

Institut royal des Sciences
naturelles de Belgique

BULLETIN

Tome XLI, n° 12

Bruxelles, juin 1965.

Koninklijk Belgisch Instituut
voor Natuurwetenschappen

MEDEDELINGEN

Deel XLI, n° 12

Brussel, juni 1965.

CONTRIBUTIONS A L'ETUDE DES BACTERIES MARINES
DU LITTORAL BELGE.

II. — Comparaison de plusieurs méthodes
pour détacher et obtenir en suspension
les bactéries contaminant des surfaces,

par Guido PERSOONE (Gand).

INTRODUCTION.

Le fouling par des macro-organismes marins (Mollusques, Crustacés, Tuniciens, Hydrozoaires, Bryozoaires), de surfaces submergées en mer, a toujours été, et reste même de nos jours, un problème qui est loin d'être résolu.

F. B. LAIDLAW (1952), dans son « History of the preventing of fouling » relate les méthodes employées à travers les siècles pour combattre tant bien que mal cet envahissement.

Par contre, le fouling par les micro-organismes n'a pas fait l'objet d'études aussi nombreuses.

En 1923, E. J. HILEN puis E. C. ANGST constatent que le film muqueux recouvrant les coques des navires est constitué surtout par des bactéries. Mais ce sont principalement les travaux de Cl. E. ZOBELL (1933, 1935, 1938, 1943) qui ont démontré l'importance des germes dans les premiers stades du fouling. V. CVIIC (1953), T. M. SKERMAN (1956) et A. A. ALEEM (1958) ont également souligné le rôle des bactéries dans la formation du film primaire sur tout substrat immergé. E. J. F. WOOD (1950), sans démentir les résultats de Cl. E. ZOBELL, a cependant trouvé que, sur la côte australienne, près de Sydney, ce ne sont pas tant les

bactéries, mais les spores d'algues et, à un degré moindre les diatomées, qui jouent le rôle prépondérant dans la formation de ce film primaire.

En submergeant des lames porte-objet recouvertes de peinture anticorrosive et antifouling, V. O. KALINENKO et N. A. MEFEDOVA (1956) ont remarqué qu'aucun des deux produits n'était capable d'inhiber le développement rapide d'un film microbien incrusté de sels de Ca, Fe, Mg, film qui permet à son tour la fixation d'invertébrés marins.

Par contre, les résultats physicochimiques de l'influence des germes sur le fer ou l'acier nu immergé en mer ont déjà fait l'objet de nombreuses publications qui rejoignent le problème de la corrosion.

De nombreux points d'interrogation restent dans le domaine très important du fouling bactérien sensu stricto; ils nous ont poussés à entreprendre l'étude bactériologique du film primaire sur divers substrats submergés, en fonction du temps.

L'étude non seulement qualitative, mais aussi quantitative de ces germes s'attachant à un substrat, suppose une méthode pour les en détacher, en vue de leur culture. Par conséquent, le premier problème à résoudre est celui de la récolte et du dénombrement des germes attachés à, ou incrustés dans, des surfaces exposées : c'est-à-dire : le « surface sampling ».

W. G. WALTER (1955) et V. W. GREENE et L. G. HERMAN (1961) ont fait le bilan des techniques utilisées dans ce « surface sampling ». Elles sont en majorité des modifications de 3 méthodes principales :

- 1) la méthode de contact, ou application d'une gélose nutritive contre la surface à examiner;
- 2) la « swab-rinse method »;
- 3) l'agitation de la surface contaminée dans une solution stérile.

En 1962, V. W. GREENE, D. VESLEY et K. M. KEENAN y ajoutent la « swab-pressure method », dont le collecteur (un morceau de feutre collé sur un cylindre) est roulé sur la surface contaminée, puis sur une gélose.

Il restait à appliquer ces méthodes à nos germes marins dont le pouvoir fixateur semble supérieur à celui des organismes telluriques pathogènes ou saprophytes qui contaminent des surfaces à l'air libre.

Dans la présente publication, nous relatons les résultats obtenus avec diverses méthodes mises à l'essai.

Nos essais nous ont finalement amené à la construction d'un appareil simple (G. PERSOONE, 1964) qui a donné les meilleurs résultats en ce qui concerne le pourcentage d'organismes détachés, le nombre de ceux que nous sommes parvenus à cultiver et la reproductibilité de la méthode.

MATERIEL ET METHODES.

Pour calculer le pourcentage d'organismes détachés par les diverses méthodes, nous avons eu recours à la technique bien connue des lames submergées, inventée par N. CHOLODNY en 1930 pour l'étude des germes

telluriques, appliquée à l'eau douce par A. J. HENRICI (1933) et G. S. KARZINKIN (1934) et à l'eau salée par Cl. E. ZOBELL et E. C. ALLEN (1933).

Des lames porte-objet de $7,5 \times 2,5 \times 0,1$ cm sont percées d'un trou de 1 mm, au milieu de chaque côté, à 1 cm du bord latéral.

Après nettoyage et dégraissage dans une solution de bichromate-acide sulfurique concentré, on les conserve dans un récipient contenant de l'alcool à 94-96°.

Au moment de l'emploi, elles sont flambées puis attachées au moyen de fils en nylon entre les traverses métalliques d'un cadre en teak (fig. 1).

Le cadre avec lames est entouré de papier et stérilisé à l'autoclave à 125 °C pendant 20 minutes.

Tous les cadres utilisés ont été immergés dans la rade du port d'Ostende, à la même place, et à la même profondeur, de façon qu'ils n'émergent pas à marée basse. La durée d'immersion était de 1, 2 ou plusieurs jours.

Remonté à la surface, le cadre est plongé dans un seau contenant de l'eau de mer également prélevée au même endroit; le tout ramené en hâte au laboratoire de l'Institut d'Etudes Maritimes à Ostende.

Une partie des lames est fixée immédiatement à la flamme d'un bec Bunsen.

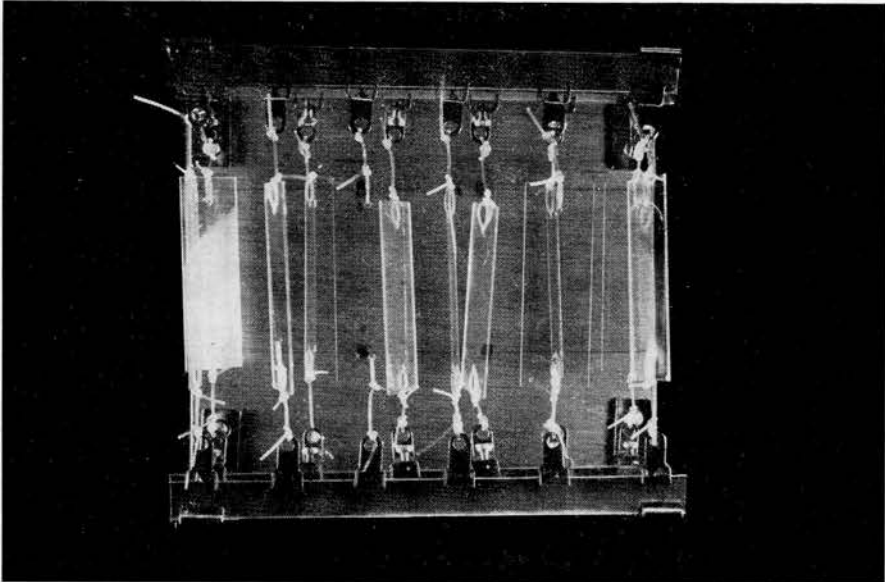


Fig. 1. — Cadre avec lames porte-objet.

Les autres sont placées séparément dans des tubes à centrifuger stériles de 35 mm de diamètre, contenant 50 ml d'eau de mer stabilisée stérile (eau de mer vieillie) (1), et recouverts d'un capuchon en caoutchouc stérile.

Ces tubes sont alors rangés dans un sac calorifugé, refroidi par des « ice-packets » pour éviter le plus possible une multiplication des germes durant le transport à l'Institut de Biogéographie et laboratoire d'Ecologie de l'Université de Gand, où ont lieu les diverses expériences. La durée du transport est d'environ une heure.

Dès l'arrivée au laboratoire, une seconde partie des lames est fixée à la flamme pour détecter tout accroissement du nombre de germes par rapport aux lames fixées à Ostende même.

Les diverses méthodes appliquées au cours de nos recherches pour tenter de détacher et de cultiver le plus grand nombre possible d'organismes sont :

- 1) la méthode dite « de contact » ou application de la lame contre une gélose nutritive pendant 10 minutes, suivie de l'incubation de cette gélose;
- 2) la « swab-rinse » method, c'est-à-dire le frottement de la surface des lames au moyen de bouts d'ouate qu'on disloque ensuite pendant 30 minutes dans une solution stérile au moyen d'un aimant (recouvert de teflon ou de verre) et d'un agitateur magnétique;
- 3) le brossage vigoureux de la surface de la lame immergée dans une solution stérile, au moyen d'un pinceau plat, stérile, de même largeur que la lame;
- 4) la centrifugation de la lame pendant 30 minutes à 4.000 tours/minute dans un tube à centrifuger de 35 mm de diamètre rempli de 50 ml de solution stérile;
- 5) attachement de la lame par un bout à un support, et immersion à la verticale dans un Erlen-Meyer contenant une solution stérile. Agitation magnétique (avec formation de 2 turbulences devant chaque face de la lame) pendant 30 minutes, au moyen d'un aimant recouvert de teflon ou de verre;
- 6) application d'un jet d'eau stérile sous pression sur chaque face de la lame;
- 7) succion des organismes, la lame étant immergée dans une solution stérile;
- 8) combinaison des méthodes 6 et 7 : la « waterpressure-and-suction rinsing method », dans un appareil que nous avons mis au point. L'assemblage de cet appareil simple et son mode d'emploi font l'objet d'une publication antérieure (PERSOONE 1964).

(1) Eau conservée à l'obscurité au laboratoire durant plusieurs mois. Le peu de matière organique qui s'y trouvait ayant été consommée par les germes, la composition de cette eau devient stable après quelques semaines (cf. Cl. E. ZOBELL, 1946; J. BRISOU, 1955).

A la fin de chacune de ces expériences, nous avons fixé à la flamme les germes restant éventuellement sur les lames traitées et nous avons fait les dilutions à partir des solutions contenant les bactéries détachées.

Toutes les solutions stériles mentionnées ci-dessus ainsi que les solutions destinées à faire les dilutions furent préparées avec de l'eau de mer stabilisée (eau de mer vieillie).

La gélose nutritive utilisée pour lesensemencements dans les boîtes de Pétri, est celle proposée en 1955 par V. CVIIC : combinaison du milieu 2216 de Cl. E. ZOBELL et du milieu de H. W. REUSZER, elle contient en plus une certaine quantité de Nutrient Broth (Difco).

| | |
|-------------------------------|--------|
| Nutrient broth (Difco) | 6,0 g |
| Bacto-peptone (Difco) | 2,0 g |
| Glucose | 1,0 g |
| FePO ₄ | 0,3 g |
| Eau de mer stabilisée | 750 ml |
| Eau distillée | 250 ml |
| Agar-agar (Difco) | 15,0 g |

pH = 7,6 (réglé au NaOH 1 N)

Avec chaque dilution, nous avons fait 3 ensemencements parallèles.

Nous avons également pris soin de placer les boîtes de Pétri (avant d'y couler la gélose refroidie à 42 °C) sur des plaques de verre refroidies à - 12 °C, pour éviter le plus possible l'effet nocif d'une température trop élevée sur les germes marins.

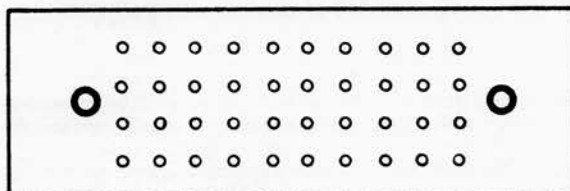
Pour des raisons de facilité, le dénombrement des colonies fut fait après 6 jours d'incubation à 20 °C.

Toutes les lames porte-objet sont colorées pendant 2 minutes au violet de Gentiane (1 %), lavées puis séchées.

L'analyse microscopique fut faite au microscope Zetopan (Reichert) à un agrandissement 100 (immersion) × 8.

Notons que l'analyse microscopique directe ne permet pas de différencier les germes vivants de ceux qui sont morts; de plus, il fut parfois très difficile de différencier les germes des particules inertes (détrit, etc.).

Sur chaque lame, nous avons compté 40 champs microscopiques disposés de façon suivante :



La surface d'un champ est de 0,02 mm².

Le total des germes trouvés dans 40 champs a été multiplié par le coefficient 125, de façon à obtenir le nombre d'organismes par centimètre carré de lame.

RESULTATS.

L'analyse microscopique des lames fixées immédiatement à Ostende (dès l'enlèvement du cadre) que nous appellerons « lames A », nous montre que :

1°) sur une même lame, le nombre d'organismes par champ examiné, varie dans une mesure telle que nous ne pouvons conclure avoir une distribution Poissonienne, sensu stricto (2).

Aussi ne tenons-nous nullement à considérer le total des 40 champs comme un chiffre exact et absolu, mais plutôt comme un « ordre de grandeur » du nombre d'organismes sur la lame examinée.

2°) le total des 40 champs, dans une même série de lames A (retirées à la même date et ayant séjourné dans les mêmes conditions écologiques), varie d'une lame à l'autre, parfois même sensiblement, sans cependant aller du simple au double (sauf pour l'expérience du 15/19-V).

C'est pourquoi, au lieu de faire la moyenne des totaux des lames A, nous mentionnerons le total le plus bas, et le total le plus haut d'une même série de lames A (total ramené à 1 cm² comme il a été mentionné plus haut).

Nous supposons alors que le nombre de germes par cm² de toutes les lames d'un même cadre est compris entre ce minimum et maximum ou du moins qu'il ne s'en écarte que très peu.

Ce faisant, nous avons une idée du nombre d'organismes détachés dans les diverses expériences, en faisant la différence du nombre de bactéries qui restent sur la lame « après » l'opération, avec les maximum-minimum des lames A. De plus, en comparant cette différence avec le nombre de colonies sur gélose, nous pouvons établir quel pourcentage approximatif de ces organismes détachés se cultive sur la gélose nutritive.

Tous les chiffres cités dans les tableaux ont trait à 1 cm² de surface.

1° Méthode de contact. — Dès le début cette méthode a été abandonnée; la quantité des colonies se développant sur une surface de 1 cm² de gélose est très grande et les microbes se développant rapidement sur notre milieu, masquent après peu de temps les autres colonies moins rapides dans leur croissance et leur développement.

(2) Ceci est dû entre autres au fait que le nombre de champs examinés par lame est assez restreint (pour des raisons d'ordre pratique), et que la surface de ces 40 champs ne représente qu'une fraction minime de la surface totale de la lame (1/5000).

De plus, les organismes sont souvent plus nombreux autour de particules d'organismes en décomposition.

Cette méthode pourrait éventuellement être reprise avec des milieux plus sélectifs.

2° *Swab-rinse method*. — Quoique le pourcentage des organismes détachés fut élevé, la méthode fut abandonnée à cause de sa variabilité et de son manque total de reproductibilité. E. J. MORRIS et H. M. DARLOW (1959), dans leurs expériences sur des peintures germicides, ont d'ailleurs abandonné cette méthode pour les mêmes raisons.

3° Centrifugation des lames.

| Date | Immersion | Lames A | Nombre restant | Nombre de colonies |
|-------------|-----------|-------------|----------------|--------------------|
| 18-19 sept. | 24 h | 52- 62.000 | > 60.000 | 350 |
| 18-20 sept. | 48 h | 133-147.000 | > 140.000 | 650 |

Le résultat fut négatif puisque le nombre de germes sur la lame après l'opération était du même ordre de grandeur que celui trouvé sur les lames A. Il confirme d'ailleurs la constatation de C. E. ZOBELL (1946), à savoir que le poids spécifique des germes marins est à peu près égal à celui de l'eau de mer, d'où impossibilité de les séparer de l'eau de mer par des procédés ordinaires de centrifugation.

4° *Agitation de la solution autour d'une lame, par rotation d'un aimant.*

| Date | Immersion | Lames A | Nombre restant | Nombre de colonies |
|------------|-----------|------------|----------------|--------------------|
| 19-20 nov. | 24 h | 30- 45.000 | 38.000 | 150 |
| 20 21 nov. | 24 h | 18- 34.000 | 20.000 | 150 |
| 2-4 déc. | 48 h | 93-102.000 | 115.000 | 360 |
| 2-5 déc. | 72 h | 51- 86.000 | 25.000 | 1.425 |
| 20-23 jan. | 72 h | 39- 45.000 | 41.000 | 410 |

Cette méthode n'est pas à préconiser puisque le nombre de bactéries non détachées égale celui trouvé sur les lames A.

Une exception est cependant à noter : l'expérience du 2/5-XII où le nombre de colonies sur les géloses est assez grand et où il ne reste sur la lame que de 30 à 50 % des germes trouvés sur les lames A. Les raisons de cette exception peuvent être aussi nombreuses que variées.

5° Brossage.

| Date | Immer- sion | Lames A | Nombre restant | Nombre de col. | % détaché | % détaché cultivant |
|----------|----------------|------------|-------------------|-------------------|--------------|------------------------|
| 2-4 déc. | 48 h | 93-102.000 | 15.000 | 1450 | 84-86 % | 1,6-1,8 % |
| 2-5 déc. | 72 h | 51- 86.000 | 16.500 | 2500 | 68-81 % | 3,5-7,2 % |

Le nombre d'organismes détachés est assez important puisqu'il ne reste que de 15 à 30 % de germes sur les lames.

Cette méthode a cependant deux inconvénients :

- a) Il est difficile de brosser de façon égale toute la surface de la lame, et à plus forte raison de 2 lames, d'où une erreur opératoire assez grande.
- b) Un certain pourcentage de germes reste accroché aux poils de la brosse et ne prétend pas aller en suspension, d'où un nombre de colonies sur gélose variant d'une expérience à l'autre.

En résumé, nous retrouvons ici les inconvénients de la swab-rinse method.

6° Jet d'eau stérile sous pression.

| Date | Immer- sion | Lames A | Nombre restant | Nombre de col. | % détaché | % détaché cultivant |
|------------|----------------|------------|-------------------|-------------------|--------------|------------------------|
| 19-20 nov. | 24 h | 30- 45.000 | 9.000 | 70 | 70-80 % | 0,1-0,3 % |
| 20-21 nov. | 24 h | 18- 34.000 | 4.800 | 290 | 74-86 % | 0,9-2,1 % |
| 2-4 déc. | 48 h | 93-102.000 | 6.600 | 2020 | 92-93 % | 2,1-2,3 % |
| 2-5 déc. | 72 h | 51- 86.000 | 8.400 | 1860 | 84-91 % | 2,3-4,3- % |

7° Suction des organismes.

| Date | Immersion | Lames A | Nombre restant | Nombre de col. | % détaché | % détaché cultivant |
|----------|-----------|------------|----------------|----------------|-----------|---------------------|
| 2-4 déc. | 48 h | 93-102.000 | 27.000 | 1820 | 71-74 % | 2,4-2,7 % |
| 2-5 déc. | 72 h | 51- 86.000 | 6.000 | 2340 | 89-94 % | 2,9-5,2 % |

Un grand pourcentage d'organismes est détaché (de 70 à 90 %). Ces deux dernières méthodes ont cependant été abandonnées au profit de la suivante qui, tout en combinant les avantages des deux premières, élimine beaucoup plus les risques de contamination extérieure.

8° Waterpressure-and-suction rinsing method.

| Appareil | Date | Immersion | Lames A | Nombre restant | Nombre de col. | % détaché | % détaché cultivant |
|----------|------------|-----------|--------------------------|----------------|----------------|-----------|---------------------|
| A | 20-23 jan. | 72 h | 39- 45.000 | 4.500 | 2.200 | 89-90 % | 5,4-6,3 % |
| B | 6-10 mars | 92 h | 187-312.000 | 48.250 | 2.800 | 75-85 % | 1-2 % |
| C | » | » | » | 49.500 | 10.325 | 74-84 % | 3,9-7,5 % |
| D | » | » | » | 10.250 | 12.800 | 95-97 % | 4,2-7,2 % |
| E | » | » | » | 30.375 | 966 | 84-90 % | < 1 % |
| F | 15-19 mai | 92 h | 4.680.000- 13.774.000 | 1.092.000 | 611.000 | 77-94 % | 4,8-17 % |
| G | » | » | » | 561.000 | 1.261.000 | 89-96 % | 9,5-40 % |
| H | » | » | » | 670.000 | 775.000 | 86-96 % | 6-19 % |
| I | » | » | » | 390.000 | 1.544.000 | 92-97 % | 11,5-36 % |

Cette combinaison du jet d'eau sous pression et de la suction des organismes nous a donné les meilleurs résultats. Non seulement 75 à 95 % environ des organismes sont détachés, mais les pourcentages des organismes qui se mettent en culture sont très supérieurs à ceux des autres méthodes (excepté pour les appareils B et E dans l'expérience du 6/10-III).

Notons que les conditions écologiques du biotope lors de la dernière expérience (15/19-V-1964) sont probablement à l'origine de ces nombres très élevés de germes qui se mettent en culture.

DISCUSSION.

En comparant les résultats, il ressort que quatre méthodes ont donné un pourcentage appréciable de germes détachés :

- le brossage,
- le jet d'eau stérile sous pression,
- la succion des organismes,
- la waterpressure-and-suction rinsing method.

La dernière nous semble la meilleure, non seulement parce qu'elle combine les avantages des deux méthodes précédentes, mais parce qu'elle élimine les possibilités de contamination extérieure. De plus, le pourcentage d'organismes détachés que nous sommes parvenus à cultiver est sensiblement plus élevé que dans les autres méthodes.

Il est à noter que tous les microbiologistes marins sont d'accord pour affirmer qu'on ne parvient à cultiver sur un milieu général, qu'une fraction minime des germes se trouvant dans un échantillon donné.

Les pourcentages de germes détachés que nous sommes parvenus à cultiver varient, dans les expériences effectuées avec notre appareil, entre 4 et 10 % (avec des maxima très prononcés pour l'expérience du 15/19-V : 20 à 40 %).

Nous pouvons donc considérer ce résultat comme satisfaisant puisque :

- 1°) dans l'analyse microscopique directe, nous n'avons pu différencier les germes vivants de ceux qui sont morts;
- 2°) comme l'affirme Cl. E. ZOBELL (1946), le nombre maximum de colonies sur les géloses n'est atteint que vers les 12-16 jours d'incubation. Effectivement un deuxième dénombrement fait après 10 jours d'incubation dans diverses expériences, nous a toujours donné des chiffres plus élevés que ceux du premier dénombrement après 6 jours d'incubation, si bien que les nombres de colonies cités dans les tableaux ne représentent pas le maximum qu'ils auraient atteint après deux semaines d'incubation.

Les diverses expériences ont été faites sous la conduite du Professeur Dr. F. EVENS, Directeur de l'Institut de Biogéographie et du Laboratoire d'Ecologie de l'Université de Gand, et du Dr. E. LELOUP, Directeur de l'Institut d'Études Maritimes d'Ostende, auxquels nous exprimons nos vifs remerciements.

Nous remercions également M^{lle} M. VAN BEVEREN, analyste, pour l'aide précieuse qu'elle nous a fournie au cours de cette investigation.

RÉSUMÉ.

Comparaison de plusieurs méthodes pour détacher et obtenir en suspension les bactéries contaminant des surfaces.

De celles-ci, la « waterpressure and suction-rinsing method » a donné les meilleurs résultats quant au pourcentage d'organismes détachés et quant au nombre de ceux-ci qu'on parvient à cultiver sur gélose.

SAMENVATTING.

Vergelijking van verschillende methodes om bakteriën, vast aan een oppervlak, los te maken en in suspensie te brengen.

De « waterpressure and suction-rinsing method » gaf ons de meest bevredigende resultaten wat betreft het percentage losgekregen organismen, en het aantal hiervan dat we op agar-bodem konden kweken.

SUMMARY.

Comparison of different methods to remove and to suspend bacteria which contaminate surfaces.

The waterpressure and suction-rinsing method gave most satisfactory results as to the percentage of removed organisms and the number of them that we could bring into culture on agar-media.

ZUSAMMENFASSUNG.

Vergleich verschiedener Methoden um Bakterien die Oberfläche besudeln, frei zu machen und in Suspension zu bringen.

Die sog. « waterpressure and suction-rinsing method » war am meisten befriedigend betreffs des Prozentsatzes an freigemachten Organismen und der Anzahl die auf Agarböden gezüchtet werden konnten.

BIOGEOGRAFISCH INSTITUUT EN LABORATORIUM VOOR OEOLOGIE
RIJKSUNIVERSITEIT GENT.

BIBLIOGRAPHIE.

- ALEEM, A. A.
1958. *Succession of marine fouling organisms on test-panels immersed in deep-water at La Jolla California* (Hydrobiol., 11, p. 40.)
- ANGST, E. C.
1923. *The fouling of ship bottoms by bacteria*. (Report Bureau Construction and Repair U. S. Navy Department, Washington.)
- BRISOU, J.
1955. *La microbiologie du milieu marin*. (Collection de l'Institut Pasteur. Ed. Médic. Flammarion.)
- CHOLODNY, N.
1930. *Ueber eine neue Methode zur Untersuchung der Bodenmikroflora*. (Arch. Mikrobiol., 1, p. 620.)
- CVIIC, V.
1953. *Attachement of bacteria to slides submerged in sea water* (Institut za Oceanografiju i Ribarstvo — Split FNR Jugoslavija n° 6.)

CVIIC, V.

1955. *Distribution of bacteria in the waters of the Mid Adriatic Sea.* (The M. V. « Hvar » Cruises—Researches into fisheries Biology 1948-1949. IZVJESCA-Reports, IV, n° 1.)

GREENE, V. W. and HERMAN, L. G.

1961. *Problems associated with surface sampling techniques and apparatus in the institutional environment.* (J. Milk and Food Technol., 24, p. 262.)

GREENE, V. W., VESLEY, D. and KEENAN, K. M.

1962. *New method for microbiological sampling of surfaces.* (J. Bact., 84 (1), p. 188.)

HENRICI, A. T.

1933. *Studies on freshwater bacteria. 1. A direct microscopic technique.* (J. Bact., p. 277.)

HILEN, E. J.

1923. *Report on bacteriological study of ocean slime* (Report Bureau Construction and Repair U. S. Navy Department, Washington.)

KALINENKO, V. O. and MEFEDOVA, N. A.

1956. *Bacterial fouling of the submerged portion of a ship* (Mikrobiologia, 25, p. 191.)

KARZINKIN, G. S.

1934. *Zum Studium des bacterialen Periphytons* (Proc. Kossino Limnol. Sta., 17, p. 21.)

LADLOW, F. B.

1952. *The history of the preventing of fouling* (U. S. Naval Inst. Proc., 78 (7), p. 769.)

MORRIS, E. J. and DARLOW, H. M.

1959. *Some observations on bactericidal paint films* (J. Appl. Bact., 22 (1), p. 64.)

PERSOONE, G.

1964. *Un appareil simple pour détacher et obtenir en suspension les bactéries contaminant des surfaces* (Bull. Inst. roy. Sc. nat. Belg., XL, n° 18.)

SKERMAN, T. M.

1956. *The nature and development of primary films on surfaces submerged in the sea.* (New Zealand Journ. Sc., 38, p. 44.)

WALTER, W. G.

1955. *Symposium on methods for determining bacterial contamination on surfaces* (Bact. Rev., 19 (4), p. 284.)

WOOD, E. J. F.

1950. *Investigations on underwater fouling I. The role of bacteria in the early stages of fouling.* (Austral. Journ. Mar. Freshw. Res., 1-2, p. 85.)

ZOBELL, Cl. E.

1938. *The sequence of events in the fouling of submerged surfaces* (Offic. Digest. Fed. Varnish. Prod. Clubs., 178; p. 379.)

ZOBELL, Cl. E.

1943. *The effect of solid surfaces upon bacterial activity* (J. Bact., 46, p. 39.)

ZOBELL, Cl. E.

1946. *Marine Microbiology.* (Waltham Mass. U. S. A. Chronica Botanica Cy.)

ZOBELL, Cl. E. and ALLEN, E. C.

1933. *Attachment of marine bacteria to submerged slides* (Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 30, p. 1409.)

ZOBELL, Cl. E. and ALLEN, E. C.

1935. *The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces* (J. Bact., 29, p. 239.)