

(3)

モリブデン欠乏下での硝化脱窒現象

Nitrification Denitrification under Molybdenum Deficiency

柳瀬 真* 高橋真哉** 田中知美** 松尾吉高**

Makoto YANASE*, Masaya TAKAHASHI**, Tomomi TANAKA**, Yositaka MATSUO**

ABSTRACT; Nitrification and denitrification process is a useful means of nitrogen removal of wastewater including night soil. A current concern about the process is the possibility that N_2O , a green-house effect gas could be released by the nitrogen removal. The mechanism of so called "aerobic denitrification" also remains to be elucidated. In this study, two lab-scale models of the nitrification denitrification process of a mixed liquor recycle type were operated under conditions similar to those of "High Rate Process" amply adopted in night soil treatment and characterized by high MLSS concentration and high volumetric loads of nitrogen and organic matter. During the operation, the content of nutritional metals (Cu, Fe, Zn, Mn, Co and Mo) in the influent was varied to investigate the effects of the metals on nitrification and denitrification. The deficiency of Mo in the influent resulted in a halt of the oxidation of NO_2^- to NO_3^- , which accompanied a prominent aerobic denitrification concomitantly releasing N_2O in a large amount. This finding suggests that Mo is a metal essential for preventing N_2O emission from the nitrification denitrification process.

KEYWORDS; aerobic denitrification, greenhouse effect., molybdenum deficiency, nitrous oxide.

1. はじめに

硝化脱窒法が窒素除去技術として開発されてから既に30年の歳月が経過し⁽¹⁾、排水処理技術としてはほぼ完成の域に達している。しかし、今もってなおいくつかの問題も残されている。その一つは、好気脱窒と呼ばれる現象で、これは幾つかのし尿処理実施設で生じていると報告されているが⁽²⁾、室内実験での再現が難しいこともあって、その機構の詳細が不明のままに残されている。第二の問題点は、地球温暖化物質である亜酸化窒素 (N_2O) が硝化脱窒過程で発生する可能性である。脱窒の最終生産物の一部が N_2O になる可能性は古くより知られてはいたが⁽³⁾、それが地球環境の保護に問題であると認識されたのはごく最近のことである⁽⁴⁾⁽⁵⁾。硝化脱窒法からの N_2O 発生量については、いまだ実態把握が不十分ではあるが、いくつかのし尿処理施設ではかなりの量の N_2O 発生が観測されている⁽⁶⁾⁽⁷⁾。しかし、下水処理における硝化脱窒法施設での N_2O はわずかであり⁽⁸⁾⁽⁹⁾、また、し尿処理の場合であっても、施設によってはほとんど N_2O が発生しないとの報告もある。したがって、 N_2O 発生の条件を明確にしさえすれば N_2O の発生量を抑制できる可能性もある。

筆者らはこの五年間ほど、し尿処理で利用されている膜分離高負荷硝化脱窒法（固液分離に分離膜を利

* (株) 新日本開発工業 (Shin-Nihon Kaihatsu Kougyou Co. Ltd)

** 中央大学理工学部 (Faculty of Science & Engineering, Chuo University)

用することにより MLSS 濃度を維持して高容積負荷で処理する硝化脱窒法。以下においては高負荷法と略記する) を模擬した室内規模の連続実験装置により N_2O 発生 の条件と機構を研究し、これまでに、1) 回分式高負荷法よりも循環式高負荷法のほうが N_2O 発生しにくい、2) N_2O 発生は硝化過程で蓄積する窒素酸化物イオン種に関係があり、 NO_3^- よりも NO_2^- が蓄積する場合に N_2O が発生しやすいなどの知見を得ている⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾。

しかし、循環式高負荷法連続実験装置においても、ときとしてかなりの N_2O を発生することもあった。とりわけ、多量に発生したのは、硝化が悪化した後の回復過程である場合が多かった。硝化悪化の原因の多くは曝気不足によるものであったが、なかには原因が不明の硝化不良もあった。その場合には脱窒菌培養用微量金属塩溶液⁽¹²⁾を硝化液に数滴加えると回復したが、この回復過程では NO_2^- の蓄積とともに多量の N_2O が発生し、その以後に NO_3^- 蓄積型の硝化が確立すると N_2O 発生が低下するという挙動を示した。このことから、脱窒菌培養用微量金属塩溶液に含まれている Cu、Fe、Zn、Mn、Mo、Co のいずれかが、硝化や N_2O 発生抑制に効果を持っていると推定し、その金属を同定するために、連続実験装置への流入水からこれらの金属を順次除き、その硝化・脱窒に及ぼす影響を観察する実験を行なった。本報文では、それらの実験結果のうち、 NO_2^- から NO_3^- への酸化段階の硝化が進行せずに、それとともに多量の N_2O 発生を伴う好気脱窒が生じた Mo 欠乏流入水を供給した場合の実験結果を中心に報告する。

2. 実験材料と方法

2.1 連続実験装置と運転方法

Fig. 1 に高負荷硝化脱窒法連続実験装置の概略を示す。硝化槽には内容積5.8 L、液容積4.0 Lの攪拌機を備えた密閉槽を用いた。曝気は、新鮮空気補給と排気を間欠的に行ないながら槽内ガスを循環する方法で行い、この新鮮空気補給量を適宜調整することにより硝化槽液 DO を2.0~4.0 mg/L に制御した。また、この槽には pH 電極が挿入されており、2N-NaOH で槽内液 pH の下限値を7に制御した。脱窒槽も攪拌機を備えた密閉槽でその1.0 L の内容積は完全に液で満たされている構造となっている。硝化槽と脱窒槽とは恒温槽に設置し、反応液温を33℃に制御した。固液分離には、有効膜面積122cm²の交差流型平膜モジュールを利用し、膜材には公称排斥分子量20000の UF 膜(日東電工 NTU-2120)を用いた。

本実験においては、このような連続実験装置 2 系列に対して金属塩添加種だけを変えた合成排水を同じ水理条件で通水し、金属塩の硝化脱窒に及ぼす影響を調べた。装置運転条件をTable 1 に、また、金属塩を除いた合成排水の組成をTable 2 に示す。合成排水中の成分が貯留・供給の過程で沈殿するのを防ぐために、合成排水は実際には、 NH_4HCO_3 および KH_2PO_4 を含む液とそれ以外の成分を含む液との2液に分けて作製し、その2液を脱窒槽の流入口直前で合流させた。Table 2 に示される濃度は2液混合後の値である。2液を合計した合成排水の通水量は2 L/day で、硝化槽、脱窒槽を合わせた全反応槽液容積から計算される HRT は2.5日であった。余剰汚泥はタイマー制御ポンプで自動的に引き抜いたが、この量に分析に供された混合液量を加えた値から計算される SRT は13日前後であった。槽容積あたりの N 負荷は

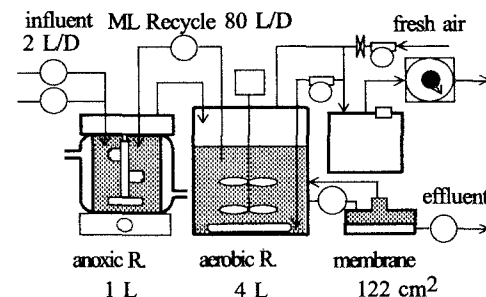


Fig 1 Unit for Continuous Experiment

Table 1 Operational Terms

Temp	33 C,	pH >7.1	MLSS	13-16 kg/m3
NH ₄ -N Load	1.0 kg/m3/D	HRT	2.5 days	
DOC Load	1.8 kg/m3/D	SRT	12-14 days	

1.0 g/L/day、DOC 負荷は2.0 g/L/day と高いが MLSS (MLTS) も13-16 g/L と、それ相応に高いので汚泥あたり負荷はそれほど高いものではない。硝化槽から脱窒槽への循環混合液量は Mo 欠乏を調べた実験の後期を除けば、実験全期にわたり 80 L/day に制御した。脱窒槽で脱窒が完全に行われ、硝化槽で硝化が完全に行なわれ、しかも、そこで好気脱窒などによる窒素損失がなければ、この運転条件下での脱窒液の $\text{NH}_4\text{-N}$ と硝化液の $\text{NO}_x\text{-N}$ は 62 mg/L 程度になると計算される。

2 系列の各運転期間に加えた金属濃度を Table 3 に示す。この濃度は、参考文献⁽⁹⁾記載の脱窒菌培養用微量金属塩液の組成を参考にして定めた。最初に、すべての金属塩を加えた対照系 (Run A1) と Cu 欠乏の実験系 (Run B1) とを並列に運転した。Cu の欠乏は、一時的な N_2O 発生をもたらすものの、暫く運転すると N_2O 発生は止まった。このことから、Cu は不可欠なものではないと判断し、次の Fe 欠乏の影響を調べた第2実験期では、対照系 (Run A2) と実験系 (Run B2) とともに、Cu 塩を除いた合成排水を通水した。第3実験期では、一方の装置 (A 系列) では、Zn、Mn、Co の欠乏の影響を観察し (Run A3~A5)、一方の装置 (B 系列) では、Mo の欠乏の影響を調べた (Run B3)。Mo 不足実験系においては、好気脱窒と N_2O 発生が生じたが、循環液量の相違がそれらの現象に及ぼす影響を調べるために、低循環液量 (16 L/day) の運転を行なった (Run B4)。

Table 2 Composition of Influent

CH_3COOH	11000	mg/L	NH_4HCO_3	2500	mg/L as N
Yeast Extract	90		$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	630	mg/L
KH_2PO_4	1100		$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	64	
NaCl	50		Metal Solution		

NH_4HCO_3 and KH_2PO_4 are segregated to prevent precipitation and putrefaction during storage.

Table 3 Metals Supplied

Run & Mode	Fe	Cu	Mo (ug/L)	Co	Zn	Mn
A1 Reference	2500	60	70	6	36	35
B1 Cu deficient	2500	0	70	6	36	35
A2 Fe supplied	2500	0	70	6	36	35
B2 Fe deficient	5	0	70	6	36	35
A3 Zn deficient	2500	0	70	6	0	35
A4 Mn deficient	2500	0	70	6	0	0
A5 Co deficient	2500	0	70	0	0	0
B3 Mo deficient	2500	0	70	6	0	0
B4 Mo deficient	2500	0	70	6	0	0

The metals were supplied as salts as follows;

Fe : $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Mo : $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Cu : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Co : $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Zn : $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ Mn : $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

2.2 分析・測定方法

連続実験での水質分析および排出ガスの測定は週3回隔日毎に行った。水質分析では、流入水、流出水のほか、硝化槽内液と脱窒槽液のろ過液について、 $\text{NH}_4\text{-N}$ (HBrO による NH_4^+ 酸化を利用した電量滴定法)、陰イオン類 (イオンクロマトー Dionex 2000 I による)、DOC (Shimadzu TOC-500 による) を測定し、日あたり N_2O 発生量はガス流量計で計測した排気量に排気中の N_2O 濃度を乗じて求めた。 N_2O 濃度は PID (光電離化検出器) を備えたガスクロマトグラフで測定した。汚泥混合液の溶存 N_2O 濃度の測定はヘッドスペース法 (試料混合液と濃厚 NaCl 液を気密バイアルに封入した後に機械的に振動・混合して気液平衡状態に達した気相の N_2O 濃度から求める方法) によった。反応槽内の汚泥濃度の測定は、混合液を直接磁皿で蒸発する全蒸発残渣法 (MLTS、MLTVS) によった。

2.3 回分実験手法

連続実験での現象、とりわけ Mo 欠乏状態の活性汚泥が示した好気脱窒現象の機構を理解するために連

続実験装置より排出された余剰汚泥を用いて硝化と脱窒の挙動を回分実験で検討した。

硝化実験および NO_2^- と NO_3^- を出発基質とする脱窒実験では、Fig. 2 のように精密ガス混合器、密閉反応器およびガス流量計の3者を組み合わせた装置を用いた。この反応器は反応液の液温 (33°C) と pH (7.1) が自動制御できるようになっている。

また、反応器に DO 計を取りつけ、通気する2ガス（純空気と窒素）の流量を調節することにより、反応液 DO を制御をした。 N_2O を出発基質とする脱窒実験においては、基質が気体であることから図3のような36 L の循環ガス貯留槽を付け加えた密閉系の回分実験装置を用い、反応器上部および循環ガス貯留槽のガスを反応液に吹き込み循環させた。嫌気状態の還元実験においては、循環ガスとして所定量の N_2O を添加した窒素を用いた。また、好気状態の還元実験においては、その窒素に替えて DO が所定濃度になる割合で純空気と窒素を混合させたガスを用いた。それぞれの N_2O の変化は、循環ガス中の N_2O 濃度を測定することによって求めた。

余剰活性汚泥は、濃度が15 g/L as MLSS 前後と非常に高いので、いずれの実験においても、余剰活性汚泥液を処理液もしくは連続実験の合成排水と同濃度に調整した無機塩類液で4ないし5倍に希釈して実験に供した。硝化実験では、これに窒素基質 (NH_4^+ あるいは NO_2^-) 液を添加して実験を開始した。脱窒実験では、窒素基質 (NO_3^- 、 NO_2^- 、あるいは N_2O) とならんで還元用の有機物として CH_3COONa を500mg/L as DOC 加えて実験を開始した。なお、 NO_3^- を窒素基質とする場合には NaNO_3 を、また NO_2^- を窒素基質とする場合には NaNO_2 を用いた。分析・測定方法は連続実験のそれに準じて行った。 N_2O 還元実験を除く実験では、測定時刻の排気ガス N_2O 濃度に排気速度を乗じて N_2O 発生速度 (mg-N/h) を求めた。なお、実験開始時の反応液量は 1.1 L で、実験終了時には採取試料量に対応して、0.97~0.95 L になった。従って、 N_2O 発生速度 (mg-N/h) を 1 L で除した値がおおむね液量あたりの N_2O 発生速度換算値 (mg-N/L·h) であると考えてよい。

3 実験結果と考察

3.1 Mo 以外の金属を欠乏させた連続実験の結果

各 Run での流出水質、 N_2O 発生率などのデータを Table 4 に示す。一連の連続実験全体の結果を総括すると、Zn と Mn が欠乏しても硝化脱窒への影響は小さいが、Cu、Fe、Co、および Mo の欠乏は硝化脱窒に少なからず影響すると言える。

硝化・脱窒が正常に進行している状態の例として、Zn 欠乏状態 (Run A3) と Mn 欠乏状態 (Run A4) における硝化槽液 N 濃度および脱窒槽液 N 濃度の経日変化を Fig. 3 に示す。硝化槽での硝化は NO_2^- 蓄積が起こることなく NO_3^- まで完全に酸化され、その液の NO_3^- -N 濃度は脱窒槽液 NH_4^+ -N 濃度とほぼ同じになっていることが理解される。なお、この場合には、 N_2O の発生は全く見られない。このような正常な硝化脱窒状態は、曝気不全による硝化槽への酸素供給不足時を除けば、すべての金属塩を供給した対照系 (Run A1) においても、また Cu だけを除いた (Run A2) においても同様に維持された。

Fig. 4 に流入水から Cu を除いた運転状態 (Run B1) での N_2O 発生率と硝化槽液 N 濃度での経日変化を示す。Cu については、それが、多くの脱窒菌における N_2O 還元酵素の活性中心であると報告されて

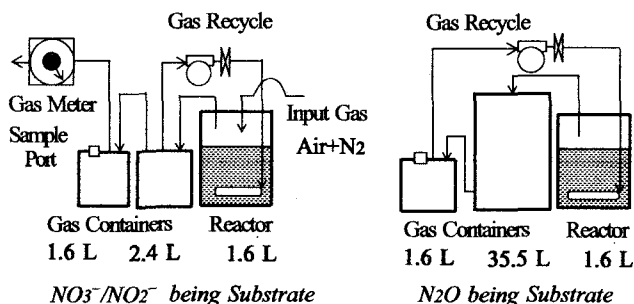


Fig 2 Apparatus For Batch Experiments

Table 4 Summary of Operational Results

Run & Mode	MLTS (mg/L)	Ave. Effluent Qualities (mg/L)				Type of Nitrific.	N ₂ O Conv.	N ₂ O Producing Reactor
		NH ₄ -N	NO ₂ -N	NO ₃ -N	DOC			
A1 Reference	15400	5.3	2.0	59	19	NO ₃ ⁻	0 %	—
B1 Cu deficient	14700	4.7	4.7	53	17	NO ₃ ⁻	5-40*	Anoxic Reactor
A2 Fe supplied	12400	1.4	1.1	53	18	NO ₃ ⁻	0	—
B2 Fe deficient	12600	218	1.7	36	15	decline	0-4	—
A3 Zn deficient	13400	0.8	0.0	54	13	NO ₃ ⁻	0	—
A4 Mn deficient	12200	0.4	0.6	60	11	NO ₃ ⁻	0	—
A5 Co deficient	13400	1.0	7.3	46	9	Mix	5-30	Aerobic Reactor
B3 Mo deficient	16700	3.5	7.7	13	13	NO ₂ ⁻	30-60	Aerobic Reactor
B4 Mo deficient								

*)The emission was temporal.

いる⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾ところから、その欠乏が N₂O 発生をもたらすと予想された。実際、欠乏実験開始直後には、多量の N₂O 発生をもたらした。しかし、一ヶ月足らずして、その N₂O 発生は減少しはじめ、最終的には全く正常な硝化脱窒が行われるようになった。このことは、自然界には、Cu を N₂O 還元酵素の活性中心としない脱窒菌も存在することを示唆している。なお、Cu は亜硝酸菌の NH₄⁺酸化酵素の活性中心であるとの報告⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾もあるが、本実験では、Cu 不足によって NH₄⁺酸化が悪化することはなかった。

Fig. 5 は、流入水の Fe 濃度を低くした状態 (Run B2) での運転結果を示したものである。流入水が

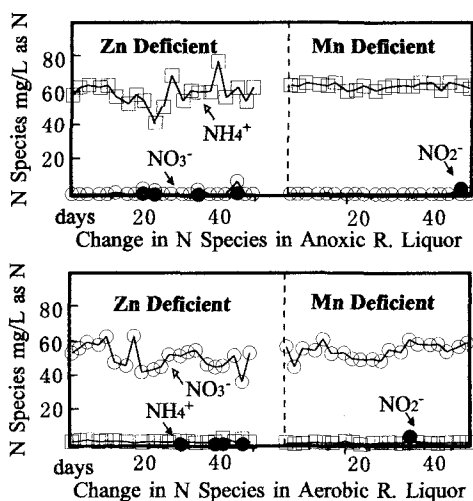


Fig 3 Operational Results of Zn/Mn Deficient Units

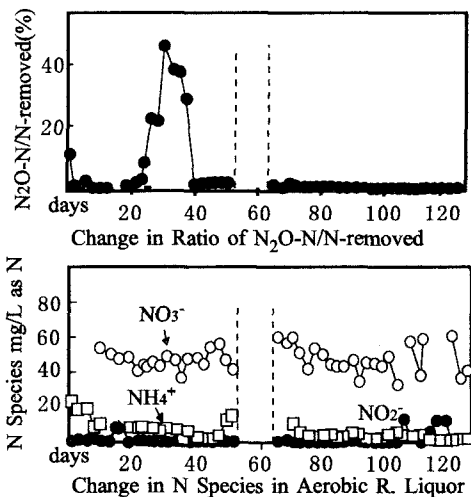


Fig 4 Operational Results of Cu Deficient Unit

ら Fe を除くと、当初は正常な硝化・脱窒が進行したものの、35日後近傍より硝化槽液に NH₄⁺が残留するようになった。残留 NH₄⁺が700mg/L as N前後になった時点で窒素基質の流入を半減してみたが、硝化の回復は見られず、残留 NH₄⁺が1000mg/L as Nを越えた時点で実験を打ち切った。脱窒への Fe 欠乏の影響については不明であるが、少なくとも硝化には相当量の Fe の存在が不可欠であると判断される。

Co 欠乏実験は約100余日間行なったが、Fig. 6 に示されるように前半期において、硝化槽液に NO₂⁻の蓄積が観察され、その時点で比較的に高 N₂O 転換率になった。後半期においては、NO₂⁻蓄積は観察さ

れなくなったが、なお、いくばくかの N_2O 発生量が観察された。硝化槽液の NO_3^- の濃度は理論的に求

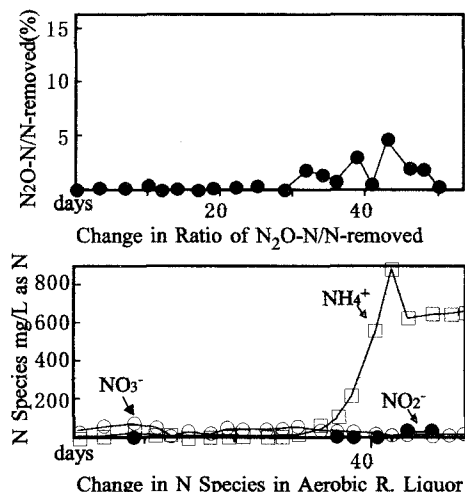


Fig 5 Operational Results of Fe Deficient Unit

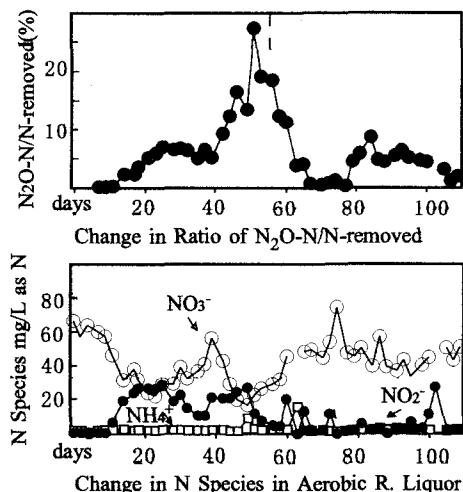


Fig 6 Operational Results of Co Deficient Unit

められる値よりも低く、硝化槽で好気脱窒が生じていたと推定される。また、データは示さないが、脱窒混合液中の溶存 N_2O 濃度のほうが、硝化混合液中溶存 N_2O 濃度よりも高く、 N_2O 発生は硝化槽で生じていたと推定される。 Co については、硝化菌、脱窒菌のいずれについても、その生理作用に及ぼす影響が不明であるので、発生機構については不詳である。しかし、おそらくは後述する Mo 不足の場合と同様に、 Co 不足によって硝酸菌が十分に増殖できないために、硝化過程での NO_2^- 残留をもたらし、そのことにより N_2O 発生を伴う好気脱窒が生じたのであろうと推定している。

3.2 Mo を欠乏させた連続実験の結果

本連続実験で最も興味深い結果をもたらしたのは、流入水から Mo を除いた場合である。この Mo 不足実験は約200日間継続した。前半期 (Run B4) では循環量を定格通りの80 L/day とし、後半期間 (Run B3) においては16L/day とした。それぞれの状態での実験結果を Fig. 7 および Fig. 8 に示す。循環流量を80 L/day にした前半期間をみると実験開始当初の硝化形式は NO_3^- 蓄積型であったが、実験開始後20日目あたりより、硝化槽に蓄積する NO_3^- は急速に減少し、36日目にはほぼ消失した。それに対応して NO_2^- 濃度が増加してきた。しかし、この NO_2^- 濃度には変動があるが、最大でも20mg/L as N 程度であった。この値は好氣的脱窒が生じていないとの仮定のもとで計算した値62 mg/L as N の1/3にすぎない。一方、 N_2O 転換率は10日目より増加の一途をたどり、45日目前後に最大値50%を記録した。この時期は硝化槽 NO_2^- 濃度がもっとも低く10mg/L as N 以下であった。その後、 N_2O 転換率は徐々に低下し夏期休業直前には30%になった

夏期休業後の後半期では、循環流量を80 L/day に低下させて、その影響を観察した。この状態での好気脱窒が生じないことを前提とした硝化液蓄積 NO_x^- は脱窒槽液 NH_4^+ と同一の 270 mg/L as N であるはずであるが、実際に蓄積した NO_2^- 濃度は高々40 mg/L as N で、多くの日々では20 mg/L as N 程度であった。すなわち、除去窒素量の90%以上が硝化槽で消失していたことになる。 N_2O 転換率は一時的に20%程度まで低下したこともあったが、大勢としては上昇を続け、最終的には50-60%になった。

この連続実験装置では装置全体での N_2O 発生量しか測定できない。硝化槽液および脱窒槽液に溶存している N_2O -N 量の測定値をみると Fig. 9 のようになり、移送硝化槽液に含まれていた N_2O が脱窒槽で

消失していたことがわかる。このことは、硝化槽で生成された N_2O が脱窒槽では N_2 に還元除去されてい

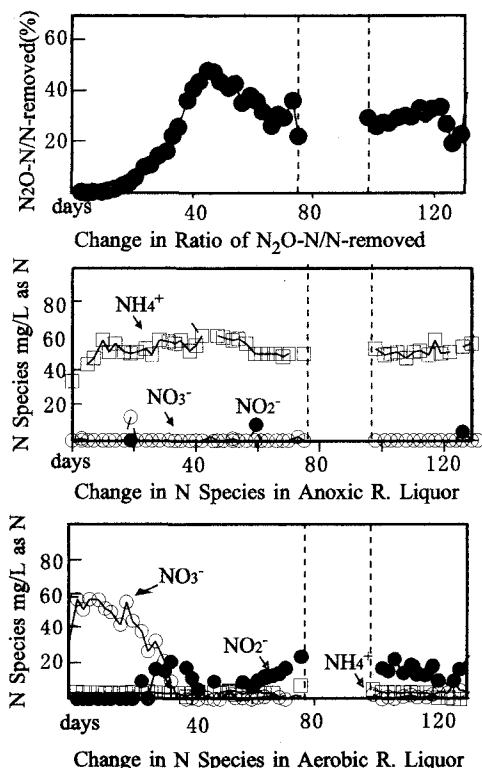


Fig 7 Operational Results of Mo Deficient Unit
(ML Recycle : 80 L/day)

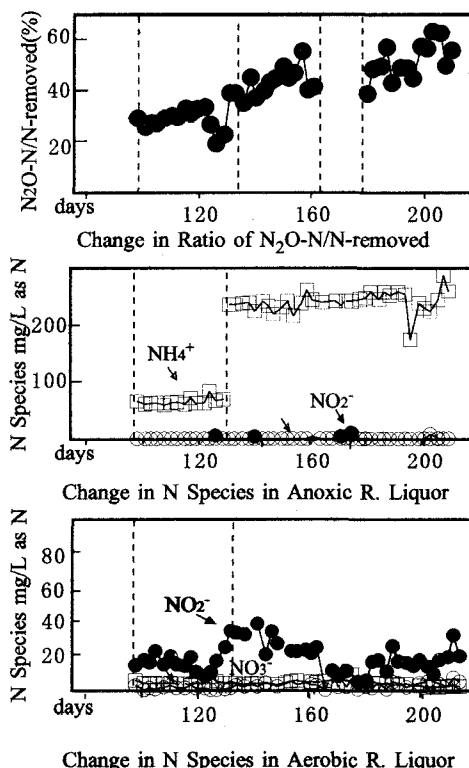


Fig 8 Operational Results of Mo Deficient Unit
(ML Recycle : 16 L/day)

たことを示唆している。興味深いことに、第1実験区では移送硝化液溶存 N_2O のすべてが除去されていたのに、脱窒槽での実質液滞留時間がより長くなった第2実験区では脱窒液に溶存 N_2O が残留するようになった。このことから、汚泥のもつ N_2O 還元力は、後半部で前半部より低くなっていたと推定される。

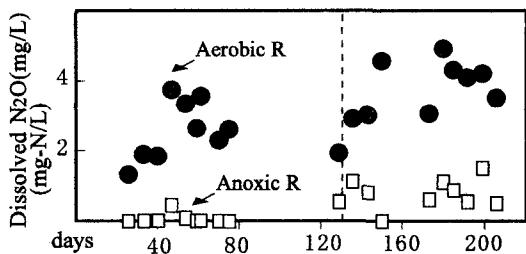


Fig 9 Dissolved N_2O in Aerobic & Anoxic Liquors
(Mo Deficient Unit)

3.3 回分実験による N_2O 発生機構の検討

上記のように、流入水から Mo 塩を除外した Mo 欠乏下の高負荷硝化脱窒法連続実験装置においては、硝化形式が NO_2^- 蓄積型に変化するとともに硝化槽で好氣的脱窒が生じ、その際に大量の N_2O が発生した。この現象の機構を理解するために、Mo 欠乏系連続実験装置から排出される余剰汚泥を利用して、いくつかの回分実験をおこなった。

1) 硝化実験

最初に、この汚泥による硝化を調べた。この実験においては、脱窒の水素供与体になり得る細胞内蓄積有機物を除去するために事前に供試余剰汚泥液を1時間ばっきしたのちに、これを希釈し、基質として

(NH_4) $_2\text{SO}_4$ (亜硝酸化実験の場合) もしくは NaNO_2 (硝酸化実験の場合) を適当量加えた。そして、反応液の DO が 2mg/L になるように調整した Air/ N_2 混合ガスを通気し、溶存窒素濃度と排気中 N_2O 濃度の時間変化を追跡した NH_4^+ 酸化実験においては、Fig. 10 に示されるように硝化された NH_4^+ -N 量とほぼ同量の NO_2^- -N 量が蓄積した。後述するように、この活性汚泥に生息する脱窒菌は好気状態でも NO_2^- を還元するが、十分に曝気を受けて細胞内蓄積有機物が減少している場合には NO_2^- を還元し得ないと推定される。なお、データには示していないが、その過程では N_2O の発生はなかった。

一方、 NO_2^- 酸化実験においては、 NO_2^- の減少も NO_3^- 蓄積も観察されなかった。このことから、Mo 欠乏状態で生育された汚泥には硝酸菌が存在していなかったと推定される。また、いずれの実験においても N_2O 発生が観察されなかったことは、硝化槽における N_2O 発生が硝化菌によるものでなかったことを示唆している。Mo は脱窒菌の NO_3^- 還元酵素 (nitrate reductase or nitrite oxido-reductase) の活性中心である⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁷⁾ ことが知られているが、硝酸菌もまた、類似の酵素を NO_2^- から NO_3^- への酸化する酵素を利用していると言われている⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾。Mo 欠乏状態で培養された活性汚泥は NO_2^- 酸化能力を欠落しているという本実験の観察結果は、このような微生物学分野の知見と合致する。

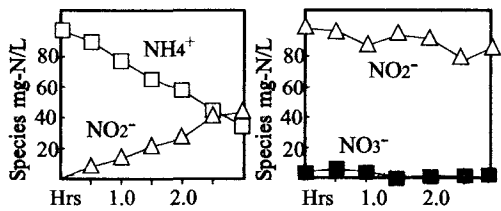


Fig 10 Oxidation of NH_4^+ and NO_2^- by Mo Deficient Sludge

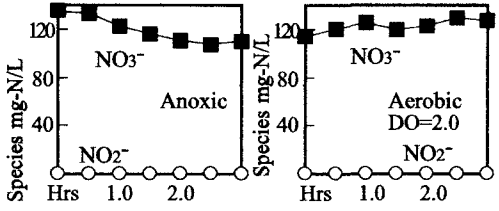


Fig 11 Reduction of NO_3^- by Mo Deficient Sludge

2) 脱窒実験

前述のように、脱窒をしらべた回分実験においては、希釈された余剰汚泥液に対して還元用の有機物として CH_3COONa を 500mg/L as DOC の割合で加えて、酸化態窒素の変化を測定した。

NO_3^- については、Fig. 11 に示されるように、嫌気状態 ($\text{DO}=0\text{ mg/L}$)、好気状態 ($\text{DO}=2\text{ mg/L}$)、を問わずほとんど還元されなかった。このように、Mo 欠乏状態で培養された汚泥が NO_3^- 還元能力を欠いていたことは、 NO_3^- 還元酵素の活性中心が Mo であるとの微生物学分野との知見⁽¹¹⁾⁽¹²⁾とも一致するが、連続実験系では、硝化が NO_2^- 蓄積までにとどまり、そのために脱窒菌が NO_3^- 還元能力を持つ必要がなかったことも原因として考えられる。

一方、 NO_2^- については、Fig. 12 に示されるように、嫌気状態 ($\text{DO}=0\text{ mg/L}$)、好

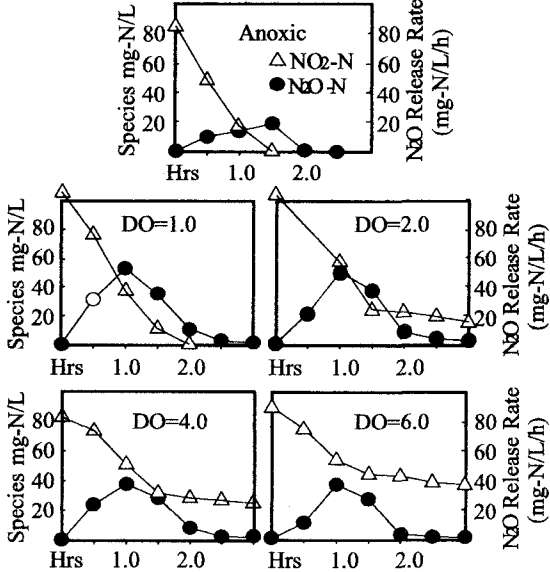


Fig 12 NO_2^- Reduction by Mo Deficient Sludge under Various DO Levels

気状態 (DO=1、2、4、6 mg/L) のいずれにおいても還元され、その過程で N_2O が発生した。DO が高くなるに従い、実験の途中で NO_2^- の還元が停止する傾向が強くなるが、これは、並行して行われている O_2 による酸化のために、還元用有機物が不足したためと思われる。Fig. 13 に示すように、1 時間までの物質収支より求めた初期の NO_2^- 還元速度は DO 濃度の増加とともに低下する傾向を示したが、 N_2O への転換率は、1 mg/L 以上の DO で、60～80% とほぼ一定であった。以上の結果より、

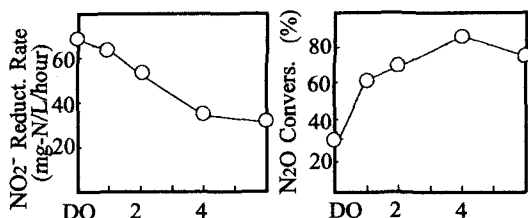


Fig 13 DO vs NO_2^- Reduction Rate and DO vs N_2O Conversion Rate

Mo 欠乏状態で培養された活性汚泥に存在する脱窒菌は、還元用有機物が存在する限り少なくとも NO_2^- については、DO 濃度のいかに関わらず還元する能力をもっていたと推定される。

Mo 欠乏活性汚泥を用いた、 N_2O 還元実験の実験結果を Fig. 14 に示す。好気状態 (DO=2 mg/L) に比べれば、嫌気状態 (DO=0 mg/L) で N_2O 還元が生じていたことが理解される。しかし、同時期に運転していた Co 欠乏活性汚泥のそれ (Fig. 15) に比べれば、その量も、その速度も非常に小さい。このように、Mo 欠乏活性汚泥の脱窒菌が、わずかな N_2O 還元能力をもたなかったのは、Mo 欠乏状態での連続運転下では、硝化槽で生成される N_2O の大部分が曝気とともに排出されるので、この状態で培養される脱窒菌は N_2O 還元酵素を多量に保持する必要性が小さかったためと思われる。

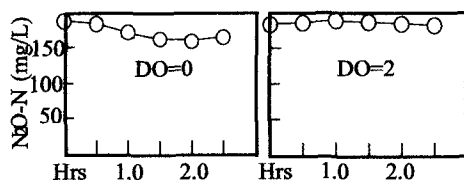


Fig 14 N_2O Reduction by Mo Deficient Sludge

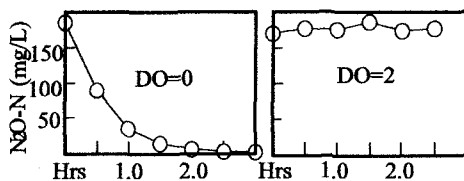


Fig 15 N_2O Reduction by Co Deficient Sludge

Co 欠乏活性汚泥の実験で典型的に示されるように、 N_2O 還元酵素は酸素存在下においてはほとんど不活性である。一方、 NO_2^- 還元酵素は酸素存在の有無に関わらず活性をもつ。したがって、Mo 欠乏状態のように、硝化槽における NH_4^+ の酸化が NO_2^- 生成にとどまる NO_2^- 還元は行われるが、生成した N_2O は好気状態のもとではそれ以上還元されないため、 N_2O の大部分が曝気によって除去され、結果的には硝化槽において硝化と脱窒 (N_2O) が同時におこることになる。すべての好気脱窒現象において N_2O 生成が伴うとは言い切れないが、 N_2O 還元酵素が酸素条件下で不活性であるとすれば、その可能性は高い。

Mo 欠乏下で、好氣的に N_2O 生成を行う好気脱窒が生じたのは、Mo 欠乏そのものが直接の原因ではなく、その欠乏によって硝酸菌の増殖が阻害され、結果として硝化が、 NO_2^- 蓄積に留まったためであろうと思われる。言い換えれば、別に Mo 欠乏が原因ではなくとも、なんらかの条件で硝酸菌の増殖が不十分で NO_2^- 蓄積が生ずれば、同様の現象が結果として起こり得ると思われる。排水から窒素を除去する目的からすれば、このような NO_2^- 蓄積型の硝化とそれに伴う好気脱窒は、硝化槽への酸素供給量や pH 調整剤添加量を削減できる点で有利であろう。しかし、 N_2O が地球温暖化物質として認識された現在においては、たとえ N_2O 排出規制がなくともこのような現象を排水処理において実現させてはならないと考える。し尿処理の硝化脱窒施設でしばしば観察されている N_2O と Mo 不足との関係は詳かではないが、Mo 塩は比較的安価な薬品であるので、し尿処理に限らず、もし Mo 不足が原因で N_2O が発生するのであ

れば、 N_2O 発生抑制剤として Mo 塩を添加すべきであると考え。

なお、 Mo 欠乏下で培養された活性汚泥がなぜ NO_2^- だけを好気状態でも還元し得るのかについては、不詳であるが、脱窒酵素のうち NO_2^- 還元酵素（および NO 還元酵素）が酸素に対して不感応であるという現象は単離された脱窒菌においても観察されている⁽¹⁸⁾。また、一般的に NO_2^- は生体毒で、多くの微生物が解毒のために非呼吸的に（つまり、 ATP 生産とせずに） NO_2^- を N_2O まで還元すると報告⁽¹⁹⁾されている。本実験で、観察された好気脱窒も、そのような非呼吸的 NO_2^- 還元であった可能性もある。全ての栄養金属が供給されている正常の状態では培養された活性汚泥についても、それが好氣的に NO_2^- 還元機能を持つかどうかなどを調べて、これらの点を更に検討して行きたい。

4 まとめ

し尿処理で行われている高負荷硝化脱窒法を模擬した室内実験を行ない、各種の微量栄養性金属欠乏が硝化・脱窒、とりわけ、 N_2O 発生に及ぼす影響を調べた。その結果、次のような知見を得た。

- 1) Zn の欠乏と Mn の欠乏は、硝化、脱窒のいずれにも顕著に影響しない。
- 2) Fe の欠乏は NH_4^+ 酸化段階の硝化を阻害する。
- 3) Cu の欠乏は、 N_2O 還元を阻害する可能性はあるものの、長期的に Cu 欠乏状態におかれた場合には、 N_2O 還元は可能である。
- 4) Co 欠乏は、 NO_2^- 酸化段階の硝化を阻害する可能性があるが、その影響は Mo 欠乏ほどではない。
- 5) Mo の欠乏は NO_2^- 酸化段階の硝化を決定的に阻害し、その付随現象として、硝化槽での NO_2^- 還元と N_2O 生成（すなわち、好気脱窒）を誘発する。

最後に、本論文の一部は、日本水環境学会年会など⁽²⁰⁾⁽²¹⁾に発表してあることを記す。

<参考文献>

- 1) 松尾吉高、鈴木隆幸（1978）生物学的硝化脱窒法、岩井重久編「し尿処理ガイドブック」（環境技術研究会）194-207
- 2) 石川宗孝、中西 弘、寺島 泰、村上定瞭（1983）好氣的脱窒現象のモデル化に関する研究、衛生工学研究論集 vol.19, 196-206
- 3) Knowles, R. (1982) Denitrification, *Microbiological Review*, Vol 46, 43-70.
- 4) Levine, J. S. (1992) The global atmospheric budget of nitrous oxide, *Proceeding of 5th International Workshop on Nitrous Oxide*, K-L-1-1, (Tsukuba, Japan)
- 5) Hanaki, K., Zheng, H. and Matsuo, T. (1992) Production of nitrous oxide gas during denitrification of wastewater, *Water Science and Technology*, Vol 26, (5/6), 1027-1036.
- 6) 糸川浩樹、花木啓祐、松尾友矩（1995）間欠ばっ気を行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、Vol 32, 311-320
- 7) 青井 透（1997）ある高負荷脱窒し尿処理施設における N_2O の発生量調査、「排水の生物学的除去実規模施設からの亜酸化窒素の発生の抑制に関する研究」（1994-1996科学研究費 基盤研究 成果報告書）、33-38
- 8) von Schulthesse, R., Wild, D. and Gujer, W. (1994) Nitric and nitrous oxides from denitrifying activated sludge at low oxygen concentration, *Water Science and Technology*, Vol 30, (6), 133-141.
- 9) 竹石和夫、鈴木 穰、松原 誠（1995）メタン・亜酸化窒素の放出源及びそ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集（土木研究所資料 3374）、115-121.

- 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、Vol 33, 301-309
- 11) Yuji Okayasu, Isaya Abe, Yoshitaka Matsuo (1997) Emission of nitrous oxide from high-rate nitrification and denitrification by mixed liquor circulating process and sequencing batch reactor process、*Water Science and Technology*、Vol 36, (12) 39-45.
- 12) Taylor, B., Hoare, D. and Hoare, S. L. (1971) *Thiobacillus denitrificans* as an obligate chemoautotroph. Isolation and growth studies. *Archiv fur Mikrobiologie*, Vol 78, 193-204.
- 13) Zumft, W. G. (1992) The denitrifying bacteria in "*The Prokaryotes*" ed. by Balow, A. et al. (Springer Verlag, New York USA) Vol 1, Chap 23, 554-582.
- 14) Zumft, W. G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Dec., 533-616
- 15) Hooper, A. (1987) Biochemistry of the nitrifying lithoautotrophic bacteria in "*Autotrophic Bacteria*" (2nd Ed) ed. by Schlegel, H. G. and Bowien, (Science Tech Publishers, Madison, USA) 239-266.
- 16) Bock, E., Koops, H-P., Ahlers, B., and Harms, H. (1992) Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source" in "*The Prokaryotes*" ed. by Balow, A. et al. (Springer Verlag New York USA) Vol 1, Chap 11, 414-430.
- 17) Stouthamer, A. (1988) Dissimilatory reduction of oxidized nitrogen compounds, in "*Biology of Anaerobic Bacteria*" ed. by Zehnder, J. B. (Wiley-Liss, New York, USA), 245-303.
- 18) Otte, S., Grobbs, N. G., Robertson, L. A., Jetten, M. S., and Kuenen, J. G. (1996) Nitrous oxide production by *Alkaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, (11) 4100-4107.
- 19) Tiedje, J. M. (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction, in "*Biology of Anaerobic Bacteria*" ed. by Zehnder, J. B. (Wiley-Liss, New York, USA), 179-244.
- 20) 柳瀬 真、田中知美、松尾吉高、高橋真哉、松尾賢一朗 (1999) 高負荷硝化脱窒法からの亜酸化窒素発生に及ぼす微量金属塩添加の効果、日本水環境学会年会講演集、33、2D9-3
- 21) 柳瀬 真、田中知美、松尾吉高 (2000) 高負荷硝化脱窒法における各種金属塩添加の効果、日本水環境学会年会講演集、34、1E16-2