

BOD バイオセンサ

上野 健郎(うえの たけお)

田中 良春(たなか よしひる)

磯部 健介(いそべ けんすけ)

1 まえがき

下水道・工場排水の水質管理や河川などの水質監視の重要性は年々高まってきている。富士電機では、このような社会的要に対応すべく、各種の水質計測器の研究開発を強力に推進している。

本稿では、水環境の汚濁の最も代表的な指標とされているBOD（生物化学的酸素要求量）バイオセンサの開発について、以下に紹介する。

BODとは、排水中に含まれる汚濁有機物の量を、その排水中に存在する微生物によって消費される酸素量で指標化したものである。現在、公に規制されているBODの測定は操作が煩雑で熟練が必要であり、また、分析には5日間の時間を要することから、BODによる迅速な水質管理は困難であった。そのため、BOD測定の自動化や測定時間の短縮化に関する研究が多くなされてきた。なかでも近年著しい発展を遂げているバイオセンサを応用したBOD⁽¹⁾迅速測定装置はJIS [JIS K 3602 (1990)「微生物電極による生物化学的酸素要求量(BODs)計測器」]に計測器として制定され、BOD測定の簡便・迅速・自動化を担う方法として、今後重要なと考えられる。

以下に富士電機のBODバイオセンサの概要を述べる。

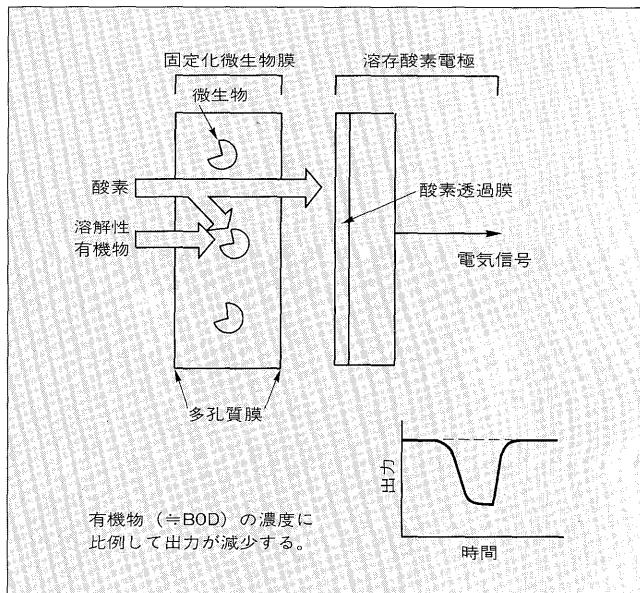
2 測定原理と装置の構成

2.1 測定原理

図1にBODバイオセンサの測定原理を示す。固定化微生物膜は有機物に対して雑食性を有する酵母（トリコスプロン・クタネウム）をアセチルセルロース多孔質膜の中心部φ5mmの範囲に沪過により吸着させ、もう1枚のアセチルセルロース膜を重ねてサンドイッチ状にしたものである。

センサは、この固定化微生物膜と隔膜形の溶存酸素電極とから成り、試料中から固定化微生物膜を透過してくる酸素の量を電気信号に変換することによって、膜中の微生物の呼吸活性の変化に対応した酸素消費量を測定するもので

図1 BODバイオセンサの測定原理



ある。このとき、エアポンプにより試料に空気を吹き込んで酸素を飽和させておく。試料中に有機物が存在しない場合、膜中の微生物の呼吸による酸素消費量は非常に少なく、このときの信号レベルをベースラインと呼ぶ。試料中に有機物が含まれる場合、微生物が有機物を取り込むと同時に呼吸も活発になり、その有機物の量に応じて酸素消費量が増大する。この信号レベルとベースラインとの差をセンサ出力として読み込み、演算に用いる。

測定は、手分析法で標準溶液として定められているグルコース・グルタミン酸等量混合溶液を、2種の濃度であらかじめ測定し、2点校正を行って検量線を作成した後、試料の測定を行い、検量線の式から濃度を演算する。

2.2 装置の構成

装置の外観を図2に、概略構成を図3に示す。本体の大きさはW580×D450×H290 (mm)である。主に測定液または洗浄液を切り換える電磁弁、定流量の送液ポンプ、エアポンプ、熱交換器、恒温槽、センサ、フローセル、計



上野 健郎

昭和53年入社。下水道用電気計装システムの設計に従事。現在、制御システム事業本部公共システム事業部技術第二部課長。



田中 良春

昭和56年入社。バイオセンサの研究開発および水質計測器の研究開発に従事。現在、(株)富士電機総合研究所水処理・バイオ研究所主任研究員。



磯部 健介

平成2年入社。バイオセンサを応用した水質計測器の研究開発に従事。現在、(株)富士電機総合研究所水処理・バイオ研究所。

図2 BODバイオセンサの外観

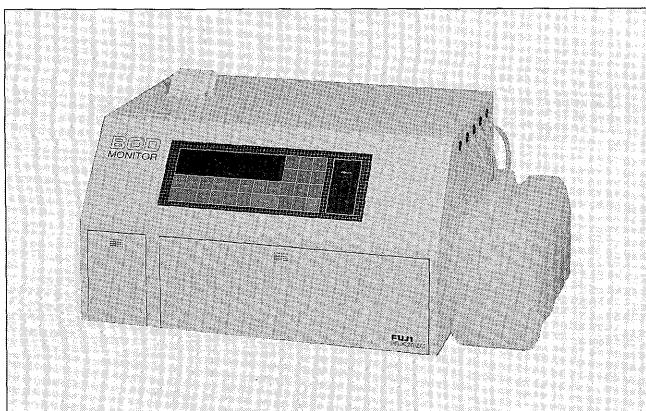
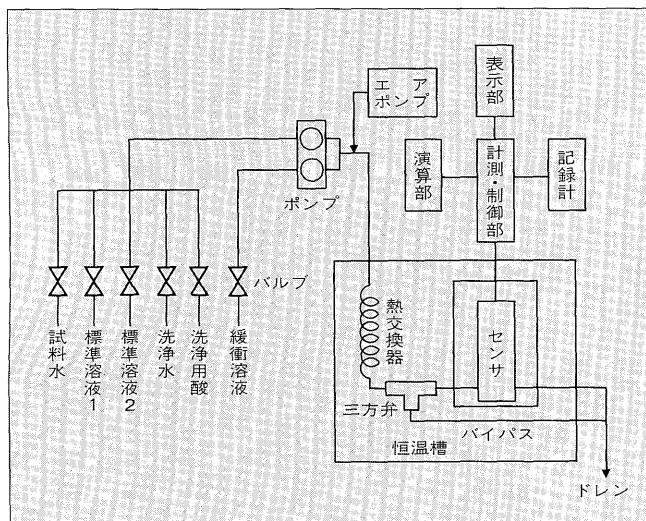


図3 BODバイオセンサの概略構成



測・制御部などから成るシンプルな構造である。定流量ポンプで測定液または洗浄液と pH 7.0 のリン酸緩衝溶液とを、例えば 1 : 1 の流量比で吸引し混合する。この混合溶液をエアポンプからの空気とともに送り、30℃に温度制御された熱交換器で加温し、恒温槽に組み込んだバイオセンサで測定する。

測定はあらかじめ設定したプログラムに従い、校正を含めすべて自動で行い、校正時の検量線のデータ、試料の BOD 測定値などを記録紙に印字することができる。

③ 特 性

3.1 BODバイオセンサの基本特性⁽³⁾

(1) 微生物の増殖特性

微生物としては JIS K 3602 (1990) に指定されているトリコスプロン・クタネウム IFO-10466 を用いた。

増殖の温度特性を図4に示す。増殖温度24℃、30℃、35℃、40℃では2～5時間ほどで対数増殖期に入り、約24時間で静止期に達し、比較的広い温度範囲で増殖することが分かった。45℃では増殖に阻害が起き、50℃では増殖しなかった。固定化微生物膜を作成するときの培養条件は24℃、24時間とした。

図4 微生物の増殖特性

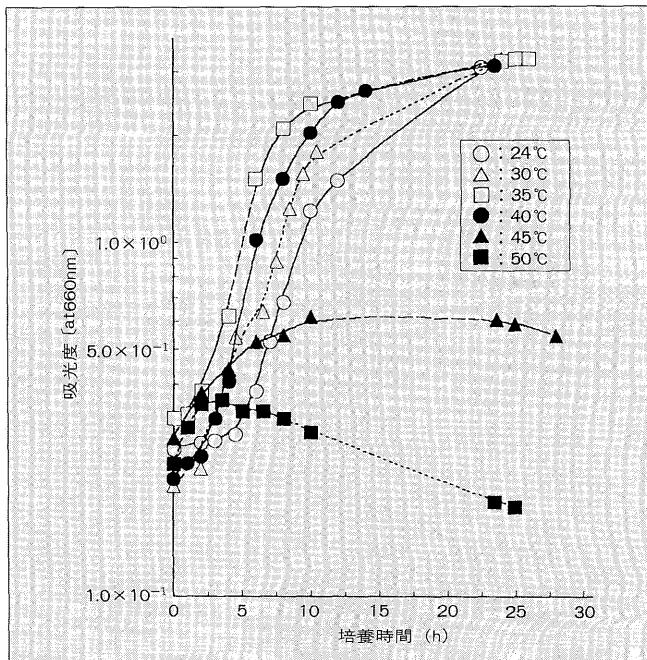
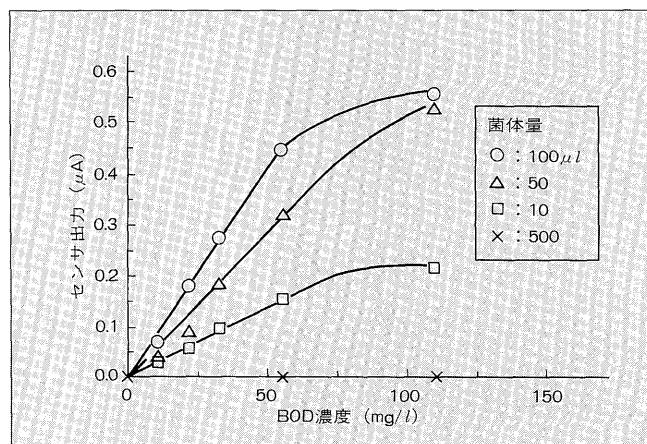


図5 センサ出力の微生物量依存性



(2) 微生物の固定化量

微生物の固定化量を変えたときのセンサ出力の測定結果を図5に示す。膜に固定化する微生物量は、培養液で 100 μl (約 $1.27 \times 10^8 \text{ cell/cm}^3$ に相当) の場合、感度、応答性が最も良いことが分かり、以後これを用いることとした。

(3) 応答例

本センサの応答例を図6に示す。応答時間を JIS K 3602 (1990) に従い、送液前後の出力電流の差が最終値の 90 % に達するまでの時間としたとき、試料注入時間15分の場合の本センサの応答時間は 6～8 分で、ベース電流値に戻すための洗浄工程には25分必要であった。したがって、測定時間は1試料あたり約40分である。

(4) 温度特性

センサの温度特性についての検討の結果、センサ出力は 20～45℃ の範囲では直線的に増加するが、それ以外の範囲では急激に低下することが分かった。装置の使用条件、周囲温度、温度制御などの面から、恒温槽温度は30℃とした。

図 6 応答例

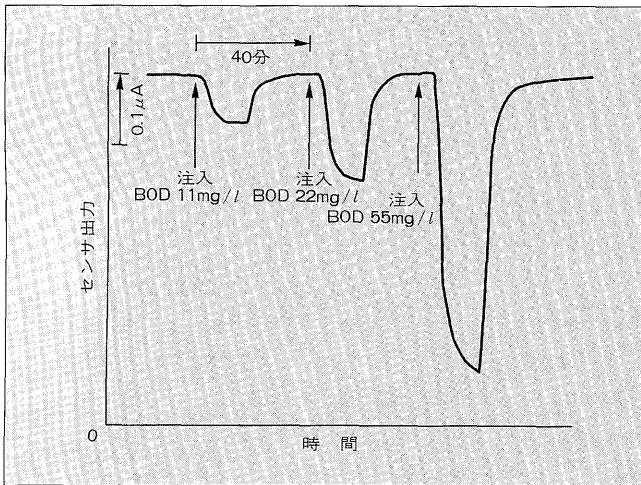
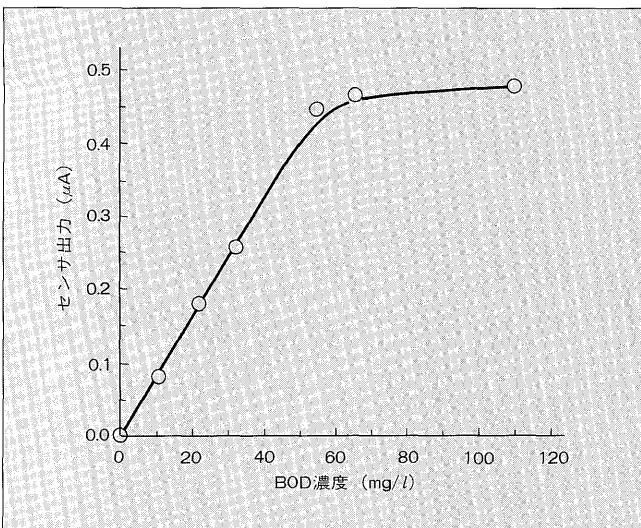


図 7 センサ出力の BOD 濃度依存性



(5) pH 特性

緩衝溶液の pH の影響について検討した結果、センサ出力は pH 5.5 以下および 7.5 以上の範囲では急激に低下することが分かった。さらに出力の長期安定性の検討結果から、pH は 7.0、濃度 0.05 mol/l のリン酸緩衝溶液を用いることとした。

(6) 測定範囲

センサ出力の BOD 濃度依存性を図 7 に示す。センサ出力は BOD 濃度 0 ~ 約 60 mg/l (標準溶液) までは直線的に増大するが、それ以上の濃度では飽和し、一定出力となる。したがって、60 mg/l 以上の試料については希釈して測定する必要がある。

3.2 測定装置

(1) 測定の再現性

センサを校正した後、BOD 濃度 55 mg/l の標準溶液を繰り返し 10 回測定した。その結果、表 1 のように良好な再現性が得られた。

また、低濃度領域を精度よく測定するためにセンサの高感度化を目的として、緩衝溶液と試料および標準溶液との

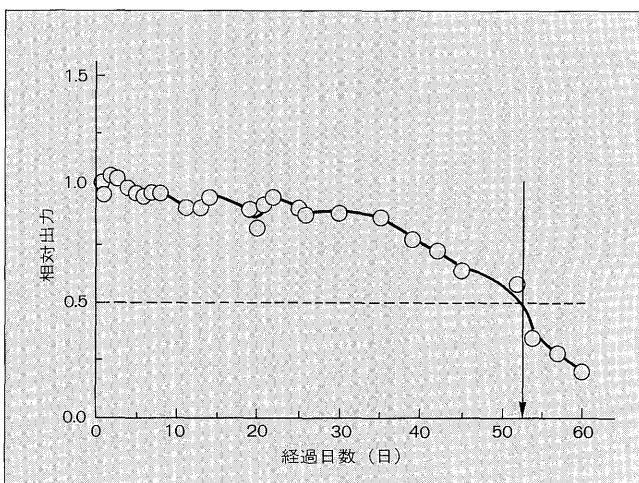
表 1 繰返し測定結果

最大値	56.3 mg/l
最小値	53.7 mg/l
平均値	54.9 mg/l ($n=10$)
変動係数 (C, V 値)	1.6 %

表 2 繰返し測定結果 (低濃度領域)

最大値	1.4 mg/l
最小値	1.1 mg/l
平均値	1.3 mg/l ($n=10$)
変動係数 (C, V 値)	9.6 %

図 8 センサ出力の安定性



流量比を 1 : 3 として測定した。その結果、BOD 標準溶液の濃度 0 ~ 33 mg/l に対して良好な直線関係が得られた。また、BOD 濃度 1.1 mg/l の標準溶液を 10 回測定した結果、表 2 のように良好な再現性が得られた。

(2) 安定性

BOD 濃度 55 mg/l の標準溶液に対するセンサの応答を長期連続的に測定した結果を図 8 に示す。図の縦軸はセンサの初期出力を 1 としたときの相対出力である。

センサ出力は時間の経過とともに徐々に低下するが、検量線の直線性は保たれ、相関係数は常に 0.990 以上であった。膜の寿命を出力が初期の 50 % 低下時と考えると、約 50 日間の測定が可能である。

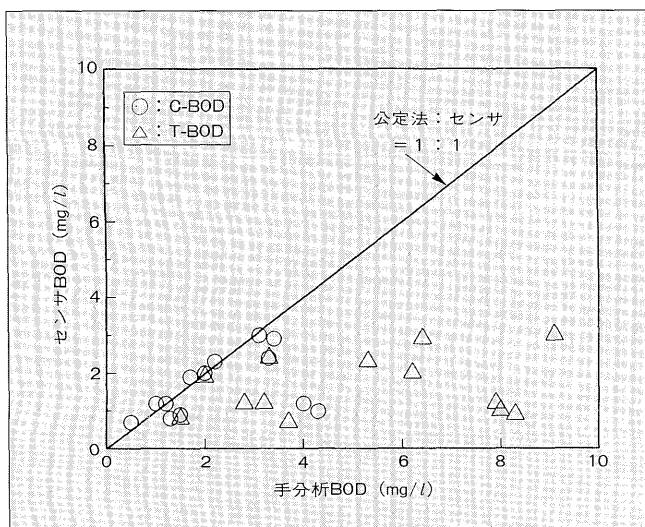
3.3 下水の測定結果⁽⁴⁾

下水処理場の試料を用いて公定法とセンサ測定値との比較を行った。試料は A 下水処理場 (4 点)、B 下水処理場 (3 点)、C 下水処理場 (2 点) および富士電機総合研究所内排水処理実験装置の二次処理水 (4 点) の計 13 サンプルである。

(1) BOD 手分析法

現在、BOD は水の汚濁度を最も適切に表現する方法として扱われている。その中身は、以下のよう 2 種類の酸

図9 下水の測定結果



素消費量に分けることができる。すなわち有機物の分解による酸素消費量 (C-BOD) と、硝化菌による窒素化合物の酸化 (硝化) に基づく酸素消費量 (N-BOD) で、その合計を T-BOD と表す。

水質汚濁法により、公定法として定められている BOD 測定法では、「好気的微生物により試料中の溶存酸素が 5 日間に消費される量」と記され、通常は硝化を抑制しないため T-BOD 測定値が用いられている。

ここで、BOD 除去率の高い処理水中には、しばしば硝化菌が存在し、BOD 測定に影響を与える。⁽⁵⁾また、このような状況では、下水中の有機物による汚濁度を正しく判断することは困難であるので、N-BOD を抑制して C-BOD を測定する ATU-BOD という手法を勧めている。BOD の概念が生まれた英國でも処理水に対しては ATU-BOD で規制している。さらに欧米などでも BOD 測定方法として ATU (アリルチオ尿素) の添加が認められている。

このような観点で、T-BOD と C-BOD の両方を測定した。

(2) 測定結果

図9に示すように、N-BOD の寄与を抑えるために一般に用いられる ATU を添加して測定した手分析値 C-BOD とセンサ測定値は相関が良かった。

また、図9は全数プロット(13点)で示してあり、採水場所によらずほとんどのサンプルについて相関性が良好である。

BOD のセンサ測定値が T-BOD 値より小さくなる主な原因是、BOD の公定法測定値にはセンサでは原理的に測定できない N-BOD の値が含まれているためと考えられる。

表3 BOD バイオセンサの主な仕様

項目	仕様
測定方式	微生物センサ法 [JIS K 3602 (1990) 準拠]
試料水導入形態	採水形
測定範囲	0~30 (低濃度レンジ), 0~60 mg/l (標準レンジ) (さらに高濃度の希釈により対応)
定量下限	2 mg/l (低濃度レンジ), 5 mg/l (標準レンジ)
再現性 (C, V 値)	5 %以内 (11 mg/l 標準溶液) 3 %以内 (55 mg/l 標準溶液)
校正時間	90分 (測定条件によって校正頻度は異なる)
測定時間	40分以内 / 1 検体
測定回数	設定により 1~99 回まで自動測定が可能
暖機時間	約 1 時間
電源	AC 100V ±10V 50/60Hz
消費電力	約 200VA (初期暖機時 350VA)
外形寸法	H290 × W580 × D450 (mm)
質量	40kg

4 あとがき

以上、BOD バイオセンサの開発について述べてきた。主な仕様をまとめると表3のようになる。

特徴として、

- (1) 手分析では 5 日間必要とする測定を 40 分以内で行うことができる。
- (2) 連続自動測定が可能である。
- (3) 自動校正 (2 点) の頻度を簡単なキー入力で変えることができる (1~n 回測定ごと)。
- (4) 低い濃度まで測定ができる (2 mg/l: 低濃度レンジ)。などがある。

さらに、本センサは下水二次処理水について、C-BOD との相関性が良好であることが分かった。

今後、BOD センサを水環境の測定に広く普及させていきたいと考える。

参考文献

- (1) 佐藤正光・萩原耕一：短時間 BOD に関する最近の研究状況、水処理技術、Vol.29, p.145 (1988)
- (2) Karube, I. et al. : Microbial Electrode BOD Sensors, Biotechnol. Bioeng., Vol.19, p.1535 (1977)
- (3) 磯部健介ほか：BOD バイオセンサの開発、第29回下水道研究発表会講演集、p.702 (1992)
- (4) 磯部健介ほか：BOD バイオセンサの開発、第30回下水道研究発表会講演集、p.741 (1993)
- (5) 古澤次男：下水試験法 (1984年度版)，下水道協会、p.123 (1984)



*本誌に記載されている会社名および製品名は、それぞれの会社が所有する商標または登録商標である場合があります。