

# **Nitrification de l'ammonium dans la basse Seine: impact de l'anthropisation de Paris à l'estuaire**

Josette Garnier, Gilles Billen, Thierry Berthe,  
Anun Martinez, Séverine Pinault, Maïté Desruelle, Laeticia Laroche, Aurélie Cébron

*UMR Sisyphe, CNRS, Tour 26, étage 5, 4 place Jussieu, 75 005 Paris*

<b>NITRIFICATION DE L'AMMONIUM DANS LA BASSE SEINE: IMPACT DE L'ANTHROPISEMENT DE PARIS À L'ESTUAIRE</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>2</b>
<b>2. CARACTÉRISATION DES REJETS DE STEP À L'AVAL DE PARIS</b>	<b>3</b>
2.1. Les sites d'étude : les stations d'Achères et de Colombes	3
2.2. Apport de bactéries nitrifiantes par les stations de Seine-Aval et Colombes.	3
2.3. Caractérisation et quantification des populations nitrifiantes par la biologie moléculaire	6
<b>3. LES TRANSFORMATIONS D'AZOTE À L'AVAL DE PARIS ET DANS L'ESTUAIRE</b>	<b>8</b>
3.1. Variations longitudinales des activités nitrifiantes et des formes de l'azote	8
3.2. Emissions de N <sub>2</sub> O de Paris à l'estuaire	10
3.3. Evaluation de la diversité des bactéries nitrosantes dans la basse Seine	11
<b>4. MODÉLISATION DU FONCTIONNEMENT ÉCOLOGIQUE DE L'AVAL DE PARIS À L'ESTUAIRE</b>	<b>14</b>
4.1. Nitrification et production de N <sub>2</sub> O : modélisation	14
4.2. Simulations par le modèle Modeste (aval de Paris)	16
<b>4. CONCLUSIONS</b>	<b>18</b>
<b>6. BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>19</b>

# 1. Introduction

A l'aval de l'agglomération parisienne, la pollution organique et ammoniacale, représente une nuisance majeure. Si la pollution organique entraîne une désoxygénation à l'aval immédiat de la station d'Achères, c'est dans l'estuaire fluvial que la pollution ammoniacale est à l'origine d'une seconde zone de désoxygénation (Figure 1). Il est intéressant de noter que les déficits en oxygène ont été moins importants lors de la période de 1996 à 1999 comparativement à la période de 1993 à 1995 (Figure 1). Cette différence est tant liée aux améliorations des traitements des effluents bruts (mise en service de la station de Colombes en 1998), qu'aux valeurs estivales de débits, de manière générale plus élevées au cours de ces dernières années.

Dans le contexte de l'évolution des traitements des effluents, l'objectif de l'étude de nitrification était de revisiter certaines formulations du modèle afin de modéliser au mieux le fonctionnement écologique actuel.

Il s'agissait par exemple de redéfinir l'équivalent-habitant pris en compte dans le modèle en terme d'organismes nitrifiantes, notamment. La reconsidération de la charge spécifique fait toutefois l'objet d'un rapport spécifique.

Dans la perspective de l'amélioration du traitement à l'horizon 2005 (nitrification, voire dénitrification des effluents), la compréhension de ces processus est de première importance. Les résultats de la littérature ainsi que nos premières investigations ont en effet montré que la nitrification produit du  $N_2O$ , gaz à effet de serre et pourrait provoquer un déplacement de la pollution vers l'atmosphère. Nous avons donc élaboré un modèle conceptuel de la nitrification, dans lequel la production de  $N_2O$  constitue une phase intermédiaire. Une formulation mathématique est proposée, et intégrée au modèle RIVE des processus, ce qui permet de modéliser outre l'ammonium et le nitrate, le nitrite et le  $N_2O$ .

Comprendre les différentes étapes de la nitrification nécessite de comprendre la dynamique des bactéries qui réalisent ce processus, c'est pourquoi nous avons au cours de cette phase utilisé les outils de détection spécifique des microorganismes issus de la biologie moléculaire.

Nous avons enfin avec le modèle validé sur des observations de terrain exploré la qualité de l'eau dans les conditions de traitement telles qu'elles pourraient être en 2005.

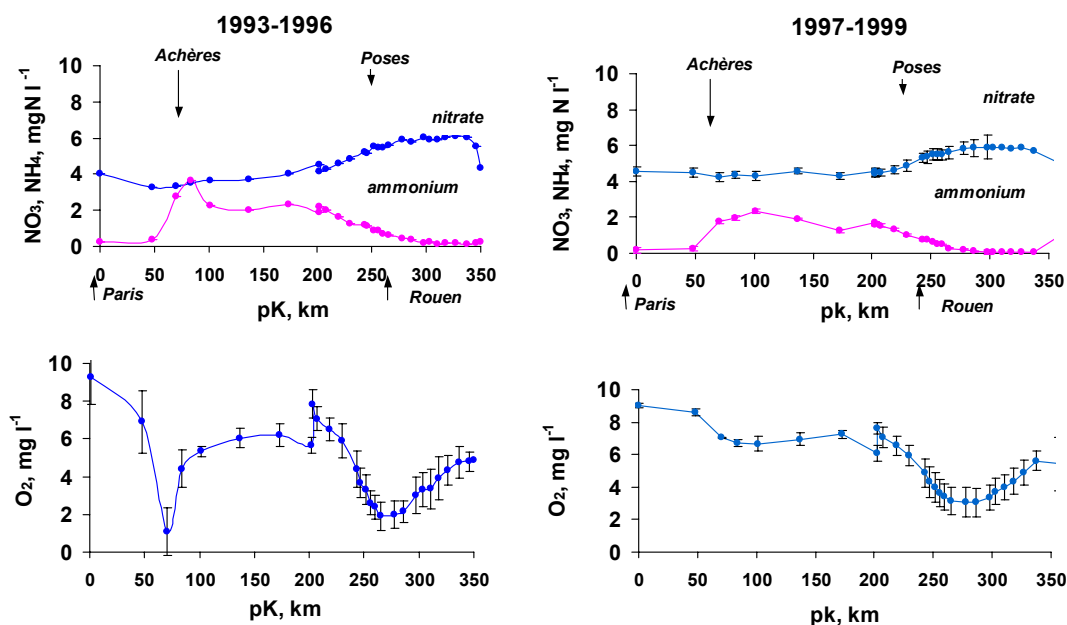


Figure 1. Variation des concentrations de Paris à l'estuaire : en haut) en nitrate et ammonium, en bas) en oxygène dissous, montrant les deux zones de désoxygénation. Moyennes de situations estivales. A gauche : période de 1993 à 1996 ; à droite : période de 1997 à 1999.

## 2. Caractérisation des rejets de STEP à l'aval de Paris

### 2.1. Les sites d'étude : les stations d'Achères et de Colombes

La station d'épuration d'Achères est la plus importante du bassin de la Seine; elle permet de traiter environ  $2 \cdot 10^6 \text{ m}^3$  par jour. A Achères, l'effluent subit d'abord un pré traitement, puis une décantation primaire suivie d'une épuration biologique par le procédé des boues activées avec décanteur secondaire. Les échantillons ont été prélevés dans les 5 canaux et moyennés proportionnellement aux débits.

La station de Colombes, mise en service en 1998, a une capacité d'environ  $0,24 \cdot 10^6 \text{ m}^3$  (Figure 2). Le traitement biologique de la station de Colombes est effectué par des unités fonctionnant en série BIOFOR-BIOSTYR-BIOFOR, à l'issue du traitement physique. Ces deux pilotes assurent une dépollution carbonée et une nitrification. Le fonctionnement des deux pilotes se caractérise par une filtration ascendante. Les supports de bactéries sont respectivement de la biolite (boules d'argiles compressées et alvéolées) ou des billes de polystyrène pour BIOFOR et BIOSTYR. respectivement. La biomasse bactérienne accumulée est quotidiennement rincée.

Des prélèvements ont également été effectués dans la rivière en amont et en aval des rejets de la station, à Maisons Laffitte et Conflans respectivement (Figure 2).

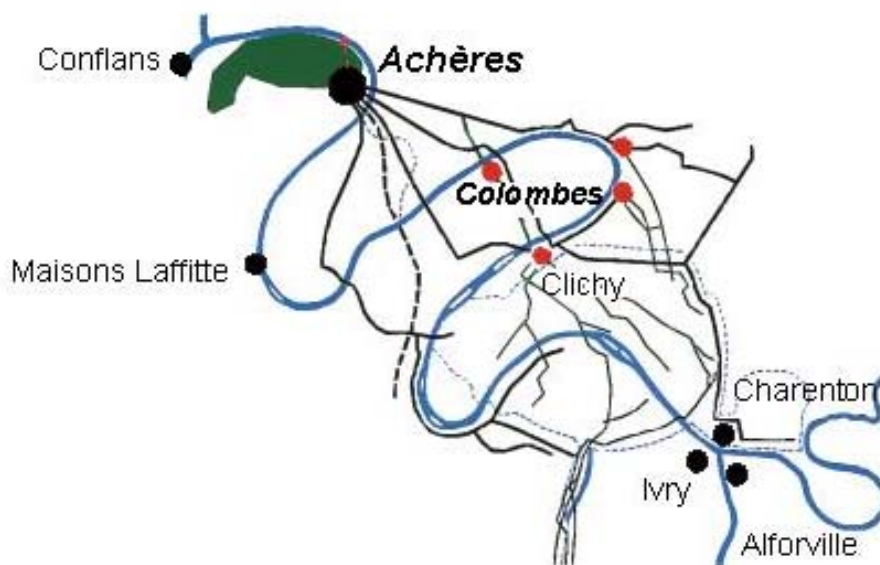


Figure 2. Situation des sites d'Achères et Colombes

### 2.2. Apport de bactéries nitrifiantes par les stations de Seine-Aval et Colombes.

L'activité nitrifiante a été mesurée par la méthode de traçage au  $^{14}\text{C}$  (Brion & Billen, 1998), basée sur une différence d'incorporation de la radioactivité à l'obscurité, entre un échantillon d'eau brute et un second contenant des inhibiteurs de la nitrification (N-Serve pour la nitrosation, chlorate de sodium pour la nitrataion).

Connaissant la quantité de carbone incorporée par les bactéries nitrifiantes, le nombre de moles d'azote oxydées peut être déterminé en tenant compte d'un facteur de rendement de 0,11 mole

de carbone incorporé par mole d'azote oxydée, établi par Brion et Billen (1998) à partir de cultures pures de bactéries nitrosantes et nitrifiantes. Une relation entre la mesure de l'activité nitrifiante potentielle et la biomasse des bactéries nitrifiantes a en outre été établie dans les conditions optimales de l'activité potentielle : pH entre 7 et 8, température entre 20°C et 30°C,  $[\text{NH}_4^+]$  d'au moins 1 mmol  $\text{l}^{-1}$  et  $[\text{O}_2]$  d'au moins 6 mg  $\text{l}^{-1}$ . Il résulte que 1  $\mu\text{g}$  de carbone de bactéries nitrifiantes oxyde 0,04  $\mu\text{mol}$  d'azote par heures.

L'activité nitrifiante potentielle mesurée aux entrée et sortie des stations d'Achères et de Colombes montrent une variabilité importante au cours du temps (une dizaine de mesures en 2000), (Figure 3). L'activité nitrifiante atteint 10  $\mu\text{mol N}_{\text{oxy}} \text{l}^{-1} \text{h}^{-1}$  et est généralement plus faible dans les effluents traités. Les bactéries nitrifiantes, qui s'attachent étroitement aux particules, sont logiquement abattues avec ces dernières.

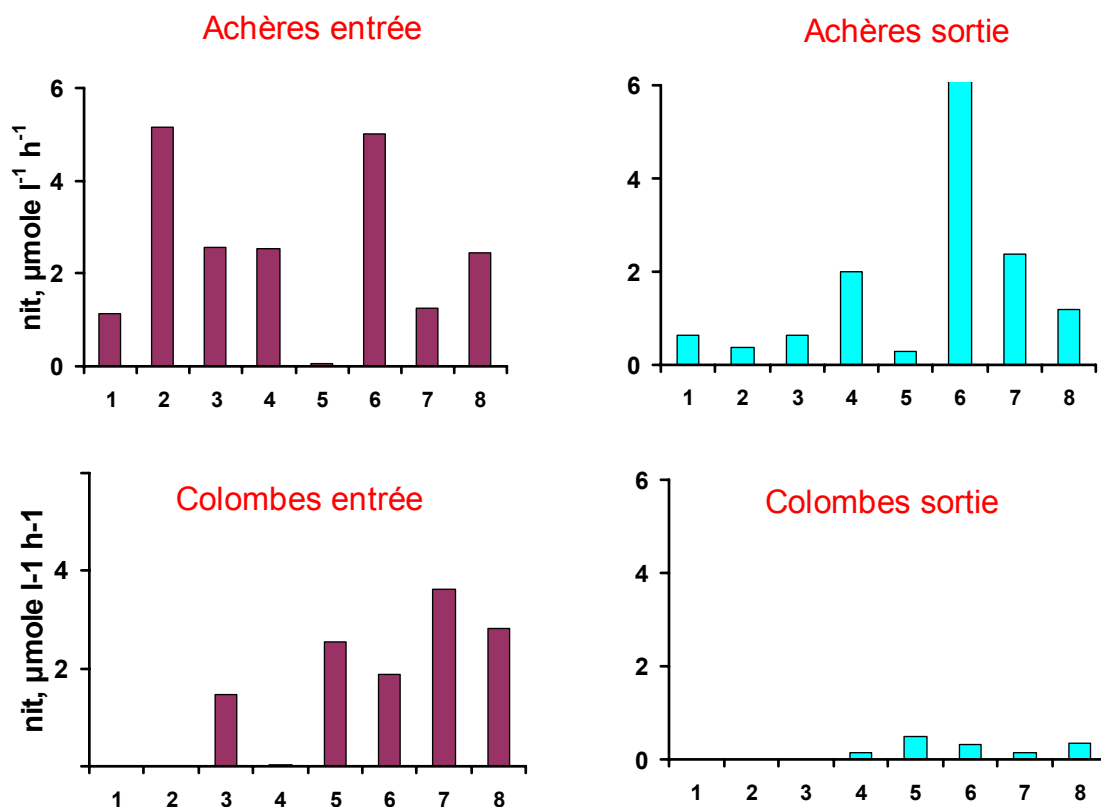


Figure 3. Variations des activités nitrifiantes dans les effluents bruts et traités de la station d'Achères et des pilotes, et de la station de Colombes en 2000.

(1, Dec 99, 2, Mar 00, 3, Avr 00, 4, Mai 00, 5, Jun 00, 6, Jul 00, 7, Sep 00, 8, Nov 00)

Les bactéries nitrifiantes apparaissent en quantité importante très en amont dans le réseau d'assainissement, les biofilms des canalisations pouvant constituer un milieu favorable à la croissance des nitrifiantes (Figure 4). La dynamique des biofilms dans le réseau d'assainissement reste toutefois une étude particulière que nous n'avons pas menée ici.

Les valeurs d'azote réduit (NTK,  $\text{mgN l}^{-1}$ ) des effluents traités de la station de Colombes montrent que la nitrification en station peut être un procédé performant : l'abattement est de l'ordre de 90% (Figure 5). A la station d'Achères en revanche, les 11 % d'abattement sont plutôt liés à l'abattement de l'azote organique des particules qu'à la nitrification.

L'inoculum de bactéries nitrifiantes reste toutefois relativement faible dans la rivière, avec une activité généralement inférieure à  $0,1 \mu\text{mol N}_{\text{oxy}} \text{l}^{-1} \text{h}^{-1}$ , souvent supérieure à l'aval de la station.

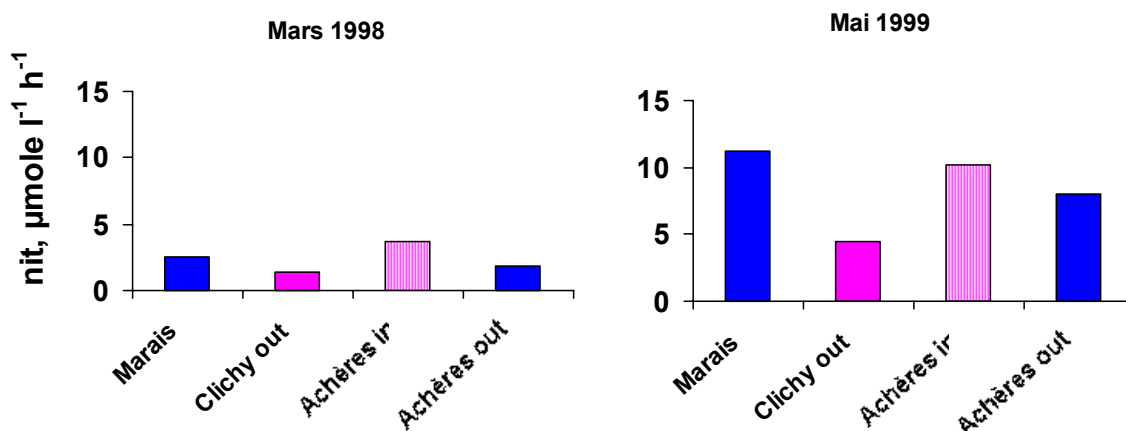


Figure 4. Variations des activités nitrifiantes dans les effluents bruts et traités du continuum du réseau d'assainissement lors de deux campagnes. Marais : tête du réseau d'assainissement dans le IVème arrondissement de Paris.

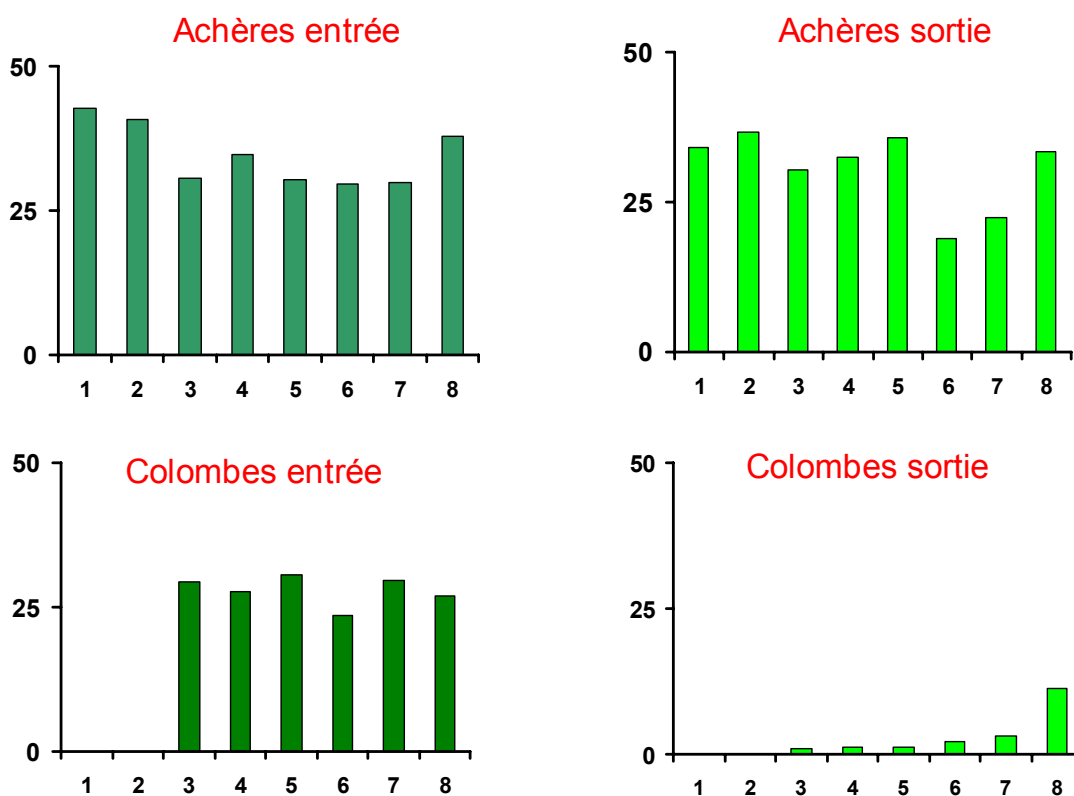


Figure 5. Variations des teneurs en azote réduit dans les effluents bruts et traités de la station d'Achères et des pilotes, et de la station de Colombes en 2000.

### 2.3. Caractérisation et quantification des populations nitrifiantes par la biologie moléculaire

L'étude des populations nitrifiantes est basée sur l'utilisation de nouveaux outils issus de la biologie moléculaire (la réaction de polymérisation en chaîne ou PCR) permettant notamment d'établir la position taxonomique des microorganismes. Ces méthodes permettent d'identifier de nouvelles espèces bactériennes sans devoir passer par une étape de mise en culture. La taxonomie moléculaire est basée sur l'étude des séquences d'ADN codant les ARN ribosomiaux 16S (ou ADNr 16S) qui possèdent des zones conservées chez les bactéries, ainsi que des zones présentant des degrés de conservation variables (cas des bactéries nitrifiantes du genre *Nitrobacter*, Degrange & Bardin, 1995). D'autres approches sont basées sur l'étude des séquences de gènes d'activités caractéristiques (gène *amoA* des nitrosantes dans le cas de notre étude, Rotthauwe *et al.*, 1997). La comparaison de ces séquences obtenues permettra d'identifier les micro-organismes présents dans différents échantillons de l'environnement.

L'ADN des échantillons d'eau de la Seine et du continuum est extrait selon une modification de la méthode proposée Tsai & Olson (1991). Ces méthodes ont été largement décrites dans Berthe *et al.* (1999) et Berthe *et al.* (2000).

L'étude de la population des nitrifiantes, peu diversifiée sur le plan phylogénétique, s'est ainsi limitée dans un premier temps au genre *Nitrobacter*, connu pour être le plus largement représenté dans les milieux aquatiques. La caractérisation des bactéries nitrosantes utilise les amorces (*amoA*-1F et *amoA*-2R; Rotthauwe *et al.*, 1997) qui amplifient un fragment (491 paires de bases) du gène codant une sous-unité de l'ammonium monooxygénase des bactéries nitrosantes appartenant au sous-groupe  $\beta$  des protéobactéries.

Les bactéries nitrosantes et nitrifiantes ont été détectées par amplification PCR dans tous les échantillons (Figure 6). La présence d'un fragment de 490 bp, indique la présence du gène *amoA* dans les échantillons d'ADN et donc de bactéries nitrosantes dans les échantillons d'eau. Un fragment de 390 pb indique la présence de l'ADNr 16S de bactéries nitrifiantes du genre *Nitrobacter*. Ces résultats confirment les résultats d'activité globale présentés ci-dessus, c-à-d que les bactéries nitrifiantes sont déjà présentes dès les têtes du réseau collecteur des eaux usées. Leur origine dans les biofilms reste à préciser, mais la présence de bactéries du genre *Nitrosomonas* dans des biofilms prélevés dans des collecteurs similaires a déjà été démontrée (Okabe *et al.*, 1999).

Afin de rendre l'approche moléculaire quantitative, la technique de PCR compétitive a été mise au point sur les échantillons d'effluents et décrite dans Berthe *et al.* (1999), pour les deux communautés de nitrosantes et nitrifiantes (Figure 7). Cette méthode quantitative (Zacchar *et al.*, 1993) est basée sur la technique de PCR compétitive qui consiste à ajouter un standard interne ou compétiteur avec l'ADN cible que l'on désire amplifier.

Ainsi, l'abondance des bactéries nitrosantes (nombre de copie d'*amoA* l<sup>-1</sup>) et des bactéries nitrifiantes (*Nitrobacter*, en nombre de cellules l<sup>-1</sup>) se situent entre 5 et 10 10<sup>7</sup> l<sup>-1</sup> dans les effluents traités d'Achères. Par comparaison les bactéries totales, déterminées par épifluorescence (Porter & Feig, 1980) ont une abondance variant entre 30 et 60 10<sup>9</sup> bact. l<sup>-1</sup>.

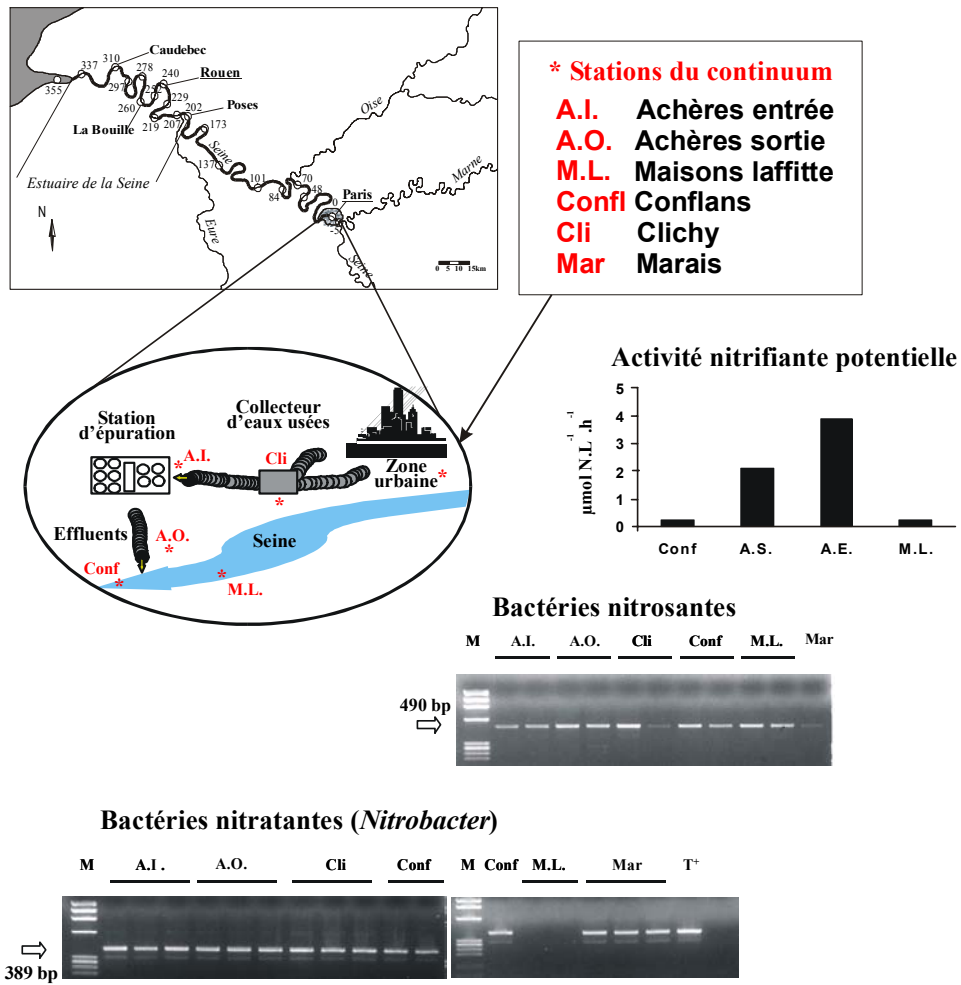


Figure 6. Détection des bactéries nitrifiantes et nitrifiantes par PCR dans les prélèvements des effluents bruts et traités.

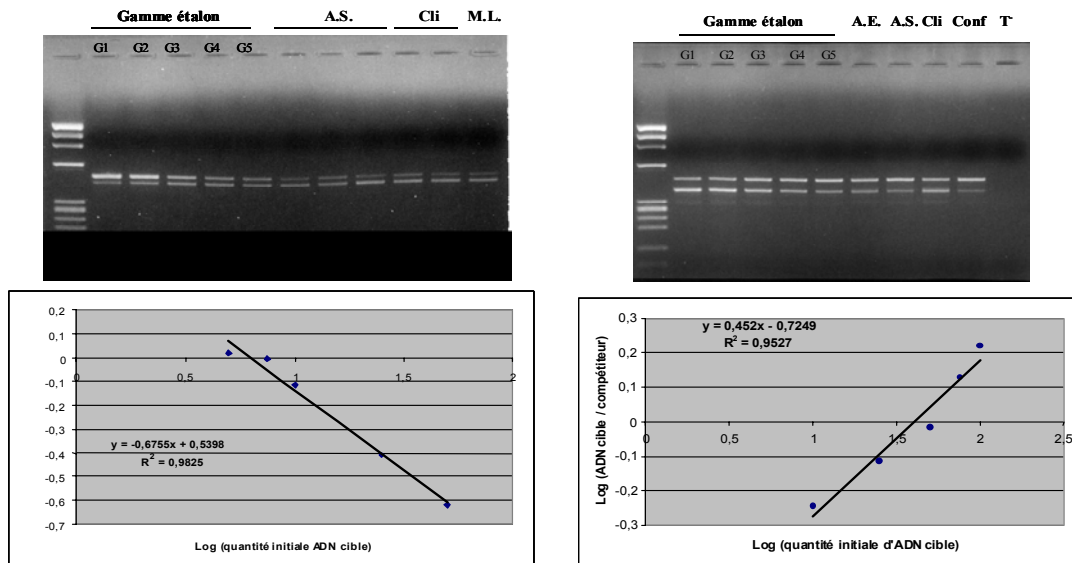


Figure 7. Quantification des bactéries nitrifiantes (à droite) et des bactéries du genre *Nitrobacter* (à gauche par cPCR). (A.S. : Achères sortie ; A.E. : Achères Entrée ; Cli : Clichy ; ML : Maison Laffitte ; Confl : Conflans

### 3. Les transformations d'azote à l'aval de Paris et dans l'estuaire

#### 3.1. Variations longitudinales des activités nitrifiantes et des formes de l'azote

Parmi les nombreux profils d'activités nitrifiantes réalisés depuis 1993, de Paris jusque dans l'estuaire, nous en présentons trois, caractéristiques des situations rencontrées (Figure 8), pour lesquels des investigations particulières de caractérisation des communautés bactériennes ont été réalisées. Les profils présentent d'une manière générale tous les mêmes tendances: l'ammonium apporté par les effluents d'Achères (entre 1 et 4 mgN l<sup>-1</sup> selon la variabilité des apports et du débit) est complètement nitrifié dans l'estuaire, où l'on observe le minimum d'oxygène et le maximum d'activité nitrifiante (Figure 8). C'est dans l'estuaire que l'activité est maximale (jusqu'à 2.7  $\mu\text{mole N}_{\text{oxyd}\acute{\text{e}} \text{l}^{-1} \text{h}^{-1}$  –cf. mesure au <sup>14</sup>C, Brion & Billen, 1998- valeur du même ordre que celle mesurée dans les effluents) quand le temps de séjour des eaux a été suffisant pour que les bactéries développent une biomasse significative. L'activité est la plus élevée en septembre 1998. En revanche, les profils de septembre 1997 et de juillet 1999 présentent des activités amont-aval moins contrastées, relativement plus élevées dans la Seine fluviale et moins importante dans le secteur estuarien.

Outre la mesure au <sup>14</sup>C, les activités nitrosante et nitratante ont été mesurées en septembre 1998 par la production et consommation de nitrites en présence ou non d'inhibiteurs de la nitrosation et/ou nitratation (Figure 9). L'activité nitrosante est bien inférieure à l'activité nitratante comme l'indiquent les paramètres physiologiques des bactéries.

La quantification des organismes du genre *Nitrobacter* réalisée par l'approche de biologie moléculaire, montre une très bonne concordance avec les profils d'activité, le nombre maximum de cellules atteignant 5 10<sup>7</sup> l<sup>-1</sup> en septembre 1998 ; comme pour les activités, ces valeurs sont similaires à celles mesurées dans les effluents de la station d'Achères.

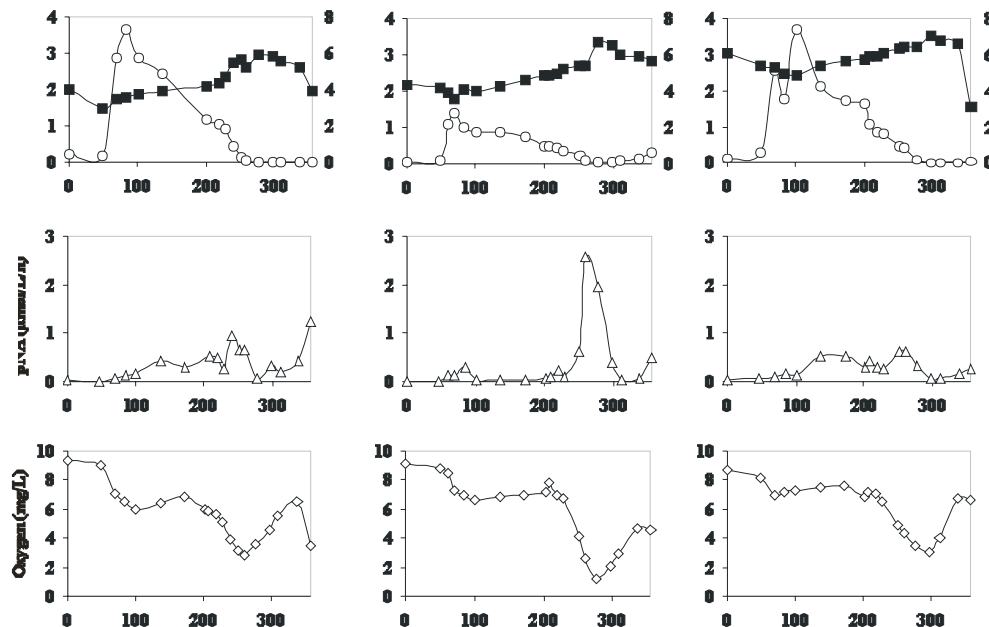


Figure 8. Variations longitudinales des formes de l'azote (N-NH<sub>4</sub> et N-NO<sub>3</sub>), de l'activité nitrifiante potentielle et de l'oxygène au cours de campagnes estivales en 1997, 1998 et 1999.



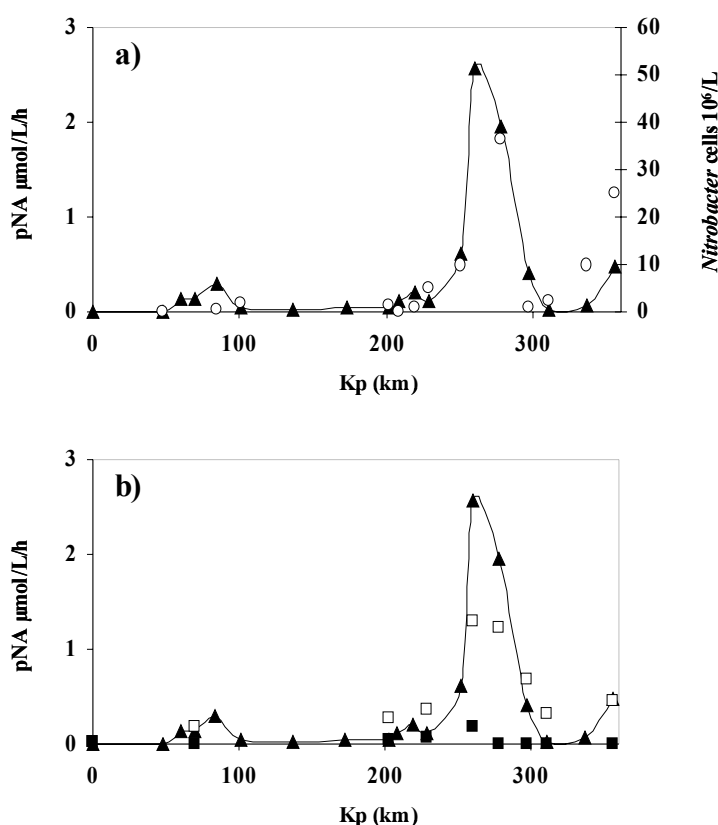
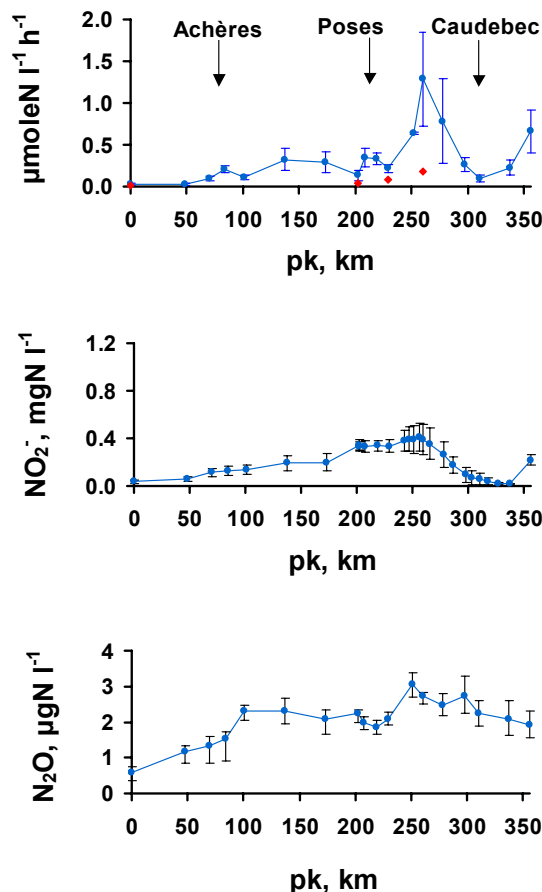


Figure 9. Variations longitudinales a) de l'activité nitrifiante et de l'abondance des bactéries du genre *Nitrobacter* (quantification par PCR) et b) de l'activité nitrifiante totale en comparaison des activités nitrosantes et nitratantes.

Comme la nitrification est connue pour être une source de  $\text{N}_2\text{O}$ , probablement liée à un déséquilibre entre l'activité des bactéries nitrosantes et nitratantes, la concentration en  $\text{N}_2\text{O}$  a été systématiquement déterminée. Le déséquilibre entre les 2 étapes de la nitrification peut également être accompagné par une accumulation transitoire de nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ). C'est dans certaines conditions de déficit en oxygène et de quantités importantes d'ammonium que des concentrations élevées en  $\text{NO}_2^-$  sont le plus souvent mentionnées, et que le  $\text{N}_2\text{O}$ , voire le  $\text{N}_2$  deviennent le produit final principal de l'oxydation de l'ammonium (nitrification dénitrifiante).

Des profils moyens de concentrations en  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{N}_2\text{O}$  ont été établis à partir des campagnes estivales réalisées entre 1997 et 1999 et comparés à un profil moyen d'activité nitrifiante pour la même période (Figure 10). Parallèlement à une augmentation de l'activité nitrifiante en aval de la station d'épuration d'Achères, qui atteint un maximum dans l'estuaire amont, il apparaît que le  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{N}_2\text{O}$  suivent globalement les mêmes tendances. Ces évolutions tendent à confirmer que la nitrification peut être à l'origine tant du  $\text{NO}_2^-$  que du  $\text{N}_2\text{O}$ . Le profil du  $\text{N}_2\text{O}$  révèle toutefois, un accroissement dès l'aval de la station d'Achères, montrant l'intervention d'autres processus, la dénitrification, en particulier connue pour être une source de  $\text{N}_2\text{O}$ . Sous l'effet des effluents de la station d'épuration, des sédiments sans doute anoxiques, peuvent en effet être le site d'une dénitrification intense.

Figure 10. Variations longitudinales moyennes (de haut en bas) : des activités nitrifiantes estivales de 1997 à 1999, des concentrations en nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), des concentrations en oxyde nitreux ( $\text{N}_2\text{O}$ ). Les barres verticales indiquent l'erreur standard.



### 3.2. Emissions de $\text{N}_2\text{O}$ de Paris à l'estuaire

Le  $\text{N}_2\text{O}$ , oxyde nitreux, est un gaz à effet de serre participant à la destruction de la couche d'ozone, qui retient désormais l'attention de la communauté scientifique concernée par les changements de climat globaux. Plusieurs études depuis Codispodi & Cristensen (1985) montrent que la production de  $\text{N}_2\text{O}$ , par les rivières anthropisées et les estuaires notamment, n'est pas négligeable, ce qui nous a conduit à établir des bilans des émissions (Tableau 1).

Tableau 1. Emissions de  $\text{N}_2\text{O}$  dans la Seine, de l'amont de Paris à Poses, et dans l'estuaire fluvial de Poses à Caudebec pour des situations estivales entre 1997 et 2001. Calculs à partir de la sursaturation ( $\mu\text{gN l}^{-1}$ ), fonction de la température, et du coefficient de réaération ( $\text{m s}^{-1}$ ), fonction de la profondeur.

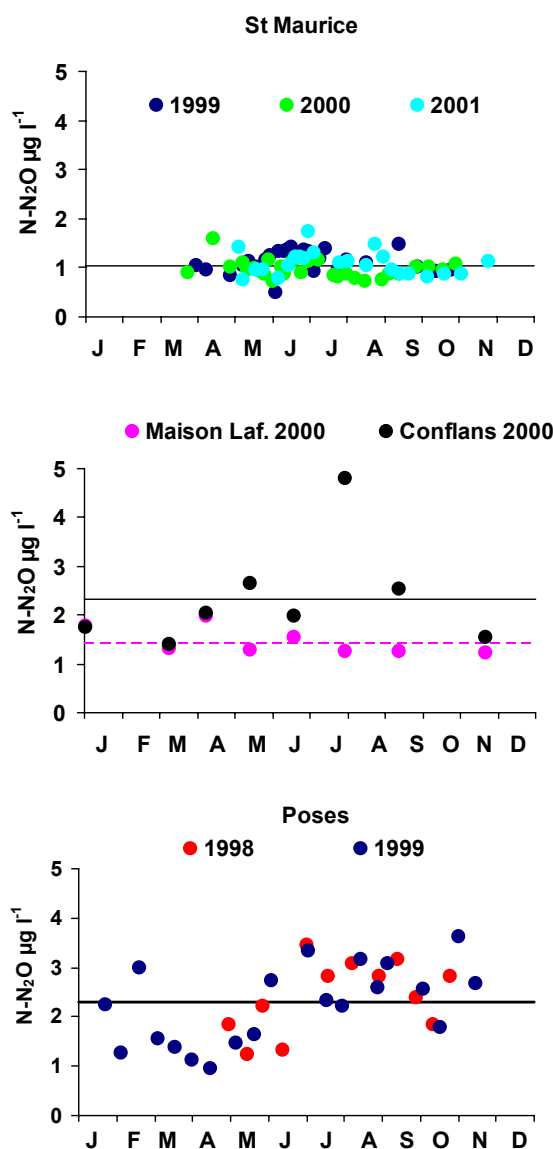
Tronçons considérés	Surf, $10^6 \text{ m}^2$	Juillet 97 $\text{mg Nj}^{-1} \text{m}^{-2}$	Sept 97 $\text{mg Nj}^{-1} \text{m}^{-2}$	Sept 98 $\text{mg Nj}^{-1} \text{m}^{-2}$	Juillet 99 $\text{mg Nj}^{-1} \text{m}^{-2}$	Juillet 01 $\text{mg Nj}^{-1} \text{m}^{-2}$
Débits à Poses, $\text{m}^3 \text{ s}^{-1}$		425	228	229	220	428
St Maurice-Maison Laffitte	8.5	0.90	0.38	0.98	1.61	1.42
Maison Laffitte-Triel	6.5	1.04	0.87	2.97	2.09	6.07
Triel-Poses	25.1	2.03	1.66	2.14	2.98	4.48
Poses-Oissel	4.7	2.51	2.89	2.77	3.24	6.35
Oissel-Caudebec	11.4	2.84	2.15	2.34	1.65	2.90
Flux moyen, $\text{mgN m}^{-2} \text{ j}^{-1}$		1.86	1.59	2.24	2.31	4.25
Flux total pour la somme des tronçons, $\text{kg Nj}^{-1}$	56.2	109.5	88.5	121.1	136.1	227

Les émissions de  $\text{N}_2\text{O}$ , calculées par mètre carré de tronçon, sont en accord avec les concentrations toujours les plus faibles dans le tronçon le plus amont. Ces émissions augmentent significativement à

l'aval d'Achères, atteignent généralement un maximum dans le tronçon Poses-Oissel, et diminuent dans le dernier secteur, avec toutefois des différences d'un cas à l'autre. Les situations observées montrent une tendance à l'augmentation des émissions de  $N_2O$ , que les conditions variées des débits ne peuvent expliquer.

Les variations amont-aval observées sur quelques situations estivales sont confirmées à l'échelle saisonnière. A St Maurice et à Maison Laffitte, outre les concentrations dans l'eau relativement basses (1.05 et 1.45  $\mu g N l^{-1}$  respectivement en moyenne annuelle), les variations saisonnières sont très faibles (Figure 11) ; elles sont beaucoup plus marquées à l'aval d'Achères, tant à Conflans qu'à Poses, où les niveaux sont de 2.3 pour les deux stations (en moyenne annuelle), (Figure 11).

Figure 11. Variations saisonnières de la concentration en  $N_2O$  en Seine Aval : St Maurice en 1999, 2000 et 2001, Maison Laffitte en 2000 et Poses en 1999 et 2000. (Les valeurs moyennes sont indiquées par des droites horizontales ( $y=cte$ )).



### 3.3. Evaluation de la diversité des bactéries nitrifiantes dans la basse Seine

Afin d'évaluer la diversité de cette communauté, nous avons étudié plus particulièrement un échantillon du milieu récepteur (la Seine) caractérisé par une activité nitrifiante importante. Après avoir extrait l'ADN des bactéries présentes dans l'échantillon, nous avons amplifié un fragment du gène *amoA* à l'aide des amorces (*amoA*-1F et 2R). Cette approche est basée sur l'étude du polymorphisme des séquences *amoA* amplifiées et sera le reflet de l'hétérogénéité de la communauté nitrifiante. Plusieurs travaux ont utilisé le gène *amoA* comme marqueur afin d'étudier la communauté

nitrosante dans différents échantillons de l'environnement (sol, eau douce, boues activées ; Purkhold *et al.*, 2000). De nombreuses séquences *amoA* sont ainsi disponibles dans les banques de données, ce qui permet d'obtenir des arbres phylogénétiques de plus en plus robustes.

Un travail de clonage réalisé selon la stratégie de Stephen *et al.* (1999) a montré que les clones *amoA* obtenus pouvaient être regroupés en douze profils de restriction différents (rapport PIREN-Seine, Berthe *et al.*, 2000, Thème 4). Les séquences obtenues à partir d'un clone représentatif de chaque groupe majeur (groupes I, VIII, IX et X) ont été alignées avec celles disponibles dans les banques de données (GenBank) et analysées à l'aide des logiciels du package PHYLIP v3.5 (Felsenstein, 1993). L'arbre phylogénétique présenté à la figure 12 a été obtenu en appliquant la méthode du « Neighbor-joining ». Il apparaît que les bactéries nitrosantes appartenant au sous-groupe  $\beta$  des protéobactéries peuvent être regroupées en trois différents clusters représentés par les genres *Nitrospira*, *Nitrosomonas marina* (incluant *N. oligotropha* et *N. ureae*) et *Nitrosomonas europaea* (Purkhold *et al.*, 2000).

La majorité des clones analysés sont étroitement affiliés au genre *Nitrosomonas*. Les clones Duc-27, Duc-1 et Duc-32 appartiennent au cluster représenté par *Nitrosomonas marina*, *N. oligotropha* et *N. ureae*. Les clones Duc-2 et Duc-14 sont regroupés dans le cluster *Nitrosomonas europaea*. Notons également que pour tous ces clones, de fortes similitudes de séquences (entre 87 et 99 %, Tableau 2) ont été obtenues avec des clones *amoA* provenant d'échantillons d'eaux usées de stations d'épuration (Purkhold *et al.*, 2000). Le clone Duc-32 est le seul à être affilié au genre *Nitrospira* et montre une forte similarité de séquence avec un clone présent dans un biofilm nitrifiant. Ces résultats pourraient indiquer que les bactéries nitrosantes identifiées dans la Seine proviendraient de rejets de stations d'épuration.

Tableau 2. Analyse des clones *amoA* obtenus à partir d'un échantillon d'eau de la Seine. Le pourcentage de similitude avec le clone le plus proche identifié dans la banque de données GenBank est indiqué. (STEP, Station d'épuration).

Clone	% de similitude	Organisme de plus proche	Numéro accession (GenBank)	Origine
<b>Ducl 1</b>	> 87 %	Bactérie non cultivée <i>Clone E1</i>	AF196795	Eaux usées de STEP Purkhold <i>et al.</i> , 2000
<b>Ducl 2</b>	> 98 %	Bactérie non cultivée <i>Clone BF1-2</i>	AF272483	Eaux usées de STEP Purkhold <i>et al.</i> , 2000
<b>Ducl 14</b>	> 97 %	Bactérie non cultivée <i>Clone BF1-2</i>	AF272483	Eaux usées de STEP Purkhold <i>et al.</i> , 2000
<b>Ducl 26</b>	> 88 %	Bactérie non cultivée <i>Clone amoA17</i>	AF272507	Eaux usées de STEP Purkhold <i>et al.</i> , 2000
<b>Ducl 27</b>	> 99 %	Bactérie non cultivée <i>Clone PolI-5</i>	AF272474	Eaux usées de STEP Purkhold <i>et al.</i> , 2000
<b>Ducl 32</b>	> 98 %	Bactérie non cultivée <i>Clone al3</i>	AF239879	Biofilm de STEP Dong <i>et al.</i> , 2000

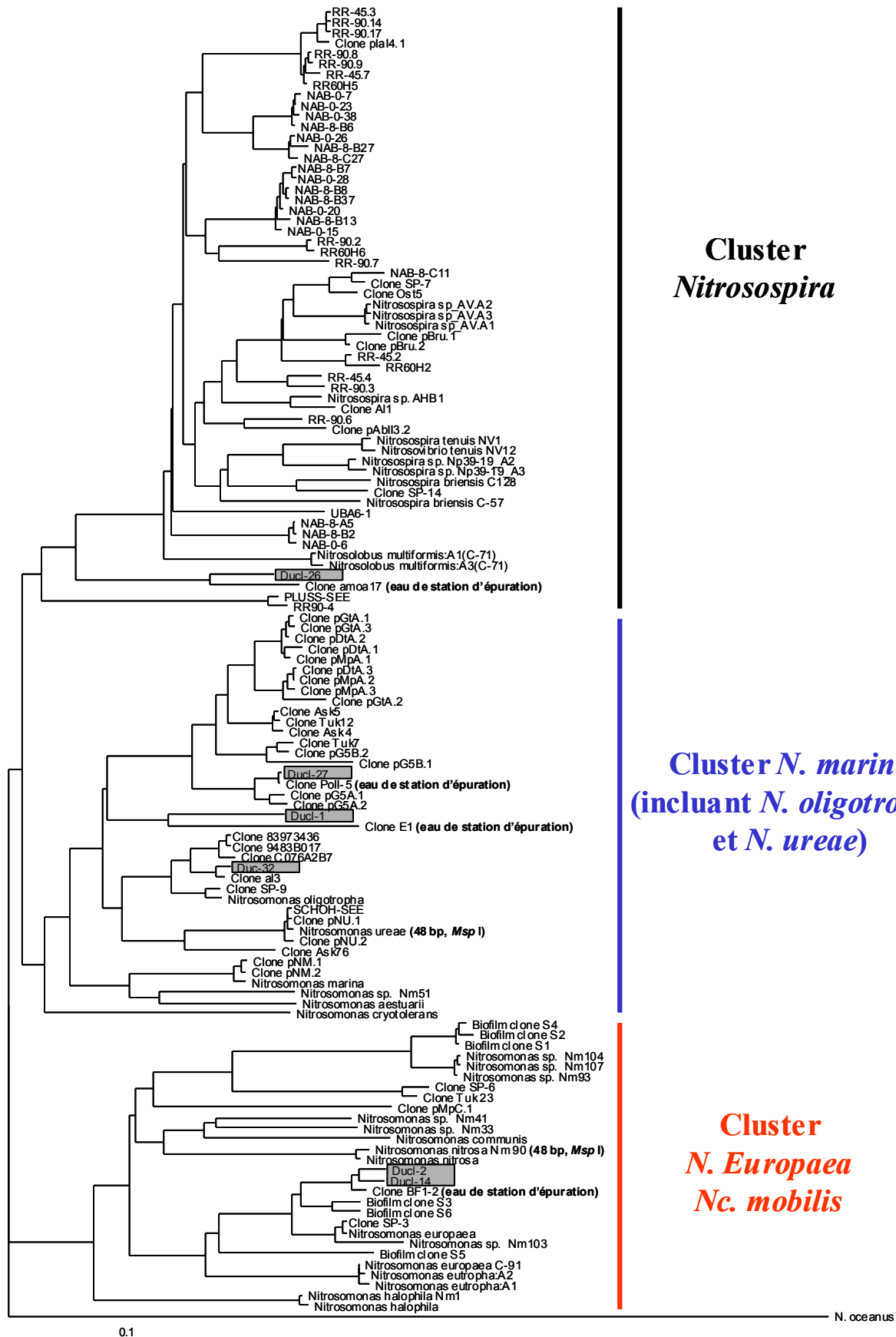


Figure 12. Positionnement des séquences *amoA* obtenues dans ce travail (séquences encadrées) parmi d'autres séquences provenant de bactéries nitrosantes cultivables ou provenant de différents échantillons de l'environnement (données GenBank).

## 4. Modélisation du fonctionnement écologique de l'aval de Paris à l'Estuaire

### 4.1. Nitrification et production de $N_2O$ : modélisation

Si la quantification de la production du  $N_2O$  par la nitrification, la participation de la nitrification au bilan d'oxygène et la dynamique temporelle des activités et des stocks des nitrifiantes sont des informations fondamentales pour la connaissance du fonctionnement de l'écosystème, il est également important comprendre les processus, d'en déterminer les cinétiques et leurs paramètres pour mieux maîtriser la quantité de  $N_2O$ . Dans une perspective de modernisation des stations, la production de  $N_2O$  actuellement émise dans l'estuaire pourrait être déplacée vers les stations d'épuration, voire amplifiée. Comme, sur quelques expériences de laboratoire de nitrification en culture « batch » par populations naturelles (Figure 13), nous n'avons pas montré de relation simple en fonction de l'oxygénation, nous avons formulé un schéma conceptuel de la nitrification, sous ces deux étapes, en prenant compte la dynamique des bactéries qui réalisent chacune de ces deux étapes, et en introduisant une étape intermédiaire de production de  $N_2O$ .

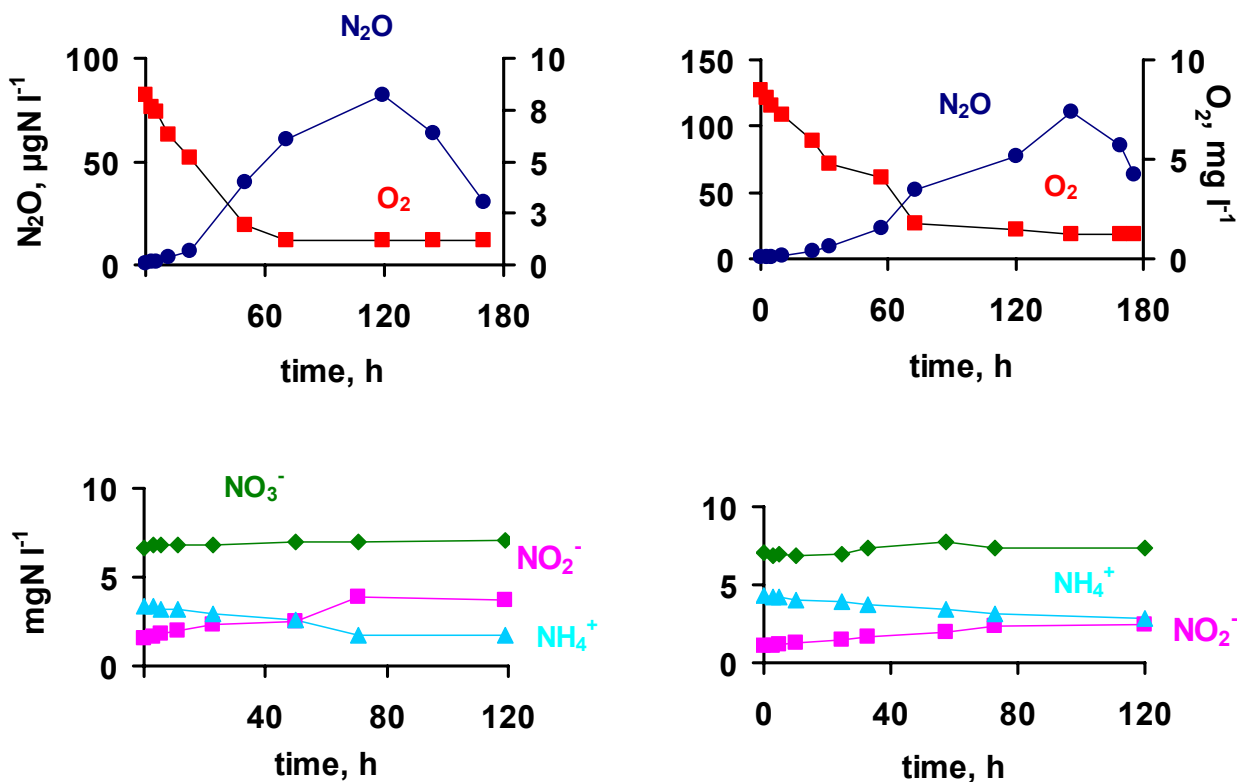


Figure 13. Variations de la production de  $N_2O$  au cours de deux expériences (culture batch) avec diminution de la concentration en oxygène. L'évolution de l'ammonium, nitrite et nitrate est montrée en comparaison, en bas.

Ce schéma conceptuel de la nitrification est basé sur un certain nombre d'hypothèses (Figure 14):

- Les caractéristiques physiologiques des nitrosantes ( $NH_4 \rightarrow NO_2^-$ ) et des nitratantes ( $NO_2^- \rightarrow NO_3$ ) sont celles décrites par Brion et Billen (1998).
- La transformation de  $NO_2^-$  en  $N_2O$  ainsi que la transformation de  $N_2O$  en  $N_2$  est réalisée par les bactéries nitrosantes conventionnelles, et non par celles du groupe anamox, spécialisées.
- Ces bactéries nitrosantes, ont toutes une même activité spécifique et un taux de mortalité égal à celui des bactéries hétérotrophes (Garnier et al., 1991 ; 1992)

- Leur taux de croissance respectif selon la transformation réalisée est proportionnel au rendement énergétique.
- Toutes les bactéries (les nitrosantes et nitratantes) ont une même dépendance à la température.

Un module de nitrification a ainsi été développé sur cette base et inclus au modèle RIVE des processus écologiques (Billen et al., 1994 ; Garnier et al., 1995 ; Billen & Garnier, 1999 ; Garnier et al., 1999), (Figure 14; Tableau 3).

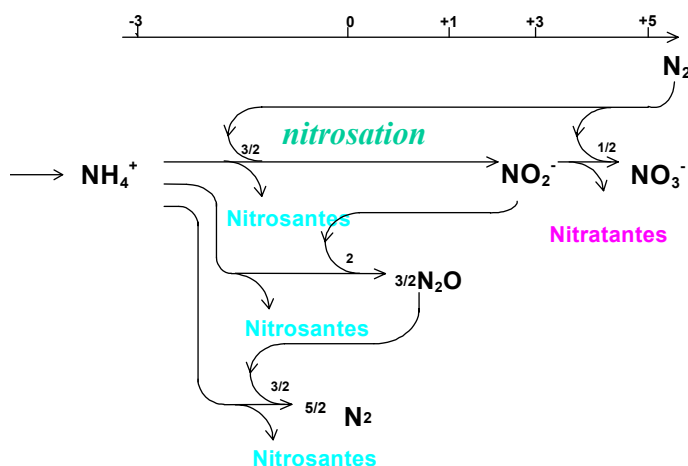


Figure 14. Schéma conceptuel des étapes de la nitrification, prenant en compte la production de  $N_2O$ .

Tableau 3. Paramètres physiologiques de la nitrification utilisés dans le modèle.

Paramètres		Unités	$NH_4^+$ oxydation	$NO_2^-$ oxydation	Références
$\mu_{max}$	Taux de croissance max	$h^{-1}$	0,05	0,04	Brion & Billen, 1998 & littérature
$\gamma$	Rendt de croissance	$\mu gC/\mu gN$	0,09	0,015	
$V_{spMax}$	Act. Spéc. max	$\mu gC/\mu gN/h$	0,5	2,6	Garnier <i>et al.</i> , 1991 & littérature
Kd	Taux de mortalité	$h^{-1}$	0,02	0,02	
$T_{opt}$	Temp. opt	$^{\circ}C$	23	23	Brion & Billen, 1998
dTi	Ecart	$^{\circ}C$	12	12	
$K_{oxy}$	$\frac{1}{2}$ cst de sat pour $O_2$	mg/l	0,6	1,1	Brion & Billen, 1998 & littérature
$K_s$	$\frac{1}{2}$ cst de sat pour subst	mgN/l	1,5	0,03	
$K_{mNO_{2nos}}$	$\frac{1}{2}$ cst de sat pour subst	mgN/l	4,2		ajusté
$K_{mN_2O_{nos}}$	$\frac{1}{2}$ cst de sat pour subst	mgN/l	0,03		ajusté

## 4.2. Simulations par le modèle Modeste (aval de Paris)

Le modèle SENEQUE a donc été utilisé sous cette nouvelle forme et permet désormais de simuler les différentes formes de l'azote ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ) ainsi que l'activité nitrifiante (Figure 15). Le modèle a été validé sur un profil longitudinal typique des conditions hydrologiques estivales ( $240 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ) pour laquelle nous avons toutes ces données (programme PIREN-Seine et Seine-Aval).

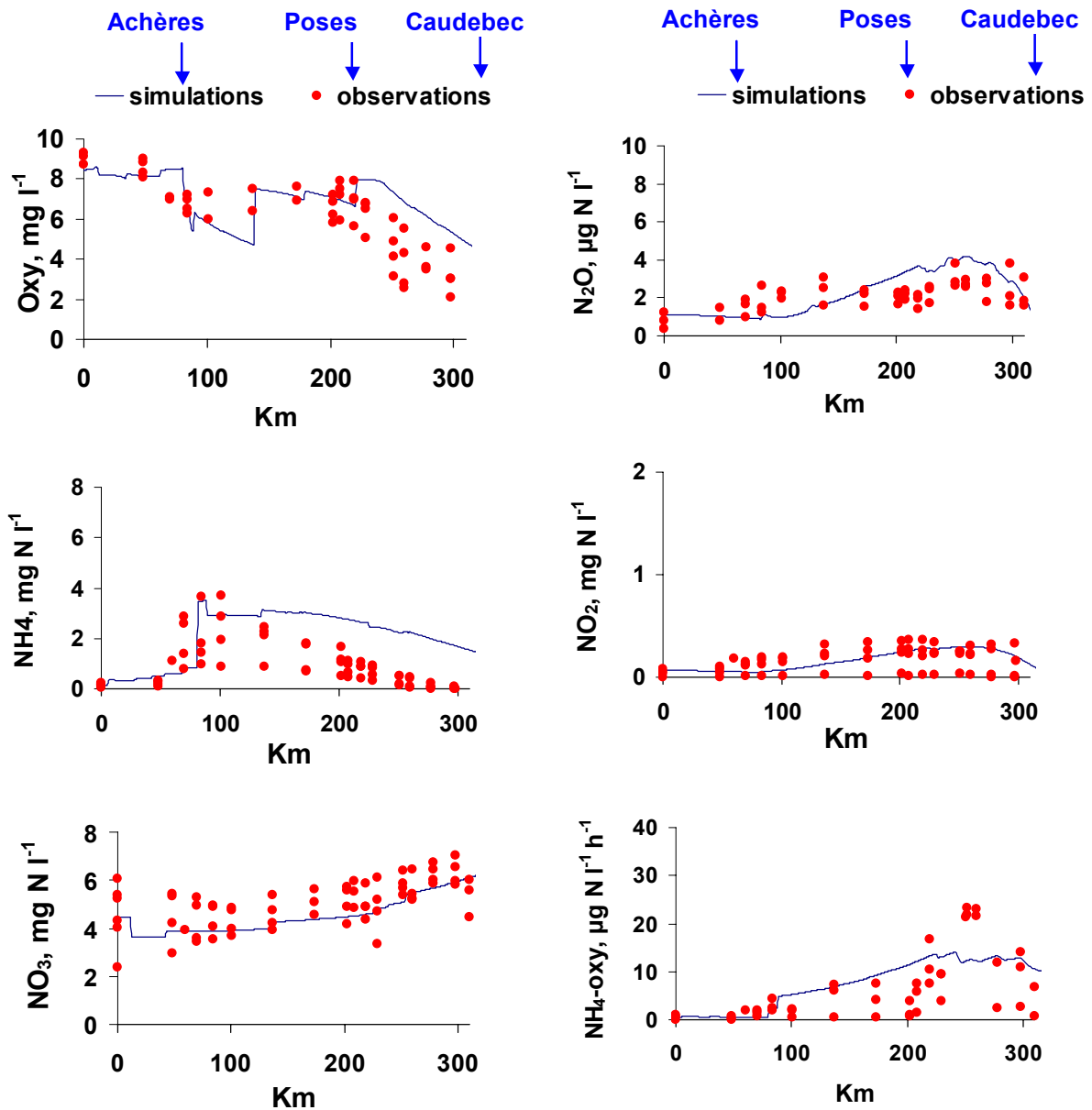


Figure 15. Simulation par le modèle de l'oxygène, des formes de l'azote et de l'activité nitrifiante dans la Seine de Paris à Caudebec pour des situations estivales de 1996 à 1999.

A ce stade de l'étude, il existe une bonne concordance entre les observations et les simulations par le modèle. Ces simulations pourraient de toute évidence être améliorées en tenant compte des situations hydrologiques réelles.



Nous avons testé sur cette base la réponse du modèle à une amélioration du traitement à la station d'Achères en considérant que les effluents traités seraient une moyenne de ceux des pilotes et de Colombes (Figure 16). Il apparaît dans ce cas une nette amélioration de l'oxygénation tant à l'aval immédiat d'Achères que dans l'estuaire. Nous pouvons toutefois remarquer que l'azote transféré ( $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ ) en aval est du même ordre dans les deux situations. Seule la dénitrification permettra donc de réduire les apports à la zone côtière.

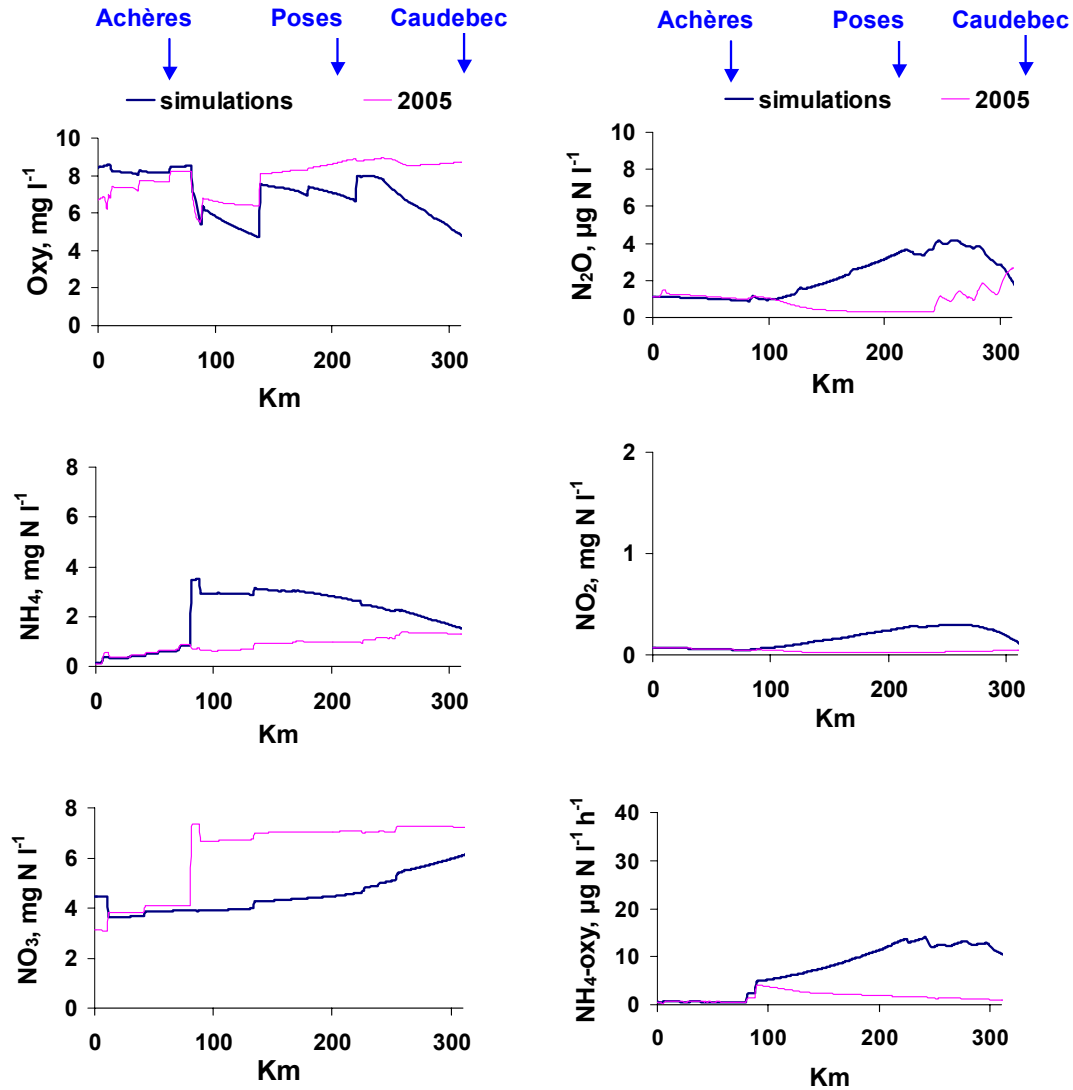


Figure 16. Simulations par le modèle de l'oxygène, des formes de l'azote et de l'activité nitrifiante dans la Seine de Paris à Caudebec pour des conditions futures de 2005, en référence à la simulation présente.

## 4. Conclusions

La phase III du programme PIREN-Seine nous a conduit de manière générale à mieux évaluer la variabilité de la qualité des rejets. Bien que les rejets de stations d'épuration ait fait l'objet de travaux approfondis à l'amont du bassin, le travail présenté ici concerne l'impact des stations d'épuration de Seine-Aval sur le fonctionnement de la Basse Seine, où se concentre une grande partie de la pollution du bassin et de la région parisienne.

Les apports d'ammonium par la station d'Achères constituent un enjeu majeur car c'est insidieusement dans l'estuaire que la nitrification de l'ammonium se produit, en conduisant à un déficit en oxygène important (Garnier et al., 2001).

Outre la compréhension de la dynamique des bactéries nitrifiantes sur un tronçon de 300 km, depuis leur inoculation dans le milieu par les effluents, cette étude nous a conduit à quantifier et modéliser le devenir de ces effluents.

L'étude de la qualité des effluents à l'échelle saisonnière des deux stations d'épuration de Seine-Aval (Achères et Colombes) du point de vue de l'azote, montre une grande variabilité de la qualité des rejets en bactéries nitrifiantes et en azote réduit (NTK). Comme la station d'Achères n'est pas équipée d'un traitement tertiaire, bactéries nitrifiantes et azote réduit sont rejetés en quantité importante avec une grande variabilité saisonnière. En revanche, la qualité des rejets de Colombes montre toute la performance du traitement tertiaire. Toutefois, en raison des différences de charge des deux stations d'épurations, ce sont évidemment les rejets d'Achères qui conditionnent la qualité du milieu récepteur à l'aval.

Les travaux menés au cours de cette phase confirment que les bactéries nitrifiantes sont présentes dès les têtes des réseaux d'assainissement et il semblerait que c'est dans les biofilms des réseaux qu'elles se développent.

L'ammonium rejeté est progressivement nitrifié de l'aval de Paris à l'estuaire, et en conditions estivales la nitrification est complète. Cette nitrification s'accompagne d'une accumulation de nitrite et d'une production de  $N_2O$ . Le processus de dénitrification dans les sédiments, pourrait également être à l'origine de ces produits intermédiaires, nitrites et oxyde nitreux. L'émission de  $N_2O$  est de l'ordre de 40 à 80 tN an<sup>-1</sup> dans ce secteur aval de la Seine et de l'estuaire fluvial, non négligeable en regard des 1000 tN an<sup>-1</sup> émises par l'ensemble des terres agricoles du bassin (selon les coefficients de Mosier & Kroeze, 1999).

Les méthodes moléculaires introduites au cours de cette phase du programme ont permis de pousser plus loin l'analyse des organismes qui réalisent la nitrification, l'étape de la nitrosation notamment ainsi que la diversité des bactéries nitrosantes. Il apparaît à ce stade que la communauté présente dans la Seine soit assez restreinte et similaire à celle trouvée dans des effluents de station. Cette approche par la biologie moléculaire ainsi que les expériences de nitrification en conditions contrôlées ont conduit à formuler des hypothèses sur les processus intermédiaires de la nitrification et d'élaborer un modèle conceptuel, formalisé dans le modèle RIVE. Il reste à davantage explorer les conditions optimales de la nitrification et à mieux comprendre la dynamique des communautés de nitrosantes et dans nitratantes dans ces conditions particulières. Les études en chémostat en cours actuellement permettront d'affiner cette représentation des processus.

A ce stade, le modèle des processus RIVE inclus au modèle SENEQUE (i.e. MODESTE à l'aval de Paris) fournit des simulations cohérentes des formes de l'azote, ammonium, nitrate, nitrite et  $N_2O$ . Nous avons même exploré la réponse du modèle à une amélioration du traitement à Achères ; il montre une amélioration sensible de l'oxygénation, tant à l'aval d'Achères que dans l'estuaire.

Au terme de cette phase III du programme PIREN-Seine, nous sommes d'ores et déjà en mesure de fournir un outil pour tester les politiques d'aménagement de la station d'Achères. Au préalable, des tests de sensibilité tenant compte de la variabilité observée devront être effectués pour connaître les limites de l'outil.

## 6. Bibliographie

- Berthe T., Garnier J., Petit F. (1999). Quantification de bactéries nitrifiantes du genre *Nitrobacter* en milieu aquatique (l'estuaire de la Seine, France). C.R. Acad. Sci. Paris **322**, 517-526.
- Berthe T., Garnier J., Philippon X., Pinault S., Laroche L. (2000). Activités nitrifiantes et hétérotrophes dans le continuum « réseau d'assainissement - station d'épuration - milieu naturel. Rapport d'Activité 1999 du PIREN- Seine. Thème 4 (4), 23-48
- Billen G., Garnier J. et Hanset Ph. (1994). Modelling phytoplankton development in whole drainage networks: the RIVERSTRAHLER model applied to the Seine river system. *Hydrobiologia*, 289:119-137.
- 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.
- 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.
- Codispoti L.A., Christensen J.P. (1985). Nitrification, denitrification and nitrous oxide cycling in the Eastern Tropical South Pacific Ocean. *Marine Chemistry* **16**, 277-300.
- Degrange V., Bardin R. (1995). Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2093-2098.
- Felsenstein, J. (1993). PHYLIP: Phylogeny inference package (version 3.5c). University of Washington, Seattle.
- Garnier J., Servais P. et Billen G. (1991). Bacterioplankton in the Seine River: impact of the parisian urban effluents. *Can. J. Microbiol.*, 38: 56-64
- Garnier J., Billen G., Servais P. (1992). Physiological characteristics and ecological role of small and large bacteria in a polluted river (Seine River, France). *Arch. Hydrobiol., Beih*, **37**, 83-94.
- Garnier J., Billen G. & Coste M. (1995). Seasonnal succession of diatoms and Chlorophyceae in the drainage network of the river Seine: Observations and modelling. *Limnol. Oceanogr.* 40: 750-765.
- Garnier J., Billen G. & Palfner L. (1999). Understanding the oxygen budget of the Mosel drainage network with the concept of heterotrophic/autotrophic sequences: the Riverstrahler approach. *Hydrobiologia*, 410: 151-166.
- Garnier J., Berthe T., Pinault S., Laroche L., Martinez A. (2001). Impact des activités nitrifiante et hétérotrophe sur l'oxygénation à l'aval de Paris : évolution récente et perspectives pour 2005. Rapport d'Activité 2000 du PIREN- Seine. Thème 4, 25p.
- Okabe S., Satoh H., Watanabe Y. (1999). In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(7)**, 3182-3191
- Mosier & Kroeze (1999). IGBP Newsletter 34 .
- Porter K.J., Feig Y.S. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25**, 943-948.
- Purkhold U., Pommerening-Roser A., Juretschko S., Schmid M.C., Koops H.P., Wagner M. (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5368-5382.

- Rotthauwe J.H., Witzel K.P., Liesack W. (1997) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4704-4712.
- Stephen J.R., Chang Y.J., Macnaughton S.J., Kowalchuk G.A., Leung K.T., Flemming C.A., White D.C.(1999) Effect of toxic metals on indigenous soil beta-subgroup proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 95-101.
- Tsai Y.L., Olson B.H. (1991). Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1070-1074.
- Zachar V., Thomas R.A., Goustin A.S. (1993) Absolute quantification of target DNA: a simple competitive PCR for efficient analysis of multiple samples. *Nucleic Acids Res.* **21**, 2017-2018.