

## 5. 4 考察

### 5.4.1 基質のCOD/N比の影響

まず、基質のCOD/N比と窒素除去状態・N<sub>2</sub>O放出量との関連について考察する。

基質のCOD/N比は、処理状態およびN<sub>2</sub>O放出量に大きな影響を与えた。

基質のCOD/N比を2.4~3.5に設定したRun 1-1, 1-2, 2-1, 2-2では、NO<sub>3</sub>-N蓄積型の処理状態となり、高濃度のNO<sub>3</sub>-Nが蓄積した。これは、脱窒のための有機物が窒素分に対して不足していたためであると考えられる。そして、これらの系列において、NO<sub>3</sub>-Nが蓄積している期間に10~45%という高い転換率でN<sub>2</sub>Oが放出された。

Run 1-2では、運転途中に硝化が不調となりNH<sub>4</sub>-Nが高濃度に蓄積した期間があったが、そこではNO<sub>3</sub>-Nは蓄積しなかった。これは、硝化により生成されるNO<sub>3</sub>-N量が減少するため、脱窒菌にとっての実質的なCOD/N比が低下したためであると理解される。本系列では基質のCOD/N比が3.4であったが、硝化不調時のNH<sub>4</sub>-Nは約500 mgN/lであった。その場合、除去されたNH<sub>4</sub>-Nが全量NO<sub>3</sub>-Nへ変換されたと仮定しても、無酸素工程において脱窒菌に供給されるCODとNO<sub>3</sub>-Nの比は4.8であったと計算される。実際には、除去されたNH<sub>4</sub>-Nのうちで無視できない割合が好気性の従属栄養細菌の増殖に使用されたと考えられるので(Hanaki et al., 1990a)、脱窒菌に供給される実質的なCOD/N比はより大きかったと予想できる。そして、この期間にはN<sub>2</sub>O放出量は転換率で1%以下と極端に小さかった。

一方、基質のCOD/N比を5.0~5.6に設定したRun 1-3およびRun 2-3では、脱窒は常時良好に進行され、NO<sub>3</sub>-Nの蓄積が観察されることはなかった。そこでのN<sub>2</sub>O放出量は小さく抑えられ、好気工程のDOを低濃度に制御した場合を除いて、転換率は概ね1%以下であった。ただし、Run 1-3では長期にわたって硝化が不調となったが、この点は後に考察の対象とする。

上の結果の中で、(a)脱窒が完遂されずNO<sub>3</sub>-Nが蓄積した状態において大量のN<sub>2</sub>O放出が見られた、(b)脱窒が完全におこなわれておりさえすればN<sub>2</sub>O放出量は極端に小さく抑制された、という2点より、脱窒が完全におこなわれるか否かがN<sub>2</sub>O放出量を大きく左右する因子であると考えることができ。これは、実し尿処理施設の間欠曝気槽において脱窒が良好であった場合にN<sub>2</sub>O放出量が小さかった傾向に合致している(第4章)。

実際、N<sub>2</sub>O放出量が大きかった場合に、1サイクルの中では無酸素工程での放出量が卓越しており、脱窒過程でN<sub>2</sub>Oが生成されていたことを示唆している。これを検証するための検討結果については第6章で述べる。

ただし、ここで見られた大量のN<sub>2</sub>O放出に対して、(a)脱窒が不完全であったこと自体が寄与したのか、(b)蓄積したNO<sub>3</sub>-Nの影響であるのか、(c)他の原因が存在するのか、については、本章の結果からは判断できない。この点については、第7章で詳細な検討をおこなった。

一方、Run 1-2およびRun 1-3において、硝化が不調となり高濃度のNH<sub>4</sub>-Nが蓄積した条件であってもN<sub>2</sub>O放出量は小さかったことから、硝化の良否はN<sub>2</sub>O放出量に大きく影響しないことが予想される。もちろん、NH<sub>4</sub>-Nが蓄積している場合には変換を受ける窒素量が減少するため、それに応じてN<sub>2</sub>O放出量が減少した効果もそこには含まれている。しかし、ここで見られたN<sub>2</sub>O放出量の大きな違いは、このような変換される窒素量の違いで説明できるほど小さなものではない。実際、Run 1-2におけるNH<sub>4</sub>-N蓄積型とNO<sub>3</sub>-N蓄積型の各状態の窒素収支を比較すると、窒素除去率自体には大きな違い

が無いにもかかわらず、NH<sub>4</sub>-N蓄積型の状態ではN<sub>2</sub>O放出量が極端に小さかったことが分かる(図5.12)。

ここまでの議論より、基質のCOD/N比が小さいために脱窒が完遂されず、NO<sub>3</sub>-Nが高濃度に蓄積されている条件ではN<sub>2</sub>O放出量が大きく、一方で、脱窒が完全に進行してさえいれば、硝化の良否には関わらずN<sub>2</sub>O放出量は小さく抑えられるのではないかと考えることができる。そして、前者の場合には無酸素工程で顕著なN<sub>2</sub>O放出が起こったことから、そこでのN<sub>2</sub>O生成に対しては脱窒が重要であることが予想できる。

ただし、Run 2-3において好気工程のDOを0.5~1.1 mg/lに制御した場合に見られたように、非常に良好な窒素除去がおこなわれているにも関わらず、N<sub>2</sub>O放出量が転換率で4~18%と大きかった場合もあったことには留意する必要がある。これに関しては、5.4.2で触れる。

上で、Run 1-1, 1-2, 2-1, 2-2では、基質のCOD/N比が小さいために脱窒のための有機物が不足し高濃度のNO<sub>3</sub>-Nが残留したと考察した。ここで、設定したCOD/N比が、これらの系列で見られたような高濃度のNO<sub>3</sub>-N蓄積をもたらすほど小さかったのかどうかを考えてみる。

NO<sub>3</sub>-NからN<sub>2</sub>ガスまでの脱窒に必要なCOD/N比は、化学量論的には2.86である。実際には、脱窒菌や他の細菌の増殖によってもCODが消費されるため、必要COD/N比はこれよりも大きくなると考えられ、活性汚泥中での脱窒に必要なCOD/N比は3.5~4.5程度であると言われる(Henze et al., 1994)。

この値と上で挙げた各系列に投入した基質のCOD/N比とを比較すると、まず、Run 1-1ではCOD/N比が2.4であるので明らかに有機物が不足していたと言える。基質中の有機物が全て脱窒に使用され、基質中のNH<sub>4</sub>-Nが好気工程において全てNO<sub>3</sub>-Nに変換されると仮定すれば、脱窒に必要なCOD/N比が

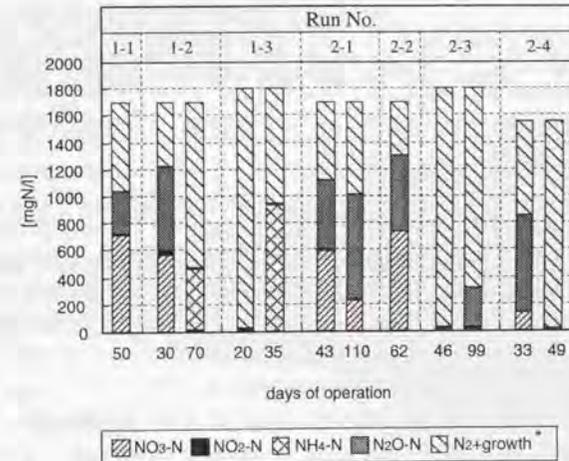


図 5.12 各運転系列における窒素収支

\*. (流入窒素)-(NH<sub>4</sub>-N+NO<sub>3</sub>-N+NO<sub>2</sub>-N+N<sub>2</sub>O-N)=(N<sub>2</sub>+増殖に使用された分)と見なした。

3.5~4.5である場合、基質のCOD/Nが2.4の条件では混合液中に530~800 mgN/lのNO<sub>3</sub>-Nが残留すると算出される。実際には、NH<sub>4</sub>-Nの一部は菌体へも転換されるため、残留するNO<sub>3</sub>-Nはこれより小さいはずである。これとRun 1-1において見られたNO<sub>3</sub>-N (700~800 mgN/l)とを比較すると、後者の方が高濃度であると言える。基質のCOD/N比を3.4~3.5に設定した系列についても同様の仮定を用いて算出をおこなうと、予想される残留NO<sub>3</sub>-Nは0~380 mgN/lである。Run 1-1, 1-2, 2-1, 2-2において蓄積したNO<sub>3</sub>-Nは、これよりも明らかに大きかった。

すなわち、上に挙げた各系列においては、基質のCOD/N比から想定される濃度よりも高濃度のNO<sub>3</sub>-Nが残留したと言える。

これをもたらした要因については、7.2節および7.3節で明らかにする。

Run 1-2およびRun 1-3では、運転途中で硝化が不調となりNH<sub>4</sub>-Nが蓄積する現象が起こった。特に、Run 1-3ではその傾向が顕著であり、5.3.1で述べたような種々の対策を講じたにも関わらず、最終的に安定した硝化を実現することができなかった。そこで、このように硝化が阻害を受けた理由についても考察しておく。

活性汚泥において、有機物負荷を高くすると硝化が抑制されることはしばしば報告されている(Painter, 1970)。その要因としては、以下の点が考えられる。

- (a) 従属栄養細菌との間で酸素をめぐる競争が起こる。特に、亜硝酸酸化菌の方が低DO条件に対する感受性が高いことが知られており(Hanaki *et al.*, 1990b)、まず亜硝酸酸化の段階が阻害を受けることが予想される。
- (b) 従属栄養細菌との間でNH<sub>4</sub>-Nをめぐる競争が起こる。Hanaki *et al.* (1990a)は、従属栄養細菌によるNH<sub>4</sub>-Nの同化が硝化に優先して起こることを見出している。
- (c) 従属栄養細菌の存在自体が硝化菌の増殖を抑制する。Hanaki *et al.* (1990a)は、有機物負荷が高い条件では、アンモニア酸化菌の増殖速度をMonod型のモデルで表現した場合の半飽和定数(K<sub>s</sub>)が増加することを見出した。その要因としてアンモニア酸化菌が従属栄養細菌により空間的な制限を受けた可能性が高いことが指摘されている。一方、亜硝酸酸化菌に対しては、そのような阻害が起こらなかった。

Run 1-2およびRun 1-3においても、有機物負荷による硝化の阻害が起こったと考えられる。これらの系列においては好気工程のDOを制御しなかったため、見かけ上は十分なDO (4 mg/l以上)が混合液中に確保されていた。しかしながら、本リアクターの生物濃度が高く、また有機物負荷が高い系列ほど生物濃度が高い傾向があったことから、上の(c)に示した機構のように、硝化菌の周囲に従属栄養細菌が密集し、硝化菌が酸素ないしはNH<sub>4</sub>-Nの制限を受けた可能性が高いと考えられる。その結果、当初設定した20日というSRTでは硝化菌がwash outされたものと思われる。

SRTを長くとしたRun 2-1およびRun 2-3においては、好気工程のDOを低濃度に制御したにも関わらず硝化が大きく阻害を受けることは無かったことから、Run 1-2やRun 1-3においても、十分なSRTを確保してやれば硝化は阻害を受けなかったと考えられる。

基質のCOD/N比が小さい条件で運転をおこなった場合に大量に放出されたN<sub>2</sub>Oが、真に脱窒に由来

するのかどうかについては、第6章で検討する。また、そこでのN<sub>2</sub>O生成機構については、第7章で検討する。

#### 5.4.2 好気工程のDOを低濃度に制御した影響

DO制御を実施したRun 2-1およびRun 2-3では、当初は好気工程のDOが0.7~1.3 mg/lの条件で運転された。しかしながら、硝化はその影響を受けず、混合液中にNH<sub>4</sub>-NおよびNO<sub>2</sub>-Nはほとんど残留しなかった。SRTが十分に確保されれば、この程度のDO条件では十分に硝化が進行することが分かる。

この条件ではN<sub>2</sub>O放出に対する影響も小さかった。投入基質のCOD/N比を等しくし好気工程のDOのみが異なるRun 2-1とRun 2-2とでは、N<sub>2</sub>O放出量・サイクル内でのN<sub>2</sub>O放出パターンともに違いが見られず、いずれの系列においても無酸素工程の後半に大きなN<sub>2</sub>O放出が見られた。基質のCOD/N比が高いRun 2-3においては、確かに好気工程でN<sub>2</sub>O放出速度が増加する傾向があったが、転換率は概ね1%以下と小さかった。

ところが、運転途中でDOの設定値をさらに下げたところ、両系列に影響が現れた。

Run 2-1では、59日目以降好気工程のDOを0.3~0.8 mg/lにまで引き下げた運転を実施したところ、N<sub>2</sub>O放出量が増加し、転換率は最大で46%に達した。ただし、この放出量増加に対しては無酸素工程でのN<sub>2</sub>O放出量の増加が主要な要因であった。好気工程での硝化の進行およびN<sub>2</sub>O放出量には、影響が見られなかった。

無酸素工程でのN<sub>2</sub>O放出量の増加に対しては、脱窒率が増加したことの寄与が大きいと考えられる。流入窒素分当たりの転換率で見ただけでは確かにDO条件変更後の転換率増加が認められたが、脱窒量当たりの転換率を計算すると、50%程度で大きくは変化していなかった(図5.12)。すなわち、好気工程のDOを0.3~0.8 mg/lに引き下げた後であっても、依然として脱窒過程からのN<sub>2</sub>O放出が主要であり、脱窒により変換される窒素量が増加した分、N<sub>2</sub>O放出量も増加したと考えることができる。

ここで、本系列において80日目以降に残留NO<sub>3</sub>-N濃度が減少した理由は不明である。そのきっかけとなったのは77日目に事故として起こった気体流入の停止であるが、そこから想定されるのは一時的なNO<sub>3</sub>-N濃度の減少であり、以降もその濃度で維持された要因は見当たらない。

一方、Run 2-3では、81日目以降好気工程のDOを0.5~1.1 mg/lへと引き下げたことによって、好気工程からのN<sub>2</sub>O放出量が増加した。10%以上の高い転換率もしばしば観測されており、5.4.1で述べたような無酸素工程からの放出だけでなく、好気工程からの放出量も無視できないことがあることが分かる。

ここでは、好気工程のDOを引き下げたことによって硝化に影響を受けたことが予想されるが、好気工程終了時にはNH<sub>4</sub>-Nが残留しておらず、NH<sub>4</sub>-N酸化が大きく阻害を受けた様子は見受けられなかった。一方、好気工程の終了時に低濃度ではあるがNO<sub>2</sub>-Nが蓄積されるようになったことから、亜硝酸酸化が阻害を受けたことが予想される。これは、亜硝酸酸化菌の方が低DO条件に対する感受性が高いという既存の知見(Hanaki *et al.*, 1990b)に合致する結果である。

このことがN<sub>2</sub>O放出に対してどのように影響したのか、あるいは、ここでのN<sub>2</sub>O生成が硝化と脱窒のいずれによるのか、などについては本結果からは明らかでない。これらの点に関して、第6章および第9章で検討する。

### 5.4.3 メタノール投入の影響

投入基質のCOD/N比を3.5に設定し、混合液中にNO<sub>3</sub>-Nが高濃度に蓄積されていた運転系列Run 2-2に対してメタノールを投入することにより(Run 2-4)、NO<sub>3</sub>-N濃度が徐々に減少した(図5.8(b))。これは、脱窒菌が利用可能な有機物量が増加したためであると解釈できる。

メタノールの代謝経路は有機酸やグルコースなどとは異なっており、汚泥の馴養条件によってはメタノールを唯一の有機物源とした場合に脱窒が全く進行しないことが知られている(Akunna *et al.*, 1993)。しかし、本リアクターにおいてはNO<sub>3</sub>-Nの減少がメタノール投入開始直後から観測されたことから、酢酸を有機物源とした運転で馴養された脱窒菌がメタノールを利用する代謝経路をも有していたことが予想される。ただし、メタノール投入を開始した直後においては好気工程終了時にNH<sub>4</sub>-NおよびNO<sub>2</sub>-Nが低濃度残留したことから、その時期にあっては投入されたメタノールの一部が好気工程に持ち越され、硝化に影響を与えた可能性が想定される。すなわち、無酸素工程において、NO<sub>3</sub>-Nが十分量存在するにも関わらずメタノールを全量消費することができなかったと考えることができる。

メタノールを唯一の有機物源とした脱窒処理では脱窒菌相が通常とは異なることが報告されているが(Nurse, 1980; Timmermans & Haute, 1983)、本系列において脱窒菌相がどの程度変化したのかは明らかでない。

N<sub>2</sub>O放出は、投入基質とメタノールが混合された状態でのCOD/N比が5.5となるような量のメタノールを与えた場合に、転換率が1%以下にまで抑制された。このことから、基質のCOD/N比が小さくN<sub>2</sub>Oが大量発生している場合の対処法として、メタノール投入が効果的であることが分かる。

ただし、酢酸を主要な有機物源とした場合にはCOD/N比が5.0の条件でN<sub>2</sub>Oがほとんど発生しなかったのに対して(Run 2-3)、メタノールを加えて同じCOD/N比を達成した場合には、放出量が一時的に減少したもののその後再び増加し、N<sub>2</sub>O放出を抑制するには至らなかった点には注意が必要である。

この点も含めて、メタノール投入によるN<sub>2</sub>O放出抑制効果については7.8節で考察する。

## 5.5 まとめ

本章では、高負荷間欠曝気式の条件で運転された実験室規模リアクターにより、基質のCOD/N比、好気工程のDO、メタノール投入、という各因子がN<sub>2</sub>O放出量に与える影響について調べた。

主な結果は以下の通りである。

- (1) 基質のCOD/N比を2.4~3.5に設定すると、脱窒が完遂されずにNO<sub>3</sub>-Nが残留し、大量のN<sub>2</sub>O放出が観測された(図5.13)。これらの条件では、流入窒素当たりのN<sub>2</sub>O転換率が10~45%であった。一方、COD/N比を5.0~5.5に設定した場合には、脱窒が良好に進行し、また、N<sub>2</sub>O放出量は小さく転換率は概ね1%以下であった(図5.13)。これより、脱窒の良否がN<sub>2</sub>O放出量に大きく影響すると考えられた。この傾向は、好気工程のDOが高い運転条件下だけでなく、DOを1 mg/l前後と実施レベルに制御した運転においても確認された。
- (2) COD/N比を高く設定した運転では硝化が阻害を受け高濃度のNH<sub>4</sub>-Nが蓄積することがあったが、脱窒が良好におこなわれている限りN<sub>2</sub>O放出量は小さかった(図5.13)。

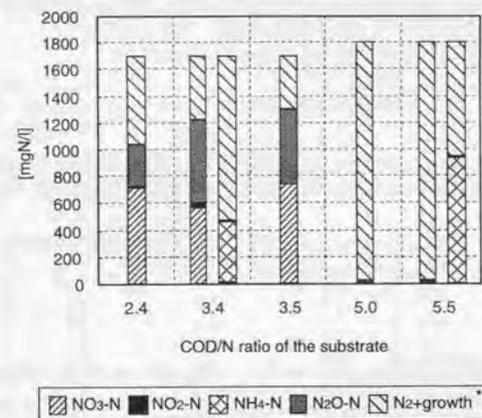


図5.13 実験室規模リアクターにおいて異なるCOD/N比の基質で運転したときの窒素収支  
\* (流入窒素)-(NH<sub>4</sub>-N+NO<sub>2</sub>-N+NO<sub>3</sub>-N+N<sub>2</sub>O-N)=(N<sub>2</sub>+増殖に使用された分)と見なした。

- (3) 基質のCOD/N比を3.5に設定した系列では、好気工程のDOを0.3~0.8 mg/lに制御しても硝化は影響を受けず、好気工程でのN<sub>2</sub>O放出傾向にも変化が見られなかった(図5.14)。一方、COD/N比を5.0に設定した系列では、好気工程のDOを0.5~1.1 mg/lに制御すると、好気工程でのN<sub>2</sub>O放出量が増大した(図5.14)。このとき、硝化過程で亜硝酸酸化のみが阻害を受けたことが示唆された。

(4) 基質のCOD/N比を3.5に設定しN<sub>2</sub>Oを大量に発生していた系列にメタノールを投入し、脱窒過程からのN<sub>2</sub>O放出に対する抑制効果を検証した。メタノール添加によりN<sub>2</sub>O転換率が1%以下にまで抑制されたが、酢酸を主要な有機物とした系列の運転結果から想定されるよりも多量の投入を要した(図5.15)。

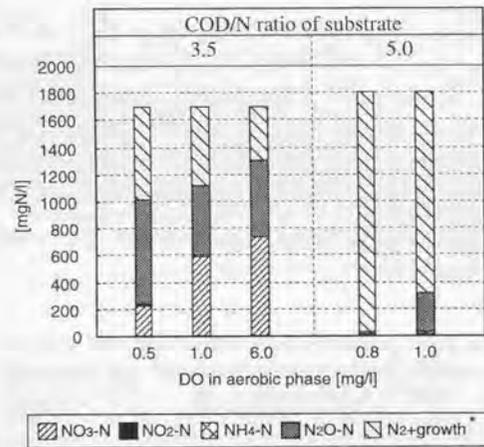


図5.14 実験室規模リアクターにおいて好気工程のDOを変化させたときの窒素収支  
 \*(流入窒素)-(NH<sub>4</sub>-N+NO<sub>2</sub>-N+NO<sub>3</sub>-N+N<sub>2</sub>O-N)=(N<sub>2</sub>+増殖に使用された分)と見なした。

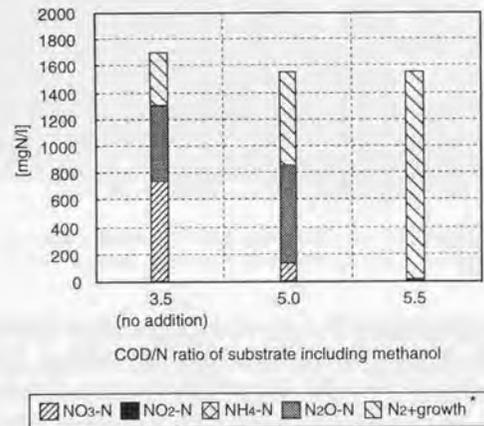


図5.15 実験室規模リアクターにおいて基質と同時にメタノールを投入した運転条件での窒素収支  
 \*(流入窒素)-(NH<sub>4</sub>-N+NO<sub>2</sub>-N+NO<sub>3</sub>-N+N<sub>2</sub>O-N)=(N<sub>2</sub>+増殖に使用された分)と見なした。

## 第6章 N<sub>2</sub>O生成に対する 硝化と脱窒の寄与率推定

- 6. 1 結論
- 6. 2 実験方法
- 6. 3 N<sub>2</sub>O起源の推定方法
- 6. 4 結果
- 6. 5 考察
- 6. 6 まとめ

### 6. 1 結論

本章では、第5章で述べた実験室規模リアクターにおけるN<sub>2</sub>Oの発生に対する硝化と脱窒の寄与率を推定した結果について記述する。手法としては、窒素の安定同位体<sup>15</sup>Nをトレーサーとした回分実験を使用した。

第5章では、高負荷間欠曝気式の実験室規模リアクターを様々な運転条件で運転した際の、運転条件およびその結果としての処理状態がN<sub>2</sub>O放出量に与える影響を検討した。

また、運転サイクル中での気相のN<sub>2</sub>O濃度の挙動に着目し、顕著なN<sub>2</sub>O放出が見られた時期が運転条件によって異なることを指摘した。すなわち、N<sub>2</sub>O放出量が大きかった二つのケースについて見ると、投入基質のCOD/N比が小さい条件では無酸素工程の後半における放出が主要であり(Run 1-1, 1-2, 2-1, 2-2)、基質のCOD/N比が高く好気工程のDOが低濃度である条件では主に好気工程からN<sub>2</sub>Oが放出された(Run 2-3においてDOを0.8 mg/l前後に制御した場合)。前者についてはN<sub>2</sub>Oが脱窒過程で生成されている可能性が高い点を指摘したが、好気工程でのN<sub>2</sub>O生成が硝化に由来し無酸素工程での生成が脱窒に由来することは、必ずしも自明ではない。好気工程においても脱窒が、また無酸素工程においても硝化が進行する可能性があるためである。

まず、好気工程に脱窒が進行しその過程でN<sub>2</sub>Oが生成される可能性について考えてみる。活性汚泥法において、好気条件であるにも関わらず脱窒が進行する現象が観察されているが、それ

に対する説明として以下のものを挙げる事ができる(石川ら, 1982)。

- (a) 槽内が局部的に無酸素条件となる。
- (b) 汚泥フロック内部が無酸素条件となる。
- (c) 好気条件で脱窒をおこなう細菌が存在する。

本リアクターの生物濃度がMLSSで10,000~15,000 mg/l程度と高濃度であった点は、好気工程であっても局所的な無酸素領域が生じていた可能性を支持するものである。すなわち、好気工程においてDO計の指示値が好気条件を示している場合でも、局所的に脱窒が起こっていた可能性があると言える。

フロック内部に生じた無酸素条件に関しては、本リアクターが膜分離式でありフロックの形成が活発でないことから、沈殿により固液分離をおこなう活性汚泥と比較すると、その可能性は小さいものと見なされる。実際、Zhang (1997)は、通常の活性汚泥のフロック径が50~400  $\mu\text{m}$ であったのに対して、膜分離活性汚泥のフロック径が4~40  $\mu\text{m}$ と明らかに小さかったことを報告している。

好気条件であっても脱窒をおこなう細菌は実際に報告されているが(Robertson & Kuenen, 1990a,b; 山田ら, 1993)、その代表種とも言える*Thiosphaera pantotropha*は元来活性汚泥から単利されたものである(Robertson & Kuenen, 1990b)。また、活性汚泥中で普通に見られる*Paracoccus denitrificans*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas stutzeri*などの脱窒菌が好気条件下でも脱窒をおこなうことが明らかにされている(Lloyed *et al.*, 1987; Kathryn *et al.*, 1989)。したがって、本研究で運転したリアクター中にも好気性脱窒菌が息していることは十分に考えられる。そして、菌種によっては好気条件下の脱窒において高い生成率で $\text{N}_2\text{O}$ が生じることが知られている(Robertson & Kuenen, 1990b; Robertson *et al.*, 1995)。好気工程で発生した $\text{N}_2\text{O}$ が、このような好気性脱窒菌による脱窒過程で生成されたものである可能性がある。

また、好気性脱窒能を持たない通常の脱窒菌の場合でも、DOが存在すると直ちに脱窒が停止するわけではない。DOが増加すると脱窒速度が低下するのは事実であるが、 $\text{N}_2\text{O}$ 生成率はDOが高いほど増加する。したがって、完全な好気条件においては脱窒速度自体が著しく低下するために $\text{N}_2\text{O}$ 生成量は小さいと予想されるが、低濃度のDOが存在する条件では脱窒速度の低下分よりも $\text{N}_2\text{O}$ 生成率の増加の方が大きく寄与することが予想され、無酸素条件よりも $\text{N}_2\text{O}$ 生成量が増大する可能性が高い。実際、脱窒をおこなう活性汚泥を回分式に培養した場合に、0~4 mg/lのDO範囲においてDOが高いほど $\text{N}_2\text{O}$ 生成量が大きくなる傾向が見いだされている(von Schulthess *et al.*, 1994)。このことから、好気工程で維持されるDOレベル次第では、通常の脱窒が進行するだけでなくそこからの活発な $\text{N}_2\text{O}$ 生成がもたらされる可能性があると言える。

これまでの議論より、好気工程においても脱窒が進行し、その過程で $\text{N}_2\text{O}$ が生成されている可能性は十分にあることが分かる。これは、特に同工程のDOを低く制御した場合に顕著であることが予想される。

一方で、無酸素工程において、硝化菌の寄与により $\text{N}_2\text{O}$ が生成される可能性もある。

酸素制限条件下あるいは無酸素条件下では、代表的なアンモニア酸化菌である*Nitrosomonas europaea*が $\text{NO}_2\text{-N}$ を還元することが知られている(Ritchie & Nicholas, 1972; Hynes & Knowles, 1984; Poth & Focht, 1985; Bock *et al.*, 1995)。本反応では主産物として $\text{N}_2\text{O}$ が生成されることが多いようであ

る。すなわち、無酸素工程においても硝化菌が代謝をおこない、 $\text{N}_2\text{O}$ を生成する可能性があることが分かる。

以上の議論から、好気工程であっても脱窒由来の $\text{N}_2\text{O}$ が、無酸素工程であっても硝化由来の $\text{N}_2\text{O}$ が生成される可能性があると言える。

$\text{N}_2\text{O}$ の発生量を抑制することを考えた場合、発生した $\text{N}_2\text{O}$ が硝化に由来するのか脱窒に由来するのかが明らかであった方が対策がとりやすいと思われる。各反応での $\text{N}_2\text{O}$ 生成に対する影響因子が異なることが多いと予想されるためである。

そこで、窒素の安定同位体 $^{15}\text{N}$ をトレーサーとして使用することにより、リアクターにおいて発生した $\text{N}_2\text{O}$ に対する硝化と脱窒それぞれの寄与率を推定することを試みた。

$^{15}\text{N}$ を用いた手法は、生体内での窒素成分の代謝経路の検討や、土壌や底泥での硝化・脱窒速度の測定などに広く使用されている。しかし、硝化と脱窒が同時に進行している系での $\text{N}_2\text{O}$ 生成に対する両者の寄与率を知る目的で使用された例は見あたらない。

上記の目的のためには、硝化の阻害剤を使用した例が多く報告されている(Jørgensen *et al.*, 1984; Davidson *et al.*, 1986; Robertson & Tiedje, 1987; Klemmedtsson *et al.*, 1988a,b; Schuster & Conrad, 1992)。これは、同一の試料に対して硝化の阻害剤を添加した場合と添加しない場合の2種類の培養をおこない、両者における $\text{N}_2\text{O}$ 生成量の差を硝化由来の $\text{N}_2\text{O}$ とみなすものである。本法では、阻害剤添加の有無が脱窒由来の $\text{N}_2\text{O}$ 生成量に影響しないことが仮定されている。しかしながら、硝化による $\text{NO}_3\text{-N}$ の供給が阻害剤により停止するため、系内の全 $\text{NO}_3\text{-N}$ 量に対して硝化由来の $\text{NO}_3\text{-N}$ 量が無視できない条件ではこの仮定が妥当ではなくなってくる。

本研究で対象とする間欠曝気式の運転においても、硝化と脱窒が密接に関連しているものと考えられる。例えば、投入基質中の窒素分はほぼ全てが $\text{NH}_4\text{-N}$ の形態であるため、脱窒菌に供給される $\text{NO}_3\text{-N}$ ないし $\text{NO}_2\text{-N}$ は全て硝化菌の寄与により生成されたものである。一方で、硝化過程で $\text{NO}_2\text{-N}$ が蓄積し、それが脱窒菌によって利用されることも考えられる。したがって、硝化の阻害剤を使用した場合には脱窒からの $\text{N}_2\text{O}$ 生成も影響を受ける可能性があると考えられるため、同法は本研究には不適と判断した。

一方、 $^{15}\text{N}$ をトレーサーとして使用した方法であれば、トレーサーを添加したことによる硝化・脱窒の代謝への影響は生じないと考えられる。

具体的には、実験室規模リアクターから混合液を取り出し、リアクターと同様のサイクル運転が可能な回分装置にてサイクル運転をおこなった。その際、添加する基質の $\text{NH}_4\text{-N}$ を $^{15}\text{N}$ でラベルした。運転中に流出気体および混合液を経時的に採取し、諸指標の測定をおこなった。 $\text{N}_2\text{O}$ および無機態窒素成分に関してはその中の $^{15}\text{N}$  atom%の分析も併せておこない、それらの結果をもとに $\text{N}_2\text{O}$ の起源を推定した。

以下、使用した装置および実験手順について6.2節で、 $\text{N}_2\text{O}$ の起源の推定法について6.3節で解説し、結果を6.4節以降に述べる。

## 6.2 実験方法

### 6.2.1 実験装置

本実験で使用した回分式の培養装置の概略を図 6.1 に示した。本装置では、第 5 章で述べた実験室規模リアクターでの好気-無酸素サイクルの運転を模擬することを意図している。

本体は 1 l のガラス瓶で、ゴム栓により内部を密閉構造とした。混合液の攪拌はスターラーによりおこなった。

内部気体を流量 5 l/min でエアポンプにより強制的に循環させ、 $N_2O$  の気液平衡を保つようにした。

本循環ラインの途中に気体流入をおこなったが、流入気体の種類によらず常に一定流量で流入されるようニードルバルブ付の流量計により調整した。好気工程の DO を制御しない実験では、好気工程には  $N_2$  ガスと  $O_2$  ガスの混合気体を体積比 79:21 で流入させ、無酸素工程には  $N_2$  ガスのみを流入させた。好気工程の DO 制御をおこなう実験では、流入気体として空気と  $N_2$  ガスとを切り換える電磁弁を DO コントローラと連動させることにより、好気工程の DO を設定値付近に保った。この場合にも、無酸素工程には  $N_2$  ガスを流入させた。

pH は、pH コントローラによりリアクターと同様の 6.5~7.5 の範囲に維持されるようにした。調整液としては、0.5N-HCl 溶液と 0.5N-NaOH 溶液を使用した。

気体試料は、気体流出ラインに設けた採取口より採取した。液体試料は、本体のゴム栓に挿入した採取口より、プラスチック製シリンジにて吸引採取した。なお、本採取口は基質注入口を兼ねている。基質の注入はプラスチック製シリンジにておこない、注入の際に気体の交換が無いようにおこなった。

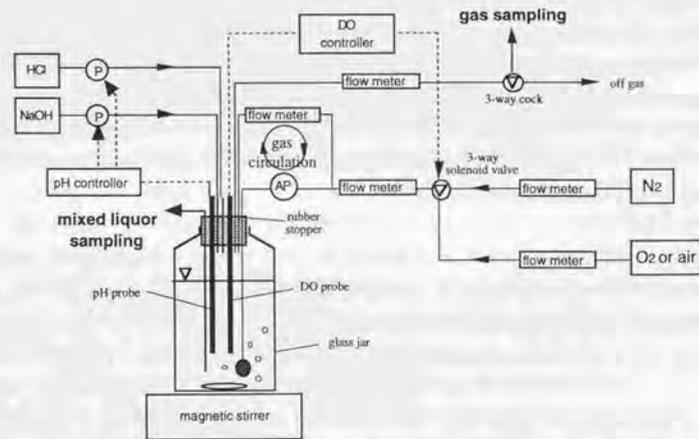


図 6.1  $^{15}N$ トレーサー実験に使用した回分装置

### 6.2.2 実験手順

連続運転中のリアクターにおいて、無酸素工程終了間際の時点で混合液を 800 ml 採取し、直ちに本回分装置に移した。そこから、図 6.2 に示したタイム・スケジュールにて、好気-無酸素-好気という各工程の運転をおこなった。

基質は、無酸素工程に移行後 5 分が経過した時点で一括注入した。有機物源として酢酸ナトリウム、窒素源として塩化アンモニウムを用い、リアクターへの投入基質と同一の COD/N 比となるよう調整した (表 6.1)。注入量は、汚泥体積当たりの負荷量がリアクターと同一となるようにした。また、基質中の塩化アンモニウムを  $^{15}N$  でラベルした ( $^{15}N$  atom%=16%程度)。

気体試料は、最初の好気工程の初期から経時的に採取した。採取は 1 l のテドラバッグ (GLサイエンス) におこなった。本テドラバッグには、気密を保ったままシリンジにて内部気体を採取できるコネクターが装着されている。

混合液試料は、最初の好気工程の終了時から採取を開始した。採取した混合液は直ちに遠心 (14,000 rpm  $\times$  5 min, 4  $^{\circ}C$ ) にかけて、上澄みを 0.45  $\mu m$  のメンブランフィルターにてろ過したものを分析試料とした。

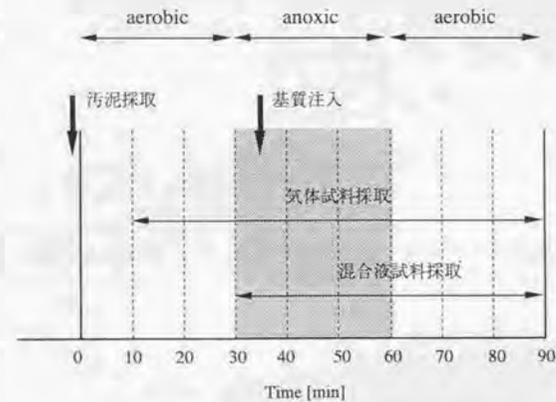


図 6.2  $^{15}N$ トレーサー実験のタイム・スケジュール

表 6.1  $^{15}N$ トレーサー実験に使用した基質

リアクター Run No.	注入基質濃度		基質の COD/N比	$^{15}NH_4Cl$ atom%	注入量 [ml]
	acetate [g-COD/l]	$NH_4Cl$ [gN/l]			
1-1	30	13	2.4	16.2	1.0
1-2	42	13	3.2	16.4	1.0
2-1	46	12	3.8	16.5	1.0

分析項目は、気体試料に対しては $N_2O$ 、 $CO_2$ 各濃度、および $N_2O$ の同位体構成比とし、混合液試料に対しては $NH_4-N$ 、 $NO_2-N$ 、 $NO_3-N$ 、 $TN$ 、 $COD$ 、 $TOC$ 各濃度、 $NH_4-N$ 、 $NO_2-N$ 、 $NO_3-N$ 中の $^{15}N$  atom%とした。

### 6.3 $N_2O$ 起源の推定方法

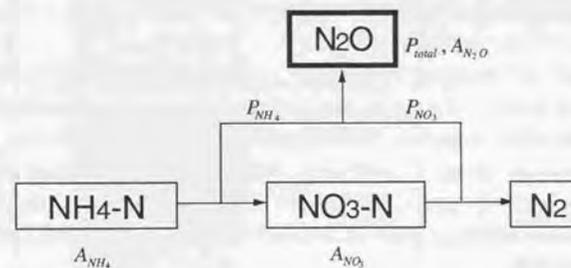
発生した $N_2O$ に対する硝化と脱窒の寄与率を定量化するために、硝化と脱窒から成る反応系を簡略化したモデルを想定した(図6.3)。すなわち、硝化と脱窒が同時進行していると仮定し、硝化により $NH_4-N$ が $NO_3-N$ へ変換される過程と脱窒により $NO_3-N$ が $N_2$ ガスへと変換される過程において、それぞれ $N_2O$ が生成されるというモデルである。

図6.3で、 $P_{NH_4}$ および $P_{NO_3}$ が、それぞれ $NH_4-N$ と $NO_3-N$ に由来する $N_2O$ 量である。これらを算出するために、次に示す2つの物質収支式を用いた。式6-1は $N_2O$ の収支をとった式であり、式6-2は $^{15}N$ の収支をとった式である。

$$P_{total} = P_{NH_4} + P_{NO_3} \quad (6-1)$$

$$P_{total} \cdot A_{N_2O} = P_{NH_4} \cdot A_{NH_4} + P_{NO_3} \cdot A_{NO_3} \quad (6-2)$$

ここに、 $P_{total}$  : 総 $N_2O$ 生成量、 $P_{NH_4}$  :  $NH_4-N$ 由来の $N_2O$ 生成量、 $P_{NO_3}$  :  $NO_3-N$ 由来の $N_2O$ 生成量、 $A_{N_2O}$  :  $N_2O$ 中の $^{15}N$  atom%、 $A_{NH_4}$  :  $NH_4-N$ 中の $^{15}N$  atom%、 $A_{NO_3}$  :  $NO_3-N$ 中の $^{15}N$  atom%である。



- $P_{total}$  : 総 $N_2O$ 生成量
- $P_{NH_4}$  :  $NH_4-N$ 由来の $N_2O$ 生成量
- $P_{NO_3}$  :  $NO_3-N$ 由来の $N_2O$ 生成量
- $A_{N_2O}$  :  $N_2O$ の $^{15}N$  atom%
- $A_{NH_4}$  :  $NH_4-N$ の $^{15}N$  atom%
- $A_{NO_3}$  :  $NO_3-N$ の $^{15}N$  atom%

図 6.3  $^{15}N$ トレーサー実験において $N_2O$ 起源推定のために仮定した反応経路

## 6. 4 結果

### 6.4.1 投入基質のCOD/N比=2.4, 好気工程のDO制御無し系列 (Run 1-1)

リアクターの運転系列Run 1-1において、運転開始後95日が経過した時点でおこなった実験結果について述べる。本系列では、 $\text{NO}_3\text{-N}$ が約800 mg/Nと高濃度に蓄積し、無酸素工程の後半に大量の $\text{N}_2\text{O}$ 放出が見られた(5.3.1(1)参照)。本実験をおこなった時点では、流入窒素当たりの $\text{N}_2\text{O}$ 転換率は約12%であった。また、使用した混合液のMLSSは7,440 mg/lであった。

$^{15}\text{N}$ 同分実験における各指標の変化を図6.4に示した。

$\text{N}_2\text{O}$ は、無酸素工程の後半において放出速度が大きくなり、好気工程に入ると放出速度は速やかに低下した。これは、リアクターにおいて見られた同様の傾向である(5.3.1(1)参照)。 $\text{N}_2\text{O}$ 中の $^{15}\text{N}$  atom%は、無酸素工程の間は1%程度で変化が見られず、好気工程に入るとやや増加し、好気工程開始20分後に10.5%へと急増した。本実験では $\text{NH}_4\text{-N}$ が $^{15}\text{N}$ ラベルされており、後で述べるように $\text{NO}_3\text{-N}$ 中の $^{15}\text{N}$  atom%は自然界での値(0.366%)と大きくは違わなかったため、ここで見られた $\text{N}_2\text{O}$ 中の $^{15}\text{N}$  atom%の急増は、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 由来の $\text{N}_2\text{O}$ の寄与が増加したことを示している。

1サイクルの間の $\text{N}_2\text{O}$ 放出量と添加した $\text{NH}_4\text{-N}$ 量から、添加窒素量当たりの $\text{N}_2\text{O}$ 転換率を算出すると、12.4%であった。これは、リアクターにおいて得られた流入窒素当たりの $\text{N}_2\text{O}$ 転換率とほぼ同等であり、 $\text{N}_2\text{O}$ 放出速度の変動もリアクターで観察されたものに類似していたことから、本同分装置においてリアクターで生じた現象が概ね再現できていたと判断できる。

$\text{NH}_4\text{-N}$ は無酸素工程の間は変化せず、好気工程に入ると直線的に減少した。好気工程に硝化が進行したのは明らかであるが、一方で、少なくとも見かけ上は無酸素工程での硝化の進行は起こらなかったと言える。 $\text{NH}_4\text{-N}$ 中の $^{15}\text{N}$  atom%は、実験期間を通して16%程度ではほぼ一定であった。これは、基質中の $\text{NH}_4\text{-N}$ の $^{15}\text{N}$  atom%(16.2%)と同程度であり、基質添加時点で $\text{NH}_4\text{-N}$ がほとんど残留していたことが事実と合致している。ただし、好気工程においては $^{15}\text{N}$  atom%がわずかに減少した。これに対しては、有機態窒素の無機化による $\text{NH}_4\text{-N}$ 生成の寄与が想定されるが、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度が低い故の分析誤差である可能性もある。

$\text{NO}_3\text{-N}$ は無酸素工程の間に減少し、好気工程に入ると増加した。 $\text{NO}_3\text{-N}$ 中の $^{15}\text{N}$  atom%は、無酸素工程の間は0.4%程度で大きな変化が見られず、好気工程に入ると直線的に増加した。好気工程では、 $^{15}\text{N}$ ラベルされた $\text{NH}_4\text{-N}$ が硝化により $\text{NO}_3\text{-N}$ へと変換されるため、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 中の $^{15}\text{N}$  atom%が増加したものと解釈される。

$\text{NO}_2\text{-N}$ は、基質添加直後に5 mg/N/日まで蓄積され、無酸素工程の間は大きな変化を受けず、好気工程に入ると直線的に減少した。なお、 $\text{NO}_3\text{-N}$ に比べて $\text{NO}_2\text{-N}$ がはるかに低濃度であったため、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 中の $^{15}\text{N}$  atom%値は得られなかった。

流出気体中の $\text{CO}_2$ 濃度を見ると、基質注入直後に急増しており、微生物による呼吸が基質投与により活発となったことを示している。その後、無酸素工程から好気工程にかけて $\text{CO}_2$ 濃度は徐々に減少した。無酸素工程での $\text{CO}_2$ の生成源として脱窒が主要であると考えられるならば、脱窒は基質添加直後が最も活発であったとみなせる。一方で $\text{N}_2\text{O}$ 放出のピークは無酸素工程の後半になって現れており、両者のピークに時間差が見られたことは特徴的である。なお、中性付近のpHでは $\text{CO}_2$ の重炭酸塩( $\text{HCO}_3^-$ )への解離度がpHに依存するため、 $\text{CO}_2$ 濃度の変化に対してはpHの寄与も考慮する必要がある。

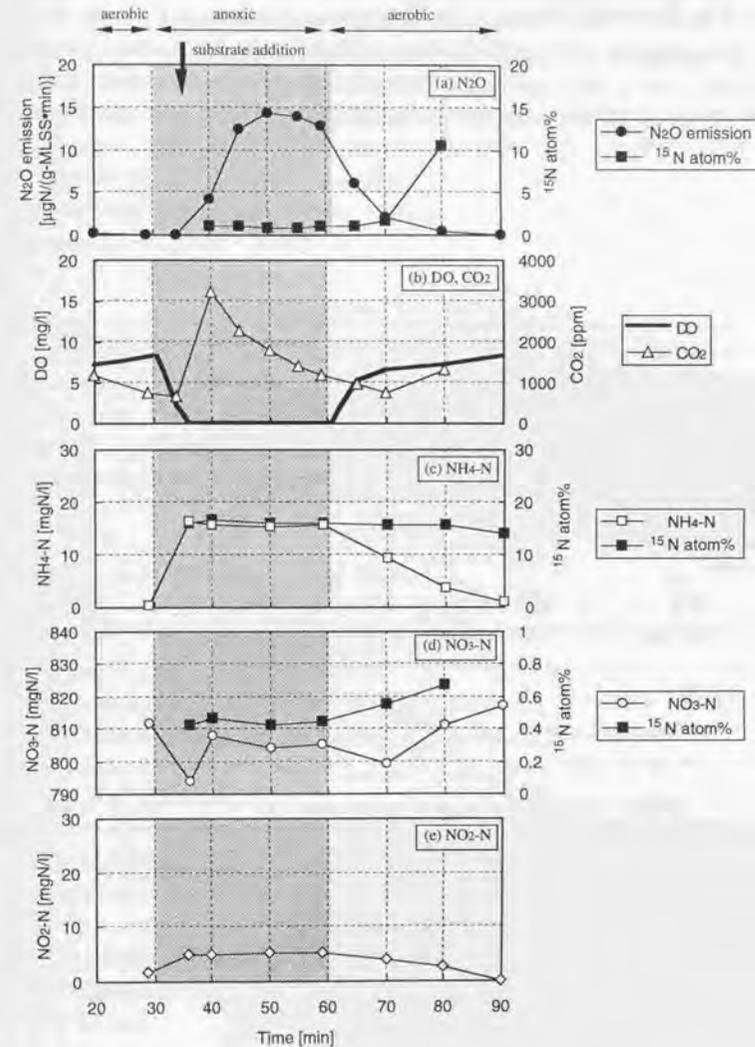


図 6.4 Run 1-1の混合液を使用した $^{15}\text{N}$ トレーサー実験における各指標の変化 (基質のCOD/N比=2.4; DO制御無し)

る。しかし、本実験においてはその影響は実際のCO<sub>2</sub>濃度の変化と比較して小さいため、無視して考えることができる。これは、6.4.2、6.4.3で述べる結果についても同様である。

DOは、無酸素工程に入ると直線的に減少を始め、基質が注入されると直ちに0.0 mg/lまで低下した。基質注入直前のDOは1.2 mg/lであった。好気工程に入ると約1分のラグを置いてDOの増加が観測され、同工程開始5分後には5.3 mg/lに達した。同工程終了時のDOは8.3 mg/lであり、ほぼ飽和に達していた。

表 6.2 Run 1-1の混合液を使用した<sup>15</sup>Nトレーサー実験において推定されたNH<sub>4</sub>-NとNO<sub>3</sub>-N由来のN<sub>2</sub>O放出

培養時間 [min]	N <sub>2</sub> O放出速度 [μgN/(g-MLSS-min)]			NO <sub>3</sub> -N由来の N <sub>2</sub> O放出割合 [%]
	総放出速度	NH <sub>4</sub> -N由来	NO <sub>3</sub> -N由来	
29	0.05	-	-	-
34	0.02	-	-	-
40	4.1	0.2	4.0	96
45	12	0.4	12	97
50	14	0.5	14	97
55	14	0.4	13	97
59	13	0.4	13	97
65	6.2	0.2	6.0	97
70	2.0	0.2	1.8	93
80	0.4	0.2	0.2	34
90	0.1	-	-	-

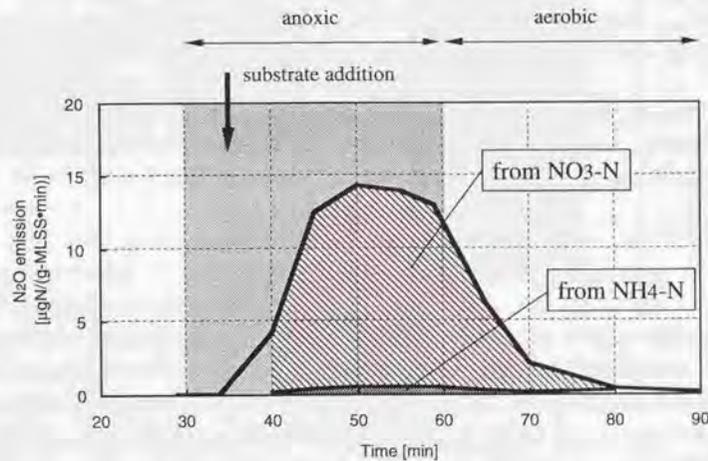


図 6.5 Run 1-1の混合液を使用した<sup>15</sup>Nトレーサー実験におけるN<sub>2</sub>O起源推定結果

本結果より、NH<sub>4</sub>-N由来のN<sub>2</sub>OとNO<sub>3</sub>-N由来のN<sub>2</sub>Oの寄与を推定した結果を表6.2および図6.5に示した。無酸素工程から好気工程開始5分後までに放出されたN<sub>2</sub>Oは、95%以上がNO<sub>3</sub>-N由来であると推定された。好気工程開始10分後の時点でもNO<sub>3</sub>-N由来のN<sub>2</sub>Oが92%を占めたが、好気工程開始20分後には発生N<sub>2</sub>Oの66%がNH<sub>4</sub>-N由来であると推定された。

これより、無酸素工程から好気工程初期にかけて放出されたN<sub>2</sub>Oは、大半が脱窒により生成されたものであると考えることができる。1サイクル中に放出されたN<sub>2</sub>Oの大半がこの期間に生じていたため、サイクル全体で見ても、N<sub>2</sub>Oの起源としては脱窒が主要であると言える。

一方で、好気工程の後半には硝化によるN<sub>2</sub>O生成が起こったことが示唆されるが、この時点では放出量自体が小さいので、1サイクルの総放出量に占める硝化の寄与は小さいと結論づけられる。

#### 6.4.2 投入基質のCOD/N比=3.4, 好気工程のDO制御無しの系列 (Run 1-2)

ここでは、リアクターの運転系列Run 1-2において、運転開始後137日が経過した時点でおこなった実験の結果を述べる。

本系列では、6.4.1で述べたRun 1-1と同様、NO<sub>3</sub>-Nが高濃度に蓄積しており(約350 mgN/l)、N<sub>2</sub>O放出も転換率で35%と高かった(5.3.1(2)参照)。また、使用した混合液のMLSSは12,400 mg/lであった。

<sup>15</sup>N回分実験における各指標の変化を図6.6に示した。

N<sub>2</sub>O放出は、6.4.1と同様に、無酸素工程の後半において活発になり好気工程に入ると急速に低下する傾向が見られた。これはリアクターの運転サイクルで観測された傾向と一致している(図5.9(b))。N<sub>2</sub>O中の<sup>15</sup>N atom%は、無酸素工程の間は0.4~0.6%程度で大きな変化が見られなかったが、好気工程に入ると徐々に増加し、好気工程開始20分後には7.7%に達した。これは、好気工程において硝化由来のN<sub>2</sub>Oの割合が増加したことを示唆している。しかし、NH<sub>4</sub>-N中の<sup>15</sup>N atom%は約16%とN<sub>2</sub>O中の<sup>15</sup>N atom%よりも明らかに大きく、好気工程に放出されたN<sub>2</sub>Oであっても脱窒の寄与が無視できないことが分かる。

注入基質中の窒素当たりのN<sub>2</sub>O転換率は16.4%と算出された。これは、実験当時にリアクターにおいて観測された転換率(35%)の半分程度である。6.4.1に記した実験ではリアクターでの転換率と<sup>15</sup>N回分実験での転換率とが同等であったが、本実験では両者が一致しなかったことになる。その理由は不明である。

NH<sub>4</sub>-Nは好気工程に入ると急速に消費されたが、無酸素工程においてもわずかな減少が見られた。NH<sub>4</sub>-N中の<sup>15</sup>N atom%は、無酸素工程の間は約16%で一定値を示したが、好気工程の後半において増加する傾向が見られた。しかしながら、運転サイクル中に<sup>15</sup>N atom%が増加する要因は存在しなため、これは試料中のNH<sub>4</sub>-N濃度が小さいことに起因する分析誤差であると判断される。なお、無酸素工程での<sup>15</sup>N atom%は、注入基質中のNH<sub>4</sub>-Nの<sup>15</sup>N atom%(16.4%)にほぼ等しかった。

NO<sub>3</sub>-Nは、無酸素工程の間に消費され、好気工程に入ると増加に転じた。その中の<sup>15</sup>N atom%は、無酸素工程の間には約0.5%で変化が無く、好気工程に入ると硝化の進行に応じて増加した。

NO<sub>2</sub>-Nは2つの時点で蓄積された。まず、基質添加直後に0.7 mgN/lとわずかに蓄積され、その後、

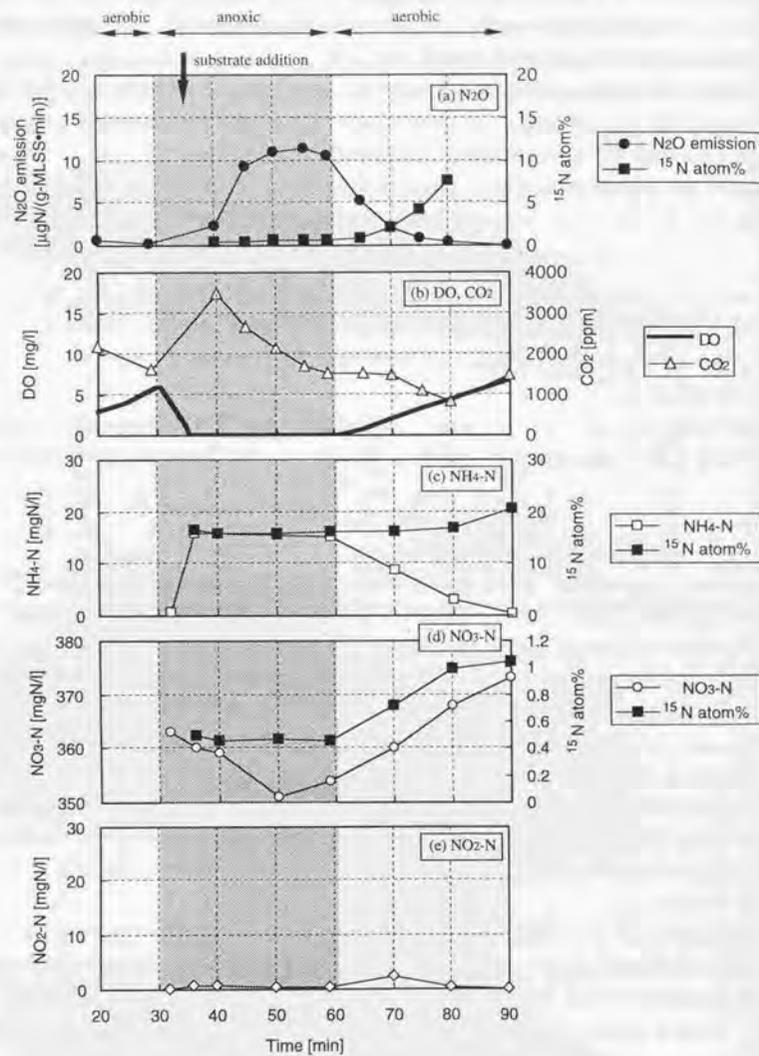


図 6.6 Run 1-2の混合液を使用した<sup>15</sup>Nトレーサー実験における各指標の変化  
(基質のCOD/N比=3.4; DO制御無し)

好気工程の初期に2 mgN/lの蓄積が見られた。ただし、これは同工程中に全量消費された。なお、本実験においても、NO<sub>3</sub>-Nに対してNO<sub>2</sub>-N濃度が非常に小さかったため、NO<sub>2</sub>-N中の<sup>15</sup>N atom%値は得られなかった。

流出気体中のCO<sub>2</sub>濃度のピークが基質注入直後に出現した点は、6.4.1と同様である。

DOに関しては、無酸素工程においては6.4.1と同様の変化を示したが、好気工程でのDOの増加は6.4.1よりも緩慢であった。好気工程開始5分後のDOは0.5 mg/lであり、10分後においても2 mg/lであった。また、同工程終了時のDOも6.8 mg/lと、飽和に達していなかった。これらの傾向は、本実験で使用した混合液の生物濃度 (MLSS=12,400 mg/l) が6.4.1に記した実験で使用したもの (MLSS=

表 6.3 Run 1-2の混合液を使用した<sup>15</sup>Nトレーサー実験において  
推定されたNH<sub>4</sub>-NとNO<sub>3</sub>-N由来のN<sub>2</sub>O放出

培養時間 [min]	N <sub>2</sub> O放出速度 [µgN/(g-MLSS·min)]			NO <sub>3</sub> -N由来の N <sub>2</sub> O放出割合 [%]
	総放出速度	NH <sub>4</sub> -N由来	NO <sub>3</sub> -N由来	
29	0.1	-	-	-
40	2.4	0.00	2.4	100
45	9.3	0.01	9.3	100
50	11	0.09	11	99
55	11	0.09	11	99
59	11	0.07	11	99
65	5.2	0.07	5.1	99
70	2.0	0.2	1.8	90
75	0.8	0.2	0.6	78
80	0.3	0.1	0.2	58
90	0.1	-	-	-

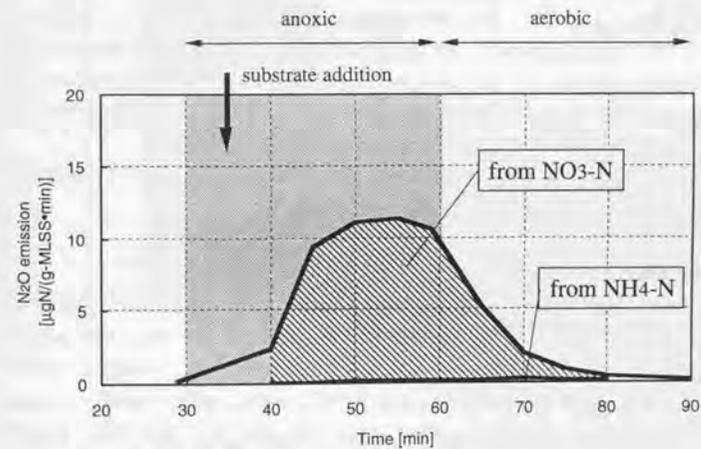


図 6.7 Run 1-2の混合液を使用した<sup>15</sup>Nトレーサー実験におけるN<sub>2</sub>O起源推定結果

7.440 mg/l) に比べて高かったことに起因すると推察される。

$N_2O$ の起源を推定した結果を表 6.3 および図 6.7 に示した。

6.4.1 と概ね類似した傾向を示しており、無酸素工程から好気工程初期にかけては放出  $N_2O$  の 99% 以上が  $NO_3-N$  に由来すると推定された。好気工程に入ると  $NH_4-N$  由来の  $N_2O$  の寄与が増加し、好気工程開始 10 分後には 10%、15 分後には 22%、20 分後には 42% が  $NH_4-N$  に由来すると見積もられた。ただし、好気工程に入ると総  $N_2O$  放出速度が急速に低下したため、この  $NH_4-N$  由来の  $N_2O$  が 1 サイクル内の総  $N_2O$  放出量に占める割合は小さかった。

結局、6.4.1 と同様に、1 サイクル内に放出された  $N_2O$  の大半は無酸素工程での脱窒に由来すると結論づけられた。

#### 6.4.3 投入基質の COD/N 比 = 3.5, 好気工程の DO を 0.3~0.8 mg/l に制御した系列 (Run 2-1)

ここでは、リアクターの運転系列 Run 2-1 について、運転開始後 140 日が経過した時点でおこなった実験結果を述べる。本実験では、6.4.1 および 6.4.2 とは異なり、リアクターと同様に好気工程の DO を低濃度に制御した。

Run 2-1 では、投入基質の COD/N 比を 3.5 に設定して運転されたが、これは 6.4.2 で対象とした系列 Run 1-2 に供給した基質と同程度の COD/N 比である。ただし、Run 2-1 においては、本実験実施時には好気工程の DO が 0.3~0.8 mg/l と低濃度に制御されていた。処理状態は  $NO_3-N$  蓄積型であり、本実験実施時の混合液ろ液の  $NO_3-N$  濃度は約 140 mg/l であった。一方で硝化は良好におこなわれていた。また、使用した混合液の MLSS は 13,500 mg/l であった。

本実験実施時にはリアクター本体での  $N_2O$  放出量測定をおこなっていなかった。本実験実施の 21 日前の時点では (運転開始後 119 日)、流入窒素分当たりの  $N_2O$  転換率が 40% を越えており、無酸素工程後半での放出が主要であった。それ以前の約 120 日間に及ぶ運転において、大きな  $N_2O$  放出量、無酸素工程後半での  $N_2O$  放出、という傾向は安定して観測されたことから、本実験を実施した時期にも、リアクター本体では同様の  $N_2O$  放出がおこなわれていたものと推察される。

本実験では、添加した基質の COD/N 比が 3.8 と、リアクター系列 Run 2-1 における供給基質よりもやや高かった (表 6.1)。ただし、これは意図したものではない。

$^{15}N$  回分実験における各指標の変化を図 6.8 に示した。

$N_2O$  放出は、無酸素工程後半と好気工程後半の 2 度に渡ってピークが見られた。好気工程での顕著な  $N_2O$  放出は、リアクター系列 Run 2-1 の運転中には見られなかった傾向である (図 5.10 (b) 参照)。本実験においては無酸素工程終了時の  $N_2O$  放出速度が大きく減少したが、この傾向もリアクターでは見られなかった。また、 $N_2O$  放出速度は 6.4.1 や 6.4.2 で示した結果と比較して全体的に小さかった。

$N_2O$  中の  $^{15}N$  atom% は、無酸素工程の間は 0.4% 程度で変化が見られず、好気工程に入ると増加した。その増加傾向は好気工程開始 15 分後まで続き、以降は約 8.5% で安定した。この数値は、後で述べる  $NH_4-N$  中の  $^{15}N$  atom% にほぼ等しく、好気工程後半に放出された  $N_2O$  が  $NH_4-N$  に由来していたことを

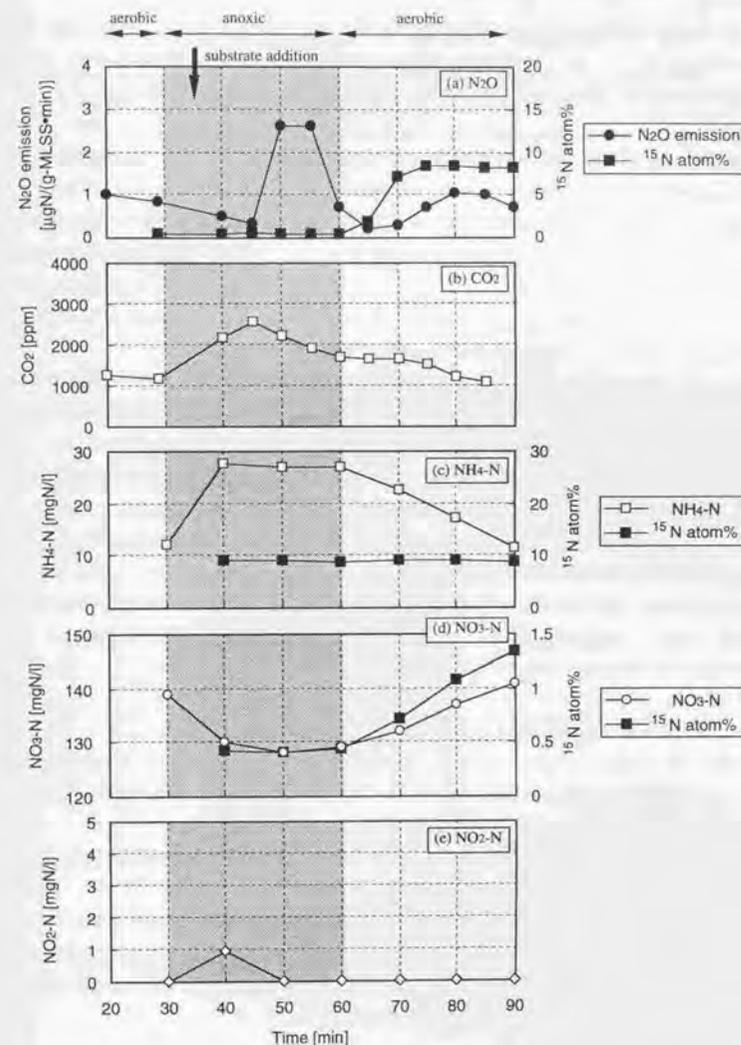


図 6.8 Run 2-1 の混合液を使用した  $^{15}N$  トレーサー実験における各指標の変化 (基質の COD/N 比 = 3.5; DO = 0.3~0.8 mg/l)

示している。

添加した基質の窒素当たりの $N_2O$ 転換率は、4.0%と算出された。このうち、無酸素工程での放出量が72%を占めた。リアクター本体においては40%を超える転換率で $N_2O$ が放出されたが、本実験での転換率はそれよりも相当小さかった。これは、無酸素工程後半での放出量が小さかったことに起因している。

本実験での低い $N_2O$ 転換率、およびリアクターでは見られなかった好気工程での $N_2O$ 放出が観察されたことから、ここではリアクターで生じていた現象を必ずしも再現できなかったことが分かる。

$NH_4-N$ は、無酸素工程の間は消費されず、好気工程に入ると直線的に消費された。 $NH_4-N$ 中の $^{15}N$  atom%は約9%で、1サイクルを通して変化が見られなかった。これは、有機態窒素の無機化量が無視しう程度であることを示唆している。なお、ここで得られた $^{15}N$  atom%値は、基質添加時に混合液中に残っていた $NH_4-N$ 量 (9.8 mgN)、基質として添加した $NH_4-N$ 量 (12.0 mgN)、基質中の $NH_4-N$ の $^{15}N$  atom% (16.5%) から算出される $^{15}N$  atom%値 (9.2%) にはほぼ等しい。

$NO_3-N$ は、基質添加直後に大きく減少し、その後無酸素工程の間は大きな消費が起らなかった。そして好気工程に入ると直線的に増加した。その中の $^{15}N$  atom%は、無酸素工程の間は約0.4%で変化が無く、好気工程に入ると直線的に増加した。好気工程終了時の $^{15}N$  atom%は1.3%であった。

$NO_2-N$ に関しては、基質添加直後にのみ約1 mgN/lと低濃度の蓄積が見られ、以降は好気工程の終了時まで全く検出されなかった。これは、リアクター本体においては無酸素工程を通して $NO_2-N$ が存在していたのと対照的である(9.2節, 図9.1参照)。なお、本実験での $NO_2-N$ 濃度が小さかったため、その $^{15}N$  atom%値は得られなかった。

DOは、無酸素工程開始後の約3分間で0.0 mg/lまで低下した。したがって、基質添加時(無酸素工程開始5分後)にはDOが存在しなかったと考えられる。好気工程においては、DO制御をおこなったためにDOが0.3~1.0 mg/lと低濃度であった。

$N_2O$ の起源を推定した結果を表6.4および図6.9に示した。

無酸素工程で放出された $N_2O$ は、ほぼ100%が $NO_3-N$ に由来すると推定された。これは、6.4.1および6.4.2の結果に合致している。好気工程に入ると $NO_3-N$ の寄与率は低下し、好気工程後半に $N_2O$ 放出量が再び増大した時点では $NH_4-N$ 由来の $N_2O$ が90%以上を占めると推定された。

本結果より、無酸素工程での $N_2O$ 放出に対しては脱窒が主要な起源であり、好気工程後半で見られた $N_2O$ 放出に対しては硝化が主要な起源であると考えられる。

ただし、1サイクルの総放出量は、Run 1-1やRun 1-2の混合液を使用した場合と比較して小さかった。しかしながら、本実験において好気工程後半で見られた $NH_4-N$ 由来の $N_2O$ 放出速度は最大で1  $\mu\text{gN}/(\text{g-MLSS}\cdot\text{min})$ であり、Run 1-1およびRun 1-2の混合液を使用した実験での $NH_4-N$ 由来の $N_2O$ 放出速度(0.2  $\mu\text{gN}/(\text{g-MLSS}\cdot\text{min})$ 以下)よりも明らかに大きかった。

表 6.4 Run 2-1の混合液を使用した $^{15}N$ トレーサー実験において推定された $NH_4-N$ と $NO_3-N$ 由来の $N_2O$ 放出

培養時間 [min]	$N_2O$ 放出速度 [ $\mu\text{gN}/(\text{g-MLSS}\cdot\text{min})$ ]			$NO_3-N$ 由来の $N_2O$ 放出割合 [%]
	総放出速度	$NH_4-N$ 由来	$NO_3-N$ 由来	
29	0.84	-	-	-
40	0.52	0.00	0.52	99
45	0.32	0.01	0.31	98
50	2.63	0.01	2.62	100
55	2.62	0.00	2.62	100
60	0.69	0.00	0.70	100
65	0.21	0.03	0.18	83
70	0.28	0.21	0.07	24
75	0.73	0.66	0.07	9
80	1.04	0.95	0.09	8
85	1.00	0.91	0.08	8
90	0.73	0.69	0.04	6

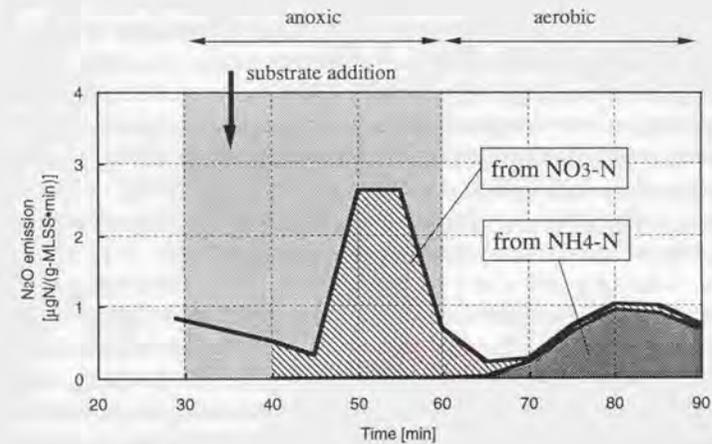


図 6.9 Run 2-1の混合液を使用した $^{15}N$ トレーサー実験における $N_2O$ 起源推定結果

## 6.5 考察

### 6.5.1 基質のCOD/N比が小さい運転条件でのN<sub>2</sub>O起源

基質のCOD/N比を2.4あるいは3.4に設定したリアクター系列Run 1-1・1-2の混合液を使用した<sup>15</sup>N回分実験より(6.4.1, 6.4.2)、このような運転条件で発生したN<sub>2</sub>Oは、大半がNO<sub>3</sub>-Nに由来していることが示された。ここでの放出が無酸素工程に顕著であったことと考え併せれば、発生したN<sub>2</sub>Oの起源としては脱窒が主要であると考えてよいだろう。

これらの系列と同様に基質のCOD/N比を3.5と小さく設定したRun 2-1についても同様の検討を実施したが(6.4.3)、その場合にも、無酸素工程で放出されたN<sub>2</sub>Oに対しては、大半がNO<sub>3</sub>-Nに由来しておりその起源としては脱窒が主要であると考えられた。6.4.3で指摘したように、本実験においてはリアクターでの現象を再現できたとは言えないが、リアクター系列Run 2-1で見られたN<sub>2</sub>O放出に対しては脱窒が主要な起源であると考えてよいだろう。本系列において気相のN<sub>2</sub>O濃度の変化パターンがRun 1-1・1-2と酷似していた点、処理状態がRun 1-1・1-2と同様にNO<sub>3</sub>-N蓄積型であった点などは、上に述べたRun 1-1・1-2と同様の現象が起こっていたことを示唆している。

Run 2-1と同一の基質で運転し、好気工程のDOが高い条件で運転されたRun 2-2については<sup>15</sup>Nトレーサー実験を実施しなかったが、1サイクル内でのN<sub>2</sub>O濃度の挙動や処理状態がRun 1-1・1-2・2-1に類似していたことから、本系列においても放出N<sub>2</sub>Oの大半は脱窒に由来すると考えられる。

Run 1-1およびRun 1-2の混合液を使用したトレーサー実験において、好気工程の後半にはNH<sub>4</sub>-N由来のN<sub>2</sub>Oも生成されたことが示された。これは硝化由来のN<sub>2</sub>O生成も起こっていたことを示唆している。しかし、この時点では無酸素工程後半と比較するとN<sub>2</sub>O放出速度が著しく小さかったことから、その寄与は小さいものと判断できる。

ただし、6.4.3で見られたように、好気工程のDOを低濃度に制御した場合には、硝化由来のN<sub>2</sub>O放出量が大きくなることも予想される。この点に関しては、次の6.5.2で述べる。

6.4節に示した各結果において、流出気体中のCO<sub>2</sub>濃度が基質添加直後に最大となったのに対して、N<sub>2</sub>Oは無酸素工程の後半になって顕著に生成された。このことは、脱窒が活発に起こる時期とN<sub>2</sub>Oが生成される時期とが異なっていることを示している。これは、7.2節および7.4節で明らかにするような、脱窒が内生型とならない限り顕著なN<sub>2</sub>O蓄積が起こらないという事実と合致している。すなわち、無酸素工程後半になると添加した有機物が枯渇して内生脱窒が起こり、そこでN<sub>2</sub>Oが生成されたと考えられる。

Run 1-1・1-2の混合液を用いた両トレーサー実験において、好気工程に入るとN<sub>2</sub>O放出速度は速やかに低下した。しかし、好気工程初期の10分間には未だ相当量の放出が続いていた。このN<sub>2</sub>Oも大半が脱窒に由来すると推定されたが、これをもたらしした要因として次の二つが想定される。

- (a) 好気工程で起こった脱窒により生成されたN<sub>2</sub>O
- (b) 無酸素工程で生成され溶存態として残留したN<sub>2</sub>O

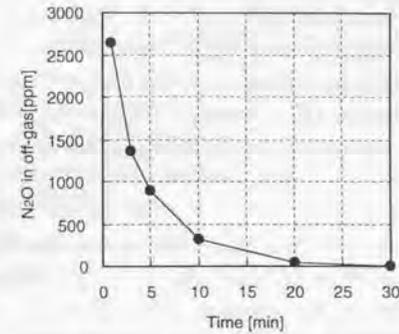


図 6.10 N<sub>2</sub>Oを過飽和に溶存させた純水で<sup>15</sup>N回分実験装置を運転したときの流出気体中のN<sub>2</sub>O濃度の経時変化

好気工程で起こった脱窒が起源であるならば、その放出量はDOに依存することが予想される。しかしながら、好気工程開始後速やかにDOが増加したRun 1-1のケースとDOの増加が緩慢であったRun 1-2のケースとを比較すると、N<sub>2</sub>O放出速度の減少曲線に違いが見られなかった。このことから、好気工程で起こった脱窒の寄与は小さいものと推定される。

一方、上の(b)に示した要因の寄与を評価するために、微生物の存在しない条件下で、過飽和に溶存させたN<sub>2</sub>Oの放出をモニタする試験を実施した。トレーサー実験に使用した装置にN<sub>2</sub>Oを過飽和に溶存させた純水を入れ、トレーサー実験と同一の条件で気体流入・内部気体循環をおこなった。そのときの流出気体中のN<sub>2</sub>O濃度の変化を見ると(図6.10)、過飽和に溶存したN<sub>2</sub>Oが完全に系外へ放出されるのに約20分を要した。また、その際の気相のN<sub>2</sub>O濃度減少曲線は、Run 1-1・1-2における好気工程でのN<sub>2</sub>O濃度減少曲線に類似していた。本結果より、純水と混合液という違いはあるものの、好気工程初期に放出されたN<sub>2</sub>Oは無酸素工程で生成され溶存していたものが移動してきただけである可能性が高いと考えられる。

すなわち、好気工程初期に見られたN<sub>2</sub>O放出に対しては、その時点で生成されたものよりも、無酸素工程で生成され混合液中に溶存していたものの寄与が大きいと考えられる。

同様の傾向はリアクターでの気相のN<sub>2</sub>O濃度の変化にも現れた(図5.9(a), (b))、上の議論から類推すると、これに対しても過飽和に溶存したN<sub>2</sub>Oが放出されるのに時間遅れを伴うという機構が想定される。

### 6.5.2 好気工程のDOを低濃度に制御した運転条件でのN<sub>2</sub>O起源

Run 2-1の混合液を使用したトレーサー実験において(6.4.3)、リアクター本体と同様に好気工程のDOを0.3~1.0 mg/lと低濃度に制御した。その結果、無酸素工程後半だけでなく好気工程の後半にもN<sub>2</sub>O放出速度が増加した。ここで好気工程の後半に見られたN<sub>2</sub>O放出は、その90%以上がNH<sub>4</sub>-Nに由来

することが確認された。したがって、好気工程後半での $N_2O$ 放出の大半が硝化によるものであると判断できる。また、Run 1-1, 1-2の混合液を使用したトレーサー実験においても(6.4.1, 6.4.2)、好気工程後半には $NH_4-N$ 由来の $N_2O$ が少量ではあるが生じたことが示された。

活性汚泥において、好気条件で $N_2O$ が発生することは既に確認されているが(Zheng *et al.*, 1994; 松尾・岡安, 1996)、その起源が硝化であることを確認した例はなかった。その意味で、本章で実施したトレーサー実験により、好気工程において硝化由来の $N_2O$ の発生が確認されたことは大きな意義を持つ。

6.4.3で指摘したように、好気工程のDOを低濃度に制御したトレーサー実験において見られた $NH_4-N$ 由来の $N_2O$ 放出速度は、好気工程のDOが高い条件で実施した他の実験系において見られた $NH_4-N$ 由来の放出速度よりも明らかに大きかった。このことから、好気工程のDOが低い条件では硝化由来の $N_2O$ 放出量が増加することは確実であろう。これは、Goreau *et al.* (1980)が*Nitrosomonas europaea*の純培養系において見出した結果に合致している。

ただし、低DO条件の好気工程において見られた $N_2O$ 放出速度(最大で $1.0 \mu gN/(g-MLSS \cdot min)$ )は、Run 1-1やRun 1-2の混合液を用いた実験系で見られた無酸素工程での $N_2O$ 放出速度(最大で $14 \mu gN/(g-MLSS \cdot min)$ )と比較すると、相当小さかった。実際、Run 2-1の混合液を使用した実験結果について、 $NH_4-N$ 由来の $N_2O$ 放出量のみから $N_2O$ 転換率(添加窒素量当たり)を算出すると、1.1%と小さかった。

実際には、実験室規模リアクターの系列Run 2-3において、好気工程のDOを $0.5 \sim 1.1 \text{ mg/l}$ に制御した場合に、同工程から4~18%の転換率で $N_2O$ が発生した(5.3.2参照)。本研究では、このRun 2-3で発生した $N_2O$ の起源を把握することができなかったが、本系列において好気工程で大量の $N_2O$ が発生した機構に関しては第9章で検討する。

## 6. 6 まとめ

$^{15}N$ をトレーサーとした回分実験により、実験室規模リアクターにおいて発生した $N_2O$ の起源を推定した。

主な結果を以下にまとめた。

- (1) 基質のCOD/N比を2.4~3.5に設定し大量の $N_2O$ が発生していた運転系列においては、無酸素工程後半で起こる脱窒が主要な $N_2O$ 起源であると判断された(図6.11)。
- (2) 好気工程には硝化由来の $N_2O$ が発生することが示された(図6.11)。特に、好気工程のDOを $0.3 \sim 1.0 \text{ mg/l}$ と低濃度に制御した条件において好気工程後半に $N_2O$ 放出量が増大する傾向が観察され、その90%以上が硝化に由来すると判断された。これより、DOが低い条件では硝化過程での $N_2O$ 生成が促進されると推察された。

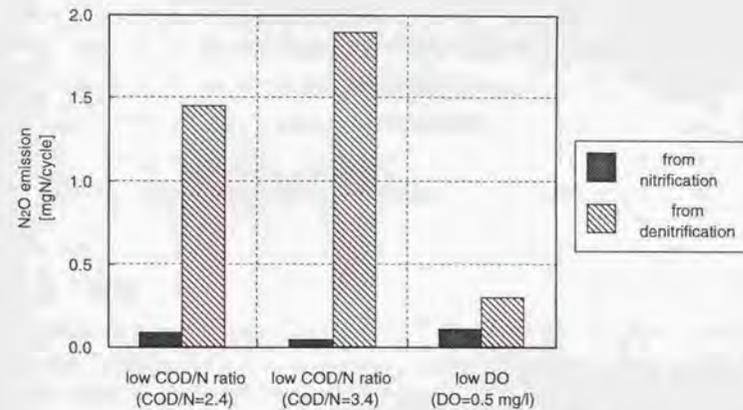


図 6.11 実施した $^{15}N$ トレーサー実験において硝化・脱窒それぞれに由来すると推定された $N_2O$ 放出量

## 第7章

### 有機物制限条件下での 脱窒過程でのN<sub>2</sub>O生成機構

- 
- 7. 1 緒論
  - 7. 2 1サイクル内での窒素系指標の変化
  - 7. 3 脱窒経路中の各還元活性の比較
  - 7. 4 脱窒過程からのN<sub>2</sub>O生成に対する環境因子の影響
  - 7. 5 内生脱窒時の各還元速度の比較
  - 7. 6 内生脱窒への移行段階でのNO<sub>3</sub>-N蓄積とNO<sub>2</sub>-N蓄積の効果
  - 7. 7 低COD/N比運転でのN<sub>2</sub>O生成機構
  - 7. 8 メタノール投入によるN<sub>2</sub>O放出抑制
  - 7. 9 まとめ
- 

#### 7. 1 緒論

実験室規模リアクターの連続運転において、投入基質のCOD/N比を小さく設定すると大量のN<sub>2</sub>Oが放出された。その場合、1サイクルの中では無酸素工程後半での放出が卓越しており、これより脱窒がN<sub>2</sub>Oの主要な起源であると推定された(第5章)。

N<sub>2</sub>Oの起源に関しては、<sup>15</sup>Nをトレーサーとして用いた回分実験により、そのような条件で発生したN<sub>2</sub>Oの大半が脱窒に由来することが示された(第6章)。

これらの結果を受け、本章では、低COD/N比の基質で運転をおこなった場合に脱窒過程で大量のN<sub>2</sub>Oが放出された機構について検討した結果を報告する。

脱窒過程でN<sub>2</sub>Oが蓄積されるためには、脱窒経路においてN<sub>2</sub>O生成速度がN<sub>2</sub>O分解速度よりも大きくなっている必要がある。すなわち、N<sub>2</sub>O生成速度としてNO<sub>2</sub>-N還元速度を、N<sub>2</sub>O分解速度としてN<sub>2</sub>O還元速度を想定すれば、NO<sub>2</sub>-N還元速度がN<sub>2</sub>O還元速度よりも大きくなければならない。なお、ここでは、NO<sub>2</sub>-NからN<sub>2</sub>Oへの還元の際に生じうるNOは無視して考えている。

このことから、リアクターでの運転サイクルにおいて、無酸素工程の後半にN<sub>2</sub>O還元速度がNO<sub>2</sub>-N還元速度よりも小さくなっていたと考えることができる。ここで、リアクターが連続運転であった

点、サイクル内では回分的な処理がおこなわれており $N_2O$ 放出が一時期に集中して生じた点を考慮すると、 $N_2O$ 還元速度が $NO_2-N$ 還元速度よりも小さくなった要因を次の2つのレベルにおいてとらえる必要がある。

- (a) 脱窒自体の変化
- (b) 環境因子の影響

(a)は、低COD/N比の基質で運転することにより、汚泥中で進行する脱窒自体が $N_2O$ の蓄積を伴うものに変化したという機構である。ここでは、主に脱窒経路中の各還元活性の変化を想定している。

直接的なものとしては、脱窒菌が持つ $N_2O$ 還元活性の低下が考えられる。そもそも汚泥中の脱窒菌が持つ $N_2O$ 還元能力が低下していたために、必然的に $N_2O$ が蓄積されたというものである。ただし、この機構では、最も活発に脱窒が起こっていたはずの基質投入時に $N_2O$ が放出されなかった点を説明することができない。

また、副次的な効果を持つものとしては、脱窒経路中での $N_2O$ 還元以外の箇所での還元速度のアンバランスによる $NO_3-N$ ないしは $NO_2-N$ の蓄積が考えられる。例えば、 $NO_2-N$ 還元能が $NO_3-N$ 還元能よりも低下したために $NO_2-N$ が蓄積し、それが $N_2O$ 還元速度の低下を招いた、といったような現象が想定される。この機構は、 $NO_3-N$ あるいは $NO_2-N$ の蓄積が $N_2O$ 還元速度の低下を招くという点から、(b)の環境因子の影響とも関連してくる。

このような還元活性の変化を引き起こす要因として、ひとつには脱窒菌相の変化が挙げられる。例えば、脱窒菌の中には $N_2O$ までの還元能力しか持たないものが存在することが知られており

(Greenberg & Becker, 1977; Brettar & Höfle, 1993)、汚泥中でそのような細菌が優占したために $N_2O$ 還元能力が低下した可能性がある。また、 $NO_3-N$ からの脱窒に際して細菌種により中間体の蓄積傾向が異なることも指摘されている(Betlach & Tiedje, 1981)。一方で、脱窒菌相自体の変化は大きくなく、 $N_2$ ガスまでの完全な脱窒能力を持つ脱窒菌が優占しているにも関わらず、脱窒に関与する還元酵素量に不均衡が生じており、結果として上で想定したような現象がもたらされた可能性もある。

(b)は、汚泥が持つ脱窒特性自体には高いCOD/N比の基質で運転したものと違いが無く、処理状態に伴う環境条件、あるいは、運転サイクルの中で生じる一時的な環境条件の変化が $N_2O$ の蓄積を招いたという機構である。

ここで言う環境条件としては、以下のものを想定している。(3)を除き、いずれも低COD/N比の基質で運転したリアクターにおいて観察されたものである。

- (1) 脱窒菌が利用可能な有機物が不足すること自体の効果
- (2)  $NO_3-N$ の蓄積
- (3)  $NO_2-N$ の蓄積
- (4) pHの影響

(1)は、脱窒に際しての電子供与体として利用可能な有機物が不足することが $N_2O$ の蓄積をもたらすという機構である。これは、運転条件としての低いCOD/N比という因子が $N_2O$ 蓄積に対して直接影響

を及ぼしていることに相当する。特に、リアクターの運転において基質投入直後ではなく無酸素工程の後半になって顕著な $N_2O$ 放出が見られた点は、この機構の可能性を示唆している。

(2)は、低COD/N比運転において見られた高濃度の $NO_3-N$ 蓄積が、大量の $N_2O$ 放出をもたらしたと見る機構である。実際、土壌中での脱窒に対しては、高濃度の $NO_3-N$ が $N_2O$ 還元を阻害する効果を持つことが示唆されている(Gaskell *et al.*, 1981)。

(3)は、 $NO_2-N$ の蓄積が大量の $N_2O$ 放出に寄与していたという機構である。 $NO_2-N$ の蓄積が脱窒過程での $N_2O$ 生成率を増加させることは、活性汚泥や土壌を試料とした研究により示されている

(Firestone *et al.*, 1979; Gaskell *et al.*, 1981; Hanaki *et al.*, 1992; von Schulthess *et al.*, 1994)。リアクターの運転においては、好気工程終了時の $NO_2-N$ をモニタした限りでは、大量の $N_2O$ 放出が見られた場合であっても必ずしも常に $NO_2-N$ が蓄積していたわけではない。しかし、無酸素工程において一時的に $NO_2-N$ が蓄積し、それが大量の $N_2O$ 蓄積を招いた可能性がある。

(4)のpHが、脱窒過程での中間体蓄積に大きく影響することが知られている(Nömmik, 1956; Koskinen & Keeney, 1982; Hanaki *et al.*, 1992; Thomsen *et al.*, 1994)。しかし、本研究でのリアクターの運転においては、基質のCOD/N比が小さく $N_2O$ 放出量が大きかった系列と同程度のpH条件であっても、基質のCOD/N比が大きい場合には $N_2O$ 放出が抑制されたことから(Run 2-3)、前者における $N_2O$ の大量放出をpHの違いに帰することはできない。なお、混合液のpHの効果については、第8章で検討する。

本研究では、上に挙げた機構(a)に関連した検討として、リアクターの混合液を使用した脱窒経路中の各還元活性の測定・比較をおこなった。当初は有機物を過剰に投与した条件での測定をおこなったが(7.3節)、種々の検討の結果、脱窒が内生型となる条件での各還元速度の大小関係が重要であることが示唆されたため、窒素量に対して有機物量が不足する条件での速度測定も実施した(7.5節)。

また、機構(b)に関連した検討として、リアクターの混合液を使用して脱窒条件での回分培養をおこない、初期条件を様々に変化させることにより各種因子の影響を調べた(7.4節)。検討した初期条件は、COD/N比、 $NO_3-N$ 濃度、 $NO_2-N$ 濃度である。

さらに、内生脱窒時の $N_2O$ 蓄積に対する支配因子を検討するため、リアクターの運転中に $NO_3-N$ ないしは $NO_2-N$ を添加する実験をおこなった(7.6節)。

本章では以上の検討結果について述べるが、その前に、リアクターの運転における1サイクル内での窒素系指標の変化について記述する(7.2節)。ここでは、基質のCOD/N比が小さく $N_2O$ 放出量が大きかった系列(Run 2-1, 2-2)とCOD/N比が大きく放出量が小さかった系列(Run 2-3)との比較をおこなう。

以上の結果をふまえ、7.7節において、基質のCOD/N比が小さい条件で運転した場合の $N_2O$ 生成機構について考察する。

また、7.8節では、第5章で報告したメタノール投入の影響について、7.7節でまとめた機構をふまえながら、考察をおこなう。

## 7.2 1 サイクル内での窒素系指標の変化

ここでは、基質のCOD/N比を3.5に設定しN<sub>2</sub>O放出量が大きかったリアクター系列 (Run 2-1, 2-2) と、COD/N比を5.0に設定しN<sub>2</sub>O放出量が小さかった系列 (Run 2-3) について、1 サイクル内でのNH<sub>4</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、酢酸イオンの挙動を示す。これと気相のN<sub>2</sub>O濃度の変化とを比較することにより、N<sub>2</sub>Oの生成機構について考察する。

### 7.2.1 実験方法

連続運転中のリアクターにおいて、1 サイクルの間経時的に混合液を採取し、NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、酢酸イオン濃度を測定した。採取した混合液は、5.2.2 (2) で述べたのと同一の条件で直ちに遠心・ろ過し、分析に供した。

同種の検討はいくつかの運転条件において適宜実施したが、ここでは、運転条件としての基質のCOD/N比の違いがもたらしたN<sub>2</sub>O放出量の違いを議論する目的から、Run 2-1~2-3について実施した結果を比較する。なお、本節で示す結果を得た当時には、Run 2-1・2-3において好気工程のDOが0.7~1.3 mg/lに制御されていた。

実験を実施した時点での各系列の運転条件、処理状態、N<sub>2</sub>O転換率などを表7.1にまとめた。

Run 2-1ではNO<sub>3</sub>-Nが約600 mgN/lと高濃度に蓄積しており、流入窒素当たりのN<sub>2</sub>O転換率も30%と高かった。Run 2-2においてもRun 2-1とほぼ同様の状態であり、NO<sub>3</sub>-Nが680 mgN/lと高濃度に残留し、N<sub>2</sub>O転換率は30%であった。一方、Run 2-3においてはNO<sub>3</sub>-Nの蓄積は見られず、N<sub>2</sub>O転換率は2.2%と小さかった。3系列ともに、NH<sub>4</sub>-Nの蓄積は見られず、また好気工程終了時にはNO<sub>2</sub>-Nも検出

表 7.1 実験の実施日、対象系列の運転条件および処理状態

	Run 2-1	Run 2-2	Run 2-3
実施日*	45日目	45日目	45日目
基質のCOD/N比	3.5	3.5	5.0
好気時間：無酸素時間 [min]	30:30	30:30	30:30
好気工程DO [mg/l]	0.7-1.3	6	0.7-1.3
pH	6.5-6.9	6.5-6.8	6.5-6.9
NH <sub>4</sub> -N** [mgN/l]	4.4	0.6	0.6
NO <sub>3</sub> -N** [mgN/l]	602	676	16.4
NO <sub>2</sub> -N** [mgN/l]	N.D.	N.D.	N.D.
N <sub>2</sub> O転換率*** [%]	30.1	30.1	2.2
MLSS**** [mg/l]	16,200	16,000	18,800

\*. 運転開始からの日数。

\*\* 好気工程終了時の混合液中の濃度。

\*\*\* 流入窒素当たりの転換率。

\*\*\*\* 運転開始後43日目に測定。

されなかった。

### 7.2.2 結果

各系列について、気相のN<sub>2</sub>O濃度および混合液中の各態窒素成分濃度、混合液のDOおよびpHの変化を図7.1, 7.2, 7.3に示した。

3系列ともに、好気工程には硝化、無酸素工程には脱窒の進行が確認された。

また、3系列ともに酢酸イオンは1 サイクルを通して全く検出されなかった。このことから、投入基質中の主要な有機物源である酢酸塩は、投入と同時に直ちに全量が消費されたことが分かる。なお、酢酸イオンの検出下限は約1 mg-COD/lである。

Run 2-1においては、無酸素工程でNO<sub>3</sub>-Nが消費される際にNO<sub>2</sub>-Nの蓄積を伴った点が特徴的であった。これは、特に基質投入中において顕著であり、サイクル時間で30分から40分の間に消費されたNO<sub>3</sub>-Nのうち、47%がNO<sub>2</sub>-Nの段階までしか還元されなかった。そして、無酸素工程の間には蓄積されたNO<sub>2</sub>-Nの顕著な消費は見られず、好気工程に入ってから速やかな消費が起こった。したがって、基質投入終了後には無酸素工程を通してNO<sub>2</sub>-Nが10 mgN/l程度蓄積されていたことになる。

気相のN<sub>2</sub>O濃度は無酸素工程の後半になって急増し、好気工程の間は減少傾向にあった。

Run 2-2においては、混合液中の窒素系指標、気相のN<sub>2</sub>O濃度ともに、Run 2-1と同様の挙動を示した。すなわち、無酸素工程において基質が投入される間に起こる脱窒過程でNO<sub>2</sub>-Nの蓄積が見られた。この期間に消費されたNO<sub>3</sub>-Nのうち、49%がNO<sub>2</sub>-Nとして残留した。このNO<sub>2</sub>-Nは、好気工程に入ると速やかに消費された。

Run 2-3においては、無酸素工程に入り基質が投入されるとNO<sub>3</sub>-Nが速やかに消費され、基質投入終了時にはNO<sub>3</sub>-Nが残留しなかった。その際、Run 2-1・2-2の場合に見られたようなNO<sub>2</sub>-Nの蓄積は全く認められなかった。しかし、好気工程に入るとNH<sub>4</sub>-Nの消費とともにNO<sub>2</sub>-Nの蓄積が見られた。ただし、その濃度は最大でも1 mgN/l以下であり、Run 2-1・2-2において無酸素工程に見られた濃度と比較すると1/10以下であった。好気工程の後半になると、蓄積されたNO<sub>2</sub>-Nが全量消費された。

N<sub>2</sub>Oは好気工程に生成されており、特に、好気工程開始20分後にN<sub>2</sub>O濃度が一時的に急増した。

### 7.2.3 考察

Run 2-1・2-2とRun 2-3とは、NO<sub>2</sub>-Nの蓄積傾向が全く異なっていたのが特徴的であった。Run 2-1・2-2では無酸素工程に、Run 2-3では好気工程にNO<sub>2</sub>-Nが蓄積されたが、N<sub>2</sub>O放出が最大となった工程がこれと一致していた点は興味深い。これより、NO<sub>2</sub>-Nの蓄積とN<sub>2</sub>O生成との間に関連があるのではないかと推察される。ただし、Run 2-1・2-2において、NO<sub>2</sub>-Nの蓄積が主に基質投入中に生じたのに対して、N<sub>2</sub>O放出は無酸素工程の後半に顕著となったことから、NO<sub>2</sub>-Nの蓄積が直ちにN<sub>2</sub>Oの大量発生を引き起こすとは限らない。

ここで、全系列において基質中の主要な有機物である酢酸塩が投入と同時に直ちに全量摂取された点に着目する。このことは、基質投入終了後におこなわれた脱窒は概ね内生脱窒であったことを意味する。Run 2-1・2-2において40分以降の $\text{NO}_3\text{-N}$ 消費速度が減少しているのは、有機物存在下での脱窒速度に比べて内生脱窒速度が小さいためであると考えられる (Abufayed & Schroeder, 1986)。

これより、Run 2-1・2-2において $\text{N}_2\text{O}$ が大量に放出された無酸素工程の後半では、脱窒は内生型であったと判断できる。つまり、本系列で大量に放出された $\text{N}_2\text{O}$ は、内生脱窒の過程で生成されたものであると考えることができる。

一方、Run 2-3においては、基質投入中に $\text{NO}_3\text{-N}$ および $\text{NO}_2\text{-N}$ が完全に消費されたため、無酸素工程の後半には脱窒がほとんど進行していなかったと思われる。

この違いが、無酸素工程後半での $\text{N}_2\text{O}$ 放出量が大きく異なった要因のひとつではないかと考えられる。つまり、基質中の有機物が枯渇した時点で、電子受容体となる窒素酸化物が混合液中に存在しているかどうかということが重要ではないかと考えられる。

Run 2-1・2-2において、基質のCOD/N比を3.5と、 $\text{N}_2$ ガスまでの完全な脱窒に必要なCOD/N比としての一般的な値である3.5~4.5 (Henze *et al.*, 1994)と比較して著しく小さく設定したわけではないにも関わらず、 $\text{NO}_3\text{-N}$ が高濃度に蓄積した点に対しては(5.4.1参照)、この $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積が寄与していたと考えられる。無酸素工程において脱窒により消費される $\text{NO}_3\text{-N}$ の一部が $\text{NO}_2\text{-N}$ までしか変換されない場合、その $\text{NO}_2\text{-N}$ は好気工程において硝化により再び $\text{NO}_3\text{-N}$ へと酸化される。つまり、無酸素工程で消費される $\text{NO}_3\text{-N}$ のうち $\text{NO}_2\text{-N}$ として残留する分は、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の除去に全く寄与していないことになる。これは、基質中の有機物の一部が無駄に消費されることを意味する。無酸素工程での消費 $\text{NO}_3\text{-N}$ 量のうち50%が $\text{NO}_2\text{-N}$ までしか還元されないとすれば、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 除去率は最大でも50%しか得られないことになり、これらの運転条件において数百 $\text{mgN/l}$ と高濃度の $\text{NO}_3\text{-N}$ が蓄積した点にも納得がいく。

ただし、基質中の有機物の貯蔵物質への変換も寄与していた可能性がある。7.4節で示すように(図7.12)、基質投入時には、有機物が脱窒に使用されるだけでなく相当割合がPHBとして菌体内に貯蔵されたものと思われる。その一部は無酸素工程後半での脱窒において使用されると考えられるが、好気工程にまで持ち越される分があるとすれば、そこで貯蔵物質を使った酸素呼吸が起こることが予想される。これは、基質中の有機物の一部が脱窒ではなく酸素呼吸により消費されることに相当する。すなわち、脱窒により消費される実質的なCOD/Nが基質のCOD/Nよりも小さかったと考えられ、この点も $\text{NO}_3\text{-N}$ の蓄積に寄与していた可能性がある。

Run 2-1・2-2と同様に $\text{NO}_3\text{-N}$ が高濃度に蓄積したRun 1-1・1-2では、運転サイクルに沿った各指標の変化を見ることをおこなわなかったが、やはり同様の現象が起こっていたものと思われる。

## 7.2.4 まとめ

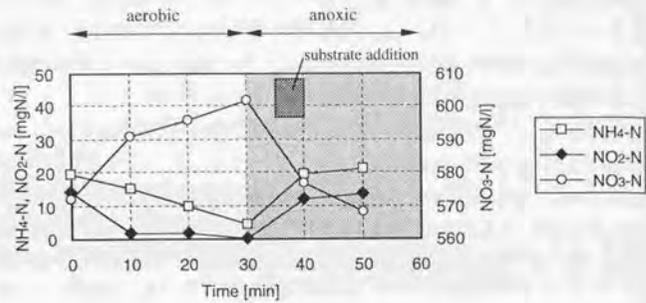
リアクターの運転における1サイクル内の窒素成分濃度の挙動を観察した。

基質のCOD/N比が小さく $\text{N}_2\text{O}$ を大量に放出しているリアクター (Run 2-1, 2-2) と $\text{N}_2\text{O}$ 放出量が小さいリアクター (Run 2-3) とでは、 $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積状況に大きな違いが見られた。前者においては無酸素工程で脱窒が進行する際に $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積を伴った。一方、後者においては脱窒の際に $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積は見られず、好気工程に低濃度の $\text{NO}_2\text{-N}$ が一時的に蓄積した。

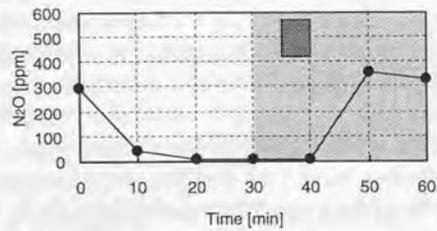
いずれの場合にも、 $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積と $\text{N}_2\text{O}$ の生成が同じ工程に見られたことから、 $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積が $\text{N}_2\text{O}$ 生成に関与している可能性が示唆された。

3系列ともに、基質中の主要な有機物源である酢酸塩は投入後直ちに全量が消費されており、基質投入終了後に進行する脱窒は内生脱窒であることが明らかにされた。これより、Run 2-1・2-2において無酸素工程の後半で大量に発生した $\text{N}_2\text{O}$ は、内生脱窒の過程で生成されたものであると考えられた。

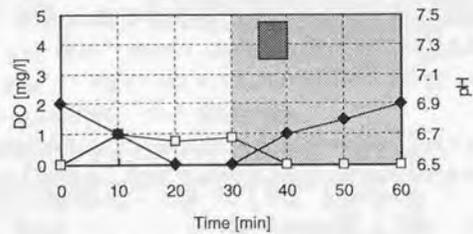
Run 2-3では、基質投入終了時には $\text{NO}_3\text{-N}$ および $\text{NO}_2\text{-N}$ が残留しておらず、内生脱窒が起こっていないと思われた。このことから、無酸素工程での $\text{N}_2\text{O}$ 発生に対しては、基質中の有機物が枯渇した時点で脱窒の電子受容体となる窒素酸化物が混合液中に残留しているかどうかと推定された。



(a) NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N

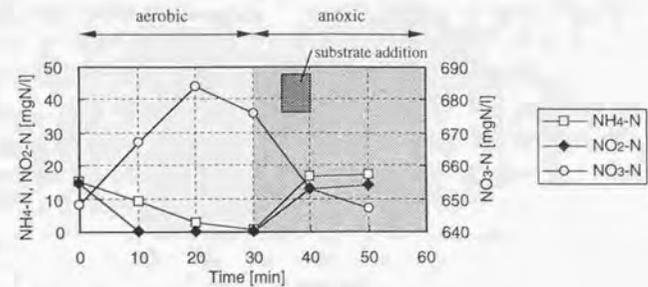


(b) 気相のN<sub>2</sub>O

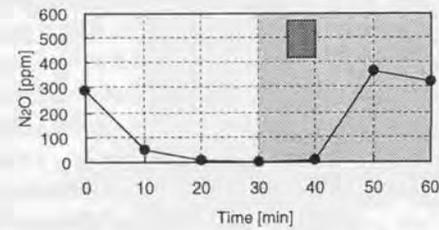


(c) DO, pH

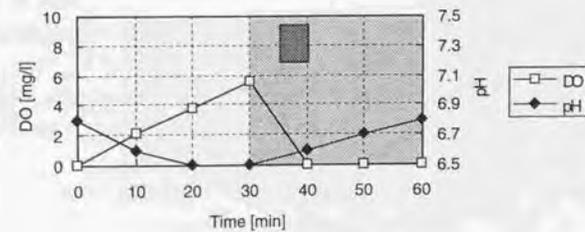
図 7.1 1 サイクル内の各指標の変化 (Run 2-1)  
(a): 45日目, (b),(c): 43日目に測定)



(a) NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N

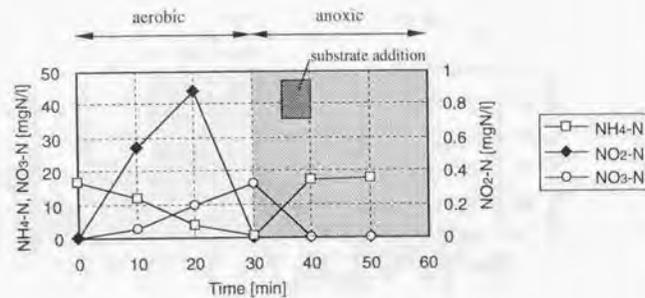


(b) 気相のN<sub>2</sub>O

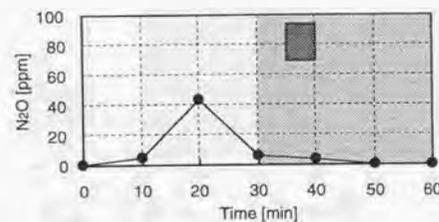


(c) DO, pH

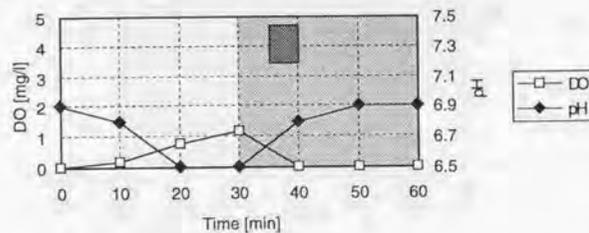
図 7.2 1 サイクル内の各指標の変化 (Run 2-2)  
(a): 45日目, (b),(c): 43日目に測定)



(a) NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N



(b) 気相のN<sub>2</sub>O



(c) DO, pH

図 7.3 1 サイクル内の各指標の変化 (Run 2-3)  
(a): 45日目, (b),(c): 43日目に測定

### 7. 3 脱窒経路中の各還元活性の比較

7. 1 節で指摘したように、リアクターにおいて低COD/Nの基質で運転をおこなった場合に脱窒過程でN<sub>2</sub>Oが大量に発生した機構のひとつとして、汚泥中の脱窒菌が持つN<sub>2</sub>O還元能力自体の低下が考えられる。また、流入基質のCOD/N比を小さく設定しN<sub>2</sub>Oが大量発生しているリアクターでは、基質投入中に進行する脱窒過程でNO<sub>2</sub>-Nが蓄積する傾向が見られた(7. 2 節)。

これらの点について検討するため、リアクターより取り出した汚泥に対して、有機物を過剰に与えた条件でNO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, N<sub>2</sub>Oの各還元速度を測定した。目的は、(a) 脱窒菌のN<sub>2</sub>O還元能力とリアクター運転時のN<sub>2</sub>O放出量との関連性評価、(b) 脱窒過程でのNO<sub>2</sub>-N蓄積機構の解明、の2点である。

測定対象としたのは、運転系列Run 1-1~1-3およびRun 2-1~2-3である。

#### 7.3.1 実験方法

各還元活性の測定方法の概略は、以下の通りである。リアクターから混合液の一部を取り出し、蓄積しているNO<sub>3</sub>-NおよびNO<sub>2</sub>-Nを除くために遠心洗浄した後に、測定容器に移した。そして、容器内部の酸素をN<sub>2</sub>ガスバージにより追い出した後、電子受容体となる窒素酸化物を加え、培養を開始した。培養中に適宜混合液ないしは気相部気体を採取し、対象窒素酸化物濃度の減少を追った。得られた減少直線の傾きより、還元速度を算出した。

なお、N<sub>2</sub>O還元活性の測定に際しては、実測されるのは気相のN<sub>2</sub>O濃度の変化であるが、混合液中に溶存したN<sub>2</sub>O量も把握する必要がある。そこで、N<sub>2</sub>Oの気液平衡を仮定して気相のN<sub>2</sub>O濃度から溶存N<sub>2</sub>O濃度を算出し(Moraghan & Buresh, 1977)、得られた全N<sub>2</sub>O量の減少直線から還元速度を求めた。溶存N<sub>2</sub>O濃度の算出には、20℃でのOstwald係数(0.6788 l/l; Wilhelm *et al.*, 1976)を使用した。

洗浄後の汚泥を再懸濁させる反応溶液としては、リン酸バッファー(50 mM)に酢酸ナトリウムおよび無機塩を加えpHを7.0に調整したものを使用した(表 7.2)。酢酸ナトリウムは還元反応の際の電子供与体として添加したもので、リアクターの運転で使用した基質中の主要な有機物である。これを、対象とする窒素酸化物量に対して過剰量与えた。また、無機塩の組成および濃度は、リアクターへの投入基質とはほぼ同等とした。

添加する各窒素酸化物量は、NO<sub>3</sub>-NおよびNO<sub>2</sub>-N還元の場合には2.4 mgN、N<sub>2</sub>O還元の場合には1.2 mgNとした。これより、それぞれの初期濃度は、NO<sub>3</sub>-NおよびNO<sub>2</sub>-N還元においては30 mgN/l、N<sub>2</sub>O還元においては添加したN<sub>2</sub>Oが全て液相中に溶存している状態での濃度で40 mgN/lとなった。なお、NO<sub>3</sub>-Nは硝酸カリウム溶液で、NO<sub>2</sub>-Nは亜硝酸ナトリウム溶液で、N<sub>2</sub>Oは標準N<sub>2</sub>Oガス(昭和電工)で与え

表 7.2 脱窒経路中の各還元活性測定に使用した反応溶液 [mg/l]

CH <sub>3</sub> COONa·3H <sub>2</sub> O	9,540
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,800
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	200
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	20
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	20
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2
pH	7.0

た。

なお、測定対象とするリアクターの混合液が10倍希釈された生物濃度で測定がおこなわれるように、反応溶液量を調整した。

NO<sub>3</sub>-NおよびNO<sub>2</sub>-Nの還元活性は、図7.4に示した装置にて測定した。気体の流入・流出口が設けられてあり、N<sub>2</sub>ガスにより内部を連続的にパージしながら測定をおこなった。試料は、ゴム栓に挿入した採取口よりプラスチック製シリンジ（テルモ）にて採取した。

N<sub>2</sub>O還元活性は、ブチルゴムセパムおよびアルミシールで密閉したバイアル瓶により測定した。

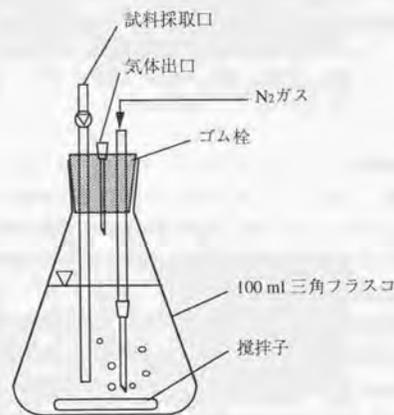


図 7.4 NO<sub>3</sub>-N/NO<sub>2</sub>-N還元活性測定に使用した反応容器

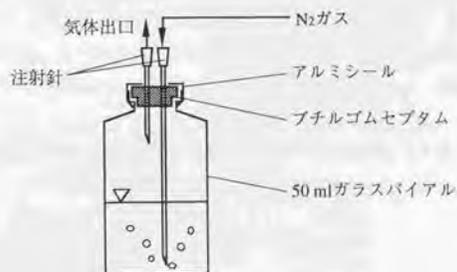


図 7.5 N<sub>2</sub>O還元活性測定前のN<sub>2</sub>ガスによるバイアル内パージ操作

アルミシールには開口部が設けてあり、ガスタイトシリンジ（Hamilton, U.S.A.）にて密閉状態のまま内部気体を採取した。その際、シリンジ内部のデッドボリューム中に残留した空気中の酸素による汚染を防ぐため、毎回の採取直前にシリンジ内部をN<sub>2</sub>ガスで置換した。

毎回の測定時には、反応容器に移す直前の状態での汚泥のMLSSを測定し、生物濃度とした。

NO<sub>3</sub>-N/NO<sub>2</sub>-N還元活性は室温で測定し、N<sub>2</sub>O還元活性は20℃の恒温室内で測定した。

以下に、各還元活性の測定手順を記す。

#### [NO<sub>3</sub>-N/NO<sub>2</sub>-N還元活性]

- (1) リアクターより混合液を適量採取する。
- (2) 遠心分離をおこなう（4,000 rpm×5 min, 20℃）。
- (3) 上澄みを捨て、沈殿した汚泥を反応溶液に再懸濁させる。
- (4) (2)～(3)の操作を2～3回繰り返す。最終的に、混合液を10倍希釈した生物濃度となるよう、適量の反応溶液に懸濁させる。
- (5) 懸濁液80 mlを反応容器へ移す。
- (6) 攪拌およびN<sub>2</sub>ガスパージを開始し、30分間の前培養をおこなう。これは、容器内部の酸素を完全に除く目的以外に、残留したNO<sub>3</sub>-NあるいはNO<sub>2</sub>-Nを完全に消費させることを意図している。
- (7) 試料採取口（図7.4）からプラスチック製シリンジ（テルモ）にて、NO<sub>3</sub>-NないしはNO<sub>2</sub>-Nを添加する。その際に、シリンジ内部の空気が流入しないよう注意する。この時点をもって、培養開始とする。
- (8) 適宜、汚泥試料を採取する。試料は採取後直ちにメンブランフィルター（0.45 μm）でろ過し、NO<sub>3</sub>-NおよびNO<sub>2</sub>-Nの測定に供する。

#### [N<sub>2</sub>O還元活性]

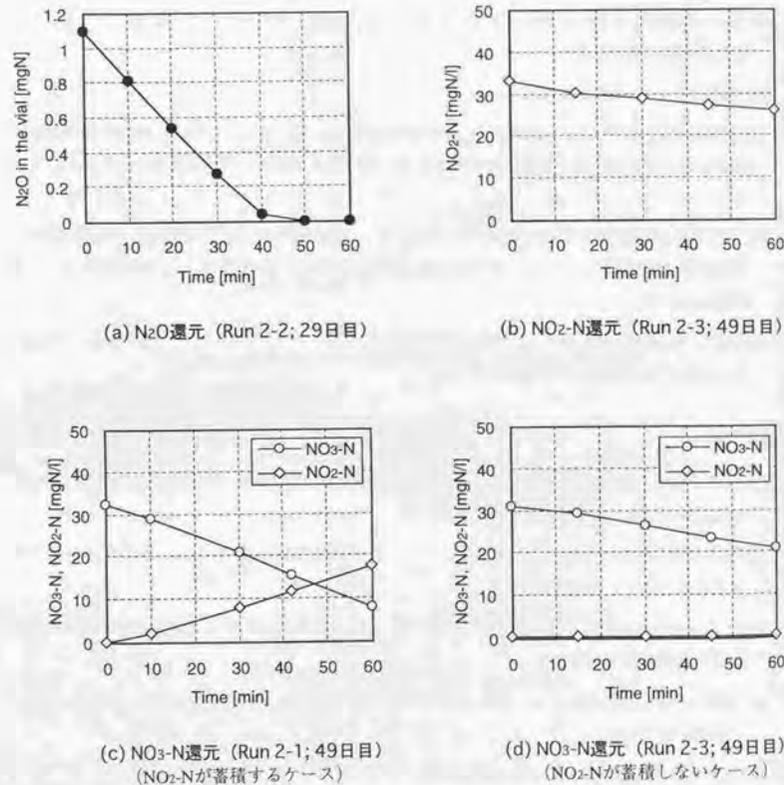
- (1) リアクターより混合液を採取し、洗浄・再懸濁操作をおこなう。本過程は、NO<sub>3</sub>-N/NO<sub>2</sub>-N還元速度測定の際の操作(1)～(4)と同一である。
- (2) 再懸濁液30 mlを、50 mlのガラス製バイアル瓶（内容積約68 ml）に移し、ブチルゴムセパムおよびアルミシールで密栓する。
- (3) アルミシールの開口部から注射針を2本挿入し、30分以上N<sub>2</sub>ガスを通すことにより内部をN<sub>2</sub>ガスで置換する（図7.5）。
- (4) 標準N<sub>2</sub>Oガスを適量注入し、激しく攪拌する。この時点をもって、培養開始とする。その後、振とう培養をおこなう。
- (5) 適宜気相部気体を採取し、N<sub>2</sub>O濃度を測定する。

### 7.3.2 結果

各測定において、添加した電子受容体はほぼ直線的に消費された（図 7.6 (a)~(d)）。NO<sub>3</sub>-N還元活性の測定に際しては、NO<sub>3</sub>-N還元よりもNO<sub>2</sub>-N還元速度の方が小さい場合にはNO<sub>2</sub>-Nが直線的に蓄積した。ただし、その場合でもNO<sub>3</sub>-Nの消費は直線的に起こった（図 7.6 (c)）。

なお、培養終了時のpH上昇は、0.1以下であった。また、培養直前の汚泥をろ過しNO<sub>3</sub>-NおよびNO<sub>2</sub>-Nを測定したところ、両者ともに検出されなかった。N<sub>2</sub>O還元活性測定に際しては、N<sub>2</sub>O注入をおこなわないブランクの培養を同時に実施したが、N<sub>2</sub>Oの生成は認められなかった。

リアクターの運転系列Run 1-1~1-3においては、N<sub>2</sub>O還元活性のみを測定した。各系列について2~3回ずつの測定を実施した結果を表 7.3および図 7.7に示した。



(a) N<sub>2</sub>O還元 (Run 2-2; 29日目)

(b) NO<sub>2</sub>-N還元 (Run 2-3; 49日目)

(c) NO<sub>3</sub>-N還元 (Run 2-1; 49日目)  
(NO<sub>2</sub>-Nが蓄積するケース)

(d) NO<sub>3</sub>-N還元 (Run 2-3; 49日目)  
(NO<sub>2</sub>-Nが蓄積しないケース)

図 7.6 脱窒経路中の各還元活性測定における電子受容体濃度の経時変化の例

表 7.3 N<sub>2</sub>O還元活性測定結果 (Run 1-1~1-3)

リアクター 運転条件	経過日数	測定時の MLSS* [mg/l]	N <sub>2</sub> O還元活性	
			体積当たり [μgN/(l·min)]	生物量当たり [μgN/(g·MLSS·min)]
1-1	74	630	747	1,190
	88	1,150	733	638
1-2	74	737	606	822
	104	1,160	846	729
	125	1,190	670	563
1-3	74	970	577	595
	104	1,890	703	372

\*. リアクターの混合液を10倍希釈した状態での濃度。

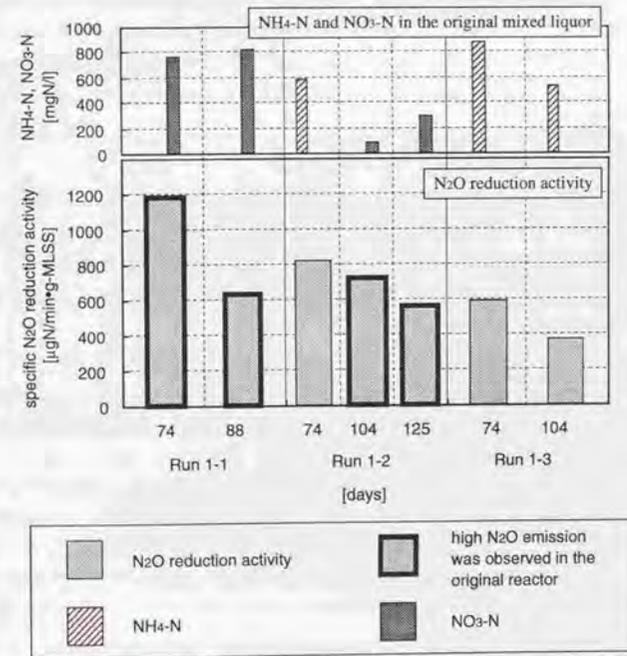


図 7.7 リアクター混合液 (Run 1-1~1-3) のN<sub>2</sub>O還元活性 (下段) および測定実施日の汚泥供給元リアクターでのNH<sub>4</sub>-N・NO<sub>3</sub>-N蓄積状況 (上段)

表 7.4 NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, N<sub>2</sub>O還元活性測定結果  
(Run 2-1~2-3)

リアクター 運転条件	運転 日数	測定時の MLSS* [mg/l]	体積当たり還元活性 [μgN/(l·min)]			生物量当たり還元活性 [μgN/(g-MLSS·min)]		
			NO <sub>3</sub> -N還元	NO <sub>2</sub> -N還元	N <sub>2</sub> O還元	NO <sub>3</sub> -N還元	NO <sub>2</sub> -N還元	N <sub>2</sub> O還元
2-1	29	1,350	497	180	1,110	368	134	820
	49	1,160	400	91	807	344	79	696
2-2	29	1,440	602	210	1,100	418	146	760
	49	1,390	605	123	1,020	435	88	737
2-3	29	1,620	281	303	1,040	174	187	640
	49	1,500	173	175	653	115	117	435
	80	1,180	121	140	603	102	119	511

\*.リアクターの混合液を10倍希釈した状態での濃度。

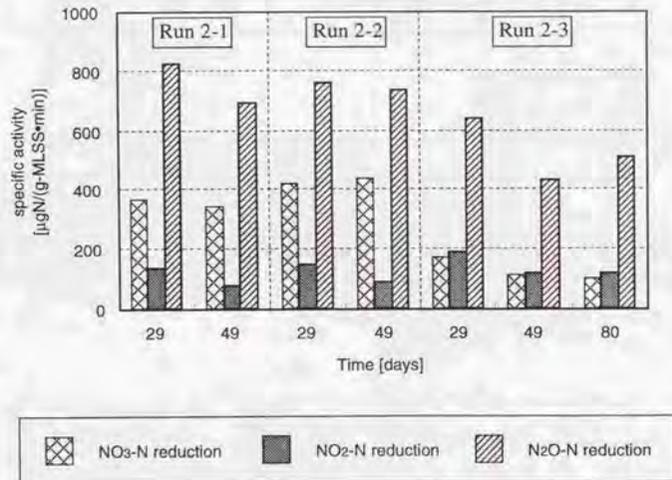


図 7.8 NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, N<sub>2</sub>O還元活性の比較 (Run 2-1~2-3)

系列間の比較を試みると、各系列内で測定時期によりばらつきが見られたものの、体積当たりの活性には顕著な傾向が見られなかった。MLSS当たりの活性では、N<sub>2</sub>O放出量の大きかったRun 1-1や1-2の活性は、N<sub>2</sub>Oをほとんど放出していないRun 1-3の活性よりもむしろ大きい傾向が見られた。本結果より、脱窒過程で大量のN<sub>2</sub>Oを放出している系列の汚泥であっても、N<sub>2</sub>O放出量が小さい系列と同程度かそれ以上のN<sub>2</sub>O還元能力を有していることが分かる。

同一系列内で処理状態およびN<sub>2</sub>O放出量が異なるケースについても見てみる。Run 1-2において、処理状態がNH<sub>4</sub>-N蓄積型の場合とNO<sub>3</sub>-N蓄積型の場合および両者が蓄積していない場合について測定しているが、活性に差は見られなかった。実際にはN<sub>2</sub>O放出量がこれら処理状態の影響を強く受けたのは、5.3節で述べたとおりである。

Run 2-1~2-3では、NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, N<sub>2</sub>O還元活性をそれぞれ測定した。結果を表 7.4および図 7.8に示した。

いずれの系列においても、N<sub>2</sub>O還元活性はNO<sub>3</sub>-N/NO<sub>2</sub>-N還元活性よりも明らかに大きかった。

NO<sub>3</sub>-N還元活性とNO<sub>2</sub>-N還元活性とを比較すると、両者の大小関係にはリアクター系列により明確な違いが見られた。N<sub>2</sub>O放出量が大きかったRun 2-1およびRun 2-2ではNO<sub>3</sub>-N還元活性の方が明らかに大きかったのに対して、Run 2-3では両者が同程度の値であった。この違いは、NO<sub>3</sub>-N還元活性測定時にNO<sub>2</sub>-Nの蓄積傾向としても現れており、Run 2-1およびRun 2-2ではNO<sub>3</sub>-Nの消費につれてNO<sub>2</sub>-Nが蓄積したのに対して、Run 2-3ではNO<sub>2</sub>-Nの蓄積を伴わずにNO<sub>3</sub>-Nが還元された(図 7.6 (c), (d))。

### 7.3.3 考察

各還元活性測定において、添加した窒素酸化物は直線的に減少した。このことから、本測定条件において、窒素酸化物濃度および有機物濃度は制限因子になっていなかったと判断される。したがって、ここで測定した還元速度は設定pH (=7.0)での最大還元速度、すなわち還元活性であると見なせる。

実際、文献において見られる各窒素酸化物および有機物に対する半飽和定数(K<sub>m</sub>)と本測定での条件とを比較すると(表 7.5)、本測定で設定した窒素酸化物濃度および有機物濃度は、K<sub>m</sub>よりもはるかに大きいことが分かる。

N<sub>2</sub>O還元活性の測定に際しては、培養開始時にN<sub>2</sub>Oを気相へ注入したため、N<sub>2</sub>Oの気相から液相への移動が律速になっていた可能性が考えられる。

しかしながら、希釈率の小さい汚泥を使用して同様の条件で測定をおこなうと、還元速度が明らかに大きかった。これは、観察された気相のN<sub>2</sub>Oの減少が液相でのN<sub>2</sub>O消費速度に依存していたことを意味する。

すなわち、N<sub>2</sub>Oの気相から液相への移動速度は、N<sub>2</sub>O還元速度と比較して十分に大きかったと見なすことができる。

表7.5 文献において見られる脱窒経路中の各還元反応の動力学定数

対象	最大還元速度 [mgN/(mgSS·day)]		半飽和定数 [mg/l]				文献
	NO <sub>3</sub> -N	NO <sub>2</sub> -N	NO <sub>3</sub> -N	NO <sub>2</sub> -N	N <sub>2</sub> O-N	COD	
活性汚泥	0.32	0.52	<1	-	-	30	Beccari <i>et al.</i> (1983)
活性汚泥*	0.015	0.024	0.14-0.56	-	-	-	Nakajima <i>et al.</i> (1984)
活性汚泥	-	-	-	-	-	72.5 (9.1)**	Stensel <i>et al.</i> (1973)
活性汚泥	0.32	-	0.08	-	-	-	Moore & Schroeder (1971)
<i>Pa. denitrificans</i>	2.4	2.2	0.77	0.28	-	8.4	Kornaros <i>et al.</i> (1996)
<i>Alcaligenes sp.</i>	-	-	-	0.18	-	-	Betlach & Tiedje (1981)
<i>Ps. fluorescens</i>	-	-	-	0.078	-	-	Betlach & Tiedje (1981)
<i>Flavobacterium sp.</i>	-	-	-	0.077	0.0062	-	Betlach & Tiedje (1981)

\*. オキシデーションディッチの汚泥を使用。

\*\* 括弧内は、不活性なCODを除いて算出した値。

Run 1-1~1-3およびRun 2-1~2-3全てにおいて、N<sub>2</sub>O放出量とN<sub>2</sub>O還元活性との間に関連は見出されず、いかなる条件の混合液を使用してもN<sub>2</sub>O還元活性には顕著な違いが見られなかった。すなわち、N<sub>2</sub>O放出量の大小に関わり無く、汚泥中の脱窒菌が持つN<sub>2</sub>O還元能力は同程度に維持されていたと言える。

さらに、N<sub>2</sub>O以外の窒素酸化物の還元活性を測定した全ての場合について、N<sub>2</sub>O還元活性は脱窒経路中で前段に位置する各還元活性よりも数倍大きかった。

これらの観測事実より、基質のCOD/N比が小さいリアクターにおいて見られた脱窒過程での大量のN<sub>2</sub>O発生は、汚泥中の脱窒菌が持つN<sub>2</sub>O還元能力が低下したためではないと結論づけられる。したがって、脱窒過程でN<sub>2</sub>Oが発生する場合には、汚泥中の脱窒菌が十分量有しているはずのN<sub>2</sub>O還元酵素が最大限には機能せず、実際のN<sub>2</sub>O還元速度がNO<sub>2</sub>-N還元速度を下回っていたと推察される。

7. 2節において、基質のCOD/N比が小さくN<sub>2</sub>Oが大量に発生しているRun 2-1およびRun 2-2においては、基質投入中に脱窒が進行する過程でNO<sub>2</sub>-Nが蓄積する傾向が見られた。

これに対しては、本節で得られたNO<sub>3</sub>-N還元活性とNO<sub>2</sub>-N還元活性の差より説明される。これらの系列の汚泥ではNO<sub>3</sub>-N還元活性と比較してNO<sub>2</sub>-N還元活性が明らかに小さくなっており、そのためにNO<sub>3</sub>-Nからの脱窒が進行する際に必然的にNO<sub>2</sub>-Nが蓄積したものと考えられる。

一方、Run 2-3においてはNO<sub>3</sub>-N還元活性とNO<sub>2</sub>-N還元活性がほぼ同程度の大きさであった。これは、同系列においては脱窒過程でNO<sub>2</sub>-Nの蓄積が見られなかった事実と合致している。

ここで、上の傾向が有機物を過剰に投与した条件で得られたものである点を指摘しておく。内生脱窒時における両還元速度の大小関係には異なった傾向が見られたが、これに関しては7. 5節で述べる。

Run 2-1およびRun 2-2においてNO<sub>2</sub>-N還元活性がNO<sub>3</sub>-N還元活性よりも小さかった理由としては、以下のものが考えられる。(a)~(c)は運転条件の違いが汚泥中の脱窒菌群が持つ還元活性に影響することにより引き起こされる効果である。(d)はNO<sub>2</sub>-N還元活性測定時の問題、(e)は脱窒菌以外の細菌の寄与

を考慮したものである。

- (a) リアクターでの高濃度のNO<sub>3</sub>-N蓄積がもたらした高いNO<sub>3</sub>-N還元活性
- (b) 亜硝酸塩還元酵素の合成抑制
- (c) 脱窒菌相の違い
- (d) NO<sub>2</sub>-NによるNO<sub>2</sub>-N還元阻害。
- (e) NO<sub>3</sub>-NからNO<sub>2</sub>-Nまでの還元のみをおこなう細菌群の集積。

(a)は、Run 2-1およびRun 2-2ではRun 2-3と比較してNO<sub>3</sub>-N還元活性が数倍大きかった点に着目したものである(図7.8)。すなわち、Run 2-1・2-2において見られたNO<sub>3</sub>-N還元とNO<sub>2</sub>-N還元の活性差は、NO<sub>2</sub>-N還元活性が小さかったためではなくNO<sub>3</sub>-N還元活性が大きかったことに起因していたと言える。そして、両系列においてNO<sub>3</sub>-N還元活性が大きかった理由として、高濃度のNO<sub>3</sub>-N蓄積が高いNO<sub>3</sub>-N還元活性をもたらした可能性を挙げることができる。ただし、7. 2節で述べたように、両還元活性の不均衡が、間欠曝気型の運転サイクル全体を考えた場合にNO<sub>3</sub>-Nの蓄積をもたらした要因であるとも考えられるため、両活性の不均衡とNO<sub>3</sub>-Nの蓄積とが互いに相乗効果をもたらした可能性も考えられる。

(b)は、活性汚泥による脱窒においてしばしば見られるNO<sub>2</sub>-N蓄積に対する要因のひとつとして、Wilderer *et al.* (1987)が指摘しているものである。しかしながら、上で述べたように両還元反応の活性差は高いNO<sub>3</sub>-N還元活性が原因で生じたものでありNO<sub>2</sub>-N還元活性の低下によるものではないため、本機構は除外される。

(c)は、純菌レベルでの研究において、脱窒菌種により中間体の蓄積状況が異なるという既報に基づいている(Betlach & Tiedje, 1981)。本報告によると、3種の脱窒菌をそれぞれNO<sub>3</sub>-N投与の条件で回分式に培養した場合に、菌種によりNO<sub>2</sub>-Nを蓄積するものと蓄積しないものとが見られた。そしてこれは、各菌種が持つNO<sub>3</sub>-N還元活性とNO<sub>2</sub>-N還元活性の差により生じる違いであることが示唆された。すなわち、種々の脱窒菌が持つNO<sub>3</sub>-N還元とNO<sub>2</sub>-N還元の活性比は様々であり、菌種によってはNO<sub>3</sub>-Nからの脱窒に際して必然的にNO<sub>2</sub>-Nの蓄積を伴うことが起こりうる。脱窒菌の純粋培養系において、NO<sub>3</sub>-Nからの脱窒過程でNO<sub>2</sub>-Nが蓄積する傾向は、Almeida *et al.* (1995a)やSijbesma *et al.* (1996)によっても報告されており、前者においては、亜硝酸塩還元速度が硝酸塩還元速度の46%であった。本リアクターの運転においても、Run 2-1やRun 2-2のように基質のCOD/N比が小さい条件では、このような脱窒菌種が集積した可能性がある。

(d)は、NO<sub>2</sub>-N還元活性測定時に、NO<sub>2</sub>-Nによる自己阻害により活性が過小評価された可能性があるというものである。実際、Nakajima *et al.* (1984b)は、オキシデーションディッチの返送汚泥を使用して脱窒の動力学的考察をおこなった際に、NO<sub>3</sub>-NないしはNO<sub>2</sub>-N濃度が小さい領域ではNO<sub>2</sub>-N還元速度がNO<sub>3</sub>-N還元速度を上回るのに対して、高濃度領域では両者の大小関係が入れ替わることを見出している。この阻害は、NO<sub>2</sub>-N濃度がある閾値を超えると急激に現れるものであるらしい(Beccari *et al.*, 1983)。ただし、汚泥の馴養により閾値以上の濃度であっても阻害が起こらなくなることも示されている上、生物濃度によっても閾値が異なる傾向が見出されている。したがって、閾値となるNO<sub>2</sub>-N濃度は汚泥の運転条件によって異なることが予想されるが、Beccari *et al.* (1983)は500~1,000

mgVSS/lの活性汚泥について20~25 mgN/lという閾値を報告している。本研究でのNO<sub>2</sub>-N還元活性測定に際しては初期NO<sub>2</sub>-Nを30 mgN/lとしており、ある程度の阻害が起こっていた可能性は否定できない。しかしながら、Run 2-1およびRun 2-2でのNO<sub>2</sub>-N還元活性測定時に、NO<sub>2</sub>-Nが存在しない培養初期からNO<sub>2</sub>-Nが直線的に蓄積されたことから、これらの系列において実際にNO<sub>3</sub>-N還元速度がNO<sub>2</sub>-N還元速度を上回っていたのは確実であると言える。

(e)は、SBR (Sequencing Batch Reactor) 型の活性汚泥による脱窒において、有機物としてグルコースを与えた場合にNO<sub>2</sub>-Nの蓄積が見られた理由としてWilderer *et al.* (1987)が挙げているものである。それによると、投与する有機物の種類によっては、NO<sub>2</sub>-Nまでの還元しかおこなわない発酵細菌が集積し、見かけ上NO<sub>3</sub>-N還元活性がNO<sub>2</sub>-N還元活性よりも大きくなることありうる。しかし、同じ実験系列において酢酸を有機物源とした場合にはそのような傾向が全く見られなかったことから、本研究のリアクターにおいて見られた現象の要因である可能性は小さいと考えられる。

ここでの議論をまとめると、Run 2-1およびRun 2-2においてNO<sub>3</sub>-N還元活性がNO<sub>2</sub>-N還元活性よりも大きかった点に対して、まず、(d)に挙げたような測定手法上の問題は要因から除外される。そして、(a)に示したNO<sub>3</sub>-N蓄積に伴うNO<sub>3</sub>-N還元活性の増加という機構が有力な要因であると予想されるが、その際、(c)に挙げたような脱窒菌種の違いが生じていたのかどうかについては、本結果からは不明である。

脱窒の過程でNO<sub>2</sub>-Nが蓄積する機構として、純菌レベルでは以下の(1)~(4)が考えられる (Blaszczuk, 1993)。

- (1) NO<sub>3</sub>-Nによる亜硝酸塩還元酵素の阻害
- (2) NO<sub>3</sub>-NがNO還元酵素を阻害することで蓄積したNOによる亜硝酸塩還元酵素の阻害
- (3) NO<sub>3</sub>-N還元活性とNO<sub>2</sub>-N還元活性の違いに由来する両還元反応の速度差
- (4) 硝酸塩還元酵素と亜硝酸塩還元酵素の誘導レベルで生じる時間差

上の考察から、リアクターの運転系列Run 2-1やRun 2-2において脱窒過程でNO<sub>2</sub>-Nが蓄積した点に対しては、(3)が主要な機構であると推定された。ここで、他の機構も寄与していた可能性について考えてみる。

(1)および(2)に関しては、本結果からは寄与の有無を判定できない。しかし、NO<sub>2</sub>-N還元活性測定時にはNO<sub>3</sub>-Nは存在していないため、これらを考慮しなくてもNO<sub>2</sub>-Nの蓄積は説明される。ただし、(1)に関しては、この効果を組み込んだ多くの動力学モデルによりNO<sub>2</sub>-Nの蓄積が再現されていることから (Almeida *et al.*, 1995b; Wang *et al.*, 1995; Komaros *et al.*, 1996)、本研究のリアクターの運転時にも寄与していた可能性がある。NO<sub>3</sub>-Nが亜硝酸塩還元酵素を阻害する機序としては、硝酸塩還元酵素と亜硝酸塩還元酵素が電子をめぐる競合関係にある点が指摘されている (Almeida *et al.*, 1995b; Rijn *et al.*, 1996)。

(4)については、NO<sub>3</sub>-N/NO<sub>2</sub>-N還元活性測定の際に培養初期より両基質が直線的に消費され、ラグタイムが見られなかったことから、寄与は小さいと思われる。

### 7.3.4 まとめ

リアクター運転系列Run 1-1~1-3、2-1~2-3の混合液に対して、脱窒経路中の各還元反応の活性を測定・比較した。

N<sub>2</sub>O還元活性は、前段の各活性よりも常に大きかった。また、処理状態およびN<sub>2</sub>O放出量とN<sub>2</sub>O還元活性との関連も明白ではなかった。これより、低COD/N比の基質で運転し脱窒過程でN<sub>2</sub>Oを大量に発生している汚泥であっても、その中の脱窒菌のN<sub>2</sub>O還元能力は維持されていることが示された。

したがって、そこでのN<sub>2</sub>Oの大量発生に対しては、脱窒菌のN<sub>2</sub>O還元能力が低下したという機構では説明できない。保持されているはずのN<sub>2</sub>O還元能力が十分に機能しなくなった要因を検討する必要がある。この点に関して、次節以降で検討していく。

脱窒過程で大量のN<sub>2</sub>Oが放出された系列 (Run 2-1, 2-2) に限って、NO<sub>2</sub>-N還元活性よりもNO<sub>3</sub>-N還元活性の方が大きかった。これらの系列で見られた脱窒過程でのNO<sub>2</sub>-Nの蓄積は(7, 2節)、この両活性の不均衡によるものであると解釈できた。この活性差は、NO<sub>2</sub>-N還元活性の低下ではなく高いNO<sub>3</sub>-N還元活性に起因していた。一方、N<sub>2</sub>O放出量が小さい系列 (Run 2-3) では、NO<sub>2</sub>-N還元活性とNO<sub>3</sub>-N還元活性が同程度の値を示した。

## 7. 4 脱窒過程からのN<sub>2</sub>O生成に対する環境因子の影響

7. 3節での検討より、リアクターにおいて低COD/N比の基質で運転した場合に見られた脱窒過程でのN<sub>2</sub>Oの大量発生を要因として、脱窒菌のN<sub>2</sub>O還元能力の低下という可能性は除外された。すなわち、汚泥中の脱窒菌が十分なN<sub>2</sub>O還元能力を持つにも関わらず、実際に脱窒が進行する際にはその能力を十分に発揮できずにN<sub>2</sub>Oの蓄積を招いたと推察された。

このようなN<sub>2</sub>O還元速度の低下を引き起こす要因として、種々の環境因子の影響が考えられる。そこで、脱窒過程でのN<sub>2</sub>O生成に対する環境因子の影響を調べるため、リアクターの混合液を使用し、脱窒条件での回分実験をおこなった。その際の初期条件を変化させることにより、各因子の影響を調べた。

検討対象とした初期条件は以下の通りである。

- (a) 基質のCOD/N比
- (b) NO<sub>3</sub>-N濃度
- (c) NO<sub>2</sub>-N濃度

基質のCOD/N比は、脱窒菌にとっての利用可能な有機物量とN<sub>2</sub>O蓄積との関連を明らかにするために検討した。窒素分に対して有機物が不足する条件下で活性汚泥に脱窒をおこなわせるとN<sub>2</sub>O生成率が大きくなることは既に見出されており (Hanaki *et al.*, 1992)、本研究においても同様の傾向が見られたわけであるが (第5章)、これらの結果に対して、利用可能な有機物が不足すること自体がN<sub>2</sub>O生成率に影響していたのかどうかを明らかにするのが目的である。なお、ここで実施した複数の回分実験の結果から、培養初期に消費される有機物量と窒素酸化物量との比が、脱窒の化学量論から想定されるよりも明らかに大きいことが分かったので、過剰に摂取された有機物の行方として、細菌の貯蔵物質のひとつであるPHAの蓄積を調べる実験も実施した。

NO<sub>3</sub>-N濃度が高い条件下で脱窒過程でのN<sub>2</sub>O生成率が増加する傾向は、土壌試料の回分培養においてしばしば見出されてきた (Nömmik, 1956; Blackmer & Bremner, 1978; Firestone *et al.*, 1979; Letey *et al.*, 1980; Gaskell *et al.*, 1981)。基質のCOD/N比を小さく設定したリアクター系列においては、有機物不足および7. 3節で考察した機構から脱窒が完結せずに高濃度のNO<sub>3</sub>-Nが蓄積していた。したがって、そこで見られた大量のN<sub>2</sub>O発生に対して、混合液中に蓄積したNO<sub>3</sub>-Nが寄与していた可能性がある。

NO<sub>2</sub>-Nの蓄積が脱窒過程でのN<sub>2</sub>O蓄積を促進することに対しても多くの報文がある (Firestone *et al.*, 1979; Gaskell *et al.*, 1981; von Schulthess *et al.*, 1994)。本研究のリアクターの運転においては、好気工程の終了時に高濃度のNO<sub>2</sub>-Nが見られることは希であった。すなわち、無酸素工程で起こる脱窒に対しては、硝化由来のNO<sub>3</sub>-Nのみが電子受容体として供給されていたと言える。ところが、基質のCOD/N比が小さくN<sub>2</sub>Oを大量発生している系列に限って、基質投入時に進行する脱窒過程でNO<sub>2</sub>-Nが蓄積される傾向が見られた (7. 2節)。この一時的なNO<sub>2</sub>-Nの蓄積がN<sub>2</sub>Oの大量発生に寄与していた可能性も想定される。

なお、pHの影響を調べる実験系も実施したが、これに関しては第8章で述べる。

### 7.4.1 実験方法

リアクターより取り出した混合液を洗浄・希釈し、密閉バイアル中で無酸素条件下での培養をおこなった。気相のN<sub>2</sub>O、N<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>濃度および実験によっては混合液のNO<sub>3</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、COD濃度を適宜測定し、脱窒の進行状況およびN<sub>2</sub>O蓄積状況をモニタした。

培養に使用したのは、50 ml (内容積約68 ml) ないしは100 ml (内容積約121 ml) のガラス製バイアル瓶である。これを、ブチルゴムセプタムおよびアルミシールにより密閉した。

注入した基質中の有機物としては、酢酸ナトリウムを使用した。また、窒素酸化物としては、NO<sub>3</sub>-Nの場合には硝酸カリウムを、NO<sub>2</sub>-Nの場合には亜硝酸ナトリウムを使用した。

気体試料は、ガスタイトシリンジ (Hamilton, U.S.A.) により採取し、採取量は1回当たり1 mlとした。その際、シリンジのデッドボリュームに残留した気体による汚染を防ぐために、採取前には毎回内部をヘリウムガスで置換した。分析は採取後直ちにおこなった。

液体試料は、プラスチック製シリンジ (テルモ) により採取した。採取量は1回当たり5 mlとしたが、バイアル内圧の保持のため、毎回の採取後にガスタイトシリンジ (Hamilton, U.S.A.) にてヘリウムガス5 mlを注入した。なお、ここで使用したプラスチック製シリンジについても、毎回の使用前に内部をヘリウムガスで置換した。採取した試料は5.2.2 (2)に記したのと同条件で直ちに遠心・ろ過し、分析に供した。

ただし、PHAの蓄積状況を調べた実験 (F-1) においては、同一の汚泥に対して複数のバイアルを準備し、適宜バイアルを開封して混合液を採取した。PHA測定用の試料は、採取後直ちに遠心 (3,500 rpm×5 min, 4℃) にかけて、上澄みを捨てた後に冷凍保存した。

洗浄後の汚泥を再懸濁させる反応溶液としては、リン酸バッファー (100 mM) に無機塩を加えpHを6.5に調整したものを使用した (表7.6)。

再懸濁の際には、リアクターの混合液が3倍希釈された生物濃度となるよう、反応溶液量を調整した。

以下に、具体的な実験操作を記す。なお、(1)~(4)の洗浄・希釈操作については、混合液の希釈倍率を除いて還元活性測定の場合 (7. 3節) と同様である。

- (1) リアクターより混合液を適量採取する。
- (2) 遠心分離をおこなう (4,000 rpm×5 min, 20℃)。
- (3) 上澄みを捨て、沈殿した汚泥を反応溶液に再懸濁させる。

表7.6 脱窒条件での回分実験に使用した反応溶液 [mg/l]

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,600
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,000
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	100
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	100
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10
pH	6.5

- (4) (2)~(3)の操作を2~3回繰り返す。最終的に、元の混合液を3倍希釈した生物濃度となるよう、適量の反応溶液に懸濁させる。
- (5) 再懸濁液をガラス製バイアル瓶に移し、ブチルゴムセプタムおよびアルミシールで密栓する。封入する再懸濁液量は、50 mlバイアル使用の場合には28.5 ml、100 mlバイアル使用の場合には58.5 mlとした。これに対して操作(7)で基質を1.5 ml注入したため、培養時の液相体積はそれぞれ30 ml、60 mlとなった。
- (6) アルミシールの開口部より注射針を2本挿入し、内部を30分間以上ヘリウムガスにてパージする(N<sub>2</sub>O還元活性測定時と同様の方法、図7.5参照)。
- (7) 基質を添加し激しく攪拌する。この時点を、培養開始とする。その後、20℃の恒温室内で振とう培養をおこなう。
- (8) 適宜気相部気体および混合液を採取し、各指標の測定をおこなう。

## 7.4.2 結果

実施した各実験系での検討条件、汚泥供給源となったリアクターの運転系列およびその処理状態を表7.7にまとめた。

以下、各因子ごとに結果を述べる。

### (1) COD/N比

リアクターの運転系列Run 1-2の汚泥を使用し、初期のCOD/N比をそれぞれ1.1, 3.8, 5.8に設定した3系列を実施した(実験系A-1~A-3)。窒素源としてはNO<sub>3</sub>-Nのみを与え、初期NO<sub>3</sub>-N濃度は3系列

表7.7 脱窒条件での回分実験の各実験系における検討条件、汚泥供給元  
リアクターおよびその処理状態、リアクターでのN<sub>2</sub>O転換率

実験系	検討条件	汚泥供給元リアクター (運転日数)	リアクター処理状態*	リアクターでの N <sub>2</sub> O転換率**
A-1~A-3	COD/N比	Run 1-2 (122)	NO <sub>3</sub> -N蓄積	39
B-1~B-3	NO <sub>3</sub> -N	Run 1-1 (91)	NO <sub>3</sub> -N蓄積	12
C-1~C-3	NO <sub>3</sub> -N	Run 1-2 (118)	NO <sub>3</sub> -N蓄積	36
D-1~D-3	NO <sub>2</sub> -N	Run 1-2 (127)	NO <sub>3</sub> -N蓄積	30
E-1	NO <sub>3</sub> -N	Run 1-3 (154)	蓄積無し	3
F-1	PHA蓄積	Run 2-1 (140)	NO <sub>3</sub> -N蓄積	44***

\*. 実験実施日付近での混合液中の無機態窒素成分蓄積状況。

\*\* . 実験実施日付近での流入窒素相当量あたりのN<sub>2</sub>O転換率。

\*\*\* . 本実験実施20日前に測定。

ともに190 mgN/lで統一した。そして、各系列の初期CODをそれぞれ200, 700, 1100 mg/lと設定することにより、所定の初期COD/N比を得た。

初期条件および結果を表7.8にまとめた。また、各系列での気相のN<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>濃度および混合液中のNO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, CODの変化を図7.9~7.11に示した。

各系列において、培養初期にN<sub>2</sub>OおよびCO<sub>2</sub>濃度の増加が見られ、脱窒の進行が確認された。ただし、その期間にはN<sub>2</sub>Oはほとんど蓄積されなかった。その後、N<sub>2</sub>OおよびCO<sub>2</sub>の増加速度が急激に低下し、その時点からN<sub>2</sub>Oが蓄積され始めた。

混合液中のNO<sub>3</sub>-NおよびCODの変化を見ると、培養初期には両者が活発に消費されたのに対して、N<sub>2</sub>OおよびCO<sub>2</sub>の増加速度が低下した時点以降では両者の消費速度が大きく低下した。その時点で残留していたCODが系列A-1~A-3についてそれぞれ49, 75, 70 mg/lと同程度であったことから、N<sub>2</sub>OおよびCO<sub>2</sub>の増加速度が低下したのは、添加した有機物が枯渇したことにより脱窒形態が内生型へと移行したためであると考えられる。

本結果より、添加した有機物が残存する限りは活発な脱窒が起こり、その期間にはN<sub>2</sub>Oが蓄積されないが、有機物を消費し尽くした後の内生脱窒期になると顕著なN<sub>2</sub>O蓄積が開始されると考えられる。

なお、3系列全てにおいて、初期の活発な脱窒期にはNO<sub>2</sub>-Nが蓄積されたが、その後の内生脱窒期にはNO<sub>2</sub>-Nの消費が起こった点が特徴的であった。

10時間の培養終了時の脱窒率は、初期COD/N比が大きいくほど高くなった(表7.8)。系列A-1およびA-2では明らかに有機物が不足していたことが分かる。ただし、初期COD/N比を5.8と理論値よりも明らかに高く設定した系列A-3においても脱窒率は85%にとどまっており、培養途中で有機物不足の状態に陥ったことが分かる。

N<sub>2</sub>O蓄積開始後の数時間におけるバイアル内でのN<sub>2</sub>O蓄積速度を見ると(表7.8)、各系列についてそれぞれ10, 14, 11 μgN/(g-MLSS-min)であり、系列間で大きな違いが見られなかった。なお、N<sub>2</sub>O蓄積速度の算出にあたっては、N<sub>2</sub>Oの溶解度指標であるOstwald係数(0.6788 l/l (Wilhelm *et al.*, 1976))を用いて液相への溶存量も考慮に加えた(Moraghan & Buresh, 1977)。また、密閉バイアル内での気体発生による内圧の変化に対しては補正をおこなった。ただし、試料採取による気相の引き抜き分は無視した。

培養初期の活発な脱窒期において消費されたCODとNO<sub>3</sub>-Nとの比(ΔCOD/ΔNO<sub>3</sub>-N比)をとると、実験系A-1~A-3についてそれぞれ5.0, 5.2, 5.8であった(表7.8)。これだけを見ても、活性汚泥によるN<sub>2</sub>ガスまでの脱窒に必要なと言われるCOD/N比(3.5~4.5, Henze *et al.*, 1994)よりも大きい。

さらに、本実験で消費されたNO<sub>3</sub>-Nのうち、一部はNO<sub>2</sub>-NないしはN<sub>2</sub>Oの段階までしか還元されていない点を考慮する必要がある。NO<sub>3</sub>-NからN<sub>2</sub>までの脱窒に必要な有機物量に対して、増殖を考慮せずに電子の移動のみを考えた場合、NO<sub>2</sub>-Nまでの還元は0.4倍、N<sub>2</sub>Oまでの還元は0.8倍量の有機物で遂行される計算になる。そこで、消費されたNO<sub>3</sub>-N量のうち、NO<sub>2</sub>-Nまで還元されたものに対しては0.4倍、N<sub>2</sub>Oまで還元されたものに対しては0.8倍量の消費しか起こらなかったと見なして、N<sub>2</sub>までの

表 7.8 初期COD/N比の影響を調べた脱窒回分実験の初期条件および結果  
(リアクターRun 1-2の汚泥使用; MLSS=4,380 mg/l)

実験系	初期NO <sub>3</sub> -N	COD/N比			ΔCOD/ΔNO <sub>3</sub> -N比*3	N <sub>2</sub> O蓄積速度 [μgN/(g-MLSS-min)]		脱窒率*6 [%]
		初期	内生移行時*1	終了時*2		初期*4	内生時*5	
		A-1	186	1.1		0.3	0.3	
A-2	187	3.8	0.7	0.8	5.2	0.1	14	57
A-3	187	5.8	1.4	2.0	5.8	0.05	11	85

\*1. 内生脱窒移行時に残留していたCOD/(NO<sub>3</sub>+NO<sub>2</sub>)-N比。  
 \*2. 培養終了時に残留していたCOD/(NO<sub>3</sub>+NO<sub>2</sub>)-N比。  
 \*3. 添加した有機物残存時に消費されたCODとNO<sub>3</sub>-Nの比。  
 \*4. 培養初期の数時間でのN<sub>2</sub>O蓄積速度。  
 \*5. 内生脱窒移行後数時間でのN<sub>2</sub>O蓄積速度。  
 \*6. 初期NO<sub>3</sub>-Nと培養終了時の(NO<sub>3</sub>+NO<sub>2</sub>)-Nとから算出。

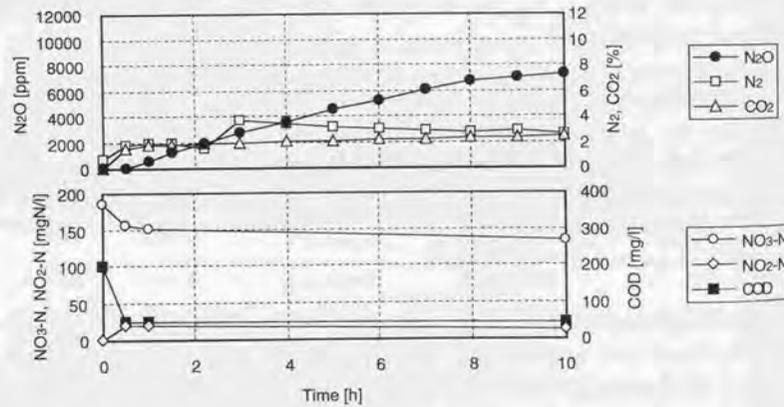


図 7.9 初期COD/N比の影響を調べた脱窒回分実験における気相のN<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>濃度、混合液ろ液のNO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, CODの経時変化 (実験A-1; 初期COD/N比=1.1)

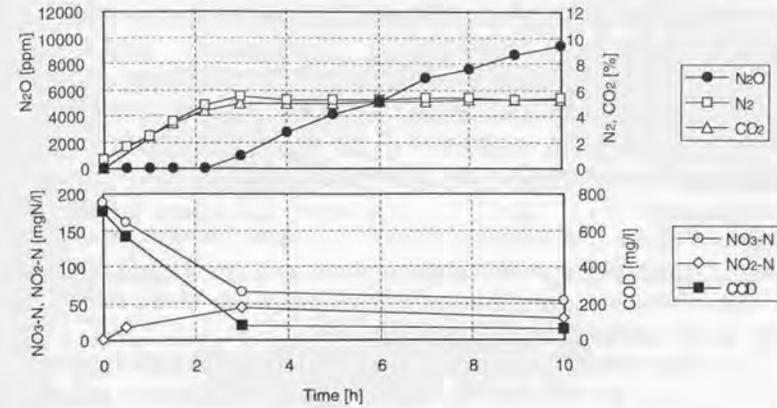


図 7.10 初期COD/N比の影響を調べる脱窒回分実験における気相のN<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>濃度、混合液ろ液のNO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, CODの経時変化 (実験A-2; 初期COD/N比=3.8)

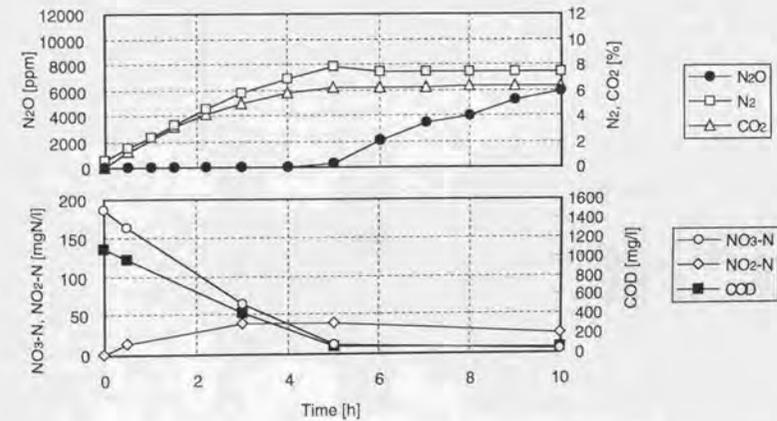


図 7.11 初期COD/N比の影響を調べる脱窒回分実験における気相のN<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>濃度、混合液ろ液のNO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, CODの経時変化 (実験A-3; 初期COD/N比=5.8)

還元がおこなわれなかった分について補正をおこなった。補正後の $\Delta\text{COD}/\Delta\text{NO}_3\text{-N}$ 比はそれぞれ8.6, 6.7, 6.7となり、上に挙げた必要COD/N比の1.5~2倍程度であった。

これより、培養初期の脱窒期において、脱窒量から想定される必要COD量に対して過剰量のCODが消費されたことが分かる。

実際、 $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積開始直前の状態で液相中に残存していた $\text{COD}/(\text{NO}_3+\text{NO}_2)\text{-N}$ 比は0.27~1.4へと低下していた。さらに、それ以降のCOD消費速度が著しく小さかったことから、残存したCODの大半は脱窒菌が利用できないCOD成分であったと推察される。したがって、 $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積開始時には、脱窒菌が利用できる窒素量に対して有機物量が著しく不足した状態にあったと考えることができる。

有機物残存時に見られた高い $\Delta\text{COD}/\Delta\text{N}$ 比の要因として、有機物の一部が脱窒に使用されずに貯蔵物質として菌体内に蓄積された可能性が考えられる。そこで、リアクター系列Run 2-1の汚泥を使用し、初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度を150 mgN/l、初期COD/N比を3.7に設定した培養中に、混合液の酢酸イオン濃度と混合液のPHA濃度の変化を追った(実験F-1)。

4時間の培養における炭素収支を図7.12に示した。ここで、脱窒による消費分は、消費された $\text{NO}_3\text{-N}$ 量のうち、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{N}_2$ まで還元された量をそれぞれ算出し、それぞれについて消費された酢酸量を化学量論から算出した。PHAの測定においては、構成モノマーのうち3HV(3-ヒドロキシ酪酸)と3HV(3-ヒドロキシ吉草酸)についてのみ定量をおこなったが、3HV濃度には変化が認められなかったため、貯蔵PHAとしてはPHBのみが重要であると考えた。また、消費された酢酸量から脱窒による消費分とPHBへの変換分を除いたものを、増殖に使用された分として図7.12に示したが、この中には他の貯蔵物質(グリコーゲンなど)への変換分も含まれる。

同図から、消費された酢酸塩の相当割合がPHBへ変換されたことが分かる。培養開始から4時間の間に、消費された酢酸塩のうち49%がPHBへと変換され、これは脱窒による消費量よりも大きかった。また、4時間の時点で、脱窒による消費分とPHBへの変換分の和が酢酸消費量の84%を占めたことから、グリコーゲンや未定量のPHA成分への変換分は小さいものと見なされる。

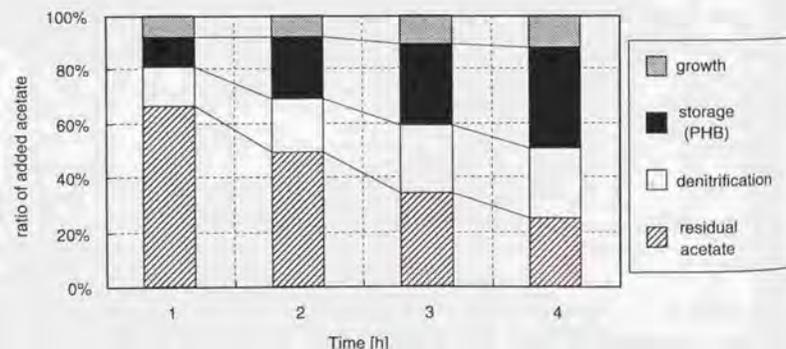


図7.12 PHAの蓄積を調べる脱窒回分実験における炭素収支(実験F-1)

## (2) $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度

リアクターの運転系列Run 1-1およびRun 1-2の汚泥を使用した実験系を実施した(B-1~B-3, C-1~C-3)。電子受容体として $\text{NO}_3\text{-N}$ のみを与え、その初期濃度の影響を調べた。有機物は、各系列の初期COD/N比が実験系内でほぼ等しくなるように添加した。

実験系B-1~B-3では、Run 1-1の汚泥を使用し、初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ をそれぞれ26, 100, 270 mgN/lに設定した。各系列の初期COD/N比は2.2~2.4と、リアクターへの投入基質とほぼ等しい値にした。

実験系C-1~C-3では、Run 1-2の汚泥を使用し、初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ を各系列についてそれぞれ53, 210, 520 mgN/lに設定した。初期COD/N比は、各系列ともに3.4と、上と同様にリアクターでの投入基質に等しくした。

各実験系の初期条件および結果を表7.9, 7.10にまとめた。また、各系列での気相の $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{N}_2$ 、 $\text{CO}_2$

表7.9 初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の影響を調べた脱窒回分実験の初期条件および結果  
(リアクターRun 1-1の汚泥使用; MLSS=3,470 mg/l)

実験系	初期 $\text{NO}_3\text{-N}$	COD/N比			$\Delta\text{COD}/\Delta\text{NO}_3\text{-N}$ 比 <sup>*3</sup>	$\text{N}_2\text{O}$ 蓄積速度 [ $\mu\text{gN}/(\text{g}\cdot\text{MLSS}\cdot\text{min})$ ]		脱窒率 <sup>*6</sup> [%]
		初期	内生移行時 <sup>*1</sup>	終了時 <sup>*2</sup>		初期 <sup>*4</sup>	内生時 <sup>*5</sup>	
B-1	26	2.4	0.6	0.7	4.0	-	0.1	58
B-2	100	2.4	0.4	0.4	4.9	0.5	5	39
B-3	270	2.2	0.4	0.4	4.4	0.02	9	32

- \*1. 内生脱窒移行時に残存していた $\text{COD}/(\text{NO}_3+\text{NO}_2)\text{-N}$ 比。
- \*2. 培養終了時に残存していた $\text{COD}/(\text{NO}_3+\text{NO}_2)\text{-N}$ 比。
- \*3. 添加した有機物残存時に消費されたCODと $\text{NO}_3\text{-N}$ の比。
- \*4. 培養初期の数時間での $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積速度。
- \*5. 内生脱窒移行後数時間での $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積速度。
- \*6. 初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ と培養終了時の $(\text{NO}_3+\text{NO}_2)\text{-N}$ 比から算出。

表7.10 初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の影響を調べた脱窒回分実験の初期条件および結果  
(リアクターRun 1-2の汚泥使用; MLSS=4,690 mg/l)

実験系	$\text{NO}_3\text{-N}$ [mgN/l]	終了時 $\text{NO}_2\text{-N}$ [mgN/l]	COD [mg/l]		COD/N比		$\text{N}_2\text{O}$ 蓄積速度 [ $\mu\text{gN}/(\text{g}\cdot\text{MLSS}\cdot\text{min})$ ]		脱窒率 <sup>*4</sup> [%]	
			初期	終了時	初期	終了時 <sup>*1</sup>	初期 <sup>*2</sup>	内生時 <sup>*3</sup>		
C-1	53	8	N.D.	180	30	3.4	3.6	0.02	6.3	84
C-2	210	80	9	710	39	3.4	0.4	0.06	14.7	57
C-3	520	260	23	1,760	54	3.4	0.2	13.7	11.5	46

- \*1. 培養終了時に残存していた $\text{COD}/(\text{NO}_3+\text{NO}_2)\text{-N}$ 比。
- \*2. 培養初期の数時間での $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積速度。
- \*3.  $\text{N}_2\text{O}$ および $\text{CO}_2$ 濃度の変化より内生脱窒に移行したと判断した時点以降の数時間での $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積速度。
- \*4. 初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ と培養終了時の $(\text{NO}_3+\text{NO}_2)\text{-N}$ 比から算出。

濃度および混合液中の $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、CODの変化を図7.13～7.15および図7.16～7.18に示した。なお、実験系C-1～C-3においては、混合液中の各指標は培養開始時と培養終了時のみ測定したため、同図には含まなかった。

両実験系において、 $\text{N}_2$ および $\text{CO}_2$ 濃度の変化には実験系A-1～A-3と同様の傾向が見られた。これより、培養初期に活発な脱窒が起こり、与えたCODを枯渇後に脱窒が内生型となるため脱窒速度が急激に低下したと考えられた。実際、混合液の各指標をモニタした実験系B-1～B-3では、CODと $\text{NO}_3\text{-N}$ の変化に実験系A-1～A-3と同様の変化が観察された。

気相の $\text{N}_2\text{O}$ 濃度の変化にも、概ね実験系A-1～A-3と同様の傾向が確認され、内生脱窒に移行するまでは顕著な $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積が起こらなかった。

ただし、系列C-3においては、培養初期から活発な $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積が起こった。 $\text{N}_2$ 濃度の変化より、この期間には $\text{N}_2$ までの脱窒も活発に起こっていたことが分かる。本系列においては、共試汚泥の供給元となったりアクター混合液の $\text{NO}_3\text{-N}$ よりも相当高い初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度条件で培養をおこなった。本系列の初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ は520 mgN/lであったが、これを実施した時点での汚泥供給元リアクターの混合液中の $\text{NO}_3\text{-N}$ は260 mgN/lであった。このことから、汚泥が馴養されていないような高濃度の $\text{NO}_3\text{-N}$ が存在する条件下では、有機物残存時の脱窒においても大量の $\text{N}_2\text{O}$ が蓄積されると推察できる。

$\text{NO}_3\text{-N}$ がほとんど蓄積しなかったリアクター運転系列Run 1-3の汚泥を使用した同様の培養では（実験E-1）、初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ =100 mgN/lと、他の実験系において有機物残存時には $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積が起こらなかった程度の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度であるにも関わらず、同様に培養初期から活発に $\text{N}_2\text{O}$ が蓄積されており（図7.19）、上の推論を裏付けている。

系列C-3においては、培養途中で $\text{N}_2\text{O}$ が減少し、その後再び $\text{N}_2\text{O}$ が蓄積され始めた。この一時的な

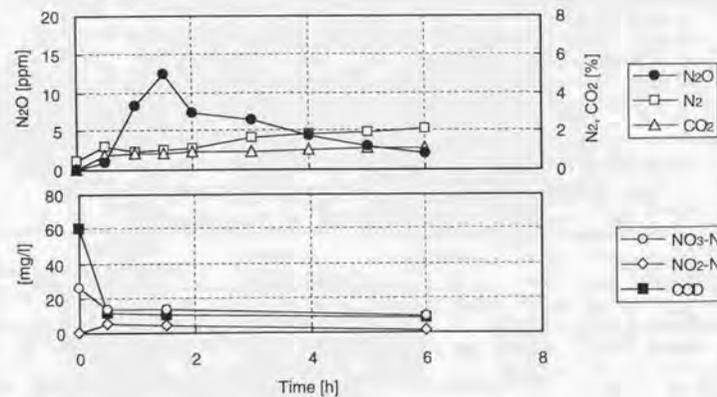


図 7.13 初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の影響を調べる脱窒回分実験における気相の $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{N}_2$ 、 $\text{CO}_2$ 濃度、混合液ろ液の $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、CODの経時変化 (実験B-1；初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ =26 mgN/l)

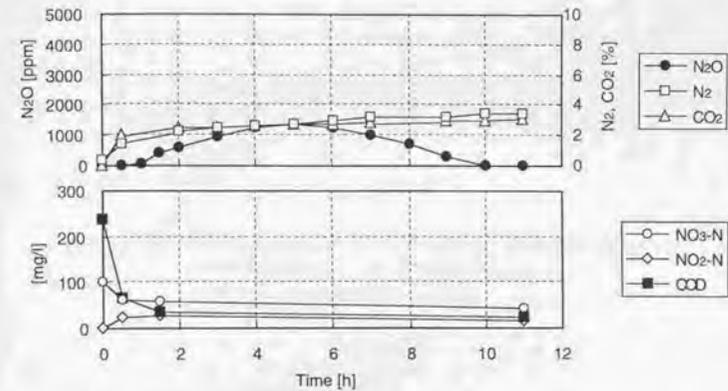


図 7.14 初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の影響を調べる脱窒回分実験における気相の $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{N}_2$ 、 $\text{CO}_2$ 濃度、混合液ろ液の $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、CODの経時変化 (実験B-2；初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ =100 mgN/l)

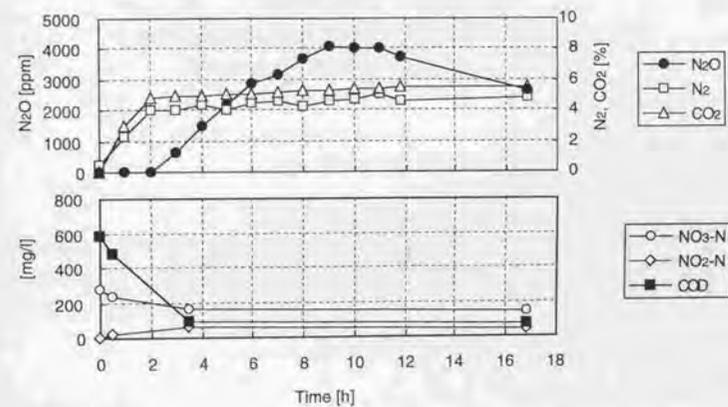


図 7.15 初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の影響を調べる脱窒回分実験における気相の $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{N}_2$ 、 $\text{CO}_2$ 濃度、混合液ろ液の $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、CODの経時変化 (実験B-3；初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ =270 mgN/l)

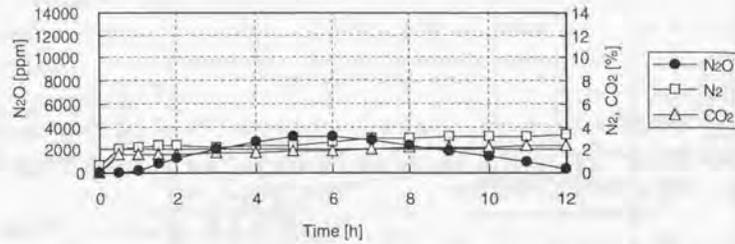


図 7.16 初期NO<sub>3</sub>-N濃度の影響を調べる脱窒回分実験における気相のN<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>濃度の経時変化 (実験C-1; 初期NO<sub>3</sub>-N=53 mgN/l)

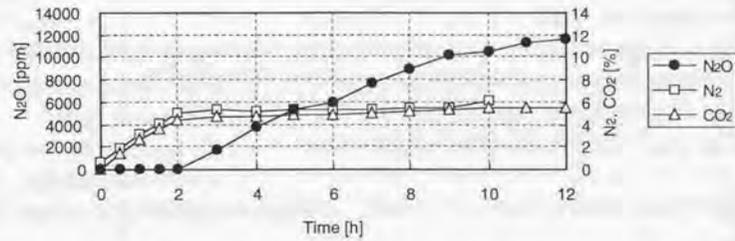


図 7.17 初期NO<sub>3</sub>-N濃度の影響を調べる脱窒回分実験における気相のN<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>濃度の経時変化 (実験C-2; 初期NO<sub>3</sub>-N=210 mgN/l)

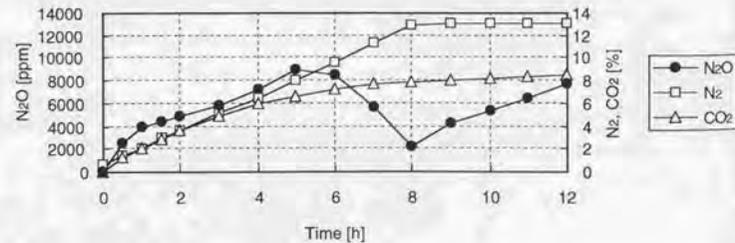


図 7.18 初期NO<sub>3</sub>-N濃度の影響を調べる脱窒回分実験における気相のN<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>濃度の経時変化 (実験C-3; 初期NO<sub>3</sub>-N=520 mgN/l)

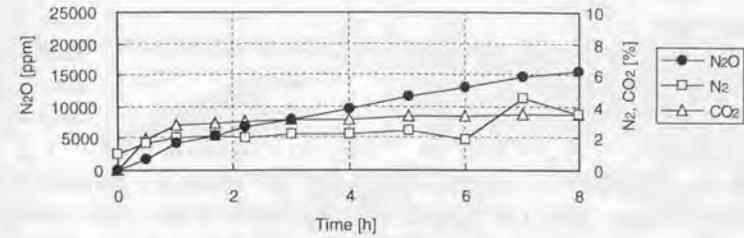


図 7.19 リアクター運転系列Run 1-3の汚泥を使用した脱窒回分実験における気相のN<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>濃度の経時変化 (実験E-1; 初期NO<sub>3</sub>-N=100 mgN/l, COD/N=3.4)

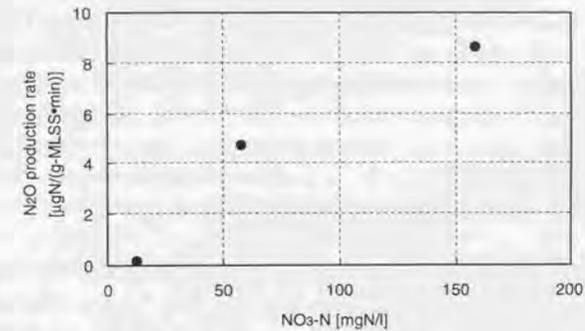


図 7.20 脱窒回分実験系B-1~B-3におけるN<sub>2</sub>O蓄積開始時のNO<sub>3</sub>-N濃度とN<sub>2</sub>O蓄積速度との関係

N<sub>2</sub>Oの消費は、脱窒の進行につれてNO<sub>3</sub>-N濃度が減少したために脱窒がN<sub>2</sub>にまで進行しやすくなったことに起因すると解釈できる。その後再びN<sub>2</sub>Oが蓄積され始めた時期はN<sub>2</sub>の生成速度が急減した時期と一致しており、この時点で脱窒が内生型となって高い生成率でN<sub>2</sub>Oが蓄積されたことを示唆している。

実験系B-1~B-3において、N<sub>2</sub>Oが蓄積され始めた時点で残留していたNO<sub>3</sub>-N濃度とそれ以降でのN<sub>2</sub>O蓄積速度との関係を図7.20に示した。N<sub>2</sub>O蓄積速度としては、蓄積開始後数時間の平均速度を用い、その算出にあたっては、本項の(1)で述べたのと同様に溶存分と内圧の補正をおこなった。

同図より、N<sub>2</sub>O蓄積開始時のNO<sub>3</sub>-N濃度が高いほど、N<sub>2</sub>O蓄積速度が大きくなる傾向が見取れる。これより、脱窒が内生型へと変化した際に、その場のNO<sub>3</sub>-N濃度がN<sub>2</sub>O生成速度に大きく影響し

てくることが分かる。

系列B-1～B-3, C-1においては、内生脱窒期に蓄積したN<sub>2</sub>Oが時間経過後に再び減少する傾向が見られた。この原因は不明である。

### (3) NO<sub>2</sub>-N濃度

リアクター運転系列Run 1-2の汚泥を使用した実験系 (D-1～D-3) を実施した。窒素成分としてNO<sub>3</sub>-NおよびNO<sub>2</sub>-Nを、両者を併せた初期濃度が約200 mgN/lとなるように与え、その中のNO<sub>2</sub>-N濃度を各系列についてそれぞれ50, 90, 140 mgN/lと変化させた。初期COD/N比はリアクター系列Run 1-2への投入基質と同程度の3.5～3.7とした。

初期条件および結果を表7.11に示した。また、各系列の気相のN<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>濃度の変化を図7.21～7.23に示した。

3系列ともに、培養初期より活発なN<sub>2</sub>O蓄積を示した。培養開始後4時間までのN<sub>2</sub>O蓄積速度は各系列についてそれぞれ47, 80, 90 μgN/(g-MLSS-min)と算出され、培養初期にNO<sub>2</sub>-Nを高濃度に共存させた系はN<sub>2</sub>O蓄積速度が大きかった (図7.24)。また、ここで得られた蓄積速度は、既に本項の(1), (2)で述べた実験系において内生脱窒期に見られた蓄積速度よりもはるかに大きかった。

10時間の培養終了時での脱窒率は、各系列について59, 75, 89%と、初期のNO<sub>2</sub>-Nが高濃度であるほど高くなった (表7.11)。これは、NO<sub>3</sub>-Nからの脱窒と比較してNO<sub>2</sub>-Nからの脱窒に要する有機物量が少ないためであると解釈される。また、ここで得られた脱窒率は他の実験系と比較しても高く、脱窒の進行自体は、初期に高濃度のNO<sub>2</sub>-Nを共存させた場合でも大きくは阻害されなかったことがうかがえる。

本結果より、NO<sub>2</sub>-Nが高濃度に蓄積している条件では、たとえ脱窒菌が利用可能な有機物量が充分に残存していたとしても、大量のN<sub>2</sub>Oが生成されることが分かる。このとき、脱窒自体に対する阻害は顕著でなかったことから、NO<sub>2</sub>-Nの毒性に対してN<sub>2</sub>O還元感受性が高いことが示唆される。

表 7.11 初期NO<sub>2</sub>-N濃度の影響を調べた脱窒回分実験の初期条件および結果  
(リアクター-Run 2-1の汚泥使用; MLSS=4,030 mg/l)

実験系	NO <sub>3</sub> -N [mgN/l]		NO <sub>2</sub> -N [mgN/l]		COD [mg/l]		COD/N比		N <sub>2</sub> O蓄積速度 [μgN/(g-MLSS-min)]		脱窒率 <sup>*4</sup> [%]
	初期	終了時	初期	終了時	初期	終了時	初期	終了時 <sup>*1</sup>	初期 <sup>*2</sup>	内生時 <sup>*3</sup>	
D-1	150	29	48	52	700	86	3.5	1.1	47	2.1	59
D-2	100	0.1	94	48	700	120	3.6	2.6	80	13	75
D-3	51	0.1	140	21	700	51	3.7	2.5	90	1.3	89

\*1. 培養終了時に残留していたCOD/(NO<sub>3</sub>+NO<sub>2</sub>)-N比。

\*2. 培養初期の数時間でのN<sub>2</sub>O蓄積速度

\*3. N<sub>2</sub>およびCO<sub>2</sub>濃度の変化より内生脱窒に移行したと判断した時点以降の数時間でのN<sub>2</sub>O蓄積速度。

\*4. 初期(NO<sub>3</sub>+NO<sub>2</sub>)-Nと培養終了時の(NO<sub>3</sub>+NO<sub>2</sub>)-Nとから算出。

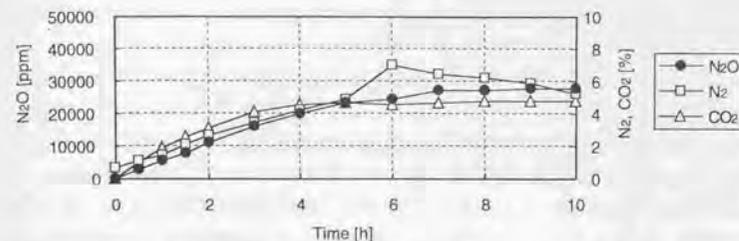


図 7.21 初期NO<sub>2</sub>-N濃度の影響を調べる脱窒回分実験における気相のN<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>濃度の経時変化 (実験D-1; 初期NO<sub>2</sub>-N=50 mgN/l, NO<sub>3</sub>-N=150 mgN/l)

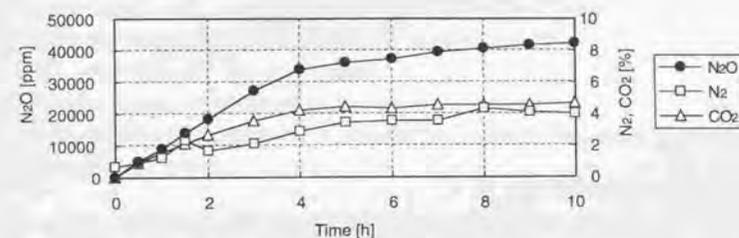


図 7.22 初期NO<sub>2</sub>-N濃度の影響を調べる脱窒回分実験における気相のN<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>濃度の経時変化 (実験D-2; 初期NO<sub>2</sub>-N=90 mgN/l, NO<sub>3</sub>-N=100 mgN/l)

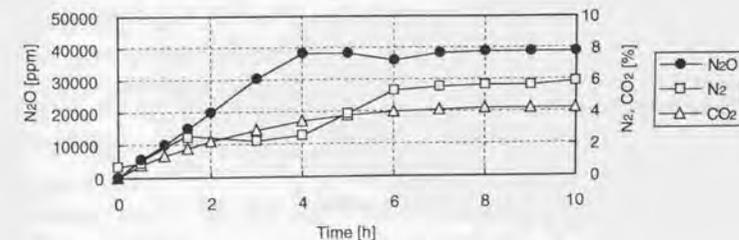


図 7.23 初期NO<sub>2</sub>-N濃度の影響を調べる脱窒回分実験における気相のN<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>濃度の経時変化 (実験D-3; 初期NO<sub>2</sub>-N=140 mgN/l, NO<sub>3</sub>-N=51 mgN/l)

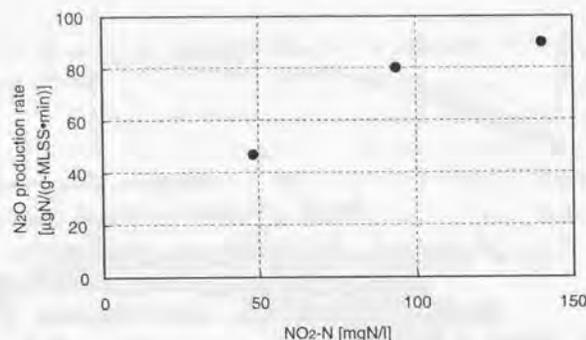


図 7.24 脱窒回分実験系D-1~D-3における初期NO<sub>2</sub>-N濃度と初期N<sub>2</sub>O蓄積速度との関係

### 7.4.3 考察

#### (1) 脱窒菌が利用可能な有機物量

種々の初期条件で実施した実験系において、例外的なケースを除き（高濃度のNO<sub>3</sub>-NないしはNO<sub>2</sub>-Nの存在）、培養初期にはN<sub>2</sub>Oの蓄積を伴わない活発な脱窒が起こり、添加した有機物が枯渇して脱窒形態が内生脱窒へと移行して初めてN<sub>2</sub>Oが蓄積され始める傾向が見られた。このことから、脱窒菌が利用可能な有機物が混合液中に存在するか否かが、N<sub>2</sub>O蓄積に影響する支配的な因子であると考えられる。すなわち、混合液中に利用可能な有機物が存在する限りはN<sub>2</sub>Oの蓄積を伴わない脱窒が進行するが、有機物が枯渇し内生脱窒が起こると高い生成率でN<sub>2</sub>Oが蓄積されると推察できる。

リアクターの運転においても、基質投入中には顕著なN<sub>2</sub>O放出が起こらず、基質のCOD/N比が小さい運転条件（Run 1-1, 1-2, 2-1, 2-2）では、その後起こる内生脱窒によってN<sub>2</sub>Oが大量に発生することが示唆されたが（7. 2節）、これは本節で得られた結果に合致している。

液相中の各指標の変化も追った実験系A-1~A-3およびB-1~B-3において、内生脱窒への移行後に、それまで蓄積傾向にあったNO<sub>2</sub>-Nが一転して消費されるようになった。これは、内生脱窒への移行後に各還元速度が低下する中で、NO<sub>2</sub>-N還元速度の低下率が小さいことを示唆している。

この点を含めた、内生脱窒時のN<sub>2</sub>O蓄積機構については7. 5節で検討する。

内生脱窒期に脱窒菌が利用しうる有機物源としては、細胞内の貯蔵物質、細胞構成物質、代謝産物などが挙げられる。本回分実験系では、初期の活発な脱窒期において、脱窒に必要なCOD量に対して過剰量のCODが消費された。これに対しては、添加した有機物のPHBへの転換が大きく寄与していることが示された。本研究で使用したリアクターのように基質の投入が連続的でない運転方法では、活

性汚泥を構成する微生物群の有機物貯蔵能力が高いことが指摘されている（Alleman & Irvine, 1980）。

本回分実験系では、添加した有機物が枯渇した後の内生脱窒期において、それ以前に蓄積されたPHBが使用されているかどうかは確認できなかった。しかしながら、細胞外に利用可能な有機物が存在しない場合に、細胞構成物質よりも貯蔵物質が優先的に使用されると予想されることから（Painter, 1970）、本回分実験で見られた内生脱窒においても、その有機物源としては細胞内の貯蔵物質が主要であると考えられる。そこから類推すれば、リアクターの運転において無酸素工程の後半に起こった内生脱窒に対しても、その有機物源としては貯蔵物質が主要であることが予想される。したがって、以降の記述では、「内生脱窒」と言う場合に貯蔵物質を用いた脱窒を想定する。

#### (2) NO<sub>3</sub>-N濃度

実験系B-1~B-3において、内生脱窒に移行時のNO<sub>3</sub>-N濃度が高いほど、その後のN<sub>2</sub>O蓄積速度が大きくなった。内生脱窒時には有機物が脱窒の制限因子となっていると考えられることから、NO<sub>3</sub>-N濃度は内生脱窒速度には影響しないはずである。それにも関わらずここで述べたような傾向が見られたことは、NO<sub>3</sub>-Nが内生脱窒時のN<sub>2</sub>O蓄積を促進する効果を持つことを示唆している。

ただし、汚泥が馴養されていないような高濃度のNO<sub>3</sub>-Nが存在している場合を除いては、添加した有機物が残存する期間にはN<sub>2</sub>Oの蓄積が起こらなかったことから、N<sub>2</sub>O蓄積に対してより支配的な因子は(1)で述べた利用可能な有機物量であり、NO<sub>3</sub>-N濃度は、有機物枯渇後に開始されるN<sub>2</sub>O蓄積に対する影響因子として位置づけることができよう。

上で述べたNO<sub>3</sub>-Nによる効果は、実は培養初期の活発な脱窒期に蓄積されたNO<sub>2</sub>-Nの影響であった可能性もある。内生脱窒への移行時のNO<sub>2</sub>-N濃度は、系列B-1~B-3についてそれぞれ4.7, 26, 58 mg/Lであった。つまり、内生脱窒移行時のNO<sub>2</sub>-N濃度とその後N<sub>2</sub>O蓄積速度との間に正の相関があることになる。また、NO<sub>2</sub>-Nの蓄積がN<sub>2</sub>O生成に大きく影響することも実験系D-1~D-3により示されている。

同種の議論は、土壌中での脱窒過程からのN<sub>2</sub>O生成に対するNO<sub>3</sub>-N濃度の影響を検討した既報においてもなされている。Firestone *et al.* (1979)は、土壌スラリーを用いた脱窒回分実験において、NO<sub>3</sub>-N添加とNO<sub>2</sub>-N添加がN<sub>2</sub>O生成率に与える影響を比較した。両者がN<sub>2</sub>O生成率を上昇させる効果を示したが、NO<sub>2</sub>-Nの方が低濃度でもはるかに大きな効果を示したことから、従来観察されたNO<sub>3</sub>-NによるN<sub>2</sub>O生成率の上昇効果は、脱窒過程で蓄積されたNO<sub>2</sub>-Nの効果である可能性が高いことを指摘している。

ただし、Gaskell *et al.* (1981)がおこなった同種の実験では、NO<sub>3</sub>-N自体がN<sub>2</sub>O還元に対して阻害作用を持つことも示唆されている。

本節の結果においても、初期NO<sub>3</sub>-N濃度をリアクター中の濃度よりも著しく高く設定して培養をおこなった場合に、培養開始直後から顕著なN<sub>2</sub>O蓄積が観察されたことから、NO<sub>3</sub>-N自体がN<sub>2</sub>O還元を阻害する作用を持つことは間違いのないと思われる。

したがって、リアクターの運転系列Run 1-1, 1-2, 2-1, 2-2において高い転換率でN<sub>2</sub>Oが生成された点に対しても、高濃度に蓄積したNO<sub>3</sub>-Nが内生脱窒時のN<sub>2</sub>O生成率を引き上げる作用をもたらした可能性が高いと考えられる。

その際に、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の蓄積のみによって高い $\text{N}_2\text{O}$ 転換率をもたらされたのか、あるいは、 $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積を引き起こすより決定的な要因が他に存在し、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の蓄積自体はそれを助長する効果を持つのみであったのか、という疑問が残る。この点に関しては、7.6節で検討を加える。

$\text{NO}_3\text{-N}$ が脱窒過程での $\text{N}_2\text{O}$ 還元反応を阻害する機序としては、(a)電子をめぐる競合、(b) $\text{NO}_3\text{-N}$ による $\text{N}_2\text{O}$ 還元酵素阻害、の2点が想定される。

各培養系において、添加した有機物が残存する期間には内生脱窒時と比較して $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度が高いにも関わらず $\text{N}_2\text{O}$ の蓄積がほとんど見られなかった点は、(b)の寄与が小さいことを示唆している。そして、実験D-3やE-1のように、汚泥が馴養されていないような高濃度の $\text{NO}_3\text{-N}$ が存在する条件においてのみ、 $\text{N}_2\text{O}$ 還元酵素が大きく阻害を受け、利用可能な有機物が残存しているにも関わらず $\text{N}_2\text{O}$ の活発な蓄積が起こったものと考えられる。

内生脱窒時に $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度と $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積速度との間に正の相関が見られた点に対しては、(a)の寄与が大きいと考えられる。内生脱窒時には電子供与体が脱窒の制限因子であると思われ、そのような条件においては、還元酵素同士の電子をめぐる競合が各電子受容体の消費速度を大きく律することが予想されるためである。

### (3) $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度

培養初期に $\text{NO}_2\text{-N}$ を共存させると、培養初期から顕著な $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積が見られた。これより、 $\text{NO}_2\text{-N}$ が $\text{N}_2\text{O}$ 還元に対して強い阻害作用を持つことが分かる。

ただし、初期に $\text{NO}_2\text{-N}$ を共存させなかった実験系において、脱窒の進行とともに $\text{NO}_2\text{-N}$ が高濃度に蓄積されたにも関わらず、内生脱窒に移行するまでは $\text{N}_2\text{O}$ の蓄積が起こらなかったことから(図7.9-7.11, 7.13-7.15)、実験系D-1-D-3で見られた $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積は、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度の急激な上昇が脱窒菌の適応能力の範疇を越えたことに起因していた可能性もある。Beccari *et al.* (1983)は、活性汚泥による $\text{NO}_2\text{-N}$ 還元に対する $\text{NO}_2\text{-N}$ の阻害効果を調べた実験系において、数時間という培養時間内で $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度を徐々に上げていくと阻害が起こりにくいことを見出し、脱窒菌が高濃度の $\text{NO}_2\text{-N}$ に対してある程度適応しうることを示している。 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が連続的に増加する場合にその阻害効果が小さくなることは、Almeida *et al.* (1995a)によっても報告されている。

リアクターの運転において、 $\text{N}_2\text{O}$ 放出量が大きかった運転系列Run 2-1およびRun 2-2では、基質投入中に進行する脱窒過程で還元活性差により必然的に $\text{NO}_2\text{-N}$ が蓄積することを7.2および7.3節で示した。 $\text{N}_2\text{O}$ はその後の内生脱窒の過程で生成されたようであるが、それに対しても、蓄積された $\text{NO}_2\text{-N}$ が寄与した可能性がある。

ここで、 $\text{NO}_2\text{-N}$ の効果も、(a)直接的な $\text{N}_2\text{O}$ 還元酵素阻害作用、(b) $\text{NO}_2\text{-N}$ 蓄積に起因する二次的な影響、の2つに分けて考えてみる。(a)の効果は、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度の急激な増加があった場合に顕著に現れると考えられる。これは、本節の回分実験系D-1-D-3の結果を見ると明らかである。ただし、既述したように $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が連続的に増加する場合には脱窒菌がある程度の適応力を示すものと思われる。リアクターの運転サイクルにおいて、基質投入終了直後の段階では $\text{NO}_2\text{-N}$ が蓄積されているにも関わらず $\text{N}_2\text{O}$ の放出が見られなかった点と、本回分実験系において培養途中に $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積が起こった場合には内生脱窒に移行しない限り $\text{N}_2\text{O}$ の蓄積が起こらなかった点は、この推論を裏付けている。

したがって、リアクターの運転で基質のCOD/N比が小さい場合に見られた $\text{N}_2\text{O}$ 放出に対しては、(a)の効果のみでは説明できないことになる。そこで、(b)の効果も含めた内生脱窒時の $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積機構について、7.5および7.6節で考察する。

### 7.4.4 まとめ

脱窒過程での $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積に対する環境因子の影響を調べるため、リアクターの汚泥を使用した脱窒条件での回分実験を種々の初期条件の元で実施した。

特殊な条件を除いて、添加した有機物が残存する内は $\text{N}_2\text{O}$ が蓄積されなかった。有機物枯渇後の内生脱窒期に入ると脱窒速度が急減し、同時に高い生成率で $\text{N}_2\text{O}$ が蓄積され始めた。

有機物残存時に起こる脱窒過程では、還元された電子受容体量に対して過剰量のCODが消費された。これに対してはPHBとして細胞内へ貯蔵された分の寄与が大きいたことが示されたことから、内生脱窒時の有機物源は細胞内の貯蔵物質であると推定された。

内生脱窒時の $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積速度は、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の影響を受けた。 $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積開始時の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度が高いほど、 $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積速度が大きくなった。また、汚泥がリアクターにおいてさらされているよりも高濃度の $\text{NO}_3\text{-N}$ が存在する条件では、有機物残存時から $\text{N}_2\text{O}$ が活発に蓄積された。

培養初期に $\text{NO}_2\text{-N}$ を共存させると、培養初期から大きな速度で $\text{N}_2\text{O}$ が蓄積された。ただし、これは $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度の急増時にのみ見られる効果であると考えられた。 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が連続的に増加する場合には、ここで見られたような有機物残存時における $\text{N}_2\text{O}$ の蓄積は起こらないものと推察された。

## 7.5 内生脱窒時の各還元速度の比較

リアクターの運転において、基質中の主要な有機物源である酢酸塩は添加と同時に直ちに消費され、それ以降の脱窒は内生型であると思われる(7.2節)。脱窒過程でN<sub>2</sub>Oが大量に発生した場合には、無酸素工程の後半になってN<sub>2</sub>O放出速度が急激に増加する傾向が見られ、そこでのN<sub>2</sub>Oも内生脱窒の過程で生成されたと考えられる。

実際、リアクターの汚泥を使用した脱窒回分実験において、特殊なケースを除けば、与えた有機物が枯渇して脱窒が内生型へと移行して初めてN<sub>2</sub>Oが蓄積される傾向が見られた(7.4節)。

7.3節では有機物を過剰に与えた条件での脱窒経路中の各還元速度を比較し、還元活性差ではN<sub>2</sub>Oの蓄積を説明できないと結論づけた。しかし、低COD/N比の基質で運転したリアクターにおいて実際に起こった現象を説明するためには、内生脱窒時の各還元速度差を考慮に入れる必要がある。

そこで本節では、窒素量に対して有機物量が不足する条件で、7.3節と同様の手法を用いて脱窒の各還元速度を測定し、内生脱窒時のN<sub>2</sub>O蓄積機構について考察をおこなった。

測定対象としたのはリアクター運転系列Run 2-1の汚泥である。

### 7.5.1 実験方法

測定に使用した反応容器および操作手順は、以下に記した点を除いて7.3.1に記したのと同様である。

反応溶液としては、表7.12に示したものを使用した。7.3節で使用したものとの違いは、有機物源としての酢酸ナトリウムが含まれていない点のみである。

NO<sub>3</sub>-N/NO<sub>2</sub>-N還元速度の測定に際しては、培養開始時に窒素酸化物と同時に有機物を添加した。

N<sub>2</sub>O還元速度の測定においては、標準N<sub>2</sub>Oガスを添加後直ちに有機物を添加し、培養を開始した。

表7.12 窒素に対して有機物が不足した条件での脱窒経路中の各還元速度測定に使用した反応溶液

	[mg/l]
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,800
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	200
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	20
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	20
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2
pH	7.0

表7.13 窒素に対して有機物が不足した条件での脱窒経路中の各還元速度測定における初期条件

	電子受容体濃度 [mgN/l]	COD [mg/l]	COD/N比	pH	MLSS [mg/l]
NO <sub>3</sub> -N還元	30	75	2.5	7.0	1,150
NO <sub>2</sub> -N還元	30	45	1.5	7.0	1,150
N <sub>2</sub> O還元	117*	58	0.5	7.0	1,130

\*. 注入したN<sub>2</sub>O量を液相容積で除したものを。

有機物の添加にはガスタイトシリンジ(Hamilton, U.S.A.)を使用し、気体の流入が無いよう注意を払った。また、液相の試料を採取するために、同一条件で汚泥・N<sub>2</sub>O・有機物を封入したバイアルを複数個作成し、適宜開封した。

各測定における窒素酸化物および有機物の初期条件を表7.13に示した。有機物は酢酸ナトリウム、NO<sub>3</sub>-Nは硝酸カリウム、NO<sub>2</sub>-Nは亜硝酸ナトリウム、N<sub>2</sub>Oは標準N<sub>2</sub>Oガス(昭和電工)で与えた。初期COD/N比は、NO<sub>3</sub>-N還元、NO<sub>2</sub>-N還元、N<sub>2</sub>O還元についてそれぞれ2.5、1.5、0.5に設定した。これは、与えた窒素量に対する有機物量の不足の割合が等しくなるよう、脱窒の化学量論に基づき決定した。すなわち、各電子受容体からの還元がN<sub>2</sub>まで進むと仮定し、NO<sub>2</sub>-N還元およびN<sub>2</sub>O還元においては、NO<sub>3</sub>-N還元で消費されるCODに対して、それぞれ0.6倍量、0.2倍量のCODが消費されたと考えた。

測定項目は、測定対象とした電子受容体濃度および酢酸イオン濃度とし、加えて、NO<sub>3</sub>-N還元の場合にはNO<sub>2</sub>-N濃度の測定もおこなった。

### 7.5.2 結果

各測定時の窒素酸化物および酢酸イオンの減少を図7.25に示した。

培養開始後直ちに窒素酸化物および酢酸塩が消費され始め、この消費は酢酸イオンが検出されなくなるまで直線的に進行した。酢酸塩が枯渇後、脱窒形態が内生脱窒となるため各窒素酸化物の消費速度は低下した。

酢酸塩残存時および内生脱窒時の各電子受容体の減少直線より、それぞれの期間での還元速度を算出した(表7.14)。

有機物残存時には、NO<sub>2</sub>-N還元速度よりもNO<sub>3</sub>-N還元速度の方が大きかった。さらに、N<sub>2</sub>O還元速度はこれらの数倍の値であった。これは、有機物過剰の条件での測定において見られたのと同様の傾向である(7.3節参照)。

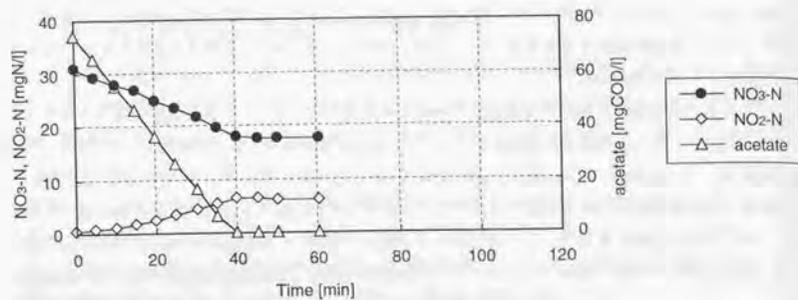
内生脱窒時には各還元速度が大きく低下したが、その低下率は電子受容体の種類によって異なった。NO<sub>3</sub>-N還元およびN<sub>2</sub>O還元では有機物残存時の速度のそれぞれ1.3%、6.0%にまで低下したのに対して、NO<sub>2</sub>-N還元の場合には有機物残存時の速度の24%と比較的高い速度に維持された(図7.27)。その結果、内生脱窒時の各還元速度は、NO<sub>3</sub>-N還元、NO<sub>2</sub>-N還元、N<sub>2</sub>O還元についてそれぞれ3.5、

表7.14 窒素に対して有機物が不足した条件での脱窒経路中の各還元速度測定結果

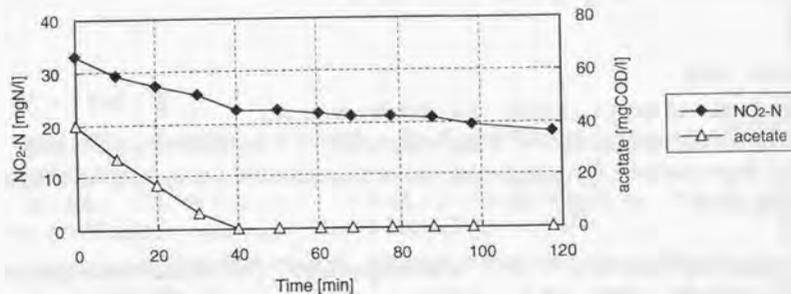
還元反応	有機物残存時 還元速度(a) [μgN/(g-MLSS-min)]	内生時 還元速度(b) [μgN/(g-MLSS-min)]	(b)/(a)* [%]	COD消費速度 [μg/(g-MLSS-min)]	COD消費速度/ 還元速度**
NO <sub>3</sub> -N還元	270	3.5	1	1,680	6.3
NO <sub>2</sub> -N還元	206	50	24	960	4.7
N <sub>2</sub> O還元	903	55	6	1,210	1.3

\*. 「(内生脱窒時の還元速度) / (有機物残存時の還元速度) × 100」より算出。

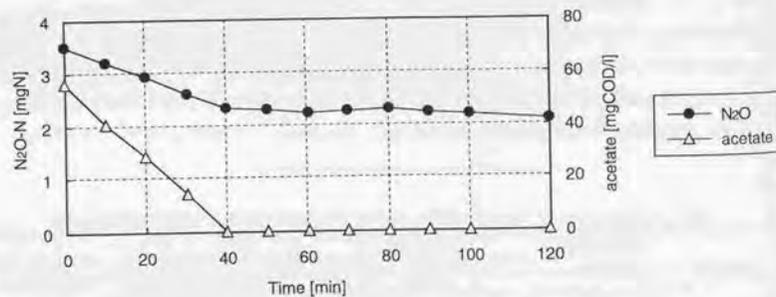
\*\* 「(COD消費速度) / (有機物残存時の還元速度)」より算出。



(a) NO<sub>3</sub>-N還元



(b) NO<sub>2</sub>-N還元



(c) N<sub>2</sub>O還元

図 7.25 有機物制限条件下での脱窒経路中の還元速度測定における各窒素酸化物および酢酸イオンの減少 (リアクターRun 2-1の汚泥を使用)

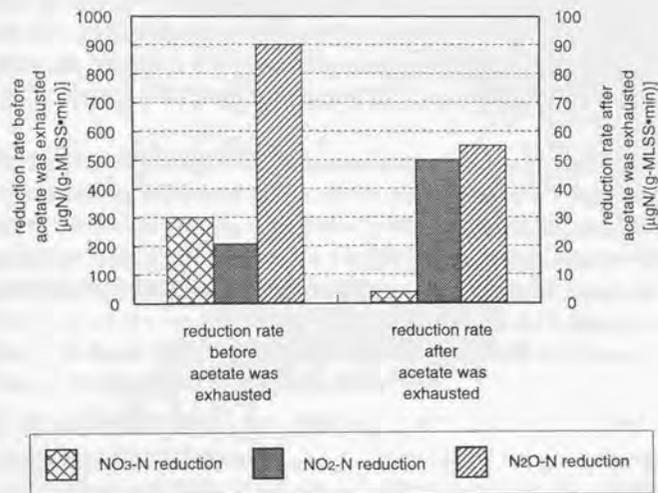


図 7.26 添加した酢酸塩残存時と酢酸塩枯渇後の脱窒経路中の各還元速度の比較

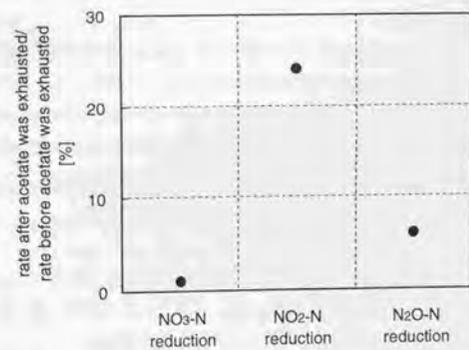


図 7.27 添加した酢酸塩残存時の還元速度に対する酢酸塩枯渇後の還元速度の割合

50, 55  $\mu\text{gN}/(\text{g-MLSS}\cdot\text{min})$ と、有機物残存時とは大小関係が異なった(図 7.26)。特に、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 還元速度が $\text{NO}_3\text{-N}$ 還元速度よりも大きくなったのが特徴的であった。

$\text{NO}_3\text{-N}$ 還元速度と $\text{NO}_2\text{-N}$ 還元速度の大小関係が内生脱窒時に逆転したことは、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 還元速度測定時の $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積状況にも現れた(図 7.25 (a))。有機物残存時には $\text{NO}_3\text{-N}$ の消費とともに $\text{NO}_2\text{-N}$ が蓄積されたのに対して、内生脱窒時には $\text{NO}_2\text{-N}$ は明らかに消費された。このことは、内生脱窒時に $\text{NO}_3\text{-N}$ と $\text{NO}_2\text{-N}$ が同時に利用可能である場合、 $\text{NO}_2\text{-N}$ が優先的に使用されることも示唆している。

有機物残存時のCOD消費速度と電子受容体還元速度との比をとると(表 7.14)、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 還元、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 還元、 $\text{N}_2\text{O}$ 還元についてそれぞれ6.3, 4.7, 1.3であった。 $\text{N}_2$ までの脱窒において使用されるCOD/N比は、化学量論的には各電子受容体についてそれぞれ2.86, 1.72, 0.57である。これを上の比と比較すると、明らかに有機物が過剰に消費されたことが分かる。7, 4節での結果から、この過剰分のうち、大部分がPHBとして細胞内に貯蔵され、有機物枯渇後の内生脱窒時に電子供与体として使用されることが予想される。

### 7.5.3 考察

内生脱窒へ移行後に各還元速度が低下する中で、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 還元速度の低下率のみが極端に小さかった点は、内生脱窒時の $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積に対して重要であると考えられる。これは、脱窒経路中で $\text{N}_2\text{O}$ の生成速度のみが、内生呼吸へ移行したことの影響を受けにくいことを示唆しているからである。

その意味で、脱窒が内生型へと変化した時点で $\text{NO}_2\text{-N}$ が蓄積されているかどうかが重要であると予想される。 $\text{NO}_2\text{-N}$ が蓄積されていない場合には、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 還元速度が $\text{N}_2\text{O}$ 還元速度よりも小さい限りは、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 還元反応が全脱窒反応の律速となるので $\text{N}_2\text{O}$ は蓄積されない。一方で、 $\text{NO}_2\text{-N}$ が蓄積されている場合には、 $\text{NO}_2\text{-N}$ が $\text{NO}_3\text{-N}$ よりも優先的に使用される点、 $\text{NO}_2\text{-N}$ が $\text{N}_2\text{O}$ 還元を阻害する点などを考慮すれば、内生脱窒時の $\text{NO}_2\text{-N}$ 還元速度が $\text{N}_2\text{O}$ 還元速度よりも大きくなり $\text{N}_2\text{O}$ が蓄積されることは容易に起こりうると推察される。

これは、7.4.3で挙げた $\text{NO}_2\text{-N}$ による2つの効果、すなわち、(a)直接的な $\text{N}_2\text{O}$ 還元酵素阻害作用、(b) $\text{NO}_2\text{-N}$ 蓄積に起因する二次的な影響、の両者が $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積に対して寄与しているとする機構である。内生脱窒時には $\text{NO}_3\text{-N}$ よりも $\text{NO}_2\text{-N}$ が優先的に使用される点、内生脱窒時の $\text{NO}_2\text{-N}$ 還元速度の低下率が小さい点は、ともに $\text{N}_2\text{O}$ 生成速度を増加させる要因となり、(b)の $\text{NO}_2\text{-N}$ による二次的な影響に相当する。そして、その際に(a)に挙げた $\text{NO}_2\text{-N}$ がもたらす $\text{N}_2\text{O}$ 還元の阻害作用によって、より $\text{N}_2\text{O}$ が蓄積されやすい状況が作り出されると考えられる。

リアクターの運転においても、脱窒過程で大量の $\text{N}_2\text{O}$ が放出される場合には、基質投入中に進行する脱窒過程で $\text{NO}_2\text{-N}$ が蓄積する傾向が見られた(7, 2節)。その結果、内生脱窒時において、上で述べたような機構により $\text{N}_2\text{O}$ の大量発生がもたらされたと推察できる。

内生脱窒時に $\text{NO}_3\text{-N}$ 還元速度と $\text{NO}_2\text{-N}$ 還元速度の大小関係が逆転する点については、7, 4節の脱窒回分実験においても示唆された。すなわち、添加した有機物が残存する期間には $\text{NO}_3\text{-N}$ の消費に伴

い $\text{NO}_2\text{-N}$ が蓄積されたが、内生脱窒時には $\text{NO}_2\text{-N}$ の消費が見られた。

この回分実験時の結果および本節の実験における $\text{NO}_3\text{-N}$ 還元測定時の $\text{NO}_2\text{-N}$ の挙動から、内生脱窒時に $\text{NO}_3\text{-N}$ よりも $\text{NO}_2\text{-N}$ が優先的に使用されるのは間違いないようである。

このことから、内生脱窒時の $\text{NO}_3\text{-N}$ 還元速度が極端に小さかった一因として、有機物残存時に蓄積した $\text{NO}_2\text{-N}$ の寄与を挙げることができる。したがって、 $\text{NO}_2\text{-N}$ が存在しない状態では $\text{NO}_3\text{-N}$ の内生還元速度はより大きくなる可能性があると言えるが、本研究ではその評価はおこなっていない。

内生脱窒時に $\text{NO}_2\text{-N}$ 還元速度が比較的高く維持された点と、そこでは $\text{NO}_3\text{-N}$ よりも $\text{NO}_2\text{-N}$ が優先的に使用された点を説明する機構を考えてみる。有機物残存時と内生脱窒時との大きな違いは、電子供与体となる有機物の種類である。有機物残存時には細胞外の酢酸塩が、内生脱窒時には細胞内に貯蔵されたPHBが、主要な電子供与体となったことが想定される。しかし、いずれの有機物源が使用される場合でも、脱窒の電子伝達経路への電子の供給は、アセチルCoAおよびTCA回路を経てNADHによりおこなわれると考えられるので、以降の電子伝達経路における各還元速度の大小関係には違いが生じないように思える。それにもかかわらず上に記したような現象が見られた要因は、明らかではない。ただし、以下のようなものを想定することは可能である。

- (a) 有機物存在時と内生脱窒時とは、脱窒の電子伝達経路への電子供給速度が異なることが予想される。電子受容体が多量に残存しているにも関わらず内生脱窒時に各還元速度が低下した事実は、そこでの電子供給速度が低下したことを示唆している。その場合、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 還元や $\text{N}_2\text{O}$ 還元に対して $\text{NO}_2\text{-N}$ 還元反応の電子に対する親和性が大きければ、電子の供給が制限因子となったときに $\text{NO}_2\text{-N}$ 還元速度のみが影響を受けにくいことも有りうる。また、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 還元と $\text{NO}_2\text{-N}$ 還元は電子をめぐる競合関係にあると考えられるので(Almeida et al., 1995)、電子の供給が制限となる条件では $\text{NO}_2\text{-N}$ が優先的に消費されることも生じうる。
- (b) 各電子受容体からの還元反応において、単位電子量当たりのエネルギー収率が電子受容体の種類によって異なれば、電子の供給が制限される条件において、収率の高い特定の電子受容体が選択的に使用されることも有りうる。しかしながら、*Pseudomonas denitrificans*の純粋培養系において、電子当たりの最大増殖収率が電子受容体の種類によらずほぼ一定値をとったという結果が報告されている(Koike & Hattori, 1975)。同様の結果は、やはり*Pseudomonas denitrificans*を用いて $\text{NO}_3\text{-N}$ 還元と $\text{NO}_2\text{-N}$ 還元とを比較したKomaros et al. (1996)によっても示されている。他の脱窒菌種においても同様の傾向があるのであれば、本機構は成り立たない。
- (c) 硝酸塩還元酵素と亜硝酸塩還元酵素の細胞内での存在箇所が寄与している可能性もある。*Paracoccus denitrificans*や*Pseudomonas denitrificans*のような代表的な脱窒菌では、亜硝酸塩還元酵素がペリプラズム空間に可溶性酵素として存在しているのに対して、硝酸塩還元酵素は細胞膜結合型でありさらにその活性中心が膜の内側に位置していることが明らかにされている(Hochstein, 1988)。このことは、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 還元の際には $\text{NO}_3\text{-N}$ の膜輸送にもエネルギーを投入する必要があることを意味する。そこで、内生脱窒時のように電子供与体が不足する条件では、 $\text{NO}_3\text{-N}$ および $\text{NO}_2\text{-N}$ が十分存在するのであれば、 $\text{NO}_2\text{-N}$ を使用した方がエネルギー的に優れていることから、 $\text{NO}_2\text{-N}$ を優先的に使用する機構が働くことが考えられる。ただし、 $\text{N}_2\text{O}$ 還元酵素もペリプラズム空間に存在しているので、本機構では $\text{NO}_2\text{-N}$ 還元と $\text{N}_2\text{O}$ 還元との間に

見られた違いを説明することはできない。

(d) 電子供与体として酢酸塩を使用した場合とPHBを使用した場合とで、脱窒の電子伝達経路において電子が供給される箇所が異なれば、PHBを電子供与体とした場合にNO<sub>2</sub>-Nが優先的に電子受容体として使用されることも有りうる。しかし、上で述べたように酢酸塩とPHBからの電子供給はいずれもNADHを介しており、そこからの経路に差が生じうる可能性は小さい。ただし、電子供与体となる有機酸の種類によって電子が供給される箇所が異なることを示唆する知見が、*Pseudomonas stutzeri*の純粋培養系において報告されている (Rijn *et al.*, 1996)。

#### 7.5.4 まとめ

窒素酸化物に対して有機物が不足する条件での脱窒経路中の各還元速度を測定し、有機物残存時と内生脱窒時の還元速度をそれぞれ算出した。

有機物残存時と比較して内生脱窒時には各還元速度が低下したが、NO<sub>2</sub>-N還元速度の低下率のみが極端に小さかった。その結果、内生脱窒時にはNO<sub>3</sub>-N還元とNO<sub>2</sub>-N還元の速度の大小関係が逆転し、NO<sub>2</sub>-N還元速度の方が大きくなった。また、内生脱窒時にNO<sub>3</sub>-NとNO<sub>2</sub>-Nが共に存在する場合、NO<sub>2</sub>-Nが優先的に使用されることが示唆された。

内生脱窒時のN<sub>2</sub>O蓄積に対しては、NO<sub>2</sub>-Nの有無が重要であると考えられた。NO<sub>2</sub>-Nが存在している場合には、上で述べた機構によりN<sub>2</sub>O生成速度が比較的大きく保たれ、さらに、NO<sub>2</sub>-NによるN<sub>2</sub>O還元酵素の阻害が起こり、NO<sub>2</sub>-N還元速度がN<sub>2</sub>O還元速度よりも大きくなってN<sub>2</sub>Oの蓄積が起こると考察された。

### 7. 6 内生脱窒への移行段階でのNO<sub>3</sub>-N蓄積とNO<sub>2</sub>-N蓄積の効果

7. 5節での検討結果から、内生脱窒時のN<sub>2</sub>O蓄積に対しては、脱窒が内生型へと移行した時点でNO<sub>2</sub>-Nが蓄積されているかどうか重要であると考えられた。

しかし、実際には、内生脱窒がおこなわれさえすれば、NO<sub>2</sub>-N蓄積の有無には関係なくN<sub>2</sub>Oが蓄積する可能性もある。内生脱窒においては脱窒速度が急激に低下するため、通常の脱窒では蓄積されない中間体が必然的に蓄積されるという機構も想定されうる。

この点に関して、リアクターの運転、脱窒の各還元速度測定、脱窒条件での回分実験の結果からは検証できなかった。内生脱窒がおこなわれた場合には、例外無くNO<sub>2</sub>-Nが蓄積されていたためである。

そこで、運転中のリアクターにおいて、基質投入終了直前にNO<sub>3</sub>-NないしはNO<sub>2</sub>-Nを添加することにより、内生脱窒時にNO<sub>3</sub>-NあるいはNO<sub>2</sub>-Nが存在する状態を強制的に作り出すことを試みた。

その目的は、上で述べたように、内生脱窒時のN<sub>2</sub>O蓄積に対して、NO<sub>2</sub>-Nが蓄積していることが支配的な因子であるのか、あるいは内生脱窒が進行すること自体が重要であるのかを検証することにある。

使用したリアクターの運転系列は、Run 2-3である。これは、本系列においては基質投入終了時にNO<sub>3</sub>-NおよびNO<sub>2</sub>-Nが存在しておらず(7. 2節)、無酸素工程でのN<sub>2</sub>O放出がほとんど見られなかったため、両窒素酸化物添加の影響を見るのに最適であると判断したためである。

#### 7.6.1 実験方法

リアクター運転系列Run 2-3において、基質投入終了2~3分前にNO<sub>3</sub>-NあるいはNO<sub>2</sub>-Nを添加した。添加量は、NO<sub>3</sub>-Nの場合には100 mgN、NO<sub>2</sub>-Nの場合には20 mgNとした。これらは、混合液中においてそれぞれ56 mgN/l、12.5 mgN/lの濃度上昇分に相当する。なお、NO<sub>3</sub>-Nの添加は硝酸カリウム溶液により、NO<sub>2</sub>-Nの添加は亜硝酸ナトリウム溶液によりおこなった。

投与前後での気相のN<sub>2</sub>O濃度および混合液ろ液中のNO<sub>3</sub>-N・NO<sub>2</sub>-Nを運転サイクルに沿ってモニタした。試料採取方法および採取後の遠心・ろ過操作については、5.2.2で述べた手順どおりである。

本実験を実施した時点では、リアクター系列Run 2-3では良好な窒素除去がおこなわれており、混合液中には無機態窒素がほとんど残留しなかった。N<sub>2</sub>Oは、無酸素工程の間にはほとんど放出されず、好気工程の中頃から後半において、一時的に放出された。流入窒素当たりのN<sub>2</sub>O転換率は3~10%程度であった。

## 7.6.2 結果

### (1) NO<sub>3</sub>-N添加

基質投入終了3分前（無酸素工程開始7分後）にNO<sub>3</sub>-Nを添加した際の気相のN<sub>2</sub>O濃度および混合液中のNO<sub>3</sub>-N・NO<sub>2</sub>-Nの経時変化を図7.28に示した。

NO<sub>3</sub>-N添加をおこなったサイクルとその直前のサイクルとで、気相のN<sub>2</sub>O濃度およびその変化のパターンに違いは見られなかった。すなわち、NO<sub>3</sub>-Nを添加した影響がN<sub>2</sub>Oの放出には全く現れなかった。

混合液中のNO<sub>3</sub>-N濃度は、NO<sub>3</sub>-N添加後に67 mgN/lへと増加し、その後無酸素工程を通して57 mgN/lまで消費された。その際、NO<sub>2</sub>-Nの蓄積は見られなかった。このNO<sub>3</sub>-Nの消費が起きている時点では混合液中に酢酸イオンは残留していないと思われ、ここでの脱窒は内生型であると考えることができる。

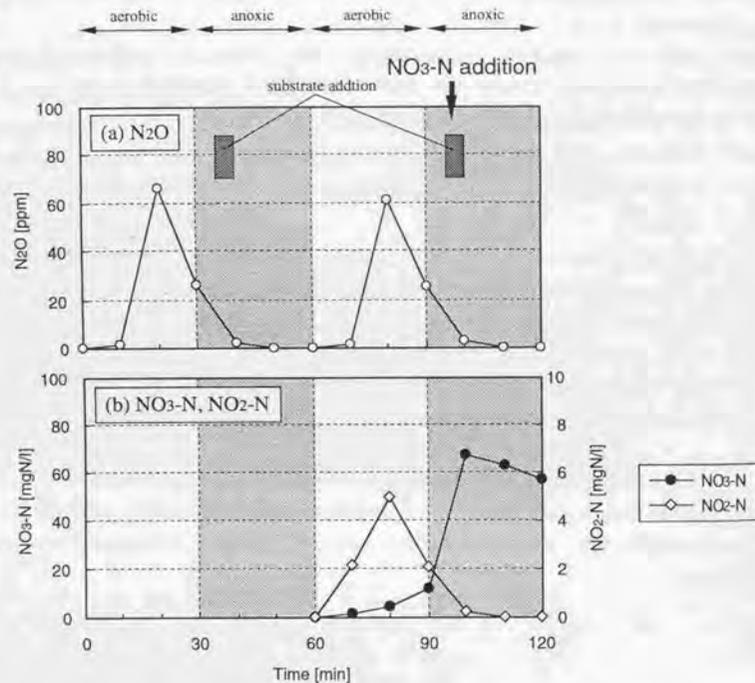


図7.28 リアクターにおいて基質投入終了3分前にNO<sub>3</sub>-Nを添加したときの気相のN<sub>2</sub>O濃度、混合液中のNO<sub>3</sub>-NおよびNO<sub>2</sub>-Nの経時変化 (Run 2-3; COD/N=5.0, DO=0.5~1.1 mg/l)

これより、内生脱窒が進行しても、それだけではN<sub>2</sub>Oの蓄積には直結しないことが分かる。

### (2) NO<sub>2</sub>-N添加

基質投入終了2分前（無酸素工程開始8分後）にNO<sub>2</sub>-Nを添加した際の気相のN<sub>2</sub>O濃度および混合液中のNO<sub>3</sub>-N/NO<sub>2</sub>-Nの経時変化を図7.29に示した。なお、気相のN<sub>2</sub>O濃度については、NO<sub>2</sub>-N添加を実施したサイクルを3サイクル分測定した。

NO<sub>2</sub>-N添加の2分後に基質投入が終了した時点で、既に気相のN<sub>2</sub>O濃度は500 ppmへと急増していた。その10分後にはN<sub>2</sub>O濃度が1300 ppmで最大に達し、無酸素工程を通して多量のN<sub>2</sub>O放出が継続した。それ以前のサイクルにおいて、無酸素工程での気相のN<sub>2</sub>O濃度が最大で3.7 ppm、N<sub>2</sub>O放出速度が増加した好気工程でも最大で65 ppmであったことを考えれば、NO<sub>2</sub>-Nを添加することによりN<sub>2</sub>O生成が大きく促進されたことが分かる。

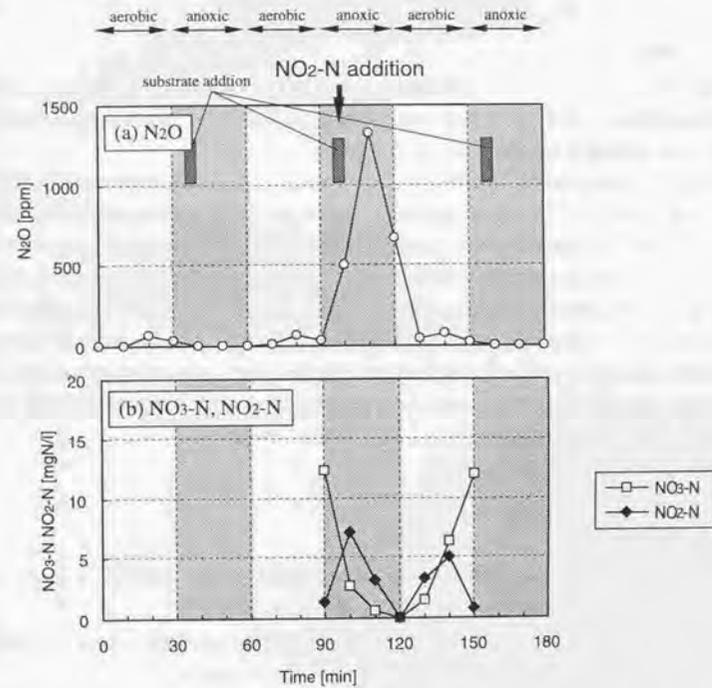


図7.29 リアクターにおいて基質投入終了2分前にNO<sub>2</sub>-Nを添加したときの気相のN<sub>2</sub>O濃度、混合液中のNO<sub>3</sub>-NおよびNO<sub>2</sub>-Nの経時変化 (Run 2-3; COD/N=5.0, DO=0.5~1.1 mg/l)

NO<sub>2</sub>-Nを添加したサイクルでのN<sub>2</sub>O放出量は26.5 mgNであり、その直前のサイクルにおける放出量(1.3 mgN)の20倍であった。

NO<sub>2</sub>-N添加直後には、混合液のNO<sub>2</sub>-Nは計算上13.8 mgN/lになったはずであるが、その2分後には既に7.2 mgN/lまで消費されていた。この期間には基質由来の有機物が連続的に供給されたために、脱窒による消費が進んだものと解される。その後もNO<sub>2</sub>-Nの消費は続き、無酸素工程終了時には検出限界以下となった。

NO<sub>2</sub>-N添加をおこなったサイクルにおいて、無酸素工程の間に消費された窒素成分量に対するN<sub>2</sub>O転換率は57%と算出された。

以上の結果より、NO<sub>2</sub>-Nの存在が大量のN<sub>2</sub>O蓄積を招くことが分かる。特に、基質添加後に脱窒が内生型となった時点でN<sub>2</sub>O放出が最大となったことと、NO<sub>2</sub>-Nが枯渇した無酸素工程終了時にはN<sub>2</sub>O放出速度が減少したことから、内生脱窒においてNO<sub>2</sub>-Nの存在が大量のN<sub>2</sub>O生成をもたらすことが示唆される。

### 7.6.3 考察

NO<sub>3</sub>-Nを添加した実験より、内生脱窒の進行自体はN<sub>2</sub>Oの蓄積を伴わないことが示された。そして、NO<sub>2</sub>-Nを添加した場合に直ちに多量のN<sub>2</sub>O放出が見られたことから、内生脱窒時のN<sub>2</sub>O蓄積に対しては、NO<sub>2</sub>-Nの存在が重要であることが示唆された。

ただし、ここでのNO<sub>2</sub>-N添加後の状態は、Run 2-1やRun 2-2において基質添加中にNO<sub>2</sub>-Nが蓄積した状態とは同一ではないことに注意する必要がある。前者においては混合液中のNO<sub>2</sub>-N濃度が瞬間的に増加したのに対して、後者においてはNO<sub>3</sub>-Nの消費に伴って連続的にNO<sub>2</sub>-N濃度が増加したと判断できる。これより、後者の条件では脱窒菌がNO<sub>2</sub>-Nに対してある程度順応する時間的余裕があったが、後者の条件ではその余裕が全く無かったと推察できる。したがって、本実験でのNO<sub>2</sub>-N添加後の急激なN<sub>2</sub>O生成は、7.5節で考察したような内生脱窒時の還元速度差よりも、N<sub>2</sub>O還元に対するNO<sub>2</sub>-Nの阻害作用自体が大きく寄与したものと思われる。本実験において、NO<sub>2</sub>-N添加直後に基質投入が終了した時点において既に大量のN<sub>2</sub>Oが生成されていた点も、NO<sub>2</sub>-N濃度の急増が有機物供給中の脱窒であるにも関わらずN<sub>2</sub>Oの蓄積を引き起こしたことを示唆している。

### 7.6.4 まとめ

内生脱窒開始時におけるNO<sub>3</sub>-N蓄積およびNO<sub>2</sub>-N蓄積がN<sub>2</sub>O生成に与える影響を、リアクターの運転中にNO<sub>3</sub>-NないしはNO<sub>2</sub>-Nを添加する実験により調べた。

基質投入終了時にNO<sub>3</sub>-Nを添加した場合には、以降の脱窒過程でN<sub>2</sub>Oの蓄積が見られず、NO<sub>3</sub>-Nからの内生脱窒が進行しただけではN<sub>2</sub>Oの蓄積に直結しないことが示された。

NO<sub>2</sub>-Nを同様に添加した場合には、NO<sub>3</sub>-N添加の場合と比較して添加量が小さかったにも関わらず、大量のN<sub>2</sub>O放出を招いた。これより、内生脱窒開始時にNO<sub>2</sub>-Nが存在することがその後のN<sub>2</sub>O生成を決定づける因子であることが示唆された。

ただし、NO<sub>2</sub>-N添加後に見られた大量のN<sub>2</sub>O生成に対しては、NO<sub>2</sub>-Nが持つN<sub>2</sub>O還元の阻害効果が強

く現れたと推定された。

## 7. 7 低COD/N比運転でのN<sub>2</sub>O生成機構

本節では、7. 2～7. 6節で実施した諸検討の結果を総括し、低COD/N比の基質で運転されたリアクターにおいて脱窒過程で大量のN<sub>2</sub>Oが放出された機構について考察する。

まず、脱窒過程で大量のN<sub>2</sub>Oが発生した運転系列において、1サイクルの中で大きなN<sub>2</sub>O放出が見られた時点では脱窒形態が内生型になっていたと考えられる点が重要である(7. 2節)。

実際、有機物を過剰に与えた条件での還元速度差では、N<sub>2</sub>Oの蓄積を説明できなかった(7. 3節)。そこでは、リアクターでのN<sub>2</sub>O放出量の大小に関わらず、N<sub>2</sub>O還元活性は常にNO<sub>3</sub>-N/NO<sub>2</sub>-N還元活性よりも高く維持されていた。

そして、脱窒条件での回分実験により、特殊な条件を除いては、脱窒菌が利用可能な有機物が混合液中に残存する間にはN<sub>2</sub>Oが蓄積されず、内生脱窒が進行して初めてN<sub>2</sub>Oの蓄積が起こる傾向が見出された(7. 4節)。ここで言う特殊な条件とは、汚泥が通常の運転でさらされていないような高濃度のNO<sub>3</sub>-Nが存在する場合、NO<sub>2</sub>-N濃度が瞬間的に増加する場合である。このような状況がリアクターの定常的な運転の中で起こるとは考えにくく、これらはリアクター運転時のN<sub>2</sub>O生成機構としては除外される。

以上の結果は、リアクターにおいて基質投入終了後に脱窒が内生型となる点が、大量のN<sub>2</sub>O生成に対して重要な因子であったことを示している。

ただし、内生脱窒が進行すること自体は必ずしもN<sub>2</sub>Oの蓄積を伴わないことが7. 6節で示されており、内生脱窒が進行する際の環境条件が重要であると考えられる。

ここで、N<sub>2</sub>O放出量の大きかったリアクター系列では、基質投入中に進行する脱窒の過程でNO<sub>2</sub>-Nが蓄積されたことに着目する(7. 2節)。これは、N<sub>2</sub>O放出量の小さい系列では見られない現象であった。

このことは、N<sub>2</sub>O放出量が大きい系列では、脱窒形態が内生型へと移行した時点で既にNO<sub>2</sub>-Nが蓄積されていたことを意味している。このことから、内生脱窒時にNO<sub>2</sub>-Nが存在していることが、N<sub>2</sub>O蓄積に対して重要ではないかと考えられる。

ここでのNO<sub>2</sub>-N蓄積は、有機物過剰の条件で測定したNO<sub>3</sub>-N還元活性とNO<sub>2</sub>-N還元活性の差により説明された。すなわち、NO<sub>2</sub>-Nの蓄積が見られた系列においては、NO<sub>2</sub>-N還元活性がNO<sub>3</sub>-N還元活性よりも明らかに小さかった(7. 3節)。

内生脱窒時にN<sub>2</sub>Oが蓄積されるためには、そこでのN<sub>2</sub>O還元速度がN<sub>2</sub>O生成速度よりも小さくならないなければならない。そこで、内生脱窒時のN<sub>2</sub>O生成速度を増加させる要因とN<sub>2</sub>O還元速度を低下させる要因を考えてみる。

窒素量に対して有機物量が不足するような条件で脱窒経路中の各還元速度を測定したところ、添加した有機物が枯渇し内生脱窒へと移行した際に、各還元速度が低下する中でNO<sub>2</sub>-N還元速度の低下率のみが極端に小さかった(7. 5節)。さらに、内生脱窒時にはNO<sub>3</sub>-NよりもNO<sub>2</sub>-Nの方が優先的に利用されることが示唆された。これらは、内生脱窒時にはN<sub>2</sub>O生成速度が相対的に大きくことを意味

している。

内生脱窒時のN<sub>2</sub>O還元速度を低下させる要因としては、NO<sub>3</sub>-Nの蓄積とNO<sub>2</sub>-Nの蓄積という二つを挙げることができる。脱窒条件での回分実験において、内生脱窒開始時のNO<sub>3</sub>-N濃度とN<sub>2</sub>O蓄積速度との間に正の相関が見出された(7. 4節)。また、同種の回分実験(7. 4節)およびリアクターの運転中にNO<sub>2</sub>-Nを添加した実験(7. 6節)により、NO<sub>2</sub>-NがN<sub>2</sub>O還元を強く阻害することが示された。NO<sub>2</sub>-N濃度が連続的に増加する場合にはその阻害効果が緩和されることも指摘されたが(7.4.3)、NO<sub>2</sub>-NがN<sub>2</sub>O還元速度を低下させる効果を持つことは間違いないであろう。

上に挙げたような要因は全て、脱窒過程で大量のN<sub>2</sub>Oを発生していたリアクターにおいて実際に見られたものであり、その結果として、内生脱窒時にN<sub>2</sub>O生成速度よりもN<sub>2</sub>O還元速度の方が小さくなり、N<sub>2</sub>Oが蓄積されたのではないかと考えられる。

上で推察した機構をまとめてみると、まず、有機物存在下で進行する脱窒過程ではN<sub>2</sub>Oが蓄積されず、脱窒が内生型となってからN<sub>2</sub>Oの蓄積が起こることが重要である。ただし、内生脱窒が起こること自体はN<sub>2</sub>Oの蓄積に対する必要条件であって十分条件ではない。

そこでのN<sub>2</sub>O蓄積に対しては、内生脱窒が開始される時点でNO<sub>2</sub>-Nが存在していることが支配的な因子であると考ええる。このNO<sub>2</sub>-Nは、(1)内生脱窒時のN<sub>2</sub>O生成速度を比較的高く維持する、(2)N<sub>2</sub>O還元速度を低下させる、という二つの効果によりN<sub>2</sub>Oの蓄積をもたらすと考えられる。

さらに、処理状態として高濃度に蓄積しているNO<sub>3</sub>-NがN<sub>2</sub>O還元速度を低下させる効果を持つ。ただし、NO<sub>3</sub>-Nが蓄積しているという条件のみでは、内生脱窒が進行してもN<sub>2</sub>Oの蓄積を伴わないことが予想される。

ここで、7. 1節においてN<sub>2</sub>Oの蓄積機構を整理するために指摘した(a)脱窒自体の変化、(b)環境条件の影響、という二つの因子と上でまとめた機構との関連について触れておく。

N<sub>2</sub>Oの蓄積に対して直接的に影響していると考察された、有機物の枯渇、NO<sub>2</sub>-Nの蓄積、NO<sub>3</sub>-Nの蓄積という因子は全て環境条件に相当する。したがって、利用可能な有機物量が制限因子となる条件での脱窒過程でのN<sub>2</sub>O蓄積は、(b)の環境条件の影響により説明できることになる。

ただし、N<sub>2</sub>O蓄積の支配因子であると見なされたNO<sub>2</sub>-Nの蓄積に対しては、汚泥中の脱窒菌が持つNO<sub>3</sub>-N還元活性とNO<sub>2</sub>-N還元活性との間の不均衡によってもたらされたと考えられることから、(a)の脱窒自体の変化も重要である。

すなわち、ここでのN<sub>2</sub>O蓄積に対しては(a)脱窒自体の変化と(b)環境条件という両者が寄与していると考えることができる。

基質のCOD/N比を高く設定した運転系列においてN<sub>2</sub>O放出量が小さかった要因についても考察しておく。

投入基質のCOD/N比を5.0に設定したリアクター系列Run 2-3においては、N<sub>2</sub>O放出量が極端に小さかった(5.3.2参照)。ここでは、好気工程において生成されたNO<sub>3</sub>-NおよびNO<sub>2</sub>-Nが基質投入中に進行する脱窒過程で全量消費され、そもそも内生型の脱窒が起こっていなかったようである(7. 2節)。このことが、N<sub>2</sub>O放出量が小さかった要因であると考えられる。

ただし、NO<sub>3</sub>-Nが蓄積しており内生脱窒が起こったとしても、それのみではN<sub>2</sub>Oは発生しないこと

が示されている(7.7節)。本系列の汚泥においては $\text{NO}_3\text{-N}$ 還元活性よりも $\text{NO}_2\text{-N}$ 還元活性の方がやや高く維持されており、基質投入時に $\text{NO}_2\text{-N}$ 蓄積を伴わない脱窒がおこなわれた点が重要であると言える。

実際の高濃度排水処理施設において、ここで考察したような機構により $\text{N}_2\text{O}$ が大量に発生する可能性について考えてみる。

本機構では、基質が不連続に投入されることにより起こる内生脱窒、そして一時的な $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積を $\text{N}_2\text{O}$ 発生の主因としていることから、回分的な処理形態を想定したものだと言える。そのような処理方式としては、本研究で対象とした間欠曝気式の高負荷型し尿処理の他に、fill-and draw型の間欠曝気式畜排水処理などが挙げられる。また、原水の投入が連続的におこなわれる場合であっても、反応槽の混合特性がプラグフロー型になっていれば、間欠曝気型の処理プロセスにおいて時間軸に沿って生じた現象が流れ方向に沿って同様に起こることが予想されるので、上で考察した機構による $\text{N}_2\text{O}$ 生成が起こりうる。これには、循環式の高負荷型し尿処理などが想定される。

上に挙げたような処理プロセスにおいて、原水中のC/N比が小さい場合には本研究で見られたのと同様の $\text{N}_2\text{O}$ 放出が生じうると考えられる。

しかしながら、本研究の実験室規模リアクターに用いた合成基質とは異なり実排水中の有機物成分が多量であることが、起こりうる現象の予測を困難にする。酢酸のような細菌にとって易分解性の有機物が原水の主要な有機成分であれば、原水投入と同時に直ちに有機物が消費され、その後の脱窒が内生型となるのが容易に予想できる。しかし、実排水の場合には分解に時間を要する有機物が相当量含まれると思われ(Henze *et al.*, 1994)、その場合、原水投入後の脱窒を内生脱窒と見なせるのか、あるいは、そもそも内生脱窒が起こるのか、といった疑問が生じる。また、脱窒菌の利用可能な有機物量を制御するという意味で、有機物の加水分解速度が脱窒およびそこから $\text{N}_2\text{O}$ 生成を大きく律する可能性もある。

本節での考察において、内生脱窒が起こることと同様に $\text{N}_2\text{O}$ 発生に対して重要な因子として、 $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積があった。定期的に $\text{NO}_2\text{-N}$ が低濃度であれ蓄積されているような場合には、本条件は既に満たされたことになる。実際、第4章で述べた実し尿処理施設において、 $\text{N}_2\text{O}$ 放出量が大きかった調査2・4では、 $\text{NO}_2\text{-N}$ が運転サイクルを通して常に存在している状態にあった。また、 $\text{NO}_2\text{-N}$ が常に残留してなくても、本研究の実験室規模リアクターで見られたように、有機物存在時の脱窒により必然的に $\text{NO}_2\text{-N}$ が蓄積されるような状態であれば、やはり $\text{N}_2\text{O}$ 蓄積のための条件は満たされることになる。これは、脱窒菌が持つ $\text{NO}_3\text{-N}$ 還元活性と $\text{NO}_2\text{-N}$ 還元活性の不均衡により説明されたが、その不均衡をもたらした要因は明らかにできなかった。7.3.3で推察したように、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の蓄積が原因であるならば、実施施設において高濃度の $\text{NO}_3\text{-N}$ が定期的に残留するような事態は考えにくいので、脱窒の進行とともに $\text{NO}_2\text{-N}$ が蓄積される可能性は小さい。あるいは、それ以外の要因で還元活性の不均衡をもたらされたのであれば、本研究の実験室規模リアクターと同様の現象が実施施設においても起こる可能性がある。

第4章で述べた実し尿処理施設においては、間欠曝気槽への投入原水のCOD/N比は4回の調査を通してほぼ一定であった。それにも関わらず調査日によって $\text{N}_2\text{O}$ 放出量に大きな違いが見られた点は、そこでの $\text{N}_2\text{O}$ 放出量が原水のC/N比以外の因子により決定されていたことを示唆している。

## 7.8 メタノール投入による $\text{N}_2\text{O}$ 放出抑制

ここでは、実験室規模リアクターにおいて $\text{N}_2\text{O}$ 放出の抑制を試みて基質と同時にメタノールを添加したRun 2-4の結果について(第5章)、7.7節で述べた低COD/N比運転時の $\text{N}_2\text{O}$ 生成機構をふまえて考察する。

その際、Run 2-4の運転サイクル中での脱窒系指標の挙動を観察した結果も示し、考察に供する。

連続運転リアクターでメタノール投入を実施したRun 2-4において、日数経過とともに $\text{N}_2\text{O}$ 放出量が増加した(5.3.3参照)。ここで、1サイクル内の気相の $\text{N}_2\text{O}$ 濃度の変化パターンを見ると(図5.11)、日数経過につれて大きく変化しているのは無酸素工程の $\text{N}_2\text{O}$ 放出量であった。メタノール投入をおこなう前には(Run 2-2)  $\text{N}_2\text{O}$ の起源として脱窒が主要であると判断されたことも考え合わせれば(第6章)、メタノール投入後に見られた $\text{N}_2\text{O}$ 放出量の変化は脱窒過程からの $\text{N}_2\text{O}$ 発生量の変化を反映していると考えて良いだろう。

5.3.3では、Run 2-4での運転における流入窒素当たりの $\text{N}_2\text{O}$ 転換率の推移を示した(図5.8(a))。しかし、本系列では日数経過につれて脱窒率が大きく変化するため、そこでの $\text{N}_2\text{O}$ の主要な生成源が脱窒であると考えられるならば、流入窒素当たりではなく脱窒量当たりの $\text{N}_2\text{O}$ 転換率で議論を進めるのが本質的である。

そこで、Run 2-4における脱窒量当たりの $\text{N}_2\text{O}$ 転換率の推移を示したのが図7.30である。ただし、脱窒量の算出に際して、投入基質中の $\text{NH}_4\text{-N}$ の菌体への同化分は無視し、また、 $\text{NO}_3\text{-N}$ を消費する反応として脱窒のみを考えた。同図には、混合液ろ液の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の推移も示した。

基本的な傾向は図5.8(a)と変わらないが、10日目以降 $\text{N}_2\text{O}$ 放出量が再び増加した際の転換率は、メタノール投入開始時の転換率を超えていたわけではないことが分かる。すなわち、図5.8(a)において30日目付近に $\text{N}_2\text{O}$ 放出量がメタノール投入前よりも大きくなっていった点に対しては、脱窒率が増加し

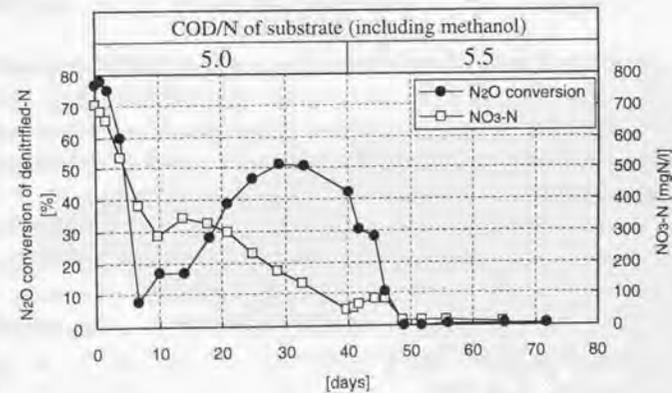


図7.30 リアクターRun 2-4における脱窒量当たりの $\text{N}_2\text{O}$ 転換率と混合液ろ液の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の経日変化

たことの寄与が含まれており、脱窒量当たりの $N_2O$ 生成率は投入前よりは小さくなっている。

投入基質のCOD/N比が3.5と小さく無酸素工程での脱窒過程で大量の $N_2O$ が放出されていた系列Run 2-2に対して、脱窒のための有機物源としてメタノールを投入することにより、 $N_2O$ 放出量を大幅に抑制できることが示された。その場合、流入窒素当たりの $N_2O$ 転換率は1%以下にまで低下した。

しかし、そのためにはメタノールを含めた基質のCOD/N比が5.5となるような量のメタノールを投入する必要がある。COD/N比が5.0となるようにメタノールを投入した時期には、一時的に $N_2O$ 放出量が減少したものの、日数経過につれて再び放出量が増加した。これは、酢酸塩を主要な有機物源として基質のCOD/N比を5.0に設定した系列 (Run 2-3; ただし好気工程のDOを0.7~1.3 mg/lに制御した状態) において $N_2O$ 放出量が非常に小さかった点と対照的である。ただし、 $N_2O$ 放出量が再び増加したとはいえ、脱窒量当たりの転換率には一応の改善効果も見られた。

活性汚泥により脱窒をおこなう場合の有機物源としてメタノールを使った場合に必要とされるCOD/N比としては、酢酸塩を使用した場合と同程度かあるいはむしろ小さい値が報告されている (Carley & Mavinic, 1991; Her & Huang, 1995)。汚泥の馴養状況によってはメタノールが電子供与体として使用されにくいことも予想されるが (Akuma *et al.*, 1993)、Run 2-4においてはメタノール投入開始直後から混合液の $NO_3-N$ は減少しており、メタノールによる脱窒が直ちに進行したことが分かる。そして、その後の日数経過につれて $NO_3-N$ は確実に減少しており、COD/N比=5.0の条件であっても脱窒率に対する改善効果は十分に現れている。

それにもかかわらずそこからの $N_2O$ 放出に対する抑制効果が小さかったことから、 $N_2O$ 放出量を抑制するためには、従来報告されてきた完全脱窒に必要なメタノール投入量 (Stensel *et al.*, 1973; Narkis *et al.*, 1979) よりも多量の投入を要する可能性がある。

ここで、Run 2-4において当初のメタノール投入量 (COD/N=5.0) では $N_2O$ 放出があまり抑制されなかった点について考察する。

7. 2節で実施したのと同様に、Run 2-4において混合液ろ液中の窒素系指標および気相の $N_2O$ 濃度の1サイクル内の変化を追った結果を示したのが、図7.31、7.32である。図7.31はメタノール投入量を増加させる直前のもの、図7.32は投入量を増加させた後約10日が経過した時点のものである。

投入量を増加させる以前には、無酸素工程において基質投入が終了した後に $NO_3-N$ の消費速度が減少している点と、基質投入時に $NO_2-N$ が蓄積されている点に注目される (図7.31 (a))。これは、Run 2-1や2-2において見られたのと同様の傾向であり (7. 2節)、7. 7節において考察した $N_2O$ 蓄積機構をここで適用できることを示唆している。すなわち、この時期に $N_2O$ 放出量が大きかった要因としては、基質投入中に起こる脱窒過程で $NO_2-N$ が蓄積した点が重要であると考えられる。

一方、メタノール投入量を増加させ $N_2O$ 放出が抑制された後の状態では、基質投入直後に低濃度の $NO_2-N$ が残留したものの、無酸素工程後半には $NO_2-N$ が検出されなかった (図7.32 (a))。メタノール投入量を増加する以前 (図7.31の状態) では、基質投入中に消費された $NO_3-N$ のうち62%が $NO_2-N$ として残留した計算になるが、投入量を増加した後は $NO_2-N$ としての残留分は16%へと減少した。これは、投入量増加後には、有機物供給時の脱窒において $NO_2-N$ の蓄積を伴わない状態へと移行していったことを示唆している。その結果として、無酸素工程の後半には $NO_3-N$ および $NO_2-N$ が存在して

おらず、内生型の脱窒が起こらなかったと判断される。このことが、 $N_2O$ 放出量が小さく抑制された原因であろう。なお、これは、 $N_2O$ 放出量が小さかったRun 2-3と同一の傾向でもある。

すなわち、当初のメタノール投入条件 (COD/N比=5.0) では、有機物供給条件下で進行する脱窒過程で $NO_2-N$ が蓄積されるという傾向が維持されていたことが重要であると考えられる。これは、メタノール投入以前の運転条件で $N_2O$ 発生をもたらしていた主要な因子が解消されていなかったことを意味するからである。

このような $NO_2-N$ 蓄積に対しては、7. 3節において $NO_3-N$ 還元と $NO_2-N$ 還元の活性差から説明した。Run 2-4においてはこれら還元活性の測定はおこななかったが、同様の活性差が生じていた可能性が高い。

当初のメタノール投入条件 (COD/N比=5.0) において $N_2O$ 放出を抑制できなかった別の要因としては、投入開始後40日が経過した時点でも混合液中に未だ $NO_3-N$ が残留していた点を挙げるができる。

ただし、(a)  $NO_3-N$ が存在すること自体は $N_2O$ の発生をもたらさないと考えられる点 (7. 6節)、(b) メタノール投入量を増加させた直後の数日間に $NO_3-N$ が増加したにも関わらず $N_2O$ 放出量は急速に低下した点などは、 $NO_3-N$ の蓄積が直接的な要因ではないことを示唆している。

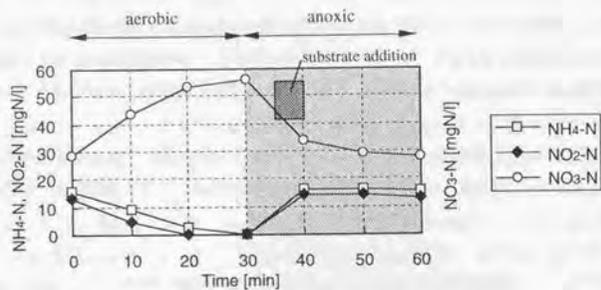
しかし、上で述べたような脱窒過程での $NO_2-N$ の蓄積をもたらす要因として、 $NO_3-N$ が間接的に関与していた可能性はある。 $NO_3-N$ 還元と $NO_2-N$ 還元との間に活性差が生じた機構のひとつとして、蓄積された $NO_3-N$ が $NO_3-N$ 還元活性を増加させた可能性を指摘した (7. 3節)。さらに、両還元の活性差ではなく、 $NO_3-N$ の蓄積自体が $NO_2-N$ 還元を阻害する可能性があることも指摘した (Błaszczuk, 1993; Komaros *et al.*, 1996)。

したがって、当初のメタノール投入条件であっても、 $NO_3-N$ が完全に混合液中に残留しなくなれば、 $N_2O$ 放出量が低下した可能性もある。Run 2-4の結果からはこれを検証することはできず、今後の検討課題である。

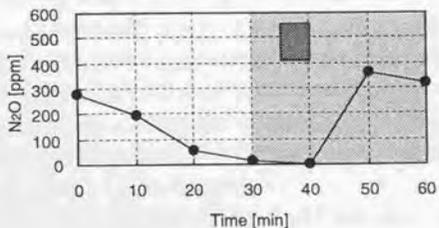
当初のメタノール投入条件において、一度減少した $N_2O$ 放出量が再び増加した原因は不明である。この期間にも混合液ろ液の $NO_3-N$ 濃度はほぼ一貫して減少しており (図7.30)、脱窒自体が不調になったわけではない。ただし、 $N_2O$ 放出量が増加を始めた時期 (投入開始後10日目頃) を境に $NO_3-N$ の減少速度が突然低下しており、汚泥中の生物相に何らかの変化が起こったことが予想される。

本節での考察結果をまとめると以下ようになる。

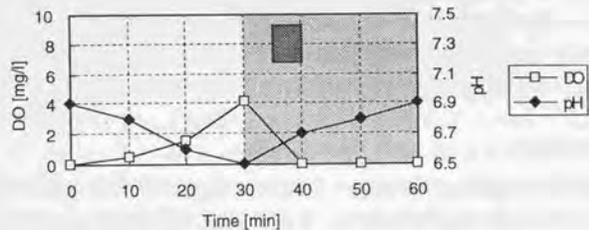
- (1) 原水のC/N比が小さく脱窒過程で大量の $N_2O$ が発生する場合には、脱窒のための有機物源としてメタノールの投入が有効な対策となる。ただし、完全な脱窒を得るのに必要とされるよりも多量の投入を要する可能性もあり、投入量については更なる検討が必要である。
- (2) メタノールが投入されたにも関わらず $N_2O$ が多量に発生した時期には、基質投入中に起こる脱窒の過程で $NO_2-N$ が蓄積した。一方、メタノール投入量を増加させ $N_2O$ 放出が抑制された条件では、 $NO_2-N$ 蓄積を伴わない脱窒が起こった。したがって、7. 7節における考察結果と同様に、ここでも内生脱窒時の $NO_2-N$ の有無が $N_2O$ 発生に対して重要であると考えられた。



(a) NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N

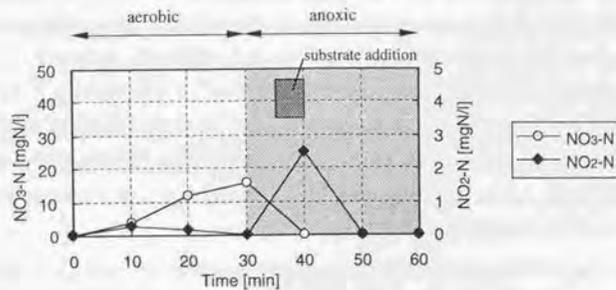


(b) 気相のN<sub>2</sub>O

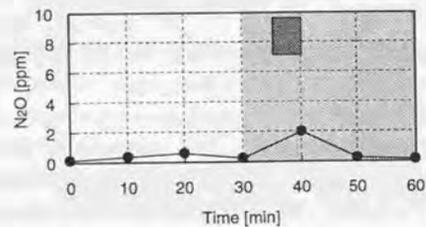


(c) DO, pH

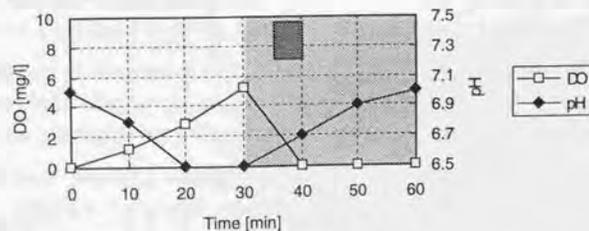
図7.31 1サイクル内の各指標の変化 (Run 2-4; COD/N=5.0)  
(40日目に測定)



(a) NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N



(b) 気相のN<sub>2</sub>O



(c) DO, pH

図7.32 1サイクル内の各指標の変化 (Run 2-4; COD/N=5.5)  
(a): 52日目, (b),(c): 49日目に測定)

## 7.9 まとめ

本章では、実験室規模リアクターにおいて基質のCOD/N比を小さく設定した運転をおこなった場合に脱窒過程で大量の $N_2O$ が放出されたという第5章の結果を受け、有機物制限条件下での脱窒からの $N_2O$ 生成機構について検討した。

得られた結果を以下にまとめた。

- (1) リアクターの運転サイクル内での窒素成分の挙動より、基質のCOD/N比が小さく $N_2O$ を大量発生している運転条件においては、 $N_2O$ 発生の時点では脱窒形態が内生型となっていることが示唆された。また、上記運転条件下に限って、基質投入中に進行する脱窒過程で $NO_2-N$ が蓄積されそれが内生脱窒期に持ち越されることが分かった。
- (2) リアクターの混合液中の脱窒菌が持つ脱窒経路中の各還元活性を測定した。連続運転中での $N_2O$ 放出量に関わらず、 $N_2O$ 還元活性は $NO_3-N/NO_2-N$ 還元活性と比較して常に高く維持されていた。これより、脱窒菌が持つ $N_2O$ 還元能力の低下という機構では脱窒過程での $N_2O$ 発生を説明できないことが分かった。また、脱窒過程で $N_2O$ を大量に発生している系列に限り、 $NO_2-N$ 還元活性が $NO_3-N$ 還元活性よりも小さい傾向があった。上の(1)で見られた $NO_2-N$ の蓄積は、この両還元活性差より説明された。
- (3) リアクターの污泥を脱窒条件で回分式に培養し、脱窒菌が利用可能な有機物量、 $NO_3-N$ 濃度、 $NO_2-N$ 濃度がそこの $N_2O$ 蓄積に与える影響を調べた。添加した有機物が残存する期間には $N_2O$ の蓄積を伴わない活発な脱窒が進行し、有機物枯渇後に脱窒が内生型となって初めて $N_2O$ が蓄積され始めた。内生脱窒時の有機物源としては、有機物残存時に細胞内に蓄積された貯蔵物質(PHB)が想定された。 $NO_3-N$ は、内生脱窒時の $N_2O$ 蓄積速度を増加させた。また、培養開始時に $NO_2-N$ を共存させた場合、有機物残存時の脱窒過程でも大量の $N_2O$ が蓄積され、 $NO_2-N$ が $N_2O$ 還元に対して強い阻害作用を持つことが示された。
- (4) リアクターの混合液を使用し、脱窒経路中の各電子受容体からの還元速度を有機物が不足した条件で測定することにより、有機物残存時と内生時の還元速度を比較した。内生脱窒時には各還元速度が大きく低下したが、 $NO_2-N$ 還元速度のみが比較的高く維持された。また、内生脱窒時には $NO_3-N$ よりも $NO_2-N$ の方が電子受容体として優先的に利用されることが示唆された。
- (5) 連続運転中のリアクターにおいて、基質投入終了直前に $NO_3-N$ ないしは $NO_2-N$ を添加することにより、内生脱窒時の両者の寄与を評価した。 $NO_3-N$ から内生脱窒が起こる場合には、 $N_2O$ の蓄積が見られなかった。一方、 $NO_2-N$ を添加した場合には大量の $N_2O$ が発生した。
- (6) 以上の実験的検討結果をもとに、低COD/N比運転における脱窒過程での $N_2O$ 生成機構を以下のように考察した(図7.33)。まず、基質投入中には $NO_3-N/NO_2-N$ 還元速度よりも $N_2O$ 還元速度の方が大きいため、 $N_2O$ は蓄積されない。ただし、この期間には $NO_2-N$ 還元速度よりも $NO_3-N$ 還元速度の方が大きいため $NO_2-N$ が蓄積される。基質投入終了後に脱窒が内生型となり利用可能な有機物量が脱窒の制限因子になると、各還元速度が低下する。その際、(a)  $NO_2-N$ 還元速度のみが比較的高く維持される、(b) 蓄積された $NO_2-N$ により $N_2O$ 還元速度が低下する、(c) 蓄積された $NO_3-N$ により $N_2O$ 還元速度が低下する、という3つの効果により、 $NO_2-N$ 還元速度よりも $N_2O$ 還元速度の方が小さくなり、結果として $N_2O$ が蓄積される。

本機構より、ここでの $N_2O$ 蓄積に対しては、(a) 基質投入終了後の内生脱窒、(b) 基質投入中の $NO_2-N$ の蓄積、という2点が支配的な因子であると考えられた。

- (7) 上の考察結果をふまえ、基質のCOD/N比が小さい場合のメタノール添加による $N_2O$ 放出抑制効果について考察した。基質のCOD/N比が小さく脱窒過程で $N_2O$ が発生する場合には、メタノール投入により脱窒の改善および $N_2O$ 放出の抑制が可能であることが示された。しかしながら、脱窒の改善に要するよりも多量の投入をおこなう必要があることを示唆する結果が得られ、投入量に関しては更なる検討が必要だと結論づけられた。

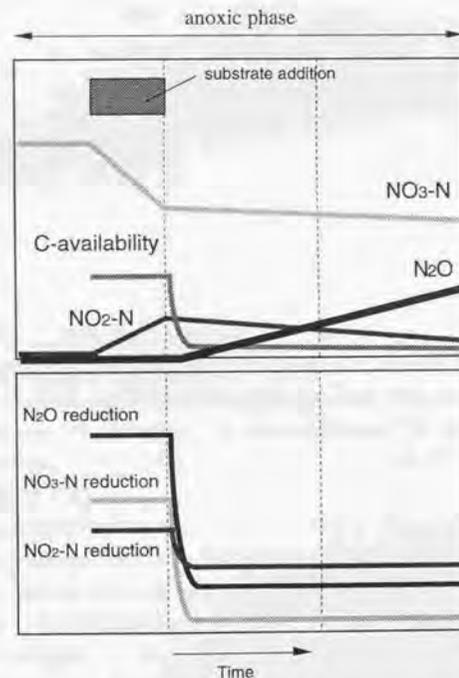


図7.33 基質のCOD/N比が小さいリアクターにおいて想定される無酸素工程での各窒素成分、有機物の利用可能性、脱窒経路の各還元速度の挙動を示す模式図

## 第8章

# 脱窒過程でのN<sub>2</sub>O生成に対する pHの効果

- 
- 8. 1 緒論
  - 8. 2 リアクター運転中での強制的なpH変化
  - 8. 3 内生脱窒時のN<sub>2</sub>O蓄積に対するpHの影響
  - 8. 4 まとめ
- 

### 8. 1 緒論

脱窒過程でのN<sub>2</sub>O生成に対してpHが大きな影響を与えることは、純培養系 (Thomsen *et al.*, 1994)、活性汚泥 (Hanaki *et al.*, 1992; Thörn & Sörensen, 1996; 松尾・岡安, 1996)、土壌 (Nömmik, 1956; Blackmer & Bremner, 1978; Gaskell *et al.*, 1981; Koskinen & Keeney, 1982; Nägele & Conrad, 1990) などを対象とした実験的検討により広く示されている。そこでは、pHが低下するとN<sub>2</sub>O生成率が増大する傾向が一般に見受けられる。

混合系の場合、pHが脱窒過程でのN<sub>2</sub>O生成率に影響する機構としては、(1) 脱窒経路中の各還元酵素のpH感受性の違い (Knowles, 1982; 松尾・岡安, 1996)、(2) NO<sub>3</sub>-NないしはNO<sub>2</sub>-NによるN<sub>2</sub>O還元阻害作用のpH依存性 (Blackmer & Bremner, 1978; Firestone *et al.*, 1980; Wicht, 1996)、(3) 脱窒菌相の変化 (Parkin *et al.*, 1985)、などが想定される。

第5章で述べた実験室規模リアクターの運転においては、全運転系列のpHを6.5~7.5の範囲に入るよう制御し、pHの影響を調べる運転系は実施しなかった。そこでは、硝化が良好におこなわれている限りはpHは安定しており、1サイクルの中で6.5~7.0の範囲で変動した。しかし、硝化が不調となる場合にはその影響が即座にpHに表れ、高いレベルでpHが変動する傾向が見られた (5.3.1参照)。

したがって、処理状態に起因するpHの変化がN<sub>2</sub>O放出量に影響していたことが想像される。ただし、小さいCOD/N比で運転した場合に大量のN<sub>2</sub>O放出が見られた点に対しては、Run 2-1とRun 2-3を比較した場合にpHが同程度であるにも関わらずN<sub>2</sub>O放出量が大きく異なったことから (5.3.2参照)、pHが6.5~7.0と低めであっても必ずしもN<sub>2</sub>Oが大量発生するとは限らないことが分かる。しかし、比

較的低いpHがN<sub>2</sub>O生成率を引き上げる役割を果たしていた可能性はある。

また、脱窒過程でN<sub>2</sub>Oが発生する場合には、pHを制御することによってそれを抑制できる可能性も考えられる。

本章では、脱窒過程でのN<sub>2</sub>O生成に対するpHの影響を検討した結果を報告する。

まず、連続運転中のリアクターにおいてpHを強制的に変化させ、N<sub>2</sub>O放出量に与える影響を調べた(8.2節)。次に、7.4節でおこなったと同様、リアクターの汚泥を使用した脱窒回分実験を実施し、pHがN<sub>2</sub>O蓄積に与える影響を調べた(8.3節)。

## 8.2 リアクター運転中での強制的なpH変化

脱窒過程で大量のN<sub>2</sub>Oを放出しているリアクター系列の運転中に混合液のpHを強制的に変化させることにより、pHが脱窒過程からのN<sub>2</sub>O放出に及ぼす影響を評価した。ただし、変化させたpH範囲は極端なものとはせず、通常運転時のpH制御範囲である6.5~7.5の中で変化させた。

なお、ここではpH自体の影響を明確にするため、pHの変化に伴う汚泥中の細菌相の変化が大きくないような短期間での実験を実施した。

### 8.2.1 実験方法

対象としたのは、リアクター運転系列Run 1-2である(第5章参照)。本系列では、流入基質のCOD/Nが3.4に設定され、好気工程のDO制御はおこなわれなかった。

本実験は、運転開始後160日が経過した時点から約20日間実施した。その時点では、処理状態は完全なNO<sub>3</sub>-N蓄積型となっており、NH<sub>4</sub>-Nがほとんど残留しなかったのに対してNO<sub>3</sub>-Nが600 mg/N/程度蓄積していた。流入窒素当たりのN<sub>2</sub>O転換率は28%と大きく、無酸素工程の後半での放出が卓越していた。基質のCOD/N比が小さく、脱窒過程でN<sub>2</sub>Oが大量に生成される典型的なケースであったと言える。

pHの下限値を6.5に設定して混合液のpH制御をおこなっていたところへ、表8.1に示したようなスケジュールでpH下限設定値を変更した。なお、変更直後に手でpH調整液を添加し、設定下限pH値まで速やかに調整した。ここで使用したpH調整液は、リアクター運転時の調整液と同一の0.5N-HCl溶液あるいは0.5N-NaOH溶液である。

実験期間を通じて、5.2節で述べた方法によりN<sub>2</sub>O放出量および混合液中の各指標をモニタした。

### 8.2.2 結果

実験期間のN<sub>2</sub>O放出量および好気工程終了時の混合液ろ液のNO<sub>3</sub>-Nの変化を図8.1に示した。表8.2には、各pHレベルで観測されたN<sub>2</sub>O放出量とN<sub>2</sub>O転換率の平均値を示した。

pH下限設定値を6.5から7.0あるいは7.5へ引き上げると、N<sub>2</sub>O放出量は直ちに減少した(図8.1)。

表8.1 リアクターRun 1-2におけるpH強制変化スケジュール

Time* [days]	pH下限設定値	サイクル内でのpH変動範囲
~0	6.5	6.5~6.8
0~4	7.0	7.0~7.3
4~11	6.5	6.5~6.8
11~14	7.5	7.5~7.8
14~	6.5	6.5~6.8

\*. pH下限を6.5から7.0へ変更した時点をもTime=0とした。

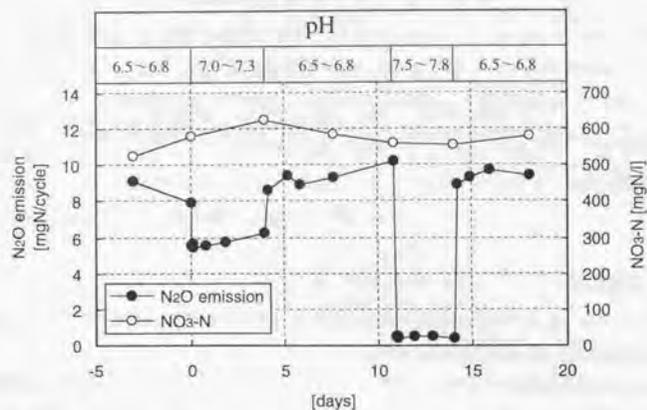


図 8.1 リアクターRun 1-2において混合液のpHを強制的に変化させたときのN<sub>2</sub>O放出量および混合液のNO<sub>3</sub>-Nの変化

表 8.2 リアクターRun 1-2において混合液のpHを強制的に変化させたときのN<sub>2</sub>O放出量・転換率（平均値）

pH下限設定値	1サイクルのpH変化	N <sub>2</sub> O放出量 [mgN/hr]	N <sub>2</sub> O転換率* [%]
6.5	6.5~6.8	9.3	32
7.0	7.0~7.3	5.7	20
7.5	7.5~7.8	0.5	1.5

\*. 流入窒素分当たりの転換率。

pH下限を6.5に設定した場合に対して、pH下限を7.0、7.5に設定するとN<sub>2</sub>O放出量がそれぞれ60%、5%にまで低下した。特に、pH下限設定値を7.5へと引き上げた場合のN<sub>2</sub>O放出量抑制効果が大きかった。

この放出量の減少はpH変更をおこなったサイクルの次のサイクルにおいて既に起こっており、pHが脱窒過程からのN<sub>2</sub>O放出に対して即座に影響を及ぼすことが分かる。変更後数日間設定pHで運転をおこなった限りでは、その後の放出量の変化は見られなかった。

pH引き上げ後、数日が経過した後に再びpH下限設定値を元の6.5へ下げると、N<sub>2</sub>O放出量も元のレベルへと戻った。この変化も、pH引き上げ時と同様に変更後直ちに起こった。このことから、pHの影響が可逆的であることが分かる。

この期間に混合液のNO<sub>3</sub>-N濃度には大きな変化が見られなかった（図 8.1）。これより、pHの変化により脱窒の進行自体は影響されず、そこでのN<sub>2</sub>O還元のみが影響を受けたことが示唆される。

1サイクル内での気相のN<sub>2</sub>O濃度の変化を見ると（図 8.2 (a)~(c)）、pH下限設定値が7.0の場合に

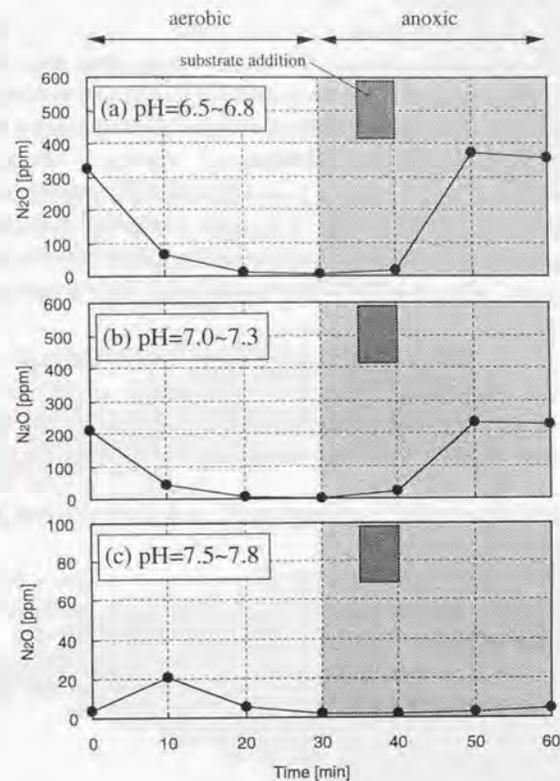


図 8.2 リアクターRun 1-2において混合液のpHを強制的に変化させたときの各設定pHでの気相のN<sub>2</sub>O濃度の1サイクル内変化（例）

は、pH下限設定値が6.5の場合と比較して、濃度が全体的に低下したものの、同じような変化パターンを示した。すなわち、主要なN<sub>2</sub>O放出は無酸素工程の後半で起こっており、脱窒過程でN<sub>2</sub>Oが生成されたと考えられる。ところが、pH下限を7.5に設定した場合にはこの変化パターンが変し、無酸素工程でのN<sub>2</sub>O放出が見られなくなった。これは、脱窒からのN<sub>2</sub>O生成がほとんど起こらなくなったことを意味している。

なお、好気工程終了時の混合液ろ液中には、実験期間を通じてNH<sub>4</sub>-NおよびNO<sub>2</sub>-Nは検出されなかった。

### 8.2.3 考察

本結果より、脱窒過程での $N_2O$ 生成に対してpHが大きく影響することが示された。pHが高いほど $N_2O$ 放出が抑制される傾向が見られ、8.1節に挙げた既報で見られる傾向と合致している。

特に、pHレベルを7.5~7.8まで引き上げた場合の効果は顕著であり、この条件での $N_2O$ 転換率は1.5%と非常に小さかった。これより、脱窒過程で大量の $N_2O$ が放出されている場合であっても、pHの制御のみによって $N_2O$ 放出量を大幅に抑制できる可能性があると言える。

8.1節で述べたように、土壌中での脱窒からの $N_2O$ 生成に対するpHの影響を議論する場合には、(1)脱窒経路中の各還元酵素のpH感受性の違い、(2) $NO_3-N$ ないしは $NO_2-N$ による $N_2O$ 還元阻害作用のpH依存性、(3)脱窒菌相の変化、という3つの機構により説明がなされることが多い。本節の結果に対しては、pHの影響が、(a)変更後直ちに現れた点、(b)可逆的であった点、を考慮すると、汚泥中の脱窒菌相の変化が寄与していたとは考えにくい。

つまり、ここで見られた現象を上で挙げた(1)あるいは(2)の機構で説明できる可能性が高い。松尾・岡安(1996)は、本研究で対象としたのと同様の間欠曝気式リアクターの混合液を用いて脱窒の各還元速度を測定し、pHが低下した場合の速度低下率が $N_2O$ 還元速度において最大であったことを報告している。これは、上記の(1)の機構を支持する知見である。

なお、ここで見られたpHの影響が、 $N_2O$ の溶解度がpHにより異なるためではないことを以下のように確認した。

種々のpHに調整したリン酸バッファー30 mlを50 mlのガラスバイアルに密封した後、標準 $N_2O$ ガス0.5 mlを気相に注入した。激しく攪拌した後20℃で1時間以上静置し、気液平衡に達した状態での気相の $N_2O$ 濃度を測定した。

pH=6.5~7.5の範囲では、気相の $N_2O$ 濃度はpHに関わらず等しかった(図8.3)。すなわち、本pH範囲においては、 $N_2O$ の溶解度は液相のpHに依存しないことが示された。

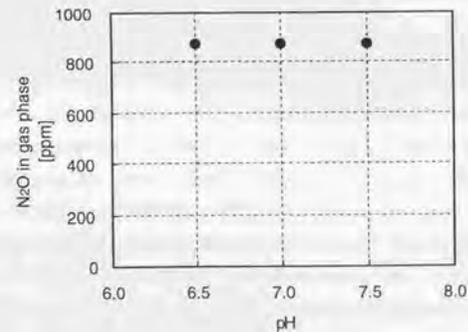


図 8.3  $N_2O$ の溶解度に対するpHの影響を調べた実験における液相のpHと気液平衡後の気相の $N_2O$ 濃度との関係

### 8.2.4 まとめ

連続運転中のリアクターにおいて混合液のpHを強制的に変化させることにより、脱窒過程で $N_2O$ が大量に発生している場合のpHの効果について調べた。

pHは $N_2O$ 放出量に大きな影響を与え、pH=6.5~7.8の範囲においてpHが高いほど放出量が小さくなった。特に、pHを7.5~7.8へ引き上げると $N_2O$ 転換率は1.5%にまで低下し、pH制御のみによって $N_2O$ 放出量を大幅に抑制できる可能性が示された。

pHの影響は迅速に現れ、かつ可逆的であった。また、pHの変化は脱窒自体には影響せず、その反応経路中の $N_2O$ 還元の箇所のみ影響することが示唆された。

ここで見られたpHの影響に対しては、脱窒菌相の変化は重要ではないと思われた。

### 8. 3 内生脱窒時のN<sub>2</sub>O蓄積に対するpHの影響

8. 2節で見られたpHの効果を更に検証し、また、第7章でおこなった有機物制限条件下でのN<sub>2</sub>O生成機構の議論とも関連づける目的で、7. 4節で実施したのと同様の脱窒回分実験をおこなった。共試汚泥としては、8. 2節で使用したリアクター系列Run 1-2のものを用いた。

#### 8.3.1 実験方法

7. 4節でおこなったのと同様に、採取したリアクター混合液を洗浄・希釈し、内部をヘリウムガスで置換した密閉バイアル内で培養した。培養期間中、気相部気体を適宜採取し、N<sub>2</sub>O、N<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>濃度を測定した。

初期条件としてpHを変えた3系列の培養を実施した(実験系G-1~G-3)。使用する反応溶液(表7.6参照)のpHを調整することにより、各系列の初期pHをそれぞれ6.5、7.0、7.5に設定した。脱窒のための電子受容体はNO<sub>3</sub>-Nで与え、初期濃度を3系列ともに190 mgN/lとした。有機物は酢酸ナトリウムで与え、初期COD/N比が3系列ともに3.7となるように設定した。

具体的な実験操作については7.4.1を参照されたい。

#### 8.3.2 結果

各系列の初期条件および結果を表8.3に示した。また、気相のN<sub>2</sub>O、N<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>濃度の変化を図8.4~8.6に示した。

N<sub>2</sub>およびCO<sub>2</sub>の変化から、3系列ともに、初期に活発な脱窒が起り、培養途中で脱窒速度が急激に低下したことが分かる。そして、N<sub>2</sub>Oの蓄積は脱窒速度が低下した時点から起こった。これらは、7. 4節において見られたのと同様の傾向である。すなわち、培養初期には活発な脱窒が起りN<sub>2</sub>Oは蓄積されないが、与えた有機物が枯渇し脱窒が内生型へと変化するとN<sub>2</sub>Oが蓄積され始めるという現象が、ここでも起こっていたと考えられる。

表 8.3 初期pHの影響を調べた脱窒回分実験の初期条件および結果  
(リアクターRun 1-2の汚泥使用; MLSS=4,320 mg/l)

実験系	初期pH	初期COD/N比	NO <sub>3</sub> -N [mgN/l]		終了時NO <sub>2</sub> -N	COD [mg/l]		N <sub>2</sub> O蓄積速度 [μgN/(g-MLSS-min)]		脱窒率*3 [%]
			初期	終了時		初期	終了時	初期*1	内生時*2	
G-1	6.5	3.7	190	50	36	690	61	0.2	13.7	54
G-1	7.0	3.7	190	52	44	690	63	0.02	12.0	49
G-3	7.5	3.7	190	55	42	690	63	0.006	3.0	48

\*1. 培養初期の数時間でのN<sub>2</sub>O蓄積速度

\*2. N<sub>2</sub>およびCO<sub>2</sub>濃度の変化より内生脱窒に移行したと判断した時点以降の数時間でのN<sub>2</sub>O蓄積速度。

\*3. 初期NO<sub>3</sub>-Nと培養終了時の(NO<sub>3</sub>+NO<sub>2</sub>)-Nとから算出。

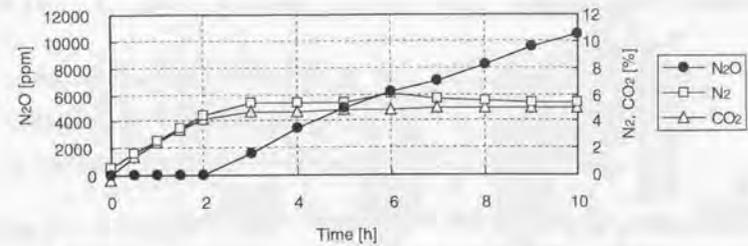


図 8.4 初期pHの影響を調べる脱窒回分実験における気相のN<sub>2</sub>O、N<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>濃度の経時変化(実験G-1; 初期pH=6.5)

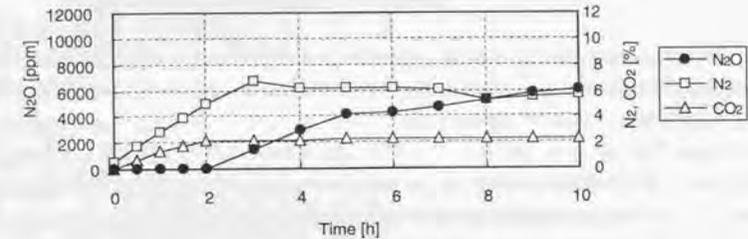


図 8.5 初期pHの影響を調べる脱窒回分実験における気相のN<sub>2</sub>O、N<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>濃度の経時変化(実験G-2; 初期pH=7.0)

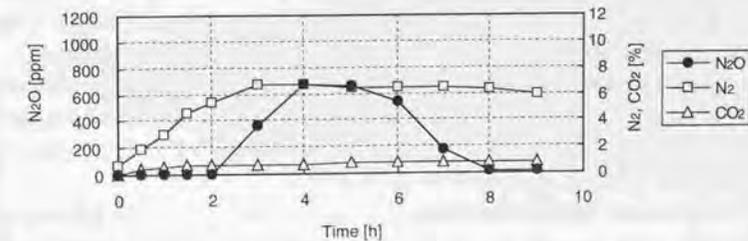


図 8.6 初期pHの影響を調べる脱窒回分実験における気相のN<sub>2</sub>O、N<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>濃度の経時変化(実験G-3; 初期pH=7.5)

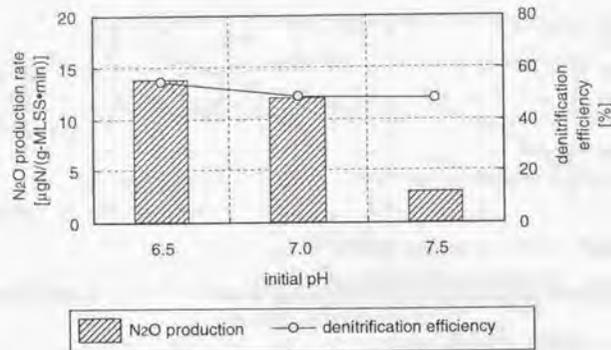


図 8.7 初期pHを変えた回分実験系 (G-1~G-3) における各pHでの内生脱窒時N<sub>2</sub>O蓄積速度および培養終了時の脱窒率

N<sub>2</sub>O蓄積開始後の蓄積速度には、pHが高いほど小さくなる傾向が見られた (図 8.7)。特に、初期pHを7.5に設定した系列G-3では、蓄積速度が極端に小さかった。さらに、同系列では蓄積されたN<sub>2</sub>Oが培養中に再び消費される傾向が見られた (図 8.6)。

10時間の培養終了時における脱窒率には、系列間の違いが見られなかった (図 8.7)。また、N<sub>2</sub>Oが蓄積され始める時期も3系列ではほぼ等しかった (図 8.4~8.6)。これらの結果より、脱窒自体はここで検討した範囲であればpHの影響を受けないことが示唆される。

培養終了時にはNO<sub>2</sub>-Nが蓄積されていたが、その濃度も系列間で大きくは違わなかった (表 8.3)。

### 8.3.3 考察

全系列において培養初期の活発な脱窒期にはN<sub>2</sub>Oの顕著な蓄積が起こらなかったことから、pHが6.5~7.5の範囲においては、N<sub>2</sub>Oは内生脱窒期に蓄積されると推定できる。これより、ここでのN<sub>2</sub>O蓄積に対しても、第7章で考察したと同様のN<sub>2</sub>O蓄積機構が想定できるものと思われる。

N<sub>2</sub>O蓄積開始後の蓄積速度は、pHが高いほど小さくなった。特に、pHを7.5に設定した実験G-3における蓄積速度は、それ以外の2系列のものと比較して極端に小さかった。また、脱窒の進行自体はpHの影響を受けなかった。これらの点は、連続運転中のリアクターにおいて見られた傾向に合致している (8.2節)。

7.7節において、内生脱窒時のN<sub>2</sub>O蓄積に対してはNO<sub>2</sub>-Nが存在していることが重要であることを指摘した。これは、(a) N<sub>2</sub>O生成のための基質となる、(b) N<sub>2</sub>O還元を阻害する、というNO<sub>2</sub>-Nの持つ2つの効果から重要であると思われた。本回分実験においても、培養終了時にNO<sub>2</sub>-Nが高濃度に蓄積されていた。しかしながら、N<sub>2</sub>O蓄積速度が極端に小さかった実験G-3においても他の系列と同程度のNO<sub>2</sub>-N濃度であった。これは、pHが高い条件では、内生脱窒時にN<sub>2</sub>O蓄積を引き起こしうるレベル

のNO<sub>2</sub>-Nが存在していたにも関わらず、N<sub>2</sub>O蓄積量が小さかったことを意味している。

その要因として、上に挙げたNO<sub>2</sub>-N蓄積による二つの効果に照らして考えると、以下のものが想定される。

- (1) 高pH条件では内生脱窒時のNO<sub>2</sub>-N還元速度が小さくなる。
- (2) 高pH条件では内生脱窒時のN<sub>2</sub>O還元速度が大きくなる。
- (3) 高pH条件ではN<sub>2</sub>O還元に対するNO<sub>2</sub>-Nの阻害作用が小さくなる。

本研究では、これらを検証する実験はおこなわなかった。(1)および(2)は、各還元酵素のpH感受性に関与した機構であるが、内生脱窒時の各還元速度に対するpHの影響を検討した例は無く、これらの現象が生じうるのかどうかは明らかでない。(3)は、実質的な阻害物質であると思われるHNO<sub>2</sub>の解離がpHが高いほど進むことを考えれば、起こりうる機構である。実際、NO<sub>2</sub>-N濃度が同一であるならば、pH=6.5の条件ではpH=7.5の場合と比較してHNO<sub>2</sub>濃度は10倍となる。

### 8.3.4 まとめ

リアクターの混合液を使用し、初期pHを変化させた脱窒回分実験を実施した。

いずれのpH条件においても、有機物が残存する内はN<sub>2</sub>Oが蓄積されず、内生脱窒時にN<sub>2</sub>Oが蓄積されることが考えられた。これより、pHが高い場合でも、N<sub>2</sub>Oの蓄積機構としては7.7節で考察したものが想定できると推察した。

pHが高いほど内生脱窒時のN<sub>2</sub>O蓄積速度が小さくなり、特に初期pH=7.5の系列ではN<sub>2</sub>O蓄積が大きく抑制された。また、ここで設定したpHの範囲 (6.5~7.5) では、脱窒自体はpHの影響を受けなかった。これらは、8.2節で述べたリアクターにおいて見られた傾向を支持するものである。

pHが高い条件では、NO<sub>2</sub>-Nが蓄積しているにも関わらず内生脱窒時のN<sub>2</sub>O蓄積が極端に抑制された。

## 8.4 まとめ

本章では、脱窒過程での $N_2O$ 生成に対するpHの影響について、実験室規模リアクターおよびその混合液を用いた脱窒回分実験により調べた。

得られた主な知見は以下の通りである。

- (1) 基質のCOD/N比を3.5に設定し脱窒過程で大量の $N_2O$ を放出していたリアクター系列 (Run 1-2) において、混合液のpHを6.5~7.8の範囲で強制的に変化させ、 $N_2O$ 放出量に与える影響を調べた。

pHが高いほど $N_2O$ 放出量が小さくなる傾向が見られ、特に、pH=7.5~7.8の条件では脱窒過程でほとんど $N_2O$ が生成されなかった (図 8.6)。このとき、脱窒自体には顕著な影響が見られなかった (図 8.6)。このpHの影響はpH変更後直ちに現れ、さらに可逆的であったことから、脱窒菌相の変化によるものではないと考えられた。

- (2) リアクターの混合液を脱窒条件下で回分的に培養し、初期pHが $N_2O$ 蓄積に与える影響を調べた。

pHの影響は(1)で見られたものと類似しており、pHが高いほど内生脱窒時の $N_2O$ 蓄積速度が小さく、その効果はpHを7.5に設定した場合に大きくなった。そして、pH=7.5の条件では、内生脱窒開始時に $NO_2-N$ が存在するにも関わらず、 $N_2O$ 蓄積速度が著しく小さかった。

また、検討したいずれのpH条件においても内生脱窒期にならないと $N_2O$ が蓄積されなかったことから、第7章で考察した有機物制限条件下での $N_2O$ 生成機構がpH=6.5~7.8の全範囲において適用できると思われた。

- (3) 基質のCOD/N比が小さく大量の $N_2O$ を放出している運転状態にあっても、混合液のpHを引き上げることにより $N_2O$ 放出量が著しく減少したことから、脱窒過程で $N_2O$ が生成されている場合にはpHの制御のみによってそれを抑制できる可能性が示されたことになる。

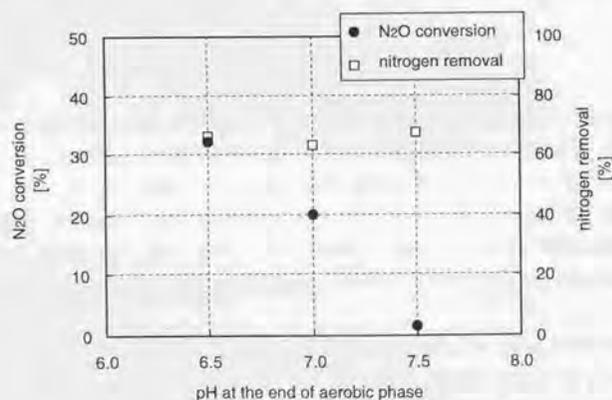


図 8.6 実験室規模リアクターにおいて混合液のpHを強制的に変化させたときの流入窒素分当たりの $N_2O$ 転換率と窒素除去率

## 第9章

### 低DO条件下での $N_2O$ 生成機構

- 9.1 緒論
- 9.2 好気工程のDOを低濃度に制御した系列における1サイクル内での窒素系指標の変化
- 9.3 好気工程のDOを低濃度に制御した場合の $N_2O$ 生成機構
- 9.4 まとめ

#### 9.1 緒論

実験室規模リアクターの連続運転において好気工程のDOを低濃度に制御し、 $N_2O$ 放出量に与える影響を調べた結果を第5章で述べた。

投入基質のCOD/N比を3.5に設定した系列では (Run 2-1)、好気工程のDOが0.7~1.3 mg/l、0.3~0.8 mg/lという2つの条件での運転をおこなった。両者において好気工程からの $N_2O$ 放出量は大きくは変化せず、1サイクルの中では無酸素工程での放出が大部分を占めた。

投入基質のCOD/N比を5.0に設定した系列では (Run 2-3)、好気工程のDOを0.7~1.3 mg/lに制御した期間には、好気工程での $N_2O$ 放出が見られたものの、転換率は概ね1%以下であった。DOを0.5~1.1 mg/lへと引き下げると $N_2O$ 放出量が明らかに増加し、 $N_2O$ 転換率は4~18%となった。

これらの結果から、好気工程のDOがそこからの $N_2O$ 放出量に影響することが分かるが、同時にその効果は有機物負荷の影響も受けることが示唆される。

$^{15}N$ トレーサー実験の結果、好気工程のDOが低い条件では硝化過程からの $N_2O$ 放出量が増加することが示された。しかし、上で述べたRun 2-3で好気工程のDOを0.5~1.1 mg/lに制御した場合については、 $N_2O$ の起源を把握するには至らなかった。

本章では、上に述べたリアクター系列における1サイクル内の窒素系指標の変化を示し (9.2節)、それと第5章・第6章の結果から、好気工程のDOを低濃度に制御した場合の $N_2O$ 生成機構について考察をおこなう (9.3節)。

## 9. 2 好気工程のDOを低濃度に制御した系列における1サイクル内の窒素系指標の変化

ここでは、好気工程のDOを低濃度に制御したリアクター系列Run 2-1とRun 2-3について、混合液ろ液のNH<sub>4</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、NO<sub>2</sub>-Nの1サイクル内での変化を示し、これと気相のN<sub>2</sub>O濃度の変化とを比較する。

### 9.2.1 実験方法

連続運転中のリアクターにおいて、1サイクルの間経時的に混合液を採取し、NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、酢酸イオン各濃度を測定した。採取した混合液は、5.2.2(2)で述べたのと同じ条件で直ちに遠心ろ過し、分析に供した。

対象としたのは、系列Run 2-1およびRun 2-3である。両系列において好気工程のDOを0.7~1.3 mg/lに制御して運転した期間の結果は7. 2節で示したので、ここでは両系列のDOをさらに低濃度に設定して運転した期間における結果を示す。

実験実施時の両系列の運転条件、処理状態、N<sub>2</sub>O転換率などを表9.1にまとめた。

Run 2-1では、好気工程のDOを0.3~0.8 mg/lへと引き下げてから49日が経過した時点で実施した。NO<sub>3</sub>-Nが200 mgN/l程度蓄積しており、NH<sub>4</sub>-NとNO<sub>2</sub>-Nはほとんど残留しなかった。流入窒素分当たりのN<sub>2</sub>O転換率は45%であり、その大半は無酸素工程後半に放出されたものであった。

Run 2-3では、好気工程のDOを0.5~1.1 mg/lへと引き下げてから30日が経過した時点で実施した。混

表 9.1 実験の実施日、対象系列の運転条件および処理状態

	Run 2-1	Run 2-3
実施日*	111日目	114日目
基質のCOD/N比	3.5	5.0
好気時間：無酸素時間 [min]	30:30	30:30
好気工程DO [mg/l]	0.3-0.8	0.5-1.1
pH	6.5-6.9	6.5-6.9
NH <sub>4</sub> -N** [mgN/l]	3.1	1.4
NO <sub>3</sub> -N** [mgN/l]	210	8.4
NO <sub>2</sub> -N** [mgN/l]	N.D.	5.3
N <sub>2</sub> O転換率*** [%]	45	16
MLSS [mg/l]	12,900	15,600

\*. 運転開始からの日数。

\*\*、好気工程終了時の混合液ろ液中の濃度。

\*\*\*、流入窒素分当たりの転換率。

合液中には無機態窒素成分がほとんど残留しておらず、良好な窒素除去がおこなわれていた。ただし、好気工程終了時に1~3 mgN/l程度のNO<sub>2</sub>-Nが残留する傾向が見られた。これは、DOを0.7~1.3 mg/lに制御した期間には見られなかった傾向である。N<sub>2</sub>O転換率は16%で、好気工程での放出が主要であった。

### 9.2.2 結果

各系列について、気相のN<sub>2</sub>O濃度、混合液ろ液中の各態窒素成分濃度、混合液のDOおよびpHの変化を図9.1, 9.2に示した。

両系列において好気工程には硝化、無酸素工程には脱窒の進行が確認された。

ただし、両系列の間には、NO<sub>2</sub>-Nの蓄積時期に大きな違いが見られた。

Run 2-1においては基質投入中に起こる脱窒過程でNO<sub>2</sub>-Nが約3 mgN/l蓄積され、無酸素工程後半にはこのNO<sub>2</sub>-Nが徐々に消費された。好気工程に入ると速やかにNO<sub>2</sub>-Nが消費され、以降、好気工程を通してNO<sub>2</sub>-Nは検出されなかった。これは、同系列において好気工程のDOを0.8~1.3 mg/lと本実験実施時よりも高い濃度に制御して運転した時期に見られたのと同様の傾向であった(7. 2節, 図7.1)。ただし、無酸素工程でのNO<sub>2</sub>-N濃度は本実験の方が小さかった。

一方、Run 2-3においては好気工程に徐々にNO<sub>2</sub>-Nが蓄積され、同工程終了時には5.3 mgN/lに達した。このNO<sub>2</sub>-Nは無酸素工程に入ると直ちに消費され、以降、無酸素工程を通して検出されなかった。この傾向も、本系列において好気工程のDOを引き下げる前の運転条件で見られたものに類似していたが(7. 2節, 図7.3)、好気工程のNO<sub>2</sub>-N濃度は本実験の方が明らかに大きかった。さらに、DO引き下げ以前には好気工程後半にNO<sub>2</sub>-Nの消費が起こったのに対して、本実験では好気工程を通してNO<sub>2</sub>-Nが蓄積傾向にあった。

N<sub>2</sub>O放出に関しては、Run 2-1においては無酸素工程の後半に、Run 2-3においては好気工程の後半に大きな放出が見られた。これも、両系列ともにDOを引き下げる前の運転条件と同様の傾向であるが(7. 2節, 図7.1, 7.3)、N<sub>2</sub>O放出量はいずれも本実験の方が大きかった。

なお、7. 2節で述べた各系列と同様に、酢酸イオンは1サイクルを通して検出されなかった。

### 9.2.3 考察

Run 2-3で好気工程のDOを0.5~1.1 mg/lへと引き下げた条件で同工程でのN<sub>2</sub>O放出量が増加した点に対しては、同工程でのNO<sub>2</sub>-Nの蓄積が大きく寄与していると考えられる。これは、以下の観察結果より推察される。

- (a) Run 2-3において、DO引き下げ後、好気工程で蓄積されるNO<sub>2</sub>-N濃度が増加した。
- (b) Run 2-3において、DO制御値に関わらず、1サイクルの中でNO<sub>2</sub>-N濃度が最大となる時期とN<sub>2</sub>O放出速度が最大となる時期とが一致していた。

(c) 好気工程での顕著な $N_2O$ 放出が見られなかったRun 2-1においては、同工程に $NO_2-N$ が蓄積されなかった。

ただし、 $NO_2-N$ の蓄積自体が好気工程での $N_2O$ 生成を促進したのが、あるいは他に $N_2O$ 生成を促進する機構が存在し、その結果として $NO_2-N$ の蓄積と $N_2O$ 生成とが同時に起こっただけなのかは、本結果からは明らかでない。この点については、9.3節で考察を加える。

Run 2-3で見られた好気工程での $NO_2-N$ の蓄積は、5.4.2で指摘したように、亜硝酸酸化菌の低DO条件に対する感受性がアンモニア酸化菌よりも高いことに起因すると考えられる。実際、Run 2-3においては $NH_4-N$ の除去は良好におこなわれており、アンモニア酸化が阻害を受けた様子は無い。さらに、好気工程における混合液の $NH_4-N$ 濃度の減少のみを考慮した見かけの $NH_4-N$ 消費速度を、DO引き下げ前後の状態について算出すると(図7.3および図9.2の元となったデータから算出)、それぞれ34, 32  $\mu gN/(g\text{-MLSS}\cdot min)$ と同程度であり、設定した範囲内ではDOの影響を受けなかった。これも、 $NH_4-N$ 酸化が阻害を受けなかったことを示唆している。本系列において好気工程のDOを引き下げた後には、亜硝酸酸化の阻害がより顕著になり、蓄積 $NO_2-N$ 濃度が増加したものと思われる。

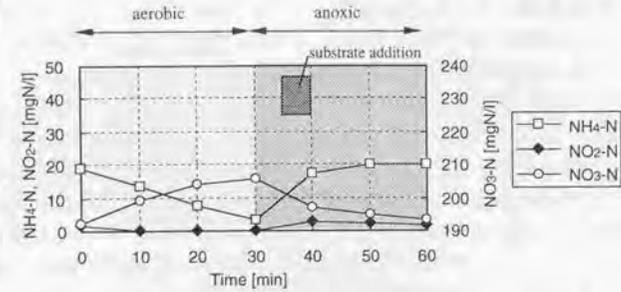
Run 2-1において、好気工程のDOをRun 2-3よりも低く制御したにも関わらず、同工程で $NO_2-N$ が蓄積されなかったことから、亜硝酸酸化が阻害を受けるDOレベルは有機物負荷によって異なると考えられる。Hanaki *et al.* (1990a)が指摘しているように、活性汚泥のフロックにおいて硝化菌の周囲に従属栄養細菌が密集しているのであれば、フロック内部へ供給される酸素量が従属栄養細菌による酸素消費の影響を受けるので、硝化菌への酸素供給が混合液のDOだけでなく有機物負荷の影響も受けることが予想される。有機物負荷の高いRun 2-3ではRun 2-1に比べて生物濃度が高かった(表9.1)ことも考慮すれば、Run 2-3においては見かけのDOから判断されるよりも亜硝酸酸化菌が被る酸素制限の程度がRun 2-1の場合よりも大きかった可能性が高い。

#### 9.2.4 まとめ

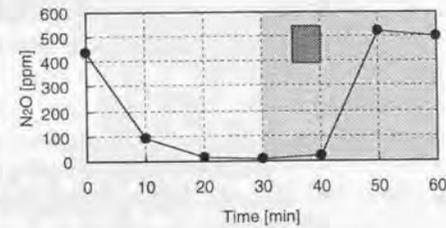
好気工程のDOを低濃度に制御したリアクター系列 (Run 2-1, 2-3) において、窒素系指標の1サイクル内の挙動を追った。

好気工程から大量の $N_2O$ が放出されたRun 2-3においては、好気工程に $NO_2-N$ が蓄積した。この $NO_2-N$ の蓄積と $N_2O$ 放出とが1サイクルの中で同時期に起こったことから、同系列での $N_2O$ 発生には $NO_2-N$ の蓄積が関与していると推察された。

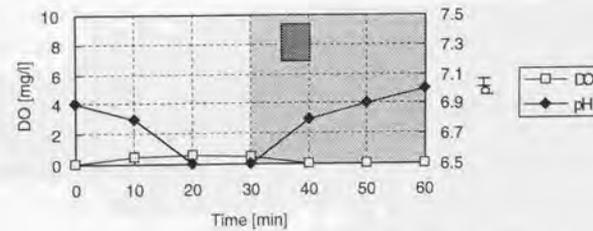
そこで見られた $NO_2-N$ の蓄積は、DOが低いことにより硝化の過程で亜硝酸酸化が阻害を受けたためであると考えられた。また、亜硝酸酸化が阻害を受けるDOレベルは、有機物負荷によって異なることが示唆された。



(a)  $NH_4-N$ ,  $NO_2-N$ ,  $NO_3-N$



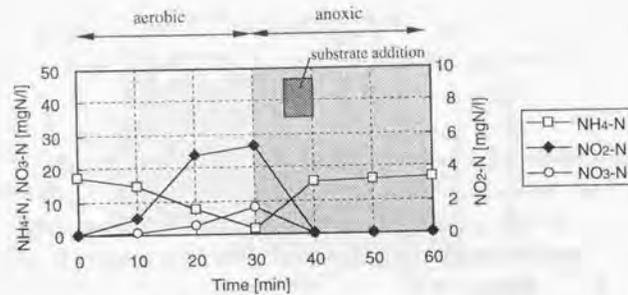
(b) 気相の $N_2O$



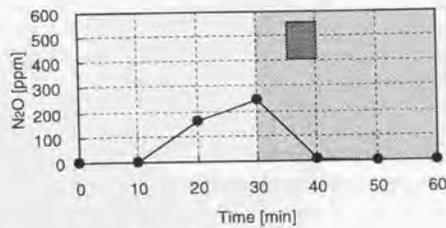
(c) DO, pH

図9.1 1サイクル内の各指標の変化 (Run 2-1)  
(a): 111日目, (b),(c): 110日目に測定

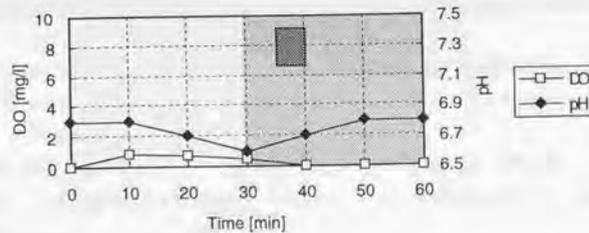
### 9. 3 好気工程のDOを低濃度に制御した場合のN<sub>2</sub>O生成機構



(a) NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N



(b) 気相のN<sub>2</sub>O



(c) DO, pH

図9.2 1サイクル内の各指標の変化 (Run 2-3)  
(114日目に測定)

実験室規模リアクターにおいて、基質のCOD/N比を5.0に設定し好気工程のDOを低濃度に制御した系列 (Run 2-3) で、好気工程からのN<sub>2</sub>O放出が見られた (第5章)。ここでは、DOを0.7~1.3 mg/lに制御した場合よりも0.5~1.1 mg/lとより低濃度に制御した場合の方が、明らかに放出量が大きかった。このことから、好気工程においてはDOがN<sub>2</sub>O放出量に影響する重要な因子であると考えられた。

本リアクター系列においては、好気工程にNO<sub>2</sub>-Nが蓄積する傾向が見られた。DOを0.7~1.3 mg/lに制御した期間においては好気工程の中で一時的にNO<sub>2</sub>-Nが蓄積し (7. 2節)、DOを0.5~1.1 mg/lに制御した期間には好気工程を通してNO<sub>2</sub>-Nが蓄積された (9. 2節)。また、両者において、1サイクルの中でNO<sub>2</sub>-N濃度の変化とN<sub>2</sub>O放出速度の変化が類似した傾向を示した。このことから、NO<sub>2</sub>-Nの蓄積とN<sub>2</sub>Oの発生とが密接に関連していることが示唆された。

この場合、前節で指摘したように、(1) NO<sub>2</sub>-Nの蓄積がN<sub>2</sub>O生成を促進した、(2) NO<sub>2</sub>-Nの蓄積とN<sub>2</sub>O生成が同時に起こった、という二つのケースを想定する必要がある。

(1)のケースの場合、硝化と脱窒両者からのN<sub>2</sub>O生成量が増加する可能性がある。硝化の場合には、酸素制限条件においてアンモニア酸化菌がNO<sub>2</sub>-Nの還元によりN<sub>2</sub>Oを産することが知られているし

(Hynes & Knowles, 1984; Poth & Focht, 1985)、脱窒過程においてもNO<sub>2</sub>-Nの蓄積がN<sub>2</sub>O生成率を増加させることが予想される (Firestone *et al.*, 1979)。

また、この場合のNO<sub>2</sub>-N蓄積機構としては、前節で述べたように低いDOにより亜硝酸酸化が阻害を受けた可能性が高い。好気工程で起きた脱窒の過程でNO<sub>2</sub>-Nが蓄積したこともありうるが、本工程では脱窒が起こったとしても内生型であると考えられ、その場合にはNO<sub>2</sub>-Nは蓄積しないと思われることから (第7章)、その可能性は小さいものと判断できる。

(2)のケースの場合、脱窒過程で中間体としてNO<sub>2</sub>-NとN<sub>2</sub>Oが同時期に蓄積したという機構が想定される。しかしながら、上と同じ理由からここでの脱窒に際してはNO<sub>2</sub>-Nの蓄積は起こらないことが予想されるため、脱窒過程で両者が同時に蓄積した可能性は低い。

したがって、上に挙げた二つのケースのうち、(1) NO<sub>2</sub>-Nの蓄積によるN<sub>2</sub>O生成の促進、という機構が実態を反映していると判断できる。このNO<sub>2</sub>-Nの蓄積は亜硝酸酸化が阻害を受けたためであると考えられるが、上で述べたように、NO<sub>2</sub>-NからN<sub>2</sub>Oへの変換が硝化菌と脱窒菌いずれによって遂行されたのかは明らかでない。なお、NO<sub>2</sub>-N自体が好気条件でのN<sub>2</sub>O生成を著しく促進することは、高負荷膜分離型の活性汚泥を用いた松尾・陶安 (1996)の検討によっても示されている。

ここで、Run 2-3と同様にDOを低濃度に制御したRun 2-1において、好気工程終了時にNO<sub>2</sub>-Nが残留する場合があったにも関わらず、そこでの顕著なN<sub>2</sub>O放出が見られなかった点も指摘しておく。このことは、NO<sub>2</sub>-Nの蓄積が必ずしも常に大量のN<sub>2</sub>O生成をもたらさないことを示唆している。ただし、本系列においては無酸素工程での放出量が大きく、そこで混合液中に溶存したN<sub>2</sub>Oが好気工程に入った後も引き続き放出され、好気工程において実際に生成されたN<sub>2</sub>O量を把握することが困難であった。そのことが、好気工程に現れたかもしれないN<sub>2</sub>O放出量の変化を見えにくくした可能性も考えられる。しかし、Run 2-3でDO制御値を引き下げた後に見られたような好気工程での顕著なN<sub>2</sub>O放出がRun 2-1において起こらなかったことは事実である。

一方、 $^{15}\text{N}$ トレーサー実験において、好気工程に $\text{NO}_2\text{-N}$ が蓄積されない場合であっても、DOが小さい条件では $\text{NH}_4\text{-N}$ 由来の $\text{N}_2\text{O}$ 放出量が増加することが示された(6.4.3参照)。ここでは、既存の知見も併用して、低DO条件では硝化からの $\text{N}_2\text{O}$ 生成が促進されると推察した。

このことは、好気工程での $\text{N}_2\text{O}$ 生成に対しては、上で述べた $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積という機構以外に、酸素が制限されるということ自体がもたらす効果を考慮する必要があることを示唆している。しかし、6.4.3の実験で算出された $\text{N}_2\text{O}$ 転換率は、好気工程からの放出のみを考慮した場合には1.1%と小さかったことから、その効果は $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積がもたらす効果よりは小さいと予想できる。

以上の議論から、好気工程でDOが低い場合の $\text{N}_2\text{O}$ 生成に対しては、次の二つが寄与していたと考えられる。

- (a) 硝化菌が利用可能な酸素量が制限されること自体が硝化過程での $\text{N}_2\text{O}$ 生成量を増大させる。
- (b) 酸素量が制限されたことにより亜硝酸酸化が阻害を受け、その結果蓄積した $\text{NO}_2\text{-N}$ が $\text{N}_2\text{O}$ 生成を促進する。

(b)に関しては、 $\text{NO}_2\text{-N}$ を $\text{N}_2\text{O}$ へ変換する過程としては硝化と脱窒の両者が想定され、それぞれの寄与は本研究の結果からは明らかでない。

リアクターにおいて好気工程に大量の $\text{N}_2\text{O}$ 放出が見られた場合には(Run 2-3)、同時に $\text{NO}_2\text{-N}$ が蓄積したことから、(b)が大きく寄与した可能性が高い。したがって、硝化の進行に際して亜硝酸酸化のみが阻害を受けるDOレベルにおいて、好気工程からの $\text{N}_2\text{O}$ 放出量が大きくなることが予想される。

## 9. 4 まとめ

本章では、実験室規模リアクターにおいて好気工程のDOを低濃度に制御した場合に見られた好気工程からの $\text{N}_2\text{O}$ 放出に関して、1サイクル内での窒素系指標の変化および第6章で述べた $^{15}\text{N}$ トレーサー実験の結果をもとに考察した。

得られた結果をまとめると以下のようになる。

- (1) 好気工程のDOを低濃度に制御したリアクターにおいて1サイクル内の窒素系指標の変化を調べたところ、好気工程で $\text{N}_2\text{O}$ が大量に放出される場合には $\text{N}_2\text{O}$ 放出と同時期に $\text{NO}_2\text{-N}$ が蓄積される傾向が見られた。
- (2) Run 2-3においてDOを0.5~1.1 mg/lと低濃度に制御した場合に好気工程での $\text{N}_2\text{O}$ 放出量が増加した機構としては、(a) 酸素量が制限されること自体が硝化過程での $\text{N}_2\text{O}$ 生成を増加させる、(b) 酸素制限により亜硝酸酸化が阻害を受けその結果蓄積した $\text{NO}_2\text{-N}$ が $\text{N}_2\text{O}$ 生成を増加させる、という二つが想定された。

上記リアクターにおいては、特に(b)の寄与が重要であると考えられた。ただし、その場合の $\text{N}_2\text{O}$ の起源としては硝化と脱窒の両者が想定され、それぞれの寄与を明らかにすることはできなかった。

- (3) 間欠曝気式の運転においては、アンモニア酸化は阻害を受けないが亜硝酸酸化が阻害されるようなDOレベルにおいて、好気工程での $\text{N}_2\text{O}$ 放出量が大きくなることが予想される。

## 第10章

### N<sub>2</sub>O放出抑制型の運転法

本章では、実し尿処理施設における調査（第4章）、実験室規模リアクターを使用した諸検討（第5章～第9章）で得られた結果に基づき、間欠曝気式の硝化脱窒法においてN<sub>2</sub>Oの放出を抑制する運転方法を提案する。

実験室規模リアクターの運転において、大量のN<sub>2</sub>O発生が見られたのは次の2つの場合であった。以下に、各ケースについて、N<sub>2</sub>O放出を抑制する方策を考察する。

- (1) 投入基質のCOD/N比が小さい場合。
- (2) 好気工程のDOが低濃度である場合。

#### (1) 原水のC/N比が小さい場合

実験室規模リアクターにおいて、基質のCOD/N比を3.5以下に設定した運転条件では、投入される窒素成分量当たりのN<sub>2</sub>O転換率が10～45%と非常に大きかった（第5章）。そして、そのような条件では無酸素工程後半での脱窒過程でN<sub>2</sub>Oが生成されることが示された（第6章）。これらの傾向は、好気工程のDOを実施レベルに制御した場合にも観察された。したがって、実施においても原水のC/N比が小さい場合には脱窒により大量のN<sub>2</sub>Oが発生する可能性が高い。

その場合、以下に挙げたような方策が考えられる。

#### 【間欠曝気槽での脱窒の完遂】

まず、間欠曝気槽で脱窒を完了させNO<sub>3</sub>-Nを残留させないことが、有効な対策だと考えられる。実験室規模リアクターにおいて、基質のCOD/N比が小さい運転条件でN<sub>2</sub>Oが大量に発生した場合には、例外無くNO<sub>3</sub>-Nが高濃度に残留していたためである。

このNO<sub>3</sub>-N蓄積の効果としては、脱窒におけるN<sub>2</sub>O還元阻害が想定される（7.4節）。ただし、NO<sub>3</sub>-Nが高濃度に存在すること自体は脱窒過程でのN<sub>2</sub>Oの蓄積に対する支配的な因子ではない（7.4節、7.6節）。しかしながら、7.3節で考察したように、低COD/N比運転でのNO<sub>3</sub>-N還元活性とNO<sub>2</sub>-N還元活性の不均衡が、蓄積したNO<sub>3</sub>-Nによってもたらされたのであるならば、NO<sub>3</sub>-Nが間接的にN<sub>2</sub>O生成に大きく寄与していたことになる。

また、実し尿処理施設においては、脱窒が不調であると判断された場合にN<sub>2</sub>O放出量が著しく大きくなる傾向が見られた（第4章）。これに対しては、原水のC/N比との関連が明確ではなく、他の機構によりN<sub>2</sub>Oが発生した可能性もあるが、少なくとも、NO<sub>3</sub>-Nを残留させないような運転をおこなえば、N<sub>2</sub>Oが大量に発生する機会は減少するものと思われる。

実施において、本研究で運転した実験室規模リアクターのように混合液中に $\text{NO}_3\text{-N}$ が数百 $\text{mgN/l}$ も残留するような運転状態は希である。しかし、間欠曝気式の硝化脱窒プロセスでは、有機物不足による脱窒率の低下を補うために、間欠曝気槽の後段にメタノール投入設備を備えた第2脱窒槽（無酸素槽）が設置されるのが標準的である。すなわち、原水の $\text{C/N}$ 比が小さい場合には、間欠曝気槽では硝化を優先させて $\text{NO}_3\text{-N}$ を残留させ、続く第2脱窒槽において $\text{NO}_3\text{-N}$ を除去するという状況が存在する。その場合、間欠曝気槽において脱窒過程で大量の $\text{N}_2\text{O}$ が発生する可能性があるため、 $\text{N}_2\text{O}$ 放出抑制の見地からは、間欠曝気槽において脱窒を完遂させることが肝要である。

間欠曝気槽で脱窒を完遂させるための条件設定としては、(a) 無酸素工程を長く確保する、(b) 脱窒のための有機物源を添加する、などが考えられる。

無酸素時間を長くすることは長い脱窒時間を確保することに相当するので、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 蓄積レベルを低下させる効果が見込まれる。実際、実施調査において、1サイクルを通して $\text{NO}_3\text{-N}$ がほとんど検出されなかった調査2・3においては、好気工程よりも無酸素工程を長くとった運転がおこなわれていた（第4章）。

しかしながら、そもそも脱窒のための有機物源が不足している場合には、無酸素工程を長くとった運転は、内生脱窒による $\text{NO}_3\text{-N}$ 低減効果がある程度は期待できるものの、基質投入終了後の内生脱窒期間を長く確保することに相当するため、 $\text{N}_2\text{O}$ 放出量が増大する恐れがある。

投入原水の $\text{C/N}$ 比が小さい場合には、脱窒のための有機物添加が有効であると考えられる。実際、実験室規模リアクターにおいてメタノール投入による $\text{N}_2\text{O}$ 放出抑制効果が確認された。ただしこの場合、脱窒の改善に必要であると想定される以上の投入量を要する可能性があることも示された。また、基質の $\text{COD/N}$ 比が小さい場合の $\text{N}_2\text{O}$ 生成機構の中で、脱窒の際の $\text{NO}_3\text{-N}$ 還元速度と $\text{NO}_2\text{-N}$ 還元速度との間の不均衡が重要であると考えられた点（7.7節）、メタノールを投入した場合に $\text{N}_2\text{O}$ 放出量が低下するまでにラグタイムがあった点（5.3節）などから、有機物添加後に $\text{N}_2\text{O}$ 放出量が低下するまで、最低でも数日程度の期間が必要であると予想される。

#### 【原水投入時期の最適化】

脱窒過程で $\text{N}_2\text{O}$ が大量に発生するためには、脱窒が内生型となっていなければならないことが示された（7.4節）。実際、実験室規模リアクターにおいて、基質投入中には顕著な $\text{N}_2\text{O}$ 放出が見られなかった（第5章）。そこで、原水の投入法を工夫することにより内生脱窒が起こらないようにすれば、 $\text{N}_2\text{O}$ の発生を抑制できる可能性がある。

例えば、原水投入終了から好気工程開始までの時間を短縮する、無酸素工程を通して連続的に原水を投入する、などの方策が考えられる。

ただし、その場合には、原水中の有機物が好気工程に持ち越されないような条件を設定する必要がある。有機物が酸素呼吸により消費されることは脱窒の見地からは効率が悪い上に、好気工程での有機物負荷が上昇することによる硝化の阻害が起こる可能性もある。

#### 【pHの制御】

実験室規模リアクターにおいて、混合液のpHが脱窒過程からの $\text{N}_2\text{O}$ 放出量に大きく影響することが示された（第8章）。pHが高いほど $\text{N}_2\text{O}$ 放出量が小さくなる傾向が見られたことから、脱窒過程で $\text{N}_2\text{O}$ が発生する場合には、pHをなるべく高く保った運転が肝要である。

また、8.2節で述べた検討において、pHを7.5~7.8と最も高く設定した場合に、基質の $\text{COD/N}$ 比が3.4と小さいにも関わらず $\text{N}_2\text{O}$ 放出量が低レベルに抑えられたことから、基質の $\text{C/N}$ 比が小さく大量の $\text{N}_2\text{O}$ を発生している条件であっても、pHの制御のみによって放出量を抑制できる可能性がある。

さらに、上記検討においてpHの影響がpH変更後直ちに現れたことから、原水水質の変動などにより一時的に $\text{N}_2\text{O}$ が大量に発生した場合の対処法としても、pHの制御は有効であろう。

pHの制御法としては、(a) 薬品添加、(b) 処理状態の操作、というふたつが考えられる。

(a)は酸・アルカリによる一般的なpH調整法であり確実な方法であるが、費用がかかるという欠点がある。

(b)は、処理状態を $\text{NH}_4\text{-N}$ 蓄積型にすることによりpHの上昇を意図するというものである。つまり、硝化をやや犠牲にして脱窒過程からの $\text{N}_2\text{O}$ 放出量を抑制することになる。具体的には、好気工程を短くする、好気工程のDOを抑制する、などの運転条件が想定される。この場合、当然のことながら $\text{NH}_4\text{-N}$ が残留する可能性が高いため、処理水質の悪化を招く。また、第9章で述べたように、硝化の中で亜硝酸酸化のみが阻害を受けようような状態では好気工程からの $\text{N}_2\text{O}$ 放出量が増加する恐れがあるので、注意が必要である。現段階では $\text{N}_2\text{O}$ 放出に対して法的な規制がかかっていないので、本法が採用される可能性は小さいが、将来的に $\text{N}_2\text{O}$ の放出規制がおこなわれた場合、処理水質、 $\text{N}_2\text{O}$ 放出量、費用などを勘案した結果、本法が採用されることもありうる。

#### (2) 好気工程のDOが低濃度である場合

実験室規模リアクターにおいて、基質の $\text{COD/N}$ 比が5.0と大きく、さらに好気工程のDOを $0.8\text{ mg/l}$ 前後と低濃度に設定した系列において、好気工程で無視できない量の $\text{N}_2\text{O}$ が放出された。これに対しては、亜硝酸酸化菌の活動が低DO条件により阻害を受けた結果として硝化の過程で $\text{NO}_2\text{-N}$ が蓄積することが重要な因子になっていると考えられた。

この場合、好気工程終了時に $\text{NH}_4\text{-N}$ は残留しておらず、 $\text{NO}_2\text{-N}$ は残留していても $10\text{ mgN/l}$ 以下と低濃度であった。すなわち、硝化率が低下していたわけではない。

実施において、エネルギー消費量を削減するために、好気工程のDOを硝化が十分に進行する範囲内でなるべく低濃度に維持するのが望ましい。しかしながら、上で述べたように、見かけ上硝化が十分に進行しているようなDOレベルであっても $\text{N}_2\text{O}$ が大量に発生する場合が想定される。したがって、 $\text{N}_2\text{O}$ 放出抑制の見地からは、 $\text{NH}_4\text{-N}$ が残留しないという条件設定では不十分であり、たとえ低濃度であれ、 $\text{NO}_2\text{-N}$ が蓄積しないようなDOレベルを確保する必要がある。

また、実験室規模リアクターにおいて基質の $\text{COD/N}$ 比を3.5に設定した系列では、好気工程のDOを $0.5\text{ mg/l}$ 前後にまで低下させた運転をおこなった場合であっても、好気工程において $\text{N}_2\text{O}$ の顕著な発生が見られなかったことから、必要とされるDOは有機物負荷の影響を受けることにも注意が必要である。

実験室規模リアクターにおいて、(a) 基質のCOD/N比が小さく脱窒過程で $N_2O$ が発生したケース、(b) 好気工程のDOが低く同工程で $N_2O$ が放出されたケース、の両者において、運転サイクル内での一時的な $NO_2-N$ の蓄積が $N_2O$ 生成に対して重要な役割を果たしていることが示された(7, 7節, 9, 3節)。

前者においては、基質添加時に蓄積した $NO_2-N$ がその後の内生脱窒時での $N_2O$ 発生をもたらすと考えられた。後者においては、特に好気工程から大量の $N_2O$ が発生した場合には、同工程において $N_2O$ 放出と $NO_2-N$ 蓄積が同時に見られる傾向があり、 $NO_2-N$ の蓄積が $N_2O$ 生成を促進したと考察された。

これらの結果から、そもそも $NO_2-N$ が1サイクルを通して蓄積されているような処理状態では、たとえそれが $10\text{ mgN/l}$ 以下という低濃度であっても、硝化・脱窒両過程から多量の $N_2O$ 放出を招くことが予想される。実際、第4章で述べた実し尿処理施設において $N_2O$ 放出量が大きかった調査1・4では、1サイクルを通して常に $NO_2-N$ が残留している状態にあった。また、実験室規模リアクターの運転系列Run 1-1およびRun 1-2において、運転開始当初に非常に大量の $N_2O$ が発生したが、そのとき同時に $NO_2-N$ も高濃度に蓄積していた(図5.2, 5.3)。

したがって、 $N_2O$ 放出の抑制を考える場合、たとえ原水のC/N比が大きく、また好気工程のDOが十分に高く維持されている場合であっても、 $NO_2-N$ の蓄積状況には注意を払う必要があると言える。

また、同様の理由から、硝化を $NO_2-N$ の段階までしかおこなわないいわゆる亜硝酸型の硝化脱窒法(Abeling & Seyfried, 1992)は、大量の $N_2O$ 発生を招く恐れの大い処理方式であると言える。

最後に、本章で提案した運転方法をまとめてみる。

- (1) 原水のC/N比が小さい場合には、脱窒過程で $N_2O$ が大量に発生する恐れがある。その場合、(a) 間欠曝気槽で脱窒を完遂させる、(b) 原水投入法を最適化し内生脱窒の進行を抑制する、(c) pHを高く維持する、などの方策が考えられる。(a)に関しては、脱窒のための有機物源の添加が有効であり、その際に第2脱窒槽ではなく間欠曝気槽へ添加をおこなうのがポイントである。
- (2) エネルギー使用量の見地から、好気工程のDOは硝化が進行する範囲内でなるべく低濃度に維持するのが望ましい。その場合に、亜硝酸酸化のみが阻害を受けるDO条件下では、好気工程において大量の $N_2O$ が発生する可能性がある。したがって、 $NH_4-N$ の蓄積のみに注目するのではなく、たとえ低濃度であれ $NO_2-N$ が残留しないようなDOレベルを確保する必要がある。
- (3)  $NO_2-N$ が1サイクルを通して常に蓄積しているような状態では、硝化・脱窒両者からの $N_2O$ 発生量が著しく増大する恐れがあるので、 $NO_2-N$ の蓄積状況には細心の注意を払う必要がある。

## 第11章 結論および今後の検討課題

### 11.1 結論

#### 11.2 今後の課題

本章では、本研究で得られた結果をまとめた上で総括をおこない(11.1節)、今後の検討課題を指摘する(11.2節)。

### 11.1 結論

本研究で得られた主な結果をまとめると、以下のようになる。

高負荷膜分離型の実し尿処理施設において調査をおこない、環境中への $N_2O$ 放出量を推定した(第4章)。また、処理状態と $N_2O$ 放出量との関連についても考察した。

$N_2O$ の主たる生成箇所は間欠曝気槽であり、そこからの放出量が排水処理系からの総放出量の大半を占めると推察された。また、放出量は $0.16\sim 63\text{ gN/d}$ と調査日より大きく異なった。

得られた放出量をもとに、日本の全し尿処理施設からの $N_2O$ 放出量を $0.01\sim 13\text{ GgN/yr}$ と試算した。これより、し尿処理施設が $N_2O$ の発生源として無視できないものである可能性を示した。また、し尿処理施設は下水処理施設や浄化槽と同程度のインパクトを持つ $N_2O$ 発生源であると評価された。

$N_2O$ 放出量の変動が大きかった要因を、間欠曝気槽の処理状態と関連づけて考察した。同槽での脱窒の役割が重要であると考えられ、脱窒が良好であると判断された場合には $N_2O$ 放出量が小さかった。

上記のし尿処理施設の間欠曝気槽を模擬した実験室規模リアクターの運転をおこない、(1)投入基質のCOD/N比、(2)好気工程のDO、という二つの因子が $N_2O$ 放出に与える影響を検討した(第5章)。また、基質のCOD/N比が小さく $N_2O$ が大量に発生している場合の対処法としてメタノールの投入をおこない、その効果を検証した。

基質のCOD/N比は、処理状態・N<sub>2</sub>O放出量の両者に大きく影響した。COD/N比が2.4~3.5と小さい条件で運転すると、脱窒が完結せずに高濃度のNO<sub>3</sub>-Nが残留し、同時に大量のN<sub>2</sub>Oが発生した(N<sub>2</sub>O転換率:10~45%)。一方で、COD/N比を5.0以上と高く設定した場合には脱窒が良好に進行し、N<sub>2</sub>O放出量は小さかった。COD/N比が小さい条件では無酸素工程の後半に大きなN<sub>2</sub>O放出が起こり、脱窒過程でのN<sub>2</sub>O生成が示唆された。また、上で述べたCOD/N比の影響は、当初好気工程のDOが4 mg/l以上の条件で運転した場合に観察されたが、好気工程のDOを1.0 mg/l前後と実施レベルに制御した場合にも同様の傾向が見られた。

基質のCOD/N比が大きい条件では硝化が阻害を受け高濃度のNH<sub>3</sub>-Nが蓄積することがあったが、その場合でもN<sub>2</sub>O放出量は小さかった。ただし、後で述べるように、好気工程のDOを低濃度に制御した場合には、好気工程で大量のN<sub>2</sub>Oが発生する場合もあった。

好気工程のDOの影響は、本研究で検討した範囲では、基質のCOD/N比を5.0に設定した系列でDOを0.5~1.1 mg/lに制御した場合に顕著となった。そこでは、良好な窒素除去がおこなわれているにも関わらず好気工程で大量のN<sub>2</sub>Oが発生した(N<sub>2</sub>O転換率:4~18%)。また、この条件では硝化の過程でNO<sub>2</sub>-Nが蓄積する傾向が見られた。

基質のCOD/N比が小さくN<sub>2</sub>Oを大量に発生していた系列において、基質と同時にメタノールを投入することによりN<sub>2</sub>O放出の抑制を試みた。メタノールを含めた基質のCOD/N比が5.5となるような投入条件においてN<sub>2</sub>O放出量が著しく減少し、N<sub>2</sub>O放出抑制策としてメタノールの投入が有効であることが示された。しかし、脱窒の改善に必要とされるよりも多量の投入を要する可能性もあり、有効な投入量に関しては決定できなかった。

実験室規模リアクターで見られたN<sub>2</sub>O放出に対する硝化と脱窒それぞれの寄与率を明らかにすることを目的として、窒素の安定同位体<sup>15</sup>Nを用いたトレーサー実験をおこなった(第6章)。

基質のCOD/N比が小さい条件では、放出されるN<sub>2</sub>Oの大半がNO<sub>3</sub>-Nに由来することが示され、無酸素工程後半での脱窒が主要なN<sub>2</sub>O起源であると判断された。

好気工程においては、硝化由来のN<sub>2</sub>Oが発生することが確認された。特に、好気工程のDOを0.5 mg/l前後と低濃度に制御した場合に、硝化由来のN<sub>2</sub>O放出量が増加した。

基質のCOD/N比を小さく設定した実験室規模リアクターにおいて脱窒過程で大量のN<sub>2</sub>Oが発生した機構を明らかにすることを目的として、リアクターおよびその混合液を使用した種々の検討を行った(第7章)。

これらの運転系列において見られた大量のN<sub>2</sub>O放出に対しては、(a)基質投入終了後の内生脱窒、(b)基質投入中に進行する脱窒過程でのNO<sub>2</sub>-Nの蓄積、という二つが支配的な要因であると考えられた。

脱窒が内生型としない限りは顕著なN<sub>2</sub>O放出が起こらないことが示された。ただし、内生脱窒が進行するだけでは必ずしもN<sub>2</sub>Oの生成は観察されず、N<sub>2</sub>Oの蓄積が起こるためにはそこにNO<sub>2</sub>-Nが存在することが必要とされた。実際、脱窒経路中の各還元速度を測定したところ、有機物が過剰の条件ではN<sub>2</sub>O還元速度が常に他の還元速度よりも大きかったのに対して、内生脱窒時にはNO<sub>2</sub>-N還元のみがその速度を比較的高く維持することが示された。また、酢酸塩を唯一の有機物源として与えた脱窒回分実験において、消費された酢酸の約50%がPHBとして菌体内へ蓄積されたことから、内生脱窒時

の電子供与体としては有機物存在時に貯蔵されたPHBが主要であると判断された。

基質投入中に進行する脱窒過程でNO<sub>2</sub>-Nが蓄積する傾向は、基質のCOD/N比を小さく設定したリアクターの混合液において特異的に見られた。これは、NO<sub>3</sub>-N還元とNO<sub>2</sub>-N還元の活性差から説明された。また、蓄積されたNO<sub>2</sub>-Nは、上で述べたように内生脱窒へ移行後に比較的大きな速度でN<sub>2</sub>Oを生成させるだけでなく、N<sub>2</sub>O還元を阻害する効果を持つことも示された。

処理状態として蓄積したNO<sub>3</sub>-Nは、内生脱窒時のN<sub>2</sub>Oの蓄積を促進することが示された。

メタノール投入をおこなった場合にも、上で述べたのと同様のN<sub>2</sub>O蓄積機構が適用できるものと思われた。投入量が不足して大量のN<sub>2</sub>O放出が見られた条件では基質投入中にNO<sub>2</sub>-Nの蓄積が観察されたのに対して、N<sub>2</sub>O放出が抑制された条件ではNO<sub>2</sub>-Nの蓄積を伴わない脱窒が進行した。

脱窒過程からのN<sub>2</sub>O発生に対するpHの効果も、実験室規模リアクターおよびその混合液を使用した回分実験により調べた(第8章)。

脱窒過程からN<sub>2</sub>Oを大量に発生しているリアクターにおいて混合液のpHを6.5~7.8の範囲で強制的に変化させたところ、窒素除去率には大きな影響が見られなかったにも関わらず、N<sub>2</sub>O放出量はpHが高いほど小さくなった。特に、pHを7.5~7.8へと引き上げた場合には、ほとんどN<sub>2</sub>Oが放出されなくなった。この変化はpH変更後直ちに起こり、また可逆的であった。

上で述べたpHの影響は、リアクターの混合液を用いた脱窒回分実験によっても示された。

実験室規模リアクターにおいて好気工程のDOを低濃度に制御した場合に見られた好気工程からのN<sub>2</sub>O放出機構について考察した(第9章)。

好気工程のDOが低い条件でのN<sub>2</sub>Oの発生に対しては、(a)硝化菌が利用可能な酸素量が制限されること自体による硝化過程でのN<sub>2</sub>O生成量の増加、(b)酸素量が制限されたことにより亜硝酸酸化が阻害を受けその結果蓄積したNO<sub>2</sub>-NによるN<sub>2</sub>O生成量の増加、という二つの機構が寄与していると推察された。

ここで、好気工程でのN<sub>2</sub>O放出量が多い場合には、N<sub>2</sub>O放出と同時にNO<sub>2</sub>-Nの蓄積が観察されたことから、(b)の寄与が大きいものと思われた。

以上の結果をもとに、間欠曝気式の硝化脱窒法においてN<sub>2</sub>Oの放出を抑制する運転方法を提案した(第10章)。

投入原水のC/N比が小さい場合には脱窒過程で大量のN<sub>2</sub>Oが発生する可能性があるが、その場合には、(a)間欠曝気槽で脱窒を完遂させる、(b)原水投入時期を最適化し内生脱窒の進行を抑制する、(c) pHを高く維持する、などの方策が有効であると考察された。

また、好気工程のDOを決定する際には、NH<sub>4</sub>-Nの蓄積のみに注目するのではなく、亜硝酸酸化が阻害を受けないようなDOレベルを維持する必要がある点を指摘した。

最後に、たとえ低濃度であれ常時NO<sub>2</sub>-Nが残留しているような運転は避けるべきである点を指摘した。

地球温暖化問題に対して、現在ようやくその対策のための枠組みが部分的に設定された段階である。温室効果ガスの放出削減策としては二酸化炭素が主たる対象となるであろうが、第1章で指摘したように、 $N_2O$ を含む他の温室効果ガスの放出量も積極的に削減していく必要がある。

排水処理施設の $N_2O$ 発生源としての側面が指摘されるようになったのは、1990年代に入ってからである。その後徐々に報告例が増えているとはいえ、未だ不明な点は多い。そもそも、排水処理施設が $N_2O$ の発生源として重要であるのかどうかについてさえ、正確には評価されていない。 $N_2O$ の発生に対する影響因子に関しては、純粋培養系や土壌だけでなく、活性汚泥を試料とした知見も蓄積され始めている。しかし、そこでは硝化あるいは脱窒を個別におこなう活性汚泥を対象としたものが多く、両反応を遂行する活性汚泥を対象とした研究例は少ない。

本研究では、実し尿処理施設において $N_2O$ 放出量を実測し、し尿処理施設が $N_2O$ の発生源として無視できないものであることを示した。実際、実施施設および実験室規模リアクター両者において、条件によっては投入される窒素成分に対して数十%の割合で $N_2O$ が放出され、適切な運転方法でないと大量の $N_2O$ が発生しうることが明らかとなった。したがって、今後数多くの処理施設からの放出量を実測し、し尿処理施設からの $N_2O$ 放出実態を把握する必要がある。

実験室規模リアクターにおいては、基質のCOD/N比、DO、pHという因子の影響を検討した。これらは $N_2O$ の発生に大きく影響したが、いずれの因子も運転条件を最適化すれば処理能力を損なうこと無しに $N_2O$ の発生を抑制できる可能性が示された。基質のCOD/N比が小さい場合には脱窒過程で大量の $N_2O$ が発生したが、脱窒のための有機物源を与えることにより対処可能であった。好気工程のDOが低い場合にはそこで $N_2O$ が発生したが、亜硝酸酸化が阻害を受けない程度のDOレベルを維持すれば抑制可能であると思われた。また、pHが脱窒過程からの $N_2O$ 発生量に大きく影響することが示され、特に、pHの制御のみによって $N_2O$ 発生量を大きく抑制できる可能性が示されたことには注目される。

これらの結果に基づいて、 $N_2O$ 放出抑制型の運転方法を提案したが、それらを実施施設において検証することも必要である。

## 11.2 今後の課題

本研究で扱った諸点のうちで検討し切れなかった点について、以下に列挙する。

### (1) し尿処理施設からの $N_2O$ 放出量

本研究では、高負荷膜分離型の実施設1箇所での調査結果から、し尿処理施設の $N_2O$ 発生源としてのインパクトを評価することを試みた。しかし、調査日によって放出量が大きく異なったため、そこから外挿した全し尿処理施設からの放出量試算値も、大きな幅を持ったものとなった。したがって、し尿処理施設の $N_2O$ 発生源としての重要性を明確に示すには至らなかった。

しかしながら、そこからの放出量が日本の総 $N_2O$ 放出量に対して大きく寄与する可能性があるのは確実であり、より多くの放出量実測データが必要である。また、高負荷型だけでなく他の処理方式の施設からの放出量も数多く測定されるべきである。

その際には、 $N_2O$ 放出量が処理状態によって大きく異なることが予想されるので、1施設において複数回の調査を実施する必要がある。

### (2) 低DO条件での $N_2O$ 生成に対する硝化と脱窒の寄与率

本研究では、実験室規模リアクターにおいてDOを低く制御した場合に好気工程から発生した $N_2O$ の起源を把握することができなかった。硝化の過程で $NO_2-N$ の蓄積を伴わない場合には、発生する $N_2O$ の大半が硝化に由来することが $^{15}N$ トレーサー実験より示されたが、リアクターにおいて好気工程に大量の $N_2O$ 放出が見られた場合には同時に $NO_2-N$ の蓄積が起こっており、そこで生成された $N_2O$ に対する硝化と脱窒の寄与率を把握する必要がある。

### (3) 有機物制限条件下での脱窒過程での $N_2O$ 蓄積機構

実験室規模リアクターにおいて低COD/N比の基質で運転した場合に $N_2O$ が大量に発生した要因を明らかにするため、第7章において種々の検討をおこなった。そこで見られた重要な現象の中には、それが起こった機構を確定できないものがあつた。

そのひとつは、有機物存在時に進行する脱窒過程での $NO_2-N$ の蓄積である。これは、脱窒由来の $N_2O$ を大量に発生していたリアクターにおいて特異的に見られた現象であり、無酸素工程後半で起こった $N_2O$ 放出に大きく関与していると考えられたので、その機構についても明らかにしておく必要がある。7.3節において、 $NO_3-N$ 還元と $NO_2-N$ 還元の活性差による説明を試みたが、それが生じた要因は明らかでない。また、混合液中に蓄積された $NO_3-N$ により $NO_2-N$ 還元が阻害を受けた可能性もある。

もう一点は、細胞外に利用可能な有機物が枯渇し脱窒が内生型へと移行した際に、脱窒経路の中で $NO_2-N$ 還元速度のみが影響を受けにくかった点である。これは、内生脱窒時の $N_2O$ 蓄積を説明する重要な現象であると見なされるが、それが生じた原因は明らかにできなかった。

また、ここで考察した機構が実排水の処理においても適用可能であるかという点も重要である。本研究での議論は、有機物源として酢酸塩が主要であることを想定していた。実際にし尿処理施設が受け入れる原水には、それ以外にも分解性の異なる種々の有機物が含まれている。その場合、無酸素工

程後半での脱窒は、「内生脱窒」ではなく「分解の遅い有機物による脱窒」と言えるかもしれない。そのときに、第5章で見たような傾向で $N_2O$ が放出されるのか、あるいは第7章で考察した機構がそのまま適用できるのか、という点が問題となる。これらに関しては、本研究では明らかにされていない。

#### (4) 最適なメタノール投入量

第5章において、基質のCOD/N比が小さく脱窒過程で大量の $N_2O$ が発生する場合には、脱窒の有機物源としてのメタノールの投入が有効な対策であることを示した。しかしながら、酢酸塩を主要な有機物源とした運転では、COD/N比が5.0の条件において $N_2O$ の発生を伴わない処理が可能であったのに対して、メタノールを投入した場合には5.0というCOD/N比では $N_2O$ の発生を完全に抑制することはできなかった。本研究では、この点に関する実験的検討を十分におこなえなかったため、 $N_2O$ 放出抑制策として有効なメタノール投入量の決定については今後の課題である。

#### (5) pHの長期的な影響

8. 2節において、混合液のpHにより $N_2O$ 放出量が大きく変化することが示された。しかし、本検討は各pH条件において数日間という短期間の運転によりおこなったものであり、実施への適用を考えると、設定pH条件で長期間の運転を実施し、長期的な影響評価をおこなう必要がある。特に、異なるpHで長期間運転をおこなった場合には汚泥中の脱窒菌相が変化することが予想されるため、8. 2節で見られたのとは異なる影響が現れてくる可能性もある。

## 謝辞

本研究をおこなうにあたって、以下の方々の多大なる御指導・御協力を頂きました。本研究は筆者一人の力では決してなす得ず、以下の方々との関わりがあって初めて完成したものであることを明記し、ここに厚く感謝の意を表します。

筆者の指導教官である花木啓祐教授（東京大学先端科学技術研究センター）には、学部時代から5年半に渡って、暖かい御指導を頂きました。ともすれば狭視野的になる筆者の思考に対して、常に幅広い視点による助言を頂きました。また、先生にはし尿処理施設調査にも同行して頂き、試料採取等を手伝って頂きました。

東京大学工学部の松尾友矩教授、味埜俊教授には、研究会において厳しい意見を頂きました。また、岡先生には日頃からシニカルながらも暖かい言葉をかけて頂き、筆者にとっては大いに励みとさせて頂きました。岡先生には本論文の審査員も動めて頂きました。

東京大学工学部の大垣真一郎教授、市川新助教授（現・京都大学工学部教授）、滝沢智助教授（現・アジア工科大学助教授）、古米弘明助教授、東京大学環境安全センターの山本和夫教授、浦瀬太郎助教授にも、様々な場で貴重な意見を頂きました。山本先生には本論文の審査員も動めて頂きました。

東京大学の長棟輝行教授には、本論文の審査員を動めて頂きました。

東京農業大学の熊沢喜久雄教授には、 $^{15}N$ 関連の分析法について助言を頂きました。

し尿処理施設での調査にあたっては、南濃衛生施設組合の雨宮順四郎所長、住友重機械工業株式会社の岡庭良安氏、公営事業サービス株式会社の古屋一博氏の御協力をいただきました。

東京大学工学部の講師・助手諸氏にも大変お世話になりました。佐藤弘泰講師、大瀧雅寛講師、中島典之助手には、実験全般に渡っての御協力を頂きました。特に、佐藤先生と中島先生には研究面での相談にもって頂きました。荒巻俊也助手には、コンピュータに弱い筆者が直面した困難を何度も解決して頂きました。

東京大学大学院工学系研究科の大学院生諸氏にもお世話になりました。中でも、Zhang Boran氏（現・西原環境衛生研究所）には、し尿処理施設調査に際して何度か同行して頂き、試料採取も手伝って頂くなど大変お世話になりました。Rajeev Goel氏には、研究に際して貴重な御意見を頂きました。白川智章氏（現・住宅・都市整備公団）には、リアクターで使用した膜モジュールの作成法を教えてくださいました。高島寛生氏には、PHAの分析法を指導して頂きました。黄善振氏、長谷川聖氏、堀芳彦氏には $N_2O$ の勉強会を盛り上げて頂きました。

最後に、不規則になりがちな筆者の生活を正し、温かい目で見守ってくれた両親・恋人に感謝します。

## 参考文献

- 浅田日出夫・上垣内郁夫・小野由述・辻文夫 (1979) ワンリアクタープロセスによるし尿の脱窒について, 水処理技術, 20: 753-764.
- 飯尾友幸・原田良誠・村上喜之 (1988) 間欠曝気法による窒素除去に関する研究, 下水道協会誌, 25(2): 16-23.
- 石川宗孝・水船清司・中西弘 (1982) 好気性脱窒に関する基礎的研究—脱窒機構の解析とモデル化—, 第18回衛生工学研究討論会講演論文集, 98-105.
- 石田宏司・山田豊・和泉清司・師正史・北尾高嶺 (1996) Uチューブ型膜分離深層曝気槽におけるし尿の硝化脱窒特性に関する研究, 水環境学会誌, 19: 147-160.
- 糸川浩紀 (1995) 生物学的硝化・脱窒をおこなう排水処理過程からの亜酸化窒素の発生に関する研究, 東京大学修士学位論文.
- 糸川浩紀・花木啓祐・松尾友矩 (1993) 都市河川における一酸化二窒素の変化に関する調査, 第30回環境工学研究フォーラム講演集, 118-120.
- 糸川浩紀・花木啓祐・松尾友矩 (1995) 間欠曝気をおこなうし尿処理施設における硝化・脱窒過程からの亜酸化窒素の発生と制御, 環境工学研究論文集, 32: 311-320.
- 糸川浩紀・花木啓祐・松尾友矩 (1997) 高負荷間欠曝気式硝化・脱窒法における有機物制限条件下での $N_2O$ 生成機構, 環境工学研究論文集, 34: 191-202.
- 稲森悠平・細見正明・須藤隆一 (1991) 地球温暖化の原因となる温室効果ガスの排水処理施設からの発生抑制対策, 用水と廃水, 33: 28-34.
- 指宿克嗣 (1992) 一酸化二窒素 (亜酸化窒素) の地球規模循環, 資源と環境, 1: 219-227.
- 大石京子・楠田哲也 (1997) 土壌の脱窒過程で生成される $N_2O$ の濃度に及ぼす細菌類と真菌類の影響, 環境工学研究論文集, 34: 35-40.
- 岡久宏史 (1992) 地球温暖化と下水道, 下水道協会誌, 29(1): 40-44.
- 落修一・渡辺春樹・竹石和夫 (1996) 下水汚泥のコンポスト化による亜酸化窒素ガスの発生, 用水と廃水, 38: 662-667.
- 狩野広美・米山忠克・熊沢喜久雄 (1974) 発光分光分析法による重窒素の定量について, 土肥誌, 45: 549-559.
- 河村清史・井上雄三 (1995) し尿処理における膜利用技術, 水環境学会誌, 18: 90-94.
- 久保田宏・宮地有正 (1977) 活性汚泥法による硝化操作, 下水道協会誌, 14(8): 16-20.
- 熊沢喜久雄 (1972) 化学分析技術 (X) 分光法による重窒素 ( $^{15}N$ ) の定量, *Radioisotopes*, 21: 37-47.
- 栗原光規・西田武弘 (1996) 地球温暖化抑制のための $CH_4$ ,  $N_2O$ の対策技術開発と評価に関する研究 (2) 反芻家畜におけるメタン及び亜酸化窒素放出とその変動要因の解明に関する研究, 地球環境研究総合推進費平成7年度終了研究成果報告集, 186-189.

- 厚生省生活衛生局水道環境部環境整備課監修(1994)「廃棄物処理事業・施設年報 平成6年版」, 環境産業新聞社。
- 児玉威(1981)日本におけるし尿処理の歴史, 用水と廃水, 23: 1397-1406。
- 桜井敏郎(1991)し尿の高負荷生物処理技術, 水質汚濁研究, 14: 772-776。
- 佐藤和明・鈴木稔・水落元之(1992)下水処理場からのメタン・亜酸化窒素の放出量の解明に関する研究, 平成4年度下水道関係調査研究年次報告書集, 105-110。
- 佐藤弘泰・味埜俊・松尾友矩(1993)PHAの測定とその意味—活性汚泥細菌の蓄積有機物としての生分解性プラスチックの定性定量分析, 「環境微生物工学研究法」, 土木学会衛生工学委員会編, 技報堂出版, pp. 67-70。
- 佐藤弘泰・味埜俊・松尾友矩(1995)余剰汚泥を用いるポリエステル生産, 生物材料科学 研究計画化調査資料, 理化学研究所, pp. 43-52。
- 沢田英子・佐藤敏生(1984)脱窒光合成細菌の脱窒素作用, 「光合成細菌」, 北村博・森田茂廣・山下仁平(編), 学会出版センター, pp. 175-180。
- し尿処理ガイドブック編集委員会編(1986)「し尿処理ガイドブック」, 理工新社。
- 鈴木善三(1992)燃焼に伴う亜酸化窒素の排出とその生成機構—第5回 亜酸化窒素に関する国際ワークショップにおける発表の紹介—, 資源と環境, 1: 229-241。
- 宗宮功・津野洋・山下洋正(1996)間欠曝気式膜分離活性汚泥法における窒素除去特性に関する研究, 下水道協会誌論文集, 33: 104-118。
- 宗宮功・山田登志夫・津野洋・山下洋正(1994)脱窒菌における脱窒機能発現機構に関する研究, 下水道協会誌論文集, 31: 86-99。
- 高橋令二・徳山龍明(1993)化学独立栄養アンモニア酸化菌—*Nitrosomonas*のアンモニア酸化・ヒドロキシルアミン酸化系を中心にして—, *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology*, 8: 95-107。
- 高橋令二・徳山龍明(1994)化学合成独立栄養細菌における炭素固定—特に硝化細菌におけるトリカルボン酸回路と炭素固定経路について—, *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology*, 9: 135-147。
- 竹石和夫・鈴木稔・松原誠(1993)下水処理場からのメタン・亜酸化窒素の放出量の解明に関する研究, 平成5年度下水道関係調査研究年次報告書集, 105-110。
- 竹石和夫・鈴木稔・松原誠(1994)下水処理場からのメタン・亜酸化窒素の放出量の解明に関する研究, 平成6年度下水道関係調査研究年次報告書集, 115-121。
- 田中勝・井上雄三・中野正博・大迫政浩・山田正人・渡辺征夫(1996)地球温暖化抑制のための $CH_4$ ,  $N_2O$ の対策技術開発と評価に関する研究(7)廃棄物処理分野におけるメタン・亜酸化窒素の発生制御対策に関する研究, 地球環境研究総合推進費平成7年度終了研究成果報告集, 48-59。
- 土肥義治(1995)共重合ポリエステルの微生物合成と生物材料科学研究, 「生物材料科学 研究計画化調査資料」, 理化学研究所, pp. 1-20。
- 遠矢泰典(1970a)生物学的脱窒素法に関する研究(I)—硝化作用の支配因子に関する研究—, 下水道協会誌, 7(7): 21-42。

- 遠矢泰典(1970b)生物学的脱窒素法に関する研究(II)—微生物活性に対する亜硝酸塩の毒作用について—, 下水道協会誌, 7(8): 13-28。
- 遠矢泰典(1970c)生物学的脱窒素法に関する研究(III)—活性汚泥の脱窒素機能および有機炭素源に関する研究—, 下水道協会誌, 7(9): 23-39。
- 遠矢泰典(1970d)生物学的脱窒素法に関する研究(IV)—通性嫌気性脱窒素菌の生理・機能に関する検討—, 下水道協会誌, 7(10): 19-32。
- 遠矢泰典(1970e)生物学的脱窒素法に関する研究(V)—硝化の動力学および脱窒素プロセスの選定根拠について—, 下水道協会誌, 7(11): 2-15。
- 中根良平(1963)質量分析法による同位体比測定(III)重窒素存在比の測定, 質量分析, 22: 51-56。
- 花木啓祐(1991)地球温暖化時代の排水管理, 水質汚濁研究, 14: 593-598。
- 花木啓祐(1992)地球温暖化問題にどう取り組むか, 月刊下水道, 15: 6-9。
- 花木啓祐・鄭紅・市岡信也・松尾友矩(1994)生活排水の窒素除去過程で発生する一酸化二窒素, 土木学会第2回地球環境シンポジウム講演集, 189-194。
- 花木啓祐・鄭紅・松尾友矩(1993)脱窒における一酸化二窒素生成と制御因子の関係, 下水道協会誌論文集, 30: 30-42。
- 半田暢彦編(1996)「大気圏科学から見た地球温暖化」, 名古屋大学出版会。
- 平木隆年・玉置元則(1991)亜酸化窒素排出量調査の動向, 公害, 26: 23-32。
- 松尾友矩(1992)地球温暖化問題からみた下水道への課題, 下水道協会誌, 29(8): 18-22。
- 松尾吉高(1995)し尿処理技術の発展と窒素除去, 水環境学会誌, 18: 162-166。
- 松尾吉高・岡安祐司(1996)高負荷回分式硝化脱窒法における亜酸化窒素の発生, 環境工学研究論文集, 33: 301-309。
- 水落元之・京才俊則(1992)温室効果気体の下水処理プロセスからの放出, 月刊下水道, 15: 33-38。
- 水落元之・京才俊則(1992)温室効果気体の下水処理場からの放出について, 第29回下水道研究発表会講演集, 821-823。
- 森山克美・高橋正宏・原田良誠・北村武之(1992)硝化・内生脱窒法における脱窒反応速度に関する研究, 下水道協会誌論文集, 29: 65-73。
- 陽捷行(1988)農業水域からの $N_2O$ フラックスと溶存 $N_2O$ の変動, 環境情報化学, 17(1): 53-56。
- 陽捷行(1990)土壌生態系のガス代謝に関する研究, 土肥誌, 61: 227-230。
- 陽捷行(1991)土壌生態系のガス代謝と地球環境1 総論, 土肥誌, 62: 445-450。
- 陽捷行・大西将・福士定雄(1983)土壌中の硝酸化の過程で発生する $N_2O$ , 土肥誌, 54: 277-280。
- 陽捷行・福士定雄(1983)ECD付ガスクロマトグラフによる $N_2O$ の微量定量法, 土肥誌, 54: 427-428。
- 森山克美・高橋正宏・原田良誠・北村武之(1992)硝化・内生脱窒法における脱窒反応速度に関する研究, 下水道協会誌論文集, 29: 65-73。

- 山田登志夫・宗宮功・津野洋 (1993) 好気性脱窒能を有する細菌の検索とその生理特性に関する研究, 下水道協会誌論文集, 30: 118-129.
- 山本豊 (1995) C/N比と完全硝化時の活性汚泥解体との関係, 用水と廃水, 37: 368-375.
- 楊宗興 (1993) 生態システムの特徴と温室効果ガス代謝—陸上生態系からの $N_2O$ ,  $CH_4$ 放出現象と微生物生態—, *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology*, 8: 133-140.
- 楊宗興・陽捷行 (1991) 土壌生態系のガス代謝と地球環境 3 土壌からの亜酸化窒素発生, 土肥誌, 62: 654-661.
- 渡辺征夫・手塚和人・松澤裕・井上雄三・大迫政浩・田中勝 (1994) 高負荷型し尿処理施設から排出される亜酸化窒素, 大気汚染学会誌, 29: 225-233.

- Abeling, U. & C.F. Seyfried (1992) Anaerobic-aerobic treatment of high-strength ammonium wastewater—Nitrogen removal via nitrite. *Wat. Sci. Tech.*, 26(5-6): 1007-1015.
- Abeliovich, A. & A. Vonshak (1992) Anaerobic metabolism of *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.*, 158: 267-270.
- Abufayed, A.A. & E.D. Schroeder (1986) Kinetics and stoichiometry of SBR/denitrification with a primary sludge carbon source. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 58: 398-405.
- Akunna, J.C., C. Bizeau & R. Moletta (1993) Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources: glucose, glycerol, acetic acid, lactic acid and methanol. *Wat. Res.*, 27: 1303-1312.
- Alefunder, P.R. & S.J. Ferguson (1982) Electron transport-linked nitrous oxide synthesis and reduction by *Paracoccus denitrificans* monitored with an electrode. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 104: 1149-1155.
- Alefunder, P.R., A.J. Greenfield, J.E.G. McCarthy & S.J. Ferguson (1983) Selection and organisation of denitrifying electron-transfer pathways in *Paracoccus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta*, 724: 20-39.
- Alleman, J.E. & R.L. Irvine (1980) Storage-induced denitrification using sequencing batch reactor operation. *Wat. Res.*, 14: 1483-1488.
- Allison, S.M. & J.I. Prosser (1993) Ammonia oxidation at low pH by attached populations of nitrifying bacteria. *Soil Biol. Biochem.*, 25: 935-941.
- Almeida, J.S., S.M. Júlio, M.A.M. Reis & M.J.T. Carrondo (1995a) Nitrite inhibition of denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnol. Bioeng.*, 46: 194-201.
- Almeida, J.S., M.A.M. Reis & M.J.T. Carrondo (1995b) Competition between nitrate and nitrite reduction in denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnol. Bioeng.*, 46: 476-484.
- Anderson, I.C. & J.S. Levine (1986) Relative rates of nitric oxide and nitrous oxide production by nitrifiers, denitrifiers, and nitrate respirers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 938-945.
- Anderson, I.C., M. Poth, J. Homstead & D. Burdige (1993) A comparison of  $NO$  and  $N_2O$  production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3525-3533.
- Arah, J.R., I.J. Crichton & K.A. Smith (1993) Denitrification measured directly using a single-inlet mass spectrometer and by acetylene inhibition. *Soil Biol. Biochem.*, 25: 233-238.
- Arts, P.A.M., L.A. Robertson & J.G. Kuenen (1995) Nitrification and denitrification by *Thiosphaera pantotropha* in aerobic chemostat cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 18: 305-316.
- Aulakh, M.S., D.A. Rennie & E.A. Paul (1984a) Gaseous nitrogen losses from soils under zero-till as compared with conventional-till management systems. *J. Environ. Qual.*, 13: 130-136.

- Aulakh, M.S., D.A. Rennie & E.A. Paul (1984b) Acetylene and N<sub>2</sub>O emissions from NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> treated soils under aerobic and anaerobic conditions. *Soil Biol. Biochem.*, **16**: 351-356.
- Balderston, W.L., B. Sherr & W.J. Payne (1976) Blockage by acetylene of nitrous oxide reduction in *Pseudomonas perfectomarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**: 504-508.
- Bandibas, J., A. Vermoesen, C.J. De Groot & O. Van Cleemput (1994) The effect of different moisture regimes and soil characteristics on nitrous oxide emission and consumption by different soils. *Soil Sci.*, **158**: 106-114.
- Bandow, H. (1992) Chemistry of nitrous oxide in the atmosphere. In *Proceedings of the 5th International workshop on Nitrous Oxide Emissions*, Tsuluba, Japan, pp. 13-16.
- Batchelor, B. & A.W. Lawrence (1978) Autotrophic denitrification using elemental sulfur. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **50**: 1986-2001.
- Baumann, B., M. Snozzi, A.J.B. Zehnder & J.R. van der Meer (1996) Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *J. Bacteriol.*, **178**: 4367-4374.
- Bazylnski, D.A., C.K. Soohoo & T.C. Hollocher (1986) Growth of *Pseudomonas aeruginosa* on nitrous oxide. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**: 1239-1246.
- Beccari, M., R. Passino, R. Ramadori & V. Tandori (1983) Kinetics of dissimilatory nitrate and nitrite reduction in suspended growth culture. *J. Wat. Pollu. Control Fed.*, **55**: 58-64.
- Berks, B.C., D. Baratta, D.J. Richardson & S.J. Ferguson (1993) Purification and characterization of a nitrous oxide reductase from *Thiosphaera pantotropha*. Implications for the mechanism of aerobic nitrous oxide reduction. *Eur. J. Biochem.*, **212**: 467-476.
- Betlach, M.R. & J.M. Tiedje (1981) Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**: 1074-1084.
- Blackmer, A.M. & J.M. Bremner (1976) Potential of soils as a sink for atmospheric nitrous oxide. *Geophys. Res. Lett.*, **3**: 739-742.
- Blackmer, A.M. & J.M. Bremner (1978) Inhibitory effect of nitrate on reduction of N<sub>2</sub>O to N<sub>2</sub> by soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.*, **10**: 187-191.
- Blackmer, A.M. & J.M. Bremner (1979) Stimulatory effect of nitrate on reduction of N<sub>2</sub>O to N<sub>2</sub> by soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.*, **11**: 313-315.
- Blackmer, A.M., J.M. Bremner & E.L. Schmidt (1980) Production of nitrous oxide by ammonium-oxidizing chemoautotrophic microorganisms in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**: 1060-1066.
- Blackmer, A.M., S.G. Robbins & J.M. Bremner (1982) Diurnal variability in rate of emission of nitrous oxide from soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **46**: 937-942.
- Blaszczyk, M. (1993) Effect of medium composition on the denitrification of nitrate by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 3951-3953.
- Bleakley, B.H. & J.M. Tiedje (1982) Nitrous oxide production by organisms other than nitrifiers and denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**: 1342-1348.
- Bock, E., I. Schmidt, R. Stüven & D. Zart (1995) Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch. Microbiol.*, **163**: 16-20.
- Bock, E., P.A. Wilderer & A. Freitag (1988) Growth of *Nitrobacter* in the absence of dissolved oxygen. *Wat. Res.*, **22**: 245-250.
- Bollag, J.-M. & N.M. Henninger (1978) Effects of nitrite toxicity on soil bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Soil Biol. Biochem.*, **10**: 377-381.
- Bollag, J.-M. & G. Tung (1972) Nitrous oxide release by soil fungi. *Soil Biol. Biochem.*, **4**: 271-276.
- Bonin, P. (1996) Anaerobic nitrate reduction to ammonium in two strains isolated from coastal marine sediment: A dissimilatory pathway. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **19**: 27-38.
- Bonin, P., M. Gilewicz & J.C. Bertrand (1989) Effects of oxygen on each step of denitrification on *Pseudomonas nautica*. *Can. J. Microbiol.*, **35**: 1061-1064.
- Bouwman, A.F. (1994) Estimated global source distribution of nitrous oxide. In *CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O: Global Emissions and Controls from Rice Fields and Other Agricultural and Industrial Sources*, pp. 147-159. NIAES.
- Bowden, W.B., W.H. McDowell, C.E. Asbury & A.M. Finley (1992) Riparian nitrogen dynamics in two geomorphologically distinct rain forest watersheds: Nitrous oxide fluxes. *Biogeochem.*, **18**: 77-99.
- Braun, C. & W.G. Zumft (1991) Marker exchange of the structural genes for nitric oxide reductase blocks the denitrification pathway of *Pseudomonas stutzeri* at nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, **266**: 22785-22788.
- Breitenbeck, G.A. & J.M. Bremner (1986) Effects of various nitrogen fertilizers on emission of nitrous oxide from soils. *Biol. Fertil. Soils*, **2**: 195-199.
- Bremner, J.M. & A.M. Blackmer (1978) Nitrous oxide: Emission from soils during nitrification of fertilizer nitrogen. *Science*, **199**: 295-296.
- Bremner, J.M. & A.M. Blackmer (1979) Effects of acetylene and soil water content on emission of nitrous oxide from soils. *Nature*, **280**: 380-381.
- Bremner, J.M., A.M. Blackmer & S.A. Waring (1980) Formation of nitrous oxide and dinitrogen by chemical decomposition of hydroxylamine in soils. *Soil Biol. Biochem.*, **12**: 263-269.
- Bremner, J.M. & A.P. Edwards (1965) Determination and isotope ratio analysis of different forms of nitrogen in soils: I. Apparatus and procedure for distillation and determination of ammonium. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **29**: 504-507.

- Bremner, J.M. & D.R. Keeney (1966) Determination and isotope ratio analysis of different forms of nitrogen in soils: 3. Exchangeable ammonium, nitrate, and nitrite by extraction-distillation methods. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **30**: 577-582.
- Bremner, J.M., S.G. Robbins & A.M. Blackmer (1980) Seasonal variability in emission of nitrous oxide from soil. *Geophys. Res. Lett.*, **7**: 641-644.
- Bremner, J.M. & K. Shaw (1958a) Denitrification in soil I. Methods of investigation. *J. Agric. Sci.*, **51**: 22-39.
- Bremner, J.M. & K. Shaw (1958b) Denitrification in soil II. Factors affecting denitrification. *J. Agric. Sci.*, **51**: 40-52.
- Brettar, I. & M.G. Höfle (1993) Nitrous oxide producing heterotrophic bacteria from the water column of the central Baltic: Abundance and molecular identification. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **94**: 253-265.
- Brettar, I. & G. Rheinheimer (1992) Influence of carbon availability on denitrification in the central Baltic Sea. *Limnol. Oceanogr.*, **37**: 1146-1163.
- Burford, J.R. & J.M. Bremner (1975) Relationships between the denitrification capacities of soils and total, water-soluble and readily decomposable soil organic matter. *Soil Biol. Biochem.*, **7**: 389-394.
- Burton, C.H., R.W. Sneath & J.W. Farrent (1993) Emissions of nitrogen oxide gases during aerobic treatment of animal slurries. *Biore. Tech.*, **45**: 233-235.
- Carley, B.N. & D.S. Mavinic (1991) The effects of external carbon loading on nitrification and denitrification of a high-ammonia landfill leachate. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **63**: 51-59.
- Castignetti, D. & T.C. Hollocher (1984) Heterotrophic nitrification among denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**: 620-623.
- Castro, M.S., P.A. Steudler, J.M. Melillo, J.D. Aber & S. Millham (1993) Exchange of N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> between the atmosphere and soils in spruce-fir forests in the northeastern United States. *Biogeochem.*, **18**: 119-135.
- Cates Jr, R.L. & D.R. Keeney (1987) Nitrous oxide production throughout the year from fertilized and manured maize fields. *J. Environ. Qual.*, **16**: 443-447.
- Cheng, H.H. & J.M. Bremner (1966) Determination and isotope ratio analysis of different forms of nitrogen in soils: 2. A Simplified procedure for isotope-ratio analysis of soil nitrogen. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **30**: 450-453.
- Cho, C.M. & J.G. Mills (1979) Kinetic formulation of the denitrification process in soil. *Can. J. Soil Sci.*, **59**: 249-257.
- Christensen, S. (1983a) Nitrous oxide emission from the soil surface: Continuous measurement by gas chromatography. *Soil Biol. Biochem.*, **15**: 481-483.
- Christensen, S. (1983b) Nitrous oxide emission from a soil under permanent grass: Seasonal and diurnal fluctuations as influenced by manuring and fertilization. *Soil Biol. Biochem.*, **15**: 531-536.
- Christensen, S. (1985) Denitrification in an acid soil: Effects of slurry and potassium nitrate on the evolution of nitrous oxide and on nitrate-reducing bacteria. *Soil Biol. Biochem.*, **17**: 757-764.
- Cicerone, R.J., J.D. Shetter & S.C. Liu (1978) Nitrous oxide in Michigan waters and in U.S. municipal waters. *Geophys. Res. Lett.*, **5**: 173-176.
- Colbourn, P. & I.W. Harper (1987) Denitrification in drained and undrained arable clay soil. *J. Soil Sci.*, **38**: 531-539.
- Cole, J.A. (1990) Physiology, biochemistry and genetics of nitrate dissimilation to ammonia. In N.P. Revsbech & J. Sørensen (eds.) *Denitrification in Soil and Sediments*. pp. 57-76. Plenum Press, New York.
- Conrad, R. (1996) Metabolism of nitric oxide in soil and soil microorganisms and regulation of flux into the atmosphere. In J.C. Murrell & D.P. Kelly (eds.) *NATO ASI Series, Vol. 139 Microbiology of atmospheric trace gases*, pp. 167-203, Springer-Verlag, Berlin.
- Conrad, R., W. Seiler & G. Bunse (1983) Factors influencing the loss of fertilizer nitrogen into the atmosphere as N<sub>2</sub>O. *J. Geophys. Res.*, **88**: 6709-6718.
- Craswell, E.T., B.H. Byrnes, L.S. Holt, E.R. Austin, I.R.P. Fillery & W.M. Strong (1985) Nitrogen-15 determination of nonrandomly distributed dinitrogen in air. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **49**: 664-668.
- Czepiel, P., P. Crill & R. Harriss (1995) Nitrous oxide emissions from municipal wastewater treatment. *Environ. Sci. Tech.*, **29**: 2352-2356.
- Czepiel, P., E. Douglas, R. Harriss & P. Crill (1996) Measurements of N<sub>2</sub>O from composted organic wastes. *Environ. Sci. Tech.*, **30**: 2519-2525.
- Davidson, E.A. (1992) Sources of nitric oxide and nitrous oxide following wetting of dry soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **56**: 95-102.
- Davidson, E.A., P.A. Matson, P.M. Vitousek, R. Riley, K. Dunkin, G. García-Méndez & J.M. Maass (1993) Processes regulating soil emissions of NO and N<sub>2</sub>O in a seasonally dry tropical forest. *Ecology*, **74**: 130-139.
- Davidson, E.A. & W.T. Swank (1986) Environmental parameters regulating gaseous nitrogen losses from two forested ecosystems via nitrification and denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**: 1287-1292.
- Davidson, E.A., W.T. Swank & T.O. Perry (1986) Distinguishing between nitrification and denitrification as sources of gaseous nitrogen production in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**: 1280-1286.
- Davies, K.J.P., D. Lloyd & L. Boddy (1989) The effect of oxygen on denitrification by *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.*, **135**: 2445-2451.
- de Boer, W., P.J.A. K. Gunnewiek, M. Veenhuis, E. Bock & H.J. Laanbroek (1991) Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 3600-3604.

- Debruyn, W., M. Wevers & J. van Rensbergen (1987) The measurement of nitrous oxide emissions from sewage systems in Belgium. *Fertil. Res.*, **37**: 201-205.
- De Boer, W., P.J.A.K. Gunnewiek, S.R. Troelstra & H.J. Laanbroek (1989) Two types of chemolithotrophic nitrification in acid heathland humus. *Plant and Soil*, **119**: 229-235.
- De Groot, C.J., A. Vermoesen & O. van Cleemput (1994) Laboratory study of the emission of N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> from a calcareous soil. *Soil Sci.*, **158**: 355-364.
- De Laune, R.D. & C.J. Smith (1987) Simultaneous determination of nitrification and nitrate reduction in sediment-water columns by nitrate-15 dilution. *J. Environ. Qual.*, **16**: 227-230.
- Delwiche, C.C. (1978) Biological production and utilization of N<sub>2</sub>O. *Pageoph.*, **116**: 414-422.
- Delwiche, C.C. & B.A. Bryan (1976) Denitrification. *Ann. Rev. Microbiol.*, **30**: 241-262.
- Denmead, O.T., J.R. Freney & J.R. Simpson (1979a) Nitrous oxide emission during denitrification in a flooded field. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **43**: 716-718.
- Denmead, O.T., J.R. Freney & J.R. Simpson (1979b) Studies of nitrous oxide emission from a grass sward. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **43**: 726-728.
- Downes, M.T. (1988) Aquatic nitrogen transformations at low oxygen concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 172-175.
- Drury, C.F., D.J. McKenney & W.L. Findlay (1992) Nitric oxide and nitrous oxide production from soils: Water and oxygen effects. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **56**: 766-770.
- Duxbury, J.M., D.R. Bouldin, R.E. Terry & R.L. Tate III (1982) Emissions of nitrous oxide from soils. *Nature*, **298**: 462-464.
- Eaton, L.J. & D.G. Patriquin (1989) Denitrification in lowbush blueberry soils. *Can. J. Soil Sci.*, **69**: 303-312.
- Egginton, G.M. & K.A. Smith (1986) Nitrous oxide emission from a grassland soil fertilized with slurry and calcium nitrate. *J. Soil Sci.*, **37**: 59-67.
- Eilersen, A.M., M. Henze & L. Kløft (1994) Effect of volatile fatty acids and trimethylamine on nitrification in activated sludge. *Wat. Res.*, **28**: 1329-1336.
- Elkins, J.W. (1980) Determination of dissolved nitrous oxide in aquatic systems by gas chromatography using electron-capture detection and multiple phase equilibration. *Anal. Chem.*, **52**: 263-267.
- Eriksen, A.B. & L.H. Hartwig (1993) Emission spectrometry for direct measurement of nitrous oxide and dinitrogen from soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **57**: 738-742.
- Evans, D.G., E. Beauchamp & J.T. Trevors (1985) Sulfide alleviation of the acetylene inhibition of nitrous oxide reduction in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**: 217-220.
- Falcone, A.B., A.L. Shug & D.J.D. Nicholas (1963) Some properties of hydroxylamine oxidase from *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **77**: 199-208.
- Ferguson, S.J. (1987) Denitrification: A question of the control and organization of electron and ion transport. *Trends Biochem. Sci.*, **12**: 354-357.
- Ferguson, S.J. (1990) Denitrification and its control. *Antonie van Leeuwenhoek*, **66**: 89-110.
- Firestone, M.K. & E.A. Davidson (1989) Microbiological basis of NO and N<sub>2</sub>O production and consumption in soil. In M.O. Andreae & D.S. Schimel (eds.) *Exchange of Trace Gases between Terrestrial Ecosystems and the Atmosphere*, pp. 7-21, John Wiley & Sons Ltd.
- Firestone, M.K., R.B. Firestone & J.M. Tiedje (1980) Nitrous oxide from soil denitrification: Factors controlling its biological production. *Science*, **208**: 749-751.
- Firestone, M.K., M.S. Smith, R.B. Firestone & J.M. Tiedje (1979) The influence of nitrate, nitrite, and oxygen on the composition of the gaseous products of denitrification in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **43**: 1140-1144.
- Firestone, M.K. & J.M. Tiedje (1979) Temporal change in nitrous oxide and dinitrogen from denitrification following onset of anaerobiosis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**: 673-679.
- Focht, D.D. (1974) The effect of temperature, pH, and aeration on the production of nitrous oxide and gaseous nitrogen- A zero-order kinetic model. *Soil Sci.*, **118**: 173-179.
- Focht, D.D. & A.C. Chang (1975) Nitrification and denitrification processes related to waste water treatment. *Adv. Appl. Microbiol.*, **19**: 153-186.
- Focht, D.D., L.H. Stolzy & B.D. Meek (1979) Sequential reduction of nitrate and nitrous oxide under field conditions as brought about by organic amendments and irrigation management. *Soil Biol. Biochem.*, **11**: 37-46.
- Focht, D.D., N. Valoras & J. Letey (1980) Use of interfaced gas chromatography-mass spectrometry for detection of concurrent mineralization and denitrification in soil. *J. Environ. Qual.*, **9**: 218-222.
- Francis, C.W. & J.B. Mankin (1977) High nitrate denitrification in continuous flow-stirred reactors. *Wat. Res.*, **11**: 289-294.
- Freney, J.R., O.T. Denmead & J.R. Simpson (1978) Soil as a source or sink for atmospheric nitrous oxide. *Nature*, **273**: 530-532.
- Freney, J.R., O.T. Denmead & J.R. Simpson (1979) Nitrous oxide emission from soils at low moisture contents. *Soil Biol. Biochem.*, **11**: 167-173.
- Galsworthy, A.M. & J.R. Burford (1978) A system for measuring the rates of evolution of nitrous oxide and nitrogen from incubated soils during denitrification. *J. Soil Sci.*, **29**: 537-550.
- Garrido, J.M., J.L. Campos, R. Méndez & J.M. Lema (1997) Nitrous oxide production by nitrifying biofilms in a biofilm airlift suspension reactor. *Wat. Sci. Tech.*, **36**(1): 157-163.

- Gaskell, J.F., A.M. Blackmer & J.M. Bremner (1981) Comparison of effects of nitrate, nitrite, and nitric oxide on reduction of nitrous oxide to dinitrogen by soil microorganisms. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **45**: 1124-1127.
- Goodroad, L.L. & D.R. Keeney (1984a) Nitrous oxide emission from forest, marsh, and prairie ecosystems. *J. Environ. Qual.*, **13**: 448-452.
- Goodroad, L.L. & D.R. Keeney (1984b) Nitrous oxide production in aerobic soils under varying pH, temperature and water content. *Soil Biol. Biochem.*, **16**: 39-43.
- Goodroad, L.L. & D.R. Keeney (1985) Site of nitrous oxide production in field soils. *Biol. Fertil. Soils*, **1**: 3-7.
- Goodroad, L.L., D.R. Keeney & L.A. Peterson (1984) Nitrous oxide emissions from agricultural soils in Wisconsin. *J. Environ. Qual.*, **13**: 557-561.
- Goreau, T.J., W.A. Kaplan, S.C. Wofsy, M.B. McElroy, F.W. Valois & S.W. Watson (1980) Production of NO<sub>2</sub>- and N<sub>2</sub>O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**: 526-532.
- Gronszky, M.C., G. Demoulin & M. Newland (1997) Aerated denitrification in full-scale activated sludge facilities. *Wat. Sci. Tech.*, **35**(10): 103-110.
- Granli, T. & O.C. Bøckman (1994) Nitrous oxide from agriculture. *Norwegian J. Agric. Sci.*, Supplement No. 12.
- Grant, R.F., M. Nyborg & J.W. Laidlaw (1993a) Evolution of nitrous oxide from soil: I. Model development. *Soil Sci.*, **156**: 259-265.
- Grant, R.F., M. Nyborg & J.W. Laidlaw (1993b) Evolution of nitrous oxide from soil: II. Experimental results and model testing. *Soil Sci.*, **156**: 266-277.
- Greenberg, E.P. & G.E. Becker (1977) Nitrous oxide as end product of denitrification by strains of fluorescent pseudomonads. *Can. J. Microbiol.*, **23**: 903-907.
- Groeneweg, J., B. Sellner & W. Tappe (1994) Ammonia oxidation in *Nitrosomonas* at NH<sub>3</sub> concentrations near K<sub>m</sub>: Effects of pH and temperature. *Wat. Res.*, **12**: 2561-2566.
- Guenzi, W.D., W.E. Beard, F.S. Watanabe, S.R. Olsen & L.K. Porter (1978) Nitrification and denitrification in cattle manure-amended soil. *J. Environ. Qual.*, **7**: 196-202.
- Hanaki, K., Z. Hong & T. Matsuo (1992) Production of nitrous oxide gas during denitrification of wastewater. *Wat. Sci. Tech.*, **26**(5-6): 1027-1036.
- Hanaki, K., C. Wantawin & S. Ohgaki (1990a) Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor. *Wat. Res.*, **24**: 289-296.
- Hanaki, K., C. Wantawin & S. Ohgaki (1990b) Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Wat. Res.*, **24**: 297-302.
- Hansen, S., J.E. Mæhlum & L.R. Bakken (1993) N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> fluxes in soil influenced by fertilization and tractor traffic. *Soil Biol. Biochem.*, **25**: 621-630.
- Hardy, R.W.F. & E. Knight Jr. (1966) Reduction of N<sub>2</sub>O by biological N<sub>2</sub>-fixing systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**: 409-414.
- Hauck, R.D. (1982) Nitrogen- Isotope-ratio analysis. In *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties- Agronomy Monograph no. 9 (2nd edition)*, pp. 643-698.
- Hayatsu, M. (1993) The lowest limit of pH for nitrification in tea soil and isolation of an acidophilic ammonia oxidizing bacterium. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **39**: 219-226.
- Head, I.M., W.D. Hiorns, T.M. Embley, A.J. McCarthy & J.R. Saunders (1993) The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA sequences. *J. Gen. Microbiol.*, **139**: 1147-1153.
- Henze, M., G.H. Kristensen & R. Strube (1994) Rate-capacity characterization of wastewater for nutrient removal processes. *Wat. Sci. Tech.*, **29**(7): 101-107.
- Her, J.-J. & J.-S. Huang (1995) Influences of carbon source and C/N ratio on nitrate/nitrite denitrification and carbon breakthrough. *Bioresource Tech.*, **54**: 45-51.
- Hernandez, D. & J.J. Rowe (1987) Oxygen regulation of nitrate uptake in denitrifying *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 745-750.
- Hochstein, L.I. (1988) The enzymes associated with denitrification. *Ann. Rev. Microbiol.*, **42**: 231-261.
- Hockenbury, M.R. & C.P.L. Grady, Jr. (1977) Inhibition of nitrification- Effects of selected organic compounds. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **49**: 768-777.
- Hooper, A.B. (1968) A nitrite-reducing enzyme from *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **162**: 49-65.
- Hutchinson, G.L., W.D. Guenzi & G.P. Livingston (1993) Soil water controls on aerobic soil emission of gaseous nitrogen oxides. *Soil Biol. Biochem.*, **25**: 1-9.
- Hynes, R.K. & R. Knowles (1984) Production of nitrous oxide by *Nitrosomonas europaea*: Effects of acetylene, pH, and oxygen. *Can. J. Microbiol.*, **30**: 1397-1403.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) (1990) *Climate Change The IPCC Scientific Assessment*, Cambridge University Press.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) (1992) *Climate Change 1992 The Supplement Report to the IPCC Scientific Assessment*, Cambridge University Press.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) (1994) *Climate Change 1994 Radiative Forcing of Climate Change and an Evaluation of the IPCC IS92 Emission Scenarios*, Cambridge University Press.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) (1995) *Climate Change 1995 The Science of Climate Change*, Cambridge University Press.

- Isaacs, S.H., M. Henze, H. Sørenberg & M. Kümmel (1994) External carbon source addition as a means to control an activated sludge nutrient removal process. *Wat. Res.*, **28**: 511-520.
- Itokawa, H., K. Hanaki & T. Matsuo (1996) Nitros oxide emission during nitrification and denitrification in a full-scale night soil treatment plant. *Wat. Sci. Tech.*, **34**(1-2): 277-284.
- John, R.T. St & T.C. Hollocher (1977) Nitrogen 15 tracer studies on the pathway of denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, **252**: 212-218.
- Jones, R.D. & M.A. Hood (1980a) Interaction between an ammonium-oxidizer, *Nitrosomonas* sp., *Nocardia atlantica* and *Pseudomonas* sp.: A Note. *Microb. Ecol.*, **6**: 271-275.
- Jones, R.D. & M.A. Hood (1980b) Effects of temperature, pH, salinity, and inorganic nitrogen on the rate of ammonium oxidation by nitrifiers isolated from wetland environments. *Microb. Ecol.*, **6**: 339-347.
- Jørgensen, K.S., H.B. Jensen & J. Sørensen (1984) Nitrous oxide production from nitrification and denitrification in marine sediment at low oxygen concentrations. *Can. J. Microbiol.*, **30**: 1073-1078.
- Kaldorf, M., K.-H.L. von Berg, U. Meier, U. Servos & H. Bothe (1993) The reduction of nitrous oxide to dinitrogen by *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.*, **160**: 432-439.
- Kaplan, W.A., J.W. Elkins, C.E. Kolb, M.B. McElroy, S.C. Wofsy & A.P. Durán (1978) Nitrous oxide in fresh water systems: An estimate for the yield of atmospheric N<sub>2</sub>O associated with disposal of human waste. *Pageoph.*, **116**: 423-438.
- Kaspar, H.F. & J.M. Tiedje (1980) Response of electron-capture detector to hydrogen, oxygen, nitrogen, carbon dioxide, nitric oxide and nitrous oxide. *J. Chromatogr.*, **193**: 142-147.
- Kaspar, H.F. & J.M. Tiedje (1981) Denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in digested sludge. *Can. J. Microbiol.*, **27**: 878-885.
- Kawashima, H., M.J. Bazin & J.M. Lynch (1996) Global N<sub>2</sub>O balance and nitrogen fertilizer. *Ecol. Modelling.*, **87**: 51-57.
- Keeney, D.R., I.R. Fillery & G.P. Marx (1979) Effect of temperature on the gaseous nitrogen products of denitrification in a silt loam soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **43**: 1124-1128.
- Keeney, D.R. & D.W. Nelson (1982) Nitrogen- Inorganic forms. In *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties- Agronomy Monograph no. 9 (2nd edition)*, pp. 643-698.
- Keller, M., W.A. Kaplan, S.C. Wofsy & J.M. Da Costa (1988) Emissions of N<sub>2</sub>O from tropical forest soils: response to fertilization with NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. *J. Geophys. Res.*, **93**: 1600-1604.
- Khalil, M.A. & R.A. Rasmussen (1992) The global sources of nitrous oxide. *J. Geophys. Res.*, **97**: 14,651-14,660.
- Klemetsson, L., G. Hansson & A. Mosier (1990) The use of acetylene for the quantification of N<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O production from biological processes in soil. In N.P. Revsbech & J. Sørensen (eds.) *Denitrification in Soil and Sediments*. pp. 167-180. Plenum Press, New York.
- Klemetsson, L., B.H. Svensson & T. Rosswall (1988a) A method of selective inhibition to distinguishing between nitrification and denitrification as sources of nitrous oxide in soil. *Biol. Fertil. Soils*, **6**: 112-119.
- Klemetsson, L., B.H. Svensson & T. Rosswall (1988b) Relationships between soil moisture content and nitrous oxide production during nitrification and denitrification. *Biol. Fertil. Soils*, **6**: 106-111.
- Klingensmith, K.M. & V. Alexander (1983) Sediment nitrification, denitrification, and nitrous oxide production in a deep arctic lake. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 1084-1092.
- Knowles, R. (1982) Denitrification. *Microbiol. Rev.*, **46**: 43-70.
- Knowles, R. (1993) Interactions between the nitrogen and methane cycles. In R. Guerrero & C. Pedrós-Alliό (eds.) *Trends in Microbial Ecology*, pp. 445-448, Spanish Society for Microbiology.
- Koike, I. & A. Hattori (1975) Energy yield of denitrification: An estimate from growth yield in continuous cultures of *Pseudomonas denitrificans* under nitrate-, nitrite- and nitrous oxide-limited conditions. *J. Gen. Microbiol.*, **88**: 11-19.
- Kornaros, M., C. Zafiri & G. Lyberatos (1996) Kinetics of denitrification by *Pseudomonas denitrificans* under growth conditions limited by carbon and/or nitrate or nitrite. *Wat. Environ. Res.*, **68**: 934-945.
- Koskinen, W.C. & D.R. Keeney (1982) Effect of pH on the rate of gaseous products of denitrification in a silt loam soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **46**: 1165-1167.
- Kroeckel, L. & H. Stolp (1985) Influence of oxygen on denitrification and aerobic respiration of soil. *Biol. Fertil. Soils*, **1**: 189-193.
- Kroneck, P.M.H. & W.G. Zumft (1990) Bio-inorganic aspects of denitrification: Structures and reactions of N<sub>x</sub>O<sub>y</sub> compounds and their interaction with iron and copper proteins. In N.P. Revsbech & J. Sørensen (eds.) *Denitrification in Soil and Sediments*. pp. 1-20. Plenum Press, New York.
- Krul, J.M. & R. Veenigen (1977) The synthesis of the dissimilatory nitrate reductase under aerobic conditions in a number of denitrifying bacteria, isolated from activated sludge and drinking water. *Wat. Res.*, **11**: 39-43.
- Kuenen, J.G. & L.A. Robertson (1988) Ecology of nitrification and denitrification. In J.A. Cole & S.J. Ferguson (eds.) *The Nitrogen and Sulphur Cycles*, pp. 161-218, Cambridge University Press, Cambridge.
- Kuenen, J.G. & L.A. Robertson (1993) Interactions among bacteria metabolizing inorganic nitrogen compounds. In R. Guerrero & C. Pedrós-Alliό (eds.) *Trends in Microbial Ecology*, pp. 289-294, Spanish Society for Microbiology.

- Kuenen, J.G. & L.A. Robertson (1994) Combined nitrification-denitrification processes. *FEMS Microbiol. Rev.*, **15**: 109-117.
- Law, C.S., A.P. Rees & N.J.P. Owens (1993) Nitrous oxide production by estuarine epiphyton. *Limnol. Oceanogr.*, **38**: 435-441.
- Lees, H. & J.R. Simpson (1957) The biochemistry of the nitrifying organisms 5. Nitrite oxidation by *Nitrobacter*. *Biochem. J.*, **65**: 297-305.
- Letej, J., N. Valoras, D.D. Focht & J.C. Ryden (1981) Nitrous oxide production and reduction during denitrification as affected by redox potential. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **45**: 727-730.
- Letej, J., N. Valoras, A. Hadas & D.D. Focht (1980) Effect of air-filled porosity, nitrate concentration, and time on the ratio of N<sub>2</sub>O/N<sub>2</sub> evolution during denitrification. *J. Environ. Qual.*, **9**: 227-231.
- Levine, J.S. (1992) The global atmospheric budget of nitrous oxide. In *Proceedings of the 5th International workshop on Nitrous Oxide Emissions*, Tsuluba, Japan, pp. 1-9.
- Lipschultz, F., O.C. Zafiriou, S.C. Wofsy, M.B. McElroy, F.W. Valois & S.W. Watson (1981) Production of NO and N<sub>2</sub>O by soil nitrifying bacteria. *Nature*, **294**: 641-643.
- Livingston, G.P., P.M. Vitousek & P.A. Matson (1988) Nitrous oxide flux and nitrogen transformations across a landscape gradient in Amazonia. *J. Geophys. Res.*, **93**: 1593-1599.
- Lloyd, D., L. Boddy & K.J.P. Davies (1987) Persistence of bacterial denitrification capacity under aerobic conditions: The rule rather than the exception. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **45**: 185-190.
- Lofffield, N.S., R. Brumme & F. Beese (1992) Automated monitoring of nitrous oxide and carbon dioxide flux from forest soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **56**: 1147-1150.
- Mahne, I. & J.M. Tiedje (1995) Criteria and methodology for identifying redipiratory denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 1110-1115.
- Malhi, S.S., W.B. McGill & M. Nyborg (1990) Nitrate losses in soils: Effect of temperature, moisture and substrate concentration. *Soil Biol. Biochem.*, **22**: 733-737.
- Martikainen, P.J. (1985) Nitrous oxide emission associated with autotrophic ammonium oxidation in acid coniferous forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**: 1519-1525.
- Martikainen, P.J. & W. De Boer (1993) Nitrous oxide production and nitrification in acidic soil from a Dutch coniferous forest. *Soil Biol. Biochem.*, **25**: 343-347.
- Masscheleyn, P.H., R.D. DeLaune & W.H. Patrick Jr. (1993) Methane and nitrous oxide emissions from laboratory measurements of rice soil suspension: Effect of soil oxidation-reduction status. *Chemosphere*, **26**: 251-260.
- Matson, P.A., S.T. Gower, C. Volkman, C. Billow & C.C. Grier (1992) Soil nitrogen cycling and nitrous oxide flux in a Rocky Mountain Douglas-fir forest: Effects of fertilization, irrigation and carbon addition. *Biogeochem.*, **18**: 101-117.
- McKeneey, D.J., C.F. Drury, W.I. Findlay, B. Mutus, T. McDonnell & C. Gajda (1994) Kinetics of denitrification by *Pseudomonas fluorescens*: Oxygen effects. *Soil Biol. Biochem.*, **26**: 901-908.
- Meineke, M., E. Bock, D. Kastrau & P.M.H. Kroneck (1992) Nitrite oxidoreductase from *Nitrobacter hamburgensis*: Redox centers and their catalytic role. *Arch. Microbiol.*, **158**: 127-131.
- Miller, L.G., R.S. Oremland & S. Paulsen (1986) Measurement of nitrous oxide reductase activity in aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**: 18-24.
- Minami, K. (1994) Effect of nitrification inhibitors and slow-release fertilizer on emission of nitrous oxide from fertilized soils. In *CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O: Global Emissions and Controls from Rice Fields and Other Agricultural and Industrial Sources*, pp. 187-196, NIAES.
- Minami, K. & S. Fukushi (1983) Effects of phosphate and calcium carbonate application on emission of N<sub>2</sub>O from soils under aerobic conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **29**: 517-524.
- Minami, K. & S. Fukushi (1984) Methods for measuring N<sub>2</sub>O flux from water surface and N<sub>2</sub>O dissolved in water from agricultural land. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **30**: 495-502.
- Minami, K. & S. Fukushi (1986) Emission of nitrous oxide from a well-aerated andosol treated with nitrite and hydroxylamine. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **32**: 233-237.
- Moore, S.F. & E.D. Schroeder (1971) The effect of nitrate feed rate on denitrification. *Wat. Res.*, **5**: 445-452.
- Moraghan, J.T. & R. Buresh (1977) Correction for dissolved nitrous oxide in nitrogen studies. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **41**: 1201-1202.
- Moritomi, H. (1994) N<sub>2</sub>O emission from industrial facilities. In *CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O: Global Emissions and Controls from Rice Fields and Other Agricultural and Industrial Sources*, pp. 161-179, NIAES.
- Mosier, A.R. (1994a) Nitrous oxide emissions from agricultural soils. *Fertil. Res.*, **37**: 191-200.
- Mosier, A.R. (1994b) Nitrous oxide summary. In *CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O: Global Emissions and Controls from Rice Fields and Other Agricultural and Industrial Sources*, NIAES, pp. 135-139.
- Mosier, A.R., K.F. Bronson, J.R. Freney & D.G. Keerthisinghe (1994) Use of nitrification inhibitors to reduce nitrous oxide emission from urea fertilized soils. In *CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O: Global Emissions and Controls from Rice Fields and Other Agricultural and Industrial Sources*, pp. 197-207, NIAES.
- Mosier, A.R., S.K. Mohanty, A. Bhadrachalam & S.P. Chakravorti (1990) Evolution of dinitrogen and nitrous oxide from the soil to the atmosphere through rice plants. *Biol. Fertil. Soils*, **9**: 61-67.
- Mulder, A., A.A. van de Graaf, L.A. Robertson & J.G. Kuenen (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **16**: 177-184.

- Mulvaney, R.L. & L.T. Kurtz (1982) A new method for determination of  $^{15}\text{N}$ -labeled nitrous oxide. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **46**: 1178-1184.
- Mulvaney, R.L. & L.T. Kurtz (1984) Evolution of denitrogen and nitrous oxide from nitrogen- $^{15}$  fertilized soil cores subjected to wetting and drying cycles. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **48**: 596-602.
- Murakami, T., N. Owa & K. Kumazawa (1987) The effects of soil conditions and nitrogen form on  $\text{N}_2\text{O}$  evolution by denitrification. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **33**: 35-42.
- Muzio, L.J. & J.C. Kramlich (1988) An artifact in the measurement of  $\text{N}_2\text{O}$  from combustion sources. *Geophys. Res. Lett.*, **15**: 1369-1372.
- Myers, R.J. (1975) Temperature effects on ammonification and nitrification in a tropical soil. *Soil Biol. Biochem.*, **7**: 83-86.
- Myrold, D.D. (1990) Measuring denitrification in soils using  $^{15}\text{N}$  techniques. In N.P. Revsbech & J. Sørensen (eds.) *Denitrification in Soil and Sediments*. pp. 181-198. Plenum Press, New York.
- Myrold, D.D. & J.M. Tiedje (1985) Establishment of denitrification capacity in soil: Effects of carbon, nitrate and moisture. *Soil Biol. Biochem.*, **17**: 819-822.
- Myrold, D.D. & J.M. Tiedje (1986) Simultaneous estimation of several nitrogen cycle rates using  $^{15}\text{N}$ : Theory and application. *Soil Biol. Biochem.*, **18**: 559-568.
- Nagashima, M., S. Noguchi & T. Suzuki (1981a) Acclimation of sludge for efficient removal of nitrogen from fermentation wastewater. *J. Ferment. Tech.*, **59**: 49-53.
- Nagashima, M., S. Noguchi & T. Suzuki (1981b) Operational conditions eliminating the evolution of nitrous oxide in a denitrification process. *J. Ferment. Tech.*, **59**: 55-58.
- Nakajima, M., T. Hayamizu & H. Nishimura (1984a) Effect of oxygen concentration on the rates of denitrification and denitrification in the sediments of an eutrophic lake. *Wat. Res.*, **18**: 335-338.
- Nakajima, M., T. Hayamizu & H. Nishimura (1984b) Inhibitory effect of oxygen on denitrification and denitrification in sludge from an oxidation ditch. *Wat. Res.*, **18**: 339-343.
- Narkis, N., M. Rebhun & C. Sheindorf (1979) Denitrification at various carbon to nitrogen ratios. *Wat. Res.*, **13**: 93-98.
- Neal, J.L., G.C. Allen, R.D. Morse & D.D. Wolf (1983) Anaerobic nitrate-dependent chemolithotrophic growth by *Rhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.*, **29**: 316-320.
- Nurse, G.R. (1980) Denitrification with methanol: Microbiology and biochemistry. *Wat. Res.*, **14**: 531-537.
- Nägele, W. & R. Conrad (1990a) Influence of pH on the release of NO and  $\text{N}_2\text{O}$  from fertilized and unfertilized soil. *Biol. Fertil. Soils*, **10**: 139-144.
- Nägele, W. & R. Conrad (1990b) Influence of soil pH on the nitrate-reducing microbial populations and their potential to reduce nitrate to NO and  $\text{N}_2\text{O}$ . *FEMS Microbiol. Ecol.*, **74**: 49-58.
- Nömmik, H. (1956) Investigations on denitrification in soil. *Acta Agriculturae Scandinavica*, **6**: 195-228.
- Nömmik, H., D.J. Pluth & J. Melin (1984) Dissimilatory reduction of  $^{15}\text{N}$ -labeled nitrate in the presence of nonlabeled NO or  $\text{N}_2\text{O}$ . *Can. J. Soil Sci.*, **64**: 21-29.
- Orso, S., M. Gouy, E. Navarro & P. Normand (1994) Molecular phylogenetic analysis of *Nitrobacter* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**: 83-86.
- Osada, T., K. Kuroda & M. Yonaga (1995) Reducing nitrous oxide gas emissions from fill-and-draw type activated sludge process. *Wat. Res.*, **29**: 1607-1608.
- Otte, S., N.G. Grobden, L.A. Robertson, M.S.M. Jetten & J.G. Kuenen (1996) Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 2421-2426.
- Painter, H.A. (1970) A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms. *Wat. Res.*, **4**: 393-450.
- Papen, H., R. von Berg, I. Hinkel, B. Thoene & H. Rennenberg (1989) Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis*:  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ , and NO production in exponentially growing cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 2068-2072.
- Parkin, T.B., A.J. Sexstone & J.M. Tiedje (1985) Adaptation of denitrifying populations to low soil pH. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**: 1053-1056.
- Parkin, T.B. & J.M. Tiedje (1984) Application of a soil core method to investigate the effect of oxygen concentration on denitrification. *Soil Biol. Biochem.*, **16**: 331-334.
- Parsons, W.F., M.E. Mitre, M. Keller & W.A. Reiners (1993) Nitrate limitation of  $\text{N}_2\text{O}$  production and denitrification from tropical pasture and rain forest soils. *Biogeochem.*, **22**: 179-193.
- Paul, J.W., E.G. Beauchamp & X. Zhang (1993) Nitrous and nitric oxide emissions during nitrification and denitrification from manure-amended soil in the laboratory. *Can. J. Soil Sci.*, **73**: 539-553.
- Payne, W.J. (1973) Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriol. Rev.*, **37**: 409-452.
- Plaza, E., B. Hultman & J. Trela (1990) Effect of easily degradable carbon sources on nitrogen removal efficiency. *Wat. Sci. Tech.*, **22**(7/8): 281-282.
- Poth, M. & D.D. Focht (1985)  $^{15}\text{N}$  kinetic analysis of  $\text{N}_2\text{O}$  production by *Nitrosomonas europaea*: An examination of nitrifier denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**: 1134-1141.
- Prakasam, T.B.S. & R.C. Loehr (1972) Microbial nitrification and denitrification in concentrated wastes. *Wat. Res.*, **6**: 859-869.

- Prosser, J.I. (1989) Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.*, **30**: 125-181.
- Rasmussen, R.A. & D. Pierotti (1978) Global and regional N<sub>2</sub>O measurements. *Pageoph.*, **116**: 405-413.
- Reimer, R.A. & C.S. Slaten (1992) Abatement of N<sub>2</sub>O emission produced in adipic acid. In *Proceedings of the 5th International workshop on Nitrous Oxide Emissions*, Tsuluba, Japan, pp. 427-436.
- Remde, A. & R. Conrad (1991) Role of nitrification and denitrification for NO metabolism in soil. *Biogeochem.*, **12**: 189-205.
- Ritchie, G.A.F. & D.J.D. Nicholas (1972) Identification of the sources of nitrous oxide produced by oxidative and reductive processes in *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. J.*, **126**: 1181-1191.
- Robertson, G.P. & J.M. Tiedje (1984) Denitrification and nitrous oxide production in successional and old-growth Michigan forests. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **48**: 383-389.
- Robertson, G.P. & J.M. Tiedje (1987) Nitrous oxide sources in aerobic soils: Nitrification, denitrification and other biological processes. *Soil Biol. Biochem.*, **19**: 187-193.
- Robertson, L.A., R. Cornelisse, P. de Vos, R. Hadjoetomo & J.G. Kuenen (1989) Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. *Antonie van Leeuwenhoek*, **56**: 289-299.
- Robertson, L.A., T. Dalsgaard, N.-P. Revsbech & J.G. Kuenen (1995) Confirmation of 'aerobic denitrification' in batch cultures, using gas chromatography and <sup>15</sup>N mass spectrometry. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **18**: 113-120.
- Robertson, L.A. & J.G. Kuenen (1984) Aerobic denitrification- Old wine in new bottles?. *Antonie van Leeuwenhoek*, **50**: 525-544.
- Robertson, L.A. & J.G. Kuenen (1990a) Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropa* and other bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **57**: 139-152.
- Robertson, L.A. & J.G. Kuenen (1990b) Physiological and ecological aspects of aerobic denitrification, a link with heterotrophic nitrification?. In N.P. Revsbech & J. Sørensen (eds.) *Denitrification in Soil and Sediment*, pp. 91-104, Plenum Press, New York.
- Ronen, D., M. Magaritz & E. Almon (1988) Contaminated aquifers are a forgotten component of the global N<sub>2</sub>O budget. *Nature*, **335**: 57-59.
- Roy, R. & R. Knowles (1994) Effects of methane metabolism on nitrification and nitrous oxide production in polluted freshwater sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 3307-3314.
- Ryden, J.G., L.J. Lund & D.D. Focht (1979) Direct measurement of denitrification loss from soils: I. Laboratory evaluation of acetylene inhibition of nitrous oxide reduction. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **43**: 104-110.
- Sahrawat, K.L. & D.R. Keeney (1986) Nitrous oxide emission from soils. *Adv. Soil Sci.*, **4**: 103-148.
- Samson, M.I., R.J. Buresh & S.K. De Datta (1990) Evolution and soil entrapment of nitrogen gases formed by denitrification in flooded soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **36**: 299-307.
- Samuelsson, M.-O. (1985) Dissimilatory nitrate reduction to nitrite, nitrous oxide, and ammonium by *Pseudomonas putrefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**: 812-815.
- Schimel, J.P., M.K. Firestone & K.S. Killham (1984) Identification of heterotrophic nitrification in a sierran forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**: 802-806.
- Schipper, L.A., A.B. Cooper, C.G. Harfoot & W.J. Dyck (1993) Regulators of denitrification in an organic riparian soil. *Soil Biol. Biochem.*, **25**: 925-933.
- Schuster, M. & R. Conrad (1992) Metabolism of nitric oxide and nitrous oxide during nitrification and denitrification in soil at different incubation conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **101**: 133-143.
- Seada, M.N.I.A. & J.C.G. Ottow (1985) Effect of increasing oxygen concentration on total denitrification and nitrous oxide release from soil by different bacteria. *Biol. Fertil. Soil*, **1**: 31-38.
- Seitzinger, S.P. (1990) Denitrification in aquatic sediments. In N.P. Revsbech & J. Sørensen (eds.) *Denitrification in Soil and Sediment*, pp. 301-322, Plenum Press, New York.
- Seitzinger, S.P., S.W. Nixon & M.E.Q. Pilson (1984) Denitrification and nitrous oxide production in a coastal marine ecosystem. *Limnol. Oceanogr.*, **29**: 73-83.
- Seitzinger, S.P., M.E.Q. Pilson & S.W. Nixon (1983) Nitrous oxide production in nearshore marine sediments. *Science*, **222**: 1244-1246.
- Sherlock, R.R. & K.M. Goh (1983) Initial emission of nitrous oxide from sheep urine applied to pastured soil. *Soil Biol. Biochem.*, **15**: 615-617.
- Sidransky, E., B. Walter & T.C. Hollocher (1978) Studies on the differential inhibition by azide on the nitrite/nitrous oxide level of denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**: 247-250.
- Sijbesma, W.F.H., J.S. Almeida, M.A.M. Reis & H. Santos (1996) Uncoupling effect of nitrite during denitrification by *Pseudomonas fluorescens*: An in vivo <sup>31</sup>P-NMR study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **221**: 176-182.
- Simarmata, T., G. Benckiser & J.C.G. Ottow (1993) Effect of increasing carbon : nitrate-N ratio on the reliability of acetylene in blocking the N<sub>2</sub>O-reductase activity of denitrifying bacteria in soil. *Biol. Fertil. Soils*, **15**: 107-112.
- Sitaula, B.K. & L.R. Bakken (1993) Nitrous oxide release from spruce forest soil: Relationships with nitrification, methane uptake, temperature, moisture and fertilization. *Soil Biol. Biochem.*, **25**: 1415-1421.
- Skiba, U., K.A. Smith & D. Fowler (1993) Nitrification and denitrification as sources of nitric oxide and nitrous oxide in a sandy loam soil. *Soil Biol. Biochem.*, **25**: 1527-1536.

- Skrinde, J.R. & S.K. Bhagat (1982) Industrial wastes as carbon sources in biological denitrification. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **54**: 370-377.
- Smith, C.J. & P.M. Chalk (1980) Gaseous nitrogen evolution during nitrification of ammonia fertilizer and nitrite transformation in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **44**: 277-282.
- Smith, C.J. & W.H. Patrick Jr (1983) Nitrous oxide emission as affected by alternate anaerobic and aerobic conditions from soil suspensions enriched with ammonium sulfate. *Soil Biol. Biochem.*, **15**: 693-697.
- Smith, C.J., M.F. Wright & W.H. Patrick Jr (1983) The effect of soil redox potential and pH on the reduction and production of nitrous oxide. *J. Environ. Qual.*, **12**: 186-188.
- Smith, M.S. (1982) Dissimilatory reduction of NO<sub>2</sub> to NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and N<sub>2</sub>O by a soil *Citrobacter* sp.. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**: 854-860.
- Smith, M.S. & J.M. Tiedje (1979) Phases of denitrification following oxygen depletion in soil. *Soil Biol. Biochem.*, **11**: 261-267.
- Smith, M.S. & K. Zimmerman (1981) Nitrous oxide production by nondenitrifying soil nitrate reducers. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **45**: 865-871.
- Smith, R.L., M.L. Ceazan & M.H. Brooks (1994) Autotrophic, hydrogen-oxidizing, denitrifying bacteria in groundwater, potential agents for bioremediation of nitrate contamination. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 1949-1955.
- Snyder, S.W., D.A. Bazylnski & T.C. Hollocher (1987) Loss of N<sub>2</sub>O reductase activity as an explanation for poor growth of *Pseudomonas aeruginosa* on N<sub>2</sub>O. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 2045-2049.
- Stensel, H.D., R.C. Loehr & A.W. Lawrence (1973) Biological kinetics of suspended-growth denitrification. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **45**: 249-261.
- Stenstrom, M.K. (1980) The effect of dissolved oxygen concentration on nitrification. *Wat. Res.*, **14**: 643-649.
- Stepanauskas, R., E.T. Davidsson & L. Leonardson (1996) Nitrogen transformations in wetland soil cores measured by <sup>15</sup>N isotope pairing and dilution at four infiltration rates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 2345-2351.
- Stevens, R.J., R.J. Laughlin, G.J. Atkins & S.J. Prosser (1993) Automated determination of nitrogen-15 labeled dinitrogen and nitrous oxide by mass spectrometry. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **57**: 981-988.
- Stojanovic, B.J. & M. Alexander (1958) Effect of inorganic nitrogen on nitrification. *Soil Sci.*, **86**: 208-215.
- Strong, W.M., E.R. Austin, L.S. Holt & R.J. Buresh (1987) Determination of the combined nitrogen-15 content of dinitrogen and nitrous oxide in air. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **51**: 1344-1350.
- Stüven, R., M. Vollmer & E. Boeck (1992) The impact of organic matter on nitric oxide formation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.*, **158**: 439-443.
- Sørensen, J., J.M. Tiedje & R.B. Firestone (1980) Inhibition by sulfide of nitric and nitrous oxide reduction by denitrifying *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**: 105-108.
- Stümer, E., A. Weiske, G. Benckiser & C.G. Ottow (1995) Influence of environmental conditions on the amount of N<sub>2</sub>O released from activated sludge in a domestic waste water treatment plant. *Experimentia*, **51**: 419-422.
- Svensson, B.H. (1996) Contribution of microbial processes to global budgets. In *NATO ASI Series, Vol. 139 Microbiology of Atmospheric Trace Gases*, pp. 255-259, J.C. Murrell & D.P. Kelly (eds.), Springer-Verlag.
- Taber, W.A. (1976) Wastewater microbiology. *Ann. Rev. Microbiol.*, **30**: 263-277.
- Tanaka, M., M. Miyazaki & I. Watanabe (1994) CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emission from waste disposal facilities in Japan. In *CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O: Global Emissions and Controls from Rice Fields and Other Agricultural and Industrial Sources*, pp. 181-186, NIAES.
- Tate III, R.L. (1980) Variation in heterotrophic and autotrophic nitrifier populations in relation to nitrification in organic soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**: 75-79.
- Terai, H., M. Yoh & Y. Saijo (1987) Active denitrification in the hypolimnetic water column in lake Kizaki. *Jpn. J. Limnol.*, **48**: 219-224.
- Terry R.E. & R.L. Tate III (1980) The effect of nitrate on nitrous oxide reduction in organic soils and sediments. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **44**: 744-746.
- Terry, R.E., R.L. Tate III & J.M. Duxbury (1981) The effect of flooding on nitrous oxide emissions from an organic soil. *Soil Sci.*, **132**: 228-232.
- Teske, A., E. Alm, J.M. Regan, S. Toze, B.E. Rittmann & D.A. Stahl (1994) Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J. Bacteriol.*, **176**: 6623-6630.
- Thalasso, F., A. Vallecillo, P.G. Encina & F.F. Polanco (1997) The use of methane as a sole carbon source for wastewater denitrification. *Wat. Res.*, **31**: 55-60.
- Thomsen, J.K., T. Geest & R.P. Cox (1994) Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 536-541.
- Thörn, M. & F. Sörensson (1996) Variation of nitrous oxide formation in the denitrification basin in a wastewater treatment plant with nitrogen removal. *Wat. Res.*, **30**: 1543-1547.
- Tiedje, J.M., A.J. Sexstone, D.D. Myrold & J.A. Robinson (1982) Denitrification: Ecological niches, competition and survival. *Antonie van Leeuwenhoek*, **48**: 569-583.
- Timmermans, P. & A. van Haute (1983) Denitrification with methanol. Fundamental study of the growth and denitrification capacity of *Hyphomicrobium* sp. *Wat. Res.*, **10**: 1249-1255.
- Tortoso, A.C. & G.L. Hutchinson (1990) Contributions of autotrophic and heterotrophic nitrifiers to soil NO and N<sub>2</sub>O emissions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 1799-1805.

- Ueda, S. & N. Ogura (1991) Nitrogen stable isotope ratio of groundwater N<sub>2</sub>O. *Geophys. Res. Lett.*, **18**: 1449-1452.
- Ueda, S., N. Ogura & T. Yoshinari (1993) Accumulation of nitrous oxide in aerobic groundwaters. *Wat. Res.*, **12**: 1787-1792.
- van Amstel, A.R. & R.J. Swart (1994) Methane and nitrous oxide emissions: An introduction. *Fertil. Res.*, **37**: 213-225.
- van de Graaf, A.A., A. Mulder, P. de Bruijn, M.S.M. Jetten, L.A. Robertson & J.G. Kuenen (1995) Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 1246-1251.
- van den Born, G.J., A.F. Bouwman, J.G.J. Olivier & R.J. Swart (1991) *The Emission of Greenhouse Gases in the Netherlands*. Report no. 222901003, National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands.
- van Kessel, C., D.J. Pennock & R.E. Farrell (1993) Seasonal variations in denitrification and nitrous oxide evolution at the landscape scale. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **57**: 988-995.
- van Luijn, F., P.C.M. Boers & L. Lijklema (1996) Comparison of denitrification rates in lake sediments obtained by the N<sub>2</sub> flux method, the <sup>15</sup>N isotope pairing technique and the mass balance approach. *Wat. Res.*, **30**: 893-900.
- van Rijn, J., Y. Tal & Y. Barak (1996) Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by a *Pseudomonas stutzeri* strain isolated from a denitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 2615-2620.
- Vedenina, I.Y. & G.A. Zavarzin (1977) Biological removal of nitrous oxide under oxidizing conditions. *Microbiology*, **46**: 728-733.
- Vedenina, I.Y. & G.A. Zavarzin (1979) Removal of nitrous oxide by a combined bacterial culture. *Microbiology*, **48**: 459-462.
- von Schulthess & W. Gujer (1996) Release of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) from denitrifying activated sludge: Verification and application of a mathematical model. *Wat. Res.*, **30**: 521-530.
- von Schulthess, R., M. Kühni & W. Gujer (1995) Release of nitric and nitrous oxides from denitrifying activated sludge. *Wat. Res.*, **29**: 215-226.
- von Schulthess, R., D. Wild & W. Gujer (1994) Nitric and nitrous oxides from denitrifying activated sludge at low oxygen concentration. *Wat. Sci. Tech.*, **30**(6): 123-132.
- Walker, N. & K.N. Wickramasinghe (1979) Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in acid tea soil. *Soil Biol. Biochem.*, **11**: 231-236.
- Wallace, W. & D.J.D. Nicholas (1969) The biochemistry of nitrifying microorganisms. *Biol. Rev. Cam. Philos. Soc.*, **44**: 359-391.
- Walter, H.M., D.R. Keeney & I.R. Fillery (1979) Inhibition of nitrification by acetylene. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **43**: 195-196.
- Wang, J.-H., B.C. Baltzis & G.A. Lewandowski (1995) Fundamental denitrification kinetic studies with *Pseudomonas denitrificans*. *Biotechnol. Bioeng.*, **47**: 26-41.
- Wang, W.C., Y.L. Yung, A.A. Lacis, T. Mo & J.E. Hansen (1976) Greenhouse effects due to man-made perturbations of trace gases. *Science*, **194**: 685-690.
- Weier, K.L., J.W. Doran, J.F. Power & D.T. Walters (1993) Denitrification and the dinitrogen/nitrous oxide ratio as affected by soil water, available carbon, and nitrate. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **57**: 66-72.
- Weier, K.L. & J.W. Gilliam (1986) Effect of acidity on denitrification and nitrous oxide evolution from Atlantic coastal plain soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **50**: 1202-1205.
- Weier, K.L., I.C. Macrae & J.K. Myers (1991) Seasonal variation in denitrification in a clay soil under a cultivated crop and a permanent pasture. *Soil Biol. Biochem.*, **23**: 629-635.
- Weiss, R.F. & B.A. Price (1980) Nitrous oxide solubility in water and seawater. *Mar. Chem.*, **8**: 347-359.
- Wichit, H. (1996) A model for predicting nitrous oxide production during denitrification in activated sludge. *Wat. Sci. Tech.*, **34**(5-6): 99-106.
- Wild, D., R. von Schulthess & W. Gujer (1994) Synthesis of denitrification enzymes in activated sludge: Modelling with structured biomass. *Wat. Sci. Tech.*, **30**(6): 113-122.
- Wild, D., R. von Schulthess & W. Gujer (1995) Structured modelling of denitrification intermediates. *Wat. Sci. Tech.*, **31**(2): 45-54.
- Wilderer, P.A., W.L. Jones & U. Dau (1987) Competition in denitrification systems affecting reduction rate and accumulation of nitrite. *Wat. Res.*, **21**: 239-245.
- Wilhelm, E., R. Battino & R.J. Wilcock (1976) Low-pressure solubility of gases in liquid water. *Chem. Rev.*, **77**: 219-262.
- Yoh, M. (1990) Experimental examination on nitrous oxide accumulation during nitrification in a freshwater lake. *Jpn. J. Limnol.*, **51**: 237-248.
- Yoh, M. (1992) Marked variation in lacustrine N<sub>2</sub>O accumulation level and its mechanism. *Jpn. J. Limnol.*, **53**: 75-81.
- Yoh, M., A. Yagi & H. Terai (1990) Significance of low-oxygen zone for nitrogen cycling in a freshwater lake: Production of N<sub>2</sub>O by simultaneous denitrification and nitrification. *Jpn. J. Limnol.*, **51**: 163-171.
- Yoshida, T. & M. Alexander (1970) Nitrous oxide formation by *Nitrosomonas europaea* and heterotrophic microorganisms. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **34**: 880-882.
- Yoshinari, T. (1980) N<sub>2</sub>O reduction by *Vibrio succinogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**: 81-84.
- Zafiriou, O.C., Q.S. Hanley & G. Snyder (1989) Nitric oxide and nitrous oxide production and cycling during dissimilatory nitrite reduction by *Pseudomonas perfectomarina*. *J. Biol. Chem.*, **264**: 5694-5699.
- Zhang, B. (1997) A study on microbial activities and the role of predators in membrane separation activated sludge process. Ph.D. thesis, The University of Tokyo, Japan.
- Zheng, H., K. Hanaki & T. Matsuo (1994) Production of nitrous oxide gas during nitrification of wastewater. *Wat. Sci. Tech.*, **30**(6): 133-141.

Zumft, W.G. & M.H. Kroneck (1990) Metabolism of nitrous oxide. In N.P. Revsbech & J. Sørensen (eds.) *Denitrification in Soil and Sediment*, pp. 37-55, Plenum Press, New York.

