



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การจำแนกชนิดและศึกษาคุณสมบัติของเชื้อไบฟิโดแบคทีเรีย

ที่เกี่ยวข้องกับโรคฟันผุนรุนแรงในเด็ก

Identification and cariogenic characterization of oral

Bifidobacterium spp. associated with severe childhood caries

คณะนักวิจัย

นาง สุปัทธินันท์ พิวัฒน์

นางสาว รวี เกียรติไพศาล

นางสาว ภารดา อุทโท

๕๘๐

เลขที่	RK306.05	ศ. ๗๖ 2018
Bib. Key	424351	
	27 APR 2018	

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก เงินรายได้มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2555 รหัสโครงการ*DEN 550498S

ส่วนที่ 2 เนื้อหา

1. ชื่อชุดโครงการ: -

2. ชื่อโครงการเดี่ยว: การจำแนกชนิดและศึกษาคุณสมบัติของเชื้อไบฟิโดแบคทีเรีย ที่เกี่ยวข้องกับโรคฟันผุรุนแรงในเด็ก (Identification and cariogenic characterization of oral *Bifidobacterium* spp. associated with severe childhood caries)

3. คณะนักวิจัย:

- นาง สุพัชรีนทร์ พิวัฒน์ หน่วยงานต้นสังกัด: สถาบันวิจัยโรคที่พบบ่อยในช่องปากและวิทยาการระบาด และภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์
- นางสาว รวี เกียรติไพศาล หน่วยงานต้นสังกัด: สถาบันวิจัยโรคที่พบบ่อยในช่องปากและวิทยาการระบาด และภาควิชาโอบุรุษวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์
- นางสาว ภารดา อุทโท หน่วยงานต้นสังกัด: สถาบันวิจัยโรคที่พบบ่อยในช่องปากและวิทยาการระบาด และภาควิชาโอบุรุษวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์

4. กิตติกรรมประกาศ:

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ DEN 550498 S.

5. บทคัดย่อ:

แม้ว่ามีรายงานถึงความสัมพันธ์ของไบฟิโดแบคทีเรียกับรอยโรคฟันผุ แต่ไม่พบว่ามีข้อมูลเกี่ยวกับความชุกหรือการศึกษาคุณสมบัติของการยึดติดของเชื้อนี้ในช่องปาก *Bifidobacterium* spp. ในเด็กไทย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุชนิดของสายพันธุ์ของเชื้อไบฟิโดแบคทีเรีย เปรียบเทียบความชุก *Bifidobacterium* spp. ในช่องปากของเด็กที่เป็นโรคฟันผุและในเด็กที่ปราศจากโรคฟันผุ และทำการศึกษาคู่สมบัตินี้ของการยึดติดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากรอยโรคฟันผุของเด็กกลุ่มนี้ โดยสามารถแยกแบคทีเรียไบฟิโดแบคทีเรียจำนวนทั้งหมด 167 สายพันธุ์ จากเด็ก 50 คนที่มีฟันผุและ 50 คนที่ไม่มีฟันผุ และทำการระบุสายพันธุ์โดยใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุล แล้วทำการศึกษาความสามารถในการเกาะติด สมบัติของผิวเซลล์ การสร้างไบโอฟิล์ม พบว่าความชุกของเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียในเด็กโรคฟันผุ (48%) (24/50) สูงกว่าในเด็กผู้มีสุขภาพฟันดี (24%) (12/50) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 5.8 ± 0.9 Log CFU/ml และ 2.7 ± 0.8 Log CFU/ml ตามลำดับ ไบฟิโดแบคทีเรียที่พบบ่อยในเด็กโรคฟันผุ ได้แก่ สายพันธุ์ *B. dentium* (82.9%) (102/123), *B. breve* (11.4%) (14/123), และ *B. longum* (5.7%) (7/123) และพบสายพันธุ์ *B. dentium* ในเด็กผู้สุขภาพดีทุกคน (100%) (44/44) ไบฟิโดแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ ที่แยกได้จากทั้งสองกลุ่มตัวอย่าง มีความสามารถในการเกาะติดเซลล์เพาะเลี้ยง keratinocyte ในหลอดทดลอง โดย สายพันธุ์ *B. dentium* จากเด็กฟันผุ (66%) มีความสามารถในการเกาะติดสูงกว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากเด็กสุขภาพดี (50%) และ *B. dentium* แต่ละสายพันธุ์แสดงความแตกต่างของสมบัติผิวเซลล์ในการชอบน้ำหรือไม่ชอบน้ำ นอกจากนี้ *B. dentium* ยังมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม โดยสรุป *B. dentium* เป็นสายพันธุ์ที่พบเป็นส่วนใหญ่ และสามารถแสดงศักยภาพในการเกาะติดผิวเซลล์และสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ดี ซึ่งแสดงถึงบทบาทสำคัญของความสัมพันธ์ในการคงอยู่และเพิ่มจำนวนไบฟิโดแบคทีเรีย

ในช่องปาก

Abstract

The association of bifidobacteria with dental caries lesions has been reported in several publications, however, no data of the prevalence or the adhesive properties of oral *Bifidobacterium* spp. have been evaluated in Thai children. The objectives of this study were to identify the oral *Bifidobacterium* species, to compare the prevalence of these species in caries-active and caries-free Thai children and to characterize the adhesive properties of the predominant bifidobacteria isolated from caries lesions. A total number of 167 strains of oral bifidobacteria were isolated from 50 caries-active and 50 caries-free subjects and identified by molecular biology techniques. The selected bifidobacteria from both groups were examined for adhesive ability, surface properties, and biofilm formation. The prevalence of oral bifidobacteria in caries-active children (48 %) (24/50) was significantly higher than in the caries-free group (24 %) (12/50) ($p < 0.05$), with total counts of 5.8 ± 0.9 Log CFU/ml and 2.7 ± 0.8 log CFU/ml, respectively. The predominant species of bifidobacteria were *B. dentium* (82.9 %) (102/123), *B. breve* (11.4 %) (14/123), and *B. longum* (5.7 %) (7/123) for the caries-active group, and *B. dentium* 100 % (44/44) for the caries-free group. All strains of bifidobacteria were able to adhere to keratinocyte cell line in vitro. The adherent strains of *B. dentium* showed higher total adhesive ability in caries-active subjects (66 %) than in the caries-free group (58 %). *B. dentium* showed strain variations in the cell surface characteristics of hydrophobic and hydrophilic surface charges. The strains of *B. dentium* from both groups were able to form biofilm. In conclusion, the predominant strains of *B. dentium* had high adhesive ability with keratinocytes and a biofilm forming capacity, implying a role in the colonization of oral mucosa.

6. บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary) ประกอบด้วย

บทนำ

โรคฟันผุ เป็นปัญหาสาธารณสุขวิกฤตปัญหาหนึ่งของทันตสุขภาพโดยเฉพาะในเด็ก ซึ่งในประเทศไทยเป็นปัญหาสำคัญปัญหาหนึ่งซึ่งจำเป็นต้องได้รับการแก้ไขอย่างเร่งด่วน สาเหตุหนึ่งของโรคฟันผุคือ เชื้อแบคทีเรีย (agent) ได้แก่ เชื้อกลุ่ม mutans streptococci (MS) ที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดฟันผุระยะเริ่มต้นในปี อย่างไรก็ตามมีรายงานถึงการแยกเชื้อ bifidobacteria ได้จากปากของทารกและจากฟันผุ

เชื้อ bifidobacteria เป็นเชื้อที่มีรูปร่างเป็นแท่งแยกเป็นกิ่ง ย้อมสีแกรมเป็นบวก (Gram-positive) ไม่เคลื่อนไหว ไม่สร้างสปอร์ มีสายพันธุ์ทั้งหมดประมาณ 36 ชนิดของสายพันธุ์ เชื้อกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่มีความสามารถสร้างกรด (acidogenic) โดยเฉพาะสามารถหมักน้ำตาลผ่านทาง fructose-6-phosphate phosphoketolase pathway และสามารถทนกรดได้ดี (aciduric) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของเชื้อก่อโรคฟันผุ โดยค่าความสามารถในการสร้างกรดของเชื้อกลุ่มนี้ใกล้เคียงกับเชื้อก่อโรคฟัน

ผุชนิดอื่น เช่น เชื้อ MS¹

โดยที่การจะพบเชื้อนี้หรือไม่ มีความสัมพันธ์อย่างมากกับชนิดของ media ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง หรือวิธีการที่ใช้ในการตรวจหา แต่เมื่อมีการพัฒนาวิธีการตรวจหาและประสบความสำเร็จในการพัฒนา selective media ที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ bifidobacteria ทำให้การศึกษาในช่วงไม่นานมานี้สามารถพบเชื้อกลุ่มนี้ได้มากขึ้นและบ่อยขึ้น Mantzourani และคณะในปี ค.ศ. 2009² รายงานว่าความชุกของการพบสปีชีส์ต่างๆ bifidobacteria ในรอยฟันผุด้านบดเคี้ยวเท่ากับ 87% ของผู้ใหญ่และ 67% ของเด็ก อย่างไรก็ตามยังไม่มีผลการการศึกษาอย่างเฉพาะเจาะจงของเชื้อนี้ในเด็กไทยเชื้อ bifidobacteria มีความหลากหลายของชนิดของสายพันธุ์ และมีข้อจำกัดในการหาวิธีที่เหมาะสมมาใช้ในการจำแนกชนิด การแยกและระบุชนิดของสายพันธุ์ของเชื้อกลุ่มนี้โดยการแยกลักษณะฟีโนไทป์และชีวเคมีไม่สามารถให้ผลที่แน่นอน การแยกโดยวิธีการทางชีวโมเลกุลที่ใช้อยู่ในปัจจุบันยังมีความยุ่งยาก ทำให้การระบุเชื้อในกลุ่มนี้ให้เฉพาะเจาะจงว่าชนิดของสายพันธุ์ใดหรือสายพันธุ์ใดที่เกี่ยวข้องกับการเกิดฟันผุเป็นไปได้ยาก ที่ผ่านมารายงานผลจึงมักรายงานเป็นกลุ่มของ bifidobacteria โดยไม่ระบุสายพันธุ์ที่ชัดเจน³ ทำให้ไม่สามารถทราบได้ว่าสายพันธุ์ใดเป็นสายพันธุ์ก่อโรค ดังนั้นในการศึกษาการกลไกการก่อโรคจึงไม่สามารถทำได้เช่นกัน และศึกษาว่าชนิดของสายพันธุ์หรือ สายพันธุ์ใดมีความเกี่ยวข้องกับโรคฟันผุ ก็สามารถทราบถึงบทบาทที่แท้จริงของเชื้อกลุ่มนี้ในแต่ละสายพันธุ์ และมีประโยชน์ต่อการวางแผนการป้องกันโรคฟันผุต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อระบุชนิดของสายพันธุ์ของเชื้อ bifidobacteria ที่พบในช่องปาก เปรียบเทียบความชุก *Bifidobacterium* spp. ในช่องปากของเด็กที่เป็นโรคฟันผุและในเด็กที่ปราศจากโรคฟันผุ และทำการศึกษาคณสมบัติของการยึดติดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากรอยโรคฟันผุของเด็กกลุ่มนี้

สรุปผลการทดลอง

ความชุกของ *Bifidobacterium* spp. ในช่องปากของเด็กที่เป็นโรคฟันผุและในเด็กที่ปราศจากโรคฟันผุ

จากเด็ก 50 คนที่มีฟันผุและ 50 คนที่ไม่มีฟันผุ พบว่าความชุกของเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียในเด็กที่มีโรคฟันผุเท่ากับ 48% (24/50) ซึ่งสูงกว่าในเด็กผู้มีสุขภาพฟันดีที่มีความชุกของเชื้อเท่ากับ 24% (12/50) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงใน ตารางที่ 1 โดยมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 5.8 ± 0.9 Log CFU/ml และ 2.7 ± 0.8 Log CFU/ml ตามลำดับ แยกได้ bifidobacteria จำนวนทั้งหมด 167 สายพันธุ์ ไบฟิโดแบคทีเรียที่พบบ่อยในเด็กโรคฟันผุ ได้แก่ สปีชีส์ *B. dentium* (82.9%) (102/123), *B. breve* (11.4%) (14/123), และ *B. longum* (5.7%) (7/123) และพบสายพันธุ์ *B. dentium* ในเด็กที่ไม่มีฟันผุทุกคน (100%) (44/44) ดังแสดงใน ตารางที่ 2

ความชุกของเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียในเด็กไทยมีค่าต่ำกว่าที่เคยมีรายงานไว้ ที่พบ 66% ในรอยฟันผุด้านบดเคี้ยว⁴ และพบ 95% จากน้ำลายของเด็กที่มีฟันผุ⁵ อาจเนื่องจากเทคนิควิธีการแยก การจำแนกเชื้อ หรือจากปัจจัยความแตกต่างของกลุ่มศึกษา การที่พบ *B. dentium* เป็นเชื้อที่พบบ่อยทั้งในเด็กที่มี และไม่มีฟันผุ อาจเนื่องจาก *B. dentium* เจริญได้ดีในสภาวะ pH ที่เป็นกลาง ซึ่งเป็นสภาวะในน้ำลาย

ของเด็กที่ไม่มีฟันผุ ไปจนถึงสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรด (pH 6.5) ในน้ำลายของเด็กที่มีฟันผุ และเชือนี้สามารถอยู่ร่วมกับเชื้อ mutans streptococci ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อก่อโรคฟันผุได้⁵ *B. dentium* เป็นเชื้อสปีชีส์ที่มีลักษณะเป็นเซลล์ที่มีส่วนยื่นคล้าย pilus (pilus-like appendages) อยู่ที่ผิวเซลล์มากกว่าเชื้อสปีชีส์อื่นๆ ในกลุ่ม⁶ ซึ่งอาจเป็นลักษณะบ่งชี้ได้ว่า *B. dentium* มีศักยภาพมากที่สุดในการยึดเกาะกับเซลล์ของมนุษย์

ตารางที่ 1 Prevalence of oral *Bifidobacterium* spp. in caries-active and caries-free groups.

Characteristic	No. of Subjects	Prevalence, N (%)	Total count (Log CFU/ml)
Caries free	50	12 (24)	2.70 ± 0.79
Caries active	50	24 ^a (48)	5.77 ^b ± 0.88

^aChi-square test indicates a statistical significance ($p < 0.05$) in the prevalence of bifidobacteria from caries-active and caries-free groups.

^bMann-Whitney U Test indicates a statistical significance ($p < 0.05$) in the total count from caries-active and caries-free groups.

ตารางที่ 2 Distribution of oral *Bifidobacterium* spp. in caries-active and caries-free groups.

Species	All subjects, N = 36		Caries-free group, N = 12		Caries-active group, N = 24	
	No. of subjects (%)	No. of isolates (%)	No. of subjects (%)	No. of isolates (%)	No. of Subjects (%)	No. of isolates (%)
<i>B. dentium</i>	34 (94.4)	146 (87.4)	12 (100)	44 (100)	22 ^a (95.5)	102 (82.9)
<i>B. breve</i>	5 (13.9)	14 (8.4)	ND	ND	5 (22.7)	14 (11.4)
<i>B. longum</i>	2 (5.6)	7 (4.2)	ND	ND	2 (9.1)	7 (5.7)

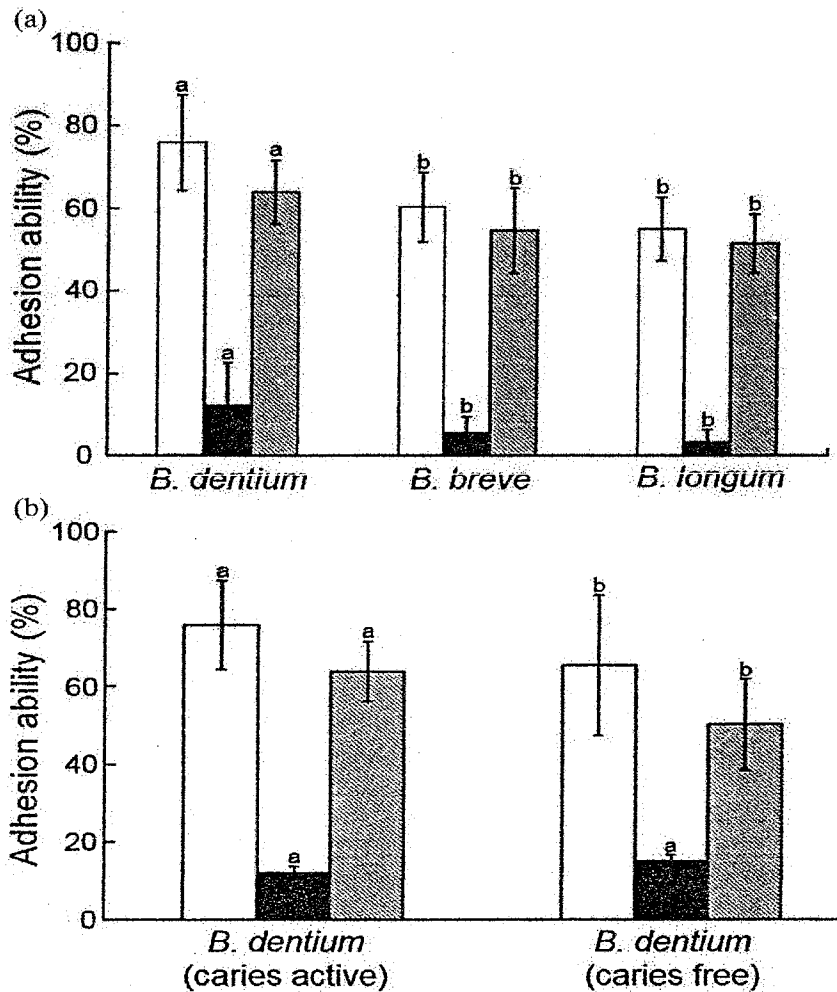
^aChi-square test indicates a statistical significance ($p < 0.05$) in *B. dentium* from caries-active and caries-free groups. ND = Not detected

ความสามารถในการเกาะติด (Adhesion abilities) ของเชื้อ *Bifidobacterium spp.* ต่อ *keratinocyte cells*

การศึกษาใช้ bifidobacteria จำนวนทั้งหมด 167 สายพันธุ์ ที่ได้จากเด็ก 50 คนที่มีฟันผุและ 50 คนที่ไม่มีฟันผุ โดยทำศึกษาอัตราการเกาะติดของเชื้อ bifidobacteria สปีชีส์ต่างๆ จากในช่องปากต่อ *keratinocyte cells line H357* ซึ่งปรับปรุงจากวิธีการของ Kintarak และคณะ พบว่า bifidobacteria ทุกสายพันธุ์ ที่แยกได้จากทั้งเด็กสองกลุ่มตัวอย่าง มีความสามารถในการเกาะติดเซลล์เพาะเลี้ยง *keratinocyte* ในหลอดทดลอง โดยพบว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างของของคุณสมบัติการเกาะติดทั้ง ความสามารถในการเกาะติดโดยรวม (total adhesion) การเกาะติดที่ผิวเซลล์ (externalization) และการเข้าสู่เซลล์ (internalization abilities) (รูปที่ 1) และจากรูปที่ 1b พบว่าสายพันธุ์ *B. dentium* จากเด็กฟันผุ มีความสามารถในการเกาะติดโดยรวม และในการเข้าสู่เซลล์ สูงกว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากเด็กที่ไม่มีฟันผุ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

มีรายงานก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิด bifidobacteria มีความสามารถในการยึดเกาะและคุณสมบัติผิวเซลล์ที่หลากหลาย โดยได้ทำการศึกษาคุณสมบัติเหล่านี้ในสายพันธุ์ของ *B. longum* B6 กับเซลล์ไลน์ (cell line) Caco-2 cell ซึ่งเกิดจากมะเร็งต่อม้ำเหลืองในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ และได้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่ตรงระหว่างการยึดเกาะในหลอดทดลองและการตั้งถิ่นฐาน (colonization) ของเชื้อในร่างกายจริง⁷

ในการเกิดฟันผุ ความเกี่ยวข้องของ bifidobacteria ในรอยโรคฟันผุสัมพันธ์กับความสามารถในการตั้งถิ่นฐานของเชื้อและการสร้างไบโอฟิล์ม เกิดเป็นแผ่นคราบจุลินทรีย์ และความสามารถในการผลิตกรดที่ทำลายเนื้อฟัน ผลการวิจัยพบว่าสายพันธุ์ *B. dentium* มีความสามารถในการเกาะติดสูง ทั้งการเกาะติดที่ผิวเซลล์ และการเข้าสู่เซลล์ ซึ่งอาจอธิบายการพบความชุกที่สูงของ *B. dentium* ที่พบในคราบจุลินทรีย์ในการศึกษานี้



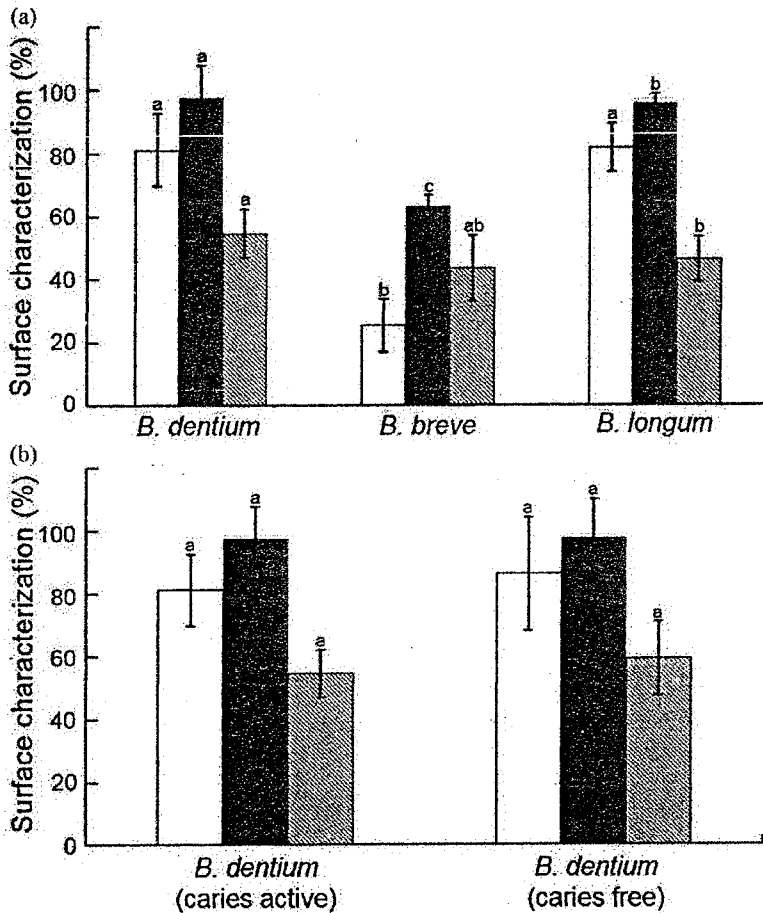
รูปที่ 1 Adhesion ability to keratinocyte cells of (a). *B. dentium*, *B. breve* and *B. longum* from caries-active subjects and (b). *B. dentium* from caries-active and caries-free group. The adhesion ability represents total adhesion (□), externalization (■) and internalization (▨). Different letters (compared within the same parameter) are significantly different at $p < 0.05$.

คุณสมบัติทาง physicochemical ของผิวเซลล์ของ *Bifidobacterium* spp. จากในช่องปาก

การวิเคราะห์คุณสมบัติในการยึดติด (adhesive characteristics) ของเชื้อ bifidobacteria สปีชีส์ต่างๆ ทำโดยการวัดการยึดติดกับสารตัวทำละลาย ซึ่งปรับปรุงจากวิธีการของ Xu และคณะ ได้แก่ xylene เพื่อวัด hydrophobicity และวัดคุณสมบัติ hydrophilic โดยวัดการยึดติดกับสาร chloroform และ ethyl acetate ซึ่งสามารถบอกค่าประจุที่ผิวเซลล์ (surface charges) ของแบคทีเรียว่าเป็น electron donor (basic) หรือเป็น electron acceptor (acidic) ตามลำดับ จากรูปที่ 2 พบว่าเชื้อ bifidobacteria สปีชีส์ต่างๆ มีความหลากหลายของคุณสมบัติในการยึดติด และมีระดับของ hydrophobic (affinity to xylene) และ hydrophilic (affinity to chloroform and affinity to ethyl acetate) surface charges อยู่ในระดับกลางถึงสูง และไม่พบว่าคุณสมบัติในการยึดติดของเชื้อ *B. dentium* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติเมื่อเทียบระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ที่แยกได้จากเด็กสุขภาพดี กับจากเด็กที่มีฟันผุ รูปที่ 2 b

จากการศึกษาในช่องปาก มักไม่ค่อยพบ *B. breve* และ *B. longum* ในคราบจุลินทรีย์ที่ผิวฟัน อาจเนื่องจากเชื้อทั้งสองสปีชีส์นี้มีความสามารถในการยึดเกาะกับ hydroxyapatite ที่ต่ำ⁸ ในขณะที่การศึกษานี้พบว่า *B. dentium* มีการยึดติดกับสาร chloroform และ ethyl acetate สูงกว่าเชื้อสปีชีส์อื่น แสดงถึงการที่ผิวเซลล์มีประจุ ซึ่งมีความสำคัญในการยึดติดกันของเซลล์กับพื้นผิวอื่น นอกจากนี้การที่ *B. dentium* สามารถยึดเกาะกับเซลล์ keratinocyte ซึ่งเป็นเซลล์เยื่อช่องปากได้ ก็อาจเป็นสิ่งที่ส่งเสริมให้เชื้อนี้สามารถอยู่ในช่องปาก และตั้งถิ่นฐานได้



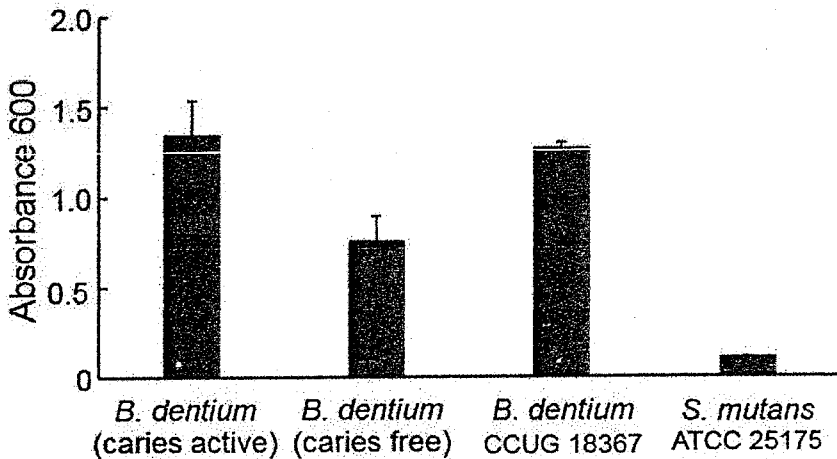
รูปที่ 2. Adhesion characteristics to different solvents of (a). *B. dentium*, *B. breve* and *B. longum* from caries-active subjects. (b). *B. dentium* from caries-active and caries-free group. The solvents represent xylene (□), chloroform (■) and ethyl acetate (▨). Different letters (compared within the same parameter) are significantly different at $p < 0.05$.

การสร้างไบโอฟิล์มของ *Bifidobacterium dentium* จากในช่องปาก

การศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของ *B. dentium* จากในช่องปาก ทำโดยวิธี biofilm assay ซึ่งอ้างอิงจากการศึกษาของ Patterson และคณะ โดยเลือก *B. dentium* ที่แยกได้จากเด็กที่ไม่มีฟันผุ และมีฟันผุ กลุ่มละ 5 สายพันธุ์ที่พบว่ามีความสามารถการยึดเกาะที่สูงที่สุดมาทำการศึกษา และเปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน *B. dentium* CCUG 18367 พบว่าทุกสายพันธุ์ที่เลือกสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ *B. dentium* จากเด็กที่มีฟันผุ และ *B. dentium* CCUG 18367 สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ดีกว่า *B. dentium* แยกได้จากเด็ก

ที่ไม่มีฟันผุ และดีกว่า *S. mutans* ATCC 25175 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูปที่ 3)

จากการที่การศึกษานี้พบว่า *B. dentium* มีความสามารถในการเกาะติดสูง ทั้งการเกาะติดที่ผิวเซลล์ และการเข้าสู่เซลล์ อาจเป็นผลให้เชื้อนี้มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มได้ดี การสร้างไบโอฟิล์มจะเกิดขึ้นภายในเวลาเพียง 2-3 นาที ไปจนถึง 2-3 เดือน โดยเริ่มจากการดูดซับโปรตีนที่ผิวฟัน มีการได้รับสารคาร์โบไฮเดรต เกิดการยึดเกาะร่วมกันของแบคทีเรียหลายๆ สปีชีส์ มีการผลิต exopolysaccharide จากแบคทีเรียเหล่านั้น ซึ่งก่อให้เกิดเป็นไบโอฟิล์มขึ้นมา⁹ และจากการรวมตัวของแบคทีเรียเหล่านั้น เมื่อได้รับน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรต ก็จะมีการผลิตกรดเกิดขึ้น



รูปที่ 3 Biofilm formation capacity of *B. dentium* isolated from caries-active and caries-free subjects and reference strains of *B. dentium* CCUG 18367 and *S. mutans* ATCC 25175.

เอกสารอ้างอิง

- Haukioja A, Soderling E, Tenovuo J. Acid production from sugars and sugar alcohols by probiotic lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Caries Res.* 2008;42(6):449-53.
- Mantzourani M, Gilbert SC, Sulong HN, Sheehy EC, Tank S, Fenlon M, et al. The isolation of bifidobacteria from occlusal carious lesions in children and adults. *Caries Res* 2009; 43: 308-13.
- Kaur R, Gilbert SC, Sheehy EC, Beighton D. Salivary levels of Bifidobacteria in caries-free and caries-active children. *Int J Paediatr Dent* 2013; 23: 32-8.
- Mantzourani M, Gilbert SC, Sulong HN, Sheehy EC, Tank S, Fenlon M, et al. The isolation of bifidobacteria from occlusal carious lesions in children and adults. *Caries Res* 2009; 43: 308-13.
- Nakajo K, Takahashi N, Beighton D. Resistance to acidic environments of caries-associated bacteria: *Bifidobacterium dentium* and *Bifidobacterium longum*. *Caries Res* 2010; 44: 431-7.
- Ventura M, Turrone F, Motherway MO, MacSharry J, van Sinderen D. Host-microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria. *Trends*

Microbiol 2012; 20: 467-76.

7. Xu H, Jeong HS, Lee HY, Ahn J. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. Lett Appl Microbiol 2009; 49: 434-42.
8. Haukioja A, Yli-Knuuttila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand AC, Meurman JH, Tenovuo J. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. Oral Microbiol Immunol. 2006 Oct;21(5):326-32.
9. Pacchioli D. Engineering Biofilms: Understanding How Bacteria Function in Communities could Lead to a Host of New Applications, Available at: <http://news.psu.edu/story/142007/2012/11/29/research/engineering-biofilms>, accessed March 2016.

7. ภาคผนวก

7.1 แนบสำเนาบทความที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว (Reprint)

Utto P, Piwat S, Teanpaisan R. Prevalence and Adhesion Properties of Oral Bifidobacterium species in Caries-active and Caries-free Thai Children. Walailak J. Sci. & Tech., 2017; 14(8): 645-653.

โดยวารสารที่ตีพิมพ์ Walailak Journal of Science and Technology (WJST) อยู่ในฐานข้อมูล SCOPUS เป็นไปตามสัญญาวิทยารับทุนรหัสโครงการ DEN550005d

7.2 ผลการวิจัยส่วนที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์หรือตีพิมพ์ไม่ได้แต่อยู่ในวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยประกอบด้วย

Identification of oral *Bifidobacterium* spp.

A total number of 167 strains of oral *Bifidobacterium* spp. isolated from 50 caries-active children and 50 caries-free subjects were used for identification by presumptive methods and molecular biology techniques as shown in Table 3. The *Bifidobacterium* spp. were positive in the following characteristics as an anaerobe, gram positive, pleomorphic branching of Y or rod shape and catalase negative. All bifidobacteria possessed F6PPK enzyme using fructose-6-phosphate as substrate. The isolated strains showed different PCR products from PCR-RFLP methods, compared to the reference strains as shown in the same mobility of the bands or molecular weight (Fig. 4). The PCR products from *B. dentium* were different from *B. bifidum*, *B. breve* and *B. longum*, while PCR products from *B. breve* and *B. longum* showed same mobility of the bands. The PCR products without endonuclease digestion of *B. breve* and *B. longum* were further run on DGGE electrophoresis. The fingerprint results showed different mobility pattern DNA mobility on DGGE as compared to the reference strains (Fig. 5). For uncertain one strains with different mobility band from the

reference strains were further performed by DNA sequencing of 16S rRNA gene. The DNA sequence was blasted to the DNA gene bank, expressed as percentages homology for the sequence. For oral bifidobacteria, there were *B. dentium* 102 strains, *B. breve* 14 strains and *B. longum* 7 strains from caries-active subjects and *B. dentium* 44 strains from caries-free group.

Table 3. Identification of oral *Bifidobacterium* spp. isolated from dental caries-active and caries-free children

Tests/Methods	<i>B. dentium</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. longum</i>
Anaerobe	+	+	+
Gram positive	+	+	+
Pleomorphic Y or rod shape	+	+	+
Catalase	-	-	-
F6PPK	+	+	+
PCR-RFLP	146	14	7
DGGE	ND	14	7
DNA sequencing	1	ND	ND

+ = Positive characteristic, ND = Not done

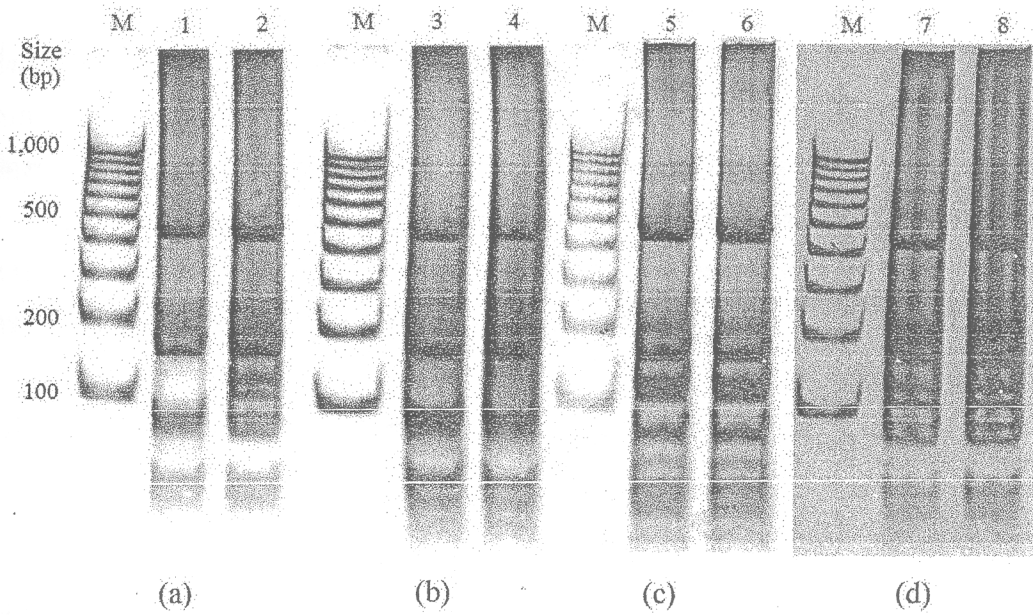


Fig. 4. PCR-RFLP products digested with *HpaII* of *Bifidobacterium* spp. (a) lane 1, *B. dentium* CCUG 18367, lane 2, *B. breve* CCUG 30511A or *B. longum* CCUG 28903. (b) lane 3-4, *B. dentium*. (c) lane 5-6, *B. bifidum* and (d) lane 7-8, *B. breve* or *B. longum*.

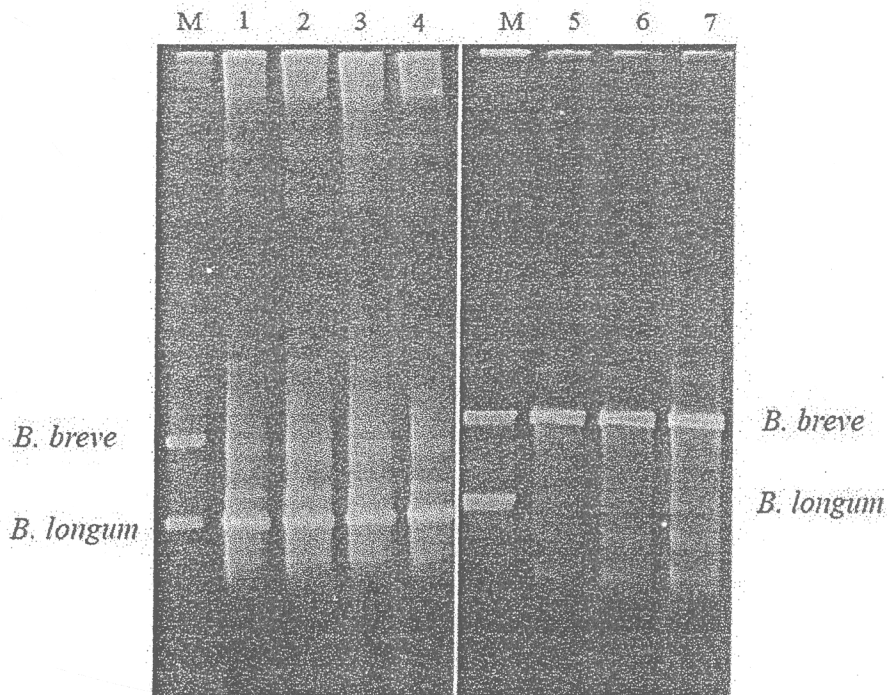


Fig. 5. DGGE fingerprints of *B. breve* CCUG 30511A and *B. longum* CCUG 28903 of maker reference strains (M). Lane 1-4 *B. longum*. Lane 5-7 *B. breve*.

7.3 ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

สายพันธุ์ bifidobacteria ในช่องปากพบมากในเด็กที่มีฟันผุ โดยสปีชีส์ที่พบมากคือ *B. dentium* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่มีความสามารถในการยึดเกาะและการสร้างฟิล์มชีวภาพได้ดี อาจส่งผลให้มีบทบาทสำคัญในการตั้งถิ่นฐานในช่องปากและเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคฟันผุ ดังนั้น การพบเชื้อ bifidobacteria ในช่องปาก อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ใช้ทำนายการเกิดฟันผุ นอกจากการพบเชื้อ mutans streptococci การศึกษาถึงโครงสร้างผิวเซลล์ในส่วนอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการคงอยู่ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ในช่องปาก เช่น adhesin การผลิต exopolysaccharide การศึกษาการเกาะติดกับผิวฟัน จะเป็นประโยชน์ต่อการทราบถึงบทบาท และกลไกของเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการเกิดฟันผุ

7.4 บทความวิจัยที่นำเสนอที่ประชุมวิชาการ (Proceeding) (ถ้ามี)

หมายเหตุ: ข้อ 7.1 ขอให้ระบุฐานข้อมูลของวารสารที่ตีพิมพ์ตามเงื่อนไขที่มหาวิทยาลัยกำหนด (ISI หรือ SCOPUS หรือ อื่น ๆ)

Prevalence and Adhesion Properties of Oral *Bifidobacterium* species in Caries-active and Caries-free Thai Children

Parada UTTO¹, Supatcharin PIWAT² and Rawee TEANPAISAN^{1,*}

¹Common Oral Diseases and Epidemiology Research Center and the Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand

²Common Oral Diseases and Epidemiology Research Center and the Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand

(*Corresponding author's e-mail: rawee.t@psu.ac.th)

Received: 19 April 2016, Revised: 16 August 2016, Accepted: 8 September 2016

Abstract

Several publications have reported the association of bifidobacteria with dental caries lesions, but no data for the prevalence or the adhesive properties of oral *Bifidobacterium* spp. have been evaluated in Thai children. The objectives of this study were to compare the prevalence of oral *Bifidobacterium* spp. in caries-active and caries-free Thai children and to characterize the adhesive properties of the predominant bifidobacteria isolated from caries lesions. A total number of 167 strains of oral bifidobacteria were isolated from 50 caries-active and 50 caries-free subjects and identified by molecular biology techniques. The selected bifidobacteria from both groups were examined for adhesive ability, surface properties, and biofilm formation. The prevalence of oral bifidobacteria in caries-active children (48 %) (24/50) was significantly higher than in the caries-free group (24 %) (12/50) ($p < 0.05$), with total counts of 5.8 ± 0.9 Log CFU/ml and 2.7 ± 0.8 log CFU/ml, respectively. The predominant species of bifidobacteria were *B. dentium* (82.9 %) (102/123), *B. breve* (11.4 %) (14/123), and *B. longum* (5.7 %) (7/123) for the caries-active group, and *B. dentium* 100 % (44/44) for the caries-free group. All strains of bifidobacteria were able to adhere to keratinocyte cell line *in vitro*. The adherent strains of *B. dentium* showed higher total adhesive ability in caries-active subjects (66 %) than in the caries-free group (58 %). *B. dentium* showed strain variations in the cell surface characteristics of hydrophobic and hydrophilic surface charges. The strains of *B. dentium* from both groups were able to form biofilm. In conclusion, the predominant strains of *B. dentium* had high adhesive ability with keratinocytes and a biofilm forming capacity, implying a role in the colonization of oral mucosa.

Keywords: Prevalence, adhesion, biofilm, bifidobacteria, dental caries

Introduction

Dental caries is caused by the bacterial acid demineralization of teeth. In addition to *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, bifidobacteria are also recognized as acidogenic and aciduric to be able to proliferate in a cariogenic environment [1-3]. The *Bifidobacterium* species is anaerobic, gram-positive rod-shaped, pleomorphic branched, non-motile, non-spore-forming, and possesses fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) to produce lactic acid as well as acetic acid as end products of glucose metabolism [4]. Bifidobacteria in the oral cavity are limited to the genera of *Bifidobacterium*, *Scardovia*, *Parascardovia*, and *Alloscardovia* [5,6]. Recently, Mantzourani *et al.* [7] reported that bifidobacterial species predominating in active occlusal lesions from 87 % of adults and 67 % of children were *Bifidobacterium dentium*, *Parascardovia denticolens*, *Scardovia inopicata*, *Bifidobacterium longum*, *Scardovia genomosp.* C1, and *Bifidobacterium breve*, whereas no bifidobacteria were detected in supra-

or subgingival plaques from clinically healthy teeth [8]. Other studies in England reported the isolation of bifidobacteria from the saliva of 95 % of caries-active, and from only 9 % of caries-free, children [3], and 96.8 % of bifidobacteria found in the saliva of caries-active older adults [1]. However, information on the prevalence of oral bifidobacteria in Thai children has not yet been evaluated.

Caries-associated bifidobacteria may be incorporated into dental plaques, where acids are responsible for the caries process [9]. Haukioja *et al.* [10] studied the adhesion of bifidobacterial strains (*B. breve*, *B. longum*, *B. lactis*, and *B. adolescentis*) to human saliva coated hydroxyapatite, but the binding ability was less than 5 %. The adhesive ability of oral bifidobacteria, and the capacity of biofilm formation on the surfaces of teeth coated with saliva, food debris, and bacterial consortia, would be interesting for further investigation. Information on the adhesive property of the oral bifidobacteria and the cell surface charges of hydrophobic and hydrophilic characteristics, reflecting on the colonizing ability of the oral strains, are still limited. It is postulated that the oral bifidobacteria have an ability to adhere to oral epithelial cells for its purpose to maintain in oral cavity. The objectives of this study were to evaluate the prevalence of bifidobacterial strains in Thai children in high risk caries-active and caries-free groups, and to investigate the adhesive ability with keratinocyte cell line *in vitro* and biofilm formation, as well as assessment of hydrophobic and hydrophilic surface charges of the oral bifidobacteria.

Materials and methods

Subjects and clinical examination

Examination of the dental caries status of subjects was performed by dentists using a WHO probe (#621) and mouth mirror under unit light. A scoring system was adapted from the WHO criteria, 1997 [11]. The dental status of each examined set of teeth was categorized as: S = Sound surface, D = Dental caries with cavitated lesions.

A total of 100 children (aged 6 to 9 years old) from the Paediatric dental clinic, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Thailand, were included in this study. A total of 100 pool supragingival plaque samples were used for analysis: 50 samples collected from the sound teeth of 50 caries-free children, and 50 samples collected from the carious lesions of 50 caries-active children. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University.

Bacterial sampling

The plaque samples were collected using a curette and were immediately suspended in 200 µl of reducing transport fluid (RTF). Ten-fold dilution series of each sample was made in phosphate buffer saline (PBS) with 0.05 % L-cysteine hydrochloride (as a reducing agent), and 0.1 ml of the diluted sample was spread on Beerens agar plate. After 2 to 7 days of incubation at 37 °C under anaerobic conditions (10 % H₂, 10 % CO₂ and 80 % N₂), the number of bifidobacteria-like colonies were counted as colony forming units per milliliter (CFU/ml). Then, 2 - 5 colonies, either of the same or different colonial appearance, were collected and were initially identified as bifidobacteria based on being gram-positive, having pleomorphic rods, being catalase negative, and the presence of the key enzyme fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) from the glucose catabolic pathway, as described by Scardovi [12]. After culture purification, all isolates were kept at -80 °C until use.

Identification of *Bifidobacterium* spp. using 16S rRNA genes PCR-RFLP

A total number of 167 strains of oral bifidobacteria were isolated from 50 caries-active and 50 caries-free subjects and were identified to species levels by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes (16S rRNA genes PCR-RFLP), according to the method of Teanpaisan & Dahlen [13]. Briefly, the 16S rRNA genes were amplified by PCR using the universal primers 8UA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGGTACCTTGTTACGACTT-3'). A 50 µl PCR reaction mixture contained 100 ng of DNA template, 1.0 µM of each primer, 5 µl of 10x Buffer with 2.0 mM MgCl₂, 1.0 U of Taq DNA polymerase, and 0.2 mM of each dNTP. Amplification proceeded using a GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster, CA). Initial heat

denaturation at 95 °C for 15 min was followed by annealing at 50 °C for 2 min and a primer extension at 72 °C for 1.5 min. Subsequent cycles of denaturation were at 94 °C for 1 min; after 35 such cycles, the reaction was stopped at 72 °C for 10 min. The PCR products of 16S rRNA genes were individually digested with *HpaII* (New England Biolab, Ipswich, MA) according to the manufacturer's instructions. Digestion products were separated by 7.5 % polyacrylamide and stained with silver staining. The discrimination of uncertain strains was confirmed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and 16S rRNA genes by DNA sequencing. The following reference panel strains were used for comparative identification: *B. longum* CCUG 28903, *B. breve* CCUG 30511A, *B. dentium* CCUG 18367, *Bifidobacterium scardovii* CCUG 13008A, *Alloscardovia omnicolens* CCUG 31649, and *S. inopinata* CCUG 35729.

Adhesion assay

The H357 keratinocyte from the oral squamous carcinoma cell line used in this study was a gift from Professor Paul Speight of the University of Sheffield, UK. The keratinocytes were grown in flasks and maintained in medium containing 3 parts Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) plus 1 part Ham's F-12 nutrient mixture, supplemented with 10 % fetal calf serum, epidermal growth factor (10 ng/ml), hydrocortisone (0.5 g/ml), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 g/ml), and amphotericin B (2.5 g/ml). The cells were harvested by trypsinization with 0.25 % trypsin - 0.05 % EDTA at 37 °C for 10 to 15 min and collected by centrifugation. The keratinocytes were subcultured in 24-well plates at approximately 10⁵ cells/well, and were grown at 37 °C in 5 % CO₂ to confluence over 2 days.

The adhesion assay was performed on fixed keratinocytes by a modification of the methods described by Kintarak *et al.* [14]. Each selected *Bifidobacterium* strain was grown anaerobically overnight in 10 ml MRS broth with 0.05 % L-cysteine hydrochloride at 37 °C under anaerobic conditions (10 % H₂, 10 % CO₂ and 80 % N₂). The bacterial cells were harvested and washed twice with phosphate buffered saline containing 0.05 % L-cysteine hydrochloride. A bacterial inoculum containing approximately 10⁸ CFU/ml of each bifidobacteria strain suspended in DMEM was added to each well and incubated at 37 °C in 5 % CO₂ for 1 h. Non adherent bacteria were washed off, and the adherent bacteria plus intracellular bacteria were quantified as the adhesion.

To quantitate internalization, 1 ml of a solution, containing 100 µg/ml of ampicillin in DMEM, was added to each well to kill extracellular bacteria. The plates were incubated with ampicillin for 1 h at 37 °C in a 5 % CO₂ and then washed twice with PBS. To determine the number of bacteria, the keratinocytes were trypsinized with 0.05 % trypsin-EDTA and lysed with 0.1 % Triton X-100, and serial dilutions were plated onto MRS agar to determine the viable bacterial counts. Data were expressed as Log CFU/ml.

Total adhesion or internalization was reported as a percentage from duplicates according to the formula for total adhesion or internalization, as follows: (%) = $(N/N_0) \times 100$, where N₀ and N are log₁₀ number of bacterial cells (CFU/ml) before and after total adhesion or internalization. Adhesion (externalization) was calculated as total adhesion minus internalization.

Bacterial adhesion to solvents

The microbial adhesion to solvents (MATS) test was performed according to the methods of Rosenberg *et al.* [15] with some modifications. The adhesion of bacteria to different hydrocarbon solutions, including xylene (nonpolar neutral solvent), chloroform (polar acidic solvent), and ethyl acetate (polar basic solvent), were measured. Bacterial cells suspended in PBS (pH 7.0) containing 0.05 % L-cysteine hydrochloride were adjusted to A₆₀₀ of 0.5 (approximately 10⁸ CFU/ml cell density). A volume of 3 ml bacterial suspension was mixed with 1 ml of hydrocarbon solution by vortexing for 60 s and after allowing the phases to separate for 30 min of incubation at room temperature, the absorbance of the aqueous phase was measured at 600 nm. The results were reported as a percentage from triplicates, according to the formula $MATS (\%) = 1 - (A_t / A_0) \times 100$, where A_t represents the absorbance at time t = 30 min and A₀ the absorbance at t = 0. The bifidobacteria were classified into 3 groups: those with low hydrophobicity (0 - 35 %), moderate hydrophobicity (36 - 70 %), and high hydrophobicity (71 - 100 %).

Biofilm assay

Biofilm formation was examined in 96-well flat bottom plates, as previously described [16]. The selected 2-strains of high adhesive property of *B. dentium* from caries-active and caries-free subjects were used for biofilm assay, as well as a reference strain of *B. dentium* CCUG 18367. Fresh bacterial suspensions were prepared in BHI broth from overnight cultures and adjusted to A_{600} of 0.5 (approximately 10^8 CFU/ml cell density). Aliquots of 200 μ l bacterial suspension were inoculated into individual wells of a 96-well flat-bottomed polystyrene plate and incubated overnight at 37 °C for 24 h. Following overnight incubation, plates were gently washed with phosphate buffered saline (PBS; pH 7.0) and air-dried for 1 h. Biofilms were stained with 200 μ l crystal violet for 30 min, the wells washed gently to remove the crystal violet, and the plates air-dried. After the biofilms had been visually analyzed and imaged using a flatbed scanner, the crystal violet was solubilized with 100 μ l of 33 % (v/v) acetic acid per well. For quantitative results, the A_{600} of the solubilized crystal violet was measured, using the 96-well plate reader.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The Chi-square test was used to assess the difference of the prevalence of each studied group. The distribution of *Bifidobacterium* spp. was calculated as a percentage. The comparative differences of adhesion properties and surface charges between caries-active and caries-free groups were evaluated using the Mann-Whitney U-test. All analyses were performed with the Statistical Package for Social Sciences version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software package. The differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results and discussion

Prevalence of oral *Bifidobacterium* spp. in caries-active and caries-free subjects

The prevalence of bifidobacteria were 48 % (24/50) from caries-active children, which was significantly higher than the 24 % (12/50) from the caries-free group ($p < 0.05$), as shown in **Table 1**. The quantity of bifidobacteria in caries-active subjects exhibited a bacterial count of 5.8 ± 0.9 Log CFU/ml, whereas the lower number of bacteria found in the caries-free group was 2.7 ± 0.8 Log CFU/ml. The most frequently found species of bifidobacteria were *B. dentium* (82.9 %) (102/123), *B. breve* (11.4 %) (14/123), and *B. longum* (5.7 %) (7/123) for caries-active subjects, and *B. dentium* (100 %) (44/44) for the caries-free group (**Table 2**).

Table 1 Prevalence of oral *Bifidobacterium* spp. in caries-active and caries-free groups.

Characteristic	No. of Subjects	Prevalence, N (%)	Total count (Log CFU/ml)
Caries free	50	12 (24)	2.70 ± 0.79
Caries active	50	24 ¹ (48)	$5.77^2 \pm 0.88$

¹Chi-square test indicates a statistical significance ($p < 0.05$) in the prevalence of bifidobacteria from caries-active and caries-free groups.

²Mann-Whitney U Test indicates a statistical significance ($p < 0.05$) in the total count from caries-active and caries-free groups.

Table 2 Distribution of oral *Bifidobacterium* spp. in caries-active and caries-free groups.

Species	All subjects, N = 36		Caries-free group, N = 12		Caries-active group, N = 24	
	No. of subjects (%)	No. of isolates (%)	No. of subjects (%)	No. of isolates (%)	No. of Subjects (%)	No. of isolates (%)
<i>B. dentium</i>	34 (94.4)	146 (87.4)	12 (100)	44 (100)	22 ¹ (95.5)	102 (82.9)
<i>B. breve</i>	5 (13.9)	14 (8.4)	ND	ND	5 (22.7)	14 (11.4)
<i>B. longum</i>	2 (5.6)	7 (4.2)	ND	ND	2 (9.1)	7 (5.7)

¹Chi-square test indicates a statistical significance ($p < 0.05$) in *B. dentium* from caries-active and caries-free groups. ND = Not detected.

Adhesion abilities of oral *Bifidobacterium* spp. to keratinocyte cells

The adhesion rates of the isolated oral bifidobacteria to keratinocytes are shown in **Figure 1**. All isolated bifidobacteria were able to adhere to culture cells. There were strain variations in the adhesive properties of total adhesion, externalization, and internalization abilities. The adherent strains expressed as percentages of total adhesion, externalization, and internalization are per the following: *B. dentium* (76, 12 and 64 %), *B. breve* (60, 6 and 55 %), and *B. longum* (55, 4 and 52 %) from caries-active subjects, respectively (**Figure 1(a)**), while *B. dentium* from the caries-free group showed 66, 15 and 50 % (**Figure 1(b)**).

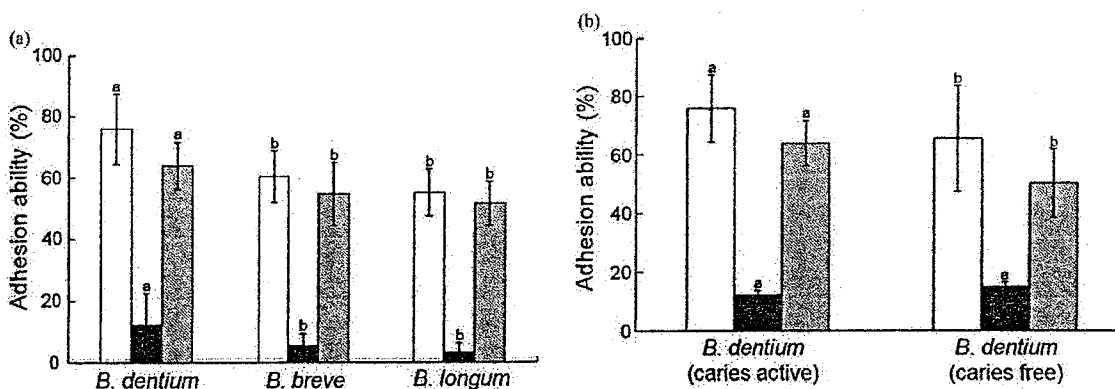


Figure 1 Adhesive ability with keratinocyte cells of (a) *B. dentium*, *B. breve*, and *B. longum* from caries-active subjects; (b) *B. dentium* from caries-active and caries-free groups. The adhesive ability represents total adhesion (□), externalization (■), and internalization (▨). Data are expressed as mean \pm SD. Different superscript letters indicate significant differences of each parameter at $p < 0.05$.

Physicochemical cell surface properties of oral *Bifidobacterium* spp.

The cell surface hydrophobicity and surface charges of the isolated oral bifidobacteria are shown in **Figure 2**. The adhesive characteristics of bifidobacteria were analyzed by measuring adhesion to xylene (hydrophobicity), chloroform, and ethyl acetate (surface charge to describe electron donor (basic) and electron acceptor (acidic) characteristics of bacterial surface, respectively). The bifidobacteria showed strain variations for adhesive characteristics and exhibited a moderate to high degree of hydrophobic (affinity to xylene) and hydrophilic (affinity to chloroform and affinity to ethyl acetate) surface charges as

follows: *B. dentium* (81, 96 and 56 %), *B. breve* (25, 63 and 44 %), and *B. longum* (82, 98 and 46 %) for caries-active subjects, and *B. dentium* (86, 98 and 59 %) for the caries-free group, respectively. Moreover, the strain *B. dentium* showed no significant differences in surface properties in both groups.

Biofilm formation of oral *Bifidobacterium* spp.

Biofilm-forming bifidobactetia assessed by biofilm assay are shown in **Figure 3**. All selected strains of oral *B. dentium* were able to form biofilm. The predominant *B. dentium* from caries-active subjects and *B. dentium* CCUG 18367 showed biofilm formation higher than that of *B. dentium* from the caries-free group.

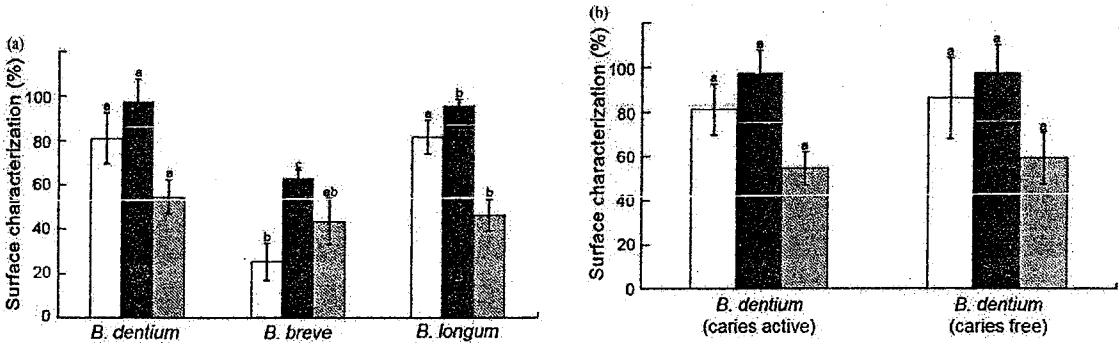


Figure 2 Adhesive characteristics in different solvents of (a) *B. dentium*, *B. breve* and *B. longum* from caries-active subjects; (b) *B. dentium* from caries-active and caries-free groups. The solvents represent xylene (□), chloroform (■), and ethyl acetate (▨). Data are expressed as mean ± SD. Different superscript letters indicate significant differences of each parameter at $p < 0.05$.

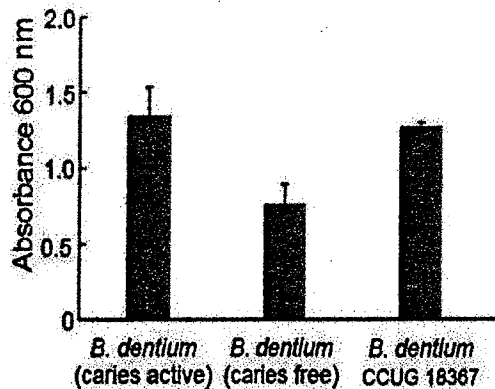


Figure 3 Biofilm formation capacity of *B. dentium* isolated from caries-active and caries-free subjects and reference strains of *B. dentium* CCUG 18367. Data are expressed as mean ± SD.

Discussion

The prevalence rate of bifidobacteria in Thai children (48 % in caries children) was lower than previous reports from occlusal lesions (67 %) [7] and caries saliva (95 %) [3]. However, some reports showed that bifidobacteria were undetected in the mouths of healthy individuals [8] and in active root caries lesions [17]. Interestingly, in this study, the species of *B. dentium* was the major strain isolated from the oral route in both groups. The results are in agreement with previous reports, in that the

predominant bifidobacteria is *B. dentium*, found in children in root surface plaque (80 %), infected root caries lesions (100 %), and soft active lesions (80 %) [2]. Other analyses identified caries-associated bifidobacteria as follows: *B. dentium* (83 %), *B. longum* (12.8 %), *P. denticolens* (3.9 %), *S. inopinata* (4.6 %), *B. scardovii* (1.3 %), and *A. omnicolens* (0.7 %) [1]. The differences in the occurrence of bifidobacterial strains are not surprising, owing to the methods of isolation, identification, individual races, age group, diversity of microbial flora, habit of food consumption, and personal hygiene. Importantly, in a host habitat, the particular pH in such an environment would determine the dominant strain of bifidobacterial species. The *B. dentium* grows well in around neutral pH, and could maintain viability with mutans streptococci [18], since saliva pH is around 7.0 for the caries-free group and 6.5 for the caries-active group [19]. The frequently found strains of *B. dentium* are strongly associated with dental caries in children [3] and adults [7]. The other bifidobacterial strains, such as *B. breve* and *B. longum*, were sporadically isolated in caries lesions in this study, suggesting that they were not significantly involved in the caries process. It is obvious that *B. dentium* shows higher numbers of pilus-like appendages around the cell surface than other bifidobacterial species [20], indicating that *B. dentium* is the strain with the most potential to adhere to host tissue. Previous reports demonstrated that bifidobacteria had variations in adhesive ability and cell surface property [21]. These properties were assessed in an intestinal bifidobacterial strain of *B. longum* B6 and several probiotic lactobacilli using a Caco-2 cell line originated from a human colonic adenocarcinoma, indicating a good relationship between *in vitro* adhesion and *in vivo* colonization [21].

In dental caries, the association of bifidobacteria in caries lesions arises from the crucial colonization ability to form biofilm, as well as dental plaque and the production of invasive acids. The findings that *B. dentium* strains showed a high ability of adhesion (both internalization and externalization) may explain the high prevalence of *B. dentium* found in the plaque samples used in this study. Such an ability may also affect the capability of biofilm formation of the *B. dentium* strains. Biofilm formation occurs from a few minutes up to few months, mediated by the adsorption of protein and the carbohydrate intake, followed by the immobilization of multispecies bacteria and the consolidation of exopolysaccharide production from bacteria, and finally colonization to form biofilm [22]. The accumulation of microbial consortia generates acids when sugar and/or carbohydrate is supplied, which results in dental disease [23]. In oral environments, bifidobacteria (*B. breve* and *B. longum*) may not attach to the hard tissue of the teeth surface, as evidenced by the low affinity to hydroxyapatite [10], whereas the strains of *B. dentium* as demonstrated in this study showed high adhesive ability with keratinocytes. Additionally, the *B. dentium* possessed a high affinity to xylene and chloroform, indicating the properties of bacterial cell surface exhibited hydrophobic and hydrophilic electron donor (basic) characteristics in the adherence to host cells. Interestingly, *B. dentium* was able to adhere to keratinocytes, representing the epithelium of oral mucosa of gingival, cheek bulge and palate in the oral cavity; this may facilitate the proliferation of *B. dentium*.

Conclusions

The prevalence of oral bifidobacteria was significantly higher in caries-active Thai children than in the caries-free group. The predominant strain of *B. dentium* was found in both groups. *B. dentium* from caries-active subjects showed a high degree of adhesive ability with keratinocytes, and was able to form biofilm, implying an important role in the colonization of oral mucosa.

Acknowledgements

This work was financially supported by a scholarship from the Office of the Higher Education Commission awarded to Ms. Parada Utto under the CHE-PhD and from the annual research scholarship of the Graduate School, Prince of Songkla University, and the Prince of Songkla University DEN 550498 S.

References

- [1] D Beighton, M Al-Haboubi, M Mantzourani, SC Gilbert, D Clark, L Zoitopoulos and JE Gallagher. Oral Bifidobacteria: Caries-associated bacteria in older adults. *J. Dent. Res.* 2010; **89**, 970-4.
- [2] M Mantzourani, M Fenlon and D Beighton. Association between Bifidobacteriaceae and the clinical severity of root caries lesions. *Oral Microbiol. Immunol.* 2009; **24**, 32-7.
- [3] R Kaur, SC Gilbert, EC Sheehy and D Beighton. Salivary levels of Bifidobacteria in caries-free and caries-active children. *Int. J. Paediatr. Dent.* 2013; **23**, 32-8.
- [4] K Pokusaeva, GF Fitzgerald and DV Sinderen. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes Nutr.* 2011; **6**, 285-306.
- [5] W Jian and X Dong. Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* and *Bifidobacterium denticolens* to *Scardovia inopinata* gen. nov., comb. nov., and *Parascardovia denticolens* gen. nov., comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002; **52**, 809-12.
- [6] G Huys, M Vancanneyt, K D'Haene, E Falsen, G Wauters and P Vandamme. *Alloscardovia omnicolens* gen. nov., sp. nov., from human clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007; **57**, 1442-6.
- [7] M Mantzourani, SC Gilbert, HN Sulong, EC Sheehy, S Tank, M Fenlon and D Beighton. The isolation of bifidobacteria from occlusal carious lesions in children and adults. *Caries Res.* 2009; **43**, 308-13.
- [8] JA Aas, BJ Paster, LN Stokes, I Olsen and FE Dewhirst. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* 2005; **43**, 5721-32.
- [9] K Todar. Colonization and Invasion by Bacterial Pathogens. Available at: <http://textbookofbacteriology.net/colonization.html>, accessed February 2016.
- [10] Haukioja, H Yli-Knuutila, V Loimaranta, K Kari, AC Ouwehand, JH Meurman and J Tenovou. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria *in vitro*. *Oral Microbiol. Immunol.* 2006; **21**, 326-32.
- [11] World Health Organization. *Oral Health Surveys - Basic Methods*. 4th ed. World Health Organization, Geneva, 1997.
- [12] V Scardovi. Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, 472^{al}. In: PHA Sneath, NS Mair, ME Sharpe and JG Holt (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1986, p. 1418-34.
- [13] R Teanpaisan and G Dahlen. Use of polymerase chain reaction techniques and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for differentiation of oral *Lactobacillus* species. *Oral Microbiol. Immunol.* 2006; **21**, 79-83.
- [14] S Kintarak, SA Whawell, PM Speight, S Packer and SP Nair. Internalization of *Staphylococcus aureus* by human keratinocytes. *Infect. Immun.* 2004; **72**, 5668-75.
- [15] M Rosenberg, D Gutnick and E Rosenberg. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *Federat. Eur. Microbiol. Soc. Microbiol. Lett.* 1980; **9**, 29-33.
- [16] CJ Sanchez, KJ Mende, ML Beckius, KS Akers, DR Romano, JC Wenke and CK Murray. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect. Dis.* 2013; **13**, 47.
- [17] D Preza, I Olsen, JA Aas, T Willumsen, B Grinde and BJ Paster. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J. Clin. Microbiol.* 2008; **46**, 2015-21.
- [18] K Nakajo, N Takahashi and D Beighton. Resistance to acidic environments of caries-associated bacteria: *Bifidobacterium dentium* and *Bifidobacterium longum*. *Caries Res.* 2010; **44**, 431-7.
- [19] M Hurlbutt, B Novy and D Young. Dental caries: A pH-mediated disease. *J. Calif. Dent. Hyg. Assoc.* 2010; **25**, 9-15.
- [20] M Ventura, F Turrioni, MO Motherway, J MacSharry and DV Sinderen. Host-microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria. *Trends Microbiol.* 2012; **20**, 467-76.
- [21] H Xu, HS Jeong, HY Lee and J Ahn. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009; **49**, 434-42.

- [22] D Pacchioli. Engineering Biofilms: Understanding How Bacteria Function in Communities could Lead to a Host of New Applications, Available at: <http://news.psu.edu/story/142007/2012/11/29/research/engineering-biofilms>, accessed March 2016.
- [23] N Takahashi and B Nyvad. The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives. *J. Dent. Res.* 2011; **90**, 294-303.

Walailak Journal of Science and Technology (WJST)

- HOME
- ABOUT
- LOGIN
- REGISTER
- SEARCH
- CURRENT
- ARCHIVES
- ANNOUNCEMENTS
- PROCESS
- ONLINE SUBMISSIONS

Home > Vol 14, No 10 (2017)

Walailak Journal of Science and Technology (WJST)

About the WJST

Walailak Journal of Science and Technology (*Walailak J. Sci. & Tech.* or WJST), is a peer-reviewed journal (Editorial Board) covering all areas of science and technology, launched in 2004.

- E-ISSN: 2228-835X
- Start year: 2004
- Language: English
- Publication fee: Free of Charge
- Free access: Immediate
- Issues per year: 12 Issues (Monthly)

2015 SJR (SCOPUS): 0.199 (Q2)

STATISTICS

Walailak J. Sci. & Tech.

2016 TOTAL SUBMISSIONS 928	2016 PUBLISHED ARTICLES 87	ACCEPTANCE RATIO 15%
2015 TOTAL CITES 88	SJR (SCIMAGO JOURNAL RANK) 0.199	SCOPUS RANKING Q2

Aims and scope

Walailak Journal of Science and Technology is published 12 Issues (Monthly) by the Institute of Research and Development of Walailak University. The scope of the journal includes the following areas of research: Agriculture, Biological sciences, Health sciences, Physical sciences, Engineering, Information and communications technology. ([View full editorial policies](#))

Indexed and Abstracts

Walailak Journal of Science and Technology is indexed in the [Thai-Journal Citation Index Centre \(TCI\)](#), [Google Scholar](#), [ThaiScience](#), [Directory of Open Access Journals \(DOAJ\)](#), [CAB Abstracts](#), [EBSCOhost](#), [JournalSeek](#), [ASEAN Citation Index \(ACTI\)](#) and [SCOPUS](#).

USER

Username

Password

Remember me

INFORMATION

- [For Readers](#)
- [For Authors](#)

JOURNAL CONTENT

Search

Search Scope

Browse

- [By Issue](#)
- [By Author](#)
- [By Title](#)

FONT SIZE

CURRENT ISSUE

170	1.0
1.0	1.0
1.0	1.0

NOTIFICATIONS

- [View](#)
- [Subscribe](#)