한국치위생과학회
THE KOREAN SOCIETY OF DENTAL HYGIENE SCIENCE

J Dent Hyg Sci Vol. 18, No. 2, 2018, pp.69-75
https://doi.org/10.17135/jdhs.2018.18.2.69
RESEARCH ARTICLE

치과용 유니트 수관에서 분리한 세균의 부착 및 바이오필름 형성 능력

윤혜영 · 이시영†

강릉원주대학교 치과대학 구강미생물학교실, 구강과학연구소

Adhesion and Biofilm Formation Abilities of Bacteria Isolated from Dental Unit Waterlines

Hye Young Yoon and Si Young Lee†

Department of Oral Microbiology, College of Dentistry and Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea

The purpose of our study is to compare the adhesion and biofilm formation abilities of isolates from water discharged from dental unit waterlines (DUWLs). Bacteria were isolated from a total of 15 DUWLs. Twelve isolates were selected for the experiment. To confirm the adhesion ability of the isolates, each isolate was attached to a glass coverslip using a 12-well plate. Plates were incubated at 26°C for 7 days, and the degree of adhesion of each isolate was scored. To verify the biofilm formation ability of each isolate, biofilms were allowed to form on a 96-well polystyrene flat-bottom microtiter plate. The biofilm accumulations of all isolates formed at 26°C for 7 days were identified and compared. A total of 56 strains were isolated from 15 water samples including 12 genera and 31 species. Of the 56 isolates, 12 isolates were selected according to the genus and used in the experiment. *Sphingomonas echinoides*, *Methylobacterium aquaticum*, and *Cupriavidus pauculus* had the highest adhesion ability scores of +3 among 12 isolates. Among these three isolates, the biofilm accumulation of *C. pauculus* was the highest and that of *S. echinoides* was the third-most abundant. The lowest biofilm accumulations were identified in *Microbacterium testaceum* and *M. aquaticum*. Most isolates with high adhesion ability also exhibited high biofilm formation ability. Analysis of adhesion and biofilm formation of the isolates from DUWLs can provide useful information to understand the mechanism of DUWL biofilm formation and development.

Key Words: Bacterial adhesion, Biofilms, Dental infection control, Water microbiology

서 론

치과용 유니트 수관(dental unit waterlines, DUWL) 내 물의 관리는 환자와 환자 사이, 치과종사자와 환자 사이의 교차 감염을 예방하기 위해 필요하다[1,2]. DUWL에서 배출되는 물에는 많은 미생물들이 포함되어 있으며, 미생물의 종에 대해서는 이전 연구들을 통해 밝혀졌다[3-5]. DUWL에는 대부분 그람 음성의 종속영양세균이 포함되어 있으며, 기회병원성 세균 또한 일부 존재하는 것으로 알려져 있다[6-8]. DUWL 관리의 중요성이 증가하면서 DUWL 관리를 위한 다양한 방법이 사용되고 있다. 이 방법들 중 가장 효과적인 방법으로 DUWL 물 내 세균 수를 줄이면서 DUWL에 형성된 바이오필름을 제거할 수 있는 화학소독제의 사용이 추천되고 있다[9,10]. DUWL 바이오필름을 완전히 제거하지 않는다면 남아있는 바이오필름에 부유하고 있는 세균의 재성장을 허용하면서 물 내 세균 오염이 계속되기 때문에 DUWL

Received: December 11, 2017, Revised: February 26, 2018, Accepted: March 5, 2018
ISSN 2233-7679 (Online)

†Correspondence to: Si Young Lee
Department of Oral Microbiology, College of Dentistry and Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, 7 Jukheon-gil, Gangneung 25457, Korea
Tel: +82-33-640-2455, Fax: +82-33-642-6410, E-mail: siyoung@gwnu.ac.kr, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8826-1413

바이오필름을 완벽하게 제거할 수 있는 화학 소독제를 사용하는 것이 중요하다[11-13].

DUWL 바이오필름은 DUWL 내면에 conditioning film의 형성, 세균의 가역적 및 비가역적 부착, 세균과 세균 사이 응집으로 인한 군집화, 그리고 세균의 군집과 세포외다당류(exopolysaccharide, EPS)의 결합과정으로 성숙한다[14]. DUWL에 부착하는 세균의 종에 따라 DUWL 바이오필름을 구성하는 세균의 다양성이 달라질 수 있으며, 세균의 다양성은 소독제에 대한 바이오필름의 감수성에 영향을 줄 수 있다[15,16]. 바이오필름의 효과적인 제거 및 바이오필름 형성 방지를 위해서는 바이오필름을 구성하는 세균의 종을 확인하고 개별 세균들의 바이오필름 형성 능력 및 바이오필름 형성에 영향을 주는 요인들의 대한 연구가 필수적이다. 현재까지 바이오필름을 구성하는 세균 종에 대한 연구는 많이 진행되었지만, 각각의 개별 세균의 바이오필름 형성 특성에 대한 연구는 전무한 실정이다. 개별 세균의 부착 능력은 바이오필름 형성 특성 및 소독제에 대한 세균의 감수성에 영향을 주기 때문에 DUWL 바이오필름을 구성하는 개별 세균의 부착 및 바이오필름 형성 능력을 확인하는 연구는 필요하다.

실험실에서 glass coverslip 또는 well-plate는 세균의 부착 능력 및 바이오필름 형성 능력을 확인하기 위해 사용되고 있다[17-21]. Eginton 등[18]은 소독제와 같은 항균물질로 처리 후 표면에 대한 세균의 부착 강도를 비교하기 위해 glass coverslip을 사용했으며, Modesto와 Drake[19]의 연구에서는 항균물질 처리 후 세균의 부착 정도와 바이오필름 형성 능력을 평가하기 위해 glass coverslip과 well-plate를 사용하였다. 또한, 수계(water system)나 구강 등과 같은 환경에 존재하는 바이오필름을 실험실에서 간단히 재현할 수 있는 장치로는 well-plate가 주로 사용되고 있다[22,23]. 따라서, 본 연구의 목적은 DUWL에서 배출되는 물에서 분리한 균주의 부착 능력과 바이오필름 형성 능력을 glass coverslip과 well-plate를 사용하여 확인하고 두 능력 사이 관계를 확인하는 것이다.

연구대상 및 방법

1. 시료 수집 및 세균 분리

물 시료(500 ml)는 강릉시 내 치과 4곳에 위치한 치과용 유니트 15대의 초음파치석제거기로부터 얻었다. 수집 전 초음파치석제거기의 입구를 70% 에탄올로 닦아 주었다. 시료 수집 후, 잔류 염소를 중화시키기 위해 각 물 시료에 10% sodium thiosulphate (Yakuri Pure Chemicals Co., Ltd., Kyoto, Japan) 용액을 0.5 ml씩 넣어주었다. 각 물 시료를 0.2 μm 여과지(Millipore, Billerica, MA, USA)에 여과시켰고, 여과지를 10 ml phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) 용액에 현탁시켰다. Spiral plater (IUL, Barcelona, Spain)를 사용하여 현탁액의 50 μl를 R2A 고체배지(Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 도말하였고 배지를 26°C에서 7일간 배양하였다. 배양 후 R2A 고체배지에서 성장한 콜로니 형태를 확인하였고, 각 물 시료당 수적으로 대표적인 3～5개의 콜로니를 선택하였다. 선택한 콜로니를 R2A 고체 배지에 도말하였고, 26°C에서 7일간 배양한 후 R2A 액체배지(Becton, Dickinson and Company)로 계대배양하였다.

2. 세균의 동정

분리된 세균은 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 증폭과 16S ribosomal RNA (rRNA) 유전자 염기서열확인에 의해 동정되었다. 세균 배양액의 1 ml를 13,000×*g*로 3분 동안 원심분리하고 상층액은 버린 후 200 μl의 멸균증류수에 현탁하였다. 이 현탁액으로부터 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology Inc., Seongnam, Korea)를 이용하여 제조회사의 방법대로 세균의 genomic DNA를 추출하였다. Universal PCR primer (27F; 5′-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3′, 1492R; 5′-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3′)와 Accupower HotStart PCR Premix (Bioneer, Deajeon, Korea)를 이용하여 GeneAmp PCR System 9700 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)에서 16S rRNA 유전자를 증폭하였다[24]. PCR stock solution은 0.1 μM forward 및 reverse primer와 100 pg의 세균 genomic DNA를 첨가한 후 최종 용량이 20 μl가 되도록 증류수로 채워 제조하였다. PCR은 94°C에서 2분간 초기 열처리한 다음 94°C에서 30초간 변성(denaturation), 55°C에서 30초간 결합(annealing), 72°C에서 1분간 중합(extension) 과정을 34회 반복하여 시행하였다. 증폭된 DNA는 *AccuPrep*® PCR Purification Kit (Bioneer)를 사용하여 정제하였고 코스모진텍(Cosmogenetech, Seoul, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 얻었다. 세균 종 동정을 위하여 염기서열은 Blastn (genome database of the National Center for Biotechnology Information)을 이용하여 분석하였다.

3. 세균 선택 및 준비

염기서열 분석을 통해 12속(genus)과 31종(species)을 포함한 총 56균주가 확인되었고 그 중 속당 1균주씩을 선택하

여 총 12균주가 부착 실험을 위해 사용되었다. 12균주는 R2A 액체배지에 계대되었고 26°C에서 7일 동안 배양하였다.

4. 분리 균주의 부착 양상 확인

분리균주의 부착 능력을 확인하기 위해 각 균주가 glass coverslip에 부착하는 양상을 확인했다. 각 균주의 부착 양상은 Park 등[17]이 보고한 방법을 변형하여 확인하였다. R2A 액체배지에서 배양된 세균은 0.5 McFarland standard (1×10^8 colony-forming unit [CFU]/ml)와 동등한 농도의 세균 현탁액을 얻기 위해 R2A 액체 배지에 희석되었다. 12-well plates (SPL, Pocheon, Korea)의 각 well에 멸균된 glass coverslip (round, 12 mm diameter)을 넣고 R2A 액체 배지를 4 ml씩 첨가하였다. 그 후, 세균 현탁액을 각 well에 0.4 ml씩 첨가하고 26°C 배양기에서 7일 동안 배양하였다. 배양 후, 바이오필름이 형성된 glass coverslip은 멸균된 PBS (pH 7.4)로 약하게 씻어 glass coverslip에 부착하지 않은 세균을 제거하였다. 각 세균을 부착하여 나타난 glass coverslip의 혼탁 정도를 비교하였고 혼탁도를 1～3점으로 점수화하였다.

5. 분리 균주의 바이오필름 축적량 확인

분리 균주의 바이오필름 형성 능력을 확인하기 위해 이전 연구에서 설명한 방법을 변형하여 수행하였다[21,25]. 각 균주의 바이오필름을 7일 동안 형성시키고 그 축적량을 확인하였다. 96-well polystyrene flat-bottom microtiter plate (SPL)에 R2A 액체 배지를 180 μl 넣고 1×10^8 CFU/ml로 농

Table 1. List of All the Species Isolated in the 15 Water Samples from Different Dental Unit Waterlines

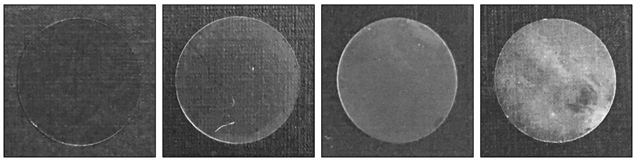
Phylum	Genus	Species	Total
Proteobacteria	*Acidovorax*	*Acidovorax delafieldii*[a]	1
		Acidovorax soli	1
	Brevundimonas	*Brevundimonas subvibrioides*[a]	1
	Cupriavidus	*Cupriavidus pauculus*[a]	1
	Methylobacterium	*Methylobacterium aquaticum*[a]	1
		Methylobacterium fujisawaense	4
		Methylobacterium populi	1
		Methylobacterium radiotolerans	1
	Novosphingobium	*Novosphingobium aromaticivorans*	1
		Novosphingobium capsulatum	2
		Novosphingobium fuchskuhlense[a]	4
		Novosphingobium nitrogenifigens	3
		Novosphingobium resinovorum	1
		Novosphingobium sediminicola	1
		Novosphingobium stygium	1
		Novosphingobium subterraneum	1
	Pelomonas	*Pelomonas puraquae*[a]	2
	Polaromonas	*Polaromonas aquatica*[a]	5
	Sphingobium	*Sphingobium limneticum*	1
		Sphingobium xenophagum[a]	4
		Sphingobium yanoikuyae	1
	Sphingomonas	*Sphingomonas echinoides*[a]	7
		Sphingomonas ginsenosidimutans	2
		Sphingomonas hunanensis	1
		Sphingomonas oligophenolica	1
		Sphingomonas paucimobilis	1
		Sphingomonas starnbergensis	1
		Sphingomonas wittichii	1
	Sphingopyxis	*Sphingopyxis panaciterrae*[a]	2
Bacteroidetes	*Sediminibacterium*	*Sediminibacterium salmoneum*[a]	1
Actinobacteria	*Microbacterium*	*Microbacterium testaceum*[a]	1
Total			56

[a]The selected strains used for susceptibility tests.

도 조정된 세균 현탁액 20 μl를 추가했다. Plate는 static 상태로 26°C에서 7일 동안 배양하였다. 배양 후, plate 내 배지를 제거하고 비부착 세균을 제거하기 위해 150 μl PBS로 2번 세척했다. 새로운 R2A 액체 배지 100 μl는 추가되었고, 바이오필름은 파이펫팅으로 plate에서 분리 및 현탁되었다. 세균 현탁액은 10배수로 희석되었고 희석액은 R2A 고체 배지에 spiral plater를 이용하여 도말하였다. 배지는 26°C에서 7일 배양되었고 세균의 집락을 colony counter (IUL)로 계수한 후 CFU/ml로 계산하였다.

Table 2. Adhesion Score of Each Isolate on Glass Slip

Isolate	Score
Acidovorax delafieldii	++
Brevundimonas subvibrioides	++
Cupriavidus pauculus	+++
Methylobacterium aquaticum	+++
Microbacterium testaceum	++
Novosphingobium fuchskuhlense	+
Pelomonas puraquae	++
Polaromonas aquatica	++
Sediminibacterium salmoneum	++
Sphingobium xenophagum	+
Sphingomonas echinoides	+++
Sphingopyxis panaciterrae	++



결 과

1. 분리균주

15개의 물 시료로부터 총 56균주가 분리되었다(Table 1). 56균주는 12속과 31종을 포함하였다. 바이오필름 형성 능력과 부착 능력의 평가를 위해, 각 속당 1균주씩 선택되었다. 실험에 사용된 균주는 *Sphingomonas echinoides, Polaromonas aquatica, Novosphingobium fuchskuhlense, Sphingobium xenophagum, Pelomonas puraquae, Sphingopyxis panaciterrae, Acidovorax delafieldii, Brevundimonas subvibrioides, Cupriavidus pauculus, Methylobacterium aquaticum, Microbacterium testaceum, Sediminibacterium salmoneum*과 같다.

2. 분리 균주의 부착 양상

실험에 사용된 12균주의 부착 점수는 Table 2에 나타냈다. *C. pauculus, M. aquaticum*과 *S. echinoides*의 부착 점수는 가장 높은 +3으로 관찰되었다. *N. fuchskuhlense*와 *S. xenophagum*의 부착 점수가 +1로 가장 낮았고 나머지 7균주는 모두 +2의 부착 점수를 나타냈다.

3. 분리 균주의 바이오필름 축적량

7일 동안 배양 후 microtiter plate에 축적된 바이오필름 양은 Fig. 1에 나타냈다. *C. pauculus*가 8.06 log CFU/ml로 가장 많은 바이오필름 축적량을 보여주었고, *P. aquatica*와 *S. echinoides*가 그 다음으로 바이오필름 축적량이 많았다. *M. testaceum*의 바이오필름 축적량은 4.69 log CFU/ml로

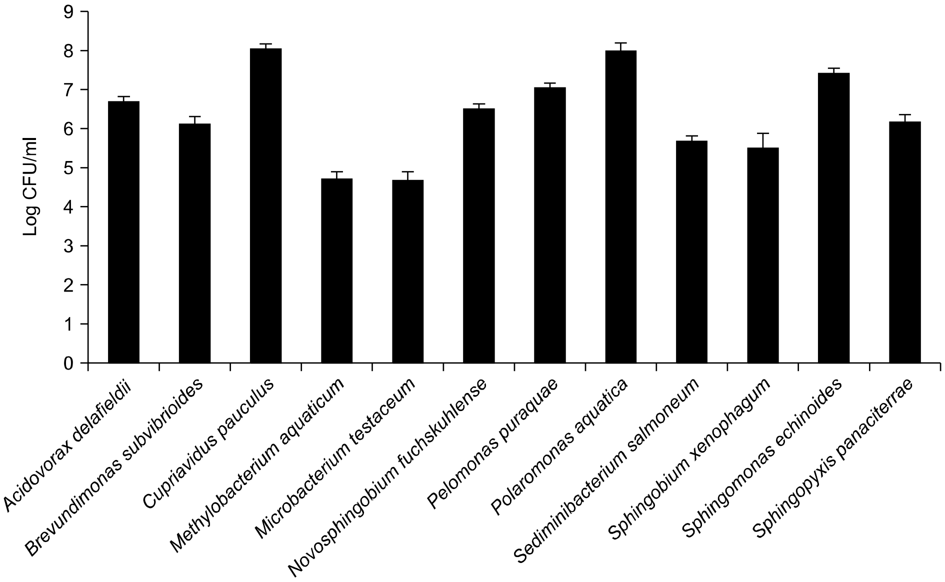


Fig. 1. The mean biofilm accumulation of each isolate formed in 12-well plate for 7 days. The error bars indicate standard deviations of the mean for three repeated experiments in triplicate. CFU: colony-forming unit.

가장 적었다. 이와 유사하게 *M. aquaticum*의 바이오필름 축적량은 4.72 log CFU/ml로 적었다.

고 찰

본 연구에서는 DUWL에서 분리한 균주의 바이오필름 능력 및 부착 능력을 확인하였다. 본 실험에 사용된 12균주들 중 *Sphingomonas* spp.는 배지 배양법 및 pyrosequencing 분석을 사용하여 DUWL 내 다양성을 확인한 이전 연구들의 결과에서 공통적으로 많이 발견되는 세균이다[3,4,8,26]. *Methylobacterium* spp., *Novosphingobium* spp., *Sphingobium* spp. 또한 DUWL 내 세균의 다양성을 확인한 대부분의 연구에서 빈번하게 발견되었으며 그 외 나머지 균주들도 DUWL 내에서 검출되는 세균에 포함된다[3,8,26]. 배양 배지법으로 DUWL 내 세균을 동정한 연구의 경우 배지에 배양이 되지 않는 세균들은 제외한 후 대표적인 세균들을 확인하였고[3,26], 분자생물학적 방법인 pyrosequencing 분석으로 DUWL 내 세균의 다양성을 확인한 연구에서는 세균을 종 수준까지 정확하게 확인할 수 없었다[8]. 지금까지의 연구 결과들로 DUWL 내 발견되는 대표적인 세균들을 결정할 수 없기 때문에 본 연구에서는 분리된 총 56균주 중 속당 1균주씩 선택하여 실험에 사용하였다.

단단한 표면에 세균이 부착하는 것은 바이오필름이 형성되고 성숙하는 과정에서 첫 단계에 해당하기 때문에 중요하다[27]. 우리의 연구에 사용된 12균주 중에서 높은 부착 능력을 보여준 *S. echinoides, M. aquaticum, C. pauculus*는 초기 DUWL 바이오필름 형성 과정에 영향을 주었을 가능성이 있다.

Simoes 등[27]은 음용수에서 분리한 세균의 polystyrene에 대한 부착 능력과 바이오필름 형성 능력 사이 관계를 확인했고, 그 결과 부착 능력이 낮은 균주보다 높은 균주가 바이오필름 형성 능력이 더 높은 것을 보여주었다. 이와 유사하게 우리의 연구에서 부착 능력이 높은 *S. echinoides*와 *C. pauculus*는 높은 바이오필름 형성 능력을 보여주었다. *M. aquaticum*의 경우 부착 능력은 높았지만, 바이오필름 형성 능력은 낮았다. 이는 *M. aquaticum*의 바이오필름 형성 과정에 부착 능력보다 다른 요소의 영향을 더 크게 받았기 때문으로 추측된다. 바이오필름 형성에는 세균의 부착 능력 외에 응집 및 EPS 생산 능력 등과 같은 요소들도 영향을 줄 수 있다[14,28,29]. 따라서 분리 균주들의 응집 및 EPS 생산 능력과 같은 다른 특성들을 확인하는 추가적인 연구가 필요할 것이다.

Yabune 등[30]은 불소 코팅을 한 DUWL의 바이오필름 형성 억제 효과를 확인했다. 불소코팅을 하지 않은 DUWL보다 불소 코팅한 DUWL을 연결한 치과용 유니트에서 배출되는 물 내 세균의 수가 더 낮았고, 주사전자현미경으로 DUWL 내면을 관찰했을 때 불소 코팅한 DUWL의 표면에 부착한 세균이 거의 없었다. 이 현상은 불소 코팅한 DUWL의 사용 후 6개월까지 지속되었다. Yabune 등[30]의 연구 결과는 불소 코팅 DUWL의 세균 부착을 억제하는 효과가 바이오필름의 형성을 예방할 수 있다는 것을 보여주었다. 이 연구와 같이 표면으로부터 세균의 부착을 억제하는 방법은 바이오필름의 형성을 예방하고 억제하는 데 효과적일 수 있다. 세균의 부착을 억제하는 방법의 주요 타깃은 바이오필름 형성 과정에서 초기에 관여하는 세균들이기 때문에 이 세균들에 대한 정보는 DUWL 바이오필름 형성을 억제시키기 위해 중요할 수 있다.

세균의 부착은 부착하는 표면의 물질에 영향을 받을 수 있다[27,30]. 본 연구에서는 실험실에서 세균의 부착 능력 및 바이오필름 형성 능력을 확인하는 기본적인 실험 방법에 따라 세균이 부착하는 표면으로 glass나 polystyrene을 사용했다. 하지만 DUWL의 재질로는 보통 polyurethane이나 polyvinylchloride가 사용되기 때문에[14], 이 재질에 대한 분리 균주의 부착 및 바이오필름 형성 특성에 대한 연구는 추가적으로 수행되어야 할 것이다.

본 연구의 결과는 DUWL 바이오필름의 형성 기전을 파악하는 데 도움을 주며 나아가 바이오필름 형성을 억제하는 방법의 개발에 기본적인 정보를 제공할 수 있을 것이다.

요 약

우리 연구의 목적은 DUWL에서 배출되는 물에서 분리한 균주의 부착 능력과 바이오필름 형성 능력을 확인하고 두 능력 사이 관계를 확인하는 것이다. DUWL로부터 분리한 12균주를 실험에 사용하였다. 각 균주의 부착 능력을 확인하기 위해, 12-well plates의 각 well에 멸균된 glass coverslip, R2A 액체 배지, 그리고 1×10^8 CFU/ml의 농도로 조정된 세균 현탁액을 넣고 26°C 배양기에서 7일 동안 배양하였다. 배양 후, glass coverslip에 부착한 정도에 따라 1～3점으로 점수를 부여하였다. 분리 균주의 바이오필름 형성 능력을 확인하기 위해, 96-well polystyrene flat-bottom microtiter plate에 R2A 액체 배지와 세균 현탁액을 넣고 26°C에서 7일 동안 배양하였다. 배양 후, plate에 형성된 바이오필름은 R2A 액체 배지에 현탁했고, 현탁액을 R2A 고체 배지에 도말하였다. 26°C에서 7일 배양한 후 세균의 집락을 계수하고 CFU/ml를 계산하였다. DUWL로부터 총 56

균주가 분리되었으며, 12속과 31종을 포함하였다. 실험에는 속당 1균주씩 선택하여 총 12균주가 사용되었다. 12균주 중에 *S. echinoides, M. aquaticum, C. pauculus*의 부착 능력 점수는 +3으로 가장 높았다. 바이오필름 축적량은 *C. pauculus*가 가장 많았고, *M. testaceum*이 가장 적었다. 대부분의 부착 능력이 높은 균주는 바이오필름 형성 능력 또한 높았다. 본 연구의 결과는 DUWL 바이오필름의 형성 기전을 파악하는 데 도움을 주며 나아가 바이오필름 형성을 억제하는 방법의 개발에 기본적인 정보를 제공할 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초 연구 사업임(2015R1D1A1A01057790).

References

1. Walker JT, Bradshaw DJ, Finney M, et al.: Microbiological evaluation of dental unit water systems in general dental practice in Europe. Eur J Oral Sci 112: 412-418, 2004. https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2004.00151.x
2. O'Donnell MJ, Boyle MA, Russell RJ, Coleman DC: Management of dental unit waterline biofilms in the 21st century. Future Microbiol 6: 1209-1226, 2011. https://doi.org/10.2217/fmb.11.104
3. Barbeau J, Tanguay R, Faucher E, et al.: Multiparametric analysis of waterline contamination in dental units. Appl Environ Microbiol 62: 3954-3959, 1996.
4. Singh R, Stine OC, Smith DL, Spitznagel JK Jr, Labib ME, Williams HN: Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems. Appl Environ Microbiol 69: 3412-3420, 2003. https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3412-3420.2003
5. Szymańska J, Sitkowska J, Dutkiewicz J: Microbial contamination of dental unit waterlines. Ann Agric Environ Med 15: 173-179, 2008.
6. Dutil S, Tessier S, Veillette M, et al.: Detection of Legionella spp. by fluorescent in situ hybridization in dental unit waterlines. J Appl Microbiol 100: 955-963, 2006. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02845.x
7. Szymanska J, Sitkowska J: Opportunistic bacteria in dental unit waterlines: assessment and characteristics. Future Microbiol 8: 681-689, 2013. https://doi.org/10.2217/fmb.13.33
8. Costa D, Mercier A, Gravouil K, et al.: Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in dental unit waterlines. Water Res 81: 223-231, 2015. https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.065
9. Cobb CM, Martel CR, McKnight SA 3rd, Pasley-Mowry C, Ferguson BL, Williams K: How does time-dependent dental unit waterline flushing affect planktonic bacteria levels? J Dent Educ 66: 549-555, 2002.
10. Walker JT, Bradshaw DJ, Fulford MR, Marsh PD: Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system. Appl Environ Microbiol 69: 3327-3332, 2003. https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3327-3332.2003
11. Whitehouse RL, Peters E, Lizotte J, Lilge C: Influence of biofilms on microbial contamination in dental unit water. J Dent 19: 290-295, 1991. https://doi.org/10.1016/0300-5712(91)90075-A
12. Meiller TF, Kelley JI, Baqui AA, DePaola LG: Laboratory evaluation of anti-biofilm agents for use in dental unit waterlines. J Clin Dent 12: 97-103, 2001.
13. Meiller TF, Depaola LG, Kelley JI, Baqui AA, Turng BF, Falkler WA: Dental unit waterlines: biofilms, disinfection and recurrence. J Am Dent Assoc 130: 65-72, 1999. https://doi.org/10.14219/jada.archive.1999.0030
14. Walker JT, Marsh PD: Microbial biofilm formation in DUWS and their control using disinfectants. J Dent 35: 721-730, 2007. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2007.07.005
15. Liu Y, Zhang W, Sileika T, Warta R, Cianciotto NP, Packman A: Role of bacterial adhesion in the microbial ecology of biofilms in cooling tower systems. Biofouling 25: 241-253, 2009. https://doi.org/10.1080/08927010802713414
16. Simões LC, Simões M, Vieira MJ: Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection. Appl Environ Microbiol 76: 6673-6679, 2010. https://doi.org/10.1128/AEM.00872-10
17. Park JH, Lee JK, Um HS, Chang BS, Lee SY: A periodontitis-associated multispecies model of an oral biofilm. J Periodontal Implant Sci 44: 79-84, 2014. https://doi.org/10.5051/jpis.2014.44.2.79
18. Eginton PJ, Holah J, Allison DG, Handley PS, Gilbert P:

Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agents. Lett Appl Microbiol 27: 101-105, 1998.
https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00390.x
19. Modesto A, Drake DR: Multiple exposures to chlorhexidine and xylitol: adhesion and biofilm formation by Streptococcus mutans. Curr Microbiol 52: 418-423, 2006.
https://doi.org/10.1007/s00284-005-0104-0
20. Bodenmiller D, Toh E, Brun YV: Development of surface adhesion in Caulobacter crescentus. J Bacteriol 186: 1438-1447, 2004. https://doi.org/10.1128/JB.186.5.1438-1447.2004
21. Antunes AL, Bonfanti JW, Perez LR, et al.: High vancomycin resistance among biofilms produced by Staphylococcus species isolated from central venous catheters. Mem Inst Oswaldo Cruz 106: 51-55, 2011.
https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000100008
22. Yoon HY, Lee SY: Establishment of a dental unit biofilm model using well-plate. J Dent Hyg Sci 17: 283-289, 2017.
https://doi.org/10.17135/jdhs.2017.17.4.283
23. Walker C, Sedlacek MJ: An in vitro biofilm model of subgingival plaque. Oral Microbiol Immunol 22: 152-161, 2007. https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00336.x
24. de Lillo A, Ashley FP, Palmer RM, et al.: Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. Oral Microbiol Immunol 21: 61-68, 2006.
https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2005.00255.x
25. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, et al.: Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS 115: 891-899, 2007.
https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
26. Yabune T, Imazato S, Ebisu S: Assessment of inhibitory effects of fluoride-coated tubes on biofilm formation by using the in vitro dental unit waterline biofilm model. Appl Environ Microbiol 74: 5958-5964, 2008.
https://doi.org/10.1128/AEM.00610-08
27. Simoes LC, Simoes M, Vieira MJ: Adhesion and biofilm formation on polystyrene by drinking water-isolated bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 98: 317-329, 2010.
https://doi.org/10.1007/s10482-010-9444-2
28. Azeredo J, Oliveira R: The role of exopolymers produced by Sphingomonas paucimobilis in biofilm formation and composition. Biofouling 16: 17-27, 2000.
https://doi.org/10.1080/08927010009378427
29. Rickard AH, McBain AJ, Ledder RG, Handley PS, Gilbert P: Coaggregation between freshwater bacteria within biofilm and planktonic communities. FEMS Microbiol Lett 220: 133-140, 2003. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00094-6
30. Yabune T, Imazato S, Ebisu S: Inhibitory effect of PVDF tubes on biofilm formation in dental unit waterlines. Dent Mater 21: 780-786, 2005.
https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.01.016