

Étude du processus de nitratisation avec des boues activées : effet inhibiteur de l'ammoniac sur les bactéries nitratantes

Study of the nitrification process with activated sludge : inhibiting effect of ammonia on nitrifying bacteria

G. A. Vazquez-Rodriguez et J.-L. Rolst

Volume 10, numéro 3, 1997

URI : <https://id.erudit.org/iderudit/705284ar>

DOI : <https://doi.org/10.7202/705284ar>

[Aller au sommaire du numéro](#)

Éditeur(s)

Université du Québec - INRS-Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE)

ISSN

0992-7158 (imprimé)

1718-8598 (numérique)

[Découvrir la revue](#)

Citer cet article

Vazquez-Rodriguez, G. A. & Rolst, J.-L. (1997). Étude du processus de nitratisation avec des boues activées : effet inhibiteur de l'ammoniac sur les bactéries nitratantes. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, 10(3), 359–375. <https://doi.org/10.7202/705284ar>

Résumé de l'article

Cet article porte sur l'étude de la réaction de nitratisation (oxydation de nitrites en nitrates) par voie biologique aérobie avec des bactéries autotrophes nitratantes. Les phénomènes d'inhibition de l'ammoniac sur l'activité nitratante de populations microbiennes issues de boues activées (populations mixtes ou enrichies en bactéries nitratantes) ont été caractérisés.

A l'aide d'une méthodologie faisant appel à la respirométrie, les caractéristiques de la population enrichie ont été définies :

- les conditions optimales de mise en oeuvre sont un pH de 7,8 et une température de 29°C

- les paramètres cinétiques définissant les performances sont $Q_{Smax}=61$ mgN-NO₂-/gMVS×h et $K_S=3,04$ mgN-NO₂-/l

- cette population présente une bonne tolérance vis-à-vis de NH₃, une inhibition de 60% de la respiration des bactéries nitratantes ayant été obtenue pour 11,4 mgN-NH₃/l.

Les mêmes effets inhibiteurs ont été observés lors de la mise en culture discontinue de populations mixtes dans les conditions optimales de pH et température. Dans ces conditions de mise en oeuvre, différentes cultures dont les concentrations en biomasse totale ont varié de 0,1 à 2 gMVS/l, en présence de 3 mgN-NH₃/l, ont présenté la même vitesse spécifique de nitratisation.

Ces phénomènes d'inhibition de la nitratisation par NH₃ paraissent complexes et fortement dépendant de facteurs environnementaux qui agissent sur la dynamique de croissance de ces bactéries.

Étude du processus de nitratation avec des boues activées : effet inhibiteur de l'ammoniac sur les bactéries nitratantes

Study of the nitrification process with activated sludge: inhibiting effect of ammonia on nitrifying bacteria

G. A. VAZQUEZ-RODRIGUEZ et J.-L. ROLS¹

Reçu le 18 décembre 1996, accepté le 2 mai 1997*.

SUMMARY

This paper focuses both on nitrification and on inhibition by ammonia of the bacteria responsible for this process in activated sludge (nitrifying bacteria). Nitrification (autotrophic nitrite oxidation to nitrate) is the limiting step in wastewater treatment plants during nitrogen biological treatment (ammonia is known as the major inhibitor).

To assess the effects of environmental conditions on nitrification, respirometric measurements of a nitrifying bacteria-enriched activated sludge were carried out using a chemostat providing a stable nitrite-oxidizing population. The influence of pH, temperature, and the free ammonia concentration [$\text{NH}_3\text{-N}$] was studied. The maximum activity of the nitrifying bacteria was found at pH 7.8 and at 29°C, with the 90% range of maximum activity lying between pH values of 7.5 and 8.1. Activation and deactivation energies for nitrification were estimated by Arrhenius analysis to be 12.2 and -41.5 kcal/mol, respectively. A Q_{10} value (multiplicative factor of oxygen consumption rate for each 10°C increase) of 2.8 was determined. Saturation or half-velocity coefficient (K_S) and maximum specific rate of nitrite oxidation ($q_{S\text{max}}$) were calculated by respirometric measurements, and are 3.04 mg $\text{NO}_2\text{-N} / \text{l}$ and 61 mg $\text{NO}_2\text{-N} / \text{g VSS} \cdot \text{h}$, respectively. In the study of effect of free ammonia, respirometric measurements were performed at ammonia concentrations ranging from 0.1 to 70 mg $\text{NH}_3\text{-N} / \text{l}$. For a concentration of 11.4 mg $\text{NH}_3\text{-N} / \text{l}$, a nitrification inhibition degree of 60% was reached. Contrary to the work of Anthonisen *et al.* (1976), which showed total inhibition of nitrifying bacteria at a concentration of 1 mg $\text{NH}_3\text{-N} / \text{l}$, our results indicate a residual respiration, even at a concentration of 70 mg $\text{NH}_3\text{-N} / \text{l}$. This displacement of total inhibition could be due to the predominance of nitrifying bacteria in the activated sludge used.

1. Institut National des Sciences Appliquées, Département de Génie Biochimique et Alimentaire, Centre de Bioingénierie Gilbert Durand, UMR CNRS 5504, LA INRA, Complexe Scientifique de Rangueil, 31077 Toulouse, Cedex 4, France.

* Les commentaires seront reçus jusqu'au 20 mars 1998.

In the second phase of the present research, our results were validated for another mixed bacterial population that was not enriched in nitrifying bacteria. Different concentrations of NH_3 were imposed in flask cultures of nitrifying activated sludge, to assess the inhibition thresholds for ammonia. Between 0 and 10 mg $\text{NH}_3\text{-N} / \text{l}$, the degrees of inhibition were inferior to those obtained by respirometric measurements for cultures enriched with nitrifying bacteria, except at 10 mg $\text{NH}_3\text{-N} / \text{l}$, where about 58% inhibition was achieved. The effect of the total biomass concentration of nitrifying activated sludge was also studied. An ammonia concentration of 3 mg $\text{NH}_3\text{-N} / \text{l}$ was used in flask cultures with different biomass concentrations (0.1 to 2 g VSS / l). This variable was not significant as similar specific nitrite oxidation rates were measured in all cultures. Inhibitory effects of ammonia on nitrifying bacteria activity seem to be complex and strongly dependent on other environmental factors which modify the dynamics of biomass growth.

Key words : nitrification, nitrification, inhibition, ammonia, respirometry, activated sludge.

RÉSUMÉ

Cet article porte sur l'étude de la réaction de nitrataion (oxydation de nitrites en nitrates) par voie biologique aérobie avec des bactéries autotrophes nitrifiantes. Les phénomènes d'inhibition de l'ammoniac sur l'activité nitrifiante de populations microbiennes issues de boues activées (populations mixtes ou enrichies en bactéries nitrifiantes) ont été caractérisés.

À l'aide d'une méthodologie faisant appel à la respirométrie, les caractéristiques de la population enrichie ont été définies :

- les conditions optimales de mise en œuvre sont un pH de 7,8 et une température de 29 °C,
- les paramètres cinétiques définissant les performances sont $q_{\text{Smax}} = 61 \text{ mg N-NO}_2^- / \text{gMVS} \cdot \text{h}$ et $K_s = 3,04 \text{ mg N-NO}_2^- / \text{l}$,
- cette population présente une bonne tolérance vis-à-vis de NH_3 , une inhibition de 60 % de la respiration des bactéries nitrifiantes ayant été obtenue pour 11,4 mg $\text{N-NH}_3 / \text{l}$.

Les mêmes effets inhibiteurs ont été observés lors de la mise en culture discontinue de populations mixtes dans les conditions optimales de pH et température. Dans ces conditions de mise en œuvre, différentes cultures dont les concentrations en biomasse totale ont varié de 0,1 à 2 gMVS / l, en présence de 3 mg $\text{N-NH}_3 / \text{l}$, ont présenté la même vitesse spécifique de nitrataion.

Ces phénomènes d'inhibition de la nitrataion par NH_3 paraissent complexes et fortement dépendant de facteurs environnementaux qui agissent sur la dynamique de croissance de ces bactéries.

Mots-clés : nitrification, nitrataion, inhibition, ammoniac, respirométrie, boues activées.

1 - INTRODUCTION

L'azote est considéré comme le second polluant des eaux après le carbone et avant le phosphore. Il est présent surtout sous forme ammoniacale, dont l'épuration biologique implique les deux principales étapes du cycle de l'azote : la nitrification autotrophe aérobie et la dénitrification hétérotrophe anaérobie (fig. 1).

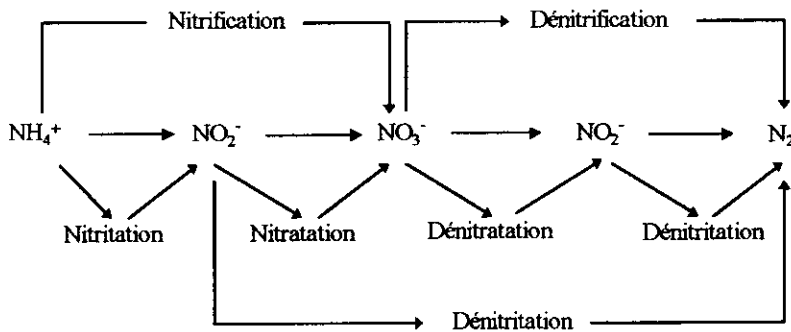
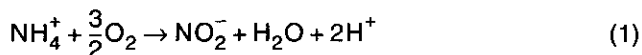


Figure 1 Schéma synoptique du cycle de traitement biologique de l'azote (d'après RAHMANI, 1993).

Synoptic representation of the nitrogen biological treatment cycle (from RAHMANI, 1993).

La nitrification se réalise grâce à l'action conjointe de deux populations bactériennes autotrophes : les bactéries nitritantes, oxydant l'azote ammoniacal en nitrites (nitritation), et les bactéries nitratantes, oxydant les nitrites en nitrates (nitratisation). Les équations stoechiométriques sont les suivantes :

Nitritation :



Nitratisation :



Par rapport à la filière classique nitrification-dénitrification, un nouveau schéma de traitement comportant la séquence nitritation-dénitratation (« shunt des nitrates ») a été proposé. Il a comme avantage principal la réduction des besoins énergétiques (aussi bien l'oxygénation de l'étape de nitritation que la matière organique carbonée de l'étape de dénitratation) et de la biomasse produite (TURK et MAVINIC, 1987). Cette nouvelle filière est basée sur le contrôle des mécanismes d'activation des bactéries nitritantes et d'inhibition des bactéries nitratantes, ce qui a déjà été mis en œuvre sur un pilote semi-industriel avec des cultures fixées pour traiter des effluents fortement chargés en azote (ABELING et SEYFRIED, 1992). La dynamique de croissance de ces bactéries et des inhibitions de type externe sont les facteurs déterminant l'activité de la population nitrifiante, laquelle évolue au détriment des bactéries nitratantes à cause des différences physiologiques entre les deux groupes (VILLAVERDE, 1994). Parmi les inhibitions externes, la concentration en azote minéral joue un rôle prépondérant. Ainsi, selon les travaux d'ANTHONISEN *et al.* (1976), les bactéries nitrifiantes sont inhibées par l'ammoniac (NH_3) et l'acide nitreux (HNO_2), dont les concentrations dépendent de la teneur en NH_4^+ et en NO_2^- , du pH et de la température du milieu. L'effet de ces paramètres physiques est donc très important lorsqu'il s'agit de modifier l'équilibre de croissance entre les deux groupes de bactéries. En effet, la concentration en NH_3 a été signalée comme un facteur de sélection des bactéries

nitritantes par inhibition de la croissance des bactéries nitrifiantes (TURK et MAVINIC, 1987).

Il en est de même pour les caractéristiques de la population nitrifiante, d'après les travaux de BALMELLE *et al.* (1992) et ROLS *et al.* (1994). Ces auteurs ont remarqué l'importance de la composition et de l'histoire de la biomasse nitrifiante : en fonction du groupe de bactéries prédominant dans la culture (population mixte ou enrichie en bactéries nitritantes), des réponses différentes aux paramètres environnementaux sont obtenues, les principaux étant les concentrations en NH_3 et en HNO_2 . Ces auteurs ont montré que les seuils d'inhibition de la nitrification par NH_3 étaient sensiblement différents dans les deux types de culture (100 % d'inhibition à partir de 3 mgN- NH_3 /l pour la population enrichie et de 17 mgN- NH_3 /l pour la population mixte).

Afin de compléter ces observations, et vu que l'oxydation des nitrites est l'étape décisive aussi bien dans les procédés conventionnels d'épuration de l'azote (couplage nitrification-dénitrification, nécessitant l'activation des deux groupes bactériens de la nitrification) que dans les nouveaux systèmes consistant à la réduction des nitrites de façon anaérobie (couplage nitrification-dénitrification, où l'inhibition des bactéries nitrifiantes est indispensable), ce travail a été ciblé sur l'étape de nitrification et son inhibition par NH_3 .

L'étude du processus de nitrification a été réalisée avec deux populations issues de boues activées nitrifiantes (population mixte ou enrichie en bactéries nitrifiantes) et deux méthodologies différentes (respirométrie ou mise en culture). D'abord, la respirométrie a permis de caractériser, pour la population enrichie, l'effet de facteurs environnementaux (pH et température) sur la vitesse d'oxydation des nitrites et l'inhibition par NH_3 . Puis, une étude de la cinétique de nitrification en cultures discontinues de la population mixte a été effectuée pour vérifier les seuils d'inhibition par NH_3 obtenus par respirométrie, et pour évaluer l'effet de la concentration en biomasse sur cette inhibition.

2 – MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Caractérisation des inhibitions de la nitrification

Les bactéries nitrifiantes peuvent être inhibées par leurs propres substrats, ainsi que par leurs produits d'oxydation, ce qui résulte soit en l'accumulation de nitrites (inhibition de la nitrification), soit en l'inhibition complète de la nitrification. Ces inhibitions sont attribuables aux formes non-ionisées des substrats, dont la capacité de pénétration dans les bactéries les rend plus inhibiteurs que les substrats ionisés. Le degré d'inhibition des deux étapes de la nitrification dépend des équilibres entre les formes ionisées (NH_4^+ ou NO_2^-), et respectivement leurs formes libres (NH_3 ou HNO_2), comme il est montré dans la figure 2.

Les teneurs en espèces libres sont fonction des concentrations en NH_4^+ et en NO_2^- , du pH et de la température, en accord avec les équations 3 et 4 (FORD *et al.*, 1980) :

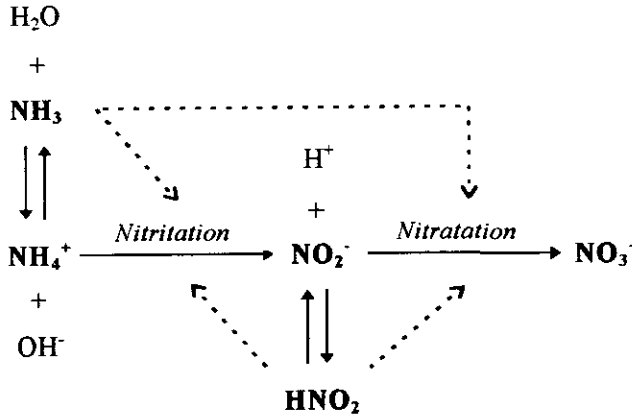


Figure 2 Équilibres ioniques intervenant sur la disponibilité des substrats des bactéries nitrifiantes. Les lignes discontinues indiquent l'inhibition du groupe bactérien par les formes libres azotées.

Ionic equilibria involved in availability of substrate to nitrifying bacteria. Discontinuous lines show the inhibitory effect of free nitrogen free forms on bacterial groups.

$$[\text{N} - \text{NH}_3] = \frac{[\text{N} - \text{NH}_4^+] \cdot [10^{\text{pH}}]}{\left[\left(\frac{K_b}{K_e}\right) + 10^{\text{pH}}\right]} \quad (3)$$

où K_b est la constante d'ionisation de l'ammoniac, K_e la constante d'ionisation de

l'eau, et $\frac{K_b}{K_e} = \exp\left(\frac{6334}{(273+T)}\right)$

$$[\text{N} - \text{HNO}_2] = \frac{[\text{N} - \text{NO}_2^-]}{K_a \cdot 10^{\text{pH}}} \quad (4)$$

où K_a est la constante d'ionisation de l'acide nitreux, et $K_a = \exp\left(\frac{-2300}{(273+T)}\right)$

ANTHONISEN *et al.* (1976) ont délimité quatre zones d'inhibition des bactéries nitrifiantes, en fonction des concentrations en NH_3 et en HNO_2 (à température comprise entre 10 et 24 °C, pH compris entre 5,5 et 9 et durée d'incubation 8 semaines). Ces zones prédisent l'inhibition de la nitrification pour des concentrations de l'ordre de 0,1-1 mgN/l (et au-delà) en N-NH_3 , et de 0,2-2,6 mgN/l (et au-delà) en N-HNO_2 . Pour la nitritation, ces mêmes seuils d'inhibition correspondent respectivement à 10-150 mgN/l et 0,2-2,6 mgN/l. La nitratation est donc plus sensible à l'inhibition par NH_3 que la nitritation. Cependant, les concentrations seuils d'inhibition peuvent être modifiées par la concentration en population viable et surtout par la possible acclimatation des bactéries nitrifiantes à des concentrations élevées en inhibiteur (ANTHONISEN *et al.*, 1976 ; WONG-CHONG et LOEHR, 1978).

Une autre source d'inhibition des bactéries nitrifiantes est l'inhibition par leurs substrats. Les constantes d'inhibition (concentration en azote pour laquelle la vitesse spécifique maximale est divisée par 2) est de 780 mgN-NH₄⁺/l pour la nitrification et 290 mgN-NO₂⁻/l pour la nitrification (PRINCE AGBODJAN, 1977). Une inhibition totale de la nitrification avec une concentration de 500 mgN-NO₂⁻/l a été obtenue par ROLS *et al.* (1994) dans des conditions expérimentales pour lesquelles la concentration en HNO₂ à l'équilibre était inférieure au seuil d'inhibition annoncé par ANTHONISEN *et al.* (1976).

Les réactions de nitrification et nitrification sont des réactions consécutives. De ce fait, la présence d'un effet inhibiteur des bactéries nitrifiantes par NH₃ résulte de la charge en azote appliquée sur l'unité de nitrification, alors que l'inhibition par HNO₂ ou NO₂⁻ résulte d'une accumulation de nitrites initialement provoquée par un ralentissement de la nitrification par NH₃ ou par un autre paramètre d'environnement : pH, température ou faible oxygénation. L'inhibition par HNO₂ ou NO₂⁻ n'est donc qu'une conséquence du déséquilibre des dynamiques de croissance des deux groupes de bactéries, c'est pourquoi les expériences réalisées dans le cadre de cette étude ont été ciblées sur l'effet inhibiteur de NH₃. L'inhibition a été imposée par l'apport de NH₄⁺, et les équivalents en NH₃ et HNO₂ ont été calculés par le biais des équations 3 et 4.

2.2 Respirométrie

La capacité respiratoire d'une population en présence d'azote est un indicateur de son potentiel à nitrifier. Les vitesses de consommation d'oxygène pour différentes conditions expérimentales (pH, température, concentration en substrat) ont été utilisées pour quantifier l'effet de ces paramètres sur la nitrification. Le respiromètre utilisé est un appareil de marque YSI modèle 5300. Il est pourvu de sondes à oxygène de type Clark immergées dans 4 cellules indépendantes agitées magnétiquement. Un bain thermostaté assure une température d'essai constante, comprise entre 5 et 40 °C. Le volume des échantillons peut varier de 3 à 8 ml, et l'ajout de petits volumes après la mise en place de la sonde est possible (0,1 ml). Un analyseur couplé à un enregistreur indique le pourcentage de saturation en oxygène et le pH.

L'effet d'un inhibiteur (dans notre cas NH₃) sur la vitesse de consommation d'oxygène par les bactéries nitrifiantes peut être connu par une adaptation de la méthode de CECH *et al.* (1984) (fig. 3). Elle consiste à enregistrer dans un premier temps la respiration endogène en absence de substrat ($r_{O_2, e}$ représentée par la ligne AB). L'ajout du substrat azoté NO₂⁻ à l'instant B provoque l'augmentation temporaire de la vitesse de respiration. Ceci est montré par la ligne BC, laquelle représente la vitesse exogène de consommation d'oxygène ($r_{O_2, t} = \Delta\sigma/\Delta t$). Si la concentration d'oxygène dissous n'est pas limitante, la cinétique obtenue est d'ordre zéro. Lorsque, à l'instant C, l'azote est ajouté sous forme NH₄⁺ en présence d'allylthiourée pour bloquer la nitrification (DRTIL *et al.*, 1993 ; SURMACZ-GORSKA *et al.*, 1996), la vitesse de consommation d'oxygène est ralentie si la concentration en NH₃ correspondante est au-dessus du seuil d'inhibition des bactéries nitrifiantes. Cette vitesse de respiration exogène en présence de NH₃ ($r_{O_2, i} = \Delta\sigma'/\Delta t'$) est représentée par la ligne CD. En prenant en compte la respiration endogène, les vitesses de respiration dues à l'oxydation des nitrites en nitrates en absence et en présence d'inhibition par NH₃ sont respectivement :

$$r_{O_2, ox} = r_{O_2, t} - r_{O_2, e} \quad \text{et} \quad r_{O_2, oxi} = r_{O_2, i} - r_{O_2, e}$$

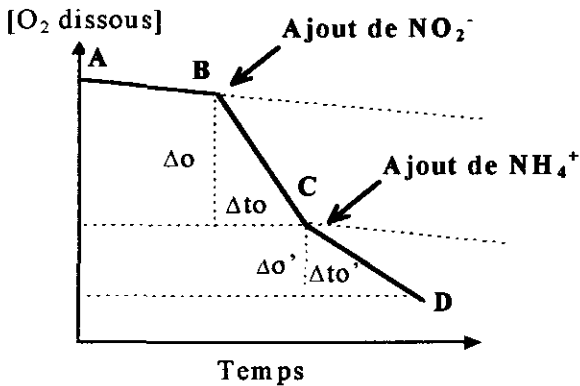


Figure 3 Respirogramme type obtenu lors de l'étude de l'effet inhibiteur de NH_3 sur la nitratisation.

Typical respirogram obtained in the study of the inhibitory effect of NH_3 on nitratisation.

Le degré d'inhibition de la nitratisation par NH_3 est alors exprimé par :

$$\% \text{ d'inhibition} = 1 - \frac{r_{\text{O}_2, \text{oxi}}}{r_{\text{O}_2, \text{ox}}} \quad (5)$$

2.3 Populations microbiennes et modes de culture

À partir d'une boue activée provenant d'une unité pilote de nitratisation (biomasse = 2,4 gMVS/l et $[\text{N-NH}_4^+]_{\text{alimentation}} = 50 \text{ mgN/l}$), il a été sélectionné deux types de populations microbiennes : une population mixte (contenant en quantités équivalentes les deux groupes bactériens de la nitratisation) et une population enrichie en bactéries nitrifiantes.

2.3.1 Population mixte

Le protocole de préparation de l'inoculum produisant la population mixte est le suivant : 300 ml de milieu ATCC 481 (substrat azoté NO_2^- à 80 mgN/l) ont étéensemencés par 300 ml de boues activées dans une fiole d'Erlenmeyer bafflée de 2 l de capacité. La culture a été réalisée sur table agitante à 30 °C pendant 8 heures. Cette durée d'incubation a permis de réactiver les bactéries nitrifiantes tout en préservant les bactéries nitrifiantes.

Cette culture a ensuite été répartie dans des fioles d'Erlenmeyer bafflées de 1 l (volume de la culture 100 ml). Une solution concentrée de nitrite de sodium a été rajoutée de manière à initier la culture avec $[\text{N-NO}_2^-]_{\text{initial}} = 100 \text{ mgN/l}$ et le pH initial ajusté à 8 par ajout de H_3PO_4 5 M. Puis différentes quantités d'une solution de NH_4Cl (5 g/l) ont été ajoutées de façon à atteindre les concentrations en NH_3 choisies pour imposer l'inhibition. Enfin, l'allylthiourée a été utilisée (5 mg/l) pour éviter l'oxydation de NH_4^+ par les bactéries nitrifiantes. Les cultures ont été réalisées sur table agitante à 30 °C pendant 35 heures.

La composition du milieu ATCC 481 adapté à notre étude est la suivante : NaNO_2 , 400 mg/l ; NaHCO_3 , 1,613 g/l ; CaCl_2 , 10 mg/l ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mg/l ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg/l ; K_2HPO_4 , 3,5 mg/l ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg/l ; Na_2MoO_4 , 50 $\mu\text{g/l}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 $\mu\text{g/l}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 $\mu\text{g/l}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 $\mu\text{g/l}$.

2.3.2 Population enrichie en bactéries nitrifiantes

Le protocole de préparation de l'inoculum produisant la population enrichie est le suivant : 1,45 l de milieu ATCC 481 (substrat azoté NO_2^- à 80 mgN/l) ont étéensemencés par 50 ml de boues activées dans un fermenteur SETRIC de 2 l. La culture a été réalisée à 25 °C, pH 8 et la teneur en oxygène dissous a été maintenue à 50 % de la saturation à l'air. En fin de culture, la totalité du milieu a été centrifugée et le culot microbien resuspendu dans 1,45 l de milieu frais. Ce cycle de culture a été reproduit 8 fois, la teneur initiale en nitrites étant progressivement augmentée à chaque cycle (de 80 à 130 mgN- NO_2^- /l). Au cours de ces 8 cycles, l'activité spécifique de nitrification de la biomasse a été augmentée de 2,3 à 6,5 mgN- NO_2^- /gMVS. h.

Au terme du huitième cycle, le réacteur a été placé en mode d'alimentation continu en milieu ATCC 481 avec soutirage. Les caractéristiques de cette culture continue sont données dans le tableau 1.

Tableau 1 Caractéristiques du réacteur continu de nitrification.

Table 1 Characteristics of the nitrification chemostat.

| | |
|---|------------------------|
| Volume | 1,5 l |
| Débit d'alimentation | 0,0024 l/h |
| $[\text{N-NO}_2^-]_{\text{alimentation}}$ | 480 mgN/l |
| $[\text{N-NO}_2^-]_{\text{sortie}}$ | 4 mgN/l |
| Taux de dilution | 0,0016 h ⁻¹ |
| Concentration en biomasse | 52 mgMVS/l |

2.3.3 Techniques analytiques

Les techniques d'analyse des ions NH_4^+ , NO_2^- et des matières volatiles en suspension sont issues des normes AFNOR.

2 – RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'étude de l'inhibition des bactéries nitrifiantes par NH_3 repose sur deux méthodologies d'investigation différentes : la respirométrie qui permet de caractériser les effets à court terme (de l'ordre de l'heure) sur la capacité respiratoire de

la biomasse, et la mise en culture qui montre les effets à long terme (35 heures dans notre cas) sur la capacité de nitratisation.

3.1 Étude respirométrique avec population enrichie

Ces expérimentations sont réalisées sur une population microbienne issue de boues activées et enrichie en bactéries nitratantes, de manière à limiter l'effet des bactéries hétérotrophes sur la technique respirométrique (respiration endogène faible), tout en évitant de ramener l'étude à une simple caractérisation de l'activité d'une souche pure, par exemple du genre *Nitrobacter*. Cette biomasse est régulièrement collectée dans le réacteur continu de nitratisation décrit précédemment. Le pH et la température intervenant dans les relations d'équilibre entre NH_4^+ et NH_3 , les effets propres à ces paramètres ainsi que l'inhibition par NH_3 (effets combinés) sont analysés.

3.1.1 Effet du pH

La vitesse de consommation d'oxygène par les bactéries nitratantes dans les cellules respirométriques a été mesurée à des pH différents ($6 \leq \text{pH} \leq 9$), avec une concentration initiale en substrat fixe ($15 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{l}$) et des températures régulées à 20, 25 et 30 °C. L'utilisation de HCl et de KOH pour fixer le pH au début de chaque test permet de s'affranchir de la présence de NH_3 , et ainsi de n'étudier que les effets propres au pH. À partir des résultats (fig. 4), les valeurs de pH et température optimales pour l'activité nitratante ont été obtenues : pH 7,8 et 30 °C. Les résultats de l'approximation des trois courbes à des modèles quadratiques sont montrés dans le tableau 2, où l'intervalle 90 % équivaut à l'intervalle de valeurs de pH à une température fixe où la vitesse de respiration est supérieure à 90 % de la vitesse maximale.

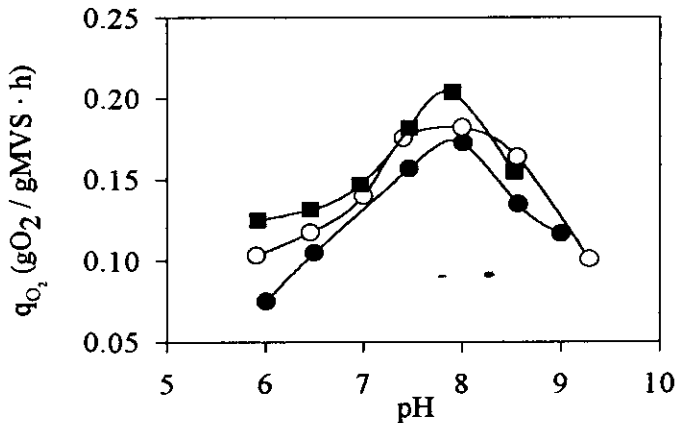


Figure 4 Effet du pH sur la vitesse spécifique de consommation d'oxygène des bactéries nitratantes à différentes températures : ● = 20 °C, ○ = 25 °C et ■ = 30 °C.

pH effect on the specific oxygen consumption rate of nitrifying bacteria at different temperatures : ● = 20 °C, ○ = 25 °C and ■ = 30 °C.

Les pH optimaux obtenus sont en accord avec les valeurs généralement citées dans la littérature (BOON et LAUDELOUT, 1962, repris par FORD *et al.*, 1980 ; SRINATH *et al.*, 1976). C'est aussi le cas des seuils des intervalles à 90 %, qui sont très proches de ceux proposés par WILD *et al.* (1971) et BOON et LAUDELOUT (1962, repris par FORD *et al.*, 1980). De part et d'autre de ces seuils, le pH a un effet désactivateur sur la capacité respiratoire des micro-organismes, et donc sur la cinétique de nitratisation.

Tableau 2 Résultats du lissage quadratique des courbes illustrées dans la figure 4.

Table 2 Results of quadratic fitting of curves appearing in Figure 4.

| T (°C) | pH optimal | Intervalle 90 % |
|--------|------------|-------------------------------|
| 20 | 7,76 | $7,4 \leq \text{pH} \leq 8,3$ |
| 25 | 7,81 | $7,3 \leq \text{pH} \leq 8,6$ |
| 30 | 7,75 | $7,5 \leq \text{pH} \leq 8,1$ |

3.1.2 Effet de la température

La mesure de la vitesse de consommation de l'oxygène par les bactéries nitrifiantes dans les cellules respirométriques à différentes températures (comprises entre 10 et 48 °C) a été réalisée pour connaître l'effet activateur-désactivateur de ce paramètre sur la nitrification. Pour tous les essais, le pH a été initialement fixé à 8 et la concentration en substrat azoté a été équivalente à 15 mgN-NO₂⁻/l. Les phénomènes d'activation et de désactivation de la capacité respiratoire des bactéries nitrifiantes en fonction de la température sont représentés dans la figure 5. La valeur optimale de la température obtenue est d'environ

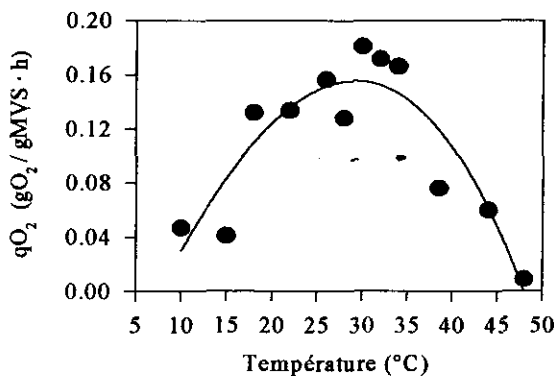


Figure 5 Effet de la température sur la vitesse spécifique de consommation d'oxygène : T_{optimale} dérivée de l'approximation à un modèle du type Gauss = 28,8 °C.

Temperature effect on the specific oxygen consumption rate : T_{optimal} obtained by Gaussian fitting = 28.8°C.

29 °C. Le calcul de Q_{10} (facteur multiplicatif de la vitesse de consommation d'oxygène pour une augmentation de 10 °C) a conduit à des valeurs de 2,8 pour l'activation (dans l'intervalle 10-20 °C), et de 0,3 pour la désactivation (dans l'intervalle 35-45°C). Une analyse selon le formalisme d'Arrhenius a permis de calculer une énergie d'activation de 12,2 kcal/mol et une énergie de désactivation de - 41,5 kcal/mol.

3.1.3 Effet de la concentration en substrat (NO_2^-)

Un troisième paramètre agit sur la capacité respiratoire des micro-organismes et donc sur leurs performances : il s'agit de la limitation par le substrat azoté. L'équation de Michaelis-Menten s'applique dans ce cas, avec $q_S = q_{O_2} \cdot R_{O_2/S}$:

$$q_S = q_{S \max} \cdot \frac{S}{S + K_S} \quad (6)$$

où $R_{O_2/S}$ est le rendement oxygène/substrat fixé à 0,5 mol O_2 /mol NO_2^- (WIESMANN, 1994). À l'aide de cette équation, il est possible de déterminer K_S et $q_{S \max}$ à partir de la construction graphique q_S en fonction de q_S/S . La vitesse de respiration des bactéries nitrifiantes a été mesurée dans les cellules respirométriques pour des concentrations initiales en substrat variables ($1 \leq [\text{N-NO}_2^-] \leq 120 \text{ mg/l}$), une température de 29 °C et un pH initial de 8 (fig. 6). La valeur obtenue pour K_S (3,04 mgN- NO_2^-/l) est en accord avec l'intervalle proposé par VILLAVERDE (1994), lequel correspond à $0,06 \leq [\text{N-NO}_2^-] \leq 8,4 \text{ mg/l}$. CHARLEY *et al.* (1980) ont trouvé une valeur équivalente à 6,08 mg N- NO_2^-/l , qui correspond au seuil en dessous duquel la nitrataion suit une cinétique de premier ordre (la vitesse de réaction est proportionnelle à la concentration en substrat). Au-delà de ce seuil, $q_{S \max}$ est atteint et la cinétique correspond à un ordre zéro. La valeur de $q_{S \max}$ (61 mgN- $\text{NO}_2^-/\text{gMVS} \cdot \text{h}$) permet de caractériser cette population enrichie en bactéries nitrifiantes en terme de potentialité maximale à réaliser la nitrataion en l'absence de toute limitation ou inhibition.

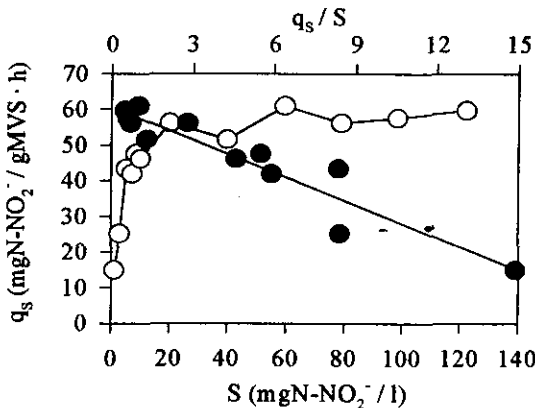


Figure 6

- Relation entre q_S et S pour l'oxydation des nitrites.
- Relation entre q_S et q_S/S ($q_{S \max} = 61 \text{ mgN-NO}_2^-/\text{gMVS} \cdot \text{h}$, et $K_S = 3,04 \text{ mgN-NO}_2^-/\text{l}$).
- Relationship between q_S and S for nitrite oxidation.
- Relationship between q_S and q_S/S ($q_{S \max} = 61 \text{ mgNO}_2^- \cdot \text{N/gVSS} \cdot \text{h}$, and $K_S = 3,04 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{N/l}$).

3.1.4 Effet de la concentration en NH_3

La méthode respirométrique décrite dans la figure 3 permet de mesurer le ralentissement de l'activité respiratoire des bactéries nitrifiantes par la présence de NH_3 . Des concentrations comprises entre 0,3 et 70 mgN- NH_3 /l ont été imposées, avec un pH initial de 8 et à 30 °C. La concentration initiale en substrat azoté a été fixée à 15 mgN- NO_2^- /l. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 7. L'équation dérivée de l'approximation du lissage des points à un modèle logarithmique est la suivante (pour $[\text{N-NH}_3] > 0,26$ mgN/l) :

$$\% \text{ d'inhibition} = 15,91 (\text{Ln} ([\text{N-NH}_3]) + 21,28) \quad (7)$$

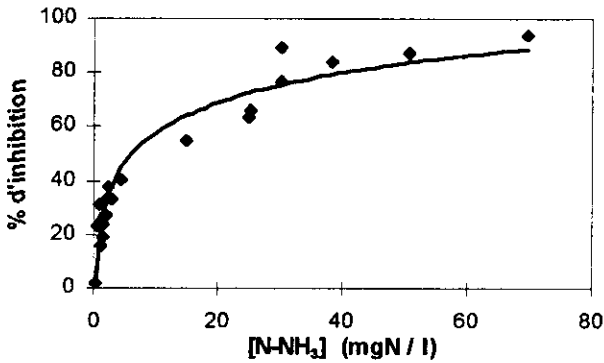


Figure 7 Inhibition de la respiration des bactéries nitrifiantes par l'ajout d'ammoniac.
Inhibition of the respiration of nitrating bacteria by the addition of ammonia.

L'équation (7) prédit 40 % d'inhibition de la nitrification à $[\text{N-NH}_3] = 3,24$ mgN/l, 60 % d'inhibition à $[\text{N-NH}_3] = 11,4$ mgN/l et 100 % d'inhibition à $[\text{N-NH}_3] = 140,9$ mgN/l. Le seuil d'inhibition totale est très supérieur à celui de 1 mgN- NH_3 /l rapporté par ANTHONISEN *et al.* (1976). Un tel déplacement des seuils peut être expliqué par le fait que les tests respirométriques dosent l'effet immédiat de NH_3 sur la nitrification, alors que les résultats d'ANTHONISEN *et al.* (1976) sont issus de cultures discontinues de boues activées à l'échelle de temps de plusieurs semaines. De plus, les conditions environnementales employées (pH après l'ajout de NH_4^+ de 8 et température de 30 °C) sont celles considérées comme optimales, de sorte que l'effet inhibiteur de NH_3 est atténué (BALMELLE *et al.*, 1992). Cependant, la cause majeure du déplacement est la composition de la biomasse, laquelle est dans notre cas principalement nitrifiante. ROLS *et al.* (1994) ont montré qu'une culture enrichie en bactéries nitrifiantes (et donc appauvrie en bactéries nitrifiantes) présentait plus de sensibilité à NH_3 qu'une culture considérée comme mixte. Le fait qu'une population enrichie en bactéries nitrifiantes présente dans notre cas une activité respiratoire résiduelle même à 70 mgN- NH_3 /l reste cohérent avec ces observations.

L'inhibition des bactéries nitrifiantes par NH_3 serait due à la capacité des espèces libres par rapport aux ions à pénétrer dans les bactéries : la modification du pH intracellulaire résulterait impliquerait une diminution de la quantité d'énergie

disponible pour l'oxydation du substrat nitreux du fait de la dépense énergétique pour le maintien du pH intracellulaire.

3.2 Mise en culture d'une population mixte

La mise en culture d'une population microbienne mixte (contenant les deux groupes bactériens de la nitrification) issue de boues activées a été réalisée en mode discontinu dans des fioles d'Erlenmeyer. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de NH_3 sur les bactéries nitrifiantes dans des conditions de mise en œuvre se rapprochant d'une unité d'épuration et de le comparer à celui caractérisé par l'étude respirométrique.

3.2.1 Vérification des seuils d'inhibition par NH_3

L'inhibition de la nitratisation par NH_3 a été imposée à différents degrés dans une culture de population mixte par ajout de NH_4^+ , avec un pH initial de 8 et à 30 °C. Les résultats sont montrés dans le tableau 3, où les degrés d'inhibition attendus sont calculés à partir du modèle logarithmique décrit par l'équation (7). Pour la concentration initiale en substrat azoté utilisée ($[\text{N-NO}_2^-] = 100 \text{ mgN/l}$), il correspond une cinétique d'ordre zéro et donc des vitesses constantes de consommation des nitrites. Le degré d'inhibition observé a été calculé en prenant la vitesse spécifique d'oxydation des nitrites sans ajout de NH_4^+ comme la vitesse de référence ($q_S = 4,05 \text{ mgN-NO}_2^-/\text{gMVS} \cdot \text{h}$). Par rapport aux expérimentations décrites au chapitre 3.1.3, la valeur de q_S est bien inférieure du fait de la dilution des bactéries nitrifiantes au sein de la population mixte (la biomasse contenant les deux groupes de bactéries autotrophes en quantités équivalentes). À partir de l'équation (4), il est possible de calculer la concentration initiale en HNO_2 associée aux conditions expérimentales, laquelle équivaut à $1,9 \times 10^{-3} \text{ mgN-HNO}_2/\text{l}$. En se basant sur les seuils d'inhibition proposés par ANTHONISEN *et al.* (1976) (l'inhibition de la nitratisation apparaît lorsque cette concentration est supérieure à $0,2 \text{ mgN-HNO}_2/\text{l}$), on peut conclure que les ralentissements des vitesses d'oxydation des nitrites ne sont dûs qu'à la présence de NH_3 .

Tableau 3 % d'inhibition de la nitratisation par NH_3 pour la population mixte.

Table 3 Nitratification inhibition (%) by NH_3 in mixed cultures.

| $[\text{N-NH}_3]$ (mgN/l) | % d'inhibition attendu | q_S (mgN- $\text{NO}_2^-/\text{gMVS} \cdot \text{h}$) | % d'inhibition observé |
|------------------------------|---------------------------|---|---------------------------|
| 0 | 0 | 4,05 | 0 |
| 1 | 21,3 | 3,94 | 2,7 |
| 3 | 38,8 | 3,38 | 16,5 |
| 5 | 46,9 | 2,90 | 28,4 |
| 10 | 57,9 | 1,73 | 57,3 |

L'inhibition observée dans les cultures discontinues est inférieure à celle prédite par les essais respirométriques, sauf pour une concentration en inhibiteur de

10 mgN-NH₃/l, laquelle a provoqué pour les deux méthodes le même degré d'inhibition, d'environ 58 %. Dans les travaux de ROLS *et al.* (1994), une concentration similaire en NH₃ occasionne une inhibition de 50 % de la nitratisation avec des boues activées, tandis que dans une culture enrichie en bactéries nitrifiantes, l'inhibition correspondant à cette concentration en NH₃ est totale.

Ce déplacement d'un facteur supérieur à 10 des zones d'inhibition des bactéries nitrifiantes par NH₃ par rapport aux seuils annoncés par ANTHONISEN *et al.* (1976) montre combien ces phénomènes sont liés aux conditions environnementales et à la composition de la biomasse.

3.2.2 Effet de la concentration en biomasse

L'étude de l'effet de la concentration en biomasse sur le seuil d'inhibition des bactéries nitrifiantes par NH₃ a été réalisée en utilisant une population mixte dont la concentration en biomasse totale a varié par le biais d'une dilution avec le milieu de culture (intervalle testé de 0,1 à 2 gMVS/l). Ces différents lots de biomasse sont mis en culture dans des fioles d'Erlenmeyer en présence de 100 mgN-NO₂⁻/l et 3 mgN-NH₃/l, avec un pH initial de 8 et à 30 °C. Pour chaque culture, la consommation des nitrites a donné lieu à des cinétiques d'ordre zéro. La figure 8 présente les vitesses et les vitesses spécifiques de consommation de substrat obtenues. De façon analogue aux expériences décrites ci-dessus, la concentration initiale en HNO₂ n'est pas suffisamment élevée pour provoquer elle-même l'inhibition de la nitratisation.

En prenant en compte les erreurs expérimentales associées à la détermination de la concentration en biomasse (hétérogénéité de l'échantillon), les vitesses spécifiques q_S peuvent être considérées comme constantes (q_S moyen = 5,1 mgN-NO₂⁻/gMVS · h). Ceci implique que la vitesse de consommation du substrat azoté est de premier ordre par rapport à la concentration en biomasse, en accord avec les observations faites par HALL et MURPHY (1980), WILD *et al.* (1971) et FORD *et al.* (1980). Les seuils d'inhibition de la nitratisation seraient ainsi indépendants de la concentration en biomasse, l'activité spécifique des bactéries nitrifiantes étant constante dans la gamme de concentration en biomasse testée. Cependant, ces expérimentations ont été réalisées avec les valeurs optimales de pH et température et, dans ces conditions, les phénomènes d'inhibition semblent atténués.

4 – CONCLUSION

Cette étude a permis de caractériser l'influence de l'environnement physico-chimique sur la réaction biologique de nitratisation réalisée par deux types de population microbienne : une population mixte et une population enrichie en bactéries nitrifiantes.

À partir d'essais respirométriques avec la population enrichie, les valeurs optimales de pH et température ont été définies et correspondent respectivement à 7,8 et 29 °C. Dans ces conditions expérimentales, une bonne tolérance des bactéries nitrifiantes vis-à-vis de NH₃ a été observée, même au-delà de 11,4 mgN-NH₃/l, concentration pour laquelle l'activité était ralentie de 60 %.

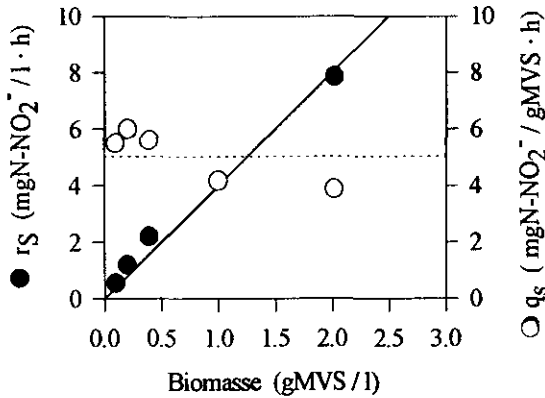


Figure 8 r_s (●) et q_s (○) en fonction de la concentration en biomasse.
 r_s (●) and q_s (○) as a function of the biomass concentration.

Lors de la mise en culture de populations mixtes avec les valeurs optimales de pH et température, un niveau de tolérance identique vis-à-vis de NH_3 a été observé. Par rapport aux données de la littérature dans ce domaine, il semble donc que la nitratacion soit moins sensible à NH_3 dès lors que les conditions de mise en œuvre sont optimales (pH, température, oxygénation...). Dans le cas contraire, un ralentissement d'activité lié à l'un de ces paramètres entraînerait alors un appauvrissement du milieu en bactéries nitratantes et une moins bonne tolérance vis-à-vis de NH_3 . Ainsi, le seuil d'inhibition par NH_3 serait bien fonction de la concentration en biomasse nitratante dès lors que l'activité de cette biomasse serait ralentie par l'effet de son environnement physico-chimique.

L'application de ces résultats à la mise en œuvre d'un procédé de nitratification produisant des nitrites (inhibition de la nitratacion) consisterait donc à affecter significativement l'activité des bactéries nitratantes par des facteurs d'environnement. Dans les procédés de traitement, la température étant généralement subie et comprise entre 10 et 20 °C, un effet désactivateur par le pH pourrait être recherché (pH préférentiellement alcalin pour amplifier le déséquilibre entre NH_4^+ et NH_3). À cet effet viendrait se superposer l'effet inhibiteur de NH_3 , dont le seuil d'inhibition serait bien inférieur à celui que l'on aurait dans les conditions optimales de traitement.

Finalement, tous ces facteurs privilégient principalement les procédés à cultures fixées et à écoulement piston (lit granulaire immobile et immergé ou à ruissellement). Dans ce type de réacteur, un gradient décroissant en NH_3 de l'entrée vers la sortie permet de maintenir un effet inhibiteur sur une hauteur de colonne significative (ROLS *et al.*, 1994). C'est d'ailleurs avec ce type de procédé qu'ABELING et SEYFRIED (1992) ont validé ce nouveau concept de traitement sur un pilote semi-industriel. Quant à l'étape de dénitratacion qui permet de réduire les nitrites en azote (N_2), elle peut être réalisée par des procédés à cultures libres ou fixées (RAHMANI *et al.*, 1995). De plus, cette filière de traitement de l'azote est plus particulièrement destinée aux effluents chargés en azote ($[\text{N-NH}_4^+] \geq 100 \text{ mgN/l}$). Ceci permet d'envisager à court terme le développement de nouvelles filières de traitement d'effluents industriels présentant ces caractéristiques.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le gouvernement mexicain (CONACyT) pour l'attribution d'une bourse à Melle G. VÁZQUEZ-RODRIGUEZ.

GLOSSAIRE

| | |
|---------------------------------------|--|
| ATCC | American Type Culture Collection |
| K_S | Constante d'affinité (mgN-NO ₂ ⁻ /l) |
| MVS | Matières volatiles en suspension (gMVS/l) |
| [N-NH₄⁺] | Concentration en ion ammonium (mgN/l) |
| [N-NO₂⁻] | Concentration en ion nitrite (mgN/l) |
| [N-NO₃⁻] | Concentration en ion nitrate (mgN/l) |
| [N-NH₃] | Concentration en azote ammoniacal (mgN/l) |
| [N-HNO₂] | Concentration en azote nitreux (mgN/l) |
| [O₂ dissous] | Concentration en oxygène dissous (mgO ₂ /l) |
| Q₁₀ | Facteur multiplicatif de la vitesse de respiration pour une augmentation de 10 °C |
| q_{O2} | Vitesse spécifique de consommation d'oxygène (gO ₂ /gMVS · h) |
| q_S | Vitesse spécifique d'oxydation du substrat (mgN-NO ₂ ⁻ /gMVS · h) |
| q_{S max} | Vitesse spécifique maximale d'oxydation du substrat (mgN-NO ₂ ⁻ /gMVS · h) |
| R_{O2/S} | Rendement oxygène/substrat azoté (molO ₂ /molNO ₂ ⁻) |
| r_{O2, e} | Vitesse de respiration endogène (μmolO ₂ /l · min) |
| r_{O2, t} | Vitesse de respiration exogène (μmolO ₂ /l · min) |
| r_{O2, i} | Vitesse de respiration exogène en présence d'un inhibiteur (μmolO ₂ /l · min) |
| r_{O2, ox} | Vitesse de respiration due à l'oxydation du substrat (μmolO ₂ /l · min) |
| r_{O2, ox i} | Vitesse de respiration due à l'oxydation du substrat en présence d'un inhibiteur (μmolO ₂ /l · min) |
| r_S | Vitesse d'oxydation du substrat (mgN-NO ₂ ⁻ /l · h) |
| S | Concentration en substrat (mgN-NO ₂ ⁻ /l) |
| T | Température (°C) |

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABELING, U., SEYFRIED, C.F. (1992). Anaerobic-aerobic treatment of high strength ammonium wastewater: nitrogen removal via nitrite. *Water Sci. Technol.*, 26 : 1007-1015.
- ANTHONISEN, A.C., LOEHR, R.C., PRAKASAM, T.B.S., SRINATH, E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 48 : 835-852.
- BALMELLE, B., NGUYEN, K.M., CAPDEVILLE, B., CORNIER, J.C., DEGUIN, A. (1992). Study of factors controlling nitrite build-up in biological processes for water nitrification. *Water Sci. Technol.*, 26 : 1017-1025.
- CHARLEY, R.C., HOOPER, D.G., McLEE, A.G. (1980). Nitrification kinetics in activated sludge at various temperatures and dissolved oxygen concentrations. *Water Res.*, 14 : 1387-1396.
- CECH, J.S., CHUDOBA, J., GRAU, P. (1984). Determination of kinetics constants of activated sludge microorganisms. *Water Sci. Technol.*, 17 : 259-272.
- DRTIL, M., NEMETH, P., BODIK, I. (1993). Kinetic constants of nitrification. *Water Res.*, 27 : 35-39.
- FORD, D.L., CHURCHWELL, R.L., KACHTICK, J.W. (1980). Comprehensive analysis of nitrification of chemical processing wastewaters. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 52 : 2726-2746.
- HALL, E.R., MURPHY, K.L. (1980). Estimation of nitrifying biomass and kinetics in wastewater. *Water Res.* 14 : 297-304.
- PRINCE AGBODJAN, W. (1977). Contribution à l'étude théorique et expérimentale des phénomènes de nitrification dans les processus de traitement biologique des eaux usées. *Thèse de Doctorat*, Université Paul Sabatier Toulouse.
- RAHMANI, H. (1993). Étude des processus de conversion des pollutions azotées dans des réacteurs à biomasses fixées de type filtre immergé. *Thèse de Doctorat*, INSA Toulouse.
- RAHMANI, H., ROLS, J.L., CAPDEVILLE, B., CORNIER, J.C., DEGUIN, A. (1995). Nitrite removal by a fixed culture in a submerged granular biofilter. *Water Res.*, 29 : 1745-1753.
- ROLS, J.L., MAURET, M., RAHMANI, H., NGUYEN, K.M., CAPDEVILLE, B., CORNIER, J.C., DEGUIN, A. (1994). Population dynamics and nitrite build-up in activated sludge and biofilm processes for nitrogen removal. *Water Sci. Technol.*, 29 : 43-51.
- SRINATH, E.G., LOEHR, R.C., ASCE, M., PRAKASAM, T.B.S. (1976). Nitrifying organism concentration and activity. *J. env. Engng Div. Am. Soc. civ. Engrs.*, EE2, 449-463.
- SURMACZ-GORSKA, J., GERNAEY, K., DEMUYNCK, C., VANROLLEGHEM, P., VERSTRAETE, W. (1996). Nitrification monitoring in activated sludge by oxygen uptake rate (OUR) measurements. *Water Res.*, 30 : 1228-1236.
- TURK, O., MAVINIC, D.S. (1987). Benefits of using selective inhibition to remove nitrogen from highly nitrogenous wastes. *Environ. Technol. Lett.*, 8 : 419-426.
- VILLAVERDE, S. (1994). Parámetros controlantes del crecimiento y actividad de la biopelícula nitrificante en biofiltros sumergidos. *Thèse de Doctorat*, Université de Valladolid.
- WIESMANN, U. (1994). Biological nitrogen removal from waste water. *Adv. Biochem. Engng. Biotechnol.*, 51 : 113-154.
- WILD, H.E.Jr, SAWYER, C.N., McMAHON, T.C. (1971). Factors affecting nitrification kinetics. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 43 : 1845-1854.
- WONG-CHONG, G.M., LOEHR, R.C. (1978). Kinetics of microbial nitrification: nitrite-nitrogen oxidation. *Water Res.*, 12 : 605-609.