

乳酸乳球菌对致龋菌生长及生物膜形成的作用

张延清 冯少霞 陈宇

广州医科大学附属妇女儿童医疗中心口腔科, 广州 510623

通信作者: 陈宇, Email: chenyu4063@163.com

【摘要】 目的 研究乳酸乳球菌(LI)对4种致龋菌生长及生物膜形成的影响,为LI龋病防治提供基础。**方法** 厌氧条件下培养LI、变异链球菌(Sm)、内氏放线菌(An)、黏放线菌(Av)和嗜酸乳杆菌(La),琼脂扩散实验检测LI对4种致龋菌的抑菌圈直径(IZD);琼脂板竞争实验检测LI与4种致龋菌的拮抗相互作用;4种致龋菌单独培养生物膜为单独培养组,LI分别与其共培养生物膜为共培养组,结晶紫染色法(CVS)及扫描电镜(SEM)检测LI对4种致龋菌生物膜形成的影响。采用SPSS 20.0统计软件数据分析。LI对4种致龋菌的IZD整体分析采用单因素方差分析,Tukey's HSD检验进行组间多重比较,采用Student's *t* 检验对细菌生物膜量进行比较。**结果** 琼脂扩散实验结果显示,LI对4种致龋菌均表现出一定的抑制作用。LI对An的IZD最大,为(11.97 ± 0.40) mm,对Sm的IZD最小,为(4.67 ± 0.32) mm。LI对4种致龋菌的IZD两两比较,差异有统计学意义($F=241.22, P<0.001$)。琼脂板竞争实验显示,LI对La、An、Av表现为竞争性抑制作用;CVS结果显示,LI与Sm、An共培养形成的双菌种生物膜的生物膜量分别为(30.66 ± 0.48)、(10.27 ± 0.04),Sm、An单独培养形成的单菌种生物膜的生物膜量分别为(80.26 ± 2.55)、(73.98 ± 0.35),Sm、An双菌种生物膜的生物膜量与单菌种生物膜的生物膜量比较差异有统计学意义($t_{sm}=19.090, P_{sm}<0.001, t_{an}=183.3, P_{an}<0.001$)。SEM结果显示,LI与Sm或An共培养形成的双菌种生物膜明显变薄。**结论** LI可抑制Sm、An、Av和La生长,并减少Sm、An生物膜的形成。

【关键词】 有益菌种; 乳酸乳球菌; 生物膜; 致病菌

引用著录格式:张延清,冯少霞,陈宇. 乳酸乳球菌对致龋菌生长及生物膜形成的作用[J/OL]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2024, 18(2):96-102.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2024.02.004

The effect of *Lactococcus lactis* on the growth and biofilm formation of cariogenic bacteria

Zhang Yanqing, Feng Shaoxia, Chen Yu

Department of Stomatology, Affiliated Women and Children's Medical Center of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510623, China

Corresponding author: Chen Yu, Email: chenyu4063@163.com

【Abstract】 Objective To study the effects of *Lactococcus lactis* (LI) on the growth and biofilm formation of 4 kinds of cariogenic bacteria, and to provide the basis for the application in caries prevention and control. **Methods** LI, *Streptococcus mutans* (Sm), *Actinomyces naeslundii* (An), *Actinomyces viscosus* (Av) and *Lactobacillus acidophilus* (La) were cultured under anaerobic conditions. A spot-on-lawn assay was used to evaluate the inhibition of LI for these 4 kinds of cariogenic bacteria. The antagonistic interaction between LI and these cariogenic bacteria was detected by plate competition test. The four kinds of cariogenic bacteria cultured separately were the single-cultured group, LI co-cultured with 4 cariogenic bacteria separately were the co-cultured group. Crystal violet staining (CVS) and scanning electron microscopy (SEM) was used to evaluate the effect of LI on the biofilm formation of the 4 kinds of cariogenic bacteria. SPSS 20.0 statistical software was used for data analysis. The data from the measurement of the inhibitory-zone diameters (IZD) of LI against the 4 kinds of cariogenic bacteria were

compared and statistically analyzed with One-Way analysis of variance (ANOVA) and tukey's HSD test, and the amount of bacterial biofilm was compared by Student's *t* test. **Results** Spot-on-lawn assay showed that LI inhibited the growth of the 4 kinds of cariogenic bacteria. LI had the largest IZD for An, (11.97 ± 0.40) mm, and the smallest for Sm, (4.67 ± 0.32) mm. LI showed statistically significant difference in the IZD of the 4 kinds of cariogenic bacteria ($F = 241.22, P < 0.001$). The plate competition test showed that LI showed competitive inhibition against La, An and Av. CVS showed that the biofilm quantity of Sm and An co-cultured with LI was (30.66 ± 0.48) and (10.27 ± 0.04), respectively. The biofilm quantity of Sm and An single-cultured was (80.26 ± 2.55) and (73.98 ± 0.35), respectively. For Sm and An biofilm, there was statistical difference in the biofilm quantity between co-cultured and single-cultured groups ($t_{sm} = 19.090, P_{sm} < 0.001, t_{An} = 183.3, P_{An} < 0.001$). The SEM showed that Sm and An showed significantly thinner biofilm in coexistence with LI than in the absence of LI. **Conclusion** LI could inhibit the growth of Sm, An, Av, La, and reduce the formation of Sm, An biofilms.

【Key words】 Probiotics; *Lactococcus lactis*; Biofilm; Pathogens

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2024.02.004

龋病是常见口腔疾病,长期以来困扰人们的健康。微生物在牙齿表面的定植和牙菌斑生物膜形成是龋病形成的主要原因。变异链球菌(*Streptococcus mutans*, Sm)是主要致龋菌,在龋病发生、发展中起重要作用。黏放线菌(*Actinomyces viscosus*, Av)是牙面早期定植菌之一,在细菌初始附着及细菌共聚集中起关键作用^[1],与根面龋相关。内氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*, An)可将蔗糖转化为果糖的细胞外均聚物并将其分解,与根面龋和牙龈炎发生有关^[2]。此外,嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*, La)作为牙齿表面的后来定植菌,具有高度的产酸性和耐酸性,通常在龋齿病变中发现,可作为儿童龋风险评估中危险因素的检测指标。

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, LI)是具有抗菌活性的益生菌,被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)认为是对人类最安全的微生物,已被广泛应用于乳制品行业。LI可定植于牙齿表面,在营养不足时竞争性抑制Sm生长及其对牙齿表面的黏附,但不会引起釉质表面明显脱矿^[3]。

目前,对LI抗菌作用方面的研究多局限于Sm,尚未有研究报道LI对上述4种致龋菌的生长及生物膜形成的影响。本实验通过研究LI对4种致龋菌生长及生物膜形成的影响,探讨LI在龋病防治中的可能作用,为LI用于临床口腔保健奠定基础。

材料与方法

一、实验菌株及培养条件

乳酸乳球菌 ATCC 11454、黏放线菌 ATCC 15987、

嗜酸乳杆菌 ATCC 4356、变异链球菌 UA 159、内氏放线菌 ATCC 12104 由中山大学口腔医学研究所提供。细菌冻存液室温复苏后划线接种于脑心浸液肉汤(brain heart infusion broth, BHI)培养基表面,37℃,厌氧培养(80% N₂、10% CO₂、10% H₂)48 h,挑取单个完整的菌落于5 mL新鲜配制的BHI培养基中,An 37℃,厌氧培养36 h,其余菌株培养24 h,制备菌液。

二、琼脂扩散实验

采用琼脂扩散法检测LI对4种致龋菌的抑菌活性。3.7 g BHI粉和0.75 g琼脂粉溶于100 mL水中制备BHI软琼脂(BHIS)培养基。取8 mL BHIS加入80 μL Sm、Av、La或800 μL An菌液,菌液浓度约1×10⁷ CFU/mL,振荡混匀,倒入固体BHI培养基表面,室温冷却1 h。每组实验BHI软琼脂板分4个区,5 μL LI菌液滴于软琼脂表面,室温放置1 h晾干。37℃厌氧培养48 h,观察并测量抑菌圈直径(inhibitory-zone diameter, IZD)大小,所有实验重复3次。IZD计算公式如下,

$$\text{IZD} = \text{外圈直径} - \text{内圈直径}。$$

三、琼脂板竞争实验

采用琼脂板竞争实验评价LI与4种致龋菌之间的拮抗相互作用^[3]。5 μL LI(早期定植菌)菌液接种于BHI琼脂板,37℃厌氧培养16 h。随后,在距离LI菌落大约5 mm处,分别接种等量的4种致龋菌(后来定植菌)菌液,培养16 h。所有菌液浓度约1×10⁷ CFU/mL。

四、结晶紫染色实验

采用结晶紫染色法检测LI对4种致龋菌生物膜形

成的影响。取24 h的Ll、Sm、Av或La菌液分别与BHI培养液(BHI+1%蔗糖)1:100混匀,36 h的An与BHI培养液1:10混匀,菌液浓度约 1×10^7 CFU/mL。稀释后的菌液分别与Ll等体积混合为共培养组,与BHI培养液等体积混合为单独培养组。菌液终浓度约 5×10^6 CFU/mL,96孔板200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C厌氧培养24 h生物膜,每组3个复孔。结晶紫染液室温避光染色,酶标仪测定595 nm波长下的吸光度值(A_{595})。

五、扫描电子显微镜实验

制备大小为4 mm \times 4 mm \times 2 mm的牙块,121 $^{\circ}$ C高温高压消毒灭菌。牙块放置于24孔板,加入1 mL/孔新鲜制备的人工唾液,37 $^{\circ}$ C,摇床60 r/min处理30 min。4种致龋菌生物膜制备方法同结晶紫染色法,同方法培养Ll生物膜,菌液终浓度为 5×10^6 CFU/mL,37 $^{\circ}$ C厌氧培养24 h。牙块经无菌磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,2.5%戊二醛溶液固定,依次加入30%、50%、70%、90%乙醇脱水15 min,100%乙醇脱水3次,每次15 min,叔丁醇脱水3次,每次15 min。扫描电镜(SEM)观察生物膜表面形态。

六、统计学处理方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,每组设3个样本,实验重复3次,取平均值。采用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析,单因素方差分析(ANOVA)和Tukey's HSD检验对4种致龋菌的IZD进行比较和统计学分析,Student's *t*检验对4种致龋菌单独和共培养生物膜的生物膜量进行分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、乳酸乳球菌对致龋菌的抑制性

琼脂扩散实验结果显示,Ll对4种致龋菌均表现出一定的抑制性,表现为琼脂板上Ll菌落周围存

在明显的抑菌圈(图1)。对于不同的菌株,Ll表现出不同的抑制性。Ll对An的IZD最大(11.97 ± 0.40) mm,Ll对La与Av的IZD分别为(9.38 ± 0.48)、(6.64 ± 0.14) mm,对Sm的IZD最小(4.67 ± 0.32) mm。Ll对4种致龋菌的IZD两两比较,差异有统计学意义($P < 0.001$,表1)。

表1 乳酸乳球菌对致龋菌的抑菌圈直径(IZD)

菌株	来源	IZD(mm, $\bar{x} \pm s$)
内氏放线菌(An)	ATCC 12104	11.97 ± 0.40^a
嗜酸乳杆菌(La)	ATCC 4356	9.38 ± 0.48^b
黏放线菌(Av)	ATCC 15987	6.64 ± 0.14^c
变异链球菌(Sm)	UA 159	4.67 ± 0.32^d

注:整体分析为单因素方差分析, $F = 241.22$,样本符合正态分布, $P < 0.001$,4组样本均值差异有统计学意义。多重比较为Tukey's HSD检验,显著性标记a、b、c、d分别为An、La、Av和Sm组两两相比差异有统计学意义($P < 0.001$)。

二、乳酸乳球菌与致龋菌之间的竞争相互作用

琼脂板竞争实验结果显示,Ll对Sm抑制作用不明显(图2A),表现为BHI琼脂板上Sm菌落细菌可正常生长,菌落呈完整的类圆形。Ll对Av、An及La表现为竞争性抑制作用(图2B~2D),靠近Ll菌落的Av、An及La的生长受到抑制,其中Ll对An的抑制作用最强,表现为BHI琼脂板上只有小部分An在距离Ll菌落较远的地方生长。Ll对Av、La亦存在生长抑制作用,BHI琼脂板上靠近Ll菌落的Av、La菌落细菌生长受抑制,菌落为部分缺失的类圆形。Sm、Av、An及La对Ll无生长抑制作用,BHI琼脂板上Ll菌落细菌可正常生长,菌落呈完整的类圆形。

三、结晶紫染色

结晶紫染色结果显示,Sm或An单独培养24 h生物膜的生物膜量分别为(80.26 ± 2.55)、(73.98 ± 0.35),Ll与Sm或An共培养24 h生物膜的生物膜量分别为

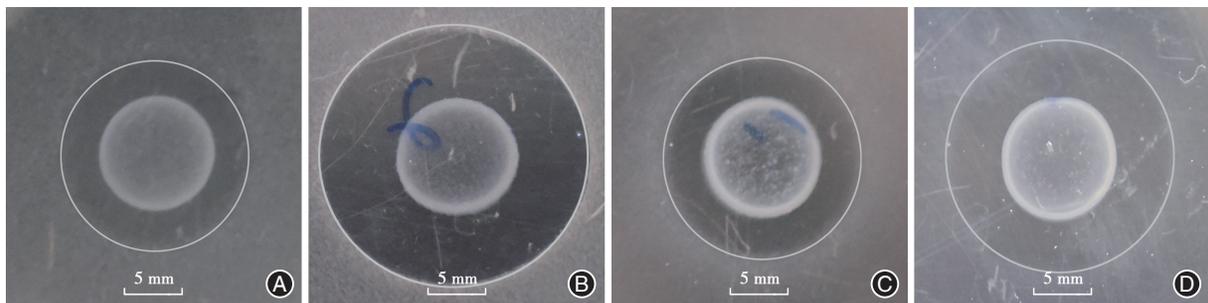


图1 乳酸乳球菌(Ll)对致龋菌的抑菌效果 A:对变异链球菌(Sm)的抑菌圈;B:对内氏放线菌(An)的抑菌圈;C:对嗜酸乳杆菌(La)的抑菌圈;D:对黏放线菌(Av)的抑菌圈;内圈直径一致。

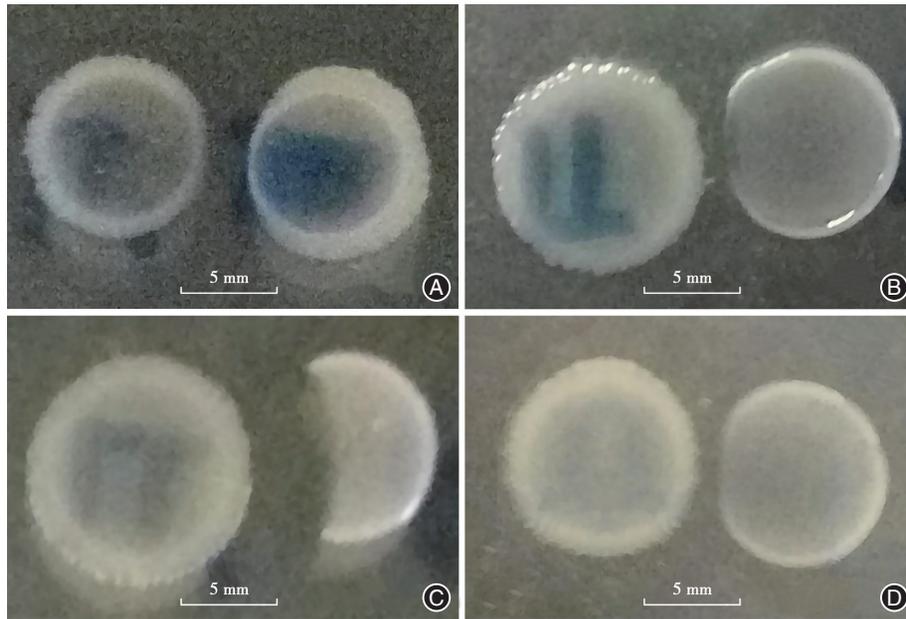


图2 乳酸乳球菌(LI)与致龋菌之间的竞争相互作用 A:对变异链球菌(Sm)竞争性抑制;B:对黏放线菌(Av)竞争性抑制;C:对内氏放线菌(An)竞争性抑制;D:对嗜酸乳杆菌(La)竞争性抑制;左侧菌落均为LI。

(30.66 ± 0.48)、(10.27 ± 0.04), Sm 或 An 单独培养 24 h 生物膜的生物膜量多于共培养 24 h 生物膜的生物膜量, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$; 表 2, 图 3 ~ 4)。Av、La 单独培养与共培养 24 h 生物膜的生物膜量少, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 表 2, 图 3 ~ 4)。

表2 致龋菌单独培养及共培养 24 h 生物膜的生物膜量($\bar{x} \pm s, \times 100$)

组别	嗜酸乳杆菌	变异链球菌	黏放线菌	内氏放线菌
单独培养组	10.07 ± 0.24	80.26 ± 2.55	11.72 ± 0.25	73.98 ± 0.35
共培养组	10.86 ± 0.41	30.66 ± 0.48	11.56 ± 0.13	10.27 ± 0.04
<i>t</i> 值	1.656	19.090	0.551	183.3
<i>P</i> 值	0.173	<0.001	0.611	<0.001

注:表2所列细菌生物膜的生物膜量为图3吸光度值 $\times 100$ 的结果。

四、乳酸乳球菌与致龋菌生物膜表面形态

SEM结果显示,LI单独培养24 h生物膜可见少量细菌散在黏附于牙面,胞外基质少(图5)。La及Av单独培养组及共培养组生物膜均见少量细菌散在排列,胞外基质少(图6B~6C、6F~6G)。Sm单独培养24 h生物膜厚且致密(图6A),共培养组生物膜较单菌种组薄而稀疏,胞外基质减少(图6E)。An单独培养24 h生物膜厚且致密(图6D),共培养组牙块上难以形成完整的生物膜,可见散在的细菌及少量胞外基质(图6H)。

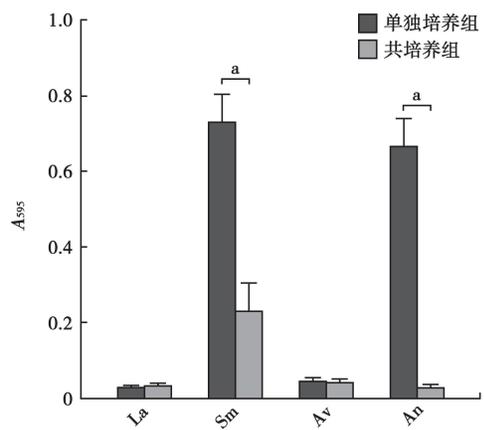


图3 致龋菌单独培养及共培养 24 h 生物膜的生物膜量(与单菌种组相比, $P < 0.05$) 变异链球菌(Sm)或内氏放线菌(An)单独培养组生物膜量多于共培养组 ($P < 0.05$)。La为嗜酸乳杆菌;Av为黏放线菌。

讨 论

龋病是由多种致龋菌共同作用引发的常见口腔疾病。抗生素用于控制口腔致病菌存在细菌耐药性和重复感染的不良反应,其临床应用有局限性^[4]。因此,需要新的方法来控制致龋菌过度增殖,减少龋病发生。近年来,益生菌因其安全有效的特点受到学者关注。

益生菌对致病菌的作用机理与竞争性抑制、细菌拮抗、分泌抗菌物质以及对免疫系统的刺激有关^[5]。LI因易于生长和被基因操控、能在胃肠道中

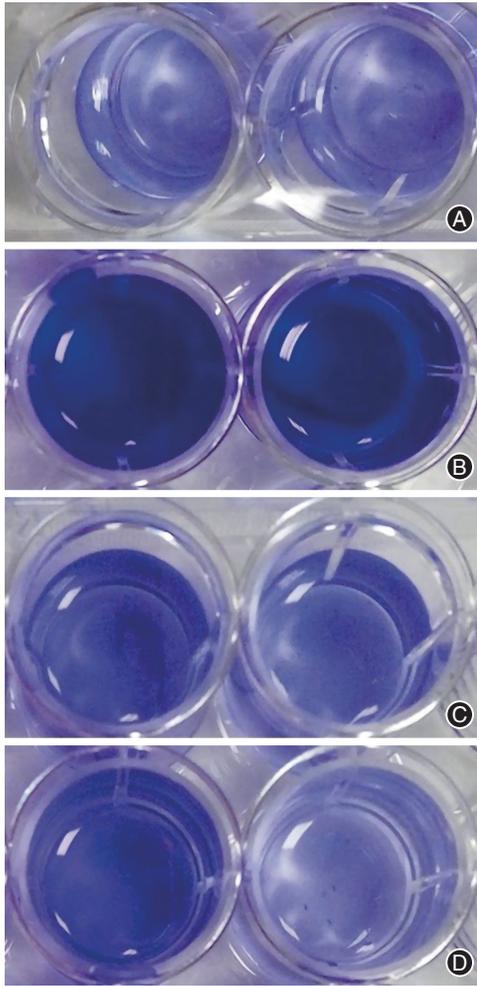


图4 致龋菌单独培养及共培养24 h生物膜结晶紫染色结果 A~D:左侧为嗜酸乳杆菌(La)、变异链球菌(Sm)、黏放线菌(Av)、内氏放线菌(An)单独培养组,右侧为共培养组。

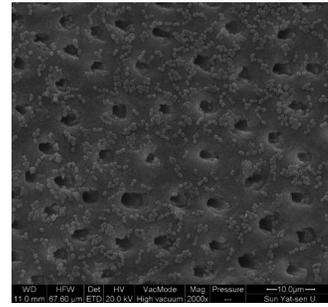


图5 扫描电镜观察乳酸乳球菌(LI)24 h生物膜表面形态 LI单独培养24 h未见明显生物膜形成。

存活、不产生脂多糖等特点,已成为基因工程最常用的载体模型^[6]。

LI能显著抑制牙菌斑生物膜形成及口腔致病菌生长。本实验中,LI抑制Sm、An生物膜形成,对4种致龋菌表现出不同程度的生长抑制作用。Tong等^[3]发现,LI在营养匮乏时抑制Sm生长及对牙齿表面的黏附,通过分泌乳酸链球菌素(nisin)抑制Sm生物膜形成。nisin对革兰阳性菌,如金黄色葡萄球菌、梭状芽孢杆菌和密螺旋体^[7]等具有广谱抗菌活性,已进行工业化生产。nisin可与革兰阳性菌细胞膜表面脂质Ⅱ特异性识别和结合,在细胞膜表面形成小的穿孔,导致细胞质内容物外流,细胞重要离子梯度崩溃,最终细胞死亡^[8]。学者已证实,nisin抑制口腔致病菌生长及生物膜形成,而不会对人类口腔细胞产生细胞毒性。目前,LI的具体抗菌机制尚不清楚,推测竞争营养物质及分泌nisin可能是LI发挥抗菌作用的主要方式。

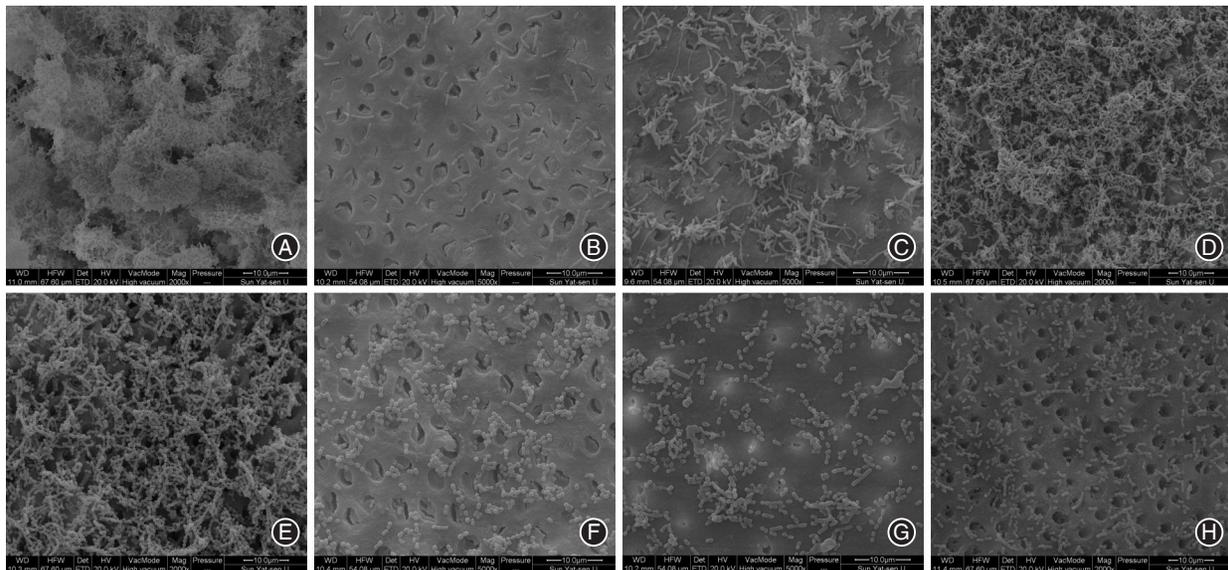


图6 扫描电镜观察致龋菌单独培养及共培养生物膜表面形态 A~D:分别为变异链球菌(Sm)、嗜酸乳杆菌(La)、黏放线菌(Av)及内氏放线菌(An)单独培养组;E~H:分别为Sm、La、Av及An与乳酸乳球菌(LI)共培养组。

益生菌在牙齿表面的定植是抑制致病菌生长的第一步。LI属于产酸菌,可能导致牙齿脱矿。Tong等^[3]通过SEM观察显示,LI可在牙釉质表面黏附,胞外基质少。与Sm组相比,LI不会导致牙釉质明显脱矿。本实验中,SEM结果显示,LI形成生物膜能力较差,与前期学者研究结果相符,单独培养24 h生物膜可见细菌散在黏附于牙面,证明LI可能在牙块表面定植,这一特性为其在生物膜中与致病菌竞争黏附位点创造条件。

Sm是通过葡聚糖形成生物膜的关键贡献者。本实验结果显示,LI抑制Sm生物膜形成。LI可能通过抑制Sm合成葡聚糖,影响生物膜形成。当Sm在口腔生物膜形成过程中与其他链球菌竞争蔗糖作为底物时,其抗菌敏感性降低^[9]。此外,Sm的葡聚糖合成依赖于蔗糖的浓度。LI HY 449通过抑制Sm葡糖基转移酶表达,竞争性消耗蔗糖,减少Sm生物膜形成^[10]。丰富的营养物质是微生物生存的必要条件,本实验中,竞争性实验在全琼脂板上进行,营养物质相对丰富,LI对Sm的生长抑制作用表现不明显。Tong等^[3]研究不同营养状况下LI对Sm的生长抑制作用,结果显示半琼脂培养基中LI对Sm的生长抑制作用明显,而全琼脂培养基中生长抑制作用不明显,与本实验结果相符。LI抑制Sm生长及生物膜形成,推测其可能原因是竞争营养物质、抑制Sm葡聚糖合成、下调致龋相关基因(如*gtfB*、*gtfC*、*gtfD*和*ftf*)表达、分泌nisin。

目前,LI对致龋菌的研究多集中在Sm。然而口腔是由数百种微生物构成的复杂微环境,在龋病发展的不同阶段,牙菌斑生物膜中的优势菌存在差异。尚无学者同时对文中4种致龋菌开展研究。因此,本研究探讨了LI对常见的4种致龋菌生长及生物膜形成的影响。

An是牙菌斑生物膜形成的重要致病菌。LI通过糖酵解途径发酵碳水化合物产酸。An耐酸能力有限,酸化处理能短暂抑制An增殖^[11]。LI生成H₂O₂,后者与Fe²⁺反应生成羟基自由基(·OH)。·OH通过降解4Fe-4S酶同时氧化包括细菌DNA和蛋白质在内的大分子物质来损伤细菌细胞,An过氧化氢酶活性低。此外,An体外生长速度比LI慢。本实验中,LI抑制An生长并降低An生物膜量,其原因可能与分泌nisin及H₂O₂、竞争营养物质及发酵蔗糖产酸有关。

BHI培养基营养丰富,可满足大多数细菌的生

长需求。Av为牙菌斑早期定植菌,单纯培养生物膜形成能力较差,但其可与其他细菌共聚,利于后期定植菌的定植。Deng等^[12]培养Av 24 h生物膜,SEM结果显示Av单独培养24 h生物膜薄,可见底部牙本质块。Xiong等^[13]培养24 h的Av生物膜,也发现同样的现象,与本实验结果相符。

本实验初步探讨了LI对4种致龋菌生长及生物膜形成的影响,结果显示LI可抑制4种致龋菌的生长,降低Sm或An生物膜量。LI具体作用机制、防治效果及其用于口腔疾病防治的安全性问题尚待进一步研究证实。考虑LI自成膜能力差,其在牙面的定植能力是否影响口腔致病菌防治尚需深入探讨。口腔生物膜由多种微生物构成,单菌种不能完全反映口腔真实情况,LI对多菌种生物膜的作用是未来的研究重点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 张延清:设计研究、实验操作、统计分析数据、撰写和修改文章;冯少霞:统计分析数据、撰写和修改文章;陈宇:研究指导、论文修改、经费支持。

致谢 感谢中山大学附属口腔医院,广东省口腔医学重点实验室提供实验平台及实验菌株;感谢童忠春副主任医师对本实验设计提出的重要参考意见

参 考 文 献

- [1] Li B, Cai Q, Wang Z, et al. D-arginine enhances the effect of alpha-amylase on disassembling *Actinomyces viscosus* biofilm [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 864012. DOI: 10.3389/fbioe.2022.864012.
- [2] Wang J, Du L, Fu Y, et al. ZnO nanoparticles inhibit the activity of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinomyces naeslundii* and promote the mineralization of the cementum [J]. BMC Oral Health, 2019, 19(1): 84. DOI: 10.1186/s12903-019-0780-y.
- [3] Tong Z, Zhou L, Li J, et al. An *in vitro* investigation of *Lactococcus lactis* antagonizing cariogenic bacterium *Streptococcus mutans* [J]. Arch Oral Biol, 2012, 57(4): 376-382. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.10.003.
- [4] Hernández-González JC, Martínez-Tapia A, Lazcano-Hernández C, et al. Bacteriocins from lactic acid bacteria. A powerful alternative as antimicrobials, probiotics, and immunomodulators in veterinary medicine [J]. Animals (Basel), 2021, 11(4): 979. DOI: 10.3390/ani11040979.
- [5] Lambo MT, Chang X, Liu D. The recent trend in the use of multistrain probiotics in livestock production: An overview [J]. Animals (Basel), 2021, 11(10): 2805. DOI: 10.3390/ani11102805.
- [6] Tavares LM, de Jesus LCL, da Silva TF, et al. Novel strategies for efficient production and delivery of live biotherapeutics and biotechnological uses of *Lactococcus lactis*: The lactic acid bacterium model [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 517166.

- DOI:10.3389/fbioe.2020.517166.
- [7] Radaic A, de Jesus MB, Kapila YL. Bacterial anti - microbial peptides and nano-sized drug delivery systems: The state of the art toward improved bacteriocins [J]. J Control Release, 2020, 321:100-118. DOI:10.1016/j.jconrel.2020.02.001.
- [8] Le MN, Kawada-Matsuo M, Komatsuzawa H. Gene rearrangement and modification of immunity factors are correlated with the insertion of bacteriocin cassettes in *Streptococcus mutans* [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(3):e0180621. DOI:10.1128/spectrum.01806-21.
- [9] Kretz J, Zhu L, Merritt J, et al. Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans* [J]. Oral Microbiol Immunol, 2008, 23(3): 213-219. DOI:10.1111/j.1399-302X.2007.00413.x.
- [10] Kim YJ, Lee SH. Inhibitory effect of *Lactococcus lactis* HY 449 on cariogenic biofilm [J]. J Microbiol Biotechnol, 2016, 26(11): 1829-1835. DOI:10.4014/jmb.1604.04008.
- [11] Horiuchi M, Washio J, Mayanagi H, et al. Transient acid - impairment of growth ability of oral *Streptococcus*, *Actinomyces*, and *Lactobacillus*: A possible ecological determinant in dental plaque [J]. Oral Microbiol Immunol, 2009, 24(4): 319-324. DOI:10.1111/j.1399-302X.2009.00517.x.
- [12] Deng L, Zou L, Wu J, et al. Voriconazole inhibits cross - kingdom interactions between *Candida albicans* and *Actinomyces viscosus* through the ergosterol pathway [J]. Int J Antimicrob Agents, 2019, 53(6): 805-813. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2019.02.010.
- [13] Xiong K, Zhu H, Li Y, et al. The arginine biosynthesis pathway of *Candida albicans* regulates its cross-kingdom interaction with *Actinomyces viscosus* to promote root caries [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(4):e0078222. DOI:10.1128/spectrum.00782-22.

(收稿日期:2024-01-05)

(本文编辑:王嫒)