

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 測定用メディエータ型バイオセンサの開発 -

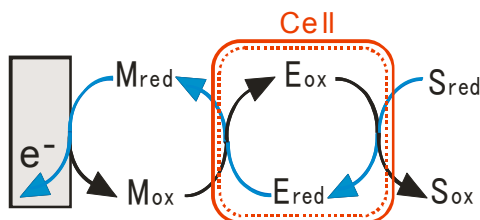
機能材料工学専攻 川上満泰

《目的》

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は、焼酎廃液資化菌を用いることが望ましい。

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。そこで本課題では同様な原理に基づくメディエータ型の BOD センサの開発を試みた。



メディエータ型センサ

《実験方法》

(1) 焼酎廃液資化菌

光酒造よりいただいた麦焼酎蒸留残渣を遠心分

離し、その上澄み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汚泥を加えて 30°C で数週間振盪培養した。培養液を焼酎廃液-Gellan Gum 培地に植菌して 30°C で静置培養することにより得た 3 種類の酵母菌、*S. cerevisiae* SH1、*Candida krusei* SH2 および SH3 を焼酎廃液資化菌として使用した。また、宮崎県のゴミ処理場付近の土壌から同様に単離した *Candida tropicalis* garb1、JIS K 3602 に規定され、BODs 測定における基準的な微生物として使用される *T. cutaneum* (NBRC10466) も併せて使用した。

(2) センサの作成

清浄化した炭素電極（直径 5mm）表面に菌体懸濁液 (OD₆₀₀ = 1.0) 20 μl をのせ、水分をほぼ蒸発させたのち、滅菌したセルロース透析膜で覆い、Oリングで固定した。これを無菌操作で行った。

(3) BOD の測定

測定には通常の 3 電極法を使用し、対極には Pt 線電極、参照極には Ag/AgCl 電極 (BAS RE1B) を用いた。センサとこれらの電極をメディエータ (1 mM) を含む電解液に浸し、メディエータの酸化および還元ピーク電位の間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変化を測定した。なお、BOD 標準液として 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 (GGA) を用い、その BOD 値を 220 mg/L とした。

《結果および考察》

(1) メディエータの特性

メディエータとして 5 種類のジヒドロキシあるいはキノン化合物、2 種類の酸化還元色素、およびフェリシアン化カリウムを用いてそのメディエータとしての適性を検討した。SH2 株を用いて GGA を基質として加えたときの応答電流の変化速度を調べた結果、表 1 にみられるように、フェリシアン化カリウム (PFC) とメトキシヒドロキノン (MHQ) が比較的良好的なメディエータ作用を示すことが認められた。そこで以下の検討ではこの 2 種類の化合物を用いることにした。

表 1. メディエータの酸化還元電位と応答速度

メディエータ	酸化還元電位 mV (vs. Ag/AgCl)	$\Delta I / \Delta t$ (nA/s)
Neutral red (NR)	-580	< 0.10
Duroquinone (DQ)	-170	< 0.10
Phenazine Methosulfate (PMS)	-60	0.70
<i>p</i> -Benzoquinone (BQ)	+110	0.31
Dihydroxy benzaldehyde (DHB)	+170	0.17
2-Methoxyhydroquinone (MHQ)	+210	-1.28
Potassium ferricyanide (PFC)	+220	1.11
(+)-Catechin	+220	< 0.10

(2) センサ応答特性

図 1 に PFC をメディエータとして用いた場合の応答曲線の例を示す。BOD 標準液や焼酎廃液 (SDW) を加える毎に、アノード電流が増大し、

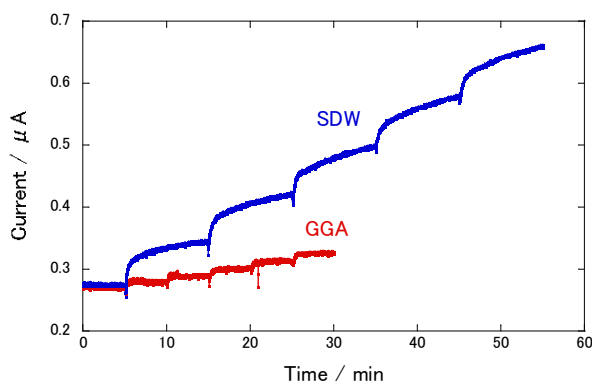


図1. PFCをメディエータとしたセンサ応答曲線 (SH1)

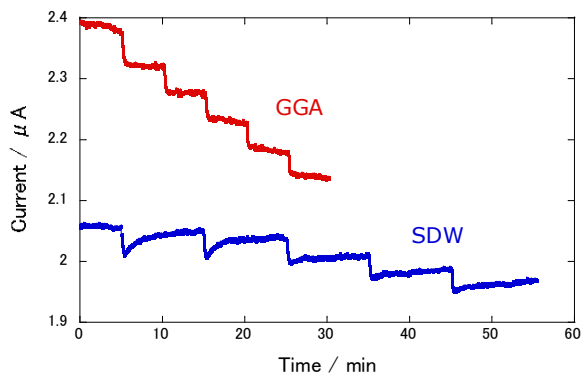


図2. MHQをメディエータとしたセンサ応答曲線 (SH2)

メディエータが電極上で酸化されていることを示している。一方、図 2 に示すように、MHQ を用いた場合は、逆にカソード電流の増大が認められ、PFC の場合とは異なる機構でメディエータとして作用することが示唆された。

またこれらの図より、SDW を加えた場合には代謝産物によるものと思われるアノード電流の増加が認められたので、PFC の場合は基質注入から 2 min 後、MHQ の場合は注入直後の電流増加をセンサ応答電流とみなし、注入量と応答電流との関係を求めたところ、いずれも良い直線関係を示すことがわかった。

(3) BOD 値の算出

このようにして得られた直線の勾配を用いて比例計算により求めた焼酎廃液の BOD 値を表 2 に示す。メディエータとして PFC を用いた場合には資化能力の高い菌ほどより大きな BOD 値が得られており、実際の BOD 値の評価に有効であることを示唆している。一方、MHQ の場合には、PFC を用いて得られた値に比べるといずれもかなり低い BOD 値を示しており、PFC の場合とは異なる代謝過程に参与していることが推察された。

表 2. 用いた菌の種類と BOD 値の比較

(a) メディエータ : PFC

菌体名	BOD / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
<i>S. cerevisiae</i> SH1	86,200
<i>C. krusei</i> SH2	66,000
<i>C. krusei</i> SH3	129,000
<i>C. tropicalis</i> garb1	29,200
<i>T. cutaneum</i>	16,400

(b) メディエータ : MHQ

菌体名	BOD / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
<i>S. cerevisiae</i> SH1	22,100
<i>C. krusei</i> SH2	20,200
<i>C. krusei</i> SH3	20,800

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、山田真也、の各位に感謝します。