

Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes

Xavier, J. B.^{1,2*}, C. Piciooreanu¹, J. S. Almeida^{1,2}, M. C. M. van Loosdrecht¹

¹ Departamento de Biotecnologia, Universidade Técnica de Delft, Julianalaan 67, 2628 BC Delft, Países Baixos

² Grupo de Biomatemática do Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, R. Qta Grande 6, 2780 Oeiras, Portugal

³ Departamento de Biometria e Epidemiologia, Medical University of South Carolina, 135 Rutledge Avenue, PO Box 250551, Charleston, SC 29425, USA.

* E-mail: j.xavier@tnw.tudelft.nl

Introdução

Os biofilmes, definidos como comunidades de microrganismos imobilizados conjuntamente numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares de origem microbiana, representam a parte maioritária de toda a vida microbiana, tanto em quantidade como em termos de actividade. Um biofilme forma-se naturalmente em qualquer superfície sólida em contacto com água não esterilizada. Agregados microbianos presentes em separação de fases ar-líquido ou líquido-líquido, ou agregados flutuantes como flocos ou grânulos, enquadram-se igualmente na definição de biofilmes. Fases essenciais de ciclo de nutrientes (e.g. azoto, enxôfre e carbono) têm lugar em biofilmes multi-espécie existentes em sistemas aquáticos e nos solos. Apesar da ubiquidade dos biofilmes ser geralmente associada aos finos filmes microbianos que prontamente se formam na maior parte das superfícies sólidas, com espessuras da ordem dos milímetros ou mesmo micrometros, a espessura de alguns biofilmes pode atingir vários centímetros, como no caso dos tapetes de algas.

Os biofilmes têm importância em várias actividades humanas. Estações de tratamento de águas ou de efluentes removem organismos patogénicos e reduzem a quantidade de matéria orgânica na água ou efluente através de interacção com biofilmes. Numerosos bioprocessos também utilizam biofilmes. Alguns exemplos incluem a produção de vinagre (Boletti 1921), produção de ácido cítrico (Sakurai et al. 1997), aplicações farmacéuticas através da produção de metabolitos secundários (Okita e Kirwan 1986), e processos biológicos para a extracção de metais a partir de minério (Rawlings 2002).

O crescimento não desejado de biofilmes, em contrapartida, tem um impacto negativo em várias actividades. Estragos em equipamento através da biocorrosão causada por biofilmes, contaminação de produtos, perdas energéticas relacionadas com o aumento de atrito, resistência acrescida à transferência de calor e perdas de pressão são alguns dos efeitos adversos da acumulação de biofilmes microbianos (Jass e Walker 2000) e representam perdas significativas para indústrias a nível global. Tais problemas são agravados pela resistência acrescida a métodos de desinfeção e limpeza que os biofilmes demonstram, comparando com células bacterianas livres (Simoes et al. 2003), pelo que os métodos convencionais de desinfeção não são suficientes e requerem

por vezes doses elevadas de desinfectante, indesejadas de um ponto de vista ambiental (Jass e Walker 2000). A contaminação microbiana de canalizações constitui uma fonte de contaminação de águas (Walker et al. 1995) e a acumulação de biofilmes nos cascos de navios é responsável por atrito acrescido e consequentes gastos de combustível (Cooksey e Wigglesworthcooksey 1995; Walker et al. 1995; Schultz e Swain 2000).

O reconhecimento da ubiquidade dos biofilmes por microbiologistas clínicos e de saúde pública ajudou ao reconhecimento de que numerosas doenças infecciosas, tais como fibrose quística, estão relacionadas com biofilmes, com o crescimento de biofilmes podendo ocorrer associado a tecidos vivos (Costerton et al. 1999). Algumas infecções causadas pela utilização de dispositivos médicos em ambientes clínicos, tais como catéteres, estão de igual modo relacionadas com biofilmes. Microrganismos da pele de doentes ou trabalhadores clínicos desenvolvem biofilmes em tais objectos, que deste modo se tornam num ponto de entrada para o organismo (Donlan 2001). A matriz de polímeros extracelulares que mantém o biofilme coeso, frequentemente denominada por EPS (do inglês extracellular polymeric substances), é possivelmente também responsável pela persistência das infecções relacionadas com biofilmes (Costerton et al. 1978), e pode até proteger os microrganismos de antibióticos, já que estudos experimentais *in vitro* revelam que células bacterianas em biofilmes são mais resistentes a antibióticos do que células da mesma espécie no estado planctónico (Ceri et al. 2001).

Como resultado do seu envolvimento num largo espectro de actividades humanas, investigadores de várias áreas têm vindo a estudar os biofilmes: Quer para impedir infecções relacionadas com biofilmes ou a sua acumulação indesejada em equipamento industrial, quer para influenciar o desenvolvimento e actividade de um biofilme para uma aplicação bioindustrial particular. O espectro de técnicas utilizadas para a investigação dos biofilmes é igualmente vasto, de acordo com o elevado número de áreas científicas envolvidas, e vai desde vários métodos de microbiologia molecular aplicados a biofilmes mono-espécie cultivados em laboratório, até à utilização de micro-sensores para o estudo de tapetes de algas (Larkum et al. 2003), passando pela utilização de reactores à escala industrial (Tijhuis et al. 1996).

O crescimento microbiano em biofilmes

As vantagens de uma célula bacteriana em se encontrar contida num biofilme são numerosas, nomeadamente no que diz respeito à protecção contra agentes agressivos. Para além das já mencionadas resistências a desinfectantes e antibióticos, os biofilmes demonstram também resistência acrescida à radiação UV (Elasri e Miller 1999), a desidratação (a matriz de EPS é altamente hidratada) e a predadores como protozoários. Esta resistência acrescida a agentes agressivos é, no entanto, uma particularidade do facto de que a actividade levada a cabo por biofilmes é notoriamente diferente daquela levada a cabo por células crescendo num modo planctónico.

A maioria das características atribuídas ao crescimento microbiano em biofilmes pode ser explicada invocando fenómenos de transferência (Stewart 2003), i.e. as implicações físicas do crescimento em sistemas geometricamente tão diferentes como é o caso dos biofilmes em comparação com as células livres. Em culturas de células livres ou planctónicas, o transporte de solutos do meio líquido (normalmente bem homogeneizado) para uma célula, ou vice-versa, é um processo relativamente rápido, não constituindo um passo limitante na totalidade dos bioprocessos que ocorrem na célula. Agregados microbianos, no entanto, são ambientes densamente empacotados onde o fluxo de líquido é limitado. Apesar do facto de se observar fluxo de líquido ocorrendo em poros nos biofilmes (De Beer *et al.* 1994; Stoodley *et al.* 1994) – “canais de água” que rodeiam os agregados celulares em alguns tipos de biofilmes – nos agregados em si, toda a transferência de massa se dá através de difusão (De Beer *et al.* 1994), um processo muito mais lento. Este facto é ainda agravado por limitações difusionais acrescidas, causadas pela matriz do biofilme (Beuling *et al.* 2000; Stewart 2003). Em agregados microbianos suficientemente espessos, usuais em biofilmes, as distâncias difusionais são suficientemente grandes para que o transporte de solutos de e para as células bacterianas interiores se torne lento em comparação com as cinéticas de bioprocessos dos microrganismos. Nestas situações formam-se gradientes de solutos no biofilme, e a transferência de massa torna-se num processo limitante para os bioprocessos (Characklis *et al.* 1990).

Nestes ambientes em limitação de transporte de solutos, os gradientes de concentração formados constituem condições favoráveis para a criação de micro-nichos. Baixas concentrações de oxigénio observadas no interior de flocos em lamas activadas (Schramm *et al.* 1999; Meyer *et al.* 2003) e outros biofilmes (De Beer *et al.* 1993) podem originar micro-ambientes propícios à proliferação de organismos anaeróbios, apesar da presença de oxigénio em solução no meio líquido. Gradientes de solutos em biofilmes orais (placa bacteriana) são a causa da acidez local responsável pelas cáries dentárias: Nestes biofilmes, bactérias acidogénicas rapidamente metabolizam açúcares produzindo ácidos que gradualmente se acumulam criando um micro-ambiente ácido, sendo ao mesmo tempo responsável pela corrosão

dentária e pela limitação de espécies bacterianas competitivas, essas associadas a dentes saudáveis (Marsh 2003). Limitações de transferência de massa que impedem penetração eficiente de antibióticos no biofilme são também, frequentemente, apontadas como possíveis causas para a resistência a antibióticos mencionada anteriormente (ver Mah e O’Toole 2001 para referências).

À luz destes factos, uma interpretação do comportamento de biofilmes baseada na extrapolação da célula planctónica não é possível sem o conhecimento dos processos de transferência de massa no contexto de uma morfologia complexa.

Estrutura de biofilmes

Por estrutura de biofilmes entende-se (1) a forma tridimensional (3D) do biofilme em conjunto com (2) a distribuição espacial das substâncias imobilizadas, tanto bióticas como abióticas, no mesmo biofilme. A forma do biofilme define a forma da interface biofilme/líquido através da qual todo o transporte de massa de solutos ocorre, e as distâncias difusionais que definem micro-ambientes. A distribuição espacial de substâncias imobilizadas diz respeito à distribuição espacial de EPS, células bacterianas (possivelmente de diferentes espécies), e eventualmente de partículas inorgânicas. A estrutura pode ser descrita por meio de propriedades morfológicas, tais como a espessura do biofilme, densidade do biofilme e forma da superfície do biofilme.

O interesse de investigadores de diversas áreas levou à investigação de diversos sistemas de biofilmes, utilizando, de igual modo, um vasto leque de técnicas. Este estudo multidisciplinar originou a descrição de variados tipos de estrutura de biofilmes e a formulação de modelos conceptuais (ver Stoodley *et al.* 1999 para referências). No entanto, um modelo conceptual formulado a partir da investigação de um sistema particular não deve ser generalizado para a totalidade dos sistemas de biofilmes, com aconteceu no passado com o modelo designado *water channel model* (Costerton *et al.* 1994). Tal generalização parece-nos incorrecta, em especial considerando a evidência de que cada comunidade microbiana é única (Tolker-Nielsen e Molin 2000). Para além disso, o facto de que variações de estrutura se podem observar para o mesmo sistema alterando as condições de operação (van Loosdrecht *et al.* 1995) é bem conhecido. A visão concensual de que a estrutura de biofilmes pode demonstrar elevada heterogeneidade espacial e temporal (Stoodley *et al.* 1999) parece-nos mais exacta.

A estrutura de biofilmes tem um papel muito importante na actividade dos mesmos. Em conjunto com as condições hidrodinâmicas e fornecimento de nutrientes, a forma do biofilme influencia a transferência de massa das espécies químicas envolvidas. A estrutura, por sua vez, é definida em parte pela actividade do biofilme: Crescimento das células microbianas e sua divisão, produção e excreção de EPS, em conjunto com factores externos como forças de atrito definidas pela hidrodinâmica e outras forças mecânicas envol-

vidas (por exemplo, processos mecânicos de limpeza, predação por protozoários) moldam a estrutura dos biofilmes (Fig. 1). Entender esta relação entre estrutura e actividade de biofilmes e os factores que fisicamente moldam a forma do biofilme é crucial para utilizar ou controlar biofilmes em ambientes industriais ou clínicos (Stoodley *et al.* 1999).

Processos envolvidos na formação e acumulação de biofilmes

A formação e acumulação de biofilmes é resultado de vários processos de natureza física e biológica. Segue-se uma lista com alguns destes processos, cujo papel no desenvolvimento de biofilmes é de conhecimento aceite (Fig 2):

1. Transporte de células livres do meio líquido para uma superfície sólida e sua subsequente fixação.
2. Crescimento e divisão de células fixas à custa de nutrientes provenientes do líquido circundante, conjuntamente com a produção e excreção de EPS.
3. Fixação de células bacterianas flutuantes (e outras partículas), contribuindo para a acumulação do biofilme.
4. Libertação de material celular segundo dois mecanismos diferentes: (a) erosão (perda de células individuais) ou (b) perda de agregados maiores.

Após a fixação inicial de células microbianas (processo 1), o resultado dos processos ocorrentes (processos 2, 3 e 4) define tanto a estrutura como a actividade do biofilme. Estes processos incluem todos os *factores físicos* envolvidos no desenvolvimento de biofilmes e alguns factores biológicos, tais como crescimento e divisão celular e produção e excreção de EPS. Para além destes factores, existe um conjunto

de factores biológicos mais complexos, cuja relevância no desenvolvimento de biofilmes particulares foi constatada:

- Estudos baseados numa cultura pura de biofilme de *P. aeruginosa* cultivado em fluxo laminar (Davies *et al.* 1998) indicam que *quorum sensing* é possivelmente importante para a formação de estrutura em biofilmes. *Quorum sensing* é um mecanismo para regulação de certas actividades celulares, como a produção de metabolitos secundários de um modo dependente da densidade celular, observado em culturas planctónicas (Salmond *et al.* 1995), ou seja, um mecanismo intercelular de sinalização.
- Conjugação, o mecanismo de transferência de plasmídios, ocorre a uma taxa superior entre células em biofilmes do que entre células livres (Ehlers e Bouwer 1999; Hausner e Wuertz 1999; Roberts *et al.* 1999), e estirpes de relevância médica contendo certos plasmídios demonstram maior tendência para a formação de biofilmes (Ghingo 2001).
- Existe também evidência de que actividade flagelar por parte das células fixas inicialmente, designada por *twitching motility*, é necessária para o desenvolvimento de biofilmes de *P. aeruginosa* (O'Toole e Kolter 1998).
- Em biofilmes orais, a co-agregação tem um papel essencial ao permitir a presença de espécies sensíveis a oxigénio (estritamente anaeróbias) (Kolenbrander *et al.* 2000; Palmer *et al.* 2003).

Factores biológicos como estes têm permitido a investigadores a criação de modelos conceptuais de biofilmes de uma forma mais poética, onde estes agregados bacterianos são representados como comunidades altamente estruturadas, com comportamentos semelhantes a organismos

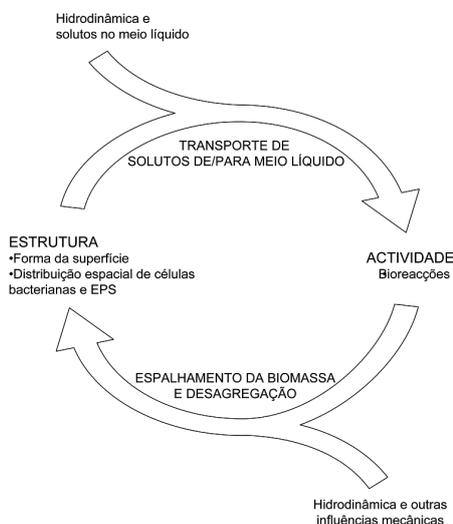


Figura 1 - As influências envolvidas na relação estrutura/actividade em biofilmes (ver texto para mais detalhes).

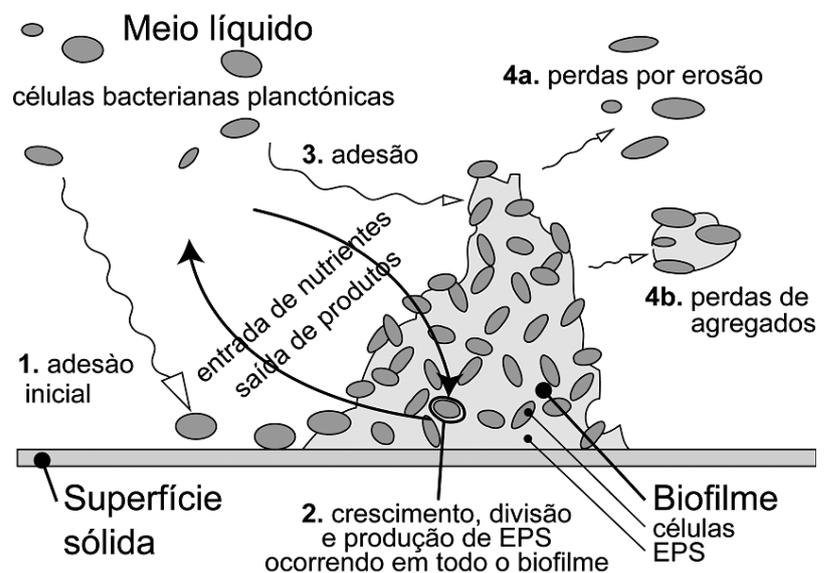


Figura 2 - Processos envolvidos na formação e crescimento de biofilmes

multi-celulares (Stoodley *et al.* 1999). Descobertas relacionadas com estes factores geraram igualmente expectativas sobre possíveis modos para controlar biofilmes através da interferência com estes mecanismos biológicos (Costerton *et al.* 1999).

No entanto, a importância destes factores biológicos mais complexos em relação aos factores físicos e biológicos básicos mencionados anteriormente não é geralmente aceite, e constitui um tópico de interessante discussão (van Loosdrecht *et al.* 1997; Stoodley *et al.* 1999). A nosso ver, na maioria dos casos reais, os factores como a hidrodinâmica do sistema e as propriedades cinéticas das espécies microbianas envolvidas são mais importantes para a estrutura e actividade do biofilme. Esta opinião é ainda apoiada pelas observações de que para biofilmes de *P. aeruginosa* cultivados em regimes turbulentos, os mecanismos de sinalização inter-celular não são necessários para a formação de estrutura de biofilmes (Purevdorj *et al.* 2002).

A importância da estrutura de biofilmes em processos industriais

A utilização de biofilmes em processos biotecnológicos tem várias vantagens tais como a conveniência de utilização e a capacidade de comportar variações nas propriedades do influente (Fitch *et al.* 1999).

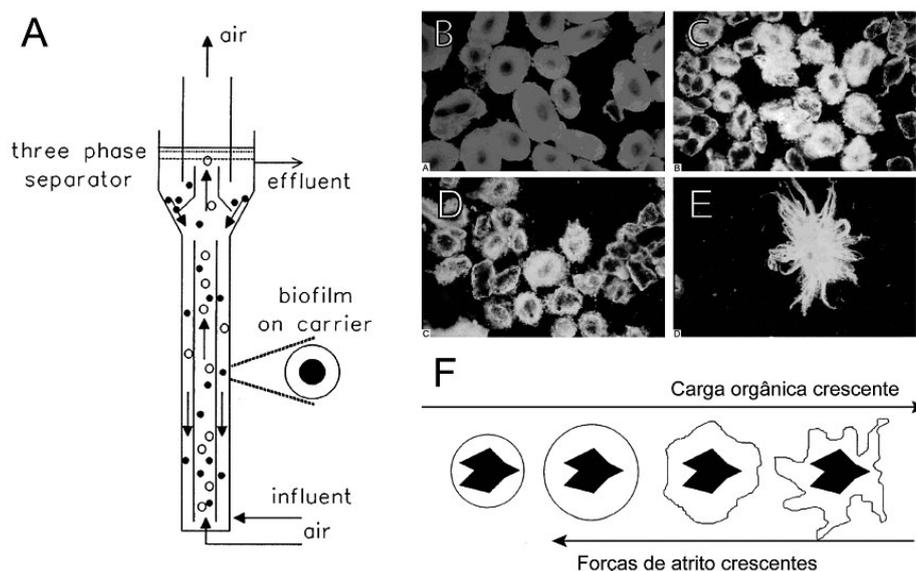
A estrutura dos biofilmes tem um papel importante na operação destes reactores. A densidade do biofilme afecta a eficiência das reacções, uma vez que tem um efeito directo na quantidade de biomassa alcançável no reactor (Tijhuis *et al.* 1996). Para processos aeróbios, biofilmes pouco espessos (<150 μm) são desejáveis, como consequência da fraca penetração de oxigénio. Estes são exemplos da influência da estrutura na actividade mencionada anteriormente.

Para além disso, a estabilidade da operação de reactores de biofilmes é altamente influenciada pela estrutura. Em sistemas aquáticos naturais, tais como riachos e rios, a corrente de água constitui uma pressão selectiva constante

para o crescimento em biofilmes: células flutuantes são removidas pela corrente, fazendo com que o crescimento associado a superfícies fixas se torne no único modo de permanência no sistema. Nos reactores de biofilmes esta pressão selectiva também está presente através duma remoção contínua de células bacterianas livres. Uma separação pode ser efectuada na base da densidade das partículas flutuantes, por sedimentação como no processo de lamas activadas (Schramm *et al.* 1999) ou por um separador como no reactor airlift (BAS – *biofilm airlift suspension*) (van Loosdrecht *et al.* 1995).

Vamos tomar o caso particular do reactor BAS para ilustrar a importância da estrutura de biofilmes. Neste tipo de reactor, os biofilmes formam-se na superfície de pequenas partículas, homogeneamente suspensas no reactor (Fig 3A). Este facto, assegura condições hidrodinâmicas e de transporte de massa homogéneas por todo o biofilme contido no reactor. O atrito exercido no biofilme é predominantemente causado por interações partícula-partícula (Gjaltema *et al.* 1995), o que torna possível o estudo do efeito do atrito na formação do biofilme. Uma grande variedade de estruturas, de lisa a rugosa, pode ser observada através da operação do reactor BAS em diferentes condições (Fig 3B-F). Factores, como a carga orgânica, a taxa de diluição e atrito exercido no biofilme, foram variados experimentalmente, utilizando acetato como substrato (Tijhuis *et al.* 1996; Kwok *et al.* 1998), e foi observado que a densidade do biofilme decresce e a rugosidade da superfície aumenta quando a carga orgânica é aumentada ou o atrito diminuído. Para além disso, um estudo utilizando outros substratos (Villaseñor *et al.* 2000) permitiu observar que substratos causando uma taxa de crescimento inferior levam a biofilmes mais densos, e que a perda de biomassa do biofilme é maior quando a taxa de crescimento é maior. Estas observações vieram apoiar uma hipótese prévia (van Loosdrecht *et al.* 1995) de que o factor determinante para a morfologia de biofilmes no reactor BAS é o balanço entre a taxa de crescimento e a perda de biomassa por desagregação (Fig 3G).

Figura 3 – A estrutura de biofilmes no reactor BAS (biofilm airlift suspension); **A** – Ilustração esquemática de um reactor BAS à escala laboratorial (Tijhuis *et al.* 1994); **B-F** – Estrutura de biofilmes cultivados em diferentes condições num reactor BAS (Tijhuis *et al.* 1996), variando desde estrutura lisa (A) até rugosa (F); **G** – Ilustração da hipótese (van Loosdrecht *et al.* 1995) de que a estrutura de biofilmes é definida por um balanço entre a taxa de crescimento e o processo de desagregação de biomassa (de (Tijhuis *et al.* 1996)).



Monitorização da estrutura de biofilmes

A análise morfológica a partir de observação directa de biofilmes constitui um método não afectado por extrapolação (Costerton *et al.* 1994). Para tal, métodos de microscopia que permitam um exame não-invasivo de biofilmes vivos e no seu estado hidratado são utilizados. A análise morfológica torna-se uma valiosa ferramenta para a investigação da influência de condições ambientais ou do impacto de mutações específicas na estrutura de biofilmes. Exemplos incluem a investigação de *quorum sensing* mencionada acima (Davies *et al.* 1998), o papel de numerosas funções celulares tais como o igualmente mencionado *twitching motility* (O'Toole e Kolter 1998), e controlo de catabolismo (O'Toole *et al.* 2000) nas fases iniciais da formação de biofilmes, e o papel de outros genes especificamente induzidos durante o desenvolvimento de biofilmes (Prigent-Combaret *et al.* 1999). Em todos estes estudos, conclusões importantes foram baseadas em investigações de carácter qualitativo derivadas de interpretações visuais de imagens de microscopia (Heydorn *et al.* 2000).

A microscopia confocal para a análise de biofilmes (Lawrence e Neu 1999) é presentemente o método de eleição para a observação da estrutura de biofilmes, pois permite a possibilidade de efectuar seccionamento óptico de biofilmes no seu estado hidratado de um modo não destrutivo. A possibilidade acrescida de efectuar seccionamentos a diferentes profundidades do biofilme (Fig 4A) permite recolha de informação 3D da estrutura (Fig 4B). A microscopia confocal permite ainda adquirir imagens em canais múltiplos, o que poderá ser utilizado para observação simultânea de várias sondas fluorescentes, de modo a obter-se informação espacial de diversidade funcional no biofilme (Fig 4C) (ver (Lawrence e Neu 1999) para mais exemplos).

As características não invasivas da microscopia confocal permite ainda a investigação ao longo do tempo de biofilmes cultivados em células de fluxo (Palmer 1999), pequenas câmaras com topo e fundo construído a partir de lamelas de vidro e que podem ser facilmente colocados num microscópio para a observação de biofilmes em crescimento nas paredes interiores (Fig 4D).

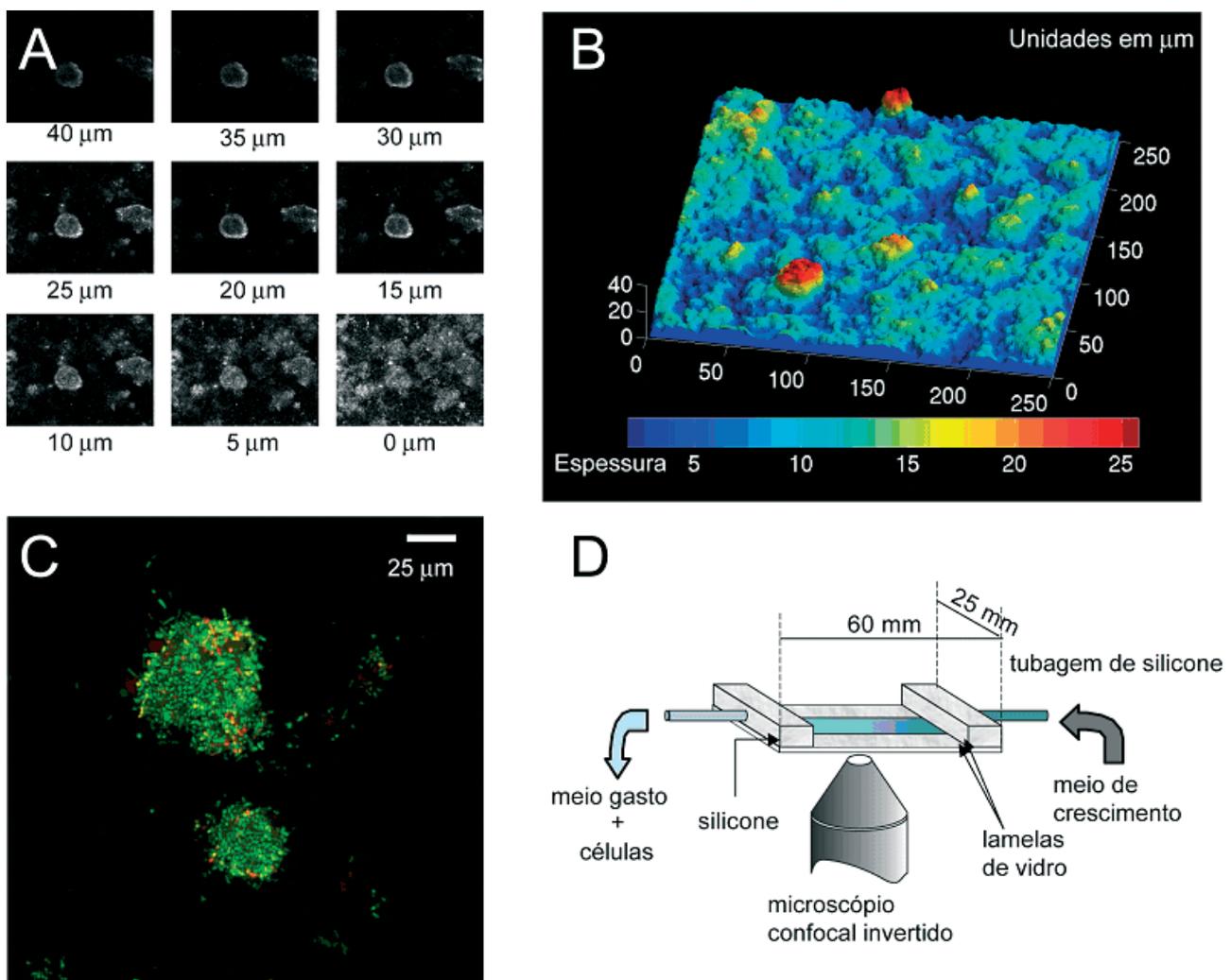


Figura 4 – Microscopia confocal para monitorização de biofilmes; **A** – Secções ópticas de biofilmes tiradas a cada 5 mm, começando acima do biofilme e descendo até à superfície sólida; **B** – Reconstrução 3D da superfície do biofilme a partir de microscopia confocal; **C** – Secção óptica de um biofilme multi-espécie marcado com o kit live/dead™ (Molecular Probes) na qual células com membrana comprometida (células “mortas”) são visualizadas a vermelho; **D** – Representação esquemática de uma célula de fluxo para o cultivo de biofilmes e observação utilizando microscopia confocal.

A informação adquirida por microscopia confocal é indicada para o processamento digital, graças à natureza digital das próprias imagens. As imagens 3D podem ser processadas para a extracção de informação estrutural sob a forma de parâmetros morfológicos. A definição de um conjunto de parâmetros que represente a estrutura de biofilmes de um modo preciso é presentemente um tópico activo de pesquisa. Um conjunto ideal de parâmetros deverá correlacionar-se com a actividade do biofilme, representando correctamente a relação estrutura/actividade. A hipótese de que tal conjunto ideal de parâmetros existe e é capaz de representar qualquer biofilme heterogéneo foi abordada (Yang *et al.* 1999), mas não satisfeita até agora. Presentemente, variados parâmetros foram definidos e utilizados para quantificação morfológica de biofilmes (Tabela 1).

Apesar de alguns destes parâmetros terem uma interpretação física e utilidade directas, por exemplo porosidade e distância difusional, uma relação formal entre parâmetros morfológicos e a actividade de biofilmes permanece ainda por determinar. Um método sugerido por Heydorn *et al.* (Heydorn *et al.* 2000) poderá, no entanto, ser utilizado para a análise de variância da dependência de propriedades estruturais (tais como espessura média do biofilme) das condições de cultivo de um biofilme (tais como estirpe bacteriana, ensaio experimental ou célula de fluxo utilizada para o crescimento utilizado). Este estudo alertou também para a necessidade de adoptar análise quantitativa de um modo estatisticamente representativo, uma vez que o desenvolvimento de biofilmes é um processo estocástico e experiências independentes nunca originam cópias estruturais exactas, mesmo que todas as condições experimentais sejam mantidas.

A análise quantitativa de imagens de microscopia confocal de um modo estatisticamente representativo requiere grandes quantidades de dados. Deste modo, existe uma necessidade da utilização de métodos quantitativos completamente automatizados (Kuehn *et al.* 1998; Xavier *et al.* 2001; Yang *et al.* 2001; Xavier *et al.* 2003). A automatização de uma metodologia de análise de imagem é conseguida apenas através da integração de operações de análise morfológica com métodos automáticos de segmentação de imagem (Xavier *et al.* 2001; Xavier *et al.* 2003) e tem as vantagens de (i) eliminar completamente a subjectividade da análise, através da definição formal de procedimentos que anteriormente seriam realizados por um operador e (ii) de constituir um método conveniente para o processamento de grandes quantidades de imagens. Este procedimento foi ainda integrado com uma base de dados de imagens de biofilmes (Xavier *et al.* 2003), originando um protótipo funcional que pode ser acedido através da World Wide Web (<http://www.itqb.unl.pt:1111/clsmip/>). A aplicação desta ferramenta à investigação de um biofilme multi-espécie desnitrificante cultivado em células de fluxo foi igualmente relatada (Xavier *et al.* 2003).

Esta metodologia foi ainda utilizada num estudo (Bleher *et al.* 2003) sobre o papel de uma molécula de sinalização inter-celular, *autoinducer 2* (AI-2), na formação de biofilmes de *Streptococcus gordinii*, uma espécie responsável pela colonização inicial de biofilmes orais. Uma análise morfológica quantitativa foi utilizada para apoiar a observação de que biofilmes formados por uma estirpe mutante *luxS* (gene que codifica AI-2 sintase) são significativamente diferentes daqueles formados pela estirpe selvagem e por uma estirpe mutante complementada (Fig 5).

TABELA 1. PARÂMETROS UTILIZADOS PARA CARACTERIZAÇÃO DE ESTRUTURA EM BIOFILMES, I.E. QUANTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA.

Parâmetro	Descrição	Referência
Biovolume	O volume ocupado pela matriz de biofilme, excluindo poros	(Kuehn <i>et al.</i> 1998)
Porosidade	Razão entre o biovolume e o volume total, incluindo poros	(Zhang e Bishop 1994)
hold-up de sólidos	1-porosidade. Também designado por fracção de espaços preenchidos (Heydorn <i>et al.</i> 2000) ou área de colonização microbiana (Kuehn <i>et al.</i> 1998; Xavier <i>et al.</i> 2003). Pode ser representado através de um perfil ao longo da espessura do biofilme	(Picioreanu <i>et al.</i> 1998)
Espessura	Espessura média ou máxima do biofilme	(Heydorn <i>et al.</i> 2000)
Volume de microcolonias	Volume médio de agregados individuais	(Heydorn <i>et al.</i> 2000)
Razão superfície/volume	A razão entre área de superfície e o biovolume	(Heydorn <i>et al.</i> 2000)
Aumento de superfície	A razão entre a área superficial do biofilme e a área da superfície sólida	(Picioreanu <i>et al.</i> 1998)
Cobertura de superfícies	A fracção de superfície sólida colonizada por biofilme	(Xavier <i>et al.</i> 2003)
Distância difusional	A distância média ou máxima do interior de um agregado até à superfície do biofilme	(Yang <i>et al.</i> 1999)
Entropia estrutural	Uma medida da heterogeneidade da distribuição espacial da densidade da biomassa no biofilme	(Yang <i>et al.</i> 1999)
Heterogeneidade	O desvio padrão da concentração de um soluto particular (determinada através de simulações ou medições com micro-sensores) ao longo do biofilme	(Kreft <i>et al.</i> 1998)
Contraste	Semelhante à entropia estrutural	(Kreft <i>et al.</i> 2001)
Dimensão fractal	Uma medida da heterogeneidade da distribuição de biomassa no biofilme	(Hermanowicz <i>et al.</i> 1995)
Eixos de desenvolvimento	Complexidade da ramificação em agregados	(Xavier <i>et al.</i> 2000)
Rugosidade	Relacionado com o desvio padrão da espessura do biofilme, valores elevados indica maior variabilidade (logo, maior rugosidade) na superfície do biofilme	(Murga <i>et al.</i> 1995; Picioreanu <i>et al.</i> 1998)

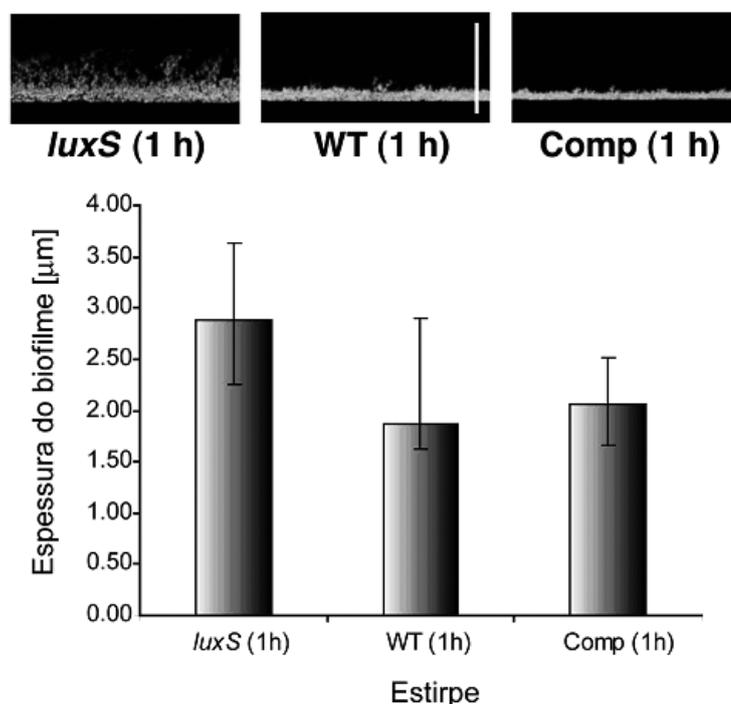
Figura 5 – Num estudo para investigar a importância do auto-indutor 2 no desenvolvimento de um biofilme de *Streptococcus gordinii*, a morfologia de biofilmes de um mutante *luxS* é significativamente diferente da observada para a estirpe selvagem (WT) e uma estirpe mutante complementada (Comp) (de (Bleher *et al.* 2003)). Esta diferença foi confirmada a partir de análise quantitativa de imagem. Escala: 50 μm .

O processamento automatizado de imagens de microscopia confocal têm ainda um papel importante no contexto do projecto PHOBIA (<http://www.photobiofilms.org>), um projecto financiado por fundos comunitários através do 5th Framework Programme, e que se foca em biofilmes fototróficos aquáticos: comunidades mistas de microrganismos photo-/heterotróficos crescendo em superfícies submersas expostas à luz do sol. Microrganismos fotossintéticos fornecem, de modo indirecto, a energia para o desenvolvimento de organismos heterotróficos nestes biofilmes. De modo a melhor compreender a estrutura, composição e processos fisiológicos chave nestas comunidades, um estudo multidisciplinar integrado é realizado, incluindo observação por microscopia confocal e respectiva quantificação. O objectivo deste projecto é o desenvolvimento de um modelo unificante para o crescimento de biofilmes fototróficos que poderá ser utilizado para prever os efeitos de condições ambientais (luz, temperatura, atrito, composição do meio de crescimento e características da superfície sólida) no desenvolvimento destes biofilmes.

Modelação da estrutura de biofilmes

A modelação da estrutura de biofilmes tem sido incentivada pelo objectivo de descrever a relação estrutura/actividade de um modo formal e matemático: a descrição matemática dos vários factores actuando simultaneamente no biofilme é importante para o entendimento das interdependências destes processos. Um modelo com capacidade de prever o modo como a estrutura de um biofilme se desenvolve a partir das condições de cultivo constitui uma ferramenta valiosa para o teste de hipóteses, em especial em sistemas nos quais os vários parâmetros operacionais têm implicações entre si. O estudo do efeito directo que a carga orgânica terá na actividade de um biofilme num reactor BAS, por exemplo, é uma tarefa dificultada pelo facto de que ao alterar esse parâmetro se altera simultaneamente a estrutura do biofilme (Fig. 3F), afectando conseqüentemente outros parâmetros que dependem da estrutura (como o atrito exercido na superfície do biofilme). Por outro lado, num modelo é possível estudar o efeito de alterações directas a parâmetros operacionais.

O modelo de biofilmes mais utilizado é o modelo unidimensional (1D), dinâmico, multi-espécie de Wanner e

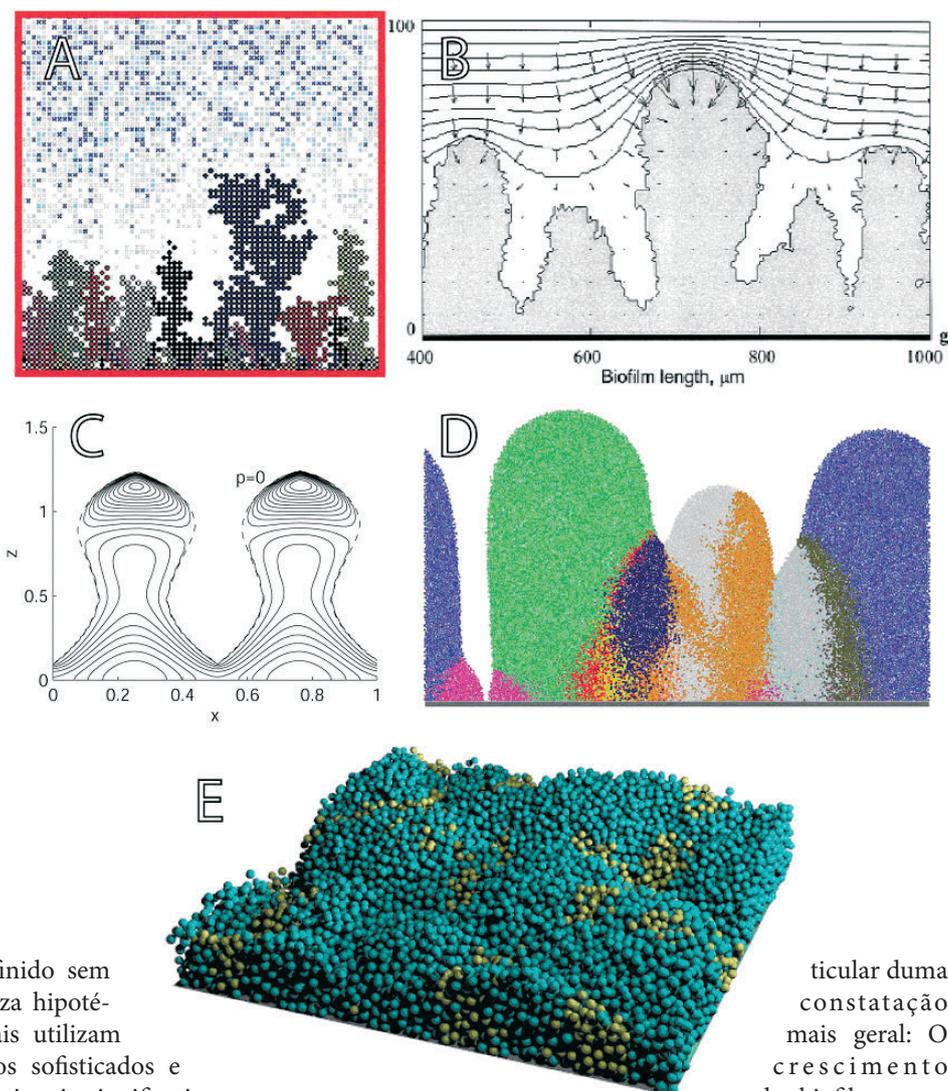


Gujer (Wanner e Gujer 1986; Wanner e Reichert 1996). Este modelo é implementado pelo pacote de software AQUASIM, um programa para a simulação de sistemas aquáticos (<http://www.aquasim.eawag.ch/>). AQUASIM é uma ferramenta valiosa para a descrição de bioconversões de um ponto de vista macroscópico. A modelação da estrutura é possível utilizando este modelo, embora limitada a uma representação 1D de distribuição de espécies, densidade e porosidade do biofilme ao longo da sua espessura.

Para um conhecimento mais aprofundado de como a estrutura se desenvolve a partir das condições experimentais, modelos bidimensionais (2D) ou mesmo 3D são necessários (van Loosdrecht *et al.* 2002). Modelos multidimensionais (2D ou 3D) permitem um melhor entendimento da relação estrutura/actividade em condições mais realistas: Se por um lado os modelos 1D assumem uma geometria planar, i.e. estrutura homogénea em todas as direcções paralelas à superfície sólida, modelos 2D ou 3D trabalham com variáveis de estado (concentrações de solutos, composição em espécies bacterianas, EPS, fluxos, etc.) em 2D ou 3D, respectivamente.

Os modelos multidimensionais são simulações computacionais utilizadas para explicar o desenvolvimento de biofilmes através da descrição de todos os factores relevantes segundo princípios físicos. Para além de contribuírem para um melhor conhecimento da influência das condições ambientais na formação da estrutura, os efeitos de gradientes laterais e elementos estruturais complexos, como poros na estrutura do biofilme, nas bioconversões ocorrendo no biofilme também são descritos. Modelos 2D e 3D utilizam uma abordagem invertida do problema, na qual a estrutura a uma escala maior é resultante de acções e interacções ocorrendo à escala celular. O comportamento das partes

Figura 6 - Modelação multidimensional de biofilmes; A - Modelo 2D utilizando movimento browniano para o processo de difusão-reacção (de (Wimpenny e Colasanti 1997)); B - Perfis de concentração de um soluto determinados por simulação para o modelo híbrido discreto-diferencial (de (Picioreanu et al. 1998; Picioreanu et al. 1999)); C - Formação de 'dedos' num model 2D descrevendo a matriz de biofilme como um contínuo (de (Dockery e Klapper 2002)); D - Simulação Individual based model (IbM) mostrando o crescimento de um biofilme a partir de 20 células iniciais, com os clones das representados utilizando uma cor diferente, de (Kreft et al. 2001); E - Estrutura 3D obtida utilizando o modelo multidimensional presentemente em desenvolvimento, que permite a simulação 2D e 3D de sistemas multi-espécie com um número arbitrário de espécies químicas envolvidas, demonstrando aqui um sistema de duas espécies (representadas a azul e amarelo) competindo para um mesmo substrato.



à menor escala deverá ser definido sem recurso a suposições de natureza hipotética. Modelos multidimensionais utilizam tipicamente métodos numéricos sofisticados e requerem capacidades computacionais significativas para realizar as simulações.

O modelo 2D de Wimpenny and Colasanti (Wimpenny e Colasanti 1997) foi o primeiro a confirmar que diferentes estruturas de biofilme podem surgir de um mesmo sistema se operado em diferentes condições. Neste estudo, um automato celular simples com um conjunto de regras para o crescimento do biofilme foi utilizado para demonstrar que a alteração da concentração de um substrato pode provocar uma mudança de morfologia desde heterogéneo e poroso (para baixas concentrações de substrato) até densa e homogénea (para elevadas concentrações de substrato).

Apesar dos méritos desta abordagem pioneira, o modelo em si possuía falhas significativas, em particular, por assumir que o crescimento bacteriano apenas tinha lugar nas camadas exteriores do biofilme e não no interior da matriz (van Loosdrecht *et al.* 1997). Esta suposição irrealista foi superada por outro modelo no qual os processos de difusão-reacção aparecem separados do processo significativamente mais lento de distribuição da biomassa (Picioreanu *et al.* 1998; Picioreanu *et al.* 1999), consequência do crescimento do biofilme. Estudos efectuados através deste modelo demonstraram que a influência da concentração de um substrato limitante do crescimento é apenas um caso par-

ticular duma constatação mais geral: O crescimento de biofilmes em que o transporte de solutos é o passo limitante originam estruturas rugosas, enquanto biofilmes cultivados em condições em que o crescimento se dá à taxa máxima produzem estruturas lisas.

As técnicas de modelação multidimensional de biofilmes têm, entretanto, vindo a ser incrementadas de modo a descrever processos tais como fluxo convectivo (Picioreanu *et al.* 2000), perda de biomassa – quer devida ao atrito (Picioreanu *et al.* 2001), quer induzida quimicamente (Hunt *et al.* 2003), deformação de estrutura induzida por atrito (Klapper *et al.* 2002; Stoodley *et al.* 2002), auto-inibição (Chang *et al.* 2003), produção de EPS (Kreft e Wimpenny 2001), um sistema nitrificante com duas espécies (Kreft *et al.* 2001) e um biofilme anaeróbio constituído por um sulfato-redutor e um metanogéneo (Noguera *et al.* 1999) e crescimento de biofilmes em membranas (Noguera *et al.* 2000).

Algumas destas abordagens utilizam técnicas para além do anteriormente mencionado automato celular 'puro' (no qual o processo de difusão-reacção é acoplado ao espalhamento de biomassa e simulado por movimentos brownianos, Fig. 6A) e o automato celular híbrido discre-

to-diferencial (Fig. 6B).

A descrição de biofilmes segundo o comportamento de fluídos viscoelásticos (Dockery e Klapper 2002; Klapper *et al.* 2002; Stoodley *et al.* 2002) descreve a biomassa como sendo um contínuo (Fig. 6C).

Individual based modelling (Kreft *et al.* 2001), IBM, descreve a biomassa como sendo composta por pequenas partículas esféricas ocupando posições no espaço definidas utilizando coordenadas contínuas (Fig. 6D). Cada partícula é um indivíduo que ao longo do processo de desenvolvimento realiza acções como crescimento, movimento e divisão (dando origem a novos indivíduos) mantendo, no entanto, a sua identidade original. Esta técnica de modelação está um passo à frente no objectivo de modelar biofilmes a partir de princípios fundamentais, quando comparada com os automatismos celulares, nos quais a biomassa é representada utilizando uma grelha discreta. No entanto, as simulações de IBM são computacionalmente mais exigentes.

O facto de existirem, presentemente, várias abordagens relatadas para modelação multidimensional de biofilmes é indicativo do crescente interesse nesta área de investigação. Interesse este criado pelos estimulantes resultados alcançados pelas abordagens pioneiras e, ao mesmo tempo, facilitado pela crescente disponibilidade de poder computacional a preços acessíveis. Simulações que apenas há alguns anos necessitavam de estações de trabalho dispendiosas podem hoje em dia ser realizadas em PCs comuns. No entanto, esta existência de variadas abordagens é ao mesmo tempo indicativa da imaturidade desta área de investigação relativamente recente. Uma *standardização* dos métodos utilizados seria altamente desejável para um futuro próximo, possivelmente culminando com a adopção de uma metodologia comum por todos os investigadores participando nesta área.

Na nossa opinião, um modelo consensual ideal derivaria da implementação do processo de espalhamento de biomassa utilizado em IBM, em conjunto com a modelação de EPS segundo um fluído viscoelástico, processos de difusão-reacção desacoplados (como no modelo híbrido discreto-diferencial) e possivelmente convecção. No entanto, apesar de não existirem aparentemente impedimentos técnicos de ordem computacional ou numérica para a concretização deste modelo, verifica-se uma falta grave em termos de parâmetros que possam ser utilizados para uma descrição realista do sistema (por exemplo propriedades físicas de EPS). Esta necessidade de parâmetros constitui o factor limitante no processo de desenvolvimento de modelos realistas.

O modelo que presentemente nos encontramos a desenvolver integra o processo de espalhamento de biomassa baseado em partículas esféricas com processos de difusão-reacção desacoplados (Fig. 6E), e permite a definição de sistemas com um número arbitrário de espécies bacterianas e químicas, constituindo uma ferramenta para a modelação dinâmica de biofilmes multi-espécie em 2D e 3D.

Comparação de modelos com imagem de microscopia confocal

Apesar dos progressos descritos na área da modelação multidimensional de biofilmes, existia a necessidade de comparar previsões com dados experimentais (Kreft *et al.* 2001). Abordamos esta necessidade num estudo recente (Xavier *et al.* 2003) no qual a *performance* de um modelo 3D foi analisada através da comparação com a estrutura de biofilmes observada experimentalmente utilizando microscopia confocal.

O modelo utilizado foi o referido anteriormente (espalhamento de biomassa utilizando o mecanismo de IBM e difusão-reacção desacoplada). Apesar dos processos de difusão-reacção serem suficientemente bem conhecidos, o mesmo não se passa com o espalhamento da biomassa, o mecanismo de dispersão da matriz de biofilme em consequência do crescimento bacteriano e produção de EPS. A comparação realizada neste estudo teve em vista principalmente a avaliação do mecanismo utilizado.

Como método de monitorização, a microscopia confocal constitui uma fonte ideal de informação para a validação de modelos 3D, graças às suas características dinâmicas e não destrutivas. No entanto, devido à natureza estocástica do desenvolvimento de biofilmes mencionada anteriormente, a avaliação não poderá ser levada a cabo através duma avaliação directa da estrutura 3D. Esta característica estocástica é também implementada no modelo, nomeadamente através da utilização de números gerados aleatoriamente em algumas operações envolvidas no espalhamento da biomassa. Uma comparação quantitativa impõe a utilização de parâmetros morfológicos tais como os descritos na Tabela 1. Graças à natureza semelhante da informação 3D obtida tanto pela microscopia confocal como pelas simulações do modelo, os parâmetros poderam ser facilmente determinados utilizando processos derivados de operações de análise de imagem descritos anteriormente.

Este estudo concluiu que o modelo é capaz de previsão correcta da estrutura de biofilmes, segundo uma descrição utilizando um conjunto de parâmetros morfológicos (Fig. 7) – fracção de espaço ocupado, biomassa total, cobertura de superfície sólida, espessura média e rugosidade. Esta constatação confirma a utilidade deste modelo para a previsão de estrutura de biofilmes.

Comentários finais

Devido ao seu envolvimento numa vasta gama de actividades humanas, o objectivo de controlar biofilmes é comum a várias áreas de investigação, desde a biotecnologia até à saúde pública. De modo a controlar os biofilmes de um modo eficiente, a relação estrutura/actividade e os numerosos processos envolvidos terão de ser compreendidos. Neste contexto, a microscopia confocal de biofilmes e a modelação multidimensional constituem ferramentas valiosas para a investigação da relação estrutura/actividade.

Acknowledgements

J. B. Xavier agradece o suporte financeiro da F.C.T./M.C.T. através da bolsa SFRH/BPD/11485/2002. Este trabalho encontra-se igualmente ligado ao projecto PHOBIA financiado pela Comunidade Europeia (5th Framework Programme, Quality of Life, Key Action 3: The Cell Factory) ref: QLK3-CT-2002-01938 (10/2002 – 10/2005).

Referências

Beuling, E. E., J. C. van den Heuvel and S. P. P. Ottengraf (2000). "Diffusion coefficients of metabolites in active biofilms." *Biotechnology and Bioengineering* 67(1): 53-60.

Bleher, D. S., R. J. Palmer, J. B. Xavier, J. S. Almeida and P. E. Kolenbrander (2003). "Autoinducer 2 production by *Streptococcus gordonii* DL1 and the biofilm phenotype of a luxS mutant are influenced by nutritional conditions." *J Bac* 185(16): 4851-4860.

Boletti, F. T. (1921). *Manufacture of vinegar*. Microbiology; a textbook on microorganisms general and applied. C. E.

Marshall. London, Churchill: 636-648.

Ceri, H., M. Olson, D. Morck, D. Storey, R. Read, A. Buret and B. Olson (2001). The MBEC assay system: Multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. *Microbial Growth in Biofilms, Pt B*. 337: 377-385.

Chang, I., E. S. Gilbert, N. Eliashberg and J. D. Keasling (2003). "A three-dimensional, stochastic simulation of biofilm growth and transport-related factors that affect structure." *Microbiology-Sgm* 149: 2859-2871.

Characklis, W. G., M. H. Turakhia and N. Zilver (1990). Transport and interracial transfer phenomena. *Biofilms*. W. G. Characklis and K. C. Marshall. New York, Wiley Interscience: 316-340.

Cooksey, K. E. and B. Wigglesworthcooksey (1995). "Adhesion of Bacteria and Diatoms to Surfaces in the Sea - a Review." *Aquatic Microbial Ecology* 9(1): 87-96.

Costerton, J. W., G. G. Geesey and K. J. Cheng (1978). "How bacteria stick." *Sci Am* 238(1): 86-95.

Costerton, J. W., Z. Lewadowski, D. DeBeer, D. Caldwell, D. Korver and G. James (1994). "Biofilms, the customized micro-niche." *J Bacteriol* 176(8): 2137-2142.

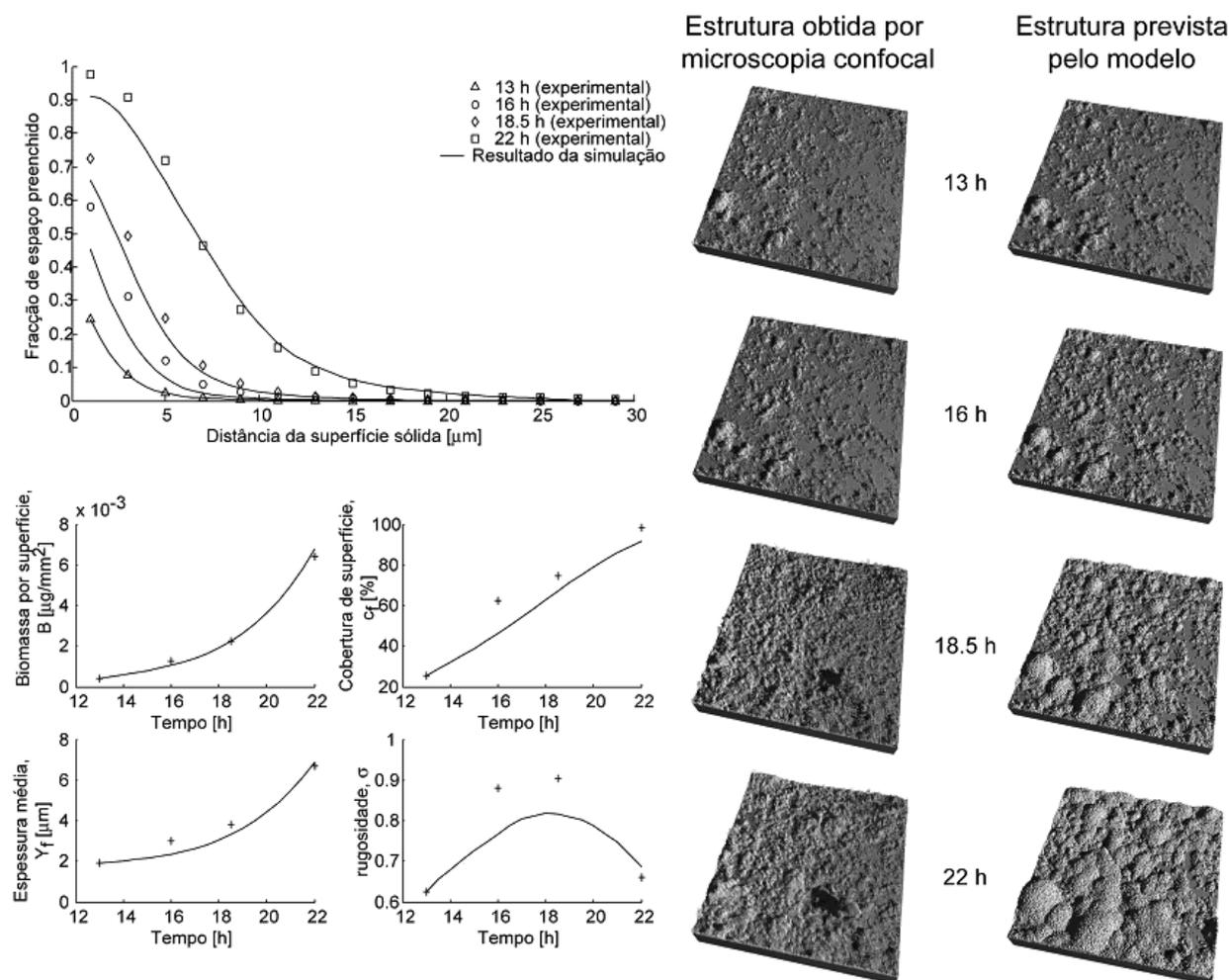


Figura 7 – Resultados de um estudo no qual estrutura prevista por um modelo 3D é comparada com imagens provenientes de microscopia confocal (Xavier *et al.* 2003). A natureza estocástica do processo de desenvolvimento de biofilmes, também implementada no modelo, requiere a utilização de parâmetros morfológicos para efectuar a comparação.

- Costerton, J. W., P. S. Stewart and E. R. Greenberg (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." *Science* 284: 1318-1322.
- Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, J. W. Costerton and E. P. Greenberg (1998). "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm." *Science* 280: 295-298.
- De Beer, D., J. C. V. d. Heuvel and S. P. P. Ottengraf (1993). "Microelectrode Measurements of the Activity Distribution in Nitrifying Bacterial Aggregates." *Appl Environ Microbiol* 59(2): 573-579.
- de Beer, D. and A. Schramm (1999). "Micro-environments and mass transfer phenomena in biofilms studied with micro-sensors." *Water Science and Technology* 39(7): 173-178.
- De Beer, D., P. Stoodley and Z. Lewadowski (1994). "Liquid flow in heterogeneous biofilms." *Biotech Bioeng* 44: 636-641.
- De Beer, D., P. Stoodley, F. Roe and Z. Lewadowski (1994). "Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport." *Biotech Bioeng* 43: 1131-1138.
- Dockery, J. and I. Klapper (2002). "Finger formation in biofilm layers." *Siam Journal on Applied Mathematics* 62(3): 853-869.
- Donlan, R. M. (2001). "Biofilms and device-associated infections." *Emerging Infectious Diseases* 7(2): 277-281.
- Ehlers, L. J. and E. J. Bouwer (1999). "RP4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor." *Wat Sci Technol* 7(8): 163-171.
- Elasri, M. O. and R. V. Miller (1999). "Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation." *Applied and Environmental Microbiology* 65(5): 2025-2031.
- Fitch, M. W., J. B. Murphy and S. S. Sowell (1999). "Biological fixed-film systems." *Water Environment Research* 71(5): 638-656.
- Ghingo, J. M. (2001). "Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development." *Nature* 412: 442-5.
- Gjaltema, A., L. Tjihuis, M. C. M. van Loosdrecht and J. J. Heijnen (1995). "Detachment of biomass from nongrowing spherical biofilms in airlift reactors." *Biotechnol Bioeng* 46: 256-269.
- Hausner, M. and S. Wuertz (1999). "High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis." *Appl Environ Microbiol* 65: 3710-13.
- Hermanowicz, S. W., U. Schindler and P. Wilderer (1995). "Fractal structure of biofilms: New tools for investigation of morphology." *Wat Sci Tech* 32(8): 99-105.
- Heydorn, A., B. K. Ersboll, M. Hentzer, M. R. Parsek, M. Givskov and S. Molin (2000). "Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms." *Microbiology* 146: 2409-2415.
- Heydorn, A., A. T. Nielsen, M. Hentzer, C. Sternberg, M. Givskov, B. K. Ersboll and S. Molin (2000). "Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT." *Microbiology* 146: 2395-2407.
- Hunt, S. M., M. A. Hamilton, J. T. Sears, G. Harkin and J. Reno (2003). "A computer investigation of chemically mediated detachment in bacterial biofilms." *Microbiology-Sgm* 149: 1155-1163.
- Jass, J. and J. T. Walker (2000). *Biofilms and biofouling. Industrial biofouling - detection, prevention and control.* J. T. Walker, S. Surman and J. Jass. New York, John Wiley & Sons: 1-12.
- Klapper, I., C. J. Rupp, R. Cargo, B. Purvedorj and P. Stoodley (2002). "Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties." *Biotechnology and Bioengineering* 80(3): 289-296.
- Kolenbrander, P. E., R. N. Andersen, K. M. Kazmerak and R. J. Palmer (2000). *Coaggregation and coadhesion in oral biofilms. Community Structure and Co-operation in Biofilms (Society for General Microbiology symposium no. 59)*, Cambridge, Cambridge University Press.
- Kreft, J. U., G. Booth and J. W. T. Wimpenny (1998). "BacSim, a simulator for individual-based modelling of bacterial colony growth." *Microbiology* 144: 3275-3287.
- Kreft, J. U., C. Picioreanu, J. W. T. Wimpenny and M. C. M. van Loosdrecht (2001). "Individual-based modelling of biofilms." *Microbiology-Sgm* 147: 2897-2912.
- Kreft, J. U. and J. W. T. Wimpenny (2001). "Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth." *Water Science and Technology* 43(6): 135-141.
- Kuehn, M., M. Hausner, H. Bungartz, M. Wagner, P. Wilderer and S. Wertz (1998). "Automated confocal laser scanning microscopy and semiautomated image processing for analysis of biofilms." *Appl Environ Microbiol* 64(11): 4115-4127.
- Kwok, W. K., C. Picioreanu, S. L. Ong, M. C. M. van Loosdrecht, W. J. Ng and J. J. Heijnen (1998). "Influence of biomass production and detachment forces on biofilm structures in a biofilm airlift suspension reactor." *Biotechnology and Bioengineering* 58(4): 400-407.
- Larkum, A. W. D., E. M. W. Koch and M. Kuhl (2003). "Diffusive boundary layers and photosynthesis of the epilithic algal community of coral reefs." *Marine Biology* 142(6): 1073-1082.
- Lawrence, J. R. and T. R. Neu (1999). "Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms." *Methods Enzymol* 310: 131-144.
- Mah, T. F. C. and G. A. O'Toole (2001). "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents." *Trends in Microbiology* 9(1): 34-39.
- Marsh, P. D. (2003). "Are dental diseases examples of ecological catastrophes?" *Microbiology-Sgm* 149: 279-294.
- Meyer, R. L., A. M. Saunders, R. J. X. Zeng, J. Keller and L. L. Blackall (2003). "Microscale structure and function of anaerobic-aerobic granules containing glycogen accumulating organisms." *Fems Microbiology Ecology* 45(3): 253-261.
- Murga, R., P. S. Stewart and D. Daly (1995). "Quantitative analysis of biofilm thickness variability." *Biotech Bioeng* 45: 503-510.
- Noguera, D. R., G. Pizarro and L. W. Clapp (2000). "Mathematical modeling of trichloroethylene (TCE) degradation in membrane-attached biofilms." *Water Science and Technology* 41(4-5): 239-244.
- Noguera, D. R., G. Pizarro, D. A. Stahl and B. E. Rittmann (1999). "Simulation of multispecies biofilm development in three dimensions." *Wat Sci Tech* 39(7): 503-510.
- O'Toole, G. A., H. B. Kaplan and R. Kolter (2000). "Biofilm formation as microbial development." *Annu rev microbiol* 54: 49-79.
- Okita, W. B. and D. J. Kirwan (1986). "Simulation of secondary

- metabolite production by immobilized living cells: penicillin production." *Biotechnol Progress* 2: 83-90.
- O'Toole, G. A. and R. Kolter (1998). "Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." *Mol Microbiol* 30: 295-304.
- Palmer, R. J. (1999). "Microscopy flowcells: perfusion chambers for real-time study of biofilms." *Methods Enzymol* 310: 160-166.
- Palmer, R. J., S. M. Gordon, J. O. Cisar and P. E. Kolenbrander (2003). "Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque." *Journal of Bacteriology* 185(11): 3400-3409.
- Picoreanu, C., M. C. M. v. Loosdrecht and J. Heijnen (1998). "Mathematical modelling of biofilm structure with a hybrid differential-discrete cellular automaton approach." *Biotech Bioeng* 58(1): 101-116.
- Picoreanu, C., M. C. M. van Loosdrecht and J. J. Heijnen (1998). "A new combined differential-discrete cellular automaton approach for biofilm modeling: Application for growth in gel beads." *Biotechnology and Bioengineering* 57(6): 718-731.
- Picoreanu, C., M. C. M. van Loosdrecht and J. J. Heijnen (1999). "Discrete-differential modelling of biofilm structure." *Water Science and Technology* 39(7): 115-122.
- Picoreanu, C., M. C. M. van Loosdrecht and J. J. Heijnen (2000). "Effect of diffusive and convective substrate transport on biofilm structure formation: A two-dimensional modeling study." *Biotechnology and Bioengineering* 69(5): 504-515.
- Picoreanu, C., M. C. M. van Loosdrecht and J. J. Heijnen (2001). "Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow." *Biotechnology and Bioengineering* 72(2): 205-218.
- Prigent-Combaret, C., O. Vidal, C. Dorel and P. Lejeune (1999). "Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 181: 5993-6002.
- Purevdorj, B., J. W. Costerton and P. Stoodley (2002). "Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Applied and Environmental Microbiology* 68(9): 4457-4464.
- Rawlings, D. E. (2002). "Heavy metal mining using microbes." *Annual Review of Microbiology* 56: 65-91.
- Roberts, A. P., J. Pratten, M. Wilson and P. Mullany (1999). "Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a model oral biofilm." *FEMS Microbiol Letter* 177: 636.
- Sakurai, A., H. Imai, Y. Takenaka and M. Sakakibara (1997). "Simulation of citric acid production by rotating disk contactor." *Biotechnology and Bioengineering* 56(6): 689-696.
- Salmond, G. P. C., B. W. Bycroft, A. Lazdunski, G. S. A. B. Steward and P. Williams (1995). "Multiple *N-acyl-homoserine* lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc Natl Acad Sci USA* 64: 3480-3485.
- Schramm, A., C. M. Santegoeds, H. K. Nielsen, H. Ploug, M. Wagner, M. Pribyl, J. Wanner, R. Amann and D. De Beer (1999). "On the occurrence of anoxic microniches, denitrification, and sulfate reduction in aerated activated sludge." *Applied and Environmental Microbiology* 65(9): 4189-4196.
- Schultz, M. P. and G. W. Swain (2000). "The influence of biofilms on skin friction drag." *Biofouling* 15(1-3): 129-139.
- Simoes, M., M. O. Pereira and M. J. Vieira (2003). "Monitoring the effects of biocide treatment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms formed under different flow regimes." *Water Science and Technology* 47(5): 217-223.
- Stewart, P. S. (2003). "Diffusion in biofilms." *Journal of Bacteriology* 185(5): 1485-1491.
- Stoodley, P., D. D. Beer and Z. Lewandowski (1994). "Liquid flow in biofilm systems." *Appl Environ Microbiol* 60: 2711-2716.
- Stoodley, P., J. D. Boyle, D. De Beer and H. M. Lappin-Scott (1999). "Evolving perspectives of biofilm structure." *Biofouling* 14(1): 75-90.
- Stoodley, P., R. Cargo, C. J. Rupp, S. Wilson and I. Klapper (2002). "Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 29(6): 361-367.
- Tijhuis, L., B. Hijman, M. C. M. VanLoosdrecht and J. J. Heijnen (1996). "Influence of detachment, substrate loading and reactor scale on the formation of biofilms in airlift reactors." *Applied Microbiology and Biotechnology* 45(1-2): 7-17.
- Tijhuis, L., M. C. M. Vanloosdrecht and J. J. Heijnen (1994). "Formation and Growth of Heterotrophic Aerobic Biofilms on Small Suspended Particles in Airlift Reactors." *Biotechnology and Bioengineering* 44(5): 595-608.
- Tolker-Nielsen, T. and S. Molin (2000). "Spatial organization of microbial biofilm communities." *Microb Ecol* 40: 75-84.
- van Loosdrecht, M. C. M., D. Eikelboom, A. Gjaltema, A. Mulder, L. Tijhuis and J. J. Heijnen (1995). "Biofilm structures." *Water Sci Technol* 32(8): 35-43.
- van Loosdrecht, M. C. M., J. J. Heijnen, H. J. Eberl, J. U. Kreft and C. Picoreanu (2002). "Mathematical modelling of biofilm structures." *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 245-256.
- van Loosdrecht, M. C. M., C. Picoreanu and J. Heijnen (1997). "A more unifying hypothesis for biofilm structures." *FEMS Microbiol Ecol* 24: 181-183.
- Villaseñor, J. C., M. C. M. van Loosdrecht, C. Picoreanu and J. J. Heijnen (2000). "Influence of different substrates on the formation of biofilms in a biofilm airlift suspension reactor." *Water Science and Technology* 41(4-5): 323-330.
- Walker, J. T., C. W. Mackerness, D. Mallon, T. Makin, T. Williets and C. W. Keevil (1995). "Control of *Legionella*-*Pneumophila* in a Hospital Water-System by Chlorine Dioxide." *Journal of Industrial Microbiology* 15(4): 384-390.
- Wanner, O. and W. Gujer (1986). "A multispecies biofilm model." *Biotech Bioeng* 28: 314-328.
- Wanner, O. and P. Reichert (1996). "Mixed modeling of mixed-culture biofilms." *Biotechnol Bioeng* 49: 172-184.
- Wimpenny, J. W. T. and R. Colasanti (1997). "A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models." *FEMS Microbiol Ecol* 22: 1-16.
- Xavier, J. B., R. Malhó, A. M. Reis and J. S. Almeida (2000). "Description of biofilm formation by determination of developmental axis." *Wat Sci Tech* 41: 121-127.
- Xavier, J. B., C. Picoreanu and M. C. M. van Loosdrecht (2003). "Assessment of three-dimensional biofilm models through direct comparison with confocal microscopy imaging." *Wat Sci Technol* (Accepted for publication).