

# Impact des activités nitrifiante et hétérotrophe sur l'oxygénation à l'aval de Paris : évolution récente et perspectives pour 2005

Josette Garnier, Thierry Berthe, Séverine Pinault, Laëtitia Laroche et Anun Martinez

*UMR Sisyphe 7619, CNRS/UPMC, Boite 123, Tour 26, étage 5  
4 place Jussieu, 75005 Paris*

## *Résumé*

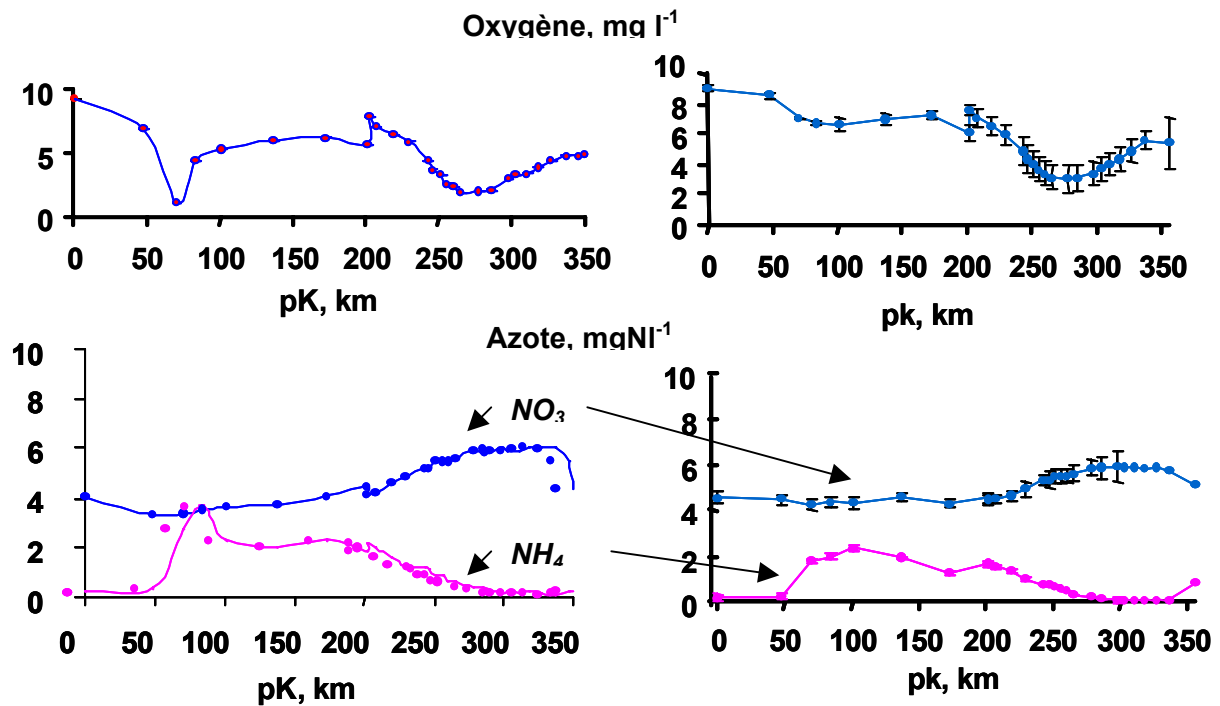
Les effluents de la station d'épuration d'Achères affectent considérablement le fonctionnement biogéochimique de la Seine. L'activité des bactéries hétérotrophes contribue à une désoxygénation de la rivière à l'aval immédiat des rejets, alors que l'activité des bactéries nitrifiantes entraîne un déficit important en oxygène bien plus en aval, dans la zone estuarienne. Cette étude nous a permis de réévaluer la charge spécifique à prendre en compte dans les modèles mathématiques des points de vue des variables classiques qui la définissent (DBO5, MES, azote et phosphore), mais aussi sur le plan des microorganismes qui les accompagnent. Le suivi saisonnier, montrant une grande variabilité permet de borner ces valeurs.

Le modèle permet ainsi de mieux simuler les principales variables décrivant la qualité de l'eau à l'aval d'Achères. A l'horizon 2005, le modèle montre que l'intégration des procédés actuellement testés sur pilotes (BIOFOR et BIOSTYR) dans la chaîne de traitement des eaux usées de la station d'Achères devrait permettre d'améliorer sensiblement l'oxygénation de la rivière et de l'estuaire.

## **1. Introduction**

Au cours de cette année 2000, nous avons poursuivi notre compréhension des compartiments bactériens (bactéries nitrifiantes et hétérotrophes) dans des effluents de stations d'épuration caractérisés par des traitements différents : il s'agit de la station d'Achères (boues activées) et de ses pilotes de nitrification (BIOFOR et BIOSTYR) ainsi que la station de Colombes (nitrification et dénitrification). Outre les 4 campagnes printanières réalisées en 1998 et 1999 à la station d'Achères essentiellement, huit campagnes ont été réalisées au cours du cycle annuel 2000 pour appréhender la variabilité de la qualité des eaux brutes et des eaux traitées du point de vue micro-biologiques. Lors de chaque campagne, des mesures ont également été effectuées dans la rivière à l'amont et à l'aval des rejets de la station d'Achères

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 de la 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 plus de 1993 à 1995 (données acquises dans le programme Seine-Aval pour la première période). 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 qui ont été plus élevées au cours de ces dernières années.



**Figure 1.** Variation des concentrations, en haut) en oxygène dissous (moyennes de situations estivales) de Paris à l'estuaire, montrant les deux zones de désoxygénation, en bas) en nitrate et ammonium. A gauche : période de 1993 à 1995 ; à droite : période de 1996 à 1999.

Dans un contexte d'évolution des traitements des effluents, l'objectif de ces campagnes était de revisiter certaines formulations du modèle afin de modéliser au mieux le fonctionnement écologique actuel. Il s'agissait en particulier de redéfinir l'équivalent-habitant pris en compte dans le modèle en terme de charge organique, de MES, azote et phosphore, mais aussi en terme d'organismes microbiens (bactéries hétérotrophes et nitrifiantes, notamment).

Dans une perspective d'amélioration du traitement à l'horizon 2005, nitrification, voire dénitrification des effluents, la compréhension de ces processus revêt toute son importance. Les résultats de la littérature ainsi que nos premières investigations ont en effet montré que la nitrification produit du N<sub>2</sub>O, gaz à effet de serre qui pourrait représenter un déplacement de la pollution vers l'atmosphère. Nous avons donc élaboré un modèle conceptuel de la nitrification, dans lequel la production de N<sub>2</sub>O 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<sub>2</sub>O. Comprendre les différentes étapes de la nitrification nécessite de comprendre la dynamique des bactéries qui réalisent ce processus, c'est pourquoi nous avons continué d'utiliser les outils moléculaires. Enfin, les résultats obtenus sur les pilotes de traitement de la nitrification et sur Colombes nous ont conduit à définir l'équivalent-habitant tel qu'il peut raisonnablement être escompté en 2005. Nous avons ainsi avec le modèle exploré la qualité de l'eau dans ces nouvelles conditions.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Les bactéries nitrifiantes

#### L'activité nitrifiante

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

Connaissant la quantité de carbone incorporée par les bactéries nitrifiantes, le nombre de moles d'azote oxydées peut être déterminé grâce à 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 nitratantes.

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/l et  $[\text{O}_2]$  d'au moins 6 mg/l. Il résulte que 1  $\mu\text{g}$  de carbone de bactéries nitrifiantes oxyde 0,04  $\mu\text{mol}$  d'azote par heures.

Les activités nitrosante et nitratante ont été mesurées séparément par la mesure de la vitesse de production (nitrosation) ou de disparition (nitratisation) des nitrites en présence des inhibiteurs spécifiques. Ces activités différenciées de la nitrosation et nitratisation n'ont pas encore été exploitées.

#### Caractérisation des populations nitrifiantes

L'étude des populations nitrifiantes est basée sur l'utilisation de nouveaux outils moléculaires (la réaction de polymérisation en chaîne ou PCR) afin d'établir une taxonomie. 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 nitratantes du genre *Nitrobacter*, Degrange et 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 et Olson (1991). Ces méthodes ont été largement décrites dans Berthe *et al.* (1999) et Berthe *et al.* (2000)

**L'étude de la population des nitratantes**, 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.

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 nitratantes.

**La diversité de la communauté des nitrosantes** a été évaluée en analysant la séquence des différents fragments d'ADN obtenus par PCR, à partir des acides nucléiques extraits des échantillons d'eau et des amorces *amoA*-1F et *amoA*-2R. Une description complète de la stratégie utilisée a été décrite dans le rapport précédent.

## 2.2. Les bactéries hétérotrophes

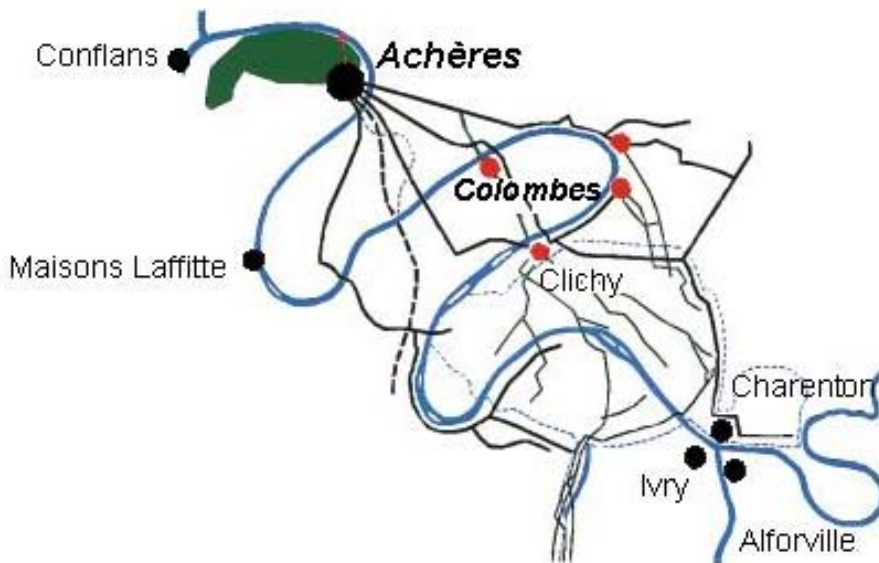
L'abondance de l'ensemble de la communauté bactérienne est déterminée par la méthode de comptage direct par épifluorescence après coloration au DAPI (Porter et Feig, 1980).

Les bactéries sont comptées et classées selon des critères de taille et de forme, permettant le calcul d'un biovolume cellulaire pour 2 fractions de bactéries : inférieures à 1  $\mu\text{m}$  et supérieures à 1  $\mu\text{m}$ . (Garnier *et al*, 1992). Les biovolumes sont convertis en biomasse d'après la relation de Simon et Azam (1989).

## 3. Sites d'étude

### *Le site d'Achères*

La station d'épuration d'Achères est la plus importante du bassin de la Seine; elle permet de traiter environ 2 Mm<sup>3</sup> 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. Nous avons en outre régulièrement réalisé des prélèvements en entrée et sortie des pilotes BIOFOR et BIOSTYR. Enfin, 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).

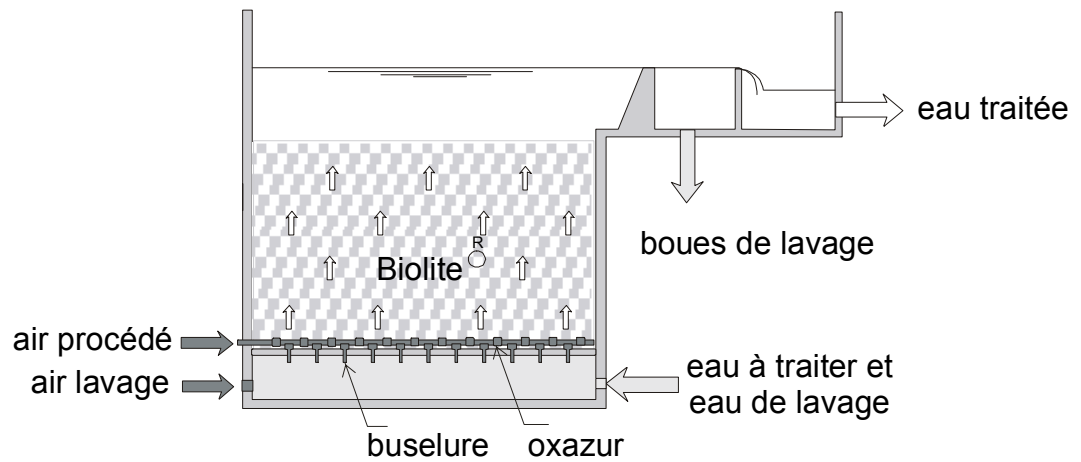


**Figure 2.** Situation des sites d'Achères et Colombes

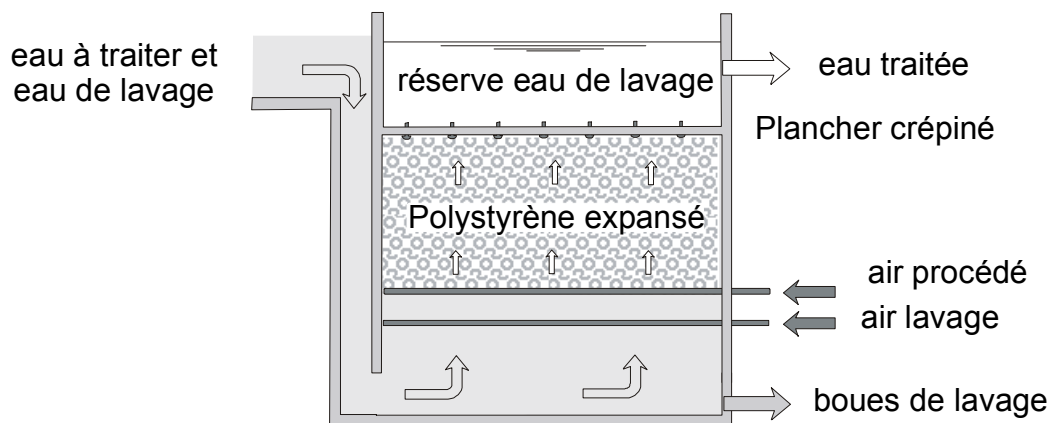
### *Les pilotes BIOFOR et BIOSTYR*

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. (Figure 3). La biomasse bactérienne accumulée est quotidiennement rincée.

### A) BIOFOR



### B) BIOSTYR



**Figure 3.** Représentation des pilotes

#### ***Le site de Colombes***

La station de Colombes, mise en service en 1998, a une capacité d'environ  $0,24\text{Mm}^3$  (Figure 2). Le traitement biologique de la station de Colombes est effectué par des pilotes fonctionnant en série BIOFOR-BIOSTYR-BIOFOR, à l'issue du traitement physique (cf. Figure 3). La dépollution carbonée, la nitrification et la dénitrification s'effectuent successivement dans les biofiltres.

## 4. Résultats et discussion

### 4.1. Variations des caractéristiques des effluents

#### 4.1.1. Les bactéries hétérotrophes et la DBO5

Les biomasses bactériennes dans les effluents bruts sont de l'ordre de 10-12 mg C l<sup>-1</sup> (Tableau 1), mais présentent une grande variabilité saisonnière (Figure 4). Celles-ci sont toutefois plus faibles dans le pilote BIOFOR, qui reçoit des eaux partiellement épurées.

En général, l'abattement observé est supérieur à 80 % : 84 % à Achères, 94 % dans le pilote BIOSTRYR et 96 % à Colombes ; celui-ci est proportionnellement moins important dans le pilote BIOFOR (77 %).

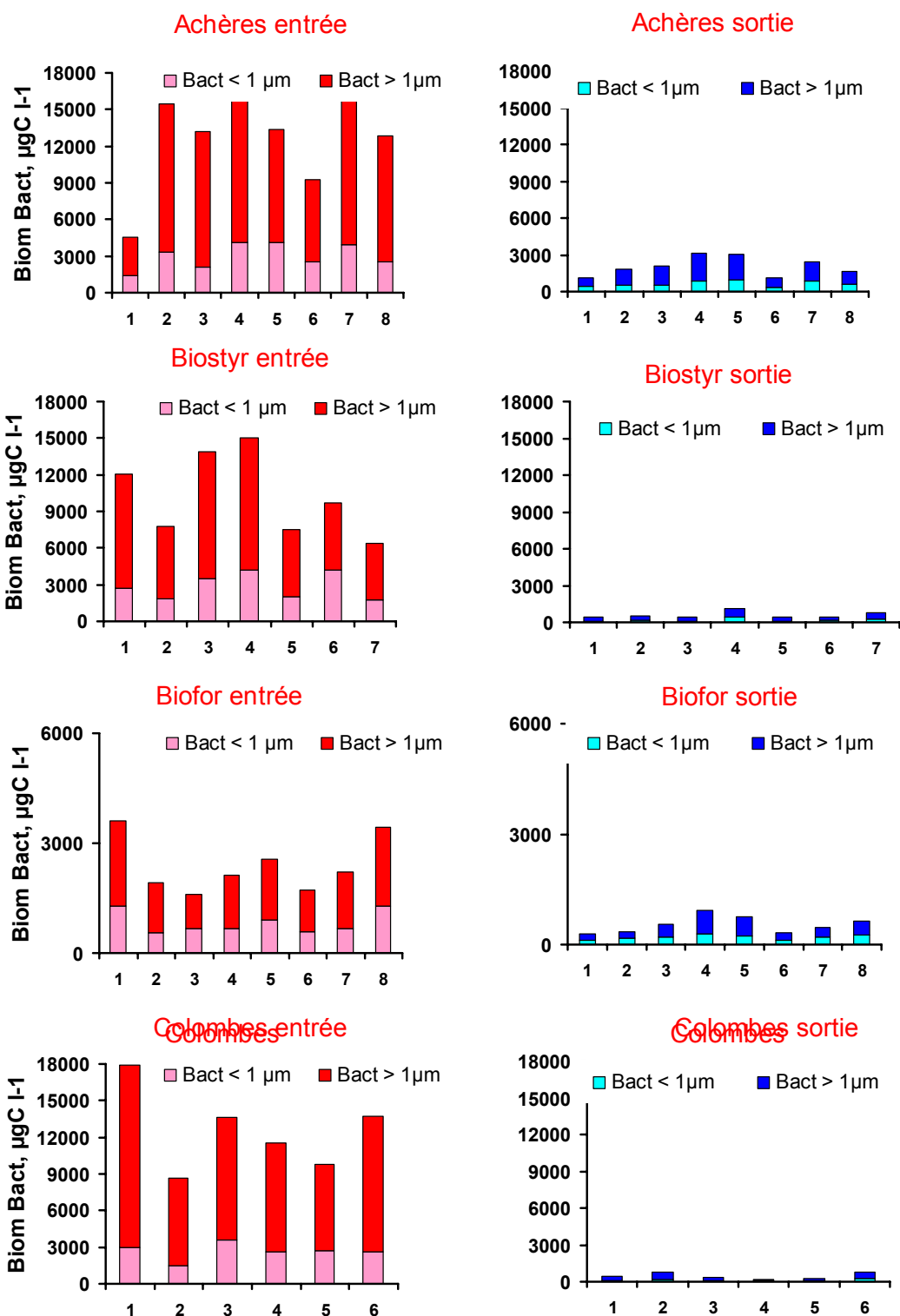
La proportion des bactéries allochtones (plus actives et dont la taille est supérieure à 1 µm en plus grande longueur) en terme de biomasse est largement dominante (70 à 80 %) ; mais légèrement plus faible dans les effluents traités que dans les effluents bruts.

L'apport à la rivière des effluents se traduit par une augmentation des biomasses des bactéries d'un facteur 2 à 7 entre les stations amont et aval (Maisons-Laffitte et Conflans, Tableau 1, Figure 5). Ainsi en amont de la station, les bactéries de grande taille ne représentent que 35 % de la biomasse totale, alors que celles-ci atteignent 65 % à l'aval.

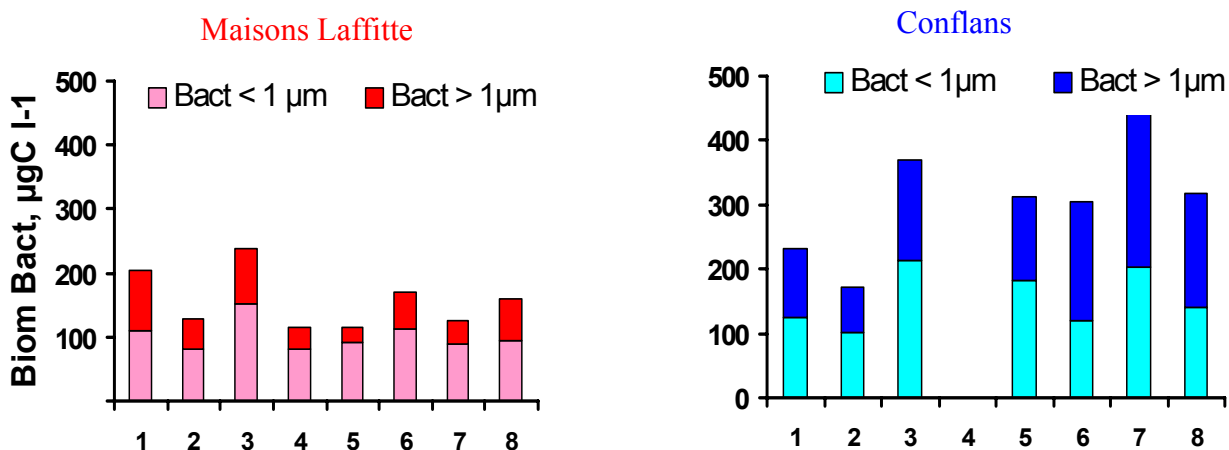
**Tableau 1.** Valeurs moyennes des biomasses bactériennes (8 campagnes) aux entrées et sortie de stations, ainsi que dans la rivière en amont (Maisons Laffitte) et en aval (Conflans) de la station d'Achères

	Biomasse Bactérienne µg C l <sup>-1</sup>		
	< 1 µm	> 1 µm	tot
<b>Achères entrée</b>	<b>3000</b>	<b>9770</b>	<b>12770</b>
Achères sortie	646	1417	2063
<b>BIOFOR entrée</b>	<b>822</b>	<b>1580</b>	<b>2400</b>
BIOFOR sortie	199	342	541
<b>BIOSTRYR entrée</b>	<b>2874</b>	<b>7461</b>	<b>10335</b>
BIOSTRYR sortie	197	412	609
<b>Colombes entrée</b>	<b>2678</b>	<b>9877</b>	<b>12564</b>
Colombes sortie	134	336	470
<b>Maisons Laffitte</b>	<b>102</b>	<b>55</b>	<b>157</b>
<b>Conflans</b>	<b>212</b>	<b>398</b>	<b>610</b>

Les biomasses des bactéries hétérotrophes présentent en fait les mêmes tendances que la matière organique qu'elles dégradent (quantifiée à travers la DBO5). En moyenne de 170 mg l<sup>-1</sup> dans les effluents bruts (sauf à BIOFOR), les valeurs en sortie sont de l'ordre de 10-20 mg l<sup>-1</sup> (soit un abattement de plus de 80 %, Figure 6). A la sortie de Colombes, la DBO5 est significativement plus faible, en moyenne de 4 mg l<sup>-1</sup>.



**Figure 4.** Variations des biomasses de bactéries hétérotrophes ( $\mu\text{g C l}^{-1}$ ) 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)



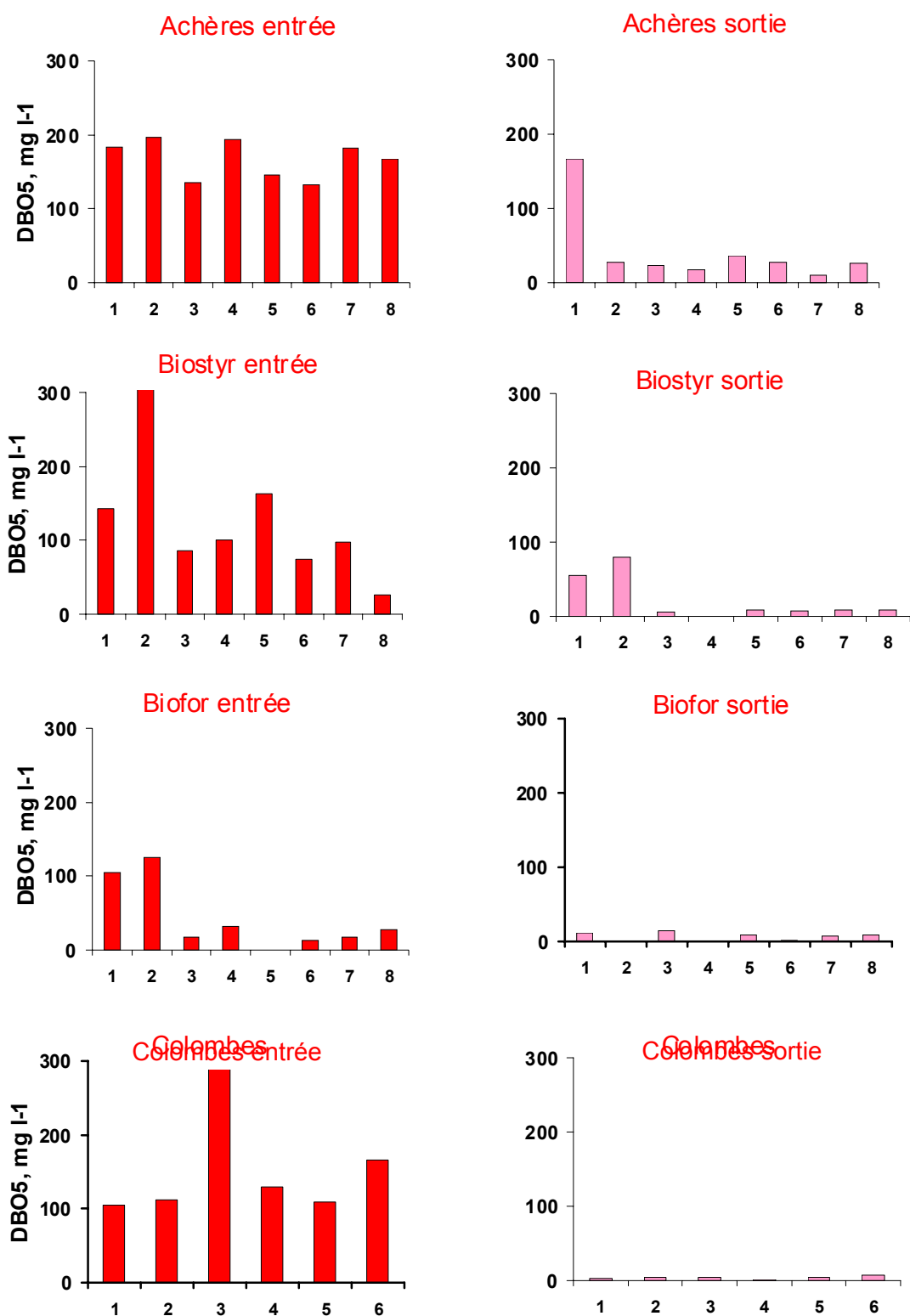
**Figure 5.** Variations des biomasses de bactéries hétérotrophes ( $\mu\text{g C l}^{-1}$ ) dans la Seine, entre l'amont et l'aval des rejets d'Achères

Les mesures d'incorporation de thymidine réalisées en 1998 et 1999 (Tableau 2), mais partiellement exploitées au cours de l'exercice précédent, conduisent à des taux de croissance moyens de  $0,52 \text{ h}^{-1}$  (écart-type= 0.38,  $n=14$ ) pour les bactéries allochtones de grande taille. Ce dernier est 10 fois plus petit que celui déterminé pour les bactéries allochtones de petite taille ( $0,033 \text{ h}^{-1}$ , écart type de 0,023,  $n = 23$ ).

**Tableau 2.** Valeurs des taux de croissance des bactéries hétérotrophes « allochtones » et « autochtones ».

	Taux de croissance Bact < 1 $\mu\text{m}$			Taux de croissance Bact > 1 $\mu\text{m}$		
	$\text{h}^{-1}$			$\text{h}^{-1}$		
	Mars 98	Mai 98	Déc 99	Mars 98	Mai 98	Déc 99
Maisons Laffitte	0,035	0,080	0,060	0,640	0,890	1,120
Achères entrée	0,031	0,015	0,007	0,390	0,530	0,010
Achères sortie	0,055	0,008	0,010	0,460	0,260	0,110
BIOFOR entrée			0,005			0,015
BIOFOR sortie			0,040			1,140
Conflans	0,051	0,025	0,035	0,380	0,390	0,890
<b>Moyenne</b>	<b>0,043</b>	<b>0,032</b>	<b>0,096</b>	<b>0,470</b>	<b>0,520</b>	<b>0,550</b>





**Figure 6.** Variations de la DBO5 (mg l<sup>-1</sup>) dans les effluents bruts et traités de la station d'Achères et des pilotes, et de la station de Colombes en 2000.

#### 4.1.2. Les bactéries nitrifiantes et l'azote réduit

Il apparaît une variabilité de l'activité nitrifiante potentielle semblable à celle mentionnée pour la dégradation organotrophe (Figure 7). L'activité nitrifiante atteint  $10 \mu\text{mol N}_{\text{oxy}} \text{l}^{-1} \text{h}^{-1}$  dans les effluents. L'activité nitrifiante est généralement plus faible dans les effluents traités, sauf au niveau du pilote BIOFOR. Les bactéries nitrifiantes connues pour leur attachements aux particules sont logiquement abattues avec ces dernières. On peut supposer qu'au niveau du pilote BIOFOR, les bactéries nitrifiantes sont détachées de leur support de biolite.

La présence de bactéries nitrifiantes en quantité important dans les effluents bruts (et même très en amont dans le réseau d'assainissement, Berthe *et al.*, 2000, rapport 1999) est confirmée quelque soit le type de traitement ; le procédé de nitrification ne représente donc pas une source de bactéries nitrifiantes (BIOFOR est en effet soumis à des essais et ne peut être retenu comme un réelle source). Seuls les biofilms des canalisations semblent être les milieux favorables à la croissance des nitrifiantes. 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,  $\text{mg l}^{-1}$ ) aux entrées et sorties d'effluents montrent que la nitrification en station est un procédé performant : l'abattement est de l'ordre de 90% (Figure 9). Ainsi que le montre la station d'Achères, la présence seule de bactéries nitrifiantes dans les effluents, ne contribue pas (ou peu) à l'abattement de l'azote réduit, les 11 % en moins étant plutôt lié à l'abattement de l'azote organique des particules.

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 10).

#### 4.1.3. Définition de la charge spécifique des effluents d'Achères

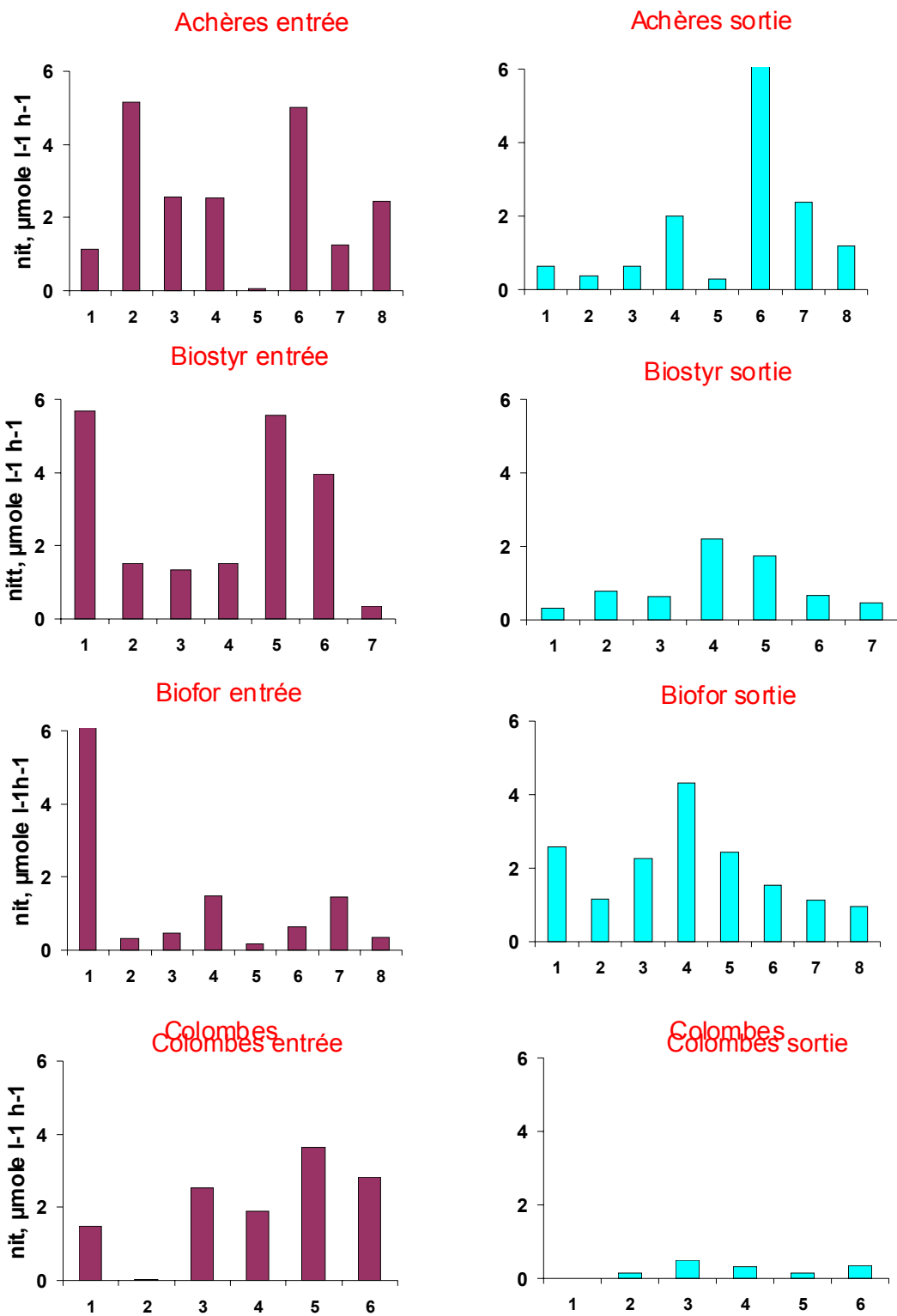
La charge spécifique par habitant a été évaluée à partir des données journalières obtenues, dans un premier temps au cours des mois correspondant à nos campagnes de mesure (décembre 1999, mars, avril, mai, juin, juillet, septembre et novembre 2000).

*NB : la base complète des années 1999 et 2000 sera exploitée au cours de l'exercice 2001.*

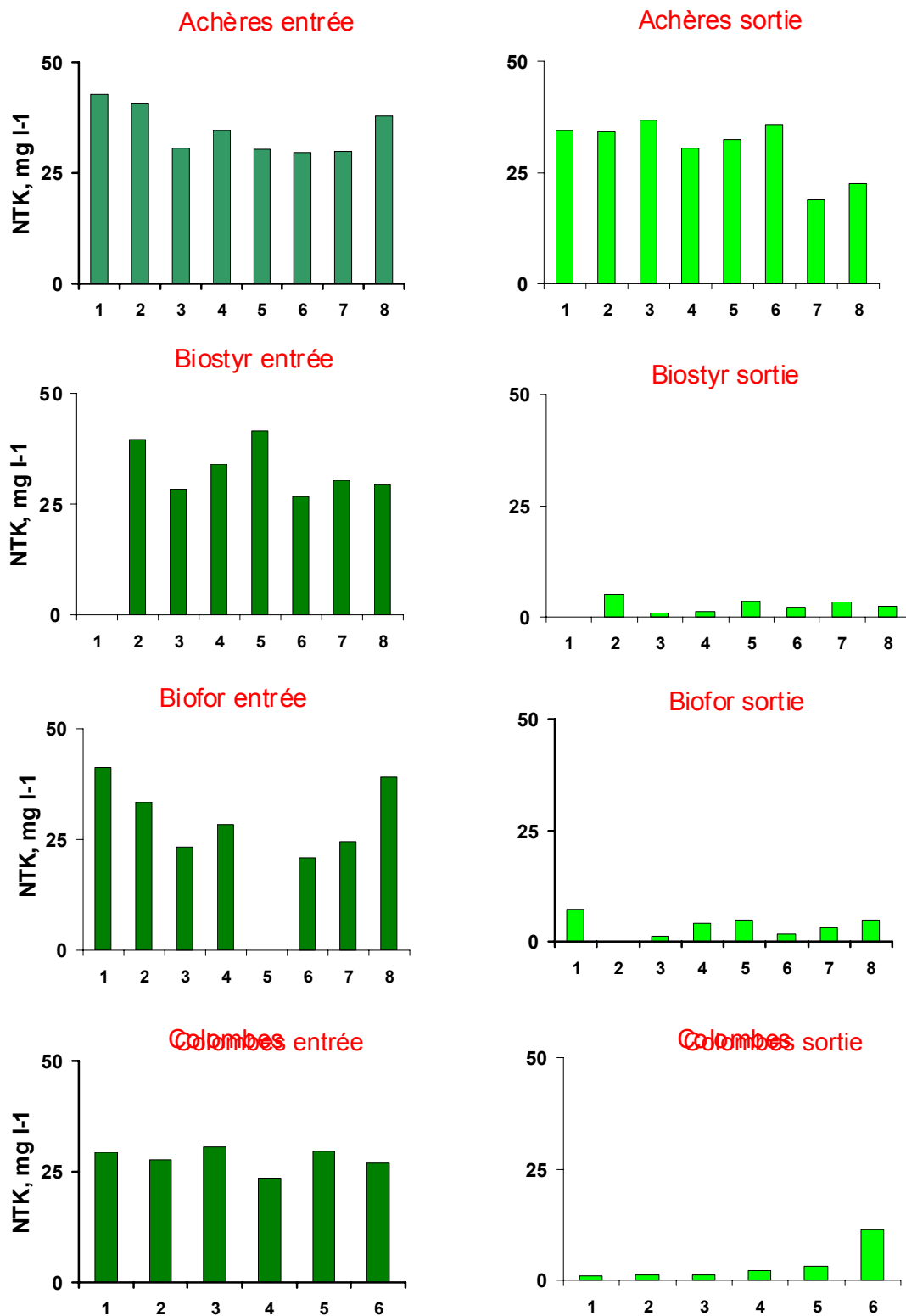
Le nombre d'habitants traité par la station d'Achères a été calculé en divisant la charge totale moyenne journalière en azote réduit dans les eaux brutes par une charge spécifique de  $12,5 \text{ gN/hab/jour}$ . Cette charge n'a en effet pas varié au cours du dernier siècle, se stabilisant autour d'une valeur physiologique de  $12,5 \text{ g hab}^{-1} \text{ j}^{-1}$  (cf. Fig. 1, *In Billen et al.*, 1999). Il apparaît ainsi que le nombre d'habitants traités varie de 5,4 à 6,1 M habitants, selon la classe de débits considérée (Tableau 3).

**Tableau 3.** Charge spécifique par habitant et par jour en 2000 pour différentes classes de débits d'effluents brut à traiter. Consommation moyenne d'eau par habitants.

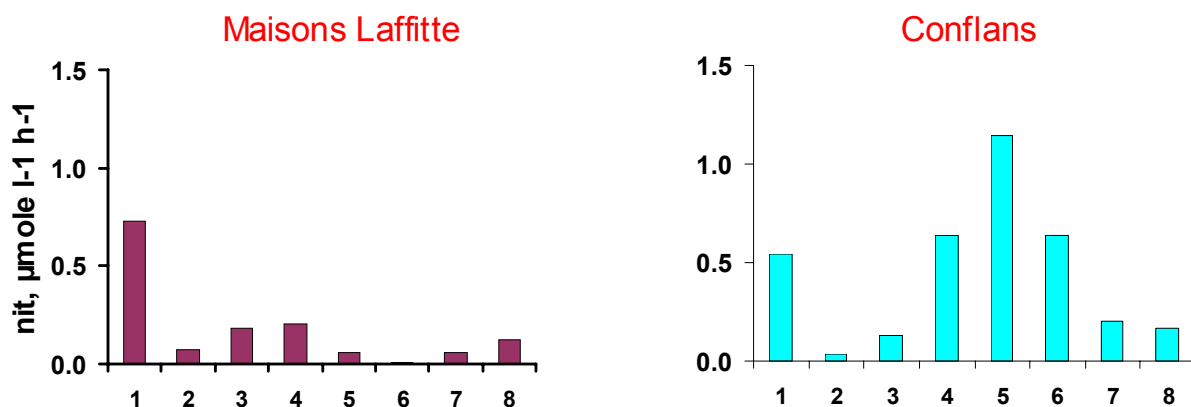
Classe de débit $\text{m}^3 \text{j}^{-1}$	MES $\text{g j}^{-1}$	DBO5 $\text{g j}^{-1}$	NTK $\text{g j}^{-1}$	NH4 $\text{g j}^{-1}$	PT $\text{g j}^{-1}$	COT $\text{g j}^{-1}$	consommation d'eau $\text{l j}^{-1}$
1300-1800	68	57	12,5	8,4	2,3	38,3	310
1800-2300	74	58	12,5	8,5	2,3	42,1	350
> 2300	86	59	12,5	8,0	2,5	45,3	415



**Figure 7.** 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.



**Figure 8.** Variations des teneurs en azote réducté dans les effluents bruts et traités de la station d'Achères et des pilotes, et de la station de Colombes en 2000.



**Figure 8.** Variations des activités nitrifiantes dans la Seine, entre l'amont et l'aval des rejets d'Achères

Seules les valeurs de la charge spécifique pour les débits les plus faibles doivent être retenues. La consommation d'eau des parisiens se situe bien autour de 300 l j<sup>-1</sup>, une valeur de DBO5 des effluents bruts étant connue pour évaluer 55 g j<sup>-1</sup>. Sous ces hypothèses la charge spécifique en phosphore est de 2,3 g j<sup>-1</sup>, bien inférieure aux 4 g j<sup>-1</sup> encore obtenus dans les années 1980 en France, malgré une diminution dans tous nos pays voisins, suite au bannissement des phosphates dans les lessives (Tableau 3). La charge spécifique en carbone organique total, plus récemment prise en compte dans les stations d'épuration est de l'ordre de 40 g j<sup>-1</sup>. La DBO5 représente environ 55 % du COT.

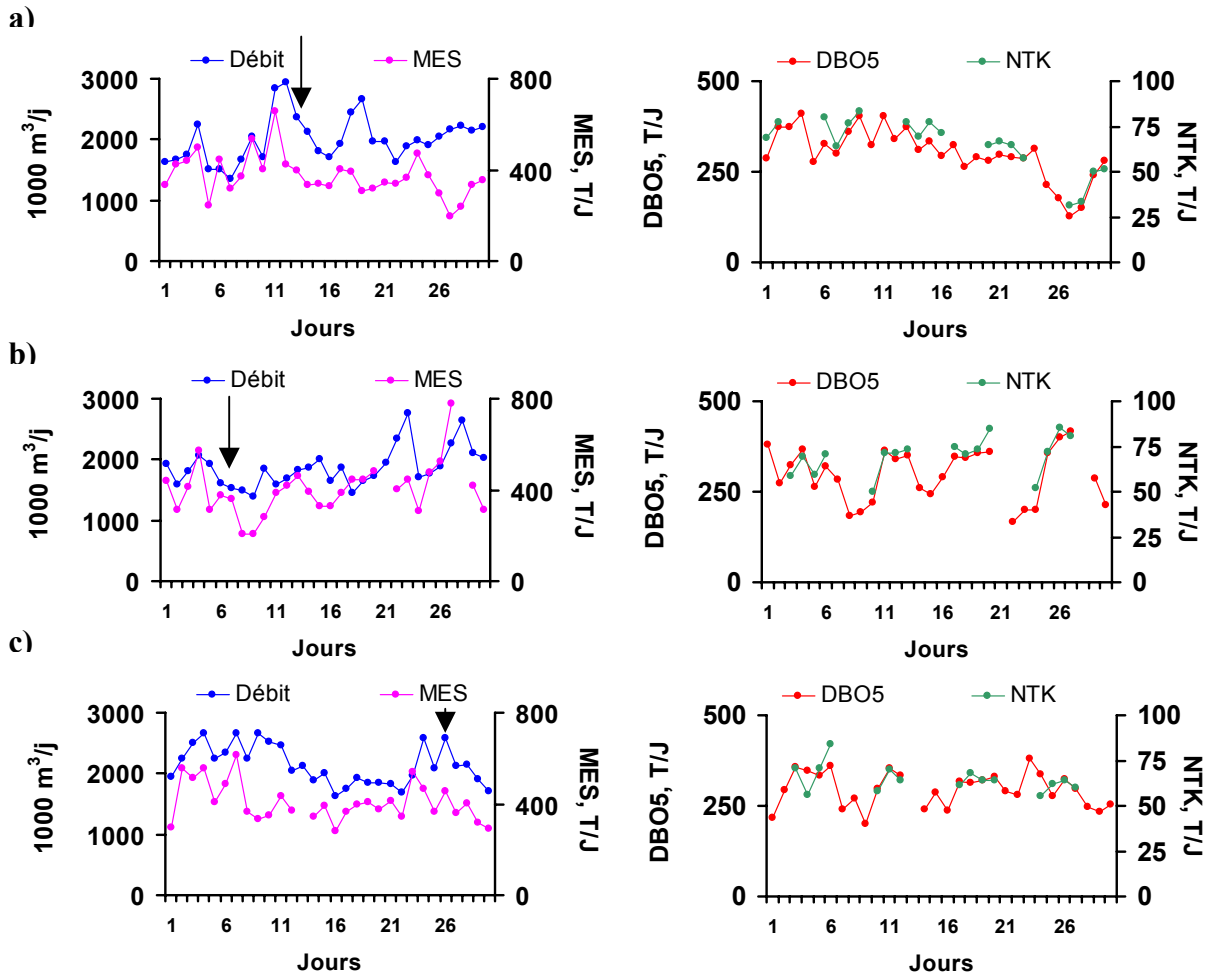
Ces valeurs sont toutefois entachées d'une variabilité en partie liée aux variations de débits des effluents d'entrée (Figures 9 et 10).

Les investigations menées depuis le début du programme sur les compartiments bactériens ont permis d'élargir la notion de charge spécifique à la biomasse bactérienne dont les effluents sont le vecteur.

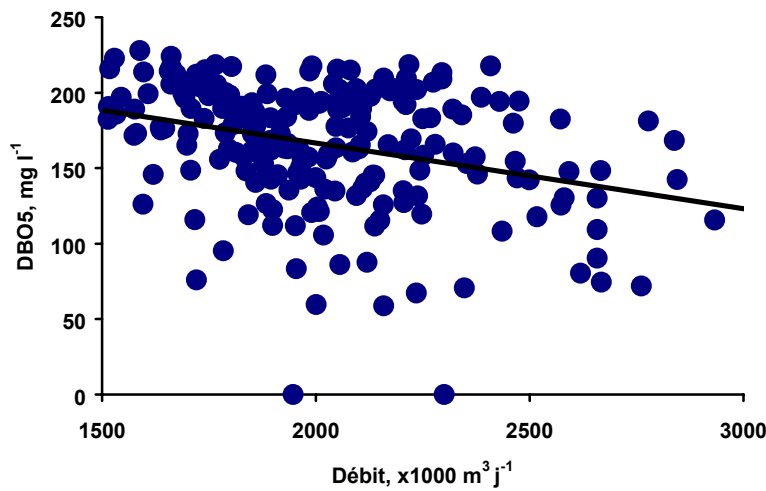
Les biomasses bactériennes sont en effet des variables du modèle, au même titre que les MES et le carbone organique sous ses différents états de dégradation. Moyennant la conversion de la DBO5 en carbone organique total biodégradable, les biomasses bactériennes peuvent être exprimées par rapport à la DBO5, avec laquelle elle présente une relation linéaire (Figure 11). Le modèle tient compte de l'apport des bactéries de l'effluent traité (cf. Tableau 4).

**Tableau 4.** Valeurs moyennes de la DBO5 et des biomasses bactériennes dans les effluents traités des différentes stations étudiées. Biom Bac : bactéries hétérotrophes, Biom Nit : bactéries nitrifiantes. Les écarts-types sont indiqués en italique.

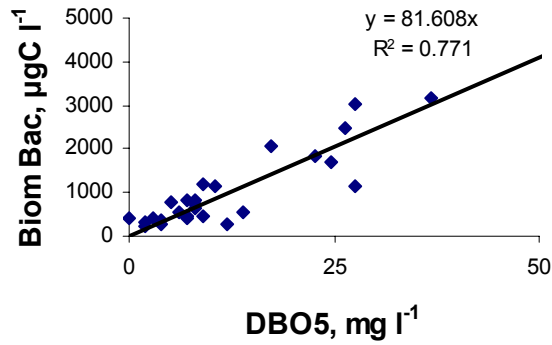
Eaux traitées	Achères	BIOFOR	BIOSTYR	Colombes
DBO5, mg/l	24,2	8,5	21,5	4,2
	<i>7,8</i>	<i>4</i>	<i>29</i>	<i>1,7</i>
Biom Bac >1µm, µg C/l	1417	342	412	336
	<i>570</i>	<i>168</i>	<i>174</i>	<i>215</i>
Biom Bac < 1µm, µg C/l	646	199	197	134
	<i>230</i>	<i>63</i>	<i>118</i>	<i>57</i>
Biom Nit, µg C/l	42	52	25	6
	<i>50</i>	<i>28</i>	<i>17</i>	<i>4</i>



**Figure 9.** Variabilité de débits et des variables de qualité des effluents d'entrée de la station d'Achères : exemple des mois de a) décembre 1999, b) avril et c) juillet 2000. Les flèches indiquent les jours des campagnes au cours du mois.



**Figure 10.** Relation entre les débits des effluents bruts et la DBO5. Valeurs des mois de décembre 1999, avril et juillet 2000. La courbe de tendance est indiquée par le trait.



**Figure 11.** Relation entre la biomasse bactérienne totale et la DBO5.

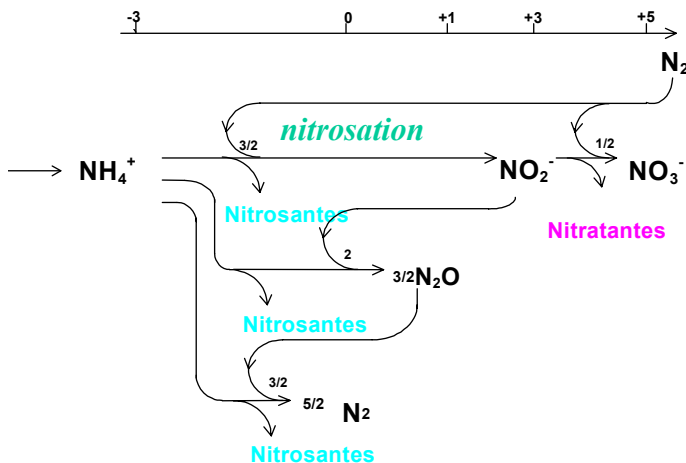
## 4.2. Modélisation de l'impact d'Achères dans la basse Seine

C'est en tenant compte des relations établies pour 2000 que le modèle a été utilisé, en tenant compte de la relation :  $1 \text{ g DBO5} = 0,33 \text{ g C organique biodégradable}$  (Servais, Garnier *et al.*, 1999). Ces relations devraient être affinées dans le cadre d'une synthèse qui considérerait l'ensemble des données acquises au cours du programme.

Outre la réévaluation des relations, l'aspect modélisation a été enrichi d'un module plus complet du processus de nitrification tenant compte des processus intermédiaires à l'origine de la production du  $\text{N}_2\text{O}$ .

### 4.2.1. Modélisation de la production du $\text{N}_2\text{O}$

La production d'oxyde nitreux ( $\text{N}_2\text{O}$ ) constitue une étape intermédiaire connue du processus de nitrification (Figure 12). Nos travaux dans l'estuaire de la Seine (rappelons que c'est dans l'estuaire que l'ammonium des effluents d'Achères est présentement nitrifié) ont montré que dans certaines conditions particulières, telles qu'un déficit en oxygène,  $\text{N}_2\text{O}$ , voire  $\text{N}_2$  deviennent le produit final principal de l'oxydation de l'ammonium.



**Figure 12.** Schéma des étapes de la nitrification.

Notons que cette production de  $\text{N}_2\text{O}$ , gaz à effet de serre participant à la destruction de la couche d'ozone, 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 estuaires notamment, n'est pas négligeable.

Dans un contexte de nitrification en station, il est important de comprendre ces étapes intermédiaires afin de ne pas déplacer la pollution. Nous avons donc élaboré un schéma conceptuel de la nitrification en faisant un certain nombre d'hypothèses :

- la transformation de  $\text{NO}_2$  en  $\text{N}_2\text{O}$  ainsi que la transformation de  $\text{N}_2\text{O}$  en  $\text{N}_2$  est réalisée par les bactéries nitrosantes conventionnelles, **et non par celles du groupe anamox, spécialisées.**
- Avec une même activité spécifique et un taux de mortalité égal à celui des bactéries hétérotrophes
- avec un taux de croissance proportionnel au rendement énergétique.
- avec la même dépendance à la température que les deux groupes principaux des bactéries nitrifiantes (les nitrosantes et nitratantes).

Alors que les paramètres des cinétiques des deux étapes de la nitrification ont été déterminés expérimentalement dans un travail antérieur (Brion & Billen, 1998), les constantes de demi-saturation pour les substrats ont ici été ajustées (Tableau 5).

**Tableau 5. Paramètres physiologiques de la nitrification utilisés dans le modèle.**

Paramètres		Unités	$\text{NH}_4^+$ oxydation	$\text{NO}_2^-$ oxydation	Références
$\mu_{\text{max}}$	Taux de croissance max	$\text{h}^{-1}$	0,05	0,04	Brion & Billen, 1998 & littérature
$\gamma$	Rendt de croissance	$\mu\text{gC}/\mu\text{gN}$	0,09	0,015	
$V_{\text{spMax}}$	Act. Spéc. max	$\mu\text{gC}/\mu\text{gN}/\text{h}$	0,5	2,6	
Kd	Taux de mortalité	$\text{h}^{-1}$	0,02	0,02	Garnier <i>et al.</i> , 1991 & littérature
$T_{\text{opt}}$	Temp. opt	$^{\circ}\text{C}$	23	23	
$dT_i$	Ecart	$^{\circ}\text{C}$	12	12	Brion & Billen, 1998
$K_{\text{oxy}}$	$\frac{1}{2}$ cst de sat pour $\text{O}_2$	mg/l	0,6	1,1	Brion & Billen, 1998
$K_s$	$\frac{1}{2}$ cst de sat pour subst	mgN/l	1,5	0,03	& littérature
$K_{\text{mNO}_{2\text{nos}}}$	$\frac{1}{2}$ cst de sat pour subst	mgN/l	4,2		ajusté
$K_{\text{mN}_2\text{O}_{\text{nos}}}$	$\frac{1}{2}$ cst de sat pour subst	mgN/l	0,03		ajusté

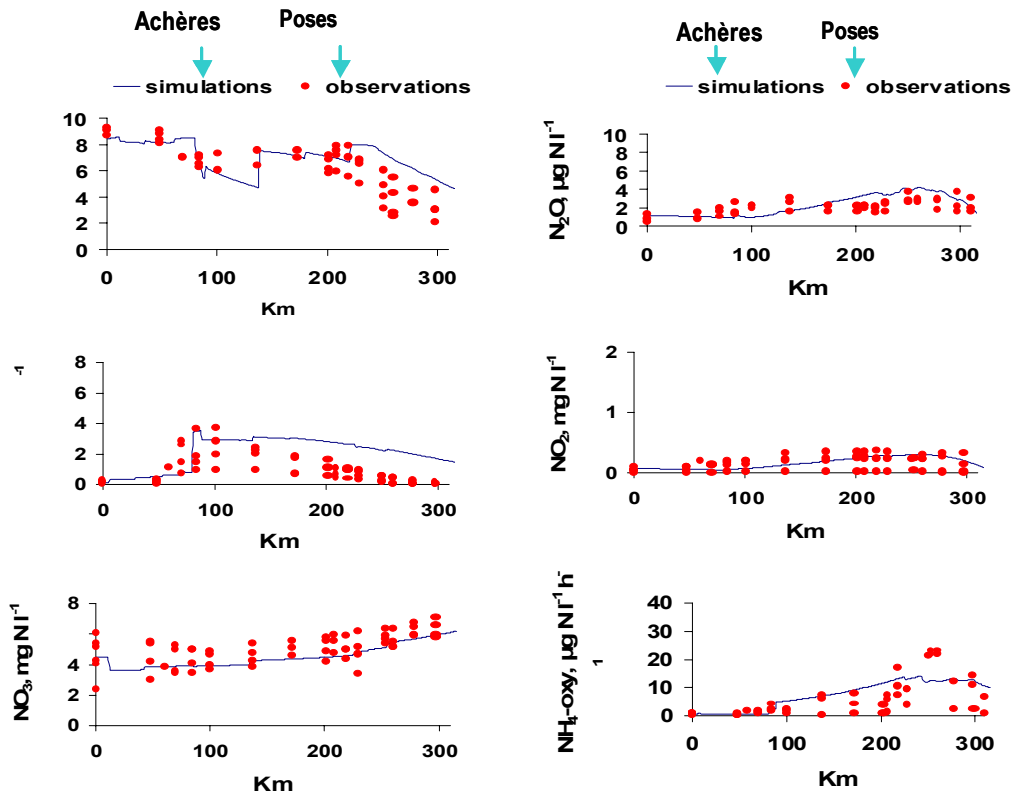
#### 4.2.2. Simulations par le modèle Modeste (aval de Paris)

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 13). 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 Seine-Aval).

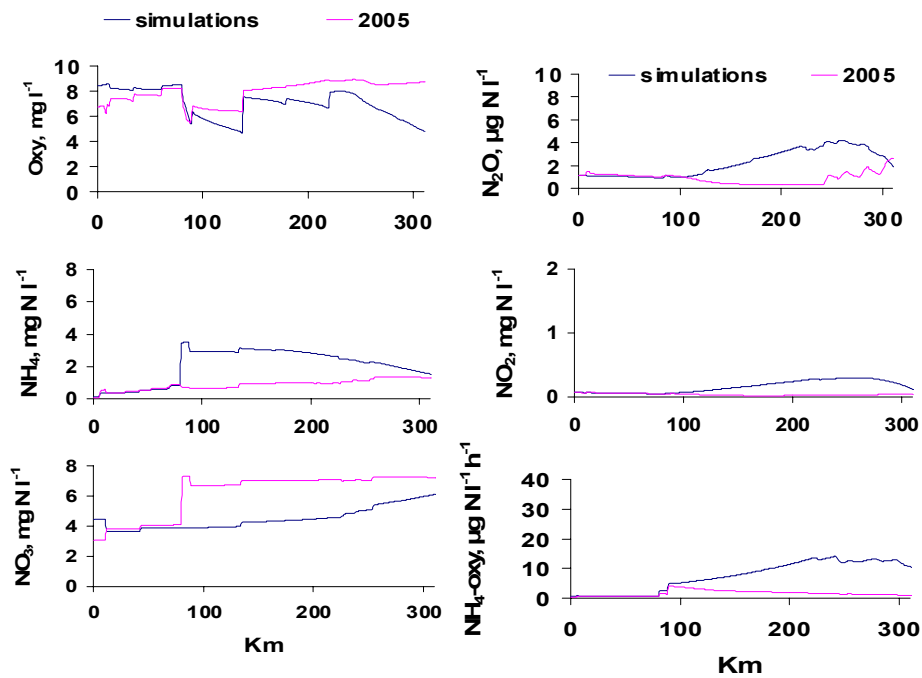
A ce stade de l'étude, il existe une bonne concordance entre les observations et les simulations par le modèle. Ces simulations seront de toute évidence améliorées en tenant compte des situations hydrologiques réelles, que nous n'avons pas encore.

Nous avons toutefois 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 14). 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 14.** 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.

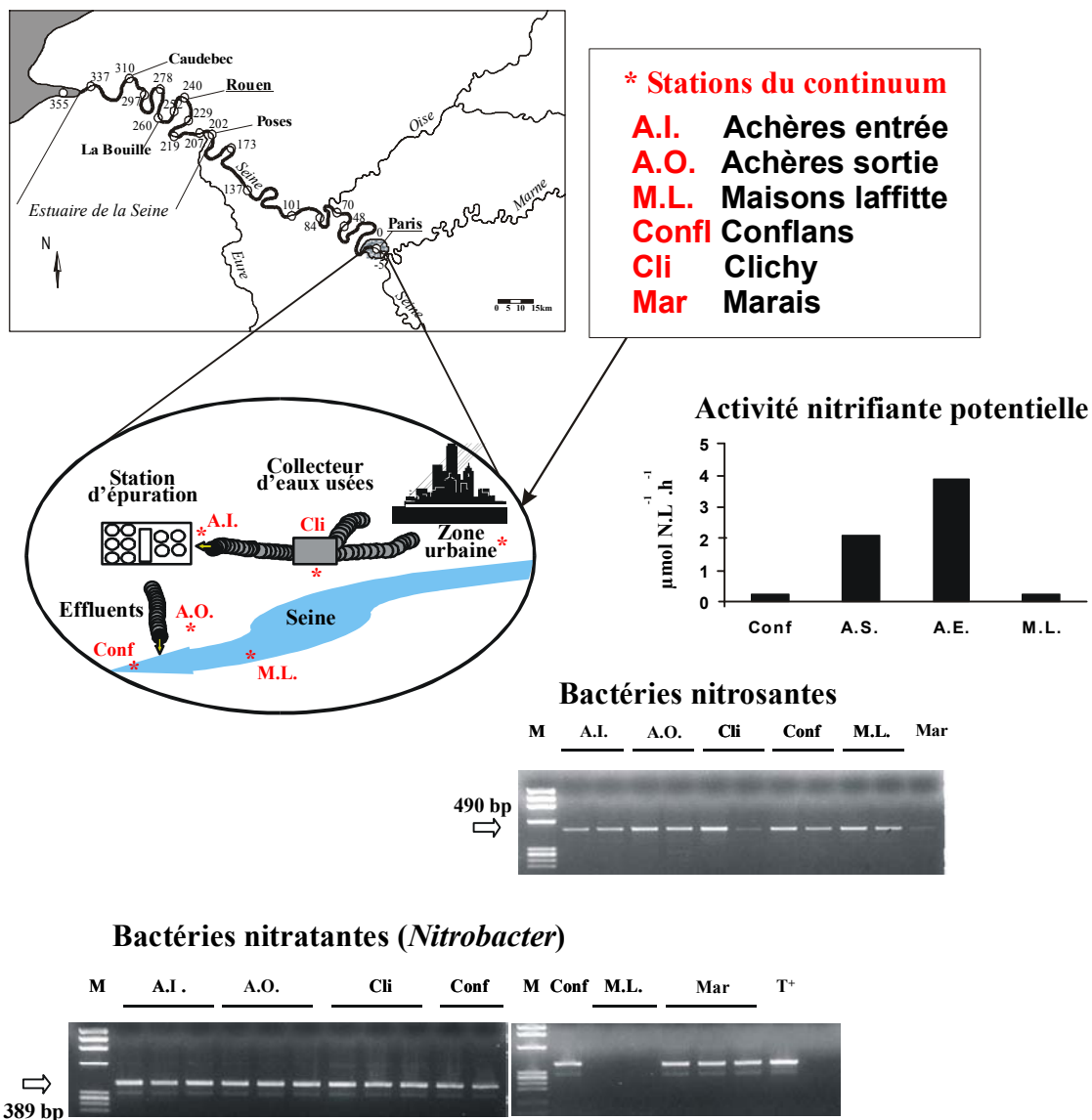


**Figure 15.** Simulation par le modèle de l'oxygène, des formes de l'azote et de l'activité nitrifiante dans la Seine de Paris à Caudebec pour des conditions de 2005, en référence à la simulation présente.

### 4.3. Approche moléculaire pour appréhender les étapes de la nitrification

#### 4.3.1. Détection des bactéries nitrosantes et nitratantes dans les effluents.

Comme la production de  $N_2O$  résulte en partie d'un déséquilibre entre l'activité des bactéries nitrosantes et nitratantes, avec accumulation de  $NO_2$  nous avons *détecté* et *quantifié* ces deux groupes dans les échantillons prélevés dans le continuum. Les bactéries nitrosantes et nitratantes sont détectées par amplification PCR dans tous les échantillons (Figure 16). 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 nitratantes du genre *Nitrobacter*. Ces bactéries sont également présentes dans la rivière. Les résultats obtenus au cours de cette année confirment les précédentes investigations (rapport 1999). Il apparaît ainsi que les bactéries nitrifiantes sont déjà présentes dans les têtes du réseau collecteur des eaux usées. Leur origine reste à préciser mais la présence de bactéries du genre *Nitrosomonas* dans des biofilms prélevés dans de tels collecteurs a déjà été démontrée (Okabe *et al.*, 1999).



**Figure 16.** Détection des bactéries nitrosantes et nitratantes par PCR dans les prélèvements des effluents bruts et traités.

La quantification a été mise au point au cours de l'exercice 1999 et effectuée sur un certain nombre de prélèvements (Berthe *et al.*, 2000, Rapport 1999). Il a été ainsi possible d'estimer à  $4,8 \cdot 10^7$  bactéries par litre le nombre de nitrosantes au niveau du quartier du Marais suggérant à nouveau la présence de bactéries nitrifiantes dans les eaux usées. Au cours de cette année 2000, nous avons plus particulièrement analysé la diversité des nitrosantes, qui selon nos hypothèses de modélisation sont les bactéries qui réalisent les étapes d'oxydation de l'ammonium, mais aussi de réduction du nitrite et du  $N_2O$  (processus de nitrification dénitrifiante).

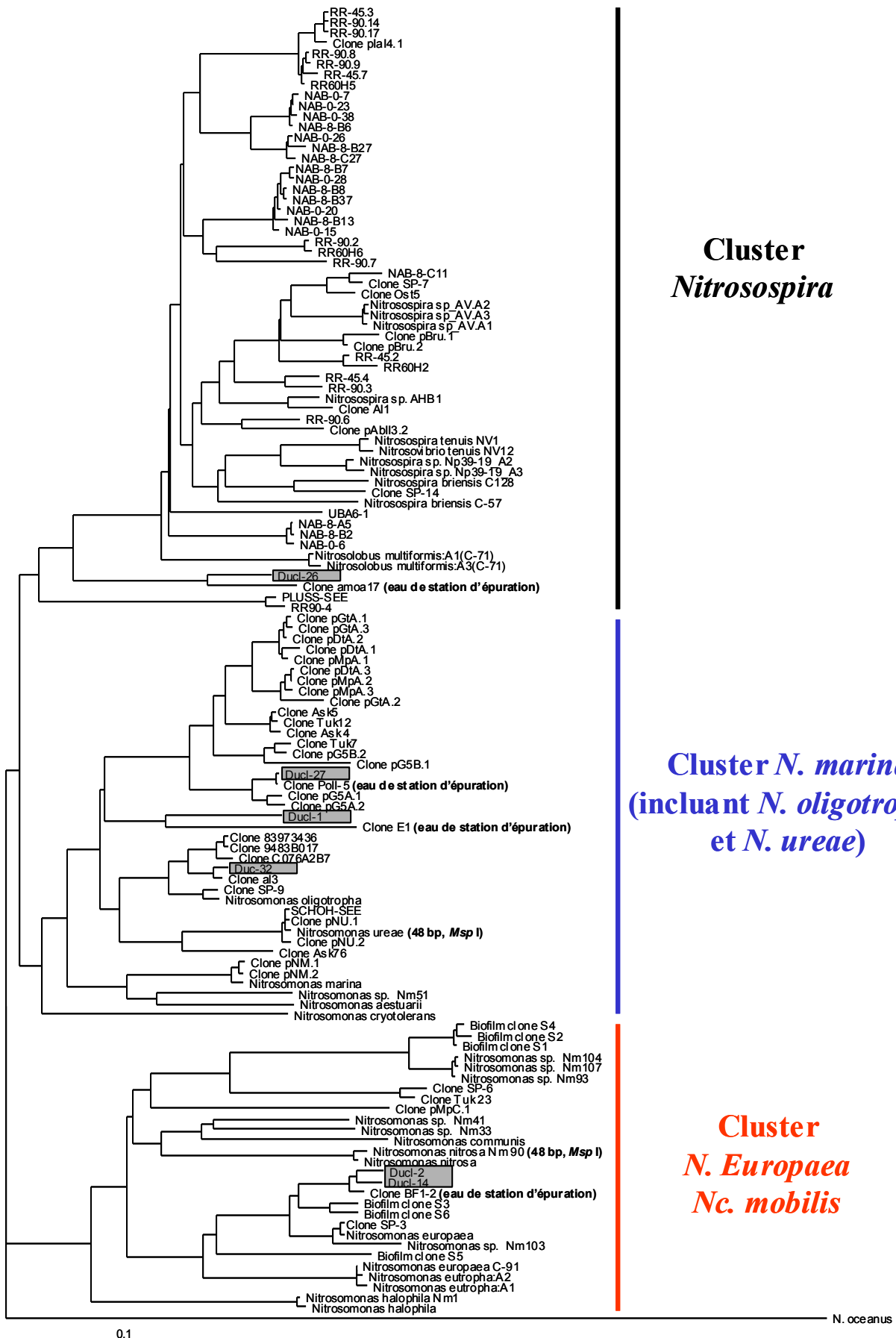
#### 4.3.2. Evaluation de la diversité des bactéries nitrosantes

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 nitrosante. 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.

Le travail réalisé au cours de l'exercice précédent avait montré que les clones *amoA* obtenus pouvaient être regroupés en douze profils de restriction différents (rapport 1999). 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 *et al.*, 1993). L'arbre phylogénétique (Figure 17) présenté 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).

**Tableau 6.** 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 PoII-5</i>	AF272474	Eaux usées de STEP Purkhold <i>et al.</i> , 2000
<b>Ducl 32</b>	> 98 %	Bactérie non cultivée <i>Clone a13</i>	AF239879	Biofilm de STEP Dong <i>et al.</i> , 2000



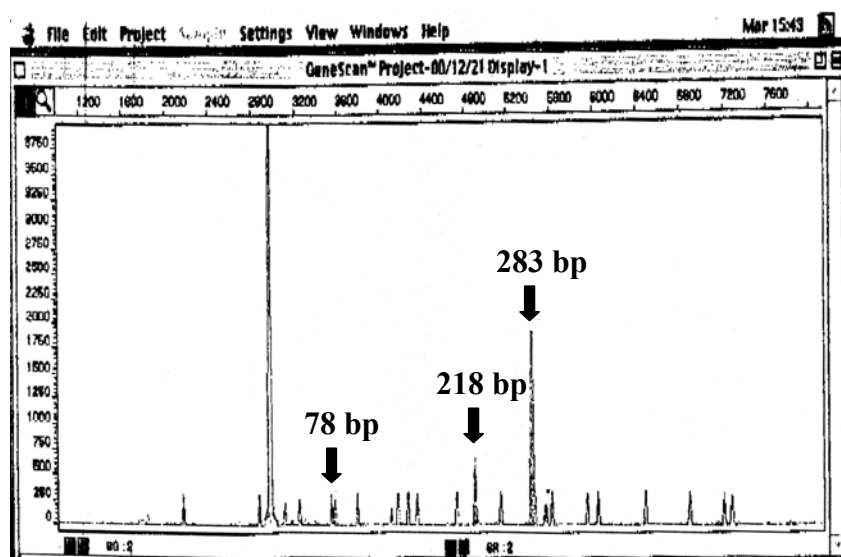
**Figure 17.** Positionnement des séquences *amoA* obtenues dans ce travail (séquences encadrées) parmi d'autres séquences provenant de bactéries nitrosantes cultivables ou provenant de différents échantillons de l'environnement (données GenBank).

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 6) ont été obtenues avec des clones *amoA* provenant d'échantillons d'eaux usées de stations d'épuration (Pukhold *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 indiquent que les bactéries nitrosantes identifiées dans la Seine proviennent de rejets de stations d'épuration.

#### 4.3.3. Evaluation de la diversité des bactéries nitrosantes en plusieurs points du continuum.

Il apparaît donc que des bactéries nitrosantes et nitrifiantes sont présentes dans les collecteurs d'eaux usées mais également que les rejets de stations d'épuration sont source de bactéries nitrifiantes. Afin de mieux comprendre l'implication des bactéries nitrosantes dans la production de N<sub>2</sub>O, il est nécessaire tout d'abord de caractériser et d'évaluer la dynamique de cette communauté le long de son cheminement dans le continuum.

L'approche classique précédemment utilisée est basée sur le clonage et le séquençage des produits *amoA* amplifiés. Nous avons voulu dans un premier temps utiliser une autre stratégie basée sur une caractérisation plus rapide des produits PCR : l'analyse T-RFLP dont le principe est analogue à la RFLP présentée dans le rapport 1998. Dans cette technique, le gène cible *amoA* est amplifié en utilisant une amorce couplée à une molécule fluorescente en 5' (amorce *amoA*-1F couplée en 5' HEX, Eurogentec). Les produits d'amplification obtenus sont ensuite digérés par une enzyme de restriction *Msp* I et analysés par un séquenceur automatique. Seul le fragment de restriction comprenant l'oligonucléotide modifié est détecté. Cette approche a été décrite par Horz *et al.* (2000). Nous avons appliqué cette méthode à la caractérisation de la communauté nitrosante d'un échantillon prélevé dans la station d'Achères (Figure 18).



**Figure 18.** Analyse des produits d'amplification *amoA* (échantillon de station d'épuration) par T-RFLP (profil obtenu par l'enzyme *Msp* I).

Trois pics majeurs correspondant aux fragments *amoA* générés sont identifiés par une flèche sur le chromatogramme; les autres signaux correspondant à des marqueurs de taille moléculaire. Deux des pics observés (218 et 283 bp) correspondent respectivement à des séquences *amoA* de clones présents dans les clusters *Nitrospira* (pic à 283 bp) et *Nitrosomonas europaea* (pic à 218 bp).

Cependant cette approche n'est pas assez discriminative puisque des fragments générés par l'enzyme de restriction *Msp* I peuvent avoir une même taille bien que provenant de genre nitrosants assez éloignés d'un point de vue phylogénique (par exemple *Nitrosomonas nitrosa* Nm90 et *Nitrosomonas ureae* Nm10 génèrent le même fragment de 48 bp après digestion par l'enzyme *Msp* I, Figure 17; voir aussi Purkhold *et al.*, 2000). Les résultats obtenus permettent d'estimer la proportion des genres *Nitrosomonas* et *Nitrospira* d'une communauté nitrosante. Cette approche doit donc être améliorée en utilisant une autre enzyme de restriction qui soit plus représentative des clusters obtenus sur l'arbre phylogénétique.

Parallèlement, nous avons également utilisé la technique de SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*) afin de caractériser le polymorphisme des fragments *amoA* amplifiés à partir de différents échantillons du continuum. Des résultats préliminaires obtenus (à l'aide de cette technique) montrent, entre autre, des modifications importantes de la communauté nitrosante entre la sortie d'Achères et la sortie du pilote BIOFOR (données non montrées). L'analyse de différents échantillons prélevés le long du continuum sera réalisée.

## 5. Conclusion et perspectives

Les expériences menées depuis 1998 sur les effluents des stations ont montré une variabilité importante de la qualité des effluents, qu'il était important d'inclure dans le modèle du fonctionnement écologique. Les nombreuses campagnes réalisées en 2000 permettent de proposer une gamme de variations des valeurs.

En étudiant les pilotes BIOFOR et BIOSTYR ainsi que la station de Colombes, nous avons pu mettre en évidence que le traitement de la nitrification en station n'était pas nécessairement une source plus importante de bactéries nitrifiantes pour la rivière, par comparaison aux traitements sans nitrification.

L'analyse des résultats étendue aux valeurs fournies par le SIAAP a permis de préciser la valeur de la charge spécifique par habitant.

Les méthodes moléculaires mises au point en 1999, ont permis de pousser plus loin l'analyse des nitrosantes et de leur diversité. Il apparaît à ce stade que la communauté présente dans la Seine soit assez restreinte et originaire des effluents de station. Elles ont permis aussi de formuler des hypothèses sur les processus intermédiaires de la nitrification et d'élaborer un modèle conceptuel, toutefois formalisé dans le modèle RIVE, qu'il faudra vérifier expérimentalement. A ce stade, le modèle (RIVE et SENEQUE, i.e. MODESTE à l'aval de Paris) fournit des simulations cohérentes des formes de l'azote, nitrite et N<sub>2</sub>O compris. 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 du programme, il s'agit de fournir un outil pour tester les politiques d'aménagement de la station d'Achères. Des tests de sensibilité tenant compte de la variabilité observée permettront de connaître les limites de l'outil.

## 6. Références bibliographiques

- 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
- Berthe T., Garnier J. Nitrification in the lower Seine River and estuary: ecological and molecular approach. Appl. Environ. Microbiol. (soumis).
- Billen G., Garnier J., Deligne C, Billen C. (1999). Estimates of early-industrial inputs of nutrients to river systems : implication for coastal eutrophication. Sci. Total Environ. **243-244**: 43-52.
- 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., 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.
- Horz H.P., Rotthauwe J.H., Lukow T., Liesack W. (2000). Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of *amoA* PCR products. J. Microbiol. Methods **39(3)**, 197-204.
- 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
- 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.
- Simon M., Azam F. (1989). Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. Mar. Ecol. Prog. Ser. **51**, 201-213.
- Stephen J.R., McCaig A.E., Smith Z., Prosser J.I., Embley T.M. (1996) Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **62**, 47-54.
- 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.