Zeitschrift: Archives des sciences [2004-ff.]

Herausgeber: Société de Physique et d'histoire Naturelle de Genève

Band: 65 (2012)

Heft: 1-2

Artikel: Les indicateurs de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques dans les sédiments du Léman

Autor: Poté, John / Thevenon, Florian / Wildi, Walter

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-738359

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Siehe Rechtliche Hinweise.

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. Voir Informations légales.

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. See Legal notice.

Download PDF: 30.03.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Les indicateurs de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques dans les sédiments du Léman

John POTÉ[1,*], Florian THEVENON[1] and Walter WILDI[1]

Ms. reçu le 22 juin 2012, accepté le 29 octobre 2012

Abstract

Antibiotic-resistant pathogenic indicator bacteria in sediments from Lake Geneva. –. *There is currently an increasing interest in the assessment of antibiotic resistant faecal indicator bacteria in freshwater sediments, because of the potential risk for human health linked to the re-suspension of pathogens that can affect the water quality and that may be ingested for instance during recreational activities or through ingestion of contaminated water. Two strategies have been developed to study these bacteria in contaminated lacustrine sediments. The first approach consists in extracting and quantifying faecal indicator bacteria (FIB) including* Escherichia coli *(*E. coli*) and* Enterococcus *spp (ENT) from sediment samples, followed by the characterization of human specific bacteroids by PCR using specific primers and by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The alternative approach is based on the evaluation of the isolated FIB multiple antibiotic resistant (MAR).*

Despite the growing interest in this issue, many questions remain unanswered, especially about the role of sediment characteristics on the accumulation of FIB and the potential adverse effects for the ecosystem and human health (risks of FIB antibiotic resistant). This paper presents an overview of the methods recently developed at the Institute F. -A. Forel for the extraction and quantification of FIB-MAR in sediments cores collected in the Bay of Vidy (in the vicinity of the city of Lausanne) which is the most contaminated area of Lake Geneva due to the release by the waste water treatment plant of industrial, hospital and domestic wastewater. Our research demonstrates that the sediments accumulated in this part of the lake since almost 50 years are highly contaminated and constitute a reservoir of FIB, FIB-MAR and antibiotic resistance genes that persist in organic-rich sediments.

Keywords: *Lake Geneva, human pathogenic bacteria, antibiotic resistant, sediment cores, waste water treatment plant*

Résumé

L'évaluation des bactéries indicatrices de contamination fécale dans les lacs d'eau douce, et plus particulièrement l'occurrence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans les sédiments, est primordiale. Cet intérêt est lié au risque potentiel de remise en suspension des agents pathogènes qui peuvent affecter la qualité de l'eau et dès lors présenter des risques pour la santé humaine, par exemple lors d'activités récréatives et/ou suite à la consommation d'eau potable contaminée. Deux stratégies ont été développées pour l'étude de l'accumulation de ces bactéries dans les sédiments lacustres contaminés. La première approche consiste à extraire et à quantifier les bactéries indicatrices de contamination fécale (FIB), y compris Escherichia coli (E. coli) *et* Enterococcus *spp (ENT) à partir d'échantillons de sédiments, suivi par la caractérisation de bacteroides spécifiques pour l'homme par PCR en utilisant des amorces spécifiques et par* matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry *(MALDI-TOF MS). Une seconde approche est basée sur l'évaluation de la résistance multiple aux antibiotiques (MAR) à partir de FIB isolées.*

Malgré l'importance de cette thématique, de nombreuses questions restent en suspens, en particulier concernant le rôle des caractéristiques physico-chimiques des sédiments sur l'accumulation de FIB et les effets négatifs potentiels sur les écosystèmes et la santé humaine (risques de résistance aux antibiotiques FIB). Cet article présente un aperçu des méthodes récemment mises au point à l'Institut F.-A. Forel pour l'extraction et la quantification de FIB-MAR dans les carottes de sédiments

[1] *Institut F.-A. Forel, Section des Sciences de la Terre et Environnement, Université de Genève, CP 416, CH-1290 Versoix, Suisse.*

* Corresponding author. E-mail: john.pote@unige.ch

recueillis dans la baie de Vidy qui est la zone la plus contaminée du Léman à cause des rejets des eaux traitées par la station d'épuration de la ville de Lausanne. Ces eaux usées proviennent de l'industrie, des hôpitaux et des activités domestiques. Notre recherche démontre que les sédiments qui se sont accumulés dans cette baie depuis 50 ans sont fortement contaminés et constituent un réservoir important de FIB, FIB-MAR et de gènes de résistance aux antibiotiques qui persistent dans les sédiments riches en matière organique.

Mots-clés: *Léman, bactéries pathogènes humaines, résistance aux antibiotiques, sédiments, station d'épuration d'eaux usées*

1. Introduction

La présence de substances toxiques tels les métaux (Cd, Hg, Cu, Pb, As, Tl, Sn), les polluants organiques persistants (PCB et HAP), les antibiotiques et les microorganismes pathogènes dans les systèmes lacustres et les réservoirs d'eau potable est principalement due aux apports par les eaux de ruissellement et des cours d'eaux qui collectent les rejets industriels et urbains, mais aussi au rejet des déchets liquides provenant des activités domestiques des particuliers (Förstner et Wittmann, 1979; Pardos et al., 2004; Schwarzenbach et al., 2006;. Martinez, 2008). La plupart de ces substances toxiques peuvent s'accumuler dans les sédiments et influencer les écosystèmes aquatiques qui évoluent au cours du temps en fonction de paramètres naturels (changements climatiques) mais aussi anthropiques (gestion de l'eau potable et agricole, pollution). De surcroît, les contaminants qui s'accumulent au cours du temps dans les dépôts sédimentaires peuvent être remobilisés à partir des sédiments vers la colonne d'eau, et constituer ainsi une menace potentielle pour les écosystèmes aquatiques (biodiversité) et la santé humaine. La remobilisation de ces contaminants peut être due à des facteurs naturels (crue ou sècheresse) ou humains (remaniement d'anciens dépôts dans le cadre de travaux). Le retour des contaminants dans la chaîne alimentaire peut donc se produire par la remise en suspension des sédiments, mais aussi par métabolisme microbien ou encore par infiltration dans la nappe phréatique. En conséquence, les sédiments contaminés peuvent constituer une source secondaire significative de pollution pour la colonne d'eau (Wildi et al., 2004; Gillan et al., 2005). Les sédiments contaminés déposés au cours du dernier siècle dans les lacs utilisés comme source d'eau potable méritent en conséquence d'être étudiés dans le cadre d'une gestion durable des ressources en eau et des écosystèmes aquatiques.

Les sédiments lacustres riches en matière organique d'origine animale ou humaine constituent un réservoir important pour les indicateurs de pollution fécale (FIB) (Haller et al., 2009 a,b; Poté et al., 2009a). En effet, la concentration en FIB accumulée peut y être 100 à 1000 fois supérieure à celle contenue dans la colonne d'eau (Davies et al., 1995). Pour cette raison, l'évaluation des teneurs en FIB en milieu aquatique ne devrait pas se limiter aux seuls prélèvements d'échantillons d'eau dont la qualité peut varier très rapidement dans le temps et dans l'espace en fonction de paramètres naturels (débit des rivières, degré oxygénation) ou anthropiques (pollutions accidentelles ou chroniques). Cette approche peut en effet fausser l'évaluation des risques potentiels d'exposition humaine aux micro-organismes pathogènes (par exemple lors d'activités récréatives dans les eaux de baignade) mais aussi l'appréciation de la qualité de l'eau potable (Craig et al., 2004; Haller et al., 2009a).

Les FIB en milieu aquatique peuvent subir l'influence de diverses substances, notamment celle des antibiotiques. De nombreuses études ont ainsi démontré que les antibiotiques qui se trouvent disséminés dans l'environnement peuvent potentiellement exercer une pression importante sur les microorganismes autochtones. Ces substances chimiques peuvent dès lors être considérées comme des polluants importants voir dangereux, puisque des bactéries peuvent être impliquées dans le transfert de gènes de résistances aux antibiotiques (Pruden et al., 2006; Martinez et al., 2009). L'échange naturel de gènes entre bactéries dans l'environnement est un fait connu (Bertolla et al., 2000). Les trois mécanismes de transfert horizontal de gènes (HGT) identifiés (la conjugaison, la transduction et la transformation) ont été largement étudiés (Yin et Stotzky, 1997; Demanèche et al., 2000). Par conséquent, la présence de FIB et de bactéries résistantes aux antibiotiques dans la colonne d'eau et dans les sédiments peut affecter la qualité de l'eau mais aussi contribuer au transfert horizontal de gènes (HGT) entre les bactéries, ce qui implique la diffusion généralisée de gènes résistants aux antibiotiques (Kümmerer, 2004; Demanèche et al., 2008; Thevenon et al., 2012a).

La persistance des bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques en milieu aquatique, spécialement dans les lieux de baignades (plages, piscines) et à proximité de stations de captage d'eau potable, motive depuis quelques années de nombreuses recherches dans le domaine de l'environnement et de la santé publique (Martinez, 2009). L'étude de résistance bactérienne aux antibiotiques dans l'environnement est pertinente pour la santé humaine en raison de l'importance croissante des maladies zoonotiques, ainsi que la nécessité de prévoir des nouveaux agents pathogènes résistants (Allen et al., 2010). Toutefois, les méthodes de caractérisation et de

quantification des microorganismes pathogènes (les coliformes totaux, *E.Coli*, germes mésophiles anaérobies, Entérocoques, salmonelles) dans les sédiments artificiellement enrichis en matière organique et en bactéries animales et humaines restent encore très peu connues. Le but de la présente synthèse est de présenter les méthodes utilisées pour la quantification et la caractérisation des FIB résistant à plusieurs antibiotiques (*multiple antibiotic resistant*, MAR) dispersées dans les sédiments, puis de présenter des résultats récemment obtenus à partir de sédiments pollués par les effluents de la station d'épuration (STEP) des eaux usées de la ville de Lausanne qui sédimentent dans la Baie de Vidy. La Baie de Vidy est une zone de baignade et de loisirs dont la qualité des eaux est susceptible d'influencer celle de l'usine de pompage de St-Sulpice (située à environ 3 km de distance) qui est la principale source d'eau potable de la ville de Lausanne. Bien que ce type de pollution puisse avoir des conséquences majeures pour la biodiversité et la santé de l'homme, peu de recherches sont encore menées à cette échelle du bassin versant, sur des sédiments et des bactéries présents dans nos environnements aquatiques du fait du rejet d'eaux usées.

2. Méthodes

2.1. Sites d'étude

Le Léman (aussi appelé Lac de Genève) est le plus grand réservoir d'eau douce d'Europe occidentale, avec un volume de 89 km³ et une profondeur maximale de 309 m. Le lac a été considéré comme eutrophe dans les années 1970 et est devenu mésotrophe dans les années 1980, après une réduction drastique des apports en phosphore (Dorioz et al., 1998). Environ 700 000 personnes sont alimentées en eau potable provenant du Léman. L'usine de traitement des eaux usées municipales de Lausanne (STEP de

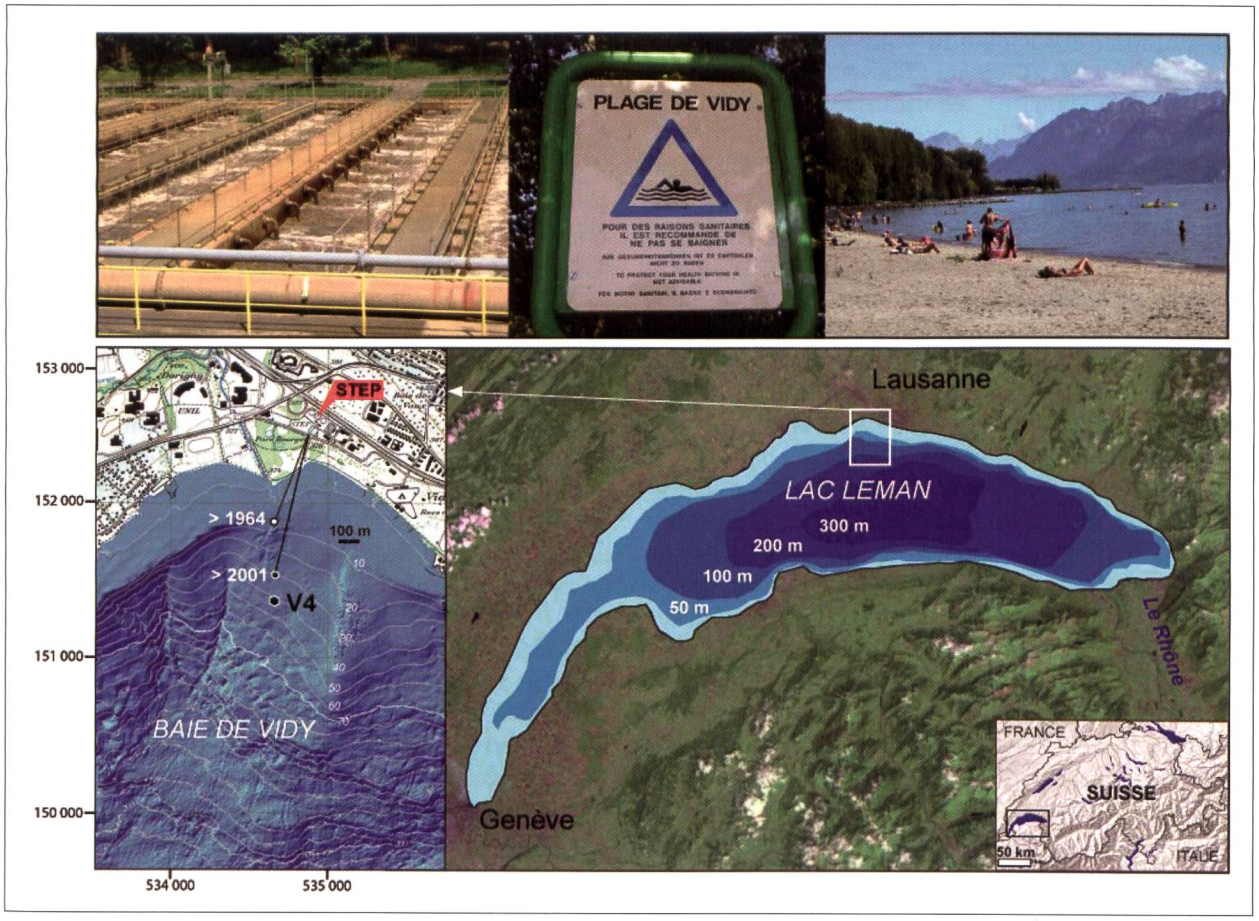

Fig. 1. En haut: Photos de la STEP de Vidy (à gauche) et de la plage de Vidy en été (à droite) où il est recommandé de ne pas se baigner (au centre). En bas: Image satellite de la région étudiée et carte bathymétrique du Lac Léman (modifié de Thevenon et al., 2011b) avec à gauche un zoom sur la bathymétrie de la Baie de Vidy où sédimente la matière en suspension provenant de la STEP (effluents domestiques, hospitaliers et industriels) (modifié de Thevenon et al. 2012a). La carte indique la position du site de carottage (V4) ainsi que la position de l'ancien (dès 1964) et de l'actuel (depuis 2001) exutoire de la STEP de la ville de Lausanne.

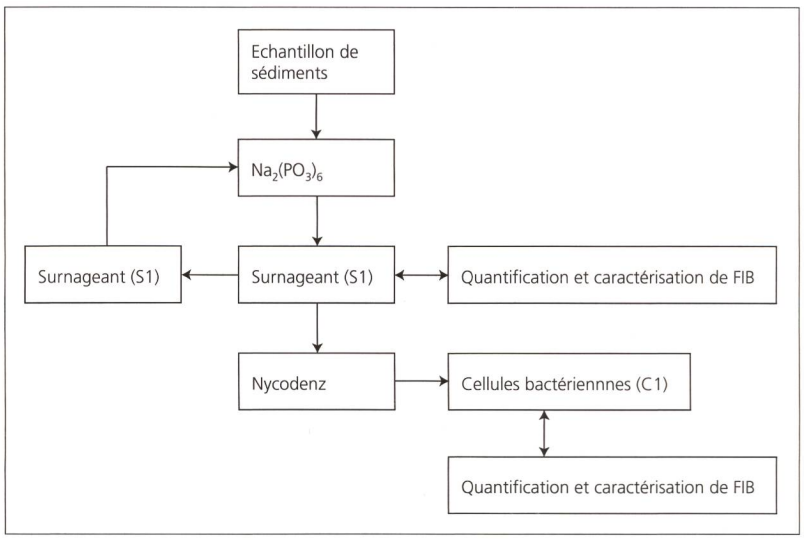

Fig. 2. Schéma de la procédure analytique utilisée pour quantifier les FIB dans le surnageant (S1) et dans ces cellules bactériennes pures (C1) par la méthode de membranes filtres (modifié d'après Poté et al., 2010).

Vidy) a été construite en 1964 pour 220 000 équivalents-habitants, puis agrandie en 1976. Ses effluents étaient d'abord déversés à une distance d'environ 300 m du bord du lac, à 15 m de profondeur (Fig. 1). La conduite du déversoir a été prolongée en 2001 jusqu'à une distance de 700 m de la rive et à 35 m de profondeur d'eau (Goldscheider et al., 2007) (Fig. 1). C'est autour de ce point de déversement que se dépose actuellement la matière en suspension provenant de la STEP avec pour effet une augmentation artificielle du taux de sédimentation compris entre 0.5 à 1 cm/an (Thevenon et al., 2011a; Loizeau et al., 2004).

Du fait de la présence de cet exutoire, la baie de Vidy est la zone la plus contaminée du Léman. L'Institut F.-A. Forel a mené de nombreuses recherches sur la dispersion des contaminants organiques et inorganiques (éléments traces métalliques ou ETM) dans les sédiments de surface mais aussi sur l'accumulation de ces polluants au cours des dernières décennies à l'aide d'enregistrements sédimentaires (ou carottes) (Loizeau et al., 2004; Pardos et al., 2004; Wildi et al., 2004; Pote et al., 2008; Thevenon et al., 2011a). D'autres recherches se sont focalisées sur l'accumulation des FIB dans les sédiments, sur le rôle du substrat sédimentaire et sur la persistance des bactéries pathogènes (Poté et al., 2009a,b; Haller et al., 2009a,b; Thevenon et al., 2012b). Nos recherches les plus récentes sont orientées sur la caractérisation des FIB MAR dans les sédiments déposés avant et après l'installation de la STEP dans la baie de Vidy; afin de comprendre l'influence des apports extérieurs de matière organique mais aussi l'impact du changement du statut trophique du lac au cours du 20e siècle (Thevenon et al., 2011b).

2.2. Méthodes de prélèvement des sédiments

Nos analyses sont effectuées sur des carottes sédimentaires courtes (30 à 70 cm de long) prélevées depuis le bateau de l'Institut F.-A. Forel (La Licorne) à l'aide d'un carottier gravitaire Uwitec®. Les carottes sont ensuite amenées à Versoix où elles sont stockées dans une chambre froide (4°C) puis rapidement ouvertes et échantillonnées. L'échantillonnage s'effectue en continue tous les centimètres pour l'analyse des paramètres physicochimiques (teneur en eau, granulométrie, teneur et composition de la matière organique) et tous les 2 cm pour reconstruire l'accumulation dans le temps des FIB MAR qui nécessitent plus de temps et des coûts analytiques supérieurs.

2.3. Extraction des cellules bactériennes par gradient Nycodenz

L'extraction des FIB à partir de sédiments riches en matière organique peut conduire à une importante sous-estimation de la quantité de bactéries. En conséquence, nous avons développé une méthodologie très fiable qui consiste à disperser les sédiments dans une solution d'hexamétaphosphate de sodium à 0.2% puis à séparer les bactéries des particules organiques et minérales en utilisant différentes vitesses de centrifugation (Haller et al., 2009a; Poté et al., 2010). En résumé, 100 g de sédiment humide sont dispersés dans 300 mL d'hexamétaphosphate de sodium à 0.2%. Le mélange est placé pendant 30 minutes dans un agitateur rotatif et ensuite centrifugé à 750 tr/min pendant 15 min à 15°C (Fig. 2). Le surnageant est alors récupéré dans de l'eau physiologique et centrifugé à 7500 tr/min pendant 30 minutes. Le culot est ensuite lavé puis récupéré dans de l'eau physiologique. Les cellules bactériennes et les particules de sédiments sont ensuite séparées par ultracentrifugation à grande vitesse (15 000 tr/min pendant 1 h à 10°C) en ajoutant du Nycodenz (0.8 g/L). Une couche blanche de cellules bactériennes (anneau bactérien) se forme à l'interface entre Nycodenz et la couche sus-jacente aqueuse. Cette couche blanche est soigneusement récupérée et

*Table 1. Les amorces et leurs cibles utilisées pour la caractérisation d'*Escherichia coli*, des Entérocoques et des gènes de résistance à la famille de beta-lactame.*

Amorces	Cible	Séquences	T (°C)	Référence
ECA75F ECA619R	GeneralE Coli	GGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGAC AGCCCGGGGATTTCACATCTGACTT A	60	Sabat et al. 2000
Ent1 Ent2	General Enterococci	TACTGACAAACCATTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	55 / 49	Ke et al. 1999 / Morrison et al. 2008
Bla TEM-F TEM-R	Amoxycillin / Ampicillin / β-lactames gene resistant	ATTCTTGAAGACGAAAGGGC ACGCTCAGTGGAACGAAAAC	60	Belaaouaj et al. 1994
HF183/134 Bac708R	human HF183 human HF134	ATCATGAGTTCACATGTCCG ATCARGTCACATGTCCCG CAATCGGAGTTCTTCGTG	9	Bernhard and Field, 2000 / Ahmed et al., 2007
CF128/193 Bac708R	ruminant CF128 ruminant CF193	CCAACYTTCCCGWTACTC TATGAAAGCTCCGGCC CAATCGGAGTTCTTCGTG	60 61	Bernhard and Field, 2000

mélangée avec un volume égal d'eau stérile ultra pure. Les cellules bactériennes pures ainsi obtenues servent à la quantifier les FIB par les méthodes conventionnelles ou par l'approche moléculaire.

2.4. Quantification des FIB par l'approche conventionnelle

Les législations de l'Union Européenne et Suisse (OHyg, 2005) pour la détermination de la qualité de l'eau prévoient la quantification d'*E. coli* et ENT par différentes méthodes de culture. Les FIB sont quantifiées à partir du surnageant (Haller et al., 2009a) ou à partir de l'anneau bactérien (Poté et al., 2010) après filtration sur membranes (en cellulose de 0.45 µm de porosité) de 100 mL d'échantillon à différentes dilutions; puis incubation à différentes températures des membranes dans des boîtes de pétri en utilisant successivement différents milieux sélectifs (Haller et al., 2009a; Pote et al., 2009). Les résultats sont exprimés en unités format colonies par 100 g de sédiments secs (CFU/100 g). La reproductibilité de la méthode d'analyse (mesure en triplicat d'échantillons) donne un coefficient de variation moyenne de 13% pour *E. coli* et 8% pour les ENT.

2.5. Confirmation des FIB isolés sur les milieux sélectifs

Les *E. coli* et ENT isolées sur les milieux sélectifs peuvent être identifiées par PCR en utilisant les amorces spécifiques. Ces amorces permettent de cibler les séquences des gènes afin de savoir si les FIB sont d'origines humaines ou animales (Table 1).
La méthode de spectrométrie de masse *«Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry»* (MALDI-TOF MS) (Tonolla et al., 2009; Benagli et al., 2011) est basée sur la détection et l'identification de protéines par la détermination du poids moléculaire de fragments spécifiques individuels bactériens.

2.6. Evaluation des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques par l'approche culturale

Les tests de résistance aux antibiotiques peuvent être réalisés sur *E. coli* et ENT par la méthode de culture après leur confirmation par PCR et/ou MALDI-TOF MS. Cette méthode consiste préalablement à définir les concentrations minima d'inhibition des antibiotiques à utiliser (Andrews, 2001; Choi et al., 2003; Sáenz et al., 2004; Demaneche et al., 2008). Pour énumérer les FIB-MAR, des dilutions appropriées de suspension de l'anneau bactérien extraites des sédiments sont réparties dans les milieux appropriés aux *E. coli* et ENT. Ces milieux sont inoculés avec des solutions d'antibiotiques à différentes concentrations. Un mélange composé des antibiotiques suivants est utilisé: ampicilline, tétracycline, amoxicilline, chloramphénicol et érythromycine (Sigma, USA); chaque antibiotique se trouve à une concentration finale de 20 µg mL^{-1} et 2 µg mL^{-1} pour l'évaluation de résistance d'*E. coli* et d'ENT respectivement. Les pourcentages de FIB-MAR sont ensuite calculés par approche statistique comme précédemment décrit par Thevenon et al. (2012a).

2.7. Evaluation des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques par approche moléculaire

Etant donné que moins de 10% des bactéries présentes dans les sédiments sont cultivables (Thevenon et al., 2011b), la méthode de l'approche culturale sous-estime largement la quantification des bactéries dans l'environnement. L'approche moléculaire par PCR et PCR quantitative est pour cette raison de plus en plus utilisée pour caractériser et quantifier les bactéries dans les différents compartiments environnementaux, y compris dans les sédiments et les eaux de surface. Nous avons utilisé cette approche dans nos récentes recherches afin de caractériser la biomasse bactérienne dans des profils sédimentaires et ainsi détecter les gènes de résistance aux antibiotiques, non seulement dans les indicateurs pathogènes mais aussi dans l'ensemble de la communauté bactérienne de la baie de Vidy (voir les détails dans Haller et al., 2011 et Thevenon et al., 2012 b).

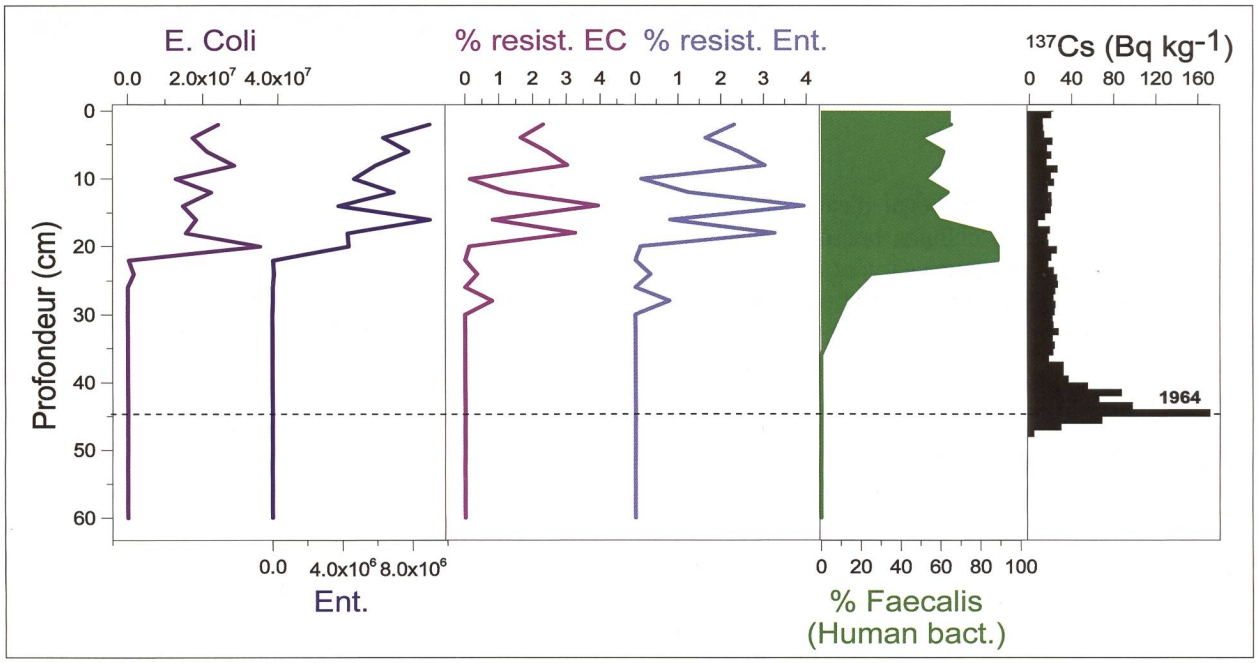

Fig. 3. *Escherichia coli* (*E. coli*) et Entérocoques (ENT) (CFU 100 g^{-1}), leur résistance respective aux antibiotiques, et le pourcentage d'*Enterococcus faecalis* mesurés en fonction de la profondeur sur la carotte V4. A droite est reporté le ^{137}Cs mesuré sur une carotte (Vs14) prélevée au même endroit (Glass-Haller 2010). La maximum de ^{137}Cs localise l'année 1964 qui correspond au maximum des retombées atmosphériques dues aux essais nucléaires et qui coïncide avec le début des rejets de la STEP de Lausanne dans la Baie de Vidy (modifié de Thevenon et al., 2011b et 2012a,b).

3. Résultats et discussion

Depuis une dizaine d'année, les chercheurs de l'Institut F.-A. Forel travaillent sur le site de la baie de Vidy dans le cadre de recherches pluridisciplinaires qui se sont récemment enrichies de l'approche microbiologique. Cet article présente des résultats inédits et synthétise les données récemment publiés sur les sédiments pollués de la baie de Vidy, afin de mieux comprendre l'influence des rejets des eaux usées dans l'environnement aquatique et plus précisément leur impact sur la communauté bactérienne vivant dans les sédiments. L'étude de carottes de sédiments permet de remonter dans le temps et de comparer les sédiments qui se sont déposés avant et après la mise en place de la STEP de Lausanne en 1964. Cette approche est rendue possible en mesurant le césium (^{137}Cs) radiogénique par comptage gamma dans les profils sédimentaires étudiés. En effet, le maximum des retombées de ^{137}Cs en Europe a eu lieu en 1964 lors du maximum des essais nucléaires atmosphériques dans le monde. L'identification de ce repère chronologique dans nos carottes permet donc de localiser très précisément les sédiments qui se sont déposés lors de la mise en place de la STEP de Lausanne en 1964 (Fig. 3). En revanche, le pic de ^{137}Cs lié à l'accident nucléaire de Tchernobyl (qui est généralement utilisé pour détecter les sédiments déposés en 1986) n'est pas détecté dans la Baie de Vidy en raison de l'abondance des sédiments anthropogéniques qui diluent fortement la fraction atmosphérique apportée dans la baie par ruissèlement naturel.

3.1. Distribution des pathogènes dans les sédiments de la baie de Vidy

Les sédiments de la baie de Vidy sont enrichis en nutriments (C_{org}: 4 à 12%, N: 0.5 à 1.5%, P: 5 à 25 mg/g) et en éléments traces métalliques (Hg: 0.3 à 20 µg/g, Pb: 60 à 1000 µg/g) (Thevenon et al., 2011a, 2012b). La teneur en matière organique peut atteindre 30% pour les sédiments de surface proches de l'exutoire de la STEP (site V4, Fig. 1) alors que les valeurs moyennes des sédiments déposés au cours du vingtième siècle dans les parties profondes du Grand Lac (309 m) et du Petit Lac (Creux-de-Genthod, 50 m) se situent aux environs de 6% (Pote et al., 2008; Thevenon et al., 2011b). Ces caractéristiques font que ces sédiments peuvent constituer un réservoir important de FIB (Haller et al., 2009 a,b).

Pour évaluer la distribution des pathogènes dans les sédiments de la baie de Vidy, nous avons quantifié les FIB dans le surnageant (S1) et dans ces cellules bactériennes pures (C1) par la méthode de filtration sur membranes (Fig. 2). Le choix de comparer ces 2 étapes a été motivé par le fait que certaines substances se trouvant dans les sédiments peuvent inhiber la croissances des certaines bactéries, y compris les

Table 2. Distribution et comparaison des souches d'*Escherichia coli* (*E. coli*) et d'Entérocoques (ENT) quantifiées (CFU 100 g^{-1}) dans le surnageant* (S1) et dans les cellules bactériennes extraites par Nycodenz gradient centrifugation** (C1) dans les sédiments de la Baie de Vidy (site V4).

Site V4				
Profondeur (cm)	*E. coli dans le surnageant (CFUx10^6)x100g^{-1}	*ENT dans le surnageant (CFUx10^6)x100g^{-1}	**E. coli dans les cellules bactériennes (CFUx10^6) 100g^{-1}	**ENT dans les cellules bactériennes (CFUx10^6) 100g^{-1}
2	22.3 (1.8)	7.8 (2.2)	16.9 (3.7)	4.7 (0.6)
4	19.2 (4.3)	6.1 (1.7)	15.4 (2.6)	4.3 (1.4)
6	25.1 (3.6)	6.4 (0.9)	19.4 (4.2)	4.9 (0.3)
8	33.2 (2.8)	6.2 (1.3)	28.6 (3.4)	3.8 (0.07)
10	11.7 (1.3)	3.4 (0.5)	9.7 (2.9)	1.9 (0.06)
12	26.1 (3.5)	6.7 (2.1)	20.4 (3.7)	4.8 (0.8)
14	14.8 (2.9)	4.3 (0.2)	8.6 (2.4)	2.8 (0.4)
16	15.4 (3.1)	7.8 (1.8)	9.6 (3.2)	5.1 (2.3)
18	13.8 (2.6)	3.9 (0.2)	9.4 (1.6)	1.7 (0.6)
20	37.4 (4.2)	14.6 (4.3)	26.5 (4.1)	8.3 (1.4)
22	0.17 (0.01)	0.23 (0.04)	0.045 (0.01)	0.05 (0.007)
24	0.22 (0.03)	0.02 (0.006)	0.097 (0.003)	0.011 (0.003)

* La première étape après la faible centrifugation à 750 tr/min

** Cellules pures bactériennes après séparation avec les particules de sédiments en grande vitesse de centrifugation 15000 tr/min

indicateurs de la pollution fécale (Davies et al., 1995; Maron et al., 2006; Poté et al., 2009a, 2010). Les résultats de nos analyses montrent de très fortes concentrations en FIB dans les sédiments récemment déposés au site V4 (Table 2). Toutefois, dans S1, la teneur en *E. coli* varie de 0.17 à 33.2 10^6 CFU/100 g alors que cette teneur varie de 0.04 à 28.6 10^6 CFU/100 g dans C1. Pour les Entérocoques, la teneur varie de 0.02 à 7.8 et de 0.01 à 5.1 CFU/100 g pour S1 et C1, respectivement. La comparaison de ces 2 étapes montre que la quantification à partir de S1 permet d'isoler environ 20% de FIB de plus que dans le C1, cela à cause de pertes de certaines bactéries avant le recouvrement total des cellules bactériennes (Furtado et Casper, 2000; Maron et al., 2006). Néanmoins, l'approche par centrifugation Nycondez permet de séparer les bactéries des autres particules présentes dans les sols et les sédiments, afin d'obtenir des cellules bactériennes pures prêtes pour l'application des approches métagénomiques (Courtois et al., 2001; Bertrand et al., 2005; Pote et al., 2010). Comme l'indiquent nos résultats (Table 3 et Fig. 3), la concentration des FIB est très élevée (de l'ordre de 10^6 CFU/100 g) dans les sédiments enrichis en matière organique de la Baie de Vidy à cause des effluents de la STEP (Haller et al., 2009a,b, Thevenon et al., 2012a).

3.2. Caractérisation des indicateurs pathogènes dans les sédiments

Les *E. coli* et ENT isolées à partir des sédiments par filtration sur membrane ont été caractérisées par amplification PCR en utilisant les amorces spécifiques (Table 1) et par MALDI-TOF MS. L'amplification PCR réalisée sur les colonies bactériennes isolées sur les membranes de filtration et sur l'ADN extrait de C1 en utilisant les amorces ECA75F/ECA619R (pour *E. coli*) et Ent1/Ent2 (pour les Entérocoques) ont confirmé la présence d'*E. coli* et d'Entérocoques dans les sédiments de la carotte V4 au dessus de 24 cm de profondeur (Table 3 et Fig. 3). Les séquences de MALDI-TOF MS ont confirmé la prédominance des *E. Faecalis* et *E. Faecium* (50 à 90%) pour les sédiments déposés

Table 3. Distribution d'*Escherichia coli* et d'Entérocoque résistantes aux antibiotiques dans le profil sédimentaire de la carotte V4 (modifié de Thevenon et al., 2012 b)

Profondeur	*E. coli*-MAR (%)	*E. coli* résistant au beta-lactame (%)	ENT MAR (%)	ENT résistant au beta-lactame (%)
2	2.32	24.62	0	21.83
4	1.65	28.74	0.016	26.74
6	2.41	48.22	0.04	36.82
8	3.03	41.71	0.13	33.61
10	0.14	21.94	0	15.92
12	1.24	**	0.017	**

** analyses non effectuées

durant cette période qui correspond probablement à la période d'eutrophisation du lac (Thevenon et al., 2011a). L'amplification PCR par les amorces HF183/134/Bac 708R a indiqué la présence des FIB d'origine humaine à plus de 95% pour les sédiments de surface du site V4, tandis que les PCRs par CF128/193/Bac708R n'ont montré aucune présence de FIB d'origine animale. Il est connu que *E. coli* et ENT d'origine animale ou humaine peuvent être trouvées dans les différents compartiments environnementaux (Ke et al., 1999). Nos recherches effectuées en conditions contrôlées (dans les microcosmes) démontrent que ces bactéries peuvent persister dans les sédiments lacustres contaminés par les rejets d'eaux usées et se multiplier dans certaines conditions environnementales (Haller et al., 2009b; Poté et al., 2009).

Les résultats de notre étude indiquent que les sédiments très riches en matière organique de la baie de Vidy qui reçoit les effluents de la STEP de Lausanne constituent un grand réservoir de FIB d'origine humaine. L'amplification PCR et MALDI-TOF MS dans des profils sédimentaires de la Baie de Vidy confirme que ces bactéries se sont accumulées depuis environ 20 ans et persistent dans les sédiments lacustres (Thevenon et al., 2012a). Toutefois, il est important de noter que l'augmentation importante de l'activité bactérienne (profils d'adénosine triphosphate [ATP]) reconstruite à partir d'enregistrements de la Baie de Vidy est synchrone d'une augmentation de l'activité bactérienne dans les sédiments profonds du Grand Lac et du Petit Lac (Thevenon et al., 2011b). Ceci suggère que cet évènement qui est le plus important du siècle n'est donc pas dû à un changement de source (la STEP de Lausanne) mais bien à un changement du système lacustre qui s'eutrophie dans les années 1970 du fait d'un excès de nutriments rejetés dans le lac. Bien que le niveau trophique du lac ait baissé au cours des dernières décennies, l'activité bactérienne demeure anormalement élevée dans les différents types de sédiments de surface du Léman (Thevenon et al., 2011b). L'analyse phylogénétique de 16S ARNr a d'ailleurs montré que les clones de bactéries sulfato-réductrices et ferri-réductrice (*Geobacter* sp.) étaient plus abondants dans les sédiments fortement contaminés de la Baie de Vidy en comparaison des sédiments non affectés par le rejet d'eaux usées; mais aussi que les compositions des communautés microbiennes étaient en chaque site corrélées aux variables environnementales étudiées (matière organique, nutriments et métaux) (Haller et al., 2011).

3.3. Evaluation des résistances aux antibiotiques

L'évaluation de résistances de FIB a été réalisée en utilisant le mélange de 5 antibiotiques (ampicilline, tétracycline, amoxicilline, chloramphénicol et érythromycine [Sigma, USA]); chaque antibiotique se trouve à une concentration finale de 20 µg mL-1 pour l'évaluation de résistance d'*E. coli* et à une concentration finale de 2 µg mL-1 pour l'évaluation de résistance d'ENT. Une autre famille d'antibiotique, notamment celle de beta-lactame communément utilisée en médecine, a été utilisée à la concentration de 100 µg mL^{-1}. Les résultats indiquent une forte résistance des bactéries aux antibiotiques utilisés, notamment à la famille de bata-lactame, avec des valeurs allant jusqu'à 48% pour *E. coli* et 37% pour les ENT. La résistance est moins significatif pour le mélange des 5 antibiotiques, avec une valeur maximale de 4.6% (Thevenon et al., 2011b).

Cette résistance bactérienne aux antibiotiques ne semble pas directement liée à l'implantation de la STEP en 1964 puisqu'elle augmente considérablement dans les sédiments accumulés dans les années 1970 lorsque l'activité bactérienne augmente elle aussi fortement (Thevenon et al., 2012b) (Fig. 3). Toutefois, selon une étude récente (Czekalski et al., 2012), les effluents hospitaliers contiennent la charge la plus élevée de bactéries MAR et de gènes de résistance aux antibiotiques. Il en est de même des sédiments de la baie de Vidy qui reçoivent les effluents de la STEP, et qui peuvent être considérés comme un grand réservoir des bactéries MAR.

Etant donné que moins de 10% des bactéries sont cultivables, nous avons détecté les gènes de résistance aux antibiotiques par la méthode moléculaire. L'amplification PCR pour la détection de gènes de résistance à la famille de beta-lactame (Table 1) a été effectuée sur l'ADN extrait des cellules bactériennes et sur les colonies de *E. coli* et ENT isolées. Les signaux positifs de gènes de résistance à la famille de beta-lactame ont été observés dans les sédiments récemment déposés. Ces résultats suggèrent que la communauté bactérienne a probablement acquis des gènes de résistances aux antibiotiques provenant essentiellement des effluents de la STEP (Pruden et al., 2006). Toutefois, des études complémentaires sont en cours pour quantifier les gènes de résistances par PCR quantitative afin de caractériser non seulement le degré de résistance de différentes familles d'antibiotique, mais aussi le phénomène de transfert horizontal de gènes entre les différentes communautés bactériennes dans les sédiments contaminés par le rejet d'eaux usées de la Baie de Vidy.

4. Conclusion

Nos résultats montrent que les sédiments artificiellement enrichis en matière organique par les effluents d'une STEP comme ceux de la Baie de Vidy constituent un réservoir important de bactéries pathogènes. De plus, ces bactéries peuvent être multi-résistantes aux différentes familles d'antibiotiques comme celle de beta-lactame. Ces résultats confirment l'im-

pact des effluents partiellement traités des STEP sur l'environnement aquatique et plus particulièrement sur la qualité bactérienne des eaux de surface. L'amplification PCR et MALDI-TOF MS a confirmé que la pollution bactérienne des sédiments de la baie de Vidy est essentiellement due aux coliformes d'origine humaine (présence de bactéroïdes humaines). Le risque majeur est la remobilisation de ces bactéries vers la colonne d'eau par des processus physicochimiques ou par remobilisation des sédiments, soit par des processus naturels (glissement gravitaire) soit par des activités humaines (activités récréatives, travaux). Cette remobilisation entrainerait la dégradation de la qualité de l'eau et d'importants risques pour la santé humaine. Sachant que les sédiments de la baie de Vidy sont soumis depuis presque 50 ans à une forte contamination organique et bactérienne, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre la persistance et la reproduction des bactéries pathogènes, la dissémination des gènes d'antibiotiques et le transfert horizontal entre bactéries dans un substrat sédimentaire fortement enrichi en nutriments mais aussi contaminé en ETM. Le rôle de la biomasse bactérienne sur la remobilisation des contaminants à partir des sédiments vers la colonne d'eau doit également faire l'objet de recherches approfondies.

Remerciements

Cette recherche a été financée en partie par la fondation Ernst et Lucie Schmidheiny et par la Société Académique de Genève, ainsi que par une bourse (PZ00P2_136899) du Fonds National Suisse (FNS) de la recherche scientifique (F. Thevenon).

Bibliographie

- **Ahmed W, Stewart J, Gardner T, Powell D, Brooks P, Sullivan D, Tindale N.** 2007. Sourcing faecal pollution: a combination of library-dependent and library-independent methods to identify human faecal pollution in nonsewered catchments. Water Res. 41: 3771-3779.
- **Allen KH, Donato J, Huimi Wang H, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J.** 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. Nature Rev. Microbiol. 8, 251-259.
- **Andrews JM.** 2001. Determination of minimum inhibitor concentrations. J. Antimicrob. Chem. 48, supp. SI: 5-16.
- **Belaaouaj A, Lapoumeroulie C, Caniça M, Vedel G, Névot P, Krishnamoorthy R, Paul G.** 1994. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). FEMS Microbiol. Lett. 120: 75-80.
- **Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O.** 2011. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Clinically Relevant Bacteria. PLoS ONE, 6: e16424.
- **Bernhard AE, Field KG**. 2000. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in Bacteroides-Prevotella genes encoding 16S rRNA. Appl. Env. Microbiol. 66: 4571-4574.
- **Bertolla F, Pepin R, Passelegue-Robe E, Simkon A, Nesme X, Simonet, P**. 2000. Plant genome complexity may be a factor limiting in situ the transfer of transgenic plant genes to the phytopatogen Ralstonia solonacearum. Appl. Env. Microbiol. 66: 4161 – 4167.
- **Bertrand H, Poly F, Van VT, Lombard N, Nalin R, Vogel TM, Simonet P**. 2005. High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction. J. Microbiol. Meth. 62: 1-11.
- **Bonvin F, Rutler R, Chevre N, Halder J, Kohn T**. 2011. Spatial and Temporal Presence of a Wastewater-Derived Micropollutant Plume in Lake Geneva. Env. Sci. Technol. 45: 4702-4709.
- **Choi S, Chu W, Brown J, Becker S, Harwood VJ, Jiang SC.** 2003. Application of enterococci antibiotic resistance patterns for contamination source identification at Huntington Beach, California. Mar. Pollut. Bull. 46: 748-755.
- **Courtois S, Frostegärd A, Göransson P, Deoret G, Jeannin P, Simonet P.** 2001. Quantification of bacteria subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. Env. Microbiol. 3: 431-439.
- **Craig DL, Fallowfield HJ, Cromar NJ.** 2004. Use of microcosms to determine persistence of Escherichia coli in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements. Journal of Applied Microbiology, 96, 922–930.
- **Czekalski N, Caucci S, Egli A, Bürgmann H.** 2012. Increased Levels of Multiresistant Bacteria and Resistance Genes after Wastewater Treatment and Their Dissemination into Lake Geneva, Switzerland. Front. Microbio. 3:106. doi: 10.3389/fmicb.2012.00106.
- **Davies CM, Long JAH, Donald M, Ashbolt NJ.** 1995. Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. Appl. Env. Microbiol. 61: 1888-1896.
- **Demanèche S, Sanguin H, Poté J, Navarro E, Bernillon D, Mavingui P, Wildi W, Vogel T-M, Simonet P**. 2008. Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105: 3957-3962.
- **Demanèche S, Jocteur-Monrozier L, Quiquampoix H, Simonet P**. 2000. Evaluation of Biological and Physical Protection against Nuclease Degradation of Clay-Bound Plasmid DNA. Appl. Env. Microbiol. 67: 293-299.
- **Dorioz JM, Pelletier JP, Benoit P.** 1998. Physico-chemical properties and bioavailability of particulate phosphorus of various origins in a watershed of Lake Geneva (France). Water research, 32: 275-286.
- **Frörstner U, Wittmann GTW.** 1979. Metal Pollution in the Aquatic Environment. Springer-Verlag, Berlin, 486 p.
- **Furtado ALS, Casper P.** 2000. Different methods for extracting bacteria from freshwater sediment and a simple method to measure bacterial production in sediment samples. J. Microbiol. Meth. 41: 249-257.
- **Gillan CD, Danis B, Pernet P, Joly G, Dubois P**. 2005. Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment. Appl. Env. Microbiol. 71: 679-690.
- **Glass-Haller L.** 2010. Microbial and geochemical characterization of a contaminated freshwater ecosystem (the case of Vidy Bay, Lake Geneva, Switzerland). Terre et Environnement, 95: 186.
- **Goldscheider N, Haller L, Poté J, Wildi W, Zopfi J.** 2007. Characterizing Water Circulation and Contaminant Transport in Lake Geneva Using Bacteriophage Tracer Experiments and Limnological Methods. Environ. Sci. Technol. 41: 5252-5258.
- **Haller L, Tonolla M, Zopfi J, Peduzzi R, Wildi W, Poté J.** 2011. Composition of bacterial and archaeal communities in freshwater sediments with different contamination levels (Lake Geneva, Switzerland). Water research, 45: 1213-1228.
- **Haller L, Poté J, Loizeau J-L, Wildi W.** 2009a. Distribution and survival of faecal indicator bacteria in the sediments of the Bay of Vidy, Lake Geneva, Switzerland. Ecological indicators, 9: 540-547.
- **Haller L, Amedegnato E, Poté J, Wildi W.** 2009b. Influence of freshwater sediment characteristics on persistence of fecal indicator bacteria. Water, Air, and Soil Pollution. 203: 217-227.
- **Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG**. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. J. Clin. Microbiol. 37: 3497-3503.
- **Kümmerer K**. 2004. Resistance in the environment. J. Antimicrob. Chemoth. 54, 311-320.
- **Loizeau J-L, Pardos M, Monna F, Peytremann C, Haller L, Dominik J.** 2004. The impact of a sewage treatment plant's effluent on sediment quality in a small bay in Lake Geneva (Switzerland–France). Part 2. Temporal evolution of heavy metals. Lakes Reservoirs: Research and Management, 9: 53–63
- **Maron P-A, Schimann H, Ranjard L, Brothier E, Domenach A-M, Lensi R, Nazaret S.** 2006. Evaluation of quantitative and qualitative recovery of bacterial communities from different soil types by density gradient centrifugation. Eur. J. of Soil Biol. 42: 65-73.

- **Martinez JL.** 2008. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. Science, 321, 365-367.
- **Martinez JL.** 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. Environmental Pollution, 157: 2893–2902
- **Morasch B, Bonvin F, Reiser H, Grandjean D, de Alencastro LF, Perazzolo C, Chèvre N, Kohn T.** 2010. Prioritization, occurrence and fate of pharmaceuticals and other micropollutants in the Vidy bay (Lake Geneva): Part II: micropollutant removal in the wastewater treatment plant and during subsequent passage through the bay into raw drinking water. Environ. Toxicol. Chem. 29: 1658–1668.
- **Morrison C, Bachoon D, Gates K.** 2008. Quantification of enterococci and Bifidobacteria in Georgia estuaries using conventional and molecular methods. Water Research, 42: 4001-4009.
- **Ordonnance sur l'hygiène** (OHyg) 2005. Ordonnance du DFI sur les denrées alimentaires et les objets usuels (ODIOUS). Berne.
- **Pardos M, Benninghoff C, De Alencastro LP, Wildi W.** 2004. The impact of a sewage treatment plant's effluent on sediment quality in a small bay in Lake Geneva (Switzerland-France). Part 1: Spatial distribution of contaminants and the potential for biological impacts. Lakes Reservoirs: Research and Management, 9: 41-52.
- **Perazzolo C, Morasch B, Kohn T, Magnet A, Thonney D, Chevre N.** 2010. Occurrence and fate of micropollutants in the Vidy Bay of Lake Geneva, Switzerland. Part I: Priority list for environmental risk assessment of pharmaceuticals. Environ. Toxicol. Chem. 29: 1649-1657.
- **Poté J, Bravo AG, Mavingui P, Ariztegui D, Wildi W.** 2010. Evaluation of quantitative recovery of bacterial cells and DNA from different lake sediments by Nycodenz density gradient centrifugation. Ecological Indicators, 10: 234-240.
- **Poté J, Haller L, Kottelat R, Sastre V, Arpagaus P, Wildi W.** 2009a. Persistence and growth of faecal culturable bacterial indicators in water column and sediments of Vidy Bay, Lake Geneva, Switzerland. Journal of Environmental Sciences, 21: 62–69.
- **Poté J, Goldscheider N, Haller L, Zopfi J, Khajehnouri F, Wildi W.** 2009b. Origin and spatial-temporal distribution of fecal bacteria in a bay of Lake Geneva, Switzerland. Environ. Monit. Assess. 154: 337–348
- **Poté J, Haller L, Loizeau J-L, Garcia Bravo A, Sastre V, Wildi W.** 2008. Effects of a sewage treatment plant outlet pipe extension on the distribution of contaminants in the sediments of the Bay of Vidy, Lake Geneva, Switzerland. Bioresource Technology, 99: 7122-7131.
- **Pruden A, Pei R, Storteboom H, Carlson K.** 2006. Antibitic resistance genes as emerging contaminants: Studies in Northern Colorado. Env. Sc. Technol. 40: 7445-7450.
- **Sabat G, Rose P, Hickey WJ, Harkin JM.** 2000. Selective and sensitive method for PCR amplification of Escherichia coli 16S rRNA genes in soil. Appl. Environ. Microbiol. 66: 844-849.
- **Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C.** 2004. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant Escherichia coli strains of human, animal and food origin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48: 3996-4001.
- **Schwarzenbach RP, Escher BI, Fenner K, Hofstetter TB, Johnson CA, von Gunten U, Wehrli B.** 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. Science, 313: 1072–1077.
- **Thevenon F, Graham ND, Chiaradia M, Arpagaus P, Wildi W, Poté J.** 2011a. Local to regional scale industrial heavy metal pollution recorded in sediments of large freshwater lakes in Central Europe (lakes Geneva and Lucerne) over the last centuries. Science of the Total Environment, 412-413, 239-247.
- **Thevenon F, Graham ND, Hebez A, Wildi W, Poté J.** 2011b. Spatio-temporal distribution of organic and inorganic pollutants from Lake Geneva (Switzerland) reveals strong interacting effects of sewage treatment plant and eutrophication on microbial abundance. Chemosphere, 84: 609-617.
- **Thevenon F, Regier N, Benagli C, Tonolla M, Adatte T, Wildi W, Poté J.** 2012a. Characterization of faecal indicator bacteria in sediments cores from the largest freshwater lake of Western Europe (Lake Geneva, Switzerland). Ecotoxicology and Environmental Safety, 78: 50-56.
- **Thevenon F, Adatte T, Wildi W, Poté J.** 2012b. Antibiotic resistant bacteria/genes dissemination in lacustrine sediments highly increased following cultural eutrophication of Lake Geneva (Switzerland). Chemosphere, 86: 468-476.
- **Tonolla M, Benagli C, De Respinis S, Gaia V, Petrini O.** 2009. Mass spectrometry in the diagnostic laboratory. Pipette, 3: 20-25.
- **Wildi W, Dominik J, Loizeau JL, Thomas RL, Favarger P-Y, Haller L, Perroud A, Peytremann C.** 2004. River, reservoir and lake sediment contamination by heavy metals downstream from urban areas of Switzerland. Lakes Reservoirs: Research and Management, 9: 75–87.
- **Yin X, Stotzky G.** 1997. Gene transfer among bacteria in natural environments. Adv. Appl. Microbiol. 45:153-212.