

Article

« Mesure de la production bactérienne par incorporation de thymidine tritiée »

P. Servais

Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science, vol. 1, n° 3, 1988, p. 217-237.

Pour citer cet article, utiliser l'information suivante :

URI: <http://id.erudit.org/iderudit/705010ar>

DOI: 10.7202/705010ar

Note : les règles d'écriture des références bibliographiques peuvent varier selon les différents domaines du savoir.

Ce document est protégé par la loi sur le droit d'auteur. L'utilisation des services d'Érudit (y compris la reproduction) est assujettie à sa politique d'utilisation que vous pouvez consulter à l'URI <https://apropos.erudit.org/fr/usagers/politique-dutilisation/>

Érudit est un consortium interuniversitaire sans but lucratif composé de l'Université de Montréal, l'Université Laval et l'Université du Québec à Montréal. Il a pour mission la promotion et la valorisation de la recherche. Érudit offre des services d'édition numérique de documents scientifiques depuis 1998.

Pour communiquer avec les responsables d'Érudit : info@erudit.org

Mesure de la production bactérienne par incorporation de thymidine tritiée

Measurement of bacterial production by
 ^3H -thymidine incorporation

P. SERVAIS (1)

RÉSUMÉ

Au cours des dix dernières années, de nombreuses méthodes ont été proposées dans la littérature, afin de mesurer l'activité des bactéries hétérotrophes en milieu aquatique. Parmi celles-ci, la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans le DNA bactérien semble être, à l'heure actuelle, la méthode la plus utilisée. Elle offre, en effet, l'avantage de sa spécificité et d'un protocole expérimental simple. Néanmoins, la conversion des résultats expérimentaux en production de biomasse bactérienne pose un certain nombre de problèmes quant à l'interprétation correcte de cette méthode. Cet article fait le point sur les réponses théoriques et expérimentales qui peuvent être apportées à ces problèmes, ainsi que sur les diverses possibilités d'utilisation de cette méthode.

Mots-clés : *production bactérienne, incorporation ^3H -thymidine, facteur de conversion.*

SUMMARY

During the last ten years, numerous methods have been proposed in the literature to measure the activity of heterotrophic bacteria in aquatic ecosystems. Among these methods, the measurement of tritiated thymidine incorporation proposed by FUHRMAN and AZAM (1980) seems to be, at the present time, the most

(1) Groupe de Microbiologie des Milieux Aquatiques, UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES, Campus de la Plaine, CP 221, Boulevard du Triomphe, B-1050 Bruxelles, Belgique.

useful. It offers in fact the advantage of its specificity for bacteria and its simple experimental procedure.

This method is based on the fact that, in bacteria, DNA synthesis is directly proportional to the division rate. The close relation between growth and DNA synthesis means that measurement of the rate of DNA synthesis is a good way to measure the bacterial growth rate. The DNA synthesis rate is estimated from the incorporation rate of methyl-³H thymidine. Thymidine is one of the four nucleoside precursors of DNA, but it is not a precursor of RNA. At the nanomolar concentrations of (methyl-³H) thymidine used in this experiment only heterotrophic bacteria utilize exogenous thymidine and all active heterotrophic bacteria utilize thymidine. The usual experimental procedure used by the various authors working with this method is that of the FUHRMAN and AZAM (1982). A 5 nM thymidine concentration has been recommended by these authors for the marine environment, but it has been shown that in more eutrophic ecosystems higher concentrations are needed to saturate the incorporation process.

In fact, the conversion of experimental data into bacterial production raises some problems. Among these, two questions are important :

- Which is the relative part of exogenous and endogenous thymidine used for DNA synthesis ? In other words, which is the isotopic dilution factor ?
- The cold trichloroacetic acid (TCA) fraction collected in this experiment includes, besides DNA, proteins and RNA. As some catabolic products of thymidine could be incorporated into RNA or proteins, how much radioactivity is really incorporated into DNA ?

Some theoretical and experimental answers can be given to these questions.

- Comparing their results of thymidine and H³²PO₄⁻ incorporation in DNA of marine bacteria, FUHRMAN and AZAM (1982) found an isotopic dilution factor in the 3-7 range. MORIARTY and POLLARD (1981) have proposed a kinetic approach for estimating the internal pool of thymidine but the accuracy of this method was criticized by RIEMANN *et al.*, (1982) and FUHRMAN and AZAM (1982).
- Usually, in order to determine the part of radioactivity incorporated into DNA, RNA and proteins, the biochemical procedure of LURIA (1960) is used. SERVAIS *et al.*, (1987), after testing this procedure with labeled macromolecules, have concluded that this method is not accurate for such determinations. These authors have proposed an enzymatic procedure based on the use of DNase cell breakage. With this method, they have showed important fluctuations in the percentage of thymidine incorporated into DNA from one ecosystem to another.

The first authors using thymidine incorporation calculated conversion factors based on theoretical data and various assumptions to convert thymidine incorporation data into bacterial cell production. These factors were in the range of 0.2 to 4 10¹⁸ bacteria produced per mole of thymidine incorporated in the cold TCA insoluble material. More recently, because

of the uncertainty or the difficulty in estimating some of the parameters (isotopic dilution, part of thymidine incorporated into DNA, part of thymidine residues in DNA, quantity of DNA per bacterial cells) required for the calculation of the conversion factor, most of the authors have used an experimental conversion factor. It was estimated from the comparison of cell number increase and thymidine incorporation in sterilized, and reinoculated samples. These experimental conversion factors were usually in the range of 0.5 to 10 10^{18} bacteria produced per mole of thymidine incorporated.

The conversion of cells production into bacterial biomass production expressed in carbon - which is finally the important flux to know for the study of the first trophic levels dynamic - requires a knowledge of the average bacterial biovolume and the carbon content per unit of cell volume. The first parameters can be estimated from the observation of bacteria by epifluorescence microscopy. Most authors use $1.2 \cdot 10^{-13}$ gC. μm^{-3} to calculate carbon content of bacteria proposed by WATSON *et al.*, (1977).

The use of the tritiated thymidine incorporation method is not limited to measure bacterial production in the water column; it is also used to measure the activity of fixed bacteria, to study the grazing of bacteria by microzooplankton and in ecotoxicological studies.

Key-Words : bacterial production, ^3H -thymidine incorporation, conversion factor.

INTRODUCTION

Dans les écosystèmes aquatiques, l'utilisation de matière organique par les micro-organismes hétérotrophes - et principalement les bactéries hétérotrophes - est, avec la production de matière organique par les organismes photoautotrophes, un des flux majeurs conditionnant le fonctionnement de ces écosystèmes. Des efforts importants ont récemment été accomplis dans le but de comprendre la dynamique des populations bactériennes hétérotrophes en milieux aquatiques. Dans cette optique, la mesure de l'activité du bactérioplancton a tout naturellement fait l'objet d'une attention particulière et, durant les dernières années, nombre de méthodes indépendantes ont été proposées dans la littérature pour la mesure de l'activité hétérotrophe bactérienne en milieu aquatique.

1 - LES MÉTHODES DE MESURE DE LA PRODUCTION BACTÉRIENNE

Parmi les méthodes proposées afin d'estimer le taux de croissance bactérienne, les plus simples consistent à séparer les bactéries des bactériovores par filtration et à suivre l'accroissement de biomasse bactérienne soit par dénombrement au microscope à épifluorescence (FURHMAN et AZAM, 1980), soit par dosage de l'A.T.P. cellulaire (SIEBURTH *et al.*,

1977). Ces méthodes présentent l'inconvénient de nécessiter de longues incubations et posent le problème de la séparation bactéries-bactériovores par filtration.

HAGSTROM *et al.*, (1979) ont proposé une méthode qui consiste à dénombrer au microscope dans un échantillon les bactéries en division et le nombre total de bactéries. La proportion de bactéries en division dans la population totale (fréquence de division cellulaire - F.D.C.) permet alors de déterminer le taux de croissance moyennant la connaissance d'un facteur de conversion. Celui-ci est établi expérimentalement sur des cultures en chemostat (HAGSTROM *et al.*, 1979 ; NEWELL et CHRISTIAN, 1981). Conceptuellement, cette méthode est très élégante ; en effet, aucune incubation n'est nécessaire et la préparation de la lame de microscope est la seule manipulation expérimentale. De plus, cette méthode est tout à fait spécifique des bactéries. Néanmoins, quelques auteurs (FUHRMAN et AZAM, 1980 ; LARSSON et HAGSTROM, 1982 ; BELL *et al.*, 1983 ; RIEMANN *et al.*, 1984) ont soulevé certains problèmes posés par cette méthode :

- la détermination du facteur de conversion se fait en laboratoire dans des conditions différentes de celles du milieu naturel ;
- le calcul du taux de croissance suppose que les bactéries soient métaboliquement actives. La présence de cellules métaboliquement inactives entraîne une erreur sur la détermination du taux de croissance.

Mais, à notre avis, la critique essentielle à cette méthode réside dans l'extrême difficulté d'un dénombrement microscopique exact des cellules en division.

La plupart des autres méthodes proposées font appel à l'utilisation des traceurs radioactifs. Parmi celles-ci, la plus ancienne consiste à mesurer l'incorporation de ^{14}C -bicarbonate à l'obscurité (SOROKIN, 1961, 1964 ; ROMANENKO, 1964 ; KUSNETSOV et ROMANENKO, 1966) par les voies anaplérotiques. Cette méthode pose deux problèmes importants : la variabilité du rapport entre la fixation anaplérotique de bicarbonate et l'assimilation totale de carbone (OVERBECK et DALEY, 1973 ; OVERBECK, 1974) nécessaire au calcul de l'utilisation totale de matière organique et, d'autre part, sa non-spécificité vis-à-vis des bactéries hétérotrophes.

Une autre méthode proposée par MONHEIMER (1972, 1974) consiste à mesurer le taux d'incorporation de ^{35}S -sulfate dans les protéines ; en connaissant la teneur en soufre des protéines bactériennes, le taux de synthèse protéique peut être calculé (JORDAN et PETERSON, 1978 ; JORDAN et LIKENS, 1980 ; CUHEL *et al.*, 1981, 1982 ; PEDROS-ALIO et BROCK, 1982). Cette méthode soulève un certain nombre de problèmes et d'incertitudes, tels que : la spécificité vis-à-vis des bactéries (la contribution algale à l'incorporation de sulfate n'est pas négligeable), la difficulté d'évaluer la contribution des composés organiques soufrés aux besoins en soufre des bactéries (ROBERTS *et al.*, 1955), la variabilité du rapport C/S des bactéries (ZOBELL, 1963 ; JORDAN et PETERSON, 1978).

KARL (1979) a proposé de mesurer l'incorporation de ^3H -adénine pour déterminer le taux de synthèse du RNA, par la suite cette méthode a été modifiée pour mesurer également la synthèse du DNA (KARL, 1981). Cette méthode n'est malheureusement pas spécifique des bactéries ; en effet, l' ^3H -adénine est assimilée aussi bien par les bactéries hétérotrophes que par les algues (KARL *et al.*, 1981).

Tableau 1.- Comparaison de la validité de quelques méthodes de mesure de production bactérienne en milieu aquatique (AZAM et FUHRMAN, 1984).

Table 1.- Comparison of the suitability of some methods for measuring bacterial production in aquatic ecosystems (AZAM and FUHRMAN, 1984).

METHODES	Critères de validité			
	1	2	3	4
Accroissement de la biomasse bactérienne	++	++	-	-
Accroissement de la concentration en ATP	-	+	-	+
F.D.C.	++	+	++	++
Assimilation de sulfate marqué	--	+	+	+
Incorporation d'(³ H)-adenine dans le RNA	--	--	+	++
Incorporation d'(³ H)-thymidine dans le DNA	++	+	+	++

Critères de validité

1. Spécificité vis-à-vis des bactéries.
 2. Facteur de conversion indépendant du taux de croissance.
 3. Non-modification du taux de croissance par la manipulation.
 4. Sensibilité suffisante pour permettre de courtes incubations.
- (++) Critère respecté par la méthode.
 (+) Critère probablement respecté par la méthode.
 (-) Critère probablement non respecté par la méthode.
 (--) Critère non respecté par la méthode.

Criteria of suitability

1. Specificity for bacteria.
 2. Conversion factor independent of the growth rate.
 3. No modification of the growth rate due to experimental manipulation.
 4. Sensitive enough to allow short incubations.
- (++) Criterion met by the method.
 (+) Criterion probably met by the method.
 (-) Criterion probably not met by the method.
 (--) Criterion not met by the method.

Pour leur part, FUHRMAN et AZAM (1980, 1982) ont proposé de mesurer l'incorporation de thymidine tritiée dans le DNA bactérien comme méthode d'évaluation de la production bactérienne. La thymidine offre l'avantage d'être un précurseur du DNA et non du RNA et, d'autre part, seuls les procariotes disposent des voies enzymatiques permettant son incorporation directe dans le matériel génétique.

A côté des méthodes évoquées ci-dessus, qui permettent l'estimation soit de l'assimilation totale de carbone par les bactéries, soit de la production bactérienne, d'autres techniques ont été proposées pour la

mesure de certaines activités particulières des bactéries hétérotrophes. Parmi celles-ci :

- la mesure de l'uptake de substrats marqués (WRIGHT et HOBBIE, 1965, 1966 ; WILLIAMS, 1970 ; BILLEN *et al.*, 1980) ;
- la mesure des activités exoenzymatiques (SOMVILLE et BILLEN, 1983 ; SOMVILLE, 1984 ; CHROST *et al.*, 1986 ; CHROST et KRAMBECK, 1986) ;
- la mesure de l'activité des systèmes transporteurs d'électron (ETS) (CHRISTENSEN et PACKARD, 1979 ; CHRISTENSEN *et al.*, 1980).

Dans une revue des méthodes de la production bactérienne (AZAM et FUHRMAN, 1984) montrent que seules deux méthodes semblent répondre favorablement aux critères de validité sélectionnés (tableau 1). Il s'agit des mesures de la fréquence de division cellulaire (F.D.C.) et de l'incorporation de thymidine dans le DNA. Certains auteurs (CHRISTIAN *et al.*, 1982 ; NEWELL et FALLON, 1982 ; FUHRMAN et AZAM, 1982 ; BELL *et al.*, 1983 ; RIEMANN *et al.*, 1984 ; RIEMANN et SONDERGAARD, 1984) ont récemment comparé les résultats d'activité bactérienne obtenus par ces différentes méthodes dans un même biotope. Les corrélations entre ces différentes méthodes sont peu souvent satisfaisantes, ce qui montre que certains problèmes méthodologiques ne sont pas résolus. Néanmoins, les meilleures corrélations obtenues sont celles effectuées entre la méthode F.D.C. et celle d'incorporation de thymidine dans le DNA (NEWELL et FALLON, 1982 ; RIEMANN et SONDERGAARD, 1984), les deux méthodes les plus fiables selon AZAM et FUHRMAN (1984). Dans la revue des méthodes appliquées à l'écologie bactérienne aquatique de STALEY et KONOPKA (1985), l'incorporation de thymidine tritiée est citée comme la méthode la plus utilisée actuellement pour la mesure de la production bactérienne en milieu aquatique. Cette affirmation est confirmée par les nombreuses publications récentes, dans lesquelles les autres utilisent cette méthode (ALLDREDGE *et al.*, 1986 ; EDWARDS et MEYER, 1986 ; HANSON *et al.*, 1986 ; JEFFREY et PAUL, 1986 ; MAC DONOUGH *et al.*, 1986 ; MALONE *et al.*, 1986 ; SCAVIA *et al.*, 1986 ; SANDERS et PORTER, 1986 ; ALBRICHT et MC CRAE, 1987 ; BILLEN et FONTIGNY, 1987 ; PALUMBO *et al.*, 1987).

Cette méthode offre l'avantage de la simplicité de son protocole expérimental, mais un certain nombre de problèmes soulevés par son interprétation méritent débat.

2 - PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'INCORPORATION DE THYMINES TRITIÉES

La méthode proposée par TOBIN et ANTHONY (1978) et revue par FUHRMAN et AZAM (1980, 1982) consiste à évaluer la production de biomasse bactérienne à partir du taux de synthèse du DNA bactérien. La croissance chez les micro-organismes est un processus complexe comprenant la synthèse des protéines, RNA et DNA, aboutissant à la division cellulaire. La synthèse du DNA est directement proportionnelle au taux de division cellulaire chez les bactéries. Le taux de synthèse du DNA est estimé par la mesure du taux d'incorporation de (méthyl-³H)-thymidine dans le DNA.

La thymidine est un des quatre nucléosides précurseurs du DNA ; mais à la différence des autres nucléosides, la thymidine n'est pas précurseur du RNA.

Chez les micro-organismes, la voie habituelle de synthèse du dTMP, précurseur pour la synthèse du DNA (figure 1) est la synthèse de novo à partir de dUMP. L'utilisation de thymidine exogène (salvage pathway) nécessite la présence d'une enzyme, la thymidine kinase, qui catalyse la synthèse de dTMP à partir de thymidine.

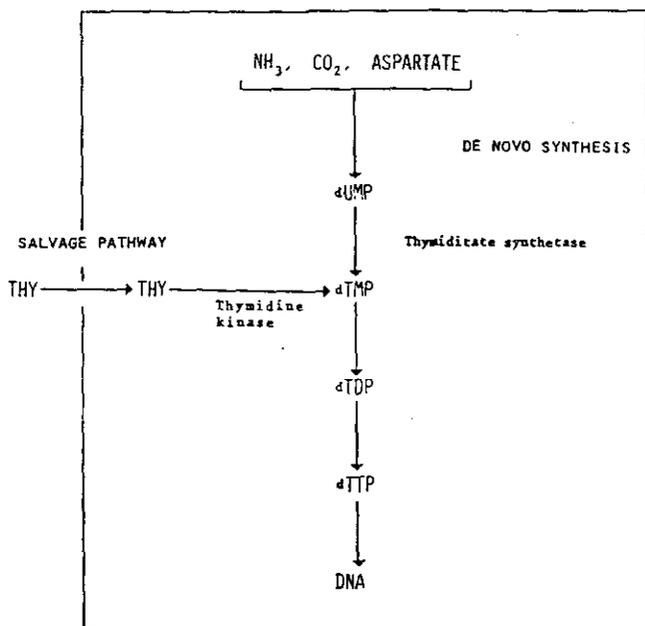


Figure 1.- Voies de synthèse du DNA par la synthèse endogène et par l'utilisation de thymidine extracellulaire.

Figure 1.- Synthesis pathways of DNA by endogenous synthesis and by the utilisation of extracellular thymidine.

Cette enzyme n'existe pas chez tous les micro-organismes : elle manque ainsi chez de nombreux eucaryotes (MORIARTY, 1984). GRIVELL et JACKSON (1968) ont montré son absence chez des champignons et GLASER *et al.*, (1973), chez des cyanobactéries.

Par micro-autoradiographie, FUHRMAN et AZAM (1982) ont montré que dans les eaux naturelles aérobies, l'incorporation active de thymidine exogène, à des concentrations nanomolaires, est le fait des seules bactéries et de toutes les bactéries actives. Plus récemment, BERNS (1985) a testé par micro-autoradiographie la faculté d'incorporer la (méthyl-³H)-thymidine à très faible concentration d'une série de micro-organismes présents dans un lac : algues vertes, diatomées, cyanobactéries et bactéries. Il a montré que seules les bactéries hétérotrophes pouvaient incorporer la thymidine de manière significative. Ceci démontre la parfaite spécificité de l'incorporation de thymidine tritiée vis-à-vis des bactéries hétérotrophes.

La (méthyl-³H)-thymidine semble le meilleur composé pour ce type d'expérience parmi les différentes formes de thymidine marquée. En effet, sa conversion en uridine lui fait perdre son marquage et évite ainsi un

marquage important du RNA. Toutefois, le groupe méthyl tritié peut être transféré à une large variété de composés, ce qui peut conduire à un certain marquage d'autres métabolites que le DNA.

3 - PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

La majorité des auteurs utilise un protocole expérimental basé sur celui proposé par FUHRMAN et AZAM (1980, 1982), dont les grandes lignes sont les suivantes :

Un échantillon d'eau du milieu à étudier est incubé, à température in situ et à l'obscurité, en présence de (méthyl-³H)-thymidine de radioactivité spécifique élevée (> 50 Curies.mmole⁻¹). En fin d'incubation, une aliquote est prélevée et ajoutée à une quantité identique d'acide trichloroacétique (TCA) 10 % froid (0 °C). Le TCA à concentration finale 5 % rend les cellules perméables aux petites molécules. Il précipite sans hydrolyser les macromolécules (HOLIBAUGH et al., 1980). Le précipité est récolté sur un filtre de porosité 0,2 à 0,45 µm (acétate de cellulose ou Nucléopore), selon les auteurs. Après rinçage du filtre au TCA 5 % froid, la radioactivité associée à celui-ci est mesurée par scintillation liquide après dissolution du filtre.

Quelques remarques s'imposent à propos de ce protocole :

- Dans le cas des bactéries marines, FUHRMAN et AZAM (1980) préconisent une concentration en (méthyl-³H)-thymidine de 5 nM pour saturer le processus d'assimilation. Dans les lacs, RIEMANN et al., (1982) et SCAVIA et al., (1986) montrent que des concentrations d'au moins 10 nM sont nécessaires. En rivière, nous avons trouvé que des concentrations d'au moins 15 nM sont indispensables pour atteindre la saturation (figure 2), mais d'autres auteurs (EDWARDS et MEYERS, 1986) citent des concentrations saturantes allant jusqu'à 63 nM. Il apparaît donc comme très important de déterminer dans chaque milieu la concentration en thymidine tritiée nécessaire pour saturer le processus d'assimilation. En effet, l'emploi d'une concentration inférieure à la concentration saturante entraîne une sous-estimation du taux de synthèse du DNA.
- Il est important de vérifier la période de linéarité de l'incorporation du marqueur dans la fraction insoluble du TCA froid et de choisir le temps d'incubation dans cette période de linéarité. Celle-ci est variable de milieu à milieu et dépend de l'activité bactérienne dans le milieu.
- Il semble que l'utilisation de filtres en polycarbonate de préférence à ceux en acétate de cellulose permette de diminuer le background et d'augmenter la reproductibilité des résultats entre réplicats.
- Certains auteurs, tels FUHRMAN et AZAM (1980), ont préconisé d'hydrolyser le DNA après filtration en plaçant la fiole à scintillation contenant le filtre dans un bain d'eau bouillante durant 20 minutes en présence d'acide chloridrique 5 N, afin de minimiser l'auto-absorption. Selon RIEMANN et SONDERGAARD (1984), ce traitement ne modifie pas les valeurs de comptage de radioactivité ; cette pratique est omise par la plupart des auteurs.

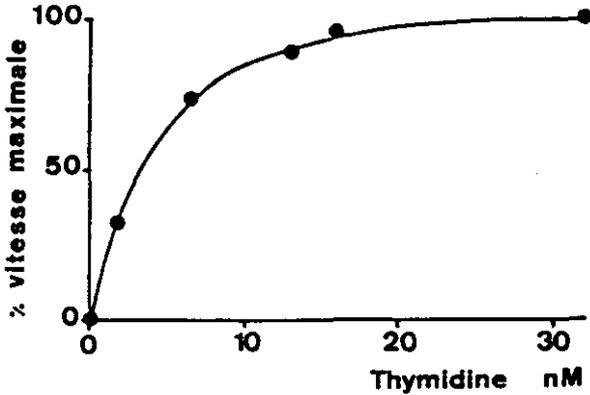


Figure 2.- Relation entre la vitesse d'incorporation de thymidine dans la fraction insoluble au TCA froid et la concentration en ^3H -thymidine ajoutée (Echantillon - Escaut 11.03.1983).

Figure 2.- Relationship between the thymidine incorporation rate in the cold TCA insoluble material and the added ^3H -thymidine concentration (Sample - Scheldt 11.03.1983).

4 - INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS D'INCORPORATION DE THYMINES TRITIÉES

Si le protocole expérimental des mesures d'incorporation de thymidine tritiée dans la fraction insoluble au TCA froid est simple, la conversion de ces mesures en production de cellules bactériennes pose un certain nombre de problèmes :

- (i) Quelle est la part relative de la thymidine endogène et de la thymidine exogène dans la synthèse du DNA ? En d'autres termes, quel est le facteur de dilution de la thymidine tritiée (exogène) dans la thymidine synthétisée par la cellule ?
- (ii) La fraction insoluble dans le TCA froid comprend, outre les acides nucléiques, les protéines. Dans la mesure où certains produits du catabolisme de la thymidine pourraient être incorporés au RNA ou aux protéines, quelle est la part de radioactivité incorporée effectivement dans le DNA ?
- (iii) Quelle est la fraction des résidus de thymidine dans l'ensemble des nucléosides utilisés pour la synthèse du DNA et quelle est la quantité de DNA par cellule bactérienne ?

Voyons les réponses théoriques et expérimentales qui peuvent être apportées à ces interrogations.

4-1 La dilution isotopique

Même en travaillant à ces concentrations saturantes en thymidine exogène, une certaine dilution de celle-ci dans le pool de thymidine endogène est possible et introduit une difficulté dans l'interprétation quan-

titative de la mesure. Par exemple, ROSENBAUM-OLIVIER et ZAMENHOFS (1972) estiment que l'intervention de la thymidine exogène dans la synthèse du DNA chez *Escherichia coli* représente seulement 35 à 65 % de la synthèse totale. FUHRMAN et AZAM (1982) en comparant les résultats de leurs mesures d'incorporation de thymidine à celles obtenues par incorporation de $H^{32} PO_4^-$ dans le DNA estiment la dilution isotopique à un facteur 3-7 pour des bactéries marines. MORIARTY et POLLARD (1981) proposent une approche cinétique (effet de l'addition de précurseur froid sur le taux d'incorporation dans le DNA) pour la détermination des pools internes de thymidine. MORIARTY et POLLARD (1982), POLLARD et MORIARTY (1984), BELL (1986) ont souligné la variabilité des résultats obtenus par cette méthode et la nécessité de déterminer ces pools lors de chaque mesure.

Ils ont, d'autre part, mis en évidence un effet de l'état de croissance des bactéries et de la concentration en thymidine marquée sur le taux de dilution. Ce dernier effet est attribué à une inhibition de la thymidilate synthétase (figure 1) par la thymidine (MORIARTY, 1984).

L'approche de MORIARTY et POLLARD (1981) a été contestée par FUHRMAN et AZAM (1982) et RIEMANN *et al.*, (1982) ; la signification exacte des résultats de cette méthode souffre en effet de nombreuses incertitudes.

4-2 Spécificité de la fraction TCA insoluble vis-à-vis du DNA

La fraction insoluble dans le TCA froid comprend, outre le DNA, les protéines et le RNA. Dans la mesure où certains produits du catabolisme de la thymidine peuvent être incorporés aux protéines et au RNA, il est important de s'interroger sur ce que représente effectivement cette fraction TCA insoluble. Pour le savoir, FUHRMAN et AZAM (1982) ont proposé l'utilisation d'un schéma de séparation biochimique tiré de LURIA (1960) qui peut être résumé comme suit :

La fraction insoluble au TCA 5 % froid comprend les protéines, le DNA et le RNA (fraction COLD TCA). L'hydrolyse à chaud (95 ° - 100 °) pendant 1 heure dans le TCA 5 % détruit les acides nucléiques, sans altérer les protéines (fraction HOT TCA). L'hydrolyse à 60 °C durant 1 heure dans le NaOH 0.5 N détruit le RNA sans altérer ni le DNA, ni les protéines qui sont reprecipitées dans le TCA 5 % froid (fraction NaOH) (figure 3).

De nombreux auteurs ont utilisé ce schéma de séparation ; les résultats obtenus par une série d'entre eux sont présentés au tableau 2.

Ce tableau montre la variabilité très grande de la répartition de la radioactivité entre les différentes fractions ; de plus, KARL (1982) a montré que les pourcentages dans les différentes fractions variaient en fonction de la concentration en traceur radioactif.

En réalité, ce schéma de fractionnement biochimique résiste mal à l'analyse aussi bien théorique qu'expérimentale. La justification de l'utilisation des hydrolyses acide et basique est assez pauvre dans la littérature, les auteurs se réfèrent soit à LURIA (1960), soit à MUNRO et FLECK (1966). Le premier cite DAVIDSON (1953) qui se base, pour sa part, sur les travaux de SCHNEIDER (1945). L'article de MUNRO et FLECK (1966) fait, pour sa part, une revue bibliographique de travaux antérieurs à 1965 sur l'extraction des acides nucléiques des tissus animaux et végétaux. De cette revue, il ressort que les conditions optimales de

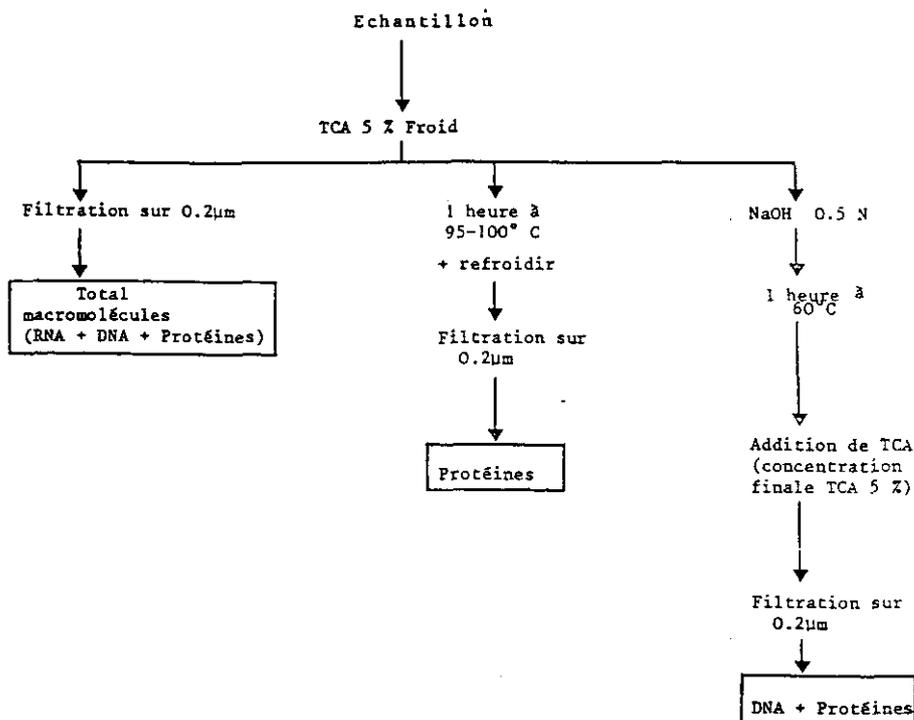


Figure 3.- Schéma de fractionnement biochimique LURIA (1960).

Figure 3.- Biochemical fractionation method of LURIA (1960).

Tableau 2.- Répartition de la radioactivité incorporée dans le DNA, le RNA et les protéines selon le schéma de fractionnement biochimique de LURIA (1960) (en % de la fraction insoluble au TCA froid).

Table 2.- Distribution of radioactivity incorporated into DNA, RNA and proteins estimated by the biochemical fractionation method of LURIA (1960) (results expressed in % of cold TCA insoluble material).

AUTEURS	MILIEU	DNA	RNA	PROTEINES
HOLLIBAUGH <i>et al.</i> , (1980)	mer	82	-	-
FUHRMAN <i>et</i> AZAM (1980)	mer	80-95	très faible	5-20
FUHRMAN <i>et</i> AZAM (1980)	mer	78-90	-	15
RIEMANN <i>et al.</i> , (1982)	lacs	variable	26-49	14-49
RIEMANN <i>et</i> SONDERGAARD } (1984)	mers	74-100	-	-
	lacs	60-80	-	-
KARL (1982)	mer	69	18	13
	eaux douces	27-35	52-60	11-13
	souches pures de bactéries marines (<i>Serratia</i> <i>marinorubra</i>)	89-94	5-11	0-1
HANSON <i>et</i> LOWERY (1983)	mer (Antartique)	90-98	-	-
BELL <i>et</i> KUPARINEN (1984)	lacs	28-81	7-50	2-22
LOVELL <i>et</i> KONOPKA (1985)	lacs	68-86	-	-
SCAVIA <i>et al.</i> , (1986)	lacs	40-60	-	-

l'utilisation de l'hydrolyse acide à chaud comme méthode d'extraction du DNA n'ont pas été suffisamment testées et que ces conditions varient de tissus à tissus.

La validité du schéma de fractionnement biochimique de LURIA (1960) a été testée en utilisant du DNA marqué au ^{14}C (thymidine-2 ^{14}C -DNA) (SERVAIS *et al.*, 1987). Ces expériences ont mis en évidence que dans les conditions expérimentales précitées :

- (i) l'hydrolyse acide du DNA est incomplète,
- (ii) l'hydrolyse acide altère en partie les protéines.

Ceci montre que le schéma de fractionnement chimique classiquement employé n'offre pas la spécificité nécessaire à la détermination de la part de thymidine incorporée dans le DNA. Dans ces conditions, les résultats présentés au tableau 2 n'ont sans doute pas grande signification et d'autres méthodes de fractionnement doivent être recherchées.

SCAVIA *et al.*, (1986) ont proposé de déterminer la radioactivité incorporée dans le DNA par différence entre l'incorporation dans un échantillon incubé en présence et en l'absence de mitomycine C ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$), un inhibiteur de la synthèse du DNA. Il apparaît néanmoins peu probable que l'addition de mitomycine C ne modifie pas l'incorporation du traceur radioactif dans les autres macromolécules.

Récemment, SERVAIS *et al.*, (1987) ont développé une technique basée sur l'utilisation de DNase après traitement des cellules aux ultrasons en présence de Triton. Le traitement des cellules bactériennes aux ultrasons en présence de Triton - un agent tensioactif non-ionique - a été proposé par PAUL et MYERS (1982) pour rendre accessible le DNA bactérien aux agents chimiques spécifiques. Après ce traitement, l'addition de DNase - enzyme qui hydrolyse spécifiquement le DNA - permet d'éliminer de la fraction macromoléculaire la radioactivité qui était associée au DNA. La différence de radioactivité associée à la fraction isolable au TCA 5 % froid avant et après action de la DNase représente la radioactivité effectivement contenue dans le DNA.

Ce traitement à la DNase a été appliqué après incorporation de ^3H -thymidine dans les bactéries d'une large gamme de milieux naturels (SERVAIS *et al.*, 1987) ; les résultats montrent une grande variabilité de la fraction de thymidine incorporée dans le DNA de milieu à milieu. D'autre part, des valeurs très basses ont été mises en évidence dans le cas d'échantillons incubés longuement où les bactéries sont en condition de starvation, le carbone organique biodégradable étant épuisé. Dans ces conditions, on peut supposer que la thymidine additionnée est beaucoup plus largement utilisée, en l'absence d'autres substrats, pour la synthèse d'autres macromolécules que le DNA qu'en conditions de croissance régulière.

En conclusion, il semble que le schéma de fractionnement de LURIA (1960) utilisé par de nombreux auteurs doit être sérieusement mis en doute. Les premiers résultats obtenus par une méthode enzymatique montrent une variabilité de milieu à milieu et au cours du temps lors d'une incubation et mettent en évidence l'importance du problème d'incorporation de thymidine dans les autres macromolécules que le DNA.

4-3 Fraction des résidus thymidines parmi les nucléosides utilisés pour la synthèse du DNA et quantité de matière par bactérie

La conversion de la mesure d'incorporation de thymidine dans le DNA en nombre de cellules produites nécessite encore la connaissance de deux facteurs : le pourcentage de résidus thymidines dans le DNA et la quantité de DNA par cellule. MANDELSTAM et MC QUILLEN (1973) citent des valeurs de 14 à 35 % pour la proportion de thymidine dans le total des nucléosides. La plupart des autres utilisant l'incorporation de thymidine considèrent une valeur moyenne de 25 %.

La quantité de DNA par bactérie est plus variable ; le tableau 3 reprend différentes gammes de valeurs trouvées dans la littérature.

Tableau 3.- Quantité de DNA par bactérie.

Table 3.- Quantity of DNA per bacterium.

AUTEURS	TYPES	gDNA.cellule ⁻¹
STANIER <i>et al.</i> , (1976)	toutes espèces	0,75 - 4,0.10 ⁻¹⁵
GILLIS <i>et al.</i> , (1970)	" "	" "
WALLACE et MOROVITZ (1973)	" "	1,6 - 6 10 ⁻¹⁵
FUHRMAN et AZAM (1982)	marines	1,2 - 4,7.10 ⁻¹⁵
MORIARTY et POLLARD (1982)	sédiments marins	4,2.10 ⁻¹⁵
MC COY et OLSON (1985)	eau potable	8,2.10 ⁻¹⁵

4-4 Conversion des résultats expérimentaux en production cellulaire

Les premiers auteurs utilisant l'incorporation de thymidine ont calculé un facteur de conversion de l'incorporation de thymidine dans la fraction TCA insoluble en nombre de cellules produites en se basant essentiellement sur des données théoriques et des hypothèses.

Ainsi FUHRMAN et AZAM (1980) calculent un facteur de conversion compris entre 0,2.10¹⁸ et 1,3.10¹⁸ cellules produites par mole de thymidine incorporée en négligeant l'éventuelle dilution isotopique et en considérant que 80 % de la thymidine est incorporée dans le DNA (pourcentage déterminé par la spéciation biochimique), que les résidus de thymidine représentent 25 % des nucléosides composant le DNA et que le poids de DNA par cellule varie entre 7,47.10⁻¹⁶ et 4,82.10⁻¹⁵ g.

En 1982, suite à des mesures expérimentales de la dilution isotopique (par comparaison avec l'incorporation de H³² PO₄⁼ dans le DNA) et du poids de DNA par cellule (valeur moyenne obtenue 2,6.10⁻¹⁵ g DNA.cell⁻¹), FUHRMAN et AZAM (1982) proposent d'utiliser un facteur de conversion compris entre 1,7.10¹⁸ et 2,4.10¹⁸ bactéries par mole de thymidine incorporée dans la fraction TCA insoluble.

Malgré la mise en garde des auteurs qui signalent que la valeur du facteur de conversion dépend certainement du milieu et des conditions d'expérimentation, de nombreux auteurs ont utilisé ce facteur de conversion ou d'autres très proches dans des milieux très divers (tableau 4).

Tableau 4.- Facteurs calculés par divers auteurs pour la conversion des mesures d'incorporation de thymidine dans la fraction insoluble au TCA froid en nombre de cellules bactériennes produites.

Table 4.- Conversion factors calculated by some authors to convert measurements of thymidine incorporation in cold TCA insoluble material into bacterial cells production.

AUTEURS		MILIEU	CELL. FORMEES PAR MOLE THYMIDINE INC. DANS TCA INSOLUBLE
FUHRMAN et AZAM	(1980)	mer	0,2 - 1,3 $\cdot 10^{18}$
FUHRMAN et AZAM	(1982)	mer	1,7 - 2,4 $\cdot 10^{18}$
RIEMANN et al.,	(1982)	lac	1,7 $\cdot 10^{18}$
DUCKLOW	(1982)	estuaire	0,35 $\cdot 10^{18}$
RIEMANN et al.,	(1984)	mer	0,65 - 1,5 $\cdot 10^{18}$
BELL et KUPARINEN	(1984)	lac	1,6 - 2,4 $\cdot 10^{18}$
HOBBIE et COLE	(1984)	milieu artificiel	1,4 $\cdot 10^{18}$
LOVELL et KONOPKA	(1985)	lac	2,1 $\cdot 10^{18}$
MALONE et al.,	(1986)	estuaire	2 $\cdot 10^{18}$
HANSON et al.,	(1986)	zone côtière	4 $\cdot 10^{18}$

Tableau 5.- Facteurs déterminés expérimentalement pour la conversion des mesures d'incorporation de thymidine dans la fraction insoluble au TCA froid en nombre de cellules bactériennes produites.

Table 5.- Experimental conversion factors to convert measurements of thymidine incorporation in cold TCA insoluble material into bacterial cells production.

AUTEURS		MILIEU	CELL. FORMEES PAR MOLE THYMIDINE INC. DANS TCA INSOLUBLE
KIRCHMANN et al.,	(1982)	mer	0,5 - 290 $\cdot 10^{18}$
BELL et al.,	(1983)	lac	1,9 - 2,2 $\cdot 10^{18}$
DUCKLOW et HILL	(1985)	mer	2,8 - 6,2 $\cdot 10^{18}$
SCAVIA et al.,	(1986)	lac	4,7 - 12,3 $\cdot 10^{18}$
SERVAIS	(1986)	rivière (Meuse)	0,5 $\cdot 10^{18}$
SERVAIS	(non publié)	rivière (Escaut) (Rupel)	1,25 $\cdot 10^{18}$
BELL	(1986)	lac	1,5 $\cdot 10^{18}$
SANDERS et PORTER	(1986)	lac	1,0 - 1,2 $\cdot 10^{18}$
BILLEN et FONTIGNY	(1987)	lac	9,8 $\cdot 10^{18}$
		mer	1,7 $\cdot 10^{18}$
RIEMANN et al.,	(1987)	mer	1,1 $\cdot 10^{18}$
MARTINEZ et al.,	(1987)	rivière (Ebro)	4,4 $\cdot 10^{18}$

Plus récemment, devant l'incertitude de certaines données utilisées pour ce calcul, telles que la dilution isotopique ou la part de thymidine réellement incorporée dans DNA, d'autres auteurs ont tenté une détermination empirique de ce facteur de conversion. Pour ce faire, un échantillon d'eau du milieu est stérilisé par filtration sur membrane

de porosité 0,2 μm et réensemencé par une aliquote d'eau brute du milieu. L'accroissement du nombre des bactéries ainsi que l'incorporation de thymidine dans la fraction insoluble au TCA sont suivis au cours du temps. La relation entre l'accroissement du nombre de bactéries et l'incorporation permet de déterminer un facteur de conversion empirique. Les valeurs de ce facteur obtenues par différents auteurs sont reprises au tableau 5.

A l'exception des valeurs très élevées trouvées par KIRCHMAN *et al.*, (1982), qui s'expliquent sans doute par le fait qu'une concentration non saturante en thymidine a été utilisée, les valeurs de facteur de conversion déterminées expérimentalement varient entre $0,5 \cdot 10^{18}$ et $12 \cdot 10^{18}$ bactéries produites par mole de thymidine incorporée dans la fraction TCA insoluble.

La variabilité de ce facteur de milieu à milieu n'est pas surprenante puisque celui-ci intègre à la fois des différences méthodologiques (concentration en ^3H -thymidine utilisée, par exemple) et des différences au niveau de la biochimie et de la physiologie des bactéries impliquées. SCAVIA *et al.*, (1986) ont même mis en évidence des fluctuations temporelles de ce facteur dans le lac Michigan, qui correspondent probablement à des variations de la population bactérienne dominante. Vu cette variabilité, il semble indispensable de déterminer empiriquement pour chaque milieu et le plus souvent possible la valeur de ce facteur de conversion, afin d'interpréter correctement les résultats expérimentaux obtenus.

4-5 Conversion en production de biomasse bactérienne

Le facteur de conversion discuté ci-dessus permet de calculer des valeurs de production bactérienne en nombre de bactéries produites à partir des résultats expérimentaux bruts. La conversion des valeurs de production cellulaire en production de biomasse exprimée en carbone - qui est finalement le flux important à connaître pour l'étude de la dynamique des premiers niveaux de la chaîne trophique - nécessite en outre la connaissance du volume cellulaire et du contenu en carbone par unité de volume cellulaire.

Le volume cellulaire bactérien est en général déterminé par observation au microscope à épifluorescence qui est actuellement la méthode la plus utilisée pour l'étude des bactéries en milieux aquatiques. L'acridine orange, comme proposée par DALEY et HOBBIE (1975) et HOBBIE *et al.*, (1977), est généralement employée comme colorant fluorescent de préférence à l'isothiocyanate de fluorescéine (FLIERMANS *et al.*, 1975), l'euchrysin (JONES et SIMON, 1975) ou encore le 4-6-diaminidino-2-phénylindole (DAPI) (PORTER et FEIG, 1980). En règle générale, deux types de bactéries peuvent être observés dans les milieux aquatiques naturels, d'une part des bactéries sphériques et d'autre part des bâtonnets. Les volumes sont calculés en traitant les premières comme des sphères et les secondes comme des cylindres (WATSON *et al.*, 1977 ; FUHRMAN *et al.*, 1980).

Le contenu en carbone par unité de volume cellulaire dans des bactéries a été estimé par une série d'auteurs ; le tableau 6 reprend les valeurs citées dans la littérature récente. A l'exception des valeurs curieusement élevées de BRATBAK et DUNDAS (1984) et BRATBAK (1985) obtenues pour des souches pures de bactéries, la fourchette est assez étroite ($0,75 - 1,65 \cdot 10^{-13}$ g C. μm^{-3}) et correspond à celle obtenue par calcul, en considérant une densité du matériel cellulaire de 1,1, une teneur en eau de 70 à 80 % et un contenu en carbone de la matière organique de 40 %.

La très grande majorité des auteurs utilise la valeur médiane $1,2 \cdot 10^{-13}$ g C. μm^{-3} , celle-ci mérite néanmoins d'être vérifiée dans une large gamme de milieux aquatiques.

Tableau 6.- Contenu en carbone par unité de volume cellulaire.

Table 6.- Carbon content per unit of cell biovolume.

MILIEUX	gC. μm^{-3}	AUTEURS
Marin côtier	$0,87 \cdot 10^{-13}$	FERGUSON et RUBLEE (1976)
Marin	$1 \cdot 10^{-13}$	WILLIAMS et CARLUCCI (1976)
Marin ouvert	$1,21 \cdot 10^{-13}$	WATSON <i>et al.</i> , (1977)
Marin côtier	$1,65 \cdot 10^{-13}$	HAGSTROM <i>et al.</i> , (1979)
Marin côtier	$1,20 \cdot 10^{-13}$	FUERMAN et AZAM (1980)
Lac oligotrophe	$1,0 \cdot 10^{-13}$	JORDAN et LIKENS (1980)
Lac entrophe et mésotrophe	$0,75 \cdot 10^{-13}$	KRAMBECK <i>et al.</i> , (1981)
Souche pure		
<i>Pseudomonas putida</i>		
<i>Escherichia coli</i>	$2,2 \cdot 10^{-13}$	BRATBAK et DUNDAS (1984)
<i>Bacillus subtilis</i>		
<i>Pseudomonas putida</i>	$5,6 \cdot 10^{-13}$	BRATBAK (1985)
Lac mésotrophe	$1,06 \cdot 10^{-13}$	NAGATA (1986)

5 - CONCLUSION

Grâce à la simplicité de son protocole expérimental, la méthode d'incorporation de thymidine tritiée a retenu durant les cinq dernières années l'attention des nombreux auteurs pour la mesure de la production bactérienne en milieu aquatique. Outre sa simplicité, cette méthode basée sur la mesure du taux de synthèse du DNA offre l'avantage d'être tout à fait spécifique des bactéries hétérotrophes. Néanmoins, la conversion des résultats expérimentaux bruts en production cellulaire pose des problèmes sur lesquels nous avons fait le point. De cet état de la question, il ressort que de nombreuses interrogations subsistent qui ne permettent pas le calcul théorique d'un facteur de conversion. Par contre, la détermination expérimentale de ce facteur de conversion, même si elle alourdit le travail expérimental, n'en paraît pas moins beaucoup plus judicieuse.

Pour autant qu'elle soit employée correctement (concentration en thymidine exogène saturante et temps d'incubation appropriés), qu'un facteur de conversion expérimental soit déterminé pour le milieu étudié, qu'une méthode d'observation permette l'estimation du biovolume bactérien moyen, cette méthode paraît tout à fait performante pour l'étude du bactérioplancton hétérotrophe en milieux aquatiques.

Notons, par ailleurs, que le champ d'application de l'incorporation de thymidine tritiée par les bactéries hétérotrophes ne se limite pas à la seule mesure de la production bactérienne dans la colonne d'eau. Ainsi cette méthode, moyennant quelques modifications expérimentales, est également utilisée pour la mesure de l'activité des bactéries dans les sédiments (MORIARTY et POLLARD, 1981, 1982) fixées à des supports

solides (SERVAIS *et al.*, soumis) ou formant des biofilms (MURREY *et al.*, 1986). Le marquage des bactéries par la ^3H -thymidine a également été utilisé pour l'étude du broutage de celles-ci par le microzooplancton (HOLLIBAUGH *et al.*, 1980) et l'étude des processus de mortalité bactérienne (SERVAIS *et al.*, 1985). Depuis peu, cette méthode est également utilisée dans des études écotoxicologiques ; l'effet de différents toxiques sur l'activité bactérienne a ainsi pu être testé (JONAS *et al.*, 1984 ; BAUER et CAPONE, 1985 ; PRICE *et al.*, 1986 ; VIVES-REGO *et al.*, 1986).

REMERCIEMENTS

L'auteur remercie le Dr. G. BILLEN pour ses conseils lors de la rédaction de cet article.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBRIGHT L.J., MC CRAE S.K. (1987). Annual bacterioplankton biomasses and productivities in a temperate West Coast Canadian Fjord. *Appl. Environm. Microbiol.*, 53: 1277-1285.
- ALLDREDGE A.L., COLE J.L., CARON D.A. (1986). Production of heterotrophic bacteria inhabiting macroscopic organic aggregates (marine snow) from surface waters. *Limnol. Oceanogr.*, 31: 68-78.
- AZAM F., FUHRMAN J.A. (1984). Measurement of bacterioplankton growth in the sea and its regulation by environmental conditions. In : *Heterotrophic activity in the sea*. J.E. Hobbie and P.J. LeB Williams (eds), Plenum Press, New-York.
- BAUER J.E., CAPONE D.G. (1985). Effects of four aromatic organic pollutants on microbial glucose metabolism and thymidine incorporation in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 828-835.
- BELL R.T. (1986). Further verification of the isotope dilution approach for estimating the degree of participation of ^3H -thymidine in DNA synthesis in studies of aquatic bacterial production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 1212-1214.
- BELL R.T., AHLGREN G., AHLGREN I. (1983). Estimating bacterioplankton production by measuring ^3H -thymidine incorporation in a eutrophic swedish lakes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45: 1709-1721.
- BELL R.T. KUPARINEN J. (1984). Assessing phytoplankton and bacterioplankton production during early spring in Lake Erken, Sweden. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 1221-1230.
- BERNS L. (1985). Autoradiographic studies of (methyl- ^3H)-thymidine incorporation in a cyanobacterium (*Microcystis wesenbergii*). Bacterium association and in selected algae and bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 232-233.
- BILLEN G., JOIRIS C., WIJNANT J., GILLAIN G. (1980). Concentration and microbial utilization of small organic molecules in the Scheldt estuary, the Belgian coastal zone of the North Sea and the English Channel. *Estuarine and Coastal Marine Sci.*, 11: 279-294.
- BILLEN G., FONTIGNY A. (1987). Dynamics of *Phaeocystis*-dominated spring bloom in Belgian coastal waters. II. Bacterioplankton dynamics. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 37: 249-257.
- BRATBAK G. (1985). Bacterial biovolume and biomass estimations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 1488-1483.
- BRATBAK G., DUNDAS I. (1984). Bacterial dry matter content and biomass estimations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 755-757.

- CHRISTENSEN J.P., OWENS T.G., DEVOL A.H., PACKARD T.T. (1970). Respiration and physiological state in marine bacteria. *Mar. Biol.*, 77: 267-276.
- CHRISTENSEN J.P., PACKARD T.T. (1979). Respiratory electron transport activities in phytoplankton and bacteria: comparison of methods. *Limnol. Oceanogr.*, 24: 576-583.
- CHRISTIAN R.R., HANSON R.B., NEWELL S.Y. (1982). Comparison of methods for measurements of bacterial growth rates in mixed batch culture. *Appl. Environm. Microbiol.*, 43: 1160-1165.
- CHROST R.J., KRAMBECK H.J. (1986). Fluorescence correction for measurements of enzyme activity in natural waters using methylumbelliferyl-substrates. *Arch. Hydrobiol.*, 106: 79-90.
- CHROST R.J., WCISLO R., HALEMEJKO G.Z. (1986). Enzymatic decomposition of organic matter by bacteria in a eutrophic lake. *Arch. Hydrobiol.*, 107: 145-165.
- CUHEL R.L., TAYLOR C.D., JANNASCH H.W., (1981). Assimilatory sulfur metabolism in marine microorganisms: Characteristics and regulation of sulfate transport in *Pseudomonas halodurans* and *Alteromonas lutea-violaceus*. *J. bacteriol.*, 147: 340-349.
- CUHEL R.L., TAYLOR C.D., JANNASCH H.W. (1982). Assimilatory sulfur metabolism in marine microorganisms: considerations for the application of sulfate incorporation into protein as a measurement of natural population protein synthesis. *Appl. Environm. Microbiol.*, 43: 160-168.
- DALEY R.J., HOBBIE J.E. (1975). Direct count of aquatic bacteria by a modified epi-fluorescent technique. *Limnol. Oceanogr.*, 20: 875-882.
- DAVIDSON J.N. (1953). *The biochemistry of nucleic acids*. 2nd ed. Wiley, New-York, ch. 7.
- DUCKLOW H.W. (1982). Chesapeake Bay nutrient and plankton dynamics. I. Bacterial biomass and production during spring tidal destratification in the York river, Virginia, estuary. *Limnol. Oceanogr.*, 27: 651-659.
- DUCKLOW H.W., HILL S.M. (1985). Tritiated thymidine incorporation and the growth of heterotrophic bacteria in warm core rings. *Limnol. Oceanogr.*, 30: 260-272.
- EDWARDS R.T., MEYER J.L. (1986). Production and turnover of planktonic bacteria in two south eastern blackwater rivers. *Appl. Environm. Microbiol.*, 1317-1323.
- FERGUSON R.L., RUBLEE P. (1976). Contribution of bacteria to the standing crop of coastal plankton. *Limnol. Oceanogr.*, 21: 141-145.
- FLIERMANS C.B., SCHNEIDER CAIN P., SCHMIDT E.L. (1975). Direct measurement of bacterial stratification in Minnesota lakes. *Arch. Hydrobiol.*, 76: 248-255.
- FUHRMAN J.A., AMMERMAN J.W., AZAM F. (1980). Bacterioplankton in the coastal eutrophic zone: distribution, activity and possible relationships with phytoplankton. *Mar. Biol.*, 60: 201-207.
- FUHRMAN J.A., AZAM F. (1980). Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia Antarctica and California. *Appl. Environm. Microbiol.*, 39: 1085-1095.
- FUHRMANN J.A., AZAM F. (1982). Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar. Biol.*, 66: 102-120.
- GILLIS M., DELEY J., DE CLEENE M. (1970). The determination of molecular weight of bacterial genome DNA from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.*, 12: 143-153.
- GLASER V.M., AL-NUI M.A., GROSHEV V.V., SHESTAKOV S.V. (1973). The labelling of nucleic acids by radioactive precursors in the blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.*, 92: 217-226.
- GRIVELL A.R., JACKSON J.J. (1968). Thymidine kinase: evidence for its absence from *Neurospora crassa* and some other microorganisms, and the relevance of this to the specific labelling of deoxyribonucleic acid. *J. Gen. Microbiol.*, 54: 307-317.
- HAGSTROM A., LARSSON U., HORSTEDT P., NORMAK S. (1979). Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Appl. Environm. Microbiol.*, 37: 805-812.
- HANSON R.B., ALVAREZ-OSSORIO M.T., CAL R., CAMPOS M.J., ROMAN M., SANTIAGO G., VARELA M., YODER J.A. (1986). Plankton response following a spring upwelling event in the Ria de Arosa, Spain. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 32: 101-113.
- HANSON R.B., LOWERY H.K. (1983). Nucleic acid synthesis in oceanic microplankton for the Drake Passage, Antarctica. Evaluation of steady-state growth. *Mar. Biol.*, 73: 79-89.

- HOBBIE J.E., COLE J.J. (1984). Response of a detrital food web to eutrophication. *Bull. Mar. Sci.*, 35: 357-363.
- HOBBIE J.E., DALEY R.J., JASPER S. (1977). Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environm. Microbiol.*, 33: 1225-1228.
- HOLLIBAUGH J.T., FUHRMAN J.A., AZAM F. (1980). Radioactive labeling of natural assemblages of bacterioplankton for use in trophic studies. *Limnol. Oceanogr.*, 25: 172-181.
- JEFFREY W.H., PAUL J.H. (1986). Activity of an attached and free-living *Vibrio* sp. as measured by thymidine incorporation, p-iodonitrotetrazolium reduction, and ATP/DNA ratios. *Appl. Environm. Microbiol.*, 51: 150-156.
- JONAS R.B., GILMOUR C.C., STONER D.L., WEIR M.M., TUTTLE J.H. (1984). Comparison of methods to measure acute metal and organometal toxicity to natural aquatic microbial communities. *Appl. Environm. Microbiol.*, 47: 1005-1011.
- JONES J.G., SIMONS B.M. (1975). An investigation of errors in direct counts of aquatic bacteria by epifluorescence microscopy, with reference to a new method for dyeing membrane filters. *J. Appl. Bact.*, 39: 317-329.
- JORDAN M.J., LIKENS G.E. (1980). Measurement of planktonic bacterial production in a oligotrophic lake. *Limnol. Oceanogr.*, 25: 729-732.
- KARL D.M. (1979). Measurement of microbial activity and growth in the ocean by rates of stable ribonucleic acid synthesis. *Appl. Environm. Microbiol.*, 38: 850-860.
- KARL D.M. (1981). Simultaneous rates of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid syntheses for estimating growth and cell division of aquatic microbial communities. *Appl. Environm. Microbiol.*, 42: 802-810.
- KARL D.M., WINN C.D., WONG D.C.L. (1981). RNA synthesis as a measure of microbial growth in aquatic environments. I. Evaluation, verification, and optimization of methods. *Mar. Biol.*, 64: 1-12.
- KIRCHMAN D., DUCKLOW H., MITCHELL R. (1982). Estimates of bacterial growth from changes in uptake rates and biomass. *Appl. Environm. Microbiol.*, 44: 1296-1307.
- KRAMBECK C., KRAMBECK H.J., OVERBECK J. (1981). Microcomputer-assisted biomass determination of planktonic bacteria on scanning electron micrographs. *Appl. Environm. Microbiol.*, 42: 142-149.
- KUSNETSOV S.J., ROMANENKO W.J. (1966). Produktion der Biomasse heterotropher Bakterien und die Geschwindigkeit ihrer Vermehrung im Rybinsk-Stausee. *Verh. Internat. Ver. Limnol.*, 16: 1493-1500.
- LARSSON U., HAGSTROM A. (1982). Fractionated phytoplankton primary production, exudate release and bacterial production in a Baltic eutrophication gradient. *Mar. Biol.*, 67: 57-70.
- LOVELL C.R., KONOPKA A. (1985). Primary and bacterial production in two dimictic-Indiana lakes. *Appl. Environm. Microbiol.*, 49: 485-491.
- LURIA S.E. (1960). The bacterial protoplasm: composition and organization. In: *The bacteria*, Gunsalus, I.C. et Stainer, R.Y. ed. Academic Press, Oxford.
- MAC COY W.F., OLSON B.H. (1985). Fluorometric determination of the DNA concentration in municipal drinking water. *Appl. Environm. Microbiol.*, 49: 811-817.
- MAC DONOUGH R.J., SANDERS R.W., PORTER K.G., KIRCHMAN D.L. (1986). Depth distribution of bacterial production in a stratified lake with anoxic hypolimnion. *Appl. Environm. Microbiol.*, 52: 992-1000.
- MALONE T.C., KEMP W.M., DUCLOW H.W., BOYNTON W.R., TUTTLE J.H., JONAS R.B. (1986). Lateral variation in the production and fate of phytoplankton in a partially stratified estuary. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 32: 149-160.
- MANDELSTAM D., MAC QUILLLEN K. (1973). *Biochemistry of bacterial growth*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- MONHEIMER R.H. (1972). Heterotrophy by plankton in three lakes of different productivity. *Nature*, 236: 463-464.
- MONHEIMER R.H. (1974). Sulfate uptake as a measure of planktonic microbial production in freshwater ecosystems. *Can. J. Microbiol.*, 20: 825-831.
- MORIARTY D.J.W. (1984). Measurement of bacterial growth rates in marine systems using nucleic acid precursors. In: *Heterotrophic activity in the sea*. J.E. Hobbie and P.J. LeB. Williams (eds). Plenum Press, New-York.
- MORIARTY D.J., POLLARD P.C. (1981). DNA synthesis as a measure of bacterial productivity in seagrass sediments. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 5: 151-156.
- MORIARTY D.J., POLLARD P.C. (1982). Diel variation of bacterial productivity in seagrass (*Zostera Capricorni*) beds measured by rate of thymidine incorporation into DNA. *Mar. Biol.*, 72: 165-173.

- MUNRO H.N., FLECK A. (1966). The determination of nucleic acids. In : *Methods of biochemical analysis*, Ed. by D. Glick, New-York, N.Y. : Interscience Publishers.
- MURRAY R.E., COOKSEY K.E., PRISCU J.C. (1986). Stimulation of bacterial DNA synthesis by algal exudates in attached algal-bacterial consortia. *Appl. Environm. Microbiol.*, 52: 1177-1182.
- NAGATA T. (1986). Carbon and nitrogen content of natural planktonic bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.*, 52: 28-32.
- NEWELL S.Y., CHRISTIAN R.R. (1981). Frequency of dividing cells as an estimator of bacterial productivity. *Appl. Environm. Microbiol.*, 42: 23-31.
- NEWELL S.Y., FALLON R.D. (1982). Bacterial productivity in the water column and sediments of the Georgia (USA) coastal zone estimated via direct counting and parallel measurements of thymidine incorporation. *Microb. Ecol.*, 1982, 8: 33-46.
- OVERBECK J. (1974). Microbiology and biochemistry. *Mitt. Int. Ver. Limnol.*, 20: 198-228.
- OVERBECK J., DALEY R.J. (1973). Some precautionary comments on the Romanenko technique for estimating heterotrophic bacterial production. *Bull. Ecol. Comm. (Stockholm)*, 17: 342-344.
- PALUMBO A.V., BOGLE M.A., TURNER R.R., ELWOOD J.W., MULHOLLAND P.J. (1987). Bacterial communities in acidic and circumneutral streams. *Appl. Environm. Microbiol.*, 53: 337-344.
- PAUL J.H., MYERS B. (1982). Fluorometric determination of DNA in aquatic microorganisms by use of Hoechst 33258. *Appl. Environm. Microbiol.*, 43: 1393-1399.
- PEDROS-ALIO C., BROCK T.D. (1982). Assessing biomass and production of bacteria in eutrophic Lake Mendota, Wisconsin. *Appl. Environm. Microbiol.*, 44: 203-218.
- POLLARD P.C., MORIARTY D.J.W. (1984). Validity of the tritiated thymidine method for estimating bacterial growth rates : measurement of isotope dilution during DNA synthesis. *Appl. Environm. Microbiol.*, 48: 1076-1083.
- PORTER K.G., FEIG Y.S. (1980). Use of DAPI for indentifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, 25: 943-948.
- PRICE N.M., HARRISON P.J., LANDRY M.R., AZAM F., HALL K.J.F. (1986). Toxic effects of latex and tygon tubing on marine phytoplankton, zooplankton and bacteria. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 34: 41-49.
- RIEMANN B., BJORNSEN P.K., NEWELL S.Y., FALLON R.D. (1987). Calculation of bacterioplankton production from measurements of ³H-thymidine incorporation. *Limnol. Oceanogr.*, 32: 471-476.
- RIEMANN B., FUHRMAN J., AZAM F. (1982). Bacterial secondary production in freshwater measured by ³H-thymidine incorporation method. *Microb. Ecol.*, 8: 101-114.
- RIEMANN B., NIELSEN P., JEPPESEN M., MARCUSSEN B., FUHRMAN J.A. (1984). Diel changes in bacterial biomass and growth rates in coastal environments, determined by means of thymidine incorporation into DNA, frequency of dividing cells (FDC), and microautoradiography. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 17: 227-235.
- RIEMANN B., SONDERGAARD M. (1984). Measurements of diel rates of bacterial secondary production in aquatic environments. *Appl. Environm. Microbiol.*, 47: 632-638.
- ROBERTS R.D., COWIE D.B., ABELSON P.H., BOLTON E.T., BRITTON R.J. (1955). Studies of biosyntheses in *Escherichia coli*. *Carnegie, Inst. Wash. Publ.*, 607: 521.
- ROMANENKO V.I. (1964). Heterotrophic assimilation of CO₂ by the bacterial aquatic flora. *Mikrobiologiya*, 33: 679-683.
- ROSENBAUM-OLIVER D., ZAMENHOFS S. (1972). Degree of participation of exogenous thymidine in the overall deoxyribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 110: 585-591.
- SANDERS R.W., PORTER K.G. (1986). Use of metabolic inhibitors to estimate protozooplankton grazing and bacterial production in a monomictic eutrophic lake with an anaerobic hypolimnion. *Appl. Environm. Microbiol.*, 52: 101-107.
- SCAVIA D., LAIRD G.A., FLAHNENSTIEL G.L. (1986). Production of planktonic bacteria in Lake Michigan. *Limnol. Oceanogr.*, 31: 612-626.
- SCHNEIDER W.C. (1945). Phosphorus compounds in animal tissues. Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 161: 293-303.
- SERVAIS P. (1986). Etude de la dégradation de la matière organique par les bactéries hétérotrophes en rivière. Développement d'une démarche méthodologique et application à la Meuse belge. Université Libre de Bruxelles. *Thesis*, 271 p..
- SERVAIS P., BILLEN G., VIVES-REGO J. (1985). Rate of bacterial mortality in aquatic environments. *Appl. Environm. Microbiol.*, 49: 1448-1455.

- SERVAIS P., MARTINEZ J., BILLEN G., VIVES-REGO J. (1987). Determining ^3H -thymidine incorporation into bacterioplankton DNA : improvement of the method by means of DNase treatment. *Appl. Environm. Microbiol.*, 53: 1977-1979.
- SIEBURTH J. McN., JOHNSON K.M., BURNEY C.M., LAVOIE D.M. (1977). Estimation of *in situ* rates of heterotrophy using diurnal changes in organic matter and growth rates of picoplankton in diffusion culture. *Helgol. Wiss. Meeresunters*, 30: 565-574.
- SOMVILLE M. (1984). Measurement and study of substrate specificity of exoglucosidase activity in eutrophic water. *Appl. Environm. Microbiol.*, 48: 1181-1185.
- SOMVILLE M., BILLEN G. (1983). A method for determining exoproteolytic activity in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 28: 190-193.
- SOROKIN Yu.I. (1961). Role of chemosynthesis in production of organic substances in water reservoir. Investigation of chemosynthesis production in Kuibyshev Water Reservoir in 1958-1959. *Mikrobiologiya*, 30: 928-937.
- SOROKIN Yu.I. (1964). On the trophic role of chemosynthesis in water bodies. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.*, 49: 307-324.
- STALEY J.T., KONOPKA A. (1985). Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Ann. Rev. Microbiol.*, 39: 325-346.
- STANIER R.Y.E., ADELBERG E.A., INGRAHAM J.L. (1976). The microbial world. 4th ed. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.Y..
- TOBIN R.S., ANTHONY D.H.J. (1978). Tritiated thymidine incorporation as a measure of microbial activity in lake sediments. *Limnol. Oceanogr.*, 23: 161-165.
- VIVES-REGO J., VAQUE O., MARTINEZ J. (1987). Effect of heavy metals and surfactants on glucose metabolism, thymidine incorporation and exoproteolytic activity in sea water. *Water res.*, 20: 1411-1415.
- WALLACE D.C., MOROWITZ H.J. (1973). Genome size and evolution. *Chromosoma*, 40: 121-126.
- WATSON S.W., NOVITSKY T.J., QUINBY H.L., VALOIS F.W. (1977). Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Appl. Environm. Microbiol.*, 33: 940-946.
- WILLIAMS P.J. LeB. (1970). Heterotrophic utilization of dissolved organic compounds in the sea. I. Size distribution and relationship between respiration and incorporation of growth substance. *J. Mar. Biol. Ass., U.K.*, 50: 859-870.
- WILLIAMS P.M., CARLUCCI A.F. (1976). Bacterial utilization of organic matter in the deep sea. *Nature*, London, 262: 810-811.
- WRIGET R.T., HOBIE J.E. (1965). The uptake of organic solutes in lake water. *Limnol. Oceanogr.*, 10: 22-28.
- WRIGHT R.T., HOBIE J.E. (1966). Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Ecology*, 47: 447-453.
- ZOBELL C.E. (1963). Organic geochemistry of sulfur. In : *Organic Geochemistry*, I. Breger (ed.), Macmillan, 513-578.