口腔常见微生物的培养方法

Culture Method of Oral Common Microorganisms

张翼飞[1,#]，卢洪叶[2,#]，张倩[1]，陈智滨[2,*]，陈峰[1,*]

[1]中心实验室微生物平台，北京大学口腔医学院，北京；[2]牙周科，北京大学口腔医学院，北京

*通讯作者邮箱：chenfeng2011@hsc.pku.edu.cn; kqyehui21@bjmu.edu.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式：张翼飞，卢洪叶，张倩，陈智滨，陈峰. (2021). 口腔常见微生物的培养方法. *Bio-101* e2003516. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003516.

How to cite: Zhang, Y. F., Lu, H. Y., Zhang, Q., Chen, Z. B. and Chen, F. (2021). Culture Method of Oral Common Microorganisms. *Bio-101* e2003516. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003516. (in Chinese)

摘要：口腔微生物实验常见菌包括：链球菌属、乳酸杆菌属、白色念珠菌、牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、中间普雷沃菌以及伴放线聚集杆菌等。其基本培养条件分别是：口腔链球菌需在37℃含5%CO_2或厌氧条件下，静置培养在BHI培养基中；乳酸杆菌需在37℃含5%CO_2或厌氧条件下，静置培养于MRS培养基中；口腔白色念珠菌需37℃，150 r/min摇瓶培养于沙氏培养基或静置培养于沙堡弱培养基平皿；牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、中间普雷沃菌等牙周可疑致病菌需在37℃下，用BHI血肉汤培养基在80%N_2、10%H_2和10%CO_2混合气体下厌氧培养；伴放线聚集杆菌需在37℃含5~10% CO_2下，用BHI血肉汤培养基培养。

关键词：口腔链球菌属，口腔乳酸杆菌属，白色念珠菌，牙龈卟啉单胞菌，具核梭杆菌，中间普雷沃菌，伴放线聚集杆菌，培养条件

材料与试剂

1. 无菌脱纤维羊血（品牌：Solarbio；产地：中国；catalog number: TX0030）
2. 琼脂（品牌：Biotopped；产地：日本；catalog number: A6190）
3. 氯化血红素-维生素K1（品牌：PYG；产地：日本；catalog number: 21301）
4. 脑心浸液肉汤培养基（BHI）（品牌：Oxiod；产地：美国；catalog number: CM1135）
5. 脑心浸液琼脂培养基（品牌：AOBOX；产地：中国；catalog number: 02-349）
6. MRS肉汤培养基（品牌：Oxiod；产地：美国；catalog number: CM0359B）

7. MRS 琼脂培养基（品牌：Oxiod；产地：美国；catalog number: CM0359B）
8. 液体沙氏培养基（品牌：海博；产地：中国；catalog number: HB0379）
9. 沙氏琼脂培养基（品牌：海博；产地：中国；catalog number: HB0235）

仪器设备

1. 二氧化碳孵箱（品牌：Thermo Fisher Scientific；**产地：美国；**catalog number: ab12345）
2. 电热恒温培养箱（品牌：上海一恒；产地：中国；catalog number: DHP-9052）
3. 厌氧培养罐（品牌：尤德生物；产地：中国；catalog number: UT706）
4. 厌氧产气袋（品牌：梅里埃；产地：法国；catalog number: 45534）
5. 恒温摇床（品牌：RADOBIO；产地：中国；catalog number: Stab S2）
6. 立式压力蒸汽灭菌器（品牌：上海申安；产地：中国；catalog number: LDZX-30KBS）

实验步骤

一、培养方法

1. 口腔链球菌（*Streptococcus*），包括血链球菌（*Streptococcus sanguinis*）、变异链球菌（*Streptococcus mutans*）、唾液链球菌（*Streptococcus salivarius*）、酿脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）、轻型链球菌（*Streptococcus mitis*）等的培养。该方法已被广泛应用于多个研究并得到了有效验证（Fu, 2013; Zhu and Wang, 2017; Sun *et al.*, 2019；Ren *et al.*, 2014）。
   1.1 培养基的选择：选用脑心浸液肉汤（brain heart infusion, BHI）培养基和 BHI 琼脂培养基。
   1.2 菌株的活化与复壮：取 20 µl 冻存于甘油管中的保种液，接种于 1 ml 的 BHI 肉汤培养基中，于 5%二氧化碳孵箱（或厌氧培养罐）中，37℃下静置培养 24 h，活化菌株。将过夜培养的口腔链球菌采用三区划线的方式转接于 BHI 琼脂培养基上，37℃培养 48 h，以此连续活化 3 次。
   1.3 菌株扩大培养：从培养皿上挑取单菌落，接种到 1 ml 的 BHI 肉汤培养基中，放置到 5%二氧化碳孵箱中（或厌氧培养罐中），37℃下静置培养 12 h。
   1.4 菌种的保存：常采用冷冻保存法或液氮保存法（Zhou *et al.*, 2009）。

2. 口腔乳酸杆菌属（*Lactobacillus*），包括嗜酸乳酸杆菌（*Lactobacillus acidophilus*）、干酪乳酸杆菌（*Lactobacillus casei*）等的培养。

该方法已被广泛应用于多个研究并得到了有效验证（Wright and Klaenhammer, 1981；Zhang *et al.*, 2014）。

2.1 培养基的选择：通常选用 MRS 肉汤培养基（De Man, Rogosa and Sharpe Broth）和 MRS 琼脂培养基（Ratchapin *et al.*, 2016; Zinatizadeh *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2020）。

2.2 菌株的活化与复壮：取 20 µl 冻存于甘油管中的保种液，接种于 1 ml 的 MRS 肉汤培养基中，于 37 ℃条件下静置培养 24 h，活化菌株（Chen *et al.*, 2017; Yue *et al.*, 2020）。将过夜培养的乳酸杆菌采用三区划线的方式转接于 MRS 琼脂培养基上，37 ℃培养 48 h，以此连续活化 3 次。

2.3 菌株扩大培养：从培养皿上挑取单菌落，接种到 1 ml 的 MRS 肉汤培养基中，放置到 5%二氧化碳孵箱中（或厌氧培养罐中），37 ℃下培养 18 h。

2.4 菌种的保存：常用的有冷冻保存法或冷冻干燥法。

3. 常见牙周致病菌的培养

主要牙周致病菌包括：牙龈卟啉单胞菌（*Porphyromonas gingivalis*）、具核梭杆菌（*Fusobacteria nucleatum*）、中间普雷沃菌（*Prevotella intermedia*）以及伴放线聚集杆菌（*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*）等。该方法已被广泛应用于多个研究并得到了有效验证（Moslemi *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2009；Li *et al.*, 2019）。

3.1 培养基的选择：通常选用 BHI 血肉汤培养基和 BHI 血琼脂平板培养基（用于厌氧菌培养，最好新鲜配置，避免放置时间过长而渗入大量氧气）。

3.2 菌种复苏：从吸取 20 µl 保种液，接种到 BHI 血琼脂平板培养基上，放入厌氧培养袋中，并将袋置入 5%二氧化碳孵箱（厌氧袋法）；也可直接置于含有 80%N_2、10%H_2 和 10%CO_2 混合气体的厌氧培养罐中（厌氧培养罐法），37℃下培养 5-7 d。

3.3 菌株扩大培养：从培养皿上挑取 1-3 个单菌落，接种到 2 ml 的 BHI 血肉汤培养基中，放到厌氧产氧袋中，将袋置入 37 ℃的空气孵箱中，培养 48 h。

 DOI:10.21769/BioProtoc.2003516

3.4 菌种的保存：常用的有冷冻保存法或冷冻干燥法。

注：另外一个重要的牙周致病菌伴放线聚集杆菌（Aggregatibacter actinomycetemcomitans）是微需氧菌，生长需要 5~10%的二氧化碳条件下，其他操作步骤同上。

4. 口腔白色念珠菌（*Candida albicans*）的培养

该方法已被广泛应用于多个研究并得到了有效验证（Khan *et al*., 2013; Gamarra *et al*., 2015；Hu *et al*., 2019）。

4.1 培养基的选择：通常选用沙氏（Sabouraud）琼脂培养基和沙氏液体培养基。

4.2 菌种复苏：吸取 20 µl 甘油保种液，接种到沙氏琼脂培养板上，放置到 5%二氧化碳孵箱中，37℃下培养 48 h（Jacouton *et al*., 2017）。

4.3 菌株扩大培养：从培养皿上挑取单菌落，接种到 1 ml 的沙氏液体培养基中，37℃下 150 r/min 摇瓶培养 48 h（Yue *et al*., 2020）。

4.4 菌种的保存：常用的有冷冻保存法或冷冻干燥法。

二、 培养基的配制

注：培养基的配制及灭菌需要参考产品包装上的说明，不同品牌的同一产品配制比例及灭菌温度和时间可能不一样。

1. BHI 肉汤培养基：称取 3.7 g BHI 肉汤干粉，溶于 100 ml 蒸馏水中，121℃高压灭菌 15 min，待冷却至常温，备用。
2. BHI 血肉汤培养基：将 3.7 g BHI 肉汤干粉，溶于 100 ml 蒸馏水中。121℃高压灭菌 15 min，降至 50℃。以 1:10 和 1:100 的浓度加入无菌脱纤维羊血（冻融的羊血效果更佳）和氯化血红素-维生素 K，震荡混合均匀。冷却至常温，放入 4℃冰箱，避光保存，备用。
3. BHI 琼脂培养基：称取 5.2 g BHI 琼脂干粉，溶于 100 ml 蒸馏水中，121℃高压灭菌 15 min，待温度降至 50℃左右倒入无菌培养皿中，待凝固，备用。
4. BHI 血琼脂平板培养基：将 BHI 粉、琼脂粉与蒸馏水以 3.7 g：2 g：100 ml 的比例混合。121℃高压灭菌 15 min，降至 50℃。以 1:10 和 1:100 的浓度加入无菌脱纤维羊血（冻融的羊血效果更佳）和氯化血红素-维生素 K，震荡混合均匀。倾注于无

菌平板上，待其冷却凝固，放入 4℃冰箱，避光保存，备用。

5. MRS 肉汤培养基：称取 5.2 g MRS 肉汤干粉，溶于 100 ml 蒸馏水中，115℃高压灭菌 20 min，待冷却至常温，备用。
6. MRS 琼脂培养基：称取 6.62 g MRS 琼脂粉，溶于 100 ml 蒸馏水中，115℃高压灭菌 20 min，待温度降至 50℃左右倒入无菌培养皿中，待凝固，备用。
7. 沙氏液体培养基：称取 5 g 液体沙氏培养基干粉，溶于 100 ml 蒸馏水中，115℃高压灭菌 20 min，待冷却至常温，备用。
8. 沙氏固体培养基：称取 6.5 g 液体沙氏琼脂培养基干粉，溶于 100 ml 蒸馏水中，115℃高压灭菌 20 min，待温度降至 50℃左右倒入无菌培养皿中，待凝固，备用。

参考文献

1. Fu, H. (2017). Clinical study of oral *Candida Albicans* infection screening and diagnosis. *Chin J Med Guide* 000(004): 616-618. (in Chinese)
2. Ren, W., Chen, F., Zhang, Y., Zhang, Q., Wang, X., Liu, Y., Yuan, C., Ma, Q., Xu, T. and Zheng, S. (2014). Identification of *Streptococcus mutans* in carious patients' saliva samples by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Peking Univ Health Sci* 46(1): 25-29. (in Chinese)
3. Zhou, X. D., Xiao, L. Y. and Xiao, X. R. (2009). *Applied oral microbiology and technique.* People's Medical Publishing House Co., LTD. ISBN: 9787117112857. (in Chinese)
4. Zhu, L. F. and Wang, B. (2017). Platycodin D protects oral epithelial cells against infection of *Candida albicans*. *Chin J Pathophys* 33(1): 161-165. (in Chinese)
5. Chen, Z. Y., Hsieh, Y. M., Huang, C. C. and Tsai, C. C. (2017). Inhibitory effects of probiotic *Lactobacillus* on the growth of human colonic carcinoma cell line HT-29. *Molecules* 22(1): 107.
6. Gamarra, S., Mancilla, E., Dudiuk, C. and Garcia-Effron, G. (2015). *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* differentiation by colony morphotype in Sabouraud-triphenyltetrazolium agar. *Rev Iberoam Micol* 32(2): 126–128.
7. Hu, L., He, C., Zhao, C., Chen, X., Hua, H. and Yan, Z. (2019). Characterization of

oral candidiasis and the *Candida* species profile in patients with oral mucosal diseases. *Microb Pathog* 134: 103575.

8. Khan, M. A., Khan, S. M., Sarker, M., Hussain, R., Ahmed, M., Joarder, Y., and Hasan, M. (2013). Studies on microscopic technique and culture on Sabouraud's dextrose agar medium for diagnosis of dermatophytes infection. *KYAMC Journal,* 3(1): 235-238.
9. Jacouton, E., Chain, F., Sokol, H., Langella, P. and Bermúdez-Humarán, L. G. (2017). Probiotic strain *Lactobacillus casei* BL23 prevents colitis-associated colorectal cancer. *Front Immunol* 8: 1553.
10. Lin, S., Deng, D. M., Roffe, S. and Gibbs, S. (2020). Differential influence of *Streptococcus mitis* on host response to metals in reconstructed human skin and oral mucosa. *Contact Dermatitis* 83(5): 347-360.
11. Lu, W. X., Wu, Y. F., Xiao, L. Y., Li, M. Y., Guo, Q., Xiong, P., Jia, X. M., Xiao, X. R., Zhu, Z., Gong, Q. M. and Li, W. (2009). Preliminary study on the discrimination of putative periodontal pathogens with a metabonomics method. *West China Journal of Stomatology* 27(3): 310-312, 316.
12. Moslemi, N., Soleiman-zadeh Azar, P., Bahador, A., Rouzmeh, N., Chiniforush, N., Paknejad, M. and Fekrazad, R. (2015). Inactivation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* by two different modalities of photodynamic therapy using Toluidine blue O or Radachlorin as photosensitizers: an *in vitro* study. *Lasers Med Sci* 30(1): 89-94.
13. Ratchapin, L. S., Boworn, K. and Natthamet, W. (2016). Antimicrobial effect of topical local anesthetic spray on oral microflora. *J Dent Anesth Pain Med* 16(1): 17-24.
14. Sun, Y., Pan, Y. H., Sun,Y., Li, M. Y., Huang, S. B., Qiu, W., Tu, H. X. and Zhang, K. K. (2019). Effects of norspermidine on dual-species biofilms composed of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *Biomed Res Int* 3: 1950790.
15. Wright, C. T. and Klaenhammer, T. R. (1981). Calcium-Induced alteration of cellular morphology affecting the resistance of *Lactobacillus acidophilus* to freezing. *Appl Environ Microbiol* 41(3): 807-815.
16. Yue, Y. C., Xu, X. X., Yang, B. Y., Lu, J., Zhang, S. W., Liu, L., Nassar, K., Zhang, C., Zhang, M., Pang, X. Y. and Lv, J. P. (2020). Stable colonization of orally

administered *Lactobacillus casei* SY13 alters the gut microbiota. *Biomed Res Int* 3: 5281639.

17. Yue, Y., Ye, K., Lu, J., Wang, X., Zhang, S., Liu, L., Yang, B., Nassar, K., Xu, X., Pang, X. and Lv, J. P. (2020). Probiotic strain *Lactobacillus plantarum* YYC-3 prevents colon cancer in mice by regulating the tumour microenvironment. *Biomed Pharmacother* 127: 110159.
18. Zhang, Y., Liu, Y., Ma, Q., Song, Y., Zhang, Q., Wang, X. and Chen, F. (2014). Identification of *Lactobacillus* from the saliva of adult patients with caries using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 9: e106185.
19. Zinatizadeh, N., Khalili, F., Fallah, P., Geravand, M. and Yaslianifard, S. (2018). Potential preventive effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* in patients with polyps or colorectal cancer. *Arq Gastroenterol* 55(4): 407-411.