

Javier Gómez¹
María Luisa Gómez-Lus¹
Pedro Bas¹
Carmen Ramos¹
Fabio Cafini¹
Juan Ramón Maestre²
José Prieto¹

¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos gramnegativos?

¹Departamento de Medicina (Área de Microbiología), Facultad de Medicina UCM. Madrid
²Servicio de Microbiología. Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla. Madrid

RESUMEN

El objetivo del estudio fue investigar la formación de biofilms en bacterias gramnegativas y cuantificar la producción de biofilm mediante la aplicación de una técnica que permitiese una comparación de los resultados de la formación de biofilm entre las diferentes especies de gramnegativos. Se estudiaron un total de 153 cepas de bacilos gramnegativos correspondientes a 12 especies bacterianas por el método de la densidad óptica aplicando una modificación de la técnica descrita por Stepanovic et al. Los valores obtenidos mediante el análisis de la densidad óptica permiten clasificar a los microorganismos en formadores fuertes, moderados, débiles y no formadores. Los resultados obtenidos se han expresado de dos maneras, ambas utilizando el mismo método estadístico: sin estandarizar, donde los controles fueron diferentes dependiendo de los días en los que se realizaron las medidas; y estandarizados mediante un factor de corrección, utilizando el mismo control para todas las cepas de cada especie, lo que permite su homogeneización. Los resultados obtenidos en el estudio tras el análisis y estandarización establecen que de las 153 cepas de gramnegativos estudiados, 105 de ellas fueron no formadoras de biofilms, representando el 63,75% de los géneros estudiados. Consideramos que la estandarización y cuantificación de la producción de biofilm entre las bacterias gramnegativas puede resultar de utilidad en el ámbito clínico, ya que el conocimiento de la capacidad de producción de biofilm puede dirigir o enfocar el tratamiento de elección de las patologías producidas por dichos microorganismos.

Palabras clave: Biofilms, gramnegativos, densidad óptica, estandarización, comunidades bacterianas.

Biofilm score: is it a differential element within gram negative bacilli?

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate biofilm formation in Gram negative bacteria and to quantify biofilm production applying a new developed technique that made possible to compare results about biofilm formation within the different Gram negative bacteria species. A total of 153 Gram negative strains corresponding to 12 different bacterium species were studied applying a variation of the optic density measurement technique reported by Stepanovic et al. Data obtained with optic density analysis allow to classify microorganisms in strong biofilm developers, moderate biofilm developers, weak biofilm developers and no biofilm developers. The results were expressed in two ways, using in both cases the same statistical method: without standardization, where controls were different depending on the day optic density measurements were performed, and standardized using a correction factor, using the same control for every strain of all our bacterium species in our study, which allows result homogenization. The obtained results in our study after data analysis and standardization show that over the 153 Gram negative strains in our study, 105 of them were no biofilm developers, representing 63.75% of all the studied bacterium genera. We consider that standardization and quantification of biofilm development in Gram negative bacteria can be useful in clinical practice, because biofilm development ability can lead or focus the gold treatment of pathologies produced by these microorganisms.

Key Words: Biofilms, Gram negatives, optic density, standardization, bacterial communities.

INTRODUCCIÓN

Los biofilms se definen como el crecimiento en la interfase sólido-líquido o sólido-gas formado por las diversas poblaciones bacterianas adheridas a una superficie inerte o a un tejido vivo mediante un proceso de sedimentación formando una estructura que se mantiene cohesionadas mediante la sín-

Correspondencia:
José Prieto Prieto
Departamento de Medicina. Área de Microbiología, Universidad Complutense de Madrid
Avenida Complutense s/n
28040 Madrid
Tfno: +34 91 3941511
Fax: +34 91 3941511
E-mail: jprieto@med.ucm.es

tesis de una matriz de exopolisacáridos por las bacterias que conforman el biofilm. La formación de biofilms no parece estar restringida a determinados microorganismos y se considera que bajo condiciones adecuadas, todos los microorganismos pueden formar biofilms^{1,2}. La formación de biofilms por las diferentes especies de microorganismos ha sido ampliamente estudiada y se conoce el proceso mediante el cual se produce la formación del biofilm: las bacterias en su forma planctónica se adhieren a una superficie y crean una microcolonia, la cual posteriormente dará lugar a un biofilm³. Pero en estudios recientes, se ha descubierto que la propia colonia bacteriana posee una estructura interna similar a los biofilms bacterianos, por lo que podemos considerar el biofilm como el estadio final e irreversible del proceso de formación de biofilm, mientras que la colonia bacteriana se comporta con un biofilm y puede ser considerada como un paso previo al biofilm tal y como se concibe hoy en día^{4,5}.

Las bacterias organizadas formando un biofilm desarrollan significativas diferencias fenotípicas, bioquímicas y morfológicas respecto a su presentación en forma planctónica, las cuales permiten a las bacterias la supervivencia dentro del biofilm^{4,6}. La hostilidad del entorno y la cantidad de nutrientes del medio imponen determinados patrones estructurales a las comunidades microbianas, que modifican su comportamiento para adaptarse al entorno. Este sistema de organización tan complejo demuestra la importancia que tiene el conocimiento adecuado de su estructura y de los mecanismos que permiten a las bacterias organizarse a modo de biofilms. Por este motivo, es muy importante determinar qué especies bacterianas son capaces de formar biofilms y hallar un método apropiado que permita la cuantificación de la formación de biofilms en las distintas especies bacterianas.

Existen muchos métodos que permiten la demostración de la formación de biofilm, pero frecuentemente consisten en teñir el biofilm formado en un tubo de cultivo o una placa de micro-titer para demostrar su existencia o no, lo cual solamente aporta una información cualitativa de las características del biofilm (su existencia o ausencia) pero no permite establecer una relación entre la presencia de biofilm y la capacidad del microorganismo de producir dicho biofilm^{7,8}. Por este motivo, es necesario buscar un método de cuantificación de la producción de biofilm que sea aplicable a cualquier biofilm procedente de cualquier microorganismo y reproducible en cualquier tipo de circunstancia, lo cual se consigue mediante la medición de la densidad óptica del biofilm, ya que ésta es variable dependiendo de las características intrínsecas del biofilm y nos aporta una información sobre la estructura de dicho biofilm en relación al tipo de microorganismo que lo sintetiza^{7,8}.

MATERIAL Y MÉTODOS

Características de las muestras estudiadas. Este estudio se llevó a cabo en el Departamento de Medicina (Área de Microbiología) de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Las muestras utilizadas en el presente estudio proceden de aislados clínicos de pacientes que presen-

taban infección urinaria y/o infección de partes blandas. Todas las cepas del presente estudio presentan un origen infeccioso. Para la realización de este estudio se emplearon un total de 12 especies diferentes de gramnegativos repartidos en 153 cepas como sigue: *Acinetobacter baumannii* (10 cepas); *Pseudomonas aeruginosa* (10 cepas); *Stenotrophomonas maltophilia* (10 cepas); *Morganella morganii* (6 cepas); *Providencia stuartii* (5 cepas); *Proteus mirabilis* (9 cepas); *Serratia marcescens* (14 cepas); *Citrobacter freundii* (15 cepas); *Escherichia coli* (20 cepas); *Klebsiella pneumoniae* (8 cepas); *Enterobacter aerogenes* (20 cepas); *Salmonella enteritidis* (26 cepas).

Test en placa de Micro-titer. Partiendo de un inóculo de 10^5 UFC, se toma la cantidad de 200 μ l y se introduce en 1,8 ml. del medio de cultivo TSB (Bacto™ Tryptic Soy Broth. BD) y con esta dilución se toman 200 μ l que se pasan a una placa de micro-titer de 96 pocillos. Se utilizó para cada cepa tres pocillos y un control positivo y negativo de bacterias productoras de biofilm y control del medio TSB sin inóculo, procediendo a su incubación en estufa a 35°C durante 24 horas. Tras el periodo de incubación se eliminó el medio de cultivo de manera delicada y se realizaron varios lavados con 200 μ l de solución salina. Continuando con la técnica, se introducen 150 μ l de metanol por análisis ACS-ISO (Panreac) durante 20 minutos. Finalizado el tiempo, se procede a su eliminación y lavado, dando paso a la coloración con cristal violeta (QCA) durante un periodo de 20 minutos. Transcurrido el tiempo se procede a su eliminación, lavado y secado a temperatura ambiente, para finalizar con 150 μ l de Etanol Absoluto PA (Panreac). Transcurridos unos minutos se procede a su medición por espectrometría con GCB Cintra 101 a una longitud de onda de 575 nm. Se tomaron cortes semifinos de 0,5 μ m de espesor de los biofilms y se tiñeron con una solución de azul de toluidina al 1% y visualizados al microscopio óptico (Leica, DM5000).

Interpretación de los resultados. La interpretación de los resultados requiere definir un punto de corte que separe a las bacterias no formadoras de biofilms de aquellas que sí son formadoras. Nosotros utilizaremos la técnica estadística descrita por Stepanovic et al. para la interpretación de los resultados^{5,6}. Para este estudio se calculó la media de la densidad óptica (DO) de los controles y se midió la DO de cada cepa bacteriana individualmente. A continuación, procedemos a definir el punto de corte (DOc) utilizado. El DOc se define como tres desviaciones estándar (SD) sobre la DO media de los controles: $DOc = DO \text{ media de los controles} + (3 \times SD \text{ de los controles})$. La DO final de cada una de las cepas podemos expresarla como el valor de la DO medido para cada una de las cepas sustrayendo el valor de DOc ($DO = DO \text{ de una cepa} - DOc$). Si algún valor obtenido de DO resultaba negativo, se tomaba como valor cero, mientras que cualquier valor positivo indicaba la producción de biofilm^{7,8}.

Atendiendo a los resultados obtenidos, las bacterias se clasificaron en:

- No Formadoras: La DO de la cepa se encuentra por debajo del punto de corte establecido ($DO \leq DOc$)
- Formadores débiles: La DO de la cepa se encuentra entre

Tabla 1 Producción de biofilm

Especie	Nº Cepas estudiadas	Fuerte	Moderado	Débil	No Formador
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10	0	2	2	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	2	2	4	2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	10	7	1	0	2
<i>Morganella morganii</i>	6	3	0	1	2
<i>Providencia stuartii</i>	5	0	0	0	5
<i>Proteus mirabilis</i>	9	0	0	0	9
<i>Serratia marcescens</i>	14	1	7	3	3
<i>Citrobacter freundii</i>	15	0	0	3	12
<i>Escherichia coli</i>	20	0	2	1	17
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	0	2	1	5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	20	0	0	2	18
<i>Salmonella enteritidis</i>	26	0	1	1	24
Totales	153	13	17	18	105

el punto de corte y el valor de DO correspondiente al doble del mismo ($DOc < DO \leq 2DOc$).

- Formadores moderados: La DO de la cepa se encuentra entre el doble del valor del punto de corte y el valor de DO correspondiente al cuádruple del mismo ($2DOc < DO \leq 4DOc$).

- Formadores fuertes: La DO de la cepa se encuentra por encima del cuádruple del valor del punto de ($4DOc < DO$).

Los valores de DO de los controles fueron diferentes dependiendo de los días en los que se realizaron las medidas, por lo que encontramos que las cepas estudiadas en un mismo día no presentan el mismo control que las estudiadas al día siguiente. Para eliminar este sesgo, se recurre a la estandarización de resultados.

Todos los datos fueron expresados posteriormente en tablas por especie y globales en valor absoluto y porcentaje de formación de biofilm.

Estandarización de resultados. Para poder establecer una visión global de la formación de biofilms en gramnegativos es necesario que los resultados obtenidos sean valorados por parámetros comunes que permitan no sólo valorar la formación de biofilms a nivel de cada cepa, sino también a nivel de la especie. Para ello, los resultados obtenidos se sometieron a un proceso de estandarización que permitía valorar la formación de biofilms de todas las bacterias estableciendo un punto de corte común para todas las cepas y a su vez permitía eliminar el error correspondiente a la utilización de distintos controles.

Se realizó la media de los 12 valores de DO correspondientes a los controles de cada una de las especies estudiadas, obteniendo un valor estándar de control (DOe) de 0,210. También se calculó la desviación estándar de los 12 valores de control obteniendo un valor de 0,043. Con estos nuevos parámetros

definimos un nuevo punto de corte estándar (DOce): $DOce = 0,210 + (3 \times 0,043)$; $DOce = 0,339$.

Utilizando estos nuevos valores de referencia, la nueva clasificación de las bacterias en función de la producción de biofilm es la siguiente:

- No Formadoras: La DO de la cepa se encuentra por debajo del punto de corte establecido ($DO \leq 0,339$)

- Formadores débiles: La DO de la cepa se encuentra entre el punto de corte y el valor de DO correspondiente al doble del mismo ($0,339 < DO \leq 0,678$).

- Formadores moderados: La DO de la cepa se encuentra entre el doble del valor del punto de corte y el valor de DO correspondiente al cuádruple del mismo ($0,678 < DO \leq 1,356$).

- Formadores fuertes: La DO de la cepa se encuentra por encima del cuádruple del valor del punto de ($1,356 < DO$).

Los nuevos datos fueron expresados posteriormente en tablas por especie y globales en valor absoluto y porcentaje de formación de biofilm.

RESULTADOS

Cuantificación de la producción de biofilm. Los resultados obtenidos en el estudio tras el análisis y estandarización establecen que de las 153 cepas de gramnegativos estudiados, 105 de ellas fueron no formadoras de biofilms, representando el 63,75% de los géneros estudiados. El resto de cepas se dividen en 13 fuertes (12,25%), 17 moderados (11,58%) y 18 débiles (12,42%)

Dentro de las especies estudiadas destacamos como formadores fuertes de biofilms a *S. maltophilia* (70%) y *M. morganii* (50%); dentro de los formadores moderados se en-

Tabla 2 Porcentaje de producción de biofilm

Especie	Nº Cepas estudiadas	Producción Biofilm (%)			
		Fuerte	Moderado	Débil	No Formador
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10	0	20	20	60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	20	20	40	20
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	10	70	10	0	20
<i>Morganella morganii</i>	6	50	0	16,67	33,33
<i>Providencia stuartii</i>	5	0	0	0	100
<i>Proteus mirabilis</i>	9	0	0	0	100
<i>Serratia marcescens</i>	14	7,14	50,00	21,43	21,43
<i>Citrobacter freundii</i>	15	0	0,00	20	80
<i>Escherichia coli</i>	20	0	10	5	85
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	0	25	12,50	63
<i>Enterobacter aerogenes</i>	20	0	0	10	90
<i>Salmonella enteritidis</i>	26	0	3,85	3,85	92,30
Totales	153	12,25	11,58	12,42	63,75

cuentra *S. marcescens* (50%); y como formador débil se sitúa *P.aeruginosa* (40%); mientras que *A. baumannii* (60%), *C. freundii* (80%), *E. coli* (85%), *K. pneumoniae* (63%), *E. aerogenes* (90%), *S. enteritidis* (92,30%), *P. mirabilis* (100%) y *P. stuartii* (100%) son considerados no formadores de biofilms.

Las especies cuyos resultados pre y pos estandarización han presentado variaciones han sido *S. marcescens*, *C. freundii*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. enteritidis*.

DISCUSIÓN

En este estudio se ha tratado de aportar un método para realizar una cuantificación de la producción de biofilm en gramnegativos mediante la utilización de diversas especies de microorganismos productores de patología en la clínica habitual. Las publicaciones científicas acerca de la producción de biofilm es extensa y ampliamente cubierta por muchos autores, pero una revisión más detallada de la literatura científica acerca del biofilm revela que existe una gran cantidad de información acerca del biofilm en grampositivos y gramnegativos, pero habitualmente restringida a las especies de referencia, como *Staphylococcus aureus* en grampositivos y *P. aeruginosa* o *E. coli* en gramnegativos. No obstante, una revisión más minuciosa de toda la literatura sí que permite encontrar referencias al biofilm formado por otros microorganismos, aunque no de manera tan extensa como en los microorganismos previamente citados. En nuestro estudio acerca de la producción de biofilm en gramnegativos pudimos evaluar la formación o no formación de biofilm en las diferentes especies estudiadas, pero nosotros queríamos dar un paso más y poder clasificar las especies de gramnegativos según características

cualitativas de la producción de biofilm (formadores fuertes, moderados, débiles o no formadores) en lugar de la forma dicotómica formador/no formador, todo ello mediante la relación de dicha variable con otra de tipo cuantitativo que fuese medible y reproducible en el laboratorio mediante el diseño de un protocolo adecuado. Partiendo de esta premisa, la revisión de la literatura acerca de este tema reveló sólo un estudio realizado en grampositivos^{7,8}, pero ninguno en gramnegativos, por lo que se decidió aplicar una variación de la técnica descrita en grampositivos a nuestro estudio adaptada al estudio de gramnegativos.

La participación del biofilm en el desarrollo patogénico de diferentes enfermedades es ampliamente conocido^{6,9,10,11}, siendo un ejemplo importante las infecciones asociadas a catéteres que se producen en el contexto hospitalario, así como la dificultad del tratamiento de dichas patologías cuando el asentamiento del biofilm se ha producido en el lugar de la infección. Por ello, consideramos que el estudio de la producción de biofilm en gramnegativos es importante desde el punto de vista terapéutico, ya que el conocimiento acerca de no sólo si el microorganismo es productor de biofilm o no, sino de si además el microorganismo es un formador fuerte o moderado, puede condicionar mucho el pronóstico y el tratamiento de determinadas patologías en la que dichos microorganismos estén implicados, pudiendo desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para la identificación precoz de microorganismos formadores fuertes de biofilm así como el desarrollo de nuevas guías terapéuticas y protocolos de prevención de la infección por determinados microorganismos cuya capacidad de producción de patología asociada a la formación de biofilm es conocida previamente^{1,4,5,11-13}.

Los resultados de nuestro estudio demuestran que existe un gran porcentaje de gramnegativos no formadores de biofilm, aunque algunas especies pueden ser formadoras moderadas o fuertes. Pero la literatura científica acerca del biofilm en gramnegativos pone de manifiesto que la variación de determinadas condiciones del medio puede hacer variar la formación de biofilm de gramnegativos, permitiendo que microorganismos que de forma natural no son formadores de biofilm desarrollen la capacidad de convertirse en formadores moderados o incluso fuertes¹. Este punto es quizás el más crítico del estudio, ya que este método sólo es capaz de cuantificar la producción de biofilm obtenido *in vitro* y este hecho no refleja con exactitud el comportamiento del microorganismo en un entorno *in vivo*. Las condiciones del medio *in vivo* están en constante cambio, ya sea por la utilización de un tratamiento antimicrobiano; el uso de catéteres, sondas, drenajes, etc.; la existencia de estados de inmunosupresión o defectos en la inmunidad; entre otros ejemplos, situaciones que no son del todo reproducibles en un entorno *in vitro*, el cual presenta unas condiciones mucho menos variables y más controlables, ya que existe un menor número de elementos que puedan interferir con el resultado del experimento. Por tanto, es necesario señalar la existencia de discrepancias entre la utilización de un entorno *in vitro* y el entorno *in vivo* debido fundamentalmente a las condiciones de experimentación. Se deben elaborar protocolos que permitan establecer una extrapolación de los resultados obtenidos bajo condiciones de experimentación *in vitro* optimizadas e ideales, las cuales proporcionan una máxima formación de biofilm, a una situación real *in vivo*^{1,7,8}.

Debido a este hecho, es importante identificar a aquellos microorganismos que son formadores fuertes de biofilm per se, así como identificar también a los microorganismos que bajo determinados cambios de las condiciones del medio producidas en un medio *in vivo* son capaces de formar biofilm, ya que este hecho puede condicionar el pronóstico y el tratamiento de la infección por dicho microorganismo¹.

Consideramos que el paso previo a toda infección por un microorganismo implica una adaptación previa al medio en forma de colonización y producción de biofilm^{4,5}. El método de estudio utilizado es universal, pero no es capaz de detectar toda la variabilidad de la producción de biofilm, existiendo diferencias en la producción de biofilm dependiendo del medio utilizado. Esto se debe a que el método de estudio utilizado tiene sus limitaciones técnicas que en ocasiones pueden dificultar la obtención de unos resultados completamente exactos, ya que existen multitud de factores que se deben tener en cuenta: la contaminación del medio o los controles, la mala calibración de los aparatos de medida o errores humanos de observación, por ejemplo, los cuales plantean una dificultad añadida a la hora de homogeneizar y presentar los datos del estudio. Para paliar el efecto de estos posibles errores y disminuir su incidencia al máximo, otro punto crítico del estudio fue lograr una estandarización del experimento que permitiese una homogeneización de los resultados obtenidos para todas nuestras especies bacterianas, ya que se hace imprescindible la necesidad de disponer de métodos de estudio y de valoración de carácter objetivo que permitan universalizar los resultados.

Consideramos que este método de estudio aporta una he-

rramienta importante, atractiva y de realización sencilla que permite un conocimiento claro acerca de la cuantificación de la producción de biofilm en gramnegativos y que también aporta una visión de conjunto de todas las especies incluidas dentro de los gramnegativos, lo que permite a su vez una mayor comprensión de las implicaciones que una infección por uno de estos microorganismos puede producir en diversas situaciones clínicas.

FINANCIACIÓN

No se ha recibido ningún tipo de financiación externa para la realización del estudio por parte de ninguna organización y/o empresa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nucleo E, Fugazza G, Migliavacca R, Spalla M, Comelli M, Pagani L, et al. Differences in biofilm formation and aggregative adherence between -lactam susceptible and-lactamases producing *P. mirabilis* clinical isolates. *New Microbiologica* 2010, 33:37-45.
2. Pais-Correia A-M, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, Gessain A, et al. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med* 2010; 16:83-90. DOI:10.1038/nm.2065.
3. Watnick P, Kolter R. Biofilm, City of Microbes. *J Bacteriol* 2000; 182:2675-79. DOI: 10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000.
4. Gómez-Aguado F, Alou L, Corcuera MT, Sevillano D, Alonso MJ, Gómez-Lus ML, et al. Evolving Architectural Patterns in Microbial Colonies Development. *Micros Res Tech* 2011; 74:925-30. DOI: 10.1002/jemt.20977.
5. Gómez-Aguado F, Gómez-Lus ML, Corcuera MT, Alou L, Alonso MJ, Sevillano D, et al. Colonial architecture and growth dynamics of *Staphylococcus aureus* resistant to methicilin. *Rev Esp Quimioter* 2009; 22: 224-7.
6. Uhlich GA, Cooke PH, Solomon EB. Analyses of the Red-Dry-Rough Phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 Strain and Its Role in Biofilm Formation and Resistance to Antibacterial Agents. *Appl Environ Microbiol* 2006, 72:2564. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2564-2572.2006.
7. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Švabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; 40: 175-9.
8. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007; 115:891-9.
9. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010; 74:417-33. DOI: 10.1128/MMBR.00016-10.
10. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cel Microb* 2009; 11:1034-43. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x
11. López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2:a000398. DOI: 10.1101/cshperspect.a000398

12. Kolter R. Biofilms in lab and nature: a molecular geneticist's voyage to microbial ecology. *Int Microbiol* 2010; 13:1-7. DOI: 10.2436/20.1501.105.
13. Werner E, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Heydorn A, Molin S, et al. Stratified Growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2004 ; 70:6188-96. DOI: 10.1128/AEM.70.10.6188-6196.2004.