



## ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการผลิตกรดและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Streptococcus mitis*

### Effect of Sucrose on The Acid Production and Biofilm Formation of *Streptococcus mitis*

ปานัดดา อยู่อภิบาลรักษ์<sup>\*1</sup> อรนาฎ มาตังคสมบัติ<sup>2</sup> และ พนิดา ธัญญศรีสังข์<sup>2</sup>

Panadda Yuapibanrak<sup>\*1</sup>, Oranart Matangkasombut<sup>2</sup> and Panida Thanyasrisung<sup>2</sup>

<sup>1</sup>สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

<sup>2</sup>ภาควิชาจุลชีววิทยา และหน่วยปฏิบัติการวิจัยจุลชีววิทยาช่องปากและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

<sup>1</sup>Medical Microbiology, Interdisciplinary Program, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Research Unit on Oral Microbiology and Immunology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

\*Corresponding author, E-mail: 6187286320@student.chula.ac.th

#### บทคัดย่อ

*Streptococcus mitis* พบได้ทั่วไปในช่องปาก เชื้อนี้เป็นหนึ่งในเชื้อกลุ่มแรกที่มาตั้งรกรากบนผิวฟันซึ่งมีส่วนในการสร้างไบโอฟิล์มระยะเริ่มต้น การศึกษาไม่นานนี้แสดงให้เห็นว่า *Streptococcus sanguinis* และ *S. mitis* ถูกพบมากในรอยโรคฟันผุระยะเริ่มต้น ซึ่งอาจทำให้เกิดรอยโรคในระยะเริ่มต้นได้เมื่อมีเชื้อกลุ่มก่อโรคฟันผุในปริมาณน้อย มีหลักฐานสนับสนุนว่า *S. sanguinis* อาจทำให้เกิดโรคฟันผุได้ แต่ *S. mitis* ยังมีข้อมูลที่จำกัด การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความสามารถของ *S. mitis* ในการผลิตกรดและสร้างไบโอฟิล์มในภาวะที่มีน้ำตาลซูโครส ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดฟันผุ โดยทำการทดลองเลี้ยง *S. mitis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Brain-Heart-Infusion (BHI, กลุ่มควมคุม) และในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว BHI ที่มีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 1 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นตรวจการผลิตกรด และการสร้างไบโอฟิล์ม โดยการวัดค่าความเป็นกรดต่างและมวลไบโอฟิล์มตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรดต่างของ *S. mitis* ในภาวะที่มีน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 4.6 ในขณะที่มวลไบโอฟิล์มมีระดับต่ำมาก สรุปได้ว่า *S. mitis* สามารถลดค่าความเป็นกรดต่างได้ในระดับต่ำกว่าค่าความเป็นกรดต่างวิกฤตของสารเคลือบฟัน (ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.5) แต่มีความสามารถจำกัดในการสร้างไบโอฟิล์มในภาวะที่มีน้ำตาลซูโครส

**คำสำคัญ:** *Streptococcus mitis* น้ำตาลซูโครส การผลิตกรด ไบโอฟิล์ม



## Abstract

*Streptococcus mitis* is commonly found in the oral cavity. It is one of early colonizers contributing to initial biofilm formation. A recent study showed that *Streptococcus sanguinis* and *S. mitis* were predominantly found in early carious lesions; therefore, they may initiate caries when there are low numbers of caries pathogens. Some evidence support the role of *S. sanguinis* in causing caries, but limited data are available on *S. mitis*. This study aims to examine the ability of *S. mitis* to produce acid and form biofilm in the presence of sucrose, which is related to caries formation. *S. mitis* was cultured for 36 hours in Brain-Heart-Infusion (BHI) broth, (a control) and in BHI broth containing 1% sucrose. After that, the acid production and the biofilm formation were examined by measuring the pH and biofilm mass respectively. The pH of *S. mitis* in the presence of sucrose was 4.6 whereas the biofilm mass was detected at a very low level. In conclusion, *S. mitis* decreased pH to the level lower than the critical pH of enamel (pH = 5.5); however, it had a limited ability to form biofilm in the presence of sucrose.

**Keywords:** *Streptococcus mitis*, Sucrose, Acid Production, Biofilm

## 1. บทนำ

โรคฟันผุเป็นโรคที่พบได้ในทุกช่วงวัย แต่ในเด็กเล็กโรคฟันผุส่งผลกระทบต่อพัฒนาการของเด็กในหลาย ๆ ด้าน (Sheiham, 2006) ซึ่งกระบวนการเกิดฟันผุเริ่มจากการบริโภคน้ำตาลซูโครสที่มากเกินไป โดยเชื้อแบคทีเรียในช่องปากสามารถนำซูโครสไปใช้เป็นพลังงานเพื่อเพิ่มจำนวน โดยให้กรดออกมาเป็นผลพลอยได้และยังสามารถนำไปสร้างไบโอฟิล์มได้อีกด้วย (Takahashi, 2015; Takahashi & Nyvad, 2011; Xu et al., 2018) ซึ่งกรดที่ถูกปล่อยออกมานี้จะสะสมในไบโอฟิล์มที่เกาะติดผิวฟัน หากไม่กำจัดไบโอฟิล์มออก กรดที่สะสมจะส่งผลให้ค่าความเป็นกรดต่างภายในไบโอฟิล์มลดต่ำลง ทำให้เกิดการสลายแร่ธาตุของฟัน (Pitts et al., 2017) จนทำให้เกิดรอยโรคฟันผุในที่สุด

ปกติหลังการแปรงฟันไม่นานเชื้อแบคทีเรียในช่องปากจะเริ่มมาเกาะบนผิวฟัน เพื่อสร้างไบโอฟิล์ม โดยเชื้อกลุ่มแรก คือ mitis group streptococci ซึ่งมักพบเชื้อ *S. mitis*, *Streptococcus oralis* และ *S. sanguinis* เป็นต้น (Diaz, Chalmers et al., 2006; Ihara, Takeshita et al., 2019) โดยทั่วไปเชื้อในกลุ่มนี้พบได้ในสภาวะช่องปากของเด็กที่ไม่มีฟันผุ แต่จากการศึกษาของ Jurczak และคณะพบว่าในเด็กที่มีรอยโรคฟันผุเริ่มต้น หรือที่เรียกว่า “white spot lesion” มีสัดส่วนของเชื้อ mitis group streptococci ในปริมาณสูง (*S. sanguinis* ร้อยละ 56 และ *S. mitis* ร้อยละ 31) ในขณะที่เชื้อก่อโรคฟันผุกลับพบน้อยกว่า (*S. mutans* ร้อยละ 9 และ *Lactobacillus rhamnosus* ร้อยละ 4) ซึ่งผู้วิจัยได้อภิปรายไว้ว่าในกรณีนี้การสลายแร่ธาตุจากผิวฟันอาจมาจากเชื้อกลุ่ม mitis group ได้แก่ *S. sanguinis* หรือ *S. mitis* (Jurczak, KoŚcielniak et al., 2015)

*S. sanguinis* และ *S. mitis* อยู่ในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียในช่องปากที่สามารถย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสไปเป็นไพรูเวท และพลังงานผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส ในภาวะที่มีน้ำตาลเกิน เช่น ในระหว่างมื้ออาหารไพรูเวทที่ได้นี้จะถูก



ย่อยสลายไปเป็นแลคเตท และจะถูกขับออกนอกเซลล์ของเชื้อในรูปกรดแลคติก (Takahashi, 2015) มีหลายการศึกษา ก่อนหน้าที่แสดงให้เห็นว่าถึงความสามารถของ *S. sanguinis* ในการผลิตกรดในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครส (Aizawa, Miyasawa-Hori et al., 2009; Lozano, Diaz-Garrido et al., 2019) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อกลุ่ม non-mutans streptococci ซึ่งประกอบด้วย *S. sanguinis*, *S. mitis* และ *Streptococcus gordonii* ในสภาวะกรด เชื้อทั้งสามชนิด สามารถปรับตัวให้ทนกรด และผลิตกรดได้มากขึ้น (Takahashi and Yamada, 1999) สำหรับการสร้างไบโอฟิล์ม มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า *S. sanguinis* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 1 (Liu, Stone et al., 2017) ซึ่งกลไกการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. sanguinis* มีความคล้ายคลึงกับเชื้อก่อโรคอย่าง *S. mutans* โดยพบว่า *S. sanguinis* สร้างเอนไซม์กลูโคซิเดสทรานสเฟอเรส พี ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับเอนไซม์กลูโคซิเดสทรานสเฟอเรสที่พบใน *S. mutans* และสามารถสร้างกลูแคนได้ทั้งชนิดที่ละลายน้ำ และไม่ละลายน้ำซึ่งชนิดหลังนี้มีบทบาทสำคัญในการสร้างไบโอฟิล์ม แต่การควบคุมการทำงานของเอนไซม์มีความซับซ้อนกว่าของ *S. mutans* (Liu et al., 2017) สำหรับเชื้อ *S. mitis* มีข้อมูลการผลิตกรดในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครส และกลูโคส (Aizawa, Miyasawa-Hori et al., 2009) และยังพบว่าในสภาวะที่เป็นกรด *S. mitis* สามารถปรับตัวให้ทนต่อกรด และยังสามารถผลิตกรดได้จากกลูโคส (Takahashi and Yamada, 1999) แต่ยังไม่มียุทธศาสตร์เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตกรด และการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mitis* ในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครส

## 2. วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตกรดของเชื้อ *S. mitis* ในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครส
- 2) เพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mitis* ในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครส

## 3. วิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้และสภาวะการเจริญเติบโต

*Streptococcus mitis* ATCC 49456 ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดเหลว Brain-Heart-Infusion (BHI) บ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ในเครื่องเขย่า ที่ 240 rpm จนได้เชื้อที่มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600nm}$ ) อยู่ในช่วง 0.4-0.6 (ระยะแบ่งตัว) ซึ่งจะมีจำนวนของเชื้อประมาณ  $10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

### 3.2 วิธีการ/การทดลอง

#### 3.2.1 การสร้างไบโอฟิล์ม

นำเชื้อที่อยู่ในระยะแบ่งตัวจากข้อ 3.1 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ แล้วนำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ชนิดเหลวที่มีน้ำตาลซูโครสอยู่ร้อยละ 1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร (จำนวนเชื้อประมาณ  $2 \times 10^8$  ซีเอฟยูต่อ



มิลลิลิตร) และเตรียมเชื้อแบบเดียวกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ชนิดเหลวเป็นกลุ่มควบคุม โดยเลี้ยงในไมโครเวลเพลท 24 หลุม บ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปวัดค่าความเป็นกรดต่าง และวัดมวลไบโอฟิล์ม

### 3.2.2 การวัดค่าความเป็นกรดต่าง

การวัดค่าความเป็นกรดต่างคัดแปลงจากการศึกษาของ Lozano และคณะ โดยหลังจากอบเลี้ยงเชื้อครบ 36 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อจากกลุ่มทดสอบที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ที่มีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 1 และกลุ่มที่เลี้ยงใน BHI ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม มาวัดค่าความเป็นกรดต่าง โดยใช้พีเอช มิเตอร์ (Compact pH Meter, Horiba, Japan) (Lozano, Díaz-Garrido et al., 2019) ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง การวัดค่าความเป็นกรดต่างเป็นการวัดทางอ้อมที่แสดงถึงการผลิตกรดของเชื้อ

### 3.2.3 การวัดมวลไบโอฟิล์ม

หลังจากอบเลี้ยงเชื้อครบ 36 ชั่วโมง ทำการดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวออกให้เหลือเพียงไบโอฟิล์มที่ก้นหลุม จากนั้นล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (phosphate buffered saline) ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 3 ครั้ง เติมเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาณ 500 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เพื่อตรึงไบโอฟิล์มให้ติดก้นหลุม จากนั้นดูดออกแล้วเติมสีย้อมคริสตัลไวโอเล็ตร้อยละ 0.1 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำประปาให้สีส่วนเกินหลุดออก และเติมกรดอะซิติกร้อยละ 30 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตรลงในหลุมทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เพื่อสกัดสีที่ข้อมัดไบโอฟิล์ม นำสีที่สกัดได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ( $OD_{520nm}$ ) โดยใช้กรดอะซิติกร้อยละ 30 โดยปริมาตรต่อปริมาตรเป็นสารละลายที่ไม่มีตัวอย่าง (blank) ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง ความเข้มสีที่วัดได้จะแปรผันตรงกับปริมาณของมวลไบโอฟิล์ม

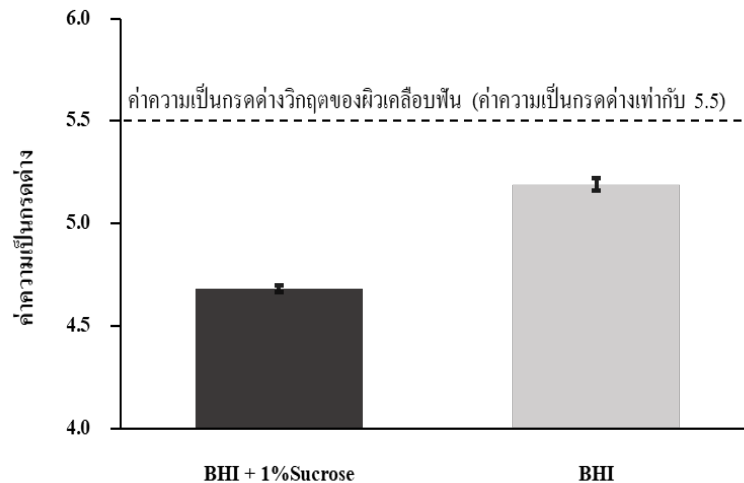
## 4. ผลการวิจัยและวิเคราะห์ผล

### 4.1 ผลการทดสอบการวัดค่าความเป็นกรดต่าง

ความเป็นกรดต่างของเชื้อ *S. mitis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครสมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.6 (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.014) ในขณะที่กลุ่มควบคุม (ไม่มีน้ำตาลซูโครส) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.1 (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.028) (รูปที่ 1) จากผลการทดลองจะเห็นว่าค่าความเป็นกรดต่างของทั้งสองกลุ่มต่ำกว่าค่าความเป็นกรดต่างวิกฤตของผิวเคลือบฟัน (ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.5) ซึ่งเป็นค่าที่เริ่มเกิดการละลายแร่ธาตุของผิวเคลือบฟัน โดยผลการทดสอบนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า *S. mitis* บางสายพันธุ์ผลิตกรดได้ในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส (de Soet, Nyvad et al., 2000) ค่าความเป็นกรดต่างที่ลดต่ำลงนี้เป็นผลจากการย่อยสลายน้ำตาลของเชื้อผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส และได้กรดแลคติกเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการที่เกิดในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครสในปริมาณมากดังที่กล่าวไว้ข้างต้น (Takahashi, 2015) และการที่เชื้อสร้างกรดได้นี้ทำให้สภาวะแวดล้อมในไบโอฟิล์มเปลี่ยนเป็นกรดส่งผลให้เกิดการละลายแร่ธาตุในระยะแรก และมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไปเป็นเชื้อก่อโรคซึ่ง



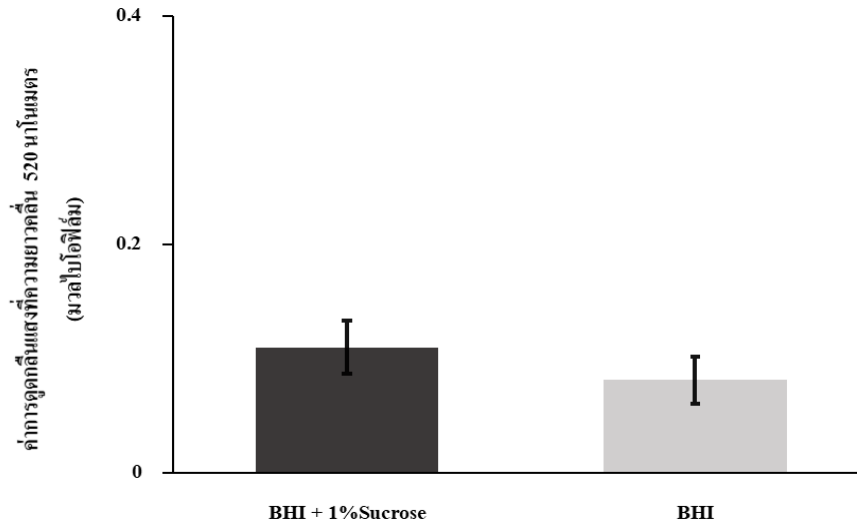
ทนกรด และผลิตกรดได้เร็วกว่า และทำให้เกิดรอยโรคที่รุนแรงมากขึ้นได้ (Takahashi, 2015, de Soet, Nyvad et al., 2000) สำหรับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีน้ำตาลซูโครส แต่ค่าความเป็นกรดค้างยังลดต่ำลงนั้น อาจเป็นผลจากอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI มีส่วนประกอบเป็นน้ำตาลกลูโคสอยู่ร้อยละ 0.2 ซึ่งเชื้อสามารถนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ได้โดยผ่านกระบวนการไกลโคไลซิสเช่นกัน (Takahashi, 2015)



รูปที่ 1 ค่าความเป็นกรดค้างของเชื้อ *Streptococcus mitis* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ผสมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 1 และอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI อย่างเดียว (กลุ่มควบคุม) เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

#### 4.2 ผลการทดสอบการวัดปริมาณมวลไบโอฟิล์ม

จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีคริสตัล ไวโอเล็ตที่สกัดพบว่า *S. mitis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครส มีค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.11 (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.023) ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.08 (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.020) (รูปที่ 2) ซึ่งเป็นค่าที่อยู่นอกค่าที่เครื่องวัดจะสามารถวัดได้ค่าที่ถูกต้อง (0.1-1) แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครสเชื้อ *S. mitis* แทบจะไม่สร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งอาจจะอธิบายได้จากผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ทำการสำรวจยีน *gtf* ซึ่งสร้างเอนไซม์กลูโคซิลทรานเฟอร์เรสไปย่อยน้ำตาลซูโครสแล้วได้กลูแคนอันเป็นองค์ประกอบสำคัญของไบโอฟิล์ม พบว่า *S. mitis* ไม่มียีน *gtf* (Xu et al., 2018)



รูปที่ 2 ค่ามวลไบโอฟิล์มของเชื้อ *Streptococcus mitis* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ผสมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 1 และอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI อย่างเดียว (กลุ่มควบคุม) เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

แต่การที่พบเชื้อ *S. mitis* ในคราบจุลินทรีย์ระยะเริ่มต้นได้นั้นเนื่องจากภาวะจริงในช่องปาก ไบโอฟิล์มประกอบไปด้วยเชื้อมากกว่าหนึ่งชนิด ถึงแม้ *S. mitis* จะสร้างไบโอฟิล์มเองไม่ได้โดยตรงแต่สามารถเกาะกับเชื้ออื่น ๆ และเกาะบนผิวฟันโดยอาศัยเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างจากเชื้ออื่นที่อยู่ร่วมกันในไบโอฟิล์ม ดังรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่า *S. mitis* มีโปรตีนบนผิวเซลล์ที่สามารถจับกับเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสของเชื้อ *S. mutans* ทำให้เกิดการเกาะรวมกลุ่มกันขึ้น (Harth-Chu, Alves et al., 2019) นอกจากนี้การยึดเกาะของเชื้อสามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะที่ไม่มีน้ำตาลซูโครสเช่นกัน ดังที่การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า *S. mitis* สามารถจับกับอะไมเลสในน้ำลายโดยใช้ saliva-binding proteins เพื่อเกาะบนผิวฟัน และใช้เส้นใยพวกไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์ในการจับกับเชื้ออื่น ๆ (Nobbs, Lamont et al., 2009)

### 5. สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษานี้พบว่า *S. mitis* สามารถผลิตกรดโดยทำให้ค่าความเป็นกรดต่างลดลงต่ำกว่าค่าความเป็นกรดต่างวิกฤตของผิวเคลือบฟัน แต่สร้างไบโอฟิล์มได้ปริมาณต่ำมากในสภาวะที่มีซูโครส ผลจากการศึกษานี้ทำให้ได้รับข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับการใช้น้ำตาลซูโครสต่อการผลิตกรดและสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mitis* เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและป้องกันการเกิดโรคฟันผุต่อไป

### 6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนส่งเสริมและสนับสนุนหน่วยปฏิบัติการวิจัยจุลชีววิทยาช่องปากและวิทยาภูมิคุ้มกัน กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## 7. เอกสารอ้างอิง

- Aizawa, S., Miyasawa-Hori, H., Nakajo, K., Washio, J., Mayanagi, H., Fukumoto, S., and Takahashi, N. (2009). Effects of alpha-amylase and its inhibitors on acid production from cooked starch by oral streptococci. *Caries Research*, 43(1), 17-24. doi: 10.1159/000189703
- de Soet, J. J., Nyvad, B., and Kilian, M. (2000). Strain-related acid production by oral streptococci. *Caries Research*, 34(6), 486-490. doi: 10.1159/000016628
- Diaz, P. I., Chalmers, N. I., Rickard, A. H., Kong, C., Milburn, C. L., Palmer, R. J., Jr., and Kolenbrander, P. E. (2006). Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2837-2848. doi: 10.1128/aem.72.4.2837-2848.2006
- Harth-Chu, E. N., Alves, L. A., Theobaldo, J. D., Salomao, M. F., Hofling, J. F., King, W. F., . . . Mattos-Graner, R. O. (2019). PcsB Expression Diversity Influences on Streptococcus mitis Phenotypes Associated With Host Persistence and Virulence. *Frontiers in microbiology*, 10, 2567. doi: 10.3389/fmicb.2019.02567
- Ihara, Y., Takeshita, T., Kageyama, S., Matsumi, R., Asakawa, M., Shibata, Y., . . . Yamashita, Y. (2019). Identification of Initial Colonizing Bacteria in Dental Plaques from Young Adults Using Full-Length 16S rRNA Gene Sequencing. *mSystems*, 4(5). doi: 10.1128/mSystems.00360-19
- Jurczak, A., Kościelniak, D., Papież, M., Vyhouskaya, P., and Krzyściak, W. (2015). A study on  $\beta$ -defensin-2 and histatin-5 as a diagnostic marker of early childhood caries progression. *Biological research*, 48, 61-61. doi: 10.1186/s40659-015-0050-7
- Liu, J., Stone, V. N., Ge, X., Tang, M., Elrami, F., and Xu, P. (2017). TetR Family Regulator brpT Modulates Biofilm Formation in Streptococcus sanguinis. *PLoS one*, 12(1), e0169301-e0169301. doi: 10.1371/journal.pone.0169301
- Lozano, C. P., Diaz-Garrido, N., Kreth, J., and Giacaman, R. A. (2019). Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis Expression of Competition-Related Genes, Under Sucrose. *Caries Research*, 53(2), 194-203. doi: 10.1159/000490950
- Nobbs, A. H., Lamont, R. J., and Jenkinson, H. F. (2009). Streptococcus adherence and colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(3), 407-450, Table of Contents. doi: 10.1128/MMBR.00014-09
- Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., . . . Ismail, A. (2017). Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17030. doi: 10.1038/nrdp.2017.30
- Sheiham, A. (2006). Dental caries affects body weight, growth and quality of life in pre-school children. *Dental Journal*, 201(10), 625-626. doi: 10.1038/sj.bdj.4814259



- Takahashi, N. (2015). Oral Microbiome Metabolism: From "Who Are They?" to "What Are They Doing?". *Journal of Dental Research*, 94(12), 1628-1637. doi: 10.1177/0022034515606045
- Takahashi, N., and Nyvad, B. (2011). The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *Dental Research*, 90(3), 294-303. doi: 10.1177/0022034510379602
- Takahashi, N., and Yamada, T. (1999). Acid-induced acid tolerance and acidogenicity of non-mutans streptococci. *Oral Microbiology and Immunology*, 14(1), 43-48. doi: 10.1034/j.1399-302x.1999.140105.x
- Xu, R.-R., Yang, W.-D., Niu, K.-X., Wang, B., and Wang, W.-M. (2018). An Update on the Evolution of Glucosyltransferase (Gtf) Genes in Streptococcus. *Frontiers in microbiology*, 9, 2979-2979. doi :10.3389/fmicb.2018.02979