



# Well-Plate를 사용한 치과용 유니트 수관 바이오필름 모델 확립

윤혜영 · 이시영<sup>†</sup>

강릉원주대학교 치과대학 구강미생물학교실 및 구강과학연구소

## Establishment of a Dental Unit Biofilm Model Using Well-Plate

Hye Young Yoon and Si Young Lee<sup>†</sup>

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

The water discharged from dental unit waterlines (DUWLs) is heavily contaminated with bacteria. The development of efficient disinfectants is required to maintain good quality DUWL water. The purpose of this study was to establish a DUWL biofilm model using well-plates to confirm the effectiveness of disinfectants in the laboratory. Bacteria were obtained from the water discharged from DUWLs and incubated in R2A liquid medium for 10 days. The bacterial solution cultured for 10 days was made into stock and these stocks were incubated in R2A broth and batch mode for 5 days. Batch-cultured bacterial culture solution and polyurethane tubing sections were incubated in 12-well plates for 4 days. Biofilm accumulation was confirmed through plating on R2A solid medium. In addition, the thickness of the biofilm and the shape and distribution of the constituent bacteria were confirmed using confocal laser microscopy and scanning electron microscopy. The average accumulation of the cultured biofilm over 4 days amounted to  $1.15 \times 10^7$  CFU/cm<sup>2</sup>. The biofilm was widely distributed on the inner surface of the polyurethane tubing and consisted of cocci, short-length rods and medium-length rods. The biofilm thickness ranged from 2  $\mu$ m to 7  $\mu$ m. The DUWL biofilm model produced in this study can be used to develop disinfectants and study DUWL biofilm-forming bacteria.

**Key Words:** Biofilms, Dental infection control, Model, Water microbiology

### 서론

치과용 유니트 수관(dental unit waterline, DUWL)에서 배출되는 물이 세균에 높은 수준으로 오염되어 있다는 것은 많은 연구를 통해 밝혀져 왔다<sup>1-3)</sup>. 현재까지 DUWL에서 배출되는 물 내 세균 수준을 줄이기 위해 다양한 방법이 사용되고 있으며, 이 중 수관에 형성된 바이오필름을 제거하고 감소시키는 방법으로 화학제제를 포함한 소독제의 사용이 언급되고 있다<sup>4)</sup>. 하지만 바이오필름 제거에 가장 좋은 효과를 보인 차아염소산 나트륨(sodium hypochlorite)과 과산화수소(hydrogen peroxide) 등의 사용에서 부작용 또한 함께 발견되면서 계속적인 사용이 제한되어 왔다<sup>5-7)</sup>.

DUWL 바이오필름을 효과적으로 제거할 수 있는 안전한 새로운 소독제를 개발하기 위해서는 실험실에서의 선행연구가 필수적이다. 이와 같은 실험실 연구를 위해서는 바이오필름이 형성된 수관이 필요하지만 이를 임상에서 사용하고 있는 치과용 유니트에서 얻기에는 어려움이 있다. 일부 연구자들은 소독제의 효과를 확인하기 위해 DUWL 바이오필름 모델을 개발해왔다<sup>7-9)</sup>. 하지만 이들의 모델은 특수하거나 자동화된 장비를 사용했기 때문에 실험실에서 재현하는 것이 쉽지 않다. Yoon과 Lee<sup>10)</sup>는 실험실에서 쉽게 구할 수 있는 재료들을 사용하여 DUWL 바이오필름 모델을 제작하였다. 비록 고가의 재료들은 아니지만, 이 재료들로 바이오필름 형성 장비를 제작해야 되는 과정이 필요하다. 따라서

Received: April 26, 2017, Revised: May 17, 2017, Accepted: June 13, 2017

ISSN 1598-4478 (Print) / ISSN 2233-7679 (Online)

<sup>†</sup>Correspondence to: Si Young Lee

Department of Oral Microbiology, College of Dentistry and Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea  
Tel: +82-33-640-2455, Fax: +82-33-642-6410, E-mail: siyoung@gwnu.ac.kr

Copyright © 2017 by Journal of Dental Hygiene Science

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

실험실에서 더 재현이 간단한 DUWL 바이오필름 모델을 확립하기 위한 추가적 연구는 수행되어야 한다.

Well-plate는 실험실에서 바이오필름을 형성시키기 위해 광범위하게 사용되어왔다. Christensen 등<sup>11)</sup>은 well-plate을 사용하여 *Staphylococcus* sp. 바이오필름 모델을 제작하였다. 또한 Walker와 Sedlacek<sup>12)</sup>, Sánchez 등<sup>13)</sup>은 치은 연하 치태의 실험실 모델을 제작하기 위해 well-plate를 사용했다. 두 연구 모두 well-plate 모델이 간단하고 높은 재현성을 가지면서 구강 바이오필름의 군집 과정, 구조와 역학을 연구하기에 적합한 것을 입증하였다. 하지만 현재까지 well-plate를 사용하여 DUWL 바이오필름을 재현한 연구는 없다.

이 연구의 목적은 well-plate를 사용하여 실험실에서 재현이 간단한 DUWL 바이오필름 모델을 개발하고, 모델에서 형성된 바이오필름의 구성 및 특징을 공초점 현미경(confocal laser scanning microscope, CLSM)과 주사전자 현미경(scanning electron microscope, SEM)으로 평가하는 것이다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 세균 수집

치과대학 임상실습을 위해 사용되는 치과용 유니트 4대의 초음파 스케일러와 연결된 수관에서 1 L의 물을 멸균된 유리병에 수집하였다. 수집한 물은 즉시 실험실로 옮겨졌고 0.2 µm 여과지(Millipore, Billerica, MA, USA)에 여과시켰다. 여과지는 20 ml의 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) 용액에 현탁시켰다. 현탁액의 0.5 ml를 R2A 액체배지(Becton; Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 10 ml에 접종했고 25°C에서 10일 동안 배양했다. 10

일 동안 배양 후, 세균 배양액은 1 ml씩 stock으로 제작하였고 -70°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

### 2. 세균 배양(batch culture) 및 바이오필름 형성

세균 stock의 0.5 ml를 R2A 액체배지 10 ml에 접종했고 25°C에서 5일간 회분 배양(batch culture)했다. 바이오필름을 형성하기 위해 내경 2 mm인 폴리우레탄 튜빙(Nitta Moore Corp., Gumi, Korea)을 가로로 1 cm, 그리고 세로로 반으로 잘라 사용하였다. 12-well plate (SPL, Seoul, Korea)의 각 well에 멸균한 폴리우레탄 튜빙 조각과 R2A 액체배지 3 ml를 넣었다(Fig. 1). 그리고 5일 회분 배양한 세균액 0.5 ml를 접종하였다. 그 후 정제된 상태로 25°C 배양기에서 배양시켰다. 배양 2일마다 R2A 액체배지를 2 ml씩 교체 해주었다.

### 3. 바이오필름 분석

#### 1) 바이오필름 축적량

바이오필름 형성 후 70% 에탄올로 폴리우레탄 튜빙 조각의 내면을 제외하고 모든 외면을 닦아주었다. 그 후 폴리우레탄 튜빙 조각을 PBS 용액에 2번 세척하여 느슨하게 부착한 세균을 제거하였고 내면을 멸균한 dental probe로 긁어서 0.09 mm 유리비드를 넣은 PBS 1 ml에 바이오필름을 모은 후 폴리우레탄 튜빙 조각을 PBS 1 ml에 넣고 함께 와류시켰다. 바이오필름을 분리시킨 용액을 10배수로 희석시켜 희석액을 R2A 고체배지(Becton)에 spiral plate (IUL, Barcelona, Spain)를 이용하여 도말하였다. 도말한 R2A 고체배지는 25°C에서 7일 배양하고 세균의 집락을 colony counter (IUL)로 계수한 후 CFU/cm<sup>2</sup>로 계산하였다.

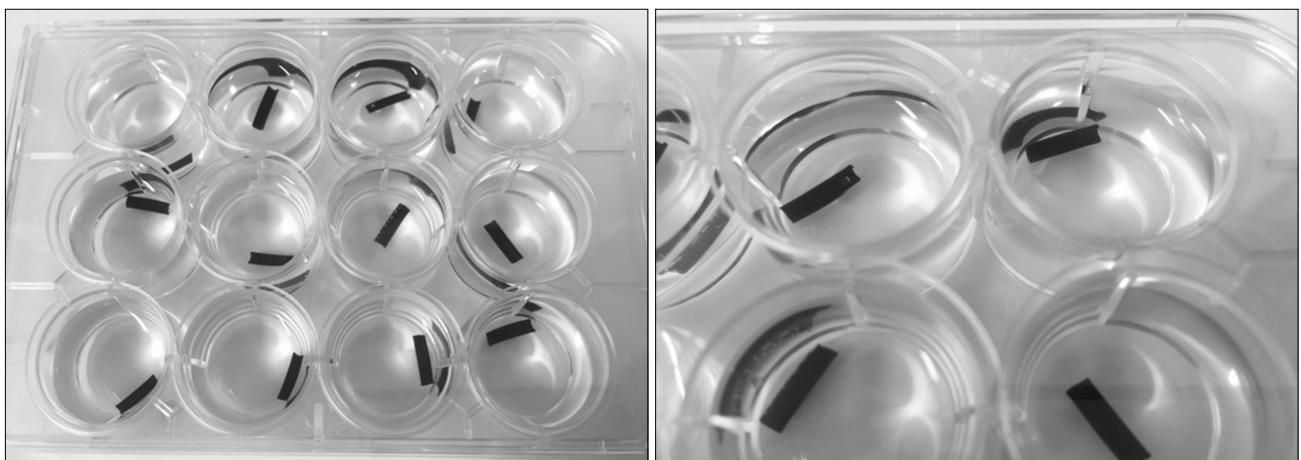


Fig. 1. The dental unit waterline biofilm model using well-plate and polyurethane tubing.

### 2) 주사전자현미경(SEM)

모델에서 형성한 바이오필름 내 구성 세균의 형태를 확인하기 위해 SEM (UHR-SEM; Hitachi, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 폴리우레탄 튜빙 조각은 2.5% glutaraldehyde로 처리하여 1시간 동안 고정시켰다. 고정된 시료를 0.1 M phosphate buffer 용액을 사용하여 10분 동안 2번 씻어낸 후, 연속적으로 높은 농도의 에탄올(30%, 50%, 70%, 90%, 100%)에 처리하여 탈수시켰다. 건조 후, 시료를 stub 위에 고정시켰다. 그리고 금으로 코팅하였고 SEM으로 관찰하였다.

### 3) 공초점 현미경(CLSM)

모델에서 형성한 바이오필름을 구성하는 세균의 분포와 바이오필름 두께를 확인하기 위해 폴리우레탄 튜빙 조각을 LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> bacterial viability kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)로 염색했다. SYTO<sup>®</sup> 9 3 µl와 propidium iodide 3 µl를 멸균증류수 1 ml에 희석하고 폴리우레탄 튜빙 조각당 희석한 시약을 200 µl씩 넣어주고 상온의 어두운 곳에서 20분 동안 반응시켰다. 그 후 멸균증류수로 세척하고 CLSM (IX71 Olympus, Tokyo, Japan)으로 1,000× 배율에서 관찰하였다. SYTO<sup>®</sup> 9로 염색된 살아있는 세균은 여기파장 480 nm, 방출파장 500 nm에서 측정했고, propidium iodide로 염색된 손상된 세균은 여기파장 490 nm, 방출파장 635 nm에서 측정하였다. CLSM 촬영은 1 µm 두께 간격으로 수행되었다.

## 결 과

### 1. 바이오필름 축적량

바이오필름 형성 8일까지 측정된 평균 축적량은 Fig. 2와 같다. 바이오필름 형성 2일에서 6일까지 축적량이 증가했다. 이후의 실험에서는 4일을 바이오필름 형성 기간으로 정하였다. 4일 동안 배양시킨 바이오필름의 평균 축적량은  $1.15 \times 10^7$  CFU/cm<sup>2</sup>였다.

### 2. 바이오필름 구성 세균의 형태와 바이오필름의 두께

SEM 사진에서 구균, 짧은 길이의 간균, 그리고 중간 길이의 간균과 같은 다양한 세균의 형태가 관찰되었다(Fig. 3). 이 중 짧은 길이의 간균이 주로 발견되었다. 세균들은 대부분 튜빙 내면에 넓게 분포하고 있었고 부분적으로 세균 덩어리도 관찰되었다. 일부 세균은 튜빙 내면과 수직으로 서 있는 양상을 확인할 수 있었다(Fig. 3F).

CLSM으로 촬영한 결과, 작은 세균 덩어리들이 튜빙 내면의 곳곳에서 관찰되었다(Fig. 4). 위치별로 차이가 있었지

만 바이오필름 두께는 2 µm ~ 7 µm였다(Fig. 4).

## 고 찰

이 연구에서 우리는 간단한 방법으로 실험실에서 재현이 가능한 DUWL 바이오필름 모델을 개발하고 모델에서 형성된 바이오필름을 평가하는 것을 목표로 하였다. 바이오필름을 형성하기 위해, DUWL의 물에서 배양 가능한 모든 세균과 실제 DUWL인 폴리우레탄 튜빙을 사용했다. 바이오필름 형성 후 2일부터 바이오필름 축적량이 증가하기 시작했으며, 6일에는 최대 축적량을 보였다. 따라서 바이오필름 축적량이 증가한 기간 중 중간 지점에 해당하는 4일이 바이오필름의 축적량과 성숙도 측면에서 가장 적절하다고 판단했기 때문에 4일을 바이오필름 형성 기간으로 정하였다. CLSM과 SEM 분석으로 바이오필름을 평가했을 때 본 연구의 모델에서 4일 형성한 바이오필름이 구균, 짧은 길이의 간균, 그리고 중간 길이의 간균으로 구성되어있는 것을 확인했고, 이 세균 유형은 미국 치과대학 병원 내 DUWL 바이오필름을 구균, 짧은 길이의 간균, 중간 길이의 간균, 그리고 나선균이 구성하고 있다는 것을 보여준 Cobb 등<sup>14)</sup>과 일본 치과대학병원에 DUWL 설치 52일 후 응집된 간균과 적은 양의 중간 길이의 간균의 부착을 확인한 Yabune 등<sup>15)</sup>의 결과와 유사하였다. 또한, 본 연구의 모델에서 4일 배양한 바이오필름의 축적량은  $1.15 \times 10^7$  CFU/cm<sup>2</sup>였으며 다른 저자들이 실제 치과에서 사용하고 있는 DUWL의 평균 바이오필름 축적량을  $9.2 \times 10^2$  CFU/cm<sup>2</sup>와  $4.6 \times 10^3$  CFU/cm<sup>2</sup>라고 보고한 것에 비해 많았다<sup>2,16)</sup>. 바이오필름 축적량은 많았지만, 바이

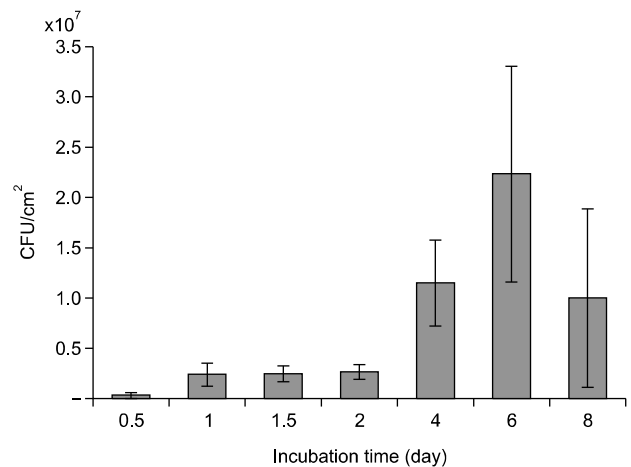
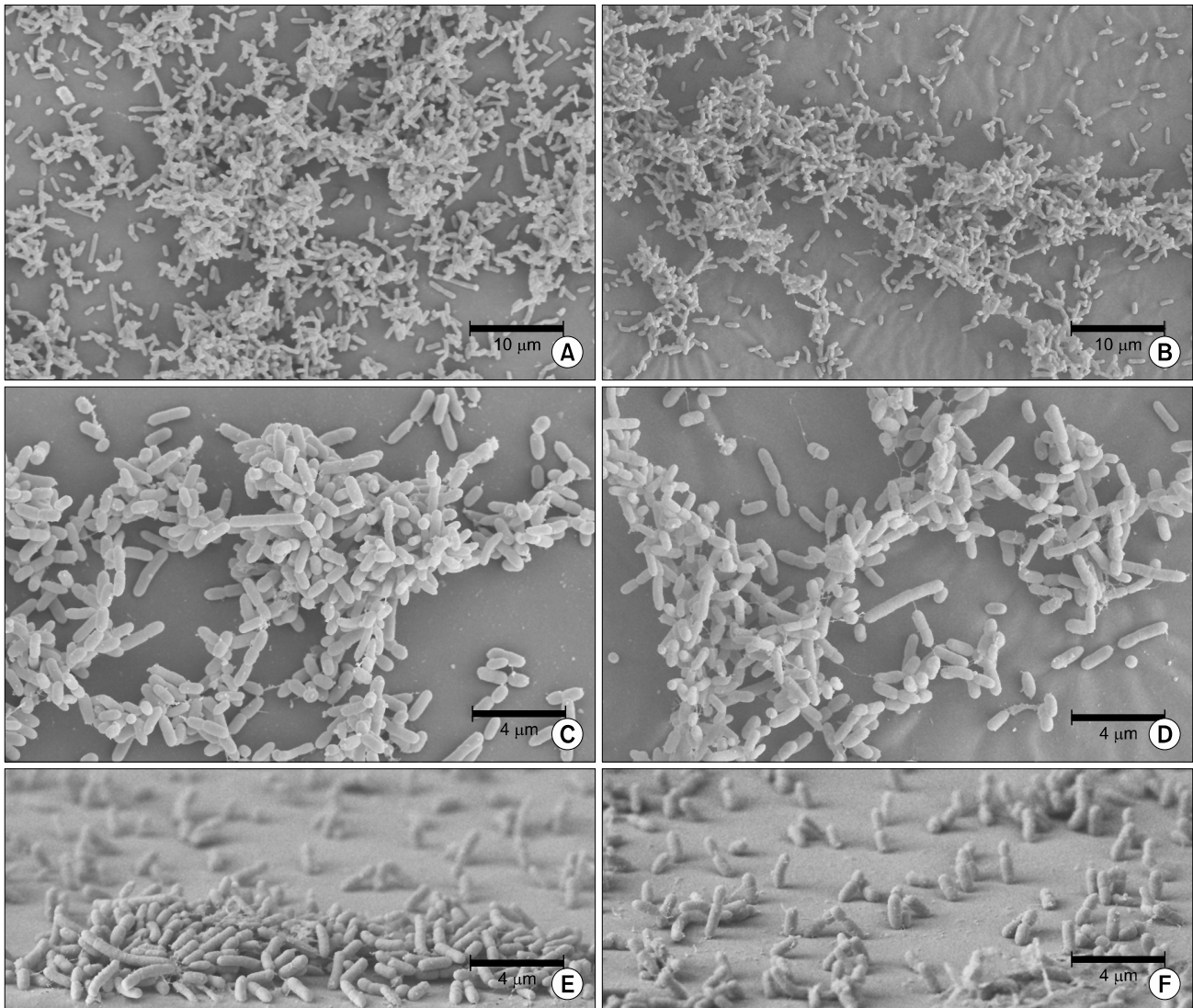
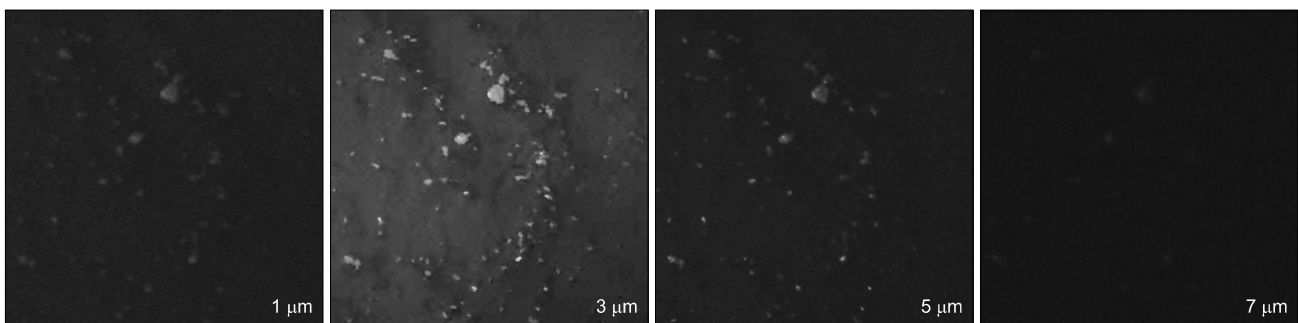


Fig. 2. Time-dependent accumulation of biofilm formed well-plate model. The bar represents the mean for at least two replicates. The error bars indicate standard deviations of the mean.



**Fig. 3.** Scanning electron microscope images of the four day old biofilm at the polyurethane tubing inner surface in well-plate model. (A, B)  $\times 2,000$ , (C~F)  $\times 5,000$ .



**Fig. 4.** Confocal laser scanning microscope images of four day old biofilm at the polyurethane tubing inner surface in well-plate model. From left to right, the images were taken from the bottom layer to the top layer of the biofilm ( $\times 1,000$ ). Live bacteria (fluorescent green) were stained with SYTO<sup>®</sup> 9, while dead bacteria (fluorescent red) were stained by propidium iodide.

오필름의 두께는 최고 7  $\mu\text{m}$ 로 실제 치과에서 사용하고 있는 DUWL 바이오필름의 두께 범위로 보고된 10  $\mu\text{m}$  ~ 50  $\mu\text{m}$ 보다 얇았다<sup>14,17</sup>.

본 연구에서 배양 배지로써 사용된 R2A 배지는 저 영양 배지로 음용수와 같은 낮은 영양 환경에서 성장한 세균을 회복시키는 데 가장 적합한 배지로 보고되고 있다<sup>18</sup>. 또한 DUWL 시료로부터 세균을 배양하기 위한 가장 적합한 방법으로서 여겨지고 있다<sup>19,20</sup>. 치과용 유니트에 공급되는 물은 수도물이나 멸균수이지만 멸균증류수를 배양 배지로 사용한 예비실험에서, 세균의 배양시간과 바이오필름 성장기간이 길어져 모델로 확립시키는 데 어려움이 있었다(data not shown). Walker 등<sup>9</sup>은 멸균증류수에서 배양시킨 세균액을 폴리우레탄 튜빙에 흘려주어 DUWL 바이오필름 모델을 제작했고, 그 결과 약 3주의 긴 바이오필름 형성 기간을 가졌다. Yabune 등<sup>17</sup>은 DUWL 바이오필름 모델을 제작하기 위해 배양 배지로 R2A 배지를 사용하였다. 이들은 폴리우레탄 튜빙을 DUWL 내에서 발견되는 3종의 세균 배양액에 넣고 정제 상태로 최대 4일까지 배양하여 바이오필름을 형성시켰다. 이들의 연구에서 최대 4일까지 배양시킨 바이오필름 내 세균수는  $10^5$  이상이었고, 두께는 최대 5  $\mu\text{m}$ 였다. Yabune 등<sup>17</sup>은 모델에서 4일 동안 배양시킨 바이오필름이 임상에서 6개월 동안 사용한 DUWL의 바이오필름과 유사하다고 언급했다. 본 연구의 모델과 Yabune의 모델에서 볼 수 있듯이, R2A 배지의 사용은 짧은 바이오필름 형성기간 내 많은 바이오필름 축적을 가능하게 한다.

치과용 유니트가 작동될 때 DUWL 내에 물의 흐름이 생기게 된다. 이 물의 흐름은 수관 내면과 강한 부착을 할 수 있는 세균을 선별하고, 초기 부착 세균을 중심으로 후기 부착 세균의 축적이 이루어지게 한다<sup>21</sup>. 이러한 현상 때문에 실제 치과에서 사용하는 DUWL에는 부분적으로 두꺼운 바이오필름의 형성이 이루어질 수 있다. 하지만 본 연구의 모델은 정제된 상태에서 바이오필름이 형성되었기 때문에 두께가 실제 치과의 DUWL 바이오필름 두께보다 얇았던 것으로 생각된다.

최근에 Costa 등<sup>8</sup>은 CDC biofilm reactor를 사용하여 DUWL 내에서 발견되는 3종의 미생물로 DUWL 바이오필름 모델을 제작했다. 반면, 본 연구의 모델은 DUWL 물에서 수집된 모든 세균을 바이오필름 형성을 위해 사용했다. 즉, 세균의 다양성 측면에서 본 연구의 모델이 실제 치과에서 사용하고 있는 DUWL과 더 유사하다고 할 수 있다. 바이오필름 내 세균의 다양성은 세균 사이 상호작용으로 부착 능력에 영향을 줄 수 있으며, 또한 바이오필름의 소독제에 대한 내성에도 영향을 줄 수 있기 때문에 바이오필름 형성 시

중요하다<sup>22</sup>).

DUWL 바이오필름 모델은 치과에서 DUWL 내에 부착한 바이오필름 제거를 위한 효율적인 소독방법의 개발을 위해 필요하다. 우리가 알고 있는 한, well-plate를 이용하여 DUWL 바이오필름을 형성시킨 첫 번째 연구이다. 본 연구의 well-plate 모델은 바이오필름 형성을 위해 DUWL에서 수집된 모든 세균을 사용했으며, 실험실에서 재현이 쉽다는 장점을 가진다. 치과 치료 시 생기는 DUWL 내 물의 흐름은 교반기(shaker)를 사용하여 생기는 배지의 와류로 대체할 수 있으며, 추후 바이오필름 형성 시 교반기를 사용하는 발전된 well-plate 바이오필름 모델의 확립은 필요하다. 본 연구의 DUWL 바이오필름 모델은 새롭게 개발된 DUWL 소독제의 효과 및 다양한 소독 방법의 효과 확인을 위해 사용될 수 있다. 또한, DUWL 바이오필름을 구성하는 세균의 부착 특성 조사를 위해 사용될 수 있을 것으로 예상된다.

## 요 약

DUWL에 형성한 바이오필름을 효율적으로 제거할 수 있는 새로운 소독제는 개발되어야 하며, 실험실에서 소독제의 효과를 확인하기 위해 DUWL 바이오필름 시료는 필요하다. 이 연구의 목적은 well plate를 사용하여 간단하고 재현 가능한 DUWL 바이오필름 모델을 개발하는 것이다. 사용 중인 4대의 DUWL에서 배출된 1 L의 물을 여과지에 여과시켜 세균을 얻었다. 여과지를 PBS (pH 7.4) 용액 20 ml에 현탁시킨 후, 현탁액을 R2A 액체배지에 접종하고 25°C에서 10일 동안 배양하였다. 10일 배양한 세균 배양액을 -70°C에 보관하였고 매 실험에 사용하였다. 세균배양액을 R2A 배지에서 5일 동안 회분 배양하였다. 12-well plate에 회분 배양한 세균 배양액과 멸균한 폴리우레탄 튜빙 조각을 넣고 정제된 상태로 25°C에서 바이오필름을 형성시켰다. R2A 액체배지는 2일마다 2 ml씩 교체해주었다. 폴리우레탄 내 형성된 바이오필름의 축적량을 확인하기 위해 폴리우레탄 튜빙 조각을 내면에서 수집한 바이오필름을 R2A 고체배지에 도말하였다. 도말한 R2A 고체배지는 25°C에서 7일 배양하고 CFU/cm<sup>2</sup>를 계산하였다. 그리고 바이오필름의 두께와 구성 세균의 형태 및 분포를 확인하기 위해 CLSM과 SEM을 사용하였다. 4일 동안 배양시킨 바이오필름의 평균 축적량은  $1.15 \times 10^7$  CFU/cm<sup>2</sup>였다. 바이오필름은 구균, 짧은 길이의 간균, 그리고 중간길이의 간균을 포함하고 있었고 폴리우레탄 튜빙 내면에 넓게 분포하고 있었다. 바이오필름 두께는 위치에 따라 차이가 있지만 2  $\mu\text{m}$  ~ 7  $\mu\text{m}$ 였다. 이 연구에서 제작된 DUWL 바이오필름 model은 DUWL에서 수

집된 모든 세균을 사용하여 세균의 다양성을 확보했고 또한 실험실에서 쉽게 구할 수 있는 well-plate를 사용했기 때문에 비용 효율적이고 재현이 간단하다. 본 연구의 DUWL 바이오필름 모델은 새로운 소독방법의 개발하는 데 유용하게 사용될 수 있다.

## 감사의 글

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

## References

1. Barbeau J, Tanguay R, Faucher E, et al.: Multiparametric analysis of waterline contamination in dental units. *Appl Environ Microbiol* 62: 3954-3959, 1996.
2. Walker JT, Bradshaw DJ, Bennett AM, Fulford MR, Martin MV, Marsh PD: Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. *Appl Environ Microbiol* 66: 3363-3367, 2000.
3. Yoon HY, Lee SY: Bacterial contamination of dental unit water systems in a student clinical simulation laboratory of college of dentistry. *J Dent Hyg Sci* 15: 232-237, 2015.
4. 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.
5. Schel AJ, Marsh PD, Bradshaw DJ, et al.: Comparison of the efficacies of disinfectants to control microbial contamination in dental unit water systems in general dental practices across the European Union. *Appl Environ Microbiol* 72: 1380-1387, 2006.
6. Karpay RI, Plamondon TJ, Mills SE, Dove SB: Combining periodic and continuous sodium hypochlorite treatment to control biofilms in dental unit water systems. *J Am Dent Assoc* 130: 957-965, 1999.
7. Lin SM, Svoboda KK, Giletto A, Seibert J, Puttaiah R: Effects of hydrogen peroxide on dental unit biofilms and treatment water contamination. *Eur J Dent* 5: 47-59, 2011.
8. Costa D, Girardot M, Bertaux J, Verdon J, Imbert C: Efficacy of dental unit waterlines disinfectants on a polymicrobial biofilm. *Water Res* 91: 38-44, 2016.
9. 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.
10. Yoon HY, Lee SY: Developing a dental unit waterline model using general laboratory equipments. *J Dent Hyg Sci* 16: 284-292, 2016.
11. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al.: Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 22: 996-1006, 1985.
12. Walker C, Sedlacek MJ: An in vitro biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 22: 152-161, 2007.
13. Sánchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, León R, Herrera D, Sanz M: Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodontol Res* 46: 252-260, 2011.
14. 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.
15. Yabune T, Imazato S, Ebisu S: Inhibitory effect of PVDF tubes on biofilm formation in dental unit waterlines. *Dent Mater* 21: 780-786, 2005.
16. Uzel A, Cogulu D, Oncag O: Microbiological evaluation and antibiotic susceptibility of dental unit water systems in general dental practice. *Int J Dent Hyg* 6: 43-47, 2008.
17. 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.
18. Reasoner DJ: Heterotrophic plate count methodology in the United States. *Int J Food Microbiol* 92: 307-315, 2004.
19. Bartoloni JA, Porteous NB, Zarzabal LA: Measuring the validity of two in-office water test kits. *J Am Dent Assoc* 137: 363-371, 2006.
20. Porteous N, Sun Y, Dang S, Schoolfield J: A comparison of 2 laboratory methods to test dental unit waterline water quality. *Diagn Microbiol Infect Dis* 77: 206-208, 2013.
21. Walker JT, Marsh PD: Microbial biofilm formation in DUWS and their control using disinfectants. *J Dent* 35:

- 721-730, 2007.
22. 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.