**口腔常见微生物培养条件**

标题要求准确、简洁且尽可能体现实验方案的专一性

英文标题要与中文标题要严格对应以方便被英文文献引用

张翼飞1, #，卢洪叶2, #，岳元春 3，王晓燕3，陈智滨2, \*，陈峰1, \*

1北京大学口腔医学院中心实验室微生物平台，北京；

2北京大学口腔医学院牙周科，北京；

3北京大学口腔医学院牙体牙髓科，北京；

\*通讯作者邮箱: [chenfeng2011@hsc.pku.edu.cn；kqyehui@bjmu.edu.cn](mailto:chenfeng2011@hsc.pku.edu.cn；kqyehui21@bjmu.edu.cn)。

#共同第一作者/同等贡献

**摘要**

介绍口腔常见菌的培养方法。

口腔常见菌包括：链球菌、乳酸杆菌、白色念珠菌、牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌以及中间普氏菌等。前三种菌属的培养方法分别是：口腔链球菌在37℃条件下，静置培养在BHI培养基中；口腔乳杆菌属于37℃厌氧条件下，静置培养于MRS培养基中；口腔白色念珠菌于37℃，150r/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。牙周可疑致病菌如牙龈卟啉单胞菌，必须用血培养基加特殊辅助因子厌氧培养。

**关键词:** 口腔链球菌，口腔乳杆菌，口腔念珠菌，牙龈卟啉单胞菌，具核梭杆菌，中间普氏菌，伴放线放线杆菌，培养条件

添加3-5个关键词，帮助读者快速检索到此文。

**材料与试剂**

脑心浸液肉汤培养基（BHI）（品牌：Oxiod；产地：美国；货号：CM1135）

脑心浸液琼脂培养基（品牌：AOBOX；产地：中国；货号：02-349）

MRS肉汤培养基（品牌：Oxiod；产地：美国；货号：CM0359B）

MRS琼脂培养基（品牌：Oxiod；产地：美国；货号：CM0359B）

液体沙氏培养基（品牌：海博；产地：中国；货号：HB0379）

沙氏琼脂培养基（品牌：海博；产地：中国；货号： HB0235）

琼脂（品牌：Biotopped；产地：日本；货号：A6190）

无菌脱纤维羊血（品牌：Solarbio；产地：中国；货号：TX0030）

氯化血红素-维生素K1（品牌：PYG；产地：日本；货号：21301）

**仪器设备**

二氧化碳孵箱（品牌：Thermo；产地：美国；型号：3111）；电热恒温培养箱（品牌：上海一恒；产地：中国；型号：DHP-9052）；厌氧培养罐（品牌：尤德生物；产地：中国；型号：UT706）；厌氧产气袋（品牌：梅里埃；产地：法国；型号：45534）；恒温摇床（品牌：RADOBIO；产地：中国；型号：Stab S2）；立式压力蒸汽灭菌器（品牌：上海申安；产地：中国；型号：LDZX-30KBS）。

**实验步骤**

1. **口腔细菌的培养**

**1、口腔链球菌（血链球菌、变异链球菌、唾液链球菌、化脓性链球菌、轻链球菌等）的培养**

（1）培养基的选择：选用脑心浸液肉汤（brain heart infusion，BHI broth）培养基和BHI琼脂培养基。

（2）菌株的活化与复壮：取20μL冻存于甘油管中的保种液，接种于1mL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24h，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48h，以此连续活化3次[2-4]。

（3）菌株扩大培养：从培养皿上挑取单菌落，接种到1mL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12h。

（4）菌种的保存：常采用冷冻保存法或液氮保存法 [1]。

**2、口腔乳酸杆菌（嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌等）的培养**

（1）培养基的选择：通常选用De Man, Rogosa, and Sharpe（MRS）琼脂培养基及MRS肉汤培养基[5-7]。

（2）菌株的活化与复壮：取20μL冻存于甘油管中的保种液，接种于1mL的MRS肉汤培养基中，于37℃条件下静置培养24h，活化菌株[8,9]。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48h，以此连续活化3次。

（3）菌株扩大培养：从培养皿上挑取单菌落，接种到1mL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18h。

（4）菌种的保存：常用的有冷冻保存法或冷冻干燥法[1]。

**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*）、中间普氏菌（*Prevotella intermedia*）以及伴放线聚集杆菌（*[Aggregatibacter Actinomycetemcomitans](https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/aggregatibacter-actinomycetemcomitans" \t "_blank)*）等，均为厌氧菌。

（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）。

（2）菌种复苏：从吸取20μL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（或厌氧培养罐中），37℃下培养5-7d。

（3）菌株扩大培养：从培养皿上挑取1-3个单菌落，接种到2mL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48h。

（4）菌种的保存：常用的有冷冻保存法。收集生长良好的琼脂表面菌落混悬于无菌保护剂（如甘油、脱脂纤维蛋白羊/兔血、加葡萄糖的血清、脱脂牛乳中，制成混悬液分装于无菌安瓿中，立即放入-20~-70℃低温冰箱中[1]。菌种保存的方法还有冷冻干燥法、甘油保存法等。

注：另外一个重要的牙周致病菌伴放线聚集杆菌（是微需氧菌，不需要厌氧产气袋，其他操作步骤同上。

1. **口腔白色念珠菌的培养**
2. 培养基的选择：通常选用沙氏（sabourand’s）琼脂培养基和沙氏液体培养基
3. 菌种复苏：吸取20μL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48h[10]。
4. 菌株扩大培养：从培养皿上挑取单菌落，接种到1mL的沙氏液体培养基中，37℃下150r/min摇瓶培养48h[11]。

**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3.7g BHI肉汤干粉，溶于100mL蒸馏水中，121℃高压灭菌15分钟，待冷却至常温，备用。

2、BHI血肉汤培养基：将3.7g BHI 肉汤干粉, 溶于100mL蒸馏水中。121℃高压灭菌15分钟，降至50℃。以1:10和1:100的浓度加入无菌脱纤维羊血和氯化血红素-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5.2g BHI琼脂干粉，溶于100mL蒸馏水中，121℃高压灭菌15分钟，待温度降至50度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3.7g：2g：100mL的比例混合。121℃高压灭菌15分钟，降至50℃。以1:10和1:100的浓度加入无菌脱纤维羊血和氯化血红素-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5.2g MRS肉汤干粉，溶于100mL蒸馏水中，115℃高压灭菌20分钟，待冷却至常温，备用。

6、MRS琼脂培养基：称取6.62g MRS琼脂粉，溶于100mL蒸馏水中，115℃高压灭菌20分钟，待温度降至50度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5g液体沙氏培养基干粉，溶于100mL蒸馏水中，115℃高压灭菌20分钟，待冷却至常温，备用。

8、沙氏固体培养基：称取6.5g液体沙氏琼脂培养基干粉，溶于100mL蒸馏水中，115℃高压灭菌20分钟，待温度降至50度左右倒入无菌培养皿中，待凝固，备用。

**致谢**

**参考文献**

[1] 周学东，肖丽英，肖晓蓉. (2009) 实用口腔微生物学与技术，人民卫生出版社

[2] Yan Sun, Yihuai Pan, Yu Sun, et al.(2019) Effects of norspermidine on dual-species biofilms composed of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*[J]*.* BioMed Research International.

[3] Lin Shang, Dongmei Deng, Sanne Roffe, et al.(2020) Differential influence of *Streptococcus mitis* on host response to metals in reconstructed human skin and oral mucosa[J]. Contact Dermatitis.

[4] Ratchapin L Srisatjaluk, Boworn Klongnoi, Natthamet Wongsirichat.(2016) Antimicrobial effect of topical local anesthetic spray on oral microflora[J]. Journal of Dental Anesthesia and Pain Medicine, 16(1): 17-24.

[5] Nazi Zinatizadeh, Farzad Khalili, Parviz Fallah, et al.(2018) Potential preventive effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* in patients with polyps or colorectal cancer[J]. Arquivos de Gastroenterologia, 55(4): 407-411.

[6] Zhungyuan Chen, Youmiin Hsieh, Chunchih Huang, Chengchih Tsai.(2017) Inhibitory effects of probiotic *Lactobacillus* on the growth of human colonic carcinoma cell line HT-29[J]. Molecules, 22(1).

[7] Yuanchun Yue, Xiaoxi Xu, Baoyu Yang, et al.(2020) Stable colonization of orally administered *Lactobacillus casei* SY13 alters the gut microbiota[J]. Biomed Research International.

[8] Elsa Jacouton, Luis G. Bermúdez-Humarán, Florian Chain, et al.(2017) Probiotic strain *Lactobacillus casei* Bl23 prevents colitis-associated colorectal cancer[J]. Frontiers in Immunology, 8(1553).

[9] Yuanchun Yue, Kai Ye, Jing Lu, et al. Probiotic strain *Lactobacillus plantarum* YYC-3 prevents colon cancer in mice by regulating the tumour microenvironment[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020(127).

[10] 付洪.(2013) 口腔白色念珠菌感染的检查和诊治的临床研究[J]. Chinese Journal of Medicinal Guide, 15(4): 616-618.

[11] 朱立芬, 王冰.(2017) 桔梗皂苷D防御口腔黏膜上皮细胞感染白色念珠菌的作用[J]. 中国病理生理杂志, 33(1): 161-165.

**投稿邮箱：**yuanzhen@bio-protocol.org

**投审稿过程中有任何问题，请与袁珍博士联系（**yuanzhen@bio-protocol.org**；电话：**010-62966488）

# 更多参考实例:

下面是其他领域正式发表实验手册中阅读量较高的文章，格式和内容供参考。

本项目示例文章正在紧张制作中，将进一步提高方法的可重复性和易用性，近期发布！

## 中文实验手册参考示例(实验类)：

1. 水稻白叶枯病菌及细菌性条斑病菌培养及接种(含视频) <https://bio-protocol.org/bio101/e1010180>
2. DNA甲基化检测(含视频) <https://bio-protocol.org/bio101/e1010110>
3. 外源蛋白在烟草叶片瞬时表达 <https://bio-protocol.org/bio101/e1010127>
4. 水稻重要发育时期表型观察<https://bio-protocol.org/bio101/e1010178>
5. PCR扩增及克隆基因<https://bio-protocol.org/bio101/e1010202>
6. Gateway系统构建双元表达载体 <https://bio-protocol.org/bio101/e1010201>
7. 实验用果蝇的饲养及管理 <https://bio-protocol.org/bio101/e1010250>
8. 人外周血免疫细胞亚群25色流式全景分析<https://bio-protocol.org/bio101/e1010325>
9. 常用细胞周期流式检测方法<https://bio-protocol.org/bio101/e1010328>

## 中文实验手册参考示例(分析类)：

1. miRNA-seq数据分析<https://bio-protocol.org/bio101/e1010249>
2. mRNA-seq分析 <https://bio-protocol.org/bio101/e1010251>

已经完成的实验手册 (水稻、柑橘、果蝇、流式细胞术)，更多文章详见：

<https://bio-protocol.org/bio101/Special_Issues.aspx>

## Bio-protocol(英文版)稿件参考实例：

优秀中文方法稿件(原方法已发表于高水平杂志)，可推荐英文版投稿Bio-protocol （Pubmed和ESCI收录）。

1. Quantification of the Composition Dynamics of a Maize Root-associated Simplified Bacterial Community and Evaluation of Its Biological Control Effect(玉米根系相关简化细菌群落组成动力学定量及其生物防治效果评价) <https://bio-protocol.org/e2885>
2. Extraction and 16S rRNA Sequence Analysis of Microbiomes Associated with Rice Roots(模式生物小鼠口腔微生物组鉴定) <https://bio-protocol.org/e2884>
3. Oral Microbiome Characterization in Murine Models(水稻根系相关微生物群落的分离及其16S rRNA序列分析) <https://bio-protocol.org/e2655>
4. Human, Bacterial and Fungal Amplicon Collection and Processing for Sequencing(人、细菌和真菌扩增子的采集、处理并测序)
5. Single-step Precision Genome Editing in Yeast Using CRISPR-Cas9 <https://bio-protocol.org/e2765>
6. Adapting the Smart-seq2 Protocol for Robust Single Worm RNA-seq <https://bio-protocol.org/e2729>