

Dénitrification et production de N₂O dans le bassin de la Seine.

Approches expérimentales et in situ dans les bassins amont

Josette Garnier, Emmanuelle Mounier, Anniët Laverman, Céline Amsaleg, Anun Martinez,

Mohamed Herbal & Thibeault Geoffroy

UMR Sisyphe 7619, Fonctionnement des Hydrosystèmes, Université P. & M. Curie-CNRS, Boite 105, Tour 56,
Etage 4, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France

1. Introduction	2
2. Matériel et méthodes.....	2
2.1. Sites d'études et stratégies d'échantillonnage	3
2.1.1 Les sites d'étude.....	3
2.1.2 Les stratégies d'échantillonnage	5
2.2. Méthodes et protocoles	6
2.2.1 Les réacteurs.....	6
2.2.2 Les techniques de Biologie Moléculaire.....	7
<i>Extraction des ADN</i>	7
<i>Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)</i>	8
<i>La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)</i>	9
3. Résultats	9
3.1. Distribution de l'azote inorganique dans le réseau de la Seine	9
3.1.1 Distribution de l'azote en fonction de l'ordre des rivières.....	10
3.1.2 Distribution de l'azote en fonction de l'occupation du sol	11
3.1.3 Variations saisonnières de l'azote dans les sous-bassins emboîtés de la Marne	13
3.2. Taux de dénitrification en réacteur à flux continu.....	14
3.3. La communauté dénitrifiante en réacteurs.....	18
3.3.1 Le gène nirS.....	18
3.3.2 Le gène nirK	19
3.3.3 Le gène nosZ	19
3.3.4 Les nouvelles recherches méthodologiques pour la caractérisation des populations microbiennes ...	20
4. Résultats	21
5. Conclusions.....	22

Résumé

Les émissions de N₂O dans les cours d'eau amont de la Seine, sans doute essentiellement liées à la dénitrification dans les zones ripariennes (Thèse E. Mounier, en cours) ont été étudiées en 2006 à l'échelle spatiale du bassin de la Seine à 70 stations à deux périodes clé, hivernales et estivales et à une échelle temporelle dans un des sous-bassins, afin d'interpréter l'importance de l'ordre des rivières et de l'occupation des sols sur ces émissions. A noter que des échantillons sont préparés en parallèle pour appréhender la dénitrification par la biogéochimie isotopique avec ces mêmes objectifs (cf Sebilo et al., ce volume).

En laboratoire, les facteurs de contrôle de la dénitrification, tels que les teneurs en carbone et les concentrations en nitrate (NO₃⁻), ont été exploré avec des réacteurs à flux continu. Après avoir raffiné les facteurs de contrôle de la dénitrification et formalisé mathématiquement les cinétiques de dénitrification et d'émissions de N₂O, un module décrivant explicitement le processus sera inclus au modèle Riverstrhaler du fonctionnement écologique de la Seine.

La caractérisation des organismes qui réalisent la dénitrification, après une longue phase de mise au point mettant justement en œuvre les techniques de biologie moléculaire, est aussi en cours de réalisation.

1. Introduction

Les deux processus de dénitrification et de nitrification (la nitrification dénitrifiante en particulier) sont à l'origine d'une production importante d'oxyde nitreux (N₂O). Le N₂O, au même titre que le gaz carbonique (CO₂) ou le méthane (CH₄), est un gaz à effet de serre, et contribue donc au réchauffement climatique global. Il est impliqué également dans la destruction de la couche d'ozone, ce qui justifie une attention particulière aux mécanismes responsables de ses émissions. 20 % des gaz à effet de serre proviennent de l'agriculture, et en France 56 % sont liés au N₂O contre 11 % et 33 % pour le CO₂ et le CH₄ respectivement. Le réseau hydrographique de la Seine, des têtes de bassins à l'estuaire, offre un cas d'étude idéal pour l'étude des perturbations du cycle de l'azote par l'activité humaine à l'échelle régionale.

Alors que le processus de nitrification qui domine dans l'axe principal du fleuve à l'aval de Paris, lié essentiellement aux rejets en ammonium des effluents urbains a largement été étudié (Brion & Billen, 1998 ; Brion et al., 2000 ; Cébron et al., 2003, 2005 ; Garnier et al., 2001, 2006), la dénitrification semble un processus majeur dans les sédiments des grands cours d'eau régulés (ordre 5-7) et de leurs annexes hydrauliques (barrages réservoirs, Garnier et al., 1999), et surtout dans les zones riveraines des petits cours d'eau (Billen & Garnier, 1999, Sebilo et al., 2003).

Un objectif majeur est de quantifier les émissions de N₂O dans les bassins amont associées aux pratiques agricoles (fertilisation, types d'occupation des sols) et d'appréhender le N₂O dans les cours d'eau, résultants de sa production aux interfaces et de sa ventilation en fonction de l'ordre des cours d'eau. La démarche, celle que nous avons utilisée depuis plus de 15 ans dans le cadre du programme PIREN-Seine, allie les observations de terrains, l'expérimentation en laboratoire et la modélisation. Toutefois, le modèle conceptuel ayant été présenté précédemment, l'accent sera ici sur les résultats destinés à l'implémenter.

2. Matériel et méthodes

2.1. Sites d'études et stratégies d'échantillonnage

2.1.1 Les sites d'étude

Le bassin de la Seine

Le réseau hydrographique de la Seine s'étend sur un bassin versant de 78 650 km² (jusqu'au Havre). Le fleuve prend sa source sur le plateau de Langres (417 m) et se jette dans la Manche (Figure 1). La Seine et l'ensemble de ses tributaires sont caractérisés par un régime hydrologique de type pluvial océanique : les pluies sont réparties toute l'année, avec un maximum d'écoulement en hiver, quand les températures sont basses et l'évapotranspiration minimum, et un minimum d'écoulement en été.

Le réseau hydrographique de la Seine peut être subdivisé en quatre sous-bassins : la Seine-Amont, les affluents principaux de la Seine (Marne, Oise et Eure) et un axe principal, la basse Seine.

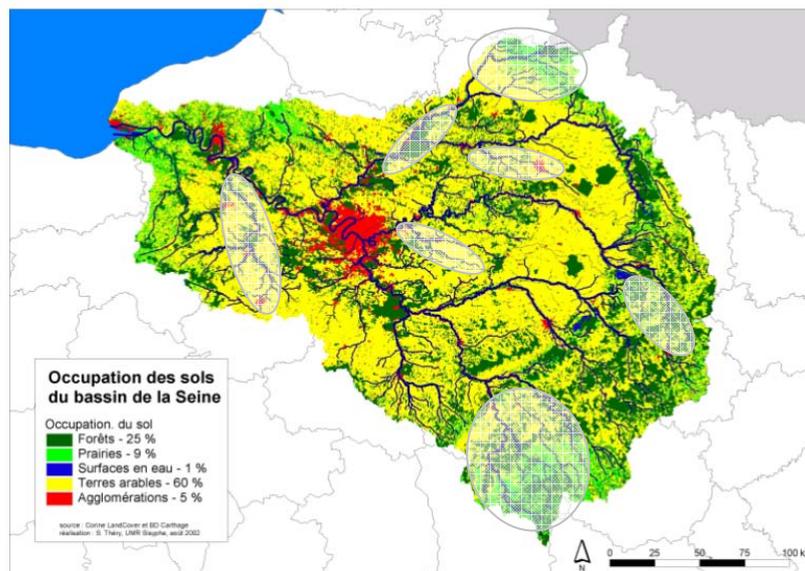


Figure 1: Occupation des sols dans le bassin de la Seine (Carte PIREN-Seine de Sylvain Théry)

Le bassin de la Marne et le sous-bassin du Grand Morin

La Marne est l'un des principaux affluents de La Seine, avec un bassin hydrographique d'une superficie de 12 800 km². Elle prend, tout comme la Seine, sa source sur le plateau de Langres. L'un de ses affluents, le Grand Morin, présente un bassin versant de 1 180 km² qui est devenu un bassin type pour l'étude du fonctionnement écologique d'un cours d'eau de tête de bassin en milieu agricole (Figure 2).

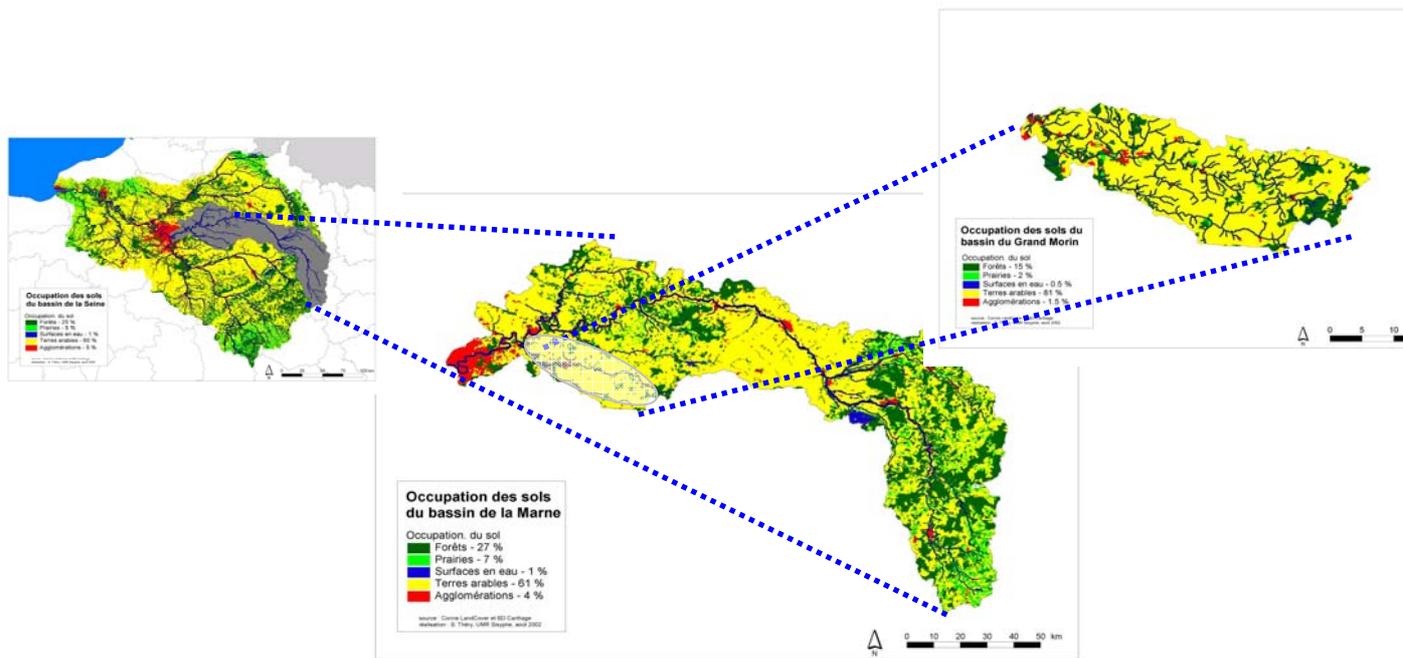


Figure 2. Localisation des bassins de la Marne et du Grand Morin. Occupation des sols dans les bassins de la Marne et du Grand Morin (Carte PIREN-Seine de Sylvain Théry)

Le bassin de l'Orgeval

Le bassin de l'Orgeval couvre une superficie de 104 km² et présente une mosaïque de zones forestières et de grandes cultures (Figure 3). Les cours d'eau qui le parcourent offrent par conséquent de bons contrastes entre les affluents purement forestiers, ceux ne traversant que des terrains agricoles et enfin les affluents mixtes (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

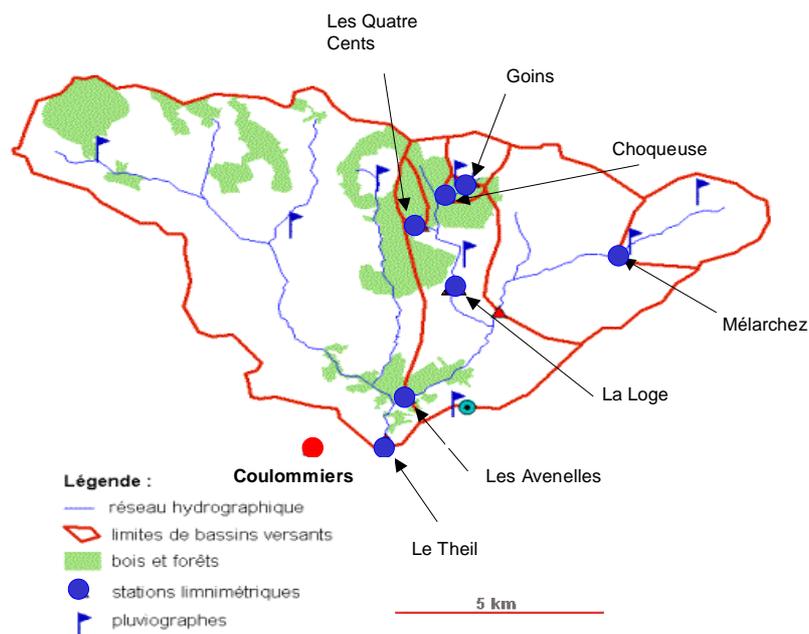


Figure 3. Occupation des sols dans le bassin de l'Orgeval (carte Cemagref de Claire Billy).

Tableau 1. Caractéristiques des stations (ordre de Strahler, superficie et type du bassin versant)

Stations	Ordre de Strahler	Superficie du bassin versant (km ²)	Type de bassin versant	% cultures	% Forêt
Les quatre cent	1	1.1	Forestier	0	100
Goins	1	1.3	Agricole	> 90	< 10
Choqueuse	1	1.7	Mixte		
Mélarchez	1	7.1	Agricole	> 90	< 10
La Loge	1	9.6	Mixte / agricole		
Les Avenelles	2	45.7	Mixte		
Le Theil	3	104	Mixte		
Tresmes (Grand Morin)	4	770	Mixte		
St Maurice (Marne)	6	12726	Mixte/dominance		

2.1.2 Les stratégies d'échantillonnage

Prélèvement d'eau

L'étude du bassin emboîté de la Marne est réalisée à 9 stations d'échantillonnage; pour les plus grandes rivières, il s'agit de St Maurice à l'exutoire de la Marne, de Tresmes, à l'exutoire du Grand Morin, du Theil, à l'exutoire de l'Orgeval (Figure 2 ;Figure 3). Six autres stations ont été échantillonnées dans le bassin de l'Orgeval (Tableau 1. Caractéristiques des stations (ordre de Strahler, superficie et type du bassin versant), (Figure 3. **Occupation des sols dans le bassin de l'Orgeval (carte Cemagref de Claire Billy).**). La fréquence des prélèvements est de toutes les 3 semaines environ depuis novembre 2005. Ces prélèvements seront poursuivis en 2007, mais éventuellement en 2008 si nécessaire.

Pour les autres bassins de la Seine, l'Oise (Vesle et Oise amont), la Seine Amont (Seine et Yonne), l'Eure et la Marne (Grand Morin et Blaise), les échantillonnages ont été réalisés au printemps et en été 2006, à environ 70 stations.

En même temps que sont mesurées sur le terrain les variables classiques (oxygène, pH, température), qui peuvent éventuellement renseigner sur la pertinence des stations choisies (pollution par exemple), de l'eau est prélevée aux différentes stations avec un seau ou une bouteille.

Un échantillon de 100 ml est stocké immédiatement dans des flacons de verre, traité au chlorure mercurique afin de stopper toute activité bactérienne puis scellé hermétiquement jusqu'à l'analyse en chromatographie en phase gazeuse. De 5 à 10 litres d'eau sont ramenés au laboratoire où ils sont conditionnés pour les analyses de matières en suspension -MES-, et carbone organique particulaire -COP-, (filtration sur des filtres Whatman GF/F pré-grillés à 500 °C et pré-pesés), et pour les formes dissoutes inorganiques de l'azote (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+), de la silice et du phosphore (filtrats des précédents). De l'eau filtrée est également conservée pour effectuer des mesures de biogéochimie isotopique (^{15}N et ^{18}O) dans le cadre d'une collaboration financée par le programme ECCO-CNRS (2 ; 9). De l'eau est également filtrée sur une membrane en nitrocellulose (Durapore, Millipore, 0.22 μm) en vue d'une extraction éventuelle d'ADN et d'une analyse des profils des communautés dénitrifiantes. Les filtres sont réalisés en triplicats. Le volume filtré est compris entre 50 et 100 ml en fonction de l'importance des matières en suspension. Le filtre peut ensuite être congelé à -20°C jusqu'à l'analyse.

Des filtrats obtenus à travers des filtres Whatman GF/C sont également stockés pour éventuellement déterminer la quantité de biomasse algale par la mesure des pigments, chlorophylle et

phéopigments. Les filtres des MES et COP sont conservés dans des boîtes de Pétri (Petrislide) à température ambiante, ceux des chlorophylles étant stockés dans des tubes à centrifuger de 10 ml à -20°C et congelés jusqu'à l'analyse.

Prélèvement de sédiments

Des prélèvements de sédiments sont régulièrement effectués à la station de Tresmes dans le Grand Morin, et sont destinés aux études expérimentales en réacteurs à flux continu. Des prélèvements ont été également réalisés en juin 2006 pour appréhender l'hétérogénéité de la zone de prélèvement, horizontale et verticale. D'autres investigations de ce type pourront être réalisées, si nécessaire.

Des sédiments ont aussi été prélevés au cours de la campagne estivale dans différents secteurs du bassin de la Seine.

Des segments de tubes en plexiglas sont insérés dans un carottier, leur hauteur (1, 2 ou 3 cm) dépendant de la hauteur du réacteur utilisé. Ces segments constituent les corps des réacteurs, les sédiments étant ainsi conservés intacts. Les échantillons de sédiments sont collectés dans un carré d'environ 1 mètre de côté où des prélèvements supplémentaires sont pratiqués pour les analyses permettant de caractériser le sédiment (granulométrie, contenu en carbone, etc.). Le substrat est choisi dans une zone représentative du secteur de rivière, exempte de végétation (pour éviter une déstructuration de la carotte par des racines) et de débris plus gros que la circonférence du carottier.

Après le prélèvement du sédiment, il suffit de retirer le segment du carottier que l'on a choisi d'étudier en conditions contrôlées du laboratoire. Les prélèvements sont conservés dans une glacière jusqu'à l'arrivée en laboratoire où les réacteurs sont montés (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**)

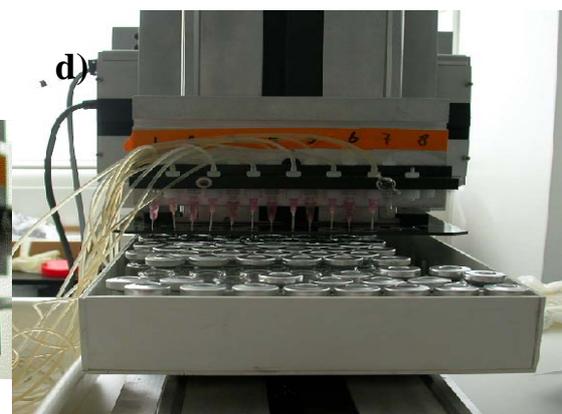
2.2. Méthodes et protocoles

2.2.1 Les réacteurs

Les échantillons ainsi transportés au laboratoire sont montés en réacteur à l'arrivée au laboratoire puis placés dans le réfrigérateur jusqu'au lancement de l'expérience



Figure 4. Photos du dispositif de prélèvements du sédiment et d'un réacteur
a) Carottier. b) Réacteur avant montage. c) Réacteur monté. d) système complet.
(Laverman et al. 2006)



Pour chaque traitement, 6 échantillons liquides sont prélevés à intervalles réguliers (12 h) afin d'obtenir des conditions stationnaires dans le réacteur. Les prélèvements sont ainsi effectués pendant 2 heures/jour (2 prélèvements de 1h chacun). A la fin de l'expérience, les flacons sont agités 5 minutes et 5 ml d'atmosphère sont prélevés à l'aide d'une seringue étanche aux gaz puis injectés dans des flacons de 5 ml, hermétiquement clos par un septum et sous vide (Venojects). Ce prélèvement destiné à la détermination du N₂O, est conservé jusqu'à analyse au chromatographe phase gazeuse. L'échantillon liquide du flacon à pénicilline est conservé en totalité, congelé à -20° C jusqu'à l'analyse des formes dissoutes de l'azote.

Au début et à la fin de l'expérience en réacteur, des échantillons de sédiments sont prélevés : 3 fois 0.5 mg pour les analyses par les outils de la biologie moléculaire, 5 g pour l'extraction au KCl et une dizaine de gramme pour le taux d'humidité et la perte au feu. Le reste est congelé pour les autres analyses (granulométrie, carbone, etc.).

Les études en réacteurs sont réalisées selon Laverman et al. (2006) avec un débit de pompe d'environ 8.4 ml/h, le volume des réacteurs étant de 41.54 cm³. Les réacteurs sont alimentés en continu pendant 2 à 3 jours, période pendant laquelle les prélèvements sont effectués à la sortie pendant 1h30 dans un tube de 15 ml. 2 prélèvement par jour sont effectués pour analyser le N₂O. Ces expériences relative à la dénitrification sont effectuées en anaérobiose en triplicat.

Influence du nitrate sur le taux de dénitrification : plusieurs séries de réacteur ont été étudiées. Une gamme de 4 concentrations en nitrate ajouté a été testée lors de ces expériences de 1 à 100 mgN/l (2, 5, 10, 30, 60 mgN/l ou encore 10, 20, 60, 100 mgN/l).

Influence du carbone sur le taux de dénitrification : deux séries de 12 réacteurs ont été explorées avec 4 concentrations en carbone : 2, 5, 20 et 30 mg C /L pour les premiers, 0 mg C, 2, 5 et 30 mg C/L pour les second. La concentration en nitrate était maintenue saturante à 60 mg N /L.

2.2.2 Les techniques de Biologie Moléculaire

Extraction des ADN

L'extraction des ADN à partir des sédiments *in situ* et des sédiments issus des réacteurs après expérience est réalisée à l'aide du kit UltraClean Soil DNA Isolation Kit utilisé conformément au protocole fourni par le fabricant et en répétant une deuxième fois l'étape finale d'élution. Aucune étape de purification n'est nécessaire et l'ADN est immédiatement utilisable en PCR. La qualité de l'extraction est observée et quantifiée par migration sur un gel d'agarose. La quantification se fait grâce au marqueur de taille de concentration connue qui co-migre.

L'extraction de l'ADN recueilli sur les filtres en nitrocellulose se fait selon un protocole dérivé de celui présenté par Harry et al. (1999). Les rebords du filtre sont d'abord éliminés puis le filtre est découpé en 4 chacun des morceaux étant introduit dans un tube de 2 ml.

L'analyse commence par une première étape de lyse ou cours de laquelle les matières en suspension retenues sur le filtre sont d'abord éluées grâce à 250µl d'une solution de lyse (0.15 M NaCl, 0.1 M Na₂EDTA ph 8, lysozyme 15 mg/ml), passées au vortex et incubées 50 min à 50°C. De la protéinase K est ensuite ajoutée (85 µl à 10 mg/ml), les tubes passés au vortex sont incubés 10 min à 50°C et 10 min à 60°C. Après incubation, 85 µl de SDS à 10 % sont ajoutés ainsi que 250 µl d'une solution de lyse II (0.2 M NaCl, 1M Tris-HCl, pH8). Le tout est incubé 10 min à 65°C.

La deuxième étape consiste en la précipitation des protéines. On ajoute 400 µl de NaCl (4.5 M) chauffé à 65°C, les tubes sont agités par retournement et incubés à 4°C pendant 5 min. Enfin, à 2 reprises, on centrifuge le contenu du tube pour éliminer le filtre et les précipités dans le culot, (15 min à 5000 g) ; le surnageant contenant l'ADN peut alors être récupéré dans un tube de 1.5 ml propre.

La troisième étape est la précipitation de l'ADN. Un demi volume d'isopropanol est ajouté, le tube est centrifugé 15 min à 10 000 g et le surnageant éliminé. Le culot est lavé avec 500 µl d'éthanol à 70%, centrifugé pendant 5 min à 10 000 g, puis séché dans le tube à l'air libre ou à l'étuve (45-50°C) pendant la nuit. Enfin, l'ADN est remis en suspension dans 25 µl d'eau Milli-Q par tube et les contenus des 4 tubes (correspondant aux 4 quarts du filtre) mélangés. Au terme de ces 3 étapes, l'ADN de chacun des filtres est donc en suspension dans 100µl.

Après cette extraction, une étape de purification s'impose. Celle ci s'effectue à l'aide des kits Wizard® SV Genomic DNA Purification de Promega. L'ADN est ensuite testé par PCR sur le MyCycler de Biorad avec 2.5 µl d'ADN non dilué dans un volume final de 12.5 µl avec les amorces spécifique du gène *nirK*.

Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les **différentes amorces (oligonucléotides)** permettant d'amplifier le gène ciblé) utilisées au cours de ce mémoire sont présentées dans le Tableau 2. Chaque couple d'amorces a été choisi à partir de publications scientifiques. Une de ces amorces a toutefois été modifiée dans le cadre de cette étude suite à un défaut d'orientation. La température d'hybridation optimale (T_m) a été calculée ou déterminée expérimentalement lors de la mise au point des conditions de PCR.

Tableau 2: Liste des amorces utilisées

^(a) : R = A ou G ; M = A ou C ; Y = C ou T ; S = G ou C ; K = T ou G ; V = A, G ou C ; H = A, C ou T ; N = A, C, G ou T

Oligonucléotide	Sens	Gène ciblé	Séquence (5' en 3') ^(a)	T _m	Taille du fragment	Référence
NosZ-F NosZ1622Rb	Sens Anti-sens	<i>nosZ</i> <i>nosZ</i>	CGYTGTTCMTGGACAGCCAG CGSACCTTSTTGCCSTYGCG		411 bp 411 bp	Rösch et al, 2002 (8) D'après Thröback et al 2004 (12)
cd3F	Sens	<i>nirS</i>	GTNAAYGTNAARGARACNG G	50 °C	495 bp	Goréguès , 2004 (3)
cd4R	Anti-sens	<i>nirS</i>	ACRTRAAAYTTNCCNGTNGG	50 °C	495 bp	Goréguès , 2004 (3)
nirKCF	Sens	<i>nirK</i>	GGCRYTTYGTCTAYCACTGC	58 °C	476 bp	Goréguès , 2004 (3)
nirKCR	Anti-sens	<i>nirK</i>	NGHRCCVCCVSGRATRAACC A	58 °C	476 bp	Goréguès , 2004 (3)

L'amplification par PCR et la détection de fragments d'intérêt par PCR est réalisée sur 50 ng d'ADN cible. Le mélange réactionnel contient 1 ml d'oligonucléotides à 50 µM, 2 ml de MgCl₂ à 15 mM, 0.25 ml d'un mélange de désoxyribonucléotide triphosphate à 5 µM chacun, 2 ml de BSA à 5 mg/ml, 0.75 unité de Taq polymérase (Promega Corporation) et 5 µl du tampon fourni avec la Taq dans un volume final de 25 µl.

Les conditions d'amplification, déterminées d'après celles mentionnées dans les travaux cités ci-dessus, sont les suivantes :

- Pour *nirS* : une première étape de dénaturation de 2 minutes à 95°C puis 30 cycles composés d'une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C, une étape d'hybridation de 20 sec à 50°C et une étape d'élongation d'une minute à 72°C; enfin une étape d'élongation finale de 3 minutes à 72°C puis la mise à 4°C.

- Pour *nirK* : une première étape de dénaturation de 2 minutes à 95°C puis 30 cycles composés d'une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C, une étape d'hybridation de 20 sec à 58°C et une étape

d'élongation d'une minute à 72°C; enfin une étape d'élongation finale de 3 minutes à 72°C puis la mise à 4°C.

- Pour *nosZ* : une première étape de dénaturation de 2 minutes à 95°C puis 2 cycles composés d'une étape de dénaturation de 20 secondes à 95°C, une étape d'hybridation de 30 sec à 65°C et une étape d'élongation de 35 secondes à 72°C ; 3 cycles composés d'une étape de dénaturation de 20 secondes à 95°C, une étape d'hybridation de 30 sec à 62°C et une étape d'élongation de 40 secondes à 72°C ; 4 cycles composés d'une étape de dénaturation de 20 secondes à 95°C, une étape d'hybridation de 30 sec à 59°C et une étape d'élongation de 45 secondes à 72°C ; 30 cycles composés d'une étape de dénaturation de 20 secondes à 95°C, une étape d'hybridation de 30 sec à 56°C et une étape d'élongation de 40 secondes à 72°C et enfin une étape d'élongation finale de 10 minutes à 72°C puis la mise à 4°C.

Une partie des produits de PCR (5 µl) est ensuite déposé sur un gel d'agarose pour vérification de l'intensité et de la taille des produits d'amplification, avant le dépôt sur le gel de DGGE.

La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

L'appareillage au laboratoire a été mis en place au cours de cette première étape et la technique à l'étude de la diversité génétique des trois gènes de fonctions déjà mentionnés : *nirS*, *nirK* et *nosZ*. A du être adaptée.

La DGGE est une technique de séparation électrophorétique basée sur la différence de comportement de fragments d'ADN double brin de séquences différentes lors de leur dénaturation. Cette technique a été appliquée dès 1993 par Muyzer et al. (1993) pour l'étude de la structure génétique de mélanges complexes de communautés bactériennes grâce aux variations de séquences du gène codant pour l'ADNr 16S. D'autres travaux ont par la suite utilisées cette technique pour l'étude de la diversité génétique de gènes de fonction (Stephen et al., 1998 ; Cébron et al., 2004 ; Goréguès et al., 2005).

Après amplification par PCR et vérification (cf. ci-dessus), les produits sont déposés sur un gel vertical de polyacrylamide à gradient dénaturant d'urée et de formamide en utilisant un système Dcode (Bio-Rad Laboratories Inc.) afin de séparer les produits en fonction de leur séquence.

Lors de cette migration, plusieurs bandes peuvent apparaître et parfois former un profil complexe, illustrant la complexité de la communauté bactérienne. Les images à haute résolution des gels DGGE sont numérisées et analysées à l'aide du logiciel Quantity One (Bio-Rad). A chaque dépôt (piste) correspond un profil de migration mesuré en intensité de pixels. L'intensité du bruit de fond est soustraite de chaque profil. Les bandes de chaque piste sont détectées, répertoriées et celles qui occupent la même position sur le gel sont considérées comme identiques.

3. Résultats

3.1. Distribution de l'azote inorganique dans le réseau de la Seine

Les échantillons récoltés lors de la campagne d'été et destinés à quantifier les concentrations de N₂O dans l'eau n'ayant pas encore été analysés, seules les formes dissoutes de l'azote seront présentées ici.

3.1.1 Distribution de l'azote en fonction de l'ordre des rivières

L'observation de concentrations en nitrate plus faibles dans les petits cours d'eau que dans les aquifères ou les eaux sous-racinares qui les alimentent a depuis longtemps permis de soupçonner l'existence d'un processus riparien éliminant une fraction importante des nitrates agricoles avant qu'ils ne rejoignent les eaux de surface (Billen and Garnier, 1999). La biogéochimie isotopique permet de montrer clairement que la dénitrification riparienne est responsable de ce phénomène (Sebilo et al., 2003 ; Sebilo et al., 2006).

La distribution des concentrations en nitrate en fonction de l'ordre, en hiver (mars 2006) et en été (juillet 2006), montre en outre que les valeurs se différencient tant en fonction de l'ordre que de la saison (Figure 5). Encore élevées en hiver dans les ordres 1 avec une diminution dans les ordres supérieurs (environ 5 mgN.L^{-1}), les concentrations en nitrate sont bien plus faibles en été (environ 3 mgN.L^{-1}) (Figure 5).

A ce stade, cette différence entre l'été et l'hiver peut être attribuée à la fois au lessivage hivernal des sols nus et à la dénitrification estivale.

Des données complémentaires des concentrations en N_2O conduiront à interpréter le rôle de la dénitrification dans les émissions de N_2O .

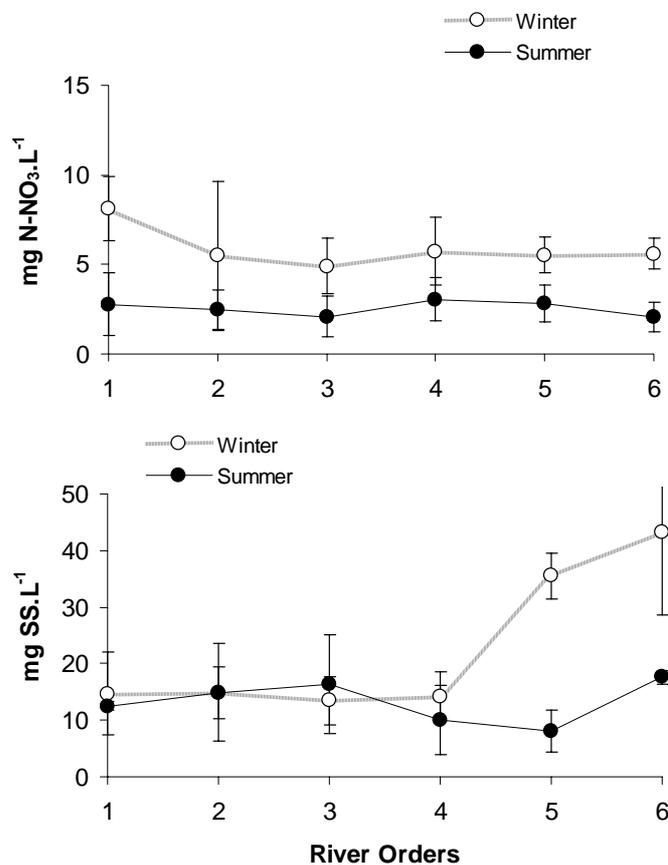


Figure 5 : Variations a) des concentrations en nitrate en fonction de l'ordre en hiver et en été 2006, b) des concentrations en matière en suspension (SS, suspended solids). Les valeurs sont moyennées par ordre, et assorties de leur écart-type (environ 70 échantillons à l'échelle du bassin de la Seine, pour chaque saison)

3.1.2 Distribution de l'azote en fonction de l'occupation du sol

Parmi les 70 stations échantillonnées, 5 types d'occupation des sols ont été sélectionnés (Figure 6). Comme précédemment, il apparaît que les valeurs sont plus faibles en été qu'en hiver, mais la Figure 6 montre en outre, comme on pouvait l'attendre, des valeurs plus élevées pour les terres arables que pour les secteurs à occupation mixte (forêts et/ou prairies et/ou cultures), les eaux des zones forestières étant naturellement les plus pauvres en nitrate. Les secteurs urbains de l'amont du bassin ne montrent pas de tendance particulière, se comportant comme des zones à occupation mixte.

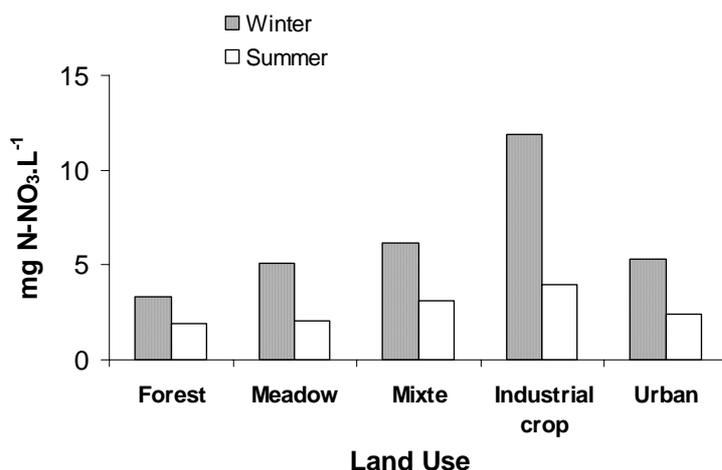


Figure 6 : Variations des concentrations en nitrate en fonction de l'occupation du sol pour l'hiver et l'été 2006 (environ 70 échantillons à l'échelle du bassin de la Seine, pour chaque saison).

Le comportement des matières en suspension est similaire à celui du nitrate. Si en hiver, cette similitude provient du même lessivage, érosif quand les sols sont nus, en été si la couverture des sols contribua à la diminution des matières en suspension, la diminution des concentrations en nitrate est bien un phénomène biologique (Figure 7).

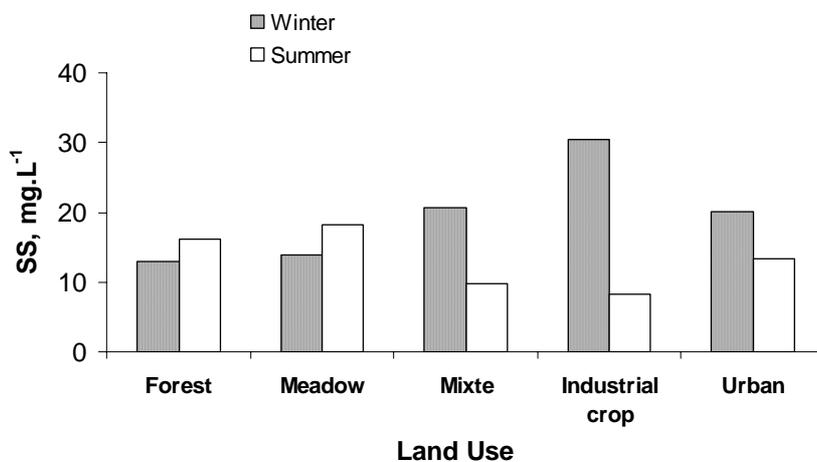


Figure 7 : Variations des concentrations en matières en suspension (SS) en fonction de l'occupation du sol pour l'hiver et l'été 2006.

Les valeurs montrent en outre une variabilité très importante (Figure 8) ce qui doit conduire à les interpréter en fonction de la situation dans le bassin (géologie, ordre) et de l'occupation des sols.

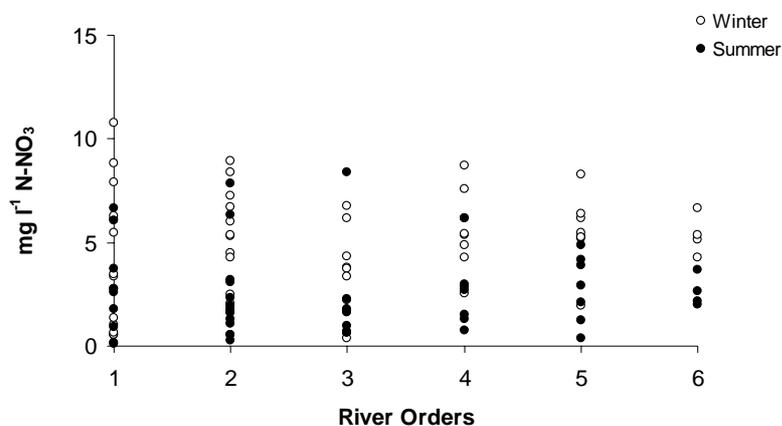


Figure 8 : Variabilité des concentrations en nitrate en fonction de l'ordre en hiver et en été 2006 par ordre (de 1 à 6) et par période (été, hiver)

Les concentrations en ammonium sont d'une manière générale assez faibles, plus élevées en été qu'en hiver, ce qui peut être dû à une augmentation de la minéralisation de la matière organique avec la température et/ou à une moins grande dilution d'apport ponctuel domestique et/ou d'élevage à bas débit estival (Figure 9).

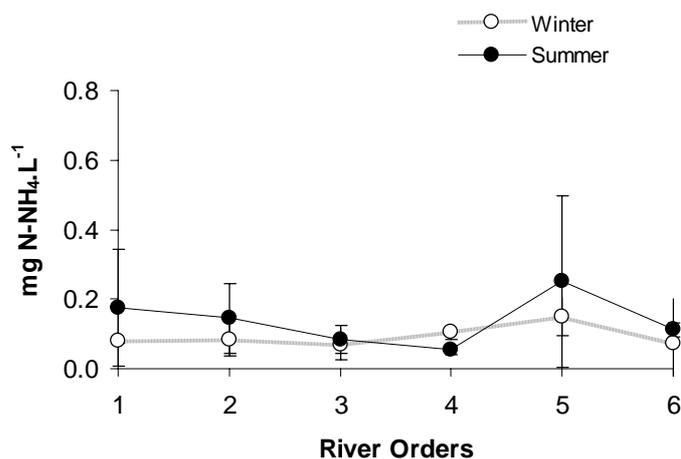


Figure 9 : Variations des concentrations en ammonium en fonction de l'ordre en hiver et en été 2006. Les valeurs sont moyennées par ordre, et assorties de leur écart-type.

3.1.3 Variations saisonnières de l'azote dans les sous-bassins emboîtés de la Marne

Les résultats des variations saisonnières de l'azote concernent presque un cycle annuel de novembre 2005 à septembre 2006 (Tableau 3). Rappelons que les prélèvements seront poursuivis jusqu'à la fin de l'année 2007 voire en 2008, en fonction de l'interprétation des résultats, ceux-ci étant encore largement incomplets à ce jour. Les concentrations en N₂O et les communautés bactériennes n'ont pas encore été analysées.

Tableau 3 : Liste des dates de prélèvements dans les bassins emboîtés de la Marne en 2006. Les stations et leur ordre correspondant sont indiqués, ainsi que les principales variables qui seront analysées (cf Figure 1 ; Figure 2 ; Figure 3).

ordre	15-nov	13-déc	3-janv	27-janv	23-févr	29-mars	19-avr	10-mai	30-mai	19-juin	18-juil	9-août	31-août	21-sept	10-oct	15-nov	10-déc
1	stations:		Source, Loges, Mélarchez,					variables:		NO ₃ , NH ₄ , NO ₂							
2			Avenelles							SS, COP,							
3			Theil							N ₂ O, communautés bactériennes dénitrifiantes							
4			Tresmes							PO ₄ , DSi							
6			St Maurice														

Bien que certaines valeurs soient encore manquantes et que d'autres mériteraient une validation, les variations des concentrations en nitrate montrent une tendance amont-aval avec des valeurs plus élevées à l'amont, assez stables saisonnièrement en ce qui concerne la tête du bassin (Source et Mélarchez, Figure 10).

A la station Loge, une diminution spectaculaire de la concentration en nitrate révèle probablement une dénitrification importante en été ; cette station se caractérise par un ralentissement du courant, un léger accroissement de la profondeur accompagné d'une accumulation de la matière organique comme le montre les observations visuelles du fond sédimentaire. Même si cette station est atypique dans un continuum d'ordre de rivière, elle est intéressante pour son potentiel dénitrifiant ; c'est un lieu où pourraient être réalisées des expériences de flux d'azote à l'interface eau-sédiment à l'aide de cloches benthiques (des essais préliminaires y ont été réalisés, pas montrés ici)

Aux ordres supérieurs (Avenelles et Theil), les concentrations hivernales sont, comme en tête de bassin, relativement hautes mais diminuent en été, révélant encore probablement une importante dénitrification (Figure 10).

Les concentrations en nitrate diminuent à l'aval, à Tresmes et davantage à St Maurice, les variations saisonnières étant de moins en moins marquées malgré une tendance générale à une diminution estivale. Cette tendance amont-aval est certainement liée à une dilution par des affluents moins contaminés en nitrate où les grandes cultures dominent moins que dans le petit bassin de l'Orgeval. Les distributions de l'occupation du sol des bassins concernés n'ont pas encore été analysées de manière rigoureuse dans cette perspective.

La tendance amont-aval des concentrations en ammonium est inversée par rapport à celles du nitrate, l'augmentation vers l'aval étant nécessairement liée à une augmentation progressive de la pollution ponctuelle, et sans doute à une minéralisation de la matière organique accumulée vers l'aval, produite dans ou apportée par les cours d'eau (Figure 10). La nitrification peut également sans doute expliquer un pourcentage de la variabilité.

Il n'est pas utile à ce stade, de poursuivre plus loin l'interprétation des transformations de l'azote, car des données clés, telles que les concentrations en N₂O, les variations des communautés bactériennes, les activités dénitrifiantes, et les données de la biogéochimie isotopiques devront être synthétisées ensemble.

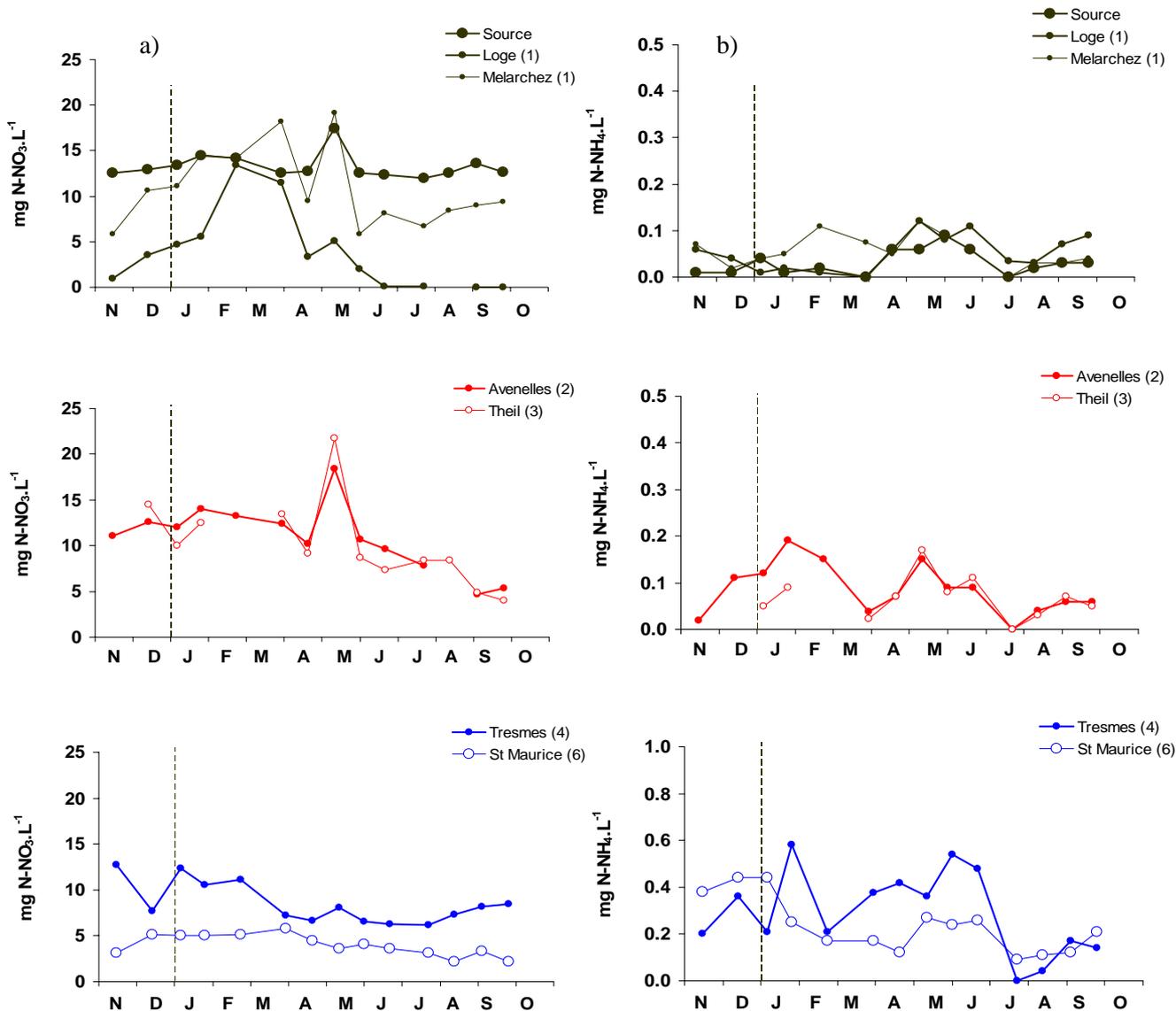


Figure 10 : Variations saisonnières des concentrations en nitrate (a) et en ammonium (b) aux stations des bassins emboîtés de la Marne (Tableau 3).

3.2. Taux de dénitrification en réacteur à flux continu

La figure 10 correspond à un sédiment prélevé à Tresmes (Grand Morin) en novembre 2006 dans les 3 premiers cm du sédiment. Le débit de la pompe était de 7.4 ml/h et la concentration en nitrate de la nourrice de 60 mg N/l.

Au cours de l'expérience, les flux de nitrate, nitrite, ammonium et d'oxyde nitreux montrent qu'une relative stabilité est obtenue après quelques heures. Seules les données après 20 heures sont considérées (Figure 10).

Dans ce cas particulier, il apparaît que la dénitrification est de l'ordre de 5 µgN/cm³/h avec une production de N₂O représentant de 0 to 0.2 % du nitrate réduit.

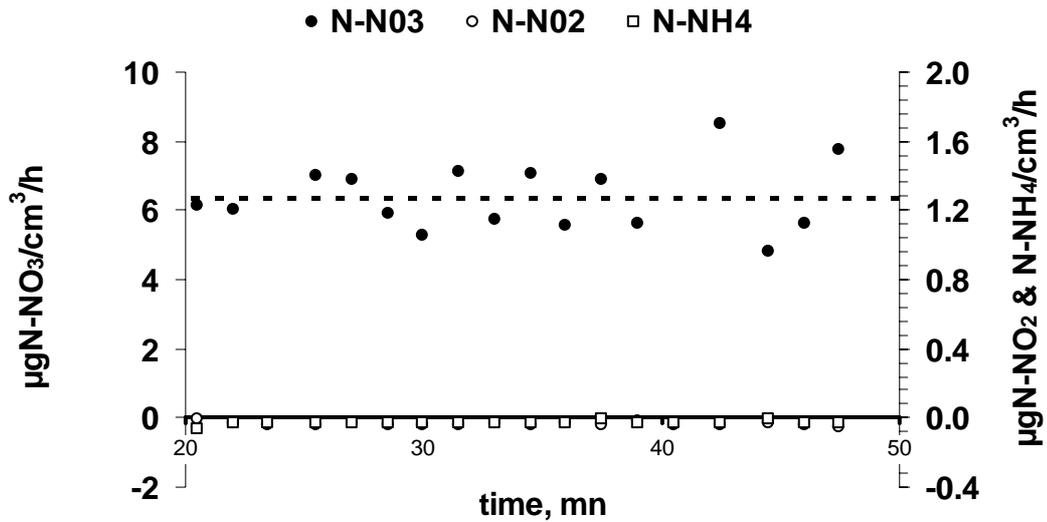


Figure 11: Exemple de résultats lors du fonctionnement d'un réacteur. Flux de nitrate, nitrite, ammonium à une concentration de la nourriture à $60 \text{ mg N-NO}_3^- / \text{l}$ solution.

Influence du nitrate sur le taux de dénitrification et les émissions de N_2O

Les taux de dénitrification portés en fonction des concentrations en nitrate explorées peuvent être ajustés à une cinétique de Michaelis-Menten kinetic ($Y = R_m \cdot [X] / (K_s + [X])$) permettant de déterminer deux paramètres, R_m (taux maximal de dénitrification) and K_s (constante de demi-saturation), (Figure 12). Pour l'ensemble des expériences effectuées, le taux de dénitrification maximum est de l'ordre de $7 \text{ µgN/cm}^3/\text{h}$ et la constante de demi-saturation de l'ordre de 18 mgN/L .

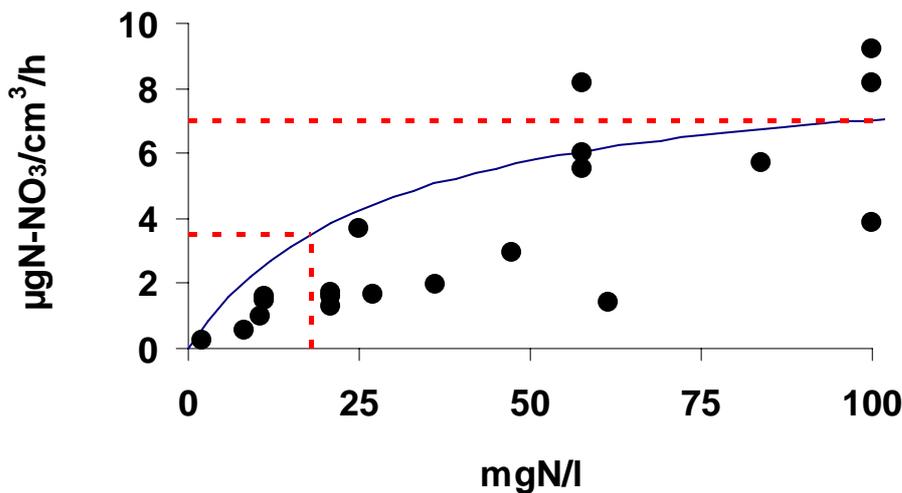


Figure 12. Valeurs expérimentales du taux de dénitrification en fonction des concentrations en nitrate. Ajustement à une courbe de Michaelis-Menten. Les valeurs des paramètres sont indiquées par les droites en pointillés.

Nous avons également cherché l'influence de l'ajout de nitrate sur la production de N_2O . Les dosages du N_2O sont tous réalisés en triplicats, la valeur utilisée pour les calculs étant la moyenne des trois dosages pour chaque expérience. L'évolution du taux de production en fonction de la concentration en nitrate de la solution nourrice pourrait être de type Michaelis-Menten, mais il existe des variations importantes dont l'analyse doit être poursuivie (Figure 13). Une droite de proportionnalité pourrait même être retenue.

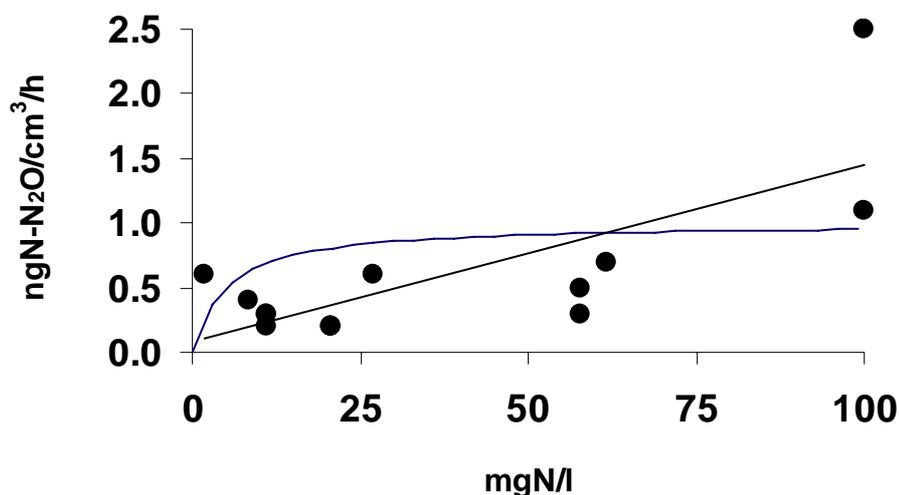


Figure 13: Valeurs expérimentales de la production de N_2O en fonction des concentrations en nitrate. Les valeurs ne permettent pas de conclure sur la forme de la cinétique.

En calculant le rapport production de N_2O / taux de dénitrification en fonction du taux de dénitrification, il apparaît que ce rapport est faible, 0.25 %_O en moyenne, si l'on exclut la valeur la plus élevée (>2 %_O) qui reste à confirmer pour un taux de dénitrification relativement faible inférieur à $1\mu\text{gN-NO}_3/\text{cm}^3/\text{h}$ (Figure 14).

Influence du carbone sur le taux de dénitrification et les émissions de N_2O

Alors que les réacteurs ont été alimentés avec une concentration saturante en nitrate (60 mg N L^{-1}), du carbone a été ajouté sous forme d'acétate de sodium (2, 5, 10, 20 et 30 mg/L).

Les données peuvent s'ajuster à une courbe cinétique de type Michaëlienne, avec un taux maximum de dénitrification R_m d'environ $9\mu\text{gN-NO}_3^-/\text{cm}^3/\text{h}$, assez proche de celui obtenu pour le gradient de nitrates (environ $7\mu\text{gN-NO}_3^-/\text{cm}^3/\text{h}$), (Figure 15). Compte tenu de la variabilité, cette différence de R_m n'est sans doute pas significative.

La constante de demi-saturation « apparente » en carbone est de l'ordre de 2 mgC/l dissout ajouté. Il n'est pas encore possible d'interpréter cette valeur en terme valeur réelle car les dosages du carbone des échantillons ne sont pas encore effectués, tant sous la forme totale que biodégradable. Une valeur initiale de 1 mgC/L de carbone total biodégradable peut en effet être attendue.

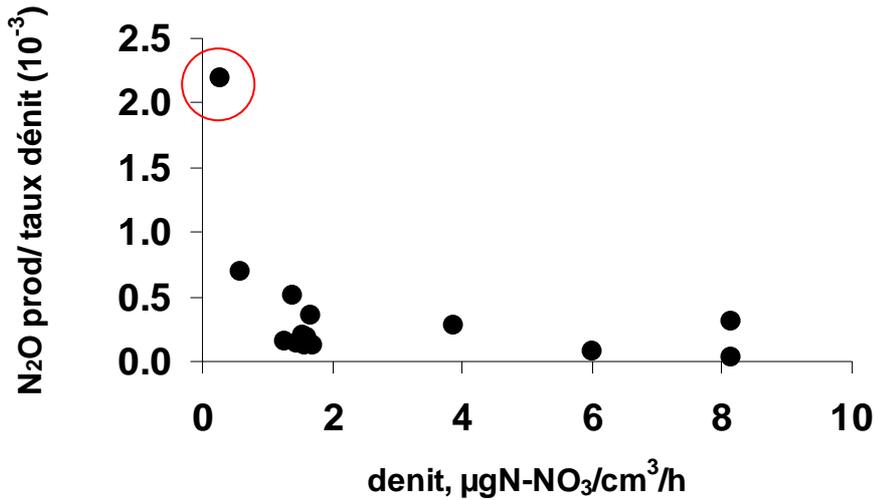


Figure 14. Rapport de la production de N_2O et de la dénitrification (en ‰) en fonction du taux de dénitrification.

Il est important de noter que des expériences en réacteur avec $100 \text{ mgN-NO}_3/\text{l}$ et 10 et 20 mgC/l ajouté montrent des taux de dénitrification à $14 \mu\text{gN-NO}_3^-/\text{cm}^3/\text{h}$, ce qui tend à confirmer que les concentrations en nitrate de 60 mg N L^- pourraient ne pas être saturantes. De même, pour s'assurer de la saturation en carbone, des expériences pourraient être menées en accroissant le gradient de carbone à 50 mgC/L .

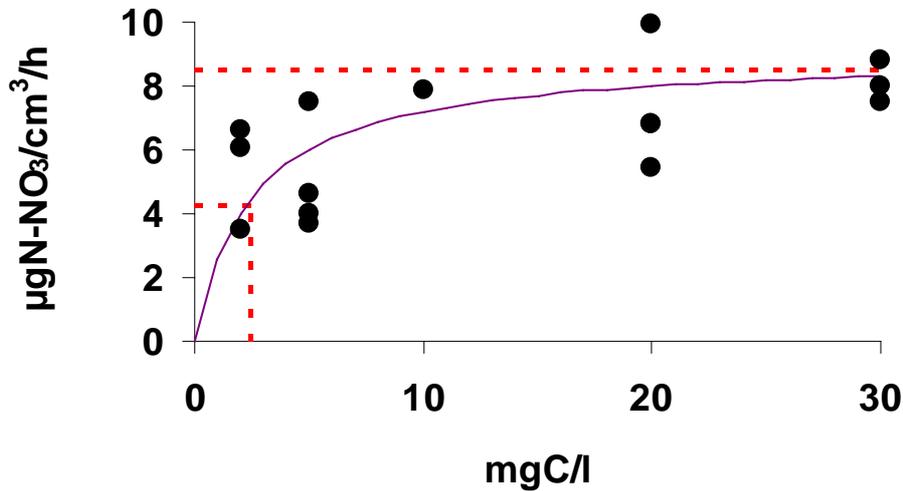


Figure 15. Valeurs expérimentales du taux de dénitrification en fonction des concentrations carbone pour un ajout en nitrate de 60 mgN/l . Ajustement à une courbe de Michaelis-Menten. Les valeurs des paramètres sont indiquées par les droites en pointillés.

La production de N_2O avec une concentration en nitrate saturante ou proche de la saturation, est relativement stable dans un gradient de carbone, et très faible (de l'ordre de $0.3 \text{ ngN-NO}_3^-/\text{cm}^3/\text{h}$, soit environ 0.5 ‰ du taux de dénitrification), (Figure 16).

Bien que ces valeurs soient à confirmer, une faible production de N_2O dans des conditions relativement favorables de dénitrification confirmerait que la production d'intermédiaires comme le N_2O seraient le fait de conditions non optimales comme nous l'avons montré pour la nitrification (eau de Seine et STEPs, Cébron et al., 2005) et pour la dénitrification (STEPs, Tallec et al., 2006).

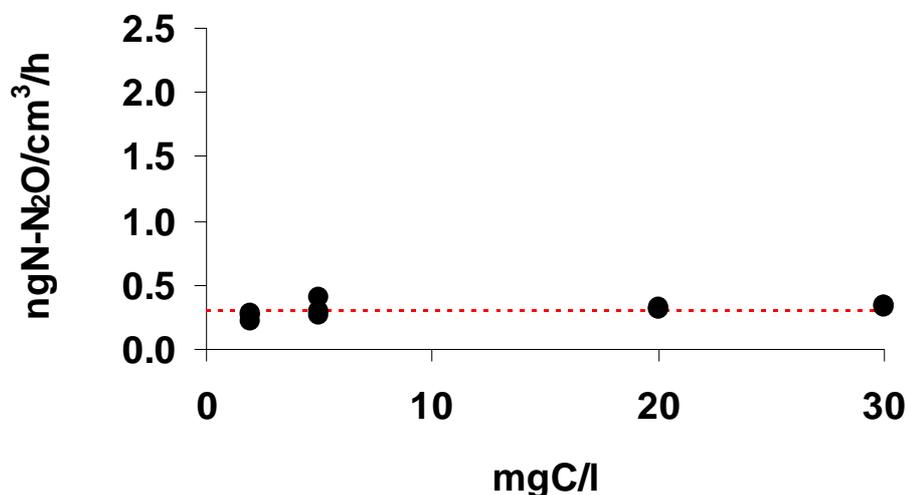


Figure 16. Valeurs expérimentales de la production de N_2O en fonction des concentrations en carbone ajouté sous forme d'acétate.

3.3. La communauté dénitrifiante

Seuls les résultats de DGGE de la série de réacteurs de juillet seront présentés. Il s'agit en effet de la seule série dont les migrations DGGE soient effectuées à l'heure actuelle et pour laquelle les gels DGGE ont à ce jour été doublés.

3.3.1 Le gène *nirS*

Il y a peu ou pas de variations entre les différents réacteurs en fin d'incubation, pas plus qu'avec le sédiment initial (Figure 17). Entre les deux gels, nous n'observons, là encore, pas ou peu de variations visibles (variations d'intensité dues probablement à des quantités d'ADN déposées différentes). Ces premiers résultats montrent donc une stabilité de la communauté dénitrifiante pendant l'incubation en réacteur ; ce résultat est tout à fait intéressant car il devrait permettre d'interpréter les vitesses de dénitrification ou de production de N_2O en fonction des variables testées en s'affranchissant d'une modification de la population microbienne.

Des analyses plus poussées des profils DGGE seront possibles grâce à une analyse du gel sur ordinateur avec le logiciel Quantity One (Bio-Rad Laboratories Inc.) et par séquençage de bandes d'intérêt.

Notons toutefois que si les marqueurs migrent de manière semblable sur un même gel, cette migration présente une différence entre les deux gels. Ce problème devrait être réglé par l'utilisation de clones pour construire un marqueur, à la place des fragments d'ADNr 16S de souches pures tels qu'utilisés à l'heure actuelle.

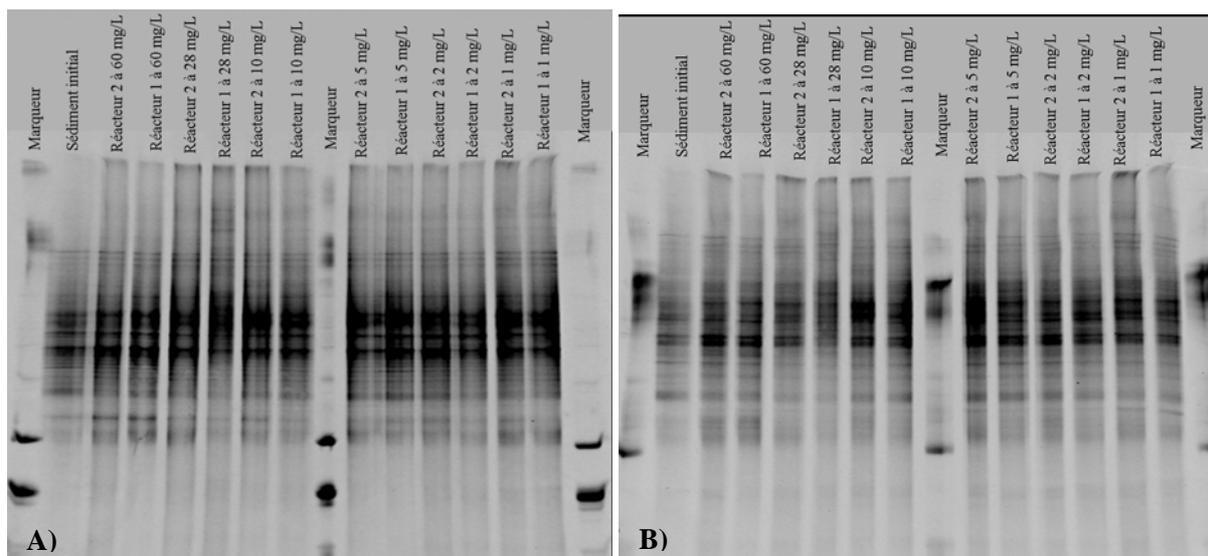


Figure 17: Gel de DGGE pour les amplifiats du gène *nirS*. Le marqueur est aux extrémités et au milieu du gel, Dans la seconde piste est présenté le profil du sédiment initial. Les autres pistes correspondent aux 12 réacteurs correspondant aux différents traitements en nitrate (de 60 à 1 mgN L^{-1}). Les gels A) et B) correspondent à des duplicats.

3.3.2 Le gène *nirK*

La Figure 18 présente des résultats du gel DGGE obtenu avec les amplifiats *nirK* issus des réacteurs de juillet 2006. Sur un même gel, les profils des différents réacteurs (en duplicats) ne montrent pas de différences entre eux pas plus qu'avec le sédiment initial. Cependant les deux gels ne sont pas identiques, la migration ayant été malheureusement perturbée pour un gel (Figure 18) ; ce résultat n'est donc pas définitif.

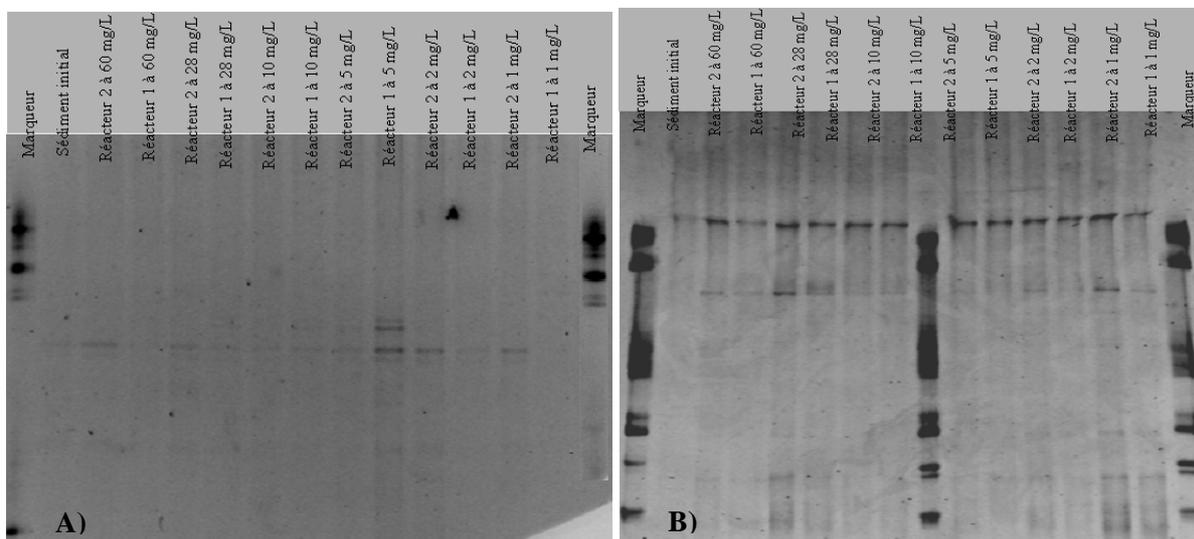


Figure 18 : Gel de DGGE pour les amplifiats du gène *nirK*. Le marqueur est en début, milieu et fin de gel. En second est présenté le profil du sédiment initial. Les autres pistes correspondent aux 12 réacteurs correspondant aux différents traitements en nitrate (de 60 à 1 mgN L^{-1}). Les gels A) et B) correspondent à des duplicats.

3.3.3 Le gène *nosZ*

Les profils obtenus après migration en DGGE des amplifiats *nosZ* sont observables à la Figure 19. Comme pour les deux premiers gènes, il n'y a pas de différence observable entre les différents traitements des réacteurs, et entre les réacteurs et le sédiment initial.

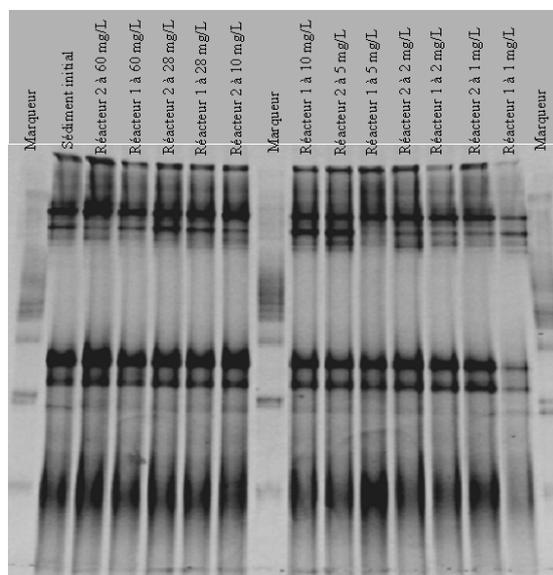


Figure 19 : Gel de DGGE pour les amplifiats du gène *nosZ*. Le marqueur est en début, milieu et fin de gel. En second est présenté le profil du sédiment initial. Les autres pistes correspondent aux 12 réacteurs correspondant aux différents traitements en nitrate (60 mgN L^{-1} , 28 , 10 , 5 , 2 et 1 mgN L^{-1}).

L'absence de modification de la communauté microbienne pendant les incubations en réacteurs quelques soient les traitements est un premier résultat intéressant, qui devra toutefois être confirmé dans d'autres conditions de traitements.

3.3.4 Les nouvelles recherches méthodologiques pour la caractérisation des populations microbiennes

Nous sommes actuellement en cours de mise au point d'un marqueur de migration DGGE spécifique des gènes de dénitrification *nirK*, *nirS* et *nosZ*.

A partir d'échantillons d'eau provenant du bassin du grand morin, nous avons extrait l'ADN microbien puis amplifié le gène *nirK*. Ces amplifiats ont été déposés sur un gel contenant un gradient de dénaturant (i.e. DGGE) pour séparer les différentes séquences en présence. Les profils obtenus ont permis d'isoler certaines bandes (séquences *nirK*) et de les cloner. Les bandes clonées sont ensuite re-testées en DGGE pour vérifier qu'elles couvrent bien l'ensemble de l'espace de migration.

Le marqueur sera ensuite testé, éventuellement adapté et amélioré, pour les deux autres gènes et permettra de comparer les communautés bactériennes dénitrifiantes d'un grand nombre d'échantillons environnementaux.

Des échantillons d'eau ont en effet été conditionnés sur les 70 stations en périodes hivernale et estivale et l'ADN extrait. De nombreux échantillons de sédiments ont aussi été récoltés et l'ADN également extrait. A cet égard une mise au point d'extraction de l'ADN total microbien récoltés sur filtres ($0.22 \mu\text{m}$) a du être re-mise au point pour les échantillons concernés par une méthode chimique et enzymatique (Roose-Amsaleg, et al., 2001).

4. Conclusion

Nous avons depuis plusieurs années (Phase 4 du PIREN-Seine et phase 3 de Seine-Aval), quantifié expérimentalement, sur le terrain et en laboratoire la production de N₂O lors de la nitrification en Basse Seine (de Paris à l'estuaire), ainsi que les microorganismes associés (Cébron et al., 2003 ; Cébron et al., 2004 ; Cébron & Garnier ; 2005 ; Cébron et al., 2005. Les émissions de N₂O par les STEPs de la région parisienne lors de la dénitrification et la nitrification ont également fait l'objet (Tallec et al., 2006 ; Tallec et al., 2007), 3) les émissions de N₂O dans les cours d'eau amont, sans doute essentiellement liés à la dénitrification dans les zones ripariennes (Thèse E. Mounier, en cours).

Nous avons dans un premier temps entrepris la quantification du N₂O dans les bassins et le réseau amont. A l'échelle du bassin, de manière plus complète que le bilan établi à partir des fertilisants (Garnier et al., 2006), une étude des émissions de N₂O sur la base des PRA en fonction des pratiques agricoles est en cours (INRA Mirecourt, M. Benoit), ce qui permettra d'établir un bilan spatialisé des émissions dans le bassin.

Dans le réseau hydrographique, cherchant à déterminer la production du N₂O résultants des processus aux interfaces sol-rivière et sédiment-eau, nous avons réalisé de campagnes spatiales à l'échelle du bassin qui montrent déjà, bien que le N₂O n'ait pas encore été analysé, des différences entre les bassins et selon la saison.

Sur le plan expérimental, nous commençons à cerner les cinétiques qui relient la dénitrification et les émissions de N₂O à leurs facteurs de contrôle (le nitrate et carbone à ce stade). Un gros travail de mise en œuvre des outils de biologie moléculaire a été réalisé pour caractériser les populations microbiennes dénitrifiantes, mais n'a pas encore abouti en termes de description des communautés et de liaison avec leur fonction dénitrifiante.

Sur le plan physiologique, le taux de dénitrification en fonction des facteurs de contrôle semble être décrit par des lois de Michaëlis-Menten. Les constantes de demi-saturation du taux de dénitrification par rapport au nitrate et au carbone sont relativement élevées (de l'ordre de 20 mgN/L et 2 mgC/L respectivement), ce qui montre une faible affinité pour le substrat. Les taux de dénitrification maximum, estimés mgN/m²/h en supposant la dénitrification homogène sur 2 cm de profondeur, sont d'environ 160 mgN/m²/h, de manière attendue d'environ 4 fois plus élevés que les flux mesurés *in situ* dans des conditions *in situ* (cf Billen et al., 2007).

Les cinétiques qui relient la production de N₂O à ces mêmes facteurs de contrôle ne sont à ce stade pas bien définies. Dans un gradient de nitrate ajouté, la production de N₂O s'accroît, mais c'est aux plus faibles valeurs de dénitrification que la proportion de la production de N₂O par rapport à la dénitrification est la plus élevée. S'il est possible que la production de N₂O soit plus élevée dans des conditions non optimales de dénitrification, de plus grande variabilité des faibles valeurs doit être analysée. Dans les conditions de saturation en nitrate et en carbone, les émissions de N₂O sont faibles, de 0.05 ‰ de la dénitrification.

A ce stade, il est important de mieux cerner la production de N₂O en fonction des concentrations en nitrate et en carbone. Il reste aussi à explorer le rôle des facteurs de contrôle importants tels que la concentration en nitrite, la température, le pH.

Enfin, au cours de la nouvelle phase du PIREN-Seine, nous souhaiterions élargir ces investigations, aux autres gaz à effet de serre, le CO₂ et le CH₄.

5. Références

- Billen G. & Garnier J. (1999). Nitrogen transfers through the Seine drainage network: a budget based on the application of the Riverstrahler model. *Hydrobiologia*, 410: 139-150.
- Billen, G., Garnier, J. (2006). River basin nutrient delivery to the coastal sea: assessing its potential to sustain new production of non siliceous algae. *Mar. Chem*, doi: 10.1016/j.marchem.2006.12.017
- Brion N. & Billen G. (1998). Une réévaluation de la méthode d'incorporation de $^{14}\text{HCO}_3$ pour mesurer la nitrification autotrophe et son application pour estimer les biomasses de bactéries nitrifiantes. *Rev. Sci. Eau* **11**, 283-302.
- Brion, N., G. Billen, et al. (2000). "Distribution of nitrifying activity in the Seine river (France) from Paris to the estuary." *Estuaries* **23**: 669-682.
- Cébron A., Berthe T. & Garnier J. (2003). Nitrification and Nitrifying bacteria in the lower Seine River and estuary. *Applied Envir. Microb.*, 69: 7091-7100
- Cébron A., Coci M., Garnier J. & Laanbroek H.J. (2004). DGGE analysis of the Ammonia Oxidizing Bacterial Community structure in the lower Seine River: impact of the Paris wastewater effluents. *Applied Envir. Microb.* 70: 6726-6737.
- Cébron A., Garnier J. & Billen G. (2005). Nitrous oxide production and nitrification kinetics by bacteria communities naturally present in river water (the lower Seine, France). *Aquat. Microb. Ecol.*, 41: 25–38.
- Cébron A. & Garnier J. (2005). Nitrobacter and Nitrospira genera as representative of the nitrite oxidizing bacteria: detection, quantification and growth along the lower Seine River. *Wat. Res.*, 39: 4979-4992.
- Garnier J., Leporcq B. Sanchez N. & Philippon X. (1999)- Biogeochemical budgets in three large reservoirs of the Seine basin (Marne, Seine & Aube reservoirs). *Biogeochemistry*, 47: 119-146
- Garnier J., Servais P., Billen G., Akopian M. & Brion N. (2001b). The oxygen budget in the Seine estuary: balance between photosynthesis and degradation of organic matter. *Estuaries* 24(6) : 964-977.
- Garnier J., Cébron A., Tallec G., Billen G., Sebilo M, Martinez A. (2006). Nitrogen behaviour and nitrous oxide emission in the tidal Seine River estuary (France) as influenced by human activities in the upstream watershed. *Biogeochemistry*, 77: 305 - 326
- Goréguès, C. M., V. D. Michotey, et al. (2005). "Molecular, biochemical, and physiological approaches for understanding the ecology of denitrification." *Microbial Ecology* **49**: 198-208.
- Laverman, A.M., Van Cappellen, P., van Rotterdam-Los, D., Pallud, C., Abell, J. (2006) Potential rates and pathways of microbial nitrate reduction in coastal sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 58(2), 179-192.
- Muyzer, G., E. C. de Waal, et al. (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 695-700.
- Roose-Amsaleg C.L., E. Garnier-Sillam, M. Harry, 2001. Extraction and Purification of microbial DNA from soil and environment samples, *Applied Soil. Ecology* , 18 : 47-60.
- Sebilo M., Billen G., Grably M. & Mariotti A. (2003). Isotopic composition of nitrate-nitrogen as a marker of riparian and benthic denitrification at the scale of the whole Seine River system. *Biogeochemistry*. 63 : 35-51.
- Sebilo M., Billen G., Mayer B., Billiou D., Grably M., Garnier J. & Mariotti A. (2006). Assessing nitrification and denitrification in the Seine River and estuary using chemical and isotopic techniques. *Ecosystems*. 9 : 564-577.
- Stephen, J. R., G. A. Kowalchuk, et al. (1998). "Analysis of β -subgroup proteobacterial ammonia oxidizer populations in soil by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and hierarchical phylogenetic probing." *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 2958-2965.

- Tallec G., Garnier J., Billen G., Gossailles M. (2006). Nitrous oxide emissions from secondary activated sludge in nitrifying conditions of urban wastewater treatment plants: effect of oxygenation level. *Water Research*, 40: 2972 - 2980.
- Tallec G., Rousselot O., Garnier J. & Gossailles M. (2007). Emissions d'oxyde nitreux lors du traitement de l'azote des eaux usées de l'agglomération parisienne: état actuel et prévisions. *Sciences Eau*. in press (Revue des Sciences de l'Eau).