

Bactéries dénitrifiantes, dénitrification dans les compartiments eau, sédiment, sol

Céline Roose-Amsaleg^{*}, Anniët Laverman, Guillaume Vilain, Josette Garnier

UMR Sisyphe 7619, Fonctionnement des Hydrosystèmes, Université Pierre et Marie Curie-CNRS, Boite 105, Tour 56, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France

^{*}celine.amsaleg@upmc.fr

1 Introduction

Les précédentes phases du programme PIREN-Seine ont permis de mieux identifier, quantifier et prévoir les pollutions dans le bassin de la Seine. On sait maintenant dans quelles proportions le bassin de la Seine est soumis à la pollution azotée, du fait de son agriculture intensive et son anthropisation soutenue. Ainsi, pour la pollution azotée, un bilan a pu être dressé par type de source. En tout, annuellement, ce sont 70 à 3961 kg d'azote apporté par km² (selon que l'année est sèche ou humide) qui sont d'origine diffuse agricole et 553 kg N/km² d'origine urbaine ponctuelle (Thieu *et al.*, 2009). Cet apport est principalement dû à deux composés azotés inorganiques : les nitrates (NO₃⁻) et l'oxyde nitreux (N₂O). Les NO₃⁻, sont dangereux pour la santé humaine mais surtout à l'origine des proliférations d'algues en zone côtière ; le N₂O, est un puissant gaz à effet de serre ayant un pouvoir de réchauffement 300 fois supérieur à celui du CO₂.

NO₃⁻ et N₂O sont impliqués dans de nombreuses réactions chimiques et/ou biologiques des cycles biogéochimiques (Canfield *et al.*, 2010). C'est sur la dénitrification que nous nous sommes focalisés dans cette phase du PIREN-Seine, la nitrification ayant été largement étudiée au cours de la phase précédente (Cebren *et al.*, 2003 ; Tallec *et al.*, 2006). En effet, la dénitrification, se définissant comme la réduction des NO₃⁻ en composés gazeux (le diazote, N₂ *in fine* et le N₂O comme intermédiaire), lorsqu'elle est complète, va représenter la principale voie de dépollution de l'azote inorganique. La dénitrification requiert 4 étapes enzymatiques catalysées par des réductases : NO₃⁻ → NO₂⁻, NO₂⁻ → NO, NO → N₂O, N₂O → N₂. C'est un processus biologique réalisé par des micro-organismes chemoorganotrophes facultativement aérobiques. Ces micro-organismes, capables de respirer des oxydes d'azote, sont phylogénétiquement très diversifiés : ils proviennent des trois principales branches de l'arbre du vivant *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya*. Par ailleurs, il est à noter qu'un même micro-organisme ne possède pas nécessairement toutes les enzymes de la dénitrification. De ce fait, les différentes étapes de la dénitrification peuvent avoir lieu indépendamment les unes des autres, spatialement et temporellement.

L'étude microbiologique des processus biogéochimiques se heurte au fait qu'une très faible proportion de micro-organismes sont cultivables sur milieu. Seulement entre 0,25 et 0,3 % des micro-organismes ayant pour habitat des échantillons environnementaux tels que ceux qui nous préoccupent, à savoir des eaux et sédiments de rivières et des sols agricoles peuvent être cultivés (Amann, 1995) et de ce fait permettre des études physiologiques. La grande majorité devra être atteinte au moyen de son matériel génétique (ADN) avec des outils de biologie moléculaire. Sachant tout cela, il apparaît évident que pour étudier les micro-organismes acteurs de la dénitrification, il faut travailler sur les gènes codant pour les enzymes impliquées dans les différents modules de réactions.

Les facteurs de contrôle de la dénitrification tels les concentrations en azote inorganique, en carbone, des expérimentations au laboratoire mesurant des taux de dénitrification de production de N₂O, ainsi que la caractérisation des *Bacteria* qui réalisent ces processus ont été étudiés, mettant en œuvre des techniques de biologie moléculaire et de biogéochimie. Un échantillonnage exhaustif des eaux et sédiments à divers ordres de rivière et correspondant à des milieux différents (rural urbain, forestier, agricole, etc..) a été réalisé sur l'ensemble du bassin de la Seine. Le compartiment-sol a également été étudié localement dans un petit sous-bassin agricole. Tout ceci a été mis en œuvre dans le même objectif : afin de caractériser les communautés bactériennes dénitrifiantes et les processus de dénitrification.

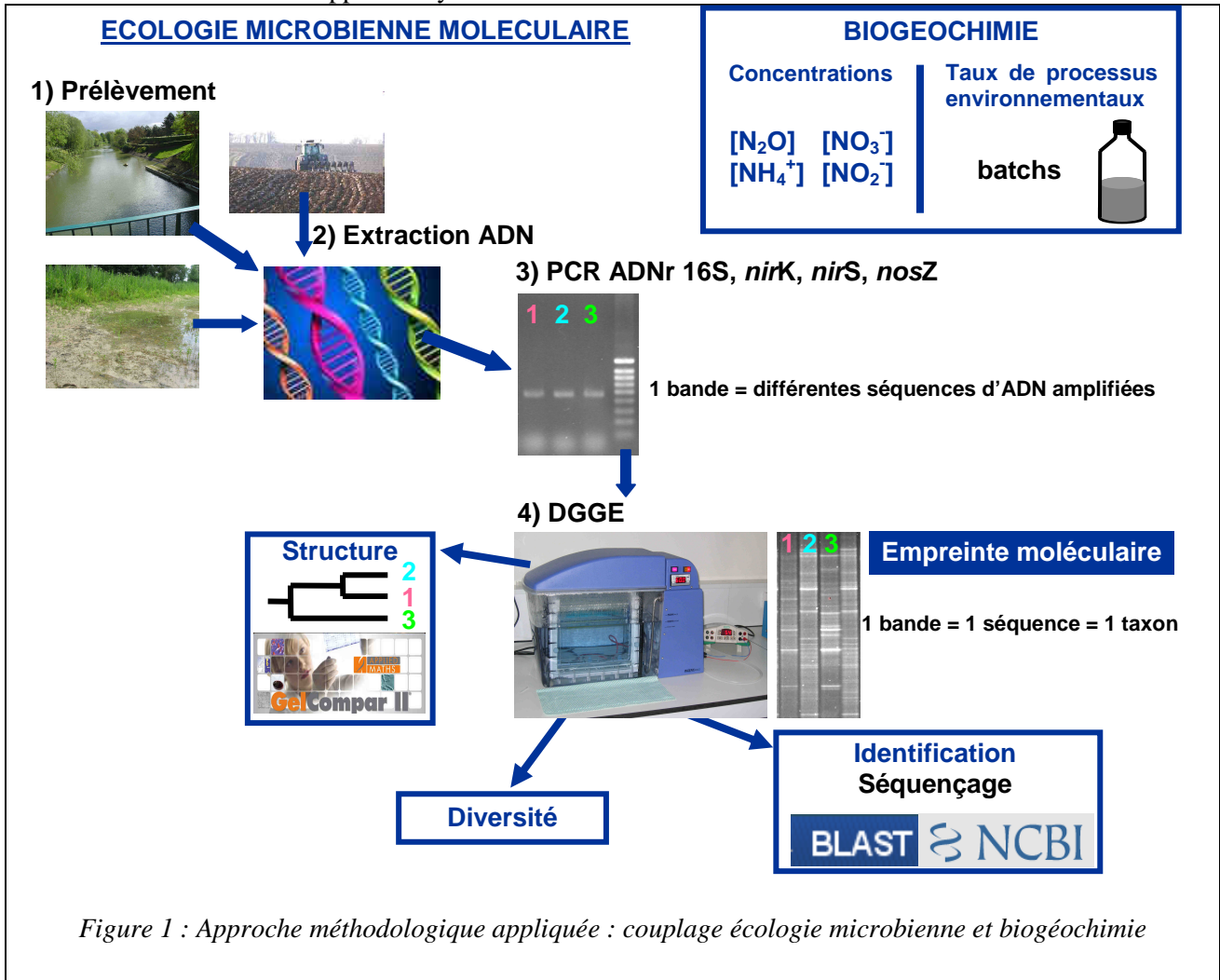
2 L'approche méthodologique

Pour mieux appréhender la dénitrification, nous avons couplé des analyses de **biogéochimie** soit des dosages de concentrations (NO_3^- , NO_2^- , N_2O , NH_4^+) soit des mesures de processus (potentiels de réduction des NO_3^- et d'émission de N_2O) à des explorations d'**écologie microbienne moléculaire** (voir la *Figure 1*).

Afin d'appréhender les potentialités de réduction des NO_3^- et d'émissions de N_2O , la dénitrification a été étudiée expérimentalement tant sur les sédiments que sur les sols en réalisant des batchs. Ces expériences, menées sur des durées relativement courtes, en conditions non limitantes de NO_3^- , et anoxie permettent de déterminer des taux semi-potentiels (le carbone organique pouvant être limitant).

L'extraction d'ADN a été réalisée directement à partir des sédiments, eaux et sols. Pour les sédiments et sols, il s'agissait d'une méthode de lyse mécanique et chimique (avec le kit UltraClean® Soil DNA Isolation de MOBIO pour les premiers et PowerSoil DNA Kit de MOBIO pour les seconds) ; pour les eaux, d'une lyse uniquement chimique (avec le kit NucleoSpin® Plant II de Macherey Nagel). Nous avons sélectionné 3 gènes fonctionnels de dénitrification parmi tous ceux connus (Philippot, 2002). Nous avons choisi de nous intéresser plus précisément aux communautés microbiennes dénitrifiantes du phylum des *Bacteria*. L'ADN codant pour la nitrite réductase (2 gènes : *nirS* et *nirK*, structurellement différents mais fonctionnellement identiques) permet d'étudier les populations bactériennes capables de réduire le NO_2^- en NO (Braker *et al.*, 1998; Michotey *et al.*, 2000) et l'ADN codant pour l'oxyde nitreux réductase (*nosZ*) permet d'étudier les populations bactériennes capables de réduire le N_2O en N_2 (Kloos *et al.*, 2001; Throbäck *et al.*, 2004). Enfin, l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S), présent dans toutes les bactéries permet de visualiser la structure des communautés bactériennes dans leur totalité (Muyzer *et al.*, 1993). En tout, ce sont 4 locus différents qui étaient analysés pour chaque échantillon prélevé.

A l'issue de la PCR, est obtenu un mélange d'amplifiats du gène ciblé, correspondant à des formes différentes du gène, venant de différentes bactéries présentes dans le milieu échantillonné. Une électrophorèse classique (séparant les molécules en fonction de leur poids moléculaire) ne permet pas de distinguer ces différentes formes du même gène (voir 3) de la *Figure 1*). C'est pourquoi nous avons soumis ces mélanges d'amplifiats à une électrophorèse en gradient de dénaturation (Denaturing Gradient Gel electrophoresis ou DGGE). La DGGE est une méthode de séparation de produits de PCR de poids moléculaires identiques en fonction de leur capacité à se dénaturer. Les produits d'amplification migrent dans un gel en présence de produits dénaturants répartis sous la forme d'un gradient. Ainsi, les différentes formes du gène s'échelonnent le long du gel (voir 4) de la *Figure 1*) et une empreinte génétique moléculaire est réalisée (pour les gènes de fonction, une bande est sensée représenter une seule séquence d'ADN et donc une seule espèce). Les gels sont numérisés et analysés avec le logiciel Gelcompar® II (Applied Maths). Les pistes de migration de chaque échantillon constituent une entrée dans une base de données et sont comparées de par leur contenu et disposition en bandes. On peut retirer trois types d'informations de ces empreintes moléculaires : la diversité de la communauté, sa structure c'est-à-dire sa composition et enfin l'identification de ses membres via le séquençage de bandes extraites du gel puis soumises à des bases de données via le l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).



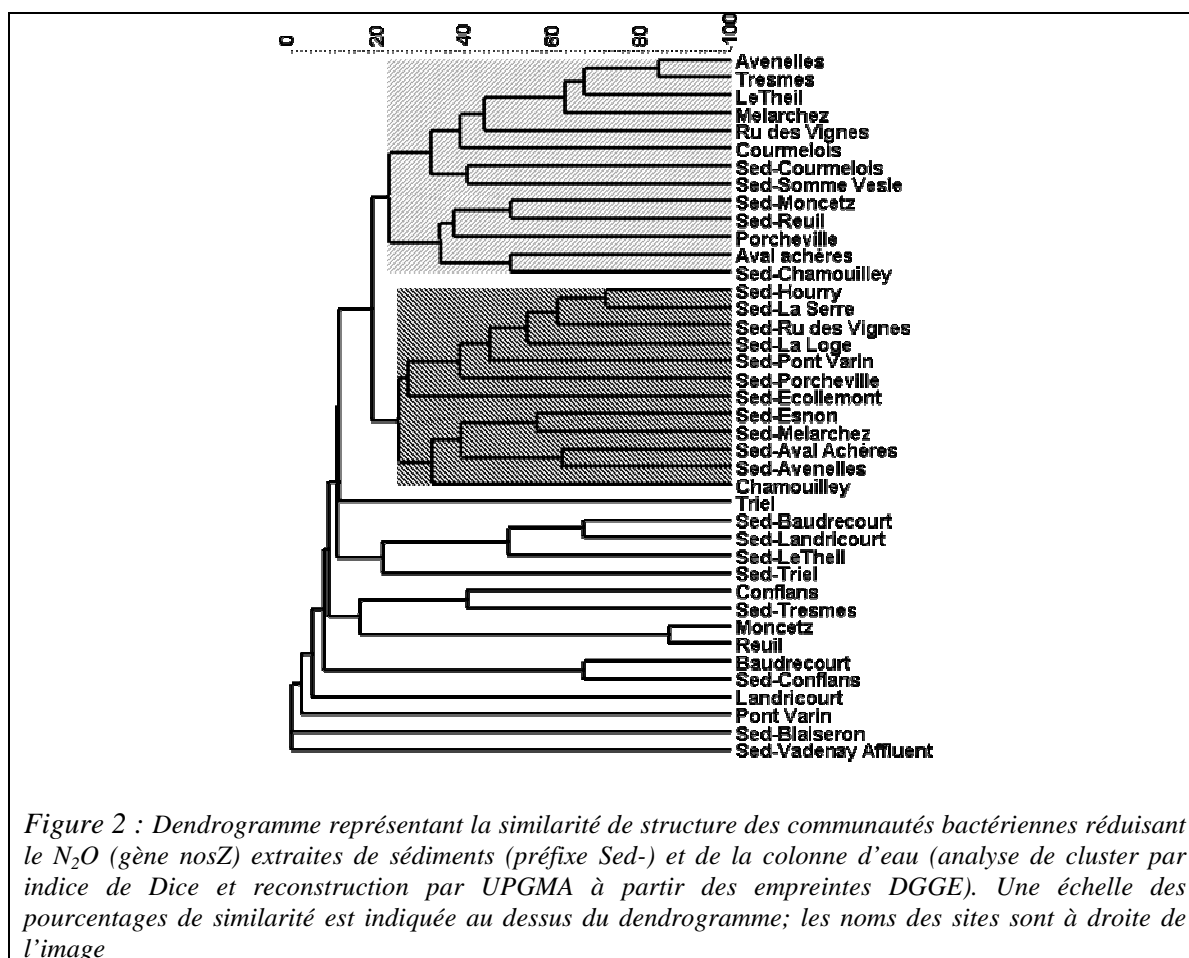
3 Résultats

3.1 Cas des Eaux et Sédiments : étude snapshot sur l'ensemble du bassin

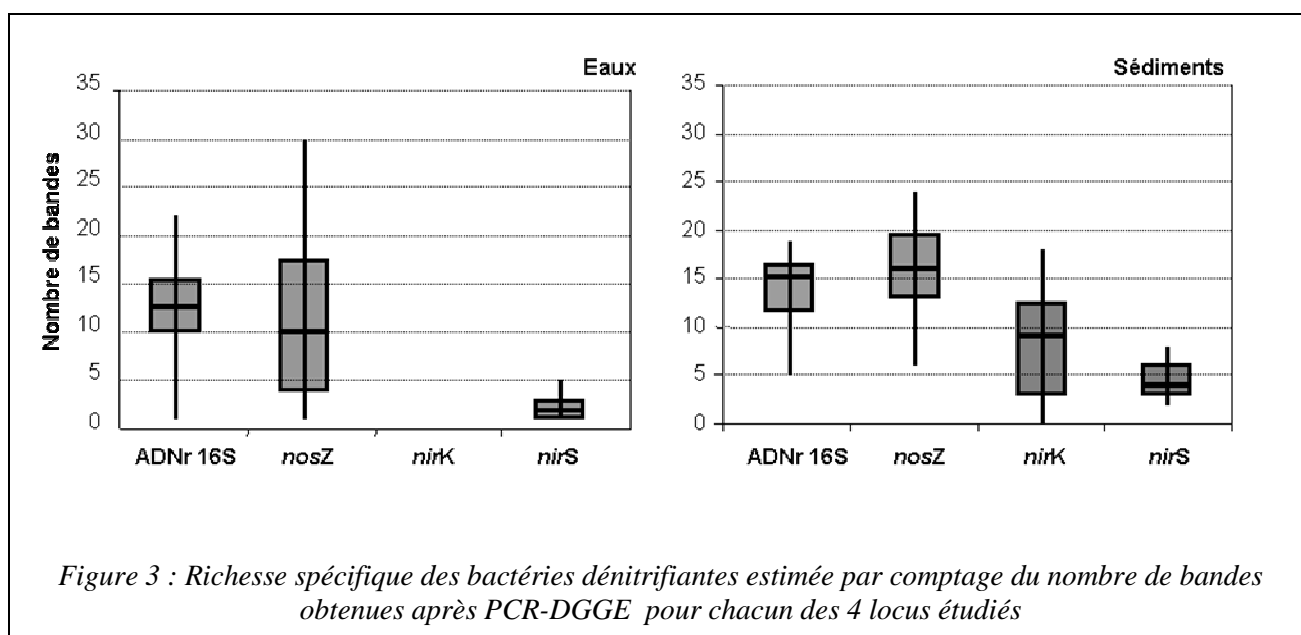
Dans cette étude, des eaux et des sédiments ont été collectés en juillet 2007, dans 7 sous-bassins de la Seine à savoir la Blaise, l'Yonne, la Vesle, la Basse Seine, l'Oise, l'axe Marne et le Grand Morin.

Les concentrations en NO_3^- mesurées dans les eaux s'avèrent relativement constantes (3-7 mg N.L⁻¹) dans l'ensemble du réseau hydrographique ; les concentrations en N_2O sont élevées aux têtes de bassin (1-2 $\mu\text{g N. L}^{-1}$), légèrement plus faibles aux ordres intermédiaires, et augmentent (4-5 $\mu\text{g N. L}^{-1}$) en aval (Garnier *et al.*, 2009). Dans les sédiments associés, une tendance semblable a été observée pour les taux de réduction des NO_3^- et de production de N_2O potentiels (Garnier *et al.*, 2010).

Concernant les eaux et sédiments des 7 sous-bassins de la Seine, la caractérisation moléculaire des bactéries dénitrifiantes par DGGE met en évidence de grandes différences de structure de communauté microbienne (quelque soit le gène ou le compartiment considéré). La comparaison de la structure des communautés bactériennes réduisant le N_2O (*nosZ*, voir Figure 2) semble faire ressortir deux groupes d'échantillons dont un (le central) qui pourrait avoir une signification environnementale. En effet, ce groupe rassemble uniquement des sédiments et de sites connus pour être fortement chargés en matière organique. En revanche, ce dendrogramme ne semble pas refléter de lien entre les structures des communautés bactériennes étudiées ni avec les concentrations de N_2O , ni avec les taux potentiels de dénitrification ni de production de N_2O .



La diversité bactérienne a été estimée en dénombrant le nombre de bandes DGGE différentes identifiées par empreinte moléculaire (correspondant au nombre de phylotypes différents), et mesure la richesse spécifique des échantillons pour chaque communauté bactérienne (voir *Figure 3*). La richesse spécifique des communautés bactériennes possédant le gène *nosZ* est importante à la fois dans les eaux (1-30 bandes) et les sédiments (6-24), confirmant l'ubiquité des bactéries réduisant le N_2O dans ces deux compartiments du bassin de la Seine. A l'opposé, ces échantillons montrent une plus faible diversité des bactéries réduisant le NO_2^- (*nirS* : 2-8 bandes dans les sédiments et 1-5 dans l'eau ; *nirK* : 2-18 dans les sédiments). En outre, dans les eaux prélevées, les gènes *nirK* étaient en dessous de la limite de détection de notre méthode. Ceci suggère néanmoins que même si les eaux sont supposées ne pas être le siège d'une intense dénitrification, car rarement anoxiques, leurs communautés microbiennes dénitrifiantes sont toutefois en partie représentées.



La comparaison des séquences issues du gel DGGE *nosZ* (provenant de sédiments et d'eaux de la Seine) a confirmé qu'il s'agissait dans tous les cas de gènes codant pour l'enzyme oxyde nitreux réductase (voir *Tableau 1*). Comme attendu, ces séquences sont principalement affiliées à des séquences provenant de bactéries non cultivables provenant d'échantillons environnementaux très contrastés et d'origine géographique très diverses (boues, sols, sédiments de lac, etc...) et également à certaines bactéries onnues comme *Alicyclophilus denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *Denitrificans*, ou encore *Ralstonia eutropha*.

PIREN-Seine. Phase V – Rapport de synthèse 2007-2010

Tableau 1 : Résultats de BLAST X (Search protein database using a translated nucleotide query) confronté à la base « Non redondant protein sequences » du NCBI pour les 21 séquences : plusieurs résultats potentiels de séquences protéiques les plus probables sont donnés étant donné les fortes valeurs de E (« The lower the E-value, or the closer it is to zero, the more "significant" the match is »). L'origine (type d'échantillon environnemental) est indiquée lorsque le résultat est une séquence de bactérie non cultivable

Type d'échantillons	Site	Numéro de bande	Séquence en acide aminée la plus probable obtenue par BLASTx (si il s agit d'une séquence provenant d'une bactérie non cultivable, on indique aussi celle d'une bactérie cultivable)	Expect value (E)	Echantillon environnemental à partir duquel les séquences de la base de données proviennent
sediments	Blaiseron	s1	ADF30139-nitrous oxide reductase [uncultured bacterium]	1 e-75	China, landfill leachate treatment plant
			AJ002531-nosZ [Bradyrhizobium japonicum]	2,00E-72	-
	Blaiseron	s2	ABX52730.1-nitrous oxide reductase [uncultured bacterium]	8,00E-75	Denmark/ lake sediment without chironomid larvae
			ABY19423.1-NosZ [uncultured bacterium]	3,00E-71	Spain/ free water surface constructed wetland/rhizosphere Typha sp. June 2006 (TJ4 Ruiz)
	Ecollemont	s3-3a	AAD43473.1-nitrous oxide reductase [Rhodobacter sphaeroides f. sp. denitrificans]	7,00E-72	-
	Ecollemont	s3-3b	ZP_04763466.1-Nitrous-oxide reductase [Acidovorax delafieldii 2AN]	7,00E-69	-
	Ecollemont	s4-4a	ACI488651-putative nitrous oxide reductase [uncultured bacterium]	7,00E-69	China, 0-20cm paddy soil
			ZP_03696836.1-Nitrous-oxide reductase [Lutiella nitroferrum 2002]	6,00E-63	-
	Ecollemont	s4-4b	CBM40970-nitrous-oxide reductase [uncultured bacterium]	2,00E-70	China, acivated sludge
			AAD43473.1-nitrous oxide reductase [Rhodobacter sphaeroides f. sp. denitrificans]	2,00E-69	-
	Ecollemont	s5-5c	ZP_07020447-Nitrous-oxide reductase [Alicyclophilus denitrificans BC]	4,00E-70	-
	Pont Varin	s6	AAD43473.1-nitrous oxide reductase [Rhodobacter sphaeroides f. sp. denitrificans]	1,00E-71	-
	Pont Varin	s8	CBM40970-nitrous-oxide reductase [uncultured bacterium]	8,00E-70	China, acivated sludge
	Courmelois	s11	ABX52730.1-nitrous oxide reductase [uncultured bacterium]	1,00E-72	Denmark/ lake sediment without chironomid larvae
	Aval Achères	s12	AAX10861.1-nitrous oxide reductase [uncultured forest soil bacterium]	1,00E-68	Germany, 0-20 cm bulk soil, forest
			ZP_07020447-Nitrous-oxide reductase [Alicyclophilus denitrificans BC]	2,00E-68	-
	La Serre	s18	ZP_07020447.1-Nitrous-oxide reductase [Alicyclophilus denitrificans BC]	1,00E-70	-
La Serre	s19	AAX10861.1-nitrous oxide reductase [uncultured forest soil bacterium]	1,00E-69	Germany, 0-20 cm bulk soil, forest	
La Serre	s20	CBM40993.1-nitrous-oxide reductase [uncultured bacterium]	2,00E-77	China, acivated sludge	
		AAD43473.1-nitrous oxide reductase [Rhodobacter sphaeroides f. sp. denitrificans]	2,00E-71	-	
Theil	s21	ZP_07020447.1-Nitrous-oxide reductase [Alicyclophilus denitrificans BC]	2,00E-71	-	
Theil	s22	ABY19429.1NosZ [uncultured bacterium]	7,00E-72	Spain/ free water surface constructed wetland/rhizosphere Typha sp. June 2006 (TJ26 Ruiz)	
surface water	Baudrecourt	w2	CBM40979.1-nitrous-oxide reductase [uncultured bacterium]	2,00E-58	China, acivated sludge
			NP_942887-nitrous-oxide reductase [Ralstonia eutropha H16]	7,00E-56	-
	Aval Achères	w3	CBM40979.1-nitrous-oxide reductase [uncultured bacterium]	8,00E-60	China, acivated sludge
			NP_942887-nitrous-oxide reductase [Ralstonia eutropha H16]	4,00E-57	-
	Porcheville	w5	CBM40979.1-nitrous-oxide reductase [uncultured bacterium]	4,00E-61	China, acivated sludge
			NP_942887-nitrous-oxide reductase [Ralstonia eutropha H16]	1,00E-58	-
Tresmes	w7	CBM40979.1-nitrous-oxide reductase [uncultured bacterium]	9,00E-56	China, acivated sludge	
			NP_942887-nitrous-oxide reductase [Ralstonia eutropha H16]	2,00E-53	-

3.2 Cas d'un sol agricole (voir Vilain *et al.*, en révision)

Le compartiment du sol a également été étudié localement dans une pente d'un petit sous-bassin agricole (le Grand Morin) afin de dégager des regroupements de structure de communautés bactériennes. Sur un sol cultivé (maïs) en bord de rivière, des mesures d'activités et des analyses moléculaires ont été menées en parallèle. L'objectif était d'évaluer l'influence sur la dénitrification de la position dans une pente à la rivière (haut ou bas de pente ou zone enherbée, qui était également en bas de pente) et de la profondeur (horizon superficiel : 10-30 cm ou profond : 90-110 cm).

Alors que le taux potentiel de réduction des NO_3^- s'est révélé statistiquement inchangé en fonction de la pente et la profondeur (variant de 0,30 à 1,44 $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}^{-1}$ de sol sec h^{-1}), la production potentielle de N_2O était plus importante dans les horizons superficiels du sol (en moyenne 155,1 $\text{ng N-N}_2\text{O g}^{-1}$ de sol sec h^{-1}) que profonds (en moyenne 0,4 $\text{ng N-N}_2\text{O g}^{-1}$ de sol sec). Dans ce sol agricole, la dénitrification était donc plus incomplètement réalisée dans les horizons superficiels (où le N_2O produit représentait entre 8,5 et 48 % de tout le NO_3^- dénitrifié) que les profonds (où le N_2O produit ne représentait que moins d'1 % de tout le NO_3^- dénitrifié).

Les structures de communautés microbiennes réduisant le N_2O obtenues par PCR DGGE du gène *nosZ* (voir en Figure 4) ont mis en évidence une nette distinction des sols profonds par rapport aux superficiels, suggérant que les émissions de N_2O divergentes entre ces deux horizons seraient le fait de communautés différentes. La richesse spécifique obtenue par DGGE se montrait dans ce sol, plus importante pour les communautés bactériennes totales (entre 14 et 36 bandes d'ADNr 16S par sol) que pour les communautés bactériennes réduisant le N_2O (entre 4 et 15 bandes *nosZ* seulement) mais sans qu'une différence n'ait pu être notée en fonction de la profondeur.

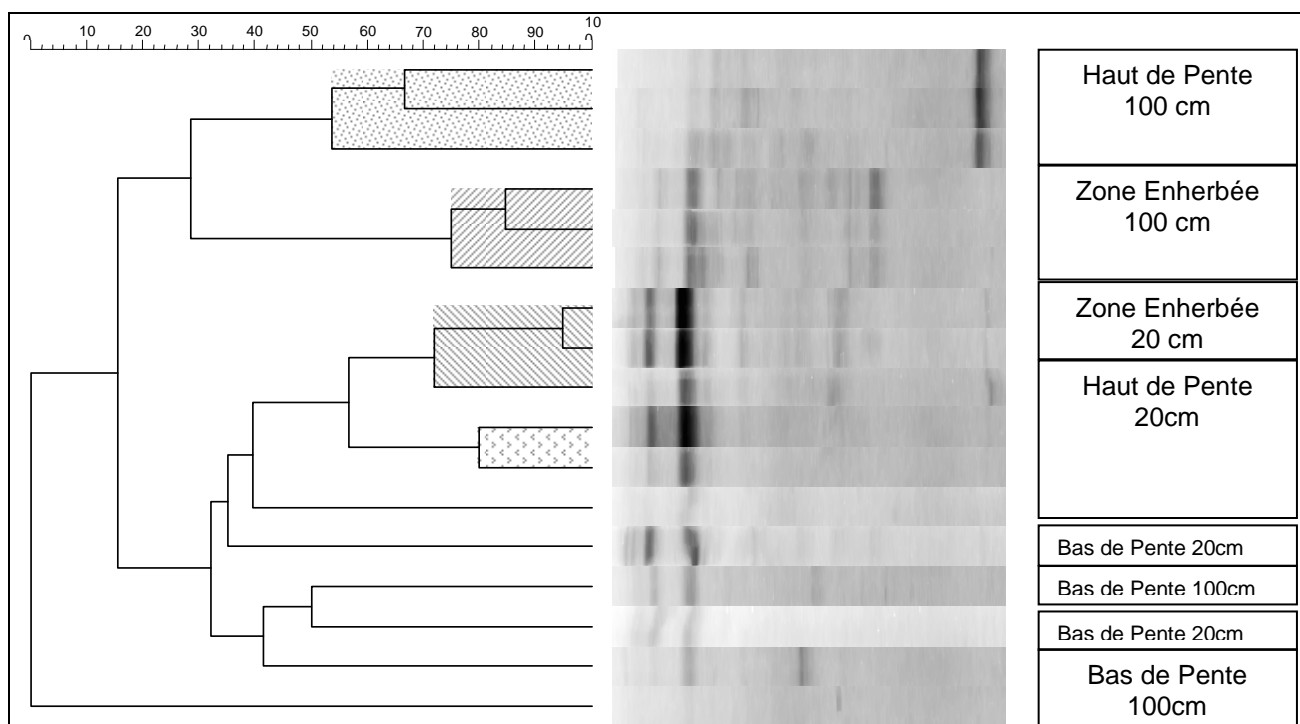


Figure 4 : Dendrogramme représentant la similarité de structure des communautés bactériennes réduisant le N_2O (gène *nosZ*) extraites d'un sol agricole à trois positions le long d'une pente (haut : haut de pente et bas : bas de pente et bande enherbée) et deux profondeurs (pour 20 cm, comprendre 0-30 cm et 100 cm, 90-110cm). L'analyse de cluster a été réalisée à partir du calcul de l'indice Dice et de la reconstruction par UPGMA des empreintes DGGE. Une échelle des pourcentages de similarité est indiquée au dessus du dendrogramme.

4 Conclusions-Perspectives

Nous avons travaillé sur la variabilité des formes présentes des gènes *nirK*, *nirS* (codant pour la nitrite réductase) et *nosZ* (oxyde nitreux reductase) au sein des communautés bactériennes, tout en étudiant également les communautés bactériennes totales via l'ADNr 16S (codant pour l'ARN ribosomique 16S). Les trois principaux habitats susceptibles d'abriter des bactéries dénitrifiantes ont été inventoriés, à savoir les compartiments eaux, sédiments et sols. Bien que le lien entre structure des communautés bactériennes et processus ne soit pas toujours évident à établir, la réalisation et la comparaison des empreintes génétiques est un outil synthétique et prouve l'**ubiquité** de bactéries capables de dénitrifier dans tous les milieux échantillonnés pour les deux réactions étudiées : la réduction du NO_2^- et la réduction du N_2O .

Néanmoins, ce couplage du processus de réduction du NO_3^- uniquement avec l'étude des bactéries dénitrifiantes conduit naturellement à de nouveaux questionnements. D'une part, se focaliser sur la dénitrification demeure insuffisant lorsqu'on s'intéresse à l'origine et/ou au devenir des NO_3^- et du N_2O . En effet, ils sont impliqués dans d'autres réactions du cycle de l'azote comme la nitrification mais également la réaction d'« anaerobic ammonium oxidation » (anammox) ou encore la réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (DNRA). Quelques gènes fonctionnels qui permettraient de garder la même approche par empreinte moléculaire sont déjà connus pour d'autres méthodologies (pour anammox voir Schmidt *et al.*, 2002 et DNRA, Simon, 2002).

D'autre part, cette étude de la structure des populations bactériennes, comme elle s'attache aux ADN et pas aux ARN ne donne en aucun cas une idée de l'activité réelle des bactéries dénitrifiantes, ce qui la rend parfois difficile à relier à des mesures de processus de biogéochimie classique. L'étude des ARN, en restant couplée à celle des ADN pourrait renseigner sur l'expression des gènes de dénitrification. Coupler des mesures biogéochimiques à des comparaisons des empreintes moléculaires ADN (bactéries présentes) et ARN (bactéries actives) pourrait donner de nouvelles indications sur les facteurs de contrôles environnementaux favorables à une dénitrification complète ou au contraire incomplète (c'est-à-dire stoppée à l'étape de production de N_2O). Ceci pourrait permettre d'améliorer encore notre compréhension de la réduction du NO_3^- et du NO_2^- et de la production du N_2O dans le bassin de la Seine.

5 Références

- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59:143.
- Braker G, Fesefeldt A, Witzel KP (1998) Development of PCR Primer systems for amplification of nitrite reductase genes (Nirk and Nirs) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3769.
- Canfield DE, Glazer AN, Falkowski PG (2010) The Evolution and Future of Earth Nitrogen Cycle. *Science* 330:192.
- Cébron A., Berthe T. & Garnier J. (2003). Nitrification and Nitrifying bacteria in the lower Seine River and estuary. *Applied Envir. Microb.*, 69:7091.
- Garnier J., Billen G., Vilain G., Martinez A., Mounier E., Silvestre M., Toche F. (2009). Nitrous oxide (N₂O) in the Seine river and basin: observations and budgets. *Agric. Ecosyst. Environ.* 133: 223.
- Garnier J.A., E.M. Mounier A.M. Laverman, G. Billen (2010). Potential denitrification and N₂O production in the sediments of the Seine River drainage network (France). *Journal of Environmental quality*, 39:449.
- Kloos K, Mergel A, Rosch C, Bothe H (2001) Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria. *Australian Journal Of Plant Physiology* 28:991.
- Michotey V, Mejean V, Bonin P (2000) Comparison of methods for quantification of cytochrome cd(1)-denitrifying bacteria in environmental marine samples. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1564.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59:695.
- Philippot L (2002) Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1577:355.
- Schmidt I, Hermelink C, de Pas-Schoonen K, Strous M, den Camp HJO, Kuenen JG, Jetten MSM (2002) Anaerobic ammonia oxidation in the presence of nitrogen oxides (NO_x) by two different lithotrophs. *Applied And Environmental Microbiology* 68:5351.
- Simon Jr (2002) Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiology Reviews* 26:285
- Talleg G., Garnier J., Billen G., Gousailles M. (2006). Oxide nitrous emissions from nitrifying activated sludge of urban wastewater treatment plant, under different oxygen conditions. *Water Research*, 40, (15):2978.
- Thieu V, Billen G, Garnier J (2009) Nutrient transfer in three contrasting NW European watersheds: The Seine, Somme, and Scheldt Rivers. A comparative application of the Seneque/Riverstrahler model. *Water Research* 43:1740.
- Vilain G., Garnier J., Roose-Amsaleg C., Laville P., Potential of denitrification, associated bacterial communities and N₂O production from deep and shallow agricultural soils (Seine Basin, France), en révision pour *Soil Biology & Biochemistry*, manuscript n°SBB5203.