

# Dynamique des nitrites dans la Seine

Mélanie Raimonet<sup>1\*</sup>, Eric Viollier<sup>2</sup>, Thibaut Cazier<sup>1</sup>, Vincent Rocher<sup>3</sup>,  
Nicolas Flipo<sup>4</sup>, Lauriane Vilmin<sup>4</sup>, Anniet Laverman<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR 7619 Sisyphe, Université Pierre et Marie Curie,  
4 place Jussieu, 75252 Paris

<sup>2</sup> Laboratoire de Géochimie des Eaux, Université Paris Diderot -  
Institut de Physique du Globe de Paris, 35 rue Hélène Brion, 75205 Paris

<sup>3</sup> SIAAP-Direction du Développement et de la Prospective,  
82 avenue Kléber, 92700 Colombes

<sup>4</sup> Centre de Géosciences, Mines ParisTech,  
35 rue Saint-Honoré, 77305 Fontainebleau

\* Contact : melanie.raimonet@upmc.fr

## 1 Résumé

L'accumulation de nitrite est un problème environnemental majeur en raison de la forte toxicité des nitrites pour les organismes vivants. De fortes concentrations en nitrite sont observées dans les eaux de Seine en aval des rejets de la station d'épuration Seine Aval, en particulier depuis 2007 suite à d'importants changements de traitement des eaux usées. Bien que les nitrites soient, en général, rapidement oxydés dans l'environnement, ils persistent sur plusieurs dizaines de kilomètres en aval de la station d'épuration, à des niveaux de concentrations dépassant le critère de bon état écologique des eaux ( $> 0.09$  mg N/l ou  $1 \mu\text{M}$ ). La persistance des nitrites résulte d'un équilibre entre les processus de transport et réaction au sein des différents compartiments (eau, sédiments compacts, vases fluides) de l'écosystème de la Seine. Très peu d'études ont cependant quantifié les cinétiques de production et consommation de nitrites (nitrosation et nitratisation) par les communautés microbiennes naturelles d'eaux fluviales, ainsi que les flux de nitrite entre les compartiments benthiques et la colonne d'eau.

Au cours de cette étude, l'évolution mensuelle des concentrations en nitrite a été suivie le long de la Seine en Île de France (Choisy, Asnières, Conflans, Poissy, Méricourt), ainsi que dans les rejets

de la station d'épuration Seine Aval. Des incubations d'eau de Seine prélevées en amont (Asnières) et aval (Poissy) de cette station d'épuration ont été menées en milieu contrôlé afin de déterminer et comparer les cinétiques et les vitesses *in situ* recalculées de production et consommation de nitrite en avril et novembre 2012. Des carottes de sédiment ont également été prélevées en amont (Bougival, La Frette) et aval (Conflans) de la station Seine Aval afin de mesurer les concentrations interstitielles en nitrite et les flux de nitrite à l'interface eau-sédiment en période de débit plus faible et de température élevée (en juin et août 2012). Des alternances de conditions oxiques et anoxiques ont été menées afin de tester la sensibilité des sédiments aux conditions d'oxygénation.

En 2012, comme observé depuis 2007, les concentrations en nitrite augmentent fortement après les rejets de la station d'épuration Seine Aval, en raison du fort flux de nitrite provenant de la station Seine Aval (>> 40 % du flux total de nitrite), et varient peu jusqu'à Méricourt (> 40 km en aval). Quels que soient le site et la saison étudiés, les vitesses *in situ* recalculées de nitrosation et nitratisation sont peu différentes, ce qui contribue à la persistance de nitrite observée dans les eaux de Seine. En été, les sédiments agissent comme des puits de nitrite, mais montrent cependant une forte sensibilité à l'oxygénation, pouvant conduire à une source de nitrite. Ces premiers résultats nécessitent d'être complétés par l'étude des communautés bactériennes, de la dynamique des nitrites au sein des vases fluides soumises à des alternances de conditions oxiques et anoxiques, ainsi que par la cartographie de la répartition spatiale des sédiments compacts et vases fluides. Des travaux en cours permettront de calibrer de nouveaux jeux de paramètres cinétiques de nitrification à valider ensuite dans les modèles de transport-réaction de la Seine.

## 2 Introduction

L'accumulation de nitrites constitue un problème environnemental majeur, en raison de la forte toxicité des nitrites pour les êtres vivants, et ce, à de très faibles concentrations. Quelques exemples de la toxicité des nitrites sont la formation de composés N-nitroso cancérigènes et mutagènes résultant de la réaction des nitrites avec certaines protéines pendant la digestion, l'oxydation irréversible de l'hémoglobine en méthémoglobine qui empêche la fixation de l'oxygène et cause des déficiences respiratoires, l'inhibition du transport branchial d'ions  $\text{Cl}^-$  (Stein et Arp, 1998; van Leeuwen, 2000; Philips et al., 2002). En raison de la forte toxicité des nitrites, le critère européen de qualité de l'eau a donc été fixé à 0.003 et 0.009 mg N- $\text{NO}_2^- \text{l}^{-1}$  pour les poissons, *i.e.* salmonidae et cyprinidae (soit 0.2 et 0.6  $\mu\text{M}$ , Directive du Conseil de l'Union Européenne 2004), et 0.15 mg N- $\text{NO}_2^- \text{l}^{-1}$  pour les eaux potables (soit 10  $\mu\text{M}$ , Directive du Conseil de l'Union Européenne 1998).

Dans la Seine, depuis 2007, des accumulations de nitrites sont observées en aval de la station d'épuration Seine Aval, la plus importante station d'épuration à l'échelle européenne (> 7 millions équivalent-habitants) (Rocher et al., 2011; Garnier et al., 2012). Alors qu'avant 2007 les nitrites étaient progressivement produits au cours du transit de l'eau le long du fleuve pour atteindre des concentrations maximales dans l'estuaire, un pic de concentration est maintenant observé en aval de la station Seine Aval (Cébron, 2004; Garnier et al., 2012). Bien que les nitrites soient, en général, rapidement oxydés dans l'environnement, ils persistent sur plusieurs dizaines de kilomètres en aval de la station d'épuration, à des niveaux de concentrations en nitrite dépassant le critère de bon état écologique des eaux (fixé à 0.09 mg N- $\text{NO}_2^- \text{l}^{-1}$ , soit 1  $\mu\text{M}$ ). Les modifications de localisation des concentrations maximales en nitrite sont en partie liées aux modifications et améliorations du traitement des eaux usées. Depuis 2007, des unités de nitrification et dénitrification ont été ajoutées afin d'éliminer l'ammonium. Bien que les concentrations en ammonium aient été réduites à des niveaux atteignant généralement le bon état écologique, les réactions incomplètes de dénitrification au sein de la station d'épuration ont simultanément conduit à une augmentation des concentrations en nitrite dans les eaux de rejets et, par conséquent, dans la Seine (Rocher et al., 2011).

Il est en général admis que les populations microbiennes oxydant les nitrites sont plus efficaces que celles oxydant l'ammonium, empêchant ainsi l'accumulation de nitrite dans l'environnement. Des accumulations de nitrites, telles qu'observées dans la Seine, ont cependant été reportées dans différents environnements terrestres et aquatiques (Kelso et al., 1997; von der Wiese et Wetzel, 1998). L'accumulation de nitrites est principalement liée à la position du nitrite dans le cycle de l'azote. Les nitrites sont en effet un composé intermédiaire mis en jeu dans les processus aérobiques (*e.g.* nitrification) et anaérobiques (*e.g.* dénitrification, anammox) (Figure 1). La production, persistance et/ou accumulation de nitrite dans l'environnement, *e.g.* dans les eaux de rivière, résultent de la balance entre les

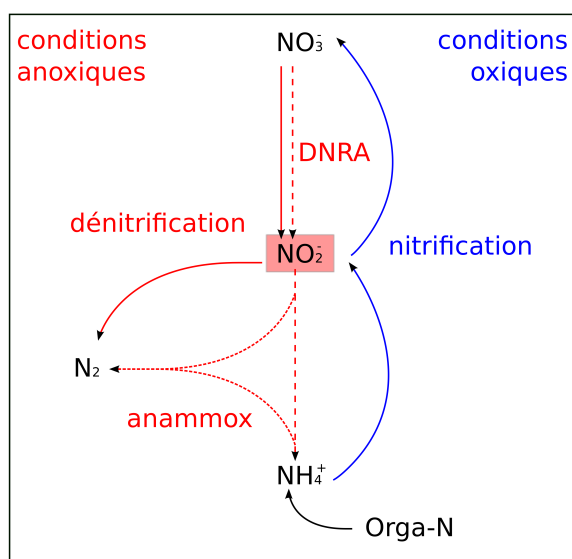


FIGURE 1 – Les nitrites, composés intermédiaires dans le cycle de l'azote.

vitesse de nitrosation et nitratisation, elles-mêmes contrôlées par les facteurs environnementaux, *e.g.* pH, oxygène, température, matière organique, ammonium, ammoniac, nitrate, biomasse, activité et diversité bactérienne (Kelso et al., 1997; Glass et Silverstein, 1998; Bae et al., 2001; Philips et al., 2002; Ruiz et al., 2003; Webster et al., 2005; Kim et al., 2006).

Bien que de nombreuses expériences en laboratoire aient été menées sur des cultures de bactéries nitrifiantes ou des boues de stations d'épuration (Brion et Billen, 1998; Cébron, 2004; Jiménez et al., 2011), les cinétiques de nitrosation et nitratisation en conditions oxiqes, ainsi que leur variabilité saisonnière, n'ont pas été étudiées sur des communautés aquatiques naturelles, en lien avec la persistance de nitrite dans l'eau. De plus, la forte activité de navigation fluviale en Seine entraîne de fréquentes resuspensions de sédiments pouvant entraîner des alternances de conditions oxiqes et anoxiques, qui peuvent moduler les activités microbiennes.

L'objectif de cette étude est d'évaluer :

- le rôle des processus de nitrosation et nitratisation dans la persistance des nitrites dans la Seine à différentes saisons, et l'impact des rejets de la station d'épuration Seine Aval sur la modification de l'activité microbienne nitrifiante,
- la contribution des processus benthiques et l'importance de l'alternance de conditions oxiqes et anoxiques sur les flux de nitrite à l'interface eau-sédiment en période estivale (*i.e.* débit faible et température élevée).

## 3 Méthodologie

### 3.1 Prélèvement et conditionnement

#### 3.1.1 Colonne d'eau

##### *Suivi mensuel :*

Les prélèvements d'eau ont été effectués par seau à partir de ponts par le service Direction Développement et Prospectives (DDP) du Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP), de mars à décembre 2012. Les échantillons d'eau de surface ont été prélevés à quatre stations en Ile de France (Choisy, Asnières, Poissy, Méricourt ; Figure 2). Deux stations supplémentaires (Charenton, Conflans/Seine) ont été échantillonnées entre juillet et décembre 2012. Les rejets des deux principales stations d'épuration Seine Amont (SAM, non présenté) et Seine Aval (SAV) ont également été prélevés sur 24h et de façon mensuelle par le SIAAP. Des volumes de 2 l par station ont été stockés dans des flacons en plastique jusqu'au retour au laboratoire.

Au laboratoire, l'eau a été conditionnée et stockée pour les différentes analyses. Trois filtrations successives de 50 à 200 ml d'eau ont été effectuées sur 3 filtres en PVDF (porosité 0,2  $\mu\text{m}$ ) aussitôt stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour les analyses des communautés bactériennes par des méthodes de biologie moléculaire. Le filtrat a été stocké dans des tubes en polypropylène de 15 ml à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour les analyses de nitrite, ammonium et nitrate.

##### *Incubations en milieu contrôlé :*

Les prélèvements ont été effectués aux sites d'Asnières et Poissy en avril et novembre 2012, ainsi qu'au niveau des rejets de SAV en novembre 2012 (non présenté). Un volume de 10 à 20 l a été prélevé à chaque station et saison et conditionné dans un bidon jusqu'au retour au laboratoire.

#### 3.1.2 Sédiments

Les sédiments ont été prélevés grâce à un carottier à gravité UWITEC<sup>©</sup> déployé à partir d'un bateau à moteur fourni par le SIAAP. Ce carottier permet de prélever des carottes de sédiment de 10 à 40 cm de profondeur. Les sédiments ont été prélevés à Bougival en juin 2012, et en amont (La Frette) et en aval (Conflans) des rejets de la station d'épuration Seine Aval en août 2012. Des tubes en plexiglas pré-perçés et scotchés ainsi que des tubes non percés ont respectivement été utilisés pour la récupération des eaux interstitielles et les mesures de flux à l'interface eau-sédiment, dès le retour au laboratoire (1 à 5h).

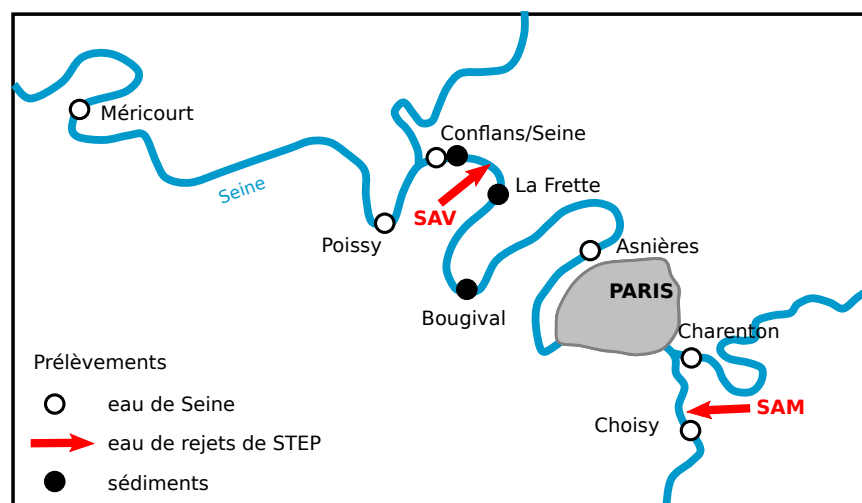


FIGURE 2 – Localisation des points de prélèvements d'eau et sédiments le long de la Seine en Ile de France, et des rejets des stations d'épuration Seine Amont (SAM) et Seine Aval (SAV).

### 3.2 Incubations d'eau de Seine en milieu contrôlé

Des volumes de 200-250 ml d'eau de Seine ont été incubés dans des erlenmeyers de 500 ml à 20°C, sous agitation constante (120 rpm) pendant 14 jours. Des inhibiteurs des processus d'oxydation d'ammonium en nitrite ou nitrosation (Chlorate sodium 5 mM) et d'oxydation de nitrite en nitrate ou nitratisation (Allylthiourée 5 mg l<sup>-1</sup>) ont été ajoutés dans 2 séries d'erlenmeyers afin d'étudier séparément les cinétiques de nitrosation et de nitratisation (Cébron, 2004). Pour chaque série, des concentrations croissantes de substrat (ammonium ou nitrite) ont été ajoutées dans chaque triplicat d'erlenmeyers : concentrations *in situ*, 10 ou 20, 50, 100, 250, 500, 1000 μM.

Des contrôles avec et sans ajout de substrat (ammonium et/ou nitrite) et avec ou sans ajout d'inhibiteurs (Chlorure sodium+Allylthiourée) ont également été effectués afin de vérifier l'efficacité des inhibiteurs et de mettre en évidence la présence ou absence d'accumulation de nitrite lors de la réalisation simultanée des deux étapes de la nitrification sans inhibiteurs.

#### 3.2.1 Vitesses initiales et cinétiques de nitrosation et nitratisation

Les vitesses initiales semi-potentiellles de nitrosation et nitratisation ont été déterminées à partir de la variation de quantité de matière de nitrite par unité de volume en fonction du temps, au cours des 20 à 22 premières heures d'incubation. Les concentrations en nitrite ont été mesurées à plusieurs intervalles de temps en avril (T<sub>0</sub>, T<sub>20</sub>) et en novembre (T<sub>0</sub>, T<sub>6</sub>, T<sub>22</sub>).

Les cinétiques de nitrosation et nitratisation sont respectivement obtenues en traçant les vitesses initiales de nitrosation et nitratisation en fonction des concentrations en ammonium et nitrite. Les paramètres  $V_{max}$  et  $K_M$  sont déterminés pour chaque étape de la nitrification (nitrosation et ni-

tration) en ajustant l'équation de Michaelis-Menten de réaction enzymatique (Equation 1), par minimisation de la somme des carrés des écarts entre les valeurs calculées et mesurées.

$$V = V_{max} \cdot \frac{[DIN]_{in}}{[DIN]_{in} + K_M} \quad (1)$$

avec  $V$ , la vitesse de nitrosation ou nitratisation ( $\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ),  $V_{max}$ , la vitesse maximale de nitrosation ou nitratisation ( $\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ),  $[DIN]_{in}$ , la concentration initiale en ammonium ou nitrite pour les réactions de nitrosation et nitratisation, respectivement ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ),  $K_M$ , la constante de demi-saturation ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ).

### 3.2.2 Vitesses *in situ* de nitrosation et nitratisation

Il est ensuite possible de recalculer les vitesses *in situ* de nitrosation ou nitratisation caractéristiques de la communauté microbienne présente (Equation 2) :

$$V_{insitu} = V_{max} \cdot \frac{[DIN]_{insitu}}{[DIN]_{insitu} + K_M} \cdot f(T_{insitu}) \quad (2)$$

avec  $V_{insitu}$ , la vitesse *in situ* recalculée de nitrosation ou nitratisation ( $\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ),  $V_{max}$  et  $K_M$ , explicités dans l'Equation 1,  $[DIN]_{insitu}$ , la concentration *in situ* en ammonium (nitrosation) ou nitrite (nitratisation) mesurée dans l'eau de Seine ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ),  $f(T_{insitu})$ , la fonction de température permettant de recalculer les vitesses *in situ* de nitrosation et nitratisation aux températures *in situ* (Brion et Billen, 1998).

## 3.3 Rhizons et flux à l'interface eau-sédiment

### 3.3.1 Rhizons

Des Rhizons<sup>©</sup> ont été utilisés afin de récupérer les eaux interstitielles des carottes de sédiment prélevées à l'aide de tubes en plexiglas pré-perçés et scotchés (n=1 ou 2), et ainsi déterminer les concentrations en éléments dissous dans les eaux interstitielles. Seules les concentrations en nitrite sont présentées dans ce rapport. Les Rhizons<sup>©</sup> se composent d'une tige poreuse en fibre de verre à laquelle est connecté un tube sous vide. Les tiges poreuses ont été placées à une résolution centimétrique selon l'axe vertical du tube, depuis l'eau surnageante (+0,5 cm) jusqu'au sédiment profond (-9,5 cm). La connexion simultanée de tubes sous vide aux tiges poreuses a permis de créer une dépression pour ainsi prélever directement l'eau interstitielle en conservant les conditions anoxiques des sédiments, et sans perturber la zonation verticale des eaux interstitielles.

### 3.3.2 Flux à l'interface eau-sédiment

Les flux benthiques totaux ont été quantifiés par l'incubation de carottes de sédiment (n=3) à 20°C (température *in situ*  $\pm$  2°C). La hauteur d'eau surnageante a été ajustée à 8 cm dans chaque tube. Une aération a été fixée à mi-hauteur afin d'homogénéiser et oxygéner l'eau surnageante. L'alternance de conditions oxiques et anoxiques a respectivement été générée par l'alimentation par air ou N<sub>2</sub>. Des échantillons d'eau surnageante ont été prélevés toutes les 1 à 10h pendant 48h. Les flux benthiques totaux ont été déterminés par la variation de quantité de matière par unité de surface en fonction du temps, en conditions oxiques et anoxiques.

Afin de vérifier le passage de conditions oxiques à anoxiques et vice versa, des optodes à oxygène (Pyroscience<sup>©</sup>) ont été placées dans l'eau surnageante. Le logiciel Firesting Logger a été utilisé pour acquérir les données brutes et les convertir en concentrations en oxygène. La calibration a été effectuée en 2 points. Le bullage au N<sub>2</sub> puis à l'oxygène dans un bécher d'eau a été successivement utilisé pour la mesure correspondant à une concentration nulle puis saturée en oxygène, dans les conditions de mesure (température, salinité).

## 3.4 Analyses chimiques

*Nitrite* : Les concentrations en nitrite ont été mesurées grâce à une méthode colorimétrique adaptée de Rodier (1984). Le volume de 1ml d'échantillon initialement utilisé par Rodier (1984) a été réduit à 0,3 ml. Des comparaisons ont permis de valider cette méthode, permettant ainsi d'effectuer les mesures sur des microplaques de 96 puits. Cette méthode présente le double avantage de réduire la quantité d'échantillon et de réactif nécessaire au dosage, ainsi que d'augmenter l'efficacité de mesure simultanée d'échantillons.

*Ammonium, nitrate* : Les concentrations en ammonium et nitrate ont été mesurés par chromatographie ionique en phase liquide (HPLC, Dionex).



## 4 Résultats et discussion

### 4.1 Débit et température de la Seine

Les débits de la Seine à Paris s'échelonnent entre des valeurs minimales de 100-200 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> au début du printemps et en fin d'été (80-100 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> pendant seulement quelques jours en septembre 2012) et des valeurs maximales atteignant 900 et 600 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> au cours de deux épisodes pluvieux en hiver et au printemps (Figure 3). Les températures de l'eau de Seine augmentent quant à elles de l'hiver à l'été 2012, avec des valeurs mesurées de 13°C en avril, 20°C en juin, 23°C en août, 10°C en novembre, lors de chacun de nos prélèvements.

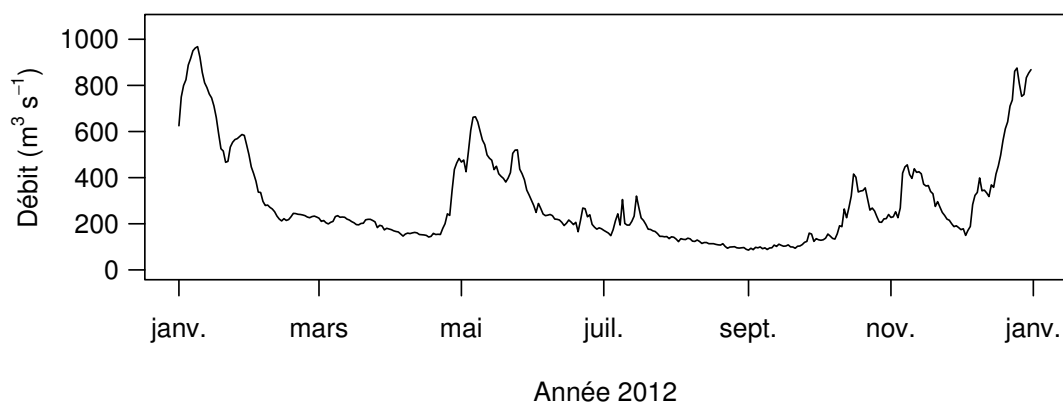


FIGURE 3 – Débit de la Seine à Austerlitz en 2012.

### 4.2 Dynamique des formes azotées le long de la Seine

Les concentrations des différentes formes de l'azote inorganique dissous (nitrate, nitrite, ammonium) le long de la Seine en Île de France sont présentées dans la Figure 4. Les concentrations en nitrate sont très fortes, en raison d'activités agricoles intensives sur les bassins versants. Les variations de concentrations le long de la Seine sont faibles, avec une sensible diminution en aval de la station d'épuration Seine Aval, partiellement liée à l'unité de dénitrification installée en 2007, et/ou une possible dilution par l'Oise. L'unité de dénitrification à Seine Aval élimine en effet les nitrates des eaux usées et conduit à des rejets d'eaux caractérisées par des concentrations inférieures ou égales à celles des eaux de Seine.

Contrairement aux nitrates, les concentrations en nitrite et ammonium sont 10 à 100 fois plus faibles, mais augmentent fortement en aval des rejets de la station d'épuration Seine Aval. Les concentrations plus faibles en ammonium, et généralement inférieures au critère de bon état écologique,

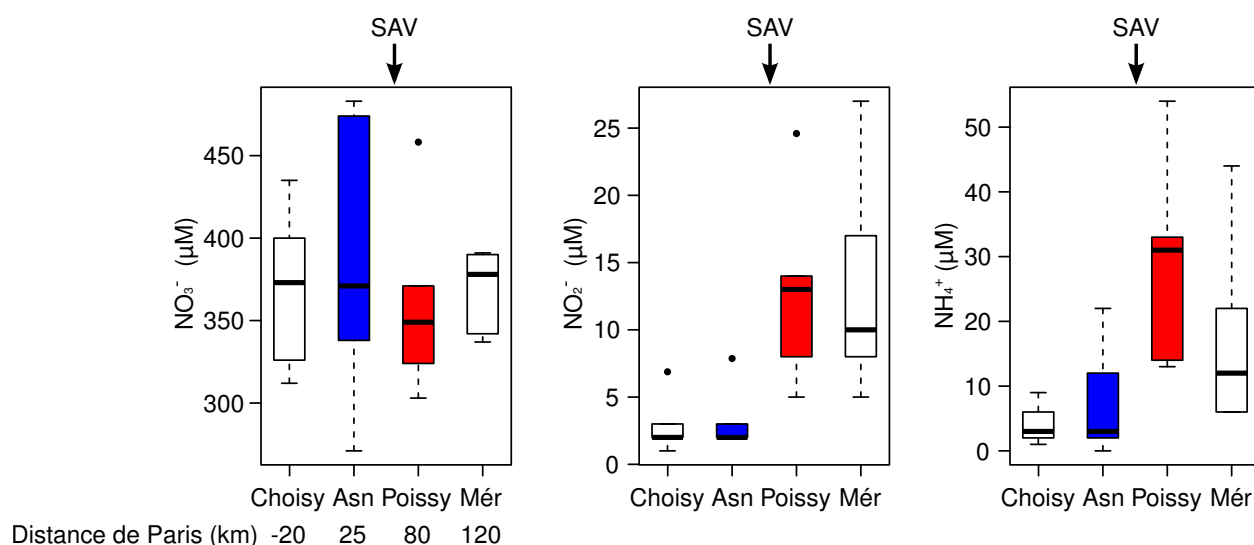


FIGURE 4 – Concentrations en nitrate, nitrite et ammonium entre Choisy et Méricourt (moyenne des prélèvements mensuels entre mars et décembre 2012). Les rejets de la station d'épuration Seine Aval (SAV) sont indiqués sur chaque profil longitudinal.

traduisent l'amélioration considérable du traitement des eaux usées depuis 2007. Le statut de bon état écologique n'est cependant jamais atteint pour les concentrations en nitrite. L'augmentation des concentrations en nitrite dans la Seine suite aux rejets de la station de Seine Aval s'explique par l'accumulation de nitrite lors du processus de dénitrification à Seine Aval (Rocher et al., 2011). Les flux de nitrite dans les eaux de rejet de Seine Aval sont par conséquent supérieurs aux flux de nitrite de la Seine, et représentent plus de 40% des apports de nitrite à la Seine au point de confluence de la Seine et des rejets de la station Seine Aval (Figure 5).

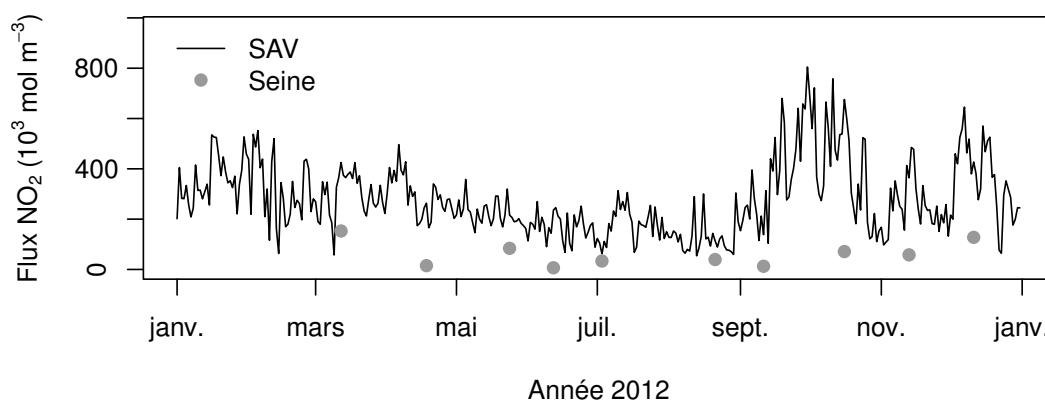


FIGURE 5 – Flux de nitrite provenant de la Seine et des rejets de la station d'épuration de Seine Aval (SAV) en 2012.

Il faut cependant noter que si de faibles concentrations en nitrite ( $< 4 \mu\text{M}$ ) sont observées en amont de la station d'épuration Seine Aval (à Choisy et Asnières), de plus fortes concentrations (4-8  $\mu\text{M}$ ) sont néanmoins observées en mars, août et décembre 2012. Ces résultats indiquent que, même si la majorité des nitrites proviennent des rejets de la station Seine Aval, une partie des nitrites peut saisonnièrement provenir de l'amont.

Les concentrations en nitrite estimées au point de confluence de la Seine et des rejets de Seine Aval à partir des flux de nitrite provenant respectivement de ces deux sources ont ensuite été comparées aux valeurs mesurées lors du suivi le long de la Seine (Figure 6). Les concentrations mesurées à Conflans/Seine (station située juste en aval du point de confluence) sont généralement supérieures ou égales aux valeurs estimées, alors que les concentrations mesurées à Poissy sont inférieures ou égales aux valeurs estimées. Les variabilités observées autour de la droite 1 :1 résultent de l'hétérogénéité liée au mélange des masses d'eaux, de la contribution des apports de l'Oise en amont de Poissy, mais peuvent être également liées aux processus microbiens ayant lieu dans la colonne d'eau ou les sédiments de la Seine (cf Sections 4.3 et 4.4).

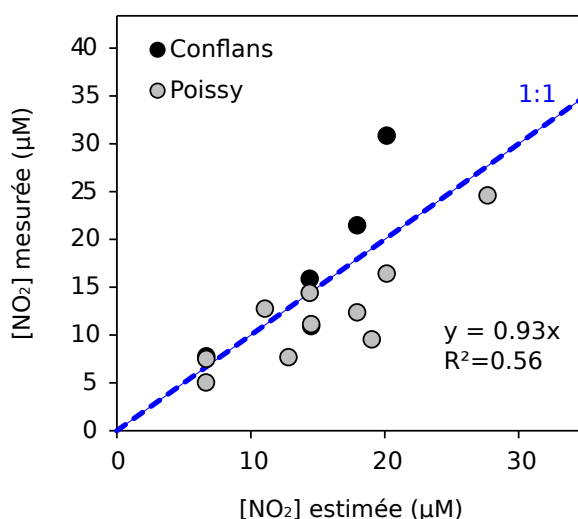


FIGURE 6 – Comparaison entre les concentrations en nitrite mesurées à Conflans/Seine et Poissy (ordonnée) et les concentrations en nitrite estimées à la confluence des eaux de la Seine et des rejets de la station d'épuration de Seine Aval (abscisse) en 2012.

### 4.3 Production et consommation des nitrites dans la colonne d'eau

L'étude des cinétiques microbiennes des étapes de nitrosation (production de nitrite) et nitrata-tion (consommation de nitrite) permet de recalculer les vitesses *in situ* de chacune des étapes. Les différences de vitesse entre ces deux étapes indiquent ensuite les possibles accumulations ou disparitions de nitrite en Seine.

### 4.3.1 Cinétiques microbiennes

Les activités microbiennes d'oxydation d'ammonium et de nitrite sont des réactions enzymatiques qui sont communément décrites par l'équation de Michaelis-Menten en fonction de la concentration en ammonium ou nitrite. Un exemple de cinétique est donné pour l'étape d'oxydation d'ammonium dans les eaux de rejet de Seine Aval en novembre 2012 (Figure 7). La variabilité parfois forte pour certains triplicats (Figure 7) met en évidence la variation d'activité microbienne pouvant se produire d'un batch à l'autre en dépit des précautions prises lors de l'homogénéisation. L'ajustement statistique des paramètres  $V_{max}$  et  $K_M$  de l'équation de réaction enzymatique de Michaelis-Menten (cf Eq. 1) aux données permet cependant d'intégrer et quantifier cette variabilité. Les paramètres ajustés sont présentés dans le Tableau 1.

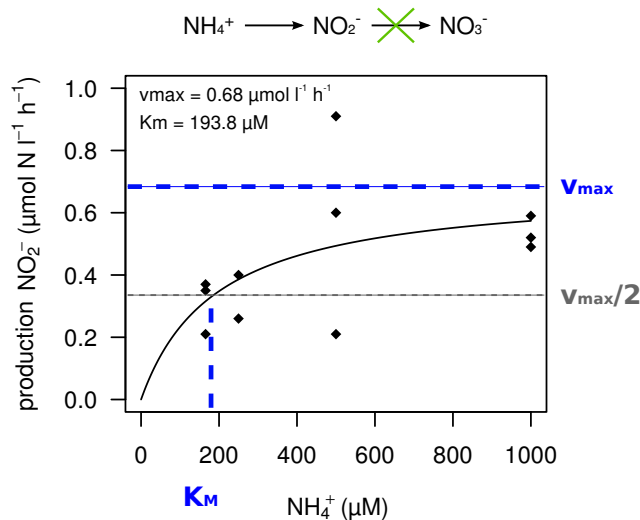


FIGURE 7 – Exemple de cinétique de production de nitrite en fonction des concentrations en ammonium (eaux de rejet de Seine Aval en novembre 2012).

Les  $V_{max}$  sont plus forts pour les microorganismes oxydant les nitrites que pour les microorganismes oxydant l'ammonium. Les  $V_{max}$  des microorganismes oxydant l'ammonium sont beaucoup plus faibles que dans les cultures de bactéries nitrosantes, mais dans la fourchette de valeurs observées dans la Seine, à Conflans et Triel, en 2002-2003 (0,02-0,32  $\mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) (Cébron, 2004). Les  $V_{max}$  des microorganismes oxydant les nitrites sont similaires à ceux observés dans les cultures de bactéries nitratantes, mais bien plus élevés que ceux mesurés en 2002-2003 (0,02-0,18  $\mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) (Cébron, 2004). Ces résultats suggèrent des différences en terme de biomasse et activité microbienne (Belser et Mays, 1982). Les plus forts  $V_{max}$  des microorganismes oxydant les nitrites par rapport aux microorganismes oxydant l'ammonium met en évidence une biomasse ou activité de microorganismes oxydant les

TABLEAU 1 – Valeurs des concentrations en ammonium et nitrite et paramètres cinétiques ( $V_{max}$  et  $K_M$ ) pour les étapes d'oxydation d'ammonium et nitrite, à Asnières et Poissy, en avril et novembre 2012. La dernière ligne correspond aux valeurs obtenues par [Brion et Billen \(1998\)](#) sur des cultures enrichies en bactéries.

Station	Date	Oxydation ammonium				Oxydation nitrite	
		$[NH_4^+]$	$[NO_2^-]$	$V_{max}$	$K_M$	$V_{max}$	$K_M$
		( $\mu\text{M}$ )	( $\mu\text{M}$ )	( $\mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	( $\mu\text{M}$ )	( $\mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	( $\mu\text{M}$ )
Asnières	nov 2012	5	1,80	0,04	50	3	570
	avr 2012	14	1	0,10	50	5,07	210
Poissy	nov 2012	20	4	0,12	132	2,92	624
	avr 2012	30	11	0,23	43	3,5	244
Brion et Billen	1998	-	-	8,6	107	1,6	1,7

nitrites forte et supérieure à celle des microorganismes oxydant l'ammonium, et pourrait notamment résulter de la modification des procédés de traitement des eaux usées au niveau de la station Seine Aval. Cependant, les faibles variations de  $V_{max}$  et  $K_M$  entre Asnières et Poissy suggèrent également un changement d'activité et de communautés bactériennes le long de la Seine en Île de France, par rapport à la période antérieure à 2007.

Les  $K_M$  des microorganismes oxydant l'ammonium et les nitrites sont respectivement proches et plus élevés que ceux déterminés il y a 20 ans pour des cultures de bactéries nitrosantes et nitrifiantes en Seine ([Brion et Billen, 1998](#)). Ces différences peuvent, d'une part, s'expliquer par l'évolution des communautés microbiennes au cours des 15 dernières années, suite aux importantes modifications du traitement des eaux usées et donc aux changements quantitatifs et qualitatifs de communautés microbiennes rejetées dans la Seine, ainsi qu'aux fortes diminutions de flux d'ammonium mais augmentations de flux de nitrite rejetés dans la Seine. De plus, les paramètres cinétiques de production et oxydation de nitrite mesurés au cours de notre étude ont été obtenus à partir de communautés microbiennes naturelles alors que les résultats de [Brion et Billen \(1998\)](#) avaient été déterminés pour des cultures enrichies de bactéries nitrosantes et nitrifiantes. Les  $K_M$  déterminés au cours de notre étude se situent dans la fourchette de valeurs obtenues dans la littérature pour les bactéries nitrosantes (70-700  $\mu\text{M}$ ) et nitrifiantes (350-600  $\mu\text{M}$ ). La plupart des travaux ont cependant été réalisés avant les années 1980-90 et sur des cultures bactériennes ou boues ([Focht et Verstraete, 1977](#); [Henriksen et Kemp, 1988](#)). Bien que ces valeurs de  $K_M$  soient élevées, des valeurs plus faibles ont été observées dans le milieu naturel caractérisé par de plus faibles concentrations en ammonium et nitrite. Les plus faibles valeurs d'oxydation d'ammonium et nitrite (0,1  $\mu\text{M}$ ) ont été observées pour des populations naturelles océaniques, et des valeurs intermédiaires d'oxydation d'ammonium ont été mesurées dans

l'estuaire Ems Dollard ( $55 \mu\text{M}$ ) (Henriksen et Kemp, 1988). Les fortes valeurs de  $K_M$  mesurées dans notre étude indiquent une affinité pour les concentrations élevées en ammonium et nitrite, en dépit de concentrations faibles dans l'environnement. Ceci peut indiquer la dominance de communautés microbiennes issues des rejets de station d'épuration (se développant dans des eaux riches en ammonium et nitrite) sur les populations naturelles, ainsi que l'absence d'adaptation des communautés microbiennes au cours du transit fluvial en Île de France.

Les fortes valeurs de  $V_{max}$  et  $K_M$  mesurées lors des incubations de communautés microbiennes naturelles pourraient également s'expliquer par l'activité de microorganismes nitrifiants hétérotrophes, déjà mise en évidence dans d'autres systèmes (Focht et Verstraete, 1977), et qui a pu être favorisée par l'ensemencement de la Seine en bactéries hétérotrophes et la présence de matière organique dissoute. De plus, l'unité de dénitrification ajoutée en 2007 a pu contribuer à la sélection de microorganismes résistants aux conditions anoxiques. Les hétérotrophes ont pu être favorisés par rapport aux microorganismes nitrifiants autotrophes en raison de leur tolérance aux faibles concentrations en oxygène et des fortes concentrations en carbone organique dissous (Focht et Verstraete, 1977). Il est également possible que les fortes concentrations en nitrite et bactéries dénitrifiantes dans l'unité de dénitrification aient stimulé la réduction des nitrites. Une fois rejetées en Seine, les bactéries dénitrifiantes ont pu exercer une activité de réduction des nitrites. Ce processus a déjà été mis en évidence en conditions aérobiques, mais de façon réduite en Seine avant 2007 (Cébron, 2004). Ces hypothèses seront explorées par la caractérisation et quantification des populations microbiennes aux différentes stations et saisons (thèse de T. Cazier).

En ce qui concerne les variations temporelles de  $V_{max}$  et  $K_M$  dans notre étude, la même tendance est observée en avril et novembre 2012. Les  $V_{max}$  sont cependant plus forts et les  $K_M$  plus faibles en avril qu'en novembre 2012. Ces modifications traduisent une augmentation de biomasse et activité microbiennes liée aux plus fortes températures, ainsi qu'aux plus fortes concentrations en ammonium et nitrite dans le milieu. Une étude complémentaire de variations saisonnières sera menée en printemps/été 2013.

#### 4.3.2 Vitesses *in situ* de production et consommation de nitrite

Les paramètres cinétiques obtenus en laboratoire ( $V_{max}$ ,  $K_M$ ; cf Section 4.3.1), ainsi que les concentrations en ammonium et nitrite et les températures mesurées sur le terrain (cf Section 4.2) permettent ensuite de recalculer les vitesses *in situ* d'oxydation d'ammonium (production de nitrite) et d'oxydation de nitrite à chaque station et saison (Figure 8). L'augmentation des vitesses d'oxydation d'ammonium et de nitrite entre Asnières et Poissy traduit la présence d'eaux plus riches en ammonium et nitrite en aval des rejets de Seine Aval, ainsi que l'augmentation de biomasse et activité microbiennes oxydant ammonium ou nitrite. Des vitesses de production et consommation de nitrite plus élevées

en novembre qu'en avril sont également observées, et s'expliquent par de plus fortes concentrations en ammonium et nitrite, ainsi que par l'augmentation des températures qui stimule la production microbienne.

Quelle que soit la station ou la saison considérée, bien que les paramètres cinétiques soient différents pour les étapes de production et consommation de nitrite, de très faibles différences sont observées entre les vitesses *in situ* recalculées de production et consommation de nitrite (Figure 8). Ces faibles différences traduisent un certain équilibre entre l'activité des communautés microbiennes oxydant l'ammonium et celles oxydant les nitrites. Ce résultat implique donc de faibles variations de concentrations en nitrite dans la colonne d'eau, ce qui peut expliquer l'absence de diminution rapide des concentrations en nitrite dans la colonne d'eau en aval de la station d'épuration Seine Aval. De plus, les valeurs faibles des vitesses de nitrosation et nitratisation contribuent également aux faibles variations de concentrations en ammonium et nitrite le long de la Seine, qui sont ensuite stimulées dans la zone estuarienne où l'activité microbienne est beaucoup plus forte (Cébron, 2004).

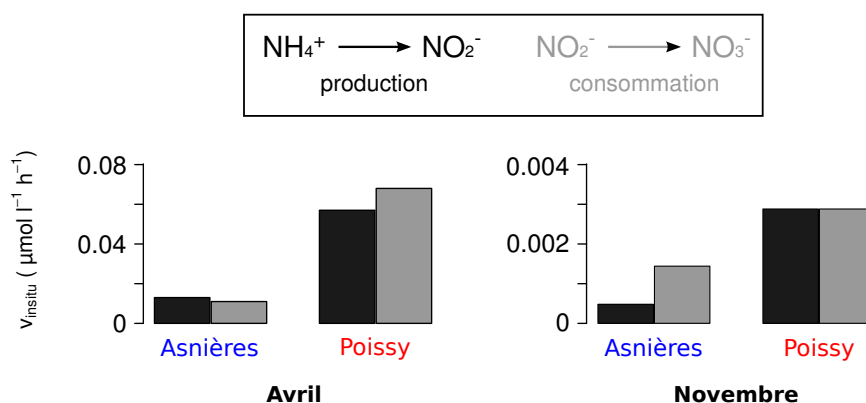


FIGURE 8 – Vitesses *in situ* recalculées de production et consommation de nitrite à Asnières et Poissy en avril et novembre 2012.

#### 4.4 Flux de nitrite à l'interface eau-sédiment

Après avoir étudié les vitesses de production et consommation de nitrites dans la colonne d'eau, une étude des flux de nitrite à l'interface eau-sédiment en condition de débits plus faibles et de températures élevées a été menée en amont et aval de la station d'épuration Seine Aval, *e.g.* aux stations Bougival, La Frette et Conflans (Fig. 2). En période estivale, que ce soit en juin ou août 2012, les flux de nitrite à l'interface eau-sédiment sont négatifs dans plusieurs zones d'accumulation de sédiments dans la Seine, que ce soit en amont (Bougival, La Frette) ou en aval (Conflans) de la station d'épuration Seine Aval (Fig. 9A). Les sédiments se comportent donc comme un puits à nitrite

en condition estivale, lorsque les eaux surnageantes sont oxygénées. Bien que les flux soient négatifs, il faut cependant noter que les flux sont plus faibles en aval de la station Seine Aval.

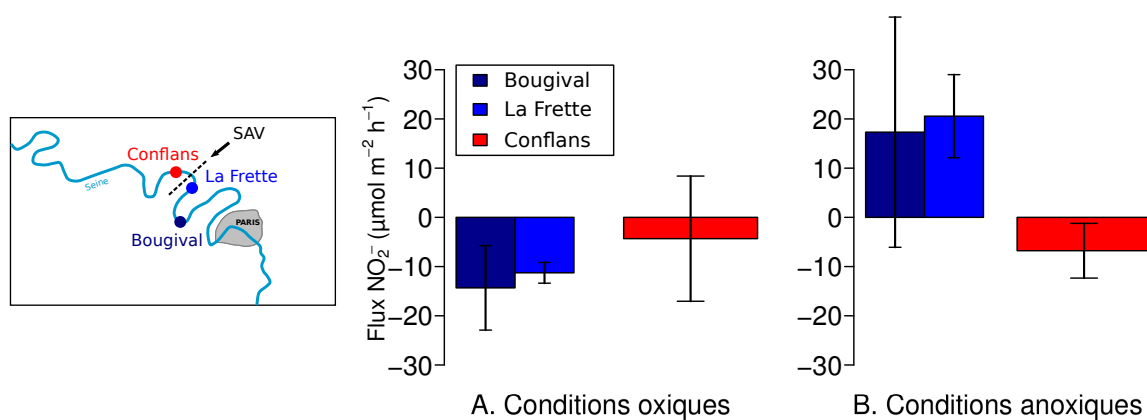


FIGURE 9 – Flux de nitrite à l'interface eau-sédiment en amont (Bougival, La Frette) et aval (Conflans) des rejets de la station d'épuration Seine Aval, mesurés en conditions oxiques (A) et anoxiques (B), en juin et août 2012.

Lorsque les conditions deviennent anoxiques dans l'eau surnageante, les flux sont très peu modifiés en aval, alors que les flux deviennent immédiatement positifs en amont (Fig. 9B). Cette inversion rapide de flux de nitrite met en évidence la modification rapide des processus microbiens à la surface des sédiments. Le passage en conditions anoxiques se traduit par l'arrêt des processus aérobiques de nitrification et la stimulation de processus anaérobiques telles que la dénitrification. L'augmentation des concentrations en nitrite en conditions anoxiques peut s'expliquer par des conditions transitoires, pendant lesquelles l'activité des quatre enzymes mises en jeu dans la réduction des nitrates en N<sub>2</sub> ne sont pas à l'équilibre et conduisent à l'accumulation de nitrite. Cela a déjà été observé lorsque la respiration des nitrates s'effectue sans réduction complète jusqu'au N<sub>2</sub>, ce qui est particulièrement favorisé dans les milieux riches en nitrates qui inhibent la réduction du nitrite (Wilderer et al., 1987; Philips et al., 2002). Au contraire en aval, les conditions anoxiques ne conduisent à aucun changement de flux de nitrite à l'interface eau-sédiment. Cette station est caractérisée par de forts apports de matière organique conduisant à une forte activité microbienne dans les sédiments, se traduisant par un rapide épuisement de l'oxygène. Les bactéries dénitrifiantes sont donc présentes dans les couches superficielles du sédiment, ce qui pourrait expliquer l'absence de changement des flux de nitrite en conditions oxiques et anoxiques.

En complément à l'étude des flux de nitrite à l'interface eau-sédiment, les profils de concentrations en nitrite mesurées dans les sédiments confirment les différentes réactions microbiennes ayant lieu en amont et en aval de la station Seine Aval. Alors que les profils verticaux de nitrite mettent en évidence de fortes concentrations dans les couches plus profondes des sédiments (> 5 cm) en amont, les profils de



nitrite suivent une décroissance exponentielle pour atteindre des concentrations nulles en profondeur en aval. L'accumulation de nitrite observée à 3-5 cm de profondeur à La Frette, en amont des rejets de Seine Aval, ainsi que la présence de nitrite ( $> 5 \mu\text{M}$ ) en profondeur pourrait s'expliquer par une diminution du carbone biodisponible pour la dénitrification (réduction de nitrate). En effet le tronçon fluvial situé en amont des rejets de Seine Aval reçoit des quantités de matière organique plus faibles qu'en aval, qui pourrait conduire à des limitations en carbone. L'hypothèse similaire d'accumulation de nitrite liée à une limitation en carbone avait déjà été formulée pour des sols (McGarity et Myers, 1968). Au contraire, les forts apports de matière organique par Seine Aval conduisent à une absence de limitation de la dénitrification en aval, et ainsi à une diminution des concentrations en nitrite dans les sédiments pour atteindre des valeurs proches de zéro en profondeur. De plus amples conclusions pourront être apportées par un exercice de modélisation associé à des mesures de vitesses de réaction.

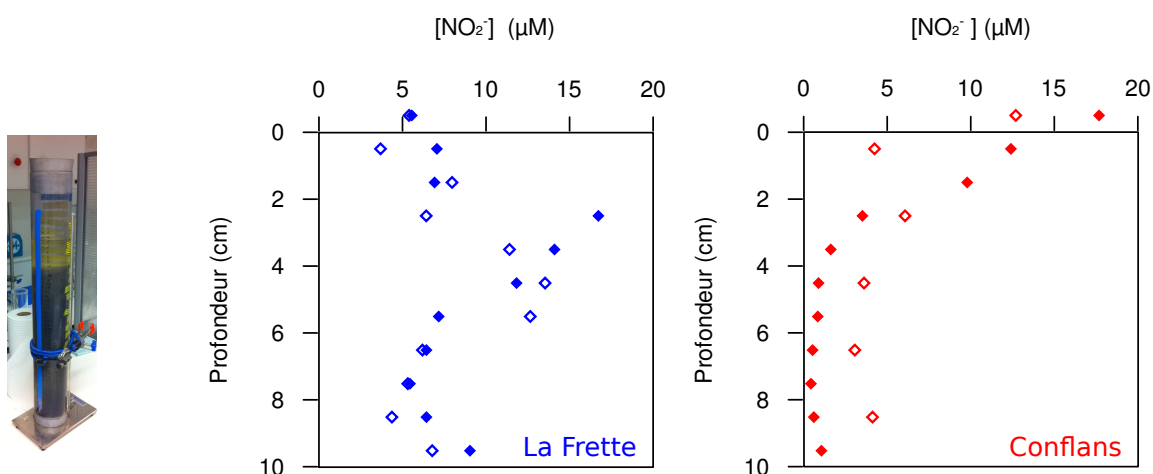


FIGURE 10 – *Profils verticaux de concentrations en nitrite dans les eaux interstitielles des sédiments en amont (La Frette) et aval (Conflans) des rejets de la station d'épuration Seine Aval en juin et août 2012.*

## 5 Conclusions générales et perspectives

Cette étude a confirmé l'importante diminution des concentrations en ammonium observées en Seine depuis 2007 suite à la mise en place d'unité de nitrification et dénitrification au niveau de la station d'épuration Seine Aval, cependant accompagnée d'une forte augmentation des concentrations en nitrite dans la Seine en aval de la station. Des améliorations sont encore nécessaires afin de diminuer les concentrations en nitrite lors de l'étape de dénitrification.

Les résultats obtenus suggèrent des changements d'activité et communauté microbiennes qui seront quantifiés et qualifiés le long de la Seine et dans les rejets de stations d'épuration (thèse T. Cazier). Cela permettra notamment d'évaluer les changements de communautés microbiennes suite aux rejets de Seine Aval. Des mesures de cinétiques et vitesses de nitrosation et nitratisation en printemps/été 2013 permettront de quantifier les paramètres cinétiques en conditions de débit faible et température élevée, et de les comparer à ceux obtenus en avril et novembre 2012. Une étude (en cours) de modélisation associée aux données obtenues lors d'incubations permettra de calibrer les taux de croissance,  $V_{max}$ ,  $K_M$  et biomasse microbienne à chaque station et saison.

De premières mesures de flux benthiques ont mis en évidence le comportement de puits à nitrite des sédiments en conditions oxiques en période estivale, ainsi que la capacité des sédiments à se comporter comme des puits ou sources en fonction des conditions d'oxygénation et des conditions environnementales. Un exercice de modélisation couplé aux mesures de vitesses permettra de tester et valider les hypothèses formulées.

La méthode de prélèvement de vases fluides ayant été mise au point en 2012 (non montré), des études privilégiées sur les vases fluides permettront de caractériser les vitesses réactionnelles et communautés microbiennes associées, en simulant l'alternance de conditions oxiques et anoxiques potentiellement associées à la remise en suspension des vases fluides par le transit fluvial.

Une étude de la répartition benthique des sédiments consolidés et vases fluides permettra de déterminer la répartition spatiale de ces sédiments dans la Seine, et ainsi la contribution relative des flux benthiques.

L'ensemble des résultats seront ensuite utilisés pour calibrer et valider les modèles hydro-sédimentaire et biogéochimique de la Seine, permettant ainsi de mieux comprendre et représenter la dynamique des nitrites en Seine.

## 6 Remerciements

Nous remercions Erwan Garcia Gonzalez, Julien Pouillaude, Céline Briand et Sabrina Guérin pour leur contribution et leur disponibilité pour l'échantillonnage au cours de l'année 2012, Benjamin Mercier et Anun Martinez pour leur aide en laboratoire, Laura Culoma, Arnaud Blanchouin et Aurélie Mothet pour leur participation aux expériences d'avril ou novembre, Alexis Groleau et Nicolas Escoffier pour l'invitation à Bougival, Josette Garnier, Gilles Billen, Jean-Marie Mouchel et Michel Poulin pour leur participation au lancement du projet. Nous remercions la Région Île-de-France qui a financé le salaire de M. Raimonet.

## Références

- Bae W, Baek S, Chung J, Lee Y (2001) Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors. *Biodegradation* 12(5) :359–366, DOI 10.1023/A:1014308229656, URL <http://www.springerlink.com/content/0p0k7htg0v2ckm/abstract/>
- Belser LW, Mays EL (1982) Use of nitrifier activity measurements to estimate the efficiency of viable nitrifier counts in soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 43(4) :945–948, URL <http://aem.asm.org/content/43/4/945>
- Brion N, Billen G (1998) Une réévaluation de la méthode d'incorporation de H<sup>14</sup>C<sup>03</sup>- pour mesurer la nitrification autotrophe et son application pour estimer des biomasses de bactéries nitrifiantes. *Revue des sciences de l'eau* 11(2) :283, DOI 10.7202/705308ar, URL <http://www.erudit.org/revue/rseau/1998/v11/n2/705308ar.html>
- Cébron A (2004) Nitrification, bactéries nitrifiantes et émission de N<sub>2</sub>O. PhD thesis, Pierre et Marie Curie, Paris
- Focht DD, Verstraete W (1977) Biochemical ecology of nitrification and denitrification [soils]. *Advances in Microbial Ecology* 1 :135–214, URL <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=1978/US/US78052.xml;US7863273>
- Garnier J, Billen G, Aissa-Grouz N, Romero E, Martinez A, Mercier B, Tronquart O, Rolland A (2012) Qualité de l'eau de l'axe seine : quels changements depuis la mise aux normes des STEPS de l'agglomération parisienne ? Tech. rep.
- Glass C, Silverstein J (1998) Denitrification kinetics of high nitrate concentration water : pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Research* 32(3) :831–839, DOI 10.1016/S0043-1354(97)00260-1, URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135497002601>
- Henriksen K, Kemp WM (1988) Nitrification in estuarine and coastal marine sediments. In : Nitrogen cycling in coastal marine sediments, T. H. Blackburn and J. Sørensen, pp 201–249
- Jiménez E, Giménez J, Ruano M, Ferrer J, Serralta J (2011) Effect of pH and nitrite concentration on nitrite oxidation rate. *Bioresource Technology* 102(19) :8741–8747, DOI 10.1016/j.biortech.2011.07.092, URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411010431>
- Kelso B, Smith RV, Laughlin RJ, Lennox SD (1997) Dissimilatory nitrate reduction in anaerobic sediments leading to river nitrite accumulation. *Applied and Environmental Microbiology* 63(12) :4679–4685, URL <http://aem.asm.org/content/63/12/4679>

- Kim DJ, Lee DI, Keller J (2006) Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresource Technology* 97(3) :459–468, DOI 10.1016/j.biortech.2005.03.032, URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085240500180X>
- McGarity JW, Myers RJK (1968) Denitrifying activity in solodized solonetz soils of eastern australia. *Soil Science Society of America Journal* 32(6) :812–817, DOI 10.2136/sssaj1968.03615995003200060030x, URL <https://www.crops.org/publications/sssaj/abstracts/32/6/SS0320060812>
- Philips S, Laanbroek HJ, Verstraete W (2002) Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 1(2) :115–141, DOI 10.1023/A:1020892826575, URL <http://www.springerlink.com/content/w1556460u17447j7/abstract/>
- Rocher V, Garcia-Gonzalez E, Paffoni C, Thomas W (2011) La production de nitrites lors de la dénitrification des eaux usées : un sujet sensible et complexe! *L' Eau, l'industrie, les nuisances* (344) :80–83, URL <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=24545542>
- Ruiz G, Jeison D, Chamy R (2003) Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Water Research* 37(6) :1371–1377, DOI 10.1016/S0043-1354(02)00475-X, URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004313540200475X>
- Stein LY, Arp DJ (1998) Loss of ammonia monooxygenase activity in nitrosomonas europaea upon exposure to nitrite. *Applied and Environmental Microbiology* 64(10) :4098–4102, URL <http://aem.asm.org/content/64/10/4098>
- van Leeuwen F (2000) Safe drinking water : the toxicologist's approach. *Food and Chemical Toxicology* 38, Supplement 1(0) :S51–S58, DOI 10.1016/S0278-6915(99)00140-4, URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691599001404>
- von der Wiesche M, Wetzel A (1998) Temporal and spatial dynamics of nitrite accumulation in the river lahn. *Water Research* 32(5) :1653–1661, DOI 10.1016/S0043-1354(97)00376-X, URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004313549700376X>
- Webster G, Embley TM, Freitag TE, Smith Z, Prosser JI (2005) Links between ammonia oxidizer species composition, functional diversity and nitrification kinetics in grassland soils. *Environmental Microbiology* 7(5) :676–684, DOI 10.1111/j.1462-2920.2005.00740.x, URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-2920.2005.00740.x/full>

Wilderer PA, Jones WL, Dau U (1987) Competition in denitrification systems affecting reduction rate and accumulation of nitrite. *Water Research* 21(2) :239–245, DOI 10.1016/0043-1354(87)90056-X, URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004313548790056X>