



การผลิตกรดและการเจริญเติบโตของไบฟิโดแบคทีเรียในช่องปาก  
ในห้องปฏิบัติการ

*Acid Production and Growth by Oral Bifidobacteria in vitro*

วนิดา ปิยวิโรจน์กุล

Wanida Piyawirojkul

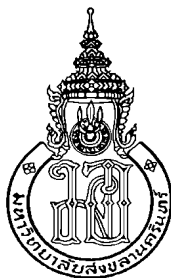
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of  
Master of Science in Oral Health Sciences

Prince of Songkla University

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การผลิตกรดและการเจริญเติบโตของไบฟิโดแบคทีเรียในช่องปาก  
ในห้องปฏิบัติการ

*Acid Production and Growth by Oral Bifidobacteria in vitro*

วนิดา ปิยวิโรจน์กุล

Wanida Piyawirojkul

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of**

**Master of Science in Oral Health Sciences**

**Prince of Songkla University**

**2559**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์                      การผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ ไบโอฟิล์มแบคทีเรียในช่องปากใน  
ห้องปฏิบัติการ

ผู้เขียน                                      นางสาวนิตา ปิยวิโรจน์กุล

สาขาวิชา                                    วิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก**

**คณะกรรมการสอบ**

.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัชรินทร์ พิวัฒน์)

.....ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์พิเศษชุติมา ไตรรัตน์วรกุล)

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม**

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัชรินทร์ พิวัฒน์)

.....  
(ศาสตราจารย์ ดร.รวี เกียรติไพศาล)

.....กรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร.รวี เกียรติไพศาล)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อ้อยทิพย์ ชาญการคำ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์  
สุขภาพช่องปาก

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคล  
ที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัชรินทร์ พิวัฒน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาววนิดา ปิยวิโรจน์กุล)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน  
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาววนิดา ปิยวิโรจน์กุล)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดและการเจริญเติบโตของไบฟิโดแบคทีเรียในช่องปากใน ห้องปฏิบัติการ
ผู้เขียน	นางสาววนิดา ปิยวิโรจน์กุล
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก
ปีการศึกษา	2558

### บทคัดย่อ

โรคฟันผุเกิดจากการเสียสมดุลระหว่างการสูญเสียแร่ธาตุกับการคืนกลับแร่ธาตุ ถ้าค่าความเป็นกรดในช่องปากลดลงต่ำกว่าค่าวิกฤตของการเกิดฟันผุ คือ 5.5 จะทำให้เกิดการสูญเสียแร่ธาตุของผิวเคลือบฟันได้ แบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Streptococcus mutans* และ *Lactobacillus salivarius* สามารถให้ความเป็นกรดได้ต่ำกว่า 5.5 จากการเมตาบอลิซึมน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงาน โดยเฉพาะการให้กรดแลคติกหลังจากการสลายน้ำตาล ไบฟิโดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกและกรดอะซิติกจากการย่อยสลายน้ำตาล และมีหลายการศึกษาที่รายงานความสัมพันธ์ระหว่างไบฟิโดแบคทีเรีย โดยเฉพาะ *Bifidobacterium dentium* กับโรคฟันผุ หากแต่การศึกษานี้ของไบฟิโดแบคทีเรียกับรูปแบบการสลายน้ำตาลต่างๆ ยังไม่ชัดเจน

วัตถุประสงค์ 1) เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *B. dentium* เปรียบเทียบกับเชื้อก่อโรคฟันผุ *S. mutans* และ *L. salivarius* เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 ณ เวลาต่างๆ 2) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่แยกได้จากสภาวะฟันผุต่างๆ กับความสามารถในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *B. dentium* และ 3) เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของไบฟิโดแบคทีเรียในช่องปากสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 2 ณ เวลาต่างๆ

เชื้อที่ใช้ในการศึกษาดังนี้ ไบฟิโดแบคทีเรียต้นแบบที่มีรายงานว่าพบในช่องปาก 6 สายพันธุ์ (*B. dentium* CCUG 18367, *Bifidobacterium longum* CCUG 28903, *Bifidobacterium breve* CCUG 30511A, *Scardovia inopicata* CCUG 35729, *Alloscardovia omnicoles* CCUG 31649 และ *Bifidobacterium scardovii* CCUG 13008A), *S. mutans* ATCC 25175 และ *L. salivarius* ATCC 11741 รวมถึงเชื้อ *B. dentium* ที่แยกจากในช่องปากเด็ก 10 คน จำนวน 15 สายพันธุ์ โดยเป็นเชื้อที่แยกได้จากแผ่นคราบจุลินทรีย์ของเด็กที่ไม่มีฟันผุ 5 สายพันธุ์ จากแผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิว

ฟันที่ไม่ผุของเด็กที่มีฟันผุ 5 สายพันธุ์ และจากรอยโรคฟันผุ 5 สายพันธุ์ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อใน น้ำตาลชนิดต่างๆ (pH 7.0) ในสภาวะไร้ออกซิเจน วัดค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายด้วย เครื่องวัดความเป็นกรดเบส และวัดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการวัดความขุ่นด้วยเครื่องวัดการ ดูดกลืนแสง ที่เวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

ผลการวิจัยพบว่า เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบทุกชนิดและสายพันธุ์มีรูปแบบ ของการสร้างกรดและการเจริญเติบโตแบบเดียวกัน คือ การให้ค่าความเป็นกรดต่างแปรผกผันกับ การเจริญเติบโต แตกต่างกันที่ความเร็วในการให้ความเป็นกรดและการเจริญเติบโต โดย *S. mutans* สามารถเจริญเติบโตได้มากที่สุดและให้ความเป็นกรดต่ำสุดในช่วงเวลา 0-6 ชั่วโมง ค่าความเป็น กรดสุดท้ายเท่ากับ 3.6-4.2 ตามด้วย *L. salivarius* และ *B. dentium* ซึ่งเจริญเติบโตและให้ความเป็น กรดในช่วงเวลา 6-12 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรดสุดท้ายเท่ากับ 3.7-4.3 และ 4.2-4.6 ตามลำดับ เชื้อ ทั้ง 3 ชนิดสามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดจากน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส โดยความ เข้มข้นของน้ำตาลที่แตกต่างกันไม่ได้ส่งผลต่ออัตราเฉลี่ยการผลิตกรดและอัตราเฉลี่ยการ เจริญเติบโตของเชื้อที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามอัตราเฉลี่ยการสร้างกรดและการเจริญเติบโตของ เชื้อต่อน้ำตาลแลคโตสมิแนวโน้มให้ค่าต่ำกว่า

*B. dentium* CCUG 18367, *B. longum* CCUG 28903, *B. breve* CCUG 30511A, *B. scardovii* CCUG 13008A และ *A. omnicoles* CCUG 31649 สามารถเจริญเติบโตและให้ความเป็น กรดในช่วงเวลา 6-12 ชั่วโมง ซึ่งเร็วกว่า *S. inopicata* CCUG 35729 ที่เจริญเติบโตและให้ความเป็น กรดในช่วงเวลา 12-24 ชั่วโมง โดยค่าความเป็นกรดสุดท้ายเท่ากับ 3.8-4.8

*B. dentium* ที่แยกได้จากสภาวะฟันผุต่างๆ กัน มีรูปแบบในการสร้างกรดและการ เจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน

สามารถสรุปได้ว่าไบฟิโดแบคทีเรียในช่องปากเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการ ผลิตกรดได้มาก สามารถให้ค่าความเป็นกรดสุดท้ายต่ำกว่าค่าวิกฤต เช่นเดียวกับ *S. mutans* และ *L. salivarius* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสำคัญที่เกี่ยวข้องกับโรคฟันผุ ดังนั้น *B. dentium* จึงอาจมีบทบาทสำคัญ ต่อโรคฟันผุเช่นเดียวกัน เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการเจริญเติบโตและการผลิตกรดจาก น้ำตาลชนิดต่างๆ รวมทั้งน้ำตาลแลคโตสซึ่งพบได้ในน้ำนมแม่

<b>Thesis Title</b>	Acid Production and Growth by Oral Bifidobacteria <i>in vitro</i>
<b>Author</b>	Miss Wanida Piyawirojkul
<b>Major Program</b>	Oral Health Sciences
<b>Academic Year</b>	2015

## ABSTRACT

Caries develops as an imbalance between the demineralization and remineralization process of enamel and dentin due to frequent pH drops below the critical pH (5.5) for demineralization. Oral bacteria such as *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus salivarius* can produce lactic acid from sugar metabolism to cause the pH fall lower than 5.5. Bifidobacteria are heterofermentative and produce lactic acid and acetic acid as the main-end products of the fermentation of sugars. Bifidobacteria in the oral cavity especially *Bifidobacterium dentium* are reported sporadically in association with dental caries. However, less is known of how acidogenicity and growth abilities differs from various sugars among the *Bifidobacterium* species.

The objectives of this study were: 1) to investigate the acid-producing and growth ability of *B. dentium* compared with *S. mutans* and *L. salivarius* in 0%, 2%, 5%, 7% and 10% glucose, sucrose and lactose solution, 2) to analyze acid production and growth abilities of *B. dentium* isolated from high caries and caries free subjects, and 3) to study the acid-producing and growth abilities of different *Bifidobacterium* species in 2% glucose, sucrose and lactose solution.

Six reference *Bifidobacterium* species, which had been found in oral cavity (*B. dentium* CCUG 18367, *Bifidobacterium longum* CCUG 28903, *Bifidobacterium breve* CCUG 30511A, *Scardovia inopicata* CCUG 35729, *Alloscardovia omnicolens* CCUG 31649 and *Bifidobacterium scardovii* CCUG 13008A), *S. mutans* ATCC 25175 and *L. salivarius* ATCC 11741, and 15 clinical strains of oral *B. dentium* (5 strains from dental plaque of caries-free subjects, 5 strains from dental plaque on sound teeth of caries subjects, and 5 strains from carious lesion) were studied. Anaerobically-grown bacterial cells were inoculated 48 h. in BHI broth



containing glucose, sucrose or lactose (pH 7.0). Acid production and growth were measured at 0, 6, 12, 24 and 48 h. by pH meter and spectrophotometer.

A positive correlation was found between the growth rate and the pH decrease in all tested bacterial species, however, the variation of the speed of acid production and growth was detected among the species. The maximum acid production and growth from various sugars metabolism of *S. mutans* was found at 6 h. and the final pHs at 48 h. were 3.6–4.2. *L. salivarius* and *B. dentium* showed considerably growth and acid production at 12 h. Their final pHs were 3.7–4.3 and 4.2–4.6, respectively. *S. mutans*, *L. salivarius* and *B. dentium* could grow and produce acid from all tested sugars, however, growth and acid production from lactose had a tendency to be lower. The concentrations of the sugar did not affect the acid production and growth rates.

*B. dentium* CCUG 18367, *B. longum* CCUG 28903, *B. breve* CCUG 30511A, *B. scardovii* CCUG 13008A and *A. omnicolens* CCUG 31649 had maximum acid production and growth rate at 12 h. However, the maximum acid production and growth rate of *S. inopicata* CCUG 35729 was found at 24 h. The final pHs of tested *Bifidobacterium* species were 3.8–4.8.

The acid production and growth rate of *B. dentium* (clinical isolates) among different caries conditions showed no statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

It concluded that high acidogenic characteristic was found in various Bifidobacteria. Their final pHs could drop below critical pH as *S. mutans* and *L. salivarius* which are the predominant cariogenic pathogen. Thus *B. dentium* might play an important role in caries development due to their abilities to grow and produce acid from various sugars including lactose in human milk.

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลือจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัชรินทร์ พิวัฒน์ และศาสตราจารย์ ดร.รวี เกียรติไพศาล อาจารย์คณะทันตแพทยศาสตร์ ผู้ซึ่งให้คำปรึกษา แนะนำและให้ความรู้ต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้ ตลอดจนตลอดเวลาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.รวี เกียรติไพศาล ในการแนะนำและให้ความรู้การทำวิจัยเกี่ยวกับการเลี้ยงเชื้อและแลกเปลี่ยนจุลชีววิทยา

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ได้กรุณาให้แนวคิดและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์เพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ผู้สนับสนุนทุนอุดหนุนการทำวิจัยครั้งนี้ หน่วยบัณฑิตศึกษา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้การช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในทุกๆ เรื่อง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาโสตจักษุวิทยา รวมถึงนักศึกษาหลังปริญญาภาควิชาโสตจักษุวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัยและช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน ขอขอบคุณรุ่นพี่และรุ่นน้องนักศึกษาหลังปริญญาสาขาทันตกรรมสำหรับเด็ก ภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้กำลังใจและช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน

ขอขอบพระคุณนายแพทย์สาธารณสุขจังหวัดสุราษฎร์ธานี ผู้อำนวยการโรงพยาบาลศิริรัฐนิคม จังหวัดสุราษฎร์ธานี โรงพยาบาลต้นสังกัดที่สนับสนุนทุนการลาศึกษาต่อของข้าพเจ้า ขอขอบพระคุณเพื่อนร่วมงาน โรงพยาบาลศิริรัฐนิคม และทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือและสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดาและทุกคนในครอบครัว ที่เสียสละเวลา มอบความห่วงใยและคอยสนับสนุนในทุกเรื่อง พร้อมทั้งให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้าเสมอมา ขอขอบพระคุณคณาจารย์ บุคลากรทุกท่านในภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้คำปรึกษา แนะนำและให้กำลังใจในการเรียนและทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา คุณงามความดีที่เกิดจากการวิจัยครั้งนี้ ขอมอบแด่บุพการีและคณาจารย์ทุกท่านที่เป็นผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาตั้งแต่เริ่มต้นการศึกษาของข้าพเจ้า

วนิดา ปิยวิโรจน์กุล

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการรูป	(13)
บทที่	
1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การทบทวนวรรณกรรม	2
วัตถุประสงค์	14
2 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	15
3 ผลการวิจัย	23
4 บทวิจารณ์	44
5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	48
บรรณานุกรม	49
ภาคผนวก	55
ประวัติผู้เขียน	57

## รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงค่าความเป็นกรดสุดท้ายของเชื้อต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบ	9
ตารางที่ 2	แสดงค่าความเป็นกรดสุดท้ายของเชื้อต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลชนิดต่างๆ	10
ตารางที่ 3	แสดงความชุกของเชื้อ ไบฟิโดแบคทีเรียที่แยกได้จากช่องปากของเด็กไทย จำนวน 100 คน อายุระหว่าง 6 - 9 ปี ที่อาศัยอยู่ใน จ.สงขลา	13
ตารางที่ 4	แสดงจำนวน strain ที่นำมาศึกษาในแต่ละสปีชีส์	16
ตารางที่ 5	แสดงจำนวน clinical strains จากตำแหน่งต่างๆ ในช่องปากที่สุ่มเลือกมาศึกษา	16
ตารางที่ 6	แสดงชนิดและความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลที่ต้องการศึกษาสำหรับเชื้อแต่ละสปีชีส์	17
ตารางที่ 7	แสดงอัตราเฉลี่ยการผลิตรวดของ <i>B. dentium</i> CCUG 18367 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 ณ เวลาต่างๆ	26
ตารางที่ 8	แสดงอัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโตของ <i>B. dentium</i> CCUG 18367 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 ณ เวลาต่างๆ	27
ตารางที่ 9	แสดงอัตราเฉลี่ยการผลิตรวดของ <i>S. mutans</i> ATCC 25175 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 ณ เวลาต่างๆ	31
ตารางที่ 10	แสดงอัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโตของ <i>S. mutans</i> ATCC 25175 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 ณ เวลาต่างๆ	32
ตารางที่ 11	แสดงอัตราเฉลี่ยการผลิตรวดของ <i>L. salivarius</i> ATCC 11741 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 ณ เวลาต่างๆ	36

## รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 12	แสดงอัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโตของ <i>L. salivarius</i> ATCC 11741 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 ณ เวลาต่างๆ	37
ตารางที่ 13	แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของอัตราการผลิตรดของ <i>B. dentium</i> (clinical strains) ของทั้ง 3 กลุ่มในช่วงเวลาต่างๆ	38
ตารางที่ 14	แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของอัตราการเจริญเติบโตของ <i>B. dentium</i> (clinical strains) ของทั้ง 3 กลุ่มในช่วงเวลาต่างๆ	39
ตารางที่ 15	แสดงอัตราเฉลี่ยการผลิตรดของไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปาก สปีชีส์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 2 ณ เวลาต่างๆ	41
ตารางที่ 16	แสดงอัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโตของไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปาก สปีชีส์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 2 ณ เวลาต่างๆ	42
ตารางที่ 17	แสดงค่าความเป็นกรดสุดท้ายที่ 48 ชั่วโมงของไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากสปีชีส์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 2	43

## รายการรูปภาพ

รูปภาพที่	หน้า
รูปที่ 1 แสดงลักษณะรูปร่างทั่วไปของเชื้อไบฟิโดแบคทีเรีย	3
รูปที่ 2 แสดงไดอะแกรมของกระบวนการเมตาบอลิซึมน้ำตาลเฮกโซสของไบฟิโดแบคทีเรีย	4
รูปที่ 3 แสดงปัจจัยซึ่งเป็นส่วนประกอบของกระบวนการเกิดโรคฟันผุของเชื้อมิวแทนสเตรปโตคอคไค และแลคโตบาซิลไล	7
รูปที่ 4 แสดงแผนภูมิกระบวนการเกิดโรคฟันผุ	8
รูปที่ 5 แสดงความสามารถในการผลิตกรดของ <i>B. dentium</i> CCUG 18367 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10	24
รูปที่ 6 แสดงความสามารถในการเจริญเติบโตของ <i>B. dentium</i> CCUG 18367 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10	25
รูปที่ 7 แสดงความสามารถในการผลิตกรดของ <i>S. mutans</i> ATCC 25175 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10	29
รูปที่ 8 แสดงความสามารถในการผลิตเจริญเติบโตของ <i>S. mutans</i> ATCC 25175 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10	30
รูปที่ 9 แสดงความสามารถในการผลิตกรดของ <i>L. salivarius</i> ATCC 11741 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10	34
รูปที่ 10 แสดงความสามารถในการเจริญเติบโตของ <i>L. salivarius</i> ATCC 11741 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10	35

## บทที่ 1

### บทนำ

#### บทนำตั้งเรื่อง

ไบฟิโดแบคทีเรียเป็นเชื้อแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเกินร้อยละ 0.5 อยู่ในบรรยากาศปกติได้ไม่เกิน 10 นาที (บางสปีชีส์สามารถทนออกซิเจนในรูปแบบของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้) ไม่มีเอนไซม์ catalase (ยกเว้น *B. indicum* และ *B. coryneforme*) มีหลายขนาดและหลายรูปร่าง ลักษณะเป็นแท่ง แยกออกเป็นสองแขนงหรือหลายแขนง พบอยู่เดี่ยวๆ เป็นสายยาวหรือรวมกันเป็นกลุ่ม<sup>1</sup> โดยลักษณะรูปร่างนั้นยังขึ้นอยู่กับชนิดของ strain และอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อด้วย<sup>2</sup> เชื้อไบฟิโดแบคทีเรียอาศัยอยู่ในลำไส้ ช่องคลอดและช่องปากของมนุษย์ ลำไส้ของสัตว์ ช่องท้องของแมลงและน้ำเสีย<sup>3</sup> เชื้อที่แยกได้จากมนุษย์และสัตว์มีอยู่ 7 ชนิด ได้แก่ *Bifidobacterium*, *Aeriscardovia*, *Falci vibrio*, *Gardnerella*, *Parascardovia*, *Scardovia* และ *Alloiscardovia*<sup>4,5</sup> และมีประมาณ 36 สปีชีส์<sup>6</sup>

ไบฟิโดแบคทีเรียสามารถแยกได้จากน้ำลาย แผ่นคราบจุลินทรีย์เนื้อเหงือก รอยโรคฟันผุในชั้นเนื้อฟันและโพรงประสาทฟันที่มีการอักเสบ ไบฟิโดแบคทีเรียสปีชีส์ที่แยกได้จากตัวอย่างในช่องปาก ได้แก่ *B. dentium*, *S. inopinata*, *P. denticolens*, *A. omnicoles*<sup>6,7</sup>, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. scardovii* และ *S. wiggisiae*<sup>7-12</sup> และมีการรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างไบฟิโดแบคทีเรียกับโรคฟันผุโดยพบว่าจากการเก็บตัวอย่างฟันผุ 19 ตัวอย่าง พบไบฟิโดแบคทีเรีย 13 ตัวอย่าง โดยสปีชีส์ที่พบมากที่สุดคือ *S. inopinata* และจากตัวอย่างแผ่นคราบจุลินทรีย์ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง พบไบฟิโดแบคทีเรีย 11 ตัวอย่าง โดยสปีชีส์ที่พบมากที่สุดคือ *B. dentium*<sup>13</sup> การศึกษาในรอยผุชั้นเนื้อฟันด้านบดเคี้ยวและแผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวเคลือบฟันที่ไม่มีรอยผุ พบว่าผิวเคลือบฟันด้านบดเคี้ยวที่ไม่มีรอยผุพบไบฟิโดแบคทีเรียได้น้อยกว่าบริเวณที่มีรอยผุอย่างมีนัยสำคัญ<sup>14</sup> สัดส่วนของไบฟิโดแบคทีเรียสัมพันธ์กับความรุนแรงของรอยผุบริเวณผิวรากฟันด้วย โดยสปีชีส์ที่พบมากที่สุดคือ *B. dentium*<sup>15</sup> การศึกษาระดับไบฟิโดแบคทีเรียในน้ำลายของผู้สูงอายุ พบความสัมพันธ์กับจำนวนฟันที่ได้รับการอุด ( $p < 0.001$ ) และจำนวนด้านที่ฟันผุ ( $p = 0.036$ ) อย่างมีนัยสำคัญ<sup>16</sup> และการศึกษาระดับไบฟิโดแบคทีเรียในน้ำลายของเด็ก พบว่าเด็กที่มีฟันผุจะมีระดับไบฟิโดแบคทีเรียมากกว่าเด็กที่ฟันไม่ผุอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.001$ )<sup>17</sup>

โรคฟันผุเกิดจากการเสียสมดุลระหว่างการสูญเสียแร่ธาตุกับการคืนกลับแร่ธาตุ (remineralization) ถ้ากรดถูกผลิตมากจนค่าความเป็นกรดในช่องปากลดลงต่ำกว่าค่าวิกฤตของการเกิดฟันผุ คือ 5.5 จะทำให้เกิดการสูญเสียแร่ธาตุ (demineralization) ของผิวเคลือบฟันได้<sup>18</sup> ไบฟิโดแบคทีเรียสามารถผลิตกรดอะซิติกและกรดแลคติกในอัตราส่วนโดยเฉลี่ย 3:2 จากการย่อยสลายน้ำตาล ไบฟิโดแบคทีเรียที่แยกได้จากกรากฟันที่ผุรุนแรง (root caries) สามารถลดค่าความเป็นกรดสุดท้ายได้ต่ำกว่า 4.2 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบ<sup>19</sup> *B. dentium* และ *B. longum* ที่แยกได้จากช่องปากสามารถลดค่าความเป็นกรดสุดท้ายให้เหลือ 4.4 และ 5.4 ตามลำดับเมื่อเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบ<sup>20</sup> แสดงให้เห็นถึงความสามารถของไบฟิโดแบคทีเรียในการสร้างกรดซึ่งเป็นบทบาทหนึ่งที่สำคัญของแบคทีเรียก่อโรคฟันผุ

อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันของไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากสปีชีส์ต่างๆ ยังมีจำกัด การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากสปีชีส์ต่างๆ จากการสลายน้ำตาลต่างๆ

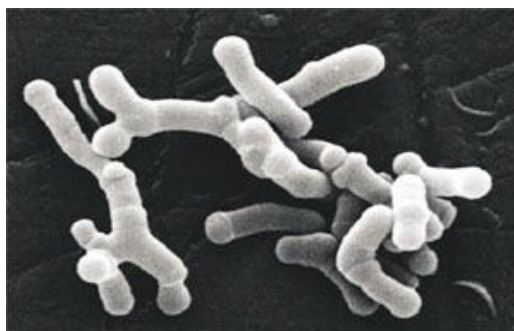
## การสืบค้นเอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิทยานิพนธ์

### ลักษณะทั่วไปของไบฟิโดแบคทีเรีย

ไบฟิโดแบคทีเรียถูกกล่าวถึงครั้งแรกในชื่อ “Bifidus” ในปี ค.ศ.1900 เมื่อ Tissier ได้ทำการแยกเชื้อแอนแอโรบิกแบคทีเรียด้วยลักษณะ bifid จากอุจจาระของทารกที่กินนมมารดา โดยเขาได้ตั้งชื่อเชื้อว่า *Bacillus bifidus*<sup>1,3</sup> และในปี ค.ศ.1957 สามารถแยกจีโนมไบฟิโดแบคทีเรียออกจากจีโนมแลคโตบาซิลไลได้ประสบความสำเร็จด้วยความแตกต่างของกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate fermentation patterns) ไบฟิโดแบคทีเรียเป็นเชื้อแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เป็น strictly anaerobe (บางสปีชีส์สามารถทนออกซิเจนในรูปแบบของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้) ไม่มีเอนไซม์ catalase (ยกเว้น *B. indicum* และ *B. coryneforme*) มีหลายขนาดและหลายรูปร่าง ลักษณะเป็นแท่งแยกออกเป็นสองแขนงหรือหลายแขนง พบอยู่เดี่ยวๆ เป็นสายยาวหรือรวมกันเป็นกลุ่ม<sup>1</sup> (รูปที่ 1) โดยลักษณะรูปร่างนั้นยังขึ้นอยู่กับชนิดของ strain และอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อด้วย<sup>2</sup> เชื้อไบฟิโดแบคทีเรียอาศัยอยู่ในลำไส้ ช่องคลอดและช่องปากของมนุษย์ ลำไส้ของสัตว์ ช่องท้องของแมลงและน้ำเสีย<sup>3</sup> Bifidobacteriaceae ซึ่งแยกได้จากมนุษย์และสัตว์มีอยู่ 7 จีโนม ได้แก่ *Bifidobacterium*, *Aeriscardovia*, *Falcivibrio*, *Gardnerella*, *Parascardovia*,



*Scardovia* และ *Alloscardovia*<sup>4,5</sup> และประมาณ 36 สปีชีส์<sup>6</sup> ไบฟิโดแบคทีเรียที่แยกได้จากมนุษย์จะเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 36-38 องศาเซลเซียส ในขณะที่ไบฟิโดแบคทีเรียที่แยกได้จากสัตว์จะเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิที่สูงขึ้น 41-43 องศาเซลเซียส โดย *B. thermacidophilum* สามารถเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิสูงสุดถึง 49.5 องศาเซลเซียส<sup>21</sup> ส่วนอุณหภูมิต่ำสุดโดยทั่วไปในการเจริญเติบโตของไบฟิโดแบคทีเรียจะไม่ต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส ยกเว้น *B. psychraerophilum* ซึ่งสามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส<sup>22</sup> ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมในการเริ่มต้นการเจริญเติบโตของเชื้อประมาณ 6.5-7.0 เป็นกรดเบสที่ต่ำกว่า 4.5 หรือสูงกว่า 8.5 จะไม่พบการเติบโตของเชื้อ ยกเว้น *B. thermacidophilum* ซึ่งสามารถเติบโตได้ที่ค่าความกรด 4.0<sup>21</sup>



รูปที่ 1 ลักษณะรูปร่างทั่วไปของเชื้อไบฟิโดแบคทีเรีย

ที่มา: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacterium>

### เมตาบอลิซึมของเชื้อไบฟิโดแบคทีเรีย

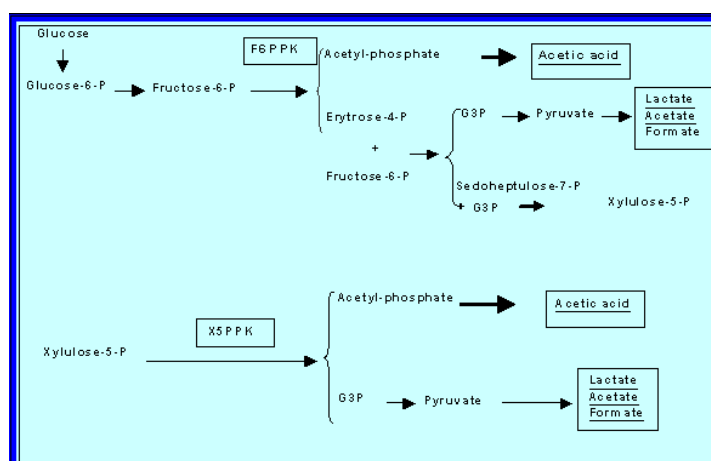
ส่วนใหญ่ของสปีชีส์ต่างๆ ของไบฟิโดแบคทีเรียไม่สามารถเติบโตได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์เพียงอย่างเดียว จำเป็นต้องใช้สารชีวภาพที่มีความซับซ้อน เช่น เลซีน ซีรั่ม อัลบูมินจากวัว สารสกัดจากยีสต์ เติมน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ<sup>23</sup> เมื่อไบฟิโดแบคทีเรียย่อยสารคาร์โบไฮเดรตจะให้ผลผลิตเป็นกรด แต่จะไม่ผลิตก๊าซออกมา เชื้อไบฟิโดแบคทีเรียไม่มีเอนไซม์ catalase (ยกเว้น *B. indicum* และ *B. coryneforme* เมื่อเติบโตในที่ที่มีอากาศ)<sup>2</sup>

การย่อยน้ำตาลเฮกโซสของเชื้อไบฟิโดแบคทีเรานั้นจะผ่าน fructose 6-phosphate pathway<sup>24</sup> ดังแสดงในรูปที่ 2 “bifid shunt” หรือกระบวนการแคตาบอลิซึมกลูโคสผ่านเอนไซม์ fructose 6-phosphate phosphoketolase ทำให้เกิด acetyl phosphate และ erythrose 4-phosphate ผลผลิตสุดท้ายของกระบวนการเกิดจากเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ transaldolase, transketolase และ fructose 6-phosphate phosphoketolase ซึ่งจะทำให้เกิด glyceraldehyde 3-phosphate จากนั้น

glyceraldehyde 3-phosphate จะให้ผลผลิตเป็น acetic acid และ lactic acid ในอัตราส่วนโดยเฉลี่ย 3:2

ไบฟิโดแบคทีเรียยังสามารถ متابอไลต์น้ำตาลหลายโมเลกุลที่มนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ เช่น hog gastric, mucin, pectin, plant oligosaccharides และ fructo-oligosaccharides<sup>1</sup>

ไบฟิโดแบคทีเรียสปีชีส์ที่แตกต่างกันจะผลิต acetic acid, lactic acid, formic acid และ ethanol ในปริมาณที่ต่างแตกต่างกันถึงแม้ว่าจะอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกันก็ตาม ตัวอย่างเช่น *B. adolescentis* ในนมสามารถผลิต lactic acid ได้มากกว่า *B. bifidum* และ *B. longum*<sup>25</sup> นอกจากนี้ ความแตกต่างของแหล่งคาร์บอนและปริมาณคาร์บอนอาจจะส่งผลต่อผลผลิตจากกระบวนการหมัก ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาลเฮกโซสจะไม่เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ยกเว้นในการย่อยสลาย gluconate<sup>1</sup>



รูปที่ 2 ไคอะแกรมของกระบวนการเมตาบอลิซึมน้ำตาลเฮกโซสของไบฟิโดแบคทีเรีย  
ที่มา: <http://www.respyn.uanl.mx/vii/4/ensayos/sugarcatabolisminbifidobacteria.htm>

การศึกษาเกี่ยวกับการเมตาบอลิซึมน้ำตาลชนิดต่างๆ ของ lactic acid bacteria ชนิดอื่นๆ ได้แก่ การศึกษาความสามารถในการผลิตกรดแลคติกจากการเมตาบอลิซึมน้ำตาลชนิดต่างๆ ของเชื้อ *Lactobacillus casei* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดจากน้ำตาลซูโครสได้ที่สุด (ได้ lactic acid 39.1 g l<sup>-1</sup>) ผลิตกรดจากกลูโคสได้รองลงมา (ได้ lactic acid 36.9 g l<sup>-1</sup>) และผลิตกรดจากแลคโตสได้น้อยที่สุด (ได้ lactic acid 17.2 g l<sup>-1</sup>)<sup>26</sup> สอดคล้องกับการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. cerevisiae* strains ATCC 9080 และ ATCC 2366 ในสารละลายน้ำตาลความเข้มข้น 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นระยะเวลา 30 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตในสารละลายน้ำตาลซูโครสได้ดีกว่าสารละลายน้ำตาลแลคโตส<sup>27</sup> และการศึกษาการเจริญเติบโตของ

เชื้อ *Bacillus* sp. ในสารละลายน้ำตาลความเข้มข้น 1% เป็นระยะเวลา 4 วัน พบว่าเมื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการวัดความขุ่น (OD) เชื้อสามารถเจริญเติบโตในสารละลายน้ำตาลซูโครสได้ดีที่สุด และเจริญเติบโตในสารละลายน้ำตาลกลูโคสและแลคโตสได้รองลงมาตามลำดับ<sup>28</sup>

### การเจริญเติบโตของไบฟิโดแบคทีเรีย

#### อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

ไบฟิโดแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่สังเคราะห์ที่มีน้ำตาลแลคโตส กรดอะมิโนอิสระ 3 ชนิด (cysteine glycine และ tryptophan) วิตามิน นิวกลิโอไทด์ และแร่ธาตุเป็นองค์ประกอบ บางสายพันธุ์สามารถเติบโตได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตส สารบัพเฟอร์ แร่ธาตุ เกลือแอมโมเนียม cysteine vitamins biotin และ calcium pantothenate<sup>29</sup> ในปัจจุบันมีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อไบฟิโดแบคทีเรียหลากหลายชนิด โดยอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง คือ Bifidobacterium iodoacetate medium ซึ่งประกอบด้วย iodoacetate 25 mg/l (BIM-25) หรือ 50 mg/l (BIM-50) โดย iodoacetate จะยับยั้งเอนไซม์ glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase ซึ่งไม่จำเป็นต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของไบฟิโดแบคทีเรีย ดังนั้นจึงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อปนเปื้อนอื่นๆ ได้ นอกจากนี้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้ออีกชนิดหนึ่งที่ใช้กันอย่างกว้างขวางถูกพัฒนาโดย Beerens ประกอบด้วย propionic acid ซึ่งมีความจำเพาะต่อไบฟิโดแบคทีเรีย<sup>30</sup> และเมื่อไม่นานมานี้มีการผลิต bifidobacterium selective media (BMS) โดยการเติม 50 mg/l mupirocin ใน MRS-derived media<sup>22,31</sup>

#### Growth factors

Growth factor เป็นสารประกอบที่ช่วยให้ไบฟิโดแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้นในการทดลองในห้องปฏิบัติการ มีหลายการศึกษาเกี่ยวกับแหล่งที่มาและวิธีการใช้งานของ growth factors แต่ละตัว ซึ่งพบว่าสารประกอบที่ได้จากน้ำนมมนุษย์และน้ำนมวัวส่งเสริมการเจริญเติบโตของไบฟิโดแบคทีเรียได้ดี นอกจากนี้การใช้ yeast extract 0.25% (v/v) เป็น growth factor สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของ *B. bifidum* และ *B. infantis* ได้ สารประกอบอื่นๆ ที่ใช้เป็น growth factor ได้แก่ threonine, cysteine, enzyme-treated chlorella, peptone, trypticase, dextrin,

maltose และสารสกัดจากแคโรท (coenzyme A) มะเขือเทศและข้าวโพด รวมถึง commercial casein hydrolysates และ ultrafiltered hydrolysates<sup>29</sup>

### ไบฟิโดแบคทีเรียและช่องปากของมนุษย์

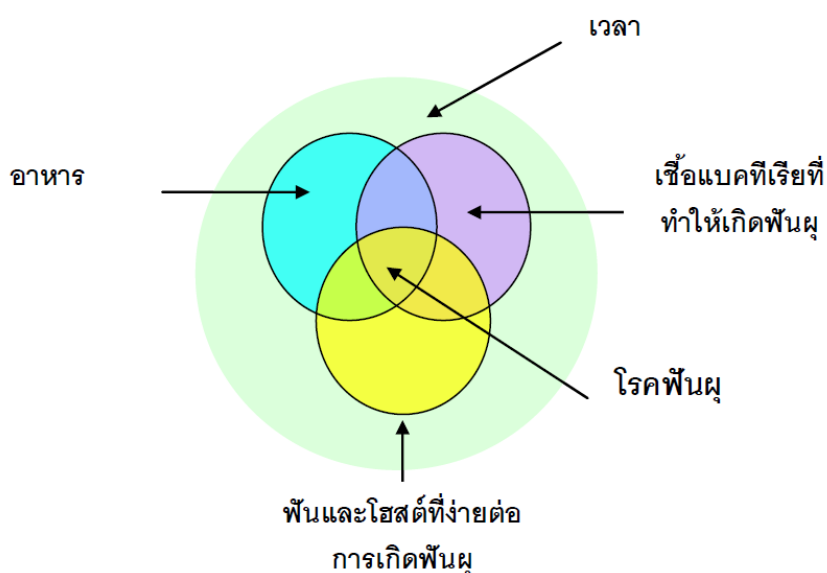
ช่องปากของมนุษย์เป็นแหล่งที่เหมาะสมในการอาศัยอยู่ของเชื้อแบคทีเรียหลากหลายชนิด จินัสของเชื้อ anaerobe ที่เป็น normal flora พบได้บ่อยในช่องปาก ได้แก่ *Actinomyces*, *Arachnia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Leptotrichia*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Treponema* และ *Veillonella*<sup>32</sup> การศึกษาในระยะหลังสามารถพบเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียในรอยโรคฟันผุ (active caries) ได้บ่อยขึ้น ซึ่งวิธีการที่ใช้ในการแยกไบฟิโดแบคทีเรียจากตัวอย่างจากช่องปาก (oral samples) มีความสำคัญต่ออัตราการพบเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวรากฟันของผู้สูงอายุด้วยวิธี Amplification and sequence analysis of 16S rRNA genes จากรากฟันที่ผุหรือแผ่นคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือกที่สัมพันธ์กับการเกิดฟันผุที่รากฟัน พบว่าไม่สามารถบ่งชี้เชื้อไบฟิโดแบคทีเรียจากผิวรากฟันได้เลย เนื่องจากเทคนิคในการแยกเชื้อที่ไม่ไวพอ<sup>33</sup> เมื่อใช้เทคนิค DNA-DNA checkerboard โดยสกัด DNA จากตัวอย่างจากช่องปาก โดยไม่ใช้ PCR amplification พบไบฟิโดแบคทีเรียในแผ่นคราบจุลินทรีย์ที่แยกมาจากรอยโรคฟันผุ (cavitated lesions) จากเด็ก 16 คนของเด็กทั้งหมด 30 คน และพบในเนื้อฟันจากตัวอย่าง 21 คนจากเด็กทั้งหมด 30 คนที่มี early childhood caries<sup>34</sup> เมื่อใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อกึ่งจำเพาะซึ่งใช้แยกแบคทีเรียชนิดที่ต้องการออกจากแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการ (semi-selective cultural approach) พบไบฟิโดแบคทีเรีย 13 ใน 19 ตัวอย่างจากเนื้อฟันที่ผุ และพบ 11 ใน 15 ตัวอย่างจากแผ่นคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือก<sup>13</sup> และสุดท้ายเมื่อใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิด modified TPY agar ที่เติม glacial acetic acid (1 มิลลิลิตร/ลิตร) และ mupirocin (100 มิลลิกรัม/ลิตร) เป็น selective growth medium ในการแยกไบฟิโดแบคทีเรียในการศึกษาเชื้อในลำไส้ไก่จึงประสบความสำเร็จ โดยพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดนี้มีความจำเพาะต่อไบฟิโดแบคทีเรียสูงและไบฟิโดแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้เป็นจำนวนมาก<sup>35</sup> สารประกอบเฉพาะในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อนี้คือ mupirocin ในสถานะที่เป็นกรดอ่อน การใช้เทคนิคนี้สามารถแยกเชื้อจากน้ำลายได้ถึง 94.2% จากผู้ใหญ่จำนวน 192 คน ซึ่งปริมาณเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียไม่แตกต่างจาก mutans streptococci และมากกว่า lactobacilli อย่างมีนัยสำคัญ<sup>6</sup> ต่อมาภายหลังสามารถแยกเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียได้ในปริมาณที่มากขึ้นในรอยโรคที่รากฟันเมื่อเปรียบเทียบกับรอยโรคที่รากฟันที่หยุดแล้ว พบไบฟิโด

แบคทีเรียในรอยฟุที่รากฟัน 12 ซี่จากทั้งหมด 15 ซี่<sup>15</sup> และจากการเก็บตัวอย่างรอยฟุชั้นเนื้อฟันด้านบดเคี้ยวในฟันน้ำนม 24 ซี่และฟันแท้ 15 ซี่ พบว่าสามารถแยกไบฟิโดแบคทีเรียจากฟันน้ำนมได้ 16 ซี่และจากฟันแท้ได้ 13 ซี่<sup>14</sup> จะเห็นได้ว่าเมื่อเทคนิคในการแยกเชื้อดีขึ้น พบมีการรายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างไบฟิโดแบคทีเรียกับการเกิดฟันผุมากขึ้น และพบว่าไบฟิโดแบคทีเรียมีแนวโน้มจะเป็นเชื้อก่อโรคในช่องปากมากขึ้น<sup>5</sup>

ไบฟิโดแบคทีเรียอาศัยอยู่ในส่วนต่างๆ ของช่องปาก ได้แก่ แผ่นคราบจุลินทรีย์ รอยโรคฟันผุ<sup>14,36</sup> และน้ำลาย<sup>6</sup> โดยสปีชีส์ที่พบ ได้แก่ *Bifidobacterium dentium*, *Scardovia inopicata* และ *Parascardovia denticolens* และเมื่อไม่นานมานี้มีการพบ *Alloscardovia omnicolens* เพิ่มเติมซึ่งแยกได้จากบริเวณที่มีการติดเชื้อในช่องปากและน้ำลาย<sup>6,7</sup> โดยสปีชีส์ส่วนใหญ่ที่พบคือ *Bifidobacterium dentium*<sup>6,36</sup>

## โรคฟันผุ

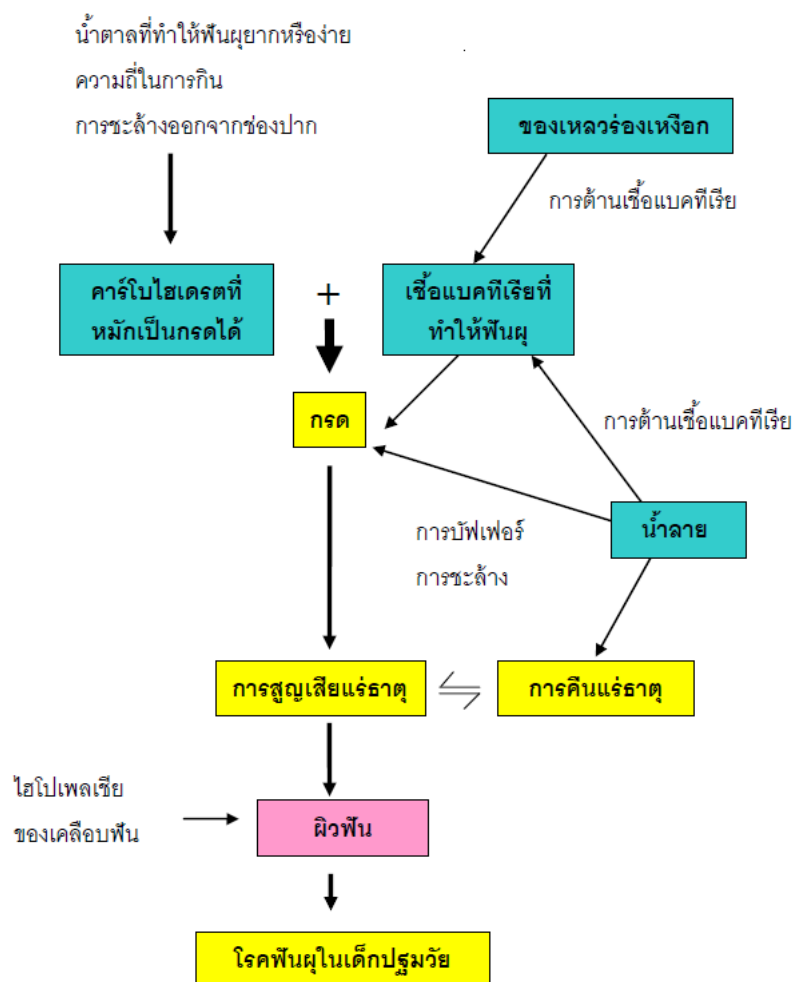
โรคฟันผุเป็นโรคติดเชื้อที่สามารถส่งผ่านจากบุคคลหนึ่งไปยังอีกบุคคลหนึ่งได้ โดยสาเหตุหลักเกิดจากปัจจัย 3 ประการ คือ แบคทีเรียที่ทำให้เกิดฟันผุ ฟัน และอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต รวมทั้ง ต้องอาศัยระยะเวลาในการเกิดโรคขึ้น (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ปัจจัยซึ่งเป็นส่วนประกอบของกระบวนการเกิดโรคฟันผุ

ที่มา: ชูติมา (2008)

การเกิดฟันผุจะเริ่มขึ้นเมื่อมีการสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก (lactic acid) กรดอะซิติก (acetic acid) เป็นต้น โดยกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ของแบคทีเรียซึ่งอาศัยอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงาน กรดที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยานี้จะทำให้ค่าความเป็นกรดในช่องปากลดลง โดยปกติแล้วกรดที่เกิดขึ้นนี้จะถูกบัฟเฟอร์ให้เป็นกลางโดยระบบที่สำคัญ ได้แก่ ระบบบัฟเฟอร์ในน้ำลาย เช่น สารประกอบไบคาร์บอเนต เพื่อให้เกิดความสมดุลของสภาวะความเป็นกรดต่าง แต่ถ้ากรดถูกผลิตมากจนค่าความเป็นกรดในช่องปากลดลงต่ำกว่าค่าวิกฤตของการเกิดฟันผุ คือ 5.2-5.5 จะทำให้เกิดการสูญเสียแร่ธาตุ (demineralization) ของผิวเคลือบฟันได้ ดังนั้นการเกิดฟันผุจึงเป็นการเสียสมดุลระหว่างการสูญเสียแร่ธาตุกับการคืนกลับแร่ธาตุ (remineralization)<sup>37</sup> ซึ่งสามารถเขียนเป็นแผนภูมิในรูปที่ 4



รูปที่ 4 แผนภูมิกระบวนการเกิดโรคฟันผุ

ที่มา: ชูติมา (2008)

## บทบาทของ cariogenic bacteria ต่อการเกิดโรคฟันผุ

เชื้อแบคทีเรียหลายชนิดในแผ่นคราบจุลินทรีย์สามารถผลิตกรดจากอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตได้และกรดที่ถูกผลิตขึ้นจะทำให้เกิดการสูญเสียแร่ธาตุ (demineralization) ของผิวเคลือบฟันได้ อย่างไรก็ตามถ้ากระบวนการสร้างกรดจากแบคทีเรียเกิดขึ้นน้อยครั้งและเกิดกรดในปริมาณน้อย จะเกิดกระบวนการรักษาสมดุลในแผ่นคราบจุลินทรีย์โดยการคืนกลับแร่ธาตุ (remineralization)<sup>38</sup> ในสภาวะนี้แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบ ได้แก่ non-mutans streptococci และ *Actinomyces* แต่เมื่อมีการบริโภคน้ำตาลลิ้นหรือหลังน้ำลายไม่เพียงพอต่อการปรับสภาพความเป็นกรดให้เป็นกลาง ค่าความเป็นกรดในแผ่นคราบจุลินทรีย์จะลดลง การเปลี่ยนแปลงนี้จะส่งผลให้ non-mutans bacteria ปรับตัวเพื่อให้มีคุณสมบัติที่สามารถทนกรดและสร้างกรดได้<sup>39</sup> เกิดการสูญเสียสมดุลระหว่างการสูญเสียแร่ธาตุกับการคืนแร่ธาตุและนำไปสู่การเกิดรอยโรคฟันผุในที่สุด

ถึงแม้ว่า low-pH non-mutans bacteria สามารถทนกรดและสร้างกรดได้มากขึ้น และเป็นเชื้อกลุ่มหลักที่พบในแผ่นคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือก แต่ภายใต้สภาวะความเป็นกรดสูงจะพบ mutans streptococci และ lactobacilli เป็นเชื้อกลุ่มหลัก การบริโภคน้ำตาลที่ทำให้แผ่นคราบจุลินทรีย์มีค่าความเป็นกรดลดลงเหลือ 4.0 อย่างรวดเร็ว จะส่งผลให้ non-mutans streptococci และ *Actinomyces* บางส่วนตายไป แต่ mutans streptococci และ lactobacilli สามารถอยู่รอดได้ดังแสดงในตารางที่ 1 ฟันมีการสูญเสียแร่ธาตุและมีการดำเนินของโรคฟันผุอย่างรวดเร็ว<sup>40</sup> ไบฟิโดแบคทีเรียเป็นเชื้อในกลุ่ม lactic bacteria ที่มีคุณสมบัติในการสร้างกรดและทนกรด<sup>19</sup> ดังนั้นไบฟิโดแบคทีเรียอาจอยู่รอดและเพิ่มจำนวนได้มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ

จะเห็นได้ว่าสภาวะที่มีความเป็นกรดจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดของแบคทีเรียภายใต้เงื่อนไขความสามารถในการทนกรดและการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดนั้นๆ<sup>41</sup>

**ตารางที่ 1** แสดงค่าความเป็นกรดสุดท้ายของเชื้อต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบ (1 Holt, 1984 2 Johnson *et al.*, 1990)

ชนิดของแบคทีเรีย	ค่าความเป็นกรดสุดท้าย	แหล่งอ้างอิง
Non-mutans streptococci	4.2-5.2	1
<i>Actinomyces</i>	4.3-5.7	2
Mutans streptococci	4.0-4.4	1
<i>Lactobacillus</i>	3.6-4.0	1

การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดของ lactic acid bacteria ในน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ การศึกษาเกี่ยวกับค่าความเป็นกรดสุดท้าย (Final pH) ของ *Lactobacillus casei* เมื่อเพาะเลี้ยงใน สารละลายน้ำตาลชนิดต่างๆ พบว่าค่าความเป็นกรดสุดท้ายที่เวลา 18 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงใน สารละลายน้ำตาลกลูโคสและซูโครสเท่ากับ 5.1 และ 5 ตามลำดับ ขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงใน สารละลายน้ำตาลแลคโตส ค่าความเป็นกรดสุดท้ายที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่ากับ 6.2<sup>26</sup>

การศึกษาในห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับการผลิตกรดจากสารละลายน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่เวลา 30 นาที ของไบฟิโดแบคทีเรียและ lactobacilli ซึ่งเป็น probiotic strains ในท้องตลาด โดยใช้ *S. mutans* Ingbritt เป็นตัวแปรควบคุม พบว่าไบฟิโดแบคทีเรียและ lactobacilli สามารถสร้างสภาวะ ที่เป็นกรดได้อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ขณะที่ *S. mutans* Ingbritt สร้างสภาวะที่เป็นกรดได้อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาล กลูโคสและซูโครส<sup>42</sup> ดังแสดงในตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** แสดงค่าความเป็นกรดสุดท้ายของเชื้อต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลชนิดต่างๆ

(Haukioja *et al.*, 2008)

ชนิดของแบคทีเรีย	ค่าความเป็นกรดสุดท้ายที่ 30 นาที		
	กลูโคส	ซูโครส	แลคโตส
Bifidobacteria	3.9-4.0	5.0-5.6	4.7-5.6
Lactobacilli	3.6-3.9	4.1-5.7	4.1-5.7
<i>S. mutans</i> Ingbritt	4.5	4.3	5.8

### แบคทีเรียก่อโรคฟันผุ

มีหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่าผิวฟันที่เพิ่งได้รับการทำความสะอาดจะมีเชื้อที่มีความจำเพาะสูงมาเกาะ ได้แก่ *S. sanguinis*, *S. oralis*, และ *S. mitis*<sup>43</sup> แต่สามารถพบเชื้ออื่นได้ เช่น *Actinomyces*<sup>44</sup> โดยส่วนใหญ่ของเชื้อที่เริ่มเกาะบนผิวฟันเป็นกลุ่ม mitis ซึ่งเป็น non-mutans streptococci ที่มีความแตกต่างจาก mutans streptococci ด้วยลักษณะทางพันธุกรรม<sup>45</sup> เมื่อเวลาผ่านไป ชนิดของเชื้อจะเปลี่ยนจาก *Streptococcus*-dominant ไปเป็น *Actinomyces*-dominant<sup>46</sup> จินัสที่โดดเด่นในแผ่นคราบจุลินทรีย์บนพื้นผิวฟันที่เรียบ คือ *Actinomyces* และ *Streptococcus* ซึ่งส่วนใหญ่เป็น non-mutans streptococci<sup>47</sup> สัดส่วนของ mutans streptococci ในแผ่นคราบจุลินทรีย์ที่ปกคลุมบนรอยพระยะเริ่มต้นบนผิวเคลือบฟันจะสูงกว่าในแผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวเคลือบฟันปกติ<sup>48</sup>



แต่อย่างไรก็ตามพบ non-mutans streptococci เป็นเชื้อกลุ่มหลักใน white spots<sup>49</sup> ในรอยผุที่ลุกลามจนถึงชั้นเนื้อฟันจะพบ mutans streptococci ประมาณ 30% ของเชื้อทั้งหมด<sup>50</sup> แต่จะพบ mutans streptococci ได้น้อยลงในรอยผุชั้นเนื้อฟันที่ลึกลงไป ซึ่งจะพบเชื้อ lactobacilli, Prevotellae และ *Bifidobacterium* ได้<sup>15,19</sup> จะเห็นได้ว่าชนิดของเชื้อที่พบเปลี่ยนแปลงไปตามการดำเนินของรอยโรคฟันผุ นอกจาก *S. mutans* แล้ว พบว่า *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, non-mutans streptococci และ *Actinomyces* มีบทบาทต่อการดำเนินของโรคฟันผุด้วย

### ไบฟิโดแบคทีเรียกับการเกิดโรคฟันผุ

ไบฟิโดแบคทีเรียสามารถแยกได้จากน้ำลาย แผ่นคราบจุลินทรีย์เนื้อเหงือก รอยโรคฟันผุในชั้นเนื้อฟันและโพรงประสาทฟันที่มีการอักเสบ สปีชีส์ของไบฟิโดแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างในช่องปาก ได้แก่ *B. dentium*, *S. inopinata*, *P. denticolens*, *A. omnicoles*<sup>6,7</sup>, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. scardovii* และ *S. wiggisiae*<sup>7-12</sup> มีการรายงานออกมาเป็นระยะๆ ถึงความสัมพันธ์ระหว่างไบฟิโดแบคทีเรียกับโรคฟันผุ Modesto M. และคณะในปี 2005 พบไบฟิโดแบคทีเรียในตัวอย่างฟันผุ 13 ตัวอย่างจากทั้งหมด 19 ตัวอย่าง โดยสปีชีส์ที่พบมากที่สุดคือ *S. inopinata* และพบไบฟิโดแบคทีเรียในตัวอย่างแผ่นคราบจุลินทรีย์ 11 ตัวอย่างจากทั้งหมด 15 โดยสปีชีส์ที่พบมากที่สุดคือ *B. dentium*<sup>13</sup> Mantzourani M. และคณะในปี 2009 ทำการศึกษาในรอยผุชั้นเนื้อฟันด้านบดเคี้ยวในฟันน้ำนม 24 ซี่และฟันแท้ 15 ซี่ และเก็บแผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวเคลือบฟันที่ไม่พบรอยผุในฟันน้ำนม 12 ซี่และฟันแท้ 12 ซี่ พบว่าสามารถแยกไบฟิโดแบคทีเรียจากฟันน้ำนมได้ 16 ซี่และจากฟันแท้ได้ 13 ซี่ โดยสปีชีส์ที่พบมากที่สุดคือ *B. dentium* และไม่พบไบฟิโดแบคทีเรียบนผิวเคลือบฟันที่ไม่มีรอยผุทั้งในฟันน้ำนมและฟันแท้ ดังนั้นผิวเคลือบฟันด้านบดเคี้ยวที่ไม่มีรอยผุพบไบฟิโดแบคทีเรียได้น้อยกว่าบริเวณที่มีรอยผุอย่างมีนัยสำคัญ<sup>14</sup> นอกจากนี้ Mantzourani M. และคณะในปี 2009 ยังพบว่าสัดส่วนของไบฟิโดแบคทีเรียสัมพันธ์กับความรุนแรงของรอยผุบริเวณผิวรากฟันอีกด้วย โดยสปีชีส์ที่พบมากที่สุดคือ *B. dentium*<sup>15</sup> Beighton D. และคณะในปี 2010 ศึกษาระดับไบฟิโดแบคทีเรียในน้ำลายของผู้สูงอายุจำนวน 156 คน พบว่าสัมพันธ์กับจำนวนฟันที่ได้รับการอุด ( $p < 0.001$ ) และจำนวนด้านที่ฟันผุ ( $p = 0.036$ ) อย่างมีนัยสำคัญ<sup>16</sup> Kaur R. และคณะในปี 2012 สามารถแยกไบฟิโดแบคทีเรียในน้ำลายได้ 95% ของเด็กที่มีฟันผุและแยกไบฟิโดแบคทีเรียได้เพียง 9% ของเด็กที่ฟันไม่ผุ ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.001$ )<sup>17</sup>

การศึกษาความชุกของเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียในช่องปากของเด็กไทยอายุระหว่าง 6-9 ปี ที่อาศัยอยู่ใน จ.สงขลา ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาโอยษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งยังไม่ตีพิมพ์ โดยทำการเก็บตัวอย่างรอยโรคฟันผุและแผ่นคราบจุลินทรีย์ในช่องปากของเด็กที่มีฟันผุจำนวน 50 คน และเก็บตัวอย่างแผ่นคราบจุลินทรีย์ในช่องปากของเด็กที่ไม่มีฟันผุจำนวน 50 คน แล้วแยกเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียออกมาด้วยการคุณลักษณะ colonial morphology การย้อมติดสีแกรมเป็นสีม่วง การคุณลักษณะเซลล์และการทดสอบ catalase reaction ซึ่งจะให้ผลเป็นลบ จากนั้นทำการระบุสปีชีส์ของเชื้อด้วยวิธี 16S rRNA genes PCR-RFLP DGGE และ DNA sequencing พบว่าสามารถแยกไบฟิโดแบคทีเรียได้จำนวน 3 สปีชีส์ ได้แก่ *B. dentium*, *B. breve* และ *B. longum* ทั้งหมด 257 strains โดย *B. dentium* เป็นสปีชีส์ที่แยกออกมาได้มากที่สุด พบในเด็กที่มีฟันผุจำนวน 24 คน (คิดเป็นร้อยละ 24 ของจำนวนเด็กทั้งหมด) 193 strains (คิดเป็นร้อยละ 75.10 ของจำนวน strains ทั้งหมดที่แยกได้) โดยพบในรอยโรคฟันผุจำนวน 18 คน 94 strains และพบในแผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันที่ไม่ผุ 15 คน 99 strains ขณะที่เด็กที่ไม่มีฟันผุพบ *B. dentium* เพียง 12 คน (คิดเป็นร้อยละ 12 ของจำนวนเด็กทั้งหมด) 44 strains (คิดเป็นร้อยละ 17.12 ของจำนวน strains ทั้งหมดที่แยกได้) *B. longum* พบเฉพาะในแผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันที่ไม่ผุของเด็กที่มีฟันผุจำนวน 2 คน (คิดเป็นร้อยละ 2 ของจำนวนเด็กทั้งหมด) 7 strains (คิดเป็นร้อยละ 2.72 ของจำนวน strains ทั้งหมดที่แยกได้) และ *B. breve* พบเฉพาะในแผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันที่ไม่ผุของเด็กที่มีฟันผุจำนวน 4 คน (คิดเป็นร้อยละ 4 ของจำนวนเด็กทั้งหมด) 13 strains (คิดเป็นร้อยละ 5.06 ของจำนวน strains ทั้งหมดที่แยกได้) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 3 จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่า *B. dentium* เป็นสปีชีส์ที่มีความน่าสนใจในการนำมาศึกษา เนื่องจากเป็นสปีชีส์ที่แยกออกมาจากช่องปากของเด็กได้มากที่สุด และเป็นสปีชีส์เดียวที่แยกออกมาได้จากรอยโรคฟันผุ

ตารางที่ 3 แสดงความชุกของเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียที่แยกได้จากช่องปากของเด็กไทยจำนวน 100 คน อายุระหว่าง 6-9 ปี ที่อาศัยอยู่ใน จ.สงขลา

สปีชีส์	เด็กที่มีฟันผุ (50 คน)		เด็กที่ไม่มีฟันผุ (50 คน)
	รอยโรคฟันผุ (คน/strains)	แผ่นคราบจุลินทรีย์ บนผิวฟันที่ไม่ผุ (คน/strains)	แผ่นคราบจุลินทรีย์ บนผิวฟันที่ไม่ผุ (คน/strains)
<i>B. dentium</i>	18/94	15/99	12/44
<i>B. longum</i>	-	2/7	-
<i>B. breve</i>	-	4/13	-

#### บทบาทของไบฟิโดแบคทีเรียในกระบวนการการเกิดฟันผุ

ไบฟิโดแบคทีเรียมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ และคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อน (complex carbohydrates)<sup>1,3</sup> รวมทั้ง dextrans ได้<sup>51</sup> จากการศึกษาต่างๆ ที่พบความสัมพันธ์ระหว่างไบฟิโดแบคทีเรียและโรคฟันผุบ่งชี้ให้เห็นว่าไบฟิโดแบคทีเรียมีคุณสมบัติในการสร้างกรดและทนกรด ทำให้สามารถอยู่รอดในสภาวะที่เป็นกรดและสร้างกรดเพิ่มขึ้นในรอยโรคฟันผุได้<sup>4,33</sup> ไบฟิโดแบคทีเรียที่แยกได้จากรากฟันที่ผุรุนแรง (root caries) สามารถลดค่าความเป็นกรดสุดท้ายได้ต่ำกว่า 4.2 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบ แสดงให้เห็นถึงความสามารถของไบฟิโดแบคทีเรียในการสร้างกรดและทนกรดในกระบวนการเกิดฟันผุในช่องปากของมนุษย์<sup>19</sup> การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดของ *B. dentium* ที่แยกได้จากช่องปากสามารถลดค่าความเป็นกรดสุดท้ายได้ที่ 4.4 และ 4.5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและแลคโตสเป็นส่วนประกอบตามลำดับ<sup>20</sup> นอกจากนี้การศึกษาของ Haukioja และคณะในปี 2008 พบว่าไบฟิโดแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ที่นำมาทดลอง (*Bifidobacterium* sp. 1100, *B. lactis* Bb12, *B. longum* 913 และ *Bifidobacterium* sp. 420 สามารถสร้างสภาวะที่เป็นกรดได้อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคสเป็นเวลา 30 นาที<sup>42</sup>

อย่างไรก็ตามการศึกษาก็เกี่ยวกับการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *B. dentium* ในสารละลายน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ยังมีจำกัด และยังไม่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะฟันผุต่างๆ กับความสามารถในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *B. dentium* เช่นเดียวกันกับที่ยังไม่พบการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากสปีชีส์ต่างๆ

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *B. dentium* เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 ณ เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับเชื้อก่อโรคฟันผุ *S. mutans* และ *L. salivarius* ในเชิงพรรณนา
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะฟันผุต่างๆ กับความสามารถในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *B. dentium*
3. เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ ไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากสปีชีส์ต่างๆ ในเชิงพรรณนา เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ที่ความเข้มข้นที่เชื้อผลิตกรดและเจริญเติบโตดีที่สุดซึ่งได้จากการศึกษาตามวัตถุประสงค์ข้อที่ 1 ณ เวลาต่างๆ

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

#### วิธีการดำเนินการวิจัย

##### การเลือกเชื้อที่นำมาศึกษา

เชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วยเชื้อที่เป็น Reference strains ของไบฟีโดแบคทีเรียจำนวน 6 strains, *S. mutans* ATCC 25175, *L. salivarius* ATCC 11741 และเชื้อ *B. dentium* (clinical strains) ที่แยกได้จากช่องปากเด็กไทยอายุระหว่าง 6-9 ปี ที่อาศัยอยู่ใน จ.สงขลา จำนวน 15 strains

Reference strains ของเชื้อไบฟีโดแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ *B. dentium* CCUG 18367, *B. longum* CCUG 28903, *B. breve* CCUG 30511A, *S. inopicata* CCUG 35729, *A. omnicolens* CCUG 31649 และ *B. scardovii* CCUG 13008A และใช้ *S. mutans* ATCC 25175 และ *L. salivarius* ATCC 11741 เป็นตัวแปรควบคุมในการศึกษานี้ด้วย

ส่วนเชื้อ *B. dentium* (clinical strains) ที่นำมาศึกษานี้ได้มาจากการศึกษาความชุกของเชื้อไบฟีโดแบคทีเรียในช่องปากของเด็กไทยอายุระหว่าง 6-9 ปี ที่อาศัยอยู่ใน จ.สงขลา ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาโสตจักษุวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งได้ทำการแยกเชื้อไบฟีโดแบคทีเรียจากรอยโรคฟันผุและแผ่นคราบจุลินทรีย์ในช่องปากของเด็กที่มีฟันผุจำนวน 50 คน และแยกเชื้อไบฟีโดแบคทีเรียจากแผ่นคราบจุลินทรีย์ในช่องปากของเด็กที่ไม่มีฟันผุจำนวน 50 คน ซึ่งพบไบฟีโดแบคทีเรียจำนวน 3 สปีชีส์ ได้แก่ *B. dentium*, *B. longum* และ *B. breve* ทั้งหมด 257 strains เชื้อถูกเก็บไว้ที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาโสตจักษุวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ -80 องศาเซลเซียส ทำการเลือก *B. dentium* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่แยกออกมาได้มากที่สุด เข้าสู่การศึกษา 15 strains โดยเลือกเด็กที่มีฟันผุสูงสุดจำนวน 5 คน (ค่าเฉลี่ยจำนวนฟันผุ  $10.80 \pm 2.17$  ซี่/คน) มาสุ่มเลือกเชื้อจากรอยโรคฟันผุคนละ 1 strain และเชื้อจากแผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันที่ไม่ผุคนละ 1 strain ด้วยวิธีการสุ่มตัวอย่างอย่างง่าย (Simple random sampling) และสุ่มเลือกเด็กที่ไม่มีฟันผุจำนวน 5 คนด้วยวิธีการสุ่มตัวอย่าง

อย่างง่าย มาสุ่มเลือกเชื้อจากแผ่นคราบจุลินทรีย์คนละ 1 strain ด้วยวิธีการสุ่มตัวอย่างอย่างง่าย จำนวน strain ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้ดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4 แสดงจำนวน strain ที่นำมาศึกษาในแต่ละสปีชีส์

สปีชีส์	จำนวน strain ที่นำมาศึกษา (strains)
<i>B. dentium</i> CCUG 18367	1
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	1
<i>L. salivarius</i> ATCC 11741	1
<i>B. dentium</i> (clinical isolates)	15
<i>B. longum</i> CCUG 28903	1
<i>B. breve</i> CCUG 30511A	1
<i>S. inopicata</i> CCUG 35729	1
<i>A. omnicolens</i> CCUG 31649	1
<i>B. scardovii</i> CCUG 13008A	1
รวม	23

ตารางที่ 5 แสดงจำนวน clinical strains จากตำแหน่งต่างๆ ในช่องปากที่สุ่มเลือกมาศึกษา

สปีชีส์	เด็กที่มีฟันผุ 5 คน		เด็กที่ไม่มีฟันผุ 5 คน
	รอยโรคฟันผุ (strains)	แผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันที่ไม่ผุ (strains)	แผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันที่ไม่ผุ (strains)
<i>B. dentium</i>	5	5	5

## การเพาะเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อที่ต้องการศึกษาซึ่งถูกเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสมาเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อไปฟิโคแบคทีเรียใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion (BHI) agar (BHI broth: Difco, Sparks, MD 21152 USA, agar: Himedia Laboratorios Put. Ltd., Mumbai-400086, India) ที่เติม 0.05% (น้ำหนัก/ปริมาตร) L-cysteine-hydrochloride (Sigma-aldrich, Co., St. Louis, MO 63103 USA) ส่วน *S. mutans* และ *L. salivarius* ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Blood agar (Kemmar, V.S. Chem House, Bangkok, Thailand) และ MRS agar (Pronadisa, Laboratorios Conda S.A., Madrid, Spain) ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มในภาชนะเลี้ยงแบคทีเรียไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar) ในภาวะ 80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub> และ 10% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

## ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวแปรต้น ได้แก่ เชื้อสปีชีส์ต่างๆ ชนิดและความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ
2. ตัวแปรตาม ได้แก่ ความหนาแน่นของเซลล์โดยการวัดความขุ่น (OD: Optical density) และค่าความเป็นกรดเบส (pH)
3. ตัวแปรควบคุม ได้แก่ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้น ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ สภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 6 แสดงชนิดและความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลที่ต้องการศึกษาสำหรับเชื้อแต่ละสปีชีส์

สปีชีส์	ชนิดและความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลที่ต้องการศึกษา (น้ำหนัก/ปริมาตร)
<i>B. dentium</i> CCUG 18367	กลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	
<i>L. salivarius</i> ATCC 11741	
<i>B. dentium</i> (clinical isolates)	กลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 2
<i>B. longum</i> CCUG 28903	กลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 2 (ความเข้มข้นที่เชื้อผลิตกรดและเจริญเติบโตดีที่สุด ซึ่งได้จากการศึกษาตามวัตถุประสงค์ข้อที่ 1)
<i>B. breve</i> CCUG 30511A	
<i>S. inoplicata</i> CCUG 35729	
<i>A. omnicolens</i> CCUG 31649	
<i>B. scardovii</i> CCUG 13008A	

#### การเตรียมสารละลายน้ำตาล

สำหรับเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 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 เติมน้ำตาลกลูโคส ซูโครสหรือแลคโตส ให้มีความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลร้อยละ 2, 5, 7 หรือ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เท่ากับ 7 แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที



### การเตรียมเชื้อสำหรับการทดลอง

นำเชื้อที่ได้จากงานเพาะเลี้ยงเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวโดยเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Brain Heart Infusion (BHI) broth ที่เติม 0.05% L-cysteine-hydrochloride ส่วน *S. mutans* และ *L. salivarius* ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Brain Heart Infusion (BHI) broth หลังจากการบ่มเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกที่ 6,500 รอบเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg, Germany) ล้างเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียด้วย phosphate buffered saline ผสม 0.05% L-cysteine-hydrochloride และล้างเชื้อ *S. mutans* และ *L. salivarius* ด้วย phosphate buffered saline วัดปริมาณเชื้อตั้งต้นด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความหนาแน่นของเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียโดยวัดความขุ่นเท่ากับ 0.5 ส่วน *S. mutans* และ *L. salivarius* ให้ได้ค่าความหนาแน่นของเชื้อโดยวัดความขุ่นเท่ากับ 0.2 ซึ่งจะได้อัตราจำนวนเชื้อ  $10^8$  CFU/ml

### การวัดการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของเชื้อ

เติมเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในสารละลายน้ำตาลที่เตรียมไว้ให้ปริมาตรรวมแต่ละขวดเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วนำขวดทดลองไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic condition) ในภาวะ 80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub> และ 10% CO<sub>2</sub> ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ที่เวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตรออกจากขวดทดลอง เพื่อวัดค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดเบส (Cyberscan 1000 pH, Oakton Instruments, Vernon Hills, USA) และวัดการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยการวัดความหนาแน่นของเซลล์โดยการวัดความขุ่นด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้งตั้งแต่ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อจนถึงขั้นตอนการวัดการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของเชื้อ

### สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการวัดการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของเชื้อ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายน้ำตาล (ค่า pH) และค่าความหนาแน่นของเซลล์โดยการวัดความขุ่น

คำนวณอัตราเฉลี่ยการผลิตกรดและอัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโตของเชื้อสปีชีส์ต่างๆ ดังนี้

- อัตราเฉลี่ยการผลิตกรด (Acid-production-rate) =  $(\text{pH at } t_1 - \text{pH at } t_2) / (t_2 - t_1)$
- อัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโต (Growth rate) =  $(\text{OD at } t_2 - \text{OD at } t_1) / (t_2 - t_1)$

เมื่อ pH at  $t_1$  คือ ค่าความเป็นกรดเบสที่เวลา  $t_1$

pH at  $t_2$  คือ ค่าความเป็นกรดเบสที่เวลา  $t_2$

OD at  $t_2$  คือ ค่าความหนาแน่นของเซลล์โดยการวัดความขุ่นที่เวลา  $t_2$

OD at  $t_1$  คือ ค่าความหนาแน่นของเซลล์โดยการวัดความขุ่นที่เวลา  $t_1$

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่

- เปรียบเทียบอัตราเฉลี่ยการผลิตกรดและอัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโตของเชื้อสปีชีส์ต่างๆ ในสถานะที่แตกต่างกัน โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา
- เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราความเป็นกรดเบสของสารละลายน้ำตาลและการเจริญเติบโตของ *B. dentium* (clinical isolates) ระหว่างสถานะฟันผุต่างๆ โดยใช้ One-Way ANOVA หรือ Kruskal Wallis Test ในโปรแกรม SPSS 16.0 กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่  $p$ -value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05

### จรรยาบรรณของผู้วิจัยและการตรวจสอบจริยธรรมการวิจัย

การวิจัยนี้ได้นำเสนอเพื่อการพิจารณาของคณะกรรมการจริยธรรมเพื่อการวิจัยในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์และผ่านความเห็นชอบเรียบร้อยแล้ว ตามใบรับรองการตรวจสอบจริยธรรม (EC5803-12-P-LR) ในภาคผนวก ก ก่อนเก็บข้อมูลการวิจัย

## วัสดุ

1. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Blood agar (Kemmar, V.S. Chem House, Bangkok, Thailand)
2. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS agar (Pronadisa, Laboratorios Conda S.A., Madrid, Spain)
3. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Brain Heart Infusion (BHI) broth (Difco, Sparks, MD 21152 USA )
4. พงู๋น (Himedia Laboratorios Put. Ltd., Mumbai-400086, India)
5. L-cysteine hydrochloride monohydrate (Sigma-aldrich, Co., St. Louis, MO 63103 USA)
6. ไม้พันสำลี cotton swab
7. Phosphate buffered saline
8. Phosphate buffered saline ผสม 0.05% L-cysteine-hydrochloride
9. น้ำกลั่น
10. น้ำตาลกลูโคส (Fisher Scientific, Loughborough, Leicestershire LE 11 SRG, UK)
11. น้ำตาลซูโครส (Univar, Taren Point NSW 2229, Australia)
12. น้ำตาลแลคโตส (Difco, Sparks, MD 21152 USA )

## อุปกรณ์

1. Sterile wire loop
2. ภาชนะเลี้ยงแบคทีเรียไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar: Scientific Promotion Co., Ltd., USA)
3. ตู้บ่มเพาะเชื้อ ขนาด 400 ลิตร (Binder: Scientific promotion Co., Ltd., USA)
4. หม้อนึ่งควบคุมความดันไอน้ำ (Autoclave: Tomy SD-320, Tokyo, Japan)
5. ขวดฝาขาว ขนาด 20 มิลลิลิตร
6. Centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร
7. ปิเปตแก้ว ขนาด 10 มิลลิลิตร

8. ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร
9. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg, Germany)
10. เครื่องสั่น (Vibrator: Vortex-Genie 2 TM, Scientific industries, Inc., Bohemia, N.Y., 11716, USA )
11. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England)
12. Cuvette
13. ปีกเกอร์
14. เครื่องชั่งสาร (Sartorius AG Germany)
15. เครื่องเตรียมสาร (IKA<sup>®</sup> C-MAG HS 7, Becthai Bangkok Equipment & Chemical Co., Ltd., Bangkok, Thailand)
16. เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter: Cyberscan 1000 pH, Oakton Instruments, Vernon Hills, USA)

### บทที่ 3

#### ผลการวิจัย

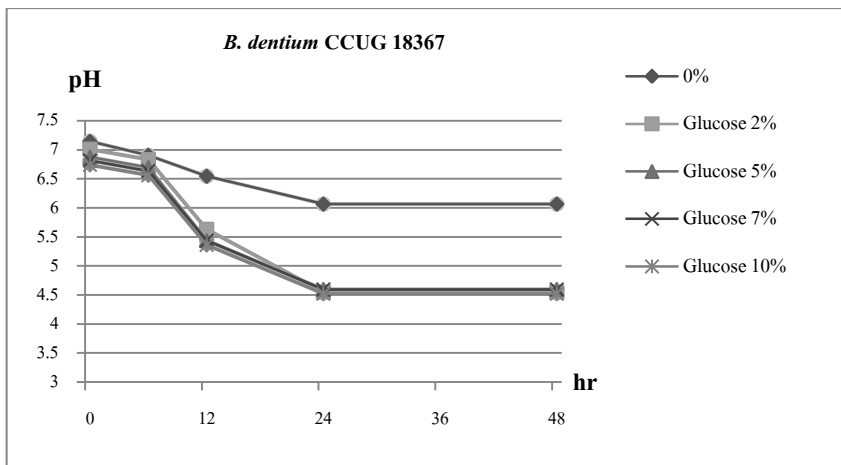
การผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *B. dentium* เปรียบเทียบกับเชื้อก่อโรคฟันผุ *S. mutans* และ *L. salivarius* ในเชิงพรรณนา

จากการศึกษาการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *B. dentium* CCUG 18367 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสหรือแลคโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 พบว่า *B. dentium* CCUG 18367 ที่เพาะเลี้ยงในสารละลายพื้นฐานซึ่งไม่เติมน้ำตาลใดๆ สามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดได้ดีในช่วงเวลา 6-12 ชั่วโมง โดยมีอัตราเฉลี่ยการผลิตกรดและอัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโตน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสหรือแลคโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2, 5, 7 และ 10 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 5 (A-C) และรูปที่ 6 (A-C) และตารางที่ 7 และ 8

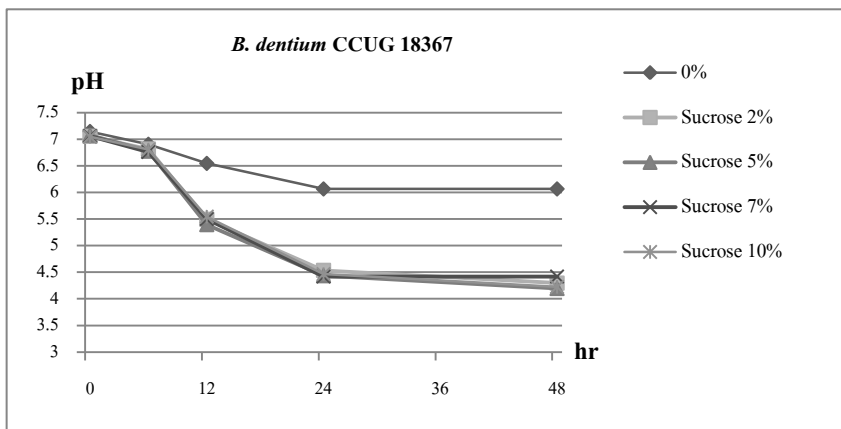
เมื่อพิจารณาชนิดของสารละลายน้ำตาลที่แตกต่างกันในการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *B. dentium* CCUG 18367 ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส เชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดจากสารละลายน้ำตาลแต่ละชนิดได้ใกล้เคียงกัน แต่มีแนวโน้มใช้สารละลายน้ำตาลแลคโตสได้ดี โดยเชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดได้ดีในช่วงเวลา 6-12 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 7 และ 8 และไม่ว่าจะเป็นสารละลายน้ำตาลชนิดใด ถึงแม้ว่าความเข้มข้นแตกต่างกัน (ร้อยละ 2, 5, 7 หรือ 10) พบว่าเชื้อมีอัตราเฉลี่ยการผลิตกรดและอัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 5 (A-C) และรูปที่ 6 (A-C) และตารางที่ 7 และ 8

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดสุดท้ายของ *B. dentium* CCUG 18367 ที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งเพาะเลี้ยงในสารละลายพื้นฐานซึ่งไม่เติมน้ำตาลใดๆ พบว่ามีค่าสูงกว่าค่าวิกฤตของการเกิดฟันผุ (critical pH 5.5) ขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยง *B. dentium* CCUG 18367 ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2, 5, 7 และ 10 ทำให้ค่าความเป็นกรดสุดท้ายต่ำกว่าค่าวิกฤตของการเกิดฟันผุทั้งหมด โดยค่าต่ำสุดสามารถต่ำลงไปได้ถึง pH 4.2 ดังแสดงในรูปที่ 5 (A-C) และรูปที่ 6 (A-C)

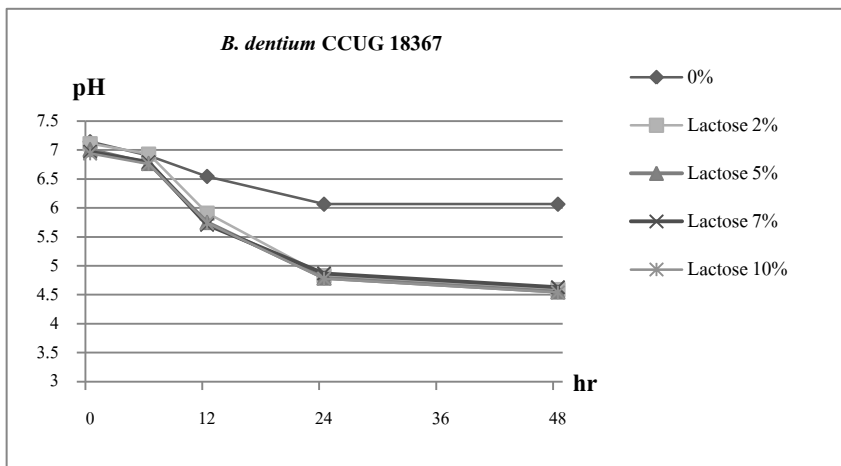
(A)



(B)

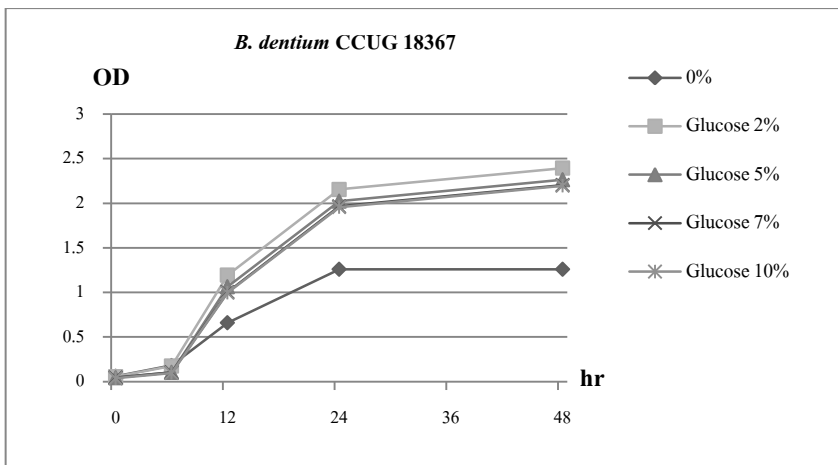


(C)

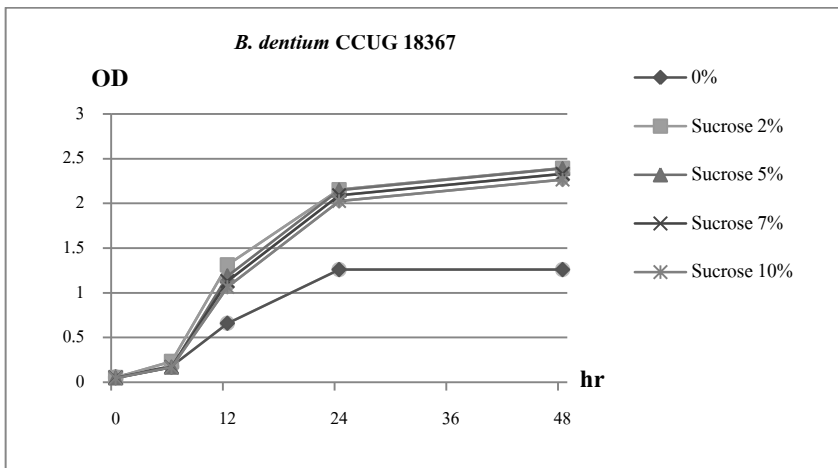


รูปที่ 5 แสดงความสามารถในการผลิตกรดของ *B. dentium* CCUG 18367 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส (A) ซูโครส (B) และแลคโตส (C) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10

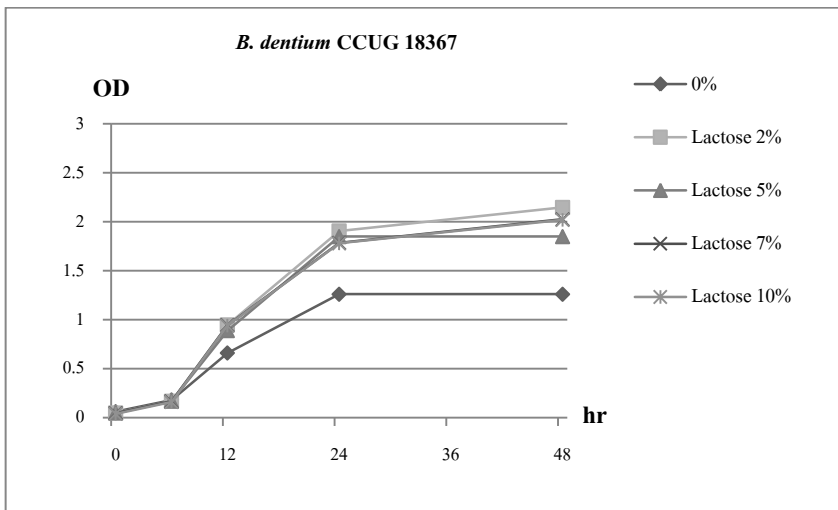
(A)



(B)



(C)



รูปที่ 6 แสดงความสามารถในการเจริญเติบโตของ *B. dentium* CCUG 18367 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส (A) ซูโครส (B) และแลคโตส (C) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10

ตารางที่ 7 แสดงอัตราเฉลี่ยการผลิตกรดของ *B. dentium* CCUG 18367 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลาย น้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 ณ เวลาต่างๆ

ชนิดน้ำตาล	ความเข้มข้น (ร้อยละ น้ำหนัก/ปริมาตร)	อัตราเฉลี่ยการผลิตกรด ( $\Delta$ pH/hr)			
		0 - 6	6 - 12	12 - 24	24 - 48
ไม่เติมน้ำตาล	0	0.04	0.06	0.04	0.00
	2	0.03	0.20	0.09	0.00
	5	0.03	0.21	0.07	0.00
	7	0.03	0.20	0.07	0.00
	10	0.03	0.20	0.07	0.00
กลูโคส	2	0.04	0.22	0.08	0.01
	5	0.05	0.23	0.08	0.01
	7	0.05	0.21	0.09	0.00
	10	0.04	0.21	0.09	0.01
ซูโครส	2	0.03	0.17	0.09	0.01
	5	0.04	0.17	0.08	0.01
	7	0.03	0.18	0.07	0.01
	10	0.03	0.17	0.08	0.01
แลคโตส	2	0.03	0.17	0.09	0.01
	5	0.04	0.17	0.08	0.01
	7	0.03	0.18	0.07	0.01
	10	0.03	0.17	0.08	0.01

แสดงอัตราเฉลี่ยการผลิตกรดสูงสุดของเชื้อ



ตารางที่ 8 แสดงอัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโตของ *B. dentium* CCUG 18367 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 ณ เวลาต่างๆ

ชนิดน้ำตาล	ความเข้มข้น (ร้อยละ น้ำหนัก/ปริมาตร)	อัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโต ( $\Delta$ OD/hr)			
		0 - 6	6 - 12	12 - 24	24 - 48
ไม่เติมน้ำตาล	0	0.02	0.08	0.05	0.00
	2	0.02	0.17	0.08	0.01
	5	0.01	0.16	0.08	0.01
	7	0.01	0.15	0.08	0.01
	10	0.01	0.15	0.08	0.01
กลูโคส	2	0.03	0.18	0.07	0.01
	5	0.02	0.17	0.08	0.01
	7	0.02	0.16	0.08	0.01
	10	0.02	0.15	0.08	0.01
ซูโครส	2	0.02	0.13	0.08	0.01
	5	0.02	0.12	0.08	0.00
	7	0.02	0.13	0.07	0.01
	10	0.02	0.13	0.07	0.01

แสดงอัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโตสูงสุดของเชื้อ

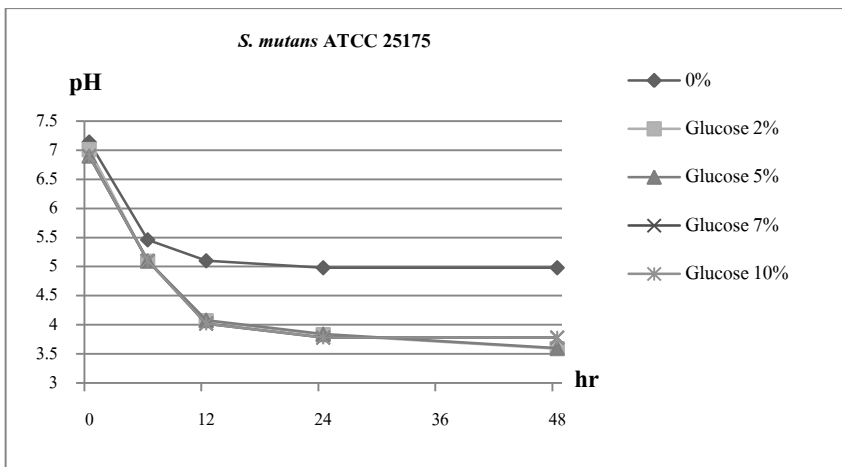
จากการศึกษาการผลิตรกรดและการเจริญเติบโตของ *S. mutans* ATCC 25175 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสหรือแลคโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 พบว่า *S. mutans* ATCC 25175 ที่เพาะเลี้ยงในสารละลายพื้นฐานซึ่งไม่เติมน้ำตาลใดๆ สามารถเจริญเติบโตและผลิตรกรดได้ดีในช่วงเวลา 0-6 ชั่วโมง แต่หลังจาก 6 ชั่วโมง (ช่วง 6 – 48 ชั่วโมง) เชื้อเจริญเติบโตและผลิตรกรดได้น้อย ดังนั้น *S. mutans* ATCC 25175 ที่เพาะเลี้ยงในสารละลายพื้นฐานซึ่งไม่เติมน้ำตาลใดๆ มีอัตราเฉลี่ยการผลิตรกรดและอัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโต น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสหรือแลคโตส ที่ความ

เข้มข้นร้อยละ 2, 5, 7 และ 10 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 7 (A-C) และรูปที่ 8 (A-C) และตารางที่ 9 และ 10

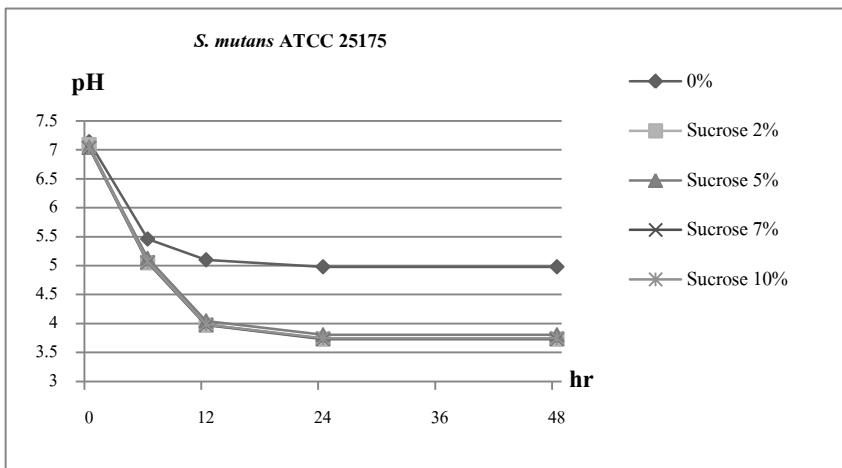
เมื่อพิจารณาชนิดของสารละลายน้ำตาลที่แตกต่างกันในการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *S. mutans* ATCC 25175 ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส เชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดจากสารละลายน้ำตาลซูโครสได้ใกล้เคียงกับสารละลายน้ำตาลกลูโคส และมีแนวโน้มใช้สารละลายน้ำตาลแลคโตสได้ต่ำกว่า โดยเชื้อเจริญเติบโตและผลิตกรดได้มากในช่วงเวลา 0-6 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 9 และ 10 และไม่ว่าจะเป็นสารละลายน้ำตาลชนิดใด ถึงแม้ว่าความเข้มข้นแตกต่างกัน (ร้อยละ 2, 5, 7 หรือ 10) พบว่าเชื้อมีอัตราเฉลี่ยการผลิตกรดและอัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 7 (A-C) และรูปที่ 8 (A-C) และตารางที่ 9 และ 10

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดสุดท้ายของ *S. mutans* ATCC 25175 ที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 พบว่ามีค่าต่ำกว่าค่าวิกฤตของการเกิดฟันผุทั้งหมด โดยค่าต่ำสุดสามารถต่ำลงไปได้ถึง pH 3.6 ดังแสดงในรูปที่ 7 (A-C) และรูปที่ 8 (A-C)

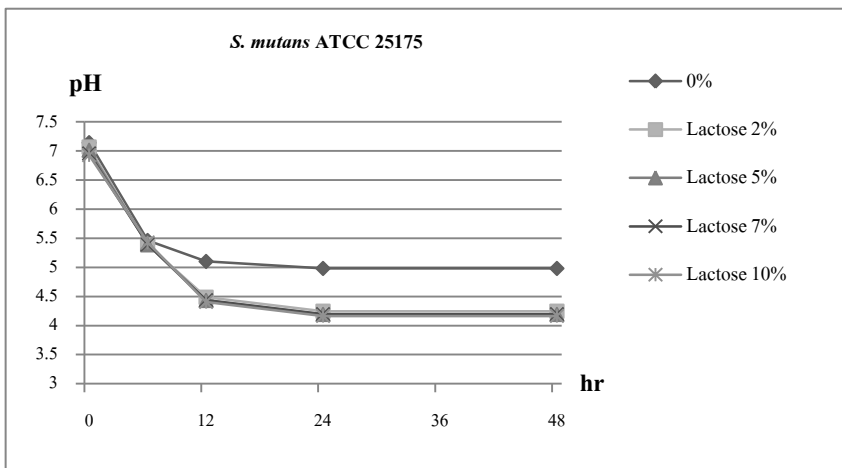
(A)



(B)

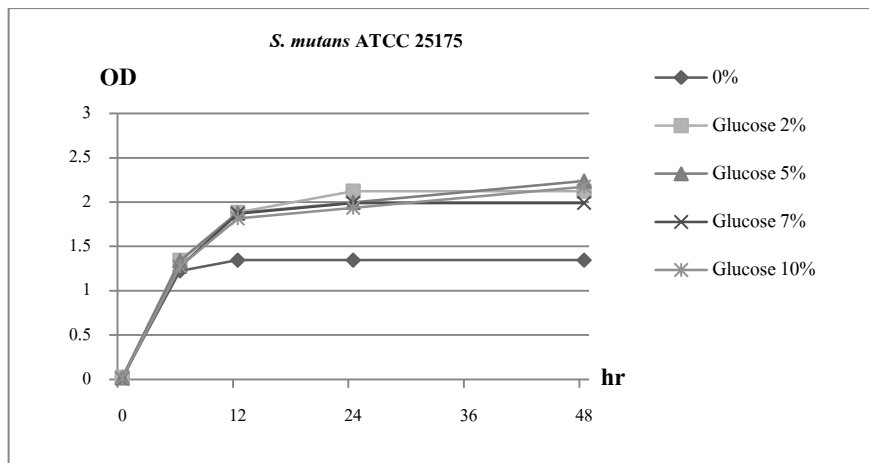


(C)

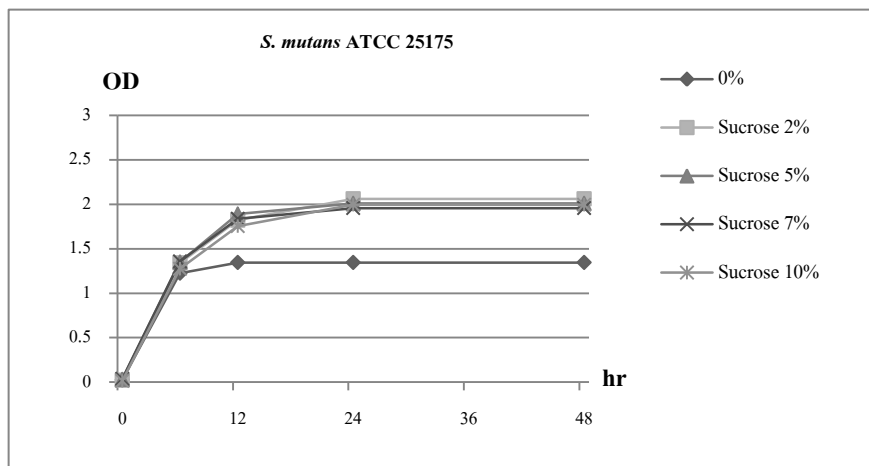


รูปที่ 7 แสดงความสามารถในการผลิตกรดของ *S. mutans* ATCC 25175 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส (A) ซูโครส (B) และแลคโตส (C) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10

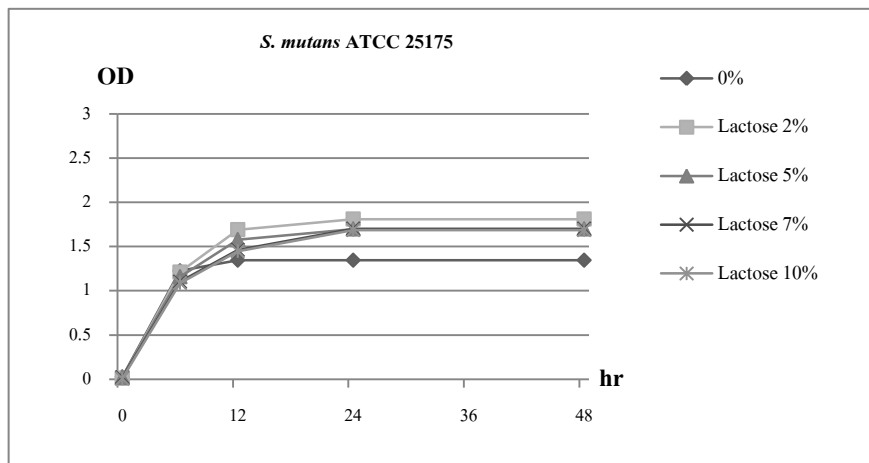
(A)



(B)



(C)



รูปที่ 8 แสดงความสามารถในการผลิตเจริญเติบโตของ *S. mutans* ATCC 25175 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส (A) ซูโครส (B) และแลคโตส (C) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10

ตารางที่ 9 แสดงอัตราเฉลี่ยการผลิตกรดของ *S. mutans* ATCC 25175 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลาย น้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 ณ เวลาต่างๆ

ชนิดน้ำตาล	ความเข้มข้น (ร้อยละ น้ำหนัก/ปริมาตร)	อัตราเฉลี่ยการผลิตกรด ( $\Delta$ pH/hr)				
		0 - 6	6 - 12	12 - 24	24 - 48	
ไม่เติมน้ำตาล	0	0.28	0.06	0.01	0.00	
	กลูโคส	2	0.32	0.17	0.02	0.01
		5	0.30	0.17	0.02	0.01
		7	0.30	0.18	0.02	0.00
		10	0.30	0.18	0.02	0.00
ซูโครส		2	0.34	0.18	0.02	0.00
	5	0.32	0.18	0.02	0.00	
	7	0.33	0.18	0.02	0.00	
	10	0.33	0.18	0.02	0.00	
	แลคโตส	2	0.28	0.15	0.02	0.00
5		0.27	0.16	0.02	0.00	
7		0.26	0.16	0.02	0.00	
10		0.25	0.17	0.02	0.00	

แสดงอัตราเฉลี่ยการผลิตกรดสูงสุดของเชื้อ

ตารางที่ 10 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของ *S. mutans* ATCC 25175 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 ณ เวลาต่างๆ

ชนิดน้ำตาล	ความเข้มข้น (ร้อยละ น้ำหนัก/ปริมาตร)	อัตราการเจริญเติบโต ( $\Delta$ OD/hr)			
		0 - 6	6 - 12	12 - 24	24 - 48
		ไม่เติมน้ำตาล	0	0.20	0.02
กลูโคส	2	0.22	0.09	0.02	0.00
	5	0.22	0.09	0.01	0.01
	7	0.21	0.10	0.01	0.00
	10	0.21	0.09	0.01	0.01
	ซูโครส	2	0.22	0.08	0.02
5		0.22	0.09	0.01	0.00
7		0.22	0.08	0.01	0.00
10		0.21	0.08	0.02	0.00
แลคโตส	2	0.20	0.08	0.01	0.00
	5	0.19	0.07	0.01	0.00
	7	0.18	0.06	0.02	0.00
	10	0.18	0.06	0.02	0.00

แสดงอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดของเชื้อ

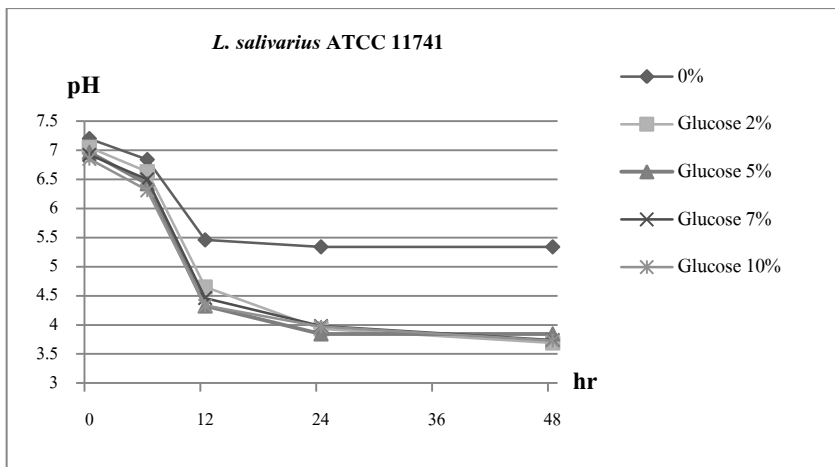
จากการศึกษาการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *L. salivarius* ATCC 11741 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสหรือแลคโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 พบว่า *L. salivarius* ATCC 11741 ที่เพาะเลี้ยงในสารละลายพื้นฐานซึ่งไม่เติมน้ำตาลใดๆ สามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดได้ดีในช่วงเวลา 6-12 ชั่วโมง แต่หลังจาก 12 ชั่วโมง (ช่วง 12-48 ชั่วโมง) เชื้อเจริญเติบโตและผลิตกรดได้น้อย ดังนั้น *L. salivarius* ATCC 11741 ที่เพาะเลี้ยงในสารละลายพื้นฐานซึ่งไม่เติมน้ำตาลใดๆ มีอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการเจริญเติบโตที่น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสหรือแลคโตส ที่ความ

เข้มข้นร้อยละ 2, 5, 7 และ 10 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 12 (A-C) และรูปที่ 13 (A-C) และตารางที่ 11 และ 12

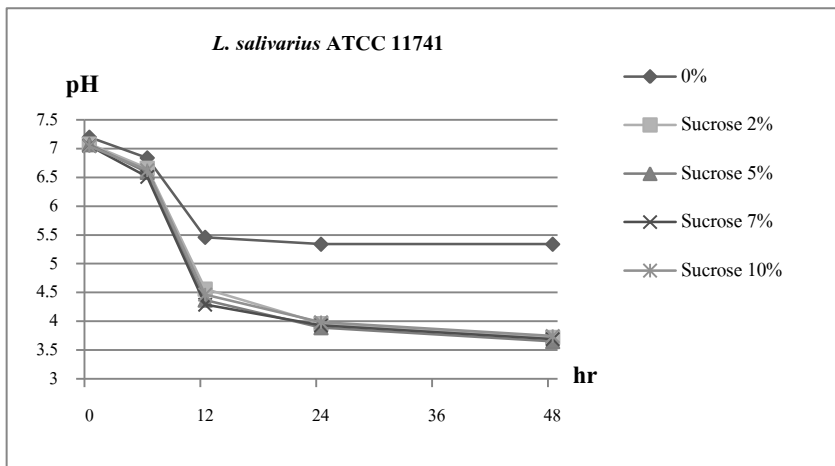
เมื่อพิจารณาชนิดของสารละลายน้ำตาลที่แตกต่างกันในการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *L. salivarius* ATCC 11741 ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส เชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดจากสารละลายน้ำตาลซูโครสได้ใกล้เคียงกับสารละลายน้ำตาลกลูโคส และมีแนวโน้มใช้สารละลายน้ำตาลแลคโตสได้ต่ำกว่า โดยเชื้อผลิตเจริญเติบโตและผลิตกรดได้มากในช่วงเวลา 6-12 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 11 และ 12 และไม่ว่าจะเป็นสารละลายน้ำตาลชนิดใด ถึงแม้ว่าความเข้มข้นแตกต่างกัน (ร้อยละ 2, 5, 7 หรือ 10) พบว่าเชื้อมีอัตราเฉลี่ยการผลิตกรดและอัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 12 (A-C) และรูปที่ 13 (A-C) และตารางที่ 11 และ 12

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดสุดท้ายของ *L. salivarius* ATCC 11741 ที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 มีค่าต่ำกว่าค่าวิกฤตของการเกิดฟันผุทั้งหมด โดยค่าต่ำสุดสามารถต่ำลงไปได้ถึง pH 3.7 ดังแสดงในรูปที่ 12 (A-C) และรูปที่ 13 (A-C)

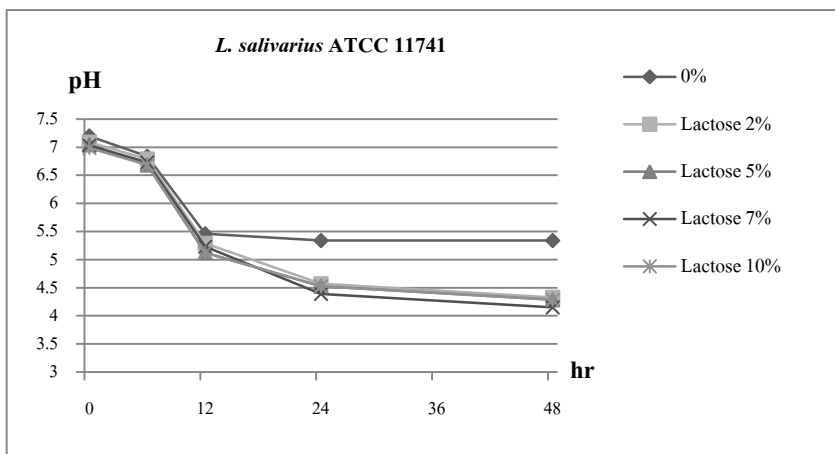
(A)



(B)

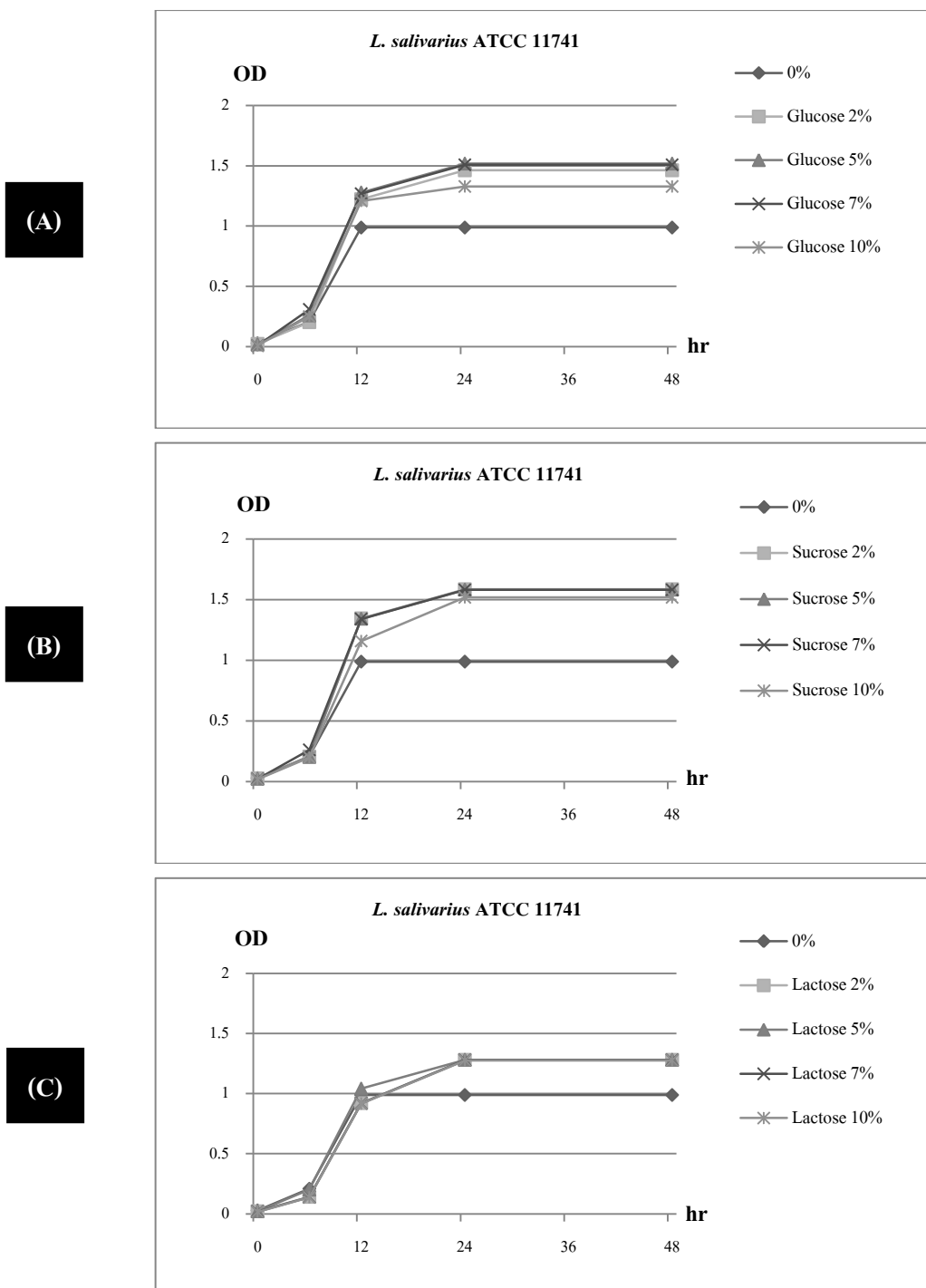


(C)



รูปที่ 9 แสดงความสามารถในการผลิตกรดของ *L. salivarius* ATCC 11741 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส (A) ซูโครส (B) และแลคโตส (C) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10





รูปที่ 10 แสดงความสามารถในการเจริญเติบโตของ *L. salivarius* ATCC 11741 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส (A) ซูโครส (B) และแลคโตส (C) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10

ตารางที่ 11 แสดงอัตราเฉลี่ยการผลิตกรดของ *L. salivarius* ATCC 11741 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 ณ เวลาต่างๆ

ชนิดน้ำตาล	ความเข้มข้น (ร้อยละ น้ำหนัก/ปริมาตร)	อัตราเฉลี่ยการผลิตกรด ( $\Delta$ pH/hr)			
		0 - 6	6 - 12	12 - 24	24 - 48
ไม่เติมน้ำตาล	0	0.06	0.23	0.01	0.00
กลูโคส	2	0.07	0.33	0.06	0.01
	5	0.09	0.35	0.04	0.00
	7	0.07	0.34	0.04	0.01
	10	0.09	0.33	0.03	0.01
	2	0.07	0.35	0.05	0.01
ซูโครส	5	0.08	0.37	0.04	0.01
	7	0.09	0.37	0.03	0.01
	10	0.07	0.36	0.04	0.01
	2	0.05	0.25	0.06	0.01
แลคโตส	5	0.06	0.26	0.05	0.01
	7	0.05	0.25	0.07	0.01
	10	0.05	0.26	0.05	0.01

แสดงอัตราเฉลี่ยการผลิตกรดสูงสุดของเชื้อ

ตารางที่ 12 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของ *L. salivarius* ATCC 11741 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 0, 2, 5, 7 และ 10 ณ เวลาต่างๆ

ชนิดน้ำตาล	ความเข้มข้น (ร้อยละ น้ำหนัก/ปริมาตร)	อัตราการเจริญเติบโต ( $\Delta$ OD/hr)			
		0 - 6	6 - 12	12 - 24	24 - 48
ไม่เติมน้ำตาล	0	0.03	0.13	0.00	0.00
กลูโคส	2	0.03	0.17	0.02	0.00
	5	0.04	0.17	0.02	0.00
	7	0.05	0.16	0.02	0.00
	10	0.04	0.16	0.01	0.00
ซูโครส	2	0.03	0.19	0.02	0.00
	5	0.03	0.19	0.02	0.00
	7	0.04	0.18	0.02	0.00
	10	0.03	0.16	0.03	0.00
แลคโตส	2	0.02	0.13	0.03	0.00
	5	0.03	0.14	0.02	0.00
	7	0.02	0.13	0.03	0.00
	10	0.02	0.13	0.03	0.00

แสดงอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดของเชื้อ

ดังนั้น หากเปรียบเทียบอัตราการผลิตรวดและอัตราการเจริญเติบโตของ *B. dentium* CCUG 18367, *S. mutans* ATCC 25175 และ *L. salivarius* ATCC 11741 โดยใช้ความเร็วที่เชื้อสามารถผลิตรวดและเจริญเติบโตได้ดีเป็นเกณฑ์ พบว่า *S. mutans* ATCC 25175 สามารถผลิตรวดและเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในช่วงเวลา 0-6 ชั่วโมง รองลงมาคือ *L. salivarius* ATCC 11741 และ *B. dentium* CCUG 18367 ซึ่งสามารถผลิตรวดและเจริญเติบโตได้ดีในช่วงเวลา 6-12 ชั่วโมง

ความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะฟันผุต่างๆ กับความสามารถในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *B. dentium* (clinical isolates)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะฟันผุต่างๆ กับความสามารถในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *B. dentium* ซึ่งแยกได้จากปากของเด็กไทยอายุระหว่าง 6-9 ปี ที่อาศัยอยู่ใน จ.สงขลา ด้วยวิธีการสุ่มตัวอย่างอย่างง่าย (Simple random sampling) เข้าสู่การศึกษา 15 strains โดยกลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อจากแผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันที่ไม่ผุของเด็กที่ไม่มีฟันผุ 5 strains, กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อจากแผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันที่ไม่ผุของเด็กที่มีฟันผุ 5 strains และกลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อจากรอยโรคฟันผุ 5 strains พบว่า *B. dentium* ทั้ง 15 strains มีอัตราเฉลี่ยการผลิตกรดและอัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโตสูงสุดในช่วงเวลา 6-12 ชั่วโมง และให้ค่าความเป็นกรดสุดท้ายที่ 48 ชั่วโมง อยู่ระหว่าง 3.5-4.3 ซึ่งต่ำกว่าค่าวิกฤตของการเกิดฟันผุ

เมื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการผลิตกรดและอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจากทั้ง 3 กลุ่ม ไม่พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการผลิตกรดและอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจากทั้ง 3 กลุ่ม ที่เวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value < 0.05) ดังแสดงในตารางที่ 13 และ 14

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *B. dentium* (clinical strains) กับ *B. dentium* CCUG 18367 (reference strain) พบว่า *B. dentium* (clinical strains) มีอัตราเฉลี่ยการผลิตกรดและอัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโตที่สูงกว่า *B. dentium* CCUG 18367 (reference strain)

ตารางที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของอัตราการผลิตกรดของ *B. dentium* (clinical strains) ของทั้ง 3 กลุ่มในช่วงเวลาต่างๆ

ช่วงเวลา (ชั่วโมง)	ค่าเฉลี่ยอัตราการผลิตกรดของ <i>B. dentium</i> ( $\Delta$ pH/hr)			p-value
	กลุ่มที่ 1 (n=5)	กลุ่มที่ 2 (n=5)	กลุ่มที่ 3 (n=5)	
0 – 6	0.06 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.282 <sup>a</sup>
6 – 12	0.31 ± 0.07	0.31 ± 0.03	0.30 ± 0.09	0.912 <sup>a</sup>
12 – 24	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.03	0.926 <sup>a</sup>
24 – 48	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.01	0.108 <sup>b</sup>

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อจากแผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันที่ไม่ผุของเด็กที่ไม่มีฟันผุ

กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อจากแผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันที่ไม่ผุของเด็กที่มีฟันผุ

กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อจากรอยโรคฟันผุ

a สถิติการทดสอบ One-Way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

b สถิติการทดสอบ Kruskal Wallis Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 14 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของอัตราการเจริญเติบโตของ *B. dentium* (clinical strains) ของทั้ง 3 กลุ่มในช่วงเวลาต่างๆ

ช่วงเวลา (ชั่วโมง)	ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตของ <i>B. dentium</i> ( $\Delta$ OD/hr)			p-value
	กลุ่มที่ 1 (n=5)	กลุ่มที่ 2 (n=5)	กลุ่มที่ 3 (n=5)	
0 – 6	0.05 ± 0.03	0.04 ± 0.04	0.06 ± 0.03	0.628 <sup>a</sup>
6 – 12	0.23 ± 0.06	0.21 ± 0.04	0.21 ± 0.04	0.272 <sup>b</sup>
12 – 24	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.02	1.000 <sup>a</sup>
24 – 48	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	1.000 <sup>b</sup>

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อจากแผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันที่ไม่ผุของเด็กที่ไม่มีฟันผุ

กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อจากแผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันที่ไม่ผุของเด็กที่มีฟันผุ

กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อจากรอยโรคฟันผุ

a สถิติการทดสอบ One-Way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

b สถิติการทดสอบ Kruskal Wallis Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การผลิตกรดและการเจริญเติบโตของไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากสปีชีส์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ที่ความเข้มข้นที่เชื้อผลิตกรดและเจริญเติบโตดีที่สุดซึ่งได้จากการศึกษาตามวัตถุประสงค์ข้อที่ 1 ณ เวลาต่างๆ

จากการศึกษาการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากสปีชีส์ต่างๆ ซึ่งได้แก่ *B. dentium* CCUG 18367, *B. longum* CCUG 28903, *B. breve* CCUG 30511A, *B. scardovii* CCUG 13008A, *A. omnicolens* CCUG 31649 และ *S. inopicata* CCUG 35729 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ

2 ณ เวลาต่างๆ พบว่า *B. dentium* CCUG 18367, *B. longum* CCUG 28903, *B. breve* CCUG 30511A, *B. scardovii* CCUG 13008A และ *A. omnicoles* CCUG 31649 สามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดได้ดีในช่วงเวลา 6-12 ชั่วโมง ขณะที่ *S. inopicata* CCUG 35729 สามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดได้ช้ากว่าในช่วงเวลา 12-24 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 15 และ 16

เมื่อพิจารณาชนิดของสารละลายน้ำตาลที่แตกต่างกันในการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *B. dentium* CCUG 18367, *B. longum* CCUG 28903, *B. scardovii* CCUG 13008A, *A. omnicoles* CCUG 31649 และ *S. inopicata* CCUG 35729 ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส เชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดจากสารละลายน้ำตาลแต่ละชนิดได้ใกล้เคียงกัน ยกเว้น *B. breve* CCUG 30511A สามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดจากสารละลายน้ำตาลแลคโตสได้มากกว่าสารละลายน้ำตาลกลูโคสและซูโครส ดังแสดงในตารางที่ 13 และ 14

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดสุดท้ายที่ 48 ชั่วโมง พบว่าไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากทุกสปีชีส์ที่นำมาศึกษา เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสหรือแลคโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ทำให้ค่าความเป็นกรดสุดท้ายต่ำกว่าค่าวิกฤตของการเกิดฟันผุทั้งหมด โดยค่าความเป็นกรดสุดท้ายอยู่ระหว่าง 3.8-4.8 ดังแสดงในตารางที่ 17

ดังนั้น หากเปรียบเทียบอัตราการเฉลี่ยการผลิตกรดและอัตราการเจริญเติบโตของไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากสปีชีส์ต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลชนิดต่างๆ ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยใช้ความเร็วในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นเกณฑ์ พบว่า *B. dentium* CCUG 18367, *B. longum* CCUG 28903, *B. breve* CCUG 30511A, *B. scardovii* CCUG 13008A และ *A. omnicoles* CCUG 31649 สามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดได้เร็วกว่าในช่วงเวลา 6-12 ชั่วโมง ขณะที่ *S. inopicata* CCUG 35729 เจริญเติบโตและผลิตกรดได้ช้าในช่วงเวลา 12-24 ชั่วโมง

ตารางที่ 15 แสดงอัตราการเปลี่ยนแปลงการผลิตรกรดของไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากสปีชีส์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 2 ณ เวลาต่างๆ

ชนิดของแบคทีเรีย	ชนิดน้ำตาล (2% น้ำหนัก/ปริมาตร)	อัตราการเปลี่ยนแปลงการผลิตรกรด ( $\Delta$ pH/hr)			
		0 - 6	6 - 12	12 - 24	24 - 48
<i>B. dentium</i> CCUG 18367	กลูโคส	0.03	0.20	0.09	0.00
	ซูโครส	0.04	0.22	0.08	0.01
	แลคโตส	0.03	0.17	0.09	0.01
<i>B. longum</i> CCUG 28903	กลูโคส	0.05	0.17	0.14	0.01
	ซูโครส	0.05	0.20	0.10	0.01
	แลคโตส	0.06	0.19	0.14	0.01
<i>B. breve</i> CCUG 30511A	กลูโคส	0.06	0.20	0.11	0.00
	ซูโครส	0.06	0.19	0.08	0.01
	แลคโตส	0.06	0.32	0.07	0.01
<i>B. scardovii</i> CCUG 13008A	กลูโคส	0.04	0.18	0.14	0.01
	ซูโครส	0.04	0.18	0.13	0.01
	แลคโตส	0.04	0.21	0.13	0.01
<i>A. omnicolens</i> CCUG 31649	กลูโคส	0.05	0.22	0.09	0.01
	ซูโครส	0.07	0.22	0.09	0.01
	แลคโตส	0.07	0.20	0.05	0.01
<i>S. inopicata</i> CCUG 35729	กลูโคส	0.04	0.05	0.20	0.02
	ซูโครส	0.07	0.05	0.17	0.02
	แลคโตส	0.04	0.06	0.20	0.01

แสดงอัตราการเปลี่ยนแปลงการผลิตรกรดสูงสุดของเชื้อ

ตารางที่ 16 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของไบฟิโคแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากสปีชีส์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 2 ณ เวลาต่างๆ

ชนิดของแบคทีเรีย	ชนิดน้ำตาล (2% น้ำหนัก/ปริมาตร)	อัตราการเจริญเติบโต ( $\Delta$ OD/hr)			
		0 - 6	6 - 12	12 - 24	24 - 48
<i>B. dentium</i> CCUG 18367	กลูโคส	0.02	0.17	0.08	0.01
	ซูโครส	0.03	0.18	0.07	0.01
	แลคโตส	0.02	0.13	0.08	0.01
<i>B. longum</i> CCUG 28903	กลูโคส	0.03	0.21	0.06	0.01
	ซูโครส	0.04	0.20	0.03	0.01
	แลคโตส	0.03	0.21	0.06	0.01
<i>B. breve</i> CCUG 30511A	กลูโคส	0.02	0.13	0.09	0.01
	ซูโครส	0.02	0.13	0.08	0.01
	แลคโตส	0.02	0.18	0.06	0.01
<i>B. scardovii</i> CCUG 13008A	กลูโคส	0.02	0.14	0.09	0.01
	ซูโครส	0.02	0.14	0.10	0.01
	แลคโตส	0.01	0.15	0.08	0.01
<i>A. omnicolens</i> CCUG 31649	กลูโคส	0.09	0.16	0.03	0.02
	ซูโครส	0.09	0.17	0.03	0.02
	แลคโตส	0.09	0.15	0.01	0.01
<i>S. inopicata</i> CCUG 35729	กลูโคส	0.02	0.04	0.13	0.01
	ซูโครส	0.02	0.04	0.11	0.02
	แลคโตส	0.02	0.05	0.12	0.02

แสดงอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดของเชื้อ



ตารางที่ 17 แสดงค่าความเป็นกรดสุดท้ายที่ 48 ชั่วโมงของไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปาก  
สปีชีส์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส  
ความเข้มข้นร้อยละ 2

ชนิดของแบคทีเรีย	ชนิดน้ำตาล (2% น้ำหนัก/ปริมาตร)	ค่าความเป็นกรดสุดท้าย ที่ 48 ชั่วโมง
<i>B. dentium</i> CCUG 18367	กลูโคส	4.55
	ซูโครส	4.30
	แลคโตส	4.59
<i>B. longum</i> CCUG 28903	กลูโคส	4.50
	ซูโครส	3.81
	แลคโตส	4.29
<i>B. breve</i> CCUG 30511A	กลูโคส	3.97
	ซูโครส	4.48
	แลคโตส	3.93
<i>B. scardovii</i> CCUG 13008A	กลูโคส	3.87
	ซูโครส	4.09
	แลคโตส	3.81
<i>A. omnicolens</i> CCUG 31649	กลูโคส	4.09
	ซูโครส	4.12
	แลคโตส	4.75
<i>S. inopicata</i> CCUG 35729	กลูโคส	3.82
	ซูโครส	4.02
	แลคโตส	3.89

## บทที่ 4

### บทวิจารณ์

การศึกษาศักยภาพในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *B. dentium* CCUG 18367 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลต่างๆ เปรียบเทียบกับเชื้อก่อโรคฟันผุ *S. mutans* ATCC 25175 และ *L. salivarius* ATCC 11741 พบว่าความสามารถในการผลิตกรดมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* สามารถผลิตกรดและเจริญเติบโตได้เร็วที่สุดโดยมีอัตราเฉลี่ยสูงในช่วงเวลา 0-6 ชั่วโมง รองลงมาคือ *L. salivarius* ซึ่งมีอัตราการผลิตกรดและอัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโตสูงในช่วงเวลา 12 ชั่วโมง โดยค่าความเป็นกรดสุดท้ายของ *S. mutans* และ *L. salivarius* เท่ากับ 3.6-4.2 และ 3.7-4.3 ตามลำดับ *B. dentium* สามารถผลิตกรดและเจริญเติบโตได้ดีในช่วงเวลา 6-12 ชั่วโมง แม้ว่า *B. dentium* ผลิตกรดและเจริญเติบโตได้ช้ากว่า *S. mutans* และมีอัตราเฉลี่ยในการผลิตกรดและเจริญเติบโตต่ำกว่าเมื่อเทียบกับ *S. mutans* และ *L. salivarius* แต่พบว่า *B. dentium* มีค่าความเป็นกรดสุดท้ายเท่ากับ 4.2-4.6 ซึ่งต่ำกว่าค่าวิกฤตของการเกิดฟันผุ (pH 5.5) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่า *B. dentium* ที่แยกได้จากช่องปากสามารถลดค่าความเป็นกรดสุดท้ายได้ที่ 4.4 และ 4.5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและแลคโตสเป็นส่วนประกอบตามลำดับ<sup>20</sup>

เมื่อพิจารณาความสามารถในการเจริญเติบโตและผลิตกรดของเชื้อจากสารละลายน้ำตาลชนิดต่างๆ พบว่า *B. dentium* สามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดจากสารละลายน้ำตาลที่ใช้ในการศึกษาได้ทั้ง 3 ชนิดเช่นเดียวกับ *S. mutans* และ *L. salivarius* แสดงให้เห็นว่า *B. dentium* สามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดจากน้ำตาลได้หลากหลายชนิด สอดคล้องกับรายงานที่ว่าไบโไฟโดแบคทีเรียมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่และคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อนได้<sup>3</sup> *S. mutans* และ *L. salivarius* สามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดจากสารละลายน้ำตาลกลูโคสได้ใกล้เคียงกับสารละลายน้ำตาลซูโครส และมีแนวโน้มใช้สารละลายน้ำตาลแลคโตสได้ต่ำกว่า แสดงให้เห็นว่าชนิดน้ำตาลเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดของเชื้อ โดยกลูโคสและซูโครสเป็นน้ำตาลที่เชื้อสามารถใช้ได้ดีที่สุด นั่นคือ หากมีการบริโภคน้ำตาลกลูโคสหรือซูโครส เชื้อในช่องปากสามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดได้สูง จึงอาจเสี่ยงต่อการเกิดโรคฟันผุได้มาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่รายงานว่าน้ำตาลซูโครสทำให้เกิดฟันผุได้สูง<sup>52</sup> ขณะที่แลคโตสมีแนวโน้มเป็นน้ำตาลที่เชื้อใช้ได้น้อยกว่า นั่นคือ หากมีการบริโภคน้ำตาลแลคโตสเชื้อในช่องปากมีแนวโน้มเจริญเติบโตและผลิตกรดได้ต่ำกว่า จึงอาจเสี่ยงต่อการเกิดโรคฟันผุน้อยกว่า ซึ่ง

สอดคล้องกับการศึกษาที่รายงานว่าน้ำตาลแลคโตสทำให้เกิดฟันผุได้ต่ำ<sup>51,52</sup>

เมื่อพิจารณาความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (ความเข้มข้นร้อยละ 2, 5, 7 และ 10) ของสารละลายน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่าไม่ว่าจะเป็นสารละลายน้ำตาลชนิดใด ถึงแม้ว่าความเข้มข้นแตกต่างกัน เชื้อมีอัตราเฉลี่ยการผลิตกรดและอัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน โดยเชื้อทั้ง 3 สปีชีส์ให้ค่าความเป็นกรดสุดท้ายที่ 48 ชั่วโมง ต่ำกว่าค่าวิกฤตของการเกิดฟันผุในทุกความเข้มข้น แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลเพียงร้อยละ 2 ก็ทำให้เชื้อเจริญเติบโตและให้ค่าความเป็นกรดต่ำกว่าค่าวิกฤตของการเกิดฟันผุได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ไม่ได้ทำการวัดปริมาณน้ำตาลที่เหลือจากการเมตาบอลิซึมของเชื้อ และการทดลองนี้เป็นระบบปิด

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดสุดท้ายจากการผลิตกรดของ *B. dentium*, *S. mutans* และ *L. salivarius* จากสารละลายน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดในการศึกษานี้ พบว่ามีค่าต่ำกว่าค่าวิกฤตของการเกิดฟันผุทั้งหมด บ่งชี้ให้เห็นว่า *B. dentium* เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตกรดได้มาก ซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งของเชื้อก่อโรคฟันผุ และยืนยันความเป็นเชื้อก่อโรคของ *S. mutans* และ *L. salivarius*

จากการที่สามารถพบ *B. dentium* ได้มากในรอยโรคฟันผุ<sup>14,31</sup> ถึงแม้ว่าเชื้อจะเจริญเติบโตและผลิตกรดได้ช้า แต่เชื่อนี้มีความสามารถในการเจริญเติบโตและการผลิตกรดจากน้ำตาลได้หลากหลาย และมีคุณสมบัติในการผลิตกรดจนมีค่าความเป็นกรดสุดท้ายต่ำกว่าค่าวิกฤต บ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้ออาจมีบทบาทก่อให้เกิดโรคฟันผุในช่องปากได้

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะฟันผุต่างๆ กับความสามารถในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของ *B. dentium* (clinical isolates) เมื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการผลิตกรดและอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจากแผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันที่ไม่ผุของเด็กที่ไม่มีฟันผุ เชื้อจากแผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันที่ไม่ผุของเด็กที่มีฟันผุ และเชื้อจากรอยโรคฟันผุ ไม่พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการผลิตกรดและอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจากทั้ง 3 กลุ่ม ที่เวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value < 0.05) แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการสร้างกรดและการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. dentium* จากสภาวะฟันผุต่างๆ ไม่แตกต่างกัน และเป็นที่น่าสังเกตว่า *B. dentium* (clinical strains) มีอัตราเฉลี่ยการผลิตกรดและอัตราเฉลี่ยการเจริญเติบโตที่สูงกว่า *B. dentium* CCUG 18367 (reference strain)

จากการทบทวนวรรณกรรม การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบคุณลักษณะด้านต่างๆ ของไบโอฟิล์มแบคทีเรียสปีชีส์ต่างๆ ที่พบได้ในช่องปาก ซึ่งอาจสัมพันธ์กับการก่อโรคฟันผุยังมีน้อย

รวมถึงคุณลักษณะในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากสปีชีส์ต่างๆ ด้วย การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่มีการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดและการเจริญเติบโตของไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากสปีชีส์ต่างๆ โดยเฉพาะเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 2 พบว่าความสามารถในการผลิตกรดมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อ นั่นคือ หากเชื้อมีการเจริญเติบโต ค่าความเป็นกรดที่วัดได้จะลดลง โดยพบว่า *B. dentium* CCUG 18367, *B. longum* CCUG 28903, *B. breve* CCUG 30511A, *B. scardovii* CCUG 13008A และ *A. omnicoles* CCUG 31649 สามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดได้เร็วกว่าในช่วงเวลา 6-12 ชั่วโมง ขณะที่ *S. inopicata* CCUG 35729 เจริญเติบโตและผลิตกรดได้ช้ากว่าในช่วงเวลา 12-24 ชั่วโมง

ไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากทุกสปีชีส์ที่นำมาศึกษานั้นสามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดจากน้ำตาลได้ทั้ง 3 ชนิด โดยผ่าน fructose 6-phosphate pathway หรือ bifid shunt การศึกษาเกี่ยวกับการแคแทบอลิซึม (catabolism) น้ำตาลกลูโคสและแลคโตสของ *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ยังพบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตในน้ำตาลแลคโตสได้ใกล้เคียงกับน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากน้ำตาลแลคโตสที่เข้าสู่เซลล์สามารถแตกตัวเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ น้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตสได้ดี ดังนั้นเชื้อจึงสามารถเมตาบอลิซึมกลูโคสต่อได้<sup>53</sup>

เมื่อพิจารณาความสามารถในการเจริญเติบโตและผลิตกรดจากสารละลายน้ำตาลชนิดต่างๆ ของ *B. breve* CCUG 30511A พบว่าเชื้อนี้สามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดจากสารละลายน้ำตาลแลคโตสได้ดีกว่าสารละลายน้ำตาลกลูโคสและซูโครส มีอัตราการเลี้ยงการผลิตกรดจากสารละลายน้ำตาลแลคโตสในช่วงเวลา 6-12 ชั่วโมงสูงสุดเมื่อเทียบกับไบฟิโดแบคทีเรียสปีชีส์อื่นๆ ในการศึกษา และสามารถให้ค่าความเป็นกรดจากการเมตาบอลิซึมสารละลายน้ำตาลแลคโตสได้มากกว่า *L. salivarius* ATCC 11741 แสดงให้เห็นว่า *B. breve* CCUG 30511A สามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดจากการเมตาบอลิซึมสารละลายน้ำตาลแลคโตสได้มาก สอดคล้องกับการศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของไบฟิโดแบคทีเรียในสารละลายน้ำตาลชนิดๆ ต่าง ซึ่งพบว่า *B. breve* ซึ่งแยกได้จากอุจจาระของทารกสามารถเจริญเติบโตในสารละลายน้ำตาลแลคโตส (specific growth rate =  $0.76 \pm 0.19 \text{ h}^{-1}$ ) ได้ดีกว่าในสารละลายน้ำตาลกลูโคส (specific growth rate =  $0.48 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ ) และซูโครส (specific growth rate =  $0.55 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ ) ที่เวลา 16 ชั่วโมง<sup>54</sup> นอกจากนี้ยังมีหลายการศึกษาที่สนับสนุนว่า *B. breve* เป็น predominant *Bifidobacterium* species ที่พบในนมแม่

55-57

ค่าความเป็นกรดสุดท้ายจากการเมตาบอลิซึมสารละลายน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดของไบฟิโดแบคทีเรียทุกสปีชีส์ในการศึกษานี้อยู่ระหว่าง 3.8-4.8 ซึ่งต่ำกว่าค่าวิกฤตของการเกิดฟันผุทั้งหมด

สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าไบฟีโดแบคทีเรียที่แยกได้จากรากฟันที่ผุรุนแรงสามารถลดค่าความเป็นกรดสุดท้ายได้ต่ำกว่า 4.2 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบ<sup>19</sup> บ่งชี้ให้เห็นว่าไบฟีโดแบคทีเรียเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตกรดได้มาก สามารถให้ค่าความเป็นกรดสุดท้ายต่ำกว่าค่าวิกฤต ซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งของเชื้อก่อโรคฟันผุ

เป็นที่น่าสงสัยว่าเหตุใด *B. dentium* สามารถพบได้มากในรอยโรคฟันผุเมื่อเทียบกับสปีชีส์อื่นๆ<sup>14,31</sup> เช่น *B. longum* ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ *B. dentium* มีความสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่จำพวกโพลีแซ็กคาไรด์และโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นแหล่งพลังงาน โดย *B. dentium* เป็นเชื้อที่สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ (polysaccharides) เช่น amylopectin และ amylase ได้ ขณะที่ *B. longum* ไม่สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่เหล่านี้ได้<sup>58</sup> และ *B. dentium* ซึ่งแยกได้จากรอยโรคฟันผุในช่องปากของมนุษย์ยังสามารถใช้ raffinose และ trisaccharide ในการเจริญเติบโตได้<sup>49</sup> นอกจากนี้ *B. longum* ไม่สามารถยึดเกาะกับ type I collagen ซึ่งรวมถึงเนื้อฟันได้<sup>59</sup> จากที่กล่าวมาอาจจะเป็นเหตุผลที่ทำให้พบ *B. longum* ในรอยโรคฟันผุได้น้อยกว่า *B. dentium* ดังนั้นจำเป็นต้องศึกษาคุณลักษณะด้านอื่นๆ ของไบฟีโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากซึ่งอาจสัมพันธ์กับการก่อโรคฟันผุ เช่น การยึดเกาะของเชื้อกับเนื้อฟัน และการทนกรด เป็นต้น

## บทที่ 5

### บทสรุปและข้อเสนอแนะ

#### บทสรุป

1. ค่าความเป็นกรดของสารละลายแปรผกผันกับความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อ แต่ต่างกันที่ความเร็วในการให้ความเป็นกรดและการเจริญเติบโตของเชื้อ
2. ไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตกรดได้มาก สามารถให้ค่าความเป็นกรดสุดท้ายต่ำกว่าค่าวิกฤตเช่นเดียวกับ *S. mutans* และ *L. salivarius* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสำคัญที่เกี่ยวข้องกับโรคฟันผุ ดังนั้น *B. dentium* จึงอาจมีบทบาทสำคัญต่อโรคฟันผุเช่นเดียวกัน เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ รวมทั้งน้ำตาลแลคโตสซึ่งพบได้ในน้ำนมแม่
3. *B. dentium* ที่แยกได้จากสภาวะฟันผุต่างกัน มีรูปแบบในการสร้างกรดและการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน

#### ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

จากผลการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นที่น่าสนใจต่อไปว่าการศึกษาในอนาคตเกี่ยวกับไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากดังต่อไปนี้

1. ศึกษาคุณลักษณะด้านอื่นๆ ของไบฟิโดแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากซึ่งอาจสัมพันธ์กับการก่อโรคฟันผุ เช่น การยึดเกาะของเชื้อกับเนื้อฟัน และการทนกรด เป็นต้น
2. ศึกษาความสัมพันธ์ของ *B. breve* ในช่องปากกับการเกิดโรคฟันผุในเด็ก

### บรรณานุกรม

1. Reimann S. Novel Technologies for Detection, Production and Screening of Stress Tolerant Bifidobacteria [Doctor of Sciences]. Swiss Federal Institute of Technology Zurich; 2009.
2. Tannock GW. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr Issues Mol Biol* 1999; 1(1-2): 53–64.
3. Masco L. Identification, antimicrobial susceptibility and functionality of potentially probiotic bifidobacteria [Doctor (Ph.D.) in Sciences, Biotechnology]. Belgium: Faculty of Sciences, Ghent University; 2006.
4. Nakajo K, Takahashi N, Beighton D. Resistance to Acidic Environments of Caries-Associated Bacteria: Bifidobacterium dentium and Bifidobacterium longum. *Caries Res* 2010; 44(5): 431–7.
5. Mantzourani M, Gilbert SC, Fenlon M, Beighton D. Non-oral bifidobacteria and the aciduric microbiota of the denture plaque biofilm. *Mol Oral Microbiol* 2010 Jun 1; 25(3): 190–9.
6. Beighton D, Gilbert SC, Clark D, Mantzourani M, al-Haboubi M, Ali F, *et al.* Isolation and Identification of Bifidobacteriaceae from Human Saliva. *Appl Environ Microbiol* 2008 Oct; 74(20): 6457–60.
7. Huys G, Vancanneyt M, D’Haene K, Falsen E, Wauters G, Vandamme P. *Alloscardovia omnicolens* gen. nov., sp. nov., from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007 Jul 1; 57(7): 1442–6.
8. Moore WE, Holdeman LV, Cato EP, Good IJ, Smith EP, Ranney RR, *et al.* Variation in periodontal floras. *Infect Immun* 1984 Dec 1; 46(3): 720–6.
9. Chávez de Paz LE, Molander A, Dahlén G. Gram-positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment. *Int Endod J* 2004 Sep 1; 37(9): 579–87.
10. Hoshino E. Predominant Obligate Anaerobes in Human Carious Dentin. *J Dent Res* 1985 Oct 1; 64(10): 1195–8.

11. Hooper SJ, Crean SJ, Lewis MAO, Spratt DA, Wade WG, Wilson MJ. Viable Bacteria Present within Oral Squamous Cell Carcinoma Tissue. *J Clin Microbiol* 2006 May 1; 44(5): 1719–25.
12. Hojo K, Nagaoka S, Murata S, Taketomo N, Ohshima T, Maeda N. Reduction of vitamin K concentration by salivary Bifidobacterium strains and their possible nutritional competition with Porphyromonas gingivalis. *J Appl Microbiol* 2007 Nov 1; 103(5): 1969–74.
13. Modesto M, Biavati B, Mattarelli P. Occurrence of the family bifidobacteriaceae in human dental caries and plaque. *Caries Res* 2006; 40(3): 271–6.
14. Mantzourani M, Gilbert SC, Sulong HNH, Sheehy EC, Tank S, Fenlon M, *et al.* The Isolation of Bifidobacteria from Occlusal Carious Lesions in Children and Adults. *Caries Res* 2009; 43(4): 308–13.
15. 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.
16. Beighton D, Al-Haboubi M, Mantzourani M, Gilbert SC, Clark D, Zoitopoulos L, *et al.* Oral Bifidobacteria Caries-associated Bacteria in Older Adults. *J Dent Res* 2010 Sep 1; 89(9): 970–4.
17. 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.
18. Seow WK. Biological mechanisms of early childhood caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 1998 Dec 2; 26: 8–27.
19. 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.
20. 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.
21. Dong X, Xin Y, Jian W, Liu X, Ling D. Bifidobacterium thermacidophilum sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000 Jan 1; 50(1): 119–25.



22. Simpson PJ, Fitzgerald GF, Stanton C, Ross RP. The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed. *J Microbiol Methods* 2004 Apr; 57(1): 9–16.
23. Petschow BW, Talbott RD. Growth promotion of Bifidobacterium species by whey and casein fractions from human and bovine milk. *J Clin Microbiol* 1990 Feb 1; 28(2): 287–92.
24. Wolin MJ, Zhang Y, Bank S, Yerry S, Miller TL. NMR Detection of  $^{13}\text{C-CH}_3$   $^{13}\text{C-COOH}$  from 3- $^{13}\text{C}$ -Glucose: A Signature for Bifidobacterium Fermentation in the Intestinal Tract. *J Nutr* 1998 Jan 1; 128(1): 91–6.
25. Samona A, Robinson RK, Marakis S. Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. *Food Microbiol* 1996 Aug; 13(4): 275–80.
26. Chronopoulos G, Bekatorou A, Bezirtzoglou E, Kaliafas A, Koutinas AA, Marchant R, *et al.* Lactic acid fermentation by Lactobacillus casei in free cell form and immobilised on gluten pellets. *Biotechnol Lett* 2002 Aug; 24(15): 1233–6.
27. Matuo MCS, Kikuchi IS, Pinto T de JA. Evaluation of cytochrome P-450 concentration in Saccharomyces cerevisiae strains. *Braz J Pharm Sci* 2010 Sep; 46(3): 483–90.
28. Santos E de O, Martins MLL. Effect of the medium composition on formation of amylase by Bacillus sp. *Braz Arch Biol Technol* 2003 Jan; 46(1): 129–34.
29. Gomes AMP, Malcata FX. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci Technol* 1999 Apr; 10(4–5): 139–57.
30. Mayo B, Sinderen D van, editors. Bifidobacteria: Genomics and Molecular Aspects. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2010. 274 p.
31. Turrone F, Foroni E, Pizzetti P, Giubellini V, Ribbera A, Merusi P, *et al.* Exploring the Diversity of the Bifidobacterial Population in the Human Intestinal Tract. *Appl Environ Microbiol* 2009 Mar 15; 75(6): 1534–45.
32. Sutter VL. Anaerobes as Normal Oral Flora. *Clin Infect Dis* 1984 Mar 1; 6 (Supplement 1): S62–6.
33. Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Bacterial Profiles of Root Caries in Elderly Patients. *J Clin Microbiol* 2008 Jun 1; 46(6): 2015–21.

34. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, *et al.* Molecular Analysis of Bacterial Species Associated with Childhood Caries. *J Clin Microbiol* 2002 Mar 1; 40(3): 1001–9.
35. Rada V, Petr J. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *J Microbiol Methods* 2000 Dec 15; 43(2): 127–32.
36. Ventura M, Turrone F, Zomer A, Foroni E, Giubellini V, Bottacini F, *et al.* The Bifidobacterium dentium Bd1 Genome Sequence Reflects Its Genetic Adaptation to the Human Oral Cavity. *PLoS Genet* 2009 Dec 24; 5(12): e1000785.
37. ชูติมา ไตรรัตน์วรกุล. ทักษะการป้องกันในเด็กและวัยรุ่น. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2008.
38. Manji F, Fejerskov O, Nagelkerke NJD, Baelum V. A random effects model for some epidemiological features of dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991 Dec; 19(6): 324–8.
39. Takahashi N, Yamada T. Acid-induced acid tolerance and acidogenicity of non-mutans streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 1999 Feb 1; 14(1): 43–8.
40. Horiuchi M, Washio J, Mayanagi H, Takahashi N. Transient acid-impairment of growth ability of oral Streptococcus, Actinomyces, and Lactobacillus: a possible ecological determinant in dental plaque. *Oral Microbiol Immunol* 2009 Aug 1; 24(4): 319–24.
41. Takahashi N, Nyvad B. The Role of Bacteria in the Caries Process Ecological Perspectives. *J Dent Res* 2011 Mar 1; 90(3): 294–303.
42. Haukioja A, Söderling E, Tenovou J. Acid Production from Sugars and Sugar Alcohols by Probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria in vitro. *Caries Res* 2008; 42(6): 449–53.
43. Nyvad B, Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Eur J Oral Sci* 1987 Oct 1; 95(5): 369–80.
44. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, *et al.* Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 2004 Dec 1; 97(6): 1311–8.
45. Kawamura Y, Hou X-G, Sultana F, Miura H, Ezaki T. Determination of 16S rRNA Sequences of Streptococcus mitis and Streptococcus gordonii and Phylogenetic

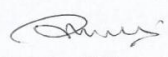
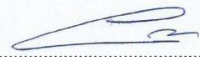
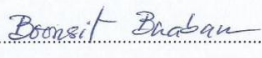
- Relationships among Members of the Genus Streptococcus. *Int J Syst Bacteriol* 1995 Apr 1; 45(2): 406–8.
46. Syed SA, Loesche WJ. Bacteriology of Human Experimental Gingivitis: Effect of Plaque Age. *Infect Immun* 1978 Sep; 21(3): 821–9.
  47. Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000 Oct 1; 27(10): 722–32.
  48. Van Houte J, Sansone C, Joshipura K, Kent R. Mutans Streptococci and Non-mutans Streptococci Acidogenic at Low pH, and in vitro Acidogenic Potential of Dental Plaque in Two Different Areas of the Human Dentition. *J Dent Res* 1991 Dec; 70(12): 1503–7.
  49. Sansone C, Van Houte J, Joshipura K, Kent R, Margolis HC. The Association of Mutans Streptococci and Non-Mutans Streptococci Capable of Acidogenesis at a Low pH with Dental Caries on Enamel and Root Surfaces. *J Dent Res* 1993 Feb; 72(2): 508–16.
  50. Loesche WJ, Eklund S, Earnest R, Burt B. Longitudinal investigation of bacteriology of human fissure decay: epidemiological studies in molars shortly after eruption. *Infect Immun* 1984 Dec 1; 46(3): 765–72.
  51. Kaster AG, Brown LR. Extracellular dextranase activity produced by human oral strains of the genus Bifidobacterium. *Infect Immun* 1983 Nov 1; 42(2): 716–20.
  52. Gupta P, Gupta N, Pawar AP, Birajdar SS, Natt AS, Singh HP, *et al.* Role of Sugar and Sugar Substitutes in Dental Caries: A Review, Role of Sugar and Sugar Substitutes in Dental Caries: A Review. *Int Sch Res Not* 2013 Dec 29; 2013: e519421.
  53. González-Rodríguez I, Gaspar P, Sánchez B, Gueimonde M, Margolles A, Neves AR. Catabolism of Glucose and Lactose in Bifidobacterium animalis subsp. lactis, Studied by <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance. *Appl Environ Microbiol* 2013 Dec 15; 79(24): 7628–38.
  54. Rada V, Bartonová J, Vlková E. Specific growth rate of bifidobacteria cultured on different sugars. *Folia Microbiol (Praha)* 2002; 47(5): 477–80.
  55. Klaassens ES, Boesten RJ, Haarman M, Knol J, Schuren FH, Vaughan EE, *et al.* Mixed-species genomic microarray analysis of fecal samples reveals differential transcriptional responses of bifidobacteria in breast- and formula-fed infants. *Appl Environ Microbiol* 2009 May; 75(9): 2668–76.

56. Roger LC, Costabile A, Holland DT, Hoyles L, McCartney AL. Examination of faecal Bifidobacterium populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiol Read Engl* 2010; 156(Pt 11): 3329–41.
57. Turrone F, Foroni E, Serafini F, Viappiani A, Montanini B, Bottacini F, *et al.* Ability of Bifidobacterium breve To Grow on Different Types of Milk: Exploring the Metabolism of Milk through Genome Analysis. *Appl Environ Microbiol* 2011 Oct 15; 77(20): 7408–17.
58. Crociani F, Alessandrini A, Mucci MM, Biavati B. Degradation of complex carbohydrates by Bifidobacterium spp. *Int J Food Microbiol* 1994 Dec; 24(1–2): 199–210.
59. Mukai T, Toba T, Ohori H. Collagen Binding of Bifidobacterium adolescentis. *Curr Microbiol* 1997 May; 34(5): 326–31.

**ภาคผนวก**

## ภาคผนวก ก

หนังสือรับรองผ่านการพิจารณาและได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย

<p>RESEARCH ETHICS COMMITTEE (REC)          BUILDING 1 5<sup>TH</sup> FLOOR ROOM 504          TEL. 66-74-287533, 66-74-287504          FAX. 66-74-287533</p>		<p>FACULTY OF DENTISTRY          PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY          HADYAI, SONGKHLA 90112, THAILAND          TEL. 66-74-212914, 66-74-429871, 66-74-287500          FAX. 66-74-429871, 66-74-212922</p>
<p><b>Documentary Proof of Ethical Clearance</b>  <b>Research Ethics Committee (REC)</b>  <b>Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University</b></p>		
<p><b>The Project Entitled</b>      Acid Production and Growth by Oral Bifidobacteria <i>in vitro</i></p>		
<p><b>REC Project No.</b>                :    EC5803-12-P-LR</p>		
<p><b>Principal Investigator</b>        :    Miss Wanida Piyawirojkul</p>		
<p>Approved by Research Ethics Committee (REC), Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University.</p>		
<p>This is to certify that REC is in full Compliance with International Guidelines for Human Research Protection such as the Declaration of Helsinki, the Belmont Report, CIOMS Guidelines and the International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP).</p>		
<p><b>Date of Approval</b>                :    19 MAY 2015      <b>No. of Approval</b>        :    MOE 0521.1.03/ 590</p>		
<p>          (Asst. Prof. Dr. Srisurang Suttapreyasri)          Chairman of Research Ethics Committee</p>		
<p>          (Asst. Prof. Surapong Vongvatchranon)</p>	<p>.....          (Dr. Supatcharin Piwat)</p>	
<p>          (Assoc. Prof. Pornchai Sathirapanya)</p>	<p>          (Mr. Kamolphon Nuangsri)</p>	
<p>          (Asst. Prof. Dr. Angkana Thearmontree)</p>	<p>          (Mr. Wasin Suwannarat)</p>	
<p>          (Asst. Prof. Dr. Suwanna Jitpakdeebodintr)</p>	<p>          (Mr. Boonsit Buaban)</p>	

