การผลิตกรดและการเจริญเติบโตของไบฟิโดแบคทีเรียในช่องปากในห้องปฏิบัติการ

Acid Production and Growth by Oral Bifidobacteria *in vitro*

วนิดา ปิยวิโรจน์กุล (Wanida Piyawirojkul)* สุพัชรินทร์ พิวัฒน์ (Supatcharin Piwat)**
รวี เถียรไพศาล (Rawee Teanpaisan)***

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *Bifidobacterium dentium* ในการใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตสความเข้มข้นร้อยละ 2 เปรียบเทียบกับ *Streptococcus mutans* และ *Lactobacillus salivarius* ที่เวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า *S. mutans*, *L. salivarius* และ *B. dentium* สามารถผลิตกรดและเจริญเติบโตได้ดีในช่วงเวลาที่ 6, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถใช้ได้ทั้งน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตสในกระบวนการเมตาบอลึซึม โดย *S. mutans* และ *L. salivarius* มีค่าความเป็นกรดต่ำสุด 3.8-4.0 และ *B. dentium* มีค่าความเป็นกรดต่ำสุด 4.4-4.5 การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า *B. dentium* สามารถผลิตกรดจากการใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตสได้ โดยให้ค่าความเป็นกรดที่ต่ำกว่า 5.5 แสดงว่า *B. dentium* เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตกรดสูงซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งของเชื้อก่อโรคฟันผุ

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the acid-producing and growth abilities of *Bifidobacterium dentium* in 2% glucose, sucrose and lactose at 0, 6, 12, 24 and 48 hours compared to *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus salivarius*. The results showed that the maximum acid production and growth of *S. mutans, L. salivarius* and *B. dentium* were found at 6, 12 and 24 hours, respectively. The final pHs obtained from various sugars metabolism were similar, they were 3.8-4.0 for *S. mutans* and *L. salivarius,* and 4.4-4.5 for *B. dentium*. These results indicated that high acidogenic characteristic which is the one of the important properties of cariogenic bacteria was found in *B. dentium*.

คำสำคัญ: การผลิตกรด การเจริญเติบโต ไบฟิโดแบคทีเรียในช่องปาก

Keywords: Acid production, Growth, Oral bifidobacteria

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*
*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*
**** ศาสตราจารย์ ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*

บทนำ

ไบฟิโดแบคทีเรียเป็นเชื้อแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สามารถเคลื่อนที่ เจริญเติบโตได้ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น ไม่มีเอนไซม์คะตะเลส ลักษณะเป็นแท่งปลายแยกออกเป็นสองแขนงหรือหลายแขนง พบอยู่เดี่ยวๆ เป็นสายยาวหรือรวมกันเป็นกลุ่ม (Reimann, 2009) ไบฟิโดแบคทีเรียในช่องปากสามารถแยกได้จากน้ำลาย แผ่นคราบจุลินทรีย์ รอยโรคฟันผุและการติดเชื้อในโพรงประสาทฟัน สปีชีส์ที่พบได้บ่อย ได้แก่ *Bifidobacterium dentium Scardovia inopinata Bifidobacterium longum Parascardovia denticolens* และ *Alloscardovia omnicolens* (Mantzourani et al., 2009) โดยสปีชีส์ที่พบได้บ่อยที่สุด คือ *Bifidobacterium dentium* (Scardovi, Crociani, 1974)

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า จากตัวอย่างแผ่นคราบจุลินทรีย์ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง พบไบฟิโดแบคทีเรีย 11 ตัวอย่าง โดยสปีชีส์ที่พบมากที่สุดคือ *B. dentium* (Modesto et al., 2006) การศึกษาในรอยผุด้านบดเคี้ยวและแผ่นคราบจุลินทรีย์บนฟันที่ไม่มีรอยผุ พบว่าผิวฟันที่ไม่มีรอยผุพบไบฟิโดแบคทีเรียได้น้อยกว่าบริเวณที่มีรอยผุอย่างมีนัยสำคัญ (Mantzourani et al., 2009) และการศึกษาจำนวนไบฟิโดแบคทีเรียในน้ำลายของเด็ก พบว่าเด็กที่มีฟันผุจะมีจำนวนไบฟิโดแบคทีเรียมากกว่าเด็กที่ฟันไม่ผุอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) (Kaur et al., 2013)

โรคฟันผุเกิดจากการเสียสมดุลระหว่างการสูญเสียแร่ธาตุกับการคืนกลับแร่ธาตุ (remineralization) ถ้ากรดถูกผลิตมากจนค่าความเป็นกรดลดลงต่ำกว่าค่าวิกฤต (critical pH) คือ 5.5 จะทำให้เกิดการสูญเสียแร่ธาตุ (demineralization) ของผิวเคลือบฟัน (Seow, 1998) ไบฟิโดแบคทีเรียสามารถผลิตกรดอะซิติกและกรดแลคติกในอัตราส่วนโดยเฉลี่ย 3:2 จากการย่อยสลายน้ำตาล ไบฟิโดแบคทีเรียที่แยกได้จากรากฟันที่ผุรุนแรงสามารถลดค่าความเป็นกรดได้ต่ำกว่า 4.2 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบ (Van Houte et al., 1996) *B. dentium* ที่แยกได้จากช่องปากสามารถลดค่าความเป็นกรดเบสสุดท้ายให้เหลือ 4.4 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบ (Moynihan et al., 1998) แสดงให้เห็นถึงความสามารถของไบฟิโดแบคทีเรียในการสร้างกรดซึ่งเป็นบทบาทหนึ่งที่สำคัญของแบคทีเรียก่อโรคฟันผุ

อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *B. dentium* ในสภาวะของชนิดน้ำตาลต่างๆ ยังมีจำกัด การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *B. dentium* ในสภาวะของชนิดน้ำตาลต่างๆ เปรียบเทียบกับ *S. mutans* และ *L. salivarius*

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *B. dentium* ในการเพาะเลี้ยงในน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 2 ณ เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับเชื้อก่อโรคฟันผุ *S. mutans* และ *L. salivarius*

วิธีการวิจัย

เชื้อที่เลือกนำมาศึกษา

เชื้ออ้างอิงที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ *B. dentium* CCUG 18367, *S. mutans* ATCC 25175 และ *L. salivarius* ATCC 11741

การเพาะเลี้ยงเชื้อและการเตรียมเชื้อทดลอง

นำเชื้อที่ต้องการศึกษาซึ่งถูกเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสมาเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงโดย *B. dentium* ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิด Brain Heart Infusion (BHI) agar เติม 0.05% (น้ำหนัก/ปริมาตร) L-cysteine-hydrochloride ส่วน *S. mutans* และ *L. salivarius* ใช้อาหารเพาะเลี้ยง Brain Heart Infusion (BHI) agar บ่มในภาชนะเลี้ยงแบคทีเรียไร้ออกซิเจน

(Anaerobic jar) ในภาวะ 80% N_2, 10% H_2 และ 10% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลร้อยละ 2

สำหรับ *B. dentium* ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Brain Heart Infusion (BHI) broth ที่เติม 0.05% L-cysteine-hydrochloride เป็นสารละลายพื้นฐาน ส่วน *S. mutans* และ *L. salivarius* ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Brain Heart Infusion (BHI) broth เป็นสารละลายพื้นฐาน เติมน้ำตาลต่างๆ ให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตสร้อยละ 2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) นำไปทำการปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

การเตรียมเชื้อสำหรับการทดลอง

นำเชื้อที่ได้จากจานเพาะเลี้ยงเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวโดย *B. dentium* ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Brain Heart Infusion (BHI) broth ที่เติม 0.05% L-cysteine-hydrochloride ส่วน *S. mutans* และ *L. salivarius* ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Brain Heart Infusion (BHI) broth ที่เติม 0.05% (w/v) L-cysteine-hydrochloride สำหรับเชื้อที่ใช้ในการศึกษา หลังจากการบ่มเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกที่ 6,500 รอบเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเชื้อ *B. dentium* ด้วย phosphate buffered saline ผสม 0.05% L-cysteine-hydrochloride และล้างเชื้อ *S. mutans* และ *L. salivarius* ด้วย phosphate buffered saline วัดปริมาณเชื้อตั้งต้นด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความหนาแน่นของ *B. dentium* โดยวัดความขุ่น (optical density) 0.5 ส่วน *S. mutans* และ *L. salivarius* วัดความขุ่น 0.2 ซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/ml

การวัดการเจริญเติบโตและการผลิตกรดของเชื้อ

เติมเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมน้ำตาลที่เตรียมไว้ให้ปริมาตรรวมแต่ละขวดเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วนำขวดทดลองไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar) ในภาวะ 80% N_2, 10% H_2 และ 10% CO_2 ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ที่เวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตรจากขวดทดลอง ออกมาเพื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยการวัดความหนาแน่นของเซลล์โดยการวัดความขุ่นด้วยเครื่องเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และวัดค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Cyberscan 1000 pH, Oakton Instruments, Vernon Hills, USA)

ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้งตั้งแต่ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อจนถึงขั้นตอนการวัดการเจริญเติบโตและการการผลิตกรดของเชื้อ

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการวัดการเจริญเติบโตและการผลิตกรดของเชื้อ ได้แก่ ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเซลล์โดยการวัดความขุ่นและค่าความเป็นกรดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้สถิติเชิงพรรณนาในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและค่าความเป็นกรด

ผลการวิจัย

ตารางที่ 1 แสดงอัตราการผลิตกรดที่ช่วงเวลาต่างๆ ของ *B. dentium, S. mutans* และ *L. salivarius* เมื่อเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นส่วนประกอบ

ชนิดของแบคทีเรีย	ชนิดน้ำตาล	อัตราการผลิตกรด (△pH/hr)			
		6	12	24	48
B. dentium CCUG 18367	กลูโคส	0.03	0.09	0.30	0.00
	ซูโครส	0.04	0.13	0.25	0.02
	แลคโตส	0.03	0.09	0.28	0.05
S. mutans ATCC 25175	กลูโคส	0.31	0.17	0.04	0.02
	ซูโครส	0.35	0.14	0.04	0.01
	แลคโตส	0.31	0.17	0.03	0.02
L. salivarius ATCC 11741	กลูโคส	0.07	0.33	0.12	0.02
	ซูโครส	0.07	0.35	0.10	0.02
	แลคโตส	0.05	0.19	0.26	0.03

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการเจริญเติบโตที่ช่วงเวลาต่างๆ ของ *B. dentium, S.mutans* และ *L.salivarius* เมื่อเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นส่วนประกอบ

ชนิดของแบคทีเรีย	ชนิดน้ำตาล	อัตราการเจริญเติบโต (△OD/hr)			
		6	12	24	48
B. dentium CCUG 18367	กลูโคส	0.02	0.12	0.15	0.03
	ซูโครส	0.03	0.15	0.11	0.04
	แลคโตส	0.02	0.11	0.15	0.03
S. mutans ATCC 25175	กลูโคส	0.22	0.07	0.03	0.01
	ซูโครส	0.22	0.06	0.03	0.00
	แลคโตส	0.22	0.08	0.03	0.01
L. salivarius ATCC 11741	กลูโคส	0.03	0.17	0.05	0.01
	ซูโครส	0.03	0.19	0.04	0.01
	แลคโตส	0.02	0.11	0.15	0.01

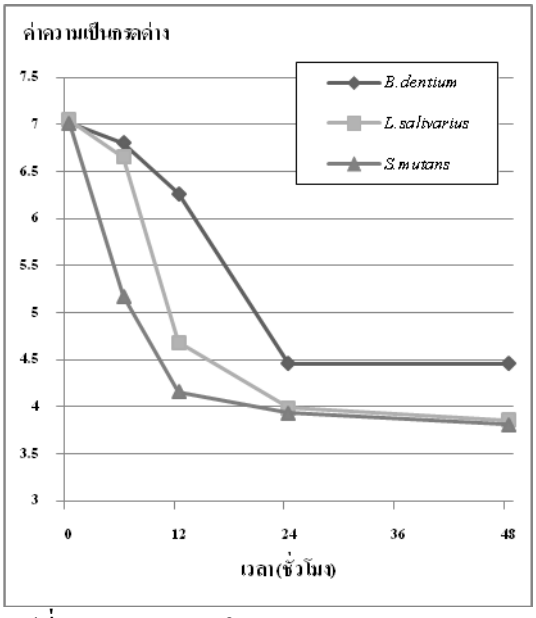
▯ แสดงอัตราการผลิตกรดและการเจริญเติบโตสูงสุดของเชื้อ

ผลการศึกษาพบว่า *S. mutans* สามารถผลิตกรดและเจริญเติบโตได้ดีที่ 6 ชั่วโมง โดยมีอัตราการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตสเป็นส่วนประกอบได้ไม่แตกต่างกัน มีอัตราการผลิตกรดในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีน้ำตาลซูโครสมากที่สุด และมีอัตราการผลิตกรดในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคสและแลคโตสรองลงมา (ตารางที่ 1 และ 2)

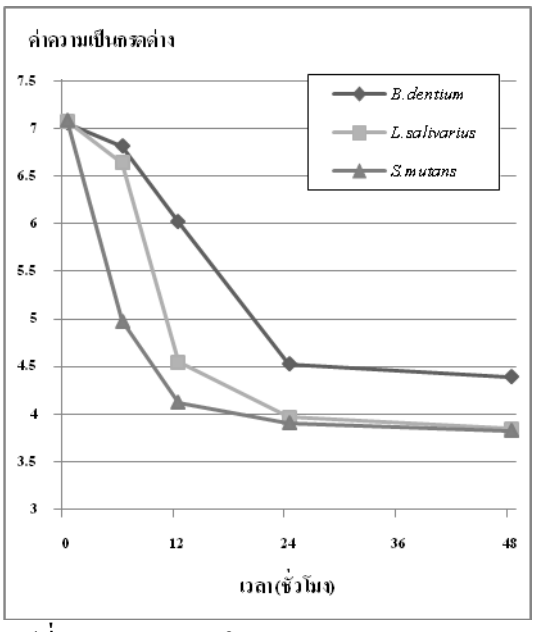
เมื่อเพาะเลี้ยง *L. salivarius* ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคสและซูโครส พบว่า *L. salivarius* สามารถผลิตกรดและเจริญเติบโตได้ดีที่ 12 ชั่วโมง โดยมีอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตกรดในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีน้ำตาลซูโครสได้ดีกว่าในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีกลูโคส (ตารางที่ 1 และ 2)

เมื่อเพาะเลี้ยง *L. salivarius* ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีน้ำตาลแลคโตส พบว่า *L. salivarius* สามารถผลิตกรดและเจริญเติบโตได้ดีที่ 24 ชั่วโมง โดยมีอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตกรดน้อยกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีกลูโคสและซูโครส (ตารางที่ 1 และ 2)

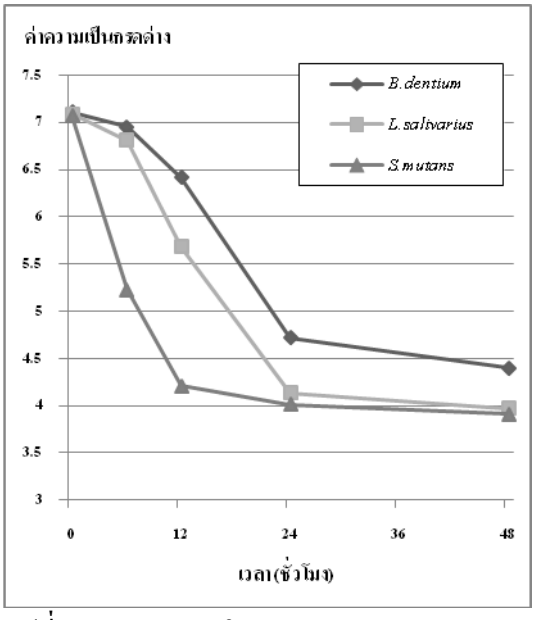
B. dentium สามารถผลิตกรดและเจริญเติบโตได้ดีที่ 24 ชั่วโมง โดยมีอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตกรดในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตสใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 1 และ 2)



รูปที่ 1 ความสามารถในการผลิตกรดของ *B. dentium S. mutans* และ *L. salivarius* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดเหลวที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบที่เวลาต่างๆ



รูปที่ 2 ความสามารถในการผลิตกรดของ *B. dentium* *S. mutans* และ *L. salivarius* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดเหลวที่มีซูโครสเป็นส่วนประกอบที่เวลาต่างๆ



รูปที่ 3 ความสามารถในการผลิตกรดของ *B. dentium* *S. mutans* และ *L. salivarius* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดเหลวที่มีแลคโตสเป็นส่วนประกอบที่เวลาต่างๆ

S. mutans มีค่าความเป็นกรดสุดท้ายในการใช้น้ำตาลต่าง ๆ ที่ 3.8-3.9 ใกล้เคียงกับ *L. salivarius* มีค่าความเป็นกรดสุดท้ายในการใช้น้ำตาลต่าง ๆ ที่ 3.9-4.0 และ *B. dentium* มีค่าความเป็นกรดสุดท้ายในการใช้น้ำตาลต่าง ๆ ที่ 4.4-4.5 (รูปที่ 1-3)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ความสามารถในการผลิตกรดมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อ การศึกษานี้พบว่า *S. mutans* สามารถผลิตกรดและเจริญเติบโตได้เร็วที่สุดโดยมีอัตราสูงที่ 6 ชั่วโมง รองลงมาคือ *L. salivarius* ซึ่งมีอัตราการผลิตกรดและเจริญเติบโตสูงที่ 12 ชั่วโมง โดยค่าความเป็นกรดสุดท้ายของ *S. mutans* และ *L. salivarius* เท่ากับ 3.8-3.9 และ 3.9-4.0 ตามลำดับ *B. dentium* มีอัตราการผลิตกรดและเจริญเติบโตสูงที่ 24 ชั่วโมง แม้ว่า *B. dentium* สามารถผลิตกรดและเจริญเติบโตได้ช้าเมื่อเทียบกับ *S. mutans* และ *L. salivarius* แต่พบว่า *B. dentium* มีค่าความเป็นกรดสุดท้ายเท่ากับ 4.4-4.5 ซึ่งต่ำกว่าค่าวิกฤตของการเกิดฟันผุ (pH 5.5) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Moynihan et al. (1998) ที่รายงานว่า *B. dentium* ที่แยกได้จากช่องปากสามารถลดค่าความเป็นกรดสุดท้ายที่ 4.4 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบ

นอกจากนี้การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า *B. dentium* มีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้หลากหลายในกระบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งมีรายงานของ Masco (2006) ที่ว่า bifidobacteria มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่และคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อนได้

ค่าความเป็นกรดสุดท้ายจากน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดในการศึกษานี้มีค่าต่ำกว่าค่าวิกฤตของการเกิดฟันผุ บ่งชี้ให้เห็นว่า *B. dentium* เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตกรดสูงซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งของเชื้อก่อโรคฟันผุ

จากการที่สามารถพบ *B. dentium* ได้มากในรอยโรคฟันผุ (Mantzourani et al., 2009) ถึงแม้ว่าเชื้อจะเจริญเติบโตและผลิตกรดได้ช้า แต่เชื้อนี้มีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้หลากหลาย และมีคุณสมบัติในการผลิตกรดจนมีค่าความเป็นกรดสุดท้ายต่ำกว่าค่าวิกฤต บ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อนี้อาจมีบทบาทก่อให้เกิดโรคฟันผุในช่องปากได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์และสถานวิจัยโรคที่พบบ่อยในช่องปากและวิทยาการระบาด

เอกสารอ้างอิง

Kaur R, Gilbert SC, Sheehy EC, Beighton D. Salivary levels of Bifidobacteria in caries-free and caries-active children. Int J Paediatr Dent 2013 Jan 1; 23(1): 32-8.

Mantzourani M, Fenlon M, Beighton D. Association between *Bifidobacteriaceae* and the clinical severity of root caries lesions. Oral Microbiol Immunol 2009 Feb 1; 24(1): 32-7.

Masco L. Identification, antimicrobial susceptibility and functionality of potentially probiotic bifidobacteria [Doctor (Ph.D.) in Sciences, Biotechnology]. Belgium: Faculty of Sciences, Ghent University; 2006.

Modesto M, Biavati B, Mattarelli P. Occurrence of the family *bifidobacteriaceae* in human dental caries and plaque. Caries Res 2006; 40(3): 271-6.

Moynihan PJ, Ferrier S, Blomley S, Wright WG, Russell RRB. Acid production from lactulose by dental plaque bacteria. Lett Appl Microbiol 1998 Sep 1; 27(3): 173-7.

Reimann S. Novel Technologies for Detection, Production and Screening of Stress Tolerant Bifidobacteria [Doctor of Sciences]. Swiss Federal Institute of Technology Zurich; 2009.

Scardovi V, Crociani F. *Bifidobacterium catenulatum, Bifidobacterium dentium,* and *Bifidobacterium angulatum*: Three New Species and Their Deoxyribonucleic Acid Homology Relationships. Int J Syst Bacteriol 1974 Jan 1; 24(1): 6-20.

Seow WK. Biological mechanisms of early childhood caries. Community Dent Oral Epidemiol 1998 Dec 2; 26: 8-27.

Van Houte J, Lopman J, Kent R. The Final pH of Bacteria Comprising the Predominant Flora on Sound and Carious Human Root and Enamel Surfaces. J Dent Res 1996 Apr; 75(4): 1008-14.