

アプリケーションレポート 0600412e

Universität

Hohenheim



**Wissenschaftlich-Technische
Werkstätten GmbH & Co. KG**

Dr. Karl-Slevogt-Straße 1

D-82362 Weilheim

Tel 0881 / 183-0

Fax 0881 / 6 25 39

E-Mail Info@WTW.com

Internet <http://www.WTW.com>

Prof. Dr. Roland Süßmuth
Dr. Christine Doser
Tillmann Lueders

Institut für Mikrobiologie

Garbenstrasse 30
D-70599 Hohenheim

Tel :
+49-711-459-2229

Fax :
+49-711-459-2238

E-mail :
cdoser@uni-hohenheim.de

分析用アプリケーション

OxiTop[®] Control測定システムを使用した嫌気性条件における有機物質の生分解性測定

実験的解法の実施例

1. Auflage : Oktober 1999

はじめに

汚染物質の影響を評価するための水質分析（BOD、減水）では、これまで何十年も、ルーチン測定の測定指標として生物活動が使用されてきました。しかし今日に至るまで、嫌気性分解の解析測定において重要な成果を残せなかったケースも多く存在します。その大きな理由は、この測定手法が多く時間を（およびコスト）を必要とすること、また実施が難しいということです。一方、嫌気条件での生物系廃棄物処理分野における課題や、嫌気性菌毒性テストをさらに開発していく必要性から、実施が容易で、経済性の高い測定手法への需要が高まってきました。OxiTop[®]制御測定システムは好気性分析の分野で確立された装置ですが、このシステムや、専用の新型アクセサリの開発を進めることでその適用範囲も広がり、嫌気性分野にも応用できる可能性があります。以下に、消化スラッジやそのエマルジョン、特にポリマーや油脂における生物学的な嫌気性分解プロセスに関する、簡素かつ再現性を備えた測定方法を、実例を挙げて説明します。

基本原理

嫌気性分解の基本的利点

汚染物質（産業排水に含まれる化学物質など）の嫌気性分解には、好気性分解とは異なる、次のような利点があります。

- ・ 試験の結果発生する生物体量が、好気性処理よりも大幅に少ない。
- ・ エネルギーを大量に必要とするエアレーションを必要としない。
- ・ 二酸化炭素（CO₂）やメタン（CH₄）など、エネルギー生成に利用可能なバイオガスを採用できる。

測定原理

嫌気性分解の過程ではバイオガス（CH₄やCO₂など）が発生します。その結果、ガス遮断性の密閉式目盛り付きフラスコのヘッドスペースで圧力が上昇します。

検体は炭素源として使用し、水中に溶解させて無機塩溶液で希釈します（検体 >> 消化スラッジ内の炭素源）。次に、公共下水処理施設で採取した、特定の量の消化スラッジを加えます。これと平行して、検体を全く使用しないサンプル液（**ブランク溶液または対照溶液**）を調製します。磁気攪拌器や誘導攪拌システムを使用して、静かに目盛り付きフラスコの中をかき混ぜ、35°Cの暗所で培養します。バイオガスの圧力変化は、OxiTop[®]-C測定システムで記録され、実験の全過程を通してデータが自動保存されます。データは、赤外線による遠隔通信でOxiTop[®]コントローラーに送信されます。サンプル液の全圧力上昇やバイオガス発生量は、コントローラーでグラフィック表示できます。また、コントローラーに保存したデータをPCに送り、Excelで加工することも可能です。その後の分解過程でプラトー（バイオガス圧力の一定化）が形成されたら、発生したCO₂を、次のa)またはb)の方法で回収または吸収します。

a) ヘッドスペースのCO₂

CO₂吸収剤（例：1 mlのKOH液 [30 % v/v]）を、目盛り付きフラスコのセプタム栓を通して注入する。吸収剤の作用により、ヘッドスペースの圧力が低下します。

b) サンプル液およびヘッドスペースのCO₂

抽出液（例：1 mlのHCl溶液 [19 % v/v]）を、セプタムを通して試験溶液に注入する。液相内のCO₂がヘッドスペースに移り、ヘッドスペースの圧力が上昇します。溶液中のCO₂が完全に拡散したら、ヘッドスペースのCO₂をa)の手順で吸収します。その結果、圧力が低下します。試験溶液の残留圧力からブランク溶液の残留圧力を引くと、差圧が算出され、これがCH₄の発生量に相当します。この値を、試験した有機物質の嫌気的生分解性を定量計算する際に利用します。

計算の原理

消化スラッジに含まれる有機化合物の嫌気的生分解性の測定は、DIN EN ISO 11734 (1998)またはDEV L47 に、バイオガス発生量測定を含む処理として説明されています。

実務上の理由から、気体圧力はhPa ([1 hPa = 10² Pa、1 Pa = 1 N/m²]または[1 hPa = 1 mbar])、体積はml、温度は°Cを単位として測定します。

計算時は、温度がK (ケルビン) で指定されます (例 : 35°C = 308.15 K)。

以下の全ての計算の原理となるのは、理想気体の法則です。

$$n = \frac{p \cdot V}{R \cdot T}$$

ここで、

n 形成されたガスのモル数 (mol)

p ガス圧力 (Pa [N/m²])

V ガス体積 (m³)

R ガス定数 (8,314 J / [mol * K])

T 培養温度 (K)

“通常の”単位 hPa や mL で計算を行い、ガス定数 R および 35°C (308.15K に相当) の温度 T を方程式の要素として導入した場合、公式は次のようになります。

$$n = p \cdot V \cdot 3,903 \cdot 10^{-8}$$

ここで、

n 形成されたガスのモル数 (mol)

p ガス圧力 (hPa)

V ガス体積 (mL)

気相の炭素含有量

気相の炭素含有量は、メタンと二酸化炭素の合計で表されます。物質分解の結果、気相で形成された気体中の炭素正味量 (各ブランク値を差し引いた後の値) は、次の式で算出します。

$$n_{CO_2,g/CH_4} = \frac{\Delta p \cdot V_g}{R \cdot T} \cdot 10^{-4}$$

ここで、

$n_{CO_2,g/CH_4}$ 形成されたガス (二酸化炭素とメタン) のモル数 (mol)

Δp 実験終了時の各試験容器内のガス圧力と、実験開始時のガス圧力と、各ブランク値との差 (mbar [hPa])

V_g 容器内の気相の体積 (mL)

10^{-4} PaからhPa、m³からmlへの変換係数

生物分解の曲線は、時間経過にともなう圧力 Δp (単位 hPa) の累積増加として点で表示されます。この曲線から、誘導期を読み取れます (分または日単位)。誘導期とは、試験の開始から、有意義な分解が生じるまでの時間です (「結果」の項の例を参照)。

水相の炭素含有量

炭素は主に、炭酸塩や炭酸水素塩、つまり無機炭素の形で水相に含まれています。サンプル液に塩酸を注入すると、炭酸塩が二酸化炭素に変化します。これにより圧力がさらに上昇し、この上昇分が水相の炭素含有量に相当します。これは次のように計算します (ブランク値も同様に計算できます)。

$$n_{\text{CO}_2, l} = \left(\frac{p_2 \cdot (V_g - V_{\text{HCl}}) - p_1 \cdot V_g}{R \cdot T} \right) 10^{-4}$$

ここで、

$n_{\text{CO}_2, l}$ 形成されたガス (水相含有炭素) のモル数 (mol)

p_1 塩酸注入前の絶対ガス圧力 (hPa)

p_2 二酸化炭素放出後の絶対ガス圧力 (hPa)

V_g ガス体積 (mL)

V_{HCl} 注入した塩酸の体積 (mL)

R ガス定数 (8,314 J / [mol * K])

T 培養温度 (K)

メタンと二酸化炭素の差別化

(容器の気相で) KOH 液をラバースリーブに注入すると、二酸化炭素が吸着します。二酸化炭素の総量は次のように計算します (ブランク値も同様に計算します)。

$$n_{\text{CO}_2, l / \text{CO}_2, g} = \left(\frac{p_3 \cdot (V_g - V_{\text{HCl}} - V_{\text{KOH}}) - p_2 \cdot (V_g - V_{\text{HCl}})}{R \cdot T} \right) 10^{-4}$$

ここで、

$n_{\text{CO}_2, l / \text{CO}_2, g}$ 形成された二酸化炭素の総モル数 (mol)

p_2 KOH液注入前の絶対ガス圧力 (hPa)

p_3 KOH液注入後の絶対ガス圧力 (hPa)

V_g ガス体積 (mL)

V_{HCl} 注入した塩酸の体積 (mL)

V_{KOH} 注入したKOH液の体積 (mL)

R ガス定数 (8,314 J / [mol * K])

T 培養温度 (K)

注: 水相の炭素含有量が測定されていない場合は、上記の式で、 V_{HCl} が消え、 p_2 の代わりに p_1 が使用されます。

ガスに変換される全炭素量

ガスに変換される炭素の全量は、次の式で計算します。

$$n_C = n_{CO_2, g/CH_4} + n_{CO_2, l}$$

ここで、

n_C 全炭素のモル数 (mol)

検体の炭素含有量

生物分解の係数を決定するためには、検体の炭素含有量の実測値と実験値とを関連付けることが必要です。炭素含有量は、検体の総和式で算出します。

$$n_{C,theo} = \frac{m_{PS}}{M_{PS}} \cdot x_C$$

ここで、

$n_{C,theo}$ 検体内の炭素のモル数 (mol)

m_{PS} 容器内の検体の質量 (g)

M_{PS} 検体の分子量 (g/mol)

x_C 総和式の炭素原子数

例) グルコース $C_6H_{12}O_6$: $M_{PS} = 6 \cdot 12 \text{ (g/mol)} + 12 \cdot 1 \text{ (g/mol)} + 6 \cdot 16 \text{ (g/mol)} = 180 \text{ (g/mol)}$
 $x_C = 6$ 炭素原子

生物分解の係数

生物分解の係数は、気相のガス濃度から算出します。

$$D_h = \frac{n_{CO_2, g/CH_4}}{n_{C,theo}} \cdot 100\%$$

完全分解の係数は次の式で求めます。

$$D_t = \frac{n_{CO_2, g/CH_4} + n_{CO_2, l}}{n_{C,theo}} \cdot 100\%$$

ここで、

D_h 気相で形成されたガスの生物分解の係数 (%)

D_t 完全生物分解の係数 (%)

分解プロセスの曲線は、時間に対する分解度 D_t をプロットすることで得られます。

材質、媒体および測定器

試薬

- ・ 脱イオン水
- ・ HCl (19 % v/v) によるCO₂抽出
- ・ CO₂ 吸収剤、KOH液 (30 % v/v)

検体

- ・ さまざまなポリマーや油脂について、下記の実験を行いました。
- ・ **PVA (ポリビニルアルコール)** : 繊維業界において、糸加工の仕上げ剤として使用される。
- ・ **カルボキシメチル澱粉** : 上記同様、繊維業界で仕上げ剤として使用される。
- ・ **PHB (ポリヒドロキシ酪酸)** : 特に医療分野で、インプラントの生物分解性ポリマーとして使用される。また、実験室リアクターでの炭素源、電子供与体、接着剤として、さらに飲料水の硝酸塩除去にも使用される。
- ・ **揚げ油**

検体は脱イオン水に溶解させます。

参照物質

この実験では、易分解性の参照物質として、**グルコース**を使用します。通常、グルコースの分解率は60%程度です。

グルコースは脱イオン水に溶解させます。

媒体

- ・ 水道水 : pH 7.1
- ・ 食塩水 (Baumann A および B による) :

食塩水 A :

5.44 g KH₂PO₄

6.97 g K₂HPO₄

10.70 g NH₄Cl

1000 mlの脱イオン水 (pH 7.0) を添加。

食塩水 B :

2.19 g CaCl₂ · 6H₂O

2.03 g MgCl₂ · 6H₂O

0.4 g FeCl₂ · 4H₂O

6.3 mg MnCl₂

1.0 mg ZnCl₂

0.6 mg CuCl₂

0.2 mg Na₂MoO₄ · 2H₂O

12.2 mg Co(NO₃)₂ · 6H₂O

1.0 mg NiCl₂ · 6H₂O

1.0 mg Na₂SeO₃

1000 mlの脱イオン水を添加。

- TeGeWa による溶液 :
 - 85 mg KH_2PO_4
 - 218 mg K_2HPO_4
 - 334 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 475 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 - 33 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 23 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 0.25 mg FeCl_3
- 1000 mlの脱イオン水を添加。

微生物

- 主に地方自治体の公共下水処理施設で採取した消化スラッジ
- 添加量 : 25 ml (10 % v/v)

装置

ピペット、ビーカー、メスシリンダーなど、通常使用する一般的な装置。

- OxiTop[®]制御センサー (WTW、D-82362 Weilheim、FRG)
- OxiTop[®] OC110 コントローラー (WTW、D-82362 Weilheim、FRG)
- ACHAT OC PC 通信ソフトウェア (WTW、Weilheim、FRG)、データ送信ケーブル、タイプ AK 540/B (RS 232 用)
PC、プロセッサ (最小要件 : 80486)、16 MB RAM、RS 232 インターフェース、オペレーティングシステム Windows 3.1 または 3.11
- EXCEL[®]5.0 表計算プログラム (Microsoft)
- MF 45/500 目盛り付きフラスコ (WTW Weilheim、FRG)
- OxiTop[®] AD/SKアダプター (ネジ式ストッパー付き) (WTW Weilheim、FRG)
- TS 606/2-Var 恒温箱 (WTW Weilheim、FRG)
- IS 6-Var 誘導攪拌システム (WTW Weilheim、FRG)
- N_2 / H_2 雰囲気とスルース付きの嫌気性チャンバー (Coy Lab. Prod.、米)
- pH 計 (測定値の正確さ : 0.01 pH)
- 実験室用はかり (最小読取値 : 0.1g)

実験の説明

調製

- GK 600、OxiTop[®] アダプターAD/SKラバーストッパー、およびRST 600 誘導攪拌器での実験で使用するMF 45/500 目盛り付きフラスコの容器体積 (ガス体積) を、次のように測定します。
- 目盛り付きフラスコの静荷重を測定します。
- 目盛り付きフラスコに、気泡が混入ないように水を注入し、注入後の重量を測定します。
- 差異を求めてガス体積を決定します。
- 容器ごとの平均液体体積 : **617 ml**
- (特に別の指定がない限り) 各実験で使用する容器ごとの体積 : **250 ml**
- その結果得られるヘッドスペース : **367 ml**
- (N_2 の導入などによる) 無酸素媒体溶液の調製

試験溶液および対照溶液の調製

- ・ 試験溶液の注入は、N₂雰囲気嫌気性チャンバーで行います。
- ・ 磁気攪拌器を目盛り付きフラスコの中に入れ、「結果」の項の実験別注入量一覧表にしたがって、媒体溶液（水道水、Baumannによる食塩水、TEGEWA溶液など）を注入します。
- ・ できるだけ新鮮な消化スラッジを25 ml注入します。
- ・ 次に、選択した濃度範囲にしたがって、検体を注入します（ただし、**グルコースを除く**。グルコースは、**実験開始直前**に注入します）。再調製は、毎回行いました。
- ・ 消化スラッジの固有活性を測定するため、検体を全く入れない対照物質（空白値）の調製を行います。適切な量の脱イオン水を追加します。
- ・ 試験溶液のpH値を測定する。必要に応じて、希釈したアルカリまたは酸でpH 7 ±0.2に調整します。
- ・ 目盛り付きフラスコの開口部を、ストッパーとセプタムでしっかりと閉じ、OxiTop[®]アダプターを挿入します。GL45ストッパーネジおよびラバーストッパーを緩く取り付けます。
- ・ 下記の実験における嫌気性雰囲気を確保するため、嫌気性チャンバーで25°C（技術的に可能であれば35°C）で一晩培養します。
- ・ 恒温箱を、攪拌プラットフォームで2～3時間35°Cまであらかじめ調整しておきます。
- ・ 実験を開始する前に、グルコース溶液（0.5 ml）を適切な容器に注入します。
- ・ GL45ストッパーとOxiTop[®]測定センサーのネジをしっかりと締め、嫌気性チャンバーから容器を取り出します。
- ・ コントローラーの実験タイプで「Pressure p」を選択し、実験時間を入力します（20日間など）。警告圧力（250 hPa など。BA OC110 参照）を設定し、測定センサーの運転を開始します。

ガスの培養と測定

- ・ 選択した実験時間の間、恒温箱で試験溶液を35°Cで培養します。サンプル全体の温度を一定にするため、試験溶液を誘導攪拌システムでゆっくりと攪拌します。
- ・ メモ：
- ・ 感受性菌ストックの場合は、必要に応じて、連続攪拌を避けてください。代替手法として、起振機で軽い振動（50～100 rpm/min）を生じさせるか、手で動かします（1日に1回など）。
- ・ 分解手順の間に形成されるバイオガスにより、目盛り付きフラスコ内に高圧が生じます。測定された圧力値は自動的にOxiTop[®]測定システムに保存されます。
- ・ 測定値のコントローラーへの送信は、定められた間隔で、バイオガスの形成にしたがってオペレータが行います。また、圧力曲線の監視を行い、必要に応じて現在値を保存します。

圧力が警告値を超えた場合は、適切なサンプル処理（セプタムを通したエアレーションなど）を選んで実行する必要があります。

実験の終了時に、サンプルをいくつか引き抜き、pH値を測定します。

さらに、作業方法によっては、1 mlのHClを各目盛り付きフラスコに注入します（3.2項も参照のこと）。これにより、CO₂を水相から抽出します。サンプルをさらに4時間、35°Cの恒温箱で培養します。

- ・ その後、1 mlのKOH液をサンプル容器のラバーストッパーに注入します。これにより、ヘッドスペースのCO₂を吸着します。
- ・ 吸収剤（KOH液）を添加し、さらに18～24時間、35°Cで目盛り付きフラスコを培養します。メタンは残存圧力として残ります。

- ・ 測定システムに保存されたデータがコントローラーに読み込まれ、Achat OC PC 通信プログラムによりコントローラーから直接 PC に送信されます。Excel 表計算プログラムにより、データの評価が実行されます。

実験の実行および結果

さまざまな緩衝液の調製

実験の初期段階では、実験に最適な媒体を見つけるため、さまざまな緩衝液について試験を行いました。

実験 1：次の溶液を使用（それぞれ 2 種調製）

- ・ 水道水
- ・ Baumann A による無機塩溶液
- ・ TeGeWa による食塩水

全ての試験溶液に、以下を注入。

- ・ 採取した消化スラッジ（濃度：6 % v/v）

分解用検体

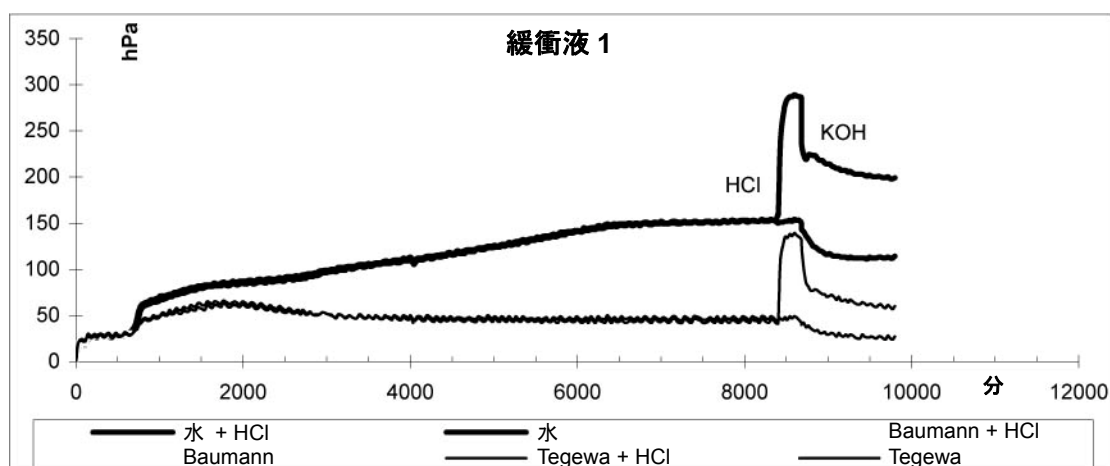
- ・ グルコース：使用したグルコース濃度は 75 mg（目盛り付きフラスコの液体体積 365 ml における最終濃度）

容器内の液体体積は 365 ml、ヘッドスペースは 252 ml でした。

注入量一覧表

容器	水道水		Baumann A		TeGeWa	
	A	B	C	D	E	F
消化スラッジ	19.5 ml	19.5 ml	19.5 ml	19.5 ml	19.5 ml	19.5 ml
溶液	345 ml	345 ml	345 ml	345 ml	345 ml	345 ml
グルコース (150 mg/ml)	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
HCl	1 ml	-	1 ml	-	1 ml	-
KOH 液	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml

図 1：消化スラッジ添加後のさまざまな緩衝液におけるグルコース分解（CO₂の放出あり・なし）



表示された曲線は、次の実験的解法を表します。

- ・ **水 + HCl**：実験の最後に、HClでCO₂を放出させ（圧力上昇）、その後KOH液を吸収剤として添加（圧力低下）。
- ・ **水**：実験の最後に、吸収剤としてKOH液のみを添加（圧力低下）。
- ・ **Baumann + HCl**：実験の最後に、HClでCO₂を放出させ（わずかな圧力上昇）、その後KOH液を吸収剤として添加（圧力低下）。
- ・ **Baumann**：実験の最後に、吸収剤としてKOH液を添加（圧力低下）。
- ・ **TeGeWa + HCl**：実験の最後に、HClでCO₂を放出させ（圧力上昇）、その後KOH液を吸収剤として添加（圧力低下）。
- ・ **TeGeWa**：実験の最後に、吸収剤としてKOH液を添加（圧力低下）。

HClで放出を行うタイミング（実験最後の急速な圧力上昇時）は、図中に印が表示されています。吸収剤KOH液をラバースリーブ（気相）に加えるタイミング（圧力低下時）も図中に印が表示されています。

図1には、実験の開始直後、全ての溶液で圧力上昇が始まったことが示されています。これは、最初の温度変更（25°Cから35°C）によるものです。12時間の誘導期の後、圧力の上昇が見られ、嫌気性分解が生じていることが分かります。

- ・ 水道水の溶液とTeGeWa液の溶液を比較すると、水道水の溶液の方が、圧力上昇がより大きく、次第にプラトーに移行しています。
- ・ TeGeWa液では、28時間後に圧力が最高点に達した後、圧力が再び低下し、その後はほとんど一定の値を保っています。
- ・ 図1は、水道水の溶液において、グルコースの分解率が非常に高かったことを明確に示しています。一方、TeGeWa液で特に顕著な点は、圧力上昇率ははるかに小さく、グルコースの分解が遅れたことです。
- ・ また、Baumann Aによる無機塩溶液では、わずかな圧力上昇しか見られず、曲線のプラトーがTeGeWa液使用時と似ています。
- ・ プラトー期に到達後、139.5時間（5.8日）経過後に、1 mlのHClを各試験溶液に注入し、溶液内のCO₂を放出させました。
- ・ 144.2時間後、目盛り付きフラスコのストッパーを通して吸収剤（0.5 mlのKOH液）を注入し、気相内のCO₂を吸収しました。
- ・ その結果、圧力が低下しています。

実験 1 (図 1) の計算

形成されたガスの量を絶対値で得るため、対照物質なしで（消化スラッジのブランク値なしで）実験を行いました。

下表は、一般的なガスの状態方程式による算出です。

表 1a : バイオガスの形成

分解	水道水 + グルコース		水道水 + グルコース	
	開始時	終了時	開始時	終了時
時間 [分]	616	8008	616	8008
圧力 [hPa] (測定値)	30	153	27	152
圧力 [hPa]	1043.25	1166.25	1040.25	1165.25
ヘッドスペース [ml]	252.0	252.0	252.0	252.0
温度 [°C]	35	35	35	35
温度 [K]	308.15	308.15	308.15	308.15
ガス [mmol]	10.26	11.47	10.23	11.46
差 [mmol]		1.21		1.23

⇒水道水では、75 mg のグルコースが以下に変換。

1.22 mmol のガス内含有炭素 (CO₂g+CH₄)

時間 : 123.2 時間

表 1b : HClによる放出

放出	水道水 + グルコース	
	開始時	終了時
時間 [分]	8372	8652
圧力 [hPa] (測定値)	153	287
圧力 [hPa]	1166.25	1300.25
ヘッドスペース [ml]	252.0	251.0
温度 [°C]	35	35
温度 [K]	308.15	308.15
ガス [mmol]	11.47	12.74
差 [mmol]		1.27

⇒水道水における 1 ml の HCl による放出量 :

1.27 mmol のガス内含有炭素 (CO₂fl.)

時間 : 4.7 時間

表 1c : KOH液の吸着によるCO₂flとCO₂gに含まれるCO₂量の内訳

吸着	HCl 入り水道水		HCl なし水道水	
	開始時	終了時	開始時	終了時
時間 [分]	8652	9520	8652	9520
圧力 [hPa] (測定値)	287	201	153	112
圧力 [hPa]	1300.25	1214.25	1166.25	1125.25
ヘッドスペース [ml]	251.0	250.5	252.0	251.5
温度 [°C]	35	35	35	35
温度 [K]	308.15	308.15	308.15	308.15
ガス [mmol]	12.74	11.87	11.47	11.05
差 [mmol]		-0.87		-0.43

⇒HCl の添加後、0.5 ml の KOH 液による吸着量 :

0.87 mmolのCO₂ 時間

時間 : 14.5

⇒HCl による放出なしで、0.5 ml の KOH 液による吸着

量 : 0.43 mmolのCO₂ 時間

時間 : 14.5

表 1d : Baumann Aによる溶液（消化スラッジ入り）内のグルコース分解

分解	Baumann A + グルコース		Baumann A + グルコース	
	開始時	終了時	開始時	終了時
時間 [分]	616	8008	616	8008
圧力 [hPa] (測定値)	27	58	30	72
圧力 [hPa]	1040.25	1071.25	1043.25	1085.25
ヘッドスペース [ml]	252.0	252.0	252.0	252.0
温度 [°C]	35	35	35	35
温度 [K]	308.15	308.15	308.15	308.15
ガス [mmol]	10.23	10.54	10.26	10.67
差 [mmol]		0.30		0.41

⇒Baumann A 液中、75 mg のグルコースの変換量 :

0.36 mmol のガス内含有炭素
(CO₂+CH₄)

時間 : 123.2 時間

表 1e : HClによる放出

放出	Baumann A + グルコース	
	開始時	終了時
時間 [分]	8372	8652
圧力 [hPa] (測定値)	58	79
圧力 [hPa]	1071.25	1092.25
ヘッドスペース [ml]	252.0	251.0
温度 [°C]	35	35
温度 [K]	308.15	308.15
ガス [mmol]	10.54	10.70
差 [mmol]		0.16

⇒Baumann A 液中、1 ml の HCl による放出量 :

0.16 mmol のガス内含有炭素 (CO₂fl.)

時間 : 4.7 時間

表 1f : KOH液の吸着によるCO₂flとCO₂glに含まれるCO₂量の内訳

吸着	HCl 入り Baumann A		HCl なし Baumann A	
	開始時	終了時	開始時	終了時
時間 [分]	8652	9520	8652	9520
圧力 [hPa] (測定値)	79	57	73	67
圧力 [hPa]	1092.25	1070.25	1086.25	1080.25
ヘッドスペース [ml]	251.0	250.5	252.0	251.5
温度 [°C]	35	35	35	35
温度 [K]	308.15	308.15	308.15	308.15
ガス [mmol]	10.70	10.46	10.68	10.60
差 [mmol]		-0.24		-0.08

⇒HCl の添加後、0.5 ml の KOH 液による吸着量 :

0.24 mmol のCO₂
時間 : 14.5 時間

⇒HCl による放出なしで、0.5 ml の KOH 液による吸着量 :

0.08 mmol のCO₂
時間 : 14.5 時間

TeGeWa 液を使用した試験溶液では、圧力の上昇が非常に遅く（図 1）、その結果発生するバイオガスの量を計算できませんでした。

表 2：全分解時間（123.5 時間）後の形成ガス量と分解率

		水道水	Baumann A 液
分解後の気相	気相内の含有炭素 (mmol) (CO ₂ g + CH ₄)	1.22	0.36
HCl による放出後の気相	気相内の含有炭素 (mmol) (CO ₂ fl)	1.27	0.16
ガス総量	気相内の含有炭素 (mmol) (CH ₄ + CO ₂ fl + CO ₂ g)	2.49	0.52
KOH液によるCO ₂ 吸着(HClによる放出なし)	気相内の含有炭素 (mmol) (-CO ₂ g)	0.43	0.08
KOH液によるCO ₂ 吸着(HClによる放出後)	気相内の含有炭素 (mmol) (-(CO ₂ g + CO ₂ fl))	0.87	0.24
生物分解率 [D _t]		99.6%	20.8%
生物分解率 [D _h] (気相の形成ガス)		48.8%	14.4%

1 mlのHClによるCO₂放出後に形成されたガスは、0.5 mLのKOH液では全量は吸着できませんでした。以下の実験では、KOH液の量を 1 mlに増量しています。特別な場合は、吸収剤の量を確認することが有効な場合があります。

実験 2：さまざまな緩衝液を使用した実験

さまざまな緩衝液を使用し、パラメータをいくつか変更して、さらに実験を行いました。

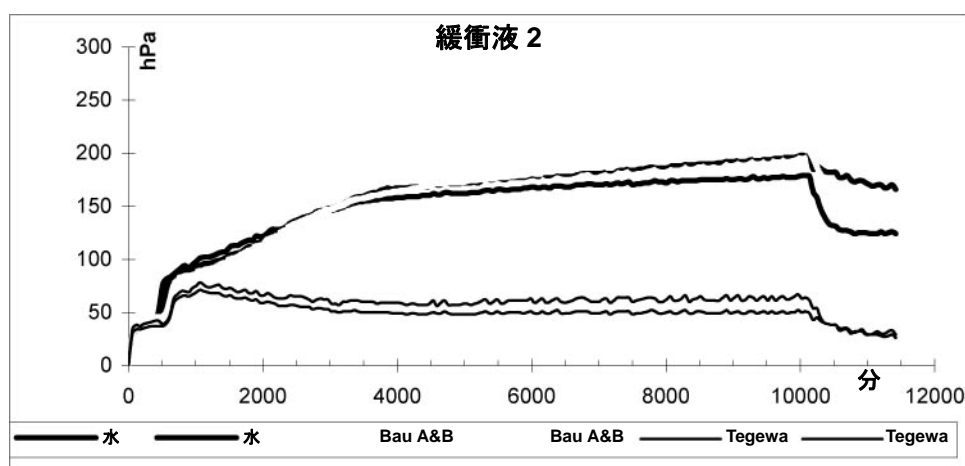
- ・ 新鮮な消化スラッジの量：25 ml、濃度：10 % v/v
- ・ 液体体積：250 ml、ヘッドスペース：367 ml

Baumann A による無機塩溶液は、無機塩と Baumann B による微粒元素溶液で補完しました。

注入量一覧表

容器	水道水		Baumann A + B (H ₂ O)		TeGeWa	
	A	B	C	D	E	F
消化スラッジ	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml
溶液	224.5 ml	224.5 ml	12.5 ml A 12.5 ml B	12.5 ml A 12.5 ml B	224.5 ml	224.5 ml
			199.5 ml H ₂ O	199.5 ml H ₂ O		
グルコース	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
KOH 液	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

図 2 : 消化スラッジ入りのさまざまな緩衝液におけるグルコース分解



技術的な理由により、この実験は、実験 1 と同様、対照溶液（消化スラッジのブランク値）なしで行いました。これは、形成されたガスの量を絶対値として得るためです。

また、実験の最後で、CO₂のHCl放出を行いませんでした。

気相のCO₂は、KOH液のラバースリーブ添加によって吸収しました。

- ・ 全ての溶液で、実験開始時の圧力上昇後、誘導期が認められ、その後、約 10 時間後に、注入されたグルコースの初期分解による急激な圧力上昇が生じています。
- ・ 全ての溶液で、実験 1 よりも大幅に高い圧力上昇が生じ、より高い最大値に達しました。これは、新鮮な消化スラッジを使用したことによると考えられます。
- ・ TeGeWa 液では、35 時間後に、圧力の低下が観察されています。
- ・ この実験では、Baumann A および B による無機塩溶液が、水道水を使用した溶液とほとんど同等の圧力上昇とプラトー形成を見せており、最大圧力値も同じ程度に高くなっています。
- ・ 試験溶液がプラトーに達した後、1 mlのKOH液をストッパーから注入し、気相のCO₂を吸収しました。

算出されたバイオガスの量は下表のとおりです。

表 3 : 形成されたバイオマス量の概要

		水道水	Baumann A&B	TeGeWa
分解	ガスのモル数 [mmol] (全炭素)	1.8	1.68	0.24
時間	時間	63.5	123.2	123.2
吸着	CO ₂ gのモル数 [mmol]	0.62	0.67	0.43

さまざまなポリマーによる分解実験

さまざまな易分解性および難分解性のポリマーを使用し、一連の実験を行いました。

- ・ 消化スラッジ：濃度 10 % v/v
- ・ 媒体：水道水
- ・ 検体：PVA、カルボキシメチル澱粉、PHB、油脂
- ・ 参照物質：グルコース
- ・ 対照：検体を入れず、消化スラッジのみの調製

能力上の理由から、一部の物質については再調製を行いませんでした。

PVA およびカルボキシメチル澱粉を使用した分解実験

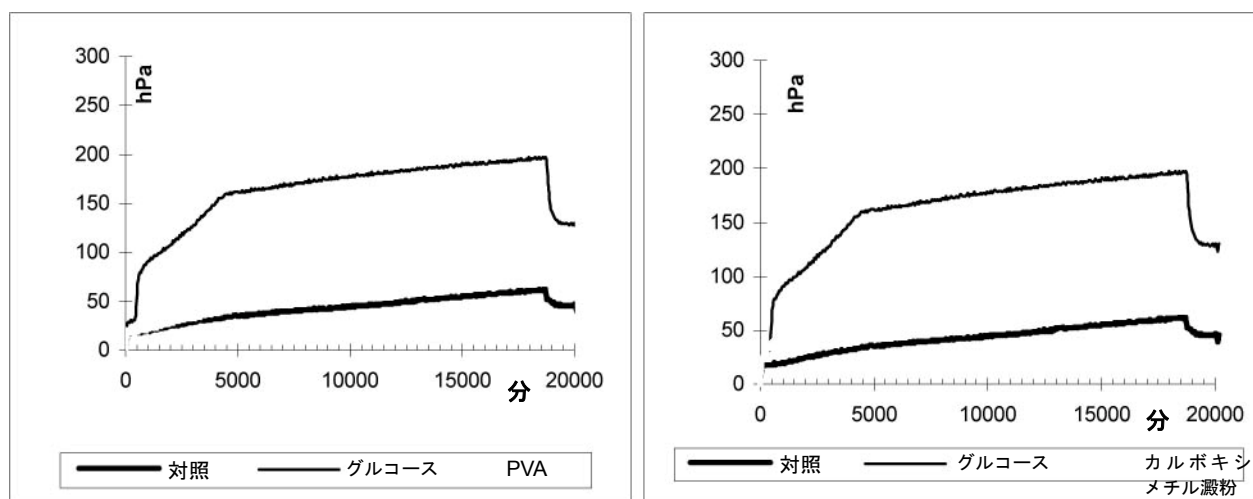
下記の実験（図 3）は、以下を使用して行っています。

- ・ 消化スラッジ：濃度 10 % v/v
- ・ 検体：ポリビニルアルコール（PVA）、カルボキシメチル澱粉（CM-S）

注入量一覧表

	対照	グルコース	PVA	カルボキシメチル澱粉
容器	A	B	C	D
消化スラッジ	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml
水	225 ml	224.5 ml	175 ml	175 ml
基質	-	75 mg / 0.5 ml	50 mg / 50 ml	50 mg / 50 ml
KOH 液	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

図 3：消化スラッジを入れたさまざまなポリマーにおける分解（液相からのCO₂放出なし。ヘッドスペースのCO₂吸収のみ）



短い誘導期の後、グルコース溶液では 7.5 時間後、PVA 溶液では 9.3 時間後、カルボキシメチル澱粉溶液では 2.8 時間後に圧力上昇が測定され、その後はプラトー状態がほぼ維持されました。

実験3（図3）の計算

計算は、実験1に詳述の方法で行いました。

ガス変換量の計算では、対照値（検体が入っていない消化スラッジ）を差し引きました。

表4：形成されたバイオマス量の概要

		グルコース	PVA	カルボキシメチル澱粉
量	mg	75	50	50
分解	ガスのモル量 [mmol] (全炭素)	1.53	0.29	0.87
時間	時間	75.6	301.5	215
吸着	CO ₂ gのモル数 [mmol]	0.73	0.04	0.3

特に、次の結果が得られました。

- ・ 76時間後、使用した75 mgのグルコースが1.53 mmolのガスに変換されました。形成されたCO₂の量は0.73 mmolで、メタンの量は0.8 mmolでした。
- ・ 302時間後、50 mgのPVAが0.3 mmolのガスに変換されました。この時点では、PVAの変換は完了していませんでした。成形されたCO₂の量は0.04 mmolでした。
- ・ 215時間後、50 mgのカルボキシメチル澱粉が0.87 mmolのガスに変換されました。吸収されたCO₂の量は0.3 mmolでした。

PHB および揚げ油を使用した分解実験

ポリマーによる実験（図4）は、以下を使用しました。

- ・ 消化スラッジ：新しく採取した濃度：10 % v/v
- ・ 検体：PHB、揚げ油

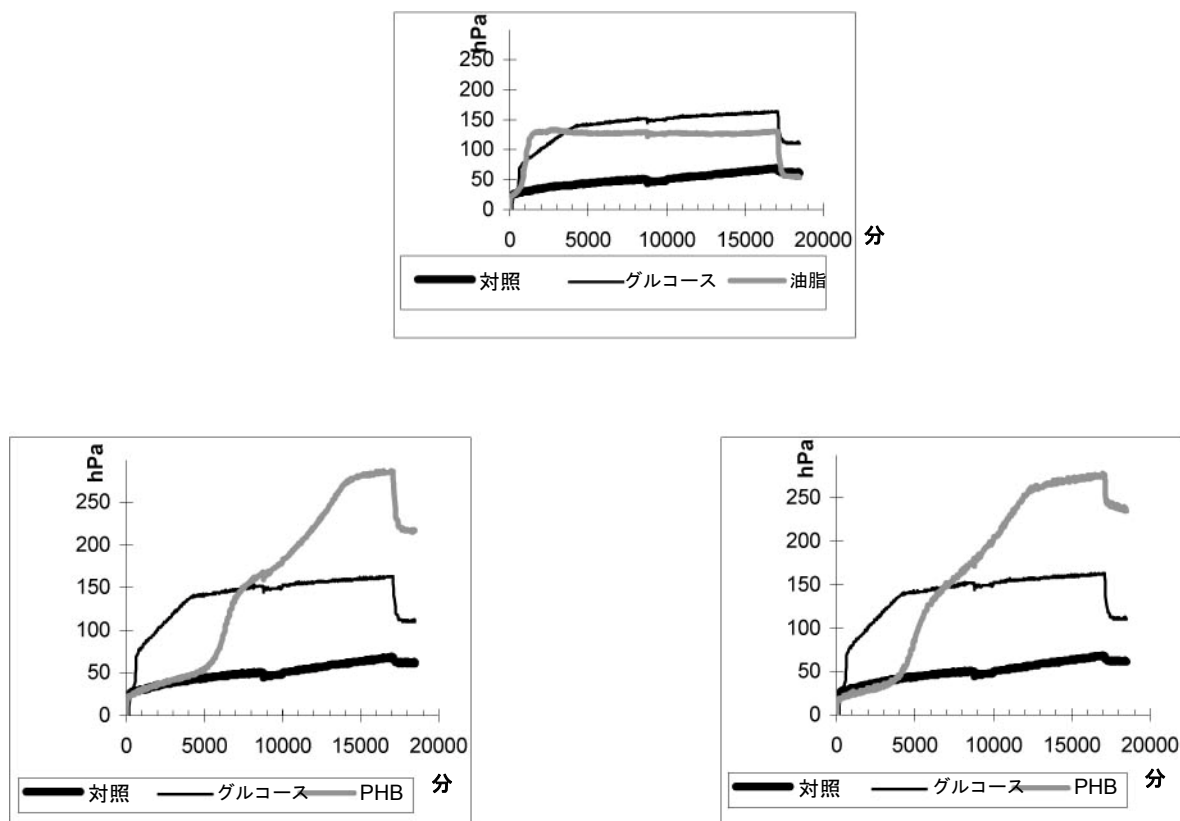
注入量一覧表

	対照	グルコース	油	PHB	PHB
容器	A	B	D	E	F
消化スラッジ	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml
水	225 ml	224.5 ml	175 ml	175 ml	175 ml
基質	-	75 mg / 0.5 ml	5 ml / 50 ml	100 mg / 50 ml	100 mg / 50 ml
KOH 液	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

実験の開始時と終了時の pH 値

容器	A	B	D	E	F
開始時	7.94	7.97	8.06	8.05	8.01
終了時	8.17	8.56	4.95	8.22	7.3
Δ pH	0.23	0.59	-3.11	0.17	-0.71

図 4: 消化スラッジ入り水道水におけるPHBおよび揚げ油の分解（液相からのCO₂放出なし。ヘッドスペースのCO₂吸収のみ）



- ・ グルコースを入れた試験溶液では、8.4 時間の短い誘導期の後、圧力上昇が観察されました。78 時間後、142 hPa のプラトーに達しました。
- ・ 油脂を入れた調製では、圧力上昇まで 12 時間が必要でした。31 時間後、圧力 130 hPa のプラトーに達しました。
- ・ 2 種類の PHB サンプルでも、長い誘導期が必要で、連続した圧力上昇まで 68 時間かかっています。どちらの PHB サンプルでも、約 116 時間後に、誘導期が再度認められます。144 時間後、明らかな圧力上昇が生じ、244 時間後に最高圧力の 279 hPa に達するまで上昇し続けています。
- ・ pH 値は、実験開始時は約 pH 8.0 で、油脂サンプル以外は、実験終了時もわずかな上昇に留まりました。
- ・ PHB サンプルでは、実験終了時の pH 値は、開始時よりも低い値（約 pH 7.3）を示しています。油脂サンプルでは、実験終了時の pH 値が開始時に比べて大幅に低下（pH 5）しています。これは、油の変換中に増加した酸の影響と考えられます。

実験 4、図 4 の計算

計算は、実験 1 に詳述の方法で行いました。

ガス変換量の計算では、対照値（検体が入っていない消化スラッジ）を差し引きました。

表 5 : 形成されたバイオマス量の概要

		グルコース	油	PHB
量	mg	75	5 ml	100
分解	ガスのモル数 [mmol] (全炭素)	1.31	1.22	2.99
時間	時間	69.1	18.7	175.5
吸着	CO ₂ gのモル数 [mmol]	0.66	0.99	0.68
生物分解率 [D _h] (気相で形成され たガス)	%	-	-	63.5%
CO ₂ 率	%	50.4%	81.1%	22.7%

基質からガスへの変換は次のように測定されました。

- ・ 75 mgのグルコースは 69 時間で 1.31 mmolのガスに変換されました。このうち、0.66 mmolがCO₂で、0.65 mmolがメタンです。
- ・ 5 mlの油は、18.7 時間で 1.22 mmolのガスに変換され、そのうち 0.99 mmolがCO₂で 0.23 mmolがメタンです。
- ・ 100 mgのPHBは、0.68 mmolのCO₂と、2.31 mmolのメタンに変換されました。

化学量論的量は全く使用されていないため、これらのデータからは相対値しか得られません。

- ・ PHBとグルコースでは、使用量はPHBの方が多かったにもかかわらず、同じ量のCO₂が発生しています。
- ・ PHBの分解では、CO₂とは異なり水に溶解しないメタン形成が支配的で、その結果、高い圧力上昇が生じています。
- ・ 中間誘導期があったことが示唆されており、この間、PHBの分解とグルコースの気相で、ほぼ同じ量のCO₂が形成され、その後、メタン生成細菌のメタン生成が始まりまっています。

異なる緩衝液やポリマーを使用し、さらに反復試験を実施した結果、これまでに得られた結果が確認されました。

これにより、TeGeWa 液の分解測定で結果が何も出なかったことも再確認されました(図 1 参照)。実際に、当初は、同程度の圧力上昇が、別の溶液の 1 つで観察されています。しかし、30 時間後に圧力が急速に低下し、その後は一定の値を保ちました。

論考

さまざまな緩衝液による実験 1 および 2 の解釈

- ・ いずれの実験でも、実験開始時には、明らかな誘導期が確認されています。消化スラッジに存在する微生物は、その代謝活性が始まる前に、新しい環境条件に適応する必要があります。
- ・ ここに、新鮮な消化スラッジで作業を行うことの大きな重要性が明らかに示されていると考えられます。これは、より活発な微生物は、より上手く環境に適応でき、その結果、大幅に高い分解値がグルコースで得られるためです。
- ・ 実験を行う上での媒体の重要性は、2つの実験において顕著に表れています。
- ・ 無機物の濃度の低さおよび重要微量元素の欠如が、Baumann A による食塩水を使用した溶液において、圧力値が低いことの原因であると考えられます（実験 1）。
- ・ 一方、無機塩溶液や微量元素水を使用した溶液は、圧力上昇その他の曲線特徴が、Baumann A および B による溶液および水道水を使用した溶液と類似しています。
- ・ これは、微量元素の存在が、消化スラッジに含まれる微生物の代謝活性において非常に重要であることを示しています。
- ・ Baumann による溶液のリン酸緩衝液の緩衝能は、これらのグルコース分解実験においては、大きな役割を果たしていません。
- ・ 微生物の代謝作用において最も重要な無機物および微量元素は、水道水に含まれています。

2つの実験から導き出される結論

- ・ これまで述べた理由から、採取した消化スラッジの試験媒体として、水道水も使用できることが明らかになりました。
- ・ 異なるスラッジにおいても微生物を確実に安全に確保できるという事実は、Baumann による微量元素水や無機塩溶液の使用を示唆しています。

ポリマー分解実験の解釈

- ・ 分解実験の結果も、新鮮な消化スラッジで作業を行うことが非常に重要であることを示しています。これは、新鮮な消化スラッジには、実験環境への適応が可能な、活発な微生物が含まれているためです。
- ・ 誘導期の後、微生物は、PHB などのより易分解性の高いポリマーと同様、カルボキシメチル澱粉のような変性ポリマーも分解できています。これら 2 種類のポリマーを使用した分解実験により、圧力上昇の再生可能な標準曲線が明らかになりました。
- ・ また、PHB では、最初の圧力上昇の後、メタンの形成によると考えられる第 2 の誘導期が確認されました。これは、PHB の第 2 の分解が、本質的にメタン生成細菌によって行われたことを示しています。
- ・ PVA は、今回の実験時間では、最小限の分解しか見られませんでした。今後の実験により、実験時間の長期化が分解率の向上をもたらすかどうかは解明されるはずですが、
- ・ 油脂による試験溶液は、溶液の強い酸性化を引き起こしました。その結果、メタン生成細菌の状態が、最適なものでなくなり、また場合によっては有害なものにさえなり、バイオガスの形成が抑えられました。
- ・ OxiTop[®]制御システムを使用した圧力測定は、微生物活動の正確な追跡、中でも、多面的なバイオガス段階の認識を可能にしました。
さらに、気相および液相のCO₂量およびメタン量の測定を容易にしました。

結論

従来の水置換法による無圧のガス測定は、エラーの可能性が高く、文書化にも時間がかかっていました。しかし、OxiTop[®]制御システムを使用すれば、測定プロセス全体を通して測定値を継続的に保存しながら、嫌気性分解を行うことが可能になります。バイオガスの増大をコントローラーで直接追跡できるため、継続的に全体像を把握できるうえ、介入が必要になった場合、素早い決断が可能になります。例えば、複数の段階の分解機能を追跡し、気相と液相の両方のCO₂量を測定できるのは大きなメリットです。これは、分解プロセスに生じるメタンガスを簡素な計算式で算出することで可能になります。データは、ごく短時間で認識が可能で、オペレータに依存せず、表示も非常に簡単に行えます。

一連の実験によって、試験対象の各物質のバイオガス生成量を簡単に追跡できること、また、生物学的過程における変化の枠組み内で、簡単に再生できることが明らかになりました。

さらに、水道水に含まれる微量元素（Baumannによる）と、特定の無機塩溶液による媒体溶液を使用した場合、試験対象のさまざまな物質の圧力上昇が互いに類似することも確認されました。

その結果、消化スラッジの嫌気性分解試験を、水道水の使用によって簡素化できました。

参考資料

Baumann, U., Schefer, W. Textilveredelung 25 (1990) 7/8, 248-251.