

排水処理システムの進展から見る窒素マネジメントの現状と課題

Current Status and Challenges of Nitrogen Management in Advancement of Wastewater Treatment Systems

寺 田 昭 彦*

AKIHIKO TERADA*

東京農工大学大学院工学研究院応用化学部門 〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16

* TEL: 042-388-7069 FAX: 042-388-7731

* E-mail: akte@cc.tuat.ac.jp

Department of Applied Chemistry, Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture & Technology,
2-24-16 Naka, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

キーワード：窒素, 排水処理, 省エネ化, バイオフィーム, 亜酸化窒素

Key words: nitrogen, wastewater treatment, energy-saving, biofilm, nitrous oxide (N₂O)

(原稿受付 2019年3月7日/原稿受理 2019年3月30日)

1. はじめに

細胞は様々な元素で構成されているが、主要なものは C, N, H, O である。細菌細胞の化学式は経験的に様々な組成比で構成され、 $C_nH_aO_bN_c$ としてまとめられている¹⁾。原核生物の細胞の化学式を考慮すると窒素の重量パーセントは 6–15% の範囲で存在している。平均で人はおよそ 6 g の窒素 (104 mg 窒素 /kg/ 日²⁾、体重 60 kg で計算) を 1 日のうちに取り込み排出している。取り込まれた窒素化合物はタンパク質、アミノ酸、核酸等の原料となる。窒素抜きで生物を語ることは出来ない。

ヒトや家畜が取り込む窒素化合物は、肥料に由来する。人類はハーバー・ボッシュ法の恩恵を得て、不活性な窒素ガスから反応性窒素であるアンモニアの合成を達成している。工業的に固定される窒素量は、2010 年で年間 1.2 億トンにのぼると試算されており³⁾、陸・海のそれぞれの年間窒素固定量と同じオーダーである。工業的に固定化される窒素量は、今後の人口増加と相まって増加することが懸念されており、2100 年には年間 1.6 億トンにのぼることが試算されている³⁾。近年、農業分野において適切な窒素肥料の施肥が推奨されており、窒素利用効率の向上が実施されている。しかし、工業的な固定を含めた人為的な窒素固定量は 2100 年では年間 6.02 億トンに到達することが予想され³⁾、2010 年 (年間 4.73 億トン) から 27% 増大する。固定される窒素量の増大は、微生物が窒素がガスへ変換するよりも多くの反応性窒素が地球環境に蓄積されていくことを示唆している。言い換えれば、反応性窒素が地上に残存してしまうことを意味している。ここに食糧生産と窒素に起因する地球環境汚染のトレードオフを示す窒素ジレンマ⁴⁾が生じる。

窒素による水環境汚染は、地球環境が元の状態に復元できない閾値である Planetary Boundary を超え、甚大な地球環境問題の 1 つとして取り上げられている^{5,6)}。また EU においては、窒素汚染が生物多様性の減少に影響を及ぼしており、Planetary Boundary で取り上げられている窒素と並ぶ甚大な環境問題と密接にリンクしている。したがって、地球上に過多に存在する反応性の窒素化合物のマネジメントが、21 世紀においてますます重要になっている⁷⁾。この観点より、我々の生活や産業活動で排出している窒素化合物が集約される排水処理施設の機能強化や省エネ化は重要な課題といえる。

本稿では、特に水環境の窒素汚染において End-of-Pipe として作用している排水処理技術の現状を俯瞰するとともに、排水の省エネ化において新たなトレードオフとして立ちのぼる温室効果の極めて高い亜酸化窒素 (N₂O) のマネジメントの重要性、窒素化合物を循環利用するだけでなく、価値の高い物質へ変換させるアップサイクリング技術について説明したい。

2. Anammox 細菌を用いた排水処理の現状

窒素化合物はアオコ・赤潮の発生による漁業被害といった水環境汚染を引き起こす原因となるため、その除去は必要不可欠である。排水中の窒素を除去する際には、酸素の供給が必須である。従来の硝化脱窒法においてアンモニアは、アンモニア酸化細菌 (Ammonia-oxidizing bacteria; AOB) とアンモニア酸化古細菌 (Ammonia-oxidizing archaea; AOA) で構成されるアンモニア酸化微生物 (Ammonia-oxidizing microorganisms; AOM) により亜硝酸に酸化される。このアンモニア酸化において、化学量論的には 3.43 g-O₂/g-N の酸素が必要になる (表 1)。

表 1. 化学量論的關係から見る部分硝化-Anammox 法のメリット

	硝化・脱窒	亜硝酸経由 硝化-脱窒 ^a	部分硝化-Anammox 法
硝化に必要な酸素量 [g-O ₂ /g-N]	4.57	3.43	1.71
脱窒に必要な有機物量 [g-COD/g-N]	2.86	1.71	0.214 ^b
生成汚泥量 [g-VSS/g-N] ^c	1.19	0.73	0.14

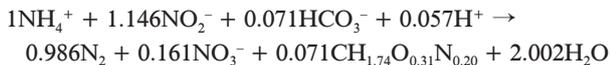
^a 硝化反応を亜硝酸で停止させて、亜硝酸経由で脱窒を行うことを想定して計算した。

^b Lotti *et al.* (2016)¹²⁾ の Anammox 反応の化学量論式により生成する硝酸イオンを脱窒することを想定して計算した。

^c 酢酸塩を電子供与体として生成汚泥量を計算した。

さらに、生成される亜硝酸イオンは、亜硝酸酸化細菌 (Nitrite-oxidizing bacteria; NOB) により、1.14 g-O₂/g-N の酸素を消費して硝酸イオンに変換される。AOM および NOB の酸化のためには合計で 4.57 g-O₂/g-N の酸素が必要になる。近年、*Nitrospira* 属の完全硝化細菌 (Complete ammonia oxidizer; Comammox) が発見され、アンモニア酸化・亜硝酸酸化の双方の反応を 1 つの細菌で完結できることが報告されている^{8,9)}。本稿では、これ以上の説明は割愛するが、特徴に関しては他の総説を参照されたい¹⁰⁾。排水処理の場合、酸素供給はブローを用いた曝気により行われるが、曝気は運転コストの 45-75% を占める最もコストがかかる工程である¹¹⁾。したがって、曝気コストの削減が望ましい。

このようなエンジニアリングの観点から鑑みると、嫌気性アンモニア酸化 (Anammox) を用いた窒素除去プロセスは省エネ・低コストであるといえる。独立栄養細菌である Anammox 細菌による Anammox 反応は、以下の化学量論¹²⁾ でアンモニアおよび亜硝酸イオンを嫌気条件下で窒素ガスと硝酸イオンに変換させる。



この場合、従前の硝化脱窒法と比較して、アンモニアを完全に酸化する必要は無い。したがって、部分的にアンモニアを亜硝酸イオンに酸化させる部分硝化、後段の Anammox 反応を用いた窒素除去、いわゆる部分硝化-Anammox 法の場合、窒素除去に必要な酸素量は 1.71 g-O₂/g-N であるため、63% の曝気コスト削減が期待できる (表 1)。

省エネ・低コストの窒素除去のためには、部分硝化-Anammox 反応を促進させる条件を創製することが肝要である。具体的には、好気・嫌気的の条件がそれぞれ必要であり、2 槽型・1 槽型のどちらかのシステムが必要になる。1 槽型の場合、バイオフィームのような微生物の凝集体の厚み方向で空間的に嫌気・好気部位を創製するか、間欠曝気方式を導入して時間的に嫌気・好気条件の期間を創製するか、どちらかが求められる。

部分硝化-Anammox 法において、窒素化合物や酸素を巡る微生物群の共生・競合関係は複雑であり (図 1)、窒素化合物の変換に関連する微生物の活性を制御する必要がある。ひとつの大きな課題は Anammox プロセスの前段である部分硝化における、AOM および NOB の増殖を巡る競合である (Anammox を用いた窒素除去プロセスの場合、AOB の方が AOA に対して優占的なので、

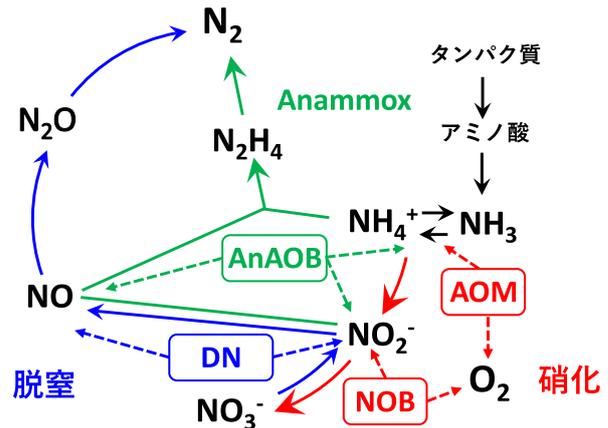


図 1. 窒素化合物をめぐる微生物群の代謝経路概観。

点線：それぞれの窒素化合物の競合を示す。AnAOB：Anammox 細菌；AOM：アンモニア酸化微生物；NOB：亜硝酸酸化細菌；DN：脱窒細菌

*AOB による N₂O 生成および Comammox 細菌の代謝経路は記載していない。

以後 AOM は AOB として言及する。) どちらの細菌群も酸素を利用するため、酸素に対する親和性がキーとなる。排水処理の分野において、AOB の方が NOB よりも酸素に対する親和性が高いことが報告されている¹³⁾。したがって、酸素供給を制御することにより AOB が優先的に酸素を利用できる可能性があるが、例外もある¹⁴⁾。NOB を抑制する他の因子として遊離アンモニア・遊離亜硝酸が挙げられる。pH, 温度, アンモニウムイオン濃度または亜硝酸濃度により変化する遊離アンモニア濃度¹⁵⁾・遊離亜硝酸濃度¹⁵⁾ への感受性は、NOB の方が AOB よりも高い。排水中のアンモニアや亜硝酸イオン濃度が高くなると、NOB に対する AOB の相対活性が高くなることにより、安定した部分硝化の達成が可能である。筆者のグループでも、人工排水や半導体排水などによりこの現象を確認してきた^{16,17)}。また、水温に関しては高温の方が AOB の増殖速度が NOB に比べて相対的に高くなるため、温度が 30°C 以上になると部分硝化の達成が容易になる¹⁸⁾。これらの報告を鑑みると、下水処理施設における嫌気消化の脱離液¹⁹⁾、埋立地浸出水²⁰⁾、産業排水²¹⁾ などに対しては、部分硝化の達成は比較的容易で、部分硝化-Anammox 法の実用例が数多くある²²⁾。

近年の Anammox プロセスの潮流は、実下水施設 (いわゆる、下水処理のメインストリーム) への適用である (図 2a)。図 2 に示すサイドストリーム内に部分硝化-

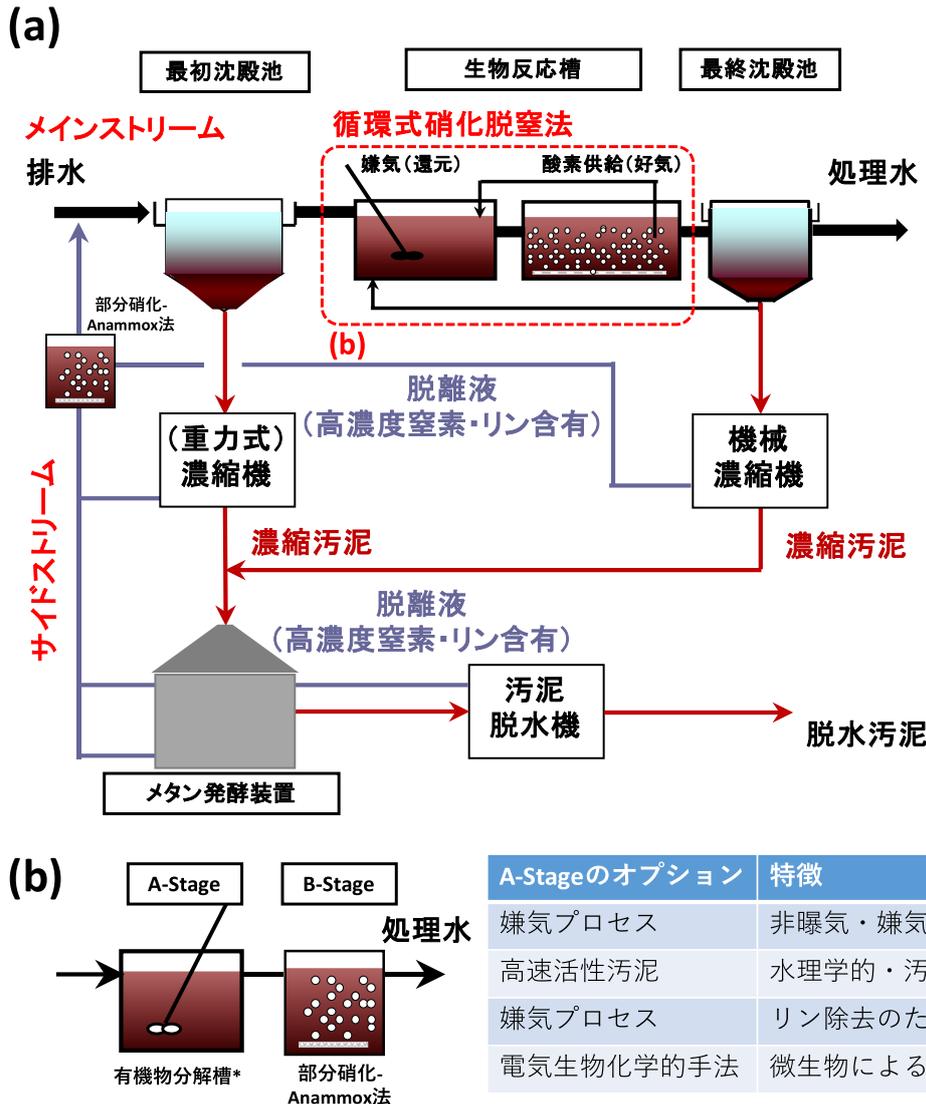


図2. 部分硝化-Anammox 法の下水処理施設への導入：(a) サイドストリーム法のプロセス概要；(b) メインストリームに導入される A-Stage・B-Stage のオプション

Anammox 法の反応槽がある場合、これを種汚泥としてメインストリームに送る方法が検討されている²³⁾。また、近年の Anammox 細菌の生理生態解析により、当初言われていた 11 日²⁴⁾ という長い倍加時間よりも短いことが再認識され²⁵⁾、スタートアップの時間も当初の想定よりも短くなるのが期待できる。上記の理由により、循環式硝化脱窒法を代替するプロセスとして部分硝化-Anammox 法の適用が注目されている。メインストリームの部分硝化-Anammox 法を用いたプロセスは、A-Stage といわれる有機物除去槽と B-stage といわれる部分硝化-Anammox 法の窒素除去槽に分かれる (図 2b)。エネルギーを大量に消費する従来の硝化脱窒法に比べ、曝気量と余剰汚泥の削減による低コスト化や、A-Stage に嫌気処理を導入してメタンを回収するオプションもあり、創エネも期待できる。

一方、メインストリームの部分硝化-Anammox 法では、窒素化合物濃度は数十 g-N/m³ 程度であり、脱離液・産業排水の濃度範囲よりも 1 桁低い。したがって、調整できる遊離アンモニア・遊離亜硝酸濃度も低く、こ

れらを利用した NOB の活性抑制は望めない。また、下水は年間を通して水温が変動し、冬場では硝化活性が劇的に下がる温度領域 (15°C 以下) になる。この温度領域では、30°C 以上の温度領域とは逆に NOB の相対活性が AOB に比べて高くなることから、部分硝化の達成は困難である^{26,27)}。さらに、温度低下により Anammox の活性は大幅に落ちる。下水処理のメインストリームにおける部分硝化-Anammox を達成するには寒冷地ではまだ課題が多く、東南アジアなど熱地域での適用が比較的進みやすいと考えられている。しかしながら、200,000 m³/day のシンガポールにある下水処理施設に部分硝化-Anammox を適用した際、これまでの観察に反し、溶存酸素濃度を低下すると NOB の AOB に対する相対活性が増大する結果が得られている¹⁴⁾。長期運転により、バイオマス中に存在する NOB が *Nitrobacter* 属から *Nitrospira* 属に優占種がシフトすることが確認されており、長期運転により酸素に対する親和性が高い NOB が増加することが不安定な部分硝化の原因となっている。現時点ではメインストリームでの部分硝化-

Anammox 法の実用化に至っておらず、安定運転にはまだ課題が多い。

3. 亜酸化窒素の放出：窒素除去の高度化の弊害

部分硝化-Anammox 法は、窒素除去の省エネ・低コスト化に貢献できるため、安定性の課題が解決されれば、世界規模での普及展開が期待できる。一方、省エネ・低コスト化と表裏一体になるのは温室効果ガスである亜酸化窒素 (N_2O) の排出である。部分硝化は AOB に対して NOB の活性を相対的に下げることにより亜硝酸イオンを蓄積させるプロセスであるが、亜硝酸イオンは N_2O 生成の前駆体であるため、 N_2O 生成の温床となる。部分硝化-Anammox 法の後段を担う Anammox 細菌は、その代謝経路に N_2O 生成を保有しないが、前段の部分硝化による N_2O 生成量が非常に多いため、この方法の N_2O 生成の総量が従来の硝化脱窒法による N_2O 生成の総量よりも多くなることが報告されている^{28,29)}。つまり、窒素除去を行う水処理技術において、省エネと N_2O 排出の間にトレードオフが生じる。 N_2O の排出経路は、AOB・AOA や脱窒細菌の生化学的な生成^{30,31)}のみならず、アンモニア酸化の中間生成物であるヒドロキシルアミンを介する非生物学的な経路^{32,33)}も存在し、生成を抑制することは容易ではない。 N_2O の生成経路に関する最新の情報は、Stein の総説を参照されたい³⁴⁾。

N_2O の排出削減を目指す際、 N_2O 生成を抑制する一方、 N_2O 消費を加速させる戦略も有効である。水処理における N_2O 消費に関しては、 N_2O 還元を担う N_2O 還元細菌の生理生態に関する研究が進められている。 N_2O 還元を担う細菌群の多くは脱窒細菌であり、脱窒細菌は数ステップの脱窒反応を担う酵素群のカスケード反応を進める。よって、最後の N_2O 還元反応が停止すると N_2O 排出の原因となり得る。したがって、脱窒酵素である亜硝酸還元酵素を有していない非脱窒性の N_2O 還元細菌の生理生態の解明が重要である。多くの非脱窒性の N_2O 還元細菌は、新たに分類された *nosZ* clade II タイプ^{35,36)}と報告されている。議論が分かれているが、*nosZ* clade II タイプの非脱窒性 N_2O 還元細菌は N_2O に対する親和性が高いことが報告されており³⁷⁾、非脱窒性 N_2O 還元細菌の N_2O シンクとしての利用が期待されている³⁸⁾。

N_2O 還元細菌を用いた N_2O 削減技術の大きな課題は、 N_2O 還元を担う N_2O 還元酵素が酸素³⁹⁾ や硫化水素⁴⁰⁾により容易に酵素活性を失う点にある。排水処理施設は、排水の流量・濃度・温度変動が常に起こる極めてダイナミックな系である。したがって、これらの阻害因子に対して耐性がある細菌群の獲得は N_2O 削減に大きなアドバンテージを有する。著者のグループが排水処理施設から集積培養の後に獲得した *nosZ* clade II の脱窒性 N_2O 還元細菌である *Azospira* sp.⁴¹⁾は、比較的高い溶存酸素濃度でも N_2O 還元能を示し、また、酸素曝露後、再度嫌気条件に移せば N_2O 還元活性の回復も早いことが見出された³⁹⁾。また、この細菌をゲルに包括固定した際、ゲルにより酸素曝露の影響を低減可能であり、バルク液の溶存酸素濃度が高くなっても N_2O 還元を進行させることが可能であった⁴²⁾。排水処理施設の窒素除去プ

ロセスから排出される N_2O は、今後さらに増加することが予想される⁴³⁾。 N_2O 還元細菌の生理生態に関する基礎研究の深化や、ゲル固定化やオーグメンテーション⁴⁴⁾などの適用技術の開発・評価といった、双方の進展が必要不可欠である。

4. 窒素除去から回収へ：微生物タンパク質の利用可能性

排水中に含まれる窒素化合物のマネジメントの新トレンドとして、資源回収の技術が開発されている。その中でも、エネルギー投資により排水中の栄養塩を無害化するのではなく、価値のある物質へ変換するアップサイクリング技術の適用が検討されている⁴⁵⁾。このアップサイクリング技術では、水素を資化する水素酸化細菌を用い、高濃度に窒素化合物をタンパク質として細胞内に蓄積させる。微生物タンパク質として、タンパク質含有量の高い微生物バイオマスを回収するコンセプトは、バイオリクターを用いた水素酸化細菌 *Sulfuricurvum* spp. を優占種とする微生物コンソーシアムの集積により有効性が確認されている⁴⁶⁾。この集積培養では、水素・二酸化炭素・空気を混合したガスを供給し、500–1,200 mg-N/L のアンモニアを含む培地を供給し、半回分培養や連続培養を行うことで達成されている。その結果、*Sulfuricurvum* spp. を優占種とする集積バイオマスから回収されたタンパク質の割合は、魚粉や大豆粕に含まれるタンパク質の割合より高く、良質なタンパク源として期待されている。畜産業や食品系の産業排水に含まれる窒素濃度は、下水に対して1–2桁高いため、これらの排水由来の窒素化合物を微生物タンパク質として転換できれば、家畜飼料として供給する窒素リサイクル技術の確立につながる。このようなコンセプトは、飼料・食料問題が顕在化している21世紀において、極めて有用である。近年の実現可能性に関する研究では、微生物タンパク質の製造システムの適切な利用により、農業地から流出する窒素の地下水や水圏環境への流亡を抑え、温室効果ガス排出量の削減にも貢献できることが試算されている⁴⁷⁾。高濃度にタンパク質を蓄積できる細菌種の探索、バイオリクターの運転条件の最適化、ライフサイクルコスト・必要エネルギー・温室効果ガスの試算といった、基礎研究から社会実装化までを継ぎ目無く行うことが今後求められる。

5. おわりに

21世紀の人口増加に伴う食糧生産の増加は、より多くの反応性窒素を地球環境に残存させる要因となった。人類はこれまでにない窒素過剰な環境下で生存しており、適切な窒素マネジメントは必須である。窒素の削減・回収技術を実施する際、(1)食料生産と環境汚染、(2)排水処理の省エネ化と温室効果ガスの排出、(3)アップサイクリング技術の確立とコストといった、3つのトレードオフに直面する。これらのトレードオフを打破する方法論の確立、もしくはトレードオフを甘受しつつも最適な解を導いていく必要がある。

本稿で紹介した技術は、水処理において実用化が期待されるごく一部のものである。本稿で紹介していない技

術も含め、既存技術が全て新技術に取って代わることはまずないと考える。水処理を行う場所の気候、排水組成、負荷変動等、その特性はケースバイケースであり、新技術がぴたりと当てはまるのが無いからである。窒素マネジメントのみならず、水処理に関して重要と考えられることは、様々な技術のメリット・デメリットを理解し、条件に応じて適切なものを吟味・選択することである。そのために、新技術の開発と実現可能性を含めた性能評価を包括的に進めていくことが必要不可欠である。微生物学や環境バイオテクノロジーに携わる研究者と、プロセス工学が専門の研究者・技術者との垣根を越えた連携を期待したい。

文 献

- Rittmann, B.E. and P.L. McCarty. 2001. *Environmental Biotechnology: Principles and Application*, McGraw-Hill Book Co., New York.
- 厚生労働省健康局がん対策・健康増進課栄養指導室, 「日本人の食事摂取基準 (2015 年版) 策定検討会」報告書, (平成 31 年 3 月 28 日閲覧), 2014.
- Fowler, D., C.E. Steadman, D. Stevenson, M. Coyle, R.M. Rees, U.M. Skiba, M.A. Sutton, J.N. Cape, A.J. Dore, M. Vieno, D. Simpson, S. Zaehle, B.D. Stocker, M. Rinaldi, M.C. Facchini, C.R. Flechard, E. Nemitz, M. Twigg, J.W. Erisman, K. Butterbach-Bahl, and J.N. Galloway. 2015. Effects of global change during the 21st century on the nitrogen cycle. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 15: 13849–13893.
- Shibata, H., J.N. Galloway, A.M. Leach, L.R. Cattaneo, L. Cattell Noll, J.W. Erisman, B. Gu, X. Liang, K. Hayashi, L. Ma, T. Dalgaard, M. Graversgaard, D. Chen, K. Nansai, J. Shindo, K. Matsubae, A. Oita, M.C. Su, S.I. Mishima, and A. Bleeker. 2017. Nitrogen footprints: Regional realities and options to reduce nitrogen loss to the environment. *Ambio*. 46: 129–142.
- Rockstrom, J., W. Steffen, K. Noone, A. Persson, F.S. Chapin, E.F. Lambin, T.M. Lenton, M. Scheffer, C. Folke, H.J. Schellnhuber, B. Nykvist, C.A. de Wit, T. Hughes, S. van der Leeuw, H. Rodhe, S. Sorlin, P.K. Snyder, R. Costanza, U. Svedin, M. Falkenmark, L. Karlberg, R.W. Corell, V.J. Fabry, J. Hansen, B. Walker, D. Liverman, K. Richardson, P. Crutzen, and J.A. Foley, 2009. A safe operating space for humanity. *Nature*. 461: 472–475.
- Steffen, W., K. Richardson, J. Rockström, S.E. Cornell, I. Fetzer, E.M. Bennett, R. Biggs, S.R. Carpenter, W. de Vries, C.A. de Wit, C. Folke, D. Gerten, J. Heinke, G.M. Mace, L.M. Persson, V. Ramanathan, B. Reyers, and S. Sorlin. 2015. Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science*. 347.
- Sutton, M.A., O. Oenema, J.W. Erisman, A. Leip, H. van Grinsven, and W. Winiwarter. 2011. Too much of a good thing. *Nature*. 472: 159–161.
- Daims, H., E.V. Lebedeva, P. Pjevac, P. Han, C. Herbold, M. Albertsen, N. Jehmlich, M. Palatinszky, J. Vierheilig, A. Bulaev, R.H. Kirkegaard, M. von Bergen, T. Rattai, B. Bendinger, P.H. Nielsen, and M. Wagner. 2015. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*. 528: 504–509.
- van Kessel, M.A.H.J., D.R. Speth, M. Albertsen, P.H. Nielsen, H.J.M. Op den Camp, B. Kartal, M.S.M. Jetten, and S. Lucker. 2015. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*. 528: 555–559.
- Lawson, C.E. and S. Lucker. 2018. Complete ammonia oxidation: an important control on nitrification in engineered ecosystems? *Curr. Opin. Biotechnol.* 50: 158–165.
- Rosso, D., L.E. Larson, and M.K. Stenstrom. 2008. Aeration of large-scale municipal wastewater treatment plants: state of the art. *Water Sci. Technol.* 57: 973–978.
- Lotti, T., R. Kleerebezem, C. Lubello, and M.C.M. van Loosdrecht. 2014. Physiological and kinetic characterization of a suspended cell anammox culture. *Water Res.* 60: 1–14.
- Blackburne, R., Z. Yuan, and J. Keller. 2008. Partial nitrification to nitrite using low dissolved oxygen concentration as the main selection factor. *Biodegradation*. 19: 303–312.
- Cao, Y., B.H. Kwok, M.C.M. van Loosdrecht, G. Daigger, H.Y. Png, W.Y. Long, and O.K. Eng. 2018. The influence of dissolved oxygen on partial nitrification/anammox performance and microbial community of the 200,000 m³/d activated sludge process at the Changi water reclamation plant (2011 to 2016). *Water Sci. Technol.* 78: 634–643.
- Anthonisen, A.C., R.C. Loehr, T.B. Prakasam, and E.G. Srinath. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control Fed.* 48: 835–852.
- Song, K., K. Sawayanagi, T. Numano, Y. Taniichi, T. Kikuchi, T. Takeda, H. Kanou, S. Riya, T. Hori, M. Hosomi, and A. Terada. 2019. High-rate partial nitrification of semiconductor wastewater: Implications of online monitoring and microbial community structure. *Biochem. Eng. J.* 143: 34–40.
- Kinh, C.T., J. Ahn, T. Suenaga, N. Sittivorakulpong, P. Noophan, T. Hori, S. Riya, M. Hosomi and A. Terada. 2017. Free nitrous acid and pH determine the predominant ammonia-oxidizing bacteria and amount of N₂O in a partial nitrifying reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101: 1673–1683.
- Hellinga, A., A.A.J.C. Schellen, J.W. Mulder, M.C.M. van Loosdrecht, and J.J. Heijnen. 1998. The sharon process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Water Sci. Technol.* 37: 135–142.
- Lackner, S., K. Thoma, E.M. Gilbert, W. Gander, D. Schreff, and H. Horn. 2015. Start-up of a full-scale deammonification SBR-treating effluent from digested sludge dewatering. *Water Sci. Technol.* 71: 553–559.
- Ganigué, R., J. Gabarró, A. Sánchez-Melsió, M. Ruscalleda, H. López, X. Vila, J. Colprim, and M.D. Balaguer. 2009. Long-term operation of a partial nitrification pilot plant treating leachate with extremely high ammonium concentration prior to an anammox process. *Bioresour. Technol.* 100: 5624–5632.
- Isaka, K., Y. Kimura, M. Matsuura, T. Osaka, and S. Tsuneda. 2017. First full-scale nitrification-anammox plant using gel entrapment technology for ammonia plant effluent. *Biochem. Eng. J.* 122: 115–122.
- Lackner, S., E.M. Gilbert, S.E. Vlaeminck, A. Joss, H. Horn, and M.C.M. van Loosdrecht. 2014. Full-scale partial nitrification/anammox experiences—An application survey. *Water Res.* 55: 292–303.
- Wett, B., S.M. Podmirseg, M. Gomez-Brandon, M. Hell, G. Nyhuis, C. Bott, and S. Murthy. 2015. Expanding DEMON sidestream deammonification technology towards mainstream application. *Water Environ. Res.* 87: 2084–2089.
- Strous, M., J.J. Heijnen, J.G. Kuenen, and M.S.M. Jetten. 1998. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 589–596.
- Zhang, L., Y. Narita, L. Gao, M. Ali, M. Oshiki, and S. Okabe. 2017. Maximum specific growth rate of anammox bacteria revisited. *Water Res.* 116: 296–303.
- Gilbert, E.M., S. Agrawal, S.M. Karst, H. Horn, P.H. Nielsen, and S. Lackner. 2014. Low temperature partial nitrification/anammox in a moving bed biofilm reactor treating low strength wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 48: 8784–8792.
- Laureni, M., P. Falás, O. Robin, A. Wick, D.G. Weissbrodt, J.L. Nielsen, T.A. Ternes, E. Morgenroth, and A. Joss. 2016. Mainstream partial nitrification and anammox: Long-term process stability and effluent quality at low temperatures. *Water Res.* 101: 628–639.

- 28) Joss, A., D. Salzgeber, J. Eugster, R. König, K. Rottermann, S. Burger, P. Fabijan, S. Leumann, J. Mohn, and H. Siegrist. 2009. Full-scale nitrogen removal from digester liquid with partial nitrification and anammox in one SBR. *Environ. Sci. Technol.* 43: 5301–5306.
- 29) Okabe, S., M. Oshiki, Y. Takahashi, and H. Satoh. 2011. N₂O emission from a partial nitrification-anammox process and identification of a key biological process of N₂O emission from anammox granules. *Water Res.* 45: 6461–6470.
- 30) J.A. Kozłowski, M. Stieglmeier, C. Schleper, M.G. Klotz, and L.Y. Stein. 2016. Pathways and key intermediates required for obligate aerobic ammonia-dependent chemolithotrophy in bacteria and Thaumarchaeota. *ISME J.* 10: 1836–1845.
- 31) Kozłowski, J.A., J. Price, and L.Y. Stein. 2014. Revision of N₂O-producing pathways in the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 4930–4935.
- 32) Terada, A., S. Sugawara, K. Hojo, Y. Takeuchi, S. Riya, W.F. Harper, Jr., T. Yamamoto, M. Kuroiwa, K. Isobe, C. Katsuyama, Y. Suwa, K. Koba, and M. Hosomi. 2017. Hybrid nitrous oxide production from a partial nitrifying bioreactor: Hydroxylamine interactions with nitrite. *Environ. Sci. Technol.* 51: 2748–2756.
- 33) Soler-Jofra, A., B. Stevens, M. Hoekstra, C. Picioreanu, D. Sorokin, M.C.M. van Loosdrecht, and J. Pérez. 2016. Importance of abiotic hydroxylamine conversion on nitrous oxide emissions during nitrification of reject water. *Chem. Eng. J.* 287: 720–726.
- 34) Stein, L.Y. 2019. Insights into the physiology of ammonia-oxidizing microorganisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 49: 9–15.
- 35) Sanford, R.A., D.D. Wagner, Q.Z. Wu, J.C. Chee-Sanford, S.H. Thomas, C. Cruz-Garcia, G. Rodriguez, A. Massol-Deya, K.K. Krishnani, K.M. Ritalahti, S. Nissen, K.T. Konstantinidis, and F.E. Löffler. 2012. Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 19709–19714.
- 36) Jones, C.M., D.R.H. Graf, D. Bru, L. Philippot, and S. Hallin. 2013. The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: A potential nitrous oxide sink. *ISME J.* 7: 417–426.
- 37) Yoon, S., S. Nissen, D. Park, R.A. Sanford, and F.E. Löffler. 2016. Nitrous oxide reduction kinetics distinguish bacteria harboring clade I NosZ from those harboring clade II NosZ. *Appl. Environ. Microbiol.* 82: 3793–3800.
- 38) Hallin, S., L. Philippot, F.E. Löffler, R.A. Sanford, and C.M. Jones. 2018. Genomics and ecology of novel N₂O-reducing microorganisms. *Trends Microbiol.* 26: 43–55.
- 39) Suenaga, T., S. Riya, M. Hosomi, and A. Terada. 2018. Biokinetic characterization and activities of N₂O-reducing bacteria in response to various oxygen levels. *Front. Microbiol.* 9: (10 pages).
- 40) Pan, Y.T., L. Ye, and Z.G. Yuan. 2013. Effect of H₂S on N₂O reduction and accumulation during denitrification by methanol utilizing denitrifiers. *Environ. Sci. Technol.* 47: 8408–8415.
- 41) Suenaga, T., T. Aoyagi, M. Hosomi, T. Hori, and A. Terada. 2018. Draft genome sequence of *Azospira* sp. strain I13, a nitrous oxide-reducing bacterium harboring clade II type nosZ. *Genome Announcements.* 6.
- 42) Suenaga, T., R. Aoyagi, N. Sakamoto, S. Riya, H. Ohashi, M. Hosomi, H. Tokuyama, and A. Terada. 2018. Immobilization of *Azospira* sp strain I13 by gel entrapment for mitigation of N₂O from biological wastewater treatment plants: Biokinetic characterization and modeling. *J. Biosci. Bioeng.* 126: 213–219.
- 43) Law, Y.Y., L. Ye, Y.T. Pan, and Z.G. Yuan. 2012. Nitrous oxide emissions from wastewater treatment processes. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* 367: 1265–1277.
- 44) Ikeda-Ohtsubo, W., M. Miyahara, S.W. Kim, T. Yamada, M. Matsuoka, A. Watanabe, S. Fushinobu, T. Wakagi, H. Shoun, K. Miyauchi, and G. Endo. 2013. Bioaugmentation of a wastewater bioreactor system with the nitrous oxide-reducing denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain TR2. *J. Biosci. Bioeng.* 115: 37–42.
- 45) Matassa, S., N. Boon, and W. Verstraete. 2015. Resource recovery from used water: The manufacturing abilities of hydrogen-oxidizing bacteria. *Water Res.* 68: 467–478.
- 46) Matassa, S., W. Verstraete, I. Pikaar, and N. Boon. 2016. Autotrophic nitrogen assimilation and carbon capture for microbial protein production by a novel enrichment of hydrogen-oxidizing bacteria. *Water Res.* 101: 137–146.
- 47) Pikaar, I., S. Matassa, B.L. Bodirsky, I. Weindl, F. Humpenoder, K. Rabaey, N. Boon, M. Bruschi, Z. Yuan, H. van Zanten, M. Herrero, W. Verstraete, and A. Popp. 2018. Decoupling livestock from land use through industrial feed production pathways. *Environ. Sci. Technol.* 52: 7351–7359.