

Analyse van Biofilm Processen

Biofilms; een proces-analytische benadering

Een biofilm is een verzameling micro-organismen en anorganisch materiaal, bijeengehouden in een matrix van polymeren en vastgehecht op een substratum (ondergrond). Anorganisch materiaal in een biofilm kan afkomstig zijn van cellen in de film (anorganische uitscheidingsprodukten), van transport vanuit de omringende vloeistof (zand of slibdeeltjes), of van interactie tussen de biofilm en het substratum (corrosie-produkten).



MAARTEN A. SIEBEL
TUC-biotechnology, Institute of Technology Bandung, Indonesia. Voorheen werkzaam bij het Institute for Biological and Chemical Process Analysis*, Montana State University, Bozeman, USA

EWOUT VAN DER WENDE
Institute for Biological and Chemical Process Analysis*, Montana State University, Bozeman, USA



KAREL CH. A. M. LUYBEN,
Technische Universiteit Delft, Vakgroep Bioprocestechnologie.

Biofilms komen in vele milieus en op vele plaatsen voor. Voorbeelden zijn water-zuiveringsinstallaties, drinkwaterleidingen, boorputten, en irrigatiekanalen. Daarnaast worden ze aangetroffen in het menselijk lichaam, o.a. op het gebit, aan de darmwand, en op medische implantaten zoals pacemakers.

Onderdelen van een biofilmsysteem

In een biofilmsysteem kunnen verschillende onderdelen worden onderscheiden (afb. 1).

Het *substratum* speelt een belangrijke rol in de beginfase van biofilmvorming. De adsorptiesnelheid van cellen en de cel-distributie op het oppervlak worden mede bepaald door de eigenschappen van het substratum.

De *basisfilm* is het relatief goed afgebakende gedeelte van de biofilm.

De *oppervlaktefilm* vormt de overgang van basisfilm naar vloeistoffase. Stofftransport in de biofilm wordt bepaald door concentratiegradiënten in zowel de oppervlaktefilm als de basisfilm. In sommige

Samenvatting

Research aan biofilms vindt plaats op zowel praktisch als fundamenteel niveau. In het eerste geval is de belangstelling gericht op het oplossen van praktische problemen, in het tweede geval wordt vergroting van de fundamentele kennis beoogd. Beide benaderingen dienen hand in hand te gaan daarbij gebruik makend van 'cross fertilization'.

Dit artikel beschrijft biofilm research op zowel het praktische, 'problem solving' niveau (bijvoorbeeld het voorkomen van biofilmvorming in drinkwater-distributienetten) als op fundamenteel niveau (bijvoorbeeld initiële adsorptie van biofilms, het loslaten van biofilms en de vorming van biofilms bestaande uit twee bacteriële stammen) en geeft de richting aan waarin toekomstige research aan biofilms zich zal begeven.

gevallen is geen afzonderlijke basisfilm aanwezig en bestaat de biofilm alleen maar uit een oppervlaktefilm. In andere gevallen is de biofilm zo gelijkmatig dat er geen sprake is van een oppervlaktefilm. De *vloeistoffase* verschaft in de meeste gevallen, de nutriënten voor de biofilm en fungeert als afvoer voor de uitscheidingsprodukten. Bijgevolg heeft de menging in de vloeistoffase een grote invloed op de verschillende biofilmprocessen. De *gasfase*, niet altijd aanwezig in ieder biofilmsysteem, voorziet in de aan- en afvoer van gasvormige produkten (O_2 , CO_2 , CH_4).

Biofilmprocessen

Diverse processen spelen een rol bij de vorming van een biofilm (afb. 1):

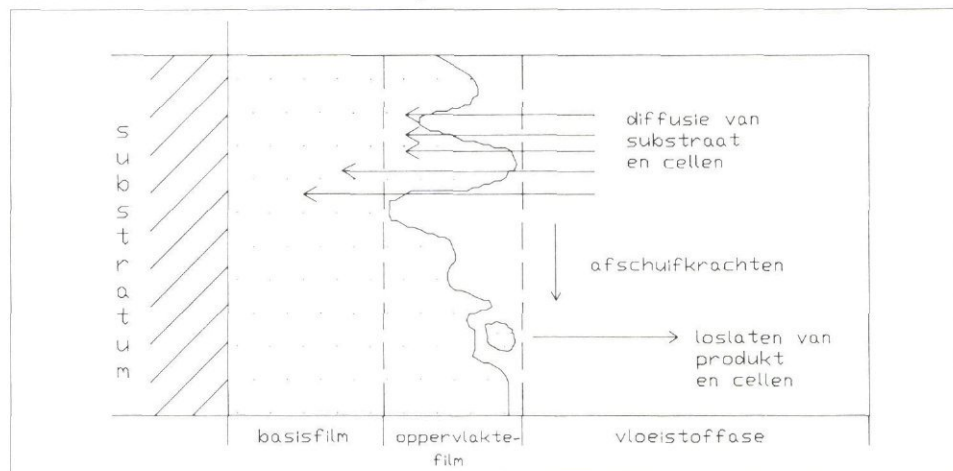
- Transport* van organisch materiaal, nutriënten en micro-organismen van de vloeistoffase naar het substratum of naar de biofilm.
- Adsorptie* van deze componenten aan het substratum of opname hiervan in de biofilm.
- Microbiologische processen* aan het substratum of in de biofilm: celgroei en -deling, vorming van stofwisselingsprodukten, celonderhoud en -afsterving.
- Het loslaten* van biofilmdeeltjes.

Voorafgaand onderzoek

Het onderzoek aan biofilms richtte zich aanvankelijk op het voorkomen van de nadelige gevolgen van de biofilmvorming. Voorbeelden hiervan zijn hogere pompkosten door toenemende weerstand in pijpleidingen, kwaliteitsverslechtering van getransporteerde produkten en aantasting van materialen. Aanvankelijk was het onderzoek dan ook sterk gericht op het effect van chloor en andere bacteriociden op biofilmvorming. De biofilm wordt hierbij beschouwd als een homogene, ongestructureerde massa en wordt als zodanig aangeduid met de term Onbepaalde Populatie Biofilm.

Deze macroscopische beschouwing voldoet niet waar het gaat om het beschrijven van processen op het cellulaire niveau. Daarom wordt nu ook onderzoek gedaan aan Bepaalde Populatie Biofilms. Dit onderzoek bestond tot voor kort uit onderzoek aan biofilms van reinkultures van *Pseudomonas aeruginosa* (monopopulatie biofilms). Research is gedaan aan de bepaling van kinetische en stoichiometrische coëfficiënten [Trulear, 1983], het effect van calcium op biofilms [Turakhia, 1986], het loslaten van biofilms [Bakke, 1986], en initiële adsorptie van

Afb. 1 - Schematische dwarsdoorsnede van een biofilm.



* Het Institute for Biological and Chemical Process Analysis (IPA) houdt zich bezig met onderzoek aan de praktische en fundamentele aspecten van biofilms.

biofilms [Escher, 1986]. Twee van deze studies worden belicht.

Initiële adsorptie

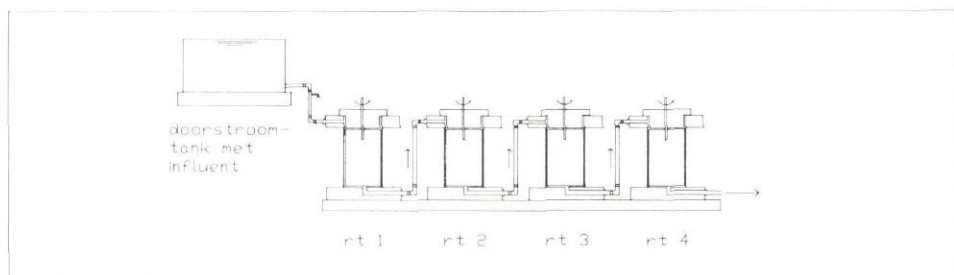
De initiële adsorptie van bacteriën aan een schoon oppervlak is tot nu toe steeds bestudeerd aan de hand van netto accumulatie. De deelprocessen adsorptie, desorptie, groei en loslaten (term meer algemeen dan erosie) konden niet afzonderlijk worden gemeten.

In het kader van een promotieonderzoek [Escher, 1986] zijn deze deelprocessen bestudeerd met behulp van beeldanalyse-technieken (image analysis) om de mechanismen van initiële adsorptie op te helderen. De experimentele opstelling bestond uit een plat glazen capillair (waarin de te bestuderen processen plaatsvinden), en een beeldanalyse-systeem. Dit systeem omvatte een op een microscoop gemonteerde videocamera, een computer (de eigenlijke image analyzer), en een beeldscherm. Effluent van een chemostaat met een reiculture van *Pseudomonas aeruginosa* werd met een bekende constante snelheid door het capillair gepompt. Gedurende een experiment werden met een vast tijds-interval videobeelden gemaakt. Per experiment werden 60 beelden verzameld, die naderhand met behulp van de image analyzer en speciaal voor dit doel geschreven computerprogramma's werden geanalyseerd.

De resultaten laten zien dat, onder de gekozen experimentele omstandigheden, de adsorptiesnelheid afhankelijk is van de concentratie cellen in suspensie en van de afschuifkrachten aan het adsorptie-opervlak, maar onafhankelijk is van de hoeveelheid reeds geadsorbeerde cellen. Tevens bleek dat veel cellen kort na adsorptie weer desorberen (omkeerbare adsorptie [Marshall *et al*, 1973]. Naarmate cellen langer geadsorbeerd waren, nam de kans op desorptie af. Blijkbaar heeft een cel tijd nodig om zich stevig aan het oppervlak te hechten. Geadsorbeerde cellen liggen meestal parallel aan de stroomrichting zodat de wrijvingskrachten minimaal zijn. Naarmate meer cellen succesvol zijn geadsorbeerd verandert het celdistributiepatroon van stochastisch naar uniform. Dit zou er op kunnen duiden dat geadsorbeerde cellen hun directe omgeving beïnvloeden door die minder geschikt te maken voor adsorptie.

Het loslaten van de biofilm

Een studie naar het loslaten van biofilms met reincultures van *P. aeruginosa* [Bakke, 1986] werd uitgevoerd in een rechthoekige buisreactor met recirculatie.



Afb. 2 - Het RotoTorque Systeem (RTS).

Gemeten werden de substraat-concentratie, de celconcentratie en de concentratie van celprodukten in de vloeistoffase. De biofilmdikte werd gemeten met behulp van optische methoden.

De belangrijkste conclusies uit deze studie waren 1. dat de biofilmdikte voor de reiculture van *P. aeruginosa* een waarde bereikt van 30-35 μm , onafhankelijk van de vloeistofdynamische condities. 2. dat de loslaatsnelheid aanmerkelijk verandert na een verandering van de vloeistofdynamische condities, maar zeer snel weer terugkeert tot de oorspronkelijke waarde; en 3. dat de uiteindelijke biofilmdikte onafhankelijk is van de substraatbelasting. Bijgevolg kan de biofilmdikte voor een reiculture van *P. aeruginosa* beschouwd worden als een inherente eigenschap van deze soort, waarbij de biofilmloslaatsnelheid een regulerende rol speelt.

Recent onderzoek

Twee onderzoeken worden in meer detail beschreven. Het eerste betreft een sterk praktijkgerichte studie naar het voorkomen van coli-achtigen in drinkwater-distributiesystemen. Vervolgens wordt fundamenteel onderzoek beschreven aan een biofilm bestaande uit twee bacteriesoorten.

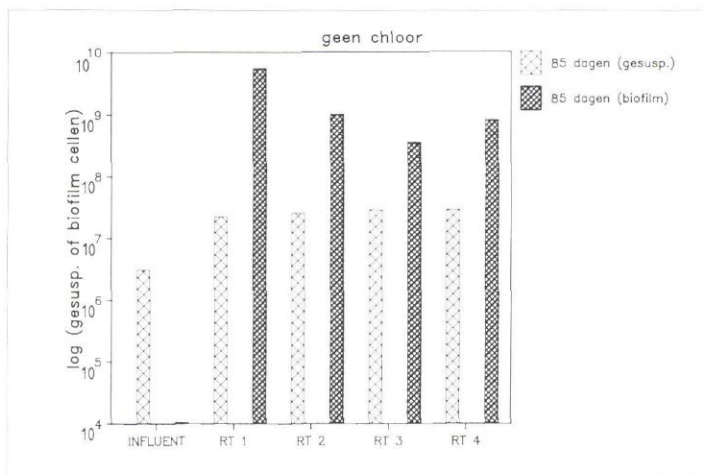
A. Biofilms in een drinkwaterleiding

In 1984 en 1985 ervoer een waterleiding-

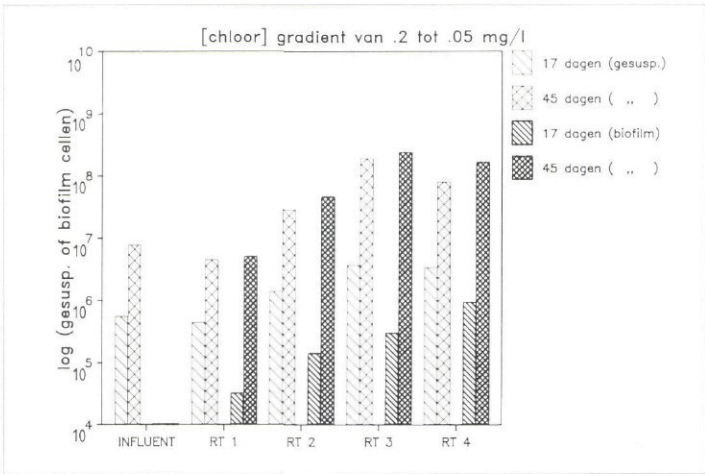
bedrijf in New Haven, Connecticut (USA) perioden met hoge concentraties coli-achtigen in het drinkwater.

De organismen werden zowel aangetroffen in drinkwater dat bereid was uit oppervlaktewater als in drinkwater bereid uit grondwater. *Klebsiella pneumoniae* was steeds sterk vertegenwoordigd, maar ook andere soorten zoals *Enterobacter cloacae* en *Enterobacter aerogenes* werden veelvuldig gevonden. *Escherichia coli*, meestal in verband gebracht met faecale verontreiniging, werd niet aangetroffen. Het desbetreffende waterleidingbedrijf startte een onderzoek naar de oorzaak van dit probleem. Na afloop werd verontreiniging door kortsluitstromen tussen drink- en afvalwater als mogelijke hoofdoorzaak uitgesloten. Een nadere analyse duidde op besmetting tijdens de drinkwaterbereiding zelf, en op verdere groei in het leidingnet als oorzaken. Het idee dat deze coli-achtigen zich in het drinkwater vermeerderden werd sterker nadat tests hadden uitgewezen dat de uit drinkwater geïsoleerde stammen beter en sneller groeiden in voedselarm water, dan hun klinische verwanten.

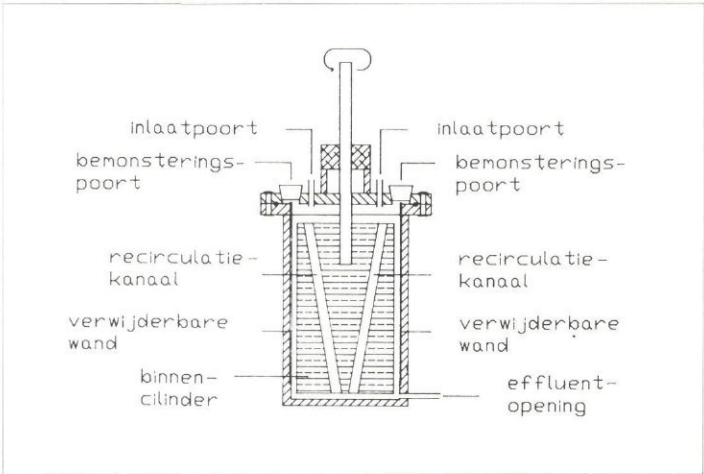
Algemeen werd aangenomen dat biofilms een belangrijke rol spelen bij bacteriële nagroei in drinkwaterleidingen. Nagegaan werd daarom of biofilms de bacteriologische waterkwaliteit kunnen beïnvloeden, en wat de invloed van chlorering op de accumulatie van biofilms is.



Afb. 3 - Cellen in de RTS onder chloorvrije condities als $l \cdot m^{-2}$ voor de biofilm en als $l \cdot m^{-3}$ voor de suspensie).



Afb. 4 - Cellen in de RTS bij lage chloorconcentraties (als L.m^{-2} voor de biofilm en als L.m^{-3} voor de suspensie).



Afb. 5 - Schematische weergave van een RotoTorque reactor.

Een waterleiding gemodelleerd
Het onderzoek werd verricht aan een gemodelleerde waterleiding die de naam RotoTorque Systems (RTS) kreeg. De RTS bestaat uit vier RotoTorques in serie (afb. 2). Elke RotoTorque is een Continuous Flow Stirred Tank Reactor (CFSTR) die bestaat uit een stuk waterleidingbuis met daarin een massieve PVC cilinder. Deze cilinder draait met een te variëren snelheid en bepaalt de lokale stroomsnelheid en afschuifkracht aan de wand van de waterleidingbuis. Het influentdebiet bepaalt de hydraulische verblijftijd. Door de juiste combinatie van rotatiesnelheid en debiet in te stellen, kunnen leidingen van verschillende lengten en met verschillende stroomsnelheden van het water worden gemodelleerd. De CFSTR's vormen de toegangsplaatsen op vier posities langs deze 'waterleiding' ter bemonstering van biofilm en water.

Groeisnelheden
In een eerste experiment werd de (specifieke) groeisnelheid van cellen in de biofilm bepaald door gebruik te maken van de balansen over een CFSTR voor biofilmcellen en de gesuspenderde cellen:

In suspensie:

$$\begin{matrix} \text{accumulatie} \\ \text{van} \\ \text{cellen} \end{matrix} = \begin{matrix} \text{celtoevoer} \\ \text{via} \\ \text{influent} \end{matrix} - \begin{matrix} \text{celafvoer} \\ \text{via} \\ \text{effluent} \end{matrix} + \begin{matrix} \text{loslaten} \\ \text{van} \\ \text{cellen} \end{matrix}$$

In de biofilm:

$$\begin{matrix} \text{accumulatie} \\ \text{van} \\ \text{cellen} \end{matrix} = \begin{matrix} \text{loslaten} \\ \text{van} \\ \text{cellen} \end{matrix} + \begin{matrix} \text{groeï} \\ \text{van} \\ \text{cellen in} \\ \text{biofilm} \end{matrix}$$

In geval van een steady state is de accumulatieterm gelijk aan nul. Verder kon groei in suspensie verwaar-

loosd worden daar de hydraulische verblijftijd beduidend korter was dan de generatietijd van de gesuspenderde cellen. In de eerste CFSTR werd voor cellen in de biofilm een specifieke groeisnelheid van $0,0025 \text{ uur}^{-1}$ berekend, overeenkomend met een generatietijd van 17 dagen. Dat er bij dergelijke groeisnelheden toch een duidelijke toename viel waar te nemen in de concentratie van gesuspenderde cellen (afb. 3), was te wijten aan het relatief grote aantal aanwezige biofilmcellen die geleidelijk door loslating in suspensie raakte. De microbiële activiteit in de volgende drie CFSTR's was beduidend lager. Het aantal gesuspenderde cellen nam niet verder toe, en de hoeveelheid biofilmcellen nam af. Blijkbaar werd al in het begin van de RTS een groeifactor verbruikt waardoor verdere groei stagneerde.

Gechloreerd leidingwater
Toevoeging van chloor aan het RTS-influent resulteerde in een concentratiegradiënt van chloor over de opeenvolgende CFSTR's doordat chloor met diverse systeemcomponenten (biofilm, pijpmateriaal, etc.) reageerde. Het effect van chloor op biofilmaccumulatie werd voor twee verschillende concentratiegradiënten van chloor over het reactorstelsel onderzocht. Afb. 4 geeft de resultaten voor de chloorconcentratiegradiënt over de RTS van $0,2-0,05 \text{ g.m}^{-3}$ (als vrij beschikbaar chloor). Zowel de hoeveelheid biofilmcellen als gesuspenderde cellen nam door de RTS toe, dit in tegenstelling tot de chloervrije situatie. De chloorgradiënt veroorzaakte de sterkste afremming van microbiële activiteit in de eerste CFSTR waardoor groeifacoren verder in de RTS door-

drongen en daar celgroei bevorderden. Verder is uit afbeelding 4 de relatie tussen hoge concentraties gesuspenderde cellen en de aanwezigheid van biofilm af te lezen. De andere chloorgradiënt liep van $0,8$ tot $0,5 \text{ g.m}^{-3}$. Dergelijke concentraties komen algemeen voor in het drinkwater in de Verenigde Staten. Aanvankelijk werd geen biofilm of gesuspenderde cellen gevonden. Pas toen in de RTS een biofilm ontstond werden de eerste gesuspenderde cellen gevonden. Het was voorts opmerkelijk dat de initiële biofilm slechts enkele species omvatte, terwijl $75-90\%$ van de cellen tot een zelfde species behoorde (*Pseudomonas aeruginosa*). Bovendien bleek deze bacterie een grote hoeveelheid extracellulaire polymeren te vormen. Mogelijk bood dit slijmbescherming tegen de oxyderende werking van chloor waardoor de sterke selectie optrad.

Conclusies
Bacteriologische aangroei in drinkwaterleidingen blijkt frequent de oorzaak van kwaliteitsproblemen voor de consument. Ondanks lage substraatgehalten is groei van bacteriën in de vorm van biofilms mogelijk, ook in geval van korte hydraulische verblijftijden. Afkomstig vanuit de biofilm kunnen ook cellen aanwezig zijn in suspensie. Chloor vertraagt biofilmvorming en derhalve de aanwezigheid van gesuspenderde cellen. De hoogte van de chloorconcentratie bepaalt hoelang en in welke mate biofilmvorming kan worden vertraagd.

B. Binaire-populatie biofilms
Onderzoek aan binaire-populatie biofilms wordt uitgevoerd als een stap verder in de richting van 'natuurlijke' biofilms. Doel van dit onderzoek [Siebel, 1987] was na te

gaan in hoeverre cellen in een binaire-populatie biofilm karakteristieken vertonen die anders zijn dan de karakteristieken van dezelfde cellen in een mono-populatie biofilm. Onderzoek werd uitgevoerd met *Pseudomonas aeruginosa* en *Klebsiella pneumoniae*. Deze organismen komen uiterlijk sterk overeen. *K. pneumonia* is niet beweeglijk en is facultatief anaëroob. *P. aeruginosa* is beweeglijk en groeit alleen in aërobe milieus.

Opzet van de experimenten

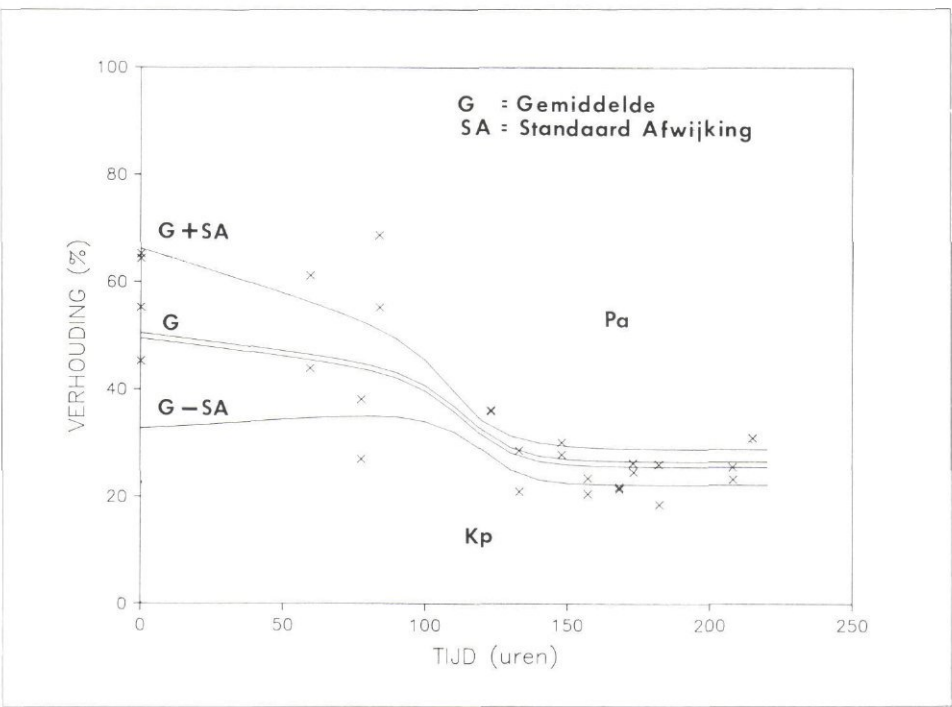
De reactor die gebruikt werd voor deze biofilmexperimenten, de RotoTorque (afb. 5), is van een iets ander ontwerp dan de reactoren die gebruikt werden bij het hiervoor beschreven drinkwateronderzoek. De in dit onderzoek gebruikte RotoTorque is gemaakt van transparant en autoclaveerbaar materiaal en is voorzien van uitneembare gedeelten die observatie en bemonstering van de biofilm vergemakkelijken.

De experimenten werden uitgevoerd door gedurende 12 uur een reïncultuur of mengcultuur van de gewenste stammen in de RotoTorque reactoren te pompen.

Cellen die in deze periode waren geadsorbeerd, vormden het begin van de biofilm. Tevens werden buffer-, calcium- en substraatoplossingen toegevoerd. Debieten werden zodanig gekozen dat de hydraulisch verblijftijd in de RotoTorque 10 minuten was ter voorkoming van celtgroei in de vloeistofase.

Massabalansen en analytische benadering

De analyse van de biofilmexperimenten beruiste geheel op het principe van behoud van massa. Zuurstof en substraat-koolstof werden in het in- en effluent van de reactor bepaald. Cel-koolstof,



Afb. 6 - Verloop van de biomassaverhouding voor de binaire-populatie biofilms. De lijnen respresenteren respectievelijk de 'time-smoothed' gemiddelden en de gemiddelden plus of min de standaardafwijking. Pa en Kp zijn de fractie van de celmassa ingenomen door respectievelijk *P. aeruginosa* en *K. pneumoniae*, G = Gemiddelde, SA = Standaard Afwijking.

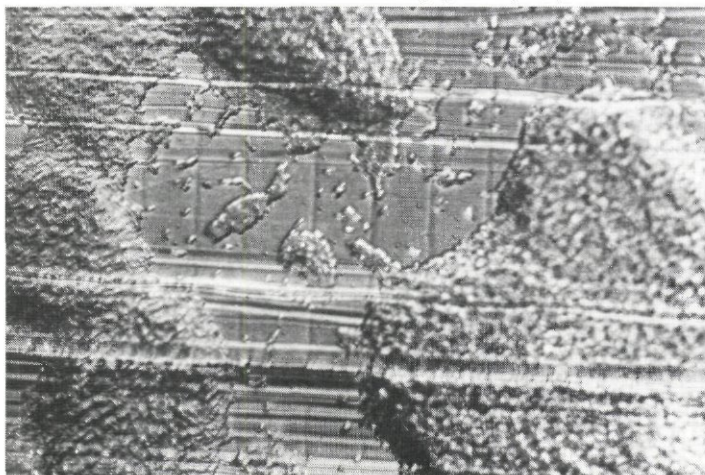
substraat-koolstof en produkt-koolstof werden bepaald in de biofilm en in het effluent. Derhalve konden massabalansen voor deze beide elementen worden opgesteld. Cel-koolstof werd bepaald door middel van celtellingen en celvolume-metingen en op basis van een bekende celsamenstelling. Bovendien werd voor de experimenten met binaire-populatie biofilms de celconcentratie van elk der stammen bepaald door deze uit te platen op selectieve media.

Resultaten en discussie

Twee parameters worden hier beproven,

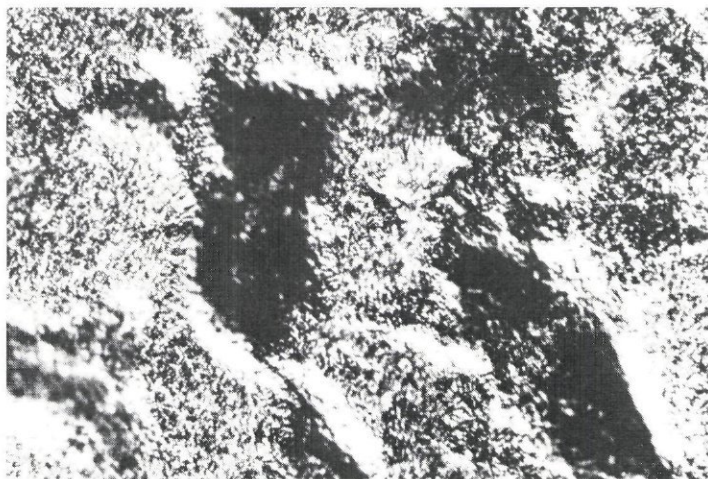
welke karakteristiek zijn voor de microbiologische activiteit in een biofilm. De specifieke produktvormings-snelheid in de biofilm (r_p) is de snelheid waarmee produkt wordt gevormd per eenheid celmassa in de biofilm. De glucose-zuurstof opnameverhouding in de biofilm (η_s) is de verhouding van de glucose-opnamesnelheid en de zuurstofopnamesnelheid in de biofilm. Zowel r_p als η_s werd bepaald voor de mono- en de binaire-populatie biofilms. Bovendien werd de biomassaverhouding in de binaire-populatie biofilms bepaald (afb. 6) en konden derhalve de waarden

Afb. 7 - Biofilm-morfogenese van *K. pneumoniae* op polycarbonaat substratum (Nomarsky microscopie, foto genomen 100 uur na inoculatie, vergroting 500 x). Celclusters breiden zich uit maar het substratum blijft gedeeltelijk ongekoloniseerd.



Afb. 8 - Biofilm-morfogenese van *P. aeruginosa* op polycarbonaat substratum (Nomarsky microscopie, foto genomen 65 uur na inoculatie, vergroting 625 x). Monolaag van dicht gepakte cellen.





Afb. 9 - Biofilm-morfogenese van een binaire-populatie biofilm op polycarbonaat substratum (Nomarsky microscopie, foto genomen 123 uur na inoculatie, vergroting 500 x). Een relatief gladde biofilmoppervlak met uitstekende pieken.

voor r_p en η_s in deze biofilm worden berekend, ervan uitgaande dat de twee stammen elkaar niet beïnvloeden. Het bleek dat de experimenteel gemeten waarden van r_p en k_s in de binaire-populatie biofilm identiek waren aan de op basis van de biomassa-verhouding berekende waarden. Dit betekent dat *K. pneumoniae* en *P. aeruginosa* elkaar in de binaire-populatie biofilm niet beïnvloeden (afgaande op deze twee parameters). Interactie tussen de twee soorten werd ook niet op andere manieren vastgesteld, zoals bij het uitplanten van twee cultures. De wijze waarop de twee stammen een biofilm vormen, duidt op interessante verschillen tussen deze twee stammen. *K. pneumoniae* vormde, door celgroei en celdeling, celclusters met hoogten van 60 μm en meer (afb. 7). Het substratum tussen de clusters werd slechts geleidelijk bedekt met cellen. *K. pneumoniae* vormde derhalve een relatief ruwe biofilm. *P. aeruginosa* daarentegen adsorbeerde en verdeelde zich uniform over het oppervlak, resulterend in een relatief gladde biofilm (afb. 9).

De redenen voor dit verschil in biofilm-morfogenese moeten vooral gezocht worden in verschillen in beweeglijkheid en produktvormingssnelheid. *P. aeruginosa* is beweeglijk en heeft derhalve een veel grotere kans om vanuit de vloeistoffase naar het aanvankelijk schone substratum te bewegen [Yang en Yen, 1985]. Eenmaal geadsorbeerd, kan *P. aeruginosa* zich over het oppervlak bewegen [Marshall, persoonlijke mededelingen] en zich relatief uniform verdelen. *K. pneumoniae* is een niet-beweeglijke bacterie; na adsorptie aan het schone substratum vindt celgroei en celdeling plaats, maar dochtercellen blijven dichtbij de moedercellen. Bovendien heeft *K. pneumoniae* een hoge specifieke produktvormingssnelheid. Dit kan een rol spelen bij het hechten van cellen aan elkaar en aan het substratum.

Dit resulteert in wat Costerton *et al.* [1985] aanduiden als 'trapped daughter cells'. Hoe ziet de binaire-populatie biofilm eruit? Omdat geen interactie tussen de beide stammen kon worden aangetoond, ligt het in de lijn der verwachtingen dat de beide types van biofilm-morfogenese additief zijn. Afb. 9 suggereert dat dit inderdaad het geval is: een relatief gladde basisfilm van *P. aeruginosa* met daaruit stekende pieken van *K. pneumoniae*. Er moet hier worden opgemerkt dat de toegepaste technieken geen cel-determinatie toestonden in de ongeroerde biofilm. Derhalve kan niet met zekerheid worden gesteld dat de basisfilm is opgebouwd uit voornamelijk de ene en de pieken voornamelijk uit de andere stam.

Conclusies

Interactie tussen *K. pneumoniae* en *P. aeruginosa* in de binaire biofilm werd niet vastgesteld. Onderzochte eigenschappen van de stammen in een binaire-populatie biofilm bleken niet anders te zijn dan in de respectievelijke mono-populatie biofilms. Bovendien kon morfogenese van de binaire-populatie biofilm van *K. pneumoniae* en *P. aeruginosa* worden beschouwd als een combinatie van de beide mono-populatie biofilms.

Toekomstig onderzoek

Toekomstig biofilmonderzoek zal zich op twee gebieden gaan richten. Onderzoek aan onbepaalde-populatie biofilms zal voortgang blijven vinden als directe benadering van praktijkgerichte problemen. Om daarnaast meer fundamenteel inzicht te verkrijgen zal onderzoek aan bepaalde-populatie biofilms meer aandacht gaan krijgen. Het praktijkgericht onderzoek zal in steeds sterkere mate gestuurd worden door het toegenomen fundamentele begrip. Belangrijke hulpmiddelen bij de

bestudering van bepaalde-populatie biofilms zullen zijn: cel-labelling, waardoor het beter mogelijk wordt om cellen in situ van elkaar te onderscheiden, en het modelleren van multi-species biofilms.

Verantwoording

Het Institute for process Analysis van Montana State University en de South Central Connecticut Regional Water Authority te New Haven maakten deze studies financieel mogelijk. Medewerking verleenden voorts dr. W. G. Characklis, Jan Hunik, Rik Beefink en Gerrie Siebel.

Literatuur

- Bakke, R. (1986). *Biofilm detachment*. Ph. D.-thesis. Montana State University, Bozeman, Mt.
- Characklis, W. G. *et al.* (1987). *Bacterial regrowth in distribution systems. Final report*. Prepared for the American Water Works Association.
- Costerton, J. W., Marrie, T. J. en Cheng, K. J. (1985). *Phenomena in bacterial adhesion*. 3-43, in: *Bacterial adhesion*. Savage, D. C. en Fletcher, M. (Ed's). Plenum Press, New York.
- Escher, A. R. (1986). *Bacterial colonization of a smooth surface: An analysis with an Image Analyzer*. Ph. D.-thesis, Montana State University, Bozeman, Mt.
- Jang, L. K. en Yen, T. F. (1985). *A theoretical model of convective diffusion of motile and non-motile bacteria toward solid surfaces*. International bioresources Journal. 1: 226-246.
- Marshall, K. C.; Stout, R. en Mitchell, R. (1971). *Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces*. J. Gen. Microbiol. 68: 337-348.
- Siebel, M. A. (1987). *Binary population biofilms*. Ph. D.-thesis. Montana State University, Bozeman, Mt.
- Trulear, M. G. (1983). *Cellular reproduction and extracellular polymer formation in the development of biofilms*. Ph. D.-thesis. Montana State University, Bozeman, Mt.
- Trulear, M. G. en Characklis, W. G. (1982). *Dynamics of Biofilm Processes*. J. Water Poll. Contr. Fed. 54: 1288-1300.
- Turakhia, M. H. (1986). *The influence of Calcium on biofilm processes*. Ph. D.-thesis. Montana State University, Bozeman, St.

