

Utilisation des activités exoenzymatiques microbiennes dans l'étude d'écosystèmes aquatiques

Use of microbial exoenzymatic activities in aquatic ecosystems studies

B. Montuelle et B. Volati

Volume 6, numéro 3, 1993

URI : <https://id.erudit.org/iderudit/705175ar>

DOI : <https://doi.org/10.7202/705175ar>

[Aller au sommaire du numéro](#)

Éditeur(s)

Université du Québec - INRS-Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE)

ISSN

0992-7158 (imprimé)

1718-8598 (numérique)

[Découvrir la revue](#)

Citer cet article

Montuelle, B. & Volati, B. (1993). Utilisation des activités exoenzymatiques microbiennes dans l'étude d'écosystèmes aquatiques. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, 6(3), 251–268. <https://doi.org/10.7202/705175ar>

Résumé de l'article

Les activités exoenzymatiques participent de façon importante à la transformation des composés organiques dans les milieux aquatiques, en particulier par hydrolyse de composés à haut poids moléculaire qui sont réduits en monomères ou en petits oligomères assimilables par les bactéries. Cette étape est un processus clé dans le fonctionnement de la boucle microbienne. De nature très diverse, les exoenzymes ont une localisation variable selon le Gram de la bactérie ; leur régulation se situe soit au niveau de leur synthèse, soit au niveau de l'expression de leur activité. Bien que certaines exoenzymes soient constitutives, l'inductibilité semble être le mode de fonctionnement le plus fréquent. L'intégration de ce processus dans des études globales sur le potentiel hydrolytique de milieux aquatiques nécessite quelques précautions dans la réalisation expérimentale et dans l'interprétation des données : variabilité intrinsèque différente selon l'exoenzyme considérée (de 7 % pour la glucosidase à 16 % pour la phosphatase), variabilité géographique importante (pouvant atteindre +/- 50 % à un mètre de distance) dans les milieux sédimentaires, ce qui nécessite la connaissance topographique du milieu étudié et la définition d'une stratégie d'échantillonnage préalable. Les méthodologies de prélèvements, en particulier en sédiments ou en substratums grossiers, présentent une certaine complexité de mise en oeuvre que n'ont pas, au moins à faible échelle, les prélèvements en colonne d'eau (hétérogénéité du milieu à l'échelle centi- voire millimétrique, densité de population très variable, diffusion de substrat nutritifs,...). Une standardisation du protocole expérimental est proposé.

Dans l'optique d'études sur les capacités d'assimilation et de biodégradation de matière organique des systèmes aquatiques, les données d'activités exoenzymatiques nécessitent d'être couplées à d'autres mesures biologiques ou biochimiques : biomasse bactérienne et/ou phytoplanctonique (en particulier pour la phosphatase), analyse fine de la matière organique assimilable (par exemple, par classes : lipides, glucides, protides, dans leurs fractions dissoutes et particulaires).

Utilisation des activités exoenzymatiques microbiennes dans l'étude d'écosystèmes aquatiques

Use of microbial exoenzymatic activities in aquatic ecosystems studies

B. MONTUELLE¹, B. VOLAT¹

Reçu le 1^{er} septembre 1992, accepté le 1^{er} juin 1993*.

SUMMARY

Exoenzymes play an important role in the transformation of organic compounds in aquatic environments : these biomolecules convert high molecular weight compounds by hydrolysis into monomeric or oligomeric compounds that are then assimilable by bacteria. This step is a key process in the microbial food web and microorganisms that produce exoenzymes are probably good competitors in aquatic environments.

The different exoenzymes are located in different places on the cell membrane with respect to the bacterial cell wall type : exoenzymes of the gram negative bacteria are rather located on the outside of the cytoplasmic membrane or in the periplasm. Their regulation can be either at the level of exoenzyme synthesis or at the level of enzymatic expression. Their activity is generally described with a Michaelis-Menten equation. Most exoenzymes are inducible (phosphatase), but some are constitutive (aminopeptidase).

The use of exoenzyme methods in the aquatic environment needs some care, both during application and interpretation. The intrinsic variability of enzyme activity differs with the type of exoenzyme : the more the activity is inducible, the higher is its variability : e. g. phosphatase (inducible : 16 %) in comparison with glucosidase (constitutive : 7 %). Experimental enzymatic substrates are in fact « model » molecules that are supposed to have the same behaviour as « natural » substrates : this is not always true.

Spatial variability is also important in sedimentary environments : significant variations in activity exist, especially with depth and stratification of sediment, at a scale of 1 – 10 cm (\pm 50 %). A topographic knowledge of the studied environment and the definition of a suitable sampling strategy are thus very important. Sampling methodologies in sediment, silt or coarse substrates are more difficult to set up than are those for the water column (heterogeneous environment at the centimetre scale, variation of microbial population density, nutrient

1. CEMAGREF, Division Biologie des Ecosystèmes Aquatiques, 3 quai Chauveau, 69336 Lyon Cedex 09.

* Les commentaires seront reçus jusqu'au 31 mars 1994.

diffusion, gradients). The sampling of sediments with a corer, and the subsequent fractionation of the sediment into different layers for incubation in the laboratory, may modify the physicochemistry of the sediment and could influence bacterial activity (experimental artefact). A technique has been developed for incubation inside the corer in order to minimize perturbations but this technique is limited by the sediment granulometry. Conversely, homogenization of sediments allows a better standardization of experiments and yields more reproducible results.

For studies on the assimilation capacity of aquatic ecosystems and biodegradation of organic matter, exoenzymatic activities data need to be associated with other biological or biochemical parameters : bacterial and/or phytoplanktonic biomass ; precise analysis of assimilable organic matter in the particulate or dissolved phases ; physicochemical data... Data concerning the modelling of exoenzyme activities in relation to parameters such as temperature or oxygen level are lacking. Integration of these data will afford a better overall understanding of the role of exoenzymes in the metabolism of aquatic environments, and will help establish the limits of the validity of this technique for global studies of the assimilation capacities and organic matter biodegradation in aquatic ecosystems.

Key-words : *Aquatic ecosystems, hydrolytic potential, biodegradation, exoenzyme, microbial activity.*

RÉSUMÉ

Les activités exoenzymatiques participent de façon importante à la transformation des composés organiques dans les milieux aquatiques, en particulier par hydrolyse de composés à haut poids moléculaire qui sont réduits en monomères ou en petits oligomères assimilables par les bactéries. Cette étape est un processus clé dans le fonctionnement de la boucle microbienne. De nature très diverse, les exoenzymes ont une localisation variable selon le Gram de la bactérie ; leur régulation se situe soit au niveau de leur synthèse, soit au niveau de l'expression de leur activité. Bien que certaines exoenzymes soient constitutives, l'inductibilité semble être le mode de fonctionnement le plus fréquent. L'intégration de ce processus dans des études globales sur le potentiel hydrolytique de milieux aquatiques nécessite quelques précautions dans la réalisation expérimentale et dans l'interprétation des données : variabilité intrinsèque différente selon l'exoenzyme considérée (de 7 % pour la glucosidase à 16 % pour la phosphatase), variabilité géographique importante (pouvant atteindre +/- 50 % à un mètre de distance) dans les milieux sédimentaires, ce qui nécessite la connaissance topographique du milieu étudié et la définition d'une stratégie d'échantillonnage préalable. Les méthodologies de prélèvements, en particulier en sédiments ou en substrats grossiers, présentent une certaine complexité de mise en œuvre que n'ont pas, au moins à faible échelle, les prélèvements en colonne d'eau (hétérogénéité du milieu à l'échelle centi- voire millimétrique, densité de population très variable, diffusion de substrat nutritifs,...). Une standardisation du protocole expérimental est proposée.

Dans l'optique d'études sur les capacités d'assimilation et de biodégradation de matière organique des systèmes aquatiques, les données d'activités exoenzymatiques nécessitent d'être couplées à d'autres mesures biologiques ou biochimiques : biomasse bactérienne et/ou phytoplanctonique (en particulier pour la phosphatase), analyse fine de la matière organique assimilable (par exemple, par classes : lipides, glucides, protides, dans leurs fractions dissoutes et particulaires).

Mots clés : *Ecosystème aquatique, potentiel hydrolytique, exoenzymes, activité microbienne.*

1 - INTRODUCTION

Les matières organiques (MO) non vivantes présentes dans les environnements aquatiques proviennent de deux sources : d'origine autochtone, elles résultent de l'activité autotrophe, essentiellement phytoplanctonique (lyse, excrétion) ; d'origine allochtone, elles proviennent d'apports telluriques (ruissellements, apports diffus de bassins versants) ou d'effluents d'origine anthropique (rejet de station d'épuration, eaux résiduaires non traitées).

Leur composition, exprimée en terme de nature biochimique de leurs composés (lipides, glucides, protides, composés humiques, ...) est très variable et présente des degrés de biodégradabilité très différents. Dans un système à l'équilibre, les biocénoses sont adaptées à la composition biochimique de leur environnement. Lors d'une modification dans la composition et la quantité de matières organiques et des nutriments minéraux de ce système, le métabolisme des biocénoses tend à s'adapter plus ou moins rapidement. Ces changements sont particulièrement étudiés dans les phénomènes d'autoépuration ou de capacité assimilatrice des milieux aquatiques (FONTVIELLE, 1987 ; SERVAIS, 1987).

Les micro-organismes hétérotrophes contrôlent l'essentiel des transformations de matière organique car ils sont la seule population capable de dégrader significativement matière organique dissoute (MOD) et matière organique particulaire (MOP). Le concept de boucle microbienne (AZAM *et al.*, 1983) a mis en évidence la contribution des microhétérotrophes à un transfert d'énergie, de carbone, d'azote vers les niveaux trophiques supérieurs (prédation par les protozoaires), ainsi qu'à une recirculation très importante de composés minéraux et organiques vers le stock abiotique et le stock MO, depuis la boucle microbienne.

Les bactéries hétérotrophes n'utilisent que les formes facilement utilisables de la MOD, monomères ou petits polymères tels que acides aminés, oligosaccharides, acides organiques, qui pénétreront dans les cellules grâce à des enzymes perméases (les phénomènes de phago- ou de pinocytose étant réservés aux Eucaryotes). Les composés de haut poids moléculaire doivent subir des hydrolyses exoenzymatiques pour pouvoir devenir assimilables et concourir à l'activité organotrophe : production de biomasse, respiration. La biomasse bactérienne sera recyclée dans le stock de MO à sa mort (lyse cellulaire) ou consommée par les niveaux trophiques supérieurs. Un schéma conceptuel a été établi, qui illustre cette succession de processus (*fig. 1*) et montre la place des systèmes exoenzymatiques bactériens dans les biotransformations de la matière organique (SERVAIS, 1991).

Les activités exoenzymatiques du compartiment microbien sont donc prépondérantes dans la transformation des composés organiques qu'il s'agisse de leur dégradation, de leur minéralisation ou de leur assimilation (HOPPE, 1991). De nombreuses études récentes prennent en compte ces activités dans différents milieux aquatiques : fleuve (ADMIRAAL & TUBBING, 1991), divers milieux d'eaux douces (BOON, 1989 et 1990 ; JACOBSEN & RAĪ, 1988 ; CHROST

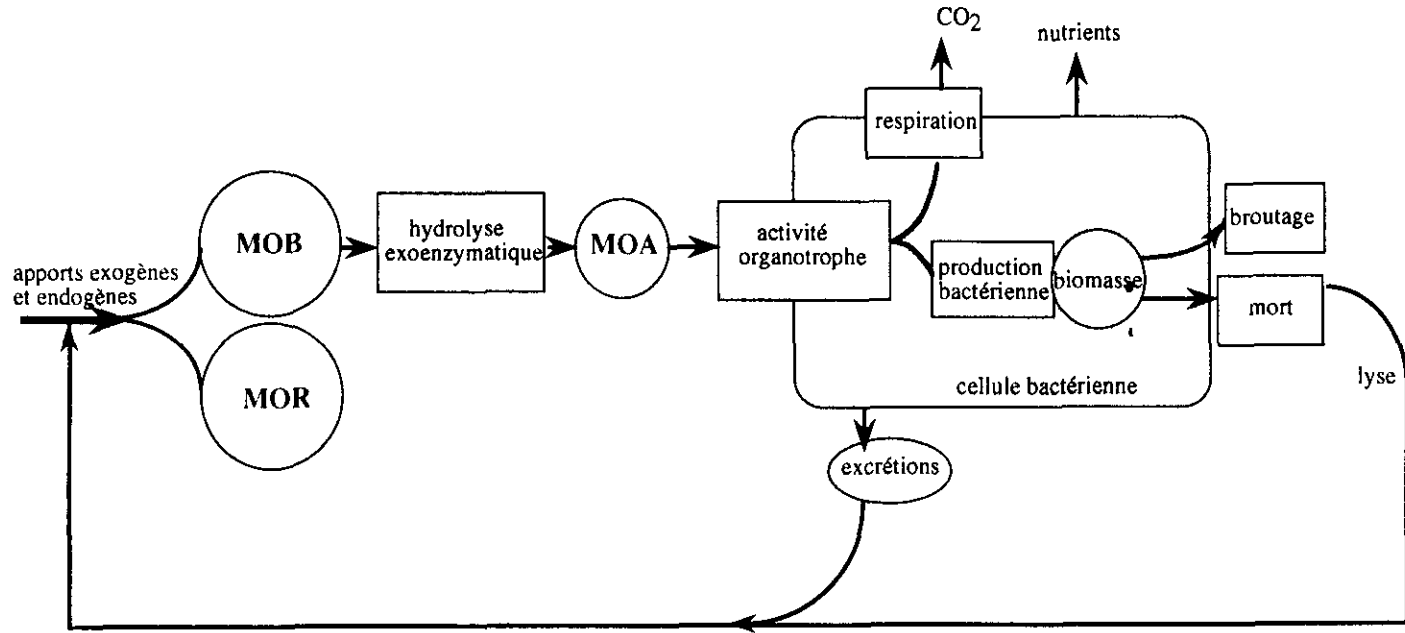


Figure 1 Intégration des processus exoenzymatiques dans la dégradation de la matière organique par des bactéries en milieu aquatique. MOB : matière organique biodégradable ; MOR : matière organique réfractaire ; MOA : matière organique assimilable (modifié d'après SERVAIS, 1991).
Place of exoenzymatic processes in bacterial degradation of organic matter in aquatic environments. MOB : Biodegradable organic matter ; MOR : resistant organic matter ; MOA : assimilable organic matter (SERVAIS, 1991, modified).

et al., 1986 ; CHROST, 1989), ou milieux marins (HERMIN, 1989). Les milieux sédimentaires, ou les substratums benthiques en général, ont été moins exploré (MEYER-REIL, 1990 ; JONES & LOCK, 1989 ; FREEMAN *et al.*, 1990).

Notre objectif est d'évaluer dans quelle mesure ces tests d'activités enzymatiques peuvent rendre compte des capacités d'hydrolyse et de biodégradation de la matière organique dans des milieux dulçaquicoles et comment ils peuvent s'insérer dans une problématique plus générale d'étude du fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Nous avons réalisé différentes séries d'expérimentations au laboratoire et *in situ*, dans divers environnements aquatiques.

2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Mesure des activités exoenzymatiques

Parmi les différentes méthodes utilisées pour mesurer des activités enzymatiques (spectrophotométrie d'absorption, produits marqués,...), la fluorimétrie est la technique la plus répandue. Lorsque les fluorogènes (MéthylUmbelliféron (MUF), β -naphtylamine (β N) et méthyl Coumarine (mC), pour les plus utilisés) sont « greffés » avec un substrat R, ils perdent leur propriété de fluorescence. L'hydrolyse enzymatique de ces molécules greffées, par les enzymes présentes dans l'échantillon étudié, libère le substrat et le fluorogène. Les longueurs d'ondes d'excitation respectives de la MUF, la β N et la mC sont : 365 nm, 340 nm et 380nm ; leurs longueurs d'ondes de réémission sont de 455 nm, 410 nm et 440 nm. Les radicaux R (substrats analogues de l'activité enzymatique) que l'on trouve greffés sur les fluorogènes sont très variés : galactoside, glucoside, phosphate, fucoside, xyloside, leucine,... et sont disponibles dans le commerce.

L'intensité de la fluorescence dépend de la concentration du fluorogène et reflète donc de façon quantitative l'activité de l'enzyme impliquée. La fluorescence d'une molécule est étroitement liée à son environnement : toute modification du milieu d'incubation (pH, concentration en sel, solvant,...) modifie la sensibilité réactionnelle et les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission. Ceci implique une standardisation stricte du protocole opératoire, en particulier pour le pH (MÜNSTER, 1989) et certaines précautions à prendre sont présentés dans le protocole et la discussion.

Nous avons suivi les activités glucosidase (4-MéthylUmbellyFeryl- β -D glucoside), phosphatase (4-MéthylUmbellyFeryl-Phosphate) et aminopeptidase (L-Leucine-4-methyl-coumarinyl-7-amideHCl), dosée sur un fluorimètre Jobin-Yvon Spectrofluor JY 3D.

2.2 Échantillonnage et incubation :

Nous avons étudiés différents milieux : un sédiment d'étang fortement eutrophe (étang de pisciculture dans la région de la Dombes, département de l'Ain), un sédiment de rivière également eutrophe (La Morges en aval de Bourgoin -Jallieu, en Isère) : ces deux milieux sont décrits par ailleurs (MONTUELLE & VOLAT, 1991). Les autres sédiments et graviers étudiés ici proviennent d'une rivière située en Corrèze et correspondent à un milieu dit de référence, c'est-à-dire ne subissant pas de contamination d'origine anthropique (pH : 6,6 ; Conductivité : 45 μ S/cm ; MES < 5mg/l ; COT : 5,4mg/l ; COD : 5,35 mg/l ; NO₂⁻ : 0,03 mg/l ; NO₃⁻ : 3,55 mg/l ; NH₄⁺ <0,02 mg/l ; PO₄³⁻ <0,03mg/l).

– **Échantillonnage terrain** : pour les sédiments et les graviers, les prélèvements se font en 3 points proches (sur un mètre carré environ) et mélangés pour obtenir un seul échantillon ; celui-ci est homogénéisé et réparti en triplicat pour incubation. Pour les échantillons d'eau, nous avons effectué des prélèvements au fil de l'eau.

– **Protocoles d'incubations** : l'incubation des échantillons se fait quelques heures (< 24h pour les échantillons les plus éloignés) après le prélèvement et conservation au froid pendant le transport au laboratoire.

Nous avons standardisé nos protocoles pour définir les conditions opératoires suivantes :

- Détermination préalable de la concentration saturante en substrat analogue pour chaque échantillon considéré (sédiment, gravier ou eau). Ceci est nécessaire pour être au V_{max} de la réaction et indépendant de la concentration en substrat ;

- incubation : pour l'eau, les sédiments et les graviers : pendant 30 minutes à l'obscurité et à 20 °C sous agitation douce ;

- sédiment : ajouter 3 g frais de sédiment à 3 ml de solution substrat dans un tube de polypropylène, homogénéiser. Un échantillon de sédiment est réservé pour calculer son poids sec.

- gravier : 3 g de gravier + 3 ml de solution substrat (diamètre moyen de nos graviers de forme pseudo-sphérique compris entre 4 et 6 mm) ; la surface de chaque échantillon est calculée après incubation en les assimilant à des sphères ;

- eau : 3 ml d'échantillon + 3 ml de solution substrat.

- centrifuger les tubes à incubation (ou le surnageant pour les incubations de graviers) à 10 000 tours, pendant 10 minutes ;

- dans une cuve pour fluorimètre, introduire 1 ml du surnageant, 1 ml d'eau distillée, puis 0,2 ml de tampon pH 10,4 (glycine/soude) ;

- lecture à 365 nm en excitation et 455 nm en émission. Les unités de fluorescence sont transformés en quantité de substrat réduit, après réalisation d'une gamme étalon spécifique à chaque expérimentation. Il est nécessaire que cette gamme étalon soit réalisée avec le milieu étudié (eau de l'échantillon pour les graviers et la colonne d'eau) ou un extrait aqueux du sédiment : ceci intègre les éventuelles modification de fluorescence de la MUF par le milieu (CEMAGREF, données non publiées). Les activités sont exprimées par gramme de sédiment sec et par centimètre carré pour les biofilms.

Les protocoles proposés ici sont discutés par la suite.

3 - RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les exoenzymes apportent un avantage compétitif : *a priori*, les micro-organismes possédant des exoenzymes sont des bons compétiteurs : ils peuvent utiliser une plus grande variété de substrats organiques nutritifs ce qui est un avantage certain dans les milieux pauvres (oligotrophes) et dans les milieux recevant des composés de différentes natures et en quantités variables (rejet de station d'épuration, par exemple). Cette capacité adaptative joue un rôle important dans les phénomènes d'autoépuration. Le temps de réponse à un changement de substrat est de durée variable, selon la nature de ce substrat. KAPLAN & BOTT (1985) ont montré qu'une nouvelle source de matière organique dissoute (en l'occurrence du lisier de bovin) provoque chez les bactéries fixées d'un cours d'eau un changement dans leur activité exoenzymatique et leur biomasse après environ 48 h d'exposition cumulée. Cette activité hydrolytique se maintient jusqu'à 72 heures après disparition du substrat inducteur.

Plusieurs paramètres expliquent les quelques difficultés d'interprétation de l'activité exoenzymatique : sur un plan biochimique, la variabilité due à la nature des enzymes et leur mode de régulation ; sur un plan écologique, les problèmes d'échantillonnage *in situ* et sur un plan expérimental, les techniques d'incubation.

3.1 Cinétiques exoenzymatique et régulation d'activité

Les réactions exoenzymatiques peuvent être généralement décrites par une équation de Michaëlis-Menten (HOPPE, 1983 ; SOMVILLE et BILLEN, 1983) qui relie la concentration en substrat à la vitesse de la réaction :

$$V = \frac{V_{\max}S}{K_m + (S)}$$

avec V : vitesse de la réaction ; V_{\max} : vitesse maximale atteinte à saturation de substrat ; (S) : concentration en substrat ; K_m : constante de Michaëlis (avec $K_m = (S)$ pour $V = V_{\max}/2$).

La vitesse de réaction est proportionnelle à la concentration en substrat lorsque cette dernière est faible (réaction d'ordre 1) et devient constante, indépendante de la concentration en substrat aux fortes concentrations en S (réaction d'ordre 0). L'étude de la cinétique des exoenzymes nécessite de déterminer les concentrations saturantes pour chacune d'entre elles et dans chacun des environnements étudiés, de façon à travailler avec des cinétiques d'ordre 0. L'application de cette équation nous permet de calculer les paramètres cinétiques caractéristiques V_{\max} et K_m pour quelques enzymes et dans différents milieux et de standardiser les expérimentations en travaillant à concentration constante en substrat (concentration saturante permettant d'atteindre le V_{\max}) (tableau 1).

Tableau 1 Paramètres cinétiques caractéristiques de trois exoenzymes mesurés dans différents environnements (données CEMAGREF).

(1) : étang fortement eutrophe ; (2) : rivière eutrophe ; (3) et (4) : rivière oligotrophe.

Table 1 Kinetic parameters of three exoenzymes in different ecosystems. (1) : highly eutrophic pond ; (2) : eutrophic river ; (3) and (4) : oligotrophic river.

	Glucosidase			Phosphatase			Amino-peptidase		
	Vmax	K _m	-C sat	Vmax	K _m	Csat	Vmax	K _m	Csat
Sédiment d'étang (1)	25 μ mole/h.g	50 μM	500 μM	37 μ mole/h.g	25 μM	500 μM	60 μ mole/h.g	544 μM	2 000 μM
Sédiment de rivière (2)	45 μ mole/h.g	194 μM	1 000 μM	60 μ mole/h.g	115 μM	750 μM	33 μ mole/h.g	807 μM	2 500 μM
Sédiment de rivière (3)				29 μ mole/h.g	76 μM	500 μM	16 μ mole/h.g	114 μM	1 000 μM
Graviers de rivière (4)	6 nmole /h.mm ²	500 μM	1 500 μM	9 nmole /h.mm ²	250 μM	500 μM	8 nmole /h.mm ²	100 μM	1 000 μM

Ces conditions expérimentales conduisent à s'éloigner des teneurs naturelles en substrats qui sont rarement saturantes en milieu naturel non pollué et donc à modifier l'activité exoenzymatique. De plus les substrats enzymatiques artificiels utilisés pour les études sont en fait des molécules « modèles » supposés se comporter en analogues des substrats naturels, ce qui n'est pas toujours entièrement exact : il y a là un risque de sous estimation de l'activité hydrolytique.

Par ailleurs, la localisation de ces exoenzymes sur la membrane cellulaire influence l'activité exoenzymatique et diffère légèrement selon le Gram de la bactérie. Chez les Gram⁻, les exoenzymes sont plutôt localisées à l'extérieur de la membrane cytoplasmique, soit dans le périplasme, soit attachées sur la face interne ou externe de la membrane externe. Chez les Gram⁺, la membrane cytoplasmique est relativement perméable, les exoenzymes sont temporairement limitées par la paroi et peuvent diffuser vers l'environnement ; certaines exoenzymes peuvent également rester fixées sur la face externe de la membrane (CHROST, 1990). L'activité exoenzymatique n'est donc pas strictement liée à des cellules vivantes, mais peut être libre ou associée à des fragments membranaires libérés dans le milieu environnant. Cela explique que des produits qui sont toxiques pour des cellules entières et intègres, ne bloqueront cependant pas toute activité exoenzymatique. Dans cette optique certains auteurs (CHROST, 1990) proposent de différencier les exoenzymes (ensemble des enzymes extracellulaires libres ou liées) et les ectoenzymes (enzymes strictement liées à la membrane de cellules intègres).

Indépendamment des facteurs de régulation de la biomasse bactérienne, la régulation des exoenzymes se fait à deux niveaux, sur un plan fonctionnel :
 - par expression ou non de la synthèse d'exoenzymes chez les populations bactériennes, selon la présence de substrats adéquats dans le milieu, de

composés inducteurs ou répresseurs : fréquemment, la synthèse d'exoenzymes est réprimée par le produit de la réaction qui s'accumule dans la cellule ou dans son environnement (CHROST, 1991) ;

– par modification de l'activité des exoenzymes, avec l'influence instantanée de paramètres tels que température, pH, ... ou présence d'inhibiteurs compétitifs ou non compétitifs (substrat de configuration voisine,...), présence de toxiques tels que métaux lourds (VIVES-REGO *et al.*, 1986 ; TUBBING *et al.*, 1991).

La nature constitutive ou inductible des exoenzymes est parfois mal définie, selon leur type ; c'est le cas des exoprotéases selon les souches bactériennes : constitutives chez *Arthrobacter sp.*, elles se révèlent inductibles par les polypeptides chez *Aeromonas proteolytica* (SERVAIS, 1987).

Dans les environnements aquatiques, les exoenzymes sont très diversifiées : lipase, estérase, β -galactosidase, xylosidase, chitinase,... Les principales enzymes étudiées sont cependant la β -glucosidase, la phosphatase alcaline et une protéase (aminopeptidase) pour lesquelles on possède de bonnes informations sur leur régulation :

– β -glucosidase (SOMVILLE, 1986 ; CHROST, 1989) : essentiellement présente chez les microhétérotrophes (bactéries et champignons inférieurs), c'est une enzyme à large spécificité qui catalyse l'hydrolyse d'une grande variété de carbohydrates ; sa température optimale de fonctionnement est de 28 °C. L'augmentation de l'activité glucosidase dans un milieu est proportionnelle à l'augmentation de biomasse bactérienne. Sa régulation est complexe et s'effectue à 2 niveaux : sur la synthèse de l'enzyme elle-même par induction (présence de substrats carbonés de type cellobiose) ou répression (présence de carbohydrates de faible poids moléculaires directement utilisables par les cellules) et sur l'expression de l'activité de l'enzyme ;

– phosphatase alcaline (CHROST *et al.*, 1986 ; HALEMEJKO & CHROST, 1984) : très étudiée, cette exoenzyme est associée le plus souvent au phytoplancton ; sa synthèse, comme la régulation de son activité, dépendent fortement de la concentration en ions PO_4^- libres dans l'environnement ;

– leucine aminopeptidase (JACOBSEN & RAJ, 1988 ; VIVES-REGO *et al.*, 1985 ; SOMVILLE & BILLEN, 1983) : très répandue en milieu aquatique et toujours associée aux bactéries hétérotrophes ; elle hydrolyse une grande variété de peptides en configuration L et est donc un bon index de l'activité protéolytique et son activité est reliée de façon linéaire à la biomasse (BILLEN, 1991). La température optimale de fonctionnement est de 20 °C. Sa régulation se ferait par répression de synthèse et/ou par répression d'activité (inhibition compétitive par des substrats carbonés de faible poids moléculaire, directement utilisable par les cellules, tels que glucose ou acides aminés). Les ions NH_4^+ et NO_3^- diminuent le V_{max} de la réaction, avec un Km constant (inhibition non compétitive) (CHROST, 1991).

Un modèle conceptuel de régulation qui schématise les effets régulateurs de matière organique dissoute directement utilisable, de la matière organique polymérisée et de paramètres physico-chimiques peut-être proposé (figure 2, modifié d'après CHROST, 1991).

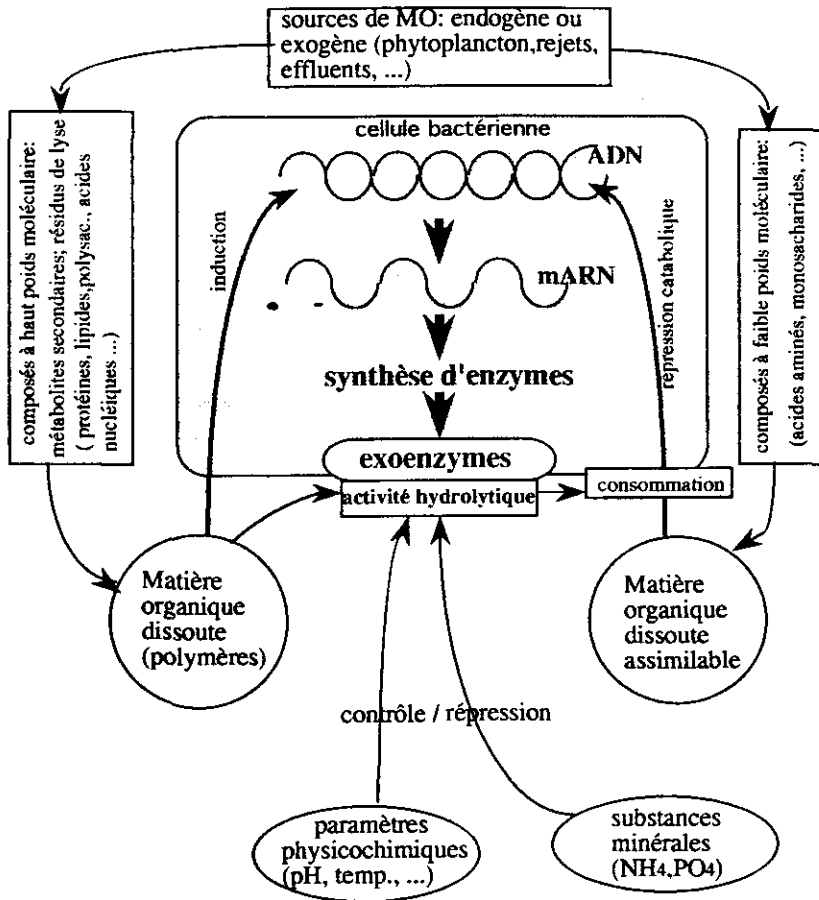


Figure 2 Modèle conceptuel d'interactions bactéries-matières organiques et régulations dans un environnement aquatique (modifié d'après CHROST, 1991).

Conceptual model for bacteria-organic matter relationships and regulations in aquatic environment (modified from CHROST, 1991).

Les activités exoenzymatiques doivent donc être interprétées comme des activités hydrolytiques potentielles ; elles reflètent cependant le pool d'enzymes existant naturellement dans le milieu étudié et qui est la résultante de la composition et de la concentration en substrats dans le milieu.

3.2 Variabilités intrinsèques et variations spatiales

Les activités exoenzymatiques présentent une variabilité intrinsèque indépendante de l'échantillonnage de terrain : ainsi, un échantillon de sédiment d'étang parfaitement homogénéisé, réparti en sous échantillons incubés dans des conditions strictement identiques, montre des coefficients de variabilité différents selon la nature de l'exoenzyme (tableau 2).

Tableau 2 Variabilité intrinsèque d'activités exoenzymatiques.
Avec n : nombre d'échantillons ; x : moyenne ; cv : coefficient de variation.

Table 2 *Intrinsic variability of some exoenzymatic activities.*

	n	x	Ecart type	cv (%)
Glucosidase	18	141,3	10,55	7
Phosphatase	18	105	17,1	16
Peptidase	18	146,6	14,9	10

On note que le coefficient de variation Cv est d'autant plus important que l'activité exoenzymatique est fortement inductible : c'est le cas de l'activité phosphatase. La MUF-glucosidase est l'activité qui présente la plus faible variance, probablement parce qu'il s'agit d'une exoenzyme constitutive et non inductible (ou très peu).

Chaque échantillon doit donc être traité en triplicat afin de tenir compte de cette variance, qui est vraisemblablement liée pour une grande part à la micro-hétérogénéité du sédiment (granulométrie, liaisons entre particules,...).

L'expression de la capacité hydrolytique d'un milieu dépend en partie de la technique d'échantillonnage retenue. Celle-ci doit refléter la diversité à grande échelle du milieu étudié et nécessite une connaissance « géographique » du lieu et de ses différents substratums (faciès). Ceci, particulièrement important pour les études appliquées aux sédiments, l'est moins dans la colonne d'eau, plus homogène : il faut cependant tenir compte d'éventuels phénomènes de stratification en lacs, de brassage en milieu courant, présence de MES,... Cette nécessaire définition d'une stratégie d'échantillonnage antérieure à toute étude est en fait valable quelque soit le paramètre recherché. Dans le cas des activités exoenzymatiques en sédiments, il existe aussi des variations d'activités non négligeables, le long d'un transect de prélèvement (*fig. 3*) ou avec la stratification du sédiment à petite échelle : en étang, sous des hauteurs d'eau de faibles profondeurs (< 1 mètre) et en partie stagnantes, l'activité sédimentaire décroît très vite et le premier centimètre représente respectivement 180 %, 250 % et 171 % des activités moyennes MUF-Glucosidase, MUF-Phosphatase et MUF-Peptidase mesurées sur l'ensemble de la couche de sédiment étudié (MONTUELLE & VOLAT, 1991). Dans le cas de sédiment de rivière, plus fluide, de granulométrie supérieure, où les substrats dissous pénètrent en profondeur, les activités exoenzymatiques persistent à des valeurs élevées et l'ensemble de la couche sédimentaire participe aux phénomènes de biodégradation (*fig. 4*).

La définition d'une stratégie de prélèvement propre à chaque environnement et adaptée à chaque topographie de milieu aquatique, au niveau macroscopique et microscopique, est donc un préalable indispensable à toute étude visant à connaître la capacité hydrolytique d'un écosystème aquatique.

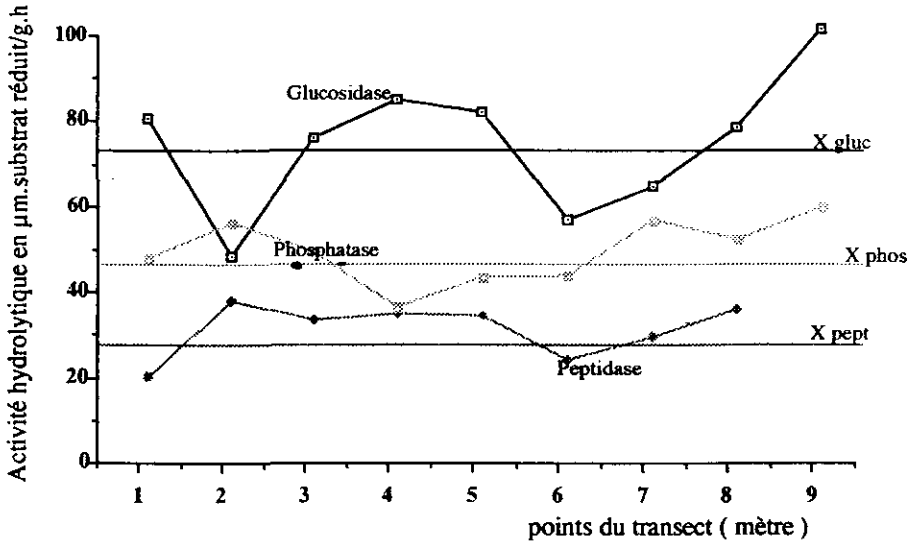


Figure 3 Variabilité géographique de 3 activités exoenzymatiques le long d'un transect en sédiment d'étang (X : valeur moyenne des activités).
Geographic variability of 3 exoenzymatic activities along a pond transect (X : mean activity value).

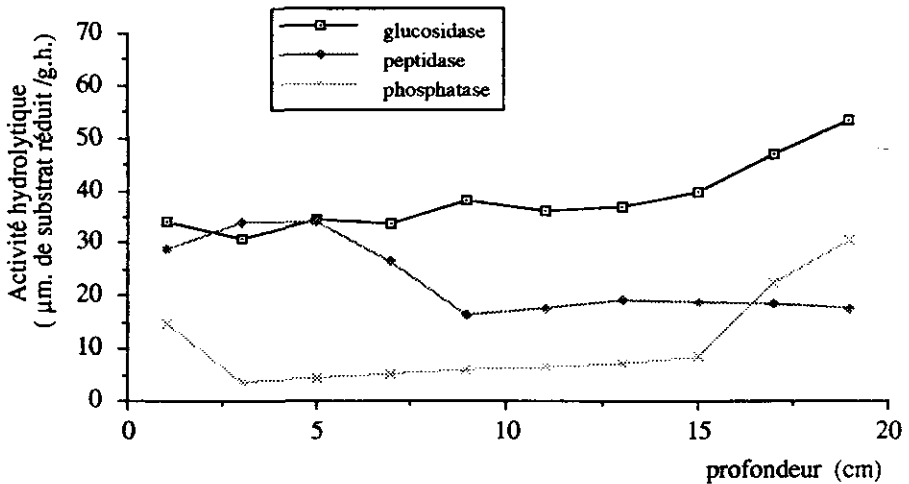


Figure 4 Évolution d'activités hydrolytiques dans un sédiment de rivière eutrophe.
Evolution of hydrolytic activities in an eutrophic river sediment.

Les milieux aquatiques présentent de grandes différences d'activités, selon leur nature (eau libre ou environnement sédimentaire), leur biomasse microbienne et leur statut en terme de matière organique (niveau de trophie). Le tableau 3 présente quelques données sur les capacités hydrolytiques de différents milieux. La diversité des informations et le manque d'indication sur les modes de calcul utilisés par les différents auteurs et les différences dans les protocoles d'incubation, font qu'il n'est pas possible de rassembler de façon cohérente et comparative toutes les données existant dans la littérature : seule une partie peut-être réunie de façon comparative, ici exprimée en terme de Carbone et de Phosphate disponible pour les cellules suite à hydrolyse exoenzymatique (en vitesse spécifique).

Nos données, obtenues en vase organique, proviennent d'un étang fortement eutrophe, utilisé en pisciculture et soumis à une fertilisation organique. Le potentiel d'hydrolyse est très élevé comparativement aux autres données : cela est à relier à la forte densité de population bactérienne de ces vases (10^9 à 10^{10} bactéries /g) ; la technique d'incubation retenue peut également intervenir dans cette différence.

3.3 Méthodologies d'étude

L'étude des activités exoenzymatiques en sédiments présente une complexité d'approche que n'ont pas les études sur la colonne d'eau : prélèvements, incubation, homogénéité de répartition du substrat-analogue dans toute la couche sédimentaire. Le prélèvement de différents horizons pour leur incubation séparée en tube perturbe la microflore et modifie les conditions physico-chimiques des sédiments ; cette technique peut donc influencer sensiblement sur les activités microbiennes du sédiment en induisant un biais expérimental (mélange de différents horizons, homogénéisation, aération des couches profondes anaérobies, ...). Certains auteurs (KARL & NOVITSKY, 1989) ont montré que la mise en suspension de sédiments pour les incuber ne modifiait pas significativement le métabolisme de l'adénine par des populations bactériennes du sédiment ; MARXSEN et WITZEL (1991) n'ont relevé aucun effet significatif de l'agitation du sédiment incubé sur les activités d'hydrolyse exoenzymatique. A l'inverse, MEYER-REIL (1986) a établi que la mise en suspension d'un sédiment pour son incubation augmentait l'activité hydrolytique d'un facteur 10 par rapport au même sédiment non perturbé. En milieu naturel, les phénomènes de bioturbation ou de mise en suspension de sédiment (courants, crues) vont donc être d'une grande importance dans l'amplification des phénomènes biologiques de dégradation.

L'homogénéisation des sédiments pour leur incubation présente un avantage certain, car elle permet une meilleure répétabilité des expérimentations, donc une meilleure standardisation et une plus grande fiabilité des résultats.

Pour limiter au maximum d'éventuels artefacts, une technique d'incubation en carotte (MEYER-REIL, 1986 ; HERMIN, 1989) permet de perturber le moins possible les sédiments : les substrats enzymatiques sont injectés à intervalles réguliers dans une carotte de sédiment de faible diamètre (de l'ordre du centimètre) ; cette technique n'est possible qu'avec des substrats analogues solubles (MéthylUmbellyFérone, β -Naphtylamine ou Méthyl Coumarine). Pour

Tableau 3 Récapitulatif de différentes valeurs d'activités exoenzymatiques dans divers environnements aquatiques, exprimées dans des unités comparables d'après les références : (1) MAYER, 1989 ; (2) MARXEN et WITZEL ; (3) MEYER-REIL, 1986 ; (4) BOON, 1990 ; (5) HOPPE, 1983 ; (6) JONES et LOCK, 1989 ; (7) CHROST, 1986 ; (8) JACOBSEN et RAÏ, 1988 ; (9) données CEMAGREF. Sed. : sédiment ; tor. : torrent ; riv. : rivière ; turb. : turbide ; eutr. : eutrophe ; mesotr. : mésotrophe.

Table 3 *Exoenzymatic activities in different aquatics environments (translated with the same units, as carbon for glucosidase and protease and PO4 for phosphatase).*

	Eau courante/rivières	Lac	Milieu marin	Biofilms	Sédiments
Glucosidase	0,43 µgC/l.h. ; 12° ; torrent oligo. ; (2) 3,7 µgC/l.h. ; 8° ; torrent oligo. ; (2) 0,3 à 10 µgC/l.h. ; 11-27° ; bras mort turb. ; (4) < 0,3 µgC/l.h. ; 7-25° ; riv. turbide ; (4)		0,33 à 1,1 µg C/h.l. ; 4-6° ; fjord eutr. ; (5)	3,5 ng C/h.cm2 ; rivière oligo. ; (6) 6,67 ng/h.cm2 ; rivière eutr. ; (6) 0,01 ngC/h.cm2 ; 12° ; tor. oligo. ; (2) 1,8 µgC/h.cm2 ; 20° ; riv. oligo. ; (9)	0,14 µgC/g.h. ; Aout ; sable de tor. ; (2) 0,3 µgC/g.h. ; Déc. ; sable de tor. ; (2) 44 à 58 MgC/g.h. ; 6-14° ; séd. marin ; (3) 0,4 à 0,7 mgC/g.h. ; 20° ; vase eutr. ; (9) 83-250 µgC/g.h. ; 20° ; séd. riv. olig. ; (9)
Phosphatase	2,1 µgPO4/l.h. ; 8° ; torrent ; (2) 0,07 à 0,5 µgPO4/l.h. ; 11-27° ; bras mort turb. ; (4) < 32 µgPO4/l.h. ; été ; riv. turbide ; (4)		1,5 à 16,3 µgPO4/h.l. ; 4-6° ; fjord eutr. ; (5)	19,8 ngPO4/h.cm2 ; 12° ; tor. oligo. ; (2) 105 µgPO4/h.cm2 ; 20° ; (9)	0,12 MgPO4/g.h. ; Déc. ; sable de tor. ; (2) 0,34 µgPO4/g.h. ; Juin ; sable de tor. ; (2) 0,3-1,7 mgPO4/g.h. ; 20° ; séd. olig. ; (9) 0,35 à 1 mgPO4/g.h. ; 20° ; séd. olig. ; (9)
Protease	10 à 96 µgC/l.h. ; 7-25° ; riv. turbide ; (4) 0,3 à 3 mgC/l.h. ; 11-27° ; bras mort turbide ; (4)	19 à 24 µgC/l.h. ; été ; lac eutr. ; (7) 5,2 à 12,5 µgC/l.h. ; hiver ; lac eutr. ; (7) 18 µg/l.h. ; 18° ; lac mesotr. ; (8) 28,8 µgC/l.h. ; 20° ; lac eutr. ; (8)	3,6 à 27,4 µgC/h.l. ; 4-6° ; fjord eutr. ; (5)	193 ngC/h.cm2 ; rivière eutr. ; (6) 2,7 µgC/h.cm2 ; 20° ; riv. olig. ; (9)	0,07 MgC/g.h. ; Mars ; séd. marin ; (1) 0,25 µgC/g.h. ; Juillet ; séd. marin ; (1) 53,7 MgC/g.h. ; 14° ; sédiment ; (3) 35,6 µgC/g.h. ; 11° ; sédiment ; (3) 1,3 à 2,5 mgC/g.h. ; 20° ; vase ; (9) 15-153 µgC/g.h. ; 20° ; séd. riv. olig. ; (9)

les substrats particuliers (Hide powder Azure, Amylopectin Azure), il est de toute façon obligatoire de perturber les sédiments pour leur introduction.

Cette technique d'injection et d'incubation en carotte n'est possible qu'en sédiment très fin (type sable fins ou de nature limoneuse) ; une granulométrie trop importante (sable grossier de 0,2 à 2 mm) ne permet que très difficilement un carottage en petit ou gros diamètre, l'enfoncement du carottier étant beaucoup plus difficile (nos expériences). Pour ces granulométries, une incubation en tubes est pratiquement nécessaire, en imposant une standardisation stricte du protocole d'incubation.

Dans le cas d'étude des biofilms microbiens de graviers ou de galets, un protocole d'incubation spécifique peut être mis en œuvre (MARXSEN & WITZEL, 1991). Deux méthodes principales sont disponibles :

- immersion de billes de verres de diamètre connu ou de membranes type Nuclepore (JONES & LOCK, 1989, 1991), pendant plusieurs semaines, permettant le développement d'un biofilm similaire à celui présents sur les pierres : il est alors possible d'en étudier le potentiel exoenzymatique exprimé par rapport à la surface des billes ou des filtres.

- mesure d'activité directement effectuée sur des échantillons de graviers ou de galets prélevés *in situ* ; cette méthode a l'avantage d'intégrer toutes les caractéristiques physiques et chimiques des pierres (rugosités, anfractuosités, réactivité chimique) en offrant la difficulté d'estimation de la surface développée de ces pierres (GRAHAM *et al.*, 1988). Une simplification, lors du prélèvement *in situ*, peut être apportée en choisissant des graviers aux formes géométriques rendant plus aisé le calcul de surface, sans introduire d'artéfact supplémentaire.

Ce problème d'estimation de surface apparaît dans tous les cas, lorsque l'on cherche à évaluer la capacité hydrolytique des biofilms sur de grandes surfaces irrégulières (lits de rivières, par exemple).

4 - CONCLUSION

La technique de mesure par fluorimétrie et l'utilisation de composés tel que la méthylumbelliféronne permettent une mesure fine (de l'ordre de quelques nanomoles) de l'activité des exoenzymes microbiennes. Sur un plan biochimique, nous possédons actuellement un certain nombre d'informations sur ces enzymes : leur cinétique de nature michaëlienne, leur localisation sur les parois cellulaires et leur régulation ; un modèle a été proposé par CHROST (1991), qui tient compte de deux niveaux de régulation : sur l'activité de l'exoenzyme et sur sa synthèse. Nous possédons donc un outil intéressant pour l'étude de différentes activités hydrolytiques exocellulaires, avec cependant quelques réserves dues au caractère inductible de certaines des exoenzymes.

Quelques problèmes apparaissent cependant lors de l'application de cette technique au calcul du potentiel hydrolytique de différents environnements aquatiques pris dans leur globalité, et non plus en tant que simple expression descriptive d'une activité par gramme de sédiment ou par litre d'eau.

Si l'on cherche à estimer la capacité d'assimilation ou de biotransformation de matière organique d'un milieu donné (application au phénomène d'auto-purification), les résultats obtenus sur l'expression du potentiel hydrolytique de différents environnements aquatiques montrent de grandes différences selon que l'on se situe en eau, en sédiment ou biofilm (biomasses, substratums et physico-chimie différents). Si l'on souhaite estimer la capacité hydrolytique d'un milieu, en particulier sédimentaire, il faut impérativement tenir compte des caractéristiques topographiques : il est nécessaire de se définir au préalable une stratégie d'échantillonnage tenant compte de la morphologie de la zone étudiée et d'établir des relations plus étroites avec des études globales d'environnements aquatiques de façon à pouvoir exprimer le potentiel hydrolytique d'un faciès donné.

L'information apportée par les activités exoenzymatiques n'est pas suffisante en soi, elle nécessite d'être couplée avec d'autres mesures biologiques ou biochimiques : biomasse bactérienne et/ou phytoplanctonique (en particulier pour la phosphatase), analyse fine de la matière organique assimilable (par exemple, par classes : lipides, glucides, protides, dans leurs fractions dissoutes et particulaires, ce que font certains auteurs comme CHROST, 1991 ou MEYER-REIL, 1986). Il manque actuellement à la connaissance des exoenzymes et particulièrement pour leur utilisation dans des études écologiques de milieux aquatiques, une certaine modélisation de leurs activités par rapport à certains paramètres tels que la température, l'oxygène ou la nature du substrat exoenzymatique. Les travaux de CHROST (1990) et SOMVILLE (1984) ont déjà abordé cet aspect de l'influence du substrat.

Ces données permettront de mieux comprendre l'intervention et le rôle des exoenzymes dans le métabolisme des milieux aquatiques et de définir plus précisément les limites d'application de cette technique dans les études globales portant sur les capacités d'assimilation et de biodégradation de la matière organique des systèmes aquatiques.

5 - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADMIRAAL W., TUBBING J.M.G., 1991. Extracellular enzyme activity associated with suspended matter in the river Rhine. *Freshwater Biology*, 26, 507-517.
- 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.
- BILLEN G., 1991. Protein degradation in aquatic environments, in « Microbial enzymes in aquatic environments ». R. Chrost Ed. Brock/ Springer Verlag Series in Contemporary BioScience, 123 - 143.
- BOON P.I., 1989. Organic matter degradation and nutrient regeneration in Australian freshwaters : 1. Methods for exoenzymes

- assays in turbid aquatic environments ; *Arch. Hydrobiol.*, 115 (3), 339-359.
- BOON P.I., 1990. Organic matter degradation and nutrient regeneration in Australian freshwaters : 2. Spatial and temporal variations and relation with environmental conditions, *Arch. Hydrobiol.*, 117 (4), 405-436.
- CHROST R.J., 1989. Characterization and significance of β -glucosidase activity in lake water, *Limnol. Oceanogr.*, 34 (4), 660-667.
- CHROST R.J., 1990. Microbial ectoenzymes in aquatic environments, in *Aquatic microbial ecology : biochemical and molecular approaches*, Brock/Springer Series in Contemporary BioScience, 190 p.
- CHROST R.J., SIUDA W., ALBRECHT D., OVERBECK J., 1986. A method for determining enzymatically hydrolysable phosphate (EHP) in natural waters. *Limnol. Oceanogr.*, 31 (3), 662-667.
- CHROST R.J., 1991. Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In « Microbial enzymes in aquatic environments ». R. Chrost Ed. Brock/ Springer Verlag Series in Contemporary BioScience, 29-59.
- DUDDRIDGE J.E., WAINWRIGHT M., 1982. Enzyme activity and kinetics in substrate-amended river sediments. *Wat. Res.*, 16, 329-334.
- FONTVIEILLE D., 1987. La circulation du carbone organique dans les écosystèmes lotiques : cas du phénomène d'autoépuration. Thèse de doctorat d'Etat, Université Claude Bernard, Lyon.
- FREEMAN C., LOCK M.A., MARXSEN J., JONES S.E., 1990. Inhibitory effects of high molecular weight dissolved organic matter upon metabolic processes in biofilms from contrasting rivers and streams. *Freshwater Biology*, 24, 159-166.
- GRAHAM A.A., McCAUGHAM D.J., MCKEE F.S., 1988. Measurement of surface area of stones. *Hydrobiologia*, 157, 85-87.
- HALEMEJKO G., CHROST R.J., 1984. The role of phosphatase in phosphorus mineralization during decomposition of lake phytoplankton blooms, *Arch. Hydrobiol.*, 101 (4), 489-502.
- HERMIN M.-N., 1989. Dégradation microbienne de la matière organique à l'interface eau-sédiment en milieu marin. Thèse de Doctorat, Université de Marseille II, 202 p.
- HOPPE H.G., 1983. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water : measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 11, 299-308.
- HOPPE H.G., 1991. Microbial extracellular enzyme activity : a new key parameter in aquatic ecology, in *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*, Springer Series in Contemporary BioScience, 60-80.
- JACOBSEN T.R., RAI H., 1988. Determination of aminopeptidase activity in lakewater by a short term kinetic assay and its application in two lakes of differing eutrophication. *Arch. Hydrobiol.*, 113 (3), 359-370.
- JONES S.E., LOCK M.A., 1989. Hydrolytic extracellular enzyme activity in heterotrophic biofilms from two contrasting streams. *Microb. Ecol.*, 22, 289-296.
- JONES S.E., LOCK M.A., 1991. Peptidase activity in river biofilms by product analysis, in « Microbial Enzymes in Aquatic Environments ». R. Chrost Ed. Springer Verlag Series in Contemporary BioScience, 144-154.
- KARL D.M., NOVITSKY J.A., 1988. Dynamics of microbial growth in surface layers of a coastal marine sediment ecosystem. *Marine Ecology Progress Series*, 50, 169-176.
- KAPLAN L.A., BOTT T.L., 1985. Acclimation of stream-bed heterotrophic microflora : metabolic responses to dissolved organic matter. *Freshwater Biology*, 15, 479-492.
- MARXSEN J., WITZEL K.-P., 1990. Measurements of exoenzymatic activity in stream-bed sediments using methylumbelliferyl-substrates. *Arch. Hydrobiol. Beih.*, 34, 21-28.
- MARXSEN J., WITZEL K.-P., 1991. Significance of extracellular enzymes for organic matter degradation and nutrient regeneration in small streams. In « Microbial enzymes in aquatic environments ». R. Chrost Ed., Springer Series in Contemporary BioSciences, 270-285.
- MAYER L.M., 1989. Extracellular proteolytic activity in sediments of intertidal mudflat. *Limnol. Oceanogr.*, 34 (6), 973-981
- MEYER-REIL L.A., 1986. Measurement of hydrolytic activity and incorporation of dissolved organic substrates by microorganisms in marine sediments. *Marine Ecol. Progr. Ser.*, 31, 143-149.

- MONTUELLE B., VOLAT B., 1991. Dégradation de matière organique en sédiment : activité hydrolytiques exoenzymatiques. *Annales de l'Institut F.A. Forel*, n° spécial 3^e CILEF, 234-237.
- MÜNSTER U., EINIO P., NURMINE J., 1989. Evaluation of the measurements of extracellular enzyme activities in a polyhumic lake by means of studies with 4- methylumbellyferyl -substrates. *Arch. Hydrobiol.*, 115 (3), 321-337.
- OVERBECK J., CHROST R.J., 1990. Aquatic microbial ecology. Brock/Springer Series, Springer Verlag, 190 p.
- SERVAIS P., 1987. Etude de la dégradation de la matière organique par les bactéries hétérotrophes en rivière : développement d'une démarche méthodologique et application à la Meuse belge. Thèse de Doctorat, Université Libre de Bruxelles, Belgique.
- SERVAIS P., 1991. Activités biologiques et transformations de la matière organique en milieu aquatique. Annales du Congrès « Matière organique : nature, dynamique et évolution », CEMAGREF, Lyon, 24/08/91.
- SOMVILLE M., 1984. Measurement and study of substrate specificity of exoglucosidase activity in eutrophic water. *Appl. and Envir. Microbiol.*, 48 (6), 1181-1185.
- SOMVILLE M., BILLEN G., 1983. A method for determining exoproteolytic activity in natural waters. *Limnol. Oceanogr.*, 28 (1), 190-193.
- TUBBING D.M.J., ADMIRAAL W., 1991. Sensitivity of bacterioplankton in the river Rhine river to various toxicants measured by thymidine and activity of exoenzymes. *Environ. Toxicol. Chemist.*, 10, 1161-1172.
- VIVES-REGO J., BILLEN G., FONTIGNY A., SOMVILLE M., 1985. Free and attached proteolytic activity in water environments. *Mar. Ecol. - Prog. Ser.*, 21, 245-249.
- VIVES-REGO J., MARTINEZ J., 1986. Effect of heavy metals and surfactants on glucose metabolism, thymidine incorporation and exoproteolytic activity in sea water. *Wat. Res.*, 20 (11), 1411-1415.