

Nouvelles méthodes pour l'étude des bactéries fécales appliquées au bassin de la Seine

Isabelle George, Muriel Petit, Pierre Servais (Groupe de Microbiologie des Milieux Aquatiques, Université Libre de Bruxelles, Belgique)

Le bassin de la Seine est un des plus densément peuplé d'Europe. Cette importante pression anthropique, qui s'exerce principalement en Ile-de-France, implique des rejets très importants de bactéries fécales dans ses eaux, essentiellement par les eaux usées domestiques et les rejets agricoles. Le fonctionnement écologique du fleuve Seine, de débit modeste (débit d'étiage à Poses: environ 130 m³/sec), est ainsi très perturbé lors de son passage dans l'agglomération parisienne, forte de ses 10 millions d'habitants. La quasi-totalité des effluents domestiques de l'agglomération parisienne sont pourtant traités en station d'épuration. Les traitements utilisés en station d'épuration éliminent environ 90% des bactéries fécales des rejets domestiques, mais les concentrations en bactéries fécales dans ces rejets sont tellement importantes que le déversement d'effluents traités en rivière se traduit toujours par une augmentation des teneurs en bactéries fécales du milieu récepteur. Ainsi, en aval de Paris, à Achères, les teneurs en bactéries fécales de la Seine augmentent spectaculairement lorsque le fleuve reçoit les effluents de la station d'épuration Seine-aval (capacité nominale de 2 100 000 m³/j). La Seine en amont de Paris et ses affluents (Oise, Marne) sont eux aussi de qualité bactériologique médiocre, ce qui peut poser des problèmes puisque les eaux de surface y sont utilisées intensivement pour la production d'eau potable.

La détection des pollutions fécales dans les milieux naturels se fait habituellement par la recherche de germes indicateurs de contamination fécale, c'est-à-dire des bactéries spécifiques de la flore intestinale, qui ne sont pas nécessairement elles-mêmes pathogènes, mais dont la présence en indique l'existence d'une contamination fécale, donc un risque épidémiologique. Les coliformes totaux et les coliformes fécaux sont les principaux indicateurs de contamination fécale utilisés en Europe. Il est à noter que l'utilisation des coliformes totaux comme indicateurs de contamination fécale est de plus en plus contestée, en raison de l'hétérogénéité de ce groupe de bactéries, dont certaines espèces peuvent être d'origine hydrique ou tellurique. En revanche, l'espèce *Escherichia coli*, qui appartient au groupe des coliformes fécaux, semble être l'un des meilleurs indicateurs d'un risque sanitaire potentiel.

Les méthodes de dénombrement des coliformes spécifiées actuellement dans les normes européennes (dénombrements sur milieu gélosé spécifique) montrent qu'après un rejet en milieu naturel, ces bactéries disparaissent rapidement. Pourtant leur dynamique dans les milieux récepteurs est sans doute beaucoup plus complexe, notamment car une partie d'entre elles sont susceptibles d'évoluer vers une stade "actives" (à métabolisme réduit) mais "non cultivables" (c'est-à-dire qu'elles sont incapables de pousser sur milieu gélosé et d'y former une colonie). C'est pourquoi l'une des premières tâches à réaliser dans le cadre de ce programme fut la mise au point de méthodes qui soient alternatives aux dénombrements sur gélose. Les méthodes alternatives proposées ici sont des méthodes enzymatiques, qui constituent l'un des outils majeurs par lesquels sont et seront évalués les différents facteurs de contrôle de la dynamique des bactéries fécales en rivière. Ces études de processus devraient permettre de remplir l'objectif final du programme "bactéries fécales" de la troisième phase du PIREN-Seine, qui est de développer un modèle mathématique de la contamination fécale des rivières du bassin de la Seine, qui permette de hiérarchiser les actions à mener afin d'aboutir à une amélioration de la qualité bactériologique des eaux.

1. Développement d'une méthode enzymatique pour le dénombrement d'*Escherichia coli*

1.1. Mise au point de la méthode enzymatique.

La méthode originale développée dans ce travail est basée sur la mesure d'une activité enzymatique spécifique du coliforme fécal le plus abondant, *Escherichia coli*: l'activité β -D-glucuronidasique. Initialement, une autre méthode basée sur la mesure d'une activité enzymatique spécifique des coliformes totaux (l'activité β -D-galactosidasique) a aussi été développée et optimisée, mais elle ne sera pas présentée dans ce travail en raison de plusieurs inconvénients, liés à la méthode elle-même (taux d'autohydrolyse important) et à la nature du groupe des "coliformes totaux", un groupe de bactéries très hétérogène, comprenant notamment des bactéries d'origine hydrique ou tellurique dont le rôle d' "indicateurs de contamination fécale" est critiquable.

La méthode enzymatique décrite ici est basée sur la propriété suivante: la β -D-glucuronidase d'*E. coli*, qui hydrolyse naturellement les β -D-glucuronides, peut également hydrolyser des composés artificiels comme le 4-méthylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MU-Glu) et libérer ainsi le produit 4-méthylumbellifère (MUF) fluorescent, qui est détecté par spectrofluorimétrie (Fig. 1).

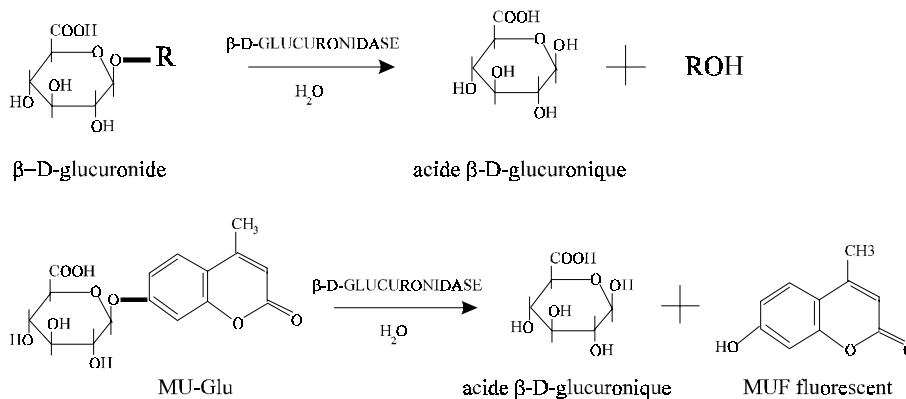


Figure 1. Hydrolyse des β -D-glucuronides et du MU-Glu par la β -D-glucuronidase. Les liaisons hydrolysées par l'enzyme sont figurées en gras.

Le principe de cette méthode est d'ajouter aux bactéries d'un échantillon naturel, retenues par filtration sur une membrane de $0.2 \mu\text{m}$ de porosité, du MU-Glu pour détecter *E. coli*, et de mesurer une vitesse d'apparition totale de la fluorescence dans le milieu de réaction, à laquelle on soustrait le taux d'autohydrolyse du substrat dans les mêmes conditions de réaction mais en l'absence de bactéries. La valeur résultant de cette soustraction représente la vitesse de production du produit fluorescent par l'activité enzymatique d'*E. coli* et est, dans des conditions standards, proportionnelle à la quantité d'enzymes présents dans l'échantillon, donc au nombre d' *E. coli* si la quantité d'enzymes par bactérie est constante (Fig. 2).

Cette méthode ne comporte aucune étape de mise en culture et permet ainsi un gain de temps considérable par rapport aux méthodes classiques d'incubation sur milieu gélosé (temps de réponse compris entre 24 et 48h), puisqu'elle donne une réponse en 20 à 30 minutes.

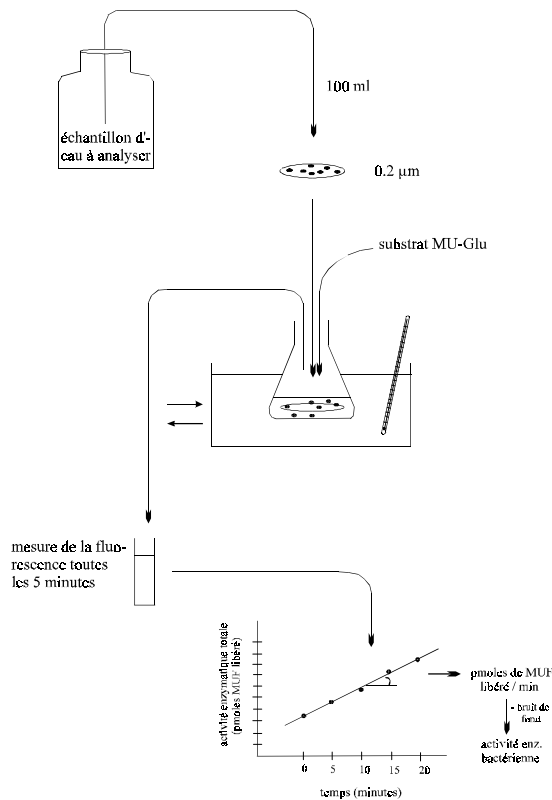


Figure 2. Principe des mesures de l'activité glucuronidasique sans passage par une mise en culture

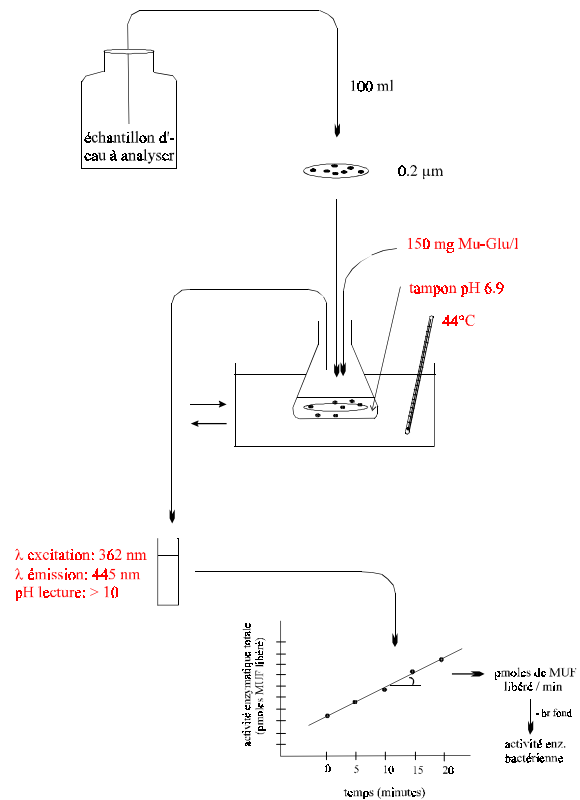


Figure 3. Protocole définitif de mesure de l'activité glucuronidasique dans les eaux douces.

Le protocole expérimental de cette méthode, proposé par Fiksdal *et al.* (1994) pour les milieux côtiers, a été ici adapté aux eaux douces de surface. Dans un premier temps, les différentes étapes du protocole ont été optimisées pour les eaux douces, c'est-à-dire les paramètres relatifs à la réaction enzymatique elle-même (pH et température de réaction, concentration en substrat) et ceux relatifs à la lecture de la fluorescence (longueurs d'onde d'émission et d'excitation, et pH de lecture de la fluorescence).

Une série d'expériences ont d'abord permis d'optimiser les paramètres relatifs à la lecture de fluorescence. L'optimisation des paramètres relatifs à la réaction enzymatique a ensuite été réalisée sur plusieurs échantillons naturels de richesse variable en bactéries fécales. Pour chaque échantillon, l'activité glucuronidasique a été mesurée à différents pH et exprimée en pourcentage de l'activité maximale (Fig. 4). De même, l'activité glucuronidasique a été mesurée pour chaque échantillon à différentes températures de réaction et exprimée en pourcentage de la valeur maximale (Fig. 5). Ces figures montrent que l'activité glucuronidasique est maximale à pH 6.9 et à 44°C. L'activité glucuronidasique a également été mesurée à différentes concentrations en substrat sur deux échantillons

de richesses très différentes en coliformes (Fig. 6), ce qui nous a permis de fixer une concentration en MU-Glu utilisée par la suite en routine (150 mg/l), qui permette de mesurer une activité enzymatique proche du maximum tout en évitant un gaspillage de substrat.

Le protocole expérimental définitif utilisé pour le contrôle bactériologique des eaux douces de surface par la méthode enzymatique est présenté à la Fig. 3.

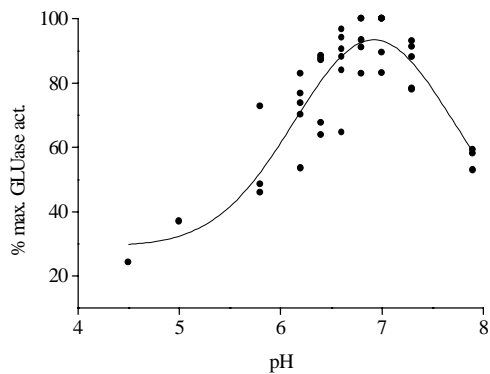


Figure 4. Influence du pH sur l'activité β -D-glucuronidase (GLUase act.)

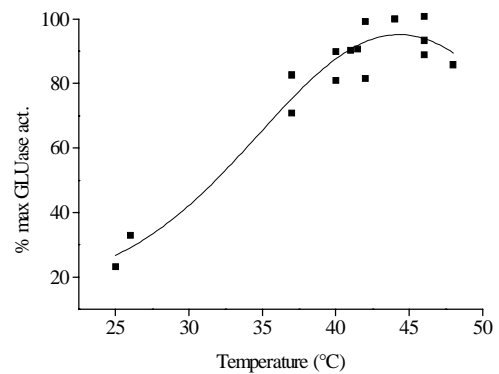


Figure 5. Influence de la température sur l'activité β -D-glucuronidase (GLUase act.)

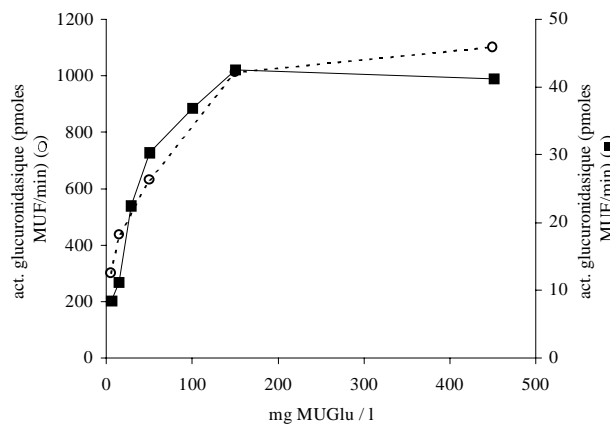


Figure 6. Relation entre l'activité β -D-glucuronidase et la concentration en MU-Glu sur un échantillon riche en coliformes (○) et sur un échantillon pauvre en coliformes (■).

D'autre part, comme la β -D-glucuronidase est une enzyme inductible, il fallait s'assurer, pour que la méthode enzymatique telle que décrite ci-dessus soit une alternative valable aux dénombrements sur gélose, que cette enzyme était bien induite dans les eaux douces de surface, quelque soit la teneur en

bactéries fécales de celles-ci. Un inducteur non compétitif, le méthyl- β -D-glucuronide (MetGlu), a été utilisé dans ce but et ajouté à plusieurs échantillons naturels, à différentes concentrations (Fig. 7). Cette expérience montre qu'il n'y a pas d'effet marqué de l'inducteur sur l'activité glucuronidasique d'*E.coli* des milieux naturels. Il semble donc que cette enzyme soit déjà induite dans les environnements naturels, ce qui nous a permis d'utiliser le protocole décrit précédemment sans ajouter d'étape d'induction, et ce quelque soit la concentration en bactéries fécales de l'eau analysée.

Enfin, une expérience a été réalisée afin de tester la spécificité de la méthode enzymatique, c'est-à-dire vérifier si, dans les eaux douces, des bactéries non coliformes contribuent significativement ou non aux mesures d'activité glucuronidasique. Cette expérience consistait à rajouter des quantités croissantes de bactéries issues d'échantillons naturels (n'appartenant pas au groupe des coliformes fécaux) à une eau naturelle réceptrice contenant des coliformes fécaux et à mesurer l'activité glucuronidasique de l'eau réceptrice après les différents ajouts. L'activité glucuronidasique n'a pas augmenté pas suite à l'ajout de bactéries autochtones, ce qui semble attester du caractère spécifique de la méthode enzymatique.

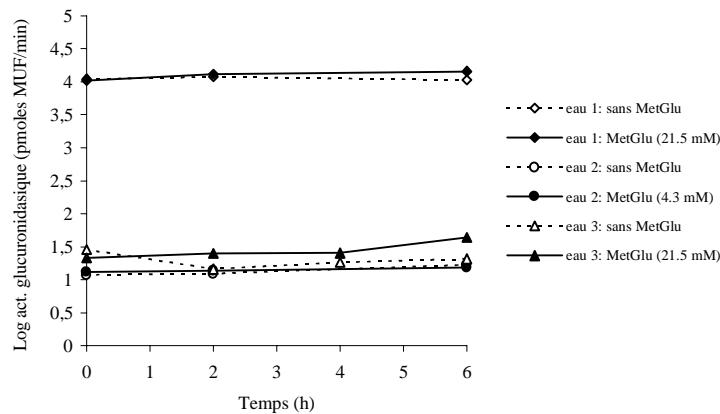


Figure 7. Effet de l'inducteur MetGlu à différentes concentrations sur l'activité glucuronidasique d'échantillons d'eau douce diversément chargés en bactéries fécales. Les mesures d'activité glucuronidasique ont été effectuées après différents temps d'incubation en présence de l'inducteur.

1.2. Comparaison de la méthode enzymatique basée sur la présence de β -D-glucuronidase chez *Escherichia coli* avec des dénombrements de coliformes fécaux sur milieu gélosé spécifique.

Sur un large éventail d'eaux douces diversément contaminées en coliformes fécaux (Fig. 8), des mesures d'activité glucuronidasique ont été effectuées en parallèle avec la méthode de référence de dénombrement des coliformes fécaux sur milieu gélosé spécifique (gélose lactosée au Tergitol et TTC, norme AFNOR 1985). Les eaux testées vont de petits ruisseaux forestiers bactériologiquement peu ou pas contaminés à des rivières en aval de rejets urbains. La relation présentée à la Fig. 8 est en échelle logarithmique, en raison de la très large gamme d'eaux testée.

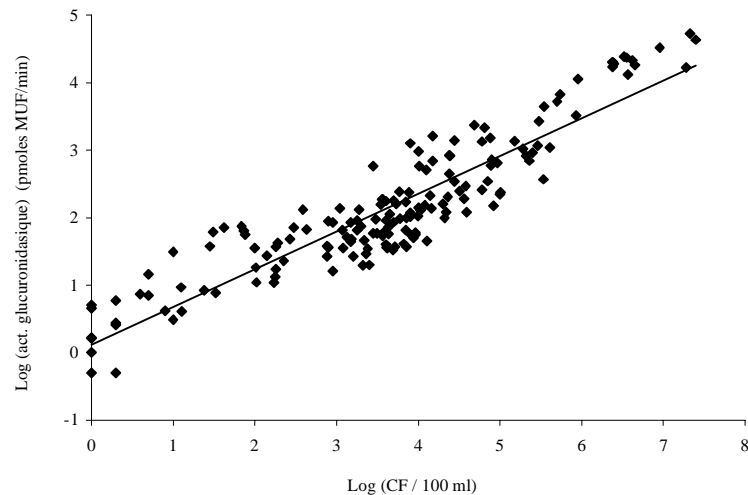


Figure 8. Relation en coordonnées logarithmiques entre les mesures d'activité β -D-glucuronidasique et les dénombrements sur gélose de coliformes fécaux, effectués sur une large gamme d'eaux de surface. Droite de régression: $\text{Log (act glucuronidasique)} = 0.56 * \text{Log (CF/100 ml)} + 0.12$ ($r^2 = 0.84$, $n = 164$, $p < 0.001$).

Il existe une bonne régression linéaire en échelle logarithmique entre l'activité glucuronidasique et le nombre de coliformes fécaux dénombrés sur gélose. Si l'on considère un seuil de détection de la méthode égal à trois fois le taux d'autohydrolyse du substrat, ce seuil vaut en moyenne 8.47 ± 0.99 pmoles MUF/min, ce qui correspond suivant la relation de la figure à 28 ± 6 coliformes fécaux dénombrés sur gélose/100 ml. Cette méthode enzymatique est donc suffisamment sensible pour être applicable pour le contrôle des eaux de surface destinées à la production d'eau alimentaire par les traitements A2 (valeur guide: 2000 CF/100 ml) et A3 (valeur guide: 20000 CF/100 ml) et à la baignade (norme guide: 100 CF/100 ml; norme impérative: 2000 CF/100 ml).

2. Application de la méthode enzymatique au bassin hydrographique de la Seine

Deux campagnes d'échantillonnage ont été réalisées sur le bassin de la Seine en mars et en septembre 1998 (sur la Seine, la Marne et l'Oise). Au cours de ces campagnes des mesures d'activité glucuronidasique ont été réalisées sur une série de points de prélèvements, en parallèle avec des dénombrements de coliformes fécaux dénombrés sur milieu gélosé spécifique (gélose lactosée au Tergitol et TTC) (Fig. 9)

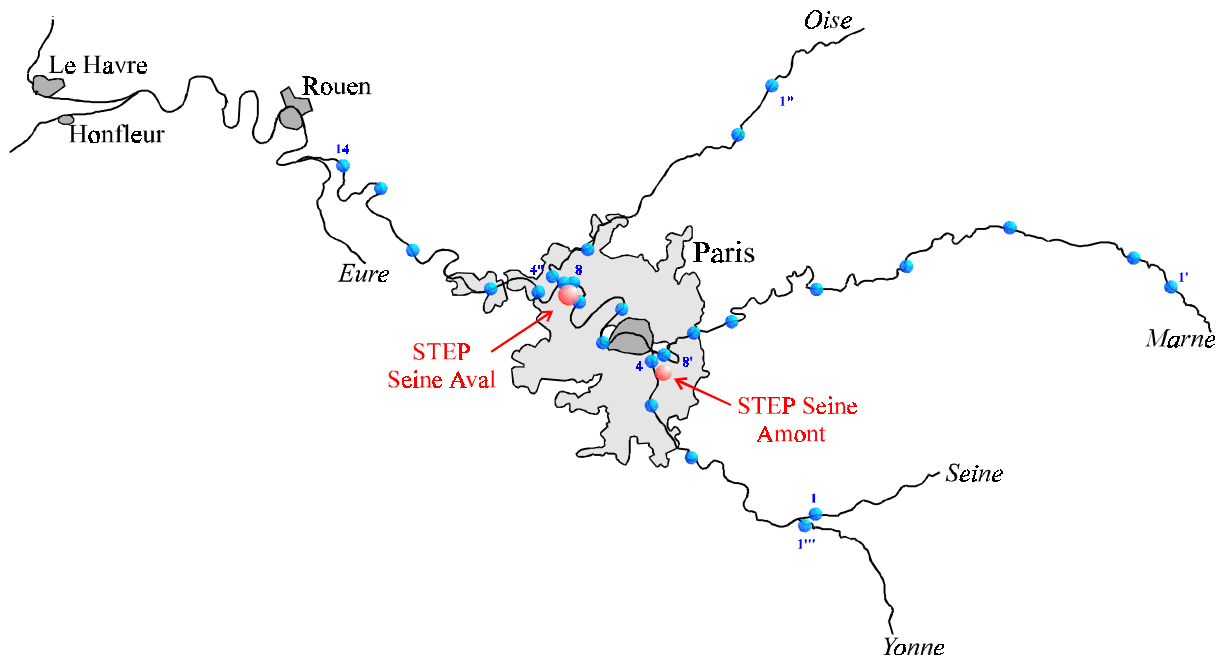


Fig. 9. Représentation schématique de la portion du bassin de la Seine échantillonnée lors des campagnes de mars et septembre 1998. STEP = Station d'épuration.

Les résultats des campagnes, présentés à la figure 10, révèlent une qualité bactériologique de la Marne, de l'Oise et de la Seine en amont de l'agglomération parisienne assez médiocre. Aux prises d'eau des usines de production d'eau potable, les teneurs en bactéries fécales sont de l'ordre de grandeur de celles des normes pour les eaux de surface destinées à la production d'eau alimentaire par le traitement le plus poussé (traitement A3).

Ces figures montrent très nettement l'influence des rejets, dans la Seine, des effluents de la station d'épuration Seine Aval à Achères (capacité de temps sec: $2.1 \cdot 10^6$ m³/j) et dans une moindre mesure de celle de Seine Amont à Valenton (capacité de temps sec: $3 \cdot 10^5$ m³/j) sur les teneurs en bactéries fécales du fleuve (Fig. 10: points 4 et 8). En aval des rejets, on observe une chute assez rapide des teneurs en bactéries fécales dans l'eau de Seine. Par exemple, en aval d'Achères, sur 130 km (c'est à dire jusqu'à Poses), le dénombrements de coliformes fécaux chutent d'environ 275 fois et l'activité glucuronidasique d'environ 65 fois (moyenne des deux campagnes). Divers mécanismes contribuent à la diminution rapide de la teneur en bactéries fécale dans la colonne d'eau de la rivière.

- la dilution des eaux de la Seine par ses affluents, moins chargés en bactéries fécales: la Marne, qui conflue avec la Seine en aval de la station Seine Amont, et l'Oise, qui conflue avec la Seine en aval de la station Seine Aval (Tableau 1)

Tableau 1. Teneurs en coliformes fécaux dénombrés sur gélose(par 100 ml d'eau), de la Seine et de ses différents affluents en amont des points de confluence.

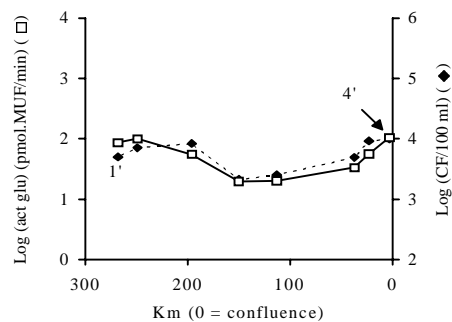
confluence Seine-Marne	confluence Seine-Oise
------------------------	-----------------------

campagne mars 1998	Seine (Port à L'Anglais): $3.4 * 10^5$	Seine (Conflans): $2.9 * 10^5$
	Marne (Joinville-le-Pont): $9.9 * 10^3$	Oise (Conflans): $7 * 10^3$
campagne septembre 1998	Seine (Port à l'Anglais): $2.2 * 10^4$	Seine (Conflans): $10.2 * 10^5$
	Marne (Joinville-le-Pont): $1.3 * 10^4$	Oise (Conflans): $5.4 * 10^3$

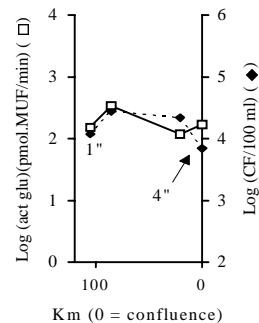
- le broitage par les protozoaires. Une technique permettant d'évaluer son importance comme facteur de disparition des bactéries fécales en rivière consiste à introduire des bactéries fécales dont l'ADN a été marqué à la thymidine tritiée dans de l'eau de rivière (avec et sans protozoaires) et à suivre en "batch" la décroissance de la radioactivité associée à l'ADN de ces bactéries (Garcia-Lara *et al.* 1991, Menon 1993, Servais et Menon 1991). Cette technique permet d'estimer la mortalité des bactéries fécales en eau de rivière ainsi que la part de cette mortalité due au broitage par les protozoaires. Quelques expériences réalisées en 1997 et 1998 sur la Seine et la Marne montrent que le broitage par les protozoaires est responsable de 20 à 65% de la mortalité des bactéries en rivière, ce qui est en accord avec les résultats précédemment obtenus en Seine par Menon (Menon 1993, Menon *et al.* 1998)
- la sédimentation des bactéries fécales avec les matières en suspension auxquelles elles pourraient être accrochées. Afin de tester la relation entre les bactéries fécales et les matières en suspension (MES), des mesures d'activité glucuronidasique ont été réalisées, sur différents échantillons de la campagne de septembre 1998, dans la fraction retenue sur filtre de 5 µm de porosité (cette fraction étant supposée contenir les bactéries "attachées"). Ces mesures ont été comparées aux mesures d'activité glucuronidasique sur l'eau brute des mêmes échantillons. Dans la gamme de MES principalement rencontrée lors de cette campagne (3 à 10 mg/l), l'activité glucuronidasique dans la fraction > 5 µm représentait en moyenne 37 ± 21 % de l'activité glucuronidasique de l'échantillon brut. Bien que ce pourcentage soit très variable, il semble néanmoins que même pour des teneurs en MES ≤ 10 mg/l, la fraction des coliformes fixés aux MES soit non négligeable. Ce type d'expériences mériterait d'être finement investiguée dans des eaux du bassin plus riches en MES.
- la lyse des bactéries fécales, spontanée ou induite par des bactériophages. Ce point n'a jusqu'à présent fait l'objet d'aucune étude dans le cadre de ce travail.

Mars 1998

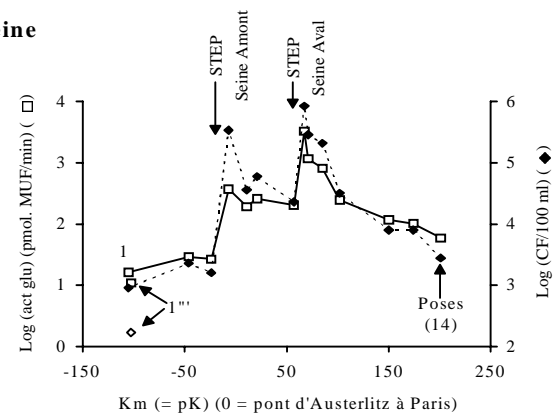
Marne



Oise

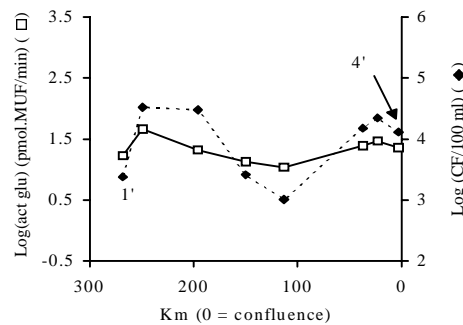


Seine

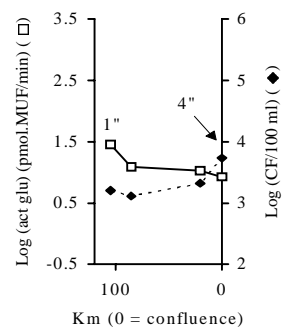


Septembre 1998

Marne



Oise



Seine

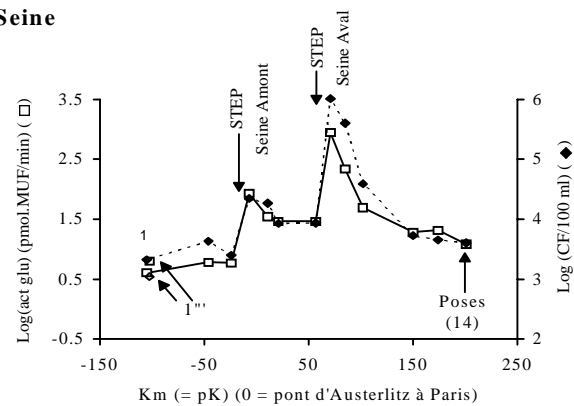


Fig 10. Abondance des coliformes fécaux dénombrés sur milieu gélosé spécifique (CF) et activité glucuronidase (act.glu) par 100 ml d'échantillon à différentes stations du bassin hydrographique de la Seine en mars et septembre 1998. STEP = station d'épuration.

Comme mentionné précédemment, en aval d'un apport ponctuel important de bactéries fécales, la chute des dénombrements sur gélose de coliformes fécaux est beaucoup plus importante que celle des mesures d'activité glucuronidasique. Ceci pourrait s'expliquer par la prise en compte par la méthode enzymatique de bactéries fécales qui gardent leur activité glucuronidasique mais qui perdent leur cultivabilité pendant leur transport avec les masses d'eau vers l'aval. Le processus de perte de cultivabilité a été maintes fois démontré dans la littérature lorsqu'on introduit des bactéries fécales dans les eaux naturelles (Barcina *et al.* 1989, Colwell *et al.* 1985, Davies *et al.* 1995, Grimes et Colwell 1986, Pommepuy *et al.* 1996, Roszack et Colwell 1987), et il est plausible que cette perte de cultivabilité soit le résultat d'un stress nutritionnel tel que celui rencontré par les bactéries fécales lorsqu'elles sont rejetées d'une eau usée dans un milieu aquatique beaucoup moins riche en matière organique. Plusieurs expériences ont été réalisées en laboratoire afin d'évaluer si des conditions de stress environnemental pouvaient mener à l'apparition en rivière de bactéries actives (présentant une activité glucuronidasique détectable) mais incapables de pousser sur milieu gélosé spécifique et d'y former une colonie. Elles consistaient à introduire une souche d' *E.coli* (mise en culture en milieu riche) dans une eau de rivière filtrée sur 0.2 µm et autoclavée, et à suivre en batch les bactéries par microscopie à épifluorescence, par dénombrement sur milieu gélosé et par mesure de leur activité glucuronidasique. Les résultats d'une de ces expériences sont présentés aux Fig. 11a et 11b.

Le nombre de cellules morphologiquement intactes (comptage par microscopie à épifluorescence) reste constant pendant les deux expériences effectuées en parallèle. L'activité glucuronidasique reste stable pendant l'expérience au noir alors que les dénombrements sur gélose diminuent, ce qui indique le passage d'une partie de la population d' *E.coli* vers un état actif mais non cultivable. La lumière a un effet négatif sur l'activité glucuronidasique des cellules (Fig 11b), mais accentue également la perte de cultivabilité par rapport au microcosme à l'obscurité, de telle manière que la différence entre le taux de décroissance de l'activité glucuronidasique et des dénombrements sur gélose est plus grande dans le microcosme à la lumière, ce qui montre que la transition vers un état actif mais non cultivable est favorisée par la lumière. En conclusion, ce type d'expériences montre qu'il est possible, lorsqu'on simule un rejet de bactéries fécales en rivière, de générer des bactéries qui gardent leur activité glucuronidasique mais qui perdent leur capacité à se multiplier sur milieu gélosé. L'apparition de ces bactéries actives mais non cultivables (BANC) a principalement lieu les premiers jours après le rejet, et semble être accentuée par un stress lumineux.

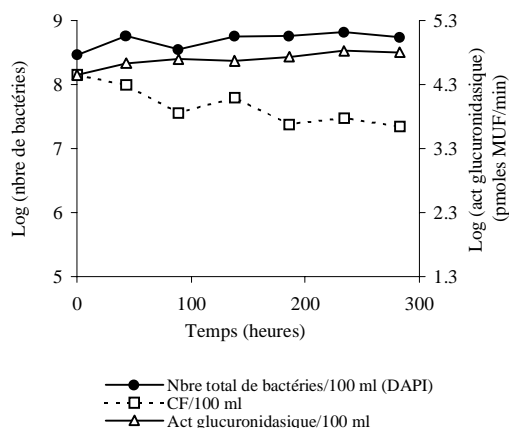


Fig 11a. *Devenir en microcosme d'E.coli rejetés dans de l'eau de Marne (Neuilly-s-Marne; 15.06.98) stérile et incubée à 20 °C à l'obscurité*

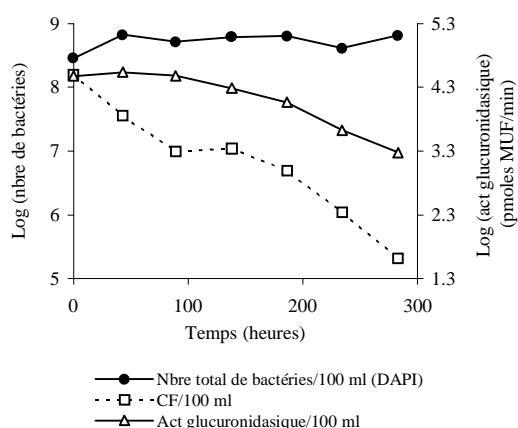


Fig 11b. *Devenir en microcosme d'E.coli rejetés dans de l'eau de Marne (Neuilly-s-Marne; 15.06.98) stérile et incubée à 20°C à la lumière (cycle nyctéméral avec 8 heures de lumière)*

L'existence de ces BANC pourrait expliquer la pente inférieure à l'unité de la relation entre l'activité glucuronidasique et les dénombrements sur gélose des coliformes fécaux en coordonnées logarithmiques à la Fig. 8. Le coefficient angulaire de cette pente (0.56) signifie que l'activité glucuronidasique par coliforme cultivable est plus importante dans les milieux peu chargés en coliformes que dans les milieux bactériologiquement très pollués. Ceci pourrait être dû à une importante sous-estimation des concentrations en bactéries fécales dans les milieux pauvres en coliformes, due à l'existence dans ces milieux de grosses quantités de bactéries actives mais non-cultivables. En effet, ces milieux sont souvent aussi les plus pauvres en matière organique, ce qui favorise probablement l'apparition de BANC.

3. Conclusion

Cette année, le travail réalisé sur les bactéries fécales dans le cadre du PIREN-Seine a consisté à la mise au point méthodologique d'une méthode enzymatique de détection des bactéries et à son application aux eaux de la Seine et de ses affluents majeurs. Un avantage majeur de cette méthode par rapport aux méthodes classiques de dénombrement est, outre sa rapidité, la possible prise en compte de bactéries fécales qui gardent leur activité enzymatique mais qui, suite aux stress rencontrés dans les environnements naturels, ne poussent plus sur milieux de culture. Nos prochains objectifs seront l'étude de certains aspects de la dynamique des bactéries fécales rejetées en rivière (réalisée notamment à l'aide de la méthode enzymatique), ainsi qu'une meilleure identification des différentes sources de contamination fécale à l'échelle du bassin.

4. Références bibliographiques

- BARCINA I., GONZALES J.M., IRIBERRI J., and L. EGEA. 1989. Effect of visible light on progressive dormancy of *Escherichia coli* cells during the survival process in natural fresh water. *Applied and Environmental Microbiology*. **55** (1):246-251.
- COLWELL R.R., BRAYTON P.R., GRIMES D.J., ROSZACK D.B., HUQ S.A. AND L.M. PALMER. 1985. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered micro-organisms. *Biotechnology*. **3**: 817-820.
- DAVIES C.M., APTE S.C. and S.M. PETERSON . 1995. B-Galactosidase activity of viable, non culturable coliform bacteria in marine waters. *Letters in applied Microbiology*. **21**: 99-102.
- FIKSDAL L., POMMEPUY M., CAPRAIS M. & I. MIDTTUN. 1994. Monitoring of Fecal Pollution in Coastal Waters by Use of Rapid Enzymatic Techniques. *Applied and Environmental Microbiology*. **60** (5): 1581-1584.
- GARCIA-LARA J., MENON P., SERVAIS P. and G. BILLEN. 1991. Mortality of faecal bacteria in seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**: 885-888.
- GRIMES D.J. & R.R. COLWELL. 1986. Viability and Virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. *FEMS Microbiological Letters*. **34**: 161-165.
- MENON P. 1993. Mortalité de bactéries allochtones rejetées en milieu aquatique. *Thèse de doctorat de l'Université de Paris VI*.
- MENON P., SERVAIS P. & G.BILLEN. Mortality rate of allochthonous bacteria in natural aquatic ecosystems. *Submitted to Aquatic Microbial Ecology*.
- Norme AFNOR NF T 90-414. Octobre 1985. Essai des Eaux - Recherche et dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants - Méthode générale par filtration sur membrane.
- POMMEPUY. M.L., FIKSDAL L., GOURMELON M., MELIKECHI H., CAPRAIS M.P., CORMIER M. and R.R. COLWELL. 1996. Effect of seawater on *Escherichia coli* β -galactosidase activity. *Journal of Applied Bacteriology*. **81**: 174-180.
- ROSZAK D.B. & R.R COLWELL. 1987. Metabolic Activity of Bacterial Cells Enumerated by Direct Viable Count. *Applied and Environmental Microbiology*. **53** (12): 2889-2983.
- SERVAIS P. and P. MENON 1991. Fate of autochthonous and fecal bacteria in marine ecosystems. *Kieler Meeresforsch.* **8**:290-296.

Sommaire  général

**Introduction du thème 4 :
Micro-organismes et matière organique**

**Encore un effort du côté de la dégradation de la matière
organique**

**Caractérisation des groupes bactériens fonctionnels dans le
continuum "réseau d'assainissement/Step/milieu récepteur**

**Nouvelles méthodes pour l'étude des bactéries fécales appliquées
au bassin de la Seine**

Site urbain amont : Troyes