



**HAL**  
open science

# Traitement des eaux usées dans les filtres plantés à écoulement vertical : Etude dynamique de l'azote dans les étapes du procédé et des limitations de la dénitrification

Kévin Maciejewski

► **To cite this version:**

Kévin Maciejewski. Traitement des eaux usées dans les filtres plantés à écoulement vertical : Etude dynamique de l'azote dans les étapes du procédé et des limitations de la dénitrification. Ingénierie de l'environnement. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSEI064 . tel-03937206

**HAL Id: tel-03937206**

**<https://theses.hal.science/tel-03937206v1>**

Submitted on 13 Jan 2023

**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.



N° d'ordre NNT : 2022LYSEI064

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon**

**Ecole Doctorale N° 206**  
**Ecole doctorale de Chimie de Lyon**

**Discipline de doctorat : Environnement**

Soutenue publiquement le 12/07/2022, par :  
**Kévin Maciejewski**

---

**Traitement des eaux usées dans les  
filtres plantés à écoulement vertical.  
Etude dynamique de l'azote dans les  
étapes du procédé et des limitations de  
la dénitrification**

---

Devant le jury composé de :

Rousseau, Diederik  
Andrès, Yves  
Delolme, Cécile  
García, Joan  
Mendret, Julie  
Gourdon, Rémy  
Gautier, Mathieu  
Molle, Pascal  
Michel, Philippe  
Cantarel, Amélie  
Jame, Patrick

Professeur – Univ. Ghent  
Professeur - IMT Atlantique  
Directrice de recherche – ENTPE  
Professeur – Univ. Polytechnique de Catalogne  
Maître de conférences – IEM  
Professeur – INSA Lyon  
Maître de conférences – INSA Lyon  
Directeur de recherche – INRAE  
Gérant de la société SCIRPE  
Maître de conférences – Univ. Lyon  
Ingénieur de recherche – ISA Lyon

Rapporteur  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examineur  
Examinatrice  
Directeur de thèse  
Co-Encadrant  
Co-Encadrant  
Invité  
Invitée  
Invité



**DEPARTEMENT FEDORA – INSA LYON - ECOLES DOCTORALES**

<b>SIGLE</b>	<b>ECOLE DOCTORALE</b>	<b>NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE</b>
<b>CHIMIE</b>	<b>CHIMIE DE LYON</b> <a href="https://www.edchimie-lyon.fr">https://www.edchimie-lyon.fr</a> Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage secretariat@edchimie-lyon.fr	<b>M. Stéphane DANIELE</b> C2P2-CPE LYON-UMR 5265 Bâtiment F308, BP 2077 43 Boulevard du 11 novembre 1918 69616 Villeurbanne <a href="mailto:directeur@edchimie-lyon.fr">directeur@edchimie-lyon.fr</a>
<b>E.E.A.</b>	<b>ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE</b> <a href="https://edeea.universite-lyon.fr">https://edeea.universite-lyon.fr</a> Sec. : Stéphanie CAUVIN Bâtiment Direction INSA Lyon Tél : 04.72.43.71.70 secretariat.edeea@insa-lyon.fr	<b>M. Philippe DELACHARTRE</b> INSA LYON Laboratoire CREATIS Bâtiment Blaise Pascal, 7 avenue Jean Capelle 69621 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.43.88.63 <a href="mailto:philippe.delachartre@insa-lyon.fr">philippe.delachartre@insa-lyon.fr</a>
<b>E2M2</b>	<b>ÉVOLUTION, ÉCOSYSTÈME, MICROBIOLOGIE, MODÉLISATION</b> <a href="http://e2m2.universite-lyon.fr">http://e2m2.universite-lyon.fr</a> Sec. : Bénédicte LANZA Bât. Atrium, UCB Lyon 1Tél : 04.72.44.83.62 secretariat.e2m2@univ-lyon1.fr	<b>Mme Sandrine CHARLES</b> Université Claude Bernard Lyon 1 UFR Biosciences Bâtiment Mendel 43, boulevard du 11 Novembre 1918 69622 Villeurbanne CEDEX <a href="mailto:sandrine.charles@univ-lyon1.fr">sandrine.charles@univ-lyon1.fr</a>
<b>EDISS</b>	<b>INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ</b> <a href="http://ediss.universite-lyon.fr">http://ediss.universite-lyon.fr</a> Sec. : Bénédicte LANZA Bât. Atrium, UCB Lyon 1Tél : 04.72.44.83.62 secretariat.ediss@univ-lyon1.fr	<b>Mme Sylvie RICARD-BLUM</b> Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS) - UMR 5246 CNRS - Université Lyon 1 Bâtiment Raulin - 2ème étage Nord 43 Boulevard du 11 novembre 1918 69622 Villeurbanne Cedex Tél : +33(0)4 72 44 82 32 <a href="mailto:sylvie.ricard-blum@univ-lyon1.fr">sylvie.ricard-blum@univ-lyon1.fr</a>
<b>INFOMATHS</b>	<b>INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES</b> <a href="http://edinfomaths.universite-lyon.fr">http://edinfomaths.universite-lyon.fr</a> Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage Tél : 04.72.43.80.46 infomaths@univ-lyon1.fr	<b>M. Hamamache KHEDDOUCI</b> Université Claude Bernard Lyon 1 Bât. Nautibus 43, Boulevard du 11 novembre 1918 69 622 Villeurbanne Cedex France Tél : 04.72.44.83.69 <a href="mailto:hamamache.kheddouci@univ-lyon1.fr">hamamache.kheddouci@univ-lyon1.fr</a>
<b>Matériaux</b>	<b>MATÉRIAUX DE LYON</b> <a href="http://ed34.universite-lyon.fr">http://ed34.universite-lyon.fr</a> Sec. : Yann DE ORDENANA Tél : 04.72.18.62.44 yann.de-ordenana@ec-lyon.fr	<b>M. Stéphane BENAYOUN</b> Ecole Centrale de Lyon Laboratoire LTDS 36 avenue Guy de Collongue 69134 Ecully CEDEX Tél : 04.72.18.64.37 <a href="mailto:stephane.benayoun@ec-lyon.fr">stephane.benayoun@ec-lyon.fr</a>
<b>MEGA</b>	<b>MÉCANIQUE, ÉNERGÉTIQUE, GÉNIE CIVIL, ACOUSTIQUE</b> <a href="http://edmega.universite-lyon.fr">http://edmega.universite-lyon.fr</a> Sec. : Stéphanie CAUVIN Tél : 04.72.43.71.70 Bâtiment Direction INSA Lyonmega@insa-lyon.fr	<b>M. Jocelyn BONJOUR</b> INSA Lyon Laboratoire CETHIL Bâtiment Sadi-Carnot 9, rue de la Physique 69621 Villeurbanne CEDEX <a href="mailto:jocelyn.bonjour@insa-lyon.fr">jocelyn.bonjour@insa-lyon.fr</a>
<b>ScSo</b>	<b>ScSo*</b> <a href="https://edsciencessociales.universite-lyon.fr">https://edsciencessociales.universite-lyon.fr</a> Sec. : Mélina FAVETON INSA : J.Y. TOUSSAINT Tél : 04.78.69.77.79 melina.faveton@univ-lyon2.fr	<b>M. Christian MONTES</b> Université Lumière Lyon 286 Rue Pasteur 69365 Lyon CEDEX 07 <a href="mailto:christian.montes@univ-lyon2.fr">christian.montes@univ-lyon2.fr</a>

\*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie



Les filtres plantés de roseaux à écoulement vertical ont connu un essor considérable en France lors des 20 dernières années. Les enjeux aujourd'hui sont de mieux maîtriser les performances de ces systèmes et d'optimiser le traitement de l'azote et du phosphore. Pour répondre à ces objectifs, des variantes aux systèmes classiques ont vu le jour, consistant notamment à immerger le fond des filtres pour instaurer des zones d'anoxie et / ou à intégrer à la chaîne de traitement des procédés favorisant l'oxydation (lit bactérien, aération forcée). Les travaux présentés ici portent sur un procédé appelé AZOE® dont les deux principales modifications par rapport au système de base sont l'immersion partielle des filtres plantés de roseaux et l'ajout d'un lit bactérien en tête de filière. Les objectifs de ces travaux sont d'approfondir la compréhension des mécanismes de traitement de l'azote sur cette filière, en particulier le lien entre carbone et azote, ainsi que de tester de possibles optimisations. Les travaux ont été menés à plusieurs échelles, combinant l'exploitation de données de terrain à l'échelle réelle à des essais expérimentaux à l'échelle pilote et de manière plus marginale en laboratoire. Une attention particulière a été portée au développement de méthodologie analytique adaptée aux particularités de ces systèmes.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence que dans ces procédés, la charge carbonée est dégradée jusqu'à 50% sur le lit bactérien, tandis que la nitrification peut atteindre 25% dans certains cas. Le lit bactérien dégrade la charge carbonée préférentiellement à la charge ammoniacale. Le premier étage de filtre planté contribue à la nitrification à hauteur de 75% et à la dénitrification à hauteur de 60%. En conditions normales, les performances du second étage s'avèrent plus faibles (20% et 5% pour la nitrification et la dénitrification respectivement). L'ensemble des travaux ont permis de confirmer que le manque de carbone organique sur le second étage était le principal facteur limitant de la dénitrification et de mieux quantifier l'évolution du ratio carbone : azote tout au long de la filière de traitement.

Un des apports de cette thèse a consisté à adapter et/ou développer des approches analytiques spécifiques pour améliorer la compréhension des procédés. Tout d'abord une approche isotopique a été développée en complément d'un traçage hydraulique pour appréhender la dynamique du comportement de l'azote au cours d'une période d'alimentation

du système. Un traçage à l'ammonium marqué a permis de mettre en évidence la réactivité de l'azote avec les médias filtrant et de suivre dans le temps le déplacement et les transformations d'une bâchée. Les pilotes expérimentaux ont été équipés d'une installation spécifique permettant le prélèvement de matériaux filtrants sur lesquels les activités enzymatiques de nitrification et de dénitrification de chaque étage ont été mesurés avec une précision d'environ 5 cm au sein des horizons des milieux poreux.

Dans une dernière phase destinée à optimiser ces systèmes au regard des limites identifiées, deux stratégies d'apport de carbone organique ont été évaluées pour lever les carences en carbone limitant la dénitrification sur le second étage. La dérivation d'une proportion d'effluent brut vers le second étage a été testée à l'échelle pilote, couplée à la mesure des potentiels microbiens de nitrification et de dénitrification permettant une cartographie fine des horizons impliquées dans le traitement de l'azote en comparaison d'un fonctionnement sans dérivation. Enfin, dans une démarche prospective, des essais de laboratoire ont porté sur le choix et l'étude de 7 matériaux biosourcés dont les volumes et les méthodes d'apport sur le second étage sont discutés.

Vertical flow treatment wetlands have experienced considerable growth in France over the last 20 years. The challenge today is to better control the performance of these systems and to optimise the treatment of nitrogen and phosphorus. To meet these objectives, variants to the classic systems have been developed, consisting in particular of immersing the bottom of the filters to create anoxic zones and/or integrating processes that promote oxidation (trickling filter, forced aeration) into the treatment chain. The work presented here concerns a system called AZOE® whose two main modifications in relation to the basic system are the partial immersion of the reed filters and the addition of a trickling filter at the head of the system. The objectives of this work are to deepen the understanding of the nitrogen treatment mechanisms in this system, in particular the link between carbon and nitrogen, and to test possible optimisations. The work was carried out on several scales, combining the exploitation of field data on a real scale with experimental tests on a pilot scale and, more marginally, in the laboratory. Particular attention was paid to the development of analytical methodology adapted to the particularities of these systems.

The results obtained have shown that in these processes, the carbon load is degraded by up to 50% on the trickling filter, while nitrification can reach 25% in certain cases. The trickling filter degrades the carbon load preferentially to the ammonia load. The first stage contributes 75% to nitrification and 60% to denitrification. Under normal conditions, the performance of the second stage is lower (20% and 5% for nitrification and denitrification respectively). The work as a whole confirmed that the lack of organic carbon on the second stage was the main limiting factor for denitrification and enabled us to better quantify the evolution of the carbon : nitrogen ratio throughout the treatment process.

One of the contributions of this thesis was to adapt and/or develop specific analytical approaches to improve the understanding of the processes. Firstly, an isotopic approach was developed in addition to hydraulic tracing to understand the dynamics of nitrogen behaviour during a system feed period. A tracing with labelled ammonium made it possible to highlight the reactivity of the nitrogen with the filter media and to follow the displacement and transformations of a batch over time. The experimental pilots were equipped with a specific



installation allowing the sampling of filtering materials on which nitrification and denitrification enzyme activity analyses were carried out to provide information of each filter stage with a precision of about 5 cm within the horizons of the porous media.

In a final phase designed to optimise these systems with regard to the identified limitations, two organic carbon supply strategies were evaluated to overcome the carbon deficiencies limiting denitrification on the second stage. The diversion of a proportion of raw effluent to the second stage was tested on a pilot scale, coupled with the measurement of microbial nitrification and denitrification potentials, allowing a fine mapping of the horizons involved in nitrogen treatment in comparison with operation without diversion. Finally, in a prospective approach, laboratory tests were carried out on the choice and study of 7 materials whose volumes and methods of input to the second stage are discussed.

# COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

---

## Articles scientifiques publiés dans une revue à comité de lecture :

S. Kharitonov, N. Shchegolkova, A. Alexandrova, A. Saynchuk, P. Michel, **K. Maciejewski**, M. Gautier, R. Gourdon, M. Semenov, G. Krasnov. Taxonomic diversity of Fungi and Bacteria in AZOE-NP® vertical flow constructed wetlands. *Water* (2022)

**K. Maciejewski**, M. Gautier, B. Kim, P. Michel, R. Gourdon. Effect of trickling filter on carbon and nitrogen removal in vertical flow treatment wetlands: A full-scale investigation. *Journal of Environmental Management* (2021).

C.M. Trein, C. Banc, **K. Maciejewski**, A.d.M Motta, R. Gourdon, P. Molle, M. Gautier, M. von Sperling. French vertical flow treatment wetlands in a subtropical climate: Characterization of the organic deposit layer and comparison with systems in France. *Science of the Total Environment* (2020).

## Communications orales en congrès international :

C.M. Trein, C. Banc, K. Maciejewski, M. Gautier, M. von Sperling. Caracterização da fração orgânica da camada de depósito de lodo na primeira etapa de um Sistema Francês em operação no Brasil. V Conferência Panamericana de Sistemas Wetlands para Tratamento e Melhoramento da Qualidade da Água / 5º Simpósio Brasileiro sobre Aplicação de Wetlands Construídos no Tratamento de Águas Residuárias, Apr 2021, Florianopolis, Brazil

K. Maciejewski, M. Gautier, M. Kania, C. Banc, P. Michel, P. Molle, R. Gourdon. Challenges in nitrogen removal in French vertical flow constructed wetlands. 8<sup>th</sup> international symposium on wetlands pollutants dynamics and control. 17 au 21 Juin 2019 à Aarhus, Danemark.

K. Maciejewski, B. Kim, M. Kania, M. Gautier, P. Michel, R. Gourdon. Comparison of nutrients removals of different types of French vertical flow constructed wetlands. 19<sup>th</sup> IWA international conference on diffuse pollution and eutrophication. 29 Octobre 2019 à Jeju, Corée du Sud.

## Communications orales en congrès national :

K. Maciejewski, M. Gautier, P. Michel, C. Banc, R. Gourdon. Rôle du carbone organique dans le cycle de l'azote : application aux filtres plantés de roseaux à écoulement vertical. 99<sup>ème</sup> congrès de l'Astee. 9 au 11 juin 2020 à Lyon, France.

### Posters :

K. Maciejewski, M. Gautier, X. Saupin, E. Bonjour, B. Kim, P. Michel, P. Molle, R. Gourdon. In depth insight of nitrogen removal in french VFCW with various configurations. 9<sup>th</sup> international symposium on wetlands pollutants dynamics and control. 13 au 17 Septembre 2021 à Vienne,

K. Maciejewski, M. Gautier, C. Banc, B. Kim, M. Kania, R. Gourdon. Récupérer les ressources de l'eau par traitement par filtres plantés de roseaux du déchet à la ressource. 17eme congrès de la Société Française de Génies des Procédés. 15 au 17 octobre 2019 à Nantes, France. Prix du meilleur poster.

### Séminaires :

K. Maciejewski, M. Gautier, P. Michel, R. Gourdon. Optimization of nitrification/denitrification phases in constructed wetlands. Research on the ecological LID design factors with pollutant removal mechanisms considering microorganism and plants, PHC STAR 2019, INSA Lyon – Kongju University joint seminar, Mar 2019, Lyon, France

## LISTES DE ABREVIATIONS

Français	Signification	Anglais
DCO	Demande Chimique en Oxygène	COD
DBO <sub>5</sub>	Demande Biochimique en Oxygène pendant 5 jours	BOD <sub>5</sub>
COT	Carbone Organique Total	TOC
NTK	Azote Total Kjeldahl	NTK
NGL	Azote Global	TN
-	Constructed /Treatment Wetland	CW/TW
FPR	Filtre Planté de Roseaux	-
LB	Lit bactérien, Trickling filter	TF
MES	Matière en suspension	TSS
MO	Matière Organique	OM
UV	Ultraviolet	UV
-	Horizontal Flow Constructed/Treatment Wetlands	HFCW/HFTW
-	Vertical Flow Constructed/Treatment Wetlands	VFCW/VFTW
DEEP	Déchets Eaux Environnement Pollutions	-
AE	Analyser élémentaire	-
IRMS	Spectrométrie de masse à rapport isotopique	IRMS
EH	Equivalent habitant	pe
Eh	Potentiel d'oxydo-réduction	ORP



Aérobic :	Organisme vivant dont la voie métabolique de production d'énergie peut utiliser le dioxygène (O <sub>2</sub> ) comme accepteur d'électrons.
Ammonification :	Désigne le processus qui transforme l'azote organique en azote inorganique (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) par une action biologique
Anabolisme :	Ensemble de réactions enzymatiques de biosynthèse de macromolécules ou de leurs précurseurs. Ces réactions nécessitent un apport d'énergie.
Anaérobic :	Organisme vivant dont son métabolisme se développe en absence d'oxygène (O <sub>2</sub> ).
Anoxie :	Désigne la diminution ou absence d'oxygène dissous biodisponible dans le milieu (sol, sédiments, eau, atmosphère).
Autotrophes :	Un organisme capable de synthétiser lui-même les matières organiques qui le composent à partir d'éléments minéraux
Catabolisme :	Ensemble de réactions chimiques ou enzymatiques de dégradation de macromolécules organique ou inorganiques en molécules de faible taille. Ce processus de dégradation génère de l'énergie.
Dénitrification :	Le processus de réduction biologique des nitrates en d'azote gazeux en absence d'oxygène.
Hétérotrophes :	Espèces qui prélèvent dans le milieu extérieur les substances organiques dont elles ont besoin, ne pouvant pas effectuer lui-même la synthèse de ses éléments
Métabolisme :	Ensemble des transformations moléculaires et énergétiques qui se déroulent de manière ininterrompue au sein de cellules ou organismes vivantes au cours des phénomènes de synthèse et de dégradation organique (anabolisme et catabolisme).
Nitrification :	Oxydation de l'azote ammoniacal successivement en nitrites puis en nitrates, en présence d'oxygène.

# REMERCIEMENTS

---

Avant tout chose, merci à ma grande famille unie et aimante qui m'a offert la chance et la force de réaliser mes projets. Vous mesurez le chemin parcouru et à quel point rien n'était gagné d'avance. J'espère que vous mesurez seulement que tout cela n'est possible que grâce à vous.

Il me reste encore l'excitation de ma première rencontre avec le laboratoire et l'impatience de travailler avec vous tous qui aviez l'air absolument cools ! Tout comme la chaleur du « bureau » qui aura tout arrangé pour que je m'y sente bien. Merci à vous Helen, Valentine, Rémy, Camille et Julie, c'était avec joie que je suis venu vous rejoindre chaque matin. J'ai toujours eu la drôle de sensation de vivre des moments privilégiés dont je savais sur l'instant qu'il fallait profiter. Je n'oublie pas Adi, Anaëlle, Amin, Damien, Jérémie, Manon, Mathis, Maxime, Nathalie, Richard, Rodolphe, Violetta, Wen et tous les autres qui êtes fantastiques, à croire que ce laboratoire n'attire que des personnes drôles et bienveillantes. Il y a évidemment une place particulière pour Boram pour son aide, son soutien, tous ces moments à nous mais aussi pour ces quelques jours en Corée qu'on ne peut oublier. Plus que tout autre chose, j'ai apprécié travailler avec vous tous qui attachez une grande importance aux relations humaines. Mathieu et Rémy vous êtes parfaits pour ça, vous étiez le duo parfait au moment parfait. C'est avec grand plaisir que je continuerai à travailler avec vous de près ou de loin. Je veux aussi chaleureusement remercier Didier et Olivier qui ont facilité mon séjour au hall expérimental de la Feyssine. Merci à Lucia qui m'a encouragé à m'investir dans l'aventure, et tendrement accompagné pendant plusieurs années.

Merci pour le soutien de l'entreprise SCIRPE représentée par Philippe et Marie et la confiance qu'ils m'ont toujours accordé. Merci à mes collègues géniaux : Caroline, Briec, Marc, Guillaume, Jean-Luc, Théophile, Philippe et l'atelier. Mention spéciale pour Cassandra qui a participé à la séance camping dans une station d'épuration.

Y por último, Diana, tú eres la que ha iluminado el final de esta tesis y has contribuido al esfuerzo cuando más importaba. Ya que has soportado lo peor de lo que puedo ser, no tengo duda de que ahora pasaremos a lo mejor de lo que podemos ser.

Je vous remercie tous infiniment de m'avoir accompagné et de continuer à le faire. Je garde pour moi la vision de vous voir tous réunis dans l'amphithéâtre le jour de la soutenance. Voici, à l'image d'un véritable travail collaboratif scientifique la répartition officielle des tâches de ce manuscrit afin de témoigner de son incroyable effort collectif.

#### Official Thesis Credit Author Statement:

**Mathieu G., Rémy G.:** Kind Management, Great supervision & Amazing conference memories giving. **Philippe M.:** Kind Management & Confidence giving. **Boram K.:** Scientific supervision, Conferences support & Unforgettable harbour discussion. **Patrick J., Amélie C.:** Exciting scientific collaboration & Valuable motivation assistance. **Camille B.:** Unusual scientific collaboration, Cherries picking, Trot' riding & outstanding friendship making. **Julie F.:** (un)scientific brainstorms on dangerously falling board, funniest emotional support. **Rémy B.:** Beer brewing chemistry debate & Thesis tension evacuation by tchoukball. **Helen C.:** Organization help, Spanish teaching & Providing internship to my future lover. **Valentine G.:** Office emotional balance ensuring & Discreetly telling the garage door is open. **Maxime B.:** Squash backhands teaching to release the pressure. **Lab's friends:** Unlimited coffee break participation & good mood providing. **Aoun's, Doum's, Roub's, Toun's, Youn's:** Emotional support, ski bagarre riding, Understanding the real groove of African love song & Providing intense friendship. **Corinne J., David J.:** Mental coaching for self-improvement & making a place for me in the family. **Thomas E., Théo M.:** English supervision, De-dramatize any situations by laughing & Providing intense friendship. **Mum and Dad:** Making and educating myself, Projects and life dreams assistance & Pretending to understand why I did a PhD. **Papy, Mamie:** Initiation to wetlands through fishing teaching & Kindergarten to high school transportations. **Emilie B., and Remi F.:** Amazing constructed wetlands drawing & providing moral comfort through fondue savoyarde. **Lucile B., Charley:** Showing that real success is only measured by human qualities. **Nieces and Nephews:** Providing real laboratory help & Providing real breaks from sciences by letting me play with them. **Jean Phi R.:** Helping to popularise my thesis subject, Sharpening my political convictions & Enlarge the family with his lovely tribe. **Isabelle B., Catherine B.:** PhD defense hypoglycaemia checking & Making the family even cooler. **Copain:** Helping to put the importance of life into perspective through the joy of grazing grass. **John Mayer, Mark Knopfler :** Huge energy transmission through guitar playing. **Diana A.R.:** Writing & manuscript layout, Salsa dancing, Emotional supervision & Unconditional love sharing.



# TABLES DES MATIERES

---

Résumé.....	5
Abstract.....	7
Communications scientifiques.....	9
Listes de abréviations.....	11
Glossaire.....	13
Tables des matières.....	16
Liste de tableaux.....	18
Liste de figures.....	19
Introduction.....	23
Chapitre 1 : Etude bibliographique.....	27
1.1    Eaux usées domestiques en France.....	29
1.2    L’azote dans les eaux usées.....	34
1.3    Le traitement par filtres plantés de roseaux.....	50
1.4    Le procédé AZOE et les technologies associées.....	57
Chapitre 2 : Matériels et méthodes.....	65
2.1    Campagnes d’échantillonnage pour le suivi de terrain.....	67
2.2    Travaux à l’échelle pilote.....	69
2.2    Méthodes analytiques.....	76
2.3    Suivi isotopique.....	79
2.4    Suivi microbiologique à l’échelle pilote.....	82
Chapitre 3 : Résultats et discussions.....	87
3.1    Exploitation de données de terrain de station filtres plantés de roseaux classiques et Azoe®.....	91
3.2    Etude à long terme du système à l’échelle pilote et de l’influence des variations de charges.....	117
3.3    Etude de la dynamique du système AZOE® par traçage hydraulique et isotopique.....	141
3.4    Etude de l’activité de nitrification et de dénitrification au regard d’une optimisation du système par ajout de carbone par dérivation d’effluent brute.....	167

3.5	Détermination du potentiel de matériaux biosourcés pour compenser les carences en carbone organique de la dénitrification hétérotrophe.....	195
Chapitre 4 : Conclusion générale.....		215
4.1	Rôle du lit bactérien.....	217
4.2	Cartographie en profondeur des étages de filtration.....	218
4.3	Dynamique de l'azote dans le système AZOE-N®.....	219
4.4	Relation entre carbone et azote.....	220
4.5	Solutions d'optimisation.....	221
4.6	Modifications opérationnelles.....	222
4.7	Mise en application des travaux de thèse à Trans-la-Forêt.....	223
4.8	Maitrise de l'épuration de l'azote dans un contexte global.....	223
Perspectives.....		225
Bibliographies.....		227
Annexes.....		238

## LISTE DE TABLEAUX

---

Tableau 1.1-1 Caractéristiques moyennes des eaux usées domestiques en milieu rural en petites collectivités (inférieures à 2000 équivalent habitants). D’après les données de Mercoiret, 2009.....	30
Tableau 1.2-1 tableau récapitulatif des processus biologiques impliquées dans le cycle de l’azote et les facteurs environnementaux associés.....	49
Tableau 1.3-1 Comparaison du dimensionnement et des performances d’abattement des polluants pour les systèmes végétalisés classiques, hybrides ou optimisés.....	56
Tableau 1.4-1 Référencement des différentes variantes du système AZOE, leur objectif de traitement, ainsi que leur occurrence.....	60
Tableau 1.4-2 Equations usuelles de l’abattement du carbone et de l’ammonium sur un lit bactérien (Henrich and Marggraff, 2013). .....	63
Tableau 2.1-1 Caractéristiques des stations de traitement des eaux usées domestiques de la campagne de prélèvement de Février 2019.....	68
Tableau 2.2-1Caractéristiques techniques et de dimensionnement du pilote de la Feysine de type AZOE-N.....	73
Tableau 2.2-2 Méthodes de prélèvement pour chaque point du pilote.....	76
Tableau 2.3-1 Protocole, appareillage et références des analyses.....	77
Tableau 3.1-1 Overview on the VF TW treatment plants selected for the study.....	99
Tableau 3.2-1 Mean values (in bold) and standard deviations (in italics) of the parameters monitored in the wastewater at different levels of the treatment line in autumn and spring respectively. (COD = Chemical Oxygen Demand; TOC = Total Organic Content; TKN = Total Kjeldahl Nitrogen; TSS = Total Suspended Solids.).....	127
Tableau 3.4-1 : Average removal rates observed in the pilot system over the 45 days of operation under conventional operating mode.....	179
Tableau 3.4-2 : Average Input / output CODd, N-NH <sub>4</sub> and TN concentrations and corresponding removal rates recorded in the pilot-scale systems operated under conventional conditions as compared to step-feeding conditions with bypass flows of 10 or 20% of the feed volumetric flow.....	186

## LISTE DE FIGURES

---

Figure 1.1-1 : Historique de la réglementation européenne et nationale sur le traitement collectif des eaux usées domestiques .....	31
Figure 1.1-2 : Cartographie des zones sensibles en France métropolitaine (hors Corse). .....	32
Figure 1.1-3 : Proportion des systèmes de traitement des petites collectivités en France (inférieur à 4000 EH) en nombre de station (gauche) et fréquence cumulée de l'installation de système filtres plantés de roseaux au cours des dernières décennies (droite). Données 2021 issues du ministère du développement durable. ....	33
Figure 1.2-1 : Représentation des eaux usées brutes en milieu rural. (Basé sur les données de : Zawilski et Brzezińska, 2008, El-Sheikh et al., 2016).....	34
Figure 1.2-2 : Diagramme des réductions successives nécessaires à la dénitrification classique hétérotrophe complète, avec les enzymes et gènes associés .....	42
Figure 1.2-3 : Schéma des voies métaboliques de l'azote dans un système végétalisé. Fortement inspiré et adapté de l'excellente figure de Hallin et al., 2018.....	46
Figure 1.2-4 : Illustration des limites planétaires (dont le flux biogéochimique de l'azote) telles qu'actualisé par Steffen et al., 2017.....	47
Figure 1.3-1 : Schéma d'un filtre planté de roseaux à écoulement hydraulique horizontal (Crédits Schéma : E. Bon) .....	51
Figure 1.3-2 : Schéma d'un filtre planté de roseaux à écoulement hydraulique vertical. (Crédits schéma : E. Bon) .....	52
Figure 1.4-1 : Photographie aérienne d'une station AZOE dans la commune de CIEL (Crédits photo : B. Cédât).....	57
Figure 1.4-2 : Nombre de station répartie par tranche d'EH (A) et évolution du nombre de station Azoé au cours du temps (B). Données SCIRPE. ....	58
Figure 1.4-3 : Carte de la répartition géographique du procédé AZOE différencié par type en France métropolitaine.....	59
Figure 1.4-4 :Synoptique de la filière AZOE-NP .....	61
Figure 1.4-5 : Schéma d'un lit bactérien en coupe .....	62
Figure 1.4-6 : Elimination de l'azote par filtres plantés de roseaux à écoulement vertical et immersion partielle (Kim, 2014) .....	64
Figure 2.2-1 : IMAGE aérienne du site de la station de la Feyssine et du hall de recherche. ...	69
Figure 2.2-2 : Photographies de la serre, des pilotes et du laboratoire d'analyse du hall expérimental de la Feyssine.....	70

Figure 2.2-3 : Schéma du pilote de la Feyssine de type AZOE-N .....	71
Figure 2.2-4 : Phases d'alimentation et de repos du lit bactérien et des deux étages de filtration de l'installation pilote pour une semaine type .....	75
Figure 2.3-1 :Concentrations en ammoniums et nitrates dans la solution mère et après passage sur les résines échangeuses d'ions. Les barres d'erreur représentent les écarts-types des répliqués réalisés. ....	80
Figure 2.3-2 : Photographie du montage utilisée pour réaliser les séparations, ici sur résine Onguard II Na. Les échantillons traités sont recueillis dans les erlenmeyers à droite. ....	81
Figure 2.4-1 : Schéma du montage de la carotte et de son fourreau en place dans le massif filtrant (ici sur le premier étage du pilote) .....	82
Figure 2.4-2 : A gauche, photographie de la carotte interne après ouverture le 28 avril 2021. A droite, photographie des flacons Plasma après division de la carotte en horizons. ....	83
Figure 3.1-1 : Schematic description of the classical French VFTW system and the AZOE systems .....	98
Figure 3.1-2 : Distribution of pH and COD, BOD5, TSS, TKN, and ammonium concentrations in influent wastewaters from the whole data set of all monitoring campaigns .....	102
Figure 3.1-3 :Comparative Input / Output (I/O) removal rates of COD, BOD5, TSS, TKN and TN in the Classical French (red), 1-stage AZOE (blue) and 2-stage AZOE (yellow) systems. For each system, middle lines within boxplot are median values. Dot colour represents the water temperature (°C). ....	104
Figure 3.1-4 :COD and TKN removal rates of the total system, TU1 and TU2 for classical, 1-stage AZOE and 2-stage AZOE configurations. See Figure 3.1-1 for definitions of TU1 and TU2. Bars represent the standard deviation.....	106
Figure 3.1-5 : Removal efficiencies of BOD5, COD, TKN and NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> of the 2-stage AZOE system on a mass load basis. Blue and pink circles show the respective contributions of TU1 and TU2. See fig. 1 for TU definitions.....	108
Figure 3.1-6 : Conceptual framework of carbon and nitrogen removal pathways on 2-stages AZOE.....	110
Figure 3.2-1 :Set-up of experimental pilot-scale AZOE system of 6-person equivalent in the Feyssine experimental hall.....	123
Figure 3.2-2 :Top - Raw wastewater concentration for carbon, nitrogen and particular parameters represented for both sessions (black line represents the median value). Bottom: wastewater temperature recorded at inlet of the system during spring and autumn sampling sessions. ....	126
Figure 3.2-3 : Input/output overall removal rates of various parameters recorded on the pilot-scale AZOE system in autumn and spring. ....	129

Figure 3.2-4 : Input/output daily performances of various parameters achieved in the aerobic trickling filter alone.....	130
Figure 3.2-5 :Respective contributions of the successive steps of treatment in the pilot-scale system in autumn (top) and spring (bottom).....	132
Figure 3.2-6 :Average (bold black lines), min and max data (thin lines) of weekly online monitoring of nitrates (top), ammonium (middle) and nitrates + ammonium concentrations (bottom, in blue and red ink, respectively) at the outlets of first-stage filter (left) and second-stage filter (right) during the autumn period.....	133
Figure 3.2-7 :Average (bold black lines), min and max data (thin lines) of weekly online monitoring of nitrates (top), ammonium (middle) and nitrates + ammonium concentrations (bottom, in blue and red ink, respectively) at the outlets of first-stage filter (left) and second-stage filter (right) during the spring period .....	134
Figure 3.2-8 : Online monitoring of ORP within the saturated zone (depth 5 cm) of first-stage filter (top) and second-stage filter (bottom) for autumn (solid brown) and spring (dashed green) sessions during the successive feed (white background) and rest (grey background) phases in the spring period. Data are expressed with the hydrogen standard electrode correction.....	136
Figure 3.2-9 :Carbon/nitrates ratio and denitrification performances one the first (green dots) and second (yellow dots) stages of filtration. ....	138
Figure 3.2-10 :Schematic representation of the behaviour of dissolved nitrogen on this pilot .....	139
Figure 3.3-1 :Pilot scale characteristics of an AZOE system designed for 6 persons equivalent (Maciejewski et al., 2022b) .....	147
Figure 3.3-2 :Diagram of the sampling protocol, sample preparation on ion exchange columns and isotope analysis during labelled ammonium tracing.....	151
Figure 3.3-3 : Mean concentration at various sampling point on the pilot with standard deviation from punctual sampling during the isotopic tracking .....	153
Figure 3.3-4 :Ammonium and nitrates measurements during the feeding period of the isotopic tracking at the outlet of the first stage (above) and second stage (below). Vertical dashed lines show the batch feeding dynamic every two hours.....	154
Figure 3.3-5 :AminoG acid tracking recovery (left) and concentration measurements (right) of partially saturated first and second filtration stages in a vertical flow treatment wetland at pilot scale.....	156
Figure 3.3-6 :Isotopic measurement of $^{15}\text{N}$ abundance on the total nitrogen at the TF, first stage and second stage outlet versus time after the system has been fed with the zero labelled batch. ....	157

Figure 3.3-7 :: Isotopic measurement of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ in ammonium and nitrates at the TF, first stage and second stage outlet versus time after the system has been fed with the zero labelled batch Isotopic ratios. ....	159
Figure 3.4-1 : Pilot-scale characteristics and experiments set-up AZOE system is composed of a trickling filter and two partially saturated constructed wetlands.....	175
Figure 3.4-2 : Daily pollutants concentrations measured along the AZOE-N pilot process line in a conventional operating mode.....	180
Figure 3.4-3 : Nitrification Enzyme Activity (NEA) and Denitrification Enzyme Activity (DEA) in the first (above) and second (below). Displayed errors bars are analytics errors. ....	184
Figure 3.4-4 : Treated and applied $\text{NH}_4^+$ and $\text{NO}_3^-$ load on the second stage of filtration in conventional operating mode (blue triangles) and with 10% (yellow dots) or 20% step-feeding ratios (green squares). ....	187
Figure 3.4-5 : Depth profiles of denitrification potentials in the second TW filter stage under conventional vs step-feeding conditions with 20% bypass flow.....	188
Figure 3.4-6 : Depth profiles of microbial denitrification potentials expressed in $\mu\text{g N-N}_2$ or $\text{N-N}_2\text{O}$ per g of stage medium as recorded in the first stage filter and the second stage filter under conventional or step-feeding conditions with 20% bypass flow. ....	190
Figure 3.5-1 : Photographie des matériaux utilisés (sauf boues) après broyage. De gauche à droite et de haut en bas : paillis de chanvre, rafles de maïs, roseaux frais, pailles, roseaux d'hiver et BRF. ....	203
Figure 3.5-2 : Masse de carbone organique total cumulée et normalisée par gramme de matériau en fonction de l'évolution du rapport liquide/solide. ....	207
Figure 3.5-3 : Masse de d'azote Kjeldahl cumulée et normalisée par gramme de matériau en fonction de l'évolution du rapport liquide/solide.....	208
Figure 3.5-4 : Rapports moyens de COT/NTK dans les lixiviats du test de lixiviation pour les 7 matériaux testés. ....	209
Figure 4.2-1 : Schéma conceptuel des mécanismes de traitement en carbone, azote et phosphore en fonction de l'avancée du traitement sur la filière AZOE. ....	219

# INTRODUCTION

---

L'utilisation de filtres plantés de roseaux pour l'assainissement des eaux usées domestiques et agricoles en milieu rural a connu un essor important ces 30 dernières années. A ce jour, plus de 5000 stations sont installées en France. Les coûts d'installation et d'exploitation mesurés, la relative autonomie de fonctionnement, la bonne intégration paysagère, la robustesse des systèmes et les performances de traitement sont parmi les raisons du succès de ces procédés de traitement. La grande majorité des systèmes en France sont conçus sur la base de deux étages de filtration successifs remplis de matériaux filtrants et plantés en leur surface par des macrophytes, généralement *Phragmites australis*. Le sens d'écoulement hydraulique est vertical et l'eau à traiter s'écoule librement dans un massif filtrant non-saturé. Cette configuration classique porte le nom de « système français » et est très bien adaptée à la rétention de la matière particulaire, à la minéralisation de la matière organique et à la nitrification de l'ammonium (Molle et al., 2005 ; Paing et Voisin, 2005).

Les filtres plantés de roseaux connaissent désormais une nouvelle phase de développement dont les objectifs sont d'optimiser le traitement des eaux usées sur les paramètres du phosphore et de l'azote total, et de réduire l'emprise au sol globale des stations de traitement. Cette évolution doit néanmoins conserver les qualités de robustesse et les coûts abordables de la filière. Sur la base du système classique, de nouvelles variantes ont été développées notamment avec l'immersion partielle des filtres pour favoriser des conditions de dénitrification. Parmi elles on distingue également des procédés intégrant en complément la circulation de l'effluent sur un lit bactérien (Kim et al., 2014 ; Stefanakis et al., 2021) et plus récemment des systèmes à aération passive ou forcée (Foladori et al., 2013).

Le procédé étudié dans ces travaux de thèse est composé de deux étages successifs de filtration auxquels s'ajoute l'utilisation d'un lit bactérien aérobie en tête de station apportant dans des conditions d'aération passive une forte minéralisation de la charge carbonée, voire la nitrification partielle de l'ammonium (Henrich and Marggraff, 2013), et permettant ainsi de réduire la surface des filtres plantés et ainsi de limiter l'empreinte au sol des stations. Ce système, connu sous le nom de AZOE<sup>®</sup>, présente une gamme de variantes sur cette base. Il a



été développé par l'entreprise SCIRPE et couvert par plusieurs brevets (FR2900921A1 ; EP1857419A1 ; WO201215026A2). Il conserve le fonctionnement global du système français classique avec ses deux étages de filtration à écoulement hydraulique vertical offrant une large surface de filtration et permettant le développement d'une couche de boues sur le premier étage (Kania et al., 2019). Au besoin une variante AZOE-P® est proposée pour le traitement du phosphore par l'ajout de chlorure ferrique après traitement sur lit bactérien (Kim et al., 2015). Enfin la variante AZOE-N® propose une immersion partielle du fond des filtres favorisant des conditions d'anoxie et assurant le traitement de l'azote total.

L'un des objectifs prioritaires de ces solutions de traitement est de diminuer les rejets d'azote largement présents dans les eaux usées sous forme d'ammonium et d'azote organique. Le cycle de l'azote s'avère relativement complexe. D'une part car cet élément peut prendre de nombreuses formes, liquide ou gazeuse, et d'autre part car il existe de nombreuses voies physiques et biologiques permettant de passer d'une forme à une autre. Outre la contribution aux phénomènes d'eutrophisation notamment à travers le rejet possible de nitrates, une attention de plus en plus importante est portée aux formes d'azote émises sous forme gazeuse en raison du fort pouvoir de réchauffement global du protoxyde d'azote  $N_2O$ . Plus globalement, la gestion du flux biogéochimique de l'azote a été établie comme l'une des limites planétaires par Rockström et al. (2009). Cette limite est considérée aujourd'hui comme dépassée (Rockstrom et al., 2015). L'état des eaux douces est également une des limites planétaires, dont des auteurs viennent de mettre en évidence également un dépassement.

En raison de la présence d'azote en forte quantités dans les eaux usées domestiques, les enjeux sont de taille pour les filières de traitement des eaux. L'assainissement de l'azote issu d'effluents domestiques consiste principalement en la transformation biologique de l'azote organique et ammoniacal en nitrates, puis des nitrates en azote gazeux sous la forme  $N_2$  (ou, plus marginalement et selon les conditions opératoires, en  $N_2O$ )

Les objectifs de cette thèse sont (i) de mieux comprendre les processus impliqués dans le traitement de l'azote et (2) de rechercher les modes opératoires pouvant améliorer lorsque nécessaire le traitement de l'azote total sur la filière AZOE®. L'approche suivie est pluridisciplinaire, mobilisant des techniques physico-chimiques, microbiologiques et chimiques (isotopiques) qui se sont nourries de deux collaborations scientifiques avec des laboratoires extérieurs. Ces approches ont permis d'investiguer le système d'étude sous des prismes

complémentaires et de croiser les informations pour en affiner notre connaissance. Le fil conducteur de ces travaux était de mieux maîtriser l'épuration de l'azote afin d'être en capacité d'adapter les projets futurs en améliorant les performances épuratoires pour répondre aux critères de rejets en zones sensibles et d'évolution des réglementations. Dans un contexte de croissance de réutilisation des eaux traitées, cette étude doit aussi pouvoir donner des éléments de réponse pour permettre des rejets maîtrisés de formes d'azote adaptées pour les usages. Les résultats de ces travaux doivent permettre d'accompagner la filière à mieux répondre aux enjeux environnementaux actuels.

Ce manuscrit est constitué de quatre chapitres classiques : une synthèse bibliographique, un chapitre « matériels et méthodes », un chapitre « résultats et discussion » suivi d'une discussion générale de conclusion.

Tout d'abord sous la forme d'un premier article un ensemble de données à l'échelle terrain d'installations en fonctionnement sont présentés. Par un bilan complet sur 29 stations, ce travail permet un état des lieux des fonctionnements globaux des différents systèmes (procédés classiques, procédés AZOE à 2 étages, et à un unique étage pour la première fois). Cela permet de comparer les systèmes, notamment en termes de performance, et d'identifier des premières limites et donc les leviers à lever.

Dans un second article, l'ensemble de la filière AZOE-N (lit bactérien et les deux étages de filtres plantés) a été reproduite à l'échelle pilote et fait l'objet d'un suivi particulier pour mieux identifier le fonctionnement global et plus notamment le rôle de chaque compartiment dans le traitement du carbone et de l'azote. Les objectifs étaient notamment de mieux comprendre la contribution de chaque unité dans la performance des systèmes et les limites rencontrées.

Dans un troisième article, la dynamique des systèmes AZOE-N à l'échelle d'une période d'alimentation a été étudiée en proposant une approche combinée d'analyses physico-chimiques, notamment en continu, couplée à des mesures de traçage hydraulique et de traçage isotopique à l'ammonium marqué  $^{15}\text{N}$ . Outre l'apport de connaissances sur le système, ce travail avait pour objectif de développer une méthodologie d'investigation isotopique adaptée aux particularités de ces procédés.

Ces trois premiers articles suggèrent que la relation carbone/azote est au cœur des possibilités d'optimisation du procédé. Les deux derniers articles traitent alors directement de la manière de contrôler la dénitrification en gérant les carences en carbone. Deux aspects ont été envisagés à différentes échelles d'investigation : la dérivation de 10 ou 20 % des effluents bruts tout d'abord, appelé le step-feeding, évaluée à l'échelle pilote et l'ajout de matériaux biosourcés à l'échelle de laboratoire.

Un quatrième article de suivi de la filière AZOE-N à l'échelle pilote avec l'utilisation de step-feeding a été comparé aux résultats sans la dérivation de l'effluent. La particularité de ce travail est de proposer une approche microbiologique via la mesure de l'activité enzymatique de nitrification et dénitrification avant et après utilisation du step-feeding. Une cartographie fine des deux étages de traitement sur toute la profondeur est réalisée et permet de mieux décrire les potentialités de traitement.

Enfin dans un 5<sup>ème</sup> article, 7 matériaux biosourcés ont été choisis et testés à l'échelle du laboratoire afin de déterminer leur potentiel d'apport de carbone organique. L'objectif était d'identifier les meilleurs matériaux disponibles pour pallier aux carences en carbone dans certaines unités de traitement, tout en garantissant un ajout d'azote limité. La partie mise en œuvre n'a pas été présentée dans ce travail.

L'ensemble des résultats est discuté dans un dernier chapitre de discussion générale qui se termine sur les perspectives associées à ces travaux.

# CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---



## 1.1 EAUX USEES DOMESTIQUES EN FRANCE

### 1.1.1 CARACTÉRISATION DES EAUX USÉES DOMESTIQUES

Le terme « eaux usées » désigne l'ensemble des effluents aqueux rejetés par les activités humaines domestiques, agricoles ou industrielles. Quelle que soit l'activité qui génère ces effluents, leurs caractéristiques imposent généralement qu'ils soient traités avant rejet dans le milieu récepteur afin de minimiser leurs impacts. Les eaux usées domestiques, générées par les ménages, sont composées d'eaux vannes issues des toilettes avec une importante fraction particulaire et d'eaux grises issues des cuisines et salles de bain qui contiennent notamment des détergents, savons et lessives. Leurs caractéristiques dépendent des pratiques et habitudes de vie des habitants. On constate cependant que les eaux-usées domestiques rurales présentent des caractéristiques similaires (Mercoiret, 2009) dont les valeurs moyennes sont présentées dans le tableau 1.1-1. La nature des polluants qu'elles renferment est semblable, ainsi que les proportions entre ces polluants. Les paramètres usuels pour décrire la composition des eaux usées domestiques sont :

**Demande Chimique en Oxygène (DCO) :** Mesure la quantité de dioxygène consommée pour oxyder les espèces organiques et minérales présentes dans un volume unitaire de l'effluent considéré, que ces espèces soient biodégradables ou non. La DCO s'exprime en  $\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$ .

**Demande Biologique en Oxygène sur 5 jours (DBO<sub>5</sub>) :** Mesure la quantité de dioxygène consommée en 5 jours à 20°C pour dégrader microbiologiquement la charge organique biodégradable. La DBO<sub>5</sub> s'exprime en  $\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$ .

**Matière En Suspension (MES) :** Désigne la fraction particulaire insoluble des eaux usées. Les MES s'exprime en  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$ .

**Azote ammoniacal ou ion ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) :** Désigne la forme la plus réduite de l'azote, qui se partage en ammoniac (NH<sub>3</sub>) et ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) en fonction du pH d'effluent. L'azote ammoniacal s'exprime en  $\text{mg N}.\text{L}^{-1}$ .

**Azote Kjeldahl (TKN) :** Désigne l'ensemble des formes réduites de l'azote, c'est-à-dire l'azote organique, l'ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et l'ammoniac (NH<sub>3</sub>). Le TKN s'exprime en  $\text{mg de N}.\text{L}^{-1}$ .

**Azote nitrique (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) :** Désigne la forme la plus oxydée de l'azote, les nitrates. La concentration en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> s'exprime en  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$  ou en  $\text{mg N}.\text{L}^{-1}$

**Azote Total (TN) :** Désigne l'azote sous toutes ses formes organiques et minérales dans l'effluent. L'azote total est la somme de l'azote Kjeldahl, des nitrates et des nitrites, et s'exprime en mg N.L<sup>-1</sup>.

**Phosphore Total (Pt) :** Désigne le phosphore sous toutes ses formes dans l'effluent analysé. Le Ptot s'exprime en mg P.L<sup>-1</sup>.

**TABEAU 1.1-1 CARACTERISTIQUES MOYENNES DES EAUX USEES DOMESTIQUES EN MILIEU RURAL EN PETITES COLLECTIVITES (INFERIEURES A 2000 EQUIVALENT HABITANTS). D'APRES LES DONNEES DE MERCOIRET, 2009.**

	DBO <sub>5</sub>	DCO	MES	TKN	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	TN	Ptot	DBO <sub>5</sub> /TN
Unités	mg.L <sup>-1</sup>	mg.L <sup>-1</sup>	mg.L <sup>-1</sup>	mg.L <sup>-1</sup>	mg.L <sup>-1</sup>	mg.L <sup>-1</sup>	mg.L <sup>-1</sup>	
<b>Moyenne</b>	<b>265,0</b>	<b>645,7</b>	<b>288,1</b>	<b>67,3</b>	<b>54,9</b>	<b>72,6</b>	<b>9,4</b>	<b>3,9</b>
Borne supérieure	570,0	1341,3	696,0	123,1	98,3	122,6	18,4	
Borne inférieure	39,0	122,0	53,0	14,1	12,0	20,2	2,0	

Enfin, il convient d'introduire la notion d'équivalent habitant (EH) très utilisée dans le domaine du traitement des eaux usées. Il s'agit d'une unité de mesure qui représente la pollution émise par une personne et par jour, et qui permet d'évaluer la capacité de traitement d'une station d'épuration. A titre d'exemple, 1 EH équivaut à 60g de DBO<sub>5</sub>/jour.

### 1.1.2 CADRE RÉGLEMENTAIRE

L'assainissement collectif en France est soumis au droit européen et national. A ce jour, le dernier arrêté paru sur l'assainissement collectif des eaux usées est l'arrêté du 31 Juillet 2021. Cet arrêté est la dernière version d'une série de mises à jour de l'arrêté du 22 Juin 2007 qui abrogea de précédents textes. La chronologie de la réglementation est représentée par la figure 1.1-1.

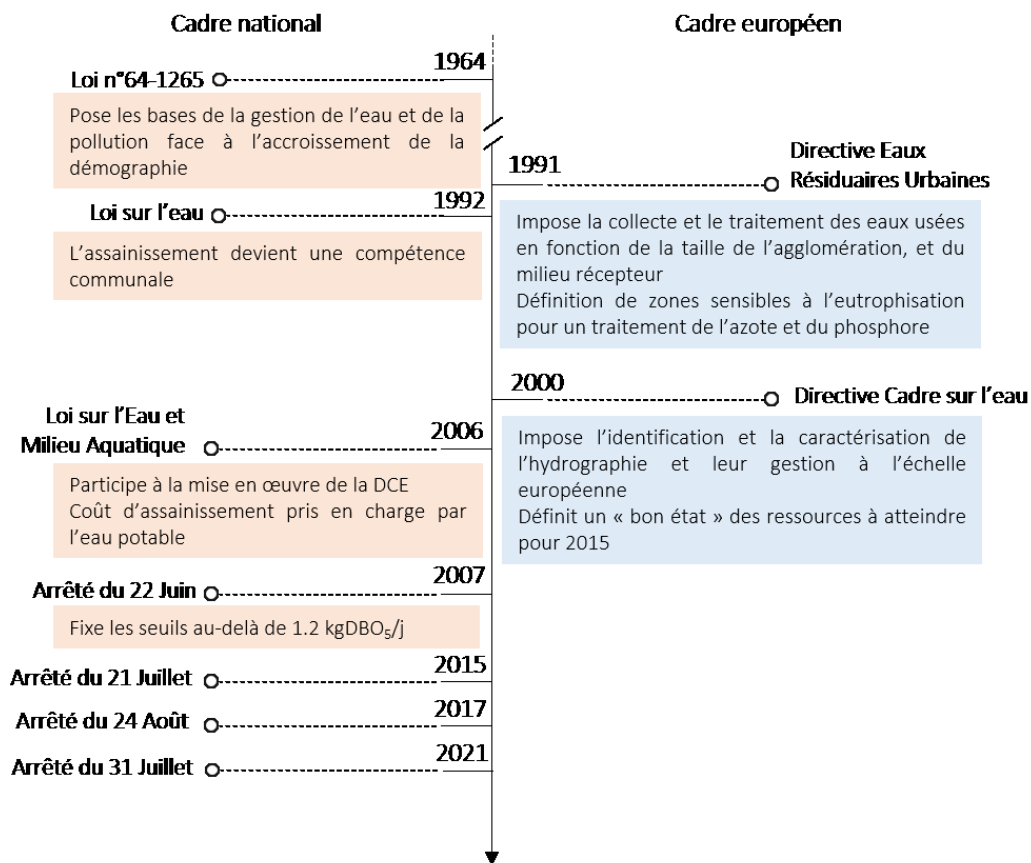


FIGURE 1.1-1 : HISTORIQUE DE LA REGLEMENTATION EUROPEENNE ET NATIONALE SUR LE TRAITEMENT COLLECTIF DES EAUX USEES DOMESTIQUES

La réglementation fixe les garanties de rejets en termes de performances ou de concentrations maximales de polluants dans l'effluent traité. Les seuils de rejet sont également fonction de la capacité de la station d'épuration (débit des rejets) et du milieu récepteur (zones sensibles ou non). La figure 1.1-2 représente les secteurs hydrographiques définis ou non comme zones sensibles à l'eutrophisation et s'il est ainsi question d'un traitement plus rigoureux de l'azote et du phosphore.

Les seuils limites de rejet à respecter dépendent de la taille de l'unité de traitement

- Capacité inférieure à 2000 EH : DBO<sub>5</sub> = 35 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> ou 60% ; COD = 200 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> ou 60 % ; MES = 50%
- Capacité supérieure à 2000 EH : DBO<sub>5</sub> = 25 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> ou 80% ; COD = 125 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> ou 75 % ; MES = 35 mg. L<sup>-1</sup> ou 90 %



Seules les stations d'épuration d'une capacité supérieure à 10000 EH sont théoriquement soumises à un traitement sur l'azote et le phosphore, en plus des garanties à atteindre sur le COD, DBO5 et MES d'une capacité supérieure à 2000 EH.

- Capacité supérieure à 10 000 EH : Azote Total = 15 mg.l ou 70 %, Phosphore Total = 2 mg.l ou 80 %
- Capacité supérieure à 100 000 EH : Azote Total = 10 mg.l ou 70 %, Phosphore Total = 1 mg.l ou 80 %

Depuis 2020, la réutilisation des eaux traitées est encadrée par un texte européen du 25 mai 2020.

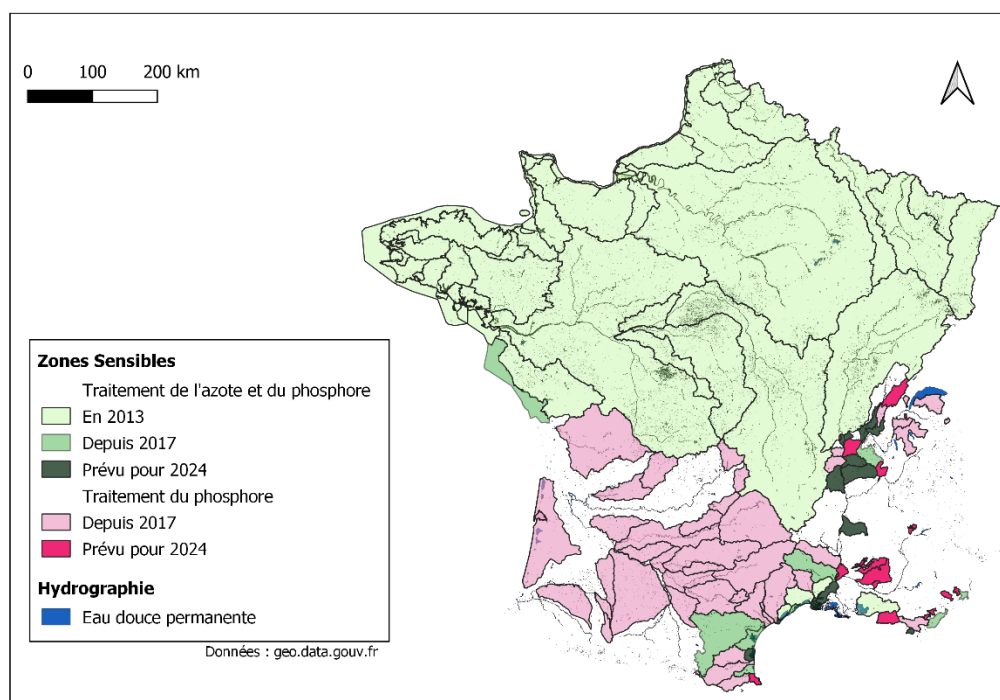


FIGURE 1.1-2 : CARTOGRAPHIE DES ZONES SENSIBLES EN FRANCE METROPOLITAINE (HORS CORSE).

### 1.1.3 LES PROCÉDÉS D'ÉPURATION EN FRANCE

D'une manière générale, ces procédés visent à réduire la charge en carbone, azote et phosphore des eaux usées afin d'atténuer notamment le risque d'eutrophisation du milieu récepteur. De plus, plutôt qu'un retour direct au milieu naturel en rejetant les eaux traitées dans un cours d'eau ou par infiltration, leur valorisation en les réutilisant pour l'agriculture est aussi largement étudiée (Haruvy N., 1997 ; Kivaisi A., 2001).

Les procédés de traitement sont nombreux et possèdent tous des avantages et inconvénients qui leur sont propres, et les rendent plus ou moins adaptés au type d'effluent à traiter. Les critères retenus pour le choix d'un système sont généralement les coûts d'investissement et d'exploitation, les performances de traitement, l'intégration paysagère, l'emprise au sol.

Les stations de traitement des effluents domestiques en petites collectivités (taille inférieure à 4000 EH) représentent 88,2 % du nombre total de stations installées en France. Parmi celles-ci les systèmes les plus fréquemment utilisés sont les boues activées (31,4% des stations), les filtres plantés de roseaux (22,6%) et les lagunes bien qu'elles tendent à être remplacées par d'autres systèmes plus performants (19,7%).

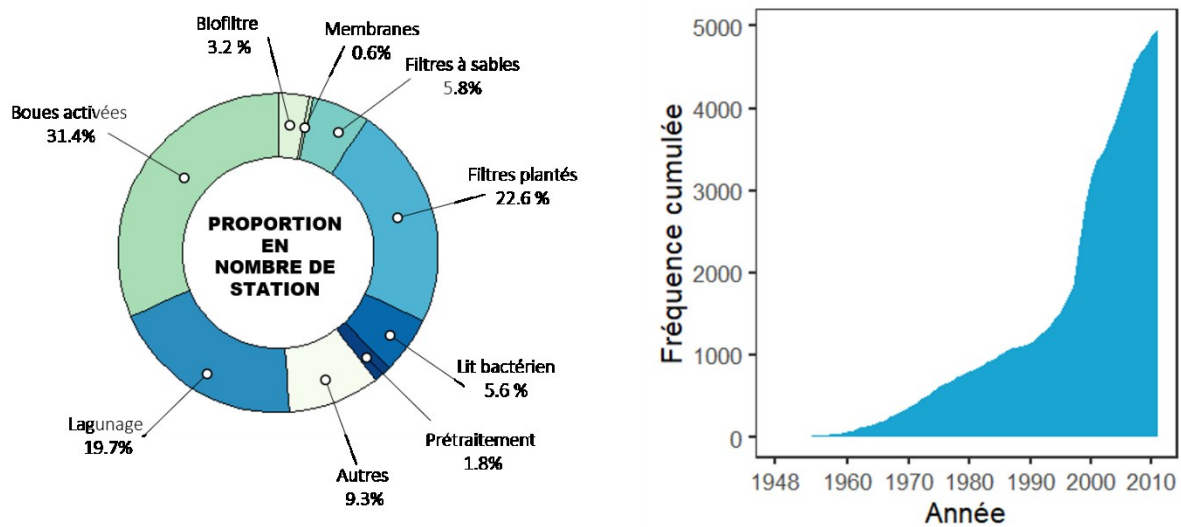


FIGURE 1.1-3 : PROPORTION DES SYSTEMES DE TRAITEMENT DES PETITES COLLECTIVITES EN FRANCE (INFERIEUR A 4000 EH) EN NOMBRE DE STATION (GAUCHE) ET FREQUENCE CUMULEE DE L'INSTALLATION DE SYSTEME FILTRES PLANTES DE ROSEAUX AU COURS DES DERNIERES DECENNIES (DROITE). DONNEES 2021 ISSUES DU MINISTERE DU DEVELOPPEMENT DURABLE.

## 1.2 L'AZOTE DANS LES EAUX USEES

### 1.2.1 L'AZOTE DANS LES EAUX USEES DOMESTIQUES

L'azote des eaux usées est d'origine humaine via les fèces et l'urine. Dans les urines elles-mêmes, 75% du N est sous la forme d'urée ou d'acide urique (Henze, 1992). Dans les fèces, l'azote organique est présent dans une grande variété de composés tels que les acides aminés, les pyrimidines, et les purines (Kadlec and Wallace, 2009). L'urée est rapidement hydrolysée sous l'action microbienne à pH neutre, ce qui explique la teneur importante d'azote sous la forme ammoniacale dans les eaux usées domestiques rurales et urbaines lorsqu'elles parviennent à la station de traitement. La part d'azote ammoniacal en entrée de stations de traitement a été estimée à 60% (Kadlec and Wallace, 2009) ou 70% (Zawilski et Brzezińska, 2008).

Il est généralement considéré que l'azote des eaux usées brutes en entrée de station et après avoir transité par les réseaux d'assainissement est principalement sous formes ammoniacale (de l'ordre de 70 %) et organiques (de l'ordre de 30 %) sans plus de précision, ce qui correspond à l'azote Kjeldahl. Toutefois, certains auteurs se sont intéressés à compartimenter et quantifier les différentes formes de l'azote organique, généralement dans un objectif de modélisation (Zawilski et Brzezińska, 2008, El-Sheikh et al., 2016). La figure 1.2-1 représente la composition moyenne des formes azotées des eaux usées brutes en milieu rural.

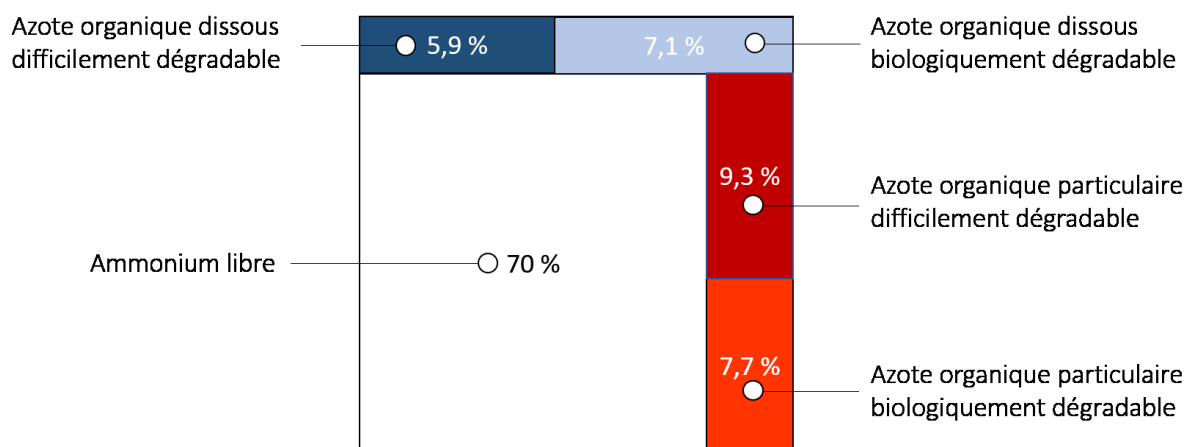


FIGURE 1.2-1 : REPRESENTATION DES EAUX USEES BRUTES EN MILIEU RURAL. (BASE SUR LES DONNEES DE : ZAWILSKI ET BRZEZINSKA, 2008, EL-SHEIKH ET AL., 2016)

## 1.2.2 CYCLE CLASSIQUE DE L'AZOTE DANS LES EAUX USEES ET LEURS TRAITEMENTS

### 1.2.3 AMMONIFICATION

L'ammonification est la conversion de l'azote organique en ammonium. Elle est le résultat d'une série d'étapes de transformation réalisée par des micro-organismes qui en tirent de l'énergie. C'est donc l'une des premières transformations que subit l'azote dans les eaux usées, dont la presque totalité de l'azote organique est considérée comme convertible en azote ammoniacal (Kadlec and Knight, 1996).

L'ammonification est rapide et est favorisée par la température croissante (Amlinger et al., 2003 ; Lee et al., 2009). Le pH optimal de l'ammonification se situe entre 6,5 et 8,5 (Saeed and Sun, 2012). D'une manière générale, l'ammonification ne pose pas de contraintes particulières pour le traitement des eaux usées de par sa cinétique rapide.

#### Volatilisation de l'azote ammoniacal :

L'azote ammoniacal se distribue en fonction du pH et de la température entre ses formes ionisées  $\text{NH}_4^+$  (ion ammonium, soluble et peu volatil) et non-ionisée  $\text{NH}_3$  (ammoniac très volatil) (Kadlec and Wallace, 1996). Le  $\text{pK}_a$  de cet équilibre est égal à 9,2, indiquant donc que la forme ionisée est majoritaire à 99% à pH neutre. La forte prédominance des ions ammonium dans les eaux usées s'explique donc par leur pH neutre et leur température moyenne (15 à 25°C). Dans de telles conditions la perte d'azote par volatilisation de l'ammoniac est considérée comme faible (Vymazal, 2007).

### 1.2.4 NITRIFICATION

La nitrification est l'oxydation biologique de l'ammonium en nitrates. Elle s'effectue en conditions aérobies en deux étapes successives réalisées par des micro-organismes chimiolithotrophes. La première étape nommée nitritation est la conversion de l'ammonium en nitrite par des bactéries autotrophes (AOB : Ammonium Oxydizing Bacteria) et des archées (AOA : Ammonium Oxydizing Archea) qui tirent de cette transformation l'énergie nécessaire pour leur croissance, et utilisent le carbone inorganique pour synthétiser leur matériel cellulaire. La seconde étape, nommée la nitratation, est l'oxydation bactérienne des nitrites en nitrates (NOB : Nitrites Oxydizing Bacteria) (Cáceres et al., 2018).

#### 1.2.4.1 MICROBIOLOGIE DE LA NITRIFICATION

##### Première étape : oxydation de l'ammonium par les AOB et AOA

Lors de l'oxydation de l'ammonium en nitrites par les AOB, l'ammonium est premièrement oxydé en hydroxylamine (NH<sub>2</sub>OH) via la synthèse de l'enzyme ammonia monooxygénase (AMO) codée par le gène amoA qui est la séquence génétique permettant d'identifier la présence de nitrifiants dans un sol. L'hydroxylamine est ensuite oxydée en nitrites via l'enzyme l'HydroxylAmine oxydoréductase (HAO) (Levy-Booth et al., 2014). La nitrification des AOA diffère sensiblement de celle des AOB au regard de la synthèse des protéines impliquées dans le processus, bien que les deux groupes aient en commun le gène amoA (Holmes et al., 2018). Bien que ces deux groupes AOB et AOA soient tous deux présents dans la grande majorité des écosystèmes, la proportion de l'un par rapport à l'autre varie fortement selon les conditions du milieu, notamment le pH et la disponibilité en ammonium. Les AOA sont généralement dominants dans des environnements acides et relativement pauvres en ammonium (Holmes et al., 2018). Les AOB sont donc plutôt majoritaires dans les eaux usées riches en ammonium. Parmi les AOB, les genres principaux sont *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* et *Nitrospira*.

La variation d'enthalpie libre standard à pH 7 de la réaction d'oxydation de l'ammonium en nitrites  $\Delta G^{\circ}$  est de - 275 kJ/mol NH<sub>3</sub> (Daims et al., 2015) :

Equation de réaction (Lee et al., 2009) :



##### Seconde étape : Oxydation des nitrites par les NOB

L'oxydation des nitrites en nitrates est réalisée par des bactéries pour leur besoin énergétique. L'enzyme responsable de ce processus biologique est la nitrite oxydoreductase (NOR) qui a été identifiée chez diverses groupes d'autotrophes, mais aussi parfois chez des hétérotrophes (Ableliovich et al., 2006) Ces bactéries sont retrouvées dans une large diversité d'environnements, parmi lesquels les eaux usées. Parmi les NOB, les genres principaux sont *Nitrobacter*, *Nitrospira* et *Nitrococcus* (Holmes et al., 2018).

Gain d'énergie associé l'oxydation de nitrites en nitrates (Daims et al., 2015) :

$$\Delta G^{\circ} = - 74 \text{ kJ/mol NO}_2$$

Equation de réaction (Lee et al., 2009) :

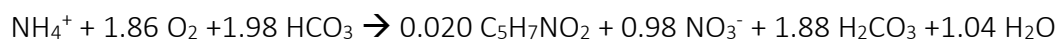


### Réaction globale de Nitrification

La nitrification dans sa globalité comprend classiquement deux étapes d'oxydation successives par les AOB/AOA et par les NOB et suggère donc que pour parvenir à une nitrification complète ces deux groupes cohabitent dans le même environnement et qu'ils puissent s'exprimer. D'une manière générale, la nitrification nécessite un environnement aéré puisque l'oxygène est utilisé comme accepteur final d'électrons. Sur la base des équations des deux étapes d'oxydation précédentes, l'équation globale de la nitrification devient (Vymazal, 2007) :



La nitrification est réalisée en large part par des micro-organismes autotrophes qui utilisent les carbonates pour leur croissance cellulaire. En prenant en compte cette croissance cellulaire, l'équation globale de la nitrification peut être écrite tel que (Green et al., 1998) :



Le gain d'énergie associé l'oxydation de l'ammonium en nitrates est de  $\Delta G^\circ = - 349 \text{ kJ/mol NH}_3$

#### 1.2.4.2 FACTEURS D'INFLUENCE

La nitrification est influencée par divers facteurs dont les principaux sont : la température, la disponibilité en oxygène, le pH et l'alcalinité (Vymazal, 2007).

#### La température :

La gamme de température optimale de la nitrification varie dans la littérature, mais reste globalement contenu entre 25 et 40 °C (Vymazal, 2007 ; Saeed and Sun, 2012). Il semble aussi que la température optimale dépende du climat et du sol étudiés. De fait, la température optimale dans les milieux tropicaux est généralement supérieure à celle observée dans les climats tempérés (Sharawat, 2008). Toutefois d'une manière générale, les vitesses de

nitrification diminuent dès lors que la température devient supérieure ou inférieure à cette gamme.

#### La disponibilité en oxygène :

La nitrification est un processus biologique très demandeur en oxygène, qui nécessite de 4.2 à 4.5 mgO<sub>2</sub> pour l'oxydation complète en nitrate d'un milligramme d'ammonium (Saeed and Sun, 2012). De plus, la concentration en oxygène dissous n'affecte pas de la même manière les communautés AOB et NOB. Des teneurs limitantes en oxygène dissous favorisent l'accumulation des nitrites (Jianlong and Ming, 2004 ; Millot, 2017). Une concentration en oxygène dissous supérieure à 1,5 mgO<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup> est considérée comme nécessaire pour permettre la nitrification complète.

#### Le pH :

D'une manière générale, les valeurs optimales de pH se situent entre 7.5 et 8.5 (Jiménez et al., 2011 ; Le et al., 2019). Des conditions acides (pH > 5.5) sont généralement considérées comme défavorables à la nitrification (Lee et al., 2009). Ceci s'explique par plusieurs raisons :

- Un pH acide déplace l'équilibre acide/base de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> en faveur NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (pKa = 9.2), ce qui limite la disponibilité du substrat NH<sub>3</sub> pour les communautés nitrifiantes AOB lors de l'oxydation de l'ammoniac en hydroxylamine (De Boer and Kowalchuk, 2001 ; Biesterfeld et al., 2003) ;
- De la même manière, un pH acide déplace l'équilibre acide/base de HNO<sub>2</sub>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (pKa = 3.3) vers la forme HNO<sub>2</sub>. Or, le substrat des communautés NOB s'avère être préférentiellement le NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Jiménez et al., 2011).

Toutefois depuis le début des années 2000, de nouvelles études invitent à élargir notre manière de considérer la nitrification et l'influence du pH pour les autotrophes AOB et NOB. Il a été observé dans des environnements acides (pH ≈ 3) des cinétiques de nitrification égales à celles observées en conditions neutres. Les micro-organismes capables de réaliser la nitrification à pH acide appartiennent aux communautés nitrifiantes hétérotrophes dont la croissance cellulaire n'est pas affectée par le manque de substrat azoté (De Boer and Kowalchuk, 2001), notamment par des AOA qui ont été identifiés comme actifs et bien plus adaptés que les AOB dans ces environnements acides (Li et al., 2018).

#### L'alcalinité :

Les organismes autotrophes sont capables d'utiliser le carbone inorganique dissous pour leur propre croissance cellulaire. Pour l'oxydation d'1 mg d'ammonium, la valeur de la consommation de CaCO<sub>3</sub> (« alcalinité ») varie entre 7.02 mg (Biesterfeld et al., 2003 ; Lee et al., 2009) et 7.14 mg (Saeed and Sun, 2012). Ainsi l'alcalinité de l'eau serait un facteur d'influence important car elle permet :

- De limiter par effet tampon la chute du pH due à la nitrification, et de garantir la disponibilité du substrat pour les microorganismes nitrifiants (AOB et NOB) ;
- De satisfaire les besoins en carbone inorganique pour la croissance cellulaire des autotrophes.

De fait, Biesterfeld et al., (2003) ont proposé une plage de 40 à 45 mg/l de CaCO<sub>3</sub> comme seuil d'alcalinité en dessous duquel les cinétiques de nitrification sont significativement plus faibles.

### 1.2.5 DÉNITRIFICATION HÉTÉROTROPHE

Les nitrates produits par nitrification peuvent être réduits selon deux voies métaboliques principales : en ammonium par DNRA (Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium) ou en diazote par dénitrification. La dénitrification est une forme de respiration réalisée par des micro-organismes hétérotrophes anaérobies facultatifs qui peuvent utiliser les nitrates comme accepteur final d'électrons lorsque l'oxygène dissous n'est pas disponible en quantité suffisante pour la respiration aérobie (Kadlec and Wallace, 2009). La dénitrification totale, en diazote, est le résultat d'une succession de réductions catalysées par 7 enzymes principales (Jones et al., 2008) :



La plupart des micro-organismes dénitrifiants ne possède pas toutes les enzymes indispensables à la réduction totale des nitrates en diazote. La séquence complète de réduction est réalisée par une coopération de bactéries, mais aussi d'archées d'une grande diversité (Holmes et al., 2019).

#### 1.2.5.1 MICROBIOLOGIE DE LA DÉNITRIFICATION HÉTÉROTROPHE

Réduction des NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en NO<sub>2</sub><sup>-</sup> :



Les nitrates sont réduits en nitrites par l'activation de l'enzyme nitrates réductases NAS, NAR et NAP. Les gènes *narG* et *napA* sont généralement ceux recherchés pour les études portant sur cette étape réductive (Levy-Booth et al., 2014)

#### Réduction des NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en NO :

La réduction des nitrites en monoxyde d'azote est une étape fondamentale car l'azote passe d'un état soluble à gazeux. Cette étape est catalysée par deux enzymes, la Cd1 nitrite réductase et la Cu nitrite réductase respectivement codée par les gènes *nirS* et *nirK*. Ces deux enzymes, dont la fonction est identique, diffèrent totalement par leur structure et les bactéries ne possèdent toujours qu'une seule des deux enzymes (Philippot et al., 2007).

Bien qu'encore peu comprise, la réponse aux facteurs environnementaux semble différente selon que les communautés portent le gènes *nirS* ou *nirK* (Wang et al., 2020 ; Sun and Jiang, 2022).

#### Réduction du NO en N<sub>2</sub>O :

La réduction du monoxyde d'azote en protoxyde d'azote est catalysée par deux enzymes différentes : l'oxyde nitrique réductase et la quinol oxyde nitrique réductase, respectivement codées par les gènes *norB* et *qnorB* (Philippot et al., 2007).

#### Réduction du N<sub>2</sub>O en N<sub>2</sub> :

Enfin, la réduction du protoxyde d'azote en diazote est catalysée par l'oxyde nitreux réductase, codée par le gène *nosZ*.

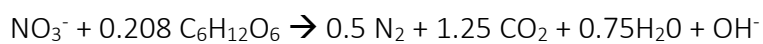
Comme développé ci-dessus, la dénitrification est généralement représentée comme une succession de réductions qui mène à la libération de N<sub>2</sub>. Cette vision est en réalité biaisée car dans de nombreux écosystèmes la dénitrification ne parvient à son terme et il en résulte une libération de l'azote sous forme N<sub>2</sub>O. Le N<sub>2</sub>O est un gaz à effet de serre dont le potentiel de réchauffement est plus de 300 fois supérieur à celui du CO<sub>2</sub>. On estime que les deux tiers des émissions de N<sub>2</sub>O proviennent d'environnements terrestres (Hallin et al., 2018). Dès lors, dans un contexte global de réchauffement climatique, les raisons pour lesquelles la dénitrification demeure incomplète est un sujet d'intérêt majeur et encore trop peu compris.

Philippot et al., (2011) suggère que l'une des raisons de la libération de N<sub>2</sub>O est génétique : Une partie des dénitrifiants ne possèdent tout simplement pas le gène *nosZ* et sont

donc incapables de synthétiser l'enzyme oxyde nitreux réductase permettant la réduction du  $N_2O$  en  $N_2$ . Si ces bactéries agissent comme des producteurs de  $N_2O$ , il existe d'autres communautés qui ne sont dotées que de *nosZ* et agissent comme un puit de  $N_2O$  qu'elles réduisent en  $N_2$  (Domeignoz-Horta et al., 2017). Toutefois, la réponse de ces groupes aux paramètres environnementaux est très peu comprise. Domeignoz-Horta et al., (2017) ont ainsi mis en évidence que la nature même du sol joue un rôle important sur l'équilibre entre producteurs et réducteurs de  $N_2O$ . En outre, un pH acide et une température froide auront tendance à augmenter le rapport  $N_2O : N_2$  (Simek and Cooper, 2002 ; Philippot et al., 2007 ; Philippot et al., 2011), ainsi que la présence d'oxygène dissous en station de traitement (Tallec et al., 2008, Glass et al., 2012), ou encore la faible disponibilité du carbone organique (Chen et al., 2019). En conclusion, il n'existe pas de consensus clair permettant d'expliquer les variations d'émission  $N_2O : N_2$  d'un environnement à l'autre.

#### Réaction globale de dénitrification :

En prenant le glucose comme source de carbone organique nécessaire à la croissance cellulaire des communautés dénitrifiantes hétérotrophes, l'équation globale de la dénitrification s'écrit comme suit (Kadlec and Wallace, 2009) :



L'intégralité de la séquence de réductions de la dénitrification classique hétérotrophe est présentée par la figure 1.2-2.

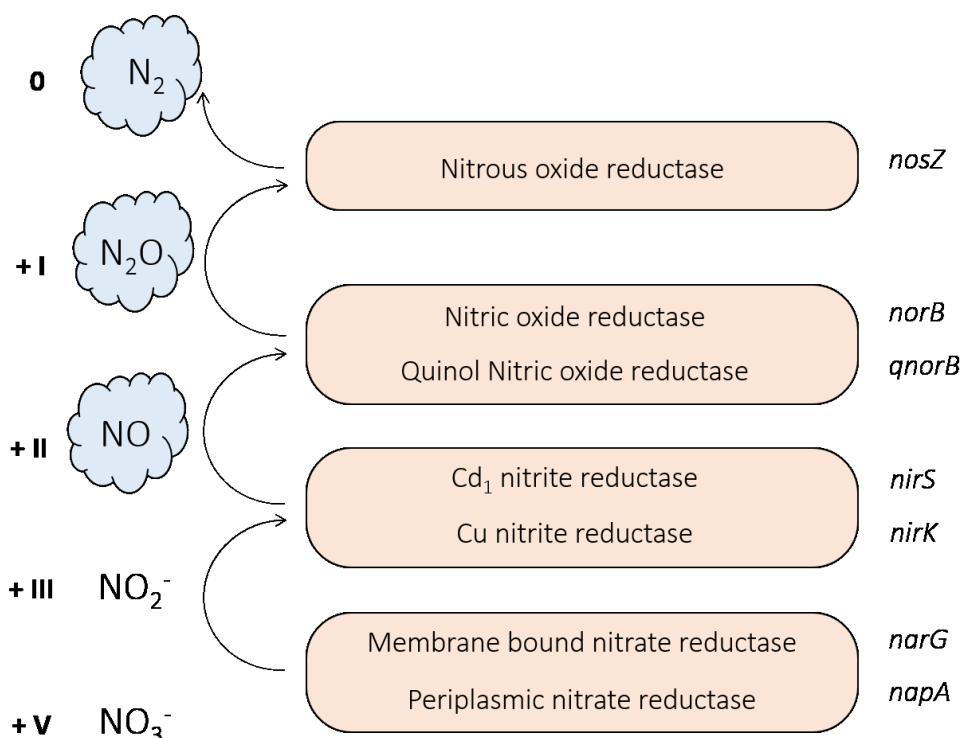


FIGURE 1.2-2 : DIAGRAMME DES REDUCTIONS SUCCESSIVES NECESSAIRES A LA DENITRIFICATION CLASSIQUE HETEROTROPHE COMPLETE, AVEC LES ENZYMES ET GENES ASSOCIES

#### 1.2.5.2 FACTEURS D'INFLUENCE

Les principaux facteurs d'influence de la dénitrification sont : la température, la disponibilité en oxygène, le pH et la disponibilité en carbone organique.

##### La température :

La gamme de température optimale pour la dénitrification se situe entre 15 et 30 °C (Lee et al., 2019). De la même manière que pour la nitrification, la dénitrification reste possible à des températures inférieures ou supérieures à cette gamme, mais les vitesses sont plus lentes. La limite de température en dessous de laquelle la nitrification, tout en restant possible se réalise très lentement est généralement de 5°C (Kadlec and Wallace, 2009).

##### Le pH :

Une gamme de pH entre 6 et 8 convient à la dénitrification (Vymazal, 2007). Toutefois, la dénitrification a déjà été observée à des pH plus acides. Il est possible que le pH n'affecte pas directement le processus enzymatique mais plutôt la disponibilité du carbone. Enfin, une

diminution du pH s'accompagne d'une augmentation de la proportion en  $N_2O$  :  $N_2$  libérée (Simek and Cooper, 2002).

#### La concentration en oxygène dissous

La dénitrification, réalisée par des micro-organismes anaérobies facultatifs, est un processus anaérobie très sensible à la présence d'oxygène dissous dans le milieu. Théoriquement, la présence d'oxygène devrait inhiber le processus. Pourtant il n'existe pas de réel consensus sur le seuil limite en oxygène dissous (Milot, 2017; Kadlec and Wallace, 2009). La limite proposée dans la littérature est de l'ordre de 0.3 à 0.5  $mgO_2/l$  (Saeed and Sun, 2012). En réalité, il est possible que des micro zones anoxiques au sein des sols oxygénés permettent une dénitrification (McKenney et al., 2001).

Des valeurs de potentiel redox comprises entre -100 et + 300 mV permettent théoriquement la dénitrification (Tanner et al., 2002 ; Kadlec and Wallace, 2009).

#### La disponibilité en carbone organique :

La dénitrification exige la présence de substrats organiques biodisponibles dont l'oxydation bactérienne fournit les électrons nécessaires à la réduction de l'azote, ainsi que les besoins nutritifs (C, N, etc.) nécessaires à la croissance cellulaire des hétérotrophes. Il a été estimé que 3,02g de matière organique sont nécessaires à la réduction d'1g de nitrates (Kadlec and Wallace, 2009). Un rapport C/N en dessous de ce rapport conduit à une dénitrification incomplète (Rocher et al., 2015).

La disponibilité en carbone organique est identifiée comme un paramètre clé pour contrôler la dénitrification dans les systèmes de traitement des eaux usées (Wu et al., 2014). Afin de maîtriser les carences, différentes stratégies sont proposées dans la littérature :

- Un apport externe direct de carbone organique solide ou liquide (Zhang et al., 2016 ; Chang et al., 2019) ;
- L'incorporation des matériaux filtrant naturellement riches en carbone organique (Saeed and Sun, 2011) ;
- La dérivation de l'effluent brute au rapport C/N élevé vers les zones en carences (Stefanakis et al., 2011 ; Al-Wahaibi et al., 2021).

## 1.2.6 AUTRES VOIES METABOLIQUES DU CYCLE DE L'AZOTE

Le traitement des eaux usées utilise principalement la description du cycle de l'azote par les voies métaboliques dites « classiques » : ammonification, nitrification autotrophe, dénitrification hétérotrophe. C'est une vision simplifiée et pratique pour décrire les systèmes de traitement. Toutefois, les voies métaboliques « alternatives » sont de plus en plus étudiées et leur connaissance peut permettre une gestion plus fine des procédés.

### 1.2.6.1 DNRA: DISSIMILATORY NITRATE REDUCTION AMMONIA

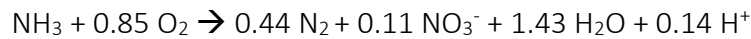
La réduction des nitrates n'a pas nécessairement comme produit final le  $N_2O$  ou  $N_2$  gazeux. Elle peut conduire à la production de  $NH_4^+$ . Cette voie est appelée la DNRA et se fait parallèlement à la dénitrification hétérotrophe. La proportion de nitrates réduits par DNRA dans les sols est mal connue. La voie DNRA semble favorisée par un haut rapport carbone : azote (Kadlec and Wallace, 2009 ; Holmes et al., 2019), conditions rarement satisfaites dans le traitement des eaux usées. Comme pour la dénitrification, la DNRA est réalisée par une très large diversité de microorganismes. Elle s'effectue en deux étapes de réduction :

- Les nitrates en nitrites, par la periplasmic nitrate reductase codée par les gènes *nap* / *nar* à l'image de la dénitrification classique ;
- Les nitrites en ammonium par le cytochrome c nitrite réductases, encodée par le gène *nrf*

### 1.2.6.2 ANAMOX: ANAEROBIC AMMONIA OXIDATION

L'ANAMOX est l'oxydation de l'ammonium par les nitrites, dont le produit final est le  $N_2$ . Moins demandeuse en énergie que la nitrification aérobie de l'ammonium en nitrates suivie de la dénitrification anaérobie des nitrates en  $N_2$ , cette voie métabolique a reçu beaucoup d'attention puisqu'elle permet le traitement de l'azote total en diminuant les coûts d'exploitation. Dans un premier temps, les nitrites sont réduits en NO par la nitrite reductase (*NirS*). Le NO ainsi formé est combiné au  $NH_3$  pour former l'hydrazine ( $N_2H_4$ ) via l'hydrazine synthase. L'hydrazine est ensuite oxydée en  $N_2$  via l'hydrazine hydrogénase. La diversité connue à ce jour des micro-organismes capables de l'ANAMOX est relativement restreinte : 19 espèces de bactéries ont été reportées. Toutes ces espèces appartiennent à phylum Planctomycetes (Holmes et al., 2019).

L'équation de l'ANAMOX en prenant en compte la croissance cellulaire est (Kadlec and Wallace, 2009) :



### 1.2.6.3 SYNTHÈSE DU CYCLE DE L'AZOTE DANS LES EAUX USEES

Les spéciations de l'azote dans un système végétalisé sont nombreuses et les transformations biologiques variées. Les voies métaboliques associées sont portées par une grande diversité de micro-organismes dont les bactéries et les archées. Toutes ces réactions sont catalysées par des une ou plusieurs enzymes dont la fonction est identique, et qui sont partagées par une diversité plus ou moins importante de micro-organismes. Les facteurs environnementaux tels tel que le pH, la disponibilité en substrat et la concentration en oxygène dissous favorisent ou défavorisent certains groupes capables d'une même réaction. La figure 1.2-3 représente les principales voies métaboliques pour un système végétalisé. La fixation de l'azote gazeux sous la forme  $\text{N}_2$  en azote organique n'a pas été mentionnée précédemment car elle ne contribue pas à l'épuration des eaux usées. Toutefois, ce processus biologique permet de refermer le cycle de l'azote. La fixation est réalisée par certaines espèces de bactéries diazotrophes en symbioses avec des végétaux et quelques légumineuses, qui transforment l'azote gazeux en une forme organique (Levy-Booth et al., 2014).

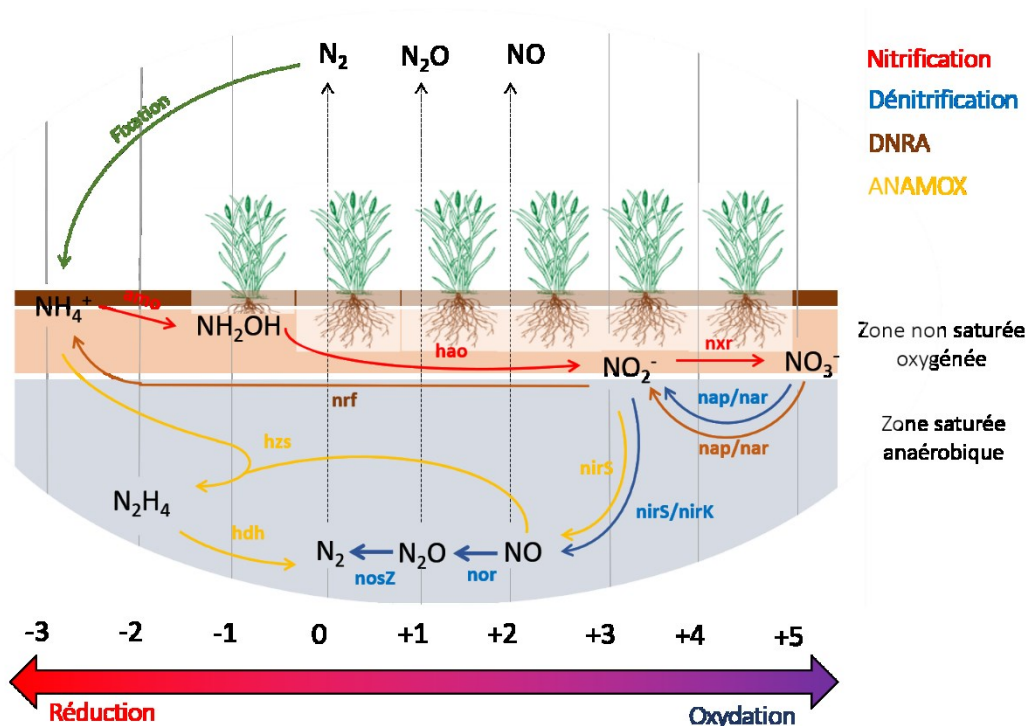


FIGURE 1.2-3 : SCHEMA DES VOIES METABOLIQUES DE L'AZOTE DANS UN SYSTEME VEGETALISE. FORTEMENT INSPIRE ET ADAPTE DE L'EXCELLENTE FIGURE DE HALLIN ET AL., 2018.

### 1.2.7 LES ENJEUX ENVIRONNEMENT DU TRAITEMENT DE L'AZOTE

Comme discuté dans les paragraphes précédents, les spéciations de l'azote sont multiples et les transformations biologiques nombreuses et complexes. Par conséquent, la nature des enjeux environnementaux associée à ces différentes formes azotées est diverse. Cette section tend donc à faire un tour d'horizon des enjeux principaux liés à l'azote dans les milieux naturels et de discuter comment les transformations de l'azote issues du traitement des eaux usées peuvent y être reliées.

#### 1.2.7.1 LA NOTION DE LIMITE PLANETAIRE ET LE FLUX BIOGEOCHIMIQUE

En 2009, un consortium de chercheurs introduit la notion de limite planétaire (Rockström et al., 2009) comme étant le seuil à ne pas dépasser pour ne pas altérer irrémédiablement les conditions favorables à un environnement durable et un écosystème sûr. Ce concept a notamment pour but d'identifier des équilibres physiques ou biologiques que l'activité humaine tend à briser. Les auteurs identifient 9 limitent planétaires (figure 1.2-4) et parmi celles-ci figure le flux biogéochimique de l'azote. Les modifications liées au cycle de l'azote interviennent via la conversion du diazote gazeux ( $\text{N}_2$ ) en de formes beaucoup plus

actives via l'industrie ou l'agriculture principalement. On retrouve parmi ces formes plus actives principalement l'ammonium mais aussi les nitrates et l'azote organique. L'impact environnementaux de ces formes peut alors prendre diverses formes : eutrophisation en milieu aquatique (lacs, rivières ou environnements côtier), pollution en nitrates des nappes phréatiques ou encore émission de  $N_2O$ . Le concept de limites planétaires prend en compte une estimation de l'ampleur des déséquilibres qui sont périodiquement réévalués pour rendre compte des améliorations ou des détériorations (Steffen et al., 2015). L'assainissement des eaux usées joue donc un rôle de premier plan par le traitement de l'azote qui consiste en réalité à transformer l'azote vers des formes moins réactives.

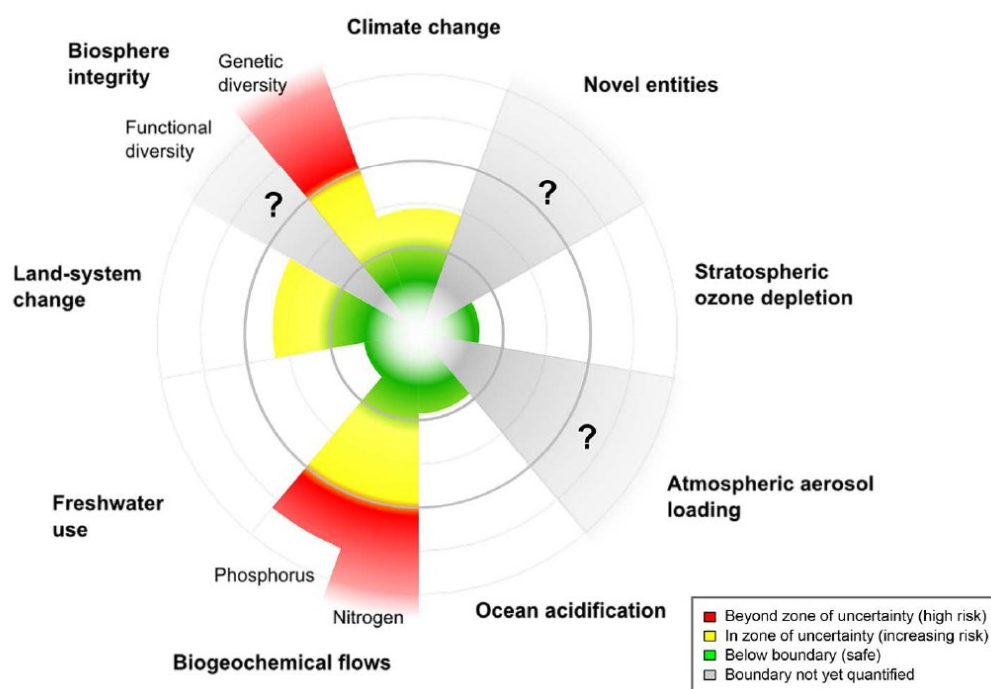


FIGURE 1.2-4 : ILLUSTRATION DES LIMITES PLANÉTAIRES (DONT LE FLUX BIOGÉOCHIMIQUE DE L'AZOTE) TELLES QU'ACTUALISE PAR STEFFEN ET AL., 2017.

### 1.2.7.2 CONTRIBUTION À L'EFFET DE SERRE

La libération dans l'atmosphère d'azote gazeux sous la forme  $N_2O$  est un cas particulier des « nouveaux » enjeux environnementaux de l'azote. Cette forme de l'azote est un puissant gaz à effet de serre dont le pouvoir de réchauffement global (RPG) est 310 fois supérieur à celui du  $CO_2$  pour une masse équivalente (ADEME). Les sources principales de  $N_2O$  sont industrielles, et agricoles via les phénomènes de dénitrification dans les sols cultivés. Le traitement des eaux



usées est aussi directement concerné par cette problématique car la réduction des nitrates passe par la dénitrification.

TABLEAU 1.2-1 TABLEAU RECAPITULATIF DES PROCESSUS BIOLOGIQUES IMPLIQUEES DANS LE CYCLE DE L'AZOTE ET LES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ASSOCIES

Processus biologique	Equations	Description	Facteurs environnementaux
Ammonification	Azote Organique $\rightarrow$ $\text{NH}_4^+$	Biologique : gain d'énergie <ul style="list-style-type: none"> <li>o Large diversité de bactéries et d'archées</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o Favorisée par des zones oxygénées</li> <li>o Température élevée</li> <li>o pH entre 6.5 et 8.5</li> </ul>
Nitrification totale	$\text{NH}_4^+ + 2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^- + 2 \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	Oxydation biologique : Gain d'énergie	<ul style="list-style-type: none"> <li>o Favorisée par une concentration en oxygène dissous supérieure à 1,5 mgO<sub>2</sub>/L</li> </ul>
Nitritation	$\text{NH}_4^+ + 1.5\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+$	Communautés autotrophes : AOB et AOA En deux étapes successives avec intermédiaire par $\text{NH}_2\text{OH}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>o pH neutre ou légèrement alcalin.</li> <li>o pH acide favorise AOA</li> </ul>
Nitratation	$\text{NO}_2^- + 0.5\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$	Communautés autotrophes : NOB	<ul style="list-style-type: none"> <li>o pH neutre</li> </ul>
Dénitrification hétérotrophe	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$	4 étapes de réduction successives pour une dénitrification complète Réalisée par une large diversité de bactéries et d'archées qui possèdent une ou plusieurs enzymes clés Ne parvient pas toujours au $\text{N}_2$ et reste bloqué au $\text{N}_2\text{O}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>o Favorisée par des zones anoxiques</li> <li>o Température optimale de 15 à 30 °C</li> <li>o pH neutre et alcalin. Possible aussi avec pH acide</li> <li>o Disponibilité en carbone organique</li> <li>o La présence d'<math>\text{O}_2</math>, et la faible disponibilité en carbone organique favorisent la libération de <math>\text{N}_2\text{O}</math></li> </ul>
ANNAMOX	$\text{NH}_3 + 0.85 \text{O}_2 \rightarrow 0.44 \text{N}_2 + 0.11 \text{NO}_3^- + 1.43 \text{H}_2\text{O} + 0.14 \text{H}^+$	Oxydation biologique de l'ammonium par les nitrites : <ul style="list-style-type: none"> <li>o 2 étapes pour parvenir au <math>\text{N}_2</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o Nécessite la coexistence de nitrites et d'ammonium</li> </ul>
DNRA	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$	Réduction des nitrates en ammonium	Favorisée lorsque le rapport carbone organique / azote est élevé

## 1.3 LE TRAITEMENT PAR FILTRES PLANTES DE ROSEAUX

### 1.3.1 GÉNÉRALITÉS

Les filtres plantés de roseaux, désignés en anglais par « constructed wetland » ou « treatment wetland », sont utilisés depuis les années 1960. A ce jour, on dénombre environ 5000 stations collectives sur le territoire français selon les données publiques d'eau France, 2019 représentant une capacité d'environ 2 000 000 EH. Largement plébiscité en France, ce système est utilisé dans le monde entier et peut s'adapter à des climats froids et tropicaux avec des performances de traitement variables (Lombard-Latune et al., 2018 ; Varma et al., 2021).

Le procédé de traitement par filtres plantés de roseaux est un système extensif, majoritairement utilisé dans les zones rurales. Leur domaine d'utilisation se situe entre une vingtaine d'équivalent habitant et plus difficilement au-delà de 4000 EH (Kim et al., 2014). Le système est constitué d'un ou de plusieurs filtres en série, isolés du sol par une membrane en géotextile et remplis de matériaux poreux à granulométries variables à travers lesquels s'écoulent les eaux usées à traiter. Les eaux à traiter ne nécessitent pas de prétraitement particulier si ce n'est un dégrillage afin de prévenir tout colmatage ou dommage sur les éventuels systèmes de pompage. Ces filtres sont plantés à leur surface avec une végétation de type macrophytes qui peut varier selon les climats et les régions du monde mais qui ont tous pour propriétés d'avoir un réseau racinaire dense afin de faciliter l'écoulement hydraulique. Le traitement des eaux usées se fait donc par filtration physique par le massif filtrant qui retient les matières en suspension, et par traitement biologique par les microorganismes naturellement présent dans les eaux usées (Kadlec et Wallace, 2009).

Il est possible de distinguer deux principales familles de filtres plantés de roseaux qui diffèrent notamment par le sens d'écoulement hydraulique à travers le massif filtrant : les systèmes à écoulement horizontal et les systèmes à écoulement vertical.

#### 1.3.1.1 FILTRES À ÉCOULEMENT HORIZONTAL

Dans un filtre planté de roseaux à écoulement horizontal (HFTW : Horizontal Flow Treatment Wetland), les eaux usées traversent latéralement le massif filtrant à travers une zone saturée maintenue artificiellement (Figure 1.3-1). En plus des conditions anaérobies qui règnent dans la zone saturée, les rhizomes des macrophytes plantés garantissent des

conditions aérobies en surface (Vymazal, 2007 ; Vymazal, 2014). En France, ce système n'est pas très utilisé, à l'inverse de son homologue à flux hydraulique vertical qui est largement plébiscité.

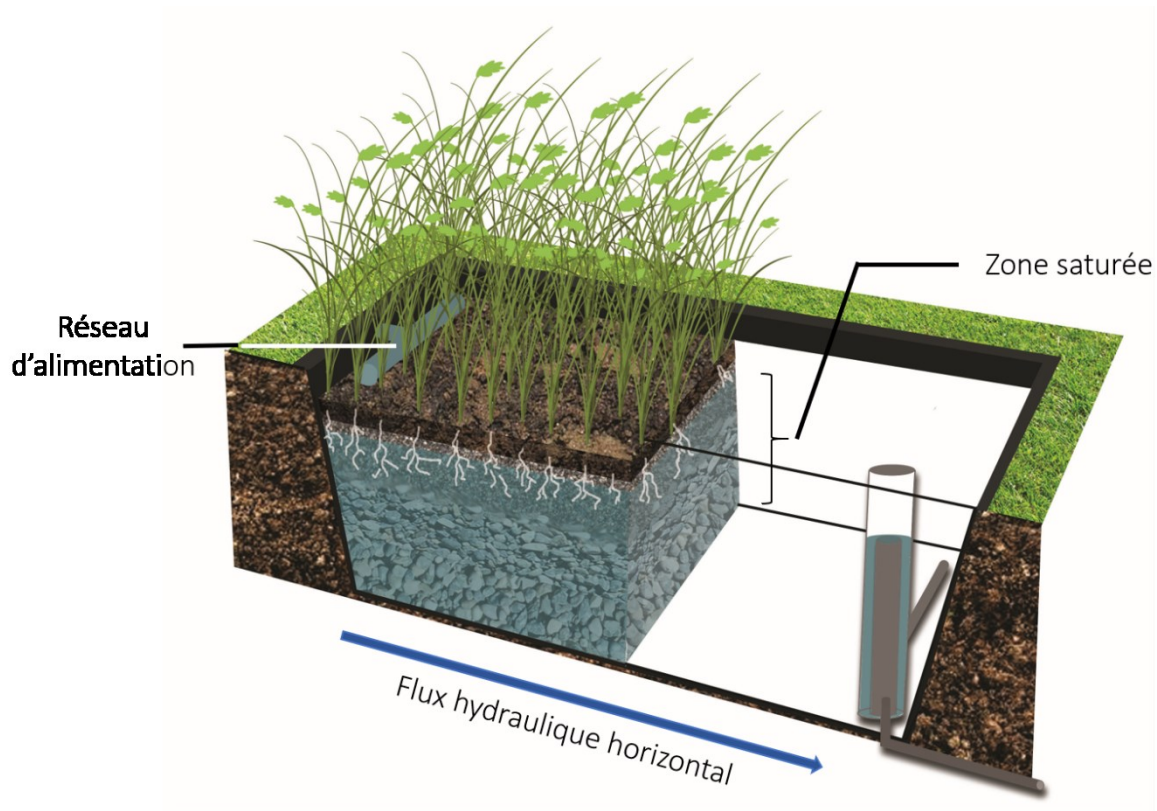


FIGURE 1.3-1 : SCHEMA D'UN FILTRE PLANTE DE ROSEAUX A ECOULEMENT HYDRAULIQUE HORIZONTAL (CREDITS SCHEMA : E. BON)

#### 1.3.1.2 FILTRES A ECOULEMENT VERTICAL

Le système à écoulement vertical est très largement utilisé en France, ce qui lui vaut l'appellation couramment utilisée de « French system ». Il possède l'avantage d'augmenter grandement la surface de filtration par rapport à son homologue horizontal et est classiquement dimensionné sur une base de 2 à 2,5 m<sup>2</sup>/EH. Il est composé de deux étages successifs de filtration, généralement non saturés pour assurer le traitement de la charge carbonée et ammoniacale.

Ce système fonctionne par bâchées. C'est-à-dire qu'il ne traite pas les eaux usées en continue comme elles arrivent sur la station d'épuration mais les retient dans un ouvrage de

bâchée conçues à cet effet et les libèrent sur l'étage de filtration lorsque le volume adéquat est atteint. Ceci permet d'alimenter l'étage avec un débit optimal permettant la bonne répartition des eaux sur toute la surface de traitement (Molle et al., 2005)

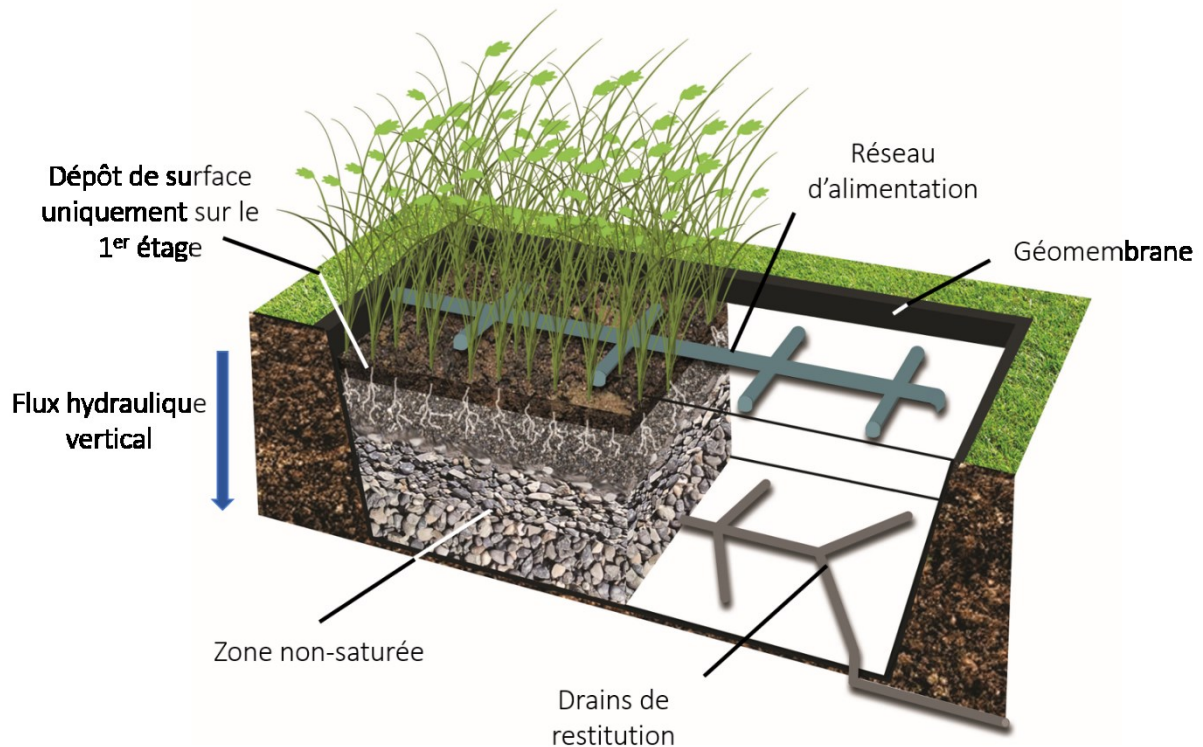


FIGURE 1.3-2 : SCHEMA D'UN FILTRE PLANTE DE ROSEAUX A ECOULEMENT HYDRAULIQUE VERTICAL. (CREDITS SCHEMA : E. BON)

Le premier étage de filtration reçoit un effluent chargé en particules qui sont retenues et s'accumulent à la surface du filtre, générant ainsi une couche de boue de surface. Cette couche de boue s'accroît avec le temps et participe ainsi au traitement (Molle, 2014 ; Kania et al., 2018). Pour garantir un fonctionnement optimal cette couche de boue nécessite d'alterner des périodes d'alimentation et de repos.

Le premier étage de filtration est divisé en cellules de surface égale, généralement au nombre de 3. Ces cellules sont successivement alimentées pendant une période de 5 à 7 jours. Ainsi, après avoir été alimentée, une cellule est au repos alors que les cellules voisines vont être alimentées tour à tour. Le deuxième étage est quant à lui divisé en deux cellules et est soumis à la même dynamique. La gestion des périodes d'alimentation/repos est primordiale pour le

bon fonctionnement du système, notamment pour assurer la bonne évolution et maturation des boues de surface du premier étage.

### 1.3.2 MECANISMES D'ÉPURATION DANS UN SYSTEME VERTICAL

#### 1.3.2.1 RÔLE DES MACROPHYTES

En France, il est d'usage de planter les filtres avec des macrophytes de type *Phragmites Australis*, mais il est tout à fait possible d'adapter l'espèce au climat. Lombard-Latune et al, (2017) ont notamment identifié les variétés de plantes les plus adaptées aux climats tropicaux.

Quelle que soit la variété, les macrophytes jouent un rôle important pour prévenir le colmatage en surface. La densité du système racinaire permet de stabiliser la surface, de contribuer à une filtration efficace et de protéger le filtre des températures les plus basses (Brix, 1997). De plus, la rhizosphère offre une importance surface de contact pour les micro-organismes et un transfert vers les zones inférieures. En revanche, l'assimilation de l'azote par les végétaux joue un rôle relativement mineur dans le traitement global du système.

#### 1.3.2.2 ROLE DE LA COUCHE DE DEPOT DE SURFACE

Le premier étage de filtration reçoit un effluent brut et chargé en matières particulaires. Il se forme alors un dépôt de surface dont la croissance est estimée à 1 cm par an. Le dépôt est curé lorsque l'épaisseur devient trop importante et perturbe le bon fonctionnement du filtre (environ 15 cm). Ceci constitue la principale maintenance du système, mais la fréquence reste relativement faible.

La nature de la couche de boues et sa contribution au bon fonctionnement du filtre a été étudiée (Kania et al., 2018 ; Kania, 2018). Elle permet notamment d'homogénéiser la répartition des eaux usées sur toute la surface du filtre et participe à la rétention physique par filtration des matières en suspension. L'alternance des phase d'alimentation/repos est primordiale pour les boues car cela permet une bonne évolution des boues dans le temps. De plus, la matière organique retenue sur le dépôt de surface est oxydé tandis que l'ammonium adsorbé est nitrifié.

### 1.3.2.3 TRAITEMENT DE L'AZOTE

Les filtres plantés de roseaux classiques sont totalement insaturés. Par conséquent, le traitement de l'azote est limité à l'ammonification – nitrification sur un système classique. L'azote entre dans le système de traitement sous la forme organique dissous ou particulaire et ammoniacale. Le dépôt de surface contribue donc directement à la rétention de l'azote particulaire et à l'adsorption de l'ammonium. Les conditions d'oxygénation sont suffisantes pour assurer les besoins en oxygène des communautés nitrifiantes au sein des deux étages de filtration. Il a été démontré l'importante contribution du second étage dans le processus de nitrification (Molle et al., 2005 ; Maciejewski et al., 2021).

### 1.3.3 PROCÉDÉS DÉRIVÉS DU VFCW

Le succès des filtres plantés de roseaux « classiques » à écoulement horizontal et vertical repose sur leur fiabilité, leur faible coût de construction et de maintenance et leur performance de traitement convenable. Toutefois, la recherche et les industriels s'intéressent à mettre au point de nouveaux systèmes hybrides ou optimisés pour pallier aux limites principales des systèmes dits classiques. Les améliorations recherchées sont :

- La réduction de l'emprise au sol, notamment pour rendre les systèmes végétalisés compétitifs sur les marchés portant sur des stations de plus grandes tailles (1500 à 2500 EH) ;
- L'amélioration du traitement des eaux usées, notamment le traitement de l'azote total en promouvant la dénitrification
- L'adaptabilité à des effluents atypiques d'origine agricole et industrielle.

#### 1.3.3.1 SYSTÈMES HYBRIDES

Une manière de tirer avantage des deux systèmes classiques, c'est-à-dire à flux hydraulique horizontal et vertical, est de les combiner en série :

- En traitant les effluents bruts sur un système vertical pour bénéficier de ses qualités de rétention de la matière particulaire et d'oxygénation, puis en alimentant un système

horizontal saturé. Ce système, abrégé  $VF_{nsat} + HF_{sat}$  dans le tableau 1.3-1, est l'une des configurations hybrides les plus populaires (Molle et al., 2008 ; Vymazal et al., 2013) ;

- En traitant les effluents en premier lieu sur un filtre horizontal, puis en alimentant un filtre vertical (Vymazal et al., 2013). Ce système est abrégé  $HF_{sat} + VF_{nsat}$
- En combinant plus de 2 étages soit écoulement vertical ou horizontal.

#### 1.3.3.2 SYSTÈME TIDAL

Le procédé tidal tend à reproduire un cycle de marée avec des phases d'immersion (saturée), puis des phases d'oxygénation (non saturée). Il fonctionne grâce à un système d'alimentation et de siphonage piloté afin de caler les temps de marnage souhaités. Toutefois, ce système reste relativement marginal et demeure généralement à la phase de pilote (Wu et al., 2014)

#### 1.3.3.3 SYSTÈMES À AÉRATION OPTIMISÉE

Les systèmes aérés représentent un nouveau genre du traitement des eaux par filière végétalisée. Ces systèmes sont généralement basés sur un filtre planté à écoulement hydraulique vertical, dont le fond est partiellement saturé en eau par un siphon. Des drains d'aération sont disposés dans le filtre et fonctionnent de manière intermittente et pilotée pour générer une alternance de phase aérobie et anaérobie dans la zone saturée. La gestion de l'oxygénation du filtre permet notamment d'affiner le traitement de l'azote en contrôlant l'un des facteurs principaux de la nitrification et de la dénitrification. Parmi les avantages l'azote total peut alors être traité, et l'emprise au sol diminuée (Folidari et al., 2013)

#### 1.3.3.4 COMPARATIF DES PERFORMANCES DES DIFFERENTS SYSTEMES



TABLEAU 1.3-1 COMPARAISON DU DIMENSIONNEMENT ET DES PERFORMANCES D'ABATTEMENT DES POLLUANTS POUR LES SYSTEMES VEGETALISES CLASSIQUES, HYBRIDES OU OPTIMISES

Type	Dimensionnement m <sup>2</sup> /EH	Performances (%)						Références (n = nombre stations)
		DCO	DBO <sub>5</sub>	MES	NTK	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	TN	
VF <sub>nsat</sub> + VF <sub>nsat</sub>	2 à 2,5 m <sup>2</sup> /EH	91 ± 3	-	95 ± 2	85 ± 5			Molle et al., 2005 (n = 80)
VF <sub>nsat</sub> + VF <sub>nsat</sub>	2 à 2,3 m <sup>2</sup> /EH	92 (min = 82 ; max = 98)	98 (min = 97 ; max = 99,7)	96 (min = 90 ; max = 99,6)	91 (min = 66; max = 98)			Paing and Voisin, 2005 (n = 20)
VF <sub>nsat</sub> + VF <sub>nsat</sub>	2 à 2,5 m <sup>2</sup> /EH	91 ± 4	97 ± 3	95 ± 7	94 ± 2		21 ± 12	Maciejewski et al., 2022 (n= 7)
HF <sub>sat</sub>	5 m <sup>2</sup> /EH	75	85	83	-	48	35	Vymazal, 2005 (< 79)
VF <sub>nsat</sub> + HF <sub>sat</sub>	-	min = 51 max = 94	min = 55 max = 96	min = 32 max = 99	-	min = 14 max = 91	min = 29 max = 78	Vymazal, 2013 (n = 19)
HF <sub>sat</sub> + VF <sub>nsat</sub>	-	min = 77 max = 95	min = 78 max = 95	min = 81 max = 98	-	min = 64 max = 85	min = 33 max = 80	Vymazal, 2013 (n = 7)
Système Tidal		80	82	78	-	58	-	Sun et al., 2006 (n=1)
VF (recirculation + aération)	1,5 m <sup>2</sup> /EH	91*	-	97*	82*	78*	75*	Foladori et al., 2013 (n = 1)
VF aération + HF <sub>sat</sub>	-	96	-	-	-	97	-	Fan et al., 2013 (n=1)

nsat = étage non saturé ; sat = étage saturé ; \*calculé via les données de la source

## 1.4 LE PROCÉDE AZOE ET LES TECHNOLOGIES ASSOCIÉES

Le procédé AZOE, développé par l'entreprise SCIRPE, est un système de type filtres plantés de roseaux à écoulement vertical associé à un lit bactérien placé en tête de filière (figure 1.3-1). L'association de ces deux technologies a été imaginée dans un premier temps afin d'adapter la capacité de traitement des eaux usées en milieu rural aux variations de charges saisonnières due à l'activité viticole. Le lit bactérien devait ainsi servir de variable d'ajustement en intensifiant son utilisation lors des périodes de fortes charges. Ainsi, la première station AZOE a ainsi été mise en fonctionnement en 2004 dans la commune de Vercia, Jura. Depuis, cette solution a été généralisée et fait l'objet des brevets français et européens suivants : EP1857419A1, WO201215026A2



FIGURE 1.4-1 : PHOTOGRAPHIE AERIENNE D'UNE STATION AZOE DANS LA COMMUNE DE CIEL (CREDITS PHOTO : B. CEDAT)

En réalité, le lit bactérien ne sert plus seulement à s'adapter aux variations de charge saisonnière mais est devenu un élément de traitement permanent. En procédant ainsi, le dimensionnement des deux étages de filtres plantés de roseaux qui l'accompagnent a été

réduit de 2 à 1,3 m<sup>2</sup>/EH rendant la filière plus compacte. La réduction de l’emprise au sol permet ainsi à l’entreprise SCIRPE de se positionner sur la réalisation de stations de plus grande capacité, jusqu’à 2500 EH. En outre, la présence du lit bactérien bénéficie aux performances épuratoires du système en favorisant le traitement de l’azote total par la mise en place de zones saturées dans les deux étages de filtres plantés de roseaux, et par en garantissant des conditions adéquates à la rétention du phosphore après traitement physico-chimique.

#### 1.4.1 UTILISATION EN FRANCE

Le nombre de réalisation du procédé AZOE est de 70 en France métropolitaine. Il n’existe à ce jour aucune réalisation hors du territoire national.

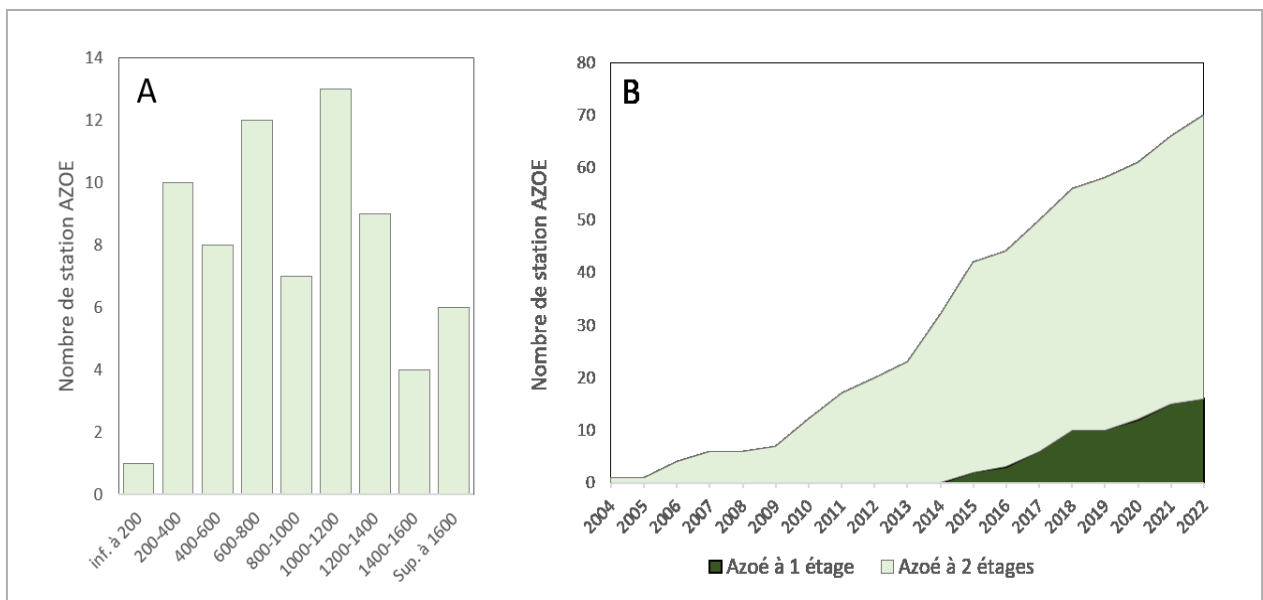


FIGURE 1.4-2 : NOMBRE DE STATION REPARTIE PAR TRANCHE D’EH (A) ET EVOLUTION DU NOMBRE DE STATION AZOE AU COURS DU TEMPS (B). DONNEES SCIRPE.

Le procédé AZOE a connu un réel développement au début des années 2010 avec une augmentation importante du nombre annuel de réalisations. On note notamment l’apparition d’une variante à un seule étage de filtration du procédé AZOE dès 2015 et qui semble devenir une solution viable pour l’entreprise. Bien qu’exceptionnellement utilisé pour des stations inférieures à 200 EH, ce procédé couvre une large gamme de capacité comme le montre la figure 1.3-2.

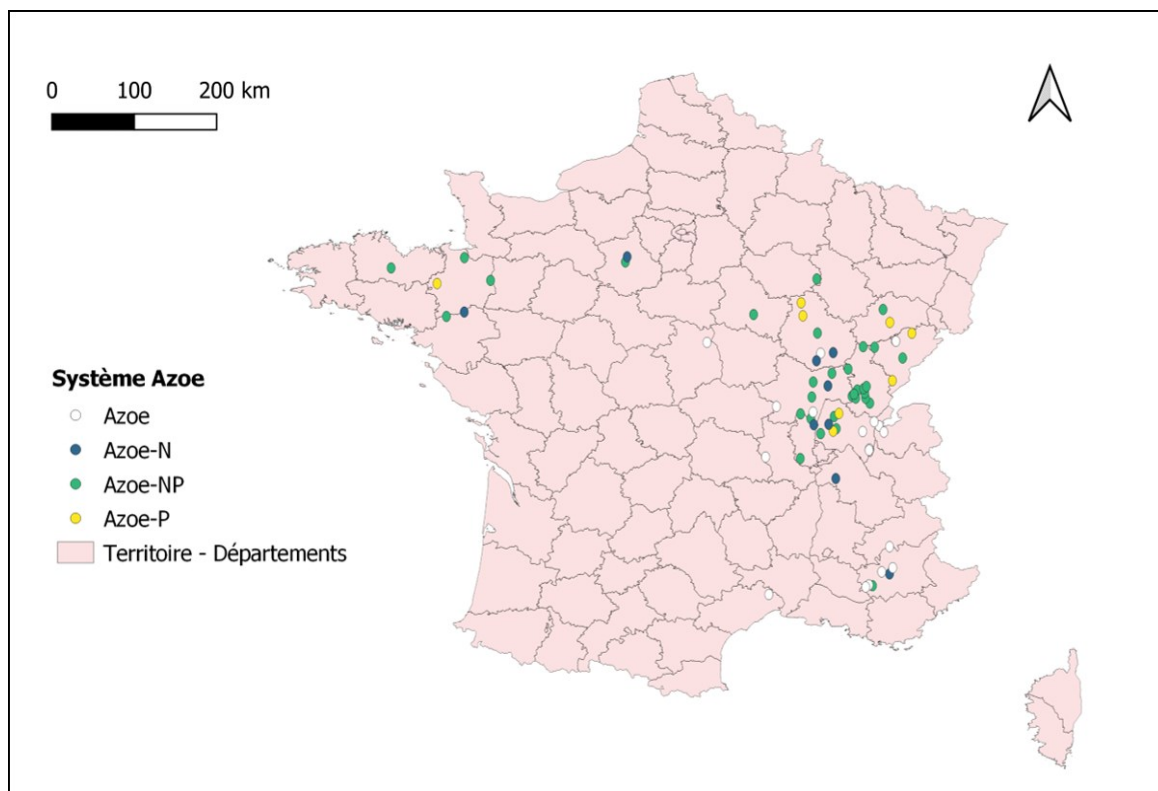


FIGURE 1.4-3 : CARTE DE LA REPARTITION GEOGRAPHIQUE DU PROCEDE AZOE DIFFERENCIE PAR TYPE EN FRANCE METROPOLITAINE.

La majeure partie des stations du procédé sont réparties dans l’Est de la France. La couleur des points de la figure 1.4.3 indique si les stations sont dimensionnées afin de réaliser la nitrification (blanc), la nitrification et la dénitrification (bleu), la nitrification et le phosphore (jaune), ou tous les traitements (vert). Cette carte met en avant la malléabilité du procédé afin de s’adapter à des exigences de rejets plus ou moins strictes.

#### 1.4.2 FONCTIONNEMENT DU PROCÉDÉ

Le procédé AZOE sous-entend l’utilisation d’un lit bactérien en début de chaîne de traitement et son association à la technologie filtres plantés de roseaux à écoulement vertical (figure 1.4-4). Historiquement, le nombre d’étage de filtration était de deux. Bien que cette configuration reste majoritaire, l’abandon du second étage de filtration semble se dessiner comme une stratégie de minimisation de l’emprise au sol et des coûts de construction. Le procédé AZOE peut se décliner en 4 variantes afin de s’adapter aux objectifs de traitement. Toutes ces variantes peuvent fonctionner avec un unique étage de filtration ou deux étages.

TABLEAU 1.4-1 REFERENCMENT DES DIFFERENTES VARIANTES DU SYSTEME AZOE, LEUR OBJECTIF DE TRAITEMENT, AINSI QUE LEUR OCCURRENCE.

Variante	Objectif	Lit Bactérien	Saturation Filtres	Traitement Phosphore	Occurrence
AZOE	Nitrification	OUI	NON	NON	20
AZOE-N	Nitrification Dénitrification	OUI	OUI	NON	8
AZOE-P	Nitrification Déphosphatation	OUI	NON	OUI	7
AZOE-NP	Nitrification Dénitrification Déphosphatation	OUI	OUI	OUI	35

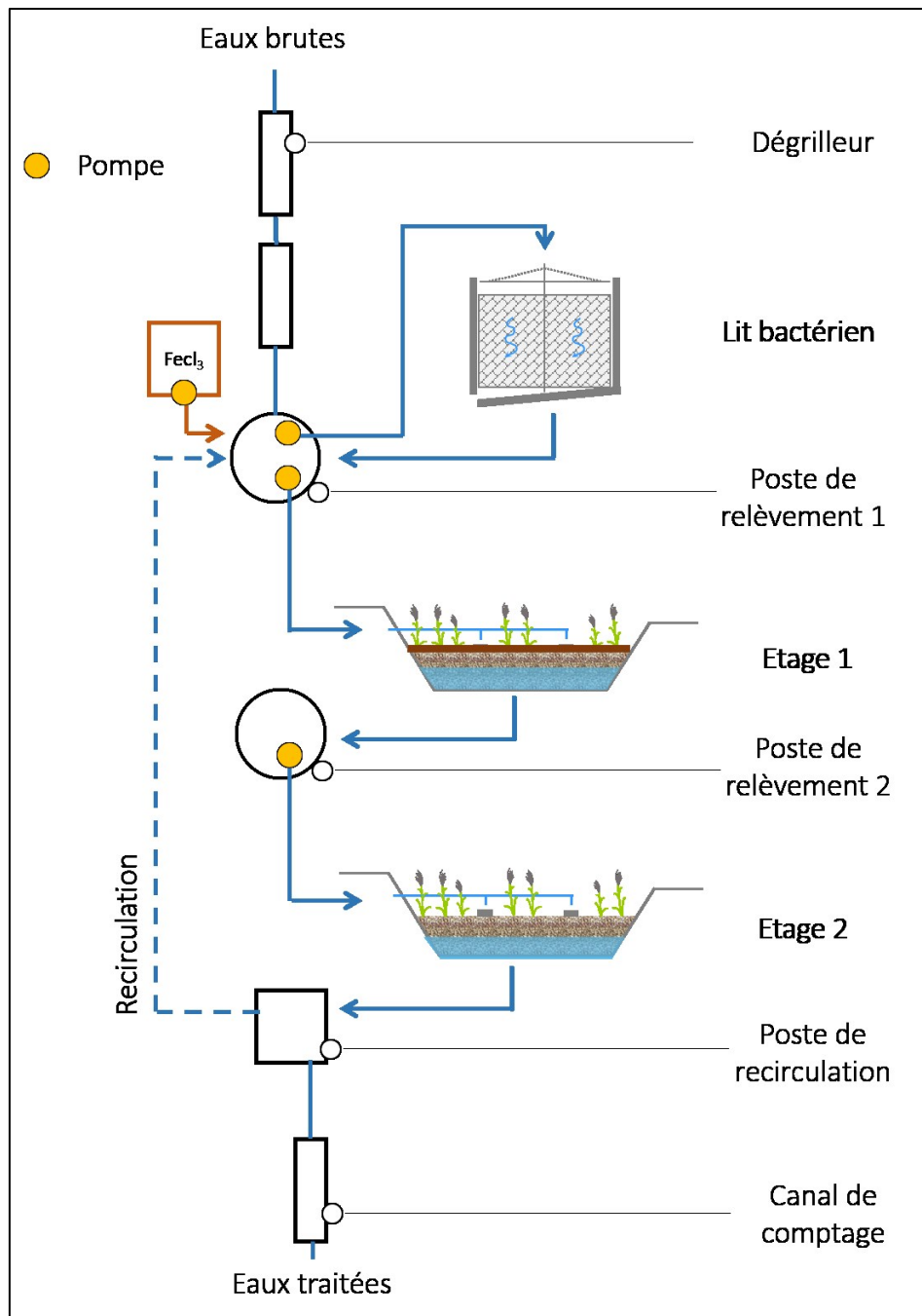


FIGURE 1.4-4 : SYNOPTIQUE DE LA FILIERE AZOE-NP

#### 1.4.2.1 TECHNOLOGIE DU LIT BACTERIEN

Les lits bactériens figurent parmi les techniques de traitement des eaux usées urbaines qui ont été largement utilisées en Europe, notamment le Royaume-Uni, la France et l'Allemagne avant d'être progressivement remplacés par les procédés de boues activées (Racault, 1996). Ce procédé repose sur la circulation de l'effluent à traiter à travers un ouvrage contenant un garnissage sur lequel peut se fixer la biomasse responsable de l'épuration.

L'alimentation en eaux usées se fait par le sommet à l'aide d'un bras rotatif percé. De ce fait la forme d'un lit bactérien est habituellement circulaire, ou encore polygonale pour faciliter le génie civil.

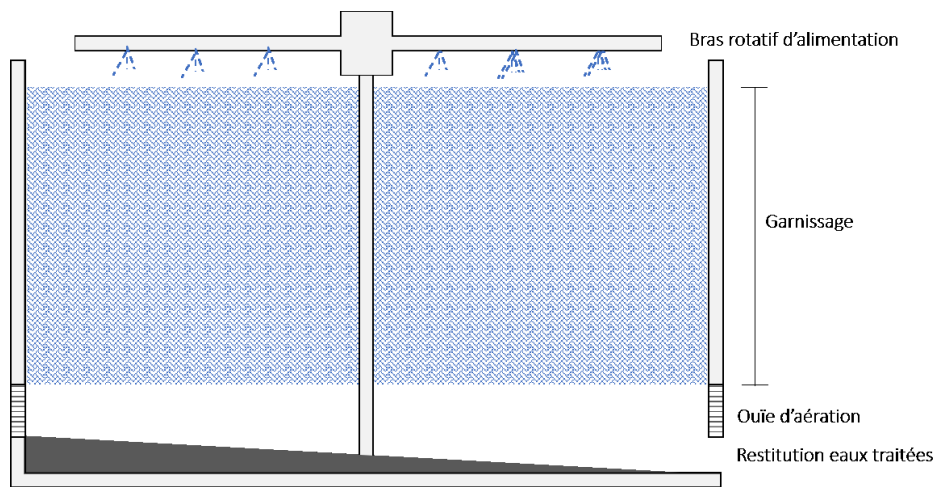


FIGURE 1.4-5 : SCHEMA D'UN LIT BACTERIEN EN COUPE

La nature du garnissage peut-être tout-à-fait diverse et a beaucoup évolué avec le temps (Lekang and Kleppe, 1999). D'un garnissage libre dans l'ouvrage (matériaux granulaires divers) les lits bactériens ont progressivement été équipés de garnissage plastique organisé dont l'enchevêtrement permet de maximiser la surface développée. Le matériau doit aussi faciliter le transfert d'oxygène au sein du lit bactérien afin de permettre un traitement aérobie. Ainsi le lit bactérien est un ouvrage de traitement à trois phases : la phase liquide (effluent à traiter) qui ruissèle à travers le garnissage, la phase solide sur laquelle se fixe la biomasse épuratrice, et la phase gazeuse dont la circulation permet la bonne oxygénation de la biomasse. Ainsi le matériau de garnissage doit avoir une grande surface spécifique pour optimiser le contact entre les eaux à traiter et la biomasse, mais aussi une grande macroporosité afin d'éviter le colmatage et de garantir une bonne aération (Daigger and Boltz, 2011).

La biomasse fixée sur le garnissage croît sous forme de biofilm et finit par se détacher sous la contrainte de cisaillement due au ruissèlement. Dans de bonnes conditions de fonctionnement, la croissance du biofilm est assez rapide pour garantir la présence de biomasse malgré le détachement. La biomasse détachée est évacuée et participe ainsi au flux particulaire qui sera reçu par le premier étage de filtre et retenue à sa surface.

Les lits bactériens sont utilisés afin d’abattre la charge carbonée, et dans de plus rares cas de réaliser la nitrification. D’une manière générale, l’épuration de la charge carbonée, représentée par la DBO<sub>5</sub>, d’un lit bactérien peut-être approchée via l’équation de Veltz, tandis que la nitrification peut être approchée par l’équation de Gujer et Boller (Henrich and Marggraff, 2013) :

TABLEAU 1.4-2 EQUATIONS USUELLES DE L’ABATTEMENT DU CARBONE ET DE L’AMMONIUM SUR UN LIT BACTERIEN (HENRICH AND MARGGRAFF, 2013).

Abattement du Carbone	Abattement de l’ammonium
$\ln\left(\frac{C_{in}}{C_{out}}\right) = \frac{k * A_s * D * \theta^{(T-20)}}{Qs^n}$	$\frac{D \cdot A_s \cdot j_{N,max}(T)}{q_A} = S_{N,i} - S_{N,e} + N \cdot \ln\left(\frac{S_{N,i}}{S_{N,e}}\right)$
<p>C<sub>in</sub> et C<sub>out</sub> - les concentrations d’entrée et de sortie (mgDBO<sub>5</sub>/l)</p> <p>A<sub>s</sub> - surface spécifique du garnissage (m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>)</p> <p>D - profondeur de garnissage (m)</p> <p>Q<sub>s</sub> - charge hydraulique (m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/h)</p> <p>Θ - coefficient de correction de température</p> <p>n - coefficient hydraulique</p> <p>k - le coefficient cinétique</p>	<p>J<sub>N,MAX</sub> – Taux de nitrification maximum (gN/m<sup>2</sup>/jour)</p> <p>S<sub>N,i</sub> et S<sub>N,e</sub> – Concentration entrante et sortant en ammonium</p>

#### 1.4.2.2 IMMERSION PARTIELLE DES FILTRES

La dénitrification est indispensable pour parvenir à l’élimination complète de l’azote. Dans ce cas, des zones saturées dans le fond des filtres peuvent être mises en place pour promouvoir l’anaérobiose (Silviera et al. 2015, Kim et al., 2015). La figure 1.4.6, met en évidence l’implication de la zone non saturée et de la couche de boues de surface dans le processus de nitrification et de la zone saturée dans le processus de dénitrification.



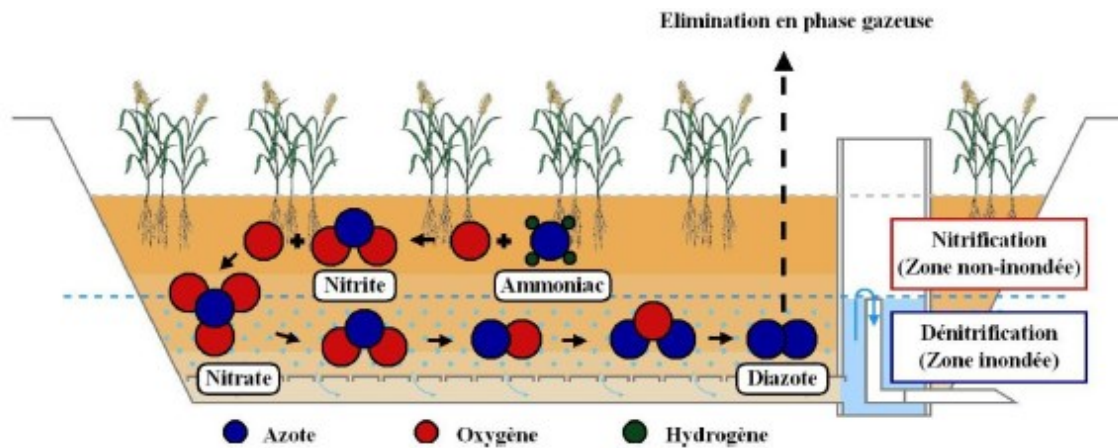


FIGURE 1.4-6 : ELIMINATION DE L'AZOTE PAR FILTRES PLANTES DE ROSEAUX A ECOULEMENT VERTICAL ET IMMERSION PARTIELLE (KIM, 2014)

### 1.4.2.3 TRAITEMENT DU PHOSPHORE SUR AZOE

Sur le système AZOE, le phosphore est traité par précipitation par voie physico-chimique. Le coagulant utilisé est le chlorure ferrique qui est ajouté en aval du traitement sur le lit bactérien. Après passage sur lit bactérien, l'effluent contenant le phosphore particulaire est envoyé sur le premier étage. Les boues de surface contribuent donc à la rétention du phosphore. Le phosphore particulaire des boues s'avère stable dans les conditions normales de fonctionnement du système, et le relargage n'est observé qu'en cas d'épisode anoxique intense (Kim, 2014 ; Kim et al., 2015)

## CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

---



## 2.1 CAMPAGNES D'ÉCHANTILLONNAGE POUR LE SUIVI DE TERRAIN

Une campagne de terrain a été menée en février 2019 pour suivre le fonctionnement de deux stations classiques à écoulement vertical (stations de Saint-Boil et Sainte-Hélène) et deux stations de type AZOE-NP (stations de Saint-Désert et Cormatin). Le but de ces suivis était de caractériser les performances de traitement et notamment la contribution respective des différentes étapes du procédé.

Les caractéristiques générales des sites sélectionnés sont présentées dans le tableau 2.1-1. La campagne s'est déroulée sur une période d'une semaine afin de procéder à des échantillonnages 24h des eaux brutes en entrée des stations, et des eaux traitées en sortie du premier étage et en sortie du second étage. Un échantillon dit « 24h » est représentatif de la composition moyenne de l'eau au point de prélèvement sur une journée entière de fonctionnement. Il est composé d'un mélange de 24 prélèvements horaires dont le volume est proportionnel au débit volumique horaire en entrée de station au moment du prélèvement. Les échantillons, conservés à 4°C, ont été analysés dans les 24h après prélèvement pour les paramètres suivants : DCO, TOC, matières en suspension, ammonium, nitrates, azote total et phosphore total.

TABLEAU 2.1-1 CARACTERISTIQUES DES STATIONS DE TRAITEMENT DES EAUX USEES DOMESTIQUES DE LA CAMPAGNE DE PRELEVEMENT DE FEVRIER 2019

Station	Localisation	Type de système	EH	Configuration
Saint-Boil	Saône-et-Loire	Classique Flux hydraulique vertical	500	2 étages non saturés
Sainte-Hélène	Saône-et-Loire	Classique Flux hydraulique vertical	400	2 étages non saturés
Cormatin	Saône-et-Loire	AZOE-NP Flux hydraulique vertical	1000	2 étages partiellement saturés
Saint-Désert	Saône-et-Loire	AZOE-NP Flux hydraulique vertical	1300	2 étages partiellement saturés

Outre ces prélèvements d'eaux usées effectués à différentes étapes de traitement, d'autres échantillons ont été prélevés par la « Soil Science Faculty » et l'« Institute of Water Problems » de Moscou pour réaliser des analyses microbiologiques dans le cadre d'un programme de collaboration scientifique avec ces partenaires. Les prélèvements réalisés ont porté sur le biofilm du lit bactérien, sur la couche de boues de surface du premier étage et à différents horizons des deux étages de filtration. Les communautés microbiennes ont été identifiées et leur diversité analysée par biologie moléculaire afin de comparer ces paramètres aux différentes étapes du traitement.

## 2.2 TRAVAUX A L'ECHELLE PILOTE

### 2.2.1 HALL EXPERIMENTAL DE LA FEYSSINE

Une grande partie du travail expérimental de la thèse a été réalisée à l'échelle pilote. Les pilotes utilisés sont localisés au sein du hall expérimental de la Feysine, à Villeurbanne. Ce hall appartient à la société AquaLyon (SUEZ) qui en a confié la gestion à l'Institut National de la Recherche Agricole et de l'Environnement (INRAe) de Lyon. Ce site de recherche est alimenté en continu par la station d'épuration de type boues activées d'AquaLyon qui traite les effluents urbains du nord Lyonnais avec une capacité nominale de 300 000 EH. Différents types d'eaux usées ou partiellement traitées sont distribués en continu au hall expérimental. Les projets de recherche du hall expérimental bénéficient donc d'effluents réels en alimentation permanente (figure 2.2-1). Dans le cadre de cette thèse, l'effluent utilisé pour alimenter l'installation pilote a été de type eaux usées dégrillées.

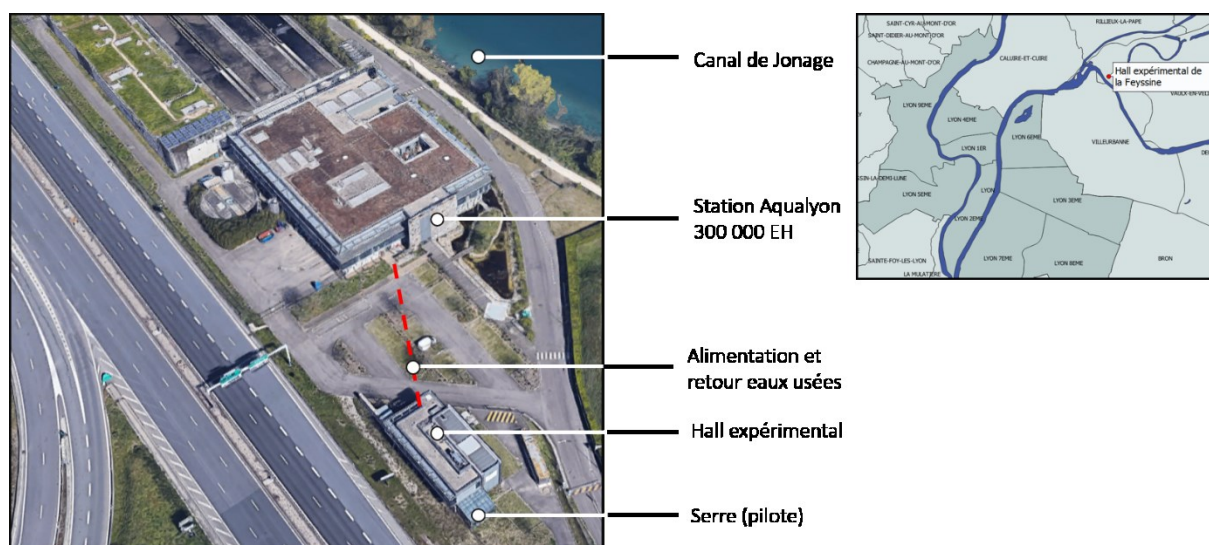


FIGURE 2.2-1 : IMAGE AERIEENNE DU SITE DE LA STATION DE LA FEYSSINE ET DU HALL DE RECHERCHE.

L'installation pilote est placée dans la serre du hall expérimental afin d'apporter l'éclairage naturel nécessaire aux roseaux (Figure 2.2-2). La serre est équipée d'un système de ventilation automatisé qui s'active lorsque la température dépasse les 25°C. Le hall expérimental est équipé d'un laboratoire d'analyses de routine qui permet d'effectuer sur place la plupart des mesures nécessaires au suivi du pilote sans avoir à transporter ou conserver les échantillons.

Les appareils suivants ont été utilisés pour la préparation et l'analyses des échantillons de suivi du pilote :

- Un spectrophotomètre pour l'analyse de microkit;
- Une microbalance, une étuve et le matériel de filtration de type Buchner pour la détermination du taux de matières en suspension ;
- Micropipettes pour pipetages de précision ;
- Sonde pH et redox.



FIGURE 2.2-2: PHOTOGRAPHIES DE LA SERRE, DES PILOTES ET DU LABORATOIRE D'ANALYSE DU HALL EXPERIMENTAL DE LA FEYSSINE

### 2.2.2 CARACTERISTIQUES DU PILOTE

L'installation pilote est conçue comme un modèle réduit d'une station AZOE-N, tel que représentée à la figure 2.2-3. Elle est composée, dans le sens du traitement, d'un lit bactérien et de deux étages successifs de filtres plantés de roseaux partiellement saturés en eau. L'installation a une capacité de traitement de 6 équivalents habitant. Ses caractéristiques techniques et de dimensionnement sont regroupées dans le tableau 2.2-1.

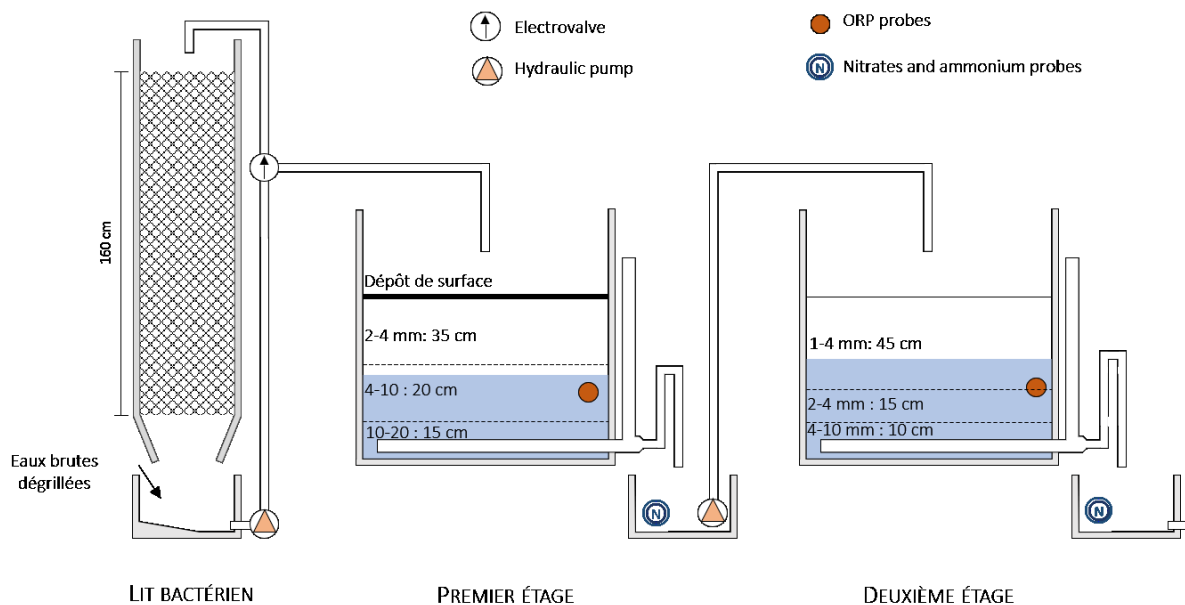


FIGURE 2.2-3 : SCHEMA DU PILOTE DE LA FEYSSINE DE TYPE AZOE-N

L'alimentation de l'installation se fait via le lit bactérien à l'aide d'une pompe péristaltique. Les eaux brutes alimentent le réservoir du lit bactérien à un débit constant de 30 litres par heure, soit 720 litres par jour d'eaux brutes dégrillées. Ce réservoir, d'une hauteur de 25 cm, est équipé d'une sonde de pression permettant de mesurer la hauteur d'eau pour déclencher l'alimentation du lit bactérien. Un automate permet de réguler le débit de la pompe de circulation des eaux usées du lit bactérien, d'asservir son déclenchement à la hauteur d'eau dans le réservoir, et de gérer une électrovanne qui oriente le flux soit vers le lit bactérien (phase de traitement sur LB), soit vers le premier étage de filtration. La routine de l'automate est paramétrée comme suit :

- De 0 à 12 cm la pompe de recirculation est à l'arrêt et le réservoir se remplit à un débit constant de 30 litres par heure ( $0,03 \text{ m}^3/\text{h}$ ) ;
- De 12 à 20 cm la pompe de recirculation est en marche pour alimenter le lit bactérien à un débit volumique de  $0,45 \text{ m}^3/\text{h}$ . L'alimentation du lit bactérien se fait en distribuant l'effluent de manière uniforme à la surface du garnissage grâce à un système de rampe percée.
- A 20 cm, correspondant à 60 L d'eau dans le réservoir, l'électrovanne oriente le volume d'eaux traitées par le lit bactérien vers le premier étage et vide en 4 minutes les 60 L du réservoir à un débit de pompe de  $0,9 \text{ m}^3/\text{h}$ .



En procédant ainsi, le taux de recirculation des eaux usées sur le garnissage du lit bactérien est de 200%. Le lit bactérien est alimenté continuellement 24h/24 et 7j / 7, sauf périodes d'arrêt pour maintenance.

L'alimentation sur un filtre planté de roseaux à écoulement vertical se fait par bâchées, correspondant à un volume donné de solution déversé en un court instant à la surface du filtre. Pour ce faire, un ouvrage de bâchée, placé en amont des filtres, se remplit jusqu'au volume souhaité et libère ensuite la bâchée rapidement soit de manière gravitaire soit par un système de pompage. Dans le cas présent, le réservoir du lit bactérien fait office d'ouvrage de bâchée du premier étage. Le volume des bâchées est donc de 60 L. L'alimentation par bâchées permet de répartir le volume sur toute la surface du filtre avant que l'eau ne s'infilte, favorisant ainsi l'écoulement uniforme au travers de l'ensemble du volume du filtre. La période entre chaque bâchée, permette à l'eau de traverser le massif filtrant et à la zone superficielle du lit d'être aérée au contact de l'atmosphère. Cette période, de l'ordre de 2h, correspond au temps nécessaire pour remplir le volume de bâchée (60L du réservoir du lit bactérien)

TABLEAU 2.2-1 CARACTERISTIQUES TECHNIQUES ET DE DIMENSIONNEMENT DU PILOTE DE LA FEYSSINE DE TYPE AZOE-N.

Élément	Paramètres	Valeurs
<b>Filière totale</b>	Capacité de traitement	6 Equivalents Habitant
	Volume de traitement journalier	720 Litres
<b>Lit bactérien</b>	Volume du réservoir	60 Litres
	Section du lit	0,15 m <sup>2</sup>
	Hauteur du lit de garnissage	180 cm
	Type de garnissage	Structure plastique alvéolé
	Surface spécifique du garnissage	200 m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup>
<b>Premier étage</b>	Débit d'apport de la bâchée	0,9 m <sup>3</sup> /h
	Débit volumique d'alimentation	Une bâchée de 60L toutes les
	Hauteur d'eau surfacique journalière	2h, soit 0,72 m <sup>3</sup> /j
		0,36 m/m <sup>2</sup> /jour
	Surface de filtration	2 m <sup>2</sup>
	Hauteur de garnissage	0,75 m
	Boues de surfaces	0,05 m
	2/4 RL – Couche de filtration	0,35 m
	4/10 RL – Couche intermédiaire	0,20 m
	10/20 RL – Couche de drainage	0,10 m
Hauteur de la zone saturée en eau	0,35 m soit 280 L	
Temps de rétention hydraulique théorique	9,2 heures	

	Débit d'apport de la bâchée	2 m <sup>3</sup> /h
	Hauteur d'eau surfacique journalière	0,36 m/m <sup>2</sup> /jour
	Surface de filtration	2 m <sup>2</sup>
<b>Second étage</b>	Hauteur de garnissage	0,70 m
	1/4 RL – Couche de filtration	0,45 m
	2/4 RL – Couche intermédiaire	0,15 m
	10/20 RL – Couche de drainage	0,10 m
	Hauteur de la zone saturée en eau	0,40 m soit 320 L
	Temps de rétention hydraulique théorique	10,5 heures

Contrairement à une station de filtres plantés classique ou Azoe en vraie grandeur, le filtre du pilote n'est pas divisé en cellules hydrauliques distinctes permettant d'alterner phase d'alimentation et de repos, mais d'une unique cellule. Pour maintenir l'alternance alimentation / repos propre au fonctionnement des filtres plantés de roseaux à écoulement vertical, chaque filtre du pilote est alimenté suivant une séquence hebdomadaire de 56 heures d'alimentation suivies de 112 heures de repos, correspondant au rapport 1/3 d'alimentation : 2/3 repos.

### 2.2.2 SUIVI DE L'INSTALLATION

L'organisation type d'une semaine de fonctionnement du pilote est indiquée à la Fig. 2.2-4. Dans la mesure du possible, chaque semaine d'essai est divisée de telle manière que la période d'alimentation débute le mardi matin à 9h et se termine le jeudi à 17h. Cette organisation permet d'utiliser les fins de semaine pour les phases de repos.

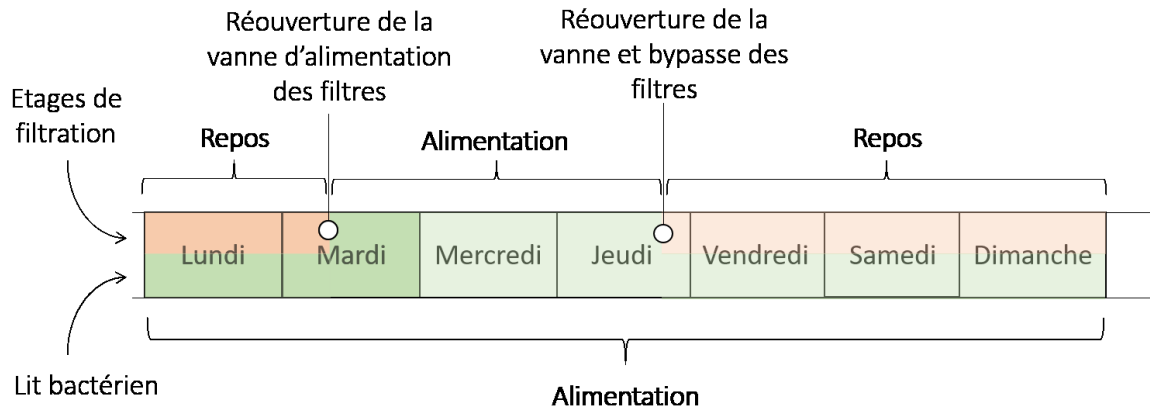


FIGURE 2.2-4 : PHASES D'ALIMENTATION ET DE REPOS DU LIT BACTERIEN ET DES DEUX ETAGES DE FILTRATION DE L'INSTALLATION PILOTE POUR UNE SEMAINE TYPE

Les points de prélèvements possibles sur le pilote dans le sens du traitement sont :

- A - Eaux brutes dégrillées
- B - Eaux traitées par le lit bactérien
- C - Eaux de la zone saturée du premier étage
- D - Eaux traitées par le premier étage
- E - Eaux de la zone saturée du second étage
- F - Eaux traitées de sortie de station

L'échantillonnage a été réalisé mélangeant 3 échantillons ponctuels issus de bâchées successives dans des contenants en PEHD de 500 mL. Les méthodes de prélèvement de chaque point sont présentées dans le tableau 2.2-2.

TABLEAU 2.2-2 METHODES DE PRELEVEMENT POUR CHAQUE POINT DU PILOTE

Méthode	Points	Occurrence
Mélange de plusieurs prélèvements ponctuels journaliers	A, B – toujours D, F – lorsque le préleveur 24h est défaillant	1 échantillon par jour composé de 3 prélèvements ponctuels
Prélèvement ponctuel par pompe péristaltique à faible débit	C et E	1 échantillon par semaine ou besoin spécifique à une campagne

Dès le prélèvement réalisé, les échantillons sont entreposés à 4°C et analysés dans les 24h. Ils sont congelés s'ils doivent être analysés au-delà de ce délai.

## 2.2 METHODES ANALYTIQUES

### 2.2.1 PROTOCOLE DE MESURE DES PARAMETRES SUIVIS

Le tableau 2.3-1 présente et détaille toutes les analyses lors des campagnes de prélèvement et du suivi pilote au laboratoire de la Feyssine et au laboratoire de DEEP.

TABLEAU 2.2-1 PROTOCOLE, APPAREILLAGE ET REFERENCES DES ANALYSES

Analyses	Description	Appareillage	Références
Demande Chimique en Oxygène (DCO)	L'échantillon est oxydé en milieu acide par une solution de dichromate de potassium. La DCO est calculée par dosage colorimétrique du dichromate de potassium réduit.	Spectrophotomètre HACH modèle 2010	NF-T 90-101, 1988 ISO 15705
Carbone Organique Total (COT)	Carbone Total (CT) : Mesure du CO <sub>2</sub> par oxydation du carbone total et combustion dans un four à 680 °C. Calcul du carbone organique (COT = TC – TIC).	Analyseur de carbone Shimadzu Modèle TOC-L	AFNOR NF EN 1484,(1997)
Matières En Suspension (MES)	Filtration de l'échantillon brute et homogénéisé sur un filtre borosilicaté via un système de type Buchner. Séchage à l'étuve à 105°C jusqu'à 14h.	Etuve séchage UM400 Memmert	AFNOR, 2005
Ammonium (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	Les ions ammoniums réagissent avec les ions hypochloreux et salicyliques et donnent une coloration bleue indophénol	Spectrophotomètre HACH modèle 2010	AFNOR, 2005
Azote Kjeldahl (NTK)	Transformation de l'azote organique en azote ammoniacal en 3 étapes : minéralisation, distillation à la vapeur et titration.  Dosage par spectrophotométrie.	Minéralisateur Digestor 2020 Foss, analyseur Kjeltex 2200 Foss	AFNOR NF EN 25663, 1994 ISO 5663
Nitrates (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) Nitrites (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	Les ions de nitrate et nitrite sont séparées par chromatographie ionique en phase liquide par l'application d'une résine échangeuse d'ions comme phase stationnaire. La détection s'effectue par un détecteur de conductivité et la conductivité détectée est reliée au temps.	HPLC(Chromatographie Liquide Ionique Haute Performance) ICS5000+, Thermo Scientific	ISO 10304- 1 & 2 (1996) AFNOR NF T 90-042

### 2.2.2 MESURES CONTINUES

Le pilote est équipé de sondes en acquisition continue :

- Sonde Ammonium et Nitrates de type VARION 700 IQ de la marque WTW en sortie du premier et du second étage de filtration. L'acquisition se fait à un pas de temps de 1 minute via un enregistreur.
- Sonde ORP dans les zones saturées du premier et du second étage via des fourreaux plantés horizontalement dans le massif filtrant. L'acquisition se fait à un pas de temps de 1 minute via un enregistreur.

#### Contrôle des sondes Ammonium et Nitrates :

Les sondes continues nécessitent un entretien régulier pour éviter les dérives instrumentales. Il a été observé que ces sondes sont d'autant plus fiables que l'effluent est dilué et prétraité. Afin de suivre le bon fonctionnement des sondes, les mesures acquises par les sondes ont été systématiquement comparées à celles faites par les méthodes classiques lorsque disponibles.

#### Correction des sondes ORP :

Les sondes redox sont vérifiées régulièrement pour corriger une éventuelle dérive. Les valeurs sont exprimées par rapport à l'électrode standard à hydrogène, par ajout de + 214 mV aux données délivrées par les sondes qui utilisent une électrode de référence au chlorure d'argent.

## 2.3 SUIVI ISOTOPIQUE

### 2.3.1 PROTOCOLE GLOBAL

Un suivi isotopique de l'azote a été réalisé en collaboration avec le laboratoire isotopique de l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon (ISA). Les essais réalisés ont consisté à introduire sous forme d'ammonium de l'azote  $^{15}\text{N}$  dans une bûchée d'alimentation et à suivre ensuite le rapport isotopique  $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$  à tous les points de prélèvement et durant toute la période d'alimentation du pilote.

La bûchée « Zéro » enrichie en  $^{15}\text{N}$  est constituée en dissolvant de l'ammonium marqué  $^{15}\text{N}$  à 99% (Sigma – Aldrich, pureté à 99%) dans 60 litres d'eaux brutes dégrillées fraîches pour atteindre un enrichissement  $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$  de 4.6%, alors que le taux naturel est de 0.36 % dans les eaux usées de la Feyssine. Le suivi isotopique du ratio  $\delta ^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$  est réalisé sur les points de prélèvement en aval pendant la phase d'alimentation, soit 56h. Durant cette période toutes les bûchées ont été prélevées en sortie du lit bactérien, en sortie du premier étage et du second étage, y compris pendant les deux périodes nocturnes d'alimentation. Les échantillons ont été congelés dans les 24h après prélèvement. Les mesures isotopiques ont ensuite été effectuées par le laboratoire isotopique de l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon (ISA), à la fois de manière globale et de manière ciblée sur l'ammonium et les nitrates.

En parallèle du suivi isotopique, la routine d'analyse du pilote a été poursuivie (cf : protocole des paramètres suivis).

### 2.3.2 PROTOCOLE DE PREPARATION DES ECHANTILLONS EN VUE DES ANALYSES ISOTOPIQUES

La mesure du rapport  $^{15}\text{N}$  étant réalisée par un AE-IRMS, les échantillons doivent satisfaire deux conditions pour être analysés :

- La forme azotée (ammonium ou nitrate) doit être isolée au préalable, ce qui implique une séparation anions/cations sur l'échantillon dissous ;
- L'échantillon doit être sous forme de résidu solide.

En conséquence, un protocole spécifique a été élaboré et suivi.

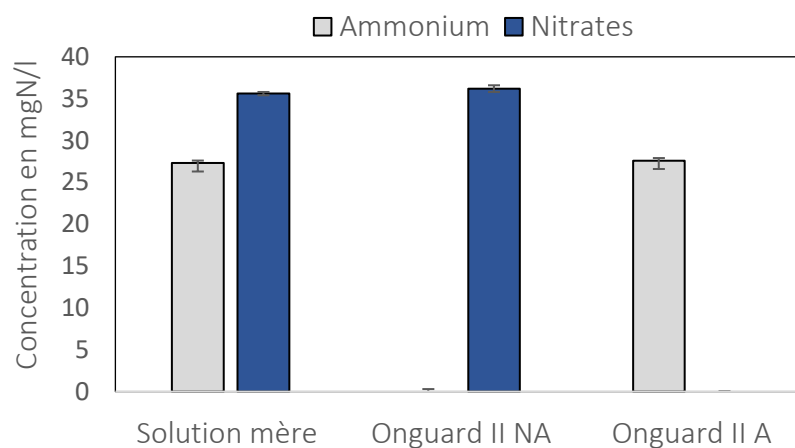


### Séparation anions/cations sur résine échangeuse d'ions :

Après décongélation, les échantillons sont filtrés à 0,45 µm grâce à des filtres seringue SATORIUS puis traités sur micro-colonnes échangeuses d'ions non spécifiques aux ammoniums, ni aux nitrates. Le principe est le suivant :

- Piégeage des cations (dont les ions ammonium) sur une cartouche DIONEX Onguard II Na<sup>+</sup> de 1 ml. On collecte en sortie de colonne une solution dépourvue d'ions ammonium dans laquelle l'azote dissous est sous la forme nitrates.
- Piégeage des anions (dont les ions nitrate) sur une cartouche DIONEX Onguard II A de 1 mL. On collecte en sortie de colonne une solution dépourvue d'ions nitrate et dans laquelle l'azote dissous est sous la forme ammonium.

Afin de s'assurer du piégeage total des ions ciblés, des tests préliminaires ont été réalisés (Figure 2.4-1)



**FIGURE 2.3-1 : CONCENTRATIONS EN AMMONIUMS ET NITRATES DANS LA SOLUTION MERE ET APRES PASSAGE SUR LES RESINES ECHANGEUSES D'IONS. LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT LES ECARTS-TYPES DES REPLICATS REALISES.**

Les cartouches ont été lavées à l'eau distillée, et préparées avec l'échantillon à traiter (conditionnement). Le volume d'échantillon passée sur une cartouche est compris entre 40 et 50 ml. Un pousse seringue a été utilisée pour garantir un flux lent et constant. La figure 2.4-2 montre le montage utilisé pour réaliser les séparations.

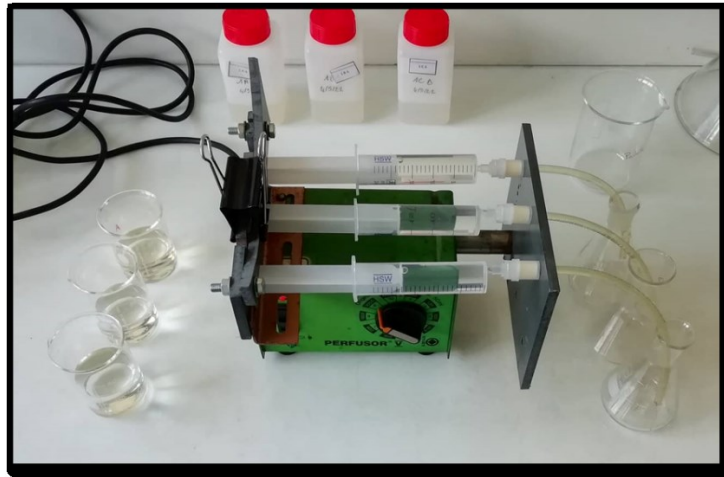


FIGURE 2.3-2 : PHOTOGRAPHIE DU MONTAGE UTILISÉE POUR RÉALISER LES SÉPARATIONS, ICI SUR RÉSINE ONGUARD II NA. LES ÉCHANTILLONS TRAITÉS SONT RECUEILLIS DANS LES ERLENMEYERS À DROITE.

#### Collecte du résidu des échantillons :

Une fois la séparation réalisée, chaque solution est congelée dans des flacons coniques de 50 ml puis lyophilisée. Il a été vérifié que la lyophilisation n'a pas induit de perte d'ammonium ni de nitrates. Les résidus solides ainsi obtenus ont alors été transférés au laboratoire isotopique de l'ISA pour mesure du  $^{15}\text{N}$  par AE-IRMS.

#### 2.3.3 PRINCIPE DE L'AE - IRMS

L'analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique (AE-IRMS) permet de mesurer des rapports entre différents isotopes, plus précisément le rapport  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  dans le cas présent.

L'échantillon sous forme solide, broyée finement et disposé dans une fine capsule en étain est converti en gaz élémentaire par combustion suivie d'une réduction à haute température. Après purification et déshydratation, les éléments gazeux sont séparés et leurs concentrations mesurées. Ils sont ensuite introduits dans l'IRMS via un gaz vecteur (Hélium). Après ionisation, les ions sont séparés selon leur masse via un champ magnétique et leur abondance est mesurée par des cages de Faraday.

## 2.4 SUIVI MICROBIOLOGIQUE A L'ECHELLE PILOTE

### 2.4.1 PROTOCOLE GLOBAL

Le suivi des essais pilotes a été complété par des analyses microbiologiques menées en collaboration avec l'unité de recherche en écologie microbienne de l'université de Lyon 1.

**Objectif :** Déterminer le potentiel de nitrification et de dénitrification de la biomasse microbienne présente à différents horizons du massif filtrant des deux étages du pilote

Des préleveurs ont été spécifiquement conçus pour échantillonner toute la hauteur du massif filtrant de chacun des deux étages du pilote sans avoir à déstructurer le milieu filtrant. Un préleveur se présente sous la forme d'une carotte de 4 cm de diamètre introduite dans un fourreau d'un diamètre très légèrement supérieur. Celui-ci est placé à demeure dans le média filtrant lors du remplissage des filtres, de manière inclinée pour éviter qu'il n'entraîne un écoulement préférentiel vertical au sein du filtre (Figure 2.5-1). La carotte interne peut-être introduite et retirée de son fourreau sans pour autant déstructurer le massif filtrant.

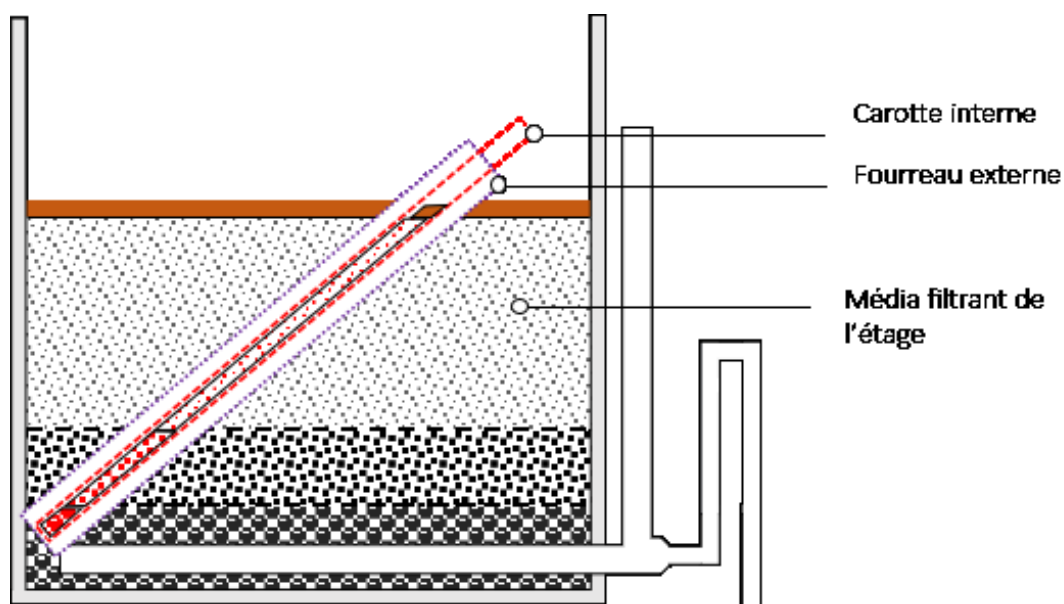


FIGURE 2.4-1 : SCHEMA DU MONTAGE DE LA CAROTTE ET DE SON FOURREAU EN PLACE DANS LE MASSIF FILTRANT (ICI SUR LE PREMIER ETAGE DU PILOTE)

Une fois retirée du fourreau, la carotte interne peut s'ouvrir en deux dans le sens de la longueur, et ainsi être remplie du même garnissage que celui du pilote (graviers ou sables). Placée dans le fourreau à l'intérieur du pilote pendant plusieurs semaines d'exploitation du pilote, les matériaux qui la composent servent alors de support à la biomasse épuratrice. Le

fourreau et le carotteur interne sont percées pour permettre aux eaux usées de s'écouler au travers de manière verticale. Les carottes internes ont été relevées à deux reprises pour analyses microbiologiques :

- Après les essais en fonctionnement normal du pilote (le 28 avril 2021) ;
- Après les essais sur l'ajout carboné par step-feeding sur le second étage (le 10 Octobre 2021).

La carotte interne est ouverte et divisée en horizons de 5 cm (Figure 2.5-2). Les matériaux de chaque horizon sont pesés et collectés dans des flacons type Plasma pour l'analyse du potentiel de nitrification et de dénitrification.



FIGURE 2.4-2 : A GAUCHE, PHOTOGRAPHIE DE LA CAROTTE INTERNE APRES OUVERTURE LE 28 AVRIL 2021. A DROITE, PHOTOGRAPHIE DES FLACONS PLASMA APRES DIVISION DE LA CAROTTE EN HORIZONS.

Les mesures de nitrification et dénitrification ont été réalisées par l'unité de recherche en écologie microbienne.

#### 2.4.2 PRINCIPE DE LA MESURE D'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE NITRIFICATION

Une masse de sédiment est incubée dans une solution de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et d'eau distillée dans un flacon plasma. Les flacons sont placés dans un four à  $28^\circ\text{C}$  équipé d'un système de mélange rotatif. Un millilitre est prélevé à 2, 4, 6, 8 et 10h d'incubation, filtré à  $0,2 \mu\text{m}$  et les concentrations en  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NO}_3^-$  sont mesurées par colorimétrie (smartchem 200, KPM

analytics 92390 Villeneuve-la-Garenne France). Le potentiel s'exprime en  $\mu\text{gN-NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  /heure/gramme de sol sec (Cantarel et al., 2020).

### 2.4.3 PRINCIPE DE LA MESURE D'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA DENITRIFICATION

Une masse d'échantillon est placée dans un flacon plasma fermé hermétiquement. L'atmosphère est remplacée par 90% d'hélium et 10% d'acétylène pour obtenir des conditions anaérobiques et inhibitrice de l'enzyme impliquée dans la réduction du  $\text{N}_2\text{O}$  en  $\text{N}_2$ . Une solution contenant du  $\text{KNO}_3$ , du glucose et de l'acide glutamique dilués dans l'eau distillée est introduite dans le flacon à l'aide d'une seringue en quantité suffisante pour ne pas être limitante à la dénitrification. Les flacons sont incubés à  $28^\circ\text{C}$  pendant 8h. Après deux heures, le  $\text{N}_2\text{O}$  est mesurée toutes les heures par chromatographie gazeuse ( $\mu\text{GC R3000}$ , SRA Instrument, Marcy L'Etoile, France) afin de suivre son accumulation dans le flacon. Le potentiel de dénitrification est exprimé en  $\mu\text{gN-N}_2\text{O}$ /gramme de sédiment sec/heure (Cantarel et al., 2020).





## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

---





## PREAMBULE

La première section 3.1 de ce chapitre résultats et discussions présente les travaux ayant pour but d'enrichir les connaissances des processus d'épuration impliquées dans le traitement des eaux usées sur le système AZOE. L'utilisation de données récoltées à échelle réelle par l'intermédiaire de campagnes de terrain ou de bilans internes à l'entreprise SCIRPE réalisés par des organismes indépendants, a donné lieu à la publication d'un article à comité de lecture :

*“Effect of trickling filter on carbon and nitrogen removal in vertical flow treatment wetlands: A full-scale investigation”*

Cet article donne donc un aperçu global du fonctionnement et des performances de 29 stations d'épuration à filtres plantés de roseaux sur une période de 13 ans. L'article couvre plusieurs systèmes de traitement : classique à deux étages ; AZOE-N à deux étages et AZOE-N à un unique étage. Parmi les jeux de données, certains possèdent un point de prélèvement intermédiaire entre le premier et le second étage de manière à séparer les performances entre les différents éléments qui composent le système. L'axe choisi à travers cet article est de souligner les modifications des processus de traitement du carbone et de l'azote, particulaire ou dissous par l'ajout du lit bactérien en tête de filière.



---

## 3.1 EXPLOITATION DE DONNEES DE TERRAIN DE STATION FILTRES PLANTES DE ROSEAUX CLASSIQUES ET AZOE<sup>®</sup>



# EFFECT OF TRICKLING FILTER ON CARBON AND NITROGEN REMOVAL IN VERTICAL FLOW TREATMENT WETLANDS: A FULL-SCALE INVESTIGATION

K. Maciejewski<sup>a,b</sup>, M. Gautier<sup>a</sup>, B. Kim<sup>a</sup>, P. Michel<sup>b</sup>, R. Gourdon<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Univ Lyon, INSA Lyon, DEEP, EA7429, 69621 Villeurbanne, France

<sup>b</sup>SCIRPE, Society of Design and Production Engineering for Wastewater Purification, 5 Allée Alban Vistel, 69110 Sainte Foy Lès Lyon, France

## Abstract:

Vertical Flow Treatment Wetland (VF-TW) systems achieve high efficiencies in terms of carbon related parameters removals from domestic wastewaters. Nitrogen removal is also efficient but optimisations are still needed. This article reports and discusses experimental data collected from 24-hour monitoring campaigns of 29 full-scale VF-TWs, having different configurations and operation time up to 13 years. All monitored systems gathered 1 or 2 stage(s) of unsaturated or partially saturated VF-TW. Additionally, some of those included an aerobic biological Tricking Filter (TF) prior to TW stage(s). Results firstly showed that the implementation of a TF improved TSS, COD and BOD<sub>5</sub> removal rates in the monitored systems. Regarding nitrogen removal, the association of TF with one stage of partially saturated vertical TW was found to achieve around 79% of nitrification in average and up to 92% in some cases. In the configurations where TF was associated to 2 successive stages of TW, almost all total nitrogen removal by nitrification / denitrification was achieved at the outlet of the first-stage TW. The contribution of the second-stage TW in denitrification was found very low due to limited availability of organic carbon to support heterotrophic denitrification. Specific solutions to enhance the contribution of the second stage in the denitrification process are discussed.

**Keywords:** VF-TW, Domestic wastewater, Tricking filter, Nitrogen removal

## Highlights:

- Field monitoring data from different 29 treatment wetland are discussed
- Implementation of trickling filter improved all treatment efficiencies
- Carbon depletion was identified in 2<sup>nd</sup>-treatment wetland stage
- Operating conditions should be optimized to enhance denitrification in 2<sup>nd</sup>-stage

### 3.1.1 INTRODUCTION

European Union has enforced strict environmental regulations (European directive 2000/60/CE) based on threshold limits on both carbon and suspended solids discharges from domestic wastewater treatment plants. Stringent N and P limits are also set for discharges into sensitive water bodies. Consequently, the implementation of more efficient treatment processes is necessary to comply with the environmental policy.

In this context, treatment wetlands (TW) have proved particularly well adapted to the treatment of domestic, agricultural, and occasionally industrial wastewaters, in rural areas (Vymazal, 2014; Kim et al., 2014). High efficiencies, low energy consumption and maintenance, along with a very good landscape integration, have made this technology the preferred solution in France for small communities below 2000 inhabitants (Paing and Voisin, 2005; Morvannou et al., 2015). One of particularities of the so-called French system is that filters are fed with unsettled raw wastewaters in a vertical flow mode. Suspended solids retention therefore induces the formation of a deposit layer at the surface of the first-stage TW filter. This layer has been shown to contribute very significantly to the global treatment efficiency (Kania et al., 2019a). Due to its lower permeability than the one of raw filter media, the deposit layer also favours the good special distribution of the influent on filter surfaces during the feeding periods (Molle, 2014; Kania et al., 2019b).

Total nitrogen removal from wastewater mainly occurs via two successive microbial processes (Kadlec and Wallace, 2009) namely aerobic oxidation of  $\text{N-NH}_4^+$  and N-org (nitrification) followed by anoxic reduction of  $\text{N-NO}_3^-$  (denitrification). Nitrogen in domestic wastewaters is mostly present in forms of ammonia and organic molecules (peptides, proteins, DNA, etc.). Organic nitrogen is hydrolysed from particulate organic matters (POM) or soluble polymers into amino-acids which are used in microbial anabolisms or further hydrolysed into ammonia or nitrates depending on the environmental conditions (Saeed and Sun, 2012).

Under aerobic conditions, ammonia is oxidized into nitrites by ammonia-oxidizing bacteria (AOB) such as *Nitrosomonas sp.* and further oxidized into nitrates by nitrite-oxidizing bacteria (NOB) such as *Nitrobacter sp.* These bacteria are strictly aerobic autotrophs. They use carbonates as a source of carbon to synthesize their cellular material and support their growth (Green et al., 1998).

Denitrification is conducted under anoxic conditions by heterotrophic bacteria which use nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) as a final electron-acceptors and convert them into gaseous  $\text{N}_2$  via several intermediates such as nitrites (Wallenstein et al., 2006; Sirivedhin and Gray, 2006). Denitrifiers require organic carbon as an electron-donor and as a substrate to support their growth (Kadlec and Wallace, 2009). Biodegradable organic substrates must therefore be available at sufficiently high concentrations in the medium (Rocher et al., 2015). Other factors of influence include high Hydraulic Retention Time (HRT), anoxic conditions, near-to-neutral pH (Grießmeier et al., 2019; Saeed and Sun 2012). Mesophilic temperature in the range of  $25^\circ\text{C}$  are usually considered as optimal for both nitrifying and denitrifying microbial communities (Lee et al., 2009).

A certain number of technical modifications to the “French system” have been proposed and used to optimize treatment performance and reduce environmental footprint, while maintaining the advantages of the process (landscape integration, affordable cost, reasonable energy consumption). These modifications include for example the combination of horizontal and vertical flow TW stages (Molle et al., 2008), the use of Zeolite filter media (Millot et al., 2016), or the recirculation on a single TW stage (Silviera et al., 2015). Forced aeration has also been implemented using for example an air pump-drain system within the saturated area for both vertical (Foladori et al., 2013) and horizontal (Nivala et al., 2007) flow TW. Increased oxygen transfer can also be achieved by the use of an aerobic biological trickling filter (TF) as a first treatment step (Kim et al., 2014). In this specific case, aeration of the TWs is provided in the form of dissolved  $\text{O}_2$  within the influent flow. Recently, TF associated with various configurations of TW has shown interest (Akratos et al., 2020; Stefanakis et al., 2019, Vucinic et al., 2013).

The AZOE process, patented by the French company SCIRPE (patents EP1857419; FR 0651656; FR 1153754), includes, among other complements, the implementation of an aerobic TF as a first treatment step. The objective is to contribute to the removal of the organic load, initiate the nitrification process and oxidize the raw influent before it is transferred to the TW filter stages. One of advantages of this design is to reduce the ground footprint surface from  $2 \text{ m}^2.\text{PE}^{-1}$  (Person Equivalent) down to  $1 - 1.5 \text{ m}^2.\text{PE}^{-1}$ .

The system is well established with more than 50 treatment units in operation mostly in Eastern France. Several pilot-scale to full-scale investigations have been published on the



characteristics and performance of the system (Kania *et al.*, 2018; Kania *et al.*, 2019b; Kim *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015a; Kim *et al.*, 2015b). However, to our knowledge, no full-scale research has yet been published on N removal and its limitation in such systems.

In the present study, 29 full-scale AZOE and classical French VF-TW plants were monitored for overall inlet-outlet treatment efficiencies in terms of C and N. The respective contributions of the successive treatment steps were also investigated by conducting analyses at intermediate levels of the treatment line of the selected treatment plants. One of the objectives was to assess limitations observed in N removal, in order to test possible adaptations of operating conditions that may improve treatment efficiencies.

### 3.1.2 MATERIALS AND METHODS

#### 3.1.2.1 GENERAL DESCRIPTION OF STUDIED SYSTEMS

The classical VF-TW, also called “French VF system”, comprises two successive TW stages planted with reeds and fed in a vertical flow mode. The influent wastewater is firstly screened to remove coarse particles larger than 20 to 30 mm. The first TW stage is divided into 3 hydraulically independent cells which are alternatively fed by batches for one week each and rested for 2 weeks while other cells are fed. The second TW stage comprises 2 cells which are fed and rested every other week. Feeding is designed at a flow rate above  $0.6 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  to ensure a good water distribution through the whole surface of cells (Molle et al., 2005).

The AZOE system combines the classical French VF-TW treatment stages described above with following additional processes or operations:

- a) A first treatment on an aerobic TF with adjustable recirculation rate. Aerobic TF has proven very efficient in carbon oxidation and may contribute also to nitrification. The bioreactor is packed with a plastic crossflow media having a specific surface ranging from 100 to 150  $\text{m}^2/\text{m}^3$ . The growth of biofilm on the surface of packing media increases the cellular density in the bioreactor as compared to suspended system (Daigger and Boltz, 2011). Wastewater influent is uniformly sprinkled over the top of the reactor and trickles downward through the packing media to drainpipes. Aeration occurs via natural circulation of air through media. Previous studies suggested a significant but variable contribution of the trickling filter to total nitrogen removal, ranging from 15 to 50% (Kim *et al.*, 2014).
- b) A syphon system at the outlet of each TW stage allows to adjust the depth of their water saturated zone to regulate the nitrification/denitrification balance between oxic conditions in the top unsaturated part and anoxic conditions in the lower saturated part.
- c) Addition of ferric chloride into outlet effluent from the TF is conducted in some of selected treatment plants for phosphorus retention (Kim *et al.*, 2015).

Some of the AZOE treatment plants monitored here were designed with one single stage of TW instead of 2, with a shallow saturated zone. This modification was used to make the system even more compact with a footprint as low as  $1 \text{ m}^2/\text{pe}$ , while maintaining still good

performance. Figure 3.1-1 summarizes technical design characteristics of VF-TW and AZOE systems in monitored 29 full-scale treatment units.

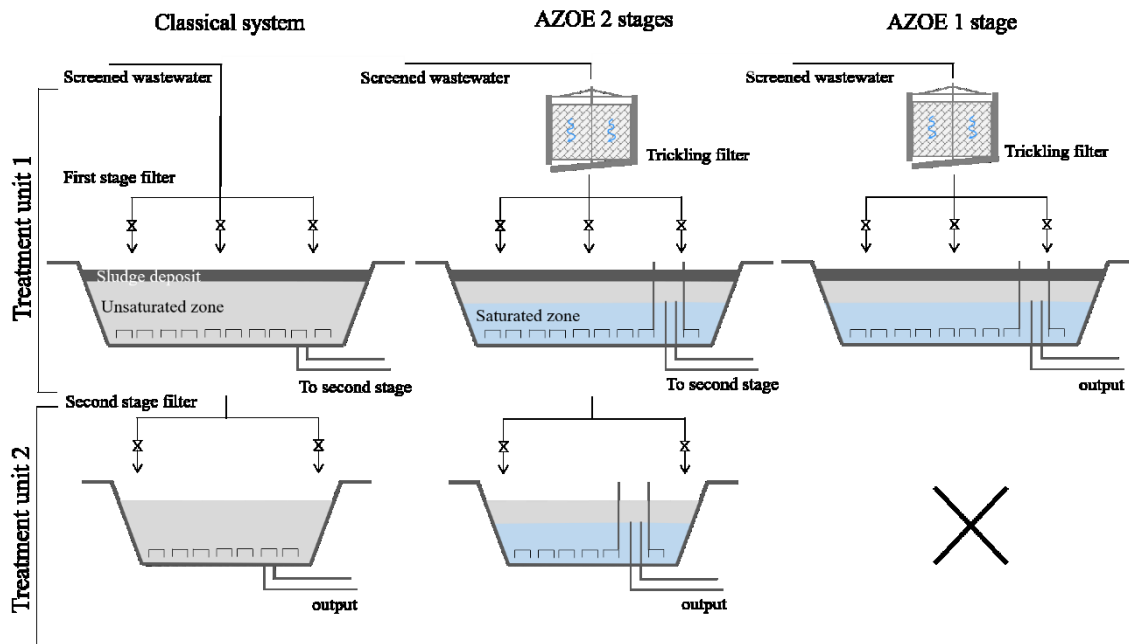


FIGURE 3.1-1 : SCHEMATIC DESCRIPTION OF THE CLASSICAL FRENCH VFTW SYSTEM AND THE AZOE SYSTEMS

### 3.1.2.2 PROCESS CONFIGURATIONS OF SELECTED TREATMENT PLANTS AND DESIGN OF MONITORING CAMPAIGNS

Table 3.1-1 gathers general information on 29 wastewater treatment plants monitored in this study, all located in France, mostly in the eastern part of the country. As shown in Figure 1, their configurations differed from each other by (i) the presence or not of an aerobic TF, (ii) the number of TW filter stages (1 or 2) and (iii) the levels of water-saturation in each stage filter.

Each treatment plant was monitored between 1 to 4 times by collecting and analyzing wastewater samples from (i) the inlet of the plant, (ii) the outlet of the 1<sup>st</sup> TW stage, (iii) the outlet of the 2<sup>nd</sup> TW stage. Inlet and outlet were systematically analyzed in all campaigns, while the outlet of the 1<sup>st</sup> TW stage was analyzed only in some of the campaigns as indicated in Table 1. In such cases, the overall treatment line was approached as 2 successive treatment units (TU) as shown in Fig. 1. Depending on the system, the TU comprised following operations:

- In the classical French system:
  - TU 1 = unsaturated 1<sup>st</sup>-stage TW
  - TU 2 = unsaturated 2<sup>nd</sup>-stage TW

- In the 2-stage AZOE system:
  - TU1 = aerobic TF + partially saturated 1<sup>st</sup>-stage TW
  - TU2 = partially saturated 2<sup>nd</sup>-stage TW
- In the 1-stage AZOE system:
  - TU1 = aerobic TF + partially saturated 1<sup>st</sup>-stage TW
  - TU2 = None

TABLEAU 3.1-1 OVERVIEW ON THE VF TW TREATMENT PLANTS SELECTED FOR THE STUDY

Location (year of implementation)	System	Nominal PE	Sizing (m <sup>2</sup> per PE)			Nb of campaigns	With inter. data*
			Total	1 <sup>st</sup> stage	2 <sup>nd</sup> stage		
Arbecey (2018)		300	2.5	1.5	1	1	
Sainte-Hélène (2006)		400	2	1.3	0.7	1	Yes (1)
Bagé-la-Ville (2007)	Classical VFCW system	920	2.4	1.55	0.85	2	
Soncourt-sur-Marne (2014)		450	2.4	1.5	0.9	1	
Saint-André de Boégé (2004)		630	2	1.3	0.7	1	
Saint-Boil (2018)		500	2.5	1.5	1	1	Yes (1)
Villemotier (2008)		350	2	1.3	0.7	1	
Trans-la-Forêt (2013)		450	1.5	1	0.5	4	Yes (4)
Ciel (2017)		1200	1.4	0.85	0.55	1	
Petit-Noir (2012)		1500	1.5	1	0.5	2	
Reillane (2013)	AZOE - 2 Stages	1950	1.5	1	0.5	2	
Lavernay (2018)		1080	1.5	1.1	0.4	1	
Saint-Michel- l'Observatoire (2016)		1200	1.45	0.9	0.55	1	
Saint-Lupercé (2012)		1300	1.3	0.85	0.45	4	

Saint-Paul-de-Varax (2019)		2500	1.4	1	0.4	1	
Saint-Désert (2015)		1000	1.5	1	0.5	4	Yes (2)
Vercia (2004)		600	2	1	1	1	Yes (1)
Cormatin (2015)		1000	1.5	1	0.5	3	Yes (2)
Thoard (2013)		800	1.1	1.1	-	4	
Pouligney-Lousans (2014)		1000	1.1	1.1	-	1	
Corcelles-les-Citeaux (2019)		1250	1	1	-	1	
Cras-sur-Reyssouze (2016)	AZOE - 1 Stage	1125	1	1	-	2	
Curtafond (2016)		700	1	1	-	1	
Dauphin (2016)		1083	1.1	1	-	1	
Masserac (2017)		770	1	1	-	1	
Marlieux (2019)		1250	1	1	-	1	
Ventrol (2017)		188	1	1	-	1	

\*Indicates campaign including data in between first and second stage. If not, only input and output data are available

### 3.1.2.3 ANALYTICAL METHODS

All wastewater samples were collected using 24h flow-proportional samplers, were transported to the laboratory at 4°C and analyzed within a maximum of 24h. All analyses were done in triplicates following French standard methods (AFNOR, 2005). The following parameters were analysed: Total Suspended Solids (TSS), Chemical Oxygen Demand (COD), five-day Biochemical Oxygen Demand (BOD<sub>5</sub>), Total Kjeldahl Nitrogen (TKN), ammonium (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), and nitrate (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

### 3.1.2.4 EXPLOITATION OF MONITORING DATA

Analytical results were used to determine in each system (1-stage AZOE, 2-stage AZOE and classical systems respectively) and for each variable:

- The overall inlet-outlet removal rates relative to the reduction of concentrations and mass flows
- The contribution of each TU relative to its inlet-outlet reduction of concentrations and mass flows

Treatment efficiencies were calculated as the average overall percentages of removal of the considered parameters of wastewater quality between the inlet and the outlet of the treatment plants. Nitrification and denitrification were represented by the TKN and TN removal rates, respectively.

#### 3.1.2.5 STATISTICAL ANALYSIS

The respective efficiencies of the overall treatment systems or the TU were compared by Wilcoxon-Mann-Whitney statistical method. Ranking hypotheses were considered true if  $p$ -value was smaller than 0.05. All statistical calculations were done using R software.

### 3.1.3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1.3.1 CHARACTERISTICS OF INFLUENT WASTEWATERS

Figure 3.1-2 gathers, for all monitoring campaigns on selected 29 treatment plants, the influent wastewaters characteristics; pH and concentrations of COD, BOD<sub>5</sub>, TSS, TKN and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. The average concentrations were found quite typical of raw domestic wastewaters compositions from communities below 2000-person equivalent in France (Mercoiret, 2010). pH values were globally close to neutrality or slightly alkaline. All treatment plants selected for the study were therefore fed with typical domestic wastewaters of rural and semi-rural areas in France.

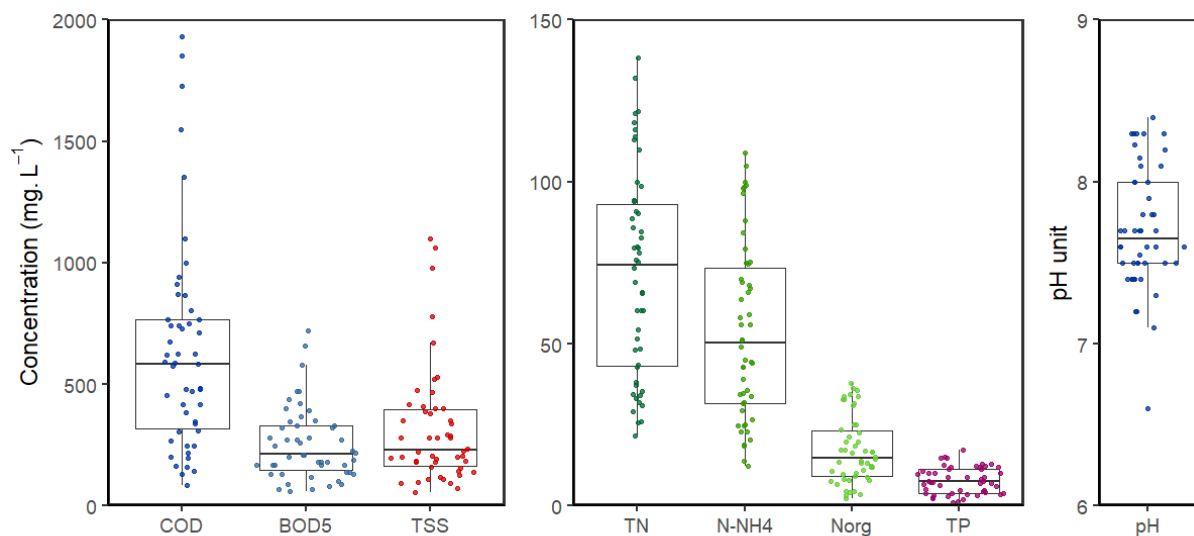


FIGURE 3.1-2 : DISTRIBUTION OF PH AND COD, BOD<sub>5</sub>, TSS, TKN, AND AMMONIUM CONCENTRATIONS IN INFLUENT WASTEWATERS FROM THE WHOLE DATA SET OF ALL MONITORING CAMPAIGNS

#### 3.1.3.2 OVERALL TREATMENT EFFICIENCIES

The whole data set gathered from all monitoring campaigns was firstly used to compare treatment efficiencies (by removal rates, Figure 3) between classical French, 1-stage AZOE and 2-stage AZOE systems (Table 1).

It can be observed that COD and BOD<sub>5</sub> removal rates were all above 85% and 90% respectively, revealing high treatment efficiencies regardless of the process configuration. These observations were in accordance with previously published studies conducted on classical French VF-TWs (Paing and Voisin, 2005; Molle, 2005; Morvannou et al., 2015). Suspended solids were efficiently removed (removal rate above 85%) due to their retention by

filtration through the surface sludge layer mostly composed of fine particles below 100  $\mu\text{m}$  (Kania et al., 2018) and through the fine gravels bed below. Single-stage and 2-stage AZOE configurations exhibited very similar TSS input/output removal rates, indicating that a single stage of filtration was sufficient to remove suspended solids from domestic wastewaters. TSS removal rates were the same in classical French and AZOE systems, revealing that the suspended solids released from the TF operation were retained to the same extent as those of the raw wastewater influents.

On the other hand, TKN removal (nitrification) was strongly affected by process configurations, particularly the presence or not of a second TW stage. The 2-stage processes (classical French system and 2-Stage AZOE) exhibited high and stable TKN inlet-outlet removal rates, respectively 94 and 95%, whereas the 1-stage AZOE system showed a TKN removal rate of 86%. These results showed that the second TW stage provided significant contribution to the nitrification process ( $p = 0,001$ ).  $\text{O}_2$  availability was therefore sufficiently high to allow the microbial oxidation of ammonia and organic forms of N, both within the aerobic TF and in the unsaturated zones of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> TW stages.



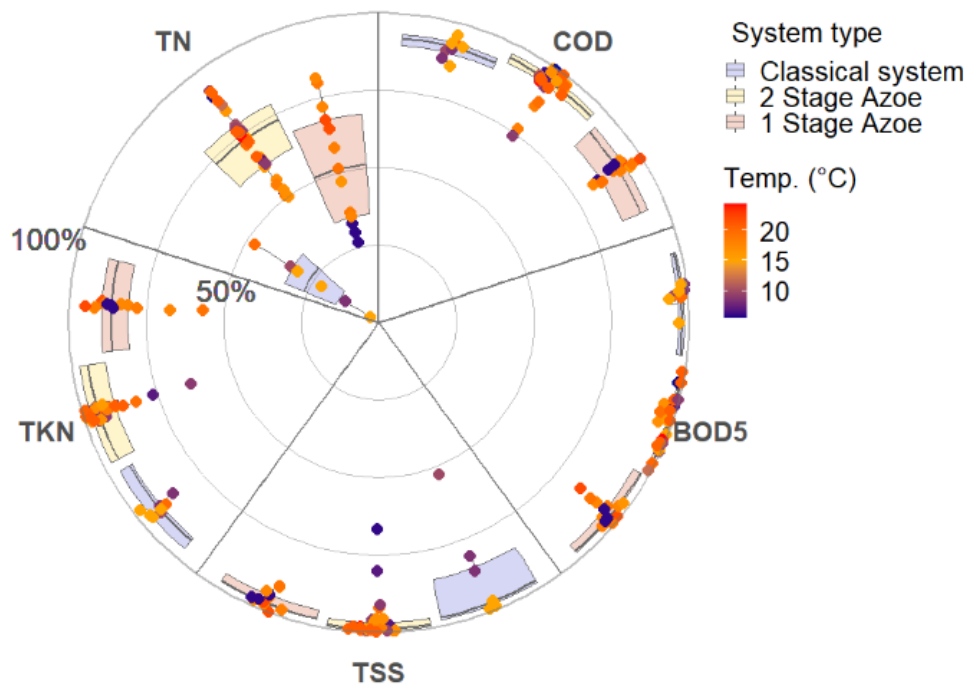


FIGURE 3.1-3 :COMPARATIVE INPUT / OUTPUT (I/O) REMOVAL RATES OF COD, BOD5, TSS, TKN AND TN IN THE CLASSICAL FRENCH (RED), 1-STAGE AZOE (BLUE) AND 2-STAGE AZOE (YELLOW) SYSTEMS. FOR EACH SYSTEM, MIDDLE LINES WITHIN BOXPLOT ARE MEDIAN VALUES. DOT COLOUR REPRESENTS THE WATER TEMPERATURE (°C).

Denitrification demands anoxic conditions which, can be observed only in the water-saturated anoxic zones of the monitored TW filters. Strong differences were observed on TN removal between Classical VFCW, 1-stage AZOE and 2-stage AZOE systems with 21, 55, and 75% removal rates, respectively. The low performance of the classical French system configuration in TN removal (Figure 3.1-3) was attributed to the absence of water-saturated zone in either stage of TW filters (Kim *et al.*, 2015a). AZOE process configurations allowed higher TN removal rates thanks to the presence of anoxic conditions within saturated zones of the first and/or second filter stage (Kim *et al.*, 2014). TN removal rates in 2-stage AZOE system (73%) were higher than in 1-stage AZOE system (52%) ( $p = 0,004$ ), suggesting the contribution of the second TW stage in the denitrification process. However, the variability of the data within each individual treatment plant was much higher for TN than other parameters, particularly in the single stage system since this configuration was not designed to operate denitrification. Even in the 2-stage AZOE system, specifically designed for denitrification, the results of TN

removal from each individual TU were much more variable than those of carbon removals. Water temperatures during the monitoring campaigns ranged between 5,5 and 24,5 °C as illustrated by the colours of the dots in Figure 4. Although it can be expected that low temperatures reduced treatment efficiencies due to lower microbial kinetics, it can be seen that temperatures cannot fully explain the variability of the data.

### 3.1.3.3 CONTRIBUTION OF THE TREATMENT OPERATIONS TO C AND N REMOVALS IN CLASSICAL AND AZOE SYSTEMS

Depending on the considered system, the treatment line was composed of a succession of different processes and operations. These operations were approached here as “treatment units” (TU) as shown in Figure 1 and discussed in the “Materials and Methods” section.

Figure 3.1-4 compares for each type of system the contributions of TUs in terms of the percentage of reduction of the concentrations of the monitored variables. The contribution of the second-stage filter (TU2) to COD removal was around 5.5% and 1.5% in the classical VF-TW and 2-stage AZOE systems respectively. This was marginal as compared to the contribution of TU1 in the classical system (83.5%) and the 2-stage AZOE system (92%).

In contrast, it was observed in the classical VF-TW system that most of the nitrification process occurred in the second-stage filter (TU2) with  $69 \pm 4.9\%$  TKN removal vs. only  $20 \pm 9\%$  in the first-stage filter (TU1). These observations confirmed the role of the second-stage filter in the classical VF-TW as previously reported (Morvannou et al. 2015, and Molle 2005).

In the 2-stage AZOE system however, the contribution of TU2 (second-stage filter) to nitrification was smaller than in the classical system with  $11 \pm 6\%$  of TKN removal. Nitrification was found to occur mostly in TU1 (77% TKN removal). This observation was attributed to effects of the aerobic biological TF in AZOE systems which contributed not only to organic carbon removal but also to nitrification (TKN removal).

TN removal remains very low or null for both classical VFCW TU which is consistent as the system does not provide anaerobic conditions while the 1-stage AZOE still allows the removal of 52%. In the 2-stage AZOE system, TN removal is largely performed by TU 1 which implies relatively poor denitrification activity in the second stage.

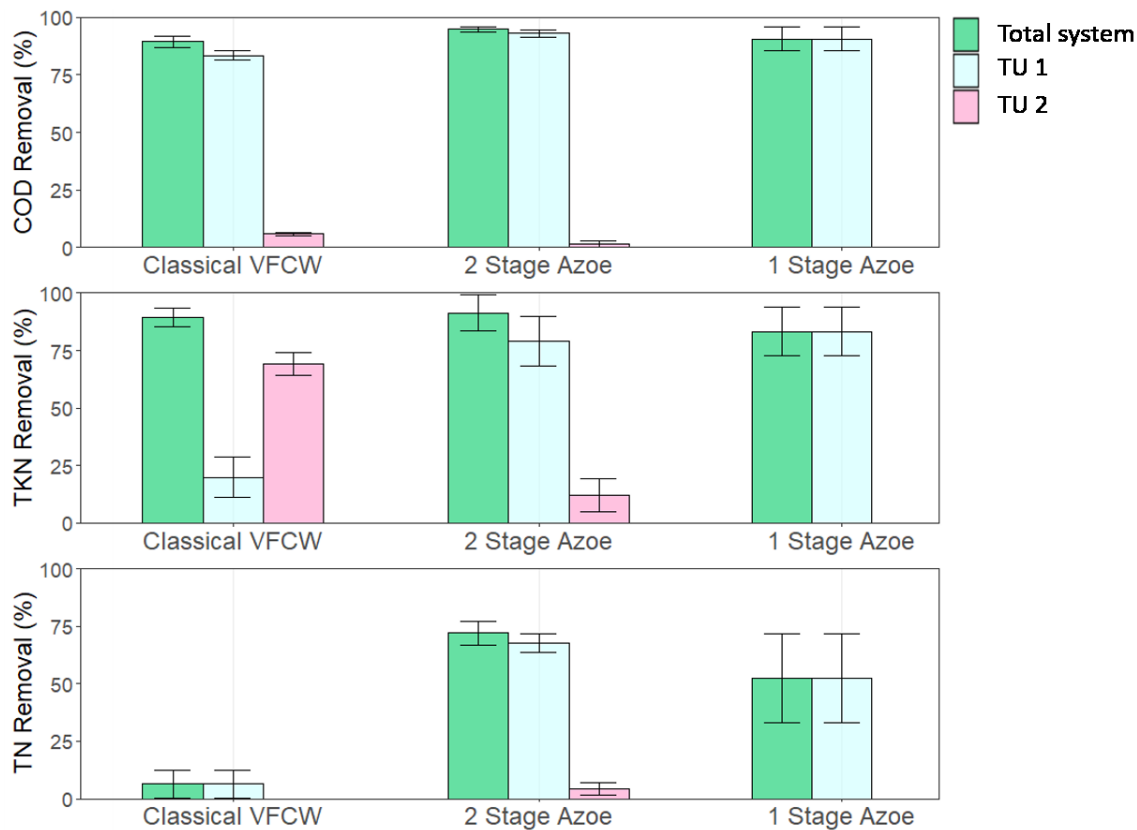


FIGURE 3.1-4 :COD AND TKN REMOVAL RATES OF THE TOTAL SYSTEM, TU1 AND TU2 FOR CLASSICAL, 1-STAGE AZOE AND 2-STAGE AZOE CONFIGURATIONS. SEE FIGURE 3.1-1 FOR DEFINITIONS OF TU1 AND TU2. BARS REPRESENT THE STANDARD DEVIATION.

#### 3.1.3.4 MASS LOADS REDUCTION EFFICIENCIES IN 2-STAGE AZOE® SYSTEMS

The monitored parameters in this study included volumetric data of wastewater flows treated in the selected treatment plants. Combined with analysed concentrations, the treatment efficiencies were calculated in terms of daily mass loads reductions. Results are shown in Figure 5 where removed loads were plotted for each variable as a function of applied loads. The respective contributions of TU1 (aerobic TF + 1<sup>st</sup>-stage TW filter) and TU2 (second-stage TW filter) are compared.

Figure 3.1-5 confirmed very high efficiencies of COD and BOD<sub>5</sub> removals in all monitored treatment plants. The mass removal rates of COD and BOD loads reached 90% for TU1 alone. Only a few percent of COD and BOD<sub>5</sub> input loads were released into the output effluents. Nitrification was found quite efficient in most of the campaigns and most of monitored treatment plants, with a mass removal rate of TKN above 75%. The contribution of the 2<sup>nd</sup>-

stage filter to nitrification was low but significant. The second stage was shown to act as a safeguard “polishing” stage to guarantee high treatment efficiencies.

In the 2-stage AZOE system, denitrification recorded in TU1 ranged between 75 and 95% of TN mass removal (excepted for one isolated result at 40%). Since denitrification may occur only under anoxic conditions, this observation showed that the water-saturated zone at the bottom of the first-stage TW filter allowed to install anoxic conditions for an efficient denitrification of at least 75% of TN removal.

The rest of denitrification occurred in the second stage filter where excess nitrates from the first stage along with nitrates produced by TKN oxidation within the unsaturated upper zone of the 2<sup>nd</sup>-stage filter were reduced within the saturated anoxic zone. The residual nitrates load was however significant in the outlet of the second stage, indicating that denitrification in the second stage was not efficient enough, suggesting a limitation of the process. This observation suggested perspectives of improvement of the systems by optimizing the second-stage filter contribution.

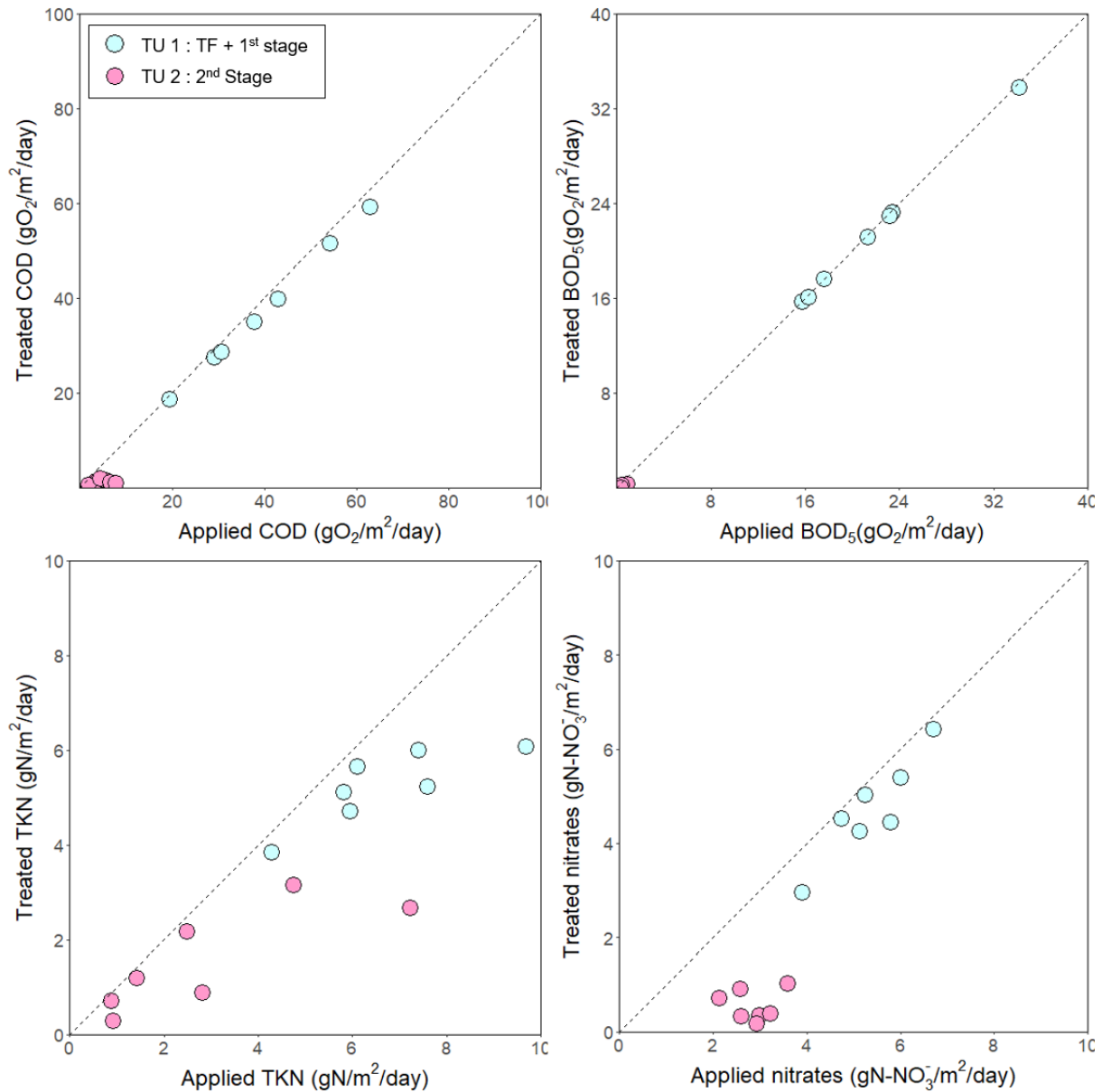


FIGURE 3.1-5 : REMOVAL EFFICIENCIES OF BOD<sub>5</sub>, COD, TKN AND NO<sub>3</sub>- OF THE 2-STAGE AZOE SYSTEM ON A MASS LOAD BASIS. BLUE AND PINK CIRCLES SHOW THE RESPECTIVE CONTRIBUTIONS OF TU1 AND TU2. SEE FIG. 1 FOR TU DEFINITIONS.

### 3.1.3.5 TOTAL NITROGEN REMOVAL AND LIMITATIONS TO DENITRIFICATION

Results from the monitoring campaigns revealed that the denitrification process was incomplete in all treatment systems studied. Output nitrates concentrations ranging between 6 and 39 mg/l N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> were recorded although most factors were favourable to a higher denitrification rate. Hydraulic retention time was adjusted to 1.2 days by setting to 50 cm the depth of the water-saturated zone in both stages. This hydraulic retention time was considered as favourable (Morvannou et al, 2017). This mode of operation also allowed the installation of

anoxic conditions in the lower parts of the TW filters, which was favourable to denitrification. Finally, pH ranging from 7.2 to 8.2 was also favourable to nitrification and denitrification processes (Šimek and Cooper, 2002).

The  $BOD_5/N-NO_3^-$  mass ratio was not favourable however in the second-stage TW filters of all monitored systems. It ranged between 0.05 and 1.5 (with an average of 0.62) whereas values between 2.5 and 3 are usually considered as optimal for heterotrophic denitrification (Rocher et al., 2015). This situation was a consequence of the high oxidation of the carbon load done in treatment unit TU1 (aerobic TF + 1<sup>st</sup>-stage TW filter). The second-stage filter acted as a polishing stage for nitrification in the upper part, but denitrification in the lower saturated part was limited by the poor availability of biodegradable organic substrates.

Carbon supply in the form of simple substrates such as methanol, glucose or acetate (Saeed and sun, 2012) can be considered as a corrective action to improve denitrification. Another solution, probably cheaper and more sustainable, would be to use locally available biowaste materials (Van Oostrom and Russel, 1994; Wen et al., 2010). The amounts needed, the type of substrates and the modalities of addition should be carefully determined to completely consume the amounts of carbon added and avoid residual COD concentrations in the effluent. Diverting a fraction of raw influent to feed the second stage may also be a possible and simple approach. Previous published studies done on a hybrid VF-HF TW system showed that this approach allowed to improve total nitrogen removal by 31 to 50% (Torrijos et al. 2017). Other studies at larger scales also gave encouraging results (Nivala et al., 2019, Al-Wahaibi et al., 2021).

This approach could be implemented on 2-stage AZOE systems by diverting raw wastewater from pumping station 1 to pumping station 2 (Figure 3.1-1) to supply biodegradable organic substrates to the 2<sup>nd</sup> TW and thereby enhance its denitrification rate. Figure 3.1-6 illustrates the fate of carbon and nitrogen in the treatment line of 2-stages AZOE systems, and highlights the possible operational conditions to optimize nitrification – denitrification processes. In this configuration, the saturation level of the TWs and the recirculation rate on the TF should be adjusted to allow the highest reachable performance.

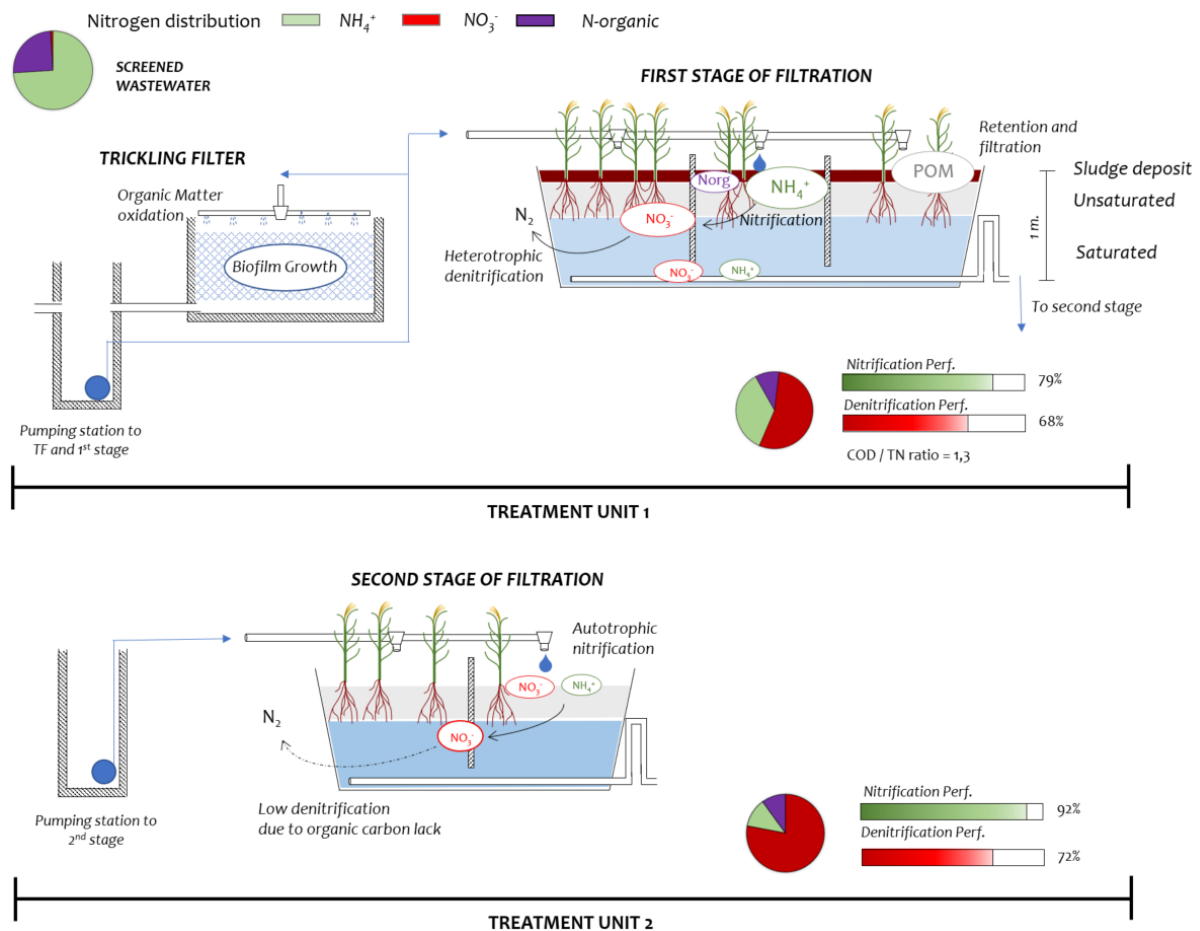


FIGURE 3.1-6 : CONCEPTUAL FRAMEWORK OF CARBON AND NITROGEN REMOVAL PATHWAYS ON 2-STAGES AZOE

### 3.1.4 CONCLUSION

The present study reports and discusses results collected over a period of time of 13 years from several monitoring campaigns of 29 full-scale operating TW wastewater treatment plants in France. Clear inter-relationships were evidenced in the performance of carbon and nitrogen removals in 1-stage and 2-stage VF-TW combined with a first treatment operation on aerobic biological TF.

Overall removal rates of COD, BOD<sub>5</sub> and TSS were very high in all monitored systems. They were slightly lower in the classical French systems than in AZOE systems where the TF provided a strong contribution.

Nitrogen dynamics in AZOE systems differed as compared to classical systems. The implementation of an aerobic TF as a first treatment stage in AZOE systems increased nitrification. More than 75% of input TKN load was nitrified within TU1. The second-stage filter

contributed furthermore to the nitrification. The water saturation of lower parts of TW filters was favourable to denitrification. It was observed however that denitrification was relatively high in the first stage-filter but quite limited in the second-stage filter although both filters were saturated at the same depth.

Analyses of the evolution of the C/N ratio in the wastewater along the process line revealed a lack of carbon in the second-stage filter, underlining this parameter as the major cause of the low denitrification observed within the second-stage filter which can be improved for optimizing this treatment unit.

### CREDIT AUTHOR STATEMENT

**Kevin Maciejewski:** Conceptualization, Methodology, Data Curation, Writing – Original Draft.

**Mathieu Gautier:** Conceptualization, Methodology, Writing – Review & Editing, Supervision.

**Boram Kim:** Conceptualization, Methodology, Data Curation, Writing – Review & Editing.

**Philippe Michel:** Writing – Review & Editing. **Rémy Gourdon:** Conceptualization, Writing – Review & Editing, Supervision

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was realized within the Graduate School H2O'Lyon (ANR-17-EURE-0018) and the Université de Lyon (UdL), as part of the programme "Investissements d'Avenir " of the French national agency for research (Agence Nationale de la Recherche, ANR). The authors would like to thank the SCIRPE Company and CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la REcherche) for funding this research project.





## A RETENIR

Ces travaux se sont basés sur l'exploitation de données de 29 bilans de stations classiques et AZOE-N à un ou deux étages de filtration à écoulement vertical. Ces travaux ont permis de renforcer les connaissances sur ces systèmes. Tout d'abord les performances en termes d'abattement de MES sont toutes supérieures à 95%. Ce résultat, déjà largement montré par la communauté scientifique, met clairement en évidence le rôle du milieu poreux dans la rétention des matières particulaires dans les systèmes français, et plus notamment le rôle du 1<sup>er</sup> étage qui voit l'accumulation d'une couche de boues de surface.

Les principaux points à retenir sont les suivants :

Tous les systèmes étudiés dans cet article fonctionnent avec un flux hydraulique vertical. Le premier étage joue un rôle considérable puisqu'il retient la matière particulaire en formant à son sommet une couche de boues de surface. Les performances sur les MES sont toutes supérieures à 95% ;

La présence du lit bactérien en tête de traitement dans le système AZOE permet d'abattre la quasi-totalité du carbone et de réaliser 80% de la nitrification avant que l'effluent ne soit traité sur le second étage ;

Le second étage joue un rôle de polissage de la nitrification et sécurise la filière en cas de dysfonctionnement ;

Le premier étage contribue très largement à la dénitrification dans sa zone saturée. Malgré la présence de nitrates et d'une zone saturée, les performances de dénitrification oscillent à des valeurs limitées entre 5 et 10% au niveau du second étage ;

Le potentiel du second étage semble largement sous exploité. Le principal levier de l'optimisation de la filière AZOE en termes de performances sur l'azote passe par l'amélioration du rôle du second étage, notamment à travers l'augmentation des performances.



## PREAMBULE :

En s'intéressant aux résultats de stations en fonctionnement, le paragraphe précédent a clairement mis en avant les performances de stations du procédé AZOE-N spécifiquement conçu pour le traitement de l'azote. Ces travaux, résultant de bilans 24h sur stations en fonctionnement, ont clairement montré les bonnes performances globales des systèmes AZOE-N étudiées. Cependant afin de mieux maîtriser les rejets d'azote dans des milieux récepteurs très sensibles, voire d'optimiser ces teneurs en azote dans ces objectifs de réutilisation des eaux usées, des compléments s'avèrent nécessaires. L'un des objectifs est de mieux comprendre quelles limites présente ces systèmes afin de pouvoir y faire face le cas échéant.

Cette partie inclut 2 articles, présentés dans les paragraphes 3.2 et 3.3 suivants, qui se base pour le 1<sup>er</sup> sur un suivi pilote sur un temps long à travers une démarche expérimentale basée sur des échantillonnages et des analyses physico-chimiques classiques. Le 2<sup>nd</sup> article s'est intéressé à une séquence plus courte pour mieux comprendre la dynamique de l'azote au sein du système, notamment à travers le développement d'une approche analytique par méthode isotopique.

### ***“Effect of organic load variation in a domestic wastewater treatment system combining an aerobic trickling filter and two successive partially saturated vertical flow treatment wetland filters”***

Cet article analyse des données de suivi ponctuel et continu d'une expérimentation pilote au sein de laquelle l'ensemble de la filière AZOE-N a été reproduite, à savoir le lit bactérien, le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>nd</sup> étage. A travers ce suivi dans le temps, deux conditions saisonnières différentes ont pu être distinguées, à savoir l'automne et le printemps. La charge organique journalière printanière est supérieure à celle d'automne et permet d'étudier l'influence de cette charge sur les performances globales.

### **“Pilot-scale Investigation of the fate of ammonium in Vertical-Flow Treatment Wetland Using <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N isotope ratio monitoring “**

Cet article propose de croiser les informations issues d'un traçage hydraulique conventionnel par traceur fluorescent avec un traçage isotopique par l'ajout d'ammonium marqué sur toute la filière. La partie isotopique a fait l'objet d'un développement analytique en collaboration avec l'équipe isotopie de l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon.



---

## 3.2 ÉTUDE A LONG TERME DU SYSTEME A L'ÉCHELLE PILOTE ET DE L'INFLUENCE DES VARIATIONS DE CHARGES



# EFFECTS OF ORGANIC LOAD VARIATION IN A DOMESTIC WASTEWATER TREATMENT SYSTEM COMBINING AN AEROBIC TRICKLING FILTER AND TWO SUCCESSIVE PARTIALLY SATURATED VERTICAL FLOW TREATMENT WETLAND FILTERS.

K. Maciejewski<sup>a,b</sup>, M. Gautier<sup>a</sup>, B. Kim<sup>a</sup>, P. Michel<sup>b</sup>, P. Molle<sup>c</sup>, R. Gourdon<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Univ Lyon, INSA Lyon, DEEP, EA7429, 69621 Villeurbanne, France

<sup>b</sup>SCIRPE, Society of Design and Production Engineering for Wastewater Purification, 5 Allée Alban Vistel, 69110 Sainte Foy Lès Lyon, France

<sup>c</sup>Institut national de recherche pour l'agriculture et l'environnement (Inrae) - UE Reversaal, Villeurbanne, France

## Abstract

AZOE processes are patented technologies for the treatment of domestic wastewaters from small communities. They associate an aerobic trickling filter (TF) and two successive partially saturated vertical flow treatment wetlands (TW) filters planted with reeds. A pilot-scale AZOE system was constructed and operated on real domestic wastewaters to investigate the contribution of each treatment stage (TF, 1<sup>st</sup> and second TW filters) to the removal of Chemical Oxygen Demand, Total Suspended Solids and nitrogen. The effect of organic load variation induced by seasonal parameters was also investigated by monitoring the system under the same operating conditions in autumn and spring. Results showed that the trickling filter removed about half of the organic load regardless of the season. Online monitoring of ammonium and nitrate concentrations at the outlets of the first and second TW filter stages clearly showed the flow of nitrates produced in the first filter and transferred to the second one. Nitrification rate was found to be lower however when the feed organic load was higher. The first filter stage showed strong contributions both to nitrification and denitrification, respectively 79 and 41% in autumn and 54 and 48% in spring, due to the alternance of oxic and anoxic conditions in its unsaturated and saturated zones respectively. The contribution of the second TW filter was low but this stage revealed the capacity to adapt to increasing feed loads, thereby acting as a buffer polishing treatment to maintain low output concentrations. The lack of carbon was assumed as a most limiting factor to denitrification on the second stage.

## Highlights

TF performance variability strongly influences first stage nitrogen removal

First stage filter achieves most of the denitrification

A peak of nitrates concentration is observed at first stage outlet shortly after feeding

Second stage filter guarantees high COD and TKN removal rates



Organic carbon availability in second-stage filter is the main limitation to denitrification

### Keywords

Constructed wetland, Wastewater Treatment, Trickling filter, Nitrogen treatment, Carbon to Nitrogen ratio

### 3.2.1 INTRODUCTION

Over the last 30 years, constructed wetlands (CWs) have been implemented very successfully worldwide with different process designs and under various climatic conditions (Varma et al., 2021). Appreciated for their good integration to rural landscape, their low operating and management costs and their high treatment performance, CWs are reliable alternatives to intensive systems for domestic wastewater treatment in rural area. Constructed wetland can either be unsaturated or saturated, with horizontal or vertical hydraulic. More occasionally, hybrid systems are also used (Vymazal, 2013). In France, VFCWs are by far predominant in practice. They contribute to the treatment of around 2% of the overall volumes of wastewater treated, and even up to 10 % in townships and rural areas of less than 4000 Person Equivalent (Eau France, 2019). The regular VFCW system most widely used in France is fed directly with screened but unsettled wastewaters and consists of two successive unsaturated filtration stages, alternately fed for 3.5 days and rested for 1 week. Under these operational conditions, the system guarantees a quasi-quantitative retention of suspended solids and good oxidizing conditions which allow high mineralization rates of organic load and strong nitrification of nitrogen load (Molle et al., 2005; Paing and Voisin, 2005). This system, known as the classical French system, has been the basis to many innovations driven by the need to make the system more compact and improve phosphorus and total nitrogen removals. The treatment design allowing to remove efficiently total nitrogen must firstly provide well aerated and oxidising conditions for the nitrification process and the oxidation of organic nitrogen, followed by anoxic conditions for denitrification. Denitrification results from microbial activities and is favoured by many factors such as very low dissolved oxygen concentrations, a close to neutral pH, relatively high hydraulic retention times and a sufficient availability of biodegradable organic substrates (Lee et al., 2009; Kadlec and Wallace, 2009, Faulwetter et al., 2009).

The required succession of oxic and anoxic conditions can be achieved by modifying the process design and mode of operation of the regular VFCW system. Particularly, water saturation of the lower part of the filters has been designed to implement oxic conditions within the upper part followed by anoxic conditions in the lower part (Kim et al., 2015; Silveira et al., 2015, Kraiem et al., 2021). Using such a configuration, other adaptations were further developed to enhance total nitrogen removal rates, such as correcting organic carbon deficiencies to heterotrophic denitrifying communities through the addition of organic carbon of various natures and origins (Wu et al., 2014; Nivala et al., 2019; Wang et al., 2020; Al-Wahaibi et al., 2021;). Other process adaptations were also proposed such as forced aeration and recirculation of wastewater through the partially saturated filters to promote nitrification and denitrification simultaneously (Foladori et al., 2013, Boog et al., 2014). Finally, the implementation of pre-treatment operations, such as on an aerobic trickling filter (TF), was also proposed and used to improve treatment efficiency (Henrich and Marggraff, 2013; Vucinic et al., 2012; Kim et al., 2014; Stefanakis et al., 2019; Akratos et al., 2020). An aerobic TF is system where the water to be treated percolates through a solid porous media having a high surface area and sufficient porosity to allow a microbial biofilm to grow on its surface, while the percolation regime leaves enough porosity to allow natural aeration (Daigger and Boltz, 2011).

The AZOE system (patents EP1857419; FR 0651656; FR 1153754) is a combination of an aerobic TF pre-treatment operation followed by two successive partially saturated filtration stages planted with reeds. The system is being used in more than 50 plants in France with an average treatment capacity around 800 - 1200 Person Equivalent (PE). In addition to reducing the treatment footprint from 2 to 1.5m<sup>2</sup>/PE, this system allows for the capture of phosphorus by ferric chloride addition into the outlet effluent of the TF (Kim et al., 2014; Kim et al., 2016), as well as quasi total nitrification and 74% denitrification (Maciejewski et al., 2022). Despite these previous studies, an in-depth investigation was missing to better understand the respective role and/or limit of each step in the treatment chain and investigate way of improvement.

A pilot –scale AZOE system comprising the TF and the two partially saturated filtration stages was used in this study. It was fed permanently with real domestic wastewaters and monitored in the objective to investigate nitrogen removal processes, more particularly the

influences of the organic carbon/nitrogen ratio and the TF pre-treatment. To achieve this goal, ORP, nitrates and ammonium probes were used to monitor online the system.

### 3.2.2 MATERIALS AND METHODS

#### 3.2.2.1 SET-UP OF PILOT-SCALE DEVICE

A pilot-scale treatment unit with a treatment capacity of 6 Person-Equivalent was constructed according to the design of a full AZOE<sup>®</sup>-N system. The experimental set-up comprised an aerobic trickling filter of 1.60 m high and 0.24 m<sup>2</sup> surface and two successive vertical-flow - filtration stages having a respective surface of 2 m<sup>2</sup>, a depth of 0.7 m and a volume of 1.4 m<sup>3</sup>. The TF is filled with a polypropylene cross pack whose volumetric surface area is 150 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>. The filter-stages were designed in a similar manner as in full-scale treatment units. They were filled with different layers of sand and gravels as shown in figure 1 and planted with Phragmites *Australis*. Before planting reeds, the first-stage filter was covered with a thin layer (5 cm thick) of organic deposits collected from a full-scale VFCW unit.

The pilot-scale device was installed in a greenhouse at the Feysine Experimental Hall, Villeurbanne, France. The experimental hall was connected to the AquaLyon 400 000 pe activated sludge wastewater treatment plant and continuously fed with freshly screened unsettled raw wastewater.

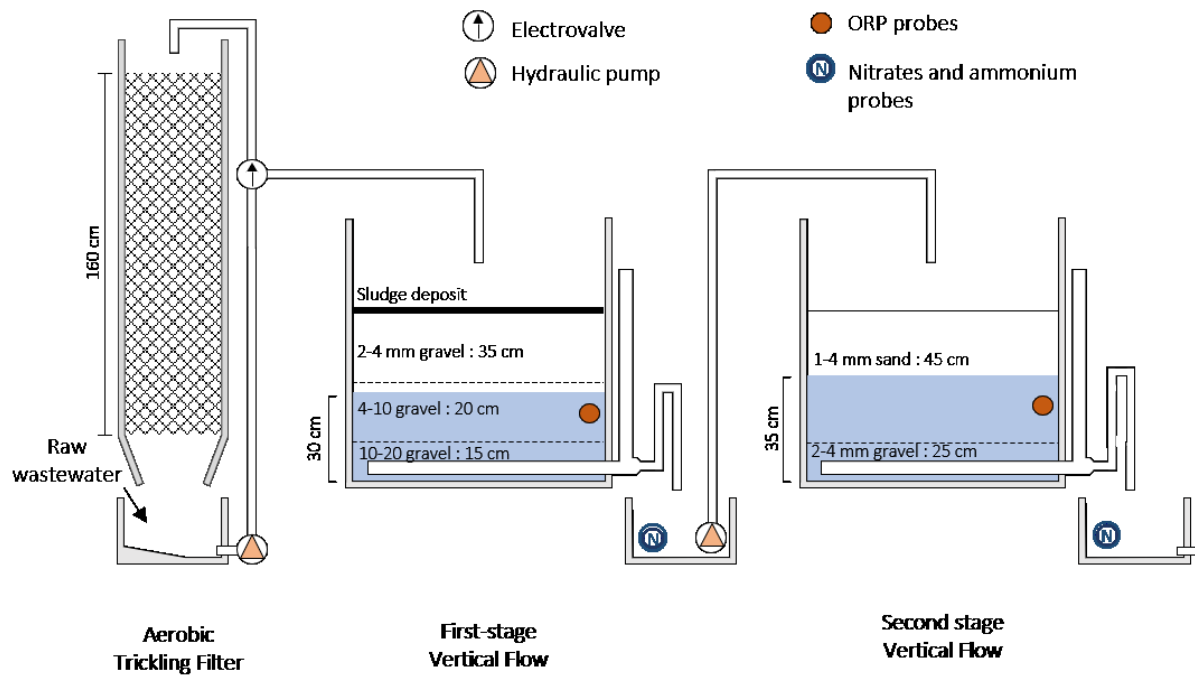


FIGURE 3.2-1 :SET-UP OF EXPERIMENTAL PILOT-SCALE AZOE SYSTEM OF 6-PERSON EQUIVALENT IN THE FEYSSINE EXPERIMENTAL HALL

### 3.2.2.2 OPERATING CONDITIONS

Raw wastewater was pumped into a feed tank reservoir at a constant rate of 25 litres per hour, so the daily volume treated on the pilot is 600 L. The trickling filter was operated discontinuously in a batch feeding mode. Every two hours, a batch of 60 L of raw wastewater pumped from the feeding reservoir was sprinkled in 30 minutes at the surface of the trickling filter with a flow rate of  $360\text{L}\cdot\text{hour}^{-1}$ . The recirculation percentage is therefore 200%, and the hydraulic load is  $0.37\text{ m}^3\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ . The first-stage filter was then fed by spreading the batch volume of the outlet effluent from the TF. Inlet wastewater flow rate was maintained at  $0.6\text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$ . The first and second filtration stages were saturated to a depth of 0.3 and 0.4m respectively, using syphons as shown in Fig. 3.2-1. The effluent from the first-stage filter was collected and the second-stage filter was then fed in the same manner as the first filter. Both filter stages were composed of a unique cell. The sequential feeding regime of 1 week feeding followed by two weeks resting used in full-scale treatment units was applied here with the same ratio but on shorter periods of time. The filters were fed for 56 hours of a week and rested for 112 hours of a week. During the resting periods, the outlet effluent from the TF was discarded. Experiments were conducted and monitored over two different periods of time, respectively in

autumn 2020 (October 28 to December 18) and spring 2021 (1 April 1<sup>st</sup> to May 8<sup>th</sup>) with a winter break in January and February when the temperature were too low. The pilot was put back into operation in early March.

### 3.2.2.3 ANALYTICAL METHODS

Wastewater samples were collected during the feeding periods from the following points: (i) raw-wastewater at the system inlet, (ii) TF outlet, (iii) first-stage filter outlet, and (iv) second-stage filter outlet. Each sample is a mixture of 3 samples taken at regular intervals during the day to obtain a more accurate representation of an operating day. Occasionally, wastewater samples were also taken from the top of the saturated zones in both filter stages using a thin piezometer installed within the filters. All samples were immediately analysed for pH, then refrigerated and stored for a maximum of 24h before the other analyses. Samples were frozen if longer storage time was needed. All parameters were analysed following French standard methods (AFNOR, 2005): Chemical Oxygen Demand (COD), Total Suspended Solids (TSS), ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), Total Kjeldahl Nitrogen (TKN), Total Nitrogen (TN). Total Organic Carbon (TOC) was analysed by a TOC-Analyzer Shimadzu TOC-L Model. Ultraviolet was measured with a spectrophotometer Shimadzu 2450.

### 3.2.2.4 ONLINE DATA ACQUISITION

Nitrates and ammonium concentrations and ORP were monitored online every minute. On line monitoring of nitrates and ammonium concentrations were done at the outlet of the TF and outlets of the first and second filtration stages respectively, using VARION PLUS NO3 and VARION PLUS NH4 probes purchased from WTW. A total of 4 ORP probes were installed at the top and the bottom of both stages of filtration using sheaths placed horizontally to limit possible preferential flows. All data were stored into a central of acquisition. ORP, nitrates and ammonium probes were routinely checked and deviation to standard control was calculated.

### 3.2.2.5 STATISTICAL TREATMENT

Analytical data were treated using R software and statistical methods.

Performance ratios were calculated using equation 1 for the different variables [X] monitored

$$(1) \text{ Performance (\%)} = ([X]_{\text{in}} - [X]_{\text{out}}) / [X]_{\text{out}} * 100$$

Applied and treated nitrates load on specific stage of treatment include the input of nitrates from nitrification of ammonium, using the equation 2:

$$(2) \text{ Applied } m\text{NO}_3^-_{\text{stage } x} = m\text{NO}_3^-_{\text{in, stage } x} + (\text{NH}_4^+_{\text{in, stage } x} - \text{NH}_4^+_{\text{out, stage } x})$$

Wilcoxon-Mann-Whitney statistical method was used to compare data series to each other, where hypothesis was considered true if p-value remained lower than 0,05.

### 3.2.3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.2.3.1 RAW WASTEWATER CHARACTERISATION

The input concentrations of carbon, nitrogen and total suspended solids for the two periods studied are shown in figure 3.2-2. Generally, the input effluents of the spring session are more concentrated, especially in COD ( $p = 0.04$ ). This can be explained by a lower dilution of the wastewater in spring by rainwater. The daily volume of water to be treated on the pilot is identical for both periods, therefore the daily organic load to be treated is higher in spring than in autumn. The impact of this difference in input load is significant, especially on the TF where the applied organic load is a parameter of primary importance on the treatment performance. Based on the average input concentrations in Table 1 ( $\text{BOD}_5$  conversion = 0.73 CODd), the applied organic load in autumn is  $2.00 \text{ kgBOD}_5/\text{m}^3/\text{day}$ , and 2.65 in spring.

The evolution of the inlet wastewater temperature over the monitored periods of time is shown in Fig. 3.2-2 for the spring and autumn periods respectively. The temperature fluctuated between 10 and 20°C in both seasons, and globally similar regardless of the season. It was observed however that temperatures recorded in autumn were more often below than above those recorded in spring. Autumn and spring are temperate and relatively mild seasons in the region where the study was done (Lyon, in the south east of France), and the greenhouse where the equipment was installed also helped regulate the room temperature.

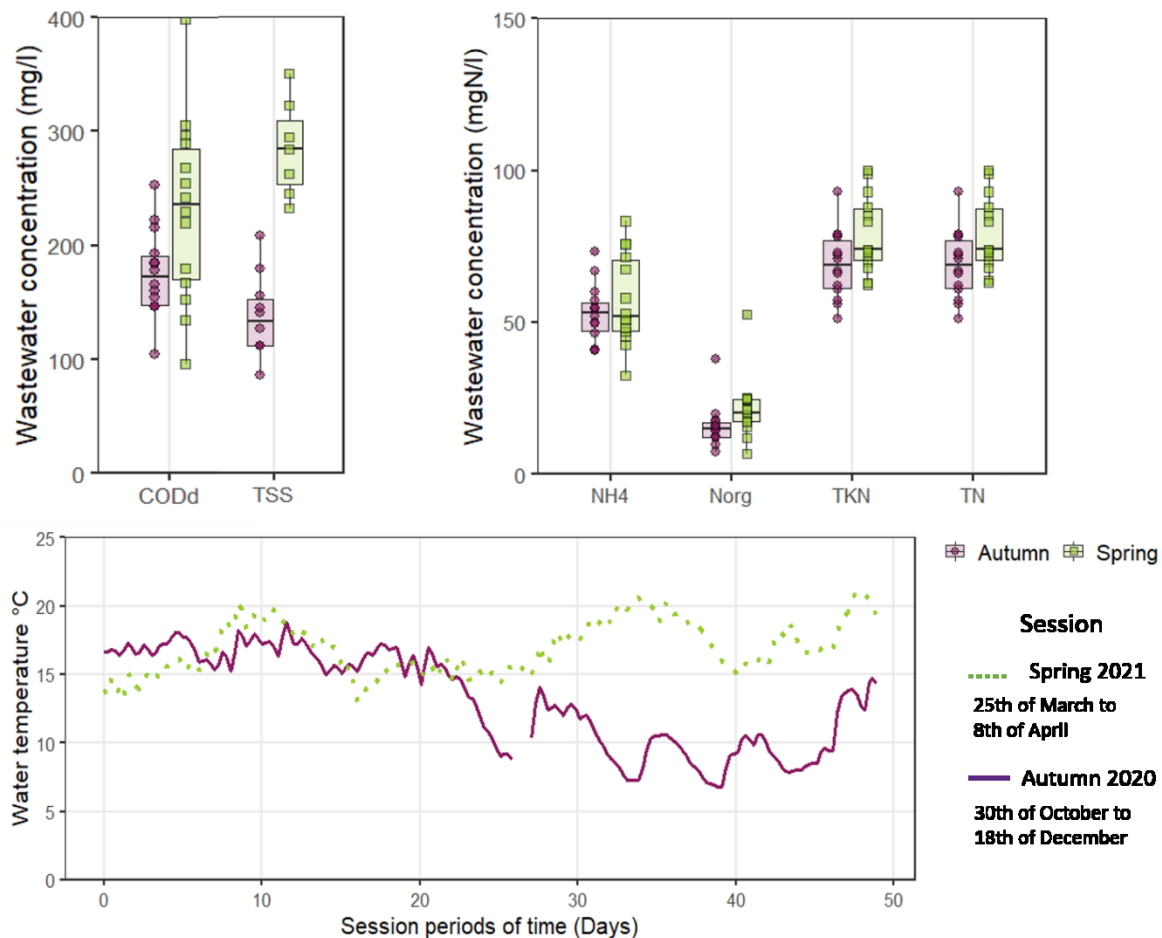


FIGURE 3.2-2 :TOP - RAW WASTEWATER CONCENTRATION FOR CARBON, NITROGEN AND PARTICULAR PARAMETERS REPRESENTED FOR BOTH SESSIONS (BLACK LINE REPRESENTS THE MEDIAN VALUE). BOTTOM: WASTEWATER TEMPERATURE RECORDED AT INLET OF THE SYSTEM DURING SPRING AND AUTUMN SAMPLING SESSIONS.

The mean values of the physicochemical data recorded in the study are shown in Table 3.2-1 for each respective seasonal period of investigation. Although differences were observed in the pH of wastewaters at the different sampling points, the general trend ranged between neutral and slightly alkaline. The strongest evolution of pH in the treatment line was a decrease of 0.5 unit between the inlet and outlet of the trickling filter. Even if this difference is relatively low, a pH difference could have consequence during contact of the effluent with sludge deposit at the top of the first stage in term of carbon release in the rest of the system (Kania et al., 2019, et Banc et al., 2022).

TABLEAU 3.2-1 MEAN VALUES (IN BOLD) AND STANDARD DEVIATIONS (IN ITALICS) OF THE PARAMETERS MONITORED IN THE WASTEWATER AT DIFFERENT LEVELS OF THE TREATMENT LINE IN AUTUMN AND SPRING RESPECTIVELY. (COD = CHEMICAL OXYGEN DEMAND; TOC = TOTAL ORGANIC CONTENT; TKN = TOTAL KJELDAHL NITROGEN; TSS = TOTAL SUSPENDED SOLIDS.)

Period	Sampling point	COD <sub>d</sub>	TOC	N <sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub>	N <sub>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></sub>	TN	TKN	TSS	pH
Autumn	Influent	<b>175.1</b> <i>88.2</i>	<b>73.6</b> <i>15.1</i>	<b>53.0</b> <i>9.5</i>	<b>0.0</b> <i>0.0</i>	<b>68.9</b> <i>11.3</i>	<b>68.9</b> <i>11.3</i>	<b>166.3</b> <i>85.2</i>	<b>8.01</b> <i>0.21</i>
Autumn	TF-Out	<b>78.4</b> <i>42.5</i>	<b>34.8</b> <i>7.3</i>	<b>30.3</b> <i>7.5</i>	<b>10.3</b> <i>7.0</i>	<b>51.3</b> <i>12.9</i>	<b>41.1</b> <i>10.3</i>	<b>159.5</b> <i>68.4</i>	<b>7.53</b> <i>0.32</i>
Autumn	1-Stage-Out	<b>23.1</b> <i>13.4</i>	<b>20.3</b> <i>2.0</i>	<b>6.4</b> <i>3.5</i>	<b>20.2</b> <i>8.5</i>	<b>30.7</b> <i>10.2</i>	<b>10.5</b> <i>4.8</i>	<b>8.9</b> <i>7.0</i>	<b>7.19</b> <i>0.09</i>
Autumn	Effluent	<b>11.1</b> <i>16.0</i>	<b>15.1</b> <i>2.6</i>	<b>2.3</b> <i>2.0</i>	<b>24.8</b> <i>4.9</i>	<b>29.2</b> <i>5.3</i>	<b>4.4</b> <i>2.8</i>	<b>6.0</b> <i>6.2</i>	<b>7.44</b> <i>0.46</i>
<b>Autumn</b>	<b>Overall treatment rate</b>	<b>93.5</b> <i>5.0</i>	<b>78.7</b> <i>5.6</i>	<b>95.7</b> <i>3.7</i>	-	<b>56.7</b> <i>10.3</i>	<b>93.4</b> <i>4.1</i>	<b>96.4</b> <i>3.9</i>	-
Spring	Influent	<b>231.2</b> <i>80.3</i>	<b>66.5</b> <i>35.5</i>	<b>57.3</b> <i>15.0</i>	<b>0.1</b> <i>0.4</i>	<b>79.0</b> <i>12.4</i>	<b>78.9</b> <i>12.5</i>	<b>284.3</b> <i>42.1</i>	<b>7.82</b> <i>0.07</i>
Spring	TF-Out	<b>120.0</b> <i>55.7</i>	<b>26.7</b> <i>2.3</i>	<b>39.9</b> <i>14.0</i>	<b>3.0</b> <i>1.9</i>	<b>64.0</b> <i>23.0</i>	<b>61.3</b> <i>23.8</i>	<b>296.7</b> <i>31.2</i>	<b>7.37</b> <i>0.13</i>
Spring	1-Stage-Out	<b>40.9</b> <i>12.2</i>	<b>12.5</b> <i>3.9</i>	<b>18.2</b> <i>3.1</i>	<b>12.7</b> <i>7.9</i>	<b>35.6</b> <i>9.7</i>	<b>22.8</b> <i>3.6</i>	<b>25.7</b> <i>13.7</i>	<b>7.15</b> <i>0.06</i>
Spring	Effluent	<b>17.1</b> <i>14.3</i>	<b>8.7</b> <i>2.3</i>	<b>5.3</b> <i>2.1</i>	<b>18.1</b> <i>10.7</i>	<b>26.1</b> <i>10.8</i>	<b>8.0</b> <i>3.4</i>	<b>3.5</b> <i>1.9</i>	<b>7.24</b> <i>0.05</i>
<b>Spring</b>	<b>Overall treatment rate</b>	<b>90.1</b> <i>9.0</i>	<b>84.3</b> <i>7.3</i>	<b>89.9</b> <i>5.1</i>	-	<b>66.5</b> <i>12.8</i>	<b>89.4</b> <i>5.1</i>	<b>99.2</b> <i>0.7</i>	-

### 3.2.3.2 TREATMENT EFFICIENCIES OF THE SYSTEM

#### OVERALL EFFICIENCIES

Overall efficiencies were calculated as the differences between the concentrations of each parameter at the inlet and outlet of the whole treatment system, expressed in % of inlet concentrations. Average overall removal rates calculated over each seasonal period are given in Table 3.2-1. Figure 3.2-3 illustrates the results by showing the daily average removal rates in green ink for the spring period and brown ink for autumn. The input/output performance of the two series is not significantly different despite the differences in incoming pollutant load.

A very high ( $97.5 \pm 3.3$  %) and relatively stable removal rate was observed for Total Suspended Solids (TSS) regardless of the season. The physical mechanism of filtration was very efficient throughout the study to capture the suspended solids at the surface of the porous media of the filters, thereby increasing the thickness of the sludge deposits layer. The same evolution was observed in full-scale VFCW units (Kim et al., 2013; Kania et al., 2018) and the important role of the surface sludge deposits layer was already documented (Kania et al., 2019; Molle 2014).



Overall treatment of organic load was followed by organic-carbon related parameters monitored at the inlet and outlet of the whole system. Fig. 2 shows that the removal rates were high to very high for all monitored parameters, with COD<sub>d</sub> removal rates, confirming the efficiencies reported previously for full-scale similar systems (Maciejewski et al., 2022). The presence of well aerated zones in the system such as in the aerobic TF and the unsaturated upper parts of the 2 filter stages, were very favourable to the oxidation of organic carbon into CO<sub>2</sub>. These conditions also allowed a high nitrification rate as shown here by the removal rate of Kjeldahl Nitrogen reaching  $91.4 \pm 4.9$  %. Total nitrogen removal was however lower (mean values of 61.6 %) and also much more variable ( $\pm 12.5\%$ ) than the other parameters. Anoxic conditions within the saturated lower part of the filters allowed the reduction of nitrates (denitrification) to occur in the pilot-scale system, but the overall efficiency was not as good as for the other parameters, suggesting that some factors limited the process. Other published studies also reported limited denitrification rates in full-scale VFCW units, which were attributed to the difficulty of maintaining optimal conditions notably the availability of organic carbon at sufficient concentrations and the effective implementation of anoxic zones in the treatment stages (Sirivedhin et al., 2006; Wu et al., 2014). The average nitrogen removal rate recorded here at the pilot-scale ( $61.6 \pm 12.5\%$ ) was slightly lower than reported in full-scale AZOE systems respectively 71% and 74% (Kim et al., 2014; Maciejewski et al., 2022) and this parameter was the most variable both at the pilot and full scales.

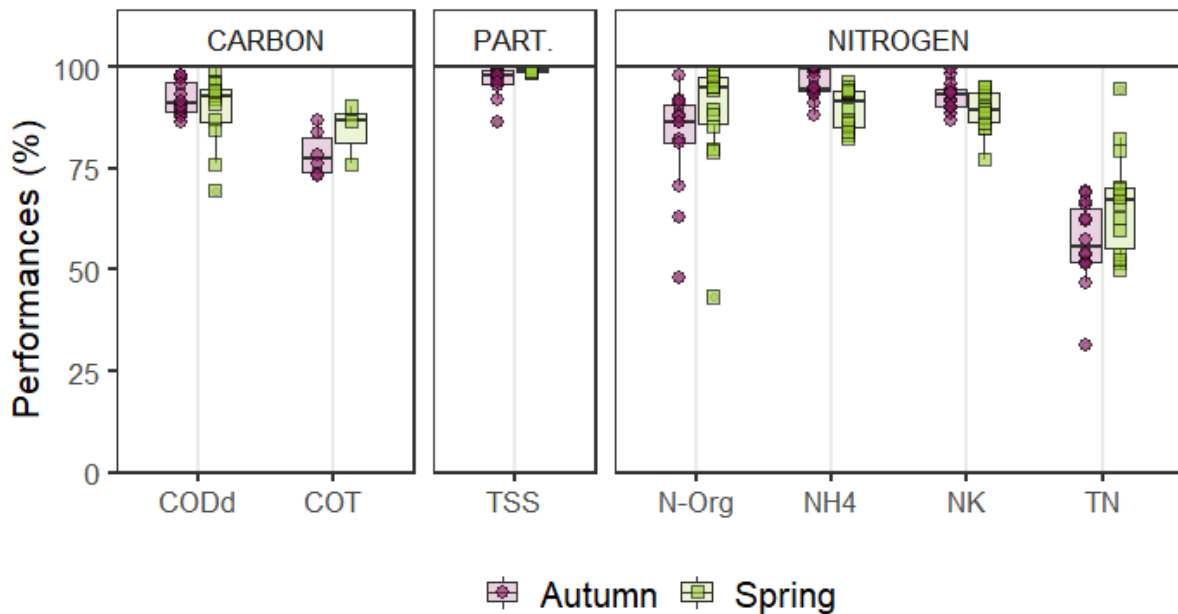


FIGURE 3.2-3 : INPUT/OUTPUT OVERALL REMOVAL RATES OF VARIOUS PARAMETERS RECORDED ON THE PILOT-SCALE AZOE SYSTEM IN AUTUMN AND SPRING.

#### INFLUENCE OF THE TRICKLING FILTER PERFORMANCE

The specific efficiency of the aerobic trickling filter was calculated from the differences between the inlet and outlet concentrations of each parameter. Experimental results revealed different efficiencies according to the season as shown in Fig. 3. It was found that the effect of the variation of organic load relative to the season was statistically significant for ammonium ( $p = 0.03$ ) and TKN ( $p = 0.01$ ) removals but not for COD removal ( $p = 0.16$ ). Nitrification was more affected by the input load seasonal variation than the carbon load removal. In both seasons, ammonification and nitrification were initiated in the TF where the conditions are favourable. Nitrification performances have already been reported in the literature (Ledang and Kleppe, 1999, Wang et al., 2015). A drop of 0.5 pH unit was observed in the wastewater between the inlet and the outlet of the TF which can be explained by the alkalinity consumed by the reaction of nitrification (Kadlec and Wallace, 2009). Surprisingly, total nitrogen removal was observed in the TF (figure 3.2-3), suggesting that denitrification occurred although the conditions within the TK are rather oxidative. One possible assumption could be that denitrification actually occurred in the feed tank reservoir where inlet wastewater was stored before feeding the TF. Redox potentials as low as -200 mV/EHN were recorded in this tank reactor (see figure 3.2-1).

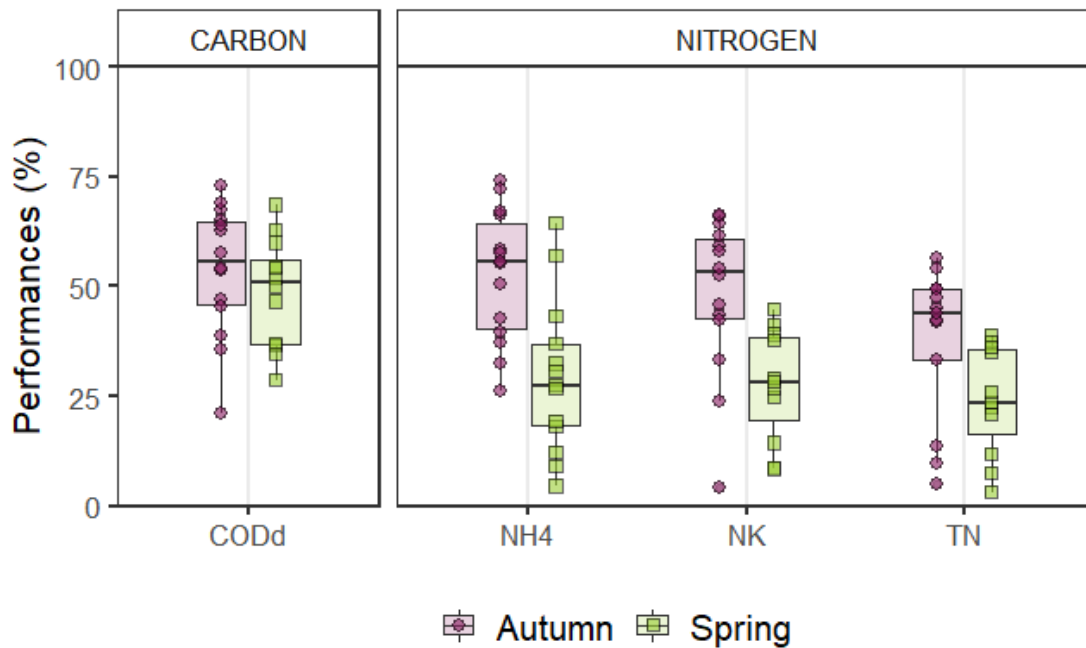


FIGURE 3.2-4 : INPUT/OUTPUT DAILY PERFORMANCES OF VARIOUS PARAMETERS ACHIEVED IN THE AEROBIC TRICKLING FILTER ALONE.

The respective contributions of the successive treatment steps to the removal rates of the different parameters are illustrated in figure 3.2-4 for each respective season. Results obtained in autumn and in spring were found very similar, indicating that the seasonal effect was quite limited. However, some differences were considered relevant to discussion.

In particular, it was observed that the contributions of TF were stronger for lower inlet than for higher ones. The interesting finding here was that the decreased contributions of the TF in spring as compared to autumn were almost systematically compensated by increased contributions of either the first filter stage, regarding particularly carbon removal, and/or the second filter stage regarding particularly nitrogen removal. Altogether, the overall treatment efficiencies of the entire system were very close in the 2 seasons for all the parameters.

The contribution to carbon removal of the 1<sup>st</sup> filter stage, and to a smaller extent the 2<sup>nd</sup> filter, occurred mostly via retention by filtration at the surface of the organic deposit, and subsequent oxidation of the organic matter by heterotrophic aerobic microorganisms in contact with air. Organic carbon was also consumed anaerobically within the unsaturated, oxic upper part of the filter media and finally by heterotrophic denitrifiers within the saturated, anoxic lower part of the filters. Based on the ration of 3.02gCOD to denitrify 1g of nitrate

(Kadlec and Wallace, 2009), the consumption of organic carbon represented by the  $COD_d$  for denitrification over the whole treatment pathway represents was calculated to 73 mgO<sub>2</sub> per day. The remaining dissolved and particulate carbon is consumed by the unsaturated upper parts and the trickling filter. The first filter stage was also found to play a significant role in nitrogen removal (figure 3.2-5) by nitrification and denitrification. The association of TF and first filter stage was already reported in full-scale studies to provide the major contribution to nitrogen removal (Maciejewski et al., 2022). The present study underlined that most of the contribution was provided by the TF.

The 2<sup>nd</sup> filter stage provides the lowest contributions of all the successive steps of the system. This can be explained by the fact that it is the last step of the treatment system and therefore the most readily degradable fractions of the wastewater constituents have already been degraded and removed from the effluent they are fed with. This situation creates a relative depletion of degradable organic substrates, resulting in a limited efficiency of the heterotrophic denitrification.

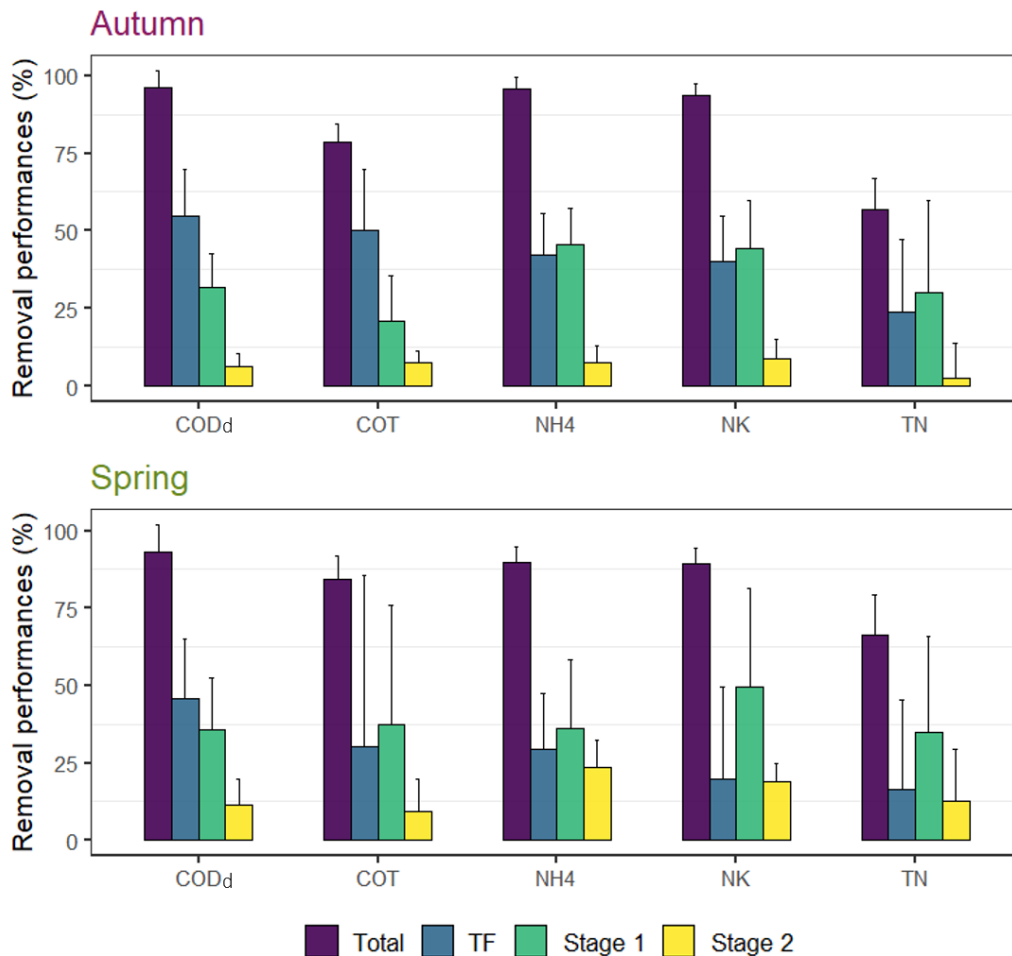


FIGURE 3.2-5 : RESPECTIVE CONTRIBUTIONS OF THE SUCCESSIVE STEPS OF TREATMENT IN THE PILOT-SCALE SYSTEM IN AUTUMN (TOP) AND SPRING (BOTTOM)

### 3.2.3.3 DYNAMICS OF NITROGEN FATE WITHIN THE SUCCESSIVE FILTER STAGES

Figures 3.2-6 and 3.2-7 show the evolutions of ammonium and nitrate concentrations at the outlets of first- and second-stage filters during the feeding periods. It can be observed that ammonium concentrations were relatively stable over both periods. However, the spring values were around  $10 \text{ mgN.L}^{-1}$  higher than those monitored in autumn, indicating that nitrification activity was better in autumn. The same observation was made on the trickling filter as discussed above.

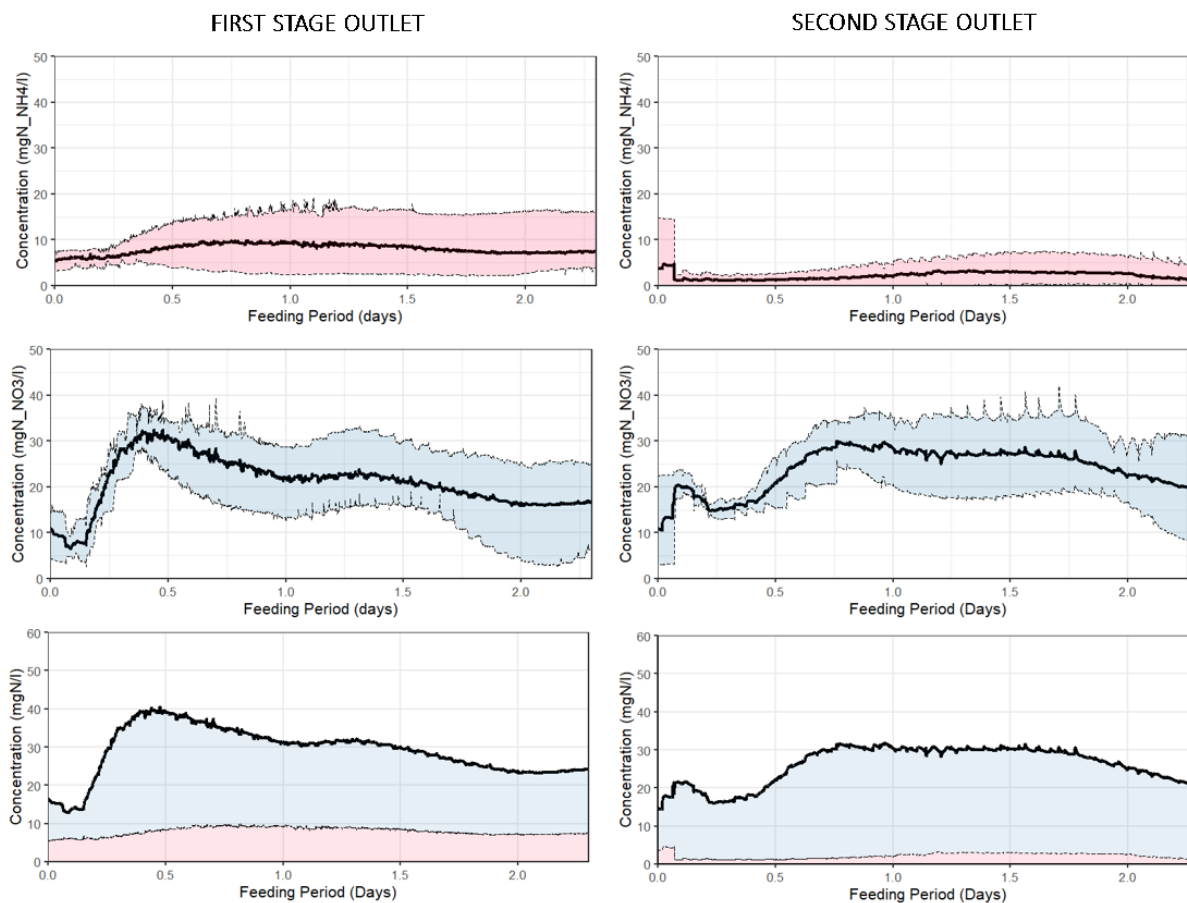


FIGURE 3.2-6 : AVERAGE (BOLD BLACK LINES), MIN AND MAX DATA (THIN LINES) OF WEEKLY ONLINE MONITORING OF NITRATES (TOP), AMMONIUM (MIDDLE) AND NITRATES + AMMONIUM CONCENTRATIONS (BOTTOM, IN BLUE AND RED INK, RESPECTIVELY) AT THE OUTLETS OF FIRST-STAGE FILTER (LEFT) AND SECOND-STAGE FILTER (RIGHT) DURING THE AUTUMN PERIOD

Unlike ammonium, nitrate concentrations were observed to vary significantly over each of the monitoring periods (Figures 3.2-6 and 3.2-7). They increased rapidly over the first half day of feeding at the outlet of the first filter, then decreased progressively within the following 2 days until they reached a concentration close to the level recorded before feeding. This pattern of evolution was attributed to the succession of feeding and resting periods. During each feeding period, a part of ammonia was retained within the filter by adsorption onto the first filter media and organic matter. This stock of ammonia was then nitrified at least partly during the following resting period, within the unsaturated oxic upper part of the first filter where the conditions were favourable to nitrification (Molle, 2014). Subsequently, the next feeding period induced a flush from the first filter of the nitrates thus produced during the preceding resting period, explaining the peak of nitrates concentration observed over the first half day at the outlet of the first filter (figure 3.2-6 and 3.2-7). After this peak, nitrates

concentrations decreased progressively down to their initial level in the feed, respectively 20 mg/L with a strong variability in autumn (figure 3.2-6) and 5 mg/L with a very small variability in spring (figure 3.2-7).

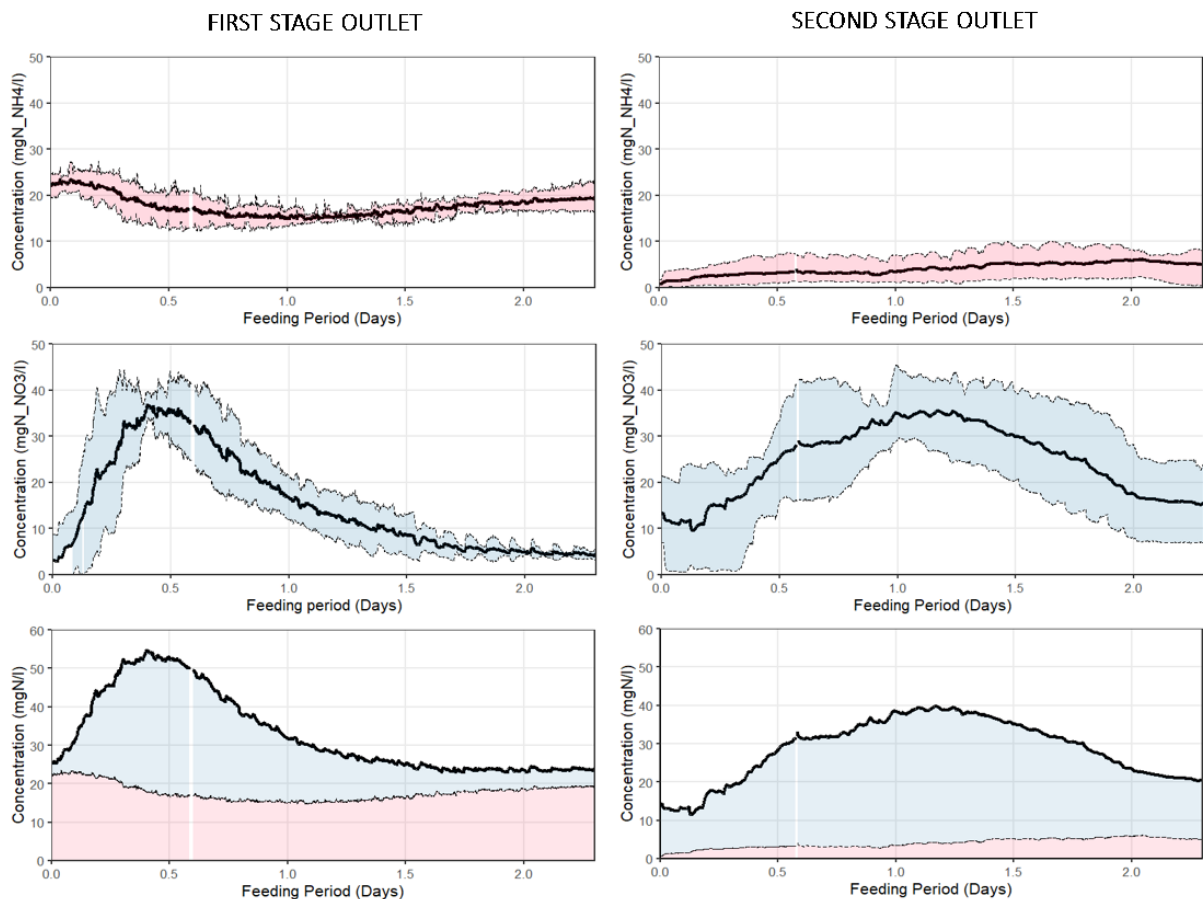


FIGURE 3.2-7 : AVERAGE (BOLD BLACK LINES), MIN AND MAX DATA (THIN LINES) OF WEEKLY ONLINE MONITORING OF NITRATES (TOP), AMMONIUM (MIDDLE) AND NITRATES + AMMONIUM CONCENTRATIONS (BOTTOM, IN BLUE AND RED INK, RESPECTIVELY) AT THE OUTLETS OF FIRST-STAGE FILTER (LEFT) AND SECOND-STAGE FILTER (RIGHT) DURING THE SPRING PERIOD

Regarding the contributions of the second-stage filter, figures 3.2-6 and 3.2-7 showed that ammonium concentrations were divided by 2 to 4 between the outlet of first filter and that of the second filter. Ammonium concentrations at the second filter outlet were stable and low to very low, especially in spring. In addition, the recorded data showed a relatively small variability. The second- filter was therefore shown to provide a strong and reliable polishing contribution to the nitrification efficiency of the system. The patterns of evolution of nitrates concentrations at the second filter outlet were similar in autumn and in spring, both

qualitatively and quantitatively. Nitrates concentrations increased slowly over the first 0.5 to 1 day up to 30-40 mg/L, remained relatively constant for 0.5 to 1 day, then decreased down to a level close to initial concentrations recorded before feeding, i.e. close to 20 mg/L regardless of the season. Quantitatively, the spring period seems to be slightly more favourable to denitrification than the autumn period (respectively 4.2 and 0.5  $\text{gNO}_3^- \cdot \text{day}^{-1}$ ). However, whatever the season, the denitrification part of the second stage remains low compared to the rest of the treatment line and the outlet second stage nitrate pattern observed during the feeding phase is the result of what comes out of the first stage.

Bottom Figures 3.2-6 and 3.2-7 show the nitrogen distribution at the outlet of the two filtration stages. Once the nitrate peak has passed, it is interesting to note that the profiles of the two seasons are quite similar with regard to the general dynamics and the value of total dissolved nitrogen towards which they tend (about  $25 \text{ mgN} \cdot \text{l}^{-1}$ ) almost entirely in the form of nitrate. While the second stage does not significantly lower the total nitrogen value and seems limited in achieving denitrification, it does play a role in securing the nitrification of the system.

Figure 3.2-8 shows the ORP profile monitored at a depth of 5 cm of the saturated zones of the first and second filters over the successive feed and rest phases in the spring period. In the first filter, sharp increases were observed during the feeding periods, followed by sharp drops when feeding was stopped. This observation was attributed to the fact that during the feeding period the saturated area is constantly renewed by well aerated water from the oxygen transfer in the upper part unsaturated of the filter and the trickling filter. When feeding was stopped, oxygen was rapidly consumed within the saturated part of the first filter through microbial oxidation processes of organic substrates and ammonia (nitrification). Consequently, the oxygen and the ORP drop quickly after the resting period starts. ORP values ranged between -300 mV during the resting periods to 0 mV during the feed periods. The conditions in the saturated zone of the first filter were therefore favourable to denitrification (Tanner et al, 2002)



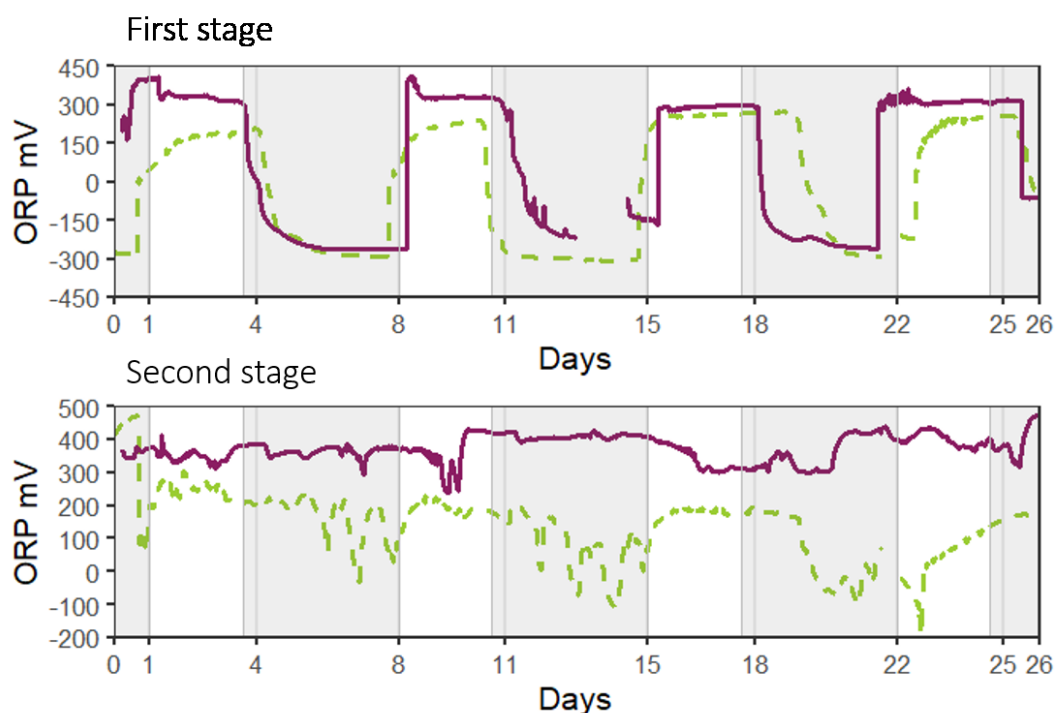


FIGURE 3.2-8 : ONLINE MONITORING OF ORP WITHIN THE SATURATED ZONE (DEPTH 5 CM) OF FIRST-STAGE FILTER (TOP) AND SECOND-STAGE FILTER (BOTTOM) FOR AUTUMN (SOLID BROWN) AND SPRING (DASHED GREEN) SESSIONS DURING THE SUCCESSIVE FEED (WHITE BACKGROUND) AND REST (GREY BACKGROUND) PHASES IN THE SPRING PERIOD. DATA ARE EXPRESSED WITH THE HYDROGEN STANDARD ELECTRODE CORRECTION.

The ORP profile observed at the second filter outlet was much more erratic than in the first filter. The feed influent received by the second filter was much less oxidic and stable than that of the first filter. The effects of the feed on the ORP were therefore lower and more variable within the second filter, probably explaining the more erratic profile. ORP values ranged between 0 and + 400 mv during the feeding periods.

#### 3.2.3.4 REMOVAL LOAD RATES

By plotting the applied and treated daily mass load expressed per unit area, figure 3.2-9 provides complementary information to the sole contribution based on the concentrations as it informs on the actual removal potential of the treatment stages. The colours point of figure 3.2-9 representing the first stage and the second stage, respectively in dark green and yellow, compares the removal behaviour of the two steps according to the pollutants of interest (COD, TKN,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$ ). Based on the equations of linear regression, the COD performances of the first stage are moderately higher than the second stage (coefficient: 0,71 against 0,5).

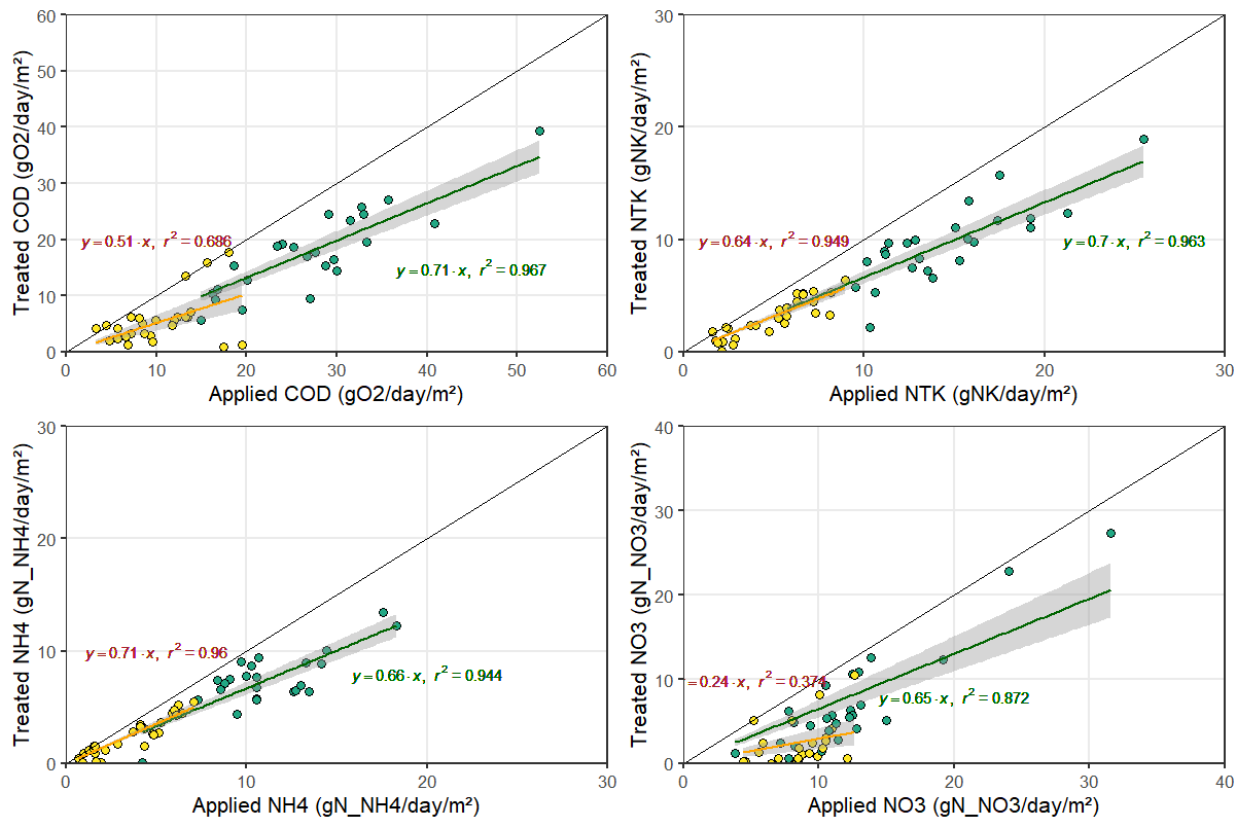


FIGURE 3.2-9 : APPLIED LOAD VS TREATED DAILY LOAD FOR COD, TKN, NH4 AND NO3. FIRST AND SECOND STAGES ARE REPRESENTED BY COLOUR POINT, RESPECTIVELY GREEN AND YELLOW. CONFIDENCE INTERVAL OF LINEAR REGRESSION ARE SHOWN BY THE GREY AREA AND SET TO 0.95.

For nitrogen, there is on one hand the high NTK and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> removal rates and low data variability highlighting the well oxidizing-conditions of the unsaturated on both stages where nitrification is homogeneously performed. On the other hand, despite correct nitrates removal rates on the first stage, the very high variability on both stages suggests that denitrification is not well managed. The variability of nitrate removal data is also a consequence of grab sampling and therefore reflects the evolution of nitrogen processing during a feeding period. Moreover, the denitrification in the second stage remains limited in spite of the saturated area. Indeed, the denitrification is dependant of several conditions as the ORP, the retention time, the temperature, the pH, the availability of organic carbon (Lee et al., 2009, Kadlec and Wallace, 2009). In this study temperature, ORP and pH is maintained relatively constant. Moreover, retention time did not change during the whole experiment, so the availability of organic carbon seems to be the dominant factor controlling denitrification.

### 3.2.3.5 C/N RATIO

Figure 3.2-10 represents the correlation between carbon / nitrates (calculated as the input nitrates added to the nitrified ammonium on the stage) ratio. A theoretical ratio of 3.02 g of COD to denitrify 1 g of nitrate (Kadlec and Wallace, 2009) must be satisfied to achieved great total nitrogen removal. This ratio is barely reached in the system, especially for the second stage of treatment where the values remain around 1.2 and leads to lower denitrification performances. Moreover, this ratio shows an important variability in the system and indicates that carbon availability is not the only factor involved with denitrification performances.

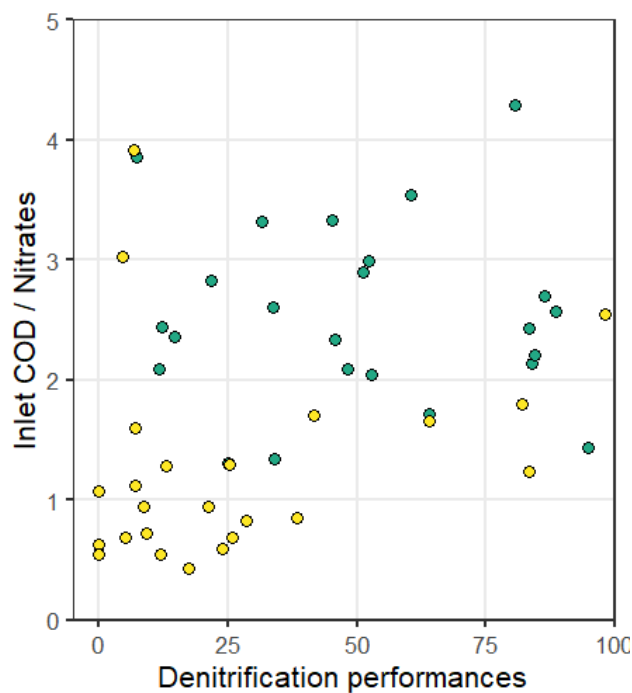


FIGURE 3.2-10 : CARBON/NITRATES RATIO AND DENITRIFICATION PERFORMANCES ON THE FIRST (GREEN DOTS) AND SECOND (YELLOW DOTS) STAGES OF FILTRATION.

Theoretically, a carbon input on the second stage could have a positive effect on denitrification as it is presented in the figure 3.2-11. Although the raw wastewater carbon/nitrogen ratio of this study is lower than usually reported in the literature ( $BOD_5/TKN = 4.2$  and  $COD/TKN = 9.7$ ; Paing and Voisin, 2005) and therefore not as favourable as it could be, the step feeding solution seems to be suitable to improve the second stage performances and has never been tested on this system. A step-feeding strategy has already been pointed out in many studies to overcome the carbon deficiency (Nivala et al., 2019; Wang et al., 2020; Al-Wahaibi et al., 2021) where the by-passed volume ranged between 10 to 30%.

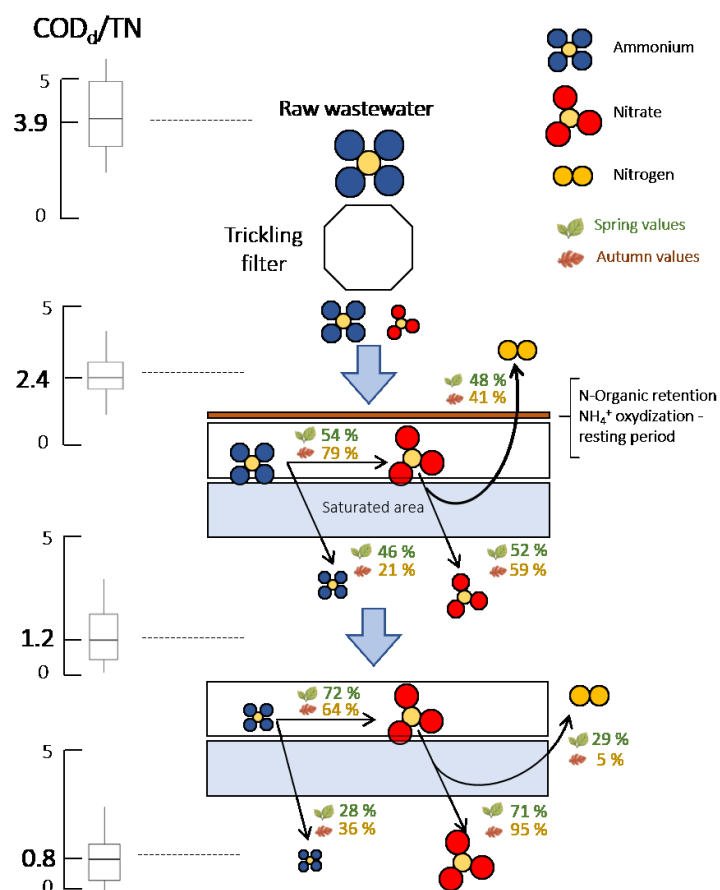


FIGURE 3.2-11 :SCHEMATIC REPRESENTATION OF THE BEHAVIOUR OF DISSOLVED NITROGEN ON THIS PILOT

### 3.2.4 CONCLUSION

The presence of the TF allows the treatment of 40 to 50% of the carbon load and, under good operating conditions, initiates the ammoniacal oxidation. Under these conditions, the implementation of a saturated area in the first stage of filtration allows 61% removal of total nitrogen. A single-stage AZOE version is then possible and provides good purification performances on carbon and Kjeldahl nitrogen, while reducing the land area as it was already demonstrated (Maciejewski et al., 2021). However, the presence of a second stage is an advantage for several reasons:

- It contributes to the polishing of the wastewater treatment for Carbon and TKN;
- It helps to compensate the TF and/or the first stage of filtration variation of performances due to input organic load fluctuation, and provides a safety function on the treatment;
- Its denitrification potential could be greatly increased by the supply of organic carbon.

This study provides a detailed view of the behaviour of carbon and nitrogen in a unsaturated/saturated vertical flow constructed wetland associated with a TF. The main findings are as follows:

- The TF allows the removal of half the carbon load, and significantly initiates nitrification when in correct operational conditions;
- The operation of the first stage in terms of nitrification is dependent on the input organic load and is initiated when the organic load is primarily consumed;
- Most of the denitrification takes place in the saturated zone of the first filter stage;
- The second stage of filtration plays an even more important role when TF removal performances are variable;
- The second stage of filtration could be optional, and the AZOE system would perform as a TF associated with a single stage of filtration with low or none saturated area. In that case, it should be designed without TN removal target or eventually easy to reach.
- To achieve more stringent total nitrogen discharge levels, dosed additions of carbon in the second stage appear to be a viable solution

#### CREDIT AUTHORS STATEMENT

**Kevin Maciejewski:** Conceptualization, Methodology, Data Curation, Writing – Original Draft.

**Mathieu Gautier:** Conceptualization, Methodology, Writing – Review & Editing, Supervision.

**Boram Kim:** Conceptualization, Methodology, Data Curation, Writing – Review & Editing.

**Philippe Michel:** Writing – Review & Editing. **Pascal Molle:** Conceptualization, Writing – Review & Editing, Supervision. **Rémy Gourdon:** Conceptualization, Writing – Review & Editing, Supervision

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the INRAE for providing access to the Feyssine facilities, metrology equipment and technical assistance. This work was realized within the Graduate School H2O'Lyon (ANR-17-EURE-0018) and the Université de Lyon (UdL), as part of the programme "Investissements d'Avenir " of the French national agency for research (Agence Nationale de la Recherche, ANR). The authors would like to thank the SCIRPE Company and CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la REcherche) for funding this research project.

---

### 3.3 ÉTUDE DE LA DYNAMIQUE DU SYSTÈME AZOE<sup>®</sup> PAR TRAÇAGE HYDRAULIQUE ET ISOTOPIQUE



## PILOT-SCALE INVESTIGATION OF THE FATE OF AMMONIUM IN VERTICAL-FLOW TREATMENT WETLAND USING $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ISOTOPE RATIO MONITORING

K. Maciejewski<sup>a,b</sup>, M. Gautier<sup>a</sup>, X. Saupin<sup>c</sup>, E. Bonjour<sup>c</sup>, A. Anchisi<sup>c</sup>, B. Kim<sup>a</sup>, P. Michel<sup>b</sup>, P. Molle<sup>d</sup>, P. Jame<sup>c</sup>, R. Gourdon<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Univ Lyon, INSA Lyon, DEEP, EA7429, 69621 Villeurbanne, France

<sup>b</sup>SCIRPE, Sainte Foy-Lès-Lyon, France,

<sup>c</sup>Univ Lyon, CNRS, UCBL 1, ISA, UMR 5280, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

<sup>d</sup>INRAE, UR REVERSAAL, 69625, Villeurbanne, France

### Abstract :

Vertical flow wetlands are systems with efficient carbon and nitrogen removal performance. These systems have their own dynamics with feeding and resting periods that have an impact on the treatment. In order to achieve an improved nitrogen treatment, the behaviour of the system during the feeding phases needs to be better predicted. This study proposes to combine two tracing approaches, hydraulic and isotopic, to explore the adsorption, retention, transformation and migration of nitrogen within a 6 pe pilot plant. Isotopic tracing was carried out using  $^{15}\text{N}$  ammonium spiked at 4.6%. Isotopic abundance measurements on the total nitrogen, ammonia and nitrate fractions were carried out throughout the feeding period at a frequency of 2 hours. The main result is that nitrogen in both its ammonium and nitrate forms has a residence time much higher than the hydraulic residence time highlighting the high reactivity of nitrogen with the filter media. The isotope tracing method provides a complex and robust monitoring of nitrogen over time.

**Keywords:** Treatment wetland, Hydraulic tracking, Isotope labelled monitoring,  $^{15}\text{N}$  stable ammonium isotope, nitrogen behaviour

### Highlights:

- A pilot scale vertical flow treatment wetland was investigated during a feeding scale period of time;
- Fluorescence tracing was performed in order to assess the hydraulic behaviour;
- Stable isotopic tracing was developed to evaluate the specific behaviour of nitrogen;
- Comparison between tracing methods highlight the high reactivity of filter media with nitrogen.
- Monitoring of biological transformations of nitrogen by isotopic approach



### 3.3.1 INTRODUCTION

The treatment of domestic wastewater in rural areas by treatment wetland (TW) has considerably grown in the last recent years as it meets the treatment requirements for carbon, nitrogen and phosphorus while being affordable in terms of installation and running costs for small communities (Paing and Voisin, 2005, Molle, 2005). From a process point of view, there are sub-groups of TWs that differ according to the direction of hydraulic flow, i.e. horizontal or vertical (Vymazal, 2007), but also the number of filtration stages and their arrangement. In France, the two-stage unsaturated vertical flow system is particularly popular with more than 5000 plants installed to date (Forquet, 2019). TWs are now entering an era of optimisation that includes the treatment of total nitrogen by denitrification and the reduction surface catchment.

Based on the classic vertical flow treatment wetland (VFTW), more sophisticated variants have been developed such as the use of forced aeration (Foladori et al., 2013), or the AZOE process studied in the research which exploits the combination of a trickling filter (TF) and VFTW (Kim et al., 2014). The use of a TF at the head of the filter guarantees good oxygenation conditions for the degradation of carbon in an aerobic environment. The effluent treated on the TF is then pumped onto the surface of the first filter stage where a surface deposit layer is formed by retention of the particulate matter (Kania et al., 2019). Oxygenation condition in the upper part of the filter also allows nitrification of ammonium to nitrate which is then reduced within the anoxic water-saturated zone at the bottom of the filter. This system has shown good removal performance on COD (95%), Kjeldahl nitrogen (86%), and up to 73% of total nitrogen (Kim et al., 2014; Maciejewski et al., 2022a). However, total nitrogen removal remains a challenge in VFTWs (Wu et al., 2014). Hydraulic dynamics is an important issue in. Each filter stage is divided into 2 or 3 hydraulically independent cells, which are individually fed with wastewater one after the other, usually over one week, while the other cells are resting. Each cell therefore undergoes successive periods of feeding and resting. Resting plays a crucial role in the ageing of the surface sludge deposits (Kania et al., 2019). Furthermore, the wastewater is not fed continuously to a cell but using a succession of batches, which represents a volume of wastewater rapidly spread on the surface of the filter. Previous studies have already reported the use of fluorescent tracers selected to investigate the characteristics of the hydraulic flow in such systems. (Hadley and Kadlec, 2007; Giraldo et al., 2009).

Combined information on (i) the patterns of hydraulic flows through the filter media and (ii) and the biotransformation of organic and inorganic forms of nitrogen are key issues to optimise nitrogen treatment. The evolutions of  $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$  isotopic ratio within each pool of N species also provides a powerful insight to the dynamics of nitrogen in the system. This approach has already been used to investigate the fate of nitrogen and other nutrients, in natural environments (Tobias et al., 2001; Pistocchi et al., 2017) and even more specifically in treatment wetlands (*Morse and Bernardt (2000)*; Reinhardt et al., 2006).

A first approach of the isotopic investigations is to record small variations in the natural isotopic distribution of the selected elements, related to biological or chemical transformations. This phenomenon, known as Isotopic fractionation, is due to the chemical species bearing the heavy isotope which are transformed more slowly than those bearing the light isotope. The proportion of heavy isotope is thereby increased in the initial substrate whereas it decreases in the product of transformation (Sebilot, 2003). This principle has already been applied to investigate denitrification in Treatment Wetlands by following the increase of  $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$  ratio in nitrates. (Lund et al., 2000). The authors pointed out the difficulty of applying this technique in a non-natural environment because the diversity of transformations makes interpretation more complex. A second approach is to use a stable isotope as a tracer. The principle is to spike a solution containing initially a substrate at a natural isotopic distribution with a substrate bearing only one of the isotopes. This modifies drastically the isotopic ratio of the substrate in the considered solution. (Jahangir et al., 2020). When using the spiked solution as a tracer in a treatment system the effect of isotopic fractionation on the evolution of the isotopic ratio during the migration of the tracer in the system then becomes negligible as compared to the effect of dispersion of the spiked solution within the solution at the natural isotopic ratio. In this study, stable isotope  $^{15}\text{N}$  was used as a tracer in the form of  $^{15}\text{N-NH}_3$ . The natural abundance of  $^{15}\text{N}$  relative to  $^{14}\text{N}$  is 0.36%. The objective of the study was to monitor the transfer of nitrogen through a pilot-scale treatment chain and the transfer of  $^{15}\text{N}$  isotope from spiked substrate  $^{15}\text{N-NH}_3$  to nitrates present initially at the natural ratio of 0.37%. In parallel, the characteristics of hydraulic flow was determined by fluorescence tracing.

### 3.3.2 MATERIALS AND METHODS

#### 3.3.2.1 PILOT SCALE EQUIPMENT

Experiments were conducted at the Feyssine INRAE experimental facilities in Lyon, France. The experimental hall is connected to the nearby municipal wastewater treatment plant and receives real domestic wastewater. The pilot-scale equipment was installed in a greenhouse equipped with a ventilation system within the experimental hall premises. The pilot setup is illustrated in Figure 3.3-1. The system was constructed as a 6-person equivalent treatment line according to the patented AZOE-N process setup designed by SCIRPE company. It combined a succession of treatment stages consisting in an aerobic biological trickling filter (TF), and 2 vertical flow Treatment Wetland Filter stages (TWF) planted with reeds. The trickling filter (TF) was filled with a polypropylene cross pack medium with a specific surface area of  $150 \text{ m}^2/\text{m}^3$ . Treatment Wetlands Filters (TWF) were filled over a depth of 0.60m with granular filter media disposed in layers from coarse grain size in the bottom (gravels) to fine grain size at the surface (sand) as detailed in a previous paper (Kim et al., 2015). The first TWF stage was covered with a 5-cm thick sludge layer sampled from a full-scale AZOE treatment wetland. Both TWF stages were planted with *Phragmites Australis* at a density of 10 plants/m<sup>2</sup>. Treatment wetlands filters were saturated with water in their bottom parts on a depth of 0.30 and 0.35m in the first and second stages respectively.

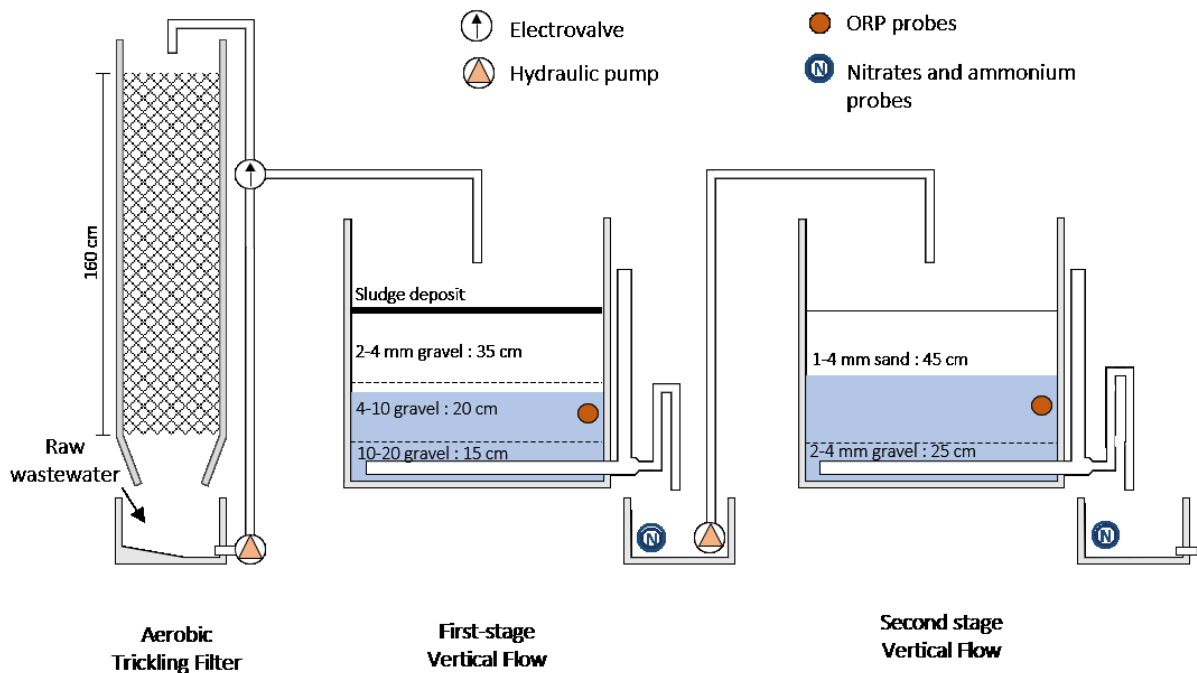


FIGURE 3.3-1 :PILOT SCALE CHARACTERISTICS OF AN AZOE SYSTEM DESIGNED FOR 6 PERSONS EQUIVALENT (MACIEJEWSKI ET AL., 2022B)

### 3.3.2.2 OPERATING CONDITIONS

Unlike the TF which was fed in a non-stop mode (except for maintenance), the TW filters were operated in a sequential feed and rest mode to mimic the operation of full-scale units where the TW filters are fed for one week and rested for two weeks. However, in order to shorten the experimental phases in the pilot system, the sequence was designed on a weekly basis by the alternation of 56 h of feeding followed by 112 hours resting.

Within each feeding period, the system was operated in a batch mode and the TW stages were fed every 2 hours with batches of 60L. Inlet wastewater was firstly pumped into a 60 L reservoir placed below the TF. Meanwhile, a recirculation pump was used to inject the feed wastewater from the tank through the TF in a closed loop mode at a flowrate of 0.5 L/min. When the tank was filled to 60 L, the TF recirculation pump was stopped and the whole volume of the tank was rapidly transferred as a batch to the surface of the first TWF stage at a high flowrate close to 17 L/min. Due to the limited permeability of the top surface of the TW filters, the 60 L batches formed a layer over the whole surface and then percolated in a uniform manner through the filter medium. The outlet effluent from the first TW stage was collected

into a reservoir. When a volume of 60L was collected, it was transferred as a batch to the top surface of the second TW stage at a high flowrate close to 17 L/min. The batch volume temporarily accumulated as a layer at the surface of the filter, then percolated in a uniform manner through the filter medium.

### 3.3.2.3 ANALYTICAL METHODS

The system was monitored by analysing wastewater at successive points along the pilot line: (i) inlet feed wastewater, (ii) TF outlet, (iii) first stage filter outlet, and (iv) system outlet. Online VARION PLUS NH<sub>4</sub> and VARION PLUS NO<sub>3</sub> probes (WTW) were positioned at levels (iii) and (iv) for continuous monitoring of ammonia and nitrate concentrations.

In addition to online monitoring, wastewater samples were regularly taken from the 4 sampling points and analysed for Chemical Oxygen Demand (CODd), Total Suspended Solids (TSS), ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), Total Kjeldahl Nitrogen (TKN), Total Nitrogen (TN), Total Organic Carbon (TOC). Most samples were refrigerated and stored at 4°C for a maximum of 24h prior to be analysed. Samples for isotopic analyses were frozen because a longer storage period was required to transport the samples to the analytical laboratory. All chemical parameters were analysed following French standard methods (AFNOR, 2005).

### 3.3.2.4 HYDRAULIC TRACER METHODOLOGY

Hydraulic tracing was carried out on each of the TWF stages independently using AminoG acid as a tracer. A mass of 1.2 and 1.8g of AminoG acid was diluted in 60 L and introduced into the first and second filtration stages respectively in the form of a pulse during the first batch of tracing. The pilot was operated in a conventional manner as described in the previous section. In each assay, tracer concentration at the outlet of the considered filter was followed by online monitoring by fluorescence probe. In parallel, outlet volumetric flow was measured over time using a pressure sensor installed in a collection tank at the outlet of each filter stage. Tracer monitoring was continued until when fluorescence values in the outflow was back to its natural level (i.e. 28 and 36 hours for the first and second filter stages respectively). A calibration curve is used to convert the signal intensity into a concentration. The mass is calculated from the concentration and volumetric flow data.

The tracer recovery was calculated using the equation (1):

$$T_{recovery}(\%) = \frac{m_{tracer\ final}}{m_{tracer\ initial}} \times 100 \quad (1)$$

The nominal hydraulic residence time (HRT<sub>n</sub>) in both TWF stages were calculated using the equation (2), where V was the volume of the saturated zone in each filter (m<sup>3</sup>), and Q the volumetric flow (m<sup>3</sup>/day):

$$HRT_n = \frac{V_{saturated\ area} * Porosity}{Q}$$

### 3.3.2.5 ISOTOPIC TRACER METHODOLOGY

Isotope tracing was carried out. A tracer batch volume was prepared by spiking a volume of 60L of feed wastewater, taken at an initial total N concentration of 60 mg/L and a natural isotopic abundance of 0.364% (see below) completed with a mass of 180 mg of Sigma Aldrich <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl enriched at 98% <sup>15</sup>N. The resulting isotopic abundance of <sup>15</sup>N in the tracer batch volume was therefore determined at 4.6%<sup>15</sup>N. This tracer batch volume was used to feed the experimental system previously described in substitution to a regular feed batch volume.

Prior to and following the injection of the spiked feed batch into the experimental system, the system was fed every 2 hours by regular feed batches containing a natural isotopic distribution of 0.364%. The proportion of <sup>15</sup>N in the spiked batch volume was therefore modified as the batch volume progressed along the treatment line. Two mechanisms induced the observed evolution. The first mechanism was the dispersion of the <sup>15</sup>N enriched batch volume in the solution at natural isotopic distribution present in the system before and after spiking. The dispersive flow would result in a decrease of the isotopic distribution. The second mechanism determined was the isotopic fractionation resulting from the transformation of ammonia into nitrates. The chemical species bearing the heavy isotope are transformed more slowly than those bearing the light isotope (Sibillot, 2003). This phenomenon would increase the proportion of <sup>15</sup>N in the substrate (ammonia) and decrease it in the product (nitrates). However, it was calculated using equation 3 that a transformation of ammonium would result in a negligible change in <sup>15</sup>N proportion in NH<sub>4</sub><sup>+</sup> compared to spiked value. This effect was therefore considered negligible as compared to the dilution effects under our experimental conditions. Equation 3 gives the variation of <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N expressed in δ (‰) due to a specific

enrichment factor  $\epsilon$  (-21 ‰ for nitrification) in relation with the concentration of the substrate (ammonium in this case) in the initial and final state.

$$\delta_{final} = \delta_{initial} - \epsilon * \ln\left(\frac{C_{initial}}{C_{final}}\right) \quad (3)$$

Conversion from isotopic abundance expressed from R (%) to  $\delta$  (‰) is given by equation 4 where  $R_{standard}$  is the international isotopic reference, the natural abundance of nitrogen in the atmosphere.

$$\delta_{sample} (\text{‰}) = \frac{(R_{sample} - R_{standard})}{R_{standard}} \times 1000 \quad (4)$$

### SAMPLES PREPARATION

Samples were defrosted and split into 3 fractions as illustrated in Figure 3.3-2. Fraction 1 was freeze-dried and the solid residues obtained were used to measure globally  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  ratio in all the forms of N present in the samples with no further treatment. Fractions 2 and 3 were purified on 0.45 $\mu\text{m}$  filters, and the collected solutions were eluted through 1 $\text{cm}^3$  Dionex ion exchange cartridges to separate anions from cations. The solution issued from fraction 2 was eluted through a cationic cartridge (Dionex OnGuard II Na, 1 cc) used to retain cations and subsequently analyse  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  in  $\text{NO}_3^-$ . The solution recovered from fraction 3 was eluted on an anionic cartridge (Dionex OnGuard II 1, 1 cc) used to retain anions and subsequently analyse  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  in  $\text{NH}_4^+$ . The anionic and cationic solutions were freeze-dried to obtain solid residue which were used for isotopic analyses. The anionic and cationic ion exchange cartridges were tested and the efficiency of separation of nitrates from ammonium ions was found round 99%.

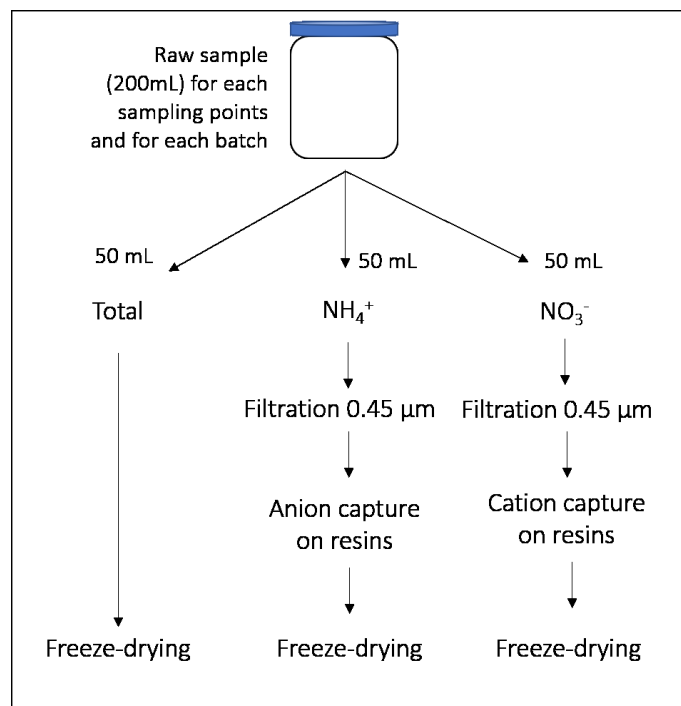


FIGURE 3.3-2 :DIAGRAM OF THE SAMPLING PROTOCOL, SAMPLE PREPARATION ON ION EXCHANGE COLUMNS AND ISOTOPE ANALYSIS DURING LABELLED AMMONIUM TRACING.

#### ISOTOPIC RATIO ANALYSIS

Analyses were performed on homogenized freeze-dried soil residues obtained as indicated above. An amount of sample between 400 and 600 µg was weighed, with precision on a microbalance, and placed in a tin capsule (5 x 9 mm). The isotopic value of each sample is obtained by an Elemental Analyser (Thermo Scientific FLASH HT) coupled to an Isotopic Ratio Mass Spectrometer (Thermo Scientific DELTA V) EA-IRMS. Sample drop in a unit combustion maintained at 950°C in a flow of helium and oxygen followed by a copper reduced glass tube hold at 650°C. The nitrogen of the sample is firstly oxidised in nitrogen oxides prior to be converted into elemental gases (N<sub>2</sub>) on the copper before to be introduced into the isotope ratio mass spectrometer. The determination of the isotopic composition (<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N) was done using the signals collected on cup for mass 28 (<sup>14</sup>N<sup>14</sup>N), 29 (<sup>15</sup>N<sup>14</sup>N) and 30 (<sup>15</sup>N<sup>15</sup>N) of the IRMS. Standard samples are measured every eight samples to check the lack of non-instrumental drift and blank was analysed. Analytical results from isotopic analyses were obtained as R defined as the mass % of <sup>15</sup>N in the overall pool of N present in the samples. The uncertainty was evaluated at +/- 0.02%, in absolute, for the <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N (%) results.



### 3.3.3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.3.3.1 PHYSICAL-CHEMICAL MONITORING

##### *POLLUTANTS BEHAVIOUR ALONG TREATMENT LINE*

The overall operation of the AZOE system has been described in previous full-scale (Kim et al., 2014) and pilot-scale studies (Kim et al., 2015, Maciejewski et al., 2022b). The physico-chemical results shown in figure 3 were collected during the week when the injection of the 60L-spiked tracer batch was done. The biological aerobic TF used as a first stage of treatment allowed to degrade up to 40% the inlet organic load. TSS concentration was practically unaffected by the TF, probably because the porosity of the bed was high enough to let most suspended solids from the feed migrate through the TF. The suspended solids were however almost quantitatively retained by filtration at the surface of the first TW stage as previously reported (Kim et al., 2015; Kania et al., 2018). This resulted in a drastic drop of the average TSS concentration from 263 mg/L at the inlet to 31 mg/L at the outlet of the first TWF stage. Nitrification also occurred slightly in the TF as shown by the nitrates concentration of 3.5 mg/L measured at the TF outlet whereas no nitrates were analysed at the input of the TF. The predominance of organic carbon (275 mg/L) in the TF relative to ammonium concentrations (57 mg/L) installed conditions which were thermodynamically much more in favour of the oxidation of organic substrates regarding ammonia. The first TW stage contributed much more significantly to nitrification and also denitrification and thereby reduced ammonia concentrations close to 68 %. The second TWF stage acted as a polishing treatment stage for nitrification and contributed to the reduction of the total nitrogen concentration from 35 to 20 mg/L. These results were similar to those recorded on the system in previous assays, indicating that the experimental system was in a stable state, thereby validating the conditions for the tracing investigations.

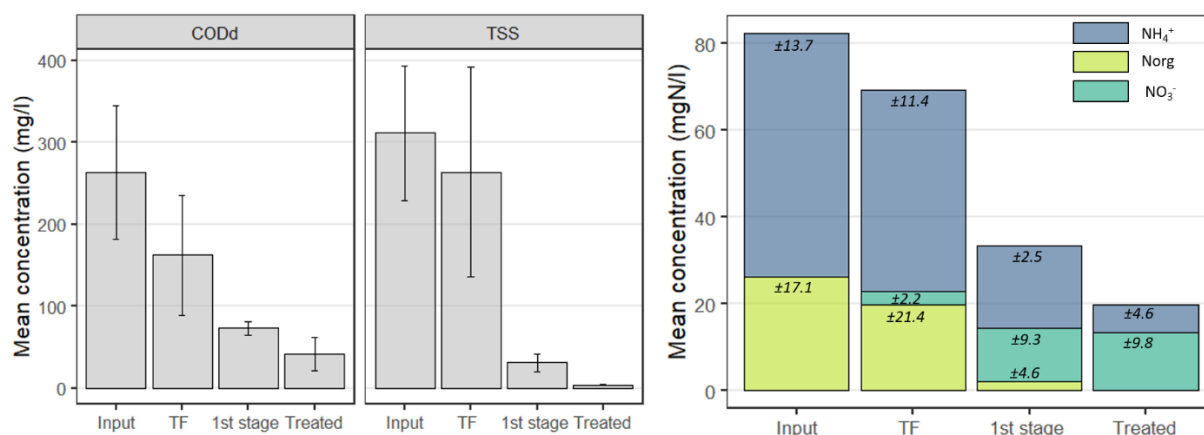


FIGURE 3.3-3 : MEAN CONCENTRATION AT VARIOUS SAMPLING POINT ON THE PILOT WITH STANDARD DEVIATION FROM PUNCTUAL SAMPLING DURING THE ISOTOPIC TRACKING

#### ONLINE MEASUREMENTS OF NITRATES AND AMMONIUM

Results of online monitoring of ammonium and nitrate concentrations using specific probes installed at the outlet of the first and second stages are shown in Figure 3.3-4.

Ammonium concentrations at the outlet of the first filter stage decreased slightly from 25 to 18 mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L over the first 36 h then increased progressively to ca. 20 mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L. Overall, it remained relatively constant around 20 mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L over the 2 days of monitoring. In contrast, the concentration of nitrates increased sharply from 0 to 34 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L over the first 12 hours, remained around 34 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L for 3-4 hours, and then decreased regularly down to below 10 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L from hour 16 to 48. This observation was typical of the dynamics of nitrogen in the system as reported in other studies (Morvannou et al., 2013). During the feeding period, ammonium ions coming from the feed wastewater were partly retained by adsorption onto the fine granular medium of the upper and unsaturated part of the filter. During the following resting period, nitrifying bacteria oxidized sorbed ammonia into nitrates using O<sub>2</sub> gas available in the porosity of the upper part of the filter. Then when the next feeding period was started, nitrates were leached to the bottom of the filter, resulting in the sharp increase of concentration observed in the first 12 hours of feeding. Denitrification occurred in the saturated lower part of the filter during the entire feeding period, allowing the reduction of the nitrate concentration.

Ammonia and nitrates concentrations profiles recorded at the outlet of the second TW stage were relatively similar, but more attenuated regarding those observed in the first filter

stage. Ammonia concentration was found to increase very progressively from a few mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L to close to 10 mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L in a period of 30h. Then it remained relatively constant below 10 mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L. Nitrates concentration fluctuated in the same range on concentrations as in the first filter stage (0-30 mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L) but more smoothly. The leaching of nitrates produced during the preceding resting period from the oxidation of ammonia accumulated during the preceding feeding period was recorded over 28 h in the second filter stage against 12 h in the first filter stage.

In both filter stages however, very low and even decreasing nitrates concentrations were recorded in the first 5 to 8 hours of feeding. This observation was attributed to the denitrification that occurred in the anoxic, bottom parts of the TW during the preceding resting period. As indicated in the materials and methods section, the resting periods were set to last twice as long as the feeding periods (112 h and 56 h respectively) allowing denitrification to be achieved almost completely.

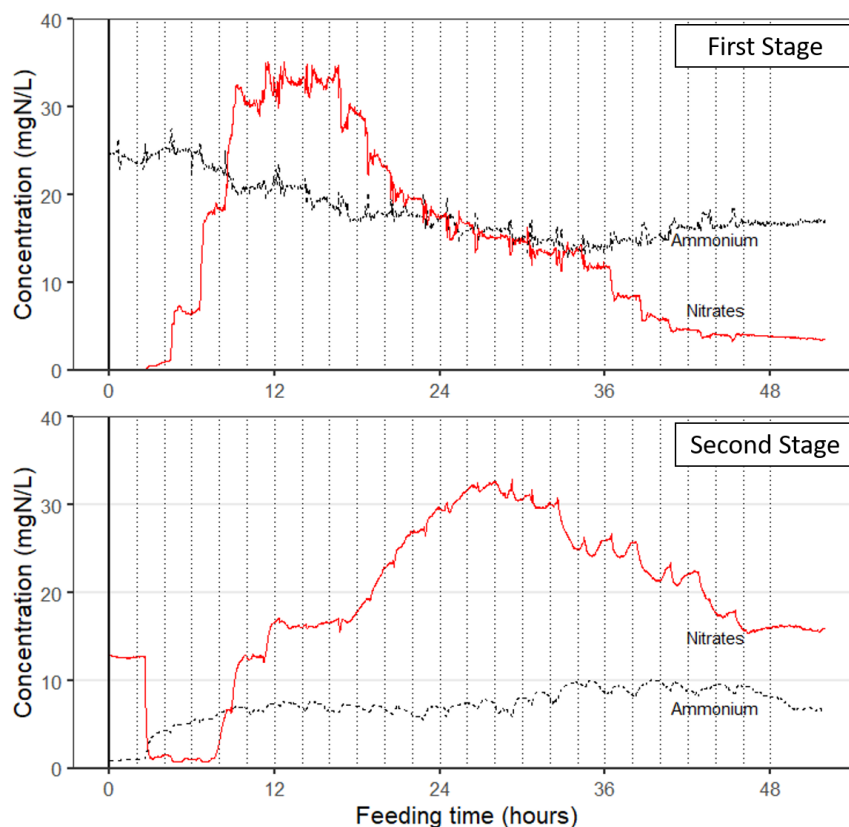


FIGURE 3.3-4 :AMMONIUM AND NITRATES MEASUREMENTS DURING THE FEEDING PERIOD OF THE ISOTOPIC TRACKING AT THE OUTLET OF THE FIRST STAGE (ABOVE) AND SECOND STAGE (BELOW). VERTICAL DASHED LINES SHOW THE BATCH FEEDING DYNAMIC EVERY TWO HOURS.

### 3.3.3.2 HYDRAULIC TRACKING

Both TW stages were composed of an upper unsaturated zone with free vertical flow and low hydraulic residence time, and a lower saturated zone with higher hydraulic residence time where dispersion occurred via diffusion and convection through the porous medium. The average hydraulic residence times HRT in the saturated parts were calculated for both TWF stages considering the respective depth of water saturation in each filter and a porosity of 0.35 in the saturated zone of the first filter stage composed of gravels and 0.40 in the saturated zone of the second filter stage composed of sand. Estimated HRT were 7 hours for the first filter stage and 9.3 hours for the second filter stage where the saturated zone is deeper (0.35 m) than in the first filter (0.3 m).

Results of hydraulic tracing are shown in Figure 3.3-4 for the first and second TW stages respectively. It can be observed that in the first filter stage, about 20% of the mass of the tracer was collected within 3.5 h corresponding to  $\frac{1}{2}$  of the hydraulic residence time in the saturated zone. This indicated the presence of preferential flows through the filter. About 60% of the tracer was collected within one hydraulic residence time (7 h). It took about 2 HRT (14h) to collect 90% of the tracer and 3 HRT to collect 95%, indicating that the hydraulic flow within the first filter was poorly dispersive. In the second filter stage made of finer porous medium, almost no tracer was collected until 6 hours, i.e. more than  $\frac{1}{2}$  HRT, and only about 10% of the tracer was collected in 1 HRT (9.3 h). These results indicated very little preferential flow path. About 75% of the tracer was collected within 2 HRT and more than 95% in 3 HRT, revealing poorly dispersive conditions.

The time required to recover 50% of the tracer is more than twice as long as that of the first stage with 13 hours. The measured tracer concentration peaks at the first batch on the first stage and then decreases steadily, while the curve for the second stage is bell-shaped and peaks at 12 hours after the start of tracing. A gamma function with simultaneous adjustment of tracer N and t by minimisation of the error function (Kadlec and Wallace, 2009) was used in both steps to calculate the mean residence time and effective volume. The mean residence times are 6.2 and 13.41 respectively for the first and second stage, while the effective volumes are 68 and 97%. It is likely that the difference of nature of filtering sediments within both stages is responsible for observed flow differences in particular because the capillarity of the sand in the unsaturated zone of the latter significantly increases the volume of water contained. The

time required for the restitution of 90% of the tracer is 24 hours in the second stage, i.e. almost double that of the first stage.

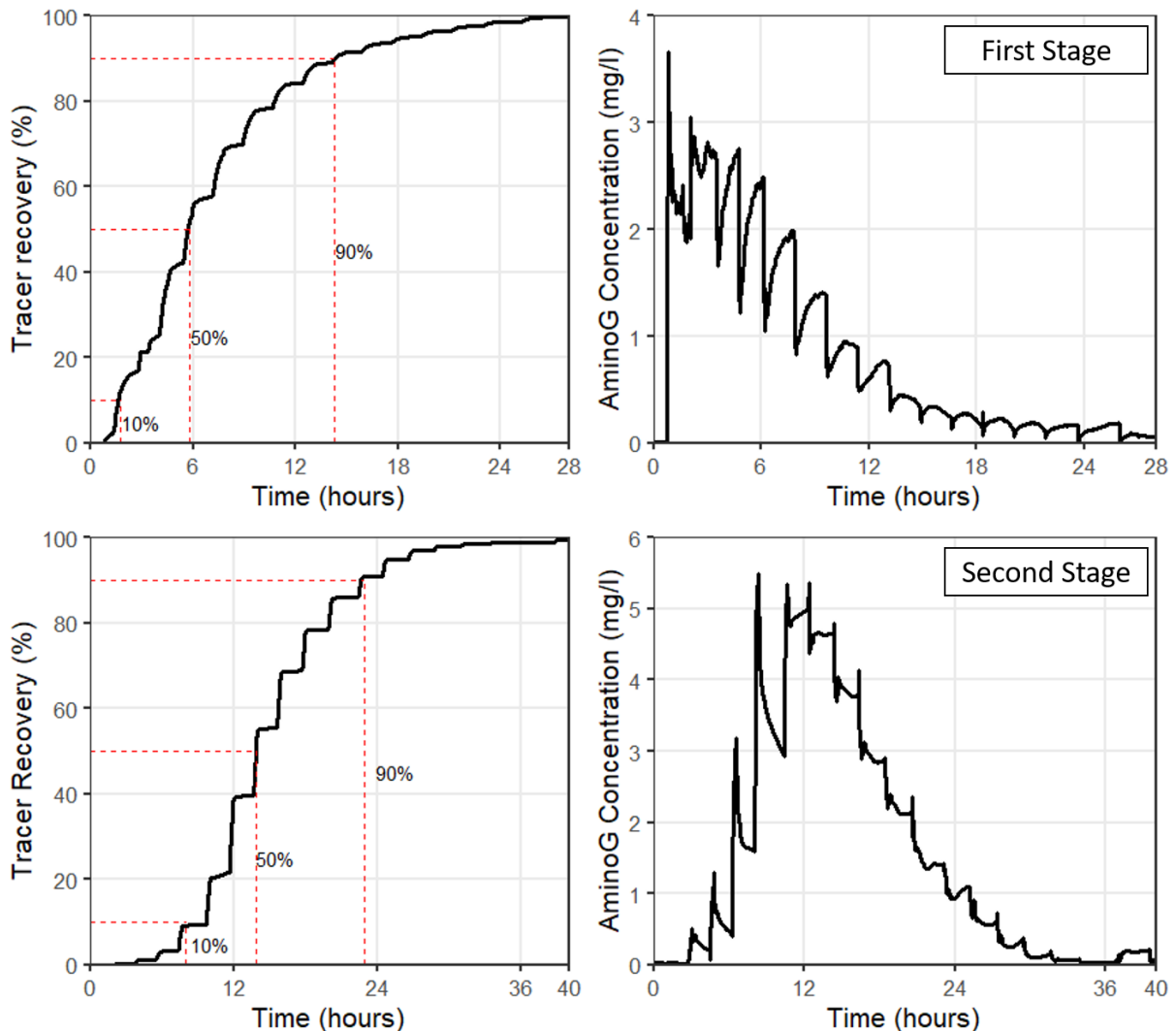


FIGURE 3.3-5 : AMINOG ACID TRACKING RECOVERY (LEFT) AND CONCENTRATION MEASUREMENTS (RIGHT) OF PARTIALLY SATURATED FIRST AND SECOND FILTRATION STAGES IN A VERTICAL FLOW TREATMENT WETLAND AT PILOT SCALE.

### 3.3.3.3 ISOTOPIC TRACKING

#### TOTAL LABELLED NITROGEN DISTRIBUTION DURING THE FEEDING PERIOD

Figure 3.3-6 shows the evolutions of the isotopic distribution  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  in the total pool of nitrogen (all forms included) measured along the treatment line and after the introduction of a 60L batch volume of feed wastewater spiked with  $^{15}\text{N}$ -ammonia at an initial isotopic ratio of 4.6%. All the  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  values recorded were above 0.364%, which is the natural abundance of

$^{15}\text{N}$  found in the environment. Figure 3.3-6 therefore shows how the  $^{15}\text{N}$ -ammonia, spiked at 4.6 % in the feed batch, was progressively diluted in the system with the medium containing N at the natural abundance of 0.364% as the feed batch volume progressed in time along the treatment line.

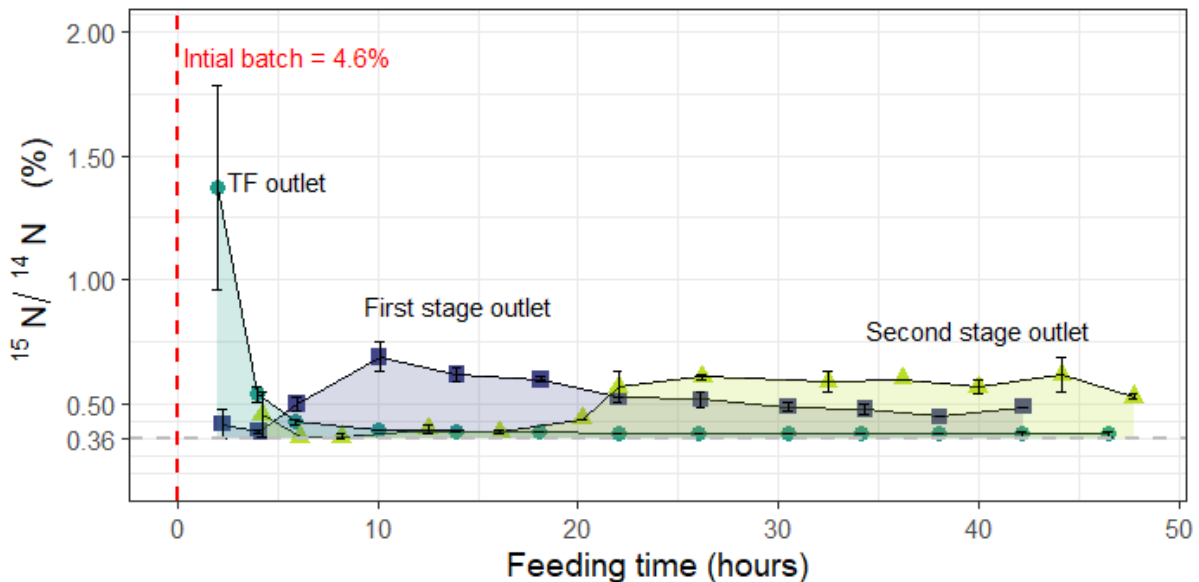


FIGURE 3.3-6 : ISOTOPIC MEASUREMENT OF  $^{15}\text{N}$  ABUNDANCE ON THE TOTAL NITROGEN AT THE TF, FIRST STAGE AND SECOND STAGE OUTLET VERSUS TIME AFTER THE SYSTEM HAS BEEN FED WITH THE ZERO LABELLED BATCH.

The highest value was measured at 1.37% at the outlet of the TF after the initial batch enriched in  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  at 4.6% was treated. Without any dilution of the labelled nitrogen from the first batch by naturally abundant nitrogen, the TF output value should have been identical to the input value, i.e. 4.6%, as the isotopic fractionation due to nitrification in the TF is considered negligible (see materials and methods). The difference in  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  between the inlet and outlet of the initial batch on the TF was explained by the dilution of the labelled nitrogen by natural nitrogen already present in the TF in the form of detached biomass. The  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratio measured at the TF outlet then decreased to 0.54% at the second batch indicating the retention of  $^{15}\text{N}$  species in the TF while all the wastewater volume of the first batch was theoretically pumped out to the first stage. By the third batch however, after about 6 hours of treatment, the presence of labelled nitrogen was no longer detected since the ratio was close to the natural value. Nitrogen was therefore very poorly retained within the TF what is expected given the operation of the TF.  $^{15}\text{N}$  above the natural ratio was detected at the outlet of the first stage at 6 hours, corresponding to the third batch. It reached a maximum around 0.6 % at 10 h and then

gradually decreased by dilution with natural N in the following feed batches.  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratio remained however above the natural ratio over more than 40h, despite the dilution with several successive feed batch volumes. The detection of  $^{15}\text{N}$  takes longer than that of fluorescence, clearly showed that nitrogen was therefore significantly retained within the first filter stage, probably by sorption as compared with the non-interactive hydraulic tracer discussed above.

#### *DISSOLVED NITROGEN FORMS DISTRIBUTION*

Figure 3.3-7 shows the evolutions of the isotopic distribution  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  in the pool of nitrogen obtained after filtration (corresponding mostly to ammonium and nitrates). It was measured along the treatment line after the introduction of a 60L batch volume of feed wastewater spiked with  $^{15}\text{N}$ -ammonia at an initial isotopic ratio of 4.6%.

The profiles of  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratios evolutions measured at the TF outlet were similar for  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  over the entire feeding period. Spiked ammonia was partly nitrified in the TF. Since the initial isotopic ratio was very high in the feed batch, the effect of isotopic fractionation by the process of nitrification was negligible. Nitrates were therefore produced at an isotopic ratio very close to the ratio of the substrate ammonia, which explained the similarities of the 2 curves, and also validated the robustness of the methodology developed here.

The peak of the labelled ammonium is reached after 6 hours at the outlet of the first stage with a value of 0.562% for the  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratio. Once this peak is reached the  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  value of ammonium gradually decreases. This is caused by the labelled ammonium retained on the first stage and diluted by natural ammonium from the system and from the new batches without addition of tracer. At the outlet of the second stage the  $^{15}\text{N}$  abundance is corresponding to the natural value (0.36 %) for 30 hours after the beginning of the tracing and increases slightly after 30 hours to reach 0.4 % at 40 hours. The low concentration of ammonium in the treated water made the method difficult to implement because very little nitrogen was detected after purification of the nitrates on ion exchange columns. The nitrate-specific  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  curve highlights the creation of nitrates on the TF and first stage and their migration through the system. The presence of nitrates at the outlet of the first stage throughout the feeding period is the consequence of the nitrification of the labelled ammonium retained in the unsaturated zone as already described in the physico-chemical monitoring of

this study. This tracing underlines the specific dynamics of ammonium treatment in VFTW and in particular the adsorption role of the filtering mass. The value of the first batch at the outlet of the second stage is however difficult to explain because the tracer could not propagate so quickly in the system. In fact, this point may be the consequence of a handling error and should not be subject to an interpretation.

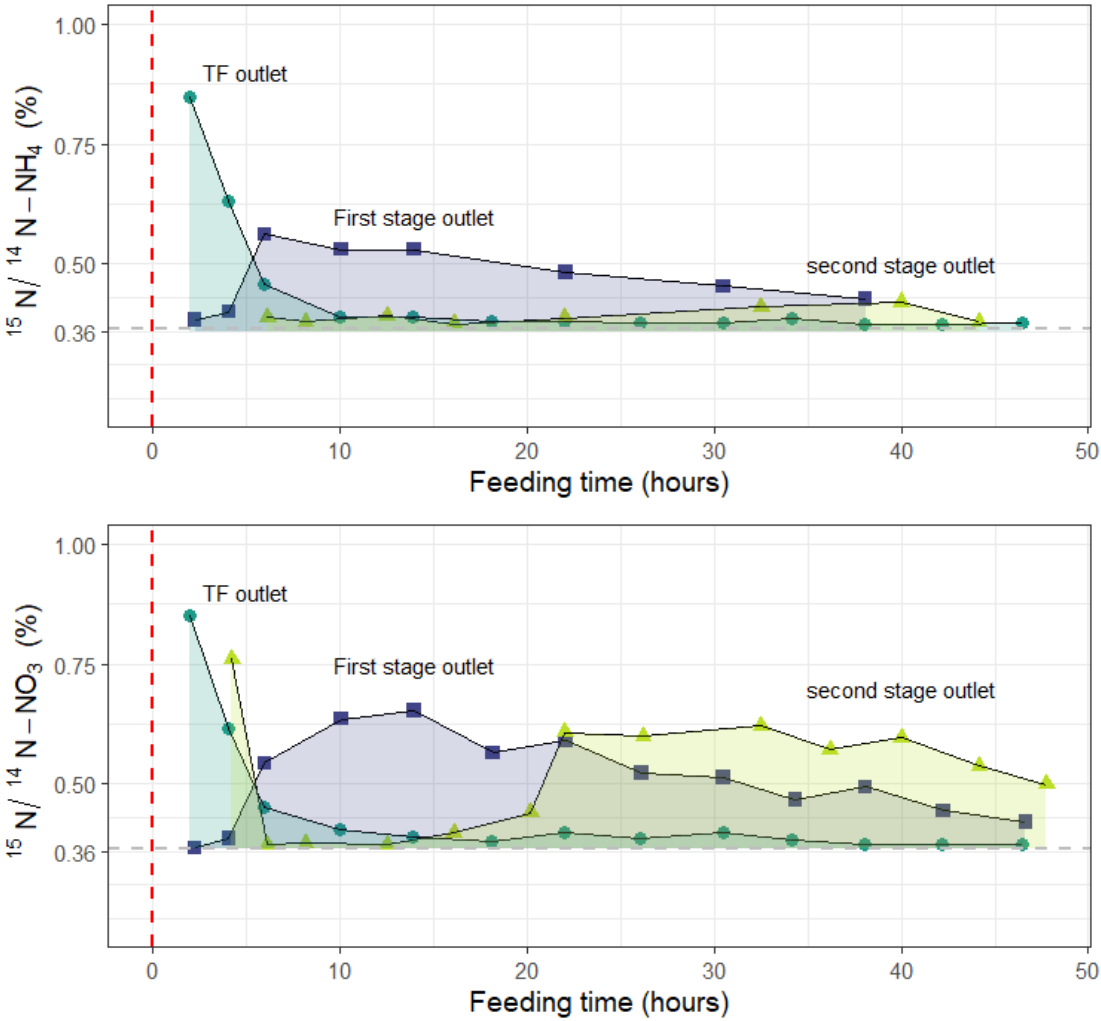


FIGURE 3.3-7 :: ISOTOPIC MEASUREMENT OF  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  IN AMMONIUM AND NITRATES AT THE TF, FIRST STAGE AND SECOND STAGE OUTLET VERSUS TIME AFTER THE SYSTEM HAS BEEN FED WITH THE ZERO LABELLED BATCH ISOTOPIC RATIOS.

*ISOTOPIC MEASUREMENT IN SLUDGE DEPOSIT*

Surface sludge deposits were sampled from the sludge layer of the first stage between each batch, and analysed for  $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$  isotopic ratio, to assess if any change appears over the duration of the assays. Results were found to be almost constant with a mean value of 0.376%



and a standard deviation of +/- 0.002%. This level was very close to the natural distribution, indicating no enrichment of the sludge was observed.

#### 3.3.3.4 GENERAL DISCUSSION

The feasibility of the isotope tracing method by adding labelled ammonium into a complex system was demonstrated in this study. In parallel, the realisation of a fluorescence tracing allows to extract and interpret the behaviour of nitrogen in the context of hydraulic dynamics. With regard to hydraulic dynamics, the two filtration stages behave in their own way, with an average residence time that is more than twice as long in the second stage than in the first stage (13 hours versus 6.2 hours respectively). The nature of the materials making up these two stages is notably at the origin of these distinct behaviours. Indeed, the saturation volume of the second stage is probably underestimated because the unsaturated part composed of sand probably retains a large proportion of water, which has the effect of increasing the saturation volume. By means of these two methods, it was shown that the residence time of nitrogen is higher than the hydraulic residence time due to the retention of nitrogen on the filter by adsorption on the filter materials. The behaviour of labelled ammonium on the first stage is remarkable as it clearly shows its transfer from the TF to the first stage, its long retention and its dilution by the input of nitrogen of natural isotopic abundance via the input of new batches. Meanwhile, the presence of marked nitrates at the outlet of the first stage throughout the feeding period is the consequence of the retention/nitrification of the marked ammonium on the first stage. This selected method can be adapted to monitor other natural or wastewater treatment systems and a real scale.

#### 3.3.4 CONCLUSION

The joint use of hydraulic tracing by fluorescence and isotopic tracing by ammonium  $^{15}\text{N}$  enriched to 4.6% makes it possible to trace the fate of a particular nutrient with regard to the hydraulic dynamics of the system studied. The overall behaviour of nitrogen appears to be linked to the hydraulic behaviour. However, the longer residence time of the nitrogen in the system clearly highlights the interaction of the nutrients with the system studied and in particular with the filter packing. It was shown that ammonium is retained more than 10 hours

in the TW than hydraulic retention time. Isotope tracing via  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  monitoring of ammonium and nitrate allows the notion of nitrogen transformation to be addressed. Finally, the isotope tracing method used appears to be robust and could be applied to other natural or anthropized systems.

#### CREDIT AUTHORS STATEMENT

**Kevin Maciejewski:** Conceptualization, Methodology, Data Curation, Writing – Original Draft.  
**Mathieu Gautier:** Conceptualization, Methodology, Writing – Review & Editing, Supervision.  
**Xavier Saupin:** Methodology, Writing – Review & Editing. **Erik Bonjour:** Methodology, Writing – Review & Editing. **Anthony Anchisi:** Methodology, Writing – Review & Editing. **Boram Kim:** Conceptualization, Methodology. **Philippe Michel:** Writing – Review & Editing. **Pascal Molle:** Conceptualization, Writing – Review & Editing, Supervision. **Patrick Jame:** Conceptualization, Writing – Review & Editing, Supervision. **Rémy Gourdon:** Conceptualization, Writing – Review & Editing, Supervision

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the INRAE for providing access to the Feysine facilities, metrology equipment and technical assistance. This work was realized within the Graduate School H2O'Lyon (ANR-17-EURE-0018) and the Université de Lyon (UdL), as part of the programme "Investissements d'Avenir " of the French national agency for research (Agence Nationale de la Recherche, ANR). The authors would like to thank the SCIRPE Company and CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la REcherche) for funding this research project.



## A RETENIR

Ces deux articles précédents ont en commun de suivre le procédé AZOE® complet à l'échelle pilote.

Une première approche a été de suivre le comportement du système au cours de successions de semaines de fonctionnement et de repos au cours de deux saisons différentes : automne et printemps. Les différences observées entre les deux saisons sont notamment dues à la qualité de l'effluent d'entrée. Au printemps, l'effluent est plus concentré et la charge organique entrante est supérieure à celle de l'automne.

De manière globale le fonctionnement du pilote rejoint celui du procédé à l'échelle réelle en termes de performances globales entrée/sortie sur la DCO et les paramètres AZOE. Toutefois, les essais pilotes permettent de procéder à un échantillonnage en sortie du lit bactérien. L'un des enseignements majeurs est que le lit bactérien dégrade prioritairement la charge carbonée par rapport à la charge ammoniacale.

Les données continues de nitrates et d'ammonium révèle très clairement un comportement propre au système avec un pic de nitrates important 10 heures après la remise en route de l'alimentation. Ce pic est attribué à un lessivage des nitrates provenant de la nitrification de l'ammonium piégé lors de la phase de repos.

Malgré la présence de nitrates sur le second étage, la dénitrification ne dépasse pas 10% et pourrait être améliorée par l'ajout de carbone organique.

La seconde approche a été de mettre en place un suivi isotopique via l'utilisation d'une première bâchée d'ammonium marqué. Ce protocole met en évidence le devenir (transformation et migration) d'un lot initial d'azote à travers le système. Le principal résultat est le temps de résidence très long de l'ammonium sur le premier étage (48 heures) soulignant son interaction forte entre le media filtrant.



## PREAMBULE :

Sur la base des conclusions de la première partie du manuscrit visant à approfondir les connaissances du systèmes AZOE-N, Les deux prochaines sections ont pour objectif d'explorer les possibilités et la faisabilité d'améliorer l'épuration de l'azote. A ce titre la dénitrification au sein du second étage de filtration est au cœur de la problématique de cette partie. Il est notamment question de déterminer la meilleure manière de palier aux carences en carbone organique sur cette ultime étape du traitement recevant des effluents riches en nitrates mais appauvris en carbone organique par les étapes de traitement précédentes.

***“Influence of organic carbon addition by step feeding in a vertical flow treatment wetland on removal performance, microbiology and nitrogen end product by denitrification”***

Dans un premier temps, la possibilité d'utiliser les effluents d'entrée de station comme source de carbone organique a été testée à l'échelle pilote. Cette stratégie, appelée « step-feeding » repose sur le principe de considérer les effluents d'entrée comme une source illimité de carbone afin de rétablir le rapport carbone/azote sur le second étage à un seuil acceptable pour la dénitrification. Cet article a été réalisé en collaboration avec l'UMR 5557 Ecologie Microbienne de Lyon afin de caractériser le potentiel de nitrification et de dénitrification à différents horizons des étages de filtrations.

***« Faisabilité d'apport de carbone organique par biodéchets valorisables »***

Dans un second temps, la possibilité de valoriser des déchets organiques riches en carbone a été envisagée. Ces matériaux « biosourcés » auraient pour finalité d'enrichir les effluents du second étage de traitement. Ce chapitre vise à définir à l'échelle laboratoire quels seraient les matériaux biosourcés au plus fort potentiel d'optimisation de la dénitrification. Le choix des matériaux, leur potentiel au regard du relargage en carbone organique total et en azote, et la faisabilité de la solution sont discutés.



---

### 3.4 ETUDE DE L'ACTIVITE DE NITRIFICATION ET DE DENITRIFICATION AU REGARD D'UNE OPTIMISATION DU SYSTEME PAR AJOUT DE CARBONE PAR DERIVATION D'EFFLUENT BRUTE





# INFLUENCE OF ORGANIC CARBON ADDITION BY STEP FEEDING IN A VERTICAL FLOW TREATMENT WETLAND ON REMOVAL PERFORMANCE, MICROBIOLOGY AND NITROGEN END PRODUCT BY DENITRIFICATION

K. Maciejewski<sup>a,b</sup>, M. Gautier<sup>a</sup>, A. Cantarel<sup>d</sup>, J. Gervais<sup>d</sup>, B. Kim<sup>a</sup>, P. Michel<sup>b</sup>, P. Molle<sup>c</sup>, A. Richaume<sup>d</sup>, R. Gourdon<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Univ Lyon, INSA Lyon, DEEP, EA7429, 69621 Villeurbanne, France

<sup>b</sup>SCIRPE, Society of Design and Production Engineering for Wastewater Purification, 5 Allée Alban Vistel, 69110 Sainte Foy Lès Lyon, France

<sup>c</sup>Institut national de recherche pour l'agriculture et l'environnement (Inrae) - UE Reversaal, Villeurbanne, France

<sup>d</sup>CNRS, UMR 5557, Microbial Ecology Centre, Université Lyon 1, Villeurbanne, France

## Abstract

A pilot-scale wastewater treatment system composed of an aerobic trickling filter (TF) associated with a vertical flow treatment wetland (VFTW) was used to investigate global nitrogen treatment from real domestic wastewater in the objective to define operational conditions to improve denitrification under conditions of limited organic carbon availability. The pilot system was operated under conventional and modified conditions and nitrogen removal rates compared. The modified conditions, classically referred to as “step feeding”, consisted in diverting a fraction of the inlet wastewater flow to bypass the TF and feed the anoxic zones of the VFTW. The compartment receiving the diverted feed flow was rich in nitrates but poor in organic carbon. On line analyses were performed to monitor the treatment under the different operating conditions. Wastewater samples were also regularly taken every 5 cm from the top surface to the bottom of the 80cm-deep VFTW porous medium. They were analyzed for several physico-chemical parameters and treated to measure the microbial potentials of nitrification and denitrification to  $N_2O$  or  $N_2$ . Results showed that the step-feeding does not significantly improve total nitrogen removal rates but has a strong effect on the denitrification enzyme activities. The highest microbial potentials were analyzed within the porous medium close to the interface between the saturated and unsaturated zones. Potential  $N_2O$  emissions were found higher in the upper zone of the stage as compared to the saturated lower zone.

## Keywords

Treatment wetland; nitrogen removal; N<sub>2</sub>O emission; step-feeding; denitrification potential

### Highlights

- Nitrification and denitrification potentials were measured along the depth of treatment wetlands
- The highest nitrification and denitrification potentials were found around the top of the saturated zone
- Denitrification was not enhanced by spiking the stage medium with inlet wastewater
- N<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O was studied in a global warming context
- By-passed COD<sub>d</sub>/TN ratio is a predominant factor in step-feeding management

### 3.4.1 INTRODUCTION

The removal of organic and inorganic forms of nitrogen from domestic wastewaters is necessary with respect to environmental protection issues and in the perspective of re-using the treated water in several applications. The approach remains however a technological challenge due to the many possible states of oxidation of nitrogen and the numerous microbial processes involved in its treatment. Nitrogen occurs in domestic wastewaters both in the suspended solids under organic forms and in the aqueous solution under organic and inorganic forms. The most reduced inorganic form, ammonia ( $\text{NH}_3$ ), is hydrosoluble and ecotoxic to many hydrosystems. The most oxidized form, nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) is also very hydrosoluble and contributes to eutrophication when released into natural hydrosystems. Under reductive conditions, gaseous species may also be formed such as nitrous oxide  $\text{N}_2\text{O}(\text{g})$  which exhibits a high global warming potential (Forster et al., 2007, IPCC 2001; Martínez-Espinosa et al., 2020). Finally, the redox neutral inorganic form  $\text{N}_2(\text{g})$  is the most environmentally friendly form of nitrogen since this inert gas is largely predominant in the Earth atmosphere. The strategies developed for nitrogen treatment therefore aim at converting as much as possible nitrogen into  $\text{N}_2(\text{g})$ .

The most classical pattern followed to implement this strategy in domestic wastewater treatments consists in the oxidation of ammonia ( $\text{NH}_4^+$ ) and organic forms into nitrate, followed by the reduction of nitrate into  $\text{N}_2$ . The first step, called nitrification, occurs under aerobic conditions following two successive reactions (Holmes et al., 2019). The first reaction, called nitritation, is the oxidation of ammonium into nitrite by autotrophic bacteria (AOB: Ammonium Oxydizing Bacteria) and archaea (AOA: Ammonium Oxydizing Archea). The second reaction, called nitration, is the oxidation of nitrite into nitrate by Nitrites Oxydizing Bacteria (NOB) (Levy-Booth et al., 2014; Cáceres et al., 2017). Total denitrification to  $\text{N}_2(\text{g})$  is the result of a succession of reductions catalysed by 7 main enzymes (Jones et al., 2008). The complete reduction sequence requires the cooperation of bacteria and archaea of great diversity (Holmes et al., 2019). Denitrifying microorganisms oxidize available carbon sources to reduce nitrates as a final electrons acceptor. It is considered that a molar COD/N ratio around 3 is needed in practice to allow complete denitrification (Kadlec and Wallace, 2009). The environmental factors known to favour denitrification are anaerobic conditions, organic carbon availability and mesophilic temperature (Lee et al., 2009). Most denitrifiers do not possess however all the enzymes required for the complete reduction of nitrate to  $\text{N}_2$ . Incomplete denitrification may

therefore be observed with the release of gaseous  $N_2O(g)$  (Philippot et al., 2011, Hallin et al., 2018). This is especially true since, within wetlands, the C:N ratio and temperature seem to be the dominant factors in  $N_2O$  emission (Søvik and Kløve, 2007; Maucieri et al., 2017). In contrast, system configuration has little effect on  $N_2O$  production (Teiter and Mander, 2005).

Treatment wetlands have proven their efficiency to treat carbon, nitrogen and phosphorus in domestic wastewaters from rural communities of less than 4000 population-equivalent, combined with other advantages such as low maintenance costs and good landscape integration (Molle, 2005; Paing and Voisin, 2005). The principle of treatment wetlands (TWs) is to circulate the feed wastewater through a porous stage bed made of layers of gravels and sand of different grain sizes. The top surface of the stage is planted with reeds. Several types of technical implementations can be found, which differ from each other in (i) the direction of the hydraulic flow (horizontal or vertical) (Vymazal, 2011; Wu et al., 2015), (ii) the number of successive filter stages (1 or 2), and (iii) the presence of an anoxic saturated zone. In France, the most popular system consists of two successive vertical flow unsaturated filter stages which are currently called French-VFTW (Vertical Flow Treatment Wetland). The system is fed with unsettled wastewaters spread at the top surface of the stages. Suspended solids are retained by filtration at the surface of the first stage (Molle, 2014). In limiting the permeability, the surface sludge deposit layer favours the uniform distribution of the feed wastewater over the top surface of the stage, thereby allowing a uniform flow of percolation through the stage medium (Kania et al., 2018, Kania et al., 2019). This surface sludge deposit layer, also called sludge blanket, also contributes to the performance of the treatment owing to the density, diversity and activity of its microflora. Efficiencies above 90% are obtained for suspended solids removal, organic load mineralization, and nitrification (Rousseau et al., 2004; Molle et al., 2005). However, classical VFTW systems exhibit relatively low denitrification rates due to the absence of an anoxic zones in the system. To allow denitrification to occur, classical VFTW systems have been modified to include an anoxic, water-saturated zone within at least one of the stages (Kim et al., 2014; Silviera et al., 2015).

The AZOE system (patents EP1857419; FR 0651656; FR 1153754) combines a pre-treatment of the feed wastewater on an aerobic trickling filter, followed by two stages of partially saturated filters planted with reeds (Kim et al., 2014; Maciejewski et al., 2022). The trickling filter offers a large surface area for the attachment and growth of an active biofilm. It

also provides good conditions of aeration for the mineralization of the most readily biodegradable organic fraction (Kania et al., 2019). These systems constitute an alternative to aerated systems (Foladori et al., 2014). Aerated condition of the TF may also allow nitrification to occur (Daigger and Boltz, 2011; Henrich and Maggraff, 2013). The oxidative action of the aerobic TF is continued and completed in the unsaturated upper parts of the planted stages. The saturated lower parts provide an alternation of aerobic and anaerobic conditions allowing nitrogen removal through nitrification/denitrification. However, previous studies have shown that denitrification in the second filter stage is limited by a lack of available organic carbon. The proper balance between carbon and nitrogen has been reported as an objective of improvement in treatment wetland systems by several authors (Sirivedhin and Grey, 2006; Wu et al., 2014).

Several approaches have been investigated in this purpose. The diversion of a fraction of the inlet carbon-rich flow to feed nitrate-rich and carbon-depleted areas. This approach, known as “step-feeding”, was already tested by several authors with several treatment wetland configurations (Nivala et al., 2019; Al-Wahaibi et al., 2021). Using a laboratory-scale hybrid VF-HF TW system fed with synthetic wastewaters, Torrijos et al, (2017) diverted up to 50% of the feed wastewater flow from the VF stage to the HF stage. Using a pilot scale HF system, Stefanakis et al., (2011) observed that the modification of the distribution of carbon supply distribution played a key role in TN removal with positive or negative effects depending on the conditions of implementation. Nivala et al., (2019) tested several step-feeding conditions on a full-scale two-stage VFTW system and reported that improving denitrification was feasible with simple modifications. However, deeper studies are needed to better understand the influence of the C:N ratio of the flow which was diverted and the influence in the microbial activity and to evaluate possible negative consequences such as the incomplete denitrification leading to the release of N<sub>2</sub>O (Janhangir et al., 2016).

This study investigated global nitrogen treatment in VFTW with the objective to evaluate operational step-feeding conditions to improve denitrification under conditions of limited organic carbon availability. A pilot-scale wastewater treatment system composed of an aerobic trickling filter associated with a vertical flow treatment wetland (VFTW) was used. The experimental system was monitored to map the nitrification and denitrification potentials at

different stages of the treatment line and assess the potential factors controlling the completeness of denitrification.

### 3.4.2 MATERIALS AND METHODS

#### 3.4.2.1 SET-UP OF PILOT-SCALE EQUIPEMENT

Experiments were conducted on a pilot-scale AZOE-N system combining a trickling filter TF and 2 successive treatment wetlands (TW) stages as shown in Figure 3.4-1. The system was installed in a ventilated greenhouse of the INRAE experimental platform of La Feyssine close to Lyon, France. The platform was connected to the nearby municipal wastewater treatment plant of La Feyssine. All experiments were thereby done with real domestic wastewater. The size of the pilot system corresponded to a 6-person scaling. The dimensions of the different equipments are given in figure 3.4-1. The TW stages were filled to a depth of 0.60m by gravels disposed in layers with grain sizes ranging from coarse in the bottom to fine in the top as details in previous papers (Kim et al., 2015a, Kim et al., 2015b). The top surface of the first stage filter was covered with a 5cm-thick layer of sludge deposits taken from a real unit in operation. The surface of the 2 TW stages was planted with reeds (*Phragmites australis*) at a density of 10 plants per m<sup>2</sup>. The TF was packed with polypropylene cross pack medium having a specific surface area of 150 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>. The bottom of the TW stages was saturated with water to a depth adjusted by a syphon at 30 and 35cm for the first and second stages, respectively.

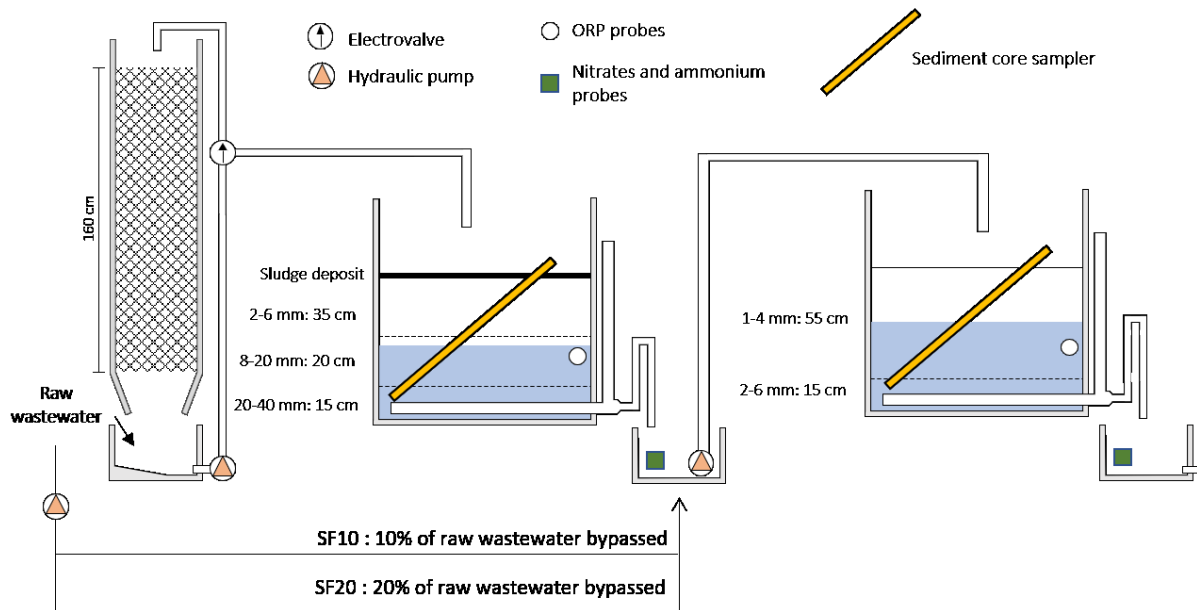


FIGURE 3.4-1 : PILOT-SCALE CHARACTERISTICS AND EXPERIMENTS SET-UP AZOE SYSTEM IS COMPOSED OF A TRICKLING FILTER AND TWO PARTIALLY SATURATED CONSTRUCTED WETLANDS.

### 3.4.2.2 OPERATING CONDITIONS

The system was fed through the TF first, followed by the first and second filter stages successively. Inlet wastewater was pumped by a feed pump at a flowrate of 30 L/h into a 60 L reservoir placed below the TF. Meanwhile, a recirculation pump was used to circulate the feed wastewater from the tank through the TF in a closed loop mode at a flowrate of 720 L/day. When the tank was filled to 60 L, the recirculation pump was stopped and the whole volume of the tank was rapidly transferred as a batch to the surface of the first stage at a very high flowrate of 1000 L/hour. Due to the high flowrate of the feed and the limited permeability of the top surface of the stages, the 60 L volume formed a layer over the whole surface and then percolated in a uniform manner through the stage medium.

Unlike the TF which was fed in a non-stop mode (except for maintenance), the TW stages were operated in a sequential feed and rest mode to mimic the operation of full-scale units where the TW stages are fed for one week and rested for two weeks. However, in order to shorten the experimental phases in the pilot system, the sequence was designed on a weekly basis by the alternance of 56h of feeding followed by and 112 hours resting.

In a first experimental phase, the system was operated for about 3 months in the conventional mode described above. Then in a second phase, step-feeding conditions were



applied for about 2 months. By-passing was operated using a pump that derived a fraction of the feed flow from the TF reservoir to the tank between the two TW filter stages (Figure 3.4-1). By passing flow was firstly set to 10% of the feed hydraulic load in September 2021. Other assays were then done with a by-pass of 20% in October 2021. Sediment sampling were done at the very end of the conventional operating phase and the 20% step-feeding phase. Samples were kept below 4°C before analysis.

#### 3.4.2.3 ANALYTICAL MONITORING OF THE PILOT-SCALE SYSTEM

The system was monitored during the feeding periods only. Wastewater was analysed at 4 steps along the treatment line: (i) inlet feed wastewater, (ii) TF outlet, (iii) TW first stage filter outlet, and (iv) outlet treated wastewater. Online probes were positioned at levels (iii) and (iv) for continuous monitoring of ammonia and nitrate concentrations. ORP probes were also positioned 5 cm below the surface of the saturation area within the TW stages as shown in Figure 3.4-1.

In addition to online monitoring, wastewater samples were regularly taken from different points and analyzed for Chemical Oxygen Demand (COD), Total Suspended Solids (TSS), ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), Total Kjeldahl Nitrogen (TKN), Total Nitrogen (TN). Total Organic Carbon (TOC). Most samples were refrigerated and stored at 4°C for a maximum of 24h prior to their analysis. Some samples were frozen when longer storage time was needed. All parameters were analyzed following French standard methods (AFNOR, 2005).

#### 3.4.2.4 SAMPLING OF TW STAGE MEDIA

Non-destructive samplers were designed and placed diagonally with an angle of 45 degrees across the whole depth of gravels in each TW stages during the construction of the pilot system. These samplers were made of two tubes:

- o a perforated rigid PVC outer tube that serves as a sheath
- o a perforated inner PVC tube packed with the same stage medium as the 1st stage and corresponding at the same depth the stage. This tube can be split open lengthwise to sample and replace the stage medium.

Both tubes were densely perforated to allow wastewater to flow through.

#### 3.4.2.5 NITRIFICATION AND DENITRIFICATION ACTIVITIES

The stage medium extracted from each TW stage as explained in section 2.4 were sampled every 5 cm from the surface (including sludge deposit on the 1st stage) to the depth of 50 cm. The bottom 10 cm were discarded due to their too high compaction in the sampler. Surface sludge deposits were also sampled from several randomly distributed spots of the surface sludge blanket in the TW first stage filter and homogenised. A fraction of each of the samples was used to measure humidity and organic matter content and the rest was used for Nitrification Enzyme Activity (NEA) and Denitrification Enzyme Activity (DEA).

##### *NITRIFICATION ENZYME ACTIVITY MEASUREMENT*

A mass of 3 g of dry equivalent sediment was incubated with a 6 mL of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solution ( $50\mu\text{g N-NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1}$  dry soil) and distilled water was added in each sample in order to get a final volume of 30 mL in a Plasma Flask. Flasks were disposed in a stirring oven at 140 rpm and a temperature of  $28^\circ\text{C}$ . After 2, 4, 6, 8 and 10 hours, one millilitre of sediment slurry was sampled, filtered at  $0.2\ \mu\text{m}$  and  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  concentration were measured with a colorimetric analyzer (Smartchem 200, KPM analytics). In this study, nitrification was expressed in  $\mu\text{g}$  of N  $\text{g}^{-1}$  dry soil.  $\text{hour}^{-1}$ . As nitrite and nitrate measurement was performed the expression could also be  $\mu\text{g}$  of  $\text{N-NO}_2^- + \text{N-NO}_3^- \text{g}^{-1}$  dry soil.  $\text{hour}^{-1}$ . This protocol is based on the protocol described in Cantarel et al., 2020.

##### *DENITRIFICATION ENZYME ACTIVITY MEASUREMENT*

A mass of 10g (equivalent dry sediment) of fresh soil was placed in a flask sealed hermetically and filled with 90% helium and 10% acetylene mixture to provide anaerobic condition and to inhibit the nitrous oxide reductase involved in the final step of denitrification from  $\text{N}_2\text{O}$  to  $\text{N}_2$ . A mixture containing 2 mL of distilled water with  $\text{KNO}_3$  ( $50 \cdot \text{g N-NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1}$  dry soil), glucose ( $500\ \mu\text{C-glucose} \cdot \text{g}^{-1}$  dry soil), and glutamic acid ( $500\ \mu\text{g C-glutamic acid} \cdot \text{g}^{-1}$  dry soil) was added with a syringe to ensure non-limiting amount of substrate to denitrification. Flasks were incubated at  $28^\circ\text{C}$  for 8h. After 2 hours and then every hour  $\text{N}_2\text{O}$  accumulation was measured using a gas chromatograph ( $\mu\text{GC R3000}$ , SRA Instrument, Marcy 'Etoile, France). In this study, denitrification was expressed in  $\mu\text{g}$  of N  $\text{g}^{-1}$  dry soil.  $\text{hour}^{-1}$ . As nitrous oxide

measurement was performed the expression could also be  $\mu\text{g}$  of  $\text{N-N}_2\text{O g}^{-1}$  dry soil.  $\text{hour}^{-1}$ . This protocol is based on the protocol described in Cantarel et al., 2020.

To quantify the proportion of end product of denitrification,  $\text{N}_2\text{O}$  or  $\text{N}_2$ , this experiment was performed without the acetylene than inhibit the final reductive step of denitrification. The difference of  $\text{N}_2\text{O}$  accumulation between with and without acetylene provide the amount of nitrogen whose end product reaches  $\text{N}_2$ .

#### 3.4.2.6 DATA EXPLOITATION

Data were exploited using R software. Performance ratios based on concentrations were calculated using equation 1 for the different variables  $[X]$  monitored

$$(1) \quad \text{Performance (\%)} = ([X]_{\text{in}} - [X]_{\text{out}}) / [X]_{\text{out}} * 100$$

Calculation of nitrates daily load for the second stage includes the nitrates input from nitrification of ammonium, as given by equation 2:

$$(2) \quad \text{NO}_3^-_{\text{applied, second stage}} = \text{NO}_3^-_{\text{in, second stage}} + \text{NH}_4^+_{\text{in, second stage}} - \text{NH}_4^+_{\text{out, second stage}}$$

### 3.4.3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.4.3.1 INPUT / OUTPUT TREATMENT PERFORMANCES UNDER CONVENTIONAL OPERATING CONDITIONS

The concentrations in  $\text{COD}_d$ , TSS, TKN,  $\text{N-NH}_3$ ,  $\text{N-NO}_3$  and TN measured in the wastewaters at different stages along the treatment line are shown in Figure 3.4-1 for the operation under conventional operating conditions. Since real wastewaters were used to feed the system, relatively high fluctuations were observed in the concentrations of each parameter as shown in Figure 3.4-2. However average concentrations of  $203.7 (\pm 67.1)$ ,  $209.7 (\pm 91.8)$ , and  $73.9 (\pm 12.7)$  for  $\text{COD}_d$ , TSS, and TKN respectively, were found in the same range as in previous studies where wastewaters from the same treatment plant were used (Silviera et al., 2014, Kim et al., 2015a). The average removal rates calculated over the operation under conventional conditions are given in Table 3.4-1. Input/output removal rates as high 97.5% were obtained for TSS. As also observed in previous studies (Kania et al., 2015), it was observed that, the major

part of TSS removal occurred by filtration on the first filter stage alone, which achieved here  $93.1 \pm 5.2$  % of overall TSS removal (Figure 3.4-2 and Table 3.4-1). Table 3.4-1 even shows that suspended solid concentration slightly increased in the trickling filter, probably due to the release of biofilm fragments. As for the other parameters monitored, high removal rates were also observed for  $COD_d$ ,  $N_{NH_4^+}$  and TKN ( $92.2 \pm 7.3$  %,  $92.8 \pm 5.2$  % and  $91.4 \pm 4.9$  %, respectively). Most of the removal was achieved by the combination of the trickling filter and the first filter stage ( $83.1 \pm 8.6$  %,  $77.2 \pm 13.4$  % and  $77.4 \pm 10.2$  %, respectively). This observation was attributed to the good oxidation of the organic load and of the reduced forms of nitrogen in the aerobic trickling filter (Henrich and Marggraff, 2013) and in the upper unsaturated part of the first filter stage.

**TABLEAU 3.4-1 : AVERAGE REMOVAL RATES OBSERVED IN THE PILOT SYSTEM OVER THE 45 DAYS OF OPERATION UNDER CONVENTIONAL OPERATING MODE**

Removal performances (%)	$COD_d$	TSS	$N_{NH_4^+}$	TKN	TN
TF	$49.5 \pm 17.1$	$-1 \pm 10.1$	$41.4 \pm 19.9$	$35.1 \pm 27.5$	$24.8 \pm 28.4$
TF + 1 <sup>st</sup> stage	$83.1 \pm 8.6$	$93.1 \pm 5.2$	$77.2 \pm 13.4$	$77.4 \pm 10.2$	$53.9 \pm 16.5$
Total system					
TF + 1 <sup>st</sup> stage + 2 <sup>nd</sup> stage	$92.2 \pm 7.3$	$97.5 \pm 3.4$	$92.8 \pm 5.2$	$91.4 \pm 4.9$	$61.6 \pm 12.4$

The trickling filter alone achieved  $41.4 \pm 19.9$  % of nitrification and  $35.1 \pm 27.5$  % of TKN removal. Table 3.4-1 and Figure 3.4-2 show that N-ammonia and TKN were furthermore oxidized in the first and second filter stages, yielding to a high overall nitrification rate.

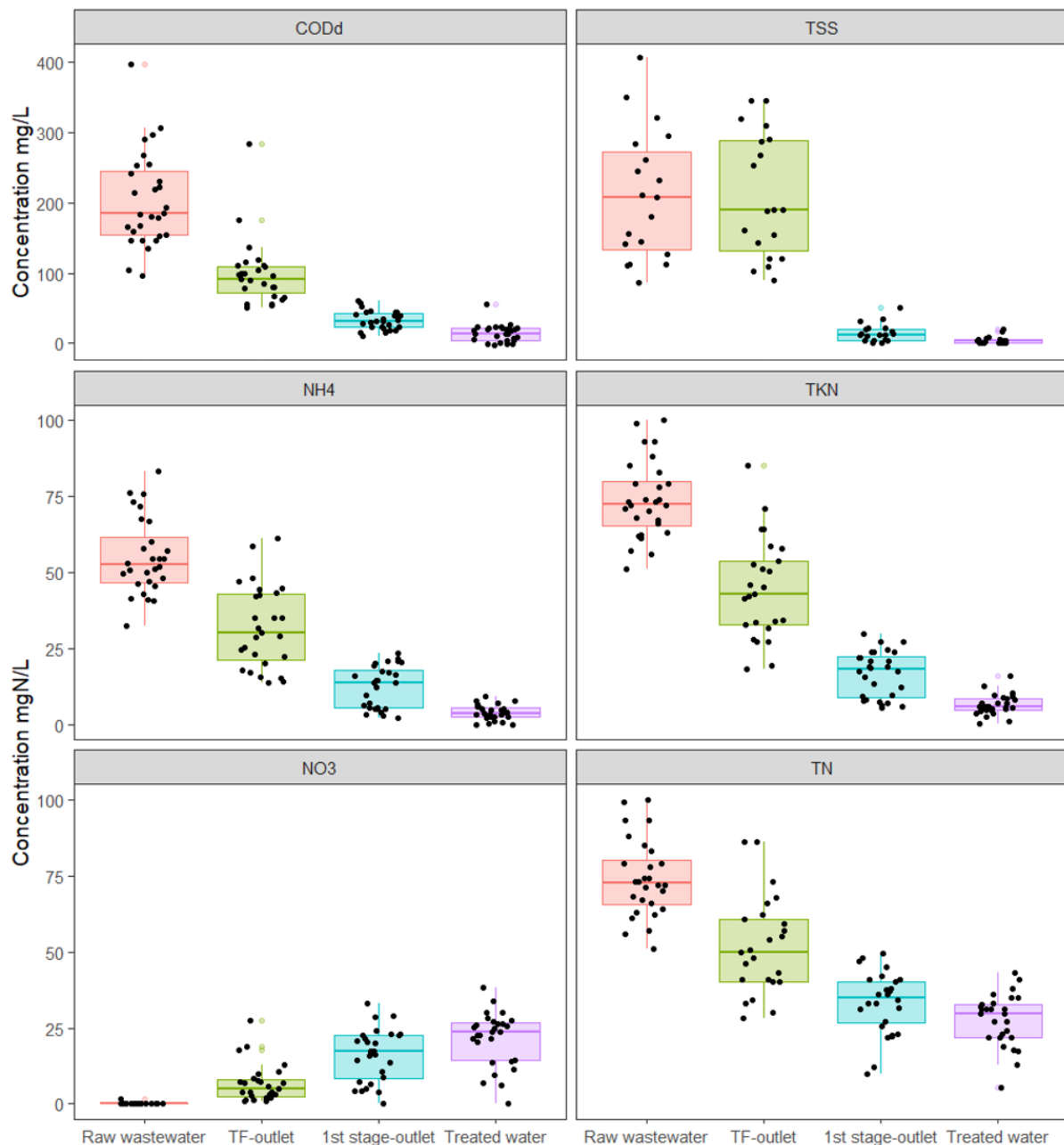


FIGURE 3.4-2 : DAILY POLLUTANTS CONCENTRATIONS MEASURED ALONG THE AZOE-N PILOT PROCESS LINE IN A CONVENTIONAL OPERATING MODE

Nitrates were analysed at the TF outlet at concentrations of 8.0 ( $\pm 4.1$ ) mg N/L in average, demonstrating the nitrification activity the trickling filter. However, it was observed that more N-ammonia was removed in average (23 mg N /L) than N-nitrate was formed. A loss of nitrogen therefore occurred in the TF treatment stage as confirmed by the decrease in total nitrogen TN between the inlet and outlet of the trickling filter. These results suggested the occurrence of denitrification within the TF treatment stage. Although surprising with regard to

the oxidative conditions in the TF, denitrification may be possible in the buffer recirculation tank underneath the TF where the presence of organic matter from the feed wastewater, nitrates from the nitrification process, and low redox level (- 200 mV) may be favourable conditions. Denitrification may also occur within the depth of the biofilm in the TF where the availability of O<sub>2</sub> may be limited in some areas.

Finally, TN removal ( $61.6 \pm 12.4$  %, Table 3.4-1) was not as good as observed for the other parameters, indicating a limitation in the nitrification/denitrification process. Denitrification was particularly low in the second filter stage which revealed a very low contribution to TN removal. There is no significant difference between the first and second stage of filtration among the principal factors affecting denitrification such as temperature, oxygen depletion, hydraulic retention time but the availability of organic carbon since COD<sub>d</sub>/TN are respectively  $1.9 (\pm 0.4)$  in the first stage and  $1.0 (\pm 0.3)$  in the second one. Carbon removal was very high in the system and the observed limitation of denitrification was mainly attributed to a lack of organic carbon. Similar observations were previously reported in full scale AZOE VFTWs (Maciejewski et al., 2022, Kim et al., 2014; Maciejewski et al., 2022a)

#### 3.4.3.2 MICROBIAL NITRIFICATION AND DENITRIFICATION POTENTIALS PROFILES WITHIN THE TW STAGE MEDIA

Nitrification Enzyme Activity (NEA) and Denitrification Enzyme Activity (DEA) were measured at different depth within the stage media of each TW stage of the pilot-scale system. The depth profiles recorded under conventional conditions of operation of the system are presented in Figure 3.4-3.

Firstly, it can be observed that both NEA and DEA were much lower in the second stage than in the first one. Figure 3.4-3 shows that NEA recorded in the second stage were all below  $1 \mu\text{g N /g dry sediment}$  and DEA all below  $2 \mu\text{g N /g dry sediment}$ , whereas in the first stage almost all measurements were above these levels and the recorded maxima were at least 5-fold higher. Yet, the sediment in the first stage was made of coarser particles than in the second stage (see Figure 3.4-1) and therefore lower potentials may have been expected in the first stage instead due to its lower specific surface available for microbial growth per unit mass of stage medium. The observation revealed that the first stage, despite its coarser particles, was

the siege of a much stronger microbial development that the second stage. This was attributed to the more favourable environmental conditions found in the first stage under the classical mode of operation of the system, with higher concentrations of ammonia, nitrates and available organic substrates that in the second stage.

Figure 3.4-3 also showed that in both stages, the depth profiles recorded below the surface for NEA and DEA were relatively similar. In the first stage, both NEA and DEA decreased with depth in the upper part of the unsaturated zone, then increased around the top of the saturated zone, and finally decreased with depth in the saturated zone. Strong NEA were therefore logically associated to the unsaturated zone where  $O_2$  availability was high enough to meet the needs of nitrifiers (Kadlec and Wallace, 2009). The highest NEA however were recorded slightly above the top of the saturated zone where not only  $O_2$  was available, but also the substrates required by the nitrifiers (ie ammonia) were sequentially accumulated after each introduction of the feed batch volumes. Below that level, the decrease of the NEA with depth within the saturated zone was attributed to the poor availability of  $O_2$ , but also to the coarser particle size of the stage medium in the lower part of the stages.

High DEA were logically rather recorded within the saturated zone, where the saturation of the medium with water reduced  $O_2$  availability and therefore installed anoxic conditions as suggested by Reilly et al., 2000. The highest DEA were recorded in the first stage at a depth of 30 to 35 cm, i.e. close but below the top of the saturated zone. This depth probably provided the best conditions to the denitrifiers, by combining anoxic conditions and the sequential accumulation at a sufficient residence time of substrates needed by the denitrifiers (organic substrates not yet mineralised and nitrates produced by nitrification in the TF and the upper part of first stage). Martínez et al., 2018 also reported strong heterotrophic denitrification activities near the top of the saturated zone in a partially saturated VFTW. Surprisingly in the second stage, the highest DEA were recorded at a depth of 20 to 25 cm, i.e. close but above the top of the saturated zone, as it was also observed for the NEA. This observation may be explained by the finer texture of the medium in the second stage. Water retention may be increased, allowing anoxic conditions to prevail intermittently even above the top of the saturated zone. As substrates availability decreased from top to bottom, the best conjunction of conditions may be found above the top of the saturated zone.

Finally, the sludge blanket at the surface of the first stage was found to exhibit a strong DEA but low NEA (figure 3;4-3). This sludge layer was rich in organic matter from the accumulation of the feed wastewater suspended solids (Kania et al., 2018). Its permeability to water was much lower than that of the stage media below and it was saturated with water during the batch feedings operations of the system. Low NEA rates could be explained by the immobilization of autotrophic organisms due to high carbon content in the sludge, as it has been shown in natural environment (Leptin et al., 2021). Therefore, despite its direct contact with the atmosphere, this layer offered anoxic conditions which, combined with the high availability of organic substrates and nitrates produced by the TF, were favourable to denitrification.



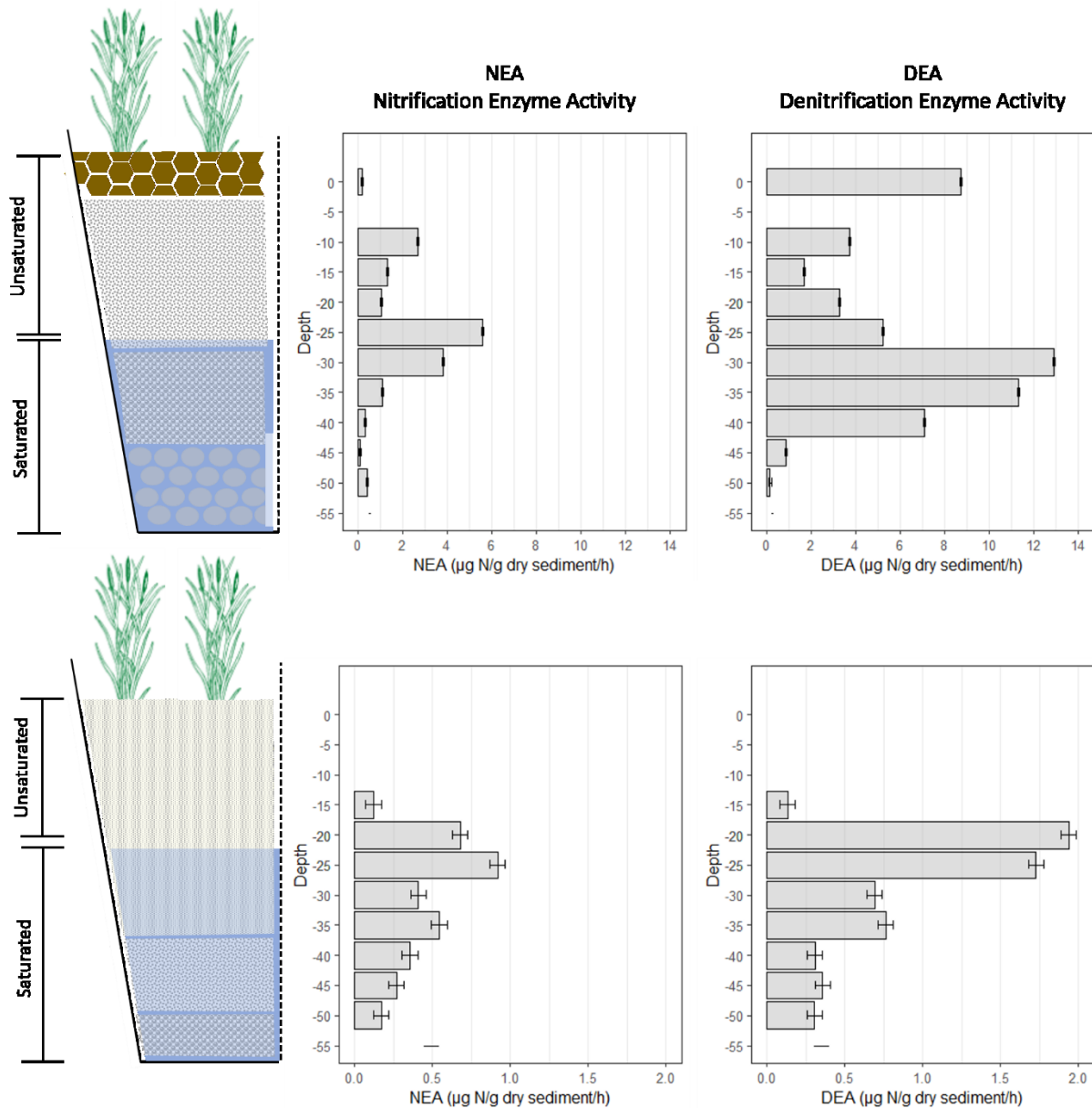


FIGURE 3.4-3 : NITRIFICATION ENZYME ACTIVITY (NEA) AND DENITRIFICATION ENZYME ACTIVITY (DEA) IN THE FIRST (ABOVE) AND SECOND (BELOW). DISPLAYED ERRORS BARS ARE ANALYTICS ERRORS.

### 3.4.3.3 EFFECTS OF STEP-FEEDING CONDITIONS ON THE SYSTEM

#### EFFECTS OF STEP-FEEDING CONDITIONS ON THE SYSTEM PERFORMANCE

The pilot-scale system operated under conventional conditions achieved high performance in TSS and COD removals but was much less efficient in TN removal as shown above (Figure 3.4-2). Due to their very high removal by the trickling filter and especially at the top of the first TW filter stage, organic substrates were poorly available in the second TW stage which thereby achieved relatively poor denitrification. The operating conditions were therefore

modified to divert part of the feed wastewater flow to the second stage and bypass the trickling filter and the first TW filter stage.

Figure 3.4-4 shows the input/output balance for  $\text{N-NH}_4^+$  and  $\text{N-NO}_3^-$  recorded during stable conditions of operation of the system under conventional conditions as compared to step-feeding conditions with bypasses of 10% or 20% of feed flow. Table 3.4-2 compares the average performance of the system or COD, N-NH<sub>4</sub> and TN removal under the different modes of operation tested. Each mode was tested over several weeks. The transitory periods of time between 2 modes of operation were not included in the determination of the average performance of the systems in the corresponding modes (Table 3.4-2) or in the input/output data of Figure 3.4-4.

TABLEAU 3.4-2 : AVERAGE INPUT / OUTPUT CODD, N-NH4 AND TN CONCENTRATIONS AND CORRESPONDING REMOVAL RATES RECORDED IN THE PILOT-SCALE SYSTEMS OPERATED UNDER CONVENTIONAL CONDITIONS AS COMPARED TO STEP-FEEDING CONDITIONS WITH BYPASS FLOWS OF 10 OR 20% OF THE FEED VOLUMETRIC FLOW.

Pollutants	Sampling point	Conventional	10%-SF	20%-SF
COD <sub>d</sub>	Input	203.2 ± 67.9	197.1 ± 31.1	192.6 ± 45.6
	Inlet 2 <sup>nd</sup> stage*	32.2 ± 13.4	41.2 ± 6.3	64.5 ± 7.9
	Outlet	19.2 ± 12.1	23.5 ± 7.4	26.4 ± 6.9
	<i>Global removal (%)</i>	<b>92.2 ± 7.3</b>	<b>87.9 ± 2.2</b>	<b>85.6 ± 4.3</b>
N <sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub>	Input	55.1 ± 12.5	51.8 ± 5.7	51.6 ± 11.3
	Inlet 2 <sup>nd</sup> stage*	12.3 ± 6.8	6.7 ± 2.9	15.2 ± 3.9
	Outlet	3.8 ± 2.5	1.4 ± 0.8	8.5 ± 4.5
	<i>Global removal (%)</i>	<b>92.8 ± 5.2</b>	<b>98.5 ± 1.7</b>	<b>83.7 ± 6.9</b>
Total Nitrogen	Input	73.9 ± 12.	68.9 ± 6.1	70.4 ± 12.5
	Inlet 2 <sup>nd</sup> stage*	33.1 ± 10	32.7 ± 2.5	37 ± 5.3
	Outlet	27.7 ± 8.5	26.3 ± 4.7	32.8 ± 2.5
	<i>Global removal (%)</i>	<b>61.6 ± 12.4</b>	<b>60.9 ± 9.5</b>	<b>52.1 ± 9.6</b>
COD <sub>d</sub> /TN	Inlet 2 <sup>nd</sup> stage*	0.97	1.26	1.74

\*Inlet 2<sup>nd</sup> stage concentrations are measured after the raw wastewater by-passing for 10% and 20% step-feeding operating mode

In the case of the study and regardless of the proportion of effluent diverted, the use of step-feeding did not show as significant a positive impact as in the literature (Al-Wahaibi et al., 2021, Nivala et al., 2019; Wang et al., 2022). The removal rates were not significantly improved

of even degraded under step-feeding conditions except that of  $\text{N-NH}_4^+$  which was improved with a bypass flow of 10%, but significantly lowered at 20%.

The probable reason for the relatively low effect of step-feeding on performance improvement of nitrogen removal observed was that the tested conditions did not improve the COD/N ratio which remained between 0.97 and 1.74 as shown in Table 2. Our study is therefore in contrast to the encouraging results of the literature (Nivala et al., 2019, Al-Wahaibi et al., 2021, Wang et al., 2022) on step-feeding and underlines the importance of the quality of the input effluent, whose C/N should be as high as possible.

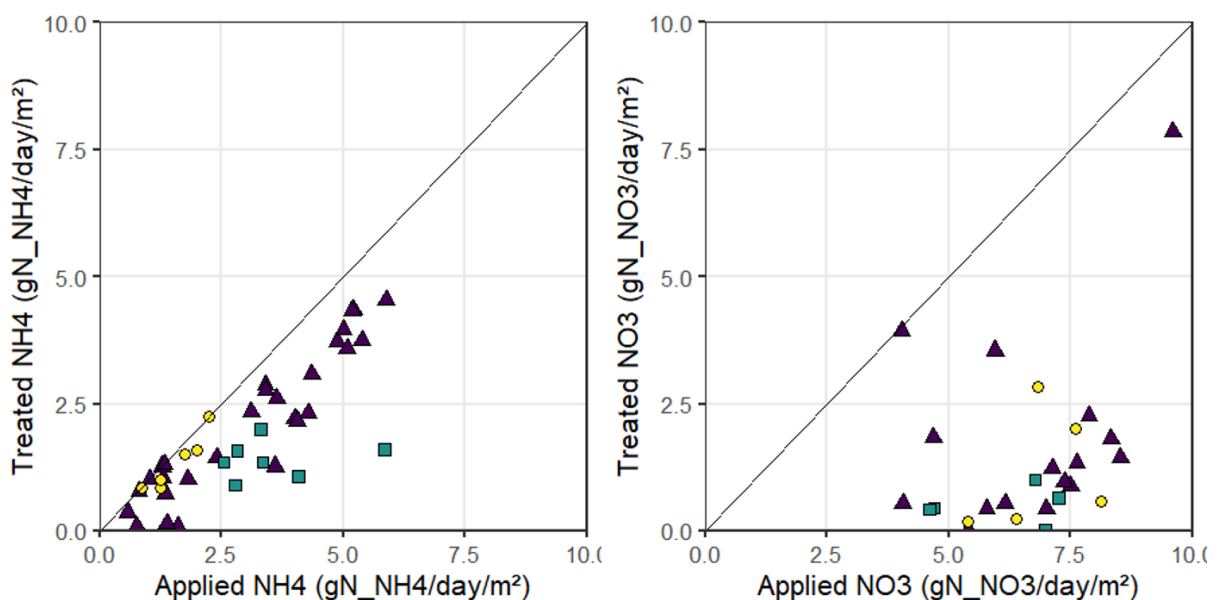


FIGURE 3.4-4: TREATED AND APPLIED  $\text{NH}_4^+$  AND  $\text{NO}_3^-$  LOAD ON THE SECOND STAGE OF FILTRATION IN CONVENTIONAL OPERATING MODE (BLUE TRIANGLES) AND WITH 10% (YELLOW DOTS) OR 20% STEP-FEEDING RATIOS (GREEN SQUARES).

#### EFFECTS OF STEP-FEEDING ON THE DEPTH PROFILES OF NITRIFICATION / DENITRIFICATION ACTIVITIES

However, with regard to the impact on microbiology, these modifications induced strong changes in the DEA recorded in the second stage medium. Figure 3.4-5 shows that with a bypass flow of 20%, the DEA were strongly decreased in the upper, unsaturated zone, and in contrast strongly increased in the lower, saturated zone as compared to the depth profile recorded under conventional conditions. As discussed above, under conventional conditions the most favourable condition for denitriers development are shallower in order to access to

more substrates percolating from the surface. The highest DEA was observed in the lowest part of the unsaturated zone. This zone, relatively more oxic than the saturated zone as oxygen from the atmosphere can diffuse, may suit to facultative aerobic denitrifiers. Under the step-feeding conditions, the flow of raw wastewater bypassed to the top surface of the second stage provided ammonia and organic substrates which percolated through the upper unsaturated oxic zone. Ammonia was oxidized into nitrates and the nitrates reached the saturated zone. The denitrifiers therefore developed preferentially in the saturated zone, slightly below the interface where favourable redox conditions and substrates availability were combined. Then, the denitrification potential decreased with depth because of the lower substrates availability and the coarser grain size of the stage medium. The depth profile was therefore globally shifted down towards the bottom of the stage when step-feedings conditions were operated.

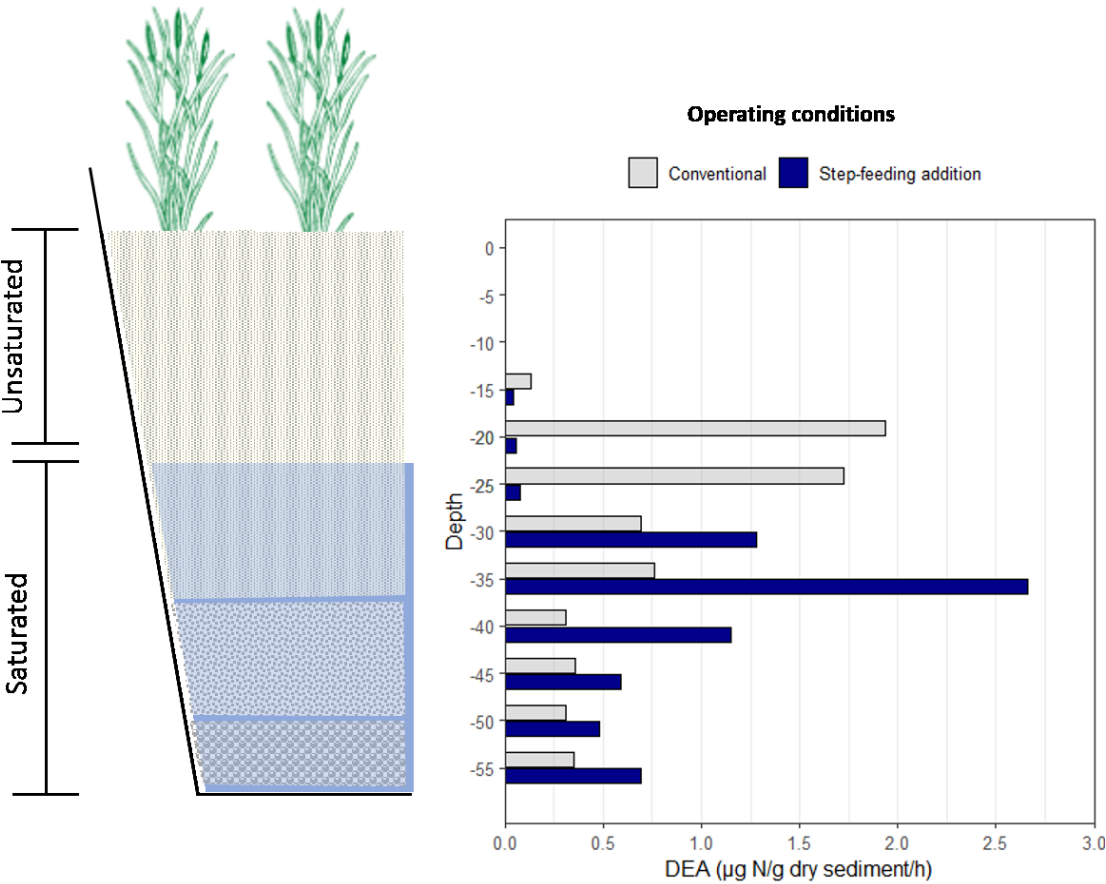


FIGURE 3.4-5 : DEPTH PROFILES OF DENITRIFICATION POTENTIALS IN THE SECOND TW FILTER STAGE UNDER CONVENTIONAL VS STEP-FEEDING CONDITIONS WITH 20% BYPASS FLOW

#### 3.4.3.4 POTENTIAL N<sub>2</sub>O EMISSION RELATION WITH NITROGEN REMOVAL

Depending on the environmental conditions, denitrification may convert nitrogen to N<sub>2</sub> or to N<sub>2</sub>O. Both forms are gaseous but N<sub>2</sub>O is at a higher state of oxidation than N<sub>2</sub> and its emission into the atmosphere generates greenhouse effects due to its high global warming potential of 310 as compared to CO<sub>2</sub> (IPCC, 2001). The protocol used to measure DEA allows to estimate the respective fractions of N-NO<sub>3</sub> that may be reduced into N<sub>2</sub> or N<sub>2</sub>O. Figure 3.4-6 shows the depth profiles of the DEA and indicates the possible proportions of N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> emissions according to the experimental measurements of the activity. The profiles represented were recorded in the first TW filter stage under conventional conditions of operation and in the second filter stage under conventional and step-feeding conditions with 20% bypass flow.

Results showed that N<sub>2</sub> was the final metabolite produced almost exclusively in most cases. The DEA profile recorded in the first stage showed N<sub>2</sub> as the quasi exclusive final product in most samples, but significant N<sub>2</sub>O emission potentials were measured however at the top of the unsaturated zone and at the very bottom of the saturated zone. N<sub>2</sub>O emission potentials measured close to the surface were attributed to the oxic conditions prevailing there. Previous works have reported that an increase in dissolved oxygen was positively correlated with the increase of N<sub>2</sub>O/N<sub>2</sub> ratio (Huang, et al., 2011), notably because O<sub>2</sub> was reported to strongly inhibit the Nos enzyme catalysing the reduction of N<sub>2</sub>O to N<sub>2</sub> (Bonin et al., 1989). Some authors have suggested that low concentrations of organic substrates was one of the parameters favouring N<sub>2</sub>O emissions (Itokawa et al., 2001; Huang et al., 2013).

The profile recorded in the second filter stage under conventional conditions revealed low DEA with extremely low proportions of N<sub>2</sub>O at any depth. The step-feeding conditions slightly increased N<sub>2</sub>O proportions in the unsaturated zone, with a particularly strong effect close below the top of the saturated zone where N<sub>2</sub>O accounted for more than 30% of the denitrification potential. As discussed above at section 3.4, the depth profile of DEA was globally shifted down towards the bottom of the stage when step-feedings conditions were operated. The availability of O<sub>2</sub> was therefore reduced, which may explain the increased occurrence of N<sub>2</sub>O emission potentials induced by the step-feeding conditions. (Huang, et al., 2011).

DEA should not be considered as predictive evaluations of N<sub>2</sub> or N<sub>2</sub>O emissions. These measurements revealed however that the microflora associated to the stage medium have locally the capacity to carry out the corresponding activity. Depending on the operating conditions of the system, the locations where the most favourable conditions are gathered for the measured potentials are modified. The results of this study suggested that carbon availability was not the predominant factor to favour N<sub>2</sub>O instead of N<sub>2</sub> emission potentials. The strong differences of aeration between the different zones of the dynamic pilot-scale system used here may explain why the effect of O<sub>2</sub> availability was found predominant in our study.

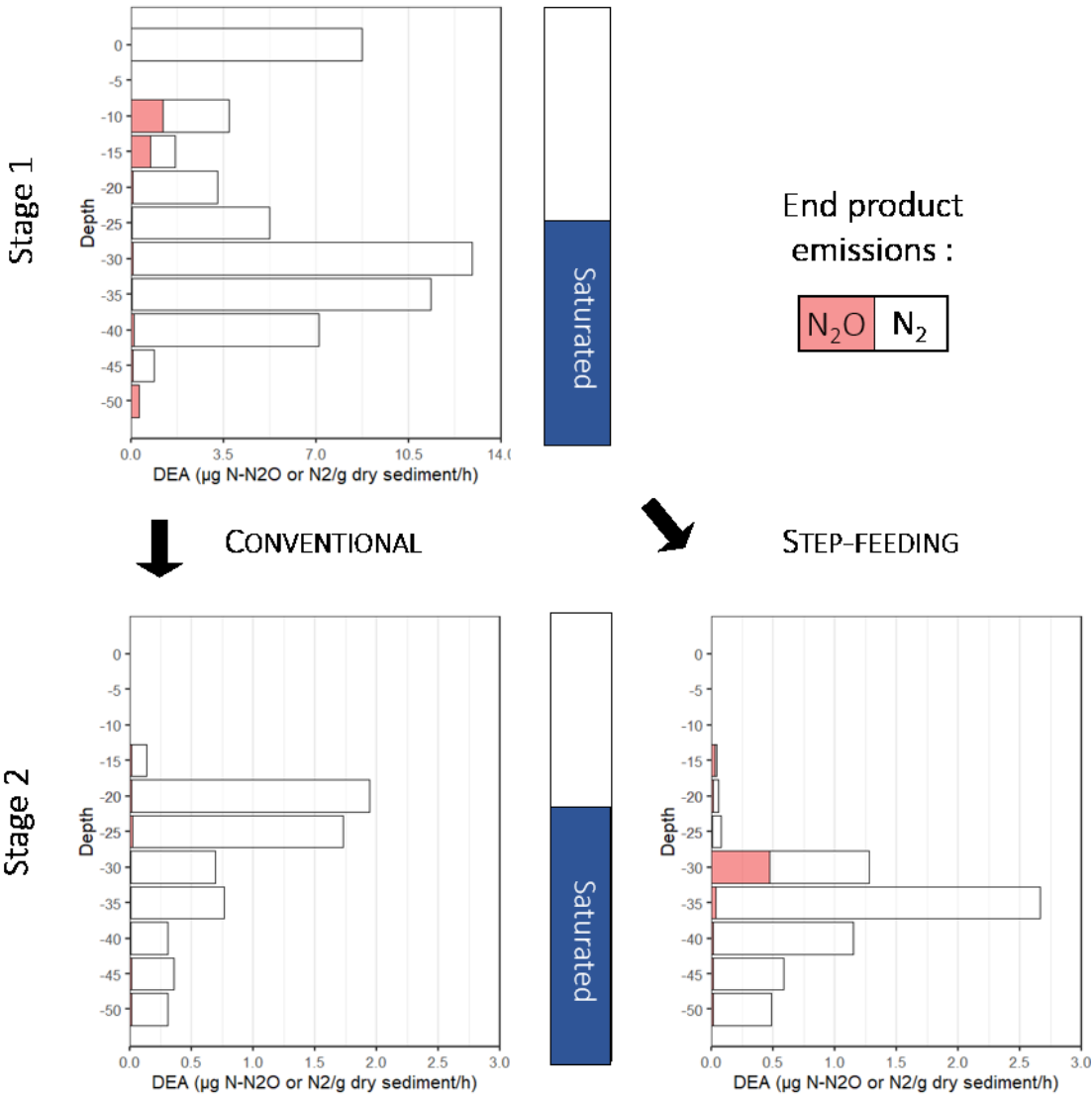


FIGURE 3.4-6 : DEPTH PROFILES OF MICROBIAL DENITRIFICATION POTENTIALS EXPRESSED IN μg N-N<sub>2</sub> OR N-N<sub>2</sub>O PER G OF STAGE MEDIUM AS RECORDED IN THE FIRST STAGE FILTER AND THE SECOND STAGE FILTER UNDER CONVENTIONAL OR STEP-FEEDING CONDITIONS WITH 20% BYPASS FLOW.

### 3.4.3.5 QUANTITATIVE ESTIMATION OF N<sub>2</sub>O POTENTIAL FLUXES FROM THE MEASURED DENITRIFICATION POTENTIALS

The objective of this section was to estimate the maximum fluxes of nitrogen possibly emitted into the atmosphere during the treatment of domestic wastewaters in the use pilot-scale VFTW system. Analytical results gathered from the monitoring of the system were used in that purpose. More specifically, an estimation of N<sub>2</sub>O potential fluxes was performed due to the strong environmental issues associated to this issue.

The balance of TN concentrations (mg/L) between the input and output of each filter provided an estimation of the masses of nitrogen (mg) released from the system in the form of gaseous species per unit volume of wastewater treated in each filter. Considering the daily hydraulic flows (m<sup>3</sup> per day), the daily masses of nitrogen removed (g/day) were calculated. Using the data shown in Figure 3.4-2, it was calculated that under conventional conditions of operations, the first and second TW filter stages removed 15 and 4 g N/day, respectively. The depth profiles of denitrification potentials measured in the first and second stages were then used to estimate the possible respective contributions of each depth layer of the filters to the calculated fluxes of nitrogen reduced from nitrates. Then, considering the proportion of N<sub>2</sub>O measured in the denitrification potential of each depth layer (Figure 3.4-6), the potential fluxes of N<sub>2</sub>O were calculated (in g N<sub>2</sub>O per day) as the sum of the emissions from each depth layer. The calculated fluxes were finally divided by the top surface area of the filters to express surface fluxes in mgN-N<sub>2</sub>O.m<sup>-2</sup>.day<sup>-1</sup>. These calculations allowed to estimate the potential emissions of N<sub>2</sub>O from the first TW filter stage at 320 mgN-N<sub>2</sub>O.m<sup>-2</sup>.day<sup>-1</sup>. The emission of N<sub>2</sub>O thereby estimated for the first filter accounted for about 4% of the overall flow of nitrogen emitted by the filter as calculated in the same manner. The major part (close to 85%) of N<sub>2</sub>O was emitted from the depth of 10 to 15 cm.

The potential emissions from the second filter were estimated at 50 mgN-N<sub>2</sub>O.m<sup>-2</sup>.day<sup>-1</sup> under conventional conditions and 231 mgN-N<sub>2</sub>O.m<sup>-2</sup>.day<sup>-1</sup> under step-feeding conditions at 20% bypass flow (most of the production originating from the 30 cm depth layer). Step-feeding conditions were therefore shown to potentially increase significantly N<sub>2</sub>O emissions. The potential N<sub>2</sub>O emission from the two filters together was 370 mgN-N<sub>2</sub>O.m<sup>-2</sup>.day<sup>-1</sup> under conventional conditions, corresponding to an average hourly flow of 15.4 mgN-N<sub>2</sub>O.m<sup>-2</sup>.hour<sup>-1</sup>.



These estimations were above the fluxes measured in full-scale TW units, reported in the range between 0.1 and 110 mgN-N<sub>2</sub>O.m<sup>-2</sup>.day<sup>-1</sup> (Mander et al., 2003; Søvik and Kløve 2007; Maucieri et al., 2017). However, considering the hypotheses made in our estimations and the uncertainties of the experimental on-site measurements, the data obtained may be considered in the same order of magnitude. Filali et al., 2017 reported peak emissions up to 17 mgN-N<sub>2</sub>O.m<sup>-2</sup>.hour<sup>-1</sup> which were recorded periodically but only for very short periods of time. This estimation allows us to highlight i) the dichotomy in terms of the contribution of the two different filtration stages ii) the greater contribution to N<sub>2</sub>O emissions of the upper layers where a form of aerobics remains iii) the risk of contributing to increase these emissions by a poorly dosed carbon input

#### 3.4.4 CONCLUSION

In this study the nitrogen treatment performance of a VFTW system combined with a trickling filter was discussed in relation to the step-feeding strategy without any significant improvement being observed, in contrast to the literature. The mapping of the nitrification and denitrification enzyme activity shows a high activity of the micro-organism's communities on the horizons near the interface of the saturation zone. N<sub>2</sub>O emissions are relatively low compared to N<sub>2</sub> but show that the upper horizons with slight oxygenation contribute a large part. The addition of carbon increases the potential for N<sub>2</sub>O.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the INRAE for providing access to the Feysine facilities and technical assistance. This work was realized within the Graduate School H2O'Lyon (ANR-17-EURE-0018) and the Université de Lyon (UdL), as part of the programme "Investissements d'Avenir " of the French national agency for research (Agence Nationale de la Recherche, ANR). The authors would like to thank the SCIRPE Company and CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la REcherche) for funding this research project.

#### CREDIT AUTHORS STATEMENT

**Kevin Maciejewski:** Conceptualization, Methodology, Data Curation, Writing – Original Draft.

**Mathieu Gautier:** Conceptualization, Methodology, Writing – Review & Editing, Supervision.

**Boram Kim:** Writing – Review & Editing. **Philippe Michel:** Writing – Review & Editing. **Pascal Molle:** Writing – Review & Editing, Supervision. **Jonathan Gervais :** Methodology, Data Curation, Writing – Review & Editing. **Amélie Cantarel;** Conceptualization, Writing – Review, Supervision **Agnès Richaume:** Conceptualization, Writing – Review, Supervision **Rémy Gourdon:** Conceptualization, Writing – Review & Editing, Supervision



---

### 3.5 DETERMINATION DU POTENTIEL DE MATERIAUX BIOSOURCES POUR COMPENSER LES CARENCES EN CARBONE ORGANIQUE DE LA DENITRIFICATION HETEROTROPHE



## APPORT DE CARBONE ORGANIQUE SOUS FORME DE BIODECHETS

K. Maciejewski<sup>a,b</sup>, M. Gautier<sup>a</sup>, P. Michel<sup>b</sup>, R. Gourdon<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Univ Lyon, INSA Lyon, DEEP, EA7429, 69621 Villeurbanne, France

<sup>b</sup>SCIRPE, Society of Design and Production Engineering for Wastewater Purification, 5 Allée Alban Vistel, 69110 Sainte Foy Lès Lyon, France

### 3.5.1 INTRODUCTION

La dénitrification demeure une étape limitante du traitement des eaux usées dans les systèmes végétalisés en général. Bien que le procédé AZOE® présente des bons rendements d'abattement, la dénitrification n'est pas totale et les performances du second étage semblent pouvoir être améliorées. La carence en carbone organique indispensable aux populations microbiennes dénitrifiantes hétérotrophes semble être le principal facteur expliquant cette limitation. Ce phénomène a déjà été documenté dans la littérature scientifique aussi bien pour les systèmes intensifs qu'extensifs. Une des solutions semble être l'apport de carbone organique sous une forme soluble très disponible. Des alcools simples tels que le méthanol et l'éthanol (Grabínska-Ioniewska et al., 1985 ; Chirstensson et al., 1994), l'acétate (Hallin et al., 1995) ou le glycérol (Lu et al., 2011) se sont par exemple avérés être des solutions remédier à ce problème.

Bien qu'efficaces et relativement faciles à doser, les ajouts de solutions de substrats carbonés nécessitent un certain investissement à l'installation (pompe doseuse, cuve de stockage) et génèrent des coûts d'exploitation (maintenance, coût des réactifs). De plus la relative dangerosité de certains de ces réactifs (méthanol et éthanol par exemple) peut poser des problèmes quant à leur stockage sur le site. Ainsi pour éviter ces contraintes, la faisabilité d'utiliser des matériaux biosourcés d'origine végétale a été étudiée. En outre, afin de coupler cette démarche à une approche de valorisation de déchets dans un contexte global d'économie circulaire, ces matériaux ont été recherchés sous forme de résidus agricoles ou agro-alimentaires.

## 3.5.2 CONTEXTE SCIENTIFIQUE

### 3.5.2.1 UTILISATION DE LITIÈRE DE MACROPHYTES

L'utilisation de matériaux biosourcés a déjà été testée sur des systèmes de traitements végétalisés de configurations diverses. Cette partie présente une synthèse des études publiées jugées les plus pertinentes. Les références bibliographiques utilisées ainsi que les principaux résultats sont présentées dans le tableau 3.5-1. La plupart des études menées ont été réalisées à l'échelle laboratoire ou pilote. Tout d'abord l'utilisation de macrophytes comme source diffuse de carbone a déjà fait l'objet de plusieurs études et on peut distinguer plusieurs modes de préparation. Les macrophytes ont par exemple été utilisés en application directe sur le filtre après un simple broyage (Van Oostrom and Russel., 1994 ; Wen et al., 2010), ou après un prétraitement à la soude visant à améliorer l'accessibilité de la cellulose par hydrolyse de la lignine (Wen et al., 2010), ou encore après fermentation anoxique (Fu et al., 2016 ; Zhang et al., 2016).

Dans une étude plus ancienne, Van Oostrom and Russel (1994) ont créé un tapis de broyat de feuilles de *Glyceria maxima* sur un filtre planté à écoulement libre de surface recevant des effluents chargés en nitrates. Les auteurs ont mis en évidence que la litière de feuille est la zone du filtre à la plus haute contribution de dénitrification par rapport à une zone sans litière due à l'importante surface de contact entre l'effluent et une source de carbone. Des travaux de Wen et al. (2010) ont montré que la litière de broyat *Typha latifolia* sur un filtre planté de roseaux à écoulement horizontal a augmenté les performances de réduction des nitrates de 37% par rapport à un filtre témoin sans complément de carbone. Ces mêmes auteurs ont comparé la litière avec et sans prétraitement par une macération à la soude. Ils rapportent que le prétraitement augmente considérablement le rapport carbone/azote de la litière et la rend plus efficace pour la dénitrification dans la phase initiale de l'expérience (10 premiers jours) tandis que les performances de dénitrification de la litière sans prétraitement sont meilleures dans la phase finale de l'expérience. L'utilisation d'un broyat solubilisé de *Typha Latifolia* après fermentation anoxique s'est avérée positivement corrélée à de meilleures performances d'épuration de l'azote total (Zhang et al., 2016). Les mesures de la concentration en nitrates en plusieurs points sur le transect longitudinal du filtre planté à écoulement horizontal ont montré que la majeure partie de la dénitrification a lieu à proximité du point d'injection de la source de carbone. De plus, ces auteurs ont clairement mis en évidence une

corrélation positive entre le pourcentage de dénitrification et le dosage en substrat carboné ajouté.

### 3.5.2.2 UTILISATION DE MATERIAUX EXOGENES AUX ZONES HUMIDES

Outre l'apport de carbone via des broyats de macrophytes, d'autres ajouts de matériaux ont été étudiés avec des performances variables. Sur un système à écoulement vertical, Shen et al., (2015) ont étudié l'utilisation de la féculé de maïs en incorporation dans les matériaux de filtration et observent les plus hauts rendements de dénitrification. Si et al., (2018) ont évalué le potentiel de plusieurs matériaux différents en mélange avec le garnissage de filtres plantés de roseaux à écoulement vertical partiellement saturés. Les matériaux utilisés sont des broyats de pailles de blé, de coton, de granules de butylène de succinates et de journaux en papiers. Parmi tous ces matériaux, la valorisation de journaux et de foin améliore significativement les performances de dénitrification (respectivement 67% et 49%) par rapport au contrôle à 15%.



Tableau 3.5-1 : Synthèse de travaux utilisant des matériaux biosourcés dans le but de promouvoir la dénitrification sur des filières végétalisées

Système étudié	Échelle	Matériaux utilisés	Références
CW à écoulement de surface	Laboratoire	Litière de <i>Glyceria maxima</i>	Van Oostrom and Russel, 1994
CW à écoulement horizontal	Laboratoire	Typha latifolia (roseaux) broyée avec ou sans prétraitement au NaOH	Wen et al., 2010
CW à écoulement vertical	Pilote	Typha latifolia broyé et fermenté	Zhang et al., 2016
CW à écoulement vertical	Pilote	<i>Aronia donax</i> et <i>Ponderia cordata</i>	Fu et al., 2017
CW à écoulement vertical	Laboratoire	Mélange de fécules de maïs et polycaprolactone incorporé au garnissage	Shen et al., 2015
CW à écoulement vertical	Laboratoire	Pailles de blés (foin) Coton Granules de butylène succinates Broyat de journaux	Si et al., 2018
CW à écoulement de surface	Pilote	Copeaux de bois (Woodchip)	Yuan et al., 2020

L'ajout de copeaux de bois dans les zones d'anoxie de systèmes végétalisés a aussi montré son efficacité dans le traitement de l'azote total (de 61 sans ajout à 74% avec ajout) par sa libération de carbone organique mais aussi en créant des conditions d'anoxie propices au processus (Yuan et al., 2020). Les propriétés de libération de carbone organique dans le temps des copeaux de bois sont aussi étudiées pour la mise en place de bioréacteur de dénitrification (Lopez-Ponnada et al., 2017, Brun et al., 2021).

### 3.5.3 MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 3.5.3.1 SELECTION DES MATÉRIAUX

Le choix des matériaux a été motivé par la possibilité de les utiliser sur diverses stations de filtres plantés de roseaux à écoulement vertical dont la localisation peut varier, notamment sur le territoire français. Dans l'idéal il s'agit d'identifier plusieurs matériaux utilisables moyennant un éventuel prétraitement simple de type broyage. Tester une large variété de matériaux se distinguant par leur composition biochimique est une démarche scientifique pour analyser les facteurs d'influence.

Le choix des matériaux a donc été réalisé sur la base de ces conditions (intérêt scientifique et faisabilité sur site) et la liste des 7 matériaux sélectionnés est présentée dans le tableau 3.5-2.

Tableau 3.5-2 : Description des matériaux sélectionnés pour l'étude de faisabilité de leur utilisation en tant qu'apport de carbone externe pour stimuler la dénitrification.

Matériaux	Code	Description
<i>Disponible sur le site de traitement des eaux usées</i>		
Roseaux d'été	A	Parties supérieures des roseaux verts d'été présents en abondance sur le filtre – <i>Phragmites Australis</i>
Roseaux d'hiver	B	Parties supérieures des roseaux d'hiver collectés lors du faucardage - <i>Phragmites Australis</i>
Boues du premier étage	C	Les boues contiennent du carbone et le libère progressivement dans le temps. Elles pourraient donc être redistribuées sur le second étage en petit volume.
<i>Hors du site de traitement des eaux usées</i>		
Rafles de maïs	D	Il s'agit de la partie centrale de l'épi de maïs. Assez dense et peu ligneux.
Foin	E	Herbacée sec qui sert à l'alimentation des herbivores. Présent en grande quantité sur tout le territoire.
Paillis de chanvre	F	Tige de chanvre broyé utilisé dans le paillage notamment dans les activités paysagères.
Bois Raméal Fragmenté (BRF)	G	Broyat de jeunes rameaux de feuillus. Il s'agit du matériau le plus dense et le plus ligneux de la sélection. Déchets de tailles de haies.

### 3.5.3.2 PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

#### PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Parmi les 7 matériaux testés, 6 d'entre eux nécessitent d'être broyés pour les besoins pratiques de l'expérimentation et pour augmenter leur surface spécifique. Ces matériaux ont été passés au broyeur dont le seuil de coupure est de 3 cm afin d'obtenir des granulats grossiers (figure 3.5-1).



FIGURE 3.5-1 : PHOTOGRAPHIE DES MATERIAUX UTILISES (SAUF BOUES) APRES BROYAGE. DE GAUCHE A DROITE ET DE HAUT EN BAS : PAILLIS DE CHANVRE, RAFLES DE MAÏS, ROSEAUX FRAIS, PAILLES, ROSEAUX D'HIVER ET BRF.

#### PROTOCOLE DE LIXIVIATION

Afin d'étudier le potentiel de libération de substrats carbonés solubles par les matériaux sélectionnés, des essais de lixiviation ont été réalisés. :

Pour chaque essai, une masse humide de 20g de matériau et un volume de 100mL d'eau désionisée ont été introduits dans des flacons de 250mL en PEHD, correspondant ainsi à un rapport Liquide/Solide (L/S) de 5 au début des essais. Tous les essais ont été dupliqués. Le taux de remplissage des flacons dépend de la masse volumique des matériaux, qui est très différente notamment entre la boue et les pailles. La masse de 20g a été retenue quel que soit le matériau

car le volume correspondant n'excède alors pas la moitié du volume du flacon. De cette manière l'immersion des matériaux est toujours complète. Les flacons sont placés sur un agitateur orbital.

A intervalles de 24h sur une durée totale de 14 jours, la fraction liquide de chaque flacon est collectée pour analyse et renouvelée par un même volume d'eau. Le rapport L/S cumulé augmente donc de 5 en début d'essai à une valeur de 35 à 50 en fin d'essai selon le matériau. Les flacons sont pesés avant et après chaque étape. Une fois l'eau renouvelée, les flacons sont replacés sur l'agitateur pour un nouveau cycle. Le volume d'eau extrait chaque jour diffère légèrement pour chaque matériau selon sa capacité de rétention en eau (Tableau 3.5-3). Le volume d'eau de renouvellement est identique au volume extrait pour conserver le même rapport liquide/solide dans les flacons tout au long de l'expérience.

Tableau 3.5-3 : Volume d'eau moyen extrait à chaque prélèvement pour tous les matériaux testés, et écart-type associés. Les matériaux sont classés selon leur capacité de rétention en eau

Matériaux	Volume d'eau moyen extrait quotidiennement (ml)	Masse volumique (kg/m <sup>3</sup> )
Paillis de chanvre	34 (± 19)	100
Foin	42 (± 5)	70
Roseaux d'hiver	43 (± 4)	80
Rafles de maïs	62 (± 4)	380
Roseaux d'été verts	64 (± 19)	110
Bois Raméales Fragmentés	65 (± 6)	200
Boues du premier étage*	68 (± 22)	1200

\* L'extraction se faisait après décantation et seul le surnageant était extrait.

Analyse des solutions aqueuses collectées (lixiviats) :

Les solutions extraites sont filtrées à 0,45  $\mu\text{m}$  par un système de type Buchner avec pompe à vide et transférées dans des flacons de 45 mL afin d'analyser les concentrations en carbone organique total et en azote Kjeldahl à chaque prélèvement.

### 3.5.4 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

#### 3.5.4.1 LIXIVIATION DU CARBONE ET DE L'AZOTE

La figure 3.5-2 représente l'évolution de la masse cumulée de COT solubilisé en fonction du L/S cumulé pour les 7 matériaux biosourcés. L'allure générale des courbes est similaire pour tous les matériaux, à savoir une augmentation rapide sur les 3 premiers jours, puis un ralentissement de l'évolution tendant vers une asymptote horizontale. La masse cumulée de COT solubilisée lors des premiers renouvellements de l'eau est très forte, puis l'augmentation devient progressivement plus lente jusqu'à tendre vers une extraction quasiment nulle. Parmi tous les matériaux testés, les pailles de blé, rafles de maïs et roseaux verts d'été permettent de récupérer des quantités de carbone organique les plus importantes avec respectivement 67,3 ; 35,7 et 31,2 mgCOT/gMatériau. De surcroît, il est intéressant de noter que l'allure générale de la courbe de lixiviation des pailles de blé diffère légèrement de celles des rafles de maïs et des roseaux verts. En effet, après les premières lixiviations des pailles la solubilisation du carbone ne parvient pas aussi rapidement à une asymptote que pour les autres matériaux. Ceci signifie que l'extraction du carbone organique est plus progressive dans les pailles de blés, ce qui constitue une caractéristique intéressante pour permettre un apport durable de carbone.

Le potentiel d'apport de carbone du bois raméal fragmenté (BRF), du paillis de chanvre et des roseaux hivernaux apparaît faible, tandis que les boues ne libèrent pas assez de carbone organique pour être intéressantes comme une utilisation spécifique comme ajout de carbone.

La libération d'azote Kjeldahl est représentée à la figure 3.5-3 pour tous les matériaux étudiés. La tendance globale des courbes est identique à celle du COT, à savoir une libération importante lors des premiers renouvellements d'eau puis une diminution progressive des quantités extraites. La masse cumulée d'azote reste bien inférieure à celle du COT. Les roseaux estivaux et hivernaux libèrent respectivement 6,9 et 3,8 mgNTK/g de matériau, ce qui est la plus valeur forte enregistrée parmi tous les matériaux testés. A l'inverse, les rafles de maïs libèrent les plus faibles quantités d'azote avec 0,8 mgNTK/g de matériau.

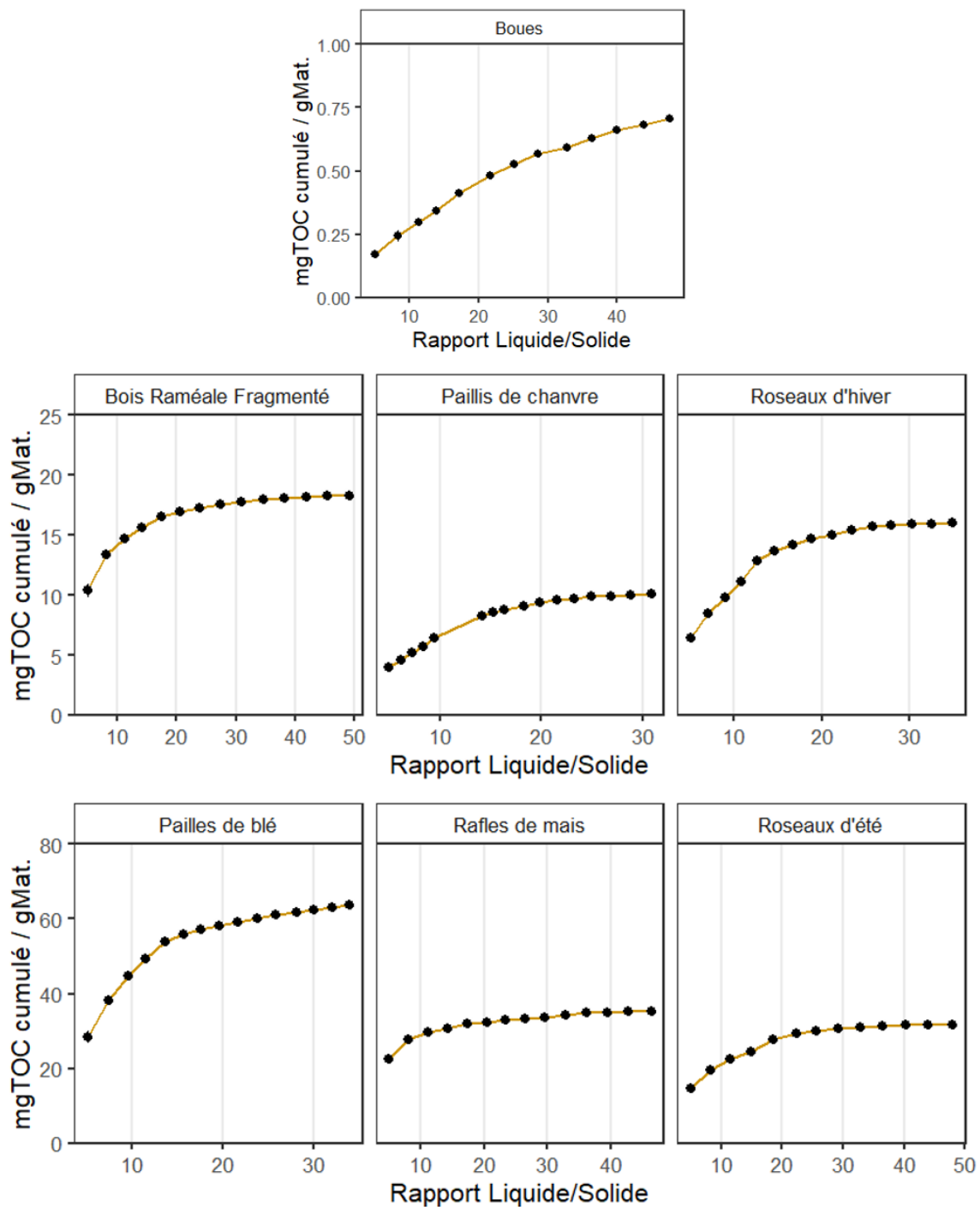


FIGURE 3.5-2 : MASSE DE CARBONE ORGANIQUE TOTAL CUMULEE ET NORMALISEE PAR GRAMME DE MATERIAU EN FONCTION DE L'EVOLUTION DU RAPPORT LIQUIDE/SOLIDE.



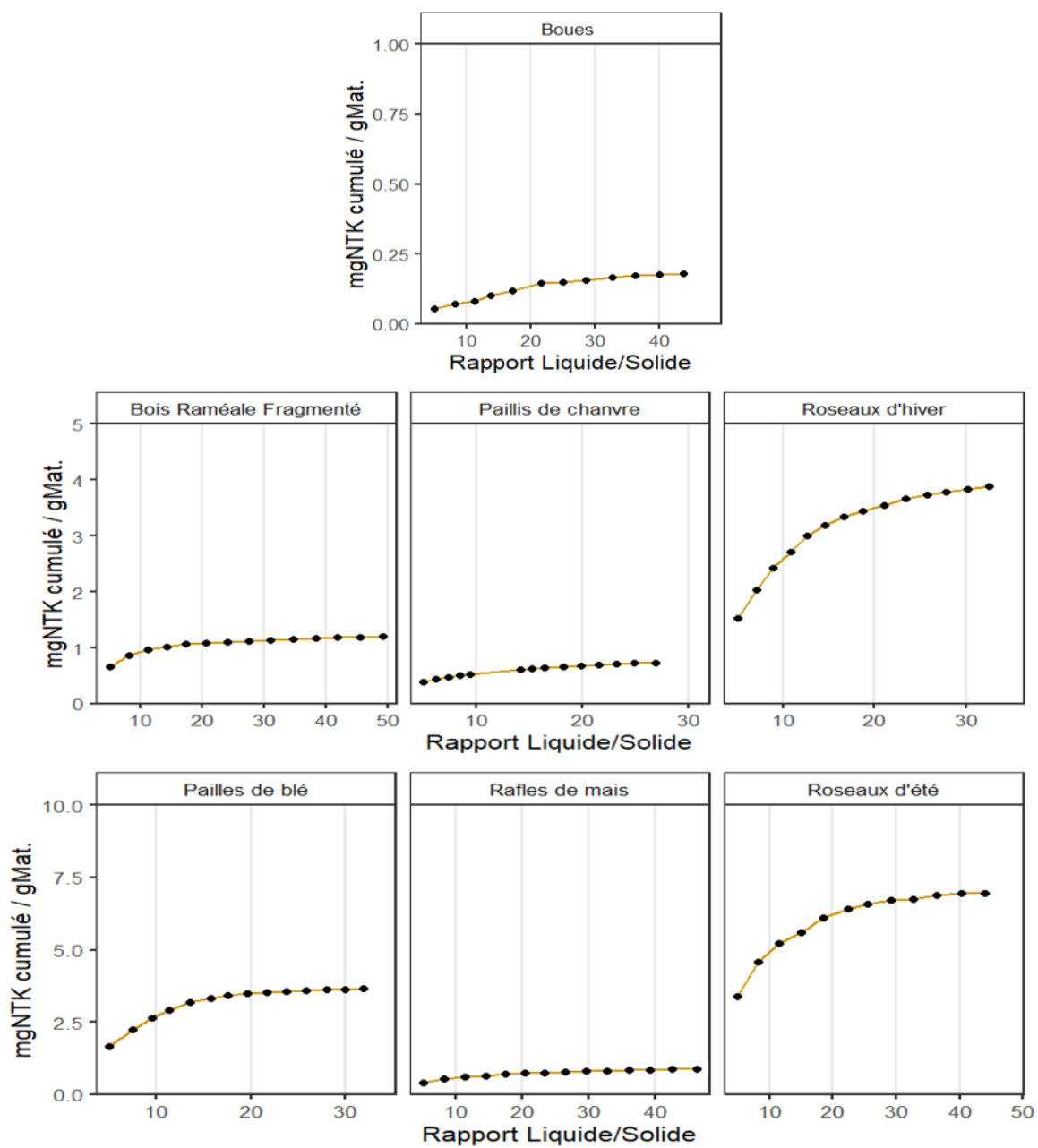


FIGURE 3.5-3 : MASSE DE D'AZOTE KJELDAHL CUMULEE ET NORMALISEE PAR GRAMME DE MATERIAU EN FONCTION DE L'EVOLUTION DU RAPPORT LIQUIDE/SOLIDE.

### 3.5.4.2 RAPPORT CARBONE / AZOTE

Les matériaux dont le rapport COT/NTK des composés lixiviés est faible sont à proscrire pour l'application recherchée puisqu'ils rapporteraient une part trop importante d'azote à oxyder en nitrates, puis à réduire sous forme d'azote gazeux. La figure 3.5-4 présente les rapports COT/NTK moyens calculés pour tous les matériaux à partir des masses cumulées de C et de N solubilisées sur la durée des essais.

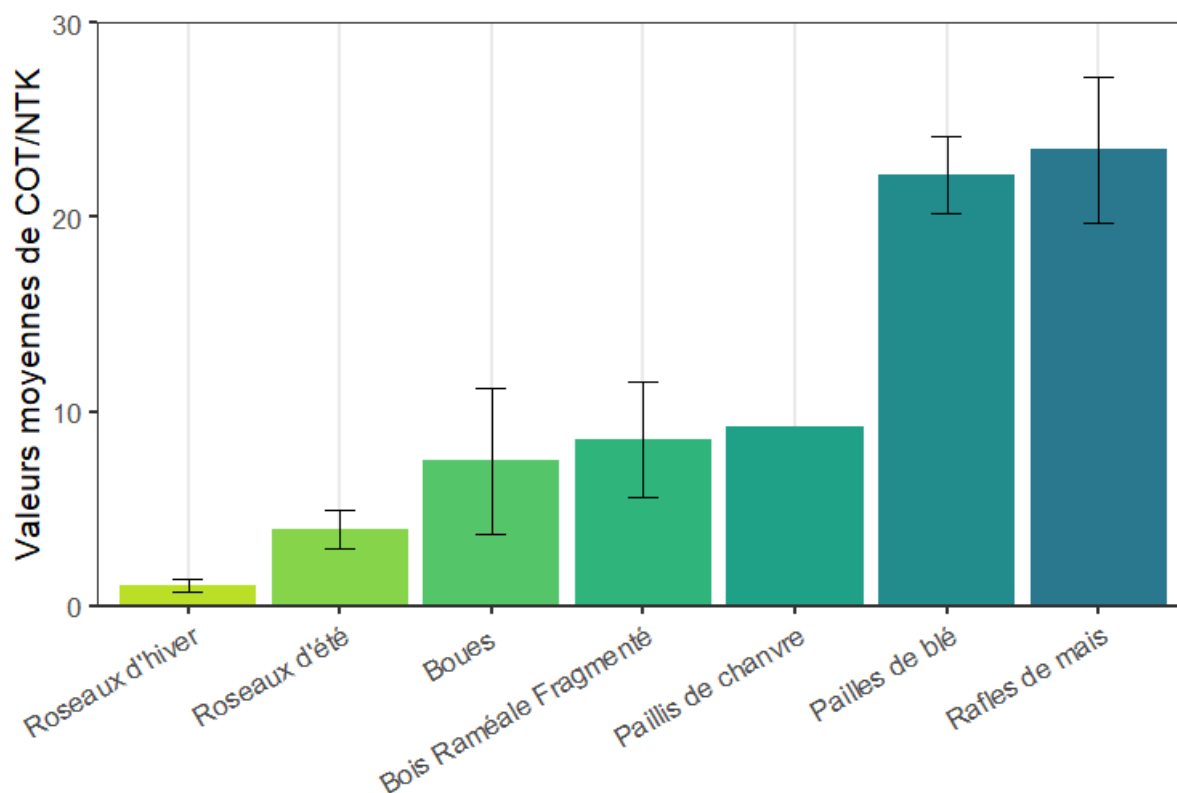


FIGURE 3.5-4 : RAPPORTS MOYENS DE COT/NTK DANS LES LIXIVIATS DU TEST DE LIXIVIATION POUR LES 7 MATERIAUX TESTES.

Les lixiviats des rafles de maïs et les pailles de blé ont un rapport COT/TKN bien supérieur aux autres matériaux, respectivement 23,4 et 22,1 tandis que les autres matériaux n'excèdent pas 10. Les roseaux d'hiver après faucardage ont le plus faible rapport COT/TKN et sont donc plutôt à éviter.

### 3.5.4.3 MISE EN APPLICATION EN VRAIE GRANDEUR SUR LA STATION DE TRANS-LA-FORET

Cette expérimentation a été motivée par la recherche d'une solution d'amélioration de la dénitrification sur la station d'épuration de type AZOE-NP en fonctionnement dans la commune de Trans-la-Forêt en Ille-et-Vilaine (35). Cette station de 600 EH reçoit des effluents chargés en azote avec des pics en azote total allant jusqu'à 120 mgN/L. La limite de 20 mg/L en azote total garantie dans les effluents traités n'est pas continuellement respectée et la majeure part de l'azote résiduel est sous la forme de nitrates. Le second étage de traitement de la filière a été identifié comme l'ouvrage dont les taux de dénitrification pourraient être améliorés par ajout de carbone.

Une sélection de matériaux a été établie sur la base des expérimentations précédentes. Les pailles de blé ont le potentiel de libération de carbone le plus important et ce matériau apparait comme un candidat solide. Les rafles de maïs peuvent permettre un apport de carbone significatif, sans apporter conjointement d'azote ou très peu et ont l'avantage d'une masse volumique importante. La masse volumique importante permet en effet de limiter le volume d'apport sur le filtre pour une masse égale.

#### Estimation des volumes de matériaux :

A Trans-la-Forêt le débit journalier moyen sur le second étage est de 20 m<sup>3</sup>/jour et l'objectif de réduction des nitrates sur le second étage de filtration est de 10 mgN-NO<sub>3</sub>-/l, soit 0,2 kgN-NO<sub>3</sub>-/jour. En considérant un rapport DCO : Azote à dénitrifier de 3,02 (Kadlec and Wallace, 2009), les besoins en DCO à apporter par jour via les matériaux biosourcés seraient de  $0,2 * 3,02 = 0,604$  kgDCO/jour, soit 0,274 gCOT/jour avec une hypothèse d'un ratio DCO/COT de 2,2 calculé sur des données terrain d'une station similaire.

Il est nécessaire de définir la manière d'extraire le COT des matériaux et de l'apporter sur le filtre pour estimer les volumes. La dégradation sur de longues périodes et le renouvellement des matériaux sur le filtre est un paramètre d'importance, bien que difficile à estimer en vraie grandeur à partir des résultats de cette expérience. Un suivi à long terme serait nécessaire afin de déterminer le temps conduisant à l'épuisement de C soluble des matériaux.

En termes de faisabilité, la méthode d'application directement à la surface du second étage est discutable pour plusieurs raisons :

- o Risque de réduction de la perméabilité hydraulique comme cela a été observé avec les parties aériennes de roseaux non broyées à Trans-la-forêt ;
- o Accumulation de la partie difficilement dégradable des matériaux en surface du filtre ;
- o Surcoût d'entretien pour l'exploitant lors de la répartition des matériaux sur le filtre, de leur éventuel curage difficile avec les plants de roseaux, et de leur renouvellement.

D'un point de vue pratique, l'ajout de solutions de fermentation de matériaux biosourcés (Zhang et al., 2016) semble être plus faisable sur le long terme. En revanche, cette méthode suggère la mise en place d'une cuve de fermentation/macération d'environ un mètre cube dans le cas des rafles de maïs et d'une pompe doseuse.

### 3.5.5 CONCLUSION

Ces travaux ont permis d'identifier que deux des sept matériaux (pailles de blés et rafles de maïs) pouvaient constituer une alternative comme apport de carbone à la dénitrification. Les matériaux au plus fort potentiel libèrent du carbone organique de manière régulière dans le temps et peu d'azote. La masse volumique des matériaux est un avantage certain pour la faisabilité de la méthode puisque les volumes à apporter sur le filtre s'avèrent moindres, à l'instar des rafles de maïs par rapport aux pailles de blé. La méthode d'application des matériaux directement sur le filtre ne semble cependant pas la solution la plus appropriée en raison des potentiels problèmes de gestion (risque de colmatage, extraction des matériaux, etc.). Un apport de solution aqueuse de macération des matériaux pourrait s'avérer une solution d'intérêt qui mériterait d'avantage d'investigations pour le développement, et moyennant aussi un investissement non négligeable des installations



## A RETENIR

Cette partie explore plusieurs méthodes d'ajout de carbone sur le second étage de traitement et en discute la faisabilité de chacune. Les principaux points à retenir sont les suivants :

Le potentiel d'optimisation de la dénitrification hétérotrophe par l'utilisation de matériaux biosourcés est très inégale entre eux. La rafle de maïs se distingue des autres matériaux par son apport constant de carbone organique, et son relatif faible volume nécessaire à appliquer sur le filtre, notamment par rapport au foin ;

Un état de l'art de la littérature souligne le potentiel d'optimisation du step-feeding d'un point de vue des performances d'abattement de l'azote total, mais aussi opérationnel ;

Les essais microbiologiques de potentiel de nitrification et de dénitrification mettent en évidence une forte activité dans la zone proche de l'interface de saturation dans des conditions d'opération normales. Les 10 premiers centimètres de la zone saturée concentrent les plus forts potentiels de dénitrification ;

Le step-feeding a pour conséquence de déplacer les plus forts potentiels de dénitrification vers des horizons plus profonds de la zone de saturation ;

Une part non-négligeable de la dénitrification demeure incomplète et résulte en la formation d'un produit final sous la forme de  $N_2O$  ;



## CHAPITRE 4 : CONCLUSION GENERALE

---





Les filtres plantés de roseaux ont connu ces 30 dernières années un essor important. En France, la variante la plus plébiscitée est composée de deux étages non saturés avec un écoulement hydraulique vertical. Ce système a pour avantage par rapport aux filtres à écoulement horizontal de maximiser la surface de filtration et de retenir la phase particulaire tout en limitant le risque de colmatage. Les conditions d'aération nécessaires à la minéralisation de la matière organique et à l'oxydation de l'azote ammoniacal sont par ailleurs satisfaites. De fait, ce système est particulièrement bien adapté pour les unités de traitement de moins de 2000 EH pour lesquelles les exigences réglementaires de performances ciblent la charge en DCO, DBO<sub>5</sub>, NTK et MES. Toutefois, la mise en place de mesures réglementaires localement plus strictes et la réalisation de stations de plus grande capacité ont motivé les entreprises du secteur de l'assainissement à investir dans la recherche -développement pour mieux prendre en compte le traitement de l'azote total et du phosphore, ainsi qu'à réduire l'emprise au sol des stations. Dès lors de nouveaux procédés ont vu le jour, généralement sur la base du modèle classique. C'est le cas de la gamme des procédés AZOE®.

Le traitement de l'azote total demeure une tâche complexe dès lors qu'il est question de parvenir à un contrôle précis sur la qualité de l'effluent traité. La raison principale à cela est que l'azote doit subir une succession de transformations biologiques réalisées dans des conditions environnementales déterminées, et très différentes selon les formes de l'azote. Ces travaux de thèse d'inscrivent dans ce contexte de meilleur contrôle de l'épuration de l'azote total avec des enjeux opérationnels de meilleure protection des milieux récepteurs mais aussi de développement de solutions de réutilisation des eaux usées. D'un point de vue opérationnel, ces travaux sont aussi motivés par des problèmes parfois rencontrés sur des stations existantes, et en particulier le cas de Trans-la-Forêt où l'engagement a été pris auprès de la commune de réduire la concentration de nitrates en sortie d'environ 5 à 10 mgN/L.

## 4.1 RÔLE DU LIT BACTÉRIEN

Les rôles du lit bactérien placé en tête de filière de traitement AZOE sont de :

- Contribuer au traitement aérobie de la matière organique en réduisant d'environ 50% la charge carbonée dissoute comme cela a été observé dans les essais pilotes et induire l'accumulation de matière plus humifiée en surface du 1<sup>er</sup> étage (Kania et al., 2019) ;

- Participer au démarrage de la nitrification si la charge carbonée entrante n'est pas trop élevée ou a été dégradée précédemment ;
- Contribuer de manière plus marginale au traitement du phosphore comme cela a précédemment été montré par Kim et al., (2014) en garantissant des conditions d'oxygénation suffisantes à la rétention du phosphore associé aux dépôts constituant la couche de boues de surface du premier étage ;

La circulation des eaux usées dans le lit bactérien en amont des filtres permet donc de favoriser le traitement sur les 2 étages de filtres plantés. Les résultats obtenus dans les travaux réalisés ici ont permis de confirmer que le traitement de l'azote total se fait en grande partie sur le premier étage de filtration et demeure très limité sur le second étage. De manière quantitative, plus de 80% de la charge ammoniacale entrante a été nitrifiée et 70% des nitrates créés ont été dénitrifiés avant le second étage. Les conditions opératoires des deux étages sont sensiblement identiques en termes de pH, de température et de potentiel d'oxydo-réduction des zones saturées. Cependant la dénitrification hétérotrophe est plus limitée dans la partie immergée du second étage de filtration en raison de la plus faible disponibilité du carbone organique, et plus précisément de ratio carbone : azote trop faible pour permettre une bonne dénitrification.

## 4.2 CARTOGRAPHIE EN PROFONDEUR DES ETAGES DE FILTRATION

L'échantillonnage par horizons de 5cm dans les deux étages de filtration a permis d'étudier l'évolution en profondeur des potentiels de nitrification et de dénitrification. Il en ressort notamment que dans chacun des étages de filtration les plus forts potentiels sont observés à l'interface entre la zone non-saturée et la zone saturée. Cette observation est d'autant plus marquée pour la dénitrification dont les plus forts potentiels se situent dans les premiers horizons de saturation et déclinent très fortement dans le fond de la zone d'immersion. Il apparaît que les meilleures conditions de dénitrification dans le système AZOE sont réunies dans la partie supérieure de la zone de saturation, très certainement en raison d'une plus grande disponibilité en carbone organique dans ces horizons. Le potentiel d'oxydo-réduction est favorable et la nature des matériaux permet une plus grande surface de croissance du biofilm (par rapport aux graviers grossiers drainant de fond de filtre).

Une station AZOE-N permet le traitement d'environ 70 à 75% de la charge d'azote total entrante. Toutefois, la variabilité des performances sur ce paramètre reste importante en comparaison des performances obtenues sur le traitement de la charge carbonée. La figure 4-1 présente de manière schématique la dégradation du carbone et les transformations de l'azote sur chaque élément du procédé AZOE, et en fonction des conditions d'oxygénation.

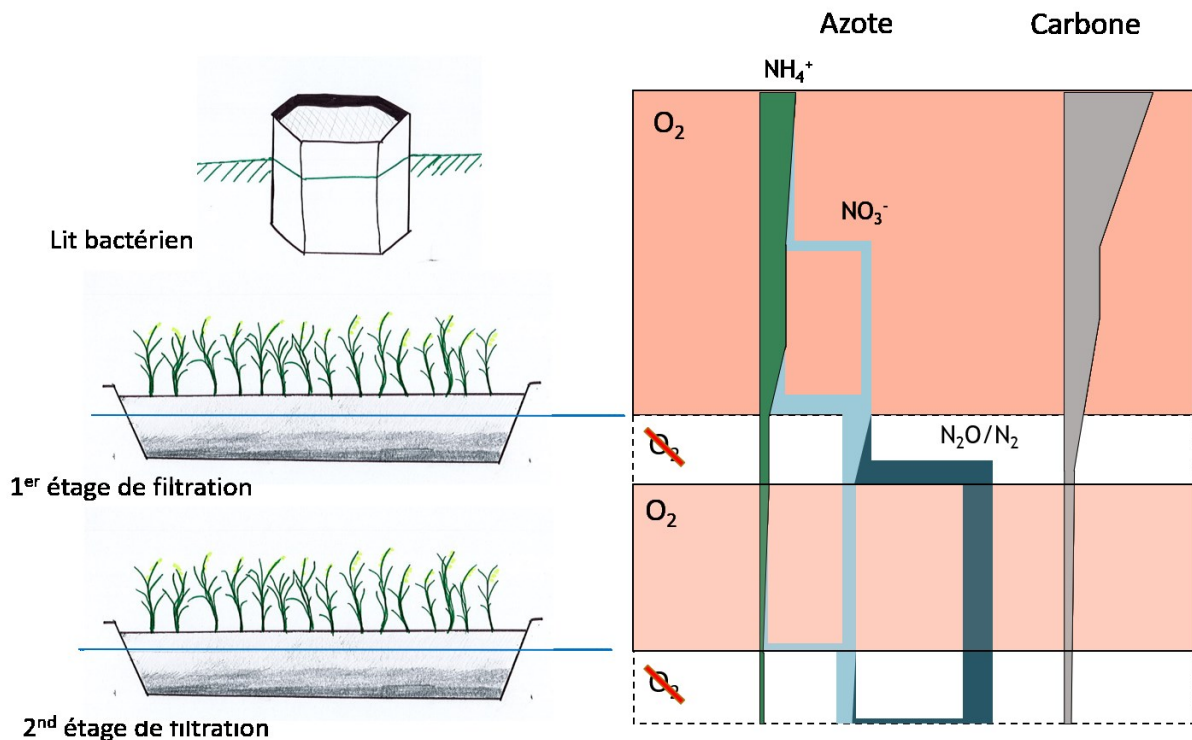


FIGURE 4.2-1 : SCHEMA CONCEPTUEL DES MECANISMES DE TRAITEMENT EN CARBONE, AZOTE ET PHOSPHORE EN FONCTION DE L'AVANCEE DU TRAITEMENT SUR LA FILIERE AZOE.

### 4.3 DYNAMIQUE DE L'AZOTE DANS LE SYSTEME AZOE-N®

Le suivi en ligne de l'azote sur les essais pilote apporte une vision plus fine de la dynamique du traitement sur le système AZOE. Après toute phase d'alimentation suivie d'une phase de repos, il a été observé un pic de nitrates dans les 12 heures après la remise en alimentation du premier étage. Ce pic est dû au lessivage des nitrates formés pendant la phase de repos par oxydation de l'ammonium préalablement accumulé pendant la phase d'alimentation. Ce pic très marqué sur le premier étage est observé de manière plus étalée en sortie du second étage avec un temps de retard proche du temps de rétention hydraulique moyen de la zone saturée.

Cette observation souligne l'effet important sur le traitement des alternances alimentation/repos propres aux systèmes verticaux.

Pour affiner l'étude le suivi de l'azote en termes de rétention, transformation et migration dans le système, un protocole de suivi isotopique a été développé spécifiquement. Une bâchée marquée à 4,6 % en  $^{15}\text{N}$ -ammonium a été suivie pendant toute la durée d'une période d'alimentation par analyses d'échantillons prélevés à intervalles de 2 heures entre chaque étage de traitement composant le procédé AZOE. Cette étude a permis de confirmer l'importante réactivité de l'ammonium avec le média filtrant. Ce traçage montre notamment que le transfert de l'azote le long de la filière de traitement suit globalement la dynamique hydraulique mais avec un retard temporel. A titre d'exemple, l'eau contenue dans le premier étage est totalement renouvelée après 30 heures tandis que de l'azote marqué est toujours détecté après 48 heures. L'ammonium marqué de la première bâchée est progressivement nitrifié et restitué vers le second étage.

#### 4.4 RELATION ENTRE CARBONE ET AZOTE

Les suivis de terrain et les essais pilotes ont démontré que les carences en carbone organique étaient le facteur limitant de la dénitrification hétérotrophes dans le second étage de filtration. Il s'agit plus généralement d'un problème récurrent pour les stations de traitement des eaux usées dès lors que le traitement de l'azote total est impliqué (Wu et al., 2014). Par ailleurs, il n'est pas étonnant de retrouver cette limite sur les systèmes AZOE-N dont le lit bactérien contribue à réduire la quantité de carbone organique sur les étages de filtrations. Une fois le traitement sur le lit bactérien effectué, l'effluent traverse la couche de dépôt de surface où la majeure partie de son carbone organique particulaire est retenue. Les conditions très oxydantes de la partie non-saturée du filtre entraînent la minéralisation de la matière organique puis la nitrification de l'azote ammoniacal. Le rapport carbone : Azote à dénitrifier évolue donc à la baisse tout au long de la filière. Quelle que soit l'échelle, réelle ou pilote, ce rapport n'est d'environ que de 1 en entrée du second étage de filtration, soit une valeur bien trop faible pour réaliser une dénitrification complète.

Le rapport  $SUVA_{254}$ , a également été suivi sur les échantillons d'eau prélevés en sortie de chaque étage de traitement. Ce rapport est proportionnel à l'aromaticité de la matière organique de l'échantillon (Weishaar et al., 2003, Banc et al., 2022). Les mesures montrent une augmentation régulière du rapport  $SUVA_{254}$  et donc du pourcentage d'aromaticité (eaux brutes = 1,7 soit 15% ; sortie lit bactérien= 3,5 soit 19% ; sortie 1<sup>er</sup> étage = 3,4 soit 25,6% ; eaux traitées = 5,7 soit 40,9 %) le long de la filière de traitement et indiquent une complexification de la matière organique, la rendant moins disponible (figure en annexes). Les composés organiques les plus simples et disponibles sont donc préférentiellement dégradés au détriment des plus aromatiques et complexes dont la part augmente logiquement à mesure que traitement s'effectue. Le problème de la carence organique à la dénitrification est en somme un problème de quantité mais aussi de qualité et donc de disponibilité de cette MO.

#### 4.5 SOLUTIONS D'OPTIMISATION

Deux solutions d'apport de carbone sur le second étage de filtration ont été testées. Dans un premier temps, le step-feeding a été étudié à l'échelle pilote. L'effet principal observé est la modification de l'activité enzymatique de dénitrification après utilisation du step-feeding. L'activité enzymatique de dénitrification a été significativement augmentée sur tous les horizons de 5cm étudiés dans la zone saturée du second étage. En revanche, d'un point de vue des performances de dénitrification, le step-feeding n'a pas eu d'impact significatif. Le rapport carbone : azote relativement faible des eaux brutes des effluents urbains utilisées pour les essais pilotes ait placé l'expérimentation dans des conditions limites. Son utilisation est conditionnée à la valeur du rapport carbone : azote dans les eaux brutes. Un rapport inférieur à 4 avec des effluents réels semble limiter les possibilités d'utilisation du step-feeding, en raison du le volume trop important à dériver vers le second étage et de la quantité d'azote apportée en conséquence.

Les boues de surface du premier étage font l'objet d'un intérêt croissant ces dernières années au regard de leur caractérisation de leur comportement dans le temps (Kania, 2018) et de leur propriété de complexation (Banc, 2021). Ces boues jouent notamment un rôle important de rétention de la matière particulaire, dont l'azote organique et ammoniacal. Le regard porté sur ces boues tend à changer et elles ne sont plus seulement considérées comme un déchet inévitable du traitement, mais comme une ressource valorisable. La valorisation des

boues a ici été considérée comme source éventuelle de carbone organique dans le but d'améliorer la dénitrification sur le second étage. Cependant les quantités relarguées semblent insuffisantes pour assurer un apport de carbone organique suffisant.

L'utilisation de matériaux bio-sourcés comme source de carbone a donc également été évaluée. Il a été montré que le choix du matériau est déterminant et que le potentiel d'apport de carbone entre eux est très variable. La valorisation des parties supérieures de roseaux en été ou après faucardage ne semble pas être une solution efficace. En revanche, certains matériaux comme les pailles de blé ou les rafles de maïs, présents en quantité sur tout le territoire, semble présenter un fort potentiel grâce à leur libération importante de carbone et une quantité limitée d'azote relarguée associée. La manière opérationnelle d'apporter les matériaux sur le filtre demeure la principale interrogation à l'issue de ces travaux. Les déposer à la surface du massif filtrant apparait comme une solution à bas coût de mise en œuvre mais difficile à exploiter par l'accumulation des matériaux et leur éventuel curage. La réalisation d'une macération de matériaux à fort potentiel comme les rafles de maïs est à explorer puisqu'elle ne présente aucun risque de colmatage et pourrait permettre un dosage plus fin du carbone apporté sur le filtre.

## 4.6 MODIFICATIONS OPERATIONNELLES

La mise en place d'une station AZOE aux performances optimisées est étroitement liée à la gestion du carbone et de l'azote, en quantité et en qualité, le long de la filière de traitement. Ces travaux ont permis d'explorer deux manières de compenser la carence en carbone sur le second étage : le step-feeding et l'apport de matériaux biosourcés. Le step-feeding est l'exemple même d'une modification qui pourrait être facilement prévue sur de futurs projets sans surcoût trop conséquent (Nivala et al., 2019). Outre la modification structurelle (canalisation, pompes, automates) que suggère le step-feeding, la station optimisée gagnerait à devenir plus intelligente en s'ajustant à la dynamique de l'azote mise en évidence par ces travaux. L'ajustement de l'ajout de carbone sur le second filtre pourrait être fonction des pics de nitrates observés à chaque changement d'alimentation des cellules.

## 4.7 MISE EN APPLICATION DES TRAVAUX DE THESE A TRANS-LA-FORET

A grande échelle ces solutions pourront être éventuellement testées sur la station de Trans-la-Forêt. Le step-feeding semble être la solution privilégiée tant par sa facilité de mise en place que par son coût d'exploitation très faible. Une pompe asservie à un compteur horaire entre le poste de relèvement entre le lit bactérien et le premier étage et le poste de relèvement entre le premier et le second étage (voir synoptique dans matériels et méthodes) devrait être installée. Le rapport carbone : azote de Trans-la-forêt en prenant en compte la DCOd varie entre 5 et 8, et semble donc favorable à l'utilisation de cette solution d'apport de carbone.

L'apport par matériaux biosourcés par différentes solutions est actuellement à l'étude, en prenant en compte l'investissement du matériel nécessaire et les coûts de renouvellement des matériaux.

## 4.8 MAITRISE DE L'EPURATION DE L'AZOTE DANS UN CONTEXTE GLOBAL

Les mesures de potentiel de nitrification et de dénitrification réalisées dans la profondeur du massif filtrant soulignent que le  $N_2$  n'est pas nécessairement la forme finale de l'azote réduit. Sous certaines conditions, du  $N_2O$  peut être libéré en proportion significative. Certaines modifications apportées à la filière de traitement, par exemple l'ajout de carbone pourraient modifier la forme sous laquelle l'azote gazeux pourrait être libéré après dénitrification. Les résultats obtenus dans cette thèse suggèrent donc une certaine prudence. Le  $N_2O$  a en effet un pouvoir de réchauffement global (PRG) très élevé (310). Son émission même marginale renvoie ainsi au contexte de réchauffement global. Les processus biologiques impliqués dans la réduction des nitrates au sein des filtres plantés sont complexes et la dénitrification hétérotrophe, bien que très contributrice à la dénitrification globale, n'est qu'un processus parmi d'autres possibles. Le lien entre les communautés de micro-organismes présentes dans le milieu, les facteurs environnementaux et la forme finale de l'azote reste encore largement à explorer.





D'un point de vue opérationnel, ces travaux invitent à un changement d'échelle de pilote à réelle quant à la faisabilité des méthodes d'apport de carbone testés. Concernant le step-feeding un suivi fin de cette solution peut être mené sur le terrain qui peut très probablement être optimisée par un pilotage asservi à la dynamique propre du système. A ce titre, ces travaux soulignent l'importance du développement de capteurs et d'instrument de mesures en ligne robustes, à coût acceptables et d'une précision suffisante.

Concernant l'utilisation de matériaux biosourcés, ces travaux ouvrent la voie à tester in-situ différentes méthodes d'apport, et en particulier la mise en place d'un protocole de préparation des matériaux par macération ou autres prétraitement réalisables.

Dans un autre registre, les collaborations interdisciplinaires dans le domaine de l'isotopie et de la microbiologie ouvrent de nombreuses voies. La prise en compte de l'azote gazeux sur le traçage isotopique serait une perspective d'intérêt pour boucler le bilan de masse de l'azote et estimer au mieux les flux émanant de la dénitrification à partir d'une bâchée initiale marquée. De plus, un développement isotopique dont un marquage supplémentaire porterait sur une source de carbone ajouté pourrait être mis en place afin de renseigner sa contribution réelle à la dénitrification. De plus, la mise en place d'un protocole simplifié permettrait un changement d'échelle pour réaliser ce type de traçage à plus grande échelle et sur des périodes plus longues. Enfin, le potentiel de l'isotopie pour le traitement des eaux usées demeure encore sous-estimé et des investigations complémentaires ouvriraient encore le champ des possibles.

Enfin, notre connaissance des facteurs environnementaux impliqués dans la dénitrification et conduisant à la réduction des nitrates en  $N_2O$  plutôt qu'en  $N_2$  méritent d'être affinée. La disponibilité en carbone, la gestion de l'aération et de la dynamique hydraulique semblent influencer les communautés de micro-organismes et sont des paramètres contrôlables dans les filtres plantés de roseaux. De fait, les perspectives de recherche en ce domaine sont nombreuses, notamment dans un contexte de réchauffement climatique.



### [A]

Abeliovich, A., 2006. The Nitrite Oxidizing Bacteria, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer New York, New York, NY, pp. 861–872. [https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1\\_41](https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_41)

Adouani, N., Lendormi, T., Limousy, L., Sire, O., 2010. Effect of the carbon source on N<sub>2</sub>O emissions during biological denitrification. *Resources, Conservation and Recycling* 54, 299–302. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2009.07.011>

Akratos, C.S., Tatoulis, T.I., Tekerlekopoulou, A.G., 2020. Biotreatment of Winery Wastewater Using a Hybrid System Combining Biological Trickling Filters and Constructed Wetlands. *Applied Sciences* 10, 619. <https://doi.org/10.3390/app10020619>

Al-Wahaibi, B.M., Jafary, T., Al-Mamun, A., Baawain, M.S., Aghbashlo, M., Tabatabaei, M., Stefanakis, A.I., 2021. Operational modifications of a full-scale experimental vertical flow constructed wetland with effluent recirculation to optimize total nitrogen removal. *Journal of Cleaner Production* 296, 126558. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126558>

Amlinger, F., Götz, B., Dreher, P., Geszti, J., Weissteiner, C., 2003. Nitrogen in biowaste and yard waste compost: dynamics of mobilisation and availability—a review. *European Journal of Soil Biology* 39, 107–116. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(03\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(03)00026-8)

### [B]

Banc, C., Gautier, M., Blanc, D., Lupsea-Toader, M., Marsac, R., Gourdon, R., 2021. Influence of pH on the release of colloidal and dissolved organic matter from vertical flow constructed wetland surface sludge deposits. *Chemical Engineering Journal* 418, 129353. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129353>

Biesterfeld, S., Farmer, G., Russell, P., Figueroa, L., 2003. Effect of alkalinity type and concentration on nitrifying biofilm activity. *Water Environment Research* 75, 196–204.

Boer, W.D., Kowalchuk, G.A., 2001. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology* 14.

Boog, J., Nivala, J., Aubron, T., Wallace, S., van Afferden, M., Müller, R.A., 2014. Hydraulic characterization and optimization of total nitrogen removal in an aerated vertical subsurface flow treatment wetland. *Bioresource Technology* 162, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.100>

### [C]

Cáceres, R., Malińska, K., Marfà, O., 2018. Nitrification within composting: A review. *Waste Management* 72, 119–137. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.10.049>

Cantarel, A.A.M., Rouifed, S., Simon, L., Bourg, J., Gervais, J., Blazère, L., Poussineau, S., Creuzé des Châtelliers, C., Piola, F., 2020. In Nitrate-Rich Soil, *Fallopia x bohemica* Modifies Functioning of N Cycle Compared to Native Monocultures. *Diversity* 12, 156. <https://doi.org/10.3390/d12040156>

Chen, D., Gu, X., Zhu, W., He, S., Huang, J., Zhou, W., 2019. Electrons transfer determined greenhouse gas emissions in enhanced nitrogen-removal constructed wetlands with different carbon sources and carbon-to-nitrogen ratios. *Bioresource Technology* 285, 121313. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121313>

[D]

Daigger, G.T., Boltz, J.P., 2011. Trickling Filter and Trickling Filter-Suspended Growth Process Design and Operation: A State-of-the-Art Review. *water environ res* 83, 388–404. <https://doi.org/10.2175/106143010X12681059117210>

Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R.H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P.H., Wagner, M., 2015. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* 528, 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature16461>

Domeignoz-Horta, L.A., Philippot, L., Peyrard, C., Bru, D., Breuil, M.-C., Bizouard, F., Justes, E., Mary, B., Léonard, J., Spor, A., 2018. Peaks of in situ N<sub>2</sub>O emissions are influenced by N<sub>2</sub>O-producing and reducing microbial communities across arable soils. *Glob Change Biol* 24, 360–370. <https://doi.org/10.1111/gcb.13853>

[E]

Erler, D.V., Eyre, B.D., Davison, L., 2010. Temporal and spatial variability in the cycling of nitrogen within a constructed wetland: A whole-system stable-isotope-addition experiment. *Limnol. Oceanogr.* 55, 1172–1187. <https://doi.org/10.4319/lo.2010.55.3.1172>

[F]

Faulwetter, J.L., Gagnon, V., Sundberg, C., Chazarenc, F., Burr, M.D., Brisson, J., Camper, A.K., Stein, O.R., 2009. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. *Ecological Engineering* 35, 987–1004. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.030>

Filali, A., Bollon, J., Molle, P., Mander, Ü., Gillot, S., 2017. High-frequency measurement of N<sub>2</sub>O emissions from a full-scale vertical subsurface flow constructed wetland. *Ecological Engineering* 108, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.08.037>

Foladori, P., Ruaben, J., Ortigara, A.R.C., 2013. Recirculation or artificial aeration in vertical flow constructed wetlands: A comparative study for treating high load wastewater. *Bioresource Technology* 149, 398–405. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.099>

Forster, P., Ramaswamy, Venkatachalam, Artaxo, Paulo, Berntsen, Terje, Betts, Richard, Fahey, David W, Haywood, James, Lean, Judith, Lowe, David C, Raga, Graciela, Schulz, Michael, Dorland, Robert Van, Bodeker, G., Etheridge, D., Foukal, P., Fraser, P., Geller, M., Joos, F., Keeling, C.D., Keeling, R., Kinne, S., Lassey, K., Oram, D., O’Shaughnessy, K., Ramankutty, N., Reid, G., Rind, D., Rosenlof, K., Sausen, R., Schwarzkopf, D., Solanki, S.K., Stenchikov, G., Stuber, N., Takemura, T., Textor, C., Wang, R., Weiss, R., Whorf, T., Nakajima, T., Ramanathan, V., Ramaswamy, V, Artaxo, P, Berntsen, T, Betts, R, Fahey, D W, Haywood, J, Lean, J, Lowe, D C, Myhre, G., Nganga, J., Prinn, R., Raga, G, Schulz, M, Dorland, R Van, n.d. Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing 106.

## [G]

Giraldi, D., de’Michieli Vitturi, M., Zaramella, M., Marion, A., Iannelli, R., 2009. Hydrodynamics of vertical subsurface flow constructed wetlands: Tracer tests with rhodamine WT and numerical modelling. *Ecological Engineering* 35, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.06.004>

Green, M., Friedler, E., Safrai, I., 1998a. Enhancing nitrification in vertical flow constructed wetland utilizing a passive air pump. *Water Research* 32, 3513–3520. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00182-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00182-1)

Green, M., Friedler, E., Safrai, I., 1998b. Enhancing nitrification in vertical flow constructed wetland utilizing a passive air pump. *Water Research* 32, 3513–3520. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00182-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00182-1)

Grießmeier, V., Leberecht, K., Gescher, J., 2019. NO<sub>3</sub> – removal efficiency in field denitrification beds: key controlling factors and main implications. *Environmental Microbiology Reports* 11, 316–329. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12758>

## [H]

Hallin, S., Philippot, L., Löffler, F.E., Sanford, R.A., Jones, C.M., 2018. Genomics and Ecology of Novel N<sub>2</sub>O-Reducing Microorganisms. *Trends in Microbiology* 26, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.003>

Haruvy, N., 1997. Agricultural reuse of wastewater: nation-wide cost-benefit analysis I 7.

Headley, T.R., Kadlec, R.H., 2007. Conducting hydraulic tracer studies of constructed wetlands: a practical guide. *Ecohydrology & Hydrobiology* 7, 269–282. [https://doi.org/10.1016/S1642-3593\(07\)70110-6](https://doi.org/10.1016/S1642-3593(07)70110-6)

Henrich, C.D., Marggraff, M., n.d. Energy-efficient Wastewater Reuse – The Renaissance of Trickling Filter Technology 12.

Henze, M., 1992. Characterization of Wastewater for Modelling of Activated Sludge Processes. *Water Science and Technology* 25, 1–15. <https://doi.org/10.2166/wst.1992.0110>

Holmes, D.E., Dang, Y., Smith, J.A., 2019. Nitrogen cycling during wastewater treatment, in: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, pp. 113–192. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.10.003>

Hu, Y., He, F., Wang, L., Sun, J., Huang, T., Wu, Z., 2016. The Fate of Ammonium in Integrated Vertical-flow Constructed Wetlands Using Stable Isotope Technique. *Pol. J. Environ. Stud.* 25, 1027–1032. <https://doi.org/10.15244/pjoes/61534>

Huang, L., Gao, X., Guo, J., Ma, X., Liu, M., 2013. A review on the mechanism and affecting factors of nitrous oxide emission in constructed wetlands. *Environ Earth Sci* 68, 2171–2180. <https://doi.org/10.1007/s12665-012-1900>

Huang, Z., Zhang, X., Cui, L., Yu, G., 2016. Optimization of operating parameters of hybrid vertical down-flow constructed wetland systems for domestic sewerage treatment. *Journal of Environmental Management* 180, 384–389. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.05.060>

[I]

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* 35, 657–664. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00309-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00309-2)

[J]

Jahangir, M.M.R., Fenton, O., Carolan, R., Harrington, R., Johnston, P., Zaman, M., Richards, K.G., Müller, C., 2020. Application of <sup>15</sup>N tracing for estimating nitrogen cycle processes in soils of a constructed wetland. *Water Research* 183, 116062. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116062>

Jahangir, M.M.R., Richards, K.G., Healy, M.G., Gill, L., Müller, C., Johnston, P., Fenton, O., 2016. Carbon and nitrogen dynamics and greenhouse gas emissions in constructed wetlands treating wastewater: a review. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 15.

Jianlong, W., Ning, Y., 2004. Partial nitrification under limited dissolved oxygen conditions. *Process Biochemistry* 39, 1223–1229. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00249-8)

Jiménez, E., Giménez, J.B., Ruano, M.V., Ferrer, J., Serralta, J., 2011. Effect of pH and nitrite concentration on nitrite oxidation rate. *Bioresource Technology* 102, 8741–8747. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.092>

Jones, C.M., Stres, B., Rosenquist, M., Hallin, S., 2008. Phylogenetic Analysis of Nitrite, Nitric Oxide, and Nitrous Oxide Respiratory Enzymes Reveal a Complex Evolutionary History for Denitrification. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1955–1966. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn146>

[K]

Kadlec, R.H., Wallace, S.D., 2009. *Treatment wetlands*, 2nd ed. ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

Kania, Manon, Gautier, M., Blanc, D., Toader-Lupsea, M., Merlot, L., Quaresima, M.-C., Gourdon, R., 2019. Leaching behavior of major and trace elements from sludge deposits of a French vertical flow constructed wetland. *Science of the Total Environment* 10.

Kania, M., Gautier, M., Imig, A., Michel, P., Gourdon, R., 2019. Comparative characterization of surface sludge deposits from fourteen French Vertical Flow Constructed Wetlands sewage treatment plants using biological, chemical and thermal indices. *Science of The Total Environment* 647, 464–473. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.440>

Kania, M., Gautier, M., Ni, Z., Bonjour, E., Guégan, R., Michel, P., Jame, P., Liu, J., Gourdon, R., 2018. Analytical indicators to characterize Particulate Organic Matter (POM) and its evolution in French Vertical Flow Constructed Wetlands (VFCWs). *Science of The Total Environment* 622–623, 801–813. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.357>

Kim, B., Gautier, M., Molle, P., Michel, P., Gourdon, R., 2015a. Influence of the water saturation level on phosphorus retention and treatment performances of vertical flow constructed wetland combined with trickling filter and FeCl<sub>3</sub> injection. *Ecological Engineering* 80, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.097>

Kim, B., Gautier, M., Olvera Palma, G., Molle, P., Michel, P., Gourdon, R., 2015b. Pilot-scale study of vertical flow constructed wetland combined with trickling filter and ferric chloride coagulation: influence of irregular operational conditions. *Water Science and Technology* 71, 1088–1096. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.077>

Kim, B., Gautier, M., Prost-Boucle, S., Molle, P., Michel, P., Gourdon, R., 2014. Performance evaluation of partially saturated vertical-flow constructed wetland with trickling filter and chemical precipitation for domestic and winery wastewaters treatment. *Ecological Engineering* 71, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.07.045>

Kivaisi, A.K., 2001. The potential for constructed wetlands for wastewater treatment and reuse in developing countries: a review. *Ecological Engineering* 16, 545–560. [https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(00\)00113-0](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(00)00113-0)

kraiem, K., Kallali, H., Ammeri, R.W., Bessadok, salma, Jedidi, N., 2021. Effects of Partial Saturation on Nitrogen Removal and Bacterial Community in Vertical-Flow Constructed Wetlands (preprint). In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-854531/v1>

[L]

Lee, C., Fletcher, T.D., Sun, G., 2009. Nitrogen removal in constructed wetland systems. *Eng. Life Sci.* 9, 11–22. <https://doi.org/10.1002/elsc.200800049>

Lee, S.-I., Koopman, B., Park, S.-K., Cadee, K., 1995. Effect of fermented wastes on denitrification in activated sludge. *Water Environment Research* 67, 1119–1122. <https://doi.org/10.2175/106143095X133383>



Lekang, O.-I., Kleppe, H., 2000. Efficiency of nitrification in trickling filters using different filter media. *Aquacultural Engineering* 21, 181–199. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(99\)00032-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(99)00032-1)

Leptin, A., Whitehead, D., Anderson, C.R., Cameron, K.C., Lehto, N.J., 2021. Increased soil nitrogen supply enhances root-derived available soil carbon leading to reduced potential nitrification activity. *Applied Soil Ecology* 159, 103842. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103842>

Levy-Booth, D.J., Prescott, C.E., Grayston, S.J., 2014. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* 75, 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.021>

Li, Y., Chapman, S.J., Nicol, G.W., Yao, H., 2018. Nitrification and nitrifiers in acidic soils. *Soil Biology and Biochemistry* 116, 290–301. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.023>

Lombard-Latune, R., Pelus, L., Fina, N., L'Etang, F., Le Guennec, B., Molle, P., 2018. Resilience and reliability of compact vertical-flow treatment wetlands designed for tropical climates. *Science of The Total Environment* 642, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.036>

Lopez-Ponnada, E.V., Lynn, T.J., Peterson, M., Ergas, S.J., Mihelcic, J.R., 2017. Application of denitrifying wood chip bioreactors for management of residential non-point sources of nitrogen. *J Biol Eng* 11, 16. <https://doi.org/10.1186/s13036-017-0057-4>

Lu, H., Nuruzzaman, F., Ravindhar, J., Chandran, K., 2011. Alcohol dehydrogenase expression as a biomarker of denitrification activity in activated sludge using methanol and glycerol as electron donors: Adh expression as a biomarker of denitrification activity. *Environmental Microbiology* 13, 2930–2938. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02568.x>

Lund, L.J., Horne, A.J., Williams, A.E., 1999. Estimating denitrification in a large constructed wetland using stable nitrogen isotope ratios. *Ecological Engineering* 14, 67–76. [https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(99\)00020-8](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(99)00020-8)

[M]

Maciejewski, K., Gautier, M., Kim, B., Michel, P., Gourdon, R., 2022. Effect of trickling filter on carbon and nitrogen removal in vertical flow treatment wetlands: A full-scale investigation. *Journal of Environmental Management* 303, 114159. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114159>

Mander, Ü., Kuusemets, V., Lõhmus, K., Muring, T., Teiter, S., Augustin, J., 2003. Nitrous oxide, dinitrogen and methane emission in a subsurface flow constructed wetland. *Water Science and Technology* 48, 135–142. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0301>

Mariotti, A., Billen, G., Pinay, G., Renault, P., Germon, J.-C., Salot, A., Mayer, B., n.d. Utilisation du traçage isotopique naturel pour caractériser et quantifier les processus de nitrification et de dénitrification à l'échelle du réseau hydrographique de la Seine. 128.

Martínez, N.B., Tejeda, A., Toro, A.D., Sánchez, M.P., Zurita, F., 2018. Nitrogen removal in pilot-scale partially saturated vertical wetlands with and without an internal source of carbon. *Science of the Total Environment* 9.

Martínez-Espinosa, C., 2021. Denitrification in wetlands: A review towards a quantification at global scale. *Science of the Total Environment* 16.

Maucieri, C., 2017. A review on the main affecting factors of greenhouse gases emission in constructed wetlands. *Agricultural and Forest Meteorology* 19.

McKenney, D.J., Drury, C.F., Wang, S.W., 2001. Effects of oxygen on denitrification inhibition, repression, and derepression in soil columns. *Soil Science Society of America Journal* 65, 126–132.

Mercoiret, L., 2009. Application aux agglomérations d'assainissement inférieures à 2 000 Equivalent Habitants 55.

Molle, P., 2014. French vertical flow constructed wetlands: a need of a better understanding of the role of the deposit layer. *Water Science and Technology* 69, 106–112. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.561>

Molle, P., Liénard, A., Boutin, C., Merlin, G., Iwema, A., 2005. How to treat raw sewage with constructed wetlands: an overview of the French systems. *Water Science and Technology* 51, 11–21. <https://doi.org/10.2166/wst.2005.0277>

Morse, J.L., Bernhardt, E.S., 2013. Using  $^{15}\text{N}$  tracers to estimate  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$  emissions from nitrification and denitrification in coastal plain wetlands under contrasting land-uses. *Soil Biology and Biochemistry* 57, 635–643. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.07.025>

Morvannou, A., Forquet, N., Michel, S., Troesch, S., Molle, P., 2015. Treatment performances of French constructed wetlands: results from a database collected over the last 30 years. *Water Science and Technology* 71, 1333–1339. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.089>

Morvannou, A., Troesch, S., Esser, D., Forquet, N., Petitjean, A., Molle, P., 2017. Using one filter stage of unsaturated/saturated vertical flow filters for nitrogen removal and footprint reduction of constructed wetlands. *Water Sci Technol* 76, 124–133. <https://doi.org/10.2166/wst.2017.115>

[N]

Nivala, J., Abdallat, G., Aubron, T., Al-Zreiqat, I., Abbassi, B., Wu, G.-M., van Afferden, M., Müller, R.A., 2019. Vertical flow constructed wetlands for decentralized wastewater treatment in Jordan: Optimization of total nitrogen removal. *Science of The Total Environment* 671, 495–504. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.376>

[P]

Paing, J., Voisin, J., 2005. Vertical flow constructed wetlands for municipal wastewater and septage treatment in French rural area. *Water Science and Technology* 51, 145–155. <https://doi.org/10.2166/wst.2005.0306>

Philippot, L., Andert, J., Jones, C.M., Bru, D., Hallin, S., 2011. Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N<sub>2</sub>O emissions from soil: ROLE OF DENITRIFIER DIVERSITY FOR N<sub>2</sub>O FLUXES. *Global Change Biology* 17, 1497–1504. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02334.x>

Philippot, L., Hallin, S., Schloter, M., 2007. Ecology of Denitrifying Prokaryotes in Agricultural Soil, in: *Advances in Agronomy*. Elsevier, pp. 249–305. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(07\)96003-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(07)96003-4)

Pistocchi, C., Tamburini, F., Gruau, G., Ferhi, A., Trevisan, D., Dorioz, J.-M., 2017. Tracing the sources and cycling of phosphorus in river sediments using oxygen isotopes: Methodological adaptations and first results from a case study in France. *Water Research* 111, 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.12.038>

[R]

Reilly, J.F., Horne, A.J., Miller, C.D., 2000. Nitrate removal from a drinking water supply with large free-surface constructed wetlands prior to groundwater recharge. *Ecological Engineering* 15.

Reinhardt, M., Müller, B., Gächter, R., Wehrl, B., 2006. Nitrogen Removal in a Small Constructed Wetland: An Isotope Mass Balance Approach. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3313–3319. <https://doi.org/10.1021/es052393d>

Rocher, V., Laverman, A.M., Gasperi, J., Azimi, S., Guérin, S., Mottelet, S., Villières, T., Pauss, A., 2015. Nitrite accumulation during denitrification depends on the carbon quality and quantity in wastewater treatment with biofilters. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 10179–10188.

Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, Å., Chapin, F.S.I., Lambin, E., Lenton, T.M., Scheffer, M., Folke, C., Schellnhuber, H.J., Nykvist, B., de Wit, C.A., Hughes, T., van der Leeuw, S., Rodhe, H., Sörlin, S., Snyder, P.K., Costanza, R., Svedin, U., Falkenmark, M., Karlberg, L., Corell, R.W., Fabry, V.J., Hansen, J., Walker, B., Liverman, D., Richardson, K., Crutzen, P., Foley, J., 2009. Planetary Boundaries: Exploring the Safe Operating Space for Humanity. *E&S* 14, art32. <https://doi.org/10.5751/ES-03180-140232>

Rousseau, D.P.L., Vanrolleghem, P.A., Pauw, N.D., 2004. Constructed wetlands in Flanders: a performance analysis. *Ecological Engineering* 13.

[S]

Saeed, T., Sun, G., 2012. A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: Dependency on environmental parameters, operating conditions

and supporting media. *Journal of Environmental Management* 112, 429–448. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.08.011>

Sahrawat, K.L., 2008. Factors Affecting Nitrification in Soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 39, 1436–1446. <https://doi.org/10.1080/00103620802004235>

Silveira, D.D., Belli Filho, P., Philippi, L.S., Kim, B., Molle, P., 2015. Influence of partial saturation on total nitrogen removal in a single-stage French constructed wetland treating raw domestic wastewater. *Ecological Engineering* 77, 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.01.040>

Šlmek, M., Cooper, J.E., 2002. The influence of soil pH on denitrification: progress towards the understanding of this interaction over the last 50 years. *European Journal of Soil Science* 53, 345–354.

Sirivedhin, T., Gray, K.A., 2006. Factors affecting denitrification rates in experimental wetlands: Field and laboratory studies. *Ecological Engineering* 26, 167–181. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2005.09.001>

Søvik, A.K., Kløve, B., 2007. Emission of N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> from a constructed wetland in southeastern Norway. *Science of the Total Environment* 10.

Søvik, A.K., Mørkved, P.T., 2008. Use of stable nitrogen isotope fractionation to estimate denitrification in small constructed wetlands treating agricultural runoff. *Science of The Total Environment* 392, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.11.014>

Stefanakis, A.I., Akratos, C.S., Tsihrintzis, V.A., 2011. Effect of wastewater step-feeding on removal efficiency of pilot-scale horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Ecological Engineering* 37, 431–443. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2010.11.006>

Stefanakis, A.I., Bardiau, M., Trajano, D., Couceiro, F., Williams, J.B., Taylor, H., 2019. Presence of bacteria and bacteriophages in full-scale trickling filters and an aerated constructed wetland. *Science of The Total Environment* 659, 1135–1145. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.415>

Steffen, W., Richardson, K., Rockstrom, J., Cornell, S.E., Fetzer, I., Bennett, E.M., Biggs, R., Carpenter, S.R., de Vries, W., de Wit, C.A., Folke, C., Gerten, D., Heinke, J., Mace, G.M., Persson, L.M., Ramanathan, V., Reyers, B., Sorlin, S., 2015. Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science* 347, 1259855–1259855. <https://doi.org/10.1126/science.1259855>

[T]

Tallec, G., Garnier, J., Billen, G., Gousailles, M., 2008. Nitrous oxide emissions from denitrifying activated sludge of urban wastewater treatment plants, under anoxia and low oxygenation. *Bioresource Technology* 99, 2200–2209. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.025>

Tanner, C.C., Kadlec, R.H., Gibbs, M.M., Sukias, J.P.S., Nguyen, M.L., 2002. Nitrogen processing gradients in subsurface-flow treatment wetlands—influence of wastewater characteristics. *Ecological Engineering* 18, 499–520. [https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(02\)00011-3](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(02)00011-3)

Teiter, S., 2005. Emission of N<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, and CO<sub>2</sub> from constructed wetlands for wastewater treatment and from riparian buffer zones. *Ecological Engineering* 14.

Tobias, C.R., Macko, S.A., Anderson, I.C., Canuel, E.A., Harvey, J.W., 2001. Tracking the fate of a high concentration groundwater nitrate plume through a fringing marsh: A combined groundwater tracer and in situ isotope enrichment study. *Limnol. Oceanogr.* 46, 1977–1989. <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.8.1977>

Torrijos, V., Ruiz, I., Soto, M., 2017. Effect of step-feeding on the performance of lab-scale columns simulating vertical flow-horizontal flow constructed wetlands. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 22649–22662.

Trein, C.M., Zumalacarregui, J.A.G., de Andrade Moraes, M.A., von Sperling, M., 2019. Performance of a French system of vertical flow wetlands (first stage) operating with an extended feeding cycle. *Water Science and Technology* wst2019395. <https://doi.org/10.2166/wst.2019.395>

[V]

Van Oostrom, A.J., Russell, J.M., 1994. Denitrification in constructed wastewater wetlands receiving high concentrations of nitrate. *Water Science and Technology* 29, 7–14.

Varma, M., Gupta, A.K., Ghosal, P.S., Majumder, A., 2021. A review on performance of constructed wetlands in tropical and cold climate: Insights of mechanism, role of influencing factors, and system modification in low temperature. *Science of The Total Environment* 755, 142540. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142540>

Vucinic, A.A., Hrenovic, J., Tepes, P., 2012. Efficiency of subsurface flow constructed wetland with trickling filter. *Environmental Technology* 33, 1323–1330. <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.626798>

Vymazal, J., 2014. Constructed wetlands for treatment of industrial wastewaters: A review. *Ecological Engineering* 73, 724–751. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.034>

Vymazal, J., 2013. The use of hybrid constructed wetlands for wastewater treatment with special attention to nitrogen removal: A review of a recent development. *Water Research* 47, 4795–4811. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.029>

Vymazal, J., 2007. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of The Total Environment* 380, 48–65. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.09.014>

[W]

Wallenstein, M.D., Myrold, D.D., Firestone, M., Voytek, M., 2006. Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *Ecological applications* 16, 2143–2152.

Wang, H., Ji, G., Bai, X., He, C., 2015. Assessing nitrogen transformation processes in a trickling filter under hydraulic loading rate constraints using nitrogen functional gene abundances. *Bioresource Technology* 177, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.094>

Wang, Y., Shen, L., Wu, J., Zhong, F., Cheng, S., 2020. Step-feeding ratios affect nitrogen removal and related microbial communities in multi-stage vertical flow constructed wetlands. *Science of The Total Environment* 721, 137689. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137689>

Weishaar, J.L., Aiken, G.R., Bergamaschi, B.A., Fram, M.S., Fujii, R., Mopper, K., 2003. Evaluation of Specific Ultraviolet Absorbance as an Indicator of the Chemical Composition and Reactivity of Dissolved Organic Carbon. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4702–4708. <https://doi.org/10.1021/es030360x>

Wen, Y., Chen, Y., Zheng, N., Yang, D., Zhou, Q., 2010. Effects of plant biomass on nitrate removal and transformation of carbon sources in subsurface-flow constructed wetlands. *Bioresource Technology* 101, 7286–7292. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.068>

Wu, S., Kuschik, P., Brix, H., Vymazal, J., Dong, R., 2014a. Development of constructed wetlands in performance intensifications for wastewater treatment: A nitrogen and organic matter targeted review. *Water Research* 57, 40–55. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.020>

Wu, S., Kuschik, P., Brix, H., Vymazal, J., Dong, R., 2014b. Development of constructed wetlands in performance intensifications for wastewater treatment: A nitrogen and organic matter targeted review. *Water Research* 57, 40–55. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.020>

[Y]

Yuan, C., Zhao, F., Zhao, X., Zhao, Y., 2020. Woodchips as sustained-release carbon source to enhance the nitrogen transformation of low C/N wastewater in a baffle subsurface flow constructed wetland. *Chemical Engineering Journal* 392, 124840. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124840>

[Z]

Zawilski, M., Brzezińska, A., n.d. Variability of COD and TKN Fractions of Combined Wastewater 5.

Zhang, C., Yin, Q., Wen, Y., Guo, W., Liu, C., Zhou, Q., 2016. Enhanced nitrate removal in self-supplying carbon source constructed wetlands treating secondary effluent: The roles of plants and plant fermentation broth. *Ecological Engineering* 91, 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.02.039>

## Annexes relative à article 1

NOM STEP	Bilan	Type	EH	Date	Point	Surface Total	DCO	DBO	MES	NK	Norg	NH <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub>	NGL	PT
ARBECEY	24h	Classique	300	16/01/2020	entrée	750	453	130	110	78	33,7	44,3	0	78	7
ARBECEY	24h	Classique	300	16/01/2020	sortie	750	43	6	52	5,5	2,5	3	45	51,7	1
CIEL	24h	AZOE 2 étages	1200	10/10/2018	entrée	1680	583	170	280	60	17	43	0,2	60,3	6,7
CIEL	24h	AZOE 2 étages	1200	10/10/2018	sortie	1680	18	0,7	2	1,5	0,5	1	14,7	16,2	2,8
CORMATIN	24h	AZOE 2 étages	1000	23/08/2015	entrée	1500	480	350	280	100	36,22	63,78	2,3	100	7,7
CORMATIN	24h	AZOE 2 étages	1000	23/08/2015	intermédiaire	1500	29	3	2	7,5	1,12	6,38	22,1	29,8	1,9
CORMATIN	24h	AZOE 2 étages	1000	23/08/2015	sortie	1500	19	3	2	5,2	5,04	0,16	22,1	27,3	0,67
CORMATIN	24h	AZOE 2 étages	1000	13/02/2019	entrée	1500	310	280	193	68	25,15	42,85	0,9	68,99	3,94
CORMATIN	24h	AZOE 2 étages	1000	13/02/2019	intermédiaire	1500	14,9	0,7	4	7	7	0	14,9	21,99	0,16
CORMATIN	24h	AZOE 2 étages	1000	13/02/2019	sortie	1500	10,8	0,6	64	1,4	1,4	0	13,3	15,9	0,19
CORMATIN	24h	AZOE 2 étages	1000	27/04/2017	entrée	1500	470	190	140	65,6	14,4	51,2	0,23	65,9	6,5
CORMATIN	24h	AZOE 2 étages	1000	27/04/2017	sortie	1500	30	3	2,2	3	2,22	0,78	11,1	14,1	3,6
CORCELLES-LES-CITEAUX	24h	AZOE 1 étage	1250	22/07/2020	entrée	1250	624	330	980	110	13,6	96,4	0	110	11,84
CORCELLES-LES-CITEAUX	24h	AZOE 1 étage	1250	22/07/2020	sortie	1250	38	3	2	11,6	1,4	10,2	27,1	39,3	2,12

NOM STEP	Bilan	Type	EH	Date	Point	Surface Total	DCO	DBO	MES	NK	Norg	NH <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub>	NGL	PT
CRAS SUR REYSSOUZE	24h	AZOE 1 étage	1125	11/09/2017	entrée	1125	872	421	416	113	8	105	0,11	113,12	11,3
CRAS SUR REYSSOUZE	24h	AZOE 1 étage	1125	11/09/2017	sortie	1125	58	10	8	21,5	1,7	19,8	9,19	31,92	1,99
CRAS SUR REYSSOUZE	24h	AZOE 1 étage	1125	17/10/2018	entrée	1125	998	392	476	85,7	16,6	69,1	0,11	85,82	10,1
CRAS SUR REYSSOUZE	24h	AZOE 1 étage	1125	17/10/2018	sortie	1125	45	7	9	7	2,61	4,39	38	45,66	5,29
CURTAFOND	24h	AZOE 1 étage	700	19/06/2017	entrée	700	752	259	353	94,3	19,7	74,6	0,11	94,42	10
CURTAFOND	24h	AZOE 1 étage	700	19/06/2017	sortie	700	60	6	8	8	2,58	5,42	29,1	39,57	4,57
DAUPHIN	24h	AZOE 1 étage	1083	06/06/2018	entrée	1100	866	170	280	65,4	14	51,4	0,23	65,73	7,1
DAUPHIN	24h	AZOE 1 étage	1083	06/06/2018	sortie	1100	85	9	12	14,3	1,8	12,5	24,8	41,65	6,2
LAVERNAY	24h	AZOE 2 étages	1080	21/10/2019	entrée	1080	1550	720	400	88,8	32,8	56	0	88,8	15
LAVERNAY	24h	AZOE 2 étages	1080	21/10/2019	sortie	1080	12	3	2	0,9	0,1	0,8	13,6	14,2	1,4
MARLIEUX	24h	AZOE 1 étage	1250	26/08/2020	entrée	1248	912	470	380	91	25	66	0	91	11,3
MARLIEUX	24h	AZOE 1 étage	1250	26/08/2020	sortie	1248	32	3	9,2	10,6	1,2	6,4	7,8	18,6	0,5
MASSERAC	24h	AZOE 1 étage	700	07/08/2019	entrée	770	1352	440	520	132	33	99	0	132	14,72
MASSERAC	24h	AZOE 1 étage	700	07/08/2019	sortie	770	6	69	13	6,8	3	3,8	36	42,8	7,49
PETIT-NOIR	24h	AZOE 2 étages	1500	18/12/2014	entrée	1500	418	200	200	52,9	17,3	35,6	4,2	60,3	7,4
PETIT-NOIR	24h	AZOE 2 étages	1500	18/12/2014	sortie	1500	3	2,9	5	5,86	2,86	3	1,67	5,86	2,9
PETIT-NOIR	24h	AZOE 2 étages	1500	22/10/2014	entrée	1500	484	209	200	73,2	17,3	55,9	0,26	73,473	7,23
PETIT-NOIR	24h	AZOE 2 étages	1500	22/10/2014	sortie	1500	22,7	6,7	4,5	3,4	1,4	2	32	35,485	3,26
POULIGNEY-LOUSANS	24h	AZOE 1 étage	1000	10/07/2019	entrée	1000	577	248	290	93,6	18,5	75,1	0,23	93,85	10,8



NOM STEP	Bilan	Type	EH	Date	Point	Surface Total	DCO	DBO	MES	NK	Norg	NH <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub>	NGL	PT
POULIGNEY-LOUSANS	24h	AZOE 1 étage	1000	10/07/2019	sortie	1000	87	11	26	15,6	1,1	14,5	1,5	17,36	9,8
REILLANE	24h	AZOE 2 étages	1950	11/09/2014	entrée	3000	740	280	390	79,3	21,3	58	0,22	79,63	9,9
REILLANE	24h	AZOE 2 étages	1950	11/09/2014	sortie	3000	48	3	5,7	14	3	11	6,2	20,5	3,6
REILLANE	24h	AZOE 2 étages	1950	17/12/2014	entrée	3000	806	400	400	90,3	15,1	75,2	0	90,3	8,95
REILLANE	24h	AZOE 2 étages	1950	17/12/2014	sortie	3000	40	3	2	8,17	1,48	6,69	4,06	12,23	1,58
SAINT-BOIL	24h	Classique	500	13/02/2019	entrée	1250	145	137	74	22	7,766667	14	4	26	1
SAINT-BOIL	24h	Classique	500	13/02/2019	intermédiaire	1250	25,8	5,8	75	19	5,155556	14	11	30	1
SAINT-BOIL	24h	Classique	500	13/02/2019	sortie	1250	18	0,9	14	3	-13,7222	17	28	32	1
SAINT-LUPERCE	24h	AZOE 2 étages	1300	25/09/2017	entrée	1680	1852	580	1100	74,4	4,4	70	0,6	75,24	17,2
SAINT-LUPERCE	24h	AZOE 2 étages	1300	25/09/2017	sortie	1680	30	3,4	4,4	1,7	0,9	0,8	31	32,71	9,5
SAINT-LUPERCE	24h	AZOE 2 étages	1300	13/02/2017	entrée	1680	480	180	155	98	9,8	88,2	0,6	98,61	10
SAINT-LUPERCE	24h	AZOE 2 étages	1300	13/02/2017	sortie	1680	35	1,8	6,4	3,6	0,36	3,24	20	23,75	8,16
SAINT-LUPERCE	24h	AZOE 2 étages	1300	27/09/2018	entrée	1680	714	270	233	121	12,1	108,9	0,6	121,61	12,9
SAINT-LUPERCE	24h	AZOE 2 étages	1300	27/09/2018	sortie	1680	39	1,2	2	8,6	0,86	7,74	0,6	9,21	13,6
SAINT-LUPERCE	24h	AZOE 2 étages	1300	28/03/2018	entrée	1680	1726	660	1064	78,9	33,9	45	0,6	79,51	12,9
SAINT-LUPERCE	24h	AZOE 2 étages	1300	28/03/2018	sortie	1680	30	3,3	6	6,8	3,5	3,3	11	17,85	3,62
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	22/09/2016	entrée	1500	217	130	144	36,9	10,2	26,7	0,2	37,13	4,1
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	22/09/2016	sortie	1500	30	3	2	3	2,2	0,8	13,3	16,6	1,3
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	23/09/2016	entrée	1500	385	89	110	33,5	8,3	25,2	1	34,53	3,7
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	23/09/2016	sortie	1500	89	3	2	3	2,2	0,8	14	17,03	1,3
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	15/05/2017	entrée	1500	130	69	92	31	12,12	18,88	0,29	31,97	2,92
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	15/05/2017	sortie	1500	3	3	4	1,6	1,55	0,05	9,49	11,096	1,27

NOM STEP	Bilan	Type	EH	Date	Point	Surface Total	DCO	DBO	MES	NK	Norg	NH <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub>	NGL	PT
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	16/05/2017	entrée	1500	160	87	120	29	4,3	24,7	0,12	29,126	3,31
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	16/05/2017	sortie	1500	7	3	4	3,2	3,11	0,09	10,62	13,826	1,26
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	17/05/2017	entrée	1500	200	68	94	25	6,56	18,44	0,29	25,854	3,47
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	17/05/2017	sortie	1500	4	3	4	1,2	1,14	0,06	11,75	12,956	1,52
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	07/08/2018	entrée	1500	768	270	340	138	38	100	0,22	138,24	12
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	07/08/2018	sortie	1500	24	3	2	1,4	0,8	0,6	9,82	11,24	0,69
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	08/08/2018	entrée	1500	1930	470	780	79,7	35,7	44	0,22	79,94	12
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	08/08/2018	sortie	1500	11	3	2	0,9	0,3	0,6	8,48	9,4	0,74
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	09/08/2018	entrée	1500	740	180	350	82,5	23,5	59	0,22	82,74	7,7
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	09/08/2018	sortie	1500	23	3	2	1,2	0,6	0,6	5,9	7,12	0,67
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	14/02/2019	entrée	1500	199	180	181	51	16,63	34,37	3,29	54,5	2,56
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	14/02/2019	intermédiaire	1500	14,9	2,3	90	19	5,08	13,92	1,49	20,58	2,04
SAINT DESERT	24h	AZOE 2 étages	1000	14/02/2019	sortie	1500	10,8	1,6	36	12	5,78	6,22	7,5	19,62	0,8
SAINTE-HELENE	24h	Classique	400	14/02/2019	entrée	800	248	138	184,74	38	13,34	24,66	4,55	42,86	2,37
SAINTE-HELENE	24h	Classique	400	14/02/2019	intermédiaire	800	37,7	5,3	81,90	28	8,17	19,83	8,20	36,32	4,05
SAINTE-HELENE	24h	Classique	400	14/02/2019	sortie	800	21,9	1,4	25,95	3	2,22	0,78	34,32	37,41	2,84
SAINT-PAUL-DE-VARAX	24h	AZOE 2 étages	2500	14/03/2020	entrée	3500	165	62	57	31	8	23	0	31	3,1
SAINT-PAUL-DE-VARAX	24h	AZOE 2 étages	2500	14/03/2020	sortie	3500	20	3	4,5	5,5	2,8	2,7	1,65	8,95	1,24
SONCOURT SUR MARNE	24h	Classique	450	15/07/2015	entrée	1035	592	228	180	84,4	16,3	68,1	0,23	84,68	8,95
SONCOURT SUR MARNE	24h	Classique	450	15/07/2015	sortie	1035	36	4,7	4,6	8,1	4,1	4	36	44,77	4,16

NOM STEP	Bilan	Type	EH	Date	Point	Surface Total	DCO	DBO	MES	NK	Norg	NH <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub>	NGL	PT
SAINT MICHEL L'OBSERVATOIRE	24h	AZOE 2 étages	1200	08/11/2017	entrée	1740	621	170	183	60,2	11	49,2	0,23	60,46	6
SAINT MICHEL L'OBSERVATOIRE	24h	AZOE 2 étages	1200	08/11/2017	sortie	1740	20	3	2	4,3	0,9	3,4	18,3	22,83	1,8
THOARD	24h	AZOE 1 étage	900	15/02/2016	entrée	880	587	220	206	43,6	4,6	39	0	43,6	5,1
THOARD	24h	AZOE 1 étage	900	15/02/2016	sortie	880	50	6	11	6,26	0	6,26	22,12	29,18	0,5
THOARD	24h	AZOE 1 étage	900	16/02/2016	entrée	880	418	130	160	35,3	3,5	31,8	0	35,3	4,4
THOARD	24h	AZOE 1 étage	900	16/02/2016	sortie	880	46	7	4,3	4,3	-0,52	4,82	20,54	25,94	0,5
THOARD	24h	AZOE 1 étage	900	17/02/2016	entrée	880	304	210	207	38,1	3,4	34,7	0	38,1	4,7
THOARD	24h	AZOE 1 étage	900	17/02/2016	sortie	880	48	6	5,2	5,2	1,11	4,09	20,54	26,64	0,5
THOARD	24h	AZOE 1 étage	900	11/06/2015	entrée	880	728	270	280	76	8,8	67,2	0	76	8,99
THOARD	24h	AZOE 1 étage	900	11/06/2015	sortie	880	128	24	17	24,7	5,7	19	24,6	49,3	6,88
TRANS LA FORET	24h	AZOE 2 étages	450	25/07/2016	entrée	675	1099,7	320,0	468,7	120,7	22,7	98,0	0,4	121,1	12,7
TRANS LA FORET	24h	AZOE 2 étages	450	25/07/2016	intermédiaire	675	62,7	3,3	8,6	27,9	2,6	25,3	4,9	33,2	0,9
TRANS LA FORET	24h	AZOE 2 étages	450	25/07/2016	sortie	675	63,7	5,3	7,4	3,6	2,5	1,2	25,6	29,3	0,9
TRANS LA FORET	24h	AZOE 2 étages	450	25/07/2016	entrée	675	625,3	330,0	224,0	118,0	19,7	98,3	0,2	118,3	12,4
TRANS LA FORET	24h	AZOE 2 étages	450	25/07/2016	intermédiaire	675	59,7	5,7	5,9	18,9	0,6	18,3	23,2	42,2	3,8
TRANS LA FORET	24h	AZOE 2 étages	450	25/07/2016	sortie	675	34,3	3,0	2,0	3,0	2,2	0,8	36,9	39,9	4,7
TRANS LA FORET	24h	AZOE 2 étages	450	25/07/2016	entrée	675	675,0	366,7	529,3	116,0	31,7	84,3	0,3	116,3	12,4
TRANS LA FORET	24h	AZOE 2 étages	450	25/07/2016	inter	675	53,3	3,0	9,9	22,8	1,9	20,8	10,1	33,0	1,4
TRANS LA FORET	24h	AZOE 2 étages	450	25/07/2016	sortie	675	45,0	3,0	3,8	15,7	1,3	14,4	11,5	27,2	2,3
TRANS LA FORET	24h	AZOE 2 étages	450	25/07/2016	entrée	675	943,0	346,7	410,7	113,7	34,3	79,3	0,2	113,9	8,1
TRANS LA FORET	24h	AZOE 2 étages	450	25/07/2016	intermédiaire	675	61,0	5,0	9,5	36,8	4,7	32,2	3,4	40,5	4,2

NOM STEP	Bilan	Type	EH	Date	Point	Surface Total	DCO	DBO	MES	NK	Norg	NH <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub>	NGL	PT
TRANS LA FORET	24h	AZOE 2 étages	450	25/07/2016	sortie	675	54,7	5,3	5,1	12,4	2,3	10,0	19,9	32,4	3,5
VERCIA	ponctuel	AZOE 2 étages	1200	13/02/2019	entrée	1200	85,9	79	293,8	44,0	12,4	31,6	4,0	48,3	1,5
VERCIA	ponctuel	AZOE 2 étages	1200	13/02/2019	sortie	1200	22,3	0,1	26,2	16,0	3,1	12,9	1,9	18,0	2,6
VENTEROL	ponctuel	AZOE 2 étages	188	10/05/2019	entrée	188	768	320	672	51,4	31	20,4	0,1	51,6	14,8
VENTEROL	ponctuel	AZOE 2 étages	188	10/05/2019	sortie	188	115	36	62	22,2	6	16,2	2,7	25,18	2,9
BAGE-LA-VILLE1	24h	Classique	919	09/05/2012	entrée	2200	346	100	126	33,8	10,8	23	0,23	34	3,9
BAGE-LA-VILLE1	24h	Classique	919	09/05/2012	sortie	2200	49	3	3	1,3	1,04	0,26	47,9	49,2	2,5
BAGE-LA-VILLE1	24h	Classique	919	26/03/2013	entrée	2200	267	170	226	32	2,4	29,6	0,61	33,1	3,89
BAGE-LA-VILLE1	24h	Classique	919	26/03/2013	sortie	2200	19	10	2	1,1	0,94	0,16	21,8	22,9	3,15
SAINT-ANDRE-DE-BAGE-LA-VILLEE	24h	Classique	300	22/05/2012	entrée	1600	248	170	197	21,5	9,1	12,4	0,2	21,7	2,13
SAINT-ANDRE-DE-BAGE-LA-VILLEE	24h	Classique	300	22/05/2012	sortie	1600	17	3	2	1,6	1,44	0,16	19,4	21	2,98
VILLEMOTIER	24h	Classique	133	17/04/2012	entrée	700	340	120	98	47	13,1	33,9	1,47	48,5	4,7
VILLEMOTIER	24h	Classique	133	17/04/2012	sortie	700	13	3	3	1	0,84	0,16	37	38	5,3

## Annexes relative à l'article 5

TOC (mg/L)	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8
VER	33,6 ± 0,0	22,4 ± 5,9	18,6 ± 5,0	17,4 ± 0,8	21,6 ± 0,0	15,3 ±	12,8 ± 0,0	11,5 ± 0,0
Pailis	799,0 ± 0,0	514,3 ± 77,9	498,7 ± 0,0	485,6 ±	745,8 ± 0,0	384,7 ± 78,6	282,4 ± 0,0	196,1 ± 0,0
BRF	2075,0 ± 120,2	954,0 ± 55,2	448,5 ± 27,6	279,0 ± 14,1	298,2 ± 11,5	125,1 ± 0,2	84,2 ± 2,7	97,7 ± 21,9
Raffles	4490,0 ± 268,7	1680,0 ± 169,7	641,5 ± 120,9	309,0 ± 43,8	355,5 ± 60,1	197,0 ± 8,4	131,4 ± 2,0	117,9 ± 6,3
RV	2955,0 ± 21,2	1506,0 ± 22,6	850,3 ± 25,3	569,6 ± 59,7	964,5 ± 78,5	412,4 ± 24,3	226,7 ± 33,4	156,1 ± 31,5
RH	1278,0 ± 76,4	999,0 ± 62,2	691,0 ± 19,8	737,5 ± 10,9	950,5 ± 13,4	404,6 ± 27,9	275,7 ± 15,6	202,0 ± 10,3
Foin	5615,0 ± 332,3	4050,0 ± 14,1	3225,0 ± 219,2	2325,0 ± 49,5	2110,0 ± 282,8	921,5 ± 2,1	741,4 ± 316,3	507,5 ± 186,0

TOC (mg/L)	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16
VER	6,7 ± 0,4	9,5 ± 3,8	9,0 ± 0,0	5,5 ± 0,0	6,4 ± 0,2			
Pailis	161,7 ± 0,0	190,1 ± 0,0	110,4 ± 0,0	95,0 ± 0,0	67,1 ± 0,0	37,0 ± 8,3	42,3 ± 9,0	37,1 ± 8,0
BRF	62,9 ± 9,5	55,1 ± 2,3	24,5 ± 0,0	32,2 ± 21,7	11,2 ± 3,7	12,0 ± 1,3		
Raffles	110,6 ± 0,9	259,0 ± 32,5	133,0 ± 0,0	84,9 ± 9,1	58,7 ± 5,8	43,5 ± 6,1		
RV	67,4 ± 4,7	116,1 ± 16,3	51,6 ± 0,0	32,2 ± 8,9	12,8 ± 0,1			
RH	162,1 ± 7,5	179,4 ± 7,5	113,3 ± 0,0	49,0 ± 12,1	28,4 ± 1,6	20,8 ± 1,0	42,8 ± 0,8	
Foin	425,5 ± 170,4	508,5 ± 235,6	430,8 ± 0,0	365,0 ± 172,6	275,5 ± 125,2	261,9 ± 80,7	414,5 ± 55,9	





## FOLIO ADMINISTRATIF

### THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON OPEREE AU SEIN DE L'INSA LYON

NOM : MACIEJEWSKI

DATE de SOUTENANCE : 12/07/2021

Prénoms : Kévin

TITRE :

Traitement des eaux usées dans les filtres plantés à écoulement vertical. Etude dynamique de l'azote dans les étapes du procédé et des limitations de la dénitrification

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre : 2022LYSEI064

Ecole doctorale : ED 206

Spécialité : Environnement

RESUME :

Les systèmes de traitement des eaux usées par filtres plantés de roseaux se sont imposés comme une référence sur le territoire national, notamment pour le traitement d'effluent domestiques ou agricoles en zone rurale. Le procédé AZOE développé par l'entreprise SCIRPE, est un procédé optimisé de traitement de l'eau végétalisée. Les bases de ce procédé sont celles d'un filtre planté de roseaux classiques à deux étages et à flux hydraulique vertical, auquel a été ajouté un lit bactérien en tête de filière. Les travaux de ce mémoire de thèse se divisent en deux grandes parties i) étude et compréhension du système à différentes échelles ii) optimisation du traitement de l'azote. Dans la première partie une étude de données de terrain sur une période de 15 ans de fonctionnement de la filière AZOE a fait l'objet d'une publication scientifique. De plus, un suivi de la filière AZOE à l'échelle pilote est présenté. Quel que soit l'échelle, réelle ou pilote, les résultats montrent l'importance de l'association lit bactérien et premier étage dans le traitement du carbone et l'azote par nitrification et dénitrification, le potentiel d'optimisation de second étage. L'étude de la filière AZOE a fait l'objet d'un développement de méthode de traçage isotopique par azote marqué avec le laboratoire d'isotopie de l'Institut des Sciences Appliquées de Lyon dont les résultats y sont présentés. Une seconde partie du mémoire est dédiée à l'étude de l'optimisation du traitement de l'azote total par dénitrification. Une stratégie d'apport de carbone par dérivation d'effluent brute y est présentée via des tests sur le pilote. Les résultats sont discutés au regard des performances d'abattement de l'azote, mais aussi des modifications sur les communautés de micro-organismes présente sur le système. Ce dernier point a fait l'objet d'une collaboration avec l'unité de recherche en écologie microbienne de l'université de Lyon.

MOTS-CLÉS :

Filtres plantés de roseaux, azote, nitrification, dénitrification, lit bactérien, traçage isotopique, microbiologie du traitement de l'eau

Laboratoire (s) de recherche :

Déchets Eaux Environnement et Pollutions (DEEP INSA, Lyon)  
SCIRPE Centre-Est

Directeur de thèse : Rémy Gourdon

Composition du jury :

Rousseau, Diederik	Professeur – Univ. Ghent	Rapporteur
Andres, Yves	Professeur - IMT Atlantique	Rapporteur
Delolme, Cécile	Directrice de recherche – ENTPE	Examinatrice
Garcia, Joan	Professeur – Univ. Polytechnique de Catalogne	Examinateur
Mendret, Julie	Maître de conférences – IEM	Examinatrice
Gourdon, Rémy	Professeur – INSA Lyon	Directeur de thèse
Gautier, Mathieu	Maître de conférences – INSA Lyon	Co-Encadrant
Molle, Pascal	Directeur de recherche – INRAE	Co-Encadrant