マイクロセンサーの開発と微生物集塊体の構造解析

呉高専　○正　山口　隆司　　呉高専　正　市坪　誠
高知高専　正　山崎　慎一　　長岡技科大　正　原田　秀樹

1．はじめに

近年，ＵＡＳＢ法等の微生物の自己固定化作用を利用した生物学的処理法が急速に実用化されてきている。しかしこの自己固定化微生物群の集塊体内での生態学的構造と機能については未解明の部分が多く残されている。そこで本研究は，ＵＡＳＢ反応器で形成されたグラニュール汚泥内の構造解析を目的として，グルコースの微小電極を開発し，グラニュール汚泥内のグルコースの消長プロファイルを評価した。また，グラニュール内の硫化物と鉄の沈殿を解析した。

2．実験方法

2-1.微小電極の原理および作成方法：グルコース微小電極の原理図をFig.1に示す。電極先端ではグルコースオキシダーゼ反応（$C_6H_{12}O_6 + O_2 \rightarrow C_6H_{10}O_6 + H_2O_2$）とPt表面での（$H_2O_2 \rightarrow 2H^+ + O_2 + 2e^-$）の反応が生じ，この時に発生する電流を測定することでグルコース濃度を測定することができる。作成方法は，0.1mmPt線を10μmガラス管に入れピペットテンションによって融合させ，Pt先端部にグルコースオキシダーゼを塗布し，グルタルアルデヒド溶液で固定し内部電極を作成する。管径3mmのガラス管を先端径数10μmになるように引き伸ばし，先端に寒天ゲルを充填し電解質溶液を注入し内部電極を挿入して作成する。

2-2.グラニュール汚泥内プロファイルの測定方法：作成したグルコース微小電極は，まずキャリブレーションを行い検量線を作成する。Fig.2にグルコースプロファイル測定装置を示す。フローセルはアクリル製で有効液容量60ml（5cmw×4cmL×3cmH）のものを使用した。フローセル内の培地は連続的にN_2ガスパージを行い嫌気条件を確保し，またホットプレートスターラーで25℃に維持した。プロファイルの測定は，マイクロステージに微小電極を取り付け100μmピッチでグラニュール汚泥の中心に向かって移動させ，各位置での電流値を測定した。本実験で使用したグラニュール汚泥は，ＵＡＳＢリアクターで長期間牛乳基質で馴化した直径3mm程度のものを選定し，所定の基質濃度に調整した培地に入れ25℃の温度条件と嫌気条件下で12時間程度馴致させたものを使用した。培地は，基質の他に微量金属塩とリン酸緩衝液（培地濃度で１mM）を添加した。

2-3.グラニュール汚泥元素分析：グラニュール汚泥（全体，内部，外部）の元素分析をICPによって行った。

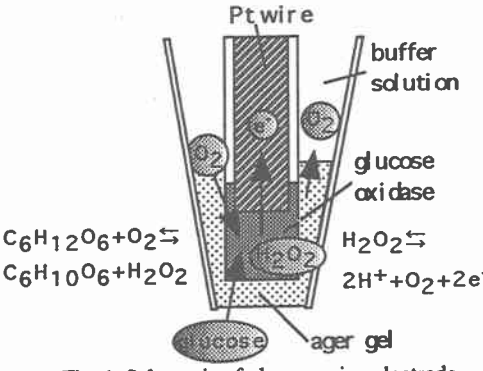
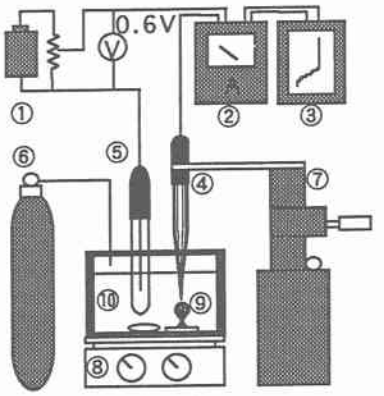
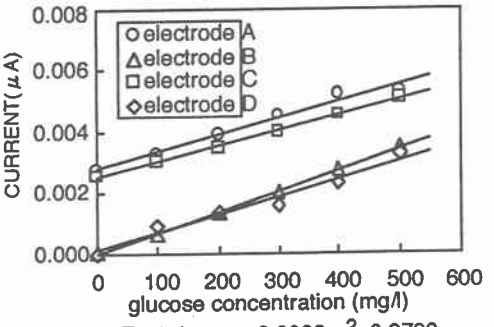


Fig. 1 Schematic of glucose microelectrode



①battery ②Ammeter ③Recorder ④glucose microelectrode ⑤reference electrode ⑥N2 gas ⑦microstage ⑧Hot plate stirrer⑨UASBgranule

Fig. 2 Measuring circuit for glucose microprofile



μA(A)=5E-06glucose+0.0028　r^2=0.9798
μA(B)=7E-06glucose+0.0000　r^2 r=0.9978
μA(C)=5E-06glucose+0.0025　r^2=0.9947
μA(D)=6E-06glucose+0.0001　r^2=0.9608

Fig.3 Calibration curve for glucose microelectrodes.

3．実験結果及び考察

3-1.微小電極の性能：Fig.3に4本のグルコース微小電極の検量線を示す。応答時間は数分程度と比較的遅く，また電極間で電流値の傾きに相異性がみられた。この原因としてガラス管先端の寒天膜の厚さあるいは内部管先端のグルコースオキシダーゼ付着量の相違によるものが考えられた。しかしグルコース濃度と電流値の間には相関関係が得られ，電流値からｸﾞﾙｺｰｽ濃度の定量は可能であるといえる。

3-2.グラニュール汚泥内グルコースプロファイル：Fig.4に培地グルコース濃度100，300，500 mg/lにおけるグラニュール汚泥内のグルコースのプロファイル測定結果を示す。各培地グルコース濃度は，グラニュール汚泥表面から次第に中心部に向けて減少傾向を示した。これはグラニュール汚泥微生物によってグルコースからの酸生成反応が生じたためと考えられる。また培地グルコース濃度が高い程，グルコース減少勾配が小さくなっており，グルコース濃度300mg/l以上では汚泥中心部でグルコースの残存が認められる。

3-3.グラニュール汚泥元素分析：本実験で使用したグラニュール汚泥は，グラニュールのの内部が黒色で，外部が白色という2重構造を有していた。Fig.5にグラニュール汚泥の全体，内部（黒色部），外部（白色部）の元素分析結果を示す。鉄，カルシウムはグラニュール内部で含有比が高かった。これは，グラニュール外部（表面）では酢酸生成が起きるためｐＨが低くなり，元素の沈殿が生じにくいためと考えられる。Fig.6に硫黄，鉄，リンに注目したPredominant area diagram を示す。黒色沈殿物である$FeS_{(s)}$はｐＨ6.5以上の環境で生成されることがわかる。すなわち，グラニュール内部の黒色沈殿は，内部で酢酸消費によるｐＨ上昇に伴って生成された$FeS_{(s)}$と考えられる。

4．まとめ

本実験結果より以下のことが明らかになった。

(1) 本研究で開発したグルコース微小電極は，グルコース濃度 0 ～ 500 mg/lで電流値との間に高い相関性を確認することができた。

(2) グラニュール汚泥内のグルコースのプロファイルを測定した結果，グラニュール汚泥内グルコース濃度は汚泥表面から次第に中心部に向けて減少していくことを確認した。

(3) グラニュール内部では，酢酸消費によるｐＨ上昇に伴って黒色沈殿$FeS_{(s)}$が生成される。

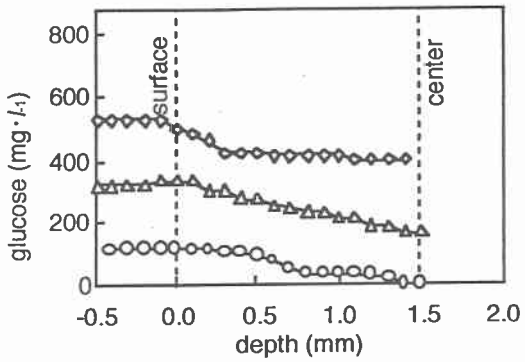


Fig.4 Measurements of glucose profiles within anUASB granular sludge for the case of glucose100 (○), 300 (△), and 500mg・l_{-1} (◇).

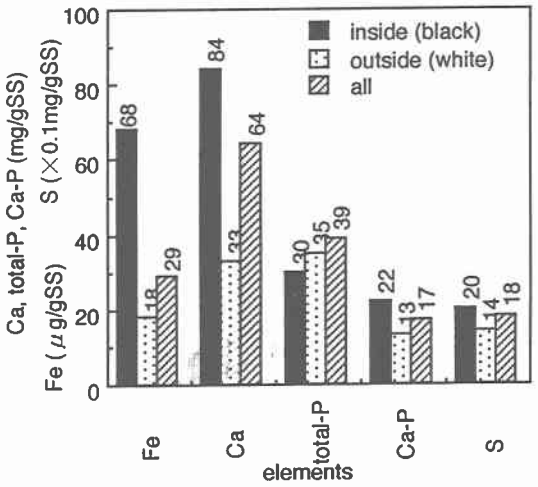


Fig.5 Elemental composition of granular sludge grown in the UASB reactor.

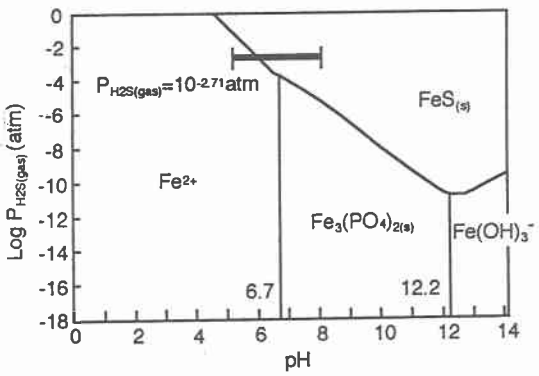


Fig.6 Predominant area diagram (at 25℃, $C_{T,Fe}=10^{-4.37}$M, $C_{T,PO4}=10^{-3.68}$M)