



**HAL**  
open science

# Diversité des bactéries de la microcouche de surface de l'eau de mer : spécificité, adaptation et résistance aux radiations solaires

Hélène Agogué

► **To cite this version:**

Hélène Agogué. Diversité des bactéries de la microcouche de surface de l'eau de mer : spécificité, adaptation et résistance aux radiations solaires. Biodiversité et Ecologie. UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1, 2004. Français. NNT : . tel-01102954

**HAL Id: tel-01102954**

**<https://hal.science/tel-01102954>**

Submitted on 18 Aug 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE  
présentée  
devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1  
pour l'obtention  
du DIPLOME DE DOCTORAT  
(arrêté du 25 avril 2002)

présentée et soutenue publiquement le  
17 Juin 2004

par

**Hélène AGOGUÉ**

Diversité des bactéries de la microcouche de surface de l'eau de mer :  
spécificité, adaptation et résistance aux radiations solaires

Directeur de thèse : Pr. Philippe Lebaron

JURY :

Mr. Pierre Caumette	Professeur – Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau	Rapporteur
Mr. Alain Saliot	Professeur – Université de Pierre et Marie Curie, Paris	Rapporteur
Mr. Patrick Potier	Professeur – Université Claude Bernard, Lyon	Examineur
Mr. Emilio O. Casamayor	Chercheur – CSIC, Blanes, Espagne	Examineur
Mr. Philippe Lebaron	Professeur – Université de Pierre et Marie Curie, Paris	Examineur

THESE  
présentée  
devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1  
pour l'obtention  
du DIPLOME DE DOCTORAT  
(arrêté du 25 avril 2002)

présentée et soutenue publiquement le  
17 Juin 2004

par

**Hélène AGOGUÉ**

Diversité des bactéries de la microcouche de surface de l'eau de mer :  
spécificité, adaptation et résistance aux radiations solaires

Directeur de thèse : Pr. Philippe Lebaron

JURY :

Mr. Pierre Caumette	Professeur – Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau	Rapporteur
Mr. Alain Saliot	Professeur – Université de Pierre et Marie Curie, Paris	Rapporteur
Mr. Patrick Potier	Professeur – Université Claude Bernard, Lyon	Examineur
Mr. Emilio O. Casamayor	Chercheur – CSIC, Blanes, Espagne	Examineur
Mr. Philippe Lebaron	Professeur – Université de Pierre et Marie Curie, Paris	Examineur

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

## **Président de l'Université**

Vice-Président du Conseil Scientifique  
Vice-Président du Conseil d'Administration  
Vice-Présidente du Conseil des Etudes et de la  
Vie Universitaire  
Secrétaire Général

## **M. le Professeur D. DEBOUZIE**

M. le Professeur J.F. MORNEX  
M. le Professeur R. GARRONE  
M. le Professeur G. ANNAT  
  
M. J.P. BONHOTAL

## SECTEUR SANTE

### Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec	Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche	Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
UFR de Médecine Lyon-Nord	Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE
UFR de Médecine Lyon-Sud	Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur J.DOURY
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. LOCHER
Institut Techniques de Réadaptation	Directeur : Mme le Professeur D. BOISSON
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE
Département de Formation à la Recherche et à l'Evaluation Pédagogiques	Directeur : M. le Professeur M. LAVILLE

## SECTEUR SCIENCES

### Composantes

UFR de Physique	Directeur : M. le Professeur J.L. VIALLE
UFR de Biologie	Directeur : M. le Professeur G. BOSQUET
UFR de Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
UFR de Génie Electrique et des Procédés	Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET
UFR Sciences de la Terre	Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE
UFR de Mathématiques	Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE
UFR d'Informatique	Directeur : M. le Professeur M. EGEA
UFR de Chimie Biochimie	Directeur : M. le Professeur J.P. SCHARFF
UFR STAPS	Directeur : M. P. THIRIET Maître de Conférences
Observatoire de Lyon	Directeur : M. le Professeur R. BACON
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon	Directeur : M. le Professeur J.P. PUAUX
Département de 1 <sup>er</sup> cycle Sciences	Directeur : M. J.C. DUPLAN Maître de Conférences
IUT A	Directeur : M. le Professeur M. ODIN
IUT B	Directeur : M. le Professeur G. MAREST
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

*A mes parents,  
A Jérôme,*

## REMERCIEMENTS

*Je tiens à remercier pour commencer le Professeur Gilles Bœuf, Directeur de l'Observatoire Océanologique de Banyuls, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir permis de finir la rédaction de la thèse dans de bonnes conditions.*

*J'exprime mes sincères remerciements au Professeur Philippe Lebaron, initiateur et directeur scientifique de cette thèse, qui m'a donné l'opportunité d'effectuer ma thèse au sein du laboratoire d'écologie microbienne. Je tiens à le remercier tout particulièrement pour son encadrement scientifique, son soutien et sa patience qu'il m'a apporté tout au long de cette thèse.*

*J'adresse toute ma reconnaissance au Professeur Pierre Caumette, de l'Université de Pau, et au Professeur Alain Saliot, de l'Université de Paris VI, d'avoir accepté de juger mon travail en qualité de rapporteurs.*

*Ces remerciements s'adressent également au Professeur Patrick Potier qui me fait l'honneur d'examiner mon travail de thèse et de présider mon jury de thèse ainsi qu'au Docteur Emilio O. Casamayor qui me fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.*

*J'en viens maintenant aux personnes du laboratoire d'écologie microbienne, "aux fameux microbes":*

*Je tiens à remercier de tout cœur Marièle. Tu es arrivée dans le bureau "étudiants" il y a plus d'un an maintenant avec dans tes bagages le soleil de la Martinique, merci pour ton sourire, ta disponibilité, tes conseils et tes encouragements tout au long de cette dernière année. Ils auront été très précieux. (Mwen ka souhété-ou an pil bonè an viou-a epinom-ou).*

*Je tiens à remercier également très chaleureusement nos jeunes chercheurs : Ingrid, Fabien et Jeff du "bureau d'à côté" pour leurs précieux conseils et leurs lectures critiques. Merci Ingrid pour tes conseils et tes encouragements. Merci Fabien pour être monté sur le toit pour ma fameuse mesure et Jeff pour avoir servi de cobaye dans les trains de nuit! Merci Muriel, pour ta formation, tes conseils en phylogénie et tes encouragements.*

*Je tiens à remercier Nathalie, qui a assisté au début de ma thèse et qui est revenue à temps pour voir la fin! , merci pour tes conseils, ton amitié et ton écoute. Merci également à mes deux "native speaking" préférées : Dani et Nyree, merci pour votre disponibilité sans limite chaque fois que mon anglais posait problème. Merci à Julia pour sa bonne humeur et ses encouragements (à quand le 3<sup>ième</sup>?).*

*Merci aux techniciens et ingénieurs "microbes": merci à Nicole, notre maman microbe à tous, merci pour ton soutien et ton aide (même très tard le soir!), merci Annabelle pour ton amitié, ton écoute et ta maîtrise des jpeg!, merci Lœtitia pour tes encouragements et tes "diplô", merci Laurent pour ton investissement important dans ce travail (même très tôt le matin !), ta bonne humeur, ton dynamisme et tes sujets de discussion inégalables (à quand le 3<sup>ième</sup> ?), et enfin merci Philippe pour ton aide en cytométrie et tes conseils.*

*Merci aux thésards, DEA et stagiaires de toutes sortes: j'ai partagé avec vous de très bons moments dans le bureau étudiants. Dans le désordre, merci donc à Karine, Anne-Claire, Sébastien, Sandrine, Raphaël (merci pour les fraises !) Frédérique, Sophie, Olivier, Heidi, David, Céline, Laure, Clémence, Audrey ...Bon vent aux doctorants microbe : Luciana (merci pour ton aide et ton amitié), Olivier, et Maher....*

*Une chaleureuse pensée va tout particulièrement vers les thésards "airwiniens" en fin de rédaction : Anissa, Nuria, Carlos et Thomas ... bonne chance!*

*Je voudrais remercier chaleureusement Gigi, pour sa constante bonne humeur et disponibilité et ses multiples dépannages pratiques. Merci également pour avoir été "mon standard" ces derniers mois. Un grand merci aux "fées" de la bibliothèque: Marie-Thérèse, Sandrine et Véronique. Merci pour votre disponibilité sans limite et vos encouragements. Merci également au service informatique et plus particulièrement à Michel, Eric (mais où est donc cette agrafeuse?) et Nicolas (le pro de la colle). Merci pour votre patience et votre disponibilité, surtout durant les derniers mois de rédaction où un peu "inquiétée" par les multiples virus ou vers infestant mon ordinateur je "déboulais" sans prévenir dans le service. Merci Laurent Z. pour tes conseils et pour avoir permis la sauvegarde avisée et régulière de mon disque dur durant les derniers mois.*

*Un remerciement général est adressé à l'ensemble des chercheurs du laboratoire. Merci également aux "gars" de l'atelier pour leur disponibilité (merci pour le chauffage, Christophe!), aux "filles" de l'administration pour leur bonne humeur et leur pause café et aux marins et plongeurs du laboratoire (à quand le prochain vendredi midi?).*

*Merci à tous les étudiants du laboratoire ARAGO et plus particulièrement aux thésards : Yasmine, Laure, Céline, Elodie, Carolina, Benoit, Olivier, Antoine, Robin et le groupe du "Brésil" : Isabel, Adriana, Joël et Marcio avec qui j'ai partagé de nombreuses et belles soirées. Une pensée particulière pour Basheer, mon compagnon de galère rédactionnelle avec qui j'ai passé de très bons moments, tes soudaines apparitions et grimaces dans le bureau vont me manquer ...*

*Pour clôre ces remerciements sur une touche plus personnelle, je tiens à remercier Géraldine pour sa précieuse amitié et ses nombreux efforts pour me faire découvrir le monde extérieur! (mwén inmin'w ).*

*Enfin, ma dernière pensée (mais pas la moins importante) va à ma famille chérie. Je tiens à remercier du fond du cœur mes parents qui m'ont permis d'en arriver jusque là, et qui m'ont toujours soutenue tout au long de mes études. Je remercie également ma grand-mère et mes grands-parents pour leurs encouragements même lointains. Merci petit frère pour m'avoir donné au moins 2 belles raisons pour "remonter", Karine fut la première et votre fille Lucie la deuxième. Merci à ce petit rayon de soleil pour avoir comblé sa tante.*

*Enfin, merci à Jérôme pour avoir tout simplement été là.*

## **TABLES DES MATIERES**



# TABLES DES MATIERES

---

## CHAPITRE I : Etude bibliographique

---

I. 1. LA MICROCOUCHE DE SURFACE : UN MILIEU PARTICULIER	13
I. 1. 1. Introduction	13
I. 1. 2. Les différents compartiments biologiques au niveau de la microcouche de surface	16
I. 1. 2. 1. Le virioneuston	17
I. 1. 2. 2. Le bactérieuston	17
I. 1. 2. 3. Le phytoneuston	18
I. 1. 2. 4. Le zooneuston	19
I. 1. 3. Caractéristiques physico-chimiques de la microcouche de surface	20
I. 1. 3. 1. Caractéristiques physiques	20
I. 1. 3. 2. Caractéristiques chimiques organiques et inorganiques	22
I. 1. 3. 3. Apports anthropiques au niveau de la microcouche de surface	23
I. 1. 4. Facteurs abiotiques potentiellement inhibiteurs pour les communautés neustoniques	25
I. 1. 4. 1. Les variations brusques des conditions environnementales	25
I. 1. 4. 2. Le haut niveau de radiations	25
I. 1. 4. 3. La forte concentration de substances toxiques	26
I. 1. 5. L'échantillonnage de la microcouche de surface	28
I. 1. 5. 1. Les différents modes de prélèvement de la microcouche	28
I. 1. 5. 2. Les critères de choix	30
I. 2. LES COMMUNAUTES BACTERIENNES DE LA MICROCOUCHE DE SURFACE	32
I. 2. 1. Diversité des communautés bactérieustoniques	32
I. 2. 1. 1. Composition taxinomique de la flore cultivable de la microcouche de surface	32
I. 2. 1. 2. Etude des communautés bactériennes totales de la microcouche de surface	33
I. 2. 2. Propriétés physiologiques et morphologique du bactérieuston	34
I. 2. 2. 1. Propriétés métaboliques des isolats de la microcouche	34
I. 2. 2. 2. Caractéristiques membranaires	34
I. 2. 2. 3. Morphologie : polymères et formation de rosettes	35
I. 2. 3. Adaptation des communautés bactériennes aux substances toxiques	36
I. 2. 3. 1. Effet des substances toxiques sur les communautés bactérieustoniques	36
I. 2. 3. 2. Modes de résistance et de protection des bactéries contre les substances toxiques	37
I. 2. 4. Adaptation des communautés bactériennes aux radiations solaires intenses	38
I. 2. 3. 1. Effet des radiations solaires sur les communautés bactériennes	38
I. 2. 3. 2. Effet des radiations solaires sur les communautés bactérieustoniques	39
I. 2. 3. 3. Mécanismes de résistance et de protection contre les radiations solaires	40
I. 2. 3. 4. Mécanismes de réparation	42
I. 3. LE PROGRAMME EUROPEEN AIRWIN	45
I. 4. SUJET DE RECHERCHE	46

---

## CHAPITRE II : Matériels et Méthodes

---

II. 1. PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS	49
II. 1. 1. Les sites d'étude	49
II. 1. 2. Les échantillonneurs	49
II. 1. 3. Expérience de contrôle des échantillonneurs	52
II. 2. ISOLEMENT ET CARACTERISATION MOLECULAIRE DES ISOLATS BACTERIENS	53
II. 2. 1. Isolement de souches	53
II. 2. 2. Caractérisation moléculaires des isolats	53
II. 2. 2. 1. Extraction d'ADN	53
II. 2. 2. 2. Amplification par PCR de l'ADNr 16S	57
II. 2. 2. 3. Criblage géotypique des isolats par RFLP	59
II. 2. 3. Conservation et codification des souches	60
II. 2. 3. 1. Les différents modes de conservation des souches	60
II. 2. 3. 2. Codification des souches	60
II. 3. IDENTIFICATION DES ISOLATS DE LA COLLECTION	61
II. 3. 1. Séquençage de l'ADNr 16S	61
II. 3. 2. Correction et reconstitution des séquences	61
II. 3. 3. Recherche de similarités	62
II. 3. 4. Soumission des séquences à GenBank	62
II. 3. 5. Construction d'arbres phylogénétiques	63
II. 3. 5. 1. Alignement des séquences par CLUSTAL W	63
II. 3. 5. 2. Correction manuelle de l'alignement sous le logiciel SEAVIEW	63
II. 3. 5. 3. Les méthodes de construction d'arbres phylogénétiques	64
II. 3. 5. 4. Visualisation des arbres, éditions et impressions	65
II. 4. ETUDE DES CARACTERES PHYSIOLOGIQUES DES SOUCHES DE LA COLLECTION	66
II. 4. 1. Détermination des courbes de croissance des souches	66
II. 4. 2. Détermination de l'hydrophobicité des isolats	66
II. 5. DETERMINATION DE LA RESISTANCE DES SOUCHES AUX RADIATION SOLAIRES	69
II. 5. 1. Dispositif experimental	69
II. 5. 2. Protocole expérimental	73

---

## CHAPITRE III

---

COMPARAISON DE DIFFERENTS ECHANTILLONNEURS POUR LA CARACTERISATION BIOLOGIQUE DE LA MICROCOUCHE DE SURFACE	75
Contexte de l'étude	75
Article Comparison of samplers for the biological characterization of the sea surface microlayer	77
Abstract	78
Introduction	79
Materials and procedures	82
Field sites and sample collection	82
Experiment to determine the potential selectivity of the sampling devices	83
Enumeration of the autotrophic and heterotrophic microbial community	83
Enumeration of culturable bacteria	84
Enumeration of viruses	84
Enumeration of ciliates and flagellates	84
Bacterial production	85
Pigments	85
Populations structure of the bacterial communities	85
Statistical analysis	87
Assessment	89
Experiments to determine the potential selectivity of the sampling devices	91
Reference depth of UW	91
Metal screen <i>versus</i> glass plate	91
Phytoneustonic and zooneustonic parameters	93
Virioneustonic and bacterioneustonic parameters	95
The case of membranes	99
Discussion	100
Comments and recommendations	101
References	102

---

## CHAPITRE IV

---

IV. 1. DIVERSITE DU BACTERIONEUSTON	107
Contexte de l'étude	107
Article Community structure and culturing of bacterioneuston from marine coastal ecosystems	109
Summary	110
Introduction	111
Results	113
Total counts and culturability	113
Structure of bacterial communities	113
Taxonomic affiliation of isolates	117
Phylogenetic diversity of isolates	117
Putative neustonic isolates	120
Discussion	126
Range of culturability	126
Structure of bacterial communities	126
Taxonomic groups of culturable bacteria from the two contrasted sites	127

Bacterioneuston specificity	128
Phylogenetic richness of the culture collection	129
Conclusion	129
Experimental procedures	130
Field sites and sample collection	130
Enumeration of total bacteria	130
DNA extraction and SSCP analysis	130
Enumeration and isolation of marine bacterial strains	131
Molecular characterization of the strains	131
Phylogenetic analysis	132
References	135
IV. 2. CARACTERISATION PHYSIOLOGIQUE DES SOUCHES DE LA COLLECTION : DETERMINATION DE L'HYDROPHOBICITE	140
IV. 2. 1. Contexte de l'étude	140
IV. 2. 2. Résultats	142
IV. 2. 2. 1. Distribution des différentes classes d'hydrophobicité au sein des isolats de la collection	142
IV. 2. 3. Discussion	144
IV. 2. 3. 1. Bacterioneuston et hydrophobicité	144
IV. 2. 3. 2. Pigmentation et hydrophobicité	145
IV. 2. 3. 4. Mode d'échantillonnage et hydrophobicité	146
IV. 2. 3. 4. Limites du test d'hydrophobicité utilisé	146
IV. 2. 4. Conclusion	148

---

## CHAPITRE V

---

RESISTANCE DU BACTERIONEUSTON AUX RADIATIONS SOLAIRES	149
Contexte de l'étude	149
Article Resistance of bacterioneuston to solar radiation	151
Abstract	152
Introduction	153
Materials and methods	155
Sampling and isolation of marine bacterial strains	155
Molecular characterization of the strains	155
Characterization of solar radiation sensitivity	156
Results	159
Determination of the different classes of resistance	159
Origin of isolates	159
Taxonomic affiliation of isolates	161
Pigmentation of isolates	161
Discussion	166
Resistance of neustonic vs non-neustonic strains	166
Interspecific variability of resistance to solar radiation	167
DNA repair mechanisms	167
Role of pigmentation for the resistance to solar radiation	168
Conclusion	170
References	172

---

## CHAPITRE VI

---

Conclusions générales	179
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	187
<b>ANNEXES</b>	207
Annexe 1 : Fiches techniques et mode opératoire des différents échantillonneurs de microcouche de surface	208
Annexe 2 : Milieu de culture et tampons	215
Annexe 3 : Collection AIRWIN : caractéristiques d'isolement	218
Annexe 4 : Collection AIRWIN : identification, pourcentage d'hydrophobicité et résistance aux radiations solaires	222

## **INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX**

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE I

Figure 1 : Mécanismes d'échange de part et d'autre de l'interface air-mer

Figure 2 : Schéma conceptuel de la microcouche de surface

Figure 3 : Les différents processus physiques se déroulant au niveau de la microcouche

Figure 4 : Impact des substances toxiques sur les différentes communautés biologiques de la microcouche de surface et de la colonne d'eau

Figure 5 : Structure en rosettes de la souche *Nevskia ramosa*

Figure 6 : Les différents stress environnementaux auxquels le bactérioneuston doit faire face et mécanismes possibles d'adaptation

### CHAPITRE II

Figure 1 : Localisation des deux sites d'échantillonnage

Figure 2 : Schéma synthétique des différentes étapes permettant l'isolement et la caractérisation moléculaire des bactéries de la microcouche et de l'eau sous-jacente

Figure 3 : Principe de l'hydrolyse de l'ADNr 16S par l'enzyme de restriction *Hin6 I*

Figure 4 : Photographie du dispositif expérimental utilisé dans les tests de résistance des souches vis-à-vis des radiations solaires

Figure 5 : Spectre de longueurs d'onde du simulateur solaire, du rayonnement solaire mesuré le 3 Mars 2004 à Banyuls-sur-Mer et du rayonnement solaire simulé pour un 21 juin

Figure 6 : Courbes de croissance de la souche de référence après différentes durées d'exposition au simulateur solaire

Figure 7 : Schéma résumant les 3 séries d'expérience d'exposition des souches aux radiations solaires

### CHAPITRE III

Figure 1 : Map of the 2 sampling sites in the NW Mediterranean Sea

Figure 2 : Negative image of DGGE gels containing PCR-amplified segments of bacterial 16S rRNA genes from Barcelona and Banyuls-sur-Mer

Figure 3 : SSCP fingerprints containing PCR-amplified segments of bacterial 16S rRNA genes from Barcelona and Banyuls-sur-Mer

## **CHAPITRE IV**

Figure 1 : Comparison between surface microlayer and underlying waters bacterial community structure using SSCP fingerprints

Figure 2 : Phylogenetic tree constructed using almost complete 16S rDNA gene sequence of isolates and related species of Gram positive bacteria

Figure 3 : Phylogenetic tree constructed using almost complete 16S rDNA gene sequence of isolates and related species of CFB group

Figure 4 : Phylogenetic tree constructed using almost complete 16S rDNA gene sequence of isolates and related species of Proteobacteria

## **CHAPITRE V**

Figure 1 : Representative growth curves of highly resistant strains of category 1, 2 and 3 exposed to 1h, 3h and 7h of simulated solar radiation



## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE I

Tableau 1 : Les différents modes de prélèvements de la microcouche de surface

### CHAPITRE II

Tableau 1 : Echantillonneurs de microcouche de surface et de l'eau sous-jacente utilisés lors des différentes campagnes de prélèvements

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées pour l'étape de PCR sur les ADN totaux

Tableau 3 : Séquences des amorces internes de séquençage

Tableau 4 : Intensités et doses respectives mesurées de la PAR, des UV-A et des UV-B des radiations solaires naturelles mesurées le 21 juin 2003 à 14h à Banyuls-sur-Mer et des radiations solaires simulées par le simulateur solaire

### CHAPITRE III

Tableau 1 : Analysis of underlying water sampled by the metal screen (MS) the glass plate (GP) and the polycarbonate (PC) bottle to test for possible adsorption artefacts introduced by the MS and the GP as compared to sampling with the PC

Tableau 2 : Comparison between the Teflon membrane and polycarbonate membrane in terms of volume sampled, thickness of the water layer sampled, the range of enrichment factors

Tableau 3 : Summary of enrichment factors (*EF*) of all biological parameters derived from the metal screen (MS) and the glass plate (GP) and statistical comparison between the sea surface microlayer (SML) samplers and underlying waters (UW)

Tableau 4 : Similarity values (Jaccard coefficient) for the absence/presence of data of the DGGE gel and of the SSCP data shown in Fig. 2 and 3 respectively

### CHAPITRE IV

Tableau 1 : Cell counts and culturability of bacteria in the sea surface microlayer sampled by the metal screen (SML) and underlying waters (UW) sampled in Barcelona and Banyuls-sur-Mer sites, respectively

Tableau 2 : Similarity values (Jaccard coefficient) for the absence/presence of data from the genetic fingerprintings carried out in the SML and UW of Barcelona coastal station

Tableau 3 : Relative contribution of taxonomic groups to the culturable fraction of the SML and UW bacterial communities of Banyuls-sur-Mer and Barcelona

Tableau 4 : Sequence similarity of the isolates to closest matching relative in the data bank. Distribution of isolates from the different divisions among sequence similarity representing new genus (< 93 %), new species within previously characterized genus (93% to 97%) and previously characterized species (> 97%)

Tableau 5 : List of putative neustonic isolates sequenced in this study

Tableau 6 : Distribution des souches de la collection dans chaque classe d'hydrophobicité en fonction de leur localisation dans la colonne d'eau, de leur affiliation phylogénétique et de leur pigmentation

Tableau 7 : Pourcentage d'hydrophobicité moyen des souches de la collection selon leur mode d'échantillonnage

## **CHAPITRE V**

Tableau 1 : Intensities and dose of UV-B, UV-A radiation and PAR of simulated solar radiation and natural solar radiation measured by the Eldonet radiometer

Tableau 2 : Classes of resistance according to bacterial growth following different time periods of exposure to simulated radiation

Tableau 3 : Relative contribution (%) of strains in each class of resistance according to the depth layer where they were collected, their taxonomic affiliations, their pigmentation and their G+C % range

Tableau 4 : Resistance to simulated solar radiation of bacterial strains isolated from the sea surface microlayer (S), from underlying waters (U) and from both layers (SU)

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

## ABREVIATIONS

AND	acide désoxyribonucléique
BATH	test d'adhésion des bactéries aux hydrocarbures (bacterial adhesion to hydrocarbons)
CFU	unité formant colonie (colony forming unit)
CPD	dimères de pyrimidine cyclobutane (cyclobutane pyrimidine dimers)
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTT	diphenyl dichloro tetrachloroéthane
EF	facteur d'enrichissement
GP	plaque de verre (glass plate)
h	heure
HAP	hydrocarbure aromatique polycyclique
MA	milieu de culture marin
MAA	mycosporine like amino acid
min	minute
MS	tamis en métal (metal screen)
NCBI	national center for biotechnology information
NER	mécanisme de réparation par excision (nucleotide excision repair)
PAR	photosynthetically active radiation
PCB	biphényles polychlorés
PER	mécanisme de réparation par photoréactivation (photoenzymatic repair)
POP	polluant organique persistant
qsp	quantité suffisante pour
R2A	milieu de culture marin
RFLP	restriction fragment length polymorphism
ROS	espèce réactive à l'oxygène (reactive oxygen species)
SDS	sodium dodecyl sulfate
sec	seconde
SML	microcouche de surface (surface microlayer)
SOLA	service d'observation du laboratoire Arago
SSCP	single strand conformation polymorphism
pb	paire de bases
UW	eau sous-jacente (underlying waters)

## **CHAPITRE I**

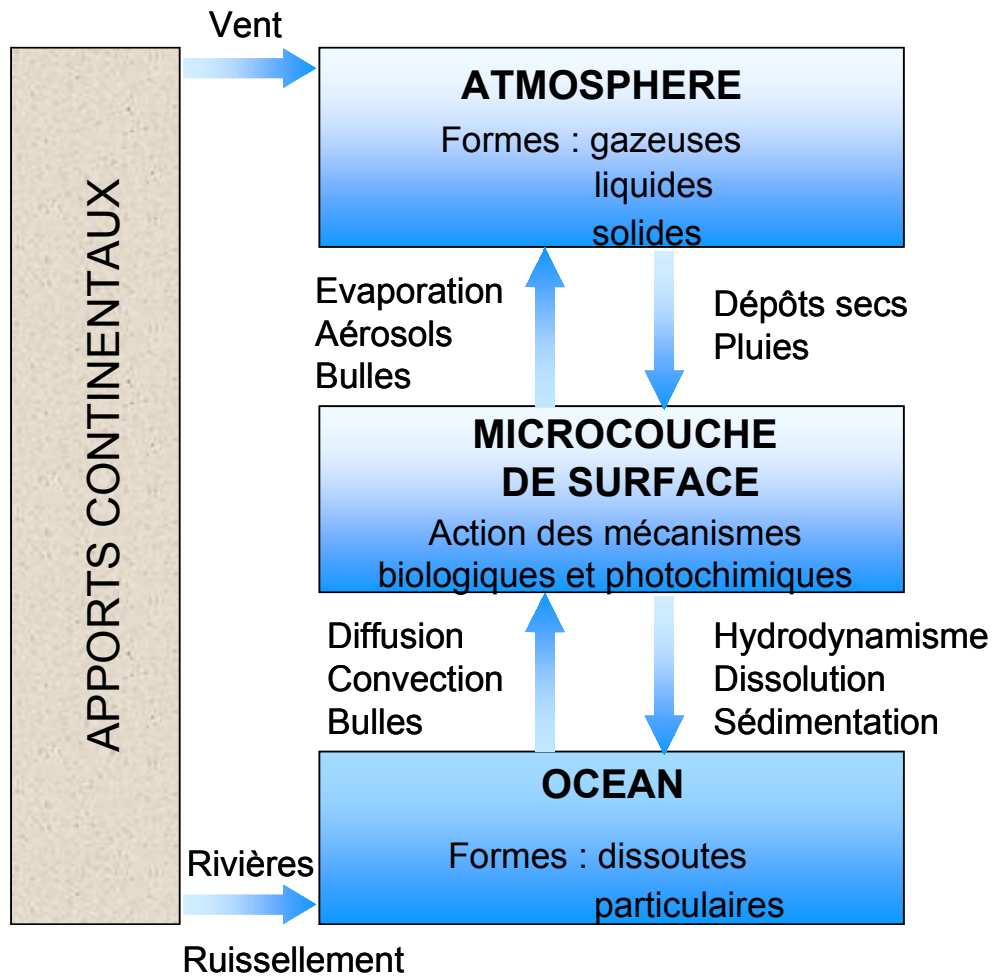
## I. 1. LA MICROCOUCHE DE SURFACE : UN MILIEU PARTICULIER

### I. 1. 1. Introduction

L'interface air-mer représente plus de 70 % de la surface de la Terre (Norkrans 1980). Soumise à l'action des vents, des courants, des radiations solaires et des précipitations atmosphériques, cette interface constitue un milieu particulièrement dynamique. Elle est le siège d'échanges permanents de chaleur, de gaz, d'humidité et de substances chimiques d'origine naturelle ou anthropique entre l'atmosphère et les océans (**Figure 1**) (Liss et Duce 1997). Depuis quelques dizaines d'années, différents auteurs ont souligné l'importance des interactions entre l'atmosphère et les océans. Ces interactions gouvernent la plupart des cycles biogéochimiques et influencent le climat à une échelle globale (Schlesinger 1991, Butcher *et al.* 1992, Hansell et Carlson 2002). Les processus de transformations des composés dans l'atmosphère sont largement conduits par des processus photochimiques. A l'inverse, dans les océans, les flux biogéochimiques dépendent en grande partie des réseaux trophiques. Au sein de l'interface air-eau, les processus chimiques et biologiques de transformation de la matière organique interagissent de manière complexe et restent encore peu étudiés.

La microcouche de surface est généralement définie comme étant le premier millimètre de la surface des océans (Macintyre 1974, Hardy 1982, Liss et Duce 1997). Cependant, la réelle épaisseur de cette microcouche a toujours été source à débats. Elle varie, selon les auteurs de 30 à 300  $\mu\text{m}$  (Harvey 1973, Hardy 1982, Li *et al.* 1998, Falkowska 1999a, Zuev *et al.* 2001). Cette épaisseur dépend, entre autre, de la quantité de matière organique présente au niveau de la microcouche (Cincinelli *et al.* 2001) et de la vitesse du vent (Liu et Dickhut 1998).

Au sein de la colonne d'eau, les bactéries jouent un rôle essentiel dans le recyclage des éléments nutritifs ainsi que dans le transfert d'une partie de la production primaire vers les niveaux trophiques supérieurs via un réseau trophique complexe appelé la « boucle microbienne » (Azam *et al.* 1983). Une grande partie de la matière organique dissoute et particulaire est utilisée par les bactéries hétérotrophes (Williams 2000). Cette matière organique provient notamment de l'excrétion des polymères de nature polysaccharidique par les cellules phytoplanctoniques, des pelotes fécales, de la prédation exercée à tous les niveaux trophiques et de la lyse virale et naturelle des cellules bactériennes et phytoplanctoniques (Azam *et al.* 1983).



**Figure 1** : Mécanismes d'échange de part et d'autre de l'interface air-mer, d'après Liss (1975)

Les substances dissoutes, les particules et les microorganismes sont apportés à la surface par simple diffusion, adsorption sur des bulles de gaz, convection et upwelling<sup>1</sup> de l'eau sous-jacente. Le transport des substances de la microcouche de surface vers l'atmosphère se déroule via la formation par le vent d'aérosols et de bulles de gaz et l'évaporation de composés volatiles. Parallèlement, la microcouche est le réceptacle des substances gazeuses (aérosols), liquides (pluies) et solides (particules) qui proviennent de l'atmosphère, et des apports fluviaux du continent.

<sup>1</sup> Phénomène de résurgences côtières

En milieu côtier, d'autres sources de matière organique s'ajoutent à celles précédemment citées. Elles correspondent à des apports terrigènes véhiculés par les cours d'eau, les rejets de station d'épuration littorales et les eaux de ruissellement. Via la reminéralisation de la matière organique et ainsi leur participation à tous les cycles biogéochimiques, les bactéries hétérotrophes jouent un rôle essentiel dans la dynamique et l'équilibre des écosystèmes marins.

Du fait de l'importance du compartiment bactérien dans les différents processus se déroulant au niveau de la colonne d'eau, on peut supposer que les communautés bactériennes situées à l'interface air-mer jouent également un rôle essentiel dans les processus biologiques se déroulant à cette interface. Les premiers travaux concernant la microcouche de surface ont surtout été focalisés sur la composition et la quantification des flux de matières (Goering et Menzel 1965, Garrett 1967, Jarvis *et al.* 1967, Williams 1967). En revanche, l'écologie des compartiments biologiques, et particulièrement du compartiment bactérien, leurs rôles respectifs dans les processus d'échange entre l'atmosphère et les océans, ont été beaucoup moins étudiés (Tsyban 1971, Harvey 1973, Hardy 1997).

La première partie de cette étude bibliographique a pour objectif d'exposer les connaissances les plus récentes concernant :

- (i) les caractéristiques biologiques et physico-chimiques de la microcouche de surface (paragraphe I. 1. 2. et I. 1. 3.),
- (ii) les facteurs abiotiques potentiellement inhibiteurs pour les communautés biologiques présentes à cette interface (paragraphe I. 1. 4.),
- (iii) et les difficultés techniques liées à l'échantillonnage de la microcouche (paragraphe I. 1. 5.).

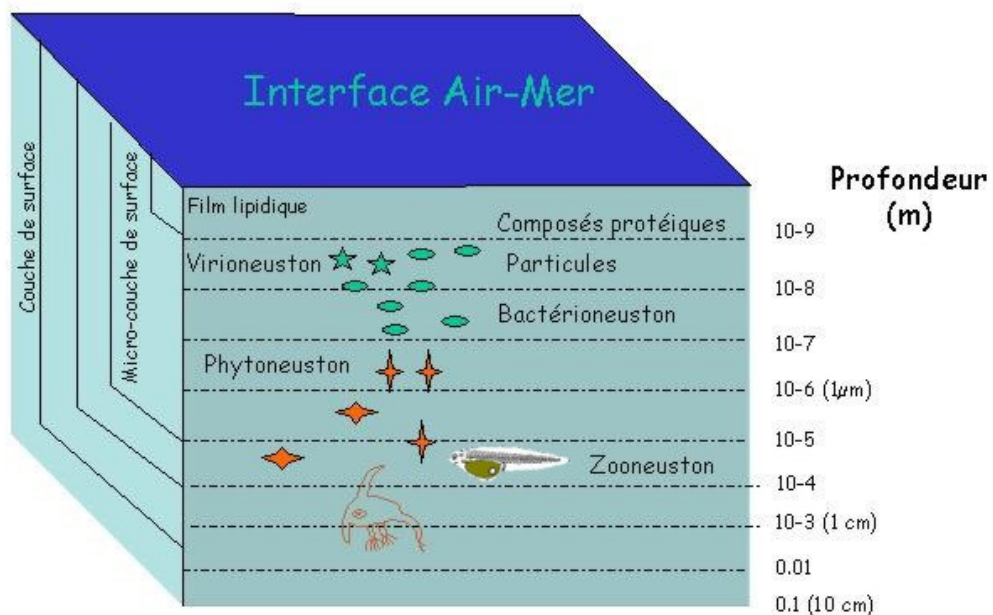
La seconde partie de cette étude bibliographique sera consacrée aux communautés bactériennes présentes au niveau de la microcouche de surface. Leur diversité (paragraphe I. 2. 1.), leurs propriétés physiologiques et morphologiques (paragraphe I. 2. 2.) ainsi que leurs stratégies d'adaptation à deux types de stress (paragraphe I. 2. 3. et I. 2. 4.) seront présentées.



## I. 1. 2. Les différents compartiments biologiques au niveau de la microcouche de surface

Naumann (1917) fut le premier à utiliser le terme de neuston pour décrire certains organismes présents au niveau de la pellicule superficielle d'étangs et de mares comme des flagellés, des amibes et des bactéries. Les différents composants de ces communautés biologiques particulières seront précisés plus tard en milieu marin par Zaitsev (1971).

La microcouche de surface est structurée en plusieurs strates horizontales (**Figure 2**, ci-dessous). Elle est composée d'un film lipidique d'une épaisseur de 10 à 20 Å environ, puis d'une couche de composés protéiques (glycoprotéines associées à des polysaccharides) d'une épaisseur de 100 à 300 Å (Hardy 1982). Etroitement associés à ces composés organiques, apparaissent à partir d'environ 1 µm de profondeur le virioneston et le bactérioneuston, le phytoneuston, et enfin les ciliés et les copépodes qui composent la majorité du zooneuston.



**Figure 2** : Schéma conceptuel de la microcouche de surface, d'après Hardy et Word (1986)

Les paragraphes suivants présentent de manière sommaire les différents compartiments biologiques de la microcouche dans un ordre croissant par rapport à la classe de taille des organismes. Cette description débute par le virioneuston et s'achève par le zooneuston. L'abondance des organismes situés au niveau de l'interface est souvent exprimée sous forme de facteur d'enrichissement. Ce facteur d'enrichissement est le rapport de la concentration des organismes neustoniques par celle des organismes se situant dans l'eau sous-jacente.

### **I. 1. 2. 1. Le virioneuston**

Le virioneuston est le compartiment biologique le moins documenté dans la littérature. Néanmoins, il est probable qu'au sein de cette interface, les virus jouent un rôle important dans le réseau trophique microbien. En effet, l'infection virale semble avoir un impact significatif sur la régulation des populations bactériennes et phytoplanctoniques marines (Wommack et Colwell 2000). En s'adsorbant sur les bulles de gaz (cf. paragraphe I. 1. 4. 1), les virus seraient transférés de la colonne d'eau vers la microcouche où ils s'accumuleraient (Baylor *et al.* 1977). A ce jour, une seule étude a porté sur l'analyse des communautés virales de surface et ceci dans un écosystème d'eau douce : le Lac Supérieur (Canada) (Tapper et Hicks 1998). Les auteurs ont montré que les virus sont 2 à 15 fois plus abondants dans la microcouche que dans l'eau sous-jacente. Ils estiment que 3 fois plus de bactéries y sont infectées par des virus tempérés. Par ailleurs, il a été montré que les radiations ultraviolettes peuvent détruire les particules virales infectieuses des eaux de surface (Wommack *et al.* 1996, Wommack et Colwell 2000). Néanmoins, 50% des communautés virales demeurent infectieuses grâce aux mécanismes de photoréparation de l'ADN endommagé des cellules hôtes (Wilhelm *et al.* 1998).

### **I. 1. 2. 2. Le bactérioneuston**

Les communautés bactérioneustoniques sont 100 à 1000 fois plus abondantes que les communautés bactériennes situées dans l'eau sous-jacente (Hardy 1982). La matière organique, fortement enrichie au niveau de la microcouche (cf paragraphe I. 1. 4. 2.) fournit les nutriments nécessaires au développement de ces communautés. Le bactérioneuston joue un rôle important dans la minéralisation et la dégradation de la matière organique d'origine

naturelle mais également celle d'origine anthropique présente en grande quantité dans la microcouche (Tsyban 1971, Walczak *et al.* 2001a, b).

A ce jour, la diversité du bactérioneuston n'a été étudiée qu'à travers l'analyse de la flore cultivable. Ces études mettent en évidence la présence dans la microcouche de certaines espèces bactériennes appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Micrococcus* et *Bacillus*, (Sieburth 1971b, Tsyban 1971, Carty et Colwell 1975, Fehon et Oliver 1979). Soulignons que ces genres bactériens ne sont pas spécifiques de la microcouche de surface des océans puisqu'on les retrouve également en abondance dans la colonne d'eau (Zobell 1946, Sieburth 1968, Fehon et Oliver 1979).

En ce qui concerne l'activité des bactéries au niveau de la microcouche, différentes études présentent des résultats controversés. Dans certains cas, la production bactérienne est plus importante au niveau de la microcouche (Dietz *et al.* 1976, Bell et Albright 1982), alors que dans d'autres cas, elle est similaire ou inférieure à celle de l'eau sous-jacente (Bailey *et al.* 1983, Hermansson et Dahlbäck 1983, Carlucci *et al.* 1985). Certains auteurs suggèrent même qu'il y a une inhibition de l'activité bactérienne au niveau de la microcouche (Marumo *et al.* 1971, Bailey *et al.* 1983). Cette inhibition serait due aux différents stress environnementaux auxquels le bactérioneuston doit faire face comme les radiations solaires intenses et les fortes concentrations de polluants.

Les bactéries situées à l'interface air-mer peuvent former des micro-colonies, des biofilms, ou être agrégées à la matière organique particulaire. Par sa viscosité et ses tensions de surface, la microcouche peut être considérée pour ces communautés bactériennes comme similaire à un substrat solide (Maki 2002). Les bactéries seraient maintenues dans les films organiques de surface du fait des caractéristiques hydrophobes de leur paroi (Dahlbäck *et al.* 1981, Hermansson *et al.* 1982).

La diversité des communautés bactérioneustoniques sera présentée plus longuement dans la deuxième partie de cette étude bibliographique.

### **I. 1. 2. 3. Le phytoneuston**

La production autotrophe dans la microcouche de surface dépend d'une grande variété de taxons (Hardy 1973, De Souza Lima et Chrétiennot-Dinet 1984, Hardy et Apts 1984). Le phytoneuston est constitué principalement de diatomées, notamment du genre *Nitzschia*, puis de cyanobactéries du genre *Trichodesmium* et de dinoflagellés du genre *Prorocentrum* (Harvey 1966, Marumo *et al.* 1971, Taguchi et Nakajima 1971, De Souza Lima et

Chrétiennot-Dinet 1984). Un enrichissement important de phytoneuston en terme de biomasse et de production est généralement observé dans les baies ou dans les lagunes protégées (Hardy 1973, 1982).

Les facteurs d'enrichissement varient de 10 à 1000 (Liss et Duce 1997). Cet enrichissement n'est pas forcément corrélé à l'activité du phytoneuston puisque certains auteurs évoquent la possibilité d'une inhibition de photosynthèse au niveau de la microcouche de surface : c'est le phénomène de photoinhibition provoquée par de fortes radiations solaires (Marumo *et al.* 1971, Taguchi et Nakajima 1971, Albright 1980, Hardy 1982, Jokiel et York 1984, Williams *et al.* 1986). En l'occurrence, la forte concentration en phaeopigments retrouvée dans la microcouche, produit de dégradation de la chlorophylle, semble indiquer que les cellules phytoplanctoniques sont dans un mauvais état physiologique (Hardy et Apts 1984, Falkowska 1999b). Le phytoneuston peut se mélanger avec certaines communautés phytoplanctoniques lors de migrations verticales diurnes par un phénomène de phototactisme. Par exemple, dans la mer du Nord, une migration des dinoflagellés *Prorocentrum micans* et *Ceratium furca* de la colonne d'eau vers la surface au milieu de la journée a déjà été observée (Wandschneider 1979).

#### **I. 1. 2. 4. Le zooneuston**

Le zooneuston peut être classé selon sa taille en trois catégories : le microzooneuston (entre 0,2 et 200  $\mu\text{m}$ ), le mésozooneuston (entre 0,2 et 20 mm) et le macrozooneuston ( $> 2$  cm) (Liss et Duce 1997). Le microzooneuston comprend les ciliés, les protozoaires, les flagellés et les tintinnides (Zaitsev 1968). Le mésozooneuston comprend principalement les copépodes dominés par les espèces appartenant à la famille des Pontellidés, les isopodes ainsi que les œufs, larves et/ou alevins d'organismes planctoniques ou benthiques (poissons, mollusques, polychètes...) présentant un stade de développement neustonique (Sieburth *et al.* 1976a, Hardy 1982). Le macrozooneuston est composé d'organismes flottants ou associés à des algues flottantes du genre *Sargassum* dans le premier mètre de la surface. Les plus connus d'entre eux sont notamment les méduses du genre *Physalia* et *Velella*, et les espèces de nudibranches *Fiona pinnata* et *Glaucus atlanticus* (Hardy 1982). Comme le phytoneuston, le zooneuston peut présenter des migrations verticales, les migrations vers la microcouche ayant le plus souvent lieu la nuit (Hardy 1982).

### I. 1. 3. Caractéristiques physico-chimiques de la microcouche de surface

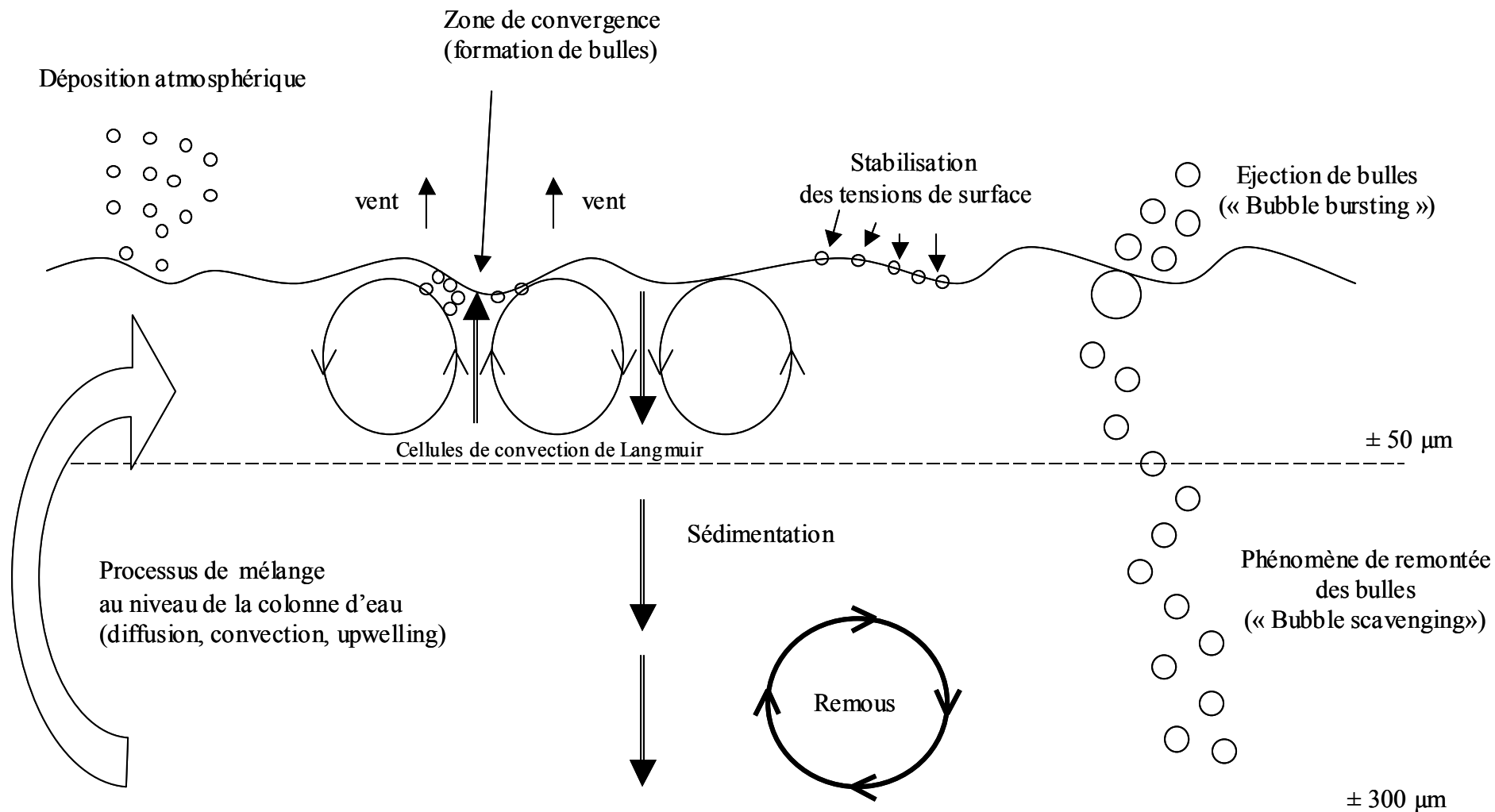
#### I. 1. 3. 1. Caractéristiques physiques

Comparativement à la colonne d'eau, la microcouche de surface est caractérisée par un environnement physique relativement stable. La stabilité physique du film de surface est due à la présence de faibles tensions de surface (Zuev *et al.* 2001) (**Figure 3**, page suivante). Les vagues tendent à modifier temporairement l'épaisseur de la microcouche mais le film de surface reste en général peu perturbé. Néanmoins, la microcouche de surface est soumise à des variations, notamment influencées par les phénomènes climatiques. La température, la salinité et les radiations solaires sont bien plus extrêmes au niveau de la microcouche de surface que dans la colonne d'eau et les fluctuations saisonnières et diurnes y sont également plus importantes (Hardy 1982).

Différents processus physiques tels que la circulation de Langmuir<sup>1</sup>, la convection et les turbulences contribuent à l'apport de matière organique vers l'interface. Les processus de transport par les bulles de gaz de la colonne d'eau vers la microcouche contribuent également de manière importante à l'accumulation de substances au niveau de cette interface (**Figure 3**, page suivante). Le phénomène d'adsorption de petites particules (0,2-1,2  $\mu\text{m}$ ), de métaux traces et/ou de bactéries sur les bulles permet un transfert de matière de la colonne d'eau vers l'interface. Ce processus est appelé épuration ou drainage par les bulles (« bubble scavenging ») (Carlucci et Williams 1965, De Souza Lima 1985, Romano 1989). Les bulles de gaz vont ensuite libérer à la surface les particules et le matériel biologique, contribuant de cette façon aux échanges de matière avec l'atmosphère (Bezdek et Carlucci 1972). L'éclatement de ces bulles s'accompagne en effet, d'une profusion de gouttelettes ou d'un pétilllement (« bubble bursting ») à la surface de l'eau, permettant ainsi le transfert dans la phase aérienne de toutes ces substances (Blanchard et Syzdek 1970, Baylor *et al.* 1977, Blanchard et Syzdek 1978). Les petites particules présentes à la surface vont également s'agréger entre elles puis sédimenter. Ce dernier processus va contribuer à augmenter la quantité de matière organique présente dans les eaux profondes (Wallace et Duce 1978, Zuev *et al.* 2001).

---

<sup>1</sup> Cellules de convection superficielles induites par le vent



**Figure 3 :** Les différents processus physiques se déroulant au niveau de la microcouche de surface, modifié d'après Hunter (1980)

Par vent faible, en zone côtière, on peut remarquer à la surface de la mer, des bandes d'eau lisses qui se distinguent des zones ridées : ce sont des slicks (Barger *et al.* 1974, Romano et Laborde 1987, Romano et Garabetian 1996). Les slicks se forment lorsque la vitesse du vent est inférieure à  $3 \text{ m.s}^{-1}$  (Liss et Duce 1997). Leur aspect lisse est une conséquence directe de l'effet d'amortissement de la matière organique sur les vagues capillaires. Leur formation est classiquement attribuée à la compression du film de surface par les cellules de convergence de la circulation de Langmuir (Barger *et al.* 1974).

### **I. 1. 3. 2. Caractéristiques chimiques organiques et inorganiques**

De nombreuses études ont comparé la composition chimique de la matière organique de la microcouche à celle de l'eau sous-jacente. La microcouche de surface est en moyenne 2 fois plus enrichie en matière organique que l'eau sous-jacente (Goering et Menzel 1965, Williams 1967, Nishizawa 1971, Zuev *et al.* 2001). Cette accumulation de matière organique est liée aux différents processus physiques se déroulant au niveau de l'interface (cf. paragraphe précédent). Les études de la microcouche en milieu marin indiquent que l'enrichissement en matières organiques est dû majoritairement à la présence de lipides. Les polypeptides et polysaccharides sont également concentrés à cette interface (Macintyre 1974), ils proviennent de la pollution mais aussi de l'activité des microorganismes.

La plupart des composés inorganiques tels que le phosphate, l'ammonium, le nitrate, le nitrite et le silicate sont plus enrichis dans la microcouche que dans l'eau sous-jacente (Goering et Menzel 1965, Williams 1967, Nishizawa 1971, Lyons *et al.* 1980, De Souza Lima 1985, Falkowska et Latala 1995). L'accumulation de silicate dans la microcouche provient de la dégradation et la dissolution des débris de diatomées, et par conséquent du matériel détritique (Lyons *et al.* 1980, De Souza Lima 1985). L'enrichissement en phosphate est attribué à une minéralisation de la matière organique (Goering et Menzel 1965, Williams 1967). L'enrichissement en nitrate peut être le résultat d'une nitrification bactérienne *in situ* (Williams 1967). L'enrichissement en nitrite peut être dû à une nitrification à partir de l'ammonium, ainsi qu'à une réduction du nitrate en nitrite par les bactéries (Goering et Menzel 1965). Ces sels minéraux peuvent également provenir des apports continentaux (De Souza Lima 1985). Selon De Souza *et al.* (1985), l'accumulation de sels nutritifs au niveau de la microcouche est dû également à une diminution de la consommation des produits de minéralisation par les organismes photo-autotrophes, vraisemblablement stressés par les

conditions environnementales régnant à l'interface (comme les radiations solaires et les changements importants de température et de salinité).

### 1. 1. 3. 3. Apports anthropiques au niveau de la microcouche de surface

La microcouche de surface est un lieu d'accumulation de matières organiques d'origine naturelle mais également d'origine anthropique issues principalement des apports fluviaux et atmosphériques. De nos jours, ces apports d'origine anthropique dans les zones côtières mais également hauturières sont de plus en plus importants (Liss et Duce 1997). Les principaux types de polluants se concentrant préférentiellement au niveau de la microcouche sont présentés dans cette partie.

#### 1. Les polluants organiques persistants

La microcouche de surface joue un rôle clé dans les processus de transfert (diffusion et déposition) des polluants organiques persistants (POP) entre l'atmosphère et l'hydrosphère (Booij et Van Drooge 2001). Les POP sont des substances hydrophobes s'accumulant préférentiellement au niveau de cette interface (Macintyre 1974, Hardy *et al.* 1987b, Knulst et Södergren 1994). Ces polluants se retrouvent aussi bien dans la matière organique particulaire que dissoute (Cincinelli *et al.* 2001).

#### ✓ Les hydrocarbures

La matière organique d'origine anthropique présente dans l'atmosphère est composée de nombreux hydrocarbures polycycliques potentiellement cancérigènes ou toxiques : ce sont les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques). Ces HAP tels que le phénanthrène, l'anthracène et le pyrène sont émis entre autre par les gaz d'échappement des automobiles et par les fumées d'incinérateurs. La microcouche constitue un réceptacle pour ces HAP (Wurl et Obbard 2004). Selon Cincinelli *et al.* (2001), le facteur d'enrichissement moyen des HAP serait de 9,1 dans la matière organique dissoute et de 21,8 dans la matière organique particulaire pour la microcouche de surface de 8 stations de la Mer Tyrrénienne. Pour Hardy *et al.* (1987b), dans les échantillons de surface fortement concentrés en HAP, 90 à 100 % de HAP sont associés à des particules, tandis que pour des échantillons de microcouche moins concentrés, les HAP sont présents dans les mêmes proportions dans la fraction dissoute que particulaire.



✓ Les pesticides et les biphényles polychlorés (PCB)

Les pesticides comprennent une multitude de produits fabriqués par l'industrie. Les herbicides et les insecticides tels que le DDT (diphényl-dichloro-tétrachloroéthane) et le lindane sont les plus couramment utilisés. Au regard des travaux de Hardy *et al.* (1987b), les pesticides sembleraient être plus présents au niveau de la microcouche dans des zones polluées fortement urbanisées.

Les PCB sont interdits depuis 1986 mais il existe encore d'anciens produits, tels que les peintures anti-corrosion, les huiles et les matières plastiques, qui contiennent des PCB pouvant diffuser dans l'air et la mer. Ces composés sont nocifs pour l'homme et son environnement. On peut toujours en trouver en forte quantité dans le milieu naturel. Par exemple, des facteurs d'enrichissement d'une valeur de 50 à 1000 ont été trouvés pour des eaux de surface de bassins et de rizières (Zuev *et al.* 2001) et de  $10^3$  et  $10^4$  pour les PCB dans les baies de Narragansett (Océan Atlantique) et de Jorefjorden (Mer du Nord), respectivement (Duce *et al.* 1972, Larsson *et al.* 1974)

2. Les métaux lourds

De nombreux métaux tels que le cuivre, le fer, le nickel, le plomb, l'aluminium, le zinc, le chrome et le mercure sont fortement présents au niveau de la microcouche de surface (Hardy *et al.* 1987b, Liss et Duce 1997, Wurl et Obbard 2004). Les dépôts atmosphériques, le « bubble scavenging » et le « bubble bursting » (cf. paragraphe I. 1. 4. 1) issus des eaux sous-jacentes, contribuent principalement à cet enrichissement (Hunter 1980, Hardy 1982). Dans la baie de Narragansett, les facteurs d'enrichissement dans la microcouche sont de 5,4 à 5,8 pour le plomb, de 4,3 à 29 pour le fer, de 5 à 36 pour le cuivre et de 6 à 50 pour le nickel (Duce *et al.* 1972). Dans un estuaire de la baie de San Francisco, les concentrations en fer sont 6 à 14 fois plus élevées dans la microcouche que dans l'eau sous-jacente (Lion *et al.* 1979). Les auteurs rapportent que 83 à 97 % de ce métal est associé à la matière particulaire de la microcouche. L'accumulation de la matière organique particulaire au niveau de la microcouche (cf paragraphe I. 1. 4. 1) engendre donc indirectement une plus forte concentration de métaux au niveau de cette interface.

3. Les radionucléides

Certains radionucléides naturels et/ou artificiels peuvent être trouvés en concentrations importantes dans la microcouche de surface de zones côtières (Badie *et al.* 1987, Liss et Duce

1997). Les radionucléides artificiels proviennent de l'activité de centrales nucléaires et des usines de retraitement. Dans le Golfe du Lion, Badie *et al.* (1987) ont mis en évidence une concentration à l'interface air-mer de radionucléides artificiels (césium-137, ruthénium-106, manganèse-54 et cobalt-60) alors que ces éléments ne sont trouvés qu'à l'état de trace dans les eaux sous-jacentes. Cette concentration serait liée à celle de la matière organique particulaire car les radionucléides sont susceptibles d'être adsorbés sur les particules organiques présentes en grandes quantités dans la microcouche.

#### **I. 1. 4. Facteurs abiotiques potentiellement inhibiteurs pour les communautés neustoniques**

Les communautés biologiques présentes au niveau de la microcouche de surface doivent faire face à de nombreux stress environnementaux tels que les fluctuations de température et de salinité, les radiations solaires intenses et la forte concentration de polluants. Ces conditions environnementales sont même parfois considérées comme extrêmes (Maki 1993, Henk 2004). Ces différents facteurs abiotiques vont certainement sélectionner certaines espèces au détriment d'autres. Ils gouverneraient donc la composition des différentes communautés biologiques présentes à cette interface (Norkrans 1980).

##### **I. 1. 4. 1. Les variations brusques des conditions environnementales**

La microcouche de surface peut être considérée comme un milieu extrême (Maki 2002). Les changements de température y sont brusques et suivent des fluctuations diurnes et saisonnières mais peuvent également être dus à l'apparition d'une couverture nuageuse importante. Les précipitations peuvent détruire le film de surface et provoquer une modification importante de salinité. La structure de la microcouche peut être rapidement modifiée suivant la vitesse du vent et donc de l'état d'agitation de la mer.

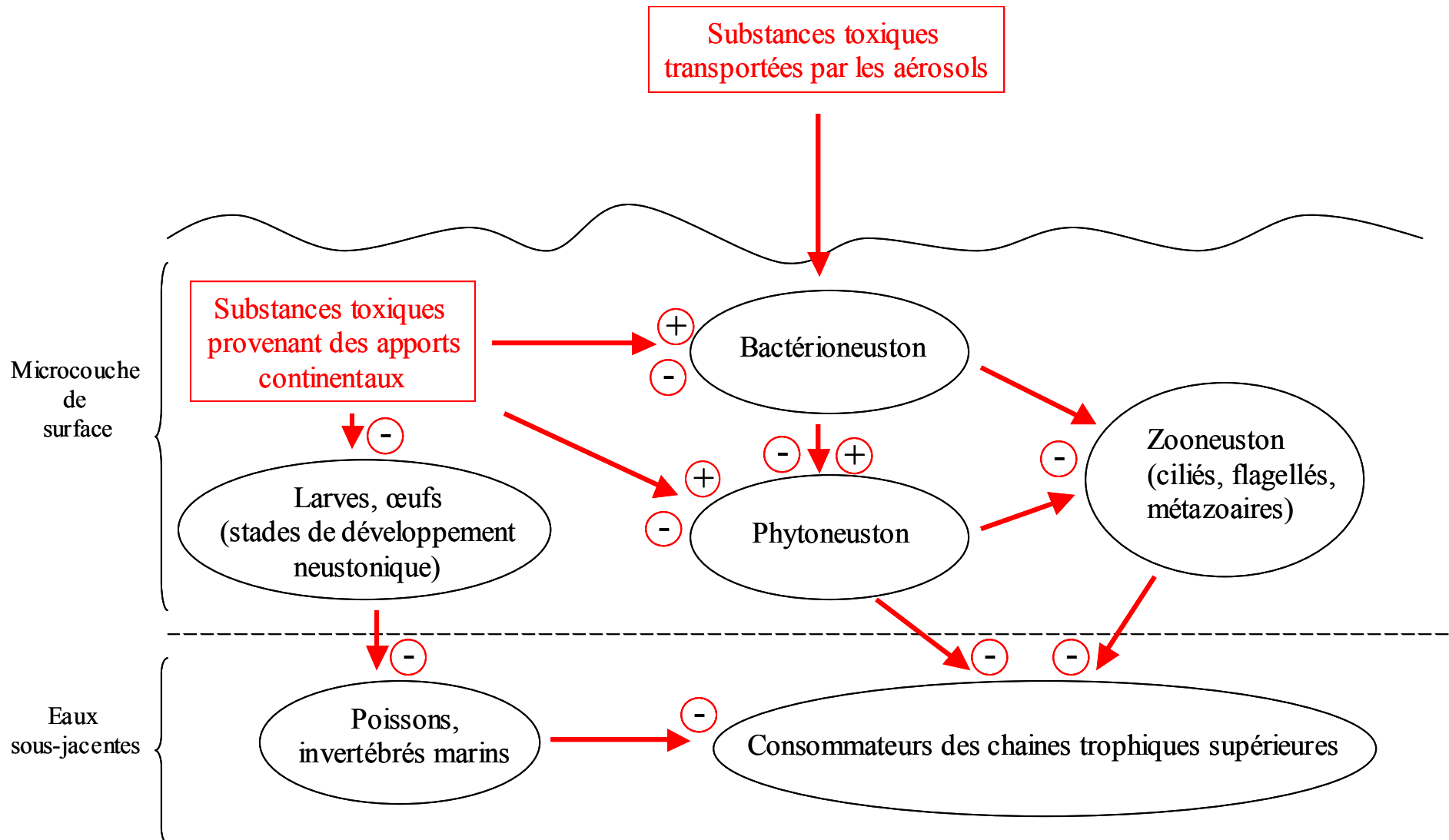
Les organismes vivant au niveau de cette interface doivent donc faire face à ces conditions environnementales extrêmes et s'adapter aux modifications brusques du milieu.

#### **I. 1. 4. 2. Le haut niveau de radiations**

Un des plus grands stress environnementaux auquel les communautés biologiques doivent faire face est le haut niveau de radiations régnant à cette interface. Ces radiations solaires intenses sont composées de lumière visible (de 400 à 700 nm) et ultraviolette (de 280 à 400 nm). Les radiations les plus nocives pour les communautés biologiques sont les radiations ultraviolettes, c'est à dire les UV-A, les UV-B et les UV-C (Jokiel et York 1984, Jeffrey *et al.* 1996a, Hader 2000, Sinha et Häder 2002). Au contraire des radiations UV-C qui sont totalement absorbées par l'atmosphère, les radiations UV-A et UV-B atteignent la surface des océans. Elles sont intenses au niveau de la microcouche de surface puis atténuées de manière exponentielle en fonction de la profondeur. Ces radiations ultraviolettes entraînent des dommages directs sur l'ADN (en bloquant l'ADN polymérase et les reverse transcriptases), les protéines et les lipides membranaires (Jagger 1967). Les dommages indirects des radiations ultraviolettes se traduisent par la formation de radicaux libres provoquant des lésions oxydatives au niveau de l'ADN et des protéines. Ces dommages directs et indirects vont induire les mêmes effets avec un blocage de l'activité de synthèse et de division des organismes qui peut conduire à des mutations et à la mort cellulaire (Hader 2000).

#### **I. 1. 4. 3. La forte concentration de substances toxiques**

Les pesticides et notamment les herbicides ont un impact négatif sur la photosynthèse et la respiration des communautés phytoplanctoniques (Delorenzo *et al.* 2001). Chez les communautés bactériennes, ces polluants organiques altèrent les membranes cellulaires, la synthèse des acides nucléiques et des acides aminés, les activités enzymatiques et peuvent causer des mutations (Rajendran *et al.* 1990, Delorenzo *et al.* 1999). Cependant, certaines espèces phytoplanctoniques et bactérioplanctoniques sont capables d'accumuler, de détoxifier ou de métaboliser les pesticides et hydrocarbures (Rajendran *et al.* 1990) (**Figure 4**, page suivante). Ces polluants sont parfois non nocifs pour ces communautés mais en s'accumulant dans ces organismes, deviennent toxiques pour les organismes de la chaîne trophique supérieure comme les brouteurs (Delorenzo *et al.* 2001).



**Figure 4 :** Impact des substances toxiques sur les différentes communautés biologiques de la microcouche et de la colonne d'eau

(+ : bioaccumulation, détoxification; - : dommages)

L'impact des substances toxiques sur les populations neustoniques larvaires et les œufs d'invertébrés et de poissons a été beaucoup étudié (Hardy 1982, Liss et Duce 1997, Wurl et Obbard 2004). Des œufs de poissons exposés à des eaux de microcouche de surface contaminées en métaux lourds et en HAP, présentent une baisse dans leur succès d'éclosion, une augmentation des malformations, des aberrations chromosomiques et de la mortalité (Hardy *et al.* 1987a, Von Westernhagen *et al.* 1987). Ainsi, une forte pollution au niveau de la microcouche peut avoir un impact important sur le recrutement des espèces marines pêchées (mollusques et poissons). Ces polluants sont en effet toxiques pour les premières phases neustoniques de développement de ces organismes zooplanctoniques.

La bioaccumulation des différents polluants dans les organismes neustoniques, leur consommation ou leur sédimentation (via les pelotes fécales) vont permettre « l'entrée » de ces différents polluants dans les chaînes trophiques supérieures présentes dans la colonne d'eau.

### **I. 1. 5. L'échantillonnage de la microcouche de surface**

Le prélèvement de la microcouche de surface constitue une première limite méthodologique à son étude. Les méthodes classiques de prélèvement utilisées en océanographie sont, en effet, inadaptées aux prélèvements de la microcouche de surface car elle ne représente que le premier millimètre de la surface des océans. Ainsi, un échantillonneur non approprié diluerait fortement la microcouche, ce qui conduirait à une analyse faussée des résultats.

#### **I. 1. 5. 1. Les différents modes de prélèvement de la microcouche**

De nombreux échantillonneurs ont été élaborés afin de collecter spécifiquement les premiers  $\mu\text{m}$  de la surface des océans. Ainsi, plus de 20 types d'échantillonneurs différents ont été recensés (Hühnerfuss 1981a, b). Les plus couramment utilisés sont présentés dans le **tableau 1** (page suivante).

Mode de prélèvement	Epaisseur prélevée	Paramètre(s) analysé(s)	Référence(s)
Tamis en métal	150-440 µm	Composés organiques	(Garrett 1965)
Tamis en polyéthylène	100-150 µm	Composés organiques et métaux lourds	(Duce <i>et al.</i> 1972)
Tamis en nylon	100 µm	Bactérioneuston, phytoneuston et composés organiques	(Sieburth <i>et al.</i> 1976b)
Plaque de verre	60-100 µm	Bactérioneuston et phytoneuston	(Harvey et Burzell 1972)
Rouleau en céramique	60-100 µm	Bactérioneuston et phytoneuston	(Harvey 1966)
Rouleau en téflon	6-66 µm	Neuston, composés organiques et métaux lourds	(Hardy <i>et al.</i> 1988)
Plateau	500-800 µm	Bactérioneuston, composés organiques et métaux lourds	(Hatcher et Parker 1974b)
Filet	0-10 cm	Zooneuston	(Ben Yami <i>et al.</i> 1970, Matsuo <i>et al.</i> 1976)
Plaque de téflon perforée	50-100 µm	Composés organiques	(Larsson <i>et al.</i> 1974)
Disque de téflon	Non déterminée	Hydrocarbures	(Miget <i>et al.</i> 1974)
Filtres	0,8-36 µm	Bactérioneuston	(Crow <i>et al.</i> 1975, Kjelleberg <i>et al.</i> 1979)
Entonnoir	3,5 mm	Zooneuston et composés organiques	(Morris 1974)
Microtome à bulles	1 µm	Non déterminé	(Macintyre 1968)
Congélation	1 000 µm	Composés organiques	(Hamilton et Clifton 1979)

**Tableau 1** : Les différents modes de prélèvement de la microcouche de surface

L'épaisseur d'eau prélevée au niveau de la microcouche dépend du mode physique d'échantillonnage et du type de matériaux de construction de l'échantillonneur qui absorbera plus ou moins efficacement les différents composants de l'interface. L'épaisseur prélevée peut varier de 1  $\mu\text{m}$  à 10 cm selon le type d'échantillonneur utilisé (**Tableau 1**). Le choix de l'échantillonneur dépend donc du type d'analyse que l'on souhaite réaliser. Le filet à neuston qui possède des mailles plus ou moins grandes permet d'échantillonner les organismes de grande taille appartenant au zooneuston. Pour des études bactériologiques, l'utilisation des membranes apparaît plus adaptée, tant pour l'épaisseur d'eau recueillie que pour les risques de contamination de l'échantillon. Cependant, du fait du faible volume d'eau prélevée, ces filtres ne permettent pas une analyse concomitante d'autres paramètres. Le rouleau de Harvey présente un avantage significatif par rapport aux autres échantillonneurs : c'est le seul échantillonneur qui une fois déployé à la surface de l'eau, prélève automatiquement la microcouche.

Des comparaisons entre ces différents échantillonneurs ont été réalisées, le plus souvent en laboratoire (Hatcher et Parker 1974a, Daumas *et al.* 1976, Hamilton et Clifton 1979, Kjelleberg *et al.* 1979, Van Vleet et Williams 1980). La plupart des intercalibrations ont évalué l'épaisseur d'eau recueillie. Ainsi, il apparaît que le rouleau Harvey, ou la plaque de verre, récoltent une épaisseur sensiblement plus faible que le tamis de Garrett, fréquemment employé pour des analyses de composés chimiques. Les échantillonneurs de microcouche de surface diffèrent donc d'un point de vue qualitatif et quantitatif dans leur mode de prélèvements. Par conséquent, il est déconseillé de faire des comparaisons directes de données collectées avec différents types d'échantillonneurs (Carlson 1982).

### **I. 1. 5. 2. Les critères de choix**

- ✓ Le(s) paramètre(s) biologique(s) ou chimique(s) étudié(s)

Le choix de l'échantillonneur va être principalement guidé par le(s) paramètre(s) étudié(s) (**Tableau 1**). Ainsi, pour l'analyse d'organismes de grandes tailles comme le zooneuston, le filet à neuston apparaît être l'échantillonneur le plus adapté. Par contre, pour une analyse du bactérioneuston et/ou du phytoneuston, qui sont des organismes de plus petites tailles et présents dans les 100 premiers  $\mu\text{m}$  de la microcouche, la plaque de verre ou le rouleau de Harvey sont couramment utilisés.

✓ Le volume prélevé

La vitesse de prélèvement est un critère fondamental dans le choix d'un échantillonneur de microcouche de surface. Une collecte rapide évite les changements significatifs de la qualité biologique et chimique des échantillons.

Le tamis en métal prélève un litre de microcouche en 10 min tandis que le rouleau de Harvey et la plaque de verre prélèvent ce même litre en 30 min environ (Garcia-Flor *et al.*). Des échantillonneurs ne sont donc pas utilisés dans certaines études nécessitant la collecte d'un grand volume d'eau, comme par exemple, l'analyse des composés organiques présents au niveau de la microcouche. Dans ce cas, les chimistes utilisent préférentiellement le tamis en métal.

✓ L'état de la mer

L'état de la mer est également un facteur limitant dans l'utilisation de certains échantillonneurs. En l'occurrence, l'utilisation des filtres et du rouleau de Harvey requière une mer très calme, avec un vent inférieur à force 3 sur l'échelle de Beaufort (équivalent à 3-5 m.s<sup>-1</sup>) (Hühnerfuss 1981a, b, Guitart *et al.* 2004). Par contre, le tamis en métal et la plaque de verre peuvent être utilisés sur une mer plus agitée.

✓ L'adsorption sélective

Certains échantillonneurs comme le rouleau en céramique et en téflon, la plaque de verre, le disque et la plaque de téflon et les filtres présentent des adsorptions sélectives de certains composés chimiques ou biologiques (Hühnerfuss 1981a, b). De ce fait, certains modes de prélèvement ne peuvent pas être utilisés pour l'analyse de polluants ou de composés chimiques particuliers. Par exemple, la plaque de verre est préférentiellement utilisée pour les analyses de métaux lourds, le tamis en métal pouvant apporter une contamination métallique dans l'échantillon.



## I. 2. LES COMMUNAUTES BACTERIENNES DE LA MICROCOUCHE DE SURFACE

### I. 2. 1. Diversité des communautés bactérienneustoniques

Les études concernant l'analyse de la diversité du bactérienneuston marin datent pour la plupart de plus d'une trentaine d'années et portent uniquement sur la fraction cultivable du bactérienneuston via des méthodes traditionnelles de culture (Sieburth 1971a, Tsyban 1971).

#### I. 2. 1. 1. Composition taxinomique de la flore cultivable de la microcouche de surface

Il existe peu de données concernant la composition des populations bactérienneustoniques marines. L'étude la plus complète a été effectuée par Tsyban en 1971. Dans cette étude, les espèces bactériennes cultivables présentes au niveau de la microcouche ont été identifiées dans 3 mers différentes et plus de 1000 souches ont été isolées. Il a été ainsi montré que le bactérienneuston de la mer d'Azov est dominé par des bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Bacterium*. La diversité du bactérienneuston de la Mer Noire est plus importante puisque des bactéries appartenant aux genres *Bacterium*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus* et *Sarcina* ont été isolées. Seuls 2 de ces genres (*Pseudomonas* et *Chromobacterium*) se retrouvent spécifiquement dans la microcouche. Le bactérienneuston de l'Océan Pacifique est dominé par des bactéries du genre *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Mycobacterium*. Ces résultats sont corroborés par les observations de Carty et Colwell (1975) et de Sieburth (1971a) qui ont également identifié des bactéries du genre *Pseudomonas*, *Micrococcus* et *Bacillus* dominantes au niveau de la microcouche dans l'Océan Pacifique. Dans une station côtière du nord ouest de l'Océan Atlantique, la microcouche de surface est dominée par les espèces du genre *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Flavobacterium* (Fehon et Oliver 1979). Les bactéries du genre *Pseudomonas* proviendraient de la colonne d'eau tandis que les bactéries des genres *Bacillus* et *Micrococcus* auraient une origine atmosphérique et terrestre (Carty et Colwell 1975, Fehon et Oliver 1979). L'ensemble de ces travaux montre que le genre *Pseudomonas* est souvent dominant dans les échantillons de microcouche de surface. Ce groupe de bactéries est considéré comme très ubiquiste, on les retrouve en effet dans les sols, sur les végétaux et surtout dans les eaux douces et marines. Les

espèces de ce genre sont capables, non seulement de supporter des conditions de vie difficiles, mais encore d'être très opportunistes pour leurs besoins nutritionnels. Les bactéries appartenant à ce genre sont également aisément cultivables sur des milieux gélosés.

L'application récente des techniques moléculaires comme par exemple le séquençage du gène ribosomique 16S, permet notamment l'identification et l'étude phylogénétique d'espèces isolées. A notre connaissance, les communautés cultivables bactérienneustoniques n'ont jamais été étudié avec ces techniques modernes utilisées dorénavant en taxonomie. L'isolement de souches cultivables est la seule méthode, à l'heure actuelle, qui nous permet d'étudier la physiologie et l'écologie des souches bactériennes présentes au niveau de la microcouche.

### **I. 2. 1. 2. Etude des communautés bactériennes totales de la microcouche de surface**

Les techniques moléculaires permettent également l'analyse de la diversité des communautés bactériennes totales (Woese 1987). Ces outils permettent d'analyser la structure des communautés naturelles à partir de l'ADN extrait au niveau communautaire sans mise en culture préalable. En milieu aquatique, ces méthodes permettent d'étudier la fraction non cultivable des communautés bactériennes qui représentent plus de 99 % de ces communautés (Amann *et al.* 1995). Les méthodes utilisées dans ces études sont notamment la DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis), la T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) et la SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) qui peuvent être couplées aux techniques de séquençage. Chacune de ces techniques est basée sur les propriétés inhérentes aux gènes amplifiés. La DGGE est basée sur la répartition des bases A-T et G-C de la séquence du gène ribosomique 16S, la T-RFLP sur la variabilité des sites de restriction du gène, et la SSCP sur la structure simple brin de la molécule.

A ce jour, une seule étude concerne l'analyse moléculaire des communautés totales bactérienneustoniques d'eau douce par la technique de DGGE (Henk 2004). Par la comparaison de profils de diversité des communautés de la microcouche et de l'eau sous-jacente, les résultats préliminaires ont mis en évidence que les communautés bactérienneustoniques sont différentes de celles de la colonne d'eau. Certaines espèces semblent être dominantes au niveau de la microcouche tandis que la diversité du bactérieneuston semble être plus faible que celle de la colonne d'eau.

## **I. 2. 2. Propriétés physiologiques et morphologiques du bactérioneuston**

Nous nous attacherons dans ce paragraphe à présenter les différentes propriétés physiologiques et morphologiques du bactérioneuston cultivable.

### **I. 2. 2. 1. Propriétés métaboliques des isolats de la microcouche**

Selon Sieburth (1971a), la plupart des isolats de la microcouche oxydent le glucose (86 %), hydrolysent les lipides (93 %) et les protéines (91,5 %), tandis que seulement 23,5 % de ces isolats sont capables de dégrader l'amidon. Les isolats issus de l'eau sous-jacente présentent une activité lipolytique et protéolytique inférieure. Les bactéries du genre *Pseudomonas* isolées de la microcouche de la Mer Noire présentent également des activités lipolytiques et protéolytiques (Tsyban 1971). En Mer Baltique, les bactéries lipolytiques constituent 70 % des bactéries isolées de la microcouche de surface (Mudryk *et al.* 1991), le facteur d'enrichissement de ces bactéries par rapport à l'eau sous-jacente est de 3,5. Les bactéries ayant une activité protéolytique sont aussi très présentes au niveau de cette microcouche. L'accumulation d'un très grand nombre de composés organiques tels que les triglycérides, les phospholipides, les lipoprotéines, les polypeptides et les acides aminés au niveau de la microcouche stimule l'activité et la croissance de bactéries lipolytiques et protéolytiques (Kjelleberg et Hakansson 1977, Mudryk *et al.* 1991). Ceci pourrait donc expliquer cet enrichissement de la microcouche en bactéries.

### **I. 2. 2. 2. Caractéristiques membranaires**

De nombreuses études ont mis en évidence l'importance des propriétés de surface des bactéries dans leur accumulation au niveau de l'interface air-mer (Kjelleberg et Stenström 1980, Hermansson *et al.* 1982, Shafer *et al.* 1998). La phase organique présente au niveau de cette interface va permettre l'accumulation des bactéries en corrélation avec l'hydrophobicité de surface des bactéries et les forces ioniques environnantes (Marshall 1976, Doyle et Rosenberg 1990, Schäfer *et al.* 1998). En effet, les bactéries, qui présentent une forte hydrophobicité membranaire, adhèrent au film organique de la microcouche en pénétrant dans ce film ou en formant une couche juste en dessous (Kjelleberg *et al.* 1976). Dahlbäck *et al.* (1981) rapportent que les bactéries isolées de la microcouche ont une hydrophobicité de surface plus élevée que celles isolées de l'eau sous-jacente. Selon Enger et Thorsen (1992), le

facteur d'enrichissement élevé (entre 10 et 440) de l'espèce pathogène, *Aeromonas salmonida* mis en évidence sur les surfaces de bassins d'élevages aquacoles, est à corrélérer à la forte hydrophobicité de surface de ces bactéries.

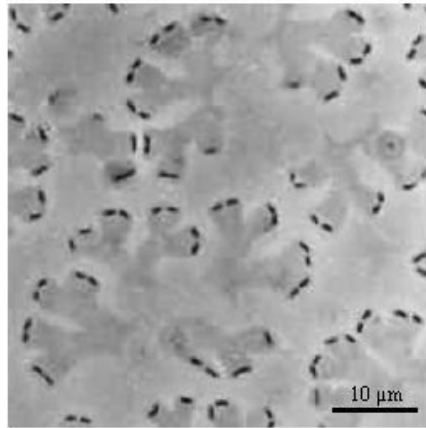
Certaines bactéries s'accumulent de façon préférentielle au film lipidique de surface. La structure, la composition et l'épaisseur du film de surface vont influencer cette accumulation (Norkrans et Sörensson 1977, Kjelleberg et Stenström 1980). Par exemple, l'accumulation au niveau d'un film lipidique simple (composé d'acide oléique) reconstitué en laboratoire est 10 fois plus importante pour des bactéries du genre *Serratia* que pour celles du genre *Aeromonas* ou *Pseudomonas*. De plus, un film lipidique artificiel plus complexe (composé de plusieurs lipides) va permettre aux souches appartenant au genre *Serratia* de s'accumuler 100 fois plus (Norkrans et Sörensson 1977).

### **I. 2. 2. 3. Morphologie : polymères et formation de rosettes**

L'adhésion de bactéries sur un substrat solide est généralement favorisée par la synthèse de polymères extracellulaires de nature polysaccharidique, et la présence de fibrilles, de pili et de flagelles (Corpe 1970, Marshall et Cruickshank 1973). Des études de microscopie effectuées sur le bactérioneuston ont montré la présence de ce type de structures associées à des bactéries neustoniques (Young 1978, Sieburth 1983, Maki 2002, Henk 2004).

Certaines bactéries bourgeonnantes et/ou appendiculées présentent à leur base un matériel extracellulaire fibreux et adhésif qui permet leurs attachement au niveau de l'interface (Marshall et Cruickshank 1973). Certaines bactéries neustoniques peuvent également former des structures dites en rosette (Paddies *et al.* 2004). Les cellules bactériennes s'accolent les unes aux autres par l'intermédiaire de polysaccharides et forment un biofilm. Ainsi, sur la surface des rivières, les bactéries de l'espèce *Nevskia ramosa* peuvent former ce type de structures typiques plates et hydrophobes (Glockner *et al.* 1998, Sturmeyer *et al.* 1998) (**Figure 5**, page suivante). Les bactéries du genre *Blastobacter* forment également ce type de biofilms à la surface de bassins ou de lacs (Krieg et Holt 1984).

Pour ces bactéries, la vie en biofilm leur confère la capacité d'utiliser dans l'eau, des composés azotés issus de l'atmosphère. Si des composés azotés sont ajoutés au milieu de culture, les bactéries ne forment plus de biofilm et présentent une croissance libre dans la colonne d'eau (Paddies *et al.* 2004).



**Figure 5** : Structure en rosettes de la souche *Nevskia ramosa* (photographie de microscopie en contraste de phase) (<http://www.icbm.de/pmbio/mikrobiologischer-garden/eng/ennev02a.html>)

### **I. 2. 3. Adaptation des communautés bactériennes aux substances toxiques**

Comme cela a déjà été présenté, la microcouche de surface est un lieu d'accumulation de nombreuses substances organiques notamment d'origine anthropique. Différents types de substances toxiques comme les hydrocarbures, pesticides et PCB sont fortement concentrés au niveau de la microcouche. Les communautés bactériennes présentes au niveau de la microcouche doivent donc faire face à ces fortes concentrations de polluants et ont dû s'adapter pour vivre dans ce milieu particulier.

#### **I. 2. 3. 1. Effet des substances toxiques sur les communautés bactérienneustoniques**

##### ➤ Etudes sur les communautés totales

Les polluants tels que les hydrocarbures et les PCB sont généralement connus pour altérer les membranes cellulaires, la synthèse des acides nucléiques et des acides aminés, les activités enzymatiques et peuvent causer des mutations (Tripathi 1988, Rajendran *et al.* 1990, Delorenzo *et al.* 1999). Cependant, certaines communautés bactériennes y compris celles de la

microcouche, sont capables de dégrader différents polluants tels que des hydrocarbures (Fehon et Oliver 1977, Gearing et Gearing 1982, Rambeloarisoa *et al.* 1984, Guerin 1989). Cette capacité à dégrader ce type de molécules ne semble pas être spécifique des communautés bactériennes neustoniques (Passman *et al.* 1979, Guerin 1989).

Les métaux lourds inhibent les enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN (Hartwig 1998) et augmentent la production de radicaux libres hautement toxiques. Ils vont donc avoir un effet sur la croissance et l'activité métabolique des bactéries et peuvent altérer qualitativement et quantitativement la structure des communautés bactériennes (Maki 2002). Les communautés bactérienneustoniques semblent être plus résistantes aux métaux lourds que les communautés se situant dans la colonne d'eau (Kim 1985, Hermansson *et al.* 1987, Jones *et al.* 1991). Kim (1985) a étudié l'effet du cuivre et du cadmium sur des communautés bactériennes prélevées au niveau de la microcouche de surface et de l'eau sous-jacente de la Mer Baltique. Il a montré que les communautés bactérienneustoniques sont beaucoup moins inhibées par l'ajout de métaux que celles de l'eau sous-jacente. Certaines bactéries neustoniques ont même leur croissance stimulée par l'ajout de cuivre.

➤ Etudes sur des isolats neustoniques

Walczak *et al.* (2001a, 2001b) ont comparé la dégradation d'hydrocarbures aromatiques (benzène, toluène, xylène, anthracène et naphthalène) par des souches isolées au niveau de la microcouche et de l'eau sous-jacente d'un lac en Pologne. Dans tous les cas, les hydrocarbures aromatiques étaient mieux décomposés par les bactéries neustoniques que par celles isolées de la colonne d'eau. Inversement, les travaux de Fehon et Olivier (1977) ne rapportent pas une dégradation plus efficace du pétrole de la part de souches isolées au niveau de la microcouche de surface. Des travaux contradictoires sont également retrouvés dans des études concernant l'effet des métaux lourds sur des isolats bactériens neustoniques et non neustoniques. D'une part, Donderski *et al.* (1999) concluent d'après leurs travaux que des bactéries neustoniques d'eau douce sont plus résistantes aux métaux lourds (Cu, Co, Cd et Pb) que celles de l'eau sous-jacente. D'autre part, les études de Mudryk *et al.* (2000) rapportent que des bactéries isolées de la microcouche de surface et de la colonne d'eau de la mer Baltique présentent des inhibitions comparables de croissance par différentes concentrations de métaux lourds (Hg, Zn, Cd et Ca).

### **I. 2. 3. 2. Modes de résistance et de protection des bactéries contre les substances toxiques**

Les modes de résistance des communautés bactériennes aux polluants sont complexes. Ils ne sont ici présentés que très brièvement.

#### ➤ Exopolysaccharides

Les bactéries marines capables de dégrader des hydrocarbures possèdent généralement des polymères extracellulaires qui ont un effet émulsifiant sur les hydrocarbures et qui aident à leur élimination (Rambeloarisoa *et al.* 1984, Goutx *et al.* 1987). Les exopolymères peuvent aussi piéger les pesticides (Wolfaardt *et al.* 1994) et les métaux lourds (Raguenes *et al.* 1997, Mancuso Nichols *et al.* 2004).

#### ➤ Gènes de résistance portés par des plasmides

Les facteurs de résistance contre les métaux lourds sont principalement associés à des plasmides (Silver et Phung 1996, Silver 1998, Nies 1999). Des plasmides de résistance aux polluants organiques comme les HAP ont également été mis en évidence chez des bactéries du genre *Pseudomonas* (Chakrabarty 1976, Whyte *et al.* 1997). Les plasmides peuvent conférer la résistance aux métaux lourds ou aux polluants organiques chez les bactéries qui les contiennent. Les bactéries neustoniques semblent contenir plus de plasmides contenant des gènes de résistance contre les métaux lourds que celles de la colonne d'eau (Hermansson *et al.* 1987, Jones *et al.* 1991). Les plasmides possèdent des gènes codant pour des enzymes capables d'inactiver ou de modifier ces substances toxiques.

### **I. 2. 4. Adaptation des communautés bactériennes aux radiations solaires intenses**

Les radiations solaires intenses au niveau de la microcouche sont une contrainte majeure à laquelle les communautés bactérienneustoniques doivent faire face. Le flux d'UV-B atteignant la surface de la Terre constitue l'une des variables physiques susceptibles d'être modifiée dans l'avenir en raison des changements climatiques d'origine anthropique ou naturelle. L'un des facteurs majeurs responsables de l'augmentation du flux d'UV-B résulte de la diminution de la couche d'ozone. On peut donc supposer que ces radiations seront de

plus en plus importantes au niveau de la microcouche, les bactéries devront s'adapter à ces modifications.

#### **I. 2. 4. 1. Effet des radiations solaires sur les communautés bactériennes**

L'effet négatif des radiations solaires sur le bactérioplancton se traduit notamment par une diminution de synthèse de l'ADN et des protéines, par une réduction de l'activité enzymatique et de l'incorporation d'acides aminés, et par une baisse de l'abondance bactérienne (Jeffrey *et al.* 1996a). Le type et l'étendue des dommages moléculaires (ARN, ADN, protéines, lipides membranaires) dépendent des longueurs d'ondes et de l'intensité des radiations solaires.

Les UV-B sont particulièrement nocifs pour les bactéries. Les photons de cette gamme de longueur d'onde ont, en effet, une énergie suffisante pour causer des dommages directs à l'ADN. Ces dommages entraînent la formation de liaisons entre les bases pyrimidines adjacentes bloquant l'ADN polymérase et les reverse transcriptases. Les dimères de pyrimidine cyclobutane ou CPD (cyclobutane pyrimidine dimers) et les photoproduits pyrimidone (6-4) représentent respectivement 90% et 10% de ces dommages.

Les UV-A entraînent quant à eux des dommages indirects qui résultent de l'absorption des photons par différents chromophores (NADH, NADPH, flavines, protéines). Ces molécules transfèrent leur énergie à l'ADN et l'endommagent. Les UV-A conduisent également à la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS (reactive oxygen species) tels que le radical superoxyde ( $O_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle (OH) dommageables pour l'ADN, les protéines et les lipides. Les lésions oxydatives des protéines causées par les ROS ont pour conséquences la modification structurale des protéines, notamment une modification du repliement ou de la charge, et donc une modification de la fonction des protéines.

#### **I. 2. 4. 2. Effet des radiations solaires sur les communautés bactérienneustoniques**

##### ➤ Etudes sur les communautés totales

Dans la baie de Chesapeake, Bailey *et al.* (1983) ne rapportent pas de corrélation entre la profondeur de l'échantillon et la survie des communautés bactériennes exposées aux mêmes doses de radiations ultraviolettes. De même, selon Herndl *et al.* (1993), les communautés bactériennes de surface sont aussi sensibles aux radiations UV-B que les communautés



bactériennes situées au niveau de la pycnocline, c'est-à-dire à 20 m de profondeur. D'après ces études, il ne semble pas y avoir de mécanismes d'adaptation particuliers contre les radiations solaires chez les communautés bactériennes de surface.

➤ Etude sur des isolats neustoniques

La résistance d'une souche neustonique face aux UV a été étudiée une seule fois. Cette étude a concerné l'espèce *Nevskia ramosa* (Sturmeyer *et al.* 1998). Cette espèce est plus sensible aux UV qu'*Escherichia coli* mais présente un mécanisme de photoréparation de l'ADN endommagé (cf. paragraphe I. 2. 4. 4.). En effet, après une exposition brève aux UV (254 nm), le nombre de cellules survivantes est multiplié par 7 si les cellules sont exposées à une lumière visible de 350 nm après l'exposition (Sturmeyer *et al.* 1998). Cependant, le comportement de cette espèce par rapport aux UV n'a pas été comparé à celui d'autres espèces marines. On ne peut donc pas conclure, d'après cette étude, quant à un mécanisme de réparation de l'ADN plus efficace chez les bactéries neustoniques.

### I. 2. 4. 3. Mécanismes de résistance et de protection contre les radiations solaires

➤ Molécules ayant des propriétés antioxydantes

Les mécanismes de photoprotection impliquent un criblage physique des UV grâce à des molécules ayant des propriétés antioxydantes. Ils impliquent donc la synthèse de substances absorbant les radiations UV. Ces composés agissent comme des agents protecteurs face aux radiations solaires. La probabilité pour que les photons atteignent une cible cellulaire sensible est donc plus faible. De nombreux organismes marins tels que le phytoplancton et les cyanobactéries possèdent ce type de composés extracellulaires (Shick et Dunlap 2002). La scytonémine et des molécules de la famille des MAAs (Mycosporine like Amino Acids) ont des propriétés antioxydantes (Garcia-Pichel et Castenholz 1993, Ehling-Schulz et Scherer 1999). Cependant, un seul composé appartenant à la famille des mycosporines a été mis en évidence chez les bactéries marines. Une bactérie du genre *Micrococcus*, isolée des eaux de surface de l'Océan Pacifique, possède une mycosporine : la shinorine (Arai *et al.* 1992).

Pour Garcia-Pichel (1994), il est physiquement impossible pour les bactéries de synthétiser et d'utiliser ces composés comme principal moyen de protection contre les radiations solaires. La dépense énergétique pour synthétiser ces substances étant trop coûteuse

par rapport à la petite taille des bactéries (Garcia-Pichel 1994). Le faible inventaire de ce type de molécules chez les bactéries ne nous permet pas de confirmer cette hypothèse.

Cependant, certaines espèces bactériennes appartenant au genre *Pseudomonas* sont capables de convertir des mycosporines synthétisées par des algues (shinorine et porphyrine 334) en mycosporine-glycine, molécule présentant une activité antioxydante (Dunlap *et al.* 1998, Shick et Dunlap 2002). Une étude récente a montré également que certains dinoflagellés sécrètent des mycosporines dans l'eau, aisément quantifiables dans la matière organique dissoute (Whitehead et Vernet 2000). Bien que cela n'a pas été démontré, ces substances sécrétées dans le milieu naturel pourraient protéger les communautés bactérienneustoniques des radiations ultraviolettes.

➤ Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont impliqués dans la protection des cellules face aux radiations solaires. Ces pigments jouent le rôle d'épurateurs de radicaux libres (« free radical scavengers »). Ces radicaux libres sont extrêmement toxiques car ce sont des puissants agents oxydants qui détruisent rapidement les constituants cellulaires.

Plusieurs études mettent en évidence le rôle des caroténoïdes chez les organismes marins et notamment les bactéries dans la protection face aux radiations solaires et plus particulièrement contre les UV (Mathews et Sistrof 1959, Miki 1991, Margalith 1992, Miki *et al.* 1994). Pour Wu *et al.* (1983), le phénotype mutant non pigmenté de l'archaebactérie halophile extrême *Halobacterium cutirubrum*, est plus sensible aux UV que le phénotype sauvage qui possède deux principaux caroténoïdes : la bactériorhodopsine et la bactériorubérine.

De plus, il a été montré de nombreuses fois que les communautés bactérienneustoniques marines et d'eau douce présentent une proportion plus importante de bactéries pigmentées que celles des eaux sous-jacentes (Sieburth 1968, Tsyban 1971, Fehon et Oliver 1979, Norkrans 1980, Hermansson *et al.* 1987, Maki et Herwig 1991, Mudryk *et al.* 1991, Maki 2002). Bien que cette hypothèse n'ait jamais été vérifiée, il est probable que les pigments aient un effet protecteur contre les radiations solaires qui sont intenses au niveau de la microcouche.

➤ Le contenu en bases G et C de l'ADN<sup>1</sup>

Les dimères de pyrimidine se forment lorsque deux pyrimidines adjacentes dans un brin d'ADN forment deux liaisons covalentes et inhibent la réplication de l'ADN et sa fonction. La composition en bases GC (guanine, cytosine) et AT (adénine, thymine) d'un génome bactérien peut donc intervenir dans l'intensité des dommages de l'ADN. Pour une même intensité de radiations, les bactéries à fort taux en G+C ont une plus faible probabilité de formation de dimères de thymine et donc de formation de CPD. Par conséquent, les dommages cellulaires sont moindres (Setlow 1966). Certains auteurs rapportent un lien évident entre le pourcentage élevé en bases G+C de bactéries et leur résistance face aux radiations solaires ou aux UV (Singer et Ames 1970, Norkrans 1980, Maki 2002). Selon Kellogg et Paul (2002) cette corrélation existe également pour les communautés virales. Néanmoins, cette hypothèse est controversée. Le taux élevé en bases G+C chez une bactérie ne semble pas être une adaptation indispensable ni suffisante dans sa résistance aux radiations solaires (Gascon *et al.* 1995, Sturmeyer *et al.* 1998, Joux *et al.* 1999).

➤ Exopolysaccharides

D'un point de vue général, les exopolysaccharides servent à protéger les bactéries de nombreux stress environnementaux tels que les modifications de pH, les chocs osmotiques, la dessiccation et les radiations UV (Flemming 1993, Ophir et Gutnick 1994, Elaslari et Miller 1999, Davey et O'toole 2000). En particulier, Elaslari et Miller (1999) ont démontré que le biofilm formé par *Pseudomonas aeruginosa* présentait des propriétés protectrices contre les UV-A, UV-B et UV-C.

➤ Gènes de résistance portés par les plasmides

La résistance aux radiations UV peut être codée sur des gènes portés sur des plasmides (Strike et Lodwick 1987). De nombreux plasmides ont en effet la capacité à augmenter la résistance aux UV de leurs cellules hôtes (Siccardi 1969). Des gènes de résistance coderaient pour les mécanismes de réparation de l'ADN endommagé par les UV (Strike et Lodwick 1987) (cf. paragraphe suivant).

---

<sup>1</sup> Le taux de G+C d'une molécule d'ADN ou d'un génome bactérien est la proportion relative (exprimée généralement en %) du nombre de paires Guanine-Cytosine dans cet ADN.

#### I. 2. 4. 4. Mécanismes de réparation

Ces différents mécanismes vont intervenir dans la réparation des différents dommages liés à l'ADN.

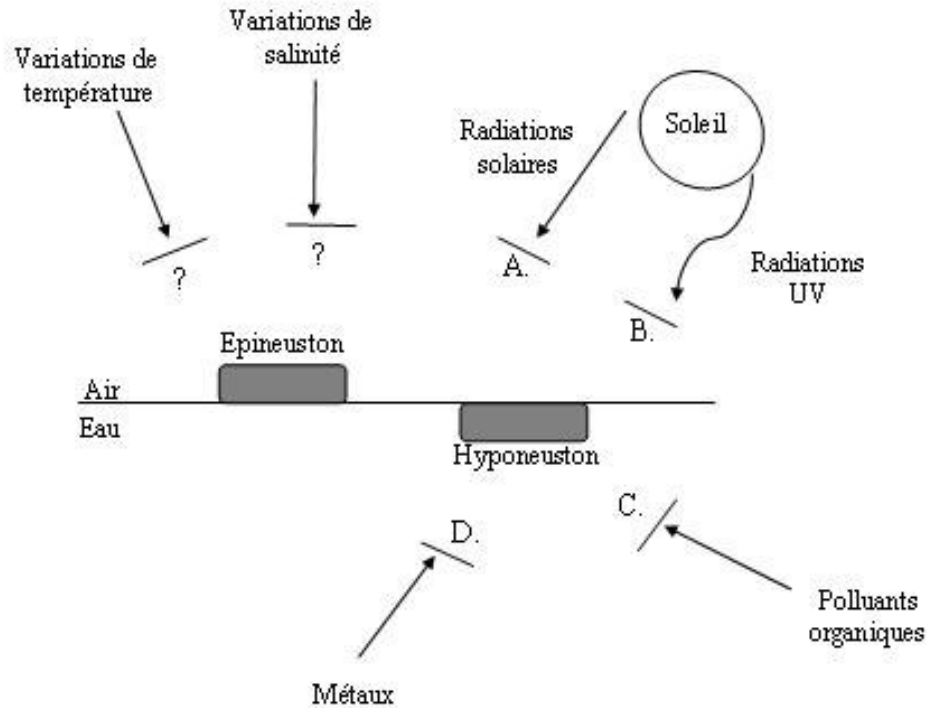
➤ Mécanismes de photoréparation ou « light repair »

La réparation par photoréactivation ou PER (photoenzymatic repair) permet la réparation des dimères de thymine (CPD) par l'intermédiaire d'une enzyme, la photolyase. Cette enzyme se fixe spécifiquement à l'ADN endommagé et catalyse en présence de lumière visible ou UV-A le clivage chimique du dimère (Miller *et al.* 1999). La durée de la photoréactivation dépend des espèces bactériennes considérées : elle varie de 1 h pour *E. coli* et *Halobacterium cutirubrum* à 4-6 h pour des souches marines pathogènes de poissons (Harm 1968, Eker *et al.* 1991, Liltved et Landfald 1996).

➤ Autres mécanismes de réparation

Il existe d'autres mécanismes de réparation de l'ADN, qui ne nécessitent pas de lumière visible pour fonctionner, ce sont les « dark repairs ». Ces mécanismes sont la réparation par excision (NER : nucleotide excision repair), la réparation inductible ou réparation SOS, et la réparation par recombinaison. La protéine régulatrice de ces 3 systèmes est issue de l'expression du gène *recA*. La protéine RecA est apparemment induite pendant les périodes où la photoréparation ne fonctionne pas (Miller *et al.* 1999). De nombreuses études de communautés bactériennes marines ont mis en évidence que le NER est un mécanisme important chez les bactéries marines (Jeffrey *et al.* 1996b, Lyons *et al.* 1998, Pakulski *et al.* 1998).

La **figure 6** (page suivante) récapitule les différents mécanismes possibles d'adaptation, de protection et de réparation des communautés bactériennes de la microcouche de surface face notamment à la concentration élevée de substances toxiques et aux radiations solaires intenses.



- A. Molécules ayant des propriétés antioxydantes et caroténoïdes
- B. Taux élevé en bases G+C, exopolysaccharides, plasmides associés et mécanismes de réparation de l'ADN efficace
- C. Plasmides associés contenant des gènes pour métaboliser des composés toxiques tels que des pesticides ou des PCB, et polymères extracellulaires contribuant à la dégradation d'hydrocarbures.
- D. Polymères extracellulaires liant les ions métalliques, plasmides associés contenant des gènes de résistance.

**Figure 6** : Les différents stress environnementaux auxquels le bactérioneuston doit faire face, et mécanismes possibles d'adaptation, d'après Maki (2002)

### **I. 3. LE PROGRAMME EUROPEEN AIRWIN**

Le programme de recherche européen AIRWIN (AIR-Water Interface) a été mis en place en Février 2001 par l'équipe d'Ecologie Microbienne du laboratoire Arago.

Ce projet avait pour originalité de regrouper plusieurs laboratoires européens de biologie et de chimie marines ainsi qu'un partenaire industriel :

- Laboratoire d'Océanographie Biologique, Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer, France.
- Laboratoire de Biogéochimie et Chimie Marines, Université Paris VI, France.
- Département de Chimie Environnementale, Consejo Superior de Invesgationes Cientificas (CSIC), Barcelone, Espagne.
- Département d'Ecologie Microbienne et Moléculaire, Royal Netherlands Institute for Sea Research (NIOZ), Pays Bas.
- Pierre Fabre Dermo Cosmétique (PFDC), Castanet-Tolosan, France.

Le projet AIRWIN avait pour objectif essentiel l'étude de la structure biologique et chimique de la microcouche de surface de l'eau de mer et de son rôle fonctionnel dans les processus de transformation et de transfert de la matière organique, qu'elle soit d'origine naturelle ou anthropique.

Les objectifs spécifiques du projet européen étaient :

- de caractériser la composition biologique et chimique de la microcouche,
- de définir le rôle de la microcouche sur l'entrée et la sortie de polluants organiques et inorganiques dans l'environnement marin,
- d'identifier ces polluants et de décrire le rôle des microorganismes dans le stockage, le transfert et la transformation des polluants,
- d'isoler et d'identifier des microorganismes d'intérêt biotechnologique,
- de déterminer des bioindicateurs de pollution atmosphérique.

Les analyses ont été effectuées sur deux sites d'étude côtiers du Nord-Ouest de la Méditerranée. Ces sites d'étude diffèrent par leur degré de pollution, le premier est localisé dans la baie de Banyuls-sur-Mer dans une zone oligotrophe, tandis que le second site, localisé au large du port Olympique de Barcelone, est caractérisé par une forte pollution urbaine.

## I. 4. SUJET DE RECHERCHE

Mon travail de thèse s'inscrit dans le cadre du projet européen AIRWIN et dans une problématique d'écologie microbienne. Il vise à acquérir des connaissances sur un milieu très peu étudié en microbiologie : l'interface air-mer.

A ce jour, la diversité du bactérioneuston a été pratiquement inexplorée. Les quelques études faites à ce sujet datent de plus d'une trentaine d'années et concernent l'analyse de la fraction cultivable du bactérioneuston via les méthodes traditionnelles de culture (Sieburth 1971a, Tsyban 1971, Carty et Colwell 1975, Fehon et Oliver 1979). Ces recherches ne semblent pas mettre en évidence des espèces bactériennes spécifiques de la microcouche de surface étant donné que les mêmes genres bactériens sont retrouvés dans la colonne d'eau (Sieburth 1971a, Fehon et Oliver 1979). Cependant, ces observations ont été effectuées uniquement sur la fraction cultivables des communautés bactériennes qui représente moins de 1% des communautés bactériennes totales en milieu marin (Amann *et al.* 1995). L'application de la biologie moléculaire à l'étude des communautés bactériennes naturelles permet désormais l'étude de la structure des communautés bactériennes cultivables et non cultivables (Woese 1987).

A ma connaissance, ces différentes méthodes n'ont jamais été appliquées à l'étude du bactérioneuston marin. L'isolement de souches reste le seul moyen d'étudier la physiologie et l'écologie des communautés bactériennes. Ainsi, une partie importante de ma thèse a été consacrée à la constitution d'une collection de souches afin de les caractériser taxinomiquement et d'étudier certaines propriétés physiologiques particulières.

Les souches neustoniques présentent un intérêt quant à leur étude étant donné qu'elles ont du s'adapter à la vie en surface et aux conditions extrêmes du milieu. La résistance des communautés ou d'isolats bactérioneustoniques aux polluants organiques et aux métaux lourds a été fréquemment étudiée (Fehon et Oliver 1977, Passman *et al.* 1979, Gearing et Gearing 1982, Kim 1985, Hermansson *et al.* 1987, Guerin 1989, Jones *et al.* 1991, Walczak *et al.* 2001a, b). Par contre, la résistance des communautés ou des souches bactérioneustoniques aux radiations solaires n'a jamais été évaluée et comparée à celle des communautés ou d'isolats de l'eau sous-jacente. Pourtant, ces communautés ont du développer des mécanismes de résistance, de protection et/ou de réparation de l'ADN endommagé efficaces pour pouvoir survivre à ces fortes radiations solaires. Ainsi, la résistance des souches de la collection aux

radiations solaires, a été évaluée afin de mettre en évidence une possible adaptation des bactéries isolées au niveau de la microcouche.

Les objectifs de ce travail étaient d'étudier (1) la diversité des communautés bactériennes cultivables situées à l'interface air-mer et de la comparer à celles de l'eau sous-jacente, collectée à 50 cm de profondeur (2) certaines propriétés particulières de ces communautés bactérienneustoniques telles que leur hydrophobicité et leur résistance aux radiations solaires.

Pour répondre aux objectifs de l'étude, nous avons mené dans un premier temps, une étude méthodologique afin de mettre en évidence le(s) échantillonneur(s) le(s) plus approprié(s) pour étudier les communautés biologiques de la microcouche de surface. Ce travail d'intercalibration a été effectué en collaboration avec les biologistes impliqués dans le projet européen AIRWIN (Chapitre III).

Dans un deuxième temps, nous avons analysé et comparé la diversité des communautés bactériennes de la microcouche de surface et de l'eau sous-jacente au niveau de sites d'étude plus ou moins impacté par la pollution (Chapitre IV). Ainsi la flore bactérienne du neuston et du plancton a été isolée puis caractérisée. A l'issue de la mise en place d'une collection de souches, nous avons déterminé l'hydrophobicité de chacune des souches de la collection.

Dans un troisième temps, nous avons évalué la résistance des souches de la collection, issues de la microcouche et de l'eau sous-jacente, face aux radiations solaires (Chapitre V). L'ensemble de ces expérimentations a été réalisé à l'aide d'un simulateur solaire. Ces analyses nous ont permis d'estimer l'impact des radiations solaires sur les communautés bactérienneustoniques.





## **CHAPITRE II**

## II. 1. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS

### II. 1. 1. Les sites d'étude

Les deux stations d'étude correspondent à deux sites côtiers méditerranéens choisis pour le projet AIRWIN (**Figure 1**, page suivante).

Le site de Banyuls-sur-Mer correspond à un site côtier oligotrophe. Les prélèvements dans la baie de Banyuls-sur-Mer ont été effectués à la station SOLA. Cette station, située à la latitude 42°29'N et à la longitude 3°08'E, fait l'objet d'études physicochimiques et biologiques hebdomadaires par l'Observatoire.

Le site de Barcelone correspond à un site eutrophe, soumis à de nombreux effluents urbains. La station de prélèvement se situe à la latitude 41°24'N et la longitude 2°16'E, à environ 3 km du port olympique. Cette station est également suivie régulièrement par le CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Cientificas) de Barcelone, partenaire du projet européen.

### II. 1. 2. Les échantillonneurs

Les échantillonneurs de la microcouche de surface (ou SML pour « surface microlayer ») utilisés lors des prélèvements sont les suivants :

- la « glass plate » (ou plaque de verre), épaisseur prélevée : 100 à 150 µm
- le « metal screen » (ou tamis en métal), épaisseur prélevée : 440 µm
- le « nylon screen » (ou tamis en nylon), épaisseur prélevée : 200 à 300 µm
- la bouteille, épaisseur prélevée : 5 à 10 mm
- le « roller » (ou rouleau de Harvey), épaisseur prélevée : de 70 à 100 µm
- le filtre en téflon, hydrophobe (PTFE), épaisseur prélevée : les 40 premiers µm
- le filtre en polycarbonate, hydrophile (PC), épaisseur prélevée : les 40 premiers µm.

La fiche technique et le mode opératoire de chaque échantillonneur sont détaillés dans l'annexe 1.

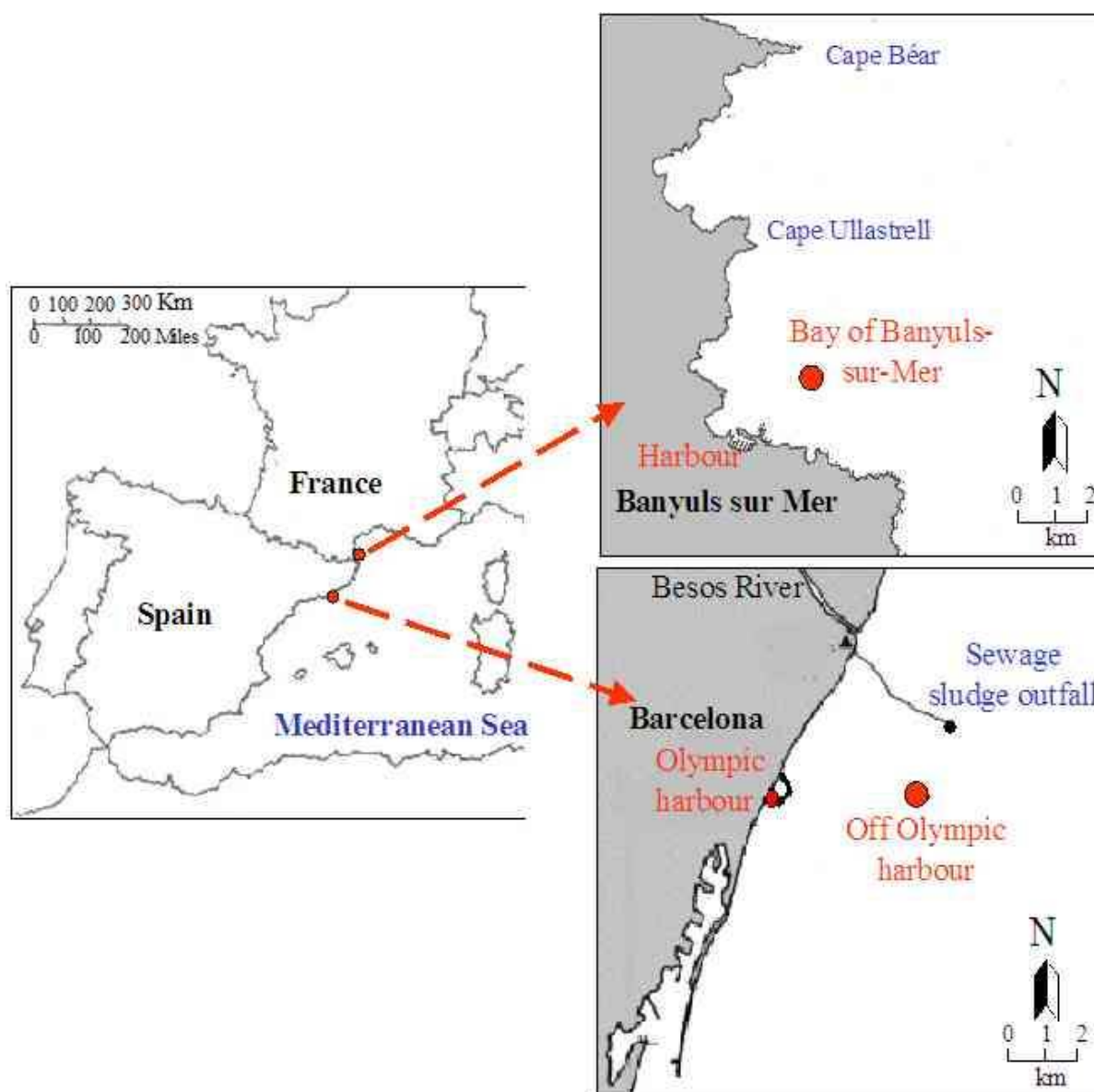


Figure 1 : Localisation des deux sites d'échantillonnage

Les échantillonneurs de l'eau sous-jacente (ou UW pour « underlying water ») sont les suivants :

- la bouteille (B) immergée puis ouverte à une profondeur de 50 cm
- la pompe (P) prélevant également à environ 50 cm de profondeur.

Les échantillonneurs utilisés lors des différentes campagnes sont détaillés dans le **tableau 1**. Lors des dernières campagnes d'échantillonnage, un prélèvement d'eau à -5m a été ajouté. Ce prélèvement supplémentaire a été réalisé au moyen d'une bouteille Niskin.

**Tableau 1:** Echantillonneurs de microcouche de surface (SML) et d'eau sous-jacente (UW) utilisés lors des différentes campagne de prélèvements

Date	Localisation	Echantillonneurs utilisés
13, 14 et 15 Mars 2001	Barcelone	SML : GP, MS, NS, Bo, PTFE, PC UW : B, P
16, 17 et 18 Mars 2001	Banyuls-sur-Mer	SML : GP, MS, NS, Bo, PTFE, PC UW : B, P
5, 6 et 7 Septembre 2001	Barcelone	SML : GP, MS, NS, R, PTFE, PC UW : B
9, 12 et 13 Septembre 2001	Banyuls-sur-Mer	SML : GP, MS, PTFE, PC UW: B
19, 20 et 21 Mars 2002	Barcelone	SML : GP, MS UW : B, -5 m
25, 26 et 27 Mars 2002	Banyuls-sur-Mer	SML : GP, MS UW : B, -5 m
25, 26 et 27 Juin 2002	Barcelone	SML : GP, MS UW : B, -5 m
1, 2 et 3 Juillet 2002	Banyuls-sur-Mer	SML : GP, MS UW : B, -5 m

GP : glass plate, MS : metal screen, NS : nylon screen, R : roller, Bo : bouteille, PTFE : filtre en téflon, PC : filtre en polycarbonate ; B : bouteille, P : pompe.

### **II. 1. 3. Expérience de contrôle des échantillonneurs**

Cette expérience est effectuée dans le but de déterminer si les principaux échantillonneurs de microcouche de surface, la plaque de verre (GP) et le tamis en métal (MS), présentent un biais possible dans la collecte de certains paramètres biologiques.

Cette expérience a été réalisée 3 fois sur une journée (matin, midi et soir). De l'eau a été prélevée à 1 m de profondeur au moyen d'une pompe dans la baie de Banyuls-sur-Mer et transférée dans 2 bacs de 400 litres chacun. Des échantillons ont été prélevés soit par le tamis en métal, soit par la plaque de verre. L'eau des bassins a été homogénéisée tout au long des prélèvements. Le contrôle correspond à des échantillons prélevés à 50 cm de profondeur dans les bassins avec une bouteille. Cinq réplicats ont été effectués pour chaque type de prélèvement.

Des expériences de contrôle ont également été effectuées pour les filtres en téflon et en polycarbonate. Au cours de 5 échantillonnages, l'eau sous jacente a été collectée sur le terrain, rapportée au laboratoire puis prélevée par les deux types de filtres comme décrit ci-dessus.

## **II. 2. ISOLEMENT ET CARACTERISATION MOLECULAIRE DES ISOLATS BACTERIENS**

Le travail d'isolement a été effectué sur chaque campagne. Les isolats ont été caractérisés sur le plan phénotypique mais également génotypique (**Figure 2**, page suivante).

### **II. 2. 1. Isolement de souches**

Cent µl d'eau correspondant soit à la microcouche de surface soit à l'eau sous-jacente, sont étalés, en triplicat, directement sur du milieu R<sub>2</sub>A salé ou MA en boîtes de Pétri ou après avoir été dilué au 1/10 et au 1/100. Les compositions des différents milieux de culture sont présentées en annexe 2. Après 14 jours d'incubation des boîtes dans l'obscurité à température ambiante, 10 colonies sont prélevées aléatoirement parmi celles qui ont un morphotype crème, morphotype le plus abondant. Un représentant de chacun des autres morphotypes est isolé.

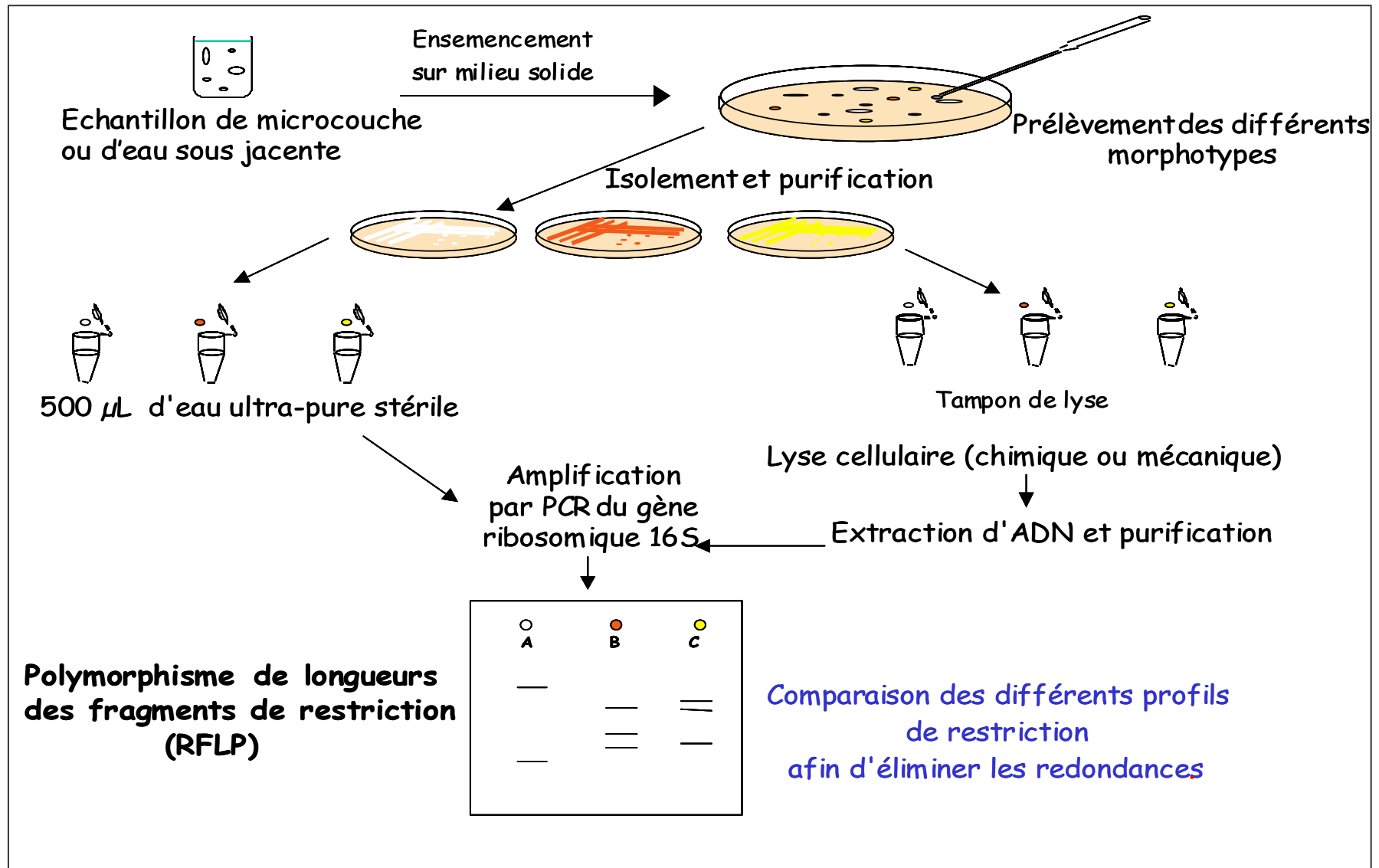
Chaque colonie est repiquée puis purifiée 3 fois avant d'être caractérisée au niveau moléculaire.

### **II. 2. 2. Caractérisation moléculaire des isolats**

#### **II. 2. 2. 1. Extraction d'ADN**

##### **1. Lyse par choc thermique**

Pour chaque isolat, les colonies purifiées sont récupérées sur boîtes à l'aide d'une pipette Pasteur puis remis en suspension dans 500 µl d'eau ultra-pure stérile. La réaction d'amplification est alors réalisée directement à partir de cette suspension. La lyse des parois cellulaires rendant l'ADN accessible aux produits de la réaction d'amplification est réalisée par traitement thermique pendant le pré-cycle de PCR de 10 min à 94°C.



**Figure 2:** Schéma synthétique des différentes étapes permettant l'isolement et la caractérisation moléculaire des bactéries de la microcouche de surface et de l'eau sous-jacente



Pour certains isolats, aucune amplification n'a pu être obtenue à partir cette méthode directe, probablement à cause de la présence en forte concentration de molécules inhibitrices (exopolysaccharides, pigments..). Pour ces isolats, une étape de lyse (chimique ou mécanique) d'extraction et de purification de l'ADN a due être entreprise.

## **2. Lyse chimique**

La lyse cellulaire se fait par traitements enzymatique et chimique conjugués utilisant du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), du lysozyme et de la protéinase K.

Le protocole est le suivant :

- reprendre des colonies sur boîte de Pétri dans 500 µl de solution de lyse (EDTA 40 mM, tris 50 mM pH 8, saccharose 0,75 M, lysozyme 1 mg/ml) ;
- incuber à 37°C pendant 45 min sous agitation douce ;
- ajouter 50 µl de SDS 10% et 12,5 µl de protéinase K à 8 mg/ml ;
- incuber dans un bain-marie à 55°C pendant 1 heure ;
- récupérer le produit de lyse.

### **✓ Purification de l'ADN**

La solution aqueuse est traitée par le mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (PCI) 25/24/1 qui dénature les protéines. Après séparation des phases par centrifugation, la phase aqueuse supérieure contenant l'ADN est recueillie. Le phénol inhibant certaines activités enzymatiques nécessaires dans la suite du travail, doit être éliminé par un dernier traitement au chloroforme.

Le protocole est le suivant :

- ajouter 1 volume de PCI (phénol/chloroforme/alcool isoamylique 25/24/1) au produit de lyse, agiter par retournement 2 ou 3 fois ;
- centrifuger 10 min à 10000 g à 16°C et récupérer le phase aqueuse (phase supérieure), à l'interface se trouvent les protéines et les débris cellulaires résiduels (résidu blanc) ;
- répéter ces 2 étapes 1 fois ;
- ajouter 1 volume de chloroforme, agiter par retournement 2 ou 3 fois ;
- centrifuger 10 min à 10000 g à 4°C ;
- récupérer la phase aqueuse.

### ✓ Précipitation de l'ADN

Le protocole est le suivant :

- ajouter 2 volumes d'isopropanol froid stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  ;
- laisser se former le précipité d'ADN pendant une nuit à  $-20^{\circ}\text{C}$  ;
- centrifuger 20 min à 10000 g à  $4^{\circ}\text{C}$  ;
- éliminer l'isopropanol ;
- laver le culot avec 500  $\mu\text{l}$  d'éthanol 70% froid stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  ;
- éliminer l'éthanol par renversement du tube puis par pipetage pour le volume résiduel ;
- laisser sécher les tubes ouverts à  $37^{\circ}\text{C}$  de 15 à 20 min ;
- remettre l'ADN en suspension dans 50  $\mu\text{l}$  d'eau ultra-pure stérile.

### 3. Lyse mécanique

Pour certains isolats, réfractaires également à la lyse chimique, nous avons effectué une extraction d'ADN par une lyse mécanique grâce au kit MOBIO (UltraClean, soil DNA isolation kit). Cette lyse mécanique se fait au moyen de billes d'argile sous agitation.

La lyse est effectuée à partir d'un culot cellulaire obtenu après centrifugation de 6 ml de culture à 6000 g pendant 5 min. Le protocole utilisé est celui fourni avec le kit.

### 4. Dosage de l'ADN et dépôt sur gel d'agarose

Le dosage de l'ADN se fait par mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm, selon la formule suivante :  $C (\mu\text{g/ml}) = (A_{260}) \times 50$ . La pureté de l'ADN est donnée par le rapport  $(A_{260})/(A_{280})$ . Ce rapport doit être voisin de 1,8. Un rapport plus élevé indique une contamination par les ARN. Les protéines ou le phénol diminuent cette valeur. Les mesures d'absorbances sont effectuées grâce au spectrophotomètre GenQuant II de Pharmacia.

Le dépôt sur gel d'agarose est informatif quant à l'état de l'ADN, la dégradation possible de l'ADN génomique se traduit par une traînée sur le gel d'agarose.

L'ADN est déposé sur un gel d'agarose 1%, préparé dans du tampon TAE 1x (Annexe 2) contenant 0,8  $\mu\text{g/ml}$  de bromure d'éthidium ou BET. Une fois gélifié, le gel est placé dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE 1x. Un courant d'environ 100 V pendant 20 min permet de faire migrer l'ADN. Le gel est ensuite visualisé sous UV.

### II. 2. 2. 2. Amplification par PCR de l'ADNr 16S

Les amorces SAdir et S17rev s'hybrident sur des régions conservées situées au début et à la fin de l'ADNr 16S bactérien (**Tableau 2**, ci-dessous). Elles permettent d'amplifier un fragment d'environ 1500 pb.

**Tableau 2:** Séquences des amorces utilisées pour l'étape de PCR sur les ADN totaux (Brosius *et al.* 1978)

Amorce	Position de référence	Séquence
Sadir	8-28 ( <i>E. coli</i> )	5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AGA-3'
S17rev	1493-1509 ( <i>E. coli</i> )	5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3'

Les produits suivants sont rassemblés dans un volume total de 50 µl :

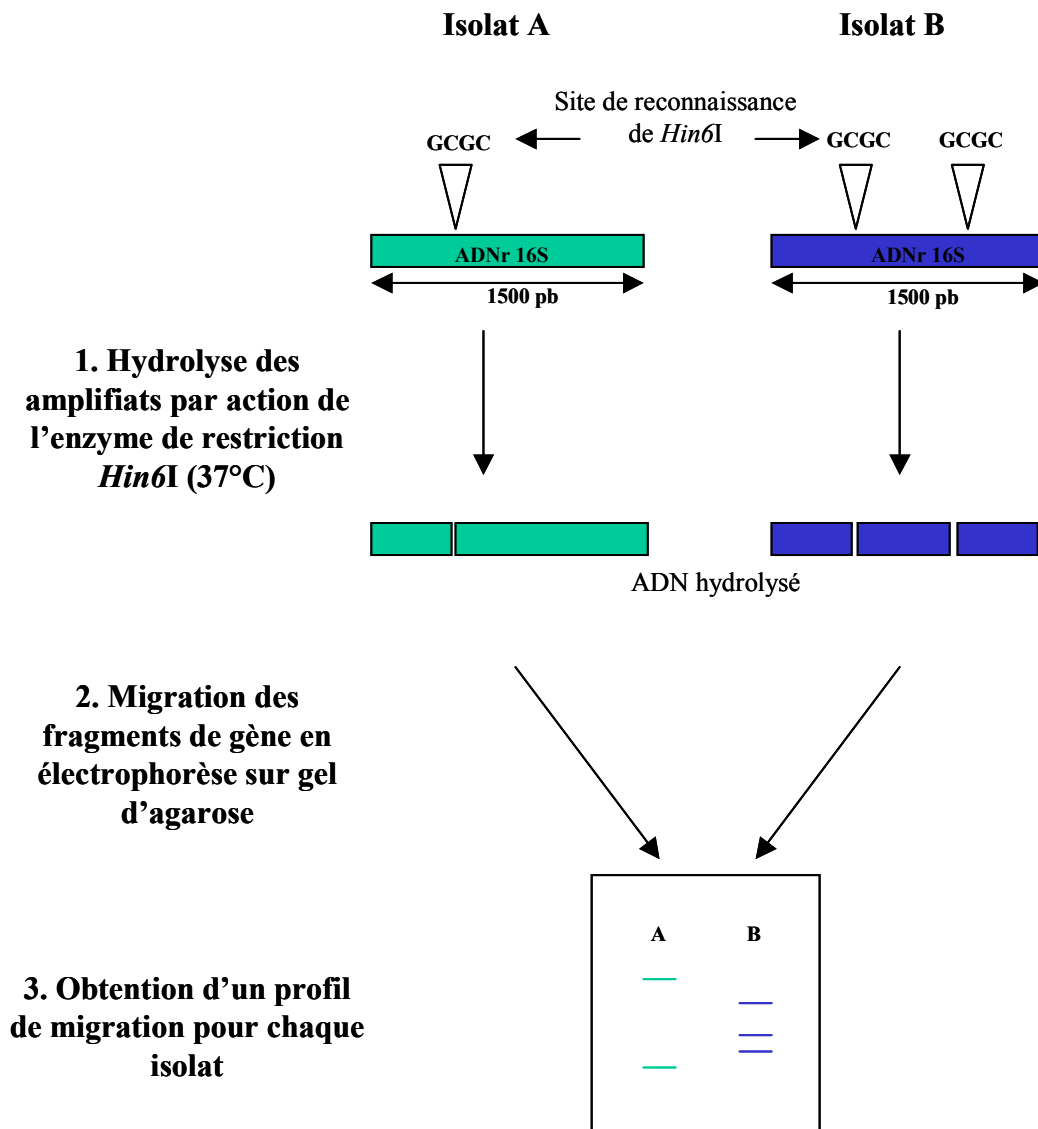
- 5 µl de suspension bactérienne ou 1 µl d'extrait d'ADN ;
- 5 µl de tampon PCR 10X (Super Taq, HT Biotechnology) ;
- 200 µM de dNTP (dNTP Master Mix d'Eurogentec) ;
- 100 pmol de chacune des deux amorces ;
- 1 U de Taq Polymerase (Super Taq) ;
- 50 µl qsp d'eau ultra-pure stérile.

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur multi-block (Robocycler Gradient 96, Stratagene).

Le programme suivant est réalisé :

- 1 précycle de dénaturation des cellules pendant 10 min ou de l'ADN pendant 3 min à 94°C,
- 30 cycles de 1 min à 94°C (dénaturation), 1 min 30' à 48°C (hybridation des amorces) et 2 min à 72°C (élongation),
- 1 cycle de 6 min à 72°C (élongation).

Les résultats sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel à 1% d'agarose. Un marqueur de taille (Smart Ladder, Eurogentec) permet de vérifier la taille de l'amplifiat (1500 pb).



**Figure 3:** Principe de l'hydrolyse de l'ADNr 16S par l'enzyme de restriction *Hin6I*.

### II. 2. 2. 3. Criblage géotypique des isolats par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Le profil RFLP de chaque isolat est analysé afin d'éliminer les redondances. Les produits amplifiés par PCR correspondant à chaque isolat sont hydrolysés par une enzyme de restriction (*Hin6 I*: *Haemophilus influenzae*, Eurogentec) qui reconnaît la séquence nucléotidique (G\*CGC/CGC\*G) comme site de coupure (**Figure 3**, ci-contre).

Le nombre et la taille des fragments générés après action de cette enzyme sont donc dépendants de la séquence du gène de la bactérie. L'électrophorèse de ces fragments sur gel d'agarose permet alors d'obtenir un profil de migration spécifique de chaque espèce bactérienne.

Le choix de cette enzyme (*Hin6 I* est un isoschizomère de *Hha I*) est justifié par le fait qu'elle discrimine l'ADNr 16S de la plupart des espèces bactériennes (Moyer *et al.* 1996, Urakawa *et al.* 1998).

Les conditions d'hydrolyse sont les suivantes :

- 1,3 µl de tampon de restriction (tampon 10X) ;
- 3 U d'enzyme *Hin6 I* (Eurogentec);
- 0,3 µl de DTT (DiThioThreitol) ;
- 3 µl qsp d'eau ultra-pure stérile ;
- ajouter à cette solution de digestion 10 µl d'amplifiat (ou 15 µl quand l'amplifiat est de faible intensité sur le gel d'électrophorèse) ;
- incuber pendant une nuit à 37°C.

Les différents fragments d'ADN générés par l'hydrolyse sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. Le marqueur de taille (Amplisize, Biorad) est utilisé pour déterminer la taille des différents fragments. La migration est réalisée à 80 V pendant 1h30. Les différents profils sont visualisés sous UV et photographiés. Les profils obtenus sont ensuite comparés les uns aux autres.

Un représentant de chaque profil RFLP est alors conservé dans une collection de souches stockées à -80°C.

## II. 2. 3. Conservation et codification des souches

### II. 2. 3. 1. Les différents modes de conservation des souches

Chaque souche est stockée en triplicat à – 80°C selon plusieurs modes de conservation.

✓ **Cryobilles** (Bacterial preservers, Protect)

Un culture liquide en phase exponentielle de chacune des souches est centrifugée à 5000 g pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans les 200 µl environ de bouillon restant. Ce « concentrat » est réparti dans les tubes contenant les cryobilles. Ensuite, le protocole du fournisseur est utilisé.

✓ **DMSO 5 %** (DiMethyl Sulfoxide)

Un volume de 950 µl de culture en phase exponentielle de chacune des souches est mélangé à 50 µl de DMSO filtré sur 0,2 µm.

✓ **Glycérol 40 %**

Un volume de 500 µl de culture en phase exponentielle de chacune des souches est mélangé à 500 µl de glycérol à 80 % autoclavé.

La pureté du bouillon utilisé pour la mise en collection est vérifiée par étalement sur boîte.

### II. 2. 3. 2. Codification des souches

Chaque code renseigne sur la date et l'année d'échantillonnage.

Exemple : 18III/A01/053

18III correspond au 18 mars.

A01 correspond à l'année 2001.

053 correspond au numéro de la souche.

Un fichier Excel regroupe toutes les informations et caractéristiques des souches isolées, le mode et le lieu de prélèvement y sont entre autre précisés (Annexe 3).

## II. 3. IDENTIFICATION DES ISOLATS DE LA COLLECTION

### II. 3. 1. Séquençage de l'ADNr 16S

Pour séquencer la moitié ou la quasi-totalité de l'ADNr 16S (1500 pb), des amorces internes du gène sont utilisées. Les séquences et positionnement par rapport au gène d'*E. coli* de ces amorces internes sont données dans le **tableau 4** (ci-dessous). Les séquençages directs des produits PCR ont été effectués par le laboratoire du NIOZ (Royal Netherlands Institute for Sea Research), partenaire du projet européen et par la société Génome Express, selon la méthode de terminaison de chaîne par didéoxynucléotides. Les résultats sont visualisés sur des chromatogrammes, les 4 types de ddNTP étant marqués par des fluorochromes différents.

**Tableau 3:** Séquences des amorces internes de séquençage (Brosius *et al.* 1978).

Amorce	Position de référence	Séquence
S8 (sens)	685-703 ( <i>E. coli</i> )	5'-TA GCG GTG AAA TGC GTA GA-3'
907RC (antisens)	907-927 ( <i>E. coli</i> )	5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3'
GM5 (sens)	342-356 ( <i>E. coli</i> )	5'-TAC GGG AGG CAG CAG-3'

Dans un premier temps, chaque isolat a été séquençé partiellement. La séquence obtenue d'environ 500 pb (en utilisant les amorces 907RC et GM5) ou de 750 pb (en utilisant les amorces S8 et 907RC) a été utilisée pour positionner taxinomiquement ces isolats par comparaison des séquences d'ADNr 16S présentes dans les banques de séquences (cf paragraphe II. 3. 3. ).

### II. 3. 2. Correction et reconstitution des séquences

L'analyse des séquences a été faite sur PC grâce aux logiciels suivant :

-Le logiciel Chromas permet de visualiser le résultat de séquençage sous forme d'électrophorégramme. Il permet la correction manuelle directe de la séquence, de supprimer le début de séquence souvent illisible et la fin de séquence où les pics s'arrondissent. Ce logiciel est disponible via le site de Génome express (<http://www.technelysium.com.au/chromas14x.html>).

-Le logiciel BioEdit permet d'assembler les séquences et de reconstituer une séquence consensus. (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

### II. 3. 3. Recherche de similarités

Le recherche de similarités entre la séquence d'ADNr 16S et une banque d'ADN (GenBank) se fait par l'intermédiaire du programme BLAST (Basic Local Alignment Tool), (Altschul *et al.* 1990) disponible sur les sites <http://www.ch.embnet.org/software/aBLAST.html> ou <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Le but de cette étape est d'affilier l'isolat étudié à un groupe taxinomique.

Les séquences ayant une similarité supérieure à 97% sont considérées comme étant identifiées au genre. Les séquences présentant une similarité inférieure à 97% à une séquence de souche type présente dans les banques sont à nouveau séquencées afin d'obtenir une séquence quasi-complète du gène ribosomique 16S (1500 pb) en utilisant les amorces S8 et 907RC. L'identification bactérienne est fondée sur le rapprochement de la séquence étudiée à la séquence de la souche type la plus proche représentant l'espèce. Il est admis qu'en dessous de 97% de similarité (pour le gène 16S entier), deux bactéries ne peuvent appartenir à la même espèce. Si le pourcentage de similarité est supérieur à 97%, en toute rigueur, le placement de deux souches dans une même espèce ou pas repose sur les résultats de l'hybridation ADN/ADN qui doit être au moins de 70% et une valeur de  $\Delta T_m$  inférieure ou égale à 5°C (Stackebrandt et Goebel 1994).

### II. 3. 4. Soumission des séquences à GenBank

#### 1. Soumission simple

Cette soumission en ligne (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/index.html>) est utilisée pour une soumission d'une ou quelques séquences. Les numéros d'accèsion sont envoyés sous deux jours via l'e-mail.

#### 2. Soumission multiple

Le logiciel Sequin (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/index.html>) a été développé par le NCBI (National Center for Biotechnology Information). Il permet la soumission multiple de séquences (et leur mise à jour) aux banques GenBank, EMBL ou DDBJ. Les séquences doivent être importées dans le logiciel Sequin sous format Fasta dans un fichier texte (format ASCII). Une fois le fichier Sequin créé, il suffit de l'envoyer via l'e-mail au NCBI qui gère la



banque de séquences GenBank. Les numéros d'accèsion sont ensuite envoyés sous 2 jours via l'e-mail.

### **II. 3. 5. Construction d'arbres phylogénétiques**

Les méthodes d'analyse phylogénétique cherchent à établir les relations phylogénétiques entre organismes, à partir de l'information contenue dans les acides nucléiques. Les arbres phylogénétiques sont une représentation des résultats obtenus. Le principe de l'analyse phylogénétique est le suivant : plus le nombre de substitutions entre deux séquences est élevé, plus la probabilité que ces deux séquences aient un ancêtre commun est faible. Les différentes méthodes visent donc à évaluer les divergences entre plusieurs séquences par observations de substitutions, et à reconstituer les liens généalogiques.

#### **II. 3. 5. 1. Alignement des séquences par CLUSTAL W**

Toutes les séquences sont comparées deux à deux, afin de déterminer pour chacune les distances d'évolution qui la séparent des autres. La matrice de distance correspond aux nombres de différences entre deux séquences, pour tous les couples possibles. Cette opération permet de définir quelles paires de séquences sont les plus proches. Cette étape permet de récupérer un fichier de séquences alignées. Ce logiciel est disponible sur le site <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>.

#### **II. 3. 5. 2. Correction manuelle de l'alignement sous le logiciel SEAVIEW**

Le manipulateur va ensuite vérifier manuellement l'alignement des séquences par le logiciel SEAVIEW. Le manipulateur peut interpréter des substitutions de manière différente et définir les zones où les substitutions sont réellement informatives. Il est également nécessaire d'avoir une vision critique par rapport aux substitutions qui correspondent à des erreurs de séquençages. Ce travail de remaniement de l'alignement s'effectue sous le logiciel SEAVIEW. Ce logiciel est disponible sur le site du pôle Bio-Informatique lyonnais de l'Université de Lyon 1 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>).

### II. 3. 5. 3. Les méthodes de construction d'arbres phylogénétiques

Un arbre phylogénétique présente les relations d'évolution entre les organismes. A chaque nœud correspond un regroupement de plusieurs organismes qui forment alors une unité taxinomique ou taxon. Les branches illustrent leurs relations généalogiques. Les longueurs des branches peuvent être proportionnelles à la distance d'évolution entre les organismes.

A partir du fichier de séquences alignées, des arbres phylogénétiques sont générés par différentes méthodes de construction dans le logiciel PHYLO-WIN disponible sur le site du pôle Bio-Informatique lyonnais de l'Université de Lyon 1 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/phylowin.html>) (Galtier *et al.* 1996). Les topologies d'arbres obtenues avec les différentes méthodes doivent être cohérentes et conduire à un arbre consensus. Certaines méthodes de construction d'arbres phylogénétiques génèrent leur propre matrice de distance. Différentes méthodes de calcul des distances sont disponibles sous PHYLO-WIN : Jukes & Cantor, Tajima et Nei, Kimura et Galtier & Gouy. Dans nos analyses, nous avons choisi la méthode de calcul des distances de Kimura à deux paramètres. Cette méthode est assez semblable à celle de Jukes & Cantor. Ces deux méthodes donnent des résultats satisfaisants avec des séquences dont le niveau de divergence est limité. La méthode de Kimura autorise que les transitions (purine-purine (A, G) ou pyrimidine-pyrimidine (C, T) se produisent à des taux plus élevées que les transversions (purine-pyrimidine). La méthode de Jukes & Cantor suppose que tous les nucléotides aient la même probabilité de se substituer.

Les méthodes de construction d'arbres choisies sont les suivantes :

- ✓ Le principe du 'neighbor joining' (ou matrice de distance) est de trouver les paires de séquences voisines qui minimisent la somme des longueurs des branches à chaque étape de regroupement. Cette méthode est une méthode de distance. Le calcul des distances est basé sur le nombre moyen de substitution par nucléotide. Cette méthode réduit l'information en travaillant sur des distances par paires (Saitou et Nei 1987).
- ✓ Le méthode du maximum de vraisemblance ('maximum likelihood') calcule pour chaque arbre et pour chaque position dans l'alignement, la probabilité de substitution (Olsen *et al.* 1994). L'arbre retenu sera le plus 'vraisemblable' c'est à dire celui dont les valeurs de longueur des branches maximise sa vraisemblance, par étude de ce critère à chaque étape de construction. L'algorithme utilisé est fastDNaml (Olsen *et*

*al.* 1994). Cette méthode nécessite des temps de calculs beaucoup plus importants que les précédentes.

La méthode d'analyse par échantillonnage ou méthode du 'bootstrap' permet d'évaluer la robustesse de chaque embranchement, en donnant une mesure statistique de la confiance qui peut lui être attribuée (Felsenstein 1985). L'échantillonnage redistribue les sites de façon aléatoire et crée différentes matrices partielles de données. A chaque nouvelle matrice correspond une nouvelle topologie d'arbre. La valeur du bootstrap d'un embranchement correspond à sa fréquence d'obtention sur les différentes topologies obtenues.

#### **II. 3. 5. 4. Visualisation des arbres, éditions et impressions**

Les arbres sont ensuite visualisés via l'utilisation du logiciel NJPLOT (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>). Les arbres peuvent être ensuite manipulés et copiés.

## **II. 4. ETUDE DE CARACTERES PHYSIOLOGIQUES DES SOUCHES DE LA COLLECTION**

### **II. 4. 1. Détermination des courbes de croissance des souches**

Les tests d'hydrophobicité et de résistance vis à vis des radiations solaires nécessitent de connaître précisément le temps que mettent les souches pour atteindre leur phase stationnaire. En effet, ce sont des souches en début de phase stationnaire qui seront soumises à ces différents tests.

Pour déterminer la courbe de croissance de chacune des souches de la collection, nous avons utilisé un lecteur de microplaques 96 puits (station Biolog) couplé au logiciel SOFTmax Pro. Dix  $\mu$ l de culture en phase stationnaire sont inoculées en triplicat dans 200  $\mu$ l de Marine Broth (cf annexe 2), la croissance est suivie pendant plusieurs jours avec une lecture d'absorbance (à 590 nm) toutes les 2 h.

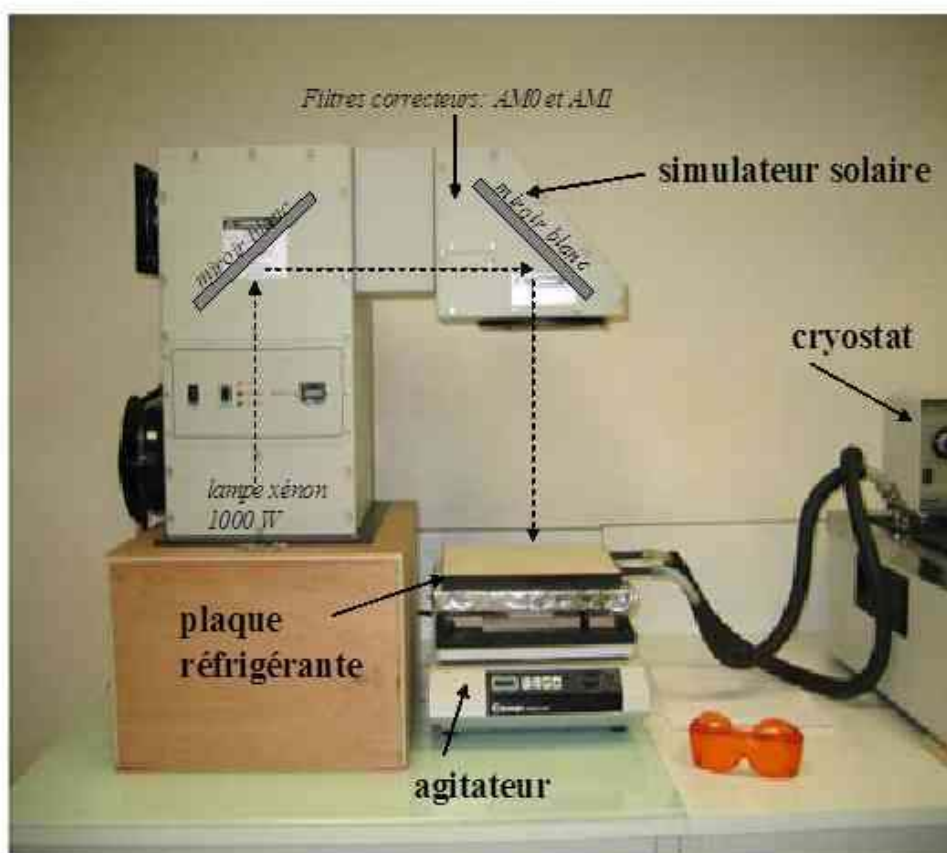
### **II. 4. 2. Détermination de l'hydrophobicité des isolats : le test d'adhésion microbienne aux hydrocarbures**

Le caractère hydrophobe ou hydrophile de la surface des bactéries peut être déterminé à partir de l'adhésion des cellules à un solvant comme décrit par Rosenberg et al. (1980, 1984) : c'est la méthode BATH (Bacterial Adhesion To Hydrocarbons). Un volume de suspension cellulaire est mélangé vigoureusement avec un volume d'hydrocarbure (protocole détaillé ci-après). Lors de l'agitation, le solvant se répartit en très fines gouttelettes auxquelles adhèrent les cellules hydrophobes. En conséquence, les cellules, selon leur hydrophobicité, restent dans la phase aqueuse ou se répartissent au niveau de l'interface liquide-solvant, ou encore dans la phase organique. La quantité de cellules hydrophobes est obtenue par différence entre la concentration cellulaire de la phase aqueuse après et avant agitation. Les résultats sont alors exprimés en pourcentage de bactéries fixées sur l'hydrocarbure par rapport à la suspension cellulaire de départ. Le protocole utilisé est celui de Gibbons et Etherden (1983). Selon ces auteurs, les bactéries sont considérées comme très hydrophiles si le pourcentage est compris entre 0 et 20 % et très hydrophobes si le pourcentage est compris entre 80 et 100 %.

Le protocole est le suivant (opération effectuée en triplicat pour chacune de souches):

- centrifuger une suspension cellulaire (début de phase stationnaire) à 5000 g pendant 5 min ;
- rincer le culot dans de l'eau de mer filtrée et autoclavée ;
- renouveler cette opération une fois ;
- déterminer la densité optique à 600 nm de cette suspension (a) ;
- ajouter 400 µl de n-hexadecane (Sigma) à 3 ml de suspension cellulaire ;
- mélanger les 2 phases au moyen d'un vortex pendant 2 périodes de 30 sec avec une pause de 5 sec entre les deux périodes.
- incuber à 25°C pendant 20 min ;
- récupérer la phase aqueuse et déterminer sa densité optique à 600 nm (b) ;
- déterminer le pourcentage d'hydrophobicité suivant la formule :  $(a-b)/a * 100$

Pour les souches présentant une croissance en milieu liquide sous forme de biofilms, d'agrégats ou de flocs, c'est sur le surnageant que j'ai effectué le test BATH. Les cellules non désagrégées ne sont donc pas prises en compte dans la détermination de l'hydrophobicité. Il est à noter que les tubes utilisés dans ce protocole doivent présenter les mêmes caractéristiques (diamètre et longueur des tubes) pour pouvoir ainsi obtenir des résultats reproductibles (Gibbons et Etherden 1983).



**Figure 4** : Photographie du dispositif expérimental utilisé dans les tests de résistance des souches vis à vis des radiations solaires

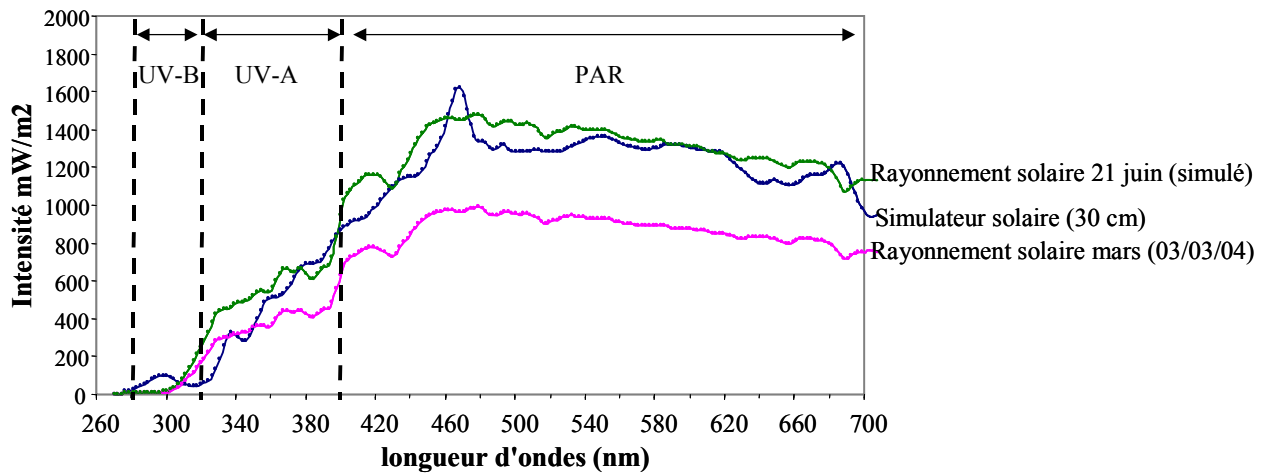
## II. 5. DETERMINATION DE LA RESISTANCE DES SOUCHES AUX RADIATIONS SOLAIRES

### II. 5. 1. Dispositif expérimental

L'étude du rayonnement solaire sur la croissance cellulaire bactérienne est réalisée à partir d'un suivi de croissance de souches exposées au simulateur solaire. Les cellules sont prises en début de phase stationnaire de croissance et sont ensuite exposées à différentes conditions lumineuses. Un échantillon de contrôle est maintenu à l'obscurité.

L'exposition des cellules bactériennes est réalisée au laboratoire au moyen d'un simulateur solaire 1000 W équipé d'une lampe xénon (Lot-Oriel, France) (**Figure 4**, ci-contre). Cette source lumineuse assure, par l'utilisation de deux filtres correcteurs (AM0 et AM1), une illumination dans les UV-B, les UV-A et le visible, identique à celle du rayonnement solaire à la surface de la terre.

Pour une surface d'exposition de 20 cm x 20 cm (équivalent à 2 microplaques de 24 puits), la distance entre la source lumineuse et les échantillons est de 30 cm et la puissance délivrée est de 310 W/m<sup>2</sup>. La distance de 30 cm a été calculée de façon à avoir une intensité équivalente à un midi solaire à Banyuls (**Figure 5**, page suivante). L'intensité reçue au niveau des microplaques des UV-A, UV-B et PAR (Photosynthetically Active Radiation) sont respectivement 40, 1,2 et 352 W/m<sup>2</sup> (**Tableau 4**, page suivante). Les échantillons sont maintenus en agitation en les plaçant sur un plateau avec une agitation orbitale. La température des échantillons est maintenue à 20-25°C grâce à une plaque réfrigérante placée sur le plateau agitateur et reliée à un cryothermostat ministat (Roucaire, France). La température de la salle est maintenue durant toutes les expositions à 25°C grâce à l'utilisation d'un climatiseur.



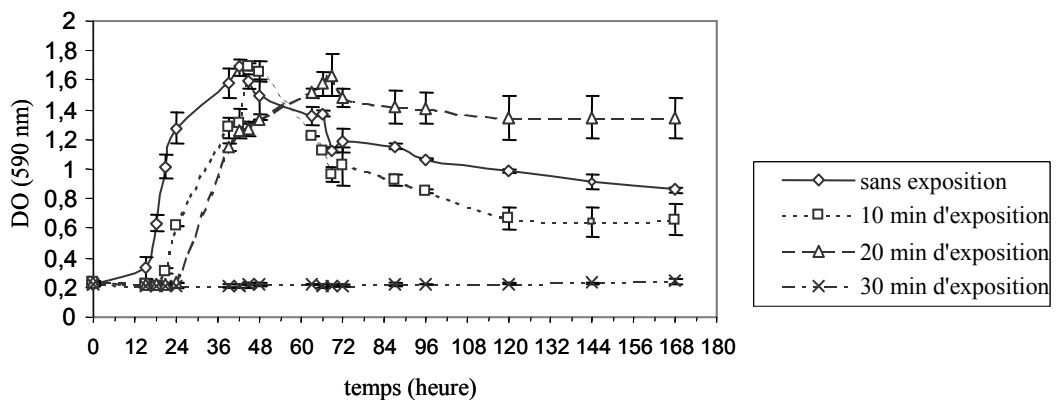
**Figure 5 :** Spectre de longueurs d'onde du simulateur solaire, du rayonnement solaire mesuré le 3 mars 2004 à Banyuls-sur-Mer et du rayonnement solaire simulé pour un 21 juin (PAR : Photosynthetically Active Radiation). Ces mesures ont été effectuées à l'aide d'un radiomètre hyperspectral UV/visible RAMSES-ACC (TriOS Optical Sensors, All.) mesurant tous les 0,2 nm (bande passante 280-720 nm).

**Tableau 4 :** Intensités et doses respectives mesurées de la PAR, des UV-A et des UV-B des radiations solaires naturelles mesurées le 21 juin 2003 à 14h à Banyuls-sur-Mer et des radiations solaires simulées par le simulateur solaire à 30 cm. Le pourcentage de dose horaire simulée par rapport à une dose journalière naturelle est précisé. Ces mesures ont été effectuées à l'aide d'un spectro-radiomètre ELDONET (European Light Dosimeter Network) à large bande (Hader *et al.* 1999).

	PAR (400-700 nm)	UV-A (320-400 nm)	UV-B (280-320 nm)
<b>Radiations solaires naturelles</b>			
Intensités d'un midi solaire	452 W/m <sup>2</sup>	72 W/m <sup>2</sup>	1,7 W/m <sup>2</sup>
Dose journalière	13 440 KJ/m <sup>2</sup>	2 122 KJ/m <sup>2</sup>	43,5 KJ/m <sup>2</sup>
<b>Radiations solaires simulées</b>			
Intensités à 30 cm	352 W/m <sup>2</sup>	40 W/m <sup>2</sup>	1,2 W/m <sup>2</sup>
Dose horaire	1 267 KJ/m <sup>2</sup>	144 KJ/m <sup>2</sup>	4,32 KJ/m <sup>2</sup>
	9,4 %	6,8%	9,9 %



Les différentes durées d'expositions de la première série d'expérience ont été déterminées par l'exposition d'une souche de référence : *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 (Vancanneyt *et al.* 2001, Godoy *et al.* 2003). Cette ultramicrobactérie marine présente une grande résistance à différents stress tels que la température, l'éthanol, l'eau oxygénée et les UV B (Eguchi *et al.* 1996, Joux *et al.* 1999). Nous l'avons exposée à différents temps d'exposition afin de connaître la durée d'exposition provoquant une inhibition totale de croissance (**Figure 6**).

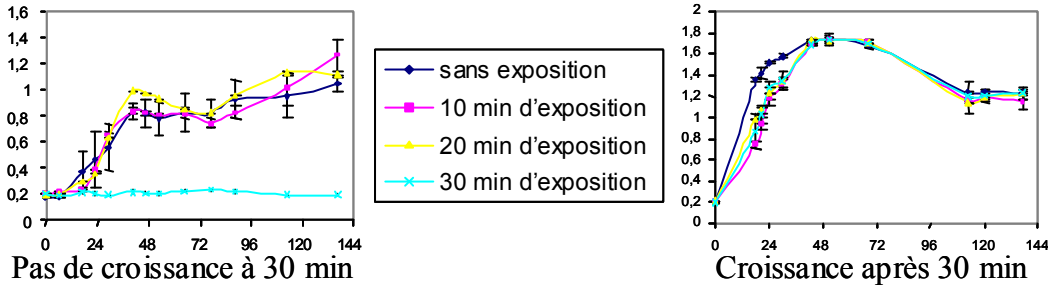


**Figure 6 :** Courbes de croissance de la souche de référence obtenues après différentes durées d'exposition au simulateur solaire

Au vu du comportement de la souche de référence vis à vis des radiations solaires (**Figure 6**), la première série d'expériences a été menée sur la collection de souches avec 3 durées d'exposition 10, 20, 30 min. Ces durées d'exposition n'ayant pas suffi à inhiber l'ensemble des souches testées, une deuxième série d'expérience a été menée (uniquement sur les souches résistantes à 30 min d'exposition) en utilisant des temps d'exposition de 1, 2 et 3 h. Enfin, une troisième série d'expériences a été menée sur les souches résistantes à 3 h d'exposition avec des temps d'exposition de 5 et 7 h (**Figure 7**, page suivante).

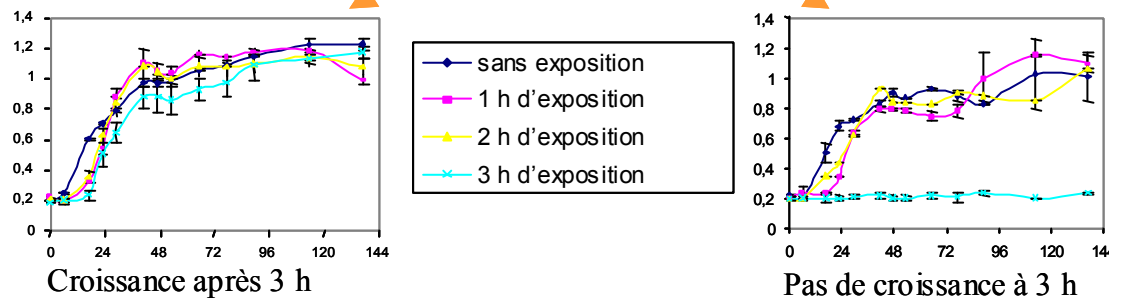
**Isolats de la microcouche de surface  
et de l'eau sous jacente**

**1<sup>ère</sup> série d'expériences: 3 durées d'exposition**



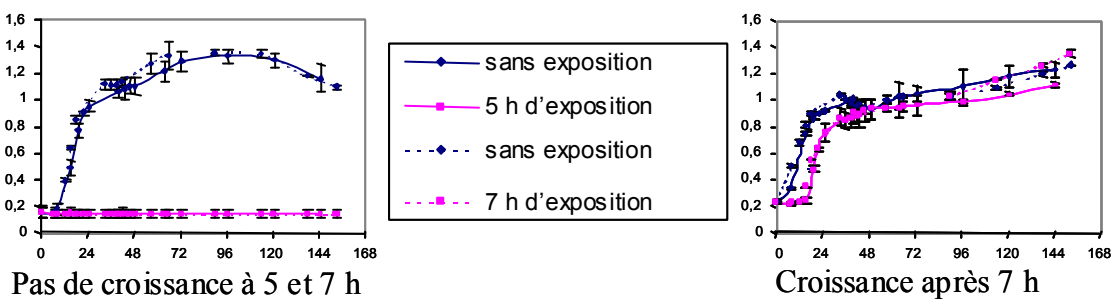
**Souches résistantes à 30 min**

**2<sup>ème</sup> série d'expériences:  
3 durées d'exposition**



**Souches résistantes à 3 h**

**3<sup>ème</sup> série d'expériences: 2 durées d'exposition**



**Figure 7 :** Schéma résumant les 3 séries d'expériences d'exposition des souches aux radiations solaires.

## II. 5. 2. Protocole expérimental

Le protocole expérimental est le suivant :

- Réaliser une préculture des souches dans du Marine Broth à 25°C sous agitation ;
- Centrifuger le bouillon cellulaire en début de phase stationnaire de croissance à 6000 g pendant 10 min ;
- Rincer le culot dans de l'eau de mer filtrée et autoclavée ;
- Renouveler cette opération une fois ;
- Déterminer la concentration cellulaire de chacune des suspensions bactériennes par cytométrie en flux (FACScan, Becton Dickinson) : chaque suspension est diluée au 1/1000, fixée au formol (2% concentration finale), puis marquée par un fluorochrome 15 min (SYBR Green I, concentration finale 0.01% de la solution commerciale, Molecular Probes Inc.) ;
- Inoculer dans chacun des puits d'une microplaque de 24 puits, 1 ml de suspension cellulaire à une concentration de  $10^4$  cellules/ml. Chaque souche est inoculée en duplicat et un contrôle de contamination est également inoculé en duplicat pour chaque microplaque ;
- Exposer les microplaques au simulateur solaire ;
- Rajouter dans chaque puit, après chaque exposition au simulateur solaire, 1 ml de milieu de culture concentré 2X (Marine Broth) ;
- Suivre, pour chacune des microplaques la croissance via la mesure de la densité optique à 590 nm, pendant 6 jours avec un lecteur de microplaques (FLUOstar Optima, BMG Labtechnology).



## **CHAPITRE III**

### III. COMPARAISON DE DIFFERENTS ECHANTILLONNEURS POUR LA CARACTERISATION BIOLOGIQUE DE LA MICROCOUCHE DE SURFACE

Ce chapitre est présenté sous forme d'une publication acceptée à *Limnology and Oceanography : Methods* (<http://aslo.org/lomethods/free/2004/index.html>). Elle est intitulée **Comparison of samplers for the biological characterization of the sea surface microlayer** (*Limnol. Oceanog.: Methods*. 2004. 2: 213-225).

#### Contexte de l'étude

Le prélèvement de la microcouche de surface constitue une première limite méthodologique. Les méthodes classiques de prélèvement d'eau de mer sont, en effet, inadaptées à l'échantillonnage de la microcouche de surface du fait de sa structure particulière. Ainsi, de nombreux échantillonneurs ont été élaborés afin de collecter les premiers  $\mu\text{m}$  de la surface des océans. Plus de 20 techniques différentes ont été utilisées, chacune possédant ses propres avantages et inconvénients (Hühnerfuss 1981a, b, Carlson 1982, Hardy 1982). Les échantillonneurs de microcouche de surface diffèrent par leur principe physique de prélèvement et par l'épaisseur de microcouche prélevée (cf. tableau 1 du chapitre I).

Afin de caractériser d'un point de vue biologique et chimique la microcouche de surface, il est donc nécessaire de choisir l'échantillonneur le plus adapté aux paramètres étudiés et donc de connaître les performances de chaque méthode d'échantillonnage. De nombreuses études de comparaison d'échantillonneurs ont été effectuées en laboratoire (Hatcher et Parker 1974, Ledet et Laseter 1974, Van Vleet et Williams 1980, Li *et al.* 1998). Cependant, ces expériences en laboratoire ont de nombreuses limites (Garrett 1974). Dans la majorité des cas, la microcouche de surface est recrée d'une manière artificielle par la constitution d'une monocouche de lipides ou d'hydrocarbures qui lui assure une stabilité et une épaisseur constantes (Hatcher et Parker 1974, Larsson *et al.* 1974, Ledet et Laseter 1974), ce qui est loin d'être le cas en milieu naturel. Ainsi, ces films artificiels sont peu représentatifs de la composition et de la structure d'une microcouche « naturelle ». La performance d'un échantillonneur déterminée en laboratoire est difficilement transposable au milieu naturel. A

partir de ces expériences en laboratoire, il est effectivement difficile de conclure quant à l'efficacité réelle de prélèvement d'un échantillonneur donné.

Les études comparatives d'échantillonneurs sur le terrain sont peu nombreuses et souvent restreintes à quelques paramètres chimiques et/ou biologiques (Harvey et Burzell 1972, Daumas *et al.* 1976, Kjelleberg *et al.* 1979, Carlson 1982, Li *et al.* 1998, Falkowska 1999a, b). Les échantillonneurs révèlent des compositions biologiques et chimiques différentes (Carlson 1982). Les résultats obtenus par les différentes méthodes d'échantillonnages sont donc difficilement comparables. De plus, la plupart de ces études s'intéressent uniquement à un compartiment biologique de la microcouche (le bactérioneuston ou le phytoneuston) ou encore certains paramètres chimiques comme les polluants, mais rarement à une large variété de paramètres.

Dans le but de comparer l'efficacité, en terme d'échantillonnage biologique, des échantillonneurs de microcouche de surface les plus utilisés en conditions naturelles, nous avons dans le cadre du projet européen AIRWIN, réalisé plusieurs campagnes d'échantillonnage à Barcelone et à Banyuls-sur-Mer. Au final, dans cette analyse, nous avons retenu et analysé les données de terrain des deux principaux échantillonneurs utilisés : le tamis en métal et la plaque de verre. L'étude a consisté à rassembler toutes les données biologiques issues de ces deux échantillonneurs et à les comparer statistiquement. Les données de la microcouche ont été confrontées à celles de l'eau sous-jacente, prélevée à 50 cm de profondeur. Nous avons également évalué le biais possible des échantillonneurs dans la collecte de certains paramètres biologiques. De plus, un travail distinct a été effectué sur un type d'échantillonneur particulier souvent utilisé pour l'analyse du bactérioneuston : les membranes hydrophobes et hydrophiles. L'efficacité des deux types de membranes dans la collecte des paramètres bactériens (bactéries totales et cultivables) a également été estimée.

Au sein du projet européen AIRWIN et parallèlement à cette étude, la comparaison des échantillonneurs de la microcouche a été effectuée d'un point de vue chimique en étudiant notamment les acides gras, les acides aminés et les carbohydrates (Monzikoff *et al.*) et les polluants à travers l'étude des HAP (Guitart *et al.*) et celle des PCB (Garcia-Flor *et al.*). Dans tous ces travaux, le tamis en métal est l'échantillonneur le plus approprié.

## Comparison of samplers for the biological characterization of the sea surface microlayer

*Hélène Agogue<sup>1</sup>, Emilio O. Casamayor<sup>1a</sup>, Fabien Joux<sup>1</sup>, Ingrid Obernosterer<sup>1</sup>, Christine Dupuy<sup>2</sup>, François Lantoiné<sup>1</sup>, Philippe Catala<sup>1</sup>, Markus G. Weinbauer<sup>3b</sup>, Thomas Reinthaler<sup>3</sup>, Gerhard J. Herndl<sup>3</sup> and Philippe Lebaron<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>Observatoire Océanologique, Université Pierre et Marie Curie, UMR 7621-INSU-CNRS, BP44, 66651 Banyuls-sur-Mer Cedex, France.

<sup>2</sup>Université de La Rochelle, Pôle Sciences, LBEM, EA 3168, Av. Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France.

<sup>3</sup>Department of Biological Oceanography, Royal Netherlands Institute for Sea Research (NIOZ), P. O. Box 59, 1790 AB Den Burg, The Netherlands.

<sup>a</sup> Present address : Centro de Estudios Avanzados de Blanes-CSIC. Acc. Cala Sant Francesc, 14. E-17300 Blanes, Spain.

<sup>b</sup> Present address : Observatoire Océanologique, Université Pierre et Marie Curie, CNRS UMR 7093, BP 28, 06234 Villefranche-sur-Mer Cedex, France.

### ***Acknowledgements:***

This work was supported by the European Commission (Research Directorate General-Environment Program-Marine Ecosystems) through the AIRWIN project “Structure and role of biological communities involved in the transport and transformation of persistent pollutants at the marine AIR-Water Interface” (contract EVK3-CT2000-00030). The AIRWIN project is part of the EC IMPACTS cluster. We thank Frédérique François-Carcaillet for helpful comments on statistical analysis and Danielle Boissé for language improvements. We are also grateful to the two anonymous reviewers for valuable comments on a previous version of the manuscript.

Running title : Sea surface microlayer sampling and biology

---

Corresponding author : E-mail : lebaron@obs-banyuls.fr



***Abstract***

The surface film of the hydrosphere covers more than 70% of the world's surface. The sea surface microlayer (SML) or "skin" of the ocean is a sink for natural and anthropogenic material originating from the atmosphere and the water column. Organisms living in this SML are called "neuston" and our knowledge of the biology of the SML is still in its infancy. Research of the sea surface microlayer requires the use of appropriate sampling techniques and strategies and the question of what is the most suitable device has not yet been answered. In the present study, we have compared the efficiency of the Harvey glass plate (GP) and the Garrett metal screen (MS) to analyse a wide range of microbiological parameters in SML samples collected at two coastal stations in the NW Mediterranean Sea. Two types of membranes (Teflon and polycarbonate) were also used to collect bacterioneuston.

The MS was the most appropriate technique for most biological parameters providing higher enrichment factors as compared to the GP and therefore, the highest enrichment factors compared to underlying waters (UW). Control experiments with UW demonstrated that the enrichment reported for the MS was not biased by any selectivity of the sampler itself. Therefore, we recommend the use of the MS when the aim is to compare different biological parameters. In contrast, there is a clear evidence that hydrophobic and hydrophilic membranes have an important drawback and should not be used for quantification purposes.

## **Introduction**

The sea-surface microlayer (SML) is generally defined as the uppermost millimeter of the ocean (Liss and Duce 1997), however, most processes at the air-sea interface occur over gradients of varying thickness. It is now well recognized that physical, chemical and biological processes are distinctly different in the SML as compared to underlying waters (UW) (for an exhaustive review, see Liss and Duce 1997). The primary interest in the structure and function of the SML is based on its crucial role in exchange processes of gases and matter across the air-water interface. In the oceanic environment, the primary source of surface-active material is phytoplankton primary production (Zutic et al. 1981), while in coastal systems terrestrially-derived material can also significantly contribute to the formation of distinct surface layers. Localized concentrations of surface active material, so-called “slicks”, are limited to low wind speed ( $< 3$  m/s) (Liss and Duce 1997), however, significant accumulation of organic matter at the air-sea interface occurs also in the absence of slicks (Williams et al. 1986). Sea surface observations by optical imagery indicate that surface films are a frequent phenomenon, covering large areas of the coastal and open ocean (Kaltenbach 1984; Romano 1996).

Since the discovery of surface-dwelling organisms designated as « neuston » by Naumann (1917), the term neuston is commonly used to define all organisms associated with the SML, including microscopic and macroscopic organisms (Welch 1935). Intensive ecological studies of neuston as a specific community started in 1959 when Zaitsev described marine neuston in the Black Sea (Zaitsev 1971). Up until now, bacterioneuston were considered to be the smallest organisms of the neuston community but this community should be extended to virioneuston since viruses may also be present in the SML.

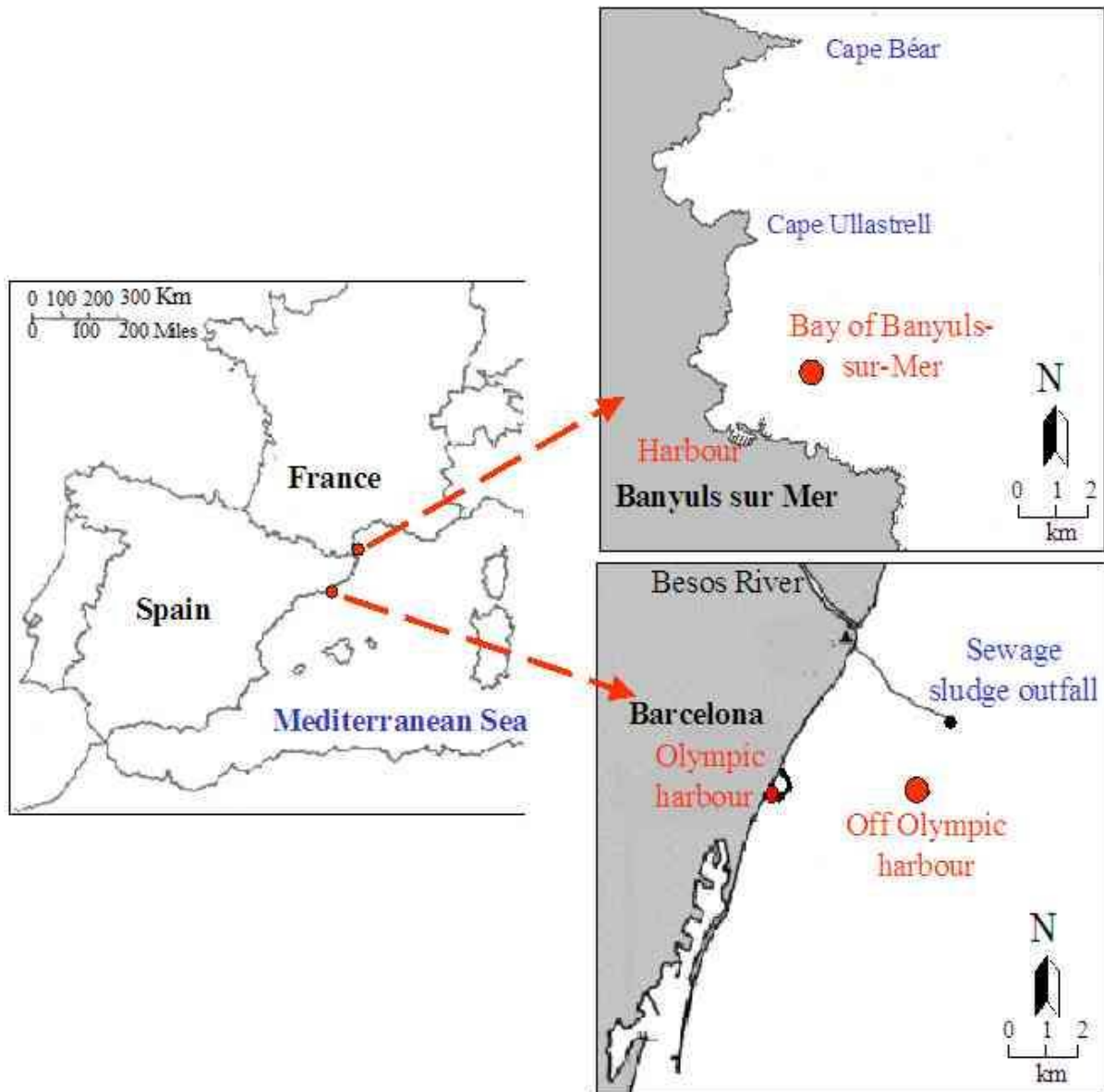
Our knowledge on the biology of the SML, however, is still in its infancy. On the one hand, organisms present in the SML may have developed life strategies to survive in this habitat exposed to intense solar radiation, high temperature and/or salinity gradients, toxic organic substances and heavy metals (Liss and Duce 1997). On the other hand, the SML is generally enriched in organic material and this might fuel bacterial growth and the development of microbial food webs. However, the role of microorganisms in the SML is still unclear and it is a controversial matter. Although higher abundances of microorganisms are frequently reported for the SML as compared to UW, lower microbial abundances are also reported for the SML (Marumo et al. 1971; Bell and Albright 1982). This variability in microbial abundances reported in the literature might be related to the use of different

sampling devices to collect the SML and/or to natural ecological variability of the enrichment (Hardy 1997).

One of the challenges in neustonology is the sampling strategy. The most common samplers are the metal screen (Garrett 1965), the glass plate (Harvey and Burzell 1972), the rotating drum (Harvey 1966; Hardy et al. 1988), the Teflon plate (Larsson et al. 1974) and the tray (Hatcher and Parker 1974). Among these, the metal screen (MS), the glass plate (GP) and the rotating drum (RD) are the most commonly used. The thickness of the SML collected with the MS varies between 250-440  $\mu\text{m}$  (Daumas et al. 1976). In contrast, the GP collects a microlayer of 60-100  $\mu\text{m}$  adhered to both sides of the plate (Harvey and Burzell 1972). GP and RD have been compared for abiotic SML components such as oil and metals and no significant differences were found between samplers (Hardy et al. 1988). These two devices sampled, on average 50-70  $\mu\text{m}$  of the SML in the same way, i.e., using viscosity and adhesion forces (Hardy et al. 1988). Hydrophilic (e.g., polycarbonate) and hydrophobic (e.g., Teflon) membranes are also used and the SML thickness collected with these membranes is in the range of 1 to 40  $\mu\text{m}$  (Kjelleberg et al. 1979). Using these membranes, many authors have suggested that bacterioneuston tend to be concentrated in the uppermost 1  $\mu\text{m}$  (Norkrans 1980; Hermansson 1990).

Field studies comparing the efficiency of different sampling devices on given SML parameters are relatively scarce (Daumas et al. 1976; Carlson 1982; Falkowska 1999a, b). In fact, the question of the most suitable method of sampling the SML is far from being answered. To determine the influence of the type of sampler on SML enrichment factors, one should compare data of several types of samplers used simultaneously. However, the higher the number of parameters to be analyzed and, therefore, the volume to be collected the greater the impact of spatial and temporal SML heterogeneity on the final results. Indeed, the SML in natural environment is patchy (Hardy and Apts 1984) and submitted to temporal variations at a given site (Carlucci et al. 1992).

The aim of this study was to compare the performance of two SML sampling devices, the GP and the MS, respectively for a large set of biological parameters. In addition, we used two types of membranes to compare their efficiency for specific bacterial parameters. The intercomparison was carried out in the Mediterranean Sea at one coastal oligotrophic site (Bay of Banyuls-sur-Mer, France) and at an eutrophic, heavily human-impacted coastal station (off Barcelona, Spain). The results for the SML with the different sampling devices are compared with those from UW (i.e., 50 cm below the surface) and are expressed as enrichment factors.



**Fig 1.** Map of the 2 sampling sites in the NW Mediterranean Sea as indicated by dots

## ***Materials and Procedures***

### Field sites and sample collection

Samples were collected at two coastal stations in the NW Mediterranean Sea: the Bay of Banyuls-sur-Mer (France) and off the Olympic Harbour in Barcelona (Spain) (Figure 1). The Bay of Banyuls-sur-Mer is oligotrophic (Médernach et al. 2001; Grémare et al. 2003). The Barcelona site is moderately eutrophic and heavily impacted by the urban sewage sludge outfall (Bayona et al. 1991; Chalaux et al. 1994). Samples were collected early in the morning around 4-5 h during four field campaigns (March 2001, September 2001, March 2002 and June-July 2002). Samples were taken from an inflatable boat and the abundance, biomass and activity of heterotrophic and autotrophic microorganisms were determined in the SML and UW as described below.

At each site, 20 L of the SML were simultaneously collected by metal screens (MS) and glass plates (GP). The MS consists of a stainless steel screen (mesh size: 1.25 mm, wire diameter: 0.36 mm) stretched over a 60x80 cm steel frame (Garrett 1965; Daumas et al. 1976). The MS was lowered vertically through the surface of the water then oriented horizontally and lifted through the SML. To collect 20 L, about 200-250 successive samplings (~ 2 h) were carried out (Hühnerfuss 1981a, b). The GP (500x250x4 mm) thoroughly cleaned with ethanol and Milli-Q water, was vertically introduced across the SML and withdrawn vertically (Harvey and Burzell 1972). The excess water was allowed to drain for about 20 s by holding the GP in a vertical position and the water adhering to the plate was subsequently removed from both sides of the GP with a Teflon wiper blade. About 1 L was collected within one hour for each GP sampler. Samples from UW were collected by submerging a polycarbonate (PC) bottle and opening it at a 0.5 m depth.

During periods when the windforce was below 3 m/s, the SML was also sampled with membranes which were allowed to float on the surface of the water for 1 min. Two types of membranes were used for the sampling: a hydrophilic polycarbonate membrane (diameter = 47 mm, 0.22 µm pore size, Isopore Membrane Filter, Millipore) and a hydrophobic Teflon membrane (diameter = 47 mm, 0.22 µm pore size, Fisher Bioblock Scientific). The membranes imbibed in the sea-surface film were retrieved with forceps and transferred to sterile flasks filled with 20 ml of 0.22 µm filter-sterilized seawater. A total of six membranes were placed in each flask. Tween 80 (2% final concentration) was added and the flasks were shaken vigorously for 5 min. Tween 80 was used as a washing agent to detach the microorganisms from the membrane (Norkrans and Sörensson 1977; Kjelleberg et al. 1979;

Dahlbäck et al. 1981). Five independent samplings with 3 sets of 6 membranes each were carried out. To estimate both dilution factors and final concentrations for each parameter analyzed, we used the mean volume collected per membrane calculated by differential weighting. The SML thickness sampled was determined by dividing the mean volume collected by the membrane, by the membrane area.

Enrichment factors ( $EF$ ) were calculated as the ratio of the biological parameters in the SML to those in UW. An  $EF > 1.0$  indicates an enrichment in the SML, an  $EF < 1.0$  indicates a depletion.

#### Experiment to determine the potential selectivity of the sampling devices

Samplers might have inherent properties, which could lead to biases such as selectivity in adsorbing microorganisms to the collecting surface. To test the inherent properties of the samplers used, 3 independent experiments were carried out in the Bay of Banyuls-sur-Mer over a diurnal cycle. Therefore, water was pumped from 1 m depth at 900 h, 1400 h, 1700 h local time and transferred to 2 polycarbonate containers (110x70x60 cm) of 400 L each. The water was homogenized and immediately sampled from the containers by the MS (for the first container) and the GP (for the second container). The water in the polycarbonate containers was homogenized during the sampling. Controls consisted of water sampled with a 500 ml PC bottle submerged to 0.5 m in the containers. Five replicate samples were collected for all parameters analyzed.

A second set of control experiments was also carried out for the two types of membranes. During 5 independent field campaigns, UW were sampled with a PC bottle and transferred to a 4 L incubator. Subsequently, bacteria were sampled from UW using Teflon and polycarbonate membranes as described above. The results were compared with standard bottle sampling.

#### Enumeration of the autotrophic and heterotrophic microbial community

Samples (3 ml) for flow cytometry analyses of both heterotrophic and autotrophic bacteria and photosynthetic eukaryotes were fixed with formaldehyde (2% final concentration) in cryotubes. The samples were left at room temperature for 10-15 min, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. The samples were run through a flow cytometer (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA) equipped with a 488 nm, 15 mW Argon laser. Phytoplankton cells were discriminated and counted according to Legendre et al. (2001) and Marie et al. (2000). The phycobilins of the cyanobacteria *Synechococcus* emit

strong orange fluorescence and were distinguished from the red fluorescence of the chlorophyll. The two groups of microbial photosynthetic eukaryotes (i. e. picoeukaryotes and nanoeukaryotes) were discriminated by their scatter signals and the facts that red fluorescence from their chlorophyll was more intense than that of *Synechococcus*.

Heterotrophic bacteria were stained with a nucleic acid dye (SYBR-Green I; final concentration 0.01% [vol/vol] of the commercial solution; Molecular Probes, Inc. Eugene, Oregon) and stored for at least 15 min at room temperature in the dark before counting was carried out. Stained bacteria were discriminated and counted according to their right angle light scatter and the green fluorescence measured at 530/30 nm (Marie et al. 1997; 2000). Number of bacterial of bacterial cells with a high and low nucleic (HNA and LNA, respectively) content are determined according to Servais et al. (2003) and Lebaron et al. (2002).

#### Enumeration of culturable bacteria

Samples for culturable bacteria were processed within 4 h after sampling. Serial dilutions (1:10 and 1:100) were prepared with filter-sterilized seawater and 100 µl of each dilution was plated on 3 replicate plates on Marine Agar 2216 media (Difco). CFU (colony forming units) were counted after an incubation at 25°C in the dark for 1-2 weeks.

#### Enumeration of viruses

Samples (2 ml) were fixed with formaldehyde (2% final concentration) and filtered onto 0.02 µm filters (Whatman; Anodisc, 25 mm diameter). Viral particles were stained on the filters using SYBR-Green I (Molecular Probes Inc.) and enumerated under a Zeiss Axiophot microscope equipped for epifluorescence microscopy as previously described (Noble and Fuhrman 1998). At least 400 viral particles were counted per filter.

#### Enumeration of ciliates and flagellates

Ciliates and flagellates were fixed, stained and enumerated according to Dupuy et al. (1999). This method is a modified version of the method previously described by Haas (1982), Caron (1983) and Sherr et al. (1994). Briefly, for counting flagellates, triplicate 100 ml samples were preserved with formaldehyde (1% final concentration). Each sample was concentrated by filtration through 0.8 µm to a volume of 10 ml and subsequently stained with primulin (50 µg ml<sup>-1</sup> final concentration) and flagellate abundance was determined by epifluorescence microscopy. For ciliates, triplicate 1 L samples were stained alive for 10 min

by adding proflavin hemisulfate solution (0.00066% final concentration). Then, stained ciliates were preserved by adding glutaraldehyde (1% final concentration) and the cells were enumerated using a reverse epifluorescence microscope.

#### Bacterial production

Bacterial production was estimated from the rates of protein synthesis using [ $^{14}\text{C}$ ]L-leucine (Amersham, S.A. 319 mCi mmol $^{-1}$ ) (Simon and Azam 1989) or via [ $^3\text{H}$ ]-thymidine incorporation (Amersham, S.A. 85 Ci mmol $^{-1}$ ) (Fuhrman and Azam 1982). Duplicate samples and one formaldehyde-killed control were incubated with 20 nmol L $^{-1}$  of [ $^{14}\text{C}$ ]L-leucine or with [ $^3\text{H}$ ]-thymidine (final concentration). Five or 10 ml samples were incubated in the dark at *in situ* temperature for 0.5 to 1 h. Incubations were terminated by adding formaldehyde (2% final concentration). Subsequently, the samples were filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore HAWP filters followed by 3 rinses with 5 ml of ice-cold 5% trichloroacetic acid. The filters were subsequently dissolved in 1 ml ethyl acetate (Riedel de Haen) and after 10 min, 8 ml of scintillation cocktail (Insta-gel plus II, Canberra Packard) were added. The radioactivity of the filter was assessed after 18 h.

#### Pigments

Chlorophyll *a*, *b* and *c* and phaeophytin *a* were determined according to Neveux and Lantoiné (1993). Triplicate samples (200 ml) were passed through Whatman GF/F filters, which were immediately frozen in liquid nitrogen. Filters were extracted in acetone (90% final concentration). Extracts were kept at 4°C for 12 h and centrifuged before the absorbance of the supernatant was measured on a Perkin Elmer MPF66 spectrofluorometer (Neveux and Lantoiné 1993).

#### Population structure of the bacterial communities

Two genetic fingerprinting techniques were used to study the bacterial community structure, i.e., Denaturing Gel Gradient Electrophoresis (DGGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP).

For DGGE analysis, 10 ml of water sample were filtered through 0.2  $\mu\text{m}$  pore size filters (GTTP, Millipore) and the filters were processed according to Bernard et al. (2000). Twenty ml of lysed solution were used as template for PCR amplification of bacterial 16S rDNA. The forward primer 358f (CCTACGGGAGGCAGCAG) with a GC-clamp and the reverse primer 907r (CCGTCAATTCCTTTGAGTTT) were used following the protocol



described elsewhere (Casamayor et al. 2000). DGGE was performed with the DGGE-D-CODE system (BIORAD) at 200 V, 60°C for 3.5 h on a 6% polyacrylamide gel. The denaturing gradient in the gel was 20%-70% (100% denaturing agent is defined as 7 M urea and 40% deionized formamide). The gel was stained with SybrGold nucleic acid gel stain (1:10 000 dilution; Molecular Probes, Inc. Eugene, Oregon) in the dark for 20 min, rinsed with Milli-Q water and visualized under UV. Digitized images were obtained with a Pulnix TM-6EX camera, saved as computer files and analyzed with the NIH Image (National Institute of Health, Bethesda, Maryland) software. Bands occupying the same position in different lanes were identified using software facilities and one matrix with presence or absence data was built. A binary data set was used to calculate a similarity matrix using the Jaccard's coefficient with the software SYSTAT 5.2.1 for Macintosh, and a dendrogram was obtained by UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic averages) in cluster analysis (Casamayor et al. 2002).

For SSCP analysis, 50 ml of water sample were filtered through 0.2 µm pore size filters (GTTP, Millipore) and stored at -80°C. Filters were thawed and resuspended in 900 µl of lysis buffer (40 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8, 0.75 M sucrose). Lysozyme was added (1 mg ml<sup>-1</sup> final concentration) and the suspension was incubated at 37°C for 45 min. After addition of proteinase K (0.2 mg ml<sup>-1</sup> final concentration) and sodium dodecyl sulfate (1% final concentration), the samples were incubated at 55°C for 1 h. DNA was then extracted with an equal volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1, vol/vol/vol) and was precipitated by the addition of one-tenth of the volume of 3 M sodium acetate and two volumes of cold isopropanol followed by incubation at -20°C for 3 h. The DNA was recovered by centrifugation at 10000 x g for 30 min and the pellet was washed with cold 70% ethanol, dried, and resuspended in 20 µl of sterile Milli-Q water. For PCR amplification the bacterial primers W49 dir (*E. coli* position 331; 5'-ACG-GTC-CAG-ACT-CCT-ACG-GG-3') and W34 rev (*E. coli* position 533; 5'-TTA-CCG-CGG-CTG-CTG-GCA-C-3'; 5'-labeled with fluoresceine phosphoramidite TET, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) were used as reported elsewhere (Servais et al. 2003). For SSCP fingerprinting analysis, PCR products were heat denatured at 94°C for 5 min and immediately placed on ice for at least 10 min. A fluorescently-labeled internal size marker was added (Genescan-400 Rox, Applied Biosystems). The size standard contained a different fluorophore and permitted, after computing correction, a reliable comparison of patterns from each sample. SSCP electrophoresis was carried out as previously described (Servais et al. 2003) using the ABI

310 Genetic Analyzer equipped with a capillary tube (Applied Biosystems). Computer files were analyzed with the 310 Genescan Analysis software (Applied Biosystems).

#### Statistical analysis

To test statistical differences between results obtained with the MS and the GP, and between the SML and UW, the Wilcoxon signed rank test was applied (Scherrer 1984; Siegel and Castellan 1988; Zar 1999). The Wilcoxon signed rank test was chosen because of the non-parametric distributions of the parameters analyzed. To ensure valid statistical comparisons, the data of the sampler control experiment were analyzed using a Student's t test at the 99% confidence level.

**Table 1.** Analysis of underlying water sampled by the metal screen (MS) the glass plate (GP) and the polycarbonate (PC) bottle to test for possible adsorption artefacts introduced by the MS and the GP as compared to sampling with the PC. Values are means of 5 replicate samples. CV: coefficient of variation. \*, \*\*, \*\*\* indicate significance at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.005$ , respectively (Student's t-test), ND : not determined.

		900 h mean (CV %)	1400 h mean (CV %)	1700 h mean (CV %)
Total bacteria ( $\times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ )	MS	7.73 (7)	7.15 (10)	8.17 (3)
	GP	7.71 (3)	7.17 (10)	8.15 (4)
	PC bottle	7.46 (3)	5.41 (10)	7.69 (4)
Culturable bacteria ( $\times 10^2 \text{ ml}^{-1}$ )	MS	5.16 (22)	3.69 (5)	19.35 (36)
	GP	4.24 (3)	4.51 (27)	3.20 (33)
	PC bottle	2.85 (15)	3.14 (27)	4.85 (33)
Bacterial production ( leu pmol $\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	MS	31.60 (18)	34.10 (39)	45.56 (18)
	GP	39.91 (53)	23.44 (45)	50.63 (47)
	PC bottle	65.15 (24)	40.12 (35)	28.14 (37)
<i>Synechococcus</i> ( $10^4 \text{ ml}^{-1}$ )	MS	8.24 (2)	6.95 (1)	6.55 (1)
	GP	8.17 (2)	6.74 (4)	7.06 (1)
	PC bottle	7.85 (1)	6.88 (1)	6.64 (1)
Photosynthetic picoeukaryotes ( $10^3 \text{ ml}^{-1}$ )	MS	2.46 (4)	2.46 (4)	2.43 (3)
	GP	2.78 (1)	2.50 (3)	2.66 (5)
	PC bottle	2.83 (6)	2.72 (2)	2.45 (4)
Photosynthetic nanoeukaryotes ( $10^3 \text{ ml}^{-1}$ )	MS	1.68 (1)	1.24 (6)	1.38 (1)
	GP	1.74 (19)	1.23 (9)	1.67 (5)
	PC bottle	1.79 (5)	1.81 (1)	1.78 (4)
Chlorophyll <i>a</i> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	MS	0.353** (3)	0.368** (5)	0.384** (4)
	GP	ND	ND	ND
	PC bottle	0.532 (6)	0.560 (4)	0.527 (7)
Chlorophyll <i>b</i> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	MS	0.027*** (7)	0.03*** (8)	0.032*** (4)
	GP	ND	ND	ND
	PC bottle	0.049 (5)	0.051 (4)	0.053 (7)
Chlorophyll <i>c</i> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	MS	0.048** (3)	0.05** (8)	0.053** (4)
	GP	ND	ND	ND
	PC bottle	0.079 (5)	0.082 (4)	0.078 (7)

### ***Assessment***

Experiments to determine the potential selectivity of the sampling devices

To test the potential biases of the MS and the GP as compared to standard bottle sampling, 3 independent experiments were carried out using UW confined in 400 L containers (Table 1). Control experiments are essential to determine whether selective adsorption to the different sampler surfaces exists. It should be performed to check for the potential bias that can be introduced by the sampler itself. Surprisingly, we are aware of only one published study which takes such potential bias into consideration (Hatcher and Parker 1974). These authors analyzed UW collected with both, SML samplers (drum, metal screen and tray) and the standard bottle and found no significant difference in CFU counts, the only parameter tested. In our study, we analyzed a large set of parameters of UW collected with the GP, the MS and the standard PC bottle. Overall, no significant differences among UW sampled with the MS, the GP and the PC bottle were detectable for the parameters studied (Student's t-test,  $p > 0.05$ ). Concentrations of chlorophyll, however, were significantly lower in UW collected with the MS as compared to the PC bottle (Student's t-test,  $p < 0.01$ ) (Table 1), probably due to the adsorption or attachment of large autotrophic cells on the surface of the screen. Estep et al. (1985) and Falkowska (1999b) have already suggested that macroscopic algal filaments often remain trapped on the screen during draining. In the present study, the SML sampled by the MS was significantly enriched in chlorophyll. However, as indicated by the control experiment for the MS, this enrichment of chlorophyll is probably slightly underestimated. For culturable bacteria and bacterial production, substantial variability among replicates of UW was observed independent of the sampling device used. Nevertheless, as a whole, there were no significant differences between these SML samplers and the PC bottle suggesting that the MS and the GP did not introduce any bias.

Hydrophobic (Teflon) and hydrophilic (polycarbonate) membranes were also used to collect total and culturable bacteria from the UW. The small sample volume collected by these membranes reduced the number of parameters that could be analyzed (Table 2). Furthermore, due to the autofluorescence of the surfactant used to detach cells from the membranes, flow cytometry analysis of autotrophic cells was not possible. To our knowledge, only one published study has carried out control experiments for selective attachment to membranes (Crow et al. 1975). These authors report similar counts for culturable bacteria in UW collected with membranes and using a standard bottle.

**Table 2.** Comparison between the Teflon membrane and polycarbonate membrane in terms of volume sampled, thickness of the water layer sampled, the range of enrichment factors (*EF*). The mean and the coefficient of variation (CV %) for total and culturable bacteria are given.

SML : sea surface microlayer, UW : underlying waters.

		Teflon membrane		Polycarbonate membrane	
		SML	UW	SML	UW
Volume sampled	range	40 - 202 $\mu$ l	27 - 79 $\mu$ l	174 - 368 $\mu$ l	91 - 175 $\mu$ l
	mean (CV %)	134 $\mu$ l (60)	54 $\mu$ l (47)	265 $\mu$ l (33)	125 $\mu$ l (26)
Thickness of water	range	23 - 117 $\mu$ m	16 - 46 $\mu$ m	100 - 212 $\mu$ m	52 - 101 $\mu$ m
	mean (CV %)	78 $\mu$ m (60)	31 $\mu$ m (47)	153 $\mu$ m (33)	72 $\mu$ m (26)
Total bacteria ( <i>EF</i> )	range	2.1 - 46.3	3.0 - 50.1	0.7 - 20.8	2.1 - 18.8
	mean (CV %)	25.7 (84)	19.8 (94)	12.2 (68)	10.2 (68)
Culturable bacteria ( <i>EF</i> )	range	9.1 - 101	3.6 - 85	2.5 - 58	0.7 - 126
	mean (CV %)	52.0 (89)	44.2 (77)	42.4 (63)	45.7 (111)

At the opposite, in the present study, the enrichment detected in total and culturable bacteria using both Teflon and polycarbonate membranes, as compared with the traditional bottle sampling, was not restricted to the SML. When UW were sampled with these membranes, the enrichment was in the same order of magnitude than that found for the SML (Table 2). This important drawback is due to adsorption of bacteria to surface on hydrophilic and hydrophobic membranes. Such a bias is probably more important for viable cells with electrically-charged membranes. Consequently, this adsorption effect is more readable for culturable bacteria since all the counted cells are living, while total counts include a more or less important fraction of dead cells.

#### Reference depth of UW

*EF* are determined in reference to concentrations found in UW with depths that vary greatly among reports, ranging from 0.10 to 5.0 meters. In this study, two depths in UW (0.50 and 5.0 m) were analyzed during two campaigns in March and June-July 2002. For most biological parameters, no significant difference was found between the two depths (Wilcoxon test rank,  $p > 0.05$ ,  $n > 16$ ) (data not shown). However, total bacteria, bacterial production by thymidine and leucine incorporation, and chlorophyll *a* were significantly enriched by *EF* of 1.10, 1.90, 2.74 and 1.34 respectively, at 0.5 m as compared to 5 m (Wilcoxon test rank,  $p < 0.05$ ,  $n > 13$ ) (data not shown). Therefore, the depth at which samples of UW are collected should be carefully defined and controlled at each sampling since variations in the depth at which UW are collected may result in different *EF*.

#### Metal screen *versus* glass plate

A comparison between the MS and the GP was carried out to determine their performances for sampling microbiological parameters of the SML. *EF* for the individual parameters from the two different coastal stations were not significantly different from each other (Student's t-test,  $p > 0.05$ ). Thus, *EF* obtained for the 2 study sites were pooled and are shown for the individual parameters in Table 3. Overall, *EF* varied substantially between the two sampling devices for all the biological parameters determined in the present study. SML samples collected with the MS were for 10 out of 14 parameters higher as compared to SML samples collected with the GP. Significant differences between the SML and UW were detectable for both sampling devices. Using the MS, 10 out of 14 parameters were significantly enriched in the SML as compared to UW, whereas for samples collected with the GP, only 4 parameters were significantly enriched (Wilcoxon test rank,  $p < 0.05$ ) (Table 3).

**Table 3.** Summary of enrichment factors (*EF*) of all biological parameters derived from the metal screen (MS) and the glass plate (GP) and statistical comparison between the sea surface microlayer (SML) samplers and underlying waters (UW). Results from the two sampling sites are pooled. \*, \*\*, \*\*\* indicate significance at  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  and  $p<0.005$ , respectively (Wilcoxon test rank) (NA : not applicable). NS : no significant difference. S : significant difference. Depletions are in bold type.

	Metal screen					Glass plate					Wilcoxon test MS vs GP <i>n</i>	
	mean <i>EF</i>	range	<i>n</i>	Wilcoxon test MS vs UW <i>n</i>		mean <i>EF</i>	range	<i>n</i>	Wilcoxon test GP vs UW <i>n</i>			
Total bacteria	1.09	0.73 - 1.50	38	S***	36	1.18	0.82 - 2.65	28	S**	25	NS	25
Culturable bacteria	11.07	0.50 - 49	31	S***	30	13.00	0.02 - 75	18	S***	17	NS	16
Bacterial production (Leucine)	1.21	0.07 - 6.23	27	NS	27	1.02	0.05 - 5.42	15	NS	16	NS	15
Bacterial production (Thymidine)	0.69	0.07 - 3.09	12	NS	10	0.76	0.16 - 1.60	10	NS	10	NS	10
Virus	2.11	0.76 - 8.54	11	NS	11	1.93	0.47 - 4.86	9	NS	10	NS	9
<i>Synechococcus</i>	1.10	0.45 - 1.92	31	S***	34	1.05	0.15 - 1.61	21	S*	24	NS	25
Photosynthetic picoeukaryotes	1.42	0.29 - 7.66	31	S*	33	1.12	0.75 - 2.61	21	NS	24	NS	25
Photosynthetic nanoeukaryotes	1.63	0.81 - 3.55	31	S***	34	<b>0.86</b>	0.46 - 1.34	21	S*** (UW>GP)	24	S***	25
Chlorophyll <i>a</i>	1.76	0.94 - 4.33	24	S***	24	<b>0.71</b>	0.26 - 1.13	11	S*** (UW>GP)	11	S***	12
Chlorophyll <i>b</i>	2.16	0.66 - 9.95	24	S*	23	1.03	0.46 - 1.71	11	NS	11	S***	12
Chlorophyll <i>c</i>	1.62	0.82 - 3.14	24	S***	24	<b>0.62</b>	0.23 - 0.93	11	S*** (UW>GP)	11	S***	12
Phaeophytin <i>a</i>	9.97	0.06 - 41.46	21	S***	20	1.04	0.22 - 2.57	11	NS	10	S***	12
Heterotrophic flagellates	5.44	0.67 - 15.57	18	S***	18	2.81	1.38 - 4.50	6	S*	6	NS	6
Ciliates	<b>0.63</b>	0.05 - 2.78	11	S* (UW>MS)	11	<b>0.29</b>	0.10 - 1.11	6	NA	<6	NS	6

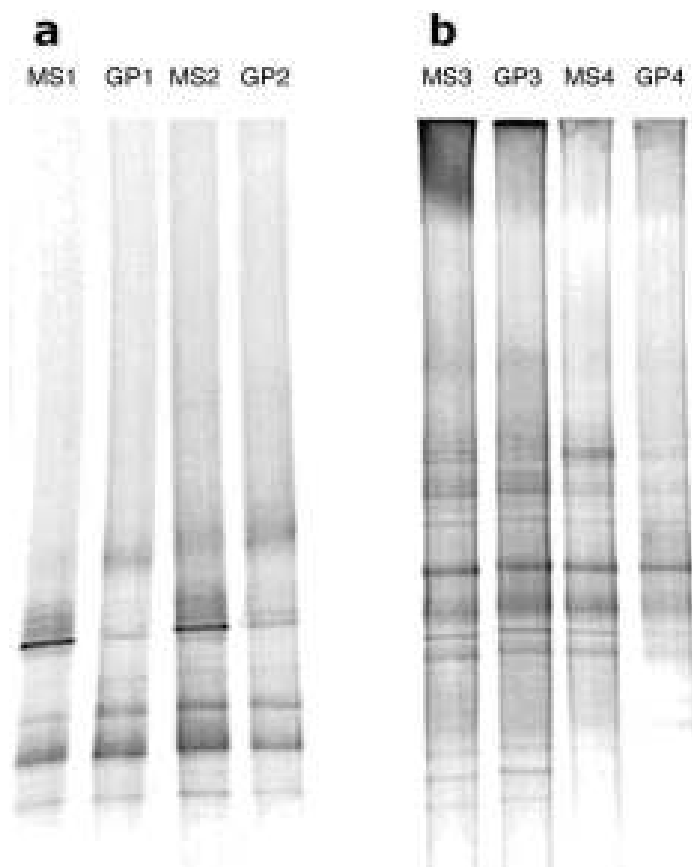
#### Phytoneustonic and zooneustonic parameters

The GP was less efficient than the MS for the analysis of phytoneustonic parameters (e.g. abundance of photosynthetic nanoeukaryotes, chlorophyll *a*, *b* and *c*, phaeophytin *a*) (Wilcoxon test rank,  $p < 0.005$ ) (Table 3). Moreover, the SML was significantly depleted in photosynthetic nanoeukaryotes, and chlorophyll *a* and *c* when the GP was used (Wilcoxon test rank,  $p < 0.005$ ). Carlson (1982) also reports that most of the GP samples were depleted in chlorophyll *a* as compared to UW. Depletion of phytoneuston and chlorophyll *a* in the SML has been attributed to inhibitory factors such as high light intensities, pesticides and heavy metals (Albright 1980; Falkowska and Latala 1995). However, the bias introduced by the sampler itself should be also taken into account. Large cells such as diatoms are probably not retained on the surface of glass plates, resulting in lower *EF* in comparison to the MS.

When photosynthetic nanoeukaryote counts, chlorophyll and phaeophytin *a* were determined in MS samples, the *EF* was significantly higher than 1 and consistently higher than those reported with the GP (Table 3). Other studies investigating the concentration of chlorophyll *a* in the SML reveal in general similar moderate values for the *EF* (Daumas et al. 1976; De Souza Lima and Chrétiennot-Dinet 1984). In the present study, *EF* for phaeophytin *a* were consistently higher than those for chlorophyll *a*. The ratio of phaeophytin *a* to chlorophyll *a* is generally higher in the SML than in UW and it is believed that this indicates unfavourable conditions for photosynthesis (Daumas et al. 1976). The comparatively high content of phaeophytin in the SML may be attributable to photo-oxidation of chlorophyll, significant consumption of microalgae by zooneuston and the input of positively buoyant dead cells from UW (Hardy and Apts, 1984). As discussed earlier for chlorophyll *a*, there is probably also a bias for phaeophytin when using the MS, most likely due to the adsorption of cells to the screen. However, the MS appears to be better suited for the analysis of phytoneustonic parameters than the GP.

For heterotrophic nanoflagellates, a significant enrichment was found with the GP and the MS. *EF* were higher with the MS but the difference between samplers was not significant (Table 3). In contrast, ciliates were depleted in SML samples collected by both samplers and the depletion was more pronounced with the GP (Table 3). This is probably due to the fact that the larger the organisms, the lower their capacity to attach to the surface of the plates and to a lesser extent, to the screen. Ciliates are usually concentrated in the SML during the night (Hardy 1982; Falkowska and Latala 1995) and this could explain why our SML samples taken early in the morning were depleted. Furthermore, zooneuston are larger in size than microorganisms and nets are probably more appropriate to collect these organisms.



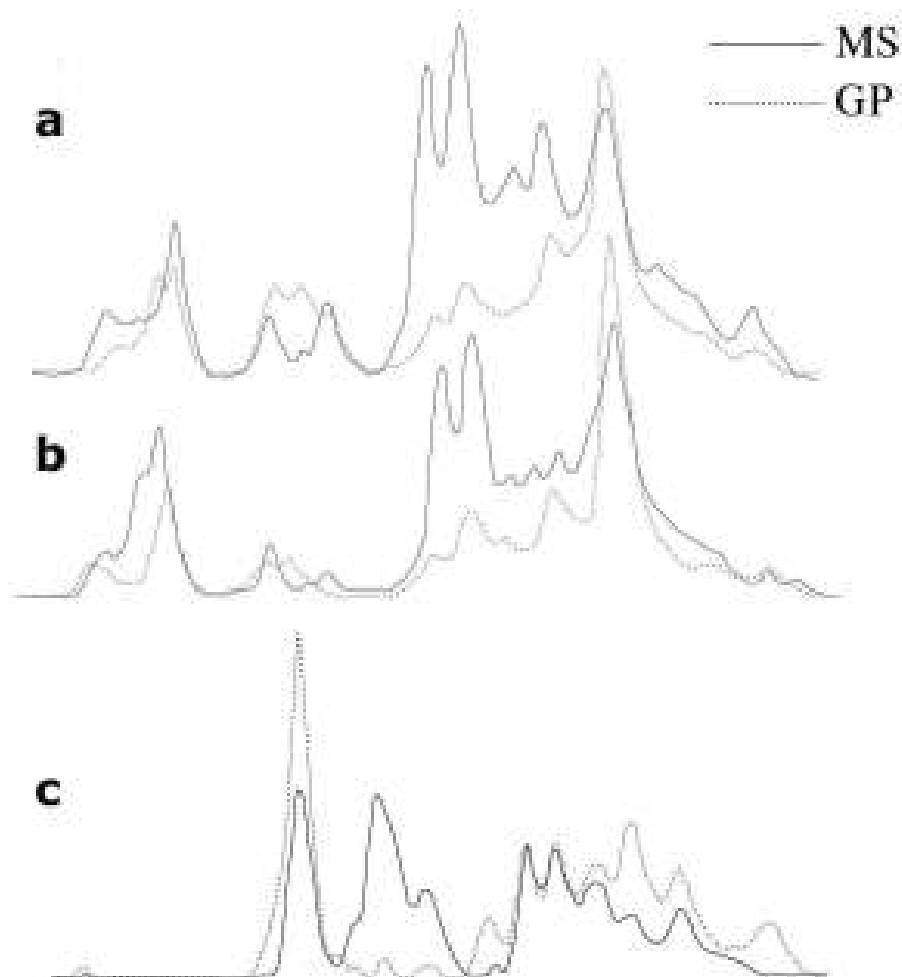


**Fig 2.** Negative image of DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) gels containing PCR-amplified segments of bacterial 16S rRNA genes from a) Barcelona and b) Banyuls-sur-Mer sampling stations using the metal screen (MS) and the glass plate (GP). MS1 and GP1: 15 March 2001, MS2 and GP2: 14 March 2001, MS3 and GP3: 18 March 2001, MS4 and GP4: 17 March 2001.

#### Virioneustonic and bacterioneustonic parameters

The *EF* reported for culturable bacteria were the highest of all the determined parameters in this study (11.1 and 13 for MS and GP, respectively) (Table 3) and similar enrichments are reported in the literature. Tsyban (1971) reported CFU concentrations 10 to 20 fold higher in the SML than in UW for samples collected with a MS. Using a GP, Dietz et al. (1976) report culturable counts 2 orders of magnitude higher in the neuston as compared to UW. In the present study, both samplers resulted in *EF* not significantly different from each other. However, remarkable variations in *EF* were detectable independent of the sampler used. The enrichment of CFU in the SML could be explained by (i) the higher concentrations of dissolved and colloidal organic compounds in the SML providing energy and nutrients, (ii) by protective agents towards stress factors such as radiation (Liss and Duce 1997) and (iii) by preferential attachment of living cells with polarized membranes to bubbles and particles.

Reports on the abundance of total bacteria in the SML vary greatly among studies. While some studies report *EF* in the order of  $10^2$ - $10^3$  (Marumo et al. 1971; Harvey and Young 1980a, b; Carlucci et al. 1991), bacterial abundance is also reported to be depleted in the SML (Bell and Albright 1982). We found only a slight but significant enrichment of total bacterial counts in the SML when samples were collected with the GP and the MS (Wilcoxon test rank,  $p < 0.005$ ) (Table 3). Higher enrichments (*EF* ranging from 1.7 to 32) have been reported for samples collected with the MS and counted by epifluorescence microscopy (Marumo et al. 1971; Harvey and Young 1980a, b). The lower values reported in this study could be due to the fact that particle attached bacteria cannot be counted by flow cytometry and may represent a significant part of total bacteria present in the SML (Harvey and Young 1980a, b). However, we determined from a few samples that the fraction of attached bacteria was less than 3% of total bacteria (Obernosterer et al. *subm.*). Therefore, differences in the reported *EF* for bacteria might also reflect the heterogeneity of the systems studied. In addition to the reported parameters, flow cytometry analysis was used to determine the fraction of cells with a high (HNA) and a low (LNA) nucleic acid content which represents the most and the least active cells, respectively, within natural communities (Lebaron et al. 2002; Servais et al. 2003) (data not shown). No significant difference between the MS and the GP for HNA and LNA cells was found (Wilcoxon test rank,  $p > 0.05$ ,  $n=19$ ) (data not shown). Our experience indicate that both samplers provide similar counts and they seem to be appropriate for sampling total and culturable bacteria in the SML.



**Fig 3.** SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) fingerprints containing PCR-amplified segments of bacterial 16S rRNA genes from a) and b) Barcelona (26 and 27 June 2002, respectively) and c) Banyuls-sur-Mer (2 July 2002) sampling stations using the metal screen (MS) and the glass plate (GP) samplers.

Bacterial activity was estimated from DNA and protein synthesis measurements. Again, the range of *EF* was important for both thymidine and leucine incorporation rates and no significant difference between samplers and between the SML and UW was detectable for this parameter (Table 3). This indicates that bacterial activity in the SML was not enhanced as compared to that in UW. Results reported in the literature are very contradictory so far. The SML collected by the GP, Bell and Albright (1982) as well as Dietz et al. (1976) found higher incorporation rates in UW in comparison to SML. Others studies on bacterial activity in SML have used different kind of samplers and they are therefore not directly comparable with our study. From our results we may conclude that both, the GP and the MS are performing equally well for bacterial activity assessments.

Considering that the two samplers had surfaces with different physical properties, we also investigated the effect of each sampler on the structure of bacterial communities. We speculated that even if counts were similar, each sampler may have a selective effect on bacterial species which have different surface properties. Genetic fingerprinting methods showed that the MS and the GP had no selective effect on the main components of the bacterial communities. Figure 2 shows the comparison using DGGE for Barcelona and Banyuls-sur-Mer sampling points in March 2001. The banding pattern was qualitatively identical for samples collected using either the MS or the GP as indicated by the similarity values calculated (Table 4). However, changes in the signal intensity were detectable for a few DGGE bands (Fig 2). We carried out the same procedure with samples collected in June and July 2002 using a more precise genetic fingerprinting method (SSCP, Fig 3). The SSCP products were not exactly the same for the GP and the MS as indicated by similarity values calculated in Table 4. However, the qualitative differences found corresponded to minor components of the bacterial assemblage (minor peaks in the SSCP profiles). These results indicate that both samplers collect the same dominant species, although some differences were found in the relative contribution of some populations. These differences were higher than differences found among PCR replicates. Therefore, both samplers can be used to investigate the structure of bacterial communities but quantitative data requires a cautious interpretation.

**Table 4.** Similarity values (Jaccard coefficient) for the absence/presence of data of the DGGE gel and of the SSCP data shown in Fig. 2 and 3 respectively.

	Date	MS vs GP
DGGE	14 March 2001	1,00
	15 March 2001	1,00
	17 March 2001	1,00
	18 March 2001	1,00
SSCP	26 June 2002	0,87
	27 June 2002	0,79
	2 July 2002	1,00

Viruses can be counted by epifluorescence microscopy after staining with a nucleic acid dye (Noble and Fuhrman 1998). We are not aware of any results on the abundance of viruses in the SML of natural waters. In the present study, no significant difference was detectable between counts in the SML and that in UW. Furthermore, no significant differences between samplers were observed. Therefore, the GP and the MS are performing equally well for counting viruses.

#### The case of membranes

Membranes offer the advantage of collecting a very thin layer (10-50  $\mu\text{m}$ ) to further investigate the vertical distribution of organisms in the SML. In this study, the *EF* found for total and culturable bacteria using membranes were higher than those obtained with the GP and the MS. *EF* for the SML sampled with the two types of membranes varied between 0.7 – 46.3 and 2.5 - 101 for total bacterial abundance and culturable bacteria, respectively (Table 2). The high enrichments found in the present study are congruent with data reported from other environments. For total bacteria and hydrophobic Nuclepore filters, Sewel et al. (1981) and Hardy and Apts (1984) found *EF* ranging from 9678 to 32305 and from 23 to 12000, respectively. While the volume of water sampled by the Teflon membrane was substantially lower than that sampled by the polycarbonate membrane, the Teflon membrane exhibited about twice the *EF* for total and culturable bacteria (Table 2). In this line, Kjelleberg et al (1979) found an enrichment in culturable bacteria ranging from 80 to 10100 when SML was collected with hydrophobic membranes and for hydrophilic membranes from 2 to 284. Thus, hydrophobic membranes collect more bacteria, although the SML thickness collected is two times smaller than the SML collected with hydrophilic membranes. Although many results of the literature suggest that most bacteria are concentrated in top 10  $\mu\text{m}$  of the SML and these studies also suggest that dilution of bacteria could occur with others sampling devices. However, as stated above, these high *EF* exceeding by far those of the MS and the GP are due to the selective adsorption of microorganisms by these membranes as determined in the present study. These conclusions should be considered with caution due to the sampling bias.

## **Discussion**

Control experiments are essential to determine whether selective adsorption to the different sampler surfaces exist. Surprisingly, we are aware of only one published study which takes such potential bias of SML samplers into consideration (Hatcher and Parker 1974) and one published study which has carried out control experiments for selective attachment to membranes (Crow et al. 1975). Sampling with membranes has important drawbacks due to the selective adsorption of bacteria to surfaces. As a consequence, many reports on bacterioneuston based on this sampling technique have generally overestimated bacterial counts yielding the conclusion that bacteria are present at high concentrations in the SML. Therefore, high bacterial abundances reported in the literature for SML collected with membranes should be considered with caution. Since membranes cannot be used for quantification purposes, their use should be limited to the isolation of bacterial cells.

In the same way, the depth at which samples of UW are collected should be carefully defined and controlled at each sampling since variations in the depth at which UW are collected may result in different *EF*. Consequently, any comparison with *EF* reported in the literature should also be related to the reference depth of UW.

The MS and the GP seem to be appropriate for sampling total and culturable bacteria and viruses, for bacterial activity assessments, and for investigating the structure of bacterial communities in the SML. However, the MS appears to be better suited for the analysis of phytoneustonic parameters than the GP. Nets are probably more appropriate to collect organisms which are larger than flagellates.

### ***Comments and recommendations***

The question about the most suitable method for sampling the SML for biological studies has not yet been answered. At present, the metal screen and the glass plate are the most frequently used samplers. They differ in the thickness of the collected SML, the thickness being larger with the MS, and they differ by their physical properties. Obviously, the problem of comparison of data obtained by different types of samplers is closely related to where the different types of organisms from virioneuston to zooneuston are located in the SML.

The thinner the layer collected, the closer the biological composition of the sample to the original distribution in the SML will be. Under this point of view, the GP is preferable. However, the MS offers the smallest contact area between the water film to be sampled and the sampler, which probably results in the lowest contamination of the SML. Furthermore, the MS offers the advantage of being more adapted than the GP to collect organisms within a wide range of sizes (from viruses to flagellates). Another advantage is that the MS collects larger volumes in shorter periods of time (roughly 10 litres per hour and per screen), something essential when many parameters are to be analyzed. In contrast, the GP has a much lower sampling capacity (1 liter per hour and per plate). The time of sampling is of great importance since the longer the time of sampling, the higher the effect of temporal and spatial variability. Thus, we recommend the use of the MS when the aim is the comparison of different parameters. In all cases, control experiments should be performed to check for the potential bias that can be introduced by the sampler itself. There is clear evidence from this study that membranes have important drawbacks and should not be used for quantification purposes. Both hydrophobic and hydrophilic membranes overestimate the concentration of living organisms by selective surface adsorption. However, sampling with membranes remains of interest for rapid and easy collection of bacteria living in the surface microlayer.

Finally, the depth at which UW samples are collected must be carefully determined depending on the question to be answered. Furthermore, any comparison with other reports in the literature should be based not only to the SML sampler but also to the reference depth of UW.



***References***

- Albright, L. 1980. Photosynthetic activities of phytoneuston and phytoplankton. *Can. J. Microbiol.* **26**: 389-392.
- Bayona, J. M., P. Fernandez, C. Porte, I. Tolosa, M. Valls, and J. Albaiges. 1991. Partitioning of urban wastewater organic microcontaminants among coastal compartments. *Chemosphere* **23**: 313-326.
- Bell, C. R., and L. J. Albright. 1982. Bacteriological investigation of the neuston and plankton in the Fraser River estuary, British Columbia. *Estuar. Coast. Shelf S.* **15**: 385-394.
- Bernard, L., C. Courties, P. Servais, M. Troussellier, M. Petit, and P. Lebaron. 2000. Relationships among bacterial cell size, productivity, and genetic diversity in aquatic environments using cell sorting and flow cytometry. *Microb. Ecol.* **40**: 148-158.
- Carlson, D. J. 1982. A field evaluation of plate and screen microlayer sampling techniques. *Mar. Chem.* **11**: 189-208.
- Carlucci, A. F., D. B. Craven, and D. M. Wolgast. 1991. Microbial populations in surface films and subsurface waters: amino acid metabolism and growth. *Mar. Biol.* **108**: 329-339.
- Carlucci, A. F., D. M. Wolgast, and D. B. Craven. 1992. Microbial populations in surface films: amino acid dynamics in nearshore and offshore waters off Southern California. *J. Geophys. Res.* **97**: 5271-5280.
- Caron, D. A. 1983. Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedure. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 491-198.
- Casamayor, E. O. and others 2002. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multi-pond solar saltern. *Environ. Microbiol.* **4**: 338-348.
- Casamayor, E. O., H. Schäfer, H. Baneras, C. Pedros-Alio, and G. Muyzer. 2000. Identification and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 499-508.
- Chaloux, N., J. M. Bayona, and J. Albaiges. 1994. Determination of nonylphenols as pentafluorobenzyl derivatives by capillary gas chromatography with electroncapture and mass spectrometric detection in environmental matrices. *J. Chromatogr. A* **686**: 275-281.

- Crow, S. A., D. G. Ahearn, W. L. Cook, and A. W. Bourquin. 1975. Densities of bacteria and fungi in coastal surface films as determined by a membrane-adsorption procedure. *Limnol. Oceanogr.* **20**: 644-646.
- Dahlbäck, B., M. Hermansson, S. Kjelleberg, and B. Norkrans. 1981. The hydrophobicity of bacteria - An important factor in their initial adhesion at the air-water interface. *Arch. Microbiol.* **128**: 267-270.
- Daumas, R. A., P. L. Laborde, J. C. Marty, and A. Saliot. 1976. Influence of sampling method on the chemical composition of water surface film. *Limnol. Oceanogr.* **21**: 319-326.
- De Souza Lima, Y., and M. J. Chrétiennot-Dinet. 1984. Measurements of biomass and activity of neustonic microorganisms. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **19**: 167-180.
- Dietz, A. S., L. J. Albright, and T. Tuominen. 1976. Heterotrophic activities of bacterioneuston and bacterioplankton. *Can. J. Microbiol.* **22**: 1699-1709.
- Dupuy, C., S. Le Gall, H. J. Hartmann, and M. Bréret. 1999. Retention of ciliates and flagellates by the oysters *Crassostrea gigas* in French Atlantic coastal pond: protists as a trophic link between bacterioplankton and benthic suspension-feeders. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **177**: 165-175.
- Estep, K. W., J. S. Maki, S. C. Danos, and C. C. Remsen. 1985. The retrieval of material from the surface microlayer with screen and plate samplers and its implications for partitioning of material within the microlayer. *Freshwater Biol.* **15**: 15-19.
- Falkowska, L. 1999a. Sea surface microlayer: a field evaluation of teflon plate, glass plate and screen sampling techniques.
- Part 1. Thickness of microlayer samples and relation to wind speed. *Oceanologia* **41**: 211-221.
- \_\_\_\_\_. 1999b. Sea surface microlayer: a field evaluation of teflon plate, glass plate and screen sampling techniques.
- Part 2. Dissolved and suspended matter. *Oceanologia* **41**: 223-240.
- Falkowska, L., and A. Latala. 1995. Short-term variations in the concentrations of suspended particles, chlorophyll a and nutrients in the surface seawater layers of the Gdansk Deep. *Oceanologia* **37**: 249-284.
- Fuhrman, J. A., and F. Azam. 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in a marine surface waters. Evaluation and field results. *Mar. Biol.* **66**: 109-120.
- Garrett, W. D. 1965. Collection of slick-forming materials from the sea surface. *Limnol. Oceanogr.* **10**: 602-605.

- Grémare, A. and others 2003. The effects of a strong winter storm on physical and biological variables at a shelf site in the Mediterranean. *Oceanol. Acta* **26**: 407-419.
- Haas, L. W. 1982. Improved fluorescence microscopy for observing planktonic microorganisms. *Ann. Inst. Oceanogr.* **58**: 261-268.
- Hardy, J. T. 1982. The sea surface microlayer: biology, chemistry and anthropogenic enrichment. *Prog. Oceanog.* **11**: 307-328.
- \_\_\_\_\_. 1997. Biological effects of chemicals in the sea-surface microlayer, p. 339-370. *In* P. S. L. a. R. A. Duce [ed.], *The sea surface and global change*. Cambridge University Press.
- Hardy, J. T., and C. W. Apts. 1984. The sea-surface microlayer: phytoneuston productivity and effects of atmospheric particulate matter. *Mar. Biol.* **82**: 293-300.
- Hardy, J. T., J. A. Coley, L. D. Antrim, and S. L. Kiesser. 1988. A hydrophobic large-volume sampler for collecting aquatic surface microlayers: characterization and comparison with glass plate method. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **45**: 822-826.
- Harvey, G. W. 1966. Microlayer collection from the sea surface: a new method and initial results. *Limnol. Oceanogr.* **11**: 608-614.
- Harvey, G. W., and L. A. Burzell. 1972. A simple microlayer method for small samples. *Limnol. Oceanogr.* **17**: 156-157.
- Harvey, R. W., and L. Y. Young. 1980a. Enrichment and association of bacteria and particulates in salt marsh surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 894-899.
- \_\_\_\_\_. 1980b. Enumeration of particle-bound and unattached respiring bacteria in the salt marsh environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 156-160.
- Hatcher, R. F., and B. C. Parker. 1974. Microbiological and chemical enrichment of freshwater-surface microlayers relative to the bulk-subsurface water. *Can. J. Microbiol.* **20**: 1051-1057.
- Hermansson, M. 1990. The dynamics of dissolved and particulate organic material in surface microlayers. *In* R. S. Wotton [ed.], *The Biology of Particles in Aquatic Systems*. CRC Press.
- Hühnerfuss, H. 1981a. On the problem of sea surface film sampling: a comparison of 21 microlayer-, 2 multilayer-, and 4 selected subsurface- samplers. Part 1. Sonderdruck aus *Meerestechnik* **12**: 137-142.
- \_\_\_\_\_. 1981b. On the problem of sea surface film sampling: a comparison of 21 microlayer-, 2 multilayer-, and 4 selected subsurface- samplers. Part 2. Sonderdruck aus *Meerestechnik* **12**: 170-173.

- Kaltenbach, J. L. 1984. The view from the Shuttle-Orbiter: observing the oceans from manned space flights. *Pro. Int. Soc. Opt. Engng. (SPIE)*, 489, *Ocean Optics VIII*: 203-207.
- Kjelleberg, S., T. A. Stenström, and G. Odham. 1979. Comparative study of different hydrophobic devices for sampling lipid surface films and adherent microorganisms. *Mar. Chem.* **53**: 21-25.
- Larsson, K., G. Odham, and A. Sodergren. 1974. On lipid surface films on the sea. I. A simple method for sampling and studies of composition. *Mar. Chem.* **2**: 49-57.
- Lebaron, P., P. Servais, A. C. Baudoux, M. Bourrain, C. Courties, and N. Parthuisot. 2002. Variations of bacterial-specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**: 131-140.
- Legendre, L., C. Courties, and M. Trousselier. 2001. Flow cytometry in oceanography 1989-1999 : environmental challenges and research trends. *Cytometry* **44**: 164-172.
- Liss, P. S., and R. A. Duce. 1997. *The sea surface and global change*. Cambridge University Press.
- Marie, D., F. Partensky, S. Jacquet, and D. Vaultot. 1997. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 188-193.
- Marie, D., N. Simon, L. Guillou, F. Partensky, and D. Vaultot. 2000. Flow cytometry analysis of marine picoplankton, p. 421-454. *In* S. DeMaggio [ed.], *In Living Color : Protocols in Flow Cytometry and Cell Sorting*. Springer Verlag.
- Marumo, R., N. Taga, and T. Nakai. 1971. Neustonic bacteria and phytoplankton in surface microlayers of the Equatorial waters. *Bull. Plankton Soc. Japan* **18**: 36-41.
- Médernach, L., A. Grémare, J. M. Amouroux, J. C. Colomines, and G. Vétion. 2001. Temporal changes in the amino acid contents of particulate organic matter sedimenting in the Bay of Banyuls-sur-Mer (northwestern Mediterranean). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **214**: 55-65.
- Naumann, E. 1917. Uber das neuston des Süswassers. *Biol. Centralblatt* **37**: 98-106.
- Neveux, J., and F. Lantoine. 1993. Spectrofluorometric assay of chlorophylls and phaeopigments using the least squares approximation technique. *Deep-Sea Res.* **40**: 1747-1764.
- Noble, R. T., and J. A. Fuhrman. 1998. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.* **14**: 113-118.
- Norkrans, B. 1980. Surface microlayers in aquatic environments, p. 51-83. *In* M. Alexander [ed.], *Advances in Microbial Ecology*. Plenum Press, New York and London.

- Norkrans, B., and F. Sörensson. 1977. On the marine lipid surface microlayer - bacterial accumulation in models systems. *Bot. Mar.* **20**: 473-478.
- Obernosterer, I., P. Catala, T. Rheinthal, G. J. Herndl, and P. Lebaron. *subm.* Enhanced heterotrophic activity in the surface microlayer of the Mediterranean Sea.
- Romano, J. C. 1996. Sea-surface slick occurrence in the open sea (Mediterranean, Red Sea, Indian Ocean) in relation to wind speed. *Deep-Sea Res. I* **43**: 411-423.
- Scherrer, B. 1984. *Biostatistique*. G. Morin.
- Servais, P., E. O. Casamayor, C. Courties, P. Catala, N. Parthuisot, and P. Lebaron. 2003. Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content. *Aquat. Microb. Ecol.* **33**: 41-51.
- Sewell, L. M., G. Bitton, and J. S. Bays. 1981. Evaluation of membrane adsorption-epifluorescence microscopy for the enumeration of bacteria in coastal surface films. *Microb. Ecol.* **7**: 365-369.
- Sherr, E. B., D. A. Caron, and B. F. Sherr. 1994. Staining of heterotrophic protists for visualisation via epifluorescence microscopy, p. 213-227. *In* J. J. Cole [ed.], *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Siegel, S., and N. J. J. Castellan. 1988. *Non parametric statistics for the behavioral sciences*.
- Simon, M., and F. Azam. 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **51**: 201-213.
- Tsyban, A. V. 1971. Marine bacterioneuston. *J. Oceanogr. Soc. Japan* **27**: 56-66.
- Welch, P. S. 1935. *Limnology*. Mc Graw Book Co.
- Williams, P. M. and others 1986. Chemical and microbiological studies of sea-surface films in the Southern Gulf of California and off the West Coast of Baja California. *Mar. Chem.* **19**: 17-98.
- Zaitsev, Y. P. 1971. *Marine Neustonology*. VA: National Marine Fisheries Service, NOAA and National Science Foundation, National Technical Information Service.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall.
- Zutic, V. B., E. Cosovic, E. Marcenko, and N. Bihar. 1981. Surfactant production by marine phytoplankton. *Mar. Chem.* **10**: 505-520.

## **CHAPITRE IV**

## IV. 1. DIVERSITE DU BACTERIONEUSTON

Ce chapitre est présenté sous forme d'une publication qui sera soumise à Environmental Microbiology en Juin 2004. Elle s'intitule **Community structure and culturing of bacterioneuston from marine coastal ecosystems.**

### Contexte de l'étude

Il existe peu de données concernant la structure et la composition taxonomique des populations bactérioneustoniques marines. Les études disponibles datent pour la plupart de plus d'une vingtaine d'années, et concernent uniquement l'analyse des communautés bactériennes de la fraction cultivable du bactérioneuston via des méthodes traditionnelles de culture (Sieburth 1971, Tsyban 1971, Carty et Colwell 1975, Fehon et Oliver 1979). Bien que la fraction cultivable ne représente en milieu marin moins de 0,1% des communautés bactériennes totales (Amann *et al.* 1995), l'analyse et l'isolement de la flore cultivable des communautés bactérioneustoniques est la seule qui nous permet actuellement d'étudier la physiologie et l'écologie de ces souches.

Au cours de cette étude, un travail important d'isolement de souches a été effectué (**Table 1**). Ces souches proviennent des deux sites d'études (Barcelone et Banyuls-sur-Mer), et sont issues de la microcouche de surface (prélevée avec différents échantillonneurs) et de l'eau sous-jacente. Les échantillons d'eau sont étalés sur boîtes de Pétri. Après 14 jours d'incubation, 10 colonies sont prélevées aléatoirement parmi celles qui ont un morphotype crème et pour les autres, chaque nouveau morphotype est isolé puis repiqué.

L'identification des isolats a été réalisée par l'analyse de la séquence nucléotidique du gène codant pour l'ARNr 16S. Ce gène, universellement présent chez les bactéries et uniquement chez ces organismes, est constitué de domaines très conservés (séquence en nucléotides peu variable d'une espèce à une autre), mais également de régions qui ont variées au cours de l'évolution, ce qui permet de l'utiliser comme outil de taxonomie. Dans cette analyse, nous avons réalisé pour chaque isolat une empreinte génomique de leur ADNr 16S par la technique de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism); les produits amplifiés correspondant à chaque isolat sont hydrolysés par une enzyme de restriction (*Hin6I*)

qui reconnaît une séquence particulière comme site de coupure. La taille et le nombre des fragments générés après action de cette enzyme est donc dépendante de la séquence du gène de la bactérie, et l'électrophorèse de ces fragments sur gel d'agarose permet donc d'obtenir un profil de migration spécifique de chaque espèce bactérienne. Pour chaque campagne, chaque souche présentant un ribotype différent est conservée et référencée dans un soucier (cf. annexe 3). Le gène ribosomique 16S de chaque souche de la collection est ensuite séquencé. Ce séquençage a permis d'identifier ou au moins de positionner phylogénétiquement les souches de la collection (cf. annexe 4).

**Tableau 1** : Nombre de souches isolées lors des différentes campagnes

Campagnes de prélèvements			Nombre de souches isolées	Nombre de souches conservées dans la collection
Année	Mois	Sites d'étude		
2001	Mars	Barcelone	181	32
	Mars	Banyuls-sur-Mer	108	26
	Septembre	Barcelone	68	24
	Septembre	Banyuls-sur-Mer	89	14
2002	Mars	Barcelone	2	2
	Mars	Banyuls-sur-Mer	19	15
	Juillet	Banyuls-sur-Mer	20	11
Total			487	124

Pour les campagnes de 2002, la sélection des isolats est basée uniquement sur des nouveaux morphotypes pour éviter la redondance.

Cette étude a pour but d'analyser les communautés bactériennes présentes au niveau de la microcouche de surface et de les comparer à celle de l'eau sous-jacente. Cet article regroupe les données concernant la flore totale et cultivable du bactérioneuston échantillonné à Barcelone et à Banyuls-sur-Mer. Cette étude a été menée en collaboration avec Emilio O. Casamayor, post doctorant du projet Européen AIRWIN, qui était chargé d'analyser la structure des communautés bactériennes totales au niveau de la microcouche de surface et de les comparer à celles de l'eau sous-jacente.



**Community structure and culturing of bacterioneuston from marine coastal ecosystems**

Hélène Agogué<sup>a</sup>, Emilio O. Casamayor<sup>a,b</sup>, Muriel Bourrain<sup>c</sup>, Ingrid Obernosterer<sup>a</sup>, Fabien Joux<sup>a</sup>, Gerhard J. Herndl<sup>d</sup> and Philippe Lebaron<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Observatoire Océanologique (OOB), Université Pierre et Marie Curie, UMR 7621-INSU-CNRS, BP44, 66651 Banyuls-sur-Mer Cedex, France.

<sup>b</sup> Unidad de Limnología, Centro de Estudios Avanzados de Blanes-CSIC. Acc. Cala Sant Francesc, 14. E-17300 Blanes, Spain.

<sup>c</sup> Centre de Recherche Dermatologique Pierre Fabre, BP 74, 31322, Castanet Tolosan, France.

<sup>d</sup> Department of Biological Oceanography, Royal Institute for Sea Research (NIOZ), P. O. Box 59, 1790 AB Den Burg, The Netherlands

Running title: Bacterioneuston community structure

## **Summary**

Bacterial populations inhabiting the sea surface microlayer (i.e., marine bacterioneuston) from two contrasted coastal stations (polluted vs. oligotrophic) of the Mediterranean Sea were investigated by both culture and culture-independent methods. Bacterioneuston community composition and cultivability were compared with those of underlying waters (50 cm depth). Bacterial community fingerprints were investigated by 16S rRNA gene polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) whereas isolated strains were analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and 16S rRNA gene sequencing. At the bacterial community level, no differences were found between the surface microlayer and underlying waters assemblages in the oligotrophic environment, whereas differences were sometimes found at the polluted site. For isolated bacterial strains, although some potential neustonic species were found at both sites, most of the species were already reported from a wide variety of environments. Phylogenetic analyses of isolated bacterial strains from both the sea surface microlayer and underlying waters revealed low similarities in 16S rRNA gene sequence with previously described species suggesting that a few isolates may correspond to new marine bacterial genera and even families. Some actinobacteria isolated in the surface microlayer at the polluted site were different from those traditionally found in marine coastal waters. The differences reported between the surface microlayer and underlying waters from both SSCP profiles and isolates were due to the presence of a wastewater outfall in the polluted area. The results indicate that surface microlayers of marine ecosystems represent a poorly investigated source of unknown marine microorganisms, but at the same time a stable bacterioneustonic community structure is not a common trait of coastal marine environments.

## Introduction

The marine air-water interface, located between the atmosphere and the hydrosphere, form a specific life environment in the ocean with peculiar and characteristic physico-chemical processes (Liss and Duce, 1997). Techniques are now available to collect the sea surface microlayer (SML) at the microscale and without destroying its structure (Agogué et al., 2004; Monzikoff et al., 2004). It was shown that chemical and biological components from different origins tend to accumulate at the SML. Although microorganisms have been poorly characterized, different reports suggested that their concentration exceed that of UW by orders of magnitude (MacIntyre, 1974; Hardy, 1982).

Microorganisms in the SML are submitted to a combination of both favourable and detrimental factors. Favourable factors are the high concentrations of inorganic and organic nutrients while detrimental factors are intense solar radiation in the ultraviolet (UV) and visible spectra, high concentrations of heavy metals and organic pollutants, temperature fluctuations and salinity changes. Therefore, the SML is often considered as an extreme environment for microorganisms that may contain unusual species and taxa (Maki, 2002). This led to the thinking that origin of a specific near surface complex of bacteria - the bacterioneuston -, would have a wide distribution in the world ocean (Tsyban, 1971). However, despite their abundance and expected widespread distribution, bacterial communities operating at the SML are poorly characterized (Norkrans, 1980). From a taxonomic point of view, bacteria of the genera *Pseudomonas*, *Bacterium*, *Chromobacterium*, *Aeromonas* and *Micrococcus* are often reported as predominant within the cultivable fraction obtained from the SML (Sieburth, 1971; Tsyban, 1971; Carty and Colwell, 1975; Fehon and Oliver, 1979). However, strains belonging to the same genera are also commonly found in other marine water samples (ZoBell, 1946; Sieburth, 1968; Fehon and Oliver, 1979). Therefore, evidence of unusual neustonic bacterial genera inhabiting the SML is not available so far. This may be due to the well-known limitations for bacterial identification during the 70s and 80s and the fact that culturable bacteria do not represent more than 0.01 to 0.1% of total bacteria in seawater (Amann et al., 1995). The adaptation of molecular techniques to the study of bacterial communities in situ and to the fast identification of isolated strains makes easier to carry out new investigations and phylogenetic studies on the bacteria inhabiting the SML (Pace et al., 1986). To our knowledge, marine bacterioneuston has never been investigated with modern taxonomic tools. Nevertheless, isolation and cultivation techniques

remain essential to investigate the physiology and ecology of marine bacteria and an approach combining both culturing and molecular DNA-based methods is the most desirable option.

The aim of this study was to compare the diversity of bacterial communities of the SML and UW using both cultivation and genetic fingerprinting methods. This comparison was carried out in two coastal sites in the Mediterranean Sea, including an oligotrophic site (Bay of Banyuls-sur-Mer, France) and a heavily human-impacted station (off Barcelona, Spain). PCR-SSCP (single-stranded-conformational polymorphism) was used to compare the structure of the bacterial assemblages from both SML and UW. We also analyzed bacteria isolated on solid media from SML and UW by RFLP screening and 16S rRNA gene sequencing.

## Results

### *Total counts and culturability*

Total averaged bacterial counts for SML and UW at Barcelona site were  $1.43 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup> and  $1.30 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup>, respectively ( $n = 10$ ) (Table 1). At Banyuls-sur-Mer site, total counts were  $0.97 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup> and  $0.93 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup> for SML and UW, respectively ( $n = 13$ ). Thus, higher cell concentrations were found in Barcelona than in Banyuls-sur-Mer, and slightly higher in the SML than in the UW. Viable counts determined by CFU on marine agar showed that at both sites the contribution of culturable bacteria was more important in the SML than in UW (Table 1). At Barcelona site, culturable bacteria represented 4.16% for the SML and 2.51 % for UW. In Banyuls-sur-Mer, the contribution of CFU to total counts in SML and UW was 1.58% and 0.34%, respectively. Again the percentage of viable bacteria was higher in Barcelona and in the SML at both sites.

### *Structure of bacterial communities*

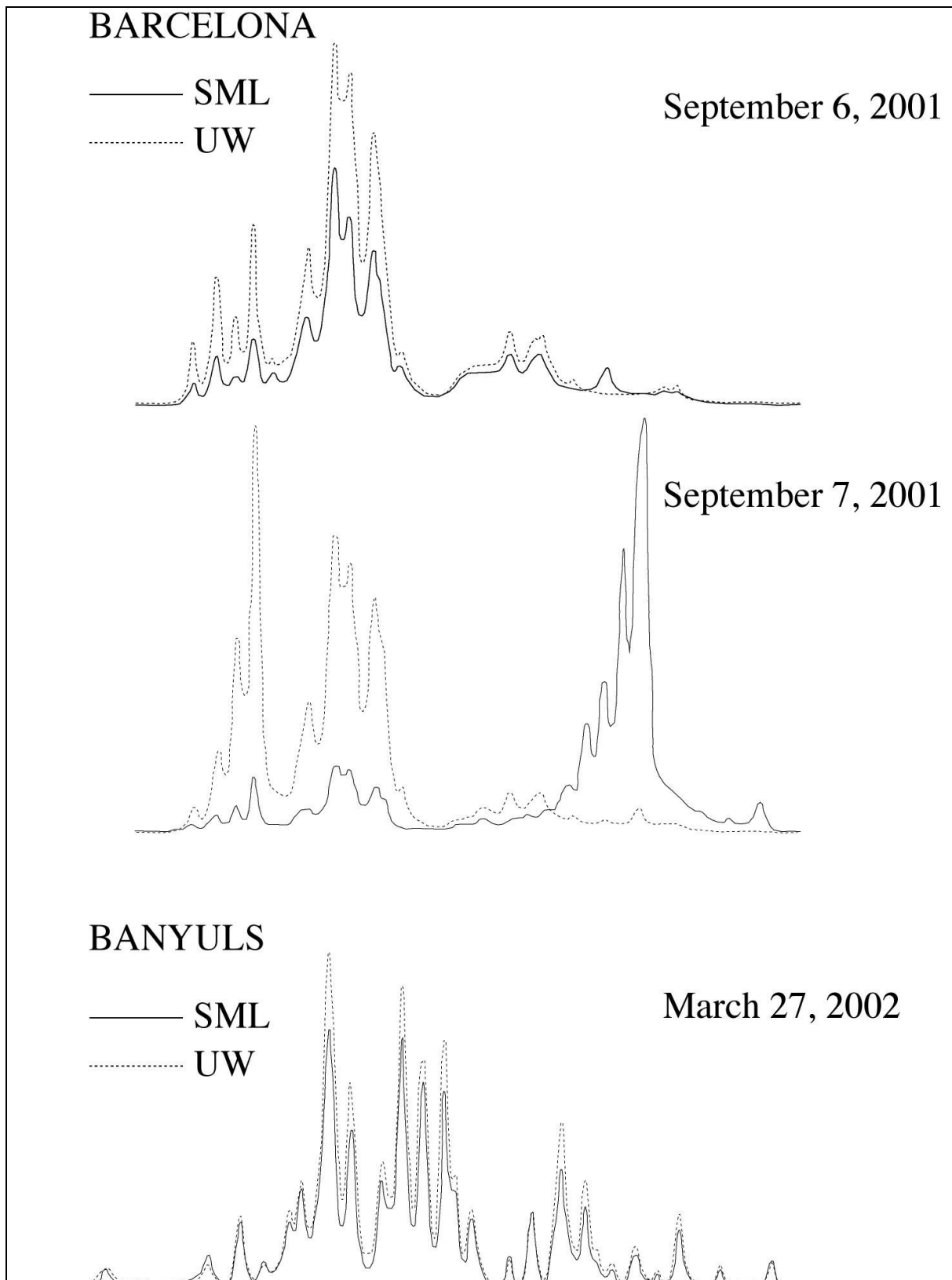
The general structure of bacterial communities inhabiting the SML and UW was addressed by SSCP genetic fingerprinting. We examined several profiles from Banyuls-sur-Mer ( $n=18$ ) and Barcelona ( $n=12$ ) sampling stations along two years. For each sampling event, SML samples collected with the metal screen were directly compared to UW collected with a bottle (Agogué et al., 2004). Overall, the number of SSCP peaks recovered for both SML and UW was within the same range (18-24 predominant peaks). For samples collected over the two annual cycles at Banyuls-sur-Mer station, we found very similar SSCP profiles for SML and UW (e.g., March 27, 2002 in Fig. 1). In contrast, differences in SSCP fingerprints between SML and UW samples were more often found at the Barcelona station (7 samples out of 12, Table 2). When that occurred, only a few additional peaks (2-3) were found in the SML but these peaks were highly significant, representing more than 30% of the total surface of the SSCP profile (Fig. 1, September 7, 2001). Interestingly, such differences between SML and UW profiles were not reproducible from one day to another. For instance, the Barcelona station was visited along 3 consecutive days during the March 2001 (day 13 to day 15), September 2001 (5 to 7), March 2002 (19 to 21) and June 2002 (25 to 27) campaigns and well-developed specific SML bacterial assemblages were only found from SSCP fingerprints on 6 occasions (14 March 2001, 7 September 2001, 20 and 21 March 2002, 26 and 27 June 2002). As an example, Fig. 1 shows the bacterial community structure found for two consecutive days (6 and 7 September 2001): on the first day only 1 minor peak was specific for the SML whereas in the following day several major peaks appeared.

**Table 1.** Cell counts and culturability of bacteria in the sea surface microlayer sampled by the metal screen (SML) and underlying waters (UW) sampled in Barcelona and Banyuls-sur-Mer sites, respectively

	Barcelona		Banyuls-sur-Mer	
	SML	UW	SML	UW
<i>n</i>	10	10	13	13
Total counts <sup>a</sup> (10 <sup>6</sup> cells ml <sup>-1</sup> )	1.43 ± 0.43	1.30 ± 0.38	0.97 ± 0.16	0.93 ± 0.14
CFU / total counts (%)	4.16	2.51	1.58	0.34
% CFU range	0.3 - 14.5	0.001 - 7.6	0.1 - 7.3	0.05 - 1.42

<sup>a</sup> mean ± standard deviation

*n* number of samples



**Fig. 1.** Comparison between surface microlayer (SML) and underlying water (UW) bacterial community structure using SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) fingerprints of 16S rRNA genes from Barcelona (6 and 7 September, 2002) and Banyuls-sur-Mer (27 March 2002) sampling station

**Table 2.** Similarity values (Jaccard coefficient) for the absence/presence of data from the genetic fingerprintings carried out in the surface microlayer (SML) and underlying waters (UW) of Barcelona coastal station

Site	Date	SML vs. UW
Barcelona	March 13, 2001	1.00
	March 14, 2001	0.58
	March 15, 2001	1.00
	September 5, 2001	1.00
	September 6, 2001	0.90
	September 7, 2001	0.60
	March 19, 2002	1.00
	March 20, 2002	0.77
	March 21, 2002	0.60
	June 25, 2002	1.00
	June 25, 2002	0.78
	June 25, 2002	0.78



*Taxonomic affiliation of isolates*

Overall, 487 isolates were collected from both sites and both layers were analyzed by RFLP fingerprinting of the 16S rDNA for the screening of redundancies. The analysis of RFLP patterns using *Hin6* I restriction enzyme revealed 124 different ribotypes (56% from the SML and 44% isolates from UW). All the isolates clustered in 5 phylogenetic bacterial groups: the  $\alpha$  and  $\gamma$  subdivisions of Proteobacteria, and the Cytophaga/Flavobacter/Bacteroides group for the Gram-negative, and the Actinobacteria and Firmicutes with Low (G+C)% groups for the Gram-positive (Table 3). The 5 groups occurred in both sampling locations. Regarding the relative abundance, the contribution of each phylogenetic group was roughly the same for the SML and UW strains collected at Banyuls-sur-Mer site (Table 3). Gram-negative bacteria (i.e., the  $\alpha$ - and  $\gamma$ - Proteobacteria and CFB group) were dominant in the collection and represented 85% and 87% of the isolates for SML and UW, respectively. For both habitats, the  $\gamma$ -Proteobacteria achieved the highest fraction in the strains collection (47% and 53%, respectively). For the strains collected at the SML of Barcelona site, the Gram-positive group were the most abundant (Table 3), mainly Actinobacteria (27%).

*Phylogenetic diversity of isolates*

Similarity values for the 16S rRNA gene sequences of our isolates with previously reported species or clones in data bases are presented in Table 4. Strains with sequence similarities  $\geq 97\%$  were considered to be representative of the same species, similarities between 93% and 97% were considered to be representative of the same genus and sequence similarities  $< 93\%$  would represent difference above genus (Hägstrom et al., 2000). Overall, 22.5% of our isolates showed a 16S rRNA gene sequence similarity  $< 97\%$  to previously reported isolated species and around 10% showed similarities below 93% (Table 4). Therefore, we found consistent novelty at the genus level. The CFB group appeared to contain the higher proportion of unknown species (i.e., 7 out of 15 isolates [47%] showed a sequence similarity less than 97%). Next, 27% of  $\alpha$ - and 25% of  $\gamma$ -Proteobacteria showed sequence similarity lower than 97%. We also explored the closest environmental clone already known from databases (Table 4). Obviously, the percentage of isolates with sequence similarities  $> 97\%$  was higher when sequences were compared to environmental clones. Nevertheless, 9 strains showed similarities below 97% and 3 other strains (2 SML  $\gamma$ -Proteobacteria isolated in Barcelona and 1 UW  $\gamma$ -Proteobacteria isolated in Banyuls-sur-Mer) had similarities lower than 93% with them.

**Table 3.** Relative contribution of taxonomic groups to the culturable fraction of the sea surface microlayer (SML) and underlying waters (UW) bacterial communities of Banyuls-sur-Mer and Barcelona

	Barcelona		Banyuls-sur-Mer	
	SML	UW	SML	UW
<i>α-Proteobacteria</i>	19	18	19	24
<i>γ-Proteobacteria</i>	24	35	53	47
CFB group	8	12	13	16
Total Gram-negative	51	65	85	87
Actinobacteria	27	6	6	3
Firmicutes low (G+C)%	22	29	9	10
Total Gram-positive	49	35	15	13

**Table 4.** Sequence similarity of the isolates to closest matching relative in the data bank. Distribution of isolates from the different divisions among sequence similarity representing new genus (<93%), new species within previously characterized genus (93% to 97%) and previously characterized species (>97%)

Taxonomic group		n <sup>c</sup>	Closest sp. <sup>a</sup>			Closest clone <sup>b</sup>		
			Known sp. ≥ 97 %	New putative sp. 93 % - 97 %	New putative gen. < 93 %	Known sp. ≥ 97 %	New putative sp. 93 % - 97 %	New putative gen. < 93 %
Banyuls-sur-Mer site								
Gamma	SML	17	14 (82%)	2 (12%)	1 (6%)	17	0	0
	UW	17	12 (71%)	2 (12%)	3 (18%)	16 (94%)	0	1 (6%)
Gram -	Alpha	SML	6	4 (67%)	1 (17%)	6	0	0
		UW	10	9 (90%)	0	9 (90%)	1 (10%)	0
CFB	SML	4	1	2	1	4	0	0
	UW	6	5 (83%)	0	1 (17%)	5 (83%)	1 (17%)	0
Gram +	Actinobacteria	SML	2	2	0	2	0	0
		UW	1	0	1	0	1	0
	FLGC	SML	3	3	0	3	0	0
		UW	4	4	0	4	0	0
Barcelona site								
Gamma	SML	9	5 (56%)	0	4 (44%)	7 (78%)	0	2 (22%)
	UW	6	6	0	0	6	0	0
Gram -	Alpha	SML	7	5 (71%)	2 (29%)	7	0	0
		UW	3	1	2	2	1	0
CFB	SML	3	2	1	0	3	0	0
	UW	2	0	1	1	0	2	0
Gram +	Actinobacteria	SML	10	9 (90%)	1 (10%)	10	0	0
		UW	1	1	0	1	0	0
	FLGC	SML	8	8	0	8	0	0
		UW	5	5	0	5	0	0
All groups	SML	69	53 (77%)	9 (13%)	7 (10%)	67 (97%)	0	2 (3%)
(for both sites)	UW	55	43 (78%)	6 (11%)	6 (11%)	48 (87%)	6 (11%)	1 (2%)

<sup>a</sup> sequence similarity values to previously reported species

<sup>b</sup> sequence similarity values to previously reported environmental clones

<sup>c</sup> number of isolates

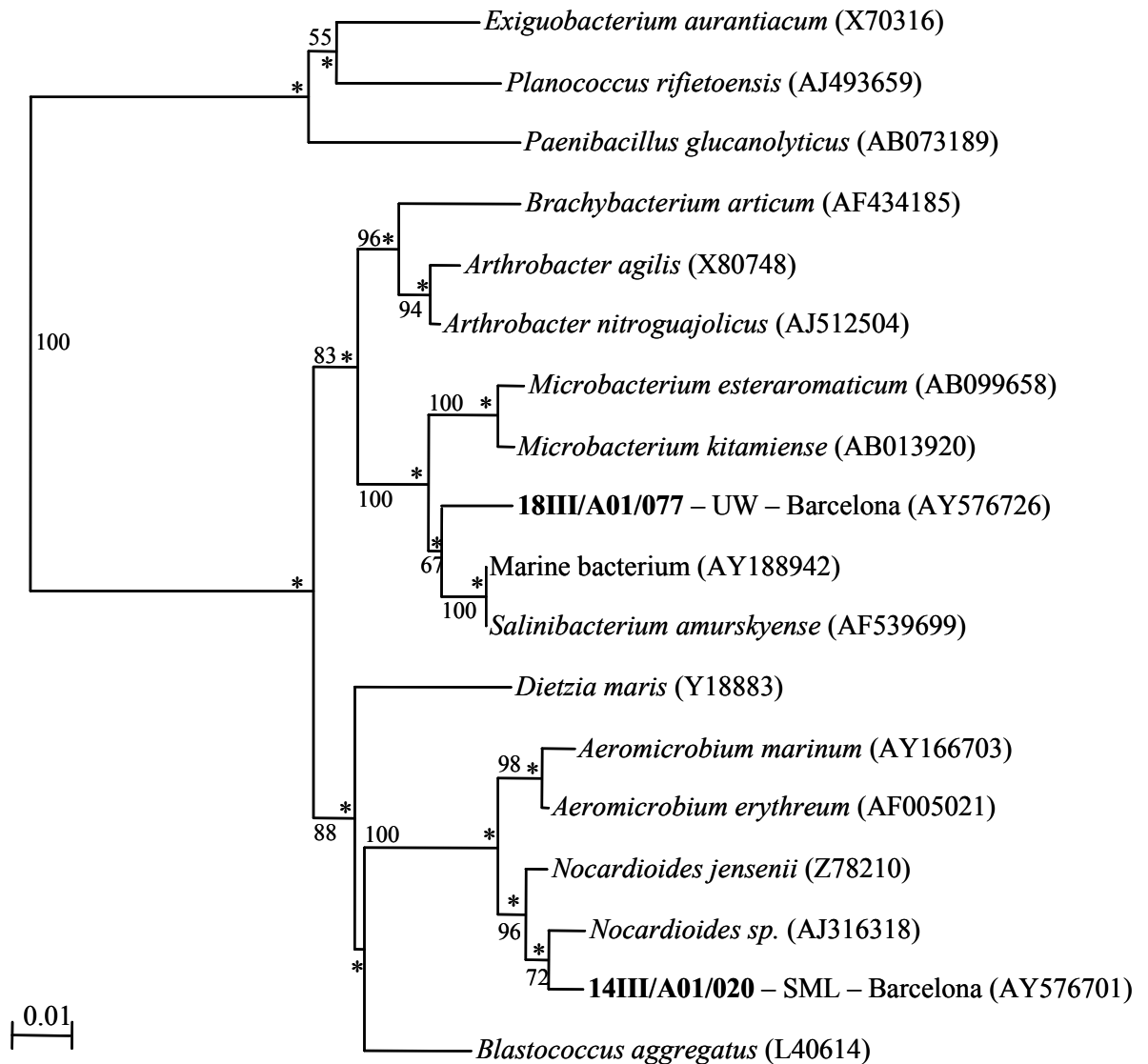
Phylogenetic trees were constructed with those SML and UW strains that were not closely related to already known species (<97%). Only 2 Gram-positive isolates were putative new species and were isolated from the SML and UW in Barcelona (Fig. 2). These 2 isolates belonged to the Actinobacteria, one (14III/A01/020) was related to the Nocardioidaceae and the other (18III/A01/077) to the Microbacteriaceae.

Seven isolates related to the CFB group showed low similarities with previously described species and are represented in Fig. 3. Among these, 4 isolates were isolated from the SML and 3 from UW and were distributed into 2 major families: 5 isolates (14III/A01/006, 14III/A01/012, 18III/A01/061, 18III/A01/068, and 12IX/A01/169) belonged to the Flavobacteriaceae and two (5IX/A01/134 and 13IX/A01/164) to the Flexibacteraceae.

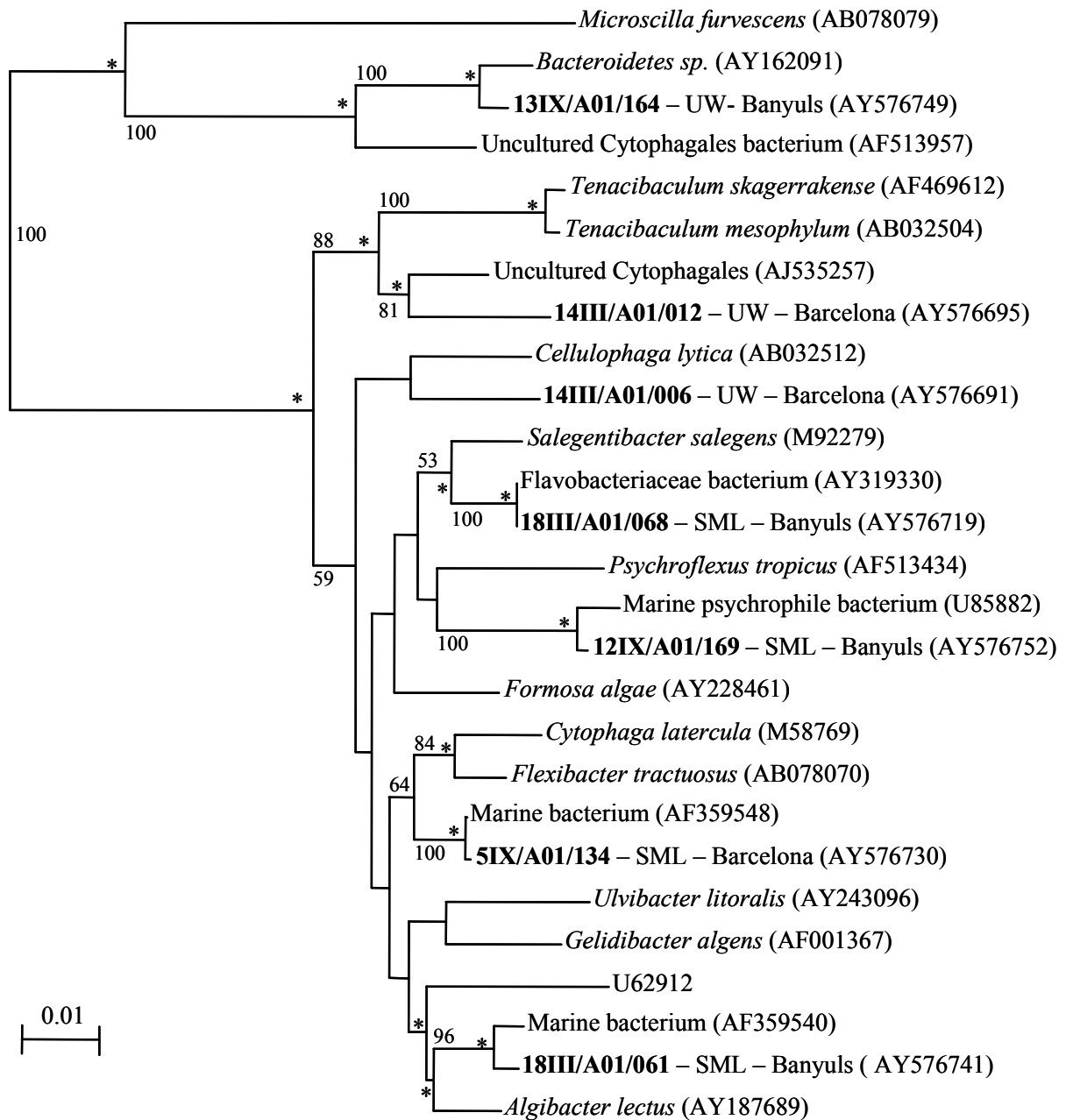
Finally, the  $\alpha$ - and  $\gamma$ - Proteobacteria were grouped on the same tree (Fig. 4). For  $\gamma$ -Proteobacteria (Table 4), only 10 sequences out of 12 were included in the tree since 2 isolates were very similar to the others and were omitted. Most of these isolates (14III/A01/015, 18III/A01/067, 26III/A02/220, 3IV/A02/222, 3X/A02/235, 17X/A02/237, and 17X/A02/240) clustered into 4 major groups representing the genera *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* and *Alteromonas*. For  $\alpha$ -Proteobacteria, 7 different isolates were found and most of them (i.e., all of them except 3X/A02/232) belonged to the order Rhodobacterales which includes the genera *Roseobacter* and *Erythrobacter*.

#### *Putative neustonic isolates*

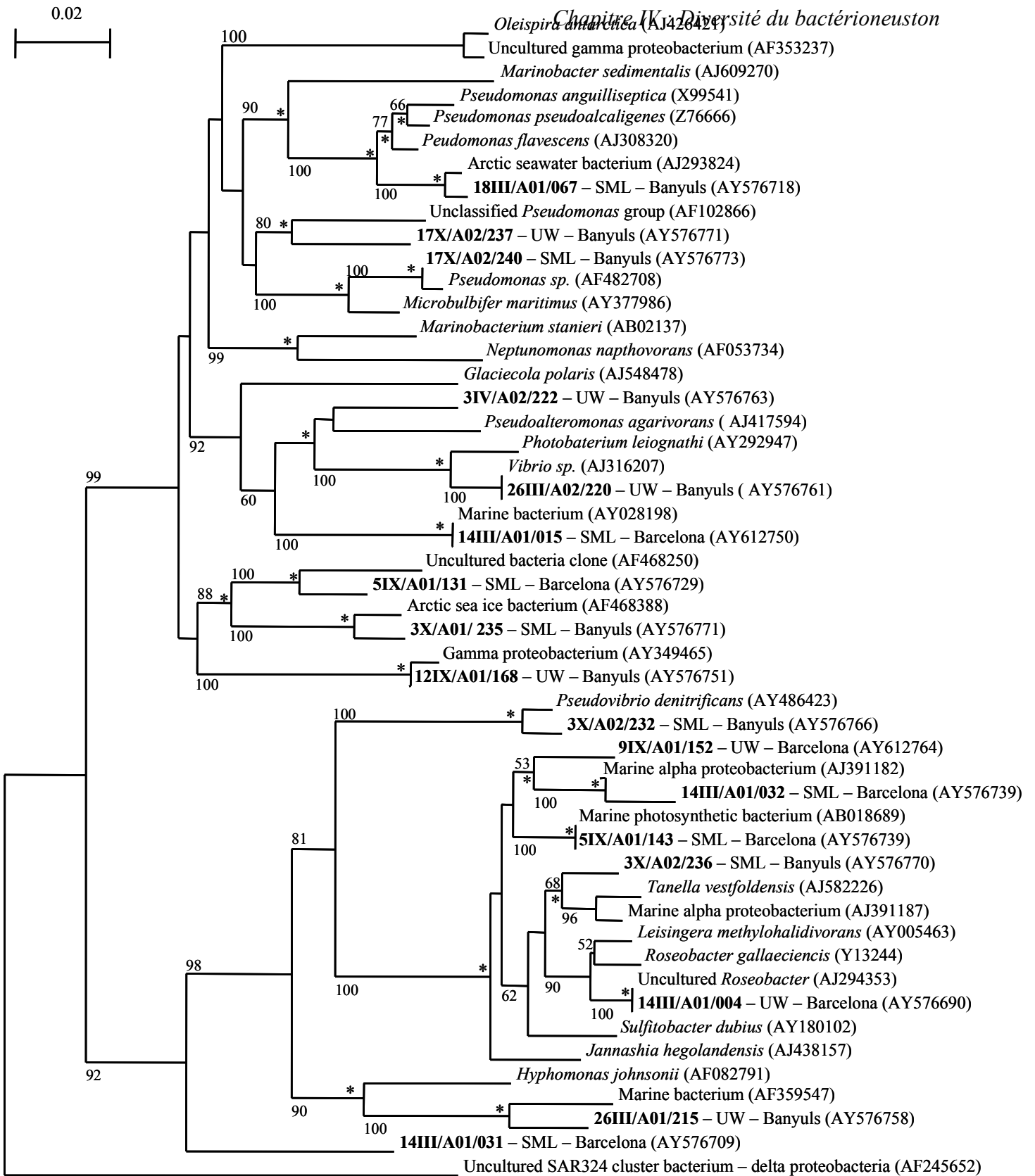
In order to explore whether some strains were specific to the air-seawater interface, we made a table including the 41 isolates that were exclusively isolated from the SML either of Barcelona or Banyuls-sur-Mer stations (Table 5). Initially, we considered these strains as potential neustonic bacteria. Most of isolates showed  $\geq 97\%$  similarity with either known bacterial species (71%) or environmental clones (95%). Environmental clones had diverse marine origins ranging from deep-sea sediments or hydrothermal vents to Arctic sea ice. However, we also found 2 potentially “neustonic”  $\alpha$ -Proteobacteria strains isolated from Barcelona (5IX/A01/131 and 14III/A01/031) which were poorly related to any previously described sequence (less than 93%). Most of the Gram-positive bacteria were closely related to environmental clones found in diverse ecosystems, mainly from soils and polluted areas. Therefore, only a few unusual bacterial taxa were present in our collection of SML isolates and most of the strains were closely related to widespread bacterial species.



**Fig. 2.** Phylogenetic tree constructed using almost complete 16S rDNA gene sequences of isolates and related species of Gram-positive bacteria. The tree was built with the neighbor-joining method by using the Kimura distance. Values at nodes indicate bootstrap percentages for 500 replicates. Values less than 50 % are not reported. Scale bar indicate a Kimura distance of 0.01. \* indicate branches that were also found using the Maximum Likelihood method.



**Fig. 3.** Phylogenetic tree constructed using almost complete 16S rDNA gene sequences of isolates and related species of CFB group. The tree was built with the neighbor-joining method by using the Kimura distance. Values at nodes indicate bootstrap percentages for 500 replicates. Values less than 50 % are not reported. Scale bar indicate a Kimura distance of 0.01. \* indicate branches that were also found using the Maximum Likelihood method.



**Fig. 4.** Phylogenetic tree constructed using almost complete 16S rDNA gene sequences of isolates and related species of proteobacteria. The tree was built with the neighbor-joining method by using the Kimura distance. Values at nodes indicate bootstrap percentages for 500 replicates. Values less than 50 % are not reported. Scale bar indicate a Kimura distance of 0.02. \* indicate branches that were also found using the Maximum Likelihood method.

**Table 5.** List of putative neustonic isolates sequenced in this study

Code	Acc. N°	Closest species (% homology)	Closest clone acc. N° (% homology)	Origin of closest clone
<b>Gamma proteobacteria</b>				
Banyuls - sur - Mer isolates				
3X/A02/235	AY576769	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (90%)	AF468388 (98%)	Arctic sea ice
17X/A02/240	AY576773	<i>Microbulbifer maritimus</i> (96%)	AF500211 (99%)	?
18III/A01/067	AY576718	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> (96%)	AJ293824 (98%)	Arctic seawater
18III/A01/066	AY576717	<i>Pseudomonas putida</i> (98%)	AJ297355 (98%)	freshwater fishfarm
27III/A02/219	AY576760	<i>Marinobacter litoralis</i> (99%)	AF479689 (99%)	East Sea in Korea
18III/A01/058	AY576713	<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i> (99%)	AY028200 (99%)	diatom detritus
17X/A02/242a	AY576775	<i>Alcanivorax venustensis</i> (100%)	AF328762 (100%)	Mediterranean Sea
Barcelona isolates				
5IX/A01/131	AY576729	<i>Marinobacter stanieri</i> (90%)	AF228694 (91%)	marine environment
14III/A01/031	AY576709	<i>Oleispira antarctica</i> (91%)	AF353237 (91%)	Arctic Ocean
14III/A01/015	AY612750	<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i> (92%)	AY028198 (98%)	diatom detritus
7IX/A01/156	AY576745	<i>Alteromonas infernus</i> (98%)	AB015135 (99%)	deep-sea hydrothermal vent
6IX/A01/151	AY576743	<i>Enterobacter sakazakii</i> (99%)	AB004746 (99%)	clinical specimens
7IX/A01/137	AY576733	<i>Pseudoalteromonas mariniglutinosa</i> (99%)	AJ551143 (99%)	deep sea sediments
14III/A01/025	AY576705	<i>Pseudoxanthomonas broegbernensis</i> (99%)	AF273082 (99%)	diverse environments
<b>Alpha proteobacteria</b>				
Banyuls - sur - Mer isolates				
3X/A02/236	AY576770	<i>Ruegeria atlantica</i> (95%)	AJ391187 (97%)	Adriatic Sea
18III/A01/069	AY576720	<i>Paracoccus aminophilus</i> (98%)	D32239 (98%)	soil
18III/A01/070	AY576721	<i>Paracoccus marcusii</i> (99%)	AJ532681 (99%)	uranium mining waste piles
Barcelona isolates				
5IX/A01/143	AY576739	<i>Jannaschia helgolandensis</i> (95%)	AB018689 (99%)	marine environments
5IX/A01/132	AY615725	<i>Salipiger muscesens</i> (97%)	AY162092 (99%)	Sargasso Sea
14III/A01/023	AY576704	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (99%)	AY221181 (99%)	soil
5IX/A01/139	AY576735	<i>Sulfitobacter pontiacus</i> (99%)	AJ298355 (99%)	Mediterranean sea
<b>Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides group</b>				
Banyuls - sur - Mer isolates				
12IX/A01/169	AY576752	<i>Psychroflexus tropicus</i> (91%)	U85882 (97%)	Antarctic sea ice
18III/A01/068	AY576719	<i>Salegentibacter salegens</i> (95%)	AY319330 (99%)	Southern Ocean
18III/A01/061	AY576714	<i>Algibacter lectus</i> (96%)	AF359540 (97%)	dinoflagellates
Barcelona isolates				
14III/A01/010	AY576693	<i>Maribacter sedimenticola</i> (97%)	AF367849 (99%)	sea water
7IX/A01/155	AY576744	<i>Muricauda ruestringensis</i> (97%)	AY445076 (98%)	East Sea in Korea
<b>Actinobacteria</b>				
Banyuls - sur - Mer isolate				
17X/A02/245	AY576777	<i>Arthrobacter agilis</i> (99%)	X80748 (99%)	water, soil and human skin
Barcelona isolates				
14III/A01/020	AY576701	<i>Nocardioides jensenii</i> (96%)	AJ316318 (99%)	mural painting environments
14III/A01/014	AY576697	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i> (97%)	X84440 (97%)	piggery waste
14III/A01/017	AY576699	<i>Brachybacterium arcticum</i> (99%)	AF468445 (100%)	Arctic sea ice
14III/A01/011	AY576694	<i>Microbacterium kitamiense</i> (99%)	AB042082 (99%)	plant-nematode
6IX/A01/148	AY576742	<i>Microbacterium esteraromaticum</i> (99%)	AB099658 (99%)	activated sludge
14III/A01/022	AY576703	<i>Micrococcus luteus</i> (99%)	AJ441006 (99%)	mats from Antarctic lakes
14III/A01/028	AY576707	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> (100%)	AJ512504 (100%)	forest soil
14III/A01/021	AY576702	<i>Dietzia maris</i> (100%)	Y18883 (100%)	soil, skin and intestine of carp
<b>Firmicutes Low GC content</b>				
Banyuls - sur - Mer isolates				
5IX/A01/142b	AY576738	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> (99%)	AB073189 (99%)	soil
13IX/A01/167	AY576750	<i>Planococcus rifietoensis</i> (99%)	AJ493659 (99%)	mat from a sulfurous spring



## Chapitre IV : Diversité du bactérioneuston

### Barcelona isolates

6IX/A01/147	AY612762	<i>Bacillus firmus</i> (99%)	AF348731 (99%)	selenium-contaminated hypersaline pond
9IX/A01/138	AY576734	<i>Staphylococcus pasteurii</i> (99%)	AJ276810 (99%)	biodeteriorated wall paintings
14III/A01/027	AY576706	<i>Staphylococcus aureus</i> (99%)	L37597 (99%)	human
5IX/A01/135	AY576731	<i>Bacillus cereus</i> (100%)	Y15466 (100%)	intestinal symbionts of animals

---

## Discussion

### *Range of culturability*

Bacterial culturability in oligotrophic to mesotrophic marine habitats generally range from 0.001% to 1%, whereas this percentage can increase in nutrient-rich environments (e.g., activated sludge) (Amann et al., 1995). The percentages reported in this study varied greatly but the mean value was lower at the oligotrophic site in agreement with this general trend. At both stations, culturability was higher in the SML. The higher percentages of culturability recorded in the SML may be explained by the accumulation of organic matter at this interface (POC enrichment: 1.8 (n=5) and 3.2 (n=7) for Banyuls-sur-Mer and Barcelona sites respectively) (Joux et al., *In preparation*) that can sustain bacterial activity or at least, viability. Other reports have shown biochemical and bacterial activities increased in the SML when compared to UW (Sieburth, 1971; Carlucci et al., 1985; Mudryk et al., 1991). This would explain why bacterial species isolated from the SML represent a more important fraction of total bacterial than in UW, although the fraction of unculturable cells remains the most important in both cases.

In addition, the higher culturability was found in Barcelona site (percentage up to 14.5%). This may be explained by the presence of a sewage outfall in the sampling area, which results in nutrients and freshwater bacteria inputs. This input is congruent with the highest proportion of Gram-positive bacteria isolated at this station (see below).

### *Structure of bacterial communities*

In this study, we used a genetic fingerprinting technique to compare the whole bacterial community inhabiting the SML and the bacterial populations living a few dm below. Genetic fingerprinting methods like single-strand conformation polymorphism (SSCP) allow the separation of DNA fragments of the same size but with a different base composition, providing a rapid picture of the most abundant 16S rDNA sequences within a community of PCR-amplified 16S rDNAs. Overall, the molecular fingerprints indicated that in most cases SML and UW were dominated by the same bacterial populations. The fact that similar SSCP profiles were found in the SML and UW suggests that, at least for predominant bacterial populations (above 1% of total bacteria), there was no evidence for unusual neustonic species which do not occur in UW. This is congruent with the hypothesis that most bacteria in the SML are planktonic cells that accumulate from a passive flotation process, although these

cells may potentially grow in the SML. This result discouraged us for further exploring the bacterioneuston by clone libraries.

We cannot discard, however, differences for minor populations such as those recovered by culture enrichment that could escape detection by SSCP fingerprinting. These minor populations inhabiting the SML are good candidates for isolation, identification and characterization in the laboratory looking for adaptations such as resistance to high solar radiation (Agogué et al., *submitted*). Only in Barcelona, and in a few occasions, we found consistent differences between SML and UW. Such differences, however, did not follow consistent patterns and probably originated from the sewage sludge outfall.

#### *Taxonomic groups of culturable bacteria from the two contrasted sites*

The dominant bacterial groups found in SML and UW isolates collected at Banyuls-sur-Mer site were similar to those commonly found in seawater samples (Benlloch et al., 1995; Bowman et al., 1997; Pinhassi et al., 1997; Eilers et al., 2000; 2001). Although at Banyuls-sur-Mer site only 0.34% of the bacteria from UW were culturable, most of them were also found in the SML although the cultivability was nearly 5 times higher (i.e., 1.58%) (Table 1). Around one half of the bacteria isolated from Banyuls-sur-Mer site belonged to  $\gamma$ -*Proteobacteria*, and a significant proportion of the strains belonged to  $\alpha$ -*Proteobacteria* and CFB. Gamma-*Proteobacteria* represents a large phylogenetic group of cosmopolitan species generally well represented in culture collections (Bowman et al., 1997; Pinhassi et al., 1997; Suzuki et al., 1997; Eilers et al., 2000). The high proportion of  $\gamma$ -*Proteobacteria* in collections can be partly biased since the isolation procedure may favor these bacterial strains which are able to rapidly grow on nutrient-rich media. Similarly, the *Cytophaga-Flavobacteria* cluster is characterized by species mainly aerobic and especially proficient in degrading complex polymers (Kirchman, 2002). Many CFB species are able to form colonies on solid media and it can also explain why these species are well represented in the collection of isolates. The same occurrence of  $\gamma$ -*Proteobacteria* and CFB was found in both SML and UW suggesting that SML species are not different from UW species.

In Barcelona, the dominant groups included species commonly found in wastewater and polluted coastal areas (Hugenholtz et al., 1998). FLGC were well represented in both SML and UW. The Gram-positive species isolated at Barcelona are commonly found in abundance in activated sludge (Kampfer et al., 1996; Snaidr et al., 1997) and were probably released from the sewage outfall. Among Gram-positive isolates, Actinobacteria, (i.e., high

G+C gram-positive group) (Stackebrandt et al., 1997) were more abundant in the SML than in UW. *Actinobacteria* are known to degrade toxic compounds such as hydrocarbons, pesticides and heavy metals in soil and aquatic environments (Kashner et al., 1994; De Schrijver and De Mot, 1999; Gremion et al., 2003; Zhuang et al., 2003). Such compounds have been already found to accumulate in the SML at Barcelona station (Valls et al., 1990; Bayona et al., 1991) and, therefore, these strains would probably be well adapted to high concentration of these toxic substances in the SML.

#### *Bacterioneuston specificity*

Although some isolates were only found in the SML, the 16S rDNA sequence analysis indicated that they were closely related to isolates retrieved from different marine environments and different water depths. In addition, the apparent higher occurrence of *Actinobacteria* in the SML at both stations should be interpreted with caution due to (i) the low number of isolates (especially in the case of Banyuls-sur-Mer, with only 3 isolates) and (ii) the influence of the treated-wastewater outfall in the Barcelona sampling station. Norkrans (1980) explained the dominance of *Bacillus* species in the SML by the fact that spore-forming species coming from the air, are more resistant to desiccation and to solar radiation than the bubble-transported marine species are. For Carty and Colwell (1975), bacteria belonging to *Bacillus* and *Micrococcus* genera were also found in abundance in air and may have a terrestrial origin. Although terrestrial origin cannot be excluded in coastal areas, these species cannot be considered as neustonic bacteria. From this study and considering these two coastal sites, we hypothesize that most of the bacteria living at the air-water interface are planktonic bacteria that may accumulate via a flotation process when they attach to particles and/or bubbles coming from the water column. A fraction of these bacteria may also accumulate via atmospheric deposition. As a consequence, viable cells collected from the SML may be those who have developed mechanisms to resist intense solar radiations and/or high concentrations of toxic compounds. To our knowledge, this is the first field experiment that suggests that specific neustonic bacterial species are rather scarce than abundant. However, existence of specific neustonic populations at the marine SML cannot be excluded since some adapted species have already been described in freshwater environments (Glöckner et al., 1998; Paddies et al., 2004). If this is the case for marine environments, they do not dominate in coastal areas.

*Phylogenetic richness of the culture collection*

The phylogenetic analyses revealed high species diversity among the isolated bacteria, with 16S rRNA gene sequence similarities ranging from 88% to 100% to already known species (Table 4). Particularly, around 25% of the isolated strains showed sequence similarities lower than 97% to previously reported species, 10% of them having sequence similarities lower than 93%. Such low similarity values indicate that we were able to bring into culture new marine genera or even new families (Devereux et al., 1990). Most of these strains were CFB (i.e., 47%), whereas *Proteobacteria* generally showed higher similarity values to already known species. These observations agreed with others reports on the prevalence of novel marine bacteria among the culturable bacterial fraction (Bowman et al., 1997; Pinhassi et al., 1997; Suzuki et al., 1997; Hägstrom et al., 2000). We also investigated the degree of similarity of our isolates to environmental sequences deposited in databases (Table 4). Most of the isolates (93%) showed high similarities to reported environmental clones. Seven percent of the isolates (9 isolates), however, had similarities to clones lower than 97%. Therefore, we found putative genera that were never detected before through both cultivation and culture-independent studies and may have a great interest for future research. Although we initially expected that these new taxonomic groups might be dominant bacterial components in the unexplored SML habitat, these potential “new” bacterial genera were not specific for the SML. This also indicates that the sea-surface layers from 0 to 100 cm are still a poorly known environment from a taxonomic point of view and represent a natural source of new organisms.

**Conclusion**

Using both culture-independent and culture-dependent methods to analyse bacterial communities, we have shown that bacterial communities inhabiting the sea surface microlayer are not substantially different from those found in underlying waters. Therefore, the term “bacterioneuston community” is probably not appropriate in coastal areas and most bacteria that accumulated in the SML are more likely planktonic cells transported by passive flotation and, to a less extent, cells brought by atmospheric deposition. However, we isolated new species and genera which are of great interest for further understanding the physiology, ecology and metabolism of marine bacteria. In this sense, we can consider the first centimetres of the marine water column as a particular environment for microorganisms that may hold unusual species and groups.

## Experimental procedures

### *Field sites and sample collection*

Samples were collected at two coastal stations in the NW Mediterranean Sea: the Bay of Banyuls-sur-Mer (France) and off the Olympic Harbour in Barcelona (Spain). The Bay of Banyuls-sur-Mer is oligotrophic (Médernach et al., 2001; Grémare et al., 2003). The Barcelona site is moderately eutrophic and heavily impacted by the urban sewage sludge outfall (Valls et al., 1990; Bayona et al., 1991; Chalaux et al., 1994). Samples were collected early in the morning around 4-5 h during four field campaigns (March 2001, September 2001, March 2002 and June-July 2002). The surface microlayer (SML) was collected by different types of devices as described in detail in Agogué et al. (2004). Most of the SML samples were collected by a metal screen and a glass plate and to a lesser extent by a nylon screen, a Harvey' roller and two types of membranes (Teflon and polycarbonate) (Hühnerfuss, 1981a, b; Agogué et al., 2004). Samples from underlying waters (UW) were collected by submerging a polycarbonate bottle and opening it at 0.5 m depth.

### *Enumeration of total bacteria*

For flow cytometry analyses of heterotrophic bacteria, samples (3 ml) were fixed with formaldehyde (2% final concentration) in cryotubes. The samples were left at room temperature for 10-15 min, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. The samples were run through a flow cytometer (FACScan, Becton Dickinson) equipped with a 488 nm, 15 mW Argon laser. Heterotrophic bacteria were stained with a nucleic acid dye (SYBR-Green I; final concentration 0.01% [v/v] of the commercial solution; Molecular Probes) and stored for at least 15 min at room temperature in the dark before counting. Stained bacteria were discriminated and counted according to their right angle light scatter and the green fluorescence measured at 530/30 nm (Marie et al., 1997; 2000).

### *DNA extraction and SSCP analysis*

Samples were collected from the SML using the metal screen sampler and from the UW and transferred to the laboratory within 1-3 hours interval. There, 1 litre sample was sequentially filtered by 5  $\mu\text{m}$  and 0.2  $\mu\text{m}$  pore size polycarbonate filters using a vacuum pump and the filters were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Filters containing the 5-0.2  $\mu\text{m}$  size range were thawed and resuspended in 900  $\mu\text{l}$  of lysis buffer (40 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8, 0.75 M sucrose). Lysozyme was added (1 mg/ml final concentration) and the suspension was incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 45 min. After addition of proteinase K (0.2 mg/ml final concentration)

and sodium dodecyl sulfate (1% final concentration), the samples were incubated at 55°C for 1h (Dumestre et al., 2002). DNA was then extracted with an equal volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1 [v/v/v]) and was precipitated by addition of one-tenth of the volume of 3 M sodium acetate and two volumes of cold isopropanol followed by incubation for 3 h at -20°C (Casamayor et al., 2000). The DNA was recovered by centrifugation at 10,000 X g for 30 min and the pellet was washed with cold ethanol 70%, dried, and resuspended in 20 µl of sterile MQ water. For PCR amplification the bacterial primers W49 dir (*E. coli* position 331; 5'-ACG-GTC-CAG-ACT-CCT-ACG-GG-3') and W34 rev (*E. coli* position 533; 5'-TTA-CCG-CGG-CTG-CTG-GCA-C-3'); 5'-labeling with fluoresceine phosphoramidite TET, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) were used as reported (Servais et al., 2003). For SSCP fingerprinting analysis, PCR products were heat denatured at 94°C for 5 min and immediately placed on ice for at least 10 min. A fluorescently-labelled internal size marker was added (Genescan-400 Rox, Applied Biosystems). The size standard contained a different fluorophore and permitted, after computing correction, a reliable comparison of patterns from each sample. SSCP electrophoresis was carried out as previously described (Servais et al., 2003) using the ABI 310 Genetic Analyzer equipped with a capillary tube (Applied Biosystems). Computer files were analyzed with the 310 Genescan Analysis software (Applied Biosystems).

#### *Enumeration and isolation of culturable bacteria*

Samples for culturable bacteria were processed within 4 h after sampling. Serial dilutions (1:10 and 1:100) were prepared with filter-sterilized seawater and 100 µl of each dilution was plated on 3 replicate plates on Marine Agar 2216 media (Difco). CFU (colony forming units) were counted after incubation at 25°C in the dark for 1-2 weeks. Isolates were selected from the plates according to differences in colour and shape. Then, isolates were picked and purified. We assigned a code for each isolated strains, for example the code 14III/A01/020 correspond to a strain isolates the March 14 (14III) in the year 2001 (A01) and numbered 20.

#### *Molecular characterization of the strains*

For most of the isolates, the DNA suspension for the PCR consisted of colonies picked from agar plates and resuspended in 500 µl of sterile water. For refractory isolates, cells were lysed and the DNA was extracted. Colonies were picked and resuspended in 500 µl of lysis buffer (EDTA 40 mM, Tris 50 mM pH 8, 750 mM saccharose) and incubated with lysozyme (final concentration, 1 mg ml<sup>-1</sup>) at 37°C for 45 min with gentle agitation. Sodium dodecyl sulfate

(final concentration, 0.5 % [w/v]) and proteinase K (final concentration 0.1 mg ml<sup>-1</sup>) were added, and the samples were incubated at 55°C for 1 h. DNA was extracted with an equal volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1 [v/v/v]) and chloroform-isoamyl alcohol (24:1 [v/v]). Then, DNA was precipitated with 2 volumes of isopropanol and recovered by centrifugation. Pellets were washed with 70% cold ethanol (-20°C), air dried, and resuspended in 50 µl of sterile water.

The 16S rRNA gene was amplified by PCR by using two primers, SAdir (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAGA-3'; *Escherichia coli* 16S rRNA gene positions 8 to 27, forward) and S17 Rev (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3'; *Escherichia coli* 16S rRNA gene positions 1491 to 1508, reverse) (Brosius et al., 1978). Reaction mixtures of 50 µl contained 5 µl of 10X PCR buffer (supplied with the enzyme), 200 µM of dNTPs mix (Eurogentec), 50 pmol of each primer, 1 U of Super Taq (HT Biotechnology), 5 µl of washed cells (or 1 µl of DNA) and MilliQ water to the 50 µl volume. PCR reaction was carried out in a Robocycler (Stratagene). The thermal PCR profile was as follows: initial denaturation at 94°C for 3 min followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, primer annealing at 48°C for 1.5 min, and elongation at 72°C for 1 min. The final elongation step was 5 min at 72°C. The 16S rDNA products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gels. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis was performed by digesting the 16S rDNA PCR products with the restriction endonuclease *Hin6* I (Eurogentec) at 37°C over night, and the resulting electrophoretic patterns obtained in 2% agarose gels were used to group the isolates. The 16S rDNA products representing each distinct pattern were then sequenced in an automatic DNA analysis system (Genome express). The nucleotide sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank database under accession no. AY576689 to AY576777 and AY612746 to AY612779.

#### *Phylogenetic analysis*

About 1300 bp of the 16S rDNA gene were used in a BLAST search (Altschul et al., 1990), and the phylogenetic position of the strains showing less than 97% similarity with already described species was investigated. A multiple sequence file was produced including the new sequences and their closest relatives given by the BLAST query (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Alignments were performed using the CLUSTAL W program (Thompson et al., 1994) and were then manually refined using the SEAVIEW software (Galtier et al., 1996). Phylogenetic trees were constructed by the neighbour-joining (Saitou and Nei, 1987) and maximum-



likelihood (Felsenstein, 1981) methods using the PHYLO-WIN software (Galtier et al., 1996), and graphic representation of the resulting trees was made using NJPLOT software (Perrière and Gouy, 1996). Indel containing regions were excluded from the analysis. Evolutionary distance values were calculated according to Kimura 2 parameters for neighbour-joining analysis. Bootstrap values were determined according to Felsenstein (1985).

**Acknowledgements**

This work was supported by the European Commission (Research Directorate General-Environment Program-Marine Ecosystems) through the AIRWIN project “Structure and role of biological communities involved in the transport and transformation of persistent pollutants at the marine AIR-Water Interface” (contract EVK3-CT2000-00030). The AIRWIN project is part of the EC IMPACTS cluster. During the final writing of this work EOC was supported by the Programa Ramón y Cajal from the Spanish MCYT. We thank Nicole Batailler, Philippe Catala and Laurent Intertaglia from the OOB and Harry Witte from the NIOZ for technical assistance. We also thank Nyree West for language improvements.

- Agogué, H., Joux, F., Obernosterer, I., and Lebaron, P. (*submitted*) Resistance of bacterioneuston to solar radiation.
- Agogué, H., Casamayor, E.O., Joux, F., Obernosterer, I., Dupuy, C., Lantoine, F. et al. (2004) Comparison of samplers for the biological characterization of the sea surface microlayer. *Limnol Oceanogr : Methods* **2**: 213-225.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Amann, R., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143-169.
- Bayona, J.M., Fernandez, P., Porte, C., Tolosa, I., Valls, M., and Albaiges, J. (1991) Partitioning of urban wastewater organic microcontaminants among coastal compartments. *Chemosphere* **23**: 313-326.
- Benlloch, S., Rodriguez-Valera, F., and Martinez-Murcia, A.J. (1995) Bacterial diversity in two coastal lagoons deduced from 16S rDNA PCR amplification and partial sequencing. *FEMS Microb Ecol* **18**: 267-279.
- Bowman, J.P., McCammon, S., Brown, M.V., Nichols, D.S., and McMeekin, T.A. (1997) Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3068-3078.
- Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J., and Noller, H.F. (1978) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 4801-4805.
- Carlucci, A.F., Craven, D.B., and Henrichs, S.M. (1985) Surface-film microheterotrophs: amino acid metabolism and solar radiation effects on their activities. *Mar Biol* **85**: 13-22.
- Carty, C., and Colwell, R.R. (1975) A microbial study of air and surface water microlayer in the open ocean. *J Wash Acad Sci* **65**: 148-153.
- Casamayor, E.O., Schäfer, H., Baneras, L., Pedros-Alio, C., and Muyzer, G. (2000) Identification and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **66**: 499-508.
- Chaloux, N., Bayona, J.M., and Albaiges, J. (1994) Determination of nonylphenols as pentafluorobenzyl derivatives by capillary gas chromatography with electroncapture and mass spectrometric detection in environmental matrices. *J Chromatogr A* **686**: 275-281.

- De Schrijver, A., and De Mot, R. (1999) Degradation of pesticides by actinomycetes. *Crit Rev Microb* **25**: 85-119.
- Devereux, R., He, S.H., Doyle, C.L., Orkland, S., Stahl, D.A., LeGall, J., and Whitman, W.B. (1990) Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *J Bacteriol* **172**: 3609-3619.
- Dumestre, J.F., Casamayor, E.O., Massana, R., and Pedros-Alio, C. (2002) Changes in bacterial and archaeal assemblages in an equatorial river induced by the water eutrophication of Petit Saut dam reservoir (French Guiana). *Aquat Microb Ecol* **26**: 209-221.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Glöckner, F.O., and Amann, R. (2000) Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the north sea. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3044-3051.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Peplies, J., Glöckner, F.O., Gerdt, G., and Amann, R. (2001) Isolation of novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5134-5142.
- Fehon, W.C., and Oliver, J.D. (1979) Taxonomy and distribution of surface microlayer bacteria from two estuarine sites. *Estuaries* **2**: 194-197.
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* **17**: 368-376.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **30**: 783-791.
- Galtier, N., Gouy, M., and Gautier, C. (1996) SEAVIEW and PHYLO-WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *CABIOS* **12**: 543-548.
- Glöckner, F.O., Babenzien, H.D., and Amann, R. (1998) Phylogeny and identification in situ of *Nevskia ramosa*. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1895-1901.
- Grémare, A., Amouroux, J.M., Cauwet, G., Charles, F., Courties, C., De Bovée, F. et al. (2003) The effects of a strong winter storm on physical and biological variables at a shelf site in the Mediterranean. *Oceanol Acta* **26**: 407-419.
- Gremion, F., Chatzinotas, A., and Harms, H. (2003) Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that *Actinobacteria* might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. *Environ Microbiol* **5**: 896-907.
- Hägström, R., Pinhassi, J., and Zweifel, U.L. (2000) Biogeographical diversity among marine bacterioplankton. *Aquat Microb Ecol* **21**: 231-244.
- Hardy, J.T. (1982) The sea surface microlayer: biology, chemistry and anthropogenic enrichment. *Prog Oceanog* **11**: 307-328.

- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., and Pace, N.R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* **180**: 4765-4774.
- Hühnerfuss, H. (1981a) On the problem of sea surface film sampling: a comparison of 21 microlayer-, 2 multilayer-, and 4 selected subsurface- samplers. Part 1. *Sonderdruck aus Meerestechnik* **12**: 137-142.
- Hühnerfuss, H. (1981b) On the problem of sea surface film sampling: a comparison of 21 microlayer-, 2 multilayer-, and 4 selected subsurface- samplers. Part 2. *Sonderdruck aus Meerestechnik* **12**: 170-173.
- Joux, F., Agogué, H., Obernosterer, I., Dupuy, C., Rheinthal, T., Herndl, G.J., and Lebaron, P. (*In preparation*) Microbial food webs in sea surface microlayer.
- Kampfer, P., Erhart, R., Beimfohr, C., Bohringer, J., Wagner, M., and Amann, R. (1996) Characterization of bacterial communities from activated sludge: culture-dependent numerical identification versus in situ identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microb Ecol* **32**: 101-121.
- Kashner, M., Breuerjammali, M., and Mahro, B. (1994) Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic-hydrocarbons (PAH). *Appl Environ Biotechnol* **41**: 267-273.
- Kirchman, D.L. (2002) The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microb Ecol* **39**: 91-100.
- Liss, P.S., and Duce, R.A. (1997) *The sea surface and global change*: Cambridge University Press.
- MacIntyre, F. (1974) The top millimeter of the ocean. *Sci Am* **230**: 62-77.
- Maki, J.S. (2002) Neuston microbiology: life at the air-water interface. In *The Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Bitton, G. (ed). New York: John Wiley & Sons, pp. 2133-2144.
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., and Vault, D. (1997) Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl Environ Microbiol* **63**: 188-193.
- Marie, D., Simon, N., Guillou, L., Partensky, F., and Vault, D. (2000) Flow cytometry analysis of marine picoplankton. In *In Living Color : Protocols in Flow Cytometry and Cell Sorting*. Diamond, R.A., and DeMaggio, S. (eds). Berlin - Heidelberg: Springer Verlag, pp. 421-454.

- Médernach, L., Grémare, A., Amouroux, J.M., Colomines, J.C., and Vétion, G. (2001) Temporal changes in the amino acid contents of particulate organic matter sedimenting in the Bay of Banyuls-sur-Mer (northwestern Mediterranean). *Mar Ecol Prog Ser* **214**: 55-65.
- Monzikoff, A., Brinis, A., Dallot, S., Gondry, G., Saliot, A., and Lebaron, P. (2004) Field study of the chemical characterization of the top ocean surface using various samplers. *Limnol Oceanogr : Methods* **In press**.
- Mudryk, Z., Korzeniewski, K., and Falkowska, L. (1991) Bacteriological investigation of the surface microlayer of the Gulf of Gdansk. *Oceanologia* **30**: 93-103.
- Norkrans, B. (1980) Surface microlayers in aquatic environments. In *Advances in Microbial Ecology*. Alexander, M. (ed). New York: Plenum Press, New York and London, pp. 51-83.
- Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J., and Olsen, G.J. (1986) The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv Microb Ecol* **9**: 1-55.
- Paddies, T., Babenzien, H.D., and Cypionka, H. (2004) Distribution of *Nevskia ramosa* and other rosette-forming neustonic bacteria. *Microb Ecol* **47**: 218-223.
- Perrière, G., and Gouy, M. (1996) WWW-Query : an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* **78**: 364-369.
- Pinhassi, J., Zweifel, U., and Hagstrom, A. (1997) Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3359-3366.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Servais, P., Casamayor, E.O., Courties, C., Catala, P., Parthuisot, N., and Lebaron, P. (2003) Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content. *Aquat Microb Ecol* **33**: 41-51.
- Sieburth, J.M. (1968) Observations on bacteria planktonic in Narragansett Bay, Rhode Island; a resume. *Bull Misaki Mar Biol Inst* **12**: 49-64.
- Sieburth, J.M. (1971) Distribution and activity of oceanic bacteria. *Deep-Sea Res* **18**: 1111-1121.
- Snaird, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1997) Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2884-2896.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., and Ward-Rainey, N.L. (1997) Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 479-491.

Suzuki, M.T., Rappé, M.S., Haimberger, Z.W., Winfield, H., Adair, N., Strobel, J., and Giovannoni, S.J. (1997) Bacterial diversity among small-subunit rRNA genes clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Appl Environ Microbiol* **63**: 983-989.

Thompson, J., Higgins, D., and Gibson, T. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.

Tsyban, A.V. (1971) Marine bacterioneuston. *J Oceanogr Soc Japan* **27**: 56-66.

Valls, M., Bayona, J.M., and Albaiges, J. (1990) Broad spectrum analysis of ionic and non-ionic organic contaminants in urban wastewaters and coastal receiving aquatic systems. *Inter J Environ Anal Chem* **39**: 329-348.

Zhuang, W.-Q., Tay, J.-H., Maszenan, A.M., Krumholz, L.R., and Tay, S.T.-L. (2003) Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. *Lett Appl Microbiol* **36**: 251-257.

ZoBell, C.E. (1946) *Marine microbiology. A monograph on hydrobacteriology*: Waltham, Mass.

## IV. 2. CARACTERISATION PHYSIOLOGIQUE DES SOUCHES DE LA COLLECTION : DETERMINATION DE L'HYDROPHOBICITE

### IV. 2. 1. Contexte de l'étude

Les propriétés de surface des bactéries jouent un rôle essentiel dans leur accumulation au niveau des interfaces de manière générale et particulièrement au niveau de l'interface air-mer (Kjelleberg et Stenström 1980, Hermansson *et al.* 1982, Shafer *et al.* 1998).

De nombreuses études concernant les interactions entre les bactéries et le film lipidique de surface (Hermansson *et al.* 1979, Kjelleberg et Stenström 1980) et l'adhésion des bactéries aux bulles de gaz (Blanchard et Syzdek 1970, Blanchard et Syzdek 1978) ont mis en évidence l'importance des interactions hydrophobes dans l'accumulation des bactéries au niveau de la microcouche de surface. Ainsi, l'accumulation des bactéries au niveau de la microcouche de surface semble être corrélée à leur hydrophobicité. Par exemple, l'orientation perpendiculaire de bactéries des espèces *Flexibacter aurantiacus* et *Hyphomicrobium vulgare* à différentes interfaces (air-eau, huile-eau) est due aux interactions hydrophobes (Marshall et Cruickshank 1973). Ce sont également les propriétés hydrophobes du biofilm de l'espèce neustonique *Nevskia ramosa* qui permettent leur accumulation au niveau de l'interface air-eau (Sturmeyer *et al.* 1998). De même, pour Enger et Thorsen (1992), l'accumulation de l'espèce *Aeromonas salmonida* mise en évidence sur les surfaces de bassins d'élevage aquacole, est corrélée à la forte hydrophobicité de surface de ces bactéries.

Chez les microorganismes, les propriétés hydrophobes sont dues principalement à la présence de protéines de surface particulières souvent appelées hydrophobines situées au niveau des membranaires cellulaires (Doyle et Rosenberg 1990). Ainsi, une digestion des protéines ou une inhibition de synthèse protéique chez la cyanobactérie *Phormidium* ou la bactérie *Vibrio proteolytica* vont entraîner une perte de leurs propriétés hydrophobes (Doyle et Rosenberg 1990). Des composants non protéiques tels que des polysaccharides et les pigments ou encore d'autres composants comme les pili (ou fimbriae) peuvent également intervenir dans l'hydrophobicité des bactéries (Marshall *et al.* 1971, Hermansson *et al.* 1982, Doyle et Rosenberg 1990).



		Origine			Affiliation phylogénétique					Pigmentation	
					Gram -			Gram +			
Classes (% d'hydrophobicité)	Total	SML	SU	UW	$\gamma$	$\alpha$	CFB	Actinobacteria	FLGC	P+	P-
	(n=121)	(n=67)	(n=24)	(n=30)	(n=47)	(n=25)	(n=15)	(n=14)	(n=20)	(n=58)	(n=63)
0-20 % (hydrophile)	62 %	60 %	58 %	70 %	81 %	64 %	47 %	50 %	35 %	52 %	71 %
20-80 % (modérément hydrophobe)	31 %	33 %	38 %	23 %	17 %	32 %	33 %	50 %	50 %	40 %	24 %
80-100 % (fortement hydrophobe)	7 %	7 %	4 %	7 %	2 %	4 %	20 %	0 %	15 %	9 %	5 %

**Tableau 6** : Distribution des souches de la collection dans chaque classe d'hydrophobicité en fonction de leur localisation dans la colonne d'eau (SML souches isolées dans la microcouche, SU souches isolées dans la microcouche mais également dans l'eau sous-jacente, UW souches isolées dans l'eau sous-jacente), de leur affiliation phylogénétique ( $\gamma$  : protéobactéries gamma,  $\alpha$  : protéobactéries alpha, CFB : groupe des *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides*, FLGC : groupe des firmicutes à faible GC), et de leur pigmentation (P+ : souches pigmentées, P- : souches non pigmentées).

Du fait de la structure particulière de la microcouche de surface, on pourrait penser que les bactéries isolées spécifiquement à ce niveau présentent des propriétés hydrophobes, contrairement à celles situées dans la colonne d'eau. Les deux seules études effectuées à ce sujet présentent des résultats contradictoires quand à l'hydrophobicité supposée des bactéries neustoniques (Dahlbäck *et al.* 1981, Hermansson *et al.* 1987).

Le but de cette étude est de déterminer l'hydrophobicité des souches de la collection. Ces souches sont représentatives de la diversité de la fraction cultivable de la microcouche de surface et de l'eau sous-jacente. La méthode utilisée pour déterminer l'hydrophobicité des souches est celle mise au point par Rosenberg (1984), basée sur l'adhésion des bactéries aux hydrocarbures. Le pourcentage d'hydrophobicité est déterminé par la capacité des souches à s'adsorber sur un hydrocarbure. Dans la littérature, cette méthode standard, nommée MATH ou BATH pour Microbial ou Bacterial Adhesion To Hydrocarbons, est souvent utilisée.

## IV. 2. 2. Résultats

### IV. 2. 2. 1. Distribution des différentes classes d'hydrophobicité au sein des isolats de la collection

Les souches de la collection ont été regroupées en 3 classes selon leur pourcentage d'hydrophobicité déterminé par le test BATH. Cette classification des souches s'est faite d'après Gibbons et Etherden (1983). Les souches très hydrophiles présentent un pourcentage d'hydrophobicité de 0 à 20 %, celles présentant un pourcentage d'hydrophobicité entre 20 et 80 % sont considérées comme modérément hydrophobes et les souches fortement hydrophobes présentent un pourcentage entre 80 et 100 %. Le pourcentage d'hydrophobicité pour chacune des souches de la collection est précisé dans l'annexe 4. Les souches hydrophiles représentent 62% de la collection tandis que seulement 7% des souches, c'est à dire 8 isolats, sont fortement hydrophobes (**Tableau 6**, ci-contre).

✓ Distribution des souches en fonction de l'origine d'isolement

Les distributions des souches de la collection au sein des 3 classes d'hydrophobicité sont proches ; et ceci, indépendamment du lieu d'isolement dans la colonne d'eau (microcouche de surface, eaux sous-jacente ou les deux) (**Tableau 6**).

Les souches de la collection sont majoritairement hydrophiles. La proportion varie de 58 % pour les souches isolées au niveau de la microcouche de surface et de l'eau sous-jacente, à 70 % pour les souches isolées uniquement dans l'eau sous-jacente. Le caractère hydrophobe ne semble pas être spécifique aux souches neustoniques.

✓ Distribution des souches en fonction de leur affiliation phylogénétique

Les bactéries Gram + semblent être plus hydrophiles que les bactéries Gram -. Les protéobactéries gamma et alpha sont majoritairement des souches hydrophiles (81 % et 65 %) (**Tableau 6**). Les bactéries du groupe des CFB (*Cytophaga/Flavobacterium/ Bacteroides*) et celles du groupe des Firmicutes à bas GC (FLGC) présentent une hydrophobicité plus importante, plus de la moitié des souches sont modérément hydrophobes ou fortement hydrophobes (53 % pour les CFB et 65 % pour les FLGC). Les actinobactéries se répartissent également dans la classe des souches hydrophiles et celle des souches modérément hydrophobes. Aucune souche appartenant au groupe des actinobactéries n'est fortement hydrophobe. La majorité des souches fortement hydrophobes appartient au groupe des CFB (20 %) et à celui des FLGC (15 %).

✓ Distribution des souches en fonction de leur pigmentation

La collection de souches regroupe autant de souches pigmentées que de souches non pigmentées (58 et 63 souches respectivement). Les souches pigmentées présentent une hydrophobicité plus importante que les souches non pigmentées. Il est à noter que les souches du groupe des CFB qui présentent des caractéristiques hydrophobes sont toutes pigmentées.

✓ Distribution en fonction du mode de prélèvement

Le pourcentage moyen d'hydrophobicité des souches prélevées avec un échantillonneur particulier de microcouche de surface a été calculé afin de mettre en évidence une adsorption préférentielle éventuelle de certains échantillonneurs (**Tableau 7**, ci-dessous).

**Tableau 7** : Pourcentage d'hydrophobicité moyen des souches de la collection selon leur mode d'échantillonnage

		<i>n</i>	pourcentage d'hydrophobicité moyen	gamme de pourcentages
Echantillonneur	plaque de verre	20	25 %	3 - 92
	tamis (métal et nylon)	26	20 %	1 - 90
	rouleau de Harvey	2	19 %	7 - 31
	bouteille	5	23 %	2 - 54
	filtre en téflon	21	26 %	2 - 89
	filtre en polycarbonate	14	33 %	3 - 86

*n* : nombre de souches analysées

Les deux types de filtres (téflon et polycarbonate) et la plaque de verre semblent prélever plus de bactéries ayant des propriétés hydrophobes que les autres échantillonneurs de microcouche.

## IV. 2. 3. Discussion

### IV. 2. 3. 1. Bactérioneuston et hydrophobicité

Dans notre étude, les bactéries isolées de la microcouche présentent une hydrophobicité équivalente à celle des bactéries isolées de l'eau sous-jacente. Dahlback *et al.* (1981) et Hermansson *et al.* (1987) ont déterminé par la méthode HIC (chromatographie d'interaction hydrophobe) l'hydrophobicité de souches isolées de la microcouche et de l'eau sous-jacente. Dahlback *et al.* rapportent une corrélation positive entre le degré d'enrichissement des bactéries à la surface et leur hydrophobicité. A l'opposé, Hermansson *et al.* ne mettent pas en évidence une hydrophobicité supérieure parmi les isolats de surface.

Nos résultats corroboreraient plutôt ceux d'Hermansson *et al.* puisque les bactéries isolées à l'interface air-mer ne présentent pas un pourcentage d'hydrophobicité plus élevé que celles isolées de la colonne d'eau. Il est cependant difficile de comparer nos données à celles d'autres études ayant utilisées des méthodes différentes pour la détermination de l'hydrophobicité. Il a été en effet montré que les différentes méthodes utilisées, et notamment le test BATH et la méthode HIC, pour déterminer les propriétés hydrophobes de surface de souches bactériennes conduisent à des résultats différents (Dillon *et al.* 1986, Pembrey *et al.* 1999).

#### IV. 2. 3. 2. Pigmentation et hydrophobicité

L'hydrophobicité de surface des bactéries du genre *Serratia* est attribuée à la présence d'un pigment insoluble dans l'eau lié aux enveloppes cellulaires : la prodigiosine (Norkrans et Sörensson 1977, Hermansson *et al.* 1979, Kjelleberg et Stenström 1980). En effet, les cellules pigmentées de l'espèce *S. marcescens* présentent une tendance nettement plus marquée à s'adsorber sur des bulles que des cellules non pigmentées de la même souche (Blanchard et Syzdek 1978). Pour ces auteurs, les cellules pigmentées sont plus hydrophobes que les cellules non pigmentées et c'est ce qui permettrait à ces bactéries de s'accumuler à l'interface.

D'après notre étude, les souches pigmentées présenteraient des propriétés de surface "plus hydrophobes" que celles de l'eau sous-jacente. Cependant, parmi les souches fortement hydrophobes, il y a autant de bactéries pigmentées que de bactéries non pigmentées.

Dans l'étude d'Hermansson *et al.* (1987), les bactéries non pigmentées présentent les mêmes degrés d'adhésion à l'interface air-eau et d'hydrophobicité que les souches pigmentées. Chez les microorganismes, les propriétés hydrophobes sont dues principalement à la présence de protéines de surface. D'après ces observations et nos résultats, les pigments ne semblent pas être responsables majoritairement des caractères hydrophobes des bactéries.

#### IV. 2. 3. 3. Mode d'échantillonnage et hydrophobicité

Il est important de savoir si un échantillonneur de microcouche de surface ne prélève pas préférentiellement les bactéries hydrophobes. En effet, les bactéries hydrophobes adhèrent préférentiellement sur les supports hydrophobes et les bactéries hydrophiles sur les supports hydrophiles (Pasmore *et al.* 2001).

On peut supposer que le filtre en téflon, hydrophobe prélève plus de bactéries hydrophobes qu'un autre échantillonneur. Ce n'est pas le cas dans notre étude. Cependant, on observe une légère tendance à ce que les deux types de filtres (hydrophobes ou hydrophiles) ainsi que la plaque de verre prélèvent plus de souches hydrophobes. Les filtres prélèvent les premiers 40  $\mu\text{m}$  de la microcouche, et la plaque de verre les premiers 100  $\mu\text{m}$ . C'est dans ces premiers  $\mu\text{m}$  que sont fortement concentrées les bactéries (Norkrans 1980). On peut donc penser qu'à ce niveau les bactéries sont plus hydrophobes.

#### IV. 2. 3. 4. Limite du test d'hydrophobicité utilisé

Pour Dillon *et al.* (1986), la méthode BATH aboutit à des résultats qui peuvent différer de manière significative selon le type d'hydrocarbure utilisé (xylène, octane ou hexadecane). De plus, les valeurs d'hydrophobicité pour certaines souches étudiées dépendraient du volume d'hydrocarbure ajouté (Lichtenberg *et al.* 1985, Dillon *et al.* 1986). Il semblerait que le maximum de sensibilité pour le test BATH soit obtenu en utilisant les 3 types d'hydrocarbures et une gamme de volume de solvant importante pour chaque souche étudiée (Rosenberg *et al.* 1980). Du fait du nombre élevé de souches dans la collection (124 souches), il était impossible dans notre étude, d'utiliser ce type de recommandations pour déterminer le pourcentage d'hydrophobicité moyen de chacune des souches. Par ailleurs, de nombreuses variables telles que la taille et le type de tubes utilisés (Gibbons et Etherden 1983), la température, le temps et la méthode d'agitation et le volume de solvant utilisé, peuvent fortement influencer l'adsorption des cellules sur l'hydrocarbure (Olsson et Westergren 1982, Rosenberg 1984, Lichtenberg *et al.* 1985, Rosenberg 1991). Nos résultats ne peuvent donc pas être directement comparés à d'autres travaux n'ayant pas utilisé exactement le même protocole. Pembrey *et al.* (1999) rapportent également que le test BATH modifie physiquement la structure des surfaces cellulaires. De plus, l'hydrocarbure utilisé dans le test peut provoquer la lyse cellulaire (Vanhaecke et Pijck 1988, Pembrey *et al.* 1999). Pour ces

auteurs, les techniques impliquant des manipulations de cellules ne sont pas appropriées pour obtenir des informations sur les propriétés physico-chimiques de surface, inhérentes des cellules.

Les données d'hydrophobicité déterminées en laboratoire de chacune des souches sont difficilement transposables au milieu naturel. Le comportement des bactéries au niveau de l'interface peut être différent.

Les bactéries carencées en nutriment auraient tendance à devenir plus hydrophobes afin de pouvoir s'accumuler au niveau des interfaces (Kjelleberg et Hermansson 1984). Le test BATH a été effectué sur des souches qui se sont multipliées dans un milieu riche, on peut donc penser que dans ces conditions, les souches n'étaient pas hydrophobes.

Des variations ou des pertes *in vitro* de polymères de surface peuvent également complètement altérer ou modifier les mécanismes d'attachement d'un microorganisme comparativement à son comportement dans le milieu naturel. Or dans le cas des souches présentant un développement en biofilms ou en agrégats (environ 20 % de la collection), nous avons déterminé le pourcentage d'hydrophobicité à partir du surnageant de ces cultures, une mesure de turbidité d'un biofilm ou d'agrégats étant impossible à effectuer. L'hydrophobicité de ces souches a donc été déterminée à partir des cellules libres dans le milieu, et non pas sur leur biofilm. Pourtant, en milieu naturel, des souches décrites comme neustoniques se développent sous forme de biofilm au niveau de l'interface. Ce sont ces biofilms qui présentent une forte hydrophobicité (Sturmeyer *et al.* 1998, Paddies *et al.* 2004). C'est le matériel extracellulaire, de nature polysaccharidique, qui possède des propriétés adhésives et hydrophobes permettant à ces bactéries de former notamment des structures en rosettes à l'interface air-mer (Marshall et Cruickshank 1973). C'est également un polysaccharide riche en rhamnose produit par une espèce du genre *Rhodococcus* isolée dans un bassin d'eau douce qui confère l'hydrophobicité de surface à cette souche et donc son adhésion au film lipidique de surface (Neu et Poralla 1988).

#### IV. 2. 4. Conclusion

Dans notre étude, nous avons déterminé l'hydrophobicité de surface des bactéries isolées de la microcouche et de l'eau sous-jacente par la méthode BATH. Les souches isolées au niveau de la microcouche présentent un hydrophobicité identique à celle des souches isolées de l'eau sous-jacente. L'analyse a été entreprise sur des cellules libres dans un milieu riche. Ces conditions sont très différentes de celles du milieu naturel car les bactéries présentes au niveau de l'interface ont tendance à s'agréger ou à former des biofilms qui présentent des propriétés hydrophobes. Ces résultats en laboratoire ne sont donc pas transposables aux propriétés des souches *in situ*.



## **CHAPITRE V**

## V. RESISTANCE DU BACTERIONEUSTON AUX RADIATIONS SOLAIRES

Ce chapitre est présenté sous forme d'une publication actuellement soumise à Applied and Environmental Microbiology. Elle s'intitule **Resistance of bacterioneuston to solar radiation**.

### Contexte de l'étude

Les radiations solaires intenses et notamment les radiations ultraviolettes sont une contrainte majeure à laquelle les communautés bactérioneustoniques doivent faire face. Le flux d'UV-B atteignant la surface de la Terre constitue l'une des variables physiques susceptibles d'être modifiée dans l'avenir en raison des changements climatiques d'origine anthropique ou naturelle. L'un des facteurs majeurs responsables de l'augmentation du flux d'UV-B résulte de la diminution de la couche d'ozone.

Différentes études ont montré que les UV ont un effet inhibiteur sur les différentes fonctions physiologiques des bactéries marines (activité de synthèse, de division, exoenzymatiques, ...) (Miller *et al.* 1999). Des diminutions de 40 à 70 % de l'activité bactérienne de synthèse protéique ou de l'ADN ont été ainsi mesurées à la surface des océans (Herndl *et al.* 1993, Aas *et al.* 1996, Sommaruga *et al.* 1997). Le bactérioplancton semble néanmoins posséder des mécanismes de réparation de l'ADN endommagé efficaces (Kaiser et Herndl 1997).

Des différences de sensibilité et d'efficacité de réparation des dommages face aux radiations UV entre différentes espèces bactériennes marines peuvent conduire à des modifications d'activité bactérienne et à une modification de la structure des communautés bactérioplanctoniques. Peu d'études ont été menées sur la résistance d'isolats bactériens marins face aux radiations ultraviolettes. Les deux seules analyses effectuées à ce jour mettent en évidence une grande diversité de résistance parmi les isolats testés (Joux *et al.* 1999, Arrieta *et al.* 2000). A notre connaissance, aucune étude n'a été mise en oeuvre sur des bactéries isolées de la microcouche de surface des océans. Ces espèces bactériennes ont dû pourtant développer des mécanismes de réparation et/ou de protection efficaces pour s'adapter à ces conditions extrêmes de radiations. Ainsi, on peut supposer que les souches neustoniques sont plus résistantes aux radiations solaires que les souches de l'eau sous-jacente.

Cette étude a pour but de comparer la résistance des souches de la microcouche et de l'eau sous-jacente face aux radiations solaires. Dans ce travail, une nouvelle méthodologie, basée sur l'utilisation d'un simulateur solaire et d'un lecteur de microplaque, a été mise au point afin d'exposer un grand nombre de souches à différentes durées d'exposition et ainsi tester la résistance de 90 souches de la collection face aux radiations solaires. Les différentes classes de résistance ont été déterminées par l'analyse des courbes de croissance de chacun des isolats après exposition.

## **Resistance of Bacterioneuston to Solar Radiation**

HÉLÈNE AGOGUÉ, FABIEN JOUX, INGRID OBERNOSTERER, AND PHILIPPE LEBARON\*

Observatoire Océanologique, Université Pierre et Marie Curie, UMR 7621-INSU-CNRS,  
BP44, 66651 Banyuls-sur-Mer Cedex, France.

Running title : Bacterioneuston and resistance to solar radiation

## ABSTRACT

A total of 90 bacterial strains were isolated from the sea surface microlayer (i.e., bacterioneuston) and underlying waters (i.e., bacterioplankton) from two sites of the North-western Mediterranean Sea. These strains were identified by sequence analysis and the growth recovery was investigated after exposure to artificial solar radiation. Bacterioneuston and bacterioplankton isolates were subjected to 6 different exposure times ranging from 0.5 to 7 h of simulated noontime solar radiation. Following exposure, the growth of each isolate was monitored and different classes of resistance were determined according to the growth pattern. Resistance to solar radiation was equally distributed within bacterioneuston and bacterioplankton. Similarly, pigmented bacteria were not more resistant to solar radiation than non-pigmented bacteria. Although large interspecific differences among the 90 marine isolates were observed, most of the isolates were resistant to sunlight exposure. The *Pseudoalteromonas* and *Alteromonas* genera and isolates belonging to the *Cytopha/Flavobacterium/Bacteroides* group appeared to be highly resistant. Resistance to solar radiation could be mediated by DNA repair mechanisms. To our knowledge, this is the first report describing the resistance of bacterioneuston isolates to simulated solar radiation. Further studies on highly resistant isolates will be helpful to better investigate the molecular mechanisms involved in the resistance of marine bacteria to solar radiation.

## INTRODUCTION

The marine air-water interface constitutes a unique microbial habitat (55, 67). Microorganisms in the surface microlayer (SML) are exposed to high intensities of solar radiation, in particular ultraviolet (UV) radiation, high concentrations of toxic organic substances and heavy metals, and unstable temperature and salinity conditions (32, 103). Despite these harmful conditions, the SML has been reported to have higher abundances of microorganisms than underlying waters (UW) (2, 32, 67). This suggests that bacterioneuston (i.e., the bacterial community of the SML) has developed strategies to survive in this “extreme environment”.

The effect of UV radiation on the ecology of microorganisms has been studied in detail in aquatic systems (30). Each type of UV radiation causes distinct but overlapping damage (47). UV-A radiation (320-400 nm) only causes indirect damage to cellular DNA, proteins and lipids by catalysing the intracellular formation of chemical intermediates such as reactive oxygen species (ROS). In contrast, UV-B (280-320 nm) radiation causes direct DNA damage by inducing the formation of DNA photoproducts, of which the cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and the pyrimidine (6-4) pyrimidinone photoproducts ([6-4] PPs) are the most common.

Bacteria are particularly vulnerable to UV damage because their small size limits effective cellular shading or protective pigmentation (26) and their genetic material comprises a significant portion of their cellular volume (44). Moreover, UV-absorbing compounds, such as mycosporine-like amino acids (MAAs) and scytonemin that confer some protection to eukaryotic organisms and cyanobacteria, appear not to be widespread antioxidant molecules in bacterioplankton (27, 81). Therefore, bacterioplankton rely primarily on repairing damage caused by UV radiation. Repairing DNA damage in bacteria is conveniently classified into “light” and “dark” repairs. “Light repair” (i.e., photoreactivation) results from light-activated DNA photolyase enzymes that repair specifically CPDs and (6-4) PPs. Photoreactivation may be induced by UV-A and PAR (photosynthetically active radiation, 400-700 nm). “Dark repair” does not require light as a cofactor (64). Bacteria use three distinct dark DNA repair mechanisms: excision, mutagenic and post replication recombinational repairs.

Results from field studies on marine bacteria indicate that exposure to natural solar UV radiation results in a decrease in total cell abundance, a reduction in amino acid uptake, a depression of the activity of degrading enzymes, and a significant inhibition of protein and

DNA synthesis (69). However, most studies are based on bulk measurements of metabolic activity for natural bacterioplankton communities while studies of photobiological responses of marine bacterial species are scarce and have examined few isolates (8, 37, 45). To our knowledge, the resistance of bacterioneuston to solar radiation has not been investigated thus far.

In the present study, we investigated the resistance of 90 marine bacterial strains to simulated solar radiation (UV and PAR). These strains were isolated from both the SML and UW collected from coastal waters in the North-western Mediterranean sea and the isolates were classified according to their growth pattern following exposure to simulated solar radiation.

## MATERIALS AND METHODS

**Sampling and isolation of marine bacterial strains.** Bacterial strains were isolated in coastal waters from the North-western Mediterranean Sea during 4 field campaigns in March and September 2001 and March and June-July 2002. The surface microlayer (SML) was collected by different types of devices as described in detail in Agogué et al. (2). Most of the SML samples were collected by a metal screen and a glass plate and to a lesser extent by a nylon screen, a Harvey' roller and two types of membranes (Teflon and polycarbonate) (2, 41, 42). Samples from underlying waters (UW) were collected by submerging a polycarbonate bottle and opening it at 0.5 m depth. After returning to the laboratory, 100 µl subsamples were spread on marine agar 2216 plates (MA 2216; Difco, Detroit, Mich.). After incubation in the dark at 20°C for 7 to 14 days, isolates were selected from the plates according to differences in colour and shape. Then, isolates were picked and purified. The strains were named S, U, and SU when originating from the SML, UW or both environments, respectively.

**Molecular characterization of the strains.** Initial identification of each isolate was determined by sequencing PCR (polymerase chain reaction) amplified regions of the 16S rRNA gene. For most of the isolates, the DNA suspension for the PCR consisted of colonies picked on agar plates and resuspended in 500 µl of sterile water. For refractory isolates, cells were lysed and the DNA was extracted. Colonies were picked and resuspended in 500 µl of lysis buffer (EDTA 40 mM, Tris 50 mM pH 8, 750 mM saccharose) and incubated with lysozyme (final concentration, 1 mg ml<sup>-1</sup>) at 37°C for 45 min with gentle agitation. Sodium dodecyl sulfate (final concentration, 0.5% [wt/vol]) and proteinase K (final concentration 0.1 mg ml<sup>-1</sup>) were added, and the samples were incubated at 55°C for 1 h. DNA was extracted with an equal volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1 [vol/vol/vol]) and chloroform-isoamyl alcohol (24:1 [vol/vol]). Then, DNA was precipitated with 2 volumes of isopropanol and recovered by centrifugation. Pellets were washed with 70% cool ethanol (-20°C), air dried, and resuspended in 50 µl of sterile water.

The 16S rRNA gene was amplified by PCR by using two primers, SAdir (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAGA-3'; *Escherichia coli* 16S rRNA gene positions 8 to 27, forward) and S17 Rev (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3'; *Escherichia coli* 16S rRNA gene positions 1491 to 1508, reverse) (13). Reaction mixtures of 50 µl contained 5 µl of 10X PCR buffer (supplied with the enzyme), 200 µM of dNTP mix (Eurogentec, Seraing, Belgium), 100 pmol of each primer, 1 U of Super Taq (HT Biotechnology, Cambridge, England), 5 µl of washed cells (or 1 µl of DNA) and MilliQ water to the 50 µl volume. PCR reaction was



carried out in a Robocycler 96 (Stratagene, La Jolla, Calif.). The thermal PCR profile was as follows : initial denaturation at 94°C for 3 min followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, primer annealing at 48°C for 1.5 min, and elongation at 72°C for 1 min. The final elongation step was 5 min at 72°C. The 16S rDNA products were analysed by electrophoresis in 1% agarose gels. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis was performed by digesting the 16S rDNA PCR products with the restriction endonuclease *Hin6 I* (Eurogentec) at 37°C over night, and the resulting electrophoretic patterns obtained in 2% agarose gels were used to group the isolates. The 16S rDNA products representing each distinct pattern were then sequenced with an automatic DNA analysis system (Genome express, Meylan, France). Sequences were compared with sequences available in the GenBank database by using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) service to determine their approximate phylogenetic affiliations (6). Sequences were deposited in the GenBank database under accession numbers AY 576689 to AY 576777 (Table 3).

**Characterization of solar radiation sensitivity.** Bacterial isolates were grown in marine broth 2216 medium (MB 2216; Difco) on a laboratory shaker at 25°C and cells were harvested in the early stationary phase by centrifugation (6,000 x g for 10 min at 10°C). The pellets were washed twice in filtered and autoclaved seawater. The bacterial abundance was determined after staining with a nucleic acid dye (SYBR-Green I; final concentration 0.01% [vol/vol], Molecular Probes Inc., Eugene, Oreg.) on a FACS-Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, N. J.) using the CellQuest software (53, 61).

Bacterial suspensions were then diluted to the final concentration of  $10^4$  cells per ml with filtered and autoclaved seawater to avoid self-shading during irradiation. One ml of each diluted bacterial suspension was dispensed in duplicate into a 24 well microtiter plate (Multiwell, Becton Dickinson) and exposed to simulated solar radiation at a distance of 30 cm. During exposure, the microplates were shaken at 100 rpm and maintained at a constant temperature (~25°C) using a cooled plate. To determine possible contamination during the exposure period one ml of filtered and autoclaved seawater was also dispensed to duplicate wells. Samples maintained in the dark were used as controls. Irradiation was conducted with a 1000 W xenon lamp solar simulator (ref. 81190, Oriel corporation, Stratford, Conn.) equipped with the air mass filters AM0 and AM1. This set of filters allows to simulate solar radiation at the earth surface. Intensities of UV-B, UV-A and PAR measured with a broad band Eldonet (European Light Dosimeter Network) radiometer (31) are presented in Table 1. The hourly dose received by the solar simulator is comparable to the noontime hourly dose at Banyuls-sur-Mer, France (Table 1).

Replicate microplates were removed after 0.5, 1, 2, 3, 5 and 7 h of exposure to simulated solar radiation, and 1 ml of concentrated (2x) MB 2216 was added to each well to investigate the growth pattern of each strain following exposure. Thereafter, microplates were incubated in the dark at 25°C under agitation (100 rpm), and bacterial growth was followed during 6 days. Bacterial growth was determined by measuring the optical density (OD) at 450 nm with an automated microplate reader (FLUOstar Optima, BMG Labtechnology, Offenburg, Germany).

**TABLE 1.** Intensities and doses of UV-B and UV-A radiation and PAR of simulated and natural solar radiation. The intensity of natural solar radiation was measured on June 21<sup>st</sup> 2003, at 14:00 h at Banyuls-sur-Mer.

	UV-B	UV-A	PAR
<b>Simulated solar radiation</b>			
Intensity ( $\text{W m}^{-2}$ )	1.2	40	352
Hourly dose ( $\text{KJ m}^{-2}$ )	4.32	144	1267
<b>Natural solar radiation</b>			
Max intensity ( $\text{W m}^{-2}$ )	1.7	72	452
Daily dose ( $\text{KJ m}^{-2}$ )	43.5	2122	13440

## RESULTS

**Determination of the different classes of resistance.** We determined four classes of resistance according to the growth of the bacterial isolates following different exposure times to simulated solar radiation. In the first series of experiments, all the 90 isolates of the collection were exposed for 30 min to simulated solar radiation. The isolates resistant to 30 min of exposure (i.e., 90% of the isolates) were subsequently exposed to 1, 2 and 3 h of simulated solar radiation. Isolates that were able to grow after 3 h (i.e., 43% of the isolates) were exposed to 5 and 7 h of exposure during the last set of experiments (Table 2).

The isolates which were not able to grow after 30 min of exposure were considered as sensitive (S) strains. The isolates that grew after 1 h of exposure, but not after 2 h were considered weakly resistant (R) strains. Bacterial strains that grew after 2 or 3 h of simulated solar radiation but not after 5 h were considered medium resistant (R+) strains. Finally, highly resistant (R++) strains were able to grow after 5 or 7 h of exposure (Table 2). This class of highly resistant strains (R++) displayed different responses with respect to the lag-time of the growth curve, therefore these strains were divided into 3 categories (C1, C2 and C3) (Fig. 1). Category 1 isolates showed no or short lag-times (i.e., < 6h) for all exposure periods tested (Fig. 1, a, b and c). Category 2 isolates had the same lag-times independent of the time of exposure (Fig. 1, d, e, and f) and isolates in category 3 were characterized by a lag-time that increased with the time of exposure (Fig. 1, g, h, and i).

Most of the isolates (41%) were medium-resistant (R+) whereas highly and weakly resistant strains represented 22% and 21% of the isolates, respectively (Table 3). Only 16% of the strains were sensitive strains.

**Origin of isolates.** Isolates analyzed in this study were obtained from samples collected in the SML and in UW. Redundancies in the collection were eliminated after RFLP screening and sequencing analyses. For each species, a single isolate was used for exposure to simulated solar radiation. A given isolate may represent a species found in a single (S for SML or U for UW) or in both biotopes (SU). Highly resistant strains (R++) were isolated from the SML or from both layers (Table 3). No isolate collected only from UW was highly resistant. However, a smaller fraction of these isolates (5%) was sensitive as compared to isolates collected in the SML or both biotopes (18% and 19%, respectively) (Table 3).

**TABLE 2.** Classes of resistance according to bacterial growth following different time periods of exposure to simulated solar radiation.

Class of resistance	Symbol	Exposure time (h)					
		0.5	1	2	3	5	7
Sensitive	S	-	-	-	-	-	-
Weakly resistant	R	+	+	-	-	-	-
Medium resistant	R+	+	+	+	+	-	-
Highly resistant	R++	+	+	+	+	+	+

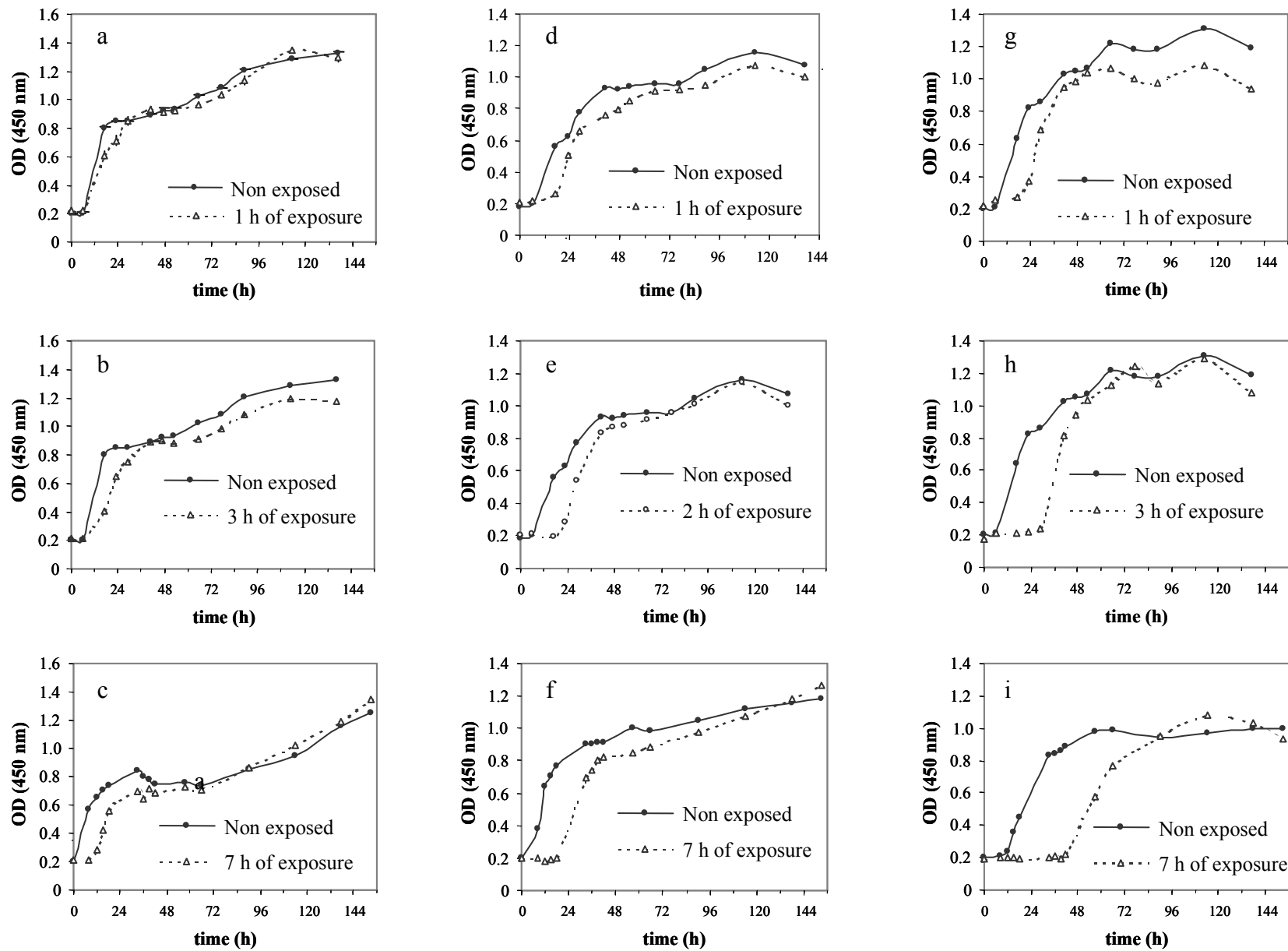
+ : growth

- : no growth

**Taxonomic affiliation of isolates.** The class of highly resistant strains was characterized by a majority of  $\gamma$ -Proteobacteria which represented 41% of the R<sup>++</sup> isolates, and 15% and 14% of the R<sup>++</sup> isolates belonged to the low G+C gram positive (LGC) group and  $\alpha$ -Proteobacteria, respectively (Table 3). Within the R<sup>++</sup>  $\gamma$ -Proteobacteria strains, dominant genera were *Pseudoalteromonas* (54%) and *Alteromonas* (15%) (Table 3). The majority of the R<sup>++</sup> isolates were characterized by no or short lag-times (i.e., C1) (Fig. 1, Table 3). The contribution of each taxonomic group to the medium resistant class (R<sup>+</sup>) ranged from 31% for the LGC group to 66% for the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) group (Table 3). For the class of weakly resistant strains (R), the contribution of each taxonomic group varied between 11% and 29%. The LGC group showed the highest relative contribution to sensitive strains (S) (31%, Table 3). In contrast, strains belonging to the CFB group were less sensitive and attributed only 7% of the strains in this class of resistance (Table 3).

The resistance of the isolates to simulated solar radiation was also investigated with regard to their G+C content. No relationship was observed between the resistance and the G+C content of the species (Table 3). The R<sup>++</sup> class was characterized by isolates with a G+C content ranging from 35.5 to 62.4%. This range of values was similar to that of sensitive strains which shared a G+C content of 30 to 67%.

**Pigmentation of isolates.** Isolates that showed visible pigmentation (brown, black, yellow, pink, orange or red pigmentation) on marine agar plates were referenced as P<sup>+</sup>, and those without pigmentation as P<sup>-</sup> (Table 3). The overall number of pigmented and non-pigmented bacteria was fairly similar (41 and 49 isolates, respectively). Among the sensitive strains, pigmented and non-pigmented strains were equally distributed, whereas the majority of R<sup>++</sup> isolates were non-pigmented (Table 3). Half the pigmented strains (53%) were medium-resistant strains (R<sup>+</sup>).



**FIG. 1.** Representative growth curve of highly resistant strain (R++) of category 1 (a, b, c, S-137, Table 4), category 2 (d, e, f, S-151, Table 4), and category 3 (g, h, I, S-139, Table 4) exposed to 1 h (a, d, g), 2 h (e), 3 h (b, h) and 7 h (c, f, i) of simulated solar radiation.

**TABLE 3.** Relative contribution (%) of strains in each class of resistance according to the depth layer where they were collected (S, strains isolated from the SML, U, strains isolated from UW and SU, strains isolated from the both layers), their taxonomic affiliations ( $\gamma$  :  $\gamma$ -*proteobacteria*,  $\alpha$ :  $\alpha$ -*proteobacteria*, *CFB* : *Cytophaga/ Flavobacterium/Bacteroides* group, LGC : low G+C gram positive), their pigmentation (P+ and P- indicate if the isolate have a visible pigmentation or not, respectively) and their G+C % range, n indicates the numbers of strains.

Class of resistance	Total	Origin			Taxonomic affiliation					Pigmentation		G+C % range
					Gram -			Gram +		P+	P-	
		S	SU	U	$\gamma$	$\alpha$	<i>CFB</i>	<i>Actinobacteria</i>	LGC			
(n=90)	(n=45)	(n=26)	(n=19)	(n=32)	(n=21)	(n=15)	(n=9)	(n=13)	(n=41)	(n=49)		
S	16	18	19	5	9	19	7	22	31	17	14	30-67 (n=7)
R	21	24	8	32	19	29	20	11	23	20	22	31.7-73 (n=12)
R+	41	38	31	63	31	38	66	56	31	53	31	32-73 (n=22)
R++	22	20	42	0	41	14	7	11	15	10	33	35.5-62.4 (n=18)



**TABLE 4.** Resistance to simulated solar radiation of bacterial strains isolated from the sea surface microlayer (S), from underlying waters (U) and from both layers (SU). (CFB for *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*). The G+C % of isolates with a sequence similarity to known species of less than 97% are presented.

		Closest relative species in the 16S rDNA sequence database - % sequence similarity		Accession no.	G+C % (reference)	pigmentation	class of resistance
<b>Origin: surface microlayer</b>							
S-156	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Alteromonas infernus</i>	98	AY576745	48.1 (70)	no	R++ - C1
S-242a	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Alcanivorax venustensis</i>	100	AY576775	66 (24)	no	R
S-151	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Enterobacter sakazakii</i>	99	AY576743	57 (1)	orange	R++ - C2
S-218	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Glaciecola mesophila</i>	95	AY576759		no	R+
S-219	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Marinobacter litoralis</i>	99	AY576760	55 (100)	no	R++ - C2
S-131	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Marinobacterium stanierii</i>	90	AY576729		no	R
S-240	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Microbulbifer maritimus</i>	96	AY576773		no	R+
S-031	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Oleispira antarctica</i>	91	AY576709		no	S
S-058	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i>	99	AY576713	42.2-43.8 (74)	no	R++ - C1
S-016	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i>	92	AY576698		no	R+
S-067	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas anguilliseptica</i>	96	AY576718		no	R++ - C2
S-137	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas mariniglutinosa</i>	99	AY576733	40.3 (73)	no	R++ - C1
S-235	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	90	AY576769		brown	R+
S-066	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas putida</i>	98	AY576717	60.8 (90)	no	R+
S-025	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pseudoxanthomonas broegbernensis</i>	97	AY576708	ND	no	R
S-023	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	99	AY576704	54-59 (76)	no	R+
S-136	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Brevundimonas intermedia</i>	98	AY576732	ND	no	S
S-140	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Erythrobacter litoralis</i>	98	AY576736	67 (101)	red	S
S-143	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Jannaschia helgolandensis</i>	95	AY576739		no	R
S-069	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Paracoccus aminophilus</i>	98	AY576720	63 (89)	no	S
S-070	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Paracoccus marcusii</i>	99	AY576721	66 (33)	orange	R+
S-132	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Salipiger mucescens</i>	97	AY615725	ND	no	R+
S-236	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Ruegiera atlantica</i>	95	AY576770		pink	R
S-232	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Stappia aggregata</i>	93	AY576766		no	R
S-032	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Sulfitobacter deliciae</i>	94	AY576710		no	R+
S-139	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Sulfitobacter pontiacus</i>	99	AY576735	62.1 (86)	no	R++ - C3
S-061	CFB group	<i>Algibacter lectus</i>	95	AY576741		yellow	R+
S-010	CFB group	<i>Maribacter sedimenticola</i>	97	AY576693	37 (65)	yellow	R+
S-169	CFB group	<i>Mesonina algae</i>	92	AY576752		orange	R+
S-155	CFB group	<i>Muricauda ruestringensis</i>	97	AY576744	41 (14)	orange	R++ - C2
S-068	CFB group	<i>Salegentibacter salegens</i>	95	AY576719		yellow	R
S-030	Actinobacteria group	<i>Arthrobacter agilis</i>	99	AY576708	67-69 (50)	pink	R+
S-028	Actinobacteria group	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	100	AY576707	61.9 (51)	yellow	S
S-017	Actinobacteria group	<i>Brachybacterium tyrofermentans</i>	98	AY576699	73 (79)	yellow	R+
S-014	Actinobacteria group	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	97	AY576697	53.2-55.8 (18)	no	R++ - C2
S-021	Actinobacteria group	<i>Dietzia maris</i>	100	AY576702	73 (71)	orange	R
S-148	Actinobacteria group	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	99	AY576742	68.8 (97)	yellow	R
S-011	Actinobacteria group	<i>Microbacterium kitamiense</i>	99	AY576694	69.2 (63)	orange	R+
S-022	Actinobacteria group	<i>Micrococcus luteus</i>	99	AY576703	71 (93)	yellow	R
S-020	Actinobacteria group	<i>Nocardioides jensenii</i>	96	AY576701		yellow	S
S-135	Low G+C gram +	<i>Bacillus cereus</i>	100	AY576731	31.7-40.1 (52)	no	R
S-007	Low G+C gram +	<i>Bacillus firmus</i>	99	AY576692	41.4 (52)	no	R++ - C2

S-142b	Low G+C gram +	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	99	AY576738	48.3-48.6 (4)	no	S
S-167	Low G+C gram +	<i>Planococcus rifietoensis</i>	99	AY576750	47.9 (75)	orange	R+
S-027	Low G+C gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	99	AY576706	32-36 (52)	no	R+
S-063	Low G+C gram +	<i>Staphylococcus warnerii</i>	99	AY576715	34-35 (52)	yellow	S

**Origin : underlying waters**

U-071	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Aeromonas media</i>	100	AY576722	62.3 (5)	no	R
U-072	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99	AY576723	44-45 (12)	no	R+
U-222	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Glaciecola mesophila</i>	91	AY576763		no	S
U-168	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Marinobacter sedimentalis</i>	90	AY576751		no	R
U-082	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Photobacterium leiognathi</i>	99	AY576728	42-44 (52)	no	R+
U-220	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Photobacterium leiognathi</i>	95	AY576761		no	R+
U-237	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas jessenii</i>	91	AY576771		black	S
U-241	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Shewanella baltica</i>	99	AY576774	46.1 (102)	brown	R+
U-080	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Shewanella putrefaciens</i>	99	AY576727	44-47 (72)	brown	R
U-233	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Brevundimonas alba</i>	97	AY576767	ND	no	R
U-215	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Hyphomonas johnsonii</i>	92	AY576758		orange	S
U-160	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Paracoccus aminovorans</i>	98	AY576746	67 (89)	orange	R
U-210	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Porphyrobacter sanguineus</i>	99	AY576755	63.8-64 (40)	no	R+
U-234	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Roseobacter gallaeciensis</i>	98	AY576768	62-62.4 (77)	red	R+
U-075	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Stappia aggregata</i>	99	AY576725	59 (88)	no	R+
U-244	CFB group	<i>Cytophaga latercula</i>	98	AY576777	34 (52)	brown	R+
U-211	CFB group	<i>Hongiella mannitolivorans</i>	99	AY576756	42 (96)	pink	R+
U-243	CFB group	<i>Muricauda ruestringensis</i>	97	AY576776	41 (14)	brown	R+
U-012	CFB group	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	93	AY576695		yellow	S
U-077	Actinobacteria group	<i>Salinibacterium amurskyense</i>	96	AY576726		yellow	R+
U-145	Low G+C gram +	<i>Bacillus megaterium</i>	99	AY576740	37.3 (52)	no	R+
U-073	Low G+C gram +	<i>Enterococcus faecium</i>	100	AY576724	38.3-39 (52)	no	R
U-033	Low G+C gram +	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	AY576711	30-37 (52)	no	S

**Origin: surface microlayer and underlying waters**

SU-003	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Alteromonas macleodii</i>	98	AY576689	45-46 (95)	no	R++ - C2
SU-229	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Alteromonas marina</i>	98	AY576765	45 (99)	no	R++ - C2
SU-053	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	99	AY576712	40.6-41.7 (3)	no	R++ - C1
SU-209	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	99	AY576754	41.5 (29)	no	R++ - C2
SU-208	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	98	AY576753	38.5-38.9 (78)	no	R++ - C1
SU-213	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100	AY576757	62 (11)	no	R++ - C2
SU-221	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	100	AY576762	41.5 (43)	no	R++ - C1
SU-018	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Vibrio splendidus</i>	99	AY576700	45-46 (10)	no	R+
SU-162	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Brevundimonas aurantiaca</i>	99	AY576748	ND	orange	R
SU-065	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Erythrobacter citreus</i>	99	AY576716	62-62.4 (20)	brown	R++ - C3
SU-228	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Erythrobacter flavus</i>	99	AY576764	64-64.1 (98)	yellow	R+
SU-004	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Roseobacter gallaeciensis</i>	96	AY576690		no	R++ - C1
SU-134	CFB group	<i>Algibacter lectus</i>	95	AY576730		yellow	R+
SU-164	CFB group	<i>Cellulophaga lytica</i>	88	AY576749		orange	R+
SU-006	CFB group	<i>Flexibacter tractuosus</i>	94	AY576691		yellow	R+
SU-239	CFB group	<i>Hongiella ornithinivorans</i>	99	AY576772	38 (96)	pink	R+
SU-013	Actinobacteria group	<i>Blastococcus aggregatus</i>	99	AY576696	ND	pink	R+
SU-161	Low G+C gram +	<i>Bacillus horikoshii</i>	99	AY576747	41.1-42 (66)	orange	R+
SU-146	Low G+C gram +	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	AY576741	33.8 (52)	no	R
SU-141	Low G+C gram +	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	99	AY576737	53.2-55.8 (19)	orange	R++ - C2
SU-138	Low G+C gram +	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	99	AY576734	37 (17)	no	S

## **DISCUSSION**

**Resistance of neustonic vs non-neustonic strains.** The interspecific variability of sunlight-induced inhibition of growth of selected marine bacterial isolates was determined under laboratory conditions using a solar simulator. The conditions of exposure were very close to those found in the natural environment where the bacterial species were isolated. Seven hours of radiation corresponded to 2/3 of the daily dose received by the bacterial community at the air-water interface in the Bay of Banyuls-sur-Mer during a sunny summer day (Table 1).

The underlying hypothesis of the present study is that bacterioneuston are more resistant to solar radiation due to adaptative strategies developed in the SML. However, in the present study, no relation was found between the sensitivity of the isolates to solar radiation and the biotope where they were isolated (i.e., the SML or UW). This suggests that resistance to radiation is well distributed among bacterial species present in the SML and subsurface waters. Similarly, no significant differences in the inhibition of bacterioneuston and bacterioplankton activity were observed when raw seawater from the respective environments was exposed to solar radiation (Herndl, unpublished data). From a one year study in the Chesapeake Bay, Bailey et al. (9) found no correlation between the depth of sampling (6 mm and 8.5 m) and the survival of bacteria exposed to surface solar radiation. In the northern Adriatic Sea, Herndl et al. (39) reported that bacterioplankton from near-surface (0.5 m depth) waters of a highly stratified water column were as sensitive to surface UV-B radiation as subpycnocline bacteria (20 m depth). These authors concluded that adaptative mechanisms against surface solar radiation are not present in near-surface bacterioplankton consortia. Similarly, when investigating the sensitivity of bacteria isolated from various marine environments (i.e., marine snow, sediment and ambient water) which received different intensities of UV radiation, Arrieta et al. (8) found no relation between the UV sensitivity of the isolates and the environments from which they originated.

Although sea surface microlayer bacterial isolates do not seem to be more resistant to solar radiation than bacterioplankton isolates, several environmental factors could explain the survival of bacterioneuston to high solar radiation. Exopolysaccharides secreted by bacteria, algae and other marine organisms accumulate in the SML (58, 83). Exopolysaccharides have been reported to provide protection from environmental stress, such as pH shifts, osmotic shock, dessication and UV radiation (23, 25). Furthermore, the SML is characterized by higher concentrations of chromophoric dissolved organic matter as compared to UW (16, 92). Moreover, the concentration of particulate organic matter in the sea-surface microlayer

exceeds that of the sub-surface waters (57). Particle attached bacteria are more abundant in the SML than in UW (35, 36, 68). Thus, the accumulation of organic matter of different origin in the SML could provide an *in situ* protection to solar radiation to bacterioneuston.

**Interspecific variability of resistance to solar radiation.** Large variability in the resistance to solar radiation was found between isolates. However, resistance was not specific to a taxonomic group (i.e.,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Proteobacteria, CFB ...). Similar results have recently been reported by others (8, 45). Sunlight could, therefore potentially influence the species composition of marine bacterioplankton in surface waters. However resistance is more species-dependant than group-dependant, and the effect of solar radiation on the structure of bacterial communities is therefore probably minor for the distribution of the different taxonomic groups in surface layers. Within the  $\gamma$ -Proteobacteria, some genera were dominated by highly resistant isolates. The genera *Pseudoalteromonas* and *Alteromonas* contained 7 and 2 highly resistant species, respectively. Similarly, CFB bacteria were more or less resistant to simulated solar radiation and the fraction of sensitive bacteria was the lowest for this group. It may partly explain the occurrence of this group in marine surface waters (49).

The harmful effects of UV-B radiation on DNA are mostly explained in terms of the formation of dimeric photoproducts involving two adjacent pyrimidine bases. Moreover, it was recently suggested that AT (adenine, thymine) -rich DNA contributes to UV damage by enhancing the generation of reactive oxygen species (ROS), which cause oxidative damage (91). Therefore, as proposed by Singer and Ames (84), bacteria adapted to sunlight exposure (i.e., bacterioneuston) may have evolved a higher guanine plus cytosine content (G+C content) in the DNA to avoid dimeric pyrimidine photoproducts and oxidative damage. Some evidence supporting this hypothesis has been obtained (58, 67, 80). Kellogg and Paul (48) reported a high correlation between G+C contents of the marine phage DNAs and the degree of DNA damage. However, we found no correlation between the resistance of bacterial species and their G+C content. These results are consistent with other observations reported in the literature (28, 45). Consequently the most resistant strains may have developed other resistance mechanisms that allow them to survive under high doses of UV radiation.

**DNA repair mechanisms.** If DNA damage is the primary target, resistance of marine bacteria to solar radiation should mainly be conferred by the ability of these organisms to efficiently repair DNA damage or to a constitutive or induced photoprotective mechanism present in these species. Although these mechanisms were not investigated in this study, some

hypothesis can be suggested to better define further investigations on this topic. Highly resistant isolates may have a very efficient mechanism of photoreactivation during the exposure to solar radiation. Photoreactivation of DNA consists of enzyme-mediated, light-dependant monomerization of pyrimidine dimers, resulting in rapid, efficient and full DNA repair. Expression of the photolyase of PER is activated by the longer UV-A range and the shorter PAR range (370-450 nm) (46) and may allow DNA repair during the exposure to simulated solar radiation. For pathogenic bacteria of fish that were exposed to bright sunlight, photoreactivation was completed within 4-6 h (54) whereas for *E. coli* or *Halobacterium cutirubrum*, completion has been shown to take place within a fraction of one hour (22, 34). The category 1 of highly resistant strains may have activated a rapid photorecovery during the time of exposure and efficiently repaired DNA damage. There is a potential for photoreactivation to peak at the highest light intensity and PER may be very active in cells at the air-water interface (54).

We hypothesize that isolates from categories 2 and 3 which showed a lag-time before recovery, may have an important nucleotide excision repair, also called dark repair (e.g., NER). After exposure, the incubation of microplates was done in the dark and PER was not possible. NER is probably a widespread mechanism of DNA repair for highly resistant isolates (Table 3). Field studies have also shown that marine bacterioplankton repaired most of the DNA damage at night after diurnal exposure to sunlight, indicating that NER is a fundamental repair mechanism for marine bacteria (44, 56, 69). We can assume that the lag-time of the recovery of isolates in categories 2 and 3 corresponds to the time needed for NER to be operational, since NER may be a time-dependant process.

**Role of pigmentation for the resistance to solar radiation.** Maki (59) and others (38, 67, 82, 87) have suggested that pigments are effective to protect bacterioneuston against solar radiation. Similarly Wu et al. (94) reported that a colourless mutant of the extreme halophilic archaeobacterium *Halobacterium cutirubrum*, was more sensitive to UV light than the wild-type strains which possessed bacteriorhodopsin and bacterioruberin, two major carotenoid pigments. For these authors and Mathews and Siström (62), carotenoid pigments appeared to contribute to the resistance to UV irradiation. Carotenoids were found to protect microorganisms from UV and visible light damage by quenching triplet-state photosensitizers and ROS (15, 60). Bacteriochlorophyll *a* of  $\alpha$ -*proteobacteria* may also confer resistance to high doses of UV radiation (28). In the SML of the Black Sea, the number of pigmented cells, primarily yellow, often exceeded that in UW (87). A significantly higher percentage of

pigmented cells, primarily red (i.e., pink, red or brown), were found in the SML ( $52\% \pm 22\%$ ) than in UW ( $12\% \pm 7\%$ ) for four stations near the Swedish west coast (38). The higher proportion of pigmented cells may be indirect evidence of resistance to intense solar radiation at the interface. However, this protective effect of pigments was never demonstrated and the results reported in this study do not support this hypothesis. We observed that most of the highly resistant isolates were non-pigmented strains. Also, Gascon et al. (28) reported that strains of *Rhodobacter sphaeroides* with high levels of pigment (associated with phototrophic growth) were more sensitive to UV-C irradiation than strains with less pigment (associated with heterotrophic growth). From the present study, there was clear evidence that there is no direct correlation between pigmentation, high solar radiation and occurrence in the SML. Therefore, pigmentation may have only an indirect effect on the resistance of bacterial cells to solar radiation.

Aquatic microorganisms such as phytoplankton and cyanobacteria, are well known to synthesize photoprotective compounds such as scytonemin and mycosporine-like amino acids (MAAs) (21, 27, 81). These molecules act as antioxidants to prevent cellular damage resulting from UV-induced production of ROS by playing a sunscreen role (85). To our knowledge, only one bacterium, *Micrococcus* sp. AK-334 isolated from Pacific surface waters, was reported to contain a shinorine, a MAA (7). Other marine bacteria may have also the ability to produce these compounds. Nevertheless, Garcia-Pichel (26) concluded that it is physically impossible for bacterioplankton to use sunscreen compounds as the main photoprotective mechanism, because the intracellular concentrations that would be needed for that purpose would be physically unattainable. Further investigations will be needed to better characterize the dominant repair mechanisms and the UV-absorbing properties of the highly resistant marine species described in this study.

**Conclusion.** Our results demonstrate (i) the absence of higher percentage of resistant bacterial isolates in the SML (ii) the interspecific variability of resistance to solar radiation even inside a same taxonomic group (iii) the variability of strategies to recover from exposure to simulated solar radiation. Rapid recovery of several species should encourage further investigations in order to characterize their resistance mechanisms. Resistance to solar radiation appears to be mainly mediated by enzymatic repair of DNA damage through several pathways. However, the G+C content and physiological traits, such as carotenoids, sunscreen molecules and polysaccharides, could be additional factors determining the resistance of bacteria to solar radiation. Rapid recovery from UV stress of several species, as determined in the present study, should encourage further investigations in order to characterize the responsible mechanisms.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by the European Commission (Research Directorate General-Environment Program-Marine Ecosystems) through the AIRWIN project “Structure and role of biological communities involved in the transport and transformation of persistent pollutants at the marine AIR-Water Interface” (contract EVK3-CT2000-00030). The AIRWIN project is part of the EC IMPACTS cluster.

We thank the laboratory of “Ecosystèmes lagunaires” (UMR CNRS 5119 University of Montpellier II, France) for providing us with the automated microplate reader. We also thank Nicole Batailler, Laurent Intertaglia and Nathalie Parthuisot for technical assistance and Nyree West for language improvements.



1. **Abraham, W.-R., C. Strömpl, H. Meyer, S. Lindholst, E. R. B. Moore, R. Christ, M. Vancanneyt, B. J. Tindall, A. Bennasar, J. Smit, and M. Tesar.** 1999. Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov. with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1053-1073.
2. **Agogué, H., E. O. Casamayor, F. Joux, I. Obernosterer, C. Dupuy, F. Lantoine, P. Catala, M. G. Weinbauer, T. Rheinthal, G. J. Herndl, and P. Lebaron.** 2004. Comparison of samplers for the biological characterization of the sea surface microlayer. *Limnol. Oceanogr.: Methods* **2**:213-225.
3. **Akagawa-Matsushita, M., M. Matsuo, Y. Koga, and K. Yamasato.** 1992. *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:621-627.
4. **Alexander, B., and F. G. Priest.** 1989. *Bacillus glucanolyticus*, a new species that degrades a variety of beta-glucans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:112-115.
5. **Allen, D. A., B. Austin, and R. R. Colwell.** 1983. *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**:599-604.
6. **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. Lipman.** 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
7. **Arai, T., M. Nishijima, K. Adachi, and H. Sano.** 1992. Isolation and structure of a UV absorbing substance from the marine bacterium *Micrococcus* sp. AK-334. MBI Report. Marine Biotechnology Institute.
8. **Arrieta, J. M., M. G. Weinbauer, and G. J. Herndl.** 2000. Interspecific variability in sensitivity to UV radiation and subsequent recovery of selected isolates of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1468-1473.
9. **Bailey, C. A., R. A. Neihof, and P. S. Tabor.** 1983. Inhibitory effect of solar radiation on amino acid uptake in Chesapeake Bay bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:44-49.
10. **Baumann, P., L. Baumann, S. S. Bang, and M. J. Woolkalis.** 1980. Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckea*, and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckea*. *Curr. Microbiol.* **4**:127-132.
11. **Baumann, P., R. D. Bowditch, L. Baumann, and B. Beaman.** 1983. Taxonomy of marine *Pseudomonas* species: *P. stanieri* sp. nov.; *P. perfectomarina* sp. nov., nom. rev.; *P. nautica*; and *P. doudoroffii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**:857-865.
12. **Bouvet, P. J. M., and P. A. D. Grimont.** 1986. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**:228-240.
13. **Brosius, J., M. L. Palmer, P. J. Kennedy, and H. F. Noller.** 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **75**:4801-4805.
14. **Bruns, A., M. Rodhe, and L. Berthe-Corti.** 2001. *Muricauda ruestringensis* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, appendaged bacterium from German North Sea intertidal sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1997-2006.
15. **Carbonneau, M. A., A. Melin, A. Perromat, and M. Clerc.** 1989. The action of free radicals on *Deinococcus radiodurans* carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* **275**:244-251.

16. **Carlson, D. J.** 1982. Surface microlayer phenolic enrichments indicate sea surface slicks. *Nature* **296**:426-429.
17. **Chesneau, O., A. Morvan, F. Grimont, H. Labischinski, and N. el Solh.** 1993. *Staphylococcus pasteurii* sp. nov., isolated from human, animal, and food specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:237-244.
18. **Collins, M. D.** 1987. Transfert of *Brevibacterium ammoniagenes* (Cooke and Keith) to the Genus *Corynebacterium* as *Corynebacterium ammoniagenes* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**:442-443.
19. **Collins, M. D., B. M. Lund, J. A. E. Farrow, and K. H. Schleifer.** 1983. Chemotaxonomic study of an alkalophilic bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen. nov., sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* **129**:2037-2042.
20. **Denner, E. B. M., D. Vybiral, M. Koblizek, P. Kampf, H.-J. Busse, and B. Velimirov.** 2002. *Erythrobacter citreus* sp. nov., a yellow-pigmented bacterium that lacks bacteriochlorophyll *a*, isolated from the western Mediterranean Sea. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **52**:1655-1661.
21. **Dunlap, W. C., and J. M. Shick.** 1998. Ultraviolet radiation-absorbing Mycosporine-like Amino Acids in coral reef organisms: a biochemical and environmental perspective. *J. Phycol.* **34**:418-430.
22. **Eker, A. P. M., L. Formenoy, and L. E. A. de Wit.** 1991. Photoreactivation in the extreme halophilic archaebacterium *Halobacterium cutirubrum*. *Photochem. Photobiol.* **53**:643-651.
23. **Elasri, M., and R. V. Miller.** 1999. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2025-2031.
24. **Fernandez-Martinez, J., M. J. Pujalte, J. Garcia-Martinez, M. Mata, E. Garay, and F. Rodriguez-Valera.** 2003. Description of *Alcanivorax venustensis* sp. nov. and reclassification of *Fundibacter jadensis* DSM12178 (Bruns and Berthe-Corti 1999) as *Alcanivorax jadensis* comb. nov., members of the emended genus *Alcanivorax*. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **53**:331-338.
25. **Flemming, H. C.** 1993. Biofilms and environmental protection. *Wat. Sci. Tech.* **27**:1-10.
26. **Garcia-Pichel, F.** 1994. A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnol. Oceanogr.* **39**:1704-1717.
27. **Garcia-Pichel, F., and R. W. Castenholz.** 1993. Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:163-169.
28. **Gascon, J., A. Oubina, A. Pérez-Lezaun, and J. Urmeneta.** 1995. Sensitivity of selected bacterial species to UV radiation. *Curr. Microbiol.* **30**:177-182.
29. **Gauthier, M. J.** 1977. *Alteromonas citrea*, a new gram-negative, yellow-pigmented species from seawater. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27**:349-354.
30. **Hader, D. P.** 2000. Effects of solar UV-B radiation on aquatic ecosystems. *Adv. Space Res.* **12**:2029-2040.
31. **Hader, D. P., M. Lebert, R. Marangoni, and G. Colombetti.** 1999. ELDONET - European Light Dosimeter Network hardware and software. *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* **52**:51-58.
32. **Hardy, J. T.** 1982. The sea surface microlayer: biology, chemistry and anthropogenic enrichment. *Prog. Oceanogr.* **11**:307-328.
33. **Harker, M., J. Hirschberg, and A. Oren.** 1998. *Paracoccus marcusii* sp. nov., an orange gram-negative coccus. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:543-548.

34. **Harm, W.** 1968. Dark repair of photorepairable UV lesions in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* **6**:25-35.
35. **Harvey, R. W., and L. Y. Young.** 1980. Enrichment and association of bacteria and particulates in salt marsh surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**:894-899.
36. **Harvey, R. W., and L. Y. Young.** 1980. Enumeration of particle-bound and unattached respiring bacteria in the salt marsh environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**:156-160.
37. **Helbling, E. W., E. R. Marguet, V. E. Villafane, and O. Holm-Hansen.** 1995. Bacterioplankton viability in Antarctic waters as affected by solar radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **126**:293-298.
38. **Hermansson, M., G. W. Jones, and S. Kjelleberg.** 1987. Frequency of antibiotic and heavy metal resistance, pigmentation, and plasmids in bacteria of the marine air-water interface. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2338-2342.
39. **Herndl, G. J., G. Müller-Niklas, and J. Frick.** 1993. Major role of ultraviolet-B in controlling bacterioplankton growth in the surface layer of the ocean. *Nature* **361**:717-719.
40. **Hiraishi, A., Y. Yonemitsu, M. Matsushita, Y. K. Shin, H. Kuraishi, and K. Kawahara.** 2002. Characterization of *Porphyrobacter sanguineus* sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-containing bacterium capable of degrading biphenyl and dibenzofuran. *Arch. Microbiol.* **178**:45-52.
41. **Hühnerfuss, H.** 1981. On the problem of sea surface film sampling: a comparison of 21 microlayer-, 2 multilayer-, and 4 selected subsurface- samplers. Part 1. *Sonderdruck aus Meerestechnik* **12**:137-142.
42. **Hühnerfuss, H.** 1981. On the problem of sea surface film sampling: a comparison of 21 microlayer-, 2 multilayer-, and 4 selected subsurface- samplers. Part 2. *Sonderdruck aus Meerestechnik* **12**:170-173.
43. **Ivanova, E. P., L. A. Romanenko, M. H. Matté, G. R. Matté, A. M. Lysenko, U. Simidu, K. Kita-Tsukamoto, T. Sawabe, M. V. Vysotskii, G. M. Frolova, V. Mikhailov, R. Christen, and R. Colwell.** 2001. Retrieval of the species *Alteromonas tetraodoni* Simidu et al. 1990 as *Pseudoalteromonas tetraodonis* comb. nov. and emendation of description. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **51**:1071-1078.
44. **Jeffrey, W. H., R. Pledger, P. Aas, S. Hager, R. B. Coffin, R. von Haven, and D. L. Mitchell.** 1996. Diel and depth profiles of DNA photodamage in bacterioplankton exposed to ambient solar radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **137**:283-291.
45. **Joux, F., W. H. Jeffrey, P. Lebaron, and D. L. Mitchell.** 1999. Marine bacterial isolates display diverse responses to UV-B radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3820-3827.
46. **Kaiser, E., and G. J. Herndl.** 1997. Rapid recovery of marine bacterioplankton activity after inhibition by UV radiation in coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4026-4032.
47. **Karentz, D., M. L. Bothwell, R. B. Coffin, A. Hanson, G. J. Herndl, S. S. Kilham, M. P. Lesser, M. Lindell, R. E. Moeller, D. P. Morris, P. J. Neale, R. W. Sanders, C. S. Weiler, and R. G. Wetzel.** 1994. Impact of UV-B radiation on pelagic freshwater ecosystems: Report of working group on bacteria and phytoplankton. *Arch. Hydrobiol. Beih* **43**:31-69.
48. **Kellogg, C. A., and J. H. Paul.** 2002. Degree of ultraviolet radiation damage and repair capabilities are related to G+C content in marine vibriophages. *Aquat. Microb. Ecol.* **27**:13-20.
49. **Kirchman, D. L.** 2002. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microb. Ecol.* **39**:91-100.

50. **Koch, C., P. Schumann, and E. Stackebrandt.** 1995. Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali-Cohen 1889) to the genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. nov. and emendation of the genus *Arthrobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:837-839.
51. **Kotouckova, L., P. Schumann, E. Durnova, C. Sproer, I. Sedlacek, J. Neca, Z. Zdrahal, and M. Nemeč.** 2004. *Arthrobacter nitroguajacolicus* sp. nov., a novel 4-nitroguaiacol-degrading actinobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **54**:773-777.
52. **Krieg, N. R., and J. G. Holt.** 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. The Williams & Wilkins Co, Baltimore.
53. **Lebaron, P., N. Parthuisot, and P. Catala.** 1998. Comparison of blue nucleic acid dyes for flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1725-1730.
54. **Liltved, H., and B. Landfald.** 1996. Influence of liquid holding recovery and photoreactivation on survival of ultraviolet-irradiated fish pathogenic bacteria. *Wat. Res.* **30**:1109-1114.
55. **Liss, P. S., and R. A. Duce.** 1997. *The sea surface and global change*. Cambridge University Press.
56. **Lyons, M. M., P. Aas, J. D. Pakulski, L. G. van Waasbergen, D. L. Mitchell, R. V. Miller, and W. H. Jeffrey.** 1998. Ultraviolet radiation induced DNA damage in coral reef microbial communities. *Mar. Biol.* **130**:537-543.
57. **MacIntyre, F.** 1974. The top millimeter of the ocean. *Sci. Am.* **230**:62-77.
58. **Maki, J. S.** 1993. The air-water interface as an extreme environment. *In* T. E. Ford (ed.), *Aquatic microbiology: an ecological approach*. Blackwell Scientific publications, Boston.
59. **Maki, J. S.** 2002. Neuston microbiology: life at the air-water interface, p. 2133-2144. *In* G. Bitton (ed.), *The Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons, New York.
60. **Margalith, P. Z. (ed.).** 1992. *Pigment microbiology*, London.
61. **Marie, D., F. Partensky, S. Jacquet, and D. Vaultot.** 1997. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:188-193.
62. **Mathews, M. M., and W. R. Sistrom.** 1959. Function of carotenoid pigments in non-photosynthetic bacteria. *Nature* **184**:1892-1893.
63. **Matsuyama, H., K. Kawasaki, I. Yumoto, and O. Shida.** 1999. *Microbacterium kitamiense* sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from the wastewater of a sugar-beet factory. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1353-1357.
64. **Miller, R. V., W. H. Jeffrey, D. L. Mitchell, and M. Elasri.** 1999. Bacterial responses to ultraviolet light. *ASM News* **65**:535-541.
65. **Nedashkovskaya, O. I., S. B. Kim, S. K. Han, A. M. Lysenko, M. Rodhe, M. S. Rhee, G. M. Frolova, E. Falsen, V. V. Mikhailov, and K. S. Bae.** 2004. *Maribacter* gen. nov., a new member of the family *Flavobacteriaceae*, isolated from marine habitats, containing the species *Maribacter sedimenticola* sp. nov., *Maribacter aquivivus* sp. nov., *Maribacter orientalis* sp. nov. and *Maribacter ulvicola* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **54**:1017-1023.
66. **Nielsen, P., D. Fritze, and F. G. Priest.** 1995. Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. *Microbiology* **141**:1745-1761.
67. **Norkrans, B.** 1980. Surface microlayers in aquatic environments, p. 51-83. *In* M. Alexander (ed.), *Advances in Microbial Ecology*, vol. 4. Plenum Press, New York and London, New York.

68. **Obernosterer, I., P. Catala, T. Rheinthal, G. J. Herndl, and P. Lebaron.** subm. Enhanced heterotrophic activity in the surface microlayer of the Mediterranean Sea.
69. **Pakulski, J. D., P. Aas, W. H. Jeffrey, M. M. Lyons, L. G. van Waasbergen, D. L. Mitchell, and R. B. Coffin.** 1998. Influence of light on bacterioplankton production and respiration in a subtropical coral reef. *Aquat. Microb. Ecol.* **14**:137-148.
70. **Raguenes, G. H., A. Peres, R. Ruimy, P. Pignet, R. Christen, M. Loaec, H. Rougeaux, G. Barbier, and J. G. Guezennec.** 1997. *Alteromonas infernus* sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *J. Appl. Microbiol.* **82**:422-430.
71. **Rainey, F. A., S. Klatte, R. M. Kroppenstedt, and E. Stackebrandt.** 1995. *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:32-36.
72. **Reid, G. A., and E. H. J. Gordon.** 1999. Phylogeny of marine and freshwater *Shewanella*: reclassification of *Shewanella putrefaciens* NCIMB 400 as *Shewanella frigidimarina*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:189-191.
73. **Romanenko, L. A., N. V. Zhukova, A. M. Lysenko, V. V. Mikhailov, and E. Stackebrandt.** 2003. Assignment of *Alteromonas marinoglutinosa* NCIMB 1770 to *Pseudoalteromonas mariniglutinosa* sp. nov., nom. rev., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1105-1109.
74. **Romanenko, L. A., N. V. Zhukova, M. Rodhe, A. M. Lysenko, V. Mikhailov, and E. Stackebrandt.** 2003. *Pseudoalteromonas agarivorans* sp. nov., a novel marine agarolytic bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:125-131.
75. **Romano, I., A. Giordano, L. Lama, B. Nicolaus, and A. Gambacorta.** 2003. *Planococcus rifietensis* sp. nov, isolated from algal mat collected from a sulfurous spring in Campania (Italy). *Syst. Appl. Microbiol.* **26**:357-366.
76. **Ruger, H. J., and M. G. Hofle.** 1992. Marine star-shaped-aggregate-forming bacteria: *Agrobacterium atlanticum* sp. nov.; *Agrobacterium meteori* sp. nov.; *Agrobacterium ferrugineum* sp. nov., nom. rev.; *Agrobacterium gelatinovorum* sp. nov., nom. rev.; and *Agrobacterium stellulatum* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:133-143.
77. **Ruiz-Ponte, C., V. Cilia, C. Lambert, and J. L. Nicolas.** 1998. *Roseobacter gallaeciensis* sp. nov., a new marine bacterium isolated from rearings and collectors of the scallop *Pecten maximus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:537-542.
78. **Sawabe, T., R. Tanaka, M. M. Iqbal, K. Tajima, Y. Ezura, E. P. Ivanova, and R. Christen.** 2000. Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM 162T and five strains isolated from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov. and the extended description of the species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:265-271.
79. **Schubert, K., W. Ludwig, N. Springer, R. M. Kroppenstedt, J. P. Accolas, and F. Fiedler.** 1996. Two coryneform bacteria isolated from the surface of French Gruyere and Beaufort cheeses are new species of the genus *Brachybacterium*: *Brachybacterium alimentarium* sp. nov. and *Brachybacterium tyrofermentans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:81-87.
80. **Setlow, R. B.** 1966. Cyclobutane-type pyridin dimers in polynucleotides. *Science* **153**:379-386.
81. **Shick, J. M., and W. C. Dunlap.** 2002. Mycosporine-Like Amino Acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annu. Rev. Physiol.* **64**:223-262.
82. **Sieburth, J. M.** 1968. Observations on bacteria planktonic in Narragansett Bay, Rhode Island; a resume. *Bull. Misaki Mar. Biol. Inst., Kyoto University* **12**:49-64.

83. **Sieburth, J. M. N., P. J. Willis, K. M. Johnson, C. M. Burney, D. M. Lavoie, K. R. Hinga, D. A. Caron, F. W. French III, P. W. Johnson, and P. G. Davis.** 1976. Dissolved Organic Matter and heterotrophic microneuston in the surface microlayers of the North Atlantic. *Science* **194**:1415-1418.
84. **Singer, C. E., and B. N. Ames.** 1970. Sunlight ultraviolet and bacterial DNA base ratios. *Science* **170**:822-826.
85. **Sinha, R. P., and D. P. Häder.** 2002. Life under UV radiation in aquatic organisms. *Adv. Space Res.* **30**:1547-1556.
86. **Sorokin, D. Y.** 1995. *Sulfitobacter pontiacus* gen. nov., sp. nov. - a new heterotrophic bacterium from the Black Sea, specialized on sulfite oxydation. *Mikrobiologiya* **64**:354-365.
87. **Tsyban, A. V.** 1971. Marine bacterioneuston. *J. Oceanogr. Soc. Japan* **27**:56-66.
88. **Uchino, Y., A. Hirata, A. Yokota, and J. Sugiyama.** 1998. Reclassification of marine *Agrobacterium* species: Proposals of *Stappia stellula* gen. nov., comb. nov., *Stappia aggragata* sp. nov., nom. rev., *Ruegera atlantica* gen. nov., comb. nov., *Ruegera gelatinovora* comb. nov., *Ruegera algicola* comb. nov., and *Ahrensia kieliense* gen. nov., sp. nov., nom. rev. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **44**:201-210.
89. **Urakami, T., H. Araki, H. Oyanagi, K. Suzuki, and K. Komagata.** 1990. *Paracoccus aminophilus* sp. nov. and *Paracoccus aminovorans* sp. nov., which utilize N,N-dimethylformamide. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**:287-291.
90. **Vera, J., R. Alvarez, E. Murano, J. C. Slebe, and O. Leon.** 1998. Identification of a marine agarolytic *Pseudoalteromonas* isolate and characterization of its extracellular agarase. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4378-4383.
91. **Wei, H., Q. Ca, R. Rahn, X. Zhang, Y. Wang, and M. Lebowhl.** 1998. DNA structural integrity and base composition affect ultraviolet light-induced oxidative DNA damage. *Biochemistry* **37**:6485-6490.
92. **Whitehead, K., and M. Vernet.** 2000. Influence of mycosporine-like amino acids (MAAs) on UV absorption by particulate and dissolved organic matter in La Jolla Bay. *Limnol. Oceanogr.* **45**:1788-1796.
93. **Wieser, M., E. B. Denner, P. Kampfer, P. Schumann, B. Tindall, U. Steiner, D. Vybiral, W. Lubitz, A. M. Maszenan, B. K. Patel, R. J. Seviour, C. Radax, and H. J. Busse.** 2002. Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:629-637.
94. **Wu, L.-C., K.-C. Chow, and K.-K. Mark.** 1983. The role of pigments in *Halobacterium cutirubrum* against UV radiation. *Microbios Lett.* **24**:85-90.
95. **Yi, H., K. S. Bae, and J. Chun.** 2004. *Aestuariibacter salexigens* gen. nov., sp. nov. and *Aestuariibacter halophilus* sp. nov., isolated from tidal flat sediment, and emended description of *Alteromonas macleodii*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:571-576.
96. **Yi, H., and J. Chun.** 2004. *Hongiella mannitolivorans* gen. nov., sp. nov., *Hongiella halophila* sp. nov. and *Hongiella ornithinivorans* sp. nov., isolated from total flat sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:157-162.
97. **Yokota, A., M. Takeuchi, T. Sakane, and N. Weiss.** 1993. Proposal of six new species in the genus *Aureobacterium* and transfer of *Flavobacterium estararomaticum* Omelianski to the genus *Aureobacterium* as *Aureobacterium estaromaticum* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:555-564.
98. **Yoon, J. H., H. Kim, I. G. Kim, K. H. Kang, and Y. H. Park.** 2003. *Erythrobacter flavus* sp. nov., a slight halophile from the East Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1169-1174.

99. **Yoon, J. H., I. G. Kim, K. H. Kang, T. K. Oh, and Y. H. Park.** 2003. *Alteromonas marina* sp. nov., isolated from sea water of the East Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1625-1630.
100. **Yoon, J. H., D. Y. Shin, I. G. Kim, K. H. Kang, and Y. H. Park.** 2003. *Marinobacter litoralis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from sea water from the East Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:563-568.
101. **Yurkov, V. V., E. Stackebrandt, A. Holmes, J. A. Fuerst, P. Hugenholtz, J. Golecki, N. Gad'on, V. M. Gorlenko, E. Kompantseva, and G. Drews.** 1994. Phylogenetic positions of novel aerobic, bacteriochlorophyll a-containing bacteria and description of *Roseococcus thiosulfatophilus* gen. nov., sp. nov., *Erythromicrobium ramosum* gen. nov., sp. nov., and *Erythrobacter litoralis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:427-434.
102. **Ziemke, F., M. G. Hofle, J. Laculat, and R. Rossello-Mora.** 1998. Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:179-186.
103. **Zuev, B. K., V. V. Chudinova, V. V. Kovalenko, and V. V. Yagov.** 2001. The conditions of formation of the chemical composition of the sea surface microlayer and techniques for studying organic matter in it. *Geochem. Internat.* **39**:773-784.

## **CHAPITRE VI**



## **VI. CONCLUSIONS GENERALES**

Les objectifs de ce travail étaient d'étudier la diversité et des propriétés particulières des communautés bactériennes cultivables situées à l'interface air-mer et de les comparer à celles de l'eau sous-jacente, collectée à 50 cm de profondeur.

La microcouche de surface représente le premier millimètre de la surface des océans. Son prélèvement requiert donc des échantillonneurs adaptés. Nous avons dans un premier temps déterminé l'échantillonneur le plus approprié pour l'analyse des communautés biologiques et notamment des communautés bactériennes présentes à cette interface. Le tamis en métal, qui prélève les 400 premiers  $\mu\text{m}$  de la microcouche, a été l'échantillonneur le plus approprié à la collecte des différents paramètres biologiques.

L'étude de la diversité et la mise en évidence de propriétés particulières spécifiques au bactérioneuston a conduit à l'isolement et la caractérisation moléculaire d'environ 500 souches collectées à la fois au niveau de la microcouche, mais aussi au niveau de l'eau sous-jacente. Dans cette analyse, nous avons réalisé pour chaque isolat une empreinte génétique de leur ADNr 16S par la technique de PCR-RFLP. Ce criblage des isolats nous a permis, par élimination des profils redondants, de constituer une collection de 124 souches, identifiées ensuite par séquençage de leur ADNr 16S. L'analyse et la comparaison de la diversité des communautés bactérioneustoniques à celle de l'eau sous-jacente a montré que la majorité des espèces retrouvées au niveau de l'interface est présente également dans les eaux sous-jacente.

L'hydrophobicité étant une adaptation potentielle des bactéries à la vie en surface, nous l'avons déterminé pour chacun des isolats de la collection et ainsi estimé l'importance de cette propriété physiologique chez les souches neustoniques. Nos expériences en laboratoire ont révélé que les souches neustoniques présentent en moyenne une hydrophobicité identique à celles de l'eau sous-jacente.

Les radiations solaires intenses sont une contrainte majeure à laquelle les communautés bactérioneustoniques doivent faire face. Nous avons donc évalué, dans un dernier temps, la résistance des souches de la collection aux radiations solaires afin de mettre en évidence une adaptation possible des bactéries isolées au niveau de la microcouche. Chacune des souches de la collection a été soumise à différents temps d'expositions aux radiations solaires recréés par un simulateur solaire. Différentes classes de résistance ont été

déterminées par l'analyse des courbes de croissance de chacun des isolats après exposition. Il apparaît ainsi que les souches neustoniques ne présentent pas une résistance supérieure aux souches isolées de l'eau sous-jacente.

### **Les échantillonneurs de la microcouche de surface : une avancée méthodologique**

L'étude présentée dans le Chapitre III nous a permis de mettre en évidence l'échantillonneur le plus adapté pour l'analyse des différentes communautés biologiques situées à l'interface air-mer. Le tamis en métal est l'échantillonneur le plus adapté à la collecte d'organismes de différentes classes de tailles (des virus aux flagellés). De plus cet échantillonneur présente l'avantage non négligeable de prélever « rapidement » la microcouche de surface. A notre connaissance, peu de comparaisons d'échantillonneurs ont été effectuées sur le terrain avec un si grand nombre de paramètres biologiques analysés. Cette étude a également permis de mettre en évidence l'importance des tests de contrôle des échantillonneurs. Par ces expériences de contrôle, nous avons évalué le biais possible des échantillonneurs dans la collecte de certains paramètres biologiques. Ainsi, le biais important des membranes dans la collecte de paramètres bactériens révélé dans cette étude, remet en question les nombreuses analyses effectuées sur le bactérioneuston collecté avec ce type de membranes. Celles-ci ont conduit de nombreux auteurs à conclure à un enrichissement important des communautés bactériennes situées au niveau de l'interface air-mer (Crow *et al.* 1975, Kjelleberg *et al.* 1979, Sewell *et al.* 1981, Hardy et Apts 1984). Ce fort enrichissement est donc à relativiser étant donné que les membranes adsorbent préférentiellement les bactéries. La profondeur de l'eau sous-jacente doit être également considérée avec attention. Les facteurs d'enrichissement calculés avec une eau sous-jacente collectée à 50 cm ou à 5 m de profondeur ne sont pas identiques pour un même paramètre biologique. En l'occurrence, des comparaisons d'études ne peuvent se faire que si elles utilisent un même échantillonneur de microcouche de surface et une même profondeur de l'eau sous-jacente.

### Diversité de la fraction cultivable du bactérioneuston

La diversité du bactérioneuston a été étudié principalement à travers l'analyse de la fraction cultivable des communautés bactérioneustoniques prélevées sur 2 sites d'étude différant par leur degré de pollution.

Sur le site de Banyuls-sur-Mer, au niveau d'une station oligotrophe côtière, la fraction cultivable représente en moyenne 1,58 % des communautés totales bactérioneustoniques. La majorité des bactéries retrouvées à l'interface air-mer sont Gram + et appartiennent aux groupes des Protéobactéries alpha et gamma ainsi qu'au groupe des *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides*. Cette distribution est semblable à celle retrouvée au niveau de l'eau sous-jacente. Ces groupes dominants au niveau de la microcouche et de l'eau sous-jacente sont caractéristiques de la fraction cultivable des communautés bactériennes marines (Benlloch *et al.* 1995, Pinhassi *et al.* 1997, Bowman 1998, Eilers *et al.* 2000). Néanmoins, cette absence de différence entre la microcouche et l'eau sous-jacente a également été retrouvée dans la structure des communautés totales bactériennes. En effet, l'analyse de ces communautés par la technique de PCR-SSCP n'a pas mis en évidence parmi les populations majoritaires du bactérioneuston, de populations spécifiques à la microcouche.

Sur le site de Barcelone, la station d'échantillonnage située près du rejet d'une des stations d'épuration de la ville est soumise à de nombreux apports anthropiques. Au niveau de la microcouche, le pourcentage des bactéries cultivables est de 4.16 %. Ce pourcentage est proche de celui retrouvé pour les communautés bactériennes de boues activées (Amann *et al.* 1995). La diversité des bactéries cultivables situées au niveau de la microcouche était différente de celle de Banyuls-sur-Mer. Les bactéries Gram + (Actinobactéries et Firmicutes avec un contenu en G+C faible), caractéristiques de communautés bactériennes de station d'épuration et de boues activées (Kampfer *et al.* 1996, Snaidr *et al.* 1997), étaient plus nombreuses aussi bien au niveau de la microcouche que de l'eau sous-jacente. Au niveau de la microcouche, les bactéries appartenant au groupe des Actinobactéries, spécialisées dans la dégradation de molécules complexes telles que les hydrocarbures et les pesticides (Kashner *et al.* 1994, De Schrijver et De Mot 1999, Gremion *et al.* 2003, Zhuang *et al.* 2003), étaient les plus représentées (27 %) contrairement à l'eau sous-jacente (6 %). La PCR-SSCP a également révélé la même tendance à savoir la présence de populations spécifiques dans la microcouche. Cependant, il n'est pas possible de conclure à l'existence de populations propres à la microcouche au niveau de la station de Barcelone étant donné que les rejets de la station d'épuration peuvent biaiser nos analyses.

Par l'utilisation de techniques d'isolement classiques, nous avons mis en évidence que 25 % des isolats de la collection présentaient de faibles (<97 %) homologues de séquence de l'ARNr 16S avec d'autres espèces décrites. Par ailleurs, 10 % des souches isolées avaient une homologie de séquence inférieure à 93%. Il est probable que nous ayons isolé de nouvelles espèces voire de nouveaux genres bactériens. Nos résultats confortent l'hypothèse selon laquelle la diversité des bactéries cultivables marines reste encore très peu explorée (Pinhassi *et al.* 1997, Hagstrom *et al.* 2000). Si de nombreuses espèces bactériennes marines sont encore inconnues et non isolées (Schmidt *et al.* 1991, Amann *et al.* 1995, Suzuki *et al.* 1997), leur proportion est certainement encore plus importantes dans les environnements peu prospectés. La microcouche de surface des océans appartient aux biotopes qui restent peu explorés. La découverte de nouvelles espèces et de nouveaux genres est susceptible de révéler l'existence d'espèces bactériennes ayant des propriétés physiologiques et écologiques originales.

### **Existe-t'il une adaptation du bactérioneuston aux radiations solaires ?**

D'après les tests de résistance effectués en laboratoire à l'aide d'un simulateur solaire, les isolats bactériens neustoniques ne semblent pas être plus résistants aux radiations solaires que ceux de l'eau sous-jacente. De plus, contrairement à ce qui était supposé par de nombreuses études sur les communautés bactériennes neustoniques (Sieburth 1968, Tsyban 1971, Fehon et Oliver 1979, Norkrans 1980, Hermansson *et al.* 1987, Maki 2002), les pigments ne seraient pas un moyen indispensable, ni suffisant, à la protection des souches neustoniques face aux radiations solaires. Ces souches, présentes au niveau de la microcouche, ne semblent pas posséder de mécanisme intrinsèque de résistance, de protection et/ou de réparation plus efficaces que celles de l'eau sous jacentes.

Cependant, plusieurs éléments pourraient laisser supposer que la microcouche de surface soit un milieu « favorable » à la résistance des bactéries face aux radiations solaires. En premier lieu, les exopolysaccharides sécrétés par les bactéries, les algues et les autres organismes marins sont fortement accumulés au niveau de la microcouche de surface (Sieburth *et al.* 1976, Maki 1993). Ces exopolysaccharides sont impliqués dans la protection des micro-organismes face à différents stress environnementaux tels que la dessiccation, les changements de pH, les chocs osmotiques et les radiations ultra-violettes (Flemming 1993, Ophir et Gutnick 1994, Elasri et Miller 1999, Davey et O'toole 2000). Cette accumulation de

polysaccharides pourrait donc fournir aux bactéries, une protection *in situ* contre les radiations solaires intenses. De plus, certaines espèces bactériennes appartenant au genre *Pseudoalteromonas* comme *P. atlantica* retrouvées en abondance dans notre étude au niveau de la microcouche, sont capables de convertir une mycosporine d'une algue (la shinorine ou la porphyra-334) en mycosporine-glycine, molécule possédant des propriétés antioxydantes (Dunlap *et al.* 1998, Dunlap et Shick 1998). Ces molécules de type MAA (mycosporine-like amino acids) protègent certains organismes eucaryotes, comme le phytoplancton et les dinoflagellés, des radiations UV (Karentz *et al.* 1991, Shick et Dunlap 2002). Ainsi, les mycosporines, une fois excrétées dans le milieu naturel, sont retrouvées en abondance dans la matière organique (Whitehead et Vernet 2000). Cette matière organique est fortement concentrée au niveau de la microcouche (Hardy 1982, Liss et Duce 1997), ces MAAs peuvent donc directement (par absorption des UV) ou indirectement (bioconversion par les bactéries) protéger les bactéries des radiations solaires.

### **Existe-t'il des communautés bactériennes spécifiques à la microcouche de surface ?**

D'après nos données concernant la diversité de la fraction cultivable, les isolats neustoniques ne semblent pas être différents taxinomiquement de ceux de l'eau sous-jacente. De plus, les données concernant la structure des communautés bactériennes totales de la station côtière oligotrophe que nous avons étudié n'ont pas permis de mettre en évidence de population spécifique à la microcouche. Par conséquent, il ne semble pas y avoir de sélection d'espèces particulières au sein de la microcouche.

L'hydrophobicité, adaptation potentielle des bactéries à la vie en surface, n'est pas plus importante pour les souches isolées de la microcouche que pour celles isolées de l'eau sous-jacente. De la même manière, les souches isolées de la microcouche de surface ne présentent pas de caractéristiques spécifiques vis à vis de leur résistance aux radiations solaires puisque cette résistance est similaire à celle des souches d'origine planctonique.

Différents travaux de la littérature confortent notre hypothèse d'absence de communautés bactériennes spécifiques à la microcouche de surface (Fehon et Oliver 1977, Gearing et Gearing 1982, Guerin 1989). Dans ces études, la dégradation d'hydrocarbures et de pesticides par le bactérioneuston et le bactérioplancton a été évaluée et comparée. Les communautés bactérioneustoniques ne dégradent pas plus efficacement ces polluants que le

bactérioplancton. Ces études renforcent le fait que ces communautés bactériennes ne semblent pas présenter d'adaptations particulières à la vie en surface.

Tous ces travaux semblent montrer que les communautés bactérienneustoniques présentent une diversité et certaines propriétés (hydrophobicité, résistance aux radiations solaires et aux polluants) identiques à celles des communautés bactériennes planctoniques.

Cette hypothèse reste cependant à confirmer. L'absence de spécificité taxinomique n'a été mise en évidence que sur la fraction cultivable et sur les populations majoritaires du bactérioneuston. Des approches de clonage-séquençage de l'ADN total bactérien ou d'hybridation *in situ* des ARNr par des sondes oligonucléotidiques spécifiques, pourraient conforter, ou non, cette hypothèse. Par ailleurs, la détermination de l'hydrophobicité et de la résistance des souches de la collection aux radiations solaires a été effectuée en laboratoire. Le comportement et la physiologie de ces souches *in situ* reste à démontrer.

Le choix de la profondeur pour l'eau sous-jacente peut être discuté. Nous avons, montré dans le chapitre III que les facteurs d'enrichissement de certains paramètres bactériens étaient supérieurs en considérant une eau sous-jacente prélevée à 5 m de profondeur par rapport à ceux calculés avec une eau sous-jacente prélevée à 50 cm de profondeur. L'analyse et la comparaison du bactérioneuston *versus* bactérioplancton pourraient conduire à des résultats différents avec une eau-sous-jacente prélevée à 5 m de profondeur.

Enfin, la microcouche de surface en milieu côtier est sujette à de nombreux apports fluviaux et atmosphériques, notamment d'origine anthropique. Ces apports influencent la composition chimique de la microcouche de surface et donc la structure des communautés neustoniques. En milieu hauturier, où la microcouche de surface est soumise à beaucoup moins d'apports, on peut supposer que la microcouche de surface soit « chimiquement » plus stable qu'en milieu côtier. Cette « stabilité » pourrait favoriser l'installation de communautés bactérienneustoniques particulières. Une étude du bactérioneuston au niveau d'une station hauturière (station MOLA de l'Observatoire Océanologique de Baynsquls-sur-Mer) pourrait être entreprise pour conforter l'hypothèse de l'absence de spécificité du compartiment bactérien au niveau de la microcouche.

### Perspectives de recherche

Les travaux présentés dans le chapitre IV de cette thèse ont permis de constituer une collection de 124 souches bactériennes issues des eaux de surface de la mer Méditerranée. Certaines de ces souches présentent des caractères physiologiques, écologiques et taxinomiques originaux.

La détermination de l'hydrophobicité a permis de mettre en évidence des souches ayant un pourcentage d'hydrophobicité élevé comme par exemple les souches 14III/A01/012 (85%), 18III/A01/070 (89%) et 5IX/A01/131 (90%). Ces souches doivent présenter des caractéristiques de surface originales qu'il serait intéressant d'approfondir.

Environ 20 % des souches de la collection présentent, en milieu liquide, un développement sous forme d'agrégats ou de biofilms (cf. annexe 4). Certaines bactéries neustoniques forment des structures dites en rosette au niveau de l'interface (Paddies *et al.* 2004). Les cellules bactériennes s'accrochent les unes aux autres par l'intermédiaire de polysaccharides et forment un biofilm. De plus, certaines bactéries présentent à leur base un matériel extracellulaire fibreux et adhésif qui permet leur attachement au niveau de l'interface (Marshall et Cruickshank 1973). La croissance en biofilm ou en agrégats peut être une caractéristique physiologique spécifique de la vie en surface. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par l'observation au microscope et l'analyse des biofilms de ces souches.

Certaines souches de la collection, isolées pour la plupart au niveau de la microcouche de surface de Barcelone, appartiennent au groupe des Actinobactéries. Ce groupe de bactéries Gram + est impliqué dans la dégradation de nombreux composés organiques tels que les hydrocarbures, les pesticides et les métaux lourds (Kashner *et al.* 1994, De Schrijver et De Mot 1999, Gremion *et al.* 2003, Zhuang *et al.* 2003). Ces souches pourront être l'objet d'études plus approfondies sur leurs éventuelles capacités de dégradation de diverses substances toxiques et ouvrir de nouvelles voies de bioconversion (dépollution, traitement d'effluents industriels, biorémediation).

Enfin, cette étude a permis de mettre en évidence des isolats présentant de faibles homologies de séquences avec des souches déjà décrites. Il peut s'agir de nouvelles espèces, de nouveaux genres ou mêmes de nouvelles familles de bactéries. Une attention particulière doit être prêtée aux isolats présentant une homologie de séquences avec des séquences de clones environnementaux également très faible (<93%). Une analyse phylogénétique approfondie et un travail de description des fonctions métaboliques, physiologiques et écologiques de ces isolats (14III/A01/031, 5IX/A01/131, 17X/A02/237) doivent être entrepris.

Dans les travaux présentés dans le chapitre V, des souches fortement résistantes aux radiations solaires ont été mises en évidence. Certains genres du groupe des Protéobactéries gamma tels que *Pseudoalteromonas* et *Alteromonas* semblent présenter un mécanisme efficace de réparation de l'ADN. La souche très résistante 18III/A01/053 proche de *Pseudoalteromonas atlantica* a été isolée à Barcelone et Banyuls-sur-Mer pendant plusieurs saisons, au niveau de la microcouche et de l'eau sous-jacente. Elle pourrait être retenue comme souche modèle pour une étude approfondie des dommages induits par les radiations solaires et des mécanismes de réparation. Les dommages ADN (formation de dimères de pyrimidine) et protéiques (formation de groupement carbonyles chez les protéines oxydées) pourraient être mesurés par immunodétection en dot-blot, technique mise au point au laboratoire. L'activation de la protéine RecA, premier facteur de régulation du système de réparation à l'obscurité des bactéries (Miller *et al.* 1999, Booth *et al.* 2001a, 2001b) est caractéristique des capacités de réparation des bactéries. Etudier l'expression du gène codant pour la protéine RecA serait un moyen d'évaluer le potentiel de réparation de la souche étudiée. Ce travail pourrait être envisagé par la construction d'un mutant biosenseur comme cela a été réalisé chez *Pseudomonas aeruginosa* ou l'opéron lux a été fusionné au promoteur de RecA (Miller *et al.* 1999). Un travail de complémentation avec le gène *recA* comme cela a été fait chez *Pseudomonas aeruginosa* (Kidambi *et al.* 1996) serait également intéressant à envisager. La concentration de la protéine RecA dans les cellules bactériennes peut être évaluée par la technique de Western blot en utilisant des anticorps anti-*E. coli* RecA (Booth *et al.* 2001a, 2001b). La prochaine étape du travail pourrait consister à étudier précisément l'impact des différentes longueurs d'onde du spectre solaire sur la formation des dommages moléculaires aussi bien ADN que protéiques. A l'aide du simulateur solaire, il est possible de faire des coupures spectrales simples (PAR, PAR+UV-A, PAR+UV-A+UV-B), ou des coupures de longueurs d'onde dans les UV-B, les UV-A et le PAR qui seraient réalisées au moyen de différents filtres. Il serait donc possible de déterminer le spectre d'action biologique de chaque paramètre étudié.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Aas, P., M. M. Lyons, R. Pledger, D. L. Mitchell, et W. H. Jeffrey.** 1996. Inhibition of bacterial activities by solar radiation in nearshore waters and the Gulf of Mexico. *Aquat. Microb. Ecol.* 11: 229-238.
- Abraham, W.-R., C. Strömpl, H. Meyer, S. Lindholst, E. R. B. Moore, R. Christ, M. Vancanneyt, B. J. Tindall, A. Bennasar, J. Smit, et M. Tesar.** 1999. Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov. with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1053-1073.
- Agogué, H., E. O. Casamayor, F. Joux, I. Obernosterer, C. Dupuy, F. Lantoine, P. Catala, M. G. Weinbauer, T. Rheintaler, G. J. Herndl, et P. Lebaron.** 2004. Comparison of samplers for the biological characterization of the sea surface microlayer. *Limnol. Oceanogr.: Methods* 2: 213-225.
- Agogué, H., F. Joux, I. Obernosterer, et P. Lebaron.** *submitted*. Resistance of bacterioneuston to solar radiation.
- Akagawa-Matsushita, M., M. Matsuo, Y. Koga, et K. Yamasato.** 1992. *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 621-627.
- Albright, L.** 1980. Photosynthetic activities of phytoneuston and phytoplankton. *Can. J. Microbiol.* 26: 389-392.
- Alexander, B., et F. G. Priest.** 1989. *Bacillus glucanolyticus*, a new species that degrades a variety of beta-glucans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 112-115.
- Allen, D. A., B. Austin, et R. R. Colwell.** 1983. *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 599-604.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, et D. Lipman.** 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Amann, R., W. Ludwig, et K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- Arai, T., M. Nishijima, K. Adachi, et H. Sano.** 1992. Isolation and structure of a UV absorbing substance from the marine bacterium *Micrococcus* sp. AK-334, p. 88-94, MBI Report. MBI Report. Marine Biotechnology Institute.
- Arrieta, J. M., M. G. Weinbauer, et G. J. Herndl.** 2000. Interspecific variability in sensitivity to UV radiation and subsequent recovery of selected isolates of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1468-1473.
- Azam, F., T. Fenchel, J. G. Field, J. S. Gray, L. A. Meyer-Reil, et F. Thingstad.** 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 257-263.
- Badie, C., J. M. Pérès, et J. C. Romano.** 1987. Concentration de radionucléides artificiels dans des films organiques de surface en Méditerranée. *C. R. Acad. Sc. Paris-Série III* 8: 177-180.
- Bailey, C. A., R. A. Neihof, et P. S. Tabor.** 1983. Inhibitory effect of solar radiation on amino acid uptake in Chesapeake Bay bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 44-49.
- Barger, W. R., W. H. Daniel, et W. D. Garrett.** 1974. Surface chemical properties of banded sea slicks. *Deep-Sea Res.* 21: 83-89.
- Baumann, P., L. Baumann, S. S. Bang, et M. J. Woolkalis.** 1980. Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckeia*, and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckeia*. *Curr. Microbiol.* 4: 127-132.

- Baumann, P., R. D. Bowditch, L. Baumann, et B. Beaman.** 1983. Taxonomy of marine *Pseudomonas* species: *P. stanieri* sp. nov.; *P. perfectomarina* sp. nov., nom. rev.; *P. nautica*; and *P. doudoroffii*. Int. J. Syst. Bacteriol. 33: 857-865.
- Baylor, E. R., V. Peters, et M. B. Baylor.** 1977. Water-to-air transfer of virus. Science 197: 763-764.
- Bayona, J. M., P. Fernandez, C. Porte, I. Tolosa, M. Valls, et J. Albaiges.** 1991. Partitioning of urban wastewater organic microcontaminants among coastal compartments. Chemosphere 23: 313-326.
- Bell, C. R., et L. J. Albright.** 1982. Bacteriological investigation of the neuston and plankton in the Fraser River estuary, British Columbia. Estuar. Coast. Shelf S. 15: 385-394.
- Ben Yami, M., A. Herzberg, S. Pisanty, et A. Lourie.** 1970. A side-tracking neuston net. Mar. Biol. 6: 312-316.
- Benloch, S., F. Rodriguez-Valera, et A. J. Martinez-Murcia.** 1995. Bacterial diversity in two coastal lagoons deduced from 16S rDNA PCR amplification and partial sequencing. FEMS Microb. Ecol. 18: 267-279.
- Bernard, L., C. Courties, P. Servais, M. Troussellier, M. Petit, et P. Lebaron.** 2000. Relationships among bacterial cell size, productivity, and genetic diversity in aquatic environments using cell sorting and flow cytometry. Microb. Ecol. 40: 148-158.
- Bernardet, J. F., Y. Nakagawa, et B. Holmes.** 2002. Proposed minimal standards for describing new taxa of the family Flavobacteriaceae and emended description of the family. Int J Syst Evol Microbiol 52: 1049-1070.
- Bezdek, H. F., et A. F. Carlucci.** 1972. Surface concentration of marine bacteria. Limnol. Oceanogr. 17: 566-569.
- Blanchard, D. C., et L. Syzdek.** 1970. Mechanism for the Water-to-Air transfer and concentration of bacteria. Science 170: 626-628.
- Blanchard, D. C., et L. D. Syzdek.** 1978. Seven problems in bubble and jet drop researches. Limnol. Oceanogr. 23: 389-400.
- Booij, K., et B. L. van Drooge.** 2001. Polychlorinated biphenyls and hexachlorobenzene in atmosphere, sea-surface microlayer, and water measured with semi-permeable membrane devices (SPMDs). Chemosphere 44: 91-98.
- Booth, M. G., L. A. Hutchinson, M. Brumsted, P. Aas, R. B. Coffin, R. C. Downer Jr, C. A. Kelley, M. Lyons Maille, J. D. Pakulski, S. L. Holder Sandvik, W. H. Jeffrey, et R. V. Miller.** 2001a. Quantification of recA gene expression as an indicator of repair potential in marine bacterioplankton communities of Antarctica. Aquat. Microb. Ecol. 24: 51-59.
- Booth, M. G., W. H. Jeffrey, et R. V. Miller.** 2001b. RecA expression in response to solar UVR in the marine bacterium *Vibrio natriegens*. Microb. Ecol. 42.
- Bouvet, P. J. M., et P. A. D. Grimont.** 1986. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwofii*. Int. J. Syst. Bacteriol. 36: 228-240.
- Bowman, J. P.** 1998. *Pseudoalteromonas prydzensis* sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium from Antarctic sea ice. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 1037-1041.
- Bowman, J. P., S. McCammon, M. V. Brown, D. S. Nichols, et T. A. McMeekin.** 1997. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3068-3078.
- Brosius, J., M. L. Palmer, P. J. Kennedy, et H. F. Noller.** 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 75: 4801-4805.

- Bruns, A., M. Rodhe, et L. Berthe-Corti.** 2001. *Muricauda ruestringensis* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, appendaged bacterium from German North Sea intertidal sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1997-2006.
- Butcher, S. S., R. J. Charlson, G. H. Orians, et G. V. Wolfe.** 1992. Global biogeochemical cycles. Academic Press.
- Carbonneau, M. A., A. Melin, A. Perromat, et M. Clerc.** 1989. The action of free radicals on *Deinococcus radiodurans* carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 275: 244-251.
- Carlson, D. J.** 1982a. A field evaluation of plate and screen microlayer sampling techniques. *Mar. Chem.* 11: 189-208.
- Carlson, D. J.** 1982b. Surface microlayer phenolic enrichments indicate sea surface slicks. *Nature* 296: 426-429.
- Carlucci, A. F., D. B. Craven, et S. M. Henrichs.** 1985. Surface-film microheterotrophs: amino acid metabolism and solar radiation effects on their activities. *Mar. Biol.* 85: 13-22.
- Carlucci, A. F., D. B. Craven, et D. M. Wolgast.** 1991. Microbial populations in surface films and subsurface waters: amino acid metabolism and growth. *Mar. Biol.* 108: 329-339.
- Carlucci, A. F., et P. M. Williams.** 1965. Concentration of bacteria from sea water by bubble scavenging. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer* 30: 28-33.
- Carlucci, A. F., D. M. Wolgast, et D. B. Craven.** 1992. Microbial populations in surface films: amino acid dynamics in nearshore and offshore waters off Southern California. *J. Geophys. Res.* 97: 5271-5280.
- Caron, D. A.** 1983. Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedure. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 491-198.
- Carty, C., et R. R. Colwell.** 1975. A microbial study of air and surface water microlayer in the open ocean. *J. Wash. Acad. Sci.* 65: 148-153.
- Casamayor, E. O., R. Massana, S. Benlloch, L. Ovreas, B. Diez, V. Goddard, J. M. Gasol, I. Join, F. Rodriguez-Valera, et C. Pedros-Alio.** 2002. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multi-pond solar saltern. *Environ. Microbiol.* 4: 338-348.
- Casamayor, E. O., H. Schäfer, H. Baneras, C. Pedros-Alio, et G. Muyzer.** 2000. Identification and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 499-508.
- Chakrabarty, A. M.** 1976. Plasmids in *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Gen.* 10: 7-30.
- Chaloux, N., J. M. Bayona, et J. Albaiges.** 1994. Determination of nonylphenols as pentafluorobenzyl derivatives by capillary gas chromatography with electroncapture and mass spectrometric detection in environmental matrices. *J. Chromatogr. A.* 686: 275-281.
- Chesneau, O., A. Morvan, F. Grimont, H. Labischinski, et N. el Solh.** 1993. *Staphylococcus pasteurii* sp. nov., isolated from human, animal, and food specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 237-244.
- Cincinelli, A., A. M. Stortini, M. Perugini, L. Checchini, et L. Lepri.** 2001. Organic pollutants in sea-surface microlayer and aerosol in the coastal environment of Leghorn--(Tyrrhenian Sea). *Mar. Chem.* 76: 77-98.
- Collins, M. D.** 1987. Transfert of *Brevibacterium ammoniagenes* (Cooke and Keith) to the Genus *Corynebacterium* as *Corynebacterium ammoniagenes* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 442-443.

- Collins, M. D., B. M. Lund, J. A. E. Farrow, et K. H. Schleifer.** 1983. Chemotaxonomic study of an alkalophilic bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen. nov., sp. nov. J. Gen. Microbiol. 129: 2037-2042.
- Corpe, W. A.** 1970. An acid polysaccharide produced by a primary marine film-forming marine bacterium. Dev. Ind. Microbiol. 2: 402-411.
- Crow, S. A., D. G. Ahearn, W. L. Cook, et A. W. Bourquin.** 1975. Densities of bacteria and fungi in coastal surface films as determined by a membrane-adsorption procedure. Limnol. Oceanogr. 20: 644-646.
- Dahlbäck, B., M. Hermansson, S. Kjelleberg, et B. Norkrans.** 1981. The hydrophobicity of bacteria - An important factor in their initial adhesion at the air-water interface. Arch. Microbiol. 128: 267-270.
- Daumas, R. A., P. L. Laborde, J. C. Marty, et A. Saliot.** 1976. Influence of sampling method on the chemical composition of water surface film. Limnol. Oceanogr. 21: 319-326.
- Davey, M. E., et G. A. O'Toole.** 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 847-867.
- De Schrijver, A., et R. De Mot.** 1999. Degradation of pesticides by actinomycetes. Crit. Rev. Microb. 25: 85-119.
- De Souza Lima, Y.** 1985. Accumulation de sels nutritifs dans la microcouche de surface: influence possible des facteurs abiotiques et biotiques du milieu. Oceanol. Acta 8: 47-58.
- De Souza Lima, Y., et M. J. Chrétiennot-Dinet.** 1984. Measurements of biomass and activity of neustonic microorganisms. Estuar. Coast. Shelf Sci. 19: 167-180.
- Delorenzo, M. E., G. Scott, et P. E. Ross.** 1999. Effects of the agricultural pesticides atrazine, deethylatrazine, endosulfan, and chlorpyrifos on an estuarine microbial food web. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2824-2835.
- DeLorenzo, M. E., G. I. Scott, et P. E. Ross.** 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. Environ. Toxicol. Chem. 20: 84-98.
- Denner, E. B. M., D. Vybiral, M. Koblizek, P. Kampfer, H.-J. Busse, et B. Velimirov.** 2002. *Erythrobacter citreus* sp. nov., a yellow-pigmented bacterium that lacks bacteriochlorophyll *a*, isolated from the western Mediterranean Sea. Int. J. Syst. Evol. Micr. 52: 1655-1661.
- Devereux, R., S. H. He, C. L. Doyle, S. Orkland, D. A. Stahl, J. LeGall, et W. B. Whitman.** 1990. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. J. Bact. 172: 3609-3619.
- Dietz, A. S., L. J. Albright, et T. Tuominen.** 1976. Heterotrophic activities of bacterioneuston and bacterioplankton. Can. J. Microbiol. 22: 1699-1709.
- Dillon, Y., J. H. Fuerst, A. C. Hayward, et G. H. G. Davis.** 1986. A comparison of five methods for assaying bacterial hydrophobicity. J. Microbiol. Meth. 6: 13-19.
- Donderski, W., M. Walczak, Z. Mudryk, et P. Skorzewski.** 1999. The influence of heavy metal ions on neustonic bacteria. Baltic Coast. Zone 3: 53-64.
- Doyle, R. J., et M. Rosenberg.** 1990. Microbial Cell Surface Hydrophobicity. American Society for Microbiology.
- Duce, R. A., J. G. Quinn, C. E. Olney, S. R. Piotrowicz, B. J. Ray, et T. L. Wade.** 1972. Enrichment of heavy metals and organic compounds in the surface microlayer of Narragansett Bay, Rhode Island. Sciences 176: 161-163.
- Dumestre, J. F., E. O. Casamayor, R. Massana, et C. Pedros-Alio.** 2002. Changes in bacterial and archaeal assemblages in an equatorial river induced by the water eutrophication of Petit Saut dam reservoir (French Guiana). Aquat. Microb. Ecol. 26: 209-221.

- Dunlap, W. C., K. Masaki, R. M. Yamamoto, R. M. Larsen, et I. Karube.** 1998. A novel antioxidant derived from seaweed, p. 33-35. In Y. L. G. a. H. O. Halvorson [ed.], New developments in marine biotechnology. Plenum Press.
- Dunlap, W. C., et J. M. Shick.** 1998. Ultraviolet radiation-absorbing Mycosporine-like Amino Acids in coral reef organisms: a biochemical and environmental perspective. *J. Phycol.* 34: 418-430.
- Dupuy, C., S. Le Gall, H. J. Hartmann, et M. Bréret.** 1999. Retention of ciliates and flagellates by the oysters *Crassostrea gigas* in French Atlantic coastal pond: protists as a trophic link between bacterioplankton and benthic suspension-feeders. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 177: 165-175.
- Eguchi, M., T. Nishikawa, K. MacDonald, R. Cavicchioli, J. C. Gottschal, et S. Kjelleberg.** 1996. Responses to stress and nutrient availability by the marine ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1287-1294.
- Ehling-Schulz, M., et S. Scherer.** 1999. UV protection in cyanobacteria. *Eur. J. Phycol.* 34: 329-338.
- Eilers, H., J. Pernthaler, F. O. Glöckner, et R. Amann.** 2000. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the north sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3044-3051.
- Eilers, H., J. Pernthaler, J. Peplies, F. O. Glöckner, G. Gerds, et R. Amann.** 2001. Isolation of Novel Pelagic Bacteria from the German Bight and Their Seasonal Contributions to Surface Picoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5134-5142.
- Eker, A. P. M., L. Formenoy, et L. E. A. de Wit.** 1991. Photoreactivation in the extreme halophilic archaeobacterium *Halobacterium cutirubrum*. *Photochem. Photobiol.* 53: 643-651.
- Elasri, M., et R. V. Miller.** 1999. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2025-2031.
- Enger, O., et B. K. Thorsen.** 1992. Possible ecological implications of the high cell surface hydrophobicity of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Can. J. Microbiol.* 38: 1048-1052.
- Estep, K. W., J. S. Maki, S. C. Danos, et C. C. Remsen.** 1985. The retrieval of material from the surface microlayer with screen and plate samplers and its implications for partitioning of material within the microlayer. *Freshwater Biol.* 15: 15-19.
- Falkowska, L.** 1999a. Sea surface microlayer: a field evaluation of teflon plate, glass plate and screen sampling techniques.  
Part 1. Thickness of microlayer samples and relation to wind speed. *Oceanologia* 41: 211-221.
- Falkowska, L.** 1999b. Sea surface microlayer: a field evaluation of teflon plate, glass plate and screen sampling techniques.  
Part 2. Dissolved and suspended matter. *Oceanologia* 41: 223-240.
- Falkowska, L., et A. Latala.** 1995. Short-term variations in the concentrations of suspended particles, chlorophyll a and nutrients in the surface seawater layers of the Gdansk Deep. *Oceanologia* 37: 249-284.
- Fehon, W. C., et J. D. Oliver.** 1977. Degradation of crude oil by mixed populations of bacteria from the surface microlayer in an estuarine system. *J. Elisha Mitchell Soc.* 93: 72-73.
- Fehon, W. C., et J. D. Oliver.** 1979. Taxonomy and distribution of surface microlayer bacteria from two estuarine sites. *Estuaries* 2: 194-197.
- Felsenstein, J.** 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17: 368-376.

- Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap. *Evolution* 30: 783-791.
- Fernandez-Martinez, J., M. J. Pujalte, J. Garcia-Martinez, M. Mata, E. Garay, et F. Rodriguez-Valera.** 2003. Description of *Alcanivorax venustensis* sp. nov. and reclassification of *Fundibacter jadensis* DSM12178 (Bruns and Berthe-Corti 1999) as *Alcanivorax jadensis* comb. nov., members of the emended genus *Alcanivorax*. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 53: 331-338.
- Flemming, H. C.** 1993. Biofilms and environmental protection. *Wat. Sci. Tech.* 27: 1-10.
- Fuhrman, J. A., et F. Azam.** 1982. Thymidine incorporation as a mesure of heterotrophic bacterioplankton production in a marine surface waters. Evaluation and field results. *Mar. Biol.* 66: 109-120.
- Galtier, N., M. Gouy, et C. Gautier.** 1996. SEAVIEW and PHYLO-WIN : two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *CABIOS* 12: 543-548.
- Garcia-Flor, N., C. Guitart, L. Bodineau, J. Dachs, J. M. Bayona, et J. Albaiges.** Comparison of sampling devices for the determination of polychlorinated biphenyls in the sea surface microlayer. *Soumis.*
- Garcia-Pichel, F.** 1994. A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnol. Oceanogr.* 39: 1704-1717.
- Garcia-Pichel, F., et R. W. Castenholz.** 1993. Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 163-169.
- Garrett, W. D.** 1965. Collection of slick-forming materials from the sea surface. *Limnol. Oceanogr.* 10: 602-605.
- Garrett, W. D.** 1967. The organic chemical composition of the ocean surface. *Deep-Sea Res.* 14: 221-227.
- Garrett, W. D.** 1974. Comments on "Laboratory comparisons of four microlayer samplers" (R. F. Hatcher and B. C. Parker). *Limnol. Oceanogr.* 19: 166-167.
- Gascon, J., A. Oubina, A. Pérez-Lezaum, et J. Urmeneta.** 1995. Sensitivity of selected bacterial species to UV radiation. *Curr. Microbiol.* 30: 177-182.
- Gauthier, M. J.** 1977. *Alteromonas citrea*, a new gram-negative, yellow-pigmented species from seawater. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27: 349-354.
- Gearing, P. J., et J. N. Gearing.** 1982. Transport of no. 2 fuel oil between water column, surface microlayer and atmosphere in controlled ecosystems. *Mar. Environ. Res.* 6: 133-143.
- Gibbons, R. J., et I. Etherden.** 1983. Comparatives hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles. *Infect. Immun.* 41: 1190-1196.
- Glöckner, F. O., H. D. Babenzien, et R. Amann.** 1998. Phylogeny and identification in situ of *Nevskia ramosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1895-1901.
- Godoy, F., M. Vancanneyt, M. Martinez, A. Steinbüchel, J. Swings, et B. H. A. Rehm.** 2003. *Sphingopyxis chilensis* sp. nov., a chlorophenol-degrading bacterium that accumulates polyhydroxyalkanoate, and transfer of *Sphingomonas alaskensis* to *Sphingopyxis alaskensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 473-477.
- Goering, J. J., et D. W. Menzel.** 1965. The nutrient chemistry of the sea surface. *Deep-Sea Res.* 12: 839-843.
- Goutx, M., S. Mutaftshiev, et J. C. Bertrand.** 1987. Lipid and exopolysaccharide production during hydrocarbon growth of a marine bacterium from the sea surface. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 40: 259-265.

- Grémare, A., J. M. Amouroux, G. Cauwet, F. Charles, C. Courties, F. De Bovée, A. Dinet, J. L. Devenon, X. Durrieu DeMadron, B. Ferre, P. Fraunie, F. Joux, F. Lantoine, P. Lebaron, J. J. Naudin, A. Palanques, M. Pujo-Pay, et L. Zudaire.** 2003. The effects of a strong winter storm on physical and biological variables at a shelf site in the Mediterranean. *Oceanol. Acta* 26: 407-419.
- Gremion, F., A. Chatzinotas, et H. Harms.** 2003. Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that *Actinobacteria* might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. *Environ. Microbiol.* 5: 896-907.
- Guerin, W. F.** 1989. Phenanthrene degradation by estuarine surface microlayer and bulk water microbial populations. *Microb. Ecol.* 17: 89-104.
- Guitart, C., N. Garcia-Flor, J. Dachs, J. M. Bayona, et J. Albaiges.** 2004. Evaluation of sampling devices for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface microlayer coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 48: 961-968.
- Haas, L. W.** 1982. Improved fluorescence microscopy for observing planktonic microorganisms. *Ann. Inst. Oceanogr.* 58: 261-268.
- Hader, D. P.** 2000. Effects of solar UV-B radiation on aquatic ecosystems. *Adv. Space Res.* 12: 2029-2040.
- Hader, D. P., M. Lebert, R. Marangoni, et G. Colombetti.** 1999. ELDONET - European Light Dosimeter Network hardware and software. *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 52: 51-58.
- Hägstrom, R., J. Pinhassi, et U. L. Zweifel.** 2000. Biogeographical diversity among marine bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 21: 231-244.
- Hamilton, E. I., et R. J. Clifton.** 1979. Techniques for sampling the air-water interface for estuarine and coastal waters. *Limnol. Oceanogr.* 24: 188-193.
- Hansell, D. A., et C. A. Carlson.** 2002. Biogeochemistry of marine dissolved organic matter. Academic Press.
- Hardy, J., S. Kiesser, L. Antrim, A. Stubin, R. Kocan, et J. Strand.** 1987a. The sea-surface microlayer of Puget Sound: Part I. Toxic effects on fish eggs and larvae. *Mar. Environ. Res.* 23: 227-249.
- Hardy, J. T.** 1973. Phytoneuston ecology of a temperate marine lagoon. *Limnol. Oceanogr.* 18: 525-533.
- Hardy, J. T.** 1982. The sea surface microlayer: biology, chemistry and anthropogenic enrichment. *Prog. Oceanogr.* 11: 307-328.
- Hardy, J. T.** 1997. Biological effects of chemicals in the sea-surface microlayer, p. 339-370. *In* P. S. L. a. R. A. Duce [ed.], *The sea surface and global change*. Cambridge University Press.
- Hardy, J. T., et C. W. Apts.** 1984. The sea-surface microlayer: phytoneuston productivity and effects of atmospheric particulate matter. *Mar. Biol.* 82: 293-300.
- Hardy, J. T., J. A. Coley, L. D. Antrim, et S. L. Kiesser.** 1988. A hydrophobic large-volume sampler for collecting aquatic surface microlayers: characterization and comparison with glass plate method. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 822-826.
- Hardy, J. T., E. A. Crecelius, L. D. Antrim, V. L. Broadhurst, C. W. Apts, J. M. Gurtisen, et T. J. Fortman.** 1987b. The sea-surface microlayer of Puget Sound: Part II. Concentrations of contaminants and relation to toxicity. *Mar. Environ. Res.* 23: 251-271.
- Hardy, J. T., et J. Q. Word.** 1986. Sea surface toxicity in Puget Sound. *Puget Sound Notes*. Seattle, Washington. U. S. EPA Region 10. 11: 3-6.
- Harker, M., J. Hirschberg, et A. Oren.** 1998. *Paracoccus marcusii* sp. nov., an orange gram-negative coccus. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 543-548.



- Harm, W.** 1968. Dark repair of photorepairable UV lesions in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 6: 25-35.
- Hartwig, A.** 1998. Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. *Toxicol. Lett.* 102-103: 235-239.
- Harvey, G. W.** 1966. Microlayer collection from the sea surface: a new method and initial results. *Limnol. Oceanogr.* 11: 608-614.
- Harvey, G. W.** 1973. Marine microbial ecology of the sea surface microlayer and nearshore waters, *In* B. Morton [ed.], Special symposium on marine science (The Pacific Science Association). J. R. Lee.
- Harvey, G. W., et L. A. Burzell.** 1972. A simple microlayer method for small samples. *Limnol. Oceanogr.* 17: 156-157.
- Harvey, R. W., et L. Y. Young.** 1980a. Enrichment and association of bacteria and particulates in salt marsh surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 894-899.
- Harvey, R. W., et L. Y. Young.** 1980b. Enumeration of particle-bound and unattached respiring bacteria in the salt marsh environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 156-160.
- Hatcher, R. F., et B. C. Parker.** 1974a. Laboratory comparisons of four surface microlayer samplers. *Limnol. Oceanogr.* 19: 162-165.
- Hatcher, R. F., et B. C. Parker.** 1974b. Microbiological and chemical enrichment of freshwater-surface microlayers relative to the bulk-subsurface water. *Can. J. Microbiol.* 20: 1051-1057.
- Helbling, E. W., E. R. Marguet, V. E. Villafane, et O. Holm-Hansen.** 1995. Bacterioplankton viability in Antarctic waters as affected by solar radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 126: 293-298.
- Henk, M. C.** 2004. Method for Collecting Air-Water Interface Microbes Suitable for Subsequent Microscopy and Molecular Analysis in both Research and Teaching Laboratories. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2486-2493.
- Hermansson, M.** 1990. The dynamics of dissolved and particulate organic material in surface microlayers. *In* R. S. Wotton [ed.], *The Biology of Particles in Aquatic Systems*. CRC Press.
- Hermansson, M., et B. Dahlbäck.** 1983. Bacterial activity at the air/water interface. *Microb. Ecol.* 9: 317-328.
- Hermansson, M., G. W. Jones, et S. Kjelleberg.** 1987. Frequency of antibiotic and heavy metal resistance, pigmentation, and plasmids in bacteria of the marine air-water interface. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2338-2342.
- Hermansson, M., S. Kjelleberg, T. K. Korhonen, et T. A. Stenström.** 1982. Hydrophobic and electrostatic characterization of surface structures of bacteria and its relationship to adhesion to an air-water interface. *Arch. Microbiol.* 131: 308-312.
- Hermansson, M., S. Kjelleberg, et B. Norkrans.** 1979. Interaction of pigmented wild type and pigmentless mutant of *Serratia marcescens* with a lipid surface film. *FEMS Microbiol. Lett.* 6.
- Herndl, G. J., G. Müller-Niklas, et J. Frick.** 1993. Major role of ultraviolet-B in controlling bacterioplankton growth in the surface layer of the ocean. *Nature* 361: 717-719.
- Hiraishi, A., Y. Yonemitsu, M. Matsushita, Y. K. Shin, H. Kuraishi, et K. Kawahara.** 2002. Characterization of *Porphyrobacter sanguineus* sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-containing bacterium capable of degrading biphenyl and dibenzofuran. *Arch. Microbiol.* 178: 45-52.
- Hughenoltz, P., B. M. Goebel, et N. R. Pace.** 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180: 4765-4774.

- Hühnerfuss, H.** 1981a. On the problem of sea surface film sampling: a comparison of 21 microlayer-, 2 multilayer-, and 4 selected subsurface- samplers. Part 1. Sonderdruck aus Meerestechnik 12: 137-142.
- Hühnerfuss, H.** 1981b. On the problem of sea surface film sampling: a comparison of 21 microlayer-, 2 multilayer-, and 4 selected subsurface- samplers. Part 2. Sonderdruck aus Meerestechnik 12: 170-173.
- Hunter, K. A.** 1980. Processes affecting particulate trace metals in the sea surface microlayer. Mar. Chem. 9: 49-70.
- Ivanova, E. P., L. A. Romanenko, M. H. Matté, G. R. Matté, A. M. Lysenko, U. Simidu, K. Kita-Tsukamoto, T. Sawabe, M. V. Vysotskii, G. M. Frolova, V. Mikhailov, R. Christen, et R. Colwell.** 2001. Retrieval of the species *Alteromonas tetraodoni* Simidu et al. 1990 as *Pseudoalteromonas tetraodonis* comb. nov. and emendation of description. Int. J. Syst. Evol. Micr. 51: 1071-1078.
- Jagger, J.** 1967. Introduction to research in ultraviolet photobiology. Prentice Hall, Inc.
- Jarvis, N. L., W. D. Garrett, M. A. Scheiman, et C. O. Timmons.** 1967. Surface chemical characterization of surface-active material in seawater. Limnol. Oceanogr. 12: 88-96.
- Jeffrey, W. H., P. Aas, M. M. Lyons, R. B. Coffin, R. J. Pledger, et D. L. Mitchell.** 1996a. Ambient solar radiation-induced photodamage in marine bacterioplankton. Photochem. Photobiol. 64: 419-427.
- Jeffrey, W. H., R. Pledger, P. Aas, S. Hager, R. B. Coffin, R. von Haven, et D. L. Mitchell.** 1996b. Diel and depth profiles of DNA photodamage in bacterioplankton exposed to ambient solar radiation. Mar. Ecol. Prog. Ser. 137: 283-291.
- Jokiel, P. L., et R. H. J. York.** 1984. Importance of ultraviolet radiation in photoinhibition of microalgal growth. Limnol. Oceanogr. 29: 192-199.
- Jones, G. W., L. Baines, et F. J. Genthner.** 1991. Heterotrophic bacteria of the freshwater neuston and their ability to act as plasmid recipients under nutrient deprived conditions. Microb. Ecol. 22: 15-25.
- Joux, F., H. Agogué, I. Obernosterer, C. Dupuy, T. Rheinthal, G. J. Herndl, et P. Lebaron.** *In preparation.* Microbial food webs in sea surface microlayer.
- Joux, F., W. H. Jeffrey, P. Lebaron, et D. L. Mitchell.** 1999. Marine bacterial isolates display diverse responses to UV-B radiation. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3820-3827.
- Kaiser, E., et G. J. Herndl.** 1997. Rapid recovery of marine bacterioplankton activity after inhibition by UV radiation in coastal waters. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4026-4032.
- Kaltenbach, J. L.** 1984. The view from the Shuttle-Orbiter: observing the oceans from manned space flights. Pro. Int. Soc. Opt. Engng. (SPIE), 489, Ocean Optics VIII: 203-207.
- Kampfer, P., R. Erhart, C. Beimfohr, J. Bohringer, M. Wagner, et R. Amann.** 1996. Characterization of bacterial communities from activated sludge: culture-dependant numerical identification versus in situ identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. Microb. Ecol. 32: 101-121.
- Karentz, D., M. L. Bothwell, R. B. Coffin, A. Hanson, G. J. Herndl, S. S. Kilham, M. P. Lesser, M. Lindell, R. E. Moeller, D. P. Morris, P. J. Neale, R. W. Sanders, C. S. Weiler, et R. G. Wetzel.** 1994. Impact of UV-B radiation on pelagic freshwater ecosystems: Report of working group on bacteria and phytoplankton. Arch. Hydrobiol. Beih 43: 31-69.
- Karentz, D., F. S. McEuen, M. C. Land, et W. C. Dunlap.** 1991. Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. Mar. Biol. 108: 157-166.

- Kashner, M., M. Breuerjammali, et B. Mahro.** 1994. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic-hydrocarbons (PAH). *Appl. Environ. Biotechnol.* 41: 267-273.
- Kellogg, C. A., et J. H. Paul.** 2002. Degree of ultraviolet radiation damage and repair capabilities are related to G+C content in marine vibriophages. *Aquat. Microb. Ecol.* 27: 13-20.
- Kidambi, S. P., M. G. Booth, T. A. Kokjohn, et R. V. Miller.** 1996. recA-dependence of the response of *Pseudomonas aeruginosa* to UVA and UVB irradiation. *Microbiology* 142: 1033-1040.
- Kim, S. J.** 1985. Effect of heavy metals on natural populations of bacteria from surface microlayers and subsurface water. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 26: 203-206.
- Kirchman, D. L.** 2002. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microb. Ecol.* 39: 91-100.
- Kjelleberg, S., et N. Hakansson.** 1977. Distribution of lipolytic, proteolytic, and amylolytic marine bacteria between the lipid film and the subsurface water. *Mar. Biol.* 39: 103-109.
- Kjelleberg, S., et M. Hermansson.** 1984. Starvation-induced effects on bacterial surface characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 497-503.
- Kjelleberg, S., B. Norkrans, H. Löfgren, et K. Larsson.** 1976. Surface balance study of the intercation between microorganisms and lipid monolayer at the Air/Water interface. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 609-611.
- Kjelleberg, S., et T. A. Stenström.** 1980. Lipid surface films: interaction of bacteria with free fatty acids and phospholipids at the air/water interface. *J. Gen. Microbiol.* 116: 417-423.
- Kjelleberg, S., T. A. Stenström, et G. Odham.** 1979. Comparative study of different hydrophobic devices for sampling lipid surface films and adherent microorganisms. *Mar. Chem.* 53: 21-25.
- Knulst, J., et A. Södergren.** 1994. Occurrence and toxicity of persistent pollutants in surface microlayers near an incineration plant. *Chemosphere* 29: 1339-1347.
- Koch, C., P. Schumann, et E. Stackebrandt.** 1995. Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali-Cohen 1889) to the genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. nov. and emendation of the genus *Arthrobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 837-839.
- Kotouckova, L., P. Schumann, E. Durnova, C. Sproer, I. Sedlacek, J. Neca, Z. Zdrahal, et M. Nemeč.** 2004. *Arthrobacter nitroguajacolicus* sp. nov., a novel 4-nitroguaiacol-degrading actinobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 54: 773-777.
- Krieg, N. R., et J. G. Holt.** 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* The Williams & Wilkins Co.
- Larsson, K., G. Odham, et A. Sodergren.** 1974. On lipid surface films on the sea. I. A simple method for sampling and studies of composition. *Mar. Chem.* 2: 49-57.
- Lebaron, P., N. Parthuisot, et P. Catala.** 1998. Comparison of blue nucleic acid dyes for flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1725-1730.
- Lebaron, P., P. Servais, A. C. Baudoux, M. Bourrain, C. Courties, et N. Parthuisot.** 2002. Variations of bacterial-specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry. *Aquat. Microb. Ecol.* 28: 131-140.
- Ledet, E. J., et J. L. Laseter.** 1974. A comparison of two sampling devices for the recovery of organics from aqueous surface films. *Anal. Lett.* 7: 553-562.
- Legendre, L., C. Courties, et M. Trousselier.** 2001. Flow cytometry in oceanography 1989-1999 : environmental challenges and research trends. *Cytometry* 44: 164-172.

- Li, J., H. Ding, Z. Wu, Z. Zhang, et L. Liu.** 1998. Determination of apparent sampling thickness of sea surface microlayer. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 16: 177-182.
- Lichtenberg, D., M. Rosenberg, N. Sharfman, et I. Ofek.** 1985. A kinetic approach to bacterial adherence to hydrocarbon. *J. Microbiol. Meth.* 4: 141-146.
- Liltved, H., et B. Landfald.** 1996. Influence of liquid holding recovery and photoreactivation on survival of ultraviolet-irradiated fish pathogenic bacteria. *Wat. Res.* 30: 1109-1114.
- Lion, L. W., R. W. Harvey, L. Y. Young, et J. O. Leckie.** 1979. Particulate matter. Its association with microorganisms and trace metals in an estuarine salt marsh microlayer. *Environ. Sci. Technol.* 13: 1522-1525.
- Liss, P. S.** 1975. Chemistry of the sea surface microlayer, p. 193-243. *In* J. P. R. G. Skirrow [ed.], *Chemical Oceanography*. Academic Press.
- Liss, P. S., et R. A. Duce.** 1997. *The sea surface and global change*. Cambridge University Press.
- Liu, K., et R. Dickhut.** 1998. Effects of wind speed and particulate matter source on surface microlayer characteristics and enrichment of organic matter in southern Chesapeake Bay. *J. Geophys. Res.* 103: 10571-10577.
- Lyons, M. M., P. Aas, J. D. Pakulski, L. G. van Waasbergen, D. L. Mitchell, R. V. Miller, et W. H. Jeffrey.** 1998. Ultraviolet radiation induced DNA damage in coral reef microbial communities. *Mar. Biol.* 130: 537-543.
- Lyons, W. B., M. J. S. Pybus, et J. Coyne.** 1980. The seasonal variations in the nutrient chemistry of the surface microlayer of Galway Bay, Ireland. *Oceanol. Acta* 3: 151-155.
- MacIntyre, F.** 1968. Bubbles: a boundary-layer "microtome" for micron-thick samples of a liquid surface. *J. Phys. Chem.* 72: 589-592.
- MacIntyre, F.** 1974. The top millimeter of the ocean. *Sci. Am.* 230: 62-77.
- Maki, J. S.** 1993. The air-water interface as an extreme environment. *In* T. E. Ford [ed.], *Aquatic microbiology: an ecological approach*. Blackwell Scientific publications.
- Maki, J. S.** 2002. Neuston microbiology: life at the air-water interface, p. 2133-2144. *In* G. Bitton [ed.], *The Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons.
- Maki, J. S., et R. P. Herwig.** 1991. A diel study of neuston and plankton bacteria in an Antarctic pond. *Antarct. Sci.* 3: 47-51.
- Mancuso Nichols, C. A., S. Garon, J. P. Bowman, G. Raguenes, et J. Guezennec.** 2004. Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. *J. Appl. Microbiol.* 96: 1057-1066.
- Margalith, P. Z.** 1992. Pigment microbiology. *In* Hall [ed.].
- Marie, D., F. Partensky, S. Jacquet, et D. Vaultot.** 1997. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 188-193.
- Marie, D., N. Simon, L. Guillou, F. Partensky, et D. Vaultot.** 2000. Flow cytometry analysis of marine picoplankton, p. 421-454. R. A. Diamond et S. DeMaggio eds., *In Living Color : Protocols in Flow Cytometry and Cell Sorting*. Springer Verlag.
- Marshall, K. C.** 1976. Interfaces in microbial ecology.
- Marshall, K. C., et R. H. Cruickshank.** 1973. Cell surface hydrophobicity and the orientation of certain bacteria at interfaces. *Arch. Mikrobiol.* 91: 29-40.
- Marshall, K. C., R. Stout, et R. Mitchell.** 1971. Selective sorption of bacteria from seawater. *Can. J. Microbiol.* 17: 1413-1416.
- Marumo, R., N. Taga, et T. Nakai.** 1971. Neustonic bacteria and phytoplankton in surface microlayers of the Equatorial waters. *Bull. Plankton Soc. Japan* 18: 36-41.

- Mathews, M. M., et W. R. Sistrom.** 1959. Function of carotenoid pigments in non-photosynthetic bacteria. *Nature* 184: 1892-1893.
- Matsuo, Y., T. Nemoto, et R. Marumo.** 1976. A convertible neuston net for zooplankton. *Bull. Plankton Soc. Japan* 23: 26-30.
- Matsuyama, H., K. Kawasaki, I. Yumoto, et O. Shida.** 1999. *Microbacterium kitamiense* sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from the wastewater of a sugar-beet factory. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1353-1357.
- Médernach, L., A. Grémare, J. M. Amouroux, J. C. Colomines, et G. Vétion.** 2001. Temporal changes in the amino acid contents of particulate organic matter sedimenting in the Bay of Banyuls-sur-Mer (northwestern Mediterranean). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 214: 55-65.
- Miget, R., H. Kator, C. Oppenheimer, J. L. Laseter, et E. J. Ledet.** 1974. New sampling device for recovery of petroleum hydrocarbons and fatty acids from aqueous surface films. *Anal. Chem.* 46: 1154-1157.
- Miki, W.** 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 63: 141-146.
- Miki, W., N. Otaki, N. Shimidzu, et A. Yokoyama.** 1994. Carotenoids as free radical scavengers in marine animals. *J. Mar. Biotechnol.* 2: 35-37.
- Miller, R. V., W. H. Jeffrey, D. L. Mitchell, et M. Elasri.** 1999. Bacterial responses to ultraviolet light. *ASM News* 65: 535-541.
- Monzikoff, A., A. Brinis, S. Dallot, G. Gondry, A. Saliot, et P. Lebaron.** 2004. Field study of the chemical characterization of the top ocean surface using various samplers. *Limnol. Oceanogr. : Methods In Press.*
- Morris, R. J.** 1974. Lipid composition of surface films and zooplankton from the Eastern Mediterranean. *Mar. Pollut. Bull.* 5: 105-109.
- Moyer, C. L., J. M. Tiedje, F. C. Dobbs, et D. M. Karl.** 1996. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2501-2507.
- Mudryk, Z., W. Donderski, P. Skorczewski, et M. Walczak.** 2000. Effect of some heavy metals on neustonic and planktonic bacteria isolated from the deep of Gdansk. *Oceanol. Studies* 29: 89-99.
- Mudryk, Z., K. Korzeniewski, et L. Falkowska.** 1991. Bacteriological investigation of the surface microlayer of the Gulf of Gdansk. *Oceanologia* 30: 93-103.
- Naumann, E.** 1917. Über das Neuston des Süßwassers. *Biol. Centralblatt* 37: 98-106.
- Nedashkovskaya, O. I., S. B. Kim, S. K. Han, A. M. Lysenko, M. Rodhe, M. S. Rhee, G. M. Frolova, E. Falsen, V. V. Mikhailov, et K. S. Bae.** 2004. *Maribacter* gen. nov., a new member of the family *Flavobacteriaceae*, isolated from marine habitats, containing the species *Maribacter sedimenticola* sp. nov., *Maribacter aquivivus* sp. nov., *Maribacter orientalis* sp. nov. and *Maribacter ulvicola* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 54: 1017-1023.
- Neu, T. R., et K. Poralla.** 1988. An amphiphilic polysaccharide from an adhesive *Rhodococcus* strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 49: 389-392.
- Neveux, J., et F. Lantoiné.** 1993. Spectrofluorometric assay of chlorophylls and phaeopigments using the least squares approximation technique. *Deep-Sea Res.* 40: 1747-1764.
- Nielsen, P., D. Fritze, et F. G. Priest.** 1995. Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. *Microbiology* 141: 1745-1761.
- Nies, D. H.** 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 730-750.

- Nishizawa, S.** 1971. Concentration of organic and inorganic material in the surface skin at the Equator, 155°W. *Bull. Plankton Soc. Japan* 18: 42-44.
- Noble, R. T., et J. A. Fuhrman.** 1998. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.* 14: 113-118.
- Norkrans, B.** 1980. Surface microlayers in aquatic environments, p. 51-83. *In* M. Alexander [ed.], *Advances in Microbial Ecology*. Plenum Press, New York and London.
- Norkrans, B., et F. Sörensson.** 1977. On the marine lipid surface microlayer - bacterial accumulation in models systems. *Bot. Mar.* 20: 473-478.
- Obernosterer, I., P. Catala, T. Rheinthal, G. J. Herndl, et P. Lebaron.** subm. Enhanced heterotrophic activity in the surface microlayer of the Mediterranean Sea.
- Olsen, G. J., H. Matsuda, R. Hagstrom, et R. Overberck.** 1994. fastDNAMl : a tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maximum likelihood. *CABIOS* 10: 41-48.
- Olsson, J., et G. Westergren.** 1982. Hydrophobic surface properties of oral streptococci. *FEMS Microbiol Ecol* 15: 319-323.
- Ophir, T., et D. L. Gutnick.** 1994. A role for polysaccharides in the protection of microorganisms from dessication. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 740-745.
- Pace, N. R., D. A. Stahl, D. J. Lane, et G. J. Olsen.** 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.* 9: 1-55.
- Paddies, T., H. D. Babenzien, et H. Cypionka.** 2004. Distribution of *Nevskia ramosa* and other rosette-forming neustonic bacteria. *Microb. Ecol.* 47: 218-223.
- Pakulski, J. D., P. Aas, W. H. Jeffrey, M. M. Lyons, L. G. van Waasbergen, D. L. Mitchell, et R. B. Coffin.** 1998. Influence of light on bacterioplankton production and respiration in a subtropical coral reef. *Aquat. Microb. Ecol.* 14: 137-148.
- Pasmore, M., P. Todd, S. Smith, D. Baker, J. Silverstein, D. Coons, et C. N. Bowman.** 2001. Effects of ultrafiltration membrane surface properties on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm initiation for the purpose of reducing biofouling. *J. Membrane Sci.* 194: 15-32.
- Passman, F. J., T. J. Novitsky, et S. W. Watson.** 1979. Surface microlayers of the North Atlantic: microbial populations, heterotrophic and hydrocarbonoclastic activities, *In* A. W. Bourquin, P. H. Pritchard [ed.], *Microbial degradation of pollutants in marine environments EPA-600/9-79-012*.
- Pembrey, R. S., K. C. Marshall, et R. P. Schneider.** 1999. Cell surface analysis techniques: what do cell preparation protocols do to cell surface properties? *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2877-2894.
- Perrière, G., et M. Gouy.** 1996. WWW-Query : an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 78: 364-369.
- Pinhassi, J., U. Zweifel, et A. Hagstrom.** 1997. Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3359-3366.
- Raguenes, G. H., A. Peres, R. Ruimy, P. Pignet, R. Christen, M. Loaec, H. Rougeaux, G. Barbier, et J. G. Guezennec.** 1997. *Alteromonas infernus* sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *J. Appl. Microbiol.* 82: 422-430.
- Rainey, F. A., S. Klatte, R. M. Kroppenstedt, et E. Stackebrandt.** 1995. *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 32-36.
- Rajendran, R., N. Rajendran, et V. K. Venugopalan.** 1990. Effect of organochlorine pesticides on the bacterial population of a tropical estuary. *Microbios Lett.* 44: 57-63.

- Rambeloarisoa, E., J. F. Rontani, G. Giusti, Z. Duvnjak, et J. C. Bertrand.** 1984. Degradation of crude oil by a mixed population of bacteria isolated from sea-surface foams. *Mar. Biol.* 83: 69-81.
- Reid, G. A., et E. H. J. Gordon.** 1999. Phylogeny of marine and freshwater *Shewanella*: reclassification of *Shewanella putrefaciens* NCIMB 400 as *Shewanella frigidimarina*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 189-191.
- Romanenko, L. A., N. V. Zhukova, A. M. Lysenko, V. V. Mikhailov, et E. Stackebrandt.** 2003a. Assignment of *Alteromonas marinoglutinosa* NCIMB 1770 to *Pseudoalteromonas marinoglutinosa* sp. nov., nom. rev., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1105-1109.
- Romanenko, L. A., N. V. Zhukova, M. Rodhe, A. M. Lysenko, V. Mikhailov, et E. Stackebrandt.** 2003b. *Pseudoalteromonas agarivorans* sp. nov., a novel marine agarolytic bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 125-131.
- Romano, I., A. Giordano, L. Lama, B. Nicolaus, et A. Gambacorta.** 2003. *Planococcus rifiensis* sp. nov, isolated from algal mat collected from a sulfurous spring in Campania (Italy). *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 357-366.
- Romano, J. C.** 1989. Les populations bactériennes à l'interface air-mer, p. 153-176. In Masson [ed.], *Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques*.
- Romano, J. C.** 1996. Sea-surface slick occurrence in the open sea (Mediterranean, Red Sea, Indian Ocean) in relation to wind speed. *Deep-Sea Res.* I 43: 411-423.
- Romano, J. C., et F. Garabetian.** 1996. Photographic records of sea-surface microlayers as a survey of pollution daily rhythm in coastal waters. *Mar. Environ. Res.* 41: 265-279.
- Romano, J. C., et P. Laborde.** 1987. Hétérogénéité spatiale à petite échelle des structures d'accumulation du matériel particulaire à l'interface air-mer. *Oceanol. Acta* 10: 63-71.
- Rosenberg, M.** 1984. Bacteria adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. *FEMS Microb. Lett.* 22: 289-295.
- Rosenberg, M.** 1991. Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon:water interface. *Crit. Rev. Microbiol.* 18: 159-173.
- Rosenberg, M., D. Gutnick, et E. Rosenberg.** 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9: 29-33.
- Ruger, H. J., et M. G. Hofle.** 1992. Marine star-shaped-aggregate-forming bacteria: *Agrobacterium atlanticum* sp. nov.; *Agrobacterium meteori* sp. nov.; *Agrobacterium ferrugineum* sp. nov., nom. rev.; *Agrobacterium gelatinovorum* sp. nov., nom. rev.; and *Agrobacterium stellulatum* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 133-143.
- Ruiz-Ponte, C., V. Cilia, C. Lambert, et J. L. Nicolas.** 1998. *Roseobacter gallaeciensis* sp. nov., a new marine bacterium isolated from rearings and collectors of the scallop *Pecten maximus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 537-542.
- Saitou, N., et M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sawabe, T., R. Tanaka, M. M. Iqbal, K. Tajima, Y. Ezura, E. P. Ivanova, et R. Christen.** 2000. Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM 162T and five strains isolated from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov. and the extended description of the species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 265-271.
- Schäfer, A., H. Harms, et A. J. B. Zehnder.** 1998. Bacterial accumulation at the Air-Water Interface. *Environ. Sci. Technol.* 32: 3704-3712.
- Scherrer, B.** 1984. *Biostatistique*. G. Morin.
- Schlesinger, W. H.** 1991. *Biogeochemistry, an analysis of global change*. Academic Press Inc.

- Schmidt, T. M., E. F. DeLong, et N. R. Pace.** 1991. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bact.* 173: 4371-4378.
- Schubert, K., W. Ludwig, N. Springer, R. M. Kroppenstedt, J. P. Accolas, et F. Fiedler.** 1996. Two coryneform bacteria isolated from the surface of French Gruyere and Beaufort cheeses are new species of the genus *Brachybacterium*: *Brachybacterium alimentarium* sp. nov. and *Brachybacterium tyrofermentans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 81-87.
- Servais, P., E. O. Casamayor, C. Courties, P. Catala, N. Parthuisot, et P. Lebaron.** 2003. Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content. *Aquat. Microb. Ecol.* 33: 41-51.
- Setlow, R. B.** 1966. Cyclobutane-type pyridin dimers in polynucleotides. *Science* 153: 379-386.
- Sewell, L. M., G. Bitton, et J. S. Bays.** 1981. Evaluation of membrane adsorption-epifluorescence microscopy for the enumeration of bacteria in coastal surface films. *Microb. Ecol.* 7: 365-369.
- Sherr, E. B., D. A. Caron, et B. F. Sherr.** 1994. Staining of heterotrophic protists for visualisation via epifluorescence microscopy, p. 213-227. *In* K. P. F., E. B. Sherr et J. J. Cole [eds.], *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Shick, J. M., et W. C. Dunlap.** 2002. Mycosporine-Like Amino Acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annu. Rev. Physiol.* 64: 223-262.
- Siccardi, A. G.** 1969. Effect of R factors and other plasmids on ultraviolet susceptibility and host cell reactivation property of *Escherichia coli*. *J. Bact.* 100: 337-346.
- Sieburth, J. M.** 1968. Observations on bacteria planktonic in Narragansett Bay, Rhode Island; a resume. *Bull. Misaki Mar. Biol. Inst., Kyoto University* 12: 49-64.
- Sieburth, J. M.** 1971a. Distribution and activity of oceanic bacteria. *Deep-Sea Res.* 18: 1111-1121.
- Sieburth, J. M.** 1983. Microbiological and organic-chemical processes in the surface and mixed layers, p. 121-172. *In* P. S. L. a. W. G. N. Slinn [ed.], *Air-Sea exchange of gases and particles*. D. Reidel Publishing Company.
- Sieburth, J. M. N.** 1971b. An instance of bacterial inhibition in oceanic surface water. *Mar. Biol.* 11: 98-100.
- Sieburth, J. M. N., P. J. Willis, K. M. Johnson, C. M. Burney, D. M. Lavoie, K. R. Hinga, D. A. Caron, F. W. French III, P. W. Johnson, et P. G. Davis.** 1976. Dissolved Organic Matter and heterotrophic microneuston in the surface microlayers of the North Atlantic. *Science* 194: 1415-1418.
- Siegel, S., et N. J. J. Castellan.** 1988. Non parametric statistics for the behavioral sciences.
- Silver, S.** 1998. Genes for all metals - A bacterial view of the periodic table. The 1996 Thom Award Lecture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20: 1-12.
- Silver, S., et L. T. Phung.** 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 753-789.
- Simon, M., et F. Azam.** 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51: 201-213.
- Singer, C. E., et B. N. Ames.** 1970. Sunlight ultraviolet and bacterial DNA base ratios. *Science* 170: 822-826.
- Sinha, R. P., et D. P. Häder.** 2002. Life under UV radiation in aquatic organisms. *Adv. Space Res.* 30: 1547-1556.



- Snaidr, J., R. Amann, I. Huber, W. Ludwig, et K. H. Schleifer.** 1997. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2884-2896.
- Sommaruga, R., I. Obernosterer, G. J. Herndl, et R. Psenner.** 1997. Inhibitory effect of solar radiation on thymidine and leucine incorporation by freshwater and marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4178-4184.
- Sorokin, D. Y.** 1995. *Sulfitobacter pontiacus* gen. nov., sp. nov. - a new heterotrophic bacterium from the Black Sea, specialized on sulfite oxydation. *Mikrobiologiya* 64: 354-365.
- Stackebrandt, E., et B. M. Goebel.** 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- Stackebrandt, E., F. A. Rainey, et N. L. Ward-Rainey.** 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 479-491.
- Strike, P., et D. Lodwick.** 1987. Plasmid genes affecting DNA repair and mutation. *J. Cell Sci. Suppl.* 6: 303-321.
- Sturmeyer, H., J. Overmann, H. D. Babenzien, et H. Cypionka.** 1998. Ecophysiological and phylogenetic studies of *Nevskia ramosa* in pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1890-1894.
- Suzuki, M. T., M. S. Rappé, Z. W. Haimberger, H. Winfield, N. Adair, J. Strobel, et S. J. Giovannoni.** 1997. Bacterial diversity among small-subunit rRNA genes clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 983-989.
- Taguchi, S., et K. Nakajima.** 1971. Plankton and seston in the sea surface of three inlets of Japan. *Bull. Plankton Soc. Japan* 18: 20-36.
- Tapper, M. A., et R. E. Hicks.** 1998. Temperate viruses and lysogeny in Lake Superior bacterioplankton. *Limnol. Oceanogr.* 43: 95-103.
- Thompson, J., D. Higgins, et T. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Tripathi, A. K.** 1988. The cytology and biochemistry of pesticide microbiology. *Crit. Rev. Microbiol.* 15: 223-246.
- Tsyban, A. V.** 1971. Marine bacterioneuston. *J. Oceanogr. Soc. Japan* 27: 56-66.
- Uchino, Y., A. Hirata, A. Yokota, et J. Sugiyama.** 1998. Reclassification of marine *Agrobacterium* species: Proposals of *Stappia stellula* gen. nov., comb. nov., *Stappia aggragata* sp. nov., nom. rev., *Ruegera atlantica* gen. nov., comb. nov., *Ruegera gelatinovora* comb. nov., *Ruegera algicola* comb. nov., and *Ahrensia kieliense* gen. nov., sp. nov., nom. rev. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44: 201-210.
- Urakami, T., H. Araki, H. Oyanagi, K. Suzuki, et K. Komagata.** 1990. *Paracoccus aminophilus* sp. nov. and *Paracoccus aminovorans* sp. nov., which utilize N,N-dimethylformamide. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 287-291.
- Urakawa, H., K. Kita-Tsukamoto, et K. Ohwada.** 1998. A new approach to separate the Genus *Photobacterium* from *Vibrio* with RFLP patterns by *HhaI* digestion of PCR-amplified 16S rDNA. *Curr. Microbiol.* 36: 171-174.
- Valls, M., J. M. Bayona, et J. Albaiges.** 1990. Broad spectrum analysis of ionic and non-ionic organic contaminants in urban wastewaters and coastal receiving aquatic systems. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 39: 329-348.
- Van Vleet, E. S., et P. M. Williams.** 1980. Sampling sea surface films: a laboratory evaluation of techniques and collecting materials. *Limnol. Oceanogr.* 25: 764-770.

- Vancanneyt, M., F. Schut, C. Snauwaert, J. Goris, J. Swings, et J. C. Gottschal.** 2001. *Sphingomonas alaskensis* sp. nov., a dominant bacterium from a marine oligotrophic environment. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 73-79.
- Vanhaecke, E., et J. Pijck.** 1988. Bioluminescence assay for measuring the number of bacteria adhering to the hydrocarbon phase in the BATH test. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1436-1439.
- Vera, J., R. Alvarez, E. Murano, J. C. Slebe, et O. Leon.** 1998. Identification of a marine agarolytic *Pseudoalteromonas* isolate and characterization of its extracellular agarase. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4378-4383.
- Von Westernhagen, H., M. Landolt, R. Kocan, G. Furstenberg, D. Janssen, et K. Kremling.** 1987. Toxicity of sea-surface microlayer: Effects on herring and turbot embryos. *Mar. Environ. Res.* 23: 273-290.
- Walczak, M., W. Donderski, Z. Mudryk, et P. Skorczewski.** 2001a. Aromatic hydrocarbon decomposition by neustonic bacteria - Part I. Single-ring hydrocarbon biodegradation. *Pol. J. Environ. Stud.* 9: 471-474.
- Walczak, M., W. Donderski, Z. Mudryk, et P. Skorczewski.** 2001b. Aromatic hydrocarbons decomposition by neustonic bacteria - Part II. Polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation. *Pol. J. Environ. Stud.* 10: 33-36.
- Wallace, G. T., et R. A. Duce.** 1978. Transport of particulate organic matter by bubbles in marine waters. *Limnol. Oceanogr.* 23: 1155-1167.
- Wandschneider, K.** 1979. Vertical distribution of phytoplankton during investigations of a natural surface film. *Mar. Biol.* 52: 105-111.
- Wei, H., Q. Ca, R. Rahn, X. Zhang, Y. Wang, et M. Lebwohl.** 1998. DNA structural integrity and base composition affect ultraviolet light-induced oxidative DNA damage. *Biochemistry* 37: 6485-6490.
- Welch, P. S.** 1935. *Limnology*. Mc Graw Book Co.
- Whitehead, K., et M. Vernet.** 2000. Influence of mycosporine-like amino acids (MAAs) on UV absorption by particulate and dissolved organic matter in La Jolla Bay. *Limnol. Oceanogr.* 45: 1788-1796.
- Whyte, L. G., L. Bourbonnière, et C. W. Greer.** 1997. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (*alk*) and naphthalene (*nah*) catabolic pathways. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3719-3723.
- Wieser, M., E. B. Denner, P. Kampfer, P. Schumann, B. Tindall, U. Steiner, D. Vybiral, W. Lubitz, A. M. Maszenan, B. K. Patel, R. J. Seviour, C. Radax, et H. J. Busse.** 2002. Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 629-637.
- Wilhelm, S. W., M. G. Weinbauer, C. A. Suttle, R. J. Pledger, et D. L. Mitchell.** 1998. Measurements of DNA damage and photoreactivation imply that most viruses in marine surface waters are infective. *Aquat. Microb. Ecol.* 14: 215-222.
- Williams, P. J.** 2000. Heterotrophic bacteria and the dynamics of dissolved organic material, p. 153-200. *In* D. L. Kirchman [ed.], *Microbial ecology of the oceans*. John Wiley & Sons.
- Williams, P. M.** 1967. Sea surface chemistry: organic carbon and organic and inorganic nitrogen and phosphorus in surface films and subsurface waters. *Deep-Sea Res.* 14: 791-800.
- Williams, P. M., A. F. Carlucci, S. M. Henrichs, E. S. Van Vleet, S. G. Horrigan, F. M. H. Reid, et K. J. Roberstson.** 1986. Chemical and microbiological studies of sea-surface films in the Southern Gulf of California and off the West Coast of Baja California. *Mar. Chem.* 19: 17-98.

- Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- Wolfaardt, G. M., J. R. Lawrence, J. V. Headley, R. D. Robarts, et D. E. Caldwell.** 1994. Microbial exopolymers provide a mechanism for bioaccumulation of contaminants. *Microb. Ecol.* 27: 279-291.
- Wommack, K. E., et R. R. Colwell.** 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 69-114.
- Wommack, K. E., R. T. Hill, T. A. Muller, et R. R. Colwell.** 1996. Effects of sunlight on bacteriophage viability and structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1336-1341.
- Wu, L.-C., K.-C. Chow, et K.-K. Mark.** 1983. The role of pigments in *Halobacterium cutirubrum* against UV radiation. *Microbios Lett.* 24: 85-90.
- Wurl, O., et J. P. Obbard.** 2004. A review of pollutants in the sea-surface microlayer (SML): a unique habitat for marine organisms. *Mar. Pollut. Bull.* In Press, Corrected Proof.
- Yi, H., K. S. Bae, et J. Chun.** 2004. *Aestuariibacter salexigens* gen. nov., sp. nov. and *Aestuariibacter halophilus* sp. nov., isolated from tidal flat sediment, and emended description of *Alteromonas macleodii*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 571-576.
- Yi, H., et J. Chun.** 2004. *Hongiella mannitolivorans* gen. nov., sp. nov., *Hongiella halophila* sp. nov. and *Hongiella ornithinivorans* sp. nov., isolated from tidal flat sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 157-162.
- Yokota, A., M. Takeuchi, T. Sakane, et N. Weiss.** 1993. Proposal of six new species in the genus *Aureobacterium* and transfer of *Flavobacterium estararomaticum* Omelianski to the genus *Aureobacterium* as *Aureobacterium estararomaticum* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 555-564.
- Yoon, J. H., H. Kim, I. G. Kim, K. H. Kang, et Y. H. Park.** 2003a. *Erythrobacter flavus* sp. nov., a slight halophile from the East Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1169-1174.
- Yoon, J. H., I. G. Kim, K. H. Kang, T. K. Oh, et Y. H. Park.** 2003b. *Alteromonas marina* sp. nov., isolated from sea water of the East Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1625-1630.
- Yoon, J. H., D. Y. Shin, I. G. Kim, K. H. Kang, et Y. H. Park.** 2003c. *Marinobacter litoralis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from sea water from the East Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 563-568.
- Young, L. Y.** 1978. Bacterioneuston examined with critical point drying and transmission electron microscopy. *Microb. Ecol.* 4: 267-277.
- Yurkov, V. V., E. Stackebrandt, A. Holmes, J. A. Fuerst, P. Hugenholtz, J. Golecki, N. Gad'on, V. M. Gorlenko, E. Kompantseva, et G. Drews.** 1994. Phylogenetic positions of novel aerobic, bacteriochlorophyll a-containing bacteria and description of *Roseococcus thiosulfatophilus* gen. nov., sp. nov., *Erythromicrobium ramosum* gen. nov., sp. nov., and *Erythrobacter litoralis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 427-434.
- Zaitsev, J. P.** 1968. La neustonologie marine : objet, méthodes, réalisations principales et problèmes. *Pelagos* 8: 1-47.
- Zaitsev, Y. P.** 1971. Marine Neustonology. VA: National Marine Fisheries Service, NOAA and National Science Foundation, National Technical Information Service.
- Zar, J. H.** 1999. Biostatistical analysis. Prentice-Hall.
- Zhuang, W.-Q., J.-H. Tay, A. M. Maszenan, L. R. Krumholz, et S. T.-L. Tay.** 2003. Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 251-257.
- Ziemke, F., M. G. Hofle, J. Laculat, et R. Rossello-Mora.** 1998. Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 179-186.

- ZoBell, C. E.** 1946. Marine microbiology. A monograph on hydrobacteriology, Chronica botanica Co. ed. Waltham, Mass.
- Zuev, B. K., V. V. Chudinova, V. V. Kovalenko, et V. V. Yagov.** 2001. The conditions of formation of the chemical composition of the sea surface microlayer and techniques for studying organic matter in it. *Geochem. Internat.* 39: 773-784.
- Zutic, V. B., E. Cosovic, E. Marcenko, et N. Bihar.** 1981. Surfactant production by marine phytoplankton. *Mar. Chem.* 10: 505-520.

<b>Nombre de références bibliographiques = 339</b>
--



## **ANNEXES**

## **LISTE DES ANNEXES**

### **Annexe 1**

Fiches techniques et mode opératoire des différents échantillonneurs de microcouche de surface

### **Annexe 2**

Milieu de culture et tampons

### **Annexe 3**

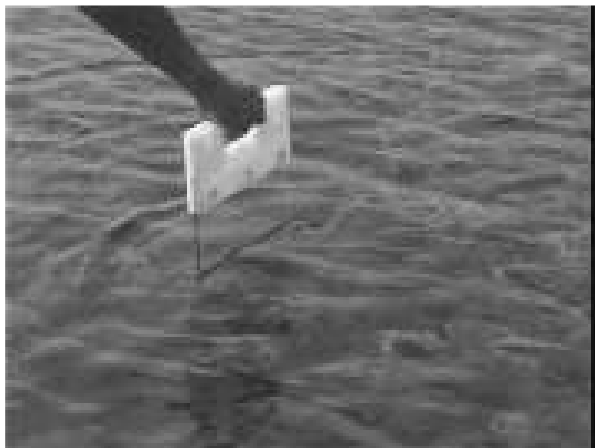
Collection AIRWIN : caractéristiques d'isolement

### **Annexe 4**

Collection AIRWIN : identification, pourcentage d'hydrophobicité et résistance aux radiations solaires

**Annexe 1** Fiches techniques et mode opératoire des différents échantillonneurs de microcouche de surface

**PLAQUE DE VERRE (GLASS PLATE)**



Immersion verticale



Egouttage



Système de récupération



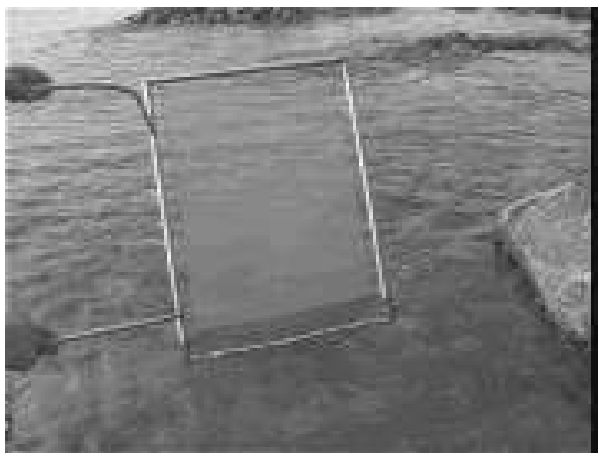
Récupération de l'échantillon

Caractéristiques : plaque de verre de 7 mm d'épaisseur.

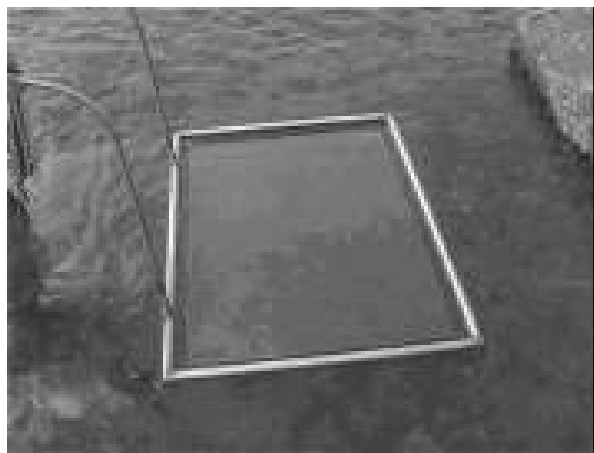
Mode opératoire : la plaque est immergée perpendiculairement au plan d'eau ; émergée lentement et égouttée afin de permettre l'adsorption de la microcouche de surface sur ses deux faces ; insérée dans le système de récupération.



**TAMIS EN METAL (METAL SCREEN)**



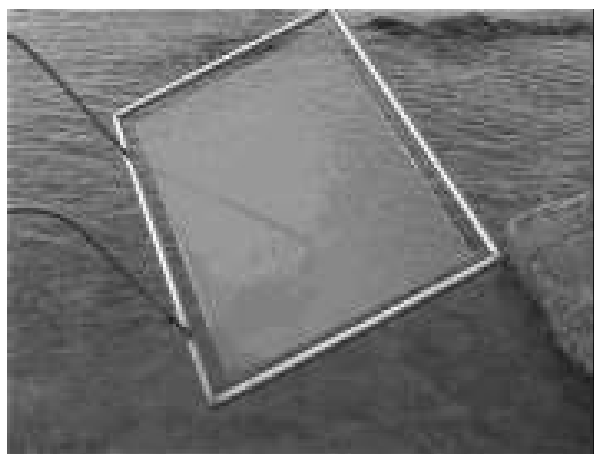
Immersion latérale



Emergence horizontale



Egouttage



Récupération de l'échantillon

Caractéristiques : grille en acier inoxydable constituée de fils de 0,32 mm de diamètre ; ouverture de maille de 1,25 mm.

Mode opératoire : le tamis est immergé latéralement (afin d'éviter la destruction de la microcouche) ; émergé et égoutté ; la microcouche est récupérée gravitairement (les mailles se vident).

**TAMIS EN NYLON (NYLON SCREEN)**



Récupération de l'échantillon

Caractéristiques : tissu en nylon de 560  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ; fils de 0,32 mm de diamètre ; 7,6 fils par cm ; ouverture de maille de 1000  $\mu\text{m}$  ; surface ouverte 57%. (Scrynel NYHC Nylon)

Mode opératoire : le tamis est immergé latéralement (afin d'éviter la destruction de la microcouche) ; émergé et égoutté ; la microcouche est récupérée gravitairement (les mailles se vident).

**ROULEAU DE HARVEY (HARVEY'ROLLER)**



échantillonneur *in situ*



système de récupération de l'échantillon



échantillonneur hors de l'eau

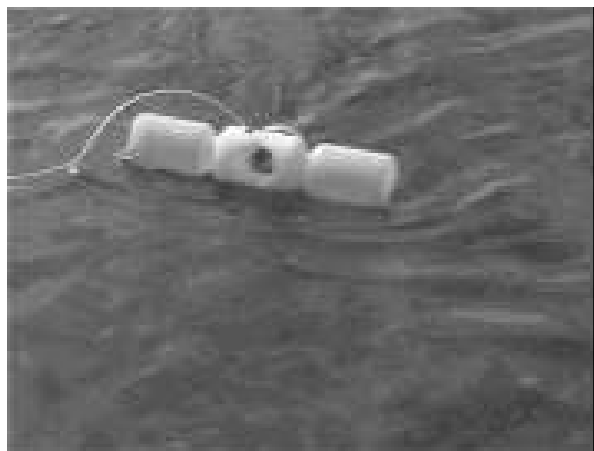
Caractéristiques : poids 230 kg  
Hauteur 1m  
Largeur 1m50  
Longueur 2m30

Mode opératoire : autonome et automatisé  
Piloté depuis le bateau avec une commande

**BOUTEILLE (SML BOTTLE)**



Système bouteille-flotteurs

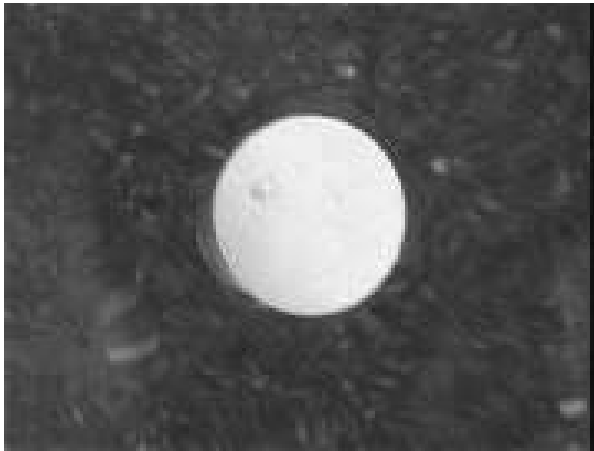


Traction du système

Caractéristiques :     bouteille amarrée à un couple de flotteurs.  
                              (Oil Sampler acc. to Schomaker, Hydro-Bios, Germany)

Mode opératoire :     le système est déposé sur le plan d'eau et tracté.

**MEMBRANE EN TEFLON (PTFE FILTER)**



Filtre *in situ*

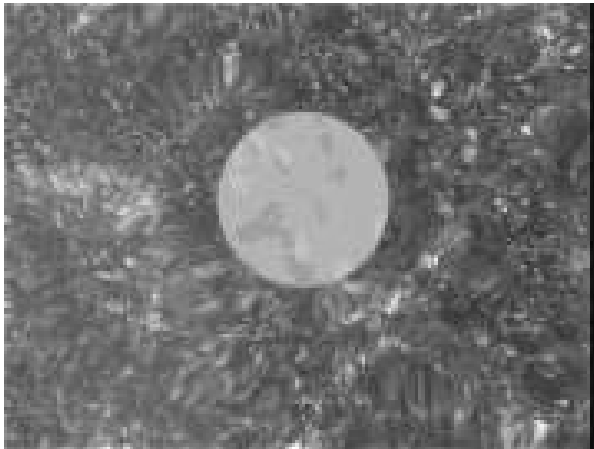


Récupération

Caractéristiques : membrane hydrophobe Téflon PTFE supportée polypropylène ;  
seuil 1  $\mu\text{m}$  ; diamètre 47 mm.  
(Fisher Bioblock Scientific)

Mode opératoire : 4 filtres sont déposés sur le plan d'eau à l'aide d'une pince stérile ;  
récupérés et déposés dans un tube contenant 20 ml d'eau de mer stérile  
(eau de mer décantée, filtrée sur 0,22  $\mu\text{m}$ , autoclavée) et 2 ml de Tween  
20% ; les filtres sont éliminés après 5 min d'agitation forte.

**MEMBRANE EN POLYCARBONATE (PC FILTER)**



Filtre in situ



Récupération

Caractéristiques : membrane hydrophile en polycarbonate ; seuil 0,22  $\mu\text{m}$  ;  
diamètre 47 mm.  
(Isopore Membrane Filter, Millipore)

Mode opératoire : 4 filtres sont déposés sur le plan d'eau à l'aide d'une pince stérile ;  
récupérés et déposés dans un tube contenant 20 ml d'eau de mer stérile  
(eau de mer décantée, filtrée sur 0,22  $\mu\text{m}$ , autoclavée) ;  
les filtres sont éliminés après 5 min d'agitation forte.

## Annexe 2

### Composition des tampons et milieux de culture utilisés

#### Tampons pour la biologie moléculaire

EDTA 0,5 M, pH 8 (solution mère)

EDTA 93,075 g

Eau déminéralisée 300 ml

Ajuster avec de l'eau jusqu'à 500 ml. Le pH est ajusté à 8 avec des cristaux de soude NaOH, puis la solution est filtrée (0,2 µm) et stérilisée 20 min à 120°C.

Tampon TAE (Tris-Acétate) 50X

Tris-base 242 g

Acide acétique glacial 57,1 ml

EDTA (0,5 M, pH 8) 100 ml

Ajuster à 1 litre avec de l'eau déminéralisée en chauffant pour dissoudre.

Pour du TAE 1X

#### Gels d'agarose

Petit gel (1 %)

Agar 0,25 g

TAE (1X) 25 ml

Grand gel (1 %)

Agar 0,50 g

TAE (1X) 50 ml

Gel RFLP (gel 2%)

Agar 1,5 g

TAE (1X) 75 ml

Faire chauffer l'agar dans le tampon au micro-onde pour le dissoudre, puis ajouter du BET.

## Milieu de croissance

Pour chaque milieu solide, 200 mg/L de cycloheximide filtré sur 0,2 µm après autoclavage est ajouté stérilement au milieu de culture. Cet antibiotique bloque la synthèse protéique chez les eucaryotes et donc empêche ainsi le développement des levures et des moisissures sur les boîtes ensemencées.

Composition du milieu R<sup>2</sup>A (salé)R<sup>2</sup>A Agar (Difco) :

Extrait de levure	0,5 g
Peptone	0,5 g
Casamino-acides	0,5 g
Dextrose	0,5 g
Amidon	0,5 g
Pyruvate de sodium	0,3 g
Phosphate de potassium di-basique	0,3 g
Sulfate de magnésium	0,05 g
Agar	15 g

R<sup>2</sup>A Agar salé :

Suspendre 18,2 g de poudre dans 750 ml d'eau de mer filtrée et 250 ml d'eau distillée ;  
Stériliser 15 min à 121°C. pH final : 7,2

## Composition du milieu Marine Agar

## Marine Agar 2216 (Difco) :

Peptone	5 g
Extrait de levure	1 g
Citrate de fer	0,1 g
Chlorure de sodium	19,45 g
Chlorure de magnésium	8,8 g
Sulfate de sodium	3,24 g
Chlorure de calcium	1,8 g
Chlorure de potassium	0,55 g
Bicarbonate de soude	0,16 g
Bromure de potassium	0,08 g
Chlorure de strontium	0,0034 g
Acide borique	0,022 g
Silicate de sodium	0,004 g
Fluorure de sodium	0,0024 g
Nitrate d'ammonium	0,0016 g
Di-phosphate de sodium	0,008 g
Agar	15 g

Suspendre 55,1 g de poudre dans 1 L d'eau distillée ;  
Stériliser 15 min à 121°C. pH final : 7,6



Composition du milieu Marine Broth

Marine Broth 2216 (Difco) :

Peptone	5 g
Extrait de levure	1 g
Citrate de fer	0,1 g
Chlorure de sodium	19,45 g
Chlorure de magnésium deshydraté	5,9 g
Sulfate de sodium	3,24 g
Chlorure de calcium	1,8 g
Chlorure de potassium	0,55 g
Bicarbonate de soude	0,16 g
Bromure de potassium	0,08 g
Chlorure de strontium	0,0034 g
Acide borique	0,022 g
Silicate de sodium	0,004 g
Fluorure de sodium	0,0024 g
Nitrate d'ammonium	0,0016 g
Di-phosphate de sodium	0,008 g
Agar	15 g

Suspendre 37,4 g de poudre dans 1 L d'eau distillée ;  
Stériliser 15 min à 121°C. pH final : 7,6

## Annexe 3

## COLLECTION AIRWIN: caractéristiques d'isolement

Code	Ribotype	code initial de la souche	Echantillonneur	site de prélèvement	Localisation dans la colonne d'eau	Milieu d'isolement	Pigmentation
14III/A01/001	A1	A2 -1 5	plaque de verre	Barcelone	SML + UW	R2A salé	crème
14III/A01/002	A2	A2 -1 2	plaque de verre	Barcelone	SML + UW	R2A salé	crème
14III/A01/003	A3	A2 -1 3	plaque de verre	Barcelone	SML + UW	R2A salé	crème
14III/A01/004	A4	B2 N 9	tamis en métal	Barcelone	SML + UW	R2A salé	crème
14III/A01/006	A6	A2 -1 13	plaque de verre	Barcelone	SML + UW	R2A salé	jaune
14III/A01/007	A7	B2 N 1	tamis en métal	Barcelone	SML	R2A salé	crème
14III/A01/008	A8	F2 N(1/4) 16	filtre en polycarbonate	Barcelone	SML	R2A salé	crème
14III/A01/009	A9	B2 -1 1	tamis en métal	Barcelone	SML	R2A salé	jaune
14III/A01/010	A10	B2 -1 2	tamis en métal	Barcelone	SML	R2A salé	jaune
14III/A01/011	A11	C2 -1 6	tamis en nylon	Barcelone	SML	R2A salé	orange
14III/A01/012	A12	H2 N 15	eau sous-jacente	Barcelone	UW	R2A salé	jaune
14III/A01/013	A13	F2 N(3/4) 5	filtre en polycarbonate	Barcelone	SML + UW	R2A salé	rose
14III/A01/014	A14	D2 N 3	bouteille	Barcelone	SML	R2A salé	crème
14III/A01/015	A15	D2 -1 6	bouteille	Barcelone	SML	R2A salé	crème
14III/A01/016	A16	D2 N 7	bouteille	Barcelone	SML	R2A salé	crème
14III/A01/017	A17	D2 N 12	bouteille	Barcelone	SML	R2A salé	jaune
14III/A01/018	A18	D2 -1 5	bouteille	Barcelone	SML + UW	R2A salé	crème
14III/A01/020	A20	E2 N(1/4) 8	filtre en téflon	Barcelone	SML	R2A salé	jaune
14III/A01/021	A21	E2 N(1/4) 10	filtre en téflon	Barcelone	SML	R2A salé	orange
14III/A01/022	A22	E2 N(1/4) 15	filtre en téflon	Barcelone	SML	R2A salé	jaune
14III/A01/023	A23	E2 N(1/4) 16	filtre en téflon	Barcelone	SML	R2A salé	crème
14III/A01/025	A25	E2 N(1/4) 19	filtre en téflon	Barcelone	SML	R2A salé	crème
14III/A01/027	A27	F2 N(1/4) 15	filtre en polycarbonate	Barcelone	SML	R2A salé	crème
14III/A01/028	A28	F2 N(1/4) 18	filtre en polycarbonate	Barcelone	SML	R2A salé	jaune
14III/A01/030	A30	F2 N(2/4) 2	filtre en polycarbonate	Barcelone	SML	R2A salé	rose
14III/A01/031	A31	F2 N(3/4) 6	filtre en polycarbonate	Barcelone	SML	R2A salé	crème
14III/A01/032	A32	F2 N(3/4) 8	filtre en polycarbonate	Barcelone	SML	R2A salé	crème
14III/A01/033	A33	H2 -1 2	eau sous-jacente	Barcelone	UW	R2A salé	crème

18III/A01/053	B1	A6 -1 1	plaque de verre	Banyuls-sur-Mer	SML	R2A salé	crème
18III/A01/054	B1	A6 -1 13	plaque de verre	Banyuls-sur-Mer	SML	R2A salé	crème
18III/A01/055	B1	B6 -1 4	tamis en métal	Banyuls-sur-Mer	SML	R2A salé	crème
18III/A01/056	B1	B6 -1 13	tamis en métal	Banyuls-sur-Mer	SML	R2A salé	crème
18III/A01/057	B2	A6 -1 7	plaque de verre	Banyuls-sur-Mer	SML	R2A salé	crème
18III/A01/058	B2	B6 -1 1	tamis en métal	Banyuls-sur-Mer	SML	R2A salé	crème
18III/A01/059	B2	E6 N(1/2) 8	filtre en téflon	Banyuls-sur-Mer	SML	R2A salé	crème
18III/A01/060	B2	E6 N(1/2) 10	filtre en téflon	Banyuls-sur-Mer	SML	R2A salé	crème
18III/A01/061	B3	A6 -1 11	plaque de verre	Banyuls-sur-Mer	SML	R2A salé	jaune
18III/A01/063	B4	A6 -2 2	plaque de verre	Banyuls-sur-Mer	SML	R2A salé	jaune
18III/A01/065	B5	E6 N(1/2) 1	filtre en téflon	Banyuls-sur-Mer	SML	R2A salé	marron
18III/A01/066	B6	E6 N(1/2) 2	filtre en téflon	Banyuls-sur-Mer	SML	R2A salé	crème
18III/A01/067	B6	E6 N(1/2) 7	filtre en téflon	Banyuls-sur-Mer	SML	R2A salé	crème
18III/A01/068	B7	E6 N(1/2) 4	filtre en téflon	Banyuls-sur-Mer	SML	R2A salé	jaune
18III/A01/069	B8	E6 N(1/2) 5	filtre en téflon	Banyuls-sur-Mer	SML	R2A salé	crème
18III/A01/070	B8	E6 N(1/2) 6	filtre en téflon	Banyuls-sur-Mer	SML	R2A salé	orange
18III/A01/071	B9	G6 N 1	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	R2A salé	crème
18III/A01/072	B10	G6 N 3	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	R2A salé	crème
18III/A01/073	B11	G6 N 10	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	R2A salé	crème
18III/A01/074	B12	G6 N 6	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	R2A salé	crème
18III/A01/075	B13	G6 N 7	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	R2A salé	crème
18III/A01/077	B15	G6 N 11	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	R2A salé	jaune
18III/A01/079	B16	G6 N 13	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	R2A salé	jaune
18III/A01/080	B17	G6 N 14	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	R2A salé	marron
18III/A01/082	B19	G6 N 16	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	R2A salé	crème
5IX/A01/131	D1	B1 -1 1	tamis en métal	Barcelone	SML	MA	crème
5IX/A01/132	D2	A1 -1 2	plaque de verre	Barcelone	SML	MA	crème
5IX/A01/133	D3	E1 -1 4	filtre en téflon	Barcelone	SML	MA	crème
5IX/A01/134	D4	A1 -1 4	plaque de verre	Barcelone	SML	MA	jaune
5IX/A01/135	D5	B1 -1 4	tamis en métal	Barcelone	SML	MA	orange
5IX/A01/136	D6	B1 -1 7	tamis en métal	Barcelone	SML	MA	crème
7IX/A01/137	D7	A3 -1 3	plaque de verre	Barcelone	SML	MA	crème
9IX/A01/138	D8	F2 N 7	filtre en polycarbonate	Barcelone	SML + UW	MA	crème

5IX/A01/139	D9	D1 -1 2	rouleau	Barcelone	SML	MA	crème
5IX/A01/140	D10	E1 -1 2	filtre en téflon	Barcelone	SML	MA	rouge
5IX/A01/141	D11	E1 -1 3	filtre en téflon	Barcelone	SML	MA	orange
5IX/A01/142a	D12	E6 -2 4	filtre en téflon	Banyuls-sur-Mer	SML	MA	rose
5IX/A01/142b	D12	E6 -2 4	filtre en téflon	Banyuls-sur-Mer	SML	MA	crème
5IX/A01/143	D13	F1 -1 3	filtre en polycarbonate	Barcelone	SML	MA	crème
9IX/A01/144	D14	F4 N 3	filtre en polycarbonate	Banyuls-sur-Mer	SML	MA	crème
5IX/A01/145	D15	G1 -1 2	eau sous-jacente	Barcelone	UW	MA	crème
6IX/A01/146	D16	A2 N 1	plaque de verre	Barcelone	SML + UW	MA	crème
6IX/A01/147	D17	A2 N 2	plaque de verre	Barcelone	SML	MA	crème
6IX/A01/148	D18	A2 -1 3	plaque de verre	Barcelone	SML	MA	jaune
6IX/A01/150	D20	B2 -1 2	tamis en métal	Barcelone	SML	MA	orange
6IX/A01/151	D21	F2 N 1	filtre en polycarbonate	Barcelone	SML	MA	orange
9IX/A01/152	D22	G4 N 4	eau sous-jacente	Barcelone	UW	MA	rose
7IX/A01/154	D24	A3 -1 4	plaque de verre	Barcelone	SML	MA	orange
7IX/A01/155	D25	D3 -1 3	rouleau	Barcelone	SML	MA	orange
7IX/A01/156	D26	F3 N(18) 1	filtre en polycarbonate	Barcelone	SML	MA	crème
7IX/A01/157	D27	F3 N(18) 3	filtre en polycarbonate	Barcelone	SML + UW	MA	orange
9IX/A01/159	D29	B4 N 6	tamis en métal	Banyuls-sur-Mer	SML + UW	MA	orange
7IX/A01/160	D30	G3 -1 4	eau sous-jacente	Barcelone	UW	MA	orange
12IX/A01/161	D31	B6 -2 4	tamis en métal	Banyuls-sur-Mer	SML + UW	MA	orange
12IX/A01/162	D32	E6 N 1	filtre en téflon	Banyuls-sur-Mer	SML + UW	MA	orange
13IX/A01/164	D34	A7 -2 3	plaque de verre	Banyuls-sur-Mer	SML + UW	MA	orange
13IX/A01/165	D35	A7 -1 8	plaque de verre	Banyuls-sur-Mer	SML + UW	MA	orange
13IX/A01/166	D36	E7 -1 2	filtre en téflon	Banyuls-sur-Mer	SML + UW	MA	jaune
13IX/A01/167	D37	E7 -1 4	filtre en téflon	Banyuls-sur-Mer	SML	MA	orange
12IX/A01/168	D38	G5 -2 3	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	MA	crème
12IX/A01/169	D39	F5 N 2	filtre en polycarbonate	Banyuls-sur-Mer	SML	MA	orange
12IX/A01/170	D40	F6 -1 3	filtre en polycarbonate	Banyuls-sur-Mer	SML	MA	jaune
20III/A02/208	E1	J2-1	tamis en métal	Barcelone	SML + UW	MA	crème
21III/A02/209	E2	J3-1	tamis en métal	Barcelone	SML + UW	MA	crème
25III/A02/210	E3	J4-P1	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	MA	crème
25III/A02/211	E4	J4-P2	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	MA	rose

25III/A02/212	E5	J4-P3	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	MA	rouge
25III/A02/213	E6	J4-P4	plaque de verre	Banyuls-sur-Mer	SML + UW	MA	crème
26III/A02/215	E7	J5-P2	(-5 m)	Banyuls-sur-Mer	UW	MA	orange
26III/A02/216	E8	J5-P3	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	MA	rose
27III/A02/218	E9	J7-P2	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	MA	crème
27III/A02/219	E10	J7-P3	tamis en métal	Banyuls-sur-Mer	SML	MA	orange
26III/A02/220	E11	J6-P1	(-5 m)	Banyuls-sur-Mer	UW	MA	crème
3IV/A02/221	E12	tF 4 (-1) 2/2	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	MA	crème (agarolytique)
3IV/A02/222	E13	tF 5 N (1/2)	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	MA	crème (agarolytique)
27III/A02/224	E14	J7 MS N (1/2)	tamis en métal	Banyuls-sur-Mer	SML	MA	crème (agarolytique)
27III/A02/225	E15	J7 MS N (1/2)	tamis en métal	Banyuls-sur-Mer	SML	MA	crème (agarolytique)
8VII/A02/226	F1	O3	tamis en métal	Banyuls-sur-Mer	SML + UW	MA	jaune
9VII/A02/228	F1	O10	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	SML + UW	MA	jaune
9VII/A02/229	F3	C3	tamis en métal	Banyuls-sur-Mer	SML + UW	MA	crème
9VII/A02/230	F4	C6	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	SML + UW	MA	crème
9VII/A02/231	F3	C7	(-5 m)	Banyuls-sur-Mer	SML + UW	MA	crème
3X/A02/232	F4	B5	tamis en métal	Banyuls-sur-Mer	SML	MA	crème
3X/A02/233	G1	B3	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	MA	crème
3X/A02/234	G2	B4	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	MA	rouge
3X/A02/235	G3	B6	tamis en métal	Banyuls-sur-Mer	SML	MA	marron
3X/A02/236	G4	B7	tamis en métal	Banyuls-sur-Mer	SML	MA	rose
17X/A02/237	G5	B11	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	MA	noir
17X/A02/238	G5	B12	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	MA	jaune
17X/A02/239	G6	B14	tamis en métal	Banyuls-sur-Mer	SML	MA	rose
17X/A02/240	G7	B16	tamis en métal	Banyuls-sur-Mer	SML	MA	crème
17X/A02/241	G8	B17	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	MA	marron
17X/A02/242a	G9	B20	tamis en métal	Banyuls-sur-Mer	SML	MA	crème
3X/A02/243	G10	B8	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	MA	marron
17X/A02/244	G11	B10	eau sous-jacente	Banyuls-sur-Mer	UW	MA	marron
17X/A02/245	G12	B13	plaque de verre	Banyuls-sur-Mer	SML	MA	rose

## Annexe 4

## COLLECTION AIRWIN: Identification, pourcentage d'hydrophobicité, et résistance aux radiations solaires

Code	N° Accession	Localisation dans la colonne d'eau	Identification			N° Acc. du clone le plus proche	%	Hydrophobicité		Résistance aux radiations solaires
			Groupe	Espèce la plus proche	%			Moy.	écart- type	
14III/A01/001	AY612746	SML + UW	γ protéobacteria	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	97%	AF354601	98%	17%	+/- 2	ND
14III/A01/002	AY612747	SML + UW	γ protéobacteria	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	99%	AJ391202	99%	13%	+/- 1	ND
14III/A01/003	AY576689	SML + UW	γ protéobacteria	<i>Alteromonas macleodii</i>	98%	AJ294362	99%	14%	+/- 6	R++ - C2
14III/A01/004	* AY576690	SML + UW	α protéobacteria	<i>Roseobacter gallaeciensis</i>	96%	AJ294353	100%	73%	+/- 4	R++ - C1
14III/A01/006	AY576691	SML + UW	CFB	<i>Flexibacter tractuosus</i>	94%	AB078070	94%	44%	+/- 2	R+
14III/A01/007	AY576692	SML	FLGC	<i>Bacillus firmus</i>	99%	AJ315064	99%	35%	+/- 6	R++ - C2
14III/A01/008	* AY612748	SML	γ protéobacteria	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99%	AJ312161	99%	8%	+/- 3	ND
14III/A01/009	AY612749	SML	Actinobacteria	<i>Arthrobacter agilis</i>	99%	AJ315071	99%	11%	+/- 2	ND
14III/A01/010	* AY576693	SML	CFB	<i>Maribacter sedimenticola</i>	97%	AF367849	99%	57%	+/- 17	R+
14III/A01/011	AY576694	SML	Actinobacteria	<i>Microbacterium kitamiense</i>	99%	AB042082	99%	10%	+/- 4	R+
14III/A01/012	AY576695	UW	CFB	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	93%	AJ535257	94%	85%	+/- 2	S
14III/A01/013	AY576696	SML + UW	Actinobacteria	<i>Blastococcus aggregatus</i>	99%	AJ316573	99%	40%	+/- 8	R+
14III/A01/014	AY576697	SML	Actinobacteria	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	97%	X84440	97%	54%	+/- 1	R++ - C2
14III/A01/015	AY612750	SML	γ protéobacteria	<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i>	92%	AY028198	98%	9%	+/- 1	ND
14III/A01/016	# AY576698	SML	γ protéobacteria	<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i>	92%	AY028199	98%	5%	+/- 1	R+
14III/A01/017	AY576699	SML	Actinobacteria	<i>Brachybacterium tyrofermentans</i>	98%	AF468445	100%	47%	+/- 15	R+
14III/A01/018	AY576700	SML + UW	γ protéobacteria	<i>Vibrio splendidus</i>	99%	AY129277	99%	2%	+/- 1	R+
14III/A01/020	AY576701	SML	Actinobacteria	<i>Nocardioides jensenii</i>	96%	AJ316318	99%	18%	+/- 3	S
14III/A01/021	AY576702	SML	Actinobacteria	<i>Dietzia maris</i>	100%	Y18883	100%	8%	+/- 1	R
14III/A01/022	AY576703	SML	Actinobacteria	<i>Micrococcus luteus</i>	99%	AJ441006	99%	27%	+/- 3	R
14III/A01/023	AY576704	SML	α protéobacteria	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	99%	AY221181	99%	7%	+/- 2	R+
14III/A01/025	AY576705	SML	γ protéobacteria	<i>Pseudoxanthomonas broegbernensis</i>	97%	AJ306770	99%	17%	+/- 5	R
14III/A01/027	AY576706	SML	FLGC	<i>Staphylococcus aureus</i>	99%	L37597	99%	86%	+/- 3	R+
14III/A01/028	AY576707	SML	Actinobacteria	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	100%	AJ512504	100%	73%	+/- 2	S
14III/A01/030	AY576708	SML	Actinobacteria	<i>Arthrobacter agilis</i>	99%	AY131225	99%	59%	+/- 17	R+

14III/A01/031	AY576709	SML	γ protéobacteria	<i>Oleispira antarctica</i>	91%	AF353237	91% ND		S
14III/A01/032	AY576710	SML	α protéobacteria	<i>Sulfitobacter delicae</i>	94%	AJ391182	99% 7%	+/- 1	R+
14III/A01/033	AY576711	UW	FLGC	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99%	L37605	99% 93%	+/- 5	S
18III/A01/053	* AY576712	SML	γ protéobacteria	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	99%	AJ391202	99% 17%	+/- 3	R++ - C1
18III/A01/054	AY612751	SML	γ protéobacteria	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	99%	AJ391202	99% 14%	+/- 2	ND
18III/A01/055	AY612752	SML	γ protéobacteria	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	99%	AJ244744	100% 11%	+/- 1	ND
18III/A01/056	AY612753	SML	γ protéobacteria	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	99%	AY028200	99% 14%	+/- 1	ND
18III/A01/057	AY612754	SML	γ protéobacteria	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	98%	AF237977	99% 9%	+/- 3	ND
18III/A01/058	* AY576713	SML	γ protéobacteria	<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i>	99%	AY028200	99% 8%	+/- 2	R++ - C1
18III/A01/059	AY612755	SML	γ protéobacteria	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	98%	AF354601	99% 8%	+/- 1	ND
18III/A01/060	AY612756	SML	γ protéobacteria	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	98%	AF354601	99% 12%	+/- 2	ND
18III/A01/061	AY576714	SML	CFB	<i>Algibacter lectus</i>	96%	AF359540	97% 12%	+/- 1	R+
18III/A01/063	AY576715	SML	FLGC	<i>Staphylococcus warneri</i>	99%	L37603	99% 92%	+/- 1	S
18III/A01/065	AY576716	SML	α protéobacteria	<i>Erythrobacter citreus</i>	99%	AY437632	99% 2%	+/- 1	R++ - C3
18III/A01/066	AY576717	SML	γ protéobacteria	<i>Pseudomonas putida</i>	98%	AJ297355	98% 30%	+/- 11	R+
18III/A01/067	AY576718	SML	γ protéobacteria	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	96%	AJ293824	98% 24%	+/- 2	R++ - C2
18III/A01/068	AY576719	SML	CFB	<i>Salegentibacter salegens</i>	95%	AY319330	99% 39%	+/- 6	R
18III/A01/069	* AY576720	SML	α protéobacteria	<i>Paracoccus aminophilus</i>	98%	D32239	98% 19%	+/- 5	S
18III/A01/070	AY576721	SML	α protéobacteria	<i>Paracoccus marcusii</i>	99%	AJ532681	99% 89%	+/- 1	R+
18III/A01/071	AY576722	UW	γ protéobacteria	<i>Aeromonas media</i>	100%	U88661	100% 6%	+/- 2	R
18III/A01/072	AY576723	UW	γ protéobacteria	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99%	AB099655	99% 28%	+/- 6	R+
18III/A01/073	* AY576724	UW	FLGC	<i>Enterococcus faecium</i>	100%	AJ276355	100% 8%	+/- 5	R
18III/A01/074	AY612757	UW	γ protéobacteria	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99%	AY055373	99% 36%	+/- 3	ND
18III/A01/075	AY576725	UW	α protéobacteria	<i>Stappia aggregata</i>	99%	AY345441	99% 12%	+/- 1	R+
18III/A01/077	AY576726	UW	Actinobacteria	<i>Salinibacterium amurskyense</i>	96%	AY188942	96% 5%	+/- 2	R+
18III/A01/079	AY612758	UW	CFB	<i>Algibacter lectus</i>	97%	AF359540	96% 67%	+/- 13	ND
18III/A01/080	AY576727	UW	γ protéobacteria	<i>Shewanella putrefaciens</i>	99%	X82133	99% 13%	+/- 2	R
18III/A01/082	AY576728	UW	γ protéobacteria	<i>Photobacterium leiognathi</i>	99%	AF497998	99% 3%	+/- 2	R+
5IX/A01/131	# AY576729	SML	γ protéobacteria	<i>Marinobacterium stanieri</i>	90%	AF468250	92% 90%	+/- 2	R
5IX/A01/132	AY615725	SML	α protéobacteria	<i>Salipiger mucescens</i>	97%	AY162092	99% 8%	+/- 1	R+
5IX/A01/133	AY612759	SML	FLGC	<i>Bacillus horikoshii</i>	99%	AB043865	99% 2%	+/- 1	ND
5IX/A01/134	AY576730	SML	CFB	<i>Algibacter lectus</i>	95%	AF359548	98% 80%	+/- 2	R+
5IX/A01/135	# AY576731	SML	FLGC	<i>Bacillus cereus</i>	100%	Y15466	100% 11%	+/- 3	R

5IX/A01/136	#	AY576732	SML	α protéobacteria	<i>Brevundimonas intermedia</i>	98%	AJ227801	100% 18%	+/- 3	S
7IX/A01/137		AY576733	SML	γ protéobacteria	<i>Pseudoalteromonas mariniglutinosa</i>	99%	AJ551143	99% 27%	+/- 6	R++ - C1
9IX/A01/138	#	AY576734	SML + UW	FLGC	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	99%	AJ276810	99% 28%	+/- 3	S
5IX/A01/139		AY576735	SML	α protéobacteria	<i>Sulfitobacter pontiacus</i>	99%	AJ298355	99% 31%	+/- 28	R++ - C3
5IX/A01/140		AY576736	SML	α protéobacteria	<i>Erythrobacter litoralis</i>	98%	AB035544	99% 20%	+/- 5	S
5IX/A01/141		AY576737	SML	FLGC	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	99%	AY345407	99% 23%	+/- 8	R++ - C2
5IX/A01/142a		AY712660	SML	Actinobacteria	<i>Dietzia maris</i>	99%	Y18883	99% 52%	+/- 2	ND
5IX/A01/142b		AY576738	SML	FLGC	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	99%	AB073189	99% 35%	+/- 9	S
5IX/A01/143		AY576739	SML	α protéobacteria	<i>Jannaschia helgolandensis</i>	95%	AB018689	99% 19%	+/- 6	R
9IX/A01/144		AY612761	SML	γ protéobacteria	<i>Vibrio splendidus</i>	99%	AB038030	99% 3%	+/- 1	ND
5IX/A01/145	*	AY576740	UW	FLGC	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	AY167862	99% 44%	+/- 7	R+
6IX/A01/146	#	AY576741	SML + UW	FLGC	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99%	Z84594	99% 14%	+/- 4	R
6IX/A01/147		AY612762	SML	FLGC	<i>Bacillus firmus</i>	99%	AF348731	99% 7%	+/- 1	ND
6IX/A01/148		AY576742	SML	Actinobacteria	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	99%	AB099658	99% 8%	+/- 1	R
6IX/A01/150		AY612763	SML	FLGC	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	99%	AY345407	99% 14%	+/- 6	ND
6IX/A01/151		AY576743	SML	γ protéobacteria	<i>Enterobacter sakazakii</i>	99%	AB004746	99% 3%	+/- 1	R++ - C2
9IX/A01/152		AY612764	UW	α protéobacteria	<i>Sulfitobacter delicae</i>	94%	AY180102	94% 13%	+/- 2	ND
7IX/A01/154		AY612765	SML	FLGC	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	99%	AY205564	99% 30%	+/- 6	ND
7IX/A01/155		AY576744	SML	CFB	<i>Muricauda ruestringensis</i>	97%	AY445076	98% 7%	+/- 1	R++ - C2
7IX/A01/156	*	AY576745	SML	γ protéobacteria	<i>Alteromonas infernus</i>	98%	AB015135	99% 39%	+/- 5	R++ - C1
7IX/A01/157		AY612766	SML + UW	FLGC	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	98%	AY205564	99% 45%	+/- 8	ND
9IX/A01/159		AY612767	SML + UW	FLGC	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	97%	AY205564	99% 36%	+/- 5	ND
7IX/A01/160		AY576746	UW	α protéobacteria	<i>Paracoccus aminovorans</i>	98%	AY494626	99% 18%	+/- 17	R
12IX/A01/161		AY576747	SML + UW	FLGC	<i>Bacillus horikoshii</i>	99%	AB043865	99% 31%	+/- 4	R+
12IX/A01/162		AY576748	SML + UW	α protéobacteria	<i>Brevundimonas aurantiaca</i>	99%	AJ227796	99% 43%	+/- 4	R
13IX/A01/164		AY576749	SML + UW	CFB	<i>Cellulophaga lytica</i>	88%		96% 83%	+/- 8	R+
13IX/A01/165		AY612768	SML + UW	FLGC	<i>Bacillus horikoshii</i>	99%	AB043865	99% 4%	+/- 1	ND
13IX/A01/166		AY612769	SML + UW	α protéobacteria	<i>Erythrobacter citreus</i>	99%	AJ294340	99% 35%	+/- 6	ND
13IX/A01/167		AY576750	SML	FLGC	<i>Planococcus rifietoensis</i>	99%	AJ493659	99% 28%	+/- 1	R+
12IX/A01/168		AY576751	UW	γ protéobacteria	<i>Marinobacter sedimentalis</i>	90%	AY349465	98% 6%	+/- 2	R
12IX/A01/169		AY576752	SML	CFB	<i>Mesonia algae</i>	92%	U85882	97% 19%	+/- 1	R+
12IX/A01/170		AY612770	SML	α protéobacteria	<i>Erythrobacter citreus</i>	99%	AJ244716	99% 31%	+/- 4	ND
20III/A02/208		AY576753	SML + UW	γ protéobacteria	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	98%	AF354601	99% 1%	+/- 1	R++ - C1



21III/A02/209	AY576754	SML + UW	γ protéobacteria	<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	98%	AJ391189	99% 3%	+/- 1	R++ - C2
25III/A02/210	AY576755	UW	α protéobacteria	<i>Porphyrobacter sanguineus</i>	99%	AB062106	99% 22%	+/- 1	R+
25III/A02/211	AY576756	UW	CFB	<i>Hongiella mannitolivorans</i>	99%	AY264838	99% 25%	+/- 3	R+
25III/A02/212	AY612771	UW	α protéobacteria	<i>Porphyrobacter sanguineus</i>	98%	AB062106	98% 3%	+/- 1	ND
25III/A02/213	* AY576757	SML + UW	γ protéobacteria	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100%	AJ312174	100% 3%	+/- 1	R++ - C2
26III/A02/215	AY576758	UW	α protéobacteria	<i>Hyphomonas johnsonii</i>	92%	AF359547	95% ND		S
26III/A02/216	AY612772	UW	CFB	<i>Hongiella ornithinivorans</i>	99%	AY264840	99% 3%	+/- 1	ND
27III/A02/218	* AY576759	UW	γ protéobacteria	<i>Glaciecola mesophila</i>	95%		2%	+/- 1	R+
27III/A02/219	AY576760	SML	γ protéobacteria	<i>Marinobacter litoralis</i>	99%	AF479689	99% 5%	+/- 1	R++ - C2
26III/A02/220	AY576761	UW	γ protéobacteria	<i>Photobacterium leiognathi</i>	95%	AJ316207	98% 6%	+/- 2	R+
3IV/A02/221	AY576762	UW	γ protéobacteria	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	100%	AJ244748	100% 10%	+/- 1	R++ - C1
3IV/A02/222	AY576763	UW	γ protéobacteria	<i>Glaciecola mesophila</i>	91%	AY205304	97% 17%	+/- 6	S
27III/A02/224	AY612773	SML	γ protéobacteria	<i>Marinobacter litoralis</i>	98%	AF479689	98% 22%	+/- 1	ND
27III/A02/225	* AY612774	SML	γ protéobacteria	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	100%	AJ244748	100% 9%	+/- 3	ND
8VII/A02/226	AY612775	SML + UW	α protéobacteria	<i>Erythrobacter citreus</i>	99%	AF314528	99% 6%	+/- 1	ND
9VII/A02/228	AY576764	SML + UW	α protéobacteria	<i>Erythrobacter flavus</i>	99%	AJ557869	99% 10%	+/- 2	R+
9VII/A02/229	* AY576765	SML + UW	γ protéobacteria	<i>Alteromonas marina</i>	98%	AJ310691	98% 5%	+/- 1	R++ - C2
9VII/A02/230	AY612776	SML + UW	γ protéobacteria	<i>Alteromonas marina</i>	98%	AB015135	99% 15%	+/- 2	ND
9VII/A02/231	AY612777	SML + UW	γ protéobacteria	<i>Alteromonas marina</i>	99%	AJ310691	99% 4%	+/- 1	ND
3X/A02/232	AY576766	SML	α protéobacteria	<i>Stappia aggregata</i>	93%	AY486423	98% 7%	+/- 2	R
3X/A02/233	AY576767	UW	α protéobacteria	<i>Brevundimonas alba</i>	97%	AJ227793	98% 1%	+/- 1	R
3X/A02/234	# AY576768	UW	α protéobacteria	<i>Roseobacter gallaeciensis</i>	98%	AJ296158	98% 5%	+/- 1	R+
3X/A02/235	AY576769	SML	γ protéobacteria	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	90%	AF468388	98% 2%	+/- 1	R+
3X/A02/236	AY576770	SML	α protéobacteria	<i>Ruegeria atlantica</i>	95%	AJ391187	97% 35%	+/- 3	R
17X/A02/237	AY576771	UW	γ protéobacteria	<i>Pseudomonas jessenii</i>	91%	AF102866	92% 21%	+/- 6	S
17X/A02/238	AY612778	UW	γ protéobacteria	<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	99%	X82137	99% 5%	+/- 4	ND
17X/A02/239	AY576772	SML	CFB	<i>Hongiella ornithinivorans</i>	99%	AY264840	99% 2%	+/- 1	R+
17X/A02/240	AY576773	SML	γ protéobacteria	<i>Microbulbifer maritimus</i>	96%	AF500211	99% 11%	+/- 4	R+
17X/A02/241	AY576774	UW	γ protéobacteria	<i>Shewanella baltica</i>	99%	AF539784	99% 12%	+/- 3	R+
17X/A02/242a	# AY576775	SML	γ protéobacteria	<i>Alcanivorax venustensis</i>	100%	AF328762	100% ND		R
3X/A02/243	* AY576776	UW	CFB	<i>Muricauda ruestringensis</i>	97%	AB073566	98% 3%	+/- 1	R+
17X/A02/244	* AY576777	UW	CFB	<i>Cytophaga latercula</i>	98%	M58769	98% 6%	+/- 1	R+
17X/A02/245	AY612779	SML	Actinobacteria	<i>Arthrobacter agilis</i>	99%	X80748	99% 12%	+/- 3	ND

(\* : croissance sous forme d'agrégats, # : croissance en biofilm)



---

Diversité des bactéries de la microcouche de surface de l'eau de mer : spécificité, adaptation et résistance aux radiations solaires

---

**RESUME :** La microcouche de surface (premier mm de la surface des océans), située à l'interface entre l'air et l'eau, est souvent enrichie en matières organiques d'origine naturelle et anthropique issues des apports fluviaux et atmosphériques et de l'activité biologique du milieu naturel. Cette richesse en matières organiques permet une forte activité biologique et la densité des microorganismes, qui constituent le bactérioneuston, est souvent très supérieure à celle trouvée dans la colonne d'eau. De nombreuses méthodes d'échantillonnage sont disponibles pour collecter les premiers  $\mu\text{m}$  de la surface des océans. Dans un premier temps, une étude méthodologique a été menée afin de mettre en évidence le ou les échantillonneur(s) le(s) plus approprié(s) pour étudier les communautés biologiques présentes à cette interface.

Lors de plusieurs campagnes de prélèvements sur deux sites côtiers du nord-ouest de la mer Méditerranée, des échantillons de microcouche de surface et d'eau sous-jacente ont été collectés pour isoler et analyser la diversité des bactéries cultivables. Une collection de 125 souches a été constituée. Le séquençage de l'ADNr 16S a révélé une grande diversité parmi les bactéries isolées de la microcouche. Ces communautés bactériennes n'étaient pas très différentes sur un plan phylogénétique de celles opérant dans la colonne d'eau. Parmi les souches isolées, certaines étaient très éloignées taxonomiquement d'espèces connues. Dans un dernier temps, la résistance des souches de la collection face aux radiations solaires a été évaluée grâce à l'utilisation d'un simulateur solaire. Une majorité des souches a présenté une résistance importante face aux radiations solaires et ceci quelque soit leur localisation dans la colonne d'eau. L'ensemble des données obtenues nous a apporté des informations concernant la diversité et les stratégies d'adaptation du bactérioneuston à l'environnement particulier de la microcouche de surface.

---

Diversity of bacteria of the sea surface microlayer : specificity, adaptation and resistance to solar radiation

---

**ABSTRACT :** The sea surface microlayer (first mm of the sea surface), located at the air-water interface, is often enriched in organic matter originating from natural and anthropogenic sources from the atmosphere, from freshwater inputs and from biological activities of the natural ecosystem. This enrichment in organic matter allows a high biological activity and the abundance of microorganisms, named the bacterioneuston, is generally higher when compared to underlying waters. A large number of samplers or sampling techniques have been designed for collection of the first  $\mu\text{m}$  of the sea surface microlayer. Initially, we made a methodological study in order to determine the most suitable method of sampling the biological communities of the sea surface microlayer.

During several field campaigns on two coastal sites of the north-western Mediterranean Sea, sea surface microlayer and underlying waters samples were collected to isolate culturable bacteria and their diversity was characterized. A collection of 125 isolates was made. The sequencing of the 16S rRNA gene of each isolates revealed a large diversity amongst the bacteria isolated from the sea surface microlayer. Based on phylogenetic analyses, bacterial communities from the sea surface microlayer were similar to those from underlying waters. Amongst the bacteria isolated, several were only distantly related to known species. Lastly, bacterial isolates were screened for resistance to simulated solar radiation. The majority of the isolates were resistant to simulated solar radiation, independent of their origin in the water column. These results provide important information concerning the diversity and adaptation strategies of bacterioneuston to the extreme environment of the sea surface microlayer.

**DISCIPLINE :** Ecologie Microbienne

**MOTS-CLES :** diversité, bactérioneuston, interface, radiations solaires, hydrophobicité

**INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :**

Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Observatoire Océanologique, UMR7621-INSU-CNRS, Université Pierre et Marie Curie, BP44, 66651 Banyuls-sur-Mer Cedex, France

---