

(26) 微小電極と数学的モデルによる嫌気性微生物グラニュール内の
基質濃度とpHプロファイルの評価

**Evaluation of Substrate and pH Profiles in Anaerobic Granular
Sludge by Microelectrodes and Mathematical Model**

大橋 晶良*、渡辺 亮**、原田 秀樹*

Akiyoshi OHASHI*, Makoto WATANABE**, Hideki HARADA*

ABSTRACT : The following two novel devices, pH microelectrode and glucose-enzyme microelectrode were originally fabricated in this study, to clarify pH and substrate *in situ* profiles within anaerobically grown microbial-aggregates. The glucose microsensor consists of double glass-tips in order to eliminate an effect of pH, and has a measurement range of 0-500 mg/L. The inner glass-tip of 10 μ m diameter was coated with glucose oxidase and covered with the outer glass-tip of 30 μ m diameter. The pH microsensor has a 10 μ m diameter of glass-tip which was filled with ion selective membrane liquid, and covers the pH range of 4-10.

Both microelectrodes were applied to anaerobic granular sludge having a diameter of approximately 2 mm harvested from an UASB (upflow anaerobic sludge blanket) reactor treating an artificial wastewater. It proved that the pH profile in the granule tended to firstly decrease toward granule depth, and then to increase after attaining a minimum point at which the glucose concentration decreased to around zero. With higher glucose concentration in the bulk liquid, pH gradient within granules became steeper and the minimum pH value dropped more significantly.

A simple mathematical model consisting of diffusion and consumption of substrate was developed to estimate substrate profiles within granule. The model could simulate well the pH and glucose profiles measured by the microelectrodes. The results of measurements and simulations suggests that acetogenic bacteria should dominate near the granule surface, on the other hand methanogenic bacteria should be dominate inside of the granule.

KEYWORDS : Anaerobic treatment, glucose sensor, granular sludge, microelectrode, pH sensor, UASB reactor

1 はじめに

近年、回転円板法、接触曝気法あるいは固定床、上昇流嫌気性スラッジブランケット (UASB)、流動床法など多様な反応器形式を用いて、微生物の自己固定化作用を利用した廃水処理法が盛んに活用されてきている。これらのプロセスでは、細胞の付着・集塊化増殖によって生物膜やグラニュールを形成させて高濃度の生物保持を達成している。生物膜やグラニュール状汚泥では細胞がきわめて密に集塊しており、集塊増殖体内部では基質・生産物の拡散抵抗が増大し、浮遊増殖形態の場とは異なる特異的な生物学的諸特性を獲得していると考えられる。しかし、集塊化増殖体を形成することによって微生物群が実際にいかなる生態学的構造と機能を獲得しているかを把握するための有効な解析手法が現在のところ不足している。

これまでの生物膜型水処理装置の開発研究では、反応器をブラックボックス的に取り扱い、入出力操作のみで処理効率を高めようとした、経験工学的な方法論に多分に頼ってきた。しかしながら、生物膜プロセスの信頼性、安定性、融通性を拡大するためには、このブラックボックスを開いて、生物膜やグラニュールなどの集塊増殖体の微生物生態学的構造を明らかにし、その構成菌叢のダイナミクスをより精確に把握したうえで、その能力をより効果的に発揮させうるような生息環境をつくり出すことが必要である。

* 長岡技術科学大学 工学部 (Department of Environmental Systems Engineering, Nagaoka University of Technology)

** 積水化学工業 (株) (Sekisui Chemical Co. Ltd.)

近年、先端径がわずか数マイクロ程度の微小なイオン選択性電極や酵素センサーの開発が医学・生物学の分野において急ピッチに行われている。これらの微小電極は、細胞などの生体内の微小領域におけるイオン濃度や代謝産物濃度の測定が可能であり、任意の現位置での生化学反応の様子を捉えることが可能となってきた¹⁾。試料に電極を挿入するだけで、ほとんど瞬時に目的成分の定量ができる微小電極は、分析手段として非常に有効であり、環境分野においても利用されつつある。Revsbech and Jorgensen *et al.*²⁾は、微小電極を自然生態系に適用してMicrobial matsの深さ5 mmまでの酸素、pH、硫化物濃度プロファイルを測定し、光があたると酸素が増加したことを観察している。さらに、廃水処理装置内の生物膜などの微生物集塊増殖体に適用されており、Cronenberg and Heuvel³⁾は微生物集塊増殖体内部の物質拡散係数を評価している。Beer and Heuvel⁴⁾やLens *et al.*⁵⁾も廃水処理生物膜に着目し、膜内のpH分布について調べている。

このような微小電極センサーは、集塊化増殖体内での*in situ*な物質代謝特性と微生物生態学的構造を把握するには有力なツールと考えられる。そこで本研究では、信頼性の高いpHおよびグルコース微小電極センサーを開発し、UASB反応器で培養されたグラニュー汚泥に適用して、種々の基質条件下でのグラニュー汚泥内のpHとグルコース濃度プロファイルを測定することで、グラニュー汚泥深度別の生態学的基質除去特性や微生物活性状態について検討した。さらに、グラニュー汚泥の生態学的構造把握の一助として基質の消長、生産物蓄積やpH勾配の様相を記述するモデルを構築し、別途回分実験より求めた動力学的パラメータ値を用いてシミュレーションを行った。

2 微小電極の構造と性能

嫌気性微生物グラニュー汚泥内の基質濃度プロファイルを測定するために、2種類の微小電極（pHとグルコースセンサー）を開発した。本研究で作成したpH及びグルコース微小電極の写真をFig. 1, 2にそれぞれ示す。

pH微小電極はマイクロピペットテンション（島津製作所MPT-1）により先端径10 μ mに引き延ばしたガラス管（内径1.5mmの100 μ l Disposable Micropipettes, Drummond Scientific Company）の先端部にイオン交換液膜（10%（w/v）トリドデシルアミン0.5 gと0.7%（w/v）テトラほう酸ナトリウム0.035gをo-ニトロフェニルオクチルエーテルに溶解し、100%二酸化炭素気相中で16時間放置）を毛管現象により充填し、Ag/AgCl線（Ag線をタンマン管中で融解させた塩化銀に浸け、Ag線表面にAgCl皮膜）を挿入した単純な構造である。電極内部には電解質溶液（0.04M KH_2PO_4 5.44g, 0.023M NaOH 0.92g, 0.015M NaCl 0.877g 水溶液、pH=7）が満たしてある。pH微小電極内のAg/AgCl線は比較電極（カロメル電極）と接続されており、両電極間の起電力よりpHが測定できる。

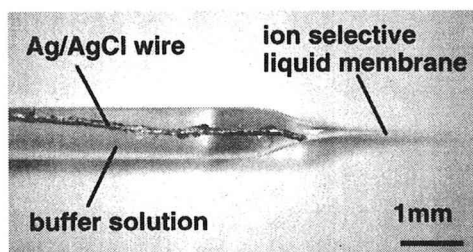


Fig.1 Magnified view of the pH microelectrode.

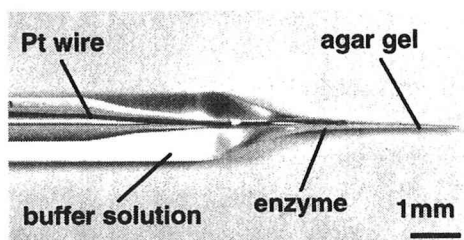


Fig.2 Magnified view of the glucose microelectrode.

グルコース微小電極は酵素センサーの代表的なもので、酵素と電気化学デバイスを組み合わせることにより測定することができる。酵素反応はpHに大きく影響を受けるため、pH微小電極よりも複雑な2重管構造から成る。内部の電極部は、直径10 μ m程度の白金線をガラス管（内径1.0mmのDisposable Micropipettes 10 μ l）と融合させ、白金線先端部に酵素（10%（w/v）のグルコースオキシダーゼ0.004gを3%（w/v）のグルタルアルデヒド溶液0.04mlに溶かす）膜を塗布し、さらに牛血清アルブミン溶液（10%の牛血清アルブミンを25%グルタルアルデヒド溶液に溶かす）中に10分間浸け、乾燥させてある。外部の緩衝液部は細管（内径2.0mmのDisposable

Micropipettes 100 μ l) を先端径30 μ m 程度に引き延ばし、先端部に2%寒天溶液を充填して、ガラス管内部を buffer 溶液 (0.05mol の塩化カリウムを0.1mol/l の酢酸緩衝液で溶解、pHを5.2に調整) で満たしてある。すなわち、グルコース微小電極は内部の電極部の先端を外部細管の寒天ゲル膜中に挿入した構造である。白金線は比較電極 (カロメル電極) と接続して、両電極間の起電力より発生する電流を測定することでグルコース濃度が評価できる。

pH微小電極の性能は、先端径約10 μ m と非常に細く、応答時間 1 分以内と短く、pH4~9の範囲で測定が可能であった。開発したpH微小電極はイオン選択性電極であるため他イオンの影響を受けるが、キャリブレーションを実験溶液で行うことで、妨害イオンの影響を除外している。一方、グルコース微小電極の性能は、先端径約30 μ m とやや太いが、応答時間約 1 分であり、グルコース濃度の定量範囲は 0 ~500mg/lであった。なお、グルコース微小電極の応答時間は寒天ゲル膜の厚さに強く依存しており、寒天ゲル膜厚を薄くすることで応答を速くすることができる。電極作成 1 日経過後も同じ検量線が得られており、電極の寿命は 1 日以上である。なお、グラニュール内濃度プロファイル測定前後で検量線のドリフトは全く観察されなかったが、プロファイル測定時には念のため常に新鮮な電極を用いた。

3 グラニュール内の基質濃度プロファイル測定

3. 1 実験装置及び方法

基質濃度プロファイル測定に用いた嫌気性微生物グラニュールは、当研究室人工廃水処理UASBリアクター (容積負荷15kgCOD/m³/day、COD除去率約90%、35℃) より採取した。グラニュールの平均密度は40mgVSS/cm³であり、粒径約 2mmのグラニュールだけを選定して、Fig. 3 に示すような測定用フローセル内の3本の虫ピン上にグラニュール 1 粒を設置した。フローセル内では実験基質条件に調節した無機塩類を含む培地溶液 (窒素パージで嫌気保持) を連続的に供給し、気相部には常時窒素ガスを流して嫌気状態を維持した。グラニュールの基質除去が定常状態になるよう12時間馴致した後に測定を実施したが、これは予備実験より測定までの馴致が10時間と12時間ではプロファイルが変化しなかったことに因る。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Fig. 4 のようにグラニュール内に慣入され、各深度のpH及びグルコース濃度を測定した。慣入したセンサーを抜き取るとグラニュールにホールができるため、1 プロファイル測定毎にグラニュールを交換した。温度は25℃に制御した。Fig. 3 はpHを測定するための装置であり、グルコース濃度測定では電圧計の代わりに電流計が置き換えてある。pH (4 ~ 9) およびグルコース (0 ~500mg/l) のキャリブレーションは、プロファイル測定と同じ環境条件 (嫌気状態、同一培地溶液) 下で行った。

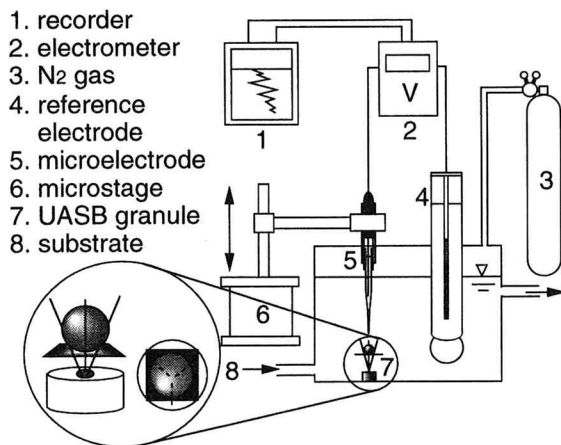


Fig. 3 Experimental set-up for measuring pH gradient in an UASB granule by pH microelectrode.

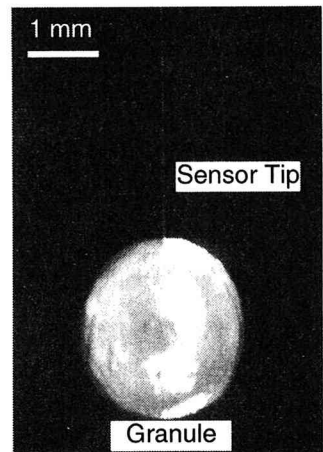


Fig. 4 Photograph of an UASB granule and a micro-electrode tip.

3. 2 実験条件

Table 1 に実験条件を示す。嫌気性微生物グラニュール内プロファイルに及ぼすpH 7でのバルク液グルコース濃度（0～500mg/l、5段階）の影響、グルコース濃度200mg/lにおけるpH（5.5～8.5、4段階）の影響、グルコース濃度200mg/lでpH 7におけるリン酸緩衝強度（0～25mM、4段階）の影響、グルコース無添加での酢酸濃度（50～500mg/l、4段階）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（10mg/l）⁶による影響を調べることを目的として設定してある。なお、酸生成菌へのクロロホルム阻害効果は別途実験的に検討しており、濃度10mg/lで活性の低下は5%以下で無視できる。

3. 3 測定結果

(1) グルコース濃度による影響

Fig. 5 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プロファイル測定結果を示す。グラニュール表面には約300 μ mの液膜が存在したために、グルコース、pHともにグラニュール表面上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、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付近でゼロとなっている。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手前までは減少して最低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。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、徐々に低下していくだけで上昇はしていない。

(2) pHによる影響

Fig. 6 にはバルク液のpHを変化させたときのプロファイル結果を示す。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移動しているようである。ただしバルク液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、グラニュール内には極限pHが存在することを示唆している。

(3) 緩衝液による影響

りん酸緩衝強度を変えた時のプロファイルを図7に示す。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る傾向があり、pHが中性付近に保たれている方が、基質消費活性は大きいようである。

(4) 阻害剤による影響

Fig. 8 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ず、クロロホルムによるメタン生成菌への阻害影響が現れている。

(5) 酢酸濃度による影響

グルコースを無添加で酢酸濃度を変化させて測定したpHプロファイルを図9に示す。グラニュール表面より深部に向かってpHは上昇しており、基質としてグルコースが存在するケースとは逆の傾向にある。しかも、酢酸濃度が高くなると共にpHの増加量が大きく、酢酸濃度が500mg/lのときにはpH 8 付近まで上昇している。この現象は、グルコースを投入したときにグラニュールの中心部付近でpHの上昇が確認されたのと同様に、メタン生成

Table1 Bulk liquid conditions for microelectrodes measurements.

Substrate	pH	Conc. (mg/l)	PO ₄ buffer (mM)	Inhibitor CHCl ₃ (mg/l)
Glucose	7.0	0	0	0
		50		
		100		
		200		
		500		
	8.5	200	0	0
	6.5	200	5	0
	5.5		10	
			25	
	7.0	200	0	10
Acetate	7.0	50	0	0
		100		
		300		
		500		

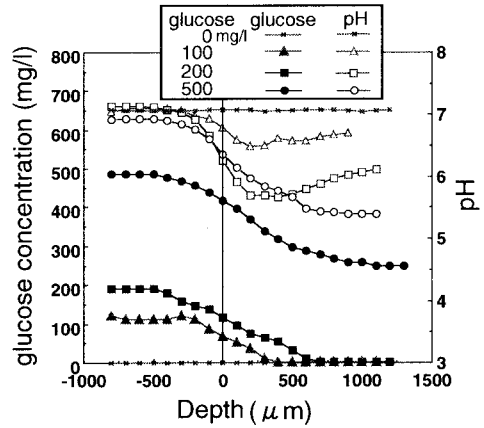


Fig.5 Influence of glucose concentration on glucose and pH microprofiles within granule.

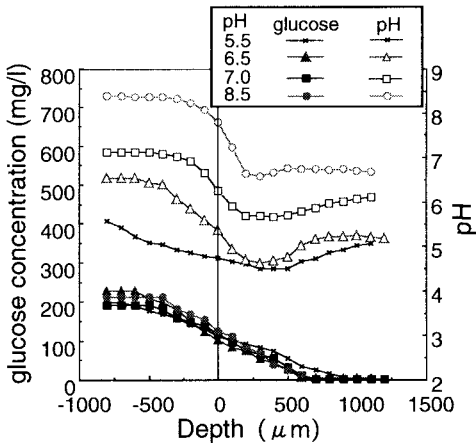


Fig.6 Influence of bulk pH on glucose and pH microprofiles within granule.

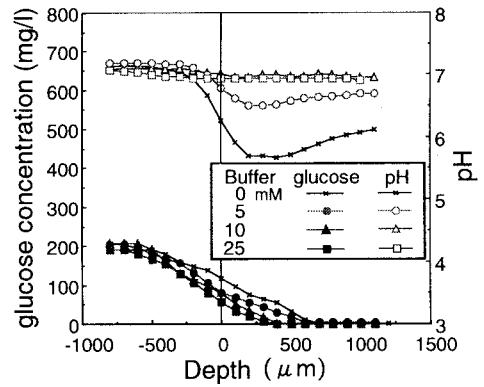


Fig.7 Influence of buffer strength on glucose and pH microprofiles within granule.

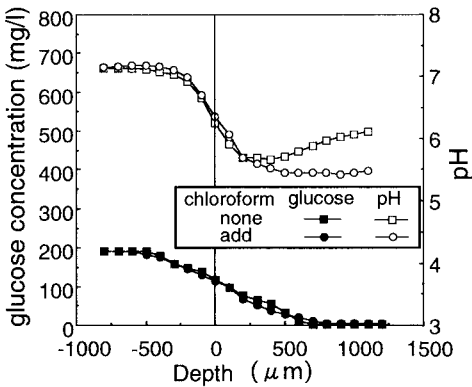


Fig.8 Influence of chloroform on glucose and pH microprofiles within granule.

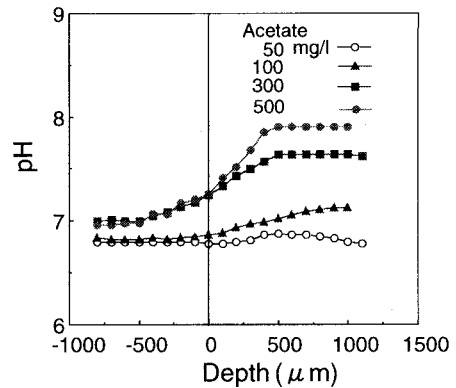


Fig.9 Influence of acetate concentration on pH microprofiles within granule.

により有機酸が消費されたために起きたものと考えられる。

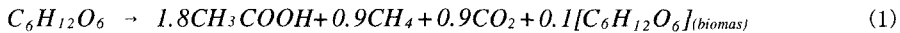
なお、グラニユール内にセンサーを挿入することによる濃度分布の乱れが懸念されるが、センサーチップの大きさはグラニユール径の約1/100であるため、濃度分布への影響は殆どないと考えられる。また、センサーとグラニユールの接面を伝わってバルクから成分が浸入することはないと思われる。

4 グラニユール内の基質・生産物濃度プロファイルモデルの構築

前節では、嫌気性微生物グラニユール内の基質（グルコース）とpHを微小電極で測定して、内部のプロファイルの様子を把握したが、グラニユールの生態学的構造や基質除去機構をさらに詳しく解明するために、グラニユール内部での基質・生産物濃度プロファイルを記述するモデルを構築した。

(1) 基質分解経路モデル

有機物の嫌気性分解経路は、種々の微生物が関与するため複雑であり、量論的な分解経路は未だに不明な点が多く、しかも環境条件によって分解経路は異なる。しかしながら、一般的なUASBリアクター内のグラニユールによる廃水処理では、有機物の約70%が酢酸経由、約30%が水素経由でメタンに転換され、水素資化性メタン菌のメタン生成速度は、酢酸資化性メタン菌の速度よりも大きいいため、水素経由の反応は律速にはならないと考えられている⁷⁾。このため、基質としてグルコースを用いた場合の分解経路は、次のようなグルコースから酢酸、酢酸からメタンという二つの簡単な反応と仮定した。



上式は、1 molのグルコースが1.8molの酢酸に転化して1.8molのメタンが生成し、水素経由で0.9molのメタンが発生して、0.1molだけバイオマスに転換することを意味している。

(2) 基質拡散・消費モデル

基質のグラニユール内への浸透は、Fickの拡散法則に従うとして、またグラニユールは完全な粒状で、内部の菌叢や密度は均質であると仮定する。基質消費が定常状態のときを考えるとグラニユール内の物質収支より、次の拡散方程式が誘導される。

$$\frac{D}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dC}{dr} \right) = v \quad (3)$$

ここに、 D ：拡散係数(cm^2/day)、 C ：基質濃度(mole/cm^3)、 r ：グラニユール中心からの距離(cm)、 v ：単位体積・時間当りの基質消費速度($\text{mole}/\text{cm}^3/\text{day}$)である。基質消費速度 v が Michaelis-Menten の式に従うとすると、基質分解経路モデルより、グルコース、酢酸、炭酸それぞれのプロファイルは次の基礎拡散方程式で表現できる。

【グルコース消費速度】

$$\frac{D_s}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dC_s}{dr} \right) = \frac{V_{s,max} C_s}{K_s + C_s} \quad (4)$$

【酢酸消長速度】

$$\frac{D_a}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dC_a}{dr} \right) = \frac{V_{a,max} C_a}{K_a + C_a} - 1.8 \frac{V_{s,max} C_s}{K_s + C_s} \quad (5)$$

【炭酸生成速度】

$$\frac{D_c}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dC_c}{dr} \right) = -0.9 \frac{V_{s,max} C_s}{K_s + C_s} - \frac{V_{a,max} C_a}{K_a + C_a} \quad (6)$$

ここに、 V_{max} ：最大基質消費速度(mol/cm³/day)、 K ：飽和定数(mol/cm³)、添字 s 、 a 、 c はそれぞれグルコース、酢酸、炭酸を示す。

(3) 境界条件

グラニュールは中心部で左右対称であり、グラニュール表面でのバルク液の基質濃度は、実験条件（流入基質濃度）より既知であるため、境界条件としては次のようになる。

$$r = 0 : \frac{dC_s}{dr} = \frac{dC_a}{dr} = \frac{dC_c}{dr} = 0 \quad (7)$$

$$r = R : C_s = C_{s,b}, \quad C_a = C_{a,b}, \quad C_c = C_{c,b} \quad (8)$$

ここに、 R ：グラニュール半径、添字 b はバルク液である。

(4) pH

グラニュール内のpHは、微小電極による測定で明らかのように、一定ではなく各部位で異なるが、水質化学（熱力学）的に各部位のpHの値を理論的に求めることができる⁸⁾。グラニュール基質プロファイル測定では、バルク液中の基質を連続的に供給しており、バルク液の全炭酸濃度は変化しないため、クローズシステムとして解析できる。実験におけるバルク液中に存在する弱電解質化合物は、 CH_3COONa 、 H_2CO_3 、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 であり、バルク液やグラニュール内での各部位でのCharge Balanceは、

$$[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] + [\text{H}^+] = [\text{CH}_3\text{COO}^-] + [\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}] + [\text{H}_2\text{PO}_4^-] + 2[\text{HPO}_4^{2-}] + 3[\text{PO}_4^{3-}] + [\text{OH}^-]$$

となる。全 CO_3 および全 PO_4 濃度は実験条件より既知であるため、上式の H^+ 以外の各イオンは、それぞれの解離平衡定数と $[\text{H}^+]$ の関数⁸⁾として表すことができる。従って、グラニュール内の各部位でのpH（ $[\text{H}^+]$ の関数）は計算によって求められる。

5 動力学パラメータ値の測定

グルコース消費および酢酸からのメタン生成は、前述したように共にMichaelis-Mentenの式で表されると仮定している。このため最大比グルコース消費速度あるいは最大比メタン生成速度と飽和定数を求める必要があり、バイアル活性試験より評価した。なお、最大活性速度と飽和定数は、いずれもpHに依存すると考えられるため、pH5.0～8.5の範囲、0.5刻みの7段階における各pHで、活性試験を各2本ずつ行った。汚泥は、微小電極での測定に使用したグラニュールと同じ当研究室人工廃水処理UASBリアクターから採取したものをホモジナイズして用いた。温度はグラニュール内プロファイル測定と同じ25℃に制御した。

5.1 測定方法

(1) グルコース消費速度

グルコース消費活性試験は、容量122mlのセルムバイアル瓶を用い、各操作はすべて窒素気下で、各pHについて2本ずつ行った。汚泥のサンプリング、培地の準備、汚泥・培地の分注、基質の投入は、珠坪の方法⁹⁾に準拠した。すなわち、適切な時間間隔で経時的にバイアル瓶をシェーカーから取り出し、0.5ml液のサンプリングを行い、フィルターろ過水をF-キットグルコース（ベーリンガー・マンハイム株式会社）によりグルコース濃度を定量した。サンプリングの時にpHを測定し、必要に応じて1N HCl 、 NaOH を投入しpH調整を行った。

(2) 酢酸からのメタン生成速度

酢酸消費速度すなわちメタン生成速度もグルコース消費活性試験と同様の方法で行い、メタン生成量はガスクロマトグラフィーで測定した。

5. 2 推定手法

活性試験から得られたグルコース消費量とメタン生成量の経時変化の一例 (pH7.5) をFig.10に示している。このデータを基にフィッティング法よりMichaelis-Menten式の最大比消費速度と飽和定数を求めた。すなわち、Michaelis-Mentenの式を適用してバッチにおけるグルコース消費量あるいはメタン生成量の計算値と測定データとの誤差が最も少なくフィットするときのパラメータ値 (最大比消費速度と飽和定数) を探り求めた。

Fig.11にフィッティング法より求めた最大比グルコース消費速度および酢酸からの最大比メタン生成速度とpHの関係を示す。両速度ともpHに強く依存しており、7.5付近で最大活性を示した。強アルカリ・強酸性域では極端に活性が低下しており、グラニューール内基質プロファイルモデルの構築にはpHの影響を考慮する必要があることを示唆している。シミュレーションを行う際には、測定pH以外での活性速度が必要であるが、スプライン補間によりpH4~8.5の間の活性を評価した。

一方、飽和定数はpHの影響があまり見られず、グルコース消費速度とメタン生成速度の飽和定数の平均値は、それぞれ0.175mM、0.109mMであった。

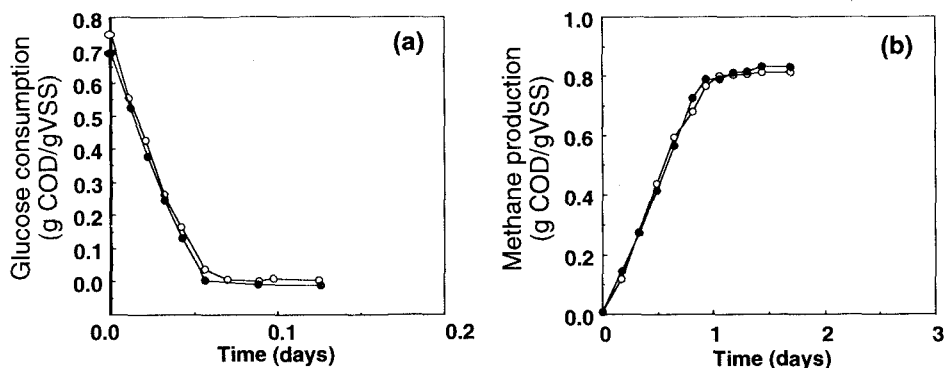


Fig. 10 Changes in (a) glucose consumption and (b) methane production by using acetate on the activity tests at pH7.5 for estimation of kinetics parameters.

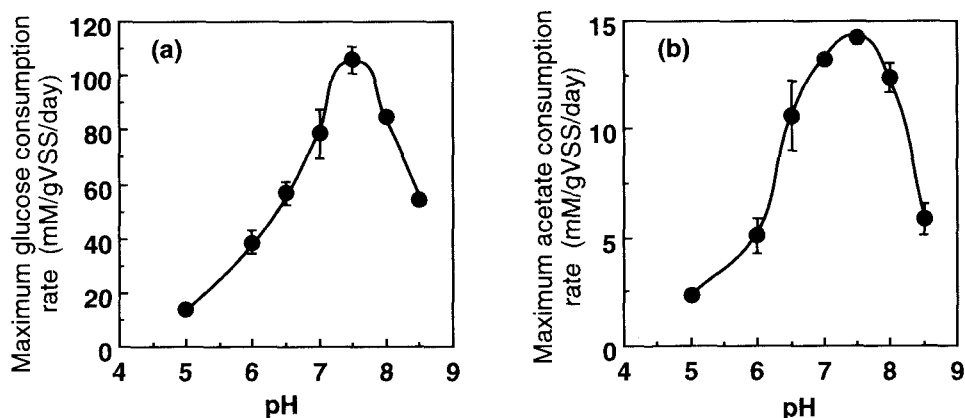


Fig. 11 pH dependency of (a) maximum glucose consumption rate and (b) maximum acetate consumption rate (methane production rate) estimated by the activity tests .

6 シミュレーション結果および考察

微小電極を使用して実測したグラニュール内の基質濃度プロファイルより、グラニュールの生態学的構造や機能のある程度把握することが可能であった。さらに本研究で構築したモデルによる実測条件でのシミュレーションから得られる知見を総合して、生態学的構造や機能をより鮮明にすることができると考えられる。また、実測とシミュレーション結果とを比較・検討することで本モデルの適合性を検証する。

計算方法は、式(4)、(5)、(6)の連立微分方程式を差分化して数値解法より求めた。使用したパラメータ値は、拡散係数以外すべて実測値である。グラニュール内での拡散係数は、グラニュール密度が40000mg/lであったことより、水中の80%¹⁰⁾を用いた。液膜厚さはプロファイル測定データより0.3mmと評価した。Table 2 に使用したパラメータ値を示した。

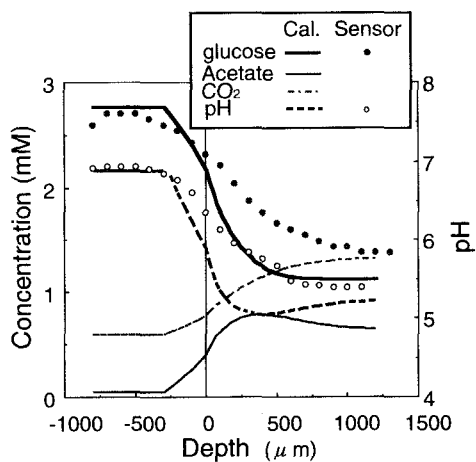
シミュレーション結果の一例（(a)：グルコース500mg/l、(b)：グルコース200mg/l、(c)：pH5.5、(d)：リン酸緩衝液25mM、(e)：クロロフォルム添加、(f)：酢酸300mg/l)をFig.12に示す。図中の(a)のようにグルコース濃度が500mg/lと高く、基質が完全浸透の場合には、酸生成菌によりグルコースから生成された酢酸がグラニュール内中心部まで蓄積しており、また生成された炭酸も蓄積しているため、pHは深部に向かって低下している。一方、(b)のグルコース濃度が200mg/lの時には、グルコースが完全に消費された深さ付近で酢酸濃度は最大を示し、深部ではメタン生成菌による酢酸の資化により減少している。このためpHは酢酸濃度の増大と共に低下するが、深部では酢酸からより弱酸の炭酸に替わることで、pHが上昇している。

(c)のようにバルク液のpHが5.5と低いと、グルコースが消費されるのが遅く、中心部付近まで残存している。緩衝液が添加されている(d)では、内部でもpHは7に維持され、グルコースの消費は早く、酢酸の蓄積量が少なくなっており、これらの現象は活性試験によるpH依存性の結果から容易に推測される。クロロフォルムを添加した(e)では、メタン生成菌の活性が停止することにより、酢酸は消費されず、酢酸濃度は深さと共に増加し、メタン生成菌が活動できる場合(b)に比べ、pHはかなり低下している。(f)のグルコースの代わりに酢酸だけを基質とした場合は、酢酸の消費に伴って内部のpHと炭酸濃度は共に増加する一方である。

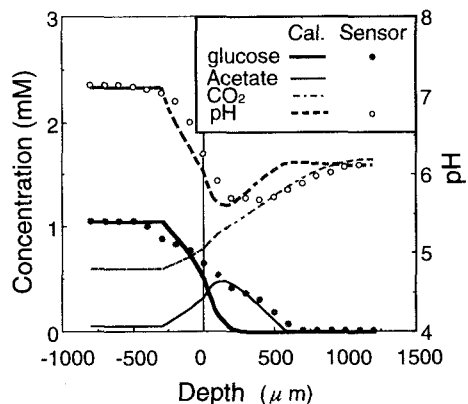
Fig.12には微小電極による実測値も一緒に図示しているが、本モデルでは実測値を精密にシミュレートしているとは言いがたい。特にグルコースのプロファイルでは、計算値は実測値よりも全ての実験条件において必ず速く消費され、その差違はグラニュールの深度と共に大きくなっている。この主原因として、本モデルではグラニュール内の菌叢を均質と仮定していること、基質の分解経路を単純化していることが考えられる。これらをモデルに組み込むこめば、かなり改善が図られると推測されるが、本モデルでも十分に基質プロファイルの様相や基質に応じた生態学的構造の把握が可能である。

Table 2 Parameters used for the simulation of substrate profiles in the granule.

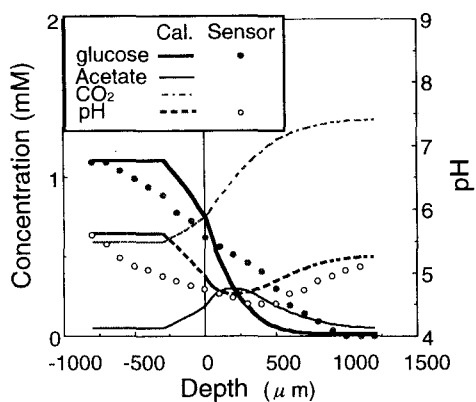
Parameter	Magnitude	Dimension	Reference
Conversion rate			
V _{max} , glucose	Depending on pH		This study, Fig.11(a)
V _{max} , acetate	Depending on pH		This study, Fig.11(b)
K _s , glucose	0.175	mM	This study
K _s , acetate	0.109	mM	This study
Diffusion coefficient			
In Water			
glucose	0.382	cm ² /day	5)
acetate	1.04	cm ² /day	5)
CO ₂	0.976	cm ² /day	5)
In Granule	80% of Water		10)
Laminar Thickness	0.3	mm	This study
Granule Diameter	2.4	mm	This study
Granule Density	40	mgVSS/cm ³	This study



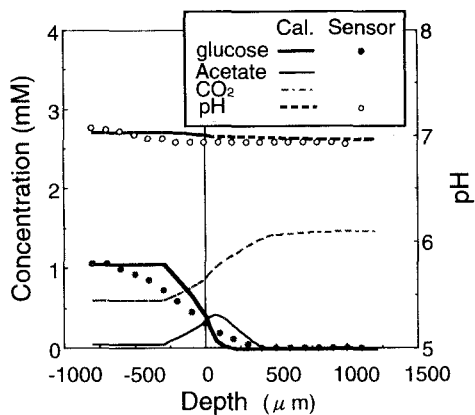
(a) glucose 500 mg/l, pH 7.0, PO₄ buffer 0 mM



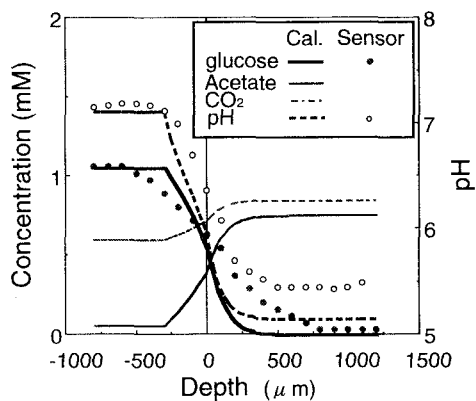
(b) glucose 200 mg/l, pH 7.0, PO₄ buffer 0 mM



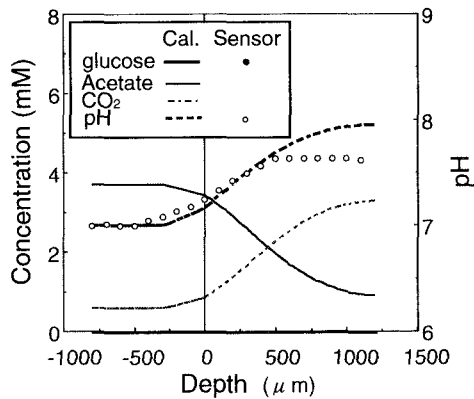
(c) glucose 200 mg/l, pH 5.5, PO₄ buffer 0 mM



(d) glucose 200 mg/l, pH 7.0, PO₄ buffer 25 mM



(e) glucose 200 mg/l, buffer 0 mM, chloroform 10mg/l



(f) acetate 300 mg/l, pH 7.0, PO₄ buffer 0 mM

Fig.12 Measurements and simulations of microprofiles within UASB granules under the six different sets of conditions.

微小電極によるプロファイル実測とシミュレーション結果は、グラニューール表面付近の極僅かなところでグルコースは消費されて、生成された酢酸が深部で消費されていることより、基質消費速度論的に酸生成菌が表面付近に多く、中心付近にメタン生成菌が優先的に生息しやすい環境をグラニューールが備えていることを示唆している。グラニューールは球状であり、体積は半径の3乗に比例するため、薄い表層だけでも全体に対する体積の割合は多く、すなわち生物量は多く、表面付近の極僅かなところで素早くグルコースが消費されても不思議ではない。

7 結論

本研究で開発したpHおよびグルコース微小電極は、測定濃度範囲が広く（pH4～9、グルコース0～500mg/l）、先端径が数十 μm と非常に細くて直径2mm程度の嫌気性微生物グラニューール内の基質濃度プロファイルを測定するのに十分な性能を有し、グラニューールの生態学的構造解明のための新しいツールとなり得た。また構築した基質プロファイルモデルは、精巧さは欠けるものの、微小電極による測定値をほぼシミュレートすることができ、未知の基質濃度に対するグラニューール内基質除去特性の予測や評価が可能である。

UASBリアクターから採取したグラニューールは、基質としてグルコースが用いられた場合、表面付近で酸生成菌によりグルコースが消費され、酢酸の生成に伴ってpHが低下したが、酢酸はメタン生成菌による資化によって中心に向かい減少し、このためにpHが上昇した。この現象は従来の知見からでも予想され得るものであるが、本微小電極による基質濃度実測およびシミュレーションより、グルコースが消費される深度、pH低下の程度や酢酸の蓄積濃度など、詳細な基質除去機構が明らかになった。

なお今後の研究課題として、グラニューール内での酢酸の消長は生態学的にも重要であるが、モデルシミュレーションでしか把握できず、*in situ*の酢酸濃度を測定するための酢酸微小電極センサーを開発することは重要である。さらに、グラニューール内の水素分圧は細菌の活性に大きな影響を及ぼすが、構築したモデルは水素分圧を考慮しておらず、また水素分圧を測定するための微小電極が開発されていないため、今後の改善と発展が望まれる。

参考文献

- 1) I.A.Silver : Microelectrode in medicine , Phil. Trans.R.Soc. Lond. B316, p.161-167, 1987.
- 2) N.P.Revsbech and B.B.Jorgensen: Microelectrode studies of the photosynthesis and O_2 , H_2S and pH profiles of a microbial mat, Limnol. Oceanogr., 28(6), p1062-1074, 1983.
- 3) C.C.H.Cronenberg & J.C. van den Heuvel: Determination of glucose diffusion coefficients in biofilms with microelectrode, Biosensor & Bioelectronics, 6, p.255-262, 1991.
- 4) D.De Beer And Van Den Heuvel: Gradient In Immobilized Biological Systems, Analytica Chimica Acta , 213 , 259-265 , 1988.
- 5) Piet N.L.Lens *et al.* : Heterogeneous Distribution of Microbial Activity in Methenogenic Aggregate : pH and Glucose Microprofiles, Applied and Environmental Microbiology, Vol 59 , No.11, p.3803-3815, 1993.
- 6) Speece R.E. Yang J., The effects of chloroform toxicity on methane fermentation, Wat. Res., 20, 1273-1279, 1986.
- 7) Gujer W. Zehnder, J. B., Cnversion processes in anaerobic digestion, Wat. Sci. Tech., 15, 127-167, 1983.
- 8) Vernon L.Snoeyink and David Jenkins: Water Chemistry, Jone Wiley & Sons, 1980.
- 9) 珠坪一晃、原田秀樹、鈴木宏誌、桃井清至、大橋晶良：高温UASBリアクターによるアルコール蒸留廃水処理特性と保持微生物群の生態学的挙動、環境工学研究論文集、第32巻、p.201-212、1995.
- 10) 大橋晶良、原田秀樹、桃井清至、黒川岳司：屈曲構造モデルから評価した水処理生物膜内の拡散係数、環境工学研究論文集、第30巻、p.197-208、1993.