

Effect of Sub-minimal Inhibitory Concentration of Chlorhexidine on Biofilm Formation and Coaggregation of Early Colonizers, Streptococci and Actinomycetes

So Yeon Lee and Si Young Lee*

Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, 210-702, Korea

(received October 14, 2016; revised November 18, 2016; accepted November 19, 2016)

Chlorhexidine has long been used in mouth washes for the control of dental caries, gingivitis and dental plaque. Minimal inhibitory concentration (MIC) is the lowest concentration of an antimicrobial substance to inhibit the growth of bacteria. Concentrations lower than the MIC are called sub minimal inhibitory concentrations (sub-MICs). Many studies have reported that sub-MICs of antimicrobial substances can affect the virulence of bacteria. The aim of this study was to investigate the effect of sub-MIC chlorhexidine on biofilm formation and coaggregation of oral early colonizers, such as *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces odontolyticus*. The biofilm formation of *S. gordonii*, *A. naeslundii* and *A. odontolyticus* was not affected by sub-MIC chlorhexidine. However, the biofilm formation of *S. mutans* increased after incubation with sub-MIC chlorhexidine. In addition, cell surface hydrophobicity of *S. mutans* treated with sub-MIC of chlorhexidine, decreased when compared with the group not treated with chlorhexidine. However, significant differences

were seen with other bacteria. Coaggregation of *A. naeslundii* with *A. odontolyticus* reduced by sub-MIC chlorhexidine, whereas the coaggregation of *A. naeslundii* with *S. gordonii* remained unaffected. These results indicate that sub-MIC chlorhexidine could influence the binding properties, such as biofilm formation, hydrophobicity and coaggregation, in early colonizing streptococci and actinomycetes.

Key words: chlorhexidine, biofilm, oral bacteria, hydrophobicity, coaggregation, sub-MIC

서론

구강 내 치태는 치과 질환의 주요 병인 요소이며, 치태의 제거는 치과 질환을 유의하게 감소시킬 수 있으나 기계적인 치태 제거 방법은 한계가 있기 때문에 항균물질의 보조적인 사용은 치태 축적을 제어하고 제거하는데 효과적인 것으로 알려져 있다[1].

항균제의 최소 억제 농도(Minimal inhibition concentration, MIC)는 세균 성장을 억제하는 항균제의 최소한의 농도이다. 항균제의 농도는 투여 혹은 처리 후 일정 기간에서만 MIC 이상의 농도로 유지되는 것으로 알려져 있으며, 지속적으로 투여하지 않을 경우 항균제의 농도는 필연적으로 MIC보다 낮아지게 되는데, 이것을 최소 억제 농도 이하의 농도(sub-MIC)라고 한다[2,3]. Sub-MIC는 세균을 죽이지 못하지만 세균의 대사작용을 방해하는 등 여러 기능에 영향을 미치며, 따라서 세균 병독성 요인의 변화를 가져올 수 있다

*Correspondence to: Si Young Lee, Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, 210-702, Korea.

Tel: +82-33-640-2455, Fax: +82-33-642-6410

E-mail: siyoung@gwnu.ac.kr

ORCID : 0000-0001-8826-1413

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

고 보고되고 있다[2,4-8].

일반적으로, 구강 세정제, 치약, 치과용 바니시에 포함된 다양한 항균제는 치태 형성을 제어하고 감소시키거나 구강 질병을 미연에 방지하기 위한 것이다[9]. 화학적 치태 제어를 위한 제제는 세균의 세포벽에 영향을 줄 수 있는 것으로 알려지고 있다[10-12]. 클로로헥시딘은 치태, 치아우식증과 치주염의 제어를 위한 구강세정제로서 오랜 기간 사용되어왔다[13,14]. 클로로헥시딘은 고체 표면에 형성된 타액 필름에 흡착하는 것으로 보고되고 있으며[15], 이러한 작용이 구강 내 지속성과 체류 시간의 정도에 영향을 미친다[12]. 클로로헥시딘은 소수성 및 친수성 그룹을 모두 가진 양이온성 분자이며, 낮은 독성 및 피부와 점막에 결합할 수 있는 능력과 함께 광범위한 항균 활성을 가지고 있다[16].

이전 연구들에서 *Streptococcus mutans*를 대상으로 클로로헥시딘의 세균 부착에 대한 영향을 조사한 연구가 많이 진행되었다[17,18]. 일부 연구에서, 구강세정제로 사용되고 있는 고농도의 클로로헥시딘을 *S. mutans*에 적용하였을 때 세균 부착이 유의하게 감소하였다고 보고하였다[17]. 그러나, 또 다른 연구에서는 sub-MIC 클로로헥시딘의 존재 하에 성장시킨 *S. mutans*는 클로로헥시딘을 적용하지 않은 대조군과 비교하여 바이오 필름 형성이 증가하였고, 바이오 필름 형성 관련 유전자의 발현을 유도하였다고 보고하는 등 클로로헥시딘의 구강세균의 부착에 대한 효과는 아직 확실하지 않다[18].

세균의 공동응집(coaggregation)은 속내, 속간 그리고 여러 속간에 일어날 수 있으며, 각각의 세균 사이 응집 기전은 다른 것으로 알려져 있다[19]. 공동응집은 여러 세균 중에 의한 바이오필름 형성에 중요한 과정이며, 구강 내에서도 초기 군집자들의 속간 공동응집에 의해 치태의 형성이 부분적으로 매개되는 것으로 알려져 있다[20,21]. 일부 연구에서, 고농도의 클로로헥시딘에 의한 구강 세균 사이의 속간 공동응집 억제에 대하여 연구하였고, 클로로헥시딘을 적용하였을 때 응집 현상이 감소하였다고 보고하였다[22].

이전 연구들에서 *S. mutans*에 대한 클로로헥시딘의 구강 세균 부착에 대한 영향을 조사한 연구가 많이 진행되었으나, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus*와 같은 초기 치면 부착 세균에 관련된 연구는 많지 않다. 또한, 대부분의 연구에서 MIC 이상의 농도인 구강 세정제에서 사용되고 있는 고농도에 초점을 맞추어 부착 효과를 관찰하였다. 따라서, 본 연구에서는 초기 부착에 관련되는 세균 중인 *S. gordonii*와 *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*를 사용하여 sub-MIC의 클로로헥시딘이 이

들 세균의 바이오필름 형성과 세균 응집에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

세균 및 배양

본 연구에서는 *S. gordonii* DL1, *S. mutans* ATCC 25175, *A. naeslundii* CCUG 35333 그리고 *A. odontolyticus* ATCC 17929를 사용하였다. 모든 세균은 Brain Heart Infusion (BHI, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)배지를 사용하여, 37°C, 5% CO₂배양기에서 18시간 배양되었다. 분광광도계를 사용하여 660 nm (OD₆₆₀)에서 세균의 혼탁도를 측정하였고, 미리 정해 놓은 표준 곡선에 적용하여 세균의 수를 정량하였다.

최소억제농도(Minimal inhibitory concentration, MIC) 측정

실험 대상 세균에 대한 클로로헥시딘의 MIC 측정은 Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI)의 지침을 따라 액체배지 희석법을 사용하였다[23]. MIC는 two-fold serial macro-dilution법을 이용하였다. 액체 배지에 클로로헥시딘을 1/2씩 연속적으로 희석한 후 세균을 5 × 10⁵ cells/ml이 되도록 넣은 후, 37°C, 5% CO₂배양기에서 18시간 배양하였다. 배양 후, 육안으로 세균 성장이 억제된 MIC를 측정하였다.

바이오필름 형성 실험

바이오필름 형성은 이전에 보고된 기존 실험 방법을 일부 변형하여 실험하였다[24]. 모든 세균은 CO₂ 배양기에서 18시간 배양 후, 분광광도계를 사용하여 OD₆₆₀에서 흡광도를 측정하고, 멸균된 PBS (phosphate buffer saline, pH7.4)로 희석하여 1 × 10⁹ CFU/ml의 현탁액을 준비하였다. 멸균된 glass slip (round, 12 mm diameter)이 들어있는 12-well plate (SPL Life Sciences, Pocheon-si, Gyeonggi-do, Korea)에 4 ml의 배양 배지와 25 µl의 준비된 세균 현탁액을 첨가하고 CO₂배양기에서 18시간 배양하였다. 배양 후, 바이오필름이 형성된 glass slip을 PBS로 부드럽게 세척하여 glass slip에 부착하지 않은 세균을 제거하였다. Glass slip에 부착하는 정도에 따라 바이오필름 형성 양상을 1-4 점으로 구분하였고, 아래의 Table 1에 기준을 표시하였다. 바이오필름 형성에 대한 클로로헥시딘의 영향을 조사하기 위하여 세균을 sub-MIC의 클로로헥시딘이 포함된 배양 배지에 배양시켜 위와 같은 방법으로 실행하였다.

세균 표면 소수성 실험

바이오필름 형성 정도의 차이가 세균 표면의 소수성 차이와 연관이 있는지 조사하기 위해 기존에 보고된 실험 방법을 이용하여 소수성을 측정하였다[25]. n-hexadecane에 세균이 흡착하는 정도에 따라 세균 표면 소수성을 결정하였다. Sub-MIC의 클로로헥시딘에서 배양된 세균은 10,000 x g, 5분 동안 원심 분리 후 PUM 완충액[26]으로 세척하고 같은 완충액에 현탁하여 OD₅₅₀에서 흡광도가 1 × 10⁹ cells/ml이 되도록 맞추었다. 유리 튜브(13 mm)에 2 ml의 세균 현탁액을 넣은 뒤 400 µl의 n-hexadecane (Sigma chemicals Co., St. Louis, MO, USA)을 넣은 후, 교반기를 이용하여 1분간 격렬하게 섞어주었다. 혼합액을 상온에서 15분간 놓아둔 후 상층액을 제외한 용액을 분광광도계를 이용하여 OD₅₅₀에서 흡광도를 측정하였다.

세포 소수성은 다음과 같은 공식에 적용하여 계산하였다. %HP = [OD(initial)-OD(expt)] × 100 / OD(initial); OD(expt)는 n-hexadecane을 첨가하고 15분 배양한 후 측정된 OD₅₅₀값을 말한다.

세균 공동응집 실험

이전 실험에서 구강 세균 사이 공동응집 양상을 관찰한 결과, *A. naeslundii*와 *S. gordonii*, *A. naeslundii*와 *A. odontolyticus*의 조합에서 세균응집이 +4로 활발히 일어났다[27]. 이를 바탕으로 sub-MIC의 클로로헥시딘을 적용하였을 때 세균응집에 어떠한 변화가 나타나는지 관찰하였다. 세균응집 실험은 기존에 알려진 Cisar 등의 실험 방법을 이용하여 육안으로 관찰된 결과를 확인하였다[22,28,29]. Sub-MIC의 클로로헥시딘을 첨가한 배양 배지에 세균을 접종하여 18시간 동안 배양한 후, 12,000 x g, 5분 동안 원심 분리하였다. 그런 다음, 세균을 멸균된 PBS로 현탁하여 OD₆₀₀에서 1 × 10⁹ CFU/ml로 맞추었다. 유리 튜브(13 mm)에 각 세균을 100 µl씩 넣고 10 초 이상 교반기를 이용하여 격렬하게 섞어주었다. 실온에서 1시간 동안 정치시키고 응집 결과를 확인하였다. 응집 정도에 따라 아래 기준으로 점수화 하였다.

0 : 육안으로 응집반응이 관찰되지 않음, 1 : 작은 응집물이 현탁액 속에 관찰됨, 2 : 응집물이 관찰되나 현탁액은 여전히 탁함, 3 : 큰 응집물이 혼합 후 즉시 가라앉으나 상층액이 약간 탁함, 4 : 큰 응집물이 혼합 후 즉시 가라앉고 상층액이 맑음.

통계 분석

각 세균의 sub-MIC의 클로로헥시딘이 처리된 그룹과, 처리되지 않은 그룹간의 소수성 차이가 통계적으로 유의한지 확인하기 위하여 독립표본 t-test를 사용하였다

(유의확률 $p < 0.05$). 통계 분석은 Software Package for Social Sciences (SPSS, version 21, IBM Inc., USA)를 사용하였다.

결 과

최소억제농도(MIC) 측정

클로로헥시딘의 최소억제농도는 아래의 Table 1에 나타내었다. 클로로헥시딘 MIC는 *A. odontolyticus* 가 0.24414 µg/ml로 가장 높았고, *S. gordonii*에서 0.00191 µg/ml로 가장 낮은 값으로 관찰되었다. 실험에 사용한 클로로헥시딘의 sub-MIC 농도는 MIC의 1/2 값을 사용하였다.

Table 1. Minimal inhibitory concentrations of chlorhexidine

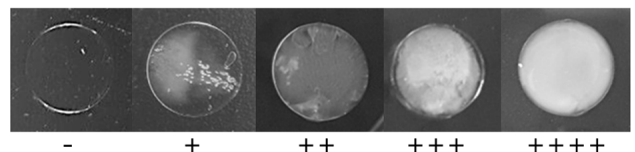
	MIC (µg/ml) of Chlorhexidine
<i>S. gordonii</i>	0.00191
<i>S. mutans</i>	0.12207
<i>A. naeslundii</i>	0.03052
<i>A. odontolyticus</i>	0.24414

바이오필름 형성 실험

클로로헥시딘을 첨가하지 않은 각 세균은 바이오필름 형성 양상에 차이를 보였다(Table 2). *S. mutans*와 *A. odontolyticus*는 +1로 비교적 낮은 수치의 바이오필름을 형성하였다. *S. gordonii* 또한 +2로 적은 양의 바이오필름을 형성하였으나, *A. naeslundii*는 +4로 많은 양의 바이오필름을 형성하였다. Sub-MIC의 클로로헥시딘이 첨가된 배지에서 성장한 *S. gordonii*, *A. naeslundii* 그리고 *A. odontolyticus*는 각각 +2, +4, +1로 클로로헥시딘을 첨가하지 않은 대조군과 차이가 없었다. 그러나, sub-MIC의 클로로헥시딘의 존재 하에 배양한 *S. mutans*는 대조군과 비

Table 2. The effect of sub-MIC chlorhexidine on biofilm formation

	No Chlorhexidine	Chlorhexidine
<i>S. gordonii</i>	++	++
<i>S. mutans</i>	+	+++
<i>A. naeslundii</i>	++++	++++
<i>A. odontolyticus</i>	+	+



교하여 +1에서 +3으로 바이오필름 양이 증가한 것으로 관찰되었다.

세균 표면 소수성 실험

각 실험 균주 간의 소수성 차이는 Fig. 1에 나타내었다. 각 세균간의 클로로헥시딘을 처리하지 않은 대조군을 비교하였을 때, *S. gordonii*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*는 약 70%로 높은 소수성을 보였으나, *S. mutans*는 약 50%로 소수성이 상대적으로 낮았다. Sub-MIC의 클로로헥시딘을 처리한 *S. gordonii*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*는 대조군과 비교하여 소수성에 유의한 차이가 없었다. 그러나, *S. mutans* 그룹에서 대조군과 비교하여 sub-MIC의 클로로헥시딘의 존재 하에 성장한 실험군에서 소수성이 약 30%로 줄어들었고, 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$).

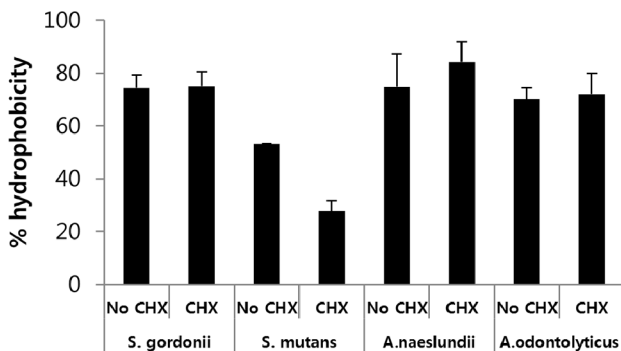


Fig. 1. The effect of sub-MIC chlorhexidine on hydrophobicity of *S. gordonii*, *S. mutans*, *A. naeslundii* and *A. odontolyticus*. The bacteria were cultured in the sub-MIC chlorhexidine and hydrophobicity was measured. Values indicate means of three experiments; standard deviations of the mean (error bars) are indicated by vertical lines. (CHX = chlorhexidine)

세균 공동응집 실험

이전 실험에서, 화학제제를 처리하지 않은 대조군을 대상으로 공동응집 실험 한 결과, *A. naeslundii*와 *S. gordonii*, *A. naeslundii*와 *A. odontolyticus* 조합에서 공동응집이 +4로 관찰되었다[27]. 이 조합을 대상으로 sub-MIC의 클로로헥시딘 존재 하에 성장시킨 *A. naeslundii*, *S. gordonii*, *A.*

*odontolyticus*사이에서 어떠한 양상으로 공동응집이 변화하는지 조사하였고, 공동응집 결과는 Table 3에 나타내었다. 각각 한 가지 세균에 대해서만 sub-MIC의 클로로헥시딘을 처리한 *A. naeslundii*와 *S. gordonii*의 조합에서 공동응집이 +4에서 +3으로 약간 감소하였다. *A. naeslundii*와 *A. odontolyticus*의 조합에서도 한 가지 세균만 클로로헥시딘을 처리하였을 때, +4에서 +3으로 응집이 약간 감소하였다. 두 세균을 각각 sub-MIC의 클로로헥시딘으로 처리했을 때, *A. naeslundii*와 *S. gordonii*의 조합에서 +4에서 +3으로 공동응집이 감소하였고, *A. naeslundii*와 *A. odontolyticus*의 조합에서는 +4에서 +2로 줄어들었다.

고찰

구강 표면에 대해 클로로헥시딘은 다른 항 미생물제보다 더 강하게 결합하며, 이 결합이 구강에서 클로로헥시딘의 효과를 연장시킨다고 보고되고 있다[30]. 낮은 독성과 광범위한 항균 활성을 가지는 클로로헥시딘은 막 손상으로 세포의 영구적인 손실을 유발하며, 높은 농도의 클로로헥시딘은 광범위한 세포 손상, 세포질의 응고, 핵산과 단백질 침전을 유발하는 것으로 알려져 있다 [16,31]. 구강세정제로 사용되고 있는 클로로헥시딘의 농도는 본 실험에 사용된 sub-MIC 농도보다 10^6 - 10^8 배 이상 높은 농도이다. 그러나, 클로로헥시딘은 구강 내의 타액에 의해 계속적으로 희석되며, 클로로헥시딘 농도는 지속적으로 투입하지 않을 경우, 적용 후 처음 몇 시간 동안 급격하게 떨어져 오랜 시간 동안 MIC 이하의 농도로 존재하게 된다[30,32].

이전 연구들에 따르면, *S. mutans*의 세균 부착이 클로로헥시딘의 농도에 따라 다르게 나타나는 것으로 보인다. Meurman의 연구에서, 고농도(0.1%)의 클로로헥시딘을 *S. mutans*에 적용하였을 때, 타액 코팅된 hydroxyapatite에 대한 세포의 흡착이 유의하게 감소하였다고 보고하였다 [17]. 그러나, 한 연구에서는 저농도(sub-MIC)의 클로로헥시딘을 *S. mutans*에 적용하였을 때 *S. mutans* 바이오필름

Table 3. The effect of sub-MIC chlorhexidine on coaggregation of *A. naeslundii* with *S. gordonii* and *A. odontolyticus*

		<i>A. naeslundii</i>	
		No chlorhexidine	Chlorhexidine
<i>S. gordonii</i>	No chlorhexidine	++++	+++
	Chlorhexidine	+++	+++
<i>A. odontolyticus</i>	No chlorhexidine	++++	+++
	Chlorhexidine	+++	++

형성이 증가하였고[18], 클로로헥시딘이 *S. mutans*의 바이오필름 형성과 관련된 glucosyltransferase(GTF) 등과 같은 유전자의 발현을 상향 조절하여 바이오 필름 형성이 증가하였다고 밝혔다. 본 연구에서도, *S. mutans*의 균주가 이전 논문과는 다른 균주였지만 저농도(sub-MIC)의 클로로헥시딘을 적용하였을 때 바이오필름 형성이 이전의 연구 결과와 같이 증가된 것으로 관찰되었다. 바이오필름 형성이 증가한 이유는 이전의 연구에서와 같이 바이오필름 형성과 관련된 유전자 발현에 클로로헥시딘이 영향을 미쳐 결과적으로 바이오필름 형성이 증가하였을 가능성이 있다.

세포 소수성은 세균 부착과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있고, 세포 소수성이 높은 세균은 치아의 획득 피막, 상피 혹은 보철 의치에 부착할 수 있다[33-35]. Cai 등은 *S. mutans*와 *Streptococcus sanguinis*의 소수성과 부착에 대한 화학제제의 영향에 대하여 조사한 결과, 클로로헥시딘을 적용하지 않은 대조군과 sub-MIC의 클로로헥시딘에서 성장시킨 실험군을 비교하였을 때, *S. mutans*와 *S. sanguinis* 모두 타액으로 코팅된 hydroxyapatite에 대한 세균의 부착 및 세균 소수성이 처리 전 후에 통계적으로 유의한 차이가 없다고 밝혔다[36]. 본 실험에서도 *S. gordonii*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*는 sub-MIC의 클로로헥시딘을 처리하였을 때 바이오필름 형성 및 소수성에 처리 전 후 간에 유의한 차이가 없었다.

본 연구에서 sub-MIC의 클로로헥시딘을 적용한 *S. mutans*의 바이오필름 형성이 증가한 반면 이 세균의 소수성은 유의하게 감소한 것으로 관찰되어, 세포 소수성이 높은 세균이 바이오필름 형성을 유도한다고 알려진 기존 사실과 반대되는 결과를 보였다. 이러한 사실은 소수성에 의한 세균 부착 이외에 클로로헥시딘에 의해 영향을 받는 어떠한 부착 기전이 바이오필름 형성에 영향을 준 것으로 보이며, 추후 연구를 통하여 이와 같은 현상의 이유에 대하여 밝혀야 할 것이다.

바이오필름 형성은 구강 내 치태를 형성하고 이러한 작용은 초기 부착 세균에 의한 순간 공동응집이 일부 매개하는 것으로 알려져 있다[20,21]. 초기 군집자들은 치아의 획득피막에 대하여 직접 부착하고 광범위한 속내, 속간 공동응집을 나타낸다[19]. Streptococci와 actinomyces와 같은 초기 군집자는 초기 치태의 살아있는 세포의 90% 이상을 구성한다고 알려져 있다[19,37]. Smith 등은 구강 세정제로 사용되는 클로로헥시딘의 농도에 의한 초기 집락군의 세균 간 공동응집 억제에 대한 연구를 시행하였다[22]. 구강 세정제로 사용되고 있는 고농도(0.2% 혹은 0.12%)의 클로로헥시딘이 그람 양성 세균인 streptococci와 actinomyces의 응집을 억제했다고 밝혔다[22]. 본 연구에

서도 저농도(sub-MIC)의 클로로헥시딘의 존재 하에 성장한 *A. naeslundii*와 *A. odontolyticus*의 공동 응집이 감소하는 결과를 보였으며, 이러한 결과로 볼 때 클로로헥시딘은 농도와 상관없이 공동응집작용을 억제하는 것으로 보인다.

본 연구에서 초기 부착 세균 종인 *S. gordonii*와 actinomyces를 대상으로 sub-MIC의 클로로헥시딘의 바이오필름 형성에 대한 영향을 관찰하였다. 일부 연구에서 저농도의 sub-MIC클로로헥시딘을 적용하였을 때 *S. mutans*에 의한 바이오필름 형성이 증가하며[18], *Fusobacterium nucleatum*의 경우에는 상피세포에의 부착이 감소하는 것으로 보고되고 있다[35]. 그러나, 본 연구에서 저농도(sub-MIC)의 클로로헥시딘이 초기 부착세균인 streptococci와 actinomyces중에 의한 바이오필름 형성에는 영향이 미치지 않는 것으로 관찰되었다. 본 연구결과를 볼 때, 클로로헥시딘은 구강세균의 치사에 관여 할뿐만 아니라 부착 과정에도 다양한 방법으로 영향을 미치는 것으로 추정된다. 지금까지의 연구는 치아 우식 원인 세균 중 및 초기 부착세균을 중심으로 단일 종을 대상으로 하는 실험이 대부분이었지만, 추후에는 치태 형성에 관여하는 여러 종의 세균을 Biofilm Reactor등 바이오필름 형성 기구를 이용하여 혼합 배양하면서 클로로헥시딘의 영향을 조사할 필요가 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초 연구 사업임(NO. 2015R1D1A1A01057790).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicting interest.

References

1. Addy M, Slayne MA, Wade WG. The formation and control of dental plaque--an overview. *J Appl Bacteriol.* 1992;73:269-278.
2. Braga PC, Sasso MD, Sala MT. Sub-MIC concentrations of cefodizime interfere with various factors affecting bacterial virulence. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45:15-25. doi: 10.1093/jac/45.1.15
3. Lorian V. Medical relevance of low concentrations of antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 1993;31 Suppl D:

- 137-148. doi: 10.1093/jac/31.suppl_D.137
4. Fonseca AP, Extremina C, Fonseca AF, Sousa JC. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol. 2004;53:903-910. doi: 10.1099/jmm.0.45637-0
 5. Lorian V, Atkinson B. Abnormal forms of bacteria produced by antibiotics. Am J Clin Pathol. 1975;64:678-688.
 6. Raponi G, Keller N, Overbeek BP, Rozenberg-Arska M, van Kessel KP, Verhoef J. Enhanced phagocytosis of encapsulated *Escherichia coli* strains after exposure to sub-MICs of antibiotics is correlated to changes of the bacterial cell surface. Antimicrob Agents Chemother. 1990;34:332-336. doi: 10.1128/AAC.34.2.332
 7. Chopra I, Linton A. The antibacterial effects of low concentrations of antibiotics. Adv Microb Physiol. 1986;28:211-259.
 8. Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. J Dent Res. 1992;71:1431-1438. doi: 10.1177/00220345920710071501
 9. Mandel ID. Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. J Clin Periodontol. 1988;15:488-498. doi: 10.1111/j.1600-051X.1988.tb01020.x
 10. Hjeljord LG, Rolla G, Bonesvoll P. Chlorhexidine-protein interactions. J Periodontal Res Suppl. 1973;12:11-16.
 11. Hugo WB, Longworth AR. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. J Pharm Pharmacol. 1964;16:655-662. doi: 10.1111/j.2042-7158.1964.tb07384.x
 12. Freitas LB, Rundegren J, Arnebrant T. The binding of delmopinol and chlorhexidine to *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains with varying degrees of surface hydrophobicity. Oral Microbiol Immunol. 1993;8:355-360. doi: 10.1111/j.1399-302X.1993.tb00611.x
 13. Freitas LB, Vassilakos N, Arnebrant T. Interactions of chlorhexidine with salivary films adsorbed at solid/liquid and air/liquid interfaces. J Periodontal Res. 1993;28:92-97. doi: 10.1111/j.1600-0765.1993.tb01055.x
 14. Gisselsson H, Birkhed D, Bjorn AL. Effect of professional flossing with chlorhexidine gel on approximal caries in 12- to 15-year-old schoolchildren. Caries Res. 1988;22:187-192.
 15. Freitas LB, Vassilakos N, Arnebrant T. Interactions of chlorhexidine with salivary films adsorbed at solid/liquid and air/liquid interfaces. J Periodontal Res. 1993;28:92-97. doi: 10.1111/j.1600-0765.1993.tb01055.x
 16. Hope CK, Wilson M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:1461-1468. doi: 10.1128/AAC.48.5.1461-1468.2004
 17. Meurman JH. Ultrastructure, growth, and adherence of *Streptococcus mutans* after treatment with chlorhexidine and fluoride. Caries Res. 1988;22:283-287.
 18. Dong L, Tong Z, Linghu D, Lin Y, Tao R, Liu J, Tian Y, Ni L. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans* biofilm formation. Int J Antimicrob Agents. 2012;39:390-395. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.01.009.
 19. Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: Oral bacterial adherence. J Bacteriol. 1993;175:3247-3252.
 20. Gibbons RJ, Nygaard M. Interbacterial aggregation of plaque bacteria. Arch Oral Biol. 1970;15:1397-1400.
 21. Ledger RG, Timperley AS, Friswell MK, Macfarlane S, McBain AJ. Coaggregation between and among human intestinal and oral bacteria. FEMS Microbiol Ecol. 2008;66:630-636. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00525.x.
 22. Smith RN, Andersen RN, Kolenbrander PE. Inhibition of intergeneric coaggregation among oral bacteria by cetylpyridinium chloride, chlorhexidine digluconate and octenidine dihydrochloride. J Periodontal Res. 1991;26:422-428. doi: 10.1111/j.1600-0765.1991.tb01732.x
 23. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, M07-A8, vol.29, no.2, 8th ed., CLSI. Wayne, PA, 2009.
 24. Park JH, Lee JK, Um HS, Chang BS, Lee SY. A periodontitis-associated multispecies model of an oral biofilm. J Periodontal Implant Sci. 2014;44:79-84. doi: 10.5051/jpis.2014.44.2.79.
 25. Lee SY, Kim YJ, Kim KK, Choe SJ. Effects of subinhibitory antibiotic concentrations on *Porphyromonas gingivalis* fibrinogen and hemin binding. Intern J Oral Biol. 1999;24:121-127.
 26. Hamada N, Watanabe K, Sasakawa C, Yoshikawa M, Yoshimura F, Umemoto T. Construction and characterization of a fimA mutant of *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun. 1994;62:1696-1704.
 27. Lee SY, Lee SY. Effect of sub-minimal inhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation and coaggregation of streptococci and actinomycetes. Intern J Oral Biol. 2015;40:189-196.
 28. Lee SY. Effects of chlorhexidine digluconate and hydrogen peroxide on *Porphyromonas gingivalis* hemin binding and coaggregation with oral streptococci. J Oral Sci. 2001;43:1-7.
 29. Cisar JO, Kolenbrander PE, McIntire FC. Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeshlundii*. Infect Immun. 1979;24:742-752.
 30. Kara D, Luppens SB, Cate JM. Differences between single- and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula* in growth, acidogenicity and susceptibility to chlorhexidine. Eur J Oral Sci. 2006;114:58-63. doi: 10.1111/j.1600-0722.2006.00262.x
 31. Jones CG. Chlorhexidine: Is it still the gold standard? Periodontol 2000. 1997;15:55-62.
 32. Bonesvoll P, Lokken P, Rolla G, Paus PN. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. Arch Oral Biol. 1974;19:209-212.
 33. Ellepola AN, Samaranyake LP. The effect of limited exposure to Antimycotics on the relative cell-surface hydrophobicity and the adhesion of oral *Candida albicans* to buccal epithelial cells. Arch Oral Biol. 1998;43:879-887.
 34. Gibbons RJ, Etherden I. Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles.

- Infect Immun. 1983;41:1190-1196.
35. Ana C. Okamoto, Elerson Gaetti-Jardim Jr., Victor E. Arana-Chavez, Mario J. Avila-Campos. Influence of subinhibitory concentrations of antimicrobials on hydrophobicity, adherence and ultra-structure of *Fusobacterium nucleatum*. Braz J Microbiol. 2002;33:178-184.
36. Cai S, Simionato MR, Mayer MP, Novo NF, Zelante F. Effects of subinhibitory concentrations of chemical agents on hydrophobicity and in vitro adherence of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. Caries Res. 1994;28:335-341.
37. Kolenbrander, P. E., London, J. Ecological significance of coaggregation among oral bacteria. Adv Microb Ecol. 1992;12:183-217.