

생물막 성장에 대한 세균의 초기 분포영향을 나타내는 셀룰라오토마톤 모델

이 상 희 · 최 경 희¹ · 전 태 수^{1,*}

(부산대학교 물리학과, ¹부산대학교 생명과학부)

Cellular Automaton Models Revealing Effects of Initial Bacterial Distribution on Biofilm Growth. Lee, Sang-Hee, Kyung-Hee Choi¹ and Tae-Soo Chon^{1,*} (Department of Physics, Pusan National University, Busan (Pusan), Korea, ¹Division of Biological Sciences, Pusan National University, Busan (Pusan), Korea)

Two dimensional cellular automaton (CA) models were developed to investigate growth of biofilms in aquatic ecosystems. Simple local rules on CA were applied to governing growth of bacterial populations in relation to different nutrient concentrations. Initial bacterial distribution played an important role in determining population size and morphology of biofilm at low concentrations of nutrition. With clumped distribution, population size increased slowly compared with uniform and random distributions, while the porosity tended to be higher with uniform distribution compared with other initial distributions.

Key words : biofilm, cellular automaton, porosity, spatial distribution

서 론

물 속에서 부유중인 미생물은 개체 별로 또는 뭉쳐서 떠 다니다가, 수서생태계 내의 여러 가지 표면에 달라 붙어 생물막(biofilm)을 형성하고 생태적 대사 작용에 중요한 역할을 한다. 미생물이 하상표면에 붙는 현상을 흡착(absorption) (Escher and charachlis, 1990)이라고 하는데, 중력에 의한 침전, Van der Waals 힘 및 흡착성이 있는 물질의 화학작용 등으로 이루어진다(Carter *et al.*, 1998). 이 과정은 단순히 고체표면에 달라붙는 물리적 흡착과 고체표면에 붙고 나서 다시 화학적 결합을 하는 화학적 흡착 등으로 나눌 수 있다. 낮은 에너지의 화학적 결합(20~50 KJ mol⁻¹)으로 이루어 지는 경우는 비교적 용이하게 다시 떨어지나(Lye and Dufour, 1993), 이온 결합 등에 의해 일어나는 흡착의 경우는 일반적으로 비

가역적인 반응으로 잘 떨어지지 않으며, 생물막을 형성하게 된다(Schmidt, 1994). 하상표면에 형성된 생물막은 세균, 진균 등으로 구성되어 영양물질의 분해와 수질개선에 크게 기여한다(Okabe *et al.*, 1999). 생물막을 구성하는 세균군의 일부분은 유체의 전단 응력 등에 의해 생물막 으로부터 분리(detachment)되고 떠돌아 다니다가 다시 흡착하는 과정을 되풀이 한다. 생물막 형성 과정은 여러 가지 자연적, 인위적 현상에서 관찰되는데, 생물학적 기관(치아, 도뇨관 등) (Marsh and Martin, 1992), 생태계 구성물(하상입자, 침전물, 흙 등), 산업용 기기(필터, 파이프라인, 배의 선체 등) (Kolenbrander and London, 1993; Stickler *et al.*, 1993) 등에서 다양하게 나타난다.

최근 생물막에 대한 많은 이론적 연구가 진행 되었다. 특히, 생물막의 이질성(heterogeneity) (Wimpenny, 1992; De Beer *et al.*, 1996)에 대한 실험적 사실들이 제시 됨에

* Corresponding author: Tel: 051) 510-2261, Fax: 051) 512-2262, E-mail: tschon@pusan.ac.kr

따라 많은 후속 연구가 이루어 지고 있다. 1970년대에 균일한 정상상태 (uniform steady state)에서 1종의 세균에 의한 1차원 생물막 모델이 구현되었다 (Shuler *et al.*, 1979). 1980년대에 다기질-다종의 생물막 모델이 제안되었고 (Wanner and Gujer, 1986), 1990년대에 컴퓨터 시뮬레이션의 기술적 발전과 더불어 2차원, 3차원 생물막 모델이 제시되었다 (Kreft J-U *et al.*, 1998; Noguera *et al.*, 1999). 2~3차원 생물막 모델은 수송현상 (transport phenomena)과 막의 성장과정 및 분리 현상을 잘 묘사해 주었다. 위의 모델들은 대부분 세균과 영양물의 상호작용을 묘사 하였는데 이들은 Biomass based models이라고 불렸다. 그러나 이러한 모델들은 주로 세균의 전체적 밀도와 관련 지은 생물막을 대상으로 하였고, 세균이 표면에 흡착되는 형태적 과정 (morphological process)에 대해서는 별로 적용되지 못하였다. 최근 Lee 등 (2004)에서 공간적 분포가 서로 다른 상태에서 영양물에 대한 경쟁이나 포식의 과정을 거치면서 확산하게 될 때 초기분포에 따라서 종의 성장 경향이 달라질 수 있음이 보고 되었다. Lee (2004) 등에서는 반응확산 모델을 이용하여 경쟁을 통한 개체군 확산 문제에서 초기조건의 중요성을 보였는데, 반응확산 모델이 본 연구에서 수행하고자 하는 셀룰라오토마타의 마구잡이 운동 문제와 일정부분 대응성을 가지고 있으므로 본 논문에서는 특수한 경쟁관계를 가지는 두 종의 확산이 셀룰라오토마톤 (Cellular Automaton; CA) 모델로 구현되는 경우에 초기 조건의 중요성을 고찰하고자 하였다.

생물막에 대한 기존의 CA 연구는 주로 영양물의 농도에 따른 변화 등을 다루었다 (Baker and Grimson, 1993). 이러한 측면에서 CA 모델이 발전하였는데, 최근에는 영양물의 농도뿐만 아니라 산소변화 등이 고려 되어지는 모델들이 제안되었다 (Hermanowicz, 1999). 그러나 바닥에 흡착된 세균들의 초기 분포가 미치는 영향에 대한 연구는 이루어져 있지 않다. 본 연구에서는, 수생태계 구성물에 초기 흡착된 세균들의 공간 분포에 따라 생물막이 어떻게 형성되는지를 알아보고자 하였다. 이를 위해 셀룰라오토마톤을 이용하여 생물막을 형성하고, 개체군 크기와 형태를 고찰하였다. CA는 시공간적 복잡계 현상의 물리적 성질을 규명하는데 적당하다고 잘 알려져 있어 (Mitchell, 1996), 제반 물리적, 화학적, 생물학적 과정에 폭 넓게 적용 되어졌다 (Ermentrout and Edelstein-Keshet, 1993; Halley *et al.*, 1994). CA는 공간을 균일한 격자로 나누어 각 격자에 제시된 입자 또는 생물의 상태가 일관적으로 기술되게 한 후, 지역적 규칙 (local rule)에 따라 주위 격자의 입자 상태에 관한 정보를 종합하여 주

격자의 다음 상태를 결정하도록 하는 수리적 방법이다. 이러한 수리적 산출 과정은 시간 진행에 따라 전체 계의 진화 과정을 보여 주는데 유용하다 (Delorme and Mazoyer, 1999). 본 연구에서는 CA를 이용하여 수 환경에서 세균의 초기 공간적 분포 조건에 따라 밀도와 생물막의 변이가 어떻게 나타나는 지를 보고자 하였다.

1. CA 모델

모델 구성의 간편성을 고려하여 본 연구에서는 분리 (detachment) 현상이 무시 되도록 하였는데, 이를 위해 흐름이 없는 유체 속을 가정하였다. 초기 세균의 공간적 흡착 조건으로 균일 (uniform), 마구잡이 (random), 그리고 집중 (clumped) 분포의 세 가지를 고려하였다. 공간을 300×300 사각형 격자로 나누었고, 각 격자를 세균과 영양물이 점유하도록 하였다. 영양물은 브라운운동을 하는 것으로 가정하였다. 세균은 인근 격자에 영양물이 있으면 인근 격자로 증식되도록 하였다. 영양물이 세균과 같은 격자를 점유하게 되면 세균이 영양물을 즉시 섭취하도록 하여, 세균과 영양물질이 같은 시간대에 같은 격자에는 존재하지 못하도록 하였다. 영양물질을 섭취한 후 세균은 적절한 확률 (P)에 따라 분열 하도록 하였다. 실제 세균의 분열확률은 세균 종과 생리적 상태 등에 따라 다양한 값을 가지나, 본 논문에서는 $P=0.94$ 로 고정하였다. 실제 실험실 조건에서는 주변여건과 개체상태가 이상적

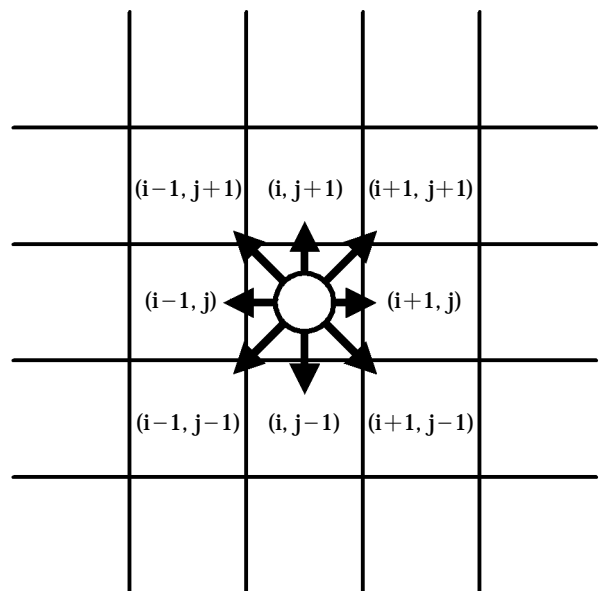


Fig. 1. The eight possible division directions of a bacterium located at (i, j) .

이지 않기 때문에 분열확률이 반드시 이상적인 1이 되지 않는다. 이를 고려하여 우리는 편의상 0.94로 가정하였다. 이 값을 0.8~1까지 다르게 하여도 본 논문에서 논의하는 결과에 큰 영향을 미치지 않았다.

세균은 자기 주위의 격자에 영양물이 있는지를 탐색하는데 주위 격자는 Moor type의 8개로 정의하였다: $\{(i-1, j-1), (i-1, j), (i-1, j+1), (i, j-1), (i, j+1), (i+1, j-1), (i+1, j), \text{ and } (i+1, j+1)\}$ ($i, j=1, 2, \dots, 300$) (Fig. 1). 영양물들은 공간상에서 마구잡이 운동을 하고, 이 영양물을 먹게 되는 세균은 주어진 분열확률 P 를 가지고 증식하게 된다. 영양물을 먹지 못하는 세균개체들은 분열을 할 수 없다. 경계효과를 최소화 하기 위해 시뮬레이션에서 격자공간의 위, 아래면은 제한적(bounded) 경계조건으로, 좌, 우면은 주기적(periodic) 경계조건으로 하였다. 제한적 주기 조건이란 경계 면이 닫혀져 있음을 의미하고, 주기적 경계조건이란 한 경계 면의 경계조건이 반대편 경계 면과 같다는 것을 의미한다. 제반 성장특성은 반복시간(iteration time) 150회 내에서 잘 볼 수 있었다. 초기 표면에 흡착된 세균은 30마리로 하였다. 균일분포의 경우 300격자에 총 30마리 세균을 1마리씩 10격자 간격으로 분포시켰고, 집중분포에서는 5개의 세균을 하나의 덩어리로 해서 각 덩어리 사이가 74격자가 되게 흡착하였고, 마구잡이분포에서는 난수를 발생시켜 각 개체를 격자에 배치하였다.

2. 생물막의 형태분석

생물막의 시공간적 성장과정과 형태를 기술하기 위해서 공극률과 프랙탈 차원이 제시되었다. Zhang과 Bishop (1994 a,b)은 생물막의 내부에 형성되는 빈 공간의 크기를 공극률(porosity)로 계산하였다. 공극률은 생물막내부가 어떤 구조로 이루어졌는가 하는 정보를 제공한다. 또한 물이 이 공극을 통하여 침투할 수 있기 때문에 생물막의 성장에 중요한 영향을 미친다. Zahid와 Ganczarczyk (1994)은 생물막 내부에 형성되는 공간의 프랙탈차원을 계산하였다. 본 연구에서는 수면에 대한 생물막의 접촉성 등을 고려하여 공극률을 형태 분석에 이용하였다. 각 영양물의 농도에 따라 10회 반복하여 계산하였는데, 공극률은 다음과 같이 정의하였다.

$$\epsilon = \frac{A_v}{A_h}$$

여기서 A_h 는 바닥에서 생물막의 표면까지의 높이 중에서 최소 높이와 바닥의 길이를 곱한 면적을 의미하고, A_v 는 그 면적 내부에 생성된 빈 공간의 면적을 나타낸다.

초기에 주어지는 영양물의 농도는 다음과 같이 정의되었다.

$$Nutrient(i, j) = 1, \text{ when } rand(i, j) < N$$

여기서 $rand(i, j)$ 는 격자 (i, j) 의 위치에 발생되는 0~1 사이의 난수를 의미한다. 이 식에서 N 은 영양물의 상대적인 농도를 나타내게 된다.

결과 및 고찰

Fig. 2는 세균의 균일분포, 집중분포, 마구잡이분포의 세가지 분포형에 대해서, 영양물의 농도에 따라 생물막이 150회 반복계산 후 어떻게 성장하는 가를 보여주고 있다. Fig. 2(a), (d), (g)는 $N=0.2$ 으로 영양물의 밀도가 낮은 경우 각 초기 분포에 따른 생물막 성장과정을 보여준다. 집중 분포인 경우 균일 및 마구잡이 분포에 비해 생물막 성장이 상대적으로 늦게 진행되었다. 영양물 농도가 올라갈수록 150 시간 반복 후 생물막 성장 형태의 구분이 낮아졌는데, $N=0.3$ 인 경우 초기분포에 따른 구분이 약해졌고(Fig. 2(b), (e), (h)), $N=0.4$ 로 초기영양물의 농도가 더 높아진 경우, 150 반복시간 후에는 초기분포에 상관없이 생물막이 거의 유사하게 성장해 지는 것을 알 수 있다(Fig. 2(c), (f), (i)). 전체적으로 초기의 분포는 영양물 농도가 낮을 경우 생물막 형성에 영향을 미침을 알 수 있었다. 그러나 초기영양물의 농도가 어느 정도 이상이 되면 장기적인 성장에서는 거의 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

Fig. 3은 $N=0.25$ 인 경우 시간에 따른 세균 밀도의 증가를 보여준다. $t=30$ 이전에 균일 및 마구잡이 분포에서 밀도가 같은 양태로 증가하였다. 반면, 집중분포에서는 이에 비해 개체군 크기가 낮게 증가하였다. 이후 $t>30$ 에서 증가 곡선은 모두 겹쳐져 같은 양태의 밀도 증가를 보여 주었다. 초기영양물의 농도를 높게 해 주면 세 곡선이 겹치는 시점이 앞당겨지는 경향을 볼 수 있었다.

Fig. 4(a), (b)는 초기에 세균들이 서로 덩어리로 흡착되어진 상태와 단일 개체로 떨어져 흡착되어진 두 가지 상태에서 성장할 수 있는 공간적 방향을 나타낸다. 집중 분포에서는 서로 근접해 있는 세균들이 처음에 성장할 수 있는 방향이 위 쪽의 3가지뿐인데 반해(Fig. 4(a)), 독립적인 세균들은 5가지 방향으로 다양하게 성장할 수 있다(Fig. 4(b)). 이것은 초기에 각 개체가 서로 떨어져 분포한 경우, 전체적으로 생물막이 넓은 공간으로 성장할 가능성이 높음을 보여주는데, 넓은 공간에 노출 될수록

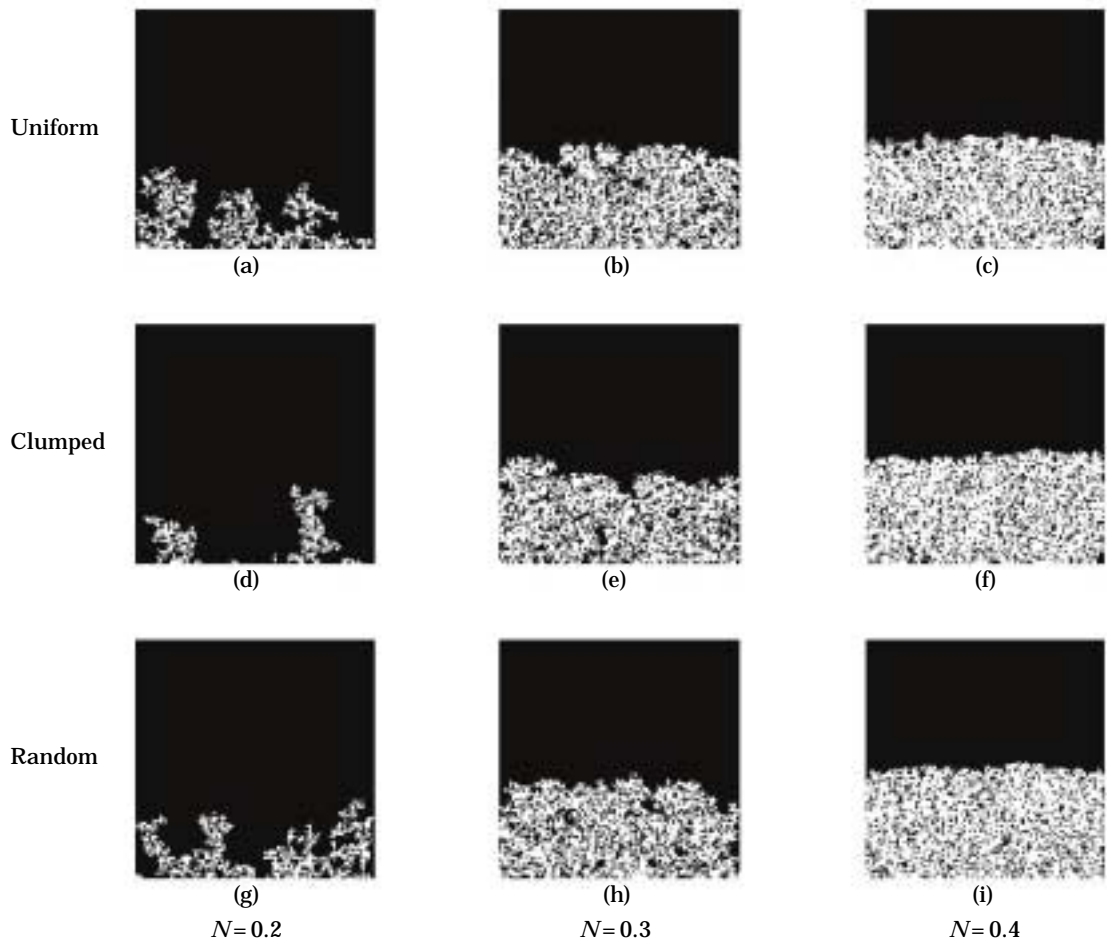


Fig. 2. Biofilm growth at different nutrient conditions ($N = 0.2, 0.4$ and 0.6) after three different initial distributions (uniform, clumped, and random).

영양물에 인접할 수 있는 확률이 높아지고 이에 수반되어 개체군 성장도 빨라 질 수 있다 (Fig. 3). 하지만 세균 층이 쌓일수록 이러한 넓은 공간 효과는 서서히 줄어들었는데, 초기분포 효과는 성장 초기 생물막 층이 낮을 때 비교적 잘 관찰될 수 있었다.

생물막의 공극률은 초기 분포에 따라 밀도증가와와는 다른 양상을 나타내었다. Fig. 5는 $t = 150$ 에서 영양물의 농도에 따른 생물막의 공극률 (porosity) 평균치 (10회 반복)와 표준 편차를 보여준다. 이 경우 집중분포와 마구잡이 분포에서 공극률이 비슷하였고, 균일분포에서는 이 보다 공극률이 뚜렷이 높게 나타났다. 균일분포인 경우 다른 초기 분포에 비해 표준편차가 크게 나타났다. 이는 공극률이 생물막 구조에 중요한 영향을 미치는 점을 감안하면 초기 분포가 균일할 때 생물막 성장이 덜 안정적임을 나타내준다. 영양물은 공간상에서 브라운운동을 하기 때

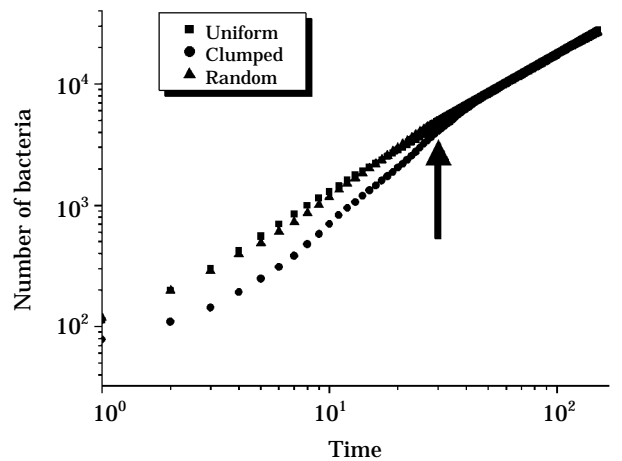


Fig. 3. Increase in population size of bacteria after three different initial distributions at $N = 0.25$.

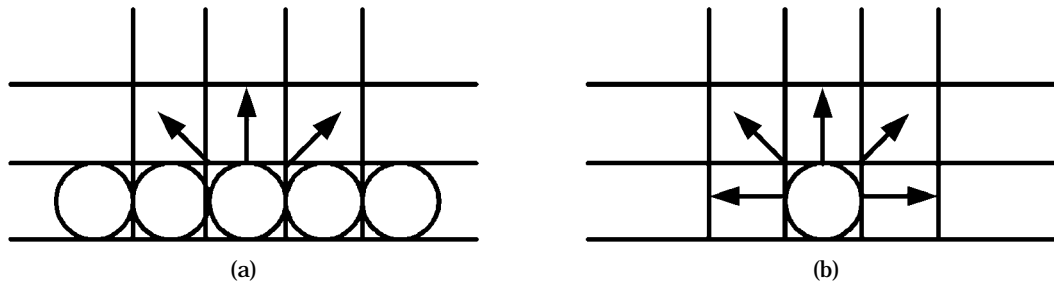


Fig. 4. Possible directions of bacterial growth in a lattice with neighbor bacteria (a), and without neighbor bacteria (b).

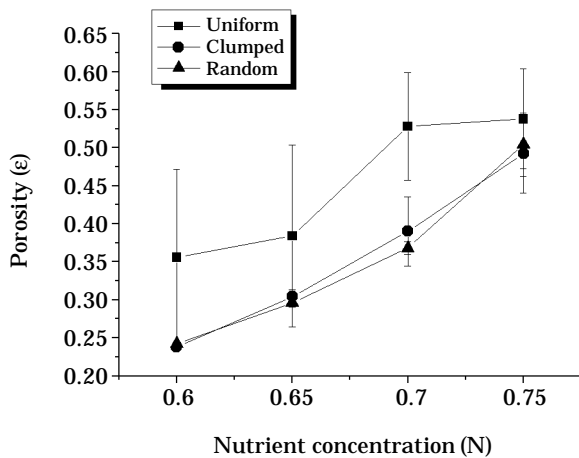


Fig. 5. Biofilm porosity at $t = 150$ after three different initial distributions at different nutrient concentrations.

문에 생물막 표면 부근에서 공간이 넓을 경우 영양물 농도차이가 상대적으로 높게 나타나 생물막 성장의 불안정성을 야기할 수 있다. 균일 분포의 경우 초기 성장시 세포막 주위 공간이 상대적으로 넓다.

Fig. 6은 생물막 외연 형태에 따라 공극률 차이가 왜 나타날 수 있는지를 설명한다. Fig. 6(a), (b)는 Fig. 4(a), (b)와 같이 각각 초기에 세균들이 집중 분포로 서로 근접해 있는 경우와 균일분포로 떨어져 있는 경우의 생물막 성장과정을 나타낸다. Fig에 있는 각 개체 내에서 1번 표기는 $t=0$ 일 때의 바닥에 흡착된 세균을 나타내고, 2번, 3번, 4번은 각각 $t=1, t=2, t=3$ 에서의 생물막 성장을 나타낸다. 검은 색 원들은 세균 주위에 분포하고 있는 영양물을 나타낸다. Fig. 6(a)의 경우는 초기에 세균들이 서로 밀집하기 때문에 자연스럽게 공간을 채우면서 성장하게 된다. 반면 Fig. 6(b)의 경우는 초기에 서로 떨어져

있기 때문에 공간을 채우면서 가지 형태 (branch pattern)의 성장을 하게 된다. 이 경우에 각 가지들이 빈 공간(예, Fig. 6(b)의 점선 상자)을 만들 수 있는 가능성을 높이게 된다. 이 공간 내에는 영양물이 들어오지 못하게 되어, 공극률 결정에 중요한 역할을 한다. Fig. 7은 Fig. 6의 초기 조건에서 연속하여 성장을 시킨 결과이다. Fig. 7에서 바닥 부분의 “o” 표시는 $t=0$ 일 때 바닥에 흡착된 세균을 나타내고, 흰색부분이 세균을 나타내고, 검은 부분이 빈 공간을 나타낸다. Fig. 6에서 설명한 점선부분의 영역이 Fig.7(b) 왼쪽 아래에서 지속적으로 볼 수 있다. Fig. 5에서 균일 분포의 경우 공극률의 표준 편차가 다른 분포에 비해 컸는데, 이는 가지 형태의 성장을 보이는 생물막 성장에서 공극률이 다양하게 나타났음을 의미하였다.

본 연구에서 생물막의 성장에 있어서 초기 분포가 나중에 생물막의 형성에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다. 앞서 언급하였듯이 생물막에 있는 미생물 군집이 수생태계의 유기물 오염 분해에 크게 기여함을 고려할 때 (Clark *et al.*, 1994), 생물막 성장에 대한 정확한 성상의 이해는 매우 중요하다. 같은 밀도로 초기 개체군이 형성된다 하더라도 초기 공간 분포에 따라 성장과정에서 개체군 크기가 달리 나타났음을 알 수 있었다(Fig. 3). 이 경우 집중 분포일 때 낮은 밀도를 보였다. 반면 공극률의 경우 균일 분포에서 높게 나타났었다(Fig. 5). 가지 형태 성장 등을 통해 공극률이 클 경우 물에 노출되는 용적이 증가되리라 여겨지는데, 이는 생태적 대사에 중요한 역할을 하리라 기대된다.

공극률을 통한 생물막 성상의 이해는 기질환경(예, 수분)이나 영양물질(또는 독성물질)에 대한 미생물의 노출양상분석을 가능하게 한다. 나아가 공극률에 따른 구조의 차이는 생물막 구성 생물의 종 다양성에 기여할 수 있다. 생물막을 구성하는 미생물의 종 다양성은 이들과 생태적으로 관련성이 있는 다른 생물(예, 생산자, 소비자)의 서

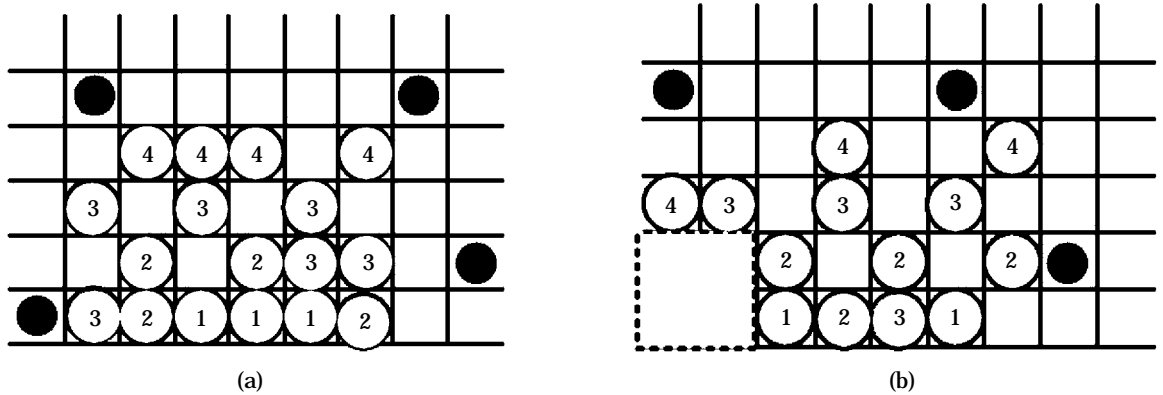


Fig. 6. Biofilm growth sequence from initial distribution of bacteria with clumped condition (a), and with uniform condition (b).

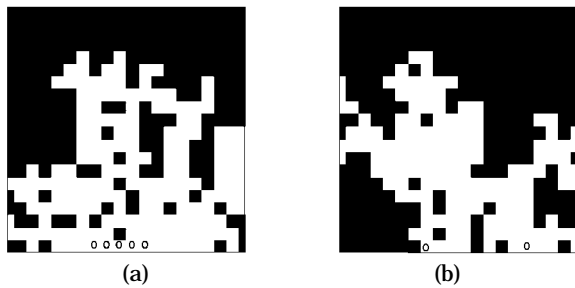


Fig. 7. (a) Biofilm growth pattern after dense distribution of bacteria at $t=0$. (b) Biofilm growth pattern after sparse distribution of bacteria at $t=0$. Here, the symbol "o" indicates the attached bacteria on substratum at $t=0$.

식처 형성에 직접 관여한다고 볼 수 있다. 앞으로 이에 대한 연구가 필요하다 하겠다.

본 연구에서 제안한 모델이 실제 상황에서 평가 받기 위해서는 생물막의 성장에 대한 많은 실험적 자료가 보강 되어져야 한다. 이를테면, 다종 미생물군집의 성장속도, 미생물의 체외물질 분비, 생물막 성장에 따른 산소투과율 및 영양소 분포 등에 대한 생물적 실험이 수반되어지면 보다 실제상황과 가까운 모델을 구현할 수 있으리라 기대된다. 그러나 이러한 생물적 실험에 대한 수행은 시뮬레이션을 통한 본 연구외의 새로운 연구가 기획되어야 한다. 그럼에도 불구하고 본 연구는 생물막의 기본적인 성장 현상에 대한 물성적 이해를 제공하는데 의의가 있다고 보겠다. 셀룰라 오토마타의 시뮬레이션 구현을 강조하여 우리는 앞서 언급한 세균들의 물질분비, 여러 종들에 의한 생물막 구성 등을 구현할 수 있는 CA모델을

구현하고자 한다.

적 요

수서 생태계에서 생물막 성장을 고찰하기 위해 2차원 셀룰라오토마톤(CA) 모델을 구현하였다. 영양물 농도와 연계하여 CA의 단순한 지역 규칙을 세균 개체군의 성장을 나타내는데 적용하였다. 초기 세균 분포는 낮은 영양물 농도에서 개체군 크기와 생물막 형태를 결정하는데 중요한 역할을 하였다. 집중분포에서는 균일분포나 마구잡이분포에 비해 개체군 크기가 느리게 증가하였다. 반면 공극률은 다른 초기 분포에 비해 균일분포에서 높게 나타나는 경향을 보였다.

감사의 글

생물막의 생물학적 현상에 대해 많은 토의를 해 주신 김선주씨와 논문교정에 도움을 준 박정훈씨에게 감사드립니다. 본 연구는 과학재단 특정기초 연구비(KOSEF R001-2001-00087)에 의해 수행되었음.

참 고 문 헌

Baker, G.C. and M.J. Grimson. 1993 A cellular automaton model of microbial growth. *Binary. Comput. Microbiol.*

- 5: 132-137
- Carter, J.T. 1998. Biofilms and planktonic bacteria in a drinking water distribution system. MS thesis, University of Cincinnati
- Clark, R.M., B.W. Lykins, J.C. Block, L.J. Wymer and D.J. Reasoner. 1994. Water quality changes in a simulated distribution system. *Aqua*. **43**: 263-277
- De Beer, D., P. Stoodley and Z. Lewandowski. 1996. Liquid flow and mass transport in heterogeneous biofilms. *Wat. Res.* **30**: 2761-2765
- Delorme, M. and J. Mazoyer. 1999. Cellular automata, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht
- Ermentrout, G.B and L. Edelstein-Keshe. 1993. Cellular automata approaches to biological modelling. *J. Theo. Biol.* **160**: 97-133
- Escher, A. and W.G. Characklis. 1990. Modeling the initial events in biofilm accumulation (ed. Characklis, W.G. and Marshall, K.C), Wiley, New York
- Helley, J.M., H.N. Commins, J.H. Lawton and M.P. Hassell. 1994. Competition, succession and pattern in fungal communities: towards a cellular automata model. *Oikos* **70**: 435-442
- Hermanowicz, S. W. 1999. Two-dimensional simulations of biofilm development: effects of external environmental conditions. *Water Sci. Technol.* **39**(7): 107-114.
- Kolenbrander, P.E. and J. London. 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J. Bacteriol.* **175**: 3247-3252
- Kreft, J.-U., G. Booth and J.W.T. Wimpenny. 1998. A simulator for individual-based modeling of bacterial colony growth. *Microbiology* **144**: 3275-3285
- Lee, S.-H., H.K. Pak, H.S. Wi, T.-S. Chon and T. Matsu-moto. 2004. Growth dynamics of domain pattern in a three-trophic population model. *Physica A* **334**: 233-242
- Lye, D.J. and A.P. Dufour. 1993. Virulence characteristic of heterotrophic bacteria commonly isolated from potable water. *Environ. Toxicol. Wat. Q.* **8**: 13-23
- Marsh, P.D. and M.V. Martin. 1992 Oral microbiology, Chapman and Hall, London
- Mitchell, M. 1996. Computation in cellular automata: a selected review, Santa Fe Institute, Working Paper 960-974
- Noguera, D.R., G.E. Pizarro, D.A. Stahl and B.E. Ritt-mann. 1999. Simulation of multispecies biofilm development in three dimensions. *Water Sci. and Technol.* **39**: 123-130
- Okabe, S., H. Satoh and Y. Watanabe. 1999. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3182-3191
- Schmidt, R. 1994. Materials in biological systems. VDI Verlag, Dusseldorf
- Shuler, M.L., S.K. Leung and C.C. Dick. 1979. A mathematical model for the growth of a single bacterial cell. *Ann NY Acad. Sci.* **326**: 35-55
- Stickler, D.J., J.B. King, C. Winters and S.L. Morris. 1993. Blockage of urethral catheters by bacterial biofilms. *J. Infect.* **27**: 133
- Wanner, O. and W. Gujer. 1986. A multispecies biofilm model. *Biotechnol. Bioengng.* **28**: 314-328
- Wimpenny, J.W.T. 1992. Microbial systems: patterns in time and space. *Adv. Microbiol. Ecol.* **12**: 469-522
- Zahid, W. and J. Ganczarczyk. 1994. Fractal properties of the RBC biofilm structure. *Water Sci. Technol.* **29**: 217-279
- Zhang, T.C. and P.L. Bishop. 1994a. Evaluation of tortuosity factors and effective diffusivities in biofilms. *Water res.* **28**: 2279-2287
- Zhang, T.C. and P.L. Bishop. 1994b. Density, porosity and pore structure of biofilms. *Water res.* **28**: 2267-2277

(Manuscript received 5 July 2004,
Revision accepted 28 August 2004)