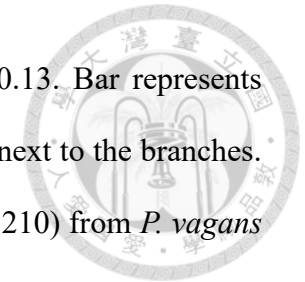


圖 5-2、LuxI 與 LuxR 同系物之親緣關係樹。(A) 為不同菌株的 LuxI 之親緣關係樹。(B) 為不同菌株的 LuxR 之親緣關係樹。使用 UPGMA 聚類方法建立親緣關係樹。演化距離以 p-distance 代表。自我重複抽樣法的結果，以百分比呈現於分支節點旁。

Figure 5-2. The phylogenetic trees of LuxI or LuxR homologue proteins. The phylogenetic trees were created based on (A) LuxI and (B) LuxR homologue proteins from *P. vagans* M17 and other *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. The evolutionary history was clustered utilizing

the UPGMA method. The evolutionary distances were calculated utilizing the p-distance method with MEGA_11.0.13. Bar represents sequence divergence. The bootstrap values, calculated from 1000 replicates, were displayed as percentages and shown next to the branches. The sequences used in the alignments were PagI-1 (accession number ADI78211) or PagR-1 (accession number ADI78210) from *P. vagans* C9-1, PagI-2 (accession number AIC38371) or PagR-2 (accession number AIC38370) from *P. agglomerans* YS19, PagI-3 (accession number ABO93631) or PagR-3 (accession number ABO93630) from *P. agglomerans* pv. *gypsophilae*, EsaI (accession number AAA82096) or EsaR (accession number AAA82097) from *P. stewartii* subsp. *stewartii* DC283, EanI (accession number BAF69064) or EanR (accession number BAF69065) from *P. ananatis* SK-1, LasI-1 (accession number AAG04821) or LasR-1 (accession number AAG04819) from *P. aeruginosa* PAO1, RhlI (accession number AAG06864) or RhlR (accession number AAG06865) from *P. aeruginosa* PAO1, and LasI-2 (accession number KWV78153) or LasR-2 (accession number KWV80327) from *P. fluorescens* strain Ps_20.





第二節、*P. vagans* M17 群體感應基因刪除突變株之建構

一、帶有基因上、下游同源片段的重組質體建構

在結果與討論的第一節中，已鑑定出 *P. vagans* M17 中的 QS 基因 *pagI* 與 *pagR*。兩基因的大小介於 600 至 700 bp，皆位在菌株自身帶有的質體 (megaplasmid)，且已藉由 PCR 確認兩基因之存在 (附錄 7 A)。為了以同源重組方式獲得突變菌株，需建構帶有基因上、下游同源片段的重組質體。針對兩個基因的上、下游同源片段，以 *P. vagans* M17 gDNA 為模板，分別使用四對引子 (附錄 2) 擴增目標片段。附錄 7 B 顯示，四個目標片段的大小皆與預期相符，落在 550 至 750 bp。接著將純化後的 *pagR* 上、下游片段進行重疊延伸 PCR，預計融合出 1236 bp 的產物；*pagI* 的上、下游片段則預計融合出 1348 bp 的產物。凝膠電泳的結果表明，反應後有觀察到符合預期中兩基因的融合產物大小之條帶，但目標條帶的上下方皆有出現非預期的產物 (附錄 7 C)，顯示專一性較低。*pagR* 與 *pagI* 的 PCR 反應中，引子貼合 (annealing) 的溫度分別使用 66.8 °C 與 65.6 °C，為考量反應所使用的聚合酶、引子序列與濃度後計算得出。本研究嘗試調整 PCR 反應中 annealing 的溫度，以觀察在其他條件相同的情況下，溫度調整對於專一性與效率的影響。從附錄 8 A 可以發現，溫度的調整對於擴增 *pagR* 融合產物的效率影響不大，但在較高溫與低溫 (71 °C 與 50 °C) 時其專一性較佳。*pagI* 融合產物的擴增效率與專一性幾乎皆不隨著溫度的調整有所改變 (附錄 8 B)。依據上述結果，將 *pagR* 的 PCR 反應中 annealing 的溫度調整為 50 °C；*pagI* 的 PCR 反應條件維持不變。此外，在反應後將目標片段從膠片中純化，進行後續試驗。

載體 pK18 mobsacB 與融合產物經限制酵素反應後，大小皆符合預期 (附錄 9)。將純化後的載體片段分別與 *pagR* 或 *pagI* 融合產物接合，再轉型至 *E. coli* DH5 α 中保存，並以菌落 PCR 確認質體片段大小。pK18 mobsacB-*pagR* 重組質體以及 pK18 mobsacB-*pagI* 重組質體經菌落 PCR 擴增出的片

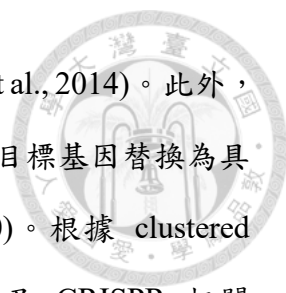
段大小分別為 1279 bp (附錄 10 A) 與 1390 bp (附錄 10 C)。分別自正確的菌落萃取出兩個重組質體，以限制酵素反應後的片段大小皆與預期相符 (附錄 10 B、附錄 10 D)。經定序確認兩個重組質體 pK18 mobsacB-pagR (附錄 11) 與 pK18 mobsacB-pagI (附錄 12) 之序列無誤。

二、*sacB* 的無標記基因刪除

將 *P. vagans* M17 與重組質體混合，進行電穿孔後修復並以 kanamycin 初步篩選成功帶有質體的菌落。利用高含量蔗糖造成細菌的生存壓力，進行第二次篩選。若菌落已完成兩次同源重組，可以 kanamycin 進行第三步的確認。最後藉由菌落 PCR 確認擴增出之片段大小，以分辨野生型或突變型菌株。

針對 *pagR*，野生型的條帶大小為 1911 bp，突變型的條帶大小為 1236 bp。挑選 79 個菌落進行 PCR 並經凝膠電泳分析，其中約 60 % 為野生型，25 % 為野生型與突變型混合，11 % 未擴增到片段，有兩個菌落可能為突變型 (附錄 13)。附錄 14 B 的凝膠電泳結果中，2 號菌落擴增出的條帶大小符合突變型菌株的預期結果，且十分專一。然將該菌落從含有蔗糖的培養基輕劃於一般的培養基，於 30 °C 放置一週皆無法生長，在 TSB 中亦同。針對 *pagI*，野生型的條帶大小為 1966 bp，突變型的條帶大小為 1348 bp。在 90 個挑選的菌落中，約 50 % 為野生型與突變型混合，約 25 % 的菌落為野生型，另外 25 % 未擴增到片段，僅有一個菌落可能為突變型 (附錄 13、附錄 15 B)。然而在另行培養該菌落、萃取 gDNA 並擴增片段確認後，結果顯示其仍為野生型菌株。此外，將呈現混合條帶的菌落經 TSB 培養，塗佈於培養基分離出單一菌落進行 PCR，所得結果一致呈現為野生型。

實驗中嘗試以基於 *sacB* 的無標記方式刪除 *P. vagans* M17 中的 QS 基因 *pagI* 與 *pagR*，但未能夠以該方法獲得突變株。未來也許可以透過增加兩基因上、下游同源片段的長度，提高同源重組成功的效率 (Yu et al., 2000)。或



是嘗試以其他反向篩選標記之基因替換 *sacB* 基因 (Yang et al., 2014)。此外，可以嘗試其餘方法，如以 lambda Red (λ -Red) 重組系統將目標基因替換為具抗生素抗性的可篩選標記基因 (Datsenko & Wanner, 2000)。根據 clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) 以及 CRISPR 相關 (CRISPR-associated, Cas) 核酸酶，組成的基因編輯系統，也已被應用於刪除 *E. coli* 與 *Pseudomonas fulva* 等細菌中的特定基因 (Ou et al., 2022; Zhang et al., 2022)。另外，屬於非編碼 RNA 的合成小片段 RNA (synthetic small RNA)，能夠藉由結合目標 mRNA，在轉譯層面上調控細菌基因表現 (Cho et al., 2023)。後續研究可以考慮採用上述方法，以建構 *pagI*、*pagR* 或是其他基因刪除之 *P. vagans* M17 突變菌株，以深入探究基因功能。



第三節、*P. vagans* M17 中自誘導劑定性與定量

一、*P. vagans* M17 主要產生之自誘導劑為 BHL

在結果與討論第一節中，與 *P. vagans* M17 具 100 % 一致性的 *P. vagans* C9-1，雖已藉由 *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 菌株作為生物感測器，證實其培養後的上清液具有足以誘導 *A. tumefaciens* NTL4 的 LacZ (β -galactosidase) 活性之 AHLs，但 AHLs 的確切成分分子尚未被解構 (Smits et al., 2010)。為了鑑定 *P. vagans* M17 的 QS 系統產生之 AHLs，根據先前進行比對的其餘四株 *Pantoea* spp. 鑑定出之 AHLs，推測 *P. vagans* M17 分泌的 AHLs 種類可能相似於以下四種成分，包含：一、從水稻中分離出之內生性細菌 *P. agglomerans* YS19，其培養後的上清液之萃取物，經 MALDI-TOF-MS 分析確認之 OOHL (Jiang et al., 2015)。二、能夠感染石頭花屬 (*Gypsophila* spp.) 植物並導致瘤腫 (gall) 產生的 *P. agglomerans* pv. *gypsophilae*，以 TLC 分析顯示其主要分泌之 BHL 及 *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (HHL)，且後續經 HPLC-MS 確認，菌株培養後的上清液萃取物，分別與兩化合物之標準品具有相同 *m/z* 的母離子 (Chalupowicz et al., 2008)。三、源自玉米且會導致玉米細菌性枯萎病的 *P. stewartii* subsp. *stewartii* DC283，以 LC-MS/MS 分析其萃取物，得到的質譜圖中觀察到 *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (OHHL) 之特徵子離子碎片，代表其主要分泌之 OHHL (Beck von Bodman & Farrand, 1995)。四、Morohoshi 等人 (2007) 以 TLC 分析河水中分離出的 *P. ananatis* SK-1 之上清液萃取物，與標準品對照後發現之 HHL 與 OHHL。

實驗參考文獻與比對結果，推測從不同 *Pantoea* spp. 中鑑定出的 AHLs 皆可能為 *P. vagans* M17 分泌的自誘導劑，因此將 BHL、HHL、OHHL 與 OOHL 納入候補。圖 5-3 顯示，以 HPLC-MS/MS 分析標準品，可藉由層析圖中波峰的滯留時間 (retention time, RT) 差異區分四者，RT 由短至長分別為：BHL、OHHL、HHL 與 OOHL。此沖提順序與文獻裡鑑定出的結果一致



(Martins et al., 2018; Ortori et al., 2011)，也與四者結構展現的極性相符。觀察標準品的質譜圖，發現在 product ion scan 模式下， m/z 102 的特徵子離子皆出現在四者 MS^2 圖譜 (圖 5-4)，其對應於高絲氨酸內酯 (homoserine-lactone) 特徵片段，由 AHLs 酰胺鍵的斷裂所形成 (Beck von Bodman & Farrand, 1995; Kher et al., 2019; Laue et al., 2000; McClean et al., 1997; Nasser et al., 1998; Swift et al., 1997)。酰胺鍵斷裂形成的另一片段為剩餘的酰基側鏈，在 BHL、HHL、OHHL 與 OOHL 中的 m/z 分別為 71、99、113 與 141，於四者的質譜圖中為強度次於 102 的子離子 (圖 5-4)。根據上述結果與文獻 (Ortori et al., 2011)，訂定後續分析時母離子與子離子的 m/z : BHL、HHL、OHHL 與 OOHL 之母離子 m/z 分別為 172、200、214 與 242，子離子 m/z 皆選擇 102。

為了定性樣品中的 AHLs，藉由 multiple reaction monitoring (MRM) 模式，分析四個標準品以及樣品 *P. vagans* M17 培養後上清液之萃取物。結果表明，樣品與 BHL 標準品 (圖 5-5 A、B) 以及 HHL 標準品 (圖 5-5 C、D) 之波峰的 RT 一致，且兩者在樣品中的強度約分別為標準品的 91 倍與 0.6 倍。OHHL 與 OOHL 標準品波峰之 RT，在樣品中相同的 RT 下，較難觀察到波峰或是波峰質量強度低 (附錄 16)。據此，判定樣品中主要包含的自誘導劑為 BHL，HHL 為次要；另外兩者則幾乎未於樣品中觀察到。由於 AHLs 標準品取得的限制性，以及期望進一步了解樣品中其他潛在 AHLs 存在的可能性，實驗進一步以 precursor ion scan 模式進行分析，並將掃描所得之母離子 m/z 與文獻資料 (Ortori et al., 2011) 相比較。樣品中有四個較明顯的波峰，其中僅有 P1 與 BHL 的 RT 一致 (圖 5-6)。P1 質譜圖中的主要離子與 BHL 標準品之母離子 (m/z 172) 相同 (圖 5-7 A)；在樣品中添加 BHL 也發現 P1 基峰 (base peak) 的絕對強度提升為原先的 1.46 倍 (表 5-3、附錄 17)，表明 P1 與 BHL 為相同化合物。P2、P3、P4 三個波峰，除了 m/z 102 的特徵離子之外，僅掃描到同樣於溶劑甲醇中觀察到的背景雜質離子 (m/z 143)，且無

法與文獻中顯現相對應的離子 (m/z 204) (圖 5-7 B、C、D)。目前仍不明白這三個波峰代表的化合物，推測他們可能為樣品中潛在或新興的 AHLs。

以 HPLC-MS/MS 分析 *P. vagans* M17 的粗萃取物，鑑定出主要自誘導劑為 BHL。文獻顯示，從滿天星分離出的 *P. agglomerans* pv. *gypsophila* 以及分離自海洋沉積物的 *Pantoea ananatis* B9，皆主要產生 BHL (Chalupowicz et al., 2008; Jatt et al., 2014)。此外，BHL 也在其他革蘭氏陰性細菌的培養液中被鑑定出，包含：*P. aeruginosa* PAO1 (Ortori et al., 2011; Patel et al., 2016)、*S. liquefaciens* (McClellan et al., 1997)、*Aeromonas salmonicida* NCIMB 1102 (Swift et al., 1997)、*Erwinia herbicola* LS005、*Pseudomonas aureofaciens* 30-84 (Patel et al., 2016)、分離自冷生乳的 *A. hydrophila* 099 (Martins et al., 2018)、分離自硬殼蛤的 *Citrobacter amalonaticus* strain YG6 (Kher et al., 2019)，以及分離自壇紫菜的 *Pseudoalteromonas galathea* P1 (Aslam et al., 2023) 等。

然而，實驗結果顯示尚無法排除 *P. vagans* M17 仍會產生其他 AHLs 的可能性。有文獻將野生型 *P. aeruginosa* PAO1，分別培養於營養充足的 LB 培養基與營養較缺乏的 M9 培養基，收集菌株培養後的上清液並進行萃取，以 HPLC-TQ MS 分析 AHLs 含量。結果顯示，不同結構的 AHLs 在不同培養基中的產量相異：HHL 與 BHL 在 LB 中濃度分別為 6.57 與 5.36 $\mu\text{g/L}$ ，此兩者在 M9 中濃度皆低於定量極限；然 *N*-(3-oxodecanoyl)-homoserine-lactone (ODHL) 與 *N*-dodecanoyl-L-homoserine lactone (dDHL) 在 M9 中的濃度高於在 LB 內 (Dal Bello et al., 2021)。本研究以 TSB 培養菌株，其成分包含：酪蛋白胰消化物 (pancreatic digest of casein)、大豆胃消化物 (peptic digest of soybean)、葡萄糖、氯化鈉與磷酸氫二鉀。由於 TSB 提供相對營養的環境，可能導致擁有較長酰基鏈的 AHLs 濃度較低而未於本研究中測得。

培養細菌時，有研究會將培養基本身以 3-嗎丙磺酸 (3-[N-morpholino] propane-sulfonic acid, MOPS) 進行酸化再用以培養細菌 (Chan et al., 2014;



Kher et al., 2019);或是將冰醋酸加入萃取用的有機溶液中，再以其萃取離心後的菌株培養液 (Aslam et al., 2023; Chalupowicz et al., 2008; Dixit et al., 2017; Jiang et al., 2015; Ortori et al., 2011; Patel et al., 2016; Pearson et al., 1994)。先前研究也證實在生長情況相似的前提下，額外在培養基中添加 MOPS 能夠較明顯觀察到 *Yersinia pseudotuberculosis* 的 AHLs 產生。作者進一步發現隨著 pH 值上升到 5 至 8，BHL 的內酯環百分比隨之下降；降低 pH 值雖能使其再度內酯化 (lactonization) 回復為閉環形式，但僅有當 pH 值降低至 2 以下，接近羧基團的 pKa 值時，才有明顯的閉環發生 (Yates et al., 2002)。該篇文獻亦測試不同培養溫度下 *Y. pseudotuberculosis* 所產生的 AHLs 變化，隨著培養溫度由 22 °C、28 °C 上升至 37 °C，藉 TLC 分析觀察到 AHLs 產量隨之減少。由上述文獻可知，pH 值與溫度皆會影響 AHLs 的產生與穩定性。

也有文獻為了探究不同細菌對於不同外源性 AHLs 的降解情況，曾培養數種細菌至對數中期，加入 AHLs 標準品混合液繼續培養，並以同位素標記分辨內源性與外源性 AHLs。結果顯示，僅有部分測試細菌具降解 AHLs 能力，且擁有長酰基側鏈（大於十個碳原子）的 AHLs，相較於短酰基側鏈（小於六個碳原子）者更容易被測試細菌降解。同篇文獻還發現在特定的細菌培養物中，自身產生的 AHLs 降解會自然發生，且都在生長停滯期被觀察到 (Patel et al., 2016)。由上可知，擁有長酰基側鏈的 AHLs 似乎相對不穩定，且菌株亦有可能降解自身所產生的 AHLs。從上述文獻可以推測，本研究中有其他 AHLs 成分存在於樣品裡的可能性。

未來研究可以考慮以各種溫度與培養基培養菌株，並添加有機酸於培養基以及萃取用的有機溶液中。分析粗萃取物時，可選用具更高靈敏度的儀器，採用非目標性篩選 (non-targeted screening) 方法，並鑑定其他特徵子離子，搭配同位素標記以確定潛在的 AHLs 分子式 (Patel et al., 2016);或直接以 NMR 鑑定結構。期望藉由多樣的方法，能夠更進一步了解菌株產生的 AHLs 全貌。

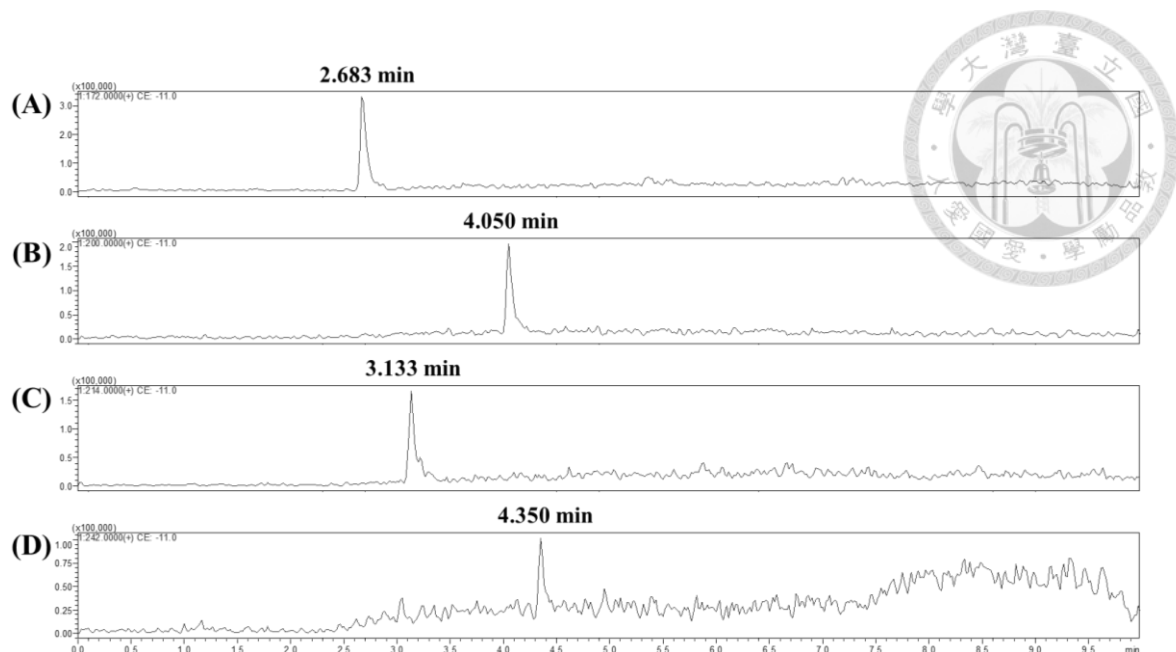


圖 5-3、AHLs 標準品在 product ion scan 模式下之總離子層析圖。(A) 至 (D) 分別為 BHL、HHL、OHHL 與 OOHL 標準品之總離子層析圖。波峰上方的數字對應滯留時間。

Figure 5-3. HPLC-MS/MS chromatograms of AHLs standards in the product ion scan mode. The total ion chromatogram of product ion from the precursor ion for (A) BHL, (B) HHL, (C) OHHL and (D) OOHL standards at m/z ($[M+H]^+$) of 172.0, 200.0, 214.0 and 242.0, respectively. The numbers above the peak indicate the corresponding retention time.

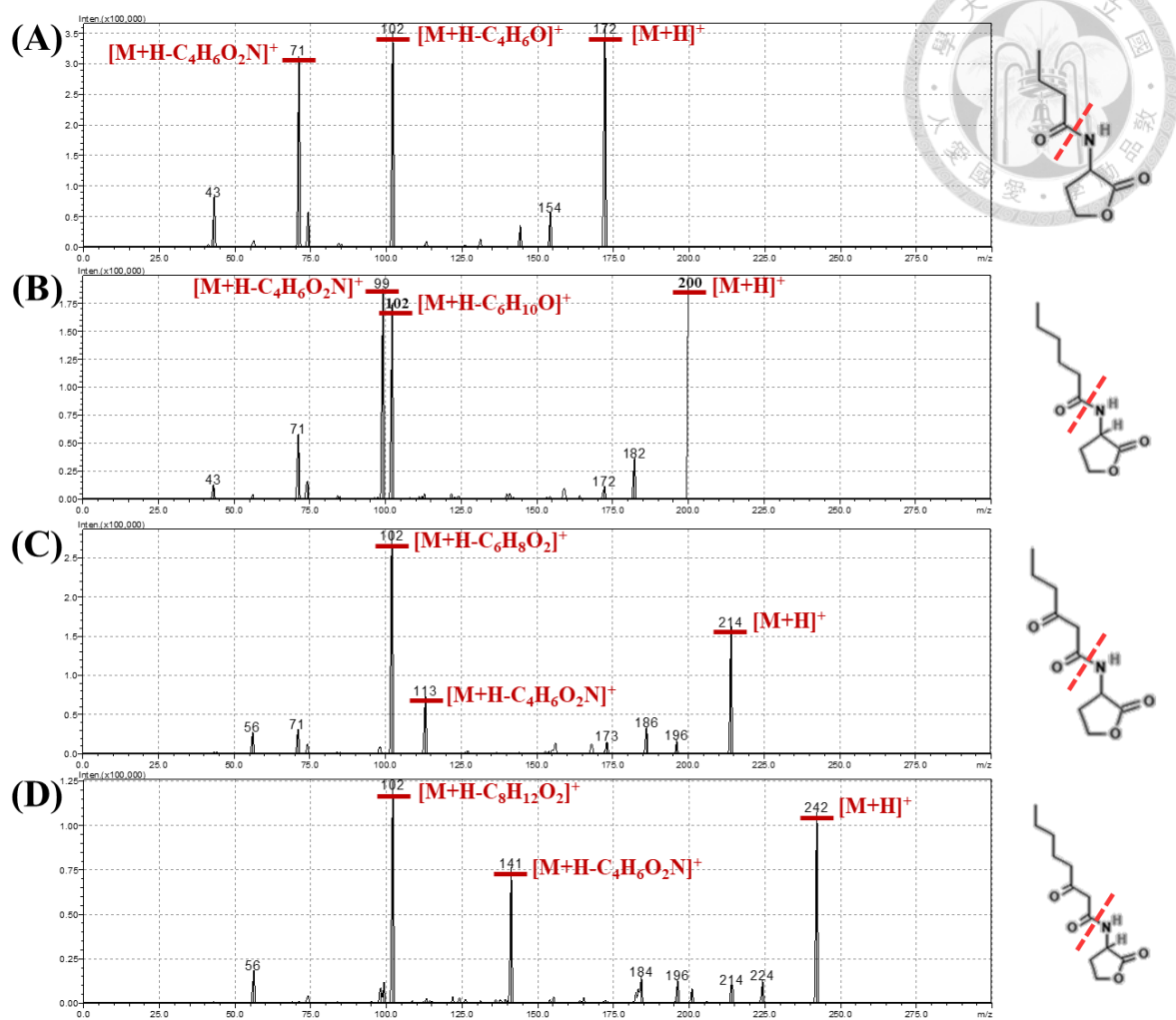


圖 5-4、AHLs 標準品二次離子之質譜。(A) 至 (D) 分別為 BHL、HHL、OHHL 與 OOHHL 標準品之質譜。

Figure 5-4. The MS² spectra of AHL standards by triple quadrupole. The precursor ion of (A) BHL, (B) HHL, (C) OHHL and (D) OOHHL standards was [M+H]⁺ with *m/z* of 172.0, 200.0, 214.0 and 242.0, respectively, in the positive ion mode. The product ions with loss of homoserine-lactone (*m/z* of 102.0) were performed by triple quadrupole.

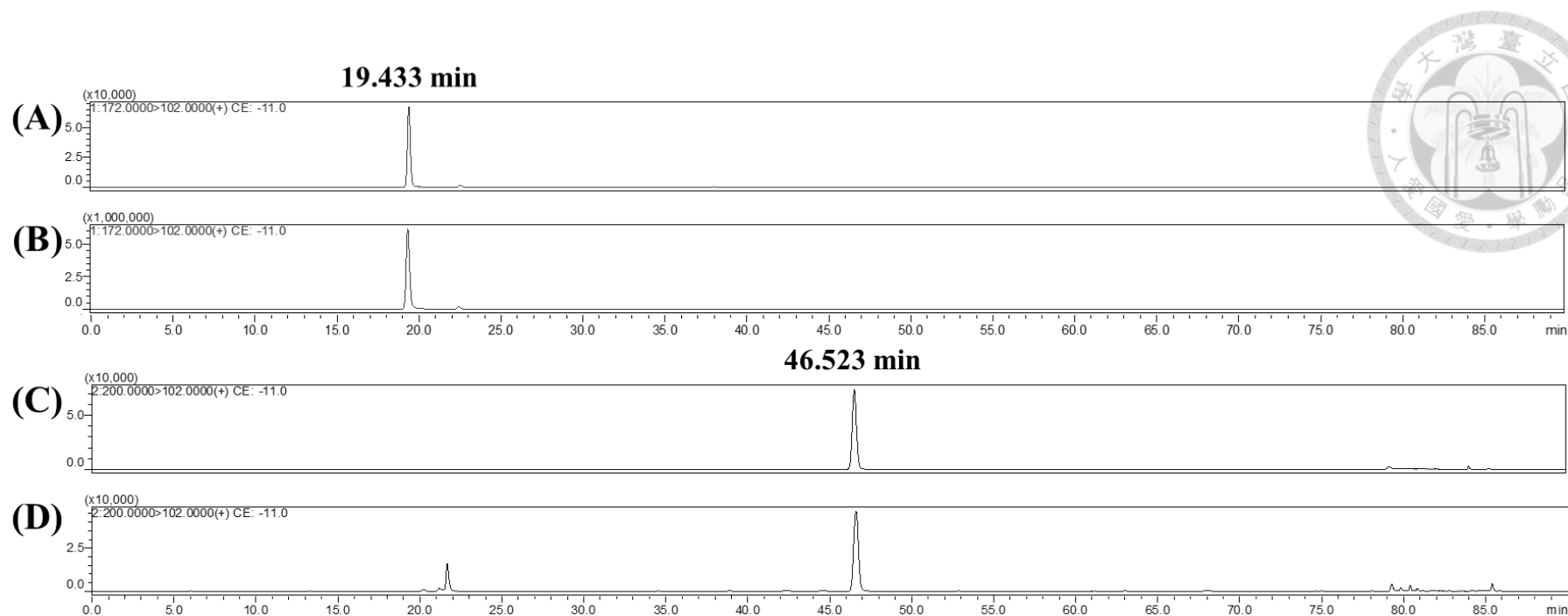


圖 5-5、BHL、HHL 標準品與樣品在 multiple reaction monitoring 模式下之總離子層析圖。(A)、(B) 分別為 BHL 標準品與樣品之總離子層析圖。(C)、(D) 分別為 HHL 標準品與樣品之總離子層析圖。波峰上方的數字對應滯留時間。

Figure 5-5. HPLC-MS/MS chromatograms of BHL, HHL standards and *P. vagans* M17 sample in the multiple reaction monitoring mode. The total ion chromatogram of product ion at m/z ($[M+H]^+$) of 102.0 from the precursor ion for (A) BHL standard and (B) sample at m/z ($[M+H]^+$) of 172.0. The total ion chromatogram of product ion at m/z ($[M+H]^+$) of 102.0 from the precursor ion for (C) HHL standard and (D) sample at m/z ($[M+H]^+$) of 200.0. The numbers above the peak indicate the corresponding retention time.

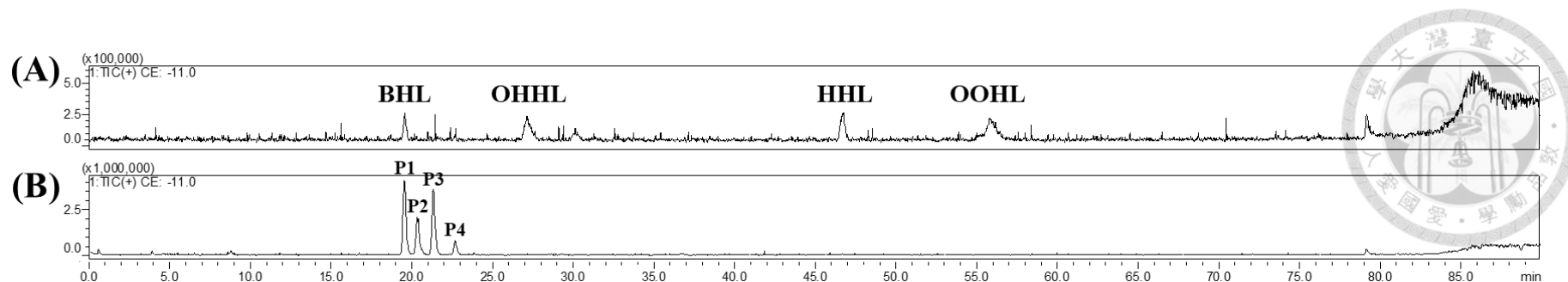


圖 5-6、AHLs 標準品與樣品在 precursor ion scan 模式下之總離子層析圖。(A) 為 AHLs 標準品之總離子層析圖。(B) 為樣品之總離子層析圖。

Figure 5-6. HPLC-MS/MS chromatograms of AHLs standards and *P. vagans* M17 sample in the precursor ion scan mode. The total ion chromatogram of precursor ion m/z ($[M+H]^+$) ranging from 100 to 500 with the product ion at m/z ($[M+H]^+$) of 102.0 for (A) AHLs standards and (B) sample.

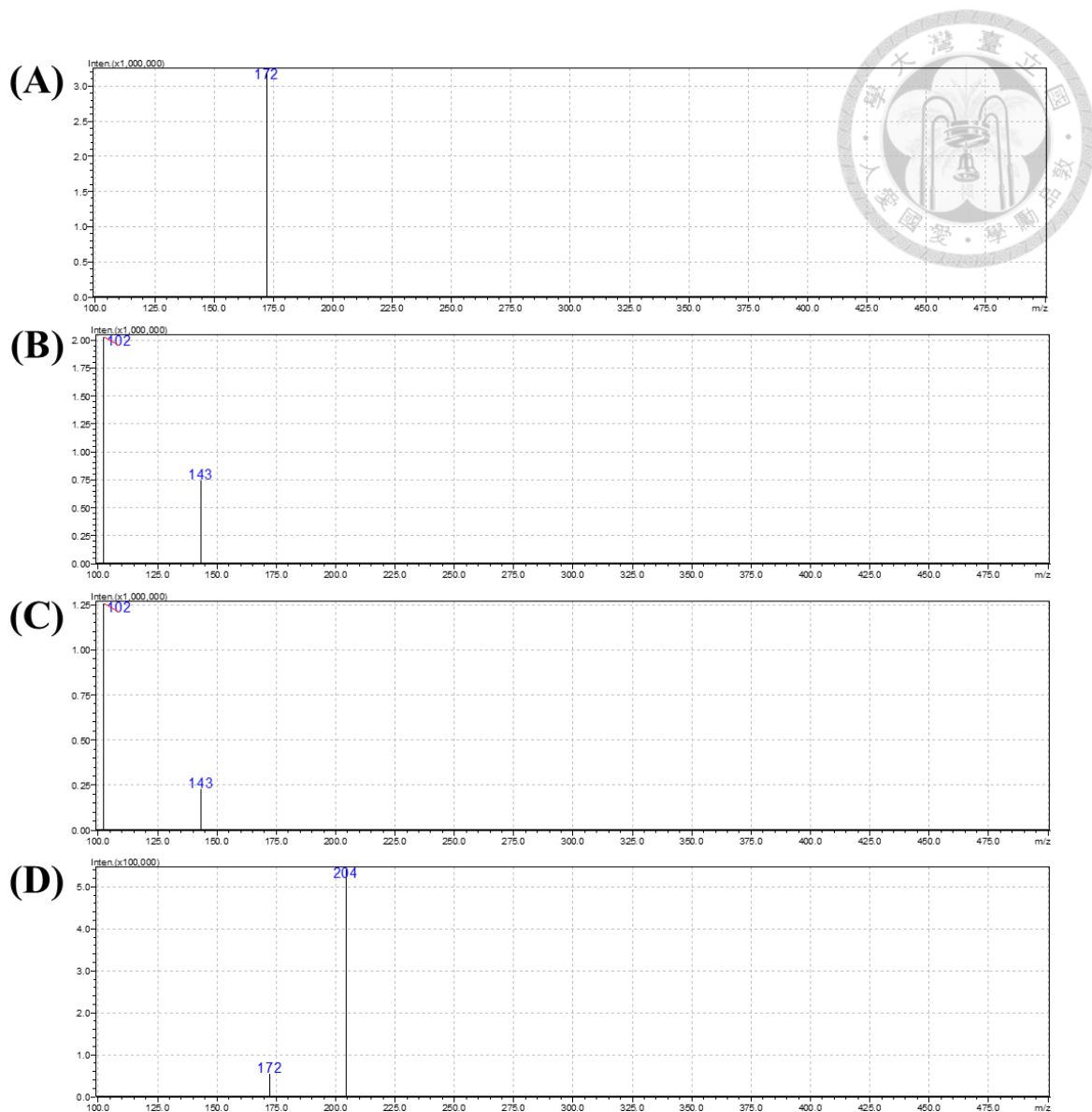


圖 5-7、樣品二次離子之質譜。(A) 至 (D) 分別為樣品中四個波峰 P1、P2、P3 與 P4 之質譜。

Figure 5-7. The MS² spectra of the four potential AHLs in *P. vagans* M17 sample by triple quadrupole. The four potential AHLs corresponding to peaks (A) P1, (B) P2, (C) P3 and (D) P4 of *P. vagans* M17 sample in Figure 5-6. The precursor ion *m/z* ([M+H]⁺) was ranging from 100 to 500 with the product ion at *m/z* ([M+H]⁺) of 102.0.

表 5-3、有無添加 BHL 之 *P. vagans* M17 樣品中基峰絕對強度比較

Table 5-3. Comparison of base peak absolute intensity of *P. vagans* M17 sample without or with addition of BHL standard

Peaks		P1	P2	P3	P4
Base peak absolute intensity ($\times 10,000$)	Without BHL	108.97	45.27	73.04	20.37
	With BHL	159.26	51.23	72.97	23.42
Multiple of base peak absolute intensity of the original sample		1.462	1.132	0.999	1.150

二、*P. vagans* M17 分泌之 BHL 含量隨著培養時間增加而上升

為了解菌株在生長曲線的不同階段分泌的 BHL 濃度是否會改變，實驗根據 *P. vagans* M17 之生長曲線 (附錄 18)，分別於培養菌株之不同時間點，萃取培養基上清液，並以 BHL 標準品製作校準曲線 (附錄 19)，以 HPLC-ESI-MS/MS 定量樣品中含有的 BHL 濃度。結果指出，隨著培養時間增加，BHL 濃度隨之提高，相較於起始的 2.75 ± 1.75 ppm，培養 4、24 與 51 小時後，BHL 濃度約提升為原先的 7、10 以及 14 倍 (表 5-4、附錄 20)。有趣的是，在第 24 小時與第 51 小時，菌株已進入生長停滯期，然 BHL 濃度在第 51 小時仍舊上升。

Jiang 等人 (2015) 將 *P. agglomerans* YS19 培養不同時間後，收集上清液並與報告菌株共同培養。藉由其上清液對於報告菌株中 AHLs 受體 TraR 所誘導的 β -galactosidase 之活化程度，以代表 *P. agglomerans* YS19 在不同生長階段下 AHLs 產量的相對多寡。結果表明 AHLs 產量在對數期階段快速增加，並於第 24 小時至 48 小時的生長停滯期達到高峰，其中第 48 小時為最高值。在第 72 小時，隨著超過半數的細菌死亡，AHLs 產量也減少為約 48 小時的一半。

此外，許多文獻也顯示使用不同的細菌培養基或是在不同的培養時間下收集 AHLs，或是不同的 AHLs 萃取方法，皆可能會影響 AHLs 的定量。例如：有研究將 *P. stewartii* DC283 在 3 L 的 AB-glucose 培養液中培養 48 小時，再萃取其 AHLs (Beck von Bodman & Farrand, 1995)。Aslam 等人 (2023) 將培養 48 小時的 *P. galathea* P1 培養液進行離心與萃取。亦有研究將 *Rhizobium etli* RT1 培養於 500 mL 的 AB minimal mannitol 培養液 48 小時達生長停滯期，隨後萃取 AHLs (Dixit et al., 2017)。Chalupowicz 等人 (2008) 則將 *P. agglomerans* pv. *gypsophilae* 隔夜培養於 10 mL LB 後萃取 AHLs。也有研究將從牛奶中分離出之嗜冷菌株，以 10^4 CFU/mL 的接種量加入 250 mL



LB 培養 20 小時，或培養至達 10^9 CFU/mL 再收集上清液萃取 (Martins et al., 2018)。前人也曾將不同 *P. fluorescens* 菌株以 10^4 CFU/mL 的接種量接種於 600 mL 的不同培養液內，培養 20 小時或達 10^9 CFU/mL 之後收集 (Martins et al., 2014)。Pinto 等人 (2007) 將嗜冷菌株於 100 mL LB 培養 20 小時，隨後萃取培養液中的自誘導劑分子。有文獻曾將 *P. fluorescens* F113 (Laue et al., 2000)、*Erwinia chrysanthemi* 3937 (Nasser et al., 1998)、*Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 (McClean et al., 1997)、*P. ananatis* SK-1 (Morohoshi et al., 2007)、*A. hydrophila* 與 *A. salmonicida* (Swift et al., 1997) 分別培養至生長停滯期後再萃取自誘導劑分子。上述文獻皆培養細菌至少 20 小時、達生長停滯期，或是培養至接近滿菌量 (10^9 CFU/mL)，再收集並萃取上清液以分析 AHLs。根據以上文獻資料可推測，較長的細菌培養時間或是較高的細菌濃度下，細菌所產生的 AHLs 濃度較高或較易於萃取，此情況與本研究的定量結果能夠互相呼應。

後續研究可以在菌株達到生長停滯期之前，縮短取樣時間間隔，以分析 BHL 濃度在初始生長階段的變化。或者是持續培養菌株至大於 51 小時之後收集上清液，以觀察其 BHL 產量於何時會趨近飽和或是下降，以進一步了解 *P. vagans* M17 分泌的 BHL 變化情形。

表 5-4、不同生長階段 *P. vagans* M17 樣品之 BHL 定量

Table 5-4. Quantification of BHL in *P. vagans* M17 sample from different growth stages

Time (hours)	State of growth	OD _{600 nm}	BHL concentration	
			ppm	μM
0	Initial growth	0.13 ± 0.01	2.75 ± 1.75	16.09 ± 10.20
4	Logarithmic phase	0.73 ± 0.04	19.30 ± 3.16	112.73 ± 18.44
24	Stationary phase	1.24 ± 0.06	27.28 ± 2.88	159.37 ± 16.85
51	Late-stationary phase	1.21 ± 0.07	38.45 ± 2.38	224.61 ± 13.91

Sample were incubated at 30 °C, 75 rpm for 0, 4, 24, and 51 hours. Data were displayed as means ± standard deviation of three biological replicates.

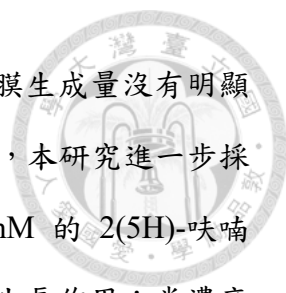
第四節、群體感應對 *P. vagans* M17 生長、生物膜生成與表面移行之影響

在結果與討論的第三節中，已鑑定出 *P. vagans* M17 主要產生之自誘導劑為 BHL (圖 5-5 A B、圖 5-8 A)。根據上述結果以及文獻，本研究選擇兩個呋喃酮化合物作為 *P. vagans* M17 之潛在的 QS 抑制劑。兩呋喃酮化合物皆帶有與 BHL 之內酯環相似的環狀結構，分別為不具側鏈之 2(5H)-呋喃酮，以及帶有溴基側鏈之 C-30 (圖 5-8 B、C)。研究顯示兩者對於不同革蘭氏陰性細菌，如 *P. aeruginosa*、*E. coli*、*A. hydrophila* 與 *A. ferrooxidans* 等，皆具有群體淬滅作用 (Hentzer et al., 2003; Maeda et al., 2012; Manefield et al., 2002; Muñoz-Cázares et al., 2022; Otton et al., 2017; Ponnusamy et al., 2010; Zhao et al., 2015)。為了正、反面驗證菌株的 QS 系統，本研究分別添加 BHL 或呋喃酮化合物與菌株共同培養，觀察外源 AHL 或 QS 抑制劑對於 *P. vagans* M17 生長以及 QS 相關表型的影響。BHL 的添加是以 HPLC-MS/MS 定量的濃度為基礎 (表 5-4)，將近似於生長停滯期後期的濃度 40 ppm，訂為 1 X。兩呋喃酮化合物的添加濃度則是參考上述文獻中使用的劑量。

一、群體感應抑制劑減緩 *P. vagans* M17 之生長

根據圖 5-9，額外添加 3 至 140 ppm (0.075 X 至 3.5 X) 的 BHL 在生長停滯期會略微影響菌株的吸光值，但並沒有顯著差異，顯示 BHL 不會明顯改變 *P. vagans* M17 的生長情況。有文獻從小扁豆 (*Lens culinaris*) 的根瘤中分離出 *R. etli* RT1，經 HPLC-MS 鑑定其乙酸乙酯萃取物中最主要的自誘導劑為 OOHL。額外添加 5 μ M OOHL 於 TSB 後培養 *R. etli* RT1，發現對於菌株在 24 小時內的生長情況未造成顯著影響 (Dixit et al., 2017)。Aslam 等人 (2023) 從壇紫菜中分離出 *P. galathea* P1，以 LC-ESI-MS/MS 從其培養液中鑑定出四種 AHLs。分別於培養基中添加 150 μ M 的四種 AHLs，皆不會改變菌株的生長情況。

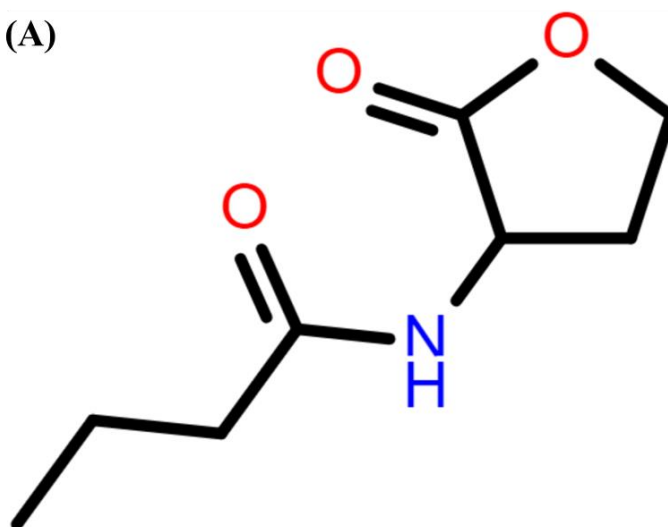
當含有 0.5 mM 至 4 mM 的 2(5H)-呋喃酮時，*P. vagans* M17 的生長情



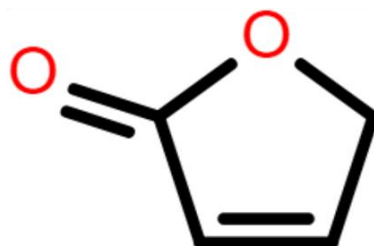
況在生長停滯期不受影響 (附錄 21、附錄 22)，但其生物膜生成量沒有明顯變化，僅在 ≥ 4 mM 時提升 (附錄 23)，與預期不符。因此，本研究進一步採用 8 mM 以上的較高濃度進行探討。於培養基中添加 8 mM 的 2(5H)-呋喃酮與未添加 2(5H)-呋喃酮之控制組相比，有顯著抑制菌株生長作用；當濃度逐步提升至 40 mM，觀察到劑量效應 (圖 5-10、附錄 24)。附錄 25 A 顯示，當 C-30 添加濃度為 0.5 至 3 μ M，對於 *P. vagans* M17 吸光值的影響僅發生於生長初期以及生長停滯期各三個時間點 (附錄 26)。進一步測定 6 至 48 μ M 的濃度範圍，發現當濃度 ≥ 12 μ M 時幾乎在測定全程皆會影響菌株生長。相較於控制組，12 與 24 μ M 的濃度使菌株的吸光值在生長停滯期有先增後減的情況，在 48 μ M 的濃度下顯著抑制菌株生長 (附錄 25 B、附錄 26)。

研究顯示，添加 C-30 共同培養會降低 *P. aeruginosa* PA14 之吸光值，在第 48 小時約為控制組的五分之一 (Maeda et al., 2012)。有文獻曾測試一系列天然或合成的呋喃酮化合物對 *Staphylococcus* spp. 生長之影響，發現當添加濃度由 1 μ g/mL 增加至 10 μ g/mL，對於菌株生長的抑制提升 10 % 至 80 % 不等 (Kjelleberg et al., 2006)。另一方面，關於 2(5H)-呋喃酮與 C-30 抑制生長的可能原因包含：不同側鏈長度的噻吩酮 (thiophenone) 化合物之群體淬滅效果相仿，但毒性不同 (Defoirdt et al., 2012)；先前研究也曾表明具有 3-烷基側鏈的溴化呋喃酮化合物對野生型 *Salmonella enterica* Typhimurium 的最小抑制濃度高於無側鏈者，但不論側鏈有無皆能抑制生物膜生成 (Janssens et al., 2008)。Defoirdt 等人 (2012) 推測噻吩酮與溴化呋喃酮化合物因具高度反應性，可能透過與必須蛋白質的親核性胺基酸結合，使蛋白質失活導致毒性；側鏈的存在對於這類分子接近親核性胺基酸造成立體阻礙，因而減低其毒性。

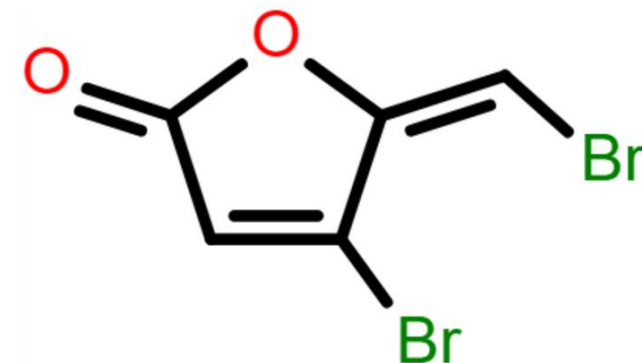
(A)



(B)



(C)



Created in ChemSpider

圖 5-8、群體感應相關化合物之結構。(A) 至 (C) 分別為 BHL、2(5H)-呋喃酮與 C-30 之結構圖。

Figure 5-8. Structures of QS-related compounds. Structures of (A) BHL, (B) 2(5H)-furanone, and (C) C-30 were created in ChemSpider (<https://www.chemspider.com/>).

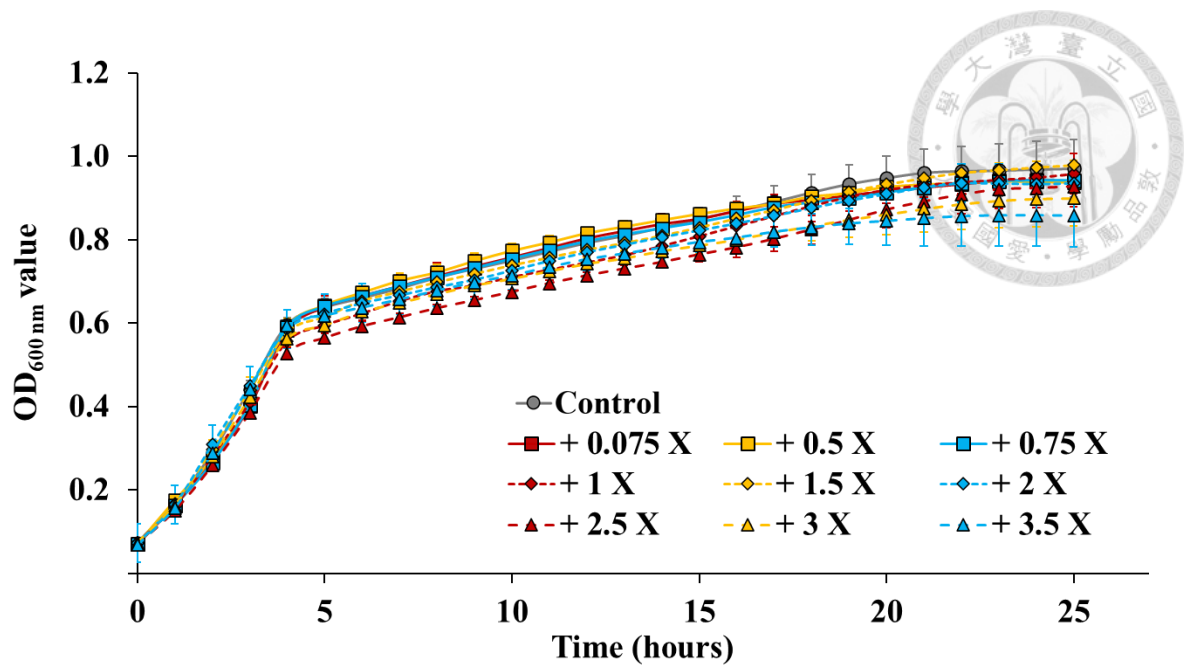


圖 5-9、群體感應自誘導劑對 *P. vagans* M17 生長之影響。

Figure 5-9. Effect of BHL on growth of *P. vagans* M17. Growth patterns of *P. vagans* M17 in TSB containing supplemental BHL were observed. Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. For BHL concentration, 0.075 X represented 3 ppm (0.018 mM) and "+" represented the exogenous addition of BHL.

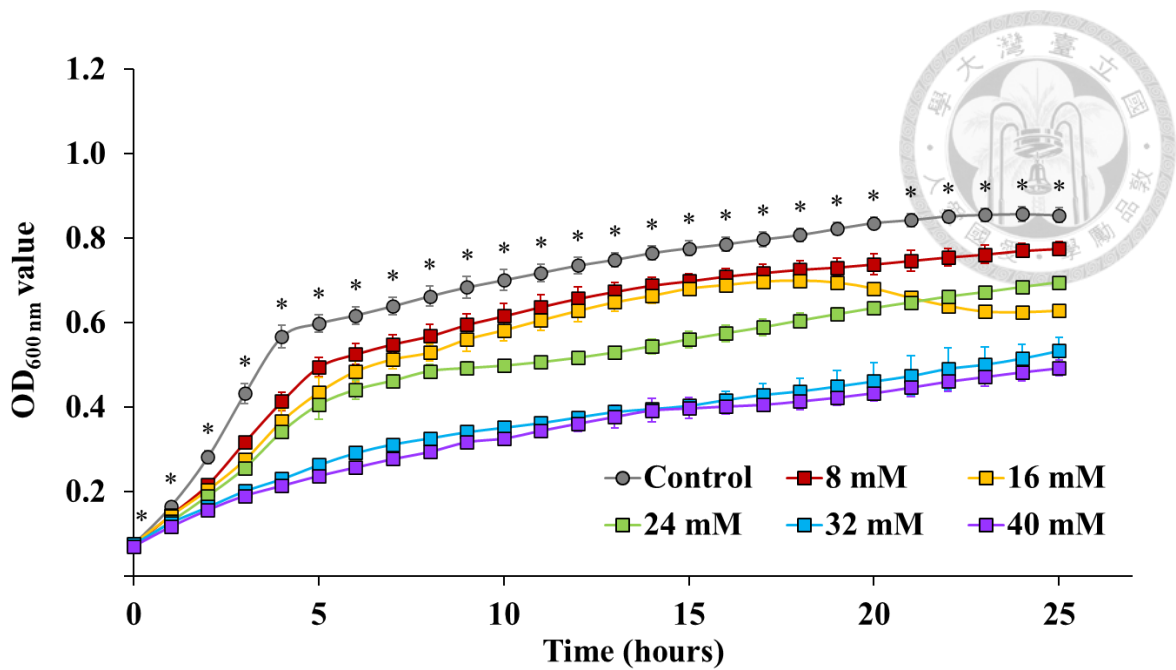


圖 5-10、群體感應抑制劑 2(5H)-呋喃酮對 *P. vagans* M17 生長之影響。

Figure 5-10. Effect of QS inhibitor 2(5H)-furanone on growth of *P. vagans* M17. Growth patterns of *P. vagans* M17 in TSB containing supplemental 2(5H)-furanone were observed. Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. At each time point, the asterisks were used to denote statistical significances ($p < 0.05$) between the control group and any of the experimental groups.

二、*P. vagans* M17 之生物膜生成受到群體感應調控

隨著 BHL 添加濃度提高，*P. vagans* M17 的生物膜產量隨之提升 (圖 5-11)。當 BHL 添加至 60 ppm (1.5 X) 時，與控制組相比提升了約 20 % 的生物膜生成。達 80 ppm (2 X) 以上，更進一步促進其產量，並在 120 ppm (3 X) 達到最高值，較控制組增加 45 %。添加 BHL 使浮游微生物的吸光值下降，但不同濃度之間幾乎沒有差異。此結果與預期一致，額外添加 BHL 會促進 *P. vagans* M17 在 24 小時的生物膜生成，BHL 應是藉由活化 QS 以調控生物膜產量。有研究從 *P. galathea* P1 培養液中鑑定出四種 AHLs，並額外添加四者與菌株共同培養，在 24 小時之後觀察生物膜生成情形。結果顯示，分別添加 BHL 與 *N*-octanoyl-L-homoserine lactone (OHL) 時的生物膜產量與未添加者相比顯著提升，且 OHL 的促進能力較佳。再來測試添加不同 OHL 濃度時的生物膜變化情況。結果表明當濃度由 50 μ M 提升至 200 μ M，生物膜產量逐步提升且皆具顯著差異，觀察到劑量效應的存在。該文獻接著添加 200 μ M OHL 培養生物膜，在 24 小時後以顯微鏡觀察。作者發現，添加 OHL 會產生較密集且胞外多醣基質較厚的生物膜，同時使其表面更平滑 (Aslam et al., 2023)。也有文獻指出，在 TSB 中分別額外添加 0.05 μ M、0.5 μ M 與 5 μ M OOHl，*R. etli* RT1 之生物膜產量隨之增加，並在 0.5 μ M 與 5 μ M 時增加為未添加者的 3 至 5 倍 (Dixit et al., 2017)。

圖 5-12 顯示，當 2(5H)-呋喃酮添加濃度為 8 mM 與 16 mM 時，會促進生物膜生成；至 24 mM 則與未添加的控制組無差異；達 32 mM 以上，對於生物膜產量方有抑制效果。與控制組相比，含有 32 mM 的 2(5H)-呋喃酮之生物膜產量下降 45 %。此外，添加 2(5H)-呋喃酮亦使浮游微生物的吸光值顯著低於控制組，且隨著劑量上升至 32 mM，實驗組的吸光值亦隨之下降。附錄 27A 顯示，當添加 0.5 至 3 μ M 的 C-30，生物膜產量隨著 C-30 濃度增加而提升，於 2 μ M 時具有顯著差異；浮游微生物的吸光值逐步下降。當

C-30 濃度提高為 6 至 48 μM ，發現會顯著促進生物膜生成，與預期不符 (附錄 27 B)。

本研究發現較低濃度的 2(5H)-呋喃酮與 C-30 並不改變或是會提升 *P. vagans* M17 之生物膜產量。實驗在接種生物膜時，TSB 中即含有兩呋喃酮化合物，且濃度固定。而菌株本身隨著培養時間增加持續分泌 BHL，其濃度逐漸提高。BHL 與呋喃酮化合物會競爭對於 PagR 的結合，且 PagR 與 BHL 的結合效果可能較佳。推測當兩呋喃酮化合物濃度較低時，無法與濃度較高或較能穩定結合的 BHL 相匹敵，導致兩者較難結合 PagR，故無法展現對於生物膜的抑制作用。此外，關於呋喃酮造成細菌 QS 活性或相關表型增加的情況，文獻曾有相似觀察或提出以下解釋，包含：一、有研究指出在不影響菌株生長的情形下，當添加 200 μM 的溴化呋喃酮 BF15 於野生型 *E. coli* RP437 與 *P. aeruginosa* PAO1 時，幾乎沒有抗生物膜活性；當增加至 300 μM 時，能夠減少 *E. coli* RP437 約 34 % 的生物膜生成。同時，該文獻提及另外兩個溴化呋喃酮 BF4 與 BF10，在不抑制生長的最高濃度下，對於 *E. coli* RP437 與 *P. aeruginosa* PAO1 的生物膜生成皆無抑制效果。再者，添加 BF8 與 BF15 皆能夠減少帶有 *lasI* 啟動子區域與綠螢光蛋白之質體的 *P. aeruginosa* PAO1 展現的螢光訊號，且隨著濃度由 100 μM 增加至 200 μM 而隨之下降，顯示 BF8 與 BF15 皆為 LasR 的拮抗劑。然對 *rhl* 系統卻相反，螢光訊號隨著兩化合物的濃度提升而增加。作者認為受體與呋喃酮間較低的結合常數會導致生物膜被抑制的程度較低；針對溴化呋喃酮在 *rhl* 系統中的促進作用，他們指出結合後的效果可能非拮抗性 (Shetye et al., 2013)。二、有研究合成出多種呋喃酮衍生物，並與自誘導劑 OdDHL 同時添加，結果表明僅有側鏈十個碳以上或具有苯基的呋喃酮能夠抑制報告菌株 *P. aeruginosa* QSI2 的 *las* 系統，顯示呋喃酮結構對於同一個 QS 系統抑制效果的影響。此外，該研究也藉由單獨添加呋喃酮與 *P. aeruginosa* QSI2 培養，測試不同呋喃酮在沒有



AHLs 的情況下結合 LasR 的效果。作者發現同樣僅有側鏈較長或具有苯基的呋喃酮才有顯著效果，並推測與菌株本身 AHLs 結構較相似的呋喃酮才具有結合能力 (Brackman et al., 2012)。三、Liu 等人 (2012) 合成出一系列呋喃酮衍生物，觀察到其中數個化合物能明顯減少臨床分離出的 *P. aeruginosa* PAOA 之生物膜，並透過分子嵌合 (molecular docking) 實驗將其中一者的效果歸因於其與 LasR 形成的氫鍵所提升的穩定性，以及該化合物苯環的親脂性促進了兩者間的親和力 (affinity)。四、有文獻添加 10 μ M 的 C-30 至 *P. aeruginosa* PAO1 菌株培養液內，再以基因體微陣列 (microarray) 觀察基因表現變化。結果顯示，編碼多種藥物外排運輸蛋白 (multidrug efflux transporter) 的 *mexEF* 表現量增加 (Hentzer et al., 2003)。MexR 為 MexAB-OprM 外排幫浦的負向調節子，研究表明 *mexR* 突變的 *P. aeruginosa* 對於 C-30 的抑制效果較不敏感，且 *mexR* 突變株吸收的 C-30 在 15 小時後外排 20%，但在野生型菌株則無觀察到外排現象。作者推測 *mexR* 失活導致 *P. aeruginosa* 增加 C-30 的排出，減少其群體淬滅效果 (Maeda et al., 2012)。概括上述，2(5H)-呋喃酮與 C-30 在低濃度下促進 *P. vagans* M17 生物膜生成，推測潛在原因包含：一、兩呋喃酮與 PagR 之結構影響結合效果與親和性，進一步影響抑制生物膜效果；二、呋喃酮與 PagR 結合後的效果非預期的拮抗作用；三、呋喃酮僅干擾菌株的特定 QS 系統或相應的 AHLs，其他的系統或 AHLs 仍在作用；四、外排幫浦的相關基因受到活化，兩呋喃酮遭排出，致群體淬滅效果減低等。

本研究在結果與討論的第三節中發現，菌株在 24 小時所產生的 BHL 濃度為 $159.37 \pm 16.85 \mu\text{M}$ 。當添加 2(5H)-呋喃酮時，發現濃度需達 32 mM 才能顯著減少 24 小時的生物膜，亦即需菌株自身 BHL 產量約 200 倍的濃度，才具抑制效果。因此若繼續提升 C-30 的濃度至約菌株 BHL 產量的 200 倍，可望觀察到生物膜減少。但本研究考量 C-30 溶解度之上限，後續選擇使

用已觀察到對 *P. vagans* M17 生物膜具抑制效果的 2(5H)-呋喃酮，探討其對生物膜週期變化與表面移行之影響。

為了探討生物膜動態系統的變化，本研究選擇能夠使 *P. vagans* M17 的 24 小時生物膜產量達最大值之 120 ppm (3 X) BHL (圖 5-11)，以及能夠明顯減少生物膜生成的 32 mM 2(5H)-呋喃酮 (圖 5-12)，觀察兩化合物對於生物膜週期循環之影響。

圖 5-13 顯示，添加 BHL 組別的生物膜週期變化與控制組相似，在 24 小時內逐步增加，並於第 24 小時達高峰；接著產量降低代表生物膜分散，完成第一個循環 (附錄 28)。加入 2(5H)-呋喃酮使生物膜產量與浮游微生物的吸光值幾乎在所有時間點皆明顯低於另外兩組 (附錄 29)，其生物膜循環的最高值發生於第 24 或 48 小時，隨後產量同樣開始下降 (附錄 28)。在第 48 至 96 小時，所有組別的生物膜產量與浮游微生物的吸光值持續降低。為了觀察浮游微生物中，具有活性的微生物數量變化，將未形成生物膜的菌液取出塗抹於 PCA 培養後計數。結果表明，浮游微生物的濃度落在 10^5 至 10^6 CFU/ μ L，且隨著時間增加逐步減少，與吸光值的變化相符 (附錄 30)。2(5H)-呋喃酮組別中，浮游微生物的濃度在第 48 至 96 小時，皆低於控制組與 BHL 組，顯示 32 mM 的 2(5H)-呋喃酮對生物膜以及浮游微生物的生長抑制作用 (附錄 30)。控制組與 BHL 組中，第二個生物膜循環的最高值發生於第 120 小時，之後產量較無明顯增加 (附錄 28)。此週期變化與先前本實驗室觀察到的結果相近 (鄧婷云, 2022)。此外，相較於控制組，添加 BHL 之生物膜產量於第 5、24 以及第 192 小時皆顯著提升 (附錄 29)。加入 2(5H)-呋喃酮培養 48 小時後，並無觀察到第二個生物膜循環。

文獻表示，當 C-30 或 5-(dibromomethylene)-2(5H)-furanone 等溴化呋喃酮化合物，在培養基中的濃度為 10 μ M 時，明顯減少 *P. aeruginosa* 的生物膜生成量，並使形成的生物膜對抗生素與洗滌劑都更為敏感 (Hentzer et al.,



2003; Muñoz-Cázares et al., 2022)。有研究發現隨著 (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone 添加濃度由 10 $\mu\text{g/mL}$ 增加至 40 $\mu\text{g/mL}$ ，24 小時內的 *B. subtilis* 生長速率被抑制 28 % 至 100 %，且遲滯期 (lag phase) 增長。此外，在 40 $\mu\text{g/mL}$ 的濃度下，生物膜的厚度與生物膜中的活性微生物百分比，分別減少 25 % 與 63 % (Ren et al., 2002)。作者先前的研究顯示，加入 5 $\mu\text{g/mL}$ 或 10 $\mu\text{g/mL}$ 該呋喃酮，皆能夠分別抑制報告菌株中 I 型自誘導劑以及 II 型自誘導劑的 QS 誘導之生物發光，且與控制組相比，抑制程度皆達數百倍以上 (Ren et al., 2001)。因此 Ren 等人 (2002) 認為該呋喃酮可能透過抑制生長與阻礙 QS，減少 *B. subtilis* 生物膜形成，但目前尚無法區分這兩種作用的影響。

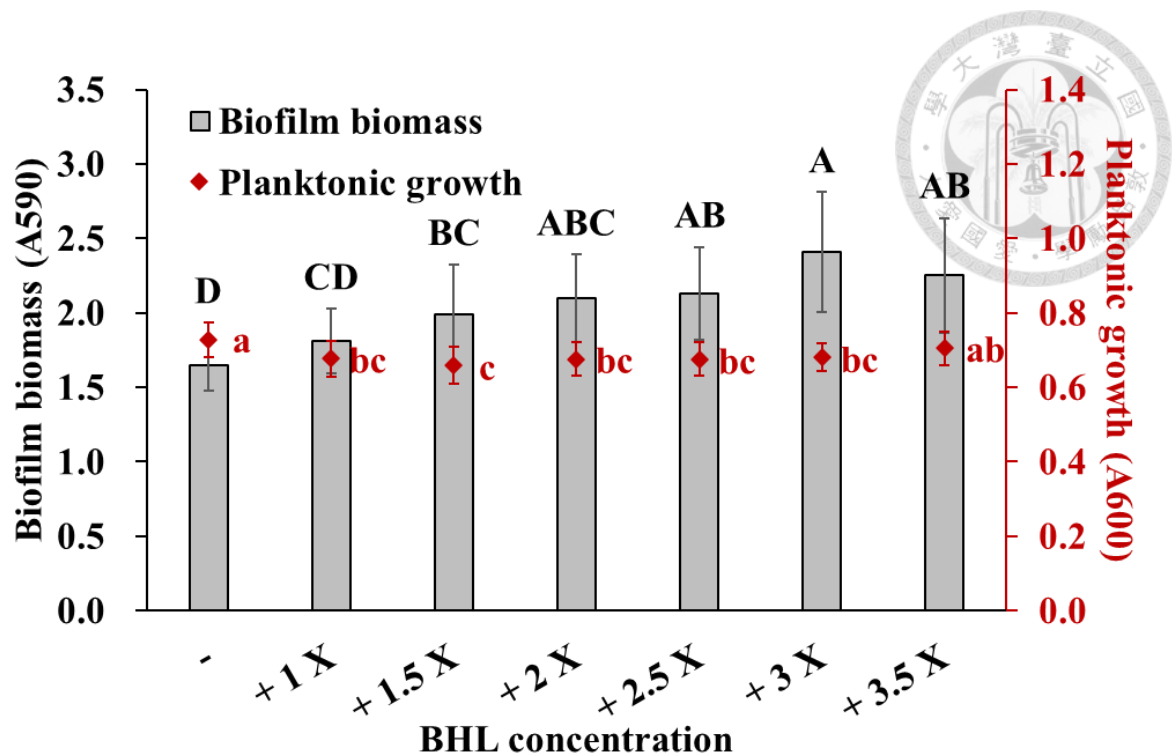


圖 5-11、群體感應自誘導劑對 *P. vagans* M17 生物膜生成與浮游微生物之影響。

BHL 濃度的 1 X 對應到 40 ppm (0.234 mM)。

Figure 5-11. Effect of BHL on biofilm formation and planktonic growth of *P. vagans* M17. Formation of biofilm and planktonic cell growth of *P. vagans* M17 in TSB containing supplemental BHL were analyzed. Each group underwent incubation for 24 hours at 30 °C. For BHL concentration, 1 X represented 40 ppm (0.234 mM) and “+” represented the exogenous addition of BHL. Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey’s multiple range test. Among different BHL concentrations, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).

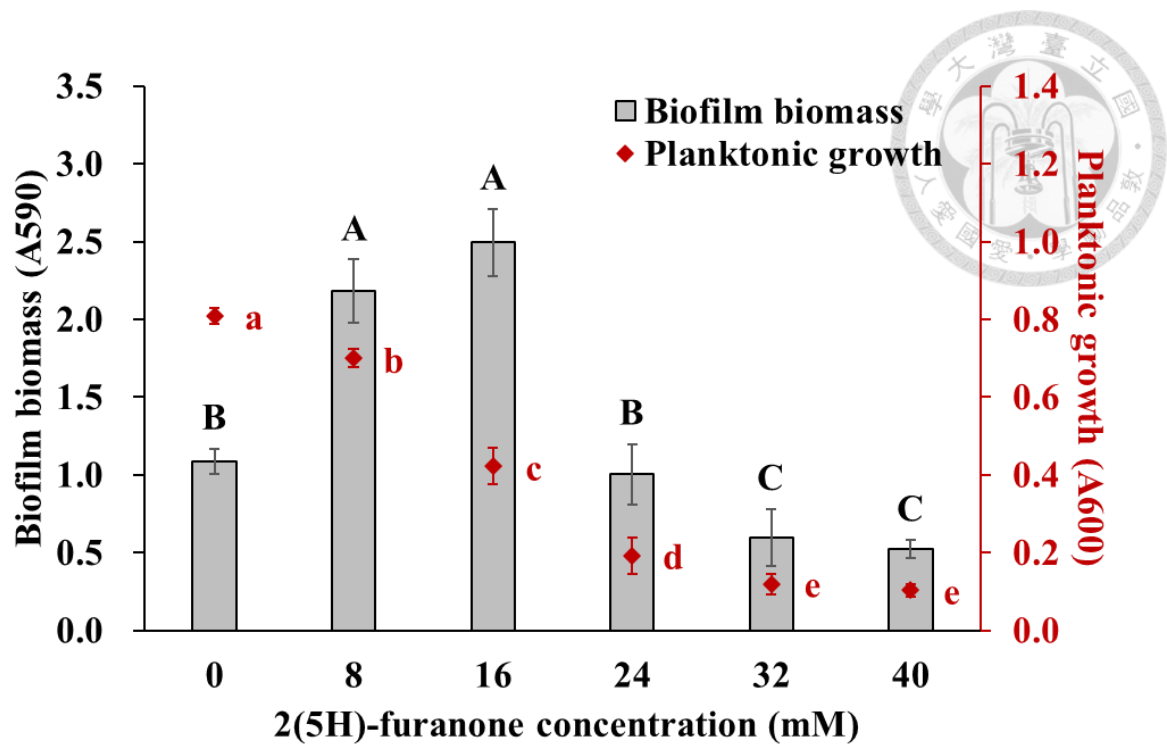


圖 5-12、群體感應抑制劑 2(5H)-呋喃酮對 *P. vagans* M17 生物膜生成與浮游微生物之影響。

Figure 5-12. Effect of QS inhibitor 2(5H)-furanone on biofilm formation and planktonic growth of *P. vagans* M17. Formation of biofilm and planktonic cell growth of *P. vagans* M17 in TSB containing supplemental 2(5H)-furanone were analyzed. Each group underwent incubation for 24 hours at 30 °C. Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. Among different 2(5H)-furanone concentrations, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).

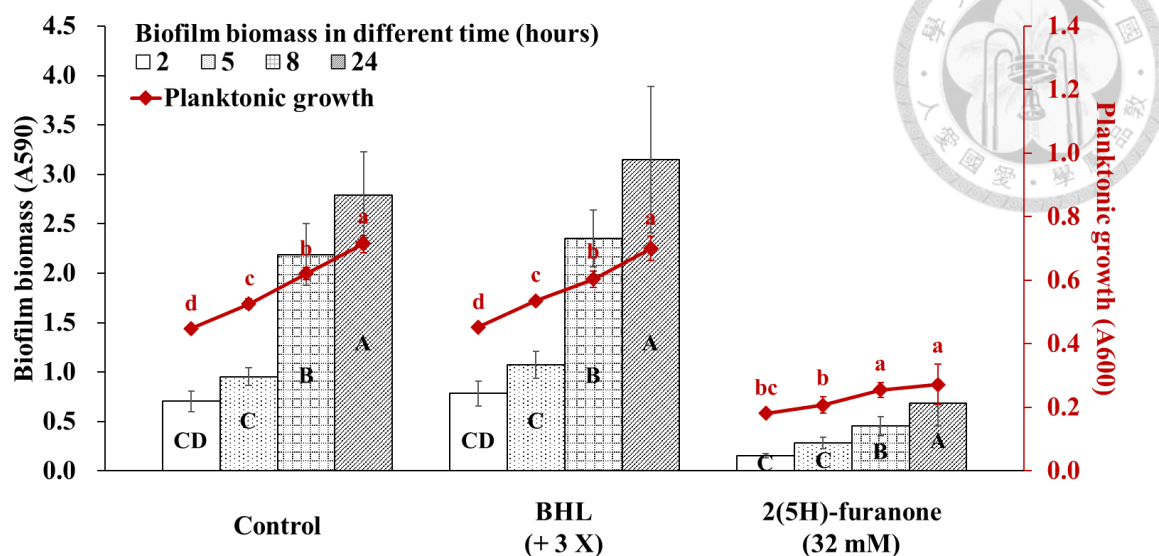


圖 5-13、群體感應相關化合物對 *P. vagans* M17 生物膜生成之影響。BHL 濃度的 3 X 對應到 120 ppm (0.701 mM)。

Figure 5-13. Effect of QS-related compounds on biofilm formation of *P. vagans* M17. Biofilm formation of *P. vagans* M17 in TSB containing supplemental BHL or 2(5H)-furanone was analyzed. Different groups were incubated at 30 °C for 2, 5, 8, and 24 hours. For BHL concentration, 3 X represented 120 ppm (0.701 mM) and “+” represented the exogenous addition of BHL. Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey’s multiple range test. In each treatment, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).



三、群體感應對 *P. vagans* M17 表面移行之影響

本實驗室先前發現 5 mM L-蘋果酸可以明顯增加 *P. vagans* M17 在含有 5 mM 葡萄糖的 M9 培養基之表面移行能力 (李奕慧, 2023)。因本研究皆使用 TSB 培養菌株, 為了解不同培養基是否會影響不同化合物對於菌株表面移行的調控效果, 本研究首先觀察在含有 5 mM 葡萄糖的 TSB 培養基或 M9 培養基中, L-蘋果酸、BHL 與 2(5H)-呋喃酮對於 *P. vagans* M17 表面移行的影響。

根據圖 5-14 與附錄 31, 在含有 5 mM 葡萄糖的 TSB 培養基中, 分別添加 5 mM L-蘋果酸或 120 ppm (3 X) 的 BHL, 對於菌株的表面移行面積皆無影響。在含有葡萄糖的 M9 培養基中, 分別額外添加 L-蘋果酸 或 BHL, 皆可以顯著增加表面移行能力。添加 2(5H)-呋喃酮可以顯著減少 *P. vagans* M17 在含有葡萄糖的 TSB 培養基之表面移行面積; 在含有葡萄糖與 2(5H)-呋喃酮的 M9 培養基中, 即使培養 72 小時也無法觀察到菌株的表面移行。圖 5-14 也顯示, 額外添加相同濃度之營養成分或 QS 相關化合物, 對於表面移行的影響, 在以 M9 為基礎之培養基較為明顯。此結果表明培養基成分會影響 *P. vagans* M17 的表面移行能力, 並干擾 BHL 與 2(5H)-呋喃酮對於菌株表面移行的調控效果。

Déziel 等人 (2003) 發現, 相較於硝酸鈉, *P. aeruginosa* PG201 利用氯化銨生長的情況較佳, 但在硝酸鈉存在時其表面移行較強, 鼠李糖脂合成酶基因 *rhlA* 的表現也較高。此外, 培養基中鐵的增加會導致菌株表面移行與 *rhlA* 表現減少。作者指出營養條件較不利時, 菌株可能藉由促進表面移行以尋找營養較豐富的生態區位。此外, 有文獻觀察到野生型 *P. aeruginosa* ATCC 15692 在以琥珀酸或麩胺酸為單獨碳源的情形下, 表面移行能力良好; 在利用葡萄糖為單獨碳源時, 表面移行較弱。 $\Delta lasI \Delta rhII$ 突變株與 $\Delta lasR \Delta rhIR$ 突變株在以琥珀酸為單獨碳源時, 幾乎完全缺乏表面移行能力; 然在以麩胺酸或葡萄糖為單

獨碳源時，表面移行能力與野生型相當。作者推測 QS 調節的鼠李醣脂，在琥珀酸上進行表面移行時為必要的，但在麩胺酸則否。此結果顯示 QS 對於表面移行的調控具有營養條件性 (Shrout et al., 2006)。另一方面，先前研究也曾探討額外添加 *P. agglomerans* YS19 的自誘導劑 OOHl 對於表面移行的影響，並選用 LB 培養基進行觀察。結果表示隨著 OOHl 添加濃度由 1 μ M 增加至 50 μ M，*P. agglomerans* YS19 的表面移行能力也隨之提升 (Jiang et al., 2015)。

本研究接著觀察不同濃度 BHL 以及 2(5H)-呋喃酮，對於 *P. vagans* M17 在 TSB 培養基表面移行的影響。從 40 ppm (1 X) 至 120 ppm (3 X) 的 BHL 皆無法提升 *P. vagans* M17 在 TSB 培養基的表面移行面積，添加 5 mM L-蘋果酸同樣無法觀察到促進效果 (圖 5-15、附錄 32)。但是添加 5 mM L-蘋果酸或是濃度不同的 BHL 皆可使菌落型態在培養 24 小時或者是 48 小時之後有所變化。與僅在 TSB 培養基表面生長的控制組相比，經過 24 小時的培養之後，分別添加 5 mM L-蘋果酸與 BHL 皆使菌落最外圈的環狀物質明顯增厚，推測為胞外多醣或是界面活性劑的累積所致 (圖 5-16 A)。培養 48 小時之後，添加 5 mM L-蘋果酸組別的菌落外圈有不平整的波紋產生，添加 BHL 組別的菌落之同心圓層次明顯 (圖 5-16 B)。16、24 或 32 mM 的 2(5H)-呋喃酮皆能夠顯著抑制菌株在 TSB 培養基的表面移行能力，且展現劑量效應 (圖 5-15)。添加 2(5H)-呋喃酮培養 24 小時之後，*P. vagans* M17 菌落顏色偏白、側面觀察的厚度較薄 (圖 5-16 A)；培養 48 小時後，添加 16 mM 2(5H)-呋喃酮的組別，在初始接菌點有明顯聚合物，然添加 24 mM 與 32 mM 的組別，菌落中央皆均勻平坦無聚集 (圖 5-16 B)。

Muñoz-Cázares 等人 (2022) 發現將不影響 *P. aeruginosa* 生長的 50 μ M C-30 加入 M8 培養基中，不同菌株的表面移行直徑皆顯著降低。此外有研究表示，(5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone 以劑量依賴的

方式減少 *B. subtilis* 在 LB 培養基表面移行的速率； $52\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的濃度會完全抑制菌株在 40 小時的表面移行，但其生長在 26 小時後有緩慢增加 (Ren et al., 2002)。顯示該呋喃酮除了抑制生長之外，應也藉由群體淬滅減少菌株的表面移行。

由上述結果可知，額外添加 BHL 於 TSB 培養基，不會影響 *P. vagans* M17 之生長與表面移行能力，但能夠促進其生物膜生成。表示在營養較富足的環境下，額外添加 BHL 可能會透過活化 QS 以增加生物膜產量，卻不影響菌株表面移行。然而，在含有 5 mM 葡萄糖的 M9 培養基內加入相同濃度的 BHL，能夠增加表面移行面積。這代表在養分較匱乏時，添加 BHL 可能藉由活化 QS 以增加菌株表面移行能力。此外，當 TSB 培養基中含有 32 mM 2(5H)-呋喃酮，會抑制 *P. vagans* M17 之生長、生物膜產生與表面移行。在含有 5 mM 葡萄糖的 M9 培養基內加入相同濃度的 2(5H)-呋喃酮，表面移行被完全抑制。無論在養分較充足或缺乏的環境下，額外添加 2(5H)-呋喃酮可能皆藉由抑制生長與阻礙 QS，降低 *P. vagans* M17 的生物膜生成與表面移行能力。這些結果顯示，QS 會調控菌株的生物膜生成，且 QS 對於表面移行的影響在養分匱乏的環境較明顯。未來研究可以繼續探究不同培養環境下，*P. vagans* M17 的 QS 調控相關表型之能力變化，以供作後續於不同基質的食品進行相關研究或應用時，能夠對照或參考之依據。

此外，在結果與討論中第三節的第一點，發現 *P. vagans* M17 除了分泌 BHL，也會產生少量 HHL。實驗並未探討額外添加 HHL 對於菌株表型的影響，但 HHL 可能對於特定表型的調節具有重要功能，或其與 BHL 共同作用後的效果更為明顯。後續研究可以進一步觀察添加 HHL 對於 *P. vagans* M17 的影響，以更完整了解其 QS 系統的作用與影響。

接著，本研究進一步分析分別添加 BHL 或 2(5H)-呋喃酮於 TSB 時，*P. vagans* M17 的基因表現變化，觀察是否能夠驗證並協助解釋表型的改變。

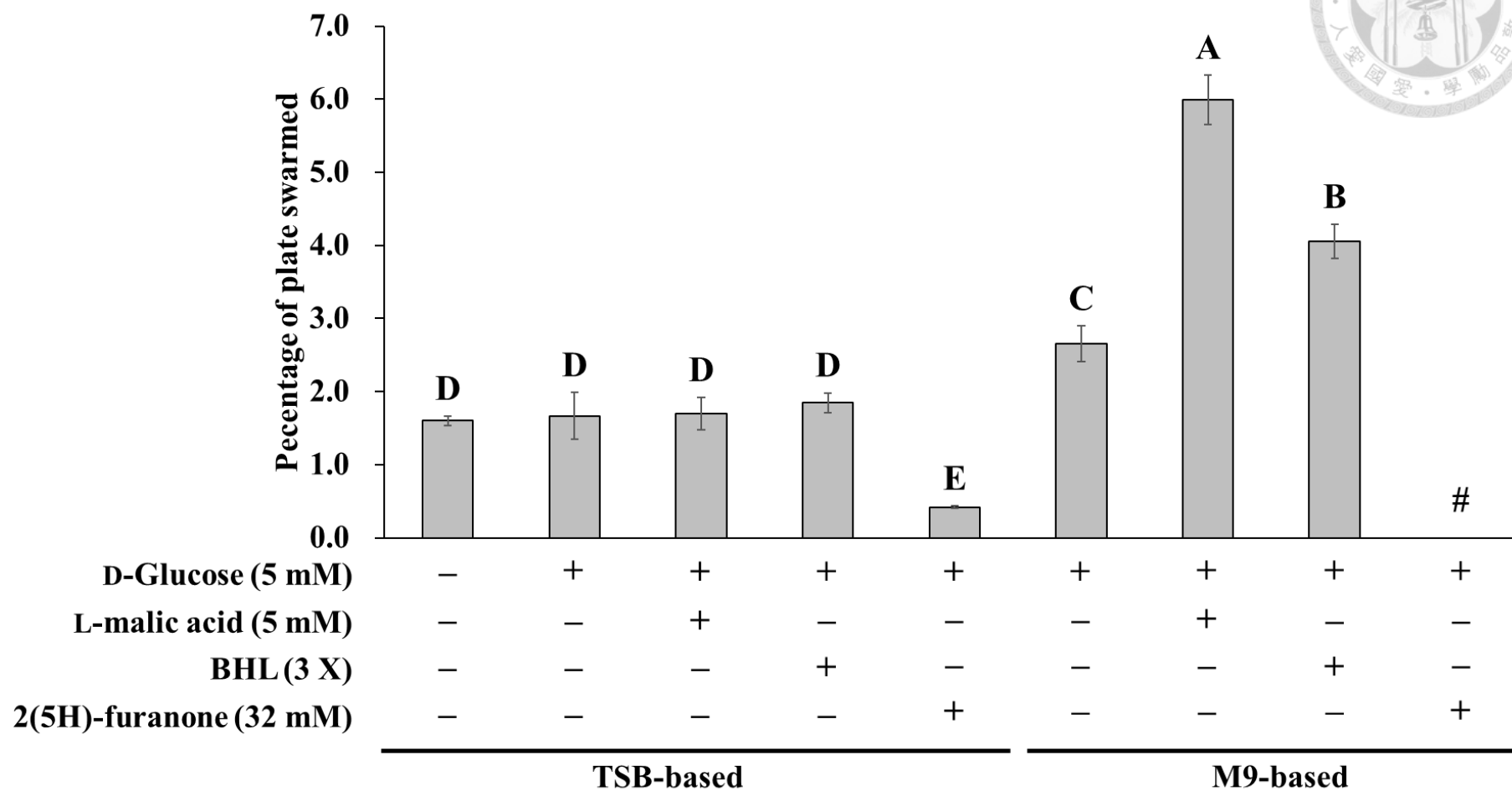


圖 5-14、不同化合物對 *P. vagans* M17 表面移行之影響。培養基中添加的化合物列於圖下方，並以「+」或「-」表示培養基中是否含有該化合物。BHL 濃度的 3 X 對應到 120 ppm (0.701 mM)。「#」代表未觀察到表面移行現象。

Figure 5-14. Effect of different compounds on swarming motility of *P. vagans* M17. Swarming motility of *P. vagans* M17 at TSB or M9 containing supplemental D-glucose, L-malic acid, BHL or 2(5H)-furanone was calculated. Each group underwent incubation for 24 hours at 30 °C. The compounds and concentrations were shown below the bar chart, and “+” or “-” represented whether the medium contained the compound or not. For BHL concentration, 3 X represented 120 ppm (0.701 mM). “#” represented that the swarming phenomenon could not be observed. Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey’s multiple range test. Among different treatment, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).

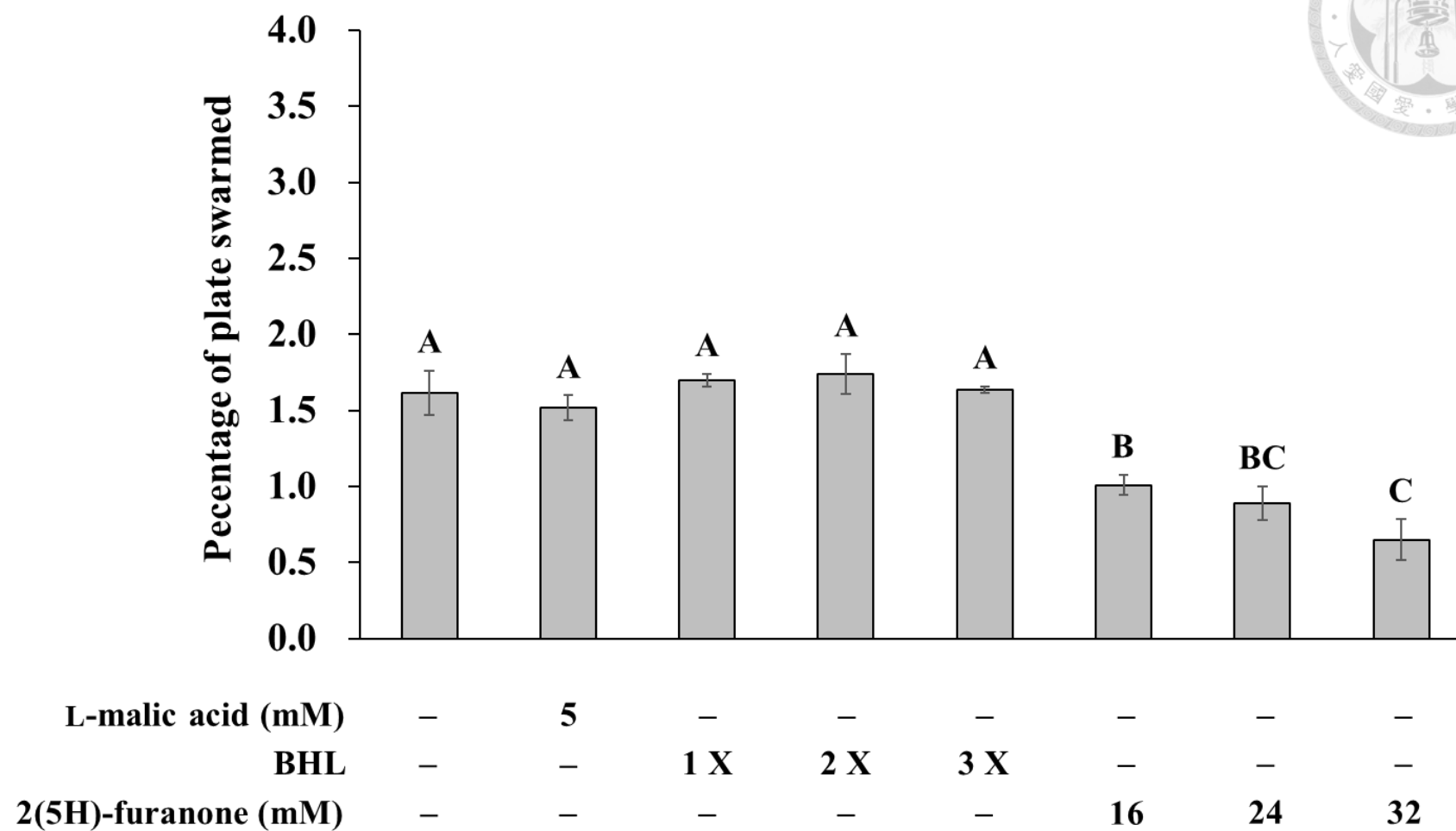
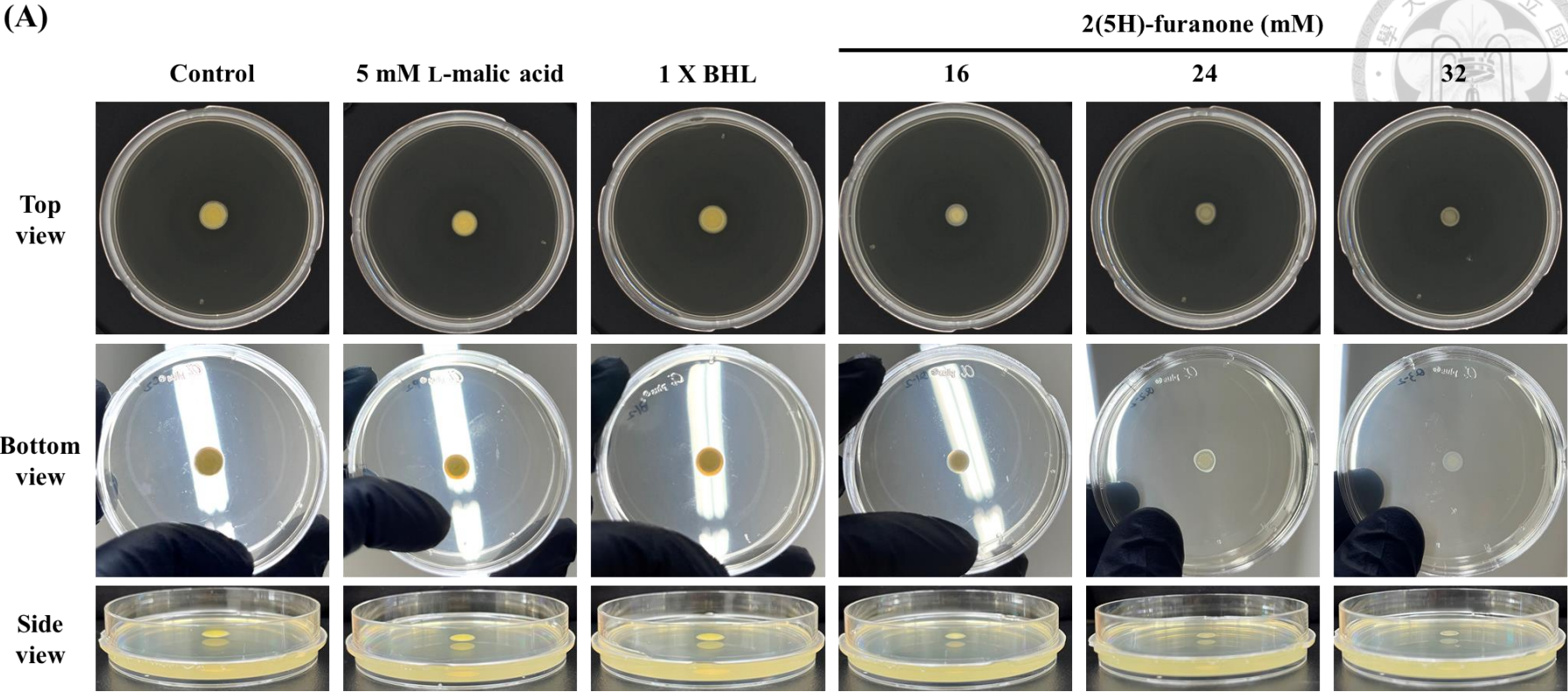


圖 5-15、群體感應相關化合物的濃度對 *P. vagans* M17 表面移行之影響。培養基中添加的化合物與濃度列於圖下方，並以「-」表示培養基中不含有該化合物。BHL 濃度的 1 X 對應到 40 ppm (0.234 mM)。

Figure 5-15. Effect of concentration of QS-related compounds on swarming motility of *P. vagans* M17. Swarming motility of *P. vagans* M17 at TSB containing supplemental L-malic acid, BHL, or 2(5H)-furanone was calculated. Each group underwent incubation for 24 hours at 30 °C. The compounds and concentrations were shown below the bar chart, and “-” represented that the medium did not contain the compound. For BHL concentration, 1 X represented 40 ppm (0.234 mM). Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey’s multiple range test. Among different treatment, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).

(A)



(B)

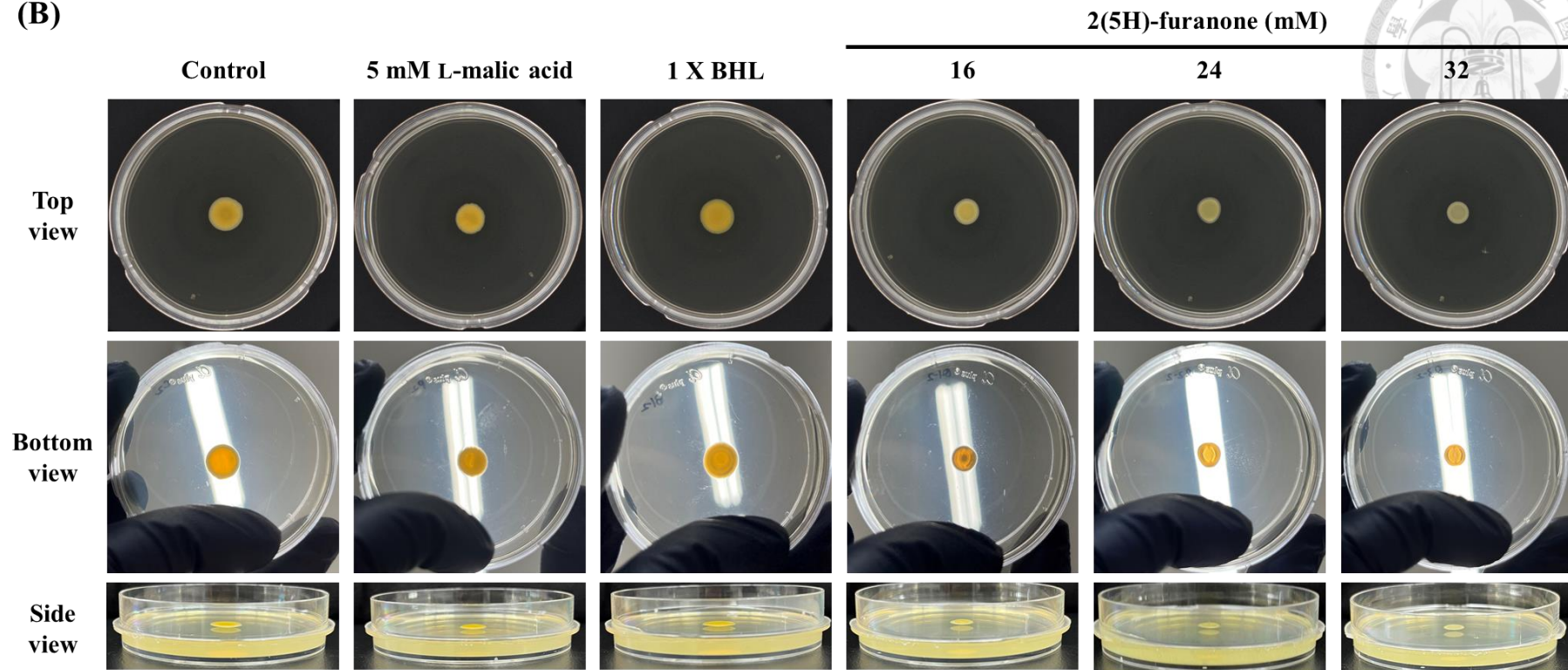


圖 5-16、群體感應相關化合物對 *P. vagans* M17 表面移行型態之影響。(A) 為培養 24 小時之型態。(B) 為培養 48 小時之型態。

Figure 5-16. Effect of QS-related compounds on swarming morphology of *P. vagans* M17. Swarming morphology of *P. vagans* M17 at TSB medium supplemented with L-malic acid, BHL, or 2(5H)-furanone after incubation at 30 °C for (A) 24 hours, or (B) 48 hours was observed.

The top view was captured utilizing ProtoCOL3. The bottom view was obtained under the same lighting conditions.



第五節、群體感應對 *P. vagans* M17 基因表現之影響

實驗未成功刪除 *P. vagans* M17 的 QS 基因 *pagI* 與 *pagR*，目前對於兩基因的了解甚少。此外，BHL 與 2(5H)-呋喃酮對於 *P. vagans* M17 生物膜生成及表面移行的影響與預期有落差，且兩化合物對於菌株此兩表型的調控機制尚未被探究。T6SS 為 QS 的調控目標之一，*P. vagans* M17 可能藉以表現毒力，但先前未曾探究菌株的 T6SS 系統。因此，本研究接續觀察 BHL 與 2(5H)-呋喃酮對 QS、生物膜、鞭毛與 T6SS 相關之基因表現變化的影響，並觀察在表型以及基因表現間是否存在相關性。此外，也期望作為未來探討 QS 對於生物膜生成、運動能力或毒力因子等影響的基礎。

在生物膜的結果中，*P. vagans* M17 在添加 120 ppm (3 X) BHL 時有最大生成量 (圖 5-11)，添加 32 mM 2(5H)-呋喃酮展現明顯抑制效果 (圖 5-12)。在 TSB 中添加 BHL 雖無法提升表面移行能力，然添加 2(5H)-呋喃酮能夠顯著減少 (圖 5-15)。因此，本研究分別將菌株培養於 TSB、含有 120 ppm (3 X) BHL 的 TSB，以及含有 32 mM 2(5H)-呋喃酮的 TSB，三者分別簡稱為 TSB 組、BHL 組與 2(5H)-呋喃酮組。接著在 *P. vagans* M17 生長曲線中四個階段 (生長初期、對數中期、生長停滯期前期與生長停滯期) 所對應的時間點 (0、2、6 與 24 小時)，收集各組別的細菌以分析基因表現。

一、引子效率與專一性

本研究進行分析的基因列在表 4-4，包含：*pagI* (AHLs 合成酶基因)、*pagR* (AHLs 受體與轉錄活化蛋白基因)、*bssSI* (調控生物膜之基因)、*fliC2* (鞭毛蛋白基因)、*hcpI* (T6SS 中構成管狀注射器之結構蛋白與效應蛋白基因) 以及 *clpVI* (T6SS 中供給能量之 ATPase 基因)。本研究選擇 *gyrBI* 作為管家基因，其表現出的 DNA 解旋酶能夠解開或引入細菌 DNA 的超螺旋結構 (Huang, 1996)。文獻指出 *gyrB* 對於 DNA 的複製與轉錄起始皆具有重要功能

(Filutowicz & Jonczyk, 1981; Filutowicz & Jonczyk, 1983)。Brady 等人 (2008) 依據 *gyrB* 序列建立 103 株 *Pantoea* spp. 的親緣關係樹，自我重複抽樣法的結果顯示 *gyrB* 在物種鑑定與親緣關係分析之結果可以信賴。研究表示，在不同溫度培養細菌，或培養細菌至不同吸光值後，收集並分析基因表現，*gyrB* 的表現程度皆相當穩定 (Pan et al., 2024)。

圖 5-17 與表 5-5 呈現本研究使用的七對引子之效率，以及熔化曲線試驗所對應之 PCR 產物的 T_m ，能夠確認引子專一性。熔化曲線試驗的結果顯示，每對引子擴增之 PCR 產物皆獲得單一 T_m 值，代表在 PCR 循環中僅有一個特異性的目標片段被擴增，每對引子專一性皆高。本研究中七個基因之引子效率介於 94 % 至 101 %，除 *fliC2* 之引子效率為 81.24 %。有研究指出，理想的試驗中引子應以至少 90 % 的效率擴增目標片段，並指出引子與模板的二級結構或是非預期的分子內交互作用可能會減少效率 (Svec et al., 2015)。也有文獻表示，引子效率在 80 % 至 110 % 皆可被接受。進行試驗時，使用同樣混合液 (master mix) 與儀器，引子與探針 (probe) 的供應商亦皆相同的情形下，能夠減少效率不同造成的誤差 (Nybo, 2011)。除了以上述條件進行試驗之外，本研究進一步採取比較性 Ct 法計算目標基因的相對表現量，減少引子效率落差的影响。首先利用穩定表現的管家基因校正目標基因獲得 ΔC_t ，再計算實驗組樣品 ΔC_t 與校正樣品 ΔC_t 平均值之間的差距以得到 $\Delta\Delta C_t$ ，最後透過對數轉換以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 呈現目標基因在不同樣品中的相對表現量 (Schmittgen & Livak, 2008)。

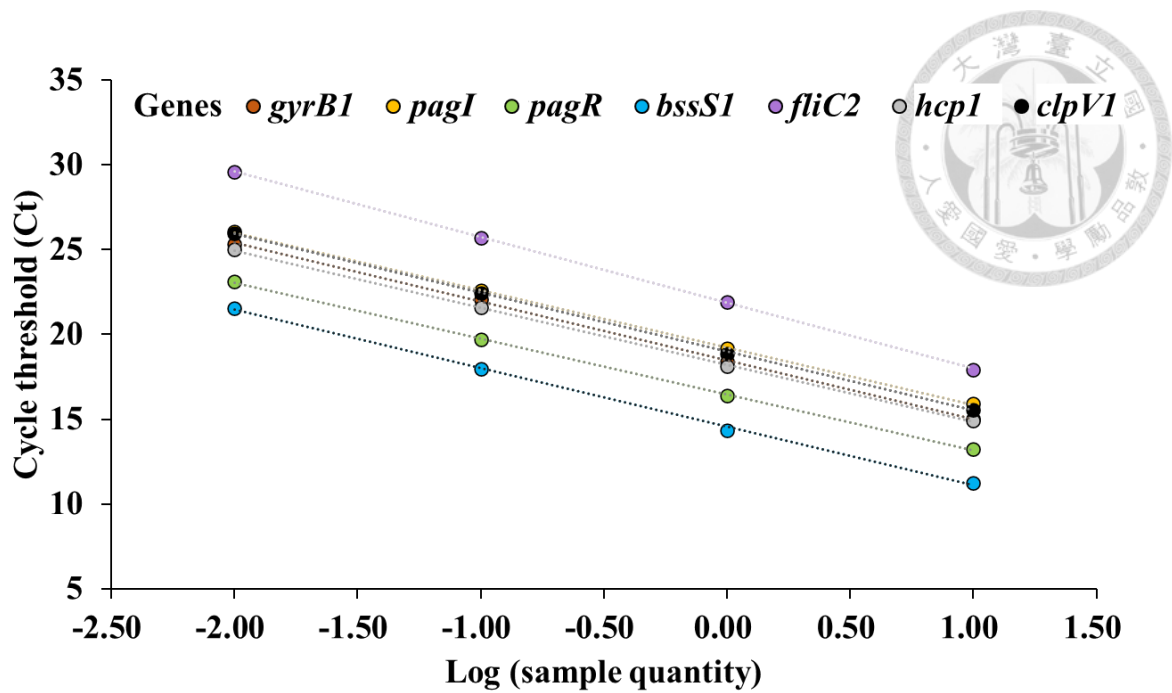


圖 5-17、即時聚合酶連鎖反應之引子效率。圖中描繪 Ct 值與 gDNA 的 log 值之關係。

Figure 5-17. Efficiency of primers used for RT-PCR. The relationship between Ct values and the log of gDNA input was plotted. The analyzed genes including *gyrB1*, DNA gyrase subunit B; *pagI*, AHLs synthase; *pagR*, transcriptional activator; *bssS1*, biofilm regulator; *fliC2*, flagellin; *hcp1*, hemolysin co-regulated protein; *clpV1*, T6SS ATPase.

表 5-5、即時聚合酶連鎖反應之引子效率與專一性

Table 5-5. Efficiency and specificity of primers used for RT-PCR

Genes	Efficiency (%)	R ²	Slope	T _m (°C)
<i>gyrBI</i>	96.22	0.9994	-3.416	83.15
<i>pagI</i>	97.67	0.9998	-3.379	80.16
<i>pagR</i>	100.58	0.9996	-3.308	78.82
<i>bssSI</i>	94.92	0.9990	-3.450	83.00
<i>fliC2</i>	81.24	0.9999	-3.872	81.36
<i>hcpI</i>	98.15	0.9996	-3.367	79.72
<i>clpVI</i>	94.13	0.9997	-3.471	86.88

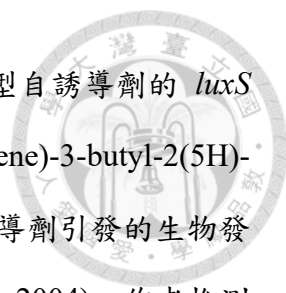
Efficiencies were determined using the equation, efficiency = $10^{(-1/\text{slope})}$. The analyzed genes including *gyrBI*, DNA gyrase subunit B; *pagI*, AHLs synthase; *pagR*, transcriptional activator; *bssSI*, biofilm regulator; *fliC2*, flagellin; *hcpI*, hemolysin co-regulated protein; *clpVI*, T6SS ATPase.

二、BHL 與 2(5H)-呋喃酮減少 *P. vagans* M17 中 *pagI* 之表現

在 TSB 組，AHLs 合成酶基因 *pagI* 的表現隨著時間增加一同提升，且處於生長停滯期的第 24 小時與生長前期的第 0 與 2 小時之相對表現有明顯差異 (圖 5-18 A)。先前發現 *P. vagans* M17 培養液中 BHL 濃度有時序性增加的情況 (表 5-4)，此處的基因表現結果與之呼應。添加 BHL 無法觀察到 *pagI* 的相對表現隨著時間的變化情形，且在第 6 與 24 小時之表現量較 TSB 組減少 (附錄 33)。推測外源提供的 BHL 可能在結合 PagR 後，藉由負回饋的調控減少 *pagI* 在 6 小時之後的表現。2(5H)-呋喃酮組中 *pagI* 的表現幾乎不隨時間變化，且在第 2 小時之後的表現量皆較 TSB 組低，代表明顯的抑制作用 (附錄 33)。

圖 5-18 B 顯示，AHLs 受體與轉錄活化蛋白基因 *pagR*，在 TSB 組前三個時間點的表現沒有顯著變化，並於第 24 小時稍微上升，此結果可能與 *P. vagans* M17 中 *pagI* 的表現以及 BHL 的濃度變化相關。BHL 組的 *pagR* 表現與 TSB 組有相似的變化，並且在所有時間點皆無明顯差異 (附錄 33)。添加 2(5H)-呋喃酮對 *pagR* 表現隨時間的改變影響不大，且相較於另外兩組，所有時間點的表現量皆沒有顯著變化。

Zhao 等人 (2015) 將 0.5 μ M 的 C-30 與 *A. ferrooxidans* 培養 24 小時，發現 AHLs 合成酶基因 *afeI* 以及 AHLs 受體基因 *afeR* 的相對表現，分別降低至控制組的 4% 與 2%。作者認為，C-30 與 AHLs 競爭 AfeR 的結合位點，且結合後的複合物無法活化包含 *afeI* 在內的相關基因表現，導致 AHLs 合成量減少，進一步造成胞外多醣與生物膜的生成量降低。此外，有文獻表示即使不同化合物能夠結合 LuxR 受體，若無法造成受體或複合物的構型變化，可能沒辦法誘導其轉錄活化功能 (Zhang et al., 2011)。相反的，Hentzer 等人 (2003) 發現 C-30 不會顯著改變 *P. aeruginosa* PAO1 中 *lasI*、*lasR*、*rhlI* 與 *rhlR* 的轉錄，但是會抑制 *las* 或 *rhl* 系統單獨或共同調節的基因之表現



量。也有文獻指出，在 *E. coli* ATCC 25404 中，合成 II 型自誘導劑的 *luxS* 與 *pfs* 之表現量，在添加 (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone 後沒有顯著變化；但該呋喃酮能夠減少 II 型自誘導劑引發的生物發光，並隨著濃度上升減少 *E. coli* 的生物膜產量 (Ren et al., 2004)。作者推測呋喃酮結合受體後，可能藉由轉錄後 (post-transcriptional) 的作用抑制 QS，而非影響 RNA 表現量。

本研究發現 BHL 與 2(5H)-呋喃酮皆會減少 *P. vagans* M17 中 *pagI* 的表現，且主要發生在生長停滯期；兩化合物不會明顯改變 *pagR* 的表現。此結果可能代表 BHL 與 PagR 結合後引發負回饋機制，2(5H)-呋喃酮與 PagR 結合後則不會改變複合物的構型，兩個情況皆導致對於 *pagI* 相似的抑制結果。此外，*pagR* 的表現雖不受直接影響，但 BHL 與 2(5H)-呋喃酮仍可能透過轉錄後的調控作用干擾 QS，此點有待更深入的研究詳細進行探討。

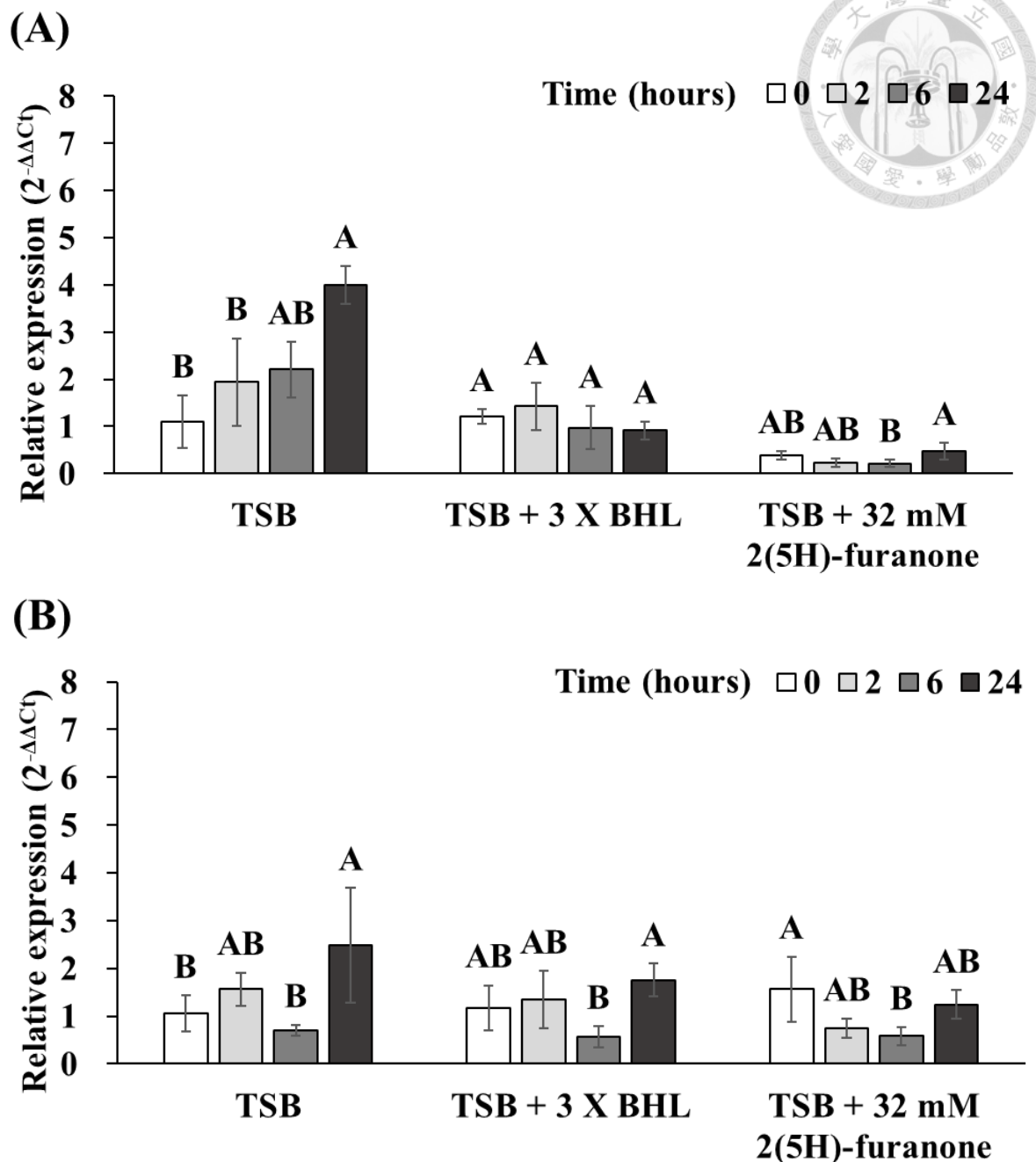
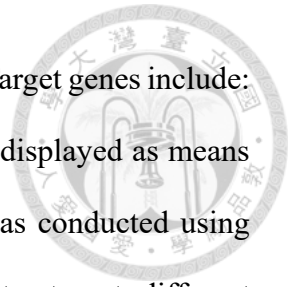


圖 5-18、*P. vagans* M17 之 *pagI* 與 *pagR* 相對表現量。(A) 為 *pagI* 的相對表現。(B) 為 *pagR* 的相對表現。BHL 濃度的 3 X 對應到 120 ppm (0.701 mM)。

Figure 5-18. Relative expression of *pagI* and *pagR* in *P. vagans* M17. *P. vagans* M17 was cultured in TSB containing supplemental BHL or 2(5H)-furanone. For BHL concentration, 3 X represented 120 ppm (0.701 mM). The relative expression of (A) *pagI* and (B) *pagR* was normalized against *gyrBI* expression and calculated based on the

calibrator sample, TSB at 0 hour. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was performed. Target genes include: *pagI*, AHLs synthase and *pagR*, transcriptional activator. Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. In each treatment, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).



三、2(5H)-呋喃酮減少且延後 *P. vagans* M17 中 *bssSI* 之表現

bssS 被指出在生物膜中表現量提升，且可能藉由調控自誘導劑以改變生物膜生成 (Domka et al., 2006; Hancock & Klemm, 2007; Zhou et al., 2017)。先前研究也發現 *bssSI* 在不同時間點的表現量變化能對應 *P. vagans* M17 生物膜表型的改變 (李奕慧, 2023)。在 TSB 組，*bssSI* 的表現於所有時間點皆無明顯改變。在 BHL 組可以觀察到第 6 小時的 *bssSI* 之表現量有明顯增加 (圖 5-19 A)。此結果有助於解釋 *P. vagans* M17 在有添加 BHL 的 TSB 中，生物膜產量隨著時間增加的情況 (圖 5-13)。在第 24 小時，*bssSI* 的表現量相較於第 6 小時有所下降；然生物膜生成量在第 24 小時有最高值，推測該時間點生物膜正準備進入分散階段，因此基因表現的變化反映於第 48 小時生物膜產量下降的結果 (附錄 28)。相反的，添加 2(5H)-呋喃酮使 *bssSI* 的表現在第 6 小時明顯較 BHL 組低，在第 24 小時則相較於 TSB 組顯著增加 (附錄 33)。此結果顯示 2(5H)-呋喃酮會使 *bssSI* 延後表現，且第 24 小時提升的基因表現也可以呼應到第 48 小時增加的生物膜產量 (附錄 28)。

研究證實鞭毛蛋白基因 *fliC* 對於表面移行具有貢獻 (Herrera et al., 2008)，且表面移行被認為有助於生物膜形成或擴散 (Daniels et al., 2004; Worlitzer et al., 2022)。先前研究發現 *P. vagans* M17 中 *fliC2* 的表現量在添加 L-蘋果酸時會上升，與表面移行的變化能夠互相呼應 (李奕慧, 2023)。也有文獻指出 *fliC* 的表現可能受到 QS 調控 (Ren et al., 2004)。圖 5-19 B 表明，在 TSB 組與 BHL 組中，*fliC2* 的表現不會隨著時間改變，且在相同的時間點下，比較兩組之間的表現量也沒有明顯變化 (附錄 33)。本研究先前測試培養基對於表面移行的影響，發現在以 M9 培養基為基礎時，才能夠觀察到 BHL 的促進效果 (圖 5-14)。因此，推測使用營養富足的 TSB 培養基，無法觀察到 BHL 對於 *fliC2* 表現量變化之影響，此結果與 *P. vagans* M17 在 TSB 培養基表面移行的結果相符。在 2(5H)-呋喃酮組也沒有觀察到 *fliC2* 的表現隨時



間有明顯改變，且與另兩組相比僅在第 2 小時有顯著下降 (附錄 33)。本研究先前發現在 TSB 培養基中添加 2(5H)-呋喃酮可以減少 *P. vagans* M17 在 24 小時的表面移行面積。基因表現的結果表示，2(5H)-呋喃酮可能不是藉由減少鞭毛蛋白的表現以阻礙表面移行，而是透過干擾生長或降低界面活性劑的產生等。

文獻表明，*P. aeruginosa* PG201 中，鼠李醣脂合成酶基因 *rhlA* 的表現雖受 *rhl* 系統控制，但環境中存在特定氮源或是鐵的情形下，較高細胞密度不一定會促進 *rhlA* 的表現，反而會受到不同營養成分的影響 (Déziel et al., 2003)。

實驗發現 BHL 對 *P. vagans* M17 中 *bssS1* 與 *fliC2* 的表現沒有明顯影響；2(5H)-呋喃酮會減少並延後 *bssS1* 在生長停滯期的表現，然不會顯著改變 *fliC2* 的表現。從圖 5-18 B 發現添加 BHL 不會增加 *pagR* 表現，代表不論有無添加 BHL，*PagR* 產量可能皆已趨近飽和，使 BHL-*PagR* 複合物濃度也接近上限，因此促進 *bssS1* 或 *fliC2* 表現的效果有限。此外，*fliC2* 表現不受 BHL 與 2(5H)-呋喃酮影響，推測在本研究的培養條件下，兩化合物並非透過調控鞭毛合成影響 *P. vagans* M17 之表面移行。並且 *fliC2* 可能不受 *PagR* 以及相對應的 QS 系統調控，或是環境中營養成分的作用勝於 QS 的調節效果，故兩化合物的添加皆無法影響其表現量。未來可以深入測試在各種培養條件下，兩化合物對於鞭毛以及其他表面移行的關鍵因子，如：界面活性劑的生成情況或合成酶基因表現之影響，以了解環境與 QS 之間的相互作用對於調控表面移行的貢獻。

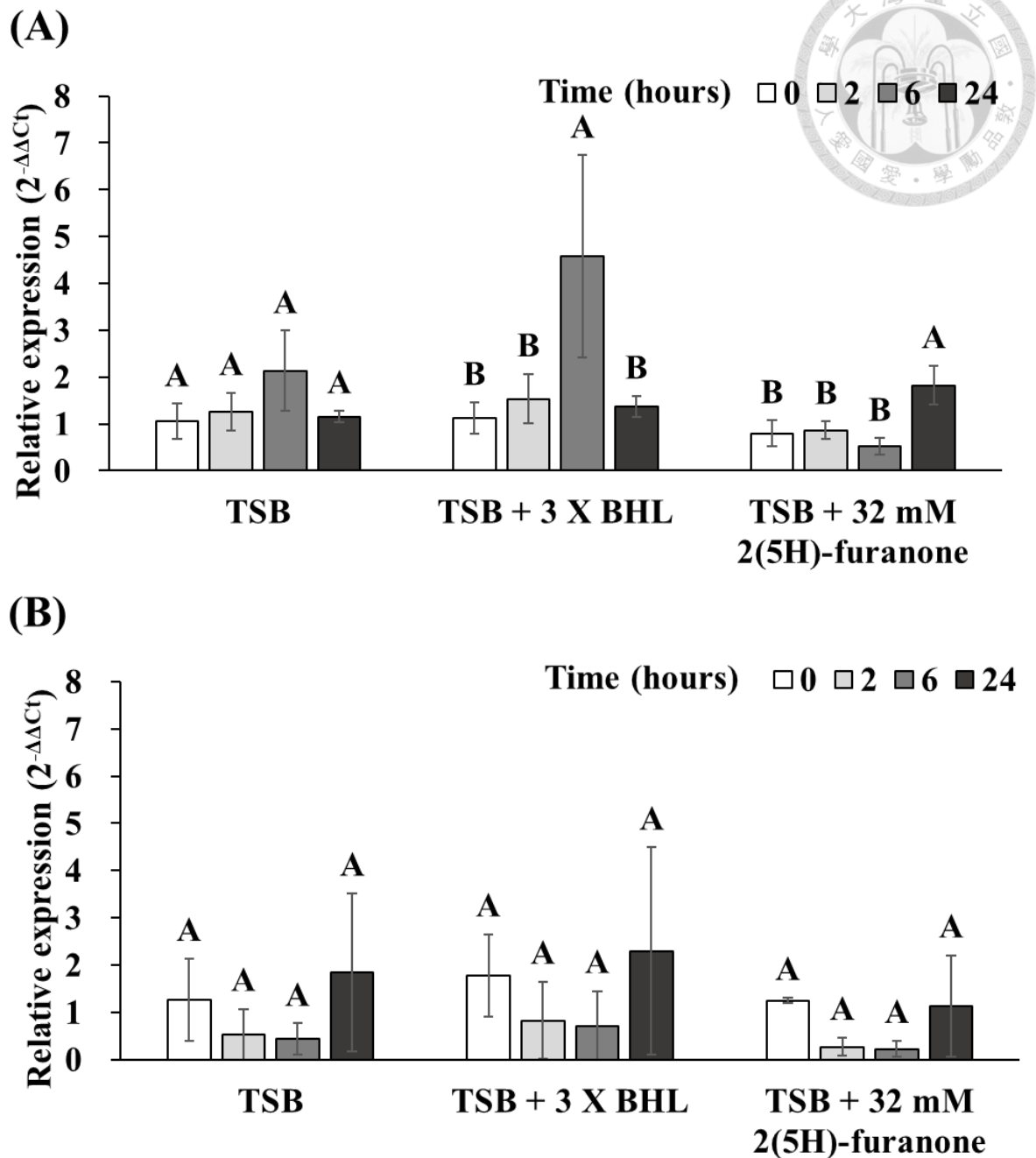
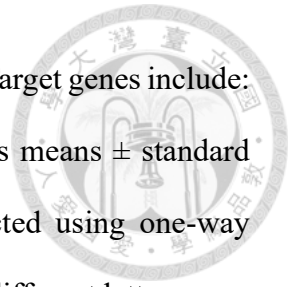


圖 5-19、*P. vagans* M17 之 *bssS1* 與 *fliC2* 相對表現量。(A) 為 *bssS1* 的相對表現。(B) 為 *fliC2* 的相對表現。BHL 濃度的 3 X 對應到 120 ppm (0.701 mM)。

Figure 5-19. Relative expression of *bssS1* and *fliC2* in *P. vagans* M17. *P. vagans* M17 was cultured in TSB containing supplemental BHL or 2(5H)-furanone. For BHL concentration, 3 X represented 120 ppm (0.701 mM). The relative expression of (A) *bssS1* and (B) *fliC2* was normalized against *gyrB1* expression and calculated based on the

calibrator sample, TSB at 0 hour. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was performed. Target genes include: *bssS1*, biofilm regulator and *fliC2*, flagellin. Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. In each treatment, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).



四、BHL 與 2(5H)-呋喃酮會調節 *P. vagans* M17 中 *hcp1* 與 *clpV1* 之表現

Hcp 為 T6SS 的標誌性結構蛋白以及效應蛋白，其表現情形與細菌的生長為正向相關，研究也指出 *hcp* 會受到 QS 系統調控 (Enos-Berlage et al., 2005; Sauer et al., 2002; Zhang et al., 2011)。圖 5-20 A 顯示，TSB 組中 *hcp1* 的表現在前三個時間點沒有變化，於第 24 小時降低；在 BHL 組的變化情形相似，然在第 6 小時顯著提升，且與另外兩個組別具明顯差異 (附錄 33)。添加 2(5H)-呋喃酮使 *hcp1* 的表現同樣在第 6 小時有提升，然相較於另外兩組，在所有時間點的表現量皆顯著降低 (附錄 33)。

ClpV 除了供應 T6SS 系統所需的能量，對於 Hcp 的分泌也具重要性，此外也會影響對其他細菌或真核細胞的毒力 (Bönemann et al., 2009; Mougous et al., 2006; Sana et al., 2012; Zhang et al., 2011)。在 TSB 組，*clpV1* 的表現在四個時間點皆沒有明顯改變 (圖 5-20 B)。在 BHL 組中，第 24 小時的表現量明顯提升，且相較於另外兩組有顯著上升 (附錄 33)。2(5H)-呋喃酮組之 *clpV1* 表現不隨著時間增長有所變化，但在第 2 小時之後表現量明顯低於 BHL 組。

多數 T6SS 中 Hcp 的分泌有賴於與目標細胞的接觸，然有研究表示細胞接觸並非必要，植物釋出的酚類化合物、環境溫度或 pH 等皆會影響 Hcp 的表現與分泌 (Wu et al., 2008; Zhang et al., 2011)。像是 Zhang 等人 (2011) 發現外源添加不同 AHLs，對於 *Y. pseudotuberculosis* 的四型 T6SS 表現情況具有程度不等的增加或減少效果，代表特定的 AHL-LuxR 複合物對於調節 T6SS 具關鍵作用。此外，有文獻將已知會抑制自誘導劑產生之 QS 抑制劑與 *P. aeruginosa* PA14 共同培養，再收集細胞並分析基因表現。結果表明包含 *hcp* 與 *clpV* 在內，二型 T6SS 中至少一半的基因以及三型 T6SS 中幾乎所有基因的表現皆有減少，下降 1.5 至 3.9 倍不等 (Lesic et al., 2009)。

本研究觀察到添加 BHL 與 2(5H)-呋喃酮皆不影響 *P. vagans* M17 中



hcp1 與 *clpV1* 表現的時間點。但是 BHL 會導致 *hcp1* 與 *clpV1* 分別於第 6 及第 24 小時有較高的表現量；2(5H)-呋喃酮使兩者幾乎在所有時間點的表現量皆較低。ClpV 為 T6SS 系統中鞘的收縮與拆卸供給能量，鞘則會包覆在主要由 Hcp 組裝的管狀注射器外側。推測 Hcp1 組裝成注射器並由鞘包覆後，ClpV1 才接著趨使該複合體收縮與回收，因此兩者達最高表現量的時間點具先後次序。此外，在 TSB 組與 BHL 組中，*hcp1* 與 *bssS1* 的變化趨勢十分相像，且文獻表示兩者對於生物膜的產生皆具重要性。這可能代表他們與 *P. vagans* M17 的生物膜產生有關連。

此結果顯示在 *P. vagans* M17 中，BHL-PagR 複合物對應的 QS 系統能夠在特定時間點調節 *hcp1* 與 *clpV1* 的表現，且 2(5H)-呋喃酮具明顯抑制作用。未來可以針對 *P. vagans* M17 的 T6SS 之表型或其他相關基因進行確認或分析，以探討其在菌株中的角色，以及與 QS 的交互作用。

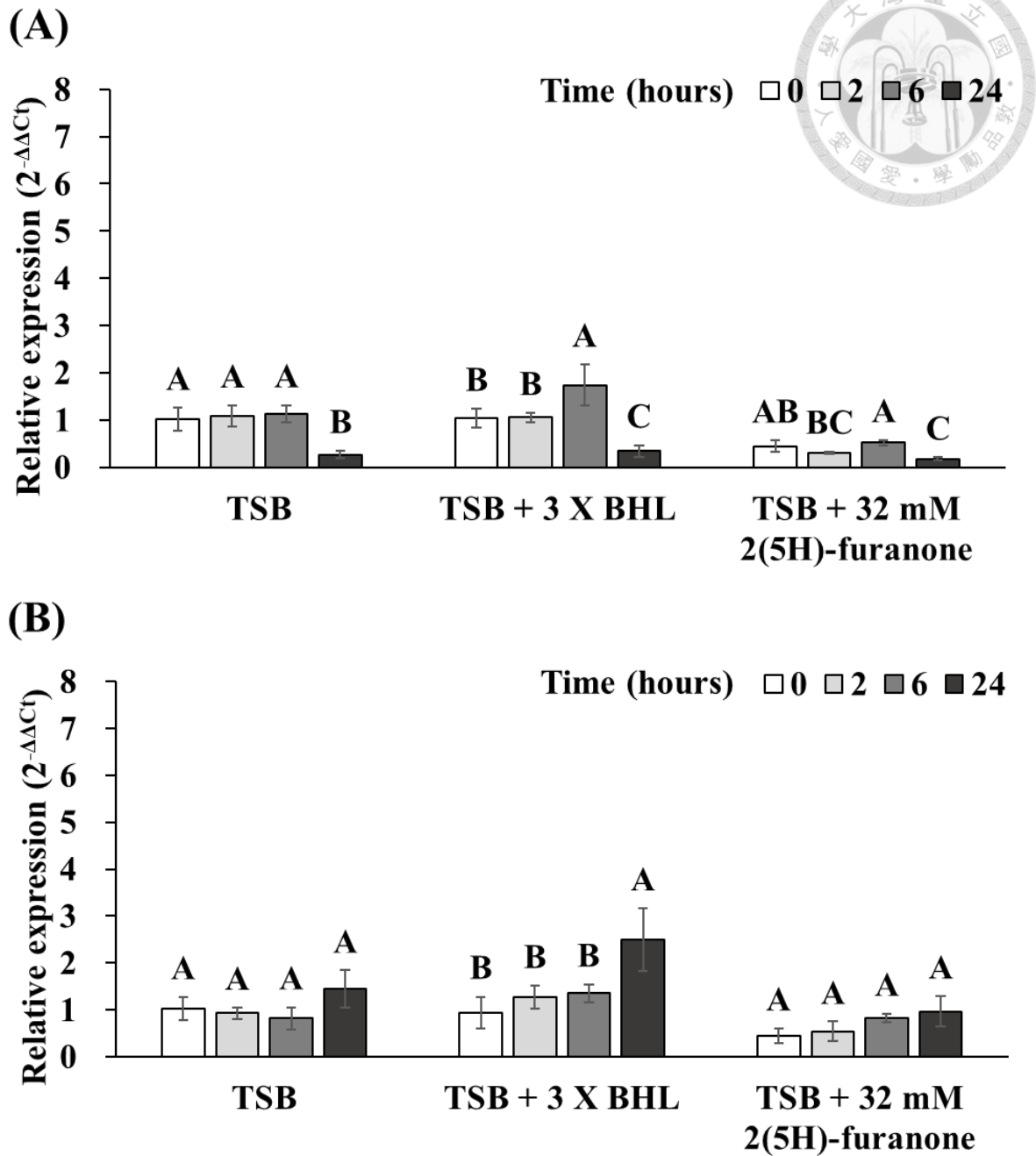
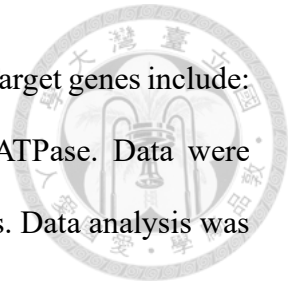


圖 5-20、*P. vagans* M17 之 *hcpI* 與 *clpV1* 相對表現量。(A) 為 *hcpI* 的相對表現。(B) 為 *clpV1* 的相對表現。BHL 濃度的 3 X 對應到 120 ppm (0.701 mM)。

Figure 5-20. Relative expression of *hcpI* and *clpV1* in *P. vagans* M17. *P. vagans* M17 was cultured in TSB containing supplemental BHL or 2(5H)-furanone. For BHL concentration, 3 X represented 120 ppm (0.701 mM). The relative expression of (A) *hcpI* and (B) *clpV1* was normalized against *gyrB1* expression and calculated based on the

calibrator sample, TSB at 0 hour. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was performed. Target genes include: *hcp1*, hemolysin co-regulated protein of T6SS and *clpV1*, T6SS ATPase. Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. In each treatment, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).



第六章、結論與展望



本研究顯示，*P. vagans* M17 中 QS 關鍵蛋白質為 PagI 與 PagR。菌株主要產生的自誘導劑為 BHL，額外添加 BHL 可能透過調控基因表現，促進菌株的生物膜生成與表面移行。對於 *P. vagans* M17 的 QS 具有抑制作用的化合物為 2(5H)-呋喃酮，其會抑制菌株生長、生物膜生成與表面移行，並減少相關基因表現。這些結果顯示，QS 對於 *P. vagans* M17 的生物膜生成能力與表面移行，具有調節作用。

然而，QS 的調控能力會受到環境影響。外源添加 BHL 或 2(5H)-呋喃酮於 TSB 培養基會促進或減少菌株生物膜生成，然兩者對於表面移行的影響在營養缺乏的 M9 培養基較為明顯。這也許是因為特定成分導致菌株訊息傳遞的變化，進一步影響 QS 對於表面移行相關基因之調節。然確切的影響因素與機制仍然未知，此點尚需更深入的探討，以供作後續於不同成份的食品進行研究或應用之基礎。

此外，2(5H)-呋喃酮對於表型的影響會因濃度變化而改變。培養基中 2(5H)-呋喃酮濃度較低時，*P. vagans* M17 之生物膜會增加，只有在達到特定濃度以上才有抑制作用。本研究對此現象提出數個猜測，然實際原因仍不清楚。在較高濃度下，2(5H)-呋喃酮會減少菌株生長、生物膜生成與表面移行能力，並減少或延後相關基因表現。推測其藉由妨礙生長以及群體淬滅的綜合效果，抑制菌株的相關表型。未來研究可以探討 2(5H)-呋喃酮對於生物膜的其他因子，如初始附著或胞外多醣之影響，以了解 QS 在生物膜形成過程中所扮演的角色。

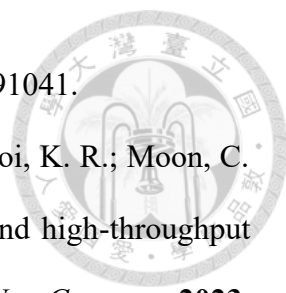
以此研究為基礎，我們期望對於 QS 系統的了解，有助於在未來尋找能夠在食品加工或食品包裝等層面應用的方法，以抑制細菌的 QS 系統、減緩其導致的食品腐敗而不影響品質，進而提升食品的保存期限與安全性。

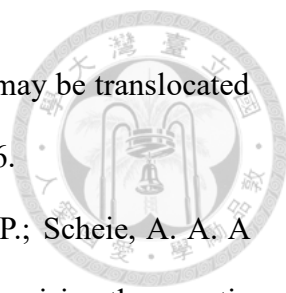
第七章、參考文獻

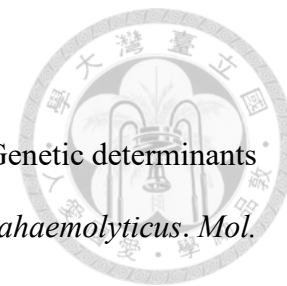


- 李奕慧. 碳源對 *Pantoea vagans* M17 表面移行及生物膜形成的影響. 國立臺灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所碩士論文. 臺北, 臺灣, 2023.
- 吳奕蓉. 探討 *Pantoea* spp. 對截切香瓜品質影響. 國立臺灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所碩士論文. 臺北, 臺灣, 2021.
- 鄧婷云. *Pantoea vagans* 之表面移行及生物膜生成能力對截切香瓜品質之影響. 國立臺灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所碩士論文. 臺北, 臺灣, 2022.
- 廖婕伶. 探討 *Luteibacter* sp. PcI1001 耐受鎂、銅和鉍之特性分析. 國立臺灣大學生物資源暨農學院農業化學系碩士論文. 臺北, 臺灣, 2021.
- 劉佳容. 移動性對 *Pseudomonas* sp. XP1-6 生物膜形成與定殖於番茄根部之影響. 國立臺灣大學生物資源暨農學院農業化學系碩士論文. 臺北, 臺灣, 2022.
- Aslam, M.; Pei, P.; Ye, P.; Li, T.; Liang, H.; Zhang, Z.; Ke, X.; Chen, W.; Du, H. Unraveling the diverse profile of *N*-acyl homoserine lactone signals and their role in the regulation of biofilm formation in *Porphyra haitanensis*-associated *Pseudoalteromonas galathea*. *Microorganisms*. **2023**, 11(9).
- Bönemann, G.; Pietrosiuk, A.; Diemand, A.; Zentgraf, H.; Mogk, A. Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion. *Embo J*. **2009**, 28(4), 315-325.
- Bai, A. J.; Rai, V. R. Bacterial quorum sensing and food industry. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2011**, 10(3), 183-193.
- Bai, X.; Nakatsu, C. H.; Bhunia, A. K. Bacterial biofilms and their implications in pathogenesis and food safety. *Foods*. **2021**, 10(9), 2117.
- Beck von Bodman, S.; Farrand, S. K. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an *N*-acylhomoserine

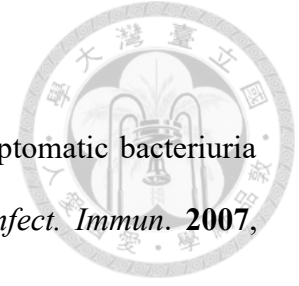
- lactone autoinducer. *J. Bacteriol.* **1995**, 177(17), 5000-5008.
- Brackman, G.; Risseuw, M.; Celen, S.; Cos, P.; Maes, L.; Nelis, H. J.; Van Calenbergh, S.; Coenye, T. Synthesis and evaluation of the quorum sensing inhibitory effect of substituted triazolyldihydrofuranones. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20(15), 4737-4743.
- Brady, C.; Cleenwerck, I.; Venter, S.; Vancanneyt, M.; Swings, J.; Coutinho, T. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Syst. Appl. Microbiol.* **2008**, 31(6-8), 447-460.
- Brady, C. L.; Venter, S. N.; Cleenwerck, I.; Engelbeen, K.; Vancanneyt, M.; Swings, J.; Coutinho, T. A. *Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov. and *Pantoea anthophila* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2009**, 59(9), 2339-2345.
- Braun-Kiewnick, A.; Jacobsen, B. J.; Sands, D. C. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causal agent of basal kernel blight of barley, by antagonistic *Pantoea agglomerans*. *Phytopathology.* **2000**, 90(4), 368-375.
- Carlier, A.; Burbank, L.; von Bodman, S. B. Identification and characterization of three novel EsaI/EsaR quorum-sensing controlled stewartan exopolysaccharide biosynthetic genes in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*. *Mol. Microbiol.* **2009**, 74(4), 903-913.
- Chalupowicz, L.; Manulis-Sasson, S.; Itkin, M.; Sacher, A.; Sessa, G.; Barash, I. Quorum-sensing system affects gall development incited by *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophilae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2008**, 21(8), 1094-1105.
- Chan, K.-G.; Cheng, H. J.; Chen, J. W.; Yin, W.-F.; Ngeow, Y. F. Tandem mass spectrometry detection of quorum sensing activity in multidrug resistant clinical

- 
- isolate *Acinetobacter baumannii*. *Sci. World J.* **2014**, 2014, 891041.
- Cho, J. S.; Yang, D.; Prabowo, C. P. S.; Ghiffary, M. R.; Han, T.; Choi, K. R.; Moon, C. W.; Zhou, H.; Ryu, J. Y.; Kim, H. U.; Lee, S. Y. Targeted and high-throughput gene knockdown in diverse bacteria using synthetic sRNAs. *Nat. Commun.* **2023**, 14(1), 2359.
- Déziel, E.; Lépine, F.; Milot, S.; Villemur, R. *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology*. **2003**, 149(Pt 8), 2005-2013.
- Dal Bello, F.; Zorzi, M.; Aigotti, R.; Medica, D.; Fanelli, V.; Cantaluppi, V.; Amante, E.; Orlandi, V. T.; Medana, C. Targeted and untargeted quantification of quorum sensing signalling molecules in bacterial cultures and biological samples via HPLC-TQ MS techniques. *Anal. Bioanal. Chem.* **2021**, 413(3), 853-864.
- Daniels, R.; Vanderleyden, J.; Michiels, J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2004**, 28(3), 261-289.
- Datsenko, K. A.; Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97(12), 6640-6645.
- Davies, D. G.; Parsek, M. R.; Pearson, J. P.; Iglewski, B. H.; Costerton, J. W.; Greenberg, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. **1998**, 280(5361), 295-298.
- de Kievit, T. R. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* **2009**, 11(2), 279-288.
- De Maayer, P.; Venter, S. N.; Kamber, T.; Duffy, B.; Coutinho, T. A.; Smits, T. H. Comparative genomics of the type VI secretion systems of *Pantoea* and *Erwinia*

- 
- species reveals the presence of putative effector islands that may be translocated by the VgrG and Hcp proteins. *BMC Genomics*. **2011**, 12, 576.
- Defoirdt, T.; Benneche, T.; Brackman, G.; Coenye, T.; Sorgeloos, P.; Scheie, A. A. A quorum sensing-disrupting brominated thiophenone with a promising therapeutic potential to treat luminescent vibriosis. *PLoS One*. **2012**, 7(7), e41788.
- Dixit, S.; Dubey, R. C.; Maheshwari, D. K.; Seth, P. K.; Bajpai, V. K. Roles of quorum sensing molecules from *Rhizobium etli* RT1 in bacterial motility and biofilm formation. *Braz. J. Microbiol.* **2017**, 48(4), 815-821.
- Domka, J.; Lee, J.; Wood, T. K. YliH (BssR) and YceP (BssS) regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation by influencing cell signaling. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72(4), 2449-2459.
- Dong, Y. H.; Wang, L. Y.; Zhang, L. H. Quorum-quenching microbial infections: Mechanisms and implications. *Philos. Trans. R. Soc., B*. **2007**, 362(1483), 1201-1211.
- Donlan, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infect. Dis.* **2002**, 8(9), 881-890.
- Douzi, B.; Brunet, Y. R.; Spinelli, S.; Lensi, V.; Legrand, P.; Blangy, S.; Kumar, A.; Journet, L.; Cascales, E.; Cambillau, C. Structure and specificity of the type VI secretion system ClpV-TssC interaction in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* **2016**, 6(1), 34405.
- Dutkiewicz, J.; Mackiewicz, B.; Kinga Lemieszek, M.; Golec, M.; Milanowski, J. *Pantoea agglomerans*: A mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: Infections of humans, animals and plants. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2016**, 23(2), 197-205.
- Eberl, L.; Molin, S.; Givskov, M. Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J.*



- Bacteriol.* **1999**, 181(6), 1703-1712.
- Enos-Berlage, J. L.; Guvener, Z. T.; Keenan, C. E.; McCarter, L. L. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol. Microbiol.* **2005**, 55(4), 1160-1182.
- Förster, A.; Planamente, S.; Manoli, E.; Lossi, N. S.; Freemont, P. S.; Filloux, A. Coevolution of the ATPase ClpV, the sheath proteins TssB and TssC, and the accessory protein TagJ/HsiE1 distinguishes type VI secretion classes. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289(47), 33032-33043.
- Feng, Y.; Shen, D.; Song, W. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, 100(5), 938-945.
- Filutowicz, M.; Jonczyk, P. Essential role of the *gyrB* gene product in the transcriptional event coupled to *dnaA*-dependent initiation of *Escherichia coli* chromosome replication. *Mol. Gen. Genet.* **1981**, 183(1), 134-138.
- Filutowicz, M.; Jonczyk, P. The *gyrB* gene product functions in both initiation and chain polymerization of *Escherichia coli* chromosome replication: Suppression of the initiation deficiency in *gyrB*-ts mutants by a class of *rpoB* mutations. *Mol. Gen. Genet.* **1983**, 191(2), 282-287.
- Fuqua, W. C.; Winans, S. C.; Greenberg, E. P. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **1994**, 176(2), 269-275.
- Givskov, M.; de Nys, R.; Manefield, M.; Gram, L.; Maximilien, R.; Eberl, L.; Molin, S.; Steinberg, P. D.; Kjelleberg, S. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J. Bacteriol.* **1996**, 178(22), 6618-6622.
- Green, E. R.; Meccas, J. Bacterial secretion systems: An overview. *Microbiol. Spectrum.*



2016, 4(1).

Hancock, V.; Klemm, P. Global gene expression profiling of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* during biofilm growth in human urine. *Infect. Immun.* **2007**, 75(2), 966-976.

Hanzelka, B. L.; Stevens, A. M.; Parsek, M. R.; Crone, T. J.; Greenberg, E. P. Mutational analysis of the *Vibrio fischeri* LuxI polypeptide: Critical regions of an autoinducer synthase. *J. Bacteriol.* **1997**, 179(15), 4882-4887.

Hayek, M.; Baraquet, C.; Lami, R.; Blache, Y.; Molmeret, M. The marine bacterium *Shewanella woodyi* produces C(8)-HSL to regulate bioluminescence. *Microb. Ecol.* **2020**, 79(4), 865-881.

Hense, B. A.; Schuster, M. Core principles of bacterial autoinducer systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2015**, 79(1), 153-169.

Hentzer, M.; Wu, H.; Andersen, J. B.; Riedel, K.; Rasmussen, T. B.; Bagge, N.; Kumar, N.; Schembri, M. A.; Song, Z.; Kristoffersen, P.; Manefield, M.; Costerton, J. W.; Molin, S.; Eberl, L.; Steinberg, P.; Kjelleberg, S.; Høiby, N.; Givskov, M. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *Embo J.* **2003**, 22(15), 3803-3815.

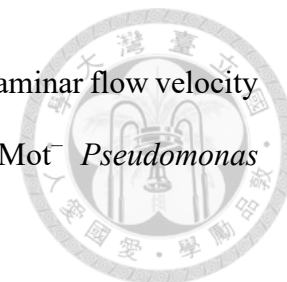
Herrera, C. M.; Koutsoudis, M. D.; Wang, X.; von Bodman, S. B. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* exhibits surface motility, which is a critical aspect of Stewart's wilt disease development on maize. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2008**, 21(10), 1359-1370.

Heydorn, A.; Ersbøll, B.; Kato, J.; Hentzer, M.; Parsek, M. R.; Tolker-Nielsen, T.; Givskov, M.; Molin, S. Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: Impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Appl. Environ.*



- Microbiol.* **2002**, 68(4), 2008-2017.
- Huang, W. M. Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes. *Annu. Rev. Genet.* **1996**, 30, 79-107.
- Huson, D. H.; Rupp, R.; Scornavacca, C. *Phylogenetic Networks: Concepts, Algorithms and Applications*. Cambridge University Press: Cambridge, 2010.
- Janssens, J. C.; Steenackers, H.; Robijns, S.; Gellens, E.; Levin, J.; Zhao, H.; Hermans, K.; De Coster, D.; Verhoeven, T. L.; Marchal, K.; Vanderleyden, J.; De Vos, D. E.; De Keersmaecker, S. C. Brominated furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, 74(21), 6639-6648.
- Jatt, A. N.; Tang, K.; Liu, J.; Zhang, Z.; Zhang, X.-H. Quorum sensing in marine snow and its possible influence on production of extracellular hydrolytic enzymes in marine snow bacterium *Pantoea ananatis* B9. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2014**, 91(2), 1-13.
- Jiang, J.; Wu, S.; Wang, J.; Feng, Y. AHL-type quorum sensing and its regulation on symplasmata formation in *Pantoea agglomerans* YS19. *J. Basic Microbiol.* **2015**, 55(5), 607-616.
- Kearns, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, 8(9), 634-644.
- Kher, H. L.; Krishnan, T.; Letchumanan, V.; Hong, K. W.; How, K. Y.; Lee, L. H.; Tee, K. K.; Yin, W. F.; Chan, K. G. Characterization of quorum sensing genes and *N*-acyl homoserine lactones in *Citrobacter amalonaticus* strain YG6. *Gene*. **2019**, 684, 58-69.
- Kjelleberg, S.; Steinberg, P. D.; Holmstrom, C.; Back, A. *Inhibition of Gram positive bacteria*. Google Patents, 2006.

Korber, D. R.; Lawrence, J. R.; Sutton, B.; Caldwell, D. E. Effect of laminar flow velocity on the kinetics of surface recolonization by Mot⁺ and Mot⁻ *Pseudomonas fluorescens*. *Microb. Ecol.* **1989**, 18(1), 1-19.



Koutsoudis, M. D.; Tsaltas, D.; Minogue, T. D.; von Bodman, S. B. Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103(15), 5983-5988.

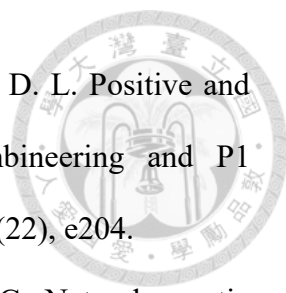
Lade, H.; Paul, D.; Kweon, J. H. Quorum quenching mediated approaches for control of membrane biofouling. *Int. J. Biol. Sci.* **2014**, 10(5), 550-565.

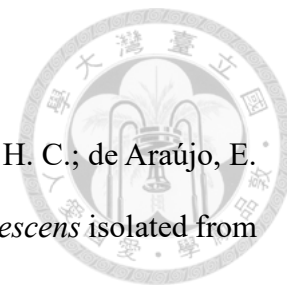
Landini, P.; Antoniani, D.; Burgess, J. G.; Nijland, R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 86(3), 813-823.

Laue, B. E.; Jiang, Y.; Chhabra, S. R.; Jacob, S.; Stewart, G. S.; Hardman, A.; Downie, J. A.; O'Gara, F.; Williams, P. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, *N*-(3-hydroxy-7-*cis*-tetradecenoyl) homoserine lactone, via HdtS, a putative novel *N*-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology.* **2000**, 146(10), 2469-2480.

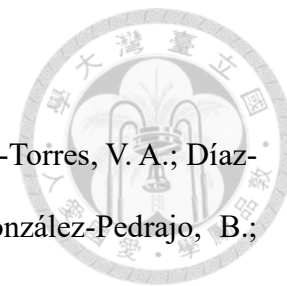
Lesic, B.; Starkey, M.; He, J.; Hazan, R.; Rahme, L. G. Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. *Microbiology.* **2009**, 155(Pt 9), 2845-2855.

Li, S.; Liang, H.; Wei, Z.; Bai, H.; Li, M.; Li, Q.; Qu, M.; Shen, X.; Wang, Y.; Zhang, L. An osmoregulatory mechanism operating through OmpR and LrhA controls the motile-sessile switch in the plant growth-promoting bacterium *Pantoea alhagi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, 85(10).

- 
- Li, X. T.; Thomason, L. C.; Sawitzke, J. A.; Costantino, N.; Court, D. L. Positive and negative selection using the *tetA-sacB* cassette: Recombineering and P1 transduction in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **2013**, 41(22), e204.
- Li, Y. H.; Lau, P. C.; Lee, J. H.; Ellen, R. P.; Cvitkovitch, D. G. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J. Bacteriol.* **2001**, 183(3), 897-908.
- Liu, G. Y.; Guo, B. Q.; Chen, W. N.; Cheng, C.; Zhang, Q. L.; Dai, M. B.; Sun, J. R.; Sun, P. H.; Chen, W. M. Synthesis, molecular docking, and biofilm formation inhibitory activity of 5-substituted 3, 4-dihalo-5H-furan-2-one derivatives on *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, 79(5), 628-638.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods.* **2001**, 25(4), 402-408.
- Lv, L.; Luo, J.; Ahmed, T.; Zaki, H. E. M.; Tian, Y.; Shahid, M. S.; Chen, J.; Li, B. Beneficial effect and potential risk of *Pantoea* on rice production. *Plants.* **2022**, 11(19).
- Maeda, T.; García-Contreras, R.; Pu, M.; Sheng, L.; Garcia, L. R.; Tomás, M.; Wood, T. K. Quorum quenching quandary: Resistance to antivirulence compounds. *Isme J.* **2012**, 6(3), 493-501.
- Manefield, M.; Rasmussen, T. B.; Henzter, M.; Andersen, J. B.; Steinberg, P.; Kjelleberg, S.; Givskov, M. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology.* **2002**, 148(Pt 4), 1119-1127.
- Mani, S.; Nair, J. *Pantoea* infections in the neonatal intensive care unit. *Cureus.* **2021**, 13(2), e13103.
- Maphosa, S.; Moleleki, L. N.; Motaung, T. E. Bacterial secretion system functions: Evidence of interactions and downstream implications. *Microbiology.* **2023**,



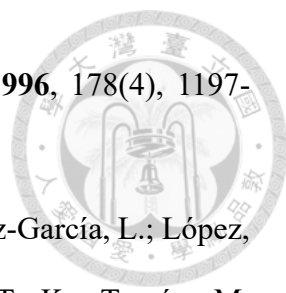
- 169(4).
- Martins, M. L.; Pinto, U. M.; Riedel, K.; Vanetti, M. C.; Mantovani, H. C.; de Araújo, E. F. Lack of AHL-based quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens* isolated from milk. *Braz J. Microbiol.* **2014**, 45(3), 1039-1046.
- Martins, M. L.; Pinto, U. M.; Riedel, K.; Vanetti, M. C. D. Quorum sensing and spoilage potential of psychrotrophic Enterobacteriaceae isolated from milk. *BioMed Res. Int.* **2018**, 2018, 2723157.
- 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.; Williams, P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology.* **1997**, 143 (Pt 12), 3703-3711.
- McLean, R. J. C.; Whiteley, M.; Stickler, D. J.; Fuqua, W. C. Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**, 154(2), 259-263.
- Merighi, M.; Majerczak, D. R.; Stover, E. H.; Coplin, D. L. The HrpX/HrpY two-component system activates *hrpS* expression, the first step in the regulatory cascade controlling the Hrp regulon in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2003**, 16(3), 238-248.
- Morohoshi, T.; Nakamura, Y.; Yamazaki, G.; Ishida, A.; Kato, N.; Ikeda, T. The plant pathogen *Pantoea ananatis* produces *N*-acylhomoserine lactone and causes center rot disease of onion by quorum sensing. *J. Bacteriol.* **2007**, 189(22), 8333-8338.
- Mougous, J. D.; Cuff, M. E.; Raunser, S.; Shen, A.; Zhou, M.; Gifford, C. A.; Goodman, A. L.; Joachimiak, G.; Ordoñez, C. L.; Lory, S.; Walz, T.; Joachimiak, A.; Mekalanos, J. J. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein



- secretion apparatus. *Science*. **2006**, 312(5779), 1526-1530.
- Muñoz-Cázares, N.; Castillo-Juárez, I.; García-Contreras, R.; Castro-Torres, V. A.; Díaz-Guerrero, M.; Rodríguez-Zavala, J. S.; Quezada, H.; González-Pedrajo, B.; Martínez-Vázquez, M. A brominated furanone inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and type III secretion, attenuating its virulence in a murine cutaneous abscess model. *Biomedicines*. **2022**, 10(8).
- Nadarasah, G.; Stavrinides, J. Quantitative evaluation of the host-colonizing capabilities of the enteric bacterium *Pantoea* using plant and insect hosts. *Microbiology*. **2014**, 160.
- Nasser, W.; Bouillant, M. L.; Salmond, G.; Reverchon, S. Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* *expI-expR* locus directing the synthesis of two *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules. *Mol. Microbiol.* **1998**, 29(6), 1391-1405.
- Nybo, K. qPCR efficiency calculations. *Biotechniques*. **2011**, 51(6), 401-402.
- O'Toole, G. A.; Kolter, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **1998**, 30(2), 295-304.
- Ortori, C. A.; Dubern, J.-F.; Chhabra, S. R.; Cámara, M.; Hardie, K.; Williams, P.; Barrett, D. A. Simultaneous quantitative profiling of *N*-acyl-L-homoserine lactone and 2-alkyl-4(1H)-quinolone families of quorum-sensing signaling molecules using LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 399(2), 839-850.
- Otton, L. M.; da Silva Campos, M.; Meneghetti, K. L.; Corção, G. Influence of twitching and swarming motilities on biofilm formation in *Pseudomonas* strains. *Arch. Microbiol.* **2017**, 199(5), 677-682.
- Ou, B.; Lv, H.; Ge, H.; Fu, D.; Lin, X.; Huang, S.; Chen, X.; Liu, Y.; Li, S.; Liu, W.; Huang, L.; Yang, Y.; Zhang, M. Deletion of the *cheZ* gene results in the loss of swimming ability and the decrease of adhesion ability to Caco-2 cells in



- Escherichia coli* Nissle 1917. *Folia Microbiol.* **2022**.
- Paluch, E.; Rewak-Soroczyńska, J.; Jędrusik, I.; Mazurkiewicz, E.; Jermakow, K. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, 104(5), 1871-1881.
- Pan, Y.; Zhao, Y.; Zeng, H. R.; Wu, J. Q.; Song, Y. Y.; Rao, Y. H.; Li, G. Q.; Jin, L. Reference genes for expression analyses by qRT-PCR in *Enterobacter cancerogenus*. *Microorganisms.* **2024**, 12(5).
- Papenfort, K.; Bassler, B. L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, 14(9), 576-588.
- Parsek, M. R.; Schaefer, A. L.; Greenberg, E. P. Analysis of random and site-directed mutations in *rhII*, a *Pseudomonas aeruginosa* gene encoding an acylhomoserine lactone synthase. *Mol. Microbiol.* **1997**, 26(2), 301-310.
- Partridge, J. D.; Harshey, R. M. Swarming: Flexible roaming plans. *J. Bacteriol.* **2013**, 195(5), 909-918.
- Patel, N. M.; Moore, J. D.; Blackwell, H. E.; Amador-Noguez, D. Identification of unanticipated and novel *N*-acyl L-homoserine lactones (AHLs) using a sensitive non-targeted LC-MS/MS method. *PLoS One.* **2016**, 11(10), e0163469.
- Pearson, J. P.; Gray, K. M.; Passador, L.; Tucker, K. D.; Eberhard, A.; Iglewski, B. H.; Greenberg, E. P. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, 91(1), 197-201.
- Pearson, J. P.; Passador, L.; Iglewski, B. H.; Greenberg, E. P. A second *N*-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, 92(5), 1490-1494.
- Pellicic, V.; Reyrat, J. M.; Gicquel, B. Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene

- 
- confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J. Bacteriol.* **1996**, 178(4), 1197-1199.
- Pena, R. T.; Blasco, L.; Ambroa, A.; González-Pedrajo, B.; Fernández-García, L.; López, M.; Bleriot, I.; Bou, G.; García-Contreras, R.; Wood, T. K.; Tomás, M. Relationship between quorum sensing and secretion systems. *Front. Microbiol.* **2019**, 10, 1100.
- Pinto, U. M.; de Souza Viana, E.; Martins, M. L.; Vanetti, M. C. D. Detection of acylated homoserine lactones in Gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. *Food Control.* **2007**, 18(10), 1322-1327.
- Ponnusamy, K.; Paul, D.; Sam Kim, Y.; Kweon, J. H. 2(5H)-furanone: A prospective strategy for biofouling-control in membrane biofilm bacteria by quorum sensing inhibition. *Braz. J. Microbiol.* **2010**, 41(1), 227-234.
- Purevdorj, B.; Costerton, J. W.; Stoodley, P. Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, 68(9), 4457-4464.
- Rahman, M. R. T.; Lou, Z.; Zhang, J.; Yu, F.; Timilsena, Y. P.; Zhang, C.; Zhang, Y.; Bakry, A. M. Star anise (*Illicium verum* Hook. F.) as quorum sensing and biofilm formation inhibitor on foodborne bacteria: Study in milk. *J. Food Prot.* **2017**, 80(4), 645-653.
- Ramamurthy, T.; Ghosh, A.; Chowdhury, G.; Mukhopadhyay, A. K.; Dutta, S.; Miyoshi, S. I. Deciphering the genetic network and programmed regulation of antimicrobial resistance in bacterial pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, 12, 952491.
- Ren, D.; Bedzyk, L. A.; Ye, R. W.; Thomas, S. M.; Wood, T. K. Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli*. *B iotechnol. Bioeng.* **2004**, 88(5),

630-642.

Ren, D.; Sims, J. J.; Wood, T. K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environ. Microbiol.* **2001**, 3(11), 731-736.

Ren, D.; Sims, J. J.; Wood, T. K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Lett. Appl. Microbiol.* **2002**, 34(4), 293-299.

Riedel, C. U.; Monk, I. R.; Casey, P. G.; Waidmann, M. S.; Gahan, C. G. M.; Hill, C. AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **2009**, 71(5), 1177-1189.

Sana, T. G.; Hachani, A.; Bucior, I.; Soscia, C.; Garvis, S.; Termine, E.; Engel, J.; Filloux, A.; Bleves, S. The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and Fur and modulates internalization in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287(32), 27095-27105.

Sana, T. G.; Soscia, C.; Tonglet, C. M.; Garvis, S.; Bleves, S. Divergent control of two type VI secretion systems by RpoN in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One.* **2013**, 8(10), e76030.

Sauer, K.; Camper, A. K.; Ehrlich, G. D.; Costerton, J. W.; Davies, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* **2002**, 184(4), 1140-1154.

Schäfer, A.; Tauch, A.; Jäger, W.; Kalinowski, J.; Thierbach, G.; Pühler, A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene.* **1994**, 145(1), 69-73.

Schmittgen, T. D.; Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nat. Protoc.* **2008**, 3(6), 1101-1108.

Shadel, G. S.; Young, R.; Baldwin, T. O. Use of regulated cell lysis in a lethal genetic selection in *Escherichia coli*: Identification of the autoinducer-binding region of the LuxR protein from *Vibrio fischeri* ATCC 7744. *J. Bacteriol.* **1990**, 172(7), 3980-3987.

Sheng, L.; Olsen, S. A.; Hu, J.; Yue, W.; Means, W. J.; Zhu, M. J. Inhibitory effects of grape seed extract on growth, quorum sensing, and virulence factors of CDC "top-six" non-O157 Shiga toxin producing *E. coli*. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, 229, 24-32.

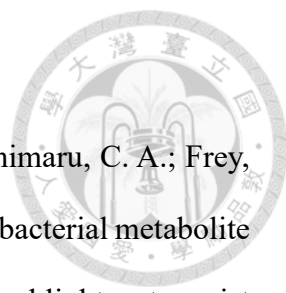
Shetye, G. S.; Singh, N.; Gao, X.; Bandyopadhyay, D.; Yan, A.; Luk, Y.-Y. Structures and biofilm inhibition activities of brominated furanones for *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *MedChemComm.* **2013**, 4(7), 1079-1084.

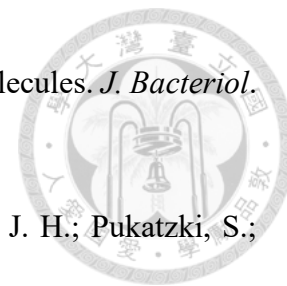
Shrout, J. D.; Chopp, D. L.; Just, C. L.; Hentzer, M.; Givskov, M.; Parsek, M. R. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol. Microbiol.* **2006**, 62(5), 1264-1277.

Shyntum, D. Y.; Theron, J.; Venter, S. N.; Moleleki, L. N.; Toth, I. K.; Coutinho, T. A. *Pantoea ananatis* utilizes a type VI secretion system for pathogenesis and bacterial competition. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2015**, 28(4), 420-431.

Sikdar, R.; Elias, M. Quorum quenching enzymes and their effects on virulence, biofilm, and microbiomes: A review of recent advances. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2020**, 18(12), 1221-1233.

Singh, R. P.; Kumari, K. Bacterial type VI secretion system (T6SS): An evolved molecular weapon with diverse functionality. *Biotechnol. Lett.* **2023**, 45(3), 309-

- 
- Smits, T. H.; Rezzonico, F.; Kamber, T.; Blom, J.; Goesmann, A.; Ishimaru, C. A.; Frey, J. E.; Stockwell, V. O.; Duffy, B. Metabolic versatility and antibacterial metabolite biosynthesis are distinguishing genomic features of the fire blight antagonist *Pantoea vagans* C9-1. *PLoS One*. **2011**, 6(7), e22247.
- Smits, T. H. M.; Rezzonico, F.; Pelludat, C.; Goesmann, A.; Frey, J. E.; Duffy, B. Genomic and phenotypic characterization of a nonpigmented variant of *Pantoea vagans* biocontrol strain C9-1 lacking the 530-kb megaplasmid pPag3. *FEMS Microbiol. Lett.* **2010**, 308(1), 48-54.
- Sperandio, V.; Li, C. C.; Kaper, J. B. Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: A regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. *Infect. Immun.* **2002**, 70(6), 3085-3093.
- Stevens, A. M.; Queneau, Y.; Soulère, L.; von Bodman, S.; Doutheau, A. Mechanisms and synthetic modulators of AHL-dependent gene regulation. *Chem. Rev.* **2011**, 111(1), 4-27.
- Stickler, D. J.; Morris, N. S.; McLean, R. J.; Fuqua, C. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules *in situ* and *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, 64(9), 3486-3490.
- Svec, D.; Tichopad, A.; Novosadova, V.; Pfaffl, M. W.; Kubista, M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol. Detect. Quantif.* **2015**, 3, 9-16.
- Swift, S.; Karlyshev, A. V.; Fish, L.; Durant, E. L.; Winson, M. K.; Chhabra, S. R.; Williams, P.; Macintyre, S.; Stewart, G. Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: Identification of the LuxRI homologs AhyRI and



- AsaRI and their cognate *N*-acylhomoserine lactone signal molecules. *J. Bacteriol.* **1997**, 179(17), 5271-5281.
- Teschler, J. K.; Jiménez-Siebert, E.; Jeckel, H.; Singh, P. K.; Park, J. H.; Pukatzki, S.; Nadell, C. D.; Drescher, K.; Yildiz, F. H. Vxrb influences antagonism within biofilms by controlling competition through extracellular matrix production and type 6 secretion. *mBio.* **2022**, 13(4), e0188522.
- Tiwari, R.; Karthik, K.; Rana, R.; Malik, Y.; Dhama, K.; Joshi, S. Quorum sensing inhibitors / antagonists countering food spoilage bacteria – need molecular and pharmaceutical intervention for protecting current issues of food safety. *Int. J. Pharmacol.* **2016**, 12.
- Vicario, J. C.; Dardanelli, M. S.; Giordano, W. Swimming and swarming motility properties of peanut-nodulating rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* **2015**, 362(2), 1-6.
- von Bodman, S. B.; Majerczak, D. R.; Coplin, D. L. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95(13), 7687-7692.
- Wang, D.; Chen, H.; Li, J.; Li, T.; Ren, L.; Liu, J.; Shen, Y. Screening and validation of quorum quenching enzyme PF2571 from *Pseudomonas fluorescens* strain PF08 to inhibit the spoilage of red sea bream filets. *Int. J. Food Microbiol.* **2022**, 362, 109476.
- Wang, L.; Hashimoto, Y.; Tsao, C. Y.; Valdes, J. J.; Bentley, W. E. Cyclic AMP (cAMP) and cAMP receptor protein influence both synthesis and uptake of extracellular autoinducer 2 in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **2005**, 187(6), 2066-2076.
- Whitehead, N. A.; Barnard, A. M. L.; Slater, H.; Simpson, N. J. L.; Salmond, G. P. C. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, 25(4),

365-404.

Williams, P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology*. **2007**, 153(Pt 12), 3923-3938.

Worlitzer, V. M.; Jose, A.; Grinberg, I.; Bär, M.; Heidenreich, S.; Eldar, A.; Ariel, G.; Be'er, A. Biophysical aspects underlying the swarm to biofilm transition. *Sci. Adv.* **2022**, 8(24), eabn8152.

Wu, H. Y.; Chung, P. C.; Shih, H. W.; Wen, S. R.; Lai, E. M. Secretome analysis uncovers an Hcp-family protein secreted via a type VI secretion system in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **2008**, 190(8), 2841-2850.

Yan, S.; Wu, G. Can biofilm be reversed through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*? *Front. Microbiol.* **2019**, 10, 1582.

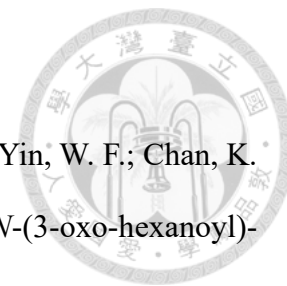
Yang, J.; Sun, B.; Huang, H.; Jiang, Y.; Diao, L.; Chen, B.; Xu, C.; Wang, X.; Liu, J.; Jiang, W.; Yang, S. High-efficiency scarless genetic modification in *Escherichia coli* by using lambda Red recombination and I-sceI cleavage. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, 80(13), 3826-3834.

Yao, B.; Huang, R.; Zhang, Z.; Shi, S. Diverse virulence attributes of *Pantoea alfaiae* sp. nov. CQ10 responsible for bacterial leaf blight in alfalfa revealed by genomic analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24(9).

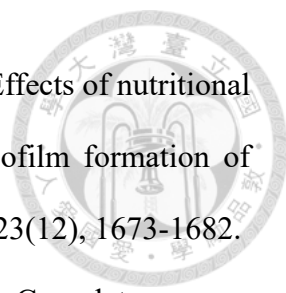
Yates, E. A.; Philipp, B.; Buckley, C.; Atkinson, S.; Chhabra, S. R.; Sockett, R. E.; Goldner, M.; Dessaux, Y.; Cámara, M.; Smith, H.; Williams, P. *N*-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **2002**, 70(10), 5635-5646.

Yu, D.; Ellis, H. M.; Lee, E. C.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G.; Court, D. L. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc.*

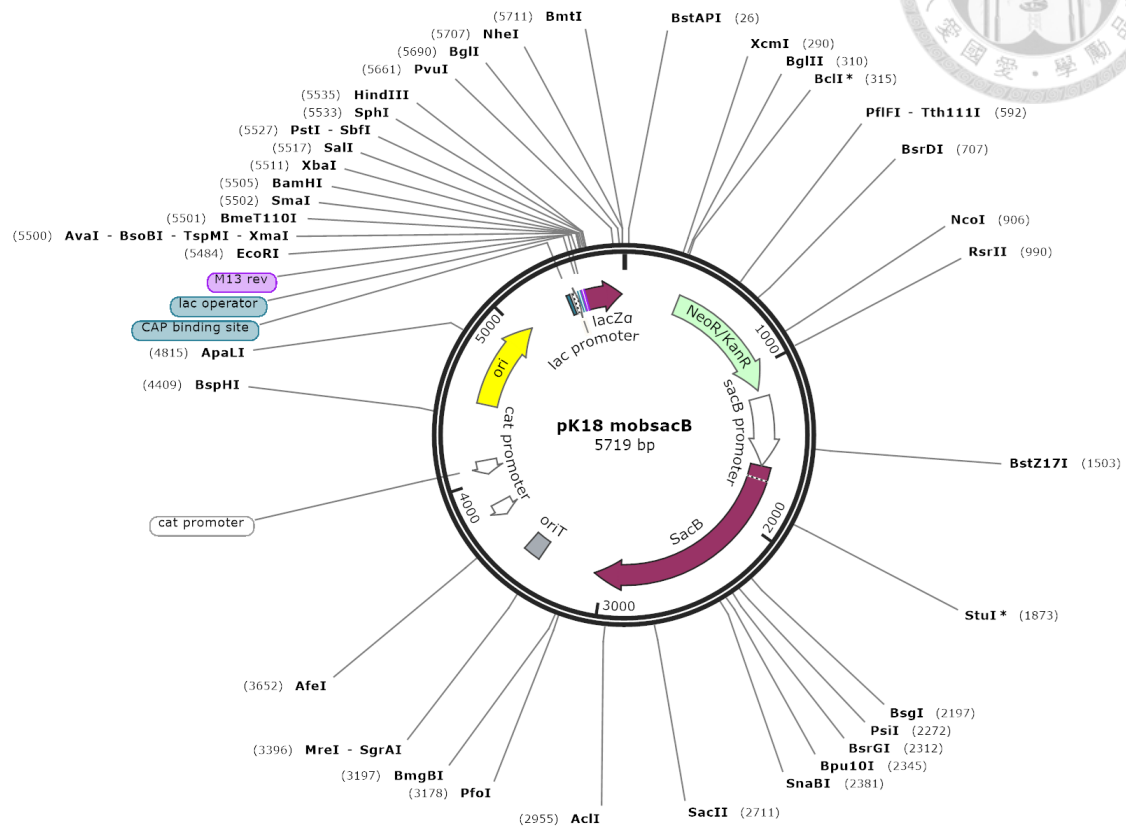




- Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97(11), 5978-5983.
- Yunos, N. Y.; Tan, W. S.; Mohamad, N. I.; Tan, P. W.; Adrian, T. G.; Yin, W. F.; Chan, K. G. Discovery of *Pantoea rodasii* strain ND03 that produces *N*-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone. *Sensors*. **2014**, 14(5), 9145-9152.
- Zaghlool, M.; Al-Khayyat, S. *In silico* structural analysis of quorum sensing genes in *Vibrio fischeri*. *Mol. Biol. Res. Commun.* **2015**, 4(3), 115-124.
- Zhang, N.; He, J.; Muhammad, A.; Shao, Y. CRISPR/CAS9-mediated genome editing for *Pseudomonas fulva*, a novel *Pseudomonas* species with clinical, animal, and plant-associated isolates. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23(10).
- Zhang, W.; Xu, S.; Li, J.; Shen, X.; Wang, Y.; Yuan, Z. Modulation of a thermoregulated type VI secretion system by AHL-dependent quorum sensing in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Arch. Microbiol.* **2011**, 193(5), 351-363.
- Zhao, X.; Gao, L.; Ali, Q.; Yu, C.; Yuan, B.; Huang, H.; Long, J.; Gu, Q.; Wu, H.; Gao, X. A type VI secretion system effector TseG of *Pantoea ananatis* is involved in virulence and antibacterial activity. *Mol. Plant. Pathol.* **2024**, 25(3), e13442.
- Zhao, Y.; Chen, P.; Nan, W.; Zhi, D.; Liu, R.; Li, H. The use of (5*Z*)-4-bromo-5-(bromomethylene)-2(5*H*)-furanone for controlling acid mine drainage through the inhibition of *Acidithiobacillus ferrooxidans* biofilm formation. *Bioresour. Technol.* **2015**, 186, 52-57.
- Zheng, J.; Ho, B.; Mekalanos, J. J. Genetic analysis of anti-amoebae and anti-bacterial activities of the type VI secretion system in *Vibrio cholerae*. *PLoS One*. **2011**, 6(8), e23876.
- Zheng, L.; Wang, S.; Ling, M.; Lv, Z.; Lin, S. *Salmonella enteritidis* Hcp distribute in the cytoplasm and regulate TNF signaling pathway in BHK-21 cells. *3 Biotech.* **2020**, 10(7), 301.

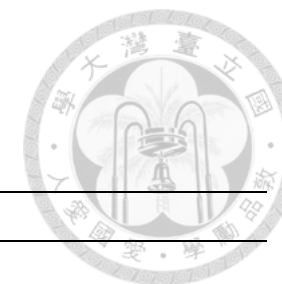
- 
- Zhou, G.; Li, L. J.; Shi, Q. S.; Ouyang, Y. S.; Chen, Y. B.; Hu, W. F. Effects of nutritional and environmental conditions on planktonic growth and biofilm formation of *Citrobacter werkmanii* BF-6. *J Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 23(12), 1673-1682.
- Zhou, G.; Peng, H.; Wang, Y. S.; Huang, X. M.; Xie, X. B.; Shi, Q. S. Complete genome sequence of *Citrobacter werkmanii* strain BF-6 isolated from industrial putrefaction. *BMC Genomics.* **2017**, 18(1), 765.

第八章、附錄



附錄 1、用於基因選殖之質體 pK18 mobsacB。

Appendix 1. Plasmid pK18 mobsacB for gene cloning in this study.

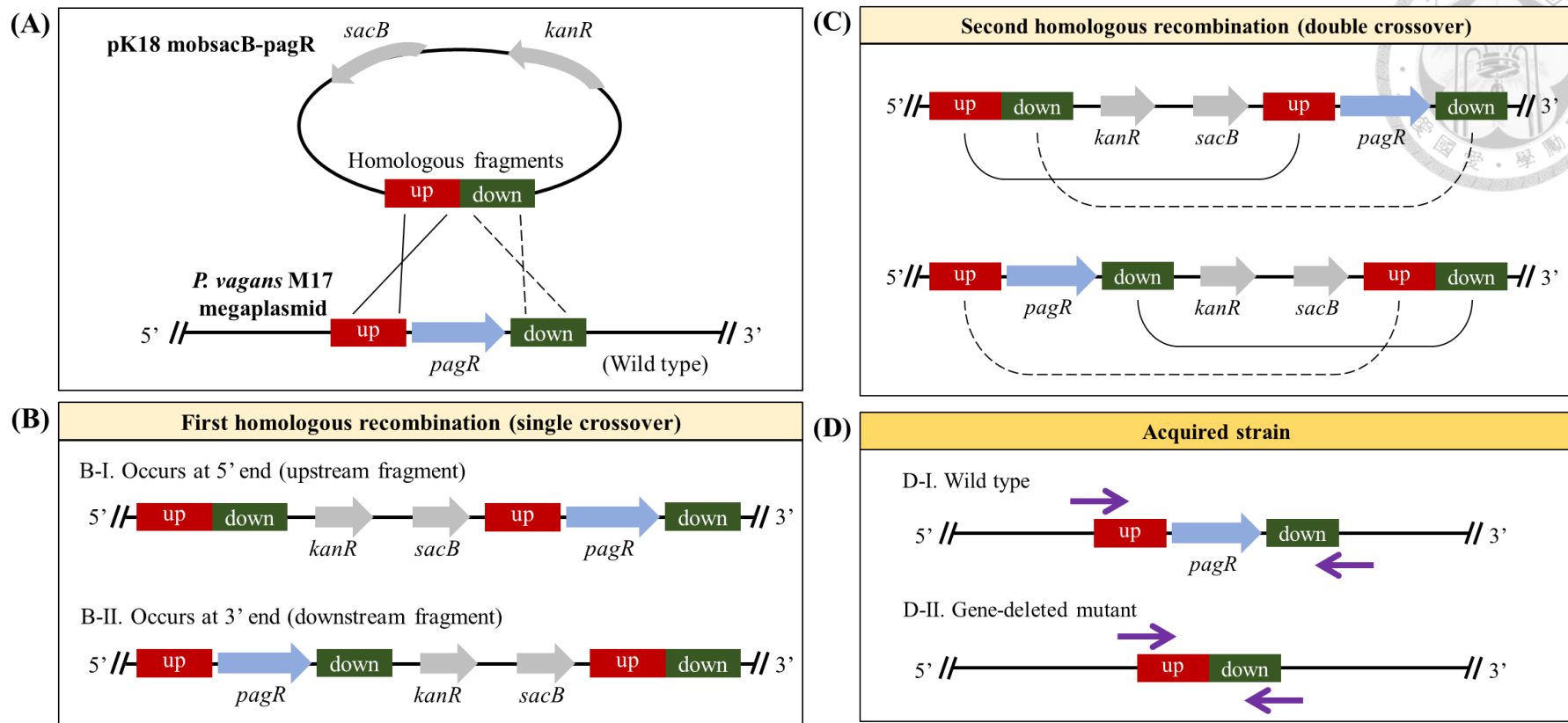


附錄 2、本研究用於建構基因刪除突變株之引子

Appendix 2. Primers used for gene deletion mutant construction in this study

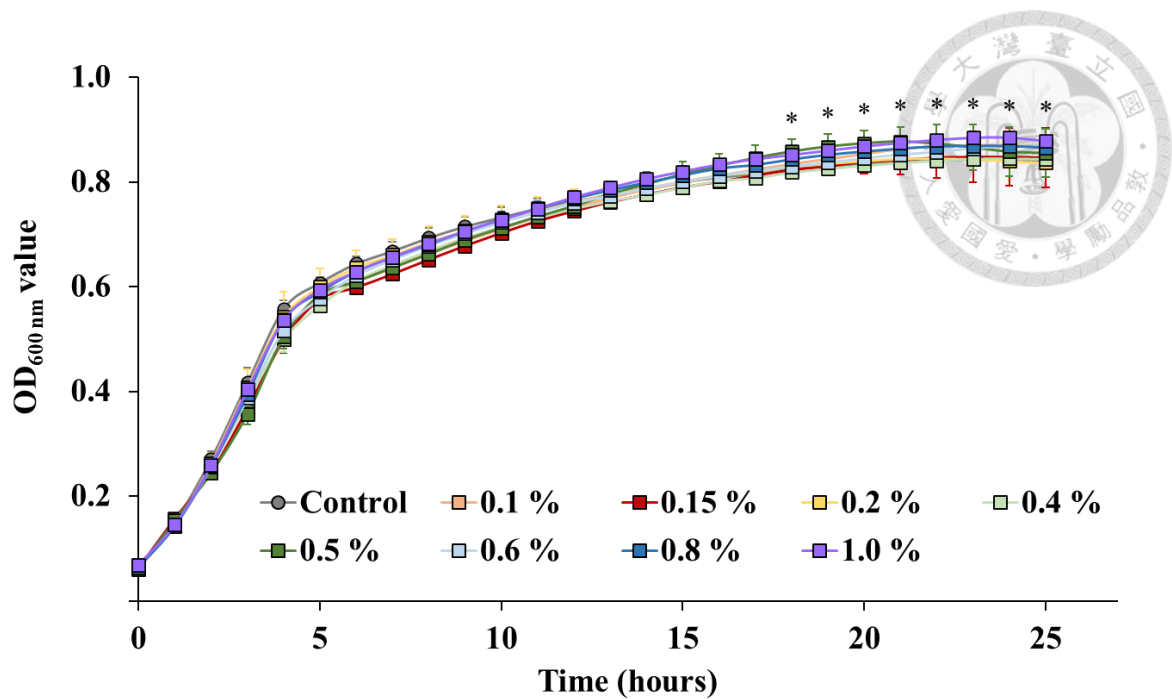
Purpose	Primer	Sequence (5' to 3') ¹
<i>pagR</i> confirmation	pagR_F	GTGAAGGATACCTACTACAA
	pagR_R	TCAGTTTTCCAGTAAGCGGA
<i>pagR</i> deletion	pagR_up_F	TATGCGAATTCAATATGCGGGCTATAGG
	pagR_up_R	<u>GAGTATCTGGCTCAGTTTTTCATCCTTCACGTCAGTTG</u>
	pagR_dn_F	GAAAACTGAGCCAGATACTC
	pagR_dn_R	GATGGATCCGGCGAGTTAATGAGTTCTG
<i>pagI</i> confirmation	pagI_F	ATGAGTTCTGCTATTGATTT
	pagI_R	TCAAAGATGGCATAAGTGCT
<i>pagI</i> deletion	pagI_up_F	GACTAGAATTCACGTGAAGGATACCTACT
	pagI_up_R3	<i>TGATTATTGAGGGCGAGTTAATGAGTTCTTGCCATCTTTGAATGAGTATC</i>
	pagI_dn_F	AGAACTCATTAACCTCGCC
	pagI_dn_R	TCAGGATCCAGATATTTTTTCATGCGCG
Plasmid sequencing	M13 (F)	GTAAAACGACGGCCAGT

¹ In underlined: sequences complementary to the pagR_dn_F. **In bold**: sequences complementary to the pagI_dn_F. *In italicized*: sequences complementary to downstream sequences of *pagI*.



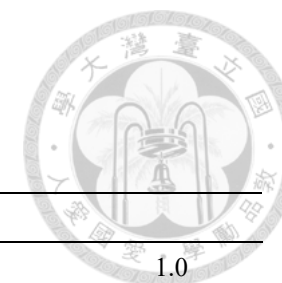
附錄 3、基於 *sacB* 的基因刪除流程。(A) 為重組質體與 *P. vagans* M17 megaplasmid 第一次同源重組時兩個可能的發生位置。(B) 為第一次同源重組後兩種可能的基因排列情況。(C) 為第二次同源重組時兩個可能的發生位置。(D) 為第二次同源重組後兩種可能獲得的菌株。

Appendix 3. Schematic diagram of *sacB*-based markerless gene deletion by homologous recombination. (A) Illustration of constructed plasmid pK18 mobsacB-pagR and partial megaplasmid of *P. vagans* M17. Constructed plasmid was transformed into *P. vagans* M17 by electroporation. (B) After first homologous recombination, there might be two circumstances. If the event occurred at 5' end (upstream fragment) which represented as solid line in figure (A), it resulted in B-I. If the event occurred at 3' end (downstream fragment) which represented as dash line in figure (A), it resulted in B-II. (C) Colonies which were kanamycin-resistant were plated on PCA containing 20 % sucrose to facilitate the second homologous recombination. (D) After second homologous recombination, the acquired strains might be wild type or gene-deleted mutant. If the event happened at the site represented as solid line in figure (C), it led to wild type strain (D-I). If the event happened at the site represented as dash line in figure (C), it led to gene-deleted mutant strain (D-II). After confirmation of kanamycin sensitivity, gene-deleted mutant strain was distinguished through colony PCR. Gray arrow: selective marker on the constructed plasmid. Red and green rectangles: upstream and downstream homologous fragments of *pagR*. Blue arrow: *pagR*, gene expected to be deleted. Purple arrow: primers used in colony PCR.



附錄 4、DMSO 對 *P. vagans* M17 生長之影響。

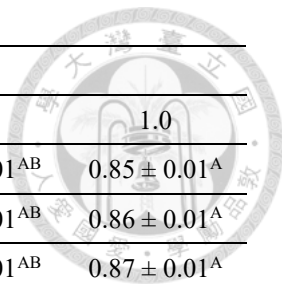
Appendix 4. Effect of DMSO on growth of *P. vagans* M17. Growth patterns of *P. vagans* M17 in TSB containing supplemental DMSO were observed. Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. At each time point, the asterisks were used to denote statistical significances ($p < 0.05$) between the control group and any of the experimental groups.



附錄 5、不同 DMSO 濃度下 *P. vagans* M17 之生長情況

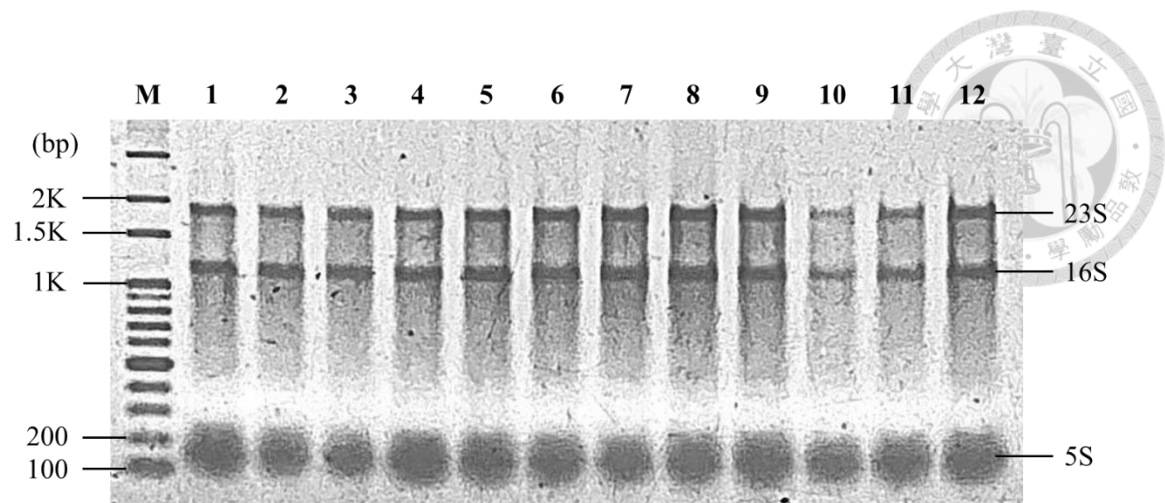
Appendix 5. Growth of *P. vagans* M17 with different concentration of DMSO

Time (hr)	Control	DMSO concentration in bacterial culture (%)							
		0.1	0.15	0.2	0.4	0.5	0.6	0.8	1.0
0	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00
1	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.00	0.16 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01
2	0.27 ± 0.01	0.25 ± 0.00	0.25 ± 0.00	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01
3	0.42 ± 0.03	0.36 ± 0.01	0.37 ± 0.02	0.41 ± 0.03	0.38 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.39 ± 0.01	0.40 ± 0.01
4	0.56 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.50 ± 0.03	0.54 ± 0.05	0.50 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.52 ± 0.03	0.54 ± 0.02	0.54 ± 0.02
5	0.61 ± 0.01	0.59 ± 0.01	0.58 ± 0.02	0.60 ± 0.03	0.56 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.58 ± 0.02	0.59 ± 0.01	0.59 ± 0.01
6	0.64 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.60 ± 0.01	0.64 ± 0.03	0.61 ± 0.01	0.61 ± 0.00	0.62 ± 0.02	0.63 ± 0.01	0.63 ± 0.01
7	0.67 ± 0.02	0.64 ± 0.01	0.62 ± 0.01	0.66 ± 0.03	0.64 ± 0.02	0.64 ± 0.00	0.65 ± 0.02	0.66 ± 0.01	0.66 ± 0.01
8	0.69 ± 0.02	0.66 ± 0.00	0.65 ± 0.01	0.69 ± 0.03	0.67 ± 0.02	0.66 ± 0.01	0.68 ± 0.02	0.68 ± 0.02	0.68 ± 0.01
9	0.72 ± 0.02	0.69 ± 0.01	0.68 ± 0.01	0.71 ± 0.03	0.69 ± 0.02	0.69 ± 0.01	0.70 ± 0.02	0.71 ± 0.02	0.71 ± 0.01
10	0.73 ± 0.02	0.71 ± 0.00	0.70 ± 0.01	0.73 ± 0.03	0.71 ± 0.01	0.71 ± 0.01	0.72 ± 0.01	0.73 ± 0.01	0.73 ± 0.01
11	0.75 ± 0.02	0.73 ± 0.00	0.73 ± 0.01	0.74 ± 0.03	0.73 ± 0.01	0.73 ± 0.02	0.74 ± 0.01	0.75 ± 0.01	0.75 ± 0.01
12	0.76 ± 0.02	0.75 ± 0.01	0.74 ± 0.00	0.76 ± 0.03	0.75 ± 0.01	0.75 ± 0.02	0.76 ± 0.01	0.77 ± 0.01	0.77 ± 0.01
13	0.78 ± 0.02	0.77 ± 0.00	0.76 ± 0.00	0.78 ± 0.02	0.76 ± 0.01	0.78 ± 0.02	0.77 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.79 ± 0.01
14	0.79 ± 0.02	0.79 ± 0.01	0.78 ± 0.00	0.79 ± 0.02	0.78 ± 0.01	0.80 ± 0.02	0.79 ± 0.01	0.80 ± 0.01	0.81 ± 0.01
15	0.80 ± 0.01	0.80 ± 0.00	0.79 ± 0.01	0.80 ± 0.02	0.79 ± 0.01	0.82 ± 0.02	0.80 ± 0.02	0.81 ± 0.01	0.82 ± 0.01
16	0.81 ± 0.01	0.81 ± 0.00	0.80 ± 0.01	0.81 ± 0.02	0.80 ± 0.01	0.83 ± 0.02	0.81 ± 0.02	0.83 ± 0.01	0.83 ± 0.01
17	0.82 ± 0.02	0.82 ± 0.00	0.81 ± 0.01	0.82 ± 0.01	0.81 ± 0.01	0.85 ± 0.02	0.82 ± 0.01	0.83 ± 0.01	0.84 ± 0.01



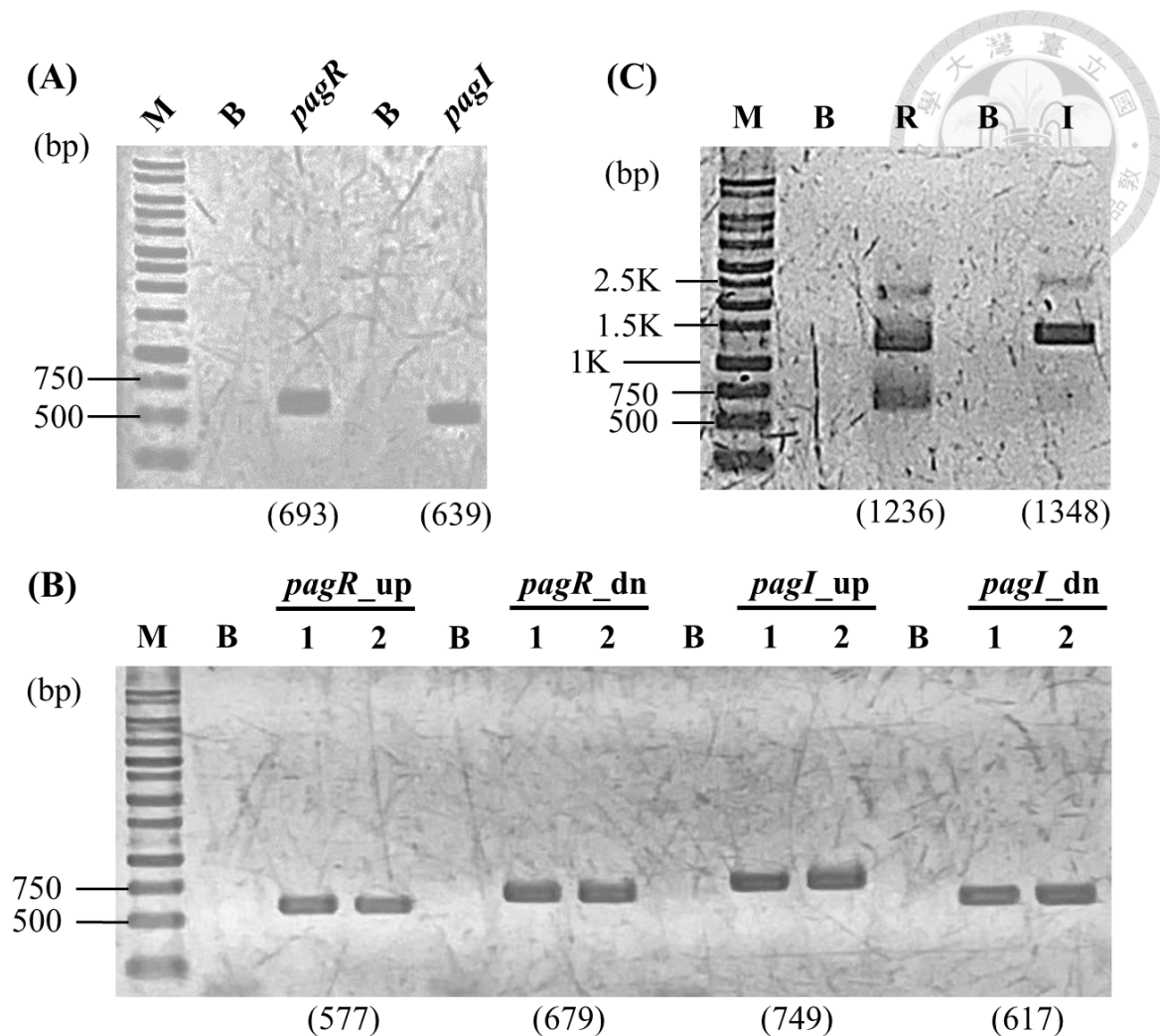
Time (hr)	Control	DMSO concentration in bacterial culture (%)							
		0.1	0.15	0.2	0.4	0.5	0.6	0.8	1.0
18	0.83 ± 0.01 ^B	0.84 ± 0.00 ^B	0.82 ± 0.01 ^B	0.83 ± 0.01 ^{AB}	0.82 ± 0.01 ^{AB}	0.86 ± 0.02 ^{AB}	0.83 ± 0.01 ^{AB}	0.84 ± 0.01 ^{AB}	0.85 ± 0.01 ^A
19	0.83 ± 0.01 ^B	0.84 ± 0.00 ^B	0.83 ± 0.02 ^{AB}	0.84 ± 0.01 ^{AB}	0.83 ± 0.01 ^{AB}	0.87 ± 0.02 ^B	0.84 ± 0.01 ^{AB}	0.85 ± 0.01 ^{AB}	0.86 ± 0.01 ^A
20	0.84 ± 0.01 ^B	0.85 ± 0.00 ^B	0.84 ± 0.02 ^B	0.84 ± 0.01 ^B	0.83 ± 0.01 ^B	0.87 ± 0.02 ^{AB}	0.85 ± 0.01 ^{AB}	0.86 ± 0.01 ^{AB}	0.87 ± 0.01 ^A
21	0.84 ± 0.01 ^C	0.86 ± 0.00 ^{BC}	0.84 ± 0.03 ^{BC}	0.84 ± 0.01 ^{BC}	0.84 ± 0.01 ^C	0.88 ± 0.03 ^{BC}	0.85 ± 0.01 ^{BC}	0.86 ± 0.01 ^{AB}	0.87 ± 0.01 ^A
22	0.84 ± 0.00 ^C	0.87 ± 0.00 ^C	0.85 ± 0.04 ^C	0.85 ± 0.01 ^C	0.84 ± 0.01 ^C	0.87 ± 0.04 ^B	0.86 ± 0.01 ^{BC}	0.87 ± 0.01 ^{AB}	0.88 ± 0.01 ^A
23	0.84 ± 0.00 ^C	0.87 ± 0.01 ^{BC}	0.85 ± 0.05 ^{BC}	0.84 ± 0.01 ^{BC}	0.84 ± 0.01 ^{BC}	0.87 ± 0.04 ^{ABC}	0.86 ± 0.01 ^{ABC}	0.87 ± 0.01 ^{AB}	0.88 ± 0.01 ^A
24	0.84 ± 0.00 ^B	0.87 ± 0.01 ^B	0.85 ± 0.05 ^B	0.84 ± 0.01 ^B	0.85 ± 0.01 ^B	0.86 ± 0.05 ^{AB}	0.87 ± 0.01 ^{AB}	0.87 ± 0.01 ^A	0.88 ± 0.00 ^A
25	0.84 ± 0.01 ^C	0.87 ± 0.01 ^C	0.85 ± 0.06 ^C	0.84 ± 0.01 ^C	0.84 ± 0.01 ^{BC}	0.86 ± 0.05 ^{ABC}	0.87 ± 0.01 ^{ABC}	0.87 ± 0.02 ^{AB}	0.88 ± 0.01 ^A

Growth patterns of *P. vagans* M17 in TSB containing supplemental DMSO were observed. Data were displayed as means ± standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. Among different DMSO concentrations, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).



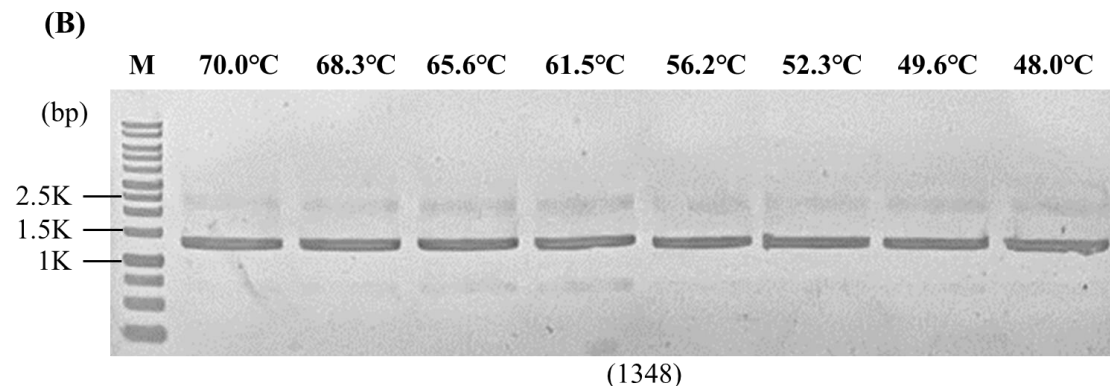
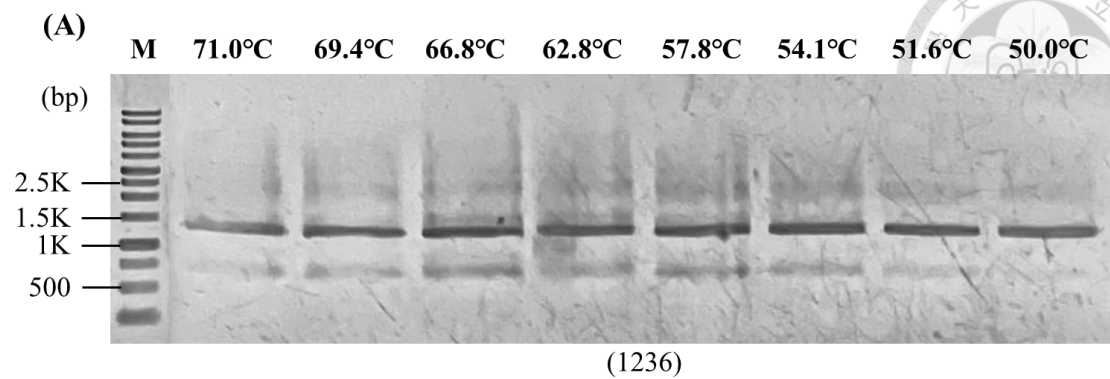
附錄 6、*P. vagans* M17 RNA 之凝膠電泳結果。

Appendix 6. Agarose gel analysis of total RNA extracted from *P. vagans* M17. M: 100 bp DNA ladder; gel lanes 1 to 12: sample.



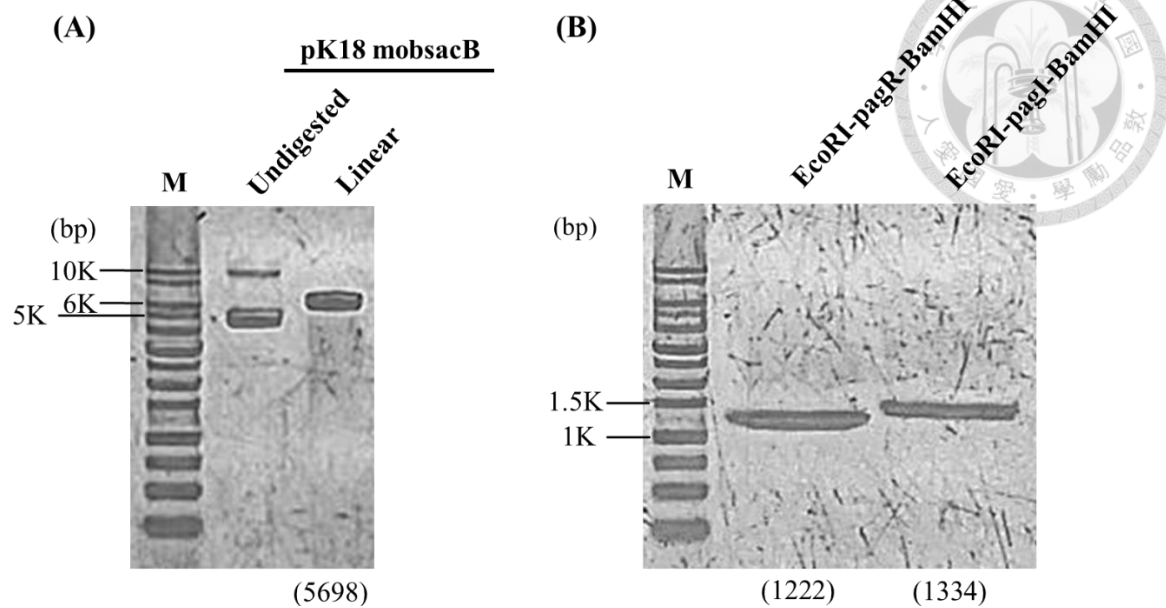
附錄 7、PCR 產物之凝膠電泳結果。(A) 為從 *P. vagans* M17 gDNA 擴增之 *pagR* 與 *pagI* 片段。(B) 為從 *P. vagans* M17 gDNA 擴增之 *pagR* 與 *pagI* 上、下游同源片段。(C) 為 *pagR* 與 *pagI* 上、下游同源片段的融合產物。

Appendix 7. Agarose gel analysis of PCR products. (A) *pagR* and *pagI* amplified from *P. vagans* M17 gDNA. (B) Upstream and downstream fragments of *pagR* or *pagI* amplified from *P. vagans* M17 gDNA. (C) Fusion products of the upstream and downstream fragments. M: 1 kb DNA ladder; B: Blank; R: fusion products of *pagR*; I: fusion products of *pagI*.



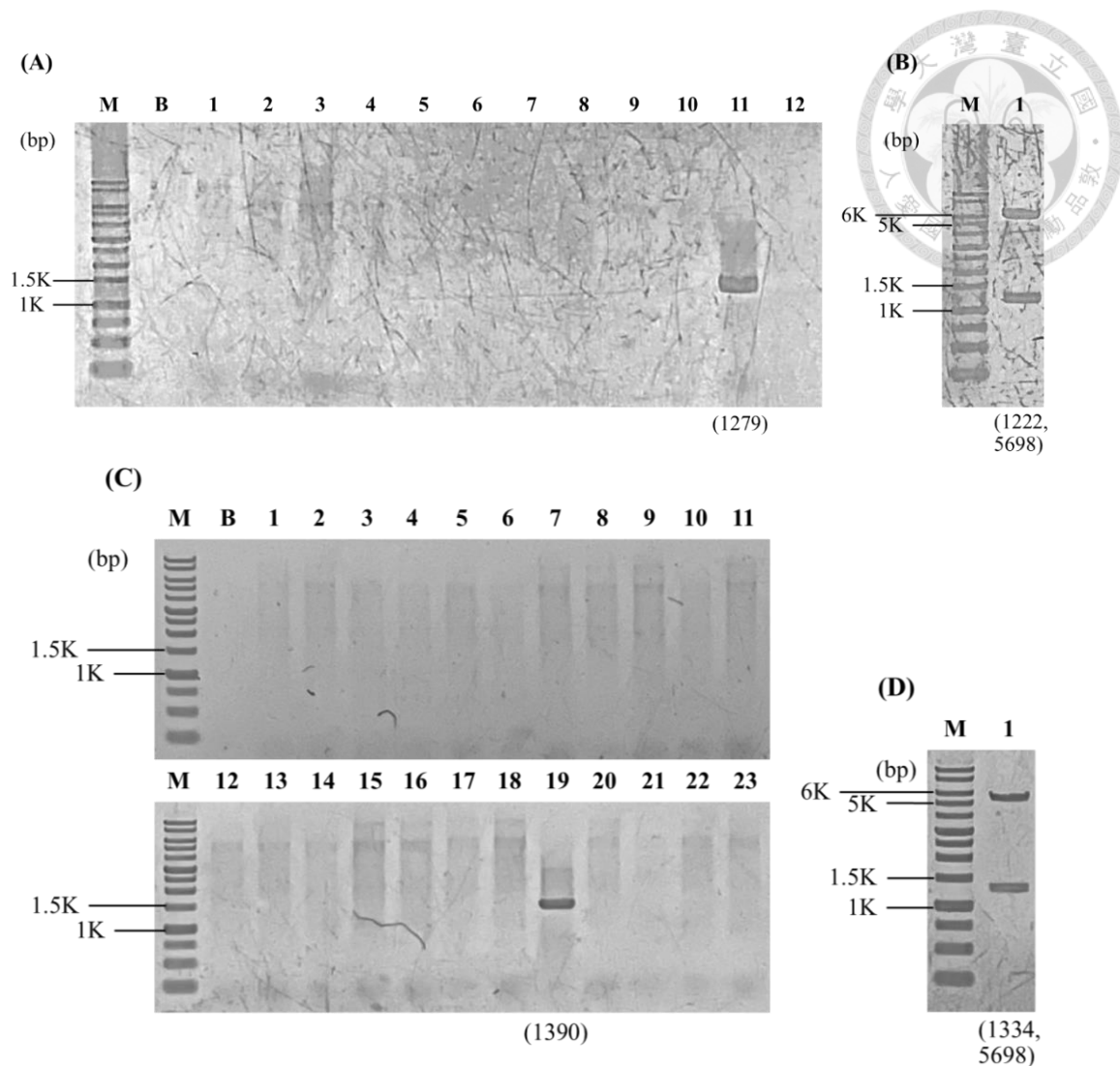
附錄 8、重疊延伸 PCR 溫度調整之凝膠電泳結果。(A) 為針對 *pagR* 進行重疊延伸 PCR 之凝膠電泳結果。(B) 為針對 *pagI* 進行重疊延伸 PCR 之凝膠電泳結果。

Appendix 8. Agarose gel analysis of annealing temperature adjustment of overlap extension PCR. Overlap extension PCR was performed for (A) *pagR* and (B) *pagI*. The expected DNA sizes of fusion products for *pagR* and *pagI* were 1236 bp and 1348 bp, respectively. M: 1 kb DNA ladder.



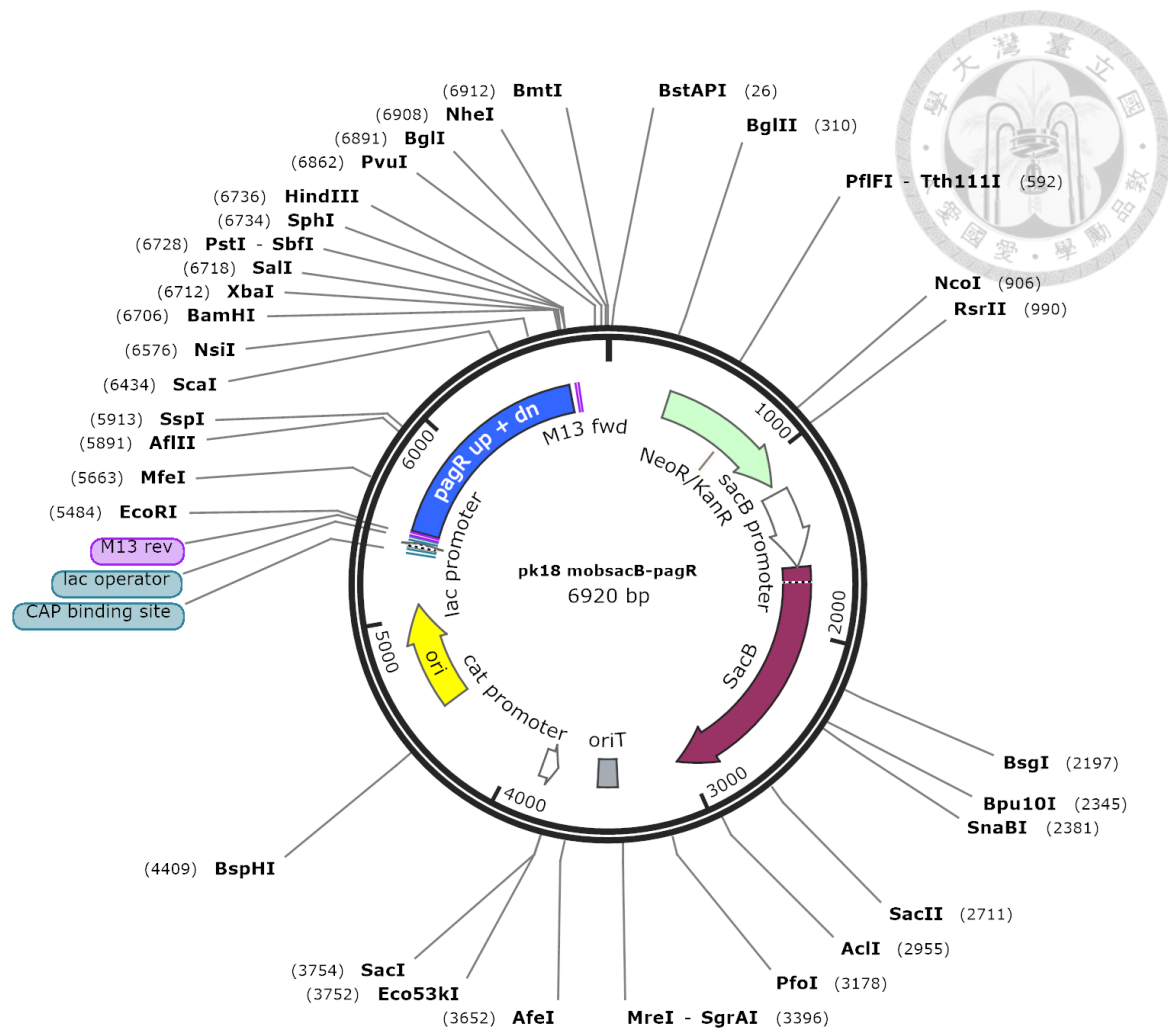
附錄 9、經限制酵素反應後 vector 與 insert 之凝膠電泳結果。(A) 為 pK18 mobsacB 經酵素反應的凝膠電泳結果。(B) 為 *pagR* 與 *pagI* 上、下游同源片段的融合產物經酵素反應的凝膠電泳結果。

Appendix 9. Agarose gel analysis of digested products of vector and insert. The EcoRI and BamHI digested products were (A) pK18 mobsacB as vector and (B) fusion products of *pagR* and *pagI* as insert. M: 1 kb DNA ladder.



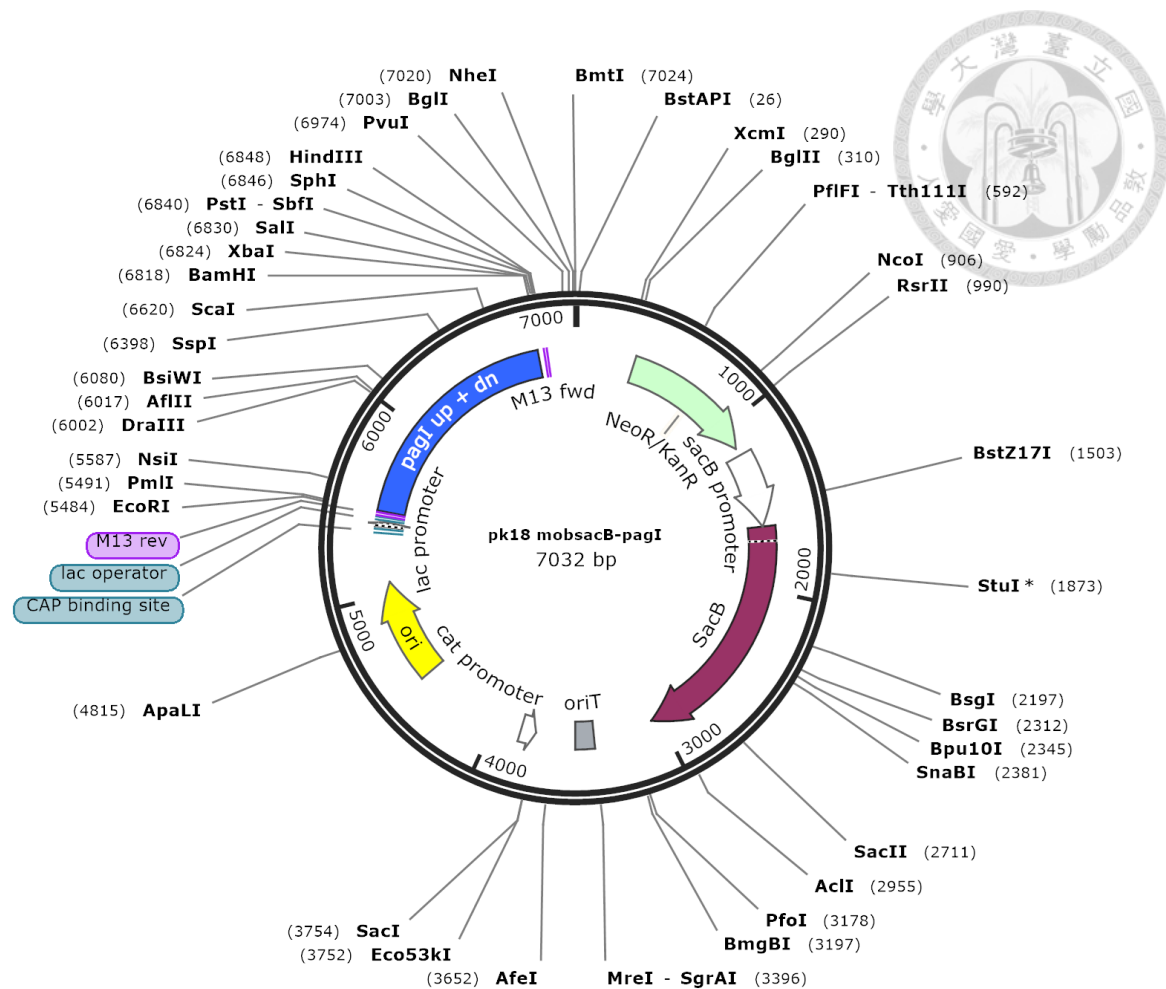
附錄 10、菌落 PCR 與質體經限制酵素反應後之凝膠電泳結果。(A)、(C) 為以菌落 PCR 確認 pK18 mobsacB-pagR 與 pK18 mobsacB-pagI 之凝膠電泳結果。(B)、(D) 為 pK18 mobsacB-pagR 與 pK18 mobsacB-pagI 經酵素反應的凝膠電泳結果。

Appendix 10. Agarose gel analysis of colony PCR and digested plasmid. (A) Checking the ligation products pK18 mobsacB-pagR with colony PCR. Genes were amplified from primers M13-F, pagR_up_F. The expected DNA sizes were 1279 bp. (B) Checking the ligation products pK18 mobsacB-pagR with EcoRI and BamHI. (C) Checking the ligation products pK18 mobsacB-pagI with colony PCR. Genes were amplified from primers M13-F, pagI_up_F. The expected DNA sizes were 1390 bp. (D) Checking the ligation products pK18 mobsacB-pagI with EcoRI and BamHI. M: 1 kb DNA ladder; B: Blank.



附錄 11、本研究建構之重組質體 pK18 mobsacB-pagR。「pagR up + dn」代表 *pagR* 上、下游同源片段的融合產物之序列。

Appendix 11. Constructed plasmid pK18 mobsacB-pagR in this study. The description “pagR up + dn” represents the homologous fragments of *pagR*.



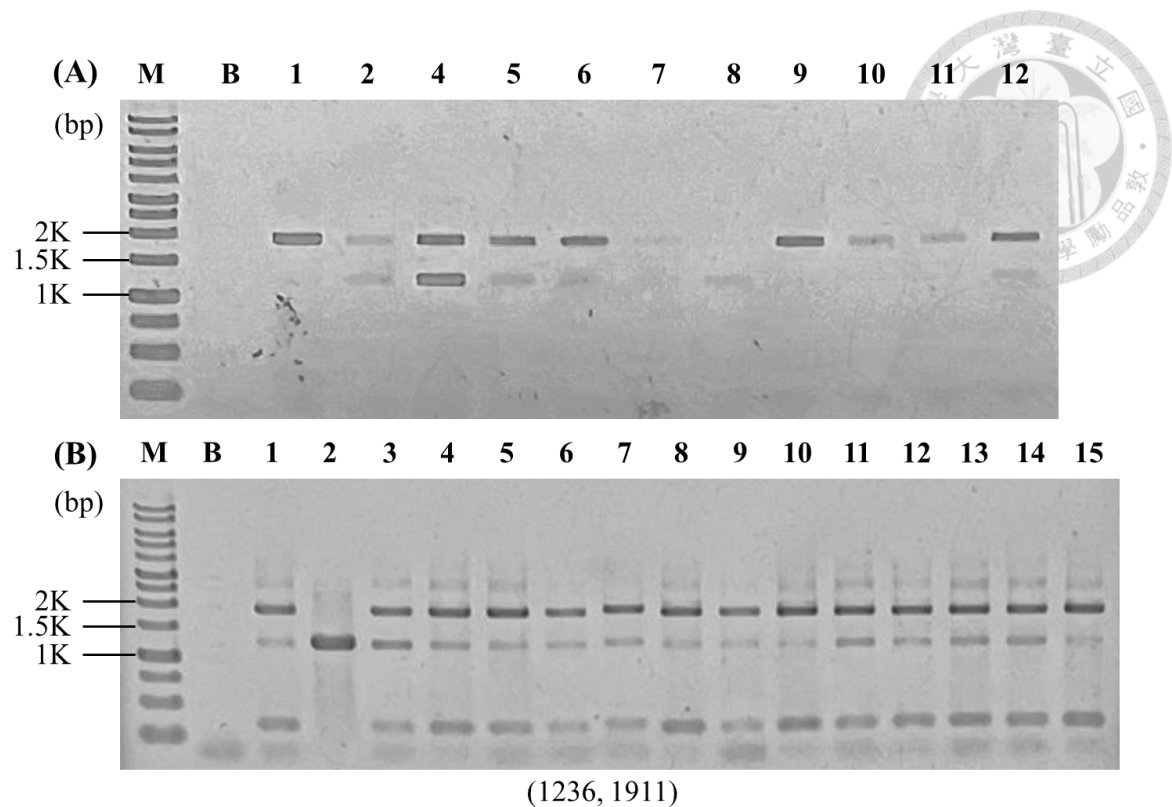
附錄 12、本研究建構之重組質體 pK18 mobsacB-pagI。「pagI up + dn」代表 *pagI* 上、下游同源片段的融合產物之序列。

Appendix 12. Constructed plasmid pK18 mobsacB-pagI in this study. The description “pagI up + dn” represents the homologous fragments of *pagI*.

附錄 13、確認 *P. vagans* M17 中 *pagR* 或 *pagI* 刪除之菌落 PCR 結果

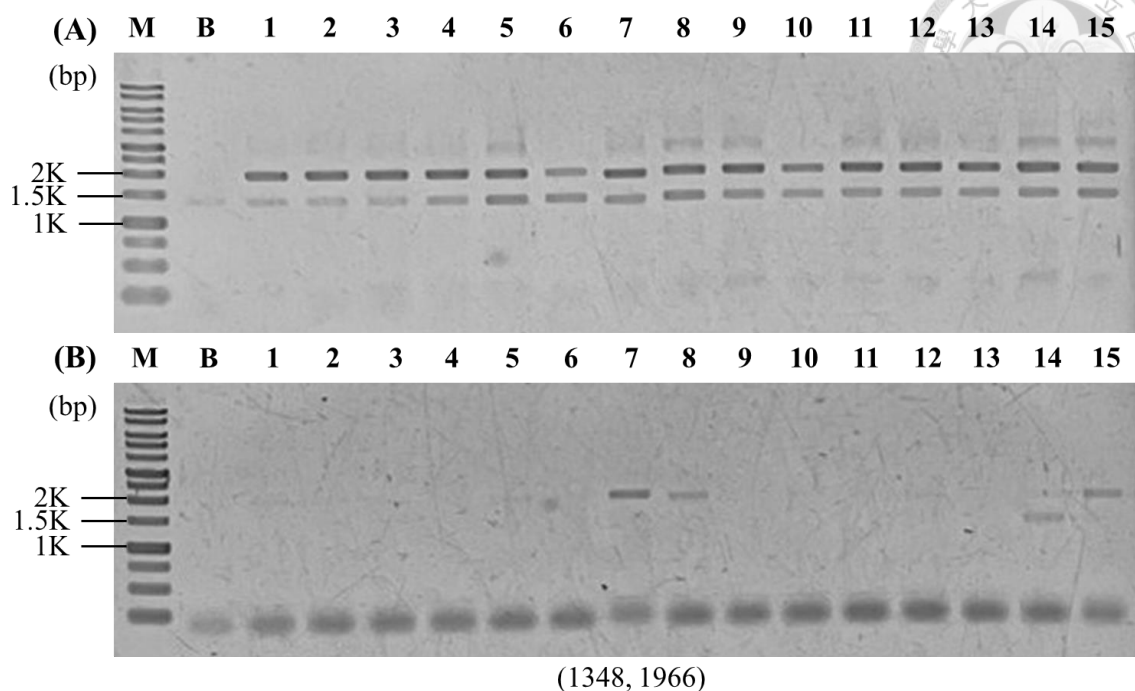
Appendix 13. Results of agarose gel analysis of colony PCR to check the deletion of *pagR* or *pagI* in *P. vagans* M17

Gel analysis result	<i>pagR</i>		<i>pagI</i>	
	Colonies	%	Colonies	%
Mixture	20	25.3	44	48.9
Wild type	48	60.8	24	26.7
Mutant	2	2.5	1	1.1
Negative	9	11.4	21	23.3
Total	79	-	90	-



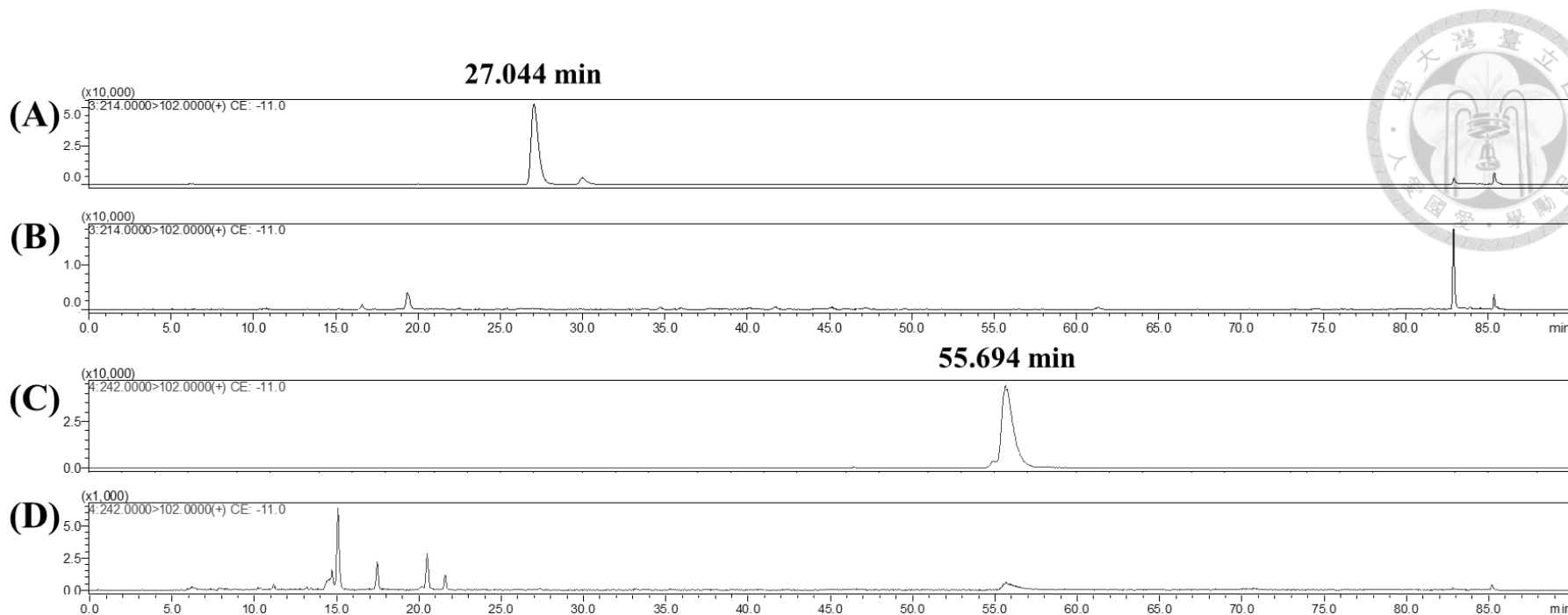
附錄 14、確認 *pagR* 刪除之菌落 PCR 凝膠電泳結果。(A) 與 (B) 為以菌落 PCR 確認 *pagR* 是否刪除之其中兩次的凝膠電泳結果。

Appendix 14. Agarose gel analysis of colony PCR to check the deletion of *pagR* in *P. vagans* M17. Within several rounds of colony PCR, figure (A) and (B) exhibited the results of two rounds of which. Genes were amplified from primers *pagR*_up_F, *pagR*_dn_R. The expected DNA sizes for mutant strain and wild type strain were 1236 bp and 1911 bp, respectively. M: 1 kb DNA ladder; B: Blank.



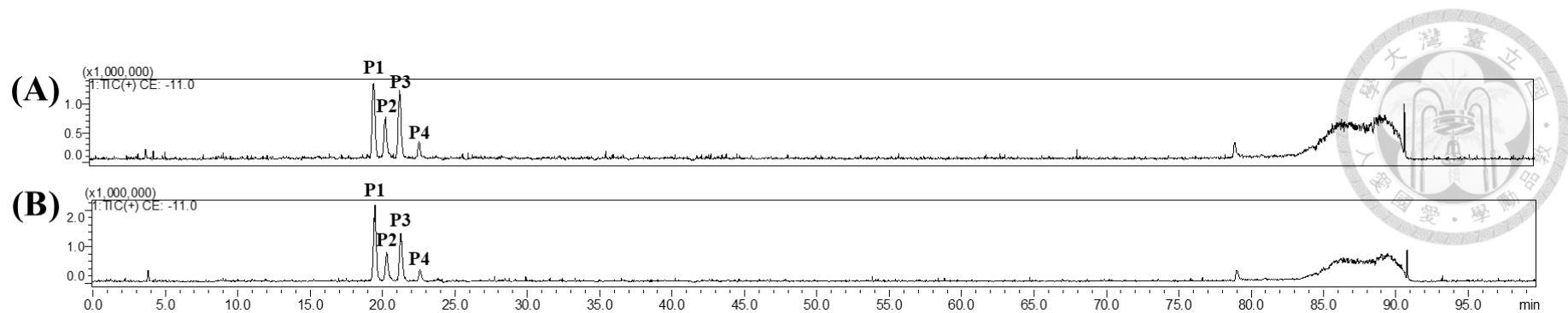
附錄 15、確認 *pagI* 刪除之菌落 PCR 凝膠電泳結果。(A) 與 (B) 為以菌落 PCR 確認 *pagI* 是否刪除之其中兩次的凝膠電泳結果。

Appendix 15. Agarose gel analysis of colony PCR to check the deletion of *pagI* in *P. vagans* M17. Within several rounds of colony PCR, figure (A) and (B) exhibited the results of two rounds of which. Genes were amplified from primers *pagI*_up_F, *pagI*_dn_R. The expected DNA sizes for mutant strain and wild type strain were 1348 bp and 1966 bp, respectively. M: 1 kb DNA ladder; B: Blank.



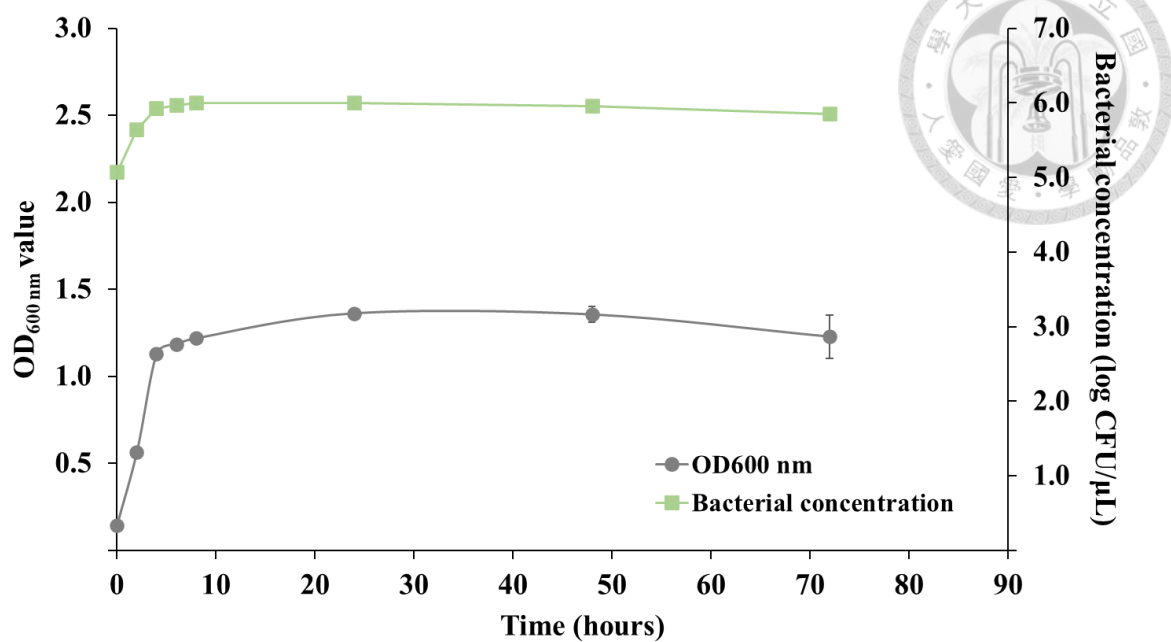
附錄 16、OHHL、OOHL 標準品與樣品在 multiple reaction monitoring 模式下之總離子層析圖。(A)、(B) 分別為 OHHL 標準品與樣品之總離子層析圖。(C)、(D) 分別為 OOHHL 標準品與樣品之總離子層析圖。波峰上方的數字對應滯留時間。

Appendix 16. HPLC-MS/MS chromatograms of OHHL, OOHHL standards and *P. vagans* M17 sample in the multiple reaction monitoring mode. The total ion chromatogram of product ion at m/z ($[M+H]^+$) of 102.0 from the precursor ion for (A) OHHL standard and (B) sample at m/z ($[M+H]^+$) of 214.0. The total ion chromatogram of product ion at m/z ($[M+H]^+$) of 102.0 from the precursor ion for (C) OOHHL standard and (D) sample at m/z ($[M+H]^+$) of 242.0. The number above the peak indicate the corresponding retention time.



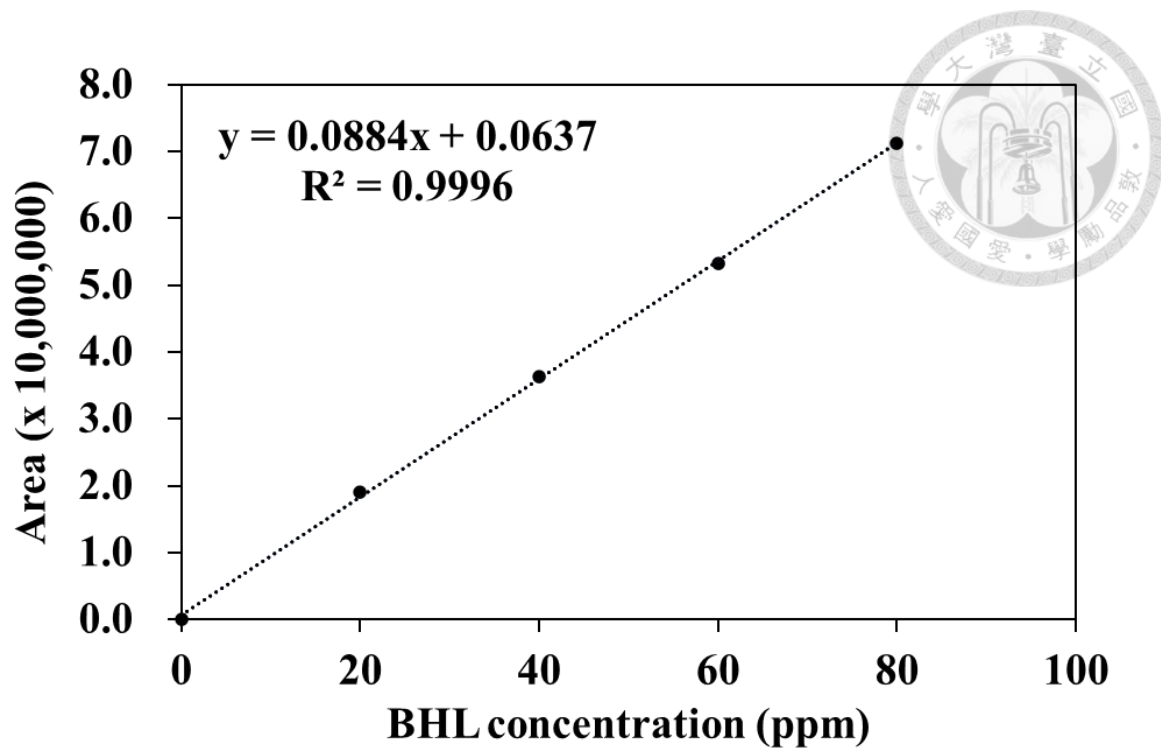
附錄 17、有無添加 BHL 之 *P. vagans* M17 樣品之總離子層析圖。(A) 為無添加 BHL 的樣品之總離子層析圖。(B) 為有添加 BHL 的樣品之總離子層析圖。

Appendix 17. HPLC-MS/MS chromatograms of *P. vagans* M17 sample without or with addition of BHL in the precursor ion scan mode. *P. vagans* M17 sample (A) without BHL and (B) with BHL were analyzed. The total ion chromatogram of precursor ion m/z ($[M+H]^+$) ranging from 100 to 500 with the product ion at m/z ($[M+H]^+$) of 102.0.



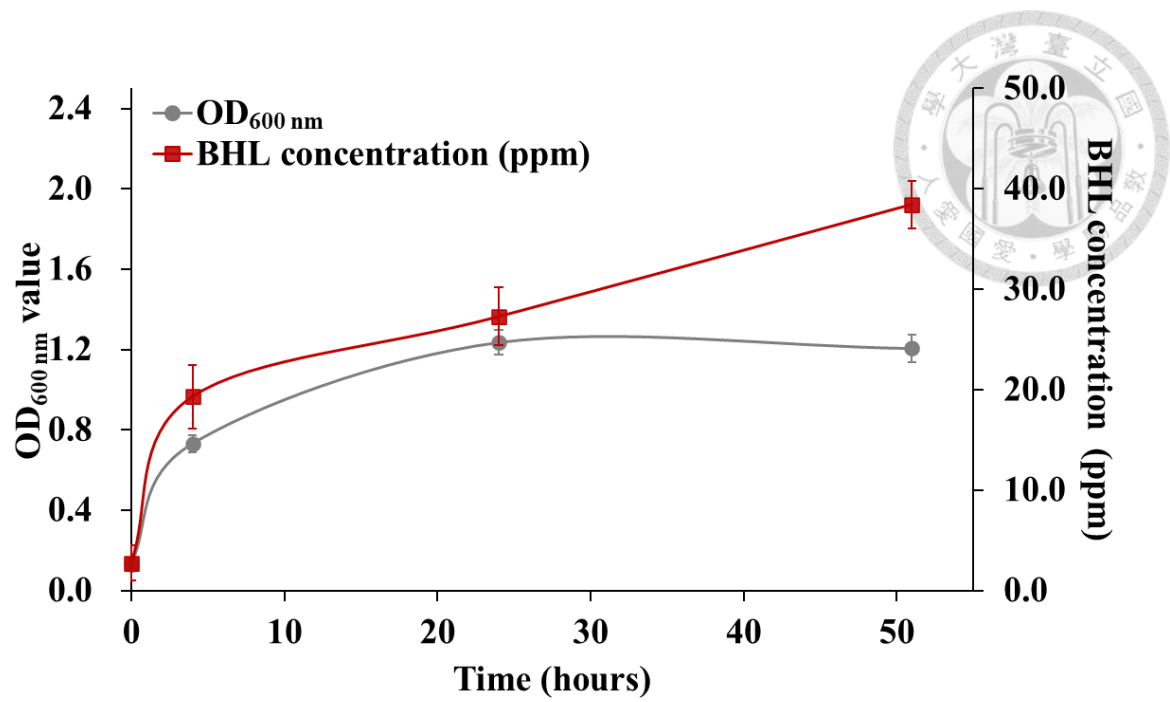
附錄 18、*P. vagans* M17 之生長曲線。

Appendix 18. Growth curve of *P. vagans* M17. Growth of *P. vagans* M17 in TSB at 30 °C, 75 rpm was observed. Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates.



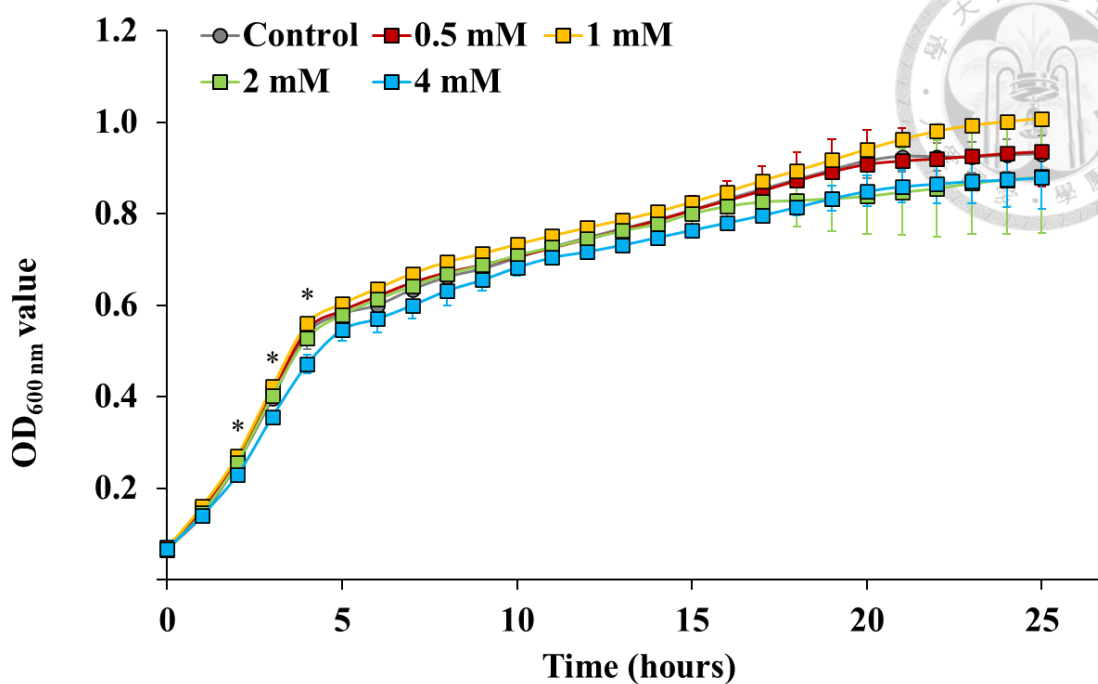
附錄 19、BHL 標準品校準曲線。

Appendix 19. Calibration curves of BHL standard. The concentration of BHL solution include 80 ppm, 60 ppm, 40 ppm, 20 ppm, and 0 ppm (methanol).



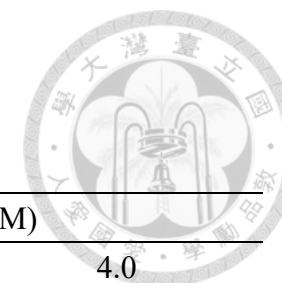
附錄 20、不同生長階段 *P. vagans* M17 樣品之 BHL 定量。

Appendix 20. Quantification of BHL in *P. vagans* M17 sample from different growth stages. Sample were incubated at 30 °C, 75 rpm for 0, 4, 24, and 51 hours. Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates.



附錄 21、較低濃度的群體感應抑制劑 2(5H)-呋喃酮對 *P. vagans* M17 生長之影響。

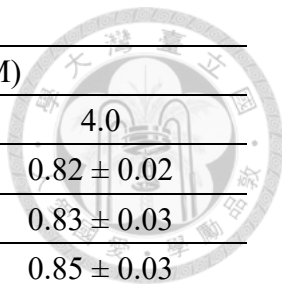
Appendix 21. Effect of lower concentration of QS inhibitor 2(5H)-furanone on growth of *P. vagans* M17. Growth patterns of *P. vagans* M17 in TSB containing supplemental 2(5H)-furanone were observed. Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. At each time point, the asterisks were used to denote statistical significances ($p < 0.05$) between the control group and any of the experimental groups.



附錄 22、2(5H)-呋喃酮濃度較低時 *P. vagans* M17 之生長情況

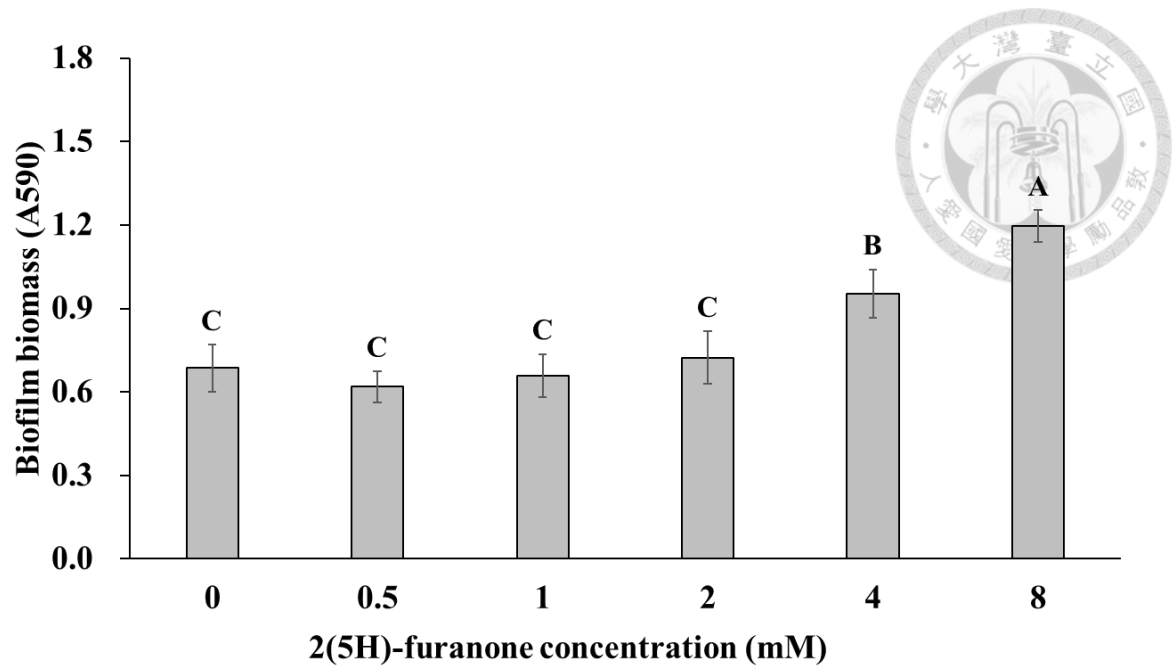
Appendix 22. Growth of *P. vagans* M17 with lower concentration of 2(5H)-furanone

Incubation time (hours)	Control	2(5H)-furanone concentration in bacterial culture (mM)			
		0.5	1.0	2.0	4.0
0	0.07 ± 0.00 ^{AB}	0.07 ± 0.00 ^A	0.07 ± 0.00 ^A	0.06 ± 0.00 ^{AB}	0.07 ± 0.00 ^{AB}
1	0.14 ± 0.00 ^{BC}	0.15 ± 0.01 ^{AB}	0.16 ± 0.01 ^A	0.15 ± 0.00 ^B	0.14 ± 0.01 ^B
2	0.25 ± 0.00 ^A	0.27 ± 0.01 ^A	0.27 ± 0.01 ^A	0.26 ± 0.01 ^A	0.23 ± 0.00 ^B
3	0.40 ± 0.01 ^A	0.41 ± 0.01 ^A	0.42 ± 0.01 ^A	0.40 ± 0.02 ^A	0.36 ± 0.01 ^B
4	0.54 ± 0.03 ^A	0.55 ± 0.01 ^A	0.56 ± 0.01 ^A	0.53 ± 0.01 ^A	0.47 ± 0.02 ^B
5	0.58 ± 0.03 ^{AB}	0.59 ± 0.01 ^{AB}	0.60 ± 0.00 ^A	0.58 ± 0.01 ^{AB}	0.55 ± 0.03 ^B
6	0.60 ± 0.03 ^{AB}	0.62 ± 0.00 ^{AB}	0.64 ± 0.00 ^A	0.61 ± 0.02 ^{AB}	0.57 ± 0.03 ^B
7	0.63 ± 0.03 ^{AB}	0.65 ± 0.01 ^{AB}	0.67 ± 0.00 ^A	0.64 ± 0.02 ^{AB}	0.60 ± 0.03 ^B
8	0.66 ± 0.03 ^{AB}	0.67 ± 0.01 ^{AB}	0.70 ± 0.00 ^A	0.67 ± 0.03 ^{AB}	0.63 ± 0.03 ^B
9	0.68 ± 0.03 ^{AB}	0.69 ± 0.01 ^{AB}	0.71 ± 0.00 ^A	0.69 ± 0.03 ^{AB}	0.66 ± 0.02 ^B
10	0.70 ± 0.02 ^{AB}	0.71 ± 0.02 ^{AB}	0.73 ± 0.00 ^A	0.71 ± 0.03 ^A	0.68 ± 0.02 ^{AB}
11	0.73 ± 0.02	0.73 ± 0.02	0.75 ± 0.00	0.73 ± 0.03	0.70 ± 0.02
12	0.75 ± 0.02 ^{AB}	0.74 ± 0.02 ^{AB}	0.77 ± 0.00 ^A	0.75 ± 0.03 ^{AB}	0.72 ± 0.01 ^{AB}
13	0.77 ± 0.02	0.76 ± 0.02	0.79 ± 0.00	0.76 ± 0.03	0.73 ± 0.01
14	0.79 ± 0.02	0.79 ± 0.02	0.80 ± 0.01	0.78 ± 0.03	0.75 ± 0.01
15	0.81 ± 0.02	0.81 ± 0.03	0.83 ± 0.01	0.80 ± 0.03	0.76 ± 0.00
16	0.83 ± 0.02	0.83 ± 0.04	0.85 ± 0.01	0.82 ± 0.03	0.78 ± 0.00
17	0.85 ± 0.03	0.85 ± 0.05	0.87 ± 0.01	0.83 ± 0.04	0.80 ± 0.01



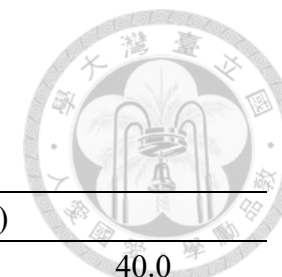
Incubation time (hours)	Control	2(5H)-furanone concentration in bacterial culture (mM)			
		0.5	1.0	2.0	4.0
18	0.87 ± 0.03	0.87 ± 0.06	0.89 ± 0.01	0.83 ± 0.06	0.82 ± 0.02
19	0.90 ± 0.03	0.89 ± 0.07	0.92 ± 0.00	0.83 ± 0.07	0.83 ± 0.03
20	0.92 ± 0.02	0.91 ± 0.07	0.94 ± 0.00	0.84 ± 0.08	0.85 ± 0.03
21	0.93 ± 0.03 ^{AB}	0.92 ± 0.07 ^{AB}	0.96 ± 0.00 ^A	0.85 ± 0.09 ^{AB}	0.86 ± 0.04 ^{AB}
22	0.92 ± 0.03 ^{AB}	0.92 ± 0.07 ^{AB}	0.98 ± 0.00 ^A	0.86 ± 0.11 ^{AB}	0.87 ± 0.04 ^{AB}
23	0.92 ± 0.03 ^{AB}	0.93 ± 0.07 ^{AB}	0.99 ± 0.00 ^A	0.87 ± 0.11 ^{AB}	0.87 ± 0.05 ^{AB}
24	0.93 ± 0.04 ^{AB}	0.93 ± 0.07 ^{AB}	1.00 ± 0.00 ^A	0.87 ± 0.12 ^{AB}	0.87 ± 0.06 ^{AB}
25	0.93 ± 0.04 ^{AB}	0.94 ± 0.08 ^{AB}	1.01 ± 0.00 ^A	0.88 ± 0.12 ^{AB}	0.88 ± 0.07 ^{AB}

Growth patterns of *P. vagans* M17 in TSB containing supplemental 2(5H)-furanone were observed. Data were displayed as means ± standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. Among different 2(5H)-furanone concentrations, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).



附錄 23、較低濃度的群體感應抑制劑 2(5H)-呋喃酮對 *P. vagans* M17 生物膜生成之影響。

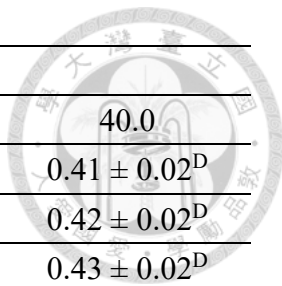
Appendix 23. Effect of lower concentration of QS inhibitor 2(5H)-furanone on biofilm formation of *P. vagans* M17. Biofilm formation of *P. vagans* M17 in TSB containing supplemental 2(5H)-furanone was analyzed. Each group underwent incubation for 24 hours at 30 °C. Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. Among different 2(5H)-furanone concentrations, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).



附錄 24、不同 2(5H)-呋喃酮濃度下 *P. vagans* M17 之生長情況

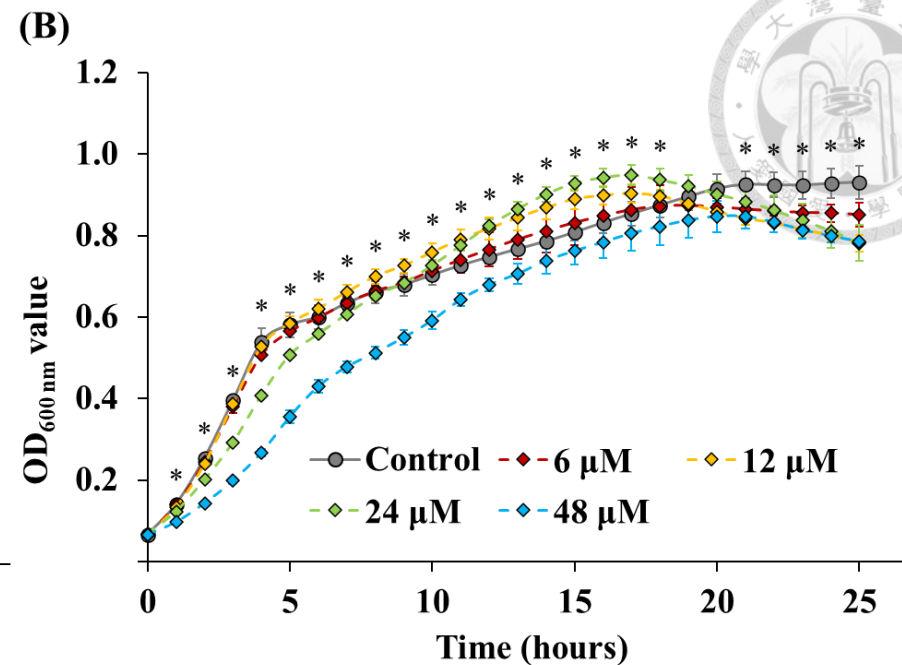
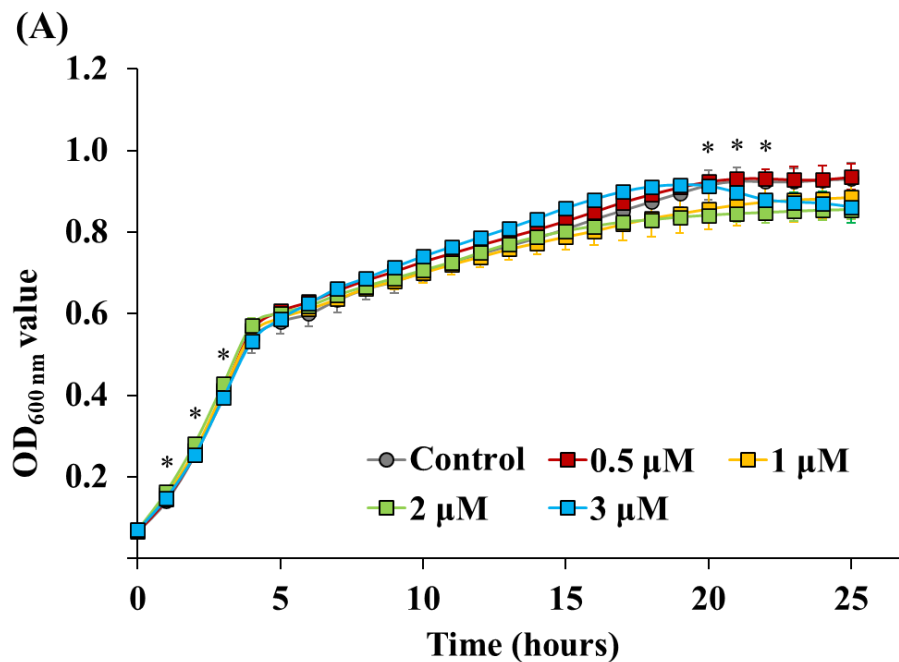
Appendix 24. Growth of *P. vagans* M17 with different concentration of 2(5H)-furanone

Incubation time (hours)	Control	2(5H)-furanone concentration in bacterial culture (mM)				
		8.0	16.0	24.0	32.0	40.0
0	0.08 ± 0.00 ^{AB}	0.07 ± 0.00 ^{AB}	0.08 ± 0.00 ^A	0.07 ± 0.00 ^{AB}	0.08 ± 0.00 ^A	0.07 ± 0.00 ^B
1	0.17 ± 0.01 ^A	0.15 ± 0.00 ^B	0.14 ± 0.00 ^B	0.13 ± 0.00 ^C	0.13 ± 0.00 ^C	0.12 ± 0.00 ^C
2	0.28 ± 0.02 ^A	0.22 ± 0.01 ^B	0.20 ± 0.00 ^{BC}	0.19 ± 0.00 ^C	0.16 ± 0.00 ^D	0.16 ± 0.00 ^D
3	0.43 ± 0.02 ^A	0.32 ± 0.01 ^B	0.28 ± 0.01 ^C	0.26 ± 0.01 ^C	0.20 ± 0.00 ^D	0.19 ± 0.00 ^D
4	0.57 ± 0.03 ^A	0.41 ± 0.02 ^B	0.37 ± 0.03 ^{BC}	0.34 ± 0.00 ^C	0.23 ± 0.01 ^D	0.21 ± 0.00 ^D
5	0.60 ± 0.02 ^A	0.50 ± 0.02 ^B	0.44 ± 0.04 ^{BC}	0.41 ± 0.03 ^C	0.26 ± 0.01 ^D	0.24 ± 0.00 ^D
6	0.62 ± 0.02 ^A	0.53 ± 0.02 ^B	0.49 ± 0.03 ^{BC}	0.44 ± 0.02 ^C	0.29 ± 0.01 ^D	0.26 ± 0.01 ^D
7	0.64 ± 0.02 ^A	0.55 ± 0.02 ^B	0.51 ± 0.02 ^B	0.46 ± 0.01 ^C	0.31 ± 0.01 ^D	0.28 ± 0.01 ^D
8	0.66 ± 0.02 ^A	0.57 ± 0.03 ^B	0.53 ± 0.02 ^{BC}	0.49 ± 0.02 ^C	0.33 ± 0.01 ^D	0.30 ± 0.01 ^D
9	0.68 ± 0.03 ^A	0.60 ± 0.03 ^B	0.56 ± 0.03 ^B	0.49 ± 0.01 ^C	0.34 ± 0.01 ^D	0.32 ± 0.01 ^D
10	0.70 ± 0.03 ^A	0.62 ± 0.03 ^B	0.58 ± 0.03 ^B	0.50 ± 0.01 ^C	0.35 ± 0.01 ^D	0.33 ± 0.01 ^D
11	0.72 ± 0.02 ^A	0.64 ± 0.03 ^B	0.61 ± 0.02 ^B	0.51 ± 0.01 ^C	0.36 ± 0.01 ^D	0.35 ± 0.02 ^D
12	0.74 ± 0.02 ^A	0.66 ± 0.03 ^B	0.63 ± 0.03 ^B	0.52 ± 0.01 ^C	0.38 ± 0.01 ^D	0.36 ± 0.02 ^D
13	0.75 ± 0.02 ^A	0.67 ± 0.02 ^B	0.65 ± 0.02 ^B	0.53 ± 0.01 ^C	0.39 ± 0.01 ^D	0.38 ± 0.03 ^D
14	0.77 ± 0.02 ^A	0.69 ± 0.02 ^B	0.66 ± 0.02 ^B	0.54 ± 0.02 ^C	0.40 ± 0.01 ^D	0.39 ± 0.03 ^D
15	0.78 ± 0.02 ^A	0.70 ± 0.02 ^B	0.68 ± 0.01 ^B	0.56 ± 0.02 ^C	0.40 ± 0.01 ^D	0.40 ± 0.03 ^D
16	0.79 ± 0.02 ^A	0.71 ± 0.02 ^B	0.69 ± 0.01 ^B	0.58 ± 0.02 ^C	0.42 ± 0.02 ^D	0.40 ± 0.02 ^D
17	0.80 ± 0.02 ^A	0.72 ± 0.02 ^B	0.70 ± 0.01 ^B	0.59 ± 0.02 ^C	0.43 ± 0.03 ^D	0.41 ± 0.01 ^D



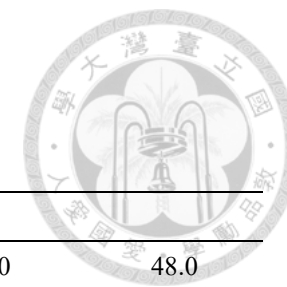
Incubation time (hours)	Control	2(5H)-furanone concentration in bacterial culture (mM)				
		8.0	16.0	24.0	32.0	40.0
18	0.81 ± 0.02 ^A	0.73 ± 0.02 ^B	0.70 ± 0.01 ^B	0.61 ± 0.02 ^C	0.44 ± 0.03 ^D	0.41 ± 0.02 ^D
19	0.82 ± 0.01 ^A	0.73 ± 0.02 ^B	0.70 ± 0.01 ^B	0.62 ± 0.01 ^C	0.45 ± 0.04 ^D	0.42 ± 0.02 ^D
20	0.84 ± 0.01 ^A	0.74 ± 0.03 ^B	0.68 ± 0.01 ^{BC}	0.64 ± 0.01 ^C	0.46 ± 0.04 ^D	0.43 ± 0.02 ^D
21	0.84 ± 0.02 ^A	0.75 ± 0.02 ^B	0.66 ± 0.01 ^C	0.65 ± 0.01 ^C	0.47 ± 0.05 ^D	0.45 ± 0.02 ^D
22	0.85 ± 0.01 ^A	0.76 ± 0.02 ^B	0.64 ± 0.01 ^C	0.66 ± 0.01 ^C	0.49 ± 0.05 ^D	0.46 ± 0.02 ^D
23	0.86 ± 0.02 ^A	0.76 ± 0.02 ^B	0.63 ± 0.01 ^C	0.67 ± 0.01 ^C	0.50 ± 0.04 ^D	0.47 ± 0.02 ^D
24	0.86 ± 0.02 ^A	0.77 ± 0.02 ^B	0.63 ± 0.01 ^D	0.69 ± 0.00 ^C	0.52 ± 0.03 ^E	0.48 ± 0.02 ^E
25	0.86 ± 0.02 ^A	0.78 ± 0.02 ^B	0.63 ± 0.00 ^D	0.70 ± 0.00 ^C	0.53 ± 0.03 ^E	0.49 ± 0.02 ^E

Growth patterns of *P. vagans* M17 in TSB containing supplemental 2(5H)-furanone were observed. Data were displayed as means ± standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. Among different 2(5H)-furanone concentrations, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).



附錄 25、群體感應抑制劑 C-30 對 *P. vagans* M17 生長之影響。(A) 為 C-30 濃度從 0.5 μM 至 3 μM 對生長之影響。(B) 為 C-30 濃度從 6 μM 至 48 μM 對生長之影響。

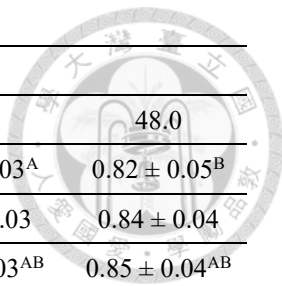
Appendix 25. Effect of QS inhibitor C-30 on growth of *P. vagans* M17. Growth patterns of *P. vagans* M17 in TSB containing supplemental C-30 were observed. The C-30 supplemented concentration ranged from (A) 0.5 μM to 3 μM , and (B) 6 μM to 48 μM . Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. At each time point, the asterisks were used to denote statistical significances ($p < 0.05$) between the control group and any of the experimental groups.



附錄 26、不同 C-30 濃度下 *P. vagans* M17 之生長情況

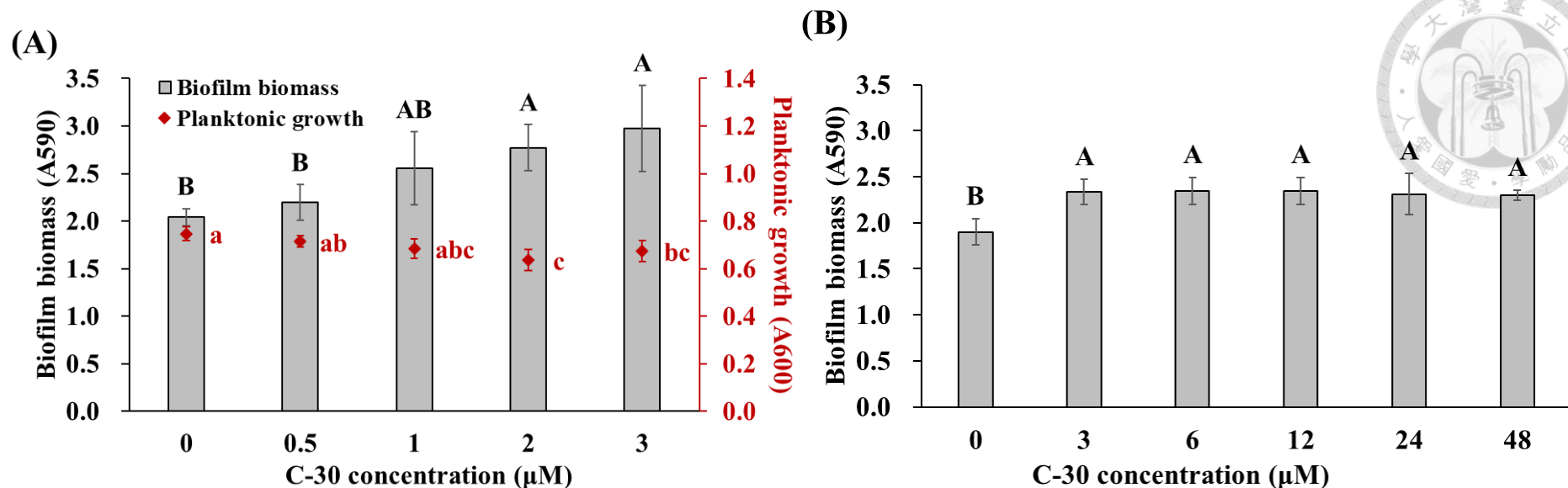
Appendix 26. Growth of *P. vagans* M17 with different concentration of C-30

Time (hr)	Control	C-30 concentration in bacterial culture (μM)							
		0.5	1.0	2.0	3.0	6.0	12.0	24.0	48.0
0	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00
1	0.14 ± 0.00 ^{CDE}	0.15 ± 0.00 ^{CD}	0.16 ± 0.00 ^{AB}	0.16 ± 0.00 ^A	0.15 ± 0.01 ^{BC}	0.14 ± 0.00 ^{DE}	0.13 ± 0.00 ^E	0.12 ± 0.00 ^F	0.10 ± 0.00 ^G
2	0.25 ± 0.00 ^{BC}	0.26 ± 0.00 ^{BC}	0.27 ± 0.00 ^B	0.28 ± 0.00 ^A	0.25 ± 0.01 ^{BC}	0.25 ± 0.01 ^{CD}	0.24 ± 0.00 ^D	0.20 ± 0.00 ^E	0.14 ± 0.00 ^F
3	0.40 ± 0.01 ^{BC}	0.41 ± 0.01 ^{AB}	0.41 ± 0.01 ^{AB}	0.43 ± 0.01 ^A	0.39 ± 0.00 ^{BC}	0.38 ± 0.02 ^C	0.39 ± 0.01 ^{BC}	0.29 ± 0.00 ^D	0.20 ± 0.01 ^E
4	0.54 ± 0.03 ^{AB}	0.56 ± 0.02 ^A	0.55 ± 0.01 ^A	0.57 ± 0.02 ^A	0.53 ± 0.01 ^{AB}	0.51 ± 0.00 ^{AB}	0.53 ± 0.02 ^{AB}	0.41 ± 0.01 ^C	0.27 ± 0.01 ^D
5	0.58 ± 0.03 ^{AB}	0.61 ± 0.01 ^A	0.59 ± 0.01 ^{AB}	0.60 ± 0.02 ^{AB}	0.59 ± 0.00 ^{AB}	0.56 ± 0.00 ^B	0.59 ± 0.02 ^{AB}	0.51 ± 0.00 ^C	0.36 ± 0.02 ^D
6	0.60 ± 0.03 ^{AB}	0.63 ± 0.02 ^A	0.61 ± 0.01 ^A	0.62 ± 0.01 ^A	0.62 ± 0.00 ^A	0.60 ± 0.01 ^{AB}	0.62 ± 0.02 ^A	0.56 ± 0.00 ^B	0.43 ± 0.02 ^C
7	0.63 ± 0.03 ^{AB}	0.66 ± 0.01 ^A	0.64 ± 0.01 ^{AB}	0.65 ± 0.01 ^{AB}	0.66 ± 0.00 ^A	0.63 ± 0.02 ^{AB}	0.66 ± 0.02 ^A	0.61 ± 0.01 ^B	0.48 ± 0.01 ^C
8	0.66 ± 0.03 ^{AB}	0.68 ± 0.01 ^{AB}	0.66 ± 0.02 ^{AB}	0.67 ± 0.01 ^{AB}	0.69 ± 0.00 ^{AB}	0.66 ± 0.01 ^{AB}	0.70 ± 0.02 ^A	0.65 ± 0.01 ^B	0.51 ± 0.02 ^C
9	0.68 ± 0.03 ^B	0.70 ± 0.01 ^{AB}	0.68 ± 0.02 ^{AB}	0.69 ± 0.00 ^{AB}	0.71 ± 0.00 ^{AB}	0.69 ± 0.01 ^{AB}	0.73 ± 0.02 ^A	0.68 ± 0.01 ^{AB}	0.55 ± 0.02 ^C
10	0.70 ± 0.02 ^B	0.73 ± 0.01 ^{AB}	0.70 ± 0.03 ^B	0.71 ± 0.00 ^{AB}	0.74 ± 0.00 ^{AB}	0.71 ± 0.02 ^{AB}	0.76 ± 0.02 ^A	0.73 ± 0.01 ^{AB}	0.59 ± 0.02 ^C
11	0.73 ± 0.02 ^{BC}	0.75 ± 0.01 ^{ABC}	0.72 ± 0.03 ^C	0.73 ± 0.01 ^{BC}	0.76 ± 0.00 ^{ABC}	0.74 ± 0.03 ^{ABC}	0.79 ± 0.02 ^A	0.78 ± 0.01 ^{AB}	0.64 ± 0.01 ^D
12	0.75 ± 0.02 ^B	0.77 ± 0.01 ^{AB}	0.74 ± 0.03 ^B	0.75 ± 0.01 ^B	0.79 ± 0.00 ^{AB}	0.77 ± 0.04 ^{AB}	0.82 ± 0.03 ^A	0.82 ± 0.01 ^A	0.68 ± 0.02 ^C
13	0.77 ± 0.02 ^{CD}	0.79 ± 0.01 ^{BC}	0.76 ± 0.03 ^{CD}	0.77 ± 0.01 ^{CD}	0.81 ± 0.00 ^{ABC}	0.79 ± 0.05 ^{BC}	0.84 ± 0.03 ^{AB}	0.87 ± 0.02 ^A	0.71 ± 0.03 ^D
14	0.79 ± 0.02 ^{CD}	0.81 ± 0.01 ^{BCD}	0.77 ± 0.03 ^{CD}	0.79 ± 0.01 ^{CD}	0.83 ± 0.01 ^{ABC}	0.81 ± 0.05 ^{BCD}	0.87 ± 0.03 ^{AB}	0.90 ± 0.02 ^A	0.74 ± 0.03 ^D
15	0.81 ± 0.02 ^{CD}	0.83 ± 0.01 ^{BCD}	0.79 ± 0.03 ^{CD}	0.80 ± 0.00 ^{CD}	0.86 ± 0.01 ^{ABC}	0.83 ± 0.06 ^{BCD}	0.89 ± 0.02 ^{AB}	0.93 ± 0.02 ^A	0.76 ± 0.03 ^D
16	0.83 ± 0.02 ^{BCD}	0.85 ± 0.01 ^{BCD}	0.80 ± 0.03 ^{CD}	0.81 ± 0.00 ^{BCD}	0.88 ± 0.01 ^{ABC}	0.85 ± 0.06 ^{BCD}	0.90 ± 0.02 ^{AB}	0.94 ± 0.02 ^A	0.78 ± 0.04 ^D
17	0.85 ± 0.03 ^{BC}	0.87 ± 0.01 ^{ABC}	0.82 ± 0.04 ^{BC}	0.82 ± 0.00 ^{BC}	0.90 ± 0.01 ^{AB}	0.86 ± 0.06 ^{ABC}	0.90 ± 0.02 ^{AB}	0.95 ± 0.02 ^A	0.81 ± 0.04 ^C



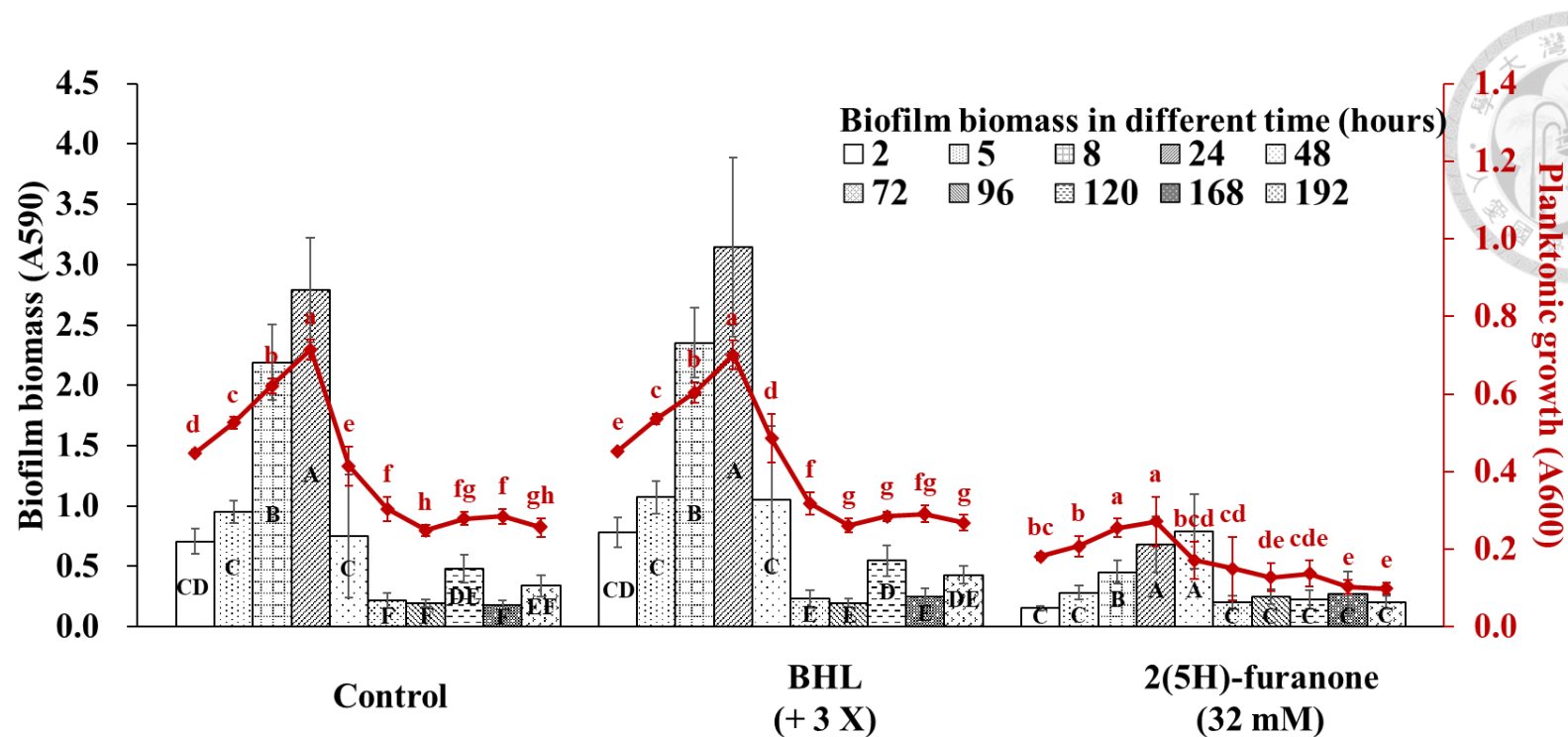
Time (hr)	Control	C-30 concentration in bacterial culture (μM)							
		0.5	1.0	2.0	3.0	6.0	12.0	24.0	48.0
18	0.87 ± 0.03 ^{AB}	0.89 ± 0.01 ^{AB}	0.83 ± 0.05 ^B	0.83 ± 0.01 ^B	0.91 ± 0.00 ^{AB}	0.87 ± 0.05 ^{AB}	0.90 ± 0.02 ^{AB}	0.94 ± 0.03 ^A	0.82 ± 0.05 ^B
19	0.90 ± 0.03	0.91 ± 0.01	0.85 ± 0.05	0.84 ± 0.01	0.92 ± 0.00	0.87 ± 0.04	0.88 ± 0.01	0.92 ± 0.03	0.84 ± 0.04
20	0.92 ± 0.02 ^{AB}	0.92 ± 0.00 ^A	0.86 ± 0.05 ^{AB}	0.84 ± 0.01 ^B	0.91 ± 0.01 ^{AB}	0.87 ± 0.02 ^{AB}	0.86 ± 0.01 ^{AB}	0.90 ± 0.03 ^{AB}	0.85 ± 0.04 ^{AB}
21	0.93 ± 0.03 ^A	0.93 ± 0.01 ^A	0.87 ± 0.05 ^{AB}	0.85 ± 0.02 ^B	0.90 ± 0.01 ^{AB}	0.86 ± 0.00 ^{AB}	0.84 ± 0.02 ^B	0.88 ± 0.03 ^{AB}	0.85 ± 0.03 ^B
22	0.92 ± 0.03 ^{AB}	0.93 ± 0.02 ^A	0.87 ± 0.05 ^{ABC}	0.85 ± 0.02 ^{BC}	0.88 ± 0.01 ^{ABC}	0.86 ± 0.01 ^{ABC}	0.83 ± 0.01 ^C	0.86 ± 0.04 ^{ABC}	0.83 ± 0.02 ^C
23	0.92 ± 0.03 ^{AB}	0.93 ± 0.03 ^A	0.88 ± 0.05 ^{ABC}	0.85 ± 0.02 ^{ABC}	0.87 ± 0.02 ^{ABC}	0.86 ± 0.02 ^{ABC}	0.81 ± 0.01 ^C	0.84 ± 0.04 ^{BC}	0.81 ± 0.02 ^C
24	0.93 ± 0.04 ^A	0.93 ± 0.03 ^A	0.88 ± 0.05 ^{AB}	0.85 ± 0.02 ^{AB}	0.87 ± 0.03 ^{AB}	0.86 ± 0.02 ^{AB}	0.80 ± 0.01 ^B	0.81 ± 0.04 ^B	0.80 ± 0.02 ^B
25	0.93 ± 0.04 ^A	0.94 ± 0.03 ^A	0.89 ± 0.05 ^A	0.86 ± 0.02 ^{AB}	0.86 ± 0.04 ^{AB}	0.85 ± 0.03 ^{AB}	0.78 ± 0.02 ^B	0.78 ± 0.04 ^B	0.79 ± 0.01 ^B

Growth patterns of *P. vagans* M17 in TSB containing supplemental C-30 were observed. Data were displayed as means ± standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. Among different C-30 concentrations, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).



附錄 27、群體感應抑制劑 C-30 對 *P. vagans* M17 生物膜生成與浮游微生物之影響。(A) 為 C-30 濃度從 0.5 μM 至 3 μM 對生物膜之影響。(B) 為 C-30 濃度從 3 μM 至 48 μM 對生物膜之影響。

Appendix 27. Effect of QS inhibitor C-30 on biofilm formation and planktonic growth of *P. vagans* M17. Formation of biofilm and planktonic cell growth of *P. vagans* M17 in TSB containing supplemental C-30 were analyzed. The C-30 supplemented concentration ranged from (A) 0.5 μM to 3 μM, and (B) 3 μM to 48 μM. Each group underwent incubation for 24 hours at 30 °C. Data were displayed as means ± standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. Among different C-30 concentrations, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).



附錄 28、群體感應相關化合物對 *P. vagans* M17 生物膜週期之影響。BHL 濃度的 3 X 對應到 120 ppm (0.701 mM)。

Appendix 28. Effect of QS-related compounds on biofilm cycle of *P. vagans* M17. Biofilm formation of *P. vagans* M17 in TSB containing supplemental BHL or 2(5H)-furanone was analyzed. Different groups were incubated at 30 °C for 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 168, and 192 hours. For BHL concentration, 3 X represented 120 ppm (0.701 mM) and “+” represented the exogenous addition of BHL. Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey’s multiple range test. In each treatment, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).

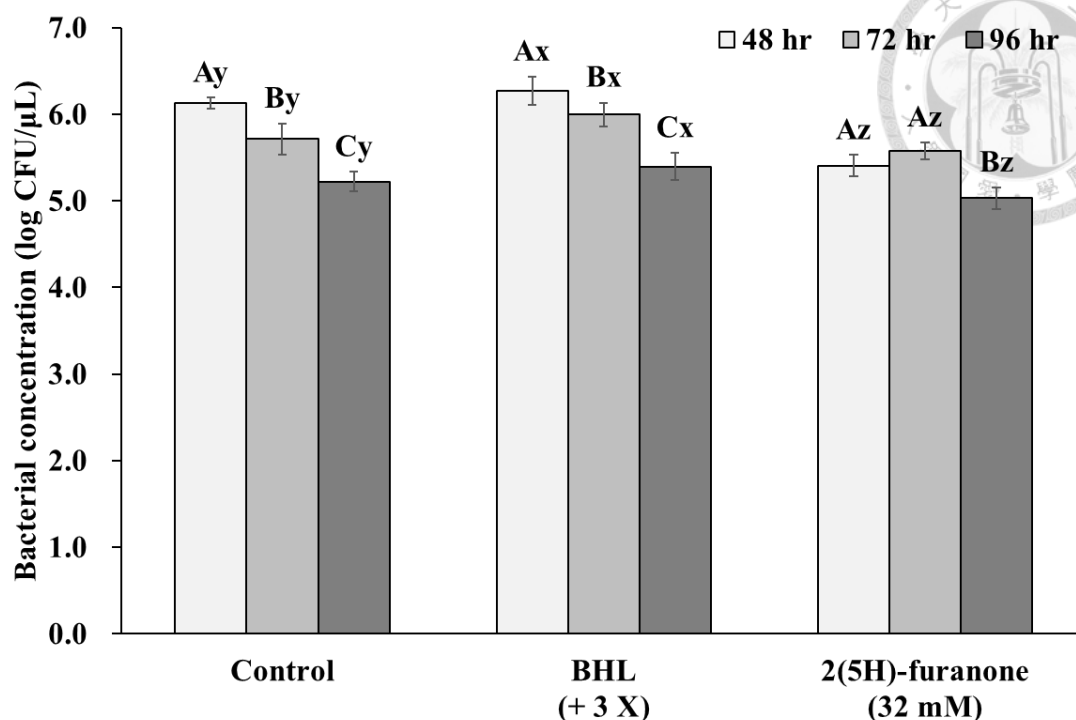


附錄 29、*P. vagans* M17 生物膜生成與浮游微生物生長情況

Appendix 29. Biofilm formation and planktonic growth of *P. vagans* M17

Incubation time (hours)	Biofilm formation			Planktonic growth		
	Control	BHL (120 ppm)	2(5H)-furanone (32 mM)	Control	BHL (120 ppm)	2(5H)-furanone (32 mM)
2	0.71 ± 0.10 ^A	0.78 ± 0.13 ^A	0.15 ± 0.02 ^B	0.45 ± 0.01 ^A	0.45 ± 0.00 ^A	0.18 ± 0.01 ^B
5	0.95 ± 0.09 ^B	1.07 ± 0.13 ^A	0.28 ± 0.06 ^C	0.53 ± 0.01 ^A	0.54 ± 0.01 ^A	0.21 ± 0.03 ^B
8	2.19 ± 0.32 ^A	2.35 ± 0.29 ^A	0.45 ± 0.10 ^B	0.62 ± 0.02 ^A	0.60 ± 0.03 ^A	0.25 ± 0.02 ^B
24	2.79 ± 0.43 ^B	3.15 ± 0.74 ^A	0.68 ± 0.23 ^C	0.71 ± 0.03 ^A	0.70 ± 0.04 ^A	0.27 ± 0.06 ^B
48	0.75 ± 0.51 ^A	1.05 ± 0.61 ^A	0.79 ± 0.31 ^A	0.41 ± 0.05 ^B	0.49 ± 0.06 ^A	0.17 ± 0.05 ^C
72	0.21 ± 0.06 ^A	0.23 ± 0.07 ^A	0.20 ± 0.05 ^A	0.30 ± 0.03 ^A	0.32 ± 0.03 ^A	0.15 ± 0.08 ^B
96	0.20 ± 0.03 ^B	0.20 ± 0.03 ^B	0.25 ± 0.06 ^A	0.25 ± 0.01 ^A	0.26 ± 0.02 ^A	0.13 ± 0.04 ^B
120	0.48 ± 0.12 ^A	0.55 ± 0.13 ^A	0.22 ± 0.08 ^B	0.28 ± 0.02 ^A	0.28 ± 0.01 ^A	0.14 ± 0.03 ^B
168	0.18 ± 0.04 ^A	0.25 ± 0.07 ^A	0.27 ± 0.19 ^A	0.28 ± 0.02 ^A	0.29 ± 0.02 ^A	0.10 ± 0.02 ^B
192	0.34 ± 0.09 ^B	0.43 ± 0.07 ^A	0.20 ± 0.05 ^C	0.26 ± 0.02 ^A	0.27 ± 0.02 ^A	0.10 ± 0.01 ^B

Formation of biofilm and planktonic cell growth of *P. vagans* M17 under different incubation time in TSB containing supplemental BHL or 2(5H)-furanone were analyzed. Data were displayed as means ± standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. At each time point, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).



附錄 30、群體感應相關化合物對 *P. vagans* M17 浮游微生物活性之影響。BHL 濃度的 3 X 對應到 120 ppm (0.701 mM)。

Appendix 30. Effect of QS-related compounds on planktonic cell viability of *P. vagans* M17. Planktonic cell viability of *P. vagans* M17 in TSB containing supplemental BHL or 2(5H)-furanone was counted. Different groups were incubated at 30 °C for 48, 72 and 96 hours. For BHL concentration, 3 X represented 120 ppm (0.701 mM) and “+” represented the exogenous addition of BHL. Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey’s multiple range test. In each treatment, different letters (A, B, C) were used to denote statistical significances ($p < 0.05$). At each time point, different letters (x, y, z) were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).

附錄 31、*P. vagans* M17 在含有不同化合物的不同培養基之表面移行面積

Appendix 31. Swarming area of *P. vagans* M17 at different medium supplemented with different compounds

Medium	Supplement	Percentage of plate swarmed (%)
TSB	None	1.60 ± 0.06 ^D
	5 mM D-glucose	1.67 ± 0.32 ^D
	5 mM D-glucose + 5 mM L-malic acid	1.70 ± 0.22 ^D
	5 mM D-glucose + 0.701 mM BHL	1.85 ± 0.14 ^D
	5 mM D-glucose + 32 mM 2(5H)-furanone	0.42 ± 0.01 ^E
M9	5 mM D-glucose	2.65 ± 0.24 ^C
	5 mM D-glucose + 5 mM L-malic acid	5.99 ± 0.34 ^A
	5 mM D-glucose + 0.701 mM BHL	4.06 ± 0.23 ^B
	5 mM D-glucose + 32 mM 2(5H)-furanone	Not observed

Swarming area of *P. vagans* M17 at TSB or M9 containing supplemental D-glucose, L-malic acid, BHL or 2(5H)-furanone was calculated. Each group underwent incubation for 24 hours at 30 °C. Data were displayed as means ± standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. Among different treatment, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).

附錄 32、*P. vagans* M17 在含有不同濃度群體感應相關化合物的 TSB 培養基之表面移行面積

Appendix 32. Swarming area of *P. vagans* M17 at TSB medium supplemented with different concentrations of QS-related compounds

Medium	Supplement	Percentage of plate swarmed (%)
TSB	None	1.62 ± 0.15 ^A
	5 mM L-malic acid	1.52 ± 0.08 ^A
	0.234	1.70 ± 0.04 ^A
	BHL (mM)	0.467
		1.74 ± 0.13 ^A
	0.701	1.64 ± 0.02 ^A
	16	1.01 ± 0.07 ^B
	2(5H)-furanone (mM)	24
		0.89 ± 0.11 ^{BC}
	32	0.65 ± 0.13 ^C

Swarming area of *P. vagans* M17 at TSB containing supplemental L-malic acid, BHL, or 2(5H)-furanone was calculated. Each group underwent incubation for 24 hours at 30 °C. Data were displayed as means ± standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. Among different treatment, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).

附錄 33、*P. vagans* M17 中目標基因相對表現量

Appendix 33. Relative expression of target genes in *P. vagans* M17

Time (hr)	Control	BHL (120 ppm)	2(5H)-furanone (32 mM)
<i>pagI</i>			
0	1.11 ± 0.55 ^A	1.21 ± 0.16 ^A	0.39 ± 0.09 ^A
2	1.94 ± 0.93 ^A	1.43 ± 0.50 ^{AB}	0.23 ± 0.09 ^B
6	2.21 ± 0.58 ^A	0.97 ± 0.46 ^B	0.21 ± 0.08 ^B
24	4.00 ± 0.41 ^A	0.92 ± 0.19 ^B	0.48 ± 0.18 ^B
<i>pagR</i>			
0	1.06 ± 0.38 ^A	1.17 ± 0.48 ^A	1.57 ± 0.68 ^A
2	1.57 ± 0.34 ^A	1.34 ± 0.60 ^A	0.75 ± 0.20 ^A
6	0.70 ± 0.11 ^A	0.57 ± 0.22 ^A	0.58 ± 0.28 ^A
24	2.48 ± 1.20 ^A	1.75 ± 0.35 ^A	1.24 ± 0.30 ^A
<i>bssSI</i>			
0	1.05 ± 0.38 ^A	1.12 ± 0.34 ^A	0.79 ± 0.28 ^A
2	1.26 ± 0.41 ^A	1.53 ± 0.53 ^A	0.86 ± 0.19 ^A
6	2.13 ± 0.86 ^{AB}	4.58 ± 2.16 ^A	0.51 ± 0.18 ^B
24	1.16 ± 0.12 ^B	1.37 ± 0.22 ^{AB}	1.83 ± 0.42 ^A
<i>fliC2</i>			
0	1.26 ± 0.87 ^A	1.78 ± 0.88 ^A	1.25 ± 0.05 ^A
2	0.53 ± 0.54 ^{AB}	0.83 ± 0.82 ^A	0.27 ± 0.19 ^B
6	0.44 ± 0.32 ^A	0.72 ± 0.73 ^A	0.23 ± 0.17 ^A
24	1.84 ± 1.68 ^A	2.29 ± 2.19 ^A	1.13 ± 1.08 ^A
<i>hcpI</i>			
0	1.02 ± 0.24 ^A	1.04 ± 0.20 ^A	0.44 ± 0.12 ^B
2	1.08 ± 0.23 ^A	1.05 ± 0.10 ^A	0.31 ± 0.03 ^B
6	1.14 ± 0.18 ^B	1.74 ± 0.44 ^A	0.52 ± 0.06 ^C
24	0.27 ± 0.08 ^{AB}	0.34 ± 0.12 ^A	0.17 ± 0.03 ^B
<i>clpVI</i>			
0	1.02 ± 0.25 ^A	0.94 ± 0.34 ^{AB}	0.45 ± 0.16 ^B
2	0.93 ± 0.12 ^A	1.27 ± 0.25 ^A	0.55 ± 0.20 ^B
6	0.82 ± 0.24 ^{AB}	1.35 ± 0.19 ^A	0.82 ± 0.09 ^B
24	1.44 ± 0.40 ^B	2.49 ± 0.67 ^A	0.97 ± 0.32 ^B

P. vagans M17 was cultured in TSB containing supplemental BHL or 2(5H)-furanone.

The relative expression was normalized against *gyrBI* expression and calculated based

on the calibrator sample, TSB at 0 hour. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was performed. Data were displayed as means $\pm$ standard deviation of three biological replicates. Data analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. At each time point, different letters were used to denote statistical significances ($p < 0.05$).

