

COURTE NOTE

**Comparaison de deux méthodes d'estimation
du broutage des bactéries
par les protozoaires en milieux aquatiques**

SHORT NOTE

Comparison of two methods assessing the grazing of
bacteria by protozoa in aquatic ecosystems

P. SERVAIS*, S. BECQUEVORT et F. VANDELDELDE

Reçu le 16 juillet 1998, accepté le 9 octobre 1998**.

SUMMARY

The goal of the present work was to compare two methods allowing to estimate, in aquatic ecosystems, the carbon flux due to grazing of bacteria by protozoa. The first method follows the decrease of labeling in the DNA of natural assemblages of bacteria previously labeled with tritiated thymidine (SERVAIS *et al.*, 1985) and the second procedure is based on the estimation of bacterial ingestion rate by protozoa using fluorescently labeled bacteria (FLB). Both methods were applied in parallel on river Meuse (Belgium) samples. Using the first method, grazing rates in the range 0.002 h^{-1} to 0.016 h^{-1} were observed; they represented in average 72% of the total bacterial mortality rates. A very good correlation between both estimates of the grazing fluxes was found but the data obtained by the FLB method were systematically lower (around 30% in average) than those estimated with the other method. A part of this difference is probably due to the fact that the FLB method does not take into account grazing by organism higher than $100 \mu\text{m}$.

Key-words: *bacteria, protozoa, grazing, mortality, thymidine.*

RÉSUMÉ

L'objectif du présent travail est de comparer deux méthodes indépendantes permettant d'estimer, dans les milieux aquatiques, le flux de carbone transitant du compartiment bactérien vers les protozoaires. Les deux méthodes utilisées sont, d'une part, celle basée sur le suivi de la décroissance de radioactivité du matériel génétique bactérien après marquage à la thymidine tritiée (SERVAIS *et al.*, 1985) et, d'autre part, celle de mesure du taux d'ingestion de bactéries fluorescentes (FLB) par les protozoaires. Elles ont été appliquées en paral-

Groupe de Microbiologie des Milieux Aquatiques, Université Libre de Bruxelles, Campus de la Plaine, CP 221, 1050 Bruxelles, Belgique.
pservais@ulb.ac.be

* Correspondance.

** Les commentaires seront reçus jusqu'au 31 juillet 1999.

lèle sur des échantillons de la rivière Meuse (Belgique). L'emploi de la première méthode a montré des taux de broutage compris entre $0,002 \text{ h}^{-1}$ et $0,016 \text{ h}^{-1}$ qui représentent en moyenne 72 % des taux de mortalité totale. Une excellente corrélation entre les estimations de flux de broutage obtenues par les deux techniques a été trouvée, mais les valeurs estimées à partir de la méthode FLB sont systématiquement inférieures (d'environ 30 % en moyenne) à celles obtenues par l'autre méthode. Une part de cette différence peut vraisemblablement s'expliquer par la non prise en compte par la méthode FLB du broutage par des organismes de taille supérieure à $100 \mu\text{m}$.

Mots clés : bactéries, protozoaires, broutage, mortalité, thymidine.

Grâce aux efforts méthodologiques accomplis au cours des vingt dernières années dans le domaine de l'écologie microbienne, il est aujourd'hui possible de quantifier correctement la biomasse et l'activité des bactéries dans les milieux aquatiques. De nombreuses études ont montré que, dans ces milieux, la biomasse bactérienne représente un compartiment très actif de l'écosystème qui utilise une part importante du carbone fixé par les organismes phototrophes (COLE *et al.*, 1988 ; WHITE *et al.*, 1991). Ces observations vont à l'encontre de l'idée classique d'une chaîne trophique linéaire (phytoplancton – zooplancton – poissons). Au contraire, il apparaît que les bactéries jouent un rôle important tant dans le recyclage des éléments nutritifs que dans le transfert d'une partie de la production primaire vers les niveaux trophiques supérieurs via un réseau trophique complexe appelé boucle microbienne (AZAM *et al.* 1983 ; GARNIER et BARILLIER, 1991 ; MASSANA *et al.*, 1996). Dans ce contexte, de nombreux travaux ont été consacrés au développement de méthodes permettant d'étudier le devenir de la biomasse bactérienne et plus particulièrement de quantifier l'importance du broutage de celle-ci par les protozoaires qui semble constituer un processus quantitativement dominant dans la mortalité bactérienne (SANDERS *et al.*, 1992).

Diverses méthodes ont été proposées pour l'estimation du taux de broutage des bactéries par les protozoaires dans les milieux aquatiques (McMANUS et FUHRMAN, 1988). Un premier groupe de méthodes est basé sur la comparaison de la croissance bactérienne en présence et en l'absence de brouteurs. Les procédures utilisées pour éliminer les brouteurs incluent la filtration sélective (WRIGHT et COFFIN, 1984), la dilution de l'échantillon avec de l'eau exempte de bactéries (DUCLOW et HILL, 1985 ; LANDRY *et al.*, 1984) ou l'addition de diverses substances inhibitrices de l'activité de broutage (NEWELL *et al.*, 1983 ; FUHRMAN et McMANUS, 1984 ; SANDERS et PORTER, 1986). Un second groupe de méthodes est basé sur l'estimation du taux d'ingestion de bactéries marquées par les protozoaires. Ces bactéries marquées peuvent être constituées d'un assemblage de cellules marquées par un traceur radioactif (NYGAARD et HESSEN, 1990), de minicellules de *Escherichia coli* marquées génétiquement (WIKNER *et al.*, 1986), de particules inertes fluorescentes (BORSHEIM, 1984 ; LANDRY *et al.*, 1984) ou de bactéries marquées par un fluorochrome (ALBRIGHT *et al.*, 1987 ; SHERR *et al.*, 1987). Par ailleurs, SERVAIS *et al.* (1985, 1989) ont proposé, une méthode qui permet d'estimer à la fois le taux de mortalité totale des bactéries ainsi que la part de la mortalité due au broutage. Cette méthode consiste à suivre la décroissance du marquage radioactif du matériel génétique de bactéries préalablement marquées avec de la thymidine tritiée.

L'objectif du présent travail était de comparer deux méthodes totalement indépendantes permettant d'estimer le flux de carbone transitant du compartiment

bactérien vers les protozoaires. Les deux méthodes utilisées sont, d'une part, celle basée sur le suivi de la décroissance de radioactivité du matériel génétique bactérien et, d'autre part, celle de mesure du taux d'ingestion de bactéries fluorescentes par les protozoaires (appelée méthode FLB – Fluorescently Labeled Bacteria) qui semble être actuellement la plus utilisée dans les études de broutage (LANDRY, 1994). Cette comparaison a été réalisée dans le cadre d'une étude sur les relations trophiques entre micro-organismes en milieu fluvial (SERVAIS *et al.*, 1997). La Haute Meuse belge (partie du cours de la Meuse située entre la frontière franco-belge et la ville de Namur) a été choisie comme modèle d'écosystème fluvial. Les échantillons utilisés pour les mesures présentées ici ont été collectés à la station de La Plante, située à trois kilomètres en amont de Namur, entre janvier et octobre 1996.

La mortalité bactérienne totale inclut la mortalité due à l'ingestion des bactéries par les brouteurs ainsi que la lyse bactérienne spontanée ou induite. La méthode proposée par SERVAIS *et al.* (1985) permet d'évaluer la mortalité totale d'une population bactérienne autochtone par suivi au cours du temps de la décroissance de la radioactivité associée à l'ADN bactérien, préalablement marqué par de la ^3H -thymidine. SERVAIS *et al.* (1989) ont montré la validité de cette approche. La décroissance du marquage radioactif suit une cinétique du premier ordre (droite en représentation semi-logarithmique) et peut donc être caractérisée par une constante du premier ordre k_d . La mesure effectuée en parallèle dans un échantillon naturel non modifié et un échantillon filtré sur une membrane de porosité $2\ \mu\text{m}$ retenant les brouteurs de bactéries permet de déterminer par différence la part de la mortalité due au broutage. Pratiquement, on ajoute à un échantillon de 200 mL d'eau de Meuse placé à température *in situ* et à l'obscurité de la ^3H -thymidine (activité spécifique 40-50 Curies/mmmole) pour obtenir une concentration finale de 4 nM. L'échantillon est incubé pendant une vingtaine d'heures afin de permettre à la thymidine tritiée d'être incorporée dans l'ADN bactérien et ainsi éliminée du milieu. À ce moment l'échantillon est divisé en deux sous-échantillons de 100 mL. Le premier n'est pas modifié, le second est filtré sur une membrane de porosité $2\ \mu\text{m}$ (filtre Nucléopore) et des inhibiteurs de l'activité des protozoaires sont ajoutés : colchicine (concentration finale 100 mg/L) et cycloheximide (concentration finale 200 mg/L). La filtration et l'addition des inhibiteurs permettent d'éliminer dans ce sous-échantillon le broutage des protozoaires. L'incubation des deux sous-échantillons se poursuit à température *in situ* et des aliquotes de 5 mL sont prélevées toutes les 10 à 20 h pendant environ 150 h et additionnées de 5 mL de TCA 15 % froid. La fraction macromoléculaire est recueillie par filtration (membrane de porosité $0,2\ \mu\text{m}$) et la radioactivité associée au filtre est mesurée par scintillation liquide. Les taux de mortalité en présence et en l'absence de broutage sont déterminés par les vitesses de décroissance de la radioactivité dans les deux sous-échantillons et le taux de mortalité due au broutage est estimé par différence. La précision des taux ainsi estimés est $0,001\ \text{h}^{-1}$ (MENON, 1993)

La figure 1 présente l'évolution saisonnière du taux de mortalité totale (k_d) et du taux de mortalité due au broutage (k_g) en Meuse. Les valeurs de taux de mortalité totale sont comprises entre $0,002\ \text{h}^{-1}$ et $0,022\ \text{h}^{-1}$. Ces valeurs sont dans la gamme des valeurs observées en général en milieux aquatiques (SERVAIS *et al.*, 1992). Le taux de mortalité augmente au cours de l'année pour atteindre un maximum en août, il décroît par la suite. Ce type d'évolution saisonnière de la mortalité bactérienne avec un maximum estival a été observé dans divers milieux

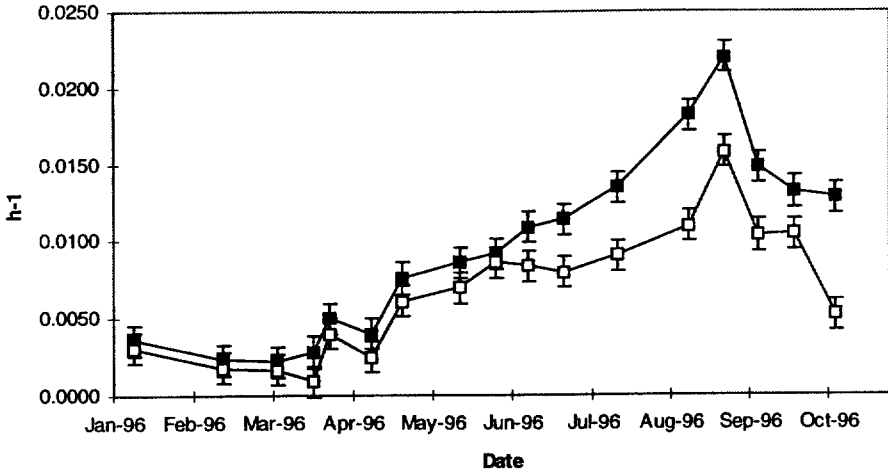


Figure 1 Évolution saisonnière des constantes du premier ordre de mortalité bactérienne totale (kd) (■) et de mortalité due au broutage (kg)(□) obtenues par la méthode basée sur le marquage à la thymidine.

Seasonal variations of the first order rate constants of total mortality (kd) (■) and mortality attributable to grazing (kg)(□) measured by the method based on labeling by thymidine.

aquatiques (SERVAIS *et al.*, 1989, 1992). Le broutage apparaît comme étant le processus prépondérant dans la disparition des bactéries ; il représente en moyenne 72 % de la mortalité totale. Les valeurs plus élevées de broutage durant la période estivale sont à mettre en relation avec des températures élevées et avec des abondances de protozoaires également élevées qui contribuent à accroître la pression de broutage des protozoaires sur les bactéries. Bien que souvent faible (entre 0,001 et 0,008 h⁻¹), une mortalité par lyse est observée dans chacune des situations étudiées. En multipliant le taux de mortalité due au broutage par la biomasse bactérienne, on obtient pour chaque prélèvement le flux de carbone transitant du compartiment bactérien vers celui des protozoaires. À cet effet, la biomasse bactérienne a été estimée sur base de dénombrements en microscopie à épifluorescence après coloration au DAPI (PORTER et FEIG, 1980) et d'une estimation du biovolume moyen converti en contenu en carbone bactérien par la relation carbone-biovolume proposée par SIMON et AZAM (1989). Les valeurs de flux ainsi obtenues varient entre 0,8 et 4,0 µgC/L·h ; elles vont être comparées ci-dessous aux estimations basées sur la méthode FLB.

La méthode FLB développée par SHERR *et al.* (1987, 1988) a été appliquée aux estimations de taux d'ingestion des bactéries par les protozoaires en parallèle avec les mesures décrites ci-dessus. Le principe de cette méthode est d'ajouter une aliquote de bactéries fluorescentes à l'échantillon et à suivre au cours du temps le nombre de bactéries ingérées par protozoaire en visualisant directement celles-ci, par microscopie à épifluorescence, au sein des protozoaires, après ingestion par ces derniers. Lors de la manipulation, les bactéries FLB sont ajoutées en concentration trace (moins de 10 % de la concentration totale en bactéries de l'échantillon). Afin d'éviter l'interférence du processus de digestion des bactéries avec le processus d'ingestion, le taux d'ingestion des bactéries

FLB par les protozoaires est estimé sur des temps courts (10 à 60 minutes selon les organismes).

Les bactéries FLB sont préparées en filtrant de l'eau du milieu naturel sur un filtre de porosité 2 μm , le filtrat est ensuiteensemencé avec de l'extrait de levure et incubé à température ambiante durant 12 h. Une concentration faible en extrait de levure (0,5 mg/L) permet d'engendrer pendant l'incubation une augmentation de l'abondance des bactéries autochtones sans modifier significativement leur taille. Les bactéries sont alors concentrées par centrifugation et le culot bactérien est remis en suspension dans 10 mL de solution saline d'hydrogénophosphate de sodium 0,05 M. Les bactéries sont colorées selon le protocole établi par SHERR *et al.* (1987) avec 0,2 mg/mL de DTAF pendant 2 h à 60 °C. La coloration est suivie de trois lavages par centrifugation. Les bactéries colorées sont alors conservées dans une solution saline de tetrasodium diphosphate 0,02 M. L'échantillon du milieu naturel (250 mL), auquel est additionnée une aliquote de bactéries FLB, est incubé à température *in situ* (10 min à 1 h). Durant l'incubation, des aliquotes de 20 mL sont prélevées à 6 reprises et fixées au lugol alcalin (0,5 % en concentration finale). Un volume de 5 mL de chaque échantillon fixé est immédiatement filtré sur une membrane noire de porosité 0,8 μm , puis coloré par une solution de DAPI (1 $\mu\text{g/mL}$). À chaque prélèvement, le nombre de bactéries FLB au sein des protozoaires est mesuré. Cette estimation se fait en distinguant parmi les protozoaires les flagellés, les dinoflagellés et les ciliés. De plus, dans chacun de ces types de protozoaires, les organismes strictement hétérotrophes sont distingués des organismes mixotrophes qui peuvent avoir à la fois un comportement phototrophe et hétérotrophe. Cette distinction s'effectue en microscopie à épifluorescence grâce à l'utilisation de combinaisons de filtres d'excitation et d'émission permettant de visualiser les organismes ayant ingéré des bactéries FLB et contenant de la chlorophylle (organismes mixotrophes) (BOUVIER *et al.*, 1998). Pour chacune des six classes de protozoaires le nombre de bactéries FLB ingérées est porté en fonction du temps. Le taux d'ingestion par protozoaire et par heure I_{FLB} est calculé comme la pente à l'origine de cette relation. Le taux d'ingestion des bactéries I est calculé par la relation suivante qui prend en compte le rapport entre l'abondance des bactéries autochtones (N_{aut}) et l'abondance des bactéries FLB ajoutées (N_{FLB}) : $I = I_{\text{FLB}} (N_{\text{FLB}} + N_{\text{aut}}) / N_{\text{FLB}}$. Les mesures effectuées permettent ainsi de calculer pour chaque prélèvement le taux d'ingestion pour les six classes de protozoaires. Le tableau 1 reprend les gammes des valeurs de taux d'ingestion obtenus lors de sept campagnes réalisées en Meuse (de une à deux fois par mois entre mars et juin 1996). On observe des variations temporelles importantes des taux d'ingestion des bactéries par chacune des classes en raison de variations de la composition des populations de protozoaires et de la température. Clairement, des valeurs plus élevées sont observées pour les ciliés et dinoflagellés que pour les flagellés, ce qui est en accord avec les résultats de la littérature. Les taux mesurés en Meuse sont, par ailleurs, du même ordre de grandeur que ceux mesurés en lac par BLOEM *et al.* (1989) et CHRZANOWSKI et SIMEK (1990). Les résultats obtenus en Meuse montrent clairement que les taux de broutage des organismes mixotrophes ne sont pas significativement inférieurs à ceux du même type d'organismes strictement hétérotrophes. Vu leur abondance, les organismes mixotrophes contribuent pour une part significative (de 10 à 40 %) au broutage des bactéries. Une contribution importante des organismes mixotrophes au broutage des bactéries a déjà été mise en évidence dans d'autres milieux aquatiques (SCHNEPF et ELBRACHTER, 1992 ; LI *et al.*, 1996).

Tableau 1 Taux d'ingestion minimum (I_{\min}) et maximum (I_{\max}) des bactéries par les ciliés, dinoflagellés et flagellés, strictement hétérotrophes et mixotrophes.

Table 1 Minimum ingestion rates (I_{\min}) and maximum ingestion rates (I_{\max}) of strictly heterotrophic and mixotrophic ciliates, dinoflagellates and flagellates.

	I_{\min} (bact/protozoa.h)	I_{\max} (bact/protozoa.h)
Ciliés hétérotrophes	5,1	82,5
Ciliés mixotrophes	5,3	79,5
Dinoflagellés hétérotrophes	5,1	112
Dinoflagellés mixotrophes	2,3	84,1
Flagellés hétérotrophes	0	27,5
Flagellés mixotrophes	0	27,0

À partir des taux d'ingestion, de l'abondance des diverses classes de protozoaires et du contenu en carbone des bactéries, il est possible de calculer les flux de carbone transitant du compartiment bactérien vers les protozoaires. Ceux-ci peuvent être comparés aux flux de broitage calculés ci-dessus sur base de la méthode faisant appel au marquage radioactif à la thymidine. À la figure 2 sont portées, l'une en fonction de l'autre, les deux estimations de flux de broitage pour les campagnes où les deux types de mesures ont effectuées en parallèle. La figure 2 montre une excellente corrélation entre les deux estimations ($r^2 = 0,97$,

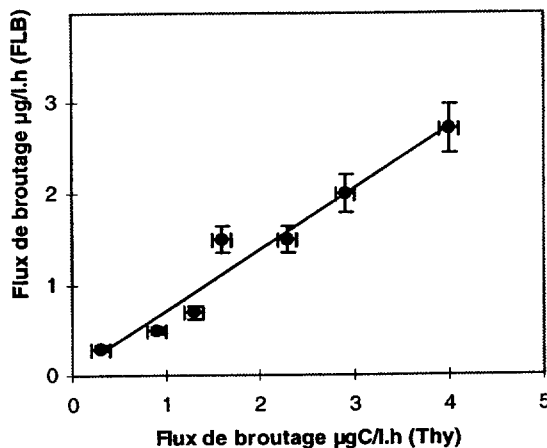


Figure 2 Flux de broitage des bactéries estimés à partir de la méthode FLB portés en fonction des flux de broitage estimés à partir de la méthode basée sur le marquage à la thymidine (Thy) sur les mêmes échantillons. Droite de corrélation : $y = 0,68x - 0,03$ ($r^2 = 0,97$, $n = 7$).

Flux of bacterial grazing estimated by the FLB method plotted against flux of bacterial grazing estimated on the same samples by the method based on thymidine (Thy) labeling.

Correlation straight line : $y = 0.68x - 0.03$ ($r^2 = 0.97$, $n = 7$).

n = 7), mais met en évidence que les valeurs obtenues à partir de la méthode FLB sont systématiquement un peu inférieures à celles obtenues par l'autre méthode. Comme l'ordonnée à l'origine de la corrélation est très faible, sa pente est caractéristique du rapport moyen entre les flux obtenus par la méthode FLB et ceux obtenus par la méthode thymidine ; ce rapport vaut 0,68. Il indique qu'en moyenne, les valeurs mesurées par la méthode FLB sont de 32 % inférieures à celles estimées par l'autre technique. Diverses raisons peuvent être responsables de cette différence. Dans le cas de la méthode FLB, les techniques microscopiques utilisées et les volumes filtrés n'ont pas permis de prendre en compte l'éventuel broutage des bactéries par des organismes de taille supérieure à 100 μm . Ce type de broutage est par contre pris en compte par la méthode de marquage radioactif. La présence de rotifères (par exemple, *Brachionus calyciflorus*) et de cladocères (par exemple, *Daphnia magna* et *Bosmina longirostris*) a été récemment mise en évidence en Meuse (JOAQUIM-JUSTO *et al.*, 1995 ; GOSSELAIN *et al.*, 1996). Pendant la période où notre comparaison a été effectuée en 1996 (entre mars et juin), les rotifères dominaient le zooplancton en Meuse ; ils se sont développés à partir d'avril pour atteindre une abondance de 3 500 individus par litre en juin (GOSSELAIN *et al.*, 1998). Même si ces organismes sont surtout connus pour avoir un effet de prédation sur le phytoplancton, on ne peut exclure une contribution de leur part au broutage de bactéries non prise en compte par la méthode FLB. D'autre part, certains auteurs ont évoqué une possible sous-estimation du broutage par la méthode FLB pour des raisons méthodologiques. Même si l'utilisation de FLB, bactéries colorées et mortes, semble donner des estimations de taux d'ingestion acceptables dans certaines conditions (SHERR *et al.*, 1989), un broutage plus faible des bactéries colorées et mortes, par rapport à celui exercé sur des bactéries colorées mais vivantes, a été montré (LANDRY *et al.*, 1991 ; MONGER and LANDRY, 1992). Par ailleurs, certains auteurs (SIERACKI *et al.*, 1987) ont mis en évidence, au moment de la fixation de l'échantillon, un possible relargage de bactéries qui avaient été ingérées. Les trois raisons évoquées ci-dessus paraissent des explications plausibles à la différence des flux de broutage estimés en Meuse.

Les deux méthodes testées, dans cette étude, pour évaluer le broutage, bien que totalement indépendantes à la fois dans leur principe et dans les techniques expérimentales mises en œuvre, sont très bien corrélées et donnent des estimations du même ordre de grandeur des flux de carbone transitant du compartiment bactérien vers les protozoaires. Ceci semble attester de la pertinence de ces deux méthodes. Néanmoins des différences sont observées entre les deux estimations de flux de carbone transitant des bactéries vers les protozoaires pour lesquelles un certain nombre d'hypothèses explicatives peuvent être émises. Si l'objectif est simplement d'évaluer le flux de bactéries consommées par broutage, la méthode basée sur le marquage à la thymidine apparaît nettement plus simple à mettre en œuvre et ne pose pas certains problèmes méthodologiques pouvant entraîner une sous-estimation de ce flux lors de l'utilisation de la méthode FLB. Par contre, la méthode FLB permet une étude beaucoup plus complète du broutage, puisqu'elle donne des informations sur le type d'organismes principalement responsables de la consommation des bactéries. Elle a ainsi permis de mettre en évidence dans cette étude le rôle important des organismes mixotrophes. Elle présente, par contre, le désavantage de nécessiter de nombreuses énumérations microscopiques longues et fastidieuses.

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés ci-dessus ont été réalisés dans le cadre d'une étude intitulée « Étude des relations trophiques au sein du plancton en milieu fluvial » soutenue par le Fonds de la Recherche Fondamentale et Collective (Belgique) (Programme FRFC N° 2.4545.94).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBRIGHT L.J., SHERR E.B., SHERR B.F., FALLON R.D., 1987. Grazing of ciliated protozoa on free and particle-attached bacteria. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **38**, 137-149.
- AZAM F., FENCHEL T., FIELD J.G., GRAY J.S., MEYER-REIL L.A., THINGSTAD F., 1983. The ecological role of water column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **10**, 257-263.
- BLOEM J., ELLENBROECK F.M., BAR-GILISEN M.B.J., CAPPENBERG T.E., 1989. Protozoan grazing and bacterial production in stratified lake Vechten estimated with fluorescently labeled bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1787-1795.
- BORSHEIM K.Y., 1984. Clearance rates of bacteria-sized particles by freshwater ciliates measured with monodisperse fluorescent latex boards. *Oecologia*, **63**, 286-288.
- BOUVIER T., BECQUEVORT S., LANCELOT C., 1998. Biomass and feeding activity of phagotrophic mixotrophs in the northern Black Sea during summer 1995. *Hydrobiologia*, **363**, 289-301.
- CHRZANOWSKI T.H., SIMEK K., 1990. Prey-size selection by freshwater flagellated protozoa. *Limnol. Oceanogr.*, **35**, 1429-1436.
- COLE J.J., FINDLAY S., PACE M.L., 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross system overview. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **43**, 1-10.
- DUCKLOW H.W., HILL S.M., 1985. The growth of heterotrophic bacteria in the surface waters of warm core rings. *Limnol. Oceanogr.*, **30**, 239-259.
- FUHRMAN J.A., McMANUS G.B., 1984. Do bacteria-sized eukariotes consume significant bacterial production. *Science*, **224**, 1257-1260.
- GARNIER J., BARILLIER A., 1991. Synthèse et dégradation de la matière organique dans les écosystèmes aquatiques: Boucle microbienne et statut trophique. *Océanis*, **17**, 561-580.
- GOSSELAIN V., JOAQUIM-JUSTO C., VIROUX L., MENA M., METENS A., DESCY J.P., THOME J.P., 1996. Laboratory and *in situ* grazing rates of large river rotifers and their contribution to community grazing. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, **113**, 356-361.
- GOSSELAIN V., VIROUX L., DESCY J.P., 1998. Can a community of small-bodied grazers control phytoplankton in rivers. *Freshwat. Biol.*, **39**, 9-24.
- JOAQUIM-JUSTO C., GOSSELAIN V., DESCY J.P., THOMÉ J.P., 1995. Relative importance of the trophic and direct pathways on PCB contamination in the rotifer *Brachionus calyciflorus* (Pallas). *Hydrobiologia*, **313/314**, 249-257.
- LANDRY M.R., HASS L.W., FAGERNESS V., 1984. Dynamics of microbial plankton communities experiments in Kaneohe Bay, Hawaii. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **16**, 127-133.
- LANDRY M.R., LEHNER-FOURNIER J.M., SUNDSTROM J.A., FAGERNESS V.L., SELPH K.E., 1991. Discrimination between living and heat-killed prey by a marine zooflagellate, *Paraphysomonas vestita* (Stokes). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **146**, 139-151.
- LANDRY M.R., 1994. Methods and controls for measuring the grazing Impact of planktonic protists. *Mar. Microb. Food Webs*, **8**, 37-57.
- LI A., STOECKER D.K., COATS D.W., ADAM E.J., 1996. Ingestion of fluorescently labeled phycoerythrin containing prey by mixotro-

- phic dinoflagellates. *Aquat. Microb. Ecol.*, 10, 139-147
- McMANUS G.B., FUHRMAN J.A., 1988. Control of marine bacterioplankton populations: measurement and significance of grazing. *Hydrobiologia*, 159, 51-62.
- MASSANA R., GARCIA-CANTIZANO J., PEDROS-ALIO C., 1996. Components, structure and fluxes of the microbial food web in a small, stratified lake. *Aquat. Microb. Ecol.* 11, 279-288.
- MONGER B.C., LANDRY M.R., 1992. Size-selective grazing by heterotrophic nanoflagellates: an analysis using live-stained bacteria and dual-beam flow cytometry. *Arch. Hydrobiol. Beih.*, 37, 173-185.
- MENON P., 1993. Mortalité des bactéries allochtones rejetées dans les milieux aquatiques. *Thèse de Doctorat. Université de Paris VI*. 140 p.
- NEWELL S.Y., SHERR B.F., SHERR E.B., FALLON R.D., 1983. Bacterial response to the presence of eukaryotic inhibitors in water from a coastal marine environment. *Marine Envir. Res.*, 10, 147-157.
- NYGAARD K., HESSEN D.O., 1990. Use of ¹⁴C-protein labelled bacteria for estimating clearance rates by heterotrophic and mixotrophic flagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 68, 7-14.
- PORTER K.G., FEIG Y.S., 1980. Use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, 25, 943-948
- SANDERS P., 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. Environ. Microbiol.*, 52, 101-107
- SANDERS R.W., CARON D.A., BERNINGER U.G., 1992. Relationships between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh waters: an inter-ecosystem comparison. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 86, 1-14.
- SCHNEPF E.M., ELBRACHTER M., 1992. Nutritional strategies in dinoflagellates. *Eur. J. protistol.*, 28, 3-24.
- SERVAIS P., BILLEN G., VIVES-REGO J., 1985. Rate of bacterial mortality in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1448-1454
- SERVAIS P., BILLEN G., MARTINEZ J., VIVES-REGO J., 1989. Estimating bacterial mortality by the disappearance of ³H-labeled intracellular DNA. Technical validation and field measurements. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 62, 119-126.
- SERVAIS P., VIVES-REGO J., BILLEN G., 1992. Survival and mortality of bacteria in natural environments In: *Release of genetically engineered and other microorganisms*. J.C. Fry & M.J Day [Ed.], Cambridge University Press, 100-119.
- SERVAIS P., DESCY J.P., THOME J.P., GOSSELAIN V., JOAQUIM-JUSTO C., 1997. Étude des relations trophiques au sein du plancton en milieu fluvial. *Rapport final FRFC*, 16 p.
- SHERR B.F., SHERR E.B., FALLON R.D., 1987. Use of monodispersed fluorescently labeled bacteria to estimate *in situ* protozoan bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 958-965.
- SHERR B.F., SHERR E.B., RASSOULZADEGAN F., 1988. Rates of digestion of bacteria by marine phagotrophic protozoa: temperature dependence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1091-1095.
- SHERR E.B., RASSOULZADEGAN F., SHERR B.F., 1989. Bacterivory by pelagic choreotrichous ciliates in coastal waters of the NW Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 55, 235-240.
- SIERACHI M.E., HAAS L.W., CARON D.A., LESSARD E.J., 1987. Effect of fixation on particle retention by microflagellates: underestimation of grazing rates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 38, 251-258.
- SIMON M., AZAM F., 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 51, 201-213.
- WHITE P.A., KALF J., RASMUSSEN J.B., GAZOL J.M., 1991. The effect of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine habitats. *Microb. Ecol.* 21, 99-118.
- WRIGHT R.T., COFFIN R.B., 1984. Measuring microzooplankton grazing on planktonic marine bacteria by its impact on bacterial production. *Microb. Ecol.*, 10, 137-149.