

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

*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

摘要: 口腔微生物实验常见菌株包括: 链球菌、乳酸杆菌、白色念珠菌、牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、中间普氏菌以及伴放线聚集杆菌等。前三种菌属的培养方法分别是: 口腔链球菌在 37 °C 条件下, 静置培养在 BHI 培养基中; 口腔乳杆菌属于 37 °C 厌氧条件下, 静置培养于 MRS 培养基中; 口腔白色念珠菌于 37 °C, 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。牙周可疑致病菌包括牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、中间普氏菌以, 必须用血培养基加特殊辅助因子厌氧培养。而伴放线聚集杆菌是微需氧菌, 不需要厌氧培养。

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

材料与试剂

1. 脑心浸液肉汤培养基 (BHI) (品牌: Oxiod; 产地: 美国; catalog number: CM1135)
2. 脑心浸液琼脂培养基 (品牌: AOBOX; 产地: 中国; catalog number: 02-349)
3. MRS 肉汤培养基 (品牌: Oxiod; 产地: 美国; catalog number: CM0359B)
4. MRS 琼脂培养基 (品牌: Oxiod; 产地: 美国; catalog number: CM0359B)
5. 液体沙氏培养基 (品牌: 海博; 产地: 中国; catalog number: HB0379)
6. 沙氏琼脂培养基 (品牌: 海博; 产地: 中国; catalog number: HB0235)
7. 琼脂 (品牌: Biotopped; 产地: 日本; catalog number: A6190)
8. 无菌脱纤维羊血 (品牌: Solarbio; 产地: 中国; catalog number: TX0030)
9. 氯化血红素-维生素 K1 (品牌: PYG; 产地: 日本; catalog number: 21301)

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、口腔细菌的培养

1. 口腔链球菌 (*Streptococcus*), 包括血链球菌 (*Streptococcus sanguis*)、变异链球菌 (*Streptococcus mutans*)、唾液链球菌 (*Streptococcus salivarius*)、化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、轻链球菌 (*Streptococcus mitior*) 等的培养

该方法已被广泛应用于多个研究(付洪, 2013; 朱立芬&王冰, 2017; Sun *et al.*, 2019), 也在我们实验室得到了验证(任雯等, 2014)。

- 1.1 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。

- 1.2 菌株的活化与复壮: 取 20 μ l 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 °C 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 °C 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 °C 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 (周学东等, 2009) 。

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

该方法已被广泛应用于多个研究(Wright and Klaenhammer, 1981)，也在我们实验室得到了验证(Zhang *et al.*, 2014)。

2.1 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 (Ratchapin *et al.*, 2016; Zinatizadeh *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2020)。

2.2 菌株的活化与复壮：取 20 μ l 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 °C 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 °C 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 °C 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 (周学东等, 2009)。

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*) 等。该方法已被广泛应用于多个研究(Moslemi *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2009)，也在我们实验室得到了验证(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 μ l 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 °C 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 °C 的空气孵箱中，培养 48 h。

3.4 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 °C 低温冰箱中 (周学东等, 2009)。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。

二、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(Khan *et al.*, 2013; Gamarra *et al.*, 2015)，也在我们实验室得到了验证(Hu *et al.*, 2019)。

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。
2. 菌种复苏：吸取 20 μ l 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 $^{\circ}$ C 下培养 48 h (Jacouton *et al.*, 2017) 。
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 $^{\circ}$ C 下 150 r/min 摇瓶培养 48 h (Yue *et al.*, 2020) 。

三、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 $^{\circ}$ C 高压灭菌 15 分钟，待冷却至常温，备用。
2. BHI 血肉汤培养基：将 3.7 g BHI 肉汤干粉，溶于 100 ml 蒸馏水中。121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 15 分钟，降至 50 $^{\circ}$ C。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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 3.7 g: 2 g: 100 ml 的比例混合。121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 15 分钟，降至 50 $^{\circ}$ C。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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 分钟，待冷却至常温，备用。
6. MRS 琼脂培养基：称取 6.62 g MRS 琼脂粉，溶于 100 ml 蒸馏水中，115 $^{\circ}$ C 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 5 g 液体沙氏培养基干粉，溶于 100 ml 蒸馏水中，115 °C 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 6.5 g 液体沙氏琼脂培养基干粉，溶于 100 ml 蒸馏水中，115 °C 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。

参考文献

1. 付洪. 口腔白色念珠菌感染的检查和诊治的临床研究[J]. *中国医药导刊*, 2013, 000(004):616-616,618.
2. 任雯, 陈峰, 张翼飞, 张倩, 王晓燕, 刘颖熠, 袁重阳, 马庆伟, 徐韬, 郑树国. (2014) MALDI-TOF 质谱技术鉴定龋病患者唾液中的变异链球菌[J]. *北京大学学报(医学版)*, 46: 25-29.
3. 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
4. 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.
5. Chen, Z. Y., Hsieh, Y. M., Huang, C. C., Tsai, C. C. (2017) Inhibitory effects of probiotic Lactobacillus on the growth of human colonic carcinoma cell line HT-29[J]. *Molecules*, 22(1).
6. Gamarra, Soledad, Estefanía Mancilla, Catiana Dudiuk, and Guillermo Garcia-Effron. (2015) Candida Dubliniensis and Candida Albicans Differentiation by Colony Morphotype in Sabouraud-Triphenyltetrazolium Agar. *Revista Iberoamericana De Micologia*, 32 (2): 126–28.
7. Hu, L., He, C., Zhao, C., Chen, X., Hua, H. & Yan, Z. (2019) Characterization of oral candidiasis and the Candida species profile in patients with oral mucosal diseases[J]. *Microbial Pathogenesis*, 134, 103575.
8. Khan, Abul Abul Hossain, S M Atique Hasan Khan, Mahbub Rashid Sarker, Rubiyat Farzana Hussain, Mejbah Uddin Ahmed, Yasmin Joarder, and Bulbul Hasan. (2013) Studies on Microscopic Technique and Culture on Sabouraud's Dextrose Agar Medium for Diagnosis of Dermatophytes Infection[J]. *KYAMC Journal*, 3 (1): 235–38.

9. Jacouton, E., Chain, F., Sokol, H., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L. G.(2017) Probiotic strain Lactobacillus casei BI23 prevents colitis-associated colorectal cancer[J]. *Frontiers in Immunology*, 8(1553).
10. Lin, S., Deng, D. M., Roffe, S., Gibbs, S.(2020) Differential influence of Streptococcus mitis on host response to metals in reconstructed human skin and oral mucosa[J]. *Contact Dermatitis*.
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. & Li, W. (2009) Preliminary study on the discrimination of putative periodontal pathogens with a metabonomics method[J]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 27, 310-312, 316.
12. Moslemi N, Soleiman-Zadeh Azar P, Bahador A, Rouzmeh N, Chiniforush N, Paknejad M, 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., Natthamet, W.(2016) Antimicrobial effect of topical local anesthetic spray on oral microflora[J]. *Journal of Dental Anesthesia and Pain Medicine*, 16(1): 17-24.
14. Sun,Y., Pan, Y. H., Sun,Y., Li, M. Y., Huang, S. B., Qiu, W., Tu, H. X., Zhang, K. K.(2019) Effects of norspermidine on dual-species biofilms composed of Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis[J].*BioMed Research International*.
15. Wright, C. T. & Klaenhammer, T. R. (1981) Calcium-Induced Alteration of Cellular Morphology Affecting the Resistance of Lactobacillus acidophilus to Freezing. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 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. et al.(2020) Stable colonization of orally administered Lactobacillus casei SY13 alters the gut microbiota[J]. *Biomed Research International*.
17. Yue, Y., Ye, K., Lu, J., Wang, X., Zhang, S., Liu, L., Yang, B., Nassar, K., Xu, X., Pang, X. et al. Probiotic strain Lactobacillus plantarum YYC-3 prevents colon cancer in mice by regulating the tumour microenvironment[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020(127).
18. Zhang, Y., Liu, Y., Ma, Q., Song, Y., Zhang, Q., Wang, X. & Chen, F. (2014)

- 181 Identification of Lactobacillus from the saliva of adult patients with caries using
182 matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J].
183 *PLoS One*, 9, e106185.
- 184 19. Zinatizadeh, N., Khalili, F., Fallah, P., Geravand, M., Yaslianifard, S.(2018)
185 Potential preventive effect of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus
186 plantarum in patients with polyps or colorectal cancer[J]. *Arquivos de*
187 *Gastroenterologia*, 55(4): 407-411.