

(22) 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

Mechanism of Nitrous Oxide Production by High-Loading Activated Sludge with Intermittent Aeration under Organic Carbon Limiting Conditions

糸川浩紀*, 花木啓祐**, 松尾友矩*

Hiroki ITOKAWA*, Keisuke HANAKI**, Tomonori MATSUO*

ABSTRACT; The mechanism of nitrous oxide production by high-loading activated sludge with intermittent aeration under organic carbon limiting conditions was investigated. Three laboratory scale reactors with different influent COD/N ratios were operated to examine the effect of organic carbon limitation on N_2O production. The ^{15}N tracer method was used to distinguish the contribution of nitrification and denitrification on N_2O production under small COD/N ratio operation. N_2O reduction activity of the sludge withdrawn from the reactors was measured. Batch experiments to investigate the effects of initial COD/N ratio and nitrate concentration were also conducted. In laboratory scale reactors, a large amount of N_2O was produced with N_2O conversion of 20-50% in the reactors with small COD/N ratios. By the ^{15}N method, denitrification in the anoxic phase was suggested to be the principal source of the N_2O produced. N_2O reduction activity was not a limiting factor of the N_2O production. Organic carbon limitation for denitrification at the latter period of anoxic phase caused by a high ratio of consumed COD to consumed NO_3-N seemed to be the regulating factor for the N_2O production. Accumulation of NO_3-N was also shown to enhance N_2O production by denitrification under organic carbon limiting conditions.

KEYWORDS; nitrous oxide, nitrification, denitrification, organic carbon limitation, nitrogen removal, activated sludge, ^{15}N , greenhouse gas, global warming

1. はじめに

近年、排水処理において窒素・リン除去を主体とした高度処理プロセスの導入が進んでいる。窒素除去法としては硝化・脱窒を用いたプロセスが広く利用されているが、両反応の過程で副産物として温室効果ガス N_2O が生成されることが知られており^{23), 26)}、活性汚泥中で進行する硝化・脱窒からも相当量の N_2O が生成されることが報告されている^{18), 33)}。IPCC (1994)²¹⁾が N_2O の各種ソース・シンクの地球規模での寄与量推定値を報告しているが、そこには排水処理は含まれていない。しかし、未だ確定されていないソースの存在も指摘されており²⁴⁾、排水処理がそのひとつとして重要な位置を占めている可能性があることから⁸⁾、 N_2O 放出削減型運転法の確立が望まれている。

排水処理施設からの N_2O 放出量を実測した例は少ないが^{2), 11), 14), 22), 28)}、下水処理施設からの放出量は総じて少ないようである^{14), 28)}。ただし、現存する下水処理施設の大半は標準活性汚泥法式であって窒素の除去を想定しておらず、今後窒素除去プロセスの導入が進めば放出量が大きく増加する可能性がある。一方、し尿処理施設においては現行の施設から大量の N_2O が発生しうることが報告されており^{2), 11), 22)}、無視できない N_2O ソースとなっている可能性がある。中でも、近年普及の著しい高負荷型の窒素除去プロセスは、水環境改善に大きな役割を果たしている反面、 N_2O の放出量が大きいことが指摘されている¹¹⁾。

硝化における N_2O の生成機構としては、アンモニア酸化細菌によるヒドロキシルアミンから亜硝酸への酸化反応の際に生じる中間体の化学的な変換、あるいは同細菌による亜硝酸の還元、という2つが提唱されている²⁷⁾。両者の寄与率は明らかでないが、酸素濃度などの環境因子により変化するものと思われる²⁰⁾。脱窒においては、 N_2O は中間体として必然的に生成されるが²³⁾、通常は生成と同時に速やかに還元される。しかし、条件によっては反応が完結せずに N_2O が蓄積する²³⁾。また、最終産物として N_2O を生成する脱窒細菌の存在も知られている¹⁶⁾。

活性汚泥中で起こる硝化による N_2O 生成を促進する因子として、低いDO、短いSRT、有機物の共存、などが報

* 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 (Department of Urban Engineering, Graduate School, The University of Tokyo)

** 東京大学先端科学技術研究センター (Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo)

告されている^{8), 33)}。一方、活性汚泥中での脱窒による N_2O 生成に対する促進因子としては、低濃度のDOの存在、低いpH、 NO_2^- の蓄積、短いSRT、C/N比の小さい基質、などが報告されている^{9), 29)}。これらに加え、硝化においては NH_4^+ あるいは NO_2^- の蓄積が^{12), 32)}、脱窒においては高濃度の NO_3^- が¹⁵⁾ N_2O 生成を促進することが、純菌や土壌試料を用いた研究により明らかにされている。

上で述べたように下水処理施設と比べてし尿処理施設からの N_2O 放出量が大い要因として、後者の窒素負荷が高いことの他に、し尿のC/N比が小さいことによる高い N_2O 生成率が挙げられる。実際、流入窒素量当たりの N_2O 転換率で比較した場合、下水処理施設の0.001%²⁸⁾に対して、し尿処理施設では0.24-55%²²⁾と大きな値が報告されている。また、渡辺ら(1994)¹¹⁾は、高負荷型のし尿処理施設2施設からの N_2O 放出量が大きく異なった原因のひとつとして原水のC/N比の違いを指摘しており、同一の処理プロセスにおいても排水のC/N比によって N_2O 放出量が大きく変化しうることが示唆される。基質のC/N比が小さいほど脱窒における N_2O 生成率が高くなることは活性汚泥を用いた室内実験の結果が報告されているし¹⁸⁾、土壌試料を用いた回分実験においても添加する有機物が多量であるほど N_2O 生成率が減少する傾向が見いだされており³⁰⁾、利用可能な有機物量が制限因子となる条件において脱窒過程での N_2O 生成が促進されることが予想される。一方、硝化を優位的におこなう活性汚泥の基質として有機物を共存させると N_2O 生成量が増大したことが報じられていることから⁸⁾、有機物負荷が硝化からの N_2O 生成に影響を与えることも予想される。

本研究では、利用可能な有機物量が脱窒の制限因子となるような条件における活性汚泥からの N_2O の生成機構を明らかにすることを目的とした。処理プロセスとしては、大量の N_2O 放出が報告されている^{2), 11), 22)} 間欠曝気式の高負荷膜分離硝化脱窒方式によるし尿処理を想定した。まず、流入基質のCOD/N比が異なる3基の室内リアクターを運転し、有機物負荷が N_2O 放出量に与える影響を調べた。そして、有機物制限条件下での N_2O 生成機構に迫るため、低COD/N比運転の汚泥に対して、(1) 窒素の安定同位体 ^{15}N をトレーサーとして用いた回分実験による、 N_2O 生成に対する硝化と脱窒の寄与率定量化、(2) 脱窒条件での N_2O 還元活性の測定、(3) 脱窒条件での回分実験によるCOD/N比および NO_3^- -N濃度の影響評価、の3点について検討をおこなった。

2. 実験方法

2.1 高負荷間欠曝気式リアクターの運転

Fig. 1に示した室内規模リアクターを3系列(系列A～C) 20℃の恒温室内で運転し、基質のCOD/N比が N_2O 放出量に及ぼす影響を調べた。種汚泥としては、高負荷型のし尿処理施設から採取した汚泥を当実験室で1年以上馴養したものを用いた。各リアクターは有効容積1.6 lで、内部は密閉構造とした。間欠曝気型の運転を模すために、好気工程には空気、無酸素工程には窒素ガスによる曝気を連続的に起こした。流入気体流量は0.5 l/minに設定したが、硝化率が低下した場合には流量を上げる措置をとった。また、溶存 N_2O のストリップングを促し気相との平衡状態を保つため、曝気ラインとは別に内部気体を流量8 l/minで強制循環させた。pHは、6.5-7.5となるよう0.5N-NaOHおよび0.5N-HClにより制御した。

固液分離は本体に浸漬した中空糸膜(孔径0.1 μm 、ポリエチレン製)によりおこない、レベルセンサと排水ポンプを連動させることにより水位を保った。週に一度膜を取り出して外面を水道水にて洗浄したが、当条件では膜に付着する汚泥量は無視しうることを事前に確認した。

運転サイクルは好気工程30分、無酸素工程30分から成る1サイクル1時間運転とし、基質を無酸素工程の初期に5分間投入した。なお、運転開始10日目までは好気工程：無酸素工程=40分：20分の運転をおこなった。また、系列Cにおいては、中途より硝化率が低下したため、再び好気工程を長くする運転に戻した。HRTは4日、SRTは20日に設定したが、77日目以降はSRTの制御を中止したため50日以上長いSRTで運転された。各系列の運転条件をTable 1にまとめた。

基質としては、し尿を想定し酢酸ナトリウムおよび塩化アンモニウムを主成分とする合成基質を用いた (Table

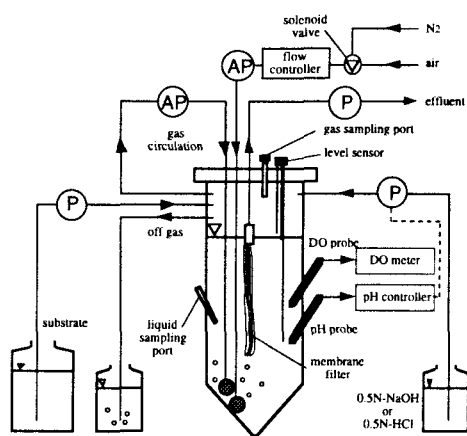


Fig. 1 Schematic diagram of the laboratory scale reactors

3日に一度、気相部の N_2O 濃度を1サイクルの間経時的に測定し、これと流入気体流量とから1サイクル当たりの N_2O 放出量を算出した。試料は本体上部の採取口からガスタイトシリンジにて採取し、直ちに分析した。また、当日に混合液も採取し、遠心(14,000 rpm $\times$ 5 min, 4℃)をろ過(0.45 μm のメンブランフィルター)後に分析に供じた。分析項目は、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、TN、TOC、CODとした。また、混合液のMLSSも毎回測定した。

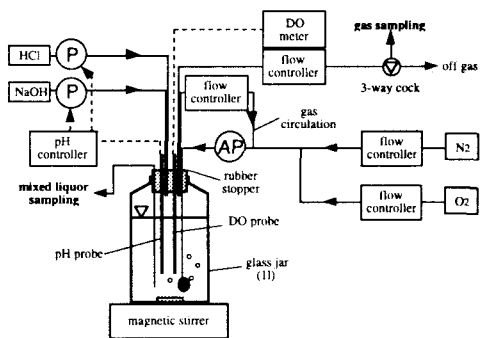
間欠曝気式の運転において、好気工程に生成される N_2O が硝化に由来し無酸素工程に生成される N_2O が脱窒に由来することは、必ずしも自明ではない。硝化・脱窒両者において N_2O 生成率が低DO条件で高くなること^{8), 29)}、無酸素条件でもアンモニア酸化細菌が N_2O を生成しうること²⁷⁾、さらに本研究で用いたリアクターの生物濃度が $MLSS = 10,000 \text{ mg/l}$ 前後と高濃度であることなどを考慮すると、好気工程においても脱窒由来の N_2O が、また無酸素工程においても硝化由来の N_2O が生成されている可能性がある。そこで、低COD/N比運転において生成される N_2O に対する硝化と脱窒の寄与率を明らかにするため、系列Aの汚泥を使用しこなかった。

系列Aリアクターより無酸素工程終了間際の混合液を800 ml採取し、直ちに本装置に投入して好気工程の運転を開始した。30分後に無酸素工程に切り替え、そこから次の好気工程終了までの1サイクルのあいだ、気体および液体試料の採取を経時的におこなった。使用した基質は酢酸ナトリウム (30,000 mgCOD/l) と¹⁵Nラベルされた塩化アンモニウム (12,500 mgN/l; 16.2 ¹⁵N atom%) の混合溶液で、これを1 ml注入した。注入の際にはプラスチック製シリリングを使用し、気体の交換が無いよう注意を払った。本基質のCOD/N比・負荷量ともに、系列Aリアクターと同一である。

気体試料は気体流出ラインよりテドラバッグに採取し、 N_2O および CO_2 濃度、 N_2O の同位体構成比を測定した。液体試料は装置に設けた採取口からプラスチック製シリンジにて混合液を採取し、直ちに遠心 ($14,000 \text{ rpm} \times 5 \text{ min}$, 4°C) によるろ過 ($0.45 \mu\text{m}$ のメンブランフィルター) した後、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 TN 、 TOC 、 COD 、 $^{15}\text{NH}_4\text{-N atom\%}$ および $^{15}\text{NO}_3\text{-N atom\%}$ を測定した。

Reactor	A	B	C
Aerobic:Anoxic [min:min]	40:20 (0-10 d) 30:30 (10 d-)	40:20 (0-10 d) 30:30 (10 d-)	40:20 (0-10 d, 57 d-) 30:30 (10-41 d) 45:15 (41-57 d)
pH Control	6.5 - 7.5	6.5 - 7.5	6.5 - 7.5
HRT [d]	4	4	4
SRT [d] ^a	20	20	20
Influent COD _{Cr} [mg/l]	4,000	5,800	10,000
Influent NH ₄ -N [mgN/l]	1,700	1,700	1,800
Influent COD/N	2.4	3.4	5.6

	[mg/l]		
Reactor	A	B	C
NH ₄ Cl	5,730	5,730	5,730
CH ₃ COONa·3H ₂ O	6,390	9,600	15,900
Yeast extract	638	960	1,600
Pepton	319	480	800
KH ₂ PO ₄	662	993	1,655
MgSO ₄ ·7H ₂ O	600	900	1,500
MnSO ₄ ·4H ₂ O	60	90	150
CaCl ₂ ·2H ₂ O	60	90	150
FeCl ₃ ·6H ₂ O	6	9	15



— 193 —

2. 3 N₂O還元活性の測定

低COD/N比運転でのN₂Oの大量発生の要因のひとつとして、脱窒の際のN₂O還元能の低下が考えられた。そこで、洗浄・希釈した汚泥を回分式に培養し添加したN₂Oの減少を追跡することにより、各系列の汚泥のN₂O還元活性を測定し、比較をおこなった。なお、反応溶液中の有機物濃度は、添加したN₂O量に対して過剰量の有機物が与えられるよう調整した。測定手順は以下のとおりである。

リアクターより混合液を10 ml採取し、Table 3に示した反応溶液(pH=7.0)による遠心洗浄(4,000 rpm×5 min、20℃)を3回おこなった後、100 mlの反応溶液に懸濁した。次に、この懸濁液30 mlを50 mlガラスバイアル瓶(内容積68 ml)に移し、ブチルゴムセブタムおよびアルミシールにて密封した。内部を窒素ガスで30分以上バージした後、標準N₂Oガス(>99%、日本酸素)1 mlを注入し、20℃の恒温室内で浸とう培養した。標準N₂Oガス添加直後より10分間隔で気相部気体0.5 mlを採取し、N₂O濃度を分析した。N₂O注入をおこなわないブランクも作成し、同様の操作をおこなった。気体の採取にはガスタイトシリンジを用いたが、外気の混入による汚染を防止するため、毎回の使用直前にシリンジ内を窒素ガスで置換した。

Table 3 Composition of reaction buffers used in N₂O reduction activity measurements and batch experiments [mg/l]

	N ₂ O Reduction Activity	Batch Experiments
CH ₃ COONa·3H ₂ O	9,540	-
KH ₂ PO ₄	6,800	13,600
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200	1,000
MnSO ₄ ·4H ₂ O	20	100
CaCl ₂ ·2H ₂ O	20	100
FeCl ₃ ·6H ₂ O	2	10
pH	7.0	6.5

2. 4 COD/N比およびNO₃-N濃度の影響を調べる回分実験

有機物制限条件下でのN₂O生成機構をさらに詳細に検討するため、系列Aリアクターの汚泥を用いた回分実験をおこない、(1)初期COD/N比、(2)初期NO₃-N濃度、が脱窒条件におけるN₂O生成に与える影響を調べた。前者においては、初期COD/N比が0.9、2.3、4.6の3系列を実施した(Run 1-1~1-3)。初期NO₃-Nは一律210 mgN/lとした。後者においては、初期NO₃-Nを25、100、270 mgN/lに設定した3系列を実施した(Run 2-1~2-3)。CODは、各系列の初期COD/N比が約2.4となるよう調整した。実験操作を以下に記す。

リアクターより混合液を80 ml採取し、Table 3に示した反応溶液(pH=6.5)にて2.3と同様の遠心洗浄を3回おこなった後、240 mlの反応溶液に懸濁した。この懸濁液58 mlを100 mlガラスバイアル瓶(内容積121 ml)に入れ、2.3と同様に密封した。内部をヘリウムガスで60分以上バージした後、設定した初期濃度になるよう調整した基質を2 ml注入し、20℃の恒温室内で浸とう培養した。適宜気相部気体を1 ml採取し、N₂O、N₂、CO₂濃度を測定した。培養終了後にはバイアルを開封し、2.3と同様の遠心・ろ過操作後にNO₃-N、NO₂-N、CODを測定した。また、Run 2-1~2-3においては適宜液相を5 ml採取し、同様にNO₃-N、NO₂-N、CODを測定した。その際には、バイアル内圧保持のため採取後にヘリウムガス5 mlを注入した。基質注入をおこなわないブランクも作成し、同様の操作をおこなった。気体の注入・採取にはガスタイトシリンジを、液体の注入・採取にはプラスチック製シリンジを用いたが、前者については2.3と同様、使用前にはヘリウムガスで内部を置換した。

2. 5 分析方法

N₂O濃度、N₂O中の同位体構成比は、それぞれGC(ECD)(GC-8A、島津)、GC/MS(QP-5000、島津)により測定した。N₂およびCO₂濃度はGC(TCD)(GC-8A、島津)により測定した。

¹⁵NH₄-N atom%および¹⁵NO₃-N atom%は、発光分光法³⁾により測定した。まず試料中のNH₄-Nを水蒸気蒸留により捕集し、次に、NH₄-N蒸留後の試料にDevarda合金を添加して再び水蒸気蒸留をおこなうことによりNO₃-NをNH₄-Nとして捕集した。これらをDumas法³⁾によりN₂へ変換し、¹⁵N分析専用の発光分光光度計(N-151、日本分光)で¹⁵N atom%を測定した。なお、Devarda合金による反応ではNO₃-NだけでなくNO₂-NもNH₄-Nへと変換されるため、ここで得た¹⁵NO₃-N atom%値は厳密には(¹⁵NO₃+¹⁵NO₂)-N atom%値であるが、本実験の際には試料中のNO₂-N量がNO₃-N量に比べて非常に小さかったため、これを¹⁵NO₃-N atom%値として用いた。水蒸気蒸留の条件についてはBremner & Edwards (1965)¹³⁾を参考にし、当方の装置に最適化した条件でおこなった。また、試料間のクロスコンタミネーションを低減するため、¹⁵N atom%の高い試料と低い試料とを同一の装置で蒸留することは避け、さらに、各蒸留間にはエタノールによる洗浄蒸留をおこなった。

NH₄-Nは、リアクターのモニタリング用としては電量滴定法を利用した測定器(HC-707N、セントラル科学)を使用し、¹⁵Nを用いた回分実験においてはインドフェノール法⁷⁾により測定した。NO₂-NおよびNO₃-NはHPLC(LC-6A、島津)で、TNは過硫酸カリウムによる酸化後に紫外線吸光度法⁷⁾で、TOCは全有機炭素分析計(TOC-

500、島津)で、CODはCOD分解試薬瓶(Hack)によりCOD_Gを測定した。

3. 結果

3. 1 リアクターの運転

運転状況

各系列ともに、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、それにつれてpHが好気工程に減少し無酸素工程には増加するという傾向が観測された。DOは好気工程開始直後より上昇し始めたが、同工程終了時のDOは系列によって異なり、系列A～Cについてそれぞれ10-11、5-8、4-8 mg/lと、有機物負荷が高いほど小さかった。無酸素工程に移行後DOは徐々に減少を始め、基質が投入されると速やかに0.0 mg/lまで低下した。

各系列における好気工程終了時の窒素系指標の経日変化をFig. 3に示した。

系列Aでは、脱窒のための有機物が不足するためNO₃-N蓄積型の運転となり、600-900 mgN/lのNO₃-Nが常時蓄積した。硝化は良好におこなわれ、NH₄-Nの蓄積は見られなかった。NO₂-Nは、一時的な変動はあったものの、概ね10 mgN/l以下であった。pHは実験区間を通じて安定しており、好気工程終了時に6.5、無酸素工程終了時には6.8であった。混合液のMLSSは7,000-10,000 mg/lであった。

系列Bでは、当初は系列Aと同様のNO₃-N蓄積型の運転となりNH₄-Nの蓄積は見られなかったが、50日目以降、NH₄-Nが蓄積し始めると同時にNO₃-Nが減少し始め、60日目には完全にNH₄-N蓄積型の状態に移行した。そこで、硝化の回復を試みて流入気体流量の増加(0.5 l/min→1.0 l/min)、試料採取以外の混合液引き抜きの中止という措置をとったところ、90日目頃から硝化能が回復し始め、105日目には再びNH₄-Nが蓄積しなくなった。それと同時に、再びNO₃-Nが蓄積され始めた。NO₂-Nは初期のNO₃-N蓄積型の状態の間は20-50 mgN/l程度蓄積されていたが、NH₄-N蓄積型の状態に移行してからは10 mgN/l以上の蓄積が起こることは希であった。pHは硝化の良否の影響を強く受け、硝化が完全に進行している状態では系列Aと同様6.5-6.8で推移したが、硝化能が低下すると7.0-7.5まで上昇した。混合液のMLSSは8,000-10,000 mg/lであった。

系列Cでは、10日目のサイクル変更以降速やかにNO₃-Nが減少し、無機態窒素の蓄積しない良好な処理が一時的に実現された。しかし、20日目頃からNH₄-Nが蓄積され始め、以降、流入気体流量の増加、サイクル変更、硝化が良好な汚泥の投入などの硝化促進のための一連の措置をとったが、安定した硝化は得られなかった。基質のC/N比が高いために従属栄養細菌の活動の影響を受け、硝化が不安定になったと推察される。NO₂-Nの蓄積は全区間を通じてほとんど見られなかった。また、pHは10日目のサイクル変更直後に7.2まで上昇し、以降、硝化能の低下とともに上限設定値である7.5まで上昇した。混合液のMLSSは10,000-15,000 mg/lであった。

N₂O生成

各系列における除去窒素量当たりのN₂O転換率の推移をFig. 4に示した。100%を越える転換率が得られているのは、除去窒素量を流入基質と混合液ろ液それぞれの窒素濃度の差より算出しており、混合液中に蓄積されているNO₃-Nの消費分が含まれていないためである。

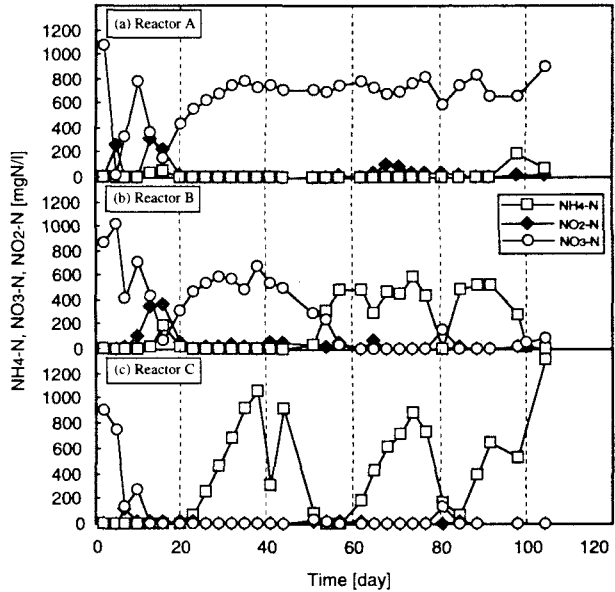


Fig. 3 NH₄-N, NO₃-N, NO₂-N at the end of aerobic phases in the reactor A-C

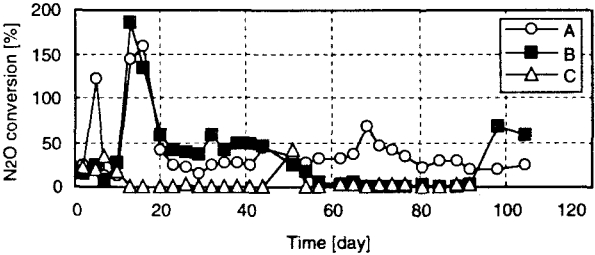


Fig. 4 N₂O conversion of removed N in the reactor A-C

系列Aでは、10日目のサイクル変更後に一時的に100%を越える高い転換率が観測され、その後も15-30%の高い転換率で推移した。運転サイクルの中では、無酸素工程後半の放出が卓越していた。

系列Bでは、50日目頃に硝化能が低下するまでは系列Aと同様のN₂O転換率の変化を示した。ただし、転換率は50%前後と、系列Aと比較して高かった。50日目以降、NH₄-Nの蓄積・NO₃-Nの減少が進行するにつれてN₂O転換率は低下し、NO₃-Nがほぼ蓄積しなくなった後は1%以下で推移した。90日目以降、硝化能が復活しNO₃-Nが再び蓄積を始めると、転換率は再び増加した。1サイクル内のN₂O放出速度の変化は、50日目以前には無酸素工程後半に放出速度が最大になるという系列Aと同様の傾向を示したが、それ以降は傾向が一変し、好気工程後半の放出速度が最大となった。

系列Cにおいては、10日目のサイクル変更以降、速やかにN₂O転換率が低下し、硝化能の低下・復活に関わらず概ね1%以下で推移した。

3. 2 ¹⁵Nを用いたN₂O起源の推定

系列Aリアクターの汚泥を用いて無酸素-好気から成る1サイクル分の回分実験をおこなった際の、各指標の経時変化をFig. 5に示した。N₂O放出速度は流出気体中のN₂O濃度とその流量より算出した。N₂O中の¹⁵N atom%は、GC/MS分析により得られた⁴⁴N₂O、⁴⁵N₂O、⁴⁶N₂Oの各ピーク面積より算出した。なお、測定された⁴⁶N₂Oには、¹⁵N¹⁵N¹⁶Oだけでなく¹⁴N¹⁴N¹⁸Oも含まれている。¹⁸Oの自然の存在比は0.2%⁶⁾であり無視できる量ではないので、⁴⁴N₂Oピーク面積と¹⁸Oの自然存在比とから¹⁴N¹⁴N¹⁸Oの寄与分を補正した。

N₂O放出速度は、基質添加後に増加し始め、無酸素工程後半で最大となった。そして、好気工程に入ると急速に減少した。N₂O中の¹⁵N atom%は、無酸素工程の間は1%程度で変化が無かったが、好気工程に入るとやや増加し、好気工程開始20分後には10.5%へと急増した。なお、N₂O濃度が5 ppm以下の試料はGC/MS分析での定量下限以下であり、¹⁵N atom%値が得られなかった。

気相中のCO₂濃度は、基質添加直後に最大となり、N₂O放出速度が最大となった時間との間にずれが生じた。

NH₄-Nは、無酸素工程の間は変化が無く、好気工程に入るとほぼ直線的に減少した。¹⁵NH₄-N atom%は、16%程度で目立った変化が見られなかった。NO₃-Nは無酸素工程から好気工程初期にかけて減少し、その後は増加に転じた。¹⁵NO₃-N atom%は、無酸素工程の間は0.4%程度で変化が小さく、好気工程に入ると0.7%まで増加した。

生成したN₂Oに対する硝化と脱窒の寄与率を推定するため、硝化-脱窒より成る反応系を簡略化したモデルを仮定し (Fig. 6)、N₂O量およびその中の¹⁵N量の収支をとった式(1)、(2)より、NH₄-NおよびNO₃-N由来のN₂O量をそれぞれ算出した。

$$P_{\text{Total}} = P_{\text{NH}_4} + P_{\text{NO}_3} \quad (1)$$

$$P_{\text{Total}} \cdot \text{AN}_2\text{O} = P_{\text{NH}_4} \cdot \text{ANH}_4 + P_{\text{NO}_3} \cdot \text{ANO}_3 \quad (2)$$

ここで、P_{total}: 総N₂O生成量、P_{NH₄}: NH₄-N由来のN₂O生成量、P_{NO₃}: NO₃-N由来のN₂O生成量、AN₂O: N₂Oの¹⁵N atom%、ANH₄: ¹⁵NH₄-N atom%、ANO₃: ¹⁵NO₃-N atom%である。

推定結果をFig. 7に示した。無酸素工程には放出されたN₂Oの約95%がNO₃-N由来であり、好気工程に移行して10分が経過した時点でもNO₃-N由来のN₂Oが92%を占めた。ただし、好気工程開始20分後にはNH₄-N由来のN₂Oが34%を占めた。1サイクル全体で考えると、放出されたN₂Oの95%以上がNO₃-N由来であった。なお、基質として添加した

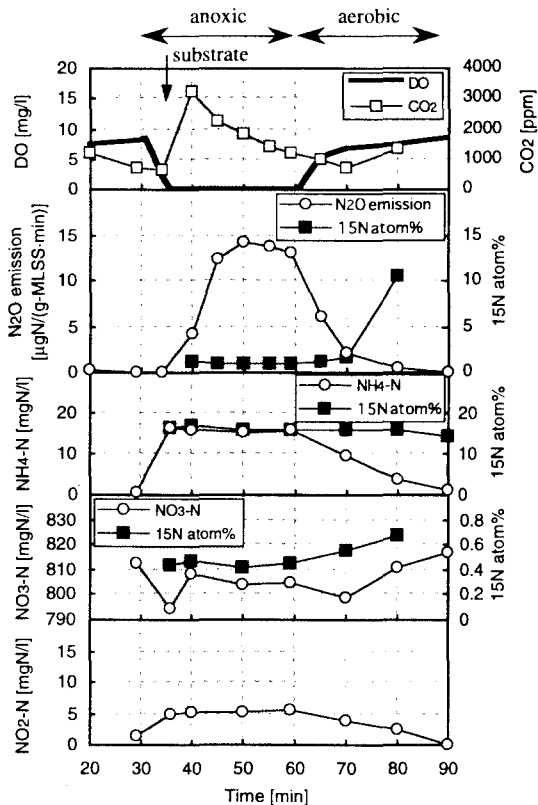


Fig. 5 Results of the ¹⁵N tracer experiment

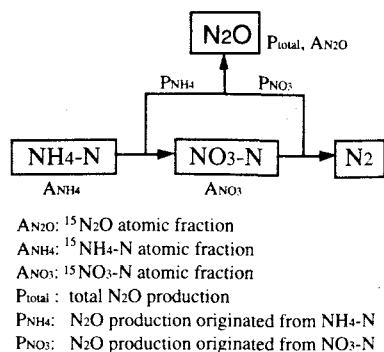


Fig. 6 Assumed pathway of N_2O production by nitrification and denitrification for estimating contribution of the both processes

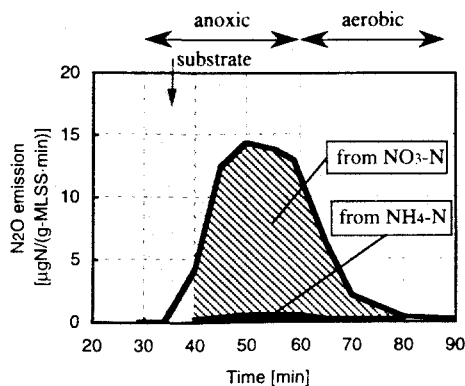


Fig. 7 Estimated contribution of NH_4-N and NO_3-N on N_2O emitted in the ^{15}N tracer experiment with the reactor A sludge

窒素量当たりの N_2O 転換率は12.4%であり、リアクター系列Aでの流入窒素量当たりの転換率とはほぼ同等の値が得られた。

3. 3 N_2O 還元活性

各系列について、それぞれ二度の測定をおこなった (Table 4)。どの場合でも標準 N_2O 添加後に N_2O は直線的に減少し (Fig. 8)、この直線の傾きより N_2O 還元活性を算出した。なお、ここではバイアル内の気液平衡を仮定し、 N_2O の溶解度³¹⁾を用いて溶存 N_2O 量も考慮した。また、ブランクからの N_2O 生成は確認されなかった。なお、無希釈の汚泥を用いて同様の測定をおこなうと初期の数分で添加した N_2O 全量が消費されたことから、本測定において N_2O の気液移動は律速になっていない。

体積当たりの活性に系列間の違いは認められず、MLSS当たりの活性ではMLSSが高いほど活性が小さくなる傾向が見られた。

3. 4 初期COD/N比の影響 (回分実験Run 1-1~1-3)

結果をTable 5にまとめた。また、各Runについて気相中の N_2O 、 N_2 、 CO_2 濃度の経時変化をFig. 9に示した。

3系列ともに、初期に N_2 および CO_2 生成が活発な時期があり (Phase I)、その後両者はほぼ横ばいとなった (Phase II)。Phase Iの長さは、Run 1-1では1時間、Run 1-2では2時間、Run 1-3では6時間と、初期COD/N比が大きいほど長かった。

N_2O は、Phase Iの間は生成されず、Phase IIに入ると増加を始めた。ただし、Run 1-3においてはその傾向が顕著ではなく、 N_2O 蓄積量が極端に小さかった。溶存気体も考慮して、培養終了時までに蓄積した N_2O および N_2 量より $N_2O/(N_2+N_2O)$ 比を算出すると、Run 1-1、1-2ではそれぞれ19、25%であったのに対して、Run 1-3では0.03%と非常に低い値であった。また、Run 1-1および1-2について、試料採取区間ごとの蓄積量より

$N_2O/(N_2+N_2O)$ 比を算出すると、Phase IIに移行後急激に増加しており、Run 1-1で最大98%、Run 1-2で最大70%に達した。培養終了時点までに消費されたCODと NO_3-N の比 ($\Delta COD/\Delta NO_3-N$ 比) は、それぞれ3.3、4.3、6.1と基質のCOD/N比よりも大きかった。なお、消費された NO_3-N のうち一部は NO_2-N あるいは N_2O までしか還元されていないので、消費されたCODと N_2 にまで還元された窒素量との比はこれよりも大きくなる。

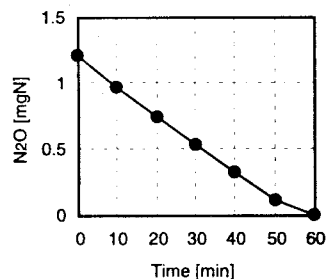


Fig. 8 Consumption of N_2O by reactor A-C sludge on the 89th day

Table 4 N_2O reduction activity of the reactor A-C sludge

Reactor	Time [d]	MLSS* [mg/l]	N ₂ O reduction rate	
			[$\mu gN/(min\cdot l)$]	[$mgN/(g\text{-}MLSS\cdot min)$]
A	74	630	743	1.18
	89	1,150	730	0.63
B	74	737	607	0.82
	105	1,160	840	0.72
C	74	970	573	0.59
	105	1,890	700	0.37

* The original sludge was diluted ten times with the reaction buffer.

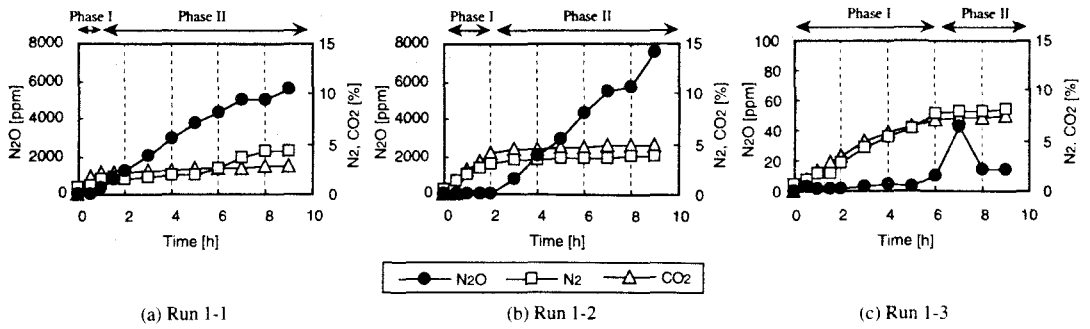


Fig. 9 N₂O, N₂, CO₂ concentration in gas phase (batch experiment Run1-1~1-3)

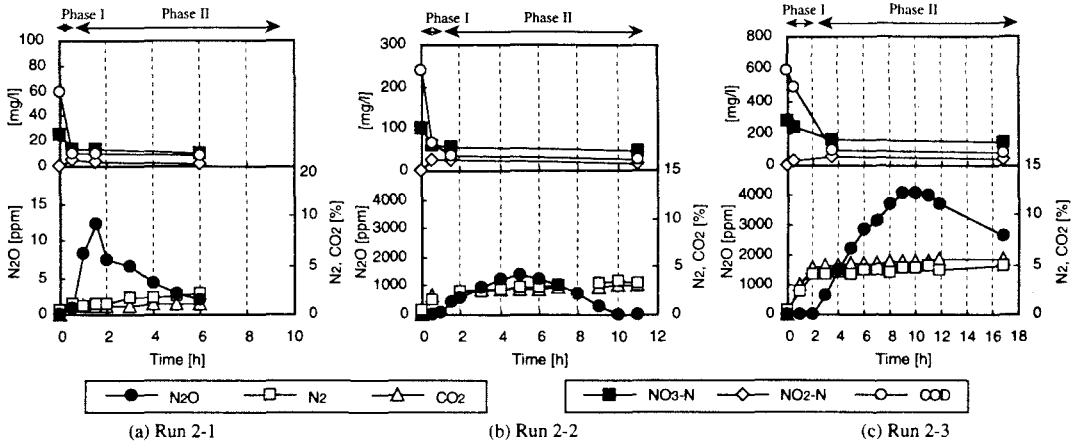


Fig. 10 N₂O, N₂, CO₂ concentration in gas phase, NO₃-N, NO₂-N, COD in liquid phase (batch experiment Run2-1~2-3)

Table 5 Results of the batch experiment with changing initial COD/N ratio (Run 1-1~1-3)

Initial COD was 193, 480, 967 mg/l for Run 1-1, 1-2, 1-3 respectively.

Initial NO₃-N was 210, 208, 209 mgN/l for Run 1-1, 1-2, 1-3 respectively.

Initial MLSS was 3,670 mg/l after diluting three times the original sludge with the reaction buffer.

Run No.	Initial COD/N	Final COD/(NO ₃ +NO ₂)-N	Δ COD/ Δ NO ₃ -N *	Final COD [mg/l]	Final NO ₃ -N [mgN/l]	Final NO ₂ -N [mgN/l]	N ₂ O/(N ₂ +N ₂ O) ** [%]
1-1	0.9	0.22	3.3	41	164	21	19
1-2	2.3	0.36	4.3	54	109	39	25
1-3	4.6	0.36	6.1	27	57	17	0.03

* Ratio of COD to NO₃-N consumed in the incubation period.

** Calculated from the amount of N₂O and N₂ accumulated in the incubation period.

Table 6 Result of the batch experiment with changing initial NO₃-N (Run 2-1~2-3)

Initial COD were 60, 238, 588 mg/l for Run 2-1, 2-2, 2-3, respectively.

Initial COD/N ratio were 2.4, 2.4, 2.2 for Run 2-1, 2-2, 2-3, respectively.

Initial MLSS was 3,470 mg/l after diluting three times the original sludge with the reaction buffer.

Run No.	Initial NO ₃ -N [mgN/l]	COD/N* (Phase I)	Δ COD/ Δ NO ₃ -N** (Phase I)	Final COD [mg/l]	Final NO ₃ -N [mgN/l]	Final NO ₂ -N [mgN/l]	N ₂ O/(N ₂ +N ₂ O) *** [%]
2-1	26	0.61	3.2	8	9.7	1.1	0.3
2-2	100	0.42	3.8	24	44	17	7.8
2-3	273	0.41	3.9	75	143	42	12

* COD/(NO₃+NO₂)-N ratio in the vial at the end of Phase I.

** Ratio of COD to NO₃-N consumed in Phase I.

*** Calculated from the amount of N₂O and N₂ accumulated until the largest N₂O concentration was observed.

3. 5 初期NO₃-N濃度の影響（回分実験Run 2-1～2-3）

結果をTable 6にまとめた。また、各Runについて、気相中のN₂O、N₂、CO₂濃度および液相中のNO₃-N、NO₂-N、COD濃度の経時変化をFig. 10に示した。

N₂OとCO₂は3. 4と類似の変化を示し、両者の生成速度が変化する時点を境としてPhase IとPhase IIとに分けることができた。さらに、NO₃-NとCODがPhase Iにおいて急速に消費され、Phase IIに入ると大きな消費が起らないことも確認された。

N₂Oはここでも、Phase IIへの移行後に蓄積され始めた。ただし、3. 4とは異なり培養の後半にはN₂Oの消費が起きた。N₂Oの最大蓄積時までの蓄積量よりN₂O/(N₂+N₂O)比を算出すると、各Runについてそれぞれ0.3、7.8、12%と、初期NO₃-N濃度が高いほど大きくなった。すなわち、NO₃-N濃度とN₂O生成率との間に正の相関が認められた。Phase II開始時のCOD/(NO₃+NO₂)-N比はそれぞれ0.61、0.42、0.41にまで低下していた。また、Phase Iの△COD/△NO₃-N比は、それぞれ3.2、3.8、3.9であった。

4. 考察

4. 1 連続運転リアクターでのN₂O生成に対する基質のCOD/N比の影響

基質のCOD/N比は、明らかに硝化・脱窒の進行状況に影響を与えた。NO₃-NからN₂までの完全な脱窒に必要なCOD/N比は3.5-4.5¹⁹⁾程度だと言われており、脱窒以外にも有機物が利用されうえることを考えると、系列AおよびBでは利用可能な有機物量が脱窒の制限因子になっていたと思われる。系列Aおよび40日目以前の系列BにおいてNO₃-N蓄積型の運転となったのは、このためであろう。系列Bにおいて硝化能の低下とともにNO₃-Nが減少した点は、供給されるNO₃-N量の減少により脱窒細菌にとっての実質的なCOD/N比が増加し有機物量が制限因子でなくなったためだと推察される。90日目以降硝化能が回復し始めるとNO₃-Nが再び蓄積され始めた点も、この推論を裏付けている。一方、系列Cにおいては有機物が十分に供給されたため、脱窒が完全に遂行されたと考えられる。

系列BおよびCにおいては、硝化率が低下しNH₄-Nが蓄積する現象が見られたが、混合系において有機物負荷を大きくすると硝化が阻害を受けることはしばしば報告されている²⁵⁾。これは、従属栄養細菌との酸素をめぐる競合で説明されることが多いが、本研究における系列BおよびCの好気工程終了時のDOは、それぞれ5-8、4-8 mg/lと実施設と比較しても高濃度に維持されており、見かけ上は酸素欠乏条件にはなっていない。しかしながら、COD/N比の大きい系列の方が好気工程のDOが低かったことは事実であり、また本リアクターのMLSSが高いことも考慮すると、実際には両系列において酸素の競合が硝化細菌の増殖を阻害していた可能性がある。また、NH₄-Nをめぐる競合の可能性もある¹⁷⁾。系列BにおいてSRTの制御を中止した後に徐々に硝化能が復活したことから考えても、当初設定した20日というSRTでは、有機物負荷が高い系列Cだけでなく系列Bにおいても硝化細菌がwash outされていた可能性が高い。なお、本リアクターでは運転サイクルのうち好気時間は半分に過ぎず、硝化細菌が実際に増殖可能な時間が限定されていた点にも注意が必要である。

N₂O放出量については、NO₃-Nが蓄積している条件で放出量が大きく（系列Aおよび50日目以前の系列B）、NO₃-Nが蓄積していない条件ではNH₄-N蓄積の有無に関わりなく放出量は小さい（系列Cおよび50-100日目の系列B）傾向が見られた。これらの結果より、脱窒の進行が不完全となる条件においてN₂O放出量が大きくなり、脱窒が完全に遂行されさえすれば、硝化の良否に関わらずN₂O放出量は小さく抑えられる、ということが推察される。N₂O放出量が大きい場合には無酸素工程にN₂Oが生成される傾向があり、実際、¹⁵Nを用いたN₂Oの起源推定より系列Aにおいて脱窒が主要なN₂O起源であることが示唆されたことから（4. 2 参照）、ここでのN₂Oの大量放出に対しては主に脱窒が寄与していると考えてよいだろう。そして、基質中のCOD/N比が小さい系列では脱窒が抑制されN₂O放出量が大きかった点、N₂O放出量が大きい場合には基質添加直後ではなく無酸素工程の後半に放出量が急増する傾向があった点などから、無酸素工程での脱窒の進行過程においてその時点での利用可能な有機物量がN₂O生成に対して大きく影響していることが示唆される。なお、実し尿処理施設においても、脱窒の進行が良好でない場合にN₂O放出量が非常に大きくなる傾向が見いだされており²²⁾、本研究の結果と合致している。

ただし、前述したように、本研究で用いたリアクターでは実施設と比較して好気工程のDOが高かった点には注意が必要である。硝化においては低DO条件でN₂O生成が促進されることが予想され³³⁾、好気工程のDOを1-2 mg/l程度に制限した場合には、硝化の寄与が無視できなくなってくる可能性もある。

以上の考察ではpHの影響を考慮してこなかったが、N₂O放出量が大きい場合と小さい場合とでは、混合液のpHにも違いが見られた。前者の条件では、硝化が良好に進行していたためpHが6.5-6.8程度だったが、後者においてはpHが7.0-7.5まで上昇した。脱窒において、低いpHがN₂O生成率を増加させることが知られており^{9), 10)}、本結果に

においても、 N_2O 放出量が大きかった場合の要因のひとつとしてpHも考慮すべきであろう。

混合液中の $\text{NO}_2\text{-N}$ 蓄積量と N_2O 生成量とが正の相関を示すことは、多くの研究者により報じられている^{11,9),10)}。本リアクターにおいても、両者の間には概ね正の相関が認められた (Fig. 11)。特に、極端に大きな N_2O 放出量が観測された場合には、 $\text{NO}_2\text{-N}$ も200-400 mgN/lと例外なく高濃度に蓄積していた。ただし、このような多量の N_2O 放出は一時的にのみ観測されたものであり、定常的な状態ではない。系列B (40日目以前)において、系列Aと比較して基質中のCOD/N比が大きいかかわらず N_2O 転換率が大きかった点も、比較的高濃度に蓄積していた $\text{NO}_2\text{-N}$ の影響である可能性がある。この $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積が硝化によるものであるか脱窒によるものであるかは把握できなかった。しかし、一般に硝化において後段の亜硝酸酸化細菌の方が阻害因子に対する感受性が高いことが知られており⁵⁾、部分的に阻害を受けた硝化が、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 蓄積をもたらすことにより間接的に N_2O 生成に関与していた可能性もある。

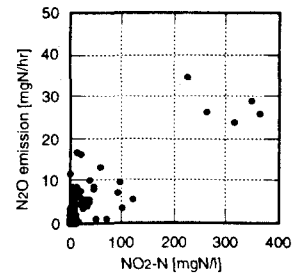


Fig. 11 Correlation between $\text{NO}_2\text{-N}$ concentration and N_2O emission in the reactor A-C

4. 2 低COD/N比運転時に生成される N_2O の起源

¹⁵Nを用いた回分実験より、系列Aリアクターにおいて大量に発生した N_2O の大半が $\text{NO}_3\text{-N}$ 由来であることが示された。 N_2O の放出が無酸素工程において顕著であったことも考慮すると、低COD/N比運転での N_2O の起源としては脱窒が主要であることは間違いないと思われる。

本推定結果によれば、好気工程において放出された N_2O も大半が $\text{NO}_3\text{-N}$ 由来であった。これには、(1) 無酸素工程において生成され過飽和に溶存していた N_2O の気相への移動、(2) 好気工程で起こった脱窒により生成された N_2O 、の2通りの可能性があるが、ここではこの両者を分離して定量することは出来ていない。しかしながら、 N_2O が溶存している純水を使って本回分実験装置での溶存 N_2O の気相への移動速度を評価した実験において、過飽和に溶存した N_2O が完全に系外に放出されるまでに約20分を要しており、本実験においても(1)による寄与が大きいと考えられる。ただ、好気工程後半には $\text{NH}_4\text{-N}$ 由来の N_2O が全体の35%程度を占め、硝化による N_2O 生成も起こっていたことを示唆している。ただしその量は、無酸素工程での脱窒由来の放出量と比べると無視しうる程度であった。

4. 3 有機物量が制限因子となる運転条件下での N_2O 生成機構

ここまでの議論で、利用可能な有機物量が制限因子となり脱窒が不完全に進行する条件で運転をおこなうと N_2O 放出量が大きく、そこでは無酸素工程での脱窒の過程で N_2O が生成されていることを示してきた。その場合、実際に脱窒細菌による N_2O 生成が促進された機構として、以下の点を挙げることができる。

- 1) 脱窒細菌が持つ N_2O 還元能力の低下 (N_2O 還元能力の低い菌種の集積も含む)
- 2) 利用可能な有機物量による制限
- 3) $\text{NO}_3\text{-N}$ 蓄積
- 4) 低pH

各系列の汚泥を用いて N_2O 還元活性を測定した結果 (3. 3) より、系列Aリアクターにおいても他の系列と同程度かそれ以上の N_2O 還元能が維持されていることが示された。したがって、脱窒細菌の N_2O 還元能力の低下では N_2O の大量発生を説明することはできない。

2回の回分実験 (3. 4, 3. 5) において、培養初期に急激な基質の消費および N_2 、 CO_2 の生成が起こる時期 (Phase I) があり、その後これらの速度が大きく低下する時期 (Phase II) が来るという傾向があった。また、Run 1-1~1-3において初期のCOD/N比を大きく設定するとPhase Iが長時間進行した。これらの事実より、Phase Iは活発に脱窒が起こる期間、Phase IIは有機物量が制限因子となり脱窒速度が低下する期間であると推察される。消費されるCODと窒素分との比 ($\Delta\text{COD}/\Delta\text{N}$ 比) が基質のCOD/N比と大差なければ、窒素に対する有機物量が一定に保たれることになるので、初期のCOD/N比がよほど小さくない限り有機物量が制限となる状態には陥らないはずである。しかし実際には、Phase IIにおいて $\Delta\text{COD}/\Delta\text{NO}_3\text{-N}$ 比で見た場合でも3.2-3.9 (Run 2-1~2-3の値) と基質のCOD/N比より大きかった。その結果として、脱窒の進行とともに混合液中のCOD/N比が低下し、有機物が脱窒の

制限因子となる状態が形成されていったと考えられる。そして、全てのRunにおいてPhase Iの間は N_2O が蓄積されずPhase IIになって初めて N_2O が蓄積され始めたことから、有機物制限条件になって初めて N_2O の蓄積が起こるものと推察される。実際、 N_2O が蓄積され始めた時点では、残留していた基質のCOD/N比は0.4-0.6にまで低下していた(Run 2-1~2-3)。

上で考察した機構は、回分実験に用いた汚泥の供給元である系列Aリアクターにおいても起こっていた可能性がある。無酸素工程初期に基質が添加された後、 $\Delta\text{COD}/\Delta\text{N}$ 比が基質のCOD/N比よりも大きいため、同工程後半において利用可能な有機物量が脱窒の制限因子となり、 N_2O の大量発生をもたらしたと推定できる。基質添加直後ではなく無酸素工程の後半になって N_2O 放出速度が最大となった点、あるいは、 ^{15}N を用いた回分実験において CO_2 濃度と N_2O 放出速度のピークに時間差が見られた点などは、この機構を支持する証拠となる。

回分実験Run 2-1~2-3の結果、初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度が高いほど、脱窒における N_2O 生成率が高くなることが示された。したがって、系列Aリアクターにおける N_2O の大量発生の要因のひとつとして、高濃度の $\text{NO}_3\text{-N}$ の蓄積が考えられる。そして、同実験において、初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度が高い場合でもPhase IIにならないと N_2O の蓄積が起こらなかったことから、 N_2O 生成に対しては利用可能な有機物量がより支配的な因子であり、高濃度の $\text{NO}_3\text{-N}$ 蓄積は有機物制限条件下で生じる N_2O の蓄積を促進する因子として位置づけることができよう。ただし、同実験においては初期 $\text{NO}_3\text{-N}$ が高い系ほど蓄積される $\text{NO}_2\text{-N}$ も大きくなったので、実際には $\text{NO}_2\text{-N}$ 蓄積量の影響が強く出ている可能性もある。しかし、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 自体が脱窒の際の N_2O 還元を阻害することを示唆している報文もある¹⁵⁾。

pHに関しては、リアクターの運転において低いpHが N_2O 生成を促進していた可能性もあるが、2回の回分実験において、初期pH=6.5で培養を開始したにも関わらずPhase Iの間は N_2O が生成されなかったことから、利用可能な有機物量の方がより支配的な因子だと考えられる。

4. 4 N_2O 放出抑制型の運転

標準的な生し尿のBOD/N比は2.5程度⁴⁾であり、 $\text{COD}_{\text{Cr}}/\text{N}$ 比はこれより大きいことを考慮しても、生し尿のみを処理する場合には利用可能な有機物量が脱窒の制限因子となって大量の N_2O 放出を招く可能性がある。

これに対する対処法としては、ひとつには脱窒のための有機物源の添加が考えられ、実際、実し尿処理施設においてメタノール添加により N_2O 放出量を抑制できる可能性を筆者らは指摘した²⁾。低COD/N比で馴致された汚泥であっても N_2O 還元活性は失われていなかったことから、有機物の供給は N_2O 大量発生時の対症療法としても有効だと考えられる。

一方、し尿の投入方法によってもこのような N_2O 生成を抑制できる可能性がある。本研究で用いた運転サイクルでは、基質は無酸素工程の初期にのみ投入された。この基質の投入時間を長く設定することにより無酸素工程の後半においても有機物が供給されれば、有機物量が制限因子となることによる脱窒からの N_2O 生成が抑制できることが予想される。ただし、 $\text{NO}_3\text{-N}$ が残留した状態で無酸素工程を終了してしまう可能性、あるいは大量の有機物の残留による硝化阻害の可能性等が考えられるので、細かな条件設定の検討が必要であろう。

5. まとめ

- (1) 高負荷間欠曝気式の室内リアクターにおいて基質のCOD/N比の影響を調べた結果、COD/N比が小さい条件で脱窒が完結せずに $\text{NO}_3\text{-N}$ が蓄積し、 N_2O が大量発生した(除去素量あたりの N_2O 転換率で20-50%)。一方、脱窒が完全に進行していれば、硝化の良否に関わらず N_2O 放出量は小さく抑制された(転換率1%以下)。
- (2) 低COD/N比で運転した系列の汚泥を用いて、 ^{15}N をトレーサーとした回分実験をおこなった結果、無酸素工程における脱窒が主要な N_2O ソースであると推定された。
- (3) 低COD/N比運転で N_2O を大量に放出している場合でも、脱窒細菌の N_2O 還元活性は維持されていた。
- (4) 低COD/N比で運転した系列の汚泥を用いて回分実験をおこなった結果、利用可能な有機物量が脱窒での N_2O 蓄積に対して重要な因子であり、有機物制限状態とならない限り N_2O の蓄積は起こらないことが示唆された。
- (5) $\text{NO}_3\text{-N}$ の蓄積は、有機物制限条件下での脱窒からの N_2O 生成率を上昇させることが示唆された。
- (6) N_2O 放出抑制の見地からは、脱窒を完全に遂行させ $\text{NO}_3\text{-N}$ を蓄積させない運転条件の設定が肝要である。また、有機物量が制限因子となり N_2O が大量発生している場合であっても、脱窒細菌の N_2O 還元活性が維持されていることから、有機物を添加することにより速やかに発生抑制が可能であることが予想される。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費補助金(COE形成基礎研究費)の補助を受けておこなわれた。

参考文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) し尿処理ガイドブック編集委員会編 (1978) し尿処理ガイドブック、pp. 14.
- 5) 遠矢泰典 (1970) 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検討 -、下水道協会誌、74(7)、21-42.
- 6) 日本化学会編 (1993) 化学便覧 (改訂 4 版) 基礎編 I、pp. I-34.
- 7) 日本下水道協会 (1984) 下水試験方法 - 1984 年版 -、pp. 145-147, 157-158.
- 8) 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.
- 9) 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操作因子の関係、下水道協会誌論文集、30、30-42.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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. Proc.*, 29, 504-507.
- 14) Czepl, P., P. Crill & R. Harriss (1995) Nitrous oxide emissions from municipal wastewater treatment. *Environ. Sci. Tech.*, 29, 2352-2356.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) Hanaki, K. (1990) Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor. *Wat. Res.*, 24, 289-296.
- 18) Hanaki, K., H. Zheng & T. Matsuo (1992) Production of nitrous oxide gas during denitrification of wastewater. *Wat. Sci. Tech.*, 26 (5-6), 1027-1036.
- 19) Henze, M., G.H. Kristensen & R. Strube (1994) Rate-capacity characterization of wastewater for nutrient removal processes. *Wat. Sci. Tech.*, 29(7), 101-107.
- 20) Hynes, R.K. & R. Knowles (1984) Production of nitrous oxide by *Nitrosomonas europaea*: effects of acetylene, pH, and oxygen. *Can. J. Microbiol.*, 30, 1397-1404.
- 21) 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.
- 22) Itokawa, H., K. Hanaki & T. Matsuo (1996) Nitrous oxide emission during nitrification and denitrification in a full-scale night soil treatment plant. *Wat. Sci. Tech.*, 34 (1-2), 277-284.
- 23) Knowles, R. (1982) Denitrification. *Microbiol. Rev.*, 46, 43-70.
- 24) Mosier, A.R. (1994) Nitrous oxide summary. in *CH₄ and N₂O: Global Emissions and Controls from Rice Fields and Other Agricultural and Industrial Sources*, NIAES, pp. 135-139.
- 25) Painter, H.A. (1970) A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms. *Wat. Res.*, 4, 393-450.
- 26) Prosser, J.I. (1989) Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 30, 125-181.
- 27) 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.
- 28) Sümer, E., A. Weiske, G. Benckiser & J.C.G. Ottow (1995) Influence of environmental conditions on the amount of N₂O released from activated sludge in a domestic waste water treatment plant. *Experientia*, 51, 419-422.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) Wilhelm, E., R. Battino & R.J. Wilcock (1976) Low-pressure solubility of gases in liquid water. *Chem. Rev.*, 77, 219-261.
- 32) Yoshida, T. & M. Alexander (1970) Nitrous oxide formation by *Nitrosomonas europaea* and heterotrophic microorganisms. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 34, 880-882.
- 33) Zheng, H., K. Hanaki & T. Matsuo (1994) Production of nitrous oxide gas during nitrification of wastewater. *Wat. Sci. Tech.*, 30 (6), 133-141.