

Caractérisation des populations bactériennes nitrosantes dans la Basse Seine

Aurélie Cébron¹, Josette Garnier¹, Manuela Coci², Ricks Laanbroek².

¹UMR Sisyphe 7619, Univ. P. & M. Curie, Tour 56, Et. 4, Boite 105, 4, place Jussieu, F-75005, Paris

²Centre for Limnology KNAW, The Netherlands

Introduction	1
1. Matériel et méthodes	2
2. Résultats et discussion	4
3. Références bibliographiques	16

Introduction

Les rejets en rivière des effluents de station d'épuration, induisent pour la plupart de fortes modifications environnementales au niveau des processus biogéochimiques, puisqu'ils apportent souvent de grandes quantités de nutriments.

Dans la basse Seine, la station d'épuration d'Achères est la cause d'une perturbation majeure du cycle de l'azote puisque en l'absence de traitement tertiaire, prévu désormais pour 2007, ses effluents sont chargés en ammonium. Le processus de nitrification a donc lieu dans la basse Seine, où l'ammonium (NH_4^+) est totalement oxydé en nitrite (NO_2^-) puis en nitrate (NO_3^-). Les deux étapes de la nitrification sont réalisées par deux groupes fonctionnels différents. La nitrosation est effectuée par des bactéries nitrosantes chemolithotrophes représentées par les genres *Nitrosomonas* et *Nitrospira* appartenant à la sous-classe β des Protéobactéries (Teske, 1994) et formant un groupe monophylogénétique. L'étape de nitrification, est réalisée par des bactéries nitrifiantes, représentées par les genres *Nitrobacter* (Hovanec & Delong, 1996), appartenant à la sous-classe α des Protéobactéries et *Nitrospira* constituant un phylum séparé (Hovanec *et al.*, 1998).

Afin de mieux comprendre le fonctionnement de la nitrification dans la basse Seine, et les effets des rejets d'Achères, nous avons voulu compléter les données physico-chimiques, par des mesures d'activités nitrifiantes potentielles et enrichir l'analyse en essayant de quantifier et de caractériser la diversité bactérienne nitrosante dans la basse Seine.

A travers l'étude de la diversité phylogénétique et de l'évolution spatiale de la communauté bactérienne nitrosante de la Seine depuis Paris jusqu'à l'estuaire, il s'agit de caractériser l'apport des bactéries nitrosantes par les effluents d'Achères, tant d'un point de vue qualitatif (espèces) que quantitatif (nombre, proportion) par rapport aux bactéries autochtones et d'analyser leur devenir dans le milieu récepteur.

1. Matériel et Méthode

1.1. Description du site d'étude

Nous avons travaillé sur les échantillons d'un transect de 356 km de la Basse Seine (Fig 1.) depuis Saint Maurice (station 1 située à la confluence entre la Marne et la Seine) jusqu'à l'estuaire à Honfleur (station 18).

Le tronçon subissant l'effet de la salinité s'étend de Caudebec (Km 310) à Honfleur. La Basse Seine reçoit les effluents de la station d'épuration d'Achères traitant les eaux usées de 6 millions d'équivalent-habitant de l'agglomération Parisienne. Les effluents sont rejetés à 70 Km à l'aval de Paris juste avant la station de Conflans (station 3). Le milieu récepteur est alors enrichi en matière organique et en nutriments, notamment en ammonium.

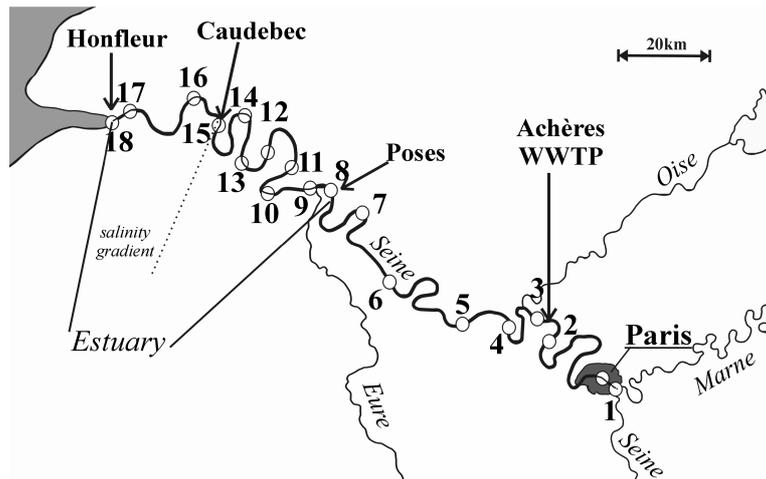


Figure 1. Description du site d'étude : La basse Seine depuis Paris (Km 0) jusqu'à l'estuaire (Km356). Les numéros (1 à 18) représentent les stations d'échantillonnage (1: Saint Maurice, 2: Maison Laffites, 3: Conflans, 4: Triel, 5: Porcheville, 6: Vernon, 7: Les Andelys, 8: Poses, 9: Pont Arche, 10: Elbeuf, 11: Oissel, 12: Bassin des Docks, 13: La Bouille, 14: Duclair, 15: Heurtauville, 16: Caudebec, 17: Tancarville, 18: Honfleur)

1.2. Prélèvements

Les échantillons d'eau analysés pour cette étude ont été prélevés en septembre 1998 et juillet 2002 à chaque station décrite à la figure 1 ; des échantillons d'eau brute et traitée provenant d'Achères ont également été considérés. Ces deux campagnes ont été menées en période d'étiage estival, période pendant laquelle la nitrification se produit.

A chaque station, le pH, la température et la concentration en oxygène dissous sont mesurés et 10 L d'eau sont prélevés. Pour les extractions d'ADN, de 100 à 250 mL d'eau (le volume dépend de la teneur en MES de l'échantillon) sont filtrés sur un filtre en nitrocellulose d'une porosité de 0.22 μm (Durapore, diam. = 45mm). Ces filtres sont réalisés en triplicat et conservés à -20°C avant extraction de l'ADN. Un volume de 450 mL est consacré aux mesures des activités nitrifiantes potentielles et le reste de l'eau est consacré aux dosages des nutriments et des MES.

1.3. Dosage des différentes formes de l'azote et des MES

Les formes minérales de l'azote sont analysées sur de l'eau filtrée (100 mL) sur une membrane en fibre de verre (Whatman, GF/F). Les méthodes utilisées sont basées sur des dosages en spectrophotométrie (les concentrations en ammonium d'après la méthode de Slawycyk & MacIsaac (1972), les concentrations en nitrites et en nitrate après réduction des nitrates en nitrites sur une colonne de Cadmium selon Rodier, 1984).

Les matières en suspensions sont pesées après séchage du filtre 30-45 minutes à 100°C , après filtration sur un filtre GF/F grillé à 450°C .

1.4. Mesures des activités potentielles nitrifiantes, nitrosante et nitratante

Nous avons évalué les activités nitrifiantes par des vitesses potentielles d'oxydation de l'ammonium (concentration saturante en ammonium, température de 20°C) pour les quatre campagnes. Deux techniques différentes ont été utilisées:

La méthode de traçage au ^{14}C permet de mesurer l'activité nitrifiante potentielle totale (pNA). Cette technique repose sur le principe de différence d'incorporation de la radioactivité entre 2 échantillons incubés en conditions optimales : 1 échantillon d'eau brute et un second contenant des inhibiteurs de la nitrification : l'allylthiourée bloquant la nitrosation et le chlorate de sodium bloquant la nitratation. Il a été établi un rapport de 0,11 mole de carbone incorporé par mole d'azote oxydé, on

peut donc par une simple conversion établir le taux d'azote oxydé correspondant à la nitrification (Brion & Billen, 1998).

Une seconde technique, basée aussi sur l'utilisation d'inhibiteurs, permet d'estimer séparément les taux de nitrosation et de nitratisation. Par dosage colorimétrique du nitrite après incubation des échantillons, on mesure la vitesse de production du nitrite (nitrosation) ou de la vitesse de sa disparition (nitratisation) en présence de l'un ou l'autre des inhibiteurs décrits précédemment.

1.5. Extraction de l'ADN et purification

L'ADN de tous les échantillons a été extrait à partir de filtres, par Bead Beating en utilisant un kit d'extraction (Fast DNA spin Kit for Soil, Bio 101, USA). L'ADN est ensuite purifié sur une colonne de Sephadex G-200, et précipité à l'éthanol ; l'ADN est ensuite stocké à -20°C dans du tampon TE.

1.6. PCR compétitive (cPCR) : quantification du nombre de copie de gène *amoA*

L'estimation du nombre de copies du gène *amoA* est réalisée par cPCR comme décrit par Stephen *et al.* (1999) et Cébron *et al.* (2003) pour les deux campagnes de prélèvement. Comme les bactéries nitrosantes possèdent de 1 à 3 copies de gène *amoA*, nous ne pouvons pas exprimer directement nos résultats en nombre de bactéries nitrosantes.

L'amplification PCR d'un fragment de 491pb du gène *amoA* (gène fonctionnel codant pour la sous unité α de l'ammonium monooxygénase, enzyme permettant l'oxydation de l'ammonium en hydroxylamine) est effectuée avec les amorces *amoA*-1F et *amoA*-2R (Rotthauwe *et al.*, 1997) ciblant l'ensemble des bactéries nitrosantes de la sous-classe β des Protéobactéries. Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% et l'intensité des bandes d'ADN est estimée grâce à un analyseur d'image (Quantity One, Bio-Rad).

1.7. Construction et analyse phylogénétique de 2 banques de gène *amoA*

Deux banques de gène *amoA* ont été construites pour les échantillons de Triel (Km84) et Duclair (Km278) pour la campagne de septembre 1998 (Cébron *et al.*, 2003). Une PCR *amoA* (Rotthauwe *et al.*, 1997) est effectuée sur l'ADN de chacun des 2 échantillons, les produits de PCR *amoA* sont excisés du gel d'agarose, puis purifiés avec un kit d'extraction sur gel (Qiagen). Les fragments de gènes *amoA* de Triel et Duclair sont ensuite clonés dans des vecteurs plasmidiques (pCR2.1 vector, TAcloning[®] kit, Invitrogen). 50 clones de chaque banque sont sélectionnés au hasard. Les fragments *amoA* de chacun des clones sont ré-amplifiés par PCR puis digérés par l'enzyme de restriction *MspI*. Les clones sont regroupés suivant leurs profils de restriction visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. La séquence du fragment de gène *amoA* d'un clone représentatif de chaque groupe de restriction est alors analysée afin d'établir la phylogénie de notre communauté nitrosante.

1.8. DGGE et Analyse phylogénétique

Les 18 échantillons et l'eau des effluents d'Achères -bruts et traités- de la campagne de Juillet 2002 ont été analysés par DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Une première PCR est effectuée avec les amorces CTO189F et CTO654R (Kowalchuk *et al.*, 1997), permettant l'amplification d'un fragment de 465 pb de l'ADNr16S spécifique des bactéries nitrosantes de la sous-classe β des Protéobactéries. Une nested PCR est ensuite effectuée sur ces premiers produits de PCR avec les amorces 357F et 518R décrites par Muyzer *et al.* (1996). Ces seconds produits de PCR ayant une longueur de 196 pb, sont alors analysés en DGGE. Cette technique d'électrophorèse permet, grâce à un gradient dénaturant de polyacrylamide, de séparer des fragments de PCR de même taille suivant leur séquence (%GC). Ainsi, chaque bande visible sur gel correspond à une séquence unique et donc à une espèce bactérienne. L'ADN est marqué au BET (Bromure d'éthydiu) et visualisé aux UV, puis l'analyse des profils DGGE est effectuée grâce à un analyseur d'image (Quantity One, Bio-Rad).

Les différentes bandes d'ADN sont découpées sur les gels DGGE, une nouvelle nested PCR et une migration DGGE sont alors réalisées pour vérifier la pureté de nos fragments d'ADN, puis les différentes bandes sont séquencées. Les séquences partielles d'ADNr16S obtenues à partir de nos échantillons d'eau de Seine, sont comparées aux séquences disponibles dans les bases de données afin d'effectuer l'analyse phylogénétique (BlastN, ClustalX, Phylip 3.5) de la communauté nitrosante.

2. Résultats et Discussion

2.1. Evolution des différentes formes d'azote, des activités nitrifiantes et du nombre de copies du gène *amoA* dans la Basse Seine pour les campagnes de Septembre 1998 et Juillet 2002.

Pour les deux campagnes étudiées, nous observons un apport d'ammonium par le rejet des effluents d'Achères, cet apport de substrat est visible dès la station de Conflans située quelques km à l'aval des rejets (Fig. 2.). Cet ammonium est entièrement oxydé en nitrate grâce au processus de nitrification prenant place dans la Basse Seine jusqu'à l'estuaire amont. Les mesures d'activité nitrifiantes, nitrosante et nitratante potentielles exprimées soit par litre d'eau de Seine, soit par gramme de MES (Fig. 2.), nous montrent l'existence de maximums de nitrification, d'une part à l'aval immédiat des effluents d'Achères et surtout dans l'estuaire amont entre 200 et 250 Km à l'aval des rejets. Pour ces deux campagnes, les résultats de la quantification du nombre de copies de gène *amoA* (estimée par cPCR) présentent la même tendance que ceux des mesures d'activité nitrifiante potentielles. Une augmentation du nombre de copies de gène *amoA* apparaît en effet à l'aval des rejets d'Achères, ainsi que dans l'estuaire amont. Bien que les campagnes soient toutes deux en période estivale et dans des conditions d'hydrologie relativement semblables (étiage, débit de 250 m³/s), il apparaît toutefois des différences au niveau de l'intensité des pics d'activité nitrifiante potentielle et des variations du nombre de copies de gène *amoA* le long du continuum.

2.2. Analyse phylogénétique des deux banques de gène *amoA* pour Triel et Duclair (septembre 1998)

Nous avons étudié la diversité des bactéries nitrosantes en deux sites pour la campagne de prélèvement de Septembre 1998. La station de Triel située à 12 km à l'aval des rejets d'Achères et la station de Duclair dans l'estuaire amont où nous avons généralement la plus forte activité nitrifiante potentielle (Fig. 2.). Nous avons construit par clonage deux banques de gène *amoA*. L'analyse phylogénétique des fragments de séquences *amoA* a permis d'établir une première estimation des proportions de chaque groupe bactérien nitrosant (Cébron et al., 2003). Nous observons un groupe bactérien majoritaire représenté par les bactéries proches des *Nitrosomonas oligotropha* et *ureae*, représentant entre 60% (station de Duclair) et 80% (station de Triel) de la population (Fig. 3.). Ce groupe est très bien adapté au faibles concentrations en ammonium car ces bactéries ont une forte affinité pour leur substrat, par conséquent ces bactéries sont bien adaptées aux conditions de la Seine, où la pollution est relativement diluée par rapport à des effluents. Ce groupe majoritaire a déjà été décrit dans d'autres milieux d'eau douce notamment dans l'Elbe (Stehr et al., 1995) et encore dans la partie amont de l'estuaire de l'Escaut (de Bie et al., 2001).

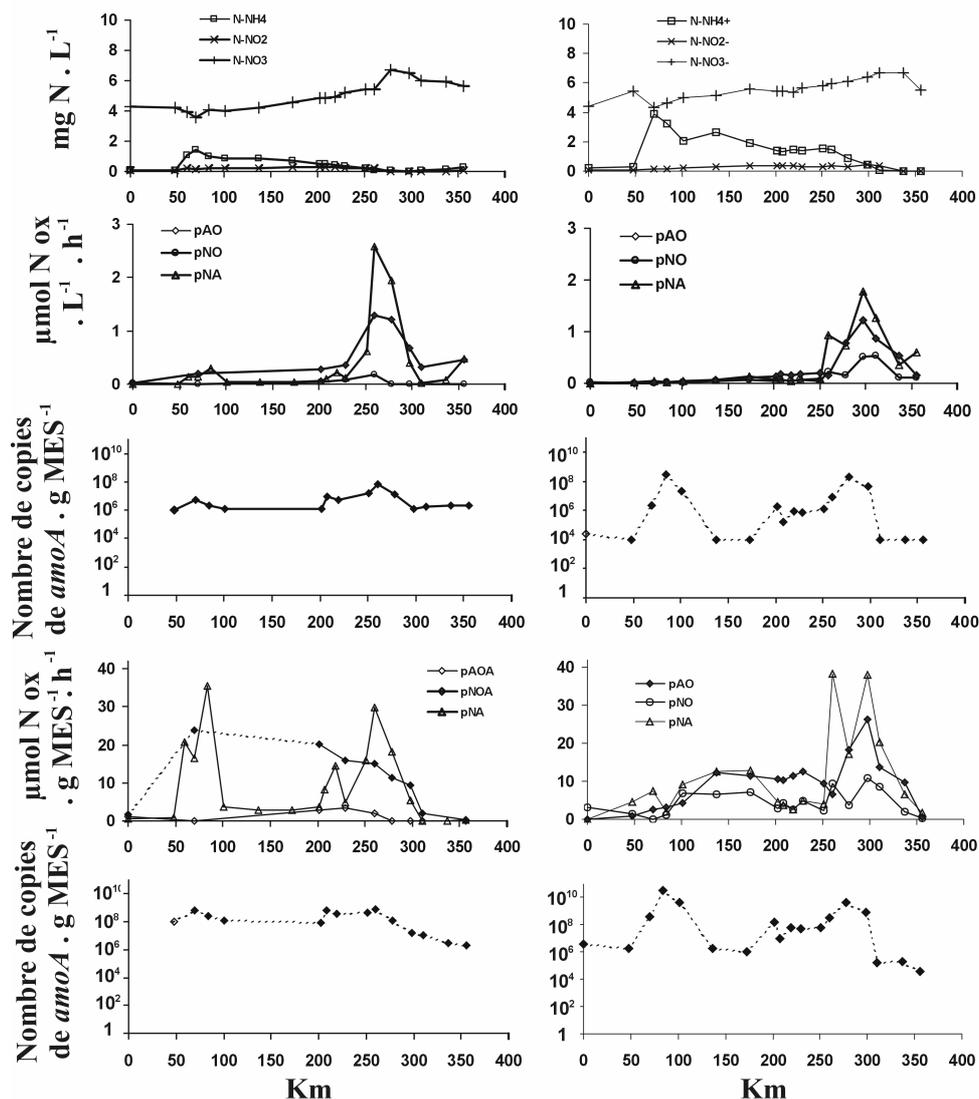


Figure 2. Evolution des différentes formes d'azote (ammonium NH_4^+ , Nitrite NO_2^- et Nitrate NO_3^-), des activités nitrifiantes (pNA), nitrosante (pAO) et nitratantes (pNO) potentielles et du nombre de copies du gène *amoA* exprimés par litre d'eau de Seine et par gramme de MES, dans la Basse Seine depuis Paris jusqu'à Honfleur, pour les campagnes de Septembre 1998 et Juillet 2002

Les deux autres groupes de bactéries nitrosantes (*Nitrosomonas europaea* et *mobilis* – cluster 7, et *Nitrosospira*) sont représentés chacun en quantités relativement égales. Il apparaît que nous obtenons à peu près les mêmes proportions, assez faibles, de clones proches de *N. europaea* pour les deux stations (13% à Triel et 16% à Duclair), ce qui peut être dû à la faible affinité de ce genre bactérien pour l'ammonium (fort K_m) ; ce groupe bactérien aurait donc besoin de concentrations en ammonium plus élevée que celle de la Seine, pour sa croissance. Finalement, une légère différence apparaît entre les deux sites pour la population de *Nitrosospira*. Ce groupe semble être mieux adapté aux conditions rencontrées dans l'estuaire amont où la concentration en ammonium est très faible par rapport au site de Triel, juste à l'aval des effluents d'Achères. Ces bactéries ont un faible K_m , elles sont donc plus compétitives dans les environnements caractérisés par de faibles concentrations en ammonium.

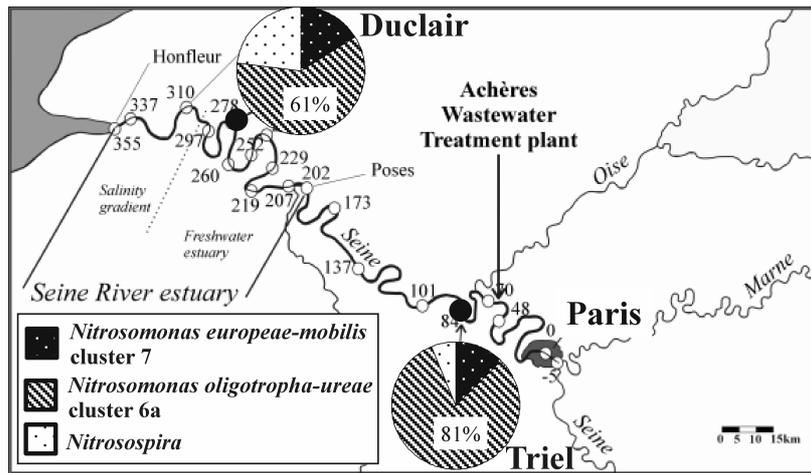


Figure 3. Proportion de clones appartenant aux trois groupes principaux de bactéries nitrosantes (*Nitrosomonas europaea* et *mobilis*-cluster 7, *N. oligotropha* et *urea*-cluster 6a, et *Nitrospira*) aux sites de Triel et Duclair pour la campagne de septembre 1998.

Nos résultats tendent à montrer une faible sélection et/ou une adaptation de la population bactérienne nitrosante le long du continuum de la Seine depuis Paris jusqu'à l'estuaire. Les différences observées entre les deux sites d'étude peuvent s'expliquer par la différence de concentration en ammonium, plus faible dans l'estuaire amont que dans la rivière à l'aval des rejets d'Achères.

Cependant cette approche ne nous a pas permis de mettre en évidence l'absence ou la présence d'un impact des effluents d'Achères sur la diversité de la communauté bactérienne nitrosante. Afin d'atteindre cet objectif et de caractériser plus finement au niveau spatial, l'évolution de la population nitrosante, nous avons utilisé la technique de DGGE, permettant l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillon.

2.3. Analyse en DGGE des échantillons de Juillet 2002

Nous avons analysé plus finement la diversité et l'évolution spatiale de la communauté bactérienne nitrosante des 18 échantillons de la Seine et de l'eau des effluents bruts et traités d'Achères pour la campagne de Juillet 2002.

Les produits de la nested PCR sont analysés en DGGE. Les résultats obtenus sont montrés à la Figure 4.

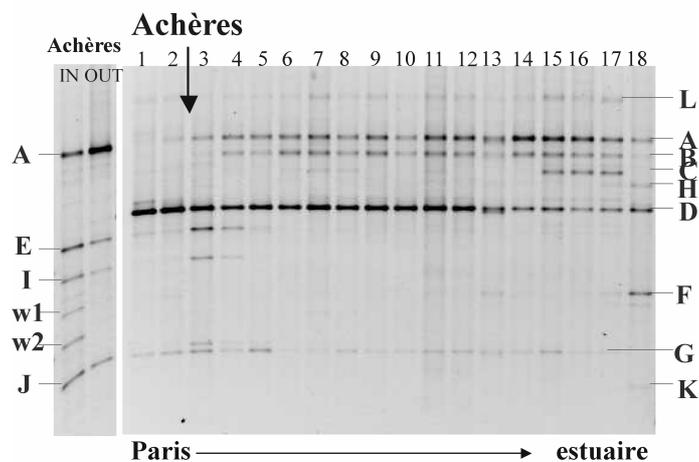


Figure 4. Profile DGGE des produits de la nested PCR effectuée sur les 20 échantillons de la campagne de juillet 2002 (les numéros 1 à 18 désignent les stations de prélèvement, les noms des stations sont donnés en Figure 1., les échantillons d'eau brute et traitée d'Achères sont respectivement notés IN et OUT). Les différentes bandes sont notées par les lettres de A à L.

Les bandes D, G et L sont présentes dans tous les échantillons, D est une bande majoritaire alors que G et L sont en plus faible proportion. Juste à l'aval des rejets d'Achères on voit apparaître 3 nouvelles bandes : les bactéries des bandes E, I et J qui proviennent clairement de la station d'épuration -*puisque'on les trouve dans les échantillons d'eau brute et traitée d'Achères-* ne se maintiennent cependant pas dans le milieu récepteur. La bande A provenant également des effluents d'Achères apparaît dans la Seine, s'y maintient, et s'y développe même puisqu'elle est encore présente dans l'estuaire. Une bande B se développe également le long du tronçon étudié, et pourrait être une bactérie autochtone présente en amont de Triel, mais en très faible quantité (ce qui expliquerait qu'on ne la voit pas sur le profil DGGE, l'apport d'ammonium permettant son développement). Dans l'estuaire, on voit apparaître de nouvelles bandes. La bande C pourrait être une espèce bactérienne adaptée aux conditions estuariennes et au bouchon vaseux (variation de salinité, bouchon vaseux donc augmentation des MES, faible concentration en ammonium). Le changement de population observé dans l'échantillon 18 (à Honfleur) est dû à la salinité, les nouvelles bandes (H, F et K) devant représenter des espèces bactériennes marines.

La plupart des bandes ont été découpées sur gel et la pureté de ces bandes a été vérifiée en réalisant une nouvelle PCR dont le produit est re-déposé sur gel (DGGE). Après séquençage des nouvelles bandes, et une analyse phylogénétique, nous avons construit l'arbre phylogénétique (Fig. 5).

Les bandes A, B et C appartiennent au cluster 6a, et sont des bactéries proches de *Nitrosomonas oligotropha* et *ureae*. La bande L présente dans tous les échantillons en faible quantité appartient au Cluster 7 et est proche de *N. mobilis*. Les bandes H et F qui n'apparaissent qu'à Honfleur appartiennent bien à des groupes bactériens halophiles : *N. marina-aestuarii* cluster 6b et *N. europaea-mobilis* cluster 7. Les bandes K et G appartiennent au genre *Nitrosospira*. K est apparemment spécifique du milieu marin puisqu'on ne retrouve cette bande qu'à Honfleur.

Il est très important de noter ici que les amorces PCR utilisées, qui ciblent l'ensemble des bactéries nitrosantes, ne sont pas totalement spécifiques (Kowalchuk et al., 1997) ; en conséquence, certaines bandes que l'on pourrait supposer être des bactéries nitrosantes de la sous classe β des protobactéries par une seule analyse DGGE, sont révélées ne pas être des nitrosantes grâce à l'étape du séquençage. En effet, les bandes E, I, J, w1 et w2 provenant des eaux d'Achères sont phylogénétiquement liées à d'autres groupes bactériens. Il en est de même pour la bande D, majoritaire dans quasiment tous les échantillons de la Seine, elle aussi placée dans un embranchement phylogénétique séparé des bactéries nitrosantes.

Les résultats obtenus sont de la plus grande importance puisque nous avons décrit pour la première fois la diversité et l'évolution de la population nitrosante sur le tronçon étudié de la Seine, long de 300 km. A ce stade de l'étude, l'évolution des proportions de chaque groupe de bactéries nitrosantes le long du continuum peut être présentée (Fig. 6) : en comparant l'intensité des différentes bandes les unes par rapport aux autres sur le profil DGGE, nous en avons en effet déduit la proportion des différentes espèces le long du tronçon étudié de la Seine. Afin de respecter le caractère quantitatif (puisque l'ensemble des bandes correspondent à une même quantité d'ADN déposé sur le gel) toutes les bandes, affiliées ou non aux bactéries nitrosantes, ont été prises en compte.

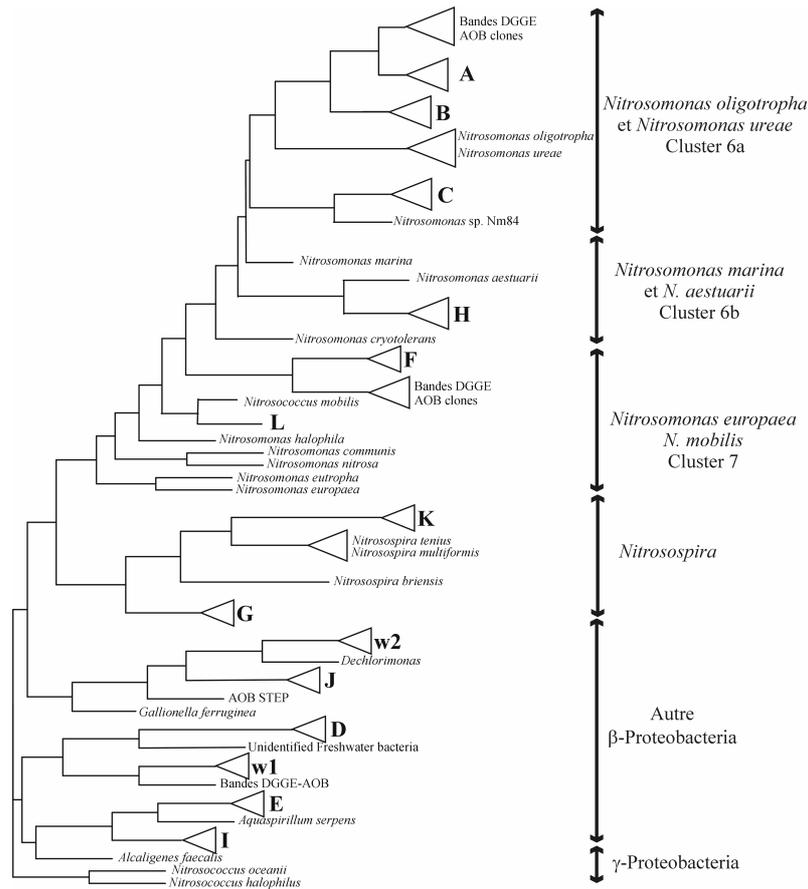


Figure 5. Arbre phylogénétique basé sur la comparaison de fragments d'ADNr16S de 152 pb. Les séquences issues de nos échantillons environnementaux sont marquée par les lettres A à L en gras.

Les rejets d'Achères apporteraient en Seine une seule espèce de bactéries nitrosantes : la bande A appartenant au cluster 6a. Cette espèce bactérienne se maintient et se développe jusqu'à l'estuaire où elle représente plus de 40-50% de la population nitrosante, au moins jusqu'à Duclair. Au niveau de la station de Triel, apparaît une nouvelle espèce (bande B) appartenant elle aussi au cluster 6a. Cette bande représente également environ 30% de la population nitrosante jusqu'à Duclair. A ces deux bandes se rajoute une troisième espèce : la bande C qui apparaît dans le bouchon vaseux et représente alors près de 25% de la population nitrosante. Les espèces nitrosantes marines (bandes F et K) apparaissent dès Caudebec, la limite de l'intrusion saline.

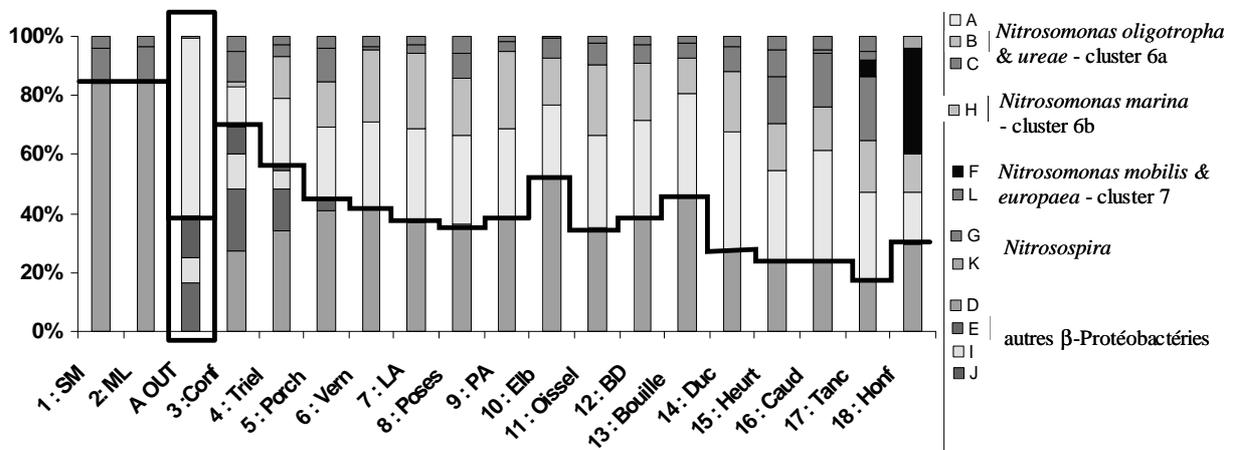


Figure 6. Proportions des différentes bandes observées en DGGE. Les bandes affiliées aux bactéries nitrosantes sont au dessus de la ligne brisée.

3. Conclusion

Les deux approches moléculaires, complémentaires l'une de l'autre, ont permis de caractériser précisément la diversité bactérienne nitrosante de la basse Seine ; elles conduisent à des résultats cohérents illustrés par le tableau 1. En effet, les approches conduisent toutes deux à la prédominance dans la Basse Seine (entre 60 et 90%) de bactéries nitrosantes proches phylogénétiquement du cluster 6a représenté par *N. oligotropha* et *N. ureae*.

Tableau 1. Comparaison des résultats des deux approches moléculaires : proportions de chaque groupe de bactéries nitrosantes pour les sites de Triel et Duclair.

	Triel		Duclair	
	<i>amoA</i>	DGGE	<i>amoA</i>	DGGE
<i>N. Oligotropha</i> – <i>N. ureae</i> _ Cluster 6a	81%	75%-83%	61%	82%-90%
<i>N. Mobilis</i> – <i>N. europaea</i> _ Cluster7	13%	10%-14%	16%	3.5%-9%
<i>Nitrospira</i>	6%	3%-14%	23%	2%-13%

De plus, nous avons pu clairement mettre en évidence l'évolution de la composition de la communauté nitrosante de l'amont vers l'aval : apport, adaptation, succession, remplacement des espèces se produisent. Cette étude permet donc de répondre à un certain nombre de questions notamment en ce qui concerne l'apport de bactéries nitrosantes par les effluents d'Achères. Nous pouvons désormais affirmer que les effluents d'Achères apportent majoritairement une espèce bactérienne nitrosante, la bande A, et que cette espèce se maintient et se développe dans le milieu récepteur et représenterait jusque dans l'estuaire amont environ, 50% de la communauté bactérienne nitrosante. Les 50 % restant de la population nitrosante dans l'estuaire sont toutefois représentées par des espèces qui proviendraient de l'amont, ou d'apports latéraux par les affluents (Oise, Eure, par exemple), les effluents de la station d'épuration de Rouen ne révélant aucune des bandes identifiées.

Un aspect des futures recherches sera donc de s'orienter sur la détermination de l'origine des 50 % des bactéries qui ne proviendraient pas des effluents. Une représentation mathématique de cette dynamique permettra de chercher, de manière théorique, des jeux de paramètres physiologiques permettant de reproduire le comportement de ces bactéries, difficiles à maîtriser par l'approche expérimentale.

4. Références bibliographiques

- Brion, N. & G. Billen. (1998). Une réévaluation de la méthode d'incorporation de $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ pour mesurer la nitrification autotrophe et son application pour estimer des biomasses de bactéries nitrifiantes. *Rev. Sci. Eau* 11:283-302.
- Cébron, A., Berthe, T. & Garnier J. (2003). Nitrification and Nitrifying bacteria in the lower Seine River and estuary (France). *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (12): 7091-7100.
- DeBie, M. J., A. G. Speksnijder, G. A. Kowalchuk, T. Schuurman, G. Zwart, J. R. Stephen, O. E. Diekmann, & H. J. Laanbroek. (2001). Shifts in the dominant populations of ammonia-oxidizing β -subclass Proteobacteria along the eutrophic Shelde estuary. *Aquatic Microbial Ecology* 23:225-236.
- Hovanec, T. A., & E. F. DeLong. 1996. Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:2888-2896.
- Hovanec, T. A., L. T. Taylor, A. Blakis, & E. F. DeLong. (1998). *Nitrospira*-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:258-264.
- Kowalchuk, G. A., J. R. Stephen, W. De Boer, J. I. Prosser, T. M. Embley, & J. W. Woldendorp (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 1489-1497.
- Muyzer, G., S. Hottenträger, A. Teske, & C. Wawer. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3(4.4):1-23.
- Rotthauwe, J.-H., Witzel, K.-P., & Liesack, W. (1997). The Ammonia Mono-oxygenase Structural Gene *amoA* as a Functional Marker: Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4704-4712.
- Rodier, J. 1984. In Dunod (ed.), L'analyse de l'eau (eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer) 7th ed.
- Slavyck, G., & J. J. McIsaac. 1972. Comparison of two automated ammonium methods in a region of coastal upwelling. *Deep-Sea-Res.* 19:1-4.
- Stehr, G., B. Bottcher, P. Dittberner, G. Rath, & H.-P Koops. (1995). The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary. *FEMS Microbiol. Ecology* 17:177-186.
- Stephen, J. R., Y. J. Chang, S. J. MacNaughton, G. A. Kowalchuk, K. T. Leung, C. A. Flemming, & D. C. White. 1999. Effect of toxic metals on indigenous soil beta-subgroup proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:95-101.
- Teske, A., E. Alm, J. M. Regan, S. Toze, B. E. Rittmann, & D. A. Stahl. 1994. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology* 176:6623-6630.