

Impact de l'agglomération Parisienne sur la communauté nitrifiante et la dynamique du nitrite de la Seine

Thibaut Cazier^{1*}, Mélanie Raimonet¹, Vincent Rocher², Eric Viollier³, Céline Roose-Amsaleg¹, Josette Garnier¹, Anniët Laverman¹

¹ METIS, UPMC, Paris

² SIAAP, Direction du Développement et de la Prospective, Colombes

³ IGP,

* thibaut.cazier@upmc.fr

1 Résumé

Le cycle de l'azote est l'un des cycles biogéochimiques majeurs dans l'environnement, et il est dominé par l'activité microbienne. Malgré les traitements subis par les eaux usées en station d'épuration (STEP) avant leurs rejets dans le milieu naturel, le cycle de l'azote des eaux de surface est perturbé par les pollutions domestiques. Ces pollutions sont surtout observées dans les cours d'eau dont les bassins versant concentrent une population importante. La nitrification est une des réactions du cycle de l'azote qui transforme l'ammonium (NH_4^+) en nitrate (NO_3^-). Un intermédiaire de la nitrification est le nitrite (NO_2^-), une forme toxique de l'azote, qui est produit par des communautés microbiennes différentes de celle qui le consomment. Sa toxicité fait qu'il est l'objet d'une surveillance dans le cadre de la "Directive Cadre de l'Eau" (DCE). L'ajout de traitements de nitrification dans les STEP de l'agglomération parisienne a conduit à une augmentation des teneurs en nitrite dans la Seine en aval immédiat des rejets. Les concentrations en nitrite dépassent le critère de bon état écologique de l'eau ($>1\mu\text{M}$ ou $0,09\text{ mg N/L}$) sur plusieurs dizaines de km en aval. Le fait que le nitrite soit un élément très réactif, et donc supposé disparaître rapidement, pose question quant à sa persistance.

Pour comprendre les causes de cette lente disparition, les communautés microbiennes impliquées dans la dynamique du nitrite dans la colonne d'eau ont été analysées à deux saisons aux abords de Paris. Ce milieu étant oxygéné, les groupes concernés sont les microorganismes nitrifiants, plus précisément les bactéries et archées oxydant l'ammonium (AOB et AOA) et les bactéries oxydant le nitrite (NOB). La diversité de ces groupes ainsi que leur abondance dans la Seine et les STEPs ont été déterminées au moyen de deux techniques, l'électrophorèse sur gel avec gradient de dénaturant (DGGE) et la PCR quantitative (qPCR).

La communauté archéenne oxydant l'ammonium dans la STEP de Seine Aval (SAV) à Achères (SAV) a une structure différente des communautés environnementales, mais son introduction par les effluents modifie peu la structure des communautés naturelles. Cette différence de structure entre les effluents et l'environnement est plus faible concernant les communautés bactériennes oxydant l'ammonium. Cependant des espèces présentes dans SAV apparaissent dans l'environnement après le point de rejet. En comparant ces résultats de diversité avec ceux obtenus avant modification des traitements en STEP, on constate que SAV constitue toujours une source de microorganismes, malgré l'ajout de traitements de nitrification et dénitrification.

Les archées oxydant l'ammonium dominent les bactéries oxydant l'ammonium en abondance dans l'environnement. Les bactéries oxydant le nitrite subissent plus fortement l'effet de SAV que les microorganismes oxydant l'ammonium. Cependant cet effet est variable sur *Nitrobacter* alors qu'une augmentation est toujours observée pour *Nitrospira*. L'effet de SAV sur l'environnement varie avec les saisons : l'influence est plus forte sur la diversité en hiver et sur l'abondance en été. Les communautés microbiennes ayant un rôle majeur dans la dynamique du nitrite, les perturbations de ces communautés en aval de SAV modifieront ses transformations. L'étude des communautés microbiennes nitrifiantes apportent un élément de réponse sur la dynamique des nitrites dans la Seine, et l'influence des saisons sur sa lente diminution dans la colonne d'eau en aval des rejets.

2 Introduction

Le nitrite est un intermédiaire du cycle de l'azote (Figure 1), toxique pour les êtres vivants à de faibles concentrations, ce qui en fait un problème environnemental majeur. En raison de cette toxicité, les normes européennes ont été fixées à 0,003 et 0,009 mg/L d'azote sous forme nitrite pour les poissons (soient 0,2 et 0,6 μM , Directive du Conseil de l'Union Européenne, 2004), et 0,15 mg/L d'azote sous forme nitrite pour l'eau potable (soit $\approx 10 \mu\text{M}$, DCUE, 1998). La colonne d'eau étant un milieu oxygéné, la nitrification est la réaction principale impliquée dans la dynamique du nitrite dans la Seine.

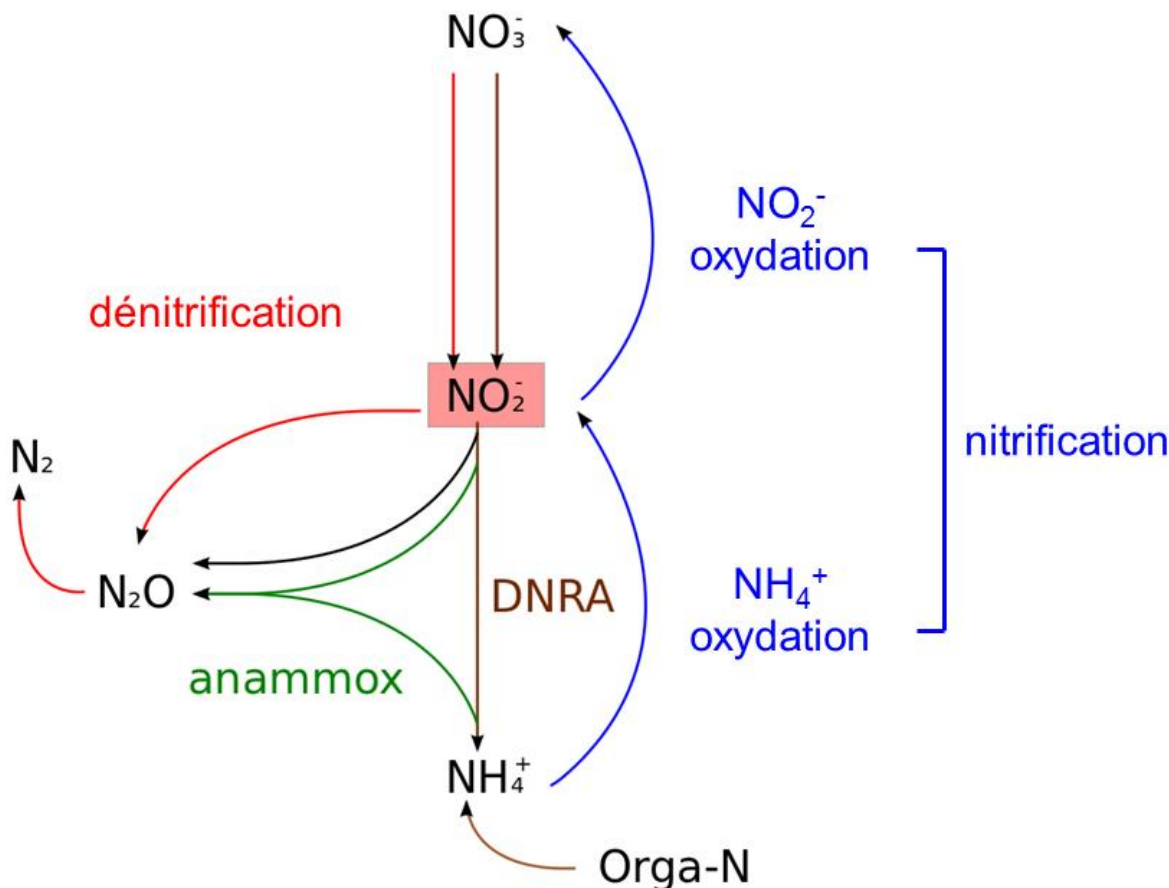


Figure 1 – Cycle de l'azote simplifié, centré autour du nitrite

La nitrification étant une voie métabolique permettant d'éliminer l'ammonium dans l'eau. C'est ce processus biologique qui a été adopté en 2007 par le SIAAP dans ses stations d'épuration (STEP) pour diminuer les rejets en ammonium dans la Seine, modifiant la dynamique des différentes formes de l'azote a changé en aval de Paris. Les rejets en ammonium ont beaucoup diminué, mais cela s'est fait au dépend des rejets de nitrite qui ont augmenté. Dans la Seine juste en aval de SAV, qui traite environ 70% des eaux usées parisiennes ([www.siaap](http://www.siaap.fr)), un pic de nitrite est apparu. Les nitrites persistent sur plusieurs dizaines de kilomètres après SAV à des concentrations dépassant le critère de bon état écologique de l'eau. Auparavant, les forts rejets d'ammonium entraînaient une production continue de nitrite le long de la Seine jusqu'à atteindre des valeurs maximales dans l'estuaire (Garnier *et al.*, 2007). Cette production tardive était le résultat de l'activité des microorganismes nitrifiants dans la Seine, rendue possible par un substrat, l'ammonium, présent en abondance.

Ces populations microbiennes nitrifiantes sont séparées en deux groupes distincts: la population oxydant de l'ammonium (AOB et AOA), et celle oxydant le nitrite (NOB). Les microorganismes oxydant le nitrite sont supposés avoir des paramètres cinétiques plus forts que ceux des oxydateurs d'ammonium. Le nitrite très réactif chimiquement est donc supposé disparaître rapidement dans l'environnement. Cependant, l'accumulation de nitrite est un phénomène qui a été rapporté dans différents milieux (Kelso *et al.*, 1997; Von der Wiesche & Wetzel, 1998), y compris en Seine (Garnier *et al.*, 2007). Principalement régie par la nature des communautés microbiennes impliquées, la dynamique du nitrite est actuellement surtout caractérisée par une lente disparition de l'apport par la STEP SAV.

De nombreuses études portent sur ces populations AOB (Cebren *et al.*, 2004; Dionisi *et al.*, 2003; Sonthiphand *et al.*, 2013) et NOB (Cebren *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2010) dans l'environnement et dans des STEP. Mais ces études portent rarement sur plusieurs saisons, malgré l'importance des facteurs de contrôle physicochimiques. Les populations bactériennes et Archées sont de plus rarement étudiées en même temps. Les travaux menés lors de cette étude ont donc pour but de déterminer l'impact des STEP de l'agglomération parisienne sur les communautés nitrifiantes le long d'un tronçon de 160 km de la Seine, en amont et aval de l'agglomération parisienne, et en deux saisons différentes afin de déterminer les liens entre les populations microbiennes nitrifiantes, les conditions saisonnières et la persistance des nitrites dans l'environnement.

3 Méthodologie

3.1 Site d'étude

Les prélèvements d'eau de Seine ont été effectués par le service Direction Développement et Prospective (DDP) et Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP) en août et décembre 2012. Les échantillons d'eau de surface ont été prélevés au centre des cours d'eau depuis un pont, sur la Seine et la Marne (Figure 2). L'eau a été prélevée au seau, à trois reprises successives et homogénéisée afin d'obtenir un échantillon représentatif pour chaque site environnemental. En plus de ces sites environnementaux, les eaux de rejet SAV ont été fournies par la DDP. Ces échantillons sont un mélange des eaux rejetées pendant 24h par la STEP. Les échantillons environnementaux et les rejets de STEP sont conditionnés dans des bidons en plastique de 2 L avant d'être acheminés au laboratoire dans une glacière.

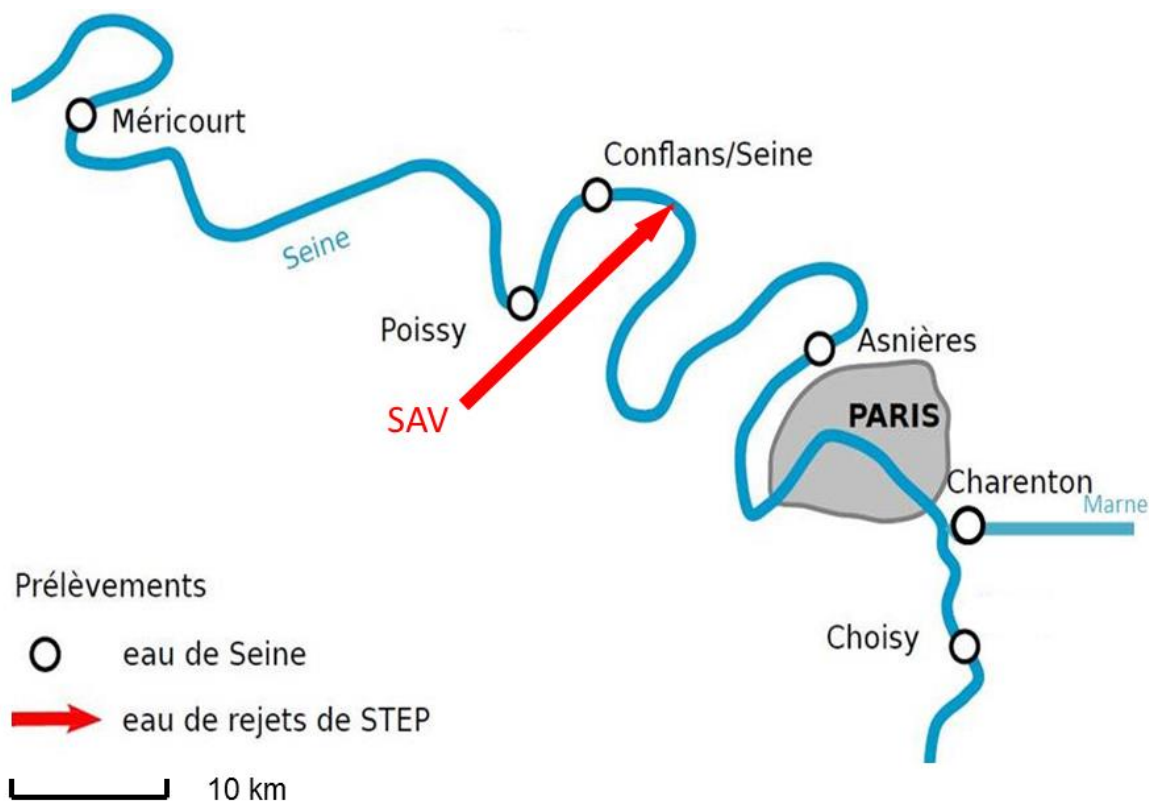


Figure 2 – Carte des sites de prélèvements d'eau le long de la Seine en Ile de France ainsi que des rejets de la station d'épuration Seine Aval

3.2 Extraction de l'ADN et détermination du poids des matières en suspension

Afin de connaître la charge des eaux en matière en suspension (MES) les échantillons sont homogénéisés puis filtrés sur un filtre en fibre de verre pré-pesés avant d'être séchés 24 heures à 110°C. Les filtres sont ensuite repesés afin de déterminer le poids sec de MES dans l'eau à chacun des points échantillonnés. Pour d'obtenir le DNA présent dans les échantillons, l'eau est homogénéisée puis filtrée en triplicats sur des filtres de porosité 0,22 µm, à raison de 3 fois 200 mL environ pour les échantillons environnementaux, et 3 fois 60 mL environ pour les rejets de STEP. Les filtres contenant les microorganismes sont ensuite pliés et conditionnés dans des tubes de 2 mL et conservés à -80°C avant extraction.

Pour extraire le DNA des microorganismes retenus sur les filtres, on utilise le kit Powersoil DNA isolation Kit (MOBIO) en suivant le protocole du fournisseur modifié comme suit. Le filtre est découpé en 4 avant la lyse des cellules, et la lyse physique est effectuée par agitation des tubes powerbead dans un appareil FastPrep FP120 (BIO 101) 45 secondes 2 fois à 4,5 Hz.

3.3 Etude de diversité

La première étape de l'analyse de diversité par « Denaturing Gradient Gel Electrophoresis » (DGGE) ou électrophorèse sur gel à gradient de dénaturant consiste en une amplification du gène d'intérêt dans l'échantillon à analyser. Pour l'analyse des bactéries oxydant l'ammonium (AOB) la PCR utilisée sera une PCR « nested », qui repose sur deux PCR successives. Pour les AOB, le premier jeu d'amorce (CTO) (Kowalchuk *et al.*, 1997; Kowalchuk *et al.*, 1998) cible les AOB spécifiquement, et le deuxième est généraliste des bactéries (Muyzer *et al.*, 1993) (Tableau 1). Les séquences cibles du deuxième jeu d'amorces sont incluses dans le fragment amplifié par la première PC, et le fragment amplifié est mieux adaptée à la

DGGE. Pour l'analyse de diversité des Archées oxydant l'ammonium (AOA), on utilise un seul jeu d'amorces (Sahan & Muyzer, 2008).

La DGGE consiste à séparer des fragments préalablement amplifiés en PCR d'un même gène en fonction de leur pourcentage en bases G et C selon un gradient de dénaturant sur un gel de polyacrylamide. Les dénaturants utilisés sont le formamide et l'urée selon un gradient de 40% à 70% de dénaturant pour l'analyse des AOB, et selon un gradient de 15 à 55% pour l'analyse des AOA. Plus le pourcentage en G-C de la séquence à analyser sera faible, plus la migration de fragment de DNA sera arrêtée par une faible concentration en dénaturant. L'arrêt de la migration d'un fragment de DNA est dû à la séparation partielle des deux brins de DNA ce qui en augmente l'encombrement. La migration est effectuée dans un bain de TAE 1X chauffé à 62°C sous une tension constante de 130 V pour une intensité optimale de 70 mA pendant 17h40. Le gel est ensuite coloré par un agent intercalant, le SightDNA Stain (euromedex). L'image obtenue est analysée grâce au logiciel Gel Compar 6.2 (Applied Math) qui calcule le pourcentage de similarité entre les différents échantillons en fonction du profil de bandes pour chaque échantillon.

Tableau 1 – Amorces et sondes utilisées dans cette étude, programmes PCR et qPCR utilisés et sources

Population ciblée	Gène	Nom de l'amorce	Technique	Source
BOA	16S rDNA spécifique	CTO189fA & CTO189fB	PCR nested	Kowalchuk 1997
		CTO189fC		Kowalchuk 1998
	16S rDNA général amoA	357F 518R amoA 1F AmoA 2R	DGGE qPCR	Muyzer et al., 1993 Rotthauwe et al, 1997
AOA	amoA	A23F A616R	DGGE & qPCR	Sahan & Muyzer 2008
NBC	16S rDNA spécifique	Nitro-1198f Nitro-1423r Nitro-1374Taq	qPCR	Graham et al., 2007
NSR	16S rDNA spécifique	NSR1113f NSR1264r NSR1143fTaq	qPCR	Dionisi et al., 2003

3.4 PCR quantitative

L'abondance des communautés microbiennes d'intérêt sera faite au moyen de la technique de PCR quantitative (qPCR), avec des amorces spécifiques pour les AOB (Rotthauwe *et al.*, 1997), les AOA (Sahan & Muyzer, 2008) ainsi que les bactéries du genre *Nitrobacter* (NBC) (Graham *et al.*, 2007) et *Nitrospira* (NSR) (Dionisi *et al.*, 2003) (Tableau 1). La qPCR repose sur la comparaison de l'intensité de fluorescence des échantillons à celle d'une gamme étalon. Deux types de mix sont utilisés: le mastermix LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) pour les qPCR sans sonde TaqMan, et le mastermix SensiFact Probe No-Rox (Bioline) pour les qPCR avec sonde TaqMan. Une sonde TaqMan est un court fragment de DNA de type

amorce, qui s'hybride au DNA au milieu de la séquence à amplifier. Sur ce fragment, est fixée une sonde fluorescente couplée à son inhibiteur de fluorescence. L'enzyme polymérase décroche la sonde et son inhibiteur au moment de la polymérisation du DNA, ce qui induit une fluorescence proportionnelle au nombre de séquence amplifiées. En absence de sonde, la fluorescence est assurée par la présence d'un agent intercalant, le SYBRGreen présent directement dans le milieu réactionnel. Les qPCR ont toutes été effectuées dans un milieu réactionnel de 10 μL , dans un appareil LightCycler 480 (Roche), sur une plateforme technique à l'UPMC. Les résultats bruts sont analysés grâce au logiciel LightCycler 480 (Roche) et les différences entre les échantillons sont qualifiées grâce à un test statistique.

4 Résultats et discussion

4.1 Conditions environnementales

Pour la période qui nous concerne, le débit de la Seine à Paris (Austerlitz) varie d'un minimum en fin d'été (septembre 2012) de $80 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, à un maximum en hiver (février 2013) de $1100 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 3). La moyenne du débit pendant les 7 jours précédant et succédant aux prélèvements d'août et décembre sont respectivement de 106 et $357 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. Aux mêmes périodes, et pour le même intervalle encadrant la date des prélèvements, SAV a rejeté en moyenne 14 et $23 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ respectivement.

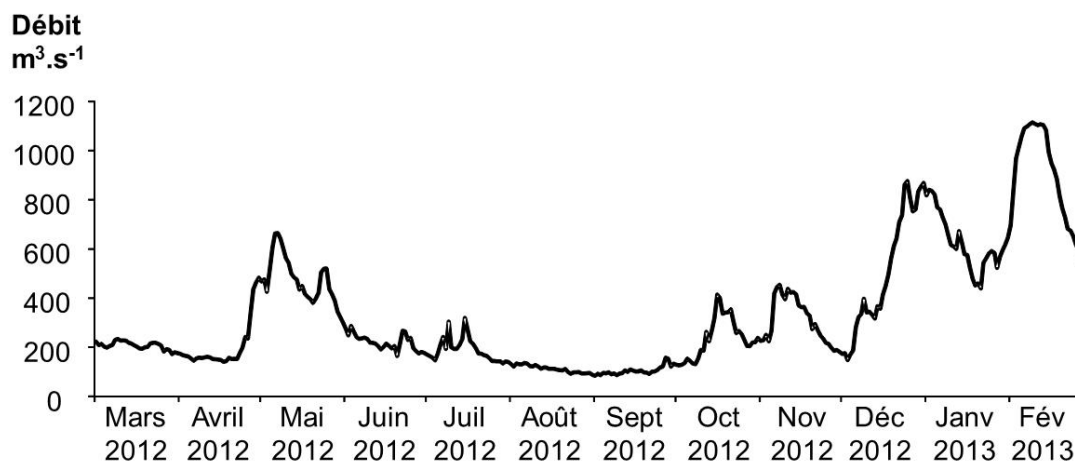


Figure 3 - Débit de la Seine à Austerlitz pendant la période mars 2012-février 2013

Les concentrations de nitrite en sortie de SAV en décembre sont plus importantes qu'en août (Tableau 2). Des concentrations plus importantes sont mesurées en aval dans l'environnement en décembre malgré un débit plus fort de la Seine, donc une dilution plus importante des rejets de STEP. Les concentrations de nitrite en amont de SAV sont peu différentes entre ces deux saisons. On note aussi de fortes concentration en MES dans l'environnement en décembre. Le choix de ces deux dates de prélèvements permet donc d'obtenir des résultats pour des conditions environnementales contrastées.

Tableau 2 – Sites, quantité de Matières En Suspension (MES) et concentrations de nitrite aux deux dates de prélèvements

Site	Origine	Août		Décembre		
		MES (mg.L ⁻¹)	[Nitrite] (µM)	MES (mg.L ⁻¹)	[Nitrite] (µM)	
Choisy	Cho	Seine	7	3,8	30	3,7
Charenton	Cha	Marne	7	2,3	22	4,7
Asnières	Asn	Seine	3	4,8	16	4,6
Conflans Seine	Cos	Seine	8	10,9	20	21,5
Poissy	Poi	Seine	9	11,1	20	12,4
Méricourt	Mer	Seine	5	7,2	18	13,9
Seine Aval	SAV	STEP	10	139,1	13	250,0

4.2 Diversité des microorganismes nitrifiants

L'analyse de la diversité des oxydateurs de l'ammonium permet de comparer des échantillons entre eux et de connaître, la structure des communautés microbiennes dans un ensemble d'échantillons. La structure des communautés correspond donc ici à l'étude comparée d'un ensemble d'espèces présentes en divers points de prélèvements. On pourra ainsi avoir un même nombre d'espèces en deux points, mais une structure différente si certaines espèces ne sont pas communes aux échantillons pris en compte.

Les communautés de la station SAV ont une structure distincte (pourcentage de similarité faible) de celles présentes dans l'environnement (Figure 4). Elles ont cependant une structure plus proche de l'environnement en décembre qu'en août. On observe dans le même temps un groupement des échantillons en aval de SAV pour les prélèvements de décembre que l'on n'observe pas en août. Cela indique un impact de SAV sur la structure des communautés bactériennes oxydant l'ammonium en aval dans la Seine.

En plus de la structure de la communauté, cette approche permet de connaître la richesse spécifique de la communauté analysée, soit le nombre d'espèces présentes. Chaque « bande » sur le gel représente une Unité Taxonomique Opérationnelle (UTO) que l'on peut approximativement assimiler à une espèce, ou un groupe d'espèces proches. Le nombre d'UTO est un bon indicateur de la richesse spécifique d'un échantillon. Ce nombre d'UTO est significativement plus élevé en décembre (17 à 23) qu'en août (8 à 14) ($p < 0.05$) dans l'environnement, ce qui indique une richesse plus forte en décembre dans la Seine. Le nombre d'UTO dans les rejets de SAV (13 en août et 19 en décembre) indique une richesse spécifique similaire dans la STEP et l'environnement.

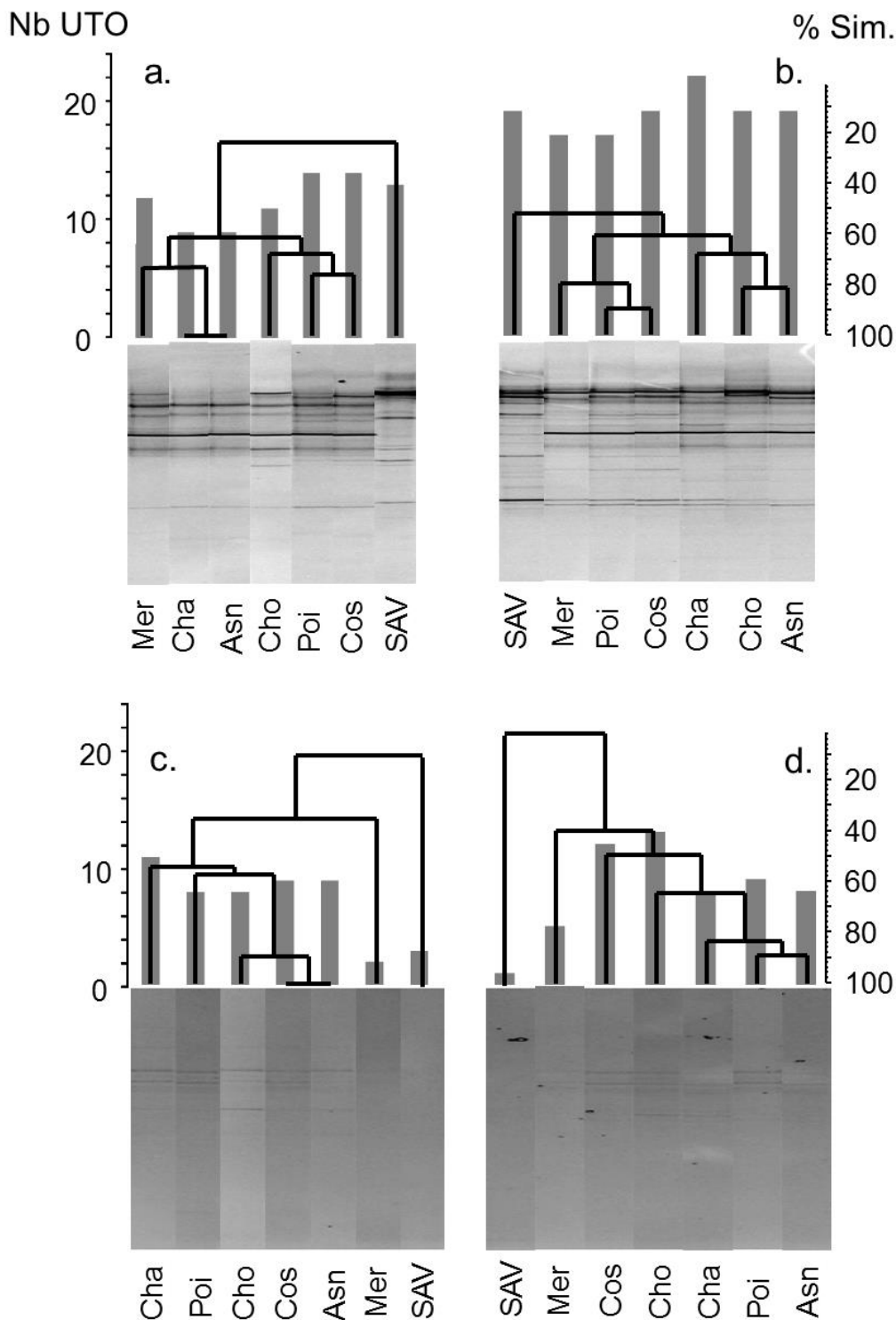


Figure 4 - Diversité des Oxydateurs de l'Ammonium. Le nombre d'UTO est représenté sous forme de diagramme, en gris avec l'échelle à gauche, et la similarité, calculée avec l'indice de Jaccard, sous forme de dendrogramme, avec l'échelle à droite. Les AOB sont représentés en 4.a (août) et 4.b (décembre), et les AOA en 4.c (août) et 4.d (décembre)

Le nombre d'UTO des échantillons pour la communauté AOA permet de déterminer que la richesse spécifique AOA est faible dans la Seine (2 à 12), et très faible dans la STEP (1 à 2) (Figure 4). Les communautés de STEP ont une structure très différentes celles de l'environnement, indiquant que ces populations ont très peu en commun. Le groupement des échantillons environnementaux en fonction de leur similarité ne permet pas de montrer un clivage entre l'amont et l'aval de SAV. Ceci ne permet pas de conclure à un impact des rejets de SAV sur la structure des communautés AOA dans l'environnement. Le nombre d'UTO et donc la richesse spécifique des AOA n'est pas significativement différent entre août (2 à 11) et décembre (5 à 12).

L'impact de SAV sur la structure des communautés oxydant l'ammonium n'est pas visible pour les AOA, et variable pour les AOB. Les déséquilibres entre les communautés AOA et AOB pourrait ainsi modifier la dynamique des nitrites et sa plus ou moins grande persistance en aval des rejets.

4.3 Abondance des microorganismes nitrifiants

4.3.1 Abondance des oxydateurs de l'ammonium

Les microorganismes oxydateurs de l'ammonium sont dominés par les archées. Cette dominance est d'un ordre de grandeur dans l'environnement. Les AOB sont présentes à environ 10^8 copies et les AOA à environ 10^9 dans l'environnement et 10 fois plus dans la STEP. Ces abondances sont en adéquation avec celles obtenues dans la littérature (Cebon & Garnier, 2005; Dionisi *et al.*, 2003; Sonthiphand *et al.*, 2013). Le rapport entre AOA et AOB est de 10:1 dans les rejets de SAV en août et de 1:1 en décembre. L'impact de SAV est faible tant sur les AOA que sur les AOB quand on observe les différences d'abondances entre l'amont et l'aval de SAV. On observe cependant une diminution significative du nombre d'AOA en aval de SAV en août. Cette diminution significative après SAV ($p < 0.05$) en août seulement, pourrait expliquer une élimination moindre de nitrite à cette saison. Les résultats de cinétique (Raimonet *et al.*, 2013) indiquent cependant une variation peu importante de la vitesse d'oxydation de l'ammonium *in situ* entre ces deux saisons. L'évolution de la communauté OA semble donc avoir une faible incidence sur la dynamique du nitrite dans la Seine en aval de SAV.

En étudiant le rapport de ces populations entre elles, on constate cependant que le rapport AOA/AOB diminue significativement aux deux saisons après SAV (figure 5.b AOB et AOA confondus). Les rejets de SAV semblent donc favoriser les AOB au détriment des AOA dans la colonne d'eau de la Seine en aval.

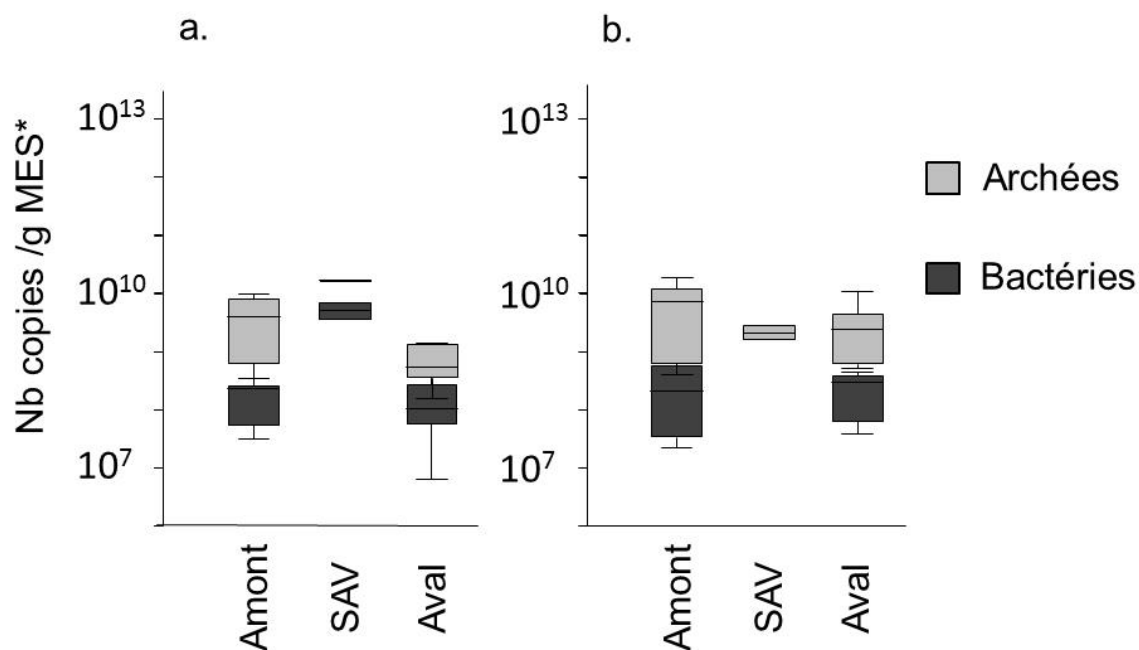


Figure 5- Abondance des oxydateurs de l'ammonium (OA) en nb de copies du gène *amoA* par g de Matière En Suspension en amont de SAV, dans les effluents et en aval de SAV. En clair les archées et en foncé les bactéries. Les résultats d'août sont à gauche (3.a) et les résultats de décembre à droite (3.b)

4.3.2 Abondance des oxydateurs du nitrite

La quantification des oxydateurs du nitrite dans l'environnement et les STEP met en évidence une dominance du genre *Nitrobacter* sur le genre *Nitrospira*. Les abondances mesurées, 10^{11} en moyenne pour *Nitrobacter* et 10^8 en moyenne pour *Nitrospira* dans l'environnement et 10 fois plus dans la STEP sont cohérents avec la littérature (Cebren *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2010). Le genre *Nitrospira* était sous le seuil de détection de la technique utilisée.

Dans l'environnement, on constate que les rejets de SAV se manifestent différemment pour les deux populations de *Nitrobacter* et *Nitrospira* aux deux périodes, estivale de bas débits et hivernale de haut débit. L'abondance de *Nitrobacter* augmente significativement à l'aval de SAV en août à bas débit, mais l'apport est dilué en décembre. La population de *Nitrospira*, en quantité plus importante dans SAV que dans la rivière amont, augmente systématiquement en aval quel que soit le débit (Figure 6).

Ces deux genres sont ceux qui sont le plus communément étudiés dans l'environnement et les STEP, pour suivre les populations oxydant le nitrite. *Nitrobacter* est le genre oxydateur du nitrite qui a été caractérisé en premier et sa physiologie est la mieux documentée. Dominants tant dans la STEP que dans l'environnement, on peut donc s'appuyer sur ses caractéristiques connues pour déterminer le comportement des microorganismes nitrite-oxydants dans l'environnement.

Les résultats sur les populations bactériennes obtenus ici sont en accord avec l'étude physiologique réalisée sur la Seine (Raimonet *et al.*, 2013), mettant en évidence après SAV une activité potentielle d'élimination des nitrites plus forte en été qu'en hiver. Ce paramètre obtenu en laboratoire en conditions contrôlées représente la capacité maximale d'oxydation du nitrite, et est donc une approximation de l'abondance/biomasse de la communauté totale.

La transformation du nitrite en aval de SAV dépend donc des apports en microorganismes, des facteurs de contrôle de leurs activités et de leur devenir dans l'environnement (dilution, etc.).

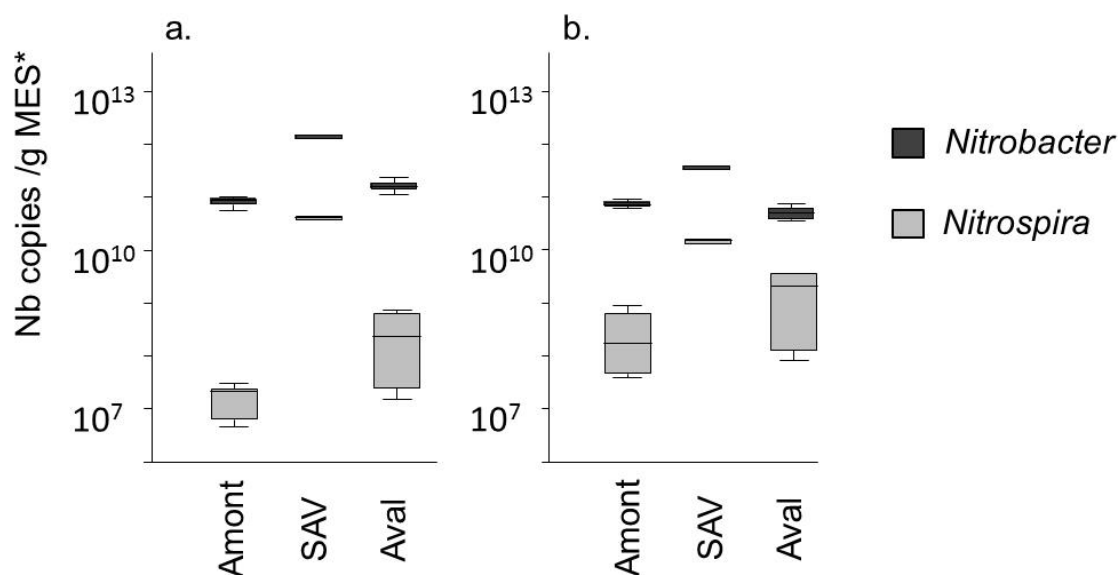


Figure 6 - Abondance des oxydateurs du nitrite en nb de copies du gène de l'ADNr 16S spécifique par g de Matière En Suspension (MES) en amont de SAV, dans les effluents et en aval de SAV. En foncé les bactéries du genre *Nitrobacter* et en gris clair les bactéries du genre *Nitrospira*. Les résultats d'août sont à gauche (4.a) et les résultats de décembre à droite (4.b)

4.3.3 Comparaison des ammonium et nitrite-oxydants

Les communautés nitrifiantes sont dominées par les oxydateurs du nitrite, et plus particulièrement le genre *Nitrobacter* dans la Seine et dans les rejets de SAV (Figure 7). Cette dominance est accentuée dans l'environnement après les rejets de SAV. Compte tenu de l'abondance des oxydateurs de nitrites et de leurs paramètres physiologiques, les concentrations en nitrites sont limitantes et le nitrite n'est donc que lentement éliminé de l'environnement après SAV ($V_{max\ NO} = 3.21 \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ vs $V_{max\ AO} = 0.175 \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ et $K_s\ NO = 434 \mu\text{M}$ vs $K_s\ AO = 87.5 \mu\text{M}$). (Raimonet *et al.*, 2013), la vitesse de disparition de nitrite pourrait en outre être compensée par sa vitesse de production.

L'étude des populations oxydatrices de l'ammonium et du nitrite réalisée ici est complémentaire de celle physiologique menée en parallèle sur les mêmes échantillons. La vitesse d'élimination du nitrite dépend des facteurs qui contrôlent l'activité biologique d'une manière générale, tel que le substrat en particulier. Malgré la grande abondance de la communauté, une activité limitée par le substrat compromet donc l'élimination du nitrite dans l'environnement, conduisant à une persistance de ce composé dans la colonne d'eau.

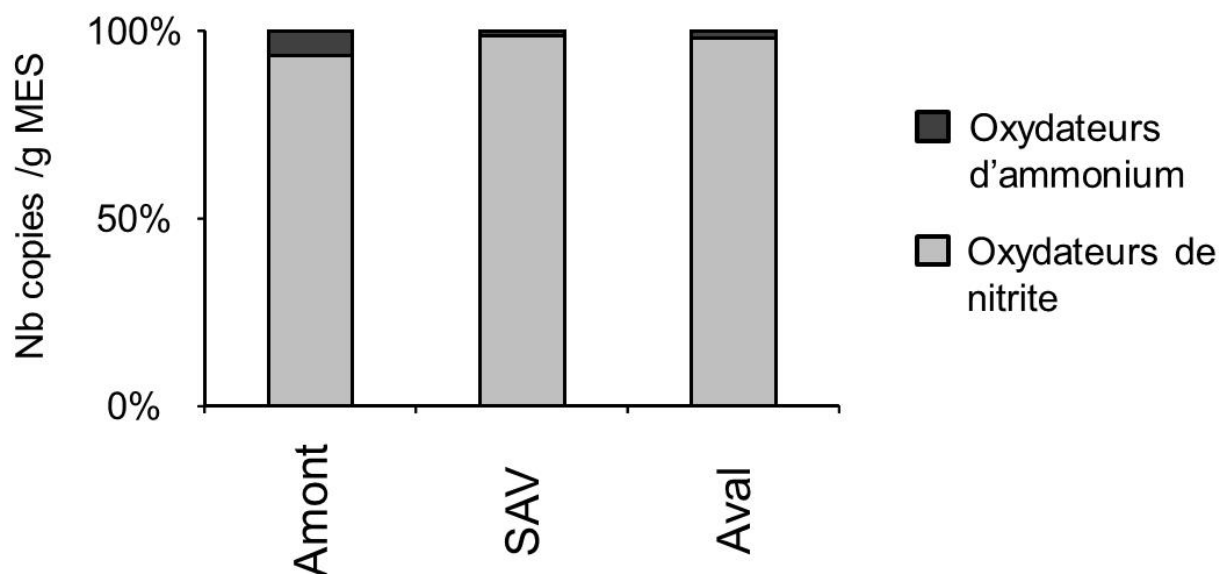


Figure 7 – Rapport OA/ON en pourcentage, moyenne faite entre août et décembre.

5 Conclusion et perspectives

Les communautés nitrifiantes de la Seine sont toujours influencées par SAV même après les changements dans les traitements de l'eau en 2007 dans cette STEP. La première étape de la nitrification est l'oxydation de l'ammonium, dominée dans la Seine par les archées (AOA). Il est cependant intéressant de noter que les AOA sont un groupe capable d'activité hétérotrophe, de sorte que leur activité n'est pas uniquement celle de la nitrification, suivant leur environnement (French *et al.*, 2012). Les abondance des AOB et des AOA mesurées dans SAV sont inverses de celles mesurées dans d'autres STEP, mais le nombre total d'AO est comparable (Jin *et al.*, 2010). La structure de la communauté AOA environnementale n'est pas affectée par SAV ; son abondance en aval est en outre peu affectée par les rejets de SAV. L'étude physiologique de l'oxydation de l'ammonium montre par ailleurs un effet limité des saisons sur la production *in situ* de nitrite en aval de SAV (Raimonet *et al.*, 2013).

Les différences de distribution du nitrite dans le secteur de la Seine étudié aux deux périodes sont donc probablement causées par les variations dans les communautés oxydatrices du nitrite et de leurs activités. Toutefois bien que les communautés nitrifiantes soient dominées par ces communautés oxydant le nitrite (*Nitrobacter* en particulier), l'élimination des nitrites dans la Seine en aval immédiat des rejets de SAV est lente, ce qui conduit à déclasser ce secteur en termes de qualité. Notons toutefois que le nitrite disparaît plus à l'aval où sa concentration est désormais plus faible qu'avant le traitement de la nitrification en STEP (Aissa-Grouz *et al.*, 2014). Aux concentrations environnementales en nitrite, les ON ont une faible efficacité (Raimonet *et al.*, 2013). Les nitrite-oxydants du genre *Nitrobacter* ont été documentées comme un genre adapté à de fortes concentrations en substrat, alors que le genre *Nitrospira* était plus adapté à de faibles concentrations (Schramm *et al.*, 2000). *Nitrospira* pourrait donc se maintenir plus facilement en aval de SAV. De plus, certains intermédiaires du cycle de l'azote (ammonium et acide nitreux HNO_2 notamment) sont également susceptibles d'inhiber l'oxydation du nitrite à des concentrations très faibles. L'inhibition de l'oxydation de l'ammonium est quant à elle effective pour des concentrations beaucoup plus élevées de ces composés (Anthonisen *et al.*, 1976). Ceci empêcherait la disparition du nitrite, et pourrait même favoriser son accumulation. Un autre facteur à prendre en compte est la présence de différents polluants dans la Seine (médicaments, métaux, hydrocarbures...), qui ont un impact sur la croissance et l'activité microbienne des communautés environnementales (Leininger *et al.*, 2006; Roose-Amsaleg *et al.*, 2013).

Outre la limitation de l'activité NO par le nitrite, une production de nitrites par les sédiments pourrait aussi expliquer sa lente disparition à l'aval des rejets. Une meilleure connaissance de tous les compartiments de la Seine, leurs cinétiques et compositions microbiennes, ainsi que leurs interactions permettra ainsi de mieux appréhender la dynamique du nitrite dans ce secteur de la Seine. Des travaux complémentaires sur les communautés ON et leur physiologie (sur les sédiments, avec une plus grande résolution temporelle et une extension spatiale) devraient permettre de mieux expliquer la dynamique saisonnière du nitrite dans la Seine.

Un travail sur les polluants de la Seine et leur impact différentiel sur les acteurs de la nitrification pourrait également permettre de mieux estimer le devenir du nitrite en fonction des saisons.

Dès à présent, une analyse microbiologique est en cours afin de déterminer les variations annuelles et l'importance relative des différentes communautés microbiennes impliquées dans la dynamique du nitrite de ce secteur de la Seine. Avec une colonne d'eau relativement bien oxygénée, on y retrouve nécessairement des communautés nitrifiantes, hétérotrophes alors que dans les sédiments, plus ou moins profondément, on doit trouver des communautés dénitrifiantes, oxydatrices anaérobiques de l'ammonium (anammox) et réductrice dissimilatrice du nitrate en ammonium (DNRA). Toutefois, entre la colonne d'eau et le sédiment compacté, un autre compartiment potentiellement important dans la dynamique du nitrite est la vase fluide. Ce compartiment est semblable à un sédiment de faible densité qui peut être remis en suspension par les turbulences dans la colonne d'eau. Ce compartiment subit donc une alternance de phases oxygènes et anoxiques, qui aurait une incidence sur la dynamique du nitrite dans le sédiment (Mélanie Raimonet, comm. person.).

Au cours de cette prochaine année, l'analyse de la dynamique du nitrite dans la vase fluide permettra de déterminer son importance comme source pour la colonne d'eau. La caractérisation des communautés microbiennes présentes dans ce compartiment permettra aussi de déterminer l'impact des effluents de SAV sur la composition en microorganisme de ce compartiment peu connu.

6 Bibliographie

- Aissa-Grouz, N., Billen, G., Garnier, J., Mercier, B. & Martinez, A. (2014).** Nitrification et dynamique des formes de l'azote dans la Seine et son estuaire suite aux changements du traitement des eaux usées à Paris : comparaison entre les périodes 2001-2003 et 2012-2013. *Rapport PIREN Seine phase 6*.
- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S. & Srinath, E. G. (1976).** INHIBITION OF NITRIFICATION BY AMMONIA AND NITROUS-ACID. *Journal Water Pollution Control Federation* **48**, 835-852.
- Cebron, A., Coci, M., Garnier, J. & Laanbroek, H. J. (2004).** Denaturing gradient gel electrophoretic analysis of ammonia-oxidizing bacterial community structure in the lower Seine River: Impact of Paris wastewater effluents. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 6726-6737.
- Cebron, A. & Garnier, J. (2005).** Nitrobacter and Nitrospira genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: Detection, quantification and growth along the lower Seine River (France). *Water Research* **39**, 4979-4992.
- Dionisi, H. M., Harms, G., Layton, A. C., Gregory, I. R., Parker, J., Hawkins, S. A., Robinson, K. G. & Sayler, G. S. (2003).** Power analysis for real-time PCR quantification of genes in activated sludge and analysis of the variability introduced by DNA extraction. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 6597-6604.
- French, E., Kozłowski, J. A., Mukherjee, M., Bullerjahn, G. & Bollmann, A. (2012).** Ecophysiological Characterization of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria from Freshwater. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 5773-5780.
- Garnier, J., Billen, G. & Cebron, A. (2007).** Modelling nitrogen transformations in the lower Seine river and estuary (France): impact of wastewater release on oxygenation and N₂O emission. *Hydrobiologia* **588**, 291-302.
- Graham, D. W., Knapp, C. W., Van Vleck, E. S., Bloor, K., Lane, T. B. & Graham, C. E. (2007).** Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification. *Isme Journal* **1**, 385-393.
- Huang, Z., Gedalanga, P. B., Asvapathanagul, P. & Olson, B. H. (2010).** Influence of physicochemical and operational parameters on Nitrobacter and Nitrospira communities in an aerobic activated sludge bioreactor. *Water Research* **44**, 4351-4358.
- Jin, T., Zhang, T. & Yan, Q. (2010).** Characterization and quantification of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) in a nitrogen-removing reactor using T-RFLP and qPCR. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**, 1167-1176.
- Kelso, B. H. L., Smith, R. V., Laughlin, R. J. & Lennox, S. D. (1997).** Dissimilatory nitrate reduction in anaerobic sediments leading to river nitrite accumulation. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 4679-4685.
- Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., DeBoer, W., Prosser, J. I., Embley, T. M. & Woldendorp, J. W. (1997).** Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta 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.
- Kowalchuk, G. A., Bodelier, P. L. E., Heilig, G. H. J., Stephen, J. R. & Laanbroek, H. J. (1998).** Community analysis of ammonia-oxidizing bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridisation. *Fems Microbiology Ecology* **27**, 339-350.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schuster, S. C. & Schleper, C. (2006).** Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* **442**, 806-809.

Muyzer, G., Dewaal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993). PROFILING OF COMPLEX MICROBIAL-POPULATIONS BY DENATURING GRADIENT GEL-ELECTROPHORESIS ANALYSIS OF POLYMERASE CHAIN REACTION-AMPLIFIED GENES-CODING FOR 16S RIBOSOMAL-RNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 695-700.

Raimonet, M., Viollier, E., Cazier, T., Rocher, V., Flipo, N., Vilmin, L. & Laverman, A. (2013). Dynamique des nitrites dans la Seine. **Phase 6**.

Roose-Amsaleg, C., Yan, C., Hoang, A.-M. & Laverman, A. M. (2013). Chronic exposure of river sediments to environmentally relevant levels of tetracycline affects bacterial communities but not denitrification rates. *Ecotoxicology* **22**, 1467-1478.

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. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 4704-4712.

Sahan, E. & Muyzer, G. (2008). Diversity and spatio-temporal distribution of ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria in sediments of the Westerschelde estuary. *Fems Microbiology Ecology* **64**, 175-186.

Schramm, A., De Beer, D., Gieseke, A. & Amann, R. (2000). Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm. *Environmental Microbiology* **2**, 680-686.

Sonthiphand, P., Cejudo, E., Schiff, S. L. & Neufeld, J. D. (2013). Wastewater Effluent Impacts Ammonia-Oxidizing Prokaryotes of the Grand River, Canada. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 7454-7465.

Von der Wiese, M. & Wetzel, A. (1998). Temporal and spatial dynamics of nitrite accumulation in the River Lahn. *Water Research* **32**, 1653-1661.