

乳杆菌生物膜成膜规律及特性研究

尹一婷, 陆文伟, 张灏

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要: 本文旨在研究乳杆菌生物膜的成膜规律及特性。采用经典的孔板-结晶紫法测定了 8 个菌种 35 株不同乳杆菌的成膜能力, 并研究了不同成膜能力菌株的成膜规律和影响因素。结果显示, 乳杆菌的成膜能力呈现菌株特异性, 与菌种及菌株来源无相关性; 扫描电镜结果显示, 乳杆菌可以在非水溶性膳食纤维表面形成特定结构的生物膜; 葡萄糖、牛肉膏、培养基浓度对菌株的成膜能力存在显著影响, 但无特定规律; 菌体表面疏水性与菌株成膜能力成正相关。此外, 耐酸耐胆盐实验显示, 膜样乳杆菌的抗逆性显著提高。综上所述, 生物膜样化在乳杆菌产品的开发应用中具有非常大的潜在价值。

关键词: 乳杆菌; 生物膜; 规律; 特性

中图分类号: TS201.3

Research on the regulation of Lactobacillus biofilm formation and the characteristics of the cells

Yin Yiting, Lu Wenwei, Zhang Hao

(College of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, 214122, China)

Abstract: The objective of this study is to explore the common rules of the formation of Lactobacillus biofilms as well as their characteristics. Classical method of 96-well plates were used to cultivate biofilms of 35 Lactobacillus strains from 8 species, finding out the regulations and influence factors of the cells with different biofilm-forming capability. It is showed that the ability of biofilm formation of these strains was strain-specific, which means there was no relationship between the capacity and species or source. The pictures of SEM illustrated that Lactobacillus cells can form biofilms on the surface of insoluble fiber with specific structures. Besides, the further study in which the concentration of glucose, beef extract and medium were changed confirmed that each stain had its own but various reaction. However, cells with higher ability of forming biofilms always have higher hydrophobicity. In addition, the resistance of biofilm-like cells to the mimic gastrointestinal condition were improved significantly compared with the suspension cells. The results of this study showed the large potential of the application of Lactobacillus biofilms in the probiotics production.

Key words: Lactobacillus; biofilm; regulation; characteristics

0 引言

乳酸菌作为益生菌的代表, 具有维持人体肠道菌群平衡、抑制腐败菌、增强免疫力、抗衰老等功效。近年来, 乳酸菌除了发挥其重要学术价值的同时, 还创造了巨大的经济价值。据统计, 2001~2005 年间, 以乳酸菌为发酵菌种的食品工业所创的经济价值占全球发酵类食品产品的 20%^[1]。现阶段, 菌粉是制备多种乳杆菌活菌制剂的主要原料, 但由于乳杆菌抗胁迫能力差, 现有制备技术局限于真空冷冻干燥^[2-3], 通过该技术生产菌粉, 耗能高、产能低。因此, 提高菌体自身抗逆性, 是突破乳杆菌菌粉制备技术的关键。

生物膜是由固定在载体表面的菌体及其自身产生的蛋白质、DNA、多糖所组成的高度组织化的细菌群体结构^[4-5]。形成生物膜能帮助菌体细胞更好地适应不良环境, 减少由不利环境及环境变化所带来影响, 提高菌体对胁迫环境的耐受性。例如, 植物乳杆菌形成生物

作者简介: 尹一婷 (1992-), 女, 硕士研究生, 食品生物技术

通信联系人: 张灏(1962-), 男, 教授、博导, 食品生物技术. E-mail: zhanghao@jiangnan.edu.cn

45 膜后较游离状态在各种有机酸及其他不利条件下表现出更强的抗逆性,且生物膜上细菌被分散或稀释后,抗逆性的提升依旧存在^[6]等。

目前,国内外有关生物膜的研究主要集中在医学和环境领域,对如何抑制致病菌生物膜形成与环境微生物生物膜处理污水等研究较多^[7],而对益生菌生物膜如乳酸菌生物膜的研究还比较少。虽然乳酸菌生物膜也引起了越来越多学者的兴趣,但大多数研究仅仅以少数的乳杆菌进行单株的研究。因此,基于该现状,本实验探究了:乳杆菌在生物膜形成方面的共同规律;不同乳杆菌菌体性质差异;膜样化乳杆菌产品对于胃肠道的耐受能力。

1 试剂与仪器

1.1 试剂

55 实验中所用的所有乳杆菌均由江南大学食品生物技术中心菌种保藏库提供。牛肉膏、鱼粉蛋白胨、葡萄糖、酵母粉、七水硫酸镁、磷酸氢二钾、无水乙酸钠、一水硫酸锰、柠檬酸氢二铵、半胱氨酸盐酸盐、吐温-80、氯化钠、胰蛋白胨、磷酸二氢钾购自国药集团。

干燥保护剂配制见文献[8]、MRS 液体培养基见文献[9]、无菌模拟胃肠液见文献[10]。

1.2 仪器

60 96 孔聚丙烯板购自 greiner bio-one 公司;超净工作台购自上海智诚分析仪器制造有限公司;水浴锅购自上海森信实验仪器有限公司;冷冻离心机购自 Eppendorf 公司;厌氧工作站购自 Whitley 公司;Multiscan GO 全波长酶标仪购自 Thermo;紫外可见分光光度计购自岛津企业管理有限公司;79480-30 真空冷冻干燥机购自 LABCONCO 公司;BIOSTAT Cplus 发酵罐购自 Sartorius stedim 公司;Quanta 200 电子扫描显微镜购自 Fei 公司。

2 实验方法

65 2.1 孔板比色法测定乳杆菌生物膜

选取来自 8 个菌种的 35 株乳杆菌,用接种环挑取保存于甘油管中的菌体,划线在 MRS 平板上,37 °C 下厌氧静置培养 24h,后挑取单菌落,接种到 5mL 的 MRS 液体管中,37 °C 下厌氧培养 24h,后再按 2% (v/v) 接种量接种于 5mL 液体 MRS 培养基中,活化三代后用于实验。

70 将 300 μ L MRS 培养基加入到聚苯乙烯 96 孔板中,按 2% 接种量,将培养好的菌悬液接入孔板内 (300 μ l),于 37 °C 厌氧培养 48h^[11]。培养结束后,先在酶标仪波长 600nm 处测定吸光值;倒掉培养基并用无菌生理盐水轻轻清洗孔板底形成的生物膜两遍,室温下稍微干燥片刻后,用 0.1% 结晶紫染色 20min;加入 300 μ L 的 95% 酒精静置 30min,待结晶紫完全完全解吸,吸取出 200 μ l 结晶紫洗脱液到另一孔板中测其 OD₅₇₀ 并记录^[12]。空白对照采用不接种菌体的 MRS 培养基,操作步骤同上。每组三个平行,重复试验三次。

75 通过改变培养基组分,利用孔板比色法测定不同培养条件下的成膜情况:

改变葡萄糖含量分别为 (g/L): 0、10、15、20、25

改变牛肉膏含量分别为 (g/L): 0、5、10、15

配制不同稀释倍数的培养基：0、2、4、6

80 其他操作同上。

2.2 乳杆菌生物膜电子显微镜观察

种子液制备同上。将 5mL 乳杆菌种子液接种至含有已灭菌的 4g 黄豆粉和 400mL MRS 培养基的发酵罐中（容积为 500mL）中（其中黄豆粉灭菌后呈颗粒状为乳杆菌生物膜载体）。37℃ 恒温培养 24h，搅拌速率调为刚好使黄豆粉颗粒不会沉降下去。空白对照为不加种子液
85 的含黄豆粉的无菌 MRS 培养基。在 24h 时取乳杆菌发酵样^[13]。

将培养后的带有生物膜的颗粒离心、生理盐水清洗后，轻轻涂在玻璃片上，用含 2% 戊二醛的二甲砷酸钠缓冲液在 4℃ 下固定 16h，后在四氧化锇溶液中再次固定，用 75%-100% 乙醇梯度脱水，喷镀金粉，放入显微镜中观察。加速电压 20KV^[14]。

2.3 菌体疏水性测定

90 以正十六烷作为非极性有机溶剂。将菌体悬浮于 PH 为 7 的 0.01 mol/L 的 PBS 溶液中，调节菌体数为 10^9 左右（ OD_{600} 约为 0.6），记下此时的 OD_{600} 为 A_0 ；取 4ml 菌液加入 1ml 溶剂后漩涡震荡 90s，静置 15min，使两相充分分层；小心地取出水相测出此时的 OD_{600} ，记为 A_1 ^[15]。

$$\text{则疏水率}(\%) = (1 - A_1/A_0) \times 100\%$$

2.4 菌体表面电荷测定

选择乙酸乙酯作为路易斯碱（ A_2 ），氯仿作为路易斯酸（ A_1 ），按照 2.3 的方法测定。

$$\text{酸电荷}(\%) = (1 - A_1/A_0) \times 100\%$$

$$\text{碱电荷}(\%) = (1 - A_2/A_0) \times 100\%$$

2.5 乳杆菌粉对模拟胃肠道环境耐受能力测定

100 采用冻干菌粉进行实验，菌粉制作见文献^[8]。将冻干的菌粉转移到 5mL 无菌 EP 离心管中，加入 1mL 无菌模拟胃液，37℃ 培养 4h 后，5000rpm 离心 8min，弃去上清液，然后加入 1mL 模拟肠液，37℃ 继续培养 4h 后，进行平板计数^[16]。

在处理前，对菌粉进行复溶（加 1mL 无菌生理盐水）并测定活菌浓度，作为初始活菌浓度。

105 按照以下公式计算乳酸菌的存活率：

$$\text{乳杆菌存活率}(\%) = (\text{干燥完活菌浓度}/\text{初始活菌浓度}) \times 100\%。$$

3 结果与讨论

3.1 不同乳杆菌成膜能力分析比较

采用 BFI（生物膜形成指数）来评价生物膜形成的程度^[17]：

$$110 \quad \text{BFI} = (\text{AB} - \text{CW}) / (\text{GB} - \text{GW})$$

其中，AB 代表结晶紫染色后的生物膜吸光度 OD_{570} ；CW 是空白介质染色后的吸光度 OD_{570} ；GB 是培养过后测得的 OD_{600} ；GW 是空白孔的 OD_{600} 。根据所得到的 BFI 将乳杆菌划分为三

个等级：强、中、弱。

115 常见的生物膜定量检测方法有活菌计数法和染色法，为了简便、快速地检测出双歧杆菌成膜能力的大小，本研究以聚苯乙烯 96 孔板作为生物膜形成装置，以结晶紫染色法进行半定量检测。根据 BFI 数值，把它们分为三个等级（见表 1）。

120 本实验选取来自江南大学食品生物技术中心菌种库中的 8 个菌种的不同来源的 44 株乳杆菌进行初筛实验。如，罗伊氏乳杆菌和瘤胃乳杆菌均来自人体粪便，而发酵乳杆菌的 *L. fermentum* 3-9 来自泡菜、*L. fermentum* 6-3 和 8-12 来自人体粪便，鼠李糖乳杆菌的 *L. rhamnosus* 712 来自微生态制剂、*L. rhamnosus* 4 来自小鼠粪便、其余的来自体外等。

表 1 乳杆菌 BFI 等级划分
Tab.1 The classification of BFI

菌株号	BFI 等级	菌株号	BFI 等级
<i>L. reuteri</i> 138-1	-	<i>L. fermentum</i> 3-9	+
<i>L. reuteri</i> 5-1	-	<i>L. fermentum</i> 3	+
<i>L. reuteri</i> 7-12	+	<i>L. fermentum</i> 6-3	-
<i>L. reuteri</i> 6-4	+	<i>L. fermentum</i> 8-12	+
<i>L. reuteri</i> 5-10	+	<i>L. mucosa</i> 4-6	+
<i>L. ruminis</i> 1-1	-	<i>L. mucosa</i> 3-2	-
<i>L. ruminis</i> 1	++	<i>L. mucosa</i> 8-8	-
<i>L. ruminis</i> 2	-	<i>L. mucosa</i> 11	+
<i>L. ruminis</i> 5	++	<i>L. plantarum</i> 362	-
<i>L. farcimini</i> 419	++	<i>L. plantarum</i> 643	++
<i>L. farcimini</i> 414	++	<i>L. plantarum</i> 11	++
<i>L. farcimini</i> 413	++	<i>L. plantarum</i> 10	++
<i>L. farcimini</i> 407	++	<i>L. casei</i> 1-1	+
<i>L. rhamnosus</i> 712	-	<i>L. casei</i> 53-10	++
LGG-C	-	<i>L. casei</i> 29-1	+
<i>L. rhamnosus</i> 4	++	<i>L. casei</i> 5276	-
<i>L. rhamnosus</i> 319	-	<i>L. casei</i> 30	++
		<i>L. casei</i> 5-11	+

125 注：根据 BFI 数值，规定当 BFI: <0.7 为弱成膜能力，表示为“-”；0.71-1.6 为中成膜能力，表示为“+”；≥1.7，为强成膜能力，表示为“++”。

由表 1 可以看出，乳杆菌细胞可以形成生物膜，且成膜能力之间有差异。

130 即使是相同菌种的不同菌株，它们的成膜能力仍然显示出差异性。如，干酪乳杆菌种内，既有成膜能力很好 *L. casei* 30 和 *L. casei* 53-10 菌株，也有成膜力很弱的 *L. casei* 5276。此外，相同来源的菌株间，也存在一定差异。如全部来源于人体粪便的罗伊氏乳杆菌中，有成膜性较好的 *L. reuteri* 7-12、*L. reuteri* 6-4 等，也有成膜性差的 *L. reuteri* 138-1 和 *L. reuteri* 5-1。综上，乳杆菌成膜能力存在菌株特异性，既和菌种无关，也和来源无关。

3.2 不同乳杆菌生物膜的微观观察

135 筛选出 *L. casei* 53-10、*L. ruminis* 1、*L. plantarum* 643、*L. casei* 1-1、*L. mucosa* 4-6、*L. fermentum* 8-12、*L. casei* 5276、*L. plantarum* 362、*L. reuteri* 138-1 这 9 株不同成膜能力的乳杆菌在发酵罐中进行成膜培养 24h 后，采用电子显微镜观察不同乳杆菌的生物膜空间

构象，结果如图所示：

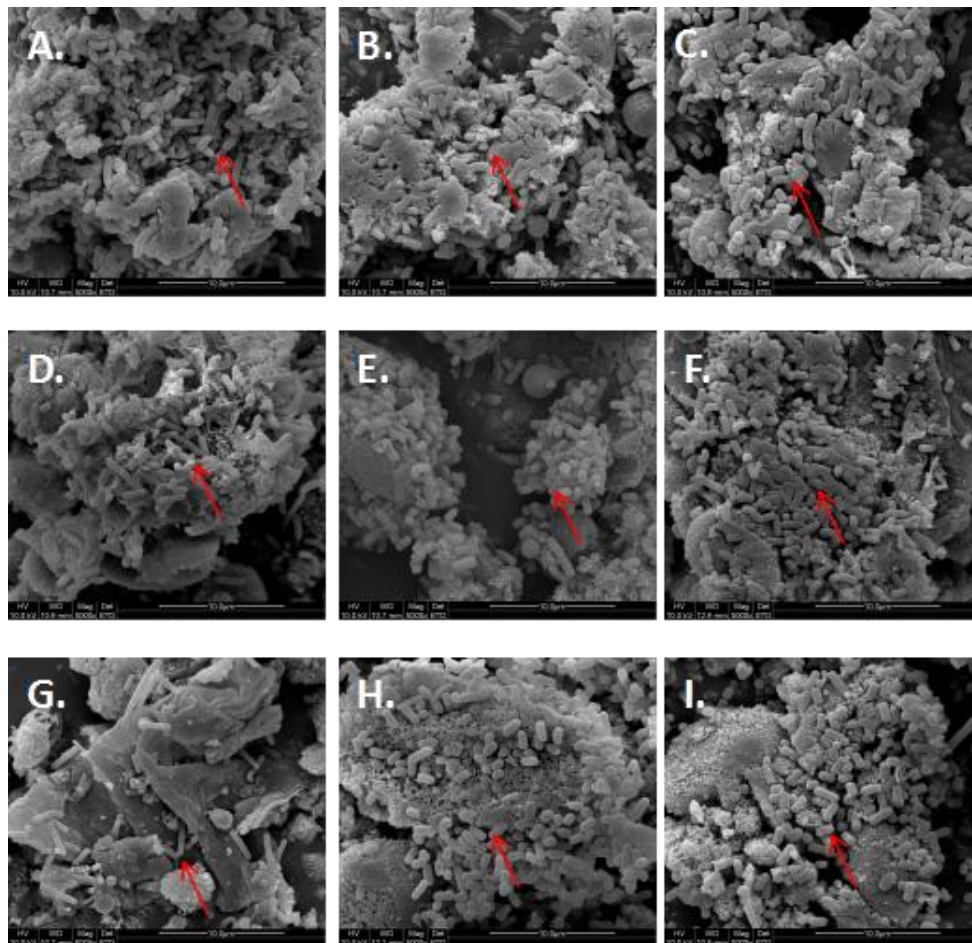


图 1 不同成膜能力乳杆菌在黄豆粉上形成的生物膜

Fig.1 The biofilm formed by *Lactobacillus* cells with various biofilm forming abilities on the soybean powder

注：A-C. 分别是强成膜力的 *L. casei* 53-10、*L. ruminis* 1、*L. plantarum* 643

D-F. 分别是中成膜力的 *L. casei* 1-1、*L. mucosa* 4-6、*L. fermentum* 8-12

G-I. 分别是弱成膜力的 *L. casei* 5276、*L. plantarum* 362、*L. reuteri* 138-1

140

145

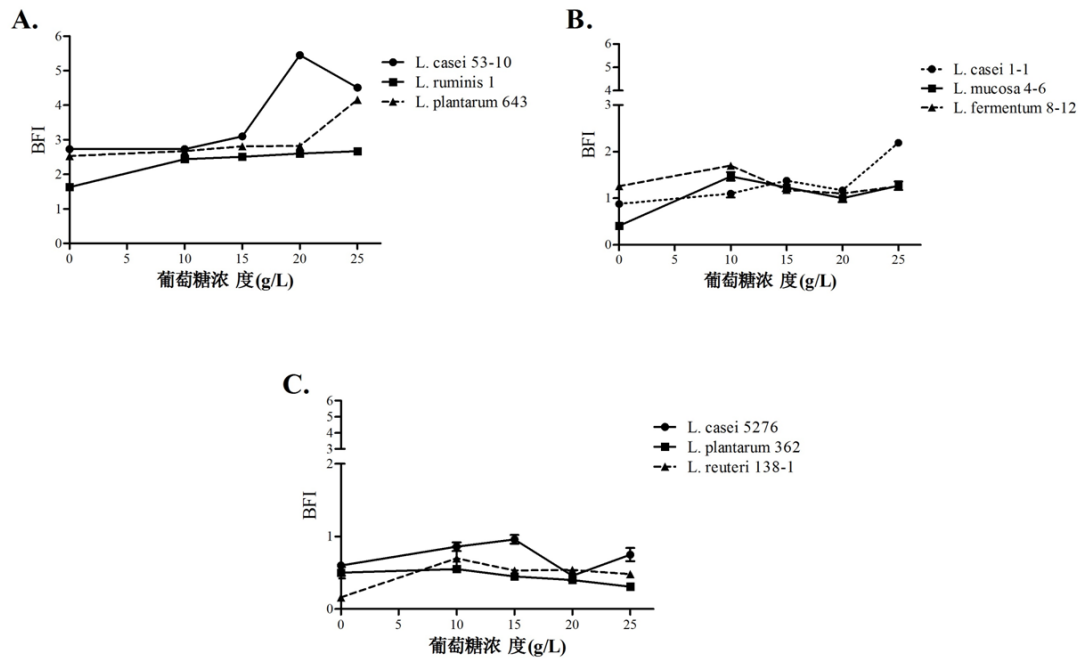
以黄豆粉作为菌体成膜界面，采用发酵罐发酵的形式来培养生物膜。从图中可看出，细胞是从黄豆颗粒的间隙中开始粘附、生长的，然后慢慢扩大面积，并分泌胞外基质将菌体包埋起来。一些成膜性好的菌株甚至将黄豆基质和菌体一起包埋了起来。相比强成膜能力的细胞，弱成膜能力的细胞产生的胞外基质较少，并且粘附在黄豆颗粒上的细胞数也较少。

3.3 乳杆菌生物膜成膜限制因素分析

3.3.1 葡萄糖浓度对乳杆菌成膜性的影响

150

葡萄糖作为碳源，是乳杆菌生长首要的营养物质，它影响了环境中营养物质的丰富程度，由此猜测可能营养物质的丰富程度会对生物膜的形成有促进或者阻碍作用（后面的培养基稀释实验也是为了验证这一想法）；此外，细菌生物膜内大量的胞外多糖生成也需要碳源的支持。为此，该实验探究葡萄糖浓度对成膜的影响。如图 2 所示，在不同成膜性的分组中，即使具有相同等级的成膜能力，葡萄糖浓度对它们的影响也不相同。



155

图2 葡萄糖浓度对乳杆菌成膜的影响

Fig.2 The influence of the concentration of glucose to the formation of biofilms

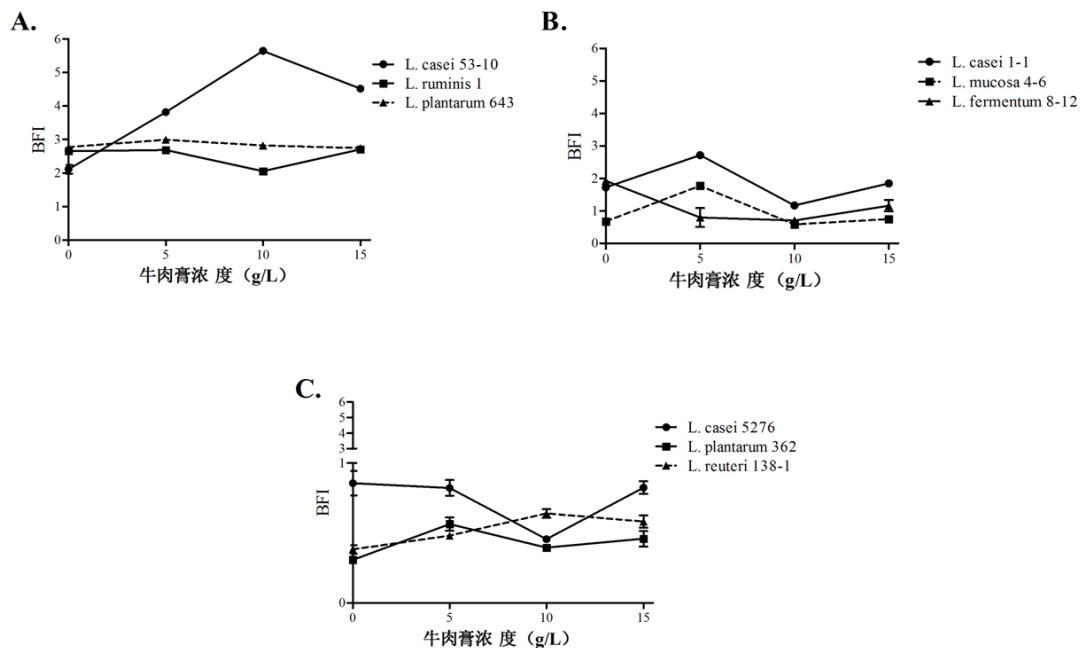
注：A-C.葡萄糖浓度分别对强、中、弱成膜能力乳杆菌的影响

同样地, *L. casei* 53-10、*L. casei* 1-1、*L. casei* 5276 的变化趋势也表明, 即使在相同的菌种当中, 不同菌株也呈现出不同的变化规律。因此推测, 葡萄糖浓度对各个菌株成膜的影响只和菌株本身有关系, 即, 成膜具有菌株特异性。

160

3.3.2 牛肉膏浓度对乳杆菌成膜性的影响

牛肉膏也是培养中最重要的成分之一。由图3可知, 无论是对于同样成膜能力的菌株还是对于同一种菌株, 都没有共同的成膜规律, 即仍然存在着菌株特异性。



165

图3 牛肉膏浓度对乳杆菌成膜的影响

Fig.3 The influence of the concentration of beef extract to the formation of biofilms

注：A-C.牛肉膏浓度对强、中、弱成膜能力乳杆菌的影响

3.3.3 培养基稀释倍数对乳杆菌成膜性的影响

培养基浓度对乳杆菌的影响仍表现出菌株特异性。稀释培养基一方面对渗透压造成了影响，另一方面也稀释了培养基中的营养物质浓度。如图 4，在培养基被稀释了两倍之后，大多生物膜变化变得平缓，有些菌株出现了略微的上升。这可能是因为贫瘠的环境促进了胞外基质的形成，从而保护细胞，也促进了生物膜的形成。

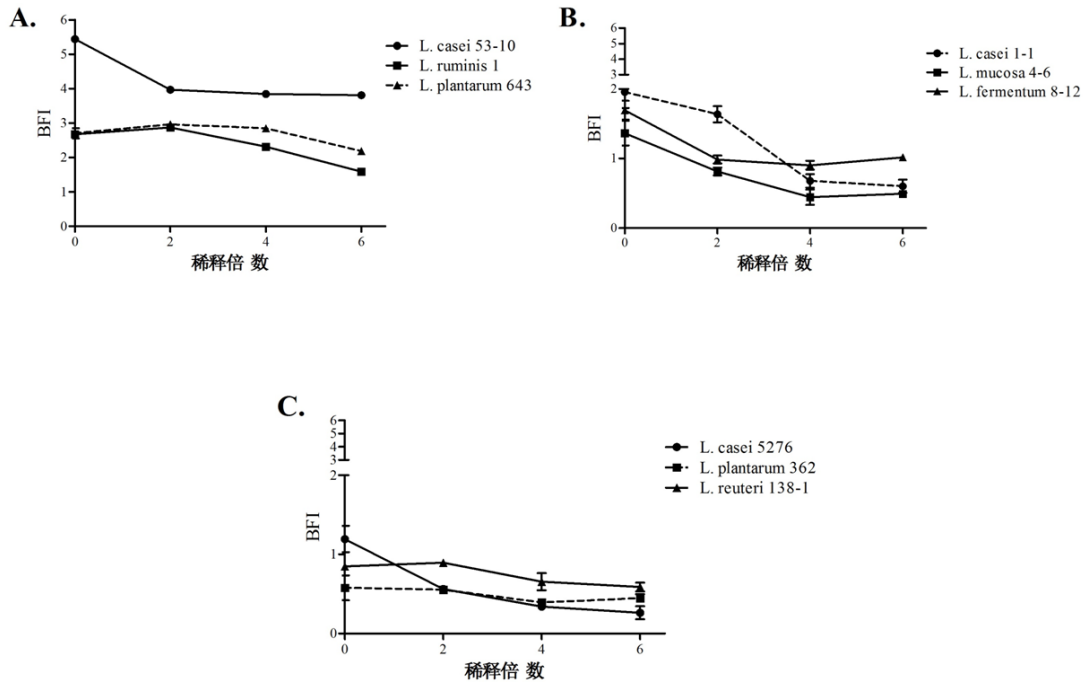


图 4 培养基浓度对乳杆菌成膜的影响

Fig.4 The influence of the dilution of medium to to the formation of biofilms

注：A-C.培养基浓度对强、中、弱成膜能力乳杆菌的影响

同时，该结果也可说明，如果生物膜的形成可能不需要过剩的营养物质，在工业生产可以节约原料，从而降低成本。

3.4 乳杆菌菌体表面性质与成膜能力

3.4.1 菌体疏水性对乳杆菌生物膜的影响

选用 *L. casei* 53-10、*L. ruminis* 1、*L. plantarum* 643、*L. casei* 1-1、*L. mucosa* 4-6、*L. fermentum* 8-12、*L. casei* 5276、*L. plantarum* 362、*L. reuteri* 138-1、*L. fermentum* 3、*L. fermentum* 6-3、*L. reuteri* 6-4、*L. reuteri* 5-10 这 13 株菌进行实验，即，从不同成膜能力等级中各选取 3 株，以及从 3 种不同的菌种中各选取 3 株。

如图 5，不同成膜能力菌株组的疏水性有显著差异 ($P < 0.01$, **)，即强、中等级菌株菌体的疏水率较高，弱成膜菌株菌体的疏水率较低；而强和中之间无差异，但它们分别和弱的差异显著。而图 4-B 则显示，在同一菌种中，不同的菌株显示出不同的疏水性，且不同菌种菌株之间的疏水性没有差异，如在同一种菌种中 *L. casei* 53-10 (++) 和 *L. ruminis* 1 (+) 比 *L. casei* 5276 (-) 疏水性好，*L. fermenti* 3 (+) 和 *L. fermenti* 8-12 (+) 比 *L. fermenti* 6-3 (-) 的疏水性好，但组间没有差异。

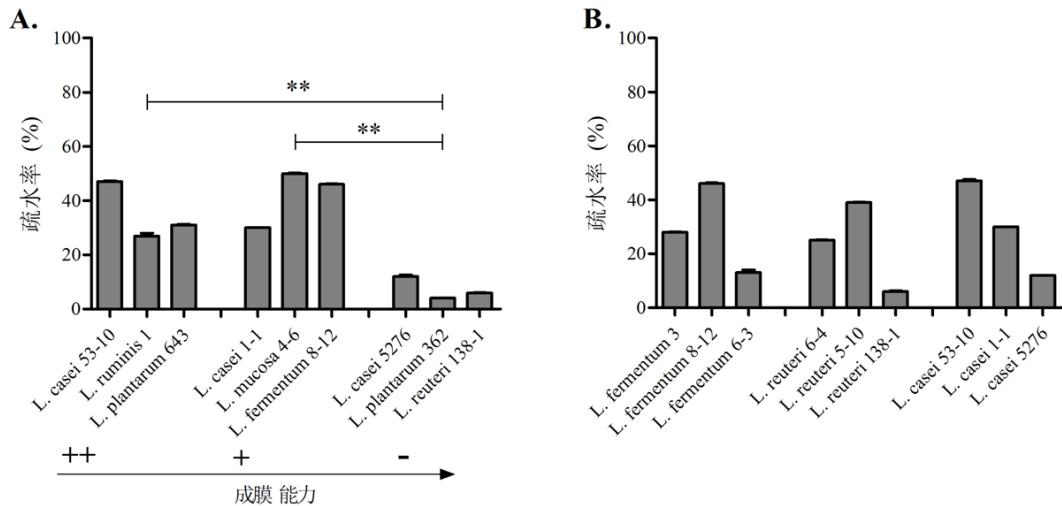


图5 不同乳杆菌菌体疏水性比较

Fig.5 The comparison of hydrophobicity of various cells

注：A. 不同成膜能力乳杆菌疏水性比较；B. 不同种乳杆菌疏水性比较

195

因此可推测，成膜能力和疏水性有一定的相关性，成膜性较强的（强/中）菌株，疏水性也显著增强；而疏水性和菌种没有关系。也有研究表明菌株的表面疏水性越高，对口腔上皮细胞的粘附性越好^[18]。

3.4.2 菌体表面电荷对乳杆菌生物膜的影响

200

如图6，不同成膜能力的菌株细胞表面酸电荷和碱电荷都没有差异；不同种菌株的细胞表面的酸碱电荷也没有差异。但低成膜能力组的菌体表面电荷平均也较低，这也可能和它们疏水性低有关。

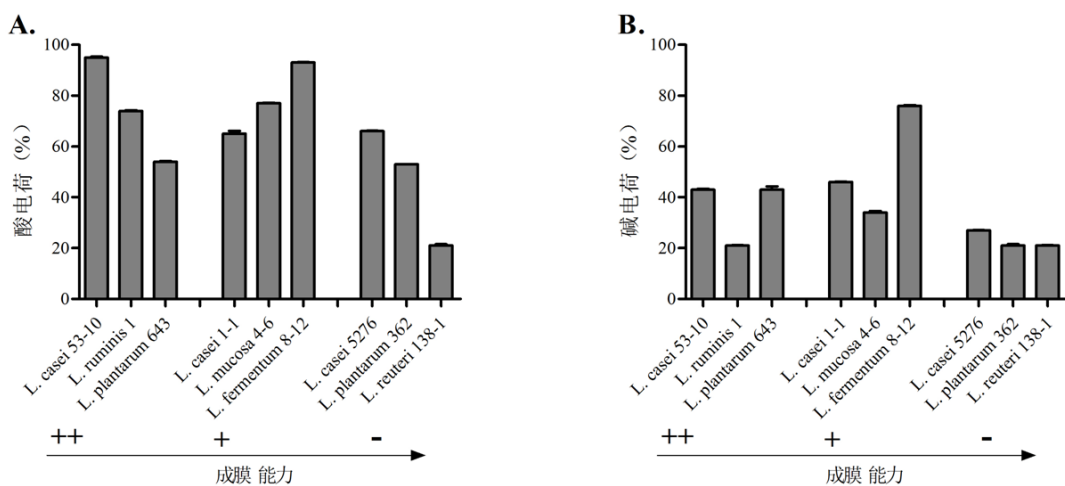


图6 不同成膜能力乳杆菌菌体酸碱电荷比较

Fig.6 The acid and basic charge of the cell with various biofilm forming abilities

注：A. 菌体表面酸电荷；B. 菌体表面碱电荷

205

3.5 膜样化乳杆菌的抗逆性分析

为了更符合实际生产操作以及益生菌产品在人体中的消化形式，该实验直接采用菌粉产

210 品进行实验。如图 7，生物膜显著性地提高了菌粉在模拟胃肠道环境中的存活率（ $P < 0.01$ ，**），且除了 CCFM8-12 为显著性差异外（ $P < 0.01$ ），其他每株菌都有非常显著的差异（ $P < 0.001$ ）。

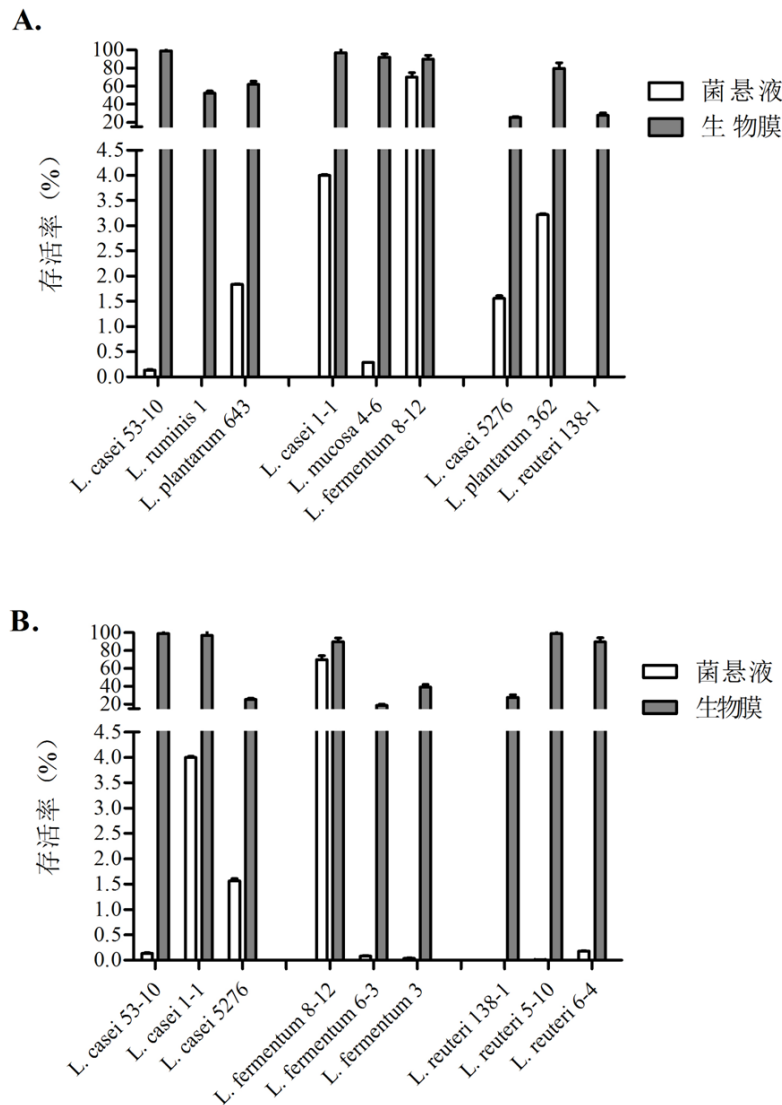


图 7 乳杆菌细胞对模拟胃肠液的耐受

215 Fig.7 The resistance of different kinds of cells to the mimic gastrointestinal condition
注：A. 不同成膜能力的乳杆菌对模拟胃肠液的耐受；B. 不同种乳杆菌对模拟胃肠液的耐受

220 形成生物膜后带来的存活率的提高，是因为形成生物膜后所造成的渗透障碍，细菌的生物膜是三维结构，外界物质要进入生物膜内必须通过生物膜中的通道才能对内部细菌造成影响^[19-20]，在形成生物膜过程中，细菌会分泌大量胞外多糖包裹细菌，胞外多糖会阻碍外界物质进入细菌内，从而提高细菌抗逆性。生物膜深层的细胞处于休眠状态也是导致细菌抗逆性提高的原因^[21]。

4 结论

本实验系统评估了不同乳杆菌的生物膜形成能力及成膜规律。结果显示, 乳杆菌生物膜形成能力存在着株间差异性, 且形成的生物膜具有一定的空间结构。培养条件对菌株生物膜形成的影响呈现菌株特异性。而菌体表面疏水性与乳杆菌生物膜成膜能力成正相关。乳杆菌形成生物膜后, 其胃肠道抗逆性显著增强, 说明通过生物膜发酵的方式来制备乳杆菌活菌制剂具有广阔的应用前景。

230

[参考文献] (References)

- [1] 庄海霁, 雷虹, 张铁丹等. 副干酪乳杆菌的应用研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(6): 989-991
- [2] 田芬, 陈俊亮, 霍贵成. 益生菌冻干保护剂优化及菌粉保存稳定性研究[J]. 食品科技, 2012(2): 15-19.
- [3] 龚虹, 马征途, 冯谦等. 植物乳杆菌发酵、冻干工艺及其益生特性的研究[J]. 中国微生物学杂志, 2017, 29(5): 526-530.
- [4] Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg,E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections [J]. Science, 1999, 284(5418): 1318-1322.
- [5] Flemming,H.C. The perfect slime[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2011, 86(2): 251-259.
- [6] Hiromi K., Shouko S., et al. Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp.plantarum 205 JCM 1149[J]. Food Microbiology, 2009, 26(6): 592-597
- [7] 赵子舒. 副干酪乳杆菌生物膜反应器构建及其 L--乳酸生产应用研究[D]. 浙江工商大学, 2017.
- [8] 崔树茂. 乳酸菌的生长抑制和冻干存活的影响因素及规律[D]. 无锡: 江南大学, 2017
- [9] 徐文生, 张艳艳, 黄漫青等. 环境因素对长双歧杆菌 CICC6069 生物膜生成的影响[J]. 中国食品学报, 2012, 12(4): 36-42.
- [10] Huang Y, Adams M C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 91(3): 253-260.
- [11] O'Toole G A, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis[J]. Molecular Microbiology, 2010, 28(3):449-461
- [12] Han N, Mizan M F R, Jahid I K, et al. Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus*, on food and food contact surfaces increases with rise in temperature[J]. Food Control, 2016, 70:161-166.
- [13] 林炳谕, 尹一婷, 陆文伟, 等. 双歧杆菌的成膜规律及其特性研究[J]. 中国科技论文在线, 2017.
- [14] Nguyen V, Karunakaran E, Collins G, et al. Physicochemical analysis of initial adhesion and biofilm formation of *Methanosarcina barkeri*, on polymer support material[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2016, 143:518-525.
- [15] Samot J, Lebreton J, Badet C. Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purposes.[J]. Anaerobe, 2011, 17(2):69-72.
- [16] 翟齐啸. 乳酸菌减除镉危害的作用及机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [17] Han N, Mizan M F R, Jahid I K, et al. Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus*, on food and food contact surfaces increases with rise in temperature[J]. Food Control, 2016, 70:161-166.
- [18] Huang R, Li M, Gregory R L. Bacterial interactions in dental biofilm.[J]. Virulence, 2011, 2(5):435-444.
- [19] Bo F, Palmgren R, Keiding K, et al. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin[J]. Water Research, 1996, 30(8): 1749-1758.
- [20] Thurnheer T, Gmür R, Shapiro S, et al. Mass Transport of Macromolecules within an In Vitro Model of Supragingival Plaque[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(3):1702-1709.
- [21] Raad I, Alrahwan A K. *Staphylococcus epidermidis*: Emerging Resistance and Need for Alternative Agents[J]. Clinical Infectious Diseases An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 1998, 26(5):1182-1187.

265