

INVOLVING SONICATION PARAMETERS FOR THE STUDY OF BIOFILMS ASSOCIATED TO CORROSION PROCESS

Vargas, A.¹, Duque, Z.^{2*}, Romero, M.¹

¹Centro de Estudios de Corrosión, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia

²Fundación Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas (INZIT), Maracaibo, Venezuela.

*Correspondence author: zduque@inzitcasi.gob.ve, zduque@inzit.gob.ve

ABSTRACT

The different techniques employed for biofilms studies can be classified in techniques of direct observation and indirect analysis, which it requires the biofilm detachment. Some of these detachment techniques are sonication and scraped-ultrasound. This work structured an experimental design that permit to obtain efficient results for such biofilm detachment employing the sonication technique, for it, 85% was established like acceptable minimum efficiency of viable cells removed. They developed bacteria biofilm of the Sulphate Reducing Bacteria *Desulfovibrio termitidis* for 24 hours on iron sheets and coupons of carbon steel of different geometries and, after obtained the maximum efficiency, the same one with the efficiency of the technique of scraped-ultrasound was compared. The evaluation of the different sonication equipment variables permitted to reach efficiencies above the established rank. The parameters that permitted to obtain a maximum efficiency of 88% were: total time 1 minute, impulse "on" 5 seconds, impulse "off" 10 seconds and 65% of amplitude for the iron sheets and the coupons of carbon steel of rectangular geometry; while for the coupons of concave carbon steel geometry was: total time 2 minutes, impulse "on" 2,5 seconds, impulse "off" 10 seconds and 70% of amplitude. Additionally, the sonication technique resulted to be 10 times more effective than the technique of scraped-ultrasound at exponential levels.

Key words: Biofilms, sonication, SRB, scraped-ultrasound.

PARÁMETROS INVOLUCRADOS EN LA TÉCNICA DE SONICADO DE BIOPELÍCULAS ASOCIADAS A PROCESOS CORROSIVOS

RESUMEN

Las diferentes técnicas empleadas para el estudio de biopelículas pueden ser clasificadas en técnicas de observación directa y de análisis indirecto, las cuales requieren del desprendimiento de la biopelícula. Algunas de estas técnicas de desprendimiento son sonicado y raspado-ultrasonido. Este trabajo estructuró un diseño experimental que permitiese obtener resultados eficientes, en el desprendimiento de células sésiles viables, empleando la técnica de sonicado, para ello se estableció 85% como eficiencia mínima aceptable. Para ello se desarrollaron biopelículas de la bacteria reductora de sulfato *Desulfovibrio termitidis* por 24 horas sobre láminas de hierro y cupones de acero al carbono de diferentes geometrías y, luego de obtenida la eficiencia máxima, se comparó la misma con la eficiencia de la técnica de raspado-ultrasonido. La evaluación de las diferentes variables del equipo de sonicación permitió alcanzar eficiencias por encima del rango establecido. Los parámetros que permitieron obtener una eficiencia máxima de 88% fueron: tiempo total 1 minuto, impulso "on" 5 segundos, impulso "off" 10 segundos y 65% de amplitud para las láminas de hierro y los cupones de acero al carbono de geometría rectangular; mientras que para los cupones de acero al carbono de geometría cóncava fue: tiempo total 2 minutos, impulso "on" 2,5 segundos, impulso "off" 10 segundos y 70% de amplitud. Adicionalmente, se comparó el desprendimiento de células viables entre la técnica de sonicado y raspado-ultrasonido; donde la técnica de sonicado resultó ser 10 veces más efectiva.

Palabras claves: Biopelícula, Sonicado, Bacteria reductora de sulfato, Raspado-ultrasonido

INTRODUCCIÓN

Existen numerosas publicaciones sobre los problemas que generan las biopelículas en las tuberías y equipos industriales de manejo de aguas naturales para la

producción de petróleo o alimentos, entre otras industrias, donde cabe mencionar la pérdida de transferencia de calor, disminución de la eficiencia de

equipos, bioensuciamiento, corrosión localizada y biodegradación de las superficies [1-3].

El desarrollo de biopelículas, es decir, la aglomeración celular y sus productos metabólicos sobre superficies e interacción de los mismos con la superficie, depende de factores como el medio, el material (tanto su acabado superficial como en su composición química), microorganismos involucrados, etc. La actividad continua de esta interfase bioorgánica puede promover la corrosión microbiana (MIC: “*Microbiologically Influenced Corrosion*”) [1,4].

En términos generales, entre los grupos bacterianos que más se han estudiado están las bacterias reductoras de sulfatos (SRB: “*Sulphate Reducing Bacteria*”), entre otros factores por ser un grupo productor de H₂S cultivable y de fácil identificación [3,4].

Entre los diferentes métodos de evaluación en los estudios de MIC está la determinación y cuantificación de la población sésil (biopelícula). Entre las diferentes técnicas utilizadas para el estudio de biopelículas están: Fotometría del ATP, Secuenciación del ADN, Cuantificación por el Número Más Probable y Microscopía de Epifluorescencia; todas estas técnicas requieren el desprendimiento inicial de la población sésil. Es por ello necesario el uso de una técnica de desprendimiento como la de Sonicado, ante lo cual resulta importante establecer los parámetros que permitan una eficiencia en la obtención de las células que componen una biopelícula sin que afecte a la viabilidad de los microorganismos que la componen, lo que permite el desarrollo de diferentes estudios, tal como la relación de la población sésil con los procesos corrosivos, la determinación de eficiencias en tratamientos químicos sobre biopelículas, caracterización poblacional, etc. [5].

Normalmente e independientemente del equipo de sonicado utilizado en ensayos microbiológicos, los parámetros más importantes en el empleo de dicha técnica son el nivel del poder utilizado (vatios), el tiempo total de aplicación de la técnica, el tipo de sustrato y las

dimensiones del “tip” o “microtip” empleados, además del control de temperatura. Por lo que en principio debe realizarse un enfoque dirigido a solucionar la incógnita de conocer cuales deben ser los valores de éstas y otras variables independientes (tales como volumen de líquido de sonicado a emplear, material del recipiente de sonicado, profundidad de inmersión del tip, entre otros) en los ensayos de tal forma de facilitar la correcta utilización y optimización de dicha técnica [5].

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El procedimiento experimental consistió en desarrollar biopelículas sobre cupones, para luego someterlos al desprendimiento a través de la técnica de sonicado, modificando parámetros operacionales con la finalidad de obtener al menos un 85% de eficiencia en remoción, porcentaje asumido en este trabajo como aceptable en el desprendimiento de células viables. Es necesario acotar, que el desarrollo experimental se realizó con una cepa aislada conocida y el control de la incidencia de la técnica se práctico tomando como referencia la densidad poblacional de las planctónicas de 24 horas presentes antes de extraer los cupones inmersos del mismo vial. Estos ensayos se hicieron por triplicado para obtener reproducibilidad de los mismos. Una vez obtenidos los valores óptimos para el desprendimiento dentro del rango de eficiencia establecido mediante la técnica de sonicado, se realizaron ensayos utilizando la técnica de Raspado-ultrasonido, con la finalidad de comparar ambas técnicas. Así como ensayos para determinar la influencia del Tampón fosfato (PBS: “*Phosphate Buffer Saline*”) anaerobio como agente de lavado de las muestras en la eficiencia de la técnica.

Materiales y cultivo utilizados

La biopelícula generada para el estudio se realizó con la SRB *Desulfovibrio termitidis*, la cual fue aislada de las aguas de formación utilizadas en procesos de recuperación secundaria de crudo en el occidente

venezolano [6]. Este desarrollo bioorgánico se promovió sobre tres tipos de cupones, los cuales se encuentran

debidamente detallados en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Tipos de cupones empleados durante la realización de los ensayos.

Dimensiones (cm)	Área (cm ²)	Caracterización	Geometría
1 x 1 x 0,1	2,4	Hierro al 99,9%	Placa Plana
1,2 x 0,7 x 0,6	3,96	API 5L grado X65	Rectangular
Diámetro 2,54 Longitud 3	6,45	API 5L grado X65	Semi-esférica, obtenida por corte longitudinal de un tubo.

Tabla 2. Composición química nominal del API 5L grado X65

C%	Mn%	P%	S%	Fe%
0,21	1,20	0,014	0,009	98,57

Estos cupones son representativos de los comúnmente empleados en la industria para la evaluación de MIC, así como en investigaciones a nivel de laboratorio [7]. La preparación de los cupones se realizó de acuerdo con la norma ASTM G1-90; luego se esterizaron colocándolos en baño de ultrasonido durante 1 minuto inmersos en etanol al 100% y 12 horas de exposición en luz ultravioleta (256 nm) dentro de una cabina de bioseguridad clase II. Hay que destacar que los cupones semi-esféricos provenientes de un corte longitudinal de un tubo de 3 cm de largo, adicional al procedimiento anterior y previo proceso de esterilización, se aisló la parte convexa con cinta plástica hidrofóbica, la cual iba adherida fuertemente para evitar la entrada de medio a esta zona, concentrando el esfuerzo de separación de biopelículas en la zona cóncava.

La solución Tampón utilizada para el proceso de lavado de los cupones fue el PBS recomendada por NACE Standard TMO 194-94 No 21224. La cantidad de NaCl empleada en la preparación del Tampón fue modificada a 2 g/l para simular las características del agua de inyección de la cual se aisló la cepa bacteriana, procedimiento que se describe detalladamente en la referencia [6].

Calibración del equipo de Sonicado

Antes de iniciar los ensayos experimentales, fue necesario calibrar o estandarizar el rango de la amplitud a utilizar, debido a su relación directa con la emisión de calor a la solución. Dado que la base del ensayo consistía en desprender el mayor número de células vivas, se requería controlar la temperatura, ya que es un parámetro fundamental en el desarrollo de las bacterias, específicamente las *Desulfovibrios* son reportadas en un rango cuyo máximo es de 40 °C [8].

Para la estandarización se colocó un vaso precipitado con solución Tampón como prueba, aplicando el Sonicado con un *Sonic Fisher Scientific* modelo 500, a diferentes amplitudes con el resto de los parámetros operacionales fijos, evaluando la temperatura de la solución y la potencia emitida por el equipo. Posteriormente, se repitió la prueba utilizando un sistema de enfriamiento (SEE) con la finalidad de controlar la temperatura. La Figura 1 representa las curvas obtenidas para la calibración en lo que a amplitud se refiere, ubicando las condiciones de trabajo a la temperatura permitida, obsérvese como a medida que incrementa el porcentaje de amplitud, se incrementa la potencia y, por ende la temperatura del medio líquido.

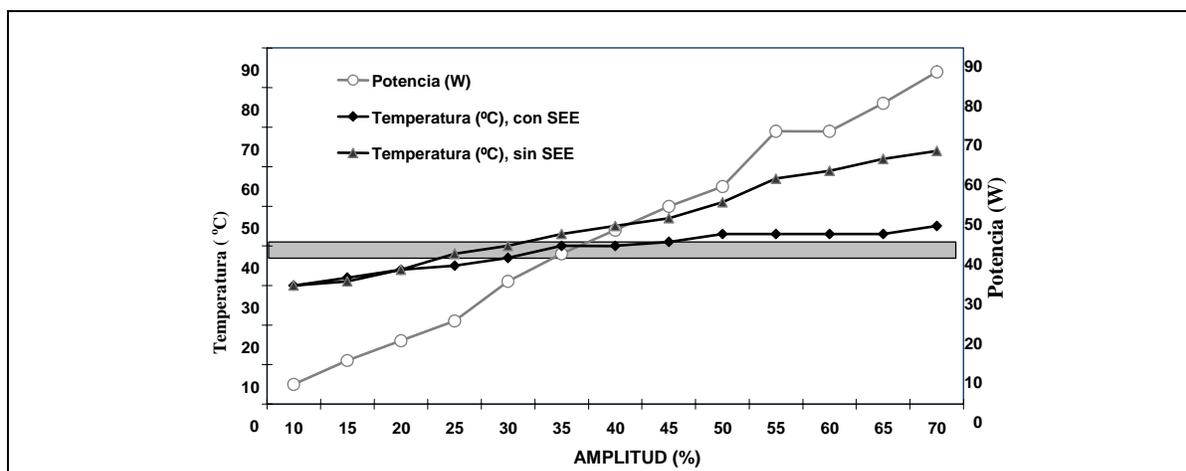


Figura 1. Curva de calibración del equipo de Sonicado

Formación de biopelícula

Para permitir las condiciones óptimas de crecimiento bacteriano se utilizó el medio reductor de sulfato, Postgate B [9], el cual ha sido empleado en diversos estudios de MIC. La cepa se utilizó al 10%, tal como se reporta en diferentes investigaciones [6,10]. Esta práctica consistió en dejar inmerso los cupones, previamente esterilizados, en el medio nutriente indicado a 37 °C durante 24 horas, condiciones favorables para el desarrollo bacteriano.

Evaluación del crecimiento bacteriano

La Figura 2 muestra el diseño experimental aplicado durante los ensayos. La técnica empleada tanto para el recuento planctónico (M1) como para el recuento sétil (M2) fue la técnica de dilución seriada [11]. Estableciendo como base de aceptación mínima un 85% de eficiencia en la remoción de células viables. En este trabajo se establece una relación entre las células planctónicas y sétiles, dado que no contamos con patrones y otras técnicas de recuento que nos permitan indicar una relación netamente sétil. Es por ello que se entenderá como eficiencia el valor calculado mediante la

$$\% \text{Eficiencia} = \frac{M2}{M1} * 100$$

La técnica de estimación de las células viables fue por dilución seriada en medio Postgate B, tal como se indicó

anteriormente, la cual se evaluó luego de una incubación de 37 °C durante 48 horas. Los cupones con biopelículas al ser sometidos al sonicado se encontraban en una solución buffer, la cual fue debidamente agitada para homogeneizarla y obtener una alícuota representativa del desprendimiento sétil.

Técnica de Sonicado

El Sonicado se realizó utilizando un equipo *Sonic Fisher Scientific* modelo 500, el cual depende de los siguientes parámetros de operación:

- Tiempo: es la duración del experimento de sonicación, medido en minutos.
- Amplitud: energía aplicada durante el ensayo, expresada en porcentaje.
- Impulso “on”: es la cantidad de tiempo, en que la vibración se mantenía aplicada.
- Impulso “off”: es la cantidad de tiempo en que la vibración no se mantenía aplicada.

La Temperatura de trabajo fue de 37- 40 °C, siendo ésta última la máxima permitida a fin de obtener células vivas, la cual fue controlada mediante la utilización de un Sistema de Enfriamiento Externo (SEE); este consistió en mantener el recipiente con la muestra, inmerso en un recipiente con agua y hielo para atemperar el calor generado por el proceso.

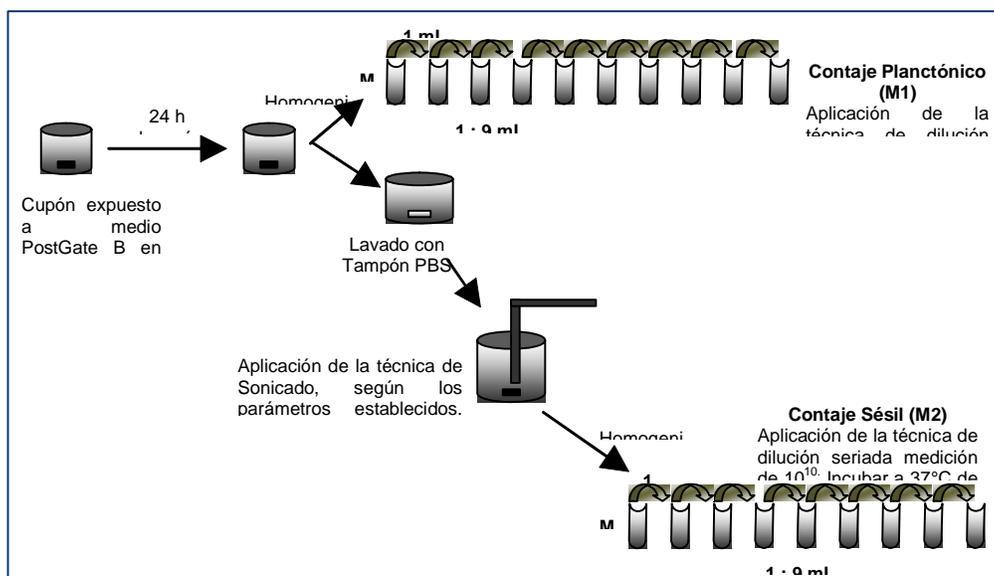


Figura 2. Diagrama del diseño experimental para la evaluación de la técnica de Sonicado

El equipo de sonicado se encontraba dentro de una cámara de anaerobiosis, de forma aséptica se colocó el recipiente con la solución Tampón y el cupón. El *Tip* del sonicador se aproximó al cupón, iniciando el ensayo con los parámetros operacionales seleccionados, generando ondas ultrasónicas directamente en dicha solución.

Si bien es cierto que la intensidad de las ondas de ultrasonido tiene su influencia en la viabilidad bacteriana, es necesario que la aplicación de esta técnica, se realice determinando las variables y sus magnitudes que inciden en el proceso. Tal como se ha descrito, las primeras variables para evitar la mortandad y lisis celular de las bacterias en estudio deben ser la potencia y amplitud, descritas en la calibración del equipo. Además de los ciclos on-off, las cuales pueden incidir en el estrés celular, según la frecuencia del equipo [5].

Técnica de Raspado-ultrasonido

El raspado se hace previo al ultrasonido, colocando el cupón dentro de una solución Tampón y con movimientos continuos utilizando una paleta estéril de polipropileno se promovía el desprendimiento. Todo esto dentro de una cámara de anaerobiosis. Posteriormente se utilizó un baño de ultrasonido, al cual se le adiciona agua y dentro de esta se coloca el recipiente con el cupón

inmerso en la solución Tampón, estos equipos tienen una frecuencia fija e incide externamente sobre la muestra [10], así mismo no hay parámetros a modificar, solo se controla el tiempo de inmersión (5 min) y la anaerobiosis durante dicho ensayo, el cual no genera calor sobre la muestra evaluada.

Evaluación morfológica del desprendimiento bacteriano

La aplicación de la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM: “*Scanning Electron Microscope*”) se realizó previa preparación de los cupones con biopelículas de 24 horas; utilizando para ello el procedimiento de fijación primaria colocando la muestra en Tampón cacodilato al 0,1 M y pH 7,4 [6,12], y luego en una solución al 2,5% de glutaraldehído durante 2 horas a 4 °C, posteriormente la muestra se lavó en Tampón cacodilato y la deshidratación se llevó a cabo a 4 °C ; la misma consistió en pasar la muestra por soluciones de acetona al 50, 70, 90, 100% durante 15 minutos y a continuación en acetona al 100% durante una hora [6,12]. Finalmente se metalizaron las muestras en un ionizador de oro, para su posterior observación en el MEB.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Técnica de Sonicado

Partiendo de los resultados de la curva de calibración del equipo (Figura 1), y luego de diversos ensayos de desprendimiento de biopelícula mediante la técnica de sonicado (Figura 2), se obtuvo una eficiencia del 88% en desprendimiento de células viables ajustando los valores de impulso “on” en 5 segundos, impulso “off” en 10 segundos, tiempo total de 1 minuto y amplitud en 65%. Esto se aplicó tanto para las placas planas de hierro al 99,9% como para los cupones API 5L grado X65 de geometría rectangular. Sin embargo, para los cupones geometría semiesférica fue necesario aumentar el tiempo de trabajo a 2 minutos para incrementar la eficiencia. Así mismo, variaciones sistemáticas de los parámetros del equipo en diversos ensayos permitieron obtener una eficiencia en el desprendimiento del 88% ajustando el impulso “on” en 2,5 segundos, impulso “off” en 10 segundos, tiempo total de 2 minutos y amplitud en 70%. La Tabla 3 muestra los mejores resultados de cada uno de los cupones estudiados en forma comparativa.

Durante la realización de los ensayos, las láminas de hierro al 99,9% y los cupones API 5L grado X65 de geometría rectangular, presentaron movimientos aleatorios en el recipiente dentro del cual se encontraban. Esto no ocurrió con los cupones de geometría semiesférica, cóncavos. Dichos movimientos, motivados al tamaño de la muestra, podrían ayudar al desprendimiento de la biopelícula; por lo que posiblemente en ausencia de los mismos, los requerimientos operacionales son mayores, explicando esto porque se debió aumentar los parámetros del

sonicador para mejorar la eficiencia del desprendimiento de células viables en el cupón cóncavo.

Estos resultados van de acuerdo con Gagnon, quien indicó que el desprendimiento celular de biopelículas promovidas en policarbonatos, pueden darse con eficiencias hasta del 90% en técnicas como Sonificación y Stomach, reportando tiempos de 2 min a 4 kHz. [13].

Técnica de Raspado-ultrasonido

La Tabla 4 muestra los resultados del desprendimiento de biopelícula empleando la técnica de raspado-ultrasonido; cuya eficiencia fue menor al mínimo establecido como aceptable.

Por otro lado, la Tabla 5, obtenida con el cupón de geometría rectangular, muestra que existe una diferencia notoria en los resultados finales (en el orden exponencial), cuando se emplea el Tampón PBS anaerobio y cuando no se utiliza el mismo con la técnica de raspado-ultrasonido; lo que significa que en los procedimientos realizados, sin el empleo del uso del Tampón, existió un error inducido por arrastre de células planctónicas, y que posteriormente se contabilizaron como sésiles, esta transportación de células se explica por el “efecto de mojado”, lo cual no es más que la presencia de células en el medio que humedece el cupón y no como parte de la población sésil adherida con exopolímeros a la superficie.

Finalmente, la Tabla 6 señala la diferencia existente entre el desprendimiento de células viables con la técnica de sonicado y la de raspado-ultrasonido empleando cupones API 5L grado X65 de geometría rectangular como sustrato.

Tabla 3. Resultados de los ensayos realizados empleando la técnica de Sonicado

Cupón	M1 (48 horas) cel/ml	M2 (48 horas) cel/ml	% Eficiencia
Placa plana de hierro	10^9	10^8	88
API 5L grado X65 de geometría rectangular	10^9	10^8	88
API 5L grado X65 de geometría semiesférica	10^9	10^8	88

Tabla 4. Resultado obtenido con la técnica de Raspado-ultrasonido

Cupón	M1 (48 horas) Cel/ml	M2 (48 horas) Cel/ml	% Eficiencia
API 5L grado X65 de geometría rectangular	10 ⁹	10 ⁶	68

Tabla 5. Influencia del PBS empleando la técnica de Raspado-ultrasonido

Uso del Tampón PBS anaerobio	M1 (48 horas) cel/ml	M2 (48 horas) cel/ml	% Eficiencia
SI	10 ⁹	10 ⁶	68
NO	10 ⁹	10 ⁷	78

Tabla 6. Comparación de los resultados obtenidos con la técnica de Sonicado y Raspado-ultrasonido

Técnica empleada	M1 (48 horas) cel/ml	M2 (48 horas) cel/ml	% Eficiencia
Sonicado	10 ⁹	10 ⁸	88
Raspado-ultrasonido	10 ⁹	10 ⁶	68

Muestras evaluadas con SEM

Utilizando SEM se confirmó la eficiencia del sonicado como técnica para el desprendimiento, tal como se observa en la Figura 3, se corrobora que la técnica de sonicado desprende y dispersa el material de la biopelícula a diferencia del raspado-ultrasonido, donde se observan las aglomeraciones sobre el sustrato metálico.

Estos resultados corroboran que la aplicación de técnicas de mayor alcance sobre los entramados celulares como la sonicación, son las que logran romper los fuertes enlaces poliméricos con los productos de corrosión, sobre todo que en los estudios de MIC, ya que se relacionan las poblaciones viables con la morfología corrosiva del material, siendo necesario, tal como lo indica la NACE en el TM194-94 y en su Report 54278, técnicas de remoción que garanticen el desprendimiento extracelular de las superficies metálicas y sus productos. [5].

CONCLUSIONES

El control de temperatura durante el sonicado es imprescindible para el mantenimiento de la viabilidad celular, según los grupos en estudio.

La máxima eficiencia en el desprendimiento de células viables, de una biopelícula de 24 horas de *Desulfovibrio termitidis* en un área entre 2-4 cm², se logró fijando los parámetros operacionales del equipo de la siguiente forma: tiempo 1 min, impulso “on” en 5 s, impulso “off” de 10 s y amplitud de 65% para los cupones de acero al carbono de geometría rectangular y para los de hierro, mientras que para los de acero al carbono con geometría cóncava el tiempo fue de 2 min e impulso “on” en 2,5 s, impulso “off” de 10 s y amplitud de 70%.

La técnica de sonicado con la biopelícula evaluada resultó ser 10 veces más efectiva que la técnica de raspado-ultrasonido en términos de recuento a nivel exponencial.

El empleo del Tampón PBS anaerobio permite una mayor confiabilidad en los resultados del recuento de bacterias sésiles, dado que se evita el recuento de planctónicas debido a los “efectos de mojado” de la muestra.

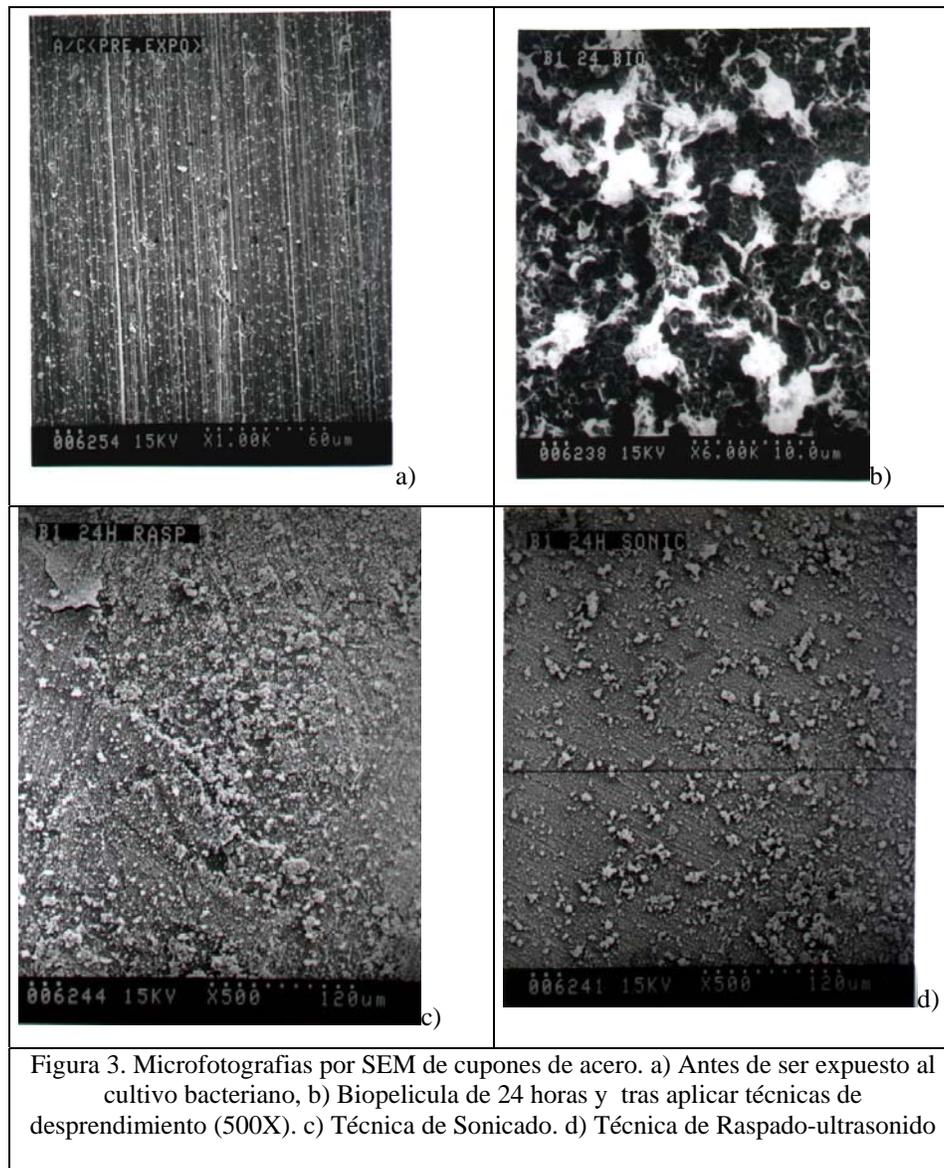


Figura 3. Microfotografías por SEM de cupones de acero. a) Antes de ser expuesto al cultivo bacteriano, b) Biopelícula de 24 horas y tras aplicar técnicas de desprendimiento (500X). c) Técnica de Sonicado. d) Técnica de Raspado-ultrasonido

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto FONACIT G-2000001606, por el apoyo financiero requerido en la dotación de equipos y materiales. A los investigadores Alexandra Magic de la Universidad de Wageningen (Netherlands) y Robert T. Bachman de la Universidad Sheffield (England), ambos aportaron incondicionalmente sus experiencias en los temas evaluados.

REFERENCIAS

- [1] Prasad R. (2000) "Assessment and Control of MIC in the Oil Industry in the 20th century". *Corrosion* 2000. Paper N° 390 USA.
- [2] Hamilton W.A. (1993) "Industrial Problems Due to Biofilms, Bacterial Biofilms and their Control in Medicine and Industry". Inaugural Meeting of the British Biofilm Club held at Gregynog Hall, pp 109-111.
- [3] Samant A.K., Singh S.K. (1998) "Role of Microbial Induced Corrosion in Subsea Water Pipe Line Failure", *Corrosion`98*. Paper N° 280 USA.
- [4] Keddad M., Monfort Moros N., Tribollet B. (2002) "Festy Detection and Mapping of SRB Influenced Corrosion of C-Steel". *Corrosion` 2002*. Paper N° 2447 USA.

- [5] Vargas A. (2004) "Parámetros involucrados en la Técnica de Sonicado de biopelículas asociadas a procesos corrosivos". Universidad del Zulia, Trabajo de grado. Venezuela.
- [6] Duque Z., Chicote E., Sarró M.I., Moreno D., Fernández M., Pérez O.(2004) "Corrosividad de bacterias productoras de H₂S aisladas de aguas de formación utilizadas en la recuperación secundaria de crudo". Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia. 27: 83–92.
- [7] Zuo R., Wood T. (2004) "Inhibiting Mild Steel Corrosion from Sulfate-reducing and iron-oxidizing bacteria using Gramicidin-S-producing biofilms". Applied Microbiology Biotechnology. 65:747–753.
- [8] Madigan M., Martinko J., Parker J.(2004) "Brock: Biología de los microorganismos". 10ª edición. PEARSON Prentice hall. España.
- [9] Postgate J.R., FRS.(1984) "The Sulphate-reducing bacteria" Second Edition. Cambridge University Press.
- [10] Romero M., Duque Z., Rodríguez L., Rincón O., Pérez O., Araujo I.(2005) "A Study of Microbiologically Induced Corrosion by Sulfate-Reducing Bacteria on Carbon Steel Using Hydrogen Permeation". Corrosion, 61: 68.
- [11] Díaz R., Gamazo C., López-Goñi I.(2000) "Manual práctico de Microbiología". 2ª edición. MASSON, S.A. España. pp.14-15.
- [12] Lutterbach M.T.S., França F.P. (1997) "Biofilm formation on brass coupons exposed to cooling water". Braz. J. Chem. Eng.,14.
- [13] Gagnon G., Slawson R. (1999) "An efficient biofilm removal method for bacterial cell exposed to drinking water". Journal of Microbiological Methods, 34.