

Mikrobni biofilmovi – I deo; Ekološki i genetski aspekti

DOI:10.2298/SGS0601035I

Microbial Biofilms – Part I; Ecological and Genetical Aspects

Mirjana Ivanović, Mirjana Vučetić

Klinika za dečju i preventivnu stomatologiju, Stomatološki fakultet u Beogradu

Clinic of pediatric and preventive dentistry, School of Dentistry, University of Belgrade

INFORMATIVNI RAD (IR)
INFORMATIVE ARTICLE

KRATAK SADRŽAJ

Relativno nova dostignuća u mikroskopskoj i molekularnoj tehnologiji, omogućila su proučavanje bakterijskih zajednica in situ. Prirodna udruženja bakterija u matriksu biofilma funkcionišu kao kooperativni konzorcijumi na relativno složen, ali i usklađen način. Bez obzira na to da li su sastavljeni od jedne ili više bakterijskih vrsta, biofilmovi se razvijaju po obrascima višćelijskog ponašanja. Mikrokolonije koje sačinjavaju biofilm, mogu da budu populacije samo jedne vrste ili višćelane bakterijske zajednice u zavisnosti od parametara sredine na osnovu kojih je biofilm i nastao. Brojni uslovi, kao što su svojstva površine pripajanja i međusobnog dodira, dostupnost hranljivih sastojaka, sastav mikrobiološke zajednice i hidrodinamika mogu da utiču na strukturu biofilma. Primena molekularnih metoda u razumevanju oralne flore i njenih karakteristika, čini da se saznanja o dentalnom plaku suštinski koriguju.

Ključne reči: biofilm, oralna flora, dentalni plak

SUMMARY

Relatively new advances in microscopy and molecular technology have made possible studying of bacterial communities in situ. Natural bacterial associations in biofilm matrix function as cooperative consortia in a complex but synchronized manner. Regardless of formation, biofilms are developing in a multicellular pattern. Microcolonies forming a biofilm can be populations of a single species or multi-species bacterial communities influenced by environmental parameters. Numerous conditions, such as characteristics of the surface and interactions, availability of nutrients, composition of microbial community and hydrodynamics may influence the structure of a biofilm. Implementation of molecular methods in understanding of oral flora and its features is making shifts in our dental plaque knowledge.

Key words: biofilm, dental plaque, bacterial communities

Naša spoznaja bakterije, kao jednoćelijskog oblika života, duboko je ukorenjena u paradigmi o čistoj bakterijskoj kulturi. Iako je proučavanje mikrobne patogeneze i rasvetljavanje pojedinih aspekata fiziologije mikroorganizama uobičajeno kultivisanjem bakterija u tečnoj podlozi, u prirodi je planktonski rast čiste kulture retka pojava. Relativno nova dostignuća u mikroskopskoj i molekularnoj tehnologiji, omogućila su proučavanje bakterijskih zajednica *in situ*. Neposrednim posmatranjem raznovrsnih prirodnih staništa, ustanovljeno je da većina mikroorganizama opstaje pripojena za podloge u okviru ekosistema biofilмова, a ne kao slobodni organizmi. Postaje jasno da ova prirodna udruženja bakterija u matriksu biofilma funkcionišu kao kooperativni konzorcijumi na relativno složen,

Our perception of bacteria as of the unicellular life form is based on a paradigm of pure bacterial culture. Though research of microbial pathogenesis and enlightening of various aspects in bacterial physiology are usually developed by growing bacteria in liquid broth, in nature planktonic growth of a pure microbial culture is rare. Not long ago, advanced microscopic and molecular technology made possible studies of bacterial communities *in situ*. Direct follow-up of different natural habitats has revealed that the great number of microorganisms remain attached to the surface within biofilm ecosystem and are not free organisms. It becomes obvious that these natural associations of bacteria in biofilm matrix are functioning as consortia in a complex but also in complementary way.

ali i usklađen način. (1) Prema tome, tipičan je međuza-visni način života kojim mikroorganizmi funkcionišu kao sastavni deo populacije ili zajednice iako mogu da postoje i u nezavisnom, planktonskom obliku. Cilj ovog rada je da prikaže nove aspekte u razumevanju bakterijskog udruživanja u oralnom i biofilmovima, uopšte.

Biofilmovi mogu da budu sastavljeni od populacija koje su se razvile iz jedne bakterijske vrste ili zajednice nekoliko vrsta, i mogu da se formiraju na brojnim abiot-skim ili biotskim podlogama.

Izvanredni napredak u filogenetskoj analizi RNK otvorio je mogućnosti za istraživanje mikrobioloških zajednica. Razvoj fluorescentno obeleženih oligonukleotida, usmerenih na rRNK, raznovrsnih mikrosenzora, trenutnih imidžing analiza i konfokalna mikroskopija omogućili su istraživačima da imaju neinvazivna sredstva u praćenju populacija *in situ*. Uz to, jedno od ključnih dostignuća u ispitivanju mikrobioloških zajednica je razvoj različitih novih načina za kultivisanje zajednica, kao što su hemostati, kulture gajene kontinualnim tokom na trakama, mikrostat i kolonizacioni nizovi. Sve ove tehnike se primenjuju u identifikaciji i kvantifikaciji specifičnih populacija u okviru raznolikih kompleksnih mikrobioloških grupa. (2)

Kolektivno ponašanje

Izuzetna saznanja o biofilmu postala su dostupna tokom prethodne decenije. Primenom novih mikroskopskih i molekularnih metoda, istraživači su pokazali da biofilmovi nisu proste bakterijske naslage na različitim površinama, već da su u pitanju biološki sistemi sa visokim stepenom organizovanosti, u kojima mikroorganizmi grade koordinisane i funkcionalne zajednice. (3) Bez obzira na to da li su sastavljeni od jedne ili više bakterijskih vrsta, biofilmovi se razvijaju po obrascima višćelijskog ponašanja. Formiranje biofilma, stoga, predstavlja složeni proces koji iziskuje od bakterija kolektivno ponašanje.

Struktura biofilma

Primena konfokalnih skening laserskih mikroskopa (KSLM) u istraživanju biofilma doprinela je radikalnoj promeni našeg uvida u strukturu i funkciju biofilma. (4) Pre upotrebe KSLM, elektronska mikroskopija je bila metod izbora u ispitivanju mikrobni biofilma u visokoj rezoluciji. Priprema uzoraka za elektronsku mikroskopiju, na žalost, dovodi do dehidracije uzoraka. Kao rezultat, ovaj pristup omogućava varljivo pojednostavljeni uvid u biofilmove, zato što dolazi do kolapsa biofilma kada se ukloni vodena faza. S druge strane, KSLM, koja omogućava vizuelizaciju potpuno hidratiranih uzoraka, otkriva trodimenzionalnu strukturu biofilma. KSLM se veoma

(1) Therefore, an interdependent pattern is typical for bacterial functioning in population or community although microbes are able to exist independently, as planktonic forms. The aim of this paper was to present some of the current aspects in better understanding of bacterial integrations, both in oral and biofilms in general.

Biofilms can be structured of a single bacterial species cultures or formed from several microorganic species and are able to grow on numerous abiotic or biotic surfaces.

Exceptional advance in phylogenetic RNA analysis has revealed possibilities for microbial communities studies. The development of fluorescent rRNA-targeted oligonucleotides, various microsensors, real-time image analysis, and confocal microscopy has made non-invasive means available in monitoring populations *in situ*. In addition, among key achievements in microbial communities studies are newly introduced cultivating tools, such as chemostats, cultures on continuous-flow slides, microstats and colonization tracks. All these techniques can be applied in identification and quantification the specific populations within variable complex microbial groups. (2)

Collective behavior

Extraordinary findings on biofilms have become available during last decade. With the introduction of new microscopic and molecular methods, researchers have revealed that biofilms are not simple bacterial layers on different surfaces but rather biological systems with high organization level, where bacteria are developing coordinated and functional communities. (3) Regardless whether these biofilms are consisted of a single bacterial species or multispecies, they are growing in multicellular patterns of behavior. This is why biofilm formation is a complex process in the terms of collective bacterial behavior.

Structure of the biofilms

Use of confocal scanning laser microscopes (CSLM) in studying biofilms has contributed to radical change of the insight we had in structure and biofilm function. (4) Before CSLM was applied, electron microscopy was the method of choice in microbial biofilms analysis in high resolution. Sample preparation for electron microscopy comprises sample dehydration. As a result, this approach offers simplified view at biofilms because biofilm itself is collapsed after water has been removed. In contrast to that, with CSLM is possible to visualize completely hydrated samples and three-dimensional biofilm structure can also

efikasno koristi u praćenju razvitka biofilma u tečnim ćelijskim kulturama. Tečne ćelijske kulture su mali sistemi sa kontinualnim protokom tečnosti i otvorom koji omogućava direktno posmatranje biofilma bez prekida kontinuiteta u zajednici. (2)

Jedan od najvažnijih mehanizama pozicioniranja je nagomilavanje (agregacija) ili pripajanje (atačment). Agregacija poboljšava međućelijsku interakciju, kao i sedimentaciju ćelija. Prijanjanjem, bakterije ne samo da se postavljaju na neku površinu, već su u stanju da osnuju zajednice i ostvaruju dodatne prednosti fenotipske raznolikosti svojih suseda. S obzirom da je pripojenost za površinu svuda prisutna u mikrobiološkom svetu, moguće je da je ovaj vid sesilnog opstanka u zajednici kritična karakteristika opstanka bakterija. Organizmi mogu da postoje u nekoj sredini nezavisno, ali u mnogim slučajevima proliferišu mnogo efikasnije zahvaljujući interakciji i osnivanju zajednica.

Mikrokolonije koje sačinjavaju biofilm, mogu da budu populacije samo jedne vrste ili višćelane bakterijske zajednice u zavisnosti od parametara sredine na osnovu kojih je biofilm i nastao. Brojni uslovi, kao što su svojstva površine pripajanja i međusobnog dodira, dostupnost hranljivih sastojaka, sastav mikrobiološke zajednice i hidrodinamika mogu da utiču na strukturu biofilma. Na primer, pri velikom trenju, kao što se dešava na površini zuba tokom žvakanja, biofilm (dentalni plak) je karakteristično stratifikovan i kompaktan. Biofilmovi su, takođe, ispitivani pod različitim hidrodinamskim okolnostima kao što su laminarno i turbulentno kretanje tečnosti, i pokazalo se da menjaju strukturu kao odgovor na različite tipove protoka tečnosti. Biofilmovi, koji su nastali u uslovima laminarnog toka tečnosti, grupisani su i sastavljeni od rapavih okruglih ćelijskih agregata koji su odvojeni intersticijalnim kanalčićima. Biofilmovi, koji su nastali u turbulentnom toku tečnosti, takođe su grupisani, ali sa izduženim agregatima ćelija i sa mestimično većim nakupinama. Nadalje, posmatranjem biofilma u kontinualnom toku tečnosti, bilo je moguće proceniti efekte promena na već formiranim biofilmovima. Pokazalo se da je biofilm polimorfno strukturno prilagođen u zavisnosti od dotoka hranljivih sastojaka. (5) Intersticijalni kanalčići ili useci su, takođe, sastavni deo strukture biofilma. Primenom tehnika praćenja čestica, istraživači su pokazali da postoji protok vode kroz ove kanalčice. Prema tome, kanalčići u osnovi predstavljaju liniju života ovih sistema s obzirom da obezbeđuju protok hranljivih sastojaka, kao i razmenu metaboličkih produkata sa većim delom tečnog sloja. *In situ* merenja rastvorenog kiseonika korišćenjem mikroelektroda, otkrila su da je kiseonik prisutan u biofilmu sve do supstrata što ukazuje na to da se kanalčićima transportuje oksigenizovana tečnost kroz biofilm do same površine na kojoj se nalazi. Dalje, *in situ* merenja degradacije toluena u biofilmu više različitih mikrobioloških vrsta pokazala su da je toluen prisutan u ćelijama duboko u biofilmu što, opet, ukazuje na transport kroz kanalčice. Pretpostavlja se da su kanalčići vitalni delovi

be seen. CLSM is very efficient in monitoring biofilm development in liquid cell cultures. Liquid cell cultures are small systems with continuous fluid flow and an opening for direct observation of the biofilm without interrupting it continuity. (2)

One of the most important positioning mechanisms for bacterial species is aggregation or attachment. Aggregation is improving intercellular interaction and cell sedimentation. By attaching, bacteria are not only positioning on a surface but become capable of forming community and gaining advantages resulting from phenotypic diversity of their neighbors. Considering that surface attachment is present widely in microbial world, it is possible that this form of sessile survival is of critical importance for bacterial survival. Microbes can exist independently one from another but in many cases their proliferation is much better in circumstances of mutual interaction and formation of the community.

Microcolonies that are forming biofilm can be populations of a single bacterial species or multiple species depending on environmental parameters influencing biofilm formation. On biofilm structure several factors are of influence, such as surface characteristics and aggregation quality, nutrients supply, microbial community composition and hydrodynamics. When intense friction is occurring like on teeth surfaces during chewing, biofilm (dental plaque) is typically compacted and stratified. Biofilms were also investigated under various hydrodynamic circumstances, like laminar and turbulent fluid flows are, and it was shown that their structure alters in response to the different types of flow. Biofilms that developed in conditions of laminar fluid flow, are in grouped and consist rough cell aggregates divided by interstitial voids. Biofilms formed in turbulent fluid flows are also grouped, but with elongated cell aggregates partially clumped. Furthermore, observation of the biofilm in continual fluid flow makes possible to evaluate effects of changes in already formed biofilms. Studies have shown that biofilm is structurally adapted depending on nutrients supplied. (5) Interstitial voids are integral part of biofilm structure. By use of particles tracking techniques, researchers have found that water flow exists through these voids. Thus, the voids are basically life line in these systems considering that they are enabling nutrients and metabolic exchange. *In situ* measurements of diluted oxygen using microelectrodes have revealed that the oxygen was present in biofilm to the substratum, which is indicating transport of the oxygenized fluid through biofilm to the surface. Toluene degradation *in situ* measurements in biofilm of several different microbial species have shown that toluene was present in cells deep in biofilm, again indicating present transport. It is reasonably assumed that the voids are vital parts of biofilm structure and function

strukture i funkcije biofilma, i da predstavljaju mehanizme gradnje i održavanja struktura biofilma. Ovo je, izvesno, polje daljih istraživanja. (6)

Sticanje novih genetskih karakteristika

Horizontalni genski transfer je važan za evoluciju i genetsku raznovrsnost mikrobioloških zajednica. Značaj ispitivanja genskog transfera u prirodnim sredinama raste pojavom bakterija rezistentnih na lekove, širokom upotrebom antibiotika za unapređenje rasta domaćih životinja i upotrebom genetski modifikovanih mikroorganizama u industrijskim procesima. Prevalenca plazmida u bakterijama iz različitih staništa je dobro poznata, a transfer gena konjugacijom je jedan od najbolje razjašnjenih mehanizama diseminacije genetskih informacija. S obzirom da većina bakterija u prirodnim uslovima boravi u biofilmovima, sledi da je konjugacija najverovatniji način na koji bakterije u biofilmovima transferišu gene u okviru ili između populacija. Jedna, relativno nova studija bavi se ispitivanjem genskog transfera u mikrokozmu dentalnog plaka. (7) Eksperimenti su izvedeni u streptokoknom biofilmu koji je dobijen u fermentoru konstantne debljine. U sistem je unesen soj *Bacillus subtilis*-a, kao nosilac konjugativnog transpozona koji utiče na rezistenciju na tetracikline i određen je profil rezistencije bakterija iz biofilma. Rezultati su pokazali da je došlo do transfera konjugativnog transpozona u biofilmu, jer je sada *Streptococcus* postao nosilac transpozona. To je, ujedno, bila prva demonstracija genskog transfera na jednu oralnu bakterijsku vrstu koja pripada biofilmu, a ovi nalazi ukazuju da bakterije van oralne sredine imaju potencijal da prenesu gene na oralne komensale.

Infekcije izazvane bakterijskim biofilmom

Infekcije izazvane mikrobnim biofilmom prati rekurentna simptomatologija uprkos ponavljanim antibiotskim terapijama. Standardnom antibiotskom terapijom se eliminišu samo planktonske ćelije, a sesilni oblici nastavljaju da se šire u biofilmu i nastavljaju da se razmnožavaju posle završene terapije. Dalje, infekcije izazvane mikrobnim biofilmom retko mogu da budu savladane samo imunim odgovorom domaćina. Bakterije iz biofilma otpuštaju antigene i stimulišu proizvodnju antitela, ali su takođe i otporne na ove odbrambene mehanizme. Nekada, imuni odgovor domaćina može da uzrokuje oštećenje okolnog tkiva. Iz tih razloga, bolje razumevanje organizacije biofilma dovodi do potrebe razvoja novih pristupa lečenju infekcija izazvanih mikrobnim biofilmovima. (1)

and are also presenting mechanisms of biofilm structure growth and maintenance. This is, most certainly, a challenge for future studies of the biofilm structure. (6)

New genetic characteristics acquisition

Horizontal genes transfer is important in evolution and genetic diversity of microbial communities. Significance of genes transfer research in natural environments is elevated by drug resistant bacteria, wide antibiotic use for domestic animals growth enforcement and by use of genetically modified microorganisms in industrial processes. Prevalence of plasmids in bacteria from different habitats is well known and genes transfer by conjugation is one of the best understood mechanisms of genetic information dissemination. Considering that great number of microbes in natural environments are in biofilms, it can be implied that conjugation is the most probable way in which bacteria in biofilms are transferring genes within the same or between different populations. One recent study is presenting genes transfer research in microcosm of dental plaque. (7) Experiments were developed in streptococcal biofilm which is obtained in constant depth film fermentor. *Bacillus subtilis* was introduced into the system as the carrier of the conjugative transposone affecting tetracycline resistance. Results have shown that transfer within biofilm continued because *Streptococcus* became transposone carrier. That was the first demonstration of genes transfer on an oral species that belongs to biofilm composition and these findings suggest that bacteria out of oral environment have potential of transferring genes on oral comensals.

Bacterial biofilm infections

Infections caused by microbial biofilm are characteristic for recurrent symptomatology regardless of repeated antibiotic medication. By standard antibiotic therapy only planktonic cells can be eliminated, and sessile forms continue reproducing in biofilm even after antibiotics administration has ended. Beside that, host immune response can cope with infection caused by microbial biofilm extremely rarely. Biofilm bacteria are releasing antigens and stimulate antibodies production, but also become resistant to these mechanisms. In some cases, host immune response can influence damaging of the surrounding tissues. For that reason, better understanding of biofilm organization brings up the need for development of the new approaches in therapy of microbial biofilms infections.(1)

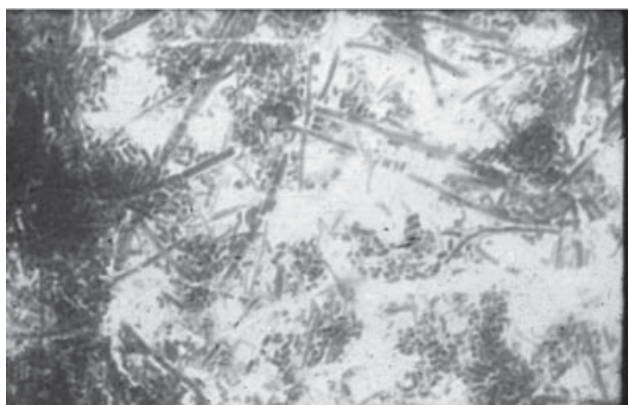
Molekularna genetika oralnih biofilmova

Jedna od najviše ispitivanih zajednica bakterija je dentalni plak. (2,3,6,7,8) Ovaj sistem je naročito kompleksan zato što sadrži stotine bakterijskih vrsta, i nove vrste se još uvek izoluju uključujući i poznate bakterijske patogene vrste koje nisu pripadnici oralnog ekosistema. Veliki broj novijih studija bavi se strukturom i sastavom oralnih bakterijskih zajednica. (2,4,5) U razumevanju molekularnih mehanizama koji su potrebni za stvaranje oralnih biofilmova na zubima, došlo se do sledećih saznanja. Uopšteno, stvaranje biofilmova na površinama zuba se odvija u tri faze: (i) stvaranje potrebnog filma ili stečene pelikule na gleđi, (ii) pripajanje bakterijskih vrsta koje prve kolonizuju zub, (iii) međučelijske interakcije kasnijih bakterijskih kolonizatora. Kada se površina zuba temeljno očisti, veoma brzo biva pokrivena složenom mešavinom komponenti koje uključuju glukoproteine, proteine koji su bogati prolinom, mucine, debris bakterijskih ćelija, spoljašnje proizvode, kao što je amilaza i sijalinsku kiselinu. Stečena pelikula služi kao supstrat prvom talasu mikroorganizama, poznatom kao primarni kolonizatori. Vrstama koje prve kolonizuju zub pripadaju *S. gordonii*, *S. sanguinis* i *Streptococcus parasanguinis* (Sl.1), koje čine do 60-80% bakterijske populacije koja pripada za površinu zuba u ranoj fazi stvaranja biofilma. Ganeškumar i saradnici su koristili polistirenske podloge kao model abiotske površine za određivanje sposobnosti *S.gordonii* da stvara biofilm i za ispitivanje bakterijskih činilaca koji su neophodni da bi došlo do ovog ranog vezivanja bakterija za podlogu. Primenom sistema polistirenskih posuda, autori su pokazali da *S.gordonii* stvara biofilm pod uticajem brojnih parametara sredine, a to su između ostalih, osmolaritet, izvori ugljenika i pH. Dalje, identifikovani su geni koji nose kodove za funkcije biosinteza i transporta. Osim toga, uočene su fimbrije koje spajaju salivarni protein 1 bogat prolinom i staterin. Ovo je naročito interesantno kada se zna da mnogi gram-negativni mikroorganizmi pomoću fimbrija ostvaruju inicijalne interakcije sa površinom. (9,10) Sazrevanje biofilma se odvija na bazi interakcija ćelija-ćelija koje se, zajedničkim imenom, zovu koagregacija. Koagregacija se još može definisati kao prepoznavanje i atezija bakterija koju su međusobno genetski različite, a prvi put je opisana pre 30 godina. (8,11) Kolenbrander i saradnici su izveli seriju kompleksnih eksperimenata sa inkubiranim parovima mikroorganizama i pratili nivo koagregacije na osnovu brzo izdvajanje sojeva iz suspenzije. (5,6) Ove interakcije ne zahtevaju postojanje živih ćelija, mogu da budu prekinute dodavanjem rastvorljivih šećera i mogu se odvijati između mikroorganizama istog ili različitih rodova. Rezultati ispitivanja koagregacije omogućili su razvoj modela bakterijskih intrakcija u dentalnom plaku. Jedan od ranih kolonizatora, *S.gordonii* može da se veže sa gram-negativnom bakterijom *Fusobacterium nuc-*

Molecular genetics of oral biofilms

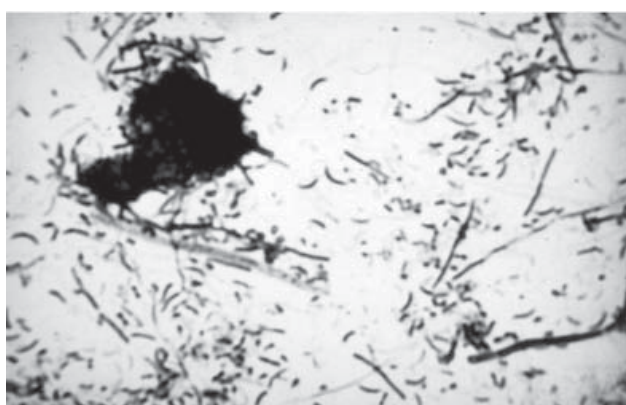
Dental plaque is among the most often studied microbial communities. (2,3,6,7,8) This system is particularly complex because it contains hundreds of species and new ones are still being isolated. Numerous studies are dealing with structure and composition of oral bacterial communities. (2,4,5) Following findings have raised the understanding of the molecular mechanisms that are needed for oral biofilm formation on the surface of teeth. Generally, formation of biofilms on teeth surfaces is developed in three phases: (i) formation of the film or acquired pellicle on enamel, (ii) adhesion of the early bacterial colonizers, (iii) intercellular interactions of the later colonizers. When the tooth surface is thoroughly cleansed, very soon it is covered by a complex mixture of components as glucoproteins, proteins rich in proline, mucins, debris of bacterial cells, extrinsic products. Acquired pellicle serves as a substrate for the first group of microorganisms, known as primary colonizers. Species that are first colonizers of the tooth surface are *S. gordonii*, *S. sanguinis* and *Streptococcus parasanguinis* (Fig.1), and they represent 60-80% of the entire bacterial population colonizing the tooth surface in early stages of the biofilm formation. Ganeshkumar and co-workers have used polystyrene disks as models of abiotic surface for the assessment of *S.gordonii* potential in biofilm formation and in studying bacterial factors which are needed in early bacterial attachment. Applying systems of polystyrene plates, authors have shown that *S.gordonii* is forming biofilm influenced by numerous environmental parameters, among which are osmolarity, carbon sources and pH. Furthermore, genes were identified that are carrying codes for biosynthesis and transport functions. Also, pili connecting salivary protein 1 rich in proline and statherine were found. This is particularly interesting when having in mind that many Gram-negative bacteria develop initial interactions with surface through pili. (9,10) Biofilm growth is based on cell-cell interactions known as coaggregation. It also can be defined as recognition and adhesion of genetically different bacteria, initially described over 30 years ago. (8,11) Kolenbrander and al. have attempted series of complex experiments with incubated microbial pairs in which they followed coaggregation level based on rapid settling of strains out of suspension. (5,6) These interactions do not request viable cells, can be interrupted by adding soluble sugars and can take place between microorganisms of the same or different genera. Results of coaggregation studies have enabled development of bacterial interactions models in dental plaque. One of the early colonizers, *S.gordonii* can attach to Gram-negative *Fusobacterium nucleatum* (Fig. 2), but not with a later colonizer - *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. That is why *F. nucleatum*, which is capable of

leatum (Sl. 2), ali ne i sa kasnijim kolonizatorom - *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-om. Stoga, *F. nucleatum*, koji može da se veže sa obe vrste, deluje kao most između ranih i kasnih kolonizatora. *Bacteroides (Porphyromonas)*, takođe, može da posluži za premoščavanje između vrsta u oralnim biofilovima. Koagregacija je rezultat relativno specifičnih interakcija. Na primer, bakterije iz određenih delova usne duplje teže da se vežu za vrste sa iste lokacije (bakterije izolovane sa jezika se vezuju sa drugim bakterijama, takođe, na jeziku) što ukazuje na direktnu prostornu organizaciju oralnih biofilmova. (12, 13)



Slika 1. Streptokoke dentalnog plaka SEM, uveličanje 100X (14)
Figure 1. Streptococci of dental plaque SEM, magnification 100X (14)

attaching to both bacteria, is acting like a bridge between early and late colonizers. *Bacteroides (Porphyromonas)* too can serve as interconnecting species in oral biofilms. Coaggregation is resulting from relatively specific interactions. For instance, bacteria from different locations of the oral cavity tend to attach to the species of the same location (microbes isolated from the tongue are coaggregating with other species at the tongue) which is indicating spacious organization of oral biofilms. (12,13)



Slika 2. Fuziformne bakterije dentalnog plaka SEM, uveličanje 100X (14)
Figure 2. Fusiform microorganisms of the dental plaque (14)

Zaključak

Primena molekularnih metoda u razumevanju oralne flore i njenih karakteristika, čini da se saznanja o dentalnom plaku suštinski koriguju. Neophodno je da se revidiraju dosadašnja znanja o karakteristikama, patogenosti, ekologiji i ulozi mikroorganizama iz biofilmova u različitim oralnim infekcijama kako bi postalo moguće da se odrede specifične terapijske procedure.

Conclusion

Use of the molecular methods in better understanding of oral flora and its characteristics has improved our knowledge on dental plaque. It is important to revise previous beliefs about characteristics, pathogenicity, ecology and the role of biofilm bacteria in different oral infections for specific treatment needs.

Literatura / References

1. Davey ME, O'Toole GA: Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics; *Microbiol Molecular Biol* 2000, 64(4): 847-67
2. Filoche SK, Zhu M, Wu CD: IN SITU biofilm formation by multi-species oral bacteria under flowing and anaerobic conditions; *J Dent Res* 2004, 83(10): 802-6
3. Scheie AA, Petersen FC: The biofilm concept: Consequences for future prophylaxis of oral diseases? *Crit Rev Oral Biol Med* 2004, 15(1): 4-12
4. Netuschil L, Reich E, Unteregger G, Sculean A, Brex M: A pilot study of confocal laser scanning microscopy in assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography; *Arch Oral Biol* 1998, 43: 277-85
5. Foster JS, Kolenbrander PE: Development of a multi-species oral bacterial community in a saliva-conditioned flow-cell; *Appl Environment Microbiol* 2004, 70(7): 4340-8
6. Kolenbrander PE, Andersen N, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer Jr. RJ: Communication among oral bacteria; *Microbiol Mol Biol Rev* 2002, 66(3): 486-505
7. Roberts AP, Pratten J, Wilson M, Mullany P: Transfer of a conjugative transposon Tn5397 in a model oral biofilm; *FEMS Microbiol Lett* 1999, 177:63-6
8. Marsh PD: Dental plaque as a microbial biofilm; *Car Res* 2004, 38: 204-11

9. Loo CY, Corliss DA, Ganeshkumar N: Streptococcus gordonii biofilm formation: Identification of genes that code for biofilm phenotypes; *J Bacteriol* 2000, 182: 1374-82
10. Wall-Manning GM, Sissons CH, Anderson SA, Lee M: Checkerboard DNA-DNA hybridisation technology focused on the analysis of Gram-positive cariogenic bacteria; *J Microbiol Meth* 2002, 51: 301-11
11. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS: Bacterial coaggregation: An integral process in the development of multi-species biofilms; *Trends microbiol* 2003, 11(2): 94-100
12. Ivanović M: Mogućnosti korišćenja mikrobioloških parametara u dijagnostici rizika za nastanak obolenja parodonticijuma; 1994 XXVIII Dani preventivne medicine sa međunarodnim učešćem, Niš, Zbornik radova
13. Ivanović M: Peptidase activity from *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* and clinical periodontal parameters (PI,GI,BOP); 2001, 6th Congress of the Balcan Stomatological Society, Bucharest, Romania
14. Ivanović M: Karakteristike zubnih plaka u područjima sa različitim koncentracijama fluorida u pijaćim vodama, Magistarski rad, Beograd, 1987.

Autor odgovoran za korespondenciju

Prof. Dr Mirjana Ivanović
Klinika za dečju i preventivnu stomatologiju
Dr Subotića 11
11000 Beograd
e-mail: profmi@eunet.yu

Address for correspondence

Prof. Dr Mirjana Ivanović
Clinic of pediatric and preventive dentistry
Dr Subotića 11
11000 Belgrade, Serbia and Montenegro
e-mail: profmi@eunet.yu