

Copyright 2012, ABRACO

Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2012, em Salvador/BA no mês de maio de 2012.

As informações e opiniões contidas neste trabalho são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

Estudo do crescimento bacteriano e da aplicação de procedimentos de limpeza e desinfecção na corrosão do aço inoxidável 304L

Yohandrina Ulloa^a, Hélène de Baynast^b, Geneviève Gaudet^c, Fabrice Audonnet^d, Márcia M. M. Gonçalves^e, Lilian F. de Senna^f, Dalva C. B. do Lago^g

Abstract

To avoid the formation of biofilms and biocorrosion are commonly employed techniques of chemical or mechanical cleaning, which are not always completely effective in removing the deposited material. In the present study, 304L stainless steel samples were subjected to accelerate testing of biofilm growth, which was subsequently removed by a sequential program of cleaning and disinfection (heat shock, cleaning with phosphoric acid and disinfection with hydrogen peroxide). Quantification of biofilm and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) analysis were performed before and after the program aims to verify the influence of these treatments on the growth of a new biofilm, in addition to studying the behaviour of the stainless steel before the proliferation of bacteria and continuous application of treatments. The results show that after 90 h of immersion in a medium containing nutrients to form a biofilm adherent to the steel surface and the concomitant use of the program was not effective in removing biofilm. The small variation of the impedance modulus over 15 weeks the test shows that there was no metal corrosion in the medium employed.

Keywords: biofilm, 304L stainless steel, electrochemical impedance spectroscopy, cleaning and disinfection treatments, microbiologically induced corrosion

Resumo

Para evitar a formação de biofilmes e a biocorrosão são comumente empregadas técnicas de limpeza química ou mecânica, que nem sempre são completamente eficazes na remoção do material depositado. Neste trabalho, amostras de aço inox 304L foram submetidas a ensaios acelerados de crescimento de biofilme, o qual foi posteriormente removido por um tratamento sequencial de limpeza e desinfecção (choque térmico, limpeza com ácido fosfórico e desinfecção com peróxido de hidrogênio). Quantificação do biofilme formado e análises de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram realizadas antes e após o tratamento de limpeza, como objetivo verificar a influência desses tratamentos sobre o crescimento de um novo biofilme, além de estudar o comportamento do aço diante da proliferação das bactérias e da contínua aplicação dos tratamentos. Os resultados mostram que após 90 h de imersão no meio contendo nutrientes forma-se um biofilme aderente à superfície do aço e que o emprego do tratamento de limpeza não foi eficaz na remoção do biofilme. A pequena

^a Licenciada em Química - Universidade do Estado do Rio de Janeiro

^b D. Sc. - Université Blaise Pascal

^c D. Sc. - Université Blaise Pascal

^d D. Sc. - Université Blaise Pascal

^e D.Sc. - Universidade do Estado do Rio de Janeiro

^f D. Sc. - Universidade do Estado do Rio de Janeiro

^g D. Sc. - Universidade do Estado do Rio de Janeiro

variação dos valores do módulo de impedância ao longo de 15 semanas de ensaio mostra que não houve corrosão do metal no meio empregado.

Palavras-chave: biofilme, aço inox 304L, espectroscopia de impedância eletroquímica, tratamentos de limpeza e desinfecção, corrosão microbiologicamente induzida

Introdução

Tanto em ambientes naturais como em indústrias muitas bactérias são capazes de desenvolver comunidades que se aderem a vários tipos de superfícies e são chamadas de biofilmes (1). A formação de biofilmes é resultado da ação combinada da adesão de macromoléculas orgânicas e/ou inorgânicas, da hidrodinâmica do sistema, do crescimento microbiano e da produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Estas substâncias podem modificar a carga, a molhabilidade e a energia livre da superfície, resultando na aceleração ou na inibição da corrosão (2). Na indústria de alimentos a formação de biofilmes pode além de promover a corrosão, causar bloqueio mecânico em sistemas de manuseio de fluidos, impedir a transferência de calor e contaminar alimentos, o que provoca a deterioração destes ou a transmissão de doenças (3,4). As indústrias de produção de água mineral e distribuição de água potável são particularmente sensíveis a estes problemas, já que a presença de biofilmes sobre a superfície das canalizações pode ser a origem da deterioração da qualidade organoléptica e microbiológica da água. A proliferação de biofilmes contendo *Legionella pneumophila* sobre as tubulações dos sistemas de distribuição de água quente ou nas torres de refrigeração de ar condicionado constitui um risco sanitário evidente como mostrou a epidemia que afetou o norte da França entre novembro de 2003 e janeiro de 2004 (5). A aplicação de tratamentos de limpeza e desinfecção (sanitização) é o melhor método para evitar o acúmulo de partículas e bactérias, e conseqüentemente controlar a formação de biofilmes (6). Estes tratamentos devem combinar fatores como tempo, temperatura e efeito químico e mecânico (7). Estudos comparativos de limpeza realizados em materiais como aço, vidro, nylon e PVC mostraram que estes materiais não apresentaram mudanças significativas na facilidade de limpeza quando as superfícies são novas. No entanto, com o tempo o aço exibe melhor resistência à deterioração causada pela aplicação consecutiva de procedimentos de limpeza. Algumas vezes a aplicação de desinfetantes, após o processo de limpeza para eliminar as bactérias residuais, pode provocar a corrosão da superfície metálica (8). Neste trabalho, foi avaliada a influência de um tratamento de limpeza e desinfecção (choque térmico, limpeza com ácido fosfórico e desinfecção com peróxido de hidrogênio) na remoção e no crescimento de um novo biofilme sobre a superfície do aço inox 304 L. O comportamento do aço diante da proliferação das bactérias e contínua aplicação dos tratamentos de limpeza e desinfecção foi avaliado por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

Metodologia

Cupons metálicos

As amostras metálicas consistiram de cupons de aço inox 304L em forma de disco de 18 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Antes de serem utilizados, estes cupons foram desgordurados com tricloroetileno, lavados várias vezes com água destilada e desinfetados

com álcool 95°, em seguida foram dispostos sobre papel absorvente e secos com jato de ar quente.

Micro-organismo e condições de cultura

Os ensaios foram realizados com uma linhagem da bactéria *Serratia marcescens*, cultivada em meio sólido TSA a 30 °C, e pH igual a $7,3 \pm 0,2$. Esta bactéria prolifera na água e forma biofilme sobre o aço e outros tipos de superfícies. O meio TSA contém 17,0 g/L de peptona de caseína, 3,0 g/L de peptona de soja, 2,5 g/L de D-glicose, 5,0 g/L de NaCl, 2,5 g/L de K_2HPO_4 e 15,0 g/L de ágar.

Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado pela adição de uma colônia de *S. marcescens*, proveniente do isolamento em meio sólido TSA, em 10 mL de meio TS. Após (16-18) h de incubação a 30 °C, o inóculo apresentava uma concentração de 10^5 bactérias/mL. O meio TS contém 17,0 g/L de peptona de caseína, 3,0 g/L de peptona de soja, 2,5 g/L de D-glicose, 5,0 g/L NaCl e 2,5 g/L de K_2HPO_4 , e pH igual a $7,3 \pm 0,2$.

Processo de formação do biofilme e posterior limpeza e desinfecção

O ensaio teve uma duração de 15 semanas, sendo que cada semana teve dois ciclos, o primeiro durava 90 h e o segundo 72 h. Cada ciclo envolveu uma etapa de formação de biofilme e uma etapa de tratamento de limpeza e desinfecção. Após a aplicação do tratamento reiniciava-se o ciclo seguinte mediante imersão dos cupons numa nova solução nutritiva contendo a *S. marcescens*, visando o reestabelecimento do biofilme sobre o aço, e assim sucessivamente até completar 30 ciclos.

A quantificação do biofilme foi realizada em triplicata a cada ciclo de 90 h, antes e após aplicação do tratamento de limpeza e desinfecção. As medidas de impedância realizaram-se após a aplicação do tratamento de limpeza no ciclo de 90 h e durante o ciclo de 72 h nos seguintes tempos de imersão na solução nutritiva: (24, 48 e 72) h.

Formação do biofilme

Os cupons metálicos foram introduzidos num meio nutritivo contendo 15 L de água da torneira, 10 mL de inóculo e 750 mL de caldo nutriente a 30 °C e pH de $6,1 \pm 0,2$, ajustado com CH_2O_2 98 % v/v. A composição do caldo nutriente foi 180 g/L de peptona de carne e 200 g/L NaCl.

Tratamentos de limpeza e desinfecção

Os tratamentos de limpeza e desinfecção aplicados reproduziam os diferentes tipos procedimentos empregados em instalações de água quente de estabelecimentos de saúde na França (9). Os tratamentos foram aplicados em cinco etapas consecutivas como exhibe a figura 1:

- Choque térmico com água da torneira a 70 °C durante 1 h;

- Limpeza ácida com ácido fosfórico 20 % v/v durante 30 min;
- Enxágue com água da torneira durante 15 min;
- Desinfecção com peróxido de hidrogênio 0,17 % v/v durante 15 min;
- Enxágue com água da torneira durante 15 min.

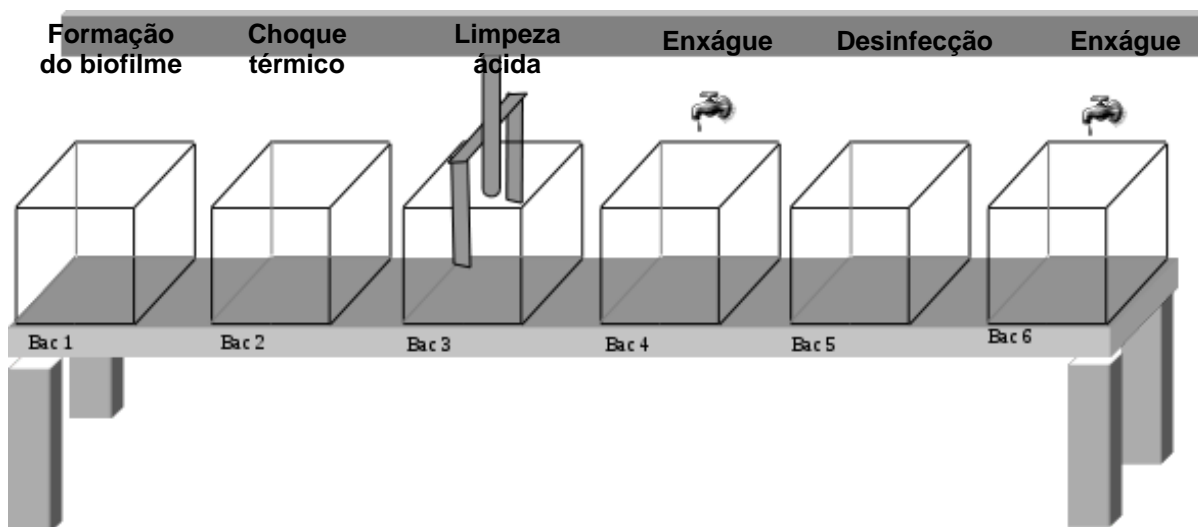


Figura 1 - Processo contínuo de crescimento do biofilme, limpeza e desinfecção

Quantificação do biofilme

O método de quantificação da biomassa é o método de coloração cristal violeta. Primeiramente os corpos de prova foram lavados duas vezes por imersão em frascos contendo água destilada sem agitação violenta para eliminar as bactérias livres, em seguida secos a 37 °C durante 60 min com ventilação. Após secagem, os corpos de prova foram imersos em solução aquosa de cristal violeta 0,05 % m/v por 30 min, fixando-se o cristal violeta sobre as estruturas bacterianas. Em seguida, os cupons foram retirados da solução, lavados delicadamente quatro vezes com água destilada até a eliminação do excesso de corante, e secos a 37 °C por 60 min com ventilação. Posteriormente, cada cupom foi colocado em frascos com capacidade de 15 mL, tendo sido adicionados a cada um deles 5 mL de etanol 96% v/v e 250 µL de 1 mol/L de HCl, e por fim, submetidos à agitação por 30 min para posterior medida da densidade ótica da solução a 588 nm (DO588 nm).

A curva padrão entre número de bactérias de *S. marcescens* e a densidade ótica do cristal violeta liberado nas soluções alcoólicas, é dada pela equação (1). Esta curva foi obtida mediante a adição de volumes crescentes (0,2 a 0,8) mL de uma cultura de *S. marcescens* em meio de TS com $1,8 \times 10^9$ células/mL em Eppendorf de 2 mL e centrifugados durante 5 min a 4000 rpm. As bactérias sedimentadas foram resuspensas em 300 µL de soro fisiológico 0,9 % m/v de NaCl, adicionou-se 200µL da solução aquosa de violeta cristal 0,05 % m/v e foram agitados por 30 min. Após, adicionou-se 1 mL de soro fisiológico e novamente centrifugou-se durante 5 min a 4000 rpm. As bactérias sedimentadas foram lavadas duas vezes com 1 mL de soro fisiológico. Ao Final foram resuspensas numa solução contendo 1 mL de etanol 96° e 40 µL de 1 mol/L de HCl, agitou-se suavemente por 30 minutos. Após centrifugação mediu-se DO588 nm. Meio TS não inoculado foi usado como referência.

$$\text{Número de bactérias} = \text{DO588 nm} / 5,40 \cdot 10^{-9} \quad (r^2 = 0,9822) \quad (1)$$

Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)

Foi empregada uma célula composta por três eletrodos: 1 - aço inox 304 L, como eletrodo de trabalho, o qual foi previamente submetido às etapas de crescimento do biofilme, limpeza e desinfecção; 2 - platina, como contra eletrodo; e 3 - calomelano saturado (ECS), como eletrodo de referência. Utilizou-se um potenciostato/galvanostato Sorlatron, variando-se a frequência de 65535 Hz a 0,01 Hz, com amplitude de 30 mV e taxa aquisição de 10 pontos de frequência por década. Todos os ensaios de EIS foram realizados empregando-se eletrodos rotatórios com área exposta de 1,13 cm² de aço inox 304 L, a 500 rpm, em solução 0,50 mol/L de KNO₃ (pH = 6,3), previamente purgada com N₂ durante 30 min, a 25 °C, a um potencial de - 0,6 V (ECS).

Resultados e discussão

Avaliação do numero de bactérias no biofilme antes e após aplicação dos tratamentos

O biofilme formado foi quantificado antes e após aplicação dos tratamentos de limpeza e desinfecção a cada ciclo de 90 h. A Figura 2 mostra que, desde a primeira semana de exposição e ao longo dos ensaios, um biofilme aderente à superfície do aço inox foi obtido, já que o numero bactérias aderidas encontra-se em torno de 10⁷ bactérias/cm². De acordo com Andrade *et al.* (10) para se considerar um biofilme é necessário um número mínimo de 10⁷ células/cm². Por outro lado, Ronner *et al* (11) já consideram como biofilme quando o número de células aderidas apresenta-se entre 10³ a 10⁵ células/cm².

A análise da Figura 2 revela que o número de bactérias antes e após aplicação do tratamento de limpeza e desinfecção permaneceu praticamente constante ao longo do ensaio. Um estudo realizado sobre a eliminação da bactéria *Legionella* em biofilmes formados sobre aço inox 316 L, simulando sistemas de distribuição de água quente e usando como tratamento o choque térmico a 70 °C (12), mostrou que após o primeiro tratamento houve uma redução na concentração de *Legionella*. Entretanto na segunda vez que este tratamento foi aplicado não houve redução significativa nas populações de *Legionella*. Segundo Farhat *et al.* (12), esta ineficiência deve-se ao fato de que o biofilme não foi completamente destruído, sendo rapidamente reconstituído após o tratamento ou a *Legionella* torna-se termo-resistente. Tal comportamento pode ter acontecido com a bactéria *S. marcescens* no presente estudo, prejudicando a eficácia dos tratamentos de limpeza e desinfecção.

Outro fator que pode ter influenciado na eficácia do tratamento de limpeza e desinfecção é a concentração das soluções empregadas. Neste trabalho a limpeza foi realizada com acido fosfórico 20 % v/v e a desinfecção com peróxido de hidrogênio 0,17 % v/v. Num trabalho realizado por Rushdy e Othman (13) diversas soluções (10 % v/v de NaOH, 70 % v/v de C₂H₅OH, 30 % v/v de H₂O₂, 4-6% v/v de NaClO, C₃H₇OH, além de misturas de H₂O₂ e NaClO, H₂O₂ e C₂H₅OH, H₂O₂ e C₃H₇OH) foram utilizadas para avaliar o efeito da concentração de diferentes desinfetantes comumente usados em equipamentos de processamento de alimentos para remoção biofilmes bacterianos. Os resultados mostraram que a solução 30 % v/v de H₂O₂ foi o desinfetante mais eficaz, tanto em bactérias Gram

positivas, tais como *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, quanto em bactérias Gram negativas, tais como *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhi*. Sendo assim é provável que o emprego de uma solução 0,17 % v/v de peróxido de hidrogênio não seja eficiente para remoção do biofilme.

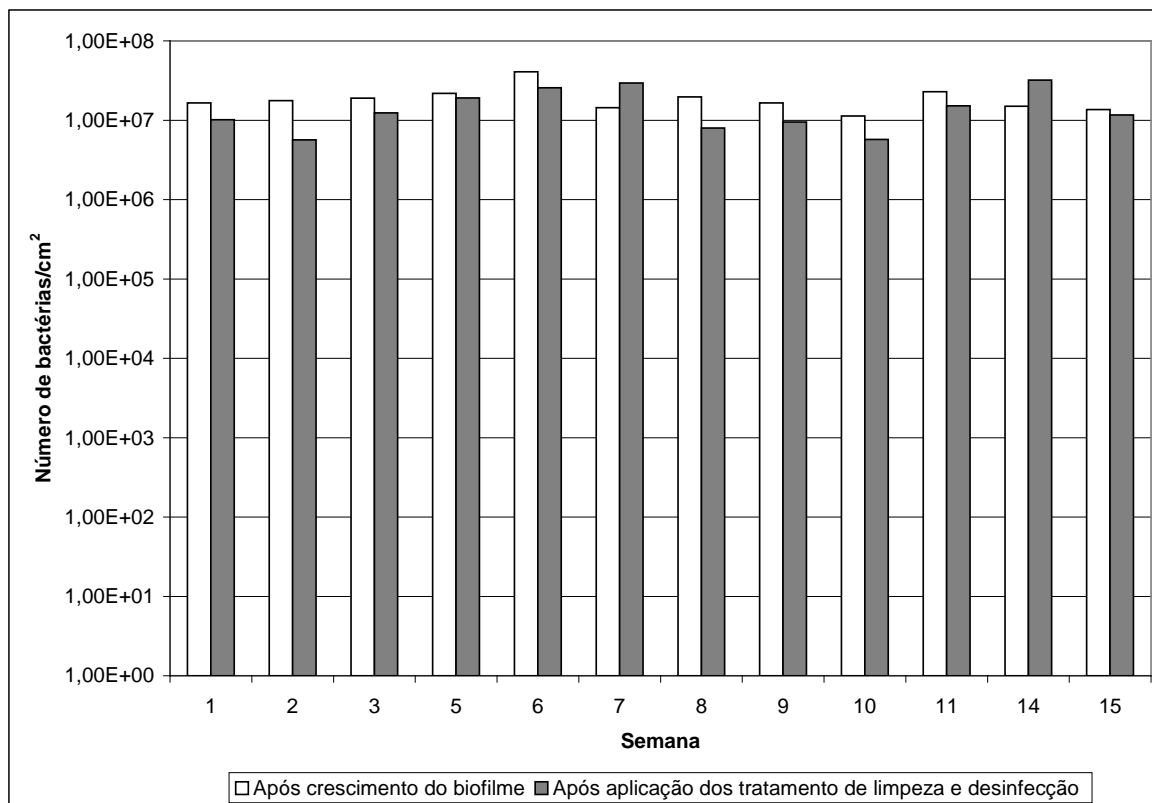


Figura 2 - Número de bactérias presentes no biofilme/cm² ao longo das semanas de estudo.

Medidas eletroquímicas

Como anteriormente descrito, o ensaio teve uma duração de 15 semanas, com dois ciclos cada: no primeiro ciclo, a formação do biofilme durava 90 h e no segundo 72 h. Cada ciclo envolveu uma etapa de formação de biofilme e uma etapa de tratamento de limpeza e desinfecção. As análises por EIS foram sempre realizadas ao final do ciclo de 90 h (após aplicação da limpeza e desinfecção) e durante o ciclo de 72 h, com retirada de cupons após (24, 48 e 72) h de imersão na solução nutritiva.

A Figura 3 apresenta os diagramas de Nyquist, de Bode e de fase dos corpos de prova analisados ao final do ciclo de 90 h (após crescimento do biofilme e aplicação da limpeza e desinfecção) e ao longo do segundo ciclo. O aumento nos valores de impedância em alta frequência após 24 h de imersão na solução bacteriana, quando comparados com os valores de impedância do aço ao início do ciclo (diagrama de Nyquist Figura 3 a), indica que a formação de um biofilme sobre a superfície do aço contribuiu para uma menor corrosão. Entretanto, após 48 h, os valores de impedância diminuíram, provavelmente por uma ruptura localizada do biofilme. Após 72 h, os valores de impedâncias aumentam de novo, possivelmente pelo restabelecimento do biofilme. No diagrama de Bode (Figura 3 b), os corpos de prova

apresentaram comportamento semelhante, enquanto que no diagrama de fase (Figura 3 c) foi possível perceber uma pequena diferença em baixas frequências.

Para melhor comparação, os diagramas de Nyquist, de Bode e de fase do aço inox 304 L conforme recebido, do mesmo aço logo após ter sido submetido ao tratamento de limpeza e desinfecção (sem que houvesse prévia formação de biofilme) e do aço ao início do segundo ciclo, são exibidos na Figura 4. Observa-se que, já após aplicação do tratamento de limpeza e desinfecção, mesmo sem prévia formação de biofilme, ocorre um aumento dos arcos capacitivos (Figura 4 a) em comparação com o do aço nu (aço sem ter sido submetido a qualquer tipo de tratamento). Isto sugere que o programa de limpeza e desinfecção proposto poderia estar inibindo a corrosão do aço inoxidável estudado, pela estabilização da camada protetora do aço (17).

Prabakaran e Rajeswari (14) investigaram o efeito de várias concentrações de ácido fosfórico, (10, 20, 30, 40, 50 e 80) % v/v, na resistência à corrosão do aço 316 L. Os resultados obtidos no estudo mostraram que todos os aços tratados com ácido fosfórico apresentam maior resistência à corrosão, quando comparados com o aço sem tratamento. Isto ocorre devido ao enriquecimento em Cr, Ni, Mo, e P no filme passivo das amostras tratadas, como mostrou a análise por espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS).

Como também pode ser verificado ainda na Figura 4 a, o arco capacitivo obtido para o aço recém saído do primeiro ciclo de 90 h e submetido ao processo de limpeza e desinfecção indica que outro processo deve estar contribuindo para que a corrosão do aço inoxidável diminuísse ainda mais no meio sob estudo, além do efeito dos agentes de limpeza anteriormente verificado. Correlacionando este resultado com o apresentado na Figura 2, é possível confirmar a ineficácia do programa de limpeza e desinfecção proposto. Pode-se, portanto, sugerir que o elevado aumento da impedância deve-se à presença do biofilme não removido da superfície do aço. Os valores do módulo $|Z|$ em baixas frequências (Figura 4 b) e a variação da fase (Figura 4 c) aumentaram gradualmente do aço nu para o aço após aplicação dos tratamentos (sem prévia formação de biofilme) e destes para o aço imediatamente antes do início do segundo ciclo, corroborando os resultados anteriormente descritos.

A avaliação do comportamento do aço diante da proliferação das bactérias e da contínua aplicação dos tratamentos ao longo dos 30 ciclos não evidenciou variação significativa em seu processo de corrosão, uma vez que os arcos capacitivos aumentaram ligeiramente com o passo dos ciclos (Figura 5 a). Esta observação deve-se, provavelmente, ao efeito conjunto da aplicação dos tratamentos, que poderia estar inibindo a corrosão pela estabilização da camada protetora do aço, e do biofilme que não foi removido da superfície.

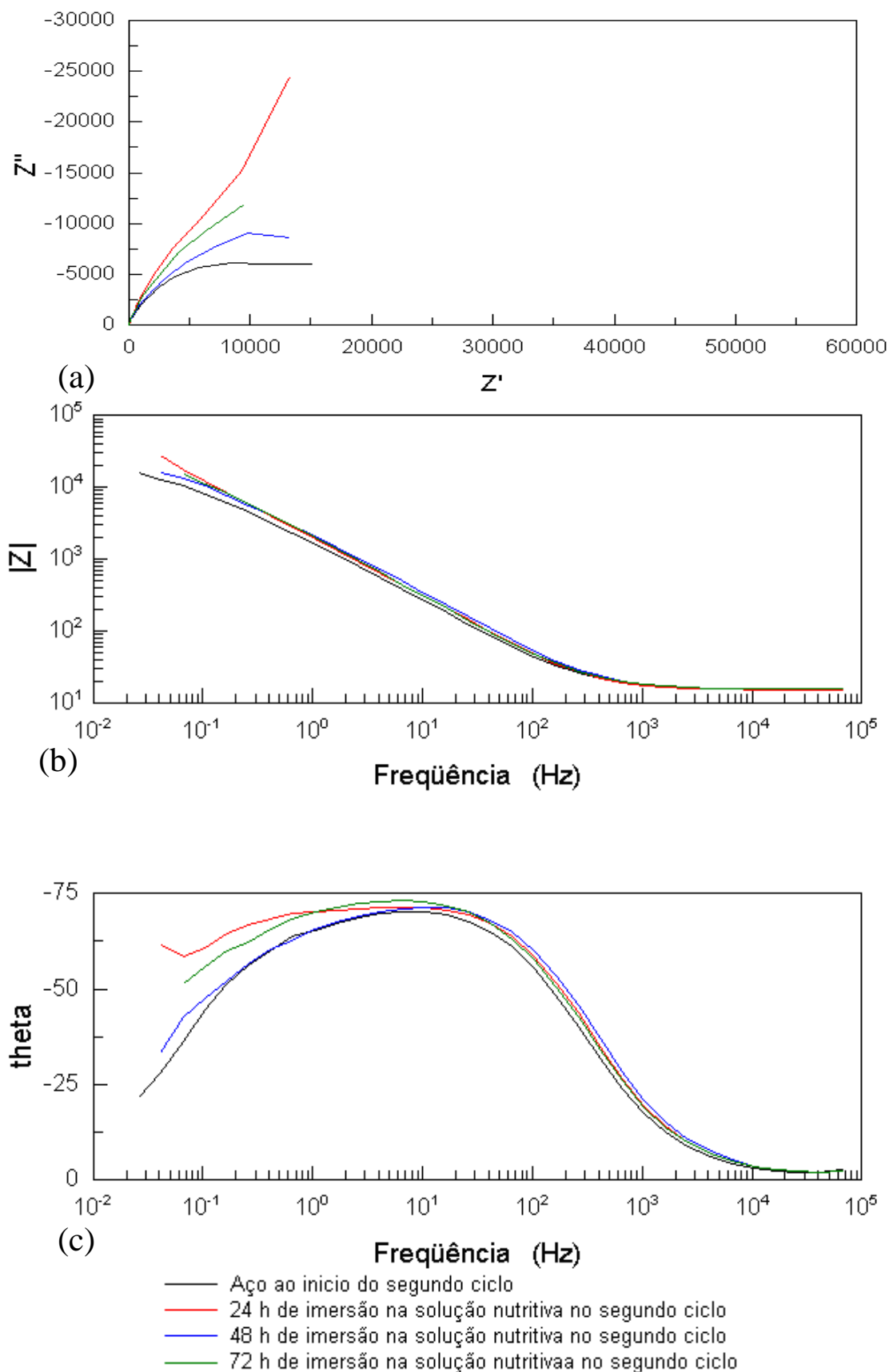


Figura 3 (a) Diagrama de Nyquist, (b) Diagrama de módulos de Bode e (c) Diagrama de fase dos corpos de prova.

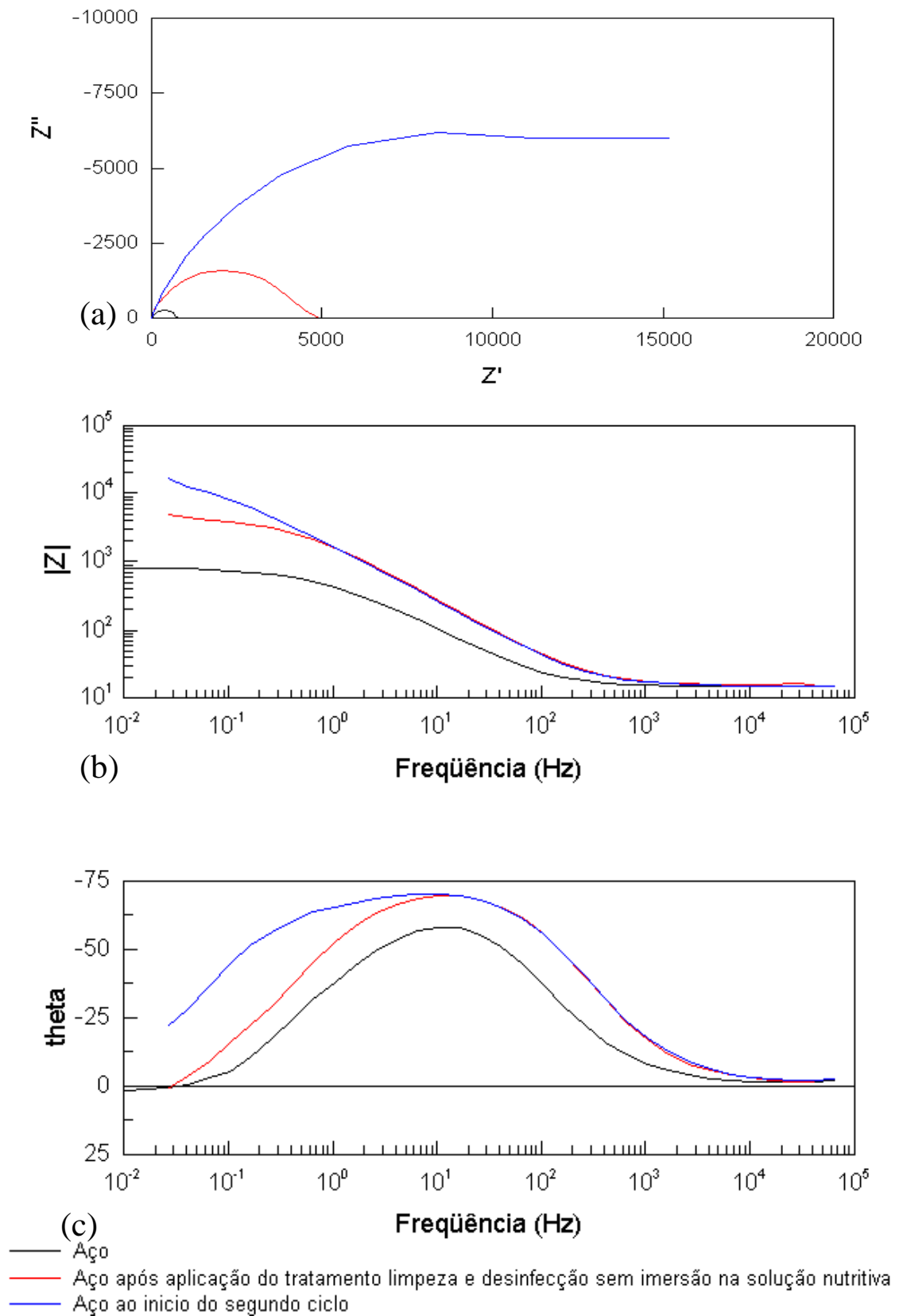


Figura 4(a) Diagrama de Nyquist, (b) Diagrama de Bode e (c) Diagrama de fase para o aço com e sem formação de biofilme

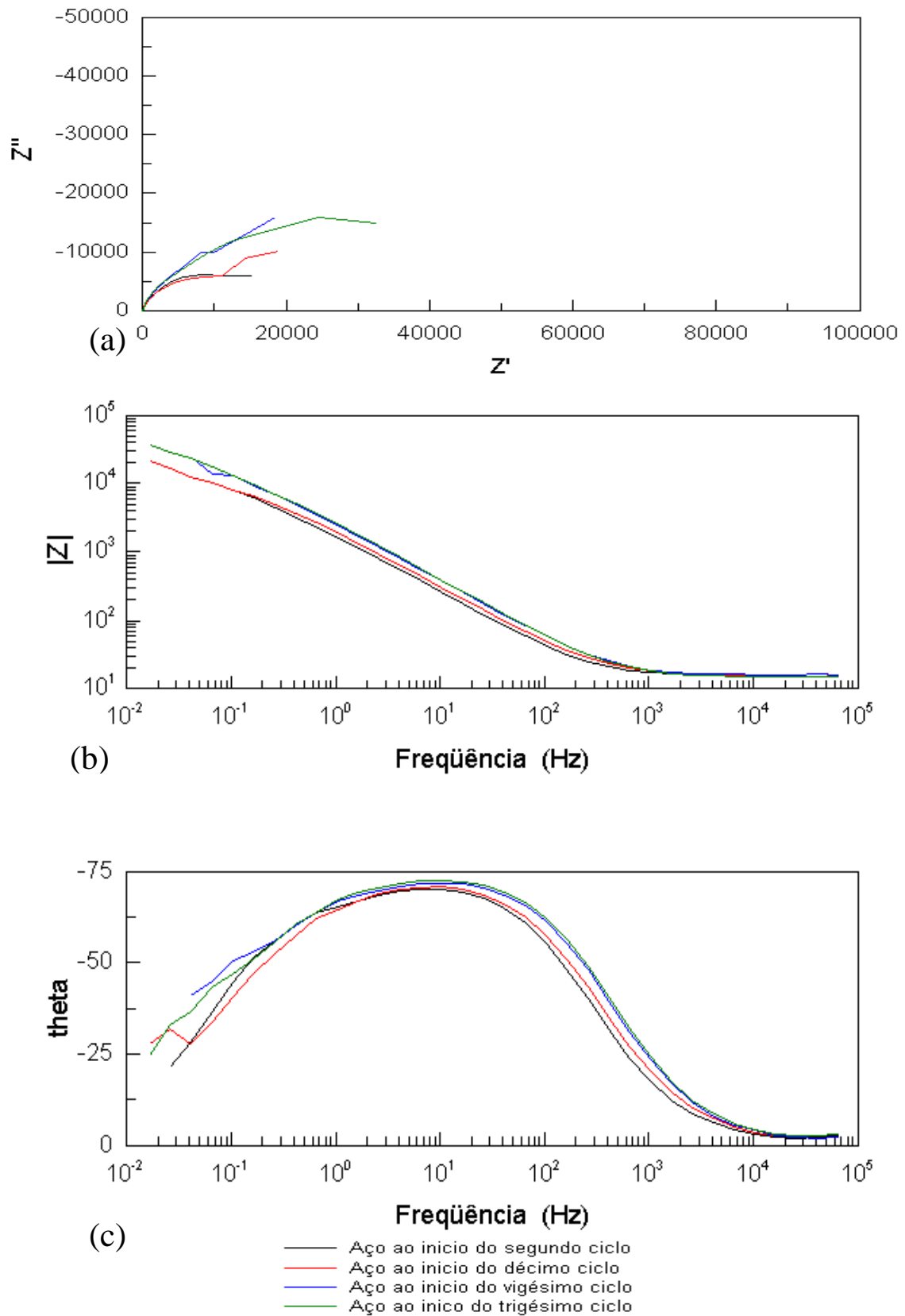


Figura 5 (a) Diagrama de Nyquist, (b) Diagrama de Bode e (c) Diagrama de fase para o aço ao longo dos ciclos

Conclusões

Ensaio realizados com a cepa bacteriana *Serratia marcescens* mostraram que se formou um biofilme, aderente à superfície do aço no início do experimento e que se manteve aderente ao longo do ensaio. Os tratamentos de limpeza e desinfecção não foram eficazes na remoção do biofilme. A pequena variação dos valores do módulo de impedância ao longo de 15 semanas de ensaio, indicou que tanto o biofilme formado como o tratamento de limpeza e desinfecção colaboraram para a inibição do processo de corrosão do aço inox 304 L no meio estudado.

Referências bibliográficas

- (1) ROLLET, C.; GAL, L.; GUZZO, J. Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiol**, Dijon, n. 290, p. 135-142, 2009.
- (2) CHONGDAR, S.; GUNASEKARAN, G.; KUMAR, P. Corrosion inhibition of mild steel by aerobic biofilm. **Electrochimica Acta**, Ambarnath, n. 50, p.4655-4665, 2005.
- (3) CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK J.F. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 2, 2003.
- (4) MYZKA, K.; CZACZYK, K. Characterization of adhesive exopolysaccharide (EPS) produced by *pseudomonas aeruginosa* under starvation conditions. **Curr Microbiol**, Poznan, n. 58, p. 541-546, Feb. 2009
- (5) JOUENNE, T. Biofilms bactériens. **Techniques de l'ingénieur**, Doc.BIO 600
- (6) GIBSON, H.; TAYLOR, J.H.; HALL, K.E.; HOLAH, J.T. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, Wolverhampton, n. 87, p. 41-48, 1999
- (7) WIRTANEN, G.;SALO, S.; HELANDER, I.M.; MATIILA-SANDHOLM, T. Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Espoo, n. 20, p. 37-50, 2001
- (8) KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Karnal, n. 42, p. 9-27, 1998
- (9) BAYNAST, H.; GAUDET, G.; CHERRE, J.P.; TROQUET, M. Influence de la corrosion sur la flore bactérienne dans les réseaux d'eaux potables. **Matériaux & Techniques**, Clermont-Ferrand, v. 99, n. 1, p. 93-100, 2011.
- (10) ANDRADE, N. J., BRIDGEMAN, T. A., ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v.61, n.7, p.833-838, 1998.

- (11) RONNER, A. B., WONG, A. C. L., Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of food Protection**, v.56, n.9, p.750-758, 1993
- (12) FARHAT, M.; TROUILHE, M.C; Briand, E; Moletta-Denat, M.; Robine, E.; Frere J. Development of a pilot-scale 1 for *Legionella* elimination in biofilm in hot water network: heat shock treatment evaluation. **Journal of Applied Microbiology**, Marne-la-Vallée v. 108, n. 3, p 1073–1082 , Mar 2010.
- (13) RUSHDY, A.A., OTHMAN, A.S. Bactericidal efficacy of some commercial disinfectants on biofilm on stainless steel surfaces of food equipment. **Annals of Microbiology**, Cairo, v. 61, n.3, p. 545–552, Dec. 2010.
- (14) PRABAKARAN ,K.; RAJESWARI, S. Electrochemical, SEM and XPS investigations on phosphoric acid treated surgical grade type 316L SS for biomedical applications. **Electrochimica Acta**, v. 39, p. 887-897, 2009.
- (15) KASNOWSKI, M. C; MANTILLA, S. P. S; OLIVEIRA, L. A. T; FRANCO, R. M. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária Semestral ISSN: 1679-7353 Ano VIII n. 2010 Jul.
- (16) EXTREMINA, C.I.; COSTA, L; AGUIAR, A.I.; PEIXE, L.; FONSECA, A.P. Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. **Journal of Microbiological Methods**. Porto, v. 84, p. 167-173, 2011