HAL
open science

Nitous oxide emissions during nitrogen removal in wastemater treatment plant - The parisian conurbation

Gaëlle Tallec

To cite this version:

Gaëlle Tallec. Nitous oxide emissions during nitrogen removal in wastemater treatment plant - The parisian conurbation. Chemical Sciences. Ecole des Ponts ParisTech, 2005. English. NNT : 2005ENPC0027 . pastel-00001652

HAL Id: pastel-00001652

https://pastel.hal.science/pastel-00001652

Submitted on 6 Apr 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Mémoire de thèse présenté pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'ÉCOLE NATIONALE DES PONTS ET CHAUSSÉES

Spécialité : Sciences et Techniques de l'Environnement

ÉMISSIONS D'OXYDE NITREUX LORS DU TRAITEMENT DE L'AZOTE EN STATION D'ÉPURATION
Agglomération parisienne

Par

Gaëlle TALLEC

Thèse soutenue le 17 novembre 2005 devant le jury composé de :

Jean-Marie	MOUCHEL	Président
Josette	GARNIER	Directrice de thèse
Nicolas	BERNET	Rapporteur
José	MARTINEZ	Rapporteur
Michel	GOUSAILLES	Examinateur
Roger	PUJOL	Examinateur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Josette Garnier d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse et de m'avoir encadrée et soutenue durant toute la durée de ce travail. J'ai beaucoup appris à ses côtés et grâce à ses conseils. Je remercie également Gilles Billen pour ses conseils et son encadrement.

Je remercie la direction de la DRD et du SIAAP pour m'avoir fait confiance et avoir bien voulu financer ce travail. Je les remercie aussi pour leur soutien technique et leur expérience.

Je suis particulièrement reconnaissante envers l'ensemble des membres du Jury d'avoir accepté de juger mon travail. Je remercie Jean-Marie Mouchel d'avoir présidé le jury, Nicolas Bernet et José Martinez pour leur travail de rapporteur ainsi que Michel Gousailles et Roger Pujol pour leur présence en tant qu'examinateur.

Je tiens à remercier chaleureusement Bernard Védry qui m'a épaulé et encouragé et sans qui rien n'aurait été possible.

Je remercie également Daniel Melet et Elisabeth Moncault, de l'Unité 1 de la DRD du SIAAP. Leur compétence et leur amitié m'ont permis de mener à bien et jusqu'au bout ce travail.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui travaillent ou ont travaillé au sein de l'Unité 1, mais également tout le personnel de la DRD, et notamment du laboratoire d'analyses, sans qui ce travail d'équipe n'aurait pu avancer. Je remercie également le personnel des différentes usines d'épuration du SIAAP pour leur collaboration.

Enfin, je remercie tout particulièrement Olivier Le Vaillant, ma famille et mes amis, pour leur aide, leur soutien et leur affection durant toute cette période de dur labeur.

Sommaire

Introduction générale 7
Chapitre 1 - État des connaissances 11
1.1 Le N_2O, gaz à effet de serre 11
1.2 Cycle de l'azote 16
1.3 Perturbation du cycle de l'azote 21
1.4 Traitement de l'azote des eaux résiduaires urbaines 23
1.5 Nitrification, dénitrification et émissions d'oxyde nitreux 33
1.6 Techniques d'étude des bactéries et de leur activité 64
1.7 Références 72
Chapitre 2 - Sites d'étude et méthodologie générale 87
2.1 Sites d'étude 87
2.2 Méthodologie générale 98
2.3 Références 115
Chapitre 3 - Nitrogen behaviour and nitrous oxide emission in the tidal Seine River estuary (France) as influenced by human activities in the upstream watershed 119
3.1 Introduction 120
3.2 Material and methods 121
3.3 Results 124
3.4 Discussion 133
3.5 References 137
Chapitre 4 - Nitrous oxide emissions from secondary activated sludge in nitrifying conditions of urban wastewater treatment plants: effect of oxygenation level 143
4.1 Introduction 144
4.2 Material and methods 145
4.3 Results 149
4.4 Discussion 155
4.5 References 157
Chapitre 5 - Nitrous oxide emissions from denitrifying activated sludge of urban wastewater treatment plants, under anoxia and low oxygenation 161
5.1 Introduction 162
5.2 Material and methods 163
5.3 Results 168
5.4 Discussion 174
5.5 References 177
Chapitre 6 - Traitement de la pollution azotée en station d'épuration par filtres biologiques immergés : Emissions d'oxyde nitreux lors de la nitrification et dénitrification 181
6.1 Introduction 183
6.2 Matériel et Méthodes 184
6.3 Résultats 189
6.4 Discussion 193
6.5 Références 197
Chapitre 7 - Emissions d'oxyde nitreux lors du traitement de l'azote des eaux usées de l'agglomération parisienne: état actuel et prévisions 201
7.1 Introduction 203
7.2 Le bassin de la Seine et les émissions de N_2O 204
7.3 Les stations d'épuration de l'agglomération parisienne et les émissions de N_2O 206
7.4 Discussion 212
7.5 Références 215
Chapitre 8 - Conclusions et perspectives 219
8.1 Les émissions de N_2O en stations d'épuration lors du traitement de l'azote 219
8.2 Les processus d'émissions du N_2O lors de la nitrification et de la dénitrification 222
8.3 Bilan global des émissions de N_2O et leur évolution 224
8.4 Perspectives 225
8.5 Références 226
Annexes 227

Introduction générale

L'oxyde nitreux (N_2O) est un gaz à effet de serre ayant un impact important sur l'environnement. Son potentiel de réchauffement est 320 fois plus élevé que celui du dioxyde de carbone (CO_2) et sa durée de vie est d'environ 120-150 ans (IPCC, 2000). De plus, au niveau de la stratosphère, le N_2O réagit avec un atome d'oxygène et donne de l'oxyde nitrique (NO), gaz destructeur de la couche d'ozone stratosphérique (Bliefert & Perraud., 2001). La production d'oxyde nitreux, par l'intensification de l'agriculture, les traitements de l'azote des eaux domestiques usées, la pollution industrielle etc., est donc indésirable.

L'oxyde nitreux n'existe à l'état naturel dans l'atmosphère qu'en très faible concentration, mais celle-ci augmente actuellement au rythme d'environ 0.3 % par année. Depuis le début de l'ère industriel, la concentration d'oxyde nitreux a augmenté de plus de 15 % (Bliefert & Perraud., 2001). Ce gaz à effet de serre, retient désormais l'attention de la communauté scientifique concernée par les changements climatiques globaux. Sa stabilisation au taux actuel de 311-313 ppb nécessiterait une réduction des émissions anthropogéniques de plus de 50 % (CITEPA, 2003). La source anthropique principale d'oxyde nitreux est l'agriculture (71 % des sources totales du N_2O) à travers les processus de nitrification et de dénitrification (Gouvernement du Canada, 2001).

Cependant, plusieurs études (Seitzinger & Kroeze 1998; De Wilde & de Bie, 2000; Bouwman et al. 2002; Garnier et al. 2005) ont montré que la production de N_2O, par les rivières anthropisées et les estuaires notamment, n'est pas négligeable. Ainsi, dans la Seine, les émissions de N_2O sont estimées entre 90 et 200 kgN j^{-1} pour tout le secteur fortement concerné par la nitrification de l'ammonium (de l'amont de Paris à l'estuaire), (Garnier et al., 2005) ; or cet ammonium est issu notamment des rejets des stations d'épuration de la région parisienne qui ne traitent encore que marginalement la pollution azotée.

Toutefois, la directive européenne 91 / 271, impose pour 2005 la mise en place d'un traitement secondaire pour les agglomérations de plus de 2000 Equivalent Habitants et, d'ici 2012, l'élimination de la pollution azotée et phosphorée pour les zones sensibles. Dans cette perspective, l'usine de traitement des rejets Seine Aval (Achères) du SIAAP (Syndicat d'Assainissement de l'Agglomération Parisienne), qui reçoit les deux tiers des eaux usées de l'agglomération parisienne, traitera en 2007 100 % des rejets azotés en nitrification et 30 % en dénitrification, cette dernière devant atteindre 100 % en 2015. Des modifications sont aussi prévues sur les autres stations d'épuration traitant le tiers restant des effluents. De plus, la construction de deux nouvelles usines, comportant un traitement de l'azote, achèvera la modernisation des installations traitant les rejets de l'agglomération parisienne.

On peut donc penser qu'une partie des émissions de N_2O de la basse Seine, serait déplacée vers les stations d'épuration de l'agglomération parisienne lorsqu'elles élimineront la pollution azotée avant rejet. Il s'agit donc de savoir, à travers ce travail, si le traitement de l'azote en station sera accompagné de changements notables des émissions totales de N_2O (accroissement ou réduction).

Dans l'ensemble, le meilleur moyen de réduire les émissions de N_2O consiste à gérer le cycle de l'azote plus efficacement. Or, à l'heure actuelle, l'estimation des émissions d'oxyde nitreux n'est qu'approximative, compte tenu des connaissances limitées sur la formation et la libération de ce dernier. Une gestion efficace ne peut se faire qu'avec l'identification et la compréhension préalable de(s) processus responsable(s) de ces émissions.

Une meilleure compréhension de ces mécanismes est encore nécessaire pour préciser les émissions d'oxyde nitreux, au niveau des stations d'épuration, du SIAAP notamment, mais aussi pour les représenter mathématiquement dans le modèle de fonctionnement écologique du programme Piren - Seine (Riverstrahler : Billen et al., 1994 ; Billen & Garnier, 1999 ; Garnier et al., 2005). Ces formulations mathématiques d'émission de N_2O pourront être appliquées à l'ensemble du bassin de la Seine, mais également réutilisées pour alimenter d'autres types de modèles mathématiques, à l'échelle globale par exemple. En effet, afin de prendre les décisions les plus pertinentes en matière d'adaptation et de réduction future des émissions (post – Kyoto), il faut disposer de renseignements supplémentaires, fondés sur des recherches plus poussées. Le but est ici d'améliorer les études fondamentales et d'apporter de nouveaux éléments aux modèles numériques.

L'étude menée ici devrait également permettre de recommander des perfectionnements d'exploitation pour les procédés d'épuration et de fournir les éléments techniques permettant la réduction des émissions d'oxyde nitreux, lors du traitement de l'azote en station d'épuration.

Ce travail de thèse de doctorat a donc pour objectifs :

- D'estimer les émissions d'oxyde nitreux lors du traitement de la pollution azotée au niveau des stations d'épuration de l'agglomération parisienne.

- D'améliorer les connaissances relatives aux processus de production du N_2O, lors de ces traitements.

- D'évaluer la part des émissions d'oxyde nitreux par les traitements de l'azote, actuels et futurs, au niveau des stations d'épuration de l'agglomération parisienne, par rapport à celles relatives à l'échelle du bassin de la Seine.

Ce mémoire est présenté en quatre parties :

- La première partie récapitule l'état des connaissances relatives au sujet traité. Cette synthèse bibliographique restitue d'abord les quantités de N_2O émis et leurs nuisances. Le N_2O est ensuite considéré dans le cycle de l'azote dont il fait partie. Outre les généralités sur la nitrification et la dénitrification, les processus producteurs de N_2O sont présentés. Ce chapitre inclut également une présentation générale du traitement de la pollution azotée en stations d'épuration. Enfin, les différentes techniques permettant l'étude des bactéries, principales actrices du cycle de l'azote, et de leur activité sont décrites.

- Le site d'étude (le bassin de la Seine et les stations d'épuration de l'agglomération parisienne) fait l'objet de la deuxième partie ; la méthodologie utilisée pour mener à bien nos objectifs y est aussi introduite.

- Les résultats de cette étude sont présentés dans une troisième partie, subdivisée en plusieurs chapitres, dont chacun est constitué d'un article paru ou soumis. Il s'agit 1) d'un bilan des émissions de N_2O au niveau de la Seine, des émissions de N_2O sur boues activées secondaires lors 2) de la nitrification et 3) de la dénitrification, 4) des émissions de N_2O sur cultures fixées en traitement tertiaire et enfin 5) des flux d'oxyde nitreux émis par le traitement de l'azote des eaux usées de l'agglomération parisienne à l'état actuel du traitement et pour les prévisions 2005-2007 et 2008-2012.

- Les conclusions de cette étude et ses perspectives seront exposées dans une dernière partie.

Chapitre 1
-
État des connaissances

1.1 Le N_2O, gaz à effet de serre

Le monoxyde de diazote appelé aussi protoxyde d'azote ou oxyde nitreux (N_2O) est un gaz incolore (masse spécifique : 1.997 g/l à 0°C, sous 1013 hPa), non toxique et peu soluble dans l'eau (à 20°C et à 1013hPa : 670ml/l).

Parmi les nombreux oxydes d'azote, le N_2O, a une grande importance pour la chimie de l'environnement, avec les NO_x représentés par le monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO_2). Pourtant, malgré les quantités importantes de N_2O présentes dans l'atmosphère, (300 ppb contre 10 ppb pour les NO_x dans l'air pollué), on parle avant tout des NO_x à propos de la pollution de l'air. En effet :

- les NO_x sont toxiques alors que le N_2O ne l'est pas.
- les NO_x participent aux réactions photochimiques au niveau de la troposphère, alors que le N_2O participe aux réactions photochimiques seulement au niveau de la stratosphère.
- la durée de vie des NO_x est de l'ordre d'une journée, contre 120-150 ans pour le N_2O. Ils sont donc plus significatifs d'une pollution de l'air anthropique récente, que le N_2O.

En fait, les NO_x et le N_2O, n'interviennent pas au même niveau, ni sur la même échelle de temps. Les NO_x sont une pollution directe et courte avec des effets directs au niveau régional, alors que le N_2O représente une pollution globale avec des effets au niveau climatique, aux échelles mondiale et séculaire. C'est un gaz à effet de serre, qui participe également à la destruction de la couche d'ozone dans la stratosphère.

L'effet de serre est un phénomène naturel lié à l'absorption des rayonnements Infra Rouge (IR) de grande longueur d'onde (Figure 1). Ces derniers, naturellement renvoyés par la surface terrestre, peuvent être absorbés par des composés présents dans l'atmosphère, les gaz à effets de serre (GES). Une partie du rayonnement IR n'est alors pas renvoyé vers l'espace. Il y a absorption d'énergie, transformée en chaleur. La plupart de ces composés sont présents à l'état naturel, ce qui a permis le développement et le maintien de la vie sur Terre. La température moyenne sur Terre est de 15°C. Si l'effet de serre naturel n'existait pas, la température moyenne serait de - 18°C.

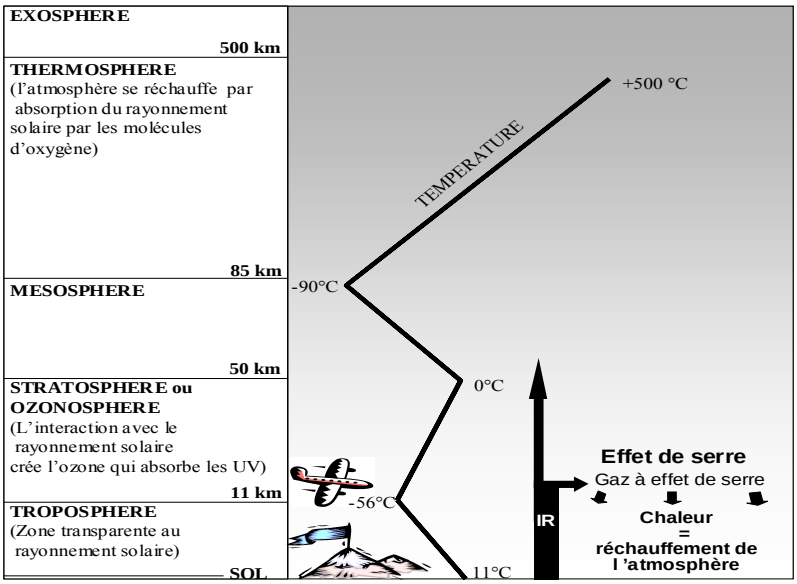


Figure 1 Structure de l'atmosphère et phénomène de l'effet de serre.

Le potentiel de réchauffement d'un gaz (forçage radioactif), dépend de sa capacité d'absorption et de reémission du rayonnement ainsi que de la durée de l'effet. Les potentiels de réchauffement du CH_4 (méthane) et du N_2O sont respectivement 21 et 310 fois plus élevés que celui du CO_2. Treize pour cent du potentiel de réchauffement global (PRG) en France métropolitaine serait dû au N_2O (C.I.T.E.P.A, 2003) (Figure 2). Le CH_4 a une durée de vie d'environ 12 ans, le N_2O de 120-150 ans et le CO_2 de 200 ans (CNCCP, 1999). Le N_2O est donc un gaz à effet de serre extrêmement efficace qui persiste très longtemps dans l'atmosphère.

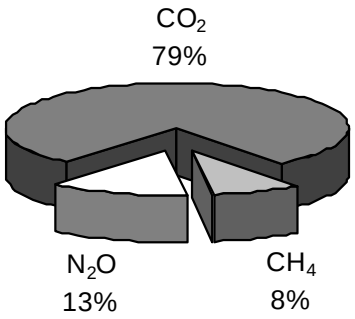


Figure 2. Contribution des différents gaz à effet de serre au potentiel de réchauffement global en 1998 pour la France métropolitaine, (C.I.T.E.P.A, 2003).

En plus de sa contribution à l'effet de serre, le N_2O, lorsqu'il est rejeté dans l'atmosphère, finit par se convertir en oxyde nitrique (NO), un gaz destructeur de la couche d'ozone (O_3). En effet, si dans la troposphère le N_2O est chimiquement inerte, au niveau de la stratosphère trois réactions de dégradation photochimique du N_2O peuvent se dérouler :

Le N_2O peut être détruit par photolyse directe :

$$N_2O \rightarrow N_2 + O^*$$

Il peut réagir de deux façons avec un atome d'oxygène excité, O* :

$$N_2O + O^* \rightarrow 2NO$$
$$N_2O + O^* \rightarrow N_2 + O_2$$

Le N_2O a ainsi une influence directe sur la production des oxydes d'azote (NO_x) dans la stratosphère et de ce fait, indirectement, sur la destruction de la couche d'ozone. Des résultats de modélisation ont montré qu'un doublement de la concentration de N_2O peut avoir pour conséquence une réduction de 10 % de la teneur en ozone, par la formation des NO_x qui ont un effet catalytique dans la stratosphère (Bliefert & Perraud, 2001).

L'analyse chimique de l'air, enfermé dans les carottes glacières polaires, apporte un témoignage sur le développement dans le temps de la teneur moyenne globale de N_2O dans la troposphère : la valeur préindustrielle se situe aux environs de 285 ppb - donc nettement au-dessous de la valeur actuelle de 310 ppb - ce qui correspond pour l'ensemble de l'atmosphère à une masse de 2350 10^6 TN. Depuis le début de l'ère industrielle, la concentration d'oxyde nitreux a augmenté de plus de 15 % (Figure 3). Globalement le N_2O est réparti de façon homogène, et sa teneur augmente actuellement au rythme d'environ 0.3 % par année.

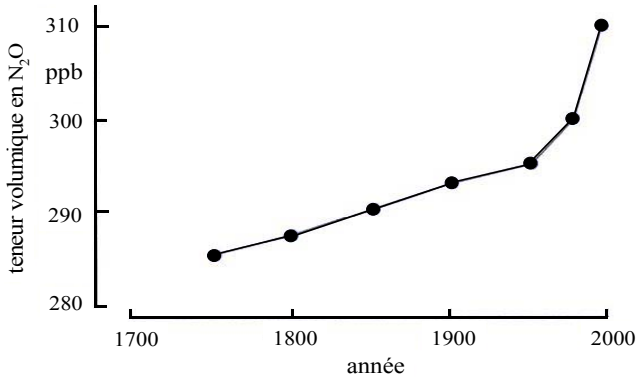


Figure 3. Teneur en N_2O dans l'atmosphère lors des dernières 250 année (Bliefert & Perraud, 2001).

L'oxyde nitreux est l'un des gaz à effet de serre dont la croissance d'émission est importante. Il fait ainsi partie des six gaz à effets de serre concernés par le protocole de Kyoto à la Convention Cadre des Nations Unies sur les Changements Climatiques (CCNUCC). La liste en est la suivante :

- Dioxyde de carbone (CO_2)
- Méthane (CH_4)
- Oxyde nitreux (N_2O)
- Hydrofluorocarbones (HFC)
- Hydrocarbures perfluorés (PFC)
- Hexafluorure de soufre (SF6)

Les principales sources anthropiques du N_2O sont l'énergie, les procédés industriels, l'utilisation de solvants et d'autres produits, l'agriculture (70 % des sources totales du N_2O à travers les processus de nitrification et de dénitrification) et les déchets dont le traitement des eaux usées (Protocole de Kyoto à la CCNUCC). Le traitement de l'eau représente à lui seul 94 % des émissions de N_2O provenant de la catégorie des déchets (Figure 4).

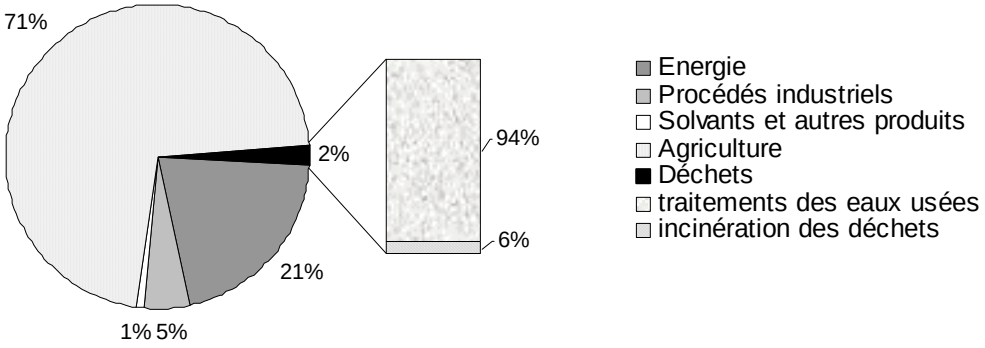


Figure 4. Les différentes sources anthropiques du N_2O, en pourcentage (Gouvernement du Canada, 2001).

Les émissions de N_2O incombent à 45 % aux pays européens, contre 39 % aux Etats-Unis et 2 % au Japon (Figure 5). Au sein de l'Union européenne (UE des quinze) on observe également une grande disparité entre les pays. La France présente le plus fort pourcentage d'émissions du N_2O, avec 23 % en 1998 (Figure 6).

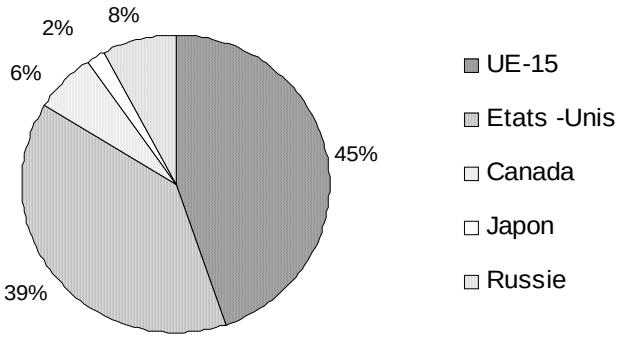


Figure 5. Répartition des émissions de N_2O pour différents pays en 1990 (CITEPA, 2003).

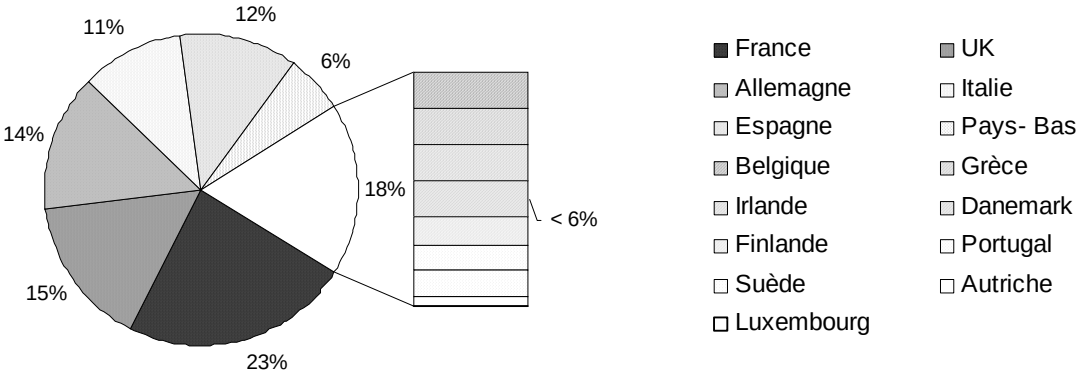


Figure 6. Répartition des émissions de N_2O en 1998 pour l'Union Européenne (des quinze), en pourcentage (CITEPA, 2003).

Au total, les effets polluants de l'oxyde nitreux se situent à une échelle globale, dans le temps et l'espace. Le N_2O contribue, au même titre que le méthane et le dioxyde de carbone, à un réchauffement global de la planète qui a (et aura) des conséquences importantes sur le climat.

D'après l'United Nations Framwork on Climate Change (UNFCC, 2003), le rapport 2001 du Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC), montre qu'une grande partie du réchauffement observé ces 50 dernières années est imputable aux activités humaines. Le GIEC prévoit en outre un réchauffement global de 1,4 à 5,8 degrés Celsius d'ici 2100 - l'évolution la plus rapide depuis la fin de la dernière ère glacière. *« Le niveau de la mer pourrait s'élever de 9 à 88 cm d'ici 2100, selon le GIEC, ce qui entraînerait une expansion des inondations sur les territoires côtiers et les îles de basse altitude (une élévation d'un mètre ferait migrer 70 millions de personnes au Bangladesh et submergerait 80 pour cent des Iles Marshall). L'eau salée pourrait s'introduire dans les rivières et les territoires côtiers, affectant l'approvisionnement en eau douce et la pêche. Les hauteurs de précipitations pourraient changer, augmentant les risques de sécheresses ou d'inondations. Un climat plus variable entraînerait des "évènements climatiques encore plus extrêmes". Des maladies tropicales comme la malaria pourraient se répandre à mesure que les moustiques et autres insectes porteurs se développeraient dans de nouveaux espaces. L'agriculture serait sérieusement affectée, entraînant une chute des productions agricoles dans de nombreuses régions. »*

Un des principes-clé de la Convention-cadre des Nations Unies sur les changements climatiques de 1992, ratifiée par 186 nations, est que les pays industrialisés donnent l'exemple dans la mesure où ils sont responsables de la plus grande partie des émissions passées et présentes. Les 41 pays industrialisés inscrits sur la liste Annexe I de la Convention (dont la France au sein de l'Union européenne) ont accepté d'atténuer les changements climatiques, notamment en soutenant les technologies non néfastes au climat. L'entrée en vigueur du Protocole de Kyoto le 16 février 2005 a inauguré une nouvelle ère dans la lutte contre le changement climatique. Pour les 25 Etats membres de l'Union européenne, comme pour les autres Etats engagés dans le Protocole, 2012 est devenue une date butoir : celle à laquelle les émissions de gaz à effets de serre devront être réduites, conformément aux objectifs convenus dans l'ancienne capitale nipponne.

C'est donc aussi dans cette optique, à l'échelle régionale du bassin de la Seine, que cette étude se propose d'évaluer les émissions d'oxyde nitreux, N_2O, généré par le traitement des eaux usées de l'agglomération parisienne.

1.2 Cycle de l'azote

Le cycle de l'azote est une succession de multiples transformations des composés azotés, via des processus pour la plupart microbiologiques. Ainsi l'azote est présent à différents degrés d'oxydation dans la nature et fait le va-et-vient entre les formes les plus oxydées et les plus réduites (Tableau 1).

Tableau 1. Quelques formes inorganiques du cycle de l'azote et leur degré d'oxydation.

Espèces	État d'oxydation	Noms communs
NH_3 (NH_4^+)	-3	Ammoniac / ammonium
NH_2OH	-1	Hydroxylamine
N_2	0	Diazote
N_2O	+1	Oxyde nitreux
NO	+2	Oxyde nitrique
NO_2^-	+3	Nitrite
NO_3^-	+5	Nitrate

Toutes les étapes du cycle de l'azote effectuées par des populations microbiennes spécifiques sont régulées par des contraintes environnementales déterminant en retour la distribution des différents composés azotés. Les principales formes minérales de l'azote sont, à l'état dissous dans les eaux, le N_2, NH_4^+, NO_2^- et le NO_3^-, à l'état gazeux dans l'atmosphère, le N_2, NH_3, N_2O et le NO_2^-. L'azote est aussi présent dans la biosphère sous forme de petites molécules organiques parfois directement assimilables par les végétaux ou par les micro-organismes (acides aminés, urée, acide urique…).

Les principales interactions entre les différentes formes existantes de l'azote sont représentées en Figure 7.

1.2.1 Fixation de l'azote

La fixation de l'azote atmosphérique peut être physico-chimique ou biologique :

- La fixation physico-chimique se fait par oxydation du N_2 en NO_2^- et NO_3^- via les éclairs d'orages rabattus à la terre par les pluies.
- La fixation biologique est conduite par les micro-organismes procaryotiques - bactéries symbiotiques des légumineuses (i.e. *Rhizobium*) ou bactéries libres (*Azotobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*…). L'azote moléculaire (N_2) est converti en ammoniac (NH_3) en présence de l'enzyme nitrogénase selon la réaction suivante : $N_2 + 6e^- + 6\ H^+ \Rightarrow 2\ NH_3$ (Mortenson et al., 1962 ; Bergersen, 1965). Chez certains organismes fixateurs d'azote, l'activité de la nitrogénase peut être rapidement inhibée par un apport d'ammonium dans le milieu (Fay, 1992), ou par un apport d'oxygène, et ce, même chez *Azotobacter,* espèce typiquement aérobie (Burk, 1930).

1.2.2 Ammonification (minéralisation de l'azote organique)

L'ammonification intervient dès lors qu'un organisme –végétal ou animal- meurt dans un écosystème. L'azote organique dont il est en partie constitué (et dont environ 40 % est sous forme protéique) va être progressivement re-minéralisé sous la forme d'ammonium. La qualité de la matière organique va déterminer la rapidité avec laquelle elle sera minéralisée. En fonction de sa complexité structurale, l'ammonification peut être une simple réaction de désamination ou une série de processus métaboliques complexes faisant intervenir des enzymes hydrolysant les polymères en composés monomériques. Cette minéralisation est un processus réalisé par un grand nombre de micro-organismes, et peut donc se faire sur une large gamme de conditions environnementales (pH, conditions redox, température…).

1.2.3 Nitrification

La nitrification est l'oxydation de l'ammonium (NH_4^+) en nitrate (NO_3^-) via le nitrite (NO_2^-). Ces réactions sont réalisées par deux groupes de micro-organismes autotrophes. La première étape conduit à la production de nitrite par les bactéries nitrosantes ou ammonium-oxydantes (AOB), et la deuxième, à la production de nitrate par les bactéries nitratantes ou nitrite-oxydantes (NOB), (Bock et al., 1986 ; Bock et al., 1992). La première étape est catalysée par l'ammonium mono-oxygénase où le NH_4^+ est oxydé en hydroxylamine (NH_2OH) avec la réduction de l'un des atomes d'oxygène (O_2) (Wood, 1986; Mc Tavish et al., 1993). NH_2OH est un intermédiaire qui est oxydé en NO_2^- par l'hydroxylamine oxydoréductase (Wood, 1986; Sayavedra-Soto et al., 1994). La deuxième étape est catalysée par la nitrite oxydoréductase sans intermédiaire détectable (Bock et al., 1986 ; Bock et al., 1992).

Il a été montré récemment, que les bactéries ammonium-oxydantes peuvent également effectuer une nitrification-dénitrifiante à de faibles concentrations en oxygène dans l'environnement, le nitrite jouant le rôle de l'oxygène comme accepteur final d'électron (Bock et al., 1995; Kuai & Verstraete, 1998; Jiang & Bakken., 1999; Itokawa et al., 2001). A la différence de la nitrification, les produits finaux sont ici des formes gazeuses de l'azote (N_2O, NO, N_2).

D'autres organismes tels que des bactéries hétérotrophes sont aussi capables d'effectuer une nitrification (Richardson et al., 1998) en condition aérobie, produisant du nitrate qui pourra être ensuite utilisé lors d'une dénitrification hétérotrophe dans des conditions favorables (Castignetti & Hollocher, 1984). Toutefois, le taux de nitrification des hétérotrophes serait plus faible que celui des autotrophes (Robertson & Kuenen, 1988). De plus, la nitrification hétérotrophe interviendrait préférentiellement sous des conditions différentes de la nitrification autotrophe, notamment dans un environnement à pH acide (Killham, 1986).

1.2.4 Réduction assimilatrice des nitrates

L'assimilation du nitrate est réalisée par un groupe hétérogène de bactéries (Lin & Stewart, 1998), champignons (Sengupta et al., 1996), algues (Solomonson & Vennesland, 1972) et plantes (Hagemann & Redd, 1980). En milieu oxygéné, la forme azotée la plus stable

au niveau thermodynamique est le nitrate et sa transformation en azote organique dans la matière vivante se fait classiquement selon la réaction suivante :

$$NO_3^- \rightarrow NH_4^+ \rightarrow R-C\left\langle \begin{matrix} NH_2 \\ \\ COOH \end{matrix} \right. \rightarrow \textit{protéines}$$

Au cours de l'assimilation, les nitrates doivent être préalablement réduits par deux enzymes : la nitrate-réductase ($NO3^- \Rightarrow NO_2^-$), puis la nitrite-réductase ($NO_2^- \Rightarrow NH_4^+$).

1.2.5 Réduction « dissimilative » des nitrates : dénitrification et nitrate ammonification

La dénitrification est un processus de respiration microbienne par lequel les nitrates sont utilisés comme accepteurs d'électrons durant l'oxydation anaérobie de la matière organique.

La dénitrification convertit le nitrate en azote gazeux (N_2O et N_2) à travers plusieurs étapes catalysées chacune par une enzyme spécifique. La capacité à dénitrifier est très largement distribuée au sein de différents groupes taxonomiques de bactéries hétérotrophes. Le processus de dénitrification est inductible (activité facultative) : il est contrôlé par le passage de conditions oxiques à des conditions anaérobies pour pratiquement tous les dénitrifiants (Baumann et al., 1996). En présence d'oxygène moléculaire ces bactéries ont un métabolisme aérobie, mais, en carence en oxygène, elles sont capables de maintenir leur activité respiratoire en utilisant le nitrate comme accepteur final d'électron. Même si des bactéries dénitrifiantes formant du N_2O comme principal produit final ont été caractérisées (Greenberg & Becker, 1977; Brettar & Höfle, 1993), le N_2O reste un intermédiaire de la dénitrification. Il peut toutefois, dans des conditions de faible oxygénation, être le produit final de la dénitrification au lieu du N_2 (Baumann et al., 1996; Robertson et al., 1995).

La nitrate ammonification correspond à la réduction des nitrates en ammonium suivant deux réactions, la réduction des nitrates en nitrites catalysée par une nitrate réductase, suivie d'une réduction des nitrites en ammonium via une nitrite réductase. Dans les milieux aquatiques très chargés en matière organique, les bactéries dénitrifiantes développent un mécanisme d'adaptation qui leur permet d'économiser ainsi les nitrates dissous (Jorgensen, 1989). Elles vont pour cela utiliser davantage le pouvoir d'accepteur d'électrons des nitrates en les réduisant en NH_4^+ plutôt qu'en N_2 (Jorgensen, 1989).

Les deux processus (dénitrification et nitrate ammonification) peuvent intervenir sous des conditions environnementales similaires (Tiedje et al., 1982), que sont l'anoxie ou les faibles concentrations en oxygène dissous (Dunn et al., 1979 ; Bonin et al., 1989). Toutefois, lorsque le milieu devient riche en nitrates, l'importance de la dénitrification augmenterait à nouveau au dépend de la réduction dissimilative (Jorgensen, 1989).

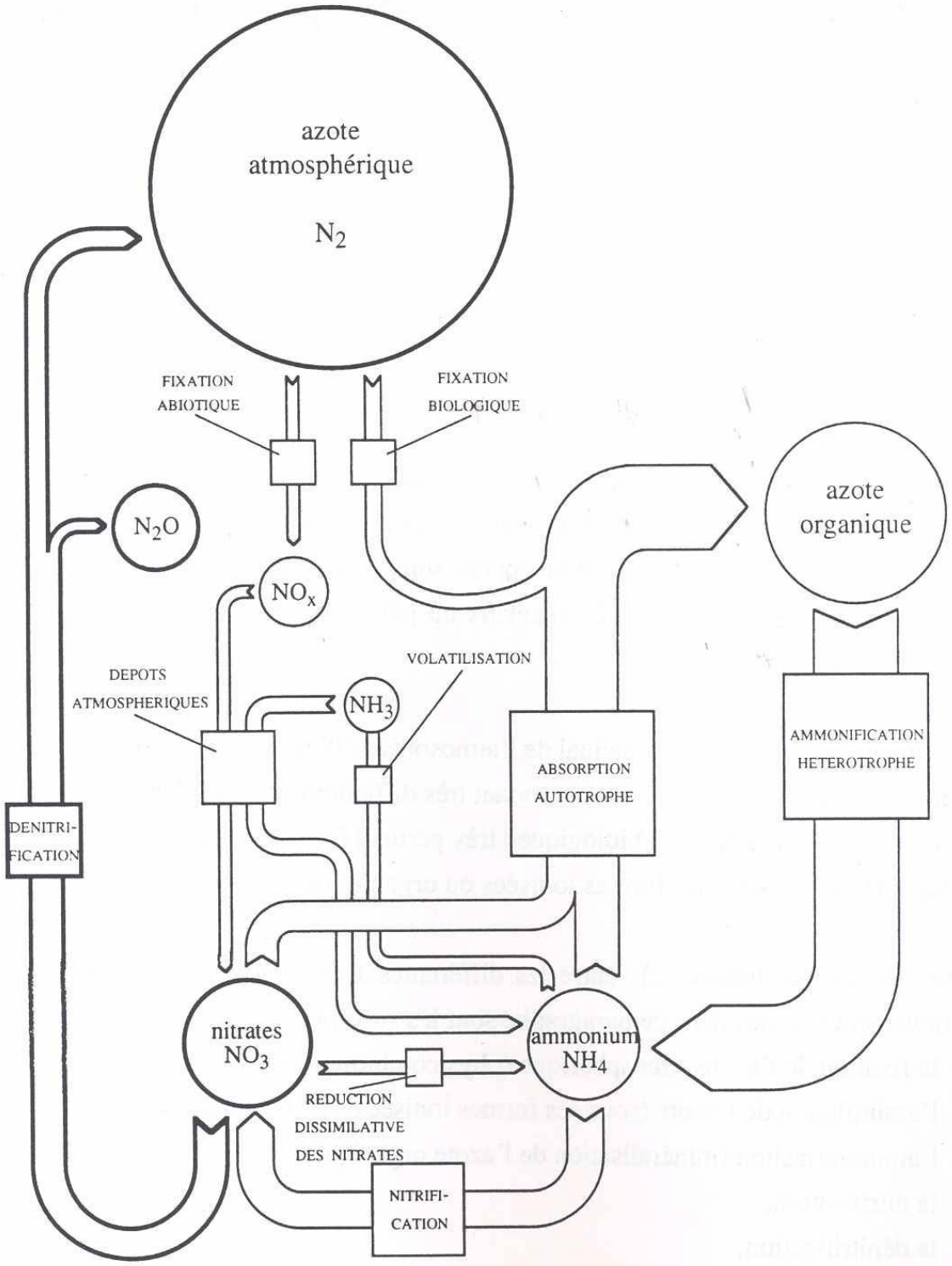


Figure 7. Schéma général des processus impliqués dans le cycle de l'azote (Billen & Garnier, 1999).

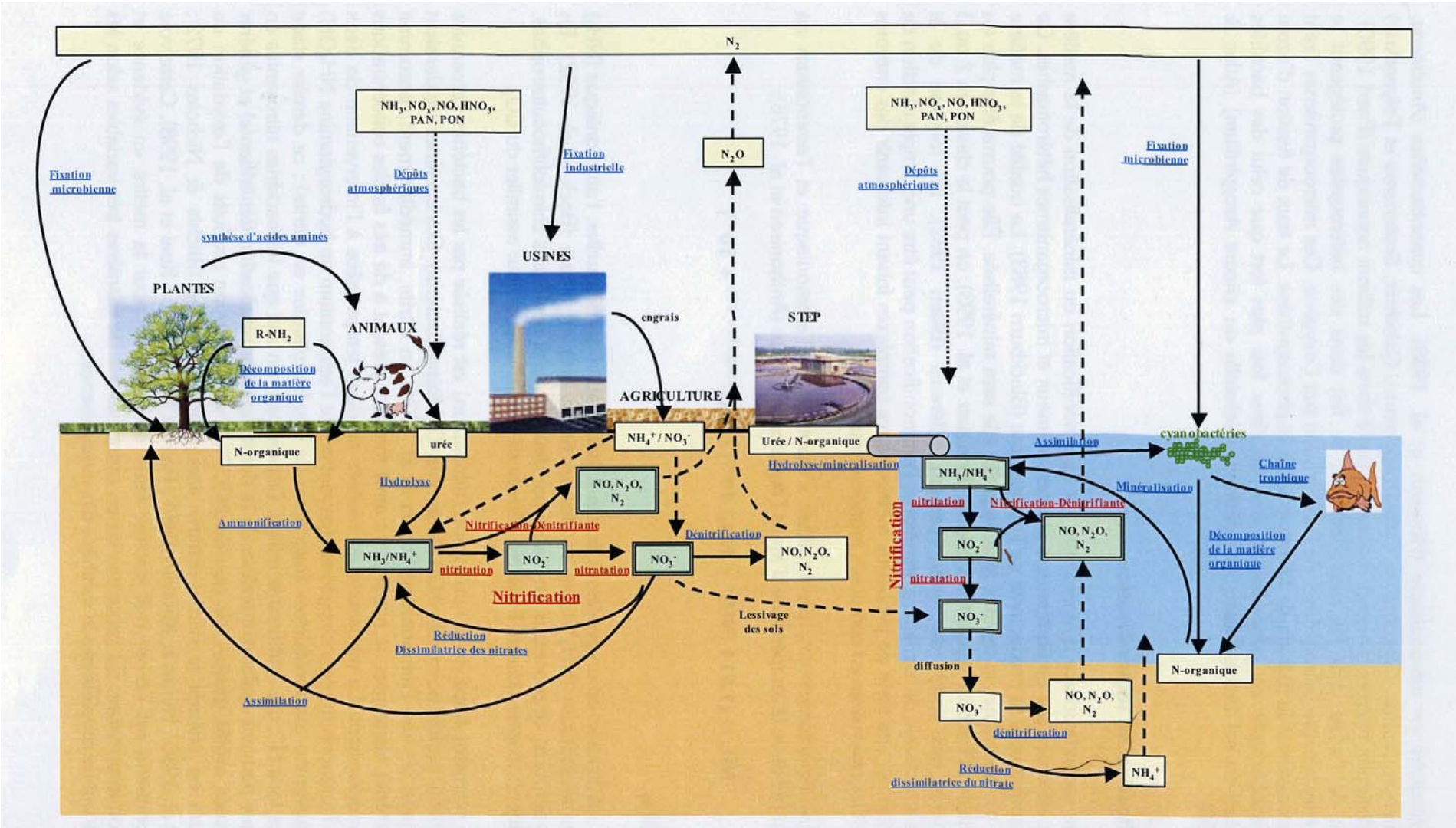


Figure 8. Cycle de l'azote montrant les connexions existant entre les milieux terrestres et aquatiques. PAN = peroxyacyl, PON = particule organic nitrogen. (Cébron, 2004)

1.3 Perturbation du cycle de l'azote

Les nombreuses transformations de l'azote permettent à cet élément de circuler entre le compartiment atmosphérique et les milieux terrestres et aquatiques, et de déterminer en partie la productivité écologique de ces habitats (Figure 8). Avant toute anthropisation, le cycle de l'azote était en équilibre entre la fixation d'azote atmosphérique (N_2) et sa production (via la dénitrification). Actuellement, les activités humaines influencent grandement ce cycle.

En milieux aquatiques, les apports anthropiques croissants augmentent constamment la quantité d'azote utilisable. Ces apports peuvent être des pollutions diffuses ou ponctuelles, d'origine urbaine ou agricole. Les pollutions ponctuelles sont souvent peu variables dans le temps (au niveau du volume et des concentrations déversées), elles sont facilement identifiables et quantifiables, et leur impact est plus marqué en période d'étiage estival, surtout lors des temps de pluie estivaux (Seidl et al., 1998). Au contraire les pollutions diffuses sont difficiles à caractériser dans l'espace et dans le temps car leurs quantités et qualités sont très variables (Thornton & Jeffrey, 1999), elles dépendent beaucoup des événements pluvieux et des interactions avec les aquifères.

Les activités humaines rendent compte actuellement de plus de la moitié de la fixation mondiale de l'azote (Vitousek et al., 1997), et le déversement de composés azotés dans les milieux aquatiques a considérablement augmenté. Les rejets d'eaux usées sont souvent la principale source locale de ces composés au voisinage des agglomérations, mais l'apport mondial demeure dû surtout aux rejets agricoles et aux dépôts atmosphériques. Ce sont dans les estuaires des fleuves d'Europe occidentale et d'Asie du Sud et de l'Est que se trouvent les concentrations les plus élevées d'azote inorganique en solution transporté par les fleuves (Seitzinger & Kroeze, 1998). Les niveaux d'azote sont encore accrus par la fréquente disparition d'écrans naturels tels que les zones humides côtières, les récifs coralliens et les forêts de mangrove.

L'azote est un nutriment essentiel à l'activité biologique dans l'eau. Cependant, au-dessus d'une certaine concentration, sa présence peut entraîner des problèmes sérieux de pollution.

D'abord, l'oxydation biologique du NH_4^+ (nitrification) entraîne une consommation d'oxygène dans le cours d'eau, au détriment des espèces animales qui seront affectées et risquent de disparaître (Metcalf et al., 1991). De plus, la vie aquatique peut être gravement atteinte pour des concentrations en azote ammoniacal de l'ordre de 2 mg L^{-1} à un pH de 7,4 à 8,5 (Agences de l'Eau et Ministère de l'Environnement, 1994). L'ammoniac non ionisé (NH_3) est particulièrement toxique pour les poissons, davantage que la forme ionisée.

Par ailleurs, l'azote peut constituer une gêne pour la potabilisation des eaux de surface. En effet, la présence de NH_4^+ entraîne une surconsommation de chlore dans le traitement de l'eau potable, alors qu'une eau chargée en nitrate est susceptible de provoquer la méthémoglobinémie chez le nourrisson (maladie du bébé bleu).

Jumelé au phosphore, l'azote peut également mener à des problèmes d'eutrophisation, menant à des croissances excessives d'algues indésirables. En plus de diminuer la concentration en oxygène dissous dans le cours d'eau, la biomasse algale constituant alors une pollution organique, la présence accrue d'algues rend l'eau peu attrayante, de couleur verte et

nauséabonde (Ramalho, 1983). L'eutrophisation marine et côtière résultant de l'importance des apports d'azote et de phosphore et d'un appauvrissement en silice (cf. Cugier et al., 2005 pour la Baie de Seine), est une tendance préoccupante, qui n'était pas perçue il y a 30 ans.

Il est de plus en plus prouvé que les efflorescences de phytoplancton, toxiques et/ou indésirables, sont de plus en plus fréquentes, graves et largement distribuées géographiquement (Richardson, 1997). Une grave eutrophisation s'est produite dans plusieurs mers fermées ou semi-fermées comme la mer Noire (Balkas et al., 1990 ; Zaitsev & Mamaev, 1997). Dans les pays du Sud de l'Europe, l'eutrophisation des eaux côtières est un problème général. C'est également le cas des " bouts de mer " (golfes, baies, anses, estuaires...) qui reçoivent les eaux usées de grandes villes ou dans lesquels se jettent des fleuves particulièrement pollués : l'estuaire de la Seine, la Baie de Naples, le Golfe de Venise (Venise, le Pô), le Golfe de Trieste (Trieste, côte Slovène), le Golfe Saronique (Athènes), etc. Dans ces régions, la forte croissance algale puis la décomposition du phytoplancton a entraîné la formation de vastes zones où l'on constate un appauvrissement saisonnier des eaux en oxygène (Figure 9). La solution est simple : il faut traiter de manière optimale les eaux usées de toutes les grandes villes concernées.

Figure 9. Zones (points foncés - rouges - sur la carte) où l'eau de mer présente un appauvrissement saisonnier en oxygène du fait des activités humaines. (Diaz & Rosenberg, 1995 ; Malakoff, 1998).

1.4 Traitement de l'azote des eaux résiduaires urbaines

1.4.1 Les rejets d'azote urbain

Outre des bactéries et certains types de déchets, les eaux usées urbaines charrient principalement de l'azote et des phosphates.

Les eaux d'égout urbaines sont un mélange de plusieurs eaux usées d'origines et de propriétés définies :

- Eaux usées domestiques. Elles sont constituées des eaux vannes provenant des toilettes et des eaux ménagères issues des cuisines, des bains et de la lessive. Les eaux vannes véhiculent les matières fécales et l'urine. Les matières fécales contiennent des bactéries entériques. L'urine est pratiquement stérile mais à l'origine de l'azote et du phosphate des eaux usées. Les eaux des cuisines sont riches en corps gras et détergeant mais ne présentent pas (ou peu) de bactéries hors les eaux d'épluchage. Les eaux de douches et des bains contiennent des bactéries saprophytes de la peau et des détergents. Les lessives sont stériles mais contiennent des détergents et des réactifs divers.
- Eaux d'arrosage des voies publiques avec leurs diverses salissures, contenant notamment en nombre des bactéries telluriques.
- Eaux de ruissellement constituées par l'ensemble des eaux de pluie. Elles contiennent des bactéries associées aux poussières, aux particules d'argile déposées sur les toits et les rues mais aussi des dépôts de boues accumulées dans les égouts et entraînées par le débit plus élevé des eaux d'égout par temps de pluie.
- Eaux résiduaires industrielles, étant soumises à autorisation de raccordement, qui sont de constitutions diverses.

La pollution azotée dans les eaux usées est constituée essentiellement de :

- L'azote organique provenant surtout des déjections humaines et des rejets des industries agroalimentaires.
- L'azote ammoniacal provenant des rejets industriels ou de transformations de l'azote organique des eaux usées domestiques par des processus biochimiques naturels dans le réseau d'égout. On admet que la pollution journalière d'un habitant est comprise entre 12 et 15 g d'azote Kjeldahl total (NTK) (NTK = azote organique + azote ammoniacal), (Deronzier et al., 2001).
- Les autres formes de l'azote, notamment le nitrate et le nitrite représentent moins de 1 % de l'azote global (NGL) arrivant en tête de station d'épuration (NGL = NTK + azote nitreux + azote nitrique).

Une eau résiduaire urbaine (eau brute), contient en moyenne, 10-20 mgN L^{-1} d'azote organique, 30-40 mgN L^{-1} d'azote ammoniacal, et moins de 1 mgN L^{-1} d'azote nitreux et nitrique (Tableau 2).

Tableau 2. Valeurs des principaux éléments polluants d'une eau brute résiduaire urbaine. (DBO_5 : Demande Biochimique en Oxygène ; DCO : Demande chimique en oxygène ;NTK : azote Kjeldahl total; P total : phosphore total)

	Concentration (mg L^{-1})	Flux g Hab^{-1} J^{-1}
$D.B.O_5$	250	60
DCO	300 - 700	120
NTK	60-70 { 40 NH_4^+ / 20 N org.	15
P total	15	4

1.4.2 Règles et échéances en matière d'assainissement

Les règles et les échéances en matière d'assainissement sont fixées par la directive européenne 91/271/CEE du 21 mai 1991 relative au traitement des eaux résiduaires urbaines des collectivités de plus de 2000 équivalents-habitants (EqH)*. Toutes les agglomérations européennes, y compris les plus modestes, devaient traiter leurs eaux usées en 2005. Les échéances et les contraintes diffèrent lorsque les agglomérations se situent en zones sensibles, (présentant des risques d'eutrophisation). La définition des zones sensibles est donnée par l'article 6 du décret 94-469 du 3 juin 1994 (alinéa 1).

> Les zones sensibles comprennent les masses d'eau significatives à l'échelle du bassin qui sont particulièrement sensibles aux pollutions, notamment celles qui sont sujettes à l'eutrophisation et dans lesquelles les rejets du phosphore, d'azote ou de ces deux substances doivent, s'ils sont cause de ce déséquilibre, être réduits. Un arrêté du ministre chargé de l'environnement, pris après avis de la mission interministérielle de l'eau et du Comité national de l'eau, peut préciser les critères d'identification de ces zones. Les cartes des zones sensibles sont actualisées au moins tous les quatre ans, dans les conditions prévues pour leur élaboration (article 7).

La directive 91/271/CEE fixe un échéancier en fonction de la taille des agglomérations, tandis que le décret 94-469 fixe une échéance en fonction de la charge de pollution organique par jour, évaluée en kilogrammes par jour. La Directive opère une distinction entre la collecte et le traitement. La collecte des eaux usées devait être effective avant le 31 décembre 1998 pour les agglomérations en zone sensible de plus de 10.000 équivalents habitants et avant le 31 décembre 2000 pour les agglomérations de plus de 15.000 équivalents habitants. Cette collecte devrait être en place avant le 31 décembre 2005 pour les agglomérations comprises entre 2.000 et 15.000 équivalents habitants. Un traitement secondaire (destiné à attaquer la pollution dissoute colloïdale, le plus souvent réalisé par voie biologique) était requis avant le 31 décembre 2000 dans les agglomérations de plus de 15.000 équivalents habitants et le sera d'ici le 31 décembre 2005 pour les agglomérations comprises entre 2.000 et 15.000 équivalents habitants. Dans les zones sensibles, il est prévu un traitement spécifique de l'azote et du phosphore.

Le coût des infrastructures de traitement des eaux usées est considérable et demande aux villes de faire certains choix difficiles en matière d'investissements, de travaux publics, d'aménagement du territoire et de politique de l'eau. De tels travaux ont en effet ouvert à discussion des dossiers liés à la politique tarifaire de l'eau, aux réformes administratives, à la privatisation de la distribution de l'eau, aux taxes communales ou régionales, etc. Ces choix ont demandé du temps avant d'être concrétisés. Un réel progrès a été effectué puisque actuellement, dans toutes les villes les projets sont en cours de mise en place. Même si ces

* Un EqH = 60 g de DBO_5

obligations souffrent de certains retards, toutes les villes européennes essayent de gérer le problème de l'assainissement.

En France, la politique de l'assainissement est principalement régie par la loi sur l'Eau de 1992, le décret du 3 juin 1994 et l'arrêté du 22 décembre 1994, transcriptions en droit français de la directive européenne 91/271/CEE du 21 mai 1991. La délimitation des zones sensibles se fait par arrêté préfectoral après concertation du Comité de Bassin.

1.4.3 Procédés biologiques de traitement de l'azote des eaux résiduaires urbaines

Traiter de manière optimale signifie, pour une grande ville, appliquer trois types de traitement aux eaux usées. Un traitement primaire permet d'abord d'éliminer les matières solides en suspension, généralement via un procédé physique. Ensuite un traitement secondaire, généralement biologique, s'attaque aux polluants dissous. Enfin un traitement tertiaire s'intéresse à des substances spécifiques, par exemple les microbes pathogènes ou les éléments nutritifs comme, l'ammonium, les nitrates et les phosphates.

Les grandes agglomérations, utilisent des procédés de traitement intensifs, à cause des débits importants à traiter mais aussi du manque de place au sein d'une ville déjà très urbanisée. Les traitements intensifs sont en effet caractérisés par des cinétiques de nitrification ou de dénitrification importantes, donc des temps de séjours hydrauliques courts ; ce qui permet d'avoir des infrastructures moins volumineuses. Les agglomérations moindres (< 2000 hab.) pourront utiliser des traitements extensifs, tel que le lagunage, plus facile à mettre en œuvre lorsque le terrain est disponible (Deronzier et al., 2001).

L'azote peut être séparé des eaux par différents mécanismes : physique (par décantation lorsqu'il est lié aux particules en suspension), physico-chimique (stripping sous forme de gaz ammoniaque lorsque le pH est basique, oxydations et réductions chimiques) et biologique (incorporation à la biomasse des bactéries produites, transformation en nitrate puis en azote gazeux lors des processus de nitrification – dénitrification). A l'heure actuelle les voies physico-chimiques d'élimination de l'azote des eaux résiduaires urbaines, n'ont pas donné lieu, pour des raisons économiques, à des applications industrielles du fait de la nature essentiellement soluble et des concentrations faibles de l'azote de ces eaux (Deronzier et al., 2001). L'élimination de l'azote des eaux usées est principalement effectuée lors du traitement secondaire ou tertiaire. Il peut toutefois être éliminé (5 à 10 % de l'azote total reçu par temps sec) lors du traitement primaire (décantation primaire) (Deronzier et al., 2001).

1.4.3.1 Processus biologiques utilisés pour le traitement de l'azote

La nitrification et la dénitrification sont les processus biologiques les plus couramment utilisés pour l'épuration de l'azote des eaux usées. Au cours du traitement l'ammonification, qui permet l'élimination d'une partie de l'azote organique non réfractaire et l'assimilation, qui peut conduire à une élimination de l'ordre de 25 % de l'azote des eaux brutes urbaines, participent également dans une moindre mesure à l'élimination de l'azote (Deronzier et al., 2001).

D'autres processus biologiques que la nitrification et la dénitrification, permettent aussi l'oxydation de l'ammonium en azote gazeux, en station d'épuration.

L'Anammox (anaerobic ammonium oxidation) permet l'oxydation de l'ammonium et du nitrite directement en azote gazeux en anaérobie, via la réaction suivante :

$$NH_4^+ + 1/2\ NO_2^- \rightarrow 1.02\ N_2 + 0.26NO_3^-.$$

Ce processus est réalisé par une bactérie appartenant à l'ordre des planctomycètes, différente des protéobactéries. Même si ce groupe a été découvert récemment à partir des eaux de stations d'épuration, sa croissance extrêmement lente (une division toutes les deux semaines) ne lui permettrait pas de se développer suffisamment pour concurrencer les bactéries nitrifiantes lors d'un traitement habituel. De plus, elles ne sont actives que lorsque leur concentration atteint 10^{10} à 10^{11} cellules ml^{-1} (Strous et al., 1999).

Du à une limitation du nitrite disponible dans un système d'épuration utilisant uniquement le processus Anammox, ce dernier peut être précédé d'un processus biologique producteur de nitrite tel que le processus de nitrification partielle. La nitrification partielle ne fait intervenir que les bactéries ammonium-oxydantes qui oxydent l'ammonium en nitrites et évite leur oxydation en nitrates. Le procédé SHARON (single reactor high activity ammonium removal over nitrite), dans un réacteur désigné au processus de nitrification partielle (différent de celui utilisé pour l'Anammox), permet un taux de croissance important des bactéries ammonium-oxydantes par rapport à celui des nitratantes, en élevant la température (plus de 26 °C), et en utilisant un temps de rétention supérieur au taux de croissance des nitrite-oxydantes qui sont ainsi éliminées du réacteur (Schmidt et al., 2003). Le procédé CANON (« completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite ») fait intervenir le processus Anammox et la nitrification partielle dans un même réacteur simultanément. Pour cela, on agit sur l'aération ; les bactéries ammonium-oxydantes oxydent l'ammonium en nitrite en consommant l'oxygène, ce qui crée les conditions anoxiques nécessaires au processus Anammox (Schmidt et al., 2003). Le procédé CANON peut être observé dans les systèmes classiques de nitrification, de manière accidentelle, lorsque les conditions sont sous-optimisées (Siegrist et al., 1998 ; Hippen et al., 2001). Les bactéries mises en jeux ici sont, *Nitrosomonas* et les Planctomycètes (Schmidt et al., 2003).

Toutefois nous n'aborderons ici que les deux principaux processus de traitements biologiques utilisés dans les stations d'épuration du SIAAP actuellement : la nitrification et la dénitrification. Les processus de nitrification et dénitrification sont mis en œuvre par le biais de cultures bactériennes libres (boues activées) ou fixées.

1.4.3.2 Le traitement biologique sur boues activées

Les procédés basés sur des milieux en suspension, en particulier les boues activées, peuvent facilement s'adapter pour faire la nitrification et la dénitrification.

La lignée des boues activées apparaît dès 1913. De manière générale, ce procédé associe les éléments suivant :

- un bassin d'aération
- un système de brassage de la boue et/ou une arrivée d'air si le procédé est aérobie
- un dispositif de recirculation des boues
- un dispositif d'extraction des boues (1 Kg de DBO_5 éliminé donne 0.6 Kg de biomasse bactérienne, d'où l'extraction des boues en excès.)
- un clarificateur ou décanteur secondaire qui permet la séparation des boues de l'eau épurée et qui s'appuie sur l'aptitude des bactéries à floculer.

Le premier système, breveté à Manchester par Arden & Lockett en 1914 (Védry, 1996), est un système biologique séquencé ou S.B.R. (Sequencing Batch Reactor). Ce procédé comprend une phase d'aération où sont cultivées les bactéries aérobies qui dégradent les matières dissoutes, et une phase de décantation qui s'effectue dans le même réacteur (Figure 10.a). John & Bolton en 1920 développent par la suite des bassins combinés où la décantation est latérale (Figure 10.b) (Védry, 1996). L'eau épurée est récupérée par sur verse, après décantation secondaire sur les bords du bassin. Le système actuel le plus répandu est le système continu, aéré ou non, avec un décanteur en aval des bassins (Figure 10.c).

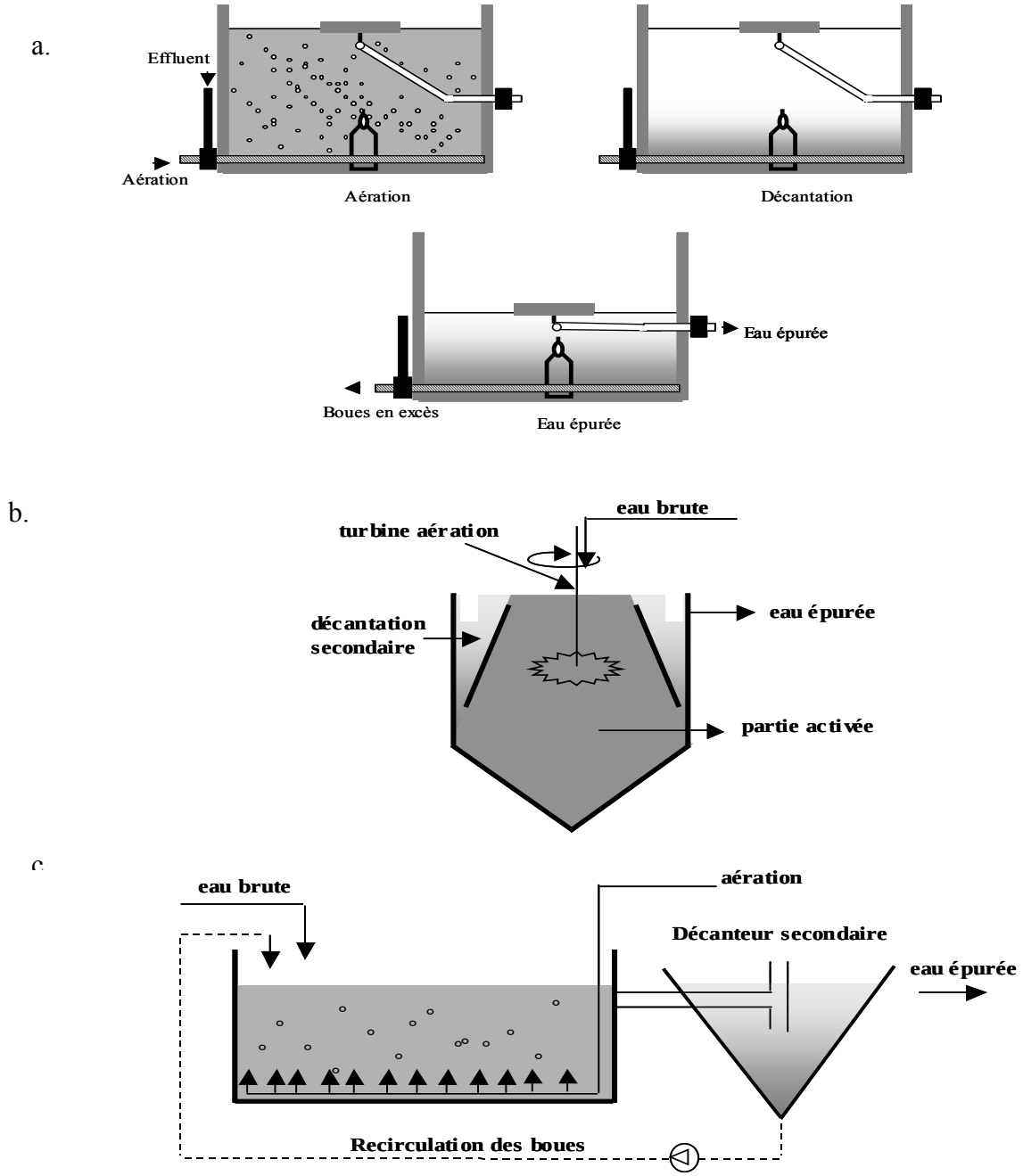


Figure 10. Exemple de procédés de traitement de l'eau par boues activées : a. Premier système de boues activées ou S.B.R. (Sequencing Batch Reactor), b. Bassins combinés, c. Système continu (d'après Védry, 1996).

En traitement secondaire, l'élimination de la pollution azotée poussée implique l'application d'une charge suffisamment faible pour le maintien d'une biomasse nitrifiante dans le milieu, et la mise en place d'une capacité d'oxygénation permettant d'assurer le traitement du carbone et de l'azote. Lors du traitement secondaire de l'azote, il n'y aucun apport extérieur de carbone organique, à l'inverse d'un traitement tertiaire.

Le traitement peut se faire par aération séquencée (Figure 11). La nitrification s'effectue durant les phases aérobies et la dénitrification durant les phases anoxiques. Après passage par une zone de contact, l'eau usée est admise dans un bassin d'aération contenant la biomasse épuratrice en suspension (boues activées). La biomasse, séparée de l'eau épurée par sédimentation dans un clarificateur, est recirculée dans le bassin d'aération.

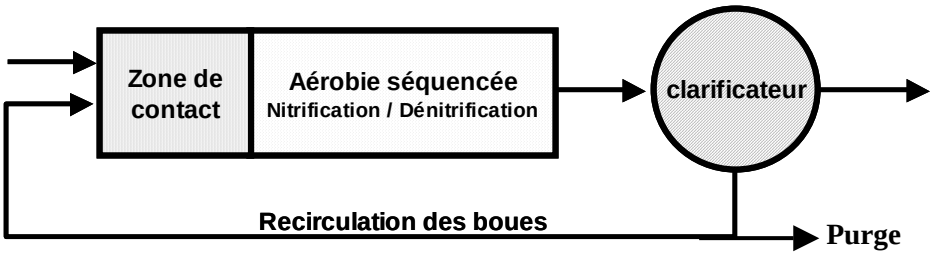


Figure 11. Traitement de l'azote sur boues activées, dans un seul bassin en aération séquencée.

Le traitement de l'azote peut se faire également avec un bassin d'anoxie en tête (Figure 12). Dans cette filière une zone non aérée et brassée est placée en amont du bassin d'aération. Elle reçoit l'eau brute, les boues re-circulées (provenant du décanteur secondaire) et de la liqueur mixte (eau + boue) issue du bassin d'aération, qui permet l'apport des nitrates. Un temps de passage minimum de l'effluent dans le bassin non aéré permet en général d'atteindre les conditions d'anoxies (0.0 mgO_2 L^{-1}), nécessaires à la dénitrification. Le débit de circulation minimum à respecter limite les apports en nitrates lors de la re-circulation de la liqueur mixte. La charge en carbone, nécessaire aux bactéries dénitrifiantes est apportée par l'eau brute, c'est pourquoi le bassin anoxique se trouve en tête de filière.

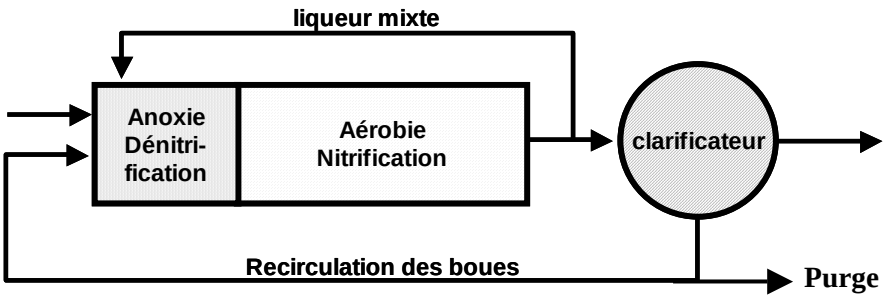


Figure 12. Traitement de l'azote sur boues activées, avec un bassin anoxie en tête et une re-circulation de liqueur mixte.

En traitement tertiaire après élimination de la pollution carbonée un traitement de l'azote peut se faire de la même façon que précédemment, mais avec un ajout de carbone organique, lors de la dénitrification (Figure 13). Le bassin aérobie peut alors se placer en tête du traitement.

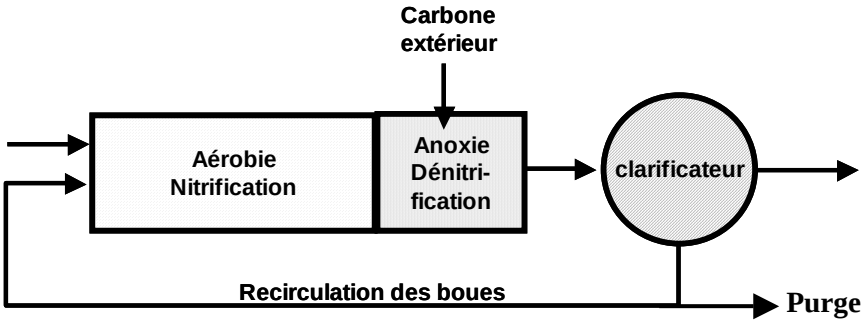


Figure 13. Traitement tertiaire de l'azote sur boues activées, avec un ajout de carbone extérieur.

Les techniques de filtration membranaire peuvent être également associées au traitement conventionnel par boues activées. Ce procédé est basé sur un couplage de deux opérations intimement liées :

- Un traitement biologique pour dégrader la pollution
- Un traitement physique de séparation par membranes d'ultrafiltration ou de microfiltration.

Les membranes sont immergées directement dans la cuve biologique et assurent la séparation liquide/solide par filtration en aspiration sous faible pression. Elles permettent l'élimination du clarificateur et l'obtention d'une eau épurée désinfectée et de qualité constante. Les membranes permettent également une rétention absolue de la biomasse à l'intérieur du système, donc la maîtrise de l'âge de la boue. L'âge élevé des boues qui résulte de ce procédé favorise le développement de bactéries à faible taux de croissance comme les bactéries nitrifiantes et expliquent les performances élevées en matière d'élimination de l'azote.

Le traitement sur boues activées est caractérisé par plusieurs paramètres :

- La charge massique (Cm) :
  Cm (kg DBO_5 j^{-1} kg MVS^{*-1}) = kg DBO_5 j^{-1} (entrant sur le biologique) / kg MVS (dans le bassin)

Faible charge	Cm < 0.1	kg DBO_5 kg MVS^{-1} j^{-1}
Moyenne charge	Cm = 0.1 à 0.4	kg DBO_5 kg MVS^{-1} j^{-1}
Forte charge	Cm > 0.4	kg DBO_5 kg MVS^{-1} j^{-1}

  La charge peut être exprimée aussi en fonction du volume du réacteur biologique, on parle alors de charge volumique (Cv) (kg DBO_5 m^{-3} j^{-1}).

[*] MVS = matières volatiles en suspensions

- Le temps de séjour hydraulique (Ts) de l'eau dans un bassin :
  Ts (heure) = Volume du bassin (m^3) / débit de l'effluent (m^3 h^{-1})

- Le temps de contact (Tc) de l'eau à traiter avec les boues activées:
  Tc (heure) = Volume du bassin (m^3) / (débit de l'effluent (m^3 h^{-1}) + débit de recirculation des boues (m^3 h^{-1}))

- L'âge des boues (A) :
  A (jour) = St /E

  St : quantité de boues dans le réacteur en kg MVS
  E : quantité moyenne des boues en excès évacuées hors du réacteur en kg MVS j^{-1} ou quantité de boues produites par jour (kg MVS produit par jour) sachant que un Kg de DBO_5 éliminé correspond à 1 kg de MVS produit.

Age faible	2 jours
Age moyen	4 jours
Age élevé	10 à 20 jours

  L'âge des boues représente le temps de séjour des boues dans le réacteur. Il est beaucoup plus long que le temps de séjour de l'eau à cause de la re-circulation des boues.

- L' Indice de Molhman (IM) et l'Indice des Boues (IB) :

  L'IM et l'IB permettent d'apprécier l'aptitude des boues à la décantation. Ces indices représentent le volume apparent occupé par un gramme de boue après 30 minutes de décantation dans une éprouvette d'un litre. L'IM et l'IB sont comparables pour des boues peu concentrées (moins de 3 gMES* L^{-1}). Pour des concentrations plus importantes, on utilise préférentiellement l'IB.

  IM (ml g^{-1}) = V_{30} (sans dilution) (ml) / MES (g)

  IB (ml g^{-1}) = V_{30} x dilution** (ml) / MES (g)

  ** Le volume décanté V_{30} mesuré ne doit pas dépasser 300 ml, ce qui peut nécessiter une dilution.

Ces paramètres sont différents suivant le traitement épuratoire (élimination de la pollution carbonée, azotée ou phosphorée) et donc suivant les bactéries cultivées.

* MES = matières en suspension

1.4.3.3 Le traitement biologique sur cultures fixées et lagunage

Les traitements sur cultures fixées regroupent tous les procédés où la biomasse épuratrice est accrochée sur un support solide à travers lequel percole l'eau à traiter. Les supports peuvent être très divers, et correspondent à autant de procédés différents.

Les disques biologiques rotatifs (DBR). Les DBR sont constitués de supports synthétiques montés sur un axe horizontal passant alternativement et lentement dans l'air puis dans un bassin contenant l'eau à épurer. L'espacement des disques en matériaux permet une aération par ventilation naturelle. Lors du passage dans l'eau, la biomasse fixée sur les supports assimile et dégrade les matières organiques. Le biofilm en expansion est soumis à un cisaillement par l'eau lors de la rotation, et décante au fond du bassin. La séparation de l'eau épurée et des matières décantées se fait sur un clarificateur ou un filtre en aval du traitement. L'élimination de l'azote s'effectue essentiellement par assimilation et nitrification. La dénitrification y est négligeable (Deronzier et al., 2001).

Les lits bactériens. La biomasse est fixée sur un matériau de grosse granulométrie (3 à 8 cm) sur lequel percole l'effluent à traiter, récupéré par des drains collecteurs. L'air est transféré par diffusion à travers le film d'eau ruisselant à la surface du matériau. Une vitesse hydraulique suffisante, assurée par un recyclage d'eau traitée, permet l'évacuation des boues en excès qui sont séparées de l'effluent traité dans un ouvrage de décantation situé en aval. En traitement secondaire, l'abattement du carbone s'effectue dans la partie supérieure du filtre, alors que la nitrification est réalisée dans sa partie basse. En traitement tertiaire le lit bactérien, alimenté par une eau préalablement épurée (élimination du carbone), permet la nitrification totale de l'effluent.

Les filtres à sables ou à graviers : l'utilisation des filtres à sable pour traiter les eaux domestiques est connue depuis très longtemps ; elle était déjà pratiquée dans le Massachusetts vers la fin des années 1800. Ce procédé est constitué d'un lit de sable d'une épaisseur comprise entre 60 et 90 cm, qui repose sur une couche de pierres concassées dans laquelle sont placés des drains collecteurs.

Un exemple de procédé peut être le lit d'infiltration-percolation sur sable. Après une décantation primaire, les eaux usées sont épurées par une biomasse fixée sur les grains de sable et localisée dans les trente premiers centimètres du massif filtrant. Afin d'éviter le colmatage des filtres par l'expansion de la biomasse, des périodes de non-alimentation doivent être ménagées. Ainsi une station doit être constituée de plusieurs filtres fonctionnant en parallèle, alimentés en alternance. L'azote peut être directement nitrifié au cours de la migration de l'effluent dans le massif ou de façon décalée après absorption sur le biofilm, lors de la phase de repos. La dénitrification peut se faire simultanément à la nitrification dans les zones du massif devenues anoxiques. Le volume d'eau supporté par le filtre est de $1m^3$ par m^2 par jour. Il faut donc une place relativement importante pour des débits importants tels que ceux des grandes agglomérations, ce qui est difficile à mettre en œuvre.

Les lits immergés fixés ou biofiltres. Les biofiltres mettent en œuvre une biomasse de concentration et surtout d'activité plus élevée qu'une boue activée. Ce sont des procédés intensifs. Ils sont compacts, facilement intégrables au site et évitent un ouvrage de clarification en aval.

Le matériau sur lequel se développe la biomasse est granulaire, fin, homogène, et présente une grande surface spécifique. La grande surface disponible permet l'accrochage de nombreuses bactéries. Ainsi, l'eau qui traverse le filtre est soumise en même temps à une filtration physique et à une épuration biologique. L'ensemble des matières en suspension, apportées par l'eau et générées par le développement bactérien, est retenu au sein du filtre qui petit à petit se colmate. Un lavage périodique est nécessaire pour restaurer une perte de charge compatible avec le fonctionnement hydraulique. Les lits bactériens sont à auto-curage et le facteur de régulation concerne donc la charge hydraulique (C_h : nombre de m^3 d'eau apporté par m^2 de réacteur et par heure). Il est assuré par un co-courant de forts débits d'eau et d'air, à des séquences appropriées, permettant le détassage du lit et l'entraînement des particules stockées. Il existe plusieurs types de biofiltres, tels que le Biofor® (Degrémont) et le Biostyr® (OTV).

Le processus de nitrification peut s'intégrer au traitement secondaire (un seul étage de biofiltres traitant simultanément la pollution carbonée et azotée) ou être spécifique d'un traitement tertiaire après un premier étage traitant le carbone. La nitrification peut être dans ce cas séparée de la dénitrification sur des biofiltres distincts. La dénitrification se fait alors avec un ajout de carbone. Il est possible également de réaliser la nitrification-dénitrification sur un seul biofiltre avec une recirculation d'eau. L'injection d'air, se fait au milieu du biofiltre, la partie basse assurant la phase de dénitrification, la partie aérée, la nitrification.

Les lits fluidisés. Sur ce procédé, le matériau support est maintenu en suspension dans le réacteur par une vitesse ascendante constante du fluide interstitiel (exemple, Biolift® (OTV)).

Il existe également des lits tel que le Sessil® (Stereau) qui se compose d'un ensemble de rubans en polyéthylène qui sont suspendus à une grille en bois imputrescible directement fixée sous la répartition de l'eau à épurer.

Lagunage. Le lagunage naturel est un procédé rustique de traitement des eaux usées domestiques. Les effluents sont dirigés dans des bassins étanches, à l'air libre. Sous l'action du soleil, les algues photosynthétisent leur matière première en fournissant l'oxygène à la population bactérienne. L'azote, fertilisant bien connu, peut aussi être utilisé par les végétaux dans les stations d'épuration (lagunage naturel, lits à macrophytes…) qui en comportent. Les végétaux supérieurs ne permettent jamais d'éliminer plus de 15 % de l'azote apporté par une eau résiduaire (Deronzier et al., 2001). Par contre les algues microscopiques permettent l'élimination d'une fraction importante de l'azote. Toutefois l'azote entrant dans la masse cellulaire algale ou végétale n'est pas soutiré du système. Lorsque les cellules meurent, elles se déposent au fond du bassin. L'ammonification, ainsi que la nitrification et dénitrification assure alors l'élimination de l'azote.

1.5 Nitrification, dénitrification et émissions d'oxyde nitreux

A la suite de l'exposé des grands principes du traitement de l'azote en station d'épuration et de l'importance que peuvent y avoir les processus biologiques de nitrification et de dénitrification, ce paragraphe s'intéressera plus particulièrement aux bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes impliquées dans l'élimination de l'azote. Nous décrirons leur taxonomie et phylogénie, leur métabolisme, ainsi que leur écologie, notamment en station d'épuration. Nous nous intéresserons également aux mécanismes d'émissions du N_2O lors de ces processus.

1.5.1 Nitrification et bactéries nitrifiantes

Les bactéries nitrifiantes se subdivisent en deux groupes physiologiques, qui ne sont pas liés phylogénétiquement :

- un groupe oxyde l'ammonium en nitrite : ce sont les bactéries ammonium-oxydantes (AOB) ou nitrosantes, dont les noms de genre portent le préfixe « nitroso ».

- un autre groupe oxyde le nitrite en nitrate : ce sont les bactéries nitrate-oxydantes (NOB) ou nitratantes, dont les noms de genre portent le préfixe « nitro ».

1.5.1.1 Taxonomie et phylogénie des bactéries nitrifiantes

Les bactéries nitrifiantes sont des bactéries Gram négatif, de petite taille (de l'ordre du µm), de mobilité variable, appartenant à la famille des Nitrobacteraceae (Watson et al., 1989). Les cellules ont différentes formes (baguette, sphère, ellipse…). La plupart possèdent des membranes intra-cytoplasmiques disposées en arrangements divers. Elles peuvent être, à l'aide de flagelles, mobiles ou non.

Les souches ont d'abord été attribuées à des genres sur la base de caractéristiques morphologiques. Le groupe des bactéries nitrosantes réunit cinq genres différents, *Nitrosomonas* (10 espèces), *Nitrosococcus* (3 espèces), *Nitrosospira* (5 espèces), *Nitrosolobus* (2 espèces) et *Nitrosovibrio* (2 espèces) (Winogradsky 1892 ; Watson et al., 1989, Koops et al., 1991). Le groupe des bactéries nitratantes renferme les genres *Nitrobacter* (4 espèces), *Nitrospina* (1 espèce), *Nitrococcus* (1 espèce) et *Nitrospira* (1 espèce) (Teske et al., 1994).

Cependant, cette classification est en contradiction avec les résultats obtenus à partir d'analyses phylogénétiques, qui montrent que les bactéries nitrosantes et nitratantes ne forment pas forcément des groupes monophyllétiques (Teske et al., 1994 ; Purkhold et al., 2000). Elles sont en fait réparties en six lignées phylogénétiques différentes (Figure 14). Pour établir les relations phylogénétiques des bactéries nitrifiantes, les séquences d'ARNr 16S ont été utilisées (Teske et al., 1994). Toutes les bactéries nitrifiantes font partie des protéobactéries, large groupe bactérien dont l'ancêtre présumé est photosynthétique (Watson, 1971; Teske et al., 1994).

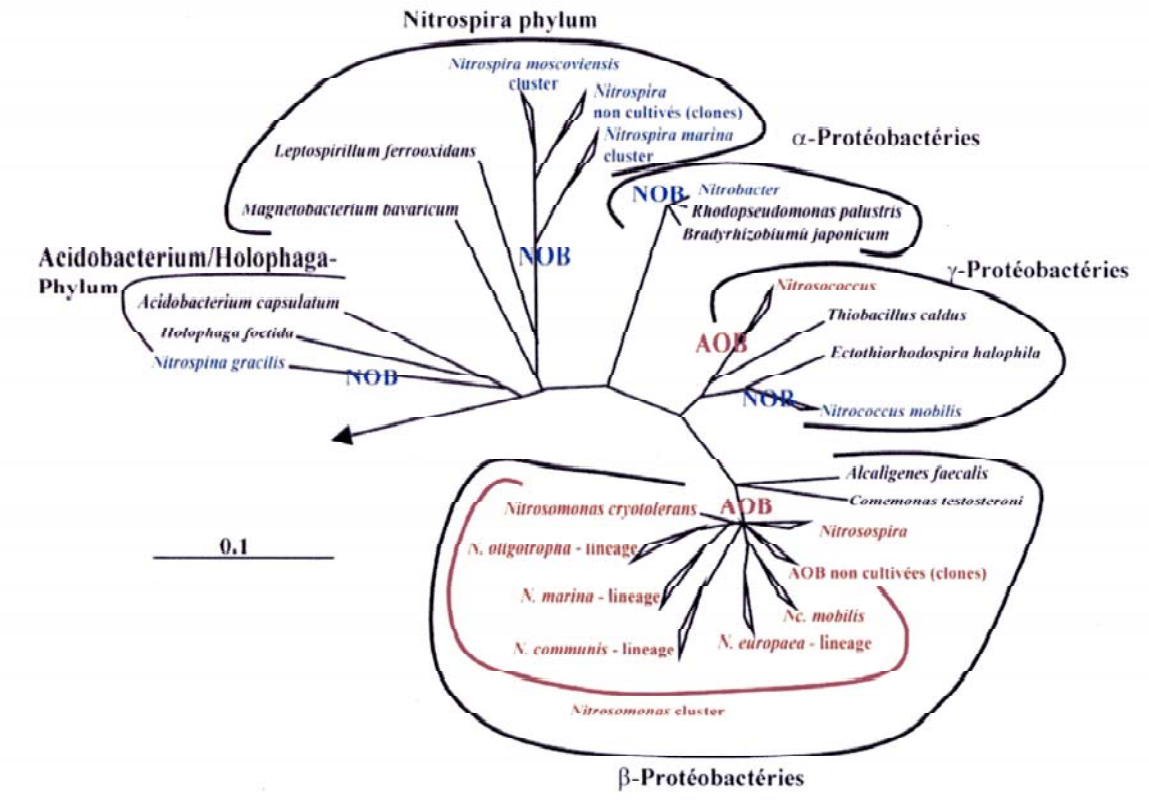


Figure 14. Arbre phylogénétique de parcimonie maximum des bactéries nitrifiantes basé sur une analyse comparative de séquences d'ARNr 16S. Les branches menant aux bactéries nitrosantes et nitratantes sont respectivement nommées par AOB et NOB, (d'après Schramm 2003).

1.5.1.2 Métabolisme des bactéries nitrifiantes

Les bactéries nitrifiantes ont un métabolisme autotrophe, tirant leur énergie de l'oxydation de l'ammonium ou du nitrite, et assimilant le dioxyde de carbone (CO_2) via le cycle de Calvin, seule source de carbone pour la synthèse de leur biomasse.

1.5.1.2.1 Métabolisme énergétique

<u>Oxydation de l'ammonium</u>

Les bactéries ammonium-oxydantes (AOB) gagnent leur énergie en oxydant l'ammonium en nitrite. Cette oxydation se déroule en deux étapes :

$$NH_4^+ + 0.5\ O_2 + 2\ e^- \rightarrow NH_2OH + H^+$$
$$NH_2OH + H_2O \rightarrow NO_2^- + 5H^+ + 4\ e^-$$

La première étape est catalysée par l'ammonium monooxygénase (Amo) qui produit l'hydroxylamine (NH_2OH) (Wood, 1986; Mc Tavish et al., 1993) et est oxygène dépendante (Shrestha et al., 2002). L'ammonium monooxygénase est localisée dans la fraction membranaire de la bactérie (Tsang & Suzuki, 1982) (Tableau 3). L'ammoniac (NH_3) plutôt que l'ammonium (NH_4^+) serait son véritable substrat (Bédard & Knowles, 1989 ; Bock et al., 1991). En effet, lorsque le pH augmente (de 6.5 à 9.1) et déplace l'équilibre NH_3/NH_4^+ vers la forme non ionisée, les valeurs de Km pour l'oxydation du NH_3/NH_4^+ diminuent considérablement (Suzuki et al., 1974). De plus la membrane bactérienne, localisation de l'ammonium monooxygénase, est très perméable à la forme NH_3 non chargée.

L'hydroxylamine, simple intermédiaire, va être oxydé en nitrite (NO_2^-), deuxième étape de l'oxydation de l'ammonium, catalysée par l'hydroxylamine oxydoréductase (Hao) (Wood, 1986; Sayavedra-Soto et al., 1994). Cette enzyme est périplasmique (Olson & Hooper, 1983 ; Wood, 1986) (Tableau 3).

L'atome d'oxygène incorporé dans l'hydroxylamine provient de l'oxygène atmosphérique, le second atome d'oxygène formant le nitrite provient de l'eau. Deux des quatre électrons générés lors de l'oxydation de l'ammonium, sont utilisés pour oxyder une nouvelle molécule d'ammonium. Les deux autres sont dirigés vers la chaîne de transfert des électrons. Ils sont utilisés pour réduire le CO_2 et pour la biosynthèse d'ATP (Shrestha et al., 2002), (Figure 15). Le flux réverse des électrons permet la formation de NADH (Figure 15)

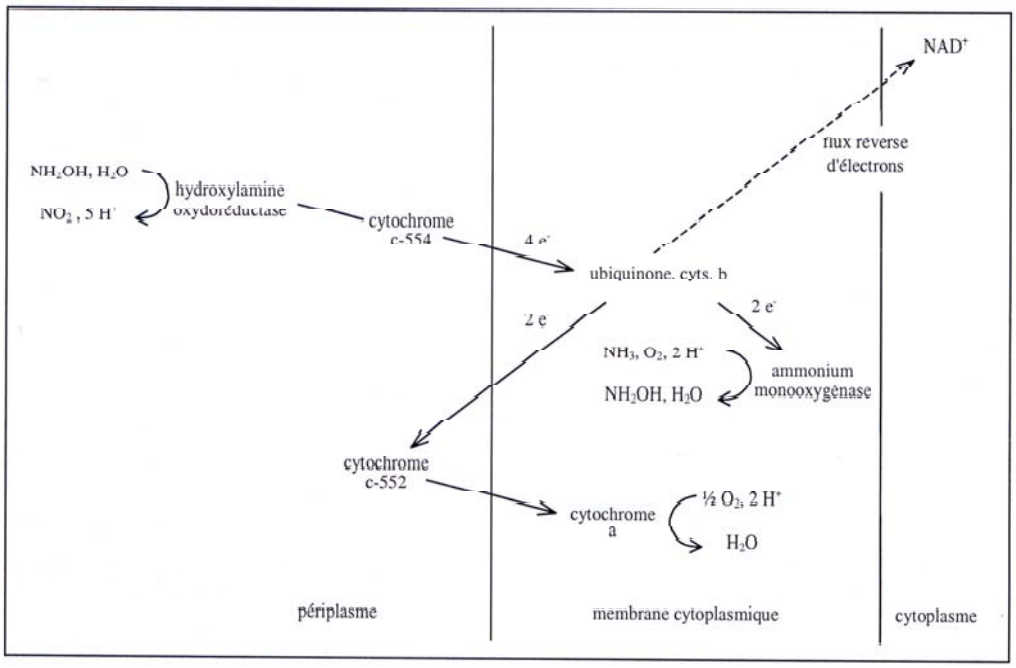
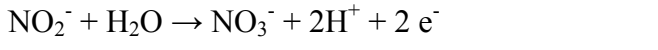


Figure 15. Oxydation de l'ammonium et transport d'électrons chez Nitrosomonas (Wood, 1986)

Oxydation du nitrite

L'oxydation du nitrite en nitrate, s'effectue sans intermédiaire détectable (Bock et al., 1986 ; Bock et al., 1992), suivant la réaction :



$$NO_2^- + H_2O \rightarrow NO_3^- + 2H^+ + 2\ e^-$$

Le système oxydant le nitrite est situé au niveau de la face interne des membranes cytoplasmiques et des membranes intra-cytoplasmiques (Tsien et al., 1968 ; Sundermeyer & Bock, 1981). Il comprend notamment la nitrite oxydoréductase (Nor) (Sundermeyer-Klinger et al., 1984 ; Meincke et al., 1992), les cytochromes a1 et c1, une quinone et une NADH déshydrogénase, nécessaires au transfert d'électrons (Bock et al., 1986) (Figure 16; Tableau 3). La forme exacte du substrat est encore inconnue ; il pourrait s'agir de l'ion NO_2^-, de l'acide nitrique non dissocié, ou d'une autre forme (Bock et al., 1986). La source d'oxygène est l'eau, et les deux électrons produits lors de la réaction d'oxydation du nitrite sont transférés à une cytochrome-oxydase via les cytochromes et permettent la production d'ATP (Figure 16).

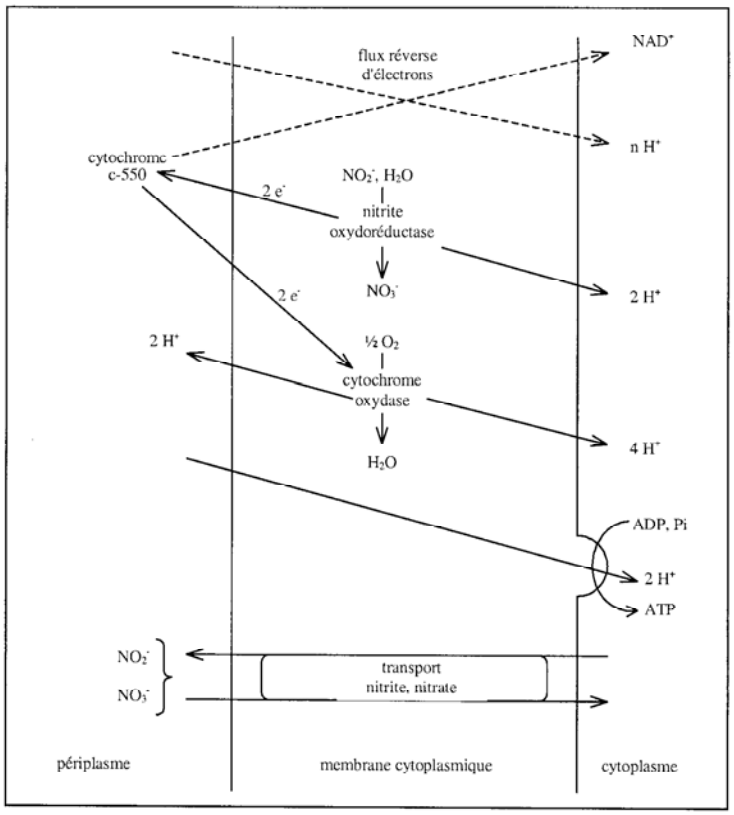


Figure 16. Oxydation du nitrite et transport d'électrons chez Nitrobacter (Wood, 1986)

Tableau 3. Caractéristiques des systèmes enzymatiques impliqués dans la nitrification autotrophe (d'après Bock et al. (1986) ; Wood (1986); Bédard & Knowles (1989) ; Underhill (1990) ; Hyman & Arp (1995) ; Sümer et al. (1995) ; Sayavedra-Soto et al. (1996)).

	Ammoniaque monooxygénase (Amo)	**Hydroxylamine oxydoréductase (Hao)**	**Nitrite oxydoréductase (Nor)**
Localisation	membrane	périplasme	Face interne des membranes cytoplasmiques et intracytoplasmiques
Nature (structure)	Protéine contenant du cuivre	Structure complexe	Molybdène – fer - soufre-protéine de type nitrate réductase
Donneur d'électron	Cytochrome c_{554}	Cytochrome c_{554}?	NO_2^-
Réaction	$NH_3 + ½ O_2 \rightarrow NH_2OH$	$NH_2OH + H_2O \rightarrow HNO_2 + 4H^+ + 4e^-$	$NO_2^- + H_2O \rightarrow NO_3^- + 2H^+ + 2e^-$
Production d'énergie	non	oui	oui
Km ($\mu gN.ml^{-1}$)		1 à 3.65	0.69 à 2.80
Inductible	oui	oui	oui
Réversible			oui
Inhibiteurs	Acétylène, thiourée, lumière U.V., NO_2^-, etc.	hydrazine	Chlorate Lumière bleue et U.V.

1.5.1.2.2 Assimilation du carbone

Les bactéries nitrifiantes ont longtemps été considérées comme exclusivement chémolithoautotrophes, mais plusieurs d'entre elles peuvent, dans certaines conditions, assimiler des composés organiques, grâce à des métabolismes mixotrophes, voire hétérotrophes.

Métabolisme autotrophe

Le CO_2 est la principale source de carbone. Il est assimilé, via le cycle de Calvin, grâce à l'enzyme D-ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase / oxygénase (RubisCO). Certaines bactéries nitrifiantes possèdent une RubisCO soluble, tandis que chez d'autres, celle-ci est liée aux carboxysomes (Bock et al., 1986). D'après Belser (1984), il existe un rapport stœchiométrique constant entre l'oxydation du substrat et le bicarbonate prélevé par une espèce nitrifiante donnée, (C incorporé)/(N oxydé), indépendamment du taux de croissance ou des conditions environnementales. D'après Brion & Billen (1998), ce rapport, pour les bactéries nitrosantes (*Nitrosomonas europaea* et *Nitrosospira* sp.) est de 0.1, alors que pour les bactéries nitratantes (*Nitrobacter winogradskyi*), il n'est que de 0.02.

Métabolisme mixotrophique et hétérotrophique

Jusqu'à récemment, la croissance des bactéries nitrifiantes n'ayant pas été démontrée en présence d'autres sources de carbone ou d'énergie, ces bactéries étaient considérées comme des chémolithotrophes strictes. Cependant, des études de marquages isotopiques ont mis en évidence l'incorporation de composés organiques par les souches de *Nitrosomonas* et de *Nitrobacter*, prouvant ainsi la croissance mixotrophe de certaines bactéries nitrifiantes.

Bock et al. (1991) ont montré que toutes les bactéries nitrosantes étudiées jusqu'à présent sont capables de métaboliser des composés organiques, dans une certaine limite, et en présence de source d'énergie inorganique ; les composés organiques les plus favorables étant l'acétate (Wallace et al., 1970 ; Martiny & Koops, 1982), le formate (Bock et al., 1991), et dans une moindre mesure, le pyruvate (Wallace et al., 1970). En plus de leur croissance autotrophe, certaines espèces de *Nitrobacter* sont capables de pousser en milieu mixotrophe en présence de nitrite et de composés organiques, voire même en conditions hétérotrophes, en présence de matière organique (Bock, 1976 ; Steinmüller & Bock, 1976 ; Bock et al., 1983). Cependant, leur croissance reste inefficace et lente dans ces conditions (Bock & Koops, 1992). D'après Bock et al. (1991), les sources de carbone organique sont incorporées dans les composés cellulaires en quantité relativement faible par rapport à la principale source de carbone qu'est le CO_2.

1.5.1.2.3 Croissance des bactéries nitrifiantes et cinétiques de nitrification

Le rendement des réactions d'oxydation de l'ammonium et du nitrite étant extrêmement bas, les taux de croissance des bactéries nitrifiantes et la biomasse produite sont faibles. En culture pure, le taux de croissance spécifique (ou taux maximal de croissance, µmax) des bactéries nitrifiantes est faible et le temps de génération très long : 7 à 24 h pour les nitrosantes, 10 à 140 h pour les nitratantes (Bock et al., 1989). Les caractéristiques de croissance connues de certaines bactéries nitrifiantes sont présentées dans le Tableau 4.

Tableau 4. Caractéristiques de croissance de certaines bactéries nitrifiantes en culture pure.

	µ max (h^{-1})	Rendement (CO_2 fixé/ NO_2^- ou NO_3^- produit)	Activité spécifique (fmol NO_2^- ou NO_3^- produit.cellule^{-1}.h^{-1})	Référence
Nitrosants				
Nitrosomonas europaea	0.088			Skinner & Walker (1961)
"	0.02-0.03			Drozd (1980)
"	0.036	0.033		Helder & De Vries (1983)
"	0.017		1.0-1.7	Keen & Prosser (1987)
Nitrosococcus mobilis		0.014 -0.031		Glover (1985)
Nitrosospira sp.		0.075-0.096		Belser (1984)
Nitratants				
Nitrobacter winogradskyi		0.02		Brion & Billen (1998)
Nitrobacter sp	0.051			Gould & Lees (1960)
"	0.058		15.4	Keen & Prosser (1987)
"	0.043	0.013-0.014		Schon (1965)
".		0.0125	5.1-13.6	Wetzernak & Gannon(1967)
Nitrococcus mobilis	0.025	0.014-0.031		Glover (1985)

Brion & Billen (1998) ont étudié en laboratoire l'activité et la croissance des bactéries nitrifiantes provenant de l'environnement ou de culture pure. Classiquement, les activités nitrifiantes mesurées suivent une fonction de type Michaëlis-Menten, selon la concentration en substrat (ammonium, nitrite, oxygène), et une relation sigmoïdale avec la température et le pH. Brion & Billen (1998) ont ainsi pu déterminer les paramètres des cinétiques de croissance des bactéries nitrifiantes, présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5. Paramètres cinétiques de croissance des bactéries nitrifiantes (Brion & Billen, 1998).

Paramètres		Unité	Nitrosation	Nitratation
Ks	Constante de demi-saturation pour l'oxydation du substrat (NH_4^+ ou NO_2^-)	µmol L^{-1}	106.8	2
Koxy	Constante de demi-saturation pour l'utilisation de l'oxygène	mg L^{-1}	0.6	1.1
Topt	Température optimale de croissance	°C	22.6	25.9
pHopt	pH optimal de croissance		7.1	7.4
Y	Rendement de croissance	molC $molN^{-1}$	0.09	0.02
µmax	Taux de croissance maximal	h^{-1}	0.05	0.051
Asmax	Activité spécifique maximale	µmolN $µgC^{-1}$ h^{-1}	0.05	0.21

Si en culture pure, les bactéries nitrifiantes oxydent leur substrat selon la cinétique de Monod, lors du traitement des eaux usées cette cinétique est plus difficile à distinguer pour plusieurs raisons : la présence de plusieurs espèces microbiennes impliquées, la diffusion du polluant comme facteur limitant, la prédation, etc. Toutefois, d'après Lee & Oleszkiewicz (2003) la prédation par les protozoaires (tels que les rotifères) n'a aucune incidence significative sur l'activité nitrifiante des boues activées. La taille des flocs des cultures libres peut également influencer les vitesses de nitrification. En effet, les flux moyens de NH_4^+ pour les biofilms autotrophes sont de 0.08 et 0.13 µmol cm^{-2} h^{-1} pour des concentrations en NO_2^-, de 0 et 100 µM de NO_2^-, respectivement.

En boues activées, sur une eau usée synthétique, Dinçer & Kargi (2000), montrent que, dans un gradient de substrat, la vitesse de nitrification suit une cinétique de Michaelis-Menten, avec une vitesse maximale Vm = 25 mg N-NH_4^+ L^{-1} h^{-1} et une constante de demi-saturation (concentration en ammonium pour ½ de Vm) K_N = 5 mg N-NH_4^+ L^{-1}. Metcalf et al. (1991) trouvent une constante de demi-saturation K_N = 1-5 mg N-NH_4^+ L^{-1}. La vitesse de nitrification devient constante (Vm) au-delà de 50 mg N-NH_4^+ L^{-1} (Dinçer & Kargi, 2000). Hall & Murphy (1985) observent une cinétique de nitrification d'ordre zéro pour un effluent contenant plus de 10 mg N-NH_4^+ L^{-1}.

1.5.1.3 Ecologie des bactéries nitrifiantes

1.5.1.3.1 Facteurs influençant la croissance des bactéries nitrifiantes

Oxygène

En raison de leur métabolisme oxydatif, les bactéries nitrifiantes sont dépendantes de la présence en oxygène pour l'oxydation de l'ammonium et du nitrite. Josserand (1983) situe entre 0.5 et 4 mgO_2 L^{-1}, la concentration en oxygène dissous correspondant à une nitrification optimale en culture pure. En boues activées, d'après Wuhrmann (1962), des concentrations en oxygène dissous de 4 à 7 mgO_2 L^{-1} n'améliore pas de façon significative la nitrification, mais une oxygénation de 1 mgO_2 L^{-1} la diminue notablement. Downing et al. (1964) concluent qu'une oxygénation de 1 mgO_2 L^{-1} représente la partie excédentaire d'oxygène non consommé par les bactéries dans le bassin de boues activées, et que le taux de nitrification ne diminue pas lorsqu'on abaisse la teneur en oxygène jusqu'à 0.4 mgO_2 L^{-1}. En effet, Nogueira et al. (1998) reportent que le coefficient moyen de diffusion de l'oxygène à l'intérieur du biofilm serait de 66 % par rapport à la concentration en oxygène dissous mesurée dans l'eau. Du fait de la texture et de la forme des flocs en boues activées, et de la présence de micro-porosités, les valeurs en oxygène dissous mesurées dans le liquide interstitiel seraient plus élevées que les valeurs en oxygène dissous réellement disponibles pour les bactéries (Blicher – Mathiesen & Hoffmann, 1999).

Sur des cultures mixtes (bactéries nitrosantes et nitratantes) en chemostat, Laanbroeck & Gerards (1993), qui ont étudié les cinétiques de consommation de l'oxygène, montrent que la diminution de la pression en oxygène limiterait l'oxydation du nitrite avant que l'oxydation de l'ammonium ne soit affectée, entraînant alors une accumulation du nitrite. Ceci résulte du fait que les bactéries nitratantes possèdent une affinité plus faible pour l'oxygène que les bactéries nitrosantes (Focht & Verstraete, 1977 ; Prosser, 1989 ; Brion & Billen, 1998). La compétition pour l'oxygène serait alors la principale cause de la ségrégation spatiale des bactéries nitrosantes et nitratantes (Poughon et al., 1999). De nombreux auteurs observent, sur les agrégats bactériens en cultures fixées, une activité nitrifiante sur les premiers 120µm du biofilm. Au-delà, dans les couches profondes du biofilm, les bactéries autotrophes sont limitées par la pénétration de l'oxygène (De Beer et al., 1993 ; Schramm et al., 1998 ; Hibiya et al., 2003). Schramm et al. (2000) montrent que dans cette zone anoxique, les bactéries nitrifiantes généralement rencontrées sont représentées en très faible proportion. De manière plus précise, à l'intérieur des biofilms autotrophes nitrifiants, l'oxygène pénètrerait jusqu'à 150 µm mais les nitrosantes se retrouveraient dans les premiers 100 µm alors que les nitratantes se situeraient entre 50 µm et 150 µm, où l'oxygène disparaît (Okabe et al.,1999). Dans tous les cas, les bactéries nitratantes se retrouvent dans les zones où l'oxygène est inférieur à 50µM (1.6 mg O_2 L^{-1}).

En station d'épuration, l'oxygénation dépend de la charge appliquée au niveau des bassins d'aération. En règle générale, il faut 4.6 kgO_2 / kg d'azote à oxyder (ou 1.2 kgO_2 / kg DBO_5 appliquée) ; on maintient 1 à 2 mgO_2 L^{-1} dans le bassin d'aération. Les stations d'épuration de type aération prolongée (faible charge) couvrent généralement ce besoin. Pour une station d'épuration fonctionnant en moyenne charge, il faut 40 % d'O_2 en plus.

Température

De façon générale, comme pour toute activité biologique, la température affecte de manière importante le taux de croissance et le coefficient de rendement cellulaire des bactéries. Les rendements de nitrification chutent avec la température. L'initiation du processus de nitrification devient très difficile en dessous de 12°C.

Les bactéries nitrifiantes sont généralement mésophiles. Elles présentent des températures optimales de croissance entre 26°C et 38°C (Grunditz & Dalhaùùar, 2001). Grunditz & Dalhammar (2001) montrent l'effet de la température sur *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* en culture pure (Figure 17). Le taux de croissance spécifique de *Nitrosomonas* augmente d'environ 10 % et celui de *Nitrobacter* d'environ 6 % après une élévation de température de 1°C, dans une gamme de température entre 8 et 23°C (Knowles et al., 1965).

La température peut également intervenir de façon indirecte sur la nitrification en modifiant la concentration en oxygène dissous, ou la teneur en NH_3 conjointement avec le pH (Laudelout et al., 1976).

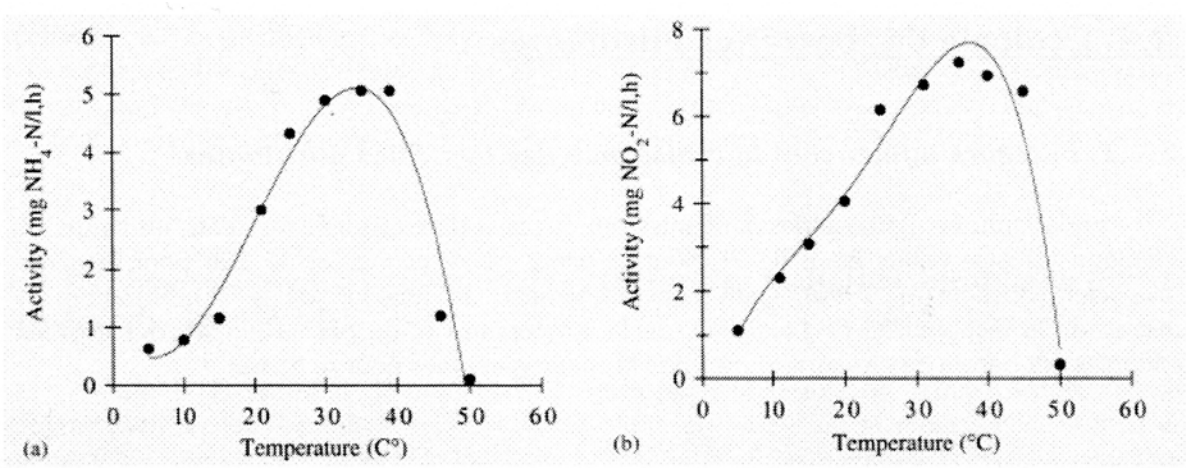


Figure 17. Effet de la température sur l'activité de (a) Nitrosomonas et (b) Nitrobacter (Grunditz & Dalhaùùar, 2001).

pH

Les bactéries nitrifiantes ont une croissance et une activité optimales pour les pH compris entre 7.5 et 8.5 (Josserand, 1983; Bock et al., 1989). Grunditz & Dalhammar (2001) montrent un effet marqué du pH sur *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* en culture pure, un optimum se dégageant effectivement autour d'un pH 8 (Figure 18). Sur des boues activées, Princic et al. (1998), observent que, si un faible pH retarde la nitrification, un pH élevé n'aurait pas d'effet notable sur l'activité nitrifiante ; ces auteurs montrent toutefois que le pH optimal se situe entre 5.8 et 8.5 pour la conversion de l'ammonium en nitrite alors que pour une nitrification complète, il se situe entre 6.5 et 8.5. De même, Shammas (1986) déterminait un pH optimal de 8±0.5 sur les procédés de traitement de l'eau en nitrification. Dans la nature cependant, on trouve des bactéries nitrifiantes dans de très larges gammes de pH , notamment des pH acides (de l'ordre de 3-4 dans les sols forestiers acides) ou basiques (pH 10-11), (Sorokin et al., 1998).

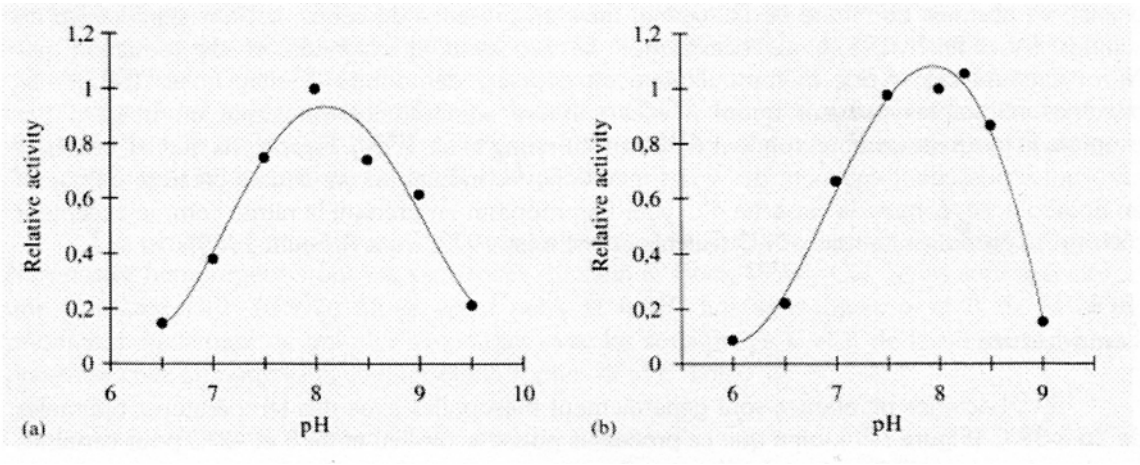


Figure 18. Effet du pH sur l'activité de (a) Nitrosomonas et (b) Nitrobacter, en culture pure (Grunditz & Dalhammar, 2001).

Par ailleurs, le pH influence indirectement les bactéries nitrifiantes en favorisant ou non la formation des formes libres de l'ammonium ou de l'acide nitreux, qui inhiberaient les bactéries. A pH acide, l'inhibition serait due à la formation de HNO_2, et à pH basique à la formation de NH_3 (Anthonisen et al., 1976). Dans l'environnement, un équilibre s'établit entre l'ammoniaque et l'ammonium en fonction du pH et de la température d'après l'équation suivante : $NH_3 = [1.214\ (NH_4^+ + NH_3)10^{pH}]\ /\ [\exp^{(6344/273\ +\ T°C)} + 10^{pH}]$ (Anthonisen et al., 1976). Toutefois il a été montré plus récemment que le substrat de la nitrosation serait plus le NH_3 que le NH_4^+ (Painter, 1986). La réduction d'activité serait donc due, à pH acide, à la limitation en NH_3 libre. La concentration de NH_3 dépend de la concentration totale en ammonium (équilibre NH_3/ NH_4^+), l'action du pH est donc variable suivant la concentration totale en ammonium, plus le substrat est concentré, plus la culture supportera des pH acides (Painter, 1986 ; Allison & Prosser, 1993)

Alcalinité

L'alcalinité est une variable importante de la nitrification. L'alcalinité requise pour la nitrification peut être calculée par la formule suivante (Eckenfelder & Grau, 1992). :

$$\text{Alc. Requ.} = 7.2 \times (NO_3\text{-}N)\ \text{formé} + 50 - (\text{Alc.})\text{in}$$

(L'alcalinité est exprimée ici en mg. de $CaCO_3$ L^{-1} et le nitrate formé est exprimée en mg N-NO_3 L^{-1} ; Alc. Requ. : alcalinité requise ; (Alc.)in : alcalinité de l'effluent).

Les bicarbonates sont consommés à raison de 8.63 mg d'HCO_3 / mg de NH_4^+ oxydé (Eckenfelder & Grau, 1992). Il est nécessaire d'avoir une forte alcalinité dans la mesure où il y a acidification et diminution du pouvoir tampon du milieu lors de la nitrification. Une réserve alcaline permet la stabilisation du pH. Ainsi l'alcalinité du milieu, plus que le pH, serait un facteur influençant réellement l'activité nitrifiante (Biesterfeld et al., 2003).

Concentration en substrat et en produit d'oxydation

De manière générale, les concentrations en NH_4^+ de 2 à 10 mM et en NO_2^- de 2 à 30 mM sont optimales (Bock et al , 1986). Pinck et al. (2001) ont cependant montré que, même avec une concentration en ammonium inférieure à la constante de demi-saturation de l'ammonium monooxygénase (Amo) (Ks = 1.8 mM), la faible activité enzymatique était compensée par une quantité importante d'enzymes.
L'Amo est présente dans la cellule avec ou sans substrat. L'augmentation d'Amo dans la cellule en même temps que le substrat est due à une augmentation de la protection de l'enzyme (ainsi moins vite dégradée) et non à une augmentation de sa production (Pinck et al., 2001).

Les bactéries nitrifiantes peuvent être inhibées par leur propre substrat, ainsi que par leur produit d'oxydation. En effet, le nitrite devient rétro-inhibiteur de la nitrosation lorsqu'il atteint de trop fortes concentrations, inhibant alors l'ammonium monooxygénase (Sümer et al., 1995). Les produits d'oxydation, nitrite et nitrate, sont inhibiteurs à des concentrations respectivement de 300 mgN L^{-1} (20 mM NO_2^-) pour le genre *Nitrosomonas* et de 4000 mgN L^{-1} (285 mM NO_3^-) pour le genre *Nitrobacter* (Bock et al, 1989). De telles valeurs ne sont cependant pas observées en stations d'épuration urbaines. Stein et Arp (1998a, 1998b) montrent qu'une charge faible en ammonium entraîne une diminution de l'activité des bactéries nitrosantes, via l'Amo spécifiquement, mais pas l'Hao ; ils montrent également que l'Amo peut être inhibée de façon irréversible par une concentration importante en nitrite (les nitrates en revanche n'auraient aucun effet), alors que l'Hao n'est pas du tout affectée. L'accumulation de nitrite pourrait donc conduire à une toxicité. A noter en outre (cf. ci-dessus) que des concentrations élevées (10 à 150 mgN L^{-1} pour les bactéries nitrosantes et 0.1 à 1.0 mgN L^{-1} pour les bactéries nitratantes) en NH_3 (pH basique) et en HNO_2 (0.22 à 2.8 mgN L^{-1} pour les bactéries nitratantes) (pH acide) peuvent respectivement inhiber la nitrosation et/ou la nitratation (Anthonisen et al., 1976).

Composés organiques

L'addition de matière organique a peu d'effet direct sur la nitrification, puisqu'elle ne contribue pas à la croissance des bactéries nitrifiantes (Downing et al., 1964). Il faut une quantité importante (bien supérieure à celle rencontrée dans les effluents urbains) pour observer un effet significatif. Par contre, cet effet augmenterait lorsque l'oxygénation est limitante (Kiff, 1972). Plus récemment des travaux ont montré qu'un rapport C/N important (C/N > 1.5) diminue les performances de nitrification dans les biofilms (Okabe et al., 1996) et selon Dinçer & Kargi (2000), ce rapport C/N dans les eaux usées doit être inférieur à 0.25 pour une nitrification effective.

1.5.1.3.2 Écologie des bactéries nitrifiantes en stations d'épuration

Les bactéries nitrifiantes sont largement distribuées dans une grande diversité de milieux : eau douce, milieux marins, sol, systèmes d'épuration des eaux, et même dans des milieux plus extrêmes tels que des systèmes de chauffage à des températures supérieures à 47 °C ou dans le permafrost à –12°C, ou encore dans des milieux à pH acide (pH=4) ou alcalins (pH= 9.7-10.5) (Sorokin et al, 1998). L'association des bactéries nitrifiantes à un support (particules en suspension, formant des clusters, agrégats, flocs ou biofilms) est observée tant en milieux naturels (Lusby et al, 1998 ; Koops & Pommerening-Röser, 2001), qu'en station d'épuration (Okabe et al., 1999).

En station d'épuration, les bactéries nitrifiantes sont souvent assemblées en agrégats ou biofilms grâce à la production de polymères extracellulaires (EPS), formant un manteau de lipopolysaccharides qui leur procure un fort pouvoir de fixation. Elles sont alors plus résistantes aux inhibiteurs de la nitrification (Powell & Prosser, 1991), peuvent supporter des pH relativement faibles (Allisson & Prosser, 1993) et sont protégées de la dessiccation et de la prédation (Prosser, 1989 ; Watson et al., 1989 ; Verhagen et al., 1993 ; Stehr et al., 1995). L'agrégation des bactéries entre elles permet également une meilleure adsorption des nutriments (Okabe et al., 1999). L'introduction de particules inertes dans le milieu, sur lesquelles 70 à 95 % des bactéries nitrifiantes présentes se fixent après 30 minutes, démontre la forte affinité des bactéries nitrifiantes pour la fixation quelle qu'elle soit (Diab & Shilo, 1998). La nitrification serait 130 % supérieure dans un biofilm fixé que dans une culture libre (Audic et al., 1984). Une proximité cellulaire et une forte concentration bactérienne procure donc un avantage écologique dans les environnements où le substrat est présent de façon irrégulière.

La sensibilité aux facteurs environnementaux étant différente selon les espèces, à chaque niche écologique particulière correspondra une association de bactéries nitrifiantes spécialisées.

Dans les eaux usées, la bactérie nitrosante la plus commune serait *Nitrosomonas* (Watson et al., 1989 ; Wagner et al., 1995 ; Princic et al., 1998 ; Okabe et al., 1999). Sur les 30 % de bactéries nitrosantes des biofilms autotrophes (au lieu de 10 % pour les biofilms hétérotrophes), 96 % sont des *Nitrosomonas* de trois genres différents (*Nitrosomonas europaea, Nitrosomonas eutropha* et *Nitrosomonas halophila*), (Okabe et al., 1999). *Nitrosospira multiformis* a également été détectée au sein des boues autotrophes, mais leur densité cellulaire ne représentait que la moitié de celle des *Nitrosomonas* (0.51 cellules μm^{-2} contre 1.12 cellules μm^{-2}), (Okabe et al., 2004). Cependant, tout comme pour *Nitrosococcus,* les outils utilisés peuvent ne pas permettre leur détection (Princic et al.,1998 ; Okabe et al., 1999).

La bactérie nitratante dominante serait *Nitrospira*, mais présente en nombre limité ; l'augmentation de l'oxygénation accroît l'oxydation de NH_4^+ mais pas celle du NO_2^- (Okabe et al., 1999). Princic et al. (1998) et Okabe et al. (1999) n'ont pas détecté de *Nitrobacter*, dans les eaux usées, à la différence de Cébron & Garnier (2005) pour les eaux étudiées ici. Même si *Nitrobacter* croit plus vite en culture pure que *Nitrospira,* elle n'est compétitive dans les boues activées que lorsque l'oxygène et le nitrite sont en concentrations importantes (Okabe et al., 1999 ; Cébron & Garnier, 2005). Il semble donc que *Nitrospira* serait prédominante par rapport à *Nitrobacter* dans les eaux usées.

La proportion des bactéries hétérotrophes au sein des boues autotrophes ne varie pas, quelle que soit la réaction (nitrosation forte charge, nitrosation faible charge et nitratation), (Holben et al., 1998). Les abondances restent relativement stables (10^7 CFU ml^{-1}) dans des conditions variées de pH, d'ammonium ou d'oxygénation, exceptée dans des conditions précises (1 % d'oxygène et 50 mgN L^{-1} d'ammonium) pour lesquelles, les bactéries hétérotrophes augmenteraient (Princic et al., 1998).

En dehors de conditions extrêmes et d'un temps suffisamment long, les communautés bactériennes des boues activées, ont déjà subi une sélection importante par le traitement de l'effluent et varient donc peu au cours du temps (Princic et al., 1998).

Toutefois, la distribution entre bactéries autotrophes et hétérotrophes, au sein du biofilm, peut changer en fonction de l'oxygénation, mais aussi du carbone organique. En effet, lorsque Okabe et al. (2004) augmente le rapport C/N à 1, la taille des micro-colonies augmente vers le fond du biofilm de 80 %. L'addition de carbone organique crée une compétition pour l'oxygène entre les hétérotrophes et les autotrophes. Un ajout de carbone organique peut diminuer fortement l'activité nitrifiante et ce en peu de temps (3 h). De même, une charge en ammonium élevée serait favorable au développement de *Nitrosomonas eutropha* (Princic et al., 1998). D'après Holben et al. (1998), il y aurait deux espèces de bactéries nitrosantes représentées : une pour les fortes charges, l'autre pour les faibles charges. Ces deux espèces possèdent des affinités, une sensibilité et des traits physiologiques relatifs aux trois éléments azote (nitrite, nitrate et ammonium) différents. Elles possèdent le même gène codant pour l'hydroxylamine oxydoréductase (Hao), mais un gène codant différent pour l'ammonium monooxygénase (Amo) (Holben et al., 1998).

1.5.2 Dénitrification et bactéries dénitrifiantes

La dénitrification constitue l'un des processus les plus important du cycle de l'azote réalisé par les bactéries. La dénitrification produit de l'azote atmosphérique à partir du nitrate présent ou/et introduit dans la biosphère. Elle fait également partie du dispositif bioénergétique de la cellule bactérienne, où les oxyanions azotés (nitrate et nitrite) et les oxydes d'azotes gazeux (NO et N_2O) prennent la place de l'oxygène lorsqu'il est absent, comme accepteur final, lors de la phosphorylation par transport d'électrons.

1.5.2.1 Taxonomie et phylogénie des bactéries dénitrifiantes

Un grand nombre de bactéries hétérotrophes, physiologiquement et taxonomiquement différentes, sont capables de dénitrifier (Knowles, 1996). Presque 130 espèces bactériennes dénitrifiantes ont été trouvées avec plus de 50 genres (Zmuft, 1992). Les genres principaux associés à la dénitrification sont : *Actinomyces, Aeromonas, Agrobacterium, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Bacteroides, Campylobacter, Cellulomonas, Chromobacterium, Citrobacter, Clostridium, Enterobacter, Erwinia, Escherichia, Eubacterium, Flavobacterium, Geodermatophilus, Halobacterium, Halococcus, Hyphomicrobium, Klebsiella, Leptothrix, Micrococcus, Moraxella, Mycobacterium, Nocardia, Peptococcus, Photobacterium, Proteus, Pseudomonas, Rhizobium, Salmonella, Serratia, Shigella, Spirillum, Staphylococcus, Streptomyces, Thiobacillus, Vibrio.* Toutefois, même si de nombreux organismes sont capables de réduire le nitrate en nitrite en absence d'oxygène, seuls quelques-uns sont capables d'une dénitrification complète (transformation du nitrate en azote gazeux). Parmi eux : *Pseudomonas denitrificans, Pseudomonas Stutzeri, Pseudomonas aeruginosa, Micrococcus denitrificans* et *Thiobacillus denitrificans* (Kiff, 1972).

Les bactéries dénitrifiantes sont phylogénétiquement diverses. On les retrouve dans tous les groupes physiologiques majeurs, sauf chez les Eubacteriaceae autres que les *Bacillus* spp. (Zumft, 1992). De nombreuses études sur la diversité des bactéries dénitrifiantes se tournent actuellement vers l'amplification de gènes fonctionnels de la dénitrification. Ces gènes peuvent être les gènes de la nitrate réductase periplasmique ou liées à la membrane (NapA et NarG) (Flanagan et al., 1999 ; Gregory et al., 2000), les gènes codant pour le cytochrome *b* (NorB), sous-unité de la réductase de l'oxyde nitrique (Zmuft, 1997), les cytochromes *c et* d_1, relatif aux nitrites réductases dont une contient du cuivre (NirS et NirK respectivement) (Braker et al., 2000), et un gène codant pour l'oxyde nitreux réductase (NosZ) (Scala & Kerkhof, 1998; Scala & Kerkhof, 1999),(Figure 19). Ces études ont révélé une importante diversité des gènes de dénitrification dans l'environnement qui, souvent, sont divergents des gènes provenant des bactéries dénitrifiantes en culture (Braker et al., 2000; Gregory et al., 2000).

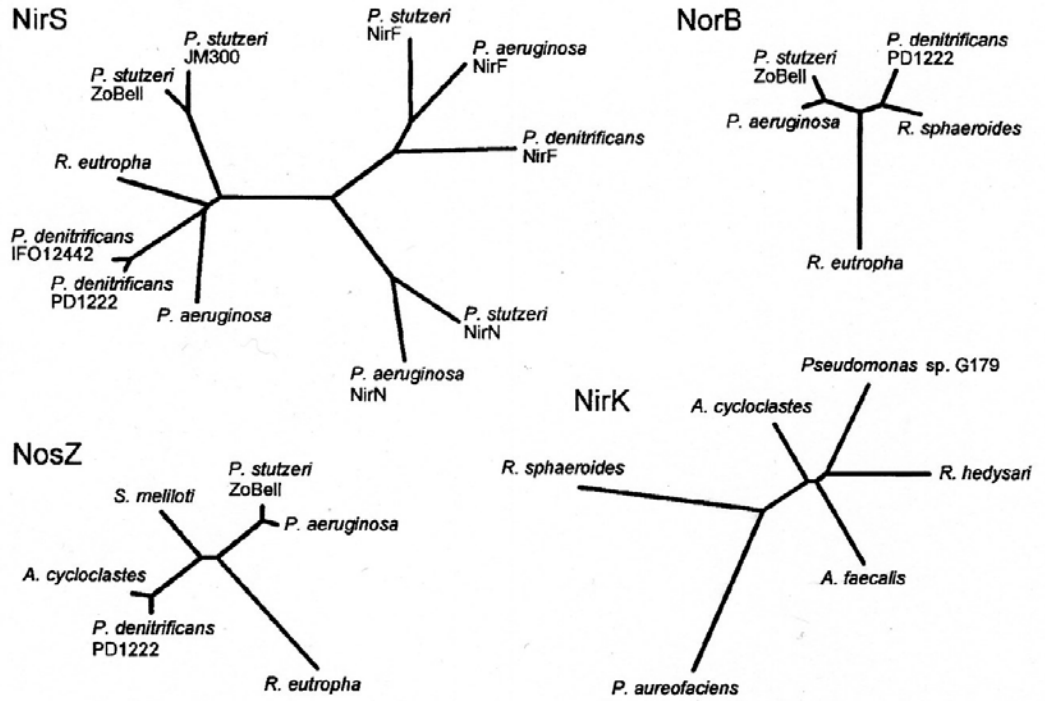


Figure 19. Séquences relatives aux oxydoreductases terminales de la dénitrification. Arbres phylogénétiques sans racines communes suivant : NirS, cytochrome cd_1 relié aux protéines nitrite réductase NirF et NirN ; NorB, cytochrome b sous-unité de la réductase de l'oxyde nitrique ; NosZ, codant pour la réductase de l'oxyde nitreux ; NirK codant pour la nitrite réductase contenant du cuivre (Zmuft, 1997).

1.5.2.2 Métabolisme dénitrifiant

1.5.2.2.1 Métabolisme énergétique

La dénitrification est un processus respiratoire microbien au cours duquel des micro-organismes sont capables de substituer à l'oxygène des formes oxydées de l'azote comme accepteur terminal d'électrons dans la chaîne respiratoire, lors de l'oxydation de la matière organique. Les oxydes d'azote solubles, nitrates (NO_3^-) ou nitrites (NO_2^-), sont transformés en composés gazeux : oxyde nitrique (NO), oxyde nitreux (N_2O) et/ou diazote (N_2) (Figure 20). Le processus de dénitrification s'effectue en quatre étapes, au cours desquelles, l'atome d'azote lié à l'oxygène gagne progressivement des électrons, et passe du degré d'oxydation + 5 au degré d'oxydation 0 (Figure 20). Chacune de ces étapes est catalysée par une enzyme : la nitrate réductase, la nitrite réductase, l'oxyde nitrique réductase et l'oxyde nitreux réductase, (Figure 20).

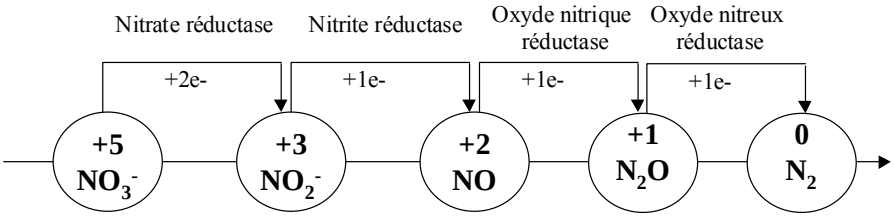


Figure 20. Gains d'électrons et degré d'oxydation des différents éléments azotés au cours des différentes étapes de la dénitrification, catalysées chacune par une enzyme spécifique.

Une chaîne respiratoire est un complexe membranaire associant transporteurs d'électrons, enzymes et transporteurs de protons. Elle permet notamment l'oxydation de composés réduits ($NADH+H^+$ en NAD^+ par exemple) avec la réduction concomitante d'accepteurs terminaux d'électrons (NO_3^- en NO_2^- par exemple), en combinant à certaines étapes du transfert des électrons, le transport de protons de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule (Figure 21). Le retour des protons dans la cellule peut être associé à la création d'énergie cellulaire sous forme d'ATP. Il faut noter que la respiration anaérobie n'est pas aussi efficace que la respiration aérobie dans la synthèse d'ATP. La différence de potentiel entre le NADH et le nitrate est plus petite qu'entre le NADH et l'oxygène ; le rendement énergétique est donc plus faible (Prescott et al., 2003).

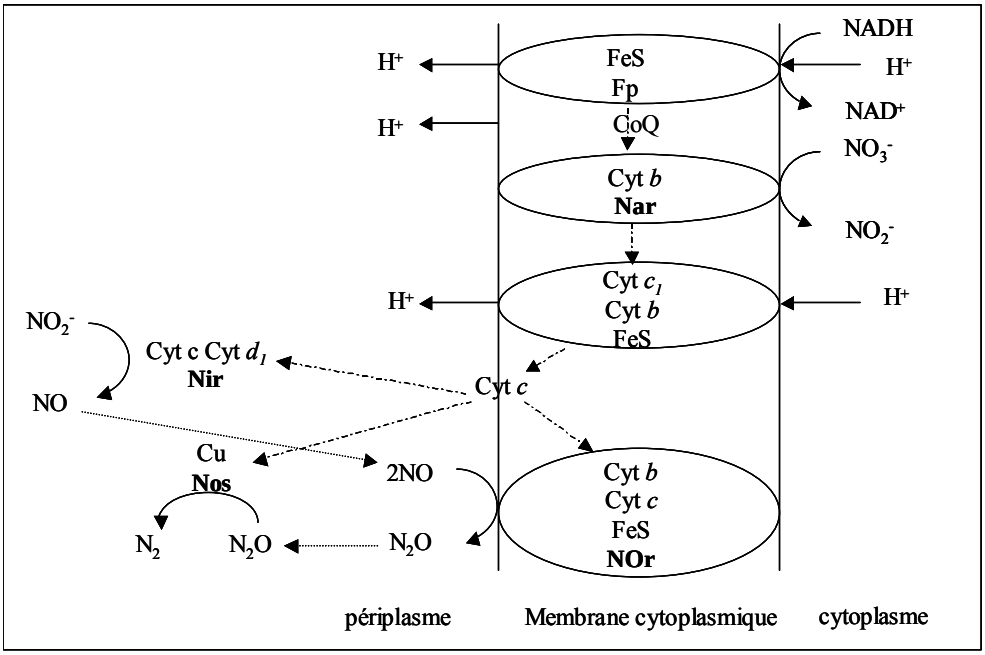


Figure 21. Chaînes de transfert d'électrons chez Paracoccus, respiration anaérobie . (la quantité de protons n'est pas indiquée) (d'après Prescott et al., 2003).
Chez Paracoccus, la nitrite réductase et la réductase de l'oxyde nitrique sont périplasmiques, alors que la nitrate réductase et la réductase de l'oxyde nitreux sont liées à la membrane (Prescott et al., 2003). Chaque étape est liée à une enzyme, la nitrate réductase (Nar), la nitrite réductase (Nir), la réductase de l'oxyde nitrique (NOr) et la réductase de l'oxyde nitreux (Nos).

1.5.2.2.2 Assimilation du carbone – métabolisme hétérotrophe

Les organismes hétérotrophes doivent synthétiser la matière organique à partir de molécules organiques réduites (CHO) et non à partir de CO_2; les hétérotrophes peuvent ainsi assimiler une vaste gamme de sources de carbone (glucose, pyruvate, lactose, méthanol, etc.). Le glucose, par exemple, peut être utilisé par beaucoup d'hétérotrophes et son mode d'assimilation va dépendre des voies et systèmes enzymatiques de l'organisme considéré. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* peut assimiler le glucose par oxydation extracytoplasmique. *Paracoccus* oxyde le méthanol en formaldéhyde, lequel est converti en CO_2 puis incorporé par le cycle de Calvin (Prescott et al., 2003). Ces voies fournissent à la fois l'énergie et les composés qui servent de points de départ pour les biosynthèses.

1.5.2.2.3 Croissance des bactéries dénitrifiantes et cinétiques de dénitrification

Plusieurs auteurs ont étudié les cinétiques de certaines enzymes de la dénitrification sur différentes espèces bactériennes et en ont déterminé les paramètres. Quelques exemples sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6. Quelques paramètres cinétiques de croissance pour certaines bactéries dénitrifiantes (Vmax : vitesse maximale en µM.min-1 ; Km : constante de demi-saturation en µM).

	Km nitrate reductase	Vmax nitrate reductase	Km nitrite reductase	Km N_2O reductase	Références
Alcaligenes sp.			12.9±2.6		Betlach & Tiedje (1981)
Flavobacterium sp.			5.6±1.6	0.5	Betlach & Tiedje (1981)
Paracoccus denitrificans				5	Kristjansson & Hollocher (1980)
Pseudomonas denitrificans				30 à 60	Matsubara & Mori (1968)
Pseudomonas fluorescens	6. ±0 1.8	1.6	5.5 ±1.1		Betlach & Tiedje (1981) Edwards & Tiedje, (1981)
Pseudomonas aeruginosa				< 100	St. John & Hollocher (1977)
Pseudomonas stutzeri JM300	5.7± 2.4	1.56			Edwards & Tiedje, (1981)

Müller & Babel (1996) ont étudié la croissance d'*Alcaligenes eutrophus* JMP 134 en culture pure anaérobie, sur plusieurs substrats. Ils montrent que, selon le substrat, la constante de demi-saturation est différente ; respectivement 0.20, 0.10 et 0.18 mgN- NO_3^- L^{-1} (14, 6.9 et 12.8 µM) pour le fructose, le phénol et le 2,4-D.

Les vitesses de dénitrification en rivière sont fonction des concentrations en nitrate, et présentent une courbe de type Michaelis-Menten avec des vitesses maximales comprises entre 0.5 et 4.5 mgN- NO_3^- m^{-2} h^{-1} (35.8 et 324 µmolN m^{-2} h^{-1}) et une constante de demi-saturation entre 0.2 et 1.3 mgN- NO_3^- L^{-1} (13.1 et 90.4µM) (Garcia-Ruiz et al., 1998). Sur cultures fixées, avec une eau usée synthétique et du glucose comme source de carbone, Dinçer & Kargi (2000) observent pour la dénitrification, une cinétique de type Michaelis-Menten, avec

une vitesse maximale de 11.7 mgN-(NO_2^-+ NO_3^-) L^{-1} h^{-1} et une constante de demi-saturation de 0.27 mgN-(NO_2^-+ NO_3^-) L^{-1}. Metcalf et al. (1991) trouvent une constante de demi-saturation comprise entre 0.1et 0.3 mgN-(NO_2^-+ NO_3^-) L^{-1}. En boues activées, la vitesse de dénitrification serait d'ordre zéro pour des concentrations supérieures à 5 mg N-NO_3^- L^{-1} (Carucci et al., 1996).

1.5.2.3 Ecologie des bactéries dénitrifiantes

1.5.2.3.1 Facteurs influençant la croissance des bactéries dénitrifiantes

Les facteurs de contrôle de la croissance des bactéries dénitrifiantes ont été étudiés dès les années 60-70. Si certains résultats ont été confortés par des études plus récentes, d'autres n'ont jamais été démentis.

Oxygène

Les concentrations en oxygène dépendent, (i) du taux de consommation de l'oxygène, (ii) du taux de diffusion d'O_2, (iii) de la géométrie du passage de diffusion et probablement d'autres facteurs (Knowles, 1982).

Il est généralement admis que les enzymes réduisant les oxydes d'azote sont réprimées par l'oxygène (Payne, 1973), même à de faibles concentrations (Kiff, 1972). On avait en effet montré depuis longtemps que l'oxygène diminuait le taux de dénitrification de 45 % avec une oxygénation à 2 % de la saturation et de 73 % à 20.6 % de la saturation, et supprimait la formation de la nitrate réductase (Sacks & Barker, 1949). Si de faibles concentrations en oxygène diminuent le taux de dénitrification, il a été très tôt mentionné qu'ils causaient en même temps une plus large proportion de N_2O en produit final (Focht, 1974).

Plus récemment, sur boues activées, Beline et al. (2001) mentionnent que l'inhibition de la dénitrification apparaîtrait pour une oxygénation supérieure à 3.8 mg O_2. L^{-1}. Néanmoins, certaines bactéries peuvent dénitrifier en aérobie : en effet, *Paracoccus denitrificans (vs Thiosphaera pantotropha*) serait capable de dénitrifier dans un environnement saturé à 90 % en oxygène (Robertson & Kuenen, 1984 ; Davies, 1989), et à 53 % chez *Alcaligenes sp*. (Krul & Veeningen, 1977). La production d'enzymes dénitrifiantes resterait tout de même maximale en anaérobiose et micro-aérobie (Körner & Zumft, 1989).

La nitrate réductase serait réprimée en culture continue dès 0.35 % d'O_2 chez *Azospirillum brasilense* (Nelson & Knowles, 1978). Elle serait déréprimée à 5 % d'O_2 chez *Pseudomonas denitrificans* (Sacks & Backer, 1949) et à 1.3 % d'O_2 chez *Thiobacillus denitrificans* (Justin & Kelly, 1978); il a été reporté également qu'une bactérie isolée d'une boue activée, présentait une nitrate réductase déréprimée en présence d'une forte teneur en oxygène, 15 mg O_2 L^{-1} (> 21 % O_2) (Krul & Veeningen, 1977). La nitrite réductase serait plus sensible à l'oxygène que la nitrate réductase (Sacks & Barker, 1949 ; Krul & Veeningen, 1977 ; Melberg et al., 1980). L'oxyde nitreux réductase ne serait déréprimée qu'en absence totale d'oxygène (Matsubara, 1971 ; Payne et al., 1971 ; Payne, 1973), et serait donc l'enzyme la plus sensible à la présence d'oxygène (Bonin et al., 1989). En effet, les réductases se trouvant en bout de chaîne respiratoire seraient plus sensibles à l'oxygène que celles qui se trouvent au début (Sacks & Barker, 1949 ; Krul & Veeningen, 1977 ; Payne, 1973 ; Betlach &

Tiedje, 1981). La nitrate et la nitrite réductase étant déréprimées avant l'oxyde nitreux réductase, il en résulte une accumulation de N_2O qui devient le produit final dominant, lorsque des conditions anaérobies s'installent ; puis, l'activité de l'oxyde nitreux réductase augmentant, le N_2 devient le produit majeur (Firestone & Tiedje, 1979 ; Smith & Tiedje, 1979). Selon Payne (1973) et Stouthamer (1976), les performances des réductases de la dénitrification, pour toutes cellules subitement ou graduellement inactivées par l'oxygène, seraient dues à une compétition pour les électrons plus que par une inactivation des enzymes elles–mêmes par l'oxygène

Carbone organique

La disponibilité des électrons dans les composés en carbone organique est l'un des facteurs les plus importants pour l'activité des hétérotrophes, dont les dénitrifiantes (Knowles, 1982). Avec l'oxygène dissous, le carbone organique est le principal facteur de la dénitrification en boues activées (Kiff, 1972).

Il a été clairement montré que l'activité des bactéries dénitrifiantes était hautement corrélée au carbone organique (Bremmer & Shaw, 1958 ; Burford & Bremmer, 1975). Cette activité est également fréquemment stimulée par une addition de carbone exogène (Bowman & Focht, 1974 ; Itokawa et al., 2001 ; Marchetto et al., 2003). Plusieurs composés carbonés organiques qui amènent à des vitesses de dénitrification comparables peuvent néanmoins conduire à des proportions différentes de N_2O comme produit final (Bremmer, 1977) ; ce résultat suggère que ces composés exercent des effets différents sur l'évolution des diverses réductases de la dénitrification.

Lors de l'élimination du nitrate au niveau des stations d'épuration, le carbone et l'énergie nécessaires à la dénitrification sont apportés, par l'introduction d'une quantité d'eau non traitée (Klapwijk et al., 1981a) qui apporte moins de 2.3 mg de DBO_5 $mgN\text{-}NO_3^{-1}$ (Narkis et al., 1979), ou par l'addition d'autres sources de carbone. Mohseni-Bandpi & Elliot (1998) suggèrent que l'efficacité de la dénitrification est affectée par la nature et la masse moléculaire des composés carbonés disponibles. La dénitrification est plus lente dans les réacteurs alimentés avec de l'eau usée domestique ou du glucose ; la complexité de ces substrats déccélère le processus (Marchetto et al., 2003). Le méthanol est souvent utilisé (Nurse, 1980 ; Klapwijk et al., 1981b). On note que l'addition de ce dernier cause un enrichissement important en bactéries dénitrifiantes *Hyphomicrobium* spp. (Nurse, 1980).

Température

D'après Kiff (1972), en boues activées, la température optimale est de 20°C avec une nette diminution de la dénitrification entre 5 et 10 °C. L'exposition d'un sol ou d'une boue activée à des températures comprises entre 10°C et 35°C conduit à un Q_{10} (vitesse de dénitrification à (T + 10)°C / vitesse de dénitrification à T°C) de 1.5 à 3.0 (Nömmik, 1956, Dawson & Murphy, 1972 ; Bailey & Beauchamp, 1973 ; Stanford et al., 1975). La vitesse de dénitrification augmente jusqu'à un maximum, aux températures comprises entre 60 et 75°C et décroît rapidement au-delà (Bremmer & Shaw, 1958 ; Keeney et al., 1979). On note qu'aux températures les plus hautes, la proportion de N_2O comme produit final de la dénitrification tend à être plus importante (Keeney et al., 1979, Knowles, 1981a). Aux basses températures, la dénitrification au niveau des sols diminue sensiblement, mais est toutefois mesurable,

même à des températures de 0 à 5°C (Bremmer &Shaw, 1958 ; Bailey & Beauchamp, 1973 ; Smid & Beauchamp, 1976). A ces températures, une proportion relativement importante de N_2O (Nömmik, 1956) et de NO (Bailey, 1976) a été mentionnée.

pH

Kiff (1972), en boues activées, ne remarque aucun effet du pH sur la dénitrification entre 6.5 et 8.5. Il observe en revanche un abattement de la dénitrification au pH 5.5. En culture pure, aussi bien que dans le milieu naturel, la vitesse de dénitrification est positivement reliée au pH, avec un optimum pour des pH compris entre 7.0 et 8.0 (Wijler & Delwiche, 1954 ; Nömmik, 1956 ; Van Cleemput & Patrick, 1974 ; Müller et al., 1980).

Aux faibles pH, les enzymes réduisant les oxydes d'azotes, et plus spécialement la N_2O réductase, sont progressivement inhibées. Cela entraînerait une décroissance des vitesses de dénitrification accompagnée d'une augmentation du taux de N_2O comme produit final. A pH 4, le N_2O peut être le produit final majeur (Wijler & Delwiche, 1954 ; Nömmik, 1956). L'interprétation du processus de dénitrification aux faibles pH est compliquée car des réactions abiotiques, avec le nitrite par exemple, peuvent intervenir (Knowles, 1981b). De plus la dénitrification produit de l'alcalinité et augmente le pH.

1.5.2.3.2 Ecologie des bactéries dénitrifiantes en station d'épuration

Les études de Neef et al (1996) sur les bactéries dénitrifiantes d'un filtre à sable alimenté en eau usée urbaine montrent que le biofilm a une épaisseur moyenne de 13 à 20 µm. Ils ont isolé 56 espèces bactériennes dénitrifiantes différentes, dont 3.5 % de *Paracoccus* spp (*P. denitrificans* et *P. versutus* notamment) et 2 % de *Hyphomicrobium* spp. Selon ces auteurs, la prédominance de *Paracoccus* spp serait due à leur résistance aux concentrations fortes en oxygène, qui apparaît lors des cycles de décolmatage des filtres.

Krogulska & Mycielski (1984) ont eux mis en évidence, sur boues activées provenant d'un traitement d'eau usée industrielle, une dominance à 90 % d' *Alcaligenes faecalis* et de *Paracoccus denitrificans*. D'autres auteurs ont trouvé, comme principales responsables de la dénitrification en eaux usées, les bactéries *Alcaligenes* (Kakutani et al., 1981), *Pseudomonas aeruginosa* (Fabig & Ottow, 1979), *Achromobacter* et *Bacillus* (Smith et al, 1972), et des bactéries similaires mais non identiques à *Moraxella* et *Acinetobacter* (Fabig & Ottow, 1979).

Au total, les populations dénitrifiantes sont très diversifiées et d'après Noda et al. (2002), cette diversité varie avec la charge en nitrate, la température et les conditions du réacteur. En outre, les boues activées hétérotrophes plus laches, avec des alvéoles interstitielles, et un bord plus irrégulier que les boues activées autotrophes seraient favorables à cette diversification des organismes (Okabe et al., 1999). Les travaux de Metz et al. (2003) montrent par une méthode immunologique, que la nitrite réductase est présente à l'extérieur mais aussi à l'intérieur des flocs dénitrifiants provenant d'une station de traitement d'eaux usées municipale, ce qui confirme une large colonisation des habitats.

1.5.3 Émissions d'oxyde nitreux

Les stations d'épuration sont le siège de production d'oxyde d'azote. Ces oxydes sont produits par les bactéries impliquées dans le cycle de l'azote via les processus de dénitrification (Knowles, 1982) et de nitrification (Goreau et al., 1980 ; Poth & Focht, 1985). On note qu'une faible quantité de N_2O est produite de façon abiotique (qui peut être vérifiée quand on utilise des inhibiteurs de nitrification), (Anderson et al., 1993). Cette dernière reste toutefois négligeable.

1.5.3.1 Processus de production de l'oxyde nitreux

1.5.3.1.1 Nitrification autotrophe et décomposition chimique

La nitrification ne produit du N_2O que dans de faibles proportions, lorsque les conditions d'oxygénation ne sont pas limitantes (Hynes et al., 1984 ; Jiang & Bakken 1999). La formation du N_2O pourrait être due à la décomposition d'un intermédiaire instable de la nitrosation, et plus précisément lors de l'oxydation du NH_2OH en NO_2^- (Casciotti & Ward, 2001). L'oxyde nitreux peut être formé durant : i) l'oxydation du NH_4^+ à travers une décomposition chimique d'intermédiaires tels que le NH_2OH ou le NO_2^- (Chalk & Smith, 1983) ou, ii) une oxydation incomplète de NH_2OH (Hooper & Terry, 1979). Toutefois Yoshinari (1990) mentionne que la production chimique du N_2O apparaît seulement en présence de concentrations relativement élevées de NO_2^- (>1mM vs 14 mgN- NO_2^- L^{-1}), concentrations peu rencontrées dans les milieux naturels et rarement en station d'épuration. A noter que selon Goreau et al. (1980) il n'y aurait pas d'émissions de N_2O par *Nitrobacter*.

1.5.3.1.2 Nitrification hétérotrophe

Des organismes autres que les bactéries autotrophes, telles que des bactéries hétérotrophes, sont capables d'effectuer une nitrification (Richardson et al., 1998). La nitrification hétérotrophe interviendrait préférentiellement sous des conditions différentes de la nitrification autotrophe, notamment dans un environnement à pH acide (Killham, 1986).

Les intermédiaires et les produits de la nitrification hétérotrophe et autotrophe sont les mêmes, bien que les enzymes respectives seraient différentes entre elles (Richardson et al., 1998). Castignetti & Hollocher (1984) montrent en effet que certaines bactéries dénitrifiantes sont capables de nitrifier, en oxydant le NH_2OH en nitrite notamment à des taux important, (*Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens* 400, *Pseudomonas* ou *Aeruginosa)*. L'activité de nitrification hétérotrophe reste toutefois strictement dépendante de la présence d'une source de carbone autre que du CO_2, et d'une source d'azote qui peut être du NH_4Cl, mais aussi du $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$ ou de l'urée (Papen et al., 1989). Beaucoup de ces bactéries nitrifiantes hétérotrophes ont été isolées des sols et des systèmes de traitement des eaux usées (*Alcaligenes faecalis*, *Thiosphaera pantothropha* : Matsuzaka et al., 2003).

Il a toutefois été montré qu'un faible nombre de bactéries hétérotrophes nitrifiantes étaient capables d'effectuer une nitrification en même temps qu'une dénitrification aérobie : il s'agit d' *Alcaligenes* sp. (Papen et al., 1989, Otte et al., 1996), de *Pseudomonas aeruginosa* (Amarger & Alexander, 1968 ; Obaton et al., 1968) ou de *Thiosphaera pantotropha* (Arts et al., 1995 ; Robertson et al., 1995). Ces organismes peuvent en fait oxyder l'ammonium en nitrate, via le nitrite, et aussi réduire le nitrite par la suite en azote gazeux (N_2) (Matsuzaka et al., 2003). Cependant, le nitrate serait produit par une plus faible proportion de microorganismes hétérotrophes nitrifiants que le nitrite (Doxtader & Alexander, 1966). La production de nitrite et de nitrate par un même organisme hétérotrophe nitrifiant, n'aurait été mentionnée que pour *Arthrobacter* sp. (Verstraete & Alexander, 1972) et *Aspergillus flavus* CMC 5 (Hirsch et al., 1961).

En outre, selon Papen et al. (1989), ainsi que selon Anderson et al. (1993) *Alcaligenes faecalis,* bactéries nitrifiantes hétérotrophes qui possède une nitrate réductase, produirait du N_2O et du NO en condition aérobie durant la nitrification. Le mécanisme de production de NO et de N_2O par *Alcaligenes faecalis* serait probablement le même (à travers la réduction des nitrites) que celui des bactéries nitrifiantes autotrophes telle que *Nitrosomonas europaea* (Poth & Focht, 1985 ; Remde & Conrad, 1990).

De plus, les bactéries nitrifiantes hétérotrophes conduiraient, en aérobie, à plus de N_2O par cellule (environ deux fois plus) que les bactéries nitrifiantes autotrophes (Papen et al., 1989; Anderson et al., 1993) malgré un taux de nitrification des hétérotrophes plus faible que celui des autotrophes (Robertson & Kuenen, 1988). *Alcaligenes faecalis,* la plus active des bactéries nitrifiantes hétérotrophes (Castignetti & Hollocher, 1984), produirait même 10 fois plus de N_2O que des bactéries nitrifiantes autotrophes (Anderson et al., 1993).

1.5.3.1.3 Dénitrification hétérotrophe.

Le fonctionnement des populations dénitrifiantes constitue un facteur de régulation des émissions de N_2O dans l'atmosphère. Même si le N_2O n'est généralement qu'un intermédiaire de la dénitrification, il peut pour certains organismes être le seul produit final de la dénitrification (Greenberg & Becker, 1977; Brettar & Höfle, 1993).

Lors de la dénitrification, les émissions de N_2O résulteraient d'une accumulation due à un retard des vitesses de réduction de l'oxyde nitreux en azote gazeux, dépendant ainsi des conditions extérieures (Holtan-Hartwig et al., 2000). Or, l'augmentation de l'activité enzymatique des bactéries dénitrifiantes en anoxie peut être attribuée à trois phénomènes : des conditions d'anaérobie induisant la production d'enzymes responsables de la dénitrification, la croissance nette, mais aussi l'addition d'une source de carbone.

Les effets de la concentration en carbone organique sur les émissions de N_2O seraient indirects. En effet, Gaskell et al. (1981) ont montré que le nitrate non réduit, lorsque le ratio DCO / N inorganique était bas, pouvait avoir un effet limitant sur la réduction du N_2O. Ceci a été depuis confirmé par Blicher-Mathiesen & Hoffmann (1999) qui observent que lorsque le pourcentage de nitrate réduit par la dénitrification augmente, le ratio N_2O /N_2 diminue, le N_2 devenant le principal gaz produit.

Au total, le N_2O est plus connu comme étant un intermédiaire de la dénitrification, émis en grandes quantités dans les environnements faiblement oxygénés avec suffisamment

de nitrate et de carbone organique biodégradable (Gaskell et al., 1981, Itokawa et al., 2001; Bonin et al., 2002). Sous de faibles concentrations en oxygène, le N_2O peut être le produit final de la dénitrification au lieu du N_2 (Baumann et al., 1996; Robertson et al., 1995), la réductase de l'oxyde nitreux étant l'enzyme la plus sensible à l'oxygène (Bonin et al, 1989).

Il faut aussi noter que la grande diversité des bactéries dénitrifiantes leur confère un avantage compétitif lorsque l'oxygène est limité, certaines d'entre elles étant même capables de dénitrifier sous des conditions aérobies. Toutefois, il reste acquis que la production d'enzymes dénitrifiantes n'atteint son maximum qu'en anaérobie et « micro-aérobie » (< 2 mg O_2 L^{-1}) (Körner & Zumft, 1989).

1.5.3.1.4 Nitrate ammonification

La réduction dissimilatrice du nitrate correspond à la réduction du nitrate en ammonium. Elle pourrait représenter 4 à 21 % de la consommation totale du nitrate ce processus semblant favorisé au dépend de la dénitrification dans les milieux aquatiques très chargés en matière organique (Jorgensen, 1989). En effet, selon cet auteur, quand les bactéries dénitrifiantes se trouvent en présence d'une grande quantité de matière organique à dégrader, elles développent un mécanisme d'adaptation qui leur permet d'économiser le nitrate : pour cela elles vont davantage utiliser le pouvoir accepteur d'électrons du nitrate en les réduisant en ammonium plutôt qu'en N_2; si le milieu s'enrichit en nitrate, l'importance de la dénitrification augmenterait à nouveau au dépend de la réduction dissimilative.

Les bactéries respirant le nitrate, les bactéries entériques notamment, semblent être les non dénitrifiantes, productrices de N_2O, les plus importantes (Bleakley & Tiedje, 1982). *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia Coli*, *Salmonella typhimurium* et d'autres bactéries entériques sont en effet connues pour produire du NH_4^+ à partir du NO_3^-, ainsi que du N_2O en conditions anaérobies (Tiedje et al., 1979; Satoh et al., 1983). La nitrate réductase serait l'enzyme catalysant la réduction des NO_2^- en N_2O (Satoh et al., 1983; Smith, 1983; Rusmana & Nedwell, 2004).

1.5.3.1.5 Dénitrification hétérotrophe et Nitrification autotrophe Simultanées (SND)

Il faut noter que les bactéries dénitrifiantes sont capables d'utiliser le NO_2^- et le NO_3^- produit durant la nitrification. Le couplage de la dénitrification et de la nitrification peut intervenir lorsque des conditions favorables sont rencontrées pour les deux processus, dans des agrégats tels que les boues activées ou les cultures fixées (Okabe et al., 1999; Zeng et al., 2003).

Au niveau des procédés de traitement de l'azote en aérobie, le processus responsable de la production de N_2O serait ainsi le double processus de nitrification –dénitrification simultanée (SND) (von Münch et al., 1996 ; Bertanza G. 1997; Helmer & Kunst, 1998). Ce processus n'interviendrait que lorsque l'oxygénation est limitée puisque l'efficacité du processus SND (Efficiency $_{SND}$ = Dénitrification / Nitrification = NH_4(tot) - NOx (acc.)/ NH_4 (tot)) serait de 98 %, 62 % et 51 % avec une oxygénation respectivement de 0.5, 1.5 et 2.5 mg L^{-1} (Zeng et al., 2003).

Des bactéries spécifiques, responsables de ce processus SND de nitrification-dénitrification simultanée, n'ont pas été identifiées. Le processus SND décrit par Zeng et al (2003) pourrait donc être le fait conjugué des ammonium–oxydantes et des dénitrifiantes hétérotrophes, ou des ammonium-oxydantes seules (processus OLAND, cf. ci-dessous) qui seraient alors capables de réduire les nitrites en N gazeux.

1.5.3.1.6 Nitrification-dénitrifiante autotrophe (processus OLAND)

Le N_2O peut être produit par la nitrification-dénitrifiante autotrophe, où l'oxydation du NH_4^+ en NO_2^- est suivie par une réduction du NO_2^- en N_2O et N_2 (Bock et al., 1995; Kuai & Verstraete, 1998 ; Jiang & Bakken, 1999, Itokawa, 2001). Cette séquence de réactions est réalisée par un seul groupe de bactéries, les ammonium-oxydantes autotrophes (Wrage et al., 2001).

Les bactéries ammonium-oxydantes utilisent l'oxygène pour deux fonctions séparées : i) comme substrat dans l'oxydation de l'ammonium en hydroxylamine et ii) comme accepteur terminal d'électron dans la chaîne de transport d'électron. Il n'y a pas connaissance actuellement de substitut pour la première fonction, mais il se peut que dans des conditions d'oxygénation limitantes, les nitrites puissent se substituer à l'oxygène comme accepteur d'électron final, ce qui reviendrait à une dénitrification comme moyen de respiration (Casciotti & Ward, 2001).

Poth & Focht (1985), avec l'utilisation de traceur isotopique ^{15}N ont montré que la production de N_2O par les bactéries ammonium-oxydantes de type *Nitrosomonas europaea* était principalement due à la réduction des nitrites, grâce à la nitrite réductase. Le gène de la nitrite réductase (*nir*K), identique à celui des bactéries dénitrifiantes classiques, a en effet été mis en évidence chez les bactéries autotrophes ammonium-oxydantes, telles que *Nitrosomonas europaea* et *Nitrosomonas marina*. D'autres, comme *Nitrosospira sp.* ou *Pseudomonas sp*., ont pu être hybridées partiellement avec une sonde *nir*K, ce qui suggère, avec une certaine variabilité, l'existence du gène de la nitrite réductase au sein des bactéries ammonium-oxydantes (Casciotti & Ward, 2001). De plus *Nitrosomonas eutropha* serait capable d'utiliser le NO_2 gazeux comme accepteur d'électron final en anaérobie (Schmidt & Bock, 1997).

Outre la nitrite réductase, l'hydroxylamine oxydoréductase (HAO) serait responsable de cette catalyse (oxydation de l'ammonium en azote gazeux). En effet la production de gaz (N_2 + N_2O) est nettement stimulée par un ajout de NH_2OH (Kuai & Verstraete, 1998). La structure de cette enzyme aboutit via une chaîne de transfert d'électron à une oxydase terminale ou peut renvoyer le flux d'électron vers une réduction. Deux électrons peuvent donc être émis par l'oxydation de l'hydroxylamine en nitrite et être amenés via un cytochrome à la nitrite réductase (Figure 22).

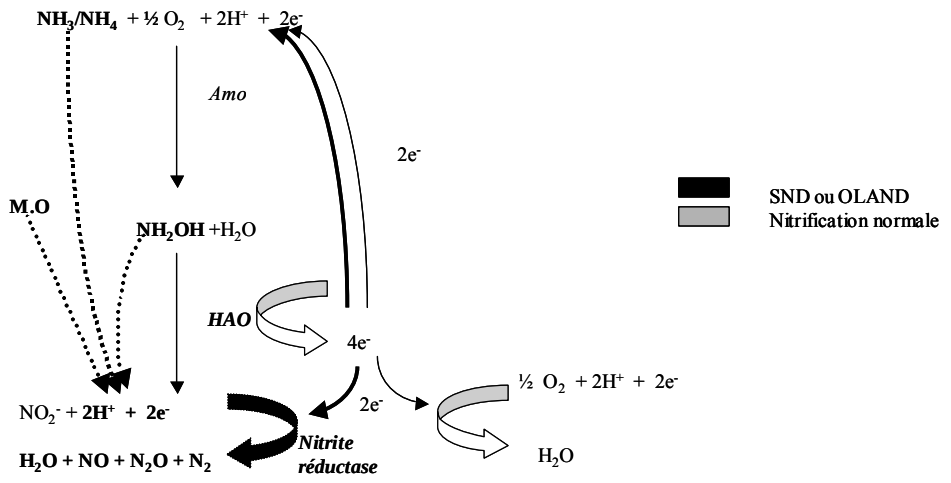


Figure 22. Processus OLAND, d'après Kuai & Verstraete (1998) et Jiang & Bakken (1999).

Plusieurs études ont, depuis longtemps, montré que les bactéries nitrifiantes aérobies strictes survivent dans des conditions d'anaérobie ou d'oxygénation extrêmement faible, notamment en eaux usées (Abeliovich, 1987). Une exposition des bactéries nitrifiantes à des conditions limitant l'oxygène aboutit à une modification physiologique, qui tend vers une activité minimale de latence cellulaire et au passage d'une activité nitrifiante vers une activité de dénitrification (Diab et al., 1992). Il est désormais reconnu que le métabolisme des ammonium–oxydantes s'adapte rapidement aux variations de potentiel d'oxydoréduction (Philips et al., 2002). Si ce métabolisme ne contribue pas à la croissance des bactéries, il permet leur survie en anoxie (Bock et al., 1995).

En anoxie l'ammonium et le NO_2 sont consommés par *Nitrosomonas eutropha* dans un rapport 1:1 avec une activité qui serait10 fois plus faible qu'en conditions aérobies (Schmidt & Bock,,1997). La baisse de l'activité nitrifiante serait de 30 % chez *Nitrosomonas* lorsque l'on diminue l'oxygénation en deçà de 3 mg O_2 L^{-1} (Goreau et al., 1980). La production de gaz (N_2O et N_2) par la réduction du nitrite permettrait en outre à ces bactéries de se déplacer, donc de s'écarter de la zone anoxique (Philips et al., 2002). Le transport cellulaire avait déjà été démontré comme essentiel pour les processus de colonisation microbienne (Mueller, 1996). C'est grâce à ce mécanisme que les bactéries nitrifiantes pourraient être universellement distribuées, tant en milieu terrestre qu'en milieu aquatique (Hagopian & Riley, 1998).

On sait donc depuis le début des années 1990 que les bactéries ammonium-oxydantes (AOB) sont capables de dénitrifier le nitrite avec une molécule d'hydrogène, d'hydroxylamine, de matière organique (pyruvate, fumarate) ou de NH_4^+, comme donneur d'électron, produisant ainsi du NO, du N_2 et du N_2O (Abeliovitch & Vonshak, 1992 ; Stüven et al., 1992; Bock et al., 1995). Ainsi d'après Kuai & Verstraete (1998), le procédé conventionnel d'élimination de l'ammonium via une nitrification aérobie suivie d'une dénitrification anaérobie, pourrait être remplacé par une seule étape, l'oxydation directe de l'ammonium en N_2 via le système OLAND. Malgré une dominance des *Nitrosomonas europaea,* les microorganismes qui catalysent le processus OLAND sont identiques à ceux des boues nitrifiantes habituelles (Kuai & Verstraete, 1998). Durant ce processus OLAND, la nitratation est considérée comme négligeable, celle-ci étant particulièrement sensible aux

conditions d'oxygénation limitées. Les AOB sont de meilleurs compétiteurs que les bactéries nitrites-oxydantes (NOB) dans ces circonstances (Hanaki et al., 1990a).

En résumé, d'après Kuai & Verstraete (1998), les deux étapes du système OLAND sont les suivantes :

$$NH_4^+ + 1.5\ O_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O + 2H^+$$
$$NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2H_2O$$

D'après Shrestha et al. (2002), l'oxydation de l'ammonium en anoxie par les AOB conduit tout comme pour les bactéries dénitrifiantes à une production de NO, N_2O et N_2 à partir de la réduction des nitrites. Il en irait de même en micro-aérobie (< 2 $mgO_2\ L^{-1}$), les produits du processus OLAND, seraient principalement du N_2, le N_2O, simple intermédiaire, ne représentant que 1-2 % de l'azote total éliminé pour des communautés bactériennes provenant du milieu naturel (Cébron et al., 2005), à 20 % pour des boues activées (Kuai & Verstraete, 1998). La production du N_2O comme produit final en micro-aérobie reste une question à explorer encore, l'oxyde nitreux réductase particulièrement sensible à l'oxygène pouvant en effet être inhibée (Bonin et al., 2002).

1.5.3.2 Facteurs pouvant influencer la production d'oxyde nitreux

Les facteurs qui influencent les processus de nitrification et dénitrification, contrôlent également la production de N_2O: les émissions de N_2O apparaissent toutefois dans des conditions environnementales critiques pour la réalisation optimale des processus de nitrification et dénitrification.

1.5.3.2.1 Lors de la nitrification

Pour mémoire, les différentes étapes de la nitrification et les enzymes correspondantes sont listées ci-dessous:

$$NH_4^+ \xrightarrow[\text{Amo}]{\text{Ammonium monooxygénase}} NH_2OH \xrightarrow[\text{Hao}]{\text{Hydroxylamine oxydoréductase}} NO_2^- \xrightarrow[\text{Nor}]{\text{Nitrite oxydoréductase}} NO_3^-$$

D'après Jiang & Bakken (1999), la production de N_2O se fait dans le périplasme (l'hydroxylamine oxydoréductase est localisée à ce niveau). Elle peut donc être affectée fortement par de nombreux facteurs, dont le principal serait l'oxygénation.

<u>L'oxygénation.</u>

La production de N_2O par la nitrification serait maximale pour une oxygénation comprise entre 0.1 et 0.4 kPa (Jorgensen et al., 1984 ; Anderson et al, 1993); le N_2O représenterait 7.4 % de l'azote total avec une oxygénation forte (3.8 $mgO_2\ L^{-1}$) et jusqu'à 21.6 % avec une oxygénation faible (moins de 3.8 $mgO_2\ L^{-1}$), (Béline et al. 2001). Une forte production peut se faire également en condition optimale de croissance (pH=7.2, t°C=26°C)

et d'oxygénation (plus de 5 $mgO_2\ L^{-1}$), favorisée par des à-coups de charges en d'ammonium qui entraînent alors une décroissance de l'oxygénation (Burgess et al., 2002). De même, un temps de rétention court au niveau des bassins aérés en station d'épuration, avec une oxygénation faible peut également influencer positivement la production de N_2O (Zheng et al., 1994).

L'oxygénation mesurée ne relate toutefois pas forcément l'oxygène dissous disponible pour les différentes communautés bactériennes présentes et notamment en boues activées. Quand l'oxygène est transféré de la phase liquide à l'intérieur du floc pour la nitrification, il y a compétition entre la diffusion de l'oxygène et son utilisation pour les différentes réactions qui entrent en jeux. Si la diffusion limite la pénétration de l'oxygène à l'intérieur du floc, une zone aérobie sur les bords du floc se crée où la nitrification prend place, ainsi qu'une zone anaérobie au centre où les bactéries hétérotrophes dénitrifient (Okabe et al., 1999 ; Zeng et al., 2003).

Le rapport C/N

Le rapport C/N peut également affecter la production de N_2O (Hanaki et al. 1990b) ; il en est de même pour la demande chimique en oxygène (DCO) au niveau des stations d'épuration urbaine (Nogita et al., 1991 ; Satio et al., 1994). Même si une corrélation entre le C/N (ou DCO/N) et la production de N_2O n'est pas toujours évidente, la production de N_2O serait maximale avec un ratio DCO/N_{total} inférieur à 5 (He et al., 2000). Un rapport C/N de 2 réduit de 50 % le taux de nitrification par rapport à un taux normal de 5, variation qui entraînerait un changement dans la communauté des bactéries ammonium-oxydantes (Ballinger et al., 2002). L'addition d'une source de carbone externe pourrait ainsi diminuer les émissions de N_2O en phase aérobie (Park et al., 2000).

Le nitrate et nitrite

La production de N_2O est toujours accompagnée d'une accumulation de nitrite. Cette accumulation est fortement corrélée à la production de l'oxyde nitreux, due à un décalage des vitesses des réactions mises en jeux (CC = 0.99) (Burgess et al., 2002). Ce phénomène est peut être amplifié par l'inaptitude des bactéries nitrite-oxydantes à oxyder le flux de nitrites en conditions limitées en oxygène (Burgess et al., 2002 ; Philips et al., 2002). Outre les faibles oxygénations, la concentration en nitrite influencerait davantage la production de N_2O (Anderson et al., 1993). La nitrification – dénitrification a été observée en anaérobiose, avec du NO_2 gazeux comme seul accepteur d'électron (Schmidt & Bock, 1997). En fait, l'oxyde nitreux réductase (responsable de la réduction du N_2O en N_2) serait inhibée lorsque la concentration en nitrite approche 1 $mgN\text{-}NO_2^-\ L^{-1}$ (Zeng et al., 2003). Notons que chez les dénitrifiantes hétérotrophes, la nitrite réductase est autant régulée par le niveau d'oxygène que par ceux du nitrite et du nitrate (Casciotti & Ward, 2001).

Dans les boues nitrifiantes de STEP, la production de N_2O pourrait être stimulée par une augmentation de nitrite (Schulthess et al., 1994, 1995 ; Wild et al., 1994a, 1994b; Zheng et al., 1994), bien que de la production de N_2O ait été observée lorsque avec des concentrations en nitrite proche du niveau zéro (Zeng et al., 2003). De faibles quantités, toutefois significatives, de nitrite (20 à 30 µM soit 0.3 à 0.4 $mgN\text{-}\ NO_2^-L^{-1}$) à l'intérieur du floc, dans une zone sub-oxique seraient à l'origine de cette production (Zeng et al., 2003). Le processus SND pourrait y être ainsi induit.

pH et Température

Le pH, et indirectement l'équilibre NH_3 / NH_4^+, peuvent également contrôler la production de N_2O (Jiang & Bakken, 1999). La tolérance au pH de chaque espèce contribue à différents niveaux de production de nitrite, et de N_2O, suivant la quantité d'ammonium, l'accumulation de N_2O n'excèdant pas 12 % du NH_4^+ (Jiang & Bakken, 1999). Alors que *Nitrosospira sp* serait plus sensible au pH que *Nitrosospira europaea* et *Nitrosospira multiformis*, ces deux dernières produiraient plus de N_2O avec de l'urée comme substrat, qu'avec l'ammonium. Le pH optimal serait pour *Nitrosospira europaea* entre 7 et 8 et il n'y aurait pas d'émissions de N_2, pour un pH inférieur à 7 (Shrestha et al., 2002).

La température influence les émissions de N_2O de manière variée lors de la nitrification (Dobbie & Smith, 2001). Les valeurs apparentes de Q_{10} (vitesse d'émission à (T + 10)°C / vitesse d'émission à T°C) sont i) pour des sols arables de 50 pour un intervalle de températures de 5 - 12°C et de 8.9 pour un intervalle de 12 - 18°C, ii) pour les prairies, de 3.7 et 2.3 en valeurs correspondantes (Dobbie & Smith, 2001).

Les communautés bactériennes

L'oxyde nitreux peut être produit par une grande variété de bactéries, hétérotrophes nitrifiantes ou autotrophes ammonium-oxydantes. La sensibilité à différents facteurs étant variable selon les espèces, la production de N_2O est elle-même contrôlée par la composition de la communauté bactérienne présente (Jiang & Bakken, 1999). Par exemple, il apparaît que la production de N_2O par les hétérotrophes serait 10 fois plus élevée que celle des autotrophes dans les mêmes conditions (Anderson et al., 1993).

1.5.3.2.2 Lors de la dénitrification

Pour mémoire, les différentes étapes de la dénitrification avec les enzymes correspondantes sont listées ci-dessous:

$$NO_3^- \xrightarrow[\text{réductase Nar/Nap}]{\text{Nitrate}} NO_2^- \xrightarrow[\text{réductase Nir}]{\text{Nitrite}} NO \xrightarrow[\text{réductase Nor}]{\text{Oxyde nitrique}} N_2O \xrightarrow[\text{réductase Nos}]{\text{Oxyde nitreux}} N_2$$

La présence de nitrite, une oxygénation faible, un pH bas, ou un rapport DCO/N faible sont autant de facteurs connus pour entraîner une accumulation de N_2O durant la dénitrification (Hanaki et al., 1992 ; Schulthess et al., 1994, 1995 ; Thörn & Sörensen, 1996).

L'oxygénation

Le processus de dénitrification est observé lorsque l'oxygène diminue en dessous de 50 µM (1.6 $mgO_2\ L^{-1}$ environ). En laboratoire toutefois, la dénitrification commencerait à moins de 10µM (0.3 $mgO_2\ L^{-1}$), différence qui s'expliquerait par la texture des sédiments, des

boues ou des cultures fixées (cf. micro-porosités), quand les valeurs en oxygène sont en fait inférieures à celles mesurées (Blicher – Mathiesen & Hoffmann, 1999).

Le NO produit par la nitrite réductase (Nir) et utilisé comme accepteur final d'électron lors de la réduction de l'oxyde nitreux par l'oxyde nitrique réductase (NOr) pourrait jouer un rôle important, les bactéries dénitrifiantes utilisant le NO comme molécule "signal" pour activer l'expression des gènes Nir et Nor (Kwiatkowski et al., 1996). Lorsque les conditions d'anoxie s'installent, on observe une accumulation de nitrite, la nitrate réductase (Nar/Nap) s'exprimant à des niveaux d'oxygène plus haut que la nitrite réductase (Nir), (Körner & Zumft, 1989). Si la combinaison d'une oxygénation faible et d'une accumulation de nitrite est favorable à la production de NO, à l'inverse une concentration importante en oxygène augmente le taux d'auto-oxydation du NO sans l'induction des gènes NOr et Nir (Kwiatkowski et al., 1996). La nitrite réductase (Nir) serait donc sensible à l'oxygénation, via le NO.

On note également, que l'oxyde nitreux réductase (Nos) est l'enzyme la plus sensible à l'oxygène par rapport aux autres enzymes de la dénitrification, ce dernier ayant un effet inhibant (Blicher – Mathiesen & Hoffmann, 1999).

Rapport DCO/N

Lorsque le rapport DCO/N_{total} est faible, la production de N_2O est importante et l'efficacité de la dénitrification est faible, avec une accumulation de nitrite (Itokawa et al., 2001). Selon les auteurs, 20 à 30 % de l'azote total est émis sous forme d'oxyde nitreux lorsque DCO/N_{total} est inférieur à 3.5 et 1 % lorsque DCO/N_{total} se situe entre 5 et 5.5.

Nitrite et nitrate

Les concentrations en nitrate et nitrite joueraient également un rôle dans les émissions de N_2O par dénitrification (Blicher – Mathiesen & Hoffmann, 1999 ; Holtan-Hartwig et al., 2000). Lorsque le pourcentage de nitrate réduit par la dénitrification augmente, le rapport N_2O /N_2 diminue et le N_2 devient le principal gaz produit (Blicher – Mathiesen & Hoffmann, 1999).

Le taux de nitrite jouerait un rôle plus important que celui du nitrate sur la production de N_2O, le taux de dénitrification étant davantage stimulé par un flux de nitrite que par un flux de nitrate et la production de N_2O augmentant 10 fois plus avec un ajout de nitrite que de nitrate (le pourcentage de N_2O par rapport à N_2 augmente également), (Dong et al., 2002).

Durant la formation du N_2O avec le nitrite comme accepteur d'électron, l'énergie produite à partir d'une mole de H_2 est en effet plus importante que lorsque le nitrate est utilisé comme accepteur d'électron. Il en est de même lors de la production de N_2. Au total, suivant la valeur du rapport $[NO_2^-] / [NO_3^-]^{0.5}$, les bactéries utiliseront le nitrate ou le nitrite comme accepteur d'électron (Dong et al., 2002). Dès 1995 (Almeida et al.) et 1996 (Rijn et al.), la réduction du nitrate et celle du nitrite étaient déjà mentionnées comme compétitrices par rapport au stock d'électrons. Une accumulation de nitrite durant la dénitrification se produirait lorsque la quantité du donneur d'électron est insuffisante, la réduction du nitrate l'emportant alors sur celle du nitrite (Oh & Silverstein, 1999).

Enfin, alors que Firestone & Tiedje (1979) proposaient une inhibition de l'oxyde nitreux réductase avec une concentration importante en nitrite, Dong et al. (2002) n'observant pas de diminution de la production de N_2 avec un ajout de nitrite supposent qu'il existe deux groupes de bactéries dénitrifantes, i) l'un utilisant uniquement le nitrite comme accepteur final d'électron et produisant du N_2 comme produit final via le N_2O, et ii) l'autre, les nitrite-dénitrifiantes obligatoires (*Alcaligenes faecalis*), qui conduisant uniquement au N_2O, à partir du nitrite.

pH et Température

En raison de sa localisation dans le périplasme (Metz et al., 2003), la nitrite réductase (Nir) serait aussi sensible au pH (Holtan-Hartwig et al., 2000), tout comme la réductase de l'oxyde nitreux (Nos) (Blicher – Mathiesen & Hoffmann, 1999). On observe en effet souvent une accumulation de N_2O comme produit final de la dénitrification, lorsque le pH est bas (Blicher – Mathiesen & Hoffmann, 1999). Selon ces mêmes auteurs, les émissions de N_2O seraient de plus liées à des changements saisonniers et diurnes, donc à la température. Une étude sur les sols montre que les émissions d'oxyde nitreux provenant de la dénitrification diminueraient avec l'augmentation de la température (Avalakki et al., 1995).

Communautés bactériennes

Outre la caractérisation des bactéries dénitrifiantes formant le N_2O comme produit final, comme par exemple *Pseudomonas fluorescens et Pseudomonas Chlororaphis* (Greenberg & Becker, 1977; Brettar & Hölfe, 1993), Holtan-Hartwig et al. (2000) ont mis en évidence des changements d'affinité pour le substrat, peut être dû à une diversité d'organismes au sein d'une communauté en présence de substrats variés.

Le Tableau 7 résume les effets des différent facteurs sur la nitrification et la production de N_2O relative à ce processus, de même pour la dénitrification et la production de N_2O qui l'accompagne.

Tableau 7. Résumé des effets des différents facteurs sur la nitrification et la production de N_2O relative à ce processus, de même pour la dénitrification et la production de N_2O qui l'accompagne.

	Nitrification	Production N_2O	Dénitrification	Production N_2O
Oxygène	DO mini = 0.4 mgO_2 L^{-1}: AOB oxygène dépendante. NOB plus sensible que AOB	$[N_2O]$ ↑ : DO < 2 mgO_2 L^{-1} : Processus OLAND	Inhibitions pour DO > 3.8 mgO_2 L^{-1}	Enzymes en fin de réaction sont les plus sensibles à l'oxygène : inhibition de la réduction du N_2O
C/N	dans les eaux usées pour une nitrification effective sans compétition avec hétérotrophes : C/N < 0.3	N_2O maxi : DCO/N_{total} < 5	C/N mini = 0.3 Vitesse dénit varie avec la source de C	N_2O maxi : DCO/N_{total} <3.5 N_2O varie avec la source de C
Nitrite & nitrate	$[NH_4^+]$ opt : 2 à 10 mM $[NO_2^-]$ opt : 2 à 30 mM $[NO_2^-]$ et $[NO_3^-]$ ↑ : rétro-inhibiteur.	Effet $[NO_2^-]$ > effet $[NO_3^-]$ $[NO_2^-]$ ↑ : $[N_2O]$ ↑	Effet $[NO_2^-]$ > effet $[NO_3^-]$ $[NO_2^-]$ ↑ : ↑ dénit $[NO_3^-]$ ↑ : ↑ dénit	Effet $[NO_2^-]$ > effet $[NO_3^-]$ $[NO_2^-]$ ↑ : $[N_2O]$ ↑
PH & T°C	T°C opt : 26 - 38°C pH opt : 7.5 - 8.5.	La tolérance au pH et la sensibilité à la T°C de chaque espèce contribue à différents niveaux de production de nitrite, et de N_2O	T°C opt : ? (14 - 17°C) pH opt : 7.0 - 8.0	- T°C ↑ : dénit↑ : $[N_2O]$ ↑ - 0 à 5°C : $[N_2O]$ ↑ : réaction chimique - pH ↓ : $[N_2O]$ ↑
Communautés	<u>AOB :</u> µ max 0.02-0.09 h^{-1} Activité spécifique : 1-1.7 fmol NO_2^- prod.cellule^{-1} h^{-1} <u>NOB :</u> µ max 0.03-0.06 h^{-1} Activité spécifique : 5.1-15.4 fmol NO_3^- prod.cellule^{-1} h^{-1} Sensibilité à différents facteurs variables selon les espèces.	- production de N_2O contrôlée par la composition de la communauté bactérienne présente - une espèce peut produire plus de N_2O qu'une autre	Grande diversité : 130 espèces 50 genres	- production de N_2O contrôlée par la composition de la communauté bactérienne présente - une espèce peut produire plus de N_2O qu'une autre - certaine N_2O comme produit final

1.6 Techniques d'étude des bactéries et de leur activité

Jusqu'à ces dernières années, le cycle de l'azote en stations d'épuration, était essentiellement abordé par la quantification des flux globaux sans détailler les processus microbiologiques. Les communautés bactériennes sont encore, dans beaucoup d'études, traitées comme une boite noire, alors que les processus métaboliques sont stratifiés et subdivisés dans différentes couches fonctionnelles au sein des biofilms. Mais les difficultés rencontrées pour la caractérisation des compositions taxonomiques ont limité les connaissances relatives aux liens entre les structures et les fonctions des communautés microbiennes. Aujourd'hui, l'approche microbiologique a montré qu'elle permettait de mieux comprendre les processus, et des études de plus en plus fines sont réalisées, utilisant des techniques les plus diversifiées, celles de l'écologie (traçages radioactifs, méthodes biogéochimiques et microscopiques) et celles de la biologie moléculaire (PCR, DGGE, FISH, …).

Si la caractérisation des microorganismes conduit à appréhender plus finement un processus écologique, la mesure de l'activité bactérienne reste un outil incontournable pour comprendre et quantifier les flux d'azote dans l'environnement.

1.6.1 Isolement et culture

Il faut d'abord désorber les bactéries de leur support ou les défloculer, soit par sonication, et/ou par l'action d'un dispersant, tel que le métaphosphate. Deux techniques d'isolement sont principalement utilisées :

- l'isolement par dilution (Soriano & Walker, 1968)
- l'isolement par étalement sur boîte (Schmidt et al., 1973).

Les communautés ont été longtemps étudiées par des méthodes de cultures sur milieux, qui restent très sélectives et qui ne permettent pas de repérer toutes les espèces bactériennes (Defives et al., 1999). Avec les techniques de cultures habituelles seul 1 à 10 % des microorganismes sont cultivables, donc identifiables (Amann et al., 1990a ; Kämpfer et al., 1996). De plus, les bactéries telles que les nitrifiantes, qui possèdent un faible taux de croissance, sont difficiles à mettre en culture.

1.6.2 Dénombrement

1.6.2.1 Méthodes classiques

Le dénombrement par MPN (« most probable number » ou nombre le plus probable), basé sur le développement des bactéries dans un milieu sélectif, a longtemps été la technique exclusive pour dénombrer les bactéries en milieu aquatique (Schmidt & Belser, 1994). L'inconvénient de cette méthode est la longue période d'incubation et son imprécision. Elle sous-estime considérablement la population (Belser, 1982).

L'Immunofluorescence permet d'obtenir des résultats cohérents en milieu naturel (Ward, 1986 ; Montuelle et al., 1996). Elle se base sur la distinction sérologique, marquage des bactéries à l'aide d'anticorps spécifiques portant un fluorochrome. Cependant cette

technique a plusieurs inconvénients non négligeables : elle requiert l'isolement et la culture des souches bactériennes pour produire des anticorps correspondant ; en station d'épuration, l'exopolymère qui recouvre les bactéries peut empêcher la réaction immunitaire (Szwerinski et al., 1985).

L'Activité potentielle compare l'activité d'un échantillon avec l'activité d'un nombre connu de cellules d'un genre donné (en culture) ; on peut ainsi en déduire la concentration en cellules recherchées dans l'échantillon (Belser & Mays, 1982 ; Sandén et al., 1996). Le principal défaut de cette méthode est qu'elle ne tient pas compte des activités spécifiques parfois très différentes des genres ou espèces d'une communauté fonctionnelle, par rapport à celles mesurées en culture pure (Belser & Mays, 1982).

1.6.2.2 Techniques de biologie moléculaire

Les techniques citées précédemment sont limitées car elles nécessitent d'avoir une culture des bactéries étudiées. Or toutes les bactéries ne sont pas cultivables ou très difficilement, comme les bactéries nitrifiantes par exemple, et il n'est pas toujours possible d'obtenir une culture pure. Depuis une vingtaine d'année, on utilise de nouveaux outils d'analyse puissants et ne nécessitant pas de culture, basés sur la microscopie et plus récemment ceux utilisant la biologie moléculaire.

Le Dénombrement non spécifique par épifluorescence, utilise un agent intercalant au niveau des acides nucléiques (AN) (Acridine Orange: Francisco et al., 1973, DAPI : Porter & Feig, 1980.) qui permet de quantifier toutes bactéries vivantes du milieu. Le comptage des bactéries ainsi marquées se fait à l'aide d'un microscope à épifluorescence.

La cytofluorimétrie est une méthode désormais établie, qui permet de mesurer de façon sélective sur des caractéristiques physiques ou chimiques, les cellules. De multiples paramètres (émission de fluorescence à une longueur d'onde spécifique, dispersion de la lumière, etc.), peut-être déterminé individuellement pour un grand nombre de cellule sur un laps de temps court. Ces dernières années la cytométrie a été utilisée dans les études écologiques, et notamment pour mesurer l'abondance et la distribution des bactéries d'une population mixte (Amann et al., 1990b ; Porter et al., 1993 ; Lebaron et al., 1998).

Le Dénombrement spécifique se base sur la conservation de certaines séquences d'ADN au sein d'une même espèce. Le gène qui code pour l'ARN ribosomal 16S est le même chez tous les individus d'une même espèce. Certains gènes codant pour une enzyme nécessaire à un certain métabolisme se retrouvent chez toutes les bactéries utilisant ce métabolisme. On peut donc détecter la présence d'une espèce dans un milieu ou d'un type métabolique, si l'on arrive à repérer la séquence d'acides nucléiques (AN) qui lui est spécifique. Ceci est actuellement possible grâce aux techniques PCR et FISH. Ces dernières utilisent la complémentarité des acides nucléiques. En effet un brin d'ADN est toujours complémentaire par ses bases d'un autre brin. Le principe est donc de faire reconnaître à un brin d'AN synthétisé, le brin qui lui est complémentaire et spécifique, *in vitro*.

La technique FISH (Fluorescence In Situ Hybridation), utilise une sonde marquée par un fluorochrome, qui permet de repérer les cellules sur lesquelles elle se sera hybridée, observée ensuite grâce à un microscope en épifluorescence. (Wagner et al., 1996 ; Mobarry et al., 1996). C'est une technique d'observation directe qui permet l'identification et l'étude

morphologique de microorganismes dans un écosystème complexe (Manz et al., 1993 ; Alfreider et al., 1996), mais aussi l'étude *in situ* de la structure d'une communauté bactérienne. On peut observer la colonisation d'un milieu par les différentes espèces bactériennes, son évolution à différents stades de développement et donc les interrelations entre colonies (Manz et al., 1993 ; Poulsen et al., 1993 ; Llobet-Brossa et al.,1998). Elle permet également de déterminer qualitativement l'activité métabolique des bactéries, par l' évaluation du nombre d'ARNm présents dans la cellule, directement proportionnel à l'activité (Manz et al., 1993).

La méthode FISH a été utilisée sur de nombreux types de bactérie (bactérie nitrifiante : Schramm et al., 1996 ; sulfato-réductrice : Ramsing et al., 1993 ; phosphatantes : Kämpfer et al., 1996) et sur des milieux très différents (eaux potables : Manz et al., 1993 ; boues activées : Kämpfer et al., 1996 ; biofilms : Amann et al., 1992 ; Poulsen et al., 1993).

Toutefois, elle nécessite l'acquisition préalable de sonde oligonucléotidique cible spécifique de l'espèce bactérienne. La technique FISH présente en outre l'inconvénient d'une faible intensité de signal et d'un fort bruit de fond pour des échantillons contenant peu de bactéries ou des bactéries faiblement actives.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) utilise comme la méthode FISH, la spécificité de certains acides nucléique (AN) pour chaque espèce (Braker et al., 1998 ; Utaker & Ner, 1998 ; Braker et al., 2000; Calvo & Garcia-Gil 2004). Elle n'utilise plus l'ARN, mais l'ADN cellulaire. Elle permet d'amplifier uniquement la séquence d'ADN recherché. On obtient ainsi un pool de séquences nucléotidiques identiques. Brièvement le principe de la PCR est d'abord d'extraire et de purifier l'ADN des cellules bactériennes présentes dans l'échantillon. Une amplification spécifique de ces AN ainsi récupérés est ensuite effectuée par PCR, grâce à des amorces synthétisées *in vitro*. (oligonucléotides à petites séquences de quelques bases, ou primers) et des nucléotides. La PCR utilise une enzyme, l'ADN-polymérase qui permet de synthétiser à partir d'une molécule d'ADN monobrin, la chaîne qui lui est complémentaire. La PCR est particulièrement bien adaptée au repérage de bactéries présentes en faible quantité dans un milieu. Elle permet de déterminer l'absence ou la présence d'une espèce donnée et peut être aussi quantitative (ci-dessous).

La PCR compétitive, ou cPCR fait intervenir le même principe que la PCR mais, pour être quantitative, elle amplifie deux séquences différentes d'acides nucléiques en même temps (Berthe et al., 1999 ; Dionisi et al., 2002 ; Cébron et al., 2003). On effectue une co-amplification de l'acide recherché (la cible) et d'une autre séquence voisine (le compétiteur). Le compétiteur est complémentaire pour les mêmes sondes (amorces) que la cible. Au préalable une courbe étalon a été établie. Elle donne pour une quantité donnée de compétiteur amplifié, la quantité d'acide nucléique cible présente dans l'échantillon de départ. Connaissant la quantité de cibles contenues dans l'échantillon grâce à la PCR compétitive, on peut alors déduire le nombre de cellules présentes dans l'échantillon. L'inconvénient est que pour certaines bactéries, la séquence d'AN spécifique peut être présente en plusieurs exemplaires sur le génome (le gène codant pour l'ammonium monooxygénase par exemple est présent en trois exemplaires dans le génome). La PCR compétitive ne donnera alors qu'une estimation du nombre de bactéries présentes dans l'échantillon. De plus la PCR de manière générale, ne donne pas d'information sur la structure de la communauté bactérienne.

Les analyses PCR sont la plupart du temps combinées à des techniques telles que la *DGGE* (Denaturing Gradient Electrophresis : Kowalchuk et al., 1997 ; Muyzer et al., 1993 ;

Gorégués et al., 2005), et la *T-RFLP* (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism : Liu et al., 1997 ; Horz et al., 2000 ; Scala & Kerkhof ; 2000) ou couplées à des *clonages et séquençages* (Bruns et al., 1999). La DGGE couplée à une cPCR a permis par exemple, l'analyse de la structure des communautés bactériennes ammonium-oxydantes de la basse Seine autochtone et provenant des rejets de station d'épuration (Cébron et al., 2004) ou encore l'étude des changements spatio-temporels dans la distribution de communautés dénitrifiantes (Gorégués et al., 2004). La PCR produit des fragments d'ADN de séquence différentes, mais de taille identique ; ces techniques permettent de les discrimer. Lors d'une PCR-DGGE, les produits de la PCR sont migrés sur un gel dénaturant, permettant la différenciation en fonction de la séquence des fragments, des groupes bactériens présents dans l'échantillon.

1.6.3 Étude de l'activité des bactéries

1.6.3.1 Evolution des formes inorganiques de l'azote

Les variations des formes inorganiques de l'azote, dissous ou gazeux, en fonction du temps permettent d'appréhender la nitrification, la dénitrification et la production de N_2O, dans les milieux étudiés, ou en laboratoire sur des échantillons naturels placés en conditions contrôlées ou sur des cultures pures de bactéries. En conditions naturelles, cette approche ne permet toutefois pas de distinguer les éléments issus de la nitrification ou/et de la dénitrification. On utilise des inhibiteurs spécifiques pour différencier les différents processus.

Les différentes formes de l'azote inorganique (NH_4^+, NO_2^-, NO_3^-) peuvent être dosées par colorimétrie soit par titrimétrie, soit au travers de la densité optique par spectrophotométrie. L'ammonium est dosé par la méthode colorimétrique au bleu d'indophénol (Slavyck & McIsaac, 1972). Les nitrites sont dosés par la méthode colorimétrique à la sulfanilamide, coloration de Griess-Ilosway (Keeney & Nelson, 1982 ; Rodier, 1984). Les nitrates sont réduits en nitrite sur une colonne de cadmium dans un tampon basique, puis les nitrites sont dosés comme décrit ci-dessus (Rodier, 1984). Ces dosages peuvent être effectués selon des principes identiques à l'aide d'appareils automatiques avec un système à flux continu type Technicon ou Skalar. Il existe des méthodes normées Afnor NF Iso 11732 (08/1997) pour les ions ammonium, NF Iso 13395 (10/1996) pour les ions nitrates et nitrites.

La chromatographie ionique (CI) peut également être utilisée pour le dosage des différentes formes de l'azote inorganique. La CI utilise une colonne composée d'une résine chargée soit positivement (pour séparer des anions) soit négativement (pour séparer des cations), un éluant emportant les anions ou les cations à séparer. Selon que l'interaction électrostatique entre la résine de la colonne et les ions à séparer est plus ou moins forte, la séparation se fera plus ou moins facilement. La CI est couplée à un capteur de conductivité et à l'aide d'une gamme étalon on pourra doser les différents ions ainsi séparés.

Les principales méthodes d'analyse en continu de l'émission du N_2O sont l'absorption IR ou l'absorption UV (ADEME). En présence d'un rayonnement, les molécules à analyser sont soumises à des rotations, vibrations (IR) ou à des transitions électroniques (UV, VIS) qui se traduisent par une absorption de l'énergie à des longueurs d'ondes précises. L'absorption de l'énergie lumineuse croît avec le nombre de molécules présentes sur le trajet du faisceau et est donc fonction de la concentration des gaz présents dans la cuve de mesure. Les appareils de mesure en continu fournissent une mesure "instantanée" et ont de bonnes caractéristiques

métrologiques : des seuils de détection et de quantification faible, une bonne répétitivité. Toutefois, la vapeur d'eau et le dioxyde de carbone (CO_2) absorbant sur une grande partie du spectre infrarouge peuvent fausser l'analyse (ADEME). Une mesure parallèle du CO_2 et une attention particulière à la vapeur d'eau, lors de la mesure sont donc nécessaires.

L'oxyde nitreux peut également être mesuré à l'état dissous ou en phase gazeuse, par chromatographie en phase gazeuse (CPG) équipée d'un capteur détecteur d'électrons. La chromatographie est une technique de séparation des substances chimiques qui repose sur des différences de comportement de séparation entre une phase mobile courante et une phase stationnaire pour séparer les composants d'un mélange. La technique CPG s'applique à des échantillons gazeux ou susceptibles d'être vaporisés sans décomposition dans un injecteur, qui permet l'évaporation et le transfert des échantillons dans une colonne représentant la phase stationnaire du système. Une phase dite mobile, symbolisé par un gaz vecteur (hélium, azote, argon ou hydrogène) balaie en permanence la colonne. Cette dernière, est placée dans un four thermostaté. Un détecteur permet l'analyse sélective et parfois l'identification de mélanges très complexes. Le détecteur est un appareil de mesures physico-chimiques qui doit donner un signal au passage de chaque constituant, sans interaction avec le gaz vecteur. Cette méthode est intéressante car elle est adaptable à un grand choix de phases stationnaires, de températures et de débit de phase mobile (azote, argon, hélium, hydrogène). Elle permet également une détection très sensible (de l'ordre du picogramme).

Plus récemment des méthodes permettant la caractérisation fine de milieux particuliers (sédiment et biofilm) ont été développées ; ce sont des microcapteurs ou microélectrodes permettant de mesurer les concentrations des différentes formes d'azote à des échelles très fines (celles du µm), sans perturber l'environnement physique, chimique et biologique de l'échantillon (Revsbech et al., 1988)

Ces méthodes de dosage toutefois indispensables, ne permettent pas la distinction des différents métabolismes qui peuvent agir sur les concentrations des formes azotées. En effet, des organismes autres que les bactéries nitrifiantes ou dénitrifiantes peuvent produire ou utiliser simultanément ces ions (Belser, 1984).

1.6.3.2 Utilisation d'Inhibiteurs

1.6.3.2.1 Inhibition des bactéries nitrifiantes

Plusieurs composés sont utilisés pour inhiber la nitrosation par inactivation de l'ammonium monooxygénase, tells que le N-serve (Henriksen et al., 1981; Hall, 1984 ; Powell & Prosser, 1986), l'allylthiourée (Hall, 1984; Bianchi et al., 1994) ou l'acetylène (Caffrey & Miller, 1995; Bonin et al., 2002). Toutefois, à cause de son pouvoir cancérigène, le N-serve (ou Nitrapyrin) n'est plus utilisé. Par ailleurs, l'inhibition avec l'acétylène peut poser problème, car certaines bactéries ammonium-oxydantes y sont insensibles telles que *Nitrosomonas briensis* ou *Nitrosomonas eutropha* (Schmidt & Bock, 1998 ; Wrage et al., 2004). L'addition de 10 Pa d'acétylène (6kPa d'acétylène, Jorgensen et al., 1984) bloque le processus de nitrification en ayant peu d'effets sur la dénitrification hétérotrophe (Bonin et al., 2002). L'hydroxylamine oxydoréductase (Hao) peut aussi être inhibée par l'hydrazine (Degré et al., 2001). Enfin, il existe également des inhibiteurs de la nitrosation et de la nitratation tel que l'Aniline (Xiong et al., 1998), ou les ions chlorite (ClO_2^-).

L'inhibition sélective de la nitratation catalysée par la nitrite oxydoréductase est moins aisée, et l'inhibiteur le plus efficace reste le chlorate (Bianchi et al., 1994; Brion & Billen, 1998; Haider et al., 2003). Le chlorate de sodium ($NaClO_3$) inhibe l'oxydation des nitrites en nitrates chez *Nitrobacter winogradskyi* et *N. agilis* (Hynes & Knowles, 1983). Le chlorate aurait aussi des effets sur l'ammonium monooxygénase (AmoA). En effet *Nitrobacter Winogradskyi* réduirait le chlorate en chlorite, ce dernier inhibant l'oxydation du NH_4^+.

On note que les bactéries méthanotrophes participent également à l'oxydation de l'ammonium, via l'enzyme méthane monooxygénase (Mmo) très voisine de l'AmoA (Holmes et al., 1995). Chez les bactéries nitrosantes, le méthane (CH_4) se lie de ce fait, au même site actif que le NH_3, agissant comme un inhibiteur compétitif de l'oxydation de l'ammonium (Roy & Knowles, 1994). La présence de CH_4 dans le milieu peut donc conduire à la suppression de la nitrification.

1.6.3.2.2 Inhibition des bactéries dénitrifiantes

Depuis longtemps, on connaît plusieurs inhibiteurs de la dénitrification, bloquant une partie ou toutes les réactions enzymatiques (Tableau 8).

*Tableau 8. Quelques inhibiteurs de la dénitrification. *DNP : 2,4- Dinitrophenol.*

Inhibiteur (concentrations)	Réaction inhibée	Références
Acétylène (10^{-3} atm) ou 10 % v/v	$N_2O \rightarrow N_2$	Yoshinari et al.,1976 Dalsgaard et al.,1995 Frette et al., 1997 Bonin et al., 2002
Azide, cyanide, DNP* (ca ; 10^{-4} M)	$NO_3^- \rightarrow N_2$, $N_2O \rightarrow N_2$	Allen & van Niel (1952) Sacks & barker (1952) Matsubara & Mori (1968)
Nitrapyrin		
14 ppm sur sols	$NO_3^- \rightarrow N_2$	Mitsuri et al. (1964)
20 ppm sur culture enrichie	$NO_3^- \rightarrow N_2O$ et N_2	Mc Elhannon & Mills (1981)
50 ppm sur culture	$NO_3^- \rightarrow N_2$	Henninger & Bollag (1976)
Composés sulfurés		
SO_4^{2-} (100-500 µg de $S.g^{-1}$)	Disparition du NO_3^-	Mitsui et al. (1964)
S^{2-}		Myers (1972)
40 $mmol.g^{-1}$	$NO_3^- \rightarrow$ production gazeuse	Sorensen et al. (1980)
0.3 mM	$NO \rightarrow N_2O$	Sorensen et al. (1980),
0.3 mM, 8 µmol g^{-1}	$N_2O \rightarrow N_2$	Tam & Knowles (1979)

On note que, la réduction de l'oxyde nitreux est inhibée, de façon réversible, par l' acétylène à 0.01 atmosphère (kPa) (Balderston et al., 1976) et 0.02 kPa (Wrage et al., 2004). L' hydrogène sulfuré (H_2S) inhibe également partiellement la NO réductase et de façon plus importante la N_2O réductase (Sorensen et al., 1980). Le chloramphénicol peut également être utilisé (0.5 ml d'une solution aqueuse anoxique, pour une concentration finale de 300 mg L^{-1}), et permet d'inhiber la synthèse de nouvelles protéines, enzymes de la dénitrification (Brooks et al., 1992).

On note également que le chlorate a été utilisé lors d'études moléculaires sur la réduction dissimilative du nitrate, pour différencier l'activité de deux nitrate réductases différentes, une nitrate réductase membranaire (Nar) et une nitrate réductase périplasmique (Nap), (Hochstein & Tomlison, 1988; Moreno-Vivian et al., 1999). Le chlorate inhiberait la réduction dissimilative du nitrate en ammonium via la nitrate réductase Nar, sans complètement inhiber la dénitrification qui elle repose sur la nitrate réductase Nap, accompagnée ou non de la nitrate réductase Nar (l'activité Nap continuant), (Rusmana & Nedwell, 2004).

1.6.3.3 Méthode des traceurs isotopiques

La méthode utilisant le ^{15}N est une méthode de mesure directe, qui consiste à suivre l'apparition ou la disparition des différentes formes ^{15}N de l'azote ($^{15}NO_2^-$ ou $^{15}NO_3^-$), dans un échantillon enrichi en ^{15}N au départ ($^{15}NH_4^+$ ou $^{15}NO_3^-$) (Bengtsson & Annadotter, 1989 ; Bonin et al.,1998; Beline et al., 2001). Cette méthode ne peut cependant être utilisée que pour un milieu déjà riche en substrat ($NH4^+$ ou NO_3^-), au risque d'augmenter l'activité bactérienne. De plus elle nécessite un temps d'incubation très long, ce qui peut être un handicap en cas d'utilisation en routine (Brion & Billen, 1998).

La technique de l'appariement isotopique mise au point par Nielson en 1992, permet non seulement de mesurer l'activité dénitrifiante mais également de distinguer la part issue du nitrate initialement présent, à celle couplée au nitrate résultant de la nitrification (Nielson, 1992). Une seule injection de $^{15}NO_3^-$ permet de suivre les transformations de l'azote gazeux avec les compositions d'isotopes différents (Rysgaard et al., 1993 ; An et al., 2001).

Une autre méthode, utilisée pour la mesure de la nitrification, est celle qui utilise le ^{14}C, améliorée par Brion & Billen (1998). Par exemple, l'oxydation d'ammonium en nitrate permet aux bactéries nitrifiantes d'incorporer du bicarbonate pour la synthèse de leur biomasse. En mesurant à l'obscurité la différence d'incorporation de $H^{14}CO_3^-$ dans deux échantillons, un traité avec un inhibiteur et l'autre non-traité, un taux d'incorporation de C peut être déterminé. Le carbone incorporé est proportionnel au taux d'oxydation de l'azote moyennent un rendement (C incorporé)/(N oxydé) constant (Belser et al., 1984 ; Brion & Billen, 1998). Grâce à cette méthode isotopique, on peut donc évaluer *in situ* l'activité réelle des bactéries nitrifiantes. Elle permet également, si l'on place les bactéries dans des conditions optimales de croissance (pH, teneur en O_2 et en NH_4^+), de mesurer l'activité potentielle des bactéries nitrifiantes. La rapidité de la méthode et le fait qu'elle ne nécessite pas d'équipement particulier, sinon celui nécessaire à la mesure du ^{14}C, en fait une méthode très utile pour les travaux d'écologie aquatique (Belser et al., 1984).

1.6.3.4 L'analyse respirométrique

L'analyse respirométrique, beaucoup utilisée en stations d'épuration, consiste à mesurer les consommations d'O_2 dissous de la biomasse étudiée. On mesure en fait les variations de concentration de l'O_2 dissous au cours de temps. Cette variation sur boues activées est directement mesurée dans la liqueur mixte sur laps de temps donné. Sur cultures fixées, on mesure la différence de concentrations en oxygène dissous sur l'eau avant traitement et l'eau après traitement. La différence est ensuite multipliée par le débit d'eau appliqué lors du traitement.

On mesure ainsi une vitesse de consommation de l'O_2, pour une biomasse donnée, vitesse appelée *Intensité Respiratoire (I.R)*. L'intérêt de l'analyse réside dans le fait que l'I.R. est proportionnelle à la quantité de substrat assimilé. Toutefois il faut tenir compte d'une certaine consommation d'O_2 dissous qui est constante, appelée *Intensité Respiratoire Endogène (I.R.E.*), qui elle est indépendante du substrat. L'I.R.E. provient de la consommation des réserves organiques intracellulaires des bactéries. L'analyse respirométrique utilise et exploite séparément les informations d'I.R. et d'I.R.E. Elles sont exprimées en mg d'O_2 consommé par gramme de matières volatiles en suspension (MVS) et par heure, pour les boues activées et en mg d'O_2 consommée par litre de matériaux support (ou m^3) et par heure pour les cultures fixées.

1.6.3.5 L'analyse écologique des biomasses épuratrices

Dans les stations d'épuration, outre les valeurs de NTK, DCO, DBO_5 entrant et sortant au niveau des bassins, qui permettent de calculer un rendement épuratoire, une analyse écologique des boues ou des cultures fixées permet d'avoir une idée de l'état, en temps réel, des biomasses épuratrices et de leur rendement (Védry, 1996).

Autour des biomasses épuratrices (floc bactérien) et à l'intérieur se développe tout un écosystème avec :

- des prédateurs de bactéries libres comme les *Vorticella* et les *Epistylis*.
- des prédateurs qui broutent le floc comme *Aspidisca* et *Trachellophyllum*, genres permanents des flocs. Ce sont des bactériophages qui décrochent les bactéries. Il existe aussi les *Lionotus* qui sont eux aussi des genres permanents mais moins abondants toutefois.
- des protozoaires à l'intérieur comme les thécamibes bactériophages, ou les amibes, grands prédateurs de protozoaire.
- d'autres organismes sont libres comme des rotifères, avec une alimentation variée, bactériophages ou prédateurs de protozoaires.

Tous ces protozoaires sont, pour l'exploitant d'une station d'épuration, des bioindicateurs de l'environnement écologique des biomasses épuratrices ; l'état de la biomasse et son aptitude à épurer sont donc ainsi renseignés. Par exemple la présence abondante de vorticelles vivantes est synonyme d'une bonne oxygénation, alors que leur faible représentation ou la présence de cadavres indique une mauvaise aération ou le passage d'un toxique. Certains protozoaires, comme les *Trepomonas* (flagellés) préfèrent les milieux peu oxygénés et indiquent donc une épuration faible. D'autres comme les Thécamibes à faible développement montrent que les boues ont un âge avancé.

1.7 Références

Abeliovich A, 1987. Nitrifying bacteria in wastewater reservoirs. Appl. Environ. Microbiol. 53 : 754 – 760.

Abeliovich A., Vonshak A., 1992. Anaerobic metabolism of *Nitrosomonas europaea*. Arch.. Microbiol. 158 : 267 – 270.

Agences de l'eau et ministère de l'environnement, 1994. L'assainissement des agglomérations : techniques d'épuration actuelles et évolutions. Cahier technique no. 27, France, 89-90.

Alfreider A., Pernthaler J., Amann R., Sattler B., Glöckner F.-O., Wille A., Psenner R., 1996. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridation. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 2138-2144.

Allen M. B. and Van Niel C. B., 1952. Experiments on bacterial denitrification. J. Bacteriol. 64, 397-412.

Allisson S.M. and Prosser JI., 1993. Ammonia oxidation at low pH by attached populations of nitrifying bacteria. Soil Biol. Biochem. 25 : 935-941.

Almeida J.S., Reis MAM., Carrondo M.J.T., 1995. Competition between nitrate and nitrite reduction in denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. Biotechnol. Bioengng 46: 476-484.

Amann R., Krumholz L., Stahl D., 1990a. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. 172 : 762-770

Amann R., Binder BJ., Olson R., Chisholm S., Devereux R., Stahl D., 1990b. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. 56 : 1919 - 1925.

Amann R., Stromley J., Devereux R., Key R., Stahl D.A., 1992. Molecular and microscopic identification of sulfato-reducing bacteria in multispecies biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 614 - 623.

Amarger N. and Alexander M., 1968. Nitrite formation from hydroxylamine and oximes by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 95: 1651-1657.

An S., Gardner WS., Kana T., 2001. Simultaneous measurment of denitrification and nitrogen fixation using isotope pairing with membrane inlet mass spectrometry analysis. Appl. Environ. Microbiol. 67 : 1171 – 1178.

Anderson I. C., Poth M., Homstead J., Burdige D.,1993. A comparison of NO and N2O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 3525 – 3533.

Anthonisen A.C, Loehr R.C., Prakasam T.B.S., Srinath E.G., 1976. Inhibition of nitrification of ammonia and nitrous acid. J. Water Pollution Control Fed. 48: 835-852.

Arts P.A.M., Robertson L.A., and Kuenen J.G., 1995. Nitrification and denitrification by *Thiosphaera pantotropha* in aerobic chemostat culture. FEMS Microbiol. Ecol. 18: 305-316.

Audic JM., Faup GM., Navarro JM., 1984. Specific activity of *Nitrobacter* through attachment of granular media. Water Res. 18: 745-750.

Avalakki UK., Strong WM., Saffigna PG., 1995. Measurement of gaseous emissions from denitrification of applied N^{15}.2. Effects of temperature and added straw. Aust. J. Soil. Res. 33 : 89-99.

Balderston W.L., Sherr B., Payne W.J., 1976. Blockage by acetylene of nitrous oxide reduction in *Pseudomonas perfectomarinus*. Appl. Environ. Microbiol. 31 : 504-508.

Balkas T., Dechev G., Mihnea R., Serbenescu O., Unluata U., 1990. *State of the Marine Environment in the Black Sea Region*, UNEP Regional Seas Reports and Studies No. 124. Nairobi (Kenya), Programme des Nations Unies pour l'environnement

Ballinger S.J., Head I.M., Curtis T.P., Godley A.R., 2002. The effect of C/N ratio on ammonia oxidising bacteria community structure in a laboratory nitrification – denitrification reactor. Water Sci. Technol. 46: 543-550.

Baumann B., Snozzi M., Zehnder A.J.B. and van der Meer J.R., 1996. Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. J. Bacteriol. 178: 4367-4374.

Bailey L. D. and Beauchamp E. G., 1973. Effect of temperature on NO_3^- and NO_2^- reduction, nitrogenous gas production, and redox potential in a saturated soil. Can. J. Soil Sci. 53: 213-218.

Bailey L. D., 1976. Effect of temperature and root on denitrification in a soil. Can. J. Soil Sci. 56: 79-87.

Bédard C. and Knowles R., 1989. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH_4, NH_4^+, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifers. Microbiol. Rev. 53: 68-84.

Beline F., Martinez J., Marol C., Guiraud G., 2001. Application of 15 N technique to determine the contributions of nitrification and denitrification to the flux of nitrous oxide from aerated pig slurry. Wat. Res. 35: 2774-2778.

Belser L.W. and Mays E.L., 1982. Use of nitrifier activity measurements to estimate the efficiency of viable nitrifier counts in soils and sediments. Appl. Environ. Microbiol. 43 : 945-948.

Belser LW., 1984. Bicarbonate uptake by nitrifiers : effects of growth rate, pH, substrate concentration, and metabolic inhibitors. Appl. Environ. Microbiol. 48: 1100-1104.

Bengtsson G. and Annadotter H., 1989. Nitrate reduction in a groundwater microcosm determined by ^{15}N gas chromatography-mass spectrometry. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2861-2870.

Betlach M.R. and Tiedje J.M., 1981. Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. Appl. Environ. Microbiol. 42: 1074-1084.

Bergersen F.J., 1965. Ammonia, an early stable product of nitrogen fixation by soybean root nodules. Aust. J. Biol. Sci. 18: 1-9.

Bertanza G., 1997. Simultaneous nitrification-denitrification process in extended aeration plants : pilot and real scale experiences. Water Sci. Technol. 35: 53-61.

Berthe T., Garnier J., Petit F., 1999. Quantification de bactéries nitrifiantes du genre *Nitrobacter* en milieu aquatique (l'estuaire de la Seine, France). Approche moléculaire. *C. R. Acad. Sci.* 322: 517-526.

Bianchi M., Bonin P., Feliatra F., 1994. Bacterial nitrification and denitrification rates in the Rhône River plume (northwestern Mediterranean Sea). Mar. Ecol. Prog. Ser. 103: 197-202.

Biesterfeld S., Farmer G., Russell P., Figueroa L., 2003. Effect of alkalinity type and concentration on nitrifying biofilm activity. Water Environ. Res. 75: 196-204.

Billen G., Garnier J., Hanset P., 1994. Modelling phytoplankton development in whole drainage networks: the RIVERSTRAHLER Model applied to the Seine river system. Hydrobiologia. 289: 119-137.

Billen & Garnier, 1999. Nitrogen transfers though the Seine drainage network : a budget based on the application of the RIVERSTRAHLER Model. Hydrobiologia. 410: 139-150.

Bleakley B. H., and Tiedje J.M., 1982. Nitrous oxide production by organisms other than nitrifiers or denitrifiers. Appl. Environ. Microbiol. 44: 1342-1348.

Blicher – Mathiesen G. and Hoffmann C., 1999. Denitrification as a sink for dissolced nitrous in a freshwater riparian fen. J. Environ. Qual. 28: 257-262.

Bliefert C. and Perraud R., 2001. « Environmental chemistry, air, water, soils, waste ». pp. 181-183. Ed. De Boeck, Paris (French).

Bock E., 1976. Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter. II. Chemoorganotrophic growth of *Nitrobacter agilis*. Arch. Microbiol. 108: 305-312.

Bock E., Sundermeer-Klinger H., Stackebrandt E., 1983. New facultative lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria. Arch. Microbiol. 136: 281-284.

Bock E., Koops H.P. and Harns H., 1986. Cell biology of nitrifying bacteria. In :Nitrication, pp 17-38. Prosser J.I. (ed) IRL Press, Oxford.

Bock E., Koops H.P. and Harns H.,1989. Nitrifying bacteria. In : Autotrophic bacteria, pp 81-96. Schlegel HG. Et Bowien B. (ed) Springer Verlag, Berlin.

Bock E., Koops H.P., Harns H., Ahlers B., 1991. The biochemistry of nitrifying microorganisms. In :Variations in autotrophic lile, pp 171-200. Shively J.M. et Barton L.L. (ed.), Academic Press, London.

Bock E. and Koops H.P., 1992. The genus *Nitrobacter* and related genera. In The prokaryotes. Ed, A, Balows, HG. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, KH. Shleifer, pp. 2302-2309. New York : Springer Verlag.

Bock E., Koops H.P., Ahlers B., Harns H., 1992. Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source. In The prokaryotes : A Handbook on biology of bacteria : Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. pp. 414-430. Ed Springer, New York.

Bock E., Scmidt E, Stüven R., Zart D., 1995. Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. Arch. Microbiol. 163: 16-20.

Bonin P., Gilewiez M., Bertrand J.C., 1989. Effect of oxygen on each step of denitrification on *Pseudomonas nautica* strain 617. Can. J. Microbiol. 35: 1061-1064.

Bonin P., Omnes P., Chalamet A., 1998. Simultaneous occurrence of denitrification and nitrate ammonification in sediments of the French Mediterranean coast. Hydrobiologia. 389: 169-182.

Bonin P., Tamburini C., Michotey V., 2002. Determination of bacterial processes which are sources of nitrous oxide production in marine samples. Water Reas. 36: 722-732.

Bouwman AF, Boumans JM, Batjes NH., 2002. Emissions of N_2O and NO from fertilied fields: Summary of available measurement data. Global Biogeochem. Cycles, 16: 6/1-6/12

Bowman R.A. and Focht D.D., 1974. The influence of glucose and nitrate concentrations upon denitrification rates in a sandy soil. Soil. Biol. Biochem. 6: 297-301.

Braker G., Fesefeldt A., Witzel K.P., 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nir*K and *nir*S) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 64 : 3769-3775.

Braker G., Zhou J.Z, Wu L.Y, Devol A.H., Tiedje J.M., 2000. Nitrite reductase genes (nirK and nirS) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2096-2104.

Bremmer J.M. and Shaw K., 1958. Denitrification in soil. II. Factors affecting denitrification. J. Agric. Sci. 51: 40-52.

Bremmer J.M., 1977. Role of organic matter in volatilisation of sulphur and nitrogen from soils, p. 229-240. In Soil organic matter studies, vol 2. International Atomic Energy Agency, Vienna.

Brettar I. and Hölfe M.G., 1993. Nitrous oxide producing heterotrophic bacteria from water column of the central Baltic : abundance and molecular identification. Mar. Ecol. Prog. Ser. 94: 253-265.

Brion N. and Billen G., 1998. Une réévaluation de la méthode d'incorporation de $H^{14}CO_3^-$ pour mesurer la nitrification autotrophe et son application pour estimer des biomasses de bactéries nitrifiantes. Rev. Sci. Eau 11 : 283-302.

Brooks M.H., Smith R.L., Macalady D.L., 1992. Inhibition of existing denitrification enzyme activity by chloramphenicol. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1746-1753.

Bruns MA., Stephen JR., Kowalchuk GA., Prosser JI., Paul EA., 1999. Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled and successional soils. Appl. Environ. Microbiol. 65 : 2994-3000.

Burford J.R. and Bremmer J.M., 1975. Relationships between denitrification capacities of soils and total, water-soluble and readily decomposable soil organic matter. Soil. Biol. Biochem. 7: 389-394.

Burgess JE., Colliver BB., Stuetz RM., Stephenson T., 2002. Dinitrogen oxide production by a mixed culture of nitrifying bacteria during ammonia shock loading and aeration failure. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 29: 309-313.

Burk D., 1930. The influence of oxygen gas upon the organic catalysis of nitrogen fixation by *Azotobacter*. J. Phys. Chem. 34: 1195-1209.

Caffrey J.M., Miller L.G., 1995. A comparison of two nitrification inhibitors used to measure nitrification rates in estuarine sediments. FEMS Microbiology ecology. 17: 213-220.

Calvo L. & Garcia-Gil J., 2004. Use of amoB as a new molecular marker for ammonia-oxidizing bacteria. J. Microbiol. Methods. In press.

Canada's National Climatique Change Process. (CNCCP), 1999. Document de base de la table de concertation de l'agriculture et de l'agroalimentaire Canada. www.nccp.ca/html_f/tables/pdf/agri_fp_fr.pdf

Carucci A., Ramadori R., Rosetti S., Tomei M.C., 1996. Kinetics of denitrification reactions in single sludge systems. Water Res. 30: 51-56.

Casciotti K.L. and Ward B.B., 2001. Dissimilatory nitrite reductase genes from autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2213-2221.

Castignetti D. and Hollocher T.C., 1984. Heterotrophic nitrification among Denitrifiers. Appl. Environ. Microbiol. 47: 620-623.

Cébron A., Berthe T., Garnier J., 2003. Nitrification and Nitrifying bacteria in the lower Seine River and estuary. Appl. Environ. Microbiol. 69: 7091-7100

Cébron A., 2004. Nitrification, bactéries nitrifiantes et émissions de N_2O. thèse de Doctorat, Université P & M. Curie. pp.289.

Cébron A., Coci M., Garnier J., Laanbroek H.J., 2004. DGGE analysis of the Ammonia Oxidizing Bacterial Community structure in the lower Seine River: impact of the Paris wastewater effluents. Appl. Environ. Microbiol. 70: 6726-6737.

Cébron A. and Garnier J., 2005. *Nitrobacter* and *Nitrospira* genera as representative of the nitrite oxidizing bacteria: detection, quantification and growth along the lower Seine River. Can J Microbiol. In press.

Cébron A., Garnier J., Billen G., 2005. Nitrous oxide production and nitrification kinetics by natural bacterial communities (the lower Seine River, France). Aquatic. Microbial. Ecology. In press.

Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (CITEPA). 2003. Emissions dans l'air en France métropole, comparaisons des émissions de la France et d'autres pays. www.citepa.org/France-autres/comparaisons.pdf.

Chalk P.M. and Smith C.J., 1983. Chemodenitritrification. In: Gaseous loss of nitrogen plant – soil systems. Freney, J.R., Simpson, J.R. (Eds). Developments in Plant and Soils Sciences 9: 65-89.

Cugier Ph., Billen G., Guillaud JF.,. Garnier J., Ménesguen A., 2005. Modelling the eutrophication of the Seine Bight (France) under historical. present and future riverine nutrient loading. J. Hydrol. In press.

Dalsgaard T., de Zwart J., Robertson L.A., Kuenen J.G., Revsbech N. P., 1995. Nitrification, denitrification and growth in artificial *Thiosphaera pantotropha* biofilms as measured with a combined microsensor for oxygen and nitrous oxide. FEMS Microbiol. Ecol. 17: 137-148.

De Beer D., van den Heuvel J., Ottengraf S., 1993. Microelectrode measurements of the activity distribution in nitrifying bacterial aggregates. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 573-579.

Degré A., Verhève D., Debouche C., 2001. Emissions gazeuses en élevage porcin et modes de réduction : revue bibliographique. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 5: 135-143

De Wilde HPJ. and De Bie MJM., 2000. Nitrous oxide in the Schelde estuary : production by nitrification and emission to the atmosphere. Marine Chemistry. 69: 203-216.

Davies K.J., Lloyd D., Boddy L., 1989. The effect of oxygen on dentrification in *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol. 135: 2445-2451.

Dawson R. N., and Murphy K. L., 1972. The temperature dependance of biological denitrification. Water Res. 6: 71-83.

Defives C., Guyard S., Oularé M.M., Mary P., Hornez J.P., 1999. Total counts. Culturable and viable, and non-culturable microflora of french mineral water : a case study. J. Appl. Microbiol. 86: 1033-1038.

Deronzier G., Schétrite S., Racault Y., Canler J-P., Liénard A., Héduit A., Duchène P., 2001. Traitement de l'azote dans les stations d'épuration biologique des petites collectivités. Ministère de l'Agriculture et de la pêche. Cemagref éditions. Document technique FNDAE n°25.

Diab S., Kochba M., Mies D., Avnimelech Y., 1992. Combined intensive-extensive (CIE) pond system. A : Inorganic nitrogen transformations. Aquaculture 101: 33-39.

Diab S. and Shilo M., 1998. Effect of adhesion to particules on the survival and activity of *Nitrosomonas* sp. and *Nitrobacter* sp. Archives of Microbiology. 150: 387-393.

Diaz R.J. and Rosenberg R., 1995. Marine benthic hypoxia : A review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. Oceanography and Marine Biology Annual Review 33: 245-303.

Dinçer A. R. and Kargi F., 2000. Kinetics of sequential nitrification and denitrification processes. Enzyme and microbial technology. 27: 37-42.

Dionisi HM., Layton AC., Harms G., Gregory IR., Robinson KG., Sayler GS., 2002. Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp. From full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. Appl. Environ. Microbiol. 68: 245-253.

Dobbie K.E. and Smith K.A., 2001. The effects of temperature, water-filled pore space and land use on N_2O emissions from an imperfectly drained gleysol. European J. Soil Sci. 52: 667-

Dong L.F., Nedwell D.B., Underwood G.J.C., Thornton D.C.O., Rusmana I., 2002. Nitrous oxide formation in the colne estuary, England : the central role of nitrite. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1240-1249.

Downing A.L., Painter H.A., Knowles G., 1964. Nitrification in activated-sludge process. J. Proc. Inst. Sew. Purif. 2: 130-158.

Doxtader K. G. and Alexander M., 1966. Nitrification by heterotrophic soil oorganisms. Soil Sci. Am. Proc. 30: 351-355.

Drozd J.W., 1980. Respiration in the ammonia-oxidizing chemoautotrophic bacteria. In: The Diversity of Bacterial Respiratory Systems, (Edited by Knowles C. J.), pp. 87-111. CRC Press, Boca Raton, Fla

Dunn G.M., Herbert R.A., Brown C.M., 1979. Influence of oxygen tension on nitrate reduction a *Klebsiella* sp. growing on chemostat culture J. Gen. Microbiol. 112: 379-383.

Eckenfelder W.W and Grau P., 1992. Water quality management library – Vol 1./ Activated sludge process design and control : theory and practice. pp55-67. éd. Technomic publishing co. inc.

Edwards R.M. and Tiedje J.M., 1981. Abstr. Annu. Meet. AM. Soc. Microbiol. N48, p181

Fabig W. and Ottow J.C.G., 1979. Isolierung und identifizierung neuer denitrifizierender bakterien aus einer model-kläranlage mit anaeroben festbettreaktoren. Arch. Hydrobiol. 85: 372-391.

Fay P., 1992. O_2 relations of N_2 fixation in cyanobacteria. Microbiol. Rev. 56: 340-373.

Firestone M.K. and Tiedje J.M., 1979. Temporal changes in nitrous oxide and dinitrogen from denitrification following onset of anaerobiosis. Appl. Environ. Microbiol. 38: 673-679.

Flanagan D.A., Gregory L. G., Carter J.P., Karakas-Sen A., Richardson D.J., Spiro S., 1999. Detection of genes for periplasmic nitrate reductase in nitrate respiring bacteria and in community DNA. FEMS. Microbiol. Lett. 177: 263-270.

Focht D.D., 1974. The effect of temperature, pH, and aeration on the production of nitrous oxide and gaseous nitrogen - a zero order kinetic model. Soil Sci. 118: 173-179.

Focht D.D. and Verstraete W., 1977. Biochemical ecology of nitrification and denitrification. Adv. Microb. Ecol. 1: 135-214.

Francisco DE., Mah RA., Rabin C., 1973. Acridine orange epi-fluorescent technic for counting bacteria in natural waters. Trans. Am. Microsc. Soc. 92: 416-421.

Frette L., Gejlsbjerg B., Westermann P., 1997. Aerobic denitrifiers isolated from an alternating activated sludge system. FEMS Microbiol. Ecol. 24: 363-370.

Garcia-Ruiz R., Pattinson S.N., Whitton B.A., 1998. Kinetic parameters of denitrification in a River continuum. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2533-2538.

Garnier J., Cébron A, Tallec G., Billen G., Sebilo M., Martinez A., 2005. Nitrous oxide emission in the seine River estuary (France) : comparaison with upstream sector of the Seine basin. Biogeochemistry. In press.

Gaskell J.F., Blackmer A.M., Bremmer J.M., 1981. Comparison of effects of nitrate, nitrite and nitric oxide on reduction of nitrous oxide to denitrogen by soil microorganisms. Soil. Sci. Soc. Am. J. 45: 1124-1127.

Glover HE., 1985. The relationship between inorganic nitrogen oxidation and organic carbon production in batch and chemostat cultures of marine nitrifying bacteria. Arch. Microbiol. 142: 45-50.

Goreau T.J., Kaplan W., Wofsy S., McElroy M., Valois F., Watson S. 1980 Production of NO_2^- and N_2O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen. Appl. Environ. Microbiol. 40: 526-532.

Gorégués CM., Michotey V., Bonin P., 2005. Seasonal and diurnal distributions of denitrifying and eubacterial communities in a hypersaline microbial mat (Camargue, France). Water Res. Submitted.

Gould GW. and Lees H., 1960. The islation and culture of nitrifying organisms. Part 1. Nitrobacter. Can. J. Microbiol. 6: 299-307.

Gouvernement du Canada. 2001. Troisième rapport national du Canada sur les changements climatiques. www.climatechange.gc.ca

Greenberg E.P. and Becker G.E., 1977. Nitrous oxide as end product of denitrification by strains of fluorescent pseudomonas. Can. J. Microbiol. 23: 903-907.

Gregory L.G., Karakas-Sen A., Richardson D.J., Spiro S., 2000. Detection of genes for membrane-bound nitrate reductase in nitrate-respiring bacteria and in community DNA. FEMS. Microbiol. Lett. 183: 275-279.

Grunditz C. and Dalhammar G., 2001. Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. Wat. Res. 35: 433-440.

Hagemann R.H. and Redd A.J., 1980. Nitrate reductase from higher plants. Methods Enzymol. 69: 270-281.

Hagopian D.S. and Riley J.G., 1998. A closer look at the bacteriology of nitrification. Aquacult Eng 18: 223-244.

Haider S., Svardal K., Vanrolleghem P.A., Kroiss H., 2003. The effect of low sludge age on wastewater fractionation (S_s, S_l). Water Sci. Technol. 47: 203-209.

Hall G.H., 1984. Measurement of nitrification rate in lake sediments : comparison of the nitrification inhibitors nitrapyrin and allylthiourea. FEMS Microbiology ecology. 10: 25-36.

Hall E.R. and Murphy K.L., 1985. Sludge age and substrate effects on nitrification kinetics. J. WPCF. 57: 413-418.

Hanaki K., Wantawin C., Ohgaki S., 1990a. Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. Water Res. 24: 297-302.

Hanaki K., Wantawin C., Ohgaki S., 1990b. Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspending-growth reactor. Water Res. 24: 289-296.

Hanaki K., Hong Z., Matsuo T., 1992. Production of nitrous oxide gas during denitrification of wastewater. Water Sci. Technol. 26: 1027-1036.

He Y., Inamori Y., Mizuochi M., Kong H., Iwami N., Sun T., 2000. Measurements of N_2O and CH_4 from the aerated composting of food waste. The Science of the Total Environment 254: 65-74.

Helder C. and De Vries RTP., 1983. Estuarine nitrite maxima and nitrifying bacteria (ems-Dollar estuary) Neth. J. Sea Res. 17: 1-18.

Helmer C.and Kunst S., 1998. Simultaneous nitrification/denitrification in an aerobic biofilm system. Water Sci. Technol. 37: 183-187.

Henninger N. M. and Bollag J.M., 1976. Effect of chemicals used as nitrification inhibitors on the denitrification process. Can. J. Microbiol. 22: 668-672.

Henriksen K., Hansen J.I, Blacburn T.H., 1981. Rate of nitrification, distribution of nitrifying bacteria and nitrate fluxes in different types of sediments from Danish waters. Marine biology. 61: 299-304.

Hibiya K., Nagai J., Tsuneda S., Hirata A., 2003. Simple prediction of oxygen penetration depth in biofilms for wastewater treatment. Biochemical engineering journal. 19: 61-68.

Hippen A., Helmer C., Kunst S., Rosenwinkel K.H., Seyfried C.F., 2001. Six years pratical experience with aerobic/anoxic deammonification in biofilm systems. Water Sci. Technol. 44: 39-48.

Hirsch P., Overrein L., Alexander M., 1961. Formation of nitrite and nitrate by actinomycetes and fungi. J. Bacteriol. 82: 442-448.

Hochstein L.I. and Tomlinson G.A., 1988. The enzymes associated with denitrification. A. Rev. Microbiol. 42: 231-261.

Holben W., Noto K., Sumino T., Suwa Y., 1998. Molecular analysis of bacterial communities in a three-compartiment granular activated sludge system indicates community-level control by incompatible nitrification processes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2528-2532

Holmes A.J., Costello A, Lidstrom L.E., Murrell J.C., 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. FEMS Microbiology letters. 132: 203-208.

Hooper AB. and Terry KR., 1979. Hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas* production of nitric oxide from hydroxylamine. Biochim. Biophys. Acta 571: 12-20.

Holtan-Hartwing L., Dörsch P., Bakken L.R., 2000. Comparison of denitrifying communities in organic soils : kinetics of NO3- and N2O reduction. Soil biology & biochemistry. 32: 833 –843.

Horz HP., Rotthauwe JH., Lukow T., Liesack W., 2000. Identification of major suggroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of AmoA PCR products. J. Microbiol. Methods. 39: 197-204.

Hyman M.R. and Arp D.J., 1995. Effects of ammonia on de novo synthesis of polypeptides in cells of *Nitrosomonas europaea* denied ammonia as an energy source. Journal of bacteriology 177: 4974-4979.

Hynes. R. K. and Knowles R., 1983. Inhibition of chemoautotrophic nitrification by sodium chlorate and sodium chlorite : a reexamination. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1178-1182.

Hynes. R. K. and Knowles R., 1984. Production of nitrous oxide by *Nitrosomonas europaea* : effects of acetylene, pH, and oxygen.. Can. J. Microbiol. 30: 1397-1404.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2000. Special report on Emissions Scenarios. Cambridge Univ. Press, 599 pp

Itokawa H., Hanaki K., Matsuo T., 2001. Nitrous oxide production in high-loading biological nitrogen removal process under low COD/N ratio condition. Water Res. 35: 657-664.

Jiang Q-Q. and Bakken L.R., 1999. Nitrous oxide production and methane oxidation by differnet ammonia-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2679-2684.

Jorgensen K.S., Jensen H.B., Sorensen J., 1984. Nitrous oxide production from nitrification and denitrificiation in marine sediment at low oxygen concentrations. Can. J. Microbiol. 30: 1073-1078.

Jorgensen K.S., 1989. Annual pattern of denitrification and nitrate ammonification in estuarine sediment.. Appl. Environ. Microbiol. 55 : 1841-1847.

Josserand A., 1983. Apport de l'immunofluorescence à l'étude écologique des germes nitrifiants (genre Nitrobacter) Thèse de Doctorat. Université Lyon I. 151p.

Justin P. and Kelly D.P., 1978. Metabolic changes in *Thiobacillus denitrificans* accompanying the transition from aerobic to anaerobic growth in continuous culture. J. Gen. Microbiol. 197: 131-137.

Kuai L. and Verstraete W., 1998. Ammonium removal by the Oygen-limited Autotrophic Nitrification-Denitrification system. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4500-4506.

Kakutani T., Bappu T., Arima K., 1981. Regulation of nitrite reductase in the denitrifying bacterium *Alcaligenes faecalis* S-6. Agric. Biol. Chem. 45: 23-28.

Kämpfer P., Erhart R., Beimfohr C., Böhringer J., Wagner M., Amann R., 1996. Characterization of bacterial communities from activated sludge : culture-dependent numerical identification versus in situ identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. Microbial Ecology. 32: 101-121

Keen GA. and Prosser JI., 1987. Steady state and transient growth of autotrophic nitrifying bacteria. Arch. Microbiol. 147: 73-79.

Keeney D.R., Fillery I.R., Marx G.P., 1979. Effect of temperature on the gaseous nitrogen products of denitrification in silt loan soil. Soil. Sci. Soc. Am. J. 43: 1124-1128.

Keeney DR. and Nelson DW., 1982. Nitrogen-inorganic forms. In : Page AL., Miller RH., Keeney DR. (eds) Methods of soil analysis. Part 2 – Chemical and microbiological properties (2nd Ed.) Agronomy. 9:643-698.

Kiff R.J., 1972. The ecology of nitrification/denitrification systems in activated sludge. Water Pollut. Control.: 475-484.

Killham K., 1986. Heterotrophic nitrification : In : Nitrification (Prosser, J.I., Ed), pp. 117-126. IRL Press, Oxford.

Klapwijk A., Smith H., Moore A., 1981a. Denitrification of domestic waste water in an upflow sludge-blanket reactor without carrier material for the biomass, p. 205-216. In P.F. Cooper and A. Atkinson (ed.), Biological fluidised bed treatment of water and wasterwater. Ellis Harwood Ltd., Chichester.

Klapwijk A., van der Hoeren J.C.M., Lettings G., 1981b. Biological denitrification in an upflow sludge blanket reactor. Water Res. 15: 1-16.

Knowles G., Downing AL., Barett MJ., 1965. Determination of kinetic constants for nitrifying bacteria in mixed culture with the aid of an electronic computer. J. Gen. Microbiol. 38: 263-278.

Knowles R., 1981a. Denitrification. P.315-329. In F. E. Clark and T. Rosswall (ed.), Terrestrial nitrogen cycles. Ecol. Bull. (Stockholm) no. 33. Swedish Natural Science Research Council, Stockholm.

Knowles R., 1981b. Denitrification. P..323-369. In E. A. Paul and J. Ladd (ed.), Soil biochemistry vol. 5. Marcel Dekker Inc., New York.

Knowles R., 1982. Denitrification. Microbiological Reviews. 46: 43 – 70.

Knowles R., 1996. Denitrification: microbiology and ecology. Life Support Biosph Sci. 3: 31-34.

Koops H-P., Böttcher B., Möller U.C., Pommerening-Röser A., Stehr G., 1991. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria : *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov., *Nitrosomonas halophila* sp. nov. J. Gen. Microbiol. 137: 1689-16990.

Koops HP., Pommerening-Röser A., 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. FEMS Microbiol. Ecol. 37: 1-9.

Körner H. and Zumft W.G., 1989. Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1670-1676.

Kowalchuk GA., Stephen JR., De Boer W., Prosser J.I., Embley T.M., Woldendorp J.W., 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β–subdivision of the class proteobacteria in coastal sand dune by denaturing gradient gel electrophoresis and sequancing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1489-1497.

Kristjansson J. K. and Hollocher T.C., 1980. First pratical assay for soluble nitrous oxide reductase of denitrifying bacteria and a partial kinetic characterization. J. Biol. Chem. 255: 704-707.

Krogulska B. and Mycielski R., 1984. Bacterial microflora participating in the removal of nitrogen from industrial wastewaters by nitrification and denitrification. Acta Microbiol. Pol. 33: 67-76.

Krul J.M. and Veeningen R., 1977.The synthesis of the dissimilatory nitrate reductase under aerobic conditions in a number of denitrifying bacteria, isolated from activated sludge and drinking water. Water Res. 11: 39-43.

Kuai L. and Verstraete W., 1998. Ammonium removal by the Oygen-limited Autotrophic Nitrification-Denitrification system. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4500-4506.

Kwiatkowski A. and Shapleigh J.P., 1996. Requirement of nitric oxide for induction of genes whose products are involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. J. Biol. Chem. 271:24382-24388.

Laanbroeck HJ. and Gerards S., 1993. Competition for limiting amounts of oxygen between *Nitrosomonas europea* and *Nitrobacter winogradsky* grown in mixed continuous cultures. Arch. Microbiol. 159: 453-459.

Laudelout H., Lambert R., Pham ML., 1976. Influence du pH et de la pression partielle en oxygène sur la nitrification. Annales de Microbiologie (Institut Pasteur) 127A : 367-382.

Lebaron P., Parthuisot N., Catala P., 1998. Comparison of blue nucleic acid dyes flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems. Appl. Environ. Microbiol. 64 1725 - 1730.

Lee Y. and Oleszkiewicz J.A., 2003. Effects of predation and ORP conditions on the performance of nitrifiers in activated sludge systems. Water. Res. 37: 4202-4210.

Lin J.T. and Stewart V., 1998. Nitrate assimilation by bacteria. Adv. Microb. Physiol. 39: 1-30.

Liu WT., Marsh TL., Cheng H., Forney LJ., 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 63 : 4516-4522.

Llobet-Brossa E., Rossello-Mora R., Amann R., 1998. Microbial community composition of wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridation. Appl. Environ. Microbiol. 64 : 2691-2696

Lusby FE., Gibbs MM., Cooper AB., Thompson K., 1998. The fate of groundwater ammonium in a lake edge wetland. J. Envion. Quality. 27: 459-466.

Malakoff D., 1998. Death by suffocation in the Gulf of Mexico. Science 281: 190-192

Manz W., Szewzyk U., Ericsson P., Amann R., Schlefer K.-H., Stenström T.-A., 1993. In situ identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridation with 16S and 23S r-RNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2293-2298

Marchetto M., Gianotti E.P., Campos J.R., Pires R.C., de Mattos Moraes E., 2003. Estimate of denitrifying microbiota in tertiary sewage treatment and kinetics of the denitrification process using different sources of carbon. Brazillian journal of microbiology. 34: 104-110.

Martiny H. and Koops HP., 1982. Incorporation of organic compounds into cell protein by lithotrophic, ammonia-oxidizing bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. 48: 327-336.

Matsubara T. and Mori T., 1968. Studies on denitrification. IX. Nitrous oxide, its production and reduction to nitrogen. J. Biochem. (Tokyo) 64: 863-871.

Matsubara T., 1971. Studies on denitrification. XIII. Some properties of the N_2O-anaerobically grown cell. J. Biochem. (Tokyo) 69: 991-1001.

Matsuzaka E., Nomura N., Nakajima-kambe T., Okada N., Nakahara T., 2003. A simple screening procedure for heterotrophic nitrifying bacteria with oxygen-tolerant denitrification activity. J. of Bioscience and Bioengineering. 95: 409-411.

McElhannon W. S. and Mills H.A., 1981. Supression of denitrification with nitrapyrin. HortScience 16: 530-531.

Mc Tavish H., Fuchs J.A., Hooper A.B., 1993. Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. Journal of bacteriology 175: 2436-2444.

Meincke M., Bock E., Kastrau D., Kroneck P.M.H., 1992. Nitrite oxidoreductase from *Nitrobacter hamburgensis* : redox centers and their catalytic role. Archives of Microbiology 158: 127-131.

Melberg J.B.M., Bruinenberg P. M., Harder W., 1980. Effect of dissolved oxygen tension on the metabolism of methylated amines in Hyphomicrobium X in the absence and presence of nitrate : evidence for "aerobic" denitrification. J. Gen. Microbiol. 120: 453-463.

Metcalf E., Tchobanoglous G., Burton F.L., 1991. Wastewater engineering : treatment, disposal, reuse. 3rd edn, McGraw Hill, New York. Pp. 695-725.

Metz S., Beisker W., Hartmann A., Scholter M., 2003. Detection methods for the expression of the dissimilatory copper-containing nitrite reductase gene (DnirK) in environmental samples. J. of Microbiol. Methods. 55: 41-50.

Mitsuri S., Watanabe I., Honma M., Honda S., 1964. The effect of pesticides on the denitrification in paddy soil. Soil Sci. Plant Nutr. 10: 15-23.

Mobarry BK., Wagner M., Urbain V., Rittmann BE., Stahl D., 1996. Phylogentic probes for analyzing abundance and spatial organisation of nitrifying bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2156-2162.

Montuelle B., Volat B., Torio-Fernandez MM., Navarro E., 1996. Changes in *Nitrobacter* serotypes biodiversity in a river : impact of a wastewater treatment plant discharge. Water Res. 30: 1057-1064.

Moreno-Vivian C., Cabello P., Martinez-Luque M., Blasco R., Castillo F., 1999. Prokaryotic nitrate reduction : molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. J. Bacteriol. 181: 6573-6584.

Mortenson L.E., Mower H.F., Carnahan J.E., 1962. Nitrogen fixation by enzyme preparations. Bacteriol. Rev. 26: 42-50.

Mohseni-Bandpi A. and Elliot D.J., 1998. Growndwater denitrification with alternative carbon sources. Water Sci. Technol. 38: 237-243.

Mueller R.F., 1996. Bacterial transport and colonization in low nutrient environments. Water Res. 30: 2681-2690.

Müller M.M, Sundman V., Skujins, 1980. Denitrification in low pH spodosols and peats determined with the acetylene inhibition method. Environ. Microbiol. 40:235-239.

Müller R.H and Babel W., 1996. Measurement of growth at very low rates ($\mu \geq 0$), an approach to study the energy requirement for the survival of *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. Appl. Environ. Microbiol. 62: 147-151.

Muyzer G., De waal EC., Uitterlinden AG., 1993. Profiling of complex microbial populations by DGGE analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700.

Myers R.J.K., 1972. The effect of sulphide on nitrate reduction in soil. Plant Soil 37: 431-433.

Narkis N., Rebhum M., Sheindorf Ch., 1979. Denitrification at various carbon to nitrogen ratios. Water Res. 13: 93-98.

Neef A., Zaglauer A., Meier H., Amann R., Lemmer H., Schleifer K-H., 1996. Population analysis in a denitrifying sand filter : conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. In methanol-fed biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4329-4339.

Nelson L.M. and Knowles R., 1978. Effect of oxygen and nitrate on nitrogen fixation and denitrification by *Azospirillum brasilense* grown in continuous culture. Can. J. Microbiol. 24: 1395-1403.

Nielson LP., 1992. Denitrification in sediment determined from nitrogen isotope pairing. FEMS Microbiol. Ecol. 86: 357-362.

Noda N., Yoshie S., Miyano T., Tsuneda S., Hirata A., Inamori Y., 2002. PCR-DGGE analysis of denitrifying bacteria in a metallurgic wastewater treatment process. Water Sci. Technol. 46: 333-336.

Nogita S, Saito Y., Kuge T., 1991. A new indicator of activated sludge process - nitrous oxide. Water Sci Technol 13: 199 – 204.

Nogueira R., Lazarova V., Manem J., Melo L.F., 1998. Influence of dissolved oxygen on the nitrification kinetics in a circulating bed biofilm reactor. Bioprocess and biosystems engineering. 19: 441-449.

Nömmik H., 1956. Investigations on denitrification in soil. Acta Agric. Scand. 6: 195-228.

Nurse, G.R. 1980. Denitrification with methanol : microbiology and biochemistry. Water Res. 14, 531-537.

Obaton M., Amarger N., Alander M., 1968. Heterotrophic nitrification by *Pseudomonas aeruginosa*. Arch. Mikrobiol. 63: 122-132.

Oh J. and Silverstein J., 1999. Acetate limitation and nitrite accumulation during denitrification. J. Environ. Eng. 125: 234-242.

Okabe S., Y. Oozawa, K. Hirata, and Y. Watanabe. 1996. Relationship between population dynamics of nitrifiers in biofilms and reactor performance at various C:N ratios. Water Res. 30, 1563-1572.

Okabe S., Satoh H., Watanabe Y., 1999. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridisation and the use of microelectrodes. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3182-3191

Okabe S., Kindaichi T., Satoh H., 2004. Analysis of size distribution and areal cell density of ammonia-oxidizing bacterial microcolonies in relation to substrate microprofiles in biofilms. Biotechnol. Bioeng. 85: 86-95.

Olson TC. and Hooper A.B., 1983. Energy coupling in the bacterial oxidation of small molecules : an extra cytoplasmic deshydrogenase in *Nitrosomonas*. FEMS Microbiology Letters 19: 47-50.

Otte S., Grobben N.G., Robertson L.A., Jetten M.S.M., Kuenen J.G., 1996. Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2421-2426.

Painter HA., 1986. Nitrification in the treatment of sewage and wastewater, p. 185-211. In J.I. Prosser (ed.), Nitrification. IRL Press, Oxforf, United Kingdom.

Papen H., Von Berg R., Hinkel I., Thoene B., Rennenberg H., 1989. Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* : NO_2^-, NO_3^-, N_2O, and NO production in exponentially growing cultures. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2068-2072.

Park K.Y., Inamori Y., Mizuochi M., Ahn K.H., 2000. Emission and control of nitrous oxide from a biological wastewater treatment system with intermittent aeration. J. Biosci. Bioengin. 90: 247-252.

Payne W.J., Riley P.S., Cox C.D., 1971. Separate nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide reducing fractions from *Pseudomonas perfectomarinus*. J. Bacteriol. 106: 356-361.

Payne W.J., 1973. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. Bacteriol. Rev. 37: 409-452.

Philips S., Wyffels S., Sprengers R., Verstraete W., 2002. Oxygen-limited autotrophic nitrification/denitrifiaction by ammonia oxidisers enables upward motion towards more favourable conditions. Appl. Microbiol Biotechnol. 59: 557-566.

Pinck C., Cœur C., Potier P., Bock E., 2001. Polyclonal antibodies recognizing the AmoB protein of ammonia oxidizers of the β-subclass of the class Proteobacteria. Appl. Microbiol Biotechnol. 67: 118-124.

Porter J., Edwards C., Morgan JA., Pickup RW., 1993. Rapid, automated separation of specific bacteria from lake water and sewage by flow cytometry and cell storing. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 3327 - 3333.

Porter KG. and Feig YS., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnol. Oceanogr. 25: 943-948.

Poth M. and Focht D.D., 1985. ^{15}N kinetic analysis of N_2O production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier denitrification. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1134-1141.

Poughon L., Dussap C.G., Gros J.B., 1999. Dynamic model of a nitrifying fixed-bed columm : simulation of the biomass distribution of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* and of transient behaviour of the column. Bioprocess and biosystems engineering. 20: 209-221.

Poulsen L. K., Ballard G., Stahl D.A., 1993. Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1354-1360.

Powell S.J. and Prosser J.I., 1986. Inhibition of ammonium oxidation by nitrapyrin in soil and liquid culture. Appl Environ. Microbiol. 52 : 782-787.

Powell SJ. and Prosser JI., 1991. Protection of *Nitrosomonas europaea* colonizing clay minerals from inhibition by nitrapyrin. J. Gen. Microbiol. 137: 1923-1929.

Prescott L., Harley J., Klein D., 2003. Microbiology. pp : 186-191. 5ème éd. De Boeck.

Princic A., Mahne I., Megusar F., Paul E., Tiedje J., 1998. Effects of pH and oxygen and ammonium concentrations on the community structure of nitrifying bacteria from wastewater. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3584-3590.

Prosser JI., 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. Adv. Micro. Physiol. 30 : 125-181.

Purkhold U., Pommerening-Röser 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.

Ramalho RS., 1983. Introduction to wastewater treatment process . 2e éd., Academic Press, Toronto, p. 541.

Ramsing N. B., Kühl M., Jorgensen B.B., 1993. Distribution of sulfate-reducing bacteria, O_2, and H_2S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes. Appl. Environ. Microbiol. 59: 3840-3849.

Remde A. and Conrad R., 1990. Production of nitric oxide in *Nitrosomonas europaea* by reduction of nitrite. Arch. Microbiol. 154: 187-191.

Revsbech NP., Nielsen LP., Christensen PB. Sorensen J., 1988. Combined oxygen and nitrous oxide microsensor for denitrification studies. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2245-2249.

Richardson K., 1997. Harmful or exceptional phytoplankton blooms in the marine ecosystem. Advances in Marine Biology 31: 301-385

Richardson D.J., Wehrfritz J.M., Keech A., Crossman L.C., Roldan M.D., Sears H.J., Butler C.S., Reilly A., Moir J.W.B., Berks B.C., Ferguson S.J., Thomson A.J., Spiro S., 1998. The diversity of redox proteins

involved in bacterial heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. Biochemical Society Transactions 26: 401-408.

Rijn J.V., Tal Y., Barak T., 1996. Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by a *Pseudomonas stutzei* strain isolated from a denitrifying fluidized bed reactor. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2615-2620.

Robertson L.A. and Kuenen J.G., 1984. Aerobic denitrification : a controversy revived. Arch. Microbiol. 139: 351-354.

Robertson L.A. and Kuenen J.G., 1988. Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantotropha* : oxygen uptake and enzyme studies. J. Gen. Microbial. 134: 857-863.

Robertson LA., Dalsgaar T., Revsbech NP., Kuenen JG., 1995. Confirmation of aerobic denitrification in batch cultures, using gas chromatography and ^{15}N mass spectrometry. FEMS Microbiol. Ecol. 18: 113-120.

Rodier J., 1984. L'analyse de l'eau (eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer), ed. Dunod.

Roy R. and Knowles R., 1994. Effect of methane metabolism on nitrification and nitrous oxyde production in polluted freshwater sediment. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3307-3314.

Rusmana I. and Nedwell D.B., 2004. Use of chlorate as a selective inhibitor to distinguish membrane-bound nitrate reductase (Nar) and periplasmic nitrate reductase (Nap) of dissimilative nitrate reducing bacteria in sediment. FEMS Microbiology Ecology. 48: 379-386.

Rysgaard S., Risgaard-Petersen N., Nielsen L.P., Revsbech N.P., 1993. Nitrification and denitrification in lake and estuaine sediments measured by the ^{15}N dilution technique and isotope pairing. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 2093 – 2098.

Sacks L.E. and Barker H.A., 1949. The influence of oxygen on nitrate and nitrate reduction. J. Bacteriol. 58: 11-22.

Sacks L.E. and Barker H.A., 1952. Substrate oxidation and nitrous oxide utilization in denitrification. J. Bacteriol. 64: 247-252.

Sandén B., Björlenius B., Grunditz C., Dalhammar G., 1996. Nitrifying bacteria in the influent to a wastewater treatment plant : influence and importance on nitrifying capacity. Water Sci. Technol. 34: 75-82.

Satio Y., Nigota S., Watanabe S, Baba K., 1994. Process for controlling an aeration tank in a activated sludge sewage treatment. United States Patent 4: 437-992.

Satoh T., Hom S.S.M., Shanmugam K.T., 1983. Production of nitrous oxide from nitrite in *Klebsiella pneumoniae* : mutants altered in nitrogen metabolism. J. of Bacteriol. 155: 454-458.

Sayavedra-Soto LA., Hommes NG., Arp DJ., 1994. Characterisation of the gene encoding hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea*. J. Bacteriol. 176: 504-510.

Sayavedra-Soto L.A., Hommes N.G. , Russel S.A., Arp D.J., 1996. Introduction of ammonia monooxygenase and hydroxylamine oxidoreductase mRNAs by ammonium in *Nitrosomonas europaea*. Molecular Microbiology. 20: 541-548.

Scala D.J. and Kerkhof L.J., 1998. Nitrous oxide reductase (nosZ) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three nosZ genes from marine sediments. FEMS Microbiol. Lett. 162: 61-68.

Scala D.J. and Kerkhof L.J., 1999. Diversity of nitrous oxide reductase (nosZ) gene in continental shelf sediments. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1681-1687.

Scala D.J. and Kerkhof L.J., 2000. Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. Appl. Environ. Microbiol. 66 : 1980-1986.

Schmidt E.L., Molina J.A.E., Chiang C., 1973. Isolation of chemoautotrophic nitrifiers from moroccan soils. Bulletins from the Ecological Research Committee (Stockolm). 17: 166-167.

Schmidt, JM. and Belser LW., 1994. autotrophic nitrifying bacteria. In : Methods of soil analysis. Part 2: Microbiological and biochemical properties, pp. 159-177. Bigham JM. (ed.), SSSA Bock series n°5, Madisson, WI.

Schmidt I., Bock E., 1997. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. Arch.. Microbiol. 167: 106 – 111.

Schmidt I., Bock E., 1998. Anaerobic ammonia oxidation by cell-free extracts of *Nitrosomonas eutropha*. Antonie van Leeuwenhoek. 73: 271-278.

Schmidt I., Sliekers O., Schmid M., Bock E., Fuerst J., Kuenen J. G., Jetten M.S.M., Strous M., 2003. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. FEMS Microbiology reviews. 27: 481-492.

Schon G., 1965. Untersüchungen über der Nutzeffekt von *Nitrobacter winogradsky*. Arch. Mikrobiol. 50: 111-132.

Schramm A., Larsen L.H., Revsbech N.P., Ransing N.B., Amann R., Schleifer K.H., 1996. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridation and the use of microelectrodes. Appl. Environ. Microbiol 62: 4641-4647

Schramm A., De Beer D., Wagner M., Amann R., 1998. Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. As dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3480-3485.

Schramm A., De Beer D., Gieseke A., Amann R., 2000. Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm. Environ. Microbiol. 2: 680-686.

Schramm A., 2003. In Situ Analysis of Structure and Activity of the Nitrifying Community in Biofilms, Aggregates, and Sediments. Geomicrobiology Journal. 20: 303-313.

Schulthess R.V., Wild D., Gujer W., 1994. Nitric and nitrous oxides from denitrifying activated sludge at low oxygen concentration. Water Sci. Tecnol. 30: 123-132.

Schulthess R.V., Kuhni M., Gujer W.,1995. Release of nitric and nitrous oxides from denitrifying activated sludge. Wat. Res. 29: 215-226.

Seidl M., Servais P., Mouchel JM., 1998. Organic matter transport and degradation in the River Seine (France) after combined sewer overflow. Wat. Res. 32: 3569-3580.

Seitzinger SP. and Kroeze C., 1998. Global distribution of nitrous oxide production, N inputs in freshwater, coastal marine ecosystems. Global Biogeochemical Cycles. 12: 93-113.

Sengupta S., Shaila M.S., Rao G.R., 1996. Purification and characterization of assimilatory nitrite reductase from *Candida utilis*. Biochem. J. 331: 147-155.

Shammas N.K., 1986. Interactions of temperature, pH, and biomass on the nitrification process. J. WPCF. 58: 52-59.

Shrestha N., Hadano S., Kamachi T., Okura I., 2002. Dinitrogen production from ammoia by *Nitrosomonas europaea*. Applied catalysis A : general. 237: 33-39.

Siegrist H., Reithaar S., Koch. G., Lais P., 1998. Nitrogen loss in a nitrifying rotating contractor treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. Water Sci. Technol. 38: 241-248.

Skinner FA. and Walker N., 1961. Growth of *Nitrosomonas europea* in batch and continuous culture. Arch. Mikrobiol. 38: 339-349.

Slavyck JHG. and McIsaac JJ., 1972. Comparison of two automated ammonium methods in a region of coastal upwelling. Deep Sea Res. 19: 1-4.

Smid A.E. and Beauchamp E.G., 1976. Effect of temperature and organic matter on denitrification in soil. Can. J. Soil Sci. 56: 385-391.

Smith J.M., Masse A.N., Feige W.A., Kamphake, L.J. 1972. Nitrogen removal from municipal waste water by columnar denitrification. Environ. Sci. Technol. 6: 260-267.

Smith MS. and Tiedje J.M., 1979. Phases of denitrification following oxygen depletion in soil. Soil Biology and Biochemistry. 11: 261-267.

Smith MS., 1983. Nitrous oxide production by *Escherichia Coli* is correlated with nitrate reductase activity. Appl. Environ. Microbiol 45: 1545-1547.

Solomonson LP. and Vennesland B., 1972. Properties of a nitrite reductase of Chlorella. Biochim. Biophys. Acta. 267: 544-557.

Sorensen J., Tiedje J.M., Firestone R.B., 1980. Inhibition by sulfide of nitric and nitrous oxide reduction by denitrifying *Pseudomonas fluorescens*. Appl. Environ. Microbiol 39: 105-108.

Soriano S. and Walker N., 1968. Isolation of ammonia-oxidizing autotrophic bacteria. J. Appl. Bacteriol. 31:493-497

Sorokin DY., Muyzer G., Brinkhoff T., Kuenen JG., Jetten MS., 1998. Isolation and characterisation of a novel facultatively alkaliphilic *Nitrobacter* species, *N. alkalicius* sp. nov. Arch. Microbiol. 170: 345-352.

Stanford G., Dzienia S., Vander Pol R.A., 1975. Effect of temperature on denitrification rate in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 39: 867-870.

Stein L. and Arp D., 1998a. Ammonium limitation results in the loss of ammonia-oxidizing activity in *Nitrosomonas europaea*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 1514-1521.

Stein L. and Arp D., 1998b. Loss of ammonia monooxigenase activity in *Nitrosomonas europaea* upon exposure to nitrite. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4098-4102.

Steinmüller W. and Bock E., 1976. Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter. I. Mixotrophic growth. Arch. Microbiol. 108: 299-304.

Stehr G., Zörner S., Böttcher B., Koops HP., 1995. Exopolymers : An ecological characteristic of a floc-attached, ammonia-oxidizing bacterium. Microbiol. Ecol. 30: 115-126.

St John R.T. and Hollocher T.C., 1977. Nitrogen 15 tracer studies on pathway of denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 252: 212-218.

Stouthamer A.H., 1976. Biochemistry and genetics of nitrate reductase in bacteria. Adv. Microb. Physiol. 14: 315-375.

Strous M., Fuerst J.A., Kramer E.H., Logemann S., Muyer G., van de Pas-Schoonen K.T., Webb R., Kuenen J.G., Jetten M.S., 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. Nature. 400: 446-449.

Stüven R., Vollmer M., Bock E.,1992. The impact of organic matter on nitric oxide formation by *Nitrosomonas europaea*. Arch. Microbiol. 158: 439-443.

Sümer LY., Weiske A., Benckiser G., Ottow J.C.G., 1995. Influence of environmental conditions on the amount of N2O released from activated sludge in a domestic waste water treatment plant. Experientia 51: 419-422.

Sundermeyer H. and Bock E., 1981. Characterization of nitrite-oxidizing system in *Nitrobacter*. In : Biology of inorganic nitrogen and sulphur, pp. 317-324. Bothe H. et Trebst A. (ed.), Springer-Verlag, Berlin.

Sundermeyer-Klinger H., Meyer W., Warnighoff B., Bock. E., 1984. Membrane-bound nitrite oxydoreductase of *Nitrobacter* : evidence for nitrate reductase system. Archives of Microbiology 140: 153-158.

Suzuki I., Dular U., Kwok S.C., 1974. Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. Journal of Bacteriology 120: 556-558.

Szwerinski H., Gaiser S., Bardtke D., 1985. Immunofluorescence for quantitative determination of nitrifying bacteria : interference of the test in biofilm reactors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 125-128.

Tam T.Y. and Knowles R., 1979. Effects of sulfide and acetylene on nitrous oxide reduction by soil and by *Pseudomonas aeruginosa*. Can. J. Microbiol. 25: 1133-1138.

Teske A., Alm E., Reagan J.M., Toze S., Rittmann B.E., Stahl D.A., 1994. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. J. Bacteriol. 176: 6623-6630.

Thörn M. and Sörensen F., 1996. Variation of nitrous oxide formation in the denitrification basin in a wastewater treatment plant with nitrogen removal. Wat. Res. 30: 1543-1547.

Thornton I. and Jeffrey A., 1999. Assessment and control of nonpoint source pollution of aquatic ecosystems : a pratical approach. (Man and the biosphere; v 23).

Tiedje J.M., Firestone R.B., Betlach M.R., Smith M.S., Caskey W.H., 1979. Methods for the production and use of nitrogen-13 in studies of denitrification. Soil Sci. Soc. Amer. J. 43:709-715.

Tiedje J.M., Sextone S., Mirold D.D., Robinson J.A., 1982. Denitrification : ecological niches, competition and survival. Ant. Van Leeuwenhoeck. 48: 261-284.

Tsang DCY. and Suzuki I., 1982. Cytochrome c-554 as a possible donor in the hydroxylation of ammonia and carbon monoxide in *Nitrosomonas europaea*. Can. J. Biochem. 60: 1018-1024.

Tsien HC., Lambert R., Laudelout H., 1968. Fine structure and localization of the nitrite-oxidizing system of *Nitrobacter winogradskyi*. Antonie Leeuwenhoek 34: 483-494.

Underhill SE., 1990. Techniques for studying the microbial ecology of nitrification. In : Methods in microbiology, pp. 417-445. Grigorova R. et Norris J.R. 'ed), Academic Press Inc, London.

United Nations Framwork on Climate Change.(UNFCC). 2003. Dossier de presse. http://unfccc.int/press/dossiers/factsheet-fr.html

Utaker JB. & Ner IF., 1998. A quantitative evaluation of the published oligonucleotides specific for the 16S rRNA gene sequences of the ammo,ia-oxidizing bacteria. Syst. Appl. Microbiol. 21: 72-88.

Van Cleemput O. and Patrick W.H., 1974. Nitrate and nitrite reduction in flooded gamma-irradiated soil under controlled pH and redox potential conditions. Soil Biol. Biochem. 6 : 85-88.

Védry B., 1996. « Les biomasses épuratrices. ». Ed 1996 Agence de l'Eau Seine - Normandie.

Verhagen FJM., Duyts H., Laanbroek HJ., 1993. Effects of grazing by flagellates on competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in soil columns. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2099-2106.

Verstraete W. and Alexander M., 1972. Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter* sp. J. Bacteriol. 110: 955-961.

Vitousek PM., Aber JD., Howarth RW, Likens GE., Matson PA., Schindler DW., Schlesinger WH., Tilman DG., 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. Ecological Applications. 7: 737-750.

Von Münch E., Lant P., Keller J., 1996. Simultaneous nitrification et denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. Water Res. 30: 277-284.

Wagner M., Rath G., Amann R., Koops H.P., Schleifer K.H.. 1995. In situ identification of ammonia oxidizing bacteria. Syst. Appl. Microbiol. 18: 251-264.

Wagner M., Rath G., Koops H.P., Flood J., Amann R., 1996. In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. Appl. Environ. Microbiol. 34: 237-244.

Wallace W., Knowles SE., Nicholas DJ., 1970. Intermediary metabolism of carbon compounds by nitrifying bacteria. Arch. Microbiol. 70: 26-42.

Ward BB., 1996. Nitrification and denitrification : probing the nitrogen cucle in aquatic environments. Microbiol. Ecol. 32: 247-261.

Watson SW., 1971. Taxonomic considerations of the family *Nitrobacteriaceae Buchanan*. Requests for opinions. Int. J. Syst. Bacteriol. 21: 254-270.

Watson SW., Bock E., Harms H., Koops H.P., Hooper A.B., 1989. Nitrifying bacteria, pp. 1808-1834. In J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig, J.G. Holt (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 3. The Willams and Wilkins Co., Baltimore, Md.

Wetzernak CT and Gannon JJ., 1967. Oxygen – nitrogen relationships in autotrophic nitrification. Appl. Microbiol. 15: 1211-1214.

Wild D., Schulthess R.V., Gujer W., 1994a. Synthetis of denitrifcation enzymes in activated sludge : modeling with structure biomass. Water Sci. Technol. 30: 113-122.

Wild D., Schulthess R.V., Gujer W., 1994b. Structure modeling of denitrifcation intermediates. Water Sci. Technol. 31: 45-54.

Wijler J. and Delwiche C.C., 1954. Investigations on the denitrifying process in soil. Plant Soil. 5: 155-169.

Winogradsky S., 1892. Contributions à la morphologie des organismes de la nitrification. Arch. Sci. Biol. St. Petersb. 1: 86-137.

Wood P.M., 1986. Nitrification as a bacterial energy source. In : Nitrifcation, pp 39-62. Prosser J.I. (ed) IRL Press, Oxford.

Wrage N., Velthof G.L., van Beusichem M.L., Oenema O., 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. Soil Boil. Biochem. 33: 1723 –1732.

Wrage N., Velthof G.L., Oenema O., Laanbroek H.J., 2004. Acetylene and oxygen as inhibitors of nitrous oxide production in *Nitrosomonas europea* and *Nitrosospira briensis* : a cautionary tale. FEMS Microbiol. Ecol. 47: 13-18.

Wuhrmann K., 1962. Nitrogen removal in sewage-treatment processes. Verh. Int.Ver. Limnol. 15: 580-596.

Xiong X., Hirata M., Takanashi H., Lee M.-G., Hano T., 1998. Analysis of acclimatation behaviour against nitrification inhibitors in activated sludge processes. J. Ferment. Bioeng. 86: 207-214.

Yoshinari T., Hynes R., Knowles R., 1976. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction and measurement of denitrification and nitrogen fixation in soil. Soil Biol. Biochem. 9: 177-183.

Yoshinari T., 1990. In : Denitrification in Soil and Sediment, Eds Revsbech, N. P., Sorenson, J. pp. 129-149. Plenum, New York

Zaitsev Y. and Mamaev V., 1997. Marine Biological Diversity in the Black Sea. New York (É.-U.), Programme des Nations Unies pour le développement.

Zeng R., Lemaire R., Yuan Z., Keller J., 2003. Simultaneous nitrifcation, denitrification, and phosphorus removal in a lab-scale sequencing batch reactor. Biotechnology and Bioengineering. 84: 170-178.

Zheng H., Hanaki K., Matsuo T., 1994. Production of nitrous oxide gas during nitrification of wastewater. Water Sci. Tecnol. 30: 134-141.

Zumft W.G., 1992. The denitrifying procaryotes, p. 554-582. In. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K-H. Schleifer (ed.), The procaryotes, vol. 1. Springer – Verlag, New York, N.Y.

Zumft W.G., 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiology and molecular biology reviews. 61: 533-616.

Avant propos

Dans ce chapitre nous présenterons les sites qui ont fait l'objet de notre étude – le bassin de la Seine et les stations de l'agglomération parisienne. Nous expliquerons également la méthodologie générale appliquée pour mener à bien nos objectifs.

Chapitre 2
-
Sites d'étude et méthodologie générale

2.1 Sites d'étude

2.1.1 Le bassin de la Seine

Le réseau hydrographique de la Seine s'étend sur un bassin versant de 78 600 km^2 (jusqu'au Havre). Le fleuve prend sa source sur le plateau de Langres (417 m) et se jette dans la Manche. L'influence des mouvements de marée est perceptible jusqu'au barrage de Poses, limite artificielle de la Seine fluviale et estuarienne. La Seine et l'ensemble de ses tributaires sont caractérisés par un régime hydrologique de type pluvial océanique : c'est-à-dire des pluies réparties toute l'année, mais avec un maximum d'écoulement en hiver, quand les températures sont basses et l'évapotranspiration minimale, et un minimum en été.

Le réseau hydrographique de la Seine peut être subdivisé en quatre sous-bassins : la Seine Amont, les affluents principaux de la Seine (Marne, Oise, Eure) et en un axe principal, la basse Seine (Figure 23).

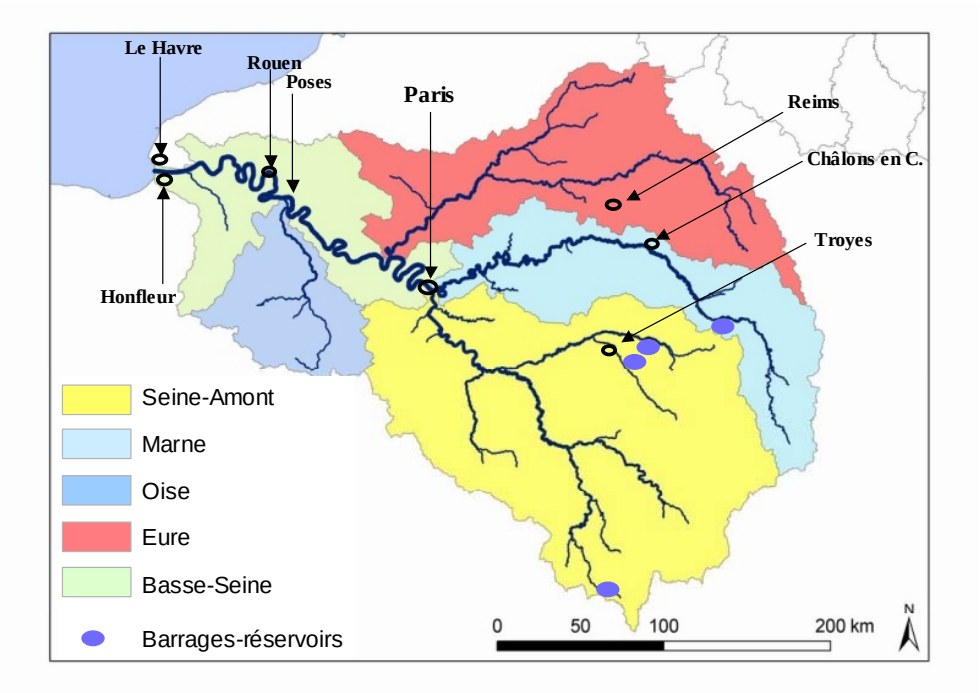


Figure 23. Réseau hydrographique de la Seine et ses quatre sous-bassins (PIREN-Seine).

Les activités humaines anciennes ou actuelles ont des conséquences importantes sur l'écoulement, la qualité des eaux et des milieux. L'agriculture, sources de pollutions diffuses, y est intensive sur l'ensemble du bassin (46 % du bassin est recouvert par des terres agricoles) et la présence de l'agglomération parisienne, une des plus grandes mégapoles d'Europe représente une pollution ponctuelle majeure.

Sur les 12 % du territoire national que représente le bassin de la Seine, sont concentrés 25 % de la population française, 33 % de la production agricole et industrielle et 50 % du trafic fluvial.

Les densités de population les plus faibles sont rencontrées à l'est du bassin, en amont de la Seine et de ses affluents, l'Yonne, la Marne, l'Aube et l'Aisne. La Figure 24 met en évidence la très forte urbanisation au centre du bassin, dans la région parisienne, mais aussi sur le tronçon de la basse Seine où l'on trouve des îlots de forte densité correspondant aux villes de Rouen et du Havre. Les 10 millions d'habitants que compte l'agglomération parisienne exercent une forte pression « urbaine » sur la Seine, accentuée par les faibles débits d'étiage. D'une manière générale, d'amont en aval, les plus fortes densités de population se situent le long des cours d'eau (Figure 24).

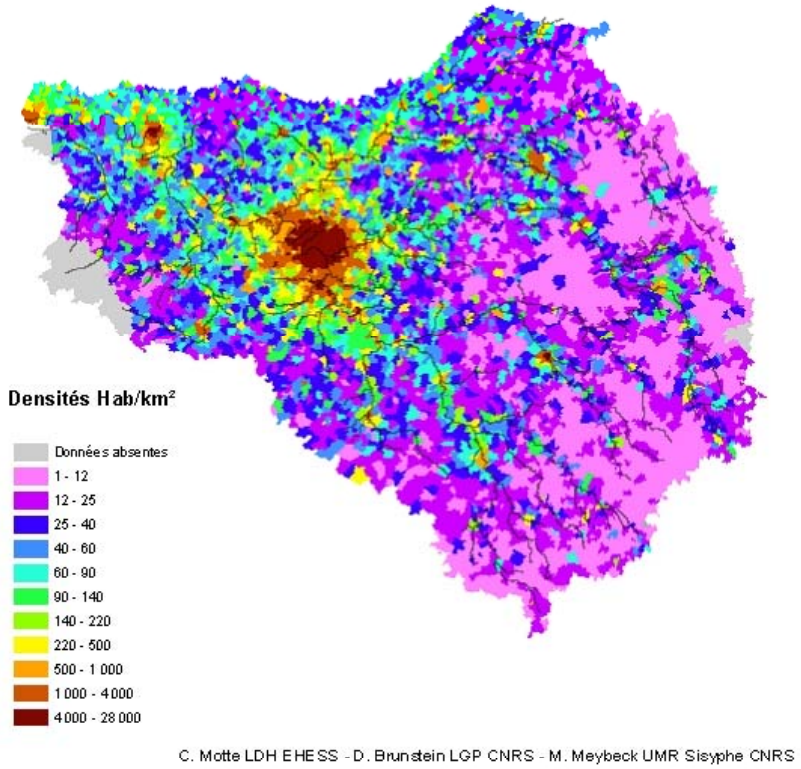


Figure 24. Densité de la population du bassin de la Seine (PIREN-Seine).

Le bassin amont de la Seine (jusqu'à la confluence de la Seine avec la Marne) couvre une surface de 31 000 km^2, soit 40 % du bassin total de la Seine. Sa périphérie est occupée par des espaces mixtes alternant entre cultures et espaces boisés. Son centre est presque entièrement recouvert de sols cultivés et de prairies agricoles, alors que la population et les activités industrielles sont regroupées près des grands axes hydrographiques. L'agriculture et l'élevage représentent ainsi les deux principales sources de pollution du bassin amont. En effet, les pratiques visant à optimiser les apports nutritifs et ne pas sur-fertiliser les sols (analyses de sols, fertilisation raisonnée), sont loin d'être systématiques chez les agriculteurs du bassin de la Seine, ce qui conduit à la pollution des sols, mais surtout des eaux de surface et marines côtières. En effet, l'excès de nitrate non consommé par la végétation est lixivié par les eaux de pluies. Les phytosanitaires, largement utilisés en agriculture, contribuent

également à cette pollution diffuse. Les échanges existant entre les eaux de surface et les eaux souterraines engendrent la pollution des nappes phréatiques tant en nitrates qu'en produits phytosanitaires.

Toutefois, la présence de zones humides en fond de vallées contribue à améliorer la qualité des eaux, non seulement en interceptant les particules et leur charge polluante (phosphore : Némery, 2003 ; Garnier et al., 2005), mais aussi en épurant les eaux de leurs composés dissous (nitrate en particulier : Billen & Garnier, 1999). En effet, les zones humides ont un pouvoir de rétention et d'élimination des polluants azotés et phosphorés. La teneur en nitrate diminue d'une part du fait de leur adsorption par les végétaux ripariens et d'autre part grâce au processus de dénitrification (Fustec et al., 1998).

Les axes principaux des sous-bassins de la Seine, de la Marne et de l'Aube, sont équipés de barrages-réservoirs destinés à maintenir le tirant d'eau nécessaire pour la navigation en été, mais surtout à soutenir un débit d'étiage suffisant pour assurer les prélèvements nécessaires à la production d'eau potable aux exutoires de la Marne et de la Seine, en amont de Paris.

Ces réservoirs modifient l'hydrologie et la biogéochimie des cours d'eaux (Garnier et al., 1999 ; Garnier et al., 2000). Ce sont des sites de sédimentation. Ils modifient donc le transport des matières en suspension et sont également connus pour stocker ou éliminer les éléments nutritifs (Si, N, P). Les nitrates diminuent alors principalement grâce au processus de dénitrification, et l'ammonium augmente durant la période estivale à cause de la minéralisation de la matière organique (Garnier et al., 1999). L'élimination du nitrate, significative à l'échelle des sous-bassins, reste limitée à l'échelle du bassin dans son ensemble en raison de la situation des réservoirs, en amont, dans les zones argileuses et imperméables.

Certaines grosses agglomérations rejettent leurs effluents urbains (Troyes, Châlon en Champagne, Reims, etc.). Cependant, ces effets sont beaucoup moins marqués que ceux de la capitale, car le traitement y est plus poussé, les stations étant plus récentes et de bien plus faible capacité (Tusseau et al., 2000). Les axes canalisés des principaux tributaires sont toutefois déjà eutrophes (Garnier et al., 1998).

*La basse Seine***.** Au niveau de la basse Seine, à l'aval de l'agglomération parisienne, la pollution ammoniacale représente une nuisance majeure. En effet, il est largement montré que l'azote ammoniacal (entre 1 et 4 mgN L^{-1}), apporté par les effluents de l'usine Seine–Aval du SIAAP (Achères) diminue peu tout au long de la Seine (Brion et al., 2000; Garnier et al., 2001; Cébron et al., 2003). Quand le temps de séjour des eaux a été suffisamment long pour que les bactéries nitrifiantes développent une activité significative, au niveau de l'estuaire, l'ammonium est alors complètement nitrifié. Ces auteurs observent en effet un maximum d'activité nitrifiante qui entraîne une désoxygénation importante. Cette nitrification est accompagnée d'une émission de N_2O (en moyenne 2,4 mgN $j^{-1}m^{-2}$ sur le secteur Oissel-Caudebec) qui pourrait provoquer un déplacement de la pollution vers l'atmosphère (Garnier et al., 2005).

*L'estuaire***.** La zone estuarienne de la Seine s'étend sur 164 km depuis le barrage de Poses jusqu'à Honfleur, marquant le début de la Baie de Seine. L'hydraulique particulière du système est conditionnée par l'action combinée du débit du fleuve et de la marée. Les forts marnages rencontrés sur les côtes atlantiques françaises entraînent la formation de zones de forte concentration de particules dans le chenal, en interaction avec des zones de dépôts

latéraux, les vasières : l'ensemble constitue le bouchon vaseux. L'estuaire est caractérisé dans sa partie fluviale par une intense activité bactérienne, notamment la nitrification qui permet d'oxyder, en situation estivale, la quasi-totalité de l'ammonium entrant à Poses. Cette nitrification s'accompagne d'un déficit en oxygène en aval de Rouen, pouvant s'étendre sur 40 à 50 km (Brion et al. 2000 ; Garnier et al., 2001).

Le bassin de la Seine est donc sensible à l'eutrophisation, largement influencé par les rejets agricoles mais aussi urbains. Afin de protéger cet environnement, un projet de décret, en référence à l'article 6 du décret 94-469 du 3 juin 1994 et relatif à la délimitation des zones sensibles au niveau du bassin Seine-Normandie, a été proposé en avril 2005. La Figure 25 présente le futur projet de zonage du bassin de la Seine.

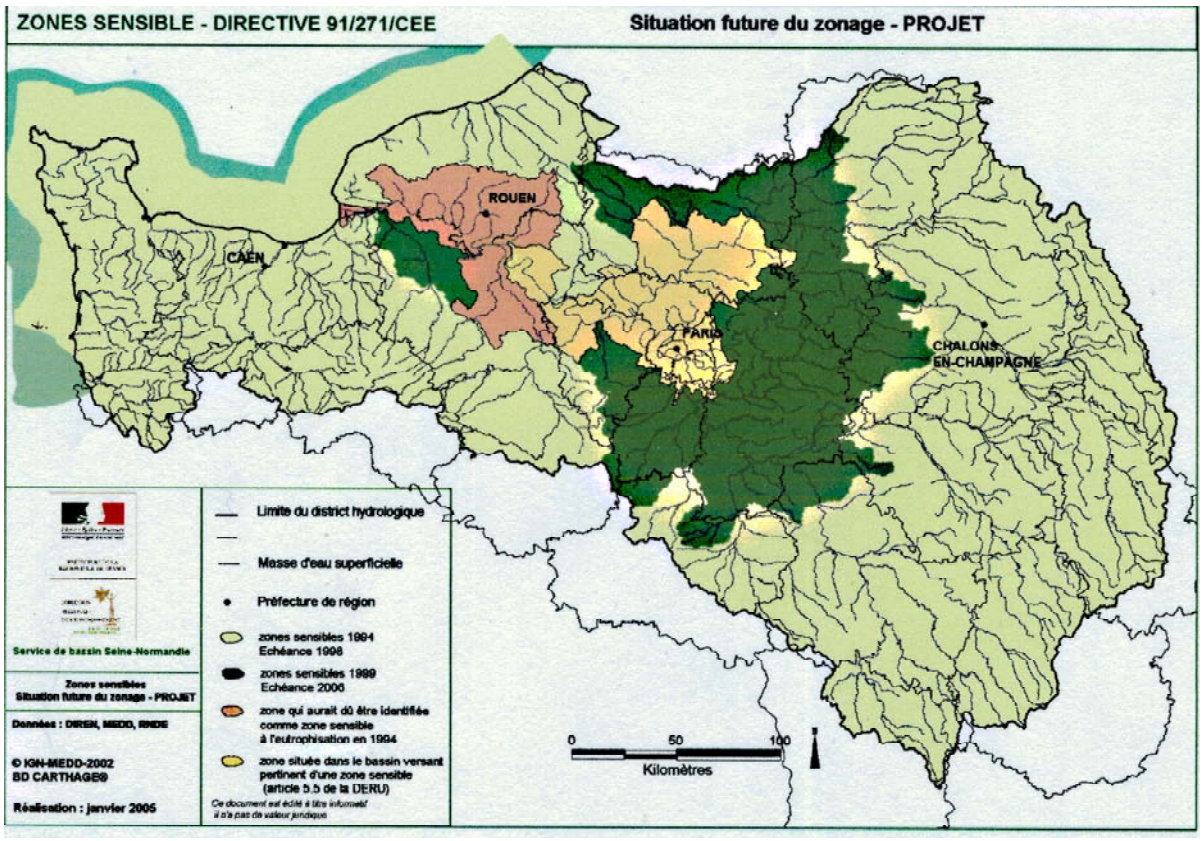


Figure 25. Futur projet de zonage du bassin de la Seine.
(Compte –rendu du Comité de bassin Seine-Normandie, mars 2005)

2.1.2 Les stations d'épuration de l'agglomération parisienne et la pollution azotée

Afin d'exploiter les ouvrages à caractère interdépartemental et de poursuivre l'exécution du programme général d'assainissement, la Ville de Paris et les départements de la Petite Couronne (Hauts-de-Seine, Seine-Saint-Denis, Val-de-Marne) se regroupèrent en 1970 au sein du Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP). Son rayon d'action s'étend au-delà de ce regroupement puisque le SIAAP reçoit également les eaux usées de 180 communes de la grande couronne (Figure 26). Depuis sa création, le syndicat exploite l'usine d'épuration 'Seine Aval' à Achères. Il a construit 'Marne Aval' à Noisy-le-Grand en 1976, 'Seine Amont' à Valenton en 1987, 'Seine Centre' à Colombes en 1998 et prévoit deux nouvelles stations, 'Les Grésillons' fin 2006 et 'La Morée' en 2015 (Figure 26).

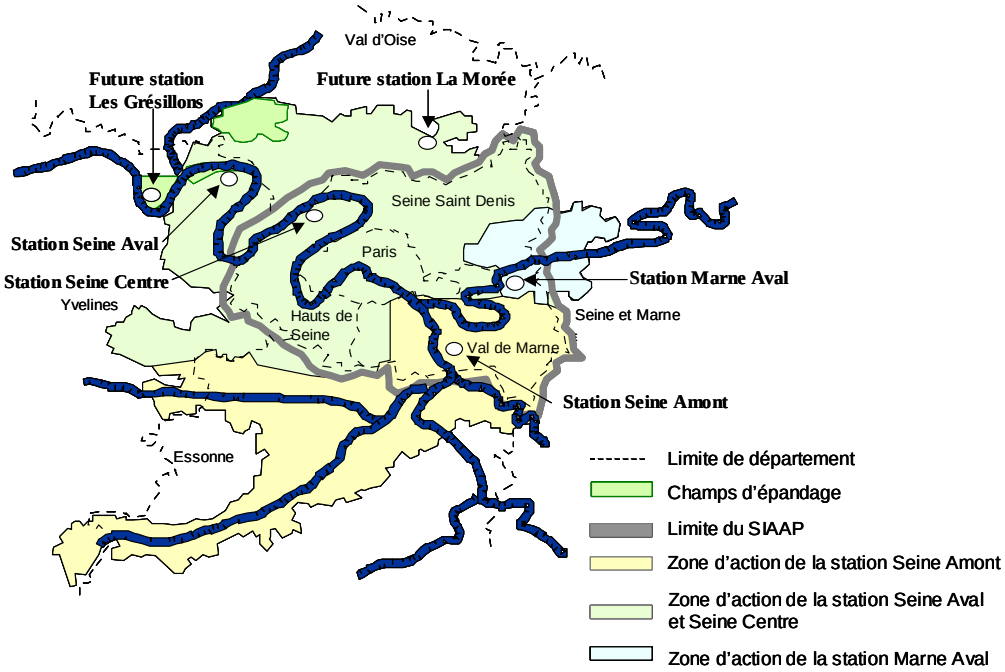


Figure 26. Zone d'action du SIAAP

Les quatre stations du SIAAP présentent des stratégies de traitement, des eaux usées et des boues, différentes. Certaines, comme 'Seine Centre' et 'Seine Aval' adaptent leurs filières de traitements des eaux lors des épisodes pluvieux.

2.1.2.1 La station 'Seine Aval'

La station 'Seine Aval' (à Achères, ouest de Paris) traite environ 20.8 10^5 m^3 j^{-1} en temps sec, soit les deux tiers des eaux usées de l'agglomération parisienne, 69 10^5 équivalent habitant (éq. Hab.), via un traitement secondaire sur boues activées.

Par temps sec, les eaux brutes sont prétraitées (stripping permettant d'éliminer les produits à fort pouvoir émissif, dégrillage, dessablage et déshuilage), puis subissent une décantation primaire suivie d'une épuration biologique secondaire où seule la pollution carbonée est éliminée (Annexe1, Figure Ia). Cette dernière s'effectue sur quatre tranches aux caractéristiques variables (Annexe1, Tableau I). Une partie des eaux traitées biologiquement

subit une déphosphatation basée sur un traitement physico-chimique ou 'clarifloculation' : après tamisage (6 tamis de 6 mm), les particules en suspension sont coagulées par un ajout de chlorure ferrique, l'addition de polymères et de micro-sable permet d'augmenter la taille des flocs ainsi formés et leur décantation sur les 6 décanteurs lamellaires de type Actiflo®.
Par temps de pluie, ce sont des eaux prétraitées qui arrivent au niveau de la clarifloculation où un traitement de la pollution carbonée et phosphorée est effectué (Annexe1, Figure Ib). Le débit de la station peut alors atteindre 45 m^3 / s.

Les boues provenant du traitement des eaux, environ 140 000 tonnes par an, sont épaissies, soit par flottation pour les boues biologiques, soit par centrifugation après conditionnement (floculation) pour les boues provenant de la clarifloculation. En temps de pluie, les excès de boues provenant de la clarifloculation sont stockés après chaulage en attendant d'être traités. Les boues épaissies rejoignent ensuite les boues de décantation primaire pour être digérées (15 jours à 35 °C), conditionnées thermiquement (45 min à 195 °C et 20 bars), puis déshydratées sur filtre presse (Annexe1, Figure Ic). Les boues sont ensuite majoritairement valorisées en agriculture comme produit d'amendement des sols, une partie moindre est incinérée ou encore mise en décharge.

La station 'Seine Aval' obtient de bons rendements pour les matières biodégradables ou non, et phosphorées (Annexe1, Tableau II), mais un meilleur rendement pour les matières azotées prend sa place dans les futurs projets du SIAAP.

Il existe également sur la station Seine Aval une station pilote, la station « 60 000 ». Cette station pilote traite une partie des eaux de la Station Seine Aval, 0.6 10^5 m^3 j^{-1}, à travers un prototype de type Biofor®, permettant le traitement tertiaire via la nitrification d'eaux traitées en aval par des bassins sur boues activées de type combiné (procédé permettant une phase d'aération où sont cultivées les bactéries aérobies qui dégradent les matières dissoutes, et une phase de décantation qui s'effectue dans le même réacteur). Les paramètres d'exploitation du Biofor® en nitrification sont présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9: Ordre de grandeur des différents paramètres appliqués surle Biofor® à la station pilote « 60 000 » pour le traitement de l'azote sur cultures fixées en temps sec.

Traitement	Paramètres		Ordre de grandeur	Unité
Nitrification Biofor®	Vitesse ascensionnelle	Eau Air	5 20	m/h
	Hauteur de matériau		3	m
	Fréquence des lavages		30min toutes les 24 h	
	Charge Volumique		0.7	Kg NTK/m^3 de matériau/j

2.1.2.2 La station 'Seine Centre'

La station 'Seine Centre' (à Colombes, ouest de Paris) d'une capacité de 2.4 10^5 m^3 j^{-1} (8 10^5 éq. Hab.), permet l'épuration des eaux allant jusqu'au traitement tertiaire par temps sec.

Le traitement de l'eau en temps sec s'effectue au débit de 2.8 m^3/s en trois étapes successives (Annexe 2, Figure IIa). L'eau brute subit d'abord un prétraitement, puis une décantation physico-chimique, avec ajout de chlorure ferrique et de polymère qui permettent

l'élimination des matières en suspension et des phosphates. Le traitement se poursuit par une épuration biologique sur biofiltre immergé (Biofor® et Biostyr®) qui s'étale sur les trois étages de la station. Celle-ci permet selon les configurations de l'usine, en fonction des conditions climatiques et du débit, l'abattement de la pollution carbonée et azotée (Annexe 2, Tableau III). De bas en haut, le premier étage consacré à l'élimination de la pollution carbonée est constitué de 24 filtres de type Biofor®. Au deuxième étage, 29 Biostyr ®, situés en tête de traitement de l'azote permettent la nitrification avec un rendement d'élimination des NTK de 90 % (Annexe 2, Tableau IV). Le troisième étage permet la dénitrification d'une partie des eaux, environ 1.9 10^5 m^3 j^{-1}, répartie sur 12 Biofor®. Le rendement est de 50 % en NGL. L'élimination de la pollution carbonée étant ici presque totale, il y a un ajout de méthanol.

Le Biostyr ® est garni, sur 3 mètres de hauteur, de billes de polystyrène expansé de 3,5 mm de diamètre. Son volume est de 333 m^3 (Figure 27a). Il dispose d'un plafond muni de crépines qui retient le matériau flottant, la densité du matériau étant plus légère que l'eau. C'est un système de filtration biologique avec des vitesses d'eau (5 m/h) et d'air (8 m/h) à co-courant ascendant.

Le matériau filtrant du Biofor® est constitué, sur 3 à 4 mètres de hauteur, d'argile expansée sphérique, appelée biolite®, et de 3 à 4 mm de granulométrie (Figure 27b). Ce matériau repose sur un plancher, muni de buselures qui permettent l'équipartition des fluides, à travers lequel est introduite l'eau à traiter. Le courant d'eau de 12 m/h est ascendant.

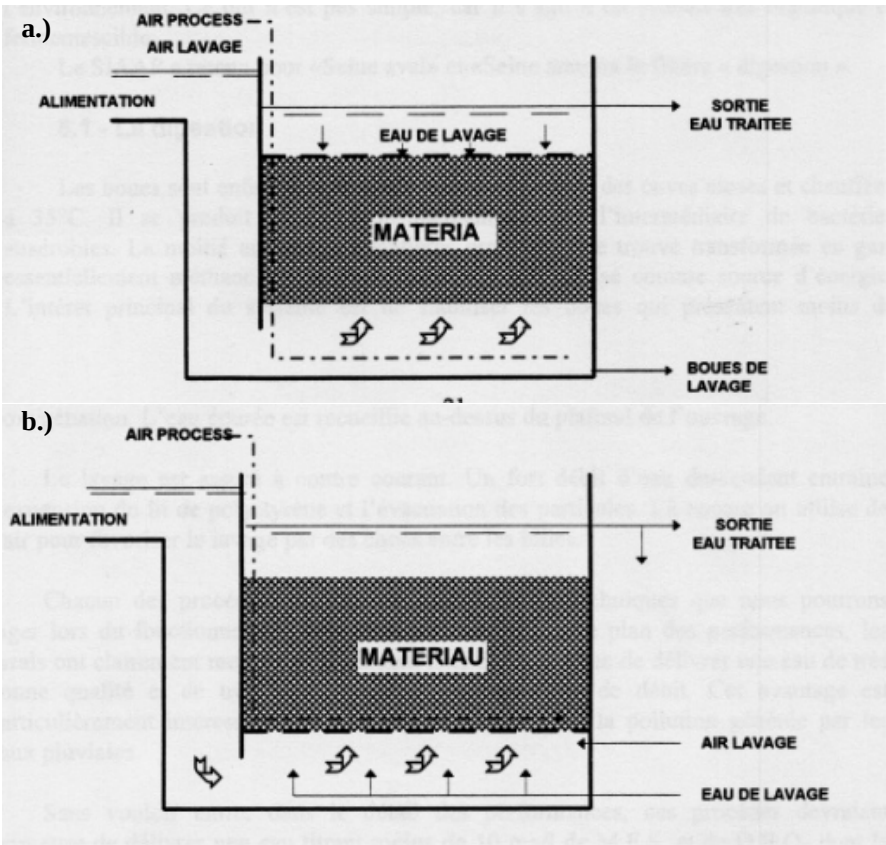


Figure 27. Lit bactérien immergé – a. procédé Biostyr ®, b. procédé Biofor ®

Le lavage périodique est assuré par un co-courant de forts débits d'eau et d'air, à des séquences appropriées, durant 30 à 40 minutes toutes les 24 heures environ. Les vitesses ascensionnelles sont alors de l'ordre de 30 m/h pour l'eau et 80 m/h pour l'air. Le lavage du Biostyr® se fait à courant descendant et celui du Biofor® à courant ascendant. Il élimine en moyenne 4 kg m^{-3} de MES, contre 5 à 6 kg m^{-3} de MES retenues par le filtre au cours d'un cycle de fonctionnement.

Les paramètres d'exploitation pour le Biostyr® en nitrification et le Biofor® en dénitrification sont présentés dans le Tableau 10.

Tableau 10: Ordre de grandeur des différents paramètres appliqués sur la station Seine Centre pour le traitement de l'azote sur cultures fixées en temps sec.

Traitement	Paramètres		Ordre de grandeur	Unité
Nitrification Biostyr®	Vitesse ascensionnelle	Eau Air	5 8	m/h
	Hauteur de matériau		3	m
	Fréquence des lavages		30min toutes les 24 h	
	Charge Volumique		0.7	Kg NTK/m^3 de matériau/j
Dénitrification Biofor®	Vitesse ascensionnelle	Eau Air	12 0	m/h
	Hauteur de matériau		3	m
	Fréquence des lavages		30min toutes les 24 h	
	Charge Volumique		2.2	Kg N-NO_3/m^3 de matériau/j

Par temps de pluie, la station peut atteindre un débit de pointe de 8 m^3/s (soit 6.9 10^5 m^3 j^{-1}) avec un traitement en deux étapes seulement (Biofor® et Biostyr® en parallèle) (Annexe2, Figure IIb). En temps de pluie, il n'y a pas de nitrification, ni de dénitrification. A titre d'exemple, cela a représenté une centaine de jours en 2003, arrêt annuel de la station compris (30 jours environ).

Les boues provenant du traitement des eaux sont centrifugées, puis incinérées avec un traitement physico-chimique des fumées (Annexe 2, Figure IIc).

2.1.2.3 La station 'Seine Amont'

La station 'Seine Amont' (Valenton, est de Paris) traitera fin 2005, 6 10^5 m^3 j^{-1} (20 10^5 éq. Hab.) via un traitement biologique secondaire sur boues activées, opérant sur deux filières différentes de 3 10^5 m^3 j^{-1}chacune, Valenton I et Valenton II. Le traitement secondaire de cette station permet l'élimination de la pollution carbonée et azotée. La pollution carbonée est éliminée en même temps que les nitrates via les bactéries hétérotrophes en conditions anoxiques, et la pollution ammoniaquée est éliminée dans un deuxième temps en conditions aérobies via les bactéries autotrophes.

A Valenton I, les eaux brutes subissent un pré-traitement, une décantation primaire, et un traitement biologique secondaire (en anoxie d'abord, puis aérobie) qui permet l'élimination de la pollution carbonée et azotée (Annexe 3, Figure IIIa). L'épuration biologique s'effectue sur deux tranches d'une capacité chacune de 1.5 10^5 m^3 j^{-1}. L'eau décantée est introduite en tête des réacteurs biologiques cylindriques, dans la partie centrale anoxique, et chemine jusqu'à la zone aérobie externe (Figure 28a). Seul le retour des boues activées extraites du clarificateur apporte la charge de nitrate au niveau de la zone anoxie. Les rendements épuratoires de Valenton I sont présentés dans l'Annexe 3, Tableau V.

A Valenton II, l'eau décantée est introduite en tête du bassin biologique caractérisé par : une zone endogène et anaérobie pour l'élimination du phosphate, suivi d'une zone anoxie pour l'élimination du nitrate, puis d'une zone aérobie pour l'élimination de l'ammonium (Figure 28b). La recirculation de la liqueur mixte, provenant de la fin de la zone aérobie, apporte le nitrate au niveau de la zone anoxie. Valenton II a ainsi un rendement épuratoire pour le nitrate plus important que Valenton I, soit 70 % contre 50 % respectivement.

Pour les deux systèmes, Valenton I et Valenton II, le carbone organique nécessaire aux bactéries hétérotrophes au niveau des bassins en anoxie est apporté par l'eau décantée.

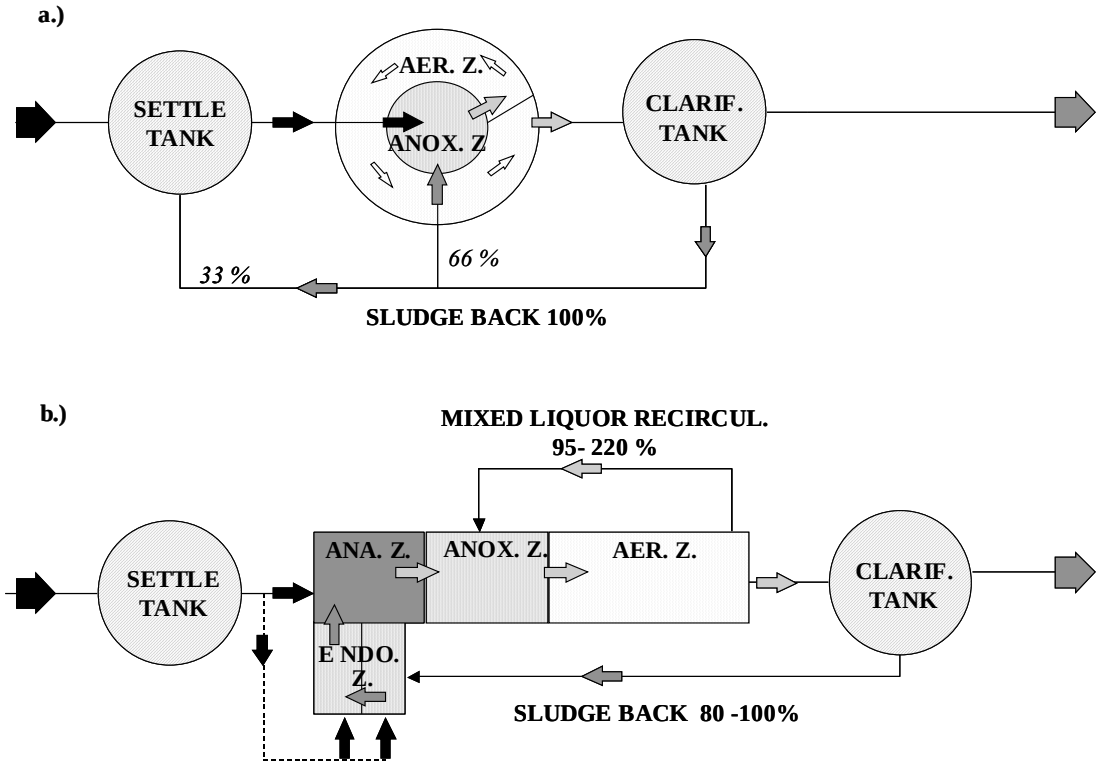


Figure 28. Traitement biologique sur la station d'épuration de Valenton: (a) Valenton I et (b) Valenton II. Les étapes de traitement et la circulation de la boue et de l'eau (en pourcentage) sont indiquées. ENDO Z. : zone endogène, ANA. Z. : zone anaérobie, ANOX. Z. : zone anoxie, AER. Z.: zone aérobie, CLARIF. TANK : clarificateur. L'alimentation en eau brute des bassins est indiquée par des flèches noires.

Les paramètres relatifs à l'élimination de la pollution azotée sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11: Ordre de grandeur des différents paramètres appliqués pour le traitement des eaux usées en temps sec sur boues activées avec bassin d'anoxie en tête à la station Seine Amont.

Traitement	Paramètres	Ordre de grandeur	Unité
Nitrification	Cm	Faible (0.1 – 0.15)	Kg DBO_5/kg MVS/j
	Tc	5	Heure
	[MES]	2	g/L
	Age des boues	Elevé (10- 20)	jours
	O_2	4.3	Kg O_2/ kg N-NO_3
Dénitrification	Cm	Elevée (0.22 – 0.35)	Kg DBO_5/kg MVS/j
	Tc	1 à 2	Heure
	[MES]	4	g/L
	Age des boues	Faible (2)	jours
	O_2	0	Kg O_2/ kg N-NO_3

Le traitement des boues comporte trois étapes successives. Les boues de l'épuration biologique sont préalablement épaissies par centrifugation avant d'entrer en digestion avec les boues provenant de la décantation primaire. Puis elles sont déshydratées par filtre-presse après avoir subi un conditionnement chimique (ajout de polymère et de chlorure ferrique). Le produit séché part ensuite en valorisation agricole ou est incinéré sur place (Annexe 3, Figure IIIb).

2.1.2.4 La station 'Marne Aval'

La station 'Marne Aval' (Noisy-Le-Grand, est de Paris) a une capacité nominale de 0.3 10^5 m^3 j^{-1} (1 10^5 éq. Hab.).

L'eau brute subit un pré-traitement, puis une décantation primaire (Annexe 4, Figure IVa). Une partie des eaux décantées passe ensuite dans un ouvrage d'activation biologique d'une capacité de 2 970 m^3, composé de trois canaux. Le premier de ces canaux offre un contact boues-oxygène optimal, ce qui permet une réactivation-stabilisation des boues provenant du décanteur secondaire. L'aération par fines bulles se fait grâce à des disques poreux. Les eaux ainsi épurées rejoignent la deuxième partie des eaux décantées primaires, et passent en traitement tertiaire sur deux bio-filtres à ruissellement ou Sessil®, qui permettent la nitrification (Figure 29). L'eau est ruisselée sur des lanières en plastique. L'intérêt de ce procédé est d'éviter une aération artificielle. 70 % des NTK sont ainsi éliminés. Les eaux épurées subissent ensuite un traitement physico-chimique (ajout de polymère et de chlorure ferrique) qui permet la déphosphatation et sont dirigées vers un décanteur lamellaire. Les rendements épuratoires de la station Marne Aval sont présentés dans l'Annexe 4, Tableau VI.

Le traitement des boues comporte trois étapes. Les boues sont d'abord épaissies puis centrifugées et incinérées dans un four à soles rotatives (Annexe 4, Figure IVb).

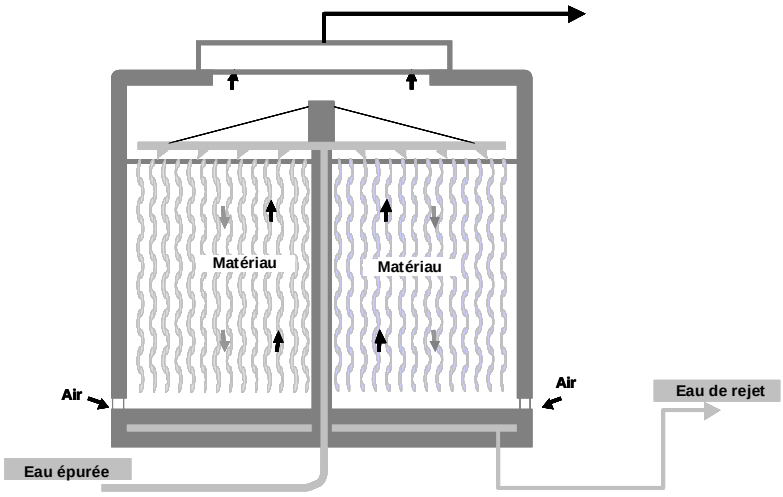


Figure 29. Lit bactérien à ruissellement ou Sessil® . Les flèches noires indiquent la circulation de l'air et les flèches grises le cheminement de l'eau traitée.

Les stations d'épuration de l'agglomération parisienne, gérées par le SIAAP, sont donc toutes différentes, tant au niveau des procédés utilisés et des débits traités, que des rendements d'épuration, notamment par rapport à la pollution azotée. Les stations de l'agglomération parisienne traitent donc l'azote, au travers d'un traitement secondaire sur boues activées au niveau de Seine Amont, et en traitement tertiaire sur cultures fixées au niveau de Seine Centre et de Marne Aval. Seine Aval, la station la plus importante d'Europe, n'élimine pas actuellement la pollution azotée. Mais par soucis de modernisation et suite à la directive européenne 91 / 271, elle va être soulagée à la fin 2005, de 3 10^5 m^3 de son débit journalier au profit de la station Seine Amont (Valenton II), qui elle traite l'azote. A la nouvelle station des Grésillons, dont la mise en route est prévue fin 2006, 1 10^5 m^3 j^{-1} y seront également traités; le débit y atteindra 3 10^5 m^3 j^{-1} en 2015. Enfin, Seine Aval traitera en 2007, 100 % de l'ammonium en nitrification et 30 % en dénitrification, pour passer à 100 % en 2015. A l'horizon 2005-2008, le débit de la station Marne Aval sera augmenté de 0.5 10^5 m^3 j^{-1}. La construction d'une nouvelle usine, 'La Morée', prévue en 2012–2015, permettra de traiter 0.5 10^5 m^3 j^{-1}. Aux nouvelles stations des Grésillons et de la Morée, ainsi qu'à la station Seine Aval, les futurs traitements de l'azote se feront sur cultures fixées à l'aide de biofiltres.

2.2 Méthodologie générale

2.2.1 Prélèvements

L'objectif principal de ce travail étant d'estimer les émissions de N_2O provenant du traitement de l'azote sur les quatre stations de l'agglomération parisienne, chacune de ces stations utilisant des stratégies différentes de traitement, nous avons choisi d'étudier et d'effectuer nos prélèvements sur les deux systèmes biologiques rencontrés, i) celui des boues activées en traitement secondaire (station Seine Amont) et ii) celui des cultures fixées en traitement tertiaire (biofiltres immergés à Seine Centre et à la station pilote « 60 000 » de Seine Aval). Ces deux grands types d'échantillons de bactéries libres ou fixées sur support, seront ensuite replacés en conditions de laboratoire dans un pilote, et alimentés par des eaux identiques à celles qui les alimentent *in situ* ou ayant les mêmes caractéristiques.

2.2.1.1 Les boues activées

Les émissions de N_2O, provenant du traitement de l'azote sur boues activées, ont été étudiées à partir d'échantillons provenant de la station d'épuration Seine Amont (Valenton), tant pour la nitrification que pour la dénitrification. Cette station, déjà décrite dans le chapitre 2.1 précédent, traite 0.6 10^6 m^3 j^{-1} d'eaux usées par un traitement secondaire sur boues activées, opérant sur deux systèmes différents de 0.3 10^6 m^3 j^{-1} chacun, Valenton I et Valenton II.

Nitrification: Au début de ce travail, comme seule Valenton I était en fonctionnement, les boues activées, sur lesquelles nous avons d'abord étudié le N_2O émis à partir de la nitrification, étaient issues d'un des bassins d'aération de Valenton I (Figure 30). La Figure 31 montre les variations des éléments azotés tout au long du continuum du bassin étudié.

La circulation de la liqueur mixte sur les bassins de Valenton I étant continue (flux piston), la boue et l'eau passent d'une zone anoxie à une zone aérée sans qu'il y ait de séparation eau-boue entre les deux zones. Nous avons donc prélevé des eaux clarifiées provenant d'une autre station de l'agglomération parisienne, celle de Seine Aval qui ne possède pas de traitement de l'azote, afin d'alimenter le pilote de laboratoire : ces eaux contiennent typiquement 31 mg MES L^{-1}, 22 mg L^{-1} de matière organique, 52 mg L^{-1} d'azote Kjeldahl (N-NTK), 36 mg L^{-1} de $N\text{-}NH_4^+$, 0 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_2^-$, 0 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_3^-$, 108 mgO_2 L^{-1} de Demande Chimique en Oxygène (DCO), 22 mgO_2 L^{-1} de Demande Biochimique en Oxygène (DBO_5), 378 mg L^{-1} de $CaCO_3$ et un pH de 7.8.

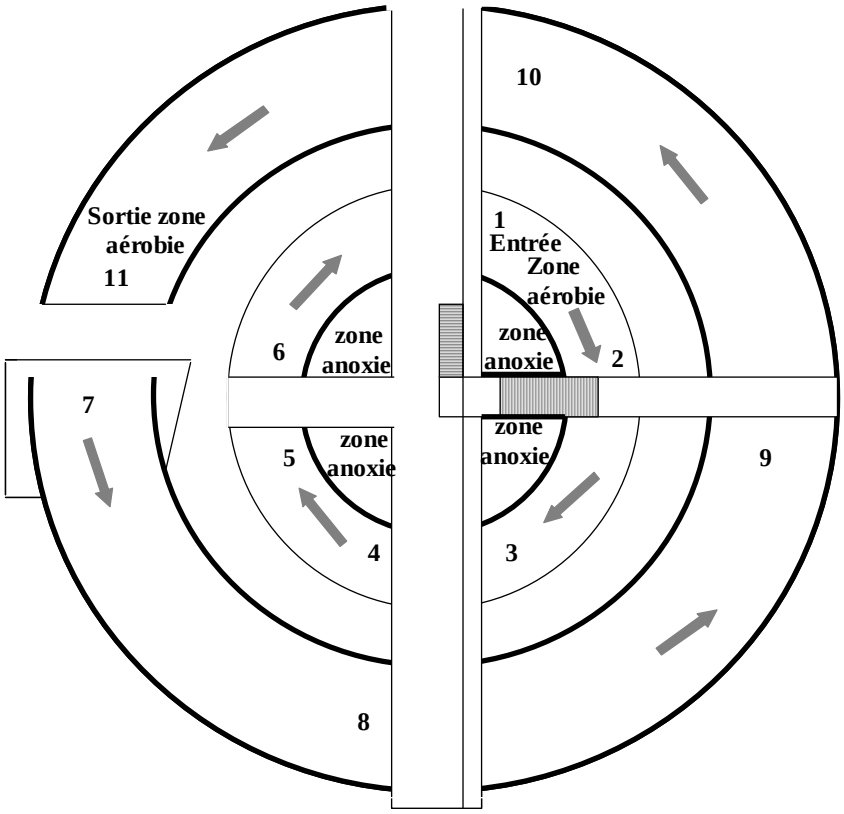


Figure 30. Schéma de l'aérateur 3 à Valenton I (station Seine Amont) dans lequel les échantillons de boues activées ont été prélevés. L'eau arrive dans la zone anoxie et passe ensuite dans la zone aérobie. Les points de prélèvement pour le suivi des éléments azotés sont les points de 1 à 11 (cf. figure ci-dessous). Ils suivent le cheminement de l'eau, indiqué par les flèches

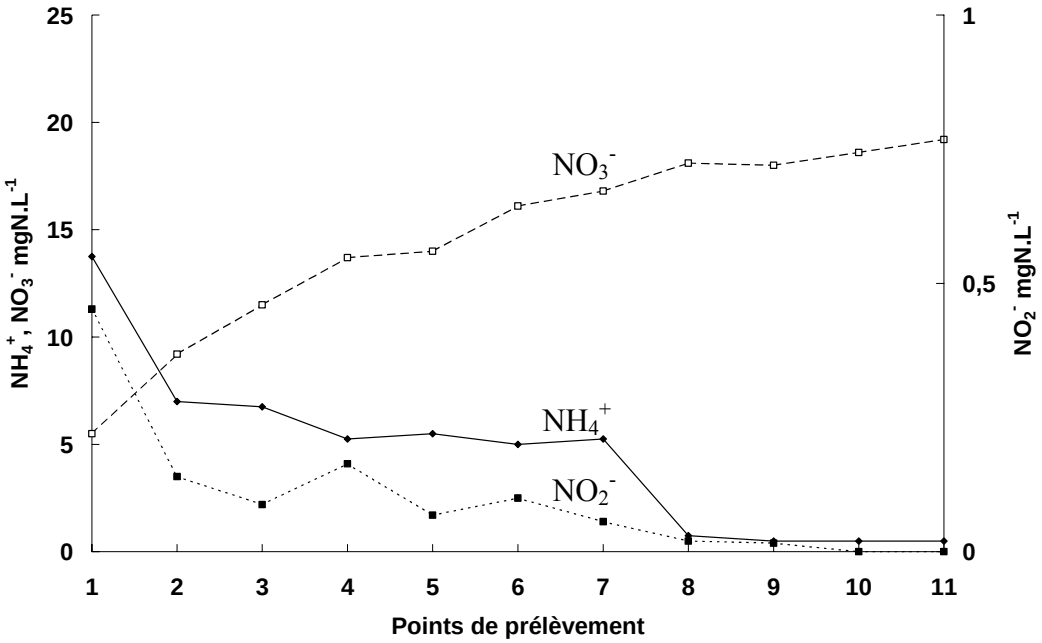


Figure 31. Variations des différents éléments azotés dans le continuum du bassin d'aération 3 de Valenton I (station Seine Amont) (♦: NH_4+; ■ NO_2-; □: NO_3-).
Données ponctuelles pour le 19/12/02.

Dénitrification: Pour l'étude des émissions de N_2O issues de la dénitrification, nous avons prélevé des boues activées provenant de la zone anoxique d'un des bassins de Valenton II (Figure 32). En effet, seule Valenton II possède des bassins non aérés accessibles aux prélèvements. La Figure 33 montre les variations des éléments azotés tout au long du continuum du bassin étudié, pour la zone aérée et la zone anoxique.

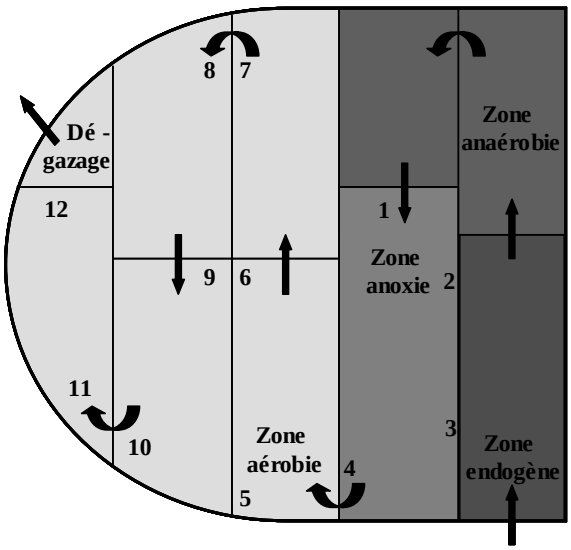


Figure 32. Schéma d'un réacteur biologique étudié à Valenton II (station Seine Amont). L'eau arrive dans la zone endogène puis anaérobie, et passe ensuite dans les zones anoxie et aérobie. Les points de prélèvement pour l'analyse des éléments azotés sont notés de 1 à 12. Ils suivent le cheminement de l'eau, indiqué par les flèches.

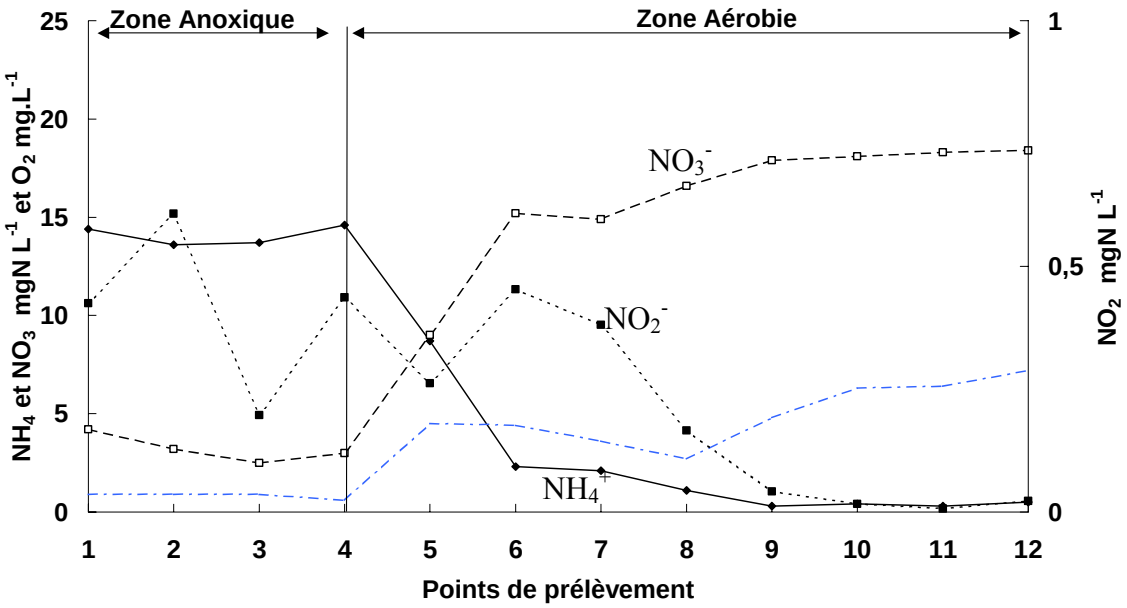


Figure 33. Variations des différents éléments azotés (♦: NH_4+; ■ NO_2-; □: NO_3-) et de l'oxygène (- · -) dans le continuum du bassin étudié de Valenton II (station Seine Amont), pour la zone en anoxie et la zone aérée. Données ponctuelles du 18/01/05.

Pour l'alimentation de notre pilote de laboratoire, nous avons prélevé de l'eau décantée primaire qui alimente les bassins anaérobies sur Valenton II. Typiquement, cette eau contient 89 mg L^{-1} de MES, 63 mg L^{-1} de matière organique, 58 mg L^{-1} de N-NTK, 48 mg L^{-1} de $N\text{-}NH_4^+$, 0 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_2^-$, 0 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_3^-$, 130 mg O_2 L^{-1} de Demande Biochimique en Oxygène (DBO_5), 305 mg O_2 L^{-1} de Demande Chimique en Oxygène (DCO), 460 mg L^{-1} de $CaCO_3$ et un pH de 7.8.

2.2.1.2 Les cultures fixées

Afin d'étudier les émissions de N_2O provenant du traitement de l'azote sur cultures fixées, nous avons prélevé des échantillons provenant de la station Seine Centre et de la station pilote « 60 000 » de Seine Aval, qui utilisent des biofiltres immergés pour le traitement de l'azote (cf. chapitre 2.1). Ces biofiltres sont des supports favorisant la fixation des bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes.

Nitrification : A la station Seine Centre, la nitrification, en tête de traitement de l'azote, s'effectue sur des Biostyr ® garnis de billes de polystyrène, support des bactéries nitrifiantes. Le Biostyr ® étant recouvert d'un plafond muni de crépines qui retient le matériau flottant, il est difficile d'y effectuer un prélèvement. Nous avons donc prélevé des cultures fixées nitrifiantes sur le pilote « 60 000 » de Seine Aval, qui dispose d'un Biofor®, utilisé en nitrification et constitué sur 3 à 4 mètres de hauteur de biolite®. Le pilote de laboratoire a été alimenté, outre les bactéries prélevées sur le support de biolite du Biofor®, avec de l'eau clarifiée, celle qui alimente normalement le Biofor® de la station pilote « 60 000 ». Cette eau contient typiquement, 48 mg MES L^{-1}, 32 mg L^{-1} de matière organique, 70 mg L^{-1} de N-NTK, 30 mg L^{-1} de $N\text{-}NH_4^+$, 0 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_2^-$, 0 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_3^-$, 187 mg O_2 L^{-1} de Demande Chimique en Oxygène (DCO), 304 mg L^{-1} de $CaCO_3$ et un pH de 7.5.

Dénitrification: Pour l'étude des émissions de N_2O durant la dénitrification sur cultures fixées, nous avons prélevé de la biolite®, provenant des Biofor® de la station Seine Centre, utilisés pour la dénitrification en fin de traitement de l'azote. Le pilote de laboratoire a été alimenté, outre les bactéries prélevées sur le support de biolite du Biofor®, avec de l'eau nitrifiée, celle qui alimente normalement les Biofor® de Seine Centre. Cette eau nitrifiée a été prélevée avant l'ajout de méthanol, utilisé à Seine Centre comme source de carbone pour le métabolisme des bactéries hétérotrophes dénitrifiantes. Cette eau contient typiquement, 4.8 mg MES L^{-1}, 1.9 mg L^{-1} de N-NTK, 1 mg L^{-1} de $N\text{-}NH_4^+$, 0.1 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_2^-$, 21 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_3^-$, 25.9 mg O_2 L^{-1} de Demande Chimique en Oxygène (DCO), 2.8 mg O_2 L^{-1} de Demande Biochimique en Oxygène (DBO_5), 165.9 mg L^{-1} de $CaCO_3$ et un pH de 7.07.

2.2.2 Matériels et méthodes

Nous avons effectué en laboratoire des expériences simulant le traitement de l'azote via la nitrification et la dénitrification en station d'épuration sur des procédés en cultures libres et fixées, afin d'étudier en conditions contrôlées le processus de nitrification et de dénitrification et de déterminer les conditions favorables et les paramètres de contrôle de la production de N_2O. Cette partie, entièrement décrite mais séparée dans les trois différents articles qui suivent ce chapitre, constitue ici un récapitulatif des types d'échantillons considérés, des processus étudiés et des facteurs de contrôle explorés.

Nous avons donc:

i.) recréé en conditions contrôlées la nitrification et la dénitrification sur boues activées secondaires (Seine Amont) et cultures fixées (Seine Centre) en traitement tertiaire. Pour cela, nous avons élaboré et optimisé des pilotes de laboratoire simulant les conditions rencontrées aux stations d'épuration lors du traitement de l'azote et permettant de mesurer le N_2O gazeux émis lors de ces traitements.

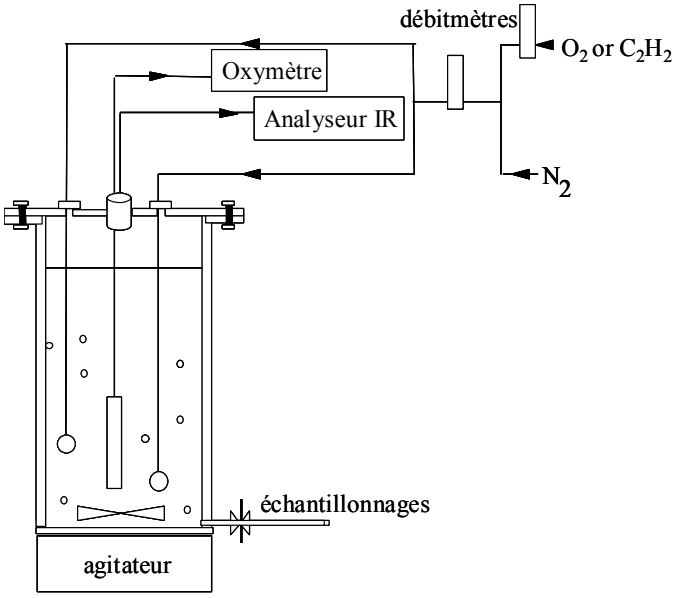
ii.) étudié les différents facteurs influençant les émissions de N_2O tels que l'oxygénation, la concentration en nitrite, ou différentes concentrations en méthanol. Pour mener à bien ce travail nous avons fait varier les différents paramètres relatifs à l'exploitation ou à des conditions pouvant être rencontrées lors du traitement.

iii.) étudié les différents processus responsables des émissions de N_2O et leur part dans les émissions de N_2O, en utilisant des inhibiteurs spécifiques des processus mis en jeu ou de certaines étapes de ces processus.

iv.) estimé les émissions de N_2O lors de ces traitements, actuels ou futurs, pour les stations d'épuration de l'agglomération parisienne, à partir des résultats des expériences mentionnées ci-dessus.

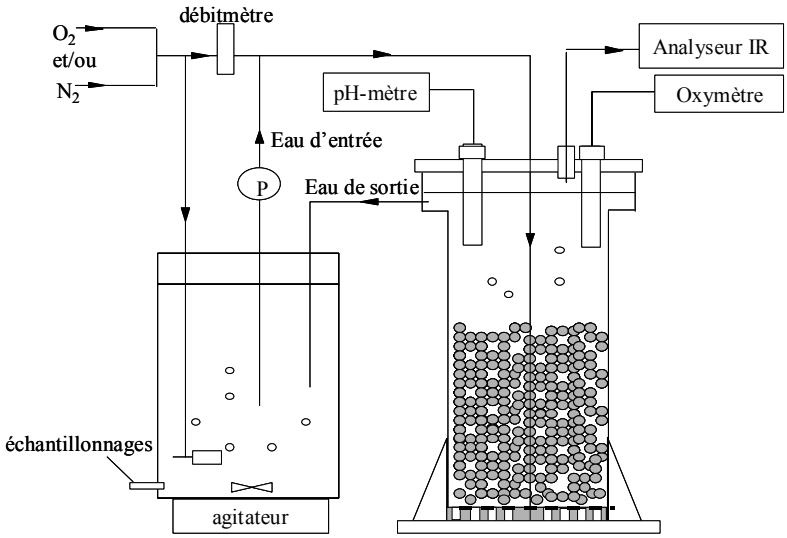
2.2.2.1 Simulations expérimentales: contrôle des conditions relatives à la nitrification et la dénitrification en stations d'épuration et mesure des émissions de N_2O

Afin de recréer en conditions contrôlées le traitement de l'azote, un premier réacteur a permis la simulation de la nitrification et de la dénitrification sur boues activées secondaires, telles que réalisées sur Seine Amont (Figure 34), un deuxième pilote était destiné à recréer le fonctionnement des biofiltres immergés à courant ascendant, de type Biofor®, rencontrés à Seine Centre pour la dénitrification, et généralisés à Seine Aval pour la nitrification dans un futur proche (Figure 35).



Caractéristiques	
Hauteur	0.39 m
Diamètre	0.1 m
Surface	7.9 10^{-3} m²
Volume	3.1 10^{-3} m^3
Matériau	P.V.C. transparent
Forme géométrique	Colonne cylindrique
Volume de boue	0.9 L
Volume eau alimentation	1.4 L
Volume liqueur mixte	2.3 L

Figure 34. Description du pilote de laboratoire pour les essais sur boues activées et liste de ses caractéristiques. La liqueur mixte (eau + boues) est mélangée de manière continue. La circulation des gaz est contrôlée et le pilote est fermé hermétiquement afin de récupérer et de mesurer les émissions de N_2O.



Caractéristiques	
Hauteur	0.66 m
Diamètre	0.115 m
Surface	0.113 m²
Volume	0. 075 m^3
Matériau	P.V.C. transparent
Forme géométrique	Colonne cylindrique
Hauteur de Biolite®	0.46 m
Volume d'eau dans pilote	6 L
Volume d'eau dans réserve	2 L
Volume d'eau total circulant	8 L

Figure 35. Description du pilote de laboratoire de type Biofor® et liste de ses caractéristiques. Le matériau utilisé pour les cultures fixées est de type biolite®. La circulation ascendante des fluides - eau et gaz - est contrôlée et le pilote et la réserve sont fermés hermétiquement afin de récupérer et de mesurer les émissions de N_2O. Un plancher perforé permet l'équipartition des fluides.

Pour chaque essai de nitrification ou de dénitrification, les boues ou les cultures fixées sont mises dans des conditions aussi semblables que possibles à celles rencontrées dans les stations d'épuration de l'agglomération parisienne.

Boues activées : Le Tableau 12 présente les différentes caractéristiques de fonctionnement appliquées au pilote de laboratoire sur boues activées pour la nitrification et la dénitrification.

*Tableau 12. Caractéristiques de fonctionnement du pilote en boues activées secondaires pour la nitrification et la dénitrification. * concentration finale en azote ajoutée à l'eau d'alimentation, les autres concentrations en azote proviennent directement de l'eau d'alimentation.*

Traitement	Paramètres	Ordre de grandeur	Unité
Nitrification	$[NH_4^+]$	30	mgN L^{-1}
	$[NO_3^-]$	Trace	mgN L^{-1}
	$[NO_2^-]$	Trace	mgN L^{-1}
	Temps de contact	5	Heure
	[MES]	0.9 ± 7 %	g L^{-1}
	O_2	0.1 à 6.2	mgO_2 L^{-1}
Dénitrification	*$[NO_3^-]$	15	mgN L^{-1}
	*$[NO_2^-]$	5	mgN L^{-1}
	Charge en NH_4^+	48	mgN L^{-1}
	Temps de contact	1 à 2	Heure
	[MES]	0.9 ± 12 %	g L^{-1}
	O_2	0.0 à 2.2	mgO_2 L^{-1}

On injecte à l'intérieur du pilote un mélange gazeux (N_2 et d'O_2) pour obtenir les conditions d'oxygénation différentes et contrôlées (0.0 à 2.2 mgO_2 L^{-1} pour la dénitrification et de 0.1 à 6.2 mgO_2 L^{-1} pour la nitrification). L'azote gazeux (N_2), inerte, et donc sans effet sur les mesures de N_2O ou les processus biologiques, nous permet de garder un débit de gaz constant pour des valeurs d'oxygénation variables. Le débit du mélange gazeux de 0.156 L min^{-1} (9.36 L h^{-1}) a été choisi arbitrairement, les débits d'air sur la station étant variables. L'objectif est de ne pas casser les flocs à l'intérieur du pilote, tout en permettant la suspension de la liqueur mixte.

Le débit de gaz est identique pour la nitrification et la dénitrification. Le pilote étant fermé hermétiquement et l'analyseur IR mesurant des concentrations de N_2O à partir d'un flux gazeux, nous avons dû introduire, lors de la dénitrification dans le pilote, un flux gazeux permettant l'échantillonnage gazeux. Le débit introduit, et qui normalement n'existe pas en dénitrification, a été choisi identique à celui appliqué en nitrification, ce qui permet également de comparer nos résultats d'émissions de N_2O entre le processus de nitrification et de dénitrification.

Lors de la dénitrification, l'eau utilisée pour l'alimentation du pilote est de l'eau décantée primaire prélevée sur Valenton II (Seine Amont). Cette eau ne contient pas de nitrate et de nitrite, les apports ayant pour origine la recirculation des boues sur cette station. Pour les batchs destinés à étudier la dénitrification des boues activées, une solution de nitrate et de nitrite aux concentrations finales de 15 et 5 mgN L^{-1} respectivement ont été ajoutées. Ces concentrations conduisent à une activité dénitrifiante optimale.

Cultures fixées: Le Tableau 13 présente les caractéristiques de fonctionnement appliquées aux cultures fixées en nitrification et dénitrification.

Tableau 13. Caractéristiques de fonctionnement du pilote en cultures fixées pour la nitrification et la dénitrification.

Traitement	Paramètres		Ordre de grandeur	Unité
Nitrification	Vitesses ascensionnelles	Eau	5	m. h^{-1}
		Air	20	
	$[NH_4^+]$		30	mgN. L^{-1}
	$[NO_3^-]$		trace	mgN. L^{-1}
	$[NO_2^-]$		trace	mgN. L^{-1}
	O_2		0.1 à 9.2	mgO_2. L^{-1}
	Temps de contact		40 à 160	min.
Dénitrification	Vitesses ascensionnelles	Eau	12	m. h^{-1}
		Air	20	
	$[NO_3^-]$		18	mgN. L^{-1}
	$[NO_2^-]$		trace	mgN. L^{-1}
	$[NH_4^+]$		trace	mgN. L^{-1}
	O_2		0.0	mgO_2. L^{-1}
	Charge en méthanol		22.5 à 75	mg CH_3OH L^{-1}
	Temps de contact		20 à 100	min.

Lors de la nitrification, les vitesses ascensionnelles pour l'eau et l'air, sont les mêmes que celles rencontrées sur le Biofor® de la station pilote « 60 000 » (Seine Aval).

Pour la dénitrification, nous avons choisi la vitesse ascensionnelle de l'eau appliquée sur les Biofor® de la station Seine Centre. Pour les mêmes raisons que précédemment, lors de nos essais sur boues activées, nous avons du introduire dans le pilote, lors de la dénitrification, un flux de N_2 permettant l'échantillonnage gazeux et qui reste identique à celui appliqué en nitrification.

Tout comme les essais sur les boues activées, on injecte à l'intérieur du pilote un mélange gazeux (N_2 et d'O_2) pour obtenir des conditions d'oxygénation différentes et contrôlées à débit constant (0.0 mgO_2 L^{-1} pour la dénitrification et de 0.1 à 9.2 mgO_2 L^{-1} pour la nitrification).

Toutes les expériences sont menées sur trois jours consécutifs (j, j+1, j+2) après échantillonnage de l'eau d'alimentation et des bactéries sur support ou sur boues activées au jour j; un à plusieurs batchs par jour ont été réalisés (suivant les temps de contact), par exemple, trois oxygénations différentes pour la nitrification (Figure 36) ou trois concentrations de méthanol différentes pour la dénitrification. Les essais sont intervertis d'une semaine sur l'autre afin d'éliminer les biais qu'ils pourraient y avoir entre les essais (Figure 36). Un batch représente une expérience de mise en contact bactéries et eau à épurer sur un temps de traitement donné (cf. temps de contact, Tableau 12 et Tableau 13). Les systèmes de batch nous permettent de prendre en compte la variabilité *in situ* de la station d'une semaine sur l'autre.

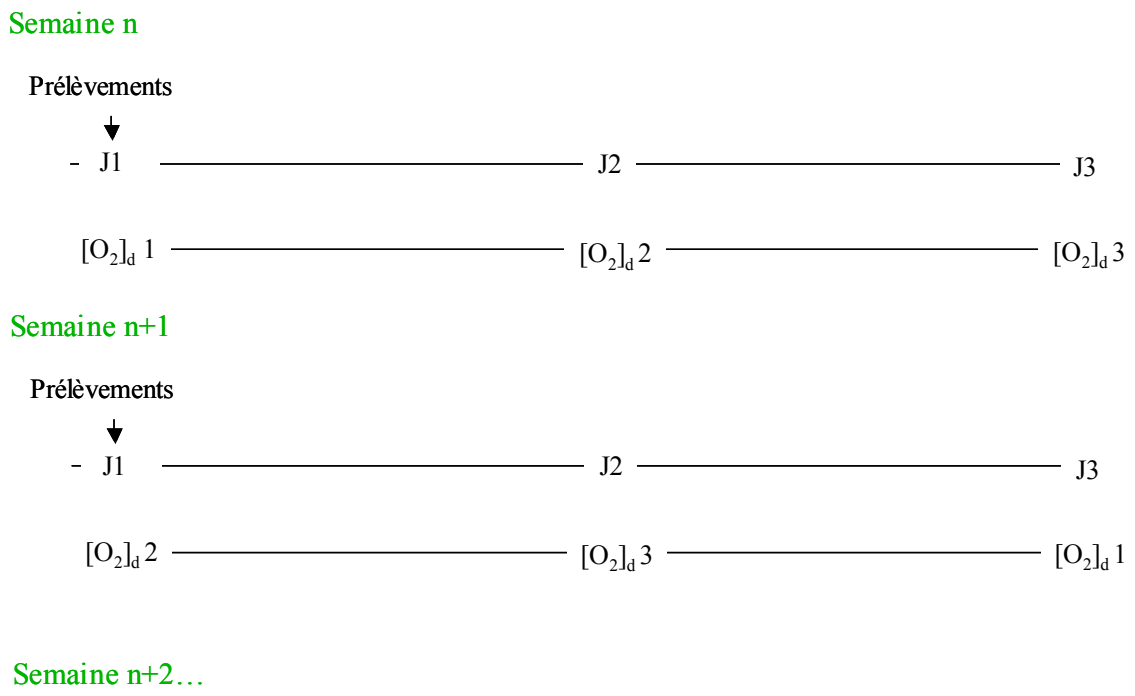


Figure 36. Protocol expérimental des essais réalisés sur les émissions d'oxyde nitreux lors du traitement de l'azote en station d'épuration. A la semaine n, des échantillons d'eau et de bactéries sur support ou non, alimentant les pilotes, sont prélevés au jour J1. Lors de la nitrification par exemple, un premier essai est effectué avec une concentration en oxygène dissous 1 ($[O_2]_d1$) au jour J1, un deuxième essai avec une concentration en oxygène dissous 2 ($[O_2]_d2$) au jour J2 et un troisieme essai avec une concentration en oxygène dissous 3 ($[O_2]_d3$)au jour J3. Des essais sont réalisés de la même façon la semaine suivante avec de nouveau un prélèvement au jour J1 mais en intervertissant les essais.

Pour toutes les expériences-batch menées sur les trois jours consécutifs, le réacteur-batch est alimenté à chaque expérience-batch avec les bactéries et l'eau prélevées au jour j, l'eau et les boues activées étant conservées pendant les trois jours à 4 °C maximum. La biolite® est alimentée hors expérience (entre le jour j et j+1) par une solution contenant de l'ammonium (concentration finale, 30 mgN L^{-1}) ou du nitrate (concentration finale, 15mgN L^{-1}), aérée ou non. Des essais de conservation de l'eau d'alimentation (analyses physico-chimiques) et des boues activées et cultures fixées (analyses respirométriques), dans les conditions décrites ci-dessus, ont été effectués pour garantir la bonne conservation des échantillons et déterminer la durée des essais sur les trois jours maximum de conservation.

Lors de chaque expérience, des échantillonnages pour les analyses des éléments azotés (NH_4^+, NO_3^- et NO_2^-) par colorimétrie (Système automatique à flux continu - Skalar - et Nova 60 Spectroquant®) sont réalisés régulièrement pour suivre les différents processus mis en jeux, liés à l'élimination de l'azote.

Les échantillons de liqueur mixte réalisés sur boues activées sont prélevés directement à l'intérieur du pilote (cf. Figure 34) et dans la réserve pour les cultures fixées (cf. Figure 35). Ces échantillonnages sont réguliers (toutes les 10 à 20 min, suivant les temps de contact et le traitement simulé).

L'oxygène dissous est mesuré avec des oxymètres (WTW Oxi 330 oxymeter). Les sondes à oxygène placées à l'intérieur des pilotes et reliées à un acquisiteur de données, permettent de mesurer toutes les minutes l'oxygène dissous dans la liqueur mixte pour les batchs sur boues activées ou de l'eau de sortie pour les batchs sur cultures fixées.

Pour les analyses de N_2O gazeux, les pilotes sont fermés hermétiquement et la circulation des gaz y est contrôlée par des débitmètres étalonnés. L'analyseur IR (Infra Red, URAS 14 Advance Optima, Hartmann & Braun) récupère les gaz sortant des pilotes et mesure la concentration de N_2O en ppm (cf ci-dessous), de façon continue (toutes les minutes) lors de chaque batch. Les concentrations de N_2O en ppm, converties en $\mu g\ N\ L^{-1}$ (1ppm = 1.273 μg N- $N_2O\ L^{-1}$) et divisées par le débit d'air, permettent de calculer un flux moyen de N_2O émis lors du traitement. Ce flux est exprimé pour les boues activées par gramme de MES pour un litre de liqueur mixte, et pour les cultures fixées par litre de biolite®.

Pour chaque expérience, on peut ainsi calculer une vitesse d'apparition ou de disparition de chaque élément azoté (NH_4^+, NO_3^- et NO_2^-), une oxygénation moyenne et un flux de N_2O (cf. Figure 37). La vitesse d'apparition ou de disparition de chaque élément azoté (NH_4^+, NO_3^- et NO_2^-) est tirée des droites de régression obtenues à partir d'environ 5 couples de données: [Concentrations des éléments azotés]= f (temps d'expérimentation pour les valeurs de N_2O et d'oxygénation constante). Pour ces calculs, nous avons, dans la mesure du possible, pris en compte les valeurs pendant lesquelles les émissions de N_2O et l'oxygénation étaient constantes. Les résultats ainsi obtenus pour chaque expérience sont présentés en Annexes 5 à 11.

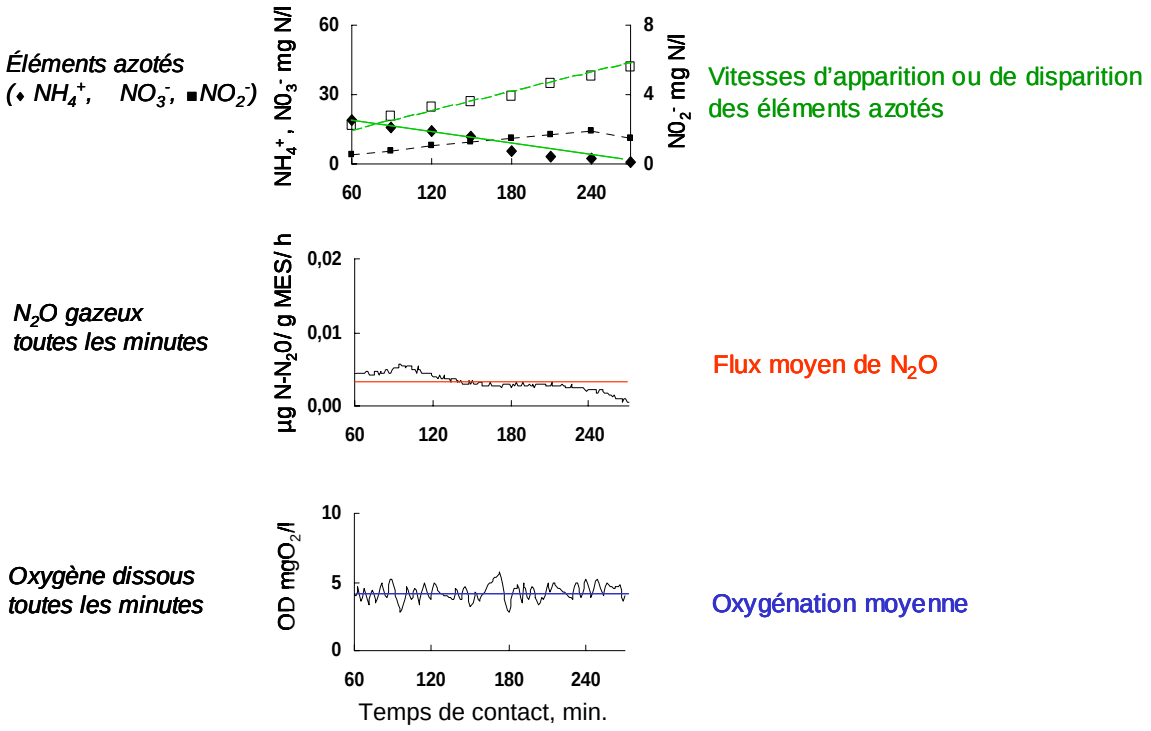


Figure 37. Analyses effectuées lors de chaque essai au cours du temps de contact eau – bactéries, à des intervalles de temps réguliers, sur les éléments azotés (ammonium, nitrate,nitrite), le N_2O gazeux et l'oxygène dissous. Ces analyses nous permettent de calculer une vitesse d'apparition ou de disparition pour chaque éléments azotés (à partir des droites de regression), un flux moyen de N_2O et une oxygénation moyenne appliquée.

2.2.2.2 Etude de la variabilité des émissions de N_2O, en fonction de différents facteurs

La section 1.5 du chapitre 1 a montré que les émissions de N_2O, durant la nitrification et la dénitrification, pouvaient être contrôlées par différents facteurs tels que, l'oxygénation, le rapport C/N, les charges en éléments azotés (ammonium, nitrate et nitrite), le pH et la température, ainsi que les communautés bactériennes. Quelques-uns de ces facteurs jouent des rôles plus importants que d'autres dans la production d'oxyde nitreux, mais constituent aussi des paramètres sur lesquels l'exploitant peut intervenir.

La concentration en oxygène, facteur majeur influençant la production de N_2O, peut être variable lors du traitement de l'azote en station d'épuration suivant la température (variation du niveau de saturation) et ainsi évoluer en fonction des saisons (été, hiver). A Seine Amont, l'oxygénation est comprise entre 2 et 7.5 $mgO_2\ L^{-1}$ au niveau des bassins aérés et entre 0 et 2 $mgO_2\ L^{-1}$ au niveau des bassins non aérés. Nous avons largement mentionné l'hétérogénéité de la distribution de l'oxygène dans les flocs des boues activées et au niveau des biofilms sur cultures fixées, due à la limitation de la diffusion ou aux chemins préférentiels empruntés par l'oxygène, malgré les précautions prises de répartition homogène des fluides. L'oxygène est un paramètre essentiel de gestion des stations d'épuration qu'il est nécessaire d'optimiser.

Un autre facteur déterminant, lors de la dénitrification notamment, est l'apport de carbone organique. Déjà à Seine Centre, mais aussi à l'avenir au niveau de la plupart des traitements de l'azote de l'agglomération parisienne, cet apport en carbone se fait grâce à des ajouts de méthanol plus ou moins importants, en fonction des conditions d'exploitation. Il est donc pertinent de connaître les effets, sur les émissions de N_2O, des quantités de méthanol ajoutées lors de la dénitrification sur cultures fixées.

La charge en nitrite contribuant fortement aux émissions de N_2O, notamment lorsque les conditions d'anoxies se mettent en place dans le réacteur, représente un autre facteur important pour la production d'oxyde nitreux. Ce serait le cas lors du redémarrage des stations, après un arrêt prolongé. A Seine Centre, par exemple, on observe des pics de nitrite lorsque l'on revient en mode de fonctionnement temps sec et que l'on rétablit des conditions anoxiques pour la remise en route de la dénitrification. Par temps de pluie, en effet, la dénitrification est inopérante.

Ces trois facteurs, essentiels à la gestion de la station, mais aussi fondamentaux pour les émissions de N_2O, ont été analysés: concentrations en oxygène dissous et en nitrite dans le milieu et apports en carbone organique qu'est le méthanol lors de la dénitrification.

Pour effectuer les expériences dans des gradients d'oxygénation, un mélange gazeux (N_2 et d'O_2), à débit constant, permet d'avoir des conditions d'oxygénation différentes et contrôlées, grâce à des débitmètres étalonnés. Chaque niveau d'oxygène a été testé plusieurs fois sur des séries différentes (donc sur plusieurs prélèvements), afin de prendre en compte les variabilités inhérentes à la station.

Le nitrite a été ajouté à une concentration de 10 mg $N\text{-}NO_2$ l^{-1} (solution étalon à 1000 mg NO_2 L^{-1}). Cette concentration est suffisamment élevée pour ne pas être limitante, mais inférieure au seuil de toxicité pour la production de N_2O via la nitrification-dénitrifiante, soit une concentration supérieure à 15 mgN. L^{-1} (Cébron et al., 2005).

Les effets du carbone organique ont été testés en ajoutant des quantités de méthanol (CH_3OH) croissantes, établies en fonction de la concentration en nitrate présente dans l'eau d'alimentation au départ, sachant qu'il faut 3g de CH_3OH / g $N\text{-}NO_3$. (Claus & Kutzner, 1985 ; Koopman et al., 1990).

2.2.2.3 Étude des différents processus: part relative dans les émissions de N_2O

Plusieurs processus, décrits dans la section 1.5 du chapitre 1 et résumés par la Figure 38, peuvent être à l'origine de la production d'oxyde nitreux lors du traitement de l'azote en station d'épuration. Ils peuvent intervenir aussi bien lors de la nitrification que de la dénitrification. Toutefois, certains processus tels que la nitrate ammonification ou la dénitrification ne devraient intervenir que si du carbone organique est disponible.

Pour déterminer si, et quand, ces processus interviennent lors des différents traitements de l'azote, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques d'un processus ou d'une étape de certains processus. Les différences observées, sur la consommation ou la production des différents éléments azotés et sur les émissions du N_2O, par rapport à un témoin sans inhibiteur, peuvent ainsi conduire à différencier les différents processus mis en jeux et leur part dans la production d'oxyde nitreux. Les inhibiteurs utilisés lors des expériences sur boues activées ont été discutés et présentés dans la section 1.6 du chapitre 1.

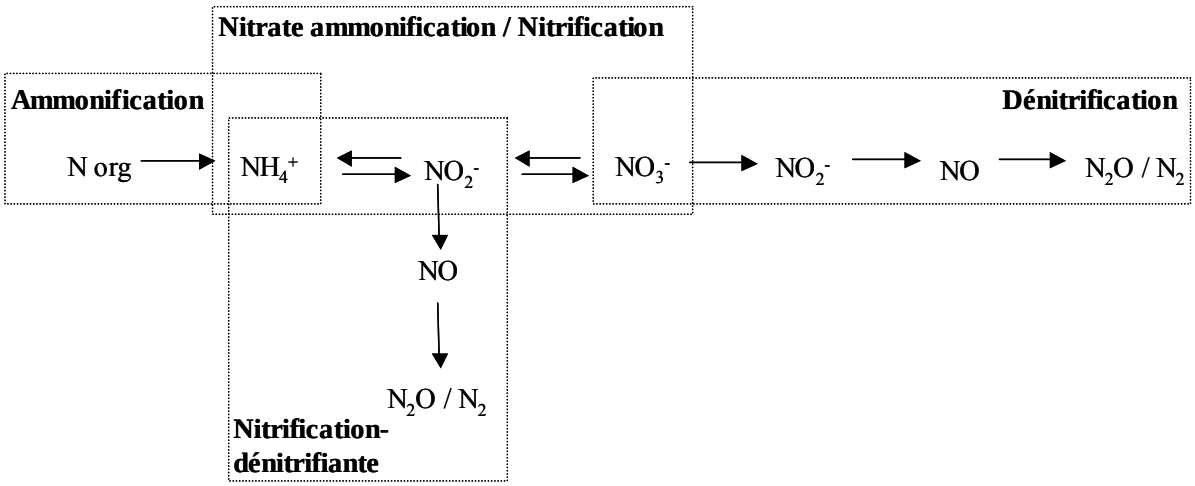


Figure 38. Différents processus participant au cycle de l'azote et potentiellement producteurs de N_2O lors du traitement de l'azote.

<u>*Nitrification*</u> : Durant la nitrification à travers une gamme de faibles oxygénations, nous avons cherché à établir la part de la nitrification-dénitrifiante et de la dénitrification hétérotrophe dans les émissions de N_2O.

Les expériences sont réalisées avec ou sans inhibiteurs. Les inhibiteurs de la nitrosation et de la nitratation sont respectivement l'allylthiourée (ATU ; concentration finale de 5-10 mg. L^{-1}; Haider et al, 2003) et le chlorate ($NaClO_3$; concentration finale de 1g. L^{-1}; Brion & Billen, 1998). Ils permettent de mesurer les émissions de N_2O provenant de la dénitrification hétérotrophe uniquement (Figure 39, (3)). Sans inhibiteurs (contrôles), nous mesurons les émissions de N_2O produit par tous les processus présentés par la Figure 39 (1). Enfin, la différence entre les deux essais (avec et sans inhibiteurs), pour les émissions de N_2O, nous permet de calculer les quantités de N_2O émis par la nitrification-dénitrifiante.

En ajoutant du nitrite à des expériences avec et sans inhibiteur, nous avons effectué un bilan des différents éléments azotés (Figure 39, (2) et (3)) ; le nitrite étant réduit et oxydé on peut, outre le N_2O, calculer les quantités de N_2 produit, et donc le ratio N_2O : N_2.

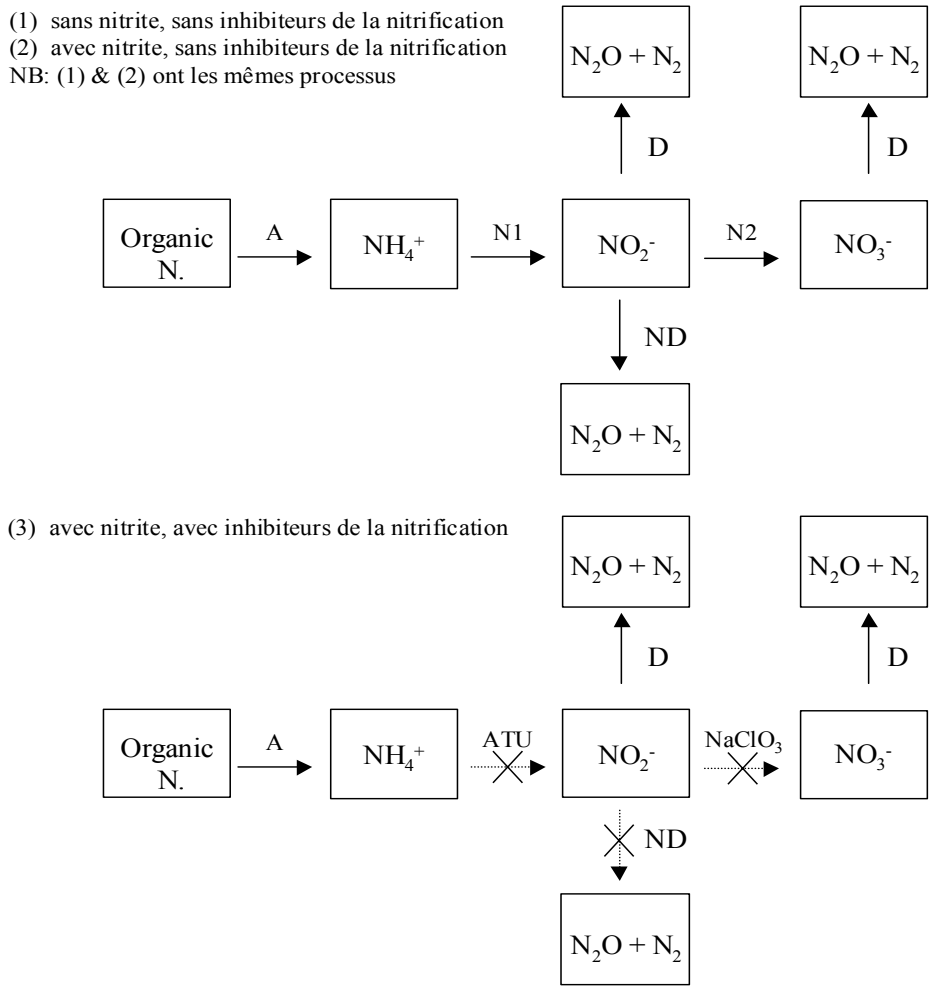


Figure 39. Diagramme des transformations de l'azote dans le pilote de laboratoire durant la nitrification sur boues activées: (1) et (2) sans inhibiteurs et avec et sans ajout de nitrite ; (3) avec inhibiteurs et avec ajout de nitrite. A = ammonification, N1= nitrosation, N2=nitratation, D= dénitrification, ND = nitrification-dénitrifiante. Les croix et les flèches en pointillés en (3) indiquent que le processus correspondant a été supprimé par les inhibiteurs.

Des essais préalables ont été effectués dans le but de vérifier les effets inhibiteurs du chlorate et de l'allylthiourée sur la nitrosation et la nitratation. Les résultats de ces essais sont présentés par le Tableau 14 et la Figure 40 et montrent l'efficacité de ces inhibiteurs sur la nitrification ; l'ajout de chlorate diminuant significativement la nitratation et par la même la nitrosation (Figure 40). Avec un ajout simultané de chlorate et d'allylthiourée, la nitrification devient négligeable (Figure 40). On remarque également que la production de N_2O est elle aussi affectée par l'ajout d'inhibiteurs (cf. Tableau 14 et Figure 40).

Tableau 14. Vitesses d'apparition (valeurs positives) ou de disparition (valeurs négatives) des différents éléments azotés et flux moyen de N_2O, lors de la nitrification sur boues activées sans inhibiteurs, avec ajout de chlorate ($NaClO_3$; concentration finale de 1g L^{-1}) et avec ajout de chlorate et d'allylthiourée (ATU ; concentration finale entre 5-10 mg L^{-1}) : l'ammonium (r NH_4^+), le nitrate (r NO_3^-), le nitrate et le nitrite (r(NO_3^-+ NO_2^-)) et le N_2O (r N_2O).

	r NH_4^+	r NO_3^-	r(NO_3^-+ NO_2^-)	r N_2O
	mgN g MES $^{-1}$ h^{-1}			
sans inhibiteurs	- 7.3	7.3	7.7	0.0058
avec $NaClO_3$	- 2	1.2	1.9	0.0032
avec $NaClO_3$ + ATU	- 0.4	-0.7	-1.2	0.0006

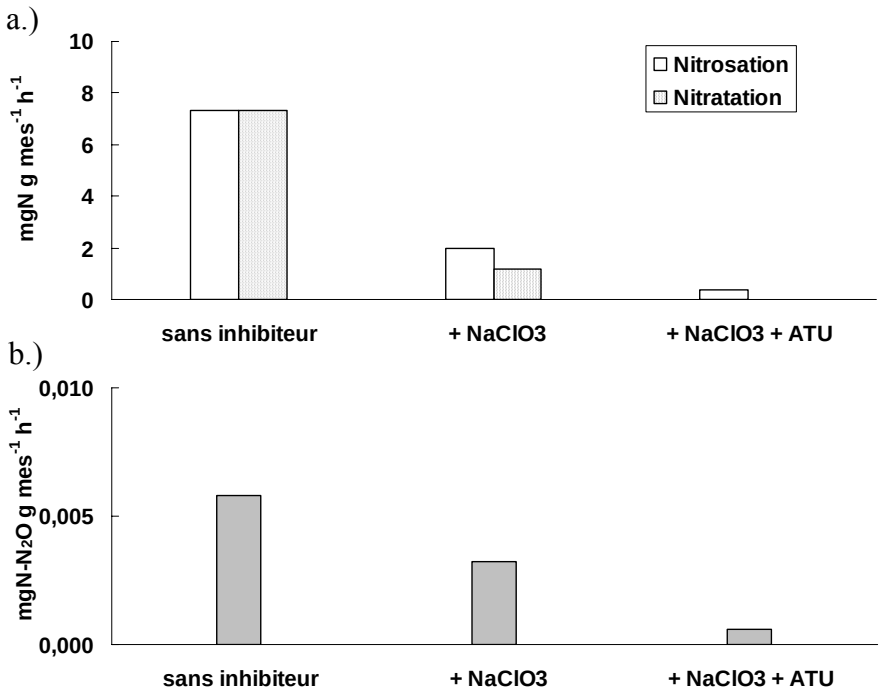


Figure 40. a.) Vitesses de disparition du NH_4^+ (nitrosation) et d'apparition du NO_3^- (nitratation) et b.) flux moyen de N_2O, lors de la nitrification sur boues activées sans inhibiteurs, avec ajout de chlorate ($NaClO_3$; concentration finale de 1g. L^{-1}) et avec ajout de chlorate et d'allylthiourée (ATU ; concentration finale entre 5-10 mg. L^{-1}).

<u>*Dénitrification*</u>*:* Avec les expériences de dénitrification, ce sont les émissions de N_2O pouvant provenir de la nitrate ammonification qui nous ont intéressés. Chez les bactéries nitrate-ammonifiantes, seule la nitrate réductase de type Nar a été observée, alors que les bactéries dénitrifiantes présentent, elles, deux types d'enzyme, Nar accompagnée ou non de Nap (Richardson et al., 2001), (Figure 41). Ainsi nous avons utilisé un inhibiteur de la nitrate réductase du type Nar, le chlorate ($NaClO_3$; concentration finale de 0.1 g l^{-1}; Rusmana & Nedwell, 2004) (Figure 41). La différence entre les essais avec inhibiteur et un contrôle sans inhibiteur, nous permet de savoir si la nitrate ammonification produit du N_2O lors de la dénitrification sur boues activées. Pour quantifier le taux de N_2O produit par rapport aux quantités de N_2, nous avons cette fois-ci utilisé de l'acétylène, un inhibiteur de l'enzyme responsable de la réduction du N_2O en N_2 (Bonin et al., 2002). La différence entre les expériences avec ou sans acétylène, nous a permis de calculer le ratio N_2O : N_2.

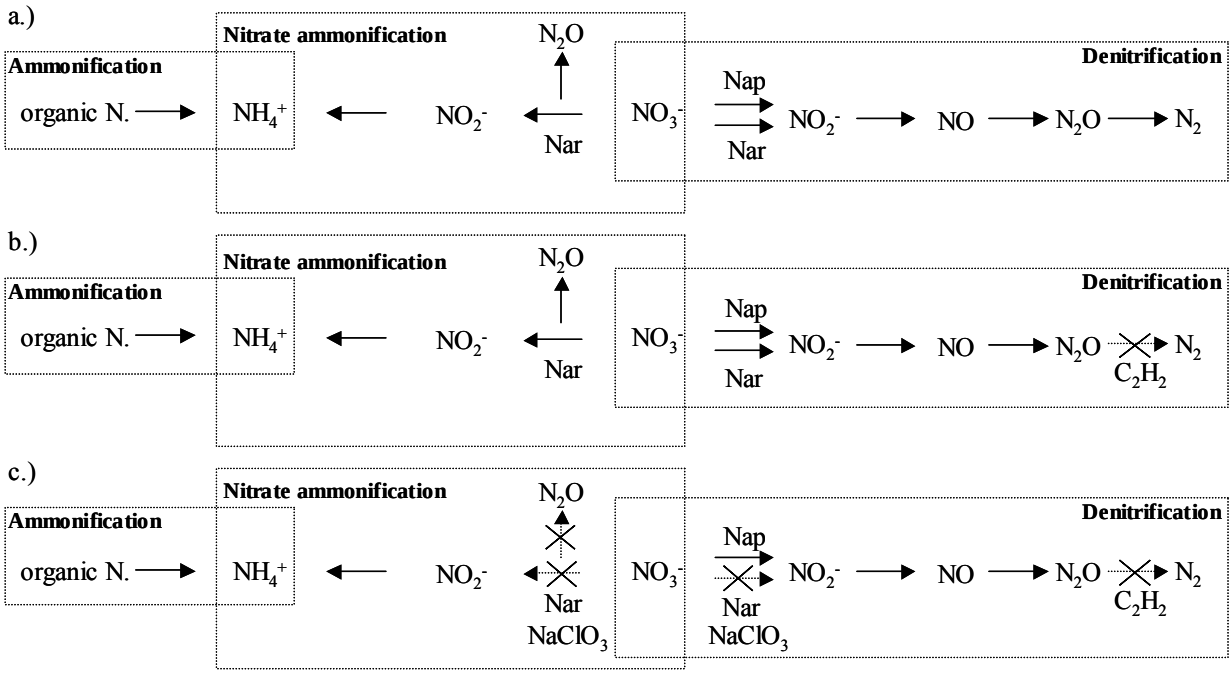


Figure 41. Diagrammes des transformations de l'azote attendues dans le pilote de laboratoire en conditions d'anoxie et de dénitrification : a.) avec inhibiteur de la nitrification (ATU), b.) avec inhibiteur de la nitrification (ATU) et de la N_2O réductase (C_2H_2), c.) avec inhibiteur de la nitrification (ATU), de la N_2O réductase (C_2H_2) et de la nitrate réductase Nar ($NaClO_3$, 0.1 mg.L-1).

Sur une deuxième série d'essais, en utilisant comme précédemment des inhibiteurs de la nitrification, nous avons également quantifié les émissions de N_2O dû à la nitrification-dénitrifiante dans des conditions de dénitrification et de micro-aérobie (< 2 $mgO_2\ L^{-1}$).

2.2.2.4 Estimation des émissions de N_2O lors du traitement de l'azote pour les STEPs actuelles et futures de l'agglomération parisienne

Grâce à toutes les expériences précédentes, représentatives de chaque système de traitement, boues activées secondaires et cultures fixées en traitement tertiaire, nous avons pu déterminer les pourcentages d'émission de N_2O émis par unité de charge traitée, en ammonium lors de la nitrification, en nitrate lors de la dénitrification. Ainsi, connaissant les charges azotées et les procédés utilisés pour chacune des stations d'épuration de l'agglomération traitant la pollution azotée, nous avons pu appliquer ces fractions d'émissions de N_2O et ainsi estimer les quantités émises actuellement. De la même façon, nous avons également estimé les futures émissions de N_2O, liées aux nouveaux traitements de l'azote qui seront mis en place aux horizons 2005-2008 et 2012-2015.

La Figure 42 résume les différentes expériences effectuées durant notre étude sur les émissions de N_2O, lors de la nitrification et de la dénitrification sur boues activées secondaires et cultures fixées en traitement tertiaire.

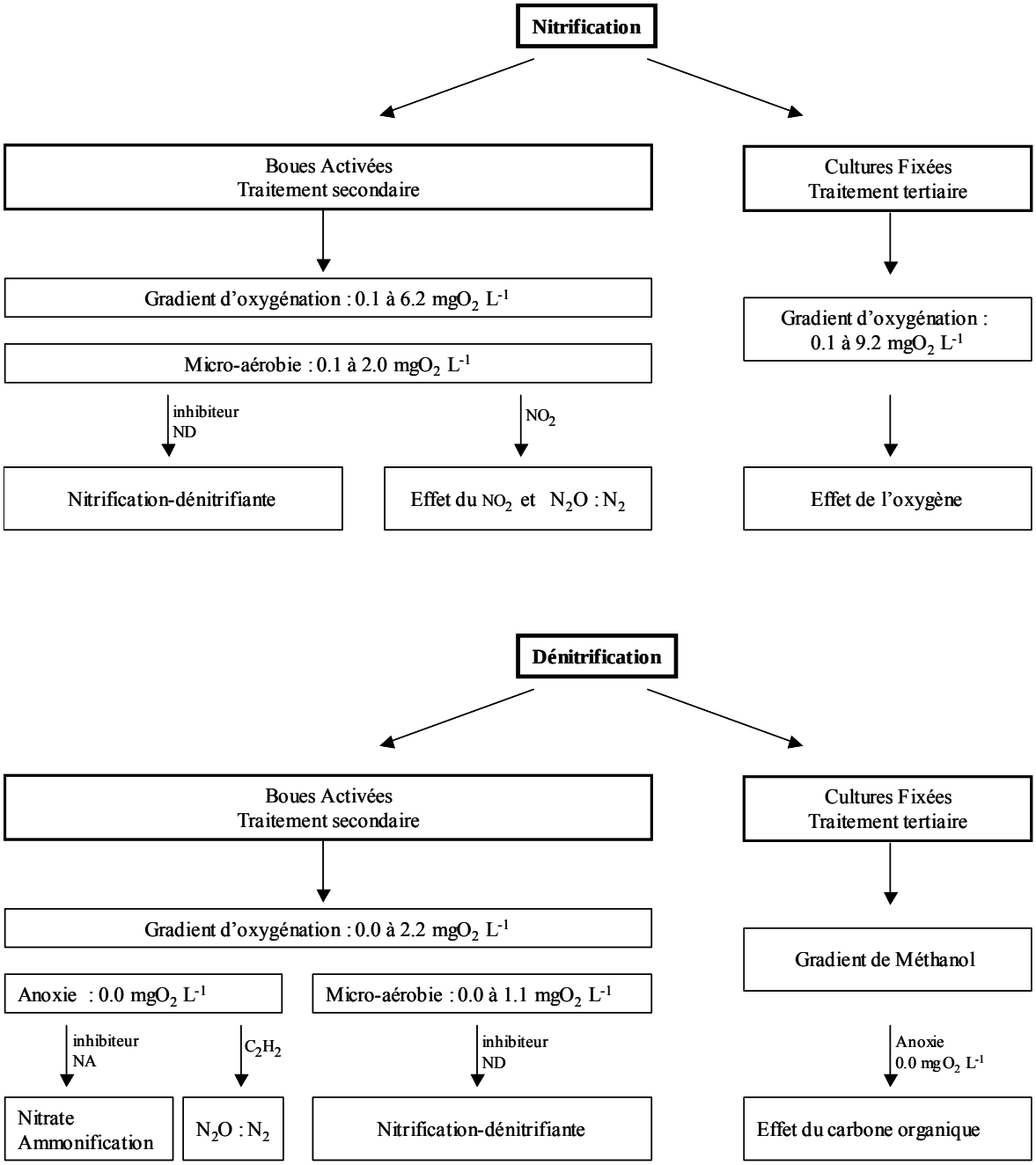


Figure 42. Schéma récapitulant les expériences effectuées sur les émissions d'oxyde nitreux, lors de la nitrification et dénitrification sur boues activées secondaires et cultures fixées en traitement tertiaire. (ND : Nitrification-dénitrifiante ; NA : Nitrate Ammonification ; C_2H_2 : acétylène).

2.3 Références

Billen G. and Garnier J., 1999. Nitrogen transfers through the Seine drainage network : a budget based on the application of the Riverstralher model. Hydrobiologia. 410: 139-150.

Bonin P., Tamburini C., Michotey V., 2002. Determination of bacterial processes which are sources of nitrous oxide production in marine samples. Water Research 36: 722-732.

Brion N. and Billen G., 1998. Une réévaluation de la méthode d'incorporation de $H^{14}CO_3^-$ pour mesurer la nitrification autotrophe et son application pour estimer des biomasses de bactéries nitrifiantes. Rev. Sci. Eau 11: 283-302.

Brion N., Billen G., Guezennec L., Ficht A., 2000. Distribution of nitrifying activity in the Seine River (France) from Paris to the estuary. Estuaries. 23: 669-682.

Cébron A., Berthe T., Garnier J., 2003. Nitrification and Nitrifying bacteria in the lower Seine River and estuary. Appl. Environ. Microbiol. 69: 7091-7100

Cébron A., Garnier J., Billen G., 2005. Nitrous oxide production and nitrification kinetics by natural bacterial communities (the lower Seine River, France). Aquatic Microbial Ecology. In press.

Claus G. and Kutzner H.J., 1985. Denitrification of nitrate and nitric acid with methanol as carbon source. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 378 – 381.

Fustec E., Greiner I., Schanen O., Gaillard S., Dzana J.G. 1998. Les zones humides riveraines : des milieux divers aux multiples fonctions. In : La seine en son bassin : Fonctionnement écologique d'un système anthropisé, ed. M. Meybeck, G. De Marsily, E. Fustec. Chapitre 5 pp.211-262.

Garnier J., Billen G., Hanset P., Testard P., Coste M., 1998. Développement algal et eutrophisation dans le réseau hydrographique de la Seine. In : La Seine et son bassin : Fonctionnement écologique d'un système anthropisé, ed. M. Meybeck, G. De Marsily, E. Fustec. Chapitre 14 pp. 593-626.

Garnier J., Leporcq B., Sanchez N., Philippon X., 1999. Biogeochemical massbalances (C, N, P, Si) in the three large reservoirs of the seine basin (France). Biogeochemistry. 47: 119-146.

Garnier J., Billen G., Sanchez N., Leporcq B., 2000. Ecological functioning of the Marne reservoir (upper Seine basin, France) Regul. Rivers : Res. Mgmt. 16: 51-71.

Garnier J., Servais P., Billen G., Akopian M., Brion N., 2001. Lower Seine river and estuary (France) : carbon and oxygen budgets during low flow. Estuarie. 24: 964-976.

Garnier J., Billen G., Berthe T., Martinez A., Pinault S., Desruelle M., Cébron A., 2002. Nitrification de l'ammoniumdans la basse Seine : impact de l'eutrophisation de Paris à l'estuaire. Rapport de synthèse Piren - Seine 1998-2001, 20p.

Garnier J., Cébron A, Tallec G., Billen G., Sebilo M., Martinez A., 2005. Nitrous oxide emission in the seine River estuary (France) : comparaison with upstream sector of the Seine basin. Biogeochemistry. In press.

Haider S., Svardal K., Vanrolleghem P.A., Kroiss H., 2003. The effect of low sludge age on wastewater fractionation (S_s, S_l). Water science and technology 47: 203-209.

Koopman B., Stevens CM., Wonderlick CA., 1990. Denitrification in a moving bed upflow sand filter. Research Journal of Wtaer Pollution Control Federation. 62 : 239-245.

Némery j., 2003 Origine et devenir du phosphore dans le continuum aquatique de la Seine, des petits basins amont à l'estuaire : Rôle du phosphore échangeable sur l'eutrophisation. Thèse de Doctorat, Université Paris VI- Pierre et Marie Curie, pp.264.

Richardson D.J., Berks B.C., Russel D.A., Spiro S., Taylor C.J., 2001. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. Cell. Mol. Life Science. 58: 165-178.

Rusmana I. and Nedwell D.B., 2004. Use of chlorate as a selective inhibitor to distinguish membrane-bound nitrate reductase (Nar) and periplasmic nitrate reductase (Nap) of dissimilative nitrate reducing bacteria in sediment. FEMS Microbiology Ecology. 48: 379-386.

Tusseau-Vuillemin M.H., Le Reveillé G., Mouchel J.M., Dispan J., Delbec M., Servais P. Biodegradabilité de la matière organique en sorite de la station d'épuration. Rapport d'activité Piren-Seine 1999. Février 2000. p 4.4-22.

Avant – propos

Nous avons vu dans le chapitre 2, que les rejets d'Achères influençaient grandement le cycle de l'azote au niveau de la Seine, en aval de l'agglomération parisienne. Ils contribuent au phénomène d'eutrophisation au niveau de l'estuaire et donc au déficit d'oxygène en période estivale. Ils favorisent la nitrification et la dénitrification dues aux apports en azote important, et donc également les émissions d'oxyde nitreux. Dans ce chapitre nous avons donc cherché à quantifier les émissions estivales de N_2O, de 1997 à 2003 dans la basse Seine et à établir les bilans de nitrification et de dénitrification dans l'estuaire de 1993 à 2003 afin d'appréhender la contribution de chaque processus dans la production de N_2O, et de montrer l'évolution de l'impact des rejets d'Achères dans la basse Seine sur une longue période et pour des situations hydrologiques variées.

Chapitre 3
-
Nitrogen behaviour and nitrous oxide emission in the tidal Seine River estuary (France) as influenced by human activities in the upstream watershed

Josette Garnier[1], Aurélie Cébron[1], Gaëlle Tallec [1,2], Gilles Billen[1], Mathieu Sebilo[1,3] and Anun Martinez[1]

[1]UMR Sisyphe 7619, Fonctionnement des Hydrosystèmes, Université P. & M. Curie-CNRS, Boite 105, Tour 56, Etage 4, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France
[2]SIAAP / DRD, 82, Av. Kléber, 92700 Colombes, France
[3]UMR 7618, Biomco, Université P. & M. Curie – INRA – CNRS, Boite 120, Tour 56, Etage 4, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France

Accepted to *Biogeochemistry* : 05/07/05.

Abstract

The Seine River estuary (France) is the receptacle of a drainage basin characterised by high population density, heavy industrial activity and intensive agriculture. Whereas nitrate concentrations are high due to diffuse sources in the upstream drainage basin, ammonium mainly originates from the effluents of the Achères wastewater treatment plant (WWTP) downstream from Paris and its suburbs (6.5 million equivalent-inhabitants). Ammonium is mostly nitrified in the tidal freshwater estuary and nitrification causes a strong summer oxygen deficit. Average longitudinal summer profiles of oxygen and nitrogen concentrations for two periods, from 1993 to 1997 and 1998 to 2003 in dry hydrological conditions (excluding the wet years 2000 and 2001) clearly reflect the changes due to the improved treatment of wastewater from Paris and its suburbs.

On the basis of daily water flux data and twice monthly nitrogen measurements at the boundaries of the upstream freshwater estuarine section (108 km), we calculated nitrification and denitrification fluxes, whose annual averages were 43 and 71 10^3 kg N d^{-1} respectively from 1993 to 2003, with summer values (July-September) representing 73 and 57 % of the annual fluxes respectively. The degree of denitrification in the upper estuary appears to be closely related to the nitrification, itself more loosely related to the amount of reduced nitrogen (Kjeldahl) brought by the treated effluents from the Achères WWTP. We estimated the total N_2O emissions to about 40kg N d^{-1} (25-60 kg N d^{-1}) in the same sector.

Key-words: Seine tidal estuary, domestic impact, nitrogen budget, N_2O emission

3.1 Introduction

The ecological functioning of the Seine estuary is greatly affected by the input of a large amount of ammonium from treated effluents from Paris and its suburbs discharged 200 km upstream, which causes a strong summer oxygen deficit due to nitrification (Garnier et al. 2001). The treatment of the Paris effluents has been considerably improved in the last 10 years. Whereas the Achères wastewater treatment plant treated 8.5 million inhabitant-equivalents by the activated sludge process at the beginning of the 1990s, it now treats only 6.5 million inhabitant-equivalents, as the remainder is processed by tertiary treatment in Valenton, Noisy and a newly constructed WWTP at Colombes. The implementation of a tertiary treatment, involving complete nitrification and partial denitrification at the Achères WWTP is programmed for 2007.

Both process of denitrification (as well as, to a lesser extent, dissimilatory nitrate reduction, Conrad 1996; Kelso et al. 1997) and nitrification, particularly nitrifier denitrification (i.e. autotrophic denitrification), at low ambient oxygen tension (Jorgensen et al. 1984; Poth & Focht 1985; De Wilde & de Bie 2000; Wrage et al. 2001; Punshon & Moore 2004), are known to cause emission of nitrous oxide (N_2O) as an intermediate product (Miller et al. 1993). The general concern for N_2O emissions arises from the fact that atmospheric N_2O significantly contributes to global warming. In addition, N_2O is stable in the troposphere and it can therefore reach the stratosphere where the NOx by-products of its photochemical decomposition contribute to the destruction of the ozone layer (Crutzen & Ehhalt 1977; Bange 2000). Since 1970, N_2O has increased at a rate of 0.2-0.3 % year^{-1}, reaching the present level of about 313 ppb (Rasmussen & Khalil 1986; Houghton et al. 1996; Garcia-Ruiz et al. 1998; Bange, 2000). The global rate of N_2O emission has increased dramatically in the last decade by about 2.8 to 4.3 Tg N y^{-1} (Nevison et al. 1995), with most of the anthropogenic N_2O production being attributed to agricultural activities (Bouwman 1996; Bouwman et al. 1993). Nitrogen transformations in the soil are considered to be responsible for 65 % of the increasing levels of nitrous oxide (N_2O) in the atmosphere (Bouwman et al. 1993; Bouwman 1996; Bouwman et al. 2002; IPCC 2000), but estuaries may account for 60 % of total marine nitrous oxide emissions (Bange et al. 1996). Whereas N_2O emission from rivers and coastal zones has been generally assumed to be related to N loading at the global scale (Bouwman 1996; Bouwman et al. 2002; Seitzinger & Kroeze 1998), field and laboratory experiments have shown the complexity of the kinetic control exerted on this process by variables such as oxygen, nitrite and pH (Goreau et al. 1980; Anderson & Levine 1986; de Bie et al. 2002; Bonin *et al*. 2002; Cébron et al., 2004). Therefore more studies are needed for a better understanding of the factors controlling the N_2O production, that appears to vary in time and to be dependent on specific conditions and cases (Mengis et al. 1996; De Bie et al. 2002).

Nitrification in the Seine river and estuary has been studied since the beginning of the 1990's (Chestérikoff et al 1992; Brion et al. 2000; Garnier et al. 2001; Cébron et al. 2003). Recently, we have characterized and quantified the populations of nitrifying bacteria using molecular methods (Cébron et al. 2003; Cébron et al. 2004), and showed that ammonium oxidizing bacteria were also responsible for the conversion of NH_4^+ into nitrous oxide (Cébron et al., 2004). Although water column denitrification is probably of limited importance in the Seine fluvial and upper tidal estuarine sectors because oxic conditions are always maintained, benthic denitrification can have a role both in the nitrogen balance of the Seine river and estuary, and in the emission of nitrous oxide, as shown for other estuaries (Robinson et al., 1998).

In this paper, we established the budget of nitrification and denitrification in the Seine estuary over a long time series (1993-2003) characterized by significant improvement of the parisian wastewater treatment, in order to i) quantify nitrogen transformations and ii) analyse the factors controlling *in situ* N_2O emission.

3.2 Material and methods

3.2.1 Site studied

Downstream from Paris, the Seine river is a large, regulated, 7th order river, draining a watershed of about 44000 km², with intensive agriculture. Nitrate concentrations are as high 4-5 $mgN.L^{-1}$. 60 km downstream Paris, it receives the effluents from the wastewater treatment plant of Achères, treating, by the activated sludge process, 6.5 million equivalent-inhabitants of Paris and its suburbs (Figure 43). Immediately downstream, it receives a major tributary, the Oise river, with a catchment of 17000 km². The fluvial sector of the Seine then continues without major tributaries nor point discharges down to the last navigation weir at Poses (km 202, distance from Paris *intra muros*), which represents the entrance of the estuarine sector and the upstream limit of tidal propagation (Figure 43). The freshwater part of the estuary extends to Caudebec (km 310), which represents the upstream limit of saline intrusion. This is a shallow estuary, well mixed vertically.

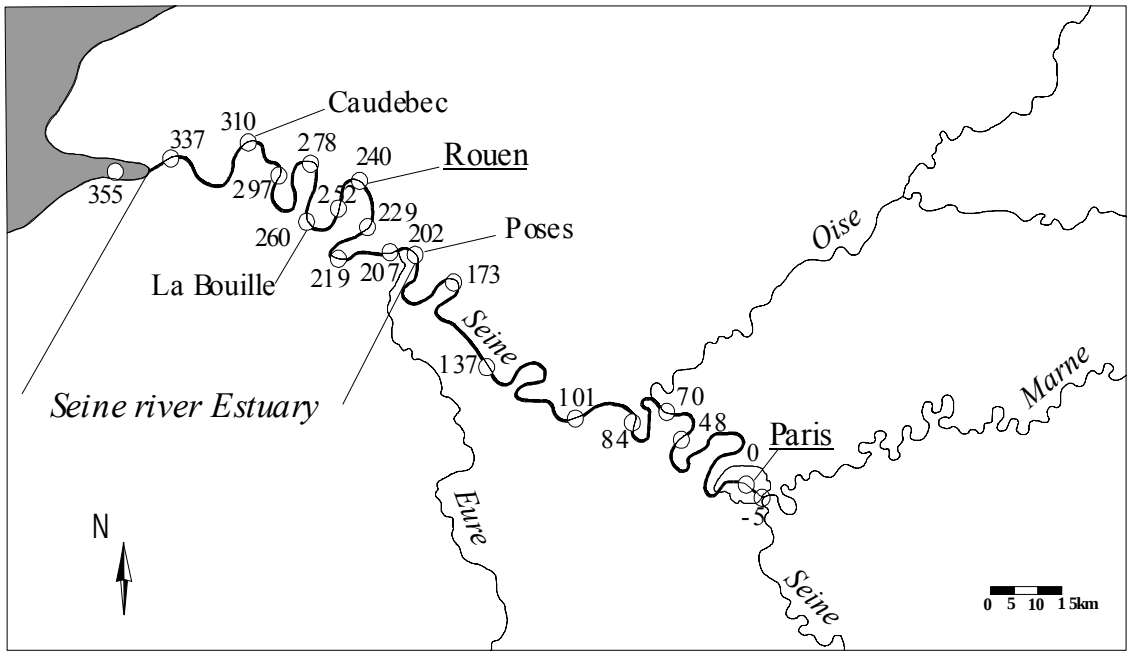


Figure 43. Map of the sampling locations in the freshwater estuary and the lower Seine River. The sampled stations are indicated by their km values.

3.2.2 Sampling strategy

Two different data set have been gathered and discussed in this paper, i) one at a twice monthly frequency at the inlet and outlet of the tidal estuary, ii) another at 2-3 occasions during summer, for 17 stations covering the whole profile from Paris to Honfleur along the fluvial and estuarine sectors of the Seine. Except for N_2O, analysed only from 1997 on, all other variables were measured according to the same protocols over a 11 year period from 1993 to 2003.

Seasonal sampling: Sampling was carried out at twice-monthly intervals, at the upstream and downstream limits of the tidal freshwater part of the estuary (Poses and Caudebec respectively), (Figure 43). Besides classical water-quality variables (O_2, PO_4^-, Si, etc.), the various forms of nitrogen were analysed (NO_3^-, NO_2^-, NH_4^+, total organic nitrogen by Kjeldahl N, i.e. dissolved + particulate). The data used here are those from 1993 to 2003, during the period when a comprehensive scientific programme was launched by the Région Haute Normandie (Seine-Aval programme). Nitrous oxide (N_2O) was also determined seasonally at Poses and Caudebec in 1998 and 1999.

Longitudinal summer profiles were obtained at 17 stations from Paris to Caudebec at 2 or 3 occasions during summer (May , July and September). On day i, samples were collected at 7 stations from Saint Maurice to Poses, on day i+1 at 8 stations from Poses to Caudebec, and on day i+2 at 2 stations in the saline estuary. In the river and the upstream part of the estuary (km 0 to 250), samples were collected from bridges with a bucket, while, for the downstream part of the estuary, samples were collected from a ship, 1 m below the surface, with a peristaltic pump. Samples for dissolved N_2O analysis were immediately collected in a peniciline flask, poisoned with $HgCl_2$ (2 %) and stopped with a rubber septum excluding any headspace gas. For the other measurements and analysis, the water was kept in 10 L containers and brought to the laboratory within 2 to 4 hours after sampling: activity measurements (see below) were initiated immediately, water was filtered and samples were deep frozen until analysis.

3.2.3 Chemical measurements

Inorganic nitrogen. Ammonium was measured on filtered water (GF/C 0.7 µm of porosity) with the indophenol blue method according to Slavyck & McIsaac (1972). Nitrate was also measured on filtered water, after a cadmium reduction into nitrite, and nitrite was measured with the sulfanilamide method according to Jones (1984). Nitrite was measured prior to cadmium reduction.

Total organic nitrogen was determined according to the Kjeldahl method (Rodier 1984) by difference between Kjeldahl N and ammonium concentrations.
Nitrous oxide in water samples was determined with a gas chromatograph (Perichrom ST 200) equipped with an electron capture detector, after degassing an aliquot (20 ml) of the water sample.

Nitrifying activity was determined by the $H^{14}CO_3$ incorporation method in the presence of specific nitrification inhibitors, as described by Brion & Billen (1998) and Cébron et al. (2003). About 125 ml of a water sample are incubated in the dark for 20-24 hours with

the radiotracer (0.5 µCi ml^{-1}) with and without inhibitors (N-serve or Nitrapyrin i.e 2-chloro-6-trichloromethyl pyridine, 5 mg l^{-1} and chlorate, 10 mmole L^{-1}). Five replicate subsamples of 10 to 20 ml were filtered on 0.2 µm polycarbonate membrane filters. Radioactivity incorporation was counted by liquid scintillation. The carbon incorporation rate by the nitrifying bacteria was calculated by difference between non-inhibited and inhibited samples. As the incubations were carried out in optimum conditions (oxygen: 6 mg L^{-1}; ammonium saturation: 2 mM; pH: 7-8; temperature: 20 °C), the values represent potential nitrifying activities. We used the yield factor of 0.11 $molC.molN^{-1}$, as determined by Brion and Billen (1998), for calculating ammonium oxidation from carbon incorporation. Potential nitrifying activity values in the estuarine sector (downstream from km 202) were multiplied by a factor of x 2.5 in order to take into account the sampling bias linked to the propensity of nitrifying bacteria to be attached on particles, as discussed in details by Brion et al. (2000).

3.2.4 Flux calculations

The measurements of the nitrogen forms at twice-monthly intervals and of daily water fluxes allowed the calculation of the N fluxes at the boundaries of the freshwater estuary (Poses-Caudebec) using the procedure described by Verhoff et al. (1980) and recommended by Walling & Webb (1985), and commonly used for the Seine (Meybeck et al. 1998; Némery et al. 2005).

$$flux = \Sigma (CiQi).\ Qm/\ \Sigma Qi$$

Ci = instantaneous concentrations
Qi= corresponding instantaneous water flux
Qm= mean water flux for the period considered (annual or summer)

These calculations assume that advection fluxes dominate the transfer. It is certainly so at the upstream limit of the sector, materialized by the weir of Poses. At the downstream limit, dispersion could play a role in the transfer. However, the choice of the station Caudebec, as a boundary is based on the fact that the longitudinal concentration gradients are minimal there (see Figure 45), owing to the fact that nitrification is completed several km upstream, and that sea water intrusion does not reach this point. Consequently, dispersion terms can be neglected.

The N_2O emission flux (kg N m^{-2} d^{-1}) across the water-air interface was estimated using the classical gas transfer velocity approach (Frankignoulle et al., 1998, Raymond & Cole, 2001, Abril & Borges, 2004), in which the flux is calculated as the product of a gas transfer velocity (k, in $m.h^{-1}$) by the excess of dissolved gas concentration over the equilibrium concentration with the atmosphere (C - Csat). At given temperature and turbulence conditions, the gas transfer velocity, k, is the same for any non reactive gaseous species, except for minor differences in their diffusivities. Previous analysis of the oxygen budget on the Seine estuary (Garnier et al. 2001) allowed to estimate the gas transfer velocity in the Seine estuary in the range from 0.04 to 0.06 $m.h^{-1}$, in agreement with the estimates made by Thibodeaux et al. (1994) for the fluvial part of the Seine River (0.02 to 0.07 $m.h^{-1}$). These values are in good agreement with the mean annual transfer velocity of 0.067 $m.h^{-1}$ estimated by Law et al. (1992) for the Tamar estuary, and with the range of 0.03-0.07 $m.h^{-1}$ proposed by Raymond & Cole (2001). The equilibrium concentration of N_2O was calculated on the basis of the relation with temperature and salinity established by Weiss & Price (1980), using the mean N_2O concentration in the atmosphere of 0.310 ppm by volume (Steffen et al. 2004).

3.3 Results

3.3.1 Changing conditions in the Seine river and estuary

The ten year period of study was characterized by changing conditions of water fluxes and effluent inputs, major factors controlling the spatial distribution and intensity of the biological processes in the lower Seine River (Chestérikoff et al. 1992; Servais & Garnier 1993; Garnier et al. 1995), (Figure 44a, b). The annual and summer average of discharges measured at Poses, shows that the years 1996 and 2003 were particularly dry, whereas the years 2000 and 2001 were wet (Figure 44a); these differences in the discharge affect the residence time of the water bodies and the spatial distribution of the processes.

Regarding the treated effluent fluxes of the Paris and suburbs wastewater treatment plants, a significant improvement during the period of study, from 1998 onwards can be observed (Figure 44b). This is evidenced both by the reduced nitrogen load (Kjeldahl) (reduction by 10 % on average), which controls nitrification, and by the organic carbon load (BOD) (reduction by 40 % on average), which controls denitrification (Figure 44b).The Achères wastewater treatment plant (one of the largest in Europe) represents more than 80 % of the pollution by Paris of the lower Seine River. The recent changes are only part of a long-term plan of improvements in the Paris wastewater treatment (Billen et al. 2001).

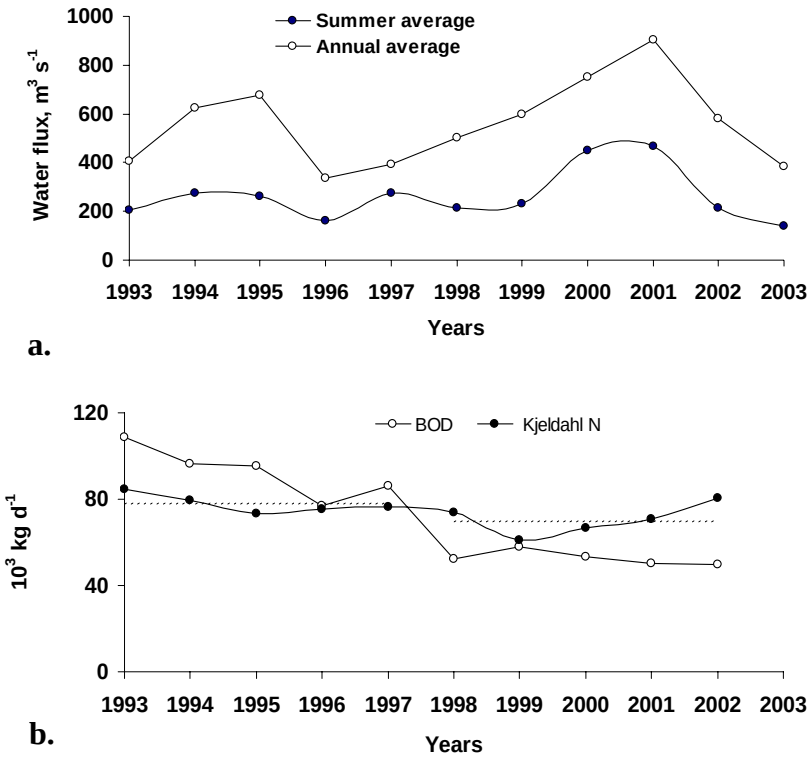


Figure 44. a) Average annual and summer variations in the water fluxes from 1993 to 2003 (m3 s-1) at Poses, the entrance of the tidal freshwater estuary. b) Mean annual fluxes of daily biological oxygen demand (BOD, 5 days, in 103 kg O_2 d-1) and Kjeldahl nitrogen (103 kg N d-1) in the effluents of the WWTPs of the Parisian region (The dashed lines represent the mean values of the Kjeldahl nitrogen fluxes for the 2 periods (1993-1997 and 1998-2002) characterized by very different BOD values).

3.3.2 Longitudinal summer profiles of oxygen and nitrogen in the estuary and the lower Seine River

To obtain a better understanding of the ecological functioning of the freshwater estuary, we have analysed the longitudinal pattern of oxygen and nitrogen concentrations along the continuum from the lower Seine upstream of the effluent outlet of the Paris WWTPs (Figure 45). The typical features of these profiles are (1) a sudden increase in ammonium, caused by the discharge of wastewater by the Achères treatment plant at km 70, (2) a limited oxygen drop immediately downstream of this input, and (3) the NH_4^+ disappearance, concomitant with an NO_3^- increase, evidence of nitrification, in the Seine freshwater estuary (from km 200 to 310); a severe oxygen deficit is also observed in this area.

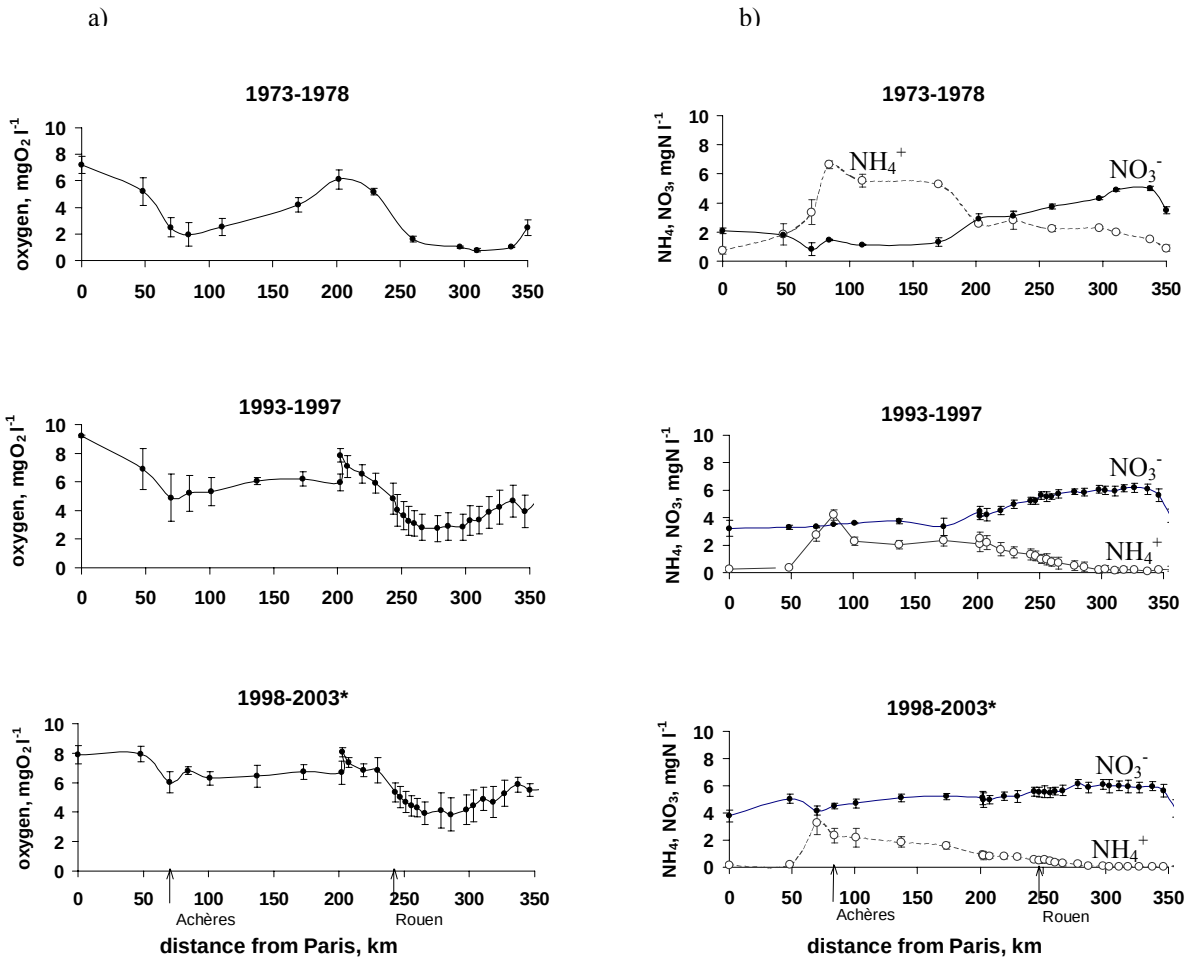


Figure 45. Summer longitudinal variations of a) average oxygen concentrations (mgO_2 l-1) and b) nitrate and ammonium (mg N l-1) for the dry periods from 1993 to 1997 and from 1998 to 2003, excluding the wet years 2000 and 2001. For comparison, similar information are given for the period 1973-1978. Paris ('Pont Marie') is at km 0; the tidal estuary begins at km 202 from Paris (Poses weir).

The longitudinal profiles, observed in similar summer conditions during the two periods from 1993 to 1997 and from 1998 to 2003 with different pollution loads, showed identical patterns; values were therefore averaged and shown with error bars (Figure 45). The water flow was low for dry summer conditions and averaged 220 m^3 s^{-1} whereas it was more than 450 m^3 s^{-1} during the wet years of 2000 and 2001, which we considered separately (profiles not shown here). For both considered periods, the ammonium brought by the Paris WWTPs (especially Achères) was completely nitrified 200 km downstream in the freshwater estuary and oxygen depletion was invariably observed in the estuarine sector (Figure 45). The fact that the oxygen depletion was less pronounced in the estuary during the recent period was obviously due to weaker nitrification because of the decreasing ammonium load. The decrease of organic matter inputs, led to better oxygenation immediately downstream of the effluent outlet during the recent period (Figure 45); previously, until the beginning of the 1990s, important heterotrophic bacterial degradation of organic matter led to frequent anoxia and fish mortality in the summer (Garnier et al. 1991; Garnier et al. 1992; Servais & Garnier 1993).

Similar profiles are presented for potential nitrification rates, nitrite and N_2O concentrations (Figure 46). Potential nitrification rates do not reflect the effective *in situ* rate of the process, but are an expression of the nitrifying biomass. Whatever the period, values were maximum in the estuary, where ammonium completely disappeared, but increased already at the outlet of Achères effluents. At the mouth of the estuary in the turbidity maximum area, potential activity was again high; the longitudinal pattern of potential nitrifying activity thus showed three sectors that were related to a shift in the bacterial community as supported by DGGE analysis (Cébron et al. 2004). The NO_2^- longitudinal pattern fits rather well with that of potential nitrifying activity but the N_2O concentrations were hardly higher in the estuary than in the lower Seine River downstream of the effluent outlet, revealing that N_2O might originate from other processes than nitrification.

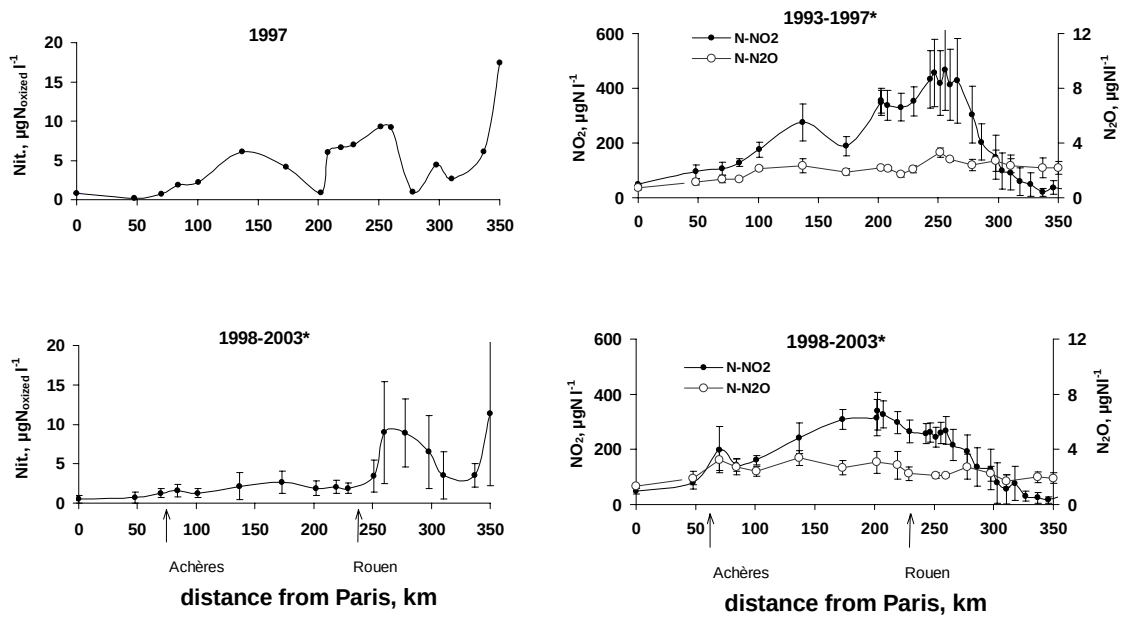


Figure 46. Summer longitudinal variations of a) average potential nitrifying activity (µgN oxidized l-1) and of b) nitrite (mg N-NO_2- l-1) and nitrous oxide (mg N-N_2O l-1) for the dry periods from 1993 to 1997 (1997 only, for nitrous oxide) and from 1998 to 2003, excluding the wet years 2000 and 2001.

3.3.3 Seasonal variations of oxygen and inorganic nitrogen in the estuary

Owing to the decrease in the pollution load, seasonal variations of NH_4^+ concentrations at the upstream and downstream limits of the estuary also showed a clear decrease since 1998, enhanced by greater dilution during the wet years of 2000 and 2001 (Figure 47). The NO_3^- concentrations, originating mainly from diffuse agricultural sources did not follow the same trend and even tended to increase due to the continuously rising nitrate contamination from agricultural sources in the Seine watershed (Billen & Garnier 1999; Billen et al. 2001). Particularly striking is the opposite variations between oxygen and nitrite concentrations (Figure 48). Taking into account the half-saturation constant for oxygen at the two stages of the nitrification process (0.2-0.5 $mgO_2\ l^{-1}$ for NH_4^+ oxidation, 0.8-2.4 $mgO_2\ l^{-1}$ for NO_2^- oxidation, Brion & Billen, 1998), oxygen depletion would limit the second stage of nitrification, allowing NO_2^- accumulation (and possibly an increase in N_2O emission). An inverse relationship between NO_2^- and O_2 was clearly shown by selecting the summer data, in the estuary as well as in the corresponding river data set upstream of the WWTPs and downstream of the Paris effluent outlet, where NO_2^- increased as soon as the oxygen was depleted to 2 mg l^{-1} (Figure 49a). A similar relationship was found between N_2O and O_2 concentrations, i.e. an increase in N_2O concentrations at low oxygen (and high NO_2^-) concentrations (Figure 49b). Unfortunately, *in situ* observations did not give any insight into NO_2^- and N_2O behaviour in the range of 0 to 2 mg $O_2\ l^{-1}$ and were therefore explored experimentally (Cébron et al., 2004).

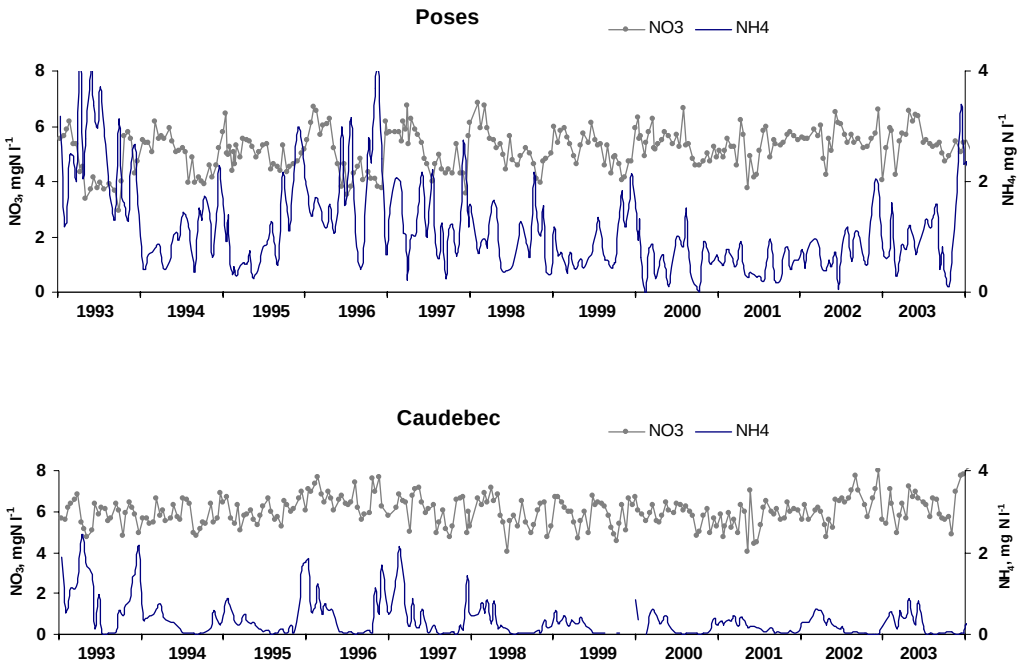


Figure 47. Seasonal variations of nitrate (mgN l^{-1}) and ammonium (mg N l^{-1}) at Poses and Caudebec from 1993 to 2003, the in- and outlet of the freshwater estuary.

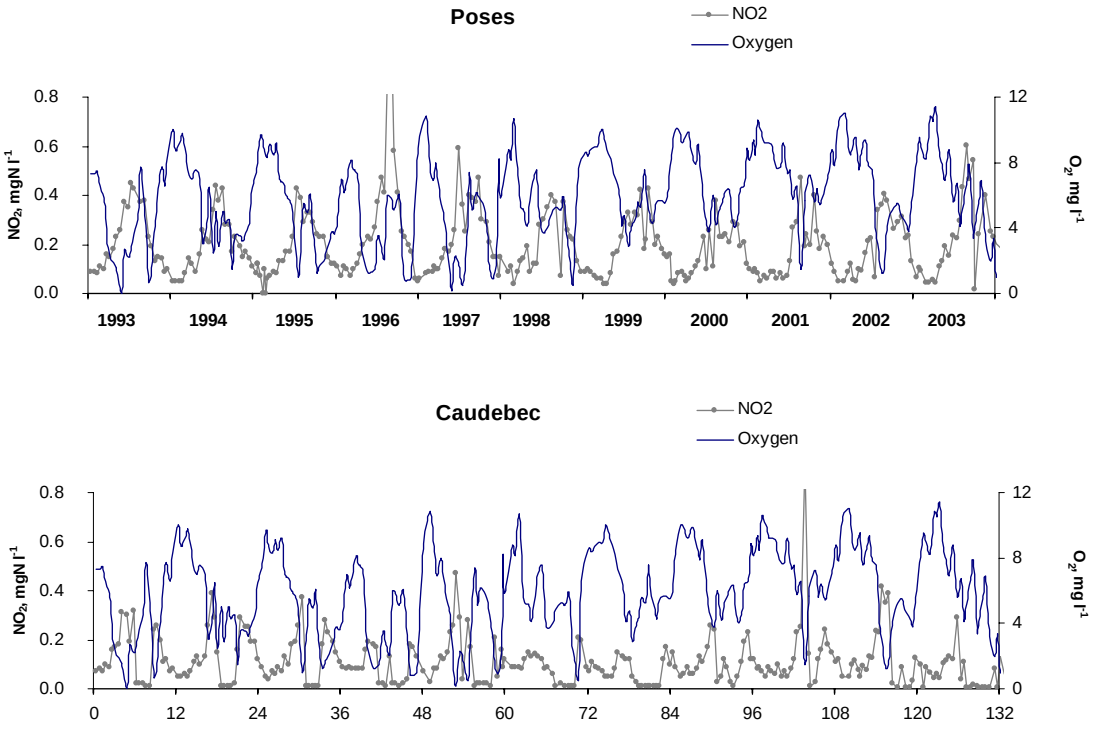


Figure 48. Seasonal variations of nitrite (mgN l^{-1}) and oxygen (mg O_2 l^{-1}) at Poses and Caudebec from 1993 to 2003, the in- and outlet of the freshwater estuary.

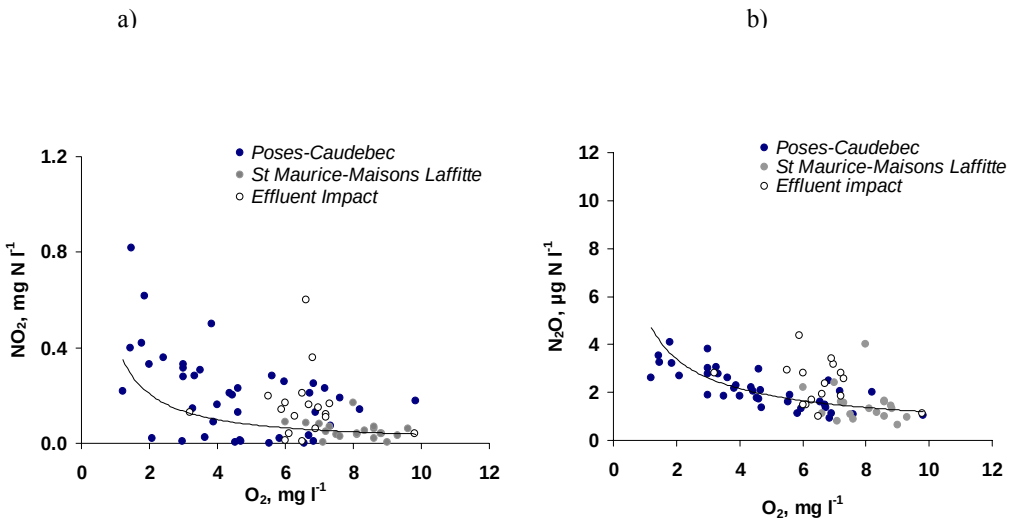


Figure 49. Relationships between a) summer values of nitrite (mgN-NO_2^- l^{-1}) and oxygen (mg O_2 l^{-1}), b) summer values of nitrous oxide (µgN-N_2O l^{-1}) and oxygen (mg O_2 l^{-1}). Poses - Caudebec, the freshwater estuary; Saint Maurice - Maisons Laffitte the lower Seine upstream of the effluent outlet; Effluent Impact: station downstream of the effluent outlet.

3.3.4 Nitrification and denitrification in the Seine freshwater estuary

Nitrification and denitrification (in 10^3 kg N d^{-1}) in the tidal freshwater estuary were calculated by subtracting the output (the fluxes at the downstream boundary, Caudebec) from the inputs represented by the sum of the concerned N fluxes: i) at the upstream boundary (Poses), ii) at the outlet of the major tributary (the Eure River), iii) and those by lateral point sources (Tableau 15 & Tableau 16). All fluxes (10^3 kg N d^{-1}), were calculated as annual and summer (July to September) averages.

The estimate of nitrification flux (Tableau 15) is given by the output-input budget of reduced nitrogen forms (Kjeldahl N). Denitrification was determined by the difference between input-output budget of total nitrogen (sum of inorganic and organic N) (Tableau 16). As nitrate is the dominant form of total nitrogen in the whole estuary, the two budgets are largely independent from each other. Another way of estimating denitrification is to calculate the input–output budget of nitrate taking into account the estimates of nitrification as an additional input term. The two methods yield remarkably similar estimates of denitrification with an average variation coefficient of around 1 % for both summer and yearly estimates (Tableau 16).

Depending on the years, the range of summer nitrification varied from 16 10^3 kg N d^{-1} to 55 10^3 kg N d^{-1} (Tableau 15), and represented on average 73 % of the annual value (Tableau 15). More than half the N-NH_4 flux brought by the Achères treatment plant was nitrified in the estuary, and nitrification fluxes within the estuary appeared to be linearly oriented with the Kjeldahl N discharged with the Achères effluents (Figure 50a). This estimation compares well with the mean integrated values of the direct potential nitrification measurements of the Figure 4 (36 10^3 kg N d^{-1} during summer conditions). Summer denitrification ranged from 61 to 27 10^3 kg N d^{-1} from 1993 to 2003 and represented on average 57 % of the yearly denitrification (Tableau 16). It is interesting to note that denitrification and nitrification are significantly positively related, a 1:1 ratio being found (Figure 50b).

Tableau 15. Budget of Nitrification (103 kgN d^{-1}) in the freshwater Seine Estuary, from 1993 to 2003, averaged annual values (year) and summer values (Sum). Fluxes of Kjeldahl Nitrogen: inputs are represented by the sum of the fluxes at the estuarine upstream boundary (Poses), of the Eure, a main tributary within the sector and the lateral inputs (domestic effluents within the sector); outputs are represented by the fluxes at the estuarine downstream boundary (Caudebec)

	1993		**1994**		**1995**		**1996**		**1997**		**1998**		**1999**		**2000**		**2001**		**2002**		**2003**	
10^3 kgN d^{-1}	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*
Poses	*107*	*65*	*95*	*58*	*110*	*46*	*71*	*40*	*87*	*47*	*104*	*60*	*84*	*39*	*103*	*56*	*83*	*45*	*58*	*30*	*49*	*19*
Eure R.	1.1	0.9	1.3	1.2	1.3	1.2	1.1	0.9	1.2	1.0	1.3	1.1	1.2	1.0	*1.2*	*1.1*	*1.2*	*1.0*	*1.1*	*1.0*	*1.0*	*0.9*
Lat. inputs	14.9	14.9	14.9	14.9	9.6	9.6	9.6	9.6	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1
Total inputs	**123**	**81**	**111**	**74**	**121**	**57**	**82**	**51**	**95**	**55**	**112**	**68**	**92**	**47**	**111**	**64**	**91**	**53**	**66**	**38**	**57**	**27**
Output (Caudebec)	**68**	**26**	**61**	**25**	**57**	**23**	**38**	**23**	**47**	**32**	**85**	**51**	**51**	**15** *15*	**59**	**25**	**52**	**26**	**40**	**16**	**35**	**11**
Nitrification	**-55**	**-55**	**-50**	**-49**	**-64**	**-34**	**-44**	**-28**	**-48**	**-23**	**-27**	**-17**	**-41**	**-32**	**-52**	**-39**	**-39**	**-27**	**-26**	**-22**	**-22**	**-16**

Tableau 16. Budget of denitrification (103 kgN d^{-1}) in the freshwater Seine Estuary, from 1993 to 2003, averaged annual values (year) and summer values (Sum). Fluxes of total nitrogen (sum of inorganic and organic N): inputs are represented by the sum of the fluxes at the estuarine upstream boundary (Poses), of the Eure, a main tributary within the sector and the lateral inputs (domestic effluents within the sector); outputs are represented by the fluxes at the estuarine downstream boundary (Caudebec). In italic is shown, for comparison, the budget of denitrification calculated using nitrification (cf Tableau 15) as an additional term to the NO_3+NO_2 budget (denitrification-nit).

10^3 kgN d^{-1}	**1993**		**1994**		**1995**		**1996**		**1997**		**1998**		**1999**		**2000**		**2001**		**2002**		**2003**	
	Year	*Sum*	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*	*Year*	*Sum*
Poses	***285***	***136***	***384***	***169***	***424***	***161***	***234***	***110***	***277***	***162***	***344***	***153***	***364***	***139***	***486***	***259***	***488***	***273***	***332***	***135***	***233***	***76***
Eure R.	*18*	*12*	27	21	26	21	17	12	19	15	23	17	*24*	*15*	*29*	*20*	*29*	*20*	*23*	*15*	*19*	*13*
Lat. inputs	*36*	*36*	*36*	*36*	22	22	22	22	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Total inputs	**340**	**184**	**448**	**226**	**472**	**204**	**273**	**144**	**316**	**198**	**387**	**190**	**408**	**175**	**535**	**299**	**537**	**314**	**375**	**171**	**272**	**109**
Output (Caudebec)	**282**	**153**	**396**	**165**	**361**	**163**	**194**	**110**	**215**	**159**	**346**	**155**	**334**	**128**	**411**	**248**	**462**	**265**	**340**	**142**	**243**	**82**
Denitrification	**-58**	**-31**	**-52**	**-61**	**-111**	**-41**	**-79**	**-34**	**-101**	**-39**	**-41**	**-35**	**-74**	**-47**	**-124**	**-51**	**-75**	**-49**	**-35**	**-29**	**-29**	**-27**
Denitrification-nit	*-60*	*-32*	*-69*	*-66*	*-111*	*-41*	*-79*	*-33*	*-101*	*-38*	*-40*	*-36*	*-75*	*-48*	*-124*	*-51*	*-77*	*-50*	*-36*	*-30*	*-29*	*-29*

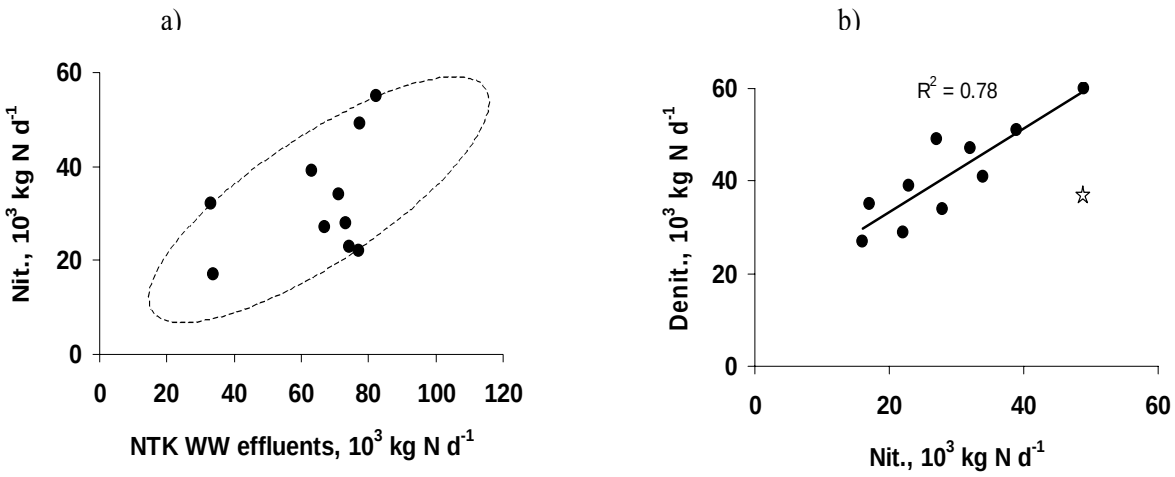


Figure 50. a) Relationships between averaged summer values of nitrification (103 kgN d-1) and nitrogen load from the Achères effluents (103 kgN d-1). b) Relationships between averaged summer values of denitrification (103 kgN d-1) and nitrification fluxes (103 kgN d-1).

3.3.5 Nitrous oxide fluxes in the Seine freshwater estuary

For the mean atmospheric N_2O concentration of 0.31 ppm, the equilibrium concentration in freshwater is between 0.48 and 0.24 µgN-$N_2O.L^{-1}$ in the temperature range from 0 to 20°C (Weiss and Price, 1980). Observed dissolved N_2O concentrations are always above these values, indicating over-saturation, hence emission of nitrous oxide from the water column to the atmosphere across the air-water interface. To calculate the magnitude of this emission flux (in terms of mgN-$N_2O.m^{-2}$.h), the difference between the measured N_2O concentration and the saturation value has to be multiplied by the gas transfer velocity, estimated between 0.04-0.06 $m.h^{-1}$ (see above, Material and Method section).

Summer N_2O emission to the atmosphere (kg N d^{-1}) for the estuarine sector (Poses-Caudebec, km 202-310, representing a surface of 16 km²) was calculated from the concentrations measured in the water at the 8 stations sampled at 2-3 occasions during summer (see Figure 43 and Tableau 17). The variations were small for the studied period (1997-2003), averaging 2.7 mg N m^{-2} d^{-1} (1.5-3.5 mg N m^{-2} d^{-1} taking into account a wider range of 0.03-0.07 $m.h^{-1}$ for the gas transfer velocity as proposed by Raymond & Cole, 2001), i.e. 38 kg N d^{-1} for the whole estuarine sector area (24-57 kg N d^{-1}) (Tableau 17).

Tableau 17. N_2O emission (kgN d-1) within the freshwater Seine estuary (Poses-Caudebec: km 202-310) from 1997 to 2003, given as averaged summer values. See text for estimates. Emissions are within the downstream lower Seine sector, from downstream of the Paris effluent outlet to Poses (km 50-202), and the Seine upstream ofthe effluent outlet (km 0-50) are given for comparison.

kg N d^{-1}	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
estuary	**41**	**40**	**34**		**39**	**43**	**30**
Downstream of the effluents	*52*	*73*	*88*		*59*	*102*	*52*
Upstream of the effluents	*5*	*8*	*14*		*5*	*10*	*28*
total	**99**	**121**	**136**		**103**	**156**	**111**

These summer N_2O emission rates can be compared with our estimates of either nitrification or denitrification rates during the same periods (Tableau 15 and Tableau 16). The N_2O emission to denitrification ratio is around $1^0/_{00}$ (0.7- 1.1 $^0/_{00}$). The N_2O emission to nitrification ratio is around 1.5 $^0/_{00}$ (0.5-2.3 $^0/_{00}$). For comparison N_2O emission values expressed per m^{-2} are in average 2.2 mg N m^{-2} d^{-1} (1.8-4.1 mg N m^{-2} d^{-1}) in the lower fluvial Seine sector (km 50-202) and 1.2 mg N m^{-2} d^{-1} (1.0-2.4 mg N m^{-2} d^{-1}) in the river upstream of the Paris WWTPs (km 0-50), the range of the estimates being calculated following Raymond & Cole's gas transfer velocity values (2001). This pattern, i.e. maximum summer values increasing from upstream to downstream, was confirmed by the annual variations in N_2O concentrations at various stations along the Seine river continuum (Figure 51).

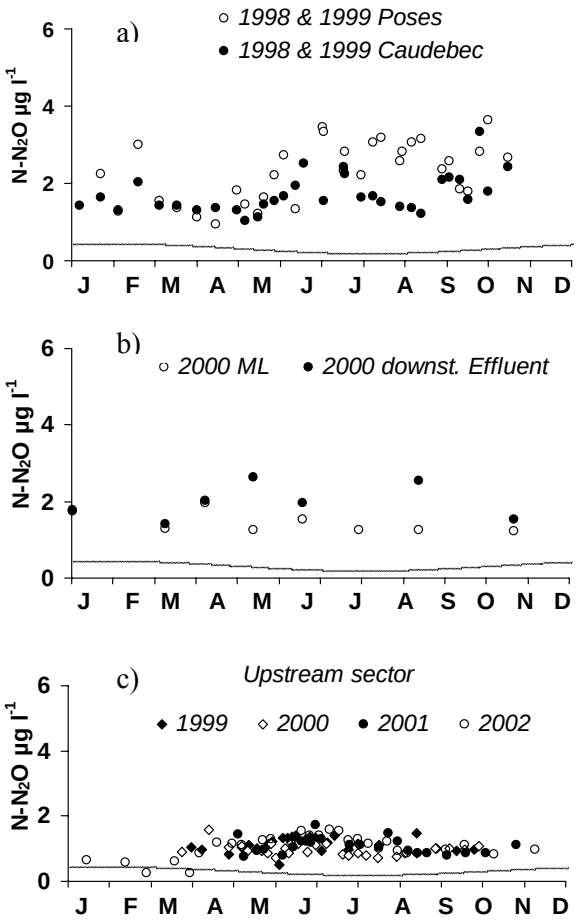


Figure 51. Annual variations of the nitrous oxide concentration (µg N-N_2O l-1) a) at Poses and Caudebec, the in- and outlet of the freshwater estuary. Seasonal variations of values b) upstream (ML: Maisons Laffitte) and downstream of the effluents, and c) in the Marne sub-basin, are shown for comparison. The line of the variation in N_2O concentrations at saturation is drawn according to Weiss & Price (1980), taking into account the temperature.

3.4 Discussion

3.4.1 Improvement of the oxygenation conditions in the lower Seine River and and the tidal estuary.

A continuous improvement of wastewater treatment was observed over a much longer period than the one analysed in this paper (see Billen et al. 2001 for a 50-year reconstruction of the Seine ecological functioning). All the Parisian domestic wastewater was collected and transferred to the Achères WWTP from 1973, but during the period 1973-1978, incomplete BOD_5 treatment (and suspended matter, data not shown) led to a strong oxygen deficit immediately downstream the effluent outlet (km 80), whereas high NH_4^+ load discharged by the effluents were far from completely nitrified in the freshwater estuary, due to oxygen limitation (at around km 300). Improvement of wastewater treatment, involving first organic matter treatment, then reduction of the ammonium loading from the Achères WWTP, considerably reduced the oxygen deficit. For the two recent periods (1993-1997 and 1998-2003), the improvement averages 1 mg O_2 l^{-1} all along the longitudinal profile.

Given the already observed improvement in oxygenation, and the implementation of a planned tertiary treatment of all the effluents from Paris and its suburbs, we can expect a summer recovery of the oxygenation all along the upstream-downstream continuum which would attenuate the river discontinuity, linked to the discharge of the Paris effluents.

3.4.2 Budget of nitrification, denitrification and nitrous oxide emission in the tidal estuary

Whereas the results of chemical analyses show a variation of less than 5 % on nutrient values, estimates of the water flux vary within about 5 % to 15 %. Regarding the lateral input (treated domestic effluents) along the sector, a range of 10 to 15 % also seems reasonable. Overall, the budget of nitrification and denitrification are given with a maximum variation of 30 %. For the nitrous oxide emission, the range of gas transfer velocity values leads to a variation of 50 %. Year-to-year changes should be interpreted with this limitation in mind.

The budget calculations carried out in the freshwater tidal estuarine sector showed that nitrification and denitrification fluxes are of the same order of magnitude (Tableau 15 & Tableau 16). Nitrification occurred mainly during the three summer months whereas the period of denitrification was longer. Although previous work using natural isotopic composition of nitrate tended to show that no significant denitrification occurred in the water column in this sector (Sébilo, 2003; Sébilo et al, in press), the budget calculations presented in this study reveal the occurrence of significant denitrification. This apparent contradiction can be easily explained if most of the denitrification revealed by our budget occurred in the benthic phase. Indeed, benthic denitrification, as it is controlled by the non-fractionating process of nitrate diffusion into the anoxic sediment layers, does not cause any significant change in the natural isotopic composition of nitrate (Sébilo et al. 2003). Some direct measurements of the benthic nitrate flux through the water sediment interface allowed Chesterikoff et al. (1992) to estimate a benthic denitrification of at least 3 10^3 kgN d^{-1} in the riverine sector downstream of the Achères WWTP outlet.

The positive relationship between the summer level of nitrification and denitrification throughout the 11 years, and the similarity of the absolute values of the corresponding

nitrogen fluxes (Tableau 15 & Tableau 16) should not lead to the conclusion that nitrate produced by nitrification was reduced by denitrification. The relationship should rather be interpreted as the double effect of the improvement of wastewater treatment which simultaneously leaded to better summer conditions of oxygenation and lower organic matter contamination, thus reducing denitrification, while, in parallel, the reduction in ammonium loading results in decreasing nitrification.

N_2O emission fluxes in the freshwater estuary (Tableau 17) amounted to less than 0.1 % of both denitrification and nitrification fluxes, in agreement with the range of percentage obtained in laboratory experiments (Kester *et al.* 1997 ; Cébron et al., 2004), although our estimates refer to net field ratio, which may include the effect of N_2O consumption processes.

3.4.3 Mechanisms and control factors of N_2O emission

N_2O can be produced by nitrification (nitrifier denitrification) in a narrow range of low oxygenation, provided that NO_2^- is available (Ritchie & Nicholas 1972; Goreau et al. 1980; Jorgensen et al. 1984; Bock et al. 1995; Cébron et al., 2004). N_2O is also known as a by-product of denitrification or dissimilatory nitrate reduction (Conrad 1996; Kelso et al. 1997). Which mechanism (nitrification and/or denitrification) is responsible for the N_2O production observed in the lower Seine River and estuary, is a question that requires further investigations.

The present study however reveals a high N_2O production in the lower Seine river and estuary impacted by ammonium effluents. In the Scheldt estuary, where the ammonium contamination is still higher than in the Seine, De Bie et al. (2002) observed an inverse relationship between N_2O and oxygen, similar to the one we found in the Seine estuary (Figure 49). However, N_2O concentrations in the Seine estuary were much lower than those in the Scheldt (3 against 8 µgN l^{-1} respectively at maximum), just as the ammonium concentration that differed in a rather similar ratio (2 against 4 mgN l^{-1} respectively at maximum). This result supports the assumption by Seitzinger & Kroeze (1998), of a direct connection between the input of DIN (Dissolved Inorganic Nitrogen) to rivers and the output of N_2O gas. These results also support the findings by McMahon & Dennehy (1999) on the South Platte River (Colorado) that systems enriched in N by wastewater effluents are an important anthropogenic source of N_2O to the atmosphere. The lower Seine River and estuary, with a concentration above 4 mgN-NO_3^- l^{-1} (300 µM) and a N_2O emission amounting 0.6 gN m^{-2} y^{-1} (0.4-1.0 gN m^{-2} y^{-1}), have values in the higher range of those reported for 7 rivers and estuaries (Cole & Caraco 2001). These emissions to the atmosphere are of the same order of magnitude as the highest N_2O emissions reported for eutrophic lake water (Mengis et al. 1996).

Both nitrite and nitrous oxide concentrations in the water clearly depend on the oxygenation level, values increasing with decreasing oxygen concentration (see Figure 49). N_2O concentrations apparently increase less than those of NO_2^-, probably due to its escape to the atmosphere when the water is supersaturated. However, a scatter of data points demonstrated the complexity of the factors controlling NO_2^- and N_2O in the water. Because concentrations in the treated effluents were low (0 to 1 µg l^{-1} N-N_2O), the N_2O present in the river was necessarily produced *in situ*. A fraction of the N_2O production might be due to denitrification occurring below the sediment-water interface, or even at microsites in suspended aggregates or fluid mud (Bonin & Raymond 1990; Bianchi et al. 1994; Abril et al. 2000; Middelburg et al. 1995; Bonin et al. 2002).

It is *a priori* surprising to find higher NO_2^- and N_2O concentrations at Poses, the upstream limit of the estuary, than at the downstream limit at Caudebec in similar oxygenation conditions. This may have several explanations. The first one would be ammonium limitation at Caudebec where more intermediate products are consumed than produced whereas at Poses conditions for nitrification were non-limiting. This would argue in favour of nitrification as the predominant mechanism of N_2O emission in the tidal freshwater estuary. Another hypothesis would be a greater accumulation of biodegradable organic matter at Poses, which is the limit between the river and the upstream estuary, where the algal development is generally highest in the summer (Garnier et al. 2001); heterotrophic respiration of organic matter would deplete the oxygen in the bottom sediment layer; in this case, denitrification would be at the origin of the high NO_2^- and N_2O concentrations.

Although nitrification appears to be the dominant process at the origin of the N_2O emissions within the tidal freshwater estuary, denitrification at the anoxic water-sediment interface would be the major source of the N_2O emissions in the river immediately downstream of the effluent outlet. The resulting longitudinal pattern of N_2O concentrations in the lower Seine and the freshwater estuary is therefore a composite one, but the two processes may interfere with each other.

3.4.4 The significance of estuarine N_2O emission

Like many estuarine systems receiving high anthropogenic nutrient inputs, the conditions in the lower Seine River and estuary are ideal both for denitrification at the sediment-water interface and for nitrification in the water column, and consequently likely to contribute significantly to the N_2O emissions to the atmosphere (Bange et al. 1996; De Wilde & De Bie 2000).

According to our estimates, the N_2O emission in the upper Seine estuary amounted to about 40 kg N d^{-1} (Tableau 17). By adding the contributions of the fluvial riverine sectors, upstream and downstream of the Paris effluent discharge, a total emission of 120 kg N-N_2O d^{-1} (90 to 200 kg N-N_2O d^{-1}) was obtained for the investigated fluvial-estuarine continuum. If we extrapolate the observed emission rates, namely 1.2 to 2.2 mg N-N_2O m^{-2} d^{-1} in average, to the whole surface of the Seine drainage network (310 10^6 m², Guerrini et al. 1998) a daily emission rate of 370 to 680 kg N-N_2O is obtained for the whole river system. Direct measurements of N_2O concentrations in small rivers and streams justify this extrapolation: N_2O concentrations remains as high in the head waters as the ones reported for the sector immediately upstream from the Parisian WWTPs (unpublished, seeFigure 51). This would indicate that about 20 –30 % of total N_2O emissions by the whole hydrographic network occur in its fluvial-estuarine part. The presently available set of data does not however allow to estimate the possible role of the processes occurring in the most upstream sectors of the drainage network, including riparian wetlands.

Global climate scenarios consider that the major part of anthropogenic N_2O emissions is related to agricultural activities and represents, on average 1.25 % (range 0.25-2.25 %) of the total nitrogen content of applied organic and mineral fertilizers (IPCC, 2000). Of this, one third is assumed to occur as direct emission from agricultural soil, one third is linked to animal waste management, and one third is due to indirect N_2O emissions through ammonium and nitrate losses (IPCC, 2000). Our data on the Seine can be compared to these general numbers.

The nitrogen fertilizers used in the Seine watershed (75 000 km²) amount to 770 10^6 kgN yr^{-1}, mostly (75 %) of inorganic fertilizers, as animal farming in the Seine basin is

restricted to the peripheral areas. Direct measurements of N_2O emission from representative cultivated soil, fertilized at a rate of 200 $kgN.ha^{-1}.yr^{-1}$, have revealed mean annual emission rates of 0.4-0.8 $kgN\text{-}N_2O.\ ha^{-1}.yr^{-1}$ (data cited by Khalil, 2003; Khalil et al., 2004). This would represent the direct emission from agricultural soils themselves, and falls within the range of 0.2 to 0.4 % of the used fertilizer. One can then propose the range of 1500 - 3000 10^3 $kgN\text{-}N_2O\ yr^{-1}$ (0.2-0.4 % of 770 10^6 $kgN\ yr^{-1}$) for the total direct emission of N_2O from agricultural soils in the Seine watershed. The emission from animal waste management should be much lower because the agriculture in the Seine watershed specializes mostly in cereal and industrial crops. The above estimate of the 'indirect' emission from the river network represents an annual flux of 135-250 $kgN\text{-}N_2O\ yr^{-1}$, i.e. about 10 % of the direct emission from agricultural soils.

Although speculative, these estimations of N_2O production caused by effluents or originating from agriculture are of major interest for managers responsible for the implementation of European Water Directive, the stakes for improving wastewater treatment competing those for changes in agricultural practices.

Acknowledgments

This work was undertaken in the framework of the programmes Seine-Aval, funded by the Région Haute-Normandie and the Agence de l'Eau Seine-Normandie (AESN), and the PIREN-Seine funded by the CNRS and several institutions involved in the water management of the Seine River, including AESN and the Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP). We are grateful to Dr. L.A. Romana, director of the programme Seine-Aval for his helpful questions and suggestions during the study and to the Service de la Navigation de la Seine (SNS), for routine measurements complementary to those we gathered during the study. Mr André Ficht (from the SNS) is particularly acknowledged for his help in the field. We thank Dr. Jack Middelburg for his useful comments and questions that helped to improve the earlier versions of this paper. Two other anonymous reviewers are also acknowledged.

3.5 References

Abril G, Riou SA, Etcheber H, Frankinioulle M, De Witt R & Middelburg JJ (2000). Transient, tidal time-scale, nitrogen transformations in an estuarine turbidity maximum-fluid mud system (The Gironde, South West France). Estuar. Coast. Schelf. Sci., 50: 703-715

Anderson IC & Levine JS (1986) Relative rates of nitric oxide and nitrous oxide production by nitrifiers, denitrifiers and nitrate respirers. Appl. Environ. Microb., 51:938-945

Bange WH, Rapsomanikis S & Andreae MO (1996) Nitrous oxide in coastal waters. Global Biogeochemical Cycles, 10: 197-207

Bange WH (2000) It's not a gas. Nature, 408:301-302

Bianchi M, Bonin P & Feliatra (1994) Bacterial nitrification and denitrification rates in the Rhône River Plume (Northwestern Mediterranean Sea). Mar. Ecol. Prog. Ser., 103:197-202

Billen G & Garnier J (1999) Nitrogen transfers through the Seine drainage network: a budget based on the application of the Riverstrahler model. Hydrobiologia, 410: 139-150

Billen G, Garnier J, Ficht A & Cun C (2001) Modelling the response of water quality in the Seine Estuary to human activity in its watershed over the last 50 years. Estuaries, 24(6): 977-993

Bock E, Schmidt I, Stüven R & Zart D (1995) Nitrogen loss caused by denitrifying Nitrosomonas cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. Arch. Microbiol. 163: 16-20

Bonin P & Raymond N (1990) Effect of oxygen on denitrification in marine sediment. Hydrobiologia, 207: 115-122

Bonin P, Tamburini Ch, Michotey V (2001) Determination of the bacterial processes which are sources of nitrous oxide production in marine samples. Water Research, 0: 1-11

Bouwman AF (1996) Direct emission of nitrous oxide from agricultural soils. Nutr. Cycling Agroecosyst., 46: 53-70

Bouwman AF, Fung I, Matthews E & John J (1993) Global analysis of the potential for N_2O production in natural soils. Global Biogeochem. Cycles, 7: 557-597

Bouwman AF, Boumans JM, Batjes NH (2002) Emissions of N_2O and NO from fertilied fields: Summary of available measurement data. Global Biogeochem. Cycles, 16(4): 6/1-6/12

Brion N & Billen G (1998) Une réévaluation de la méthode d'incorporation de 14HCO3- pour mesurer la nitrification autotrophe et son application pour estimer des biomasses de bactéries nitrifiantes. Rev.. Sci. Eau, 11 : 283-302

Brion N, Billen G, Guézennec L & Ficht A (2000) Distribution of nitrifying activity in the Seine river (France) from Paris to the estuary. Estuaries, 23:669-682

Cébron A, Berthe T & Garnier J (2003) Nitrification and nitrifying bacteria in the lower Seine River and estuary. Applied Envir. Microb., 69: 7091-7100

Cébron A, Coci M, Garnier J & Laanbroek HJ (2004) DGGE analysis of the Ammonia Oxidizing Bacterial Community structure in the lower Seine River: impact of the Paris wastewater effluents. Applied Envir. Microb. (in press)

Chesterikoff A, Garban B, Billen G & Poulin M. (1992) Inorganic nitrogen dynamics in the River Seine downstream from Paris. Biogeochemistry, 17: 147-164

Cole JJ & Caraco NF (2001) Emissions of nitrous oxide (N_20) from tidal, freshwater river, the Hudson River, New York. Environ. Sci. Tech., 35:991-995

Conrad R (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H_2, CO, CH_4, OCS, N_2O and NO). Microbiol. Rev., 60: 609-640

Crutzen PJ & Ehhalt DH (1977) Effects of nitrogen fertilizers and combustion on the stratospheric ozone layer. Ambio, 6: 112-117

De Bie MJM, Middelburg JJ, Starink M & Laanbroek HJ (2002) Factors controlling nitrous oxide at the microbial community and estuarine scale. Mar. Ecol. Prog. Ser., 240:1-9

De Wilde HPJ & De Bie (2000) Nitrous oxide in the Scheldt estuary: production by nitrification and emission to the atmosphere. Mar. Chem., 69: 203-216.

Dong LF, Nedwell DB, Underwood GJC, Thornton DCO & Rusmana I (2002) Nitrous oxide formation in the Colne estuary, England: the central role of nitrite. Appl. Environ. Microbiol., 40: 526-532.

Garcia-Ruiz R, Pattinson SN & Whitton BA (1998) Kinetic parameters of denitrification in a river continuum. Appl. Environ. Microb., 64: 2533-2538.

Garnier J, Servais P & Billen G (1991) Bacterioplankton in the Seine River: impact of the parisian urban effluents. Can. J. Microbiol., 38: 56-64

Garnier J, Billen G & Servais S (1992) Physiological characteristics and ecological role of small and large sized bacteria in a polluted river (Seine river, France). Archiv. Hydrobiol. Ergebn. Limnol. 37:83-94

Garnier J, Billen G & Coste M (1995) Seasonal succession of diatoms and Chlorophyceae in the drainage network of the river Seine: Observations and modelling. Limnol. Oceanogr. 40: 750-765

Garnier J, Servais P, Billen G, Akopian M & Brion N (2001) The oxygen budget in the Seine estuary: balance between photosynthesis and degradation of organic matter. Estuaries 24(6) : 964-977

Goreau TJ, Kaplan WA, Wofsy SC, McElroy MB, Valois FW, Watson SW (1980) Production of nitrite and N_2O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen. Appl. Environ. Microbiol. 40:526-532.

Guerrini M-C, Mouchel J-M, Meybeck M, Penven M J, Hubert G & Muxard T (1998) Le bassin de la Seine : la confrontation du rural et de l'urbain. Chapitre 1. In: *La Seine en son bassin. Fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé* (Meybeck M., De Marsily G & Fustec F. eds). Elsevier, Paris. p 29-75

Houghton JT, Meira Filho LG, Callander BA Harris N, Kattenberg A & Maskell K (Eds) (1996) Climate change 1995. The Science of Published for Intergouvernmental panel on climate change, Cambridge Univ. Press. pp 1-572)

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2000) Special report on Emissions Scenarios. Cambridge Univ. Press, 599 pp

Jones MN (1984) Nitrate reduction by shaking with cadmium, alternative to cadmium columns. Water Res. 18: 643-646

Jorgensen KS, Jensen HB & Sorensen J (1984) Nitrous oxide production from nitrification and denitrification in marine sediment at low oxygen concentration. Can. J. Microbiol., 30: 1073-1078

Kelso BHL, Smith RV, Laughtlin RJ & Lennox D (1997) Dissimilatory nitrate reduction in anaerobic sediments leading to nitrite accumulation. Appl. Environ. Microb., 63 : 4679-4685

Khalil K (2003) Emissions de N2O par nitrification et dénitrification à l'échelle de la motte de sol: effet de la structure du sol, de l'aération et des activités microbiennes. Ph-D Univ. Pierre & Marie Curie, 223 pp

Law CS, Rees AP & Owens NJP (1992) Nitrous oxide: Estuarine Sources and atmospheric flux. Estuar. Coast. Shelf Sci., 35: 301-314

Mengis M, Gächter R & Wehrli B (1996) Nitrous oxide emissions to the atmosphere from artificially oxygenated lake. Limnol. Oceanogr., 41: 548-553

Meybeck M, Mouchel J-M, Idlafkih Z, Andréassian V & Thibert S (1998) Transfert d'eau, de matière dissoute et particulaire dans le réseau fluvial. Chapitre 8. In: *La Seine en son bassin. Fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé* (Meybeck M., De Marsily G & Fustec F. eds). Elsevier, Paris. pp 345-387

Middelburg JJ, Klaver G, Nieuwenhuize J, Markusse RM, Vlug T & Van der Nat FJWA (1995) Nitrous oxide emissions from estuarine interdidal sediment. Hydrobiologia, 311: 43-55

Miller LG, Coutlakis MD, Oremland RS & Ward BB (1993) Selective inhibition of ammonium oxidation and nitrification-linked N_2O formation by methyl fluoride and dimethyl ether. Appl. Environ. Microb., 59 : 2457-2464

McMahon PB & Dennehy KF (1999) N2O emissions from a Nitrogen-enriched River. Environ. Sci. Technol, 32: 21-25.

Némery J, Garnier J & Morel C (2004) Phosphorus budget in the Marne watershed (France): urban *vs*. diffuse sources, dissolved *vs.* particulate forms. Biogeochemistry (in press)

Nevison CD, Weiss RF & Erickson DJ (1995) Global oceanic emissions of nitrous oxide. J. Geophysical Res. 100: 809-820

Rasmussen RA & Khalil MAJ (1986) Atmospheric trace gases : trends and distribution over the last decade. Science, 232: 1623-1624

Ritchie G A & Nicholas D J (1972) Identification of the sources of nitrous oxide produced by oxidative and reductive processes in *Nitrosomonas europaea*. Biochem J. **126:** 1181-1191

Rodier J (1984) L'analyse de l'eau. 7ème édition. Dunod, Paris (Ed). 1365 pp

Sebilo M (2003) Utilisation du traçage isotopique naturel pour caractériser et quantifier les processus de nitrification et dénitrification à l'échelle du réseau hydrographique de la Seine. Thèse Doct. Univ. Paris 6, 124pp

Sebilo M, Billen G, Grably M & Mariotti A (2003) Isotopic composition of nitrate-nitrogen as a marker of riparian and benthic denitrification at the scale of the whole Seine River system. Biogeochemistry, 63: 35-51

Seitzinger SP & Kroeze C (1998) Global distribution of nitrous oxide production and N inputs in freshwater and coastal ecosystems. Global Biochem. Cycles, 12: 93-113

Servais P & Garnier J (1993) Contribution of heterotrophic bacterial production to the carbon budget of the River Seine (France). Microb. Ecol., 25:19-33

Slavyck G & McIsaac J J (1972) Comparison of two automated ammonium methods in a region of coastal upwelling. Deep Sea Res. 19: 1-4

Thibodeaux L, Poulin M & Even S (1994) A model for enhanced aeration of streams by motor vessels with application to the river Seine. Journal of Hazardous Materials. 37: 459-473

Verhof FH, Yacksich SM & Melfi DA (1980) River nutrient and chemical transport estimates. J. Environ. Engng. Div., ASCE. 10 : 591-608

Walling DE & Webb W (1985) Estimating the discharge of contaminants to coastal waters by rivers: some cautionary comments. Mar. Poll. Bull.16: 488-492

Weiss R.F & Price BA (1980) Nitrous oxide solubility in water and seawater. Marine Chemistry, 8: 347-359

Whittaker RH & Likens GE (1975) The biosphere and man. In : Lieth H & Whittaker RH (Eds). Primary production of the Biosphere. Springer-Verlag, Berlin, pp. 305-328

Avant –propos

L'analyse de la littérature montre que le processus de nitrification est susceptible de produire du N_2O dans certaines conditions de stress oxique (Goreau et al., 1980 ; Poth & Focht, 1985). Nous avons donc ici cherché la gamme d'oxygénation favorable à la production de N_2O. Dans cette gamme nous avons ensuite déterminé, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs, les différents processus responsables de cette importante production d'oxyde nitreux. Nous avons également quantitifié ces émissions en fonction des charges en ammonium traitées, afin d'estimer un taux d'émission journalier au niveau des stations d'épuration urbaine, et plus spécifiquement de Seine Amont, lors de la nitrification.

Chapitre 4
-
Nitrous oxide emissions from secondary activated sludge in nitrifying conditions of urban wastewater treatment plants: effect of oxygenation level

Gaëlle Tallec[1,2], Josette Garnier[2], Gilles Billen[2] and Michel Gousailles[1]

[1]*SIAAP / DRD, 82, Av. Kléber, 92700 Colombes, France.*
[2]*UMR Sisyphe 7619, Fonctionnement des Hydrosystèmes, Université P . & M. Curie-CNRS, Boite 105, Tour 56, Etage 5, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France*

Submitted to *Water Research.*

Abstract

In order to better understand the mechanisms of N_2O emissions from nitrifying activated sludge of urban WWTPs, sludge from the Valenton plant (Paris conurbation) was subjected to lab-scale batch experiments under various conditions of oxygenation.
The results show that the highest N_2O emissions (7.1 µgN-N_2O. g SS.$^{-1}$ h.$^{-1}$ in average) occur at a dissolved oxygen concentration of around 1 mg O_2. L^{-1}. These high emisssions at low oxygenation (from 0.1 to 2 mg O_2. L^{-1}) are due to two processes : autotrophic nitrifier denitrification and heterotrophic denitrification. Nitrifier denitrification always dominates, representing from 58 % to 83 % of the N_2O production. This N_2O production originating from nitrifying activated sludge becomes 8 times higher when nitrite is added at a DO of 1 mg O_2. L^{-1}; a decrease is observed both at higher and lower oxygenation. Heterotrophic denitrification represents less than 50 % of the N_2O production, decreasing from 42 % to 17 % when oxygenation increases from 0.1 to 2 mg O_2. L^{-1}.

We have shown that ammonium oxidising bacteria (AOB) can shift to nitrifier denitrification when oxygen is depleted in the environments including in the WWTPs, nitrite then plays the role of oxygen as the final electron acceptor. As opposed to what happens in nitrification, the end products of nitrifier denitrification are gaseous forms of nitrogen, where N_2O is not negligible compared to N_2. Overall, N_2O emissions represent 0.1 to 0.4 % of oxidized NH_4^+, depending on the oxygenation level. N_2O emissions would range from 0.11 to 0.42 T N- N_2O. day^{-1} for a tertiary treatment of the Paris wastewater effluents, consisting exclusively of activated sludge nitrification.

Key words: wastewater treatment plant, activated sludge, N_2O emission, nitrification.

4.1 Introduction

Nitrous oxide (N_2O) is a greenhouse gas with a serious impact on the environment. Its 100-year global warming potential is about 320 times stronger than that of carbon dioxide (CO_2). It has a lifetime of approximately 120 years (IPCC, 2000). The major sink for N_2O is the stratospheric reaction with atomic oxygen into nitric oxide (NO). The resultant NO induces the destruction of stratospheric ozone (Bliefert et al., 2001).

A significant part of the global N_2O emission can be attributed to microbial processes, especially nitrification and denitrification (Bliefert and Perraud., 2001). The framework of the European directive 91 / 271 includes plans for tertiary wastewater treatment (nitrogen removal) in 2005-2007 in WWTPs of cities with more than 2000 inhabitant equivalents, as well as in sensitive areas. A major danger is that N_2O emissions will be increased by moving them from natural environments to WWTPs (Itokawa et al., 2001; Garnier et al., 2005). Further research is therefore needed not only to quantify the emission in natural environments (IPCC, 2000), but also to investigate the mechanism of N_2O production during nitrogen removal from wastewater (Hanaki et al., 1992; Zheng et al., 1994; Itokawa et al., 2001; Cébron et al., 2005).

Nitrification is the oxidation of NH_4^+ to NO_3^- via NO_2^-. These reactions are produced by two groups of microorganisms, the first step to NO_2^- by ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and the second step by nitrite-oxidizing bacteria (NOB), (Bock et al., 1986 ; Bock et al., 1992). The first step is catalyzed by ammonia mono-oxygenase where NH_4^+ is oxidized to hydroxylamine (NH_2OH) with the reduction of one of the atoms of O_2 (Wood, 1986; Mc Tavish et al., 1993). NH_2OH is an intermediate, which is oxidized into NO_2^-, by the hydroxylamine oxido-reductase (Wood, 1986; Sayavedra-Soto et al., 1994). The second step is catalyzed by nitrite oxido-reductase without detectable intermediate (Bock et al., 1986 ; Bock et al., 1992). Chemical decomposition of intermediates would also produce N_2O through: i) NH_4^+ oxidation into NO_2^- such as NH_2OH or NO_2^- (Chalk and Smith, 1983), or ii) incomplete oxidation of NH_2OH (Hooper and Terry, 1979). However Yoshinari (1990) reported that this chemical production of N_2O occurs only in the presence of relatively high NO_2^- concentrations (>1mM), not commonly found in natural environments, and scarcely in activated sludge.

Besides nitrification, N_2O is well-known to be an intermediate of denitrification (D), released in high quantities under low oxygen conditions with sufficient NO_3^- and biodegradable organic carbon (Gaskell et al., 1981, Itokawa et al., 2001; Bonin et al., 2002). Note that denitrifiers can use NO_2^- or NO_3^- produced during nitrification. This coupling of nitrification and denitrification can occur when the conditions are favourable for both processes, especially in aggregates such as activated sludge (Okabe et al., 1999; Zeng et al., 2003). Furthermore, denitrifying bacteria can denitrify in aerobic conditions (Krul and Veemingen, 1977; Robertson and Kuenen, 1984; Davies, 1989).

Finally, N_2O can be produced by nitrifier denitrification (ND) where the oxidation of NH_4^+ into NO_2^- is followed by the reduction of NO_2^- to N_2O and N_2 (Bock et al., 1995; Kuai and Verstraete, 1998; Jiang and Bakken., 1999; Itokawa et al., 2001). This sequence of reactions is carried out by only one group of bacteria, namely autotrophic ammonium oxidizers, AOB (Wrage et al., 2001). AOB utilize oxygen for two separate functions: i) as a

substrate for NH_4^+ oxidation into hydroxylamine and ii) as a terminal electron acceptor in the electron transport chain (Shrestha et al., 2002).

At present, there is no known substitute for the first function, while in weak oxygenation conditions, nitrite can assume the role of oxygen, as final electron acceptor (Casciotti and Ward, 2001).

As a whole, N_2O production is closely correlated to nitrite accumulation (Burgess et al., 2002) and enhanced by optimal growth conditions of pH (7.2), temperature (26°C) and especially low oxygenation (Hynes and Knowles, 1984; Kuai and Verstraete, 1998; Jiang and Bakken 1999; Béline et al. 2001). In urban wastewater treatment plants, nitrogen removal is carried out at low oxygenation to reduce cost, i.e. in conditions favourable to N_2O production.

The aim of this paper is to quantify N_2O produced by nitrifying biofilms at a WWTP in the Paris urban area (Valenton WWTP, tertiary treatment). Whereas the amount of wastewater treated at the Valenton WWTP is set to increase from 0.3 to 0.6 10^6 m^3. day^{-1} by the end of 2005, a major proportion of the Paris wastewater (1.7 10^6 m^3. day^{-1}), presently undergoing a secondary treatment by high loading activated sludge (Achères WWTP), will be subjected to a nitrifying process as early as 2007. The planned change demands greater knowledge of the processes responsible for N_2O emissions, caused by the nitrogen removal.

In this study, an approach using a bioreactor was chosen to investigate oxide nitrous emissions from a nitrifying biofilm in an urban WWTP. We measured NH_4^+ oxidation rates and NO_3^-, NO_2^-, N_2O appearance rates to identify the process at the origin of N_2O emissions in the bioreactor, in the presence or absence of inhibitors. An attempt was also made to relate nitrification rates and N_2O emissions to dissolved oxygen concentrations, a controlling factor affecting the treatment cost. A final objective is to estimate the amount of additional N_2O that might be produced by the WWTPs newly equipped to remove nitrogen.

4.2 Material and methods

4.2.1 Treatment plant

One of the four WWTPs of the Paris conurbation, Valenton I (east of Paris), presently treats 0.3 10^6 m^3.day^{-1} of wastewater by a secondary activated-sludge process. Settled water is introduced at the head of two cylindrical concentric biological tanks, first into a central anoxic zone (5000 m^3), then into an external aerobic zone (25 000 m^3) (Figure 52). Only activated sludge extracted from the clarification tank brings nitrate into the anoxic zone and Valenton I has a removal rate of 50 % for nitrate and of 90 % for Total Kjeldahl Nitrogen (TKN).

Our study site, the aerated tank of Valenton I, provides a low loading treatment (0.12 Kg BOD_5. kg SS^{-1}.day^{-1}), with a hydraulic retention time (HRT) of more than 9 hours. The sludge retention time (SRT) in the aerated and non-aerated tanks is more than 10 days.

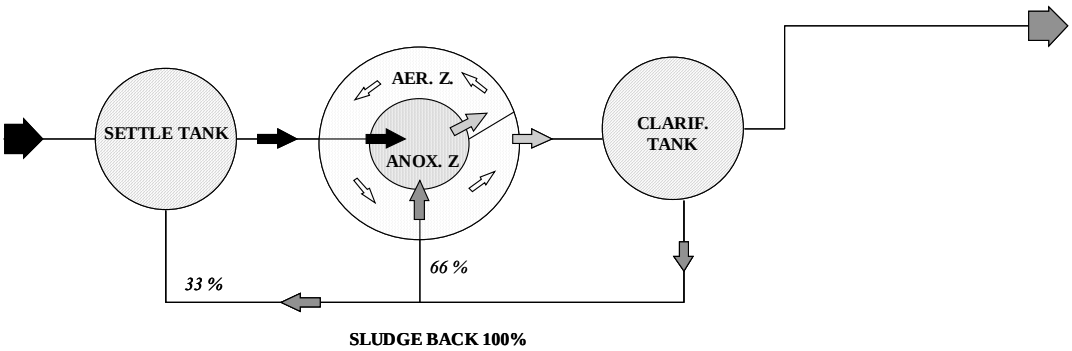


Figure 52. Biological treatment in a WWTP of the Paris conurbation, Valenton I (east of Paris). The steps of the treatment and the circulation of the sludge and water (in percentage) are indicated. AER. Z.: aerobic zone; ANOX. Z. : anoxic zone. CLARIF. TANK : clarification tank.

4.2.2 Lab-scale reactor and batch experiments

A laboratory-scale bioreactor, with a 3 L.-capacity, was filled with 900 ml of activated sludge and 1.4 litres of clarified water (Figure 53). Activated sludge in nitrifying conditions, was taken from an aerated tank at Valenton I. The clarified water used in the reactor was collected from the secondary activated sludge treatment of an urban WWTP (Achères, West of Paris), similar to the clarified water feeding the aerated tank at Valenton I. Typically, the clarified water contained 31 mg SS. L^{-1}, 22 mg. L^{-1} of organic matter, 52 mg. L^{-1} of Total Kjeldahl Nitrogen (N-TKN), 36 mg. L^{-1} of $N\text{-}NH_4^+$, 0 mg. L^{-1} of $N\text{-}NO_2^-$, 0 mg. L^{-1} of $N\text{-}NO_3^-$, 108 mg. L^{-1} O_2 of Chemical Oxygen Demand (COD), 378 mg. L^{-1} of $CaCO_3$ and the pH was 7.8.

In the reactor, the contact time between the clarified water and the sludge was 5 hours. Influent air flow was 0.156 L. min^{-1} (9.36 L. $h.^{-1}$). Aeration occurs through a thin airlock, with two diffusers to ensure better oxygen distribution. The mixed liquor was stirred to maintain the particles in suspension.

A N_2 and pure O_2 gaseous mixture, controlled by a calibrated meter flow, maintained a constant influent gas flow for various dissolved oxygen concentrations (DO) in the reactor. In the hermetically closed reactor, the gaseous N_2O flux was measured continuously.

With the same sludge and settled water, both taken at day j, three batch culture experiments were made. For each experimental condition, the reactor was filled (sludge + water) on day j and refilled on j+1 and j+2; every day a different prescribed dissolved oxygen level (between 0.1 and 6.2 mg O_2. L^{-1}) was tested. The same sludge and settled water were thus stored during the three days of the experiment at maximum 4 °C. Several experimental series were run, new sludge and clarified water were collected for each one of the three batch culture experiments, i.e. three different prescribed oxygen levels.

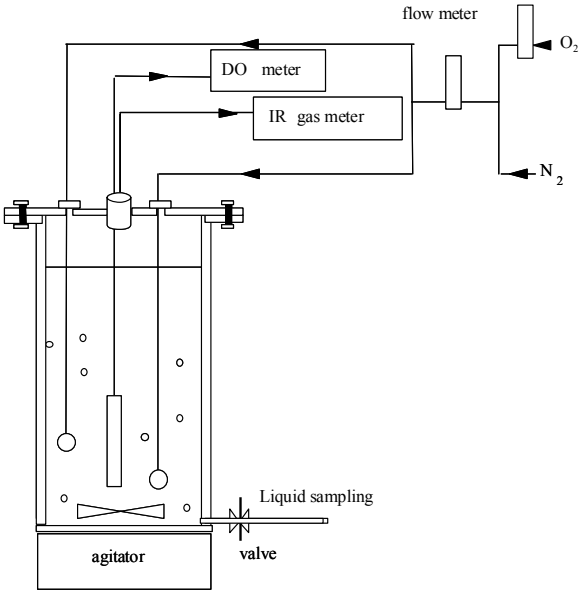


Figure 53. Description of the lab- scale reactor. The mixed liquor (sludge + settled water) is shaken continuously. Gas circulation is completely hermetic and controlled.

4.2.3 Sampling and analyses

Before starting a batch experiment, the suspended solids (SS.), endogen oxygen uptake rate (O.U.R.e.) and occasionally, the exogenous oxygen uptake rate (O.U.R.ex.) were measured in the activated sludge.

The SS. was weighed after centrifugation and 24 hrs of drying at 105°C. The average was 2.6 ± 7 % g. L^{-1} in the activated sludge and 0.9 ± 7 % g. L^{-1} in the reactor after dilution with the clarified water.

The O.U.R. was measured by respirometry, based on oxygen consumption. O.U.R.e, *i.e.* dissolved oxygen consumption, was determined after a period of aeration in order to reach the endogenous condition (without any trace of available ammonium). O.U.R.ex was measured in a second step after the addition of a substrate (NH_4Cl). The average O.U.R.e and O.U.R.ex of the activated sludge was respectively 5.6 ± 11 % and 13.5 ± 19 % mg. O_2 g SS. $^{-1}$. $h.^{-1}$.

For each batch experiment, nitrogen forms (NH_4^+, NO_3^-, and NO_2^-) were sampled every 30 minutes. Filtered samples (Gelman glass acrodisc®) were stabilized by 0.5 µl of mercuric chloride (final concentration: 1.5 mg.L^{-1}) and 0.5 µl of sulphuric acid (final concentration : 0.5 mg.L^{-1}) and kept one night at 4 °C until analysed by a continuous-flow automatic system (Skalar) using standard methods: AFNOR NF Iso 11732 08/1997 for ammonium ions, NF Iso 13395 10/1996 for nitrate and nitrite ions.

During each experiment, gaseous N_2O flux was continuously analysed (every minute), by an I. R. analyser (Infra Red, URAS 14 Advance Optima, Hartmann & Braun). Dissolved oxygen was measured in the mixed liquor (every minute) with an oxygen probe (WTW Oxi 330 oxymeter). To ensure optimal nitrifying activity, the temperature and pH were regularly measured and kept at 26 °C and 6.5 - 7.5 respectively.

4.2.4 Batch experiments using inhibitors and nitrite addition

The use of inhibitors can help to determine the magnitude of the various processes at the origin of nitrous oxide production within a range of oxygen conditions. To differentiate between the role of autotrophic and heterotrophic processes, we need the amount of i) N_2O produced by autotrophic and heterotrophic bacteria (using incubation without inhibitor), and that of ii) the N_2O produced by heterotrophic bacteria only (using incubation with specific nitrification inhibitors). Several inhibitors of the first step of nitrification are used such as N-serve (Powell and Prosser, 1986; Henriksen et al., 1981; Hall, 1984), allylthiourea (Hall, 1984; Bianchi et al., 1994) or acetylene (Caffrey and Miller, 1995; Bonin et al., 2002). The most efficient inhibitor of the second step of nitrification catalyzed by nitrite oxido-reductase is chlorate (Bianchi et al., 1994; Brion and Billen, 1998; Haider et al., 2003). Due to its carcinogenicity, N-serve is now banned and, our experimentation conditions in a continuous gaseous flow with pure oxygen, did not permit the use of acetylene. We therefore used allylthiourea (ATU) and chlorate ($NaClO_3$) as specific nitrification inhibitors.

In any batch experiment using inhibitors, ATU and $NaClO_3$ were added to a final concentration of respectively 5-10 mg. L^{-1} (Haider et al, 2003) and 1g. L^{-1} (Brion and Billen, 1998) at the start of the experiment. Simultaneously, a nitrite solution was added up to a final concentration of 10 mg. L^{-1}, except in the control.

For each tested dissolved oxygen concentration (DO), three batches were made, (1) without nitrite or inhibitor addition, (2) with nitrite addition, and (3) with nitrification inhibitors and nitrite (Figure 54).

This experimental approach accompanied by the following treatments showed: i) the effect of nitrite by the difference between the N_2O produced by nitrifier denitrification (ND) and denitrification (D) without (1) and with added nitrite (2); ii) by adding nitrite and an inhibitor it was possible to distinguish and quantify, the N_2O produced by D only (3) from the N_2O produced by ND + D (2). The calculations can be summarized as following:

- *Ammonification rate(A) = N-NH_4^+ appearance(3);*
- *NH_4^+ consumption rate = NH_4^+ disappearance rate(2) + A;*
- *NO_2^- consumption rate by D = NO_2^- disappearance rate (3);*
- *NO_2^- consumption rate by ND = (NO_2^- disappearance rate (2) - NO_2^- disappearance rate (3)) + (NH_4^+ consumption rate – NO_3^- appearance rate (2));*
- *N_2O produced by D = N_2O emissions rate (3);*
- *N_2O produced by ND= N_2O emissions rate (2) - N_2O emissions rate (3);*
- *N_2 produced by D = NO_2^- consumption rate by D - N_2O emissions rate (3);*
- *N_2 produced by ND = NO_2^- consumption rate by ND - N_2O produced by ND.*

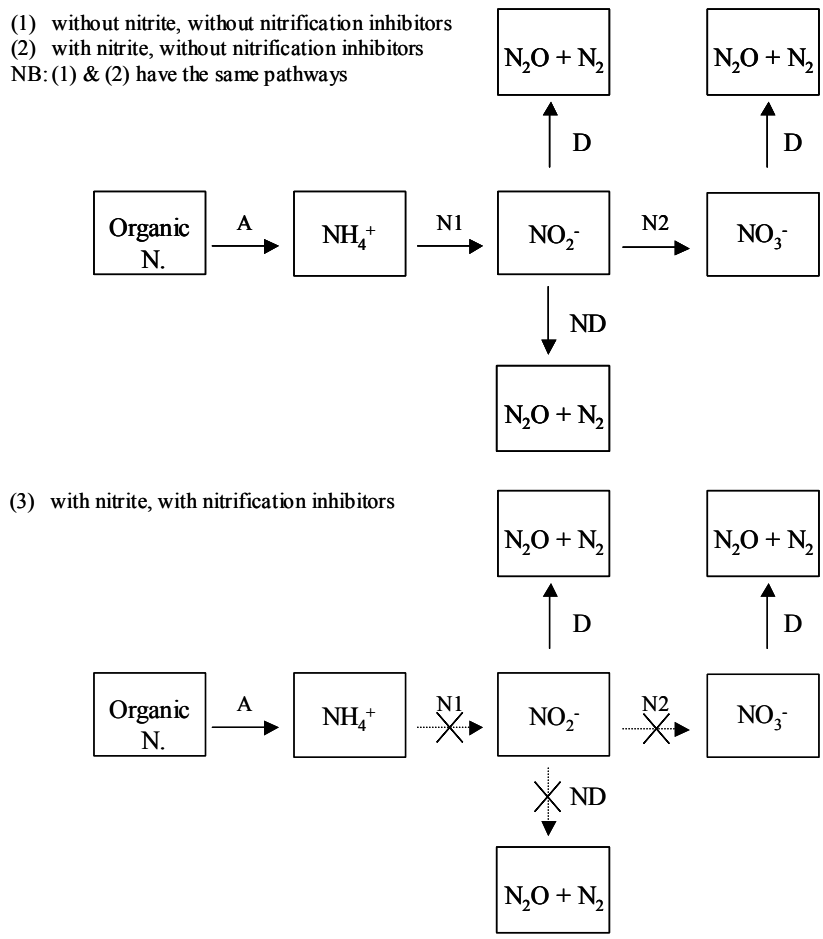


Figure 54. Diagram of nitrogen transformation in lab-scale reactor during nitrification: (1) and (2); without inhibitors and with or without nitrite addition. (3) : with inhibitors and nitrite addition. A = ammonification, D= denitrification, ND = nitrifier denitrification, N1 = first step of nitrification, N2 = second step of nitrification. The cross and dotted arrows in (3) indicate that the corresponding process has been suppressed by the inhibitors.

4.3 Results

4.3.1 Variability of results

Due to the type of samples, i.e. a suspension of sludge, and to the experimental strategy, i.e. sludge sampled at different seasons (spring and winter, mainly), the results show a large variability of double origin. However, in these conditions our study includes most of the variability existing *in situ* at the WWTP. Moreover, site-specific characteristics of the sludge and the settled tank can be affected by the conditions required to optimize the wastewater treatment influence the lab-experiments. Finally, the various microbial processes occurring simultaneously *in situ* and in batch cultures can also be sources of variability.

Despite various sources of variability, the major trends of the study help to obtain a better understanding of the microbial processes.

4.3.2 Nitrification in a batch reactor

As expected, the nitrification activity (NH_4^+ oxidation) first increases with the increasing dissolved oxygen concentration (DO; from 0.1 to 2 mg O_2. L^{-1}) in the bio–reactor (NH_4^+ disappearance rate, Tableau 18 and Figure 55). Then the activity almost reaches saturation, from which a maximum NH_4^+ oxidation (V_{max}) of about 5.2 mg N- NH_4^+. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$ and a half-saturation constant (K_m) of 0.5 mg O_2. L^{-1} (R^2 = 0.88) can be determined for activated sludge (Figure 55).

Ammonification rate, determined from the ammonium concentration increase observed when both inhibitors (ATU and $NaClO_3$) are added, is relatively high and variable, from 0.26 mgN.g$SS.^{-1}$ $h.^{-1}$ at 0.1 mg O_2. L^{-1} to 1.56 mgN. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$ at 0.6 mg O_2. L^{-1} (NH_4^+ apparition rate, Tableau 19). Consequently, the NH_4^+ disappearance rate underestimates ammonium oxidation (Tableau 18 and Tableau 19). The magnitude of ammonification explains why the NH_4^+ disappearance rate was lower than the (NO_3^- + NO_2^-) appearance rate for higher oxygenation levels than 0.1 mg O_2. L^{-1} (Tableau 18).

At a DO of about 0.1 mg O_2. L^{-1}, the NH_4^+ disappearance rate was higher than the rate of (NO_3^- + NO_2^-) production (Tableau 18)). This can be explained by a significant denitrification in these conditions.

Nitrite addition, which has no significant effect on the NH_4^+ disappearance rate, favours the NO_2^- oxidation rate, as shown by the results in the control and the nitrite addition experiments (Tableau 19). This indicates that, in natural conditions, nitrite can be limiting for nitrite oxidising bacteria.

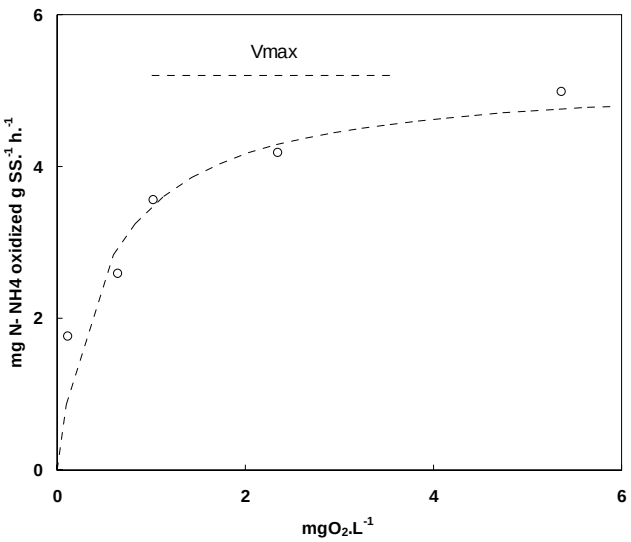


Figure 55. Michaëlis-Menten relationship between the nitrification rate NH_4+ oxidation and oxygenation in activated sludge ***Averaged*** *NH_4+ oxidized rate* ***for each oxygenation****. K_m = 0.5 mg O_2. L.-1 and V_{max} = 5.2 mgN- NH_4+ g SS.-1 h. -1 were obtained from the* ***Lineweaver-Burk curve.***

Tableau 18. Ammonium (NH_4+) disappearance rate, oxidized nitrogen (NO_3- + NO_2-) apparition rate, N_2O emission rate and percentage of N_2O emission to nitrification (Y N_2O, %), in nitrifying activated sludge as a function of oxygen concentrations (D.O.).

D.O	NH_4^+disappearance rate	(NO_3^- + NO_2^-) apparition rate	N_2O emission rate	Y N_2O
mgO_2. L^{-1}	mg N. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$	mg N. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$	µg N. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$	%
0.1	2.4	0.4	2.7	0.11
	1.9	1.1	0.5	0.03
	1.6	1.0	1.9	0.12
	1.7	1.1	3.9	0.23
0.2	1.2	1.4	2.1	0.18
Average	**1.8**	**1.0**	**2.2**	**0.13**
0.6	3.7	4.6	4.5	0.13
	3.5	4.3	1.3	0.04
0.7	0.2	1.4	3.9	0.40
	2.2	3.8	5.9	0.26
*Average	**2.6**	**3.5**	**4.0**	**0.21**
0.9	3.6	9.5	11.6	0.33
1	3.4	4.0	2.8	0.08
1.1	3.4	5.9	7.7	0.23
	3.8	4.0	6.4	0.17
*Average	**3.6**	**5.9**	**7.1**	**0.20**
2.1	6.1	6.1	4.2	0.07
2.6	2.2	3.3	1.7	0.08
*Average	**4.2**	**4.7**	**3.0**	**0.07**
4.3	5.5	7.5	3.3	0.06
5.6	5.3	6.4	4.5	0.09
6.2	4.1	5.8	4.5	0.11
*Average	**5.0**	**6.6**	**4.1**	**0.08**

N_2O emission rate (r N_2O) represents an average throughout the experimental time of the N_2O concentration in gaseous flow of the lab - scale bioreactor. N_2O concentration in ppm, measured every minute, was converted into µg N-N_2O. L^{-1} (1 ppm = 1.273 µg N-N_2O. L^{-1}) and divided by inflowing air (Q_{air}) in order to obtain a flow of N_2O. The flow of N_2O was expressed per SS. unit present in the bioreactor (g SS.) for one liter of mixed liquor. Ammonium disappearance rate (mg N- NH_4^+. g SS^{-1}.$h.^{-1}$) and oxidized nitrogen apparition rate (mgN-(NO_3^- + NO_2^-). g SS^{-1}.$h.^{-1}$) were obtained from the slope of the regression curve: N-NH_4^+ and (N-NO_3^- + N-NO_2^-)= f (time experiment). Proportion (Y N_2O) of N_2O emission (r N_2O) to nitrification (r NH_4^+) is given in percentage (%): Y N_2O = r N_2O / r NH_4^+ * 100. * Ammonification explains why NH_4^+ disappearance rate was lower than r (NO_3^- + NO_2^-) for oxygenation higher than 0.1 mgO_2. L^{-1}.

4.3.3 N_2O and oxygenation

The emission rate of N_2O from activated sludge under nitrifying conditions as a function of oxygenation shows a large variability with a confidence interval (CI) varying from 19 to 83 % (Figure 56). Despite this variability, it seems that the N_2O emission rates are relatively low for oxygen concentrations above 2 mg O_2. L^{-1} (from 1.7 to 4.5 µg N- N_2O. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$), and reach an apparent maximum at more than 10 µg N- N_2O. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$ when the oxygen concentration is lowered, to around 1 mg O_2. L^{-1} (Tableau 18 and Figure 56). With a further decrease in oxygen concentration, below 1 mg O_2. L^{-1}, lower N_2O emission is again observed (Figure 56).

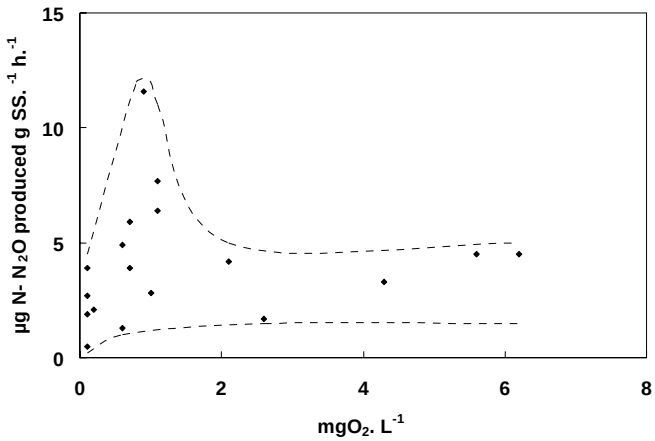


Figure 56. Relationship between nitrous oxide emission rate and oxygenation level in nitrifying activated sludge. Dotted line, i.e. the envelope of the response, determines the form of the relationship and the variability of the data set.

A calculation of the percentage of N-N_2O produced per oxidized N-NH_4^+ (Figure 57) shows that from 0.1 to 0.4 % of the oxidized N-NH_4^+ is removed as N-N_2O, depending on the oxygenation of the aerated reactor.

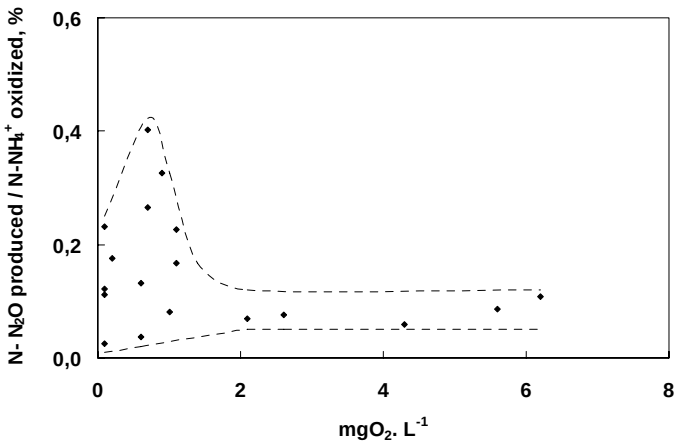


Figure 57. Proportion of N_2O emission to NH_4+ oxidation rate from nitrifying activated sludge according to the level of oxygenation. Dotted line, i.e. the envelope of the response, determines the form of the relationship and the variability of the data set.

4.3.4 Effect on N_2O emissions of adding nitrite and inhibitors

We first verified that NH_4^+ oxidation did not occur in the presence of ATU and that nitrite was not significantly oxidized with $NaClO_3$ (mean = 0.01 to 0.85 mgN. g SS.$^{-1}$h.$^{-1}$; CI = 196 %). Nitrite, added both with ATU and $NaClO_3$ and without, made it possible to distinguished the amount of N_2O produced by the two processes, heterotrophic denitrification (D) and autotrophic nitrifier denitrification (ND) as a function of oxygenation, according to the equations described in the method section (Tableau 19; Figure 58). Adding nitrite always significantly increased N_2O emission : from four times higher at 0.1 and 2 mg O_2. L^{-1} to fold six at 0.6 mg O_2. L^{-1} and up to eightfold at 1 mg O_2. L^{-1} (Figure 58).

Nitrifier denitrification (ND) appears to be the major process responsible for the N-N_2O emission peak at 1 mg O_2. L^{-1}. Whereas, N_2O emissions from ND is stimulated by a nitrite addition, this stimulation occurs mainly at 1 mg O_2. L^{-1}, and is weaker below and above this level (Figure 58). When oxygenation ranges from 0.1 to 2 mg O_2. L^{-1}, nitrifier denitrification (ND) ranges from 58 % to 83 % of the N_2O production, denitrification (D) conversely represents from 42 % to 17 %.

Tableau 19. Experiments with nitrite and inhibitor addition: N_2O emission rate, ammonium disappearance rate (NH_4+ disapp. rate), ammonium appearance rate (NH_4+ app. rate), nitrate appearance rate (NO_3- app. rate), nitrite disappearance rate (NO_2- disapp. rate).

D.O mg. L^{-1}	Experimental conditions	N_2O emission	NH_4^+ disapp. rate	NH_4^+ app. rate	NO_3^- app. rate	NO_2^- disapp. rate
		mgN. g SS^{-1}. h.$^{-1}$				
0.1	Control	0.0035	0.21	-	0.03	-
	+ NO_2^-	0.0142	0.16	-	0.04	0.90
	+ NO_2^- + ATU +$NaClO_3$	0.0060	-	0.26	0.01	0.32
0.6	Control	0.0039	0.97	-	1.38	-
	+ NO_2^-	0.0233	1.28	-	2.65	1.34
	+ NO_2^- + ATU +$NaClO_3$	0.0090	-	1.56	0.85	0.24
1.0	Control	0.0046 ± 77%	3.64 ± 11%	-	3.97 ± 0.2%	-
	+ NO_2^-	0.0374 ± 2.0%	3.64 ± 43%	-	5.64 ± 104%	2.02 ± 107%
	+ NO_2^- + ATU +$NaClO_3$	0.0085 ± 78%	-	0.65 ± 59%	0.22 ± 196%	0.31 ± 120%
2.0	Control	0.0042	6.12	-	5.87	-
	+ NO_2^-	0.0155	5.21	-	6.99	1.25
	+ NO_2^- + ATU +$NaClO_3$	0.0027	-	0.83	0.63	0.45

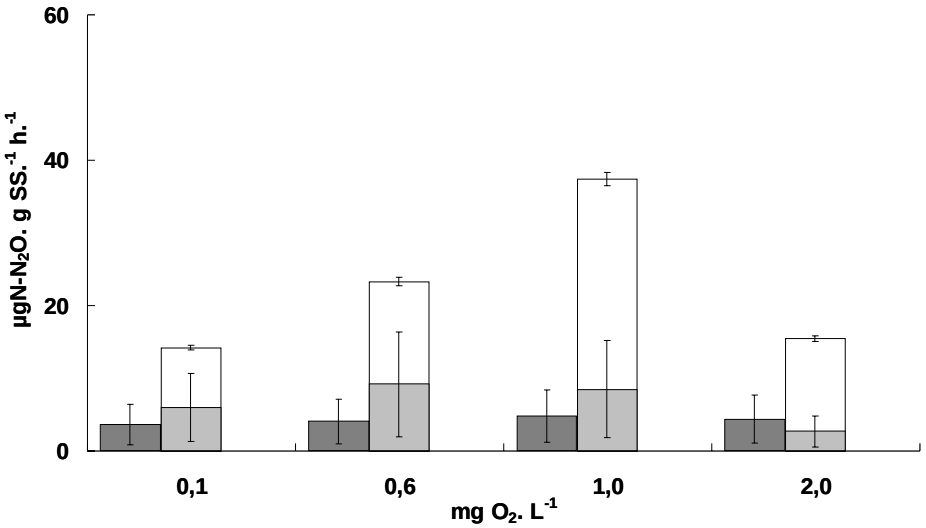


Figure 58. Nitrous oxide emission rate from nitrifying activated sludge and nitrite addition, for four oxygenation levels (black: without nitrite addition; white + grey : with nitrite addition). Regarding the treatment "With nitrite addition", white is the nitrous oxide emission rate from nitrifying activated sludge by Nitrifier denitrification (ND), grey is the nitrous oxide emission rate from Denitrification (D).

Considering that total gaseous emissions (N_2 + N_2O) can be calculated from the results of batch experiments with inhibitors (see section on material and methods), the fraction of N_2O to N_2 emission, with added nitrite, can be estimated for both D and ND (Figure 59). The N_2O:N_2 percentage shows a similar trend for both denitrification and nitrifier denitrification and the values are similar for both processes (Figure 59). The N_2O:N_2 emission percentage is generally relatively low (0.6-1.7 % for denitrification and 0.9-1.6 % for nitrifier denitrification), but much higher at 1 mg O_2. L^{-1}, reaching 6.0 for denitrification and 6.8 % for nitrifier denitrification.

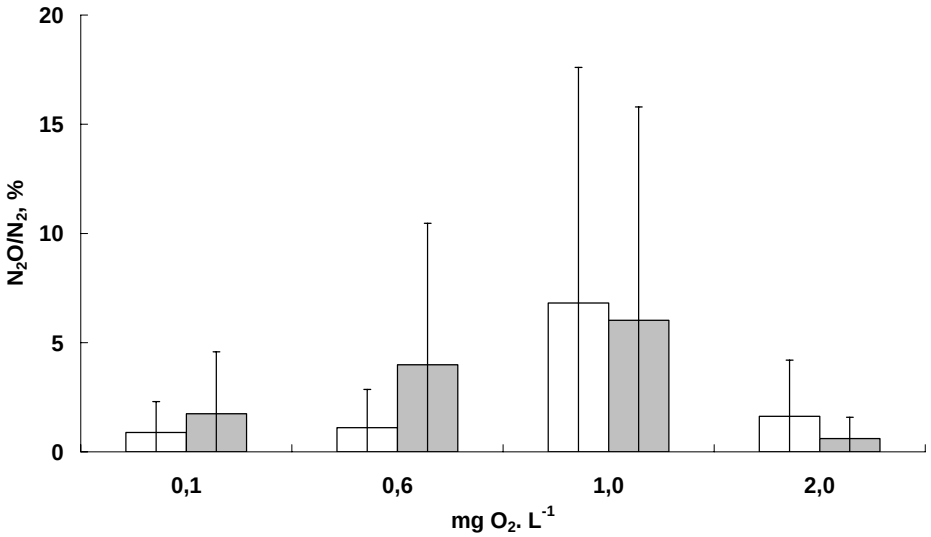


Figure 59. Fraction of nitrous oxide to dinitrogen emission rates (N_2O:N_2, %) from nitrifying activated sludge by Nitrifier denitrification (ND, white) and Denitrification (D, grey), with nitrite addition.

4.4 Discussion

4.4.1 Nitrification rate and oxygen concentration.

The major disadvantage of using activated sludge in batch experiments is the large variability, that necessarily exists *in situ* as well. However the condition of activated sludge nitrification as found in a WWTP secondary treatment have been successfully simulated in our laboratory-scale bioreactor, as shown by the values of the parameters of the Michaelis-Menten dependence of nitrification rate (NH_4^+ oxidation) on oxygen concentration; the half-saturation constant (K_m) of 0.5 mg O_2. L^{-1} and the Vmax of 5.2 mg N- NH_4^+ g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$ found here for activated sludge are in the same range as those reported in the literature for mixed-flow nitrogen removal reactors or pure cultures of bacteria (Hanaki et al., 1990; Brion and Billen, 1998).

4.4.2 Effect of oxygenation on N_2O emission rate

As reported for natural communities of ammonium oxidiser bacteria (Cébron et al., 2005 ; Kuai and Verstraete, 1998), N_2O emission rates in activated sludge reach an apparent maximum for oxygen concentrations around 1 mg O_2. L^{-1}. With inhibitor addition, it was shown that, although ND represents the major fraction of the N_2O production (58 to 83 %), when oxygenation ranges from 0.1 to 2 mg O_2. L^{-1}, D might not be negligible (42 % to 17 %). However, denitrification (and subsequently, N_2O production) decreases with increasing oxygen and represents less than 20 % of N_2O production at 2 mg O_2. L^{-1}, a result similar to those reported by Beline et al. (2001), e.g. an inhibition at oxygen concentrations of more than 3.8 mg O_2. L^{-1}. Moreover, the presence of organic carbon, which is not available in nitrifying biofilms, would lead theoretically to a relatively low proportion of heterotrophic denitrifying bacteria (Okabe et al., 1999).

The N_2O:N_2 emission percentage varies with the oxygen conditions but N_2 remains the major product, never less than 93 % and 94 % of total gaseous nitrogen removal for ND and D respectively (see Figure 59). Conversely, N_2O amounts to less than 2.0 %, except at 1 mg O_2. $L.^{-1}$, while N_2O production reaches 6.0 % through denitrification and 6.8 % through nitrifier denitrification. It is noteworthy that 20 to 30 % of total nitrogen would be emitted as nitrous oxide by heterotrophic bacteria if DOC:total N ratio were less than 3.5, as is the case in our study (2.7 for clarified water), (Itokawa et al., 2001). Results reported by Kuai and Verstraete (1998), *i.e.* N_2O representing 20 % of total nitrogen gaseous removal, tend to confirm that the proportion of N_2O emission in the conditions of our laboratory bio-reactor, assumed to well represent the functioning of the WWTP, is relatively low.

Besides the influence of oxygenation on N_2O emission, our experiments clearly confirmed that nitrite addition, further stimulates N_2O emission, but that this stimulation decreases below and above 1 mg O_2. L^{-1}. These results are well supported by Beline et al. (2001) who mention that nitrite accumulation enhances N_2O production as well as oxygen limitation; moreover, Dong et al. (2002), using nitrite addition, showed both an increase in N_2O production and in its percentage with respect to N_2.

Ammonium oxidation by ammonium oxidizing bacteria under low oxygen concentration is well-known to lead to a production of NO, N_2O and N_2 from nitrite reduction, just as for denitrifying bacteria (Shrestha et al., 2002). As early as in 1997, Schmidt and Bock showed how *Nitrosomonas eutropha* was able to reduce NO with ammonium as electron donor to the final N_2 product; N_2O is a simple intermediate, but even with low oxygenation, nitrous oxide reductase, particularly sensitive to oxygen, would be inhibited, thus making N_2O the final product (Bonin et al., 2002). As shown here the oxygen range leading to maximum N_2O production is relatively narrow, i.e. around 1 mg O_2. L^{-1}. This result may be important for wastewater treatment plant ma nagement.

4.4.3 Estimate of N_2O emission in WWTPs

The wastewater treatment plants in the Paris urban area treat a total of 3 10^6 m^3. day^{-1} which represents a reduced nitrogen load of 106 TN. day^{-1}. As N_2O emissions during nitrification represent 0.1 to 0.4 % of oxidized NH_4^+ depending on the level of oxygenation, N_2O emissions associated with the nitrification of the entire nitrogen load would range between 0.11 and 0.42 TN- N_2O. day^{-1}, if all the Paris wastewater was treated by a nitrification process using activated sludge. In the Valenton WWTP, which presently treats 0.3 10^6 m^3. day^{-1} by a nitrifying activated sludge process, the N_2O emissions can be similarly estimated at 0.01-0.03 TN- N_2O. day^{-1} in the present situation, but could be twice as high in 2005, with a new treatment unit. The estimations obtained here are in agreement with those obtained from *in situ* measurements by Legaigneur (2003) who proposed 0.19 TN- N_2O. day^{-1} for all of the WWTPs in the Paris conurbation and 0.03 TN- N_2O. $day^{-1}$for the aerated tanks at Valenton I.

Regarding the largest WWTP of Achères, presently treating 1.7 10^6 m^3. day^{-1} by a secondary activated sludge procedure only, the addition of tertiary nitrification with activated sludge would result in N_2O emissions of 0.08 to 0.32 TN-N_2O. day $^{-1}$. However, it might be expected that an alternative tertiary process, planned for 2007 and which will use an immerged biological filter process with fixed cultures, will reduce N_2O emissions because conditions of higher oxygenation will be maintained.

To evaluate these results, one can compare them with present N-N_2O emissions in the lower Seine River resulting from in-stream nitrification of the ammonium discharged by the Achères WWTP (Garnier et al., 2005), which is estimated at 0.1-0.15 TN- N_2O. d^{-1}. This emission is expected to be drastically reduced when the ammonium load from the Achères WWTP will be eliminated. If all of the Paris wastewater were subjected to nitrification treatment, this would in fact, at worst, displace N_2O emission from the natural environment towards the wastewater treatment plants.

Acknowledgments

This work was undertaken in the framework of the programmes PIREN-Seine and Seine-Aval. The study was funded by the Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP). We are grateful to D. Melet, for helpful questions and suggestions during the study.

4.5 References

Beline, F., Martinez, J., Marol, C., Guiraud, G. (2001). Application of 15 N technique to determine the contributions of nitrification and denitrification to the flux of nitrous oxide from aerated pig slurry. Water Research **35**, 2774-2778.

Bianchi, M., Bonin, P., Felatria. (1994). Bacterial nitrification in the Rhône river plume (northwestern Mediterranean Sea). Marine ecology progress series. **103**, 197-202.

Bliefert, C. and Perraud, R. (2001) « Environmental chemistry, air, water, soils, waste ». pp. 181-183. Ed. De Boeck, Paris (French).

Bock, E., Koops, H.P., Harns, H.. (1986) Cell biology of nitrifying bacteria. In: Nitrification. Prosser J.I. pp. 17-38. Ed IRL Press, Oxford.

Bock, E., Koops, H.P., Ahlers, B. and Harns, H.. (1992) Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source. In The prokaryotes : A Handbook on biology of bacteria : Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. pp. 414-430. Ed Springer, New York.

Bock, E., Scmidt, E, Stüven, R., Zart, D. (1995) Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. Archives of. microbiology **163**, 16-20.

Bonin, P., Tamburini, C., Michotey, V. (2002) Determination of bacterial processes which are sources of nitrous oxide production in marine samples. Water Research **36**, 722-732.

Brion, N. and Billen, G. (1998) Re-evaluation of $H^{14}CO_3^-$ incorporating method to autotrophic nitrification measure and application to nitrifying biomass estimation. Revue Sciences de l'eau **11**, 283-302 (French).

Burgess, JE., Colliver, BB., Stuetz, RM., Stephenson, T. (2002) Dinitrogen oxide production by a mixed culture of nitrifying bacteria during ammonia shock loading and aeration failure. Journal of industrial. Microbiology & biotechnology. **29**, 309-313.

Caffrey, J.M., Miller, L.G. (1995). A comparison of two nitrification inhibitors used to measure nitrification rates in estuarine sediments. FEMS Microbiology ecology. **17**, 213-220.

Casciotti, K.L. and Ward, B.B. (2001) Dissimilatory nitrite reductase genes from autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. Applied and environmental microbiology **67**, 2213-2221.

Cébron, A., Garnier, J., Billen, G. (2005) Nitrous oxide production and nitrification kinetics by bacteria communities naturally present in river water (the lower Seine, France). Aquatic microbial ecology. In press.

Chalk, P.M. and Smith, C.J. (1983) Chemodenitritrification. In: Gaseous loss of nitrogen plant – soil systems. Freney, J.R., Simpson, J.R. (Eds). Developments in Plant and Soils Sciences **9**, 65-89.

Davies, KJ, Lloyd, D, Boddy, L. (1989) The effect of oxygen on denitrification in Paracoccus denitrificans and Pseudomonas aeruginosa. Journal of general microbiology. **135** (9), 2445-2451.

Dong, L.F., Nedwell, D.B., Underwood, G.J.C., Thornton, D.C.O., Rusmana, I. (2002) Nitrous oxide formation in the colne estuary, England : the central role of nitrite. Applied and environmental microbiology **68** (3), 1240-1249.

Garnier, J., Cébron, A., Tallec, G., Billen, G., Sebilo, M, Martinez, A. (2005) Nitrous oxide emission in the Seine River estuary (France): comparison with upstream sector of the Seine basin. Biogeochemistry. In press

Gaskell, J. F., Blackmer, A. M., Bremmer, J.M. (1981) Comparison of effects of nitrate, nitrite and nitric oxide on reduction of nitrous oxide to denitrogen by soil microorganisms. Soil Science Society of America journal **45**, 1124-1127.

Haider, S., Svardal, K., Vanrolleghem, P.A., Kroiss, H. (2003) The effect of low sludge age on wastewater fractionation (S_s, S_I). Water science and technology **47** (11), 203-209.

Hall, G.H. (1984). Measurement of nitrification rate in lake sediments : comparison of the nitrification inhibitors nitrapyrin and allylthiourea. FEMS Microbiology ecology. **10**, 25-36.

Hanaki, K., Wantawin, C., Ohgaki, S. (1990) Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. Water Research **24**, 297-302.

Hanaki, K., Hong, Z., Matsuo, T.. (1992) Production of nitrous oxide gas during denitrification of wastewater. Water science and technology **26** (5/6), 1027-1036.

Henriksen, K., Hansen, J.I, Blacburn, T.H. (1981). Rate of nitrification, distribution of nitrifying bacteria and nitrate fluxes in different types of sediments from Danish waters. Marine biology. **61**, 299-304.

Hooper, A.B. and Terry, K.R. (1979) Hydroxylamine oxidoreductase of Nitrosomonas production of nitric oxide from hydroxylamine. Biochimica et Biophysica Acta **571** (1), 12-20.

Hooper, A.B., Vannelli, T., Bergmann, D. J., Arciero, D. M. (1997) Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. **71**, 59-67.

Hynes, R. K. and Knowles, R. (1984) Production of nitrous oxide by *Nitrosomonas europaea* : effects of acetylene, pH, and oxygen.. Canadian journal of microbiology **30**, 1397-1404.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2000) Special report on Emissions Scenarios. Cambridge Univ. Press, 599 pp.

Itokawa, H., Hanaki, K., Matsuo, T. (2001) Nitrous oxide production in high-loading biological nitrogen removal process under low COD/N ratio condition. Water Research **353**, 657-664.

Jiang, Q-Q., and Bakken, L. R. (1999) Nitrous oxide production and methane oxidation by different ammonia-oxidizing bacteria. Applied and environmental microbiology **65**, 2679-2684.

Krul, J.M., Veeningen, R. (1977) The synthesis of the dissimilatory nitrate reductase under aerobic conditions in a number of denitrifying bacteria, isolated from activated sludge and drinking water. Water Research **11**, 39-43.

Kuai, L., Verstraete, W. (1998) Ammonium removal by the Oygen-limited Autotrophic Nitrification-Denitrification system. Applied and environmental microbiology **64**, 4500-4506.

Legaigneur, V. (2003). Atmospheric emissions from WWTP of SIAAP, notably nitric and nitrous oxid. Technological Research Diploma. University Denis Diderot, Paris7.(French).

Mc Tavish, H., Fuchs, J. A., Hooper, A.B. (1993) Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. Journal of bacteriology **175**, 2436-2444.

Okabe S., Satoh, H., Watanabe, Y. (1999) In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridisation and the use of microelectrodes. Applied and environmental microbiology **65**, 3182-3191.

Powell, S.J., Prosser, J.I. (1986). Inhibition of ammonium oxidation by nitrapyrin in soil and liquid culture. Applied and environmental microbiology. **52**, 782-787.

Robertson, LA, Kuenen, JG. (1984) Aerobic denitrification--old wine in new bottles? Antonie van Leeuwenhoek. **50** (5-6), 525-544.

Sayavedra-Soto, L.A., Hommes, N.G., Arp, D. J. (1994) Characterization of the gene encoding hydroxylamine oxidoreductase in Nitrosomonas europaea. Journal of bacteriology **176**, 504-510.

Schmidt, I., Bock, E. (1997) Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by Nitrosomonas eutropha. Archives of microbiology. **167**, 106-111.

Shrestha, N., Hadano, S., Kamachi, T., Okura, I. (2002) Dinitrogen production from ammonia by Nitrosomonas europaea. Applied Catalysis A : General **237** (1-2), 33-39.

Wood, P.M. (1986) Nitrification as a bacterial energy source. In : Nitrification. Prosser J.I, pp 39-62. Ed IRL Press, Oxford.

Wrage, N., Velthof, G.L., van Beusichem, M.L., Oenema, O. (2001) Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. Soil biology & biochemistry **33**, 1723-1732.

Yoshinari, T. (1990) In : Denitrification in Soil and Sediment, Eds Revsbech, N. P., Sorenson, J. pp. 129-149. Plenum, New York

Zeng, R., Lemaire, R., Yuan, Z., Keller, J. (2003) Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in a lab-scale sequencing batch reactor. Biotechnology and bioengineering **84**, 170-178.

Zheng, H., Hanaki, K., Matsuo, T. (1994) Production of nitrous oxide gas during nitrification of wastewater. Water science and technology **306**, 134-141.

Avant - propos

Le fonctionnement des populations dénitrifiantes peut être un facteur de régulation pour les émissions de N_2O dans l'atmosphère. L'oxyde nitreux est connu comme étant un intermédiaire de la dénitrification, relargué en grandes quantités dans les environnements faiblement oxygénés avec suffisamment de nitrate et de carbone organique biodégradable (Gaskell et al., 1981, Itokawa et al., 2001; Bonin et al., 2002), conditions rencontrées sur les stations d'épuration. En effet, les bassins normalement en anoxie peuvent être faiblement oxygénés à cause de la dissolution de l'oxygène de l'air en hiver. De plus nos résultats précédents montrent que la nitrification-dénitrifiante intérvient également lorsque l'oxygène est limitant. Un autre processus, porté largement par les bactéries entériques, pourrait être également lié à la production d'oxyde nitreux, la nitrate ammonification (Bleakley & Tiedje, 1982).

Nous avons donc essayé ici de déterminer, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs, les différents processus responsables de la production d'oxyde nitreux, dans des conditions d'anoxie et de micro-aérobie (< 2 $mgO_2\ L^{-1}$). Nous avons également cherché à quantitifier ces émissions en fonction des charges en nitrate traitées, afin d'estimer un taux d'émission journalier au niveau des stations d'épuration urbaine, et plus spécifiquement de Seine Amont, lors de la dénitrification.

Chapitre 5
-
Nitrous oxide emissions from denitrifying activated sludge of urban wastewater treatment plants, under anoxia and low oxygenation

Gaëlle Tallec[1,2], Josette Garnier[2], Gilles Billen[2] and Michel Gousailles[1]

[1]*SIAAP / DRD, 82, Av. Kléber, 92700 Colombes, France.*
[2]*UMR Sisyphe 7619, Fonctionnement des Hydrosystèmes, Université P. & M. Curie-CNRS, Boite 105, Tour 56, Etage 4, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France*

Submitted to *Bioresource Technology.*

Abstract

Batch experiments were made to better understand the mechanisms of N_2O emissions from activated sludge in denitrifying conditions found in urban WWTPs, *i.e.* under anoxic and low oxygenation conditions.

The results showed that in completely anoxic conditions, denitrification, related to a periplasmic nitrate reductase activity, is the major producer of N_2O (100 % of the N_2O production), whereas the nitrate ammonifying activity is not significant.

In a gradient of low oxygenation, N_2O production from the denitrifying process varied. The highest N_2O emissions (49.7 ± 9 % µg N- N_2O. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$ on average) occured at a dissolved oxygen concentration of around 0.3 mg O_2. L^{-1}. Below 0.3 mg O_2. L^{-1}, heterotrophic denitrification (D) appeared to be the major process responsible for the N_2O emission (100 % at zero oxygenation). From 0.4 to 1.1 mg O_2. L^{-1}, N_2O emissions were due to two processes : (i) heterotrophic denitrification (D) that represented about 40 % of the N_2O production, and (ii) autotrophic nitrifier denitrification (ND) that accounted for about 60 %.

N_2O emissions from activated sludge represented on average 0.4 % of reduced NO_3^- in anoxic conditions. Thus, N_2O emissions from the Valenton WWTP, which presently treats 0.6 10^6 m^3. day^{-1} by a denitrifying activated sludge process would emit 20 T. N-N_2O $year^{-1}$. However, as oxygen levels in the Valenton WWTP "anoxic tank" in fact range from 0.4 to 2.0 mg O_2. L^{-1}, at least in winter, N_2O emissions could be much higher than above estimate. Strict anoxic conditions during nitrate removal in WWTPs thus appear important in limiting N_2O emissions during denitrification.

Compared with the same activated sludge under nitrifying conditions in a previous study, the N_2O emission under denitrifying conditions were much higher (53 µg N- N_2O. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$ against 12 µg N- N_2O. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$) and occurred at a slightly lower dissolved-oxygen concentration (0.3 mg O_2. L^{-1} against 1 mg O_2. L^{-1}).

***Key words**:* wastewater treatment plant, denitrification, N_2O emission, activated sludge.

5.1 Introduction

Biological nitrogen removal by nitrification and denitrification has been used in many wastewater treatment plants to produce effluent of better quality and therefore to reduce their impact on the receiving medium. Thus, in the Paris conurbation the amount of wastewater treated by a low loading activated sludge WWTP (Valenton, east of Paris), increased from 0.3 to 0.6 10^6 m^3. day^{-1} in 2005. Furthermore, a major proportion (1.7 10^6 m^3. day^{-1}) of the Paris wastewater, presently undergoing a secondary treatment by high loading activated sludge (Achères, west of Paris), will be subjected to a nitrifying and a denitrifying process (30 % as early as 2007 and 100 % in 2015).

It is now admitted that N_2O could be produced during both nitrification and denitrification in activated sludge and released to the atmosphere (Hanaki et al., 1990; Hanaki et al., 1992; Zheng et al., 1994; Tallec et al., submitted). Nitrous oxide (N_2O) is a greenhouse gas with a serious impact on the environment. Its 100-year global warming potential is about 320 times higher than that of carbon dioxide (CO_2). It has a lifetime of approximately 120 years (IPCC, 2000). The major sink for N_2O is the stratospheric reaction with atomic oxygen into nitric oxide (NO), that induces the destruction of stratospheric ozone (Bliefert and Perraud, 2001). A major danger is that N_2O emissions will be increased by moving them from natural environments to WWTPs (Itokawa et al., 2001; Garnier et al., 2005). The WWTPs impact on the N_2O budget is not clear either at the global or the regional scale. Moreover, additional knowledge of the microbial processes and the factors controlling N_2O production in wastewater treatment facilities is still needed (IPCC, 2000), principally concerning activated sludge during nitrate removal (Hanaki et al., 1992; Zheng et al., 1994; Itokawa et al., 2001).

Depending on the end products, two different pathways of dissimilatory nitrate reduction can be distinguished : dissimilatory nitrate reduction into (N_2O + N_2), i.e. denitrification and dissimilatory nitrate reduction into NH_4^+, e.g. nitrate ammonification (Bonin, 1996).

Denitrification is a microbial respiratory process during which nitrates are used as electron acceptors for anaerobic oxidation of organic matter. Denitrification processes occur through four sequential reactions, which are catalysed by specific enzymes:

NO_3^- (1) $\rightarrow$ NO_2^- (2)$\rightarrow$ NO (3) $\rightarrow$ N_2O (4) $\rightarrow$ N_2.

The enzymes utilized along the pathway are as follows: (1): nitrate reductase (NaR); (2): nitrite reductase (NiR); (3): nitric oxide reductase (NOR); (4): nitrous oxide reductase (N_2OR). Denitrifier organisms, with N_2O as the principal end product have been identified (Greenberg and Becker, 1977; Brettar and Höfle, 1993), although N_2O generally is an intermediate of the denitrification process only. However in low oxygen concentrations, N_2O can be the final product of denitrification instead of N_2 (Baumann et al., 1996; Robertson et al., 1995), nitrous oxide reductase being the enzyme most sensitive to oxygen (Bonin et al, 1989).

Nitrate ammonification is an anaerobic microbial pathway that transforms NO_3^- into NO_2^-, and then to NH_4^+. These reactions are catalyzed by nitrate and nitrite reductases. The conditions for nitrate ammonification (i.e., low redox potential, high concentrations of available NO_3^- and labile C) are similar to those for denitrification (Tiedje et al., 1982; Zumft, 1997). Furthermore, the two reduction pathways can exist under anoxia or low oxygen concentrations (Bonin et al., 1989; Dunn et al., 1979). In addition, Smith and Zimmerman (1981) reported that N_2O is also produced during nitrate ammonification and that the nitrate respiring bacteria, particularly the enteric bacteria found in sludge, are the most proliferous non-denitrifying N_2O producers (Bleakley & Tiedje, 1982; Satoh et al., 1983).

Alternating activated sludge treatment plants are specially designed to remove nitrogen from wastewater. Due to alternating oxygenation and because denitrifying biological tanks are not always covered, complete oxygen removal during denitrification is difficult. As a result, such nitrogen removal conditions through a secondary treatment by recirculation, can together with denitrification, be at the origin of nitrifier denitrification and perhaps of nitrate ammonification, with all processes possibly producing N_2O at low oxygenation; oxygen is indeed recognized as an important controlling factor in WWTP nitrogen transformations (Lindberg, 1996; Galluzzo et al., 2001; Yoo et al., 2004).

Whereas previous studies of activated sludge in low oxygen conditions (around 1 $mgO_2.L^{-1}$) have quantified the amount of N_2O production through nitrifier denitrification (Itokawa et al., 2001; Tallec et al., submitted), i.e., a process activated by autotrophic ammonium oxidizers (Wrage et al., 2001; Cébron et al., 2005), the aim of this paper was to study N_2O produced from a secondary activated-sludge process in an urban WWTP, focusing on denitrification.

Batch experiments in a lab-scale reactor were carried out to investigate nitrous oxide emissions using denitrifying activated sludge, under anoxic and low oxygen conditions. By measuring disappearance and appearance rates of NH_4^+, NO_3^-, NO_2^-, N_2O, and using specific inhibitors, we tried to identify the N_2O sources, i.e. denitrification or nitrate ammonification. The influence of dissolved oxygen concentrations on N_2O emissions was explored as was recently done for nitrifying sludge (Tallec et al., submitted).

5.2 Material and methods

5.2.1 Characteristics of the sampled treatment plant

One of the four WWTPs of the Paris conurbation, Valenton (east of Paris), treats 0.6 10^6 $m^3.day^{-1}$ of wastewater by a secondary activated-sludge process, operating with two different systems of 0.3 10^6 $m^3.day^{-1}$ each, Valenton I and Valenton II. Both Valenton WWTP, are a low loading treatment (0.12 Kg BOD_5. kg $SS^{-1}.day^{-1}$), with an hydraulic retention time (HRT) of more than nine hours. Sludge retention time (SRT) in the aerated and non-aerated tank is more than 10 days.

In Valenton I, settled wastewater is introduced at the head of two concentric cylindrical biological tanks, first into a central anoxic zone (5000 m^3), then into an external aerobic zone (25 000 m^3) (Figure 60, a.). Recirculation of activated sludge from the clarification tank brings some nitrate into the anoxic zone where it is denitrified. Valenton I has a removal rate of 50 % for nitrate and of 90 % for Total Kjeldahl Nitrogen (TKN).

In the new design, Valenton II, our study site, settled water is introduced at the head of a biological tank characterized by an endogenous and anaerobic zone for biological phosphate removal (68 000 m3), followed by an anoxic zone for nitrate removal (36 000 m3) and by an aerobic zone for ammonium removal (130000 m3) (Figure 60, b.). In addition to sludge recirculation, mixed liquor from the end of the aerobic zone is recirculated into the anoxic zone, bringing more nitrate in the site of denitrification. Consequently, Valenton II has a higher removal rate than Valenton I, i.e.70 % for nitrate and 90 % for Total Kjeldahl Nitrogen (TKN).

In both systems, Valenton I and Valenton II, organic carbon, necessary to heterotrophic bacteria, is brought into the anoxic tanks by settled wastewater.

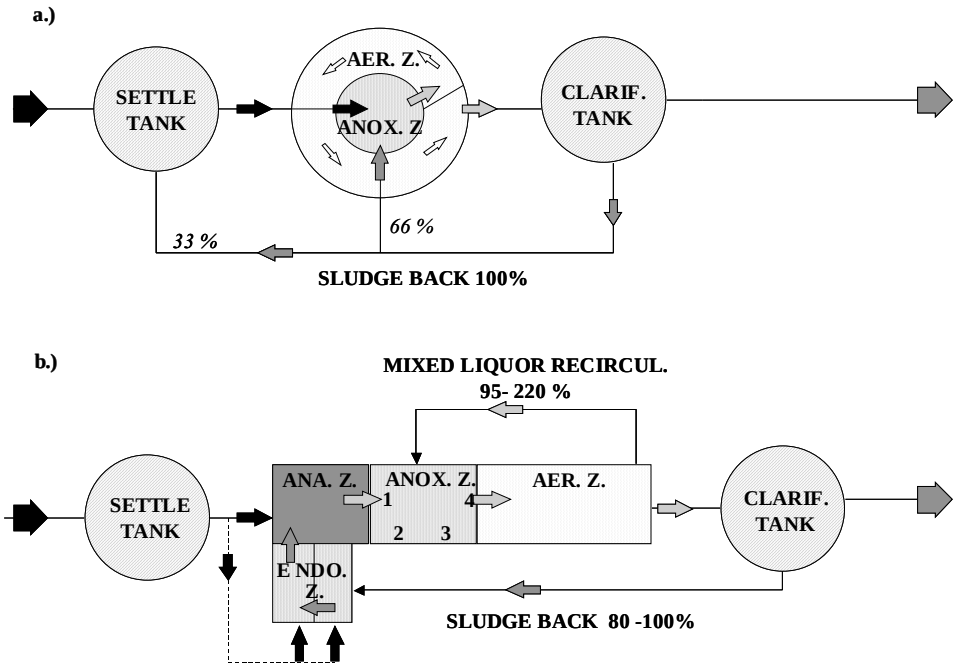


Figure 60. Biological treatment in the Valenton wastewater treatment plant (east of Paris) : (a) Valenton I and (b) Valenton II with 1, 2, 3, 4 sampling points for oxygen profile. The steps of the treatment and the circulation of the sludge and water (in percentage) are indicated. ENDO Z. : endogenous zone, ANA. Z. : anaerobic zone, ANOX. Z. : anoxic zone, AER. Z.: aerobic zone, CLARIF. TANK : clarification tank. The effluent inlets are indicated by black arrows, grey arrows indicating the effluent outlet or the directions of the effluent within the process system.

The tanks are not covered, so that it is difficult to reach completely anoxic conditions in the "anoxic zone" devoted to denitrification, especially in winter. Indeed, measurements of oxygen concentration through out a vertical profile in the denitrifying tank revealed values around 0.4 to 2.0 $mgO_2.L^{-1}$ in winter when the temperature was around 13°C, while complete anoxia (0.0 $mgO_2.L^{-1}$ over the tank depth) was effective in spring (around 17 °C) (Figure 61).

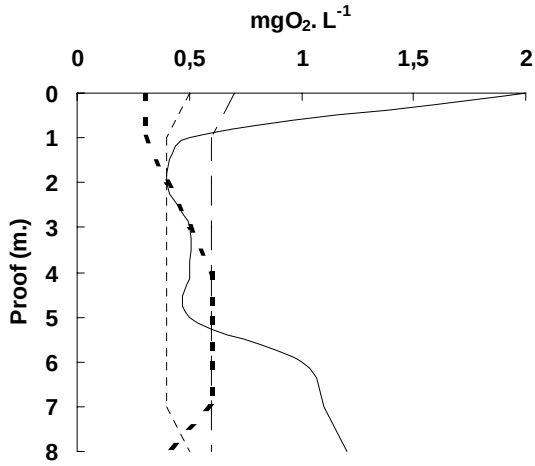


Figure 61. Oxygen profile in anoxic activated sludge tank of the Valenton II WWTP in winter (Temperature in anoxic tank : 13°C) at sampling points 1,2,3,4 (cf.Figure 60b). (— 1, — - — 2, …… 3, …… 4). Measurements at the same sampling points 1, 2, 3, 4 (cf. Figure 60b) in spring that led to zero oxygenation over depth are not shown.

5.2.2 Lab-scale reactor

The laboratory-scale bioreactor, with a 3 L.-capacity, was filled with 900 ml of activated sludge and 1.4 litres of clarified water, for each batch experiments (Figure 62). Simultaneously, nitrite (final concentration : 5 mg N. L^{-1}) and nitrate (final concentration : 15 mg N. L^{-1}) were added to avoid any limitation of the denitrifying activity. Activated sludge and settled water used in the reactor were collected from the Valenton II WWTP, to fit the conditions found *in situ*. Typically, the settled water contained 89 mg. L^{-1} of Suspended Solid (SS), 63 mg. L^{-1} of organic matter, 58 mg. L^{-1} of TKN, 48 mg. L^{-1} of N-NH_4^+, 0 mg. L^{-1} of N-NO_2^-, 0 mg. L^{-1} of N-NO_3^-, 130 mg. L^{-1} O_2 of Biological Oxygen Demand (BOD), 305 mg. L^{-1} of Chemical Oxygen Demand (COD), 460 mg. L^{-1} of $CaCO_3$ and the pH was 7.8.

In the reactor, the contact time between the water and the sludge was two hours. Influent air flow was 0.156 L. min^{-1} (9.36 L. $h.^{-1}$). Aeration occurred through a thin airlock, with two diffusers to ensure better distribution. The mixed liquor was stirred to maintain the suspension.

A N_2 and pure O_2 gaseous mixture, controlled by a calibrated flow meter, maintained a constant influent gas flow for various dissolved oxygen concentrations (DO) in the reactor (0 to 2.2 mg O_2. L^{-1}). In the hermetically closed reactor, the gaseous N_2O flux was measured continuously.

During one week, after sampling on day j, experiments were carried out over three consecutive days (j+1, j+2, j+3), three batches being followed per day, with three different oxygen levels. For each batch culture (9 in total during the week), the reactor was filled with the sludge and settled water sampled on day j. The sludge and settled water were therefore stored during the three days of experiments at 4 °C maximum.

Our study required several weeks of experiments, at the start of which new sludge and new settled water were collected from the Valenton II WWTP.

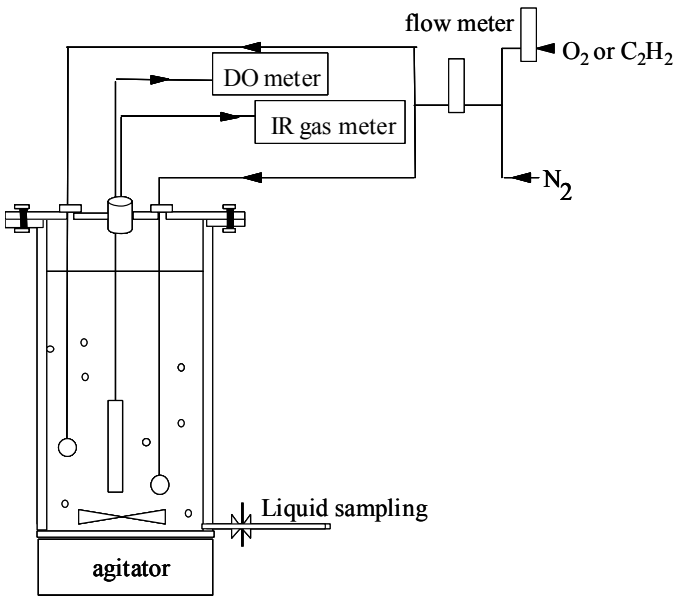


Figure 62. Description of the lab-scale reactor. The mixed liquor (sludge + settled water) is shaken continuously. Gas circulation is completely hermetic and controlled..

5.2.3 Sampling and analyses

Before starting a batch experiment, the SS were measured in the activated sludge. The SS were weighed after centrifugation and 24 hrs of drying at 105°C. The average was 3 g. L^{-1} ± 12 % in the activated sludge and 0.9 g. L^{-1} ± 12 % in the reactor after dilution with the settled water.

During each experiment, nitrogen forms (NH_4^+, NO_3^-, and NO_2^-) were sampled every 15 minutes. Filtered samples (Folded filter paper, 2V, 185 mm, Whathman®) were analyzed immediately by colorimeter with a cell test (Nova 60 Spectroquant®). The gaseous N_2O flux was analysed continuously (every minute) by an I. R. analyzer (Infra Red, URAS 14 Advance Optima, Hartmann & Braun). Dissolved oxygen was measured in mixed liquor (every minute) with an oxygen probe (WTW Oxi 330 oxymeter). The temperature and pH were measured regularly and kept at 19 °C and 7.5 - 8.5, respectively.

5.2.4 Batch tests

Behaviour of nitrogen forms and N_2O emission in a gradient of oxygen levels. 18 batch experiments were run as described above in a gradient of oxygenation, from 0 to 2.2 mg $O_2.L^{-1}$. These conditions are typically found *in situ* and are not strictly anoxic, so that denitrification and nitrifier denitrification can be observed simultaneously (See Tableau 20).

Batch experiments with inhibitors at zero oxygenation. We used inhibitors in order to determine the strength of each process in the production of nitrous oxide, in typical conditions of denitrification. To differentiate between N_2O produced by nitrate ammonification and denitrification, we used the chlorate ($NaClO_3$), already used in molecular studies of dissimilative nitrate reduction to differentiate between the activities of two different nitrate reductases, a membrane-bound nitrate reductase (Nar) and a periplasmic nitrate reductase (Nap), (Hochstein and Tomlison, 1988; Moreno-Vivian et al., 1999). Rusmana and Nedwell (2004) showed that chlorate inhibits dissimilative nitrate reduction into ammonium (Nar), but does not completely inhibit denitrification (continued Nap activity). Whereas almost all true denitrifiers such as *Pseudomonas Denitrificans*, *Paracoccus pantotropha*, *Pseudomonas aeruginosa* have either both Nap and Nar or only Nap (Richardson et al., 2001), nitrate ammonifiers such as *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus stearothermophilis* have only Nar (Richardson et al., 2001).

We also used allylthiourea (ATU) which blocks the NH_4^+ to NH_2OH step of ammonium oxidation to ensure that nitrification does not occur (Haider et al, 2003).
In addition, in anoxic batch experiments, we also measured the N_2O : N_2 ratio using acetylene (C_2H_2). Several authors have reported that with acetylene, nitrate was stoichiometrically reduced to N_2O, as nitrous oxide reductase activity was totally blocked (Yoshinari et al.,1976; Dalsgaard et al.,1995; Frette et al., 1997; Bonin et al., 2002). Thus, total N gas emitted (N_2O + N_2) can be easily measured as N_2O.

To summarize, in anoxic conditions, three type batches were made, i) with ATU, ii) with ATU and C_2H_2 and iii) with ATU, C_2H_2 and $NaClO_3$. These inhibitors were added at the start of the batch, ATU at a final concentration of 10 mg.L^{-1} (Haider et al, 2003), $NaClO_3$ at a final concentration of 0.1 g l^{-1} (Rusmana and Nedwell, 2004) and C_2H_2 at 10 % v/v of the air flow (Bonin et al., 2002). This protocol allowed us to distinguish and to quantify the different nitrogen pathways in anoxia as well as the N_2O : N_2 ratio (Figure 63).

Figure 63a (ATU) shows N_2O produced by nitrate ammonification (Nar) and by denitrification (Nar and Nap), Figure 63b (ATU + C_2H_2) provides the sum of (N_2O + N_2) produced by nitrate ammonification (Nar) and by denitrification (Nar and Nap) and Figure 63c (ATU + C_2H_2+ $NaClO_3$) leads to (N_2O + N_2) production by denitrification, with Nap only. N_2O produced by nitrate ammonification (Nar) can be deduced from the difference between the last two.

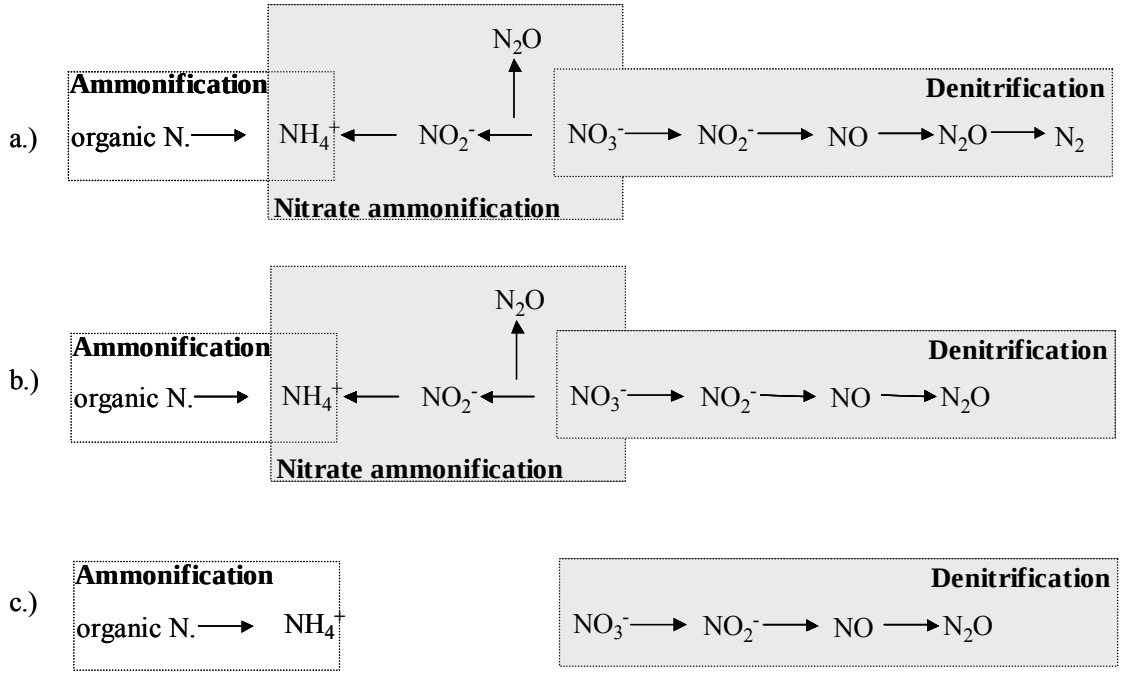


Figure 63. Diagrams of expected nitrogen transformation in lab-scale reactor in anoxic and denitrifying condition of a secondary treatment by low loading denitrifying activated sludge of urban WWTP : a.) with nitrification inhibitor (ATU), b.) with nitrification (ATU) and nitrous oxide reductase (C_2H_2) inhibitors, c.) with nitrification (ATU), nitrous oxide reductase (C_2H_2) and membrane-bound nitrate reductase ($NaClO_3$, 0.1 mg.L-1) inhibitors.

Batch experiments with inhibitors in a gradient of oxygen conditions (0.0 to 1.1 mg O_2. L^{-1}). To differentiate between autotrophic nitrifier denitrification and heterotrophic denitrification processes, we need the amount (i) of N_2O produced by autotrophic and heterotrophic bacteria (incubation without inhibitor, i.e. a control) and (ii) that of N_2O produced by heterotrophic bacteria only (incubation with specific nitrification inhibitors). ATU is the inhibitor for the first step of nitrification (Hall, 1984; Bianchi et al., 1994) catalysed by ammonia mono-oxygenase and chlorate for the second step of nitrification (Bianchi et al., 1994; Brion and Billen, 1998; Haider et al., 2003) catalyzed by nitrite oxido-reductase.

At the start of all of the batches, ATU and $NaClO_3$ were added to a final concentration of respectively 5-10 mg. L^{-1} (Haider et al, 2003) and 1g. L^{-1} (Brion and Billen, 1998). Note that the chlorate concentration was above 0.1 mg. L^{-1} to inhibit Nar activity. At each dissolved-oxygen concentration (0.0, 0.4, 0.7 and 1.1 mg O_2. L^{-1}), two batches were made, i) without inhibitors (Figure 64a) and ii) with nitrification inhibitors (Figure 64b), allowing us to identify and to quantify the different nitrogen pathways.

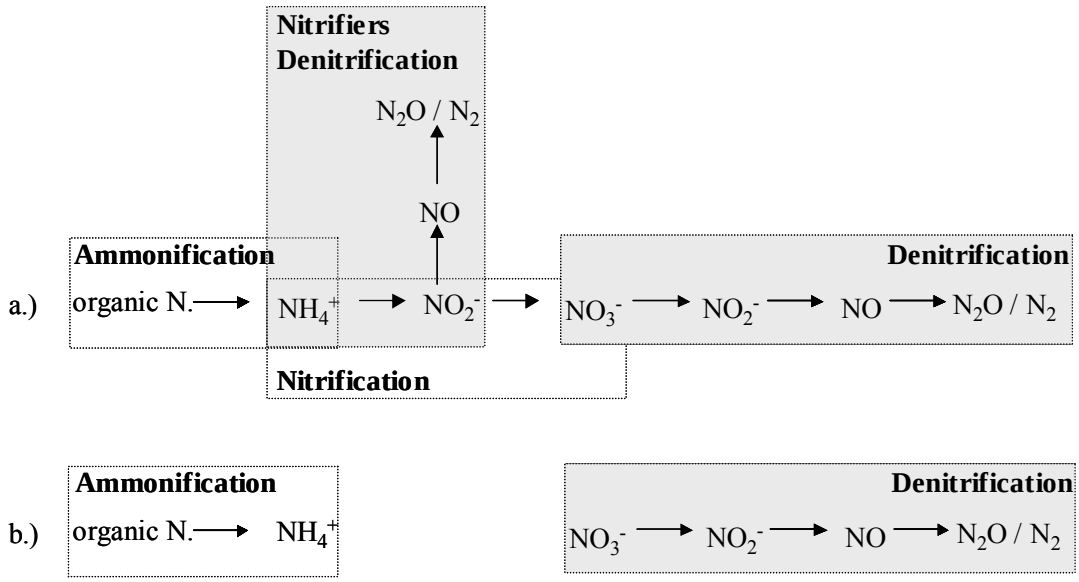


Figure 64. Diagrams of expected nitrogen transformation in lab-scale reactor in denitrifying conditions of a secondary treatment by low loading activated sludge of urban WWTP and low oxygen : a.) without nitrification inhibitors, b.) with nitrification inhibitors (ATU and $NaClO_3$, 1 mg.L-1).

5.3 Results

5.3.1 Variability of results

Due to the type of samples, i.e. a suspension of sludge, and to the experimental strategy, i.e. sludge sampled in different seasons (spring and winter, mainly), the results show a large variability of double origin. However, in these conditions our study includes most of the variability existing *in situ* at the WWTP. Moreover, site-specific characteristics of the sludge and the settling tank water may be affected by the conditions required to optimize the wastewater treatment which necessarily influences the lab-experiments. Finally, the various microbial processes occurring simultaneously in batch cultures can also be a source of variability.

However, despite the variability, the observed major trends help to better understand the processes.

5.3.2 N_2O emission by "denitrifying" sludge in a gradient of oxygenation

The appearance or disappearance rates of NH_4^+, NO_3^- and (NO_3^- + NO_2^-), showed a large variability, by a factor of 2 to 3 for most oxygenation levels (Tableau 20). This variability was maximum for dissolved-oxygen concentrations (DO) ranging from 0,3 to 0,7 mg O_2. L^{-1}. The apparent NH_4^+ rate at a DO of about 0.0 mg O_2. L^{-1} (appearance rate: rNH_4^+), ranged from 0.4 to 6.7 mg N. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$ (2.8 ± 68 % mg N. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$ on average, Tableau 20). The average apparent denitrification rate (the disappearance NO_3^- rate) at 0.0 mg O_2. L^{-1} was 4.6 ± 28 % mg N. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$ (Tableau 20).

At a DO of about 0.3 mg O_2. L^{-1}, the results did not clearly show any apparent denitrification or nitrification process; both had an average rate of 0.5 mg N. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$ and a large variability (Tableau 20). The nitrification rate increased with oxygenation, as shown by i) the (NO_3^-+ NO_2^-) appearance rate, up to 8.6 ± 80 % mg N. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$ and ii) the NH_4^+-N disappearance rate, up to 6.9 ± 75 % NH_4^+-N oxidized. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$ on average at a DO of 2.2 mg O_2. L^{-1}; the variability decreased with increasing oxygenation.

Tableau 20. Nitrogen transformation in batch experiment with activated sludge in denitrifying conditions as a function of oxygen concentrations (DO); negatives values represent disappearance rate and positives values, appearance rate: Ammonium rate (r NH_4+), nitrate rate (r NO_3-), nitrate and nitrite rate (r (NO_3-+NO_2-)) and N_2O emission rate (r N_2O). Percentage of N_2O emission relatively to denitrification (N_2O per NO_3- reduced) is also given.

DO	r NH_4^+	r NO_3^-	r.(NO_3^- + NO_2^-)	r N_2O	% N_2O per NO_3^- reduced
mg L^{-1}	mg N. g SS^{-1} hrs^{-1}	mg N. g SS^{-1} hrs^{-1}	mg N. g SS^{-1} hrs^{-1}	µg N. g SS^{-1} hrs^{-1}	
0.0	4.4	-4.4	-4.2	6.5	0.2
	6.7	-2.0	-0.3	17.0	0.9
	0.4	-5.3	-3.9	11.9	0.2
	2.8	-3.7	-1.0	17.6	0.5
	0.9	-6.1	-4.3	9.7	0.2
	1.7	-6.2	-5.2	12.8	0.2
Average	**2.8**	**-4.6**	**-3.1**	**12.6**	**0.4**
0.3	-0.1	-0.2	-0.6	51.1	
	-0.04	0.03	-0.3	45.3	
	-1.4	-1.5	-0.9	52.6	
Average	**-0.5**	**-0.5**	**-0.6**	**49.7**	**-**
0.5	-2.7	1.55	0.8	22.9	
0.6	0.1	0.20	-0.7	20.9	
Average	**-1.3**	**0.9**	**0.1**	**21.9**	**-**
0.7	-1.4	2.5	1.5	22.4	
	-0.4	1.3	1.2	27.5	
	-0.8	0.8	0.2	13.3	
Average	**-0.8**	**1.5**	**1.0**	**21.1**	**-**
1.1	-3.5	2.9	2.2	14.1	
1.3	-4.7	3.5	3.0	9.5	
Average	**-4.1**	**3.2**	**2.6**	**11.8**	**-**
2.2	-4.3	4.7	5.1	2.5	
	-9.6	11.4	12.1	6.4	
Average	**-6.9**	**8.1**	**8.6**	**4.5**	**-**

Regarding N_2O emission rates (rN_2O), the variability was lower than for the inorganic dissolved nitrogen elements (see Tableau 20), and the apparent maximum value reached 49.7 ± 9 % µg N- N_2O. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$ on average, when the oxygen concentration was around 0.3 mg O_2. L^{-1} (Tableau 20 and Figure 65). Values were lower at zero oxygenation, i.e. an optimal condition for denitrification (12.6 ± 27 % µg N- N_2O. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$ at 0.0 mg O_2. L^{-1}, on average, Tableau 20 and Figure 65), and also decreased at 0.3-0.6 mg O_2. L^{-1}. At 2.2 mg O_2. L^{-1}, N_2O emission rates were relatively low (4.5 ± 86 % µg N- N_2O. g $SS.^{-1}$ $h.^{-1}$, Tableau 20).

Calculation of the percentage of N-N_2O produced per reduced N-NO_3^- in anoxic conditions (0.0 mg O_2. L^{-1}), showed that 0.4 ± 64 % of the reduced N-NO_3^- is removed as N-N_2O (see Tableau 20).

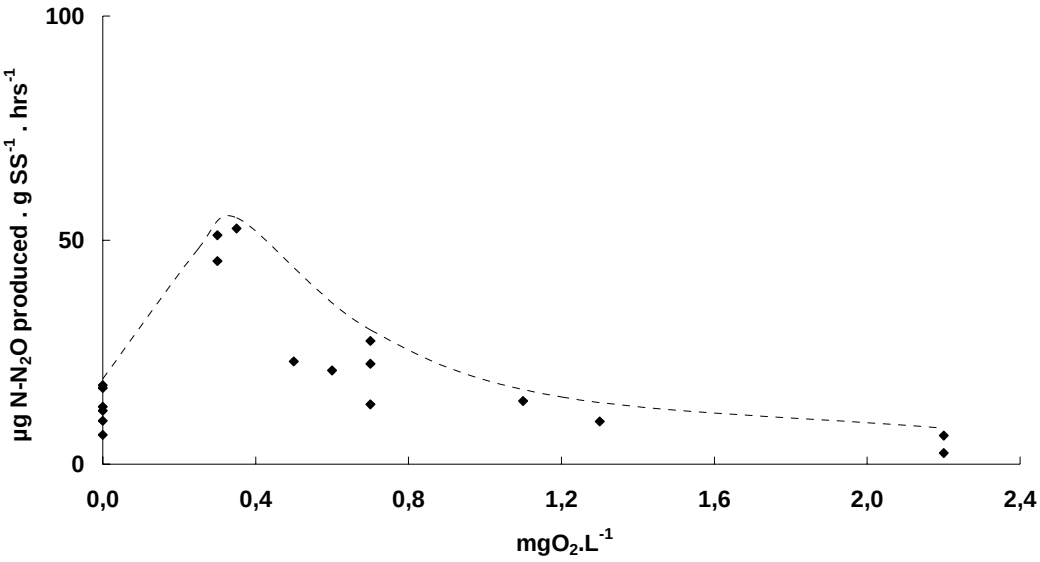


Figure 65. Relationship between nitrous oxide emission rate and oxygenation level in activated sludge from the Valenton WWTP in denitrifying conditions. Dotted line represents wrapper of the data set.

5.3.3 Effect on N_2O emissions of adding nitrous oxide reductase and membrane-bound nitrate reductase inhibitors, in anoxic condition

To estimate the N_2O:N_2 emission percentage in anoxic condition (0.0 mg $O_2.L^{-1}$) from denitrifying activated sludge, the produced N_2 is calculated by difference between the total (N_2O + N_2) production with C_2H_2 and the N_2O produced without C_2H_2. Results showed that the N_2O:N_2 emission percentage was relatively high, 10.4 %, 31.5 % and 27.9 % for the 1, 2 and 3 experiences, respectively (Tableau 21, % N_2O:N_2).

Tableau 21. Batch experiments using inhibitors with activated sludge in denitrifying conditions and anoxia: with ATU (no ammonium oxidation), C_2H_2 (no nitrous oxide reduction) and $NaClO_3$ (no membrane-bound nitrate reduction, i.e. no nitrate ammonification). Ammonium rate (r. NH_4+), nitrate rate (r. NO_3-), nitrite rate (r. NO_2-) and N_2O emission rate (r N_2O). Negatives values represent disappearance rate and positives values, appearance rate. Three experiments are shown as well as their average.

Experimental conditions	r. NH_4^+	r. NO_3^-	r. NO_2^-	r N_2O	N_2O:N_2
	mgN. g S S^{-1}. hrs^{-1}				%
	Experiment 1				
ATU	1.9	- 2.0	0.9	0.06	10.4
ATU + C_2H_2	1.2	- 2.6	1.3	0.64	
ATU + C_2H_2 + $NaClO_3$	- 1,4	- 3.5	0.6	0.96	
	Experiment 2				
ATU	2.1	- 5.3	2.1	0.40	31.5
ATU + C_2H_2	0.7	- 4.5	1.9	1.67	
ATU + C_2H_2 + $NaClO_3$	- 0.5.	- 3.5	1.3	1.58	
	Experiment 3				
ATU	- 0.6	- 4.0	1.7	0.38	27.9
ATU + C_2H_2	-0.7	- 3.6	1.3	1.74	
ATU + C_2H_2 + $NaClO_3$	-1.72	- 3.3	0.9	1.70	
	Average of the three experiments				
ATU	1.1 ± *149%*	- 3.8 ± *50%*	1.6 ± *46%*	0.28 ± *77%*	23.3 ± 55%
ATU + C_2H_2	0.4 ± *265%*	- 3.6 ± *31%*	1.5 ± *27%*	1.35 ± *52%*	
ATU + C_2H_2 + $NaClO_3$	-1.2 ± *57%*	- 3.4 ± *4%*	0.9 ± *41%*	1.41 ± *32%*	

By adding chlorate one can distinguish N_2O emitted by the reduction of nitrate by the membrane-bound nitrate reductase (Nar) and the periplasmic nitrate reductase (Nap), an approach to determination of nitrate ammonification. We did not observe any significant difference in N_2O emissions (Figure 66), with or without added chlorate (the Nar inhibitor), as the average values were 1.35± 52 % (without chlorate) and 1.41± 32 % µg N- N_2O. g SS.$^{-1}$ h.$^{-1}$ (with chlorate), (Tableau 21, r.N_2O averaged for the three experiments). Therefore, no significant amount of N_2O would be emitted from nitrate ammonification. Without chlorate, NH_4^+ rates (r. NH_4^+) were positive for experiments 1 and 2 (1.2 mg N g SS.$^{-1}$ h.$^{-1}$ and 0.7 mg N g SS.$^{-1}$ h.$^{-1}$ respectively, Tableau 21), but not for experiment 3, whereas NH_4^+ always disappeared with chlorate (Tableau 21, r. NH_4^+ with chlorate). Although no N_2O was produced by nitrate ammonification, the process should have occurred in our experiments. Furthermore, we clearly observed a decrease of the NO_2^- appearance rate (r. NO_2^-) with chlorate addition (compared to without) during the three experiments (from 1.4 fold - experiments 2 and 3- to 2.2 fold -experiments 1-, Tableau 21, r. NO_2^-), supporting the assumption of chlorate inhibition of nitrite production through the nitrate ammonification process. The lack of difference between NO_3^- disappearance rates (r. NO_3^-) with or without chlorate (3.6 ± 31 % mg N g SS.$^{-1}$ h.$^{-1}$ and 3.4 ± 4 % mg N g SS.$^{-1}$ h.$^{-1}$ respectively in average of the three experiences, Tableau 21) also supports this assumption.

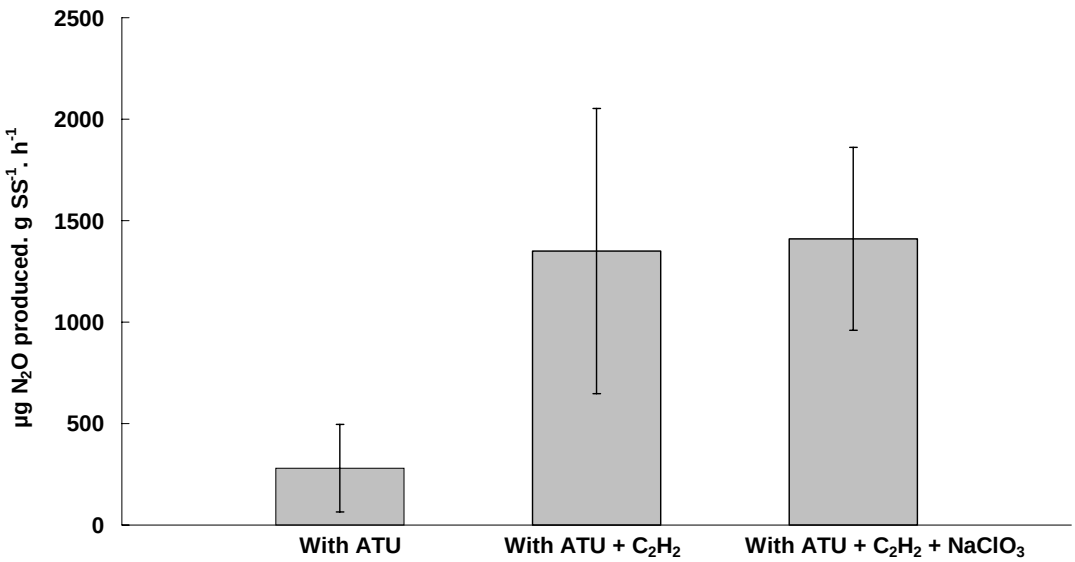


Figure 66. Nitrous oxide emission rate from "denitrifying" activated sludge in anoxic condition, with nitrification inhibitor (ATU), with ATU and nitrous oxide reductase (C_2H_2) inhibitors, with ATU+ C_2H_2 and membrane-bound nitrate reductase ($NaClO_3$) inhibitors.

5.3.4 N_2O emission at four oxygenation levels with nitrification inhibitors

After having verified that the NH_4^+ oxidation did not occur in the presence of ATU and that nitrite was not significantly oxidized with $NaClO_3$ (mean = 0.01 to 0.85 mg N. g SS.$^{-1}$h.$^{-1}$; CI = 196 %; results not shown), we ran batches i) with nitrification inhibitors to measure only denitrification (D), and ii) without inhibitors, thus cumulating ND and D (Tableau 22).

Without inhibitor, we observed an NH_4^+ disappearance rate from a DO of about 0.4 mg O_2. L^{-1}, a nitrification which increased from 1.4 to 3.1 mg N. g $SS.^{-1}h.^{-1}$ with oxygenation (Tableau 22, r NH_4^+, no inhibitor). With inhibitors, we did not observe any nitrification, but a variable NH_4^+ appearance rate, between 0.5 and 4.3 mg N. g $SS.^{-1}h.^{-1}$ (Tableau 22, r NH_4^+, with ATU + $NaClO_3$).

Whereas NO3- disappeared at a DO of < 0.4 mg O2. L-1 without nitrifying inhibitor, NO3- reduction was not clearly shown to occur when we added nitrification inhibitors, except at zero oxygenation, the optimal condition for denitrification (Tableau 22, r NO3-) and, surprisingly, also at 0.7 mg O2. L-1. However, with inhibitors, denitrification can be clearly observed through the disappearance (reduction) of nitrite (Tableau 22, r NO2-, with ATU +NaClO3). When both nitrifier denitrification and heterotrophic denitrification can occur, without an inhibitor, NO2- appearance rates were relatively strong at a DO of about 0.0 to 0.4 mg O2. L-1, (Tableau 22, r NO2-).

Tableau 22. Batch experiments with nitrification inhibitors (ATU and $NaClO_3$, showing denitrification, D) or without (Denitrification + Nitrifier Denitrification, D+ND) at low oxygenation : ammonium rate (r. NH_4+), nitrate rate (r. NO_3-), nitrite rate (r. NO_2-), and N_2O emission rate (r N_2O). Negatives values represent disappearance rate and positives values, appearance rate.

D.O mg O_2. L^{-1}	Nitrogen element rates mg N. g S S^{-1}. $h.^{-1}$							
	r. NH_4^+		r. NO_3^-		r. NO_2^-		r N_2O	
	No inhibitor	With ATU + $NaClO_3$	No inhibitor	With ATU + $NaClO_3$	No inhibitor	With ATU + $NaClO_3$	No inhibitor	With ATU + $NaClO_3$
0.0	0.7	0.5	-2.4	-2.4	1.0	-0.5	0.026	0.026
0.4	-1.4	4.3	-1.5	2.7	0.6	-0.4	0.053	0.023
0.7	-1.5	1.8	0.9	-1.5	-1.0	-0.9	0.031	0.011
1.1	-3.1 *±5%*	0.8 *±40%*	2.3 *±37%*	1.5 *±441%*	-0.9 *±153%*	-1.0 *±67%*	0.029 *±34%*	0.012 *±16%*

Regarding N2O emission, we observed that N2O appearance rates were similar at zero oxygenation with or without inhibitor (when no ND can occur), D thus representing 100 % of the N2O production. Above zero oxygenation, with inhibitor addition, N2O appearance rates were lower than without, as they originated from D and ND simultaneously and cumulated (Tableau 22, r N2O, without and with ATU + NaCLO3, see also Figure 67). Results show that the N2O production from D was lower than the one from ND at 0.4, 0.7 and 1.1 mg O2. L-1 (43.3 %, 36.2 % and 41.8 % against 56.7 %, 63.8 % and 58.2 % respectively), (Figure 67).

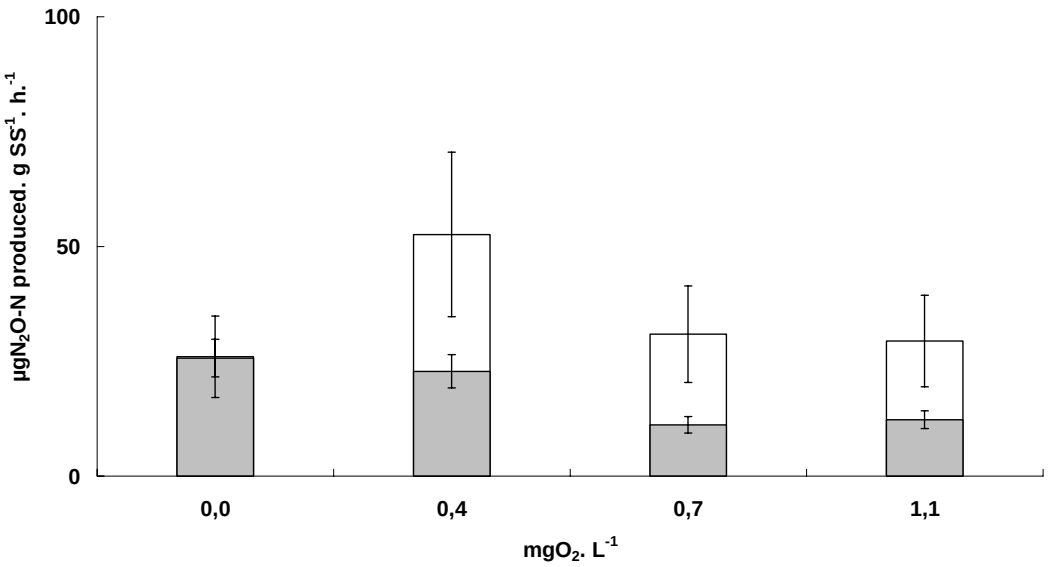


Figure 67. Nitrous oxide emission rate from "denitrifying" activated sludge, according to 4 oxygenation levels (white: without nitrifier denitrification inhibitors addition; grey : with nitrifier denitrification inhibitors addition (ATU and $NaClO_3$)).

5.4 Discussion

5.4.1 Denitrification rate

The major disadvantage of using activated sludge in laboratory batch experiments is the large variability, that necessarily exists *in situ* as well. However the condition of activated sludge denitrification as found in a WWTP secondary treatment have been successfully simulated in our laboratory-scale bioreactor, as shown by the values of the denitrification rate (Tableau 20, r NO_3^-, 4.6 mg N- NO_3^-. g SS^{-1}. $h.^{-1}$ in average at 0.0 mg O_2. L^{-1}), in the same range as that reported in the literature for a continuous denitrification process (4.4 mg N-NO_3^-. L^{-1}. $h.^{-1}$; Foglar et al., 2005).

5.4.2 Effect of oxygenation on N_2O emission rates by denitrifying sludge

The higher production rate of N_2O by WWTP activated sludge in denitrification conditions appeared at 0.3 mg O_2. L^{-1}, whereas the higher production rate of N_2O from the same WWTP activated sludge in nitrifying conditions appeared at 1 mg O_2. L^{-1} (Cebron et al., in revision, for river water ; Tallec et al., submitted, for sludge; see Figure 68). According to Okabe et al. (1999), the nitrifying activated sludge structure is thicker, more packed and without interstitial alveoli compared to heterotrophic activated sludge. As the texture and form of sludge aggregates, in the presence of micro-porosity, can lead to oxygen values lower than those measured (Blicher – Mathiesen and Hoffmann, 1999), the shift of N_2O emission toward lower oxygenation with heterotrophic activated sludge, compared to the autotrophic one, could be explained by the difference in oxygen diffusion, i.e. an overestimate of oxygen concentration in nitrifying activated sludge. However the idea that N_2O production would be higher when the conditions are not optimal is tempting, i.e. a denitrification slightly above zero oxygenation at 0.3 mg O_2 l^{-1}, and a nitrification leading to nitrifying denitrification around 1-2 mg O_2 l^{-1}.

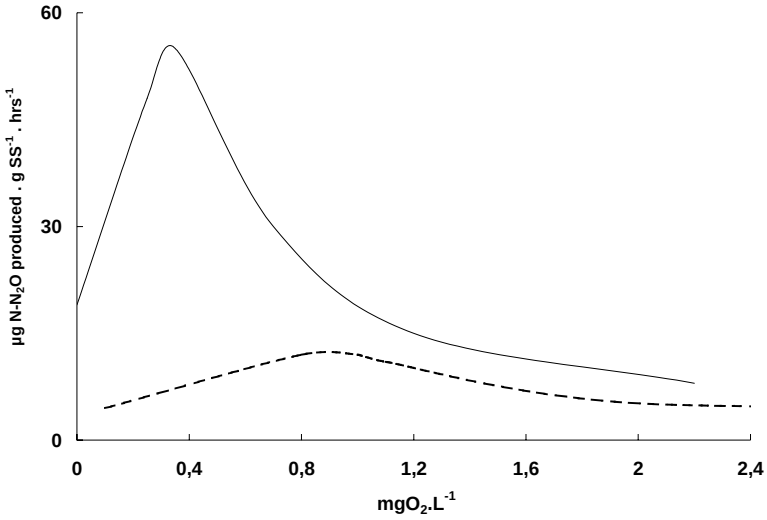


Figure 68. Relationship between nitrous oxide emission rate and oxygenation level on activated sludge in denitrification conditions (black line). Comparison with the one obtained in nitrification conditions (black dotted line; according to Tallec et al, submitted).

Results show that the "denitrifying" of activated sludge reached a maximum of N_2O production up to 53 µg N. g S S^{-1}. $h.^{-1}$, whereas N_2O "nitrifying" activated sludge production was 4.4 times lower, never exceeding 12 µg N. g S S^{-1}. $h.^{-1}$ (Figure 68). Similarly, the results of N_2O production reported by Beline et al. (2001) show that N_2O production in denitrifying conditions is nearly 3.9 times higher than in nitrifying ones. Overall, N_2O is well known to be an intermediate of denitrification, released in high quantities in low oxygen environments with sufficient NO_3^- and biodegradable organic carbon (Gaskell et al., 1981, Itokawa et al., 2001; Bonin et al., 2002). The percentage of N-N_2O produced per N-NO_3^- reduced at zero oxygen is 0.4 % ± 64 %. Our results are well with in the range (0 to 1 %) mentioned by Hanaki et al. (1992) for a bench-scale study of plants with sludge ages of more than 2.5 days and influent COD/ NO_3-N ratios higher than 2.5, which was the case here.

5.4.3 Investigating the effect on N_2O emissions by nitrate ammonification in anoxic condition

With and without addition of chlorate, an inhibitor of membrane-bound nitrate reductase (Nar), we observed nitrate ammonification in our "denitrifying" activated sludge, but it was not associated with N_2O production. Our results do not agree with those by Rusmana and Nedwell (2004) showing that chlorate inhibits Nar activity of both the denitrifying and the nitrate ammonifying bacteria. However, in anoxic conditions in our experiments, denitrifying bacteria with Nap activity were clearly the major producers of N_2O. This could be explained by the fact that the ratio of nitrate ammonifying and denitrifying organisms depended on the C/N ratio; the C/N ratio required for denitrification, would be far lower than the one required for nitrate ammonification (Rehr and Klemme, 1989). Furthermore, nitrate ammonification apparently depends on the nature of available carbon and would be more efficient in nitrate-limited cultures (Bonin, 1996; Akunna et al, 1993). Thus, even if nitrate ammonification occurred in the activated sludge tested here, the conditions would not be conducive to a high activity.

The N_2O:N_2 percentage, calculated from tests with C_2H_2, ranged from 10.4 % to 31.5 %, in agreement with the value found by Hwang and Hanaki (2000) (about 20 % in anoxic conditions).

5.4.4 N_2O emissions from denitrification at low oxygenation: interference with nitrifier denitrification

By adding a nitrification inhibitor one can distinguish the fraction of heterotrophic denitrification (D) from that of autotrophic nitrifier denitrification (ND), responsible for N_2O emissions, as a function of the oxygenation. In anoxic conditions (0.0 mg O_2. L^{-1}), heterotrophic denitrification is the only process producing N_2O (100 % of the N_2O production); this percentage decreases with oxygenation, due to the cumulative effect of nitrifier denitrification : above 0.4 mg O_2. L^{-1}, heterotrophic denitrification which represents less than 50 % of the N_2O production, would be a smaller contributor than nitrifier denitrification. These results support those by Beline et al. (2001) who mentioned that denitrification inhibition occurs at an oxygen concentration greater than 3.8 mg O_2. L^{-1}. We observed a decrease in both denitrification and its related N_2O production with increasing oxygenation. We also confirmed the coexistence of nitrification and denitrification in activated sludge wastewater treatment (see Wild et al., 1994; Zheng et al., 1994; Schulthess et al., 1994; Okabe et al., 1999) and showed that nitrifier denitrification produced slightly more N_2O when the oxygenation of the medium reached 1 mgO_2. L^{-1} (Zheng et al., 1994; Bock et al., 1995; Kuai and Verstraete, 1998; Jiang and Bakken., 1999; Itokawa et al., 2001).

5.4.5 Estimates of N_2O emission in WWTPs

The wastewater treatment plants in the Paris urban area treat a total of 3 10^6 m^3. day^{-1} which represents a reduced nitrogen load of 106 TN day^{-1}. As N_2O emissions during denitrification represent on average, 0.4 % of the reduced NO_3^-, N_2O emissions associated with the denitrification of the entire nitrogen load would amount to 155 TN- N_2O. $year^{-1}$, if all the Paris wastewater was treated by a denitrification process using activated sludge. In the Valenton WWTP, which presently treats 70 % of 0.6 10^6 m^3. day^{-1} by a denitrifying activated-sludge process, the N_2O emissions can, with the same calculation, be estimated at 20 N-N_2O T. $year^{-1}$. This estimate takes into account denitrification processes in totally anoxic conditions only. However, in winter, the oxygen level in non-covered anoxic tanks ranges between 0.4 and 2.0 mg O_2. L^{-1}, which represents favourable conditions for maximum N_2O emissions, i.e. 2 to 4 times more than N_2O emissions at 0.0 mg O_2. L^{-1}. Thus, N_2O emissions from anoxic tanks may be even greater than the above estimates.

In short, to limit N_2O emissions it seems necessary to control the denitrification in such a way that the conditions become effectively anoxic during nitrate removal at WWTPs.

Acknowledgments

This work was undertaken in the framework of the PIREN-Seine programme and funded by the Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP). We are grateful to D. Melet, for helpful questions and suggestions during the study.

5.5 References

Akunna, J.C., C. Bizeau and R. Molleta, 1993. Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources : glucose glycerol acetic acid lactic and methanol. Water Research **27** (8): 1303-1312.

Baumann, B., M. Snozzi, A.J.B. Zehnder and R. J. van der Meer, 1996. Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. Journal of bacteriology. **178** (15): 4367-4374.

Beline, F., J. Martinez, C. Marol and G. Guiraud, 2001. Application of 15 N technique to determine the contributions of nitrification and denitrification to the flux of nitrous oxide from aerated pig slurry. Water Research **35**: 2774-2778.

Bianchi, M., P. Bonin and F. Felatria, 1994. Bacterial nitrification in the Rhône river plume (northwestern Mediterranean Sea). Marine ecology progress series. **103**: 197-202.

Bleakley, B.H., H. Bruce and J.M. Tiedje, 1982. Nitrous oxide production by organisms other than nitrifiers or denitrifiers. Applied and environmental microbiology. **44** (6): 1342-1348.

Blicher – Mathiesen, G. and C. Hoffmann, 1999. Denitrification as a sink for dissolved nitrous in a freshwater riparian fen. Journal of environmental quality **28**: 257-262.

Bliefert, C. and R. Perraud, 2001. Nitrogen oxide. In : De Boeck (ed), Environmental chemistry, air, water, soils, waste., Paris (in French), pp. 177-188.

Bock, E., E. Scmidt, R. Stüven and D. Zart, 1995. Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. Archives of microbiology **163**: 16-20.

Bonin, P., M. Gilewicz and J.C. Bertrand, 1989. Effect of oxygen on each step of denitrification on *Pseudomonas nautica* strain 617. Canadian journal of microbiology. **35**: 1061-1064.

Bonin, P., 1996. Anaerobic nitrate reduction to ammonium in two strains isolated from coastal marine sediment : a dissimilatory pathway. FEMS Microbiology Ecology **19**: 27-38.

Bonin, P., C. Tamburini and V. Michotey, 2002. Determination of bacterial processes which are sources of nitrous oxide production in marine samples. Water Research **36**: 722-732.

Brettar, I. and M.G. Höfle, 1993. Nitrous oxide producing heterotrophic bacteria from a water column of the central Baltic : abundance and molecular identification. Marine ecology progress series. **94**: 253-265.

Brion, N. and G. Billen, 1998. Re-evaluation of $H^{14}CO_3^-$ incorporating method to autotrophic nitrification measure and application to nitrifying biomass estimation. Revue Sciences de l'eau. **11** : 283-302 (French).

Cébron, A., J. Garnier and G. Billen, 2005. Nitrous oxide production and nitrification kinetics by bacteria communities naturally present in river water (the lower Seine, France). Aquatic Microbial Ecology. In press.

Dalsgaard, T., J. Dezwart, L. A. Robertson, J. G. Kuenen and N. P. Revsbech, 1995. Nitrification, denitrification and growth in artificial *Thiosphaera-Pantotropha* biofilms as measured with a combined microsensor for oxygen and nitrous oxide. Fems Microbiology Ecology. **17**(2): 137-147.

Dunn, G.M., R.A. Herbert and C.M. Brown, 1979. Influence of oxygen tension on nitrate reduction by a *Klebsiella sp*. growing on chemostat culture. Journal of general microbiology. **112**: 379-383.

Foglar, L., F. Briski, L. Sipos and M. Vukovic, 2005. High nitrate removal from synthetic wastewater with mixed bacterial culture. Bioresource Technology **96**: 879-888.

Frette, L., B. Bo Gejlsbjerg and P. Westermann, 1997. Aerobic denitrifiers isolated from an alternating activated sludge system. FEMS Microbiology Ecology. **24** (4): 363-370.

Galluzzo, M., R. Ducato, V. Bartolozzi and A. Picciotto, 2001. Expert control of DO in the aerobic reactor of an activated sludge process. Computers and Chemical Engineering. **25**(4-6): 619-625.

Garnier, J., A. Cébron, G. Tallec, G. Billen, M. Sebilo and A. Martinez, 2005. Nitrous oxide emission in the Seine River estuary (France): comparison with upstream sector of the Seine basin. Biogeochemistry. In press.

Gaskell, J. F., A. M. Blackmer and J.M. Bremmer, 1981. Comparison of effects of nitrate, nitrite and nitric oxide on reduction of nitrous oxide to denitrogen by soil microorganisms. Soil Science Society of America journal **45**: 1124-1127.

Greenberg, EP. and GE. Baker, 1977. Nitrous oxide as end product of denitrification by strains of florescent pseudomonads. Canadian Journal of Microbiology. 23 (7): 903-907.

Haider, S., K. Svardal, , P.A. Vanrolleghem and H. Kroiss, 2003. The effect of low sludge age on wastewater fractionation (S_s, S_l). Water science and technology **47** (11): 203-209.

Hall, G.H., 1984. Measurement of nitrification rate in lake sediments : comparison of the nitrification inhibitors nitrapyrin and allylthiourea. FEMS Microbiology ecology. **10**: 25-36.

Hanaki, K., C. Wantawin and S. Ohgaki, 1990. Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. Water Research **24**: 297-302.

Hanaki, K., Z. Hong and T. Matsuo, 1992. Production of nitrous oxide gas during denitrification of wastewater. Water Science and Technology **26** (5/6): 1027-1036.

Hochstein, L.I. and G.A. Tomlison, 1988. The enzymes associated with denitrification. Annual Revue of Microbiology **42**: 231-261.

Hwang, S. and K. Hanaki, 2000. Effects of oxygen concentration and moisture content of refuse on nitrification, denitrification and nitrous oxide production. Bioresource Technology. **71**: 159-165.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2000. Special report on Emissions Scenarios, Cambridge Univ. Press, 599 pp.

Itokawa, H., K. Hanaki and T. Matsuo, 2001. Nitrous oxide production in high-loading biological nitrogen removal process under low COD/N ratio condition. Water Research **353**: 657-664.

Jiang, Q-Q. and L. R. Bakken, 1999. Nitrous oxide production and methane oxidation by different ammonia-oxidizing bacteria. Applied and Environmental Microbiology **65**: 2679-2684.

Kuai, L. and W. Verstraete, 1998. Ammonium removal by the Oygen-limited Autotrophic Nitrification-Denitrification system. Applied and Environmental Microbiology **64**: 4500-4506.

Lindberg, C.F. and B. Carlsson, 1996. Nonlinear and set-point control of the dissolved oxygen dynamic in an activated sludge process. Water Science and technology; **34**: 135-142.

Moreno-Vivian, C., P. Cabello, M. Martinez-Luque, R. Blasco and F. Castillo, 1999. Prokaryotic nitrate reduction : molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. Journal of Bacteriology. **181** (21): 6573-6584.

Okabe, S., H. Satoh and Y. Watanabe, 1999. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridisation and the use of microelectrodes. Applied and Environmental Microbiology **65**: 3182-3191.

Rehr, B. and J-H. Klemme, 1989. Competition for nitrate between denitrifying *Pseudomonas stutzeri* and nitrate ammonifying enterobacteria. FEMS Microbiology Letters. **62** (1): 51-57

Richardson, D.J., B.C. Berks, D.A. Russel, S. Spiro and C.J. Taylor, 2001. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. Cell. Mol. Life Science **58**: 165-178.

Robertson, L.A., T. Dalsgaar, N.P. Revsbech and J.G. Kuenen, 1995. Confirmation of 'aerobic denitrification' in batch cultures, using gas chromatography and 15N mass spectrometry. FEMS Microbiology Ecology. **18**: 113-120.

Rusmana, I. and D.B. Nedwell, 2004. Use of chlorate as a selective inhibitor to distinguish membrane-bound nitrate reductase (Nar) and periplasmic nitrate reductase (Nap) of dissimilative nitrate reducing bacteria in sediment. FEMS Microbiology Ecology. **48**: 379-386.

Satoh, T., S S. Hom and K. T. Shanmugam, 1983. Production of nitrous oxide from nitrite in *Klebsiella pneumoniae*: mutants altered in nitrogen metabolism. Journal of Bacteriology. **155** (2): 454-458.

Schulthess, R.V., D. Wild and W. Gujer, 1994. Nitric and nitrous oxides from denitrifying activated sludge at low oxygen concentration. Water Science and Technology **30**: 123-132.

Smith, M.S. and K. Zimmerman, 1981. Nitrous oxide production by non-denitrifying soil nitrate reducers. Soil Science Society of America Journal. **45**: 865-871.

Smith, M.S., 1983. Nitrous oxide production by *Escherichia coli* is correlated with nitrate reductase activity. Applied and Environmental Microbiology **45**: 1545-1547.

Tallec, G., J. Garnier, G. Billen and M. Gousailles, Submitted. Nitrous oxide emissions from secondary activated sluge in nitrifying and low oxygenation conditions of urban wastewater treatment plants. Water Research.

Tiedje, J.M., S. Sextone and D.D. Mirold, 1982. Denitrification : ecological niches, competition and survival. Antonie Van. Leeuwenhoeck. **48** : 261-284.

Wild, D., R.V. Schulthess. and W. Gujer, 1994. Synthetis of denitrification enzymes in activated sludge : modeling with structure biomass. Water Science and Technology **30**: 113-122.

Wrage, N., G.L. Velthof, M.L. van Beusichem and O. Oenema, 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. Soil Biology and Biochemistry **33**: 1723-1732.

Yoo, C.K., J-M. Lee and I-B. Lee, 2004. Nonlinear model-based dissolved oxygen control in a biological wastewater treatment process. Korean Journal of chemical Engineering. **21**(1): 14-19.

Yoshinari, T., R. Hynes and R. Knowles, 1976. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction and measurement of denitrification and nitrogen fixation in soil. Soil Biology and Biochemistry. **9** (3): 177-183.

Zheng, H., K. Hanaki and T. Matsuo, 1994. Production of nitrous oxide gas during nitrification of wastewater. Water Science and Technology **306**: 134-141.

Zumft, W.G., 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiology and Molecular Biology Review. **61** : 533-616.

Avant – propos :

Nous venons de voir que les émissions d'oxyde nitreux pouvaient être significatives, lors du traitement de l'azote sur boues activées secondaires. Or, la station de Colombes, mais aussi les futurs traitements tertiaires de l'azote au niveau de l'agglomération parisienne, se feront sur des biofiltres immergés. Il est donc intéressant de savoir si les émissions de N_2O sont également significatives lors du traitement des eaux usées sur cultures fixées, et si oui, dans quelle mesure. Un autre paramètre important dans les émissions d'oxyde nitreux, précisément lors de la dénitrification en traitement tertiaire, est l'apport de carbone organique. Sur Colombes, mais aussi sur les traitements tertiaires à venir au niveau de l'agglomération parisienne, cet apport se fait grâce à des ajouts de méthanol plus ou moins importants, en fonction des conditions d'exploitation. Il est donc pertinent de connaître les effets sur les émissions de N_2O, des concentrations de méthanol ajoutées lors de la dénitrification sur cultures fixées.

Nous avons donc, dans cette étude, mesuré les émissions de N_2O lors de la nitrification sur cultures fixées, en fonction de l'oxygénation, et lors de la dénitrification, en fonction d'ajouts croissants de méthanol.

Chapitre 6
-
Traitement de la pollution azotée en station d'épuration par filtres biologiques immergés : Emissions d'oxyde nitreux lors de la nitrification et dénitrification

Projet de soumission à la revue *Techniques Sciences et Méthodes*

Abstract

Nitrous oxide (N_2O) represents a global pollution with climatic effects, at a world and secular scale. It contributes to the greenhouse effect, to the destruction of the stratospheric ozone layer and makes part of the gaseous, which must seen their emissions decrease (Kyoto protocol). Several studies have shown that N_2O could be emitted from wastewater treatment plants (WWTP) with activated sludge processes (Hanaki et al., 1990; Hanaki et al., 1992; Zheng et al., 1994; Tallec et al., submitted a; Tallec et al., submitted b).

However, as we propose here, few authors have studied N_2O emissions during nitrogen removal from fixed culture (Kim et al., 2004). Now, the WWTP of Seine Centre (Colombes, est of Paris), and future nitrogen tertiary treatments of the Parisian conurbation, will use immerged biofilter. It is therefore important to know if N_2O emissions also are significant from nitrogen removal with fixed culture, and if yes, in which way.

We propose here to study two important factors which intervene on N_2O production : oxygen during nitrification and organic carbon supply during denitrification. The WWTP of Seine Centre, and the future nitrogen tertiary treatments of the Parisian conurbation, bring variable methanol quantities, depending of the exploitation conditions.

Key words : N_2O , WWTP, Biofilters, nitrification, denitrification

Résumé

L'oxyde nitreux (N_2O) représente une pollution globale avec des effets au niveau climatique, à l'échelle mondiale et séculaire. Il participe à l'effet de serre, à la destruction de la couche d'ozone stratosphérique et fait partie des gaz qui doivent voir leurs émissions diminuer (protocole de Kyoto). Un certain nombre d'études ont déjà montré que de l'oxyde nitreux est émis au niveau des stations d'épuration (STEP) utilisant les procédés des boues activées (Hanaki et al., 1990; Hanaki et al., 1992; Zheng et al., 1994; Tallec et al., submitted a; Tallec et al., submitted b).

Toutefois, ainsi que nous le proposons ici, peu d'études ont été menées sur les émissions d'oxyde nitreux lors du traitement de l'azote utilisant les cultures fixées (Kim et al., 2004). Or, la station Seine Centre (Colombes, ouest de Paris), mais aussi les futurs traitements tertiaires de l'azote au niveau de l'agglomération parisienne, se feront sur des biofiltres immergés. Il est donc important de savoir si les émissions de N_2O sont également significatives lors du traitement de l'azote sur cultures fixées, et si oui, dans quelle mesure.

Nous nous proposons ici d'étudier deux facteurs importants influençant largement les émissions d'oxyde nitreux : l'oxygène lors de la nitrification et l'apport de carbone organique lors de la dénitrification. Sur la station d'épuration Seine Centre, mais aussi sur les traitements tertiaires futurs de l'agglomération parisienne, l'apport de carbone organique s'effectue avec des ajouts variables de méthanol suivant les conditions d'exploitation.

Mots-clés : N_2O, station d'épuration, biofiltres, nitrification, dénitrification

6.1 Introduction

Les processus biologiques que sont la nitrification et la dénitrification, appliqués dans les traitements d'eaux usées, permettent l'élimination de la pollution azotée, l'obtention d'un effluent de meilleure qualité et donc la réduction de son impact sur le milieu récepteur.

La nitrification est un processus aérobie autotrophe, utilisé pour la conversion de l'ammonium en nitrate, impliquant deux réactions successives : $NH_4^+ \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$. L'ammonium est converti en nitrite lors d'une première étape, la nitrosation (ou nitritation), par les bactéries ammonium-oxydantes, et le nitrite en nitrate lors d'une deuxième étape, la nitratation, par des bactéries nitrite-oxydantes (Bock et al., 1986 ; Bock et al., 1992). La fraction d'organismes nitrifiants diminue avec l'augmentation du ratio C/N dans les eaux usées (Okabe et al., 1996).

La dénitrification est un processus anoxique hétérotrophe utilisé pour la conversion du nitrate en azote gazeux par des organismes dénitrifiants. Elle se définit comme une réduction biochimique du nitrate à travers la séquence de réactions suivantes : $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ (Knowles, 1982). Les organismes dénitrifiants ont besoin d'une source extérieure de carbone organique pour leur biosynthèse et la production d'énergie.

Lors du traitement des eaux, la nitrification et la dénitrification sont le plus souvent réalisées en deux étapes séparées, les conditions environnementales de ces processus étant différentes. La composition des eaux usées à traiter (i.e. le ratio C/N et les différents types d'éléments azotés) et les objectifs de rendement épuratoire déterminent l'ordre dans lequel ces processus sont mis en oeuvre.

Ainsi, le traitement biologique des eaux usées se fait grâce à la culture de populations bactériennes spécialisées qui peut être intensifiée et accélérée par des techniques d'ingénierie. La culture des bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes peut se faire selon deux techniques différentes : en culture libre (boues activées) et en cultures fixées. Toutefois, les techniques sur cultures fixées, les biofiltres immergés par exemple, sont destinées à jouer un rôle de plus en plus important dans l'élimination de la pollution azotée des eaux usées. En effet, les principaux avantages des biofiltres par rapport aux boues activées sont leur compacité et leur efficacité pour le traitement biologique des eaux.

Actuellement, au niveau de l'agglomération parisienne (environ 10 10^6 habitants), sur les 2.6 10^6 m^3 d'eaux usées traitées chaque jour par le Syndicat d'assainissement de l'agglomération parisienne (SIAAP), 23 % subissent une nitrification et une dénitrification sur boues activées au niveau de la station de Seine Amont (Valenton, est de Paris), et 10 % au travers de biofiltres immergés à la station de Seine Centre (Colombes, ouest de Paris). Environ 65 % de ces eaux passent sur la station d'épuration (STEP) de Seine Aval (Achères, ouest de Paris), la plus importante d'Europe, qui n'élimine pas actuellement la pollution azotée, mais qui, au terme de son projet de rénovation, traitera 100 % de l'ammonium par nitrification en 2007 et 100 % du nitrate par dénitrification en 2015 (30 % seulement en 2007). Ce traitement y sera réalisé sur cultures fixées (filtres biologiques immergés), avec ajout de méthanol pour la dénitrification. Un tel traitement de l'azote est également prévu dans deux nouvelles stations d'épuration, les Grésillons et la Morée, en projet pour 2007 et 2015 respectivement.

Il est désormais démontré qu'une part significative des émissions globales d'oxyde nitreux (N_2O) peut être attribuée aux processus de nitrification et de dénitrification (Bliefert & Perraud., 2001). Le N_2O représente une pollution globale avec des effets au niveau climatique, à l'échelle mondiale et séculaire. Il participe à l'effet de serre, avec un potentiel de

réchauffement 320 fois plus élevé que celui du dioxyde de carbone (CO_2) et une durée de vie particulièrement importante d'environ 120 ans (IPCC, 2000). De plus, il participe aux réactions photochimiques au niveau de la stratosphère, pour donner de l'oxyde nitrique (NO), gaz destructeur de la couche d'ozone stratosphérique (Bliefert & Perraud., 2001).

Les processus de nitrification et de dénitrification, intégrant les émissions de N_2O, sont de plus en plus pris en charge de manière accélérée et contrôlée au niveau des stations d'épuration, alors qu'ils se produisaient essentiellement et naturellement dans le milieu récepteur, la Seine en aval de Paris. Un certain nombre d'études ont déjà montré que le N_2O est émis au niveau des stations d'épuration utilisant les procédés des boues activées (Hanaki et al., 1990; Hanaki et al., 1992; Zheng et al., 1994; Tallec et al., submitted a ; Tallec et al., submitted b). Toutefois, ainsi que nous le proposons ici, peu d'études ont été menées sur les émissions de N_2O lors des traitements de l'azote utilisant les cultures fixées (Kim et al., 2004).

Nous avons ainsi étudié lors de la nitrification et de la dénitrification, en fonction de certaines variables accessibles à l'exploitant tels que l'oxygénation et l'ajout de méthanol, les émissions de N_2O qui pourraient être issues de l'amélioration du traitement de l'azote domestique de l'agglomération parisienne. Nos essais ont été réalisés en pilote de laboratoire sur des échantillons de cultures fixées et d'eau provenant des stations d'épuration Seine Centre (Colombes, ouest de Paris) et Seine Aval (Achères, ouest de Paris).

6.2 Matériel et Méthodes

6.2.1 Les sites d'étude : les STEPs Seine Centre et Seine Aval

La station Seine Centre (Colombes, ouest de Paris) traite 2.4 10^5 m^3 j^{-1} par temps sec, soit 800 000 Equivalents Habitants, au travers des différents traitements présentés sur la Figure 69. L'eau à traiter, après élimination de la pollution carbonée, passe sur 29 Biostyr ®, permettant la nitrification, avec un rendement d'élimination d'azote Kjeldahl total (NTK) de 90 %. Une partie de l'eau nitrifiée (1.9 10^5 m^3 j^{-1} environ) est répartie sur 12 Biofor®, pour subir une dénitrification qui permet l'élimination de 70 % des nitrates ($N\text{-}NO_3^-$). L'élimination de la pollution carbonée étant ici presque totale, il y a un ajout de méthanol (CH_3OH) de l'ordre de 3 kg CH_3OH / kg $N\text{-}NO_3^-$. Les temps de contact pour un Biostyr ® en nitrification et un Biofor® en dénitrification sont respectivement de 40 et 24 minutes.

Par temps de pluie, la station peut atteindre un débit de pointe de 6.9 10^5 m^3 j^{-1} où seule la pollution carbonée est éliminée.

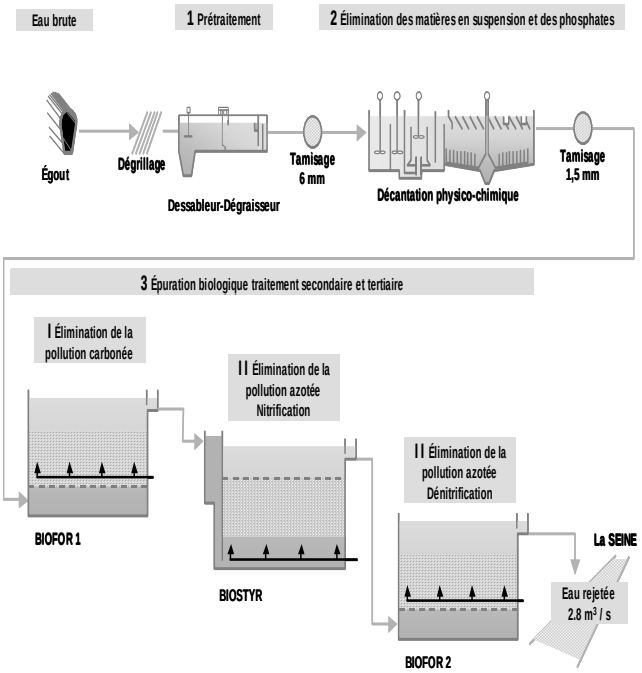


Figure 69. Traitements des eaux en temps sec sur la station d'épuration Seine Centre (Colombes, ouest de Paris), utilisant un traitement biologique sur cultures fixées.

Sur 3 mètres de hauteur, le Biostyr ® est garni de billes de polystyrène expansées de 3,5 mm de diamètre. Son volume est de 333 m^3 (Figure 70a). Ill dispose d'un plafond muni de crépines qui retient le matériau flottant, la densité du matériau étant plus légère que l'eau. C'est un système de filtration biologique avec un flux d'eau (5 m h^{-1}) et d'air (8m h^{-1}) à co-courant ascendant.

Le matériau filtrant du Biofor® est constitué sur 3 à 4 mètres de hauteur, d'argile expansée sphérique, appelée biolite®, de 3 à 4 mm de granulométrie (Figure 70b). Ce matériau repose sur un plancher muni de buselures, qui permettent l'équipartition des fluides, à travers lesquelles est introduite l'eau à traiter. Le courant d'eau de 12 m h^{-1} est ascendant.

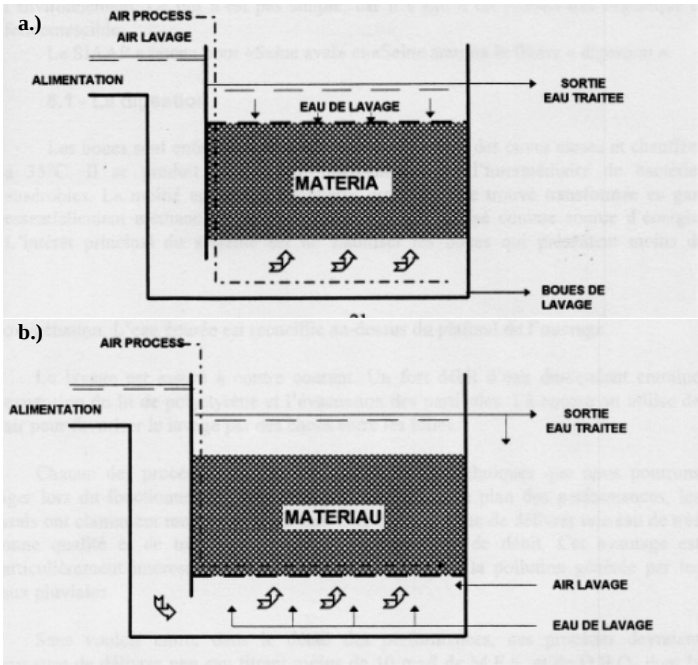


Figure 70. Procédés de lits bactériens immergés utilisés pour le traitement biologique à la station d'épuration de Colombes (ouest de Paris) –a. procédé Biostyr ® , b. procédé Biofor ®.

On note que les cheminements de l'eau, et de l'oxygène surtout, à travers le biofiltre, ne sont pas homogènes, même avec les précautions prises d'équi-répartitions.

Régulièrement (30 à 40 minutes toutes les 24 heures environ) un lavage, fonction de la charge hydraulique (C_h : nombre de m^3 d'eau apportés par m^2 de réacteur et par heure) est effectué, permettant le détassage du lit et l'entraînement des particules stockées. Il est assuré par un co-courant à des séquences appropriées de forts débits d'eau et d'air et élimine en moyenne 4 kg m^{-3} de MES, contre 5 à 6 kg m^{-3} de matières en suspension (MES) retenues par le filtre au cours d'un cycle de fonctionnement.

Les caractéristiques d'exploitation des biofiltres sur la station Seine Centre sont différents pour le Biostyr ® en nitrification et le Biofor® en dénitrification (Tableau 23).

Tableau 23. Ordre de grandeur des différents paramètres relatifs aux traitements de l'azote en cultures fixées des eaux usées urbaines, en temps sec sur la station d'épuration de Colombes (ouest de Paris).

Traitement	Paramètres		Ordre de grandeur	Unité
Nitrification Biostyr ®	Vitesses ascensionnelles	Eau	5	m h^{-1}
		Air	8	m h^{-1}
	Hauteur de matériau		3	m
	Fréquence des lavages		30min toutes les 24 h	
	Charge Volumique		0.7	Kg NTK m^{-3} de matériau j^{-1}
Dénitrification Biofor®	Vitesses ascensionnelles	Eau	12	m h^{-1}
		Air	0	m h^{-1}
	Hauteur de matériau		3	m
	Fréquence des lavages		30min toutes les 24 h	
	Charge Volumique		2.2	Kg NTK m^{-3} de matériau j^{-1}

Notre deuxième site d'étude est une station pilote - la station « 60 000 » - située au sein de la station Seine Aval (Achères, ouest de Paris). Cette dernière traite une partie de ses eaux, 0.6 10^5 m^3 j^{-1}, à travers un prototype de type Biofor®, permettant le traitement tertiaire via la nitrification d'eau traitée en aval par des bassins à boues activées de type combiné (procédé permettant une phase d'aération où sont cultivées les bactéries aérobies qui dégradent les matières dissoutes, et une phase de décantation qui s'effectue dans le même réacteur). Les caractéristiques du Biofor® sont les mêmes que celles utilisées sur Seine Centre. Il en va de même pour les paramètres d'exploitation, identiques à ceux utilisés pour le Biostyr ® en nitrification sur la station d'épuration Seine Centre (Tableau 23) , mais avec toutefois, une vitesse ascensionnelle de l'air plus importante, de 20 m h^{-1}.

6.2.2 Le bio-réacteur

Pour des essais en dénitrification et en nitrification, nous avons choisi un type unique de biofiltre plus facile à mettre en œuvre, le type Biofor® (Figure 71).

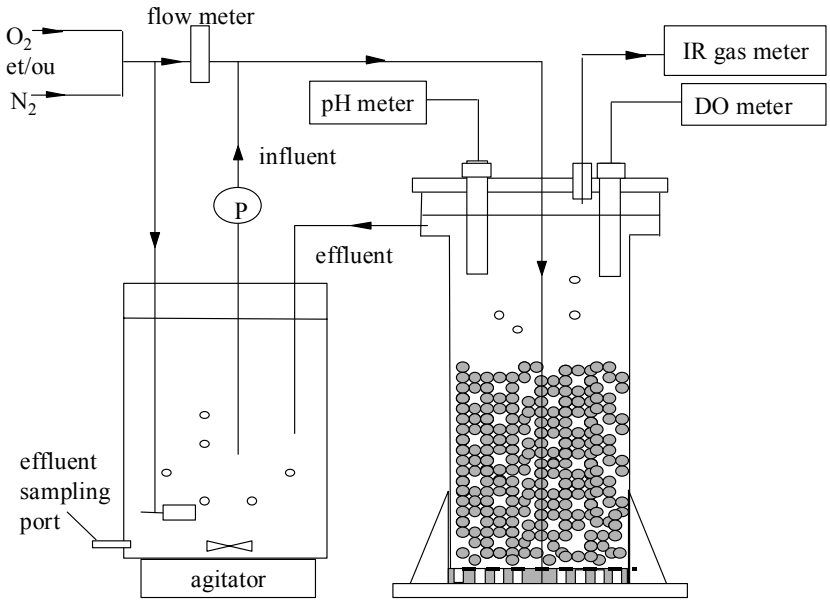


Figure 71. Description du pilote de laboratoire de type Biofor®. Le matériau utilisé pour les cultures fixées est de type biolite®. La circulation ascendante des fluides - eau et gaz - est contrôlée, et le pilote et la réserve sont fermés hermétiquement afin de récupérer et de mesurer les émissions de N_2O. Un plancher perforé permet l'équipartition des fluides.

Le bio-réacteur de type biofiltre immergé, d'une capacité de 7 L, est rempli d'un volume de 4.6 L de biolite® (argile expansée sphérique). Pour les essais de nitrification, nous avons utilisé une biolite® nitrifiante provenant du Biofor® de la station « 60 000 », alors que les essais de dénitrification ont été effectués avec une biolite® dénitrifiante provenant d'un des Biofors® de Seine Centre.

Le bio-réacteur est alimenté de façon continue et en circuit fermé avec l'eau de la réserve (Figure 71). Le volume total d'eau circulant (réserve + bio-réacteur) est de 4.8 L.

Pour les expériences de nitrification, le bio-réacteur a été alimenté avec de l'eau clarifiée, la même qui alimente normalement le Biofor® de la station pilote « 60 000 » de Seine Aval. Cette eau contient typiquement, 48 mg MES L^{-1}, 32 mg L^{-1} de matière organique, 70 mg L^{-1} de N-NTK, 30 mg L^{-1} de $N\text{-}NH_4^+$, 0 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_2^-$, 0 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_3^-$, 187 mgO_2 L^{-1} de Demande Chimique en Oxygène (DCO), 304 mg L^{-1} de $CaCO_3$ et un pH de 7.5.

Pour les expériences de dénitrification, le bio-réacteur a été alimenté avec de l'eau nitrifiée, celle qui alimente normalement les Biofors® de Seine Centre. Cette eau nitrifiée a été prélevée en amont du point d'injection de méthanol, source de carbone pour le métabolisme des bactéries hétérotrophes dénitrifiantes utilisé à Seine Centre. Cette eau contient typiquement, 4.8 mg MES L^{-1}, 1.9 mg L^{-1} de N-NTK, 1 mg L^{-1} de $N\text{-}NH_4^+$, 0.1 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_2^-$, 21 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_3^-$, 25.9 mgO_2 L^{-1} de Demande Chimique en Oxygène (DCO), 2.8 mgO_2 L^{-1} de Demande Biochimique en Oxygène (DBO_5), 165.9 mg L^{-1} de $CaCO_3$ et un pH de 7.07.

Lors de la nitrification, la vitesse ascensionnelle de l'eau dans le bio-réacteur est de 5 m h^{-1} (soit un débit contrôlé par une pompe péristaltique de 52 L h^{-1}) et de 12 m h^{-1} lors de la dénitrification (soit un débit de 127.7 L h^{-1}).

Un flux gazeux est introduit en même temps que l'eau, au travers d'un plancher perforé qui permet l'équipartition des fluides (Figure 71).

L'injection d'un mélange gazeux (N_2 et d'O_2) permet d'obtenir des conditions d'oxygénation différentes et contrôlées à débit constant (0.0 mgO_2 L^{-1} pour la dénitrification et de 0.1 à 9.2 mgO_2 L^{-1} pour la nitrification). La vitesse ascensionnelle du mélange gazeux

injecté dans le bio-réacteur est de 20 m h^{-1} (soit un flux d'air entrant, contrôlé par un débitmètre étalonné, de 206.7 L h^{-1}), tant pour la nitrification que la dénitrification. Ceci correspond au débit d'air imposé sur le Biofor® de la station « 60 000 ». Le bio-réacteur étant fermé hermétiquement et l'analyseur IR ne mesurant des concentrations de N_2O qu'à partir d'un flux gazeux, nous avons dû introduire, lors de la dénitrification dans le bio-réacteur, un flux de N_2 permettant l'échantillonnage gazeux. La vitesse ascensionnelle du N_2 introduit, et qui normalement n'existe pas en dénitrification, a été choisie identique à celle appliquée en nitrification, ce qui permet de comparer nos résultats d'émissions de N_2O entre le processus de nitrification et de dénitrification sur cultures fixées.

On injecte également le mélange gazeux dans la réserve pour que le système soit homogène. De plus, en dénitrification, un ajout de sulfite au niveau de la réserve (concentration finale de 66 mg L^{-1}) est nécessaire pour obtenir de parfaites conditions anoxiques.

Le réacteur et la réserve sont fermés hermétiquement ce qui permet de mesurer en continu le flux de N_2O. Le temps de contact eau-cultures fixées est de l'ordre de 40 à 160 min en nitrification (en fonction de l'oxygénation) et de 20 à 100 min en dénitrification (en fonction de la quantité de méthanol ajoutée).

6.2.3 Les expériences en Batch

Au cours d'une même semaine, après échantillonnage de l'eau d'alimentation et de la biolite® au jour j, les expériences sont menées sur trois jours consécutifs (j+1, j+2, j+3), avec trois batchs par jour, i.e. trois oxygénations différentes pour la nitrification ou trois concentrations de méthanol différentes pour la dénitrification.

Pour chacun des batchs (9 au total durant la semaine), le bio-réacteur est alimenté avec la biolite et l'eau prélevée au jour j. L'eau est conservée pendant les trois jours à 4 °C maximum, tandis que la biolite® est alimentée hors essais (j à j+1) par une solution contenant de l'ammonium (concentration finale, 30 mgN L^{-1}) ou du nitrate (concentration finale, 15mgN L^{-1}), aérée ou non, selon que l'on explore la nitrification ou la dénitrification respectivement.

Lors de la dénitrification, des doses différentes d'une solution de méthanol (CH_3OH) à 790 g L^{-1} sont ajoutées. Ces quantités de méthanol correspondent à un pourcentage (de 38 à 195 %) de nitrate potentiellement réduit par rapport à la concentration finale de méthanol ajouté, soit le rapport MeH = $[(CH_3OH_{ajoûté} / 3 *100)/ N\text{-}NO_3^{-}{}_{\text{de départ}}]$, sachant que 3g de CH_3OH permettent la réduction de 1g $N\text{-}NO_3$ (Koopman et al., 1990; Claus & Kutzner, 1985).

6.2.4 Echantillonnages et Analyses

Durant chaque expérience en batch, des échantillons d'eau sont prélevés dans la réserve toutes les 10 min. Les éléments azotés (NH_4^+, NO_3^- et NO_2^-) sont immédiatement analysés par colorimétrie à l'aide de Test tube (Nova 60 Spectroquant®).

Les flux de N_2O gazeux sont analysés en continu (toutes les minutes) par un analyseur Infra - Rouge (URAS 14 Advance Optima, Hartmann & Braun).

L'oxygène dissous est mesuré à la sortie du réacteur (toutes les minutes) à l'aide d'une sonde à oxygène (oxymètre WTW Oxi 330). La température, stabilisée à 19°C, et le pH (7 - 8.5) sont régulièrement contrôlés.

6.3 Résultats

6.3.1 Nitrification en cultures fixées à différentes oxygénations : émissions de N_2O

L'activité nitrifiante (oxydation du NH_4^+) n'est visible qu'à partir d'une oxygénation au moins égale à 0.5 mg O_2 L^{-1} et augmente avec l'oxygénation jusqu'à atteindre 62.6 mgN-NH_4^+ L biolite^{-1} h^{-1} à 9.2 mg O_2 L^{-1} (Tableau 24, moyenne de rNH_4^+). La moyenne des vitesses de nitrification pour chaque oxygénation (Tableau 24, moyenne de rNH_4^+), suit une courbe de type michaëlienne (Figure 72), présentant une constante de demi-saturation (K_m) de 4 mg O_2 L^{-1} et une vitesse maximale (V_{max}) de 80 mgN- NH_4^+ L biolite^{-1} h^{-1} calculée à partir de la courbe de Lineweaver-Burk (R=0.94).

*Tableau 24. Vitesses d'apparition (valeurs positives) ou de disparition (valeurs négatives) des différents éléments azotés lors de la nitrification sur cultures fixées à des oxygénations différentes : l'ammonium (r NH_4+), le nitrate et le nitrite (r(NO_3- + NO_2-)) et le N_2O (r N_2O). Pourcentages des flux de N_2O par rapport à la vitesse de disparition de l'ammonium (Y N2O = r N_2O / r NH_4+*100)*

DO	r NH_4^+	r(NO_3^- + NO_2^-)	r N_2O	Y N_2O
mg L^{-1}	mgN L biolite^{-1} h^{-1}	mgN L biolite^{-1} h^{-1}	µg N L biolite^{-1} h^{-1}	%
0,1	2.6	-5.2	55.3	ND
	3.6	-7.5	1.3	ND
Moyenne	**3.1**	**- 6.4**	**28.3**	**ND**
0.52	-14.5	2.0	66.8	0.46
0.54	- 4.0	3.3	6.9	0.17
0.61	- 4.9	7.4	50.2	1.03
0.63	- 29.5	22.1	45.0	0.15
Moyenne	**-13.2**	**8.7**	**42.2**	**0.45**
1.0	- 17.7	16.0	53.4	0.30
1.1	- 11.9	9.6	97.4	0.82
1.3	- 14.0	10.1	24.5	0.18
Moyenne	**- 14.5**	**11.9**	**58.4**	**0.43**
3.1	- 25.8	32.9	101.2	0.39
Moyenne	**- 25.8**	**32.9**	**101.2**	**0.39**
4.4	- 35.3	39.8	48.1	0.14
5.4	- 32.2	35.6	104.8	0.33
5.5	- 47.6	54.7	285.4	0.60
Moyenne	**- 38.4**	**43.4**	**146.1**	**0.35**
9.2	- 62.6	72.3	224.2	0.36
Moyenne	**- 62.6**	**72.3**	**224.2**	**0.36**

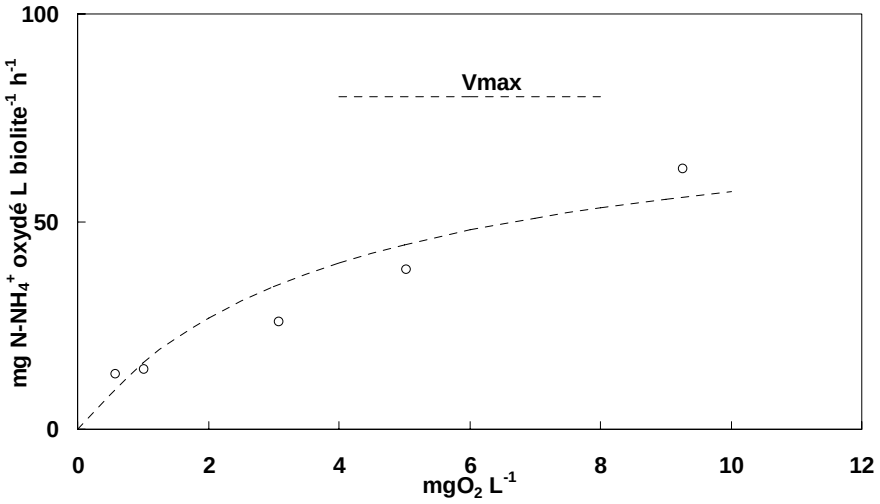


Figure 72. Relation entre les vitesses de nitrification (NH_4+ oxydé) et l'oxygénation en cultures fixées. K_m = 4 mg O_2 L-1 et V_{max} = 80 mgN- NH_4+ L biolite-1 h-1 ont été calculés à partir de la courbe Lineweaver-Burk (R = 0.94), rNH_4+ étant moyennée pour chaque oxygénation.

Il apparaît également que, lors de la nitrification, la vitesse d'oxydation de l'ammonium est supérieure à la vitesse d'apparition des nitrates et des nitrites jusqu'à une oxygénation de 1 mg O_2 L^{-1}; au-delà le phénomène s'inverse (Tableau 24, rNH_4^+ et r(NO_3^- + NO_2^-)).

Pour une faible oxygénation (0.1 mg O_2 L^{-1}), l'activité nitrifiante n'est pas visible et l'on observe même une ammonification, de l'ordre de 3.1 mgN L biolite^{-1} h^{-1} (Tableau 24, moyenne de r NH_4^+). Il se produit en revanche une réduction des nitrates et des nitrites (Tableau 24, moyenne de r(NO_3^- + NO_2^-), 6.4 mgN L biolite^{-1} h^{-1}).

Alors que les résultats présentent des flux de N_2O variables pour une même oxygénation (Tableau 24), les moyennes de ces flux pour chaque oxygénation semblent montrer que le N_2O émis lors de la nitrification est positivement relié à l'oxygénation (R^2= 0.99), (Figure 73).

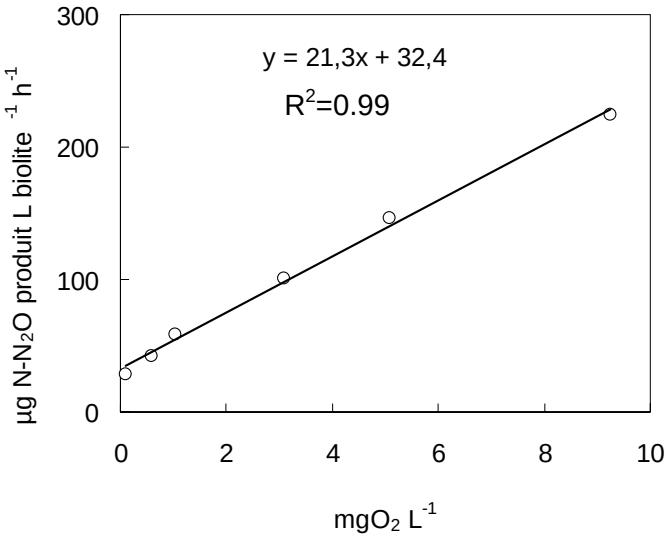


Figure 73. Relation entre les moyennes des émissions de N_2O (r N_2O) pour chaque oxygénation et l'oxygénation lors de la nitrification sur cultures fixées.

Toutefois, par rapport aux vitesses d'oxydation de l'ammonium, le pourcentage de N_2O émis est plus important lorsque l'oxygénation est faible (comprise entre 0.5 et 1 mg O_2 L^{-1}) représentant jusqu'à 1 % de l'ammonium oxydé (Figure 74). En moyenne, le N_2O émis lors de la nitrification représente 0.4 % de l'ammonium oxydé (Tableau 24, Y N_2O et Figure 74).

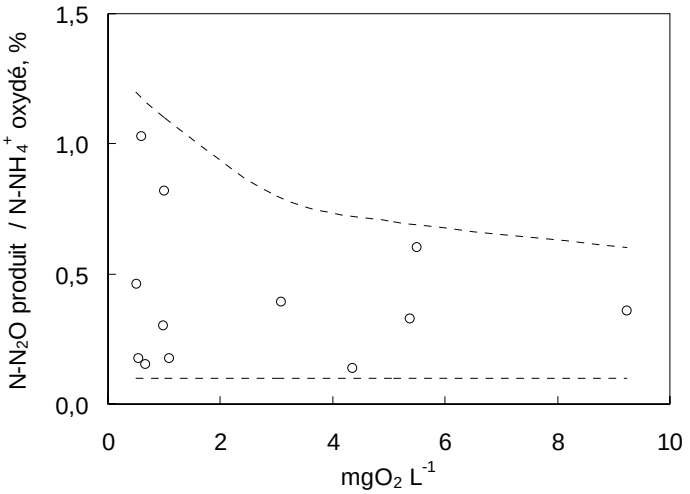


Figure 74. Pourcentages (Y N_2O) des émissions de N_2O (r N_2O) par rapport aux vitesses d'oxydation du NH_4+ (r NH_4+) en fonction de l'oxygénation, lors de la nitrification sur cultures fixées. Les lignes en pointillés représentent la variation de l'ensemble des données.

6.3.2 Dénitrification en cultures fixées avec différentes concentrations en Méthanol : émissions de N_2O

L'activité dénitrifiante (réduction de (NO_3^- + NO_2^-)) est visible même avec des concentrations en méthanol relativement faibles (3.8 mgN L biolite^{-1} h^{-1} avec 34 % de MeH par exemple), (Tableau 25, r (NO_3^- + NO_2^-)); cette activité augmente avec des doses croissantes de méthanol jusqu'à atteindre 28.6 mgN L biolite^{-1} h^{-1} avec un MeH supérieur à 100 % (Tableau 25, moyenne de r (NO_3^- + NO_2^-)).

*Tableau 25. Vitesses de disparition des différents éléments azotés lors de la dénitrification sur cultures fixées en fonction du rapport MeH (= [($CH_3OH_{ajouté}$ / 3 *100)/ N-NO_3- $_{de\ départ}$]) : le nitrate (r NO_3-), le nitrate et le nitrite (r(NO_3- + NO_2-)) et le N_2O (r N_2O). Pourcentages des flux de N_2O par rapport à la vitesse de disparition du nitrate (Y N2O = r N_2O / r NO_3- *100)*

MeH	r NO_3^-	r(NO_3^- + NO_2^-)	r N_2O	Y N_2O
%	mgN L biolite^{-1} h^{-1}	mgN L biolite^{-1} h^{-1}	µg N L biolite^{-1} h^{-1}	%
34	3.5	3.8	5.3	0.2
40	7.4	7.9	13.2	0.2
Moyenne	**5.5**	**5.9**	**9.3**	**0.2**
66	4.5	5.3	59.8	1.3
66	12.2	12.0	32.8	0.3
Moyenne	**8.4**	**8.7**	**46.3**	**0.8**
88	17.1	17.6	27.3	0.2
Moyenne	**17.1**	**17.6**	**27.3**	**0.2**
134	29.8	26.1	13.5	0.1
194	33.2	31.1	18.6	0.1
Moyenne	**31.5**	**28.6**	**16.1**	**0.1**

Nous constatons que les vitesses de dénitrification sont directement proportionnelles (R^2= 0.90) aux quantités de méthanol ajoutées (Figure 75)**.** On observe également, lorsque le rapport MeH est inférieur ou égal à 88 %, une légère accumulation des nitrites ; la vitesse de réduction du nitrate étant inférieure à la somme des vitesses de réduction des nitrates et des nitrites (Tableau 25, r NO_3^- et r (NO_3^- + NO_2^-)), phénomène qui disparaît pour les plus fortes valeurs de méthanol ajoutées (> à 100 %).

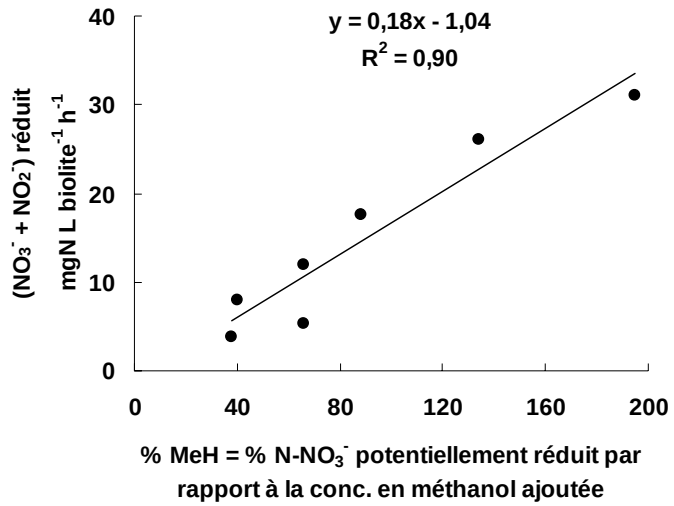


Figure 75. Vitesses de dénitrification (r (NO_3- + NO_2-)) sur cultures fixées, en fonction du rapport MeH qui correspond au pourcentage de nitrate potentiellement réduit par rapport à la concentration de méthanol ajoutée.

Si les flux de N_2O, pour une même quantité de méthanol ajoutée, peuvent apparaître variables d'un facteur 2 (Tableau 25, r N_2O entre 34 et 40 % de MeH), on peut toutefois observer un pic significatif des émissions de N_2O (r N_2O) lorsque les quantités de méthanol permettent entre 66 et 88 % de la dénitrification totale, atteignant jusqu'à 59.8 µgN L biolite^{-1} h^{-1} (Tableau 25, r N_2O et Figure 76). En dehors de ces concentrations en méthanol, les flux de N_2O diminuent et sont inférieurs à 20 µgN L biolite^{-1} h^{-1} (Tableau 25, r N_2O et Figure 76).

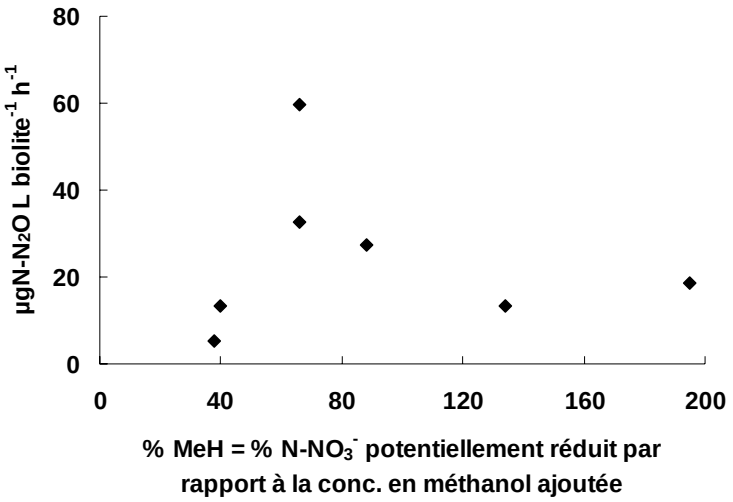


Figure 76. Flux de N_2O émis (r N_2O) sur cultures fixées lors de la dénitrification, en fonction du rapport MeH qui correspond au pourcentage de nitrate potentiellement réduit par rapport à la concentration de méthanol ajoutée.

Si le pourcentage de N_2O émis par rapport aux vitesses de réduction du nitrate représente en moyenne 0.2 % du nitrate réduit (Tableau 25, Y N_2O), ce pourcentage augmente considérablement lorsque le méthanol ajouté permet seulement 66 % de la dénitrification totale, atteignant jusqu'à 1.3 % du nitrate réduit (Tableau 25, Y N_2O).

6.4 Discussion

6.4.1 Nitrification et émissions de N_2O : variations en fonction de l'oxygénation

L'activité nitrifiante à l'intérieur du pilote de laboratoire est comparable à celles citées dans la littérature; suivant les particularités des procédés utilisés, les vitesses optimales de nitrification sur cultures fixées citées, varient entre 20 et 233 mgN-NH_4^+ L^{-1}de matériau h$^{-1.}$ (Lazarova et al., 1997 ; Garrido-Fernandez et al., 2000 ; Lee et al., 2003 ; Tarre & Green, 2004), la valeur moyenne de rNH_4^+ obtenue ici étant de 62.6 mgN-NH_4^+ L biolite^{-1} h^{-1} à 9.2 mg O_2 L^{-1} (Tableau 24). Par comparaison, en conditions *in situ*, la vitesse de nitrification à la station Seine Centre, traitant 2.4 10^5 m^3 j^{-1} avec un rendement épuratoire de 90 % (soit 6.2 TN j^{-1}) sur 29 biostyr® (soit 9 657 m^3 de matériau), peut être estimée à environ 27 mgN-NH_4^+ L^{-1}de matériau h^{-1}. Ces résultats montrent donc que les conditions de nitrification rencontrées sur les procédés en cultures fixées, ont été simulées avec succès dans notre bio-réacteur.

Les vitesses de nitrification, mesurées sur le pilote de laboratoire, diffèrent suivant l'oxygénation (Figure 72). En effet, lorsque l'oxygène devient le substrat limitant, la vitesse de nitrification est liée à l'oxygène dissous par une fonction d'ordre ½ (Nogueira et al., 1998).

Ces auteurs reportent également, que le coefficient moyen de diffusion de l'oxygène à l'intérieur du biofilm, serait autour de 66 % de la valeur respective mesurée dans l'eau. Pour les essais présentant une oxygénation mesurée dans l'eau de 0.1 mg O_2 L^{-1}, nous avions donc une concentration en oxygène à l'intérieur du biofilm proche de 0.0 mg O_2 L^{-1}. Ceci expliquerait la dénitrification observée à cette faible oxygénation (Tableau 24, r(NO_3^- + NO_2^-)) et confirmerait la coexistance des bactéries hétérotrophes et autotrophes au sein des biofilms.

De nombreux auteurs ont en effet montré que les agrégats bactériens sur cultures fixées présentaient une activité nitrifiante sur les premier 120 µm du biofilm alors que les bactéries autotrophes seraient limitées par la pénétration de l'oxygène dans les couches profondes du biofilm (De Beer et al., 1993 ; Schramm et al., 1998 ; Hibiya et al. 2003). Schramm et al. (2000) ont, en outre, montré que dans cette zone anoxique, les bactéries nitrifiantes étaient représentées en très faible proportion. Tout comme cela a été montré dans les boues activées (Okabe et al., 1999), on peut donc penser que dans les cultures fixées, des bactéries hétérotrophes peuvent être présentes dans les couches profondes du biofilm.

L'absence de carbone organique disponible devrait toutefois limiter la représentation des bactéries hétérotrophes (Okabe et al., 1999), ce qui serait d'ailleurs confirmé par les faibles taux de dénitrification (6.4 mgN L biolite^{-1} h^{-1} contre 28.6 mgN L biolite^{-1} h^{-1} lorsque le réacteur est en conditions de dénitrification, cf Tableau 24 et Tableau 25).

Lorsque l'oxygénation est faible (< 1 mg O_2 L^{-1}), les vitesses de disparition de l'ammonium sont plus importantes que les vitesses d'apparition de (NO_3^- + NO_2^-) (Tableau 24). Ceci peut s'expliquer par une dénitrification qui peut être encore significative dans ces conditions d'oxygénation basse (Tallec et al., submitted b). Toutefois, un autre processus pourrait également expliquer cette différence, la nitrification-dénitrifiante. Ce processus est réalisé par les bactéries autotrophes, où l'oxydation du NH_4^+ en NO_2^- est suivi par une réduction des NO_2^- en N_2O et N_2 (Bock et al., 1995; Kuai & Verstraete, 1998; Jiang & Bakken., 1999; Itokawa et al., 2001), lorsque l'oxygène est limitant, le nitrite remplaçant l'oxygène comme accepteur final d'électrons (Tallec et al, submitted a ; Shrestha et al., 2002). Il y aurait ainsi, moins de nitrate produit.

L'ammonification, déterminée à partir des concentrations croissantes d'ammonium lorsque l'oxygénation est égale à 0.1 mgL-1 (Tableau 24, rNH4), est relativement importante, en moyenne 3.1 mgN L biolite^{-1} h^{-1}. De ce fait, les vitesses de disparition de l'ammonium mesurées ici, sous-estimeraient les vitesses d'oxydation réelles de l'ammonium. Ceci pourrait expliquer les vitesses d'oxydation de l'ammonium inférieures aux vitesses d'apparition de (NO_3^- + NO_2^-) (Tableau 24, r NH_4^+ et r(NO_3^- + NO_2^-)).

Si l'on considère les flux moyens de N_2O obtenus lors de la nitrification en cultures fixées, on observe qu'ils sont positivement corrélés à l'oxygénation (R= 0.99, Figure 73), alors que ceux déterminés lors de la nitrification en boues activées en fonction de l'oxygène dissous dans un réacteur, présentaient un pic d'émission aux oxygénations autour de 1 mg O_2 L^{-1} (Tallec et al , submitted a). Toutefois, si l'on calcule le pourcentage de N_2O émis par rapport aux vitesses d'oxydation de l'ammonium, on constate alors que le N_2O émis représente en moyenne 0.4 % de l'ammonium oxydé, pouvant atteindre 1 % à faible oxygénation, entre 0.5 et 1 mg O_2 L^{-1} (Tableau 24, Y N_2O et Figure 74). On retrouve alors, non seulement les valeurs obtenues pour la nitrification sur boues activées, de l'ordre de 0.4 % (Tallec et al , submitted a), mais aussi le pic d'émission de N_2O, autour d'une oxygénation de 1 mg O_2. L^{-1} (Tallec et al, submitted a ; Zheng et al., 1994 ; Cébron et al., 2005). Ce pic d'émission confirmerait bien ainsi l'existance du processus de nitrification-dénitrifiante

réalisé par les bactéries autotrophes, principal producteur de N_2O aux faibles oxygénations (Bock et al., 1995 ; Cébron et al., 2005 ; Tallec et al , submitted a, submitted b).

6.4.2 Dénitrification et émissions de N_2O : variations en fonction de la quantité en méthanol ajoutée

La vitesse de dénitrification sur la station Seine Centre, traitant 1.9 10^5 m^3 j^{-1} avec un rendement épuratoire de 70 % (soit 3.9 TN j^{-1}) sur 12 biofor® (soit 4992 m^3 de matériau), peut être calculée à environ 33 mgN-NO_3^- L^{-1}de matériau h^{-1}. La vitesse de dénitrification *in situ* est donc proche de celle obtenue en laboratoire, soit 28.6 mgN L biolite^{-1} h^{-1} en condition optimale de carbone (Tableau 25, MeH > 100 %, r(NO_3^- + NO_2^-)).

L'activité dénitrifiante (réduction de (NO_3^- + NO_2^-)) est observée dès les faibles concentrations de méthanol (Tableau 25, r (NO_3^- + NO_2^-), MeH à 34 %). De telles conditions pourraient correspondre à une dénitrification dite endogène à partir du nitrite et non plus du nitrate (Itokawa et al., 2001), ce qui n'est pas le cas ici puisque l'on constate invariablement une réduction du nitrate. Les vitesses de dénitrification sont par ailleurs directement corrélées aux quantités de méthanol ajoutées (R= 0.90, Figure 75) en accord avec Marchetto et al. (2003), qui montrent qu'au delà d'un ratio DCO/N- NO_3^- égal à 1.9 (soit 40 % MeH), l'efficacité de la dénitrification augmente de façon constante jusqu'à un ratio de 5 (soit 120 % MeH).

Il apparaît également que cette activité dénitrifiante est toujours accompagnée d'émissions de N_2O, quelles que soient les quantités de méthanol ajoutées. Lorsque l'addition de méthanol permet entre 66 et 88 % de la dénitrification totale, on observe un pic de N_2O, qui peut culminer à 59.8 µgN L biolite^{-1} h^{-1} (Tableau 25 et Figure 76) et qui correspond à une zone de transition en terme de vitesses de réduction des différents éléments azotés. Lorsque la quantité de méthanol ajoutée est inférieure à 88 %, la vitesse de réduction du nitrate est légèrement inférieure à celle de la somme des nitrates et nitrites (r NO_3^- et r (NO_3^- + NO_2^-),Tableau 25), cette tendance s'inversant au-delà de 88 %. Ceci expliquerait que la production de N_2O soit minimale (environ 20 µg mgN L biolite^{-1} h^{-1}) pour les faibles (34 %, 40 %) et fortes (>100 %) quantités de méthanol ajoutées.

D'après L. Holtan-Hartwig et al. (2000), l'équilibre entre la réduction et la production de N_2O en anaérobie, est contrôlé par les activités enzymatiques lors de la dénitrification et donc par les vitesses de ces réactions. L'émission de N_2O ne dépendrait donc que des conditions extérieures et résulterait d'une accumulation suite à un retard des vitesses de réduction de l'oxyde nitreux en azote gazeux (Holtan-Hartwig et al., 2000).

Une accumulation de N_2O lors de la dénitrification avec un faible ratio DCO/N, peut être due aussi à un effet inhibant du nitrate sur la réduction du N_2O (Gaskell et al., 1981). En effet, Blicher-Mathiesen & Hoffmann (1999) observent que lorsque le pourcentage de nitrate réduit par la dénitrification augmente, le ratio N_2O /N_2 diminue, le N_2 devenant le principal gaz produit.

Au total, le N_2O émis par dénitrification sur des cultures fixées représenterait en moyenne de 0.1 à 0.8 % du nitrate réduit, mais pourrait atteindre jusqu'à 1.3 % du nitrate réduit avec 66 et 88 % de MeH. Sur boues activées, Itokawa et al. (2001) ont montré que lorsque le ratio DCO/N_{total} était faible (inférieur à 3.5, soit < 88 % MeH), la production de N_2O par dénitrification était importante, jusqu'à 20 à 30 % de l'azote total ; avec un ratio entre 5 et 5.5 (134 et 194 % MeH) la production n'est plus que de 1 % (Itokawa et al., 2001). Si les émissions de N_2O, obtenues ici avec des cultures fixées, suivent les mêmes évolutions

en fonction du méthanol que celles d'Itokawa et al. (2001) pour des boues activées, les pourcentages de N_2O émis par rapport au nitrate réduit sont beaucoup plus faibles (d'un facteur 10 à 100).

Toutefois, Tallec et al. (submitted b) trouvent lors de la dénitrification sur boues activées secondaires un pourcentage d'émissions en fonction du nitrate réduit de 0.4 %. Ces différences pourraient être liées à l'efficacité de la dénitrification connue pour être affectée par la nature et la masse moléculaire des composés carbonés disponibles (Mohseni-Bandpi & Elliot, 1998). En effet, alors qu'Itokawa et al. (2001) utilisent de l'acétate de sodium comme source de carbone, nous utilisons du méthanol, et Tallec et al. (submitted b) utilisent le carbone contenu dans les eaux usées domestique. Or plus les substrats sont complexes, plus la dénitrification est lente (Marchetto et al., 2003), ce qui pourrait influencer les émissions de N_2O.

6.4.3 Estimations des émissions de N_2O lors de l'élimination de la pollution azotée sur les procédés de cultures fixées

Rappelons qu'actuellement, l'agglomération parisienne ne traite ses eaux usées sur cultures fixées qu'au niveau de la station Seine Centre, soit 2.4 10^5 m^3 j^{-1} en nitrification et 1.9 10^5 m^3 j^{-1} en dénitrification. Les concentrations des eaux à traiter (30 mgN-NH_4^+ L^{-1} et 20 mgN-NO_3^- L^{-1}) représentent donc une pollution azotée à éliminer de 7.5 TN-NH_4^+ j^{-1} et 3.8 TN- NO_3^- j^{-1}. En considérant les résultats obtenus lors de cette étude, i) 0.4 % du NH_4^+ oxydé émis sous forme de N_2O pour la nitrification en cultures fixées, ii) 0.2 % du nitrate réduit pour la dénitrification, nous pouvons estimer les émissions de N_2O, pour la station Seine Centre, à environ 38 kgN-N_2O j^{-1} (30 + 7.6 kgN-N_2O j^{-1}). Des estimations ont été effectuées à partir de mesures *in situ* sur la station de Colombes et donnaient des émissions de N_2O de 10 à 20 kgN-N_2O j^{-1} (Legaigneur, 2003).

De la même façon, nous avons estimé les flux de N_2O qui pourraient être émis sur les nouvelles installations de traitement des eaux usées de l'agglomération parisienne, prévues à l'horizon 2007. 17 10^5 m^3 j^{-1} seront traités par cultures fixées en nitrification et à hauteur de 30 % en dénitrification au niveau de la station d'Achères (ouest de Paris). Les émissions de N_2O seront alors de 224 kgN-N_2O j^{-1} (204 + 20.4 kgN-N_2O j^{-1}), auxquelles s'ajouteront en 2007, les émissions de la future station des Grésillons (ouest de Paris), qui traitera 1 10^5 m^3 j^{-1} en nitrification et dénitrification sur cultures fixées, soit 16 kgN-N_2O j^{-1}.

Enfin, à l'horizon 2015, alors que 100 % des eaux usées reçues par la station d'Achères devraient être dénitrifiées (soit au total 272 kgN-N_2O j^{-1}), la station des Grésillons (ouest de Paris), augmentera son débit à 3 10^5 m^3 j^{-1} (soit 48 kgN-N_2O j^{-1}).

Au total, entre aujourd'hui et 2007, puis 2015, on peut donc s'attendre à une augmentation des émissions de N_2O sur les STEPs de l'agglomération parisienne, liée au traitement de la pollution azotée, respectivement estimée à 38 kgN-N_2O j^{-1}, 278 kgN-N_2O j^{-1} et 358 kgN-N_2O j^{-1}. Un traitement de la pollution azotée par systèmes de boues activées aurait conduit à des estimations similaires (Tallec et al., submitted a; Tallec et al., submitted b).

6.5 Références

Blicher – Mathiesen G. and Hoffmann C., 1999. Denitrification as a sink for dissolced nitrous in a freshwater riparian fen. J. Environ. Qual. 28: 257-262.

Bliefert C. and Perraud R., 2001. Nitrogen oxide. In : De Boeck (eds), Environmental chemistry, air, water, soils, waste., Paris (in French), pp. 177-188.

Bock E., Koops H.P. and Harns H., 1986. Cell biology of nitrifying bacteria. In :Nitrication, pp 17-38. Prosser J.I. (ed) IRL Press, Oxford.

Bock E., Koops H.P., Ahlers B., Harns H., 1992. Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source. In The prokaryotes : A Handbook on biology of bacteria : Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. pp. 414-430. Ed Springer, New York

Bock E., Scmidt E, Stüven R., Zart D., 1995. Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. Arch. Microbiol. 163 : 16-20

Cébron A., Garnier J., Billen G., 2005. Nitrous oxide production and nitrification kinetics by bacteria communities naturally present in river water (the lower Seine, France). Aquatic Microbial Ecology. In press.

Claus G. and Kutzner H.J., 1985. Denitrification of nitrate and nitric acid with methanol as carbon source. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22 : 378 – 381.

De Beer D., van den Heuvel J.C., Ottengraf S.P.P., 1993. Microelectrode measurments of the activity distribution in nitrifying bacterial aggregates. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 573-579.

Garrido-Fernandez J.M, Méndez R., Lema J.M, Lazarova V., 2000. The circulating floating bed reactor : effect of particle size distribution of the carrier on ammonia conversion. Water Sci. Technol. 41 : 393-400.

Gaskell J.F., Blackmer A.M., Bremmer J.M., 1981. Comparison of effects of nitrate, nitrite and nitric oxide on reduction of nitrous oxide to denitrogen by soil microorganisms. Soil. Sci. Soc. Am. J. 45: 1124-1127.

Hanaki K., Wantawin C., Ohgaki S., 1990. Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. Water Res. 24 : 297-302.

Hanaki K., Hong Z., Matsuo T., 1992. Production of nitrous oxide gas during denitrification of wastewater. Water Sci. Technol. 26 : 1027-1036.

Hibiya K., Nagai J., Tsuneda S., Hirata A., 2003. Simple prediction of oxygen penetration depth in biofilms for wastewater treatment. Biochem. Engin. J. 19 : 61-68.

Holtan-Hartwing L., Dörsch P., Bakken L.R., 2000. Comparison of denitrifying communities in organic soils : kinetics of NO3- and N2O reduction. Soil Biol. Biochem. 32: 833 –843

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2000. Special report on Emissions Scenarios, Cambridge Univ. Press, 599 pp.

Itokawa H., Hanaki K., Matsuo T., 2001. Nitrous oxide production in high-loading biological nitrogen removal process under low COD/N ratio condition. Water Res. 35: 657-664.

Jiang Q-Q. and Bakken L.R., 1999. Nitrous oxide production and methane oxidation by differnet ammonia-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2679-2684.

Kim J-S., Kim S.-J., Lee B.H., 2004. Effect of Alcaligenes faecalis on Nitrous Oxide Emission and Nitrogen Removal in Three Phase Fluidized Bed Process. J. Environ. Sci. Health. 39 : 1791 – 1804.

Knowles R., 1982. Denitrification. Microbiol. Revue. 46 : 43-70.

Koopman B., Stevens CM., Wonderlick CA., 1990. Denitrification in a moving bed upflow sand filter. Research Journal of Water Pollution Control Federation. 62 : 239-245

Kuai L. and Verstraete W., 1998. Ammonium removal by the Oygen-limited Autotrophic Nitrification-Denitrification system. Appl. Environ. Microbiol. 64 : 4500-4506

Lazarova V., Nogueira R., Manem J., Melo L., 1997. Control of nitrification efficiency in a new biofilm. Water Sci. Technol. 36 : 31-41.

Lee L.Y., Ong S.L., Ng W.J., 2003. Biofilm morphology and nitrification activities : recovery of nitrifying biofilm particles covered with heterotrophic outgrowth. Bioresource Technology. 95 : 209-214.

Legaigneur V., (2003). Atmospheric emissions from WWTP of SIAAP, notably nitric and nitrous oxid. Technological Research Diploma. University Denis Diderot, Paris7.(French).

Marchetto M., Gianotti E.P., Campos J.R., Pires R.C., de Mattos Moraes E., 2003. Estimate of denitrifying microbiota in tertiary sewage treatment and kinetics of the denitrification process using different sources of carbon. Brazillian Journal of Microbiology. 34 : 104-110.

Mohseni-Bandpi A. and Elliot D.J., 1998. Growndwater denitrification with alternative carbon sources. Water Sci. Technol. 38 : 237-243.

Nogueira R., Lazarova V., Manem J., Melo L.F., 1998. Influence of dissolved oxygen on the nitrification kinetics in a circulating bed biofilm reactor. Bioprocess and biosystems engineering. 19 : 441-449.

Okabe S., Oozawa Y., Hirata K., Watanabe Y., 1996. Relationship between population dynamics of nitrifiers in biofilms and reactor performance at various C:N ratios. Water Res. 30 : 1563-1572.

Okabe S., Satoh H., Watanabe Y., 1999. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridisation and the use of microelectrodes. Appl. Environ. Microbiol. 65 : 3182-3191.

Schramm A., de Beer D., Wagner M., Amann R., 1998. Identification and activities in situ of Nitrosospira and Nitrospira spp. As dominat populations in a nitrifying fluidized bed reactor. Appl. Environ. Microbiol. 64 : 3480-3485.

Schramm A., de Beer D., Gieseke A., Amann R., 2000. Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm. Environ. Microbiol. 2 : 680.

Shrestha N., Hadano S., Kamachi T., Okura I., 2002. Dinitrogen production from ammoia by *Nitrosomonas europaea*. Applied catalysis A : general. 237: 33-39.

Tallec G., Garnier J., Billen G., Gousailles M., Submitted a. Nitrous oxide emissions from secondary activated sludge in nitrifying conditions of urban wastewater treatment plants: effect of oxygenation level. Water Res.

Tallec G., Garnier J., Billen G., Gousailles M., Submitted b. Nitrous oxide emissions from secondary activated sludge in denitrifying conditions of urban wastewater treatment plants, under anoxic and low oxygenation. Bioresources Technology.

Tam N.F.Y., Lau P.S., Wong, Y.S., 1994. Wastewater inorganic N and P removal by immobilized Chlorella vulgaris. Water Sci. Technol. 30 : 369-374.

Tarre S. and Green M., 2004. High-rate nitrification at low pH in suspended and attached biomass reactors. Appl. Environ. Microbiol. 70 : 6481-6487.

Zheng H., Hanaki K., Matsuo T., 1994. Production of nitrous oxide gas during nitrification of wastewater. Water Sci. Technol. 306 : 134-141.

Avant – propos.

Les chapitres précédents nous ont permis d'estimer les émissions d'oxyde nitreux pour chacun des procédés du traitement de l'azote utilisés au niveau des stations d'épuration de l'agglomération parisienne. Nous nous proposons donc dans ce chapitre, d'établir un bilan global de ces émissions. Nous essayerons également de re-situer ces émissions à l'échelle du bassin de la Seine, et d'appréhender l'impact des futurs traitements de l'azote, qui seront mis en place aux horizons 2005-2008 et 2012-2015.

Chapitre 7
-
Emissions d'oxyde nitreux lors du traitement de l'azote des eaux usées de l'agglomération parisienne: état actuel et prévisions

Gaëlle Tallec[1,2], Olivier Rousselot[1], Josette Garnier[2], Michel Gousailles[1]

[1]*SIAAP / DRD, 82, Av. Kléber, 92700 Colombes, France.*
[2]*UMR Sisyphe 7619, Fonctionnement des Hydrosystèmes, Université P . & M. Curie-CNRS, Boite 105, Tour 56, Etage 4, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France*

Soumis à la *Revue Science de l'Eau.*

Abstract

The Seine, one of the European rivers the most affected by intense human interventions, receives wastewater discharges of almost fifteen millions of inhabitants, a quarter of the French population, with ten millions concentrated in the Parisian conurbation. In the framework of the European directive 91 / 271, wastewater treatment of the Parisian conurbation is being reorganized and improved. Nitrogen flux, still discharged in the Seine River, will be gradually treated by fixed culture and activated sludge processes, allowing nitrification and denitrification of nitrogen pollution.

It is now admitted that nitrous oxide (N_2O), a greenhouse gas which induces the destruction of stratospheric ozone, could be emitted significantly in the atmosphere, during biological nitrogen treatment in wastewater treatment plants (WWTPs). These emissions have been quantified in experimental conditions, depending on the nitrogen load treated and the process used. These results have allowed to estimate N_2O emissions from all WWTPs of the Parisian conurbation, for the present treatment conditions and also, for the future treatment conditions, scheduled in 2005-2008 and then in 2012-2015.

Our estimates lead to present N_2O emissions of 60-120 kg N-N_2O d^{-1}, which will increase to 320-480 kg N-N_2O d^{-1} in 2005-2008 and will reach 370-750 kg N-N_2O d^{-1} in 2012 – 2015. The emissions levels could reached the lower range if the nitrification of nitrogen is realised at an oxygenation higher than 2 mgO_2 L^{-1} and denitrification in total anoxic conditions and a methanol addition allowing 100 % of nitrate load reduction.

According to our results found for WWTPs (60-120 kg N-N_2O d^{-1}) and those obtained in the lower Seine river which receive the effluents not treated for nitrogen (90 –200 kg N-N_2O d^{-1}; Garnier et al, 2005), N_2O emissions amount to 150-320 kg N-N_2O d^{-1}, i.e. an increase of N_2O emissions by a factor of 2, weak taking into account the range of our estimates. Further, at the scale of the Seine basin, nitrous oxide emissions issued from nitrogen treatments in WWTPs of the Parisian conurbation (at present or in the future), will continue to represent a low ratio, 1 to 10 %, in comparison with the emissions from agricultural lands (4100– 8200 kg N-N_2O d^{-1}) (Garnier et al, 2005).

Key words: N_2O, WWTPs, nitrogen treatment, Parisian conurbation, Seine Basin.

Résumé

La Seine, un des fleuves les plus anthropisés d'Europe, reçoit les rejets des eaux usées de près de quinze millions d'habitants, soit le quart de la population française, dont dix millions sont concentrés dans l'agglomération parisienne. Suite à la directive européenne 91 / 271, l'assainissement des eaux usées de l'agglomération parisienne est actuellement remodelé et amélioré. Les flux d'azote, rejetés auparavant en Seine, seront progressivement traités *via* des procédés basés sur des cultures libres (boues activées) ou fixées (biofiltres immergés) permettant la nitrification et la dénitrification de la pollution azotée.

Néanmoins, il est désormais admis que de l'oxyde nitreux (N_2O), un gaz à effet de serre destructeur de la couche d'ozone, pouvait être émis dans l'atmosphère de façon significative durant le traitement biologique de l'azote en station d'épuration (STEP). Ces émissions ont été quantifiées en fonction des charges en azote traitées et des procédés utilisés, en conditions expérimentales. En se basant sur ces résultats, nous avons évalué les émissions de N_2O sur l'ensemble des stations d'épuration de l'agglomération parisienne, dans les conditions actuelles des traitements pratiqués, mais également estimer les émissions futures, suite aux principaux changements prévus aux horizons 2005-2008 et 2012-2015.

Les estimations conduisent à des émissions de N_2O actuelles de l'ordre de 60-120 kg N-N_2O j^{-1}, qui augmenteront à l'issue de la première étape des travaux (2005-2008) à 320-480 kg N-N_2O j^{-1}, pour atteindre 370-750 kg N-N_2O j^{-1} en 2012 – 2015. Les niveaux les plus bas de ces émissions pourront être atteints si le traitement de l'azote se fait en nitrification avec une oxygénation supérieure à 2 mgO_2 L^{-1} et en dénitrification avec des conditions d'anoxie totales et un ajout de méthanol permettant 100 % de la réduction de la charge en nitrate.

Compte tenu de nos résultats pour les stations d'épuration (60-120 kg N-N_2O j^{-1}) et ceux obtenus pour la Seine à l'aval du rejets des effluents non traités pour l'azote (90 –200 kg N-N_2O j^{-1}: Garnier et al., 2005), les émissions actuelles de N_2O sont de 150-320 kg N-N_2O j^{-1}, et celles du futur augmenteront d'un facteur 2 environ quand le traitement de l'azote sera complet en stations d'épuration; cette augmentation est relativement faible si l'on tient compte de la gamme de nos estimations. De plus, à l'échelle du bassin de la Seine, les émissions d'oxyde nitreux liées au traitement de l'azote dans les stations d'épuration de l'agglomération parisienne (actuel et futur) continueront de représenter une faible proportion, de 1 à 10 % par rapport aux émissions provenant des sols agricoles du bassin amont (4100– 8200 kg N-N_2O j^{-1}) (Garnier et al, 2005).

Mots clés : N_2O, STEPs, traitement de l'azote, agglomération parisienne, bassin de la Seine.

7.1 Introduction

La Seine constitue l'un des fleuves les plus anthropisés d'Europe (Meybeck, 2001). Elle reçoit le rejet des eaux usées de près de quinze millions d'habitants, dont dix millions d'habitants résident dans l'agglomération parisienne. Si l'élimination de la pollution carbonée a été appliquée dans de nombreuses stations d'épuration d'eaux usées, conduisant ainsi à l'obtention d'un effluent de meilleure qualité et à la réduction de son impact sur le milieu récepteur, des efforts doivent actuellement porter sur le traitement de l'azote. L'azote constitue en effet un élément clé de l'eutrophisation de la zone côtière (Billen et al., 2001 ; Cugier et al., 2005).

Le traitement de l'azote des eaux usées se fait le plus souvent par traitement biologique, grâce à la culture de populations bactériennes spécialisées qui peut être intensifiée et accélérée par des techniques d'ingénierie. Les bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes, cultivées en culture libre (boues activées) ou cultures fixées, permettent l'oxydation de l'ammonium en nitrate (la nitrification) et la réduction du nitrate en diazote gazeux (inerte) émis dans l'atmosphère (la dénitrification).

Toutefois, il est désormais admis que de l'oxyde nitreux (N_2O) pouvait être produit et émis dans l'atmosphère durant le traitement biologique de l'azote en station d'épuration (STEP) *via* la nitrification et la dénitrification, que ce soit en boues activées (Hanaki et al., 1990; Hanaki et al., 1992; Tallec et al., submitted a, b ; Zheng et al., 1994) ou en cultures fixées (Kim et al, 2004; Tallec et al., submitted c). En effet l'oxyde nitreux est produit par les bactéries impliquées dans les processus de nitrification (Goreau et al., 1980 ; Poth & Focht, 1985) et de dénitrification (Knowles, 1982). La production de N_2O est indésirable, car elle a un impact important sur l'environnement. Le N_2O est un gaz à effet de serre extrêmement efficace, son potentiel de réchauffement est 320 fois plus élevé que celui du dioxyde de carbone (CO_2). Il persiste très longtemps dans l'atmosphère (120 ans environ), (IPCC, 2000). De plus, lorsqu'il est rejeté dans l'atmosphère, il finit par se convertir en oxyde nitrique (NO), un gaz destructeur de la couche d'ozone (O_3) stratosphérique (Bliefert & Perraud, 2001). L'oxyde nitreux n'existe à l'état naturel dans l'atmosphère qu'en très faible concentration, mais celle-ci augmente actuellement au rythme d'environ 0.3 % par année (Bliefert & Perraud, 2001). Ce gaz à effet de serre retient désormais l'attention de la communauté scientifique concernée par les changements climatiques globaux. Sa stabilisation aux taux actuels de 311-313 ppb nécessiterait une réduction des émissions anthropogéniques de plus de 50 % (CITEPA, 2003).

Dans cette optique, à une échelle régionale, celle du bassin de la Seine, cette étude propose d'évaluer les émissions de ce gaz à effet de serre (N_2O) afférentes à la nitrification et la dénitrification lors du traitement des eaux usées de l'agglomération parisienne. Alors que la nitrification et la dénitrification des eaux usées, y compris les émissions d'oxyde nitreux, se produisaient essentiellement dans la Seine, ces processus sont de plus en plus pris en charge, de manière accélérée et contrôlée, au niveau des stations d'épuration. Un des dangers majeurs serait une augmentation globale des émissions de N_2O par le déplacement des sites d'émission, du milieu naturel vers les STEPs (Garnier et al., 2005; Itokawa et al., 2001).

Actuellement, au niveau de l'agglomération parisienne, sur les 2.6 10^6 m^3 d'eaux usées traitées chaque jour par le Syndicat d'assainissement de l'agglomération parisienne (SIAAP), 23 % subissent une nitrification et une dénitrification, en boues activées au niveau de la station Seine Amont (Valenton, est de Paris), et 10 % au travers de cultures fixées sur la station Seine Centre (Colombes, ouest de Paris). Environ 65 % de ces eaux usées transitent

par la station d'épuration Seine Aval (Achères, ouest de Paris), la plus importante d'Europe qui n'élimine pas actuellement la pollution azotée. Toutefois, la station d'Achères traitera en 2007, 100 % de l'ammonium en nitrification et 30 % (70 % en 2015) en dénitrification. L'implantation de deux nouvelles stations d'épuration, les Grésillons et la Morée, prévues respectivement en 2007 et 2015, soulagera la station Seine Aval d'une partie de son débit et permettra également le traitement de l'azote. Ainsi dès 2007, la majeure partie de la pollution azotée provenant des eaux usées de l'agglomération parisienne sera traitée avant son rejet en Seine.

Un objectif majeur de cette étude est d'estimer les émissions de N_2O actuelles pour l'ensemble des stations d'épuration de l'agglomération parisienne, compte tenu de leur type de traitement, en se basant sur les études expérimentales réalisées par Tallec et al. (submitted, a, b, c) ; ces estimations sont comparées à un bilan effectué pour le bassin de la Seine (Garnier et al., 2005). Un autre objectif est d'évaluer les émissions de N_2O relatives aux futurs traitements de l'azote qui seront mis en place aux horizons 2005-2008 et 2012-2015, afin d'appréhender la quantité de pollution déplacée de la basse Seine, à l'aval des rejets de l'agglomération parisienne, vers les stations d'épuration de cette mégapole.

7.2 Le bassin de la Seine et les émissions de N_2O

7.2.1 Le bassin de la Seine

Le réseau hydrographique de la Seine, qui prend sa source sur le plateau de Langres (417 m) et se jette dans la Manche, s'étend sur un bassin versant de 78 600 km^2 (jusqu'au Havre). L'influence des mouvements de marée est perceptible jusqu'au barrage de Poses, limite artificielle de la Seine fluviale et estuarienne. Le réseau hydrographique de la Seine peut être subdivisé en quatre sous-bassins (la Seine amont et les affluents principaux de la Seine : Marne, Oise, Eure) et la basse Seine (Figure 77).

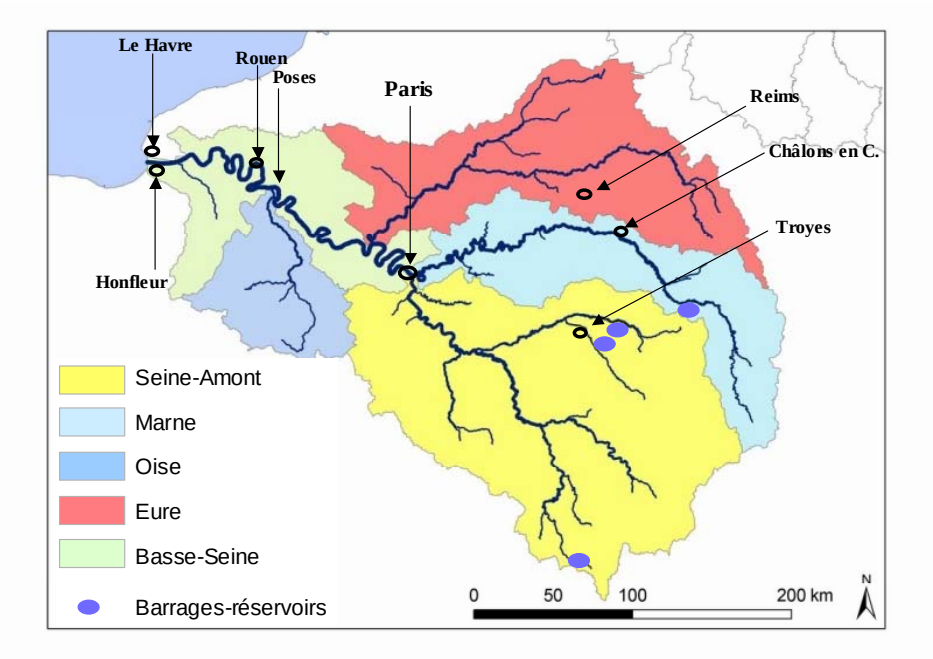


Figure 77. Carte représentant le réseau hydrographique de la Seine, ses quatre sous-bassins et la basse Seine (PIREN-Seine).

L'agriculture et l'élevage représentent les deux principales sources de pollution du bassin amont, tant au niveau des émissions de N_2O dans l'atmosphère que des apports en nitrates au niveau du fleuve.

Les axes principaux des sous-bassins de la Seine, de la Marne et de l'Aube, sont équipés de barrages-réservoirs qui modifient à la fois l'hydrologie et la biogéochimie des cours d'eaux (Garnier et al.,1999 ; 2000); ce sont des sites de sédimentation connus, qui entraînent le stockage ou l'élimination des éléments nutritifs (Si, N, P). Ainsi, les nitrates diminuent grâce principalement au processus de dénitrification, mais les réservoirs étant situés en amont (Figure 77) la rétention de nitrates reste limitée à l'échelle du bassin (Garnier et al., 2000).

L'urbanisation augmente surtout en aval de ces réservoirs. Certaines grosses agglomérations rejettent leurs effluents urbains (Troyes, Châlon-en-Champagne, Reims, etc.), les effets de ces rejets étant cependant beaucoup moins marqués que ceux de l'exutoire des grands axes et de la capitale, car les stations sont de bien plus faibles capacités (Tusseau et al., 2000).

Au niveau de la basse Seine, à l'aval de l'agglomération parisienne, la pollution ammoniacale représente une nuisance majeure. Depuis les années 1990, plusieurs travaux ont montré que l'azote ammoniacal (entre 1 et 4 mg N L^{-1}) apporté par les effluents de la station d'épuration Seine Aval (Achères, ouest de Paris), est complètement nitrifié au niveau de l'estuaire fluvial lors d'un transit de 200 km en aval, diminuant relativement peu sur le cours de la basse Seine (Brion et al., 2000 ; Cébron et al., 2003 ; Garnier et al., 2001, 2005). L'activité nitrifiante maximale dans l'estuaire entraîne une désoxygénation importante. Une étude a récemment montré que la nitrification de la colonne d'eau est accompagnée d'une émission de N_2O notable, la dénitrification benthique apparaissant aussi être une source de N_2O (Garnier et al., 2005).

7.2.2 Les émissions de N_2O

Des travaux sur les émissions de N_2O sur l'ensemble du bassin de la Seine sont menés pour les différents secteurs du bassin. Avec le quart de la population française, dont dix millions en agglomération parisienne, et le tiers de la production agricole nationale, les principales zones de production du N_2O sur le bassin de la Seine sont le bassin amont agricole et la zone estuarienne (Garnier et al., 2005).

Sur la base des travaux de Khalil et al. (2004), proposant un taux annuel d'émission de N_2O à 0.4 – 0.8 10^{-3} T N-N_2O ha^{-1} an^{-1}, soit 0.2 à 0.4 % des quantités de fertilisants azotés utilisés à un taux de 0.2 T N ha^{-1} an^{-1}, Garnier et al. (2005) proposent une gamme de 4100–8200 kg N-N_2O j^{-1} pour le total des émissions de N_2O provenant des sols agricoles du bassin de la Seine en amont de Poses (soit 75 000 km²). Garnier et al. (2005) ont, en outre, montré que plus de la moitié des flux de N-NH_4 apportés par la station Seine Aval de l'agglomération parisienne sont nitrifiés durant la période estivale, essentiellement dans l'estuaire fluvial de la Seine. De 1993 à 2003, la nitrification estivale a varié de 16 T N j^{-1} à 55 T N j^{-1} et représentait 73 % en moyenne de la nitrification annuelle. La dénitrification estivale, également source de N_2O au niveau de l'estuaire, variait pour la même période (de 1993 à 2003), de 27 à 61 T N j^{-1} et représentait 57 % en moyenne de la dénitrification annuelle. Ainsi, les émissions estivales de N_2O dans l'atmosphère (kg N j^{-1}) pour ce secteur de l'estuaire fluvial (16 km²) ont été estimées à 38 kg N j^{-1} (24 - 57 kg N j^{-1}, 2.7 mg N m^{-2} j^{-1} en moyenne), ce qui représente en moyenne 0.1 % (0.07 – 0.11 %) de la nitrification et 0.15 % (0.05 – 0.23 %) de la dénitrification dans ce même secteur. Pour le secteur de la basse Seine, de l'amont de Paris à

l'estuaire fluvial (estuaire inclus), les émissions de N_2O sont en moyenne de 120 kg N j^{-1} (90-200 kg N j^{-1}).

En extrapolant à l'échelle du réseau hydrographique, les émissions de N_2O observées sur les secteurs aval, Garnier et al. (2005) proposent des valeurs de 370-680 kg N-N_2O j^{-1} sur l'ensemble du système hydrographique de la Seine, 20 – 30 % des émissions de N_2O des surfaces en eau du bassin étant issues de la basse Seine. A noter que ces estimations ne prennent pas en compte celles des zones ripariennes, encore difficiles à quantifier.

7.3 Les stations d'épuration de l'agglomération parisienne et les émissions de N_2O

7.3.1 Les stations d'épuration

Le Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP), chargé de l'assainissement de la Ville de Paris et des départements de la Petite Couronne (Hauts de Seine, Seine-Saint-Denis, Val de Marne), soit 10 millions d'habitants, exploite l'usine d'épuration 'Seine Aval' à Achères, 'Marne Aval' à Noisy-le-Grand depuis 1976, 'Seine Amont' à Valenton depuis 1987, 'Seine Centre' à Colombes depuis 1998 et prochainement deux nouvelles stations, 'Les Grésillons' fin 2006 et 'La Morée' en 2015 (Figure 78).

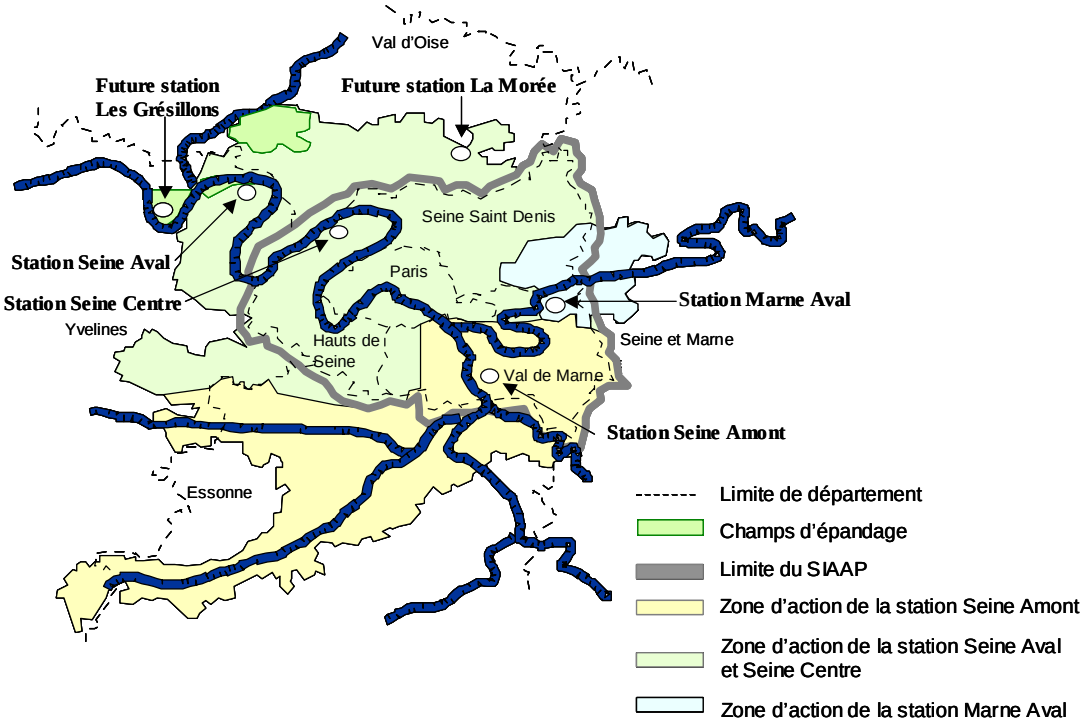


Figure 78. Zone d'action du SIAAP (Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne) et localisation des usines actuelles dont il a la charge ; les futures stations sont également localisées.

La station 'Seine Aval' (Achères, ouest de Paris), traite environ 20.8 10^5 m^3 j^{-1} en temps sec, soit les deux tiers des eaux usées de l'agglomération parisienne, 69 10^5 équivalent habitant (éq. Hab.), *via* un traitement secondaire sur boues activées.

Par temps sec, les eaux décantées primaires subissent une épuration biologique secondaire où seule la pollution carbonée est éliminée. Cette dernière s'effectue sur quatre tranches aux caractéristiques variables. Une partie des eaux traitées biologiquement, subit une déphosphatation, basée sur un traitement physico-chimique ou 'clarifloculation' (tamisage - coagulation-floculation - décantation).

Par temps de pluie ce sont des eaux prétraitées qui arrivent au niveau de la clarifloculation où un traitement de la pollution carbonée et phosphorée est effectué.

La station 'Seine Centre' (Colombes, ouest de Paris) d'une capacité de 2.4 10^5 m^3 j^{-1} (8 10^5 éq. Hab.), permet l'épuration des eaux allant jusqu'au traitement tertiaire par temps sec. Le traitement s'effectue alors en trois étapes successives. L'eau brute, après un prétraitrement, une décantation physico-chimique qui permet l'élimination des phosphates, subit une épuration biologique sur bio-filtre immergé (cultures fixées). Cette dernière permet selon les configurations de l'usine, fonction des conditions climatiques et du débit, l'abattement de la pollution carbonée et azotée. L'élimination de la pollution carbonée étant ici presque totale, il y a un ajout de méthanol lors de la dénitrification.

Par temps de pluie, la station peut traiter jusqu'à 6.9 10^5 m^3 j^{-1}, seule la pollution carbonnée est alors éliminée. A titre d'exemple, en 2003 il y a eu environ une centaine de jours de pluie (arrêt annuel de la station compris).

La station 'Seine Amont' (Valenton, est de Paris) traitera fin 2005, 6 10^5 m^3 j^{-1} (20 10^5 éq. Hab.) *via* un traitement biologique secondaire sur boues activées, opérant sur deux filiaires différentes de 3 10^5 m^3 j^{-1} chacune, Valenton I et Valenton II.

Sur Valenton I, l'eau décantée est introduite en tête des réacteurs biologiques cylindriques, dans la partie centrale anoxique, et chemine jusqu'à la zone aérobie externe. Seul le retour des boues activées extraites du clarificateur apporte la charge de nitrate au niveau de la zone anoxie.

Sur Valenton II, l'eau décantée est introduite en tête du bassin biologique, caractérisé par une zone endogène et anaérobie pour l'élimination du phosphate, suivie d'une zone anoxie pour l'élimination du nitrate, puis d'une zone aérobie pour l'élimination de l' ammonium. La recirculation de la liqueur mixte, provenant de la fin de la zone aérobie, apporte le nitrate au niveau de la zone anoxie. Valenton II a ainsi un rendement épuratoire pour le nitrate plus important que Valenton I, soit 70 % contre 50 % respectivement.

Pour les deux systèmes, Valenton I et Valenton II, le carbone organique nécessaire aux bactéries hétérotrophes au niveau des bassins en anoxie est apporté par l'eau décantée.

La station 'Marne Aval' (Noisy-Le-Grand, est de Paris) a une capacité nominale de 0.3 10^5 m^3 j^{-1} (1 10^5 éq. Hab.).

L'eau brute subit un pré-traitement, puis une décantation primaire. Une partie des eaux décantées passe ensuite dans un ouvrage d'activation biologique, composé de trois canaux. Le premier de ces canaux offre un contact boues-oxygène optimal, ce qui permet une réactivation-stabilisation des boues provenant du décanteur secondaire. Les eaux épurées de la pollution carbonée rejoignent la deuxième partie des eaux décantées primaires, et passent en traitement tertiaire sur deux bio-filtres à ruissellement (Sessil®) qui permettent la nitrification. Les eaux subissent ensuite un traitement physico-chimique (ajout de polymère et de chlorure ferrique) qui permet la déphosphatation.

Les quatre stations de l'agglomération parisienne en service actuellement présentent donc des stratégies de traitement de la pollution azotée, des débits et des rendements épuratoires différents (Tableau 26).

Tableau 26. Débits, rendements épuratoires pour le NTK (azote Kjeldahl = azote organique + NH_4+) et le NGL (azote global = NTK + NO_3- + NO_2-) et systèmes actuellement utilisés pour le traitement de l'azote sur les quatre stations d'épuration de l'agglomération parisienne. (Traitement en temps sec ; ** Actuellement la réception des ouvrages de Valenton II étant en cours, seule Valenton II fonctionne avec un débit de 3 10 5 m3 j-1)*

	Débits	Rendement épuratoire		Systèmes utilisés
	Débit (10^5 m^3 j^{-1})	NTK	NGL	
		%		
Seine Aval	*20.8*	0	0	Aucun
Seine Centre *	*2.4*	95	70	Traitement tertiaire - Cultures fixées
Seine Amont**				
Valenton I	*3*	95	50	Traitement secondaire - Boues activées
Valenton II		95	70	
Marne Aval	*0.3*	75	0	Traitement tertiaire - Cultures fixées

Le Tableau 27 présente les flux d'ammonium et de nitrate entrants et rejetés actuellement pour chaque station.

Les flux d'ammonium entrants sont calculés à partir de moyennes annuelles des flux de l'azote Kjeldahl total (NTK) sur une période comprise entre 1993 et 2002 pour Seine Aval, 1999 à 2003 pour Seine Centre, 1994 à 2003 pour Marne Aval et de 1995 à 2002 pour Seine Amont. Le rapport NH_4^+ / NTK utilisé pour les calculs est de 0.7 pour l'eau brute. Les valeurs en ammonium rejeté sont calculées suivant les rendements épuratoires par rapport au NTK de chaque station, excluant la station Seine Aval qui ne traite pas l'azote. Le rapport NH_4^+ / NTK utilisé pour les rejets est de 0.8 pour la station Seine Aval ; les NTK y sont éliminés par ammonification en NH_4^+ lors de la décantation primaire, ce qui explique l'augmentation des flux d'ammonium sortants par rapport aux flux entrants. Pour les trois autres stations, nous avons utilisé un rapport NH_4^+ / NTK égal à 0.7 pour l'eau de rejet.

Pour les stations avec nitrification, les valeurs en nitrate entrant sont égales au flux de NH_4^+ traité en station lors de cette nitrification. Les valeurs de nitrate rejeté sont calculées à partir des rendements épuratoires fixés pour l'azote global (NGL) pour chaque station.

Tableau 27. Flux actuels de l'ammonium et du nitrate entrants et rejetés, pour les quatre stations d'épuration de l'agglomération parisienne.
*(*Seuls les rendements épuratoires de Valenton I sont pris en compte ici.)*

	NH_4^+ entrant	NH_4^+ rejeté	NO_3^- entrant	NO_3^- rejeté
		T N/j		
Seine Aval	56.1	64.1	0	0
Seine Centre	6.7	0.4	6.3	2.4
Seine Amont**	11.5	0.6	10.9	7.6
Marne Aval	1.4	0.4	1.0	1.0
Total	**75.7**	**65.5**	**18.2**	**11**

On remarque que les traitements sur Seine Aval, la station la plus importante d'Europe, n'éliminent pas la pollution azotée. Si les autres stations de l'agglomération parisienne présentent un abattement de la pollution ammoniaquée élevé, celui de la pollution nitratée reste faible. Seule la station Seine Centre présente des rejets en azote faibles. Suite à la directive européenne 91 / 271, et notamment à la délimitation future du bassin de la Seine en zone sensible, un effort important va porter sur l'élimination de la pollution azotée au niveau de l'agglomération parisienne.

Seine Aval va être soulagée de 3 10^5 m^3 de son débit journalier au profit de la station Seine Amont (Valenton II) fin 2005. Un débit de 1 10^5 m^3 j^{-1} sera également acheminé à la nouvelle station des Grésillons dont la mise en route est prévue fin 2006 et dont le débit atteindra 3 10^5 m^3 j^{-1} en 2015 (Tableau 28). Enfin, l'usine Seine Aval traitera, sur cultures fixées en 2007, 100 % de l'ammonium en nitrification et 30 % (70 % en 2015) en dénitrification (Tableau 28). A l'horizon 2005-2008, la station Marne Aval augmentera son débit de 0.5 10^5 m^3 j^{-1} après une restructuration de l'usine lui permettant de traiter 70 % du NGL et 95 % des NTK. La construction d'une nouvelle usine, la Morée, prévue en 2012-2015, permettra de traiter 0.5 10^5 m^3 j^{-1} (Tableau 28). Tous les systèmes de traitement prévus se feront majoritairement en traitement tertiaire sur cultures fixées. Seule la station Seine Amont traitera l'azote en traitement secondaire sur boues activées. Toutefois du méthanol peut être injecté si cela devenait nécessaire pour atteindre les objectifs de rejets fixés. De plus, l'abattement du NGL sur la station Seine Aval, à l'horizon 2012-2015, se fera sur cultures fixées, soit en traitement secondaire avec une recirculation ou en traitement tertiaire avec ajout de méthanol.

Tableau 28. Débits (105 m3 j-1) et rendements épuratoires (RE en %) pour le NGL et le NTK pour les stations d'épuration de l'agglomération parisienne, actuels et prévus aux horizons 2005-2008 et 2012-2015.

	Actuel			**2005-2008**			**2012-2015**		
	Débit	RE		Débit	RE		Débit	RE	
		NTK	NGL		NTK	NGL		NTK	NGL
Seine Aval	20.8	0	0	17	80	33	15	85	70
Seine Centre	2.4	95	70	2.4	95	70	2.4	95	70
Seine Amont	3	95	50	6	95	70	6	95	70
Marne Aval	0.3	75	0	0.75	95	70	0.75	95	70
Les Grésillons	0	-	-	1	95	80	3	95	80
La Morée	0	-	-	0	-	-	0.5	95	70

Cette stratégie va permettre un traitement de la pollution azotée plus poussé et les flux d'azote traités *via* une nitrification et une dénitrification vont donc grandement évoluer. De la même façon que précédemment, à partir des flux de NTK et des rendements épuratoires, nous avons calculé l'évolution des flux d'azote subissant une nitrification et une dénitrification (Tableau 29).

Tableau 29. Flux d'azote traités par nitrification (N = tonnage journalier de NH_4+ nitrifié) et dénitrification (D = tonnage journalier de NO_3- dénitrifié) aux stations d'épuration de l'agglomération parisienne, actuels et prévus aux horizons 2005-2008 et 2012-2015.

Stations	Flux d'azote N (T N/j)					
	Actuel		2005-2008		2012-2015	
	N	D	N	D	N	D
Seine Aval	0.0	0.0	43.2	6.4	41.0	30.4
Seine Centre*	6.2	3.9	6.2	3.9	6.2	3.9
Seine Amont	10.9	3.5	21.8	13.6	21.8	13.6
Marne Aval	1.0	0.0	3.2	2.0	3.2	2.0
Les Grésillons	0.0	0.0	3.2	2.5	9.7	7.5
La Morée	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	1.1
Total des flux	**18.2**	**7.4**	**77.8**	**28.4**	**83.7**	**58.4**

On remarque que les tonnages journaliers de NH_4^+ nitrifié (N), relativement faibles actuellement (18.2 T N j^{-1}, Tableau 29) vont être multipliés par un facteur 4 et 4.6 aux horizons 2005-2008 et 2012-2015 respectivement (Total des flux, N, Tableau 29). Les tonnages journaliers de NO_3^- dénitrifié (D), quasi nuls, voire inexistants sur certaines stations (Tableau 29) vont augmenter d'un facteur 3.8 pour 2005-2008 à 7.9 à partir de 2012. Le traitement de l'azote sera pris en charge en majorité par les stations Seine Aval (41.0 T N j^{-1} en N et 30.4 T N j^{-1} en D, 2012-2015, Tableau 29) et Seine Amont (21.8 T N j^{-1} en N et 13.6 T N j^{-1} en D, 2012-2015, Tableau 29). La nitrification et la dénitrification, au niveau de l'agglomération parisienne, se feront donc en traitement secondaire sur boues activées et tertiaire sur cultures fixées.

7.3.2 Les emissions de N_2O

Des études menées sur les émissions de N_2O issues des différents traitements biologiques de l'azote (traitements secondaires sur boues activées et traitements tertiaires sur cultures fixées) appliqués sur les stations d'épuration de l'agglomération parisienne, ont montré qu'elles représentaient 0.1 à 0.8 % de l'ammonium oxydé ou du nitrate réduit (Tallec et al., submitted a, b, c) (Tableau 30). Cette gamme, relativement réduite, varie en fonction de l'oxygénation en traitement secondaire lors de la nitrification et en fonction des quantités de méthanol ajouté en traitement tertiaire lors de la dénitrification.

Les émissions de N_2O, provenant des procédés sur cultures fixées en traitement tertiaire lors de la nitrification, se situent dans la haute gamme des émissions de N_2O, provenant des procédés sur boues activées en traitement secondaire (Tableau 30). De même lors de la dénitrification, on observe des valeurs d'émission qui peuvent être plus importantes sur cultures fixées (jusqu'à 0.8 % du NO_3^- réduit, Tableau 30) que sur boues activées (0.4 % du NO_3^- réduit, Tableau 30). Toutefois, une dénitrification en traitement tertiaire sur cultures fixées peut émettre moins de N_2O, lorsque les conditions sont optimales, qu'une dénitrification sur boues activées en traitement secondaire.

Tableau 30. Pourcentage de N_2O émis par rapport aux quantités d'azote traitées (NH_4+ oxydé lors de la nitrification et NO_3- réduit lors de la dénitrification), suivant le traitement biologique de l'azote utilisé en STEP. Ces données sont tirées des études menées sur les différentes stations de l'agglomération parisienne, sur boues activées (Tallec et al., submitted a, b) et sur cultures fixées (Tallec et al., submitted c). (suivant l'oxygénation, ** suivant les quantités ajoutées de méthanol).*

	% N_2O / N éliminé	
Systèmes de traitement utilisés	nitrification	dénitrification
Boues activées en traitement secondaire	0.1-0.4 %*	0.4 %
Cultures fixées en traitement tertiaire	0.4 %	0.1-0.8 %**

En considérant les flux d'azote traités (ammonium et nitrate) *via* la nitrification et la dénitrification pour chaque STEPs de l'agglomération parisienne (cf. Tableau 29), nous pouvons calculer (grâce aux valeurs du Tableau 30), le pourcentage de N_2O émis par chacun de ces flux, et donc les quantités actuelles et futures de N_2O émis au niveau de chaque station (Tableau 31).

Tableau 31. Flux de N_2O émis via la nitrification (N) et la dénitrification (D) et flux de N_2O total (N+D) aux stations d'épuration de l'agglomération parisienne : flux actuels et prévus aux horizons 2005-2008 et 2012-2015, ainsi que le Total émis pour l'ensemble des stations d'épuration à chaque période de temps.

	Flux N_2O (kg N/j)								
Stations	**Actuel**			**2005-2008**			**2012-2015**		
	N	D	Total	N	D	Total	N	D	Total
Seine Aval	0	0	**0**	173	6-51	**179-224**	164	30-243	**194-407**
Seine Centre	25	4-31	**29-56**	25	04-31	**29-56**	25	4-31	**29-56**
Seine Amont	11-44	14	**25-58**	22-87	54	**76-141**	22-87	54	**76-141**
Marne Aval	4	0	**4**	13	2-16	**15-29**	13	2-16	**15-29**
Les Grésillons	-	-	-	13	3-20	**16-23**	39	8-60	**47-99**
La Morée	-	-	-	-	-	-	7	1-9	**8-16**
Total émis			**58-118**			**315-473**			**369-748**

C'est au niveau de la station Seine Aval que les émissions de N_2O vont augmenter le plus d'ici 2005-2008, (Tableau 31), puisque le traitement de l'azote sera nouveau et que les débits y demeureront les plus élevés, même en tenant compte de leur diminution prévue de 17 à 15 10^5 m^3 j^{-1} (Tableau 28).

Aucun nouveau traitement ou changement de débit n'étant prévu sur la station de Seine Centre, les émissions de N_2O ne changeraient pas au cours du temps et resteraient à 29-56 kg N-N_2O j^{-1}, suivant les quantités de méthanol ajoutées lors de la dénitrification.

Lorsque la tranche Valenton I fonctionne seule, la station de Seine Amont présente des flux de N_2O entre 25-58 kg N-N_2O j^{-1}. La mise en route de la nouvelle tranche Valenton II, traitant le même débit d'eau que Valenton I, mais avec un rendement épurateur supérieur, augmentera d'un peu plus du double les quantités de N_2O émises (Tableau 31, Seine Amont, 25-58 à 76-141 kg N-N_2O j^{-1}).

La station de Marne Aval, qui présente actuellement le plus petit débit (0.3 10^5 m^3 j^{-1}, Tableau 28), émet évidemment peu de N_2O, 4 kg N-N_2O j^{-1} (Tableau 31). Néanmoins, ses émissions pourraient s'accroître légèrement à l'horizon 2005-2008 (15-29 kg N-N_2O j^{-1}, Tableau 31) avec l'augmentation de son débit nominal (Tableau 28) et l'installation d'un traitement de l'azote plus poussé.

La future station des Grésillons présentera un taux d'émission comparable à celui de Marne Aval à l'horizon 2005-2008 (16-23 kg N-N_2O j^{-1}, Tableau 31), qui triplera en même temps que son débit à l'horizon 2012-2015 (47-99 kg N-N_2O j^{-1}, Tableau 31 et Tableau 28).

La Morée, au débit moindre (0,5 10^5 m^3 j^{-1}, Tableau 28), devrait être à l'origine d'émissions de N_2O plus faibles (8-16 kg N-N_2O j^{-1}, Tableau 31).

Au total, les quantités de N_2O émis par les stations d'épuration de l'agglomération parisienne vont augmenter au cours du temps avec la prise en charge de l'élimination de l'azote, au niveau de Seine Aval notamment. Ainsi les émissions de N_2O de 58-118 kg N-N_2O j^{-1} actuelles, augmenteront à 315-473 kg N-N_2O j^{-1} à l'horizon 2005-2008 et atteindront 369-748 kg N-N_2O j^{-1} à l'horizon 2012 – 2015 (Total émis, Tableau 31). De ces estimations, il faut évidemment déduire celles de la basse Seine (90-200 kg N-N_2O j^{-1}) qui seront déplacées vers les stations, ainsi que le montre les simulations par le modèle du fonctionnement écologique du bassin de la Seine (Garnier et al., 2005).

7.4 Discussion

7.4.1 Les émissions de N_2O provenant des traitements tertiaires sur cultures fixées et des traitements secondaires sur boues activées

Le pourcentage de N_2O émis par rapport aux flux d'azote traités est présenté ici avec une certaine variabilité (Tableau 30), prenant en compte les principaux facteurs pouvant influencer directement les émissions d'oxyde nitreux lors du traitement, tels que l'oxygène et le carbone organique (Hanaki et al., 1990 ; Itokawa et al., 2001; Pathak, 1999).

Les travaux de Tallec et al. (submitted c) ont montré que, d'une manière générale, les émissions de N_2O sur cultures fixées en traitement tertiaire se situaient dans la gamme haute de celles issues des traitements secondaires sur boues activées. Ces auteurs (Tallec et al., submitted a, b) ont en outre montré que les émissions de N_2O provenant d'un traitement secondaire sur boues activées, étaient directement influencées par l'oxygénation, que ce soit lors de la nitrification ou de la dénitrification.

Lors de la nitrification, les émissions de N_2O les plus importantes sont observées lorsque l'oxygénation se situe autour de 1 mgO_2 L^{-1} (Cébron et al., 2005 ; Tallec et al., submitted a ; Zheng et al., 1994) et à environ 0.3 mgO_2 L^{-1}, lors de la dénitrification (Tallec et al., submitted b). Ce pic d'émission est dû au processus de nitrification-dénitrifiante réalisé par les bactéries autotrophes, où l'oxydation du NH_4^+ en NO_2^- est suivie par une réduction des

NO_2^- en N_2O et N_2 (Bock et al., 1995; Itokawa et al., 2001 ; Jiang & Bakken, 1999 ; Kuai & Verstraete, 1998). Les bactéries ammonium-oxydantes sont capables de réaliser une nitrification-dénitrifiante lorsque l'oxygène est limitant, le nitrite remplaçant l'oxygène comme accepteur d'électron final (Shrestha et al., 2002 ; Tallec et al., submitted a). Ce processus se produit aussi bien lors de la nitrification que de la dénitrification en traitement secondaire avec un bassin anoxique en tête de filière, surtout si ce dernier n'est pas couvert et permet ainsi la dissolution de l'oxygène de l'air à basse température (Tallec et al., submitted a, b).

Le processus de dénitrification peut également être à l'origine d'une émission de N_2O. Même si le N_2O n'est généralement qu'un intermédiaire de la dénitrification, des organismes capables de produire du N_2O en phase finale de la dénitrification ont été caractérisés (Brettar & Höfle, 1993 ; Greenberg & Becker, 1977). Surtout, sous de faibles concentrations en oxygène, le N_2O peut être le produit final de la dénitrification au lieu du N_2 (Baumann et al., 1996; Robertson et al., 1995), la réductase de l'oxyde nitreux étant l'enzyme la plus sensible à l'oxygène (Bonin et al., 1989).

Les émissions de N_2O provenant des systèmes de traitement tertiaire présentent une large variabilité lors de la dénitrification (Tableau 30). Les systèmes en traitement tertiaire dénitrifiant nécessitent en effet un ajout de carbone organique tel que le méthanol dont la quantité conditionne ces émissions. Ainsi les émissions d'oxyde nitreux les plus faibles (0.1 % du nitrate dénitrifié) sont rencontrées lorsque les quantités de méthanol ajoutées permettent au moins 100 % de la dénitrification alors qu'entre 50 et 80 % de la dénitrification, ces émissions sont plus importantes (0.8 % du nitrate dénitrifié), (Tallec et al., submitted c).

7.4.2 Bilan des émissions de N_2O sur les stations d'épuration de l'agglomération parisienne

Des estimations de N_2O, à partir de données acquises *in situ* sur les quatre stations de l'agglomération parisienne, sur les différents systèmes de traitement de l'azote mais aussi du carbone, donnent des valeurs de l'ordre de 200 kg N- N_2O j^{-1} pour l'ensemble du traitement actuel des eaux usées (Legaigneur, 2003). Ces estimations sont du même ordre que celles que nous calculons pour le seul traitement actuel (58-118 kg N-N_2O j^{-1}).

Thörn et al. (1996) et Sümer et al. (1995) trouvent respectivement une production d'oxyde nitreux sur boues activées de l'ordre de 0.22 g N-N_2O m^{-3} j^{-1} en dénitrification et de 0.02 g N-N_2O m^{-3} j^{-1} en nitrification, soit un total de 0.24 g N-N_2O m^{-3} j^{-1} pour l'ensemble du traitement de l'azote. Pour un total de 27.7 10^5 m^3 j^{-1} d'eaux usées de l'agglomération parisienne, qui subiront un traitement de la pollution azotée, via la dénitrification et la nitrification en 2012-2015, nous pouvons, d'après ces auteurs, estimer des émissions de N_2O de l'ordre de 700 kg N j^{-1} (0.24 g N-N_2O m^{-3} j^{-1} / 27.7 10^5 m^3 j^{-1}). Ces valeurs correspondent également bien à celles estimées ici pour cette période, soit 369-748 kg N-N_2O j^{-1}. Dans les deux cas, et avec des sources différentes, nos estimations des émissions de N_2O, au niveau des stations d'épuration de la région parisienne, sont confortées.

Nous avons choisi d'utiliser les données estimées à partir d'essais effectués sur les boues activées et cultures fixées des stations de l'agglomération parisienne dans leur propre configuration. Les émissions de N_2O peuvent ainsi changer d'une station à l'autre, mais comme le montrent les travaux de Tallec et al. (submitted a, b, c), ces variations peuvent être modulées suivant les configurations utilisées par l'exploitant de la station, relatives à l'oxygénation et aux quantités de méthanol ajoutées. Ces émissions peuvent également varier

en fonction des contraintes climatiques (temps de pluie, temps sec), hydrologiques, etc. Les estimations fournies ici, présentent ainsi une variabilité que l'exploitant peut utiliser pour réduire les émissions de N_2O tout en optimisant le traitement des effluents.

7.4.3 Impact sur le bassin de la Seine des émissions de N_2O, provenant des stations d'épuration de l'agglomération parisienne, actuelles et futures

De manière générale, les émissions de N_2O sur l'ensemble des stations de l'agglomération parisienne, ne dépassent pas actuellement plus de 120 kg N-N_2O j^{-1}. Il faut y ajouter, les émissions de la basse Seine, liées à la nitrification et la dénitrification de l'azote rejeté par l'agglomération parisienne, environ 120 kg N-N_2O j^{-1} pour l'aval de l'agglomération parisienne (90-200 kg N-N_2O j^{-1}; Garnier et al., 2005), soit un total d'environ 240 kg N-N_2O j^{-1}.

Avec un meilleur traitement de l'azote en stations d'épuration, les émissions de N_2O seront au total à peine plus élevées en 2005-2008 compte tenu des incertitudes, soit 315-473 kg N-N_2O j^{-1} mais renforcées à 369-748 kg N-N_2O j^{-1} en 2012-2015, lors de la mise en place d'une dénitrification totale au niveau de la station Seine Aval.

Un taux d'émission du N_2O plus élevé en station d'épuration, de l'ordre de 0.1 à 0.8 %, contre 0.1 % à 0.2 % au niveau de l'estuaire (Garnier et al., 2005) permet d'expliquer cette augmentation. L'augmentation des émissions de N_2O avec une nitrification et une dénitrification réalisées en station d'épuration, et non plus dans le milieu naturel, peut aussi s'expliquer par des différences de communautés bactériennes. Il a été en effet montré que toutes les espèces bactériennes n'émettaient pas les mêmes quantités de N_2O (Anderson et al., 1993 ; Cavigelli & Robertson, 2001) et Cébron et al. (2003) ont mis en évidence des différences de communautés bactériennes nitrifiantes provenant de la station Seine Aval et au niveau de l'estuaire.

Si le traitement des eaux usées *via* l'élimination de la pollution azotée, peut être considéré comme à l'origine d'une nouvelle source de pollution potentiellement importante pour l'environnement, le N_2O étant un gaz à effet de serre actif, il est important de resituer cette pollution atmosphérique sur une échelle plus régionale du bassin. En effet, à cette échelle, ces émissions sont relativement faibles, plus par rapport aux émissions provenant des sols agricoles du bassin amont (4100– 8200 kg N-N_2O j^{-1}, Garnier et al., 2005 sur la base des travaux de Khalil et al ., 2004) qu'en regard de l'ensemble du système hydrographique de la Seine (370 -680 kg N-N_2O j^{-1}, Garnier et al., 2005). Si les émissions de N_2O provenant des stations de l'agglomération parisienne, de 60 à 750 kg N-N_2O j^{-1}, peuvent constituer une part importante des émissions de l'ensemble du système hydrographique de la Seine (de l'ordre 20 à 100 %), elles ne représenteraient que 1 à 10 % des émissions provenant des sols agricoles.

Remerciements

Ce travail a été effectué dans le cadre des programmes du PIREN-Seine et de Seine-Aval. L'étude a été financé par le Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP).

7.5 Références

Anderson IC., Poth M., Homstead J., Burdige, D.,1993. A comparison of NO and N_2O production by the autotrophic nitrifier Nitrosomonas europea and the heterotrophic nitrifier Alcaligenes faecalis. Appl. Environ. Microbiol., 59, 3525 – 3533.

Baumann B., Snozzi M., Zehnder A.J.B. and van der Meer J.R., 1996. Dynamics of denitrification activity of Paracoccus denitrificans in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. J. Bacteriol., 178, 4367-4374.

Billen G., Garnier J., Ficht A., Cun C., 2001. Modelling the reponse of water quality in the Seine River Estuary in response to human activity in the watershed over the last 50 years. Estuaries., 24, 977-993.

Bliefert C., Perraud, R., 2001. Les oxydes d'azote. In "Chimie de l'Environnement, air, eau, sol, déchets" De Boeck [Ed.], pp. 177-188.

Bock. E., Schmidt E., Stüven R., Zart D., 1995. Nitrogen loss caused by denitrifying Nitrosomonas cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. Arch. Microbiol., 163, 16-20.

Bonin P., Gilewiez M., Bertrand J.C., 1989. Effect of oxygen on each step of denitrification on Pseudomonas nautica strain 617. Can. J. Microbiol., 35, 1061-1064.

Brettar I., Hölfe M.G., 1993. Nitrous oxide producing heterotrophic bacteria from water column of the central Baltic : abundance and molecular identification. Mar. Ecol. Prog. Ser., 94, 253-265.

Brion N., Billen G., Guezennec L., Ficht A., 2000. Distribution of nitrifying activity in the Seine River (France) from Paris to the estuary. Estuaries., 23, 669-682.

Cavigelli M.A., Robertson G.P., 2001. Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem. Soil Biol. Biochem., 33, 297-310.

Cébron A., Berthe T., Garnier J., 2003. Nitrification and nitrifying bacteria in the lower Seine River and estuary. Appl. Environ. Microbiol., 69, 7091-7100.

Cébron A., Garnier J., Billen G., 2005. Nitrous oxide production and nitrification kinetics by bacteria communities naturally present in river water (the lower Seine. France). Aquat. Microb. Ecol., (in press).

Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (CITEPA), 2003. Emissions dans l'air en France métropole. comparaisons des émissions de la France et d'autres pays. www.citepa.org/France-autres/comparaisons.pdf.

Cugier Ph., Billen G., Guillaud JF.,. Garnier J., Ménesguen A., 2005. Modelling the eutrophication of the Seine Bight (France) under historical. present and future riverine nutrient loading. J. Hydrol., (in press).

Garnier J., Leporcq B., Sanchez N., Philippon X., 1999. Biogeochemical mass balances (C. N. P. Si) in the three large reservoirs of the seine basin (France). Biogeochemistry., 47, 119-146.

Garnier J., Billen G., Sanchez N., Leporcq B., 2000. Ecological functioning of the Marne reservoir (upper Seine basin. France). Regul. Rivers : Res. Mgmt., 16, 51-71.

Garnier J., Servais P., Billen G., Akopian M., Brion N., 2001. Lower Seine river and estuary (France) : carbon and oxygen budgets during low flow. Estuaries., 24, 964-976.

Garnier J., Cébron A; Tallec G., Billen G., Sebilo M., Martinez A., 2005. Nitrous oxide emission in the seine River estuary (France) : comparison with upstream sector of the Seine basin. Biogeochemistry., (in press).

Goreau T.J., Kaplan W., Wofsy S., McElroy M., Valois F., Watson S., 1980. Production of NO_2^- and N_2O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen. Appl. Environ. Microbiol., 40, 526-532.

Greenberg E.P., Becker G.E., 1977. Nitrous oxide as end product of denitrification by strains of fluorescent pseudomonas. Can. J. Microbiol., 23, 903-907.

Hanaki K., Wantawin C., Ohgaki S., 1990. Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. Water Res., 24, 297-302.

Hanaki K., Hong Z., Matsuo T., 1992. Production of nitrous oxide gas during denitrification of wastewater. Wat. Sci. Technol., 26, 1027-1036.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2000. Special report on Emissions Scenarios ; Univ. Press, Cambridge.

Itokawa H., Hanaki K., Matsuo T., 2001. Nitrous oxide production in high-loading biological nitrogen removal process under low COD/N ratio condition. Water Res., 35, 657-664.

Jiang Q-Q., Bakken L.R., 1999. Nitrous oxide production and methane oxidation by different ammonia-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol.,65, 2679-2684.

Khalil K., Mary B., Renault P., 2004. Nitrous oxide production by nitrification and denitrification in soil aggregates as affected by O_2 concentration. Soil Biol. Biochem., 36, 687-699.

Kim J-S., Kim S.-J., Lee B-H., 2004. Effect of Alcaligenes faecalis on Nitrous Oxide Emission and Nitrogen Removal in Three Phase Fluidized Bed Process. J Environ Sci Health, 39, 1791 – 1804.

Knowles R., 1982. Denitrification. Microbiol. Rev., 46, 43 – 70.

Kuai L., Verstraete W., 1998. Ammonium removal by the Oygen-limited Autotrophic Nitrification-Denitrification system. Appl. Environ. Microbiol., 64**,** 4500-4506.

Legaigneur V., 2003. Emissions atmosphériques provenant des stations d'épuration du SIAAP, en particulier les oxydes d'azote et le protoxyde d'azote. Dipl. de rech. technol. Univ. Paris7, 178p.

Meybeck M., 2001. River basin under anthropocene conditions. In "Science and integrated basin management" von Bodungen B. and Tuner K. [Ed.], pp. 25-294.

Pathak H., 1999. Emissions of nitrous oxide from soil. Curr. Sci., 77, 359-369.

Poth M.., Focht D., 1985. 15N kinetic analysis of N_2O production by Nitrosomonas europaea: an examination of nitrifier denitrification. Appl. Environ. Microbiol., 49, 1134-1141.

Robertson LA., Dalsgaar T., Revsbech NP., Kuenen JG., 1995. Confirmation of aerobic denitrification in batch cultures, using gas chromatography and ^{15}N mass spectrometry. FEMS Microbiol. Ecol., 18, 113-120.

Shrestha N., Hadano S., Kamachi T., Okura I., 2002. Dinitrogen production from ammoia by Nitrosomonas europaea. Appl. Catal. A Gen., 237, 33-39.

Sümer L.Y., Weiske A., Benckiser G., Ottow J.C.G., 1995. Influence of environmental conditions on the amount of N_2O released from activated sludge in a domestic waste water treatment plant. Experientia., 51, 419-422.

Tallec. G., Garnier J., Billen G., Gousailles M., Submitted a. Nitrous oxide emissions from secondary activated sludge in nitrifying conditions of urban wastewater treatment plants: effect of oxygenation level. Wat. Res.

Tallec. G., Garnier J., Billen G., Gousailles M., Submitted b. Nitrous oxide emissions from secondary activated sludge in denitrifying conditions of urban wastewater treatment plants. under anoxic and low oxygenation. Biorescour Technol.

Tallec. G., Garnier J., Billen G., Submitted c. Traitement de la pollution azotée en station d'épuration par filtres biologiques immergés : Emissions d'oxyde nitreux lors de la nitrification et dénitrification. TSM.

Thörn M., Sörensen F., 1996. Variation of nitrous oxide formation in the denitrification basin in a wastewater treatment plant with nitrogen removal. Wat. Res., 30, 1543-1547.

Tusseau-Vuillemin M.H., Le Reveillé G., Mouchel J.M., Dispan J., Delbec M., Servais P., 2000. Biodegradabilité de la matière organique en sorite de la station d'épuration. Paris, France, Rapport d'activité Piren-Seine 1999, pp 4-22.

Zheng H., Hanaki K., Matsuo T., 1994. Production of nitrous oxide gas during nitrification of wastewater. Water Sci. Tecnol., 30, 134-141.

Avant-propos

En conclusion générale de ce travail, nous vérifierons tout d'abord que les résultats obtenus ont bien permis de satisfaire les objectifs que nous nous étions fixés au départ. Nous essayerons de mettre en évidence les apports de cette étude à la connaissance globale des processus d'émissions de N_2O en stations d'épuration. Il s'agira également d'évaluer le rôle des traitements de l'azote sur les émissions globales de la Seine. Enfin, de nouvelles perspectives seront proposées.

Chapitre 8
-
Conclusions et perspectives

8.1 Les émissions de N_2O en stations d'épuration lors du traitement de l'azote

Un premier objectif était d'évaluer les émissions d'oxyde nitreux provenant des différents traitements de l'azote dans les stations d'épuration de l'agglomération parisienne, gérées par le SIAAP. Ces dernières présentent deux systèmes de traitement de l'azote différents : un système de traitement sur boues activées secondaires, avec une dénitrification en tête sans apport exogène de carbone organique, et un système de traitement sur cultures fixées en biofiltres immergés, avec une dénitrification en fin de parcours et un apport extérieur de carbone organique sous forme de méthanol.

Plusieurs facteurs peuvent intervenir sur la production d'oxyde nitreux. Les plus importants sont, outre les charges azotées, les concentrations en oxygène dissous et les charges en carbone organique. Nous avons choisi d'étudier ces deux principaux facteurs car ils sont liés également i) à l'exploitation de la station et ii) aux conditions variables - *météorologiques notamment* - qui y sont rencontrées.

L'oxygénation des bassins en boues activées secondaires à Seine Amont (Valenton, est de Paris) présente une large variabilité. Lors de la nitrification, elle se situe entre 2 et 7.5 $mgO_2\ L^{-1}$ durant la nitrification et entre 0.0 et 2.0 $mgO_2\ L^{-1}$ lors de la dénitrification. Sur cultures fixées en biofiltres immergés, l'oxygénation peut également présenter une certaine variabilité due principalement au cheminement irrégulier du flux d'air injecté.

Pour ce qui concerne la charge carbonée, les ajouts de méthanol, lors de la dénitrification en traitement tertiaire, sont principalement fonction des objectifs de traitement décidés par l'exploitant de la station, des débits et du rapport DCO/N (demande chimique en oxygène/azote total) de l'eau à traiter. Dans une perspective des futurs traitements en cours de réalisation à Seine Aval (Achères, ouest de Paris) qui, à l'horizon 2005-2008, permettront le traitement de 30 % de la pollution nitratée, il pourra être choisi d'éliminer une partie des nitrates grâce à l'ajout partiel de méthanol ou de ne traiter qu'une partie du débit de l'effluent.

En nous attachant à l'étude des émissions de N_2O, en fonction des différents paramètres liés à l'exploitation de la station, aux conditions qui y sont rencontrées et aux facteurs influençant la production d'oxyde nitreux, nous avons pu estimer cette dernière pour chacun de ces traitements.

Sur boues activées secondaires en conditions de nitrification, les flux d'oxyde nitreux varient en moyenne de 2 à 7 $\mu gN\text{-}N_2O\ g\ MES^{-1}\ h^{-1}$ et représentent de 0.1 à 0.4 % de la charge en ammonium traitée, suivant l'oxygénation. Les flux de N_2O les plus importants sont observés pour une oxygénation autour de 1 $mgO_2\ L^{-1}$.

En conditions de dénitrification, la gamme des variations des flux d'oxyde nitreux est plus ample, en moyenne de 5 à 50 $\mu gN\text{-}N_2O\ g\ MES^{-1}\ h^{-1}$ suivant l'oxygénation et représentent 0.4 % de la charge en nitrate traitée, en anoxie totale. Les flux de N_2O les plus importants sont ici observés pour une oxygénation autour de 0.3 $mgO_2\ L^{-1}$.

En cultures fixées, lors de la nitrification, les émissions de N_2O représentent entre 28 et 224 µg N L biolite^{-1} h^{-1} suivant l'oxygénation. Les flux de N_2O les plus importants sont observés pour les concentrations en oxygène dissous les plus fortes (9.2 mgO_2 L^{-1}), ce qui correspond aux vitesses de nitrification les plus importantes. Si l'on rapporte ces flux de N_2O aux taux de nitrification, comme pour les boues activées, ils ne représentent pas plus de 0.4 % de la charge en ammonium traitée en moyenne.

Lors de la dénitrification, les émissions de N_2O se situent en moyenne entre 9 et 46 µgN L biolite^{-1} h^{-1}, soit entre 0.1 et 0.8 % de la charge en nitrate traitée, suivant les doses de méthanol ajoutées. Le pic d'émission de N_2O est observé autour d'un ajout de méthanol ne permettant que 60 % de la réduction totale des nitrates. Lorsque le méthanol ajouté permet 100 % de la réduction totale des nitrates, les émissions de N_2O ne représentent que 0.1 % de la charge traitée.

Au total, il apparaît que les taux d'émissions de N_2O, en boues activées secondaires et en cultures fixées lors d'un traitement tertiaire, sont comparables entre eux et se situent entre 0.1 et 0.8 % de la charge en azote traitée, tant en nitrification qu'en dénitrification. Ces estimations sont en accord avec celles mesurées *in situ* sur les quatre stations de l'agglomération parisienne, soit environ 0.2 % de la charge en azote traitée (Legaigneur, 2003), ou encore avec des estimations de 0 à 1 % mentionnées par Hanaki et al. (1992) sur boues activées. On note qu'elles restent légèrement supérieures à la production d'oxyde nitreux en milieu naturel. En effet, Garnier et al. (2005) ont pu estimer la production de N_2O au niveau de l'estuaire de la Seine à 0.1 % (0.07-0.11 %) de la nitrification ou 0.15 % (0.05-0.23 %) de la dénitrification. L'ensemble de ces résultats obtenus sur les flux de N_2O émis lors de la nitrification et dénitrification, en station d'épuration urbaine, sur boues activées secondaires et sur cultures fixées en traitement tertiaire peuvent être résumés graphiquement (Figure 79).

Grâce aux résultats de cette étude, il apparaît important de maintenir une bonne oxygénation lors de la nitrification (supérieure à 2 mgO_2 L^{-1}) et d'atteindre l'anoxie totale lors de la dénitrification, afin de limiter les émissions du gaz à effet de serre qu'est l'oxyde nitreux. De même, il est préférable d'ajouter des quantités de méthanol permettant une réduction totale des nitrates. Il serait donc souhaitable de traiter une partie du débit, avec un rendement pour l'élimination des nitrates de 100 %, plutôt que la totalité du débit avec un rendement épuratoire moindre.

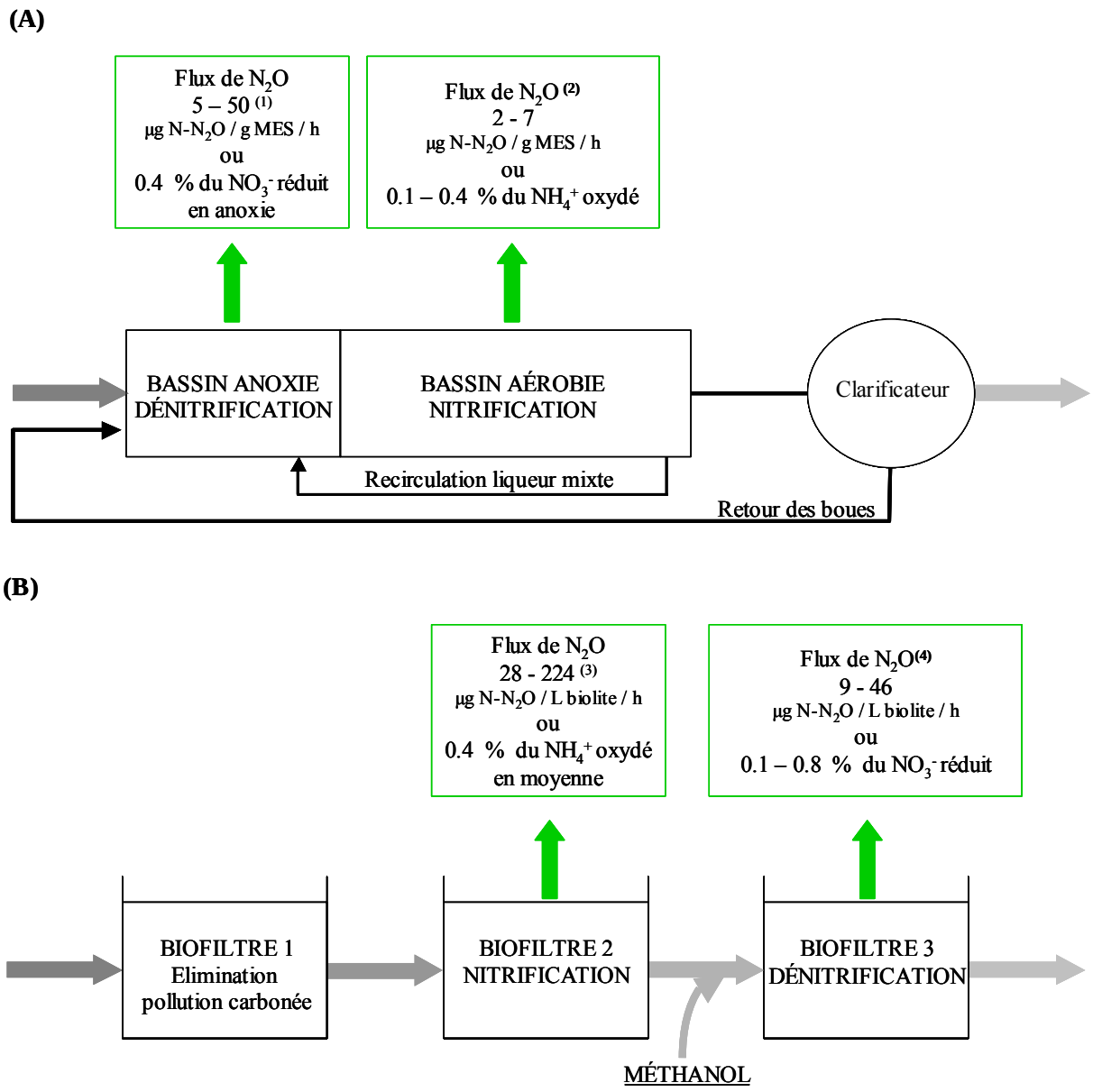


*Figure 79. Schémas récapitulatifs des résultats obtenus sur les flux de N_2O émis lors de la nitrification et de la dénitrification, en station d'épuration urbaine, sur boues activées secondaires (**A**) et cultures fixées en traitement tertiaire (**B**).*
[1.] Suivant l'oxygénation (les flux de N_2O les plus importants sont observés pour une oxygénation autour de 0.3 $mgO_2\ L^{-1}$) ; [2.] Suivant l'oxygénation (les flux de N_2O les plus importants sont observés pour une oxygénation autour de 1 $mgO_2\ L^{-1}$) ; [3.] Suivant l'oxygénation (les flux de N_2O sont corrélés à l'oxygénation, $R^2 = 0.90$) ; [4.] Suivant les quantités de méthanol ajoutées (les flux de N_2O les plus importants sont observés autour d'un ajout de méthanol permettant 60 % de la réduction totale des nitrates).

8.2 Les processus d'émissions du N_2O lors de la nitrification et de la dénitrification

Sur le plan de la recherche fondamentale, un autre objectif était de contribuer à l'approfondissement des connaissances concernant les processus d'émissions de N_2O en station d'épuration. Grâce à nos essais expérimentaux, utilisant des inhibiteurs spécifiques de l'une ou l'autre étape de transformation de l'azote, nous avons pu identifier les différents processus responsables des émissions d'oxyde nitreux en stations d'épuration. Cette deuxième partie de nos recherches a été réalisée sur les boues activées; en effet, même si les communautés bactériennes en boues activées et cultures fixées peuvent être différentes, ce sont les mêmes processus de transformation de l'azote qui interviennent.

Au sein des biofilms, boues activées ou cultures fixées, les communautés bactériennes hétérotrophes et autotrophes coexistent. Celles-ci sont plus ou moins actives, plus ou moins dominantes, suivant les conditions d'oxygénation ou la disponibilité du carbone, favorisant l'un ou l'autre processus.

Le processus responsable majoritairement des fortes émissions de N_2O, observées lorsque l'oxygénation est inférieure à 2 $mgO_2\ L^{-1}$, est la nitrification-dénitrifiante, réalisée par les bactéries autotrophes nitrifiantes. Nous avons pu mettre en évidence, tout comme Kuai & Verstraete (1998) en station d'épuration, ou Cébron et al. (2005) en milieu naturel, que ces dernières sont capables, lorsque l'oxygène devient limitant, d'utiliser le nitrite comme accepteur d'électrons final à la place de l'oxygène, formant ainsi de l'oxyde nitreux et de l'azote moléculaire comme produits finaux. Nous avons également confirmé que cette production était stimulée de façon importante par des ajouts de nitrite. Ceci permet de penser que lors d'une mise en route ou de la mise en place de conditions anaérobies en station d'épuration, les pics de nitrite observés pourraient accroître les émissions de N_2O.

Un autre processus majeur, producteur d'oxyde nitreux, est la dénitrification hétérotrophe. Cette production peut être due, à des communautés ayant comme seul produit final le N_2O (Greenberg & Becker, 1977; Brettar & Höfle, 1993), à la présence d'oxygène en faible quantité, qui inhibe l'enzyme permettant la réduction du N_2O en N_2 (Bonin et al., 2002), ou encore à des apports en carbone organique limitant (Itokawa et al., 2001).

Nous avons montré que ces deux processus sont responsables des émissions de N_2O en conditions de micro-aérobie, que ce soit lors de la nitrification ou de la dénitrification. Les bactéries hétérotrophes sont responsables de 100 % des émissions lorsque les conditions leurs sont favorables (présence de carbone organique et anoxie totale). La nitrification-dénitrifiante autotrophe est majoritaire en micro-aérobiose (0.1 à 2 $mgO_2\ L^{-1}$), que ce soit en conditions de nitrification ou de dénitrification.

Nous avons également cherché à estimer les émissions d'oxyde nitreux produit par la nitrate ammonification. Si cette voie de transformation, mise en évidence lors de notre étude sur le traitement de l'azote, peut être importante dans certaines conditions - conditions anaérobies (Tiedje et al., 1979; Satoh et al., 1983), limitantes en nitrate (Bonin, 1996; Akunna et al, 1993), avec un rapport C/N élevé (Rehr and Klemme, 1989) - elle n'est pas ici à l'origine d'émissions significatives de N_2O.

En dehors de ces conditions particulières (micro-aérobie ou faibles apports en carbone organique), les émissions de N_2O sont faibles. Ce bruit de fond peut être attribué à une décomposition chimique de certains intermédiaires de la nitrification et à la production de communautés bactériennes dénitrifiantes particulières qui ne produisent que du N_2O comme produit final.

8.3 Bilan global des émissions de N_2O et leur évolution

Grâce à ces études expérimentales sur pilotes de laboratoire, menées dans des conditions identiques à celles rencontrées sur les stations d'épuration, les émissions d'oxyde nitreux ont été évaluées entre 0.1 et 0.8 % de la charge en azote traitée pour chacun des systèmes de traitement, que ce soit lors de la nitrification ou de la dénitrification.

Compte tenu des charges en azote traitées via la nitrification et la dénitrification et des systèmes de traitement différents utilisés dans les stations de l'agglomération parisienne, les émissions de N_2O représenteraient actuellement de l'ordre de 60-120 kgN-N_2O j^{-1}. Cette étude montre que ces émissions vont sensiblement augmenter , en raison des nouveaux traitements de la pollution azotée mis en place dans les années à venir, à Seine Aval (Achères), notamment. Nous avons pu estimer les émissions d'oxyde nitreux pour l'horizon 2005-2008, à 320-480 kgN j^{-1} et pour l'horizon 2012-2015, à 370-750 kgN j^{-1}.

En 2015, les stations de l'agglomération parisienne - la station Seine Aval (Achères) en particulier- auront pris en charge le traitement de toute la pollution azotée rejetée auparavant en Seine. Cette pollution azotée qui était nitrifiée et dénitrifiée dans le milieu récepteur au niveau de l'estuaire de la Seine surtout, le sera désormais au niveau des stations d'épuration. Les émissions d'oxyde nitreux mesurées dans l'estuaire pourraient être transférées sur la station Seine Aval, sans changement notable de flux. Nos résultats montrent toutefois que les émissions en basse Seine (90-200 kg N j^{-1}), liées essentiellement aux apports de la station Seine Aval, sont plus faibles que celles estimées sur cette même station pour 2012-2015, soit 180-220 kg N j^{-1}. Une possible augmentation des émissions de N_2O lorsque la nitrification et la dénitrification sont réalisées en station d'épuration et non plus dans le milieu naturel, pourrait s'expliquer par l'intervention de communautés bactériennes différentes. En effet, les travaux de Cébron et al. (2003) ont révélé que la communauté bactérienne nitrifiante provenant de la station Seine Aval était différente de celle trouvée plus en aval dans la basse Seine et surtout au niveau de l'estuaire. De plus, il a été montré que toutes les espèces bactériennes n'émettaient pas les mêmes quantités de N_2O (Cavigelli et Robertson, 2001 ; Anderson et al, 1993).

Toutefois, si les émissions de N_2O provenant des stations de l'agglomération parisienne (de 60 à 750 kg N-N_2O j^{-1}), peuvent constituer une part importante des émissions de l'ensemble du système hydrographique de la Seine (de l'ordre 20 à 100 %), elles ne représenteraient que 1 à 10 % des émissions provenant des sols agricoles (Tableau 32).

Tableau 32. Répartition des émissions estimées de N_2O dans le bassin de la Seine, actuelle et prévue aux horizons 2005-2008 et 2012-2015.

	Flux de N_2O kg N j^{-1}		
	Actuel	**2008 - 2006**	**2012 - 2015**
STEPs SIAAP	60-120	320-480	370-750
Basse Seine	90-200	*Bruit de fond*	*Bruit de fond*
Réseau hydrographique de la Seine	370-680	*280-480*	*280-480*
Bassin Amont Agricole	4100-8200	*4100-8200*	*4100-8200*

8.4 Perspectives

Ces travaux ont permis d'obtenir des résultats nouveaux et importants pour la compréhension des processus responsables des émissions d'oxyde nitreux, notamment en stations d'épuration, pour lesquelles les traitements de l'azote vont se généraliser avec l'impulsion de la directive européenne 91/271. Toutefois, certains points doivent encore être éclaircis, ouvrant alors de nouvelles perspectives de recherches. Il s'agit 1) de l'étude des communautés bactériennes présentes *in situ* dans les bassins d'épuration, 2) de l'approfondissement de nos connaissances concernant les différents facteurs influençant les émissions de N_2O lors du traitement de l'azote, appréhendés ici ou non 3) des émissions de N_2O provenant d'autres types de traitement de l'azote que ceux étudiés lors de nos recherches.

- Un aspect important, qui n'a pas été entrepris ici, mériterait également d'être étudié de façon approfondie grâce aux outils de biologie moléculaire : il s'agit de décrire les communautés bactériennes relatives au traitement de la pollution azotée au niveau des stations d'épuration urbaines. Une telle étude permettrait une meilleure caractérisation des différents processus mis en œuvre lors de ces traitements et de mieux appréhender la variabilité des flux de N_2O émis. La connaissance des communautés bactériennes permettrait également une meilleure compréhension des événements pouvant intervenir lors du traitement, de manière rétroactive, nécessairement complexe, et donc conduire à une meilleure exploitation des stations.

- Si nous avons défini les différents processus responsables de la production de N_2O, seuls les principaux facteurs influençant cette production ont été étudiés. D'autres contraintes n'ont pas été analysées ici; la température, variable tout au long de l'année peut également jouer un rôle important sur la dissolution des gaz, mais aussi les activités bactériennes et le pH Même si la valeur du pH change peu lors du traitement des eaux, certains effluents, industriels notamment, peuvent ponctuellement l'influencer.

- Par ailleurs, nos recherches ont porté sur les traitements de l'azote sur boues activées en traitement secondaire et cultures fixées en traitement tertiaire. Des expériences sur le traitement de l'azote sur cultures fixées en traitement secondaire pourraient également compléter notre étude. De même, seuls nous concernaient ici des systèmes de type intensif; or, nous savons (cf. chapitre 1) qu'il existe de nombreux autres procédés, notamment extensifs tels que, par exemple, les lits d'infiltration-percolation sur sable ou le lagunage. Qu'en est-il des émissions de N_2O sur ces autres procédés d'épuration ?

Enfin bien que ce travail ait porté exclusivement sur l'oxyde nitreux, il existe d'autres gaz, nuisibles pour l'environnement ou la santé humaine, susceptibles d'être produits au niveau des stations d'épuration, appartenant au cycle de l'azote, tel que le monoxyde d'azote (NO) et plus largement les oxydes d'azote (NOx).

De même, d'autres gaz à effet de serre (GES), tel que le dioxyde de carbone (CO_2) ou le méthane (CH_4) sont produits au niveau des stations d'épuration (IPCC, 2000). Actuellement, un projet visant à quantifier les émissions de gaz à effet de serre à l'échelle territoriale, impliquant principalement le CO_2, le N_2O et le CH_4, est en court (Mission interministérielle de l'effet de serre -MIES- du Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, 2003). Ce projet devrait permettre l'identification des principaux acteurs dans les émissions de GES. Des scénarii d'évolution pourraient être élaborés, offrant la possibilité de se projeter dans l'avenir en dégageant les grandes tendances des émissions de GES; un programme d'action devrait alors être proposé assorti des conditions de sa réussite.

8.5 Références

Akunna, J.C., C. Bizeau and R. Molleta, 1993. Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources : glucose glycerol acetic acid lactic and methanol. Water Research **27** (8): 1303-1312.

Anderson I. C., Poth M., Homstead J., Burdige D.,1993. A comparison of NO and N2O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 3525 – 3533.

Bonin, P., 1996. Anaerobic nitrate reduction to ammonium in two strains isolated from coastal marine sediment : a dissimilatory pathway. FEMS Microbiology Ecology **19**: 27-38.

Bonin P., Tamburini C., Michotey V., 2002. Determination of bacterial processes which are sources of nitrous oxide production in marine samples. Water Reas. 36: 722-732.

Brettar I. and Hölfe M.G., 1993. Nitrous oxide producing heterotrophic bacteria from water column of the central Baltic : abundance and molecular identification. Mar. Ecol. Prog. Ser. 94: 253-265.

Cavigelli M.A., Robertson G.P., 2001. Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem. Soil Biol. Biochem., 33, 297-310.

Cébron A., Berthe T., Garnier J., 2003. Nitrification and Nitrifying bacteria in the lower Seine River and estuary. Appl. Environ. Microbiol. 69: 7091-7100

Cébron A., Garnier J., Billen G., 2005. Nitrous oxide production and nitrification kinetics by natural bacterial communities (the lower Seine River, France). Aquatic. Microbial. Ecology. In press.

Garnier J., Cébron A, Tallec G., Billen G., Sebilo M., Martinez A., 2005. Nitrous oxide emission in the seine River estuary (France) : comparaison with upstream sector of the Seine basin. Biogeochemistry. In press.

Greenberg E.P. and Becker G.E., 1977. Nitrous oxide as end product of denitrification by strains of fluorescent pseudomonas. Can. J. Microbiol. 23: 903-907.

Hanaki K., Hong Z., Matsuo T., 1992. Production of nitrous oxide gas during denitrification of wastewater. Water Sci. Technol. 26: 1027-1036.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2000. Special report on Emissions Scenarios. Cambridge Univ. Press, 599 pp

Itokawa H., Hanaki K., Matsuo T., 2001. Nitrous oxide production in high-loading biological nitrogen removal process under low COD/N ratio condition. Water Res. 35: 657-664.

Kuai L. and Verstraete W., 1998. Ammonium removal by the Oygen-limited Autotrophic Nitrification-Denitrification system. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4500-4506.

Legaigneur, V. (2003). Atmospheric emissions from WWTP of SIAAP, notably nitric and nitrous oxid. Technological Research Diploma. University Denis Diderot, Paris7.(French).

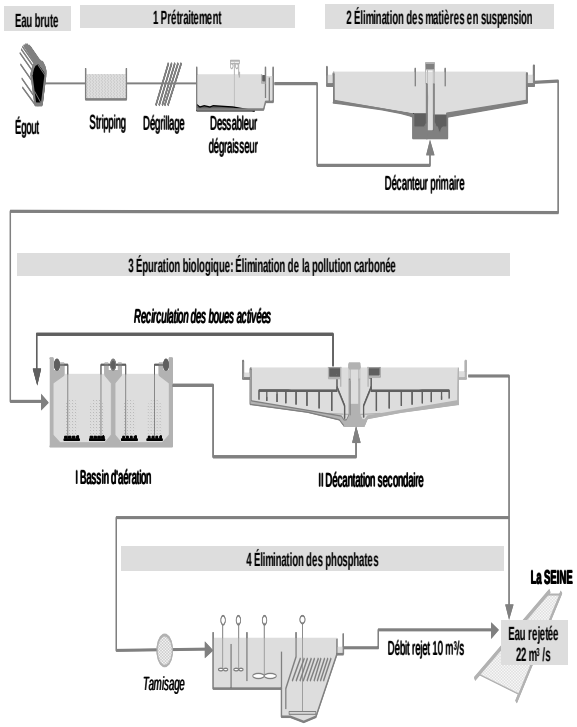
Rehr, B. and J-H. Klemme, 1989. Competition for nitrate between denitrifying *Pseudomonas stutzeri* and nitrate ammonifying enterobacteria. FEMS Microbiology Letters. **62** (1): 51-57

Satoh T., Hom S.S.M., Shanmugam K.T., 1983. Production of nitrous oxide from nitrite in *Klebsiella pneumoniae* : mutants altered in nitrogen metabolism. J. of Bacteriol. 155: 454-458.

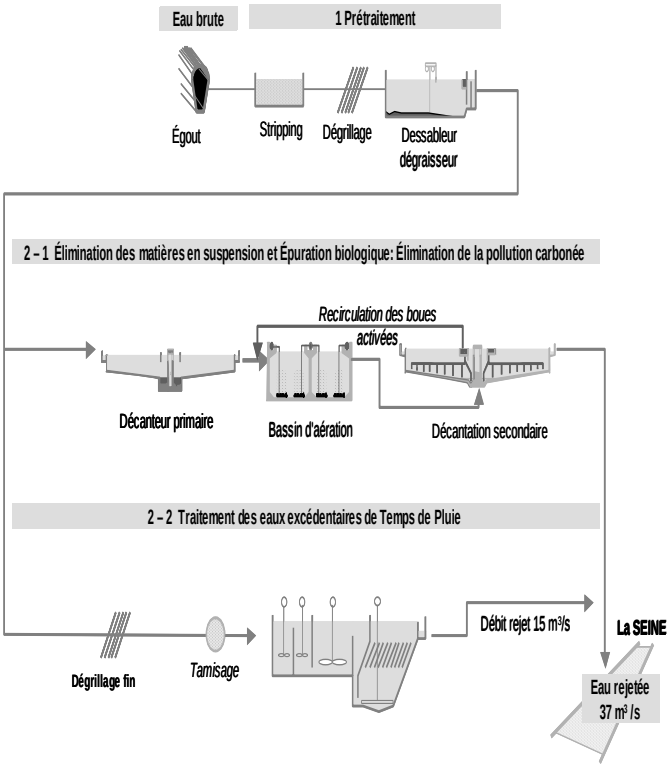
Tiedje J.M., Firestone R.B., Betlach M.R., Smith M.S., Caskey W.H., 1979. Methods for the production and use of nitrogen-13 in studies of denitrification. Soil Sci. Soc. Amer. J. 43:709-715.

Annexes

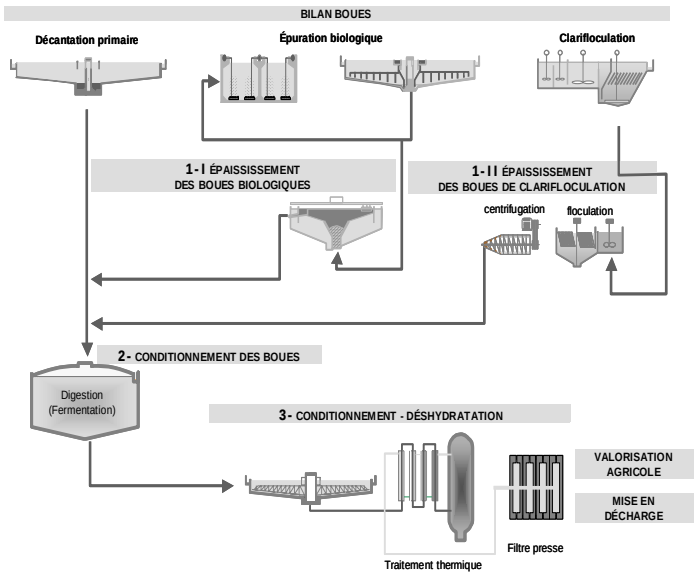
Annexe 1. La station 'Seine Aval'



(a) Traitements des eaux par temps sec



(b) Traitements des eaux par temps de pluie



(c) Traitements des boues

Figure I. Station 'Seine Aval' du SIAAP : traitements des eaux,(a) en temps sec, (b) en temps de pluies et (c) traitements des boues.

Tableau I. Station 'Seine Aval' du SIAAP : caractéristiques de l'épuration biologique en temps sec sur les quatre tranches de la station d'Achères : Achères I, II, III et IV.

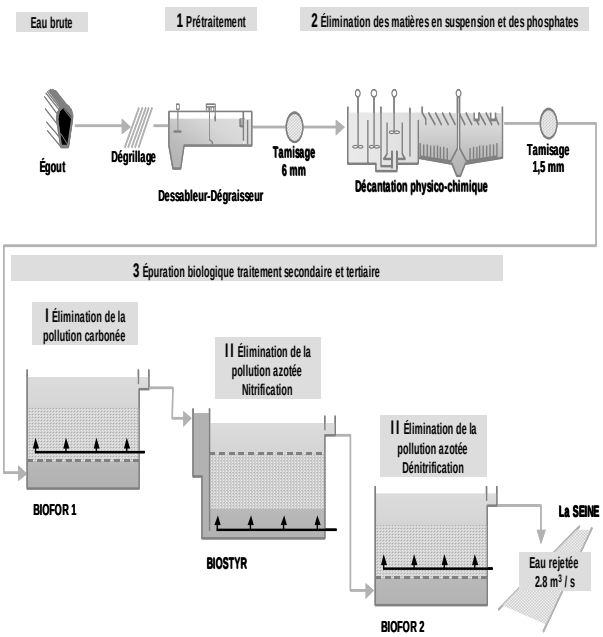
	Débit (10^3 $m^3.j^{-1}$)	*Charge* (kg DBO_5 $m^3.j^{-1}$)	*Aération* (Prof. d'insufflation) (m)	*Débit air Moyen utilisé* (10^3 $m^3.j^{-1}$)	*Temps de séjour nominal* (h.)
Achères I	*220*	*Faible*	*Grosse bulle* (canne injection) (2.75m)	*2 113*	*4.30*
Achères II	*300*	*Moyenne*	*Fine bulle* (dôme poreux) (2.75 m)	*2 433*	*2.30*
Achères III	*900*	*Forte*	*Fine bulle* (dôme poreux) (4 m)	*5 680*	*2.00*
Achères IV	*600*	*Forte*	*Fine bulle* (dôme poreux)(4m)	*2 787*	*2.30*

Tableau II. Station 'Seine Aval' du SIAAP : performances et rendements épuratoires de la station pour l'année 2001.

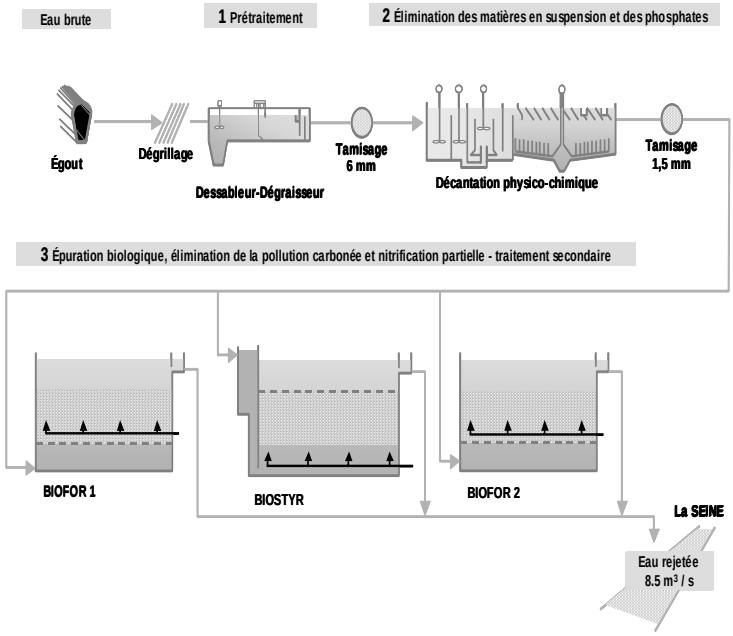
Paramètres (mg L^{-1})	Eau Brute (2 003 *)	Eau décantée (2 088 *)	Eau épurée (1 822 *)	Eau déphosphatée (9 044 *)	Eau rejetée (2 088 *)	Rendement sur eau brute (%)
MES	210	84	24	11	22	90
DBO_5	173	116	17	11	18	90
DCO	336	239	86	71	85	77
NTK	35				28.9	17
NGL	41.6				31.5	24
Ptotal	6.2			1.1	3.5	44

* débit d'eau en 10^3 $m^3.j^{-1}$

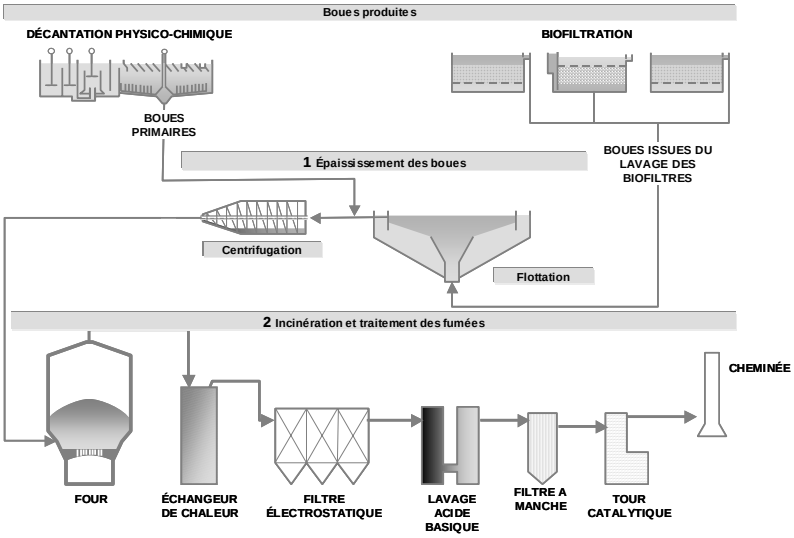
Annexe 2. La station 'Seine Centre'



(a) Traitements des eaux par temps sec



(b) Traitements des eaux par temps de pluie



(c) Traitements des boues

Figure II. Station 'Seine Centre' du SIAAP : traitements des eaux,(a) en temps sec, (b) en temps de pluies et (c) traitements des boues.

Tableau III. Station Seine Centre' du SIAAP : les différentes configurations possibles de la station.

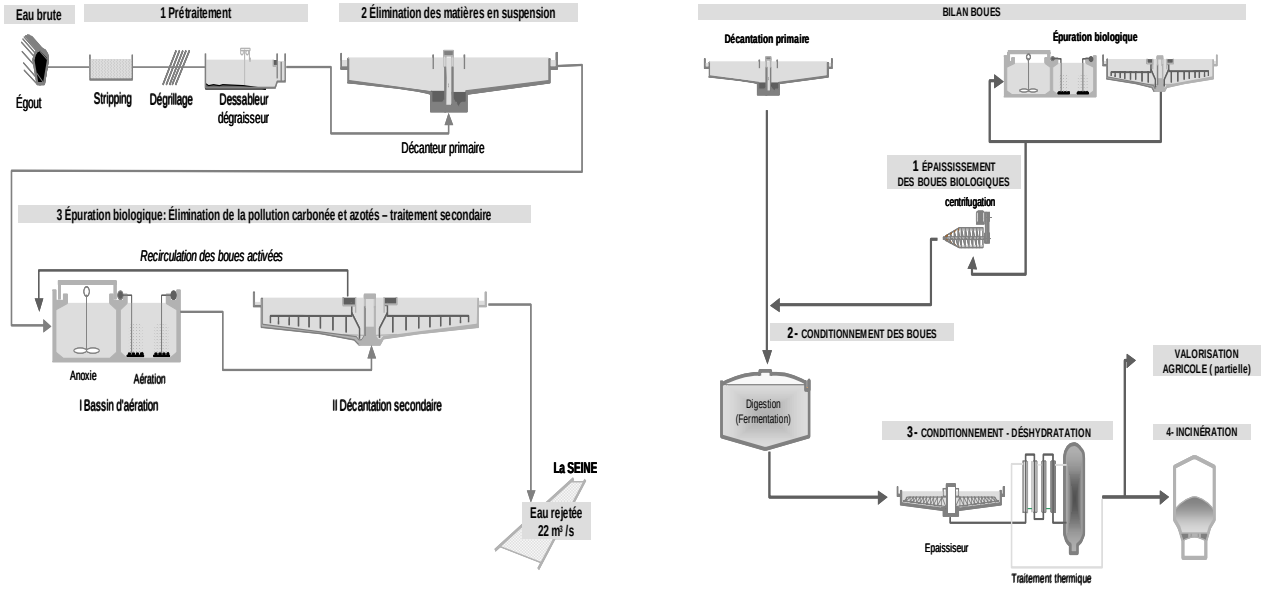
Code	Période	Débits (m^3/s) et durée (h)	Débit ($m^3.j^{-1}$)	Principe de fonctionnement du biologique
TS.NGL2	Temps sec	2.8 pdt 24 h	240 000	3 étages en série : 1er (carbone), 2ème (nitrification), 3ème (dénitrification)
TS.NTK	Temps sec	2.8 pdt 24 h	240 000	1er et 3ème étage en parallèle (carbone) et 2ème étage en série (azote)
TS.DNA	Temps sec	2.8 pdt 24 h	240 000	3 étages en série : 1er carbone + dénitrification, 2ème nitrification, 3ème finition
TS.12NTK	Temps sec	Traitement évolutif, passage en temps pluie	évolutif	3 étage en parallèle : 1er, 2ème et 3ème : carbone + azote
TS.8.5NTK	Temps sec	8.5 pdt 8 h puis 2.8 pdt. 16 h	404 800	1er et 3ème étage en parallèle (carbone) 2ème en série après 1er étage (azote)
TP.12NTK	Temps pluie	12 pdt 8 h puis 2.8 pdt. 16 h	505 600	3 étage en parallèle : 1er, 2ème et 3ème : carbone + azote
TP.12e	Temps pluie	12 pdt 24h	1 036 800	3 étage en parallèle 1er, 2ème et 3ème : carbone

Tableau IV. Station Seine Centre' du SIAAP : performances et rendements épuratoires de la station pour l'année 2000.

Paramètres ($mg.L^{-1}$)	Eau Brute (282 700*)	Eau décantée (282 700*)	Eau épurée I (281 100*)	Eau épurée II (271 800*)	Eau épurée III (191 600*)	Rendement sur eau brute (%)
MES	208	26	7	5	6	97
DBO_5	144	56	8	4	10	92
DCO	346	118	33	23	34	89
NTK	31	25.7	15.2	1.6	7	84
$N\text{-}NO_3$				19.1	6.1	
NGL	33.2	27.3	21.1	20.8	13.4	51
Ptotal	5.4	0.4	0.4	0.4	0.4	90

* débit d'eau en $m^3.j^{-1}$

Annexe 3. La station 'Seine Amont'



(a) Traitements des eaux (b) Traitements des boues

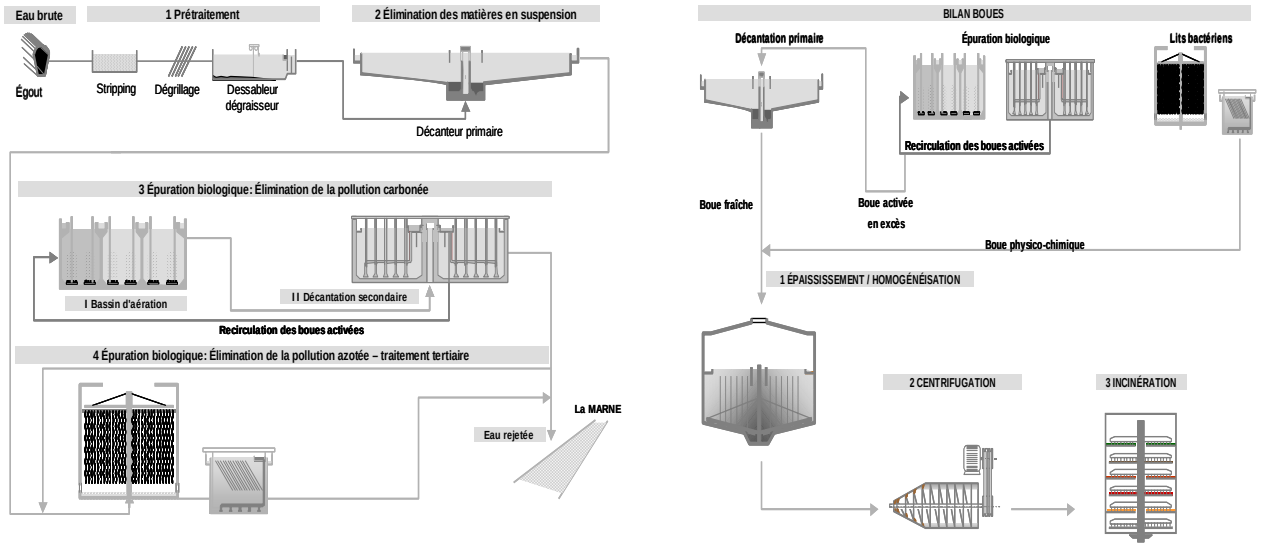
Figure III. Station 'Seine Amont' du SIAAP : (a) traitements des eaux et (b) traitements des boues. (Le traitement biologique des eaux est ici celui de Valenton I).

Tableau V. Station 'Seine Amont' du SIAAP : performances et rendements épuratoires de Valenton I pour l'année 2001.

Paramètres (mg L^{-1})	Eau Brute (347 700*)	Eau décantée (347 700 *)	Eau épurée et rejetée (347 700 *)	Rendement sur eau brute (%)
MES	219	76	22	90
DBO_5	187	96	9	95
DCO	405	228	47	88
NTK	43	41.9	2.8	93
$N\text{-}NO_3$			21	
NGL			23.7	
Ptotal	6.8		4.6	32.3

* débit d'eau en $m^3.j^{-1}$

Annexe 4. La station 'Marne Aval'



(a) Traitements des eaux (b) Traitements des boues

Figure IV. Station 'Marne Aval' du SIAAP : (a) traitements des eaux et (b) traitements des boues.

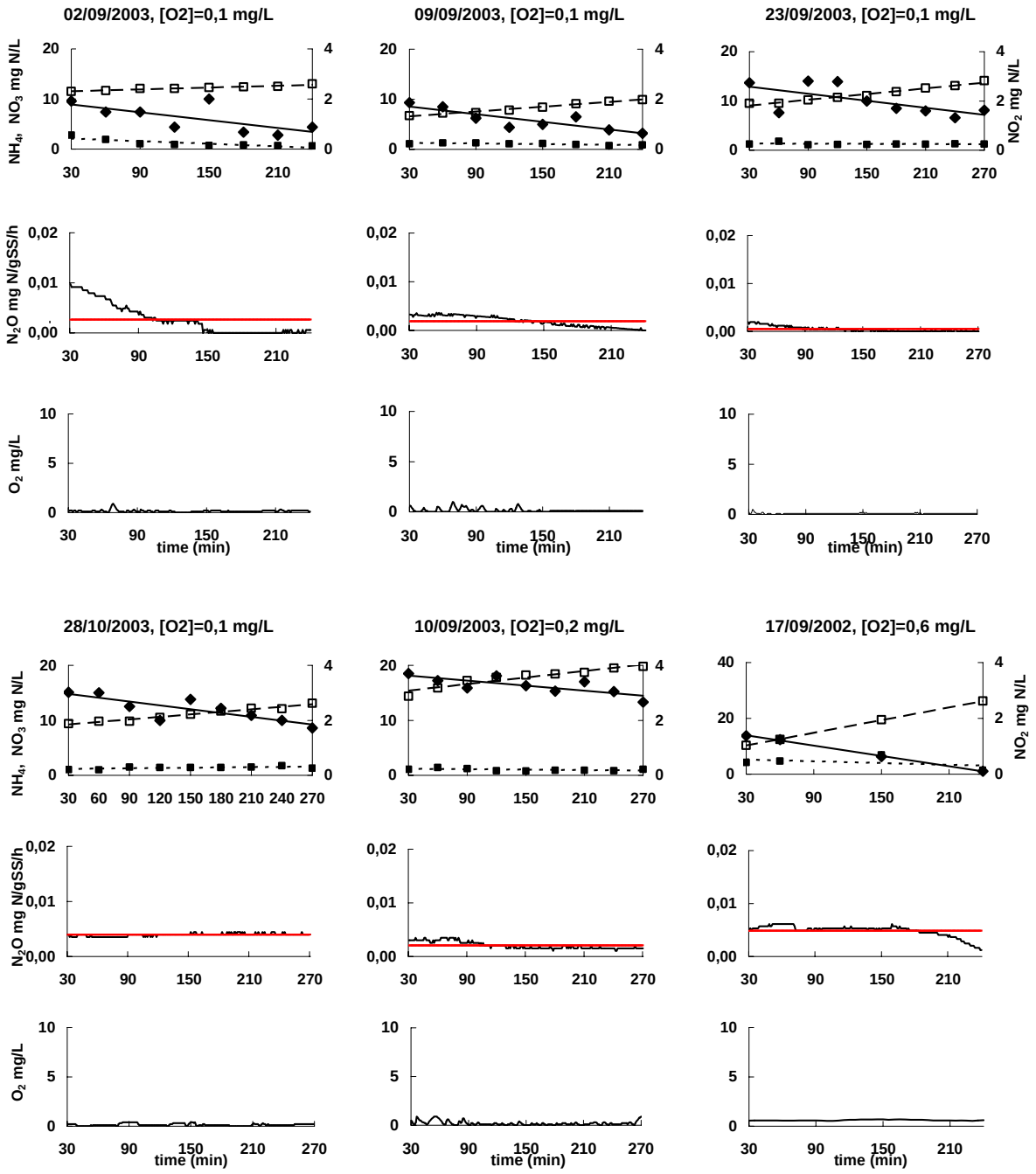
Tableau VI. Station 'Marne Aval' du SIAAP : performances et rendements épuratoires de la station pour l'année 2001.

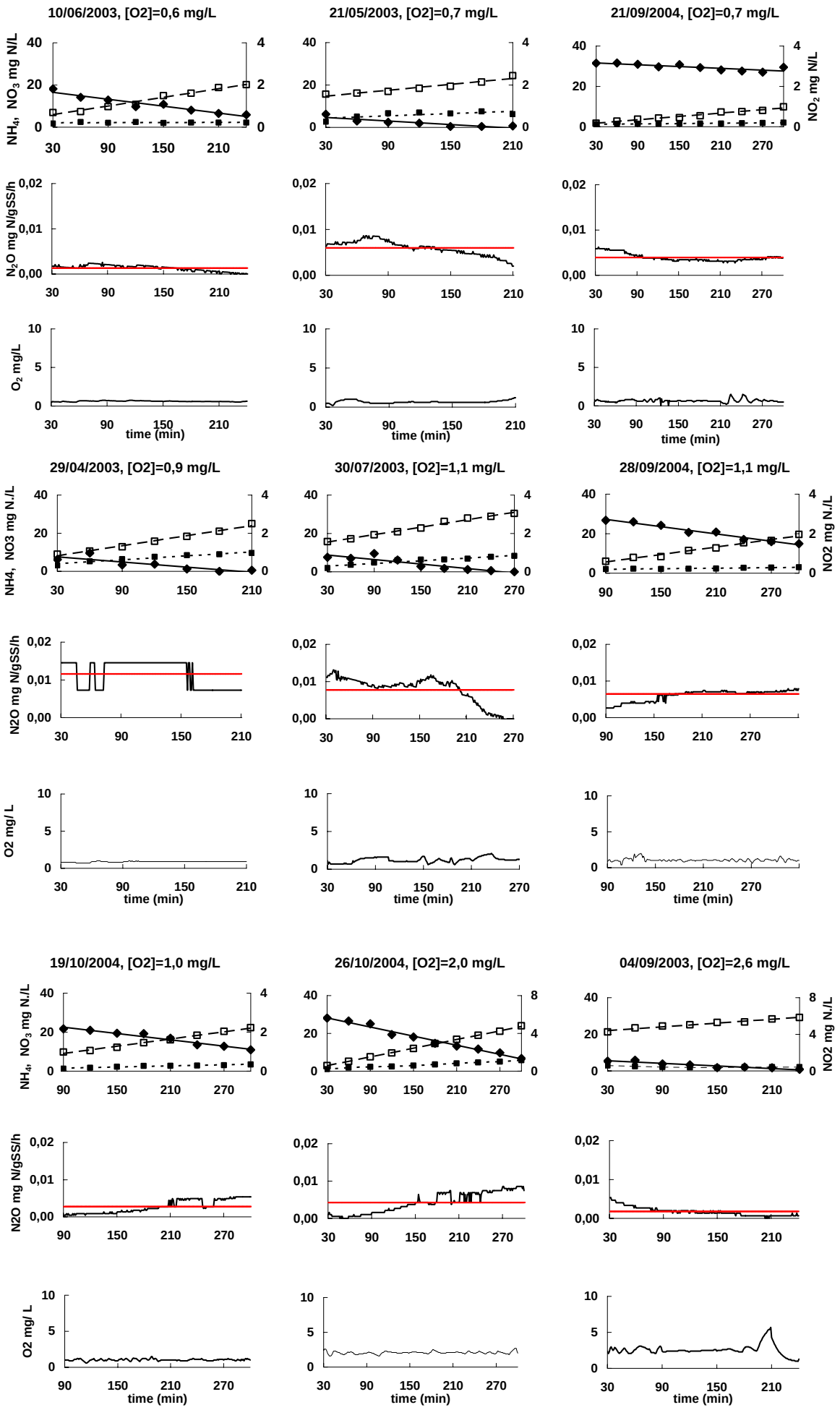
Paramètres (mg L^{-1})	Eau Brute (43 400*)	Eau décantée (39 800 *)	Eau épurée (20 000 *)	Eau nitrifiée (39 500*)	Eau rejetée	Rendement sur eau brute (%)
MES	310	144	25		36	88
DBO_5	203	129	17		19	90
DCO	545	314	89		95	85
NTK	54	49.9	31	14.9	16	70
$N\text{-}NO_3$			3.5	22.7	22.7	
Ptotal	8.7	5			5	40

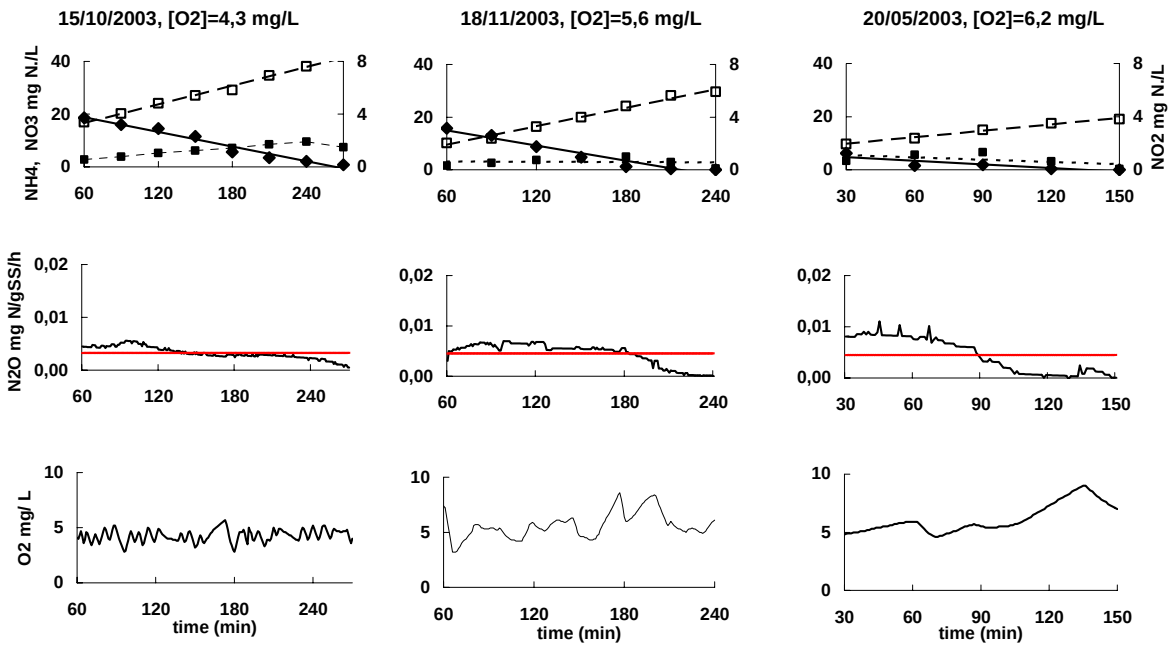
* débit d'eau en $m^3.j^{-1}$

Annexe 5. Résultats des expériences de nitrification sur boues activées et des émissions de N_2O dans un gradient d'oxygène (0.1 à 6.2 $mgO_2\ L^{-1}$)

Variables mesurées en fonction du temps. Du haut en bas : Date de l'expérience et concentration moyenne appliquée en oxygène (O_2) ; éléments azotés (NH_4 ♦, NO_3 □ et NO_2 ■) ; flux de N_2O et flux moyen (– –); oxygène (O_2).

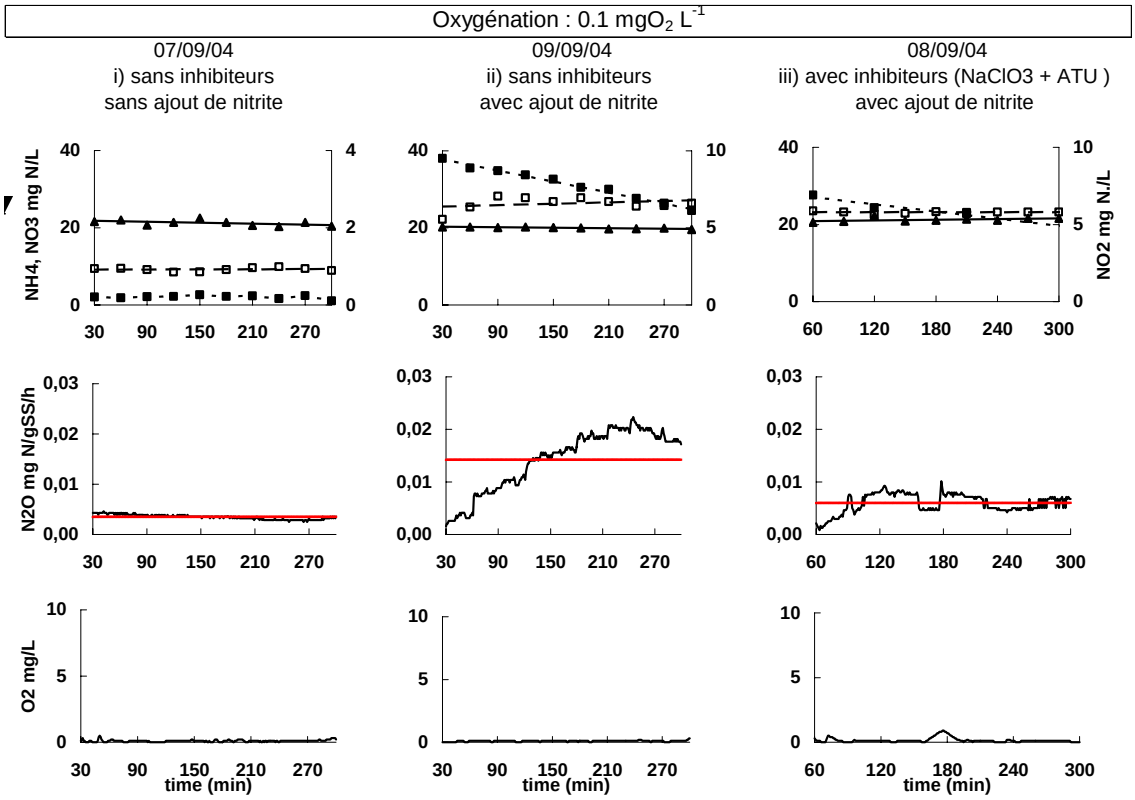


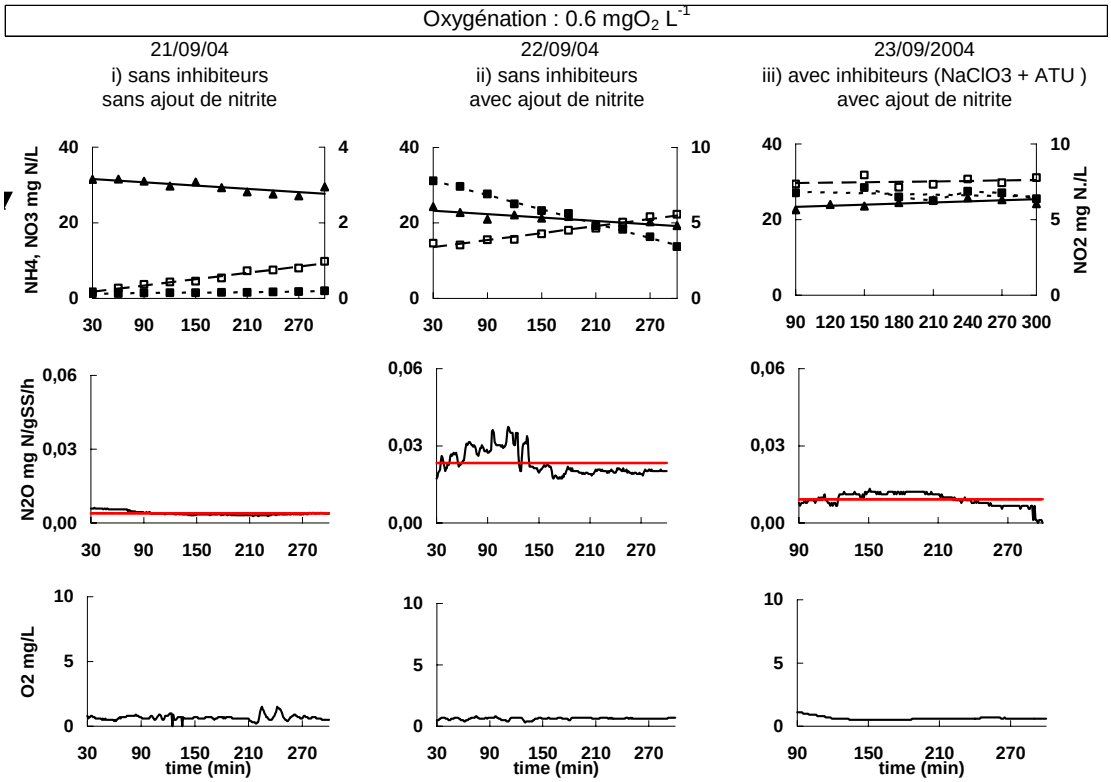

10/06/2003, [O2]=0,6 mg/L
21/05/2003, [O2]=0,7 mg/L
21/09/2004, [O2]=0,7 mg/L
NH4, NO3 mg N/L
NO2 mg N/L
N2O mg N/gSS/h
O2 mg/L
time (min)
29/04/2003, [O2]=0,9 mg/L
30/07/2003, [O2]=1,1 mg/L
28/09/2004, [O2]=1,1 mg/L
NH4, NO3 mg N./L
NO2 mg N./L
N2O mg N/gSS/h
O2 mg/ L
time (min)
19/10/2004, [O2]=1,0 mg/L
26/10/2004, [O2]=2,0 mg/L
04/09/2003, [O2]=2,6 mg/L
NH4, NO3 mg N./L
NO2 mg N./L
N2O mg N/gSS/h
O2 mg/ L
time (min)


15/10/2003, [O2]=4,3 mg/L
18/11/2003, [O2]=5,6 mg/L
20/05/2003, [O2]=6,2 mg/L
NH4, NO3 mg N./L
NO2 mg N./L
N2O mg N/gSS/h
O2 mg/ L
time (min)
time (min)
time (min)

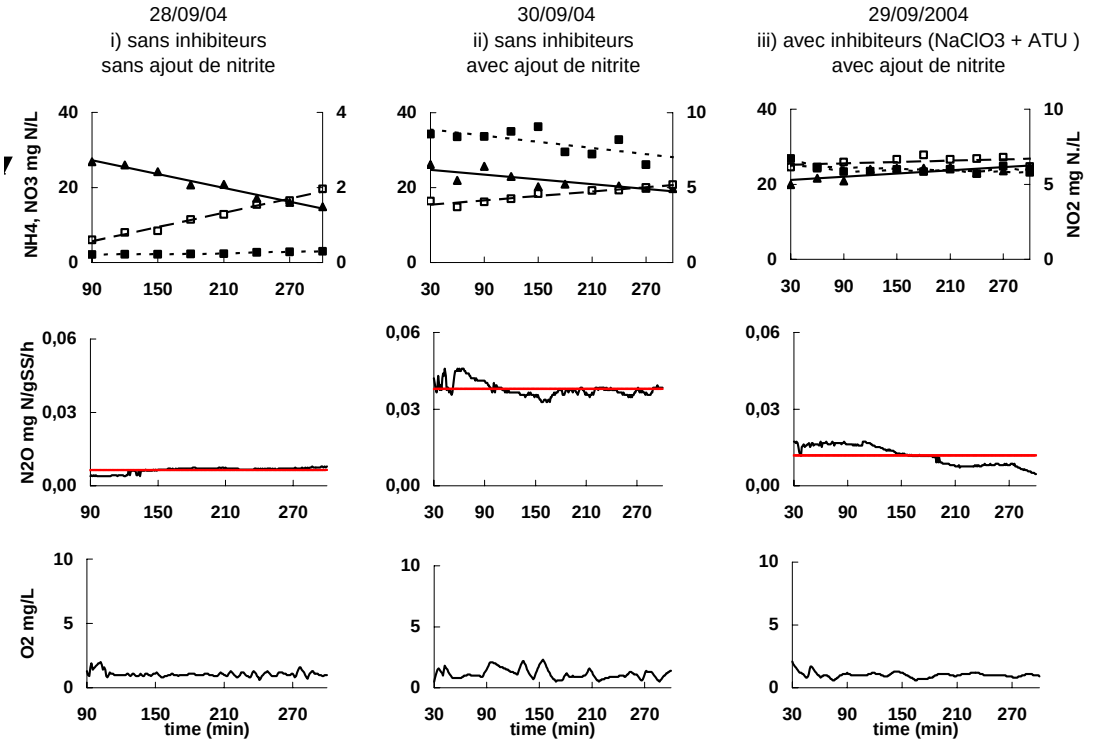
Annexe 6. Résultats des expériences de nitrification sur boues activées et des émissions de N_2O en micro-aérobie (0.1 à 2.0 $mgO_2\ L^{-1}$) avec ajout de nitrite et d'inhibiteurs de la nitrification (ATU + Chlorate)

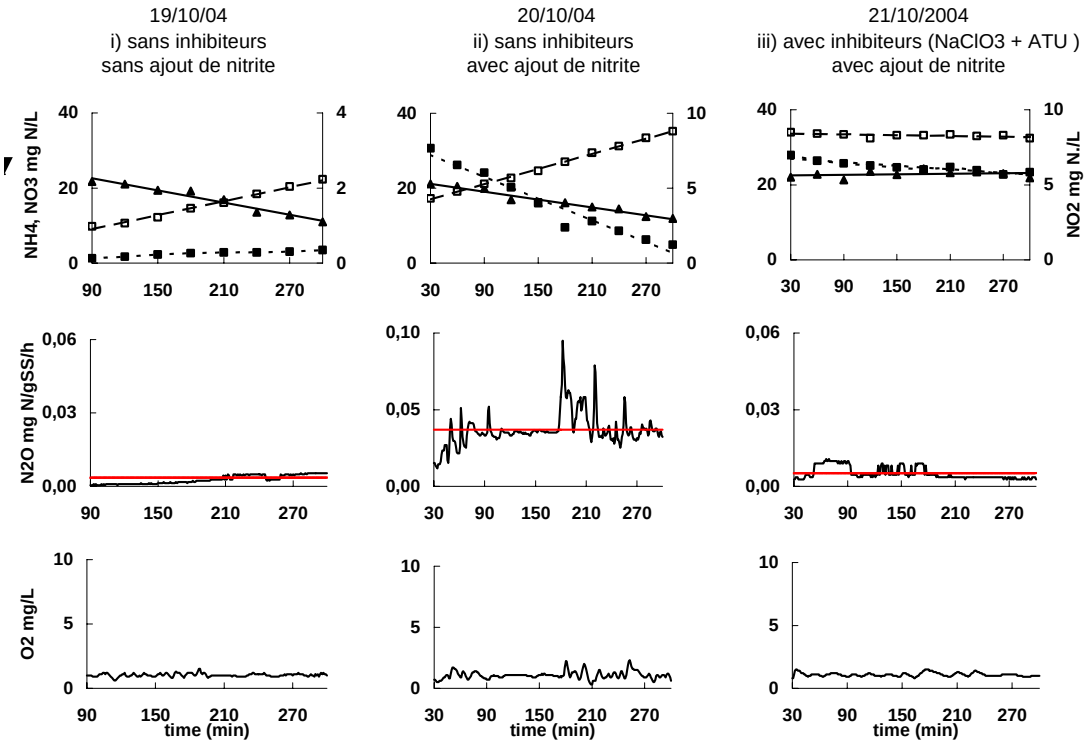
Variables mesurées en fonction du temps. Du haut en bas : Valeur de l'oxygénation moyenne appliquée ; date de l'expérience et type d'essai effectué; éléments azotés (NH_4 ♦, NO_3 □ et NO_2 ■) ; flux de N_2O et flux moyen (– –); oxygène (O_2). De gauche à droite : essais i) sans inhibiteurs et sans ajout de nitrite; ii) sans inhibiteurs et avec ajout de nitrite (conc. finale NO_2 : 10 mg L^{-1}); iii) avec inhibiteurs (conc. finale ATU et cholrate : 5-10 mg L^{-1} et 1 g L^{-1} respectivement) et ajout de nitrite.

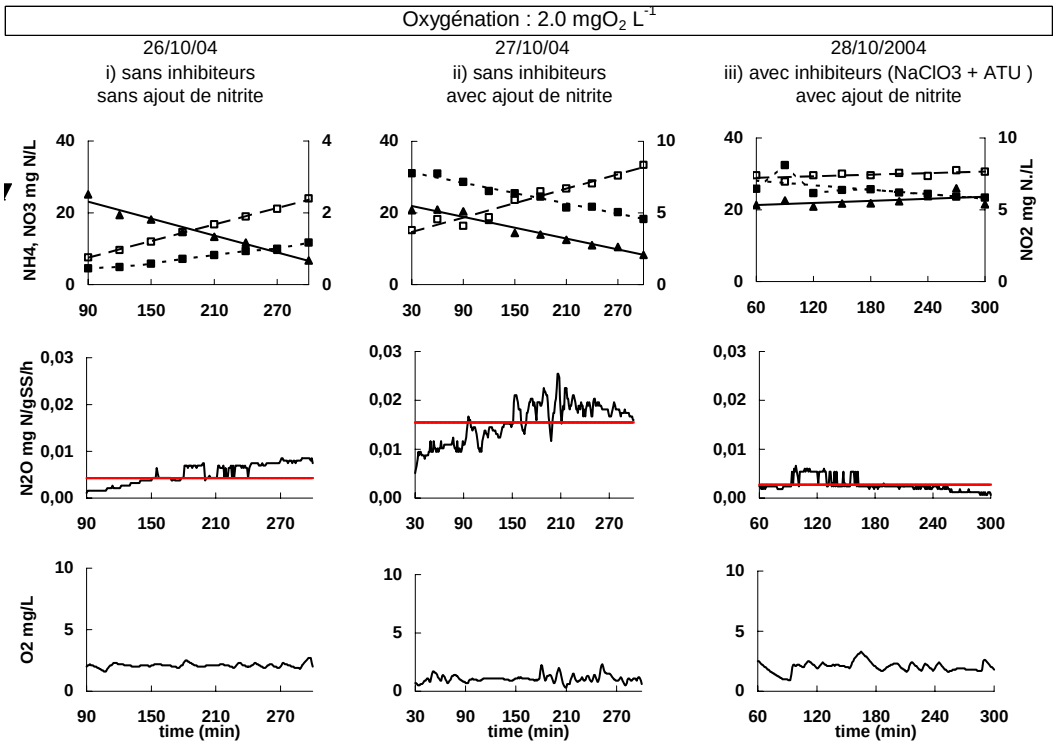



Oxygénation : 0.6 mgO2 L-1
21/09/04
i) sans inhibiteurs
sans ajout de nitrite
22/09/04
ii) sans inhibiteurs
avec ajout de nitrite
23/09/2004
iii) avec inhibiteurs (NaClO3 + ATU)
avec ajout de nitrite
NH4, NO3 mg N/L
NO2 mg N./L
N2O mg N/gSS/h
O2 mg/L
time (min)

Oxygénation : 1.0 $mgO_2\ L^{-1}$



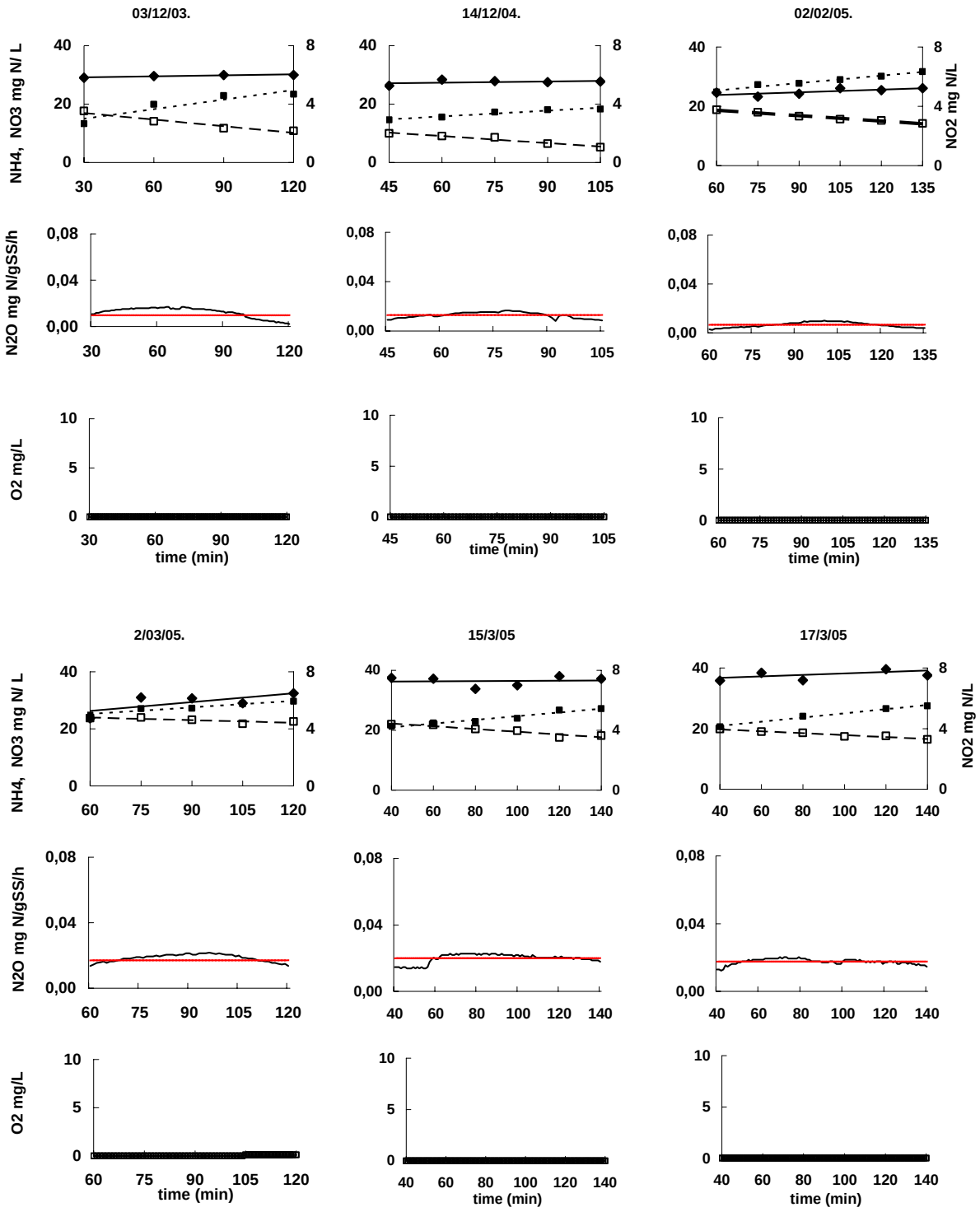



Oxygénation : 2.0 mgO2 L-1
26/10/04
i) sans inhibiteurs
sans ajout de nitrite
27/10/04
ii) sans inhibiteurs
avec ajout de nitrite
28/10/2004
iii) avec inhibiteurs (NaClO3 + ATU)
avec ajout de nitrite
NH4, NO3 mg N/L
NO2 mg N./L
N2O mg N/gSS/h
O2 mg/L
time (min)

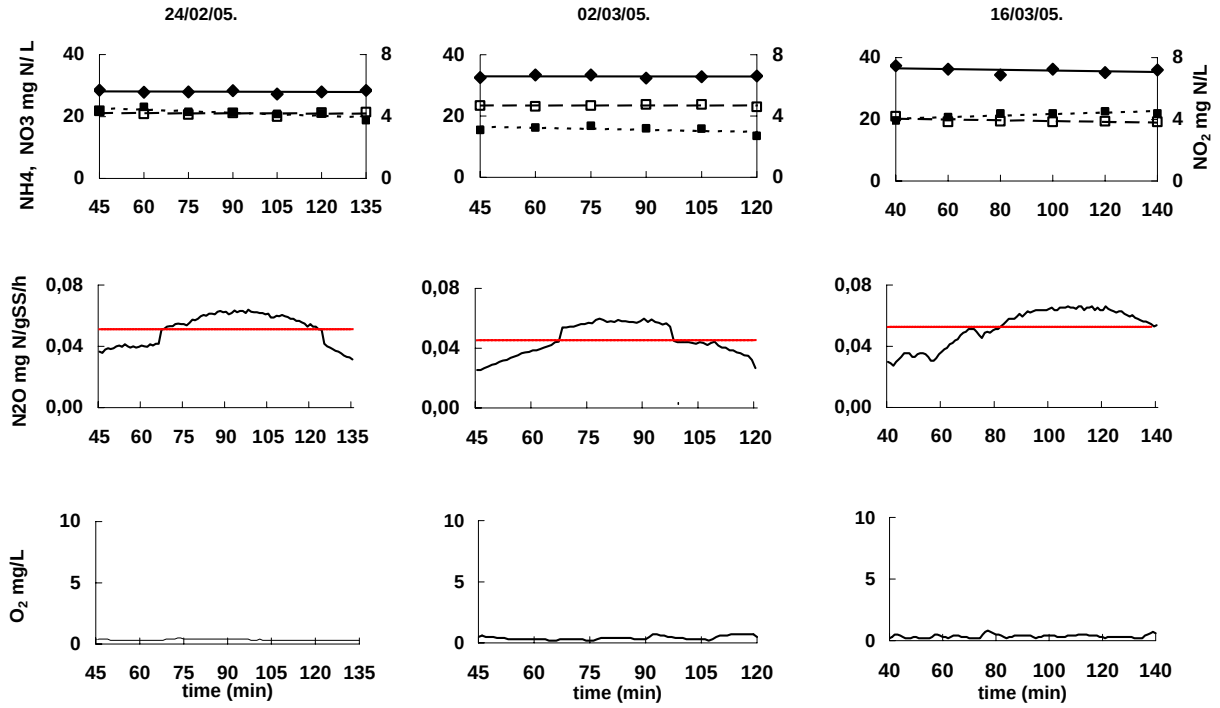
Annexe 7. Résultats des expériences de dénitrification sur boues activées et des émissions de N_2O en anoxie et micro-aérobie (0.0 à 1.1 $mgO_2\ L^{-1}$)

Variables mesurées en fonction du temps. Du haut en bas : Valeur moyenne de l'oxygénation appliquée ; date de l'expérience; éléments azotés (NH_4 ♦, NO_3 □ et NO_2 ■) ; flux de N_2O et flux moyen (– –); oxygène (O_2).

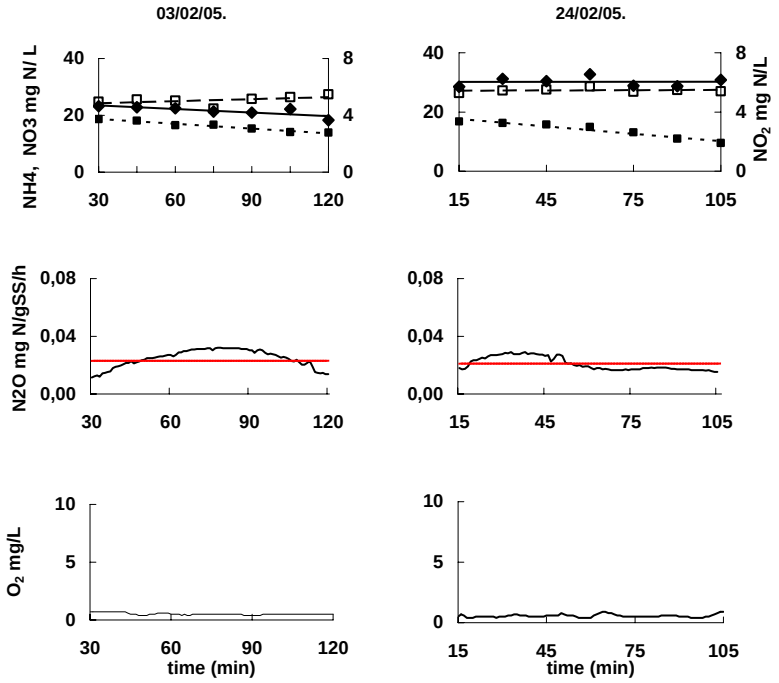
Oxygénation : 0.0 $mgO_2\ L^{-1}$



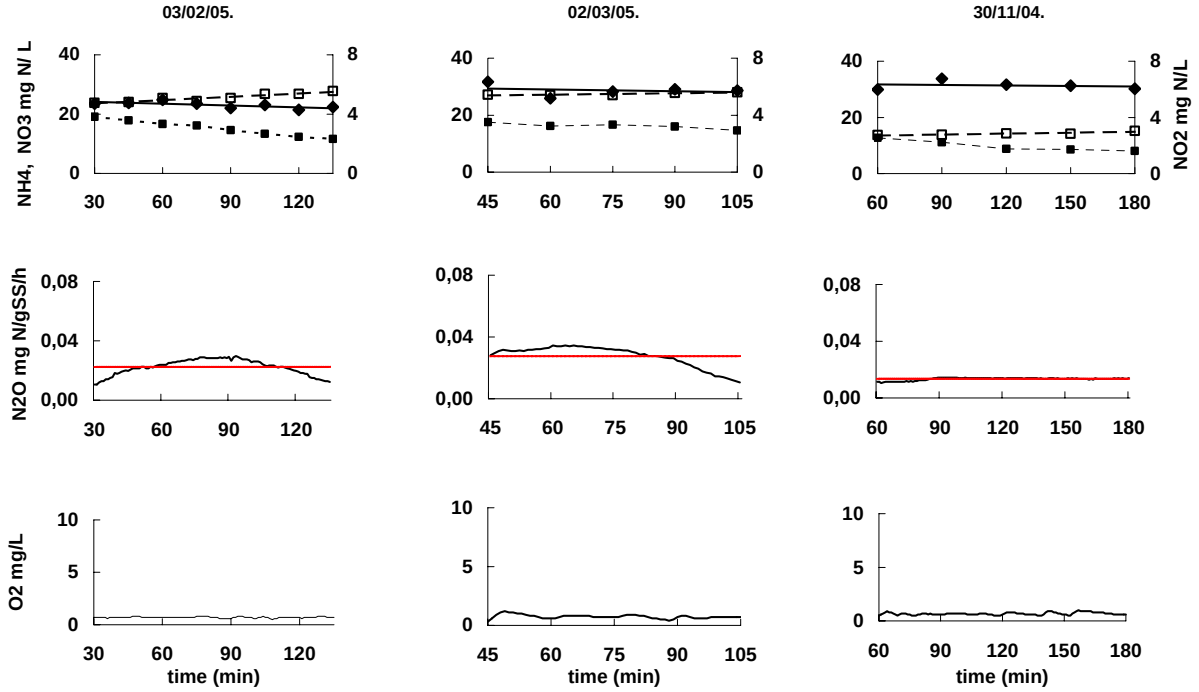
Oxygénation : 0.3 $mgO_2\ L^{-1}$



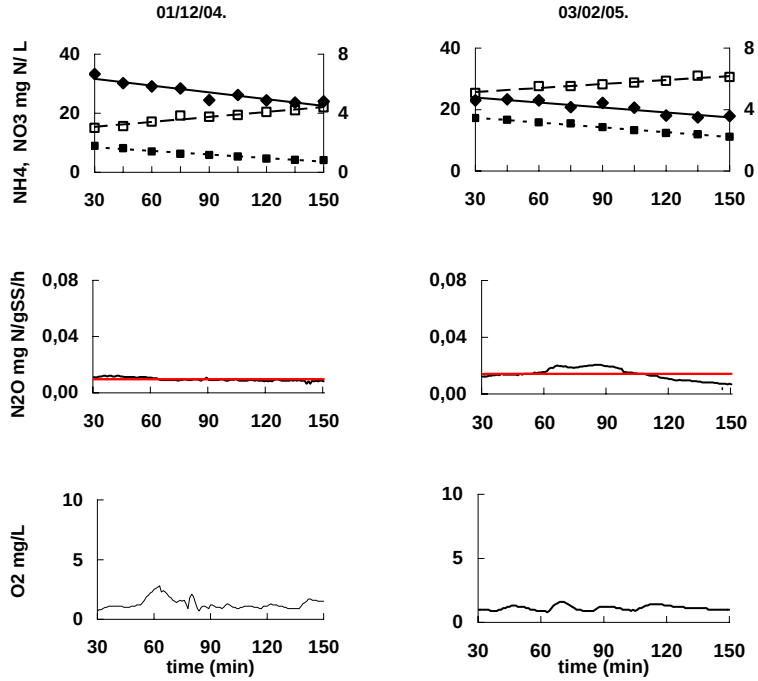
Oxygénation : 0.5 $mgO_2\ L^{-1}$



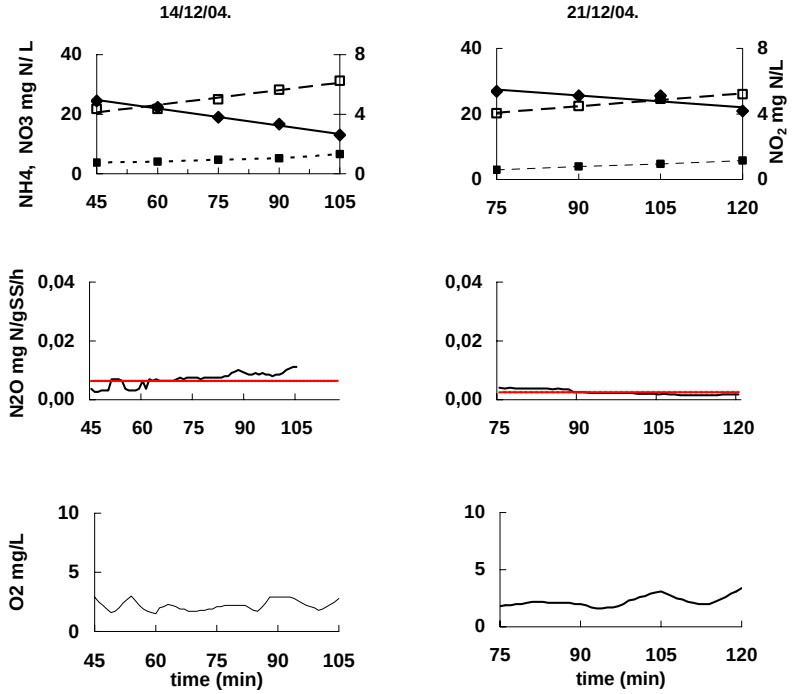
Oxygénation : 0.7 $mgO_2\ L^{-1}$



Oxygénation : 1.1 $mgO_2\ L^{-1}$

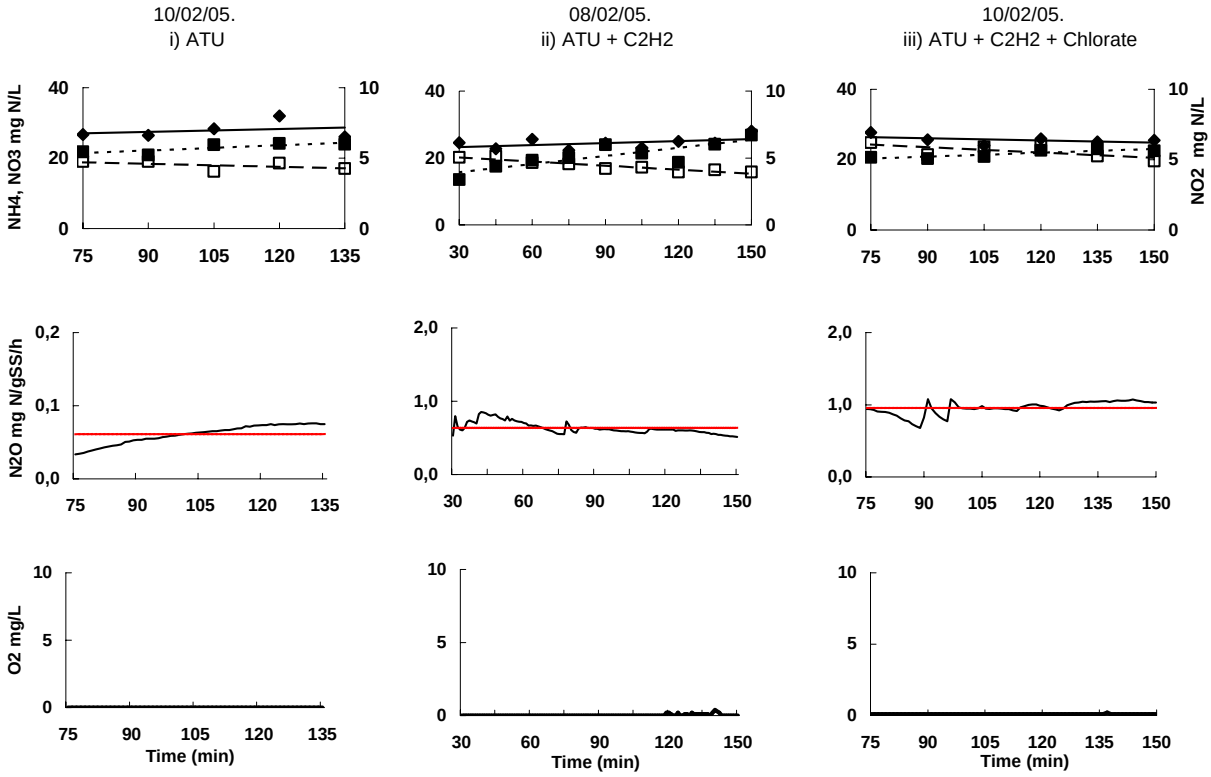


Oxygénation : 2.2 $mgO_2\ L^{-1}$

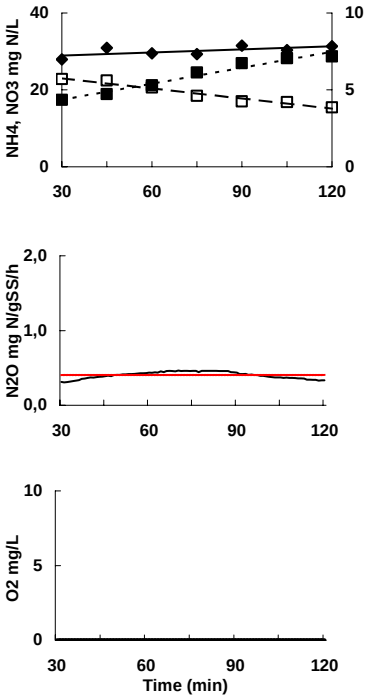


Annexe 8. Résultats des expériences de dénitrification sur boues activées et des émissions de N_2O en anoxie (0.0 mgO_2 L^{-1}) avec ajout d'inhibiteurs de la nitrification-dénitrifiante (ATU), de la nitrate ammonification (Chlorate) et de la réductase de l'oxyde nitreux (Acétylène)

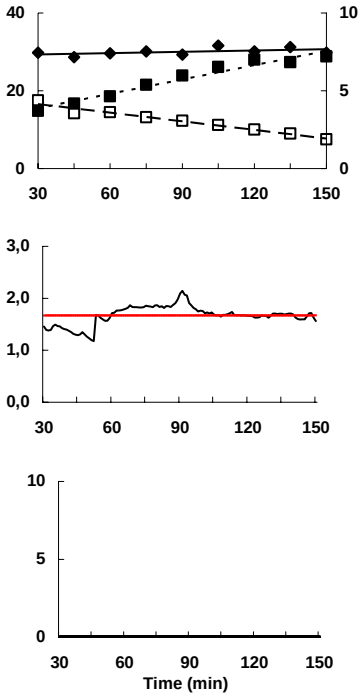
Variables mesurées en fonction du temps. Du haut en bas : date de l'expérience et type d'essai effectué; éléments azotés (NH_4 ♦, NO_3 □ et NO_2 ■) ; flux de N_2O et flux moyen (– –); oxygène (O_2). De gauche à droite : essais i) avec inhibiteur de la nitrification (ATU, conc. finale: 10 mg L^{-1}); ii) avec inhibiteurs de la nitrification et de la réductase de l'oxyde nitreux (C_2H_2 : 10 % v/v du débit d'air); iii) avec inhibiteurs de la nitrification, de la réductase de l'oxyde nitreux et de la nitrate ammonification (Chlorate, conc. finale: 0.1 g L^{-1}).



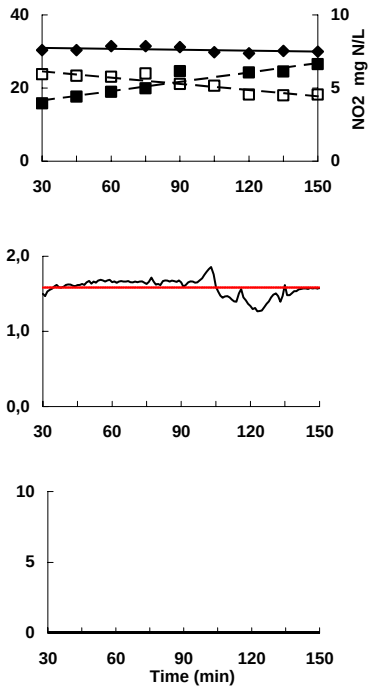
23/02/05.
i) ATU



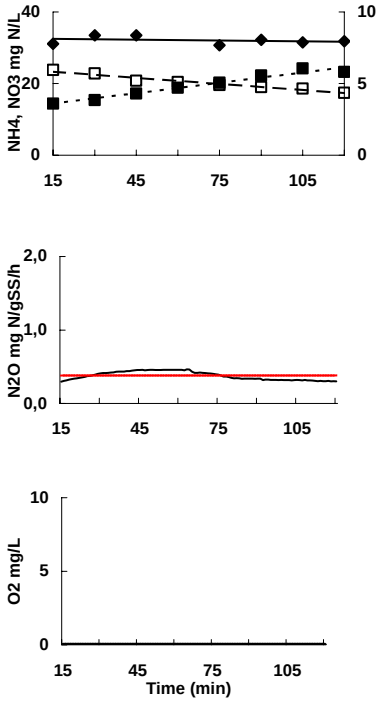
23/02/05.
ii) ATU + C2H2



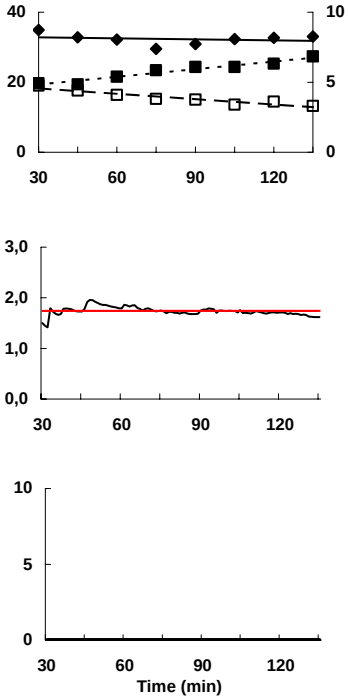
23/02/05.
iii) ATU + C2H2 + Chlorate



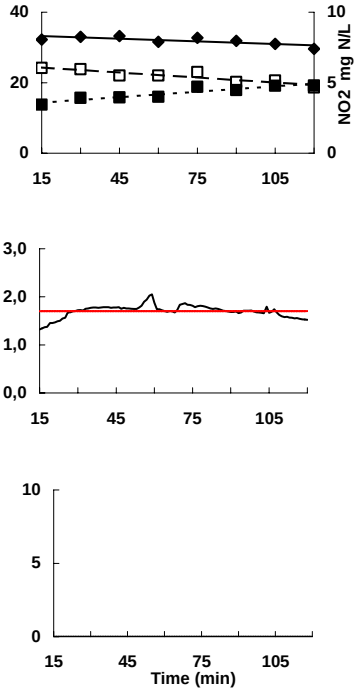
01/03/05.
i) ATU



01/03/05.
ii) ATU + C2H2

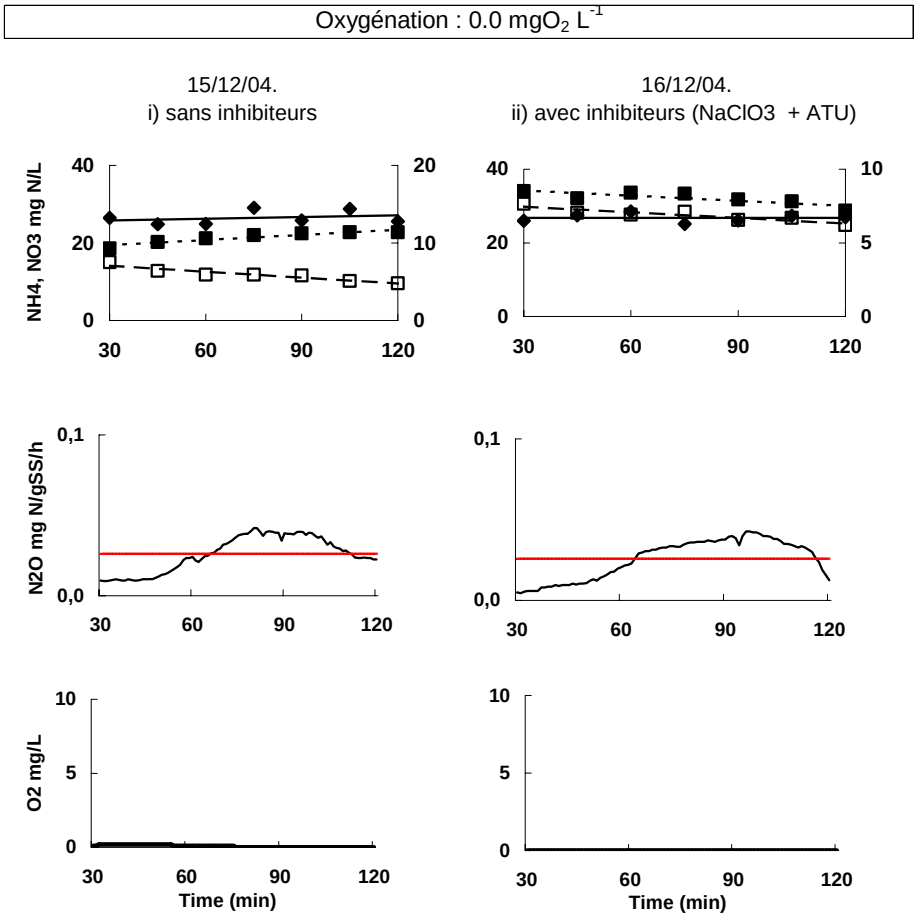


01/03/05.
iii) ATU + C2H2 + Chlorate



Annexe 9. Résultats des expériences de dénitrification sur boues activées et des émissions de N_2O en anoxie et micro-aérobie (0.0 à 1.1 $mgO_2\ L^{-1}$) avec ajout d'inhibiteurs de la nitrification-dénitrifiante (Chlorate + ATU)

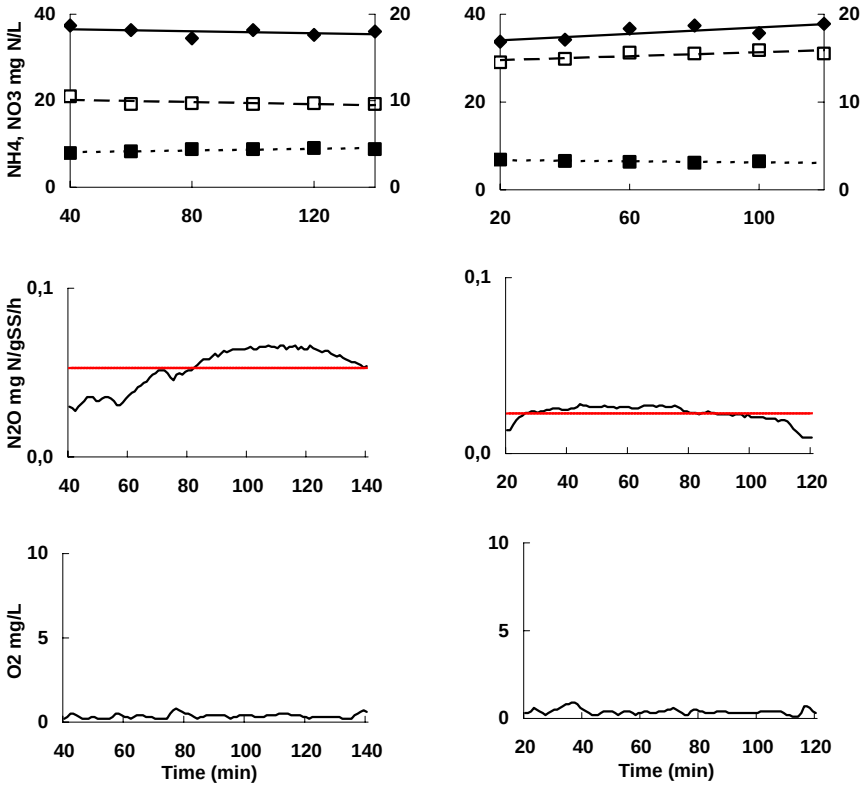
Variables mesurées en fonction du temps. Du haut en bas : Valeur moyenne de l'oxygénation appliquée ; date de l'expérience et type d'essai effectué; éléments azotés (NH_4 ♦, NO_3 □ et NO_2 ■) ; flux de N_2O et flux moyen (– –); oxygène (O_2). De gauche à droite : essais i) sans inhibiteurs; ii) avec inhibiteurs (conc. finale ATU et cholrate : 5-10 mg L^{-1} et 1 g L^{-1} respectivement).



Oxygénation : 0.4 $mgO_2\ L^{-1}$

16/03/05.
i) sans inhibiteurs

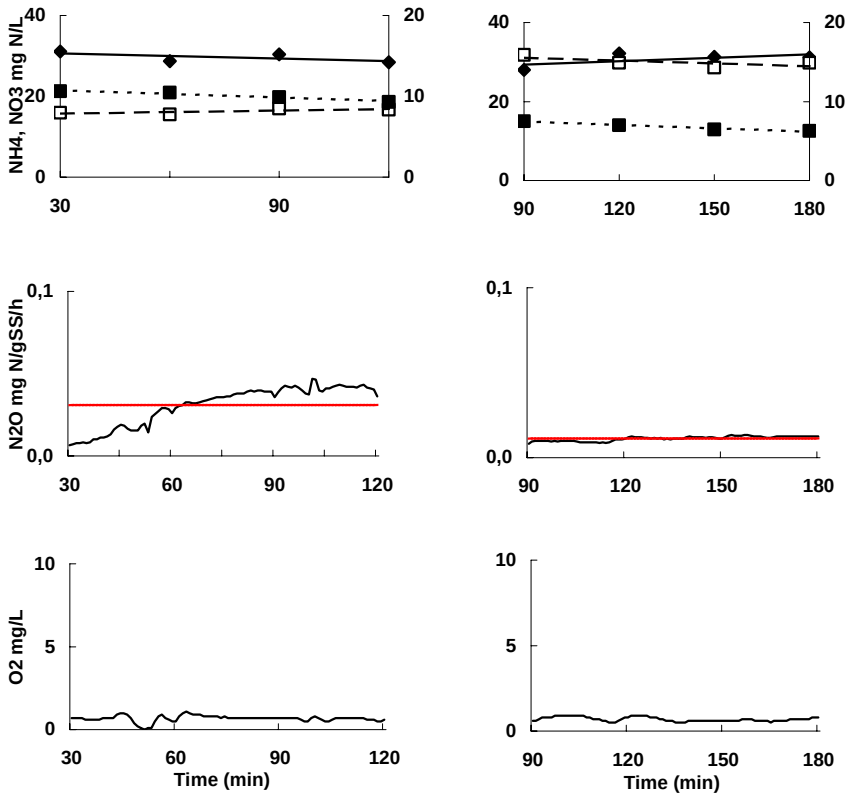
16/03/05.
ii) avec inhibiteurs (NaClO3 + ATU)



Oxygénation : 0.7 $mgO_2\ L^{-1}$

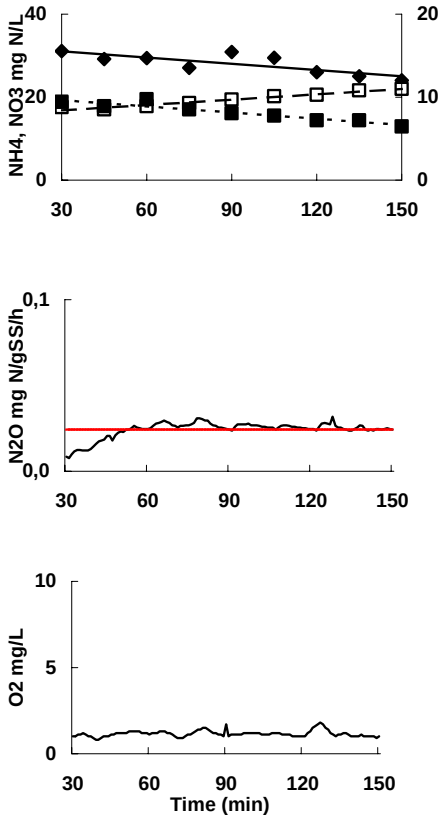
30/11/04.
i) sans inhibiteurs

01/12/04.
ii) avec inhibiteurs (NaClO3 + ATU)

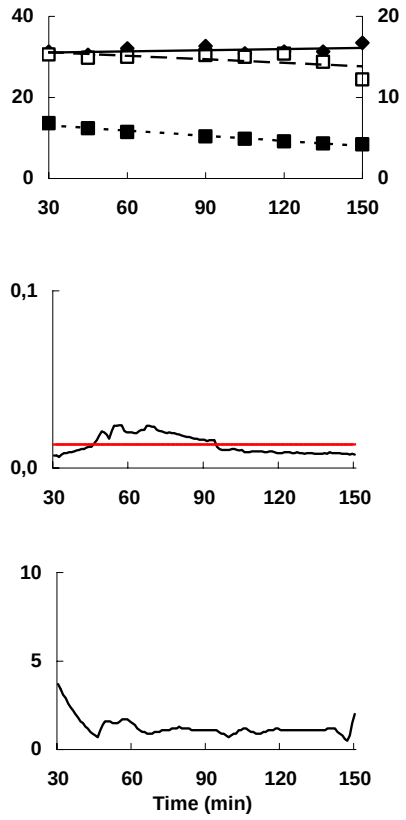


Oxygénation : 1.1 $mgO_2\ L^{-1}$

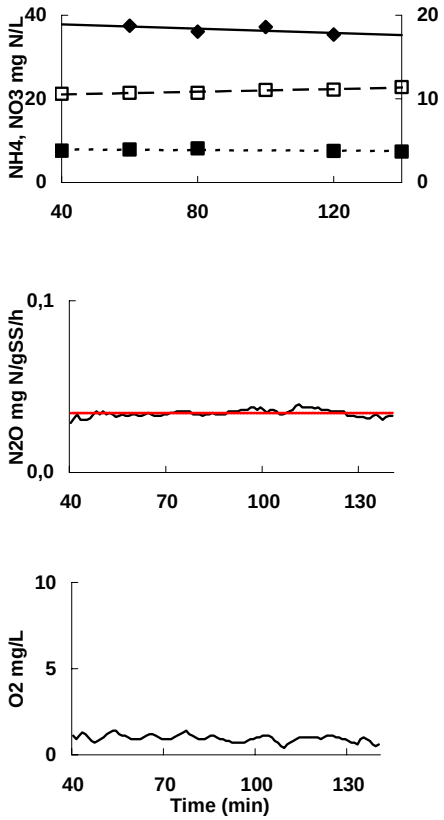
02/12/04.
i) sans inhibiteurs



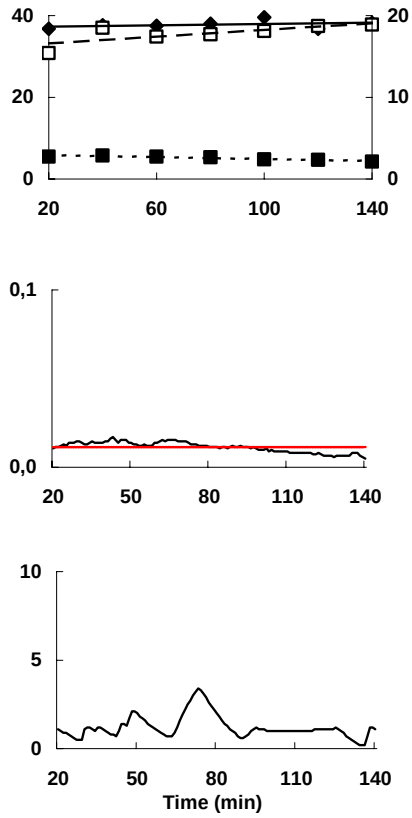
02/12/04.
ii) avec inhibiteurs (NaClO3 + ATU)



16/03/05.
i) sans inhibiteurs

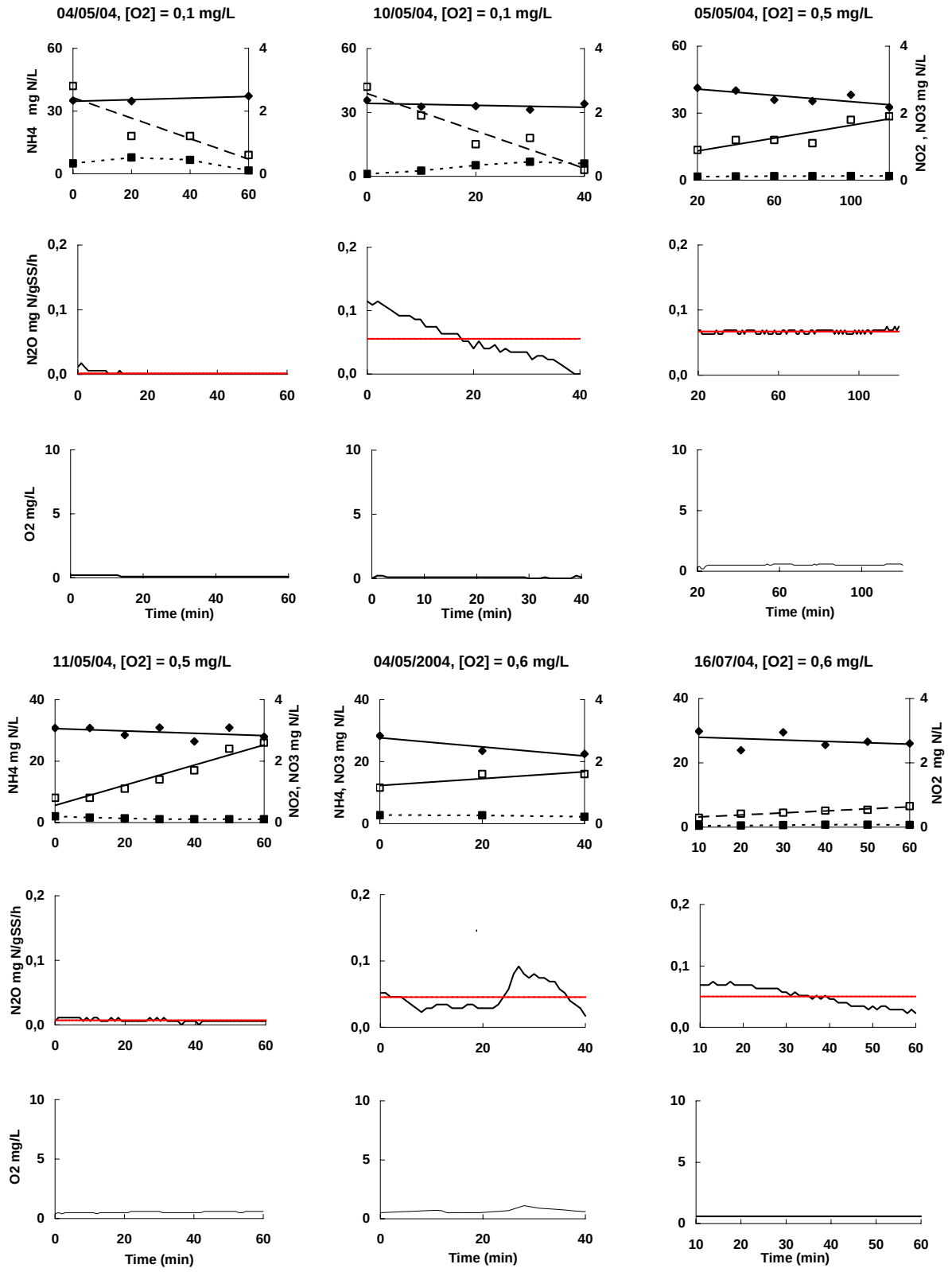


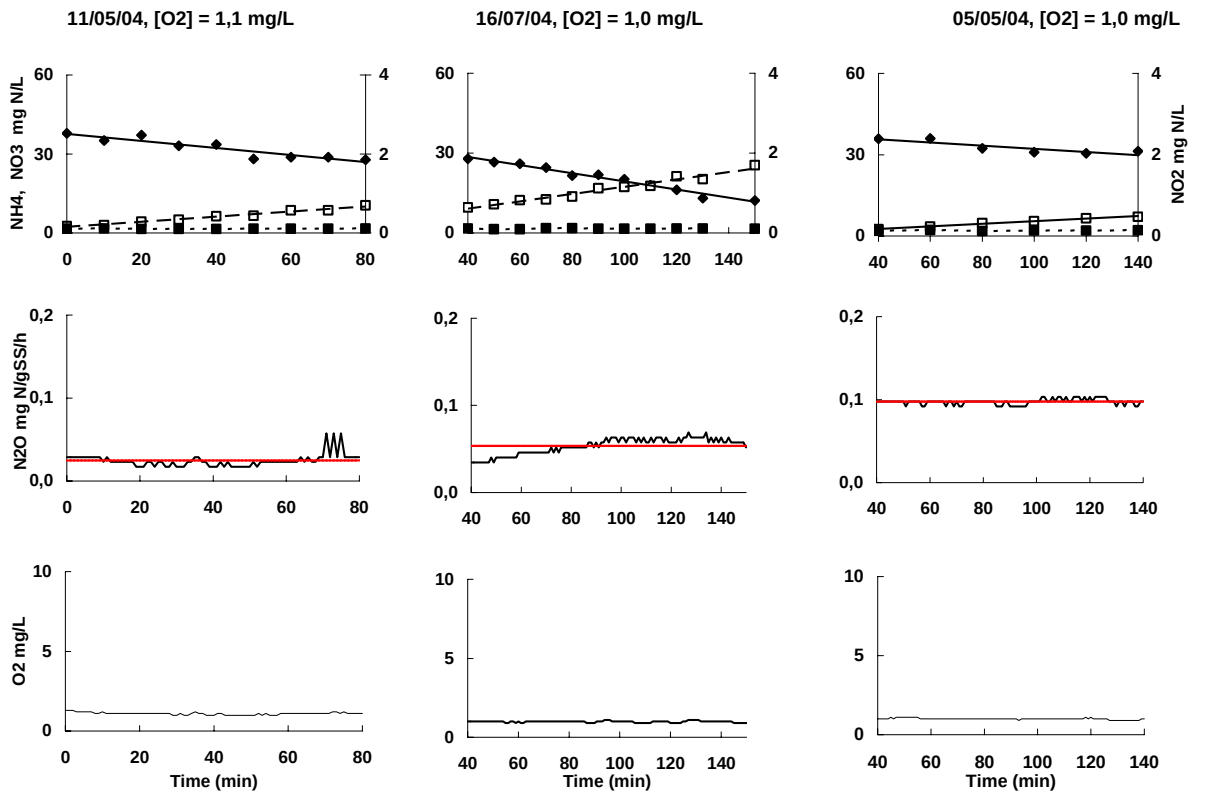
17/03/05.
ii) avec inhibiteurs (NaClO3 + ATU)

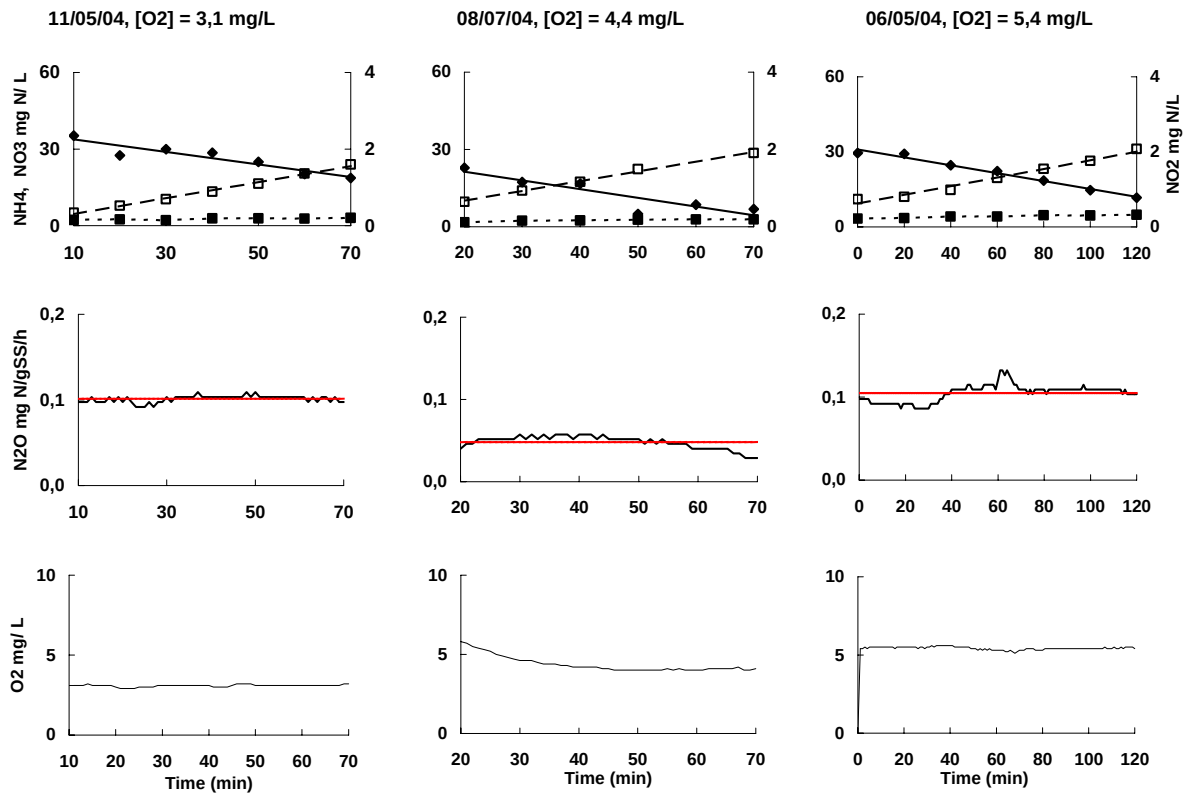


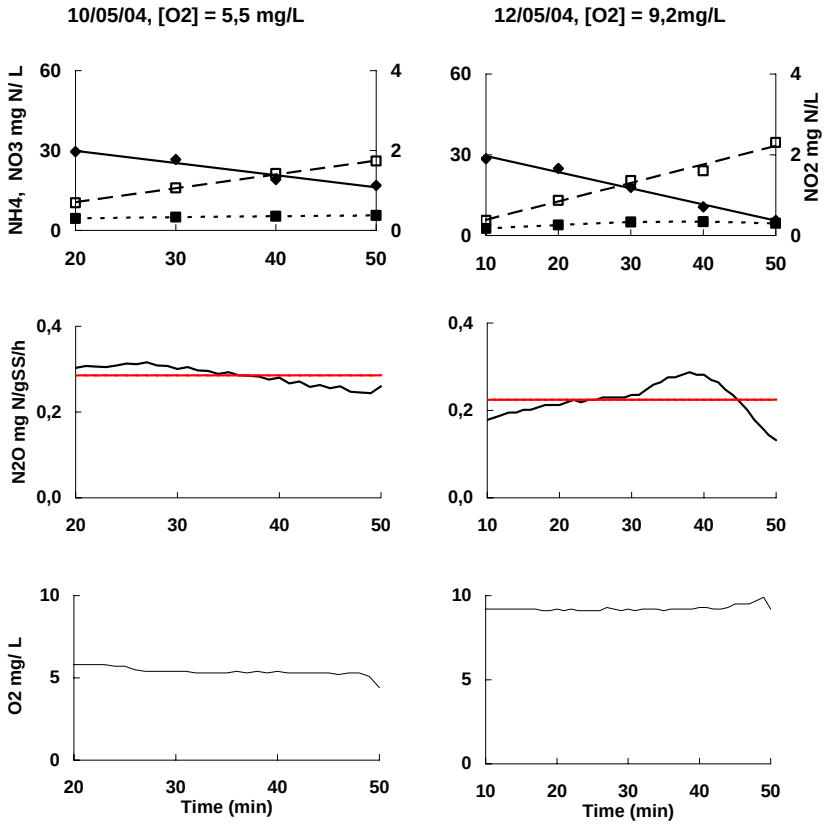
Annexe 10. Résultats des expériences de nitrification sur cultures fixées et des émissions de N_2O dans un gradient d'oxygène (0.1 à 9.2 $mgO_2\ L^{-1}$)

Variables mesurées en fonction du temps. Du haut en bas : Date de l'expérience et concentration moyenne appliquée en oxygène (O_2) ; éléments azotés (NH_4 ♦, NO_3 □ et NO_2 ■) ; flux de N_2O et flux moyen (– –); oxygène (O_2).



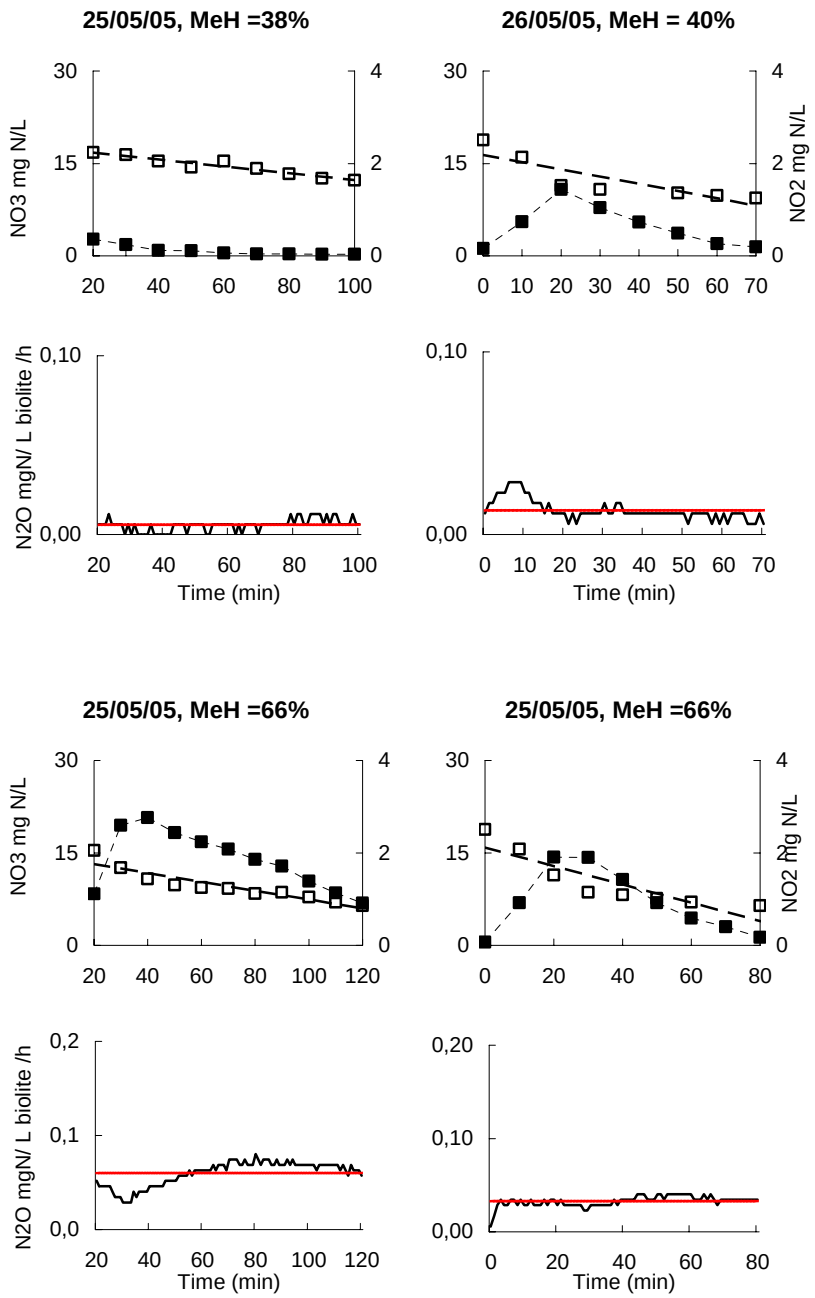

11/05/04, [O2] = 1,1 mg/L
16/07/04, [O2] = 1,0 mg/L
05/05/04, [O2] = 1,0 mg/L
NH4, NO3 mg N/L
NO2 mg N/L
N2O mg N/gSS/h
O2 mg/L
Time (min)


11/05/04, [O2] = 3,1 mg/L
08/07/04, [O2] = 4,4 mg/L
06/05/04, [O2] = 5,4 mg/L
NH4, NO3 mg N/ L
NO2 mg N/L
N2O mg N/gSS/h
O2 mg/ L
Time (min)


10/05/04, [O2] = 5,5 mg/L
12/05/04, [O2] = 9,2mg/L
NH4, NO3 mg N/ L
NO2 mg N/L
N2O mg N/gSS/h
O2 mg/ L
Time (min)
Time (min)

Annexe 11. Résultats des expériences de dénitrification sur cultures fixées et des émissions de N_2O en anoxie (0.0 mgO_2 L^{-1}) dans un gradient de Méthanol

Variables mesurées en fonction du temps. Du haut en bas : Date de l'expérience et MeH (= % N-NO_3 potentiellement réduit par rapport à la concentration en méthanol ajoutée); éléments azotés (NO_3 □ et NO_2 ■) ; flux de N_2O et flux moyen (– –).



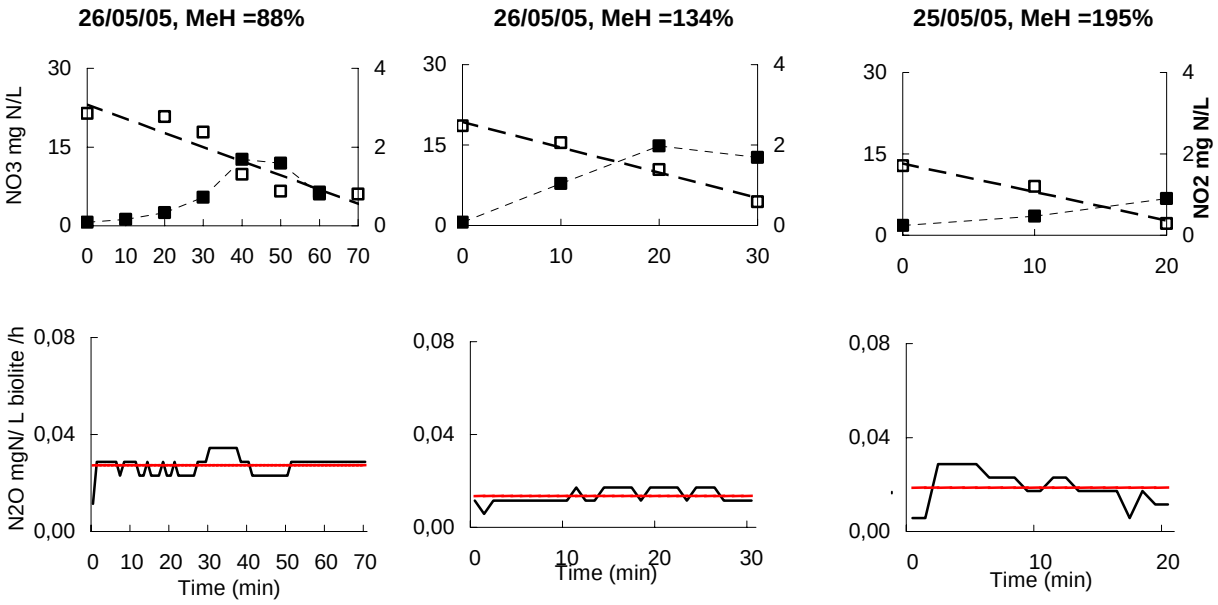

26/05/05, MeH =88%
26/05/05, MeH =134%
25/05/05, MeH =195%
NO3 mg N/L
NO2 mg N/L
N2O mgN/ L biolite /h
Time (min)
Time (min)
Time (min)

Table des matières

Introduction générale 7

Chapitre 1 - État des connaissances 11
1.1 Le N_2O, gaz à effet de serre 11
1.2 Cycle de l'azote 16
1.2.1 Fixation de l'azote 16
1.2.2 Ammonification (minéralisation de l'azote organique) 17
1.2.3 Nitrification 17
1.2.4 Réduction assimilatrice des nitrates 17
1.2.5 Réduction « dissimilative » des nitrates : dénitrification et nitrate ammonification 18
1.3 Perturbation du cycle de l'azote 21
1.4 Traitement de l'azote des eaux résiduaires urbaines 23
1.4.1 Les rejets d'azote urbain 23
1.4.2 Règles et échéances en matière d'assainissement 24
1.4.3 Procédés biologiques de traitement de l'azote des eaux résiduaires urbaines 25
1.4.3.1 Processus biologiques utilisés pour le traitement de l'azote 25
1.4.3.2 Le traitement biologique sur boues activées 26
1.4.3.3 Le traitement biologique sur cultures fixées et lagunage 31
1.5 Nitrification, dénitrification et émissions d'oxyde nitreux 33
1.5.1 Nitrification et bactéries nitrifiantes 33
1.5.1.1 Taxonomie et phylogénie des bactéries nitrifiantes 33
1.5.1.2 Métabolisme des bactéries nitrifiantes 34
1.5.1.2.1 Métabolisme énergétique 34
1.5.1.2.2 Assimilation du carbone 37
1.5.1.2.3 Croissance des bactéries nitrifiantes et cinétiques de nitrification 38
1.5.1.3 Ecologie des bactéries nitrifiantes 40
1.5.1.3.1 Facteurs influençant la croissance des bactéries nitrifiantes 40
1.5.1.3.2 Écologie des bactéries nitrifiantes en stations d'épuration 44
1.5.2 Dénitrification et bactéries dénitrifiantes 46
1.5.2.1 Taxonomie et phylogénie des bactéries dénitrifiantes 46
1.5.2.2 Métabolisme dénitrifiant 47
1.5.2.2.1 Métabolisme énergétique 47
1.5.2.2.2 Assimilation du carbone – métabolisme hétérotrophe 49
1.5.2.2.3 Croissance des bactéries dénitrifiantes et cinétiques de dénitrification 49
1.5.2.3 Ecologie des bactéries dénitrifiantes 50
1.5.2.3.1 Facteurs influençant la croissance des bactéries dénitrifiantes 50
1.5.2.3.2 Ecologie des bactéries dénitrifiantes en station d'épuration 52
1.5.3 Émissions d'oxyde nitreux 53
1.5.3.1 Processus de production de l'oxyde nitreux 53
1.5.3.1.1 Nitrification autotrophe et décomposition chimique 53
1.5.3.1.2 Nitrification hétérotrophe 53
1.5.3.1.3 Dénitrification hétérotrophe. 54
1.5.3.1.4 Nitrate ammonification 55
1.5.3.1.5 Dénitrification hétérotrophe et Nitrification autotrophe Simultanées (SND) 55
1.5.3.1.6 Nitrification-dénitrifiante autotrophe (processus OLAND) 56
1.5.3.2 Facteurs pouvant influencer la production d'oxyde nitreux 58
1.5.3.2.1 Lors de la nitrification 58
1.5.3.2.2 Lors de la dénitrification 60
1.6 Techniques d'étude des bactéries et de leur activité 64
1.6.1 Isolement et culture 64
1.6.2 Dénombrement 64
1.6.2.1 Méthodes classiques 64
1.6.2.2 Techniques de biologie moléculaire 65
1.6.3 Étude de l'activité des bactéries 67
1.6.3.1 Evolution des formes inorganiques de l'azote 67
1.6.3.2 Utilisation d'Inhibiteurs 68
1.6.3.2.1 Inhibition des bactéries nitrifiantes 68
1.6.3.2.2 Inhibition des bactéries dénitrifiantes 69
1.6.3.3 Méthode des traceurs isotopiques 70
1.6.3.4 L'analyse respirométrique 70
1.6.3.5 L'analyse écologique des biomasses épuratrices 71
1.7 Références 72

Chapitre 2 - Sites d'étude et méthodologie générale 87
2.1 Sites d'étude 87
2.1.1 Le bassin de la Seine 87
2.1.2 Les stations d'épuration de l'agglomération parisienne et la pollution azotée 91
2.1.2.1 La station 'Seine Aval' 91
2.1.2.2 La station 'Seine Centre' 92
2.1.2.3 La station 'Seine Amont' 94
2.1.2.4 La station 'Marne Aval' 96
2.2 Méthodologie générale 98
2.2.1 Prélèvements 98
2.2.1.1 Les boues activées 98
2.2.1.2 Les cultures fixées 101
2.2.2 Matériels et méthodes 102
2.2.2.1 Simulations expérimentales: contrôle des conditions relatives à la nitrification et la dénitrification en stations d'épuration et mesure des émissions de N_2O 102
2.2.2.2 Etude de la variabilité des émissions de N_2O, en fonction de différents facteurs 108
2.2.2.3 Étude des différents processus: part relative dans les émissions de N_2O 110
2.2.2.4 Estimation des émissions de N_2O lors du traitement de l'azote pour les STEPs actuelles et futures de l'agglomération parisienne 113
2.3 Références 115

Chapitre 3 - Nitrogen behaviour and nitrous oxide emission in the tidal Seine River estuary (France) as influenced by human activities in the upstream watershed 119
3.1 Introduction 120
3.2 Material and methods 121
3.2.1 Site studied 121
3.2.2 Sampling strategy 122
3.2.3 Chemical measurements 122
3.2.4 Flux calculations 123
3.3 Results 124
3.3.1 Changing conditions in the Seine river and estuary 124
3.3.2 Longitudinal summer profiles of oxygen and nitrogen in the estuary and the lower Seine River 125
3.3.3 Seasonal variations of oxygen and inorganic nitrogen in the estuary 127
3.3.4 Nitrification and denitrification in the Seine freshwater estuary 129
3.3.5 Nitrous oxide fluxes in the Seine freshwater estuary 131
3.4 Discussion 133
3.4.1 Improvement of the oxygenation conditions in the lower Seine River and and the tidal estuary 133
3.4.2 Budget of nitrification, denitrification and nitrous oxide emission in the tidal estuary 133
3.4.3 Mechanisms and control factors of N_2O emission 134
3.4.4 The significance of estuarine N_2O emission 135
3.5 References 137

Chapitre 4 - Nitrous oxide emissions from secondary activated sludge in nitrifying conditions of urban wastewater treatment plants: effect of oxygenation level 143
4.1 Introduction 144
4.2 Material and methods 145
4.2.1 Treatment plant 145
4.2.2 Lab-scale reactor and batch experiments 146
4.2.3 Sampling and analyses 147
4.2.4 Batch experiments using inhibitors and nitrite addition 148
4.3 Results 149
4.3.1 Variability of results 149
4.3.2 Nitrification in a batch reactor 150
4.3.3 N_2O and oxygenation 152
4.3.4 Effect on N_2O emissions of adding nitrite and inhibitors 153
4.4 Discussion 155
4.4.1 Nitrification rate and oxygen concentration 155
4.4.2 Effect of oxygenation on N_2O emission rate 155
4.4.3 Estimate of N_2O emission in WWTPs 156
4.5 References 157

Chapitre 5 - Nitrous oxide emissions from denitrifying activated sludge of urban wastewater treatment plants, under anoxia and low oxygenation 161
5.1 Introduction 162
5.2 Material and methods 163
5.2.1 Characteristics of the sampled treatment plant 163
5.2.2 Lab-scale reactor 165
5.2.3 Sampling and analyses 166
5.2.4 Batch tests 166
5.3 Results 168
5.3.1 Variability of results 168
5.3.2 N_2O emission by "denitrifying" sludge in a gradient of oxygenation 168
5.3.3 Effect on N_2O emissions of adding nitrous oxide reductase and membrane-bound nitrate reductase inhibitors, in anoxic condition 170
5.3.4 N_2O emission at four oxygenation levels with nitrification inhibitors 172
5.4 Discussion 174
5.4.1 Denitrification rate 174
5.4.2 Effect of oxygenation on N_2O emission rates by denitrifying sludge 174
5.4.3 Investigating the effect on N_2O emissions by nitrate ammonification in anoxic condition 175
5.4.4 N_2O emissions from denitrification at low oxygenation: interference with nitrifier denitrification 176
5.4.5 Estimates of N_2O emission in WWTPs 176
5.5 References 177

Chapitre 6 - Traitement de la pollution azotée en station d'épuration par filtres biologiques immergés : Emissions d'oxyde nitreux lors de la nitrification et dénitrification 181
6.1 Introduction 183
6.2 Matériel et Méthodes 184
6.2.1 Les sites d'étude : les STEPs Seine Centre et Seine Aval 184
6.2.2 Le bio-réacteur 186
6.2.3 Les expériences en Batch 188
6.2.4 Echantillonnages et Analyses 188
6.3 Résultats 189
6.3.1 Nitrification en cultures fixées à différentes oxygénations : émissions de N_2O 189
6.3.2 Dénitrification en cultures fixées avec différentes concentrations en Méthanol : émissions de N_2O 191
6.4 Discussion 193
6.4.1 Nitrification et émissions de N_2O : variations en fonction de l'oxygénation 193
6.4.2 Dénitrification et émissions de N_2O : variations en fonction de la quantité en méthanol ajoutée 195
6.4.3 Estimations des émissions de N_2O lors de l'élimination de la pollution azotée sur les procédés de cultures fixées 196
6.5 Références 197

Chapitre 7 - Emissions d'oxyde nitreux lors du traitement de l'azote des eaux usées de l'agglomération parisienne: état actuel et prévisions 201
7.1 Introduction 203
7.2 Le bassin de la Seine et les émissions de N_2O 204
7.2.1 Le bassin de la Seine 204
7.2.2 Les émissions de N_2O 205
7.3 Les stations d'épuration de l'agglomération parisienne et les émissions de N_2O 206
7.3.1 Les stations d'épuration 206
7.3.2 Les emissions de N_2O 210
7.4 Discussion 212
7.4.1 Les émissions de N_2O provenant des traitements tertiaires sur cultures fixées et des traitements secondaires sur boues activées 212
7.4.2 Bilan des émissions de N_2O sur les stations d'épuration de l'agglomération parisienne 213
7.4.3 Impact sur le bassin de la Seine des émissions de N_2O, provenant des stations d'épuration de l'agglomération parisienne, actuelles et futures 214
7.5 Références 215

Chapitre 8 - Conclusions et perspectives 219
8.1 Les émissions de N_2O en stations d'épuration lors du traitement de l'azote 219
8.2 Les processus d'émissions du N_2O lors de la nitrification et de la dénitrification..... 222
8.3 Bilan global des émissions de N_2O et leur évolution..... 224
8.4 Perspectives 225
8.5 Références 226

Annexes 227
Annexe 1. La station 'Seine Aval'..... 227
Annexe 2. La station 'Seine Centre' 229
Annexe 3. La station 'Seine Amont' 231
Annexe 4. La station 'Marne Aval' 232
Annexe 5. Résultats des expériences de nitrification sur boues activées et des émissions de N_2O dans un gradient d'oxygène (0.1 à 6.2 $mgO_2\ L^{-1}$) 233
Annexe 6. Résultats des expériences de nitrification sur boues activées et des émissions de N_2O en micro-aérobie (0.1 à 2.0 $mgO_2\ L^{-1}$) avec ajout de nitrite et d'inhibiteurs de la nitrification (ATU + Chlorate)..... 236
Annexe 7. Résultats des expériences de dénitrification sur boues activées et des émissions de N_2O en anoxie et micro-aérobie (0.0 à 1.1 $mgO_2\ L^{-1}$) 240
Annexe 8. Résultats des expériences de dénitrification sur boues activées et des émissions de N_2O en anoxie (0.0 $mgO_2\ L^{-1}$) avec ajout d'inhibiteurs de la nitrification-dénitrifiante (ATU), de la nitrate ammonification (Chlorate) et de la réductase de l'oxyde nitreux (Acétylène) 244
Annexe 9. Résultats des expériences de dénitrification sur boues activées et des émissions de N_2O en anoxie et micro-aérobie (0.0 à 1.1 $mgO_2\ L^{-1}$) avec ajout d'inhibiteurs de la nitrification-dénitrifiante (Chlorate + ATU)..... 246
Annexe 10. Résultats des expériences de nitrification sur cultures fixées et des émissions de N_2O dans un gradient d'oxygène (0.1 à 9.2 $mgO_2\ L^{-1}$) 249
Annexe 11. Résultats des expériences de dénitrification sur cultures fixées et des émissions de N_2O en anoxie (0.0 $mgO_2\ L^{-1}$) dans un gradient de Méthanol..... 252

Nitrous oxide emissions during nitrogen removal in wastewater treatment plant

The Parisian conurbation

Summary

Biological nitrogen removal systems (nitrification and denitrification), could emitted a greenhouse gas, the nitrous oxide (N_2O). The aim of this study was to estimate and identify processes and factors at the origin of N_2O emissions during nitrogen removal from wastewater treatment plants of the Parisian conurbation, and to estimate their impact on global N_2O emissions at the Seine basin scale.

Laboratory-scale experiments allowed us to simulate nitrogen removal processes used by the Parisian conurbation - secondary activated sludge and tertiary treatment on fixed culture - and to measure N_2O emissions, under controlled conditions. We have shown that N_2O emissions represent 0.1 to 0.8 % of the treated nitrogen load, depending on oxygenation and methanol supply. Optimal conditions for N_2O emissions were around 1 $mgO_2\ L^{-1}$ during nitrification ; around 0.3 $mgO_2\ L^{-1}$ and a methanol supply which permit only 60 % of the total nitrate reduction, during denitrification. Experiments with specific inhibitors allowed us to identify the two major processes responsible for N_2O emissions: autotrophic nitrifier denitrification and heterotrophic denitrification.

Our estimates lead to present N_2O emissions from WWTPs of the Parisian conurbation of 60-120 kg $N\text{-}N_2O\ d^{-1}$, which will increase to 320-480 kg $N\text{-}N_2O\ d^{-1}$ in 2005-2008 and will reach 370-750 kg $N\text{-}N_2O\ d^{-1}$ in 2012 – 2015. The emission levels could reached the lower range if the nitrification of nitrogen is realised at an oxygenation higher than 2 mgO_2/L and denitrification in total anoxic conditions and a methanol addition allowing 100 % of nitrate load reduction. According to our results, N_2O emissions, currently emitted in the lower Seine river which receive the effluents not treated for nitrogen, will be increased by moving them from natural environments to WWTPs. However, at the scale of the Seine basin, nitrous oxide emissions issued from nitrogen treatments in WWTPs of the Parisian conurbation (at present or in the future), will continue to represent a low ratio, 1 to 10 %, in comparison with the emissions from agricultural lands.

Key words: N_2O, nitrification, denitrification, WWTPs, activated sludge, fixed culture.

Émissions d'oxyde nitreux lors du traitement de l'azote en station d'épuration.

Agglomération parisienne

Résumé

Les systèmes de traitement biologique de l'azote, qui utilisent les processus de nitrification et de dénitrification, sont susceptibles d'émettre un gaz à effet de serre, l'oxyde nitreux (N_2O). Le but de notre étude était d'estimer et d'identifier les processus et les facteurs responsables de ces émissions, provenant du traitement de l'azote sur les stations d'épuration de l'agglomération parisienne et d'en estimer l'impact sur les émissions globales de N_2O au niveau du bassin de la Seine.

Des expériences en laboratoire ont permis la simulation des différents traitements utilisés sur l'agglomération parisienne - boues activées secondaires et cultures fixées en traitement tertiaire - et la mesure, en conditions contrôlées, des émissions de N_2O. Nous avons montré que les flux de N_2O représentent entre 0.1 à 0.8 % de la charge en azote traitée suivant l'oxygénation et les doses de méthanol ajoutées. Les flux de N_2O les plus importants sont observés pour une oxygénation autour de 1 $mgO_2\ L^{-1}$ lors de la nitrification ; autour de 0.3 $mgO_2\ L^{-1}$ et pour un ajout de méthanol en traitement tertiaire, ne permettant que 60 % de la réduction totale des nitrates, lors de la dénitrification. Des essais expérimentaux utilisant différents inhibiteurs spécifiques, ont permis d'identifier les deux processus majeurs responsables de ces émissions : la nitrification-dénitrifiante autotrophe et la dénitrification hétérotrophe.

Le traitement de l'azote, sur les stations de l'agglomération parisienne représenterait actuellement des émissions de N_2O de l'ordre de 60-120 $kgN\text{-}N_2O\ j^{-1}$ qui augmenteront avec la mise en place des nouveaux traitements de l'azote pour l'horizon 2005-2008 à 320-480 $kgN\ j^{-1}$, et pour l'horizon 2012-2015 à 370-750 $kgN\ j^{-1}$. Les niveaux les plus bas de ces émissions pourront être atteints si le traitement de l'azote se fait en nitrification avec une oxygénation supérieure à 2 $mgO_2\ L^{-1}$ et en dénitrification avec des conditions d'anoxie totales et un ajout de méthanol permettant 100 % de la réduction de la charge en nitrate. Nos résultats montrent également que les émissions de N_2O, se produisant actuellement dans la basse Seine recevant les rejets azotés de l'agglomération parisienne augmenteront notablement en étant transférées vers les STEPs. Cependant, les émissions de N_2O en STEPs ne représenteraient que 1 à 10 % des émissions provenant des sols agricoles.

Mots clés : N_2O, nitrification, dénitrification, STEP, boue activée, culture fixée.