

皮氏不动杆菌 LSQ 3 对贝莱斯芽孢杆菌 LSQ 19 成膜能力的影响及其基因组特性分析

杨小宇^{1,2,3,4}, 王志刚^{1,2,3,4}, 徐伟慧^{1,2,3,4*}, 旦真阿旺¹

- 1 齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔
- 2 黑龙江省农业微生物制剂产业化工程技术研究中心, 黑龙江 齐齐哈尔
- 3 黑龙江省农用生物制剂产业化协同创新中心, 黑龙江 齐齐哈尔
- 4 黑龙江省高浓度有机废液生物转化及产业化概念验证中心, 黑龙江 齐齐哈尔

杨小宇, 王志刚, 徐伟慧, 旦真阿旺. 皮氏不动杆菌 LSQ 3 对贝莱斯芽孢杆菌 LSQ 19 成膜能力的影响及其基因组特性分析[J]. 微生物学报, 2026, 66(2): 753-769.

YANG Xiaoyu, WANG Zhigang, XU Weihui, Danzhen Awang. Influence of *Acinetobacter pittii* LSQ 3 on the biofilm formation of *Bacillus velezensis* LSQ 19 and its genomic characteristics[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(2): 753-769.

摘要: 【目的】探究菌株皮氏不动杆菌(*Acinetobacter pittii*) LSQ 3 对贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) LSQ 19 成膜能力的影响, 以及菌株 LSQ 3 的基因组特性。【方法】采用结晶紫染色法、细胞表面特性分析、苯酚硫酸法、XTT 还原法和扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察等方法分析 LSQ 3 无细胞上清液(cell-free supernatant, CFS)对 LSQ 19 成膜能力的影响; 采用全基因组学测序明确菌株 LSQ 3 的分类学地位, 并通过全基因组数据预测其次级代谢产物基因簇。【结果】菌株 LSQ 3 的 CFS 显著抑制 LSQ 19 的生物膜形成, 10 μ L 菌液/190 μ L CFS 混合确定为最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。与对照组相比, 经菌株 LSQ 3 的 CFS 处理(MIC)后 LSQ 19 细胞的表面疏水性、黏附力、胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)产率和生物膜代谢活性均显著降低; 自聚集能力与对照组相比显著升高。扫描电镜观察表明, 在 MIC 条件下菌株 LSQ 19 在玻璃表面未形成生物膜。经全基因组学鉴定, 菌株 LSQ 3 为 *Acinetobacter pittii*, 其基因组大小为 3 939 365 bp, G+C 含量为 38.82%, 含有 3 601 个 DNA 编码序列。其基因组中存在多个与生物膜合成相关的基因及毒力因子。通过 antiSMASH 分析, 菌株 LSQ 3 的基因组中含有 7 种次级代谢物的生物合成基因簇。【结论】*A. pittii* LSQ 3 的无细胞上清液可抑制 *B. velezensis* LSQ 19 生物膜的形成, 本研究从生物膜的角度为合成菌

资助项目: 黑龙江省重点研发计划(GA23B018); 齐齐哈尔大学研究生创新项目(QUZLTS_CX2024019)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Heilongjiang Province (GA23B018) and the Qiqihar University of Graduate Student Innovation Program (QUZLTS_CX2024019).

*Corresponding author. E-mail: xwh800206@163.com

Received: 2025-08-17; Accepted: 2025-11-06; Published online: 2025-12-10

群的构建提供了理论依据和参考。

关键词：皮氏不动杆菌 LSQ 3；贝莱斯芽孢杆菌 LSQ 19；全基因组测序；无细胞上清液；生物膜形成

Influence of *Acinetobacter pittii* LSQ 3 on the biofilm formation of *Bacillus velezensis* LSQ 19 and its genomic characteristics

YANG Xiaoyu^{1,2,3,4}, WANG Zhigang^{1,2,3,4}, XU Weihui^{1,2,3,4*}, Danzhen Awang¹

1 College of Life Science and Agroforestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang, China

2 Heilongjiang Provincial Engineering Technology Research Center of Agromicrobial Preparation Industrialization, Qiqihar, Heilongjiang, China

3 Heilongjiang Provincial Collaborative Innovation Center of Agrobiological Preparation Industrialization, Qiqihar, Heilongjiang, China

4 Heilongjiang Provincial Concept Verification Center of High Concentration Organic Waste Liquid Biotransformation and Industrialization, Qiqihar, Heilongjiang, China

Abstract: [Objective] To explore the influence of *Acinetobacter pittii* LSQ 3 on the biofilm formation of *Bacillus velezensis* LSQ 19 and analyze the genomic characteristics of strain LSQ 3. **[Methods]** The effect of the cell-free supernatant (CFS) of LSQ 3 on the biofilm formation of LSQ 19 was analyzed by crystal violet staining, cell surface property analysis, the phenol-sulfuric acid method, XTT reduction assay, and scanning electron microscopy (SEM). Whole-genome sequencing was employed to determine the taxonomic status of strain LSQ 3, and the biosynthetic gene clusters for secondary metabolites were predicted based on the whole-genome data. **[Results]** The CFS of strain LSQ 3 significantly inhibited the biofilm formation of strain LSQ 19, and the volume ratio of 10 μ L bacterial suspension to 190 μ L CFS was determined as the minimum inhibitory concentration (MIC). Compared with the control, the CFS of strain LSQ 3 at MIC significantly reduced the surface hydrophobicity, adhesion, extracellular polymeric substances (EPS) production rate, and biofilm metabolic activity, while significantly improving the self-aggregation ability of LSQ 19 cells. In the presence of the CFS at MIC, LSQ 19 failed to form a biofilm on the glass surface. Strain LSQ 3 was identified as *A. pittii* based on whole-genome sequencing data. Its genome size was 3 939 365 bp, with the G+C content of 38.82% and 3 601 DNA coding sequences. The genome contained multiple genes involved in biofilm formation and virulence factors. The antiSMASH analysis showed that the genome of strain LSQ 3 contained seven biosynthetic gene clusters for secondary metabolites. **[Conclusion]** The CFS of *A. pittii* LSQ 3 can inhibit the biofilm formation of *B. velezensis* LSQ 19. This study provides a theoretical basis and reference for the construction of synthetic bacterial communities from the

perspective of biofilms.

Keywords: *Acinetobacter pittii* LSQ 3; *Bacillus velezensis* LSQ 19; whole-genome sequencing; cell-free supernatant; biofilm formation

近年来, 生物膜已成为多个领域的研究热点, 在工业、医学、海洋等领域均有相关研究报道, 但在土壤环境中的研究报道相对较少^[1]。生物膜是生防细菌占据生态位的重要存在形式, 能够帮助其抵御不良环境, 同时构筑一道防止植物病原微生物入侵的“屏障”^[2]。生防细菌还可通过营养竞争、分泌抗菌物质、诱导系统抗性 etc 机制来抑制病原菌及病原生物膜的生长。有研究报道, *Wickerhamomyces anomalus* 可通过营养和空间竞争来防治番茄灰霉病的发生^[3]。植物根际栖息着不同种类的微生物, 不同物种间进行信息传递、代谢交叉喂养和营养竞争等, 影响彼此生物膜的形成及在根际的定殖, 进而对植物生长产生影响。混合物种生物膜是自然界中常见的形式, 混合物种生物膜间的相互作用包括协同性、竞争性和中立性^[4]。因此, 从生物膜角度研究菌间互作可为合成群落的构建或简化提供理论依据。

本课题组 Luo 等^[5]在前期研究中构建了能有效防治西瓜枯萎病的合成菌群 Q, 该菌群包含路氏肠杆菌 (*Enterobacter ludwigii*) LSQ 1、LSQ 3、森林土噬几丁质菌 (*Chitinophaga silvisoli*) LSQ 14、三角农杆菌 (*Agrobacterium deltaense*) LSQ 16、*A. deltaense* LSQ 19 和贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) WB。在研究合成菌群 Q 中单菌、双菌和多菌生物膜成膜能力时发现, LSQ 3 与 LSQ 19 共培养时生物膜形成能力减弱, 而加入菌株 LSQ 14 后抑制作用消失。因此, 为探究合成菌群 Q 菌间的互作关系, 本研究以 LSQ 3 和 LSQ 19 为材料, 研究 LSQ 3 对 LSQ 19 成膜能力的影响, 并从基因组学角度探究 LSQ 3 的特性, 以期研究 LSQ 3 抑制 LSQ 19 成膜的机制奠定基础, 也为研究合成菌群 Q 的

菌间互作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

贝莱斯芽孢杆菌 (LSQ 19) 和皮氏不动杆菌 (LSQ 3) 由齐齐哈尔大学微生物生态实验室提供。

1.2 LSQ 3 无细胞上清液的制备

将新活化的 LSQ 3 接种至胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (tryptone soy broth, TSB)^[6] 中, 30 °C、150 r/min 培养 18 h, 菌液 10 000 r/min 离心 8 min, 收集上清液, 用 0.22 μm 无菌滤膜过滤后获得无细胞上清液 (cell-free supernatant, CFS), 4 °C 贮藏备用。

1.3 不同浓度的 *A. pittii* LSQ 3 无细胞上清液对 *B. velezensis* LSQ 19 的生物膜抑制率检测

为测定 LSQ 3 CFS 对 LSQ 19 生物膜是否具有抑制作用^[7], 在 96 孔板中加入 10 μL LSQ 19 菌悬液 ($OD_{600}=0.8$) 和 190 μL LSQ 3 CFS, 对照组使用 LBGM 培养基^[8]。采用结晶紫染色法对其生物被膜形成能力进行实验。于 30 °C 培养 24 h 后, 从恒温培养箱中取出 96 孔板, 缓慢移除培养 24 h 后的菌液。然后用无菌水清洗 2–3 次, 洗去未黏附的菌体, 室温干燥后加入 200 μL 0.1% 的结晶紫溶液染色 20 min, 再用无菌水清洗浮色 3–5 次 (直至清洗液澄清为止), 以去除松散附着的细菌细胞。室温干燥后加入 200 μL 无水乙醇脱色 15 min, 采用酶标仪测定 OD_{540} 条件下的吸光值, 以此衡量生物膜生物量。生物膜抑制率计算如公式(1)所示。

$$\text{生物膜抑制率} = (1 - OD_{\text{treatment}} / OD_{\text{control}}) \times 100\% \quad (1)$$

1.4 最小抑菌浓度(MIC)的测定

为研究 LSQ 3 CFS 抑制菌株 LSQ 19 成膜的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)^[9], 将 LSQ 19 菌液($OD_{600}=0.8$)与不同浓度的 LSQ 3 的无细胞上清液分别按照体积比 10/190、20/180、30/170、40/160、50/150、60/140、70/130、80/120、90/110、100/100、110/90、120/80、130/70、140/60、150/50、160/40、170/30、180/20、190/10 混合, 在 96 孔板上 30 °C 培养 24 h^[10]。本研究将 LSQ 19 培养物固定于所有孔中(每个孔 10 μ L), 并根据需要用新鲜且无菌的 TSB 稀释无细胞上清, 以保持所需浓度。当 LSQ 3 CFS 浓度对 LSQ 19 生物膜的抑制率达到 80% 时定义为 MIC。

1.5 细胞表面特性和胞外聚合物定量分析

1.5.1 疏水性

采用 Wang 等^[11]的方法测定 LSQ 19 经 LSQ 3 CFS 处理后的细胞表面疏水性。制备 MIC、1/2 MIC、1/4 MIC 的 CFS。每种 CFS 各取 20 mL 与等体积的 LSQ 19 菌液(约 10^7 CFU/mL)混合并涡流。对照组加入 TSB 培养基。30 °C 混合培养 24 h 后, 将细胞 12 000 r/min 离心 10 min, 丢弃上清, 将混合培养物重悬于磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)中。在 600 nm 处测定吸光度(H_0)。然后, 将悬浮菌与二甲苯以 2:1 的比例混合, 涡旋 60 s, 再于室温下分层 30 min。收集细菌溶液的相位, 在 600 nm 处测量吸光度(H_1)。疏水性百分比计算如公式(2)所示。

$$\text{疏水性}=(H_0-H_1)/H_0\times 100\% \quad (2)$$

1.5.2 自聚集能力

采用 Lee 等^[12]的方法测定细菌的自动聚集能力。按 1.5.1 节方法培养, 30 °C 混合培养 24 h 后, 将细胞 12 000 r/min 离心 10 min, 丢弃上清, 将混合培养物用 PBS 冲洗 2 次, 在 4 mL PBS 中, 600 nm (OD_{initial})处调节吸光度为 0.40 ± 0.05 。30 °C 下孵育 24 h, 在 600 nm ($OD_{\text{treatment}}$)处测定

上层水层的吸光度值。自动聚集能力计算如公式(3)所示。

$$\text{自聚集}=(1-OD_{\text{treatment}}/OD_{\text{initial}})\times 100\% \quad (3)$$

1.5.3 黏附力

使用 Kim 等^[7]描述的方法研究了细胞黏附在玻璃表面的能力。将 LSQ 19 的 5 mL 菌液(约 10^7 CFU/mL)和等量 MIC、1/2 MIC、1/4 MIC 的 LSQ 3 CFS 混合于无菌玻璃管中, 对照组用 TSB 培养基。然后将玻璃管倾斜 30°, 30 °C 培养 24 h。轻轻去除浮游细胞, 用 PBS 冲洗玻璃管。接着, 在每根管中加入 5 mL PBS, 并旋转, 获得贴壁细胞。将黏附的细胞 4 °C、14 240 \times g 离心 5 min, 弃上清。将收集的细胞重悬于 1 mL PBS 中, 在 600 nm 处测定吸光度值($OD_{\text{adhered cell}}$)。将贴壁细胞与浮游细胞混合并按前面描述的方法冲洗。将总细胞重悬于 1 mL PBS 中, 在 600 nm 处测定吸光度值($OD_{\text{total cell}}$)。细胞黏附能力计算如公式(4)所示。

$$\text{黏附力}=(OD_{\text{adhered cell}}/OD_{\text{total cell}})\times 100\% \quad (4)$$

1.5.4 胞外多糖(EPS)的产率分析

LSQ 19 EPS 产率的测定采用 Lee 等^[12]的方法, 并进行了一些修改。分别制备 MIC、1/2 MIC、1/4 MIC 的 LSQ 3 CFS。每种 CFS 各取 4 mL 与等体积 LSQ 19 的细菌培养物(约 10^7 CFU/mL)混合。对照组用 TSB 培养基。30 °C 培养 24 h 后, 细胞在 8 000 \times g 下离心 10 min, 弃上清, 将剩余的沉淀用 1 mL 的 1.5 mol/L NaCl 重悬。然后在 5 000 \times g 下重新离心 10 min。取 60 μ L 上清液, 加入等量 5% 苯酚和 4 mL 硫酸, 于 30 °C 水浴中涡流培养 10 min, 在 490 nm 处测定吸光度值。EPS 产率计算如公式(5)所示。

$$\text{EPS产率}=OD_{\text{treatment}}/OD_{\text{control}}\times 100\% \quad (5)$$

1.6 XTT 法检测生物膜中细胞的代谢活性

采用 XTT 还原法测定生物膜中细胞的代谢活性^[13]。用 PBS 配制 1 mg/mL XTT 溶液和 0.4 mmol/L 的萘醌溶液。用 0.1 mol/L PBS 清洗

生物膜 2 次, 以去除悬浮细胞。在 24 孔板的每孔中加入 10 μL 的萘醌溶液、200 μL 的 XTT 溶液和 790 μL 的 PBS 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 3 h。将每孔中的 200 μL 混合液转移到一个新的 96 孔板上, 利用酶标仪在 OD_{492} 测量每个样品的代谢活性变化。

1.7 扫描电镜观察 LSQ 3 CFS 对 LSQ 19 生物被膜的影响

采用扫描电镜观察 1/4 MIC、1/2 MIC 和 MIC 的 LSQ 3 CFS 对 LSQ 19 生物被膜的形态学变化。根据 Park 等^[9]描述的方法并进行了轻微的修改。为了评估 LSQ 3 CFS 对 LSQ 19 生物膜的抑制能力, 观察不同抑制浓度下在细胞爬片上形成的生物膜形态, 参考 1.3 节的方法培养生物膜, 起始接种量为 1 mL。将 LSQ 19 菌液 ($OD_{600}=0.8$) 与不同浓度的 LSQ 3 CFS 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 的细胞爬片上处理 24 h, 对照组用 LBGM 培养基培养。将浮游细胞用 PBS 冲洗 2 次, 将附着在片上的生物膜用 2.5% 的戊二醛在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定过夜, 吸出固定液, 用 PBS 浸洗 3–5 次, 每次 15 min。用系列梯度乙醇(30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%)脱水, 每种浓度乙醇脱水 1 次, 每次 10–20 min, 再用 100% 乙醇彻底脱水 1–2 次, 在室温下干燥。在生物膜样品表面镀金, 用扫描电镜观察生物膜的结构。

1.8 菌株 LSQ 3 的全基因组学分析

将菌株接种于 TSB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养过夜, 12 000 r/min 离心 8 min 后获得菌沉淀。使用 Wizard[®] 基因组 DNA 纯化试剂盒(Promega 公司)提取菌株 LSQ 3 的基因组 DNA。纯化的基因组 DNA 使用荧光计(Turner BioSystems Inc 公司)进行定量。提取的 DNA 在 Illumina HiSeq 和 PacBio RS II 单分子实时平台(SMRT)上测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。原始读数通过 Fastp v0.23.0 (<https://github.com/OpenGene/fastp>) 进行质量过滤, 剔除低质量数据以获得干净的数据。过滤

后的数据由 Unicycler v0.4.8 (<https://github.com/rrwick/Unicycler>) 组装, 用 Pilon v1.22 软件进行短序列比对和碱基质量校正。为对菌株 LSQ 3 进行准确分类, 基于 MASH 算法(<https://github.com/marbl/mash>) 和基因组爆炸距离系统发育方法(GBDP) (<http://ggdc.dsmz.de>), 利用类型菌株基因组服务器(<https://tygs.dsmz.de>) 建立其系统发育树。菌株 LSQ 3 基因组的 DNA 编码序列由软件 Glimmer v3.02 (<http://ccb.jhu.edu/software/glimmer/index.shtml>) 预测, 使用 Tandem Repeats Finder (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) 软件进行串联重复序列预测。Barrnap v.0.8 (<https://github.com/tseemann/barrnap>) 和 tRNAscan-SE v.2.0 (<http://trna.ucsc.edu/software/>) 分别用于预测 rRNA 和 tRNA 基因。利用 BLAST 和 HMMER 对 3 个数据库进行功能注释和分配, 包括蛋白直系同源簇数据库(COGs, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>)、基因本体数据库(GO, <http://www.geneontology.org/>) 和京都基因与基因组百科全书数据库(KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>)。来源于微生物, 且对微生物自身侵染和引起特定宿主疾病具有促进作用的物质称为毒力因子(virulent factor), 主要包括细菌毒素、调节细菌黏附作用的细胞表面蛋白、对细菌本身具有保护作用的蛋白、细胞表面碳水化合物以及具有细菌致病性的水解酶等^[14]。采用毒力因子数据库 VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) 预测 LSQ 3 所拥有的毒力因子。采用 antiSMASH 8.0.2 rcl (<https://dl.secondarymetabolites.org/releases/8.0.2/>) 软件和 BLAST 预测菌株的次级代谢产物基因簇及数量。

1.9 数据分析

采用 Excel 2021 和 SPSS Statistics 26 软件对数据进行整理和统计分析, 数据表示为 3 个生物学重复的平均值 \pm 标准误差(mean \pm SEM)。图中不同小写字母表示在单因素 ANOVA 检验中差异达到显著水平 $P<0.05$ 。使用 GraphPad Prism 8.0.2 绘图。

2 结果与分析

2.1 LSQ 3 无细胞上清液对 LSQ 19 生物膜抑制率的检测

如图 1A 所示, 随着 LSQ 3 无细胞上清液浓度的升高, 其对菌株 LSQ 19 生物膜的抑制能力也增强。190 μL LSQ 3 无细胞上清液对 LSQ 19

生物膜的抑制率为 85.59% (图 1B), 表明高浓度的 LSQ 3 无细胞上清液能够抑制菌株 LSQ 19 的生物膜形成。

2.2 不同浓度 LSQ 3 无细胞上清液对 LSQ 19 生物膜抑制率的检测

将 LSQ 3 CFS 浓度对 LSQ 19 生物膜的抑制率达到 80% 时定义为 MIC。通过测定 LSQ 3 无

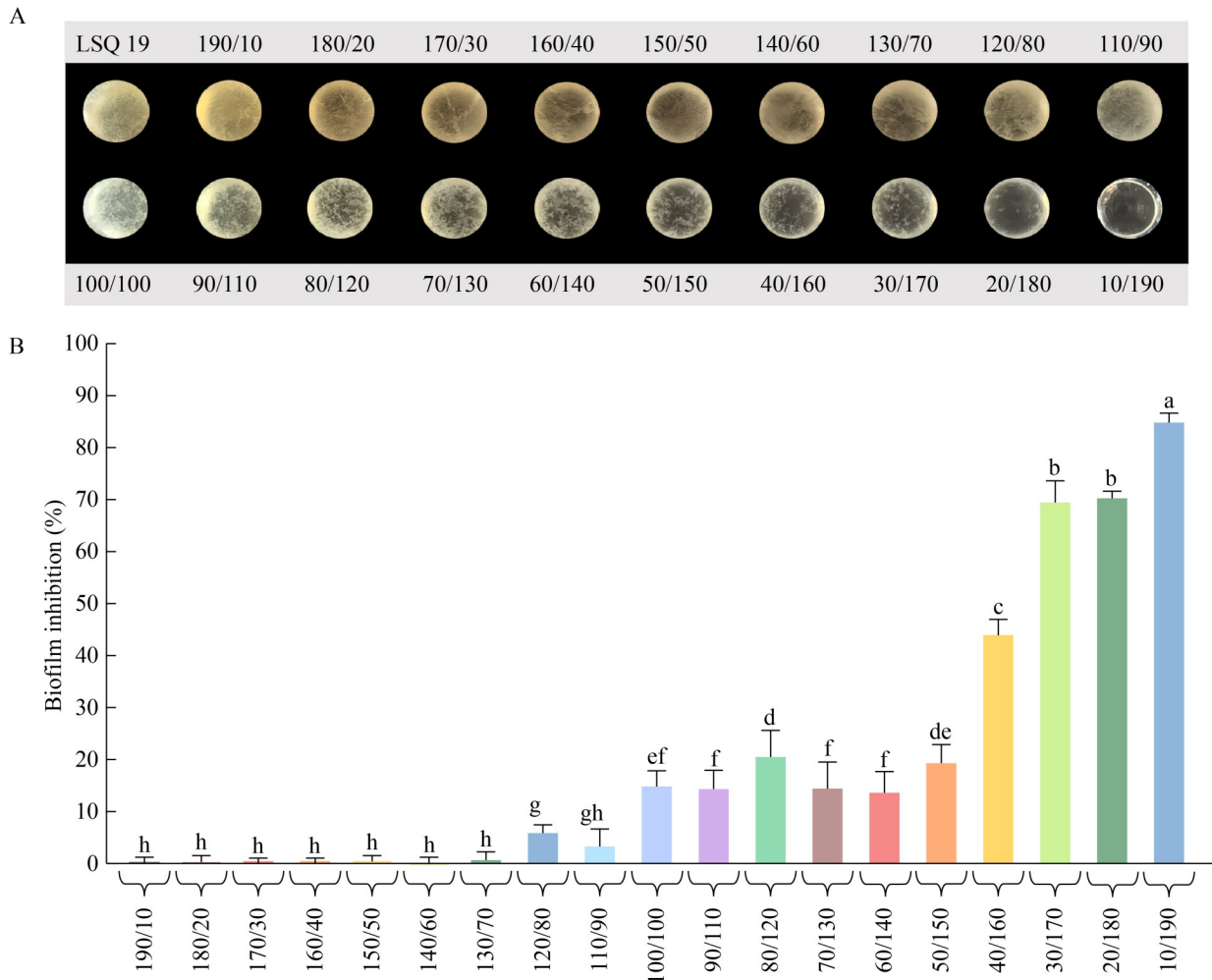


图1 *Acinetobacter pittii* LSQ 3不同浓度无细胞上清液对*Bacillus velezensis* LSQ 19生物膜抑制率的检测。柱上无相同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$), 下同。

Figure 1 Detection of biofilm inhibition rates of *Bacillus velezensis* LSQ 19 by cell-free supernatants from *Acinetobacter pittii* LSQ 3 at different concentrations. A: Biofilm formation of *Bacillus velezensis* LSQ 19 under different concentrations of *Acinetobacter pittii* LSQ 3 cell-free supernatant; B: Biofilm inhibition rate detection. The absence of matching lowercase letters on the column indicates significant processing chamber differences ($P<0.05$). The same below.

细胞上清液(CFS)对 LSQ 19 生物膜的抑制率, 研究发现, 当 10 μ L LSQ 19 的菌液与 190 μ L LSQ 3 无细胞上清液(10/190)混合培养时, 对菌株 LSQ 19 生物膜的抑制率达到 80% 以上(图 1)。因此, 将 LSQ 19 菌液与 LSQ 3 无细胞上清液的体积比为 10/190 定义为 MIC。如图 2 所示, 在 1/2 MIC 条件(10 μ L LSQ 19 菌液/95 μ L LSQ 3 CFS+95 μ L 培养基)下, LSQ 3 的 CFS 对 LSQ 19 生物膜的抑制率为 20%。

2.3 LSQ 3 CFS 不同抑制浓度对 LSQ 19 细胞表面特性和 EPS 的影响

图 3 显示了 LSQ 19 在 LSQ 3 CFS 不同抑制浓度下细胞表面特性和 EPS 产率的变化。与对照相比, 当 CFS 浓度为 MIC-1/4 MIC 时 LSQ 19 细胞表面的疏水性为 31.85%-57.62%, 显著低

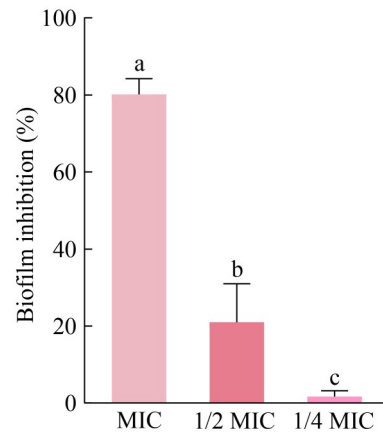


图2 不同浓度*Acinetobacter pittii* LSQ 3无细胞上清液对*Bacillus velezensis* LSQ 19生物膜抑制率的检测

Figure 2 Effect of the cell-free supernatant from *Acinetobacter pittii* LSQ 3 at different concentrations on biofilm inhibition of *Bacillus velezensis* LSQ 19.

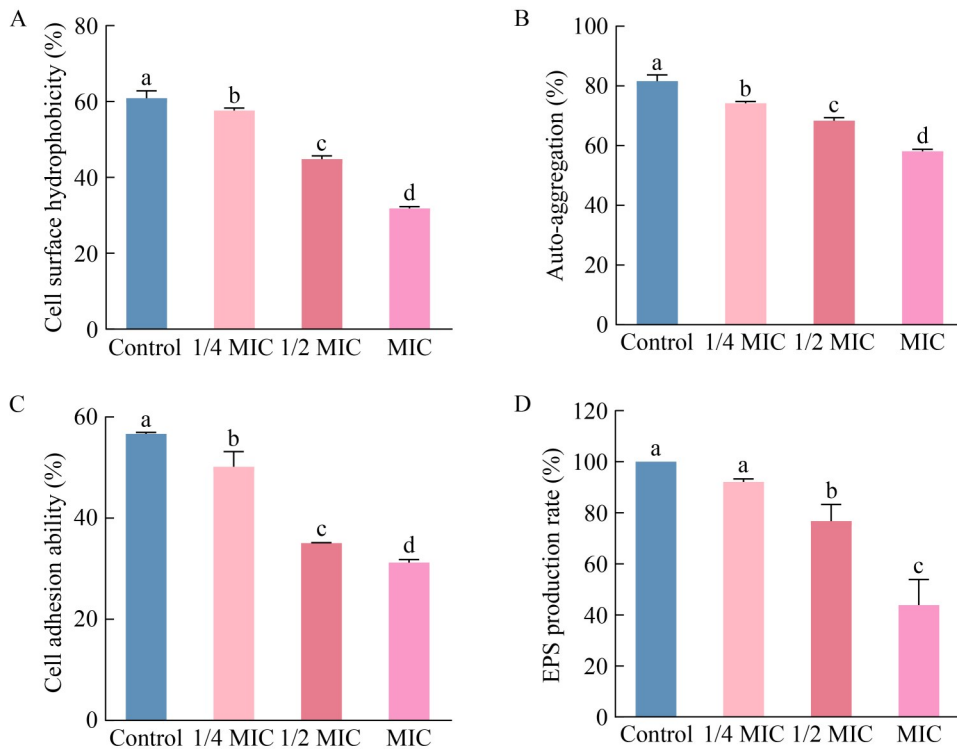


图3 *Acinetobacter pittii* LSQ 3无细胞上清液处理下*Bacillus velezensis* LSQ 19细胞表面特性及EPS的变化

Figure 3 The changes in surface characteristics and EPS of *Bacillus velezensis* LSQ 19 cells treated with *Acinetobacter pittii* LSQ 3 cell-free supernatant. A: Cell surface hydrophobicity; B: Auto-aggregation ability; C: Cell adhesion ability; D: EPS production rate.

于对照(60.89%) ($P<0.05$) (图 3A); 自聚集能力为 58.08%–74.17%, 显著低于对照组(81.58%) ($P<0.05$) (图 3B); 黏附能力为 31.25%–50.19%, 显著低于对照(56.65%) ($P<0.05$) (图 3C); 与对照相比, 当 CFS 浓度为 MIC–1/2 MIC 时 LSQ 19 的 EPS 产率均显著低于 TSB 处理的对照组 ($P<0.05$) (图 3D)。

2.4 LSQ 19 生物膜中细胞的代谢活性分析

比较了 LSQ 3 CFS 处理下 LSQ 19 与对照组生物膜中细胞的代谢活性。如图 4 所示, 当 LSQ 3 CFS 的浓度为 MIC–1/4 MIC 时, 处理组形成的生物膜中细胞的代谢活性显著低于对照 ($P<0.05$)。这表明 LSQ 3 CFS 处理影响了 LSQ 19 生物膜中细胞的代谢活性。

2.5 扫描电镜分析

通过扫描电子显微镜(SEM)评估了 LSQ 3 的 CFS 对 LSQ 19 在玻璃膜上形成生物膜的影响

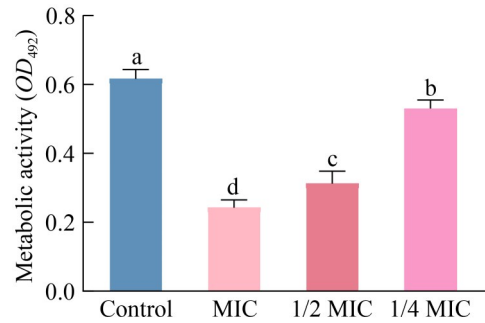


图4 *Acinetobacter pittii* LSQ 3无细胞上清液处理下*Bacillus velezensis* LSQ 19生物膜中的细胞代谢活性分析

Figure 4 Analysis of cell metabolic activity in *Bacillus velezensis* LSQ 19 biofilm under *Acinetobacter pittii* LSQ 3 cell-free supernatant treatment.

(图 5)。在对照组中, LSQ 19 在玻璃膜上形成了致密的生物膜层(图 5)。然而, 当 LSQ 3 CFS 浓度为 MIC 时, LSQ 19 未形成生物膜, 因此在扫

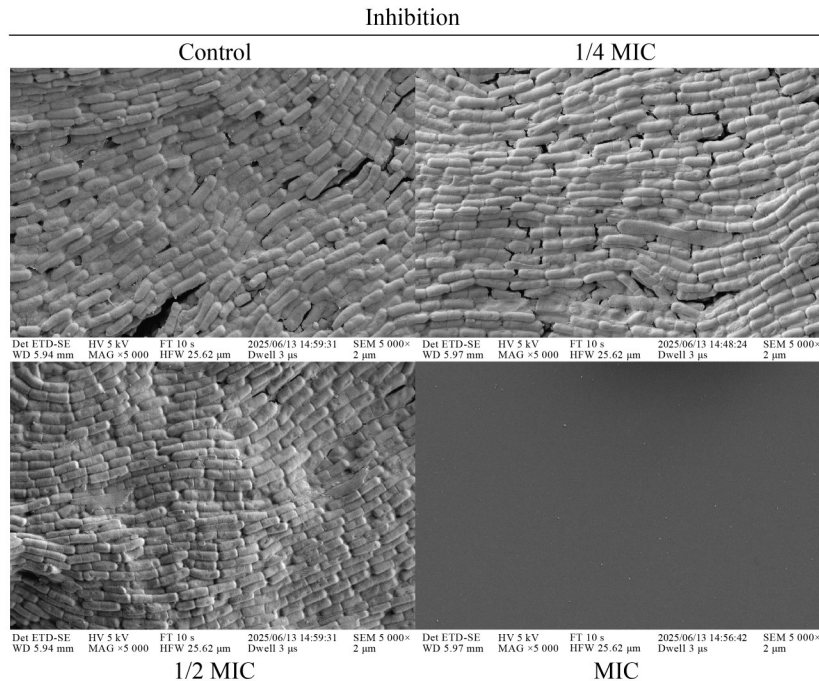


图5 *Acinetobacter pittii* LSQ 3无细胞上清液处理下*Bacillus velezensis* LSQ 19生物膜的扫描电镜图像(5 000×)

Figure 5 Scanning electron microscope images of *Bacillus velezensis* LSQ 19 biofilm treated with *Acinetobacter pittii* LSQ 3 cell-free supernatant (5 000×).

描电子显微镜观察下未发现细胞。这证明高浓度 LSQ 3 无细胞上清液可抑制 LSQ 19 生物膜的生成。

2.6 菌株 LSQ 3 的基因组特征和系统发育

上述结果表明, LSQ 3 菌株对 LSQ 19 的生物膜形成具有显著抑制效果。为从遗传基础探究其潜在的抑菌作用机制, 推测 LSQ 3 基因组中可能携带多种功能基因, 如编码抗菌代谢产物(如抗生素、细菌素、铁载体等)合成、群体感应(quorum sensing, QS)系统干扰以及竞争性定殖相关因子的基因。为验证这一推测并解析其分子机制, 对 LSQ 3 菌株进行了全基因组测序与分析。

对样品测序结果进行组装和注释, 得到 LSQ 3 的全基因组图谱(图 6A)。该菌株的全基因组由一条 3 939 365 bp 的环状染色体组成, G+C 含量为 38.82%。据预测, 该基因组包含 3 601 个 DNA 编码序列(coding DNA sequences, CDSs)、18 个 rRNA 基因和 73 个 tRNA 基因。根据 COG、GO 和 KEGG 功能注释, 鉴定的基因分别为 2 916、2 226 和 2 695 个。在基因组中鉴定出 7 个假定的次级代谢物生物合成基因簇和 11 个基因组岛。系统发育分析表明, 菌株 LSQ 3 与皮氏不动杆菌(*Acinetobacter pittii*) CIP 70.29 的亲缘关系最密切(图 6B)。因此, 菌株 LSQ 3 最终被鉴定为 *Acinetobacter pittii* LSQ 3。将其基因组序列上传至 NCBI, 获得序列登录号为 SAMN53665772。

2.7 菌株 LSQ 3 的功能注释

将菌株 LSQ 3 基因组中的编码基因进行 COG 注释, 共有 2 916 个基因得到注释, 占有基因的 80.98% (图 7A)。其中, 氨基酸转运和代谢(amino acid transport and metabolism)的占比最高, 共有 304 个(10.42%)。除此之外, 含有基因数量较多的功能分类依次为转录(296 个, 占比 10.15%), 一般功能预测(268 个, 占比 9.19%),

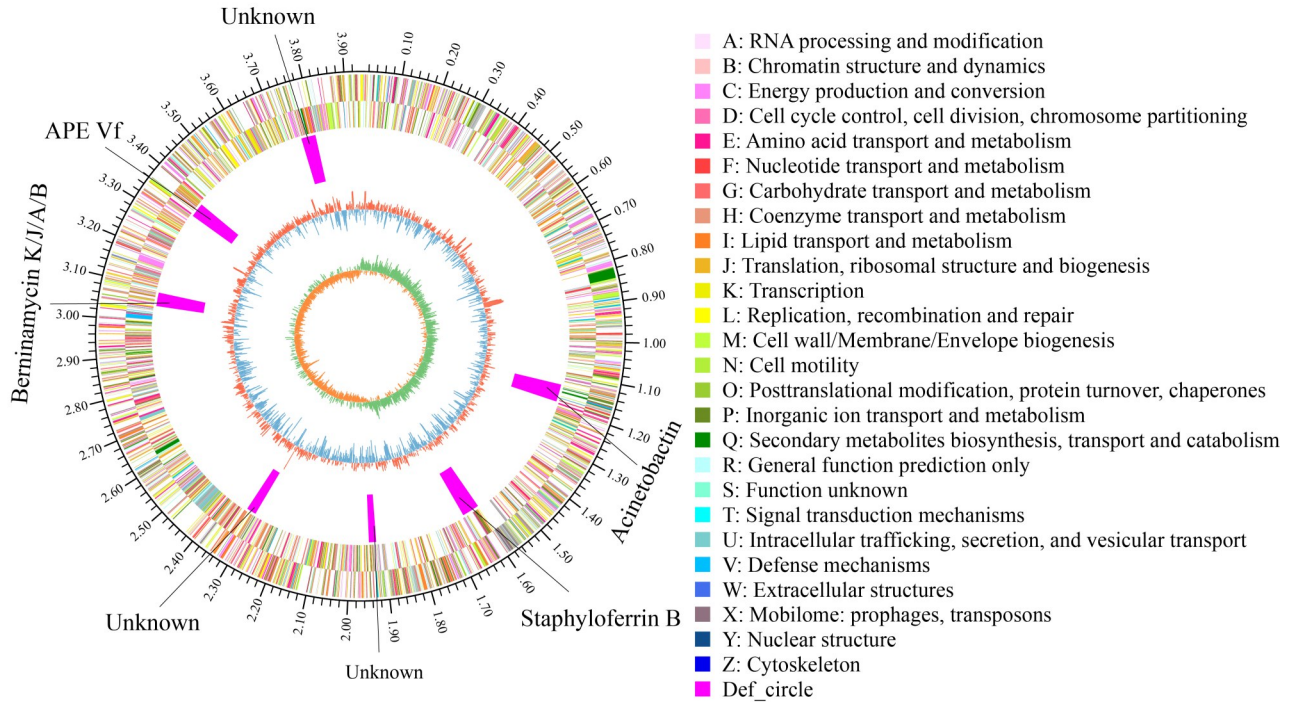
脂质转运和代谢(259 个, 占比 8.88%), 翻译、核糖体结构和生物发生(228 个, 占比 7.82%), 细胞壁/膜/包膜生物发生(206 个, 占比 7.06%)。在 KEGG 途径的 6 个分类中(图 7B), 与代谢相关的蛋白质最多, 其中, 有 918 种蛋白质与全局和总览图谱(global and overview maps)相关, 278 种蛋白质与氨基酸代谢(amino acid metabolism)相关, 203 种蛋白质与碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)相关, 197 种蛋白质与辅助因子和维生素代谢(metabolism of cofactors and vitamins)相关, 156 种蛋白质与能量代谢(energy metabolism)相关。GO 功能注释显示(图 7C), 分别有 1 119、1 085 和 1 820 个基因注释到生物过程(biological process)、细胞组分(cellular component)和分子功能(molecular function)。其中, 在细胞组分上与膜(membrane)相关的基因含量最高, 有 429 个, 占总体 CDSs 的 11.91%。

2.8 菌株 LSQ 3 与生物膜合成相关基因及毒力因子预测

A. pittii LSQ 3 基因组中与群体感应(QS)及生物膜形成相关的基因如表 1 所示。*qseB* 和 *qseC* 作为 QS 系统的一部分, 可调控细菌毒力、宿主适应性和体内生存。*rhlI* 基因编码 AHL 合成酶, 是 RhIRI QS 系统的核心组件, 能产生信号分子, 调控毒力因子(如外毒素和弹性蛋白酶)的表达和分泌。*bapA* 可能编码生物膜相关蛋白, 在 QS 表型(生物膜)中发挥下游作用。*envZ/ompR* 在沙门氏菌中调控渗透压响应, 影响生物膜基质形成, 其突变会导致生物膜能力下降。*bfmR/bfmS* 在鲍曼不动杆菌中调控 Csu 菌毛组装系统, 直接影响生物膜形成。这些基因共同调控生物膜的形成、稳定性和功能, 影响细菌的附着、基质合成和信号传递等过程。

为探究 LSQ 3 中是否含有可抑制生物膜形成的毒力因子, 将 LSQ 3 菌株的基因组与 VFDB 核心数据库数据进行对比分析, 在 LSQ 3 菌株的基因组中发现 427 个毒力因子, 菌株

A



B

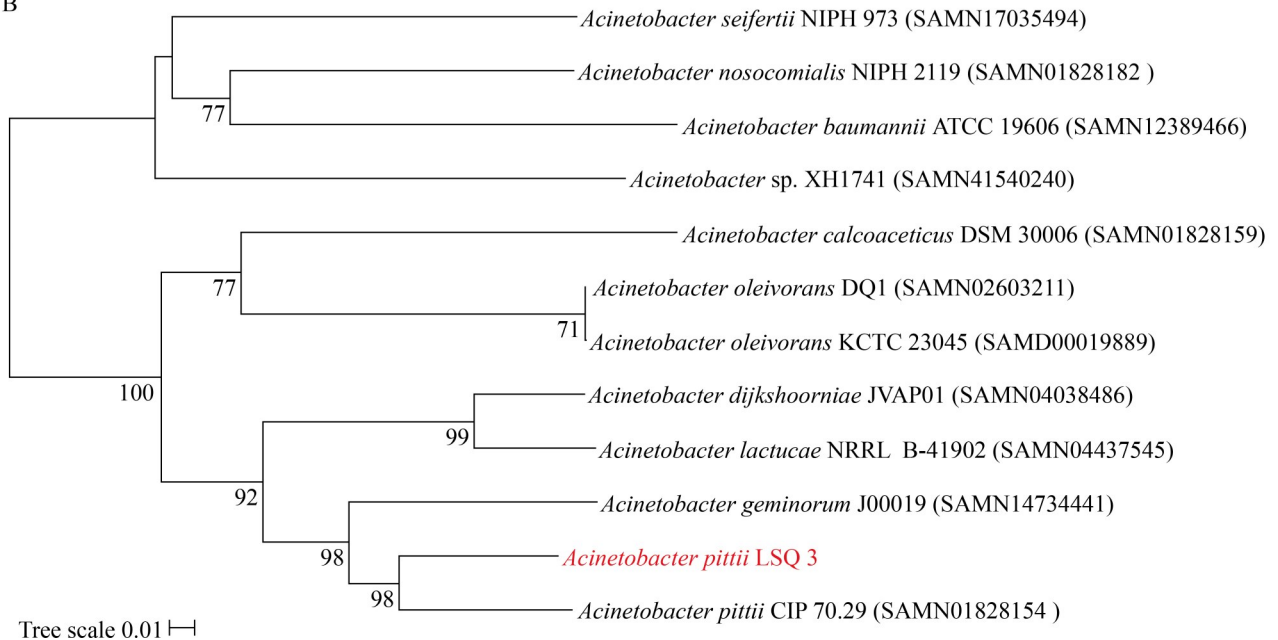
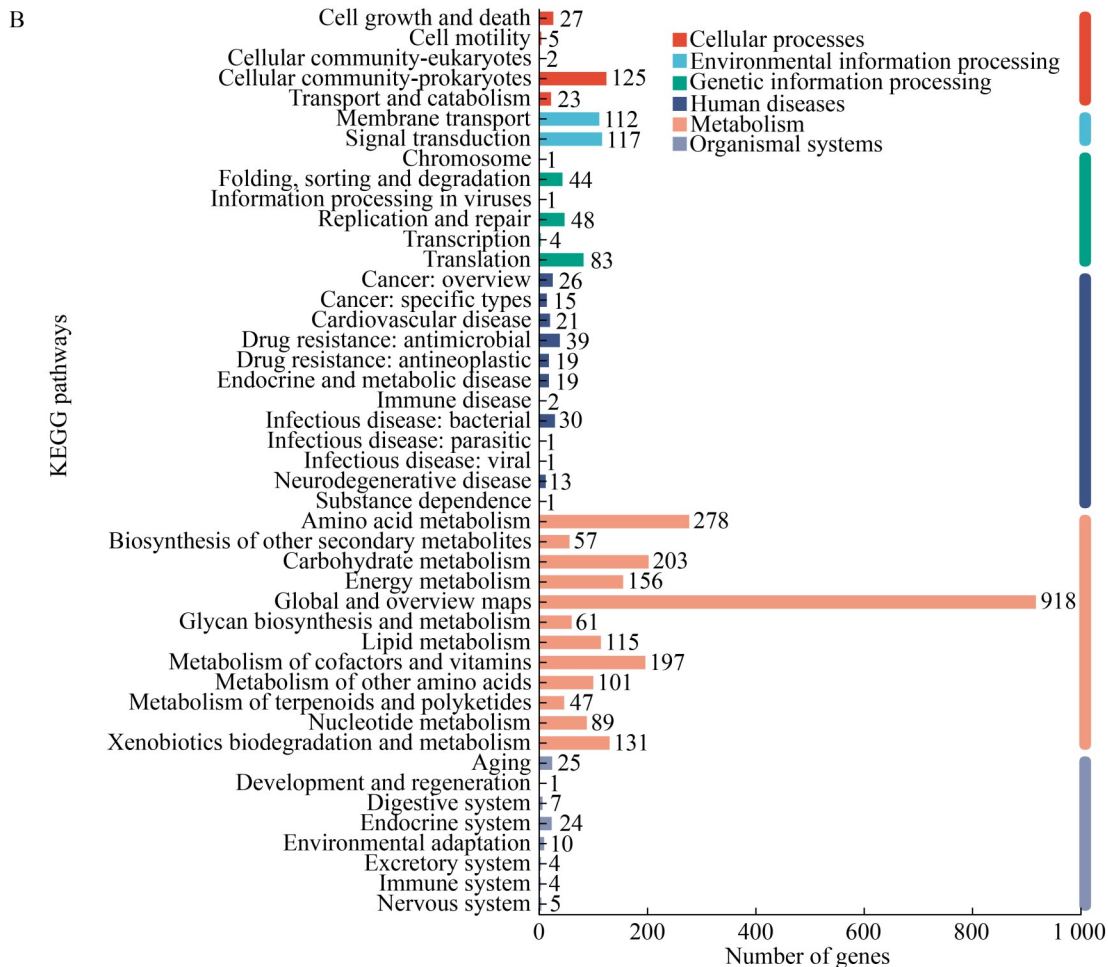
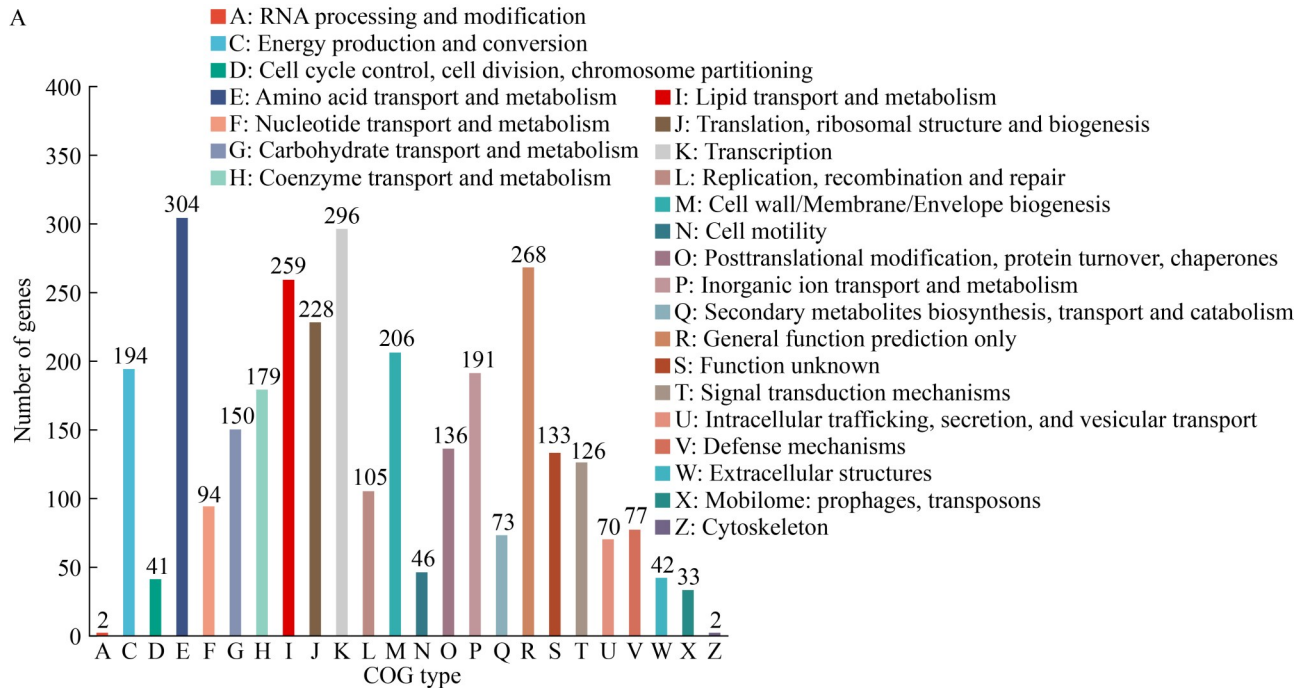


图6 菌株 *Acinetobacter pittii* LSQ 3 的基因组图谱及系统发育树分析

Figure 6 Genomic map and phylogenetic tree analysis of strain *Acinetobacter pittii* LSQ 3; B: Phylogenetic tree of strain *Acinetobacter pittii* LSQ 3 based on whole genome alignments.



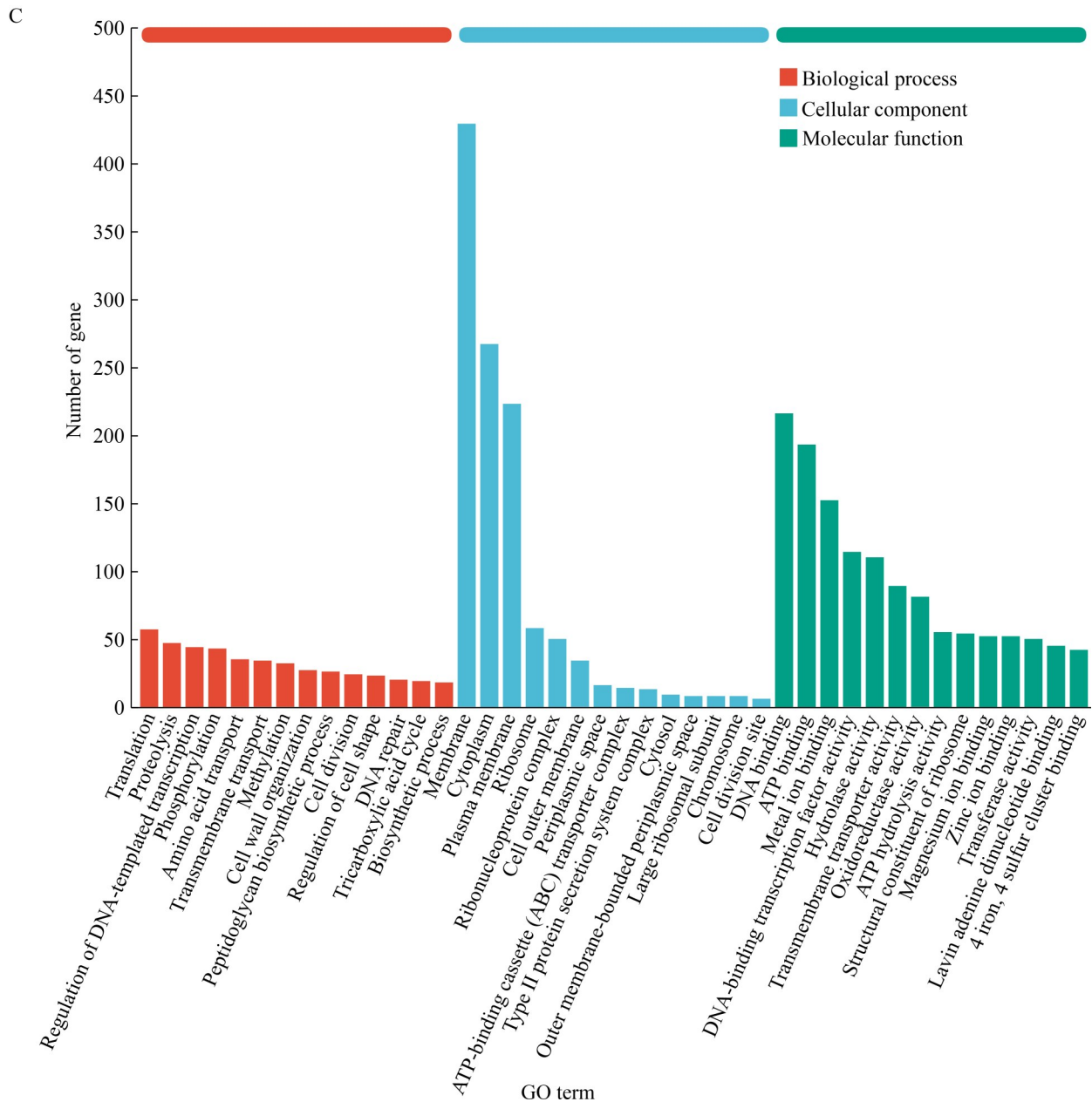


图7 菌株 *Acinetobacter pittii* LSQ 3 基因组的功能注释

Figure 7 Functional annotation of strain *Acinetobacter pittii* LSQ 3. A: COG functional annotation; B: KEGG pathway annotation; C: GO functional annotation.

LSQ 3 的主要毒力因子见表 2。

LSQ 3 基因组中的主要毒力因子与黏附相关的物质有 TFP (IV 型菌毛), 该物质对抽搐运动和自然感受态不可或缺, 并能促进宿主细胞黏附。与生物膜相关的毒力因子有: AdeFGH 外排

泵, 其在生物膜形成过程中自诱导分子的合成和转运中发挥潜在作用; Bap (生物膜相关蛋白), 有助于生物膜的形成和与真核宿主细胞的黏附; PNAG, 对生物膜形成至关重要, 与其相关的抗毒力化合物抑制细胞外多糖的合成或基

表1 *Acinetobacter pittii* LSQ 3基因组中与群体感应及生物膜形成相关的基因

Table 1 *Acinetobacter pittii* LSQ 3 genes associated with quorum sensing and biofilm formation in the genome

KEGG pathway III	LSQ 3
Quorum sensing	<i>ribA, secY, yajC, ahlD, secA, qseB, qseC, oprM, bapA, phzF, trpGkdpE, hfq, plc, ftsY, aroF, aphA, fadD, ddpD, crp, qsmR, ffh, secB, secG, secE, trpE, ribD, zur, solR, rhII, yidC</i>
Biofilm formation	<i>acfC, envZ, ompR, tpbB, pgaB, pilG, pilH, pilI, pilJ, chpA, yegE, wecB, pgaC, fimX, fimW, aphB, trpG, mucR, gspL, gspM, fis, pgaA, pgaD, hfq, oxyR, aphA, wspR, gcvA, gspK, gspJ, gspI, gspG, crp, cysE, paaK, impJ, impA, vasG, impM, impL, impH, hcp, impC, impB, bifA, csrA, roeA, rpoN, barA, gspF, trpE, gspD, gspC, gspN, dksA, uvrY, rhII, gfcE</i>
Glycolysis/ Gluconeogenesis	<i>Ahr, aceE, Acs, pdhD, adh, pckA, Fbp, gapA, ppsA, aldB, yiaY, eno, frmA, fbaA, Pgc, galM, pmm-pgm, gapN, tpiA, gpmI, pgi</i>

表2 *Acinetobacter pittii* LSQ 3主要的毒力因子预测

Table 2 *Acinetobacter pittii* LSQ 3 major virulence factors prediction

VF category	Major virulence factors
Adherence	TFP, Paa, type IV pili, EF-Tu, PEB1, Hsp60, Lap, type 1 fimbriae
Biofilm	Alginate, AdeFGH efflux pump, Bap, VPS, alginate, intercellular adhesion proteins, PNAG, type 3 fimbriae, quorum sensing
Nutritional/ Metabolic factor	Acinetobactin, allantion utilization, pyocyanin, pyoverdine, Chu, Sal, pyrimidine biosynthesis, FbpABC, purine biosynthesis, FbpABC, HitABC, allantion utilization, petrobactin, LipF, pyochelin, AnsP, biotin synthesis, Shu, HemO cluster
Effector delivery system	T4SS secreted effector, T6SS, Dot/Icm T4SS secreted effectors, Bsa T3SS, TTSS (SPI-2 encode), T2SS, T3SS, Xcp secretion system, exolysin, HSI-1 T6SS secreted effectors, HSI-1, type VII secretion system
Exotoxin	Phospholipase D, phospholipase C, colibactin, haemolysin/cytolysin
Immune modulation	LPS, PDIM, LOS, OmpA, capsule, Vi antigen, PbpG
Exoenzyme	CpaA, TlyC
Regulation	MprAB, LetA/S, RelA, BvrR-BvrS, SigA, Ler

质网络的形成；Quorum sensing，在生物膜形成中起重要作用，QS 调控的表型包括 OmpA、AdeFGH 排污泵、PNAG、I 型菌毛等和生物膜形成相关的因素。与营养/代谢因子相关的毒力因子有 acinetobactin，它是一种铁载体，可与宿主细胞竞争铁；HemO cluster，可利用血红素。Effector delivery system 中的主要毒力因子有 T6SS 系统，T6SS 可将蛋白质效应子递送至宿主细胞或竞争细菌中，是不动杆菌中重要的毒力系统。

2.9 菌株 LSQ 3 抗菌次级代谢产物分析

为探究 LSQ 3 菌株抑制 LSQ 19 生物膜形成的分子遗传机制，利用 antiSMASH 8.0.2 rc1 软

件对菌株 LSQ 3 基因组的次级代谢产物合成基因簇进行了预测及分析，发现菌株 LSQ 3 具有 7 个次级代谢产物合成相关的基因簇(图 8)。其中，有 4 个已知的基因簇，包括以非核糖体肽金属基团(NRP-metallophore)途径合成的不动杆菌素(acinetobactin)；以铁载体(NI-siderophore)途径合成的葡萄铁蛋白 B (staphyloferrin B)；以及通过芳基多烯(arylpolyyene)途径合成的伯尼那霉素 K/J/A/B (berninamycin K/J/A/B) 及 APE Vf，这些代谢产物与抗菌及螯合铁离子等功能密切相关(图 8)。

编码 acinetobactin 的 NRP-metallophore 簇与 BGC0000294.5 有 87% 的相似性。Acinetobactin

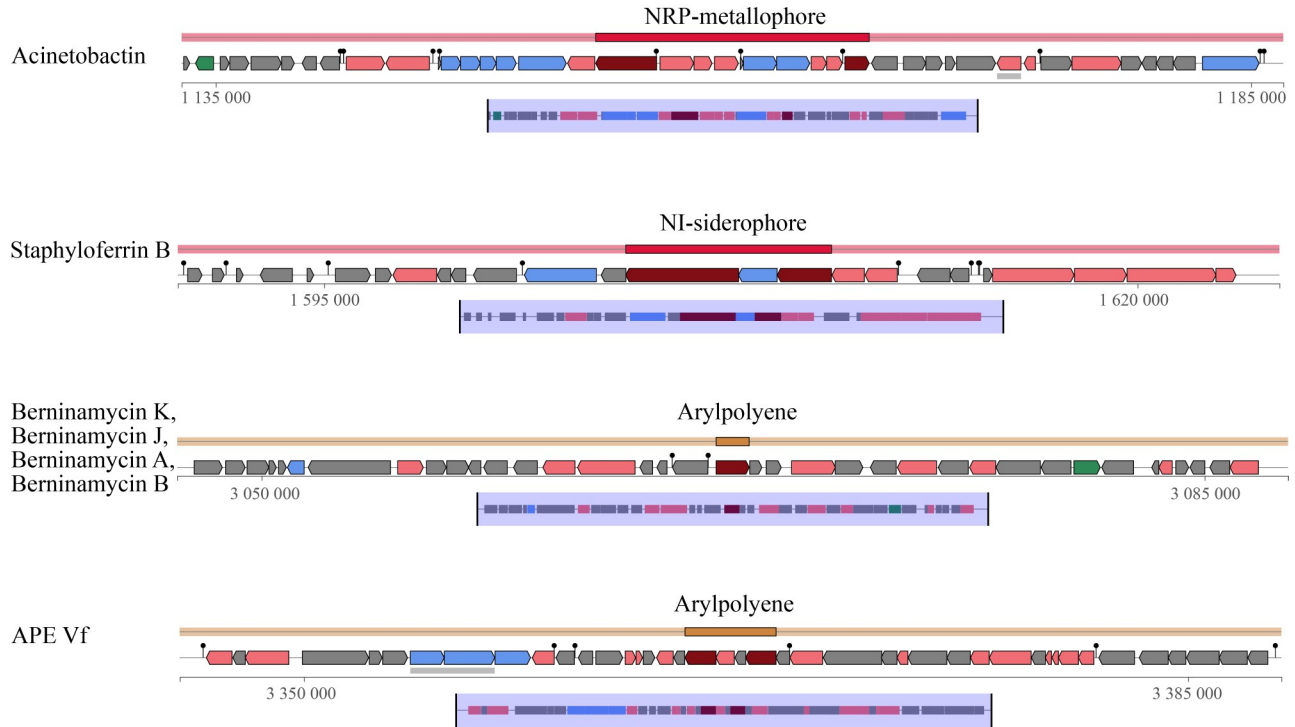


图8 利用antiSMASH 8.0.2 rc1预测菌株*Acinetobacter pittii* LSQ 3的次级代谢产物的基因簇

Figure 8 The gene clusters of secondary metabolites of strain *Acinetobacter pittii* LSQ 3 were predicted using antiSMASH 8.0.2 rc1.

是一种铁载体，负责铁的获取与吸收。在基因组中发现了核心生物合成相关基因 *vibF* 和编码 *acinetobactin* 生物合成异胆碱合酶 BasJ 的基因 *entC*。编码 *staphyloferrin B* 的铁载体与 BGC0000943.5 有 51% 的相似性，由 2 个核心生物合成基因 *sbnF*、*sbnC*，编码铁载体合成酶 *lucA/lucC/SbnC*。编码 *berninamycin K/J/A/B* 的 *arylpolyene* 簇与 BGC0002363.3 有 40% 的相似性。同时，在染色体其他位置通过 *arylpolyene* 簇预测到了 APE Vf，与 BGC0000837.4 有 47% 的相似性。此外，在 LSQ 3 基因组中还预测到了 3 个未知的次级代谢产物合成基因簇，为进一步探索新抗菌物质提供了基础。

3 讨论与结论

生物膜是细菌为适应生存环境而分泌的三维凝胶状胞外聚合物，由多糖基质、纤维蛋白、

脂质蛋白等物质包裹的微生物群体构成^[15]。生防菌形成生物膜并附着在土壤粒子或植物根系表面实现定殖，以群聚形式占据保护根系的有利生态位，发挥生防作用，抵抗病原菌入侵^[16]。

在研究防治西瓜枯萎病合成菌群 Q 菌间互动时发现，LSQ 3 的无细胞上清液能有效抑制 LSQ 19 成膜。表面疏水性和自聚集性是影响生物膜形成的关键因素。表面疏水性可促进细菌黏附到疏水表面，这是生物膜形成的第一步^[17]。同样地，自聚集直接有助于生物膜结构的发育和稳定，使细菌能够在特定环境中形成保护性的三维基质，增强细菌在不利条件下的存活能力。此外，一些研究也支持表面疏水性和自聚集是生物膜形成的关键因素^[18-20]。本研究发现，LSQ 3 CFS 显著抑制了 LSQ 19 的表面疏水性、自聚集和黏附力，进而抑制了 LSQ 19 生物膜的形成，这表明 LSQ 3 CFS 中的活性成分可能作

用于菌株 LSQ 19 的细胞表面, 干扰其生物膜的附着, 与 Silva-Dias 等^[21]研究结果相似。

生物膜由胞外聚合物(EPS)和多糖蛋白复合物组成^[15], 细菌通过分泌大量 EPS 构建和维持生物膜的三维结构^[22]。EPS 的减少会直接削弱生物膜的物理结构基础^[23-24], 使其难以发展为成熟的菌膜。本研究发现, 经 LSQ 3 CFS 处理后 LSQ 19 的 EPS 产量下降, 说明 LSQ 3 CFS 通过降低 EPS 产量影响 LSQ 19 生物膜的形成。

除了从物理结构上干预, CFS 还可能直接影响 LSQ 19 的细胞生理状态。XTT 还原法检测显示, 经 CFS 处理后 LSQ 19 生物膜的代谢活性显著降低^[25]。代谢活性的抑制可能源于 2 个方面: (1) CFS 中的抗菌成分直接损伤细胞呼吸链^[26]; (2) 生物膜结构的解体导致微环境变化(如营养物质扩散受阻), 引发局部营养匮乏和代谢废物累积^[27]。扫描电镜结果证实: LSQ 3 上清液处理组(MIC)的生物膜结构完全消失, 无生物被膜形成, 这与 *Staphylococcus aureus* 接触茶树精油后生物膜崩解的现象一致^[28]。

通过对菌株 LSQ 3 的全基因组测序分析发现, LSQ 3 基因组中含有多种毒力因子, 包括 TFP^[29]、T6SS^[30]和 acinetobactin^[31]等。值得注意的是, 其中存在一个与铁载体 acinetobactin 高度同源的次级代谢产物合成基因簇^[32]。Acinetobactin 是一种能够高效螯合环境中铁离子的铁载体。热力学模型表明, 这类铁载体可快速耗尽微环境中的游离铁, 使得缺乏相应摄取系统的竞争对手因“铁饥饿”而生长受阻、生物膜形成能力显著下降^[33-34]。因此, 推测 LSQ 3 CFS 抑制 LSQ 19 成膜的原因之一是其分泌 acinetobactin 或其他活性分子创造了局部的铁限制环境, 从而干扰了 LSQ 19 的正常生理功能及其生物被膜的发育过程。当然, CFS 中具体是哪种或哪几种代谢产物起主要作用, 仍需通过后续的分离纯化与验证实验来确定。

综上所述, LSQ 3 无细胞上清液通过抑制 LSQ 19 细胞表面疏水性、自聚集能力、黏附力

和 EPS 产率抑制其生物膜的形成。菌株 LSQ 3 经基因组学鉴定为 *Acinetobacter pittii* LSQ 3, 其基因组中有多个生物膜合成相关基因及毒力因子, 还含有 7 个次级代谢产物基因簇。本研究为防治西瓜枯萎病合成菌群 Q 的菌间互作及其应用提供理论依据和参考。

作者贡献声明

杨小宇: 数据收集和处理, 论文撰写和修改; 王志刚: 提供技术支持, 获取基金; 徐伟慧: 提供资源, 监督管理, 方法论; 旦真阿旺: 协助实验操作。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 李宇佳, 文翊, 骆乐丹, 赵升, 欧阳凯. 土壤生物膜的生态功能及其研究方法综述[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(10): 1-11.
LI YJ, WEN Y, LUO LD, ZHAO S, OUYANG K. Ecological function and research methods of soil biofilm: a review[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2023, 51(10): 1-11 (in Chinese).
- [2] 汤雨葳, 于孟, 叶建仁. Zn 对解淀粉芽孢杆菌 JK-JS8 生物膜形成及拮抗能力的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4134-4143.
TANG YW, YU M, YE JR. Biofilm formation and antagonistic ability of *Bacillus amyloliquefaciens* JK-JS8 under Zn stress[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4134-4143 (in Chinese).
- [3] ZHAO QH, SHI Y, XU CW, JIANG ZH, LIU J, SUI Y, ZHANG HY. Control of postharvest blue and gray mold in kiwifruit by *Wickerhamomyces anomalus* and its mechanism of antifungal activity[J]. Postharvest Biology and Technology, 2023, 201: 112345.
- [4] 张越, 慕雪男, 郑子薇, 王志刚, 徐伟慧. 细菌生物膜的生态功能与多物种生物膜的互作机制[J/OL]. 微生物学杂志, 2025: 1-13. (2025-05-30). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1186.q.20250529.2201.002.html>.
ZHANG Y, MU XN, ZHENG ZW, WANG ZG, XU WH. The ecological functions of bacterial biofilms and interaction mechanisms of multi-species biofilms[J/OL]. Journal of Microbiology, 2025: 1-13. (2025-05-30). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1186.q.20250529.2201.002.html> (in Chinese).
- [5] LUO SQ, WANG ZG, XU WH. *Bacillus velezensis* WB invokes soil suppression of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* by inducing particular taxa[J]. Annals of

- Agricultural Sciences, 2023, 68(2): 159-170.
- [6] 佟仁冬, 冯妍, 刘燕, 张一帆, 任小侠, 郝力力, 朱良全, 姚文生. 分光光度法快速测定副鸡禽杆菌菌液浓度的应用[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2702-2710.
TONG RD, FENG Y, LIU Y, ZHANG YZ, REN XX, HAO LL, ZHU LQ, YAO WS. Spectrophotometry for rapid determination of the concentration of *Avibacterium paragallinarum*[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2702-2710 (in Chinese).
- [7] KIM YJ, YU HH, SONG YJ, PARK YJ, LEE NK, PAIK HD. Anti-biofilm effect of the cell-free supernatant of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* against *Listeria monocytogenes*[J]. Food Control, 2021, 121: 107667.
- [8] 孔会会, 姜昱, 何鹏搏, 何月秋, 吴毅歆, 何鹏飞, 孔宝华. 儿茶酚铁载体对贝莱斯芽孢杆菌B9601-Y2的生物膜形成及抑菌活性的影响[J]. 微生物学通报, 2025, 52(9): 4013-4024.
KONG HH, JIANG Y, HE PB, HE YQ, WU YX, HE PF, KONG BH. Effects of bacillibactin on the biofilm formation and biocontrol activity of *Bacillus velezensis* B9601-Y2[J]. Microbiology China, 2025, 52(9): 4013-4024 (in Chinese).
- [9] PARK YJ, KIM YJ, YU HH, LEE NK, PAIK HD. Cell-free supernatants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus polyfermenticus* inhibit *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. Food Control, 2023, 144: 109387.
- [10] RAY S, JIN JO, CHOI I, KIM M. Cell-free supernatant of *Bacillus thuringiensis* displays anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2023, 195(9): 5379-5393.
- [11] WANG AL, TENG Y, JIN T, ZHU WX, JIA JH, XIA XD. Inhibitory effects of the cell-free supernatants of *Faecalibacterium prausnitzii* on biofilm formation of *Listeria monocytogenes*[J]. Food Research International, 2025, 213: 116588.
- [12] LEE DU, PARK YJ, YU HH, JUNG SC, PARK JH, LEE DH, LEE NK, PAIK HD. Antimicrobial and antibiofilm effect of ϵ -polylysine against *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* in tryptic soy broth and chicken juice[J]. Foods, 2021, 10(9): 2211.
- [13] XU T, XIAO Y, WANG HC, ZHU JL, LEE YK, ZHAO JX, LU WW, ZHANG H. Characterization of mixed-species biofilms formed by four gut microbiota[J]. Microorganisms, 2022, 10(12): 2332.
- [14] ABDULATEEF SA, AAL OWAIF HA, HUSSEIN MH. Importance of virulence factors in bacterial pathogenicity: a review[J]. International Journal of Medical Science and Clinical Research Studies, 2023, 3(4): 765-769.
- [15] ALPKVIST E, PICIOREANU C, van LOOSDRECHT MCM, HEYDEN A. Three-dimensional biofilm model with individual cells and continuum EPS matrix[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2006, 94(5): 961-979.
- [16] SUN XL, XU ZH, XIE JY, HESSELBERG-THOMSEN V, TAN TM, ZHENG DY, STRUBE ML, DRAGOŠ A, SHEN QR, ZHANG RF, KOVÁCS ÁT. *Bacillus velezensis* stimulates resident rhizosphere *Pseudomonas stutzeri* for plant health through metabolic interactions[J]. The ISME Journal, 2022, 16(3): 774-787.
- [17] PATEL M, SIDDIQUI AJ, HAMADOU WS, SURTI M, AWADELKAREEM AM, ASHRAF SA, ALRESHIDI M, SNOUSSI M, RIZVI SMD, BARDAKCI F, JAMAL A, SACHIDANANDAN M, ADNAN M. Inhibition of bacterial adhesion and antibiofilm activities of a glycolipid biosurfactant from *Lactobacillus rhamnosus* with its physicochemical and functional properties[J]. Antibiotics, 2021, 10(12): 1546.
- [18] PANDIT S, FAZILATI M, GASKA K, DEROUICHE A, NYPELÖ T, MIJAKOVIC I, KÁDÁR R. The exopolysaccharide component of extracellular matrix is essential for the viscoelastic properties of *Bacillus subtilis* biofilms[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(18): 6755.
- [19] JIANG XY, WHITEHEAD KA, ARNEBORG N, FANG Y, RISBO J. Understanding bacterial surface and adhesion properties and the implications for Pickering stabilization of colloidal structures[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2024, 69: 101767.
- [20] LEBELOANE MM, FAMUYIDE IM, DZOYEM JP, ADEYEMO RO, MAKHUBU FN, ELGORASHI EE, KGOSANA KG, McGAW LJ. Influence of selected plant extracts on bacterial motility, aggregation, hydrophobicity, exopolysaccharide production and quorum sensing during biofilm formation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. South African Journal of Botany, 2024, 167: 197-208.
- [21] SILVA-DIAS A, MIRANDA IM, BRANCO J, MONTEIRO-SOARES M, PINA-VAZ C, RODRIGUES AG. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp.[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 205.
- [22] RATH S, FATMA S, DAS S. Unraveling the multifaceted role of extracellular DNA (eDNA) of biofilm in bacterial physiology, biofilm formation, and matrixome architecture[J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2025, 60(1/2/3): 1-32.
- [23] ZANANE C, MITRO S, MAZIGH D, LEKCHIRI S, HAKIM T, EL LOUALI M, LATRACHE H, ZAHIR H. Characterization of *Streptomyces* cell surface by the microbial adhesion to solvents method[J]. International Journal of Microbiology, 2023, 2023(1): 8841509.
- [24] POMPILIO A, PICCOLOMINI R, PICCIANI C, D'ANTONIO D, SAVINI V, Di BONAVENTURA G. Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 287(1): 41-47.
- [25] RENDUELES O, GHIGO JM. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36(5): 972-989.
- [26] CIOFU O, ROJO-MOLINERO E, MACIÀ MD, OLIVER A. Antibiotic treatment of biofilm infections[J].

- APMIS, 2017, 125(4): 304-319.
- [27] STEWART PS, FRANKLIN MJ. Physiological heterogeneity in biofilms[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(3): 199-210.
- [28] 程峰, 刘宇, 杨珍, 莫亚男, 尚若锋, 郝宝成, 王学红, 梁剑平. 茶树精油对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物被膜的影响[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(14): 107-112.
CHENG F, LIU Y, YANG Z, MO YN, SHANG RF, HAO BC, WANG XH, LIANG JP. Effect of tea tree oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(14): 107-112 (in Chinese).
- [29] 罗艳, 张静超. IV型菌毛可视化方法及其在菌毛功能研究中的应用[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(11): 4534-4549.
LUO Y, ZHANG JC. Visualization method of type IV pili and its application in the study of pili function[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(11): 4534-4549 (in Chinese).
- [30] LUCIDI M, VISAGGIO D, MIGLIACCIO A, CAPECCHI G, VISCA P, IMPERI F, ZARRILLI R. Pathogenicity and virulence of *Acinetobacter baumannii*: factors contributing to the fitness in healthcare settings and the infected host[J]. *Virulence*, 2024, 15(1): 2289769.
- [31] GADDY JA, ARIVETT BA, McCONNELL MJ, LÓPEZ-ROJAS R, PACHÓN J, ACTIS LA. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606^T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice[J]. *Infection and Immunity*, 2012, 80(3): 1015-1024.
- [32] MIHARA K, TANABE T, YAMAKAWA Y, FUNAHASHI T, NAKAO H, NARIMATSU S, YAMAMOTO S. Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore produced by *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606^T[J]. *Microbiology*, 2004, 150(Pt 8): 2587-2597.
- [33] KNAUF GA, POWERS MJ, HERRERA CM, TRENT MS, DAVIES BW. Acinetobactin-mediated inhibition of commensal bacteria by *Acinetobacter baumannii*[J]. *mSphere*, 2022, 7(1): e0001622.
- [34] SCHIESSL KT, JANSSEN EM, KRAEMER SM, McNEILL K, ACKERMANN M. Magnitude and mechanism of siderophore-mediated competition at low iron solubility in the *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin system[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1964.