

VII-7 微小電極によるUASBグラニューール内のpH及びグルコース濃度プロファイル測定

積水化学工業（株）
長岡技術科学大学工学部

正員 渡辺 亮
正員 原田秀樹・大橋晶良・桃井清至

1.はじめに

UASB法を代表とする微生物の自己造粒機構を利用した嫌気性廃水処理法が広く普及しており、適切な維持・管理をする上で反応器内嫌気性微生物集塊体（グラニューール）の微生物学的構造に関する知見を得ることは重要である。現在のところ、微生物学的構造調査の手法として、SEM（走査型電子顕微鏡）・TEM（透過型電子顕微鏡）等の電子顕微鏡や蛍光顕微鏡による形態学的観察、メタン生成活性、MPN測定などが用いられているが、これらの手法は菌叢分布の可視化に有効な手段ではあるが、グラニューール内の *in situ* な活性を測定することはできず、微生物学的構造の把握までには至らない。

そこで本研究では、グラニューール内での基質拡散及び代謝によって生ずるpHおよび基質（グルコース）濃度測定のための先端径がわずかに数マイクロ程度のパH微小電極及びグルコース微小センサーの開発を行い、基質条件変化に伴うグラニューール内pHおよびグルコース濃度プロファイルを測定することで、グラニューール深度方向の生物反応や活性状態を検討した。

2.実験装置及び実験方法

本研究で開発したpH及びグルコース微小電極をFig.1とFig.2にそれぞれ示す。pH微小電極は先端径10 μ mに引き延ばしたガラス管先端部にイオン交換液膜が充填してあり、電極内部には電解質溶液を満たし、Ag/AgCl wireを挿入した単純な構造である。pH微小電極の諸性能は、先端径約10 μ m、応答時間1分以内であり、pH4~9の範囲で測定が可能であった。

一方、グルコース微小電極はガラス管と融合させた先端径10 μ m程度の白金線先端部に酵素膜を塗布し、これを先端径30 μ m程度に引き延ばしたガラス管先端部に充填した寒天膜中に挿入して、ガラス管内部をbuffer溶液で満たした構造である。グルコース微小電極の諸性能は、先端径約30 μ m、応答時間約1分であり、グルコース濃度0~500 mg/lの範囲で測定が可能であった。

実験に用いたグラニューールは、当研究室人工廃水処理UASBリアクター（容積負荷15 kgCOD/m³/day、COD除去率約90%、35℃）より採取し、Table.1に示す実験条件の培地溶液に12時間浸漬したものを用いた。粒径約2 mmのグラニューールは、Fig.3に示すようにフローセル内に設置した。フローセル内では実験条件に調節した無機塩類を含む培地溶液が連続的に供給してある。マイクロステージに固定した微小電極は100 μ mピッチでグラニューール内に侵入され、各深度のpH及びグルコース濃度を測定した。

実験条件は、グラニューール内プロファイルに及ぼすpH 7でのバルク液基質濃度の影響、pHの影響、緩衝液強度の影響およびメタン生成菌活性阻害剤であるクロロホルム添加による影響を調べることを目的として設定してある。

3.実験結果及び考察

3.1 グルコース濃度による影響

Fig.4にバルク液グルコース濃度を変化させたときのグルコース濃度及びpHプロファイルを示す。グラニューール表面には約300 μ mの液膜が存在するために、グルコース、pHともにグラニューール表面ではすでにバルク液濃度よりも小さくなっている。バルク液グルコース濃度が低い100、200mg/lのときは、

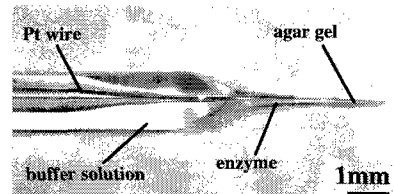


Fig.1 Magnified view of the glucose microelectrode by optical microscope.

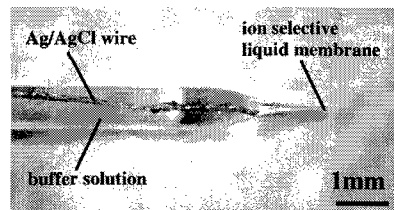


Fig.2 Magnified view of the pH microelectrode by optical microscope.

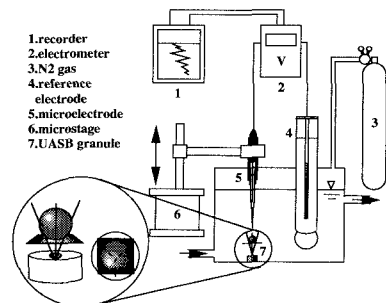


Fig.3. Experimental set up of pH microelectrode

Table 1 Experimental condition

substrate	temp.	bulk pH	bulk conc.	buffer	inhibitor
no substrate			0mg/l		
glucose	25℃	7.0	50mg/l	CTP04=0mM	CHCl3=0mg/l
			100mg/l		
			200mg/l		
			500mg/l		
			200mg/l		
		7.0	200mg/l	5mM 10mM 25mM	10mg/l

グラニュール深部に向かってグルコース濃度は徐々に低下し、深部500 μ m付近で0mg/lとなっている。この時のpHプロファイルは、グルコース濃度プロファイルと同様に深さ500 μ m手前までは減少し最低pHを示すものの、その深部では中心に向かって逆に上昇している。これはグラニュールの表面付近でグルコースが消費され、それに伴って生成される酸によってpHが低下し、グルコースが消費された後はメタンの生成によって酸が消費され、pHが上昇したと考えられる。

一方、グルコース濃度が500mg/lと高い時には、グルコースは完全には消費されずグラニュールの中心でも残っている。従って、その時のpHプロファイルは、徐々に低下していきただけで上昇はしていない。このことは、グラニュール内に基質が残存するとき、メタン生成による酸消費速度よりもグルコースからの酸生成反応速度が大きいことを示しており、グラニュールの中心部付近で酸が蓄積し、pHの低下が起こることを示唆している。

3.2 pHによる影響

Fig.5にバルク液のpHを変化させたときのグルコース濃度及びpHプロファイルの影響を示す。バルク液中のpHが変化してもグルコース濃度プロファイルに大きな差は見られなかった。一方pHプロファイルは、バルク液のpHが異なっても（pH6.5から8.5の間）プロファイル傾向は類似しており、バルク液pHの差がグラニュール内で同程度シフトしているようである。バルク液pH5.5の場合、グラニュール内での最低pHは約4.5で、バルク液pH6.5の場合の最低pHとほぼ同じであり、グラニュール内のpHはある限度を下回らなかった。

3.3 緩衝液による影響

Fig.6にりん酸緩衝液強度を変えた時のグルコース濃度及びpHプロファイルを示す。りん酸濃度が10mMと25mMのときは、グラニュール内部でのpH低下はほとんど見られないが、りん酸濃度が5mMになると、pHの低下が起こっている。グルコース濃度プロファイルは、多少であるが緩衝強度が小さくなるに従って、グルコースの消費速度が鈍くなく傾向があり、pHが中性付近に保たれている方が、基質消費活性が大きいようである。

前節では、pHによるグルコース消費への影響は小さいように見えたが、これは中性pH付近をはずれると基質消費速度の影響は少なく、緩衝液濃度の影響の結果から明かなように、pHによって多少影響するものと考えられる。

3.4 阻害剤による影響

Fig.7にクロロホルム阻害剤を投入したときのグルコース濃度及びpHプロファイルを示す。クロロホルムの有無に係わらずグルコース濃度プロファイルに変化は見られなかった。しかし、クロロホルムを投入していない時に見られた500 μ m付近からのpHの上昇が、クロロホルムを投入したときには見られない。これは、クロロホルムがメタン生成菌だけに阻害の影響を及ぼすため、酸の消費が起こらず、pHが上昇しなかったと推察される。

4. 結論

UASBグラニュール内では、グラニュール表面付近ですばやく基質のグルコースが消費され、グルコースの代謝に伴うグラニュール内pHプロファイルの存在が観察された。pHはグルコース濃度の減少と共に低下し、グルコースがなくなる付近から中心部に向かいメタン生成反応によってpHが上昇する。ただし、pH変化による基質消費速度への影響はさほど大きくないものと考えられる。すなわち、グラニュールはある程度のpH変化にも対応できる処理能力を持っている。

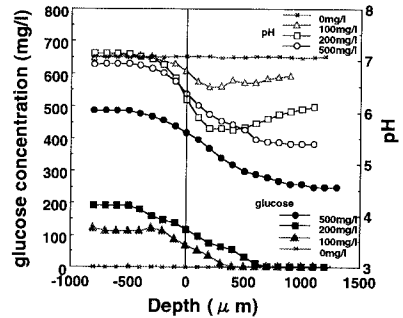


Fig.4 Influence of glucose concentration on microprofiles within a granule

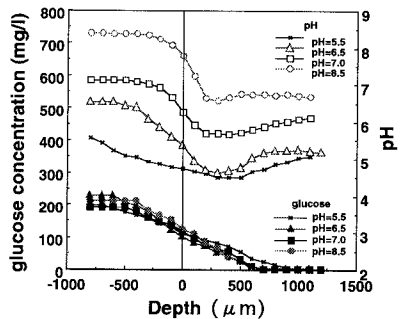


Fig.5 Influence of pH on microprofiles within a granule

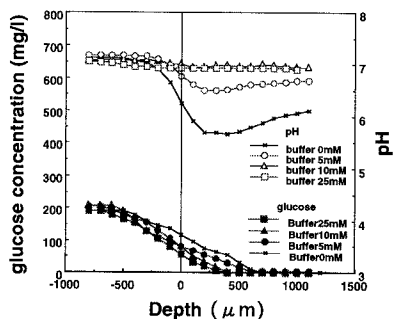


Fig.6 Influence of buffer intensity on microprofiles within a granule

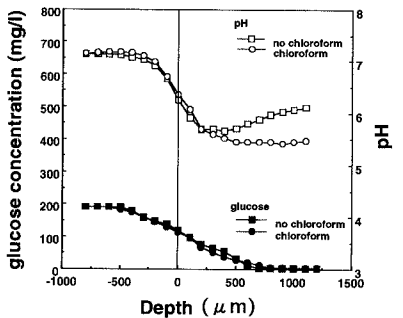


Fig.7 Influence of chloroform on microprofiles within a granule