



Title	微小電極を用いた微好気性生物膜内の硫酸塩還元の測定
Author(s)	佐藤, 久; 伊藤, 司; 岡部, 聡 他
Description	第5回衛生工学シンポジウム (平成9年11月6日 (木) -7日 (金) 北海道大学学術交流会館) . 5 測定・調査 . P5-10
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 5, 222-227
Issue Date	1997-11-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/7737
Type	departmental bulletin paper
File Information	5-5-10_p222-227.pdf



5-10 微小電極を用いた微好気性生物膜内の硫酸塩還元の測定

○佐藤 久, 伊藤 司, 岡部 聡, 渡辺義公 (北海道大学大学院)

1.はじめに

下水処理プロセスで用いられる好気性生物膜は内部に高密度に微生物を保持しており, 生物膜法によって下水中の有機物やアンモニア性窒素は効率よく除去される. 一方, このことは好気性生物膜が多量の溶存酸素(DO)を消費することを意味しており, 一般に好気性生物膜に取り込まれたDOは膜表面から数100 μ m程度で枯渇し, 生物膜内には好気領域と嫌気領域が膜深さ方向に層状に分布することが知られている^{1, 3-5)}. 嫌気領域では硝化等の好気反応は起こらないものの, 都市下水中にはアンモニア性窒素やリンと同程度の硫酸塩が含まれており, 硫酸塩還元菌(SRB)による硫酸塩還元反応が起こる^{1, 2)}. 硫酸塩還元反応は有機物除去, 発生した硫化水素(H₂S)の酸化によるDO消費等により好気性生物膜の基質除去効率に影響を与えるものと推測される.

硫酸塩還元活性を把握するためには発生したH₂Sを定量することが必要となるが, 好気条件下では発生したH₂SはDOにより酸化されるために生物膜外で検出されることはまれであり, 反応器内の硫黄の物質収支のみからは好気性生物膜内の硫酸塩還元活性を知ることはできない. 従って, 好気性生物膜内の硫酸塩還元活性を解明するためには生物膜内の現位置(*In Situ*)においてH₂Sを定量することが不可欠となる. しかし, 厚さわずか数mm程度の生物膜内のH₂S濃度を測定することは困難であり, 好気性生物膜内の硫酸塩還元反応に関しては未知の部分が多い.

近年, 生物膜内の基質濃度分布を測定するための有効なツールとして微小電極が広く利用されている^{1, 3-5)}. 生物膜内の基質濃度分布を測定することにより生物膜の基質除去機構に関する重要な情報が得られるため, 生物膜内の硫酸塩還元反応のみならず硝化^{3, 4)}及び脱窒反応機構⁵⁾に関しても微小電極を用いた研究が報告されている. Kuhl and Jorgensen¹⁾は微小電極を用いて生物膜内のH₂S濃度分布を測定し, 硫酸塩及び有機物濃度の増加に伴い好気性生物膜内の硫酸塩還元活性が高まることを報告している. さらに, 硫酸塩還元反応は酸化還元電位が-150~-200以下の還元状態で起こることから⁶⁾, SRBの電子受容体である硫酸塩, 及び電子供与体である有機物濃度と同様に生物膜内の酸化還元電位, すなわちDO及び硝酸塩(NO₃⁻)濃度についても硫酸塩還元活性に影響を与える因子として考慮しなければならない.

本研究では, 微小電極を用いて生物膜内のH₂S, DO, NO₃⁻, pH濃度分布を測定し, 計算によって求めた*In Situ*の硫酸塩還元, H₂S酸化, DO消費, NO₃⁻消費活性度及び活性領域から, 硫酸塩還元反応によるDO及び有機物消費量の定量を行った. さらに, NO₃⁻濃度の変動が*In Situ*の硫酸塩還元活性に与える影響を検討した.

2. 実験装置と方法

2.1 リアクターと生物膜の馴養条件

本研究では, 札幌市創成川下水処理場に設置したベンチスケールの全没型RBC(反

応槽容積:5.6L, 円板回転速度:13r.p.m.)を用いて生物膜を馴養した。流入基質には、札幌市創成川下水処理場の最初沈殿池流出水と、これを処理した半水没型RBCの流出水を1:1に混合したもの($\text{SO}_4^{2-}=7\sim 15\ \mu\text{mol/L}$)を用いた。微好気条件($\text{DO}=10\sim 50\ \mu\text{mol/L}$, $\text{NO}_3^-=350\sim 700\ \mu\text{mol/L}$)で馴養された生物膜は銀白色で、糸状であった。

2.2 微小電極

生物膜内基質濃度profileを測定するためにDO, NO_3^- , H_2S , pH微小電極を制作した。

(a) DO微小電極

DO微小電極(カソードタイプ)はRevsbech and Jorgensen⁷⁾の方法を参考にし制作した。DePeX⁸⁾を被膜した後の電極の先端直径は約 $15\ \mu\text{m}$, 90% response timeは2~3secであった。キャリブレーションはDOが飽和したバルク水中及び生物膜内の嫌気部分における検出電流値を用いて2点検量により行った。

(b) NO_3^- 微小電極

NO_3^- 微小電極はDeBeerら⁹⁾の方法を参考にし制作した。先端直径は $5\ \mu\text{m}$ 程度であった。L.I.X.にはNitrate ionophore-Cocktail A (Fluka)を用いた。キャリブレーションは測定基質の NO_3^- 濃度を5段階($1000\ \mu\text{mol/L}\sim 10\ \mu\text{mol/L}$)に変化させて行った($r^2=0.99$)。また、 NO_3^- 微小電極のイオン選択性(K^{pot})をseparate solution methodにより評価した¹⁰⁾ところ Cl^- に対する K^{pot} は0.04であり、同じL.I.X.を用いたZhenら¹¹⁾の値と同程度であった。

(c) H_2S 微小電極

H_2S 微小電極はLeeら¹²⁾の方法を参考にし制作した。先端直径は $25\ \mu\text{m}$ 程度であった。 N_2 脱気した測定基質の H_2S 濃度を5~8段階($1000\ \mu\text{mol/L}\sim 1\ \mu\text{mol/L}$)に変化させ、測定時のpHに調整した後にキャリブレーションを行った($r^2=0.99$)。 H_2S 微小電極は S^{2-} を選択的に検出する電極であり、 S^{2-} についての

キャリブレーションを求める必要がある。そこで、メチレンブルー法により定量した全 H_2S 濃度(すなわち H_2S , HS^- 及び S^{2-} の総濃度, 以下 H_2S とする)に対するキャリブレーションを求め、式.1から S^{2-} のキャリブレーションに変換した。このキャリブレーションと式.2を用いることで、深さ方向にpHが異なる生物膜内の正確な H_2S 濃度を求めることができる。

$$[\text{S}^{2-}] = \frac{[\text{H}_2\text{S}]}{\frac{[\text{H}^+]^2}{K_1 K_2} + \frac{[\text{H}^+]}{K_2} + 1} \quad (1)$$

$$[\text{H}_2\text{S}] = [\text{S}^{2-}] \times \left(\frac{[\text{H}^+]^2}{K_1 K_2} + \frac{[\text{H}^+]}{K_2} + 1 \right) \quad (2)$$

(d) pH微小電極

pH微小電極はDeBeerら¹³⁾の方法を参考にし制作した。先端直径は $5\ \mu\text{m}$ 程度であった。 HCl 及び NaOH を用いて測定基質のpHを7~10段階(pH=7~pH=9)に変化させキャリブレーションを行った($r^2=0.999$)。

2.3 生物膜内基質濃度profileの測定

回転円板の一部($1\text{cm}\times 6\text{cm}$)をあらかじめ取り外せるように加工し、支持体ごと採取した生物膜をフローセル内に固定して生物膜内各種濃度profileを測定した。測定時は N_2 ガスでDO濃度を調整し、定常状態を保つために2Lの基質(表.1)をフローセル内の流速が2~3cm/sとなるように循環した。数時間基質を循環した後測定を開始した。

微小電極をマイクロマニピュレーターに固定し、DO微小電極は比較電極に対して-0.75Vの電圧をかけピコアンペアメーターに、 NO_3^- , H_2S 及びpH微小電極はpHメーターに接続し測定を開始した。比較電極には Ag/AgCl タイプ(HORIBA,2010A-06T)を用い、フローセル及びマイクロマニピュレーターはFaraday cage内に設置した。

表.1 測定基質組成

成分	濃度 ($\mu\text{mol/L}$)
NaNO ₃	0, 280
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1000
Sodium acetate	2000
NH ₄ Cl	300
Na ₂ HPO ₄	570
MgCl ₂ · 6H ₂ O	84
CaCl ₂	200
EDTA · 2Na	270

2.4 生物膜単位体積当たりの基質消費活性度(R(i)), 全基質消費活性度(C(i))及びフラックス(J(i))の算出

各実験条件のDO消費, NO₃⁻消費, SO₄²⁻消費(すなわち硫酸塩還元), H₂S消費(すなわちH₂S酸化)活性を比較するために, Diffusion-reaction modelに基づき各消費活性度を計算した¹⁴⁾. 実験により求めた基質濃度profileが微生物による消費と, Fickの第2法則によって記述される濃度拡散のみによって決まると仮定すると式.3が成立する.

$$\frac{\partial C_{x,i}(i)}{\partial t} = D(i) \frac{\partial^2 C_{x,i}(i)}{\partial x^2} - R(i) \quad (3)$$

ここで, C_{x,i}: 基質濃度, i: 消費される溶質, D: 拡散係数である. 20℃でのDO, NO₃⁻, SO₄²⁻の拡散係数はそれぞれ $2.09 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $1.23 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $1.39 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ とした¹⁵⁾.

0次反応及び定常状態を仮定し式.3を積分すると, 生物膜内基質濃度profileは式.4となる.

$$C_x(i) = \frac{R(i)}{2D(i)} x^2 - \sqrt{\frac{2R(i)Cs(i)}{D(i)}} x + Cs(i) \quad (4)$$

実験により求めた基質濃度profileを式.4の二次曲線にカーブフィットしx²の係数からR(i)を求めた. また, 二次近似が可能な領域(すなわち活性を有する領域)の深さをLa(i), 活性を有する領域における全基質消

費活性度をC(i)=(R(i)×La(i))とした.

またフラックス(J(i))はFickの第1法則(式.5)から求めた.

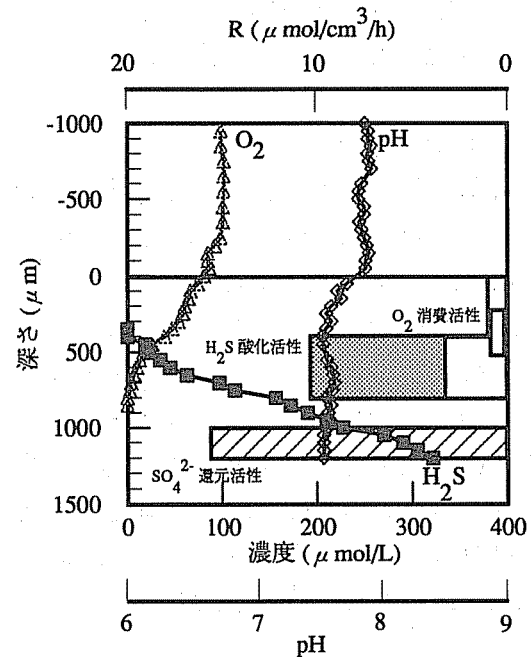
$$J(i) = -D(i) \frac{\partial C(i)}{\partial i} \quad (5)$$

膜深さ方向の濃度勾配は実験により求めた基質濃度profileの直線領域から求めた.

3. 結果と考察

3.1 生物膜内の硫酸塩還元反応及びDO消費活性

図.1に微小電極を用いて測定した生物膜深さ方向のDO, H₂S及びpH濃度profileと, 計算により求めた硫酸塩還元, H₂S酸化, DO消費活性を示す. バルク水中に約100 $\mu\text{mol/L}$ 存在したDOは表面から800 μm の地点

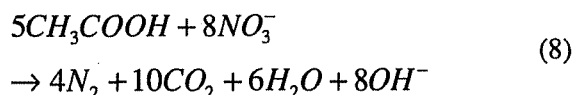
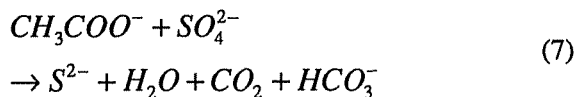
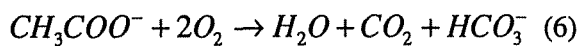


活性領域 (μm)	R ($\mu\text{mol/cm}^3/\text{h}$)	J ($\mu\text{mol/cm}^2/\text{h}$)
DO 0-450	1.21	0.104
450-800	3.21	
H ₂ S 450-800	10.4	0.180
SO ₄ ²⁻ 950-1200	15.8	0.180

図.1 生物膜内DO, H₂S及びpH濃度プロファイル (DO=100 $\mu\text{mol/L}$)

で枯渇し、膜深さ方向に好気-嫌気領域が分布していた。硫酸塩還元反応は表面から950 μm 以深の嫌気領域のみでみられ、好気性生物膜内において硫酸塩還元反応が起こることを確認した。R(SO₄²⁻)は嫌気性生物膜¹⁶⁾と同程度の15.8 $\mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{h}$ に達し、J(SO₄²⁻)は0.180 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ であった。

ここで、硫酸塩還元による有機物消費量が全有機物消費量に占める割合を式(6)~(8)に示したDO, NO₃⁻及びSO₄²⁻による酢酸分解反応の化学量論式と各フラックスから化学量論的に計算した。計算を行うにあたり、生物膜全体の有機物消費量はこれらの合計とした。ここで、SO₄²⁻は全て有機物の分解により還元されるとみなすことができるものの、DOは有機物の分解の他にH₂Sの酸化及び硝化により消費され、NO₃⁻もH₂Sの酸化により消費される。本研究においてはこれらの内訳を区別することはできないため、消費されるDO及びNO₃⁻は全て有機物の分解によると仮定し計算を行った。従って、硫酸塩還元による有機物消費量が全有機物消費量に占める割合は過小評価されることになる。図.1において、J(SO₄²⁻)、及びJ(DO)はそれぞれ0.180 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ 、0.104 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ であるから、有機物消費量は0.180 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ 、0.052 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ となり、硫酸塩還元による有機物消費量は全有機物消費量の少なくとも78%を占めることが明らかになった(表.2)。



硫酸塩還元反応により発生したH₂Sは450 μm ~800 μm の好気領域でDOにより酸化された。H₂S酸化領域におけるR(DO)は3.21 $\mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{h}$ 、C(DO)は0.112 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ で

あった。また、R(DO)は2つの領域に分かれ、膜表面から450 μm の領域におけるR(DO)は1.21 $\mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{h}$ 、C(DO)は0.054 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ であった。ここで、H₂S酸化領域で消費されたDO量がC(DO)が全てH₂Sを酸化するために消費されたものと仮定すると、H₂Sの酸化によるDO消費量は生物膜全体のDO消費量の67%にも達した。これにより、好気性生物膜内で硫酸塩還元反応が起こる場合、DOは有機物の酸化及び硝化のみならずH₂Sの酸化によっても消費されることが明らかになり、好気性生物膜の好氣的反応の効率が低下する可能性が示唆された。

3.2 硫酸塩還元活性に対するNO₃⁻の影響

図.2に、バルク水中に約280 $\mu\text{mol}/\text{L}$ のNO₃⁻を添加した場合のDO, NO₃⁻, H₂S及びpH濃度profileと硫酸塩還元, H₂S酸化, DO消費及びNO₃⁻消費活性を示す。DOは550 μm の地点で枯渇したものの、硫酸塩還元反応は1300 μm 以深のみで起こり、NO₃⁻が存在することで嫌気領域においても硫酸塩還

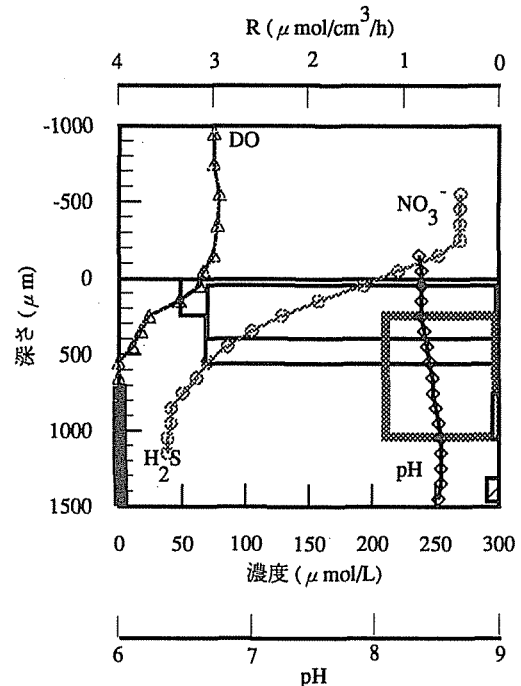


図.2 生物膜内DO, H₂S, NO₃⁻及びpH濃度プロファイル (DO=70 $\mu\text{mol}/\text{L}$)

表.2 図.1, 2における硫酸塩還元領域, 活性度及びフラックス

	Zone(μm)	R(SO_4^{2-})	J(SO_4^{2-})
図.1	950-1200	15.8	0.18
図.2	1300-1450	0.14	0.002

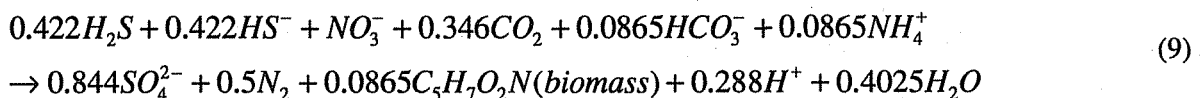
元反応が抑制された. 表.2に図.1, 2における硫酸塩還元領域, R(SO_4^{2-})及びJ(SO_4^{2-})をまとめて示す. これにより, 生物膜内の NO_3^- 濃度の増加に伴い, 硫酸塩還元活性を持つ領域は深層へ変遷することが明らかになった.

また, 表.2によって硫酸塩還元反応が深層で起こるほどR(SO_4^{2-})及びJ(SO_4^{2-})が低下することが明らかになった. この理由として, NO_3^- を添加したことで脱窒菌の活性が高まりSRBと脱窒菌が有機物をめぐり競合したこと, 生物膜の基質輸送抵抗¹⁷⁾のために深層に供給される有機物量が律速されたことが考えられる. このように, DO及び NO_3^- の増加は酸化還元電位の上昇のみならず, 有機物をめぐる競合を引き起こすことでも硫酸塩還元活性を低下させることが分かった. さらに, In Situの硫酸塩還元活性はDO, NO_3^- の侵入深さだけでなく膜厚¹⁶⁾, SO_4^{2-} ^{1, 2)}及び有機物濃度¹⁾等の影響を受けても変動する. 硫酸塩還元活性が低下することは H_2S の酸化により消費されるDOが減少すること, 生物に対し有害であり構造物の腐食を引き起こす H_2S の発生量が減少することを意味している.

図.2においても図.1と同様に硫酸塩還元による有機物消費量が全有機物消費量に占

表.3 DO, NO_3^- 及び SO_4^{2-} による酢酸消費量の全消費量に占める割合(%)

	O_2	NO_3^-	SO_4^{2-}
図.1	22	0	78
図.4	19	79	2



める割合を計算した. 結果を表.3に示す. 硫酸塩還元反応により消費される有機物量は NO_3^- 濃度の増加に伴い78%から2%に減少した. 好気性生物膜における他の研究によれば, この割合は50%¹⁾または15~20%²⁾であり, 微好気条件下ではより高いことが明らかにされた.

図.2において, 発生した H_2S は膜表面から500 μm 以深の750~1050 μm の領域において完全に酸化されたものの, DOは膜表面から500 μm 程度で枯渇しており, H_2S の酸化に関与しなかった. 250 μm から1050 μm の領域で NO_3^- が消費されていることから, この場合の H_2S の酸化は主に NO_3^- によるものと考えられる. NO_3^- による H_2S の酸化には, 硫黄化合物を電子供与体として独立栄養的に脱窒を行う硫黄脱窒菌が関与していると考えられる(式.9)¹⁸⁾. このように, 硫酸塩還元反応により発生した H_2S は脱窒の関与し, 生物膜内の硫黄循環は有機物の分解のみならず窒素の循環と結びついていることが明確にされた.

4. 結論

本研究では, 微小電極を用いて生物膜内の H_2S , DO, NO_3^- , pH濃度分布プロファイルを測定し, 計算によって求めたIn Situの硫酸塩還元, H_2S 酸化, DO消費, NO_3^- 消費活性度及び活性領域から硫酸塩還元活性を定量的に評価した. また, NO_3^- 濃度の変動がIn Situの硫酸塩還元活性に与える影響を検討した. その結果, 以下のことが明らかになった.

1.好気性生物膜内においても硫酸塩還元反応が起こっていたが, 発生した H_2S は全て生物膜内で酸化され, 膜外では検出されなかった.

2. 生物膜内で起こる硫酸塩還元反応による有機物消費量は全有機物消費量の78%を占めた。しかし、硫酸塩還元活性の低下に伴い硫酸塩還元による有機物消費量が全有機物消費量に占める割合も低下した。

3. H_2S の酸化に伴うDO消費量は全DO消費量の67%に達し、好気的な反応の効率が低下する可能性が示唆された。また、 H_2S の酸化にはDOのみならず NO_3^- が関与していた。

本研究の結果から、硫酸塩還元反応は好気性生物膜に対し多大な影響を与えることが明らかになり、今後好気性生物膜の生物膜モデルやリアクターの設計に考慮されることが望まれる。

参考文献

- 1) Kuhl, M.K. and Jorgensen, B.B. (1992) Microsensor Measurements of Sulfate Reduction and Sulfide Oxidation in Compact Microbial Communities of Aerobic Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1164-1174
- 2) Lens, P., Massone, A., Rozzi, A., and Verstraete, W. (1995) Effect of Sulfate Concentration and Scraping on Aerobic Fixed Biofilm Reactors. *Wat. Res.* 29 (3), 857-870
- 3) Schramm, A., Larsen, L.H., Revsbech, N.P., Ramsing, N.B., Amann, R., and Schleifer, K. (1996) Structure and Function of a Nitrifying Biofilm as Determined by In Situ Hybridization and the Use of Microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4641-4647
- 4) De Beer, D., Van Den Heuvel, J.C., and Ottengraf, S.P.P. (1993) Microelectrode Measurements of the Activity Distribution in Nitrifying Bacterial Aggregates. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 573-579
- 5) Nielsen, L.P., Christensen, P.B., Revsbech, N.P., and Sorensen, J. (1990) Denitrification and Oxygen Respiration in Biofilms Studied with a Microsensor for Nitrous Oxide and Oxygen. *Microb. Ecol.* 19, 63-72
- 6) Postgate, J.R. (1984) The sulfate-reducing bacteria, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- 7) Revsbech, N.P. and Jorgensen, B.B. (1986) Microelectrodes: Their use in Microbial Ecology. *Adv.*

Microb. Ecol.

- 8) Revsbech, N.P. (1983) In Situ Measurement of Oxygen Profiles of Sediments by Use of Oxygen Microelectrodes.
- 9) DeBeer, D., and Sweerts, J.P.R.A. (1989) Measurement of Nitrate Gradients with an Ion-Selective Microelectrode. *Analytica Chimica Acta* 219, 351-356
- 10) Ammann, D. (1986) Ion-selective microelectrodes, principles, design and application, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- 11) Zhen, R., Smith, S.J. and Miller, A.J. (1992) A comparison of nitrate-selective microelectrodes made with different nitrate sensors and the measurement of intracellular nitrate activities in cells of excised barley roots. *J. Exp. Bot.*, 43, 131-138
- 12) Lee, W., Lewandowski, Z., Morrison, M., Characklis, W.G., Avci, R., and Nielsen, P.H. (1993) Corrosion of Mild Steel Underneath Aerobic Biofilms Containing Sulfate-reducing Bacteria Part 2: At High Dissolved Oxygen Concentration. *Biofouling* 7, 217-239
- 13) DeBeer, D., and Van Den Heuvel, J.C. (1988) Gradients in Immobilized Biological Systems. *Analytica Chimica Acta* 213, 259-265
- 14) Nielsen, L.P., Christensen, P.B., Revsbech, N.P., and Sorensen, J. (1990) Denitrification and Oxygen Respiration in Biofilms Studied with a Microsensor for Nitrous Oxide and Oxygen. *Microb. Ecol.* 19, 63-72
- 15) Perry, J.H. () Chemical Engineers' Handbook. Fourth Edition
- 16) Nielsen, P.H. (1987) Biofilm Dynamics and Kinetics during High-Rate sulfate reduction under anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 27-32
- 17) de Beer, D., Stoodley, P. and Lewandowski, Z. (1996) Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy. *Biotechnol. Bioeng.*, 53, 151-158.
- 18) Sublette, K.L. and Sylvester, N.D. (1987) Oxidation of hydrogen sulfide by *tiobacillus* denitrificans: desulfurization of natural gas. *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 249-257