

24

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA COLONISATION DE SURFACES PAR LES BACTÉRIES, EN EAU DE MER CIRCULANTE

P. FERA et D. PRIEUR

Laboratoire de zoologie Faculté des Sciences
6 avenue Le Gorgeu - 29287 BREST Cedex (FRANCE)

RÉSUMÉ - Préalablement à la construction d'une centrale utilisant l'énergie thermique des mers, une station expérimentale a été édiflée à l'entrée de la rade de Brest en vue de réaliser des études préliminaires. Dans cette station, la colonisation par les bactéries de trois matériaux (acier inoxydable UB6, aluminium AG4, filtres en polycarbonate) a été étudiée dans un circuit d'eau de mer ouvert, dont la vitesse est de 0,7 m s⁻¹. L'étude a été réalisée de mai 1983 à mai 1984, des échantillons étant prélevés tous les deux mois, soit 7 séries d'expérimentations de 15 jours chacune. Les bactéries ont été dénombrées au microscope électronique à balayage pour les surfaces métalliques et par microscopie à épifluorescence pour les filtres en polycarbonate. Pour tous les matériaux étudiés, la colonisation bactérienne se réalise selon trois phases successives : colonisation initiale, parfois instable (environ 10⁴ bactéries cm⁻²); colonisation intense (10⁴ bactéries cm⁻² à environ 10⁷ bactéries cm⁻² en une semaine); ralentissement du phénomène au-delà de 10 jours. Bien que la microflore totale de l'eau de mer du site d'expérimentation (dénombrée en épifluorescence) soit demeurée stable pendant la période de l'étude, l'amplitude et la durée des différentes phases de la colonisation bactérienne varient au cours des saisons.

Mots clés : surfaces, adhésion, bactéries, eau de mer circulante.

ABSTRACT - Before the building of an Ocean Thermal Energy Conversion (OTEC) power plant, an experimental station was built near the entrance of the Bay of Brest in order to do preliminary studies. Using these facilities, the bacterial colonization of three substrata (stainless steel UB6, aluminium AG4, polycarbonate filters) was studied in an open seawater system, with a speed of 0,7 m s⁻¹. The study was performed between May 1983 and May 1984, including seven experiments of 15 days each. Bacteria colonizing the metallic surfaces were counted by scanning electron microscopy, and bacteria colonizing the polycarbonate filters counted by epifluorescence microscopy. On the three substrata, bacterial colonization occurred in three successive stages : initial colonization, sometimes unsteady (about 10⁴ bacteria cm⁻²); intense colonization (10⁴ bacteria cm⁻² to about 10⁷ bacteria cm⁻² within one week); slow colonization beyond ten days. Although the seawater microflora of the experimental site (counted by epifluorescence microscopy) remained steady during the time of experiments, the amplitude and the duration of the different stages of colonization fluctuated according to the seasons.

Key words : surfaces, adhesion, bacteria, flowing seawater.

INTRODUCTION

La colonisation par les microorganismes de surfaces immergées en eau de mer a fait l'objet de nombreux travaux dans le milieu naturel (Corpe, 1970; Marshall, 1980), comme en laboratoire (Fletcher et Loeb, 1979). Pour certaines de ces expérimentations utilisant des souches pures, des systèmes expérimentaux à circulation ont été employés (MC Coy et Costerton, 1982; Bott et Miller, 1983). Cependant, la colonisation par les bactéries de surfaces en contact avec l'eau de mer naturelle circulante a été assez peu étudiée (Nickels *et al.*, 1981; Dahlaback et Pedersen, 1982), si ce n'est dans le cadre des projets de centrale à énergie thermique des mers.

En effet, la fixation de microorganismes sur les surfaces immergées en mer constitue un problème à l'origine de pertes économiques importantes pour l'industrie maritime. Dans le cas des centrales à énergie thermique des mers (ETM), la formation d'un film bactérien à la surface des échangeurs de chaleur, augmente les forces de friction du fluide, accélère les processus de corrosion et entraîne une réduction du transfert de chaleur (Afring et Taylor, 1979 ; Berck *et al.*, 1981 ; Characklis *et al.*, 1981 ; MC Coy *et al.*, 1981).

Préalablement à la construction d'une centrale de ce type, l'Institut Français de Recherche et d'Études de la Mer (IFREMER) a construit une station expérimentale destinée à la mise au point de diverses techniques de nettoyage de conduites d'eau de mer.

La mesure de l'intensité de la colonisation bactérienne de ces conduites, constituait un paramètre nécessaire à l'évaluation de ces techniques. Diverses méthodes d'estimation de la biomasse bactérienne peuvent être utilisées. Ces méthodes peuvent être indirectes et consister en la mesure des modifications physiques du matériel colonisé (Nickels *et al.*, 1981 ; Characklis *et al.*, 1982). Des méthodes biochimiques, basées notamment sur le dosage de lipides spécifiques des bactéries ont également été employées (White *et al.*, 1979). Enfin, des méthodes d'observation directe permettent de dénombrer les microorganismes qui colonisent les surfaces (Weise et Rheinheimer, 1978 ; Dempsey, 1981). Elles ont été retenues pour réaliser ce travail car elles fournissent également des informations sur les types morphologiques rencontrés. Les dénombrements ont été effectués sur des échantillons d'acier inoxydable et d'aluminium, ainsi que sur des filtres de polycarbonate, d'analyse plus commode (Merlinat, comm. pers). Compte tenu des variations saisonnières, des caractéristiques de l'eau de mer et notamment la température, sur le site étudié, ces mesures ont été réparties sur un cycle annuel.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'étude a été réalisée à la station expérimentale du Centre IFREMER de Brest, à l'entrée de la rade de Brest. Le circuit utilisé (fig. 1) se compose de 4 cellules porte-échantillons en PVC, montées en parallèle et qui peuvent être alimentées simultanément en eau de mer.

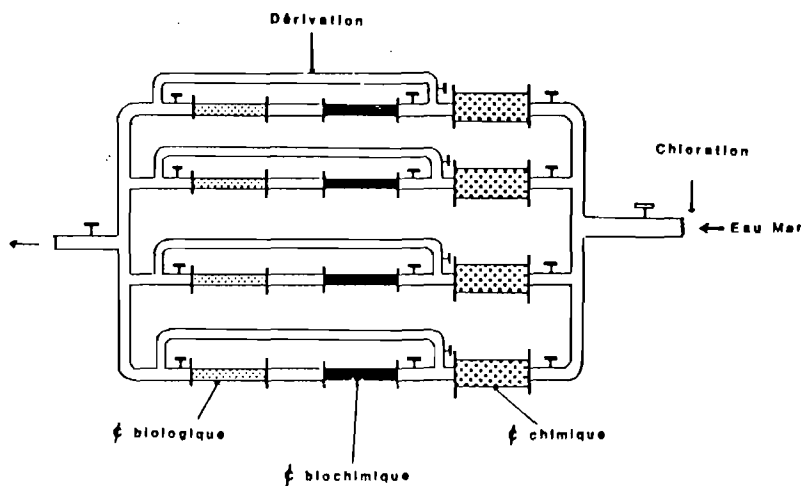


Figure 1 : Schéma du circuit d'eau de mer servant à l'étude du développement du film bactérien.

Plusieurs vannes permettent d'isoler chaque cellule sans perturber le fonctionnement des trois autres. Le détail d'une cellule est illustré sur la figure 2. Deux échantillons de chaque matériel étudié (acier inoxydable UB6, aluminium AG4, filtres de polycarbonate (nucleopore corporation) peuvent être testés simultanément. Les échantillons métalliques sont polis finement (pâte diamant 1 μm) pour obtenir une surface de type miroir. Avant l'introduction dans le porte-échantillon, ils sont dégraissés à l'acétone et stérilisés au four Pasteur (1 h 30 à 150°C). Les filtres en polycarbonate sont noircis au noir Irgalan (Hobbie *et al.*, 1977), fixés sur un plot de PVC par une bague en caoutchouc, stérilisés aux UV et introduits dans le porte-échantillon quelques instants avant la mise en eau. Dès leur émerision, les échantillons métalliques sont fixés au glutaraldéhyde (2,5 % dans l'eau de mer), déshydratés dans l'éthanol puis séchés par la méthode du point critique (Anderson, 1951). Après métallisation, ils sont observés au microscope électronique à balayage (Jeol Jsm 35.) Les microorganismes sont dénombrés au grossissement x 2000 par comptages successifs de 10 champs. Les filtres en polycarbonate sont fixés au formol (2 % dans l'eau de mer), colorés à l'acridine orange selon la technique de Hobbie *et al.* (1977) et observés à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Bausch et Lomb "Balplan"). Les dénombrements sont effectués au grossissement x 1000 par comptages successifs de 10 champs. Sept séries expérimentales ont été effectuées de mai 1983 à mai 1984. Chacune d'entre elles a duré 3 semaines, des échantillons étant relevés après les durées d'immersion suivantes : 1 heure, 6 h, 12 h, 1 jour, 2 j, 4 j, 6 j, 8 j, 10 j, 15 j. Les quatre cellules disponibles ont été utilisées par roulement. Entre deux utilisations, chaque système est nettoyé à l'eau chlorée (7 %), à l'aide d'un écouvillon et abondamment rincé à l'eau douce. Entre deux séries expérimentales, toute la conduite est nettoyée à l'eau chlorée, rincée et asséchée.

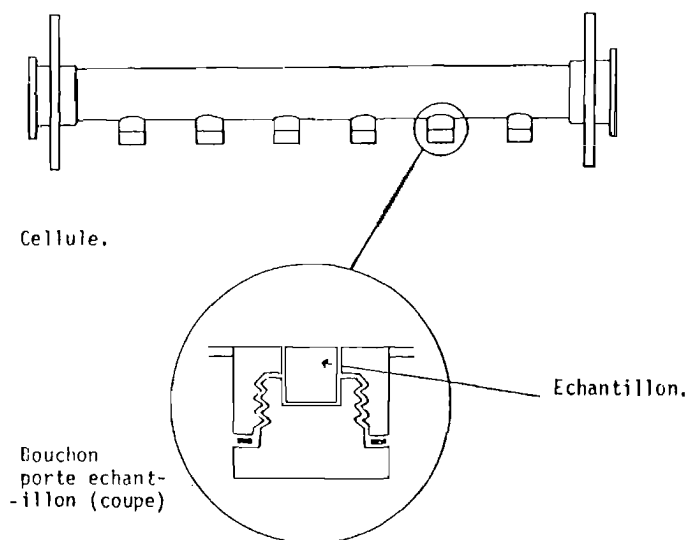


Figure 2 : Schéma d'une cellule biologique.

Pendant toute la durée des expérimentations, chaque semaine, à marée haute, différents paramètres physicochimiques de l'eau de mer ont été mesurés (température, salinité, oxygène dissous, pH). L'abondance en bactéries de l'eau de mer de surface au niveau du site d'étude et de l'eau de mer alimentant les conduites a été également mesurée par dénombrement en épifluorescence et sur milieu de culture (2216 E).

RÉSULTATS

Caractéristiques du site d'étude

- physicochimie

Durant la période d'étude, la concentration en oxygène dissous fluctue lentement entre un minimum de 7.3 mg l^{-1} en été et un maximum de 10.7 mg l^{-1} au début du printemps (fig. 3).

Le pH est sensiblement identique toute l'année et oscille autour de 8.1.

La salinité de l'eau de surface est assez stable durant l'été et l'hiver, 34.8 ‰ avec toutefois quelques chutes brusques jusqu'à 32 ‰ à la fin de l'hiver 1984.

La température est le paramètre qui montre la plus grande amplitude de variation (fig. 4). A partir du mois de mai 1983 elle augmente progressivement pour atteindre un maximum de 17.6°C au mois d'août, puis redescend, pour être minimale 7.9°C fin février et à nouveau amorcer une augmentation au début mars.

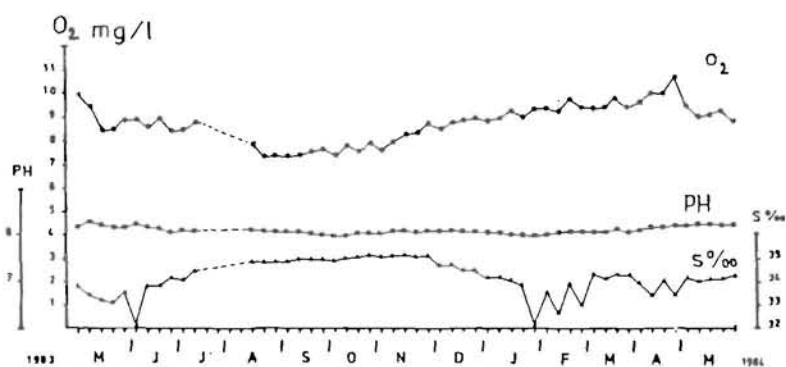


Figure 3 : Évolution des paramètres physicochimiques du milieu durant l'année expérimentale.



Figure 4 : Évolution de la température de l'eau durant l'année expérimentale.

- Bactériologie

Les nombres de bactéries totales en suspension dans l'eau de mer de surface au niveau du site et dans celle alimentant le système expérimental sont similaires tout au long de la période d'étude (fig. 5). Ils oscillent respectivement entre $7,1 \cdot 10^4$ et $8,5 \cdot 10^4$ cellules ml^{-1} , et $3,2 \cdot 10^4$ et $7,8 \cdot 10^5$ cellules ml^{-1} .

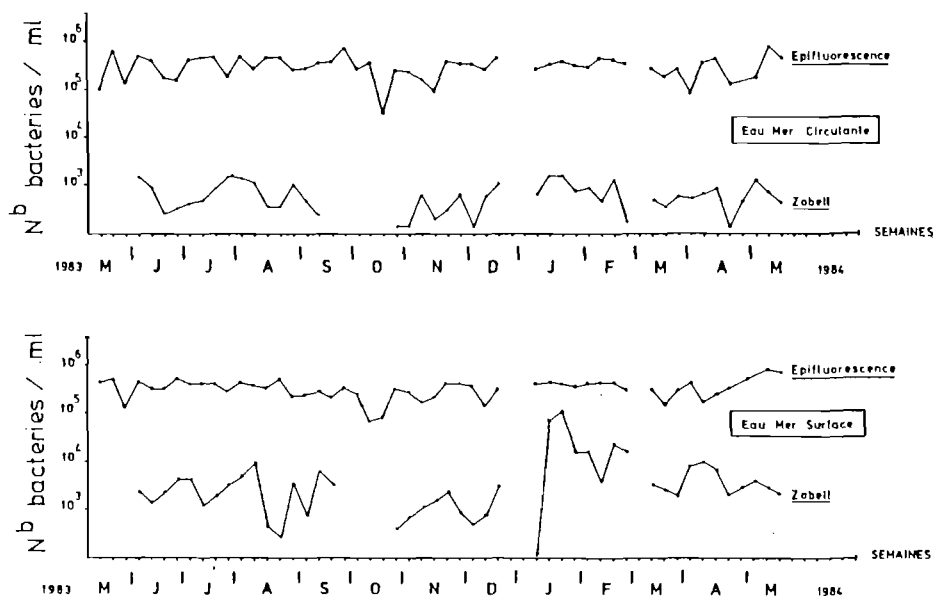


Figure 5 : Évolution de la densité bactérienne en suspension dans l'eau alimentant le circuit et dans l'eau de mer de surface durant l'année expérimentale.

Le dénombrement de la flore bactérienne viable est plus instable surtout en eau de mer de surface. Elle fluctue autour de 10^3 bactéries ml^{-1} , avec un maximum de 10^5 cellules ml^{-1} en janvier, sans qu'une tendance saisonnière n'apparaisse.

Système expérimental

La colonisation des trois matériaux étudiés de mai 1983 à mai 1984 est illustrée sur les figures 6a à 6g.

- Mai 83 (fig. 6a) :

La colonisation initiale sur les 3 matériaux est de 10^4 cellules cm^{-2} . Cette densité évolue peu pendant les premières 24 heures, puis s'accroît rapidement pour atteindre en moyenne $2 \cdot 10^7$ cellules cm^{-2} après 10 jours d'immersion, sur les 3 matériaux.

- Juillet 83 (fig. 6b) :

La colonisation initiale sur l'aluminium est de $3 \cdot 10^3$ cellules cm^{-2} , soit légèrement inférieure à celle observée sur les deux autres supports ($2,5 \cdot 10^4$ cellules cm^{-2}). Pendant la première journée, les densités restent pratiquement stationnaires, sauf pour l'aluminium où quelques fluctuations sont observées. Après 4 jours d'immersion, la densité moyenne sur les 3 matériaux est de $7,5 \cdot 10^6$ cellules cm^{-2} . Elle augmente ensuite légèrement pour être supérieure à 10^7 cellules cm^{-2} après 15 jours d'immersion.

- Septembre 83 (fig. 6c) :

La densité initiale est de $2,4 \cdot 10^3$ cellules cm^{-2} sauf pour l'aluminium, $1,9 \cdot 10^3$. Durant les premières 24 heures, la colonisation évolue lentement. L'acier inoxydable et les filtres nuclépores atteignent leur maximum de colonisation ($4 \cdot 10^6$ cellules cm^{-2}) après 4 jours d'immersion, alors que l'aluminium ne le fait qu'après 6 jours ($2,3 \cdot 10^7$ cellules cm^{-2}).

Après 15 jours d'immersion, les densités sur les 3 matériaux sont en moyenne de $4,2 \cdot 10^6$ cellules cm^{-2} .

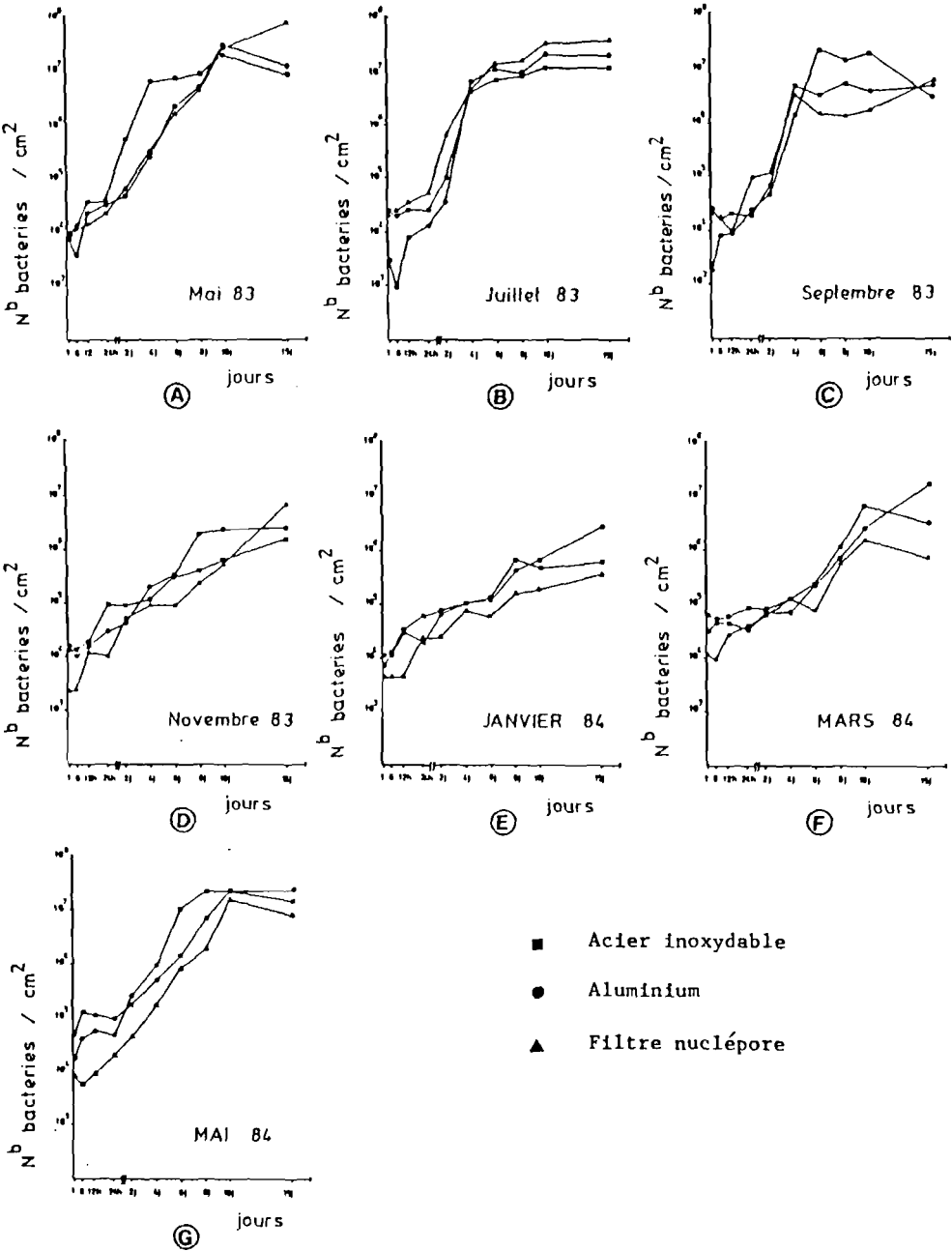


Figure 6 : (a, b, c, d, e, f, g): Colonisation bactérienne des 3 matériaux suivant les saisons.

- Novembre 83 (fig. 6d) :

Dès une heure d'immersion la densité bactérienne est de $1,5 \cdot 10^4$ cellules cm^{-2} sauf pour les filtres nuclépores ($2,3 \cdot 10^3$ cellules cm^{-2}). La colonisation est ensuite lente et continue, pour atteindre en moyenne $3,4 \cdot 10^6$ cellules cm^{-2} après quinze jours d'immersion pour les trois supports.

- Janvier 84 (fig. 6e) :

Au début des immersions $7,5 \cdot 10^3$ cellules cm^{-2} sont présentes en moyenne sur les 3 substrats. L'augmentation de la colonisation est lente et ne permet d'atteindre que $4 \cdot 10^5$ cellules cm^{-2} en fin d'expérience sauf pour l'aluminium ($2,5 \cdot 10^6$ cellules cm^{-2}).

- Mars 84 (fig. 6f) :

La colonisation initiale se situe entre $1,1 \cdot 10^4$ et $6,5 \cdot 10^4$ cellules cm^{-2} . L'acier inoxydable atteint sa colonisation maximum ($6,1 \cdot 10^6$ cellules cm^{-2}) après 10 jours d'immersion, ainsi que les filtres ($1,5 \cdot 10^6$ cellules cm^{-2}). L'aluminium se colonise plus longuement, et une densité de $1,6 \cdot 10^7$ cellules cm^{-2} est atteinte en fin d'expérience.

- Mai 84 (fig. 6g) :

La colonisation de départ varie de $7,8 \cdot 10^3$ à $4,8 \cdot 10^4$ cellules cm^{-2} . Durant les premières 24 heures elle évolue peu, sauf pour les filtres. Les densités sont atteintes pour les 3 matériaux ($2 \cdot 10^7$ cellules cm^{-2}) après 10 jours d'immersion.

Afin de synthétiser les résultats, les évolutions de la colonisation des filtres nuclépores aux différentes saisons ont été représentées sur les figures 7a et 7b. Suivant la période d'immersion, la colonisation se fait plus ou moins rapidement et les densités obtenues en fin d'expérience sont plus ou moins élevées.

Quelle que soit la saison d'expérimentation, l'évolution de la colonisation bactérienne est sensiblement identique pour les 3 matériaux.

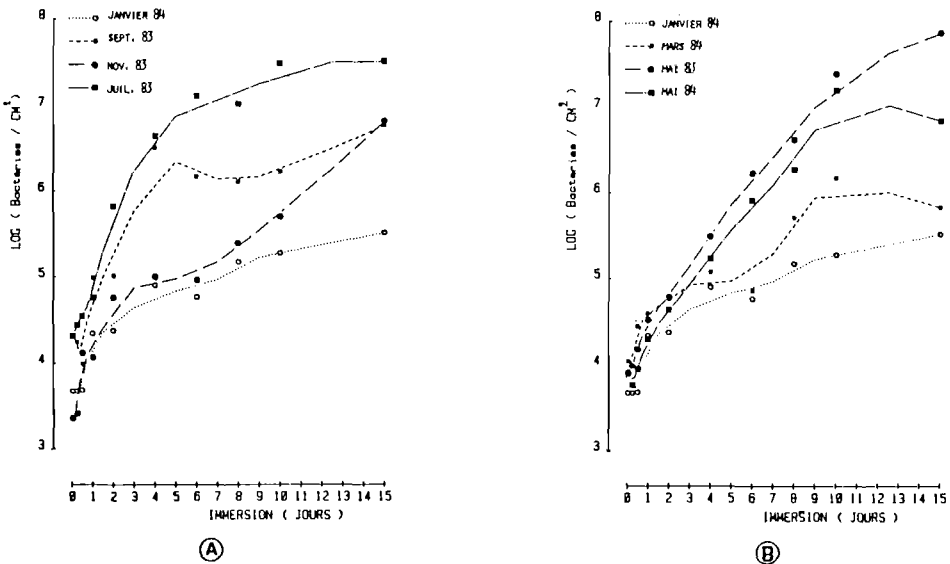


Figure 7 (A, B) : Courbes de synthèse de la colonisation bactérienne des filtres nuclépores aux différentes saisons.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les densités bactériennes observées sur les trois supports après une heure d'immersion varient de 2.10^3 cellules cm^{-2} (aluminium en septembre) à 8.10^4 cellules cm^{-2} (acier inoxydable en mars). Le plus souvent, les densités initiales sont voisines de 10^4 cellules cm^{-2} quel que soit le matériau considéré. Ces résultats sont en accord avec ceux de Stanley (1983) qui observe que l'attachement de *Pseudomonas aeruginosa* sur de l'acier inoxydable atteint en moins d'une minute des valeurs comparables, et augmente ensuite linéairement en fonction du temps. Cet auteur estime en outre qu'il s'agit déjà de la phase irréversible du processus d'adhésion (Marshall *et al.*, 1971). Après 24 heures d'immersion, les densités bactériennes sont faiblement supérieures aux valeurs initiales et les variations notées aux temps d'immersion intermédiaires correspondant vraisemblablement à l'incertitude de ces mesures. Il en est de même pour les faibles différences parfois notées d'un support à l'autre. Marszalek *et al.* (1979) observent des densités de colonisation semblables pour divers matériaux (acier inoxydable, verre) à condition qu'ils ne soient pas toxiques, comme par exemple le cuivre. Les densités maximales observées sont supérieures à 10^7 cellules cm^{-2} et ont été notées pour les trois matériaux, en période printanière et estivale. En hiver, les plus fortes valeurs sont voisines de 10^6 cellules cm^{-2} . Les densités dénombrées par Sechler et Gundersen (1972), sur des échantillons d'aluminium et d'acier inoxydable immergés en mer ne dépassent pas ces valeurs malgré une immersion prolongée jusqu'à 120 jours. Ces résultats sont par contre supérieurs à ceux de Gerchakov *et al.* (1976) ou Marszalek *et al.*, qui dénombrent au maximum 10^4 cellules cm^{-2} sur de l'acier inoxydable, en utilisant respectivement des techniques de dénombrement sur milieu de culture et en épifluorescence. Cependant, la comparaison de ces divers travaux est difficile en raison des conditions expérimentales, parfois en eau de mer, stagnante et dans le cas présent en eau de mer circulante. Selon Mac Coy *et al.* (1981), Bott et Miller (1983), une vitesse de circulation de 1 m s^{-1} permet une colonisation maximale. A des vitesses supérieures, selon ces mêmes auteurs, les densités bactériennes sont plus faibles en raison vraisemblablement d'un décrochage d'une partie du biofilm. Par contre, à des vitesses lentes, de $0,5$ à 15 cm s^{-1} , une augmentation de la colonisation bactérienne est observée par Pedersen (1982). Par rapport à un fluide stagnant ou peu mobile (eau de mer naturelle), un fluide circulant conduit à un renouvellement constant de la couche d'eau en contact avec la surface immergée, et donc des microorganismes susceptibles d'y adhérer. De plus, la turbulence de l'eau augmente la probabilité de contact entre les bactéries et la surface immergée (Daniels, 1972). La représentation synthétique des résultats des sept séries expérimentales (fig. 7A et fig. 7B) montre de nettes variations selon la période de l'expérimentation. Ces différences se traduisent davantage par l'allure des courbes de colonisation que par les niveaux de densités bactériennes atteints aux diverses périodes. Entre les résultats de janvier et juillet, la densité maximale passe de 10^5 cellules cm^{-2} à plus de 10^7 cellules cm^{-2} , en ce qui concerne par exemple les filtres de polycarbonate. En janvier, la colonisation est progressive entre 1 et 15 jours. Par contre, en juillet, la densité maximale est atteinte entre 1 et 6 jours. La colonisation estivale se produit donc en 3 étapes : une étape de 24 heures marquée par un faible accroissement de la densité, une étape de cinq jours caractérisée par un accroissement intense, puis une étape finale pendant laquelle la densité bactérienne évolue peu. Les autres périodes de prélèvement donnent des résultats intermédiaires, les différences apparaissant au niveau de la phase 2, courte en été, et longue en hiver. Les conditions expérimentales n'ayant pas varié de mai 1983 à mai 1984, il faut chercher dans le milieu extérieur des facteurs susceptibles d'influer sur le phénomène étudié. Selon Fletcher (1977), Bryers et Characklis (1981), la charge du fluide en bactéries influe sur l'intensité de la colonisation. Les dénombrements de bactéries effectués, tant dans l'eau de surface que dans l'eau des conduites, n'indiquent pas de

variation sensible de l'abondance bactérienne, et aucune tendance saisonnière n'a été relevée. La température est sans doute le paramètre (parmi ceux mesurés) qui évolue le plus, entre 8°C et 17°C. La tendance à la diminution de température débute fin août et se poursuit jusqu'en février. A la fin de ce mois, la tendance s'inverse. Ces changements dans l'évolution des températures de l'eau correspondent assez bien aux différences de colonisation observées. Après la colonisation lente observée en janvier, une légère accélération est notée dès mars. A l'inverse, après les maxima de juillet, on observe une décélération à partir de novembre. L'effet positif de la température sur l'attachement des bactéries a été effectivement montré par Fletcher (1977), mais ce résultat n'a pas été retrouvé par Molin et Nilsson (1983), en raison vraisemblablement de l'utilisation de protocoles expérimentaux différents. En fait, si dans le cas présent, la température semble en relation avec les phénomènes de colonisation bactérienne, d'autres facteurs de l'environnement, plus ou moins interactifs, interviennent certainement. La colonisation bactérienne de surfaces immergées en eau de mer circulante montre donc des fluctuations saisonnières, au moins sur le plan quantitatif, fluctuations dont il faudra tenir compte pour évaluer l'efficacité de diverses techniques de nettoyage.

Ce travail a été réalisé dans le cadre du contrat CNEXO 83/7315.

AFTRING R.P. & TAYLOR B.F., 1979. Assessment of microbial fouling in an ocean thermal energy conversion experiment - *Appl. and Environ. Microbiol.*, 38: 734-739.

ANDERSON T.F., 1951. Techniques for the preservation of three dimensional structures in preparing specimens for the electron microscope *Trans. New York Acad. Sci.*, 13: 130 p.

BERK S.G., MITCHELL R., BOBBIE R.J. NICKELS J.S. & WHITE D.C., 1981. Microfouling on metal surfaces exposed to seawater - *International Biodeterioration* 17: 29-37.

BOTT T.R. & MILLER P.C., 1983. Mechanisms of biofilm formation on aluminium tubes - *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 33B: 177-184.

BRYERS J.D. & CHARACKLIS W.G., 1981. Early fouling biofilm formation in a turbulent flow system: Overall kinetics - *Water Research*, 16: 483-491.

CHARACKLIS W.G., NIMMANS M.J. & PICOLOGLOU B.F., 1981. Influence of fouling biofilm on heat transfer-*Heat transtert engineering* 3: 23-37.

CHARACKLIS W.G., TRULEAR M.G., BRYERS J.D. & ZELVER N., 1982. Dynamics of biofilm processes: Methods- *Water Research*, 16: 1207-1216.

CORPE W.A., 1970. Attachment of marine bacteria to solid surfaces. In: Adhesion in biological systems-*Academic press, Inc, New york - London, Chap. 4*: 73-87.

MC COY W.F., BRYERS J.D., ROBBINS J. & COSTERTON J.W., 1981. Observations of fouling formation - *Can. J. Microbiol.*, 27: 910-917.

MC COY W.F. & COSTERTON J.W., 1982. Fouling biofilm development in tubular flow systems - *Dev. Ind. Microbiol.*, 23: 551-558.

DAHLBACK B. & PEDERSEN K., 1982. Viability of a marine microbial biofilm - *Current Microbiol.*, 7: 209-212.

DANIELS S.L., 1972. The adsorption of microorganisms onto solid surfaces: A review - *Developments in industrial microbiology*, 13: 211-253.

DEMPSEY M.J., 1981. Marine bacterial fouling: A scanning Electron Microscope study - *Mar. Biol.*, 61: 305-315.

- FLETCHER M., 1977. The effects of culture concentration and age, time and temperature on bacterial attachment to polystyrene - *Can. J. Microbiol.*, 23: 1-6.
- FLEISCHER M. & LOEB G.I., 1979. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine *Pseudomonad* to solid surfaces - *Appl. and Environ. Microbiol.*, 37: 67-72.
- GERCHAKOV S.M., MARSZALEK D.S., ROTH F.J. & UDEY L.R., 1976. Succession of periphytic microorganisms on metal and glass surfaces in natural seawater - In: *Proc. 4th Int. Congress on Marine Corrosion and Fouling. Eds Tomanovsky. Juan-les-Pins, Antibes*: 203-210.
- HOBBIE J.E., DALEY R.J. & JASPER S., 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy - *Appl. and Environ. Microbiol.*, 33: 1225-1228.
- MARSHALL K.C., STOUT R. & MITCHELL R., 1971.- Mechanisms of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces - *J. Gen. Microbiol.*, 68: 337-348.
- MARSHALL K.L., 1980. Bacterial adhesion in natural environments - In: *Microbial adhesion to surfaces. Eds Berkeley RCW and al.*, Chap. 4: 187-193.
- MARSZALEK D.S., GERCHAKOV S.M. & UDEY L.R., 1979. Influence of substrate composition on marine microfouling - *Appl. and Environ. Microbiol.*, 38: 987-995.
- MOLING G. & NILSSON I., 1983. Effect of different environmental parameters on the biofilm build up of *Pseudomonas putida* ATCC 11172 in chemostat *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18: 114-119.
- NICKELS J.S., BOBBIE R.J., LOTT D.F., MARTZ R.F., BENSON P.H. & WHITE D.C., 1981. Effect of manual brush cleaning on biomass and community structure of microfouling film formed on aluminium and titanium surfaces exposed to rapidly flowing seawater - *Appl. and Environ. Microbiol.*, 41: 1442-1453.
- PEDERSEN K., 1982. Factors regulating microbial biofilm development in a system with slowly flowing seawater *Appl. and Environ. Microbiol.*, 44: 1196-1204.
- SECHLER G.E. & GUNDERSEN K., 1972. Role of surface chemical composition on the microbial contribution to primary films - *Proc. Third Internat. Congr. Marine corrosion and fouling. Ed. by Dugger G. I. Northwestern Univ. Press*: 610-616.
- STANLEY M.P., 1983. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel - *Can. J. Microbiol.*, 29: 1493-1499.
- WEISE W. & RHEINHEIMER G., 1978. Scanning electron microscopy and epifluorescence investigation of bacterial colonization of marine sand sediments - *Microb. Ecol.*, 4: 175-188.
- WHITE D.D.C., DAVIS W.M., NICKELS J.S., KING J.D. & BOBBIE R.J., 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate - *Ecologia*, 40: 51-62.