질산화-탈질 연계공정에서 질소화합물 및 기능성 유전자 거동

권지현, 박형주, 이윤영, 조경숙*
이화여자대학교 환경공학과

Received: September 10, 2019 / Revised: October 28, 2019 / Accepted: October 29, 2019

Dynamics of Nitrogen Compounds and Functional Genes in a Nitrification-Denitrification Coupling Process

Ji-Hyeon Kwon, Hyung-Joo Park, Yun-Yeong Lee, and Kyung-Suk Cho*

Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 03760, Republic of Korea

The dynamics of nitrogen compounds and RNA-based functional genes were characterized in the nitrification-denitrification coupling process. For the removal of residual ammonium, intermittent aeration was introduced in the denitrification reactor. N_2O production was not observed in both reactors. In both reactors, the nitrifying genes (*achaeal-amoA*, *bacterial-amoA* and *hor*) and denitrifying genes (*narG*, *nirK*, *norB* and *nosZ*) had a copy number of 3.92×10^2 – 7.25×10^5 and 2.85×10^2 – 3.06×10^4 per ng of DNA, respectively. These results suggest that denitrification and nitrification reactions occur in both the nitrification and denitrification reactors, respectively. Therefore, the coupling process is a promising one for the conversion of ammonium to nitrogen without generating N_2O .

Keywords: Nitrification, denitrification, functional genes, wastewater treatment, nitrous oxide, coupling process

수생태계의 부영양화 문제 해결을 위해 하폐수의 질소 제거 기술은 지속적으로 요구되고 있다[1]. 현재 많이 활용되고 있는 생물학적 질소 처리 방법은 질산화 공정과 탈질 공정이다[2]. 질산화 공정은 암모니아 산화세균(ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 또는 암모니아 산화 고세균(ammonia-oxidizing archaea, AOA)에 의해 암모늄(NH_4^+)에서 아질산염(NO_2^-)으로 산화되며 아질산염 산화세균(nitrite oxidizing bacteria, NOB)에 의해 아질산염에서 질산염(NO_3^-)로 산화된다[3, 4]. 탈질 과정은 주로 혐기적인 조건에서 일어나고, 질산염이 전자수용체로 이용되어, 아질산염, 산화질소(NO), 아산화질소(N_2O)를 걸쳐 최종적으로 질소(N_2)로 환원된다[5]. 질산화과정에 관여하는 주요 효소는 ammonium monooxygenase (AMO), hydroxylamine oxidoreductase (HAO) 및 nitrite oxidoreductase (NXR)이고[6], 탈질과정에 관여하는 주요 효소는 nitrate reductase (NAR), nitrite reductase (NIR), nitric oxide reductase (NOR) 및 nitrous oxide reductase (N_2OR)이다[7].

생물학적 하폐수처리공정 해석을 위해 관련 유전자 거동에 관한 연구가 진행되고 있다[8–10]. 특히, 최근에는 활성이 있는 미생물 거동을 조사하기 위해 RNA 기반 분자생물학적 방법이 도입되고 있다[11, 12]. 따라서 본 연구에서는 질산화 및 탈질 반응을 연계한 공정에서 질소제거 특성을 조사하고, 각 반응기에서 RNA 기반 기능성 유전자의 거동을 정량 PCR(qPCR) 방법으로 분석하여 질소제거 효율과 유전자거동 사이의 상관관계를 해석하였다.

질산화 및 탈질 농화 배양 실험은 Fig. 1A에 도시한 반응을 이용하였다. 하수처리장(중랑 물 재생 센터, 서울)에서 채취한 고도처리 공정 슬러지를 15,000 $\times g$ 에서 10분간 원심분리한 후, 회수한 침전물을 접종원으로 사용하였다. 전체 5 L 용량의 반응기(KF-5L, 코바이오텍, Korea)에 접종원과 인공폐수[13]를 첨가하여 전체 용량이 3 L가 되도록 하였다. 질산화 반응기와 탈질 반응기는 정상상태에 도달하기 전까지 다음과 같이 개별적으로 농화 배양하였다. 질산화 반응기의 초기 MLSS (Mixed liquor suspended solids)는 3,000 mg/l로 하였다. 유입수는 인공폐수에 질소원으로 NH_4HCO_3 을 최종농도가 100 mg-N/l가 되도록 첨가하였다. 유입수와 유출수의 반응기내 공급 유량은 100 ml/min이며, 공기 공급 유속은 0.8 l/min (DO 농도: 4–5 mg- O_2 /l)이었다. 질산화 운전

*Corresponding author

Tel: +82-2-3277-2393, Fax: +82-2-3277-3275

E-mail: kscho@ewha.ac.kr

© 2020, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

Fig. 1. Schematic diagram and operation conditions for the nitrification-denitrification coupling process. (A) Schematic diagram, (B) Operation conditions for enriching individual reactors, (C) Operation conditions for the coupling reactors.

조건은 유입 15분, 호기 650분, 침전 40분, 유출 15분으로 총 12시간을 한 사이클로 하였고, 수리학적 체류시간(Hydraulic retention time, HRT)은 24시간으로 설정하였다(Fig. 1B). 질산화 반응기는 30℃에서 120 rpm으로 총 45일동안 운전 하였다.

탈질 반응기의 접종원을 농화배양하기 위해, MLSS 농도는 3,000 mg/l로 하고, 인공 폐수에 질산염은 KNO_3 과 NaNO_3 를 1:1로, 질소원과 탄소원(CH_3COONa)의 최종 농도가 각각 300 mg-N/l, 1,500 mg-COD/l가 되도록 첨가하였다 (COD/N ratio는 5). 유입수와 유출수는 35 ml/min의 유량의

로 반응기내 공급 및 배출하였다. 본 연구에서는 탈질반응기에서 잔류 암모늄을 제거하기 위해 간헐적으로 공기를 1 l/min으로 공급하였다. 탈질 반응조의 운전 조건은 유입 15분, 1차 혐기 40분, 호기 90분, 2차 혐기 180분, 침전 20분, 유출 15분으로 하여, 유입부터 유출까지 총 6시간을 한 사이클로(Fig. 1B), HRT는 48시간, 30℃, 120 rpm에서 총 77일 동안 배양하였다.

상기 방법으로 정상상태에 도달한 질산화와 탈질 반응기는 다음과 같이 연계하였는데, 질산화 반응기는 농화 배양과 동일하게 운전하였다(Fig. 1C). 그러나, 탈질 반응기는 인공 폐수에 질산염 첨가없이 탄소원(acetate)만 1,500 mg-COD/l (w/w) 첨가하여 공급하였다. 탈질 반응기의 운전순서는 유입 15분, 1차 혐기 80분, 호기 180분, 2차 혐기 410분, 침전

20분, 유출 15분으로 하여, 유입부터 유출까지 총 12시간을 한 사이클로 운전하였고(Fig. 1C), 최종 HRT는 24시간이었다. 모든 실험은 6-12시간 간격으로 배양액 시료를 채취하였고, 전체 운전기간은 31일이었다.

배양액 시료의 pH 측정은 pH meter (Model 420A, Orion Research Inc., USA)로, 암모늄 농도 측정은 인도 페놀법 (Indophenol, EPA)으로 분석하였다[14]. 아질산염 및 질산염 농도 분석은 이온 크로마토그래피(883 Basic IC plus, Metrohm, Switzerland)를 이용하였다. 화학적 산소 요구량 측정은 COD kit (COD digestion vials, HR, HACH Co., Loveland, USA)를 사용하여 측정하였다. 질소원 거동을 평가하기 위해 각 반응기에서 질소 화합물의 잔존율 및 전환율을 계산하였다[15].

Fig. 2. Performance of the nitrification-denitrification coupling process. (A) pH in the nitrification reactor, (B) Ammonium concentrations in the nitrification reactor, (C) Nitrite and nitrate concentrations in the nitrification reactor, (D) COD concentrations in the denitrification reactor, (E) pH in the denitrification reactor, (F) Ammonium concentrations in the denitrification reactor, (G) Nitrite and nitrate concentrations in the denitrification reactor.

Table 1. Primers and qPCR conditions.

Target gene	Related enzyme	Primer	Sequence (5'-3')	qPCR condition	Ref.
16S rRNA	16S rRNA sequence of <i>Escherichia coli</i>	340F 805R	TCCTACGGGAGGCAGCAG GACTACHVGGGTATCTAATCC	95 °C 3 min, 95 °C 30 sec, 50 °C 30 sec, 72 °C 30 sec for 35 cycle	[17]
Nitrification					
AOA (a- <i>amoA</i>)	Ammonia monooxygenase in archaea	Arch- <i>amoA</i> F Arch- <i>amoA</i> R	STAATGGTCTGGCTTAGACG GCGGCCATCCATCTGTATGT	95 °C 5 min, 95 °C 30 sec, 58 °C 30 sec, 72 °C 1 min for 35 cycle	[18]
AOB (b- <i>amoA</i>)	Ammonia monooxygenase in bacteria	AmoA-1F AmoA-1R	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	95 °C 5 min, 95 °C 30 sec, 58 °C 30 sec, 72 °C 1 min for 35 cycle	[19]
HAO (<i>hao</i>)	Hydroxylamine oxidoreductase	HaoF4 HaoR2	AAYCTKCGCTCRATGGG GGTTGGTYTTCTGKCCGG	95 °C 5 min, 95 °C 30 sec, 58 °C 30 sec, 72 °C 1 min for 35 cycle	[20]
Denitrification					
<i>narG</i>	Subunit G of mem brane bound nitrate reductase	<i>narG</i> -F <i>narG</i> -R	TCGCCSATYCCGGCSATGTC GAGTTGTACCAGTCRGC SGAYTC SG	95 °C 5 min, 95 °C 30 sec, 63 °C 30 sec, 72 °C 1 min for 35 cycle	[21, 22]
<i>nirK</i>	Copper-type nitrite reductase	<i>nirK</i> -876F <i>nirK</i> -1040R	ATYGGCGGVCA YGGCGA GCCTCGATCAGRTTRTGGTT	94 °C 5 min, 94 °C 30 sec, 50 °C 30 sec, 72 °C 1 min for 35 cycle	[23, 24]
<i>norB</i>	Subunit B of nitric oxide reductase	<i>norB</i> -1F <i>norB</i> -6R	CGNGARTTYCTSGARCARCC TGCAKSARRCCCCABACBCC	95 °C 5 min, 95 °C 30 sec, 58 °C 30 sec, 72 °C 1 min for 35 cycle	[25]
<i>nosZ</i>	Subunit Z of nitrous oxide reductase	<i>nosZ</i> -2F <i>nosZ</i> -2R	CGCRACGGCAASAAGGTSMSST CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA	94 °C 5 min, 94 °C 30 sec, 65 °C 30 sec, 72 °C 1 min for 35 cycle	[24, 26]

질산화와 탈질에 관여하는 기능성 유전자의 발현량의 차이를 비교분석하기 위해 qPCR을 수행하였다. mRNA 추출은 manual 방법과 RNeasy Mini Kit (RNeasy Mini Kit 50, Qiagen, Nederland)를 사용하여 추출하였고[16], Omniscript kit (Omniscript, Qiagen, Nederland) manual에 따라 진행하여 complementary DNA (cDNA) 시료를 준비하였다. 각 기능성유전자의 qPCR 조건을 Table 1에 나타내었다[17–26]. 모든 실험은 2반복으로 진행하였다.

질산화 및 탈질 반응기를 각각 농화 배양하여 steady-state 상태에서 연계하여 운전한 조건에서 질소화합물의 거동을 Fig. 2에 도시하였다. 질산화 반응기의 전체 조업 기간 동안 반응액의 pH는 6.7–7.3 사이에서 변화하였다(Fig. 2A). 질산화 반응기 유출액의 암모늄 농도는 39.8 ± 24.16 mg-N/l로, 평균 암모늄 제거효율이 $68.2 \pm 18.9\%$ 이었다(Fig. 2B). 아질산염의 축적은 없었으며, 질산염은 52.3–89.0 mg-N/l 사이에서 반응기에 축적되었다(Fig. 2C).

질산화 반응기로부터 유출액을 공급한 탈질 반응기에서 COD 농도 제거와 질소화합물의 거동 변화를 Fig. 2D–G에 제시하였다. 탈질 반응기에서 평균 COD 농도 제거효율이 $90.0 \pm 7.93\%$ 이었다(Fig. 2D). 탈질 배양액의 pH는 반응이 진행될수록 7.0에서 8.7로 증가하였다(Fig. 2E). 질산화 반응기에서 탈질 반응기로 유입된 잔류 암모늄은 탈질 반응기에서 제거되어 유출수 중 암모늄 평균 10.7 ± 17.39 mg-N/l로,

암모늄의 총제거효율은 $91.7 \pm 11.90\%$ 이었다(Fig. 2F). 유입된 질산염은 아질산염 축적 없이 제거되었는데, 평균제거효율은 $87.8 \pm 14.56\%$ 이었다(Fig. 2G).

연계 공정 운전시 탈질 반응기로 유입되는 질산염 농도가 상대적으로 낮은기간(5–15일 사이)과 높은 기간(16–31일 사이)으로 구분하여 질소 화합물의 잔존율(%)과 전환율(%)을 계산하여 Table 2에 제시하였다. 질산화 반응기에서 암모늄의 잔존율이 5–15일과 16–31일에서 각각 $33.5 \pm 17.08\%$, $37.9 \pm 14.23\%$ 로 유사하였다. 탈질 반응기에서의 암모늄 잔존율은 질산염 농도가 낮은 5–15일 사이에는 $10.2 \pm 15.89\%$ 이었으나, 질산염 농도가 높은 16–31일 사이에는 $6.4 \pm 7.92\%$ 로 낮았다. 질산염의 잔존율은 운전 시간이 경과함에 따라 $1.8 \pm 4.47\%$ 에서 $21.1 \pm 15.68\%$ 로 증가하였지만 아질산염 및 아산화질소의 잔존율은 관찰되지 않았다. 따라서 최종 N_2 가스로의 환원율은 $98.2 \pm 4.47\%$ 에서 $78.9 \pm 15.68\%$ 로 높은 탈질 효율을 보였다.

Li 등[27]과 Rodriguez-Caballero 등[28]은 암모늄의 농도가 38.7–64.4 mg-N/l이고 HRT 0.625일(15시간)로 하수를 고도처리한 경우, 아산화질소의 축적율이 2.9–6.8%였다고 보고하였다. Zhu 등[29]은 탄소원(acetate: 15–30 mg-COD/l)과 암모늄(20–35 mg-N/l)을 유입수로 첨가하였고, HRT 16시간 조건에서 SBR 공정을 진행하였을 때, 암모늄 제거율이 97%, 총 질소제거율은 65%이며, 총 질소 배출저감에 acetate

Table 2. Residual or transformation ratios (%) of N-compounds in the nitrification-denitrification coupling process.

Day	Influent	(Intermediate)			Effluent			
	NH ₄ ⁺ -N	Nitrification reactor			Denitrification reactor			
		(NH ₄ ⁺ -N)	(NO ₂ ⁻ -N)	(NO ₃ ⁻ -N)	NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N	NO ₂ ⁻ -N	N ₂ -N*
5-15d	100 ± 0.00	(33.5 ± 17.08)	(0.0 ± 0.00)	(43.1 ± 6.21)	10.2 ± 15.89	1.8 ± 4.47	0.0 ± 0.00	98.2 ± 4.47
16-31d		(37.9 ± 14.23)	(0.0 ± 0.00)	(62.5 ± 14.85)	6.4 ± 7.92	21.1 ± 15.68	0.0 ± 0.00	78.9 ± 15.68

*N₂-N concentration was calculated by nitrogen mass biomass.

첨가는 효과적이지만, HRT는 16시간으로 보고하였다. 본 연구결과에서는 HRT를 24시간으로 진행하였을 때, 100 mg-N/l의 암모늄 농도에서도 아산화질소 배출 및 아질산염의 축적없이 질산화 반응이 진행되었고, 탈질 반응기에 호기 공정을 넣어 잔류 암모늄을 완전히 제거할 수 있었다는 장점이 확인되었다. Marin 등[30]은 호기(DO 농도: 4.0 mg-O₂/l)에서 질산화 및 탈질 반응을 진행하였을 때, 높은 COD 제거율과 질소제거 효율이 확인되었다. 이는 탈질화 세균이 호기 조건

에서 flocc을 형성하고, 최종 전자 수용체로 질산염 또는 산소를 사용할 수 있기 때문에 호기 탈질 반응이 탈질화 세균의 활성에 효과적이라 보고하였다. 본 연구의 질산화-탈질 연계 공정은 HRT가 비교적 긴 단점은 있지만, 암모늄 제거 효율을 높이고, 아질산염의 축적 및 아산화질소 배출없이 하폐수로부터 질소를 90% 이상 제거할 수 있는 공정임을 확인하였다.

질산화 및 탈질 연계공정을 통해 변화하는 기능성 유전자의 거동을 RNA 수준에서 평가하여 Fig. 3에 도시하였다. 두 반응기에서 b-amoA의 유전량이 a-amoA보다 높았다. 고농도 암모늄(~420 mg-N/l) 함유 폐수가 처리장에 유입된 경우, AOB 군주에 속하는 *N. europaea*가 우점하였다[31]. Quan 등[32]은 *N. europaea*는 암모니아 산화반응기에서도 DO 농도와 관계없이 우점한다고 보고하였으며, Ma 등[33]은 AOB 군주는 혐기 환경에서도 소량의 산소를 이용하여 암모니아에서 아질산염으로 산화할 수 있다고 보고하였다. Ye and Zhang [34]은 AOA 군주가 생물반응기에서 암모늄 산화에 주요 역할을 담당함을 밝혔다. Mosier 등[35]도 고도처리 과정에서 AOB 뿐 아니라 AOA도 주요 역할을 한다고 보고하였다. 한편, 본 연구에서는 아질산염에서 질산염으로 산화시키는 NOB 군주의 *nirA* 유전자의 거동을 평가하지 못하여 향후 이에 대한 추가 연구가 필요하다. 습지에서 질소 제거와 기능성 유전자의 거동을 평가하였을 때, *amoA*와 *nirA* (NOB 기능성 유전자)의 유전량은 유사한 패턴을 보였고[36]. AOB와 NOB는 유사한 환경에서 적응하기 때문에 각각의 유전자(*amoA*와 *nirA*)는 비슷한 거동을 보이는 것으로 알려져 있다[37].

탈질 과정에 관여하는 질산염 환원 유전자(*narG*)가 두 반응기에서 각각 2.85×10^2 및 8.37×10^3 gene copy number ng-DNA⁻¹이었다. *nirK*의 유전자량은 두 반응기에서 모두 7.27×10^3 gene copy number ng-DNA⁻¹로 제일 낮았다. 산화질소에서 아산화질소로 환원하는 *norB*와 아산화질소에서 최종 질소로 환원시키는 *nosZ* 유전자량이 각각 2.95×10^4 gene copy number ng-DNA⁻¹와 7.27×10^3 gene copy number ng-DNA⁻¹로 높았다. 이러한 기능성 유전자 존재로 인해 질산화 및 탈질 반응기에서 아산화질소 배출없이 질소로 환원 가능함을 알 수 있었다. 탈질 효율이 높으면 탈질 관련 기능

Fig. 3. Comparison of 16S rRNA and functional gene copy numbers. There are significant differences between the different characters ($n = 6$, $p < 0.05$). (A) Nitrification reactor, (B) Denitrification reactor.

성 유전자 농도도 높았고[36], 탈질 세균과 기능성 유전자 거동은 운전조건과 환경인자에 영향을 받았으며[38], 호기조건에서도 탈질 관련 기능성 유전자인 *nirK*, *norB* 및 *nosZ*가 활성을 가진다고 보고되고 있다[39].

본 연구의 질산화-탈질 연계공정의 질소화합물 및 기능성 유전자 거동 결과로부터, 질산화 반응기는 주요 반응인 질산화 이외에도 탈질 반응이 일어나고, 탈질 반응기는 주요 반응인 탈질 이외에도 질산화 반응도 함께 진행됨을 알 수 있었다. 본 연구의 연계공정은 비록 체류 시간은 길지만, 지구 온난화 가스인 N_2O 의 배출없이 질산화와 탈질을 통해 하폐수의 고도처리가 가능한 공정이었다.

Acknowledgments

This research was supported by the Basic Science Research program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science and ICT (NRF-2016R1A2B4015007).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Jin P, Chen Y, Xu T, Chi Z, Zheng Z. 2019. Efficient nitrogen removal by simultaneous heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium in a purification tank bioreactor amended with two-stage dissolved oxygen control. *Bioresour. Technol.* **281**: 392-400.
- Zanetti L, Frison N, Nota E, Tomizioli M, Bolzonella D, Fatone F. 2012. Progress in real-time control applied to biological nitrogen removal from wastewater. A short-review. *Desalination* **286**: 1-7.
- Antileo C, Werner A, Ciudad G, MunoZC, Bornhardt C, Jeison D, et al. 2006. Novel operational strategy for partial nitrification to nitrite in a sequencing batch rotating disk reactor. *Biochem. Eng. J.* **32**: 69-78.
- Gao J, Duan Y, Liu Y, Zhuang X, Liu Y, Bai Z, et al. 2019. Long-and short-chain AHLs affect AOA and AOB microbial community composition and ammonia oxidation rate in activated sludge. *J. Environ. Sci.* **78**: 53-62.
- Wunderlin P, Mohn J, Joss A, Emmenegger L, Siegrist H. 2012. Mechanisms of N_2O production in biological wastewater treatment under nitrifying and denitrifying conditions. *Water. Res.* **46**: 1027-1037.
- Zheng Y, Hou L, Liu M, Newell S, Yin G, Yu C, et al. 2017. Effects of silver nanoparticles on nitrification and associated nitrous oxide production in aquatic environments. *Sci. Adv.* **3**: 1-11.
- Zumft WG. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 533-616.
- Chai H, Xiang Y, Chen R, Shao Z, Gu L, Li L, et al. 2019. Enhanced simultaneous nitrification and denitrification in treating low carbon-to-nitrogen ratio wastewater: Treatment performance and nitrogen removal pathway. *Bioresour. Technol.* **280**: 51-58.
- Chen Y, He H, Liu H, Li H, Zeng G, Xia X, et al. 2018. Effect of salinity on removal performance and activated sludge characteristics in sequencing batch reactors. *Bioresour. Technol.* **249**: 890-899.
- He H, Chen Y, Li X, Cheng Y, Yang C, Zeng G. 2017. Influence of salinity on microorganisms in activated sludge processes: A review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **119**: 520-527.
- Herrmann E, Young W, Rosendale D, Conrad R, Riedel CU, Egert M. 2017. Determination of resistant starch assimilating bacteria in fecal samples of mice by in vitro RNA-based stable isotope probing. *Front. Microbiol.* **8**: 1331.
- Fan Z, Zeng W, Wang B, Chang S, Peng Y. 2019. Analysis of microbial community in a continuous flow process at gene and transcription level to enhance biological nutrients removal from municipal wastewater. *Bioresour. Technol.* **286**: 121374.
- Su Q, Ma C, Domingo-Félez C, Kiil AS, Thamdrup B, Jensen MM, et al. 2017. Low nitrous oxide production through nitrifier-denitrification in intermittent-feed high-rate nitrification reactors. *Water. Res.* **123**: 429-438.
- Chen L, Hoff SJ. 2012. A two-stage wood chip-based biofilter system to mitigate odors from a deep-pit swine building. *Appl. Eng. Agric.* **28**: 893-901.
- Lee YY, Choi H, Cho KS. 2019. Effects of carbon source, C/N ratio, nitrate, temperature, and pH on N_2O emission and functional denitrifying genes during heterotrophic denitrification. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous. Subst. Environ. Eng.* **54**: 16-29.
- Kim TG, Moon KE, Yun J, Cho KS. 2013. Comparison of RNA- and DNA-based bacterial communities in a lab-scale methane-degrading biocover. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 3171-3181.
- Kim TG, Yi T, Lee EH, Ryu HW, Cho KS. 2012. Characterization of a methane-oxidizing biofilm using microarray, and confocal microscopy with image and geostatic analyses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**: 1051-1059.
- Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB. 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 14683-14688.
- Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4704-4712.
- Schmid MC, Hooper AB, Klotz MG, Woebken D, Lam P, Kuypers MMM, et al. 2008. Environmental detection of octahem cytochrome c hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Environ. Microbiol.* **10**: 3140-3149.
- Schreiber F, Wunderlin P, Udert KM, Wells GF. 2012. Nitric oxide and nitrous oxide turnover in natural and engineered microbial communities: Biological pathways, chemical reactions, and novel technologies. *Front. Microbiol.* **3**: 372.
- Bru D, Sarr A, Philippot L. 2007. Relative abundances of proteo-

- bacterial membrane-bound and periplasmic nitrate reductases in selected environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 5971-5974.
23. Henry S, Baudoin E, López-Gutiérrez JC, Martin-Laurent F, Brauman A, Philippot L. 2004. Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* **59**: 327-335.
 24. Song K, Suenaga T, Hamamoto A, Satou K, Riya S, Hosomi M, *et al.* 2014. Abundance, transcription levels and phylogeny of bacteria capable of nitrous oxide reduction in a municipal wastewater treatment plant. *J. Biosci. Bioeng.* **118**: 289-297.
 25. Casciotti KL, Ward BB. 2005. Phylogenetic analysis of nitric oxide reductase gene homologues from aerobic ammonia-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**: 197-205.
 26. Henry S, Bru D, Stres B, Hallet S, Philippot L. 2006. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 5181-5189.
 27. Li P, Wang S, Peng Y, Liu Y, He J. 2015. The synergistic effects of dissolved oxygen and pH on N₂O production in biological domestic wastewater treatment under nitrifying conditions. *Environ. Technol.* **36**: 1623-1631.
 28. Rodriguez-Caballero A, Aymerich I, Poch M, Pijuan M. 2014. Evaluation of process conditions triggering emissions of greenhouse gases from a biological wastewater treatment system. *Sci. Total Environ.* **493**: 384-391.
 29. Zhu X, Chen Y. 2011. Reduction of N₂O and NO generation in anaerobic-aerobic (low dissolved oxygen) biological wastewater treatment process by using sludge alkaline fermentation liquid. *Environ. Sci. Technol.* **45**: 2137-2143.
 30. Marin JCA, Caravelli AH, Zaritzky NE. 2019. Performance of anoxic-oxic sequencing batch reactor for nitrification and aerobic denitrification. *Biotechnol. Bioeng.* 1-22, doi: 10.5772/intechopen.84775.
 31. Limpiyakorn T, Kurisu F, Sakamoto Y, Yagi O. 2007. Effects of ammonium and nitrite on communities and populations of ammonia-oxidizing bacteria in laboratory-scale continuous-flow reactors. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**: 501-512.
 32. Quan ZX, Rhee SK, Zuo JE, Yang Y, Bae JW, Park JR, Lee ST, Park YH. 2008. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. *Environ. Microbiol.* **10**: 3130-3139.
 33. Ma B, Peng Y, Zhang S, Wang J, Gan Y, Chang J, Wang S, Wang S, Zhu G. 2013. Performance of anammox UASB reactor treating low strength wastewater under moderate and low temperatures. *Bioresour. Technol.* **129**: 606-611.
 34. Ye L, Zhang T. 2011. Ammonia-oxidizing bacteria dominates over ammonia-oxidizing archaea in a saline nitrification reactor under low DO and high nitrogen loading. *Biotechnol. Bioeng.* **108**: 2544-2552.
 35. Mosier AC, Francis CA. 2008. Relative abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the San Francisco Bay estuary. *Environ. Microbiol.* **10**: 3002-3016.
 36. Zhi W, Ji G. 2014. Quantitative response relationships between nitrogen transformation rates and nitrogen functional genes in a tidal flow constructed wetland under C/N ratio constraints. *Water. Res.* **64**: 32-41.
 37. Ji G, Zhi W, Tan Y. 2012. Association of nitrogen micro-cycle functional genes in subsurface wastewater infiltration systems. *Ecol. Eng.* **44**: 269-277.
 38. Poo KM, Im JH, Jun BH, Kim JR, Hwang IS, Choi KS, *et al.* 2006. Full-cyclic control strategy of SBR for nitrogen removal in strong wastewater using common sensors. *Water. Sci. Technol.* **53**: 151-160.
 39. Ji B, Yang K, Zhu L, Jiang Yu, Wang H, Zhou J, *et al.* 2015. Aerobic denitrification: A review of important advances of the last 30 years. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **20**: 643-651.