

B-3 微小電極を用いたUASBグラニューール汚泥内の微生物活性の解析

○佐藤 久*・對馬 育夫・岡部 聡

北海道大学大学院工学研究科環境創生工学専攻 (〒060-8628北海道札幌市北区北13条西8丁目)

* E-mail: qsato@eng.hokudai.ac.jp

1. はじめに

UASB 法ではグラニューールと呼ばれる微生物集塊が処理に用いられる。グラニューール内には多種多様の微生物が存在し、これら微生物の群集構造および活性が UASB 法の処理効率に多大な影響を与える。このため、UASB グラニューール内の微生物群集構造や微生物の空間分布が各種分子生物学的手法によって解析されてきた。既往の研究により、グラニューール内では微生物が同心円状に分布し、表層に *Bacteria* が、中心部に *Archaea* が存在することが明らかにされている。これは、嫌気性処理においては高分子有機物が加水分解、酸生成、水素(H_2)および酢酸生成反応を経て、最終的にメタン (CH_4) と二酸化炭素に変換されることを反映したものと考えられている。しかしながら、グラニューール内の微生物活性の空間分布を明らかにした研究は極めて少なく、活性分布については未知の部分が多い。そこで本研究室では CH_4 生成活性を解析するために CH_4 微小電極の製作を試みた。本研究では、この CH_4 微小電極と、既に開発済みの水素 (H_2)、ORP、pH 微小電極を併用し、グラニューール内の各種物質濃度分布を測定し、微生物活性の空間分布を解析した。さらに、FISH 法により微生物の空間分布を明らかにし、この結果と活性分布を比較した。

2. 実験方法

(1) 実験装置

本研究ではベンチスケールの UASB リアクター (高さ 50cm, 半径 25cm) から採取したグラニューールを全ての実験に用いた。異性化糖製造工程廃水を処理する UASB リアクターから採取したグラニューールを植種汚泥としてリアクターに投入し、人工廃水を流量約 4L/day (HRT 約 6h) で供給した。人工廃水は粉ミルク (1250mg/L), $NaHCO_3$ (1000mg/L), K_2HPO_4 (50mg/L), $(NH_4)_2HPO_4$

(28mg/L), 無機塩類, 微量金属からなる。リアクターは恒温槽内に設置し水温を 35°C に維持した。リアクターの運転状況を把握するため、定期的に人工廃水および処理水の水质を測定した。測定項目は COD, pH, 水温, 有機酸(乳酸, ギ酸, 酢酸, プロピオン酸, イソ酪酸, α -酪酸)とした。また、発生ガス中の CH_4 および H_2 濃度を測定した。

(2) FISH法による菌体分布の解析

UASB からグラニューールを採取し、FISH 法により微生物の空間分布を解析した。プローブは *Bacteria* に特異的な EUB338, *Archaea* に特異的な ARC915 を用いた。FISH 法の手順は Amann¹⁾の方法に準拠した。

(3) 微小電極を用いたグラニューール内の物質濃度分布の測定

グラニューール内の CH_4 , H_2 , ORP, pH 分布を、各種微小電極を用いて以下の手順により測定した。採取したグラニューール (1 個) を、微小電極測定用溶液 (人工廃水にチオグリコール酸ナトリウム (200mg/L) を添加し N_2 曝気したもの, 0.5L) が満たされた容器内に針を用いて固定した。測定時は水温を $35 \pm 1^\circ C$ に維持した。測定は 1 つのグラニューールにつき 1 回のみとし、各測定条件につき少なくとも 3 回測定した。測定した H_2 , CH_4 , および pH 分布から、Santegood *et al.*²⁾の方法に準拠し、単位体積当たりの正味の H_2 , CH_4 および H^+ 生成速度 ($R(H_2)$, $R(CH_4)$ および $R(H^+)$) ($\mu mol/cm^3/h$) を求めた。図中の正の R は生成速度を、負の R は消費速度を表す。

(4) 微小電極を用いたグラニューール内の H_2 の拡散係数の測定

グラニューール内の H_2 の拡散係数を H_2 微小電極を用いて求めた。グラニューール内の微生物の活性を抑制するため、グラニューールをクロロホルムに 10 分間浸した。このグラニューールを 100mM のリン酸緩衝液内に入れ、上

記と同様の方法で固定した。グラニューールの中心に H_2 微小電極の先端を固定し、リン酸緩衝液に H_2 ガスを通気し、グラニューール中心の H_2 濃度 (これを C とする) を経時的に測定した。次にグラニューールを取り除き、リン酸緩衝液に N_2 ガスを通気することで H_2 ガスを除去した後、再度 H_2 ガスを通気してリン酸緩衝液中の H_2 濃度 (これを C_0 とする) を経時的に測定した。これらの結果より、リン酸緩衝液中の H_2 濃度に対する微生物活性を阻害したグラニューール内の H_2 濃度の比 (C/C_0) の時間変化を求めた。この結果を球体内における拡散による物質輸送の時間変化の式で近似し、グラニューール内の拡散係数を算出した。測定は3回行った。

3. 結果および考察

(1) CH_4 微小電極の性能

CH_4 微小電極の先端直径 (測定部位) は約 $100\mu m$ であった。 CH_4 微小電極は CH_4 分圧が 0% から 100% の間で CH_4 分圧に比例して検出電流値が変化した。 CH_4 分圧 (%) を x 、検出電流値 (pA) を y とすると、検量線は $y = -1.52x + 880$ であった。90% 応答時間はグラニューール内の CH_4 濃度を測定する場合には約 3 分であった。

(2) リアクターの水質

人工廃水の溶解性 COD は $570 \pm 80 \text{ mg/L}$ (平均濃度 $\pm$ 標準偏差) であった。これは $1.67 \text{ kg/m}^3/\text{day}$ の容積負荷に相当する。処理水の溶解性 COD は $28 \pm 9 \text{ mg/L}$ であり、COD の除去率は約 95% であった。処理水中には酢酸が $4.0 \pm 1.9 \text{ mg-C/L}$ 、プロピオン酸が $2.8 \pm 1.6 \text{ mg-C/L}$ 検出された。他の有機酸はほとんど検出されなかった。人工廃水の pH は約 7.7 ± 0.3 、処理水の pH は約 6.6 ± 0.1 であった。ガス発生速度は $0.1 \pm 0.02 \text{ L/h}$ であり、発生ガス中の CH_4 濃度は $55 \pm 15\%$ 、 CO_2 濃度は $11 \pm 4\%$ 、 H_2 濃度は $2290 \pm 3310 \text{ ppm}$ であった。

(3) グラニューール内の微生物分布

図 1 はグラニューール切片に EUB338 プローブ (図 1A) および ARC915 プローブ (図 1B) を適用した FISH 画像である。*Bacteria* はグラニューール表面から深さ約 $100\mu m$ の部分に高密度に存在した。これに対し、*Archaea* は深さ約 $100\mu m$ 以深に主に存在した。深さ約 $400\mu m$ 以深では *Bacteria* および *Archaea* の菌体密度は低かった。

(4) グラニューール内の物質濃度分布

図 2 に代表的なグラニューール内の ORP, pH, CH_4 , H_2 分布を示した。測定には直径約 2 mm のグラニューールを用いた。ORP および pH はグラニューール表面で低下し、

グラニューール表面から深さ $100\mu m$ の地点で最も低くなり、これ以深では増大した (図 2A)。測定用培地に $NaHCO_3$ を添加しなかった場合、 H_2 はグラニューール内の深さ $100\mu m$ の地点でピークを示した (図 2B)。その後、測定用培地に $NaHCO_3$ を 12 mM 添加したところ、 H_2 濃度は検出限界値 ($1\mu M$) 以下となった。この結果は炭酸塩が H_2 消費活性を高めることを示している。 CH_4 はグラニューール表面から中心に向かい増大した (図 2B)。

図 3 に各物質濃度分布から算出した H^+ , CH_4 , H_2 生成速度を示した。酸生成反応はグラニューール表面から深さ $200\mu m$ の部分で生じており、最大酸生成速度は約 $0.03 \mu\text{mol/cm}^3/\text{h}$ であった。 H_2 は深さ $100\mu m$ の地点で生成し、生成速度は約 $33 \mu\text{mol/cm}^3/\text{h}$ であった。これに対し、 H_2 消費反応と CH_4 生成反応は深さ $300\mu m$ の地点で生じていた。 H_2 消費速度 ($12 \mu\text{mol/cm}^3/\text{h}$) が H_2 生成速度よりも低いことは、生成された H_2 の一部がグラニューールから放出していることを示している。深さ $500\mu m$ 以深では全ての反応速度が低かった。この原因として物質輸送律速が考えられる。以上の結果から、酸生成反応および

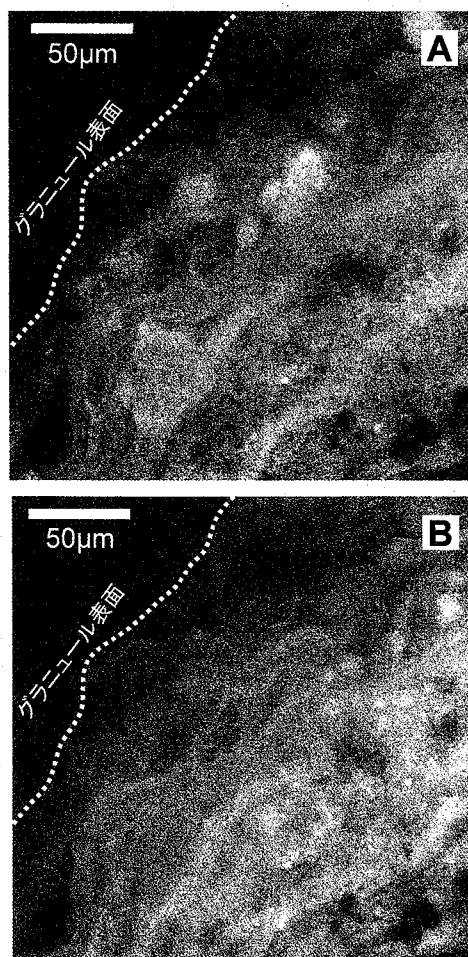


図 1 グラニューール切片の FISH 画像

H₂生成反応といった高分子有機物の分解はグラニューール表層(表面から深さ 200 μ m の部分)で、H₂消費反応および CH₄生成反応といったメタン発酵プロセスの最終段階は中層(深さ 300 μ m の地点)で生じており、中心部では反応がほとんど生じていないことが明らかとなった。

(5) グラニューール内におけるH₂の拡散係数の測定

グラニューールのような微生物集塊内部では、物質の拡散係数は水中における拡散係数とは異なることが知られている。拡散係数はグラニューール内の物質の挙動を把握する上で極めて重要な因子であるため、H₂微小電極を用いてグラニューール内の H₂ の拡散係数を求めた。図 3 に水中の C/C₀ の時間変化の一例を示した。図中の曲線は計算により求めた C/C₀ の時間変化を示している。実験値と計算値の相関係数は 0.98 であった。この結果から、グラニューール内の H₂ の拡散係数は $2.68 \pm 0.21 \times 10^{-5}$ cm²/s (n=3) であることが明らかとなった。この値は水中の H₂ の拡散係数 (3.64×10^{-5} cm²/s) の 74% であった³⁾。以上の結果から、グラニューール内では物質輸送抵抗のために H₂ の拡散速度が水中のそれに比べて低下することが明らかとなった。

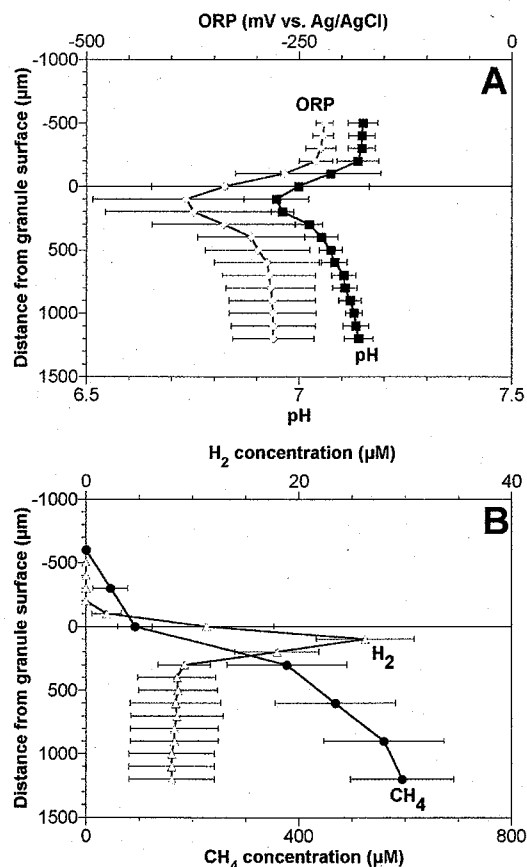


図2 グラニューール内の物質濃度分布

4. 結論

本研究では各種微小電極および FISH 法を併用し、UASB グラニューール内の微生物およびその活性の空間分布を解析した。グラニューール表層(表面から深さ 200 μ m の部分)には *Bacteria* が、グラニューール中層(深さ 300 μ m の地点)には *Archaea* が存在し、*Bacteria* は酸生成および H₂生成反応に、*Archaea* は H₂消費および CH₄生成反応に関与していることを実験的に明らかにした。

参考文献

- 1) Amann 1995. *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, p. 1-15. In A. D. L. Akkerman, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (ed.), *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- 2) Santegoeds et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.65, pp. 4618-4629, 1999.
- 3) Ebert et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.63, pp. 4039-4046, 1997.

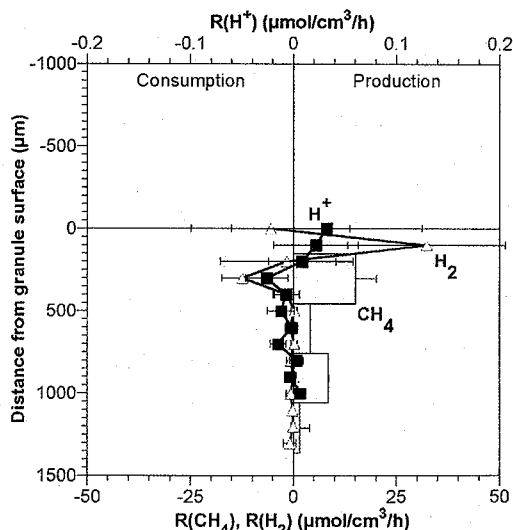


図3 グラニューール内の活性分布

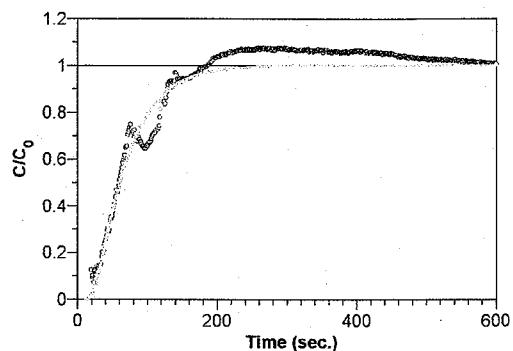


図4 C/C₀の時間変化