

DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT ET DE L'AMENAGEMENT LITTORAL



**ESSAIS DE DECROCHAGE DE BACTERIES
DE SEDIMENTS COTIERS
PAR ACTION CHIMIQUE ET PHYSIQUE**

DERRIEN A., DUPRAY E., CAPRAIS M.P.
DEL - LABORATOIRE MICROBIOLOGIE



DEL 92.12

IFREMER-DERO/EL



0EL04439

IFREMER
Centre de BREST
S.D.P.
B.P. 70
29280 PLOUZANE
Tél : 98.22.40.40
Télex : 940 627

DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT ET DE
L'AMENAGEMENT LITTORAL (DEL)

Laboratoire de Microbiologie

AUTEUR(S) : DERRIEN A., DUPRAY E., CAPRAIS M.P.		CODE : N° <u>DEL 92.12</u>
TITRE ESSAIS DE DECROCHAGE DE BACTERIES DE SEDIMENTS COTIERS PAR ACTION CHIMIQUE ET PHYSIQUE		Date : Mars 1992 Tirage nb : 20
CONTRAT (intitulé) N° _____		<u>DIFFUSION</u> Libre <input checked="" type="checkbox"/> Restreinte Confidentielle

RESUME

Afin d'améliorer les numérations bactériennes du sédiment, nous avons testé différentes méthodes physiques et chimiques pour relarguer les bactéries des particules. Une étude préliminaire a permis de définir des concentrations et des temps d'action non toxiques pour des bactéries d'intérêt sanitaire.

Les différentes techniques testées ne permettent d'augmenter la numération, dans le meilleur des cas (action du lauryl sulfate de sodium), que d'une demi unité log.

ABSTRACT

Mots-clés :

Bactéries, sédiments, adhésion, techniques de décrochage.

Key words :



ifremer - Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

SOMMAIRE

INTRODUCTION	5
I - ETUDE DE LA TOXICITE DES TECHNIQUES UTILISEES SUR SIX SOUCHES BACTERIENNES	5
<i>1.1. Souches bactériennes</i>	5
<i>1.2. Traitements physiques</i>	7
1.2.1. Protocole	7
1.2.2. Résultats	7
1.2.3. Conclusion	8
<i>1.3. Produits chimiques testés</i>	9
1.3.1. Protocole	9
1.3.2. Résultats	10
1.3.3. Conclusion	11
II - DECROCHAGE DES BACTERIES DU SEDIMENT	11
<i>2.1. Matériel et méthodes</i>	11
<i>2.2. Résultats</i>	11
ESSAI N° 1	12
ESSAI N° 2	12
ESSAI N° 3	13
ESSAI N° 4	14
ESSAI N° 5	14
ESSAI N° 6	15
ESSAI N° 7	15
III - DISCUSSION ET CONCLUSION	16
BIBLIOGRAPHIE	18

INTRODUCTION

Dans le cadre de différentes études, notamment du projet "rejets urbains", nous avons étudié la population bactérienne de sédiments côtiers, vase ou sable. La majorité des bactéries, dans un tel écosystème adhère aux particules. Le mécanisme d'adhésion fait intervenir un réseau de fibres polysaccharidiques sécrétées par la bactérie : le glycocalyx, permettant à la bactérie de "coller" à un support quelconque, et de piéger les éléments nutritifs présents dans le milieu (figure 1). Afin d'améliorer les numérations bactériennes d'échantillons de sédiment, il est nécessaire de disperser les bactéries, et donc de les "décrocher" par clivage des chaînes polysaccharidiques. Nous avons donc testé différentes techniques physiques (agitation, ultrasons) et chimiques (oxydants, chélateurs, détergents).

I - ETUDE DE LA TOXICITE DES TECHNIQUES UTILISEES SUR SIX SOUCHES BACTERIENNES

Afin de choisir les concentrations en produits chimiques ou les temps de traitements physiques qui seront appliqués pour les tests de décrochage, il était nécessaire d'étudier leur toxicité vis-à-vis de bactéries d'intérêt sanitaire.

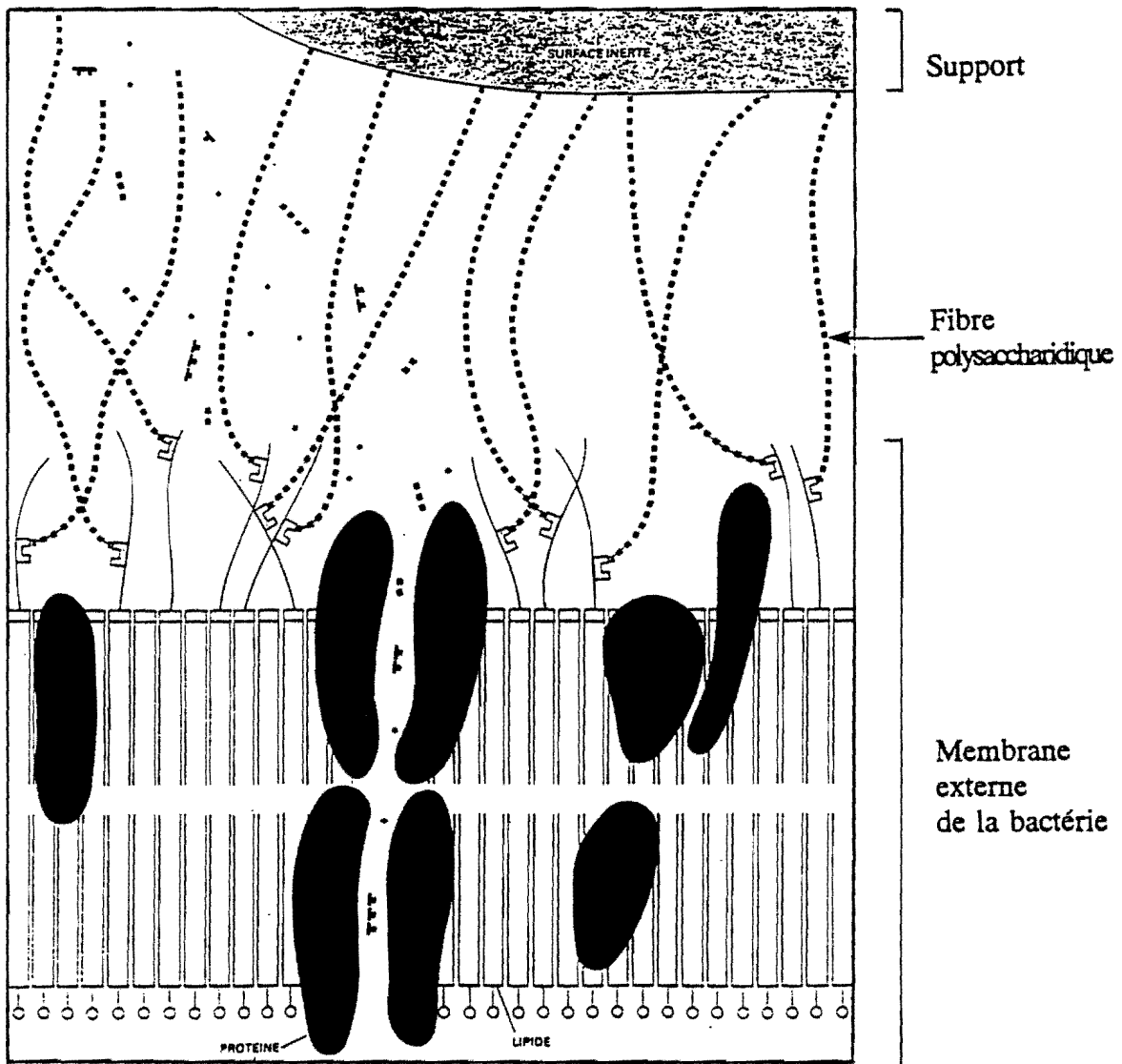
1.1. Souches bactériennes

Les six souches testées ont été isolées à partir de prélèvements provenant de l'estuaire de Morlaix :

- deux entérobactéries : *Escherichia coli* et *Salmonella spp.*,
- quatre autres espèces : *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Streptococcus faecium*.

Les souches sont traitées de la façon suivante :

- . Pré-ensemencement des souches dans un bouillon nutritif Trypto-caséine-soja (Oxoid), incubation 18 h à 37 °C.
- . Ensemencement de 1 ml de la culture dans 19 ml de bouillon nutritif : incubation 4 h à 37 °C.
- . Centrifugation (20 min à 3 500 t/min) et lavage du culot à l'eau physiologique.



4. LE GLYCOCALYX s'étend à partir de la membrane externe d'une bactérie. La membrane est constituée d'une double couche de molécules lipidiques (chaque molécule est ici représentée sous forme d'une sorte de diabaïon), dans laquelle sont enfermées des protéines (taches gris jaunées). Les lipopolysaccharides (filaments noirs) partent de la membrane. Le glycocalyx est constitué d'une masse de longues fibres polysaccharidiques (cannes de cannes de couleur). Ces fibres, consti-

tuées de molécules glucidiques, sont fabriquées grâce à des enzymes bactériennes appelées polymérase (*structures en L*), liées aux lipopolysaccharides. Les fibres du glycocalyx adhèrent aux surfaces voisines, ici une surface inerte (en haut à droite). Ces fibres entraînent aussi vers la bactérie divers nutriments : sucres (rectangles), acides aminés (*structures en T*) et ions minéraux (points) qui pénètrent dans la cellule par des canaux intramembranaires délimités par les protéines.

Figure 1 : Mécanisme d'adhésion bactérienne (d'après Costerton *et al.*).

. Inoculation de 0,1 ml des suspensions lavées dans 500 ml d'eau de mer naturelle stérile (filtrée sur 0,22 μ et autoclavée 20 min à 120 °C) de façon à obtenir des concentrations bactériennes approchant 10^5 bact/ml.

. Les flacons ensemencés sont placés une nuit à 20 °C afin de tester les techniques de décrochage sur des bactéries ayant subi un stress salé.

1.2. Traitements physiques

1.2.1. Protocole

Trois techniques déjà testées par certains auteurs ont été utilisées (Puleo, 1967 ; Ellery, 1984 ; Schallenberg, 1989 ; Le Guyader, 1988) :

- Ultra-sons (U.S.) : les tubes contenant les prélèvements sont placés dans une cuve à U.S. (48 kHz, 50 W) pendant trois temps différents.

- Agitation magnétique (A.M.) : à 500 t/min pendant 3 temps différents (flacon avec prélèvement et barreau aimanté).

- Agitation au vortex (V) : prélèvements dans des tubes avec 2 temps d'agitation.

Trois souches ont été testées avec 3 réplicats :

- . *Escherichia coli*,
- . *Salmonella spp.*,
- . *Streptococcus faecium*.

1.2.2. Résultats

Les résultats sont présentés sous forme de tableaux avec la numération moyenne de 3 réplicats \pm écart-type (par ml) :

a) Ultra-sons

	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>S. faecium</i>
	M ($\pm \sigma$)	M ($\pm \sigma$)	M ($\pm \sigma$)
Sans U.S.	$8,8 \times 10^4$	$9,6 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$
US 2 min	$8,87 (\pm 2,35) 10^4$	$1,27 (\pm 0,16) 10^5$	$8,87 (\pm 2,35) 10^4$
US 6 min	$9,73 (\pm 2,35) 10^4$	$6,51 (\pm 3,0) 10^4$	$7,87 (\pm 3,23) 10^3$
US 10 min	$8,43 (\pm 1,56) 10^4$	$9,07 (\pm 1,62) 10^4$	$1,68 (\pm 0,99) 10^4$

b) Agitation magnétique

	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>S. faecium</i>
	M ($\pm \sigma$)	M ($\pm \sigma$)	M ($\pm \sigma$)
Sans A.M.	8,8 10 ⁴	9,6 10 ⁴	1,8 10 ⁴
A.M. 5 min	8,3 ($\pm 1,85$) 10 ⁴	1,25 ($\pm 0,35$) 10 ⁵	1,98 ($\pm 1,07$) 10 ⁴
A.M. 15 min	6,93 ($\pm 1,62$) 10 ⁴	1,06 ($\pm 0,57$) 10 ⁵	5,7 ($\pm 1,32$) 10 ³
A.M. 30 min	8,46 ($\pm 1,75$) 10 ⁴	1,44 ($\pm 0,16$) 10 ⁵	9,96 ($\pm 6,07$) 10 ³

c) Vortex

	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>S. faecium</i>
	M ($\pm \sigma$)	M ($\pm \sigma$)	M ($\pm \sigma$)
Sans V	6,5 10 ⁴	1,1 10 ⁵	2,13 10 ⁴
V 5 min	6,7 ($\pm 1,71$) 10 ⁴	1,17 ($\pm 0,15$) 10 ⁵	1,37 ($\pm 0,74$) 10 ⁴
V 20 min	7,17 ($\pm 1,50$) 10 ⁴	1,43 ($\pm 0,13$) 10 ⁵	4,0 ($\pm 0,95$) 10 ³

1.2.3. Conclusion

Les traitements physiques testés affectent peu la numération bactérienne donc l'état physiologique des souches. A partir des résultats obtenus nous avons choisi pour la suite du travail des temps d'action suivant :

Ultra-sons : 10 min.

Agitation magnétique : 10 min ou 1 heure (30 min d'AM ne diminuant pas les numérations bactériennes, nous avons testé un temps d'agitation plus important : 1 heure).

Vortex : 10 min (20 min faisant chuter la numération de *S. faecium*).

1.3. Produits chimiques testés

1.3.1. protocole

Le choix des produits a été fait d'après la littérature (Corpe, 1973 ; Bryant, 1984 ; Albright, 1986 ; Yoon and Rosson, 1990 ; Le Guyader, 1988).

Ceux-ci ont été utilisés à des concentrations variables et sont des oxydants (périodate), des détergents (PRIL, LSS) ou des chélateurs (EDTA, pyrophosphate).

NATURE DU PRODUIT	NOM DU PRODUIT	CONCENTRATIONS TESTEES
Sel de sodium	Périodate de sodium	0,1 %
		0,01 %
		0,001 %
Sel de sodium	Pyrophosphate de sodium	0,01 M
		0,001 M
		0,0001 M
Sel disodique	E.D.T.A. Ethylènediaminetétra- acétique	0,1 %
		0,01 %
		0,001 %
Sel d'azote	Urée	0,1 %
		0,01 %
		0,001 %
Détergent	PRIL	2 %
		0,2 %
Détergent	L.S.S. Lauryl sulfate de sodium	0,1 %
		0,01 %
		0,001 %

Nous avons recherché la concentration maximale non toxique (n'affectant pas la croissance).

Après une nuit à 20 °C, une numération bactérienne est réalisée sur chaque flacon, puis les suspensions sont distribuées dans des tubes stériles de 10 ml auxquels on ajoute les produits chimiques aux concentrations désirées.

Après 5 min de temps de contact et une agitation au vortex, une numération sur chaque tube est faite afin d'évaluer la toxicité.

1.3.2. Résultats

Ci-dessous est indiquée la concentration maximale des produits ne modifiant pas le nombre initial de bactéries, donc sans effet toxique.

1. Périodate de Na :

Souche	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>S. faecium</i>
Concentration produit	0,01 %	< 0,01 %	0,001 %	0,01 %	0,01 %	0,01 %

2. Pyrophosphate de Na : concentration 0,01 M (la plus forte) : aucun effet toxique sur les 6 souches.

3. Urée : concentration 0,1 % : aucun effet toxique sur les 6 souches.

4. E.D.T.A. : concentration 0,1 % : aucun effet toxique sur les 6 souches.

5. P.R.I.L. :

Souche	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>S. faecium</i>
Concentration produit	2 %	2 %	2 %	2 %	< 0,2 %	< 0,2 %

6. L.S.S. :

Souche	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>S. faecium</i>
Concentration produit	0,001 %	0,001 %	0,001 %	0,1 %	0,001 %	0,001 %

1.3.3. Conclusion

Pour les essais de décrochage des bactéries du sédiment, nous avons donc choisi les concentrations suivantes :

Produits	Periodate de Na	Pyropho. de Na	Urée	EDTA	PRIL	L.S.S.
Concentrations	0,005 %	0,1 M	1 %	1 %	0,02 %	0,001 %

II - DECROCHAGE DES BACTERIES DU SEDIMENT

2.1. Matériel et méthodes

Les sédiments proviennent de l'Elorn et sont dilués avant traitement : 10 g de sédiment dans 90 ml d'eau salée à 9 ‰ (dilution 10^{-1}).

A l'action chimique nous avons parfois associé une action physique :

- Ultra-sons (US) : dans une cuve ou avec une sonde.
- Agitation magnétique (AM) : barreau aimanté et agitateur.
- Agitation physique (V) : avec un vortex.

Pour certaines études, nous avons fait des répliqués.

Les numérations bactériennes sont faites par étalement sur une gélose nutritive non sélective (gélose Trypto-caseine soja) incubée 24 heures à 37 °C (recherche de la flore d'intérêt sanitaire).

2.2. Résultats

Plusieurs essais ont été réalisés, le plus souvent sur des répliqués. Les résultats sont présentés sous forme de tableaux avec :

M = Moyenne des répliqués \pm écart-type, en nombre de bactéries par g de sédiment humide.

$$I = \% \text{ de bactéries décrochées} = \frac{\text{Nb bact après traitement} - \text{Nb bact initial}}{\text{Nb. bact. initial}} \times 100$$

ESSAI N° 1 :

Etude de l'action du vortex pendant 2 min et des US pendant 10 min (cuve 50 W, 48 kHz) les tubes contenant le sédiment étant placés dans la cuve remplie d'eau (aucune action chimique).

Sédiments : vase de l'Elorn
5 réplicats.

	M ($\pm \sigma$) sans traitement	M ($\pm \sigma$) après traitement	I
Vortex	5,44 ($\pm 1,18$) 10^5	5,06 ($\pm 1,17$) 10^5	< 0
US	4,96 ($\pm 1,73$) 10^5	6,44 ($\pm 2,79$) 10^5	29,84

ESSAI N° 2 : Sédiment : vase sableuse
US : 10 min dans une cuve (puissance 50 W et fréquence 48 kHz)
AM : Agitation magnétique pendant 10 min à 500 t/min
V : Vortex pendant 10 min

2 réplicats ont été faits.

Traitement		M ($\pm \sigma$)	I
Sans traitement		8,65 ($\pm 0,92$) 10^4	
Pyrophosphate de Na 0,01 M	US	6,15 ($\pm 2,33$) 10^4	< 0
	AM	6,25 ($\pm 0,35$) 10^4	< 0
	V	1,04 ($\pm 0,22$) 10^4	20,23
EDTA 0,1 %	US	7,1 ($\pm 0,14$) 10^4	< 0
	AM	7,45 ($\pm 0,64$) 10^4	< 0
	V	8,0 ($\pm 4,24$) 10^4	< 0
UREE 0,1 %	US	1,0 ($\pm 0,14$) 10^5	15,61
	AM	8,75 ($\pm 1,76$) 10^4	1,16
	V	8,6 ($\pm 1,98$) 10^4	< 0

ESSAI N° 3 : sédiment = vase

US : 10 min dans la cuve
 V : vortex pendant 10 min
 2 : réplicats

Dans cet essai ainsi que le suivant nous avons testé un autre produit : le Tween 80, surfactant, à la concentration de 1 %.

Traitement		M ($\pm \sigma$)	I
Sans traitement		7,6 ($\pm 0,28$) 10^4	
Tween 1 %	US	6,25 ($\pm 0,49$) 10^4	< 0
	V	5,3 ($\pm 0,99$) 10^4	< 0
Pyrophosphate de Na 0,1 M	US	5,0 ($\pm 1,69$) 10^4	< 0
	V	4,6 ($\pm 1,55$) 10^4	< 0
UREE 1 %	US	6,2 ($\pm 1,13$) 10^4	< 0
	V	5,0 ($\pm 1,98$) 10^4	< 0
EDTA 1 %	US	5,3 ($\pm 0,42$) 10^4	< 0
	V	4,55 ($\pm 1,34$) 10^4	< 0
Sans traitement		6,3 ($\pm 1,27$) 10^4	
PRIL 0,02 %	US	7,6 ($\pm 0,42$) 10^4	20,63
	V	8,05 ($\pm 3,32$) 10^4	27,78
Periodate de Na 0,005 %	US	7,6 ($\pm 0,99$) 10^4	20,63
	V	5,6 ($\pm 0,14$) 10^4	< 0
LSS 0,001 %	US	1,56 ($\pm 1,31$) 10^5	147,62
	V	1,14 ($\pm 0,8$) 10^5	80,95

ESSAI N° 4 : Sédiment = Vase sableuse

AM = Agitation magnétique à 600 t/min pendant 1 heure. Pas de réplicat.

Traitement		Nb Bact/ml	I
Sans traitement		6,4 10 ⁴	
Periodate de Na 0,005 %	AM	6,7 10 ⁴	4,69
Pyrophosphate de Na 0,1 M	AM	4,1 10 ⁴	< 0
UREE 1 %	AM	6,3 10 ⁴	< 0
E.D.T.A. 1 %	AM	6,7 10 ⁴	4,69
L.S.S. 0,001 %	AM	7,8 10 ⁴	21,87
Tween 80 1 %	AM	5,5 10 ⁴	< 0

ESSAI N° 5 :

Nous avons testé uniquement deux produits mais en réalisant 3 réplicats sans traitement et 5 réplicats avec traitement.

AM = Agitation magnétique à 600 t/min pendant 1 heure.

Traitement		M ± σ	I
Sans traitement		3,33 (± 0,42) 10 ⁴	
Periodate de Na 0,005 %	AM	2,86 (± 0,50) 10 ⁴	< 0
L.S.S. 0,001 %	AM	3,76 (± 0,68) 10 ⁴	12,91

ESSAI N° 6 :

Ici, seul le L.S.S a été étudié mais avec une action physique différente et des réplicats ont été faits.

Sédiment = vase sableuse

AM = agitation magnétique à 850 t/min pendant 1 heure

US = Ultra-sons pendant 20 s à l'aide d'une macrosonde (400 W, 20 kHz)

Traitement		M ($\pm \sigma$)	I
Sans traitement 5 réplicats		2,56 ($\pm 0,40$) 10^4	
L.S.S. 0,003 % 5 réplicats	AM	2,16 ($\pm 0,83$) 10^4	< 0
L.S.S. 0,003 % 3 réplicats	US	2,66 ($\pm 0,15$) 10^4	7.8

ESSAI N° 7 :

Nous avons testé l'action de 3 autres détergents sur le décrochage des bactéries (sans étude de toxicité) : le triton N 101, le marlophen 83 et le brij 35 à la concentration commune de 0,03 % (utilisée par les chimistes).

Sédiment = vase sableuse

AM = agitation magnétique pendant 1 heure

Vi = broyage par "Virtis" (homogénéiseur à lames) pendant 10 min à 7 500 t/min.
2 réplicats

	M ($\pm \sigma$) sans traitement		M ($\pm \sigma$) après traitement	I
Triton	3,5 ($\pm 0,71$) 10^4	AM	5,0 ($\pm 1,27$) 10^4	42,8
	5,15 ($\pm 0,21$) 10^4	Vi	5,1 ($\pm 0,71$) 10^4	< 0
Marlophen	3,5 ($\pm 0,71$) 10^4	AM	3,95 ($\pm 0,35$) 10^4	14,3
	4,8 ($\pm 0,71$) 10^4	Vi	4,85 ($\pm 1,06$) 10^4	1,0
Brij	3,5 ($\pm 0,71$) 10^4	AM	5,0 ($\pm 0,42$) 10^4	42,8
	4,6 ($\pm 0,28$) 10^4	Vi	4,95 ($\pm 0,49$) 10^4	7,6

III - DISCUSSION ET CONCLUSION

De nombreuses études ont été réalisées concernant l'amélioration des techniques de dénombrement des bactéries associées à du matériel particulaire, ou à des supports solides (cf. bibliographie). Les techniques, très diverses, ne donnent que des résultats faibles quant au nombre de bactéries décrochées (dans la même unité log). Il semble que la nature du sédiment ou du support, ainsi que la présence de matière organique interviennent dans l'efficacité du traitement de décrochage des bactéries.

C'est pourquoi nous avons voulu refaire des tests sur du sédiment, et notamment sur de la vase, dans le cadre d'une problématique sanitaire. Nous avons associé une action physique (agitation, ultra-sons), de façon à dissocier mécaniquement les floccs de matière organique que l'on rencontre fréquemment dans ce type de sédiment, à un agent chimique pour relarguer les bactéries de leur support. L'inocuité de ces traitements sur la viabilité bactérienne a été testée au préalable.

Le produit le plus actif pour le décrochage des bactéries semble être le lauryl sulfate de sodium (L.S.S.). La différence entre les actions physiques associées n'est pas significative. L'augmentation du nombre de bactéries n'est, de toutes façons, que d'un demi-log au maximum. Cette action n'est pas constante, variant certainement selon la nature du sédiment. Dans ce contexte, nous ne recommandons pas de technique particulière. Il faut également garder en mémoire que nous avons effectué les numérations bactériennes sur gélose.

En milieu liquide, le problème de la sous-estimation du nombre de bactéries présentes, du fait de leur aggrégation sur les particules est moins crucial, bien que les dilutions préalables à l'ensemencement soient également faussées (répartition non homogène).

L'utilisation de la conductance-métrie (système Malthus ou autre) résoudrait peut-être ce problème car la mesure est faite directement sur l'échantillon. Il reste que pour une étude bactériologique n'utilisant pas la culture mais l'observation directe au microscope, comme l'épifluorescence pour la flore totale ou l'immunofluorescence pour une recherche orientée, la dissociation bactéries/particules est utile.

BIBLIOGRAPHIE

- ALBRIGHT L.J., Mc CRAE S.K., MAY B.E., 1986.
Attached and free floating bacterioplankton in How-sound, British Columbia, a coastal Marine Fjord. Embayment. Appl. Environ. Microbio., 51, (3) : 614-621.
- BRYANT R.D., COSTERTON J.W., LAISHLEY E.J., 1984.
The role of *Thiobacillus albertis* glycocalyx in the adhesion of cells to elemental sulfur. Can. J. Microbio., 30 : 81-90.
- CORPE W.A., 1973.
Detachment of marine periphytic bacteria from surfaces of glass slides. Dev. Inol. Microbio., 15 : 251-287.
- COSTERTON J.W., GEESEY G.G. and CHENG K.J., 1978.
Comment collent les bactéries ? Pour la Science, 5 : 100-110.
- ELLERY W.N., SCHLEYER M.H., 1984.
Comparison of homogenization and ultrasonication as techniques in extracting attached sedimentary bacteria. Mar. Ecology. Prog. Ser., 15 : 247-250.
- LE GUYADER F., 1988.
Thèse de doctorat de l'Université de Rennes I. Colonisation bactérienne et implantation de *E. coli* dans le sédiment d'origine littorale.
- PULEO J.R., FAVERO M.S., PETERSEN N.J., 1967.
Use of ultra-sonic energy in assessing microbial contamination on surfaces. Appl. Microbiol., 15, (6) : 1345-1351.
- SCHALLENBERG M., KALFF J., and RASMUSSEN J.B., 1989.
Solutions to problems in enumerating sediment bacteria by direct counts. App. Environ. Microbiol., 55, (5) : 1214-1219.
- VELJI M.I., ALBRIGHT L.J., 1986.
Microscopic enumeration of attached marine bacteria of seawater, marine sediment, fecal matter and kelp blade samples following pyrophosphate and ultrasound treatments. Can. J. Microbiol., vol 31 : 121-126.
- YOON W.B., ROSSON R.A., 1990.
Improved method of enumeration of attached bacteria for study of fluctuation in the abundance of attached and free-living bacteria in response to diel variation in seawater turbidity. Appl. Environ. Microbiol, 56, (3) : 595-600.