

纯镁微弧氧化-壳聚糖/海藻酸钠载铜复合膜层制备及抑菌性

刘继光, 王丽萍, 李慕勤, 臧万顺, 杨万翠

(佳木斯大学 黑龙江省高校生物医学材料重点实验室, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要: 目的 采用多种表面技术复合在纯镁表面制备了功能性生物复合膜层, 以调控医用纯镁降解速度, 赋予纯镁内固定材料的抑菌性和生物活性。方法 分别通过纯镁微弧氧化, 电镀壳聚糖、海藻酸钠, 化学镀铜等方法, 制作不同复合膜层, 分别为纯镁微弧氧化膜层(A组)、纯镁微弧氧化-壳聚糖复合膜层(B组)、纯镁微弧氧化-壳聚糖/海藻酸钠复合膜层(C组)、纯镁微弧氧化-壳聚糖/海藻酸钠/壳聚糖复合膜层(D组)和纯镁微弧氧化-壳聚糖/海藻酸钠载铜复合膜层(E组)。采用扫描电子显微镜分析膜层的微观形貌, 测定润湿角, 将材料与大肠杆菌共同培养, 计算抑菌率。结果 A组表面有很多微孔和少量微裂纹, B组表面的微孔和微裂纹减少, C组的微孔和裂纹基本消失, D组和E组表面的微孔裂纹消失并出现微网状结构。A组和E组为亲水性膜层, C组为疏水性膜层, B组和D组的膜层接近疏水性。A组抑菌率最低, B、C、D组的逐渐增高, 分别为26%、30%、61%, E组的抑菌率高达88%。结论 纯镁微弧氧化-壳聚糖/海藻酸钠载铜复合膜层有封孔和愈合裂纹的作用, 具有较好的抑菌性。

关键词: 纯镁; 微弧氧化; 壳聚糖; 海藻酸钠; 铜; 抑菌性

中图分类号: TG174.442 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3660(2016)11-0159-08

DOI: 10.16490/j.cnki.issn.1001-3660.2016.11.025

Preparation and Antibacterial Activity of Pure Magnesium Micro-arc Oxidation-Chitosan/Sodium Alginate Containing Copper Composite Coating

LIU Ji-guang, WANG Li-ping, LI Mu-qin, ZANG Wan-shun, YANG Wan-cui

(Key Laboratory of Biomedical Materials of Heilongjiang Province Colleges, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

ABSTRACT: The work aims to reduce degradation speed of medical pure magnesium and endow fixation materials in medical pure magnesium with antibacterial activity and biological activity by preparing functional composite coatings on the surface of pure magnesium by combining a variety of surface technologies. Different composite coatings, including pure magnesium micro-arc oxidation (MAO) coating (group A), pure magnesium MAO-chitosan composite coating (group B), pure magnesium MAO-chitosan/alginate composite coating (group C), pure magnesium MAO-chitosan/sodium alginate/chitosan composite

收稿日期: 2016-05-03; 修订日期: 2016-05-31

Received: 2016-05-03; **Revised:** 2016-05-31

基金项目: 佳木斯大学研究生科技创新项目(LZZ2015_022); 国家自然科学基金(31370979)

Fund: Supported by the Jiamusi University Graduate Students of Science and Technology Innovation Projects(LZZ2015_022) and the National Natural Science Foundation of China(31370979)

作者简介: 刘继光(1961—), 男, 教授, 主要从事生物医学材料的研究工作。

Biography: LIU Ji-guang(1961—), Male, Professor, Research focus: biomedical materials.

通讯作者: 李慕勤(1955—), 女, 博士, 教授, 研究方向为生物医学材料表面改性。

Corresponding author: LI Mu-qin(1955—), Female, Doctor, Professor, Research focus: the modification of the surface of biomedical materials.

coating (group D) and pure magnesium MAO-chitosan/alginate containing copper composite coating (group E), were made by pure magnesium micro-arc oxidation, electroplating of chitosan and sodium alginate and chemical plating copper. Microstructures of the composite coatings were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The wetting angles of the coatings were measured and the materials were co-cultured with *Escherichia coli*. After 24 hours, their bacteriostatic rates were calculated. The results indicated that there were many micropore and a few microcracks on the surface of group A, pores and microcracks on the surface of group B reduced, that on the surface of group C mostly disappeared while microcracks on the surface of group D and E totally disappeared and micro reticular structures appeared. The coatings in group A and E were hydrophilic; for group C, hydrophobic; for group B and group D, nearly hydrophobic. The antibacterial rate of group A was the lowest; that of group B, C and D, which was respectively 26%, 30% and 61%, increased gradually; that of group E was up to 88%. Pure magnesium MAO chitosan/sodium alginate containing copper composite coating can seal pores and heal cracks and is of good antibacterial activity.

KEY WORDS: pure magnesium; micro-arc oxidation; chitosan; alginate; copper; antibacterial activity

内植入材料的感染问题已成为植入体能否成功的关键因素。如何使植入材料具有抗菌性成为研究的热点。纯镁作为一种新兴的生物医用材料,具有良好的生物相容性,具有与人体骨相似的力学性能、生物降解性、作为内固定材料无需二次取出的优点。微弧氧化后纯镁的耐蚀性增强^[1],降低了镁在人体的降解速度,弥补了其降解过快的缺陷^[2]。但单纯的微弧氧化技术还存在一些不足,如膜层还存在孔隙,仍会发生点蚀,纯镁微弧氧化膜层主要以氧化镁陶瓷为主体,其活性和抗菌性有待提高。

针对这一问题,本文提出利用微弧氧化技术在医用纯镁表面形成致密多孔生物陶瓷层,而后再组装具有抗菌和活性的膜层,以改善医用纯镁微弧氧化膜层的不足,赋予生物膜层优异的抗菌性和生物活性的设计思想。壳聚糖是一种天然多糖,带正电荷,已经被证明具有良好的组织相容性、力学相容性^[3],良好的生物降解性且降解产物对人体无毒无害,甚至可以被人体的吸收利用^[4]。分子量较小的壳聚糖具有一定的抗感染、抗肿瘤作用和抑菌性。海藻酸钠是从褐藻类中提取的多糖类物质,带有大量的负电荷,具有很好的生物相容性和生物降解性^[5-7]。壳聚糖和海藻酸钠由于正负电荷吸引可以结合在一起^[8]。郭欢等^[9]制成人工肝用壳聚糖海藻酸钠微囊,初步证明这种微囊具有良好的生物相容性。铜是一种人体必备的微量元素,具有重要的生理功能,能参与人体造血功能,是人体中多种酶的组成成分,参与酶的活化,一定量的铜能提高人体免疫力,铜的功能与银相似,都具有一定的抑菌作用^[10]。单纯使用壳聚糖的抑菌效果有限。通常,依据静电吸引组装正电荷壳聚糖和负电荷海藻酸钠,但组装时间长,层数多。

本文提出对纯镁微弧氧化膜层表面进行 OH⁻处理,采用电沉积技术快速组装壳聚糖、海藻酸钠,再化学镀铜,目的是使纯镁微弧氧化复合膜层由里至表的亲水性膜层和疏水性膜层共存,亲水性膜层实现细胞粘附,疏水性膜层控制降解速度,各材料取长补短,以便更好地发挥作用。本文主要探讨纯镁微弧氧化膜经过组装不同膜层后,其表现出亲水性还是疏水性,及对抗菌性的影响。希望设计出一种降解速度可控,又具有一定抑菌功能的功能性镁骨内固定材料,为医用镁合金尽快实现临床应用提供理论依据。

1 实验

1.1 材料及膜层制备

试件为纯镁材料,镁的纯度为 99.9%,切割成 15 mm×15 mm×1.5 mm 的尺寸。微弧氧化的电解液以硅酸盐为主盐,添加 KOH、KF、EDTA-2 钠。纯镁微弧氧化膜的成分主要为 MgSiO₃ 和 MgO^[11]。实验所用双极性脉冲微弧氧化电源,设定工作电压 300 V,脉冲频率 500 Hz,占空比 2.5%。阴极连接不锈钢槽,阳极连接纯镁试件。电解液配置均匀置于超声波不锈钢槽中,超声功率设为 60 W,频率设为 40 kHz,工作时间控制为 10 min。取出微弧氧化后的试件,蒸馏水冲洗,为实验对照 A 组。

将 3 g/L 的壳聚糖溶于含有 10 mL/L 乙酸的蒸馏水中,将 1.5 g/L 海藻酸钠溶于蒸馏水中,分别搅拌沉化成透明溶液。采用电沉积装置分别组装壳聚糖和海藻酸钠。组装壳聚糖时,试件为负极,不

锈钢槽为正极, 电压为 20 V, 沉积时间为 1 min; 组装海藻酸钠时, 试件为正极, 不锈钢槽为负极, 电压为 20 V, 沉积时间为 3 min。在 A 组试样表面组装一层壳聚糖, 获得纯镁微弧氧化-壳聚糖复合膜层, 设为 B 组。通过正负离子相互吸引的原理, 在 B 组表面再电镀一层海藻酸钠, 获得纯镁微弧氧化-壳聚糖/海藻酸钠复合膜层, 设为 C 组。在 C 组表面再镀一层壳聚糖, 获得纯镁微弧氧化-壳聚糖/海藻酸钠/壳聚糖复合膜层, 设为 D 组。D 组载铜处理后设为 E 组, 载铜配方为 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 8 g/L、 NaH_2PO_4 25 g/L、 Na_3PO_4 20 g/L。

1.2 膜层表面形貌和元素分析

采用带 FALCON 60S 能谱分析仪 (EDAX) 的 JSM-6360LV 扫描电子显微镜 (SEM) 观察膜层材料的表面形貌, 并进行元素分析。

1.3 膜层润湿角测定

上海中晨数字技术设备有限公司生产的 JC2000c 测量仪和电脑软件配合测量并分析出各组润湿角大小, 每组测量三次, 求平均值。

1.4 抗菌试验

将各组材料和大肠杆菌共同培养, 从而观察材料的抑菌性。试验菌株培养, 按 GB/T 4789.2—2010 《食品卫生微生物学检验 菌落总数测定》方法进行。革兰阳性菌对高分子量的壳聚糖敏感, 格兰阴性菌对低分子量的壳聚糖敏感^[12], 因本试验所用壳聚糖的分子量低, 故选用大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) ATCC 25922 作为试验菌株。具体方法如下。

1) 用微量移液器刮取适量菌种稀释于 1000 μL 配置好的营养肉汤中, 吹打均匀, 制成营养菌悬液, 标记为 1 号。取 900 μL 营养肉汤于另一稀释管中, 标记为 2 号。从 1 号中取 100 μL 菌悬液置于 2 号稀释管, 再次吹打均匀, 以此方法依次 10 倍稀释并标记, 直到稀释并标记为 10 号。

2) 分别从 1—10 号稀释液中取 100 μL 于培养皿中培养。放入温箱, 培养条件为: 温度 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、 $\text{RH} > 90\%$, 培养时间 24 h。使用自动菌落计数仪计数。

3) 将试件放于培养皿中, 选择与菌落计数

500~1000 之间的培养皿对应的稀释管, 取 100 μL 该管内的细菌悬液滴于试件中央。每个样品做 5 个平行。放入恒温恒湿箱中, 参数如上。

4) 取出试件放入空培养皿中, 用注射器抽取 2 mL 生理盐水反复冲洗, 用移液枪取 100 μL 于培养皿中培养, 放入恒温恒湿箱中, 参数如上。

5) 使用自动菌落计数仪计数。以上实验重复三次。

6) 根据标准 GB 4789 和《食品卫生微生物学检测菌落总数测定的方法》, 抑菌率可根据公式 (1) 计算。

$$R = \frac{m-n}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中: R 为抑菌率; m 为空白对照组平均回收菌落数; n 为抗菌实验组平均回收菌落数。

2 结果和讨论

2.1 不同膜层表面形貌和元素测定

微弧氧化膜层及不同后处理膜层的表面形貌及元素测定见图 1。SEM 表面观察可知, A 组膜层表面存在多孔结构, 孔径为 1~5 μm , 大孔径下很多微孔, 并存在少量的微裂纹; 经组装壳聚糖后 (B 组), 表面孔径变小, 凸凹不平, 表面产生了很多细小的白色颗粒, 覆盖壳聚糖膜层起到一定的封孔和愈合裂纹的作用; 再组装海藻酸钠复合膜层 (C 组), 其表面几乎没有孔隙; D、E 组表面形貌与 C 组相当, 可观察到覆盖一层薄膜且呈蒙脱的多孔结构。镁作为一种新型的内固定材料, 自身具有很多优势, 但镁易发生点蚀, 导致其降解速度过快, 植骨材料断裂^[13], 通过改良其表面结构可以控制其降解速度, 镁表面的微弧氧化膜在模拟体液中的稳定性更好^[14]。从 SEM 图片可以看出, 海藻酸钠对材料表面的封孔起到关键作用。海藻酸钠具有很强的吸附、螯合金属离子的作用^[15—17]。

分析不同膜层表面的元素发现, A 组主要元素为 Mg、O、Si, 纯 Mg 在高温游动微弧作用下氧化形成 MgO , Si 从镀液硅酸盐中进入膜层; B 组组装壳聚糖之后有 C 元素产生; C 组增加了海藻酸钠, 海藻酸钠中的 C、O 元素较多, 膜层的 C、O 含量均增加; D 组两次组装壳聚糖, 故其 C、O 含量比 C 组均有所增加, 壳聚糖纯度为 99%, 海藻

酸钠纯度为 98%，杂质中 Ca 累积，故出现 Ca 元素峰值；E 组进行化学镀 Cu 处理，故出现 Cu 元素，占 3.8%，载铜过程中添加 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} ，故出现 S、P 峰值。所有试件的能谱均出现 Pt，因为

材料喷铂金可以增加导电性，故出现该元素。通过 SEM 图片可以看出，微弧氧化膜表面依然存在明显的微孔和微裂隙，壳聚糖/海藻酸钠复合膜层可以填充这些微孔微裂隙。

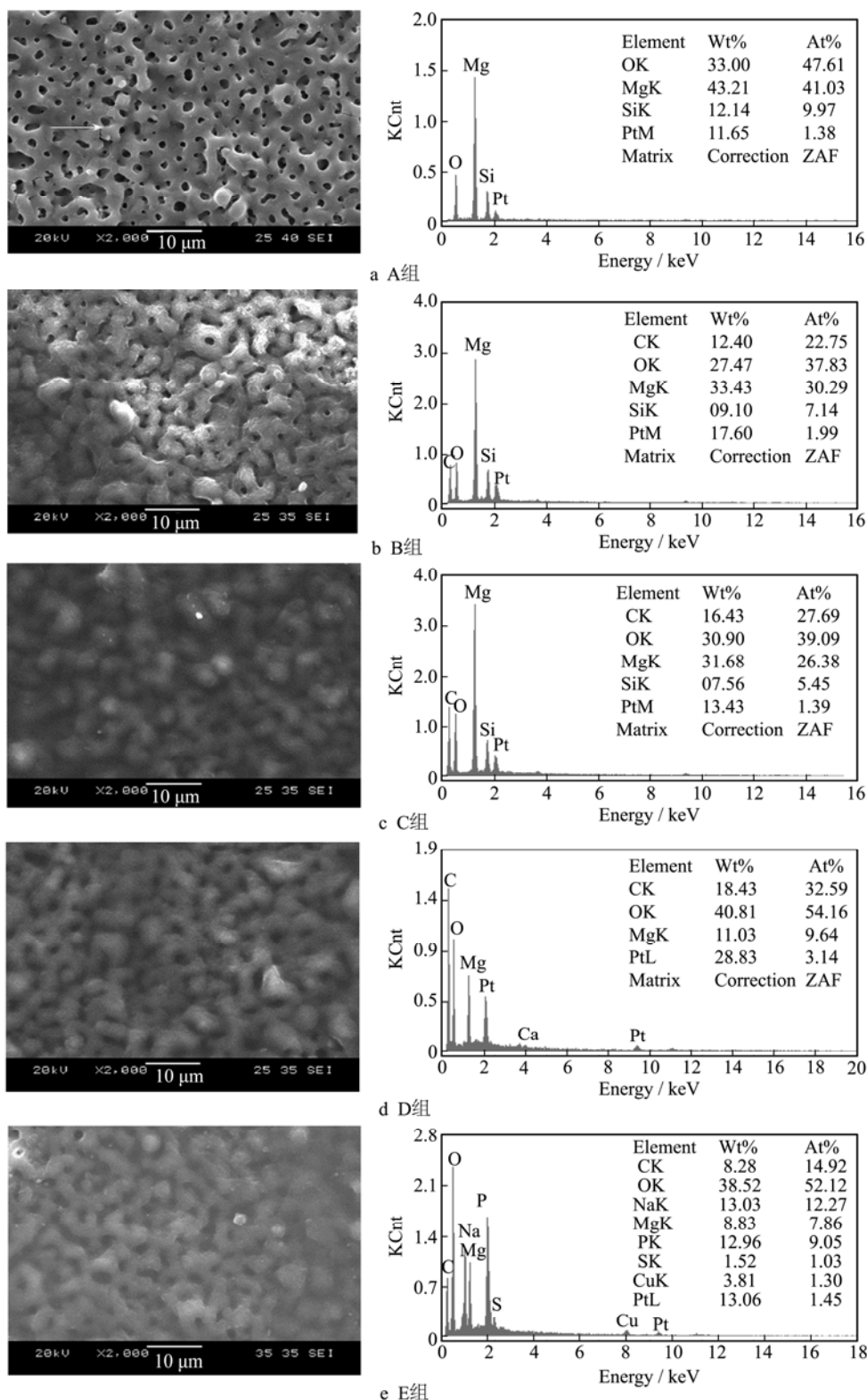


图 1 各组试件 SEM 形貌及元素测定结果

Fig.1 The results of SEM and EDAX

2.2 润湿角实验结果

A 组微弧氧化膜层的润湿角最小为 26.7° ；B 组材料表面的润湿角提高为 87.5° ；C 组表面的润湿角为 101.9° ，具有疏水性；D 组经多层组装，但表层仍为壳聚糖，故与 B 组试件表面的润湿角近似，为 87.9° ；E 组载铜后，其润湿角减小，为 53.8° ，但远高于 A 组。这可能是因为有机固体表面能都小于 100 mJ/m^2 ，无机固体表面能都大于 100 mJ/m^2 。

在试件所处的压力和温度相同的情况下，只考虑结合键对表面张力的影响。化学键键能高于物理键键能，键能越强，表面张力越大。纯镁微弧氧化膜层的元素之间由共价键和离子键维系，表面张力大；壳聚糖膜层主要由氢键、共价键、范德华力维

系，表面张力小；海藻酸钠膜层主要由氢键、共价键、范德华力维系，表面张力小；E 组膜层既有离子键又有范德华力，其表面张力小于 A 组大于 B、C、D 组。对于 E 组，壳聚糖、海藻酸钠镀层减小了膜层的表面张力，使载铜之后材料膜层的表面张力依然小于 A 组。表面张力越小材料越疏水。由图 2 可见，A 组的疏水性最弱，B、C、D 组明显较 A 组的疏水性增强，E 组表面膜层的疏水性较 B、C、D 弱，但明显高于 A 组。细胞表面疏水性可直接影响微生物非特异性吸附到物体表面，是微生物最主要的理化性质之一^[18]。多种实验^[19-21]已经证明了细菌更易粘附于疏水性材料，这主要是由细菌细胞壁中含有的脂磷壁酸决定的^[22]。纯镁微弧氧化-壳聚糖/海藻酸钠载铜复合膜层为亲水性，抗菌作用应是铜离子发挥了作用。

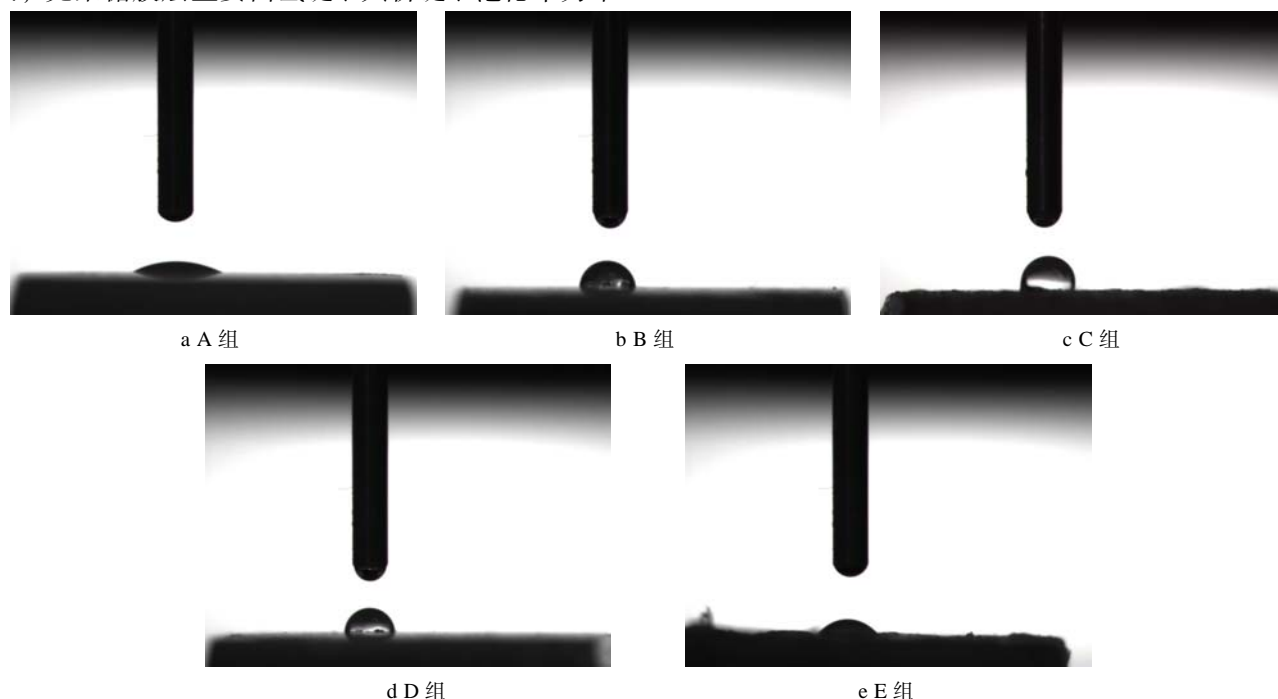


图 2 不同膜层润湿角图像
Fig.2 The figure of the wetting angle

2.3 抗菌实验结果

图 3 为大肠杆菌和各组材料共同培养之后的结果，A 组菌落密集，连成一片，形成了一层菌膜；B 组菌落减少，部分菌落之间留有一定缝隙；C 组菌落较 B 组数量减少，菌落之间的距离变大；D 组菌落散落于培养基上，菌落数量大幅度减少；与 D 组比较，E 组菌落数量锐减，说明 E 组材料对大肠杆菌的抑制作用明显。

不同试件表面培养大肠杆菌 24 h 后的抗菌率见表 1。A 组细菌布满整个视野，B 组试件的抗菌率为 26%。C 组试件抗菌率为 30%，膜层虽增加了海藻酸钠，但抑菌作用并没有明显增加。在 C 组基础上，再组装壳聚糖的 D 组试件的抑菌率为 61%，表明随壳聚糖的增加，抑菌率大大提高。D 组再载铜的 E 组的抑菌率为 88%，说明纯镁微弧氧化-壳聚糖/海藻酸钠载铜复合膜层的抑菌作用优于前几组，有一定的抑菌作用。

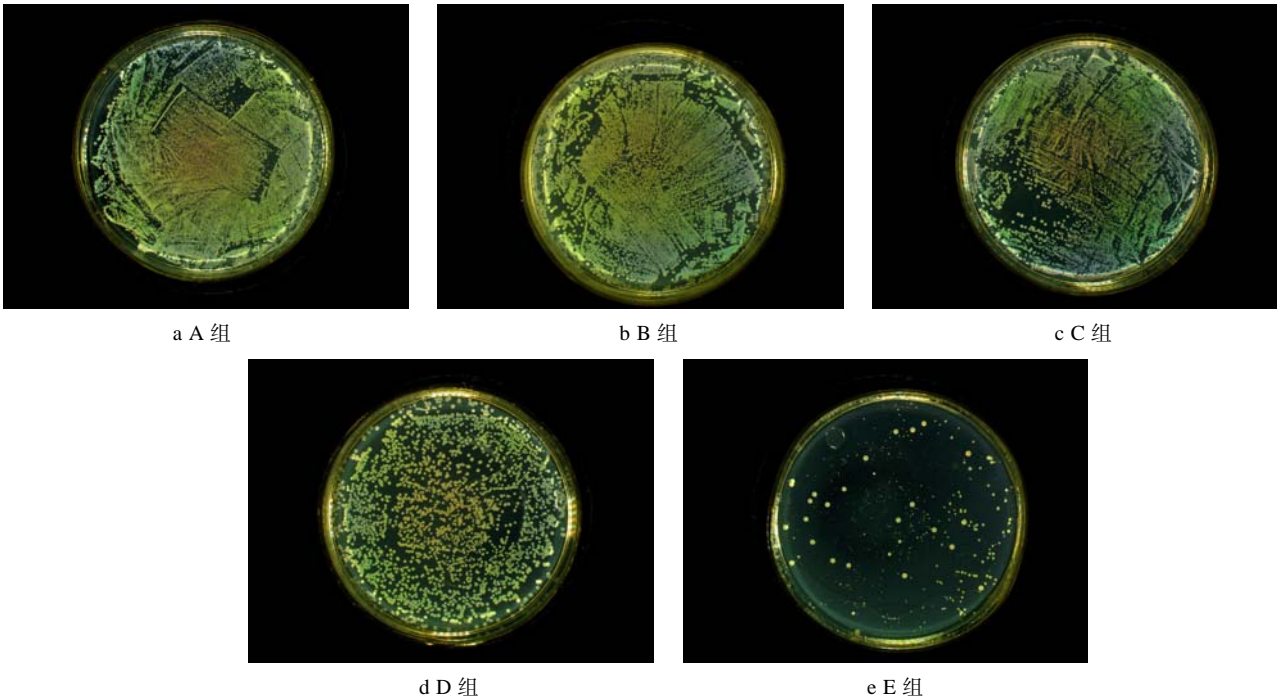


图 3 不同试件大肠杆菌 24 h 菌落分布
Fig.3 The distribution of the E. coli colonies after 24 hours growing

表 1 24 h 试件对大肠杆菌的抑菌率
Tab.1 The result of the bacteriostasis after 24 hours growing

试件	菌落数/($\times 10^2$ CFU \cdot mL $^{-1}$)	抗菌率/%
A	47.6 \pm 3.2	
B	35.0 \pm 3.1*	26
C	33.2 \pm 66.6*	30
D	18.8 \pm 1.8*	61
E	5.7 \pm 0.5*	88

注：*表示实验组与对照组比较，且 $P<0.01$ ，表明具有统计学差异。

对格兰阴性菌的抑菌机理主要是对细菌周围环境中的金属离子进行吸附,干扰正离子与细菌细胞壁结合,进入细菌细胞内部后,通过结合负电,进而影响 RNA 转录过程和蛋白形成过程^[23]。壳聚糖分子结构存在大量的伯氨基,而海藻酸钠的分子结构存在大量羧基^[24],壳聚糖和海藻酸钠能够结合,通过海藻酸钠可以使材料表面电镀上更多的壳聚糖,从而更好地发挥抑菌作用。同时壳聚糖膜层和海藻酸钠膜层呈疏水性,细菌更易于黏附,起到接触抑菌作用。铜离子有很好的抑菌作用,材料增加铜离子可以补充壳聚糖抑菌作用不强的缺点。由于海藻酸钠对金属离子的吸附、螯合作用,铜进入了膜层,在与大肠杆菌共培养、海藻酸钠逐渐降解的过程中,吸附的铜离子缓释,铜离子游离出起到

抑菌作用。
虽然壳聚糖/海藻酸钠载铜后材料的抑菌性能提高了,但载铜量及材料表面亲、疏水性对细菌膜破坏机理等还需深入研究。

3 结语

- 1) 纯镁微弧氧化-壳聚糖起到一定的封孔作用,再组装海藻酸钠后,既发挥了其封孔作用,又增加了活性 C、O 元素。
- 2) 壳聚糖/海藻酸钠组装,使膜层呈疏水性,载铜后,膜层呈亲水性。
- 3) 壳聚糖有一定的抑菌效果,多层组装壳聚糖抑菌率有所增加,载铜补充了壳聚糖-海藻酸钠复合材料抑菌性的不足。

参考文献:

[1] 杨眉,雷正,王平,等. 镁合金微弧氧化技术研究进展[J]. 热加工工艺, 2011, 40(20): 111—115.
YANG Mei, LEI Zheng, WANG Ping, et al. Research Progress on Micro Arc Oxidation of Mg Alloy[J]. Material & Heat Treatment, 2011, 40(20): 111—115.

[2] 苗波,吕岩,刘苗,等. 纯镁超声微弧氧化生物涂层植入体内 4 周的降解行为[J]. 中国表面工程, 2013, 26(3):

- 45—50.
- MIAO Bo, LYU Yan, LIU Miao, et al. Degradation Behavior of Ultrasound Micro Arc Oxidation Coating on Pure Magnesium after Implanted Four Weeks[J]. *China Surface Engineering*, 2013, 26(3): 45—50.
- [3] 李若慧, 张雪, 单丹彤, 等. 壳聚糖的生物相容性[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(12): 2237—2240.
- LI Ruo-hui, ZHANG Xue, SHAN Dan-tong, et al. Biocompatibility of Chitosan[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2012, 16(12): 2237—2240.
- [4] SAIKI I, MURATA J, NAKAJIMA M, et al. Inhibition by Sulfated Chitin Derivatives of Invasion Through Extracellular Matrix and Enzymatic Degradation by Metastatic Melanoma Cells[J]. *Cancer Research*, 1990, 50: 3631—3637.
- [5] 高春梅, 柳明珠, 吕少瑜, 等. 海藻酸钠水凝胶的制备及其在药物释放中的应用[J]. *化学进展*, 2013, 25(6): 1012—1022.
- GAO Chun-mei, LIU Ming-zhu, LYU Shao-yu, et al. Preparation of Sodium Alginate Hydrogel and Its Application in Drug Release[J]. *Progress in Chemistry*, 2013, 25(6): 1012—1022.
- [6] 吴慧玲, 张淑平. 海藻酸钠纳米复合材料的研究应用进展[J]. *化工进展*, 2014, 33(4): 954—959.
- WU Hui-ling, ZHANG Shu-ping. Progress in the Application of Sodium Alginate/Nanomaterial Composites[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2014, 33(4): 954—959.
- [7] 荣晶晶. 凝血酶-海藻酸钙复合介入栓塞止血剂的研制及应用基础研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2015.
- RONG Jing-jing. Development and Applied Basic Research of Thrombin-loaded Alginate-calcium Microspheres: A Novel Hemostatic Embolic Material for Transcatheter Arterial Embolization[D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2015.
- [8] 常会. 壳聚糖-海藻酸钠吸附剂对电镀废水中 Cr(VI) 的吸附性能研究[J]. *表面技术*, 2013, 42(5): 84—88.
- CHANG Hui. Study on the Adsorption Property of Chitosan-sodium Alginate Absorbent for Cr(VI) in Electropolishing Waste Water[J]. *Surface Technology*, 2013, 42(5): 84—88.
- [9] 郭欢, 邵安良, 程祥, 等. 生物人工肝用海藻酸钠/壳聚糖微囊的安全性和生物功能评价[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(1): 36—45.
- GUO Huan, SHAO An-liang, CHENG Xiang, et al. Safety and Biological Function Evaluation of Sodium Alginate/Chitosan Microcapsule Used in Bioartificial Liver[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(1): 36—45.
- [10] 惠兴伟. 银离子抗菌涂层钢技术及应用[J]. *表面技术*, 2008, 37(6): 87—90.
- HUI Xing-wei. The Technology and Application of Ag Ion Antimicrobial Coated Steel[J]. *Surface Technology*, 2008, 37(6): 87—90.
- [11] 郭惠霞. 镁合金微弧氧化膜电化学腐蚀行为及机理研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2014.
- GUO Hui-xia. The Electrochemical Corrosion Behavior and Mechanism of Micro Arc Oxidation Coatings on Magnesium Alloys[D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2014.
- [12] 郑连英, 朱江峰, 孙昆山. 壳聚糖的抗菌性能研究[J]. *材料科学与工程*, 2000, 18(2): 22—24.
- HENG Li-ying, ZHU Jiang-feng, SUN Kun-shan. Antimicrobial Activity of Chitosan[J]. *Materials Science and Engineering*, 2000, 18(2): 22—24.
- [13] 胡德. 镁合金的降解和人体补镁的初步研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2013.
- HU De. Degradation of Magnesium Alloys and Preliminary Probe of Human Magnesium Supplementation[D]. Chongqing: Chongqing University, 2013.
- [14] 曲立杰, 李慕勤, 张二林, 等. 超声微弧氧化处理镁合金模拟体液中的耐蚀性[J]. *材料热处理学报*, 2013, 34(3): 130—135.
- QU Li-jie, LI Mu-qin, ZHANG Er-lin, et al. Corrosion Resistance of Magnesium Alloy Coated by Ultrasonic-micro Arc Oxidation in Simulated Body Fluid[J]. *Transactions of Materials and Heat Treatment*, 2013, 34(3): 130—135.
- [15] JEON C, PARK J Y, YOO Y J. Novel Immobilization of Alginate Acid for Heavy Metal Removal[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2002, 11(2): 159—166.
- [16] LAMELAS C, AVALTRONI F, BNEDETTI M, et al. Quantifying Pb and Cd Complexation by Alginates and the Role of Metal Binding on Macromolecular Aggregation[J]. *Biomacromolecules*, 2005, 6(5): 2756—2764.
- [17] ARICA M Y, KAÇAR Y, GENÇ Ö. Entrapment of White-rot Fungus *Trametes Versicolor* in Ca-alginate Beads: Preparation and Biosorption Kinetic Analysis for Cadmium Removal from an Aqueous Solution[J]. *Bioresource Technology*, 2001, 80(2): 121—129.
- [18] 谢博媛, 李国明, 刘聪, 等. 拉米夫定-海藻酸钠/壳聚糖核壳结构微球的制备及释药性能[J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 2015, 47(4): 46—51.
- XIE Bo-yuan, LI Guo-ming, LIU Cong, et al. Preparation of Lamivudine-Sodium Alginate/Chitosan Core-shell Microspheres and the Drug-release Performance[J]. *Journal of South China Normal University(Natural Science Edition)*, 2015, 47(4): 46—51.
- [19] 黄翔峰, 方正, 黄薇, 等. MATH 法表征环境微生物细胞表面疏水性的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(1): 200—206.

- HUANG Xiang-feng, FANG Zheng, HUANG Wei, et al. Recent Progress on MATH Characterizing the Cell Surface Hydrophobicity of Environmental Microorganisms[J]. Microbiology China, 2015, 47(4): 46—51.
- [20] DONG Xiu-li, MCCOY E, ZHANG Mei, et al. Inhibitory Effects of Nisin-coated Multi-walled Carbon Nanotube Sheet on Biofilm Formation from *Bacillus Anthracis* Spores[J]. Journal of Environmental Science, 2014, 26(12): 2526—2534.
- [21] PIMENTEL-FILHO N J, MARTINS M C F, NOGUEIRA G B, et al. Bovicin HC5 and Nisin Reduce *Staphylococcus Aureus* Adhesion to Polystyrene and Change the Hydrophobicity Profile and Gibbs Free Energy of Adhesion[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 190: 1—8.
- [22] RENNER L D, WEIBEL D B. Physicochemical Regulation of Biofilm Formation[J]. MRS Bull, 2011, 36(5): 347—355.
- [23] 郑赛男, 蒋丽, 李伟. 口腔细菌黏附机制的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2016, 43(2): 223—227.
- ZHENG Sai-nan, JIANG Li, LI Wei. Research Progress on Oral Bacterial Adhesion Mechanism[J]. International Journal of Oral Medicine, 2016, 43(2): 223—227.
- [24] 袁毅桦. 基于壳聚糖与海藻酸钠的改性聚合物的制备结构与性能研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- YUAN Yi-hua. Preparation, Structure and Properties of Modified Polymers Based on Chitosan and Sodium Alginate[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.
- [25] BANERJEE A, NAYAK D, LAHIRI S. A New Method of Synthesis of Iron Doped Calcium Alginate Beads and Determination of Iron Content by Radiometric Method[J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 33(3): 260—262.