

[文章编号] 1671-587X(2024)03-0676-06

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240311

氯己定对粪肠球菌耐药性和致病性的影响及其机制

徐智博^{1,2}, 姜鑫森^{1,2}, 甄雨琦^{1,2}, 白玛曲珍^{1,2}, 孙梦瑶^{1,2}, 孟秀萍^{1,2}

(1. 吉林大学口腔医院牙体牙髓科, 吉林 长春 130021; 2. 吉林省牙发育及颌骨重塑与再生重点实验室, 吉林 长春 130021)

[摘要] **目的:** 探讨长期使用氯己定对粪肠球菌 (*E. faecalis*) 耐药性的影响, 并阐明其作用机制。**方法:** 将 *E. faecalis* 标准菌株反复暴露于氯己定中传代10代, 记录每一次传代时的最低抑菌浓度 (MIC) 值。收集第10代且MIC值增加的细菌, 即为 *E. faecalis* 氯己定耐药菌株 (*E. faecalis*-Cs)。绘制2种菌株生长曲线, 透射电子显微镜观察2种菌株形态表现, 结晶紫染色法检测2种菌株细菌生物膜形成量, 微生物黏着碳氢化合物 (MATH) 法检测2种菌株细菌疏水率, 实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 法检测2种菌株细菌生物膜中S-核糖基高半胱氨酸裂解酶 (LuxS) mRNA表达水平。**结果:** 随着传代次数 (第0~10代) 的增加, *E. faecalis* 的MIC值逐渐升高。*E. faecalis* 和 *E. faecalis*-Cs 的生长曲线无明显差异。透射电镜, *E. faecalis* 和 *E. faecalis*-Cs 均呈椭圆形或双球型, 细胞壁结构完整, 边缘光滑, 细胞质分布均匀, 2种细菌形态大小和细胞壁厚度及完整性方面无明显差异。结晶紫染色法, 与 *E. faecalis* 比较, *E. faecalis*-Cs 生物膜形成量明显增加 ($P<0.05$)。MATH法, 与 *E. faecalis* 比较, *E. faecalis*-Cs 的细菌疏水率明显升高 ($P<0.05$)。RT-qPCR法, 与 *E. faecalis* 比较, *E. faecalis*-Cs 细菌生物膜中LuxS mRNA表达水平明显升高 ($P<0.05$)。**结论:** *E. faecalis* 在反复暴露于氯己定后会产生耐药性, 耐药菌株致病能力增强。群体感应 (QS) 系统LuxS基因高表达和更强的细菌生物膜形成能力可能是 *E. faecalis* 对氯己定产生耐药性的潜在机制。

[关键词] 粪肠球菌; 氯己定; 耐药性; 粪肠球菌氯己定耐药菌株; 群体感应系统

[中图分类号] Q939.121 **[文献标志码]** A

Effect of chlorhexidine on drug resistance and pathogenicity of *Enterococcus faecalis* and its mechanism

XU Zhibo^{1,2}, JIANG Xinmiao^{1,2}, ZHEN Yuqi^{1,2}, BAI MA Quzhen^{1,2}, SUN Mengyao^{1,2}, MENG Xiuping^{1,2}

(1. Department of Endodontics, Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Jilin Provincial Key Laboratory of Tooth Development, Jaw Bone Remodeling and Regeneration, Changchun 130021, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of long-term use of chlorhexidine on the resistance of *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), and to clarify its mechanism. **Methods:** The standard strain of *E. faecalis* was repeatedly exposed to chlorhexidine for 10 generations, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was recorded at each passage. The bacteria collected from the 10th generation with increased MIC values were designated as the *E. faecalis* chlorhexidine-resistant strains (*E. faecalis*-Cs). The growth curves of two strains were drawn; the morphology of two strains were observed by transmission

[收稿日期] 2023-06-23

[基金项目] 吉林省财政厅科技项目 (JCSZ2021893-23)

[作者简介] 徐智博 (1998—), 男, 安徽省滁州市人, 在读硕士研究生, 主要从事牙体牙髓病基础和临床方面的研究。

[通信作者] 孟秀萍, 副教授, 硕士研究生导师 (E-mail: mengxp@jlu.edu.cn)

electron microscope; the number of biofilm formation of two strains was detected by crystal violet staining; the bacterial hydrophobicities of two strains were detected by microbial adhesion to hydrocarbons (MATH) method; the expression levels of S-ribosylhomocysteine lyase (LuxS) mRNA in the bacterial biofilms of two strains were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method. **Results:** From the 0th to the 10th generation, the MIC values of *E. faecalis* were gradually increased. The growth curves of *E. faecalis* and *E. faecalis*-Cs showed no significant differences. The transmission electron microscope observation results showed that both *E. faecalis* and *E. faecalis*-Cs appeared oval or diplococcal, with intact cell wall structures, smooth edges, and evenly distributed cytoplasm. There were no significant differences in the morphology, size, cell wall thickness, or integrity between two types of bacteria. The crystal violet staining results showed that compared with *E. faecalis*, the number of biofilm formation of *E. faecalis*-Cs was significantly increased ($P < 0.05$). The MATH results showed that the hydrophobicity of *E. faecalis*-Cs was significantly higher than that of *E. faecalis* ($P < 0.05$). The RT-qPCR results showed that the expression level of LuxS mRNA in the biofilms of *E. faecalis*-Cs was significantly higher than that of *E. faecalis* ($P < 0.05$). **Conclusion:** *E. faecalis* develops the resistance after repeated exposure to the chlorhexidine, and the pathogenicity of the resistant strain is enhanced. The high expression of quorum sensing (QS) system LuxS gene and stronger biofilm forming ability of bacteria may be the potential mechanism for *E. faecalis* to tolerate the chlorhexidine.

KEYWORDS *Enterococcus faecalis*; Chlorhexidine; Drug resistance; *Enterococcus faecalis* resistance stain; Quorum sensing system

粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*, *E. faecalis*) 是一种革兰阳性兼性厌氧菌, 也是导致持续难治性根尖周炎最常见的细菌之一, 可定植于根管壁的牙本质小管内形成生物膜^[1-2]。根尖周炎治疗的有效性主要取决于根管内 *E. faecalis* 生物膜清除程度, 因此根管治疗术是控制根尖周感染的关键。氯己定作为最常见的根管冲洗剂之一, 在临床上被大量使用。氯己定是一种双胍类广谱抗菌剂, 在低浓度时会导致细菌中钙离子和镁离子的置换及细胞壁中钾离子的流失, 从而产生抑菌作用。高浓度氯己定环境会导致所有细胞内主要成分渗出至细胞外, 导致细菌裂解死亡, 从而产生杀菌作用^[3]。研究^[4]显示: 长期使用氯己定可能会导致部分口腔微生物产生耐药性。EMILSON 等^[5]从长期使用氯己定漱口水患者口腔中分离出对氯己定敏感性降低的血链球菌。研究^[6-7]表明: *E. faecalis* 对多种抗生素的耐药性较高, 但目前关于 *E. faecalis* 对氯己定耐药性的研究较少, 具体机制尚未完全阐明。*E. faecalis* 具有形成生物膜的能力, 可在根管壁上形成牢固附着的生物膜, 利用牙本质和牙周膜的血清作为其营养来源, 可耐受抗菌剂和高碱性环境等极端环境^[8]。同时, *E. faecalis* 含有多种毒力因子, 这些毒力因子有利于细菌之间的质粒交换和黏附^[9-10]。持留菌状态是指细菌中可耐受致死浓度抗生素的亚

群, *E. faecalis* 可在低氧、强碱、高盐、寡营养状态和干燥的环境中以持留菌状态生存, 并可诱导羟基磷灰石沉淀形成钙化生物膜, 使其对常用的根管消毒药物不敏感^[11]。待药物被清除后, 持留菌状态的 *E. faecalis* 则恢复生长能力, 导致感染复发和炎症迁延不愈^[12]。群体感应 (quorum sensing, QS) 系统是细菌之间传递信号和调节群体行为的机制^[13]。QS 系统为细菌种群密度依赖性调节机制, 细菌与细菌之间可通过自诱导剂 (autoinducer, AI) 进行交流。研究^[14]证实: 细菌 QS 系统与细菌耐药性和生物膜形成有关, 细菌可通过 QS 系统产生信号分子, 调节细菌的基因表达^[15]。在 *E. faecalis* 中 QS 系统可由 S-核糖基高半胱氨酸裂解酶 (S-ribosylhomocysteine lyase, LuxS) 基因操控。目前 *E. faecalis* 氯己定耐药性与 QS 系统之间的关系尚未完全阐明。本研究探讨长期使用氯己定对 *E. faecalis* 耐药性的影响, 初步阐明其作用机制, 为相关疾病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细菌、主要试剂和仪器 *E. faecalis* ATCC29212 (广东环凯微生物科技有限公司), 脑心浸出液 (brain heart infusion, BHI) 培养基 (英国 Oxoid 公司), 氯己定 (北京索莱宝科技有限公司), 结晶紫染料 (北京酷来博科技有限公司), 引

物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,总RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒和实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)试剂盒(上海翌圣生物科技股份有限公司)。RT-qPCR仪(型号:CFX96,美国Bio-Rad公司),高速低温冷冻离心机(型号:Sorvall ST8,美国Thermo公司),酶标仪(型号:Synergy-HT,美国Bio-Tek公司),透射电子显微镜(型号:HT7800,日本HITACHI公司)。

1.2 体外诱导耐药菌株 收集过夜培养的*E. faecalis*,离心后将其重悬于新鲜的BHI培养基中,调整其浓度为 1×10^7 CFU·L⁻¹。将溶解于BHI培养基中的氯己定连续稀释后,取出100 μL氯己定溶液,将其与100 μL调整后的菌悬液共同加入96孔细胞培养板中,以未接种细菌的BHI培养基为对照。于37℃条件下培养24 h,记录最低抑菌浓度(minimum inhibition concentration, MIC)值。并将亚MIC的细菌悬液吸出,接种至含有相同浓度氯己定的新鲜BHI培养基中,继续培养24 h。随后5 000 r·min⁻¹离心5 min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤2次以除去残留的氯己定溶液。将离心后的细菌重悬于BHI培养基中,调整浓度,继续重复10次。最后一次收集到的细菌即为*E. faecalis*氯己定耐药菌株(*E. faecalis* chlorhexidine-resistant strains, *E. faecalis*-Cs)。氯己定体外诱导耐药菌株在不含氯己定的BHI琼脂平板上连续传代5次,观察其药物耐受性是否稳定存在,并于-80℃条件下存储,以进行下一步实验。

1.3 绘制2种菌株生长曲线 将过夜培养的*E. faecalis*和*E. faecalis*-Cs菌株分别重悬于新鲜的BHI培养基中,然后加入至96孔细胞培养板中,每孔200 μL。于37℃条件下分别在培养0、2、4、6、8、10、12、24和48 h时,采用酶标仪检测并记录波长600 nm处的吸光度(A)值,以A值反映细菌悬液中的细菌数量,绘制*E. faecalis*和*E. faecalis*-Cs菌株的生长曲线。

1.4 透射电子显微镜观察2种菌株形态表现 分别将*E. faecalis*和*E. faecalis*-Cs菌株以5 000 r·min⁻¹离心5 min, PBS缓冲液冲洗2次,加入2.5%戊二醛溶液室温避光固定30 min,4℃冰箱过夜。对样品进行包埋和制片,采用透射电子显微镜观察2种菌株形态表现。

1.5 结晶紫染色法检测2种菌株细菌生物膜形成量 采用含1%蔗糖的BHI培养基分别重悬*E. faecalis*和*E. faecalis*-Cs菌株,调整细菌浓度至 1×10^8 CFU·L⁻¹。将细菌悬液加入96孔细胞培养板中,于37℃条件下静置培养24 h。待生物膜形成后,去除上层培养基, PBS缓冲液冲洗3次。每孔加入100 μL甲醇固定15 min,再加入100 μL 0.1%结晶紫溶液,室温染色5 min后, PBS缓冲液洗去多余染料后风干。最后每孔中加入200 μL 95%乙醇,室温避光振荡30 min后,采用酶标仪检测波长550 nm处A值,以生物膜A值代表菌株细菌生物膜形成量。

1.6 微生物黏着碳氢化合物(microbial adhesion to hydrocarbons, MATH)法检测2种菌株细菌疏水率 按照参考文献[16]的方法,将培养24 h的菌液以5 000 r·min⁻¹离心5 min,并在PUM缓冲液中洗涤2次后重悬,检测其在波长600 nm处A值为A₀。取3 mL重悬后的菌液,加入400 μL正十六烷,连续振荡1 min,使其充分混匀,随后室温静置15 min,待其分层后取下层水相,于波长600 nm处检测其最终A值为A₁,以缓冲液为空白对照,计算2种菌株细菌疏水率。细菌疏水率=(A₀-A₁)/A₀×100%。

1.7 RT-qPCR法检测2种菌株细菌生物膜中LuxS mRNA表达水平 采用TRIzol法提取*E. faecalis*和*E. faecalis*-Cs生物膜的总RNA,测定总RNA浓度后,按逆转录试剂盒说明书操作,将总RNA逆转录为cDNA后进行扩增。采用RT-qPCR法检测2种细菌中LuxS mRNA表达水平,反应总体积为20 μL。引物序列: LuxS上游引物,5'-CGTTGGAACATTTATTAGC-3',下游引物,5'-TAGTTTCCGCACTCTTTTG-3'; 16S上游引物,5'-AAGCAACGCGAAGAACCCTTA-3',下游引物,5'-GTCTCGCTAGAGTGCCCAAC-3'。以16S为内参,反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性10 s,60℃退火,延伸30 s,循环40次。采用2^{-ΔΔCt}法计算2种菌株细菌中LuxS mRNA表达水平。

1.8 统计学分析 采用GraphPad Prism 8.0统计软件进行统计学分析。2种菌株细菌生物膜形成量、细菌疏水率和细菌中LuxS mRNA表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组间样本均数比较采用两独立样本t检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氯己定诱导 *E. faecalis* 的 MIC 值 将 *E. faecalis* 暴露于氯己定中连续培养 10 代, 由第 0 代至第 10 代, *E. faecalis* 的 MIC 值逐渐升高。提示 *E. faecalis* 长期暴露于氯己定中可以导致 *E. faecalis*-Cs 产生, 诱导的 *E. faecalis*-Cs 在不含氯己定的 BHI 琼脂平板上连续传代 5 次后耐药性稳定存在。见图 1。

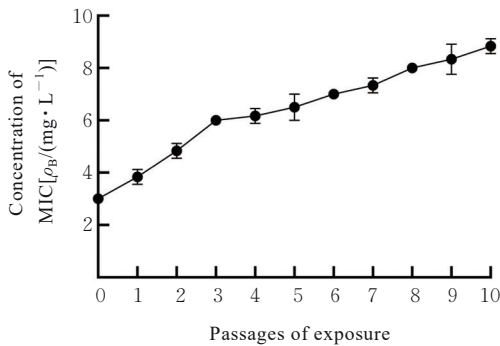


图1 氯己定诱导不同传代 *E. faecalis* 的 MIC 值

Fig. 1 MIC values of *E. faecalis* induced by chlorhexidine for different passages

2.2 2种菌株生长曲线 *E. faecalis* 和 *E. faecalis*-Cs 菌株均在培养 0~6 h 内迅速生长, 之后生长速度逐渐减慢, 最后进入稳定期。*E. faecalis*-Cs 菌株在培养 6~12 h 时菌液浑浊度高于标准株, 后趋于一致。2 种菌株整体生长趋势无明显差异。见图 2。

2.3 透射电子显微镜观察 2 种菌株形态表现

E. faecalis 和 *E. faecalis*-Cs 在透射电子显微镜下均呈椭圆形或双球形, 细胞壁结构完整, 边缘光滑, 细胞质分布均匀, 2 种细菌大小和细胞壁厚度及完整性方面无明显差异。见图 3。

2.4 2 种菌株细菌生物膜形成量 与 *E. faecalis* (2.633 ± 0.134) 比较, *E. faecalis*-Cs 菌株细菌生物膜形成量 (3.333 ± 0.121) 明显增加 ($P<0.05$)。

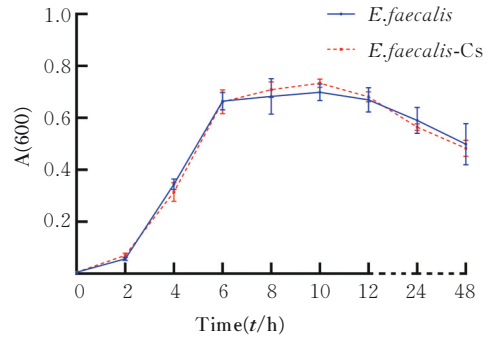


图2 2种菌株生长曲线

Fig. 2 Growth curves of two bacterial strains

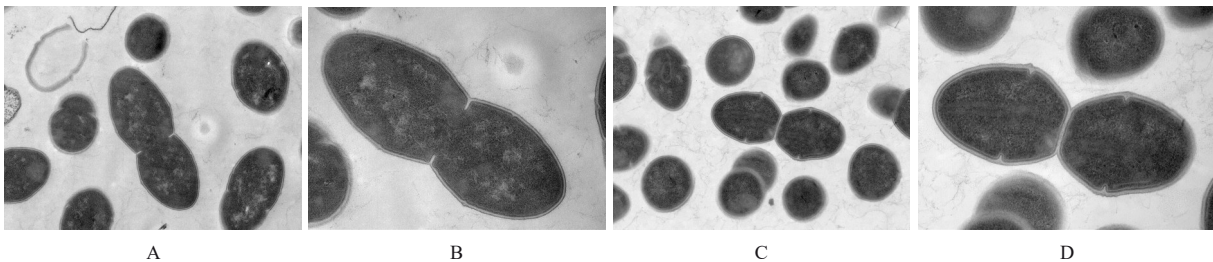
2.5 2 种菌株细菌疏水率 培养 24 h 后, 与 *E. faecalis* ($5.410\%\pm 0.217\%$) 比较, *E. faecalis*-Cs 菌株的细菌疏水率 ($29.403\%\pm 1.784\%$) 明显升高 ($P<0.05$)。

2.6 2 种菌株细菌生物膜中 LuxS mRNA 表达水平 与 *E. faecalis* (1.001 ± 0.051) 比较, *E. faecalis*-Cs 细菌生物膜中 LuxS mRNA 表达水平 (1.454 ± 0.050) 明显升高 ($P<0.05$)。

3 讨论

对于 *E. faecalis* 导致的难治性根尖周炎, 临床上通常采用根管治疗术进行处理, 氯己定作为一种根管冲洗药物被广泛使用。研究^[17]显示: 氯己定会导致细菌产生耐药性, 尽管氯己定导致的细菌耐药多在实验室条件下诱导产生, 但在临床中由氯己定导致细菌产生耐药性的风险也应被重视。

本研究结果显示: *E. faecalis* 反复暴露于氯己定会导致其 MIC 值持续升高, 证实了长期使用氯己定会导致 *E. faecalis* 产生耐药性。研究^[18]显示: 与标准株比较, 部分耐药株的生长速度较标准株更为缓慢, 许多耐药株通常会改变其细胞形态表现。MAVRI 等^[19]研究发现: 对十六烷基吡啶 (cetylpyridinium chloride, CPC) 产生耐药性的大



A: *E. faecalis* ($\times 15\ 000$); B: *E. faecalis* ($\times 30\ 000$); C: *E. faecalis*-Cs ($\times 15\ 000$); D: *E. faecalis*-Cs ($\times 30\ 000$).

图3 透射电镜观察 2 种菌株形态表现

Fig. 3 Morphology of two strains observed by electron microscope

肠弯曲杆菌细胞膜更厚。本研究结果显示：标准菌株和耐药菌株的生长曲线及形态表现均无显著差异，这可能是由于细菌种类和抗菌药物的多样性导致的。

细菌黏附能力与其致病性有密切关联，黏附是细菌形成生物膜的第一步^[20]。*E. faecalis*不仅能够黏附于侧支根管、根管峡部和根尖三角区等不易清除的部位，还可能黏附于预备后的根管壁上，进而再次形成生物膜，导致炎症迁延不愈^[21]。本研究结果显示：与标准菌株比较，耐药菌株的生物膜形成量明显增加，且细菌疏水率明显升高，提示耐药菌株的黏附能力和生物膜形成能力明显增强，其致病能力也较强。

尽管使用抗菌药物能够清除细菌群体中大部分细菌，但同时也会导致耐药菌株的产生。目前关于细菌的耐药机制已经受到广泛关注。研究^[22-23]表明：细菌的耐药性可能与QS系统有关。随着细菌密度的增加，AI分子会在环境中积累，激活其同源受体，调控相关基因表达，可通过影响外排泵表达水平、可移动遗传元件(mobile genetic elements, MGEs)和双组分调控系统等多种途径调控细菌的耐药性^[14, 24-25]。在*E. faecalis*中，QS系统主要是LuxS/AI-2依赖性QS系统^[26]。本研究结果显示：与标准菌株比较，耐药菌株的LuxS mRNA表达水平明显升高。研究^[27]证实：LuxS基因表达水平与生物膜形成能力呈正相关关系，与本研究结果一致。提示*E. faecalis*对氯己定的耐药性可能与LuxS基因的高表达及更强的细菌生物膜形成能力有关。

综上所述，*E. faecalis*会对氯己定产生耐药性，且耐药菌株的致病性明显增加，QS系统LuxS基因的高表达及更强的细菌生物膜形成能力可能是*E. faecalis*对氯己定产生耐药性的潜在机制。因此，有必要改进氯己定或研发新的药物以取代氯己定。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

徐智博参与文献检索、实验设计、实验数据收集和分析及论文撰写，姜鑫淼参与文献检索、实验设计和论文撰写，甄雨琦和白玛曲珍参与实验数据收集及分析，孙梦瑶参与实验数据分析和讨论，孟秀萍参与论文写作指导和审校。

[参考文献]

- [1] SIQUEIRA J F Jr, ANTUNES H S, PÉREZ A R, et al. The apical root canal system of teeth with posttreatment apical periodontitis: correlating microbiologic, tomographic, and histopathologic findings[J]. *J Endod*, 2020, 46(9): 1195-1203.
- [2] SONG J Z, HONG L H, ZOU X Y, et al. A self-supplying H₂O₂ modified nanozyme-loaded hydrogel for root canal biofilm eradication[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 10107.
- [3] BROOKES Z L S, BESCOS R, BELFIELD L A, et al. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review[J]. *J Dent*, 2020, 103: 103497.
- [4] HUANG S, WU M J, LI Y J, et al. The dlt operon contributes to the resistance to chlorhexidine in *Streptococcus mutans* [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2022, 59(3): 106540.
- [5] EMILSON C G, ERICSON T, LILJA J, et al. Effect of chlorhexidine on human oral streptococci[J]. *J Periodontal Res*, 1972, 7(2): 189-191.
- [6] 张鹏, 车丽赫, 郭志敏, 等. 泌尿系统感染患者病原菌的分布及其耐药性分析[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2015, 41(3): 593-598.
- [7] CODELIA-ANJUM A, LERNER L B, ELTERMAN D, et al. Enterococcal urinary tract infections: a review of the pathogenicity, epidemiology, and treatment [J]. *Antibiotics*, 2023, 12(4): 778.
- [8] PEDRINHA V F, CUELLAR M R C, DE BARROS M C, et al. The vehicles of calcium hydroxide pastes interfere with antimicrobial effect, biofilm polysaccharidic matrix, and pastes' physicochemical properties[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(12): 3123.
- [9] BARBOSA-RIBEIRO M, DE-JESUS-SOARES A, ZAIA A A, et al. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolates from teeth with failure of the endodontic treatment[J]. *J Endod*, 2016, 42(7): 1022-1028.
- [10] 胡涛, 雷蕾, 周学东. 顽固感染根管内粪肠球菌的致病机制及其控制方法进展[J]. *中华口腔医学杂志*, 2022, 57(1): 10-15.
- [11] PERSONNIC N, DOUBLET P, JARRAUD S. Intracellular persister: a stealth agent recalcitrant to antibiotics [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1141868.
- [12] GAETA C, MARRUGANTI C, ALI I A A, et al. The presence of *Enterococcus faecalis* in saliva as a risk

- factor for endodontic infection [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1061645.
- [13] BASSLER B L, LOSICK R. Bacterially speaking [J]. *Cell*, 2006, 125(2): 237-246.
- [14] WANG Y, LIU B B, GRENIER D, et al. Regulatory mechanisms of the LuxS/AI-2 system and bacterial resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(10): e01186-e01119.
- [15] SMITH W P J, WUCHER B R, NADELL C D, et al. Bacterial defences: mechanisms, evolution and antimicrobial resistance [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21(8): 519-534.
- [16] CHAO Y Q, GUO F, FANG H H, et al. Hydrophobicity of diverse bacterial populations in activated sludge and biofilm revealed by microbial adhesion to hydrocarbons assay and high-throughput sequencing [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, 114: 379-385.
- [17] 陈 珺, 罗智伟, 曾心怡, 等. 上颌侧切牙重度畸形舌侧沟多学科联合治疗1例并文献复习 [J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2023, 48(2): 302-310.
- [18] THEOPHEL K, SCHACHT V J, SCHLÜTER M, et al. The importance of growth kinetic analysis in determining bacterial susceptibility against antibiotics and silver nanoparticles [J]. *Front Microbiol*, 2014, 5: 544.
- [19] MAVRI A, SMOLE MOŽINA S. Development of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* adapted to biocides [J]. *Int J Food Microbiol*, 2013, 160(3): 304-312.
- [20] DOLL-NIKUTTA K, WINKEL A, YANG I, et al. Adhesion forces of oral bacteria to titanium and the correlation with biophysical cellular characteristics [J]. *Bioengineering*, 2022, 9(10): 567.
- [21] BOUTSIUKIS C, ARIAS-MOLIZ M T. Present status and future directions - irrigants and irrigation methods [J]. *Int Endod J*, 2022, 55(Suppl 3): 588-612.
- [22] PARGA A, MANOIL D, BRUNDIN M, et al. Gram-negative quorum sensing signalling enhances biofilm formation and virulence traits in gram-positive pathogen *Enterococcus faecalis* [J]. *J Oral Microbiol*, 2023, 15(1): 2208901.
- [23] WANG Q Q, WEI S D, SILVA A F, et al. Cooperative antibiotic resistance facilitates horizontal gene transfer [J]. *ISME J*, 2023, 17(6): 846-854.
- [24] AQAWI M, SIONOV R V, FRIEDMAN M, et al. The antibacterial effect of cannabigerol toward *Streptococcus mutans* is influenced by the autoinducers 21-CSP and AI-2 [J]. *Biomedicines*, 2023, 11(3): 668.
- [25] RAMIĆ D, JUG B, ŠIMUNOVIĆ K, et al. The role of *luxS* in campylobacter jejuni beyond intercellular signaling [J]. *Microbiol Spectr*, 2023, 11(2): e0257222.
- [26] CH'NG J H, CHONG K K L, LAM L N, et al. Biofilm-associated infection by *Enterococci* [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(2): 82-94.
- [27] YANG Y, LI W Z, HOU B X, et al. Quorum sensing LuxS/autoinducer-2 inhibits *Enterococcus faecalis* biofilm formation ability [J]. *J Appl Oral Sci*, 2018, 26: e20170566.