



HAL
open science

Étude de la structure chimique et microbiologique de l'interface air-mer en Baie de Guanabara (Rio de Janeiro, Brésil)

Luciana Contador

► **To cite this version:**

Luciana Contador. Étude de la structure chimique et microbiologique de l'interface air-mer en Baie de Guanabara (Rio de Janeiro, Brésil). Océan, Atmosphère. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2006. Français. NNT: . tel-00122547

HAL Id: tel-00122547

<https://theses.hal.science/tel-00122547>

Submitted on 3 Jan 2007

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS VI

Spécialité : Océanographie et Environnement Marin

présentée et soutenue publiquement le
08 septembre 2006
par

Luciana CONTADOR

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'Université Paris VI

Étude de la structure chimique et microbiologique de
l'interface air-mer en Baie de Guanabara (Brésil)

Directeurs de thèse : Pr. Alain Saliot
Pr. Philippe Lebaron
Pr. Madre Fatima de Maron Ramos

JURY :

Madre Fatima de MARON RAMOS	Professeur – Université Santa Úrsula, Brésil	Examineur
Mme Elaine ALBUQUERQUE	Professeur – Université Santa Úrsula, Brésil	Rapporteur
Mme Muriel BOURRAIN	Chercheur – Équipe mixte de recherche Pierre Fabre / CNRS / UPMC, Banyuls	Examineur
M Jean OUDOT	Professeur – Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris	Rapporteur
M Jean-Claude NICOLAS	Professeur – Université Paris VI, Paris	Examineur
M Alain SALIOT	Professeur – Université Paris VI, Paris	Examineur
M Philippe LEBARON	Professeur – Université Paris VI, Paris	Examineur

Étude de la structure chimique et microbiologique de l'interface air-mer en Baie de Guanabara (Rio de Janeiro, Brésil).

Résumé :

La microcouche de surface (SML) correspond au premier millimètre de la colonne d'eau. Située à l'interface air-eau, la SML est un environnement unique, riche en microorganismes, en matières organiques, en hydrocarbures et présentant des conditions extrêmes par l'impact des radiations UV et les fortes concentrations de polluants. Les échantillons ont été prélevés dans la SML et dans l'eau sous-jacente (UW) à 7 stations de la Baie de Guanabara, Brésil. Cette étude a permis de caractériser l'abondance et la diversité des bactéries et des hydrocarbures présents dans la SML de la baie. L'origine des hydrocarbures a été analysée par des marqueurs chimiques par chromatographie en phase gazeuse. Sur le plan microbiologique, 43 souches bactériennes ont été isolées et identifiées. Leur résistance aux radiations UV a été évaluée à l'aide d'un simulateur solaire. La SML de la baie est bien définie par rapport à l'UW et enrichie en hydrocarbures et en bactéries. Le bactérioneuston est plus diversifié que le bactérioplancton. La plupart des souches testées sont très résistantes aux UV et sont des espèces potentiellement intéressantes sur le plan biotechnologique.

Mots-clés :

microcouche de surface ; Baie de Guanabara ; bactérioneuston ; hydrocarbures ; radiations solaires ; chromatographie en phase gazeuse ; SSCP (*single strand conformation polymorphism*)

The microbial and chemical structure of the sea surface microlayer at Guanabara Bay (Brazil)

Abstract:

The surface microlayer (SML) covers the upper millimeter of the water. At the air-water interface, the SML is a unique environment, where microorganisms, organic matter, hydrocarbons and pollutants concentrate. The SML is considered an extreme environment due to high concentrations of pollutants and intense solar radiation. The SML and the underlying water (UW) were collected at 7 stations in Guanabara Bay, Brazil. The SML of the bay was characterized by its hydrocarbons, total bacterial counts and bacterioneuston diversity. Chemical markers analyzed by gas phase chromatography were used to identify the hydrocarbons sources. A total of 43 bacterial strains were isolated and identified, their resistance to UV radiation was evaluated by exposition to simulated solar radiation. The SML at BG is well discriminated with respect to UW, enriched in hydrocarbons and bacteria. The bacterioneuston shows a higher diversity than the bacterioplankton. Most of the bacterial strains tested were resistant to UV radiation and were potentially of great interest for biotechnology.

Key-words:

surface microlayer ; Guanabara Bay ; bacterioneuston ; hydrocarbons ; solar radiations ; gas phase chromatography ; SSCP (*single strand conformation polymorphism*)

Cette thèse a été réalisée :

au Laboratoire d'Écologie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls/mer –
Laboratoire d'Océanographie Biologique, Université Pierre et Marie Curie
BP 44, 66651 Banyuls-sur-Mer Cedex, France



au Laboratoire d'Océanographie et du Climat : Expérimentation et Approches
Numériques ; (LOCEAN) – Université Pierre et Marie Curie
4, place Jussieu – tours 46-00, 5^e étage – 75252 Paris CEDEX 05

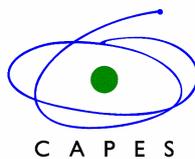


et au Laboratoire de Microbiologie Marine de l'Université Santa Úrsula
Rua Jornalista Orlando Dantas, 59 Botafogo – 22231-010 Rio de Janeiro, Brésil



Support financier (bourse d'étude) :

CAPES (Coordination pour le Perfectionnement du Personnel de l'Enseignement
Supérieur – Ministère de l'Éducation – Brésil)





À João Paulo

À Vovó Santinha

Remerciements

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mes directeurs de thèse Monsieur Alain Saliot et Monsieur Philippe Lebaron, professeurs de l'Université Paris VI, pour l'accueil cordial qu'ils m'ont réservé, pour la confiance qu'ils m'ont accordée et pour l'attention avec laquelle ils ont dirigé ce travail. Merci pour votre disponibilité et vos encouragements.

J'exprime également toute ma gratitude à Madre Fatima de Maron Ramos, chancelier de l'Université Santa Úrsula. Vous avez été un des initiateurs de ce projet et vous avez grandement contribué à son bon déroulement.

J'adresse à la CAPES (Coordination pour le Perfectionnement du Personnel de l'Enseignement Supérieur – Ministère de l'Éducation – Brésil) mes remerciements pour m'avoir attribué un support financier de trois ans qui m'a permis de mener à bien mes recherches dans des conditions très satisfaisantes.

Je remercie vivement l'ensemble des membres du jury de cette thèse : Madame Elaine Albuquerque, professeur de l'Université Santa Úrsula et Monsieur Jean Oudot, professeur de l'Université Paris VII, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci à Madame Muriel Bourrain, chercheur de l'équipe mixte de recherche Pierre Fabre/CNRS/UPMC et au Monsieur Jean-Claude Nicolas, professeur de l'Université Paris VI pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'examiner ce travail. Je vous remercie tous pour votre lecture critique de ce document.

Merci de tout cœur Anissa et Hélène, merci pour l'encouragement et l'amitié. Bonne chance !

Je remercie tous les membres de l'équipe du Laboratoire LOCEAN, ancien LBCM : Geneviève, André, Christian, Dany, Catherine, Anne, Joëlle. Merci aux thésards : Emilie, Claire, Saida, Antoine, Hatem.

Merci aux personnes du laboratoire d'écologie microbienne (aux microbes) : Marièle, Laurent, Annabelle, Lœtitia, Nicole, Ingrid, Fabien, Jeff, Muriel, Julia, Philippe. Merci de votre disponibilité sans limite et vos encouragements.

Merci chaleureuse à ma famille brésilienne en France : Carmen, Cristian, Gabriela, Isabel, Joel, Adriana et Marcio. (*Muito obrigada por toda a ajuda e por fazerem com que eu me sentisse de novo em casa.*)

Je remercie à la meilleure famille du monde (la mienne). Merci pour l'affection infinie et pour votre présence à mes côtés. C'est grâce à vous que je suis arrivée jusque là.

J'ai bien sûr une pensée toute particulière pour João Paulo, mon compagnon de chaque instant. Merci pour ton amitié, ton écoute, ta patience, ton amour. *Je t'aime à la folie.*

TABLES DE MATIÈRES

Chapitre I - Introduction

I.1 L'interface air-mer – la microcouche de surface (SML)	16
I.2 Le neuston	18
I.2.1 Le virioneuston	19
I.2.2 Le bacterioneuston	20
I.2.3 Le phytoneuston	21
I.2.4 Le zooneuston	22
I.3 Les hydrocarbures de la microcouche de surface	22
I.4 Les radiations solaires	25
I.5 Objectives	29

Chapitre II – Présentation du site d'étude

II. Présentation du site d'étude - La Baie de Guanabara	31
--	-----------

Chapitre III - Méthodologie

III.1 Stratégie d'échantillonnage	38
III.2 Prélèvement des échantillons	39
III.3 Analyses microbiennes	41
III.3.1 Bactéries cultivables	41
III.3.2 Bactéries totales	41
III.3.3 Isolement de souches	42
III.3.4 Caractérisation moléculaire des isolats	42
III.3.4.1 Extraction de l'ADN	42
III.3.4.2 Amplification de l'ADNr 16S	42
III.3.4.3 Criblage génotypique des isolats par RFLP	43
III.3.4.4 Séquençage	45
III.3.5 SSCP	46
III.3.6 Expérience sur la résistance des souches aux radiations solaires	48
III.4 Analyses chimiques	51
III.4.1 Précautions prises au cours des manipulations	51
III.4.2 Séparation entre les fractions dissoute et particulaire	51
III.4.3 Extraction	52
III.4.3.1 Fraction dissoute	52

III.4.3.2 Fraction particulière	52
III.4.4 Séparation chromatographique sur gel de silice	53
III.4.5 Méthodes de quantification et d'identification	53
III.4.5.1 Chromatographie en phase gazeuse (GC)	53

Chapitre IV - Résultats

IV.1 Analyses chimiques: les hydrocarbures de la microcouche de surface	56
IV.2 Analyses microbiennes	61
IV.2.1 Quantification des bactéries totales et cultivables	61
IV.2.2 Identification des bactéries	65
IV.2.3 Résistance aux radiations solaires	69
IV.2.3 La diversité du bactérioneuston (SSCP)	72

Chapitre V - Discussion

V.1 Les hydrocarbures à la microcouche de surface	79
V.2 Le bactérioneuston	81
V.2.1 Identification des souches bactériennes	84
V.2.2 La résistance des souches bactériennes aux radiations solaires	85
V.2.4 La structure populationnelle des communautés bactériennes	88
V.3 Discussion générale	89

Chapitre VI - Conclusions & Perspectives

VI.1 Conclusions	92
VI.2 Perspectives futures	94
Références Bibliographiques	96
Annexes	118

INDEX DES FIGURES

Chapitre I

Figure 1 - Mécanismes d'échange à l'interface air-mer	16
Figure 2 - Distribution des microorganismes dans la couche de surface	18

Chapitre II

Figure 3 – La Baie de Guanabara - Rio de Janeiro – Brésil	31
Figure 4 - Carte de la bathymétrie de la Baie de Guanabara	33

Chapitre III

Figure 5 - Localisation des sites de échantillonnage dans la Baie de Guanabara	38
Figure 6 - Échantillonnage de la microcouche à l'aide d'un tamis en métal	40
Figure 7 - Simulateur solaire et microplaque avec souches en duplicat	50

Chapitre IV

Figure 8 - Chromatogramme en phase gazeuse des hydrocarbures aliphatiques extraits de la microcouche de surface à la St1	56
Figure 9 - Distribution des données (bactéries cultivables de l'année 2003) avant et après transformation logarithmique	63
Figure 10 - Arbre phylogénétique construit à partir des séquences partiels de l'ADNr 16S des souches isolées dans la Baie de Guanabara	68
Figure 11 - Courbes de croissance des souches résistantes après leur exposition au simulateur solaire	69
Figure 12 - Distribution des souches testées par rapport à leur résistance après leur exposition au simulateur solaire	71
Figure 13 - Distribution des souches pigmentées et non pigmentées testées par rapport à leur résistance après leur exposition au simulateur solaire	71
Figure 14 - Profils de SSCP pour la SML et l'UW dans la Baie de Guanabara	73
Figure 15 - Profils de SSCP du suivi de 3 jours à 5h et à midi pour la SML et l'UW	74
Figure 16 - Dendrogramme construit à partir des distances euclidiennes entre les profils de SSCP pour la SML et UW dans la Baie de Guanabara	76
Figure 17 - Dendrogramme construit à partir des distances euclidiennes entre les profils de SSCP du suivi de 3 jours à 5h et à midi pour la SML et l'UW	77

INDEX DES TABLEAUX

Chapitre II

Tableau 1 - Classification de la qualité bactériologique des eaux de baignade _____	35
--	-----------

Chapitre III

Tableau 2 - Localisation géographique des sites d'échantillonnage dans la Baie de Guanabara _____	39
--	-----------

Tableau 3 - Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par PCR sur les ADN totaux _____	43
--	-----------

Tableau 4 - Sources et séquences de reconnaissance pour la coupure des enzymes de restriction _____	44
--	-----------

Tableau 5 - Solutions d'hydrolyse pour la criblage génotypique par RFLP _____	44
--	-----------

Tableau 6 - Séquence d'amorce interne de séquençage _____	45
--	-----------

Tableau 7 - Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par PCR sur les ADN totaux _____	47
--	-----------

Tableau 8 - Conditions expérimentales: intensités et doses horaires de PAR, UVA et UVB _____	48
---	-----------

Chapitre IV

Tableau 9 - Concentrations des hydrocarbures aliphatiques totaux, n-alcanes, pristane, phytane et UCM (enveloppe des composés non résolus) _____	57
---	-----------

Tableau 10 - Rapports caractéristiques et indicateurs aliphatiques pour les échantillons de la Baie de Guanabara _____	58
---	-----------

Tableau 11 - Facteurs d'enrichissement des hydrocarbures aliphatiques _____	59
--	-----------

Tableau 12 - Test t (Student) SML x UW _____	60
---	-----------

Tableau 13 - Test t entrée x fond _____	60
--	-----------

Tableau 14 - Résultats des quantifications des bactéries totales et cultivables. Campagne 2003 _____	61
---	-----------

Tableau 15 - Résultats des quantifications des bactéries totales et cultivables. Campagne 2004 _____	62
---	-----------

Tableau 16 - Facteurs d'enrichissement des bactéries cultivables et totales dans la microcouche de surface en comparaison avec l'eau sous-jacente (0,5m et 5m). Campagne 2003 _____	62
--	-----------

Tableau 17 - Facteurs d'enrichissement des bactéries cultivables et totales dans la microcouche de surface en comparaison avec l'eau sous-jacente (0,5m). Campagne 2004 _____	63
Tableau 18 - Analyse des variations des bactéries totales et cultivables en fonction de la profondeur (SML, UW et 5m) et de l'heure d'échantillonnage (5h et 12h) par le test t (Student). Campagnes de prélèvement de 2003 et 2004 _____	64
Tableau 19 - Analyse des variations des bactéries totales et cultivables en fonction de la localisation des sites d'échantillonnage (entrée = St1, St2 et St3 x fond = St4, St5, St6 et St7) par le test t (Student). Campagnes de prélèvement de 2003 et 2004 _____	64
Tableau 20 - Regressions linéaires entre les densités des bactéries totales et les hydrocarbures non aromatiques _____	65
Tableau 21 - Résultats du séquençage des souches bactériennes isolées de la Baie de Guanabara _____	66
Tableau 22 - Résultats du séquençage des souches bactériennes isolées de la Baie de Guanabara. Similarité aux séquences de clones du GenBank _____	67
Tableau 23 - Classes de résistance des souches bactériennes aux rayons solaires ____	69
Tableau 24 - Temps maximum de résistance des souches bactériennes testées au simulateur solaire _____	70
Tableau 25 - Nombre des pics prédominants ($\geq 3\%$ de la surface totale) dans les profils de SSCP _____	72
Tableau 26 - Nombre des pics prédominants ($\geq 3\%$ de la surface totale) dans les profils de SSCP _____	72

Chapitre I

L'interface air-mer – La microcouche de surface

I.1 L'interface air-mer – la microcouche de surface (SML)

La microcouche de surface (SML) ou film de surface correspond à l'interface entre l'eau et l'air (Liss, 1975). L'épaisseur de la microcouche dépend de plusieurs facteurs, comme la concentration en matière organique (Cincinelli *et al.*, 2001), les conditions météorologiques (Liu & Dickhut, 1998) et la méthodologie d'échantillonnage (Garrett, 1967a), mais est opérationnellement définie comme le premier millimètre de la colonne d'eau (Macintyre, 1974 ; Hardy, 1982 ; GESAMP, 1995 ; Liss & Duce, 1997).

L'interface air-mer est le siège d'échanges de matière et d'énergie entre l'Océan et l'Atmosphère (Hunter & Liss, 1981 ; Hardy, 1982 ; Carlson, 1993 ; GESAMP, 1995 ; Liss & Duce, 1997) (Figure 1).

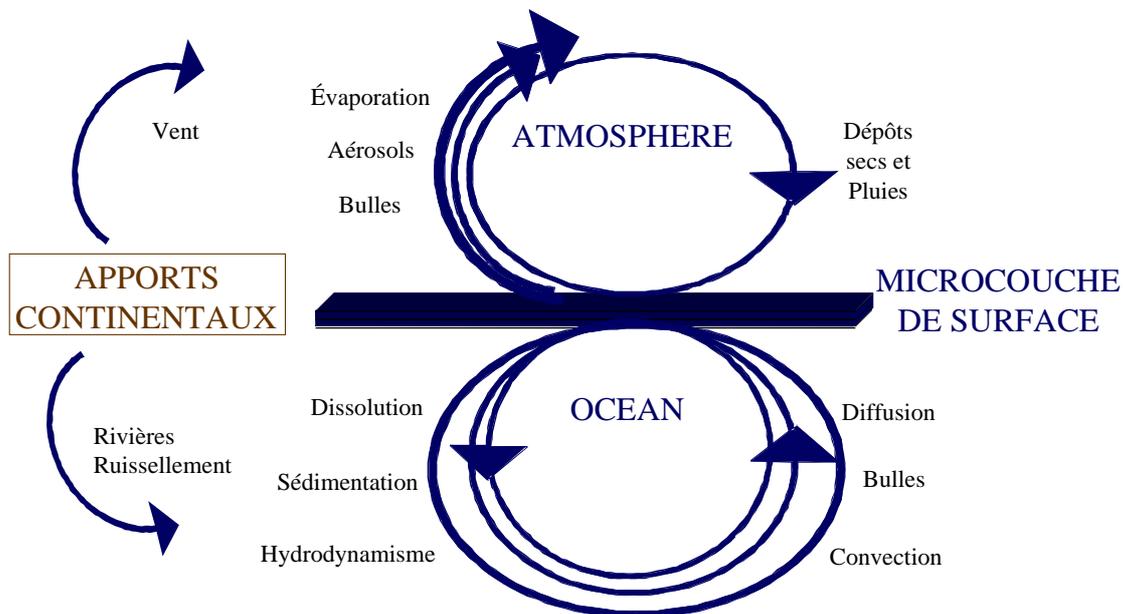


Figure 1 - Mécanismes d'échange à l'interface air-mer (Liss, 1975)

La microcouche reçoit des substances gazeuses, liquides (pluies) et solides (particules et aérosols) qui proviennent de l'atmosphère et des apports continentaux.

Ces substances sont transportées vers la colonne d'eau par dissolution, sédimentation et l'hydrodynamisme. Les substances dissoutes et particulaires et les microorganismes dans la colonne d'eau sont apportés à la surface par diffusion, adsorption sur des bulles de gaz, convection et par la résurgence (*upwelling*) de l'eau sous-jacente. L'évaporation des composés volatils et la formation, par le vent, d'aérosols et de bulles de gaz transportent les substances de la microcouche vers l'atmosphère.

La cohésion de cette interface est assurée par les propriétés tensioactives de composés organiques, particulièrement les lipides (Romano & Garabetian, 1996). Les films organiques sont présents dans tous les milieux aquatiques. En général les films de surface sont fins et invisibles à l'œil nu ; mais quand le film de surface est concentré, grâce aux mouvements des courants par exemple, les ondes capillaires sont atténuées et le film devient visible comme une nappe de surface (*surface slicks*) (Dietz & Lafond, 1950; Garrett, 1967 a et b; Lafond & Lafond, 1972; Cini *et al.*, 1983; Romano & Garabetian, 1996).

La stabilité physique de la microcouche, résultant de la tension de surface et des propriétés tensioactives, permet la concentration des particules en suspension, organismes et substances diverses à la surface. La microcouche est ainsi considérée comme un environnement unique, caractérisé par une forte concentration de matières organiques, telles les protéines, les acides aminés, les acides gras et les lipides (Jarvis *et al.*, 1967 ; Larsson *et al.*, 1974 ; Marty *et al.*, 1988), les hydrocarbures (Garrett, 1967 a ; Marty & Saliot, 1974), les nutriments (Goering & Menzel, 1965 ; Williams, 1967), les éléments métalliques associés à du matériel organique particulaire ou dissous (Piotrowicz *et al.*, 1972). On note également de fortes concentrations en microorganismes (Blanchard & Syzdek, 1970 ; Marumo *et al.*, 1971 ; Tsyban, 1971 ; Dahlbach *et al.*, 1982 ; Hardy, 1982).

Le rapport des concentrations des organismes, particules, composés chimiques dans la microcouche à celles trouvées dans l'eau sous-jacente est le facteur d'enrichissement (EF).

Les processus physiques, chimiques et biologiques de l'interface air-mer ne sont pas limités à la microcouche de surface. Hardy et Word (1986) ont proposé une couche de surface structurée en plusieurs strates horizontales (figure 2).

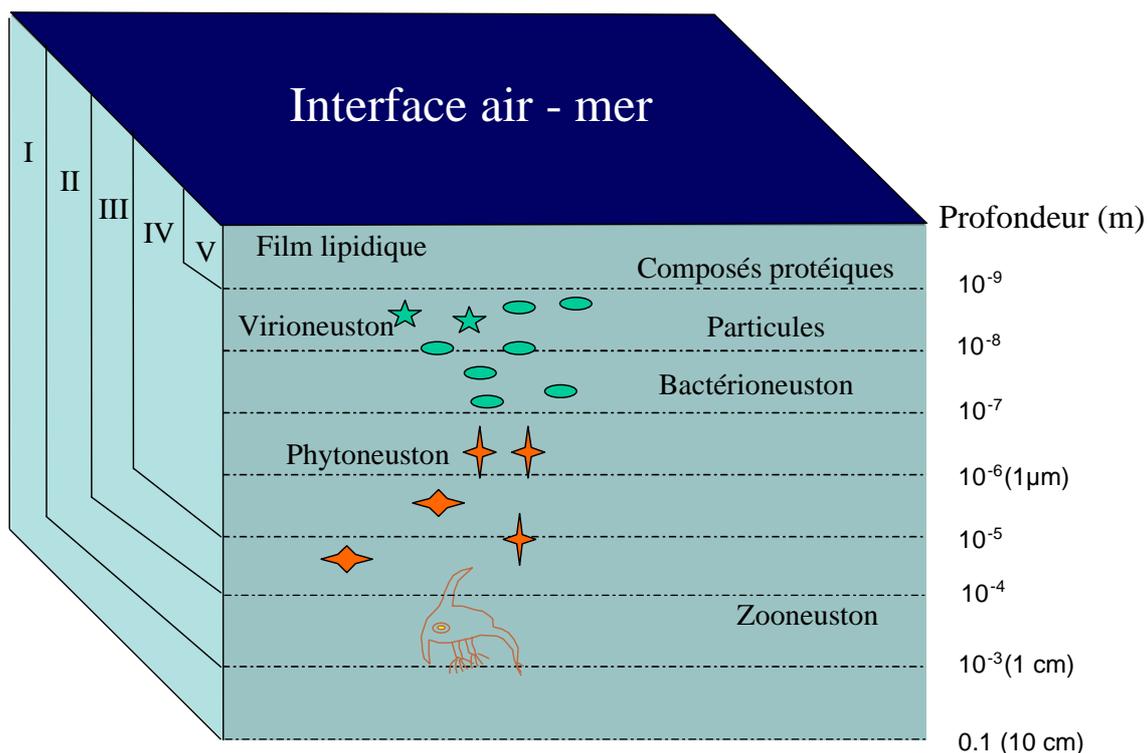


Figure 2 - Distribution des microorganismes dans la couche de surface. I - couche de surface ; II – centicouche de surface ; III – millicouche de surface ; IV – microcouche de surface (SML) ; V – nanocouche de surface.

La nanocouche de surface ($< \sim 1 \mu\text{m}$) est riche en composés organiques. La microcouche ($< \sim 1000 \mu\text{m}$) présente des densités élevées en particules et microorganismes et la millicouche de surface ($< \sim 10 \text{mm}$) est habitée par des petits animaux, des œufs et des larves de poissons et d'invertébrés.

I.2 Le neuston

La plupart des microorganismes habitent aux interfaces (Costerton *et al.*, 1985 ; Schäfer *et al.*, 1998) . L'adhésion des bactéries sur des solides est l'objet de plusieurs études (van Loosdrecht *et al.*, 1987 ; Martin *et al.*, 1992 ; Busscher *et al.*, 1995 ; Grasso *et al.*, 1997). Le film de surface est aussi l'habitat d'espèces planctoniques, particulièrement adaptées aux conditions spécifiques de ce milieu (Hardy, 1982 ; Hardy & Apts, 1984 ; Hardy *et al.*, 1987).

La concentration de matière organique dans la microcouche assure la nourriture nécessaire à la croissance des organismes qui habitent cette interface : le neuston (Naumann, 1917). Virus, bactéries, petites ciliés (Zaitsev, 1971), protozoaires (Norris, 1965), levures et moisissures (Kjelleberg & Hakansson, 1977), algues, larves, œufs et représentants (organismes) de tous les principaux groupes de plantes et animaux habitent, se reproduisent et/ou se nourrissent dans les couches de surface (figure2).

En général la microcouche présente une forte concentration de microorganismes, beaucoup plus importante que les eaux sous-jacentes (Dahlbach *et al.*, 1982).

I.2.1 Le virioneuston

Les virus sont la forme de vie la plus abondante dans l'environnement aquatique. Leur concentration dans l'océan est probablement supérieure à 10^{29} virus par litre (Wilhelm & Suttle, 1999). Les études sur l'importance écologique des virus sont récentes (Proctor & Fuhrman, 1990 ; Bratbak *et al.*, 1990 ; Thingstad *et al.*, 1993 ; Bratbak *et al.*, 1994 ; Suttle, 1994) et le virioneuston reste très peu documenté (Tapper & Hicks, 1998).

Les virus participent activement aux flux d'énergie et de matière dans le réseau trophique microbien. L'infection virale est signalée comme la principale cause de la mortalité des procaryotes dans les écosystèmes aquatiques (Fuhrman, 1999 ; Wommack & Colwell, 2000). D'ailleurs la lyse virale transforme la biomasse en matière organique dissoute (MOD), utilisée dans la production et la respiration bactériennes (Fuhrman, 1999). Cette production de MOD par la lyse virale affecte encore la structure de la communauté bactérienne (Lebaron *et al.*, 1999 ; Middelboe, 2000 ; Riemann *et al.*, 2000 ; Arrieta & Herndl, 2002). Les virus infectent également des organismes unicellulaires comme les flagellés et les algues. Dans les écosystèmes marins pélagiques, entre 6% à 26% du carbone fixé par la photosynthèse est transformé en MOD par lyse virale (Wilhelm & Suttle, 1999).

La mortalité des espèces dominantes par lyse virale affecte la composition des communautés microbiennes et entretient la richesse en espèces (Thingstad & Lignell, 1997). Les virus sont aussi capables de transférer des gènes entre espèces (Jiang & Paul, 1996 et 1998 ; Paul, 1999 ; Brüssow & Hendrix, 2002).

Dans les eaux de surface, l'abondance et l'infectivité des virus sont affectés par les effets nocifs des rayons UV (Suttle & Chen, 1992 ; Wommack *et al.*, 1996 ; Noble & Fuhrman, 1997 ; Wilhelm *et al.*, 1998 a et b). D'autre part, les radiations solaires induisent le cycle lytique dans les bactéries lysogéniques (Freifelder, 1987).

I.2.2 Le bacterioneuston

La microcouche présente une importante densité de bactéries métaboliquement actives (Sieburth, 1971 ; Bezdek & Carlucci, 1972 ; Carlucci *et al.*, 1985). Le bacterioneuston est de 100 à 1000 fois plus abondant que les communautés bactériennes de l'eau sous-jacente (MacIntyre, 1974; Dahlbach *et al.*, 1982 ; Hardy, 1982).

Les bactéries jouent un rôle fondamental dans la structure et la dynamique des réseaux trophiques et dans les cycles du carbone et des nutriments inorganiques dans les environnements marins (Cho & Azam, 1988; Azam *et al.*, 1983 ; Schauer *et al.*, 2000). Le bactérioplancton est responsable de la transformation du carbone organique dissous produit par le phytoplancton en carbone organique particulaire (biomasse bactérienne), qui est consommé ensuite par les flagellés et les ciliées (Azam *et al.*, 1983). Le bacterioneuston est essentiel dans la dégradation et la minéralisation de la matière organique d'origine naturelle et anthropique dans la microcouche (Tsyban, 1971 ; GESAMP, 1995 ; Walczak *et al.*, 2001 a et b). Le bactérioneuston joue également un rôle important dans la dégradation des polluants toxiques concentrés dans la microcouche.

Bien que l'importance des bactéries soit reconnue depuis plusieurs décades (Azam 1998, Ducklow, 2000), le nombre d'espèces bactériennes présents dans le bactérioplancton reste inconnu. Pendant longtemps, la petite taille des cellules bactériennes et l'impossibilité de cultiver la plupart (>99%) des bactéries présentes dans l'environnement (Jannasch & Jones, 1959 ; Olsen & Bakken, 1987 ; Amman *et al.*, 1995) ont rendu difficile l'étude de l'écologie et de la taxonomie bactériennes.

Des nouvelles technologies, comme la cytométrie en flux et les techniques d'empreintes moléculaires, ont permis l'approfondissement des études des communautés bactériennes (Woese, 1987 ; Marie *et al.*, 1997).

L'utilisation du gène codant l'ARNr 16S en phylogénie moléculaire (Woese, 1987) a permis une évolution significative dans le domaine de l'identification et de la taxonomie des bactéries. Les nouvelles méthodes biomoléculaires permettent une description plus précise de la diversité, de la structure et de la dynamique des communautés bactériennes (Muyzer, 1998).

Pour survivre aux conditions extrêmes de forte incidence des radiations UV et d'importantes concentrations de polluants dans la microcouche, le bacterioneuston doit présenter des mécanismes de protection et/ou de résistance. L'écologie et la diversité du bacterioneuston restent peu étudiées. L'isolement des souches neustoniques peut permettre l'identification des bactéries résistantes aux radiations UV ou capables de dégrader certains polluants. Ces études présentent un grand intérêt pour les applications biotechnologiques.

I.2.3 Le phytoneuston

Le phytoneuston rassemble une grande variété d'organismes de divers tailles et taxons. Les principaux composants du phytoneuston sont les cyanobactéries, les diatomées et les dinoflagellés.

La cyanobactérie *Trichodesmium* est un organisme phytoneustonique très important dans la production primaire et la fixation d'azote atmosphérique (Carpenter & Romans, 1991 ; Letelier & Karl, 1996 ; Capone *et al.*, 1997 ; Zehr & Ward, 2002 ; Rabouille *et al.*, 2006).

Les diatomées du genre *Nitzschia* et les dinoflagellés du genre *Prorocentrum* sont fréquemment observés dans la microcouche (Harvey, 1966 ; De Souza-Lima & Chretiennot-Dinet, 1984). Dans les eaux protégées et subissant un processus d'eutrophisation, la microcouche devient visible grâce à la forte densité (bloom) de *Prorocentrum* et d'autres espèces phytoneustoniques (GESAMP, 1995).

Diverses études montrent que le phytoneuston présente une composition spécifique distincte de celle du phytoplancton (Willians *et al.*, 1986 ; Hardy & Apts, 1989)

En général le phytoneuston présente un facteur d'enrichissement qui varie entre 10 à 1000 (Nestrova, 1980 ; Hardy *et al.*, 1988 ; Liss & Duce, 1997). Néanmoins, la photosynthèse du phytoneuston est inhibée par la forte incidence des rayons solaires dans la microcouche (Marumo *et al.*, 1971 ; Hardy 1982 ; Willians *et al.*, 1986). Les effets nocifs des rayons UV sur le phytoneuston sont indiqués par la forte concentration de phaeopigments retrouvée dans la microcouche (Hardy & Apts, 1984 ; Falkowska, 1999 b).

I.2.4 Le zooneuston

Le microzooneuston comprend les ciliés (Zaitsev, 1971), les protozoaires (Norris, 1965). Les dinoflagellés hétérotrophes *Noctiluca scintillans* et *Oxyrrhis marina* sont très abondantes dans les échantillons neustoniques (Hardy, 1973). Les tintinnides sont aussi très abondantes dans la microcouche et se nourrissent du bacterioneuston. La prédation des bactéries et d'autres microorganismes par le microzooneuston, fonctionne comme un lien entre le réseau trophique microbien et le réseau trophique classique.

Les organismes mesozooneustoniques consomment de grandes densités de microneuston (Zaitsev, 1971). Les copépodes sont très nombreux dans la microcouche, surtout la famille des Pontellidés (Zaitsev, 1971 ; Hardy, 1982). Le mesozooneuston comprend encore les isopodes et amphipodes, en général attachés à des débris (Zaitsev, 1971 ; Tully & O'Ceidigh, 1986). Certains poissons et invertébrés habitent dans la microcouche pendant la période de développement embryonnaire (oeufs) et larvaire.

Les organismes du macroneuston sont beaucoup plus rares et incluent les coelentérés comme les méduses et certains gastropodes (*Prosobranchiata* et *Nudibranchiata*).

I.3 Les hydrocarbures de la microcouche de surface

Les hydrocarbures sont les composés organiques les plus simples, constitués essentiellement de carbone et d'hydrogène. Ils présentent une grande valeur économique vu leur utilisation comme carburants, combustibles, huiles lubrifiantes et comme produits de base en synthèse pétrochimique.

On distingue les hydrocarbures aliphatiques (à chaîne droite) et les composés cycliques. Les hydrocarbures aliphatiques sont constitués d'une chaîne carbonée linéaire saturée, pouvant présenter une ou plusieurs ramifications. Les gaz de combustion (naturel et de pétrole liquéfié), l'essence et l'huile de moteur sont composés d'hydrocarbures aliphatiques.

Les composés cycliques présentent un ou plusieurs cycles. Parmi les hydrocarbures cycliques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) possèdent au moins deux cycles (aromatiques) insaturés à six atomes de carbone, dont les électrons sont délocalisés sur tout le cycle (phénomène de conjugaison).

L'interface air-mer fonctionne comme puits et source des composés anthropiques, des hydrocarbures chlorés ou pétroliers et métaux lourds, et participe activement du cycle des polluants organiques persistants (POPs) dans les écosystèmes aquatiques (Southwood *et al.*, 1999). Dans plusieurs environnements côtiers des concentrations élevées en métaux toxiques (Hoffmann *et al.*, 1974 ; Hunter, 1980; Hardy *et al.*, 1985) et en polluants organiques (Williams *et al.*, 1986 ; Hardy *et al.*, 1987 ; Cross *et al.*, 1987 ; Sauer *et al.*, 1989 ; Hardy *et al.*, 1990 ; Cincinelli *et al.*, 2001) sont observées dans la SML en comparaison avec l'eau sous-jacente.

Les hydrocarbures non-aromatiques (aliphatiques et alicycliques - HNA) et aromatiques (HAP) s'accumulent dans la SML en comparaison avec l'UW (Marty & Saliot, 1976 ; Marty *et al.*, 1979 ; Cincinelli *et al.*, 2001). En général la fraction particulaire présente des facteurs d'enrichissement plus importantes que la fraction dissoute (Marty & Saliot, 1976 ; Cincinelli *et al.*, 2001)

Les facteurs d'enrichissement des *n*-alcane varient de 0,3 à 4 dans les eaux côtières et dans les océans (Marty *et al.*, 1979 ; Boehm, 1980 ; Hô *et al.*, 1982). Pour les HAP le facteur d'enrichissement moyen varie de 9 à 21,8 (Cincinelli *et al.*, 2001). Dans les zones contaminées par du pétrole, les hydrocarbures peuvent être 1000 fois plus abondants dans la microcouche par rapport à l'eau sous-jacente (Marty & Saliot, 1976 ; Hardy *et al.*, 1987).

La toxicité des hydrocarbures est variable. En général, les hydrocarbures aromatiques sont plus toxiques que les hydrocarbures aliphatiques. L'exposition du

neuston aux polluants résulte en un impact sur l'écologie de l'environnement marin (Corsolini *et al.*, 2002 ; Wurl & Obbard, 2004).

Toutefois certaines bactéries et microalgues non seulement résistent mais peuvent dégrader les hydrocarbures et autres polluants (Johnsen *et al.*, 2002 ; Sho *et al.*, 2004).

Les hydrocarbures présents dans l'environnement proviennent de processus naturels ou anthropiques. Actuellement, on observe une augmentation des hydrocarbures d'origine anthropique par comparaison avec les hydrocarbures d'origine naturelle, notamment dans des endroits industrialisés et urbains (Bourbonniere & Meyers, 1996).

La génération naturelle des hydrocarbures dérive des feux de forêt et d'herbage, des éruptions volcaniques, de l'érosion des roches et des fuites des réservoirs naturels (NRC, 1985). La production d'hydrocarbures par les végétaux supérieurs (cires) et par les algues est importante et marquée par la prédominance des *n*-alcanes (Saliot, 1981).

Les sources anthropiques se partagent entre sources pétrolières (pétrogenèse de basse température) et sources pyrolytiques (processus de combustion à haute température) (NRC, 1985). Les principales sources anthropiques des hydrocarbures sont la circulation automobile (surtout la combustion incomplète des carburants), le chauffage urbain et les industries (Neff, 1979 ; NRC, 1985).

Les hydrocarbures sont introduits dans le milieu aquatique par des effluents industriels et municipaux, par les eaux souterraines et de ruissellements urbains et industriels, par les dépôts atmosphériques, ainsi que par les déversements accidentels de pétrole brut et de produits pétroliers (Neff, 1979 ; Eganhouse & Kaplan, 1982 ; Hoffman *et al.*, 1984 ; Burns & Saliot, 1986 ; McVeety & Hites, 1988).

La caractérisation des hydrocarbures dans l'environnement et l'identification des sources sont des tâches très importantes, mais aussi très difficiles à réaliser. L'analyse des spectres des fractions aliphatiques et aromatiques constitue une source d'informations très intéressante et indispensable dans l'identification de l'origine des hydrocarbures. L'analyse fine des spectres permet la distinction des sources biologiques et anthropiques et de différencier les origines pétrolières et pyrolytiques à partir des traceurs chimiques. La fraction aliphatique permet principalement la différenciation des

sources biologiques et anthropiques et la fraction aromatique est idéale pour la distinction des origines pétrolières et pyrolytiques.

I.4 Les radiations solaires

La microcouche de surface est fortement sensible aux irradiations du soleil qui peuvent influencer les phénomènes chimiques et biologiques.

Les premières observations sur la raréfaction de la couche d'ozone dans l'atmosphère (Molina & Rowland, 1974 ; Farman *et al.*, 1985) et l'augmentation de l'incidence des rayons UVB sur la Terre (Crutzen, 1992 ; Kerr & McElroy, 1993) ont motivé de nombreuses études sur les effets des rayons UV et les réponses des communautés biologiques.

Le soleil émet différents types de rayonnement classés en fonction de leur longueur d'onde : les rayons infrarouges (IR, >800nm), la lumière visible ou disponible pour la photosynthèse (PAR, 400-750nm) et les radiations ultraviolettes A (UVA, 320-400nm), B (UVB, 280-320nm) et C (UVC, 200-280nm) (Peak & Peak 1989). La radiation UVC, de plus forte énergie et très dangereuse, est absorbée par l'atmosphère et la couche d'ozone et n'arrive pas à la surface de la Terre. Les rayons UVB sont sélectivement absorbés par la couche d'ozone. Les rayons UVA sont les moins énergétiques et les plus pénétrants des UV et correspondent à 99% de la lumière UV qui atteint la surface de la Terre (Stolarski, 1988).

La radiation UV qui atteint la surface de la Terre correspond à environ 4% de l'énergie solaire et varie selon la latitude, la saison, l'heure, l'épaisseur de l'atmosphère et de la couche d'ozone. Les régions tropicales sont caractérisées par des niveaux naturels d'UVB très élevés (Madronich *et al.*, 1995).

Un grand nombre d'études souligne les impacts des rayons UVA et UVB sur les organismes marins, comme les bactéries (Herndl *et al.*, 1993), le phytoplancton (Ferreira *et al.*, 1997 ; Fauchot *et al.*, 2000), les protistes (Wickham & Carstens, 1998 ; Chatila *et al.*, 1999 ; Mostajir *et al.*, 1999), les métazoaires et les poissons (Rodriguez *et al.*, 2000 ; Zagarese & Williamson, 2000).

Les rayons UV pénètrent profondément dans la colonne d'eau. Dans l'océan atlantique subtropical, 10% du niveau des radiation de 340 et 380nm arrive à 35 et a 60m, respectivement (Smith & Baker, 1981 ; Fleischmann, 1989 ; Vincent & Roy, 1993 ; Obernosterer *et al.*, 1999). Dans les régions côtières les rayons UVB atteignent au moins 20m de profondeur (Smith & Baker, 1981 ; Fleischmann, 1989). Si les organismes benthiques sont affectés par les effets nocifs des rayons UV, les organismes qui habitent à la surface et dans les zones intertidales sont exposés à des niveaux très importants de rayons UVA et UVB (Booth *et al.*, 2001).

Le bactérioplancton est particulièrement affecté par les effets nocifs des rayons UV en comparaison au plancton eucaryote (Helbling *et al.*, 1995 ; Jeffrey *et al.*, 1996 a et b ; Joux *et al.*, 1999). La petite taille des cellules bactériennes et leur génome simple et haploïde avec peut ou sans redondance fonctionnelle sont indiqués comme responsables pour cette sensibilité (Joux *et al.*, 1999).

Les cellules phytoplanctoniques synthétisent des pigments comme protection contre les rayons UVB. L'importance et l'utilisation des pigments dans la protection des bactéries contre les rayons UV reste contradictoire. La petite taille des cellules bactériennes est responsable de l'empêchement d'une protection pigmentaire effective (Garcia-Pichel, 1994 ; Jeffrey *et al.*, 1996 a et b). Cependant la production des pigments photoprotecteurs comme la mycosporine et la scytonemine est observé chez les cyanobactéries (Ehling-Schulz *et al.*, 1997) et certains bactéries sont capables de convertir les mycosporines synthétisées par des algues en mycosporine-glycine, molécule ayant des caractéristiques antioxydantes (Dunlap *et al.*, 1998 ; Shick & Dunlap, 2002). Les pigments caroténoïdes jouent un rôle important dans la protection contre les effets nocifs de la radiation UVA et sont présents dans les bactéries (Wu *et al.*, 1983 ; Miki *et al.*, 1994 ; Sundin & Jacobs, 1999).

Les effets des rayons UV sur les bactéries varient selon la longueur d'onde. Les rayons UVA entraînent des dommages indirects sur l'ADN, protéines et lipides à partir de la formation d'espèces réactives de l'oxygène, comme le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et les radicales superoxyde O₂⁻ et hydroxyle OH⁻ (Xenopoulos & Bird, 1997).

La radiation UVB est fortement absorbée par l'ADN et entraîne des dommages directs et indirects aux bactéries.

Les effets indirects des UVB sur le bactérioplancton peuvent à la fois inhiber la production bactérienne ou la stimuler (Lindell *et al.*, 1996). Parmi les effets indirects nocifs on pourrait citer la production photochimique de substances toxiques comme les radicaux superoxydes et le peroxyde d'hydrogène et la libération photochimique des métaux toxiques (cuivre, aluminium) antérieurement liés (chélatés) à des macromolécules organiques (Karentz *et al.*, 1994). La radiation UV augmente la libération de matière organique dissoute (DOM) par le phytoplancton (Sommaruga *et al.*, 1997) et transforme la MOD réfractaire en formes plus labiles et vice-versa (Benner & Biddanda, 1998 ; Tranvik & Kokalj, 1998 ; Obernosterer *et al.*, 1999 ; Pausz & Herndl, 1999).

Les effets directs des rayons UVB sur les bactéries incluent la formation de lésions dans les acides nucléiques (Mitchell & Karentz, 1993), la diminution de l'activité enzymatique (Herndl *et al.*, 1993) et la réduction de la perméabilité des membranes (Klamen & Tuveson, 1982). Ces dommages résultent en la réduction de la viabilité du bactérioplancton (Vincent & Roy, 1993), la diminution de l'abondance bactérienne (Müller-Niklas *et al.*, 1995 ; Pakulski *et al.*, 1998) et la réduction de la production bactérienne (Aas *et al.*, 1996, Pakulski *et al.*, 1998 ; Visser *et al.*, 1999).

Les effets plus nocifs des rayons UVB sur les bactéries sont les lésions de l'ADN. Les rayons UVB induisent la liaison entre les bases pyrimidines adjacentes résultant surtout en la formation des dimères de pyrimidine cyclobutane (CPDs) (Mitchell & Karentz, 1993). La formation des CPDs peut bloquer la synthèse de l'ADN ou la transcription de l'ARN (Jeffrey *et al.* 1996 a et b).

En réponse aux agressions des rayons UV, les bactéries ont développé divers mécanismes de réparation. La photoréparation enzymatique (PER ou *light repair*) est activée par la lumière visible ou les UVA et permet la réparation des CPDs par l'action d'une enzyme, la photolyase, qui catalyse le clivage chimique du dimère (Friedberg, 1985 ; Miller *et al.*, 1999).

Les mécanismes qui ne nécessitent pas de lumière visible (dark repairs) sont la réparation par excision de nucléotide (NER), la réparation inductible ou réparation SOS et la réparation par recombinaison. Ces mécanismes de réparation sont régulés par la protéine RecA, qui est induite pendant les périodes d'obscurité (Miller *et al.*, 1999).

La sensibilité aux UV et la capacité de récupération des dommages causés par les radiations UV varient fortement entre les différentes espèces bactériennes (Joux *et al.*, 1999; Arrieta *et al.*, 2000). Subséquemment l'incidence des radiations UV sur un écosystème interfère dans la composition de la communauté bactérienne (Bothwell *et al.*, 1993) et affecte le transfert de l'énergie entre les niveaux trophiques (Mostajir *et al.*, 1999).

Les autres composants de la boucle microbienne sont aussi affectés par la radiation UV. Les effets négatifs des UV sur les protistes diminuent la prédation des bactéries (Chatila *et al.*, 1999). La radiation solaire UV entraîne des effets négatifs sur l'abondance virale et sur l'infectivité (Suttle & Chen, 1992 ; Wommack *et al.*, 1996 ; Noble & Fuhrman, 1997 ; Wilhelm *et al.*, 1998 a et b), mais est signalée comme un facteur d'induction du cycle lytique dans les bactéries lysogéniques (Freifelder, 1987).

Les effets des rayons solaires sur les bactéries isolées ne sont pas comparables aux effets du soleil sur le bactérioplancton totale dans les communautés marines. Dans l'environnement les effets directs et indirects de la radiation solaire sur le bactérioplancton sont divers et simultanés ; d'autres facteurs jouent avec la sensibilité et la capacité régénératrice de chaque bactérie. Par exemple, l'inhibition du bactérioplancton par la radiation solaire est plus prononcée quand le bactérioplancton est séparé de la communauté phytoplanctonique (Sommaruga *et al.*, 1997). Cependant l'étude de la résistance des souches bactériennes isolées aux radiations solaires envisage la découverte de souches très sensibles ou très résistantes et d'informations sur les mécanismes spécifiques de protection et de régénération des bactéries exposées aux rayons solaires.

I.5 Objectives

Ce travail a été réalisé en deux étapes. Pendant la première année, les hydrocarbures et les microorganismes présents dans la microcouche supérieure de la mer et dans l'eau sous-jacente (0,5 m) sont quantifiés et identifiés. De nombreuses bactéries présentes dans la microcouche sont isolées et cultivées afin de réunir une collection d'espèces, nécessaire à la deuxième étape du projet. Les buts de la première étape sont les suivants:

- Déterminer l'abondance et la structure taxonomique des communautés bactériennes présentes dans la microcouche et dans l'eau sous-jacente (0,5 m) ;
- Identifier et isoler plusieurs espèces bactériennes qui habitent dans la microcouche afin de réunir une collection d'organismes ayant un potentiel important vis-à-vis de la résistance aux radiations ultraviolettes et de la dégradation de polluants ;
- Quantifier et identifier les hydrocarbures présents dans la microcouche et dans l'eau sous-jacente.

Pendant la deuxième étape de cette étude les bactéries isolées sont soumises à des essais au laboratoire afin de vérifier leur résistance à la radiation UV.

En résumé les objectifs de la deuxième étape du projet sont les suivants:

- Évaluer les effets de la radiation UV sur différentes bactéries, isolées à partir des échantillons de la microcouche et de l'eau sous-jacente prélevés dans la Baie de Guanabara;

Chapitre II

Présentation du site d'étude - La Baie de Guanabara

II. Présentation du site d'étude – La Baie de Guanabara

La Baie de Guanabara ($22^{\circ} 57'$ à $22^{\circ} 41'$ S; $43^{\circ} 02'$ à $43^{\circ} 16'$ W) est située au Sud-Est du Brésil (figure 3). La baie s'étend en direction nord sur près de 36 km, avec une embouchure en direction est/ouest, de 1,7 km de largeur. La largeur maximale de la baie est de 23 km. Sur la rive ouest de la baie se situe la ville de Rio de Janeiro, sur la rive est, la ville de Niterói. Sur les eaux tranquilles de la baie, on recense 42 îles, 53 plages, des sites historiques, des attractions touristiques et une nature exubérante menacée par les activités anthropiques.

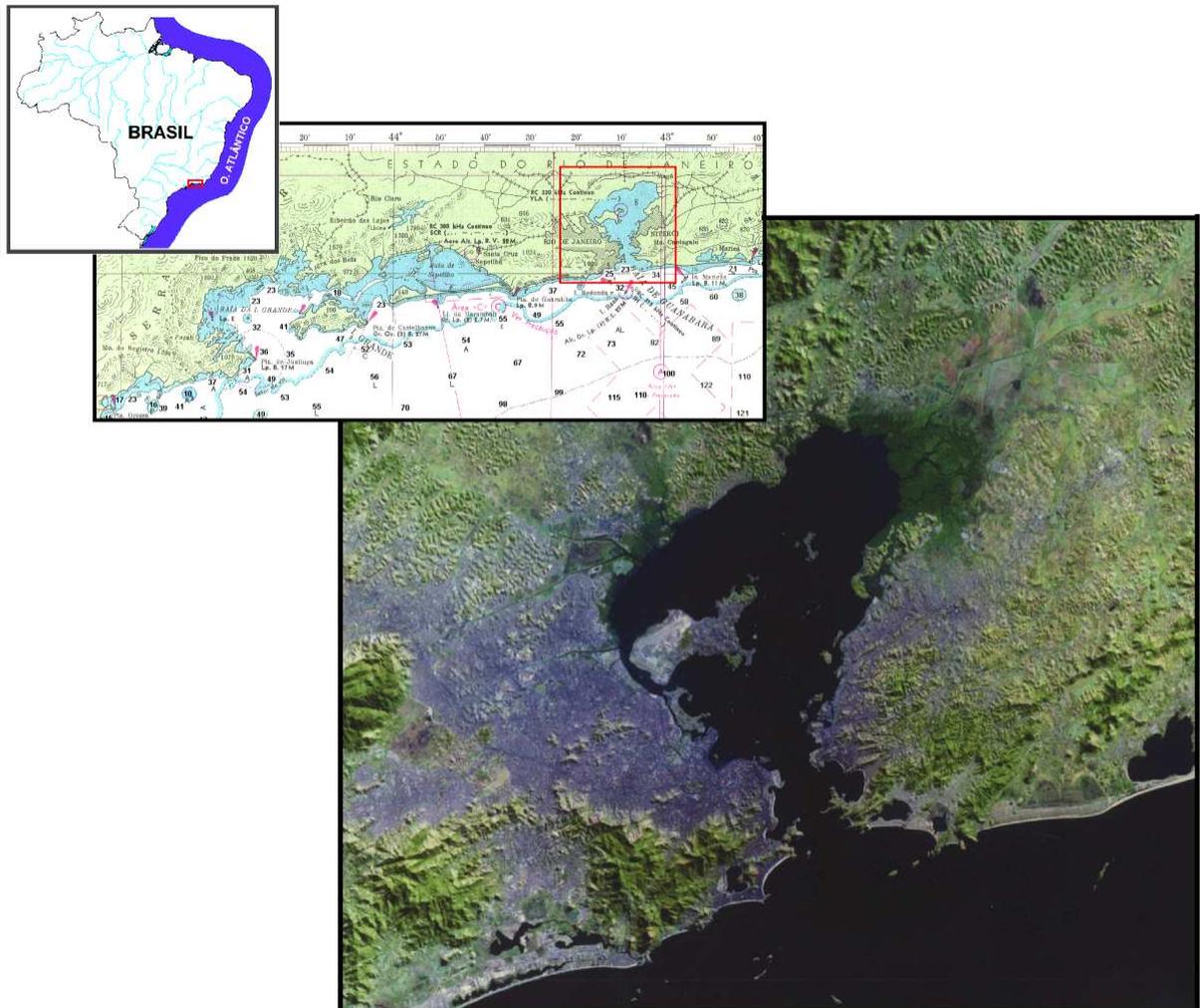


Figure 3 - La Baie de Guanabara - Rio de Janeiro - Brésil

Le climat est tropical et humide. La température moyenne annuelle est de 24°C, avec une humidité de 75%. L'été présente des températures supérieures à 40°C. Les précipitations atmosphériques, d'une valeur totale annuelle d'environ 1500 mm, sont plus abondantes pendant l'été. Les saisons ne sont pas bien marquées, mais on peut en général distinguer deux saisons, une saison humide en été (décembre - avril) et une saison sèche en hiver (juin - août) (Amador, 1997).

Les vents prédominants sont d'est et du nord-est. Pendant l'hiver, environ une fois par semaine, les fronts polaires arrivent à la côte et provoquent une diminution de la température de 5 à 10°C et de forts vents du sud, quelques fois d'intensité de plus de 25 m/s (Amador, 1997 ; Kjerfve *et al.*, 2000). Avant l'arrivée des fronts polaires, des houles (swells) océaniques de 2m à 4m arrivent à la côte et forment des vagues d'environ 1,3-1,8m (Souza, 1988).

La Baie de Guanabara s'est formée à partir de l'inondation d'un bassin fluvial par les eaux marines pendant l'augmentation du niveau de la mer à la fin du Pléistocène (Amador, 1980). La baie présente une bathymétrie irrégulière avec plusieurs canaux correspondant aux anciennes rivières (Ruellan, 1944), qui convergent en direction d'un canal principal, central. Ce canal, d'une profondeur supérieure à 20m, traverse la baie depuis l'entrée jusqu'au fond (figure 4). Ces canaux influencent la circulation de l'eau dans la baie.

La baie a une surface de 377 km² et un volume d'environ 3,058 x10⁹ m³. La profondeur moyenne de la baie est de 7,7 m et varie de 3 m à l'intérieur de la baie, environ 17 m à l'entrée et à plus de 50 m dans le canal central (Amador, 1997). Les sédiments argileux et les sables argileux prédominent dans la baie, mais le canal central présente un fond de sable.

La circulation des eaux dans la baie est contrôlée par les cycles des marées, qui sont de type diurne et dont l'amplitude est comprise entre 0,20m et 1,40m (Mayr *et al.*, 1989 ; Amador, 1997). Par les courants de flot, l'eau océanique (plus propre, froide et saline) rentre dans la baie. Les courants de jusant transportent l'eau océanique qui est rentrée plus une partie de l'eau polluée de la baie. Ces échanges entre l'eau de la baie et l'eau de l'Océan adjacent se passent principalement par le canal central (Oliveira, 1996 ; Amador, 1997). Le temps nécessaire pour renouveler 50% de l'eau de la baie est de 11,4 jours (Kjerfve *et al.*, 1997).

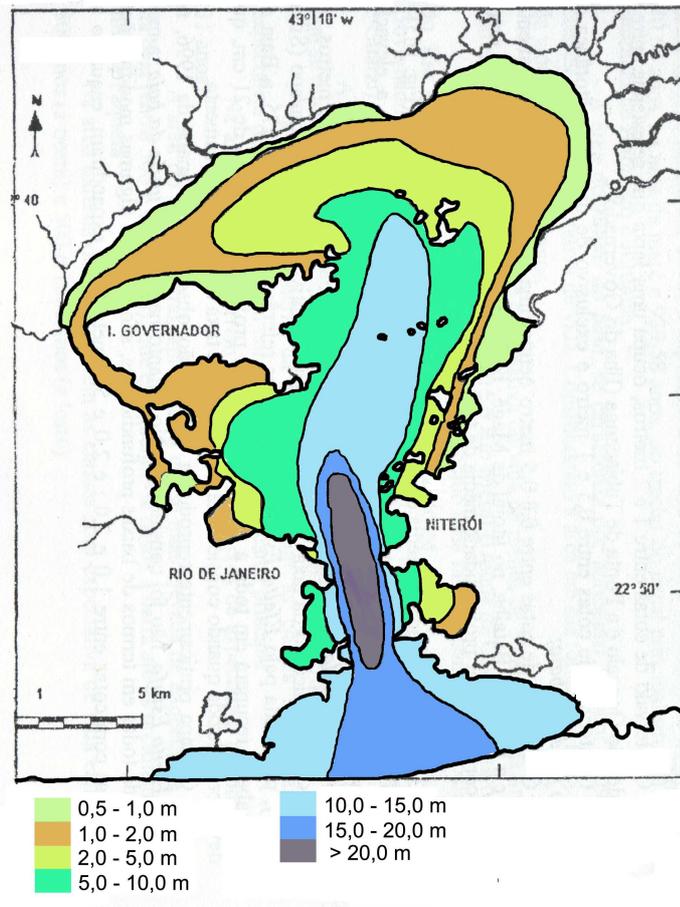


Figure 4 - Carte de la bathymétrie de la Baie de Guanabara. D'après Amador, 1997.

En conséquence de la canalisation des fleuves et la déforestation de la forêt tropicale Atlantique, le taux de sédimentation moyen de la baie est élevé (5cm/an). La sédimentation combinée aux remblais ont réduit la surface de la baie de 29,1% depuis 1500 (Amador, 1997). La circulation des eaux est donc affectée et la dégradation de la baie en est aggravée (Amador, 1980 ; Amador 1997).

La baie présente des zones spatiales et temporelles de caractéristiques distinctes et de qualités de l'eau différentes (Mayr *et al.*, 1989 ; Contador & Paranhos, 1996 ; Amador,1997 ; Valentin *et al.*, 1999). Les régions les plus influencées par l'eau océanique sont considérées comme un estuaire salin. Les régions du fond de la baie sont classées comme un estuaire aux eaux partiellement mélangées (Mayr *et al.*, 1989 ; Villac *et al.*, 1991). Le renouvellement des eaux au fond de la baie est réduit, surtout dans la partie nord-ouest, qui présente de faibles profondeurs (moins d'un mètre), et où la pollution atteint son maximum d'intensité.

Le bassin versant de la Baie de Guanabara (22°24' à 22°57' S ; 42°33' à 43°19' W) draine une surface de 4000 km² et englobe 35 fleuves. La région située dans le bassin de Guanabara est fortement urbanisée et industrialisée et comprend : 15 villes, où vivent plus de 7 millions d'habitants et où l'on recense 14000 industries, 12 chantiers de construction et de réparation navale, 14 terminaux de ravitaillement, 2 installations portuaires, 2 raffineries de pétrole et plus de 1000 stations d'essence (Amador, 1997). Le trafic des bateaux y est important.

L'activité anthropique autour de la Baie de Guanabara résulte en la dégradation de la qualité de l'eau. L'apport d'effluents domestiques, évalué à 20m³.s⁻¹, représente 340t DBO/jour de déchets *in natura* et 84t DBO/jour de déchets traités (Amador 1997 ; FEEMA, 1998). La baie reçoit environ 150 t/jour de rejets industriels et 18 t/jour de rejets pétroliers, ainsi que des rejets accidentels (FEEMA, 1990 ; Ferreira, 1995 ; Amador, 1997).

La pollution de la baie par les hydrocarbures est la conséquence principale des apports urbains (85%), des activités portuaires et de la navigation dans la baie. L'industrie du pétrole et les activités industriels sont responsables d'accidents. Par exemple, en janvier 2000 une brèche est ouverte dans un oléoduc et 1,2 million de litres de carburant (marine fuel oil – MF-380) se sont déversés dans la baie de Guanabara. Les courants de flot et le vent ont dispersé le carburant vers le Nord, Nord-Est de la baie contaminant des îles, des plages et des mangroves. La réserve naturelle de Guapimirim, qui abrite des espèces en voie de disparition, comme l'alligator à ventre jaune, a été inondée de pétrole.

L'apport de rejets domestiques et industriels dans la baie est nuisible à la pêche et au tourisme. Les 53 plages situées dans la Baie de Guanabara présentent fréquemment des concentrations en germes supérieures aux normes réglementaires (tableau 1 – CONAMA, 2000). Il faut noter que, même polluées, les plages sont fréquentées par la population locale, ce qui constitue un risque de la santé publique. Le nombre de coliformes fécaux atteignent à 50 x 10⁴ coliformes /100mL à l'ouest et moins de 1000 coliformes/100mL dans la partie est de la baie.

Tableau 1 - Classification de la qualité bactériologique des eaux de baignade, selon la norme réglementaire 274/2000 (CONAMA, 2000).

Qualité bactériologique des eaux de baignade	Coliformes fécaux (CF / 100mL)	<i>Escherichia coli</i> E. coli / 100mL)	Entérocoques fécaux (Streptocoques fécaux) (SF / 100mL)
A - Excellente	< 250	< 200	< 25
B - Bonne	< 500	< 400	< 50
C - Médiocre	< 1000	< 800	< 100
D - Polluée (fermée)	> 2500	> 2000	> 400

Le développement urbain et industriel de la région du bassin de Guanabara provoque l'eutrophisation du milieu et un processus progressif de dégradation environnementale (Sevrin-Reyssac *et al.*, 1979 ; Schutze *et al.*, 1989 ; Villac, 1990 ; Valentin *et al.*, 1999). La Baie de Guanabara est maintenant un des écosystèmes les plus eutrophisés du monde (Valentin *et al.*, 1999). Entre 1981 et 1990, la salinité moyenne de la baie a diminué d'environ 10%, probablement à cause de l'augmentation des effluents continentaux (Mayr, 1998).

Les eaux de surface présentent des teneurs élevées d'oxygène dissous, en général supersaturées, avec un gradient croissant en direction du fond de la baie. Cependant la couche profonde des zones plus intérieures est totalement anoxique. Mayr (1998) a observé une diminution significative de la teneur en oxygène dissous dans la région ouest de la baie pendant la décennie de 1980.

La baie présente de fortes teneurs en nutriments, principalement dans les régions situés au fond de la baie. Nonobstant, la capacité d'oxydation de matière organique de la baie est indiquée par l'observation des valeurs d'ammonium plus faibles à marée basse, qu'à marée haute (Valentin *et al.*, 1999).

La production primaire est très élevée (Sevrin-Reyssac *et al.*, 1979 ; Rebello *et al.*, 1988) ainsi que les teneurs en chlorophylle *a*, régulièrement supérieures à 30 µg/L. Une tendance à l'augmentation de chlorophylle est observée dans le canal central, mais la région ouest présente une tendance à la diminution, attribuée à la faible transparence des eaux (Barreto, 1992 ; Valentin *et al.*, 1999).

Les formes nanoplanctoniques, notamment les cyanobactéries, dominent le phytoplancton, qui est plus important à l'intérieur de la baie (Valentin *et al.*, 1999). Concernant la diversité du phytoplancton, sur 159 taxons identifiés, 102 sont des diatomées et 42 sont des dinoflagellés (Villac, 1990).

Encore que la disponibilité de nourriture (phytoplancton et bacterioplancton) soit très importante, les populations de zooplancton, abondantes dans l'eau côtière, diminuent de l'entrée de la baie en direction au fond.

Malgré la pollution, la pêche reste encore une des activités importantes dans la baie. Environ 2.700t de poisson sont pêcher par an dans la baie, ainsi que 200t de moules sont récoltées. La concentration de métaux lourds dans les moules est de deux à quatre fois supérieure aux valeurs permises (Rezende & Lacerda, 1986). Grâce à la faible solubilité des métaux dans les régions anoxiques et aux basses teneurs en oxygène dissous du fond de la baie, la bioconcentration des métaux lourds n'est pas encore critique dans la baie.

Un programme de récupération de la Baie de Guanabara est en cours d'exécution. Malgré la construction des 5 usines de traitement et le renforcement de 3 autres, seulement 25% des eaux usées qui arrivent dans la baie sont préalablement traitées. Les travaux n'accompagnent pas l'augmentation des villes et de la population. Dix ans après le début du programme, les résultats ne sont pas encourageants. D'autres estuaires dans le monde ont été récupérés, comme la Baie de San Francisco. La Baie de Guanabara est un important estuaire tropical, mais quelle sera la limite au-delà de la récupération ?

Les bactéries sont très importantes pour le recyclage de la matière organique et la dégradation des composés toxiques. Les études sur la diversité des populations bactériennes et leur réponse aux facteurs environnementaux sont d'extrême importance pour la meilleure compréhension des processus de récupération, y inclus le potentiel de dégradation des polluants comme les hydrocarbures pétroliers et les métaux lourds.

Chapitre III

Méthodologie

III. Méthodologie

III.1 Stratégie d'échantillonnage

Les prélèvements ont été réalisés pendant l'été en 2003 et 2004 dans la Baie de Guanabara (Rio de Janeiro – Brésil). La microcouche de surface et l'eau sous-jacente (0,5m, 0,5m et 5m) sont prélevés à sept sites d'échantillonnage, dont 6 dans la baie et 1 à l'extérieur de la baie (figure 5).

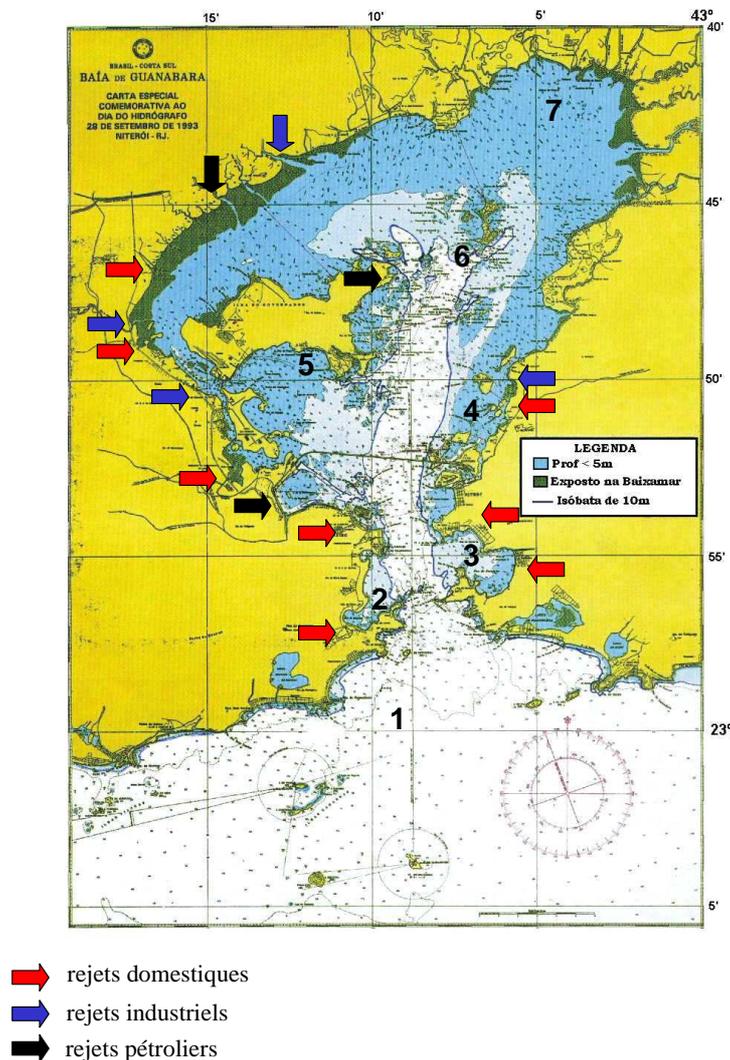


Figure 5 - Localisation des sites de échantillonnage dans la Baie de Guanabara – Brésil. Modifié à partir de carte géographique (#1501) de la Marine Brésilienne et identification des sources de pollution d'après Andrade *et al.*, 2003.

Les sites d'échantillonnage ont été déterminés en fonction de leurs caractéristiques physicochimiques, la localisation des principales sources de pollution, les courants, le trafic des bateaux et la coïncidence avec des sites utilisés pour autres études, afin de garantir la comparaison des résultats (tableau 2).

Tableau 2 - Localisation géographique des sites d'échantillonnage dans la Baie de Guanabara

Site	Localisation	Coordonnées géographiques
St1	Hors de la baie	22°59'S et 43°09,7'W
St2	Urca	22°56,6'S et 43°09,5'W
St3	Ponta da Jurujuba	22°55,4'S et 43°11,54'W
St4	Ilha do Manoel João	22°51,3'S et 43°07'W
St5	Ilha do Governador	22°50,3'S et 43°11,5'W
St6	Ilha de Paqueta	22°46,5'S et 43°06,5'W
St7	APA de Guapimirim	22°43,7'S et 43°05,5'W

Afin de vérifier les effets de l'incidence de lumière solaire et des radiations UV naturelles, le site St1 dans la baie est prélevé au midi solaire et 1-2 heures avant le lever du soleil, pendant 3 jours consécutifs à chaque campagne (2003 et 2004).

III.2 Prélèvement des échantillons

Diverses études ont proposé différents échantillonneurs pour le prélèvement de la microcouche, comme le tamis métallique (Garrett, 1965), la plaque en verre (Harvey & Burzell, 1972), la plaque en téflon (Larsson *et al.*, 1974), le rouleau en céramique et en téflon (Harvey, 1966 ; Hardy *et al.*, 1988) et le plateau (Hatcher & Parker, 1974b). Les échantillonneurs varient en fonction du mécanisme de prélèvement, de l'épaisseur de la couche et du volume d'eau prélevés.

Les études sur l'efficacité des échantillonneurs pour la microcouche sont rares (Daumas *et al.*, 1976 ; Carlson, 1982 ; Falkowska, 1999a et 1999b ; Agogué *et al.*, 2004 ; Momzikoff *et al.*, 2004 ; Garcia-Flor *et al.*, 2005). Ces études d'intercalibration de divers échantillonneurs ont considéré le tamis de Garrett comme l'engin le plus adéquat pour le prélèvement de la microcouche pour les paramètres biologiques et chimiques et dans les études multiparamétriques (Falkowska, 1999a et 1999b ; Agogué *et al.*, 2004 ; Momzikoff *et al.*, 2004 ; Garcia-Flor *et al.*, 2005).

Dans cette étude la microcouche de surface est collectée manuellement à l'aide d'un tamis (60x80cm) de Garrett (figure 6) (Garrett, 1967a ; Marty *et al.*, 1988 ; Agogué *et al.*, 2004 ; Momzikoff *et al.*, 2004). La grille du tamis est faite de fil métallique en acier inoxydable de diamètre 0,36mm et d'ouverture de maille de 1,25mm. Grâce aux forces de tension intermoléculaires, la surface de l'eau est prise par la grille. (Garrett, 1965 ; Daumas *et al.*, 1976 ; Falkowska, 1999a et b). Le tamis est immergé obliquement et remonté horizontalement à la surface, prélevant ainsi un film d'eau d'une épaisseur approximative de 0,44mm. L'eau prise par la grille est versée par l'intermédiaire d'un entonnoir dans une bonbonne en verre de 12 litres.



Figure 6 - Échantillonnage de la microcouche à l'aide d'un tamis en métal

L'eau sous-jacente est collectée à environ 50cm de profondeur par immersion de flacons stériles (microbiologie) et de bonbonnes en verre de 4 litres (chimie). Avant le prélèvement les bonbonnes ont été nettoyées au méthanol et au dichlorométhane, séchées et rincées 3 fois par l'eau échantillonnée.

Pour les analyses microbiennes, l'eau sous-jacente est aussi prélevée à 5m de profondeur à l'aide d'une bouteille Niskin.

III.3 Analyses microbiennes

III.3.1 Bactéries cultivables

Environ 2 litres de l'échantillon sont séparés pour les analyses microbiennes. Tout le matériel utilisé dans les analyses microbiennes est stérilisé.

L'analyse des bactéries cultivables est réalisée dans un délai maximum de 4 heures après le prélèvement.

À partir de l'échantillon et des dilutions successives jusqu'à 10^{-5} , les bactéries sont étalées en duplicat sur Marine Agar® (Difco 2216) en boîtes de Pétri. Les unités de formation de colonie (CFU) sont quantifiées après 7 et 10 jours d'incubation à l'obscurité à 25°C.

III.3.2 Bactéries totales

La fraction de l'échantillon destinée aux analyses de bacterioplancton total (environ 4mL) est immédiatement fixée avec le formaldéhyde (concentration finale 2%) ; incubée à l'obscurité pendant 10 minutes et conservée dans l'azote liquide jusqu'à l'analyse.

Au moment de l'analyse, après décongélation, 1 mL de l'échantillon est inoculé par 0,1 µL du marqueur fluorescent SYBR Green I (Molecular Probes) et est incubé à l'obscurité pendant 30 minutes. Une solution de billes de référence (yellow-green 0.92-µm Polysciences latex beads (10^6 billes mL^{-1}) est ajouté à l'échantillon comme standard interne.

L'analyse est réalisée en utilisant un cytomètre en flux (FACScan, Becton Dickinson) équipé d'un laser à argon (15mv, 488nm). Les bactéries sont quantifiées et discriminées à partir des caractéristiques de la lumière diffusée à l'angle droit et de la fluorescence dans le vert mesurée à 530/30nm (Marie *et al.*, 1997, 2000). Le nombre de cellules bactériennes ayant un taux élevée d'acide nucléique (HNA) et réduite d'acide nucléique (LNA) est déterminé en suivant la méthodologie de Lebaron et collaborateurs (2002) et de Servais et collaborateurs (2003).

III.3.3 Isolement de souches

L'isolement des souches est réalisé à partir des colonies sur les boîtes de Pétri utilisées pour la quantification des bactéries cultivables. Les colonies d'aspect morphologique différent sont prélevées, repiquées et purifiées 3 fois sur milieu Marine Agar. Les colonies pures sont inoculées en Marine Broth® (Difco 2216) et sont ensuite cryopréservées dans le DMSO pour les analyses biomoléculaires et la formation d'une collection de souches.

III.3.4 Caractérisation moléculaire des isolats

III.3.4.1 Extraction de l'ADN

Une suspension cellulaire est préparée dans 50µL d'eau distillée et stérile (EUP) à partir des colonies pures et isolées sur Marine Agar. Les cellules en suspension sont soumises à une lyse thermique (96°C pendant 10 minutes).

La plupart des produits PCR (*polymerase chain reaction*) sont obtenus directement des suspensions cellulaires soumises à une lyse thermique (96°C pendant 10 minutes), sans la nécessité d'une étape d'extraction. Dans l'impossibilité d'amplifier l'ADN à partir des suspensions, l'ADN est extrait à l'aide du kit d'extraction *UltraClean* (Mo Bio 12800-50).

La qualité de l'ADN est vérifiée par dépôt sur gel d'agarose. L'ADN dégradé se traduit par une traînée sur le gel.

III.3.4.2 Amplification de l'ADNr 16S

Le gène de l'ARN 16S est amplifié sélectivement avec les amorces SAdir et S17-rev (tableau 3). Ces amorces s'hybrident sur des régions conservées situées au début et à la fin de l'ADN 16S et permettent l'amplification d'un fragment d'environ 1500 pb. Les réactions d'extension sont catalysées par l'enzyme Taq-polymérase (Super Taq, HT Biotechnology Ltd).

Tableau 3 - Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par PCR sur les ADN totaux
(Brosius *et al.*, 1978)

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

Pour l'analyse, 5µL de lysat ou d'ADN purifié est ajouté à un mélange de 5µL de tampon 10x (correspondant à l'enzyme Super Taq), 2µL de dNTPs, 1µL de chaque amorce, 1µL de l'enzyme Super Taq (1U) et 35 µL d'eau ultra-pure stérile. L'amplification PCR est réalisée à l'aide d'un thermocycleur multi-bloc (RobocyclerGradient 96, Stratagene) avec la programmation suivante: un cycle initial à 94°C pendant 3 minutes; 30 cycles de dénaturation (1 minute à 94°C) ; d'appariement (1 minute à 50°C) et extension (2 minutes à 72°C) et un cycle final d'extension à 72°C pendant 5 minutes. Les produits PCR sont vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% et coloration avec le bromure d'éthidium. Un marqueur de taille (Smart Ladder, Eurogentec) permet la vérification de la taille de l'amplifiat (1500 pb).

III.3.4.3 Criblage génotypique des isolats par RFLP

La technique de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) à partir des produits PCR est un outil qui permet la comparaison des souches bactériennes et est aussi utilisée pour la caractérisation des communautés bactériennes (Massol-Deya *et al.*, 1995). La technique utilise les enzymes de restriction pour sectionner la molécule de l'ADN dans les sites de coupure où y se trouvent séquences de nucléotides caractéristiques. À chaque coupure, la molécule originale donne origine à fragments de diverses tailles. Le nombre et la taille des ces fragments dépendent de la séquence du gène de la bactérie. Après l'étape de fragmentation les fragments sont séparés par une électrophorèse sur gel d'agarose à 2% et visualisés par bromure d'éthidium. Les profils de migration sont spécifiques et permettent la comparaison des isolats afin d'éliminer les redondances.

Cependant, des bactéries de différents groupes phylogénétiques peuvent présenter un même profil de RFLP (Priemé *et al.*, 2002). L'efficacité de discrimination de la RFLP augmente quand plusieurs enzymes de restriction sont utilisées (Savelkoul *et al.*, 1999).

Les enzymes de restriction utilisées dans cette étude sont *Rsa* I et *Hha* I (tableau 4). L'efficacité de différenciation des ces enzymes a été vérifiée par d'autres études (Dowling *et al.*, 1990 ; Moyer *et al.*, 1996 ; Urakawa *et al.*, 1998 ; Caldeira *et al.*, 2003).

Tableau 4 – Sources et séquences de reconnaissance pour la coupure des enzymes de restriction.

Enzymes de restriction	Séquences de reconnaissance pour la coupure	Source
<i>Rsa</i> I	GT'AC	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
<i>Hha</i> I	GCG'C	<i>Haemophilus haemolyticus</i>

Pour l'analyse de RFLP, les produits PCR sont mélangés avec une solution d'hydrolyse (contenant l'enzyme *Hha* I), discriminée ci-dessous (tableau 5). La quantité de produit PCR ajoutée dépend de l'intensité de l'amplifiat sur le gel d'agarose et varie de 8µL et 15µL. Après une incubation à 37°C pendant la nuit (12 heures), les fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% et coloration avec le bromure d'éthidium. Un marqueur de taille (Amplisize, Biorad) est utilisé dans la détermination de la taille des fragments. Les profils sont visualisés sous UV et photographiés.

Les différents profils sont comparés et chaque nouveau profil reçoit un code. Les souches très différentes morphologiquement, mais qui présentent des profils identiques sont soumises à une deuxième analyse par RFLP avec l'enzyme de restriction *Rsa* I.

Tableau 5 - Solutions d'hydrolyse pour la criblage géotypique par RFLP.

Solutions d'hydrolyse	
<i>Hha</i> I	<i>Rsa</i> I
1,3 µL de tampon de restriction 10x ;	0,4 µL de tampon de restriction 10x ;
1,1 µL d'eau ultra-pure stérile;	3,8 µL d'eau ultra-pure stérile;
3U d'enzyme <i>Hha</i> I ;	1U d'enzyme <i>Rsa</i> I ;
0,3 µL de BSA (Bovine Serum Albumin)	0,04 µL de BSA (Bovine Serum Albumin)

Un représentant de chaque profil est inclus dans la collection des souches. Un volume de 950 µL de culture en phase exponentielle est mélangé avec 50 µL de DMSO filtré sur 0,2 µm et conservé à -80°C.

III.3.4.4 Séquençage

Les souches qui ont présenté des profils de RFLP distincts sont envoyées à Genome Express (Grenoble, France) pour la séquençage partiel du rADN 16S.

Pour séquencer la moitié (750pb) de l'ADN 16S, des amorces internes 907RC (antisens) sont utilisés (tableau 6).

Tableau 6 - Séquence d'amorce interne de séquençage (Brosius *et al.*, 1978)

Amorce	Position de référence	Séquence
907RC (antisens)	907-927 (<i>E. coli</i>)	5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3'

Les séquences sont visualisées sous forme d'électrophorégramme à l'aide du logiciel Chromas. Les pics indéfinis du début et de la fin des séquences sont supprimés, la correction manuelle est réalisée quand nécessaire. La séquence antisens est transformée en séquence sens. Le logiciel BioEdit est utilisé pour assembler les séquences et constituer une séquence "consensus".

Les séquences obtenus dans cette étude et d'autres disponibles au GenBank (Benson *et al.*, 2000) sont comparées pour une recherche de similarités, à l'aide du programme *BLASTN* (Altschul *et al.*, 1997). Les séquences ayant une similarité supérieure à 97% à une séquence de souche type présent au GenBank sont considérées de même genre.

Les séquences sont comparées deux à deux et alignées par le logiciel *CLUSTAL W* (Thompson *et al.*, 1994). L'alignement des séquences est vérifié à l'aide du logiciel *SEAVIEW* (Galtier *et al.*, 1996), afin de déterminer les zones réellement informatives.

A fin d'établir les relations phylogénétiques entre les souches isolées par cette étude et d'autres au Genbank, les distances évolutives (pairwise evolutionary distances) entre les séquences sont calculées avec la méthode de Kimura (1980), par le

logiciel *PHYLO-WIN* (Galtier *et al.*, 1996). Les arbres phylogénétiques sont construits à partir de la méthode de "neighbour-joining" (Saitou & Nei, 1987).

La robustesse de chaque embranchement d'un arbre phylogénétique est évaluée par la méthode de *Bootstrap* ou d'analyse par échantillonnage (Felsenstein, 1985). Les arbres sont visualisés à partir du logiciel NJPLOT (Perrière & Gouy, 1996).

III.3.5 SSCP

L'amplification et le séquençage des gènes de l'ADNr 16S extraits directement des échantillons naturels permettent l'étude de la diversité microbienne sans la mise en culture des bactéries.

La technique de SSCP (*single strand conformation polymorphism*) permet la séparation des molécules d'ADNr 16S en fonction de leur séquence (Orita *et al.*, 1989 ; Hayashi, 1991).

Pour cette analyse, un volume de 250 mL de l'eau prélevée est filtré sur une membrane de polycarbonate, 0,2µm. Les filtres sont préservés à -80°C avant d'être analysés.

Les membranes sont découpés à l'aide de scalpels et de pinces stériles et immergés dans 900µL d'une solution de lyse (40 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8, 0.75 M sucrose). Après l'addition de 1mg de lysozyme, la suspension est incubée à 37°C pendant 45 minutes. Ensuite, 9µL de Proteinase K (0.2 mg mL⁻¹ concentration finale) et 45µL de sodium dodecyl sulfate (1% concentration finale) sont ajoutés à la suspension qui est incubée à 55°C pendant 1 heure (Servais *et al.*, 2003).

L'ADN est extrait avec un volume égal de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1, v:v:v) et précipité par l'addition de ¹/₁₀ en volume d'acetate de sodium 3M et de 2 volumes d'isopropanol froid.

Après une incubation à -20°C pendant 12 heures l'ADN est récupéré par centrifugation à 10000 g pendant 30 minutes. Le pellet est rincé avec de l'éthanol à 70% à froid, séché et remis en suspension dans 100µL d'eau ultra pure.

L'amplification d'une partie du gène ADNr 16S est réalisée avec les amorces universelles (tableau 7) W49 dir et TET W34 rev (Applied Biosystems). L'amorce W34 rev est marqué en 5' avec la tetrahydrochloro-6-carboxy-fluorescéine (TET) (Applied Biosystems) (Servais *et al.*, 2003). Les réactions de PCR sont catalysées par l'enzyme Pfu-polymerase (Promega). Le programme de PCR utilise une dénaturation initiale à 94°C pendant 2 minutes, 20 cycles de température à 96°C pendant 1 minute, 50°C pendant 1 minute et 72°C pendant 1 minute, et une étape finale d'extension à 72°C pendant 10 minutes (Delbès *et al.*, 2000).

L'amplification PCR est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. Les produits PCR (200 bp) sont purifiés avec *QIAGEN columns* (QIAquick PCR purification kit).

Tableau 7 - Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par PCR sur les ADN totaux.

TAmorce	Position de référence	Séquence
W49 dir	331 (<i>E. coli</i>)	5'-ACG-GTC-CAGACT- CCT-ACG-GG-3'
W34 rev	533 (<i>E. coli</i>)	5'-TTA-CCG-CGG-CTG-CTG-GCA-C-3'

Les produits SSCP-PCR sont dilués en fonction de l'intensité de l'amplificat sur gel d'agarose. Le produit PCR dilué (1µL) est ajouté à 0,1µL d'un marqueur de migration fluorescent (Genesca n-400 Rox) et 18,9µL de formamide désionisée (Applera). Ce mélange contenant l'ADN est chauffé à 94°C pendant 5 minutes et immédiatement refroidi dans la glace. Le choc thermique cause l'adoption d'une conformation structure secondaire par les fragments d'ADN. La structure secondaire varie en fonction de la séquence des nucléotides du fragment.

L'électrophorèse capillaire SSCP est réalisée comme décrit par Servais et collaborateurs (2003) à l'aide de l'appareil *ABI Prism 310 genetic analyzer* (Applied Biosystems), correctement calibré. Chaque échantillon migre 30 minutes à 15kV. La migration des fragments de l'ADN dépend de leur conformation, et subséquentement de la séquence du gène. L'ADN simple brin marqué par le fluorochrome est détecté par un système de laser.

Les données résultantes sont analysées par le programme 310 Genescan Analysis (Applied Biosystems). Les profils sont alignés à l'aide des marqueurs de taille.

Afin de comparer les profils de migration, le rapport entre la surface du pic et la surface totale de la somme de tous les pics est calculé. Ce rapport donne une idée semi quantitative de l'abondance des séquences dans la population.

Des dendrogrammes pour la comparaison entre les échantillons sont construits par la méthode UPGMA (unweighted-pair-group method with arithmetic averages) à partir d'une matrice de distance calculée selon le coefficient de communauté de Jaccard (coefficient binaire excluant les doubles zéros).

III.3.6 Expérience sur la résistance des souches aux radiations solaires

L'expérience sur la résistance des souches aux radiations solaires est réalisée à l'aide d'un simulateur solaire 1000 W – lampe xenon (Loti-Oriel, France). L'utilisation de 2 filtres correctifs (AM0 et AM1) assure une illumination dans les UVB, UVA et le visible, identique à celle du rayonnement solaire à la surface de la terre.

Les conditions d'exposition sont déterminées pour atteindre les intensités de PAR, UVA et UVB indiqués sur le tableau 8 (Agogué *et al.*, 2005b). La surface d'exposition est de 20 x 20 cm (2 microplaques de 24 puits), et la distance entre la source lumineuse et les microplaques est de 30cm.

Les intensités et les doses horaires de PAR, UVA et UVB reçues au niveau des microplaques sont mesurées à l'aide d'un spectro-radiomètre ELDONET (European Light Dosimeter Network) à large bande (Hader *et al.*, 1999) (tableau 8).

Tableau 8 - Conditions expérimentales: intensités et doses horaires de PAR, UVA et UVB
(Agogué *et al.*, 2005b)

	PAR (400-700 nm)	UVA (320-400 nm)	UVB (280 – 320 nm)
intensités à 30 cm	352 W/m ²	40 W/m ²	1,2 W/m ²
dose horaire	1267 KJ/m ²	144 KJ/m ²	4,32 KJ/m ²

Un suivi de croissance des souches dans du Marine Broth (Difco 2216) est préalablement réalisé à fin de déterminer pour chaque souche le temps mis pour atteindre la phase stationnaire. Le suivi est réalisé en microplaques de 24 puits et lecture des densités optiques à 590nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. La courbe de croissance des souches est observée en triplicat (3 puits pour chaque souche). Un contrôle de contamination (3 puits avec du milieu de culture sans inoculation) est réalisé pour chaque microplaque.

Pour l'expérience de résistance des bactéries aux irradiations solaires, les souches sont mises en culture dans du Marine Broth à 25°C sous agitation. Au début de la phase stationnaire de croissance, le bouillon est centrifugé à 6000g pendant 10 minutes. Le culot est rincé à partir de la remise en suspension dans l'eau de mer filtrée et autoclavée. La suspension est centrifugée à 6000g pendant 10 minutes. Cette opération est répétée une fois.

La suspension bactérienne résultant de l'étape de rinçage est fixée au formol à une concentration finale de 2%, marquée par le fluorochrome SYBR Green I (Molecular Probes Inc.) à une concentration finale de 0,01% et incubée pendant 15 minutes à l'obscurité.

Dans une microplaque de 24 puits, chaque souche est inoculée en duplicate (2 puits) à partir de 1 mL de la suspension à 10^4 cellules/mL. Un contrôle de contamination est réalisé pour chaque microplaque : deux puits sont remplis avec 1 mL de l'eau de mer filtrée et autoclavée (figure 7).

Les microplaques sont exposées aux radiations par le simulateur solaire pendant des temps d'exposition croissants. Pendant l'exposition sous le simulateur solaire les échantillons sont maintenus en agitation orbitale sur un plateau. Une température de 20-25°C est assurée par une plaque réfrigérante placée sous le plateau agitateur et reliée à une cryothermostat ministat (Roucaire, France) (figure 7). La température de la salle de manipulation est maintenue à 25°C grâce à un climatiseur.

Une première série d'expériences sur la résistance des souches aux radiations solaires est réalisée avec 3 durées d'exposition 10, 20 et 30 minutes. Comme la majorité des souches sont résistantes à ces durées d'exposition, une deuxième série d'expériences a été conduit en utilisant les temps d'exposition de 1, 3, 5 et 7 heures.

Suite à l'exposition au simulateur solaire, 1 mL du milieu Marine Broth concentré deux fois est ajouté dans chaque puits et la croissance des bactéries est suivie par la mesure de la densité optique à 590nm, pendant 6 jours, avec un lecteur de microplaques.

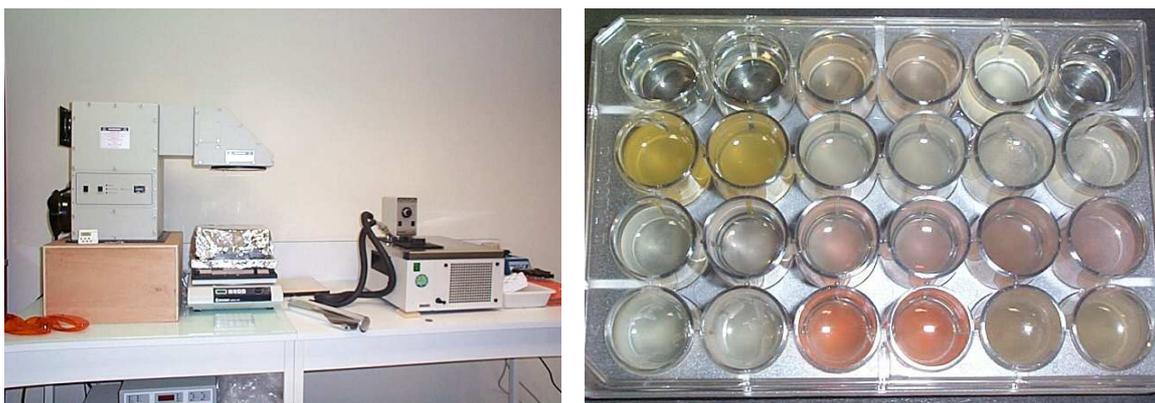


Figure 7 - Simulateur solaire et microplaque avec souches en duplicat.

III.4 Analyses chimiques

II.4.1 Précautions prises au cours des manipulations

Pour éviter la contamination des analyses, tout le matériel utilisé pour les prélèvements et pour les analyses est décontaminé par rapport aux hydrocarbures.

Avant usage, toute la verrerie est passée au four pendant 4 heures à 450°C et rincée au éthanol et au dichlorométhane. La verrerie de précision est nettoyée à l'acide sulfochromique pendant au moins trois heures, puis rincée à l'eau pure déminéralisée (milliQ®), à l'éthanol et au dichlorométhane. Les spatules, pinces et ciseaux sont nettoyés à l'eau milliQ, à l'éthanol et au dichlorométhane. Les desséchants (Na₂SO₄, CaCl₂, MgSO₄), la silice et le coton sont extraits au soxhlet pendant 24 heures au dichlorométhane. Tous les solvants sont distillés deux fois.

Le système de filtration ainsi que les tuyaux en téflon utilisés sont nettoyés au dichlorométhane. Entre les échantillonnages, le système est lavé à l'eau milliQ. Les filtres sont pré-extraits au dichlorométhane et conservés dans du papier aluminium passé au four à 450°C pendant 4 heures.

Afin de minimiser les risques de photodégradation des hydrocarbures aromatiques, les extraits lipidiques et les systèmes d'extraction de la phase particulaire sont mis à l'abri de la lumière (Sanders *et al.*, 1993).

II.4.2 Séparation entre les fractions dissoute et particulaire

Les échantillons sont transportés au laboratoire. Quelques heures après le prélèvement, ils sont filtrés pour séparer le matériel dissous et le matériel particulaire. Afin d'éliminer le zooplancton de grande taille, une pré-filtration est réalisée sur des toiles à bluter de 200 µm. La filtration a été réalisée sous faible pression sur des filtres en fibre de verre (Whatman® GF/F, porosité de 0,7 µm, diamètre de 147 ou 290mm) pré-extraits au dichlorométhane (Saliot, 1981). Le système de filtration se compose d'une pompe à vide et de porte-filtres Millipore® en acier inoxydable rincés au dichlorométhane. La filtration est stoppée dès le ralentissement de l'écoulement du filtrat.

Chaque filtre est stocké dans des tubes SVL à -30°C et transporté en France pour son analyse au laboratoire. L'eau filtrée (fraction dissoute) est stockée dans des bouteilles de verre pendant un maximum de 3 heures avant le traitement de la fraction dissoute.

II.4.3 Extraction

II.4.3.1 Fraction dissoute

Dans un maximum de 3 heures après la filtration on procède à l'extraction liquide-liquide. Environ 10 litres de l'eau filtrat (fraction dissous) sont extraits trois fois par 200 mL de dichlorométhane dans 3 ampoules en verre avec une clé en téflon. Les deux premières extractions sont faites à pH 8 et la troisième à pH 2, par addition d'environ 25 mL d'acide chlorhydrique à 36% (Sicre *et al.*, 1987). Les trois extraits sont réunis dans une bouteille en verre brun, séchés sur CaCl₂ et stockés au réfrigérateur à -5°C jusqu'à analyse.

L'extrait total est filtré sur coton, récupéré dans un ballon, et concentré par évaporation rotative. L'extrait concentré est stocké dans des vials SVL en verre à -30°C et transporté au laboratoire à Paris. L'extrait dissous est soumis par la suite au même traitement que l'extrait des phases particulières.

II.4.3.2 Fraction particulière

Dans le but de favoriser le contact entre la phase particulière et les solvants, les filtres sont découpés en morceaux à l'aide de pinces métalliques et de ciseaux rincés au méthanol et au dichlorométhane. Les morceaux des filtres sont extraits pendant 15 minutes dans une cuve à ultrasons par 50mL d'un mélange de méthanol/dichlorométhane/solution saline (10:5:4). Un mélange d'étalons internes aliphatique (C24D50) et aromatique (paraD10terphényl) est ajouté à l'extrait. Les étalons internes sont des composés deutériés de concentration connue et permettent la détermination de la concentration des différents hydrocarbures. L'utilisation d'étalons permet aussi la vérification des pertes occasionnées lors de la préparation des échantillons (Barrick, 1982).

L'extrait total obtenu est transvasé sur un fritté et filtré sous vide en récupérant le filtrat dans une ampoule à décanter. Le fritté est rincée avec 20 mL d'un mélange de méthanol/dichlorométhane/solution saline (10:5:4). Les solvants sont récupérés dans l'ampoule. L'extraction est répétée une deuxième fois. Ensuite le fritté est rincé deux fois par 37 mL de dichlorométhane. Le filtré est enlevé et 37 mL de solution saline sont ajoutés dans l'ampoule, l'ensemble est agité et la phase organique est récupéré dans un ballon après décantation. La phase aqueuse restante dans l'ampoule à décanter est ré-extrait deux fois par 15 mL de dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO₄, mélangée pendant 20 secondes dans une cuve à ultrasons et conservée au frigidaire pendant 24 heures. La phase organique est transvasée dans un entonnoir muni de coton et récupérée dans un ballon. Le ballon et l'entonnoir sont rincés avec dichlorométhane. Les extraits sont concentrés dans un évaporateur rotatif, transférés dans un vial et conservés au congélateur jusqu'à l'analyse.

II.4.4 Séparation chromatographique sur gel de silice

Après l'extraction, l'extrait dissous et l'extrait des phases particulières sont soumis au même traitement. Les composés organiques contenus dans les extraits sont séparés en deux fractions : la fraction aliphatique et la fraction aromatique. Ce fractionnement est réalisé par chromatographie en phase normale sur gel de silice, avec un gradient de dilution par polarité croissante (Peltzer *et al.*, 1984 ; Peltzer & Gagosian, 1987 ; Fernandes *et al.*, 1997).

Une colonne en verre munie de coton est rincée trois fois avec successivement de l'hexane, du dichlorométhane et du méthanol. La colonne est ensuite rempli de 0,4 g de silice (pré extraite, activée pendant 1 heure à 150°C et recouverte d'hexane) et rincée à l'hexane. L'extrait total est mis à sec, dissous dans 250 µL d'hexane et déposé en tête de colonne à l'aide d'une pipette passée au four et rincée au dichlorométhane. Les hydrocarbures non-aromatiques, ou dit aliphatiques (n-alcanes, alcanes ramifiés, alcènes, cyclo-alcanes et dérivés) sont élués avec 3 mL d'hexane et récupérés dans un ballon poire. La fraction aromatique est éluée avec 10 mL d'un mélange hexane/toluène (9 :10) et récupérée dans un autre ballon poire (Fernandes, 1997).

Les fractions sont concentrées dans un évaporateur rotatif, transférées dans des vials, mises à sec et reprises par le dichlorométhane. Les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques sont conservés au congélateur.

II.4.5 Méthodes de quantification et d'identification

II.4.5.1 Chromatographie en phase gazeuse (GC)

Les hydrocarbures aliphatiques sont injectés (1µL) dans un chromatographe en phase gazeuse équipé avec une colonne capillaire de 30 m de longueur et 0,25 mm de diamètre interne. La phase stationnaire, DB-5 (J&W Scientific), est d'une épaisseur de 0,25 µm. Le gaz vecteur est l'hydrogène.

La programmation de température de la colonne est la suivante: température initiale de 60°C, augmentation de 25°C/min jusqu'à 100°C, augmentation de 2°C par minute jusqu'à la température finale de 310°C maintenue pendant 80 minutes.

L'analyse est assistée par le logiciel Saphir (SRA Instruments) qui permet d'intégrer la surface des pics obtenus. Cette surface, comparée à celle du pic obtenu pour l'étalon interne, permet de déterminer la concentration des différents hydrocarbures.

Une série de n-alcane de C10 à C36 est injecté comme un mélange de standards à fin de déterminer le temps de rétention des composés. L'identification des hydrocarbures aliphatiques résolus est réalisée par la comparaison des temps de rétention avec le mélange de standards.

Les échantillons correspondants aux blancs d'extraction, blancs de solvants, blancs de séparation et standards sont également analysés par chromatographie en phase gazeuse.

Chapitre IV

Résultats

IV.1 Analyses chimiques : les hydrocarbures de la microcouche de surface

La fraction aliphatique des hydrocarbures est caractérisée par la prédominance des composés non-résolus (UCM) et des n-alcane (figure 8).

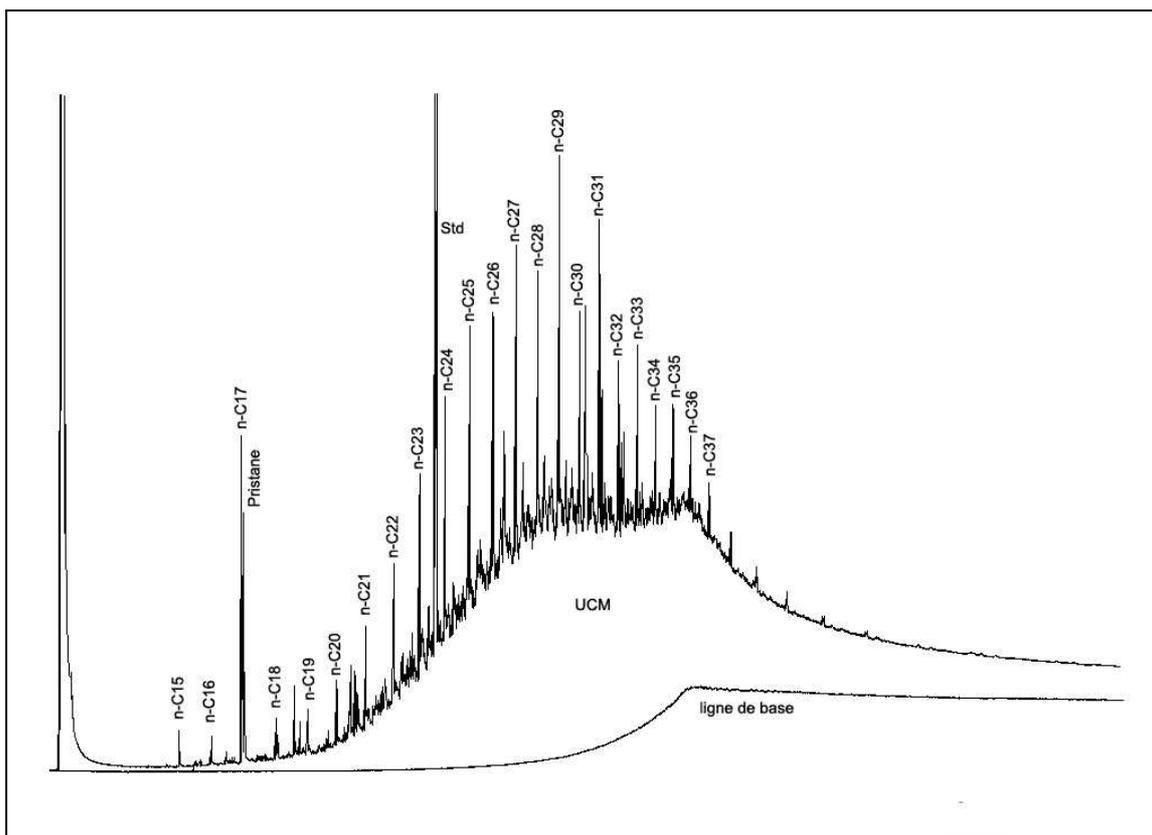


Figure 8 – Chromatogramme en phase gazeuse des hydrocarbures aliphatiques extraits de la microcouche de surface à la St1. Std = standard interne; n-C15 à 37 = n-alcane ayant 15 à 37 atomes de carbone; UCM = enveloppe de composés non résolus.

Les hydrocarbures aliphatiques résolus consistent principalement en des n-alcane ayant de 15 à 37 atomes de carbone. La concentration totale des n-alcane varie entre 643 et 11927 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (tableau 9).

Dans la plupart des échantillons, le n-alcane C17 est prédominant dans les hydrocarbures aliphatiques résolus. La concentration du n-alcane C29 est aussi très importante dans les échantillons (tableau 9).

Tableau 9 - Concentrations des hydrocarbures aliphatiques totaux, n-alcane, pristane, phytane et UCM (enveloppe des composés non résolus).

Hydrocarbures ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	St1 SML	St1 UW	St2 SML	St2 UW	St3 SML	St3 UW	St4 SML	St4 UW	St6 SML	St6 UW	St7 SML	St7 UW
n-C15	15	23	25	20	27	13	545	258	317	47	177	124
n-C16	11	0	19	14	11	4	80	20	26	6	23	9
n-C17	122	843	40	28	802	561	9016	9423	3117	2364	1184	2554
pristane	40	54	0	9	76	54	1541	773	791	317	362	409
n-C18	14	8	38	16	14	6	68	12	18	3	36	9
phytane	0	5	28	11	11	6	43	8	13	0	41	0
n-C19	18	9	51	36	29	9	114	14	19	4	85	17
n-C20	24	13	79	19	59	9	57	13	26	3	61	7
n-C21	37	10	123	18	108	60	141	11	38	4	64	7
n-C22	55	11	178	22	121	9	194	12	60	4	55	10
n-C23	78	9	220	24	122	9	109	11	89	4	54	10
n-C24	91	11	229	29	103	10	228	10	119	4	45	14
n-C25	106	8	220	32	89	11	213	13	127	5	43	13
n-C26	104	10	212	39	78	12	195	31	134	4	43	9
n-C27	115	10	208	48	73	13	112	14	137	7	47	14
n-C28	103	11	109	52	68	29	34	12	116	5	31	7
n-C29	150	14	193	59	62	13	114	17	117	9	58	15
n-C30	86	10	129	45	39	19	145	14	73	7	25	6
n-C31	108	11	120	45	40	13	211	43	72	22	40	11
n-C32	68	9	79	29	24	8	150	7	40	5	17	0
n-C33	83	8	41	24	35	7	185	3	59	8	29	12
n-C34	45	6	0	16	0	5	17	5	15	0	0	0
n-C35	47	6	0	13	0	7	0	0	0	0	17	0
n-C36	0	6	0	9	0	0	0	0	0	0	0	8
n-C37	35	5	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0
n-alcane	1515	1050	2312	643	1906	826	11927	9943	4719	2515	2135	2856
résolus	1555	1110	2340	663	1993	886	13512	10724	5523	2831	2538	3265
UCM	42025	17234	40386	29378	11031	12641	63081	14494	59794	14100	56837	33564
Total	43579	18344	42726	30041	13024	13527	76593	25218	65317	16931	59376	36829

Les composés non résolus ou UCM (*unresolved complex mixture*) prédominent sur les hydrocarbures aliphatiques résolus et correspondent à plus de 80% des hydrocarbures aliphatiques totaux (tableau 10). Le rapport entre les concentrations des composés non-résolus et résolus (U/R) confirme l'importance de l'enveloppe des composés non résolus (tableau 10).

Tableau 10 - Rapports caractéristiques et indicateurs aliphatiques pour les échantillons de la Baie de Guanabara. U/R = rapport entre les concentrations des composés non résolus et résolus ; CPI = index de prédominance calculé dans la gamme des carbones C15 à C20 et C21 à C35 ; %C17 = pourcentage du C17 parmi les hydrocarbures résolus ; C17/C29 = rapport des n-alcane ayant 17 et 29 atomes de carbons ; MH = *major hydrocarbon*, le n-alcane prédominant ; LMW/HMW = *low/high molecular weight hydrocarbons*, rapport de la somme des n-alcane de faible poids moléculaire ($\leq 20C$) et le total de n-alcane de haut poids moléculaire ($>20C$); Pri/Phy= rapport entre les concentrations de pristane et de phytane

	St1 SML	St1 UW	St2 SML	St2 UW	St3 SML	St3 UW	St4 SML	St4 UW	St6 SML	St6 UW	St7 SML	St7 UW
%UCM	96,43%	93,95%	94,52%	97,79%	84,70%	93,45%	82,36%	57,47%	91,54%	83,28%	95,73%	91,13%
U/R	27,03	15,53	17,26	44,33	5,54	14,27	4,67	1,35	10,83	4,98	22,39	10,28
CPI 15-20	3,17	43,10	0,86	1,74	10,27	30,98	47,16	214,33	50,00	200,18	12,06	107,60
CPI 21-35	1,31	1,11	1,20	1,14	1,23	1,46	1,13	1,25	1,15	2,05	1,63	1,76
%C17	7,87%	75,94%	1,70%	4,28%	40,26%	63,32%	66,73%	87,87%	56,44%	83,49%	46,66%	78,23%
C17/C29	0,81	61,44	0,21	0,48	12,88	43,68	78,92	539,17	26,70	265,38	20,43	169,45
MH	C29	C17	C24	C29	C17	C17	C17	C17	C17	C17	C17	C17
LMW/HMW	0,16	5,76	0,12	0,26	0,98	2,68	4,83	48,11	2,94	27,66	2,76	20,11
Pri/phy	-	10,11	0,00	0,81	7,07	9,57	35,65	92,84	60,86	-	8,83	-
n17/Pri	3,07	15,59	-	3,22	10,54	10,34	5,85	12,18	3,94	7,47	3,27	6,24
n18/Phy	-	1,42	1,36	1,46	1,30	1,06	1,57	1,43	1,35	-	0,87	-

Les hydrocarbures ayant des chaînes carbonées inférieures ou égales à 20 atomes de carbone sont considérés comme ayant un faible poids moléculaire (LMW ou *low molecular weight*), tandis que ceux présentant plus de 20 atomes de carbone sont les composés de haut poids moléculaire (HMW ou *high molecular weight*). Les hydrocarbures de faible poids moléculaire prédominent dans les échantillons de l'intérieur de la baie (St4, St6 et St7). À l'entrée de la baie (St1, St2 et St3) les composés de haut poids moléculaire sont plus abondants (tableau 10).

Le CPI (*carbon preference index*) correspond au rapport entre les n-alcane dont le nombre de carbones est impair et ceux ayant nombre de carbones pair (Wang *et al.*, 1999). C'est un indicateur aliphatique très utilisé (Bence & Burns, 1995). Le CPI calculé dans la gamme des n-alcane ayant de 15 à 20 carbones indique une prédominance des composés impairs. Les n-alcane de haut poids moléculaire présentent une valeur du CPI proche de 1 (tableau 10).

On observe un enrichissement des hydrocarbures aliphatiques dans la microcouche de surface par rapport à l'eau sous-jacente. L'enrichissement est plus évident pour les composés de haut poids moléculaire par rapport aux composés de faible poids moléculaire (tableau 11).

Tableau 11 - Facteurs d'enrichissement des hydrocarbures aliphatiques.

	St1	St2	St3	St4	St6	St7
C15	0,66	1,29	2,10	2,11	6,78	1,42
C16	-	1,36	2,64	3,97	4,43	2,50
C17	0,15	1,40	1,43	0,96	1,32	0,46
pristane	0,74	-	1,40	1,99	2,50	0,89
C18	1,87	2,41	2,34	5,72	5,37	3,98
phytane	-	2,59	1,90	5,19	-	-
C19	2,02	1,42	3,32	8,15	4,37	5,09
C20	1,88	4,23	6,76	4,32	8,64	8,92
C21	3,83	6,76	1,80	13,12	9,28	9,50
C22	5,21	8,16	13,43	16,52	16,06	5,33
C23	9,07	9,06	14,12	9,58	20,93	5,61
C24	8,43	8,03	10,38	23,18	31,27	3,33
C25	13,38	6,94	7,78	16,58	23,57	3,38
C26	10,39	5,41	6,50	6,19	31,61	4,93
C27	11,35	4,33	5,72	8,02	19,00	3,43
C28	9,12	2,10	2,38	2,85	21,54	4,45
C29	10,97	3,25	4,85	6,54	13,10	3,85
C30	8,34	2,85	2,11	10,70	10,35	3,94
C31	9,56	2,65	3,12	4,89	3,34	3,75
C32	7,76	2,69	2,99	21,71	8,88	-
C33	10,19	1,72	4,99	65,14	7,81	2,37
C34	7,02	-	-	3,54	-	-
C35	7,36	-	-	-	-	-
C36	-	-	-	-	-	-
C37	7,06	-	-	-	-	-
n-alcanes	1,44	3,59	2,31	1,20	1,88	0,75
UCM	2,44	1,37	0,87	4,35	4,24	1,69
LMW	0,23	1,90	1,57	1,01	1,45	0,58
HMW	8,44	4,03	4,29	10,11	13,64	4,20
Total	2,38	1,42	0,96	3,04	3,86	1,61

La distribution normale des données est vérifiée par le test de Ryan-Joiner (Shapiro & Wilk, 1965). La différence entre les échantillons de la SML et ceux de l'eau sous-jacente est analysée par le test t (Student, 1908). Les différences sont considérées significatives quand $p < 0,05$ (niveau de confiance 95%).

Les hydrocarbures non aromatiques totaux, les composés non résolus (UCM), les composés de haut poids moléculaire (HMW), le phytane et le n-alcane n-C17 présentent des concentrations significativement différentes dans la microcouche et dans l'eau sous-jacente (tableau 12).

Tableau 22 - Test t (Student) SML x UW. * p < 0,05 ; ** p < 0,01.

	n-C15	n-C17	Pris	Phy	n-C27	n-C29	LMW	HMW	n-alc	UCM	Total
t	1,09	2,83*	0,72	2,39*	0,59	0,74	0,12	4,54**	0,51	2,91*	2,71*
p	0,302	0,036	0,485	0,038	0,571	0,480	0,991	0,005	0,621	0,022	0,032
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Les concentrations des hydrocarbures sont, en général, plus importantes pour les échantillons prélevés au fond de la baie (tableau 9). Afin d'analyser la variation spatiale des hydrocarbures dans la Baie de Guanabara, les données sont regroupées en fonction de la localisation des sites dans la baie (entrée de la baie = St1 ; St2 et St3 et fond de la baie = St4 ; St6 et St7).

La différence observée pour les composés organiques aux sites du fond de la baie en comparaison de ceux situés à l'entrée est significative pour les n-alcane totaux et les composés de faible poids moléculaire (LMW), y compris le n-C15 et le n-C17 et le pristane (tableau 13).

Tableau 13 - Test t entrée x fond. * p < 0,05 ; ** p < 0,01.

	n-C15	n-C17	Pris	Phy	n-C27	n-C29	LMW	HMW	n-alc	UCM	Total
t	3,13*	2,83*	3,49**	0,83	0,59	0,74	2,87*	0,38	2,48*	1,37	1,76
p	0,011	0,018	0,006	0,424	0,562	0,478	0,017	0,714	0,033	0,200	0,11
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

IV.2 Analyses microbiennes

IV.2.1 Quantification des bactéries totales et cultivables

Les densités des bactéries totales observées dans la microcouche de surface de la Baie de Guanabara sont d'environ $1,22 \times 10^7$ cellules.mL⁻¹ pour la campagne de l'année 2003 et $8,31 \times 10^6$ cellules.mL⁻¹ pour la campagne de 2004 (tableaux 14 et 15). Les sites d'échantillonnage situés au fond de la baie présentent des concentrations en bactéries plus élevées en comparaison des sites proches de l'entrée de la baie (tableaux 14, 15 et 19).

Les cellules à haut contenu en ADN (HNA) correspondent à la plupart des bactéries totales quantifiées par cytométrie en flux (>70% en 2003 et >60% en 2004) (tableaux 14 et 15).

Comparées au bactérioplancton total analysé par cytométrie en flux, les bactéries cultivables sont une fraction minoritaire, d'environ 4% pour la campagne d'échantillonnage de l'année 2004 (tableau 15). Dans l'année 2003 les bactéries cultivables correspondent à environ 3% pour la microcouche et 1% pour l'eau sous jacente (0,5m et 5m) (tableau 14).

Tableau 14 - Résultats des quantifications des bactéries totales et cultivables. Campagne 2003.

Site	Date	Bactéries cultivables (cellules.mL ⁻¹)			Bactéries totales (cellules.mL ⁻¹)			% cultivables/total			% HNA		
		SML	UW (0,5m)	5m	SML	UW (0,5m)	5m	SML	UW (0,5m)	5m	SML	UW (0,5m)	5m
St1	10-mars	-	-	-	-	1,38E+06	1,54E+06	-	-	-	-	67%	79%
St1	27-mars	1,18E+05	8,00E+03	3,95E+04	2,40E+06	1,76E+06	1,09E+06	5%	0%	4%	80%	73%	73%
St3	11-mars	3,00E+04	1,34E+04	8,00E+04	5,52E+06	2,01E+06	3,80E+06	1%	1%	2%	89%	84%	74%
St3	27-mars	1,25E+05	3,05E+04	8,00E+04	3,95E+06	3,78E+06	2,55E+06	3%	1%	3%	87%	81%	80%
St4	12-mars	1,15E+06	1,26E+06	-	2,45E+07	4,57E+07	4,65E+07	5%	3%	-	72%	84%	76%
St4	31-mars	1,55E+05	4,50E+04	5,85E+04	3,65E+07	3,17E+07	6,68E+06	0%	0%	1%	78%	66%	66%
St5	12-mars	-	-	4,95E+04	1,30E+07	1,56E+07	5,52E+06	-	-	1%	70%	75%	67%
St5	31-mars	9,50E+05	2,85E+04	2,55E+04	1,88E+07	1,88E+07	9,75E+06	5%	0%	0%	77%	86%	71%
St6	13-mars	2,08E+05	1,97E+05	1,10E+04	2,91E+07	2,40E+07	3,19E+06	1%	1%	0%	76%	77%	68%
St7	13-mars	2,45E+05	1,93E+05	6,00E+03	3,00E+07	3,05E+07	4,57E+06	1%	1%	0%	88%	88%	66%
St2	24-mars 5h	3,10E+04	2,00E+04	2,75E+04	2,00E+06	1,73E+06	1,03E+06	2%	1%	3%	45%	57%	42%
St2	24-mars 12h	5,40E+04	8,65E+03	2,10E+04	4,35E+06	4,59E+06	2,03E+06	1%	0%	1%	70%	76%	61%
St2	25-mars 5h	1,62E+05	1,10E+05	1,49E+04	4,35E+06	3,27E+06	1,51E+06	4%	3%	1%	86%	85%	72%
St2	25-mars 12h	3,30E+05	2,65E+04	2,70E+04	3,84E+06	3,70E+06	2,27E+06	9%	1%	1%	79%	82%	73%
St2	26-mars 5h	5,45E+04	3,10E+04	1,70E+04	2,96E+06	1,97E+06	2,06E+06	2%	2%	1%	77%	73%	72%
St2	26-mars 12h	1,36E+05	2,65E+05	5,10E+03	2,02E+06	4,85E+06	2,02E+06	7%	5%	0%	79%	88%	78%
	moyenne	2,68E+05	1,60E+05	3,30E+04	1,22E+07	1,22E+07	6,01E+06	3%	1%	1%	77%	78%	70%
	max	1,15E+06	1,26E+06	8,00E+04	3,65E+07	4,57E+07	4,65E+07	9%	5%	4%	89%	88%	80%
	min	3,00E+04	8,00E+03	3,95E+04	2,40E+06	1,09E+06	1,09E+06	0%	0%	1%	72%	66%	66%
	écart-type	3,23E+05	3,00E+05	2,52E+04	1,18E+07	1,35E+07	1,07E+07	3%	1%	1%	21%	9%	9%

Tableau 15 - Résultats des quantifications des bactéries totales et cultivables. Campagne 2004.

Site	Date	Bactéries cultivables (cellules.mL ⁻¹)		Bactéries totales (cellules.mL ⁻¹)		% cultivables/total		% HNA	
		SML	UW	SML	UW	SML	UW	SML	UW
St1	31-mars 12h	6,40E+04	2,00E+04	4,93E+06	3,27E+06	1%	1%	81%	73%
St3	11-mars 12h	8,35E+04	7,60E+04	5,84E+06	1,50E+06	1%	5%	86%	76%
St4	29-mars 12h	1,60E+05	2,50E+04	1,18E+07	1,11E+07	1%	0%	62%	58%
St5	29-mars 12h	2,35E+05	1,75E+05	2,58E+07	2,16E+07	1%	1%	72%	72%
St6	30-mars 12h	4,15E+05	3,00E+04	1,29E+07	1,13E+07	3%	0%	72%	67%
St7	30-mars 12h	1,25E+04	4,00E+04	1,36E+07	1,17E+07	0%	0%	69%	66%
St1	04-mai 5h	5,25E+03	8,50E+03	2,96E+06	1,18E+06	0%	1%	23%	61%
St2	04-mai 5h	2,50E+05	3,55E+05	3,82E+06	3,98E+06	7%	9%	67%	65%
St2	04-mai 12h	7,10E+04	3,93E+04	6,40E+06	4,63E+06	1%	1%	62%	63%
St2	05-mai 5h	8,95E+04	7,42E+04	3,15E+06	2,16E+06	3%	4%	59%	64%
St2	05-mai 12h	7,26E+05	6,01E+05	6,56E+06	4,89E+06	11%	12%	66%	67%
St2	06-mai 5h	1,54E+05	1,45E+05	1,98E+06	1,65E+06	8%	9%	62%	62%
St2	06-mai 12h	3,18E+04	3,02E+04	3,82E+06	3,41E+06	1%	1%	67%	66%
	moyenne	1,89E+05	1,32E+05	8,31E+06	6,57E+06	4%	4%	64%	65%
	max	7,26E+05	6,01E+05	2,58E+07	2,16E+07	16%	18%	86%	76%
	min	5,25E+03	8,50E+03	1,98E+06	1,18E+06	0%	0%	23%	58%
	écart-type	1,96E+05	1,69E+05	6,49E+06	5,89E+06	4%	5%	11%	4%

À part quelques exceptions, les facteurs d'enrichissement observés dans la microcouche de surface sont plus grands que 1 et atteignent 40,82 pour les bactéries cultivables et 9,13 pour les bactéries totales (tableaux 16 et 17). L'enrichissement de la microcouche présente une forte variabilité entre les échantillons.

Tableau 16 - Facteurs d'enrichissement des bactéries cultivables et totales dans la microcouche de surface en comparaison avec l'eau sous-jacente (0,5m et 5m). Campagne 2003.

Site	Date	Bactéries cultivables		Bactéries totales	
		EF (sml x uw)	EF (sml x 5m)	EF (sml x uw)	EF (sml x 5m)
St1	27-mars	14,75	2,99	1,36	2,21
St3	11-mars	2,24	0,38	2,75	1,45
St3	27-mars	4,10	1,56	1,05	1,55
St4	12-mars	0,91	-	0,54	0,53
St4	31-mars	3,44	2,65	1,15	5,47
St5	12-mars	-	-	0,83	2,35
St5	31-mars	33,33	37,25	1,00	1,93
St6	13-mars	1,06	18,91	1,21	9,13
St7	13-mars	1,27	40,83	0,98	6,57
St2	24-mars 5h	1,55	1,13	1,15	1,94
St2	24-mars 12h	6,24	2,57	0,95	2,14
St2	25-mars 5h	1,48	10,87	1,33	2,88
St2	25-mars 12h	12,45	12,22	1,04	1,69
St2	26-mars 5h	1,76	3,21	1,50	1,43
St2	26-mars 12h	0,51	26,57	0,42	1,00

Tableau 17 - Facteurs d'enrichissement des bactéries cultivables et totales dans la microcouche de surface en comparaison avec l'eau sous-jacente (0,5m). Campagne 2004.

Site	Date	Bactéries cultivables	Bactéries totales
St1	31-mars	3,20	1,51
St3	11-mars	1,10	3,89
St4	29-mars	6,40	1,07
St5	29-mars	1,34	1,20
St6	30-mars	13,83	1,14
St7	30-mars	0,31	1,16
St1	04-mai 6h	0,62	2,50
St2	04-mai 6h	0,70	0,96
St2	04-mai 12h	1,82	1,39
St2	05-mai 6h	1,23	1,61
St2	05-mai 12h	1,21	1,34
St2	06-mai 6h	1,14	1,23
St2	06-mai 12h	1,05	1,12

La distribution normale des données est vérifiée par le test de Ryan-Joiner (Shapiro & Wilk, 1965). Les densités bactériennes (totales et cultivables) ne présentent pas une distribution normale. Une transformation logarithmique des concentrations des bactéries totales et cultivables est réalisée pour la normalisation de la distribution des données (figure 9).

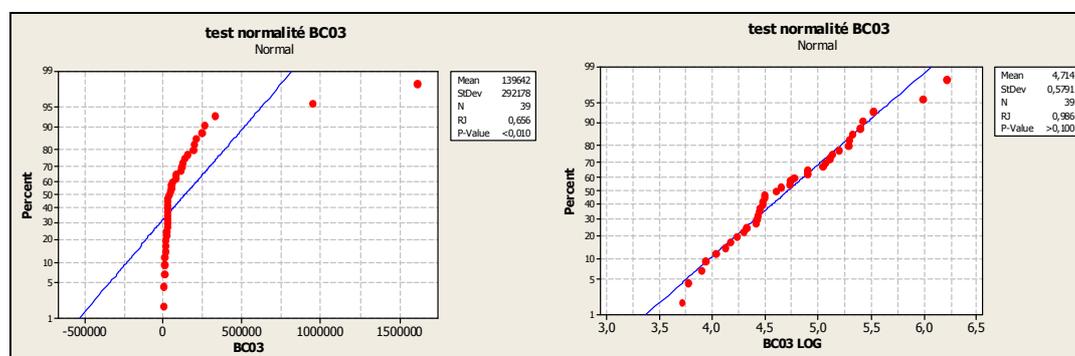


Figure 9 - Distribution des données (bactéries cultivables de l'année 2003) avant et après transformation logarithmique. Analysé par le test Ryan-Joiner, l'hypothèse nulle (la distribution est normale) est rejetée à partir d'une valeur de p inférieure à 0,05.

Les variations des bactéries totales et cultivables dans l'espace (SML x UW et entrée x fond) et dans les temps (5h et 12h) sont analysées par le test t (Student, 1908) (tableaux 18 et 19). Les différences sont considérées comme significatives quand les probabilités sont inférieures à 0,05 (niveau de confiance 95%).

Dans l'année 2003, les échantillons prélevés dans la microcouche (SML) sont significativement différents de ceux de l'eau sous-jacente (UW et 5m) pour les bactéries cultivables et les bactéries totales (SMLx5m). La campagne de 2004 présente une différence significative pour les bactéries totales de la microcouche de surface et l'eau sous-jacente. Par contre en 2004, les différences entre les concentrations des bactéries cultivables dans la SML et dans l'UW ne sont pas significatives (tableau 18).

L'échantillonnage à 5h et à midi présente des résultats significativement différents dans les deux campagnes par rapport aux bactéries totales (tableau 18)

Tableau 18 - Analyse des variations des bactéries totales et cultivables en fonction de la profondeur (SML, UW et 5m) et de l'heure d'échantillonnage (5h et 12h) par le test t (Student). Campagnes de prélèvement de 2003 et 2004. t = valeur du test t ; p = probabilité; n = nombre d'observations ; * p < 0,05 ; ** p < 0,01.

	Campagne 2003						Campagne 2004			
	Bactéries cultivables			Bactéries totales			Bactéries cultivables		Bactéries totales	
	SML x UW	SML x 5m	5h x 12h	SML x UW	SML x 5m	5h x 12h	SML x UW	5h x 12h	SML x UW	5h x 12h
t	3,85*	4,04*	0,29	0,5	4,14**	2,27	2,04	0,3	4,43**	10,37**
p	0,002	0,002	0,776	0,627	0,001	0,053	0,053	0,766	< 0,001	< 0,001
n	26	26	18	30	30	18	46	28	46	28

On observe une différence très significative (p < 0,001) entre les stations situées à l'entrée et au fond de la baie par rapport aux concentrations du bacterioplancton total (tableau 18). Quant aux bactéries cultivables, les différences entre l'entrée et le fond ne sont pas significatives (tableau 19).

Tableau 19 - Analyse des variations des bactéries totales et cultivables en fonction de la localisation des sites d'échantillonnage (entrée = St1, St2 et St3 x fond = St4, St5, St6 et St7) par le test t (Student). Campagnes de prélèvement de 2003 et 2004. t = valeur du test t; p = probabilité; n = nombre d'observations; * p < 0,05 ; ** p < 0,01.

	Campagne 2003		Campagne 2004	
	Bactéries cultivables	Bactéries totales	Bactéries cultivables	Bactéries totales
t	1,31	6,12**	0,27	5,86**
p	0,207	< 0,001	0,7879	< 0,001
n	9 (entrée) et 12 (fond)	9 (entrée) et 12 (fond)	6 (entrée) et 8 (fond)	6 (entrée) et 8 (fond)

Dans le but de vérifier les corrélations entre les données chimiques et microbiennes, une analyse par régression linéaire est réalisée entre les concentrations des bactéries totales et cultivables et les données des hydrocarbures non aromatiques analysés par chromatographie en phase gazeuse (tableau 20). Les bactéries cultivables ne présentent aucune corrélation significative avec le restant des données. Les bactéries totales présentent une corrélation significative avec le n-alcane C17. Le n-C17 présente encore des corrélations significatives avec le n-C15, le pristane et les hydrocarbures légers (LMW).

Tableau 30 - Regressions linéaires entre les densités des bactéries totales et les hydrocarbures non aromatiques, R² (valeur de p). Ne sont pas représentés ci-dessous que les regressions avec R² > 50% et une valeur de p < 0,01.

	BT	n-C15	n-C17	Pristane	n-C18	Phytane	n-C27	n-C29	LMW	HMW	UCM	Total
BT	1								0,52 (0,008)			
n-C15	0,41 (0,025)	1							0,73 (0,001)		0,41 (0,026)	
n-C17	0,51 (0,009)	0,70 (0,001)	1						0,99 (0,001)			
Pristane	0,48 (0,013)	0,97 (0,001)	0,78 (0,001)	1					0,81 (0,001)			
n-C18		0,47 (0,0134)		0,38 (0,031)	1					0,61 (0,003)	0,54 (0,007)	
Phytane		0,34 (0,045)		0,84 (0,001)	0,84 (0,001)	1				0,37 (0,037)	0,46 (0,015)	
n-C27							1	0,95 (0,001)		0,86 (0,001)	0,36 (0,040)	0,62 (0,002)
n-C29							0,95 (0,001)	1		0,85 (0,001)	0,39 (0,030)	0,54 (0,007)
LMW	0,52 (0,008)	0,73 (0,001)	0,99 (0,001)	0,81 (0,001)					1			
HMW					0,61 (0,003)	0,37 (0,037)	0,86 (0,001)	0,85 (0,001)		1	0,41 (0,024)	0,44 (0,017)
UCM		0,41 (0,026)			0,54 (0,007)	0,46 (0,015)	0,36 (0,040)	0,39 (0,030)		0,41 (0,024)	1	
Total							0,62 (0,002)	0,54 (0,007)		0,44 (0,017)		1

IV.2.2 Identification des bactéries

Les bactéries cultivables ne correspondent qu'à une minorité du batiérioplancton total et pourtant l'isolement des souches cultivables reste fondamental pour les études sur la physiologie et l'écologie des bactéries.

L'analyse RFLP a discriminé 43 ribotypes différents à partir des 58 souches bactériennes isolées dans cette étude. Les résultats du séquençage de chaque ribotype sont présentés dans le tableau 21.

Les séquences de l'ADNr 16S des souches isolées sont comparées à celles présentes au GenBank, à l'aide du programme BLAST. Les souches isolées présentant des similarités aux souches types supérieures ou égales à 97% sont considérées comme représentatives de la même espèce. Les similarités entre 97% et 93% représentent les différentes espèces d'un même genre et les similarités inférieures à 93% sont considérées comme des différences en-dessous du genre (Hagström *et al.*, 2000).

Sur le total des 43 souches séquencées, la plupart (33) présentent des similarités par rapport aux souches du GenBank supérieures ou égales à 97% (tableau 21). Huit

souches sont d'espèces différentes, mais du même genre que les souches actuellement connues et 2 souches sont probablement de nouveaux genres. Les souches isolées sont comparées encore avec les séquences de clones non cultivées présentes au GenBank (tableau 22).

Certaines souches présentent une similarité plus importante avec les clones non cultivées que avec les souches types. Trois clones proviennent d'environnements contaminés par du pétrole (tableau 22).

Tableau 21 – Résultats du séquençage des souches bactériennes isolées de la Baie de Guanabara.

Souche	Groupe	Souche Type	Similarité à la souche type	Identité	Pigment
LuP1	FLGC	<i>Bacillus vietnamensis</i>	98%	851/862	+
LuP2	CFB	<i>Lewinella cohaerens</i>	92%	310/336	+
LuP3	Actinobacteria	<i>Arthrobacter monumenti</i>	95%	809/849	-
LuP4	CFB	<i>Winogradskyella porifera</i>	99%	796/800	+
LuP5	GAMMA	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	97%	786/803	+
LuP6	GAMMA	<i>Providencia rettgeri</i>	99%	778/785	-
LuP7	GAMMA	<i>Vibrio harveyi</i>	98%	719/731	-
LuP8	GAMMA	<i>Alteromonas macleodii</i>	99%	695/699	-
LuP9	FLGC	<i>Staphylococcus aureus</i>	99%	856/857	+
LuP10	GAMMA	<i>Pseudoalteromonas ganghwensis</i>	98%	696/704	-
LuP11	ALPHA	<i>Citricella thiooxidans</i>	98%	784/797	+
LuP12	GAMMA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99%	820/821	+
LuP13	GAMMA	<i>Alteromonas macleodii</i>	98%	777/796	-
LuP14	CFB	<i>Hongiella marincola</i>	99%	666/672	+
LuP15	GAMMA	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	98%	714/722	-
LuP16	GAMMA	<i>Pseudodidymarina taiwanensis</i>	99%	800/849	-
LuP17	ALPHA	<i>Thioclava pacifica</i>	95%	708/739	-
LuP18	ALPHA	<i>Erythrobacter aquimaris</i>	97%	786/803	-
LuP19	ALPHA	<i>Ruegeria aff. gelatinovorans</i>	97%	787/804	+
LuP20	GAMMA	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	91%	658/722	+
LuP21	GAMMA	<i>Alteromonas macleodii</i>	98%	838/848	-
LuP22	FLGC	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100%	866/866	-
LuP23	GAMMA	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	98%	786/802	+
LuP24	CFB	<i>Olleya marilimosa</i>	94%	605/649	+
LuP25	FLGC	<i>Halobacillus trueperi</i>	99%	892/898	+
LuP26	ALPHA	<i>Rhodobacter veldkampii</i>	97%	794/815	+
LuP27	ALPHA	<i>Erythrobacter citreus</i>	99%	798/802	+
LuP28	FLGC	<i>Bacillus pumilus</i>	99%	755/756	-
LuP29	ALPHA	<i>Rhodobacter massiliensis</i>	97%	790/810	+
LuP30	GAMMA	<i>Photobacterium leiognathi</i>	100%	892/892	-
LuP31	GAMMA	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	99%	848/855	+
LuP32	FLGC	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	877/877	+
LuP33	ALPHA	<i>Phycococcus omphalius</i>	95%	789/823	+
LuP34	ALPHA	<i>Ruegeria aff. gelatinovorans</i>	98%	801/815	-
LuP35	Actinobacteria	<i>Microbacterium schleiferi</i>	98%	683/695	+
LuP36	ALPHA	<i>Roseobacter gallaciensis</i>	96%	764/795	+
LuP37	FLGC	<i>Bacillus subtilis</i>	96%	849/881	-
LuP38	ALPHA	<i>Rhodobacter massiliensis</i>	97%	810/831	+
LuP39	CFB	<i>Winogradskyella porifera</i>	96%	788/817	+
LuP40	ALPHA	<i>Rhodobacter massiliensis</i>	97%	758/777	+
LuP41	CFB	<i>Psychroserpens mesophilus</i>	96%	648/670	+
LuP42	FLGC	<i>Bacillus licheniformis</i>	99%	866/867	-
LuP43	Actinobacteria	<i>Micrococcus luteus</i>	99%	841/846	+

Tableau 22 – Résultats du séquençage des souches bactériennes isolées de la Baie de Guanabara. Similarité aux séquences de clones du GenBank.

Souche	Clone plus proche	code d'access	Similarité	Identité	Origine du clone
LuP1	<i>Bacillus</i> sp BWDY-7	DQ314535	98%	856/869	estuaire du fleuve jaune
LuP2	Uncultured bacterium clone E2aCO8	DQ103646	94%	586/610	biofilm microbien
LuP3	Uncultured bacterium clone KUF2	AY739684	98%	809/849	sol tropical contaminé par du pétrole
LuP4	Uncultured bacterium clone RS	DQ117431	97%	840/864	corail
LuP5	Uncultured gamma proteobacterium IB300-1	AB197184	99%	780/781	source hydrothermale
LuP6	Providencia sp UTDM314	AY870456	99%	809/813	déchets industriels
LuP7	Uncultured bacterium clone PDC-OTU2	AY700621	98%	719/731	Grand barrière de corail, Australie
LuP8	Uncultured pseudoalteromonas JL-ETNP-F14	AY727023	99%	695/699	Océan Pacifique, picoplancton
LuP9	Uncultured Staphylococcus sp MT01A-G05	DQ169307	99%	857/857	humaine
LuP10	<i>Pseudoalteromonas</i> sp 01/121	AY874345	99%	794/795	mortalité d'huîtres
LuP11	Hydrothermal vent strain AG33	AF254108	98%	794/808	source hydrothermale
LuP12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> X13	AY631241	99%	820/821	?
LuP13	Uncultured proteobacterium 270	AJ310692	97%	791/808	saumon
LuP14	<i>Hongiella</i> sp	AY612772	94%	808/852	microcouche de surface
LuP15	Uncultured bacterium clone W26	AY770966	99%	807/809	gisement de pétrole
LuP16	Uncultured gamma proteobacterium GWS-BW-H33M	AY515442	96%	822/856	Mer de Wadden
LuP17	Uncultured marine eubacterium HstpL2	AB017796	94%	749/790	zostère marine <i>Halophila stipulacea</i>
LuP18	Uncultured alpha proteobacterium 4%N-26d-5	AF432337	99%	787/792	plage contaminé par du pétrole
LuP19	Filamentous photosynthetic bacterium F190-32	AB046591	99%	796/803	cultive de <i>Chattonella marina</i>
LuP20	Gamma proteobacterium MF9	AF509477	97%	742/762	lacs d'haute altitude
LuP21	<i>Alteromonas</i> sp SHY1-1	AB078014	99%	845/850	eau marine, film de polymère produit par bactérie
LuP22	<i>Bacillus</i> sp TB3-10-I	AY599744	100%	866/866	fungale ascocarp
LuP23	<i>Pseudoalteromonas</i> sp 03/034	AJ874351	99%	805/807	mortalité d'huîtres
LuP24	<i>Mucus bacterium</i> 117	AY654753	93%	785/838	<i>Oculina patagonica</i>
LuP25	<i>Halobacillus</i> sp NT N168	AB167053	99%	880/883	sédiment de l'océan profond
LuP26	<i>Rhodobacter</i> sp AP-10	AB079681	98%	792/801	?
LuP27	<i>Paracoccus</i> sp 88/2-4	AJ313424	99%	798/802	particules de l'océan Antarctique
LuP28	<i>Bacillus</i> sp GSP46	AY505514	99%	755/756	grand plaines de l'Oklahoma
LuP29	Uncultured alpha clone AKIW1037	DQ336987	97%	795/816	eau, Kalahari Shield
LuP30	Photobacterium sp YS27-3	AB095447	99%	866/870	mortalité de poissons
LuP31	Uncultured alpha clone AKIW1037	DQ129302	99%	866/873	aérosol urbain, Texas
LuP32	<i>Bacillus</i> sp R3	AY939830	100%	866/873	?
LuP33	<i>Bacterium</i> K2-53B	AY345413	99%	823/829	eau, archipel de Hawaï
LuP31	Uncultured bacterium clone AKIW103	DQ129302	99%	866/873	aérosol urbain, Texas
LuP35	Gram-positive bacterium 13-2	AB008512	98%	687/695	sol urbain, ultramicrobactérie aérobie copiotrophique
LuP36	Rhodobacteriaceae bacterium #63	AB180391	99%	801/801	environnements côtiers
LuP37	<i>Bacillus</i> sp A7(2006)	DQ343614	96%	847/881	sol
LuP38	<i>Rhodobacter</i> sp AP-10	AB079681	98%	807/817	?
LuP39	Uncultured bacteroidetes bacterium GCDE08-K	AY701469	95%	767/802	dinoflagellé <i>Gymnodinium catenatum</i>
LuP40	<i>Rhodobacter</i> sp AP-10	AB079681	98%	762/770	?
LuP41	Uncultured Psychroserpens sp CFB1A	AY494673	99%	671/677	saumon
LuP42	<i>Bacillus</i> sp MO11	AY553104	99%	865/867	grand plaines de l'Oklahoma
LuP43	<i>Micrococcus</i> sp JL-76	AY745846	99%	842/846	estuaire du Changjiang, bactérie avec caroténoïde

Les bactéries prélevées dans la Baie de Guanabara appartiennent à différents groupes taxonomiques : les α -Proteobactéries, les γ -Proteobactéries, les CFB (*Cytophaga / Flavobacterium / Bacteroides*), les FLGC (firmicutes avec faibles contenus en C+G) et les Actinobactéries (tableau 21). Les proteobactéries correspondent à la plupart des souches isolées et identifiées (figure 10).

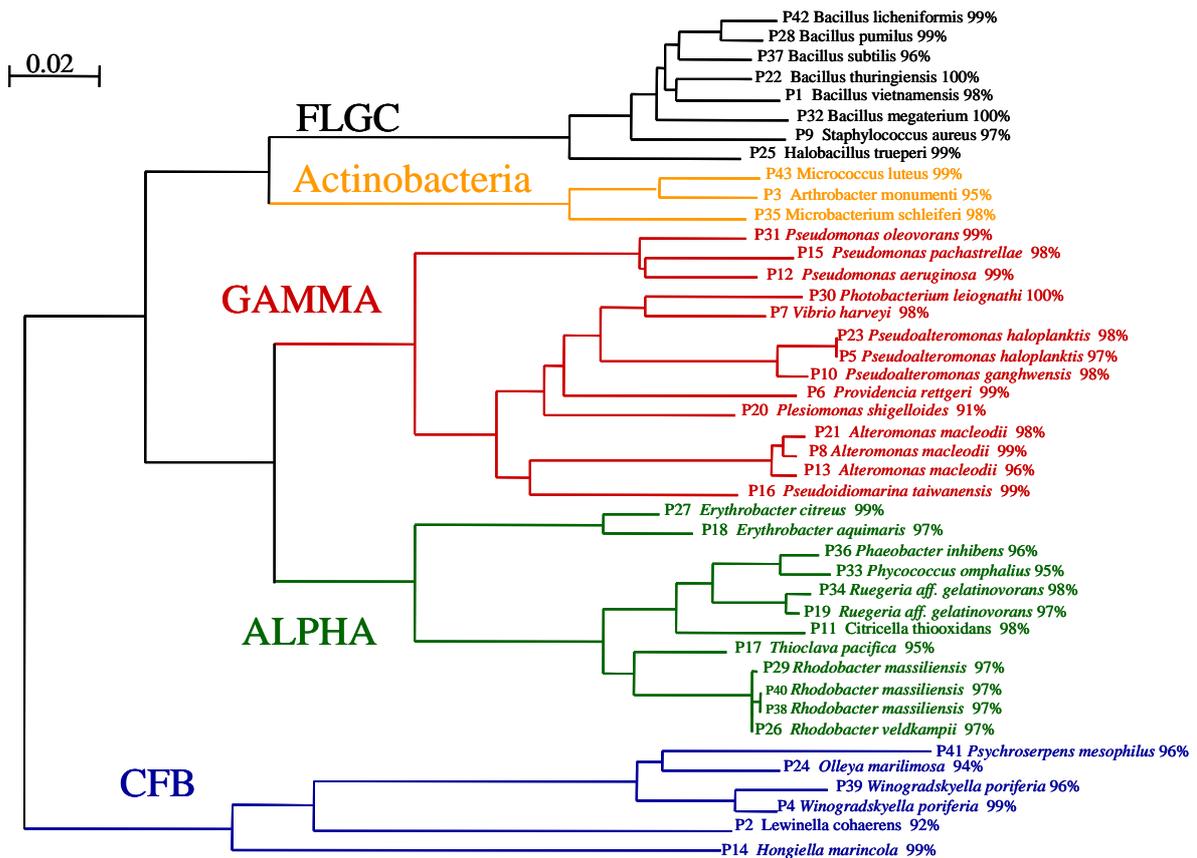


Figure 10 - Arbre phylogénétique construit à partir des séquences partiels de l'ADNr 16S des souches isolées dans la Baie de Guanabara (Brésil).

IV.2.3 Résistance aux radiations solaires

La plupart des souches bactériennes isolées dans la Baie de Guanabara présentent une forte résistance aux radiations émises par le simulateur solaire (tableau 24).

La classification des souches en fonction de leur résistance aux radiations solaires utilisée dans cette étude est définie par Agogué et collaborateurs (2005b) (tableau 23).

Tableau 23 – Classes de résistance des souches bactériennes aux rayons solaires.
(Agogué *et al.*, 2005b) (+) croissance et (-) pas de croissance

Classe de résistance	Temps d'exposition				
	30 minutes	1 heure	3 heures	5 heures	7 heures
sensible (S)	-	-	-	-	-
faiblement résistante (R)	+	+	-	-	-
moyennement résistante (R+)	+	+	+	-	-
très résistante (R++)	+	+	+	+	+

Les souches très résistantes (R++) sont classés également selon leur type de croissance après l'exposition aux radiations solaires : croissance similaire au contrôle (R++a) et croissance avec une phase lag prolongée (R++b) (figure 11).

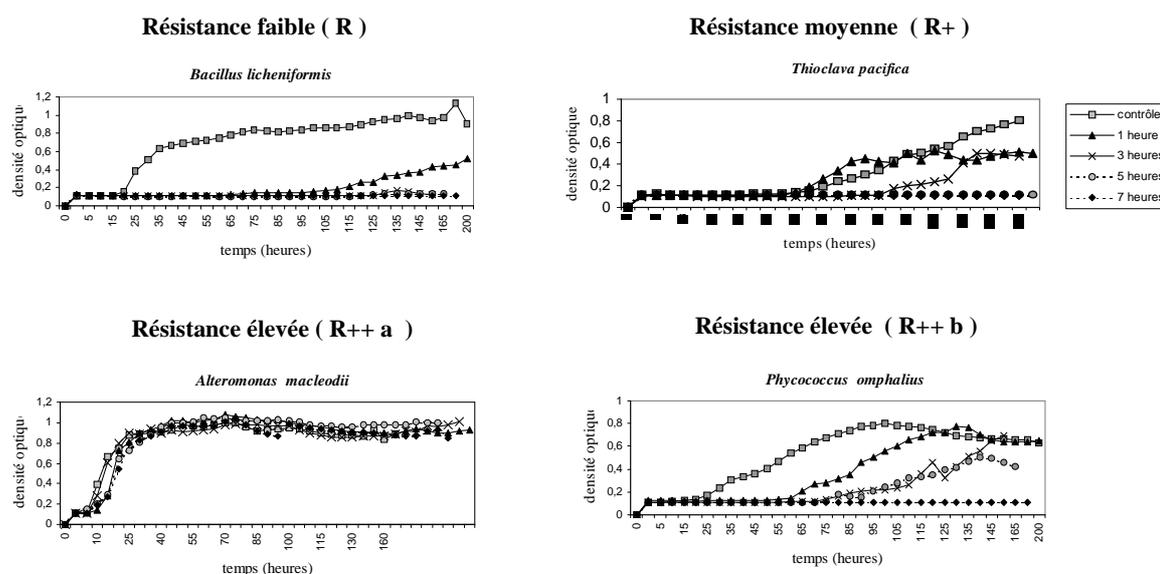


Figure 11 - Courbes de croissance des souches résistantes après leur exposition au simulateur solaire.

Tableau 24 - Temps maximum de résistance des souches bactériennes testées au simulateur solaire

Groupe	Souche type	%	MAX	Classe	Pigment
	<i>Bacillus subtilis</i>	96%	1h	R	-
Actinobacteria	<i>Arthrobacter monumenti</i>	95%	3h	R+	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100%	3h	R+	-
GAMMA	<i>Providencia rettgeri</i>	99%	3h	R+	-
ALPHA	<i>Ruegeria aff. gelatinovorans</i>	97%	3h	R+	-
ALPHA	<i>Thioclava pacifica</i>	95%	3h	R+	-
GAMMA	<i>Pseudoidiomarina taiwanensis</i>	99%	5h	R++ b	-
GAMMA	<i>Alteromonas macleodii</i>	98%	7h	R++ a	-
	<i>Bacillus pumilus</i>	99%	7h	R++ a	-
ALPHA	<i>Erythrobacter aquimaris</i>	97%	7h	R++ b	-
GAMMA	<i>Photobacterium leiognathi</i>	100%	7h	R++ a	-
GAMMA	<i>Pseudoalteromonas ganghwensis</i>	98%	7h	R++ a	-
GAMMA	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	98%	7h	R++ b	-
GAMMA	<i>Vibrio harveyi</i>	98%	7h	R++ a	-
	<i>Olleya marilimosa</i>	94%	10'	S	+
Actinobacteria	<i>Micrococcus luteus</i>	99%	1h	R	+
	<i>Bacillus licheniformis</i>	99%	1h	R	+
	<i>Bacillus vietnamensis</i>	98%	3h	R+	+
	<i>Lewinella cohaerens</i>	92%	3h	R+	+
GAMMA	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	98%	3h	R+	+
GAMMA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99%	3h	R+	+
ALPHA	<i>Rhodobacter veldkampii</i>	97%	3h	R+	+
	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	5h	R++ a	+
ALPHA	<i>Phycococcus omphalius</i>	95%	5h	R++ b	+
	<i>Winogradskyella porifera</i>	99%	5h	R++ b	+
ALPHA	<i>Citricella thiooxidans</i>	98%	7h	R++ b	+
ALPHA	<i>Erythrobacter citreus</i>	99%	7h	R++ b	+
	<i>Halobacillus trueperi</i>	99%	7h	R++ a	+
	<i>Hongiella marincola</i>	99%	7h	R++ a	+
Actinobacteria	<i>Microbacterium schleiferi</i>	98%	7h	R++ a	+
GAMMA	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	99%	7h	R++ b	+
GAMMA	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	91%	7h	R++ b	+
ALPHA	<i>Rhodobacter massiliensis</i>	97%	7h	R++ b	+
ALPHA	<i>Roseobacter gallaciensis</i>	96%	7h	R++ b	+
	<i>Staphylococcus aureus</i>	97%	7h	R++ b	+

D'après la classification utilisée par Agogué et collaborateurs (2005b) (tableau 23), seulement 1 souche isolée dans la Baie de Guanabara est considérée sensible (S) aux radiations solaires (tableau 24). La grande majorité des souches (59%) est très résistante (R++) (figure 12) ; 29% des souches présentent une résistance moyenne (R+) et 9% des bactéries sont faiblement résistantes (R).

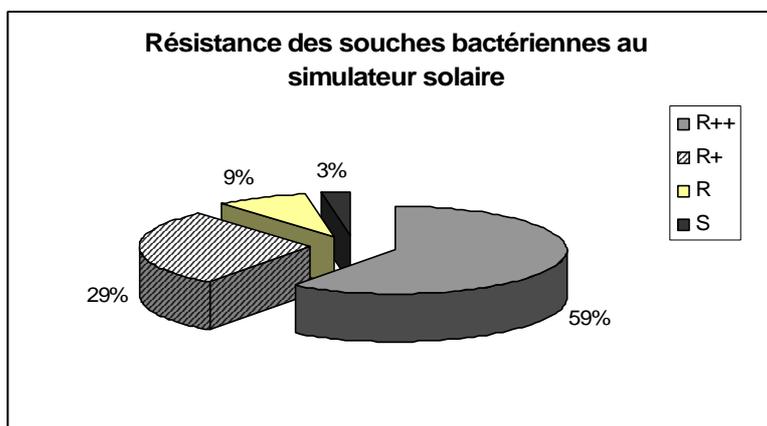


Figure 12 - Distribution des souches testées par rapport à leur résistance après leur exposition au simulateur solaire.

Parmi les souches visiblement pigmentées (21) et les souches apparemment non pigmentées (14), les bactéries très résistantes aux radiations solaires prédominent (figure 13). La distribution des classes de résistance dans les groupes de bactéries pigmentées et non pigmentées est similaire à la distribution observée pour l'ensemble des souches testées.

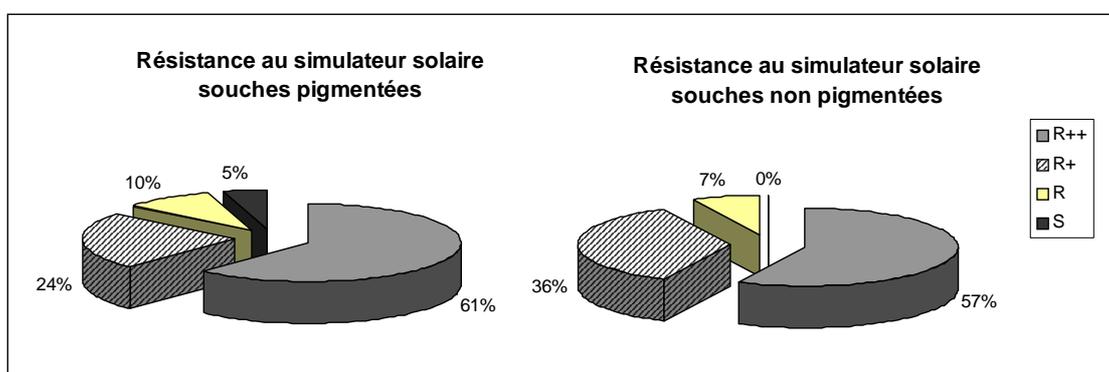


Figure 13 - Distribution des souches pigmentées et non pigmentées testées par rapport à leur résistance après leur exposition au simulateur solaire.

IV.2.3 La diversité du bactérioneuston (SSCP)

La structure populationnelle des communautés bactériennes présentes dans la microcouche de surface et dans l'eau sous jacente est déterminée par la méthode d'empreinte moléculaire, la technique de SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*). La communauté microbienne est représentée par un profil, où chaque pic correspond à une séquence et par extension à une « espèce » de microorganisme ou un OTU (*Operational Taxonomic Units*) (figures 14 et 15).

L'analyse SSCP est réalisée pour les échantillons de la microcouche et de l'eau sous-jacente prélevées au midi solaire dans différents sites (figure 14) et prélevées à 5h et au midi solaire dans le site St2 pendant 3 jours consécutifs (figure 15).

Les profils de SSCP présentent de 3 à 12 pics prédominants (correspondant à plus de 3% de la surface totale). Les échantillons prélevés au midi solaire exhibent un nombre plus important de pics dans la microcouche de surface par rapport à l'eau de surface (tableaux 25 et 26, figures 14 et 15).

Tableau 25- Nombre des pics prédominants ($\geq 3\%$ de la surface totale) dans les profils de SSCP

	St1		St3		St4		St5		St6		St7
	SML	SML	UW	SML	UW	SML	UW	SML	UW	UW	
nombre de pics	11	11	11	10	5	8	5	11	6	12	

Au contraire pour les échantillons prélevés au midi solaire, les profils SSCP des prélèvements réalisés à 5 heures du matin présentent un nombre plus important de pics dans l'eau sous-jacente par rapport à la surface (tableau 26).

Tableau 26 - Nombre des pics prédominants ($\geq 3\%$ de la surface totale) dans les profils de SSCP.

J1 = 04 mai 2004 ; J2 = 05 mai 2004 ; J3 = 06 mai 2004.

	St2 J1 5h		St2 J1 12h		St2 J2 5h		St2 J2 12h		St2 J3 5h		St2 J3 12h	
	SML	SML	UW	SML	UW	SML	UW	SML	UW	SML	UW	
nombre de pics	6	5	5	3	4	10	10	6	12	11	7	

Certains pics sont présents dans presque tous les profils SSCP. Par exemple : les pics identifiés dans les profils par les signes ♣, * et #.

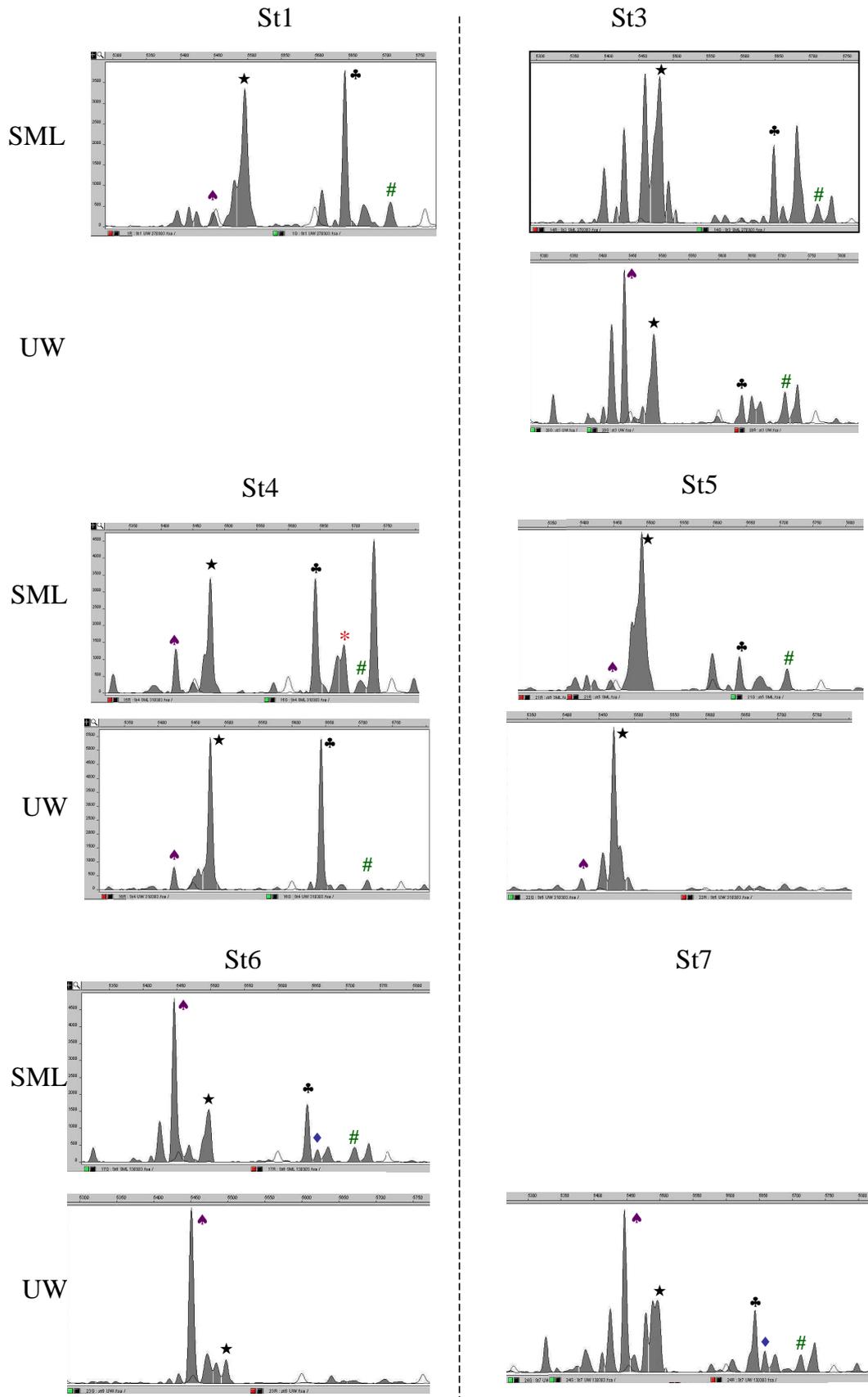


Figure 14 - Profils de SSCP pour la SML et l'UW dans la Baie de Guanabara.

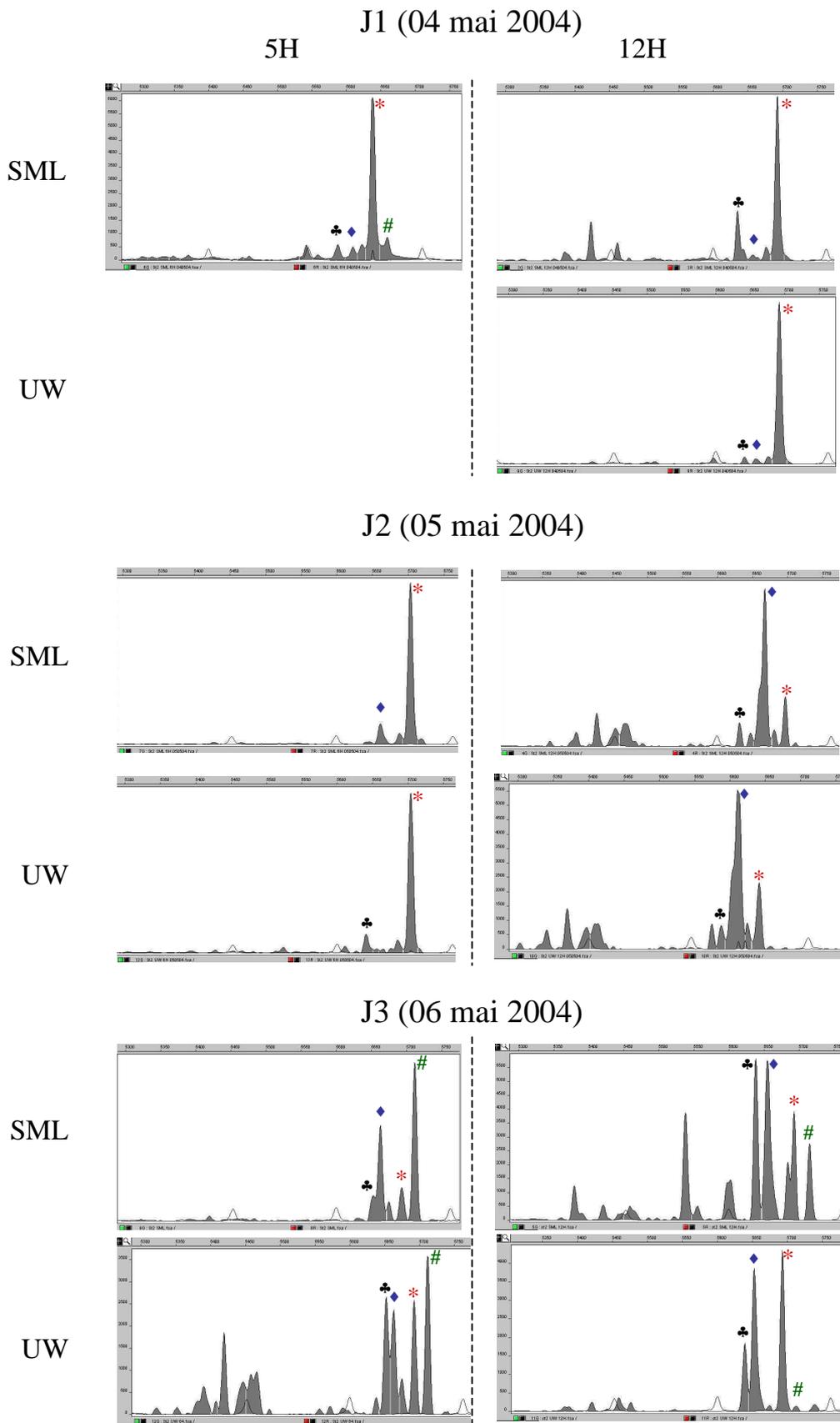


Figure 15 - Profils de SSCP du suivi de 3 jours à 5h et à midi pour la SML et l'UW.

On observe une différence de structure des communautés bactériennes de la microcouche de surface et de l'eau sous-jacente. En général la microcouche présente des pics que ne sont pas représentés dans l'eau sous-jacente. Par contre ces pics trouvés dans la microcouche, mais non dans l'eau sous-jacente ne sont pas les mêmes dans les différents profils. Les exceptions sont le site St3 et les échantillons du 05 mai 2004, quand les profils de la SML sont très similaires à ceux de l'eau sous-jacente (figures 14 et 15).

La similarité entre le profil obtenu pour le site St1, située en dehors de la baie et la microcouche de surface du site St5, localisée au fond de la baie est surprenante.

La figure 14 représente la structure des communautés bactériennes obtenue au cours de 3 jours de prélèvement au site St2. Au midi du premier jour (04 mai 2004) la microcouche de surface présente des pics qui ne sont pas observés dans la microcouche prélevée à 5 heures ou dans l'eau sous-jacente de 12 heures. Malheureusement il manque l'échantillon de la microcouche de surface à 5 heures du matin. Le deuxième jour présente une grande similarité entre les profils de surface et de l'eau sous-jacente. Le troisième jour exhibe une similarité plus importante entre la microcouche de surface de 5 heures et l'eau sous-jacente de 12 heures, où quelques pics présents dans les deux autres profils sont absents.

La surface de chaque pic donne une indication sur la proportion d'une OTU dans la communauté. Chaque profil est représenté par une matrice avec l'abondance relative (rapport entre la surface du pic et la somme totale des surfaces) de chaque pic observé. Les pics minoritaires, correspondant à moins de 3% de la surface totale sont exclus. Afin de comparer les différents profils, des dendrogrammes sont réalisés par la méthode UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with arithmetic Averages*) à partir du calcul des distances euclidiennes (figures 16 et 17).

Les clusters réalisés à partir des échantillons prélevés aux différents sites de la baie distinguent, à part quelques exceptions, deux groupes principaux : un correspondant aux communautés de la microcouche et un autre aux communautés de l'eau sous-jacente (figure 16).

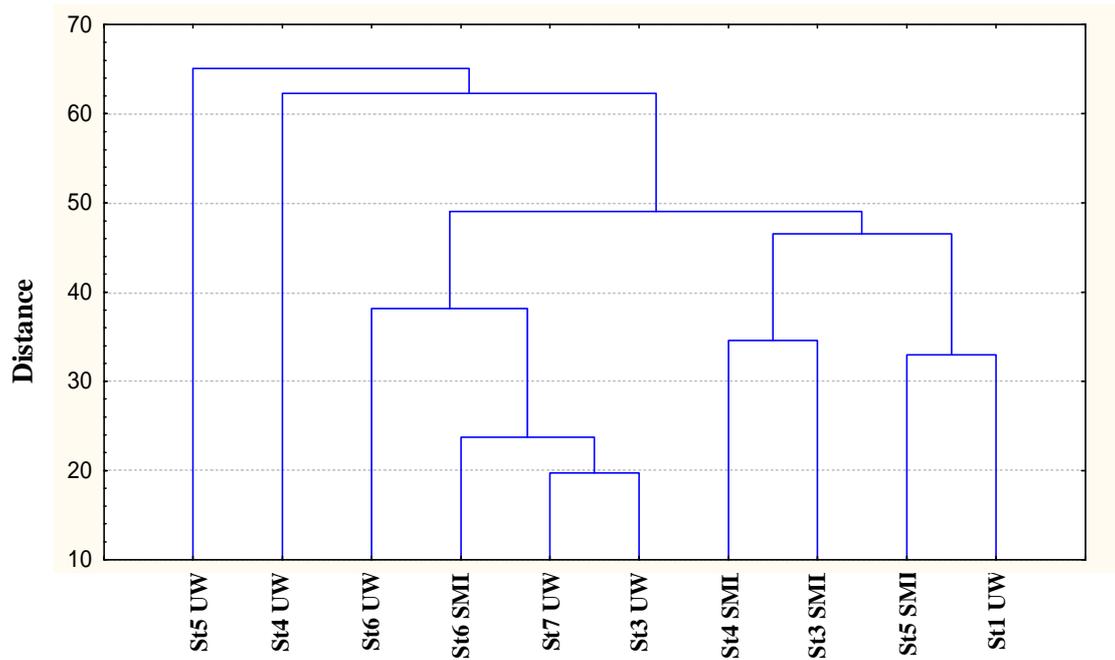


Figure 16 - Dendrogramme construit à partir des distances euclidiennes entre les profils de SSCP.

Le dendrogramme réalisé à partir des échantillons prélevés au site St2 à 5 heures et au midi solaire au cours de 3 jours présente deux groupes principaux. Un groupe correspond aux échantillons du premier jour (J1) et aux échantillons de 5 heures du matin du deuxième jour (J2). L'autre groupe rassemble les échantillons prélevés au midi solaire du deuxième jour et les échantillons du troisième jour (J3). Au troisième jour, la similarité apparente entre la microcouche de surface de 5 heures et l'eau sous-jacente de 12 heures, signalée par les pics présents dans ces profils et absents dans les deux autres profils, n'a pas été confirmée par le dendrogramme (figure 17).

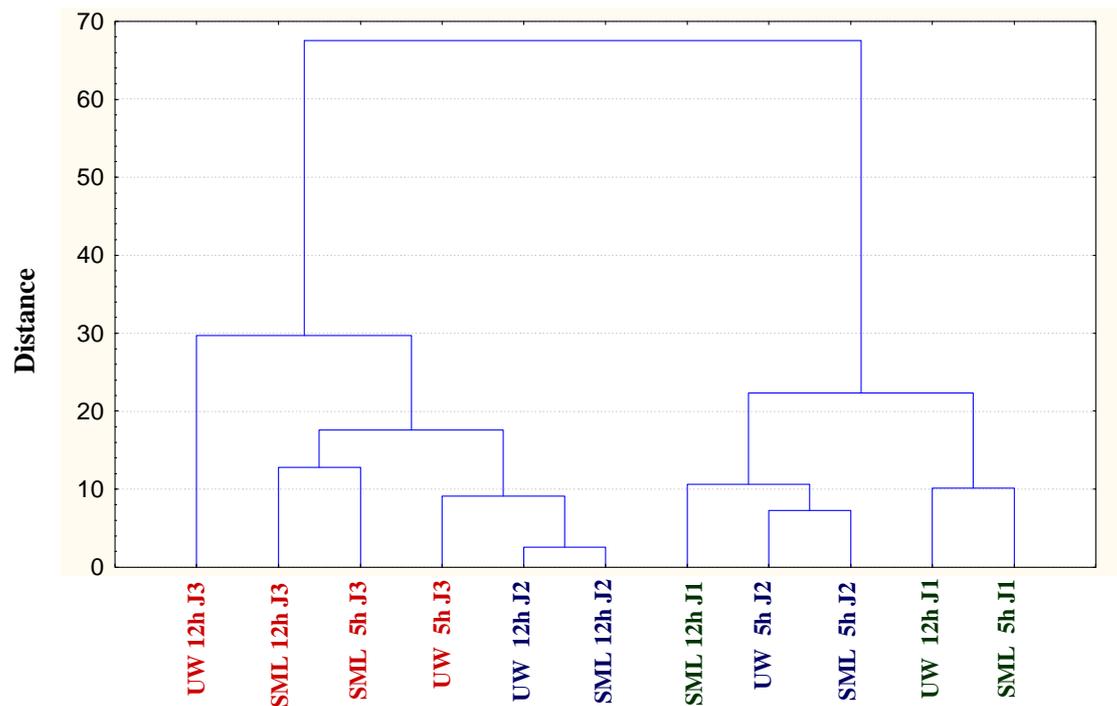


Figure 17 - Dendrogramme construit à partir des distances euclidiennes entre les profils de SSCP.

Chapitre V

Discussion

V.1 Les hydrocarbures dans la microcouche de surface

Les hydrocarbures aliphatiques sont très concentrés à la surface des eaux de la Baie de Guanabara. Les concentrations des n-alcane (tableau 9) sont similaires à celles observées dans la microcouche de surface d'autres environnements pollués, comme Pudget Sound ($2057 \mu\text{g.L}^{-1}$; Hardy *et al.*, 1987b) et Leghorn, mer Thyréniennne, ($3674 \mu\text{g.L}^{-1}$; Cincinelli *et al.*, 2001). À l'exception du site 4, où les concentrations sont beaucoup plus élevées et atteignent $11927 \mu\text{g.L}^{-1}$. L'origine des hydrocarbures est indiquée par les marqueurs chimiques.

La dominance des hydrocarbures à chaîne impaire dans la gamme des n-alcane à faibles poids moléculaires (n-C15 à n-C20) et la forte concentration du n-C15 et du n-C17 indiquent une production biogénique d'hydrocarbures par les bactéries photosynthétiques et les algues (Blumer *et al.*, 1971; Giger *et al.*, 1980; Saliot, 1981; Cranwell *et al.*, 1987). Ceci peut être mis en relation avec la présence d'une forte proportion de bactéries actives (HNA) dans la microcouche de surface.

Un important apport continental est indiqué par la forte abondance des n-alcane de haut poids moléculaire centrés sur le n-C29. Les n-alcane n-C27, n-C29, n-C31 et n-C33 reflètent la contribution de végétaux supérieurs terrestres (Eglinton & Hamilton, 1963; Lipiatou & Albaiges, 1994; Bouloubassi *et al.*, 1997), ce qui est cohérent avec la présence d'apports importants venant du continent.

Ces résultats sont similaires à ceux observés par Ehrardt et Petrick (1993) et Dachs et collaborateurs (1999) en Méditerranée.

L'enveloppe non résolue est un mélange complexe d'hydrocarbures alicycliques (Gough & Rowland, 1990) et est un indicateur des résidus pétroliers (Farrington & Quinn, 1973; Farrington, 1980; Brassell & Eglinton, 1980; Venkatesan & Kaplan, 1982; Laureillard *et al.*, 1997). La forte majorité des composés non résolus (UCM) dans la fraction aliphatique indique une contamination pétrolière chronique dans la Baie de Guanabara, ce qui est cohérent avec le contexte pétrolier local.

Malgré la grande concentration des n-alcane impairs d'origine végétale, les n-alcane lourds (n-C21 à n-C37) présentent un CPI proche de 1, une signature d'hydrocarbures pétrogéniques (Colombo *et al.*, 1989). Cette valeur de CPI, caractéristique des sources anthropiques, confirme la contamination par le pétrole dans la Baie de Guanabara.

Les fortes concentrations d'hydrocarbures pétroliers dans un environnement productif comme la Baie de Guanabara (Gonzalez *et al.*, 2000 ; Andrade *et al.*, 2003) méritent une attention spéciale. Les *blooms* phytoplanctoniques jouent un rôle fondamental dans la bioaccumulation des hydrocarbures pétrogéniques et dans leur transport vers la colonne d'eau (Dachs *et al.*, 1997). Les cellules phytoplanctoniques adsorbent les hydrocarbures, qui sont accumulés à travers de la chaîne alimentaire. La chute de cellules planctoniques et les pelotes fécales transfèrent les hydrocarbures de la surface vers le fond et le sédiment.

L'analyse des marqueurs chimiques permet donc de distinguer différentes origines dans les hydrocarbures de la baie. La contribution aux hydrocarbures par les algues et bactéries est en accord avec les productions primaire et bactérienne élevées (Sevrin-Reyssac *et al.*, 1979 ; Rebello *et al.*, 1988 ; Paranhos *et al.*, 2001), les fortes teneurs en chlorophylle *a* (Barreto, 1992 ; Valentin *et al.*, 1999) et les importantes densités de phytoplancton (Villac, 1990 ; Valentin *et al.*, 1999) et de bactérioplancton (Andrade *et al.*, 2003). Les hydrocarbures originaires des végétaux terrestres arrivent à la baie grâce à la forte contribution d'eau douce par les 35 fleuves du bassin versant et par le ruissellement qui résulte des précipitations abondantes, surtout en été (1100-2100 mm.an⁻¹, dont 300-350mm en janvier, Amador, 1997). Les hydrocarbures pétroliers sont le résultat des apports urbains qui arrivent par ruissellement, par la navigation, les activités portuaires, les fleuves pollués par les industries et les accidents.

La microcouche de surface est enrichie en hydrocarbures non aromatiques, surtout les composés à haut poids moléculaire (HMW). L'évaporation des composés légers à la surface peut être la cause des faibles facteurs d'enrichissement observés pour les n-alcanes de faible poids moléculaire (LMW).

Dans les environnements contaminés par le pétrole et/ou des produits pétroliers, la microcouche de surface peut être 1000 fois plus concentrée en hydrocarbures par rapport à l'eau sous-jacente, aboutissant à la formation d'un film visible. Dans la Baie de Guanabara le film de surface est visible la plupart du temps, mais les facteurs d'enrichissement des hydrocarbures non aromatiques varient de 0,96 à 3,86 et sont similaires aux valeurs observées dans des eaux côtières et océaniques (Marty *et al.*, 1979; Boehm, 1980; Ho *et al.*, 1982 ; Cincinelli *et al.*, 2001).

V.2 Le bactérioneuston

Les bactéries totales présentent une corrélation significative avec le n-alcane n-C17, confirmant l'origine microbienne de cet hydrocarbure.

La microcouche de surface de la Baie de Guanabara présente d'importantes densités de bactéries totales. Les concentrations du bactérioplancton total à l'entrée de la baie (SML = $3,94 \times 10^6$ et UW = $2,93 \times 10^6$) sont comparables aux résultats obtenus dans la même région de la baie au cours d'une étude précédente (Andrade *et al.*, 2003 – UW = $1,10 \times 10^6$) et à Barcelone (Agogué *et al.*, 2005a – SML = $1,43 \times 10^6$ et UW = $1,30 \times 10^6$). Les sites d'échantillonnage situés au fond de la baie présentent des concentrations plus importantes (SML = $2,07 \times 10^7$ et UW = $2,08 \times 10^7$) qui pourraient s'expliquer par une concentration plus faible en prédateurs en raison de la toxicité du film de surface.

Les analyses du bactérioplancton par cytométrie en flux permettent la discrimination entre les cellules à haut contenu en acides nucléiques (HNA) et les cellules à faible contenu (LNA) (Li *et al.*, 1995 ; Gasol *et al.*, 1999 ; Lebaron *et al.*, 2001). Ces deux groupes de cellules sont fréquemment observés dans les écosystèmes aquatiques (Li *et al.*, 1995 ; Marie *et al.*, 1997 ; Gasol *et al.*, 1999 ; Lebaron *et al.*, 2001 ; Andrade *et al.*, 2003) et présentent des différences sur le plan physiologique. De nombreuses études ont mis en évidence que les cellules HNA sont plus actives que les cellules LNA (Li *et al.*, 1995 ; Jellett *et al.*, 1996 ; Lebaron *et al.*, 2001 ; Gregori *et al.*, 2001). Gasol et collaborateurs (1999) ont proposé l'utilisation de la fraction des cellules HNA comme un indicateur du pourcentage des bactéries actives dans le bactérioplancton.

Dans la Baie de Guanabara les cellules HNA correspondent à 60-90% du bactérioplancton total analysé par cytométrie en flux (tableaux 14 et 15). Les cellules actives représentent donc une fraction importante du bactérioplancton. Ces résultats sont similaires à ceux observés antérieurement dans la Baie de Guanabara (Andrade *et al.*, 2003) et dans d'autres environnements (Li *et al.*, 1995 ; Jellett *et al.*, 1996).

Le grand pourcentage de bactéries actives à la surface de la baie indiqué par la fraction majoritaire des cellules HNA est en accord avec l'importante activité bactérienne observée précédemment dans la Baie de Guanabara (Paranhos *et al.*, 2001).

La culturabilité d'une cellule bactérienne dépend de sa viabilité (Deming & Baross, 2000), mais surtout de sa capacité de se reproduire en milieu de culture riche en carbone organique complexe (Button *et al.*, 1993 ; Button *et al.*, 1998 ; Connon & Giovannoni, 2002). La fraction cultivable des bactéries marines océaniques est inférieure à 1% (Jannasch & Jones, 1959 ; Olsen & Bakken, 1987 ; Amman *et al.*, 1995). Cependant la fraction cultivable du bactérioplancton des environnements eutrophes est plus importante et peut atteindre 15% (Amman *et al.*, 1995), parce que ces cellules sont mieux adaptées à des fortes concentrations en nutriments.

Dans la Baie de Guanabara la fraction de bactéries cultivables de la microcouche de surface est d'environ 3% en 2003 et 4 % en 2004. En 2004, la microcouche et l'eau sous-jacente présentent des pourcentages de bactéries cultivables semblables. Par contre en 2003 la microcouche présente une fraction cultivable (3%) plus importante que celle des eaux sous-jacentes (1%). Les facteurs d'enrichissement peuvent atteindre des valeurs de 33,3. Des facteurs d'enrichissement similaires sont présentés dans d'autres études (Tsyban, 1971 ; Agogué *et al.*, 2004). Cette forte culturabilité du bactérioneuston par rapport à l'eau sous-jacente a également été observée en Méditerranée (Agogué *et al.*, 2005a). La concentration des nutriments dans la microcouche (Goering & Menzel, 1965 ; Williams, 1967) peut stimuler l'adaptation des bactéries aux conditions de culture mais il est possible que cet enrichissement de la microcouche de surface en bactéries cultivables (donc viables) soit lié à leur polarisation (membranaire par gradient de protons) et à leur attachement électrostatique aux particules qui s'accumulent à la surface de l'eau de mer. Ceci permettrait d'expliquer le fort pourcentage en bactéries HNA et en bactéries cultivables.

Selon des études précédentes, le bactérioplancton total est 100 à 1000 fois plus abondant dans la microcouche que dans l'eau sous-jacente (MacIntyre, 1974; Dahlbach *et al.*, 1982 ; Hardy, 1982). Cependant dans la Baie de Guanabara l'enrichissement des bactéries totales est faible, environ 1,4. Ces résultats sont équivalents à ceux observés en Méditerranée en utilisant le tamis métallique comme échantillonneur et la cytométrie en flux comme méthode de quantification du bactérioplancton (Agogué *et al.*, 2004 ;

Obernosterer et al., 2005). Obernosterer et collaborateurs (2005) ont observé des concentrations de bactéries attachés à des particules 10 fois plus importantes dans la microcouche en comparaison à l'eau sous-jacente.

L'enrichissement des microorganismes à la surface présente une forte variabilité entre les échantillons, peut-être à cause d'une distribution dans l'espace non uniforme (*patches*) de la microcouche.

La microcouche de surface est significativement différente de l'eau sous-jacente par rapport aux bactéries totales et aux hydrocarbures non aromatiques totaux, aux composés non résolus (UCM), aux composés de haut poids moléculaire (HMW), au phytane et au n-alcane n -C17 (tableaux 12 et 18).

L'échantillonnage réalisé à 5h et à midi pendant 3 jours consécutifs avait comme but de vérifier les effets de l'incidence de la lumière solaire et des radiations UV naturelles. On a observé des densités de bactéries totales significativement différentes à 5h et à midi, dans les deux campagnes de prélèvement (tableau 19).

La Baie de Guanabara présente différentes zones en regard de la qualité de l'eau (Contador & Paranhos, 1996). L'entrée de la baie est plus influencée par les eaux océaniques, alors que dans les régions situées au fond de la baie le renouvellement des eaux est réduit. Cette variation spatiale est retrouvée dans la microcouche de surface.

Les sites d'échantillonnage situés au fond de la baie (St4, St5, St6 et St7) présentent des concentrations en bactéries et en hydrocarbures plus élevées par rapport aux sites localisés à l'entrée de la baie (St1, St2 et St3).

L'entrée de la baie est significativement différente du fond par rapport aux concentrations en bactérioplancton total et en composés organiques comme les n-alcane totaux, les composés de faible poids moléculaire (LMW), y inclus le n-C15 et le n-C17 et le pristane (tableau 13).

V.2.2 Identification des souches bactériennes

Cette étude est la première à isoler et à identifier des souches du bactérioneuston dans la Baie de Guanabara. D'autres études ont révélé un grand nombre d'espèces bactériennes nouvelles dans la fraction cultivable du bactérioplancton (Pinhassi *et al.*, 1997 ; Bowman *et al.*, 1997 ; Agogué *et al.*, 2005a). Dans la Baie de Guanabara, des 43 souches bactériennes séquencées la plupart sont des espèces déjà identifiées dans d'autres environnements. Seulement 8 souches correspondent à de nouvelles espèces et 2 souches sont probablement de nouveaux genres.

Ces résultats suggèrent l'existence de nombreuses espèces cosmopolites. Par contre, les isollements des souches de la baie ne sont pas exhaustifs. Des espèces nouvelles et/ou d'autres espèces connues peuvent se trouver dans la fraction des bactéries cultivables non observées dans cette étude et/ou parmi les bactéries non cultivables.

Certaines souches sont proches de clones non cultivés mais dont les séquences ont été déposées dans la banque de référence GenBank. Cela signifie que ces isolats représentent un intérêt pour la communauté internationale. Parmi ces souches on en retrouve trois (AF432337 - Roling *et al.*, 2002 ; AY739684 - O'Donnell *et al.*, 2004 non publié ; AY770966 - She *et al.*, 2004 non publié) qui sont similaires à des clones isolés à partir d'environnements contaminés par du pétrole. Par ailleurs, ces souches sont résistantes aux radiations solaires. Il serait intéressant de vérifier leur sensibilité au pétrole et aux hydrocarbures aromatiques (HAP) car elles peuvent avoir un intérêt sur le plan biotechnologique.

La présence des souches pathogènes, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, parmi les souches isolées dans la Baie de Guanabara confirme la contamination des eaux de la baie par des eaux usées non préalablement traitées. La présence de ces souches pathogènes dans l'eau de mer a été constatée antérieurement en Méditerranée (Yoshpe-Purer & Golderman, 1987).

Le nombre de coliformes fécaux, fréquemment supérieur aux normes réglementaires (100/100ml), donne une indication de la possible contamination de l'eau de la Baie de Guanabara par diverses bactéries pathogènes.

L'espèce *Staphylococcus aureus* est un bon indicateur de la contamination anthropique et elle est à la base de beaucoup de contamination nosocomiales (Baird-Parker, 1974). *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie ubiquiste car elle se trouve dans la plupart des environnements (Costerton, 1979). Sa concentration dans les eaux usées est supérieure à 10^5 cellules par 100mL (Rhame, 1979). Un grand nombre de maladies sont attribuées à la contamination des eaux de baignade par *Pseudomonas aeruginosa*.

Du fait que la population des villes autour de la Baie de Guanabara utilise les plages de la baie comme lieu de baignade, de loisir et du fait que les riverains consomment parfois les poissons ou les coquillages qui y sont pêchés ou récoltés, la présence de bactéries pathogènes dans les eaux de la baie et dans le film de surface constitue un véritable risque en matière de santé publique.

La plupart des souches isolées dans la Baie de Guanabara appartiennent aux groupes de Alpha- et Gamma- Proteobactéries. Ce résultat est semblable à celui observé dans autres études (Hagström *et al.*, 2002 ; Pinhassi *et al.*, 1997 ; Bowman *et al.*, 1997 ; Agogué *et al.*, 2005a). En général les Gamma-Proteobactéries représentent le groupe phylogénétique dominant dans les souches cultivables (Hagström *et al.*, 2002).

V.2.3 La résistance des souches bactériennes aux radiations solaires

La forte exposition du bactérioneuston aux radiations solaires motive un questionnement sur l'existence d'une photoadaptation des souches neustoniques. Toutefois la profondeur du prélèvement ne semble pas affecter la sensibilité des bactéries aux radiations solaires (Herndl *et al.*, 1993 ; Arrieta *et al.*, 2000 ; Wangberg *et al.*, 2001 ; Agogué *et al.*, 2005b).

Dans la Baie de Guanabara la plupart des souches bactériennes testées (62%) ont montré une forte résistance (R^{++}) aux radiations émises par le simulateur solaire (tableau 21, figure n). Les souches résistantes (R , R^+ et R^{++}) équivalent à 97% des souches testées.

Un grand pourcentage des souches bactériennes résistantes aux rayons solaires est aussi observé dans d'autres environnements. Dans une étude qui a testé la sensibilité du bactérioplancton prélevé au Mer du Nord aux radiations UV, seulement 10% des bactéries a montré une sensibilité aux radiations (Winter *et al.*, 2001). Et même les souches sensibles ont été présentes dans les horizons de surface pendant l'été. Agogué et collaborateurs (2005b) ont testé la sensibilité de 90 souches bactériennes, prélevées dans la microcouche et dans l'eau sous-jacente (0,5m), dans la baie de Banyuls sur mer et à Barcelone, aux radiations émises par un simulateur solaire (aux mêmes conditions que la présente étude) et ont observé que seulement 16% des souches sont sensibles aux radiations solaires.

La sensibilité aux UV et la capacité de réparation des dommages causés par les rayons solaires varient entre les différentes souches testées, indépendamment du groupe taxinomique. Cette variation interspécifique est observée dans d'autres études (Joux *et al.*, 1999; Arrieta *et al.*, 2000 ; Agogué *et al.*, 2005b). L'incidence des radiations UV sur un écosystème peut donc influencer la composition de la communauté bactérienne (Bothwell *et al.*, 1993 ; Joux *et al.*, 1999) mais il est toutefois intéressant de noter que la forte résistance des souches marines leur permet certainement de coloniser la colonne d'eau, et notamment la zone de mélange, sans que leur activité soit fortement affectée par le rayonnement solaire.

Les bactéries résistantes aux radiations doivent posséder des mécanismes de protection et/ou de récupération par rapport aux dommages causés par les radiations solaires. La pigmentation des bactéries a été suggérée comme une protection des cellules aux radiations UV (Wu *et al.*, 1983; Maki & Herwig, 1991). Par contre, la petite taille des cellules bactériennes est considérée comme un facteur limitant la protection pigmentaire (Garcia-Pitchel, 1994 ; Jeffrey *et al.*, 1996 a et b). Certaines études ont montré que les bactéries non pigmentées peuvent être à la fois plus résistantes aux rayons UV que les bactéries pigmentées (Gascón *et al.*, 1995 ; Agogué *et al.*, 2005b).

Dans notre étude, la pigmentation ne semble pas influencer la résistance des souches aux radiations solaires. Les classes de résistance des bactéries sensibles à très résistantes sont également présentes dans les groupes des bactéries pigmentées et non pigmentées.

D'autres mécanismes possibles de photoprotection sont la production d'exopolysaccharides (Elasri & Miller, 1999), la conversion des mycosporines synthétisées par des algues en mycosporine-glycine (Dunlap *et al.*, 1998 ; Shick & Dunlap, 2002) et l'ADN à haut contenu en guanine et cytosine (G+C) (Singer & Ames, 1970 ; Kellog & Paul, 2002). Dans l'environnement les bactéries peuvent utiliser l'ombre produit par d'autres cellules ou les particules détritiques ou abiotiques comme protection, par exemple. L'inhibition du bacterioplancton par les radiations solaires est plus prononcée quand la communauté phytoplanctonique est exclue (Sommaruga *et al.*, 1997) en raison d'une réduction de l'effet protectant et/ou de la réduction de la production d'exopolymères.

La connaissance des mécanismes de protection des bactéries aux rayons UV reste contradictoire, mais l'importance des mécanismes de récupération de l'ADN est constaté dans de nombreuses études (Jeffrey *et al.*, 1996 b; Kaiser & Herndl, 1997; Lyons *et al.*, 1998 ; Pakulski *et al.*, 1998). Il est possible que les bactéries les plus résistantes soient capables de réparer les dommages à l'ADN en temps réel.

Les souches bactériennes très résistantes aux radiations présentent deux types généraux de réponses après leur exposition au simulateur solaire. Une partie des souches (a) présente une croissance similaire au contrôle et une autre partie (b) récupère sa croissance après une phase lag prolongée.

Les bactéries résistantes du type (a) possèdent des mécanismes de réparation de l'ADN endommagé très efficaces. La réparation débute probablement pendant l'exposition aux radiations solaires grâce à la photoréparation enzymatique (PER), activée par la lumière visible ou les UVA (Friedberg, 1985 ; Miller *et al.*, 1999).

Pendant les périodes d'obscurité, d'autres mécanismes (*dark repairs*) sont responsables de la réparation de l'ADN : la réparation par excision de nucléotide (NER), la réparation inductible ou réparation SOS et la réparation par recombinaison. Ces mécanismes sont régulés par la protéine RecA (Miller *et al.*, 1999). Dans les bactéries résistantes du type (b), les mécanismes de réparation à l'obscurité doivent prédominer dans la réparation de l'ADN. Boelen et collaborateurs (2001) ont démontré une accumulation des dommages de l'ADN par les rayons UV et une forte réparation des dommages pendant la nuit par excision de nucléotide (NER).

V.2.4 La structure populationnelle des communautés bactériennes

La structure populationnelle du bactérioplancton prélevé au midi solaire présente un enrichissement d'espèces (pics/OTUs) dans la microcouche de surface (SML) par rapport à l'eau sous-jacente (UW). Cette différence est constatée sur le dendrogramme (figure 16), où les échantillons de la microcouche sont regroupés. Une différence significative entre la SML et la UW est observée à Barcelone (Agogué *et al.*, 2005b).

Les échantillons du site St2 (deuxième jour, le 05 mai 2004) et du site St3 présentent des profils SSCP très similaires en surface et dans l'eau sous-jacente (figures 14 et 15). Ces résultats peuvent indiquer une homogénéisation entre la microcouche de surface et l'eau sous-jacente. Par contre l'étude des bactéries totales et cultivables, analysées à partir des mêmes échantillons utilisés par SSCP, démontre un enrichissement dans la microcouche (tableaux 16 et 17). La similarité entre les profils SSCP de la SML et de l'UW est observée aussi par Agogué et collaborateurs (2005b) en Méditerranée.

D'autre part, les pics supplémentaires, présents dans la SML et non dans l'UW, ne sont pas toujours les mêmes et pas exclusifs de la microcouche et dont ne sont pas attribués à des espèces dites neustoniques. Il faut remarquer que certaines espèces actives dans l'environnement peuvent être insuffisamment abondantes pour être visibles sur les profils SSCP (Moeseneder *et al.*, 2001).

On n'observe pas de type de distribution associé à la variation spatiale des structures populationnelles du bactérioplancton entre les différents sites d'échantillonnage de la Baie de Guanabara. Certains pics sont communs dans presque tous les profils SSCP et indiquent probablement des espèces habituellement présentes dans la baie. Par exemple, on peut remarquer une ressemblance entre les profils SSCP du site St1, localisé en dehors de la baie, et le site St5, au fond de la baie.

Les échantillons prélevés à 5 heures du matin exhibent un nombre plus important de pics dans l'UW par rapport à la SML. Les prélèvements réalisés au cours de 3 jours indiquent que ces pics supplémentaires trouvés dans l'eau sous-jacente à 5 heures, sont retrouvés dans la microcouche et absents de l'UW à midi. Ces résultats suggèrent une migration verticale des bactéries et/ou des prédateurs au cours de la journée (*diel variation*). La migration verticale du zooplancton et du microzooplancton (heteronanoflagellés) est largement connue. Cette migration verticale des prédateurs

affecte fortement les communautés du phytoplancton et du bactérioplancton (Lampert & Taylor, 1985 ; Lampert *et al.*, 1986 ; Atkinson *et al.*, 1992 ; Pearce & Butler, 2002 ; Nakano & Ban, 2003). Le phytoplancton et les bactéries sont aussi capables de migrer verticalement à travers de la colonne d'eau (Takamura & Yasuno, 1984 ; Jones, 1988 ; Pedros-Alio & Sala, 1990 ; Nadeau *et al.*, 1999).

V.3 Discussion générale

La Baie de Guanabara est un environnement important pour les activités récréatives, le transport et même pour la survie des communautés de pêcheurs qui traditionnellement récoltent des poissons et des coquillages dans la baie. Malgré son importance, la baie reste très peu étudiée.

Les résultats de cette étude confirment la contamination des eaux de la baie par les eaux usées non traitées et par des hydrocarbures pétroliers que l'on trouve dans les eaux mais aussi dans le film de surface de l'eau de mer : la microcouche de surface.

Les environnements situés dans les régions tropicales sont connus pour leur biodiversité en général. Cette étude est la première à isoler et à identifier des souches du bactérioplancton présentes dans la Baie de Guanabara. L'isolement de souches bactériennes est une étape essentielle pour pouvoir étudier ces bactéries, souvent inconnues, et pour réaliser des études de biodégradation des polluants ou encore pour recherche des souches présentant des caractéristiques bactéricides, des propriétés de résistance à des virus, aux radiations solaires, etc. Si cette biodiversité est fondamentale pour l'homme, pour la société et si elle est à ce jour encore très largement inexplorée et inexploitée, la pollution incessante des eaux de la Baie de Guanabara par des effluents domestiques et industriels peut amener à la diminution de la diversité du bactérioplancton de la baie et en conséquence porter atteinte à la diversité de toute la chaîne alimentaire.

Nous avons montré au cours de ce travail que la microflore de la Baie de Guanabara, présente dans l'eau et à l'interface air-eau, est très diversifiée. Cette microflore présente des propriétés de résistance au rayonnement ultra-violet, ce qui lui permet certainement de rester active à la surface de l'eau. De la même manière, cet environnement se caractérise par la présence de fortes concentrations d'hydrocarbures.

Il serait important de poursuivre ce travail en étudiant le rôle de la microflore dans la transformation et la dégradation des hydrocarbures par la conduite d'expérimentation spécifiques qui peuvent se faire en laboratoire. Si des bactéries très efficaces dans la dégradation de ces hydrocarbures sont identifiées, les gènes impliqués dans ce processus pourraient être identifiés et utilisés pour la bioremédiation, soit à l'aide de souches naturelles qui pourraient être apportées dans les environnements pollués, soit à partir de souches utilisées dans des filières d'épuration spécialisées.

Chapitre VI

Conclusions et perspectives

VI.1 Conclusions

La microcouche de surface (SML) de la Baie de Guanabara est enrichie en hydrocarbures non aromatiques (HNA), en bactéries totales et en bactéries cultivables par rapport à l'eau sous-jacente. Les facteurs d'enrichissement sont d'environ 2,2 pour les hydrocarbures non aromatiques, 7,4 pour les bactéries cultivables et 1,4 pour les bactéries totales.

Le film de surface est visible la plupart du temps et la microcouche est bien définie, significativement différent de l'eau sous-jacente (UW) par rapport aux bactéries totales, aux hydrocarbures non aromatiques totaux, aux composés non résolus (UCM), aux composés de haut poids moléculaire (HMW), au phytane et au n-alcane n-C17.

La forte concentration des hydrocarbures dans la BG résulte de la somme d'une importante production bactérienne et primaire, de l'apporte significatif d'hydrocarbures d'origine végétale par les fleuves et le ruissellement ainsi que de la pollution anthropique par les apportes urbains, la navigation, les activités portuaires et les industries.

La Baie de Guanabara présente diverses zones de différentes caractéristiques chimiques et microbiennes. Les concentrations en bactéries et en hydrocarbures sont plus élevées au fond de la baie. Les sites d'échantillonnage situés à l'entrée de la baie sont significativement différents des sites du fond de la baie par rapport aux concentrations du bactérioplancton total, des n-alcane totaux et des composés de faible poids moléculaire (LMW).

La plupart des souches isolées à la Baie de Guanabara appartient au groupe des proteobactéries et sont similaires à celles déjà identifiés dans autres environnements. D'autre part, certaines souches cultivées sont des espèces bactériennes nouvelles.

La plupart des souches testées au simulateur solaire sont résistantes aux radiations solaires. La sensibilité aux UV et la capacité de récupération des dommages causés par les rayons solaires varient entre les différentes souches testées. Cette variation interspécifique est indépendante des groupes taxonomiques.

La pigmentation des souches ne semble pas affecter leur résistance aux rayons solaires. La résistance des souches est probablement due à des mécanismes efficaces de réparation de l'ADN endommagé, comme la réparation enzymatique et la réparation par excision de nucléotide. D'autres mécanismes de photoprotection, comme la production d'exopolysaccharides, peuvent participer à la résistance des bactéries aux radiations. Les facteurs et les mécanismes responsables de la forte de résistance des souches bactériennes aux rayons solaires demandent des études additionnelles.

La structure populationnelle du bactérioplancton, analysée par la SSCP, indique un enrichissement d'espèces dans la microcouche de surface (SML) par rapport à l'eau sous-jacente (UW). Par contre, les profils SSCP n'ont pas révélé d'espèces exclusives (neustoniques) de la microcouche de surface.

Les résultats de la SSCP des échantillons provenant des différents sites d'échantillonnage ne présentent pas un profil consistant de variation spatiale des structures populationnelles du bactérioplancton de la Baie de Guanabara.

Les profils SSCP des échantillons de la microcouche de surface et de l'eau sous-jacente, prélevées à 5 heures du matin et au midi solaire, indiquent une possible migration verticale des bactéries et/ou des prédateurs au cours de la journée (*diel variation*). Des études supplémentaires sont nécessaires pour la compréhension de cette variation des structures populationnelles du bactérioplancton.

VI.2 Perspectives

- Identifier les principaux polluants dans la microcouche de la Baie de Guanabara, y compris les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les polluants organiques persistants et les pesticides;
- Évaluer la résistance des bactéries isolées vis-à-vis des principaux polluants identifiés dans la Baie de Guanabara, afin d'identifier les bioindicateurs de pollution et les bactéries capables de dégrader les hydrocarbures;
- Accompagner les variations des hydrocarbures aromatiques à 5 heures du matin et au midi solaire ;
- Analyser les effets de la photodégradation sur les principaux polluants identifiés dans la Baie de Guanabara.

Références bibliographiques

- Aas P., Lyons M.M., Pledger R., Mitchell D.L. & Jeffrey W.H. (1996) Inhibition of bacterial activities by solar radiation in nearshore waters and the Gulf of Mexico. *Aquat. Microb. Ecol.*, **11**: 229-238.
- Agogu  H., Casamayor E.O., Joux F., Obernosterer I., Dupuy C., Lantoin  F., Catala P., Weinbauer M.G., Rheinthal  T., Herndl G.J. & Lebaron P. (2004) Comparison of samplers for the biological characterization of the sea surface microlayer. *Limnol. Oceanogr. Methods*, **2**: 213-225.
- Agogu  H., Casamayor E.O., Bourrain M., Obernosterer I., Joux F., Herndl G.J. & Lebaron P. (2005a) A survey on bacteria inhabiting the surface microlayer of coastal ecosystems. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **54**: 269-280.
- Agogu  H., Joux F., Obernosterer I. & Lebaron P. (2005b) Resistance of marine bacterioneuston to solar radiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 5282-5289.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**: 403-410.
- Altschul S.F., Madden T.L., Sch ffler A.A., Zhang Z., Miller W. & Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 3389-3402.
- Amador E.S. (1980) Assoreamento da Ba ia de Guanabara – taxas de sedimenta  o. An XXXII Congr. Brasil. Geol., **4**: 1474-1488.
- Amador E.S. (1997) *Ba ia de Guanabara e Ecossistemas Perif ricos: Homem e Natureza*. Rio de Janeiro, 539 pp.
- Amann R., Ludwig W. & Schleifer K.-H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, **59**: 143-169.
- Andrade L., Gonzalez A.M., Araujo F.V. & Paranhos R. (2003) Flow cytometry assesment of bacterioplankton in tropical marine environments. *J. Microbiol. Methods*, **55**: 841-850.
- Arrieta J.M. & Herndl G.J. (2002) Changes in bacterial b-glucosidase diversity during a coastal phytoplankton bloom. *Limnol. Oceanogr.*, **47**: 594-599.
- Arrieta J.M., Weinbauer M.G. & Herndl G.J. (2000) Interspecific variability in sensitivity to UV radiation and subsequent recovery of selected isolates of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 1468-1473.
- Atkinson A., Ward P., Williams R. & Poulet S.A. (1992) Feeding rates and diel vertical migration of copepods near South Georgia: comparison of shelf and oceanic sites. *Mar. Biol.*, **114**: 49-56.

- Azam F. (1998) Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science.*, **280**: 694-696
- 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. Prog. Ser.*, **10**: 257-263.
- Barreto A.S. (1992) *Evolução da Clorofila e Fósforo na Baía de Guanabara no Período de 1980-1990*. Monografia de Bacharelado Universidade do Rio de Janeiro, Brazil. 60pp.
- Barrick R.C. (1982) Flux of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons to central Puget Sound from Seattle (Westpoint) primary sewage effluent. *Environ. Sci. Technol.*, **16**: 682-692.
- Benner R. & Biddanda B. (1998) Photochemical transformations of surface and deep marine dissolved organic matter: effects on bacterial growth. *Limnol. Oceanogr.*, **43**: 1373-378.
- Bence A.E. & Burns W.A. (1995) Fingerprinting hydrocarbons in the biological resources of the Exxon Valdez spill area. *American Society for Testing and Materials*: 84-140.
- Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Rapp B.A. & Wheeler D.L. (2000) GenBank. *Nucleic Acids Res.*, **28**:15-18.
- Bezdek H.F. & Carlucci A.F. (1972) Surface concentrations of marine bacteria. *Limnol. Oceanogr.*, **17**: 566-569.
- Blanchard D.C. & Syzdek L. (1970) Mechanism for the Water-to-Air transfer and concentration of bacteria. *Science.*, **170**: 626-628.
- Blumer M., Guillard R.R.L. & Chase T. (1971) Hydrocarbons of marine phytoplankton. *Mar. Biol.*, **8**: 183-189.
- Boehm P.D. (1980) Evidence for the decoupling of dissolved particulate and surface microlayer hydrocarbons in northwestern Atlantic continental shelf waters. *Mar. Chem.*, **9**: 255-281.
- Boelen, P., Veldhuis, M.J.W. & Buma, A.G.J. (2001) Accumulation and removal of UVBR-induced DNA damage in marine tropical plankton subjected to mixed and simulated non-mixed conditions. *Aquat. Microb. Ecol.*, **24**: 265-274.
- Booth M.G., Hutchinson L.A., Brumsted M., Aas P., Coffin R.B., Downer Jr R.C., Kelley C.A., Lyons M., Pakulski J.D., Sandvik S.L.H., Jeffrey W.H. & Miller R.V. (2001) Quantification of *recA* gene expression as an indicator of repair potential in marine bacterioplankton communities of Antarctica. *Aquat. Microb. Ecol.*, **24**: 51-59.

- Bothwell M.L., Sherbot D., Roberge A.C. & Daley R.J. (1993) Influence of natural ultraviolet radiation on lotic periphytic diatom community growth biomass accrual and species composition: short-term versus long-term effects. *J. Phycol.*, **29**: 24-35.
- Bouloubassi I., Lipiatou E., Saliot A., Tolosa I., Bayona J.M. & Albaiges J. (1997) Carbon sources and cycle in the W Mediterranean—the use of molecular markers to determine the origin of the organic matter. *Deep-Sea Res.*, **44**: 781-799.
- Bourbonniere R.A. & Meyers P.A. (1996) Anthropogenic influences on hydrocarbon contents of sediments deposited in eastern Lake Ontario since 1800. *Environ. Geol.*, **28**: 22-28.
- Bowman J.P., McCammon S., Brown M.V., Nichols D.S. & McMeehin T.A. (1997) Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 3068-3078.
- Brassell S.C. & Eglinton G. (1980) Environmental chemistry - an interdisciplinary subject. Natural and pollutant organic compounds in contemporary aquatic environments. *In: Analytical Techniques in Environmental Chemistry*, J. Albaiges (editor). Pergamon Press, Oxford, 1-22.
- Bratbak G., Heldal M., Norland S. & Thingstad T. F. (1990) Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 1400-1405.
- Bratbak G., Thingstad F. & Heldal M. (1994) Viruses and the microbial loop. *Microb. Ecol.*, **28**: 209-221.
- Brosius J., Palmer M.L., Kennedy P.J. & Noller H.F. (1978) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 4801-4805.
- Brüssow H. & Hendrix R.W. (2002) Phage genomics: small is beautiful. *Cell*, **108**: 13-16.
- Burns K.A. & Saliot A (1986) Petroleum hydrocarbons in the Mediterranean Sea: a mass balance. *Mar. Chem.*, **20**: 141-157.
- Busscher H.J., Bos R. & van der Mei H.C. (1995) Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiol. Lett.*, **128**: 229-234.
- Button D.K., Robertson B.R., Lepp P.W. & Schmidt T.M. (1998) A small dilute-cytoplasm high-affinity novel bacterium isolated by extinction culture and having kinetic constants compatible with growth at ambient concentrations of dissolved nutrients in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 4467-4476.
- Button D.K., Schut F., Quang P., Martin R. & Robertson B.R. (1993) Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory procedures and initial results. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 881-891.

- Caldeira R.L., Carvalho O.S., Mendonca C.L., Graeff-Teixeira C., Silva M.C., Ben R., Maurer R., Lima W.S. & Lenzi H.L. (2003) Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis* and *A. vasorum* by polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **98**: 1039-1043.
- Capone D.G., Zehr J.P., Paerl H.W., Bergman, B. & Carpenter E.J. (1997) *Trichodesmium*, a globally significant marine cyanobacterium. *Science*, **276**: 1221-1229.
- Carlson D.J. (1982) A field evaluation of plate and screen microlayer sampling techniques. *Mar. Chem.*, **11**: 189-208.
- Carlson D.J. (1993) The early diagenesis of organic matter: reaction at the air-sea interface. In: *Organic Chemistry*, M.H. Engel & S.A. Macko (editors). Van Nostrand Reinhold, New York, 255-268.
- Carlucci A.F., Craven D.B. & Henrichs S.M. (1985) Surface-film microheterotrophs: amino acid metabolism and solar radiation effects on their activities. *Mar. Biol.*, **85**: 13-22.
- Carpenter E.J. & Romans K. (1991) Major role of the cyanobacterium *Trichodesmium* in nutrient cycling in the North Atlantic Ocean. *Science*, **254**: 1356-1358.
- Chatila K., Demers S., Mostajir B., Chanut J.P. & Monfort P. (1999) Bacterivory of a natural heterotrophic protozoan community exposed to different intensities of ultraviolet-B radiation. *Aquat. Microb. Ecol.*, **20**: 59-74
- Cho B.C. & Azam F. (1988) Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. *Lett. Nat.*, **332**: 441-443.
- Cincinelli A., Stortini A.M., Perugini M., Checchini L. & Lepri L. (2001). Organic pollutants in sea-surface microlayer and aerosol in the coastal environment of Leghorn--(Tyrrhenian Sea). *Mar. Chem.*, **76**: 77-98.
- Cini R., Lombardini P.P. & Hühnerfuss H. (1983) Remote sensing of marine slicks utilising their influence on wave spectra. *Int. J. Remote Sensing*, **4**: 101-110.
- Colombo J.C., Barreda A., Bilos C., Cappelletti N., Demichelis S., Lombardia P., Migoya M.C., Skorupka C. & Suárez G. (2004) Oil spill in the Río de la Plata estuary Argentina: 1. Biogeochemical assessment of waters sediments soils and biota. *Environ. Pollut.*, **134**: 277-289.
- CONAMA (2000) Resolução número 274, de 29 de novembro de 2000, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Ministério do Meio Ambiente. <http://www.mmma.gov.br/port/conama/res>.
- Connon S.T. & Giovannoni S.J. (2002) High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 3878-3885.

- Contador L.S. & Paranhos, R. (1996) Water quality trends in Urca Inlet (Guanabara Bay, Brazil) from 1986 to 1992. *Arq. Biol. Technol.*, **39**: 735-744.
- Corsolini S., Kannan K., Imaga T., Focardi S. & Giesy J.P. (2002) Polychloronaphtalenes and other dioxin-like compounds in Arctic and Antarctic marine food webs. *Environ. Sci. Technol.*, **36**: 3490-3496.
- Costerton J.W., Marrie T.J. & Cheng K.-J. (1985). In: *Bacterial adhesion: mechanisms and physiological significance*, D.C. Savage & M. Flecher (editors). Plenum Press, New York.
- Cranwell P.A., Eglinton G. & Robinson N. (1987) Lipids of aquatic organisms as potential contributors to lacustrine sediments-II. *Org. Geochem.*, **11**: 513-527.
- Cross J.N., Hardy J.T., Hose J.E., Hershelman G.P., Antrim L.D., Gosset R.W. & Crecelius E.A. (1987) Contaminant concentrations and toxicity of sea-surface microlayer near Los Angeles California. *Mar. Environ. Res.*, **23**: 307-323.
- Crutzen P.J. (1992) Ultraviolet on the increase. *Nature*, **356**: 104-105.
- Dachs J., Bayona J. M., Fillaux J., Saliot A. & Albaigés J. (1999) Evaluation of anthropogenic and biogenic inputs into the western Mediterranean using molecular markers. *Mar. Chem.*, **65**: 195-210.
- Dahlbach B., Gunnarsson L.A.H., Hermansson M. & Kjelleberg S. (1982). Microbial investigations of surface microlayers water column ice and sediment in the Arctic Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **9**: 101-109.
- Daumas R.A., Laborde P.L., Marty J.C. & Saliot A. (1976) Influence of sampling method on the chemical composition of water surface. *Limnol. Oceanogr.*, **21**: 319-326.
- De Souza-Lima Y. & Chrétiennot-Dinet M.J. (1984) Measurements of biomass and activity of neustonic microorganisms. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.*, **19**: 167-180.
- Delbès C., Moletta R. & Godon J.J. (2000) Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ. Microbiol.*, **2**:506-515
- Deming J.W. & Baross J.A. (2000) Survival dormancy and nonculturable cells in extreme deep-sea environments. In: *Nonculturable microorganisms in the environment*, R.R. Colwell & D.J. Grimes (editors) ASM Press Washington D.C., 147–197.
- Dietz R.S. & Lafond E.C. (1950). Natural slicks in the Ocean. *J. Mar. Res.*, **9**: 69-76.
- Dowling T. E., Moritz C. & Palmer J. D. (1990) Nucleic acids II: restriction site analysis. In *Molecular systematics*, D. M. Hillis & C. Moritz (editors). Sinauer Assoc. Inc. Sunderland Mass, 250–317.

- Ducklow H. (2000) Bacterial production and biomass in the oceans. *In: Microbial ecology of the oceans*, D.L. Kirchman (editor). Wiley New York N.Y, 85–120.
- Dunlap W.C., Masaki K., Yamamoto R.M., Larsen R.M. & Karube I. (1998) A novel antioxidant derived from seaweed. *In: New developments in marine biotechnology*, Y.L.G.a.H.O. Halvorson (editor). Plenum Press, 33-35.
- Eganhouse R.P. & Kaplan I.R. (1982) Extractable organic matter in municipal wastewaters. 2: Hydrocarbons: molecular characterization. *Environ. Sci. Technol.*, **17**: 523-530.
- Eglinton G. & Hamilton R.J. (1963) *In: Chemical Plant Taxonomy*, T. Swain (editor). Academic Press, 187–217.
- Ehling-Schulz M., Bilger W. & Scherer S. (1997) UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Bacteriol.* **179**: 1940–1945.
- Ehrhardt M. & Petrick G. (1993) On the composition of dissolved and particle-associated fossil fuel residues in Mediterranean surface waters. *Mar. Chem.*, **42**: 57–70.
- Falkowska L. (1999a) Sea surface microlayer: a field evaluation of teflon plate glass plate and screen sampling techniques. Part 1. Thickness of microlayer samples and relation to wind speed. *Oceanologia*, **41**: 211-221.
- Falkowska L. (1999b) Sea surface microlayer: a field evaluation of teflon plate glass plate and screen sampling techniques. Part 2. Dissolved and suspended matter. *Oceanologia*, **41**: 223-240.
- Farman J.C., Gardiner B.G. & Shanklin J.D. (1985) Large losses of ozone in Antarctica reveal seasonal ClO_x/NO_x interaction. *Nature*, **315**: 207-210.
- Farrington J. W. (1980) An overview of the biogeochemistry of fossil fuel hydrocarbons in the marine environment. *In: Petroleum in the Marine Environment Advances in Chemistry Series 185*, L. Petrakis & F. T. Weiss (editors). ACS Washington, 1-22.
- Farrington J.W. & Quinn J.G. (1973) Petroleum hydrocarbons in Narragansett Bay: I. Survey of hydrocarbons in sediments and clams (*Mercenaria mercenaria*). *Estuar. Coast. Mar. Sci.*, **1**: 71-79.
- Fauchot J., Gosselin M., Levasseur M., Mostajir B., Belzile C., Demers S., Roy S. & Villegas P.Z. (2000) Influence of UV-B radiation on nitrogen utilization by a natural assemblage of phytoplankton. *J. Phycol.*, **36**: 484-496.
- FEEMA (1990) Projeto de Recuperação Gradual do Ecossistema da Baía de Guanabara vol. 1. Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente, Rio de Janeiro Brazil, 203pp.

- FEEMA (1998) Qualidade da Água da Baía de Guanabara – 1990-1997. Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente, Rio de Janeiro Brazil, 187pp.
- Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **30**: 783-791.
- Fernandes M. B. Sicre M.-A. Boireau A. & Tronczynski J. (1997) Aquatic hydrocarbon distributions in the Seine Estuary: biogenic polyaromatics and n-alkanes. *Estuaries*, **20**: 281-290.
- Ferreira H.O. (1995) *Aporte de Hidrocarbonetos de Petróleo para a Baía de Guanabara*. MSc. Thesis Universidade Federal Fluminense, Brazil, 86pp.
- Ferreira G.S., Demers S., Del Giorgio P. & Chanut J.P. (1997) Responses of phytoplankton productivity and community structure to UV radiation in the Redberry Lake. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **54**: 705-714.
- Fleischmann E.M. (1989) The measurement and penetration of ultraviolet radiation into tropical marine water. *Limnol. Oceanogr.*, **34**: 1623-1629
- Freifelder D. (1987) *Microbial Genetics*. Jones and Bartlett, Boston.
- Friedberg E.C. (1985) *DNA Repair*. WH Freeman & Co., New York.
- Fuhrman J.A. (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, **399**: 541-548.
- Galtier N., Gouy M. & Galtier C. (1996) SEAVIEW and PHYLO-WIN two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *CABIOS*, **12**: 543-548.
- Garcia-Flor N., Guitart C., Bodineau L., Dachs J., Bayona J.M. & Albaiges J. (2005) Comparison of sampling devices for the determination of polychlorinated biphenyls in the sea surface microlayer. *Mar. Environ. Res.*, **59**: 255-275.
- Garcia-Pichel F. (1994) A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnol. Oceanogr.*, **39**: 1704-1717.
- Garrett W. D. (1965) Collection of slick-forming materials from the sea surface. *Limnol. Oceanogr.*, **10**: 602-605.
- Garrett W.D. (1967a) The organic chemical composition of the ocean surface. *Deep-Sea Res.*, **14**: 221-227.
- Garrett W.D. (1967b) Stabilization of air bubbles at the air-sea interface by surface-active material. *Deep-Sea Res.*, **14**: 651-672.

- Gascón J., Oubiña A., Pérez-Lezaun A. & Urmeneta J. (1995) Sensitivity of selected bacterial species to UV radiation. *Curr. Microbiol.*, **30**: 177-182.
- Gasol J. M., Zweifel U. L., Peters F., Furhman J. A. & Hagström A. (1999) Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 4475-4483.
- GESAMP (IMO/FAO/Unesco-IOC/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection) (1995) The sea-surface microlayer and its role on global change. *Rep. Stud. GESAMP* **59**, 76 pp.
- Giger W., Schaffner C. & Wakeham S.G. (1980) Aliphatic and olefinic hydrocarbons in recent sediments of Greifensee Switzerland. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **44**: 119-129.
- Goering J.J. & Menzel D.W. (1965) The nutrient chemistry of the sea surface. *Deep-Sea Res.*, **12**: 839-843.
- Gonzalez A.M., Paranhos R., Andrade L. & Valentin, J.L. (2000) Bacterial production in Guanabara Bay (Rio de Janeiro, Brazil) evaluated by ³H-leucine incorporation. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **43**: 493-500.
- Gough M.A. & Rowland S.J. (1990) Characterisation of unresolved complex mixtures of hydrocarbons in petroleum. *Nature*, **344**: 648-650.
- Grasso D., Smets B.F., Strevett K.A., Machinist B.D., van Oss C.J., Giese R.F. & Wu W. (1996) Impact of physiological state on surface thermodynamics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Sci. Technol.*, **30**: 3604-3608.
- Gregori G., Citterio S., Ghiani A., Labra M., Sgorbati S., Brown S. & Denis M. (2001) Resolution of viable and membrane compromised bacteria in fresh and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 4662-4670.
- Hader D.P., Lebert M., Marangoni R. & Colombetti G. (1999) ELDONET – European Light Dosimeter Network hardware and software. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **52**: 51-58.
- Hagström A., Pinhassi J. & Zweifel U.L. (2000) Biogeographical diversity among marine bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.*, **21**: 231-244.
- Hagström A., Pommier T., Rohwer F., Simu K., Stolte W., Svensson D. & Zweifel U.L. (2002) Use of 16S ribosomal DNA for delineation of marine bacterioplankton species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 3628-3633.
- Hardy J.T. (1973) Phytoneuston ecology of a temperate marine lagoon. *Limnol. Oceanogr.*, **18**: 525-533.

- Hardy J.T. (1982) The sea surface microlayer: biology chemistry and anthropogenic enrichment. *Prog. Oceanog.*, **11**: 307-328.
- Hardy J.T. & Apts C. W. (1984) The sea-surface microlayer: phytoneuston productivity and effects of atmospheric particulate matter. *Mar. Biol.*, **82**: 293-300.
- Hardy J.T. & Apts C. W. (1989) Photosynthetic carbon reduction: high rates in the sea-surface microlayer. *Mar. Biol.*, **101**: 411-417.
- Hardy J.T. & Word J.Q. (1986) *Sea Surface Toxicity in Puget Sound*. Puget Sound Notes. Seattle Washington. US EPA Region 10. **11**: 3-6.
- Hardy J.T., Apts C. W., Crecelius E.A. & Bloom N.S. (1985) Sea-surface microlayer metals enrichments in an urban and rural bay. *Est. Coast. Shelf Sci.*, **20**: 299-312.
- Hardy J.T., Crecelius E.A., Antrim L.D., Broadhurst V.L., Apts C.W., Gurtisem J.M. & Fortman T.J. (1987b) The seasurface microlayer of Puget Sound: Part II. Concentrations of contaminants and relation to toxicity. *Mar. Environ. Res.*, **23**: 251-271.
- Hardy J.T., Coley, J.A., Antrim L.D. & Kiesser S.L. (1988) A hydrophobic large-volume sampler for collecting aquatic surface microlayers: characterization and comparison with glass plate method. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **45**: 822-826.
- Hardy J.T. Crecelius E.A. Antrim L.D. Kiesser S.L. & Broadhurst V.L. (1990) Aquatic surface microlayer contamination in Chesapeake Bay. *Mar. Chem.*, **28**: 333-351.
- Hardy J.T., Crecelius E.A., Antrim L.D., Kiesser S.L. & Broadhurst V.L. (1990) Aquatic surface microlayer contamination in Chesapeake Bay. *Mar. Chem.*, **28**: 333-351.
- Harvey G.W. & Burzell L.A. (1972) A simple microlayer method for small samples. *Limnol. Oceanogr.*, **17**: 156-157.
- Harvey G.W. (1966) Microlayer collection from the sea surface: a new method and initial results. *Limnol. Oceanogr.*, **11**: 608-614.
- Hatcher R.F. & Parker B.C. (1974a) Laboratory comparisons of four surface microlayers samplers. *Limnol. Oceanogr.*, **19**: 162-165.
- Hatcher R.F. & Parker B.C. (1974b) Microbiological and chemical enrichment of freshwater-surface microlayers relative to the bulk-subsurface water. *Can. J. Microbiol.*, **20**: 1051-1057.
- Hayashi K. (1991) PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl.*, **1**: 34-38.

- Helbling E.W., Marguet E.R., Villafaña V.E. & Holm-Hansen O. (1995) Bacterioplankton viability in Antarctic waters as affected by solar ultraviolet radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **126**: 293-298.
- Herndl G.J., Müller-Niklas G. & Frick J. (1993) Major role of ultraviolet-B in controlling bacterioplankton growth in the surface layer of the ocean. *Nature*, **361**: 717-719.
- Ho R., Marty J.C. & Saliot A. (1982) Hydrocarbons in the Western Mediterranean Sea 1981. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **12**: 81-98.
- Hoffman G.L., Duce R.A., Walsh P.R., Hoffman E.J., Ray B.J. & Fasching J.L. (1974) Residence time of some particulate trace metals in the oceanic surface microlayer: significance of atmospheric deposition. *J. de Rech. Atmos.*, **8**: 745-759.
- Hoffman E.V., Milis G.L., Latimer J.S. & Quinn J.G. (1984) Urban runoff as a source of PAH to coastal waters. *Environ. Sci. Technol.*, **18**: 580-587.
- Hunter K.A. & Liss P.S. (1981) Organic sea surface films. In: *Marine Organic Chemistry*, E.K. Duursma & R. Dawson (editors). Elsevier Amsterdam, 259-298.
- Hunter K.A. (1980) Processes affecting particulate trace metals in the sea surface microlayer. *Mar. Chem.*, **9**: 49-70.
- Jannasch H.W. & Jones G.E. (1959) Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration. *Limnol. Oceanogr.*, **4**: 128-140
- Jarvis N.L., Garrett W.D., Scheiman M.A. & Timmons C.O. (1967). Surface chemical characterization of surface-active material in seawater. *Limnol. Oceanogr.*, **12**: 88-96.
- Jeffrey W.H., Aas P., Lyons M.M., Coffin R.B., Pledger R.J. & Mitchell D.L. (1996a) Ambient solar radiation-induced photodamage in marine bacterioplankton. *Photochem. Photobiol.*, **64**: 419-427.
- Jeffrey W.H., Pledger R.J., Aas P., Hager S., Coffin R.B., van Haven R. & Mitchell D.L. (1996b) Diel and depth profiles of DNA photodamage in bacterioplankton exposed to ambient solar ultraviolet radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **137**: 283-291.
- Jellett J. F., Li W. K. W., Dickie P. M., Boraie A. & Keplay P. E. (1996) Metabolic activity of bacterioplankton communities assessed by flow cytometry and single carbon substrate utilization. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **136**: 213-225.
- Jiang S.C. & Paul J.H. (1996) Occurrence of lysogenic bacteria in marine microbial communities as determined by prophage induction. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **142**: 27-38.
- Jiang S.C. & Paul J.H. (1998) Gene transfer by transduction in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 2780-2787.

- Johnsen A.R. , Bendixen K. & Karlson U. (2002) Detection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates by using the respiration indicator WST-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 2683-2689.
- Jones R.I. (1988) Vertical distribution and diel migration on flagellated phytoplankton in a small humic lake. *Hydrobiologia*, **161**: 75-87.
- Joux F., Jeffrey W.H., Lebaron P. & Mitchell D.L. (1999) Marine bacterial isolates display diverse responses to UV-B radiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 3820-3827.
- Kaiser E. & Herndl G.J. (1997) Marine bacterial isolates display diverse responses to UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4026-4032.
- Karentz D., Bothwell M.L., Coffin R.B., Hanson A., Herndl G.J., Kilham S.S., Lesser M.P., Lindell M., Moeller R.E., Morris D.P., Neale P.J., Sanders R. W., Weiler C.S. & Wetzel R.G. (1994) Impact of UVB radiation on pelagic freshwater ecosystems: report of the working group on bacteria and phytoplankton. *Arch. Hydrobiol.*, **43**: 31-69.
- Kellogg C.A. & Paul J.H. (2002) Degree of ultraviolet radiation damage and repair capabilities are related to G+C content in marine vibriophages. *Aquat. Microb. Ecol.*, **27**: 13-20.
- Kerr J.B. & McElroy C.T. (1993) Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. *Science.*, **262**: 1032-1034.
- Kimura M. (1980) A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, **16**: 111.
- Kjelleberg S. & Hakansson N. (1977). Distribution of lipolytic proteolytic and amylolytic marine bacteria between the lipid film and the subsurface water. *Mar. Biol.*, **39**: 103-109.
- Kjerfve B., Ribeiro C.A., Dias G.T.M., Filippo A. & Quaresma V.S. (1997) Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara Rio de Janeiro *Brazil. Contin. Shelf Res.*, **17**: 1609-1643.
- Klamen D.L. & Tuveson R.W. (1982) The effect of membrane fatty acids composition on the near-UV (300–400 nm) sensitivity of *Escherichia coli* K 1060. *Photochem. Photobiol.*, **35**: 161-173.
- Lafond E.C. & Lafond K.G. (1972). Sea surface features. *J. Mar. Biol. Assoc. India.*, **14** : 1-14.
- Lampert W. & Taylor B.E. (1985) Zooplankton grazing in a eutrophic lake: implications of diel vertical migration. *Ecology*, **66**: 68-82.
- Lampert W., Fleckner W., Rai H. & Taylor B.E. (1986) Phytoplankton control by grazing zooplankton: a study on the spring clear-water phase. *Limnol. Oceanogr.*, **31**: 478-490.

- Larsson K., Odham G. & Södergren A. (1974) On lipid surface films on the sea. I. A simple method for sampling and studies of composition. *Mar. Chem.*, **2**:49-57.
- Laureillard J., Pinturier L., Fillaux J. & Saliot A. (1997) Organic geochemistry of marine sediments of the Subantarctic Indian Ocean sector: lipid classes - sources and fate. *Deep-Sea Res.*, **44**: 1085-1108.
- Lebaron P., Servais P., Troussellier M., Courties C., Vives- Rego J., Muyzer G., Bernard L., Guindulain T., Schöfer H. & Stackebrandt E. (1999) Changes in bacterial community structure in seawater mesocosms differing in their nutrient status. *Aquat. Microb. Ecol.*, **19**: 255-267.
- Lebaron P., Servais P., Agogué H., Courties C. & Joux F. (2001). Does the high nucleic-acid content of individual bacterial cells allow to discriminate active cells in aquatic systems? *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 1775-1782.
- Lebaron P., Servais P., Baudoux A.C., Bourrain M., Courties C. & Parthuisot N. (2002) Variations of bacterial-specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry. *Aquat. Microb. Ecol.*, **28**:131-140.
- Letelier R.M. & Karl D.M. (1996) Role of *Trichodesmium spp.* In the productivity of the subtropical North Pacific Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **133**: 263-273.
- Li W. K. W., Jellett J. F. & Dickie P. M. (1995) DNA distributions in planktonic bacteria stained with TOTO or TO-PRO. *Limnol. Oceanogr.*, **40**: 1485-1495.
- Lindell M.J, Granéli H.W. & Tranvik L.J. (1996) Effects of sunlight on bacterial growth in lakes of different humic content. *Aquat. Microb. Ecol.*, **11**: 135-141.
- Ling M., Zahariev K. & Garret C. (1995). Role of Langmuir circulation in the deepening of the ocean surface mixed layer. *Science.*, **270**: 1955-1957.
- Lipiatou E. & Albaiges J. (1994) Atmospheric deposition of hydrophobic organic chemicals in the NW Mediterranean Sea: comparison with the Rhone River input. *Mar. Chem.*, **46**: 153-164.
- Liss P.S. & Duce R.A. (1997). *The Sea Surface and Global Change*. Cambridge University Press.
- Liss P.S. (1975) Chemistry of the Sea Surface Microlayer. In: *Chemical Oceanography*, J. P. R. G. Skirrow (editor). Academic Press, 193-243.
- Liu K & Dickhut R. (1998). Effects of wind speed and particulate matter source on surface microlayer characteristics and enrichment of organic matter in southern Chesapeake Bay. *J. Geophys. Res.*, **103**: 10571-10577.

- Lyons M.M., Aas P., Pakulski J.D., Van Waasbergen L., Mitchell D.L., Miller R.V. & Jeffrey W.H. (1998) Ultraviolet radiation induced DNA damage in coral reef microbial communities. *Mar. Biol.*, **130**: 537-543.
- MacIntyre F. (1974) The top millimeter of the ocean. *Sci. Am.*, **230**: 62-77.
- Madronich S., McKenzie R.L., Caldwell M.M. & Bjorn L.O. (1995) Changes in ultraviolet radiation reaching the earth's surface. *Ambio*, **24**: 143-152.
- Maki J.S. & Herwig R.P. (1991) A diel study of neuston and plankton bacteria in an Antarctic pond. *Science.*, **3**: 47-51.
- Malcolm J., Shick J.M. & Dunlap W. C. (2002) Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis accumulation and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annu. Rev. Physiol.*, **64**: 223-262.
- Marie D. Simon N., Guillou L., Partensky F. & Vaultot D. (2000) Flow cytometry analysis of marine picoplankton. *In: Living Color: Protocols in Flow Cytometry and Cell Sorting*, S. DeMaggio (editor). Springer Verlag, 421-454.
- Marie D., Partensky F., Jacquet S. & Vaultot D. (1997) Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 188-193.
- Martin R.E., Bouwer E.J. & Hanna L.M. (1992) Application of clean-bed filtration theory to bacterial deposition in porous media. *Environ. Sci. Technol.*, **26**: 1053-1058.
- Marty J.-C. & Saliot A. (1974) Étude chimique comparée du film de surface et de l'eau de mer sous-jacente : acides gras. *J. Rech. Atmos.*, **8**: 563-570.
- Marty J.-C. & Saliot A. (1976) Hydrocarbons (normal alkanes) in the surface microlayer of sea water. *Deep-Sea Res.*, **23**: 863-873.
- Marty J.-C., Saliot A., Buat Menard P., Chesselet R. & Hunter K.A. (1979) Relationship between the lipid composition of marine aerosols the sea surface microlayer and subsurface water. *J. Geophys. Res.*, **84**: 5707-5716.
- Marty J.-C., Zutic V., Precali R., Saliot A., Cosovic B., Smodlaka N. & Cauwet G. (1988) Organic matter characterization in the Northern Adriatic Sea with special reference to the sea surface microlayer. *Mar. Chem.*, **25**: 243-263.
- Marumo R., Taga N. & Nakai T. (1971) Neustonic bacteria and phytoplankton in surface microlayers of the Equatorial waters. *Bull. Plankton Soc. Japan.*, **18**: 36-41.
- Massol-Deya A.A., Odelson D.A., Hickey R.F. & Tiedje J.M. (1995) Bacterial community finger printing of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). *In: Molecular Microbial Ecology Manual*,

- A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas & F.J. de Bruijn (editors). Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands, 3321–3328.
- Mayr L.M. (1998) *Avaliação Ambiental da Baía de Guanabara com o Suporte do Geoprocessamento*. PhD Thesis Geografia Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil, 405 pp.
- Mayr L.M., Tenenbaum D.R., Villac M.C., Paranhos R., Nogueira C.R., Bonecker S.L.C. & Bonecker A.C. (1989) Hydrobiological characterization of Guanabara Bay. *In: Coastlines of Brazil*, O.T. Magoon & C. Neves (editors). American Society of Civil Engineers, New York, 124-139.
- Middelboe M. (2000) Bacterial growth rate and marine virus-host dynamics. *Microb. Ecol.*, **40**: 114-124.
- Miki W., Otaki N., Shimidzu N. & Yokoyama A. (1994) Carotenoids as free radical scavengers in marine animals. *J. Mar. Biotechnol.*, **2**: 35-37.
- Miller R.V., Jeffrey W., Mitchell D. & Elasm M. (1999) Bacterial responses to ultraviolet light: increased UV flux may be damaging microorganisms at the poles and thereby disrupting an ecology with important global impacts. *ASM News*, **65**: 535-541.
- Mitchel, D.L. & Karentz, D. (1993) The induction and repair of DNA photodamage in the environment. *In* Young, A.R., Bjorn, L.O., Moan, J., and Nultsch, W. (Eds.): *Environmental UV Photobiology*. pp. 345-377, Plenum Press.
- Molina M.J. & Rowland F.S. (1974) Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalysed destruction of ozone. *Nature*, **249**: 810-812.
- Moeseneder M. M., Winter C. & Herndl, G. J. (2001) Horizontal and vertical complexity of attached and free-living bacteria of the eastern Mediterranean Sea, determined by 16S rDNA and 16S rRNA fingerprints. *Limnol. Oceanogr.*, **46**:95-107.
- Momzikoff A., Brinis A., Dallot S., Gondry G, Saliot A. & Lebaron P. (2004) Field study of the chemical characterization of the upper ocean surface using various samplers. *Limnol. Oceanogr.: Methods.*, **2**: 374-386.
- Mostajir B., Demers S., de Mora S., Belzile C., Chanut J.-P., Gosselin M., Roy, S., Villegas, P.Z., Fauchot, J., Bouchard J., Bird D., Monfort P. & Levasseur M. (1999) Experimental test of the effect of ultraviolet-B radiation in a planktonic community. *Limnol. Oceanogr.*, **44**: 586-596
- Moyer C.L., Tiedje J.M., Dobbs F.C. & Karl D.M. (1996) A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 2501-2507.

- Müller-Niklas G., Heissenberger A., Puškaric S. & Herndl G.J. (1995) Ultraviolet-B radiation and bacterial metabolism in coastal waters. *Aquat. Microb. Ecol.*, **9**: 111-116.
- Muyzer G. (1998) Structure function and dynamics of microbial communities: the molecular biological approach. In: *Advances in Molecular Ecology*, G.R. Carvalho (editor). IOS Press Amsterdam, 87-117.
- Nadeau T.-L., Howard-Williams C. & Castenholz R.W. (1999) Effects of solar UV and visible irradiance on photosynthesis and vertical migration of *Oscillatoria sp* (cyanobacteria) in an Antarctic microbial mat. *Aquat. Microb. Ecol.*, **20**: 231-243.
- Nakano A. & Ban S. (2003) Microbial communities in oligotrophic lake Toya Japan. *Limnol. Oceanogr.*, **4**: 19-24.
- Naumann E. (1917) Beiträge sur teichnannoplanktons II. Über das neuston des Süßwassers. *Biol. Zentralbl.*, **37**: 98-106.
- Neff J.M. (1979) *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Fates and Biological Effects*. Applied Science Publishers, London, 262 pp.
- Nestrova D.A. (1980) Phytoneuston in the western Black Sea. *Gidrobiologicheskii Zhornal.*, **16**: 26-31.
- Noble R.T. & Fuhrman J.A. (1997) Virus decay and its causes in coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**:77-83.
- Norris R.E. (1965) Neustonic marine Craspedomonadales (choaflagellates) from Washington and California. *J. Protozool.*, **12**: 589-602.
- NRC (1985) *Oil in the Sea: Inputs, Fates and Effects*. US National Academic Press, Washington DC, 601pp.
- Obernosterer I., Reitner V. & Herndl G. J. (1999) Contrasting effects of solar radiation on dissolved organic matter and its bioavailability to marine bacterioplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **44**: 1645-1654.
- Oliveira M.A.C. (1996) *Utilização de documentos cartográficos na avaliação de processos de sedimentação em ambientes estuarinos – Um estudo de caso na Baía de Guanabara (RJ Brasil)*. Msc Thesis Universidade Federal do Rio de Janeiro 124pp.
- Olsen R.A. & Bakken L.R. (1987) Viability of soil bacteria: optimization of plate-counting technique. *Microb. Ecol.* **13**: 59–74
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K. & Sekyia T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as singlestrand conformation polymorphisms. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **86**:2766–2770.

- Pakulski J.D., Aas P., Jeffrey W. Lyons M., Von Waasenbergen L., Mitchell D. & Coffin R. (1998) Influence of light on bacterioplankton production and respiration in a subtropical coral reef. *Aquat. Microb. Ecol.*, **14**: 137–148.
- Paranhos R., Andrade L., Mendonça-Hagler L.C. & Pfeiffer W.C. (2001) Coupling bacterial abundance with activity in a tropical polluted coastal bay. In: *Aquatic Microbial Ecology in Brazil*, B.M. Faria, V. Farjalla & F.A. Esteves (editors). Serie Oecologia Brasiliensi, **9**: 117–132.
- Paul J.H. (1999) Microbial gene transfer. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **1**: 45-50.
- Pausz C. & Herndl G.J. (1999) Role of ultraviolet radiation on phytoplankton extracellular release and its subsequent utilization by marine bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.*, **18**: 85-93.
- Peak M.J. & Peak J.G. (1989) Solar-ultraviolet-induced damage to DNA *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **6**: 1-15.
- Pearce D. & Butler H. (2002) Short-term stability of the microbial community structure in a maritime Antarctic lake. *Polar Biol.*, **25**: 479-487.
- Pedros-Alio C & Sala M.M, (1990) Microdistribution and diel vertical migration of flagellated vs gas-vacuolate purple sulfur bacteria in a stratified water body. *Limnol. Oceanogr.*, **35**: 1637-1644.
- Peltzer E.T. & Gagosian R.B. (1987) Sampling and analysis of lipids in aerosols from the remote marine atmosphere. *Anal. Chim. Acta*, **198**: 125-144.
- Peltzer E.T., Bada J.C., Schlesinger G. & Miller S.L. (1984) The chemical conditions on the parent body of the Murchison meteorite: some conclusions based on amino hydroxy and dicarboxylic acids. *Adv. Space Res.*, **4**: 69-74.
- Perrière G. & Gouy M. (1996) WWW-query an online retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie*, **78**: 364-369.
- Pinhassi J., Zweifel U. & Hagström A. (1997) Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3359-3366.
- Piotrowicz S.R., Ray B.J., Hoffman G.L. & Duce R.A. (1972) Trace metal enrichment in the sea-surface microlayer. *J. Geophys. Res.*, **27**: 5243-5254.
- Priemé A., Braker G. & Tiedje J.M. (2002) Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 1893-1900.
- Proctor L. M. & Fuhrman J. A. (1990) Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature*, **343**: 60-62.

- Rabouille S., Staal M., Stal L.J. & Soetaert K. (2006) Modeling the dynamic regulation of nitrogen fixation in the cyanobacterium *Trichodesmium sp.* *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**: 3217-3227.
- Rajendran R., Rajendran N. & Venugopalan V.K. (1990) Effect of organochlorine pesticides on the bacterial population of a tropical estuary. *Microbiol. Lett.*, **44**: 57-63.
- Rebello A.L., Ponciano C.R. & Melges L.H. (1988) Avaliação da produtividade primária e da disponibilidade de nutrientes na Baía de Guanabara. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **60**: 419-430.
- Rezende C.E. & Lacerda L.D. (1986) Metais pesados em mexilhões (*Perna perna*) no litoral do Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Biol.*, **46**: 239-247.
- Riemann L., Steward G.F. & Azam F. (2000) Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Appl Environ Microbiol* **66**: 578- 587.
- Rodriguez C.A., Browman H.I., Runge J.A. & St-Pierre J.F. (2000) Impact of solar ultraviolet radiation on hatching of a marine copepod *Calanus Finmarchicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **193**: 85-93.
- Romano J.C. & Garabetian F. (1996) Photographic records of sea-surface microlayers as a survey of pollution daily rhythm in coastal waters. *Mar. Environ. Res.*, **41**: 265-279.
- Ruellan F. (1944) Evolução geomorfológica da Baía de Guanabara e das regiões vizinhas. *Rev. Brasil Geogr.*, **6**: 445-508.
- Saitou N. & Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**: 406-425.
- Saliot A. (1981) Natural hydrocarbons in sea water. *In: Marine Organic Chemistry*, E.K. Duursma & R. Dawson (editors). Elsevier Oceanography Series, **31**: 327-374.
- Sanders G., Jones, K.C. & Hamilton-Taylor, J. (1993) A simple method to assess the susceptibility of polynuclear aromatic-hydrocarbons to photolytic decomposition. *Atmosph. Environ. Part A – Gen. Topics*, **27**: 139-144.
- Sauer T.C., Durrell G.S., Brown J.S., Redford D. & Boehm P.D. (1989) Concentrations of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in microlayer and seawater samples collected in open ocean waters of the U.S. east coast and in the Gulf of Mexico. *Mar. Chem.*, **27**: 235-237.
- Savelkoul, P.H.M., Aarts H.J.M., De Haas J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker J.L.W., Schouls L. & Lenstra J.A. (1999) Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *J. Clin. Microbiol.*, **37**: 3083-3091.

- Schäfer A., Harms H & Zehnder A.J.B. (1998) Bacterial accumulation at the Air-Water Interface. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 3704-3712.
- Schauer M., Massana R. & Pedrós-Alió C. (2000) Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **33**: 51–59.
- Shick J.M. & Dunlap W.C. (2002) Mycosporine-like amino acids and related Gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annu Rev Physiol.*, **64**: 223-262.
- Schutze M.L.M., Machado M.C.S. & Zillmann S.M.S. (1989) Phytoplankton biomass of Guanabara Bay (Rio de Janeiro Brazil) and adjacent oceanic area: variations from January through July 1979. In: *Proc. International Symposium on utilization of coastal ecosystems: planning pollution and productivity*, M.R.C. Figueiredo, N.L. Chao & W. Kirby-Smith (editors). Fundação Universitária de Rio Grande - FURG, Brasil: 309-324.
- Servais P., Casamayor E.O., Courties C., Catala P., Parthuisot N. & Lebaron P. (2003) Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content. *Aquat. Microb. Ecol.*, **33**: 41-51.
- Sevrin-Reyssac J., Machado M.C.S., Schutze M.L.M., Bibas S.G., Lima I.C., Lima C.A. & Esteves C.P. (1979) Biomasse et production du phytoplancton de la Baie de Guanabara (état de Rio de Janeiro Brésil) et du secteur océanique adjacent. Variations de mai à juillet 1978. *Bul. Mus. Nat. Hist. Nat. Paris*, **4**: 329-354.
- Shapiro S.S. & Wilk M.B. (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, **52**: 591-611.
- Sho M., Hamel C. & Greer C.W. (2004) Two distinct gene clusters encode pyrene degradation in *Mycobacterium sp. strain S65*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **48**: 209–220.
- Sicre M.-A. Marty J.-C. Saliot A. Aparicio X. Grimalt J. &Albaigés J. (1987) Aliphatic and aromatic hydrocarbons in different sized aerosols over the Mediterranean Sea: occurrence and origin. *Atmosph. Environ.*, **21**: 2247-2259.
- Sieburth J. (1971) Distribution and activity of oceanic bacteria. *Deep-Sea Res.*, **18**: 1111-1121.
- Singer C.E. & Ames B.N. (1970) Sunlight ultraviolet and bacterial DNA base ratios. *Science.*, **170**: 822-826.
- Smith R.C. & Baker K.S. (1981) Optical properties of the clearest natural waters (200–800 nm). *Appl. Opt.*, **20**: 177-184.
- Sommaruga R., Obernosterer I., Herndl G.J. & Psenner R. (1997) Inhibitory effect of solar radiation on thymidine and leucine incorporation by freshwater and marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4178-4184

- Southwood J.M., Muir D.C.G. & Mackay D. (1999) Modelling agrochemical dissipation in surface microlayers following aerial deposition. *Chemosphere*, **38**: 121-141.
- Souza M.H.S. (1988) *Clima de Ondas ao Norte do Estado do Rio de Janeiro*. MSc Thesis Universidade Federal do Rio de Janeiro Brazil. 181pp.
- Stolarski R.S. (1988) The Antarctic ozone hole. *Sci. Am.*, **258**: 30-36.
- “Student” (1908) The probable error of a mean. *Biometrika*, **6**: 1-25.
- Sundin G.W. & Jacobs J.L. (1999) Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Microb. Ecol.*, **38**: 27-38.
- Suttle C.A. & Chen F. (1992) Mechanisms and rates of decay of marine viruses in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 3721-3729.
- Suttle C.A. (1994) The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. *Microb. Ecol.*, **28**: 237-243.
- Takamura N & Yasuno M. (1984) Diurnal changes in the vertical distribution of phytoplankton in hypertrophic Lake Kasumigaura Japan. *Hydrobiol.*, **112**: 53-60.
- Tapper M.A. & Hicks R.E. (1998) Temperate viruses and lysogeny in Lake Superior bacterioplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **43**: 95-103.
- Thingstad T.F. & Lignell R. (1997) Theoretical models for the control of bacterial growth rate abundance diversity and carbon demand. *Aquat. Microb. Ecol.*, **13**: 19-27.
- Thingstad T.F., Heldal M., Bratbak G. & Dundas I. (1993) Are viruses important partners in pelagic food webs? *Trends Ecol. Evol.*, **8**: 209-213.
- Thompson J., Higgins D. & Gibson T. (1994) CLUSTAL W improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**: 4673-4680.
- Tranvik L.J. & Kokalj S. (1998) Decreased biodegradability of algal DOC due to interactive effects of UV radiation and humic matter. *Aquat. Microb. Ecol.*, **14**: 301-307.
- Tsyban A.V. (1971) Marine bacterioneuston. *J. Oceanogr. Soc. Japan.*, **27**: 56-66.
- Tully O. & O’Ceidigh P. (1986) The ecology if *Idotea* spp. (Isopoda) and *Gammarus locusta* on surface driftwood in Galway Bay (west of Ireland). *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **66**: 931-942.

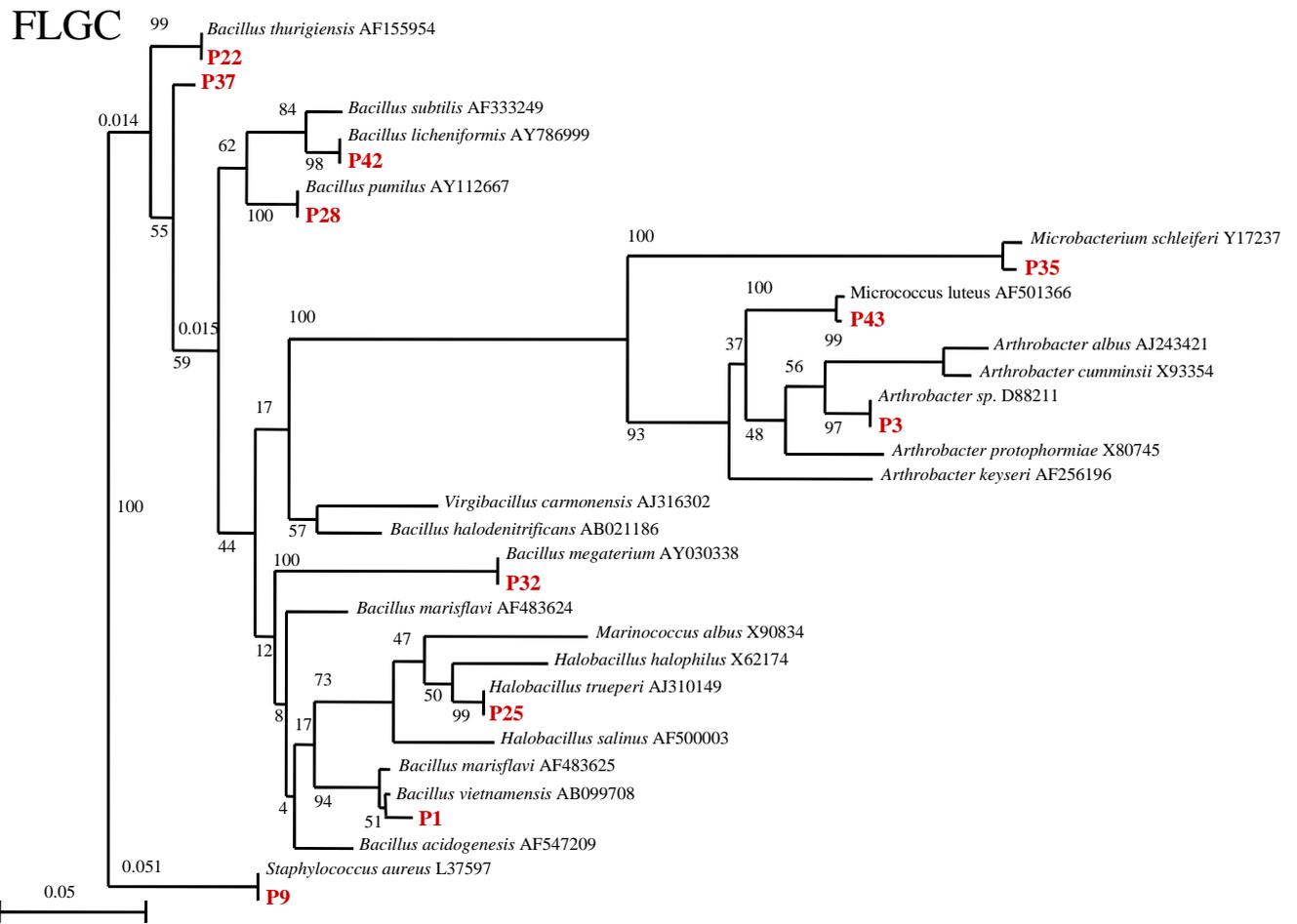
- Urakawa H., Kita-Tsukamoto K. & Ohwada K. (1998) A new approach to separate the Genus *Photobacterium* from *Vibrio* with RFLP patterns by *HhaI* digestion of PCR-amplified 16S r DNA. *Curr. Microbiol.*, **36**: 171-174.
- Valentin J.L., Tenenbaum D.R., Bonecker A.C., Bonecker S.L.C., Nogueira C.R., Paranhos R. & Villac M.C. (1999) Caractéristiques hydrobiologiques de la Baie de Guanabara (Rio de Janeiro Brésil). *J. Rech.Océanographique*, **24**: 33-41.
- Valiela I. (1995) *Marine ecological processes*. Berlin: Springer, 325–353.
- van Loosdrecht M.C.M., Lyklema J., Norde W., Schraa G., Zehnder A.J.B. (1987) The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 1893-1897.
- Venkatesan M.I. & Kaplan I.R. (1982) Distribution and transport of hydrocarbons in surface sediments of the Alaskan outer continental shelf. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **46**: 2135-2149.
- Villac M.C. (1990) *O Fitoplâncton como um Instrumento de Diagnose e Monitoramento Ambiental: Estudo de Caso da Baía de Guanabara (RJ Brasil)*. MSc. Thesis Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil, 173pp.
- Villac M.C. , Mayr L. , Tenenbaum D.R. & Paranhos R. (1991) Sampling strategies proposed to monitoring Guanabara Bay (Brazil). *Coastal Zone*, **7**: 1168-1182.
- Vincent W.F. & Roy S. (1993) Solar ultraviolet-B radiation and aquatic primary production: damage protection and recovery. *Environ. Rev.*, **1**: 1-12.
- Visser P.M., Snelder E., Kop A.J., Boelen P., Buma A.G.J. & van Duyl F.C. (1999) Effects of UV radiation on DNA photodamage and production in bacterioplankton in the coastal Caribbean Sea. *Aquat. Microb. Ecol.*, **20**: 49-58.
- Walczak M., Donderski W., Mudryk Z. & Skorcewski P. (2001a) Aromatic hydrocarbon decomposition by neustonic bacteria – Part I. Single-ring hydrocarbon biodegradation. *Pol. J. Environ. Stud.*, **9**: 471-474.
- Walczak M., Donderski W., Mudryk Z. & Skorcewski P. (2001a) Aromatic hydrocarbon decomposition by neustonic bacteria – Part II. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. *Pol. J. Environ. Stud.*, **10**: 33-36.
- Wang Z., Fingas M. & Page D. S. (1999) Oil spill identification: *J. Chromatography*, **842**: 369-411.
- Wangberg S.A., Wulff A., Nilsson C. & Stagell U. (2001) Impact of UV-B radiation on microalgae and bacteria: a mesocosm study with computer modulated UV-B radiation addition. *Aquat. Microb. Ecol.*, **25**: 75-86.

- Wickham S. & Carstens M (1998) Effects of ultraviolet-B radiation on two arctic microbial food webs. *Aquat. Microb. Ecol.*, **16**: 163-171.
- Wilhelm S.W. and Suttle C.A. (1999) Viruses and nutrient cycles in the sea. *Bioscience*, **49**: 781-788.
- Wilhelm S.W., Weinbauer M.G., Suttle C.A. & Jeffrey W.H. (1998a) The role of sunlight in the removal and repair of viruses in the sea. *Limnol. Oceanogr.*, **43**: 586-592.
- Wilhelm S.W., Weinbauer M.G., Suttle C.A., Pledger R.J. & Mitchell D.L. (1998b) Measurements of DNA damage and photoreactivation imply that most viruses in marine surface waters are infective. *Aquat. Microb. Ecol.*, **14**: 215-222.
- Williams P.M. (1967) Sea surface chemistry: organic carbon and organic and inorganic nitrogen and phosphorus in surface films and subsurface waters. *Deep-Sea Res.*, **14**: 791-800.
- Williams P.M., Carlucci A.F., Henrichs S.M., Van Fleet E.S., Horrigan S.G., Reid F.M.H. & Robertson K.J. (1986) Chemical and microbiological studies of sea-surface films in the Southern Gulf of California and off the West Coast of Baja California. *Mar. Chem.*, **19**: 17-98.
- Winter C., Moeseneder M.M. & Herndl G.J. (2001). Impact of UV radiation on bacterioplankton community composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 665-672.
- Woese C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, **51**: 221-271.
- Wommack K.E. & Colwell R.R. (2000) Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**: 69-114.
- Wommack K.E., Hill R., Muller T.A. & Colwell R.R. (1996) Effects of sunlight on bacteriophage viability and structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 1336-1341.
- Wu L.C., Chow K.C. & Mark K.K. (1983) The role of pigments in *Halobacterium cutirubrum* against UV radiation. *Microbios Lett.*, **24**: 85-90.
- Wurl O. & Obbard J.P. (2004) A review of pollutants in the sea-surface microlayer (SML): a unique habitat for marine organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, **48**: 1016-1030.
- Xenopoulos M.A. & Bird D.F. (1997) Effect of acute exposure to hydrogen peroxide on the production of phytoplankton and bacterioplankton in a mesohumic lake. *Photochem. Photobiol.* **66**: 471-478.
- Zagarese H.E. & Williamson C.E. (2000) Impact of solar UV radiation on zooplankton and fish. *In: The effects of UV radiation in the marine environment*, S. de Mora, S. Demers & M. Vernet (editors). Cambridge University Press, 279-309

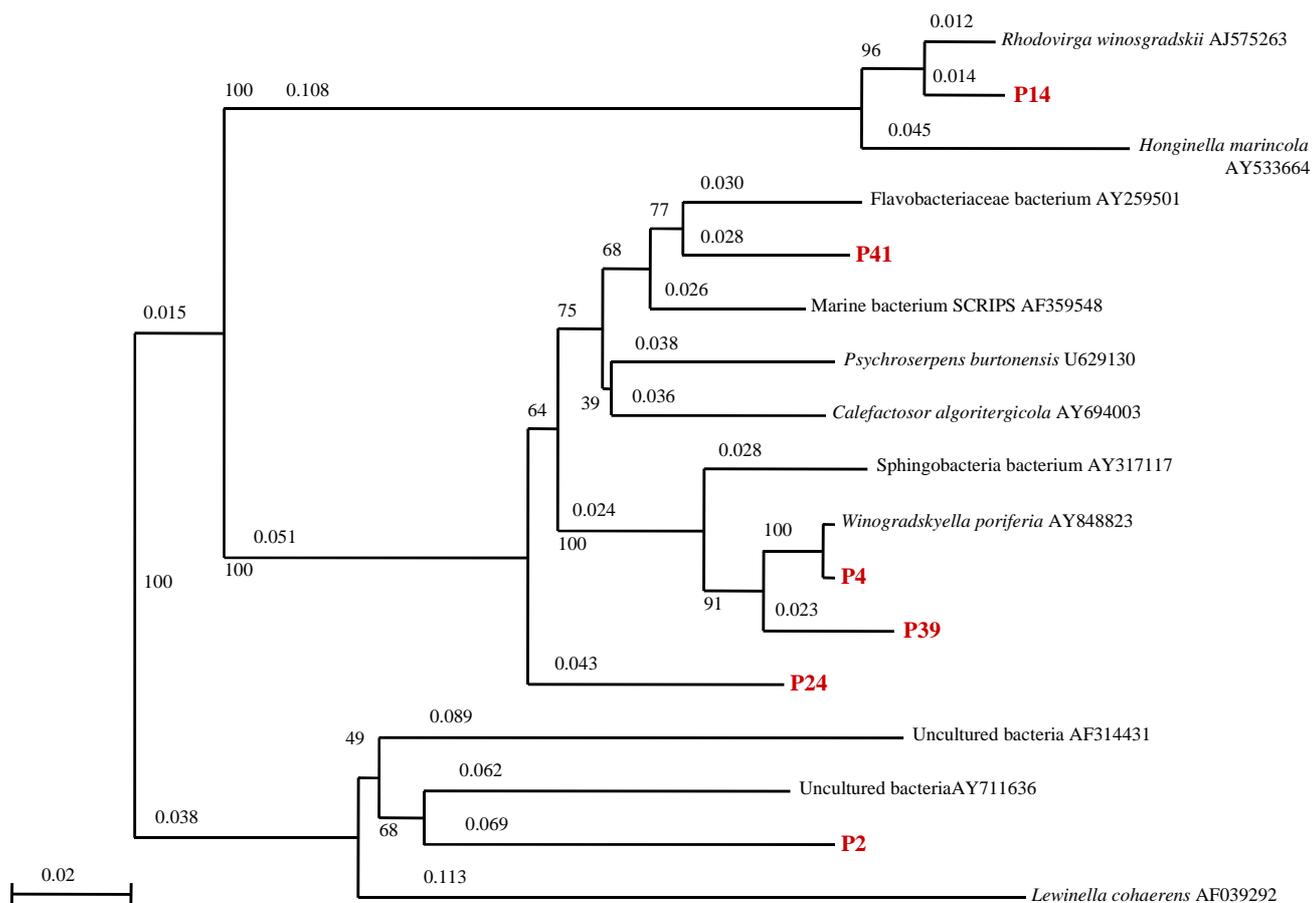
Zaitsev Y.P. (1971) *Marine Neustonology* (Translated from Russian). VA : National Marine Fisheries Service NOAA and National Science Foundation National Technical Information Service. Springfield Virginia, 207 pp.

Zehr J.P. & Ward B.B. (2002) Nitrogen cycling in the Ocean: new perspectives on processes and paradigms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 1015-1024.

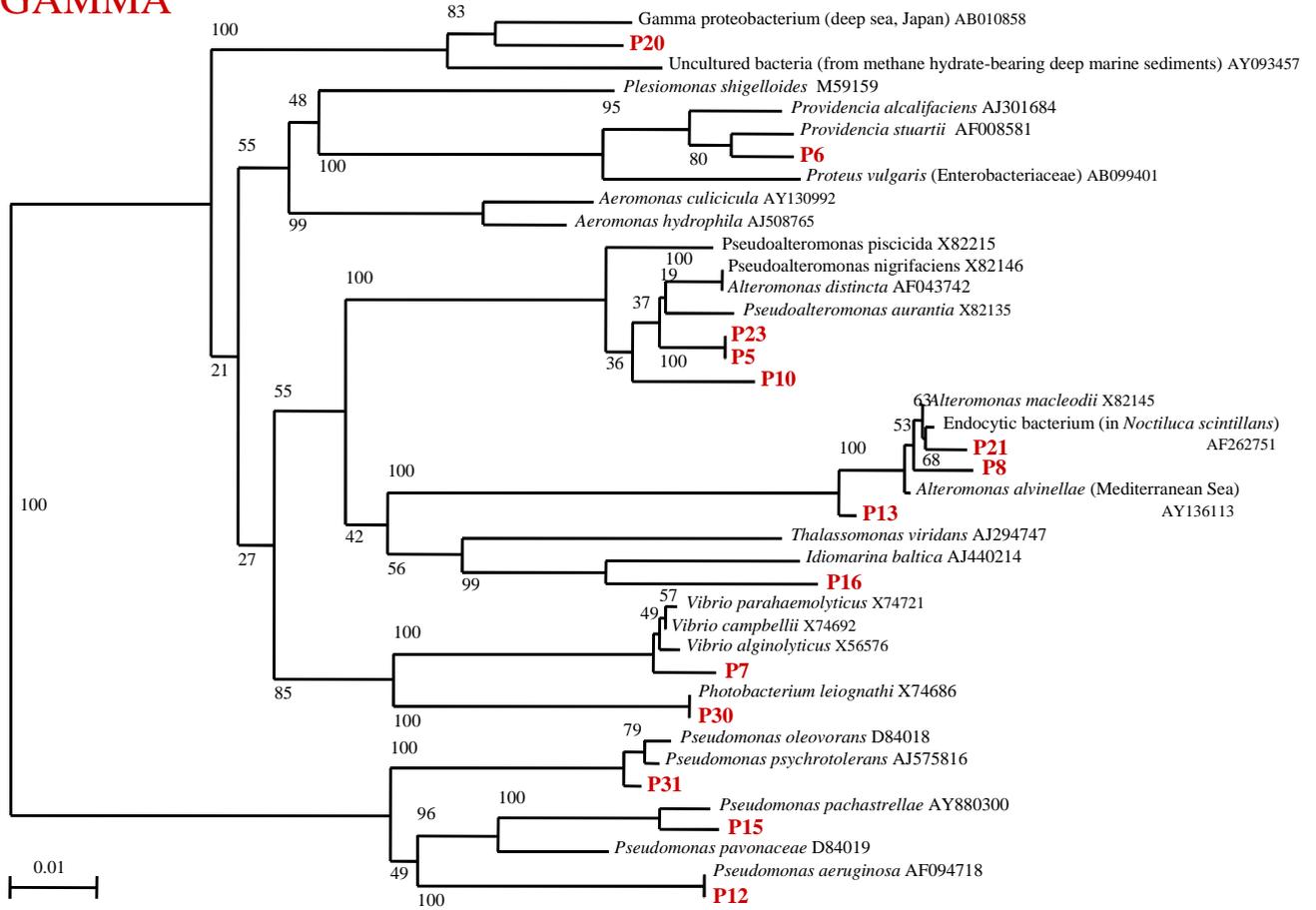
Annexes



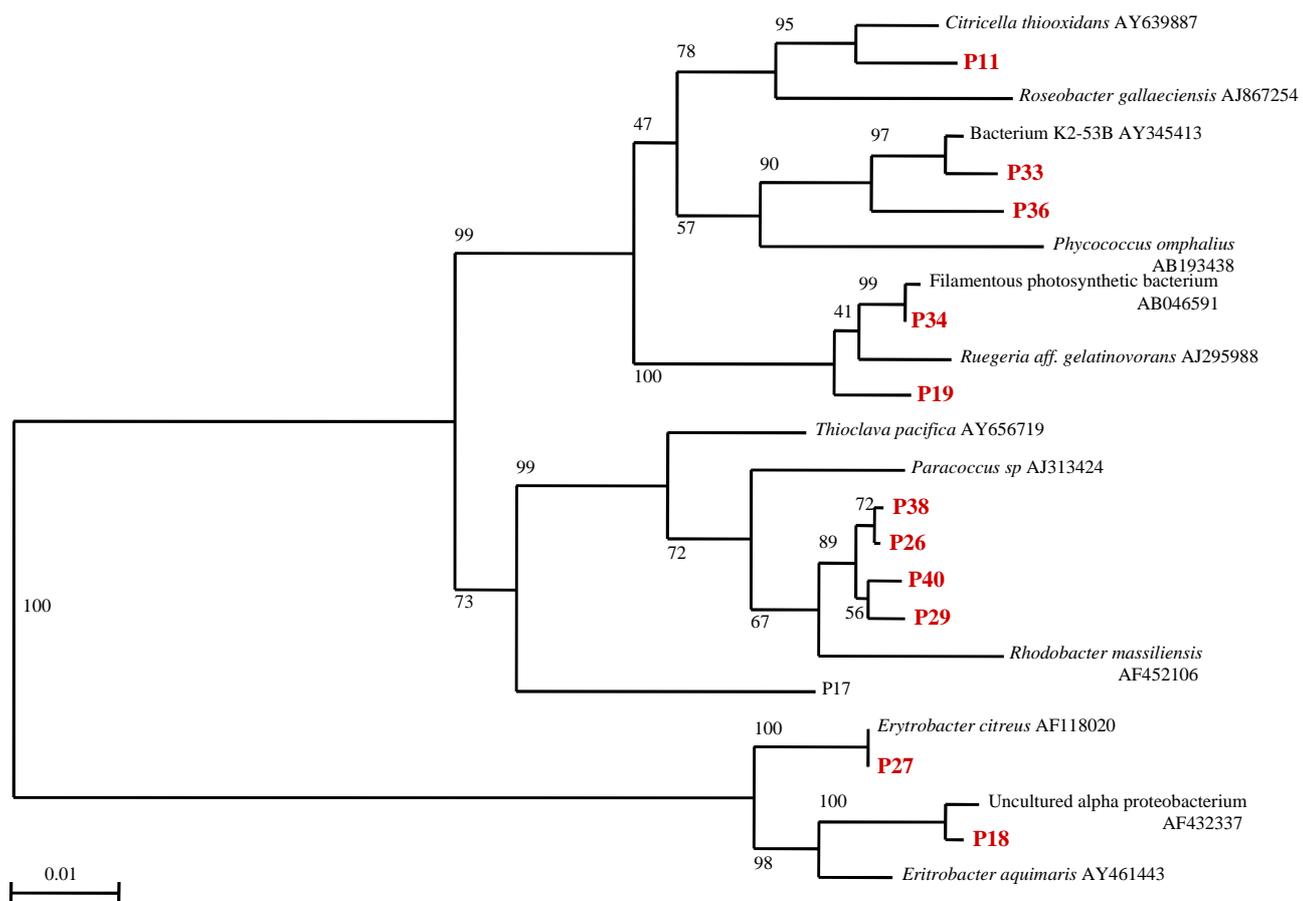
CFB



GAMMA



ALPHA



Profil	Hha I	RSA I	Souche	Échantillon	Prélèvement	Profil Hha I	Profil RSA I	Photo	Groupe	souche type	%
P1	ph1	pr18	RJ1	St2 5m	06/03/2003				FLGC	<i>Bacillus vietnamensis</i>	98%
P2	ph2		RJ2	St2 UW	06/03/2003				CFB	<i>Lewinella cohaerens</i>	92%
P3	ph3		RJ3	St2 UW	06/03/2003				FLGC	<i>Arthrobacter monumenti</i>	95%
P4	ph4	pr17	RJ4	St2 5m	06/03/2003				CFB	<i>Winogradskyella porifera</i>	99%
	ph4	pr17	RJ12	St2 UW	10/03/2003						
	ph4	pr17	RJ26	St2 5m 12h	24/03/2003						
	ph4	pr17	RJ37	St2 5m 5h	25/03/2003						
P5	ph5		RJ5	St2 SML	06/03/2003				GAMMA	<i>Pseudoalteromonas tetradonis</i>	97%
	ph5		RJ35	St2 5m 5h	25/03/2003						
P6	ph6		RJ7	St2 UW	10/03/2003				GAMMA	<i>Providencia rettgeri</i>	99%
P7	ph7		RJ8	St2 UW	06/03/2003				GAMMA	<i>Vibrio harveyi</i>	98%
	ph7		RJ16	St4 SML	31/03/2003						
	ph7		RJ57	St2 SML	24/03/2003						
	ph7		RJ58	St1 UW	10/03/2003						
P8	ph8	pr3	RJ9	St1 5m	10/03/2003				GAMMA	<i>Alteromonas macleodii</i>	99%
	ph8	pr3	RJ16	St6 SML	30/03/2004						
P9	ph9		RJ27	St2 SML 12h	24/03/2003				FLGC	<i>Staphylococcus aureus</i>	97%
	ph10		RJ17	St3 5m	27/03/2003						
P10	ph10		RJ40	St2 UW 12h	26/03/2003				GAMMA	<i>Pseudoalteromonas ganghwensis</i>	98%
	ph10		RJ44	St7 UW	13/03/2003						

Profil	Hha I	RSA I	Souche	Échantillon	Prélèvement	Profil Hha I	Profil RSA I	Photo	Souche	Groupe	souche type	%
P11	ph11		RJ14	St1 5m	27/03/2003				LuP11	ALPHA	<i>Citricella thiooxidans</i>	98%
	ph11		RJ52	St4 5m	31/03/2003							
P12	ph12		RJ15	St4 SML	31/03/2003				LuP12	GAMMA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99%
	ph12		RJ33	St2 UW 12h	25/03/2003							
P13	ph13		RJ19	St1 UW	27/03/2003				LuP13	GAMMA	<i>Alteromonas macleodii</i>	97%
	ph13		RJ19	St1 UW	27/03/2003							
P14	ph14		RJ21	St5 SML	31/03/2003				LuP14	CFB	<i>Hongiella marincola</i>	99%
	ph14		RJ21	St5 SML	31/03/2003							
P15	ph15		RJ32	St2 5m 5h	25/03/2003				LuP15	GAMMA	<i>Pseudomonas pachastrella</i>	98%
	ph15		RJ38	St2 5m	25/03/2003							
P16	ph16		RJ43	St7 UW	13/03/2003				LuP16	GAMMA	<i>Pseudodiomarina taiwanensis</i>	99%
	ph16		RJ43	St7 UW	13/03/2003							
P17	ph17	pr2	RJ23	St5 5m	31/03/2003				LuP17	ALPHA	<i>Thioclava pacifica</i>	95%
	ph17	pr2	RJ47	St2 SML 5h	24/03/2003							
	ph17	pr2	RJ49	St2 SML 5h	24/03/2003							
	ph17	pr2	Rio7	St5 SML	29/03/2004							
P18	ph18	pr3	RJ13	St2 UW	06/03/2003				LuP18	ALPHA	<i>Erythrobacter aquimaris</i>	97%
	ph18	pr3	RJ13	St2 UW	06/03/2003							
P19	ph19	pr20	RJ29	St2 SML 12h	24/03/2003				LuP19	ALPHA	<i>Ruegeria aff. gelatinovorans</i>	97%
	ph19	pr20	RJ46	St2 SML 5h	24/03/2003							
P20	ph20		RJ50	St2 SML 5h	24/03/2003				LuP20	GAMMA	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	91%

Profil	Hha I	RSA I	Souche	Échantillon	Prélèvement	Profil Hha I	Profil RSA I	Photo	Groupe	souche type	%
P11	ph11		RJ14	St1 5m	27/03/2003				ALPHA	<i>Citricella thiooxidans</i>	98%
	ph11		RJ52	St4 5m	31/03/2003						
P12	ph12		RJ15	St4 SML	31/03/2003				GAMMA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99%
	ph12		RJ33	St2 UW 12h	25/03/2003						
	ph12		RJ54	St2 UW 12h	25/03/2003						
P13	ph13		RJ19	St1 UW	27/03/2003				GAMMA	<i>Alteromonas macleodii</i>	97%
P14	ph14		RJ21	St5 SML	31/03/2003				CFB	<i>Hongiella marincola</i>	99%
P15	ph15		RJ32	St2 5m 5h	25/03/2003				GAMMA	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	98%
	ph15		RJ38	St2 5m	25/03/2003						
P16	ph16		RJ43	St7 UW	13/03/2003				GAMMA	<i>Pseudodidomarina taiwanensis</i>	99%
P17	ph17	pr2	RJ23	St5 5m	31/03/2003				ALPHA	<i>Thioclava pacifica</i>	95%
	ph17	pr2	RJ47	St2 SML 5h	24/03/2003						
	ph17	pr2	RJ49	St2 SML 5h	24/03/2003						
	ph17	pr2	Rio7	St5 SML	29/03/2004						
P18	ph18	pr3	RJ13	St2 UW	06/03/2003				ALPHA	<i>Erythrobacter aquimaris</i>	97%
P19	ph19	pr20	RJ29	St2 SML 12h	24/03/2003				ALPHA	<i>Ruegeria aff. gelatinivorans</i>	97%
	ph19	pr20	RJ46	St2 SML 5h	24/03/2003						
P20	ph20		RJ50	St2 SML 5h	24/03/2003				GAMMA	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	91%

Profil	Hha I	RSA I	Souche	Échantillon	Prélevement	Profil Hha I	Profil RSA I	Photo	Groupe	souche type	%
P31	ph28	pr9	Rio 20	St6 UW	30/03/2004				GAMMA	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	99%
P32	ph29	pr13	Rio 12	St3 UW	31/03/2004				FLGC	<i>Bacillus megaterium</i>	100%
P33	ph30	pr10	Rio 15	St7 UW	30/03/2004				ALPHA	<i>Phycococcus ophalius</i>	95%
P34	ph31	pr2	Rio 17	St7 UW	30/03/2004				ALPHA	<i>Ruegeria aff. gelatinovorans ch611</i>	98%
P35	ph32	pr15	Rio 19	St7 SML	30/03/2004				FLGC	<i>Microbacterium schleiferi</i>	98%
P36	ph34	pr10	Rio 22	St4 UW	29/03/2004				ALPHA	<i>Phaeobacter inhibens</i>	96%
P37	ph35	pr14	Rio 23	St4 UW	29/03/2004				FLGC	<i>Bacillus subtilis</i>	96%
P38	ph17	pr11	Rio 11	St5 UW	29/03/2004				ALPHA	<i>Rhodobacter massiliensis</i>	97%
P39	ph4	pr16	Rio 16	St7 UW	30/03/2004				CFB	<i>Winogradskyella porifera</i>	96%
P40	ph17	pr12	Rio 8	St5 SML	29/03/2004				ALPHA	<i>Rhodobacter massiliensis</i>	97%
P41	ph4	pr12	Rio 13	St7 UW	30/03/2004				CFB	<i>Psychroserpens mesophilus</i>	96%
P42	ph1	pr19	Rio 2	St6 SML	30/03/2004				FLGC	<i>Bacillus licheniformis</i>	99%
P43	ph30		Rio 14	St7 UW	30/03/2004				FLGC	<i>Micrococcus luteus</i>	99%

Séquences partielles de l'ADNr 16S des souches isolées de la Baie de Guanabara :

P1

CATGGCTCAGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATTGATGGAGCTTGTCCCTGAAATT
CAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGCTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGAATAACTCCGGGAAACCGGGGTAATA
CCGGATAATTCATTTCTCGCATGAGAAAATGTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCATTACAGATGGACCCGCGGCGC
ATTAGTAGTTGGTGAGGTAACGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG
GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC
AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTTCAATAGGG
CGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTCCCTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCG
TGGAGGGTCAATTGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCAGGAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAG
TGCTGCAGTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGG

P2

TCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGGAGGCTTAATACATGCAAGTCGAGGGGCAGCATGGGACTTCGGTCTGATG
GCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTACGCAACTTGCCTCCAAGCGGGGGATAGCCCCGGGAAACTGGGATTAA
TACCCCATAGCATCATTTTATCGCCTGGTAAAATGATTAAGCTTAGGGCGCTTGAGATGGGCGTGCCTGCCATTAGC
TAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGGCTAGGGGGCGTGAGAGCGTGGCCCCACACGGGTACTG
AGACACGGACCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGGACAATGGAGGCAACTCTGATCCAGCCATCC
CGCGTGCAGGATGACGGCCCTATGGGTTGTAACCTGCTTTTTCGAGGGAAGAAACGGGTGCTATTTATAGCATTTTGGC
GGTACCTCGAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTATCCGGAA
TCACTGGGTTTTAAAGGGTGCCTAGGCGGCATTATAAGTCAGAGGTGAAAGCCGTCGCTTAAACGATGGAATTGCCTT
TGATACTGTAGTCTTGAATCAAGTTGAGGCTGGCGGAATGTCGATGTAGCGGTGAAATGCATAGATATGCCATAG
AACACCAATTGCGAAGGCAGCTGGCTGGGCTTGAATTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTTACTCGTACTAGGCACCATGTTGTCTGGGACCAAGCGAAAGCGT
TAAAGT

P3

CGTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGATGCTGGTGTGACACCGGTGGATTAG
TGGCGAACGGGTGAGTAACACGCTGAGTAACCTGCCCTGACTTCGGGATAAGCCGGGAAACTGGGTCTAATACCGG
ATATGACTTCTGCTGCATGGCAGGGGTGGAAAGATTTATCGGTTGGGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGG
TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCGCGTGA
GGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAGCCCTTTTGGGGGTGACGGTACTTGCAGAAG
AAGCGCCGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GAGCTCGTAGGCGGTTTTGTCGCGTCTGCCGTGAAAAGTCCGAGGCTCAACCTCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCGAGC
TAGAGTGTAGGGGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGG
AAGGCAGGTCTCTGGGCATTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACATTCCACGTTTTCCGCGCGGTAGCTAACGCATTAAGTGCC
CGCC

P4

TCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGAAAAAAGCTTGTCTTTT
TGCTGACGAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATACAACTTACTGGGGAATAGCCTTTGGAAACGAAGA
ATAATACCCCATAGTATCTAAATTTTCGCATGTTATTTAGATTAAGTTTCGGCGGTAAGAGATGAGTATGCGTTCTAT
TAGCTAGATGGTGTGGTAACGGCACACCATGGCAACGATAGATAGGGGCCCTGAGAGGGGGATCCCCACACTGGT
ACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCC
ATGCCGCTGCAGGAAGACTGCCCTATGGGTTGTAACCTTTTATACGGGAAGAAACCCATCTACGTGTAGATGG
CTGACGGTACCCTAAGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATC
CGGAATCATTTGGGTTTTAAAGGGTCCGTAGGTGGATTGGTAAGTCAGAGGTGAAAGCCTGCAGCTCAACTGTAGA
ACTGCCTTTGATACTGCTAGTCTTGAATATTGTGAAGTGGTTAGAATATGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTAC
ATAGAATACCAATTGCGAAGGCAGATCACTAACAATATATTGACACTGATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGAACCGG
ATTAGATACCCCGTAGTCCACGCCGTAACGATGGTCACTAGCTGTTCCGATTTCGGTCTGAGTGGCTAAGCGAAA
GTGATAAGTGACCCCTGG

P5

AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACATTTCTAGCTT
GCTAGAAGATGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAATATGCCTTAGGGTGGGGGACAACAGTTGGAAA
CGACTGCTAATACCGCATAACGCTACGGACCAAAAAGGGGCTTCGGCTCTCGCCCTTAGATTAGCCCAAGTGGGAT
TAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTTTGGAGGATGATCAGCCACACTGGAA
CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCA
TGCCGCTGTGTGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCACTTTCAGTAAGGAGGAAAGGTTAGTATTAATACCTGCT
AGCTGTGACGTTACTTACAGAAGAAGCAGCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGTTGCGAGCGT
TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCTGGG
AACTGCATTTGCAACTGGCAAACTAGAGTATGATAGAGGGTGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAATACTGACGCTCATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACGGGATTAGATACCCCGTAGTCCACGCCGTAACGATGT

P6

AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGGGGAAGCTT
GCTTCTCGCTGACGAGCGGCGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCCGATAGAGGGGGATAACTACTGGAAAC
GGTGGCTAATACCGCATAATCTCTTAGGAGCAAAGCAGGGGAACTTCGGTCTTGCCTATCGGATGAACCCATATG
GGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCA
GCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGTACTTTCAGTCGGGAGGAAGGCGTTGATGCTAATATC
ATCAGCGATTGACGTTACCGACAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCA
AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGATTAAGTTAGATGTGAAAATCCCCGGGCTAAC
CTGGGAATGGCATCTAAGACTGGTCAGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGT

P7

GTCGAGCGGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATTCACCTGAATAGTGGGGGATAACCCAATTGGAAACGATGGC
TAATACCGCATAACGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCTCCCGGATATGCCTAGGTGCGATT
AGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGCAGCAGTCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAT
TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCCAT
GCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCAT
TATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTCGGA
ATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTACAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA
TCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGT

P8

GATGACCGAGTGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACCTGCCTTTGCGAGGGGGATAACAGTTGAAACGACTGCT
AATACCGCATAATGTCTTCGGACCAAACGGGGCTTCGGCTCCCGGCGCAAAAGAGAGGCCAAAGTGAGATTAGCTAGT
TGGAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAGCAGTCTCTAGCTGTTCTGAGAGGAAGATCAGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCCTGATGCAGCCATGCCGCGT
GTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGTTGTGAGGAAAAGTTAGTAGTTAATACCTGCTAGCCGTGA
CGTTAACACAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGG
AATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGCTAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTGGGATGGTCA
TTTGAAGTGGCAGACTAGAGTCTTGGAGAGGGGAGTGGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCTGGA
GGAACATCCGTGGCGAAGGCGACTCCCTGGCCAAAGACTGACGCTCATGTGCGAAAAGTGTGGGTACGCGAACAGGC
TTAGATACCCTGGTAGTCCA

P9

GGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACGGACGAGAAGCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGA
GTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTTGAAC
CGCATGGTTCAAAAAGTGAAAGACGGTCTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTA
ACGGCTTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGGCGAAAAGCCTGACGGAGCAACCGCCGCTGAGTGATGA
AGGTCTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCTAA
TCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGC
GTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGTGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGG
AAAACCTTGTAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAG
TGCGGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGTGACGCTAACGCATAAGCA
CTCCGCTGG

P10

AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAAGAGGTGC
TTGCACCTCTGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAATATGCCTTATGGTGGGGGACAACAGTTGGA
AACGACTGCTAATACCGCATGATGTCTACGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATAAGATTAGCCCAA
GTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCAGCAGTCCCTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGAT
GCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGTAAGGAGGAAAGGTTAAGTGTAAAT
AGCACTTAGCTGTGACGTTACTTACAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTG
CGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGCAAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCGGGCTCA
ACCTGGGAACTGCATTTGAACTGGCAAACTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTACAGGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCGACCCACCTGGGTCAACACTGACGCTCATGTGCGAAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA

P11

TTGAATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAGACCTTCGGGTCTAGCGGC
GGACGGGTTAGTAACCGCTGGGAACGTGCCCTTCTGCAAGGATAGCCACTGGAAACGGTGAGTAATACTGCATACG
CCCTTCGGGGAAAGATTTATCGGAGAAGGATCGGCCCGCTTAGATTAGATAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAA
GTCTACGATCTATAGCTGGTTTGGAGGATGATCAGCAACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGGCGCAAGCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTGC
TAAAGCTCTTTCGCTGGGGAAAGATAAATGACTGTACCCAGTAAAGAAACCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG
TAATACGGAGGGGTTAGCGTTGTTCCGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGATCAGAAAGTTGGGGGTG
AAATCCCGGGCTCAACCTCGAACTGCCTCCAAAACCTCTGGTCTTGAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAATTCCGAG
TGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAG
GTGCCAAAAGTGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAATGCCAGTCCGTCGGG
AAGCATGCTTGTCCGGTGACACACCTAACGGATTAAGCATCCGCTGGG

P12

CTAGAGTTTGGAAATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAG
CTTGCTCCTGGATTACGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGAAA
CGGGCGCTAATACCGCATACGTCTGAGGGAGAAAGTGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGT
CGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACAC
TGGAAGTGAACACGCTCCAGACTCTACGGGAGGACAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC
AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTAAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATAC
CTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCA
AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCGGGCTCAAC
CTGGAACTGCATCCAAAACACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACCGCTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCC

P13

AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAGCAGGATGTGCTT
GCACATCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGAACTTGCCTTTGCGAGGGGGATAACAGTTGGAAC
GACTGCTAATACCGCATAANGTCTACGGACCAACGGGGCTTTTAGCTCCGGCGCAAAGAGAGGCCCAAGTGAGATT
AGTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCTCTAGCTGTCTGAGAGGAAGATCAGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCCTGATGCACCT
GCCGCGTGTGTGAAGAAGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTAGTTGTGAGGAAAGGTTGGTAGTTAATACCTGCCA
GCTGTGACGTTAACAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGT
TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGACGGCGTTTGTAAAGCTAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTGGG
ATGGTCAATTAAGAACTGGCAGACTAGAGTCTTGGAGAGGGGAGTGGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
ATCTGGAGGAACATCAGTGGCGAAGGCGACTCCCTGGCCAAAGACTGACGCTCATGTGCCAAAAGTGTGGGTAGCGA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACCGTAAACGCTGT

P14

AGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGATACTTCGGG
TATTTGAGAGCGGCGCACGGGTGCGTAACACGTATGCAACCTACCTTATACAGGGGGATAGCCCGGAGAAATCCGG
ATTAATACCCCATGGTACTGATGGATGGCATCGTTTATCAGTTAAAGATTTATCGGTATAAGATGGGCATGCGTCTGA
TTAGCTAGTTGGTGGGGTAAACGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACACTGGC
ACTGAGATACGGGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGCAGTAGGGAATATTGGCAATGGACGAGAGTCTGACCCAGCC
ATGCCGCGTGTGAGGAAGACCGCCCTATTGGGTTGTAAGCACTTTATACGGGAAGAAAAGGGCATGCGTGGGACAT
TGCCGGTACCGTATGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTGTCC
GGATTTATGGGTTTAAAGGGTGCAGGCGGCTGATTAAGTCAGCGGTGAAAGACTTCGGCTCAACCGGAGCAGTG
CCGTTGATACTGGTTAGCTTGAAGTGTGCAGGGGTACATGGAATTGATGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATACCAT
CAGGAACACCGATAGCGAAGGCATTGTACTGGGAGCAACTGACGCTGATGCACGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACCGTAAACGATGATTACTCGCTGTTATGCCTTTTGGTGTATGCGGCCAAGCGAAA
GCGTTAAGTAATCCACCTGG

P15

AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGC
TCCCGGATTTAGCGGGCGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGACTCGAAAGGGTC
GCTAATACCGCATAAGTCTACGGGAGAAAGTGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGGAT
TAGCTAGTAGTGAAGGTAATGGCTACCTAGGCAACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGAA
CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGACAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCA
TGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTAAAGTTGGGAGGAAGGGTTGATGTTAATACGCTGC
AATCTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGT
TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTGATAAGATGGGTGTGAAATCCCGGGCTTAACTGGG
AACTGCATCCATAACTGTCTGGCTAGAGTACAGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
ATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACCGCTAAACGATGT

P16

TAGAGTTTTGGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGGAAGAA
GCTTGCTTCTTTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACCTTGCCTTTAGGAGGGGATAACCATTG
GAAACGATGGCTAATACCGCATAATGTCTCCGGACCAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGACCTAAAGATAGGCC
AAGTGAGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCCACCAAGGCGACGATCTCTAGCTGTTCTGAGAGGATGATCAGCC
ACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTG
ATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTGGTGAGGAAGGGTTGTAAGTTA
ATACCTTGCAACATTGACGTTAGCCACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGG
TGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGTAGGCGGCCTATTAAGCAAGATGTGAAAGCCCCGGGCT
CAACCTGGGAATGGCATTTTGAACTGGTAGGCTCGAGTTCGTAAGAGGGTGGTAGAATTTCCAGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGAGATTGGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGTCAGAACTGACGCTGAGGTACGAAAGCGT
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACACGATGTCAACTAGTTGTTTCGTGCATAAAATGAT
GTGAGTAACGCAGCTAACG

P17

ATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAGACCTTCGGGTCTAGCGCGGACGG
GTTAGTAACCGGTGGGAATATGCCCAAAGGTACGGAATAGCCCCGGGAAACTGGGAGTAATACCGTATGTGCCCTTC
GGGGGAAAGATTTATCGCCTTTGGATTAGCCCGCTTTGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGCCGAC
GATCCATAGCTGGTTTGGAGGATGATCAGCAACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATCTTGGACAATGGGGAAACCCTGATCCAGCCATGCCGCTGAGCGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAG
CTCTTTACCGGTGAATAATGACGGTAGCCGTAAGCAAGAAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATA
CGGAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGACTATTAAGTCGGGGTGAATCC
CGGGGCTCAACCCCGAACTGCCTTCGATACTGGTAGTCTTGTAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGA
GGTGAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGA
AAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACACGATGAATGCCAGTACGTCCGCAAGT
ATATCTGTGCGGTGACACACCTAACGGATTAAGCATAACCGCCTGGG

P18

ATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAACCCCTTCGGGGTTAGTGGCGCAC
GGGTGCGTAACCGGTGGGAACCTGCCTTTAGGTTCCGAATAACTCAGAGAAATTTGAGCTAATACCGGATGATGTCT
TCGGACCAAAGATTTATCGCCTTTAGATGGGCCCGGTTAGATTAGATAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGTCG
ACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAAGTGAAGGCCTTAGGGTTGTAA
AGCTCTTTACAGGGATGATAATGACAGTACCTGGAGAATAAGTCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAA
TACGGAGGGAGCTAGCGTTGTTCCGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGCTTTTTAAGTCAGGGGTGAAAT
CCCGGAGCTCAACTCCGGAAGTGCCTTGAAGTGGGAAGCTAGAATATTGGAGAGGTAAGTGGAAATTCGAGTGTG
GAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGACTTACTGGACAATTATTGACGCTGAGGTGC
GAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACACGATGAATAAGCTAGCTGTCCGGCT
CAAAGGATTTGGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTATCCGCTGG

P19

GCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAGGACTTCGGTCTAGCGGGCGGACGGGTT
AGTAACCGGTGGGAACGCTGCCCTTTCTACGGAATAGCCTCGGGAACCTGAGAGTAATACCGTATACGCCCTTCGGG
GGAAAGATTTATCGGAGAAGGATCGGCCCGGTTAGATTAGATAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGTCTACGAT
CTATAGCTGGTTTGGAGGATGATCAGCAACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATCTTAGACAATGGGCGCAAGCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGAAGTGAAGGCCTTAGGGTCTGTAAGGCTC
TTTCGCTGTGAAGATAATGACTGTAGCAGGTAAGAAACCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG
AGGGGTTAGCGTTGTTCCGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGACATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGG
GGCTCAACCCCGAACTGCCCTTGATACTGGGTGTCTTGTAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGT
GAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAA
GTGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCCTAAACGATGAATGCCAGTCTGCGGGCAGTATAC
TGTTCCGTGACACACCTAACGGATTAAGCATTCCCG

P20

AGAGTTTATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTTTTCCGGACCTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAATGTGTAGGAAGTACCCGATAGAGGGGATAACCAGTTGGAACGACTGTTAATACCGCAT
AATGTCTACGGACCAAAGTGTGGACCTTCGGGCCACATGCTATCGGATGCGCCTACATGGGATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCTCTAGCTGGTTTGGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGA
AGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGTTAGTGTAAATAGCTGCTAACTTTGACGTTAC
TCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACT
GGGCGTAAAGCGCACGTAAGGCGGTTGGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTGAAA
CTGGCCAACTAGAGTATGTGAGAGGGGGTAGAATTCGAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAATA
CCAGTGGCGAAGGCGGCCCTGGCAATACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGT

P21

AGAGTTTGAATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGCCAGGCCTAACACATGCAAGTCTGAAACGGTAAACATTTCTAGCT
TGCTAGAAGATGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGACCTTGCCTTTGCGAGGGGGATAACAGTTGGAAA
CGACTGCTAATACCGCATAATGTTTTTCGAACCAAAACGGGGCTTAGGCTCCGGCGCAAAGAGAGGCCCAAGTGAAGT
AGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATCTCTAGCTGTTCTGAGAGGAAGATCAGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAAACCTGATGCACCCAT
GCCGCTGACGTTAAACAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGT
TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGAGGCGGTTTGTAAAGCTAGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCTGGG
ATGGTCATTTAGAAGTGGCAGACTAGAGTCTTGAGAGAGGGGAGTGGAAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
ATCTGGAGGAACATCAGTGGCGAAGGCGACTCCCTGGCCAAAGACTGACGCTCATGTGCGAAAGTGTGGGTAGCGA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGCTGTCTACTAGCTGTGTGTGCCTTTAAGGCGTGCAGCGA
AGCTAACCGGATAAGTAG

P22

TGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCTGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGTCTCAAGAAG
TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGCTGGGTAACTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAACCGGGCTAAT
ACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCCG
ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTAGCGCCACACTGG
GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC
AACGCCGCTGATGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGC
TGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAG
CGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGT
GGAGGGTCAATTGAAAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCGGTCTGTAAGTGTGACTGACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAG
CAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGT
GCTGAAGTTAACGCATTAAGC

P23

AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCTGAGCGGTAACATTTCTAGCTT
GCTAGAAGATGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAATATGCCTTAGGGTGGGGGACAACAGTTGGAAA
CGACTGCTAATACCGCATAACGCTTACGGACCAAAGGGGCTTCGGCTCTCGCCCTTAGATTAGCCCAAGTGGGATT
AGTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTTTGGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAC
TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAAGCCAT
GCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTAGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTAAGGAGGAAAGGTTAGTAGTTAATACCTGCTA
GCTGTGACGTTACTTACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGT
AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGA
ACTGCAATTCGAAGTGGCAAACCTAGAGTATGATAGAGGGTGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA
TCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAATACTGACGCTCATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CGGGATTAGATACCCCGTAGTCCACGCGTAAACGATG

P24

TCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCTGAGGGGTAACAGGGAGTAGCTTGTACTTT
GCTGACGACCGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATAACAATCTGCCTTGTACTGGGGGATAGCCTTTAGAAATGAAGAT
TAATACCCCATAGTATATGACTGTGGCATCACAGCCATATTAAGGTTACGGTACAGATGAGTATGCGTCTATTAG
CTAGATGGTGTGTAACGGCACACCATGGCGACGATAGGTAGGGGCCCTGAGAGGGGATCCCCACACTGGTACTG
AGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGTAATTTGGACAATGGAGGCAACTCTGATCCAGCCATCA
CGCGTGCAGGAAGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTATACGGGAAGAAACACCCCCACGTGTGGGGGCTTGA
CGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTATCCGGA
ATCATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGGACGATTAAGTCAAGAGGTGAAAGTCTGCAGCTCAACTGTAGAATTGCC
TTGATACTGGTTGCTTGAATTAATTGTGAAGTGGTTAGAATAAGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACTTAG
AATACCAATTGCGAAGGCAGATCACTAACAATATATTGACGCTGAGGGACGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGGATACTAGCTGTTTCGATTTTCGGATTGAGTGGCTAAGCGAAAGTGA
TAAGT

P25

TGATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCTGAGCGCGGGAAGCGAGTGGATCCCTT
CGGGGGTGAAGCTCGTGAACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGCAACCTGCCTGTAAGATCGGAATAAC
CCCAGGAAACCGGGGCTAATGCCGGTAATACTTTCTTCGCATGAAGGAAAGTTGAAAGATGGCTTCTTGTCTATCA
CTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTG
AGAGGGTGTAGCGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA
ATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAACGATGAAGTCTTCCGATCGTAAAGTCTGTTGTTAGGGAAG
AACAAGTACCGTGCGAATAGAGCGGTACCTTACCGTACCTAACGAGGAAGCCCGGCTAACTACCTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTTCTTAAAGTCTGAT
GTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAAAGTGGGAACTTGAGGACAGAAGAGGAGAGTGGAAATC
CACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTTTCTGACGC
TGAGGTGCGAAAGCGTGGTAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGTAGGTGCTAGGTG
TAGGGGGCTTCCACCCCTTAGTGTGAGGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGG

P26

TAGAGTTTTGATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAGACCTTCGGGTCT
AGCGGGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTACCCTTTGCTACGGAATAGCCCCGGGAAACTGGGAGTAATACC
GTATGTGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGGCAAAGGATCGGCCCGCGTTGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGC
CTACCAAGCCGACGATCCATAGCTGGTTTGGAGGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGGGGAAACCCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGAGCGATGAAGCCCT
TAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGCTGGGAAGATAATGACGGTACCAGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGC
AGCCGCGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATTGGAAAAGTT
GGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTCCAAAACCTCCAGTCTTGAGGTGAGAGAGGTGAGTGGAA
ATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTG
ACGCTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAATGCCA
GTCGTCGGGTAGCATGCTATTCGGTGACACACCTAACGGATTAAGCATTCCGCCTGG

P27

ATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAACCCCTTCGGGGTGAGTGGCGCAC
GGGTGCGTAACGCGTGGGAACCTGCCTTTAGGTTCCGGAATAACAGTTAGAAAATGACTGCTAATACCGGATAATGTCT
TCGGACCAAAGATTTATCGCCTTTAGATGGGCCCGCGTTAGATTAGATAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGTCG
ACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGCCCTTAGGGTTGTAA
AGCTCTTTTACCAGGGATGATAATGACAGTACCTGGAGAATAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGGAGGGAGCTAGCGTTGTTCCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCTTTTCAAGTCAGGGGTGAAAT
CCCCGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTTTGAACTGGATGGCTAGAATACTGGAGAGGTGAGTGGAAATTCGAGTGTGA
GAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCACTGGACAGTTATTGACGCTGAGGTGC
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGATAACTAGCTGTCCGGGCTC
ATGGAGCTTGGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTATCCGCCTGG

P28

TGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTTCCTTGAACCCGATGGTTCAAGGATAAAAGACGGTTTCG
GCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGC
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATC
TTCCGCAATGGACGAAAGCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTGTGT
AGGGAAGAACAAGTGC AAGAGTAACTGCTTGCACCTTGACGGTACCTAACCGAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAAGTGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAA
GTCTGATGTGAAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGAAAAGTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT
GGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAA
CTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTG
CTAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG

P29

TAGAGTTTGATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAGGACTTCGGTCTTA
GCGGGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTGCCCTTTGCTACGGAATAGCCCCGGGAAACTGGGAGTAATACCG
TATGTGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGGCAAAGGATCGGCCCGCGTTGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAACGGCC
TACCAAGCCGACGATCCATAGCTGGTTTGGAGGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGGGGAAACCCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGAGCGATGAAGGCCCT
AGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGCTGGGAAGATAATGACGGTACCAGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCA
GCCGCGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATTGGAAAAGTTG
GGGGTGAATCCCGGGGCTCAACCTCGGAACTGCCTCCAAAACCTCCAGTCTTGAGGTGAGAGAGGTGAGTGGAAAT
TCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGAC
GCTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAATGCCAGT
CGTCGGGTAGCATTTTATTCGGTGACACACCTAACGGATTAAGCATTCCG

P30

CNTTAGAGTTTTATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGACTTAA
CTGAACCTTCGGGGAACGTTAAGNCGGCGANCGNCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAATATGCCCTGATGTGGG
GGATAACTATTGGAACGATAGCTAATACCGCATAATCTCTTCGGAGCAAAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTCCGCT
CAGGATTAGCCAGGTGGGATTAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCAACGATCCCTAGCTGGTCTGAGA
GGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCACTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAATG
GGGAAACCCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTAGTAGGGAGGAAG
GCAGTGTGTTAATAGCGGCATTGTTGACGTTACCTACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCATGCAGGCGGCTGTAAAGCAAGATGTGA
AAGCCCGGGCTCAACCTCGGAACAGCATTTTGAACCTGGCAGACTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTTCAAGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAG
ATGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCTACTTGGAGGTTGT
GGCCTTAGCCGTTGGCTTTCGGAGCTAACCGGTTAATAGACCGCTGGGATACGTCCGAGT

P31

AGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTC
TCTCGATTACGCGGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACG
CTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATTAGATGAGCCTAGGTCGGATT
AGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC
TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCAT
GCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTCGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCTCATAGCGAATACTGTGA
GTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGTAACCTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGCTTGATAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGA
ACTGCATCCAAAAGTGTCTGGCTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGTGAATTTCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA
TTGGAAGGAACACCAGTGGGGAAGGGCACTACCTGGACTAACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCAACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGC
AGCTAACGCATTAAGTGACCGCTGGG

P32

GAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTG
CTTCTATGACGTTAGCGGGCAGCGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAAC
CGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGG
CCCCGGGTGCATTAGTAGTTGGTGAAGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCG
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGT
CTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAAACTCTGTTGTTAGGGAAAGAAACAAGTACAAG
AGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACG
GCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAAAGTGGGAACTTGAAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAAGGCGGCTTTTGGTCTGTA AACTGACGCTGAGGCGCGAAA
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCC
GCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGG

P33

TTAGAGTTGATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGCGCCCTTCGGGGTGA
GCGGGCAGCGGTTAGTAACGCGTGGGAACGTGCCAGATCTAAGGAATAGCCACTGGAACCGGTGAGTAATACCT
TATACGCCCTTCGGGGGAAAGATTATCGGATTTGGATCGGCCCGCGTTAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCT
ACCAAGCTACGATCTATAGCTGGTTTTAGAGGATGATCAGCAACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCTAGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTA
GGGTCGTA AAGCTCTTTCGCTGTGATGATAATGACAGTAGCAGGTA AAGAAAACCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGGAGGGGGTTAGCGTTGTTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGACTATTAAGTCA
AGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCCGGAAGTGCCTTTGATACTGGTAGTCTAGAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAAAT
CCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCAGTGGCGAAAGGCGGCTACTGGCTCGATACTGAC
CTGAGGTGCGAAAAGTGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAATGCCAGTC
GTCGGATAGCATGCTATTCCGTTGACACACCTAACGGATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTAC

P34

CTAGAGTTTGATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAGGACTTCGGTTCT
AGCGGGCAGCGGTTAGTAACGCGTGGGAACGTACCCTTTTCTACGGAATAGCCTCGGGAAACTGAGAGTAATACCG
TATACGCCCTTAGGGGAAAGATTATCGGAGAAGGATCGGCCCGCGTTAGATTAGATAGTTGGTGGGGTAATGGCC
TACCAAGTCTACGATCTATAGCTGGTTTGAAGGATGATCAGCAACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGGCGCAAGCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCT
AGGGTCGTA AAGCTCTTTCGCTGTGAAGATAATGACTGTAGCAGGTA AAGAAAACCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGGAGGGGGTTAGCGTTGTTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGACTTTAAGTCA
GAGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTGTCTTGAAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAAAT
TCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCAGTGGCGAAAGGCGGCTACTGGCTCGATACTGAC
GCTGAGGTGCGAAAAGTGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAATGCCAGT
CGTGGGAGTACTGTTCCGTTGACACACCTAACGGATTAAGCATTCCGCCT

P35

TCTGGGATAAGCGNTGGAACGGCGTCTAATACCGGATACGAGGTNCGAAGGCATCTTCAGCAGCTGGAAGAAGCTT
CGGTCTGGGATGGGCTCGCGGCCATCAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTCACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCC
TGAGAGGGTGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA
CAATGGGCGAAAGCTGATGCAGCAACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTA AACCTCTTTTAGCAGGGA
AGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCG
CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTGTTCGCGTCTGCTGTGAAAACCCGAGGCTCA
ACCTCGGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGGGTAAGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATG
CGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGG
GGAGCAAACAGGCTTAGATAACCCCTGGTAGTCCACCCGTAACCGTGGGAACTAGTTGTGGGGTCCATTCCACTGA
TTCCG

P36

TTAGAGTTTGATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCCCTTCGGGGTGA
AGCGGCGGACGGGTAGTAACGCGTGGGAACGTGCCAGATCTAAGGAATAGCCACTGGAAACGGTGAGTAATACC
TTATACGCCCTTCGGGGAAAGATTTATCGGATTTGGATCGGCCGCGTTAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCC
TACCAAGCCTACGATCTATAGCTGGTTTTAGAGGATGATCAGCAACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTT
AGGGTCGTAAGCTCTTTTCGCTGTGATGATAATGACAGTAGCAGGTAAAGAAACCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGGAGGGGGTTAGCGTTGTTTCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGATTAAGTCAGTTA
GAGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAACCTGCCTTAATACTGCTAGTCTTGAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAAT
TCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGAC
GCTGAGGTGCGAAAGTGTGGGGAGCAACACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAATGCCAGT
CGTCGGCAAGCATGCTTGTCCGTGACACACCTAACCGGATTAAGCATTCCGCCTGGG

P37

TCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGATCTTTGGGAGCTTGCTCCCAAAG
ATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGATTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAAT
ACCGGATAACATTTGAACCCGATGGTTTCAAATGAAAGGTGGCTTTTGTACCCTTACAGATGGACCCGCGGCG
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG
GGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAG
CAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCAAATAGG
GCGGTACCATGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTGTCGGAAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGGCCACGGCTCAAC
CGTGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG
GAGCGAACAGGATTAGTACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTT
AGTGCTGACGAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA

P38

TTAGAGTTTGATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAGACCTTCGGGTCT
AGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTACCCTTTGCTACGGAATAGCCCGGAAACTGGGAGTAATACC
GTATGTGCCCTTAGGGGAAAGATTTATCGGCAAGGATCGGCCCGCGTTGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGC
CTACCAAGCCGACGATCCATAGCTGGTTTGGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGGGGAAACCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGAGCGATGAAGGCCT
TAGGGTTGTAAGCTCTTTCAGCTGGGAAGATAATGACGGTACCAGCAGAAGAAGCCCGGCTAACTCCGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATTGGAAAGTT
GGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGAACTGCCTCCAAAACCTCCAGTCTTGAGGTGAGAGAGGTGAGTGGA
ATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTG
ACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCCA
GTCGTCGGGTAGCATGCTATTCCGTGACACACCTAACCGGATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCCGCAAGT

P39

AGCTTGCTTTTCCGCTGACGAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATAACAATCTGCCTCTTACTGGGGGATAGCCTTT
GGAACGAAGAATAATACCCATGGTATCCAGGTTTCGCATGGAATCTGGATTAAAGTTTCGACGGTAAGAGATGAG
TATGCGTTCTATTAGCTAGATGGTGTGGTAACGGCACACCATGGCAACGATAGATAGGGGCCCTGAGAGGGGGATCC
CCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGAAATTTGGACAATGGGCGGAAGC
CTGATCCAGCCATGCCGCGTGACAGGAAGACTGCCCTATGGGTTGTAAGTCTGTTTGTACGGGAAGAAACCCACCTA
CGTGTAGGTGGCTGACGGTACCCTAAGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATG
CAAGCGTTATCCGGAATCATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGTGGATCGGTGAGTCAAGAGGTGAAATCCTGCACTCA
ACTGTAGAACTGCCTTTGATACTGCCGCTTTGAATTATCGTGAAGTGGTTAGAATATGTAGTGTAGCGGTGAAATGC
ATAGATATTACATAGAATACCGATTGCGAAGGCAGATCACTAACGATACATTGACACTGATGGACGAAAGCGTGGGG
AGCGAACGGGATTAGATACCCCGTAGTCCACGCCGTAACGATGGTCACTAGCTGTTCCGACTTCGGTCTGAGTGG
CTAAGCGAAAGTGATAAGTGACCCACCTGGGGAGTACGTTCCGCAAG

P40

GCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAGGACTTCGGTCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA
CGCGTGGGAACGTACCCTTTGCTACGGAATAGCCCGGAAACTGGGAGTAATACCGTATGTGCCCTTA
GGGGAAAGATTTATCGGCAAGGATCGGCCGCGTTGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTAC
CAAGCCGACGATCCATAGCTGGTTTGGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGGGGAAACCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGA
GCGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAGCTGGGAAGATAATGACGGTACCAGCAGAAGAAG
CCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTAAGTGGG
CGTAAAGCGCACGTAGGCGGATTGGAAAGTTGGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACCTGCCT
CCAAAACCTCCAGTCTTGAGGTGAGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGA
TATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGT
GGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCCAGTCTGCGGGTAG
CATTTTATTCCGGTACACACCTAACCGNNCAAGCATNCCGNCCTCNGGACGTCGCNNG

P41

TTAGAGTTTGATCATGGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCCCTAACACATGCCAGTCGAGGGGGTAACAGGGAGA
GCTTGCTCTTGCTGACGACCGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATACAATCTACCTTATACTGGAGAATAGCCAGAG
AAATTTGGATTAATGCTCCATAGTATGTCGAGTCCGCATGGGCATGACATTAAGGTTACGGTATAAGATGAGTATG
CGTTCTATTAGCTAGATGGTGTGGTAACGGCACACCATGGCAACGATAGATAGGGGGCCCTGAGAGGGGGATCCCCCA
CACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAATGGAGGCAACTCTGA
TCCAGCCATGCCCGGTGCAGGAAGACTGCCCTATGGGTTGTAACCTGCTTTTATACAGGAAGAAACCGCTCTACGTGT
AGAGCTTGACGGTACTGTAAGAATAAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATCCAAGC
GTTATCCGGAATCATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGTTGATAATTAAGTCAGAGGTGAAAGTTTGCAGCTCAACTGTA
AAATTGCCCTTTGATACTGGTTATCTTGAGTTATTATGAAGTAGTTAGAATATGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGAT
ATTACATAGAATACCAATTGCGAAGGCAGATTACTAATAATCAACTGACACTGATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGGATACTAGCTGTTCGGATTTCGGTCTGAGTGGCTAAG
CGAAAGTGATAAGTATCCCACCTGGGGAGTACGTTCCGAAGA

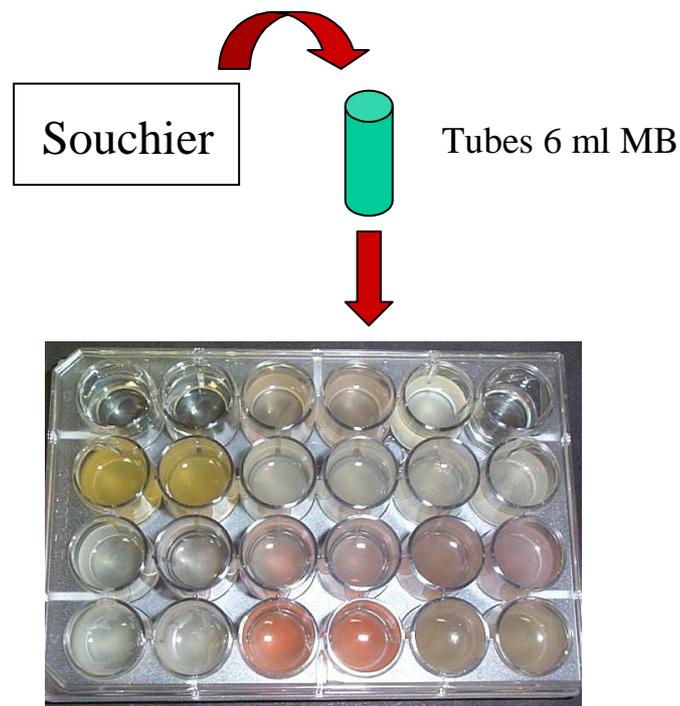
P42

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAATTCGAGCGGACCGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTT
GATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGT
TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG
TGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCTT
GACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG
GAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTC
ATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTTCCGCCCTTATGCTGCAGCA
AACGCATTAAGCACTCCGCCTG

P43

TAGAGTTTGATCATGGGTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGTCTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCAGCTTG
CTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTG
GGTCNTAATACCGGATAGGAGCGCCACCGCATGGTGGGTGTTGGAAAGATTATCGGTTTTGGATGGACTCGCGGC
CTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACT
GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGACAATGGGCGCAAGCCTGATGCA
GCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCT
GCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTATCCGGAATTATTGG
CGCTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTTGTGCGCTCTGTCTGTAAGTCCGGGGCTTAACCCCGGATCTGCGGTGGGTACG
GGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACC
GATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACCATTCCACGGTTTTCCGCGCCGAGCTAACGCATT
AAA

Protocole – Courbes de croissance des souches bactériennes cultivées dans Marine Broth



1 puits - contrôle contamination (2mL MB)
23 souches (1,9 mL MB + 0,1mL bouillon)

Incuber à 25°C (salle climatisée); suivre la croissance
(mesure de DO à 590nm) pendant 6 jours

À la fin de l'incubation, inoculer les souches de la
microplaque dans MA pour vérifier la pureté des
souches.



Protocole – Résistance des souches aux radiations solaires (simulateur solaire)

