Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), julio-agosto 2024,
Volumen 8, Número 4.

https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i4

BACTERIAS PRODUCTORAS DE BIOPELICULAS AISLADAS DE LESIONES CARIOSAS EN PACIENTES QUE ASISTEN A CONSULTA ODONTOLÓGICA EN UN HOSPITAL AL SUR DE MÉXICO

BIOFILM PRODUCING BACTERIA ISOLATED FROM CARIOUS LESIONS IN PATIENTS ATTENDING TO DENTAL CONSULTATION IN A HOSPITAL IN SOUTHERN MEXICO

Arturo Ramírez Peralta
Universidad Autónoma de Guerrero, México

Francisco Eulises Morales Gonzalez
Universidad Autónoma de Guerrero, México

Gloria Gonzales Herrera
Hospital General del ISSSTE, México

Elvia Rodríguez Bataz
Universidad Autónoma de Guerrero, México

Roberto Adame Gómez
Universidad Autónoma de Guerrero, México

María Cristina Santiago Dionisio
Universidad Autónoma de Guerrero, México

DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i4.13330

Bacterias Productoras de Biopeliculas Aisladas de Lesiones Cariosas en Pacientes que Asisten a Consulta Odontológica en un Hospital al Sur de México

Arturo Ramírez Peralta [1]
ramirezperaltauagro@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-7037-6412
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Laboratorio de investigación en patometabolismo microbiano
Universidad Autonoma de Guerrero
México

Francisco Eulises Morales Gonzalez
Frank.eu.lml@gmail.com
https://orcid.org/0000-0001-5727-2339
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Laboratorio de investigación en analisis microbiológicos
Universidad Autonoma de Guerrero
México

Gloria Gonzales Herrera
azaglez@hotmail.com
Hospital General del ISSSTE, clinica dental
México

Elvia Rodríguez Bataz
elviarb@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-3143-3768
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Laboratorio de investigación en parasitología
Universidad Autonoma de Guerrero
México

Roberto Adame Gómez
robert94a24@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-1375-2485
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Laboratorio de investigación en patometabolismo microbiano
Universidad Autonoma de Guerrero
México

María Cristina Santiago Dionisio
cristinasantiago81@hotmail.com
https://orcid.org/0000-0001-5187-665X
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Laboratorio de investigación en analisis microbiológicos
Universidad Autonoma de Guerrero
México

RESUMEN

El proceso carioso inicia con un cambio de microorganismos en la biopelícula supragingival, formándose una biopelícula polimicrobiana en la superficie del diente, siendo de importancia la búsqueda de bacterias con potencial cariogenico capaz de producir biopelícula. El objetivo fue aislar bacterias Gram positivas de lesiones cariosas y determinar la producción de biopeliculas por estos microorganismos. Los pacientes fueron sensibilizados, se firmó un consentimiento informado, el grado de las lesiones cariosas fue determinado de acuerdo con Mount y Hume. La muestra fue tomada por la técnica de aislamiento absoluto. Estas fueron sembradas en agar sangre con CO_2 a 37°C durante 24 h. Para la identificación bacteriana fueron utilizadas pruebas bioquímicas y la producción de biopelícula fue determinada por tinción de cristal violeta. La lesión cariosa más prevalente fue de tipo II (35/80), seguido del tipo III (32/80) y por último el tipo I (13/80). El género bacteriano más frecuente fue *Streptococcus*, siendo la especie bacteriana más frecuente *S. mitis* en grado de caries I y III, mientras *S. oralis* en tipo II. Solo las cepas del género *Streptococcus* fueron capaces de producir biopelícula, donde el 90% y 83.7% de cepas de *S. mitis* y *S. oralis* respectivamente fueron productoras de biopeliculas.

Palabras clave: caries dental, biopelícula, streptococcus

[1] Autor principal.
Correspondencia: cristinasantiago81@hotmail.com

Biofilm-Producing Bacteria Isolated from Carious Lesions in Patients Attending to Dental Consultation in a Hospital in Southern Mexico

ABSTRACT

The carious process starts with a change of microorganisms in the supragingival biofilm, forming a polymicrobial biofilm on the tooth's surface and finally resulting in the aggregation of several bacterial species. The aim was to isolate Gram-positive bacteria from carious lesions and determine the production of biofilms by these microorganisms. The patients were sensitized and an informed consent was signed, subsequently the grade of carious lesions was determined according to Mount and Hume. The sample was taken by the absolute isolation technique. These were grew on blood agar under CO_2 tension at 37 ° C for 24 h. Biochemical tests were used for bacterial identification and biofilm production was determined by crystal violet staining. The most prevalent carious lesion was type II (35/80), followed by type III (32/80) and finally type I (13/80). The most frequent bacterial genus was *Streptococcus*, the most frequent bacterial species being *S. mitis* in caries grade I and III, while *S. oralis* in type II. Only the strains of the genus *Streptococcus* could produce biofilm and 90% and 83.7% of *S. mitis* and *S. oralis* strains respectively were biofilm producers.

***Keywords*:** dental cays, biofilm, streptococcus

Artículo recibido 10 julio 2024
Aceptado para publicación: 15 agosto 2024

INTRODUCCIÓN

La microbiota oral se considera uno de los mas complejos microbiomas en el cuerpo (Dewhirst et al., 2010); el cual comprende una gran cantidad de microorganismos que cohabitan en la placa dental incluyendo mas de 700 filotipos de los cuales aproximadamente la mitad pueden estar presentes en cualquier individuo en cualquier tiempo (He & Shi, 2009; Kuramitsu et al., 2007; Palmer Jr, 2014). En pacientes sanos, la microbiota oral tiene una relación simbiótica con el huésped pero durante la enfermedad como la caries dental, el balance es alterado y la relación disbiotica aparece (David et al., 2014; P. D. Marsh, 2003). La disbiosis es esencial para la proliferación o un aumento en el crecimiento de microorganismos cariogénicos como *Streptococcus* del grupo mutans, que metabolizan los azucares de la dieta, generando un econicho con el pH acido, desmineralización de la estructura del diente y caries dental (Fejerskov et al., 2015). La caries dental, es una de las enfermedades mas prevalentes mundialmente (P. E. Petersen et al., 2005; Struzycka, 2014). La prevalencia de la caries dental, higiene oral, uso de fluoruro, hábitos alimenticios y acceso a la atención dental difiere entre las diferentes partes del mundo (www.who.int). La prevalencia de caries en infancia temprana de 1 a 6 años en China fue de 0.3, 17.3, 40.2, 54.4, 66.1 y 70.7% respectivamente, indicando que la prevalencia de la caries en edad temprana incrementa con la edad. Así mismo, la prevalencia de la caries dental en niños jóvenes esta entre los 28 y 38% (Douglass et al., 2001; Rosenblatt & Zarzar, 2004; Seow et al., 1999; Vachirarojpisan et al., 2004).

Enfermedades orales como la caries inician con el crecimiento de la placa dental, una biopelicula formada por la acumulación de bacterias con las glicoproteínas de la saliva y polisacáridos secretados por los microorganismos (Philip D Marsh, 2006). El proceso carioso inicia con un cambio de microorganismos en la biopelícula supragingival, formándose una biopelícula polimicrobiana en la superficie del diente y finalmente resultando en la agregación de varias especies bacterianas de una manera organizada (Philip D Marsh, 2006). Las especies bacterianas individuales han sido asociadas con caries dental en diversos estudios, incluyendo *Streptococcus mutants*, *Streptococcus* no- mutants aciduricos, *Lactobacillus*, actinomicetos, Veillonella, *Bifidobacterium* y *Scardovia* (Mantzourani et al., 2009; Ruoff, 1991; Takahashi & Nyvad, 2011; Tanner et al., 2011; Xu et al., 2014).

Un numero importante de estudios ha evaluado la complejidad de la cavidad oral en caries dental, pero los resultados difieren entre los estudios, sugiriendo que la composición de la microbiota asociada a caries no esta completamente definida (Crielaard et al., 2011; Kanasi et al., 2010; Ma et al., 2015). Basado en la hipótesis de la placa dental bacteriana, mas y mas investigaciones se han realizado en relación a los microorganismos cariogénicos y sus relaciones ecológicas dentro de la biopelicula, incluyendo diversidad de especies microbianas, diversidad genética y diversidad funcional (Tao et al., 2018). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue aislar bacterias Gram positivas de lesiones cariosas y determinar la producción de biopeliculas por estos microorganismos

METODOLOGÍA

Población de estudio

Es un estudio transversal, en el cual se eligieron a pacientes que presentaron lesiones cariosas, que acudieron al servicio que brinda la clínica del ISSSTE en Chilpancingo de los bravo, Guerrero; una vez firmado el consentimiento informado por el paciente o tutor y la aplicación de una encuesta se procedió a la toma de muestra de las lesiones cariosas. La clasificación de las lesiones cariosas se determinó de acuerdo a Mount y Hume (Mount et al., 2016)

Toma de muestra

Para la toma de muestras se usó la técnica de aislamiento absoluto (para el control de la saliva y bloqueo del líquido cervicular gingival) para poder garantizar un medio libre de humedad, así como mejorar la visibilidad y acceso del área a tratar, posteriormente se tomó la muestra con una cucharilla de caries, una vez obtenida la muestra se depositó en un tubo estéril con medio Stuart, las muestras fueron transportadas en condiciones de esterilidad al Laboratorio de Análisis Microbiológicos de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, de la Universidad Autónoma de Guerrero, para su procesamiento.

Procesamiento de las muestras

Las muestras fueron sembradas mediante estría cruzada en el medio de Agar Sangre en tensión de CO2 al 5%, incubándose de 24 a 48 horas a 37°C. Posteriormente se realizó la identificación microbiana a partir de pruebas bioquímicas.

Producción de biopeliculas

La biopelícula fue determinada en tubos de vidrio y fueron generadas en caldo BHI y este fue suplementado con glucosa en una concentración final del 2%. El caldo BHI fue inoculado con el 1% de volumen de un cultivo de 24 horas. Los tubos fueron incubados a 30˚C por 48 horas en condiciones estáticas. La cuantificación de biopelícula se determinó por el ensayo de cristal violeta. En corto, después de la incubación, el cultivo microbiano fue retirado y los tubos fueron cuidadosamente lavados en buffer de fosfatos salinos (PBS) (Life Technologies, USA). La biopelícula adherida fue teñida con una solución de cristal violeta al 0,1% (Difco, USA) por 30 minutos. Después, los tubos de vidrio fueron lavados de nuevo tres veces con PBS e inmersos con etanol al 70% por 30 minutos para liberar el cristal violeta unido a la biopelícula. El cristal violeta solubilizado fue cuantificado por medición de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Basado en la hipótesis de la placa dental bacteriana descrita desde 1994 (P.D. Marsh, 1994), mas y mas investigaciones se han realizado en relación a los microorganismos cariogénicos y sus relaciones ecológicas dentro de la biopelícula, incluyendo diversidad de especies microbianas, diversidad genética y diversidad funcional (Tao et al., 2018), es por eso que el objetivo de este estudio fue determinar las especies microbianas Gram positivas cultivables a partir de lesiones cariosas de pacientes de distintas edades y grados de lesión así como la producción de biopelículas por estas cepas.

De los 80 pacientes analizados, con respecto a la edad y el grado de lesión cariosa se observó que 32 pertenecen a niños, seguido por los adultos mayores con 27 casos, adolescentes con 11 casos y por último los jóvenes adultos con 10 casos.

De acuerdo con la clasificación de Mount y Hume, el grado de lesión cariosa más prevalente fue de tipo 2 (35/80), seguido del grado de caries tipo III (32/80) y por último el grado de caries tipo I (13/80). El grado de caries tipo I fue más frecuente en niños (53.9%), de tipo II en adultos (45.7%) y tipo III en niños (50%) como se observa en la tabla 1.

Este estudio se realizó con un muestreo de inclusión continua de pacientes con lesiones cariosas que asistieran a consulta dental de un hospital público del sur de México, en el cual, la mayor cantidad de pacientes fueron niños (32/80), en este sentido, se han descrito que la caries en infancia temprana es

uno de las enfermedades crónicas mas comunes en niños en edad preescolar y es cinco veces mas común que el asma, quien ocupa el segundo lugar (Benjamin, 2010), lo cual también remarca la importancia de la implementación de estrategias de prevención temprana y la intervención en un estado inicial de la caries de edad temprana, así como los efectos adversos los cuales afectan a los niños física y psicológicamente e incrementa el gasto económico en familias y sociedades (American Academy of pediatric dentistry, 2016).

La clasificación de Mont y Hume permite identificar lesiones cariosas basadas en el sitio y el tamaño de la lesión, además de ser un sistema de clasificación sencillo y que permite la clasificación entre dentistas como la homogeneización de conocimiento relacionado a caries, además de tener una perspectiva mas amplia en cuanto las estrategias de restauración del diente (Mount et al., 2016); el grado de lesión tipo I fue mas común en niños, lo que remarca la búsqueda de estrategias de manejo para evitar el desarrollo a lesiones de tipo II y III, las segundas que fueron mas comunes en población adulta y remarcar la presencia de las ultimas en población infantil.

Del total de muestras analizadas se aislaron 161 cepas, de las cuales fueron aisladas con mayor frecuencia cepas del género *Streptococcus* 44.7 %(72/161) , seguido por *Staphylococcus* 26.1% (42/ 161), *Enterococcus* 14.9% (24/ 161), *Micrococcus* 6.8% (11 / 161), *Bacillus 3.7%* (6/161) y *Rothia* 3.7% (6/161). En cuanto a la identificación de especie, se aisló con mayor frecuencia cepas de *Streptococcus mitis* (37), seguido de *Streptococcus oralis* (30), *Streptococcus downei* (5), *Staphylococcus aureus* (10), *Staphylococcus* coagulasa negativa (32), *Enterococcus faecalis* (24), *Micrococcus* spp. (11), *Bacillus spp*. (6) y *Rothia dentocariosa* (6). En cuanto al grado de lesión con las cepas aisladas, en los tres tipos de lesión se aisló con mayor frecuencia cepas del genero *Streptococcus* (tipo I, 42.3%; tipo II, 44.1% y tipo III, 46.3%), siendo *S. mitis* el aislado con mayor frecuencia en las lesiones de tipo I (42.3%) y III (46.3%) y *S. oralis* en lesiones de tipo II (23.5%) como se muestra en la tabla 2.

En cuanto a bacterias aisladas, el género que se aisló con mayor frecuencia fue Streptococcus, en este sentido, existe una cantidad importante de estudios que relacionan a *Streptococcus mutans* con la caries dental (Aas et al., 2005, 2008; Klein et al., 2015).

Esto es ampliamente aceptado debido a la cariogenicidad de *Streptococcus mutans* por el potencial acidurico y acidogénico que presenta (F. C. Petersen et al., 2002). Sin embargo, en este estudio, las especies fueron diferentes a *S. mutans* (*S. mitis, S. oralis*); en este punto, se ha descrito la importancia de *Streptococcus no mutans* aciduricos en el desarrollo de la caries dental (Facklam, 2002; Kreth et al., 2009; Wang & Kuramitsu, 2005) así como de otros patógenos como *Actinomyces, Lactobacillus, Veillonella* y *Bifidobacterium sp* (Xu et al., 2014). Recientemente, se ha encontrado que la microbiota oral es diferentes en varias regiones geográficas (Nasidze et al., 2011) así como etnias (Mason et al., 2013), lo cual podría justificar las diferencias en cuanto a los microorganismos aislados.

En cuanto a la producción de biopelícula, solo cepas del género *Streptococcus* fueron capaces de producirla; y solo las especies de *S. mitis* (90%) y *S. oralis* (83.7%) (Figura 1)

La placa dental bacteriana está compuesta por una comunidad microbiana compleja que se desarrolla en una biopelícula (P. D. Marsh, 2005); el crecimiento de determinados microorganismos como *Streptococcus* en la misma o de factores dietéticos que favorezcan la producción de acidez por estos microorganismos generarán una constante disminución de pH que dará como resultado con múltiples eventos al desarrollo de caries (Philip D. Marsh, 2010), por lo tanto, es importante valorar la producción de biopelículas en cepas aisladas de lesiones cariosas, en este sentido, solo las cepas del genero *Streptococcus* aisladas en este estudio fueron capaces de producir biopelícula, lo cual aunado a su poder acidurico podrían explicar su presencia en las lesiones cariosas o su participación en el desarrollo de las mismas.

Además de los microorganismos cariogénicos clásicos, se ha descrito que levaduras como *Candida albicans* son capaces de producir biopelícula en la superficie dentaria y que además se ha descrito su participación en el desarrollo de caries oclusales en un modelo de ratas (Klinke et al., 2011) o incluso la formación de biopelículas mixtas entre esta levadura y *S. mutans* (Zijnge et al., 2010), por lo cual no solo es importante la búsqueda de especies de *Streptococcus* sino de otros microorganismos así como de valorar la producción de biopelícula en los mismos.

ILUSTRACIONES, TABLAS, FIGURAS.

Tabla 1. Grado de lesión cariosa de acuerdo con la edad.

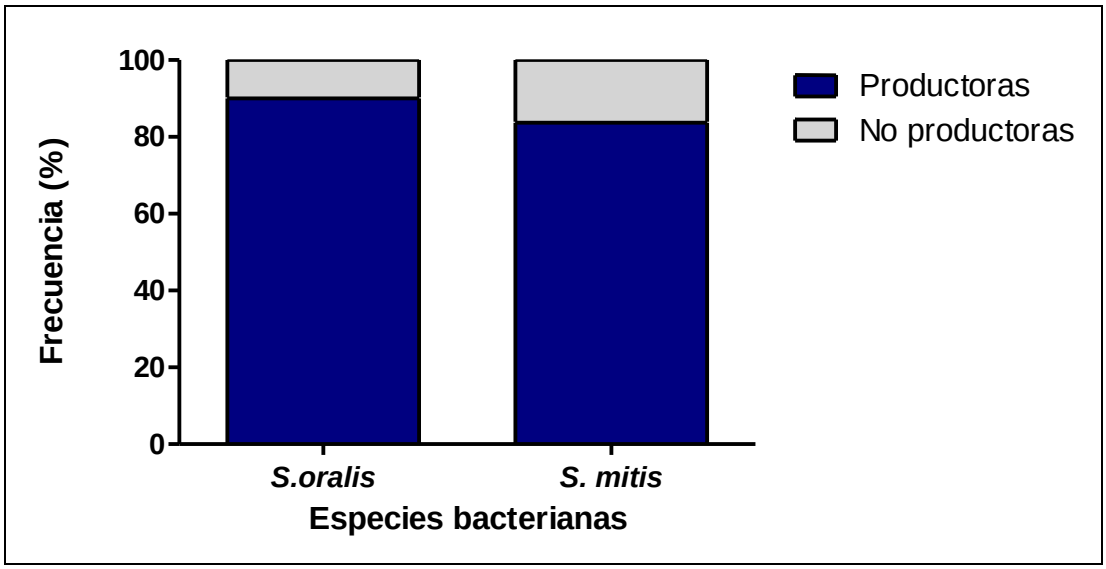
Edad (años)	Grado de lesión cariosa n= 80		
	I n= 13, n(%)	II n= 35, n(%)	III n= 32, n(%)
Niños (5- 11)	7 (53.9)	9 (25.7)	16 (50)
Adolescentes (12- 18)	4 (30.7)	5 (14.3)	2 (6.3)
Adultos jóvenes (19- 34)	1 (7.7)	5(14.3)	4 (12.5)
Adultos (35)	1 (7.7)	16 (45.7)	10 (31.2)

Tabla 2. Frecuencia de géneros y especies bacterianos aislados de lesiones cariosas.

Géneros/ especies	Cepas aisladas de acuerdo a grado de lesion cariosas N=161		
	I N= 26 (%)	II N= 68 (%)	III N= 67 (%)
Streptococcus	11 (42.3)	30 (44.1)	31 (46.3)
S. mitis	7 (26.9)	12 (17.7)	18 (26.9)
S. oralis	4 (14.4)	16 (23.5)	10 (14.9)
S. downei	-	2 (2.9)	3 (4.5)
Staphylococcus	9 (34.6)	17 (25)	16 (23.9)
S. aureus	2 (7.7)	6 (8.8)	2 (3)
SCN*	7 (26.9)	11 (16.2)	14 (20.9)
Enterococcus	4 (15.5)	11 (16.2)	9 (13.4)
E. faecalis	4 (15.5)	11 (16.2)	9 (13.4)
Micrococcus	1 (3.8)	4 (5.9)	6 (9)
Bacillus	-	4 (5.9)	2 (3)
Rothia	1 (3.8)	2 (2.9)	3 (4.4)
R. dentocariosa	1 (3.8)	2 (2.9)	3 (4.4)

*= *Staphylococcus* coagulasa negativo

Figura 1. Frecuencia de cepas productoras y no productoras de biopelicula de *S. oralis* y *S. mitis* aisladas de lesiones cariosas.



CONCLUSIONES

La caries dental es un problema prevalente a nivel mundial con diferente frecuencia en la población, por lo cual el estudio fisiopatogénico de la misma es de importancia. Comprender la evolución de este problema permite establecer medidas de prevención, así como de control. En el estudio de esta patología, la disbiosis oral juega un papel importante y causal en el desarrollo de la enfermedad. En este último punto, se ha investigado el papel de la microbiota, estudios tanto de la microbiota cultivable y no cultivable han permitido establecer teorías que aportan información de los microorganismos cariogénicos y productores de biopelículas en el establecimiento del proceso carioso. En este estudio, se identificó que el grado de lesión cariosa es diferente con respecto a la edad al igual que el tipo de microorganismo cultivable encontrado en dichas lesiones. Destacando la presencia de *Streptococcus* en todos los grados de lesión, siendo las especies *S. mitis* y *S. oralis* las más prevalentes. Además, se determinó la producción de biopelícula por la mayoría de las cepas de *Streptococcus* encontradas. Aun cuando el estudio tiene limitaciones en el sistema de aislamiento bacteriano, debido a que solo se recupera los microorganismos no exigentes cultivables, destaca dos puntos importantes: la presencia de *Streptococcus no mutans* como microorganismos comunes en lesiones cariosas de diferente tipo, así como la producción de biopelícula por los mismos, lo cual explicaría parte de la formación de caries en la población estudiada. Lo cual en ultima instancia, podría ampliar el panorama en el entendimiento y manejo de la caries dental en esta población.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aas, J. A., Griffen, A. L., Dardis, S. R., Lee, A. M., Olsen, I., Dewhirst, F. E., Leys, E. J., & Paster, B. J. (2008). Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(4), 1407–1417. https://doi.org/10.1128/JCM.01410-07

Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(11), 5721–5732. https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005

American Academy of pediatric dentistry, Aa. (2016). Policy on Early Childhood Caries (ECC): Classifications, Consequences, and Preventive Strategies. *Pediatric Dentistry*, *38*(6), 52–54.

Benjamin, R. M. (2010). Oral Health: The Silent Epidemic. *Public Health Reports*, *125*(2), 158–159. https://doi.org/10.1177/003335491012500202

Crielaard, W., Zaura, E., Schuller, A. A., Huse, S. M., Montijn, R. C., & Keijser, B. J. (2011). Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. *BMC Medical Genomics*, *4*(1), 22. https://doi.org/10.1186/1755-8794-4-22

David, L. A., Materna, A. C., Friedman, J., Campos-Baptista, M. I., Blackburn, M. C., Perrotta, A., Erdman, S. E., & Alm, E. J. (2014). Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biology*, *15*(7), R89. https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-7-r89

Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C. R., Yu, W.-H., Lakshmanan, A., & Wade, W. G. (2010). The Human Oral Microbiome. *Journal of Bacteriology*, *192*(19), 5002–5017. https://doi.org/10.1128/JB.00542-10

Douglass, J. M., Tinanoff, N., Tang, J. M., & Altman, D. S. (2001). Dental caries patterns and oral health behaviors in Arizona infants and toddlers. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, *29*(1), 14–22.

Facklam, R. (2002). What happened to the streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews*, *15*(4), 613–630. https://doi.org/10.1128/cmr.15.4.613-630.2002

Fejerskov, O., Nyvad, B., & Kidd, E. A. M. (Eds.). (2015). *Dental caries: The disease and its clinical management* (Third edition). John Wiley & Sons Inc.

He, X., & Shi, W. (2009). Oral Microbiology: Past, Present and Future. *International Journal of Oral Science*, *1*(2), 47–58. https://doi.org/10.4248/ijos.09029

Kanasi, E., Dewhirst, F. E., Chalmers, N. I., Kent, Jr., R., Moore, A., Hughes, C. V., Pradhan, N., Loo, C. Y., & Tanner, A. C. R. (2010). Clonal Analysis of the Microbiota of Severe Early Childhood Caries. *Caries Research*, *44*(5), 485–497. https://doi.org/10.1159/000320158

Klein, M. I., Hwang, G., Santos, P. H. S., Campanella, O. H., & Koo, H. (2015). Streptococcus mutans-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *5*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00010

Klinke, T., Guggenheim, B., Klimm, W., & Thurnheer, T. (2011). Dental caries in rats associated with Candida albicans. *Caries Research*, *45*(2), 100–106. https://doi.org/10.1159/000324809

Kreth, J., Merritt, J., & Qi, F. (2009). Bacterial and host interactions of oral streptococci. *DNA and Cell Biology*, *28*(8), 397–403. https://doi.org/10.1089/dna.2009.0868

Kuramitsu, H. K., He, X., Lux, R., Anderson, M. H., & Shi, W. (2007). Interspecies Interactions within Oral Microbial Communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *71*(4), 653–670. https://doi.org/10.1128/MMBR.00024-07

Ma, C., Chen, F., Zhang, Y., Sun, X., Tong, P., Si, Y., & Zheng, S. (2015). Comparison of Oral Microbial Profiles between Children with Severe Early Childhood Caries and Caries-Free Children Using the Human Oral Microbe Identification Microarray. *PLOS ONE*, *10*(3), e0122075. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122075

Mantzourani, M., Gilbert, S. C., Sulong, H. N. H., Sheehy, E. C., Tank, S., Fenlon, M., & Beighton, D. (2009). The Isolation of Bifidobacteria from Occlusal Carious Lesions in Children and Adults. *Caries Research*, *43*(4), 308–313. https://doi.org/10.1159/000222659

Marsh, P. D. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*, *149*(2), 279–294. https://doi.org/10.1099/mic.0.26082-0

Marsh, P. D. (2005). Dental plaque: Biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of Clinical Periodontology*, *32 Suppl 6*, 7–15. https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00790.x

Marsh, P.D. (1994). Microbial Ecology of Dental Plaque and its Significance in Health and Disease. *Advances in Dental Research*, *8*(2), 263–271. https://doi.org/10.1177/08959374940080022001

Marsh, Philip D. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health*, *6*(S1), S14. https://doi.org/10.1186/1472-6831-6-S1-S14

Marsh, Philip D. (2010). Microbiology of Dental Plaque Biofilms and Their Role in Oral Health and Caries. *Dental Clinics of North America*, *54*(3), 441–454. https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.03.002

Mason, M. R., Nagaraja, H. N., Camerlengo, T., Joshi, V., & Kumar, P. S. (2013). Deep Sequencing Identifies Ethnicity-Specific Bacterial Signatures in the Oral Microbiome. *PLoS ONE*, *8*(10), e77287. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077287

Mount, G. J., Hume, W. R., Ngo, H., & Wolff, M. S. (Eds.). (2016). *Preservation and restoration of tooth structure* (Third edition). Wiley Blackwell.

Nasidze, I., Li, J., Schroeder, R., Creasey, J. L., Li, M., & Stoneking, M. (2011). High Diversity of the Saliva Microbiome in Batwa Pygmies. *PLoS ONE*, *6*(8), e23352. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023352

Palmer Jr, R. J. (2014). Composition and development of oral bacterial communities: Oral bacterial communities. *Periodontology 2000*, *64*(1), 20–39. https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00453.x

Petersen, F. C., Assev, S., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., & Scheie, A. A. (2002). Functional Variation of the Antigen I/II Surface Protein in Streptococcus mutans and Streptococcus intermedius. *Infection and Immunity*, *70*(1), 249–256. https://doi.org/10.1128/IAI.70.1.249-256.2002

Petersen, P. E., Bourgeois, D., Ogawa, H., Estupinan-Day, S., & Ndiaye, C. (2005). The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the World Health Organization*, *83*(9), 661–669. https://doi.org//S0042-96862005000900011

Rosenblatt, A., & Zarzar, P. (2004). Breast-feeding and early childhood caries: An assessment among Brazilian infants. *International Journal of Paediatric Dentistry*, *14*(6), 439–445. https://doi.org/10.1111/j.1365-263X.2004.00569.x

Ruoff, K. L. (1991). Nutritionally variant streptococci. *Clinical Microbiology Reviews*, *4*(2), 184–190. https://doi.org/10.1128/CMR.4.2.184

Seow, W. K., Amaratunge, A., Sim, R., & Wan, A. (1999). Prevalence of caries in urban Australian aborigines aged 1-3.5 years. *Pediatric Dentistry*, *21*(2), 91–96.

Struzycka, I. (2014). The oral microbiome in dental caries. *Polish Journal of Microbiology*, *63*(2), 127–135.

Takahashi, N., & Nyvad, B. (2011). The Role of Bacteria in the Caries Process: Ecological Perspectives. *Journal of Dental Research*, *90*(3), 294–303. https://doi.org/10.1177/0022034510379602

Tanner, A. C. R., Kent, R. L., Holgerson, P. L., Hughes, C. V., Loo, C. Y., Kanasi, E., Chalmers, N. I., & Johansson, I. (2011). Microbiota of Severe Early Childhood Caries before and after Therapy. *Journal of Dental Research*, *90*(11), 1298–1305. https://doi.org/10.1177/0022034511421201

Tao, D., Li, F., Feng, X., Wong, M. C. M., & Lu, H. (2018). Plaque biofilm microbial diversity in infants aged 12 months and their mothers with or without dental caries: A pilot study. *BMC Oral Health*, *18*(1), 228. https://doi.org/10.1186/s12903-018-0699-8

Vachirarojpisan, T., Shinada, K., Kawaguchi, Y., Laungwechakan, P., Somkote, T., & Detsomboonrat, P. (2004). Early childhood caries in children aged 6-19 months. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, *32*(2), 133–142. https://doi.org/10.1111/j.0301-5661.2004.00145.x

Wang, B.-Y., & Kuramitsu, H. K. (2005). Interactions between oral bacteria: Inhibition of Streptococcus mutans bacteriocin production by Streptococcus gordonii. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(1), 354–362. https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.354-362.2005

Xu, H., Hao, W., Zhou, Q., Wang, W., Xia, Z., Liu, C., Chen, X., Qin, M., & Chen, F. (2014). Plaque Bacterial Microbiome Diversity in Children Younger than 30 Months with or without Caries Prior to Eruption of Second Primary Molars. *PLoS ONE*, *9*(2), e89269. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089269

Zijnge, V., van Leeuwen, M. B. M., Degener, J. E., Abbas, F., Thurnheer, T., Gmür, R., & Harmsen, H. J. M. (2010). Oral biofilm architecture on natural teeth. *PloS One*, *5*(2), e9321. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009321