

環境負荷有機物の低減化ならびにモニタリング技術の開発研究
 焼酎廃液 BOD 測定用バイオセンサの開発

機能材料工学専攻 川上満泰

BOD (生物化学的酸素要求量) は、水中の有機物が微生物の働きによって分解されるときに消費される酸素の量のこと、水環境の有機汚濁を測る代表的な指標である。BOD は、これまで工場排水試験方法 JIS K 0102 に規定される 5 日間法 (BOD5) と、微生物電極による BOD 計測器 JIS K 3602 に規定されるバイオセンサ方式 (BODs) によって測定されてきた。しかしながら、いずれの場合においても測定に用いる微生物によって代謝されにくい物質は測定値に含まれないことや、代謝活性を低下させる物質が含まれていると実際よりも低い BOD 値を示すなどの問題があった。

本課題の対象の一つである焼酎蒸留廃液は、BOD が 66,000 ~ 87,000mg/L、pH が 3.5 ~ 4 と酸性が強いことが知られており、同様な問題が生じることが推測される。そこで実際の BOD 値を評価するために、焼酎廃液資化菌の分離とそれを用いた BOD センサの開発を試みた。

《1. 焼酎廃液資化菌の分離》

焼酎廃液は、吉川教授より分けていただいた光酒造の麦焼酎蒸留残渣を遠心分離してその上澄みを用いた。これを蒸留水で希釈した液体培地に北九州市日明浄化センターで採取した下水污泥を加えて 30℃ で数週間振盪培養し、その後培養液を焼酎廃液-Gellan Gum 培地に植菌して 30℃ で静置培養した。コロニーの形状や色などから 3 種類の菌を分離し、それぞれ SH-1、SH-2、SH-3 と名付けた。

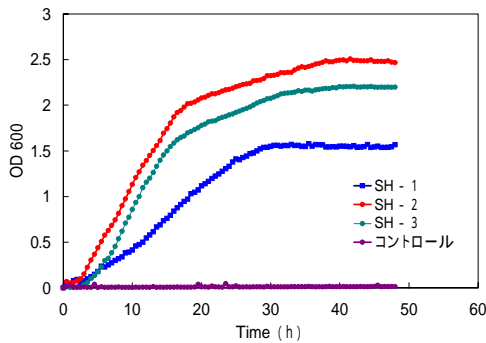


図1. 増殖曲線 (焼酎廃液培地)

図 1 は、焼酎廃液培地を用いて作成した各菌の増殖曲線である。図よりいずれの菌も焼酎廃液を資化することがわかる。また菌の形状を SEM で観察したところ、いずれも酵母であることが推察されたので、BioMerieux 社の酵母様真菌同定キット ID32C アピを用いて同定を試みたところ、SH-1 は *S. cerevisiae* (ID 99.9%)、SH-2 および SH-3 はいずれも *Candida krusei* (ID 85.7% および 97.8%) と推定された。

《2. DO 測定型 BODs センサの開発》

JIS K 3602 を参考にして、まず PTFE 製メンブレンフィルター (孔径 1.0 μm) に対数増殖期で集菌した菌体を保持させることにより、固定化微生物膜を作製した。これを酸素電極 (東亜 OE-470BA) の上に重ね、透析用セルロース膜で覆うことにより、バイオセンサとした。フローセルは自作のもので、溶存酸素計 (東亜 DO-55G) と組合わせて測定システムを

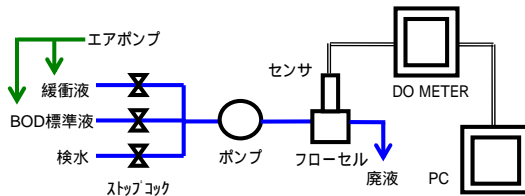


図2 フロー型BOD測定用装置

組み立てた (図 2)。

はじめにリン酸緩衝液を流してセンサからの DO 出力値が安定するのを待ち、BODs 標準液または検水 (焼酎廃液希釈液) に切換え、再び出力値が安定したら緩衝液に切換えた。DO 値の減少が BOD に比例するものとして、毎回標準液で校正することにより検水の BOD 値を求めた。なお、液流量は 2.5 mL/min とし、標準液としては 1 L 中にグルコースおよび L-グルタミン酸各 150 mg を含む水溶液を用い、その BODs 値を 220 mg/L とした。これらの水溶液の調製には、いずれも滅菌水を使用した。

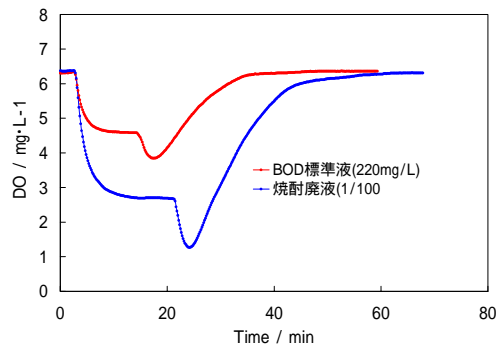


図3. BODセンサ応答曲線

センサ応答曲線の1例を図3に示す。標準液および検水に切換えると、いずれの場合もDO値が急激に減少し、10~15minでほぼ定常値に達することがわかる。その後、緩衝液に切換えるときに装置上の欠陥によると思われる不自然な変化が見られたのちゆっくりとDO値が回復していくのがみられる。

焼酎廃液の希釈倍数を変えてBODsを測定した結果を表1に示す。廃液濃度が高い場合には菌の代謝活性が低下するため、結果として低いBODs値を生じるものと推察される。

用いる菌株の種類による影響を表2に示す。JIS K 3602で用いられている菌と同種の *T. cutaneum* (NBRC 1198)に比べると、焼酎廃液資化菌であるSH-1 ~ SH-3菌株ではいずれの場合においても高いBODs値を示しており、より実際に近い値と推測される。また、得られたBODs値はSH-2 > SH-3 > SH-1の順になっており、図1の増殖曲線の結果と関連していることが示唆された。

表1. 焼酎廃液希釈倍数の影響
(SH-1株, 160 mg)

焼酎廃液 希釈倍数	BODs(mg/L)
10	4,200
100	27,600
500	34,500

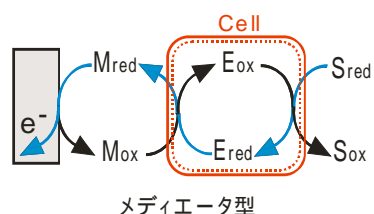
表2. 用いる菌株の影響
(100倍希釈液)

菌株	BODs(mg/L)
SH-1	27,600
SH-2	53,400
SH-3	30,000

T. cutaneum 13,000
(SH-1 160 mg; SH-2 80 mg; SH-3 100 mg)

《3. メディエータ型 BOD センサの開発》

微生物による有機物の代謝(酸化)に伴い、細胞内の酸化還元酵素は還元型に変化するので、これをメディエータとよばれる低分子化合物によって酸化型に戻し、同時に還元型に変化したメディエータが電極上で酸化される電流を測定する方法は、微生物の生菌数や代謝活性の測定法として知られてきたがあまり注目されてこなかった。そこで本課題では同様な原理に基づく新しいタイプのBODセンサの開発を平成18年度より開始した。



測定には通常の3電極法を使用し、作用極には炭素棒電極、対極にはPt電極を用いた。微生物およびメディエータを含む電解液に浸し、所定の電位を印加しながら残余電流が安定するのを待ち、基質溶液を加えてアノード電流の増大を測定した(図4)。

本年度はまず基礎的なデータを取るために、微生物として *P. fluorescens* (NBRC 14160)、メディエータとして $K_3[Fe(CN)_6]$ を用いて、BOD標準液に対する電流増大速度 I/t と標準液濃度との関係を調べた。その結果、図5にみられるようにほぼ直線的な検量線が得られ、BODの定量にも応用できることが示唆された。今後は上記の焼酎廃液資化菌を用いて焼酎廃液のBOD値の測定を行う計画である。

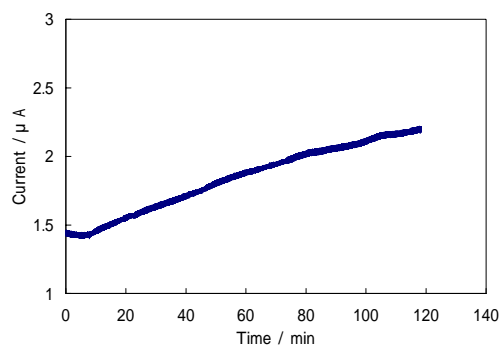


図4. メディエータ型センサの応答曲線

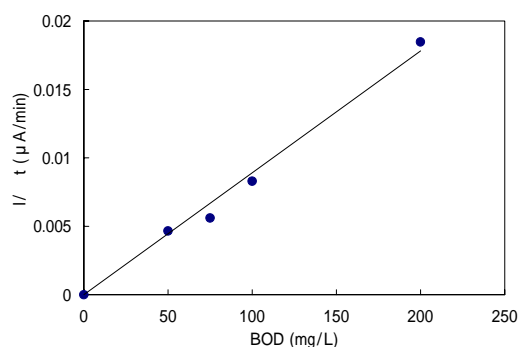


図5. BOD標準液の検量線

謝辞: 本研究遂行にあたり協力して頂いた、嶋津友彦、河本真悟、山本博嗣、越智聡匡、立園隆一の各位に感謝します。