

## 口腔静态生物膜模型研究进展

赵化冰<sup>1,2,3,4</sup>, 史婷婷<sup>1,2,3</sup>, 李凤珠<sup>1,2,3</sup>, 王睿<sup>1,2,3</sup>, 路福平<sup>1,2,3</sup>, 黄正梅<sup>4</sup>

- 1 天津科技大学 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457
- 2 天津科技大学 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457
- 3 天津科技大学 生物工程学院 工业酶国家工程实验室, 天津 300457
- 4 天科本真 (天津) 生物技术有限公司 天科本真人微生态研究院, 天津 300457

赵化冰, 史婷婷, 李凤珠, 王睿, 路福平, 黄正梅. 口腔静态生物膜模型研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3267-3278.  
ZHAO HB, SHI TT, LI FZ, WANG R, LU FP, HUANG ZM. Advance of *in vitro* oral static biofilm model. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3267-3278.

**摘 要:** 口腔静态生物膜模型是体外模拟口腔微生态环境的重要手段, 因其成本低、通量高、可靠性好、操作容易等优点, 已成为研究各种口腔疾病的发病机制, 测试各种药物、口腔护理用品、食品的重要工具。建立口腔静态生物膜模型, 可根据研究目的, 选择不同的装置、接种源、培养基、基质和培养条件, 并通过测定生物量、代谢活性、群落结构以及进行可视化分析等多种方法评价生物膜的生长情况。本文汇总了近年来报道的口腔静态生物膜模型建立和评价的方法学要素, 并分析讨论了各种方法的适用范围, 希望有助于相关领域研究和生产实践的开展。

**关键词:** 口腔; 生物膜; 静态模型; 阿姆斯特丹主动附着模型; 卡尔加里装置; 微观世界模型; 多物种模型

## Advance of *in vitro* oral static biofilm model

ZHAO Huabing<sup>1,2,3,4</sup>, SHI Tingting<sup>1,2,3</sup>, LI Fengzhu<sup>1,2,3</sup>, WANG Rui<sup>1,2,3</sup>, LU Fuping<sup>1,2,3</sup>, HUANG Zhengmei<sup>4</sup>

1 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

3 National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

4 Tianke & Benzhen Human microecology Research Institute, Tianke & Benzhen (Tianjin) Biotechnology Company Limited, Tianjin 300457, China

**Abstract:** Oral static biofilm model is an important tool for *in vitro* simulation of oral microecological environment, which has become an important method for studying the pathogenesis of various oral diseases and testing the efficacy of various drugs, oral care products and foods due to its low cost, high throughput, good reliability and easy operation. The establishment of oral static biofilm models allows the selection of different devices, inoculum sources, media, substrates and culture conditions according to the purpose of the study, and the evaluation of biofilm growth by various methods such as measuring biomass, metabolic activity, community structure and performing visualization analysis. This paper summarizes the methodological elements reported in recent years for the establishment and evaluation of oral static biofilm models, and analyzes and discusses the applicability of various methods in the hope of contributing to the research and production practice in related fields.

**Keywords:** oral; biofilm; static model; Amsterdam active attachment model; Calgary biofilm device; microcosms models; multispecies biofilm models

口腔微生物群具有高度多样性, 已鉴定出大约 700 多种细菌和 100 多种真菌<sup>[1-3]</sup>, 这些微生物大多数以生物膜的形式存在<sup>[4-5]</sup>。“生物膜”一词最初由 Costerton 在 1978 年开始使用, 指“附着在表面上的微生物细胞及细胞外基质所组成的功能性联合体”<sup>[6]</sup>。生物膜可以定殖在各种口腔生态位, 包括牙釉质、牙本质、牙骨质、牙龈、龋损、口腔黏膜、牙齿种植体和义齿等<sup>[4,7]</sup>。不同口腔生态位的生物膜组成和结构是不同的, 它们的生长受各种因素的影响, 例如 pH 值、可获得的营养物、是否存在抗菌剂以及宿主的防御等<sup>[8]</sup>。健康和疾病状态的口腔生物膜也存在差异, 健康口腔生物膜的结构平衡且稳

定, 一旦稳态被打破, 微生物组成会转向生物失调, 继而形成各种局部感染, 例如龋齿、牙龈炎、牙周炎和口腔念珠菌病等<sup>[5,9]</sup>。

研究生物膜的结构、动态发育、代谢过程及其与疾病的关系已成为口腔微生态研究的关键科学问题和前沿。各种体外口腔生物膜模型相继被开发出来, 旨在模拟口腔环境, 研究微生物相关口腔疾病的病因机制或各种活性物质和抗菌剂等对口腔微生态的影响。体外生物膜模型分为动态生物膜模型和静态生物膜模型。常见的动态模型包括恒化器、流动室/细胞、恒深膜发酵器和多重人工口腔等<sup>[10-13]</sup>。动态模型是一个连续培养系统, 在补充新鲜培养基的同

时去除代谢物和废液,可以提供类似口腔环境的唾液流体剪切力<sup>[8]</sup>。然而,动态模型设备复杂、昂贵,通量有限,在一定程度上限制了其广泛应用。尽管如此,动态模型能够比较真实地模拟口腔环境,有其不可替代的优势,是口腔生物膜模型发展的重要方向之一。

静态生物膜模型出现于 20 世纪 90 年代,由于其通量高、成本低、操作简单,成为近十年口腔微生态研究的核心技术平台,广泛应用于生物膜物种间的相互作用<sup>[14-15]</sup>、动态发育和代谢研究<sup>[16-17]</sup>、抗菌测定<sup>[18-19]</sup>和治疗方式评价<sup>[20-21]</sup>等领域。文中结合研究案例的回顾,比较了体外口腔静态生物膜模型建立的几个要点,包括培养装置、接种物来源、生长基质、培养基和培养条件,并总结了对生物膜进行评价的多维度方法(附表 1,详见《生物工程学报》网络版附件)。希望通过这些信息的汇总和分析,助力研究者进行模型选择和实验设计。

## 1 口腔静态生物膜模型的建立

### 1.1 装置

静态模型装置包括琼脂平板、微量滴定板和主动附着装置。琼脂平板主要用于模拟软组织感染或生长在细胞外基质中的生物膜。微量滴定板通常是 24 孔板或 96 孔板,生物膜生长在滴定板孔底或孔底放置的基质上,培养基中杂质沉淀容易干扰生物膜。

在微量滴定板的基础上形成了主动附着模型,在这类装置中,生物膜主动附着于悬吊在滴定板盖上的基质上,避免了培养基中杂质沉淀的干扰,同时降低了更换培养基的操作难度,生物膜的收获也更加方便。应用较多的主动附着装置是卡尔加里装置(calgary biofilm device, CBD)和阿姆斯特丹模型(amsterdam active attachment model, AAA model)(图 1)。CBD 由

Ceri 等<sup>[22]</sup>在 1999 年首次报道,它由一个带 96 个钉状物的塑料盖和相应的 96 孔板底座组成,细菌通过主动黏附到钉状物上形成生物膜。CBD 已经商品化,钉状物材质为聚苯乙烯或羟基磷灰石。AAA model 由 Exterkate 等<sup>[19]</sup>在 2010 年首次报道,它由一个悬吊 24 个夹子的不锈钢盖子和标准的 24 孔板组成,这些夹子可以固定不同的基质圆盘,实验设计具有灵活性。细菌主动附着在基质圆盘上形成生物膜,通过转移不锈钢盖子可以方便地更换培养基<sup>[19]</sup>。

在静态模型装置中,生物膜的生长会受到培养基中营养物质消耗和代谢产物积累的影响,虽然能够通过摇床振荡提供一定的流体剪切力,但与真实口腔环境仍存在差异。因此,静态模型模拟真实口腔的能力逊于动态模型<sup>[23-25]</sup>。尽管如此,由于静态模型装置具有容易获得,操作方便,通量高,不易污染,重复性好等优点,还是成为了目前研究者的主流选择。Cavalcanti 等在 24 孔板中建立了种植体周围炎多物种模型,用于研究冷等离子体氮化钛表面多物种生物膜的形成<sup>[26]</sup>; Miranda 等利用 CBD 研究了巴西红蜂胶提取物对多物种生物膜的抑菌作用<sup>[27]</sup>; Fernandez 等利用 AAA model 评价了不同漱口水对体外口腔生物膜细菌组成和代谢的影响<sup>[16]</sup>。

### 1.2 接种源

根据接种物的来源,生物膜模型可分成两类:一类是由明确的一种或多种菌株形成的单一培养物或多物种模型(multispecies biofilm models);另一类是由天然牙菌斑、唾液或舌部样本接种形成的微观世界模型(microcosms models)。

单一培养物模型常用于测试特定菌株的生理特点和对不同干预条件的反应,其中变异链球菌(*Streptococcus mutans*)表征的龋齿模型应用最为广泛<sup>[28-30]</sup>。然而,在真实的口腔环境中,生物膜通常不是特定菌株作用的结果,而

是不同微生物相互协作、竞争和代谢所形成的,因此,多物种模型比单一物种更具有优势<sup>[23]</sup>。多物种模型包含确定的可培养菌株,数量从两株<sup>[31-32]</sup>到几十株<sup>[27,33-34]</sup>不等。根据研究目的可以选择不同的菌种组合,以代表健康口腔<sup>[18]</sup>、龋齿<sup>[35-36]</sup>、牙周炎<sup>[37-38]</sup>或种植体周围炎<sup>[39-40]</sup>等多个生态系统<sup>[41]</sup>。需要提示的是,菌株的选择应特别考虑口腔群落中的共生和拮抗关系<sup>[42]</sup>。

微观世界模型是“来源于天然生态系统,并由此进化得到的一个实验室子集”。微观世界生物膜的细菌组成、pH 值变化、生化特性以及复杂性方面与天然的生物膜相似<sup>[24]</sup>,它比多物种模型更能代表真实口腔中的物种多样性和比例,而且菌株之间可以更好地适应彼此<sup>[41]</sup>。Edlund 等<sup>[43]</sup>以混合的唾液为接种物,建立了一个稳定、丰富的微观世界模型,该模型包含了 100 多个分类单元 (operational taxonomic units, OTU),已占到原始接种物 OTU 丰度的 60%–80%。但是,由于供体差异及不同口腔生态位的差异,不同来源的接种物微生物组成明显不同,最终会影响生物膜的结构和特性,因此,天然来源的生物膜通常缺乏一致性和重复性<sup>[44]</sup>。而且,体外微观世界模型只能培养类型有限的细菌,挑剔的厌氧菌种可能会丢失<sup>[44]</sup>。

### 1.3 培养基

培养基是影响生物膜生长、稳定性、厚度和组成的关键因素<sup>[45]</sup>,可分为 3 类:半合成培养基、人工唾液培养基和天然无菌唾液。

通常半合成培养基由蛋白胨、胰蛋白胨、碳源、酵母提取物和酪蛋白等简单成分组成,所提供的营养成分有限<sup>[23]</sup>。这类培养基包括胰蛋白胨大豆肉汤 (tryptic-soy broth, TSB)<sup>[46-48]</sup>、胰蛋白胨酵母提取物肉汤 (tryptone-yeast extract broth, TYE)<sup>[30,34]</sup>、超滤胰蛋白胨-酵母提取物肉汤 (ultrafiltered tryptone-yeast extract broth,

UFTYE)<sup>[49]</sup>、Todd Hewitt 肉汤 (Todd-Hewitt broth, THB)<sup>[50]</sup>、脑心浸液 (brain-heart infusion, BHI)<sup>[31,51-52]</sup>,补充了 5%蔗糖的脑心浸液 (BHI+5% sucrose, BHIS)<sup>[35]</sup>等。其中, BHI 培养基应用最广泛,适用于培养单一物种或多物种模型。Pandit 等利用 BHI 培养基培养变异链球菌生物膜<sup>[30]</sup>; De Oliverira 等<sup>[28]</sup>利用 BHI 培养基培养由变异链球菌和内氏放线菌 (*Actinomyces naeslundii*) 组成的双物种生物膜。当培养微观世界模型时,为了支持挑剔细菌的生长,培养基常会加入黏蛋白、氯化血红素、甲萘醌等营养因子。由 Marsh 等<sup>[53]</sup>在 2010 年开发的 SHI 培养基是这类培养基的代表,所含的猪胃黏蛋白与人唾液黏蛋白的寡糖结构相似性很高,5%羊血能够促进专性厌氧细菌的生长, N-乙酰胞壁酸能促进福赛坦氏菌 (*Tannerella forsythia*) 的生长,氯化血红素有助于牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 的生长<sup>[19]</sup>。

人工唾液培养基含有蛋白质、电解质、氨基酸、各种离子以及在半合成培养基中没有的低分子量化合物,可支持口腔中具有特定营养需求微生物的生长<sup>[23]</sup>。常见的人工唾液培养基包括富含黏蛋白的基础培养基 (basal medium mucin, BMM)、化学成分确定并富含黏蛋白的培养基 (defined medium mucin, DMM) 和 McBain 人工唾液培养基。生物膜的形成需要首先在牙齿上形成唾液蛋白获得性膜,之后口腔细菌逐渐黏附。人工唾液培养基可以模仿这个过程<sup>[25]</sup>,因此,人工唾液培养基适用于培养接种物复杂的生物膜,例如微观世界模型和复杂的多物种模型。Cieplik 等<sup>[54]</sup>利用人工唾液培养基培养了来自唾液、龈下菌斑、扁桃体和舌部样本的生物膜。

然而,所有人工唾液的成分都比天然的唾液简单。天然唾液中特有的各种蛋白质,例如组胺等在细菌的黏附机制中发挥重要作用<sup>[55-56]</sup>。培

养微观世界生物膜时,为了尽可能复制体内的营养环境,有些研究者利用天然灭菌的唾液作为培养基<sup>[17,57]</sup>。天然唾液的弊端也是显而易见的。首先,供体间存在个体差异,导致批次间重复性差;其次,很难采集到足够实验需要的大量唾液<sup>[23]</sup>。鉴于此,也有些研究人员使用一定比例的唾液和半合成培养基的混合物作为生物膜的培养基<sup>[36,58]</sup>。

#### 1.4 基质

生物膜基质可以是生物或非生物来源的<sup>[41]</sup>。生物材料包括牙釉质、牙本质等;非生物材料一般是惰性材料,包括羟基磷灰石、玻璃、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸酯、锆和钛盘等。

牙釉质和牙本质来源于人类或牛的牙齿<sup>[59-65]</sup>,牛牙釉质常用作人牙釉质的替代品,但是因其具有相对较大的孔隙和较快的脱矿速度,在解释实验结果时需要考虑到这一点<sup>[66]</sup>。羟基磷灰石、玻璃和钛材料都是应用广泛的基质。其中,羟基磷灰石作为牙釉质的主要成分被使用最多;玻璃圆盘易于通过光学仪器(例如显微镜)来观察生物膜,与羟基磷灰石相比,它不容易发生脱矿,能够始终保持完整<sup>[67]</sup>。聚苯乙烯微量滴定板既可以是培养装置,也能作为生物膜附着的基质,体现了一定的便捷性。

基质的选择需要根据研究目的慎重考量。牙本质基质常用于研究感染性牙髓疾病<sup>[68]</sup>,牙釉质基质常用于研究龋齿生物膜<sup>[69-70]</sup>,钛基质常用于研究种植体周围炎模型<sup>[26,40,71-72]</sup>,聚甲基丙烯酸甲酯(poly methyl methacrylate, PMMA)基质则用于研究白色念珠菌病<sup>[73]</sup>和义齿口炎模型<sup>[20]</sup>。例如,Fernández等<sup>[29]</sup>使用牙釉质建立了龋齿模型, Montelongo-Jauregui等<sup>[39]</sup>在钛圆盘上建立了与种植体周围炎相关的双物种模型, Shrry等<sup>[20]</sup>利用PMMA圆盘建立了义齿生物膜。

基质的表面特性会影响细菌细胞的黏附、

生物膜的生物量和代谢活性,这是由于细菌与不同基质的结合能力不同,基质脱矿(尤其是牙本质基质)也会造成细菌黏附力改变<sup>[74]</sup>。例如,相比牛牙釉质,三氯生能更有效地抑制羟基磷灰石表面生物膜的形成<sup>[75]</sup>;当暴露于蔗糖脉冲时,生长在牙本质上的*S. mutans*生物膜比生长在聚丙烯酸酯上的生物膜pH值下降得更多<sup>[76]</sup>。但也有报道认为不同的基质不会影响生物膜的组成,Li等<sup>[67]</sup>证明在羟基磷灰石和玻璃上生长的生物膜的微生物群落结构相似。

#### 1.5 培养条件

口腔生物膜的形成主要包括3个步骤:(1)获得性薄膜的形成;(2)主要定殖者的黏附;(3)中期和晚期定殖者的粘附及相互作用。其中,获得性薄膜的形成在口腔生物膜形成中起关键作用<sup>[77]</sup>。为此,在培养过程中可以将基质与无细胞唾液一起预先培养,预处理的时间从30 min到2 h不等,以复制体内的唾液膜,为细菌的生长提供结合位点<sup>[78]</sup>。为了得到可重复的生物膜模型,唾液采集必须标准化,保证所有的实验使用统一的唾液进行<sup>[26]</sup>。

单一物种模型在最适条件下生长,例如*S. mutans*生物膜在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下,BHI或UFTYE培养基中生长<sup>[29,49]</sup>。多物种模型的培养是分步的。首先,将单个细菌或真菌菌株在最合适的条件下生长,真菌(如白色念珠菌(*Candida albicans*))可以在25℃、35℃或37℃的有氧条件下预培养,细菌通常在5%CO<sub>2</sub>或厌氧条件下预培养,其次,当单个菌株生长到指数期时,将各物种混合,继续培养24-96 h,甚至7 d以形成生物膜<sup>[20,33,49,79]</sup>。单个菌株在最终混合物中的比例必须根据菌株、基质和培养条件仔细确定,以防止任何一个菌种过度生长。微观世界生物膜的培养条件与口腔环境接近,通常在37℃、厌氧条件下培养,基于此最终获

得的生物膜物种组成主要以厌氧菌，例如韦荣球菌属 (*Veillonella*)、普氏菌属 (*Prevotella*) 和梭杆菌属 (*Fusobacterium*) 为主<sup>[16,18,71]</sup>，但是真实的口腔中还有兼性厌氧菌和好氧菌，因此也有研究采用好氧、微需氧 (5% CO<sub>2</sub>) 或好氧转厌氧条件进行培养<sup>[17]</sup>。

生物膜的培养时间差异很大。相较于 AAA

model，使用 CBD 一般培养时间较长<sup>[33,57,79-80]</sup>，这可能是由于 CBD 钉状物上收获的生物膜相对较少；源于龈下菌斑的生物膜一般培养时间较长<sup>[81]</sup>，这可能是因为厌氧菌的培养较为困难；用于机制研究的生物膜一般培养时间较长，这可能是为了更加深入地观察，而用于测试的生物膜培养时间较短<sup>[27,37,46]</sup>。

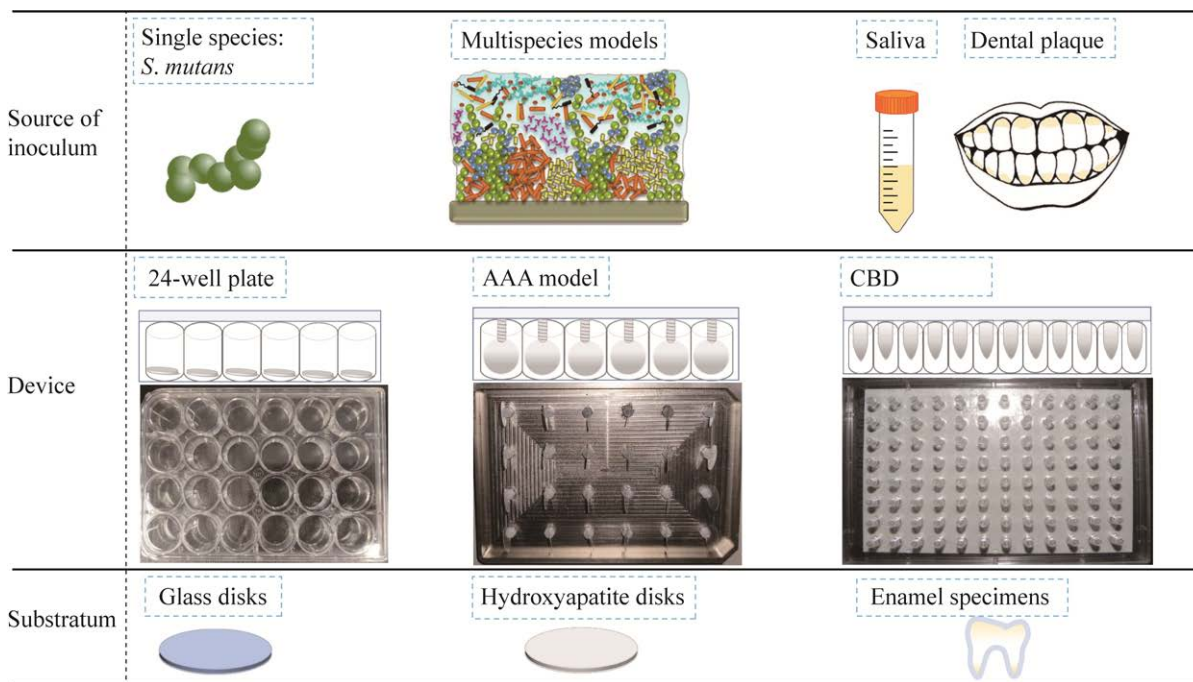


图 1 口腔静态生物膜模型的建立要素<sup>[82]</sup>

Figure 1 Essentials of establishing a static oral biofilm model. Multispecies model diagrams are from references<sup>[82]</sup>.

## 2 口腔静态生物膜模型的评价

由于研究目的、装置、接种源、培养条件等各种因素的不同，体外生物膜的培养终点及应达到的生物量、代谢活性、物种丰度和结构没有统一的标准，这就为我们提出了问题，如何评价生物膜的生长达到了研究需求，如何评价各种测试条件对生物膜的影响。为此，我们汇总了各种生物膜检测方法，并分析了其可提供给研究者的信息及适用范围。

### 2.1 生物量和物种丰度测定

#### 2.1.1 CFU 计数

菌落形成单位 (colony forming unit, CFU) 计数是指将生物膜通过机械刮擦<sup>[83-85]</sup>、涡旋振荡、超声波<sup>[37,46,71,79]</sup>等方式收获后，均匀分散在缓冲液中并涂布琼脂平板进行计数，培养基需添加营养因子以支持多种细菌的生长 (参见 1.3)。CFU 计数可以用来评估生物膜内的活细菌数<sup>[20,26,31]</sup>，然而，受培养条件的限制，总有些物种无法培养<sup>[25]</sup>，因此会低估一些重要菌种的数量<sup>[44]</sup>。

### 2.1.2 结晶紫染色

生物膜经过结晶紫染色,乙醇脱色,脱色液梯度稀释后,利用分光光度计或酶标仪测量  $OD_{595}$  值,  $OD_{595}$  值与生物膜的生物量在一定范围内呈正相关。结晶紫染色法操作简便,对实验人员和硬件条件要求不高,然而这种方法不能区分活死微生物,而且结晶紫可使细胞和胞外多糖都着色,因此其反映的生物量偏高<sup>[82]</sup>。

### 2.1.3 定量 PCR

许多研究利用定量 PCR (quantitative PCR, qPCR) 确定生物膜内细菌的数量。然而,普通 qPCR 不能区分生物膜中的活细胞和死细胞,且生物膜基质中存在的细胞外 DNA 也会被定量。因此,可以在 qPCR 前用单叠氮化丙锭 (propidium monoazide, PMA) 处理生物膜<sup>[86-87]</sup>。PMA 是一种 DNA 嵌入染料,暴露于卤素光源后会与死亡细胞或膜受损细胞的 DNA 结合形成共价键,阻止随后的 PCR 扩增,因此只能检测到活的细胞<sup>[20]</sup>。Chatzigiannidou 等<sup>[18]</sup>用 PMA 染料处理生物膜后提取 DNA, qPCR 定量检测了多物种模型中的 14 种菌,通过这个方法确定洗必泰对生物膜物种组成的影响。

### 2.1.4 ATP 生物发光法

利用 ATP 试剂中荧光素-荧光素酶等组分与被测样本反应,用荧光检测仪来检测发光值,由于被测样本所含细菌等微生物的数量与所含的 ATP 值之间存在一定的函数关系,因此能间接得到被测标本的微生物生物量。Baraniya 等<sup>[80]</sup>使用 ATP 法检测了不同培养基生长的龈下生物膜的微生物生物量。

## 2.2 代谢活性测定

### 2.2.1 有机酸测定和 pH 值测定

乳酸是变异链球菌的关键毒力因子,因此测定乳酸含量在龋齿生物膜评价方面应用广泛<sup>[19,85]</sup>。可使用分光光度法测定培养基中的乳

酸浓度<sup>[71,79]</sup>,该方法的原理是乳酸脱氢酶催化乳酸脱氢产生丙酮酸,使  $NAD^+$  转化成  $NADH$ ,其中呈色物在 340 nm 处的吸光度与乳酸含量成正比。此外,还可以采用毛细管电泳<sup>[16]</sup>、离子色谱<sup>[18]</sup>等方法测定多种有机酸浓度,如乙酸、丙酸、甲酸、丁酸、乳酸和琥珀酸,用于评估体外口腔生物膜的代谢活性。

也可以通过测定培养基 pH 值快速估计产酸情况<sup>[49,70]</sup>。Cavazana 等<sup>[84]</sup>使用变异链球菌和白色念珠菌建立了一个能够复制体内牙齿生物膜 pH 值变化的体外双物种模型。

### 2.2.2 活细胞分析

也有研究采用 TTC 法和 XTT 法等活细胞染色法反映生物膜的代谢活性。2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 是呼吸链中吡啶-核苷结构酶系统的质子受体,与细胞中的脱氢酶反应呈红色,可用于区分代谢活跃和不活跃的细胞<sup>[33]</sup>。XTT 也是一种四氮唑盐,作为线粒体脱氢酶底物,与电子耦合剂联合应用时,被活细胞还原成橙黄色甲贖产物,也被用于测定生物膜内的活细胞<sup>[81]</sup>。

此外,也有少量研究使用流式细胞仪对染色后的细胞进行活-死细胞比例分析<sup>[18]</sup>。

## 2.3 可视化分析

### 2.3.1 激光共聚焦扫描显微镜

激光共聚焦扫描显微镜 (confocal laser scanning microscope, CLSM) 具有较多的应用方案。CLSM 结合 LIVE/DEAD<sup>TM</sup> BacLight<sup>TM</sup> 细菌染色试剂盒能够快速地从死细胞中区分活细胞,结合 IMARIS 软件 (Bitplane) 可实现生物膜的三维重建,结合 COMSTAT2 软件能够计算生物膜的生物量和平均厚度。此外,CLSM 还可以结合 SYTO 85 和伴 Alexa 594 的刀豆球蛋白 A 凝集素染色来定量胞外多糖<sup>[34,81]</sup>。

### 2.3.2 扫描电子显微镜

扫描电子显微镜 (scanning electron microscopy, SEM) 能够以比 CLSM 更高的分辨率来观察生物膜的形态、三维结构和组成。然而 SEM 的样品制备需要经过戊二醛和多聚甲醛固定、乙醇脱水、干燥和溅射涂布等过程, 此过程中生物膜活性完全丧失, CLSM 则可以在保持生物膜活性的情况下拍照成像。

### 2.3.3 荧光原位杂交

荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 可以通过荧光染料标记的寡核苷酸探针在复杂的生物膜中灵敏地识别目标细菌<sup>[12,45]</sup>。FISH 结合 CLSM 还能直观地显示不同细菌物种在生物膜群落中的空间分布<sup>[88]</sup>。同扫描电镜相似, FISH 不能区分活死细胞, 且只能定性, 不能定量<sup>[41]</sup>, 但是将 FISH 与 qPCR 技术结合, 可实现对生物膜细菌组成的可视化和定量分析<sup>[81]</sup>。

可视化分析方法能够直观地呈现生物膜状态, 具有不可替代性, 而且和不同染色剂、分子生物学技术的结合使其具有多种应用方案, 但是对设备和软件的依赖限制了其广泛应用。

## 2.4 群落结构分析

### 2.4.1 变性梯度凝胶电泳

变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 是研究微生物群落结构的重要分子生物学方法之一。DGGE 能够呈现生物膜的微生物群“指纹”, 即每个条带代表某个微生物优势菌群。Tian 等<sup>[89]</sup>通过 DGGE 技术分析了常用的培养基对菌群结构的影响, 并在此基础上开发出适合口腔中多种细菌生长的 SHI 培养基。

### 2.4.2 DNA-DNA 杂交

DNA-DNA 杂交技术适用于在一个或多个生物膜样本中同时检测多种细菌的存在。Soares 等<sup>[33]</sup>通过 DNA-DNA 杂交从建立的生物膜中成功地检测到接种物中 40 种细菌中的 35 种。

### 2.4.3 高通量测序分析

随着测序技术的飞速发展, 核糖体 rRNA 编码基因多样性测序在生物膜群落分析领域得到广泛应用, 是目前的主流技术, 特别适用于天然唾液或牙菌斑来源的微观世界生物膜的物种组成分析, 特别是三代测序技术可以实现对菌群多样性组成谱的“高分辨率”解析。高通量测序获取的物种信息量最为丰富, 测序得到的结果可以进一步进行多样性、物种组成等多角度的生物信息学分析。然而, 依赖于测序的分析通常需要耗费时间, 并且经济成本也相对较高。

## 3 总结

选择装置是模型建立的起点, 传统的微量滴定板更换培养基比较费事, 还可能会破坏基质上的生物膜, 主动附着装置很好地解决了这一问题, 而且相比于 CBD, AAA Model 应用更加广泛, 因为它的基质选择具有灵活性; 接种物的来源决定了所建生物膜的类型, 多物种模型的菌株是已知的, 更容易进行研究, 微观世界模型则更接近真实口腔的微生物群落, 但生物膜组成与原始接种物总是不同的; 半合成培养基 (如 BHI 培养基) 可以满足相对简单的单一物种或多物种模型的需求, 而复杂的微观世界模型需要人工唾液或 SHI 等营养丰富的培养基; 生物膜着生基质的类型需要依研究目的慎重选择; 37 °C 厌氧或 5% CO<sub>2</sub> 是体外口腔生物膜培养最常见的条件, 基于此最终获得的生物膜物种组成主要是厌氧菌。综上, 我们归纳了口腔静态生物膜培养的技术关键, 它们都是高度多样化的, 其选择和组合主要取决于研究和应用的需要。

此外, 我们还总结了评价生物膜的各种方法, 涵盖了微生物培养、生理生化、代谢活性、影像学、分子生物学及组学技术等多个维



度。与生物膜的培养一样,评价方法也没有绝对的优劣,需要根据研究需要进行筛选。多角度组合使用这些方法,可以比较全面地阐明生物膜的生物量、物种丰度、代谢活力、微生物组成和结构。

## 4 展望

口腔健康关系到全身系统健康,关系到人们对美的追求,大健康产业的蓬勃发展对口腔医学的进步及口腔护理产品的开发提出了更高要求。为此,开发科学、有效、便利的口腔生态模型和测试平台就显得非常重要。作为动物模型和人群实验的重要补充,静态口腔生物膜模型容易操作、通量高、重复性好,有着广泛的应用,会越来越受到研究者的关注。

由于口腔环境的复杂,不同口腔生态位的生物膜结构不尽相同。因此,口腔生物膜模型在未来的发展中,还应进一步基于基础研究的结果,细化口腔中微生物生境的特点,从而细化生物膜的类型。同时,致力于开发能够结合静态模型和动态模型优点的新型装置,在保证高通量的同时,模拟唾液流动和剪切力;开发新的基质材料,优化培养基配方,实现更多挑剔细菌的培养,获得更具代表性的生物膜。我们相信,伴随口腔体外生物膜模型的发展,一定会加快提高我们对口腔疾病发病机制和口腔微生物相互作用的理解,从而为临床实践和口腔护理产品的开发提供更多的理论依据和研究手段。

## REFERENCES

- [1] Rudney JD, Jagtap PD, Reilly CS, et al. Protein relative abundance patterns associated with sucrose-induced dysbiosis are conserved across taxonomically diverse oral microcosm biofilm models of dental caries. *Microbiome*, 2015, 3: 69.
- [2] Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(11): 5721-5732.
- [3] Peters BA, Wu J, Hayes RB, et al. The oral fungal mycobiome: characteristics and relation to periodontitis in a pilot study. *BMC Microbiol*, 2017, 17(1): 157.
- [4] Foster JS, Kolenbrander PE. Development of a multi species oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(7): 4340-4348.
- [5] Eglund PG, Palmer RJ Jr, Kolenbrander PE. Interspecies communication in *Streptococcus gordonii-Veillonella atypica* biofilms: signaling in flow conditions requires juxtaposition. *PNAS*, 2004, 101(48): 16917-16922.
- [6] Brown MR, Gilbert P. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J Appl Bacteriol*, 1993, 74: 87S-97S.
- [7] Mukherjee PK, Chandra J, Retuerto M, et al. Oral mycobiome analysis of HIV-infected patients: identification of *Pichia* as an antagonist of opportunistic fungi. *PLoS Pathog*, 2014, 10(3): e1003996.
- [8] Sim CPC, Dashper SG, Reynolds EC. Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents. *J Dent*, 2016, 50: 1-11.
- [9] Ortega O, Sakwinska O, Combremont S, et al. High prevalence of colonization of oral cavity by respiratory pathogens in frail older patients with oropharyngeal dysphagia. *Neurogastroenterol Motil*, 2015, 27(12): 1804-1816.
- [10] Coenye T, Nelis HJ. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods*, 2010, 83(2): 89-105.
- [11] Pratten J, Ready D. Use of biofilm model systems to study antimicrobial susceptibility. *Methods Mol Biol*, 2010, 642: 203-215.
- [12] Brown JL, Johnston W, Delaney C, et al. Polymicrobial oral biofilm models: simplifying the complex. *J Med Microbiol*, 2019, 68(11): 1573-1584.
- [13] Myllymaa K, Levon J, Tiainen VM, et al. Formation and retention of staphylococcal biofilms on DLC and its hybrids compared to metals used as biomaterials. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 101: 290-297.
- [14] Pham LC, Van Spanning RJM, Röling WFM, et al. Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* W24 on the compositional stability of oral microbial communities. *Arch Oral Biol*, 2009, 54(2): 132-137.
- [15] Zhou Y, Millhouse E, Shaw T, et al. Evaluating *Streptococcus mutans* strain dependent characteristics

- in a polymicrobial biofilm community. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1498.
- [16] Fernandez Y Mostajo M, Exterkate RAM, Buijs MJ, et al. Effect of mouthwashes on the composition and metabolic activity of oral biofilms grown *in vitro*. *Clin Oral Investig*, 2017, 21(4): 1221-1230.
- [17] Cleaver LM, Moazzez R, Carpenter GH. Mixed aerobic-anaerobic incubation conditions induce proteolytic activity from *in vitro* salivary biofilms. *J Oral Microbiol*, 2019, 11(1): 1643206.
- [18] Chatziagiannidou I, Teughels W, Van De Wiele T, et al. Oral biofilms exposure to chlorhexidine results in altered microbial composition and metabolic profile. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2020, 6(1): 13.
- [19] Exterkate RAM, Crielaard W, Ten Cate JM. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res*, 2010, 44(4): 372-379.
- [20] Sherry L, Lappin G, O'Donnell LE, et al. Viable compositional analysis of an eleven species oral polymicrobial biofilm. *Front Microbiol*, 2016, 7: 912.
- [21] Zhang K, Wang S, Zhou X, et al. Effect of antibacterial dental adhesive on multi species biofilms formation. *J Dent Res*, 2015, 94(4): 622-629.
- [22] Ceri H, Olson ME, Stremick C, et al. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(6): 1771-1776.
- [23] Maske TT, Van De Sande FH, Arthur RA, et al. *In vitro* biofilm models to study dental caries: a systematic review. *Biofouling*, 2017, 33(8): 661-675.
- [24] Yu OY, Zhao IS, Mei ML, et al. Dental biofilm and laboratory microbial culture models for cariology research. *Dent J (Basel)*, 2017, 5(2): 21.
- [25] Darrene LN, Cecile B. Experimental models of oral biofilms developed on inert substrates: a review of the literature. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 7461047.
- [26] Cavalcanti IMG, Ricomini Filho AP, Lucena-Ferreira SC, et al. Salivary pellicle composition and multi species biofilm developed on titanium nitrided by cold plasma. *Arch Oral Biol*, 2014, 59(7): 695-703.
- [27] Miranda SLF, Damasceno JT, Faveri M, et al. Brazilian red *Propolis* reduces orange-complex periodontopathogens growing in multispecies biofilms. *Biofouling*, 2019, 35(3): 308-319.
- [28] De Oliveira RVD, Bonafé FSS, Spolidorio DMP, et al. *Streptococcus mutans* and *Actinomyces naeslundii* interaction in dual-species biofilm. *Microorganisms*, 2020, 8(2): 194.
- [29] Fernández CE, Fontana M, Samarian D, et al. Effect of fluoride-containing toothpastes on enamel demineralization and *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *Caries Res*, 2016, 50(2): 151-158.
- [30] Pandit S, Cai JN, Jung JE, et al. Effect of 1-minute fluoride treatment on potential virulence and viability of a cariogenic biofilm. *Caries Res*, 2015, 49(4): 449-457.
- [31] Junka AF, Szymczyk P, Smutnicka D, et al. Microbial biofilms are able to destroy hydroxyapatite in the absence of host immunity *in vitro*. *J Oral Maxillofac Surg*, 2015, 73(3): 451-464.
- [32] Schlecht LM, Peters BM, Krom BP, et al. Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. *Microbiology (Reading)*, 2015, 161(Pt 1): 168-181.
- [33] Soares GMS, Teles F, Starr JR, et al. Effects of azithromycin, metronidazole, amoxicillin, and metronidazole plus amoxicillin on an *in vitro* polymicrobial subgingival biofilm model. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(5): 2791-2798.
- [34] Suzuki Y, Ohsumi T, Isono T, et al. Effects of a sub-minimum inhibitory concentration of chlorhexidine gluconate on the development of *in vitro* multi-species biofilms. *Biofouling*, 2020, 36(2): 146-158.
- [35] Zheng X, Cheng X, Wang L, et al. Combinatorial effects of arginine and fluoride on oral bacteria. *J Dent Res*, 2015, 94(2): 344-353.
- [36] Muñoz-González I, Thurnheer T, Bartolomé B, et al. Red wine and oenological extracts display antimicrobial effects in an oral bacteria biofilm model. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(20): 4731-4737.
- [37] Fernandez Y Mostajo M, Exterkate RAM, Buijs MJ, et al. A reproducible microcosm biofilm model of subgingival microbial communities. *J Periodontol Res*, 2017, 52(6): 1021-1031.
- [38] Li YH, Bowden GH. Characteristics of accumulation of oral Gram-positive bacteria on mucin-conditioned glass surfaces in a model system. *Oral Microbiol Immunol*, 1994, 9(1): 1-11.
- [39] Montelongo-Jauregui D, Srinivasan A, Ramasubramanian AK, et al. An *in vitro* model for *Candida albicans-Streptococcus gordonii* biofilms on titanium surfaces. *J Fungi (Basel)*, 2018, 4(2): 66.
- [40] Bermejo P, Sánchez MC, Llama-Palacios A, et al. Topographic characterization of multi species biofilms growing on dental implant surfaces: an *in vitro* model.

- Clin Oral Implants Res, 2019, 30(3): 229-241.
- [41] Chevalier M, Ranque S, Prêcheur I. Oral fungal-bacterial biofilm models *in vitro*: a review. Med Mycol, 2018, 56(6): 653-667.
- [42] Krom BP, Kidwai S, Ten Cate JM. *Candida* and other fungal species: forgotten players of healthy oral microbiota. J Dent Res, 2014, 93(5): 445-451.
- [43] Edlund A, Yang Y, Hall AP, et al. An *in vitro* biofilm model system maintaining a highly reproducible species and metabolic diversity approaching that of the human oral microbiome. Microbiome, 2013, 1(1): 25.
- [44] Rudney JD, Chen R, Lenton P, et al. A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. J Appl Microbiol, 2012, 113(6): 1540-1553.
- [45] Ammann TW, Gmür R, Thurnheer T. Advancement of the 10-species subgingival Zurich biofilm model by examining different nutritional conditions and defining the structure of the *in vitro* biofilms. BMC Microbiol, 2012, 12: 227.
- [46] Velsko IM, Shaddox LM. Consistent and reproducible long-term *in vitro* growth of health and disease-associated oral subgingival biofilms. BMC Microbiol, 2018, 18(1): 70.
- [47] Shaddox LM, Alfant B, Tobler J, et al. Perpetuation of subgingival biofilms in an *in vitro* model. Mol Oral Microbiol, 2010, 25(1): 81-87.
- [48] Park JH, Lee JK, Um HS, et al. A periodontitis-associated multi species model of an oral biofilm. J Periodontal Implant Sci, 2014, 44(2): 79-84.
- [49] Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms *in vivo*. Infect Immun, 2014, 82(5): 1968-1981.
- [50] Montelongo-Jauregui D, Srinivasan A, Ramasubramanian AK, et al. An *in vitro* model for oral mixed biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus gordonii* in synthetic saliva. Front Microbiol, 2016, 7: 686.
- [51] Diaz PI, Xie ZH, Sobue T, et al. Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral *Streptococci* in a novel *in vitro* mucosal model. Infect Immun, 2012, 80(2): 620-632.
- [52] Sampaio FC, Do Socorro V Pereira M, Dias CS, et al. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. J Ethnopharmacol, 2009, 124(2): 289-294.
- [53] Marsh PD, Hunter JR, Bowden GH, et al. The influence of growth rate and nutrient limitation on the microbial composition and biochemical properties of a mixed culture of oral bacteria grown in a chemostat. J Gen Microbiol, 1983, 129(3): 755-770.
- [54] Cieplik F, Zaura E, Brandt BW, et al. Microcosm biofilms cultured from different oral niches in periodontitis patients. J Oral Microbiol, 2018, 11(1): 1551596.
- [55] Verkaik MJ, Busscher HJ, Jager D, et al. Efficacy of natural antimicrobials in toothpaste formulations against oral biofilms *in vitro*. J Dent, 2011, 39(3): 218-224.
- [56] Verkaik MJ, Busscher HJ, Rustema-Abbing M, et al. Oral biofilm models for mechanical plaque removal. Clin Oral Investig, 2010, 14(4): 403-409.
- [57] Shin JM, Ateia I, Paulus JR, et al. Antimicrobial nisin acts against saliva derived multi-species biofilms without cytotoxicity to human oral cells. Front Microbiol, 2015, 6: 617.
- [58] Ammann TW, Bostanci N, Belibasakis GN, et al. Validation of a quantitative real-time PCR assay and comparison with fluorescence microscopy and selective agar plate counting for species-specific quantification of an *in vitro* subgingival biofilm model. J Periodontal Res, 2013, 48(4): 517-526.
- [59] Xu JL, He JZ, Shen Y, et al. Influence of endodontic procedure on the adherence of *Enterococcus faecalis*. J Endod, 2019, 45(7): 943-949.
- [60] Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, et al. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. J Endod, 2011, 37(3): 363-366.
- [61] Zaura E, Buijs MJ, Hoogenkamp MA, et al. The effects of fractions from shiitake mushroom on composition and cariogenicity of dental plaque microcosms in an *in vitro* caries model. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011: 135034.
- [62] Du TF, Shi Q, Shen Y, et al. Effect of modified nonequilibrium plasma with chlorhexidine digluconate against endodontic biofilms *in vitro*. J Endod, 2013, 39(11): 1438-1443.
- [63] Li Y, Carrera C, Chen R, et al. Degradation in the dentin-composite interface subjected to multi-species biofilm challenges. Acta Biomater, 2014, 10(1): 375-383.
- [64] Arthur RA, Kohara EK, Waeiss RA, et al. Enamel carious lesion development in response to sucrose and fluoride concentrations and to time of biofilm formation: an artificial-mouth study. J Oral Dis, 2014, 2014: 348032.
- [65] Van De Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, et al. An *in vitro* biofilm model for enamel demineralization and

- antimicrobial dose-response studies. *Biofouling*, 2011, 27(9): 1057-1063.
- [66] Lippert F, Lynch RJM. Comparison of Knoop and Vickers surface microhardness and transverse microradiography for the study of early caries lesion formation in human and bovine enamel. *Arch Oral Biol*, 2014, 59(7): 704-710.
- [67] Li B, Zhou X, Zhou X, et al. Effects of different substrates/growth media on microbial community of saliva-derived biofilm. *FEMS Microbiol Lett*, 2017, 364(13).
- [68] Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, et al. Biofilm in endodontics: a review. *J Int Soc Prev Community Dent*, 2015, 5(1): 1-12.
- [69] Santos DMSD, Pires JG, Braga AS, et al. Comparison between static and semi-dynamic models for microcosm biofilm formation on dentin. *J Appl Oral Sci*, 2019, 27: e20180163.
- [70] Signori C, Hartwig AD, Da Silva-Júnior IF, et al. The role of human milk and sucrose on cariogenicity of microcosm biofilms. *Braz Oral Res*, 2018, 32: e109.
- [71] Han Q, Jiang YL, Brandt BW, et al. Regrowth of microcosm biofilms on titanium surfaces after various antimicrobial treatments. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2693.
- [72] Xavier JG, Geremias TC, Montero JFD, et al. Lactam inhibiting *Streptococcus mutans* growth on titanium. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 68: 837-841.
- [73] Cavalcanti IMG, Nobbs AH, Ricomini-Filho AP, et al. Interkingdom cooperation between *Candida albicans*, *Streptococcus oralis* and *Actinomyces oris* modulates early biofilm development on denture material. *Pathog Dis*, 2016, 74(3): ftw002.
- [74] Lynch RJM, Ten Cate JM. The effect of adjacent dentine blocks on the demineralisation and remineralisation of enamel *in vitro*. *Caries Res*, 2006, 40(1): 38-42.
- [75] Pratten J, Wills K, Barnett P, et al. *In vitro* studies of the effect of antiseptic-containing mouthwashes on the formation and viability of *Streptococcus sanguis* biofilms. *J Appl Microbiol*, 1998, 84(6): 1149-1155.
- [76] Deng DM, Buijs MJ, Ten Cate JM. The effects of substratum on the pH response of *Streptococcus mutans* biofilms and on the susceptibility to 0.2% chlorhexidine. *Eur J Oral Sci*, 2004, 112(1): 42-47.
- [77] Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community-implications for health and disease. *BMC Oral Health*, 2006, 6 Suppl 1(Suppl 1): S14.
- [78] Yassin SA, German MJ, Rolland SL, et al. Inhibition of multi species biofilms by a fluoride-releasing dental prosthesis copolymer. *J Dent*, 2016, 48: 62-70.
- [79] Janus MM, Crielaard W, Volgenant CMC, et al. *Candida albicans* alters the bacterial microbiome of early *in vitro* oral biofilms. *J Oral Microbiol*, 2017, 9(1): 1270613.
- [80] Baraniya D, Naginyte M, Chen T, et al. Modeling normal and dysbiotic subgingival microbiomes: effect of nutrients. *J Dent Res*, 2020, 99(6): 695-702.
- [81] Cheng XQ, Liu JM, Li JY, et al. Comparative effect of a stannous fluoride toothpaste and a sodium fluoride toothpaste on a multi species biofilm. *Arch Oral Biol*, 2017, 74: 5-11.
- [82] Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SFG, et al. *Streptococcus mutans* can modulate biofilm formation and attenuate the virulence of *Candida albicans*. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150457.
- [83] Kistler JO, Pesaro M, Wade WG. Development and pyrosequencing analysis of an *in-vitro* oral biofilm model. *BMC Microbiol*, 2015, 15: 24.
- [84] Cavazana TP, Pessan JP, Hosida TY, et al. pH changes of mixed biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* after exposure to sucrose solutions *in vitro*. *Arch Oral Biol*, 2018, 90: 9-12.
- [85] 邹政. MB-PDT 与 HMME-PDT 对变形链球菌菌斑生物膜作用的对比研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2019.
- Zou Z. Comparative study of the effects of MB-PDT and HMME-PDT on *Streptococcus mutans* plaque biofilm[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2019 (in Chinese).
- [86] Alvarez G, González M, Isabal S, et al. Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidium monoazide. *AMB Express*, 2013, 3(1): 1.
- [87] Sánchez MC, Marín MJ, Figuero E, et al. Quantitative real-time PCR combined with propidium monoazide for the selective quantification of viable periodontal pathogens in an *in vitro* subgingival biofilm model. *J Periodontal Res*, 2014, 49(1): 20-28.
- [88] De Paz LEC. Development of a multi species biofilm community by four root canal bacteria. *J Endod*, 2012, 38(3): 318-323.
- [89] Tian Y, He X, Torralba M, et al. Using DGGE profiling to develop a novel culture medium suitable for oral microbial communities. *Mol Oral Microbiol*, 2010, 25(5): 357-367.

(本文责编 陈宏宇)