

微生物集塊体内の構造解析を目的とした微小電極の開発

広島大学工学部 学 ○近藤拓也 高知高専 正 山崎慎一
呉高専 正 山口隆司 長岡技術科学大学 正 原田秀樹

1. はじめに

近年、産業廃水等の生物学的処理では接触酸化法やUASB法等の微生物の自己固定化作用を利用した処理法が急速に実用化されてきており、生物膜やグラニュール汚泥は処理の高効率化に重要な役割を果たしている。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、先端径数十 μm のpHおよび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とそれに伴うpHの挙動について調査した。

2. 実験方法

2-1. 微小電極の原理および作成方法

pH微小電極の原理は、参照電極とともに試料溶液に浸漬した時に生じる両電極間の電位差を測定することでpH（水素イオン濃度）を測定することができる。作成方法は、100 μl のガラス管を使用しマイクロピペットテンションで先端径10 μm に引き伸ばし、先端部をシラン処理後イオン交換液膜溶液を充填する。ガラス管内部に電解質溶液を満たしAg/AgCl線を挿入し作成する。

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($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{O}_2 \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6 + \text{H}_2\text{O}_2$)とPt表面での($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}^+ + \text{O}_2 + 2\text{e}^-$)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10 μm 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線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10 μm 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pHおよび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pHおよびグルコースともにアクリル製で有効液容量60ml (5cm $\times$ 4cm $\times$ 3cm)のものを使用した。フローセル内の培地は連続的にN₂ガスバ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℃に維持させた。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100 μm ピッチでグラニュール汚泥の中心に向かって移動させ、各位置での電位差（pH微小電極の場合）、電流値（グルコース微小電極の場合）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

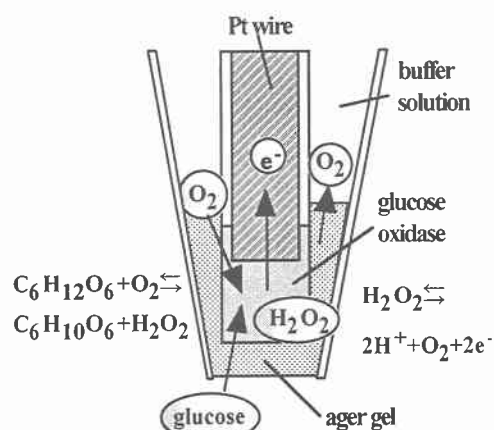
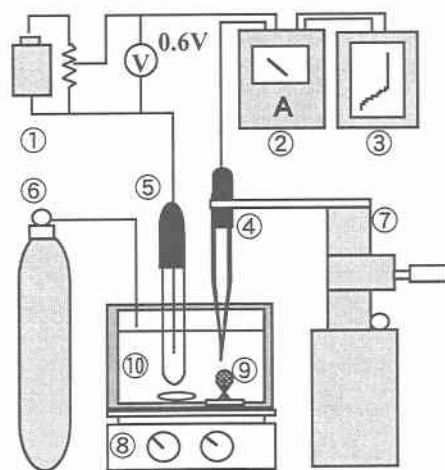


Fig. 1 Schematic of glucose microelectrode



①battery ②Ammeter ③Recorder ④glucose microelectrode ⑤reference electrode ⑥N₂ gas ⑦microstage ⑧Hot plate stirrer ⑨UASB granule

Fig. 2 Measuring circuit for glucose microprofile

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NH₄Cl、MgCl₂、CaCl₂等の微量金属塩とリン酸緩衝液（培地濃度で1mM）を添加した。

3. 実験結果及び考察

3-1.微小電極の性能

Fig.3に3本のpH微小電極の検量線を示す。応答時間は全てのpH検量液で数十秒以内であった。電位差の傾きは63~67mVを示し電極の相異性は小さいことが判明した。この電位差の傾きは理論値59.2 mV (25℃)と比較すると若干高い値であるが相関性は極めて高く、電位差からpHの定量は可能であるといえる。Fig.4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、電流値からグルコース濃度の定量は可能であるといえる。

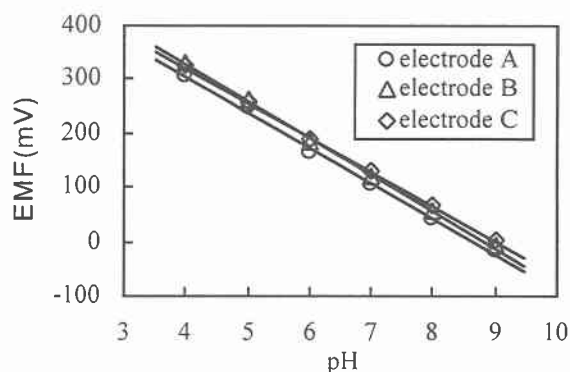
3-2.グラニュール汚泥内グルコースプロファイル

Fig.5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pHおよび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、pHもグルコース濃度の減少に応じて低下した。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、有機酸が汚泥内部で蓄積したためと考えられる。また培地グルコース濃度が高い程、汚泥内部のpH低下は著しく、グルコース減少勾配も小さくなっており、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。従って、培地グルコース濃度が高いとグラニュール汚泥内で有機酸蓄積による著しいpH低下を生じ、その結果グルコース消費活性の減少を招く傾向があることを確認した。

4. まとめ

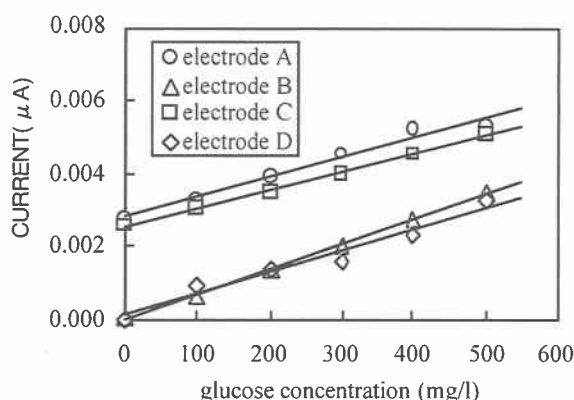
本実験結果より以下のことが明らかになった。

- 1) 本研究で開発したpHおよびグルコース微小電極は、pH4~9、グルコース0~500mg/lで電位差、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pHおよび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。また培地グルコース濃度が高いとグラニュール汚泥内で有機酸蓄積による著しいpH低下を生じ、その結果グルコース消費活性の減少を招く傾向があることを確認した。



$$\begin{aligned} \text{EMF(A)} &= -65.2\text{pH} + 566 \quad r^2 = 0.9975 \\ \text{EMF(B)} &= -67.6\text{pH} + 598 \quad r^2 = 0.9979 \\ \text{EMF(C)} &= -63.8\text{pH} + 576 \quad r^2 = 0.9993 \end{aligned}$$

Fig.3 Calibration curve for pH microelectrodes.



$$\begin{aligned} \mu\text{A(A)} &= 5\text{E-}06\text{glucose} + 0.0028 \quad r^2 = 0.9798 \\ \mu\text{A(B)} &= 7\text{E-}06\text{glucose} + 0.00003 \quad r^2 = 0.9978 \\ \mu\text{A(C)} &= 5\text{E-}06\text{glucose} + 0.0025 \quad r^2 = 0.9947 \\ \mu\text{A(D)} &= 6\text{E-}06\text{glucose} + 0.0001 \quad r^2 = 0.9608 \end{aligned}$$

Fig.4 Calibration curve for glucose microelectrodes.

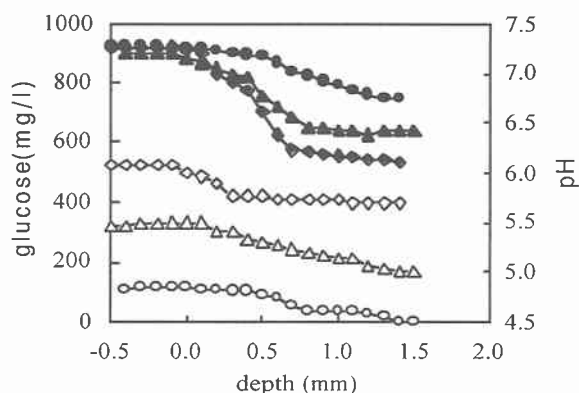


Fig.5 Measurements of glucose and pH profiles within a UASB granule for the case of glucose 100mg/l (○●), 300mg/l (△▲) and 500mg/l (◇◆).