

平成 22 年 8 月 27 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19760375  
研究課題名 (和文) ナノ膜固定化微生物を利用した新規の多目的 BOD センサの開発  
研究課題名 (英文) The development of a new multipurpose BOD sensor using a nanofilm immobilized microbe  
研究代表者  
志水 美文 (下村 美文) (SHIMIZU MIFUMI (SHIMOMURA MIFUMI))  
東京工科大学・応用生物学部・助教  
研究者番号：30396759

研究成果の概要：本研究の目的は従来の BOD センサでは測定できないリグニンやフミン酸などの難分解性の有機物を含む下水処理水や BOD 濃度の低い河川水などの試料を、簡便かつ正確に測定できる新規の多目的 BOD センサを開発することである。活性汚泥を分離源として菌株の単離を行い、候補菌株を膜に固定化した BOD センサを作製し、従来の BOD センサと比較した結果、BOD 濃度の低い試料水が測定できる、新規の BOD センサの開発に向けて重要な成果を得ることができた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：水質計測、バイオセンサ、微生物、BOD センサ、難分解性有機物、活性汚泥

## 1. 研究開始当初の背景

水はわれわれの生命維持だけでなく、生活や産業活動の根源に関わるものであり、その管理は非常に重要である。これまで、水質汚濁物質の原因としては特別な毒物が注目されてきた。しかし、毒物だけではなく、われわれの生活活動などから排出される有機物も汚濁の原因となることから、その解決が迫られている。水質汚濁を解決するには、水質モニタリングが欠かせないが、有機汚濁成分はいずれの水質モニタリングにおいても 1

つひとつ検出していくのは不可能である。このため、水質汚濁に関する指標として pH や浮遊懸濁物のほかに生物化学的酸素消費量 (Biochemical oxygen demand: BOD) をはじめとして、溶存酸素量、化学的酸素消費量の 3 種の有機物汚濁指標であらわされる。このうち、BOD は採取場所の微生物を用いて有機汚濁成分の量が計測できる重要な有機物汚濁指標の 1 つであり、古くから有効な水質汚濁の指標として、特に流動性の環境からの試料である工業排水の有機物汚濁物質モニタリ

ングに使用されている。JIS 法に規定されている BOD 5 日間法は操作が煩雑で、測定に長い時間がかかり、熟練した技術を必要とする。この BOD 5 日間法に対して、1970 年代に工場排水用の BOD センサが開発されたのをはじめとして今日に至るまで多数開発されてきた。BOD センサは JIS 法にも規定されず、市販されている。測定時間が 20 分程度でその操作も非常に簡便である。

しかし、これまでに開発された BOD センサは工業排水などの高濃度の BOD の測定を目的としたものであり、日本の一級河川から検出される低濃度の BOD (約 3 ppm 以下) は測定できなかった。この理由として、河川中に含まれる BOD 原因物質の性質が、工場排水に含まれるものとは著しく異なるという点が挙げられる。一級河川の河川水の BOD 値は工場排水よりも低いが、家庭下水などの下水処理された後の二次処理水が多く混入することから、フミン酸、リグニン、タンニン酸、セルロース (アラビアゴム)、界面活性剤などの難分解性の有機物が存在すると考えられる。これまでに用いられてきた雑食性の酵母 (*Tricosporon. cutaneum*) ではこのような難分解性の物質を短時間で分解することができず、このため従来の BOD センサでは河川水中の BOD 値は計測されなかった。

そこで、あらゆる水質の測定に多目的に使用できる BOD センサの必要性を再認識し、本研究では、これまで本研究室で池らにより単離された難分解有機物分解微生物 *Pseudomonas putida* SG10 を応用することで、河川水にも応用できる高感度な BOD センサの開発を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は従来の BOD センサでは測定できないリグニンやフミン酸などの難分解性の有機物を含む下水処理水や BOD 濃度の低い河川水などの試料を、簡便かつ正確に測定できる新規の多目的 BOD センサを開発することであった。具体的には当初は以下の研究内容を明らかにすることを目的とした。

本研究では 2 年間の間に最初の 1 年で基本的なセンサシステムの開発を行い、次の 2 年目には卓上用の BOD センサの開発を行う。研究室保有菌株を用いてナノ膜に微生物を固定化した BOD センサを作製し、その最適条件や人工合成排水を用いた応答確認、JIS 法との相関性の確認を行う。さらに前処理法としてオゾン処理法と UV 処理法の 2 種類について検討を行う。そしてセンサの再現性の確認、微生物固定化ナノ膜の安定性の検討を行う。その後、卓上用の BOD センサの実用化に向けて試作品の作製を行い、その性能の向上を目指す。最終的には実用化に向けた小型化、軽

量化の検討もを行い、下水処理水や河川水などの実試料の測定を行った際の、妨害物質の影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

新規の多目的 BOD 測定用センサシステムの開発を行い、最適条件の検討、従来の BOD センサとの比較、擬似河川水の測定を行った。具体的な方法を以下に示す。

### (1) 保有微生物の増殖および分解活性の確認

研究室保有のリグニンやフミン酸などの難分解性有機物の分解能力に優れる微生物 *P. putida* SG10 の増殖確認および分解活性の確認を行った。

### (2) 微生物のスクリーニング

新たに水再生センターの活性汚泥を分離源として菌株の単離を行った。この際、実用化したときの取り扱い易さを考慮し、酵母をターゲットにすることとした。

### (3) BOD 測定用センサシステムの構築

BOD センサ法は酸素電極に固定化微生物膜を装着させた微生物電極を利用して発酵廃液、下水などの排水を流し入れることで、排水中の BOD を酸素電極電流の変化量から測定する方法である。選出した候補菌株を膜に固定化した BOD センサを作製した。購入した DO メーター、酸素電極、ポンプなどを用いてメンブレンフィルターに微生物を固定化し、簡単な BOD 測定用の微生物センサの作製を行った。

### (4) 従来の BOD センサとの比較

従来の菌株 *T. cutaneum* を用いた BOD センサは河川水測定用 BOD センサとして、そのまま使うには問題点がある。その問題点とは、寒天平板上のコロニーが硬いため、菌を定量的に採取するのが難しいという点と、従来の BOD センサの測定範囲が BOD 濃度 3-30 mg/L なので、約 75% が BOD 濃度 3 mg/L 以下である日本の河川水を正確に測定するのは難しいという点である。

そこで従来の固定化微生物膜を改良するために、従来品の BOD センサの菌株 *T. cutaneum* と候補菌株 A の取り扱いやすさ、センサ応答、低濃度 (1-10 mg/L) BOD 標準液での濃度依存性の 3 つの項目について比較した。

### (5) 温度による測定値の影響

候補菌株 A は測定時の温度により結果にばらつきが生じたため、温度がセンサ応答値に与える影響を検討した。20 mg/L の BOD 標準液を 20°C、25°C、30°C の 3 つの温度に設定し

て測定し、比較を行った。

#### (6) 擬似河川水の測定

最終的に候補菌株を用いて作製した BOD センサにより擬似河川水の測定を行った。模擬河川水は BOD5 日間法の測定結果から BOD 値が 3.8 mg/L のものを使用した。さらにどの成分にセンサが応答をしているか調べるために各成分ごとの測定を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 保有微生物の増殖および分解活性の確認

まず、研究室保存菌株 *P. putida* SG10 の増殖確認および分解活性の確認を行った。*P. putida* SG10 は問題なく生育することが確認された。しかしながら、難分解性有機物の分解活性が著しく低下しており、期待していた分解能力が得られなかった。

#### (2) 微生物のスクリーニング

約 1 年間（春夏秋冬の計 4 回）をかけて、水再生センターの活性汚泥を分離源として菌株の単離を行った。実用化したときに取り扱い易い酵母をターゲットとして単離を行った結果、難分解性有機物を唯一の炭素源として生育する菌株が数十株得られた。これらの単離した酵母を用いて難分解性物質の分解率、増殖速度、標準 BOD 試薬への応答性および人工合成排水を用いた応答性の確認を行い、その結果、特に優れた候補菌株を 5 つ（A～E）選出した。これらの候補菌株の同定を行った結果、子囊菌系酵母および担子菌系酵母であることが明らかとなった。

#### (3) BOD 測定用センサシステムの構築

選出した候補菌株を膜に固定化した BOD センサを作製した。図 1 に実験装置の概略図を示す。図のように酸素電極に固定化微生物膜

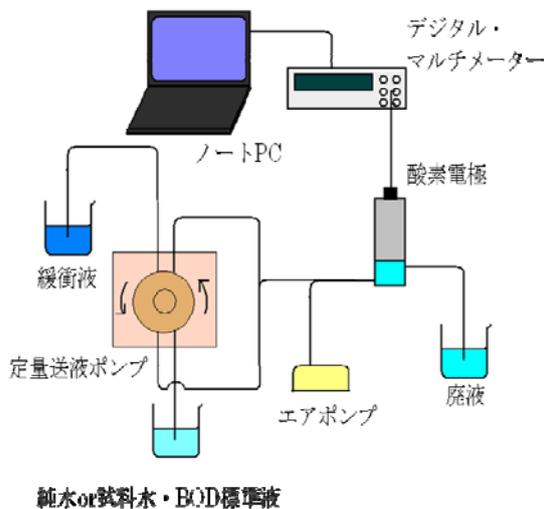


図 1 実験装置の概略図

を装着させた微生物電極を利用して試料水中の BOD を酸素電極電流の減少量から測定した。

当初予定していた研究室保存菌株 *P. putida* SG10 を使用した場合にはあらかじめ菌株が難分解性有機物を栄養源としやすいように、UV 処理やオゾン分解などの物理化学的処理を行う必要があると考えていた。しかし、今回得られた候補菌株を用いた微生物膜では前処理なしでも十分に低濃度の BOD の測定を行うことが可能であった。これは実用化・小型化するために余分な装置が必要ないことを意味し、極めて重要である。

#### (4) 従来の BOD センサとの比較

試料水を添加したとき、膜中の微生物が有機物を資化し、それにより、呼吸活性が上昇して試料水中の酸素が消費されるので、酸素電極の電流値が減少する。この電流の変化量から BOD を測定した。添加した試料水の BOD 値が高いほど電流値の減少量が大きくなる。

従来品の BOD センサの菌株 *T. cutaneum* と候補菌株 A の取り扱いやすさ、センサ応答、低濃度 (1-10 mg/L) BOD 標準液での濃度依存性について比較した。

##### ① 取り扱いやすさ

従来の菌株である *T. cutaneum* は植菌後、寒天平板上のコロニーが硬いため均一には混ざらない。このことから、菌を定量的に採取することが難しい。それに比べ、候補菌株 A は植菌後濁っているため、菌を定量的に採取しやすい。

また候補菌株 A は寒天平板上のコロニーの特徴は湿性、光沢、著しい粘性があり、サンゴ紅色 (coral red) をしている。したがって固定化微生物膜は、候補菌株 A によるサンゴ紅色をしているため、コロニーが白色である従来の菌株 *T. cutaneum* より、微生物膜に固定化後に、膜上の菌体の分布を観察・把握しやすく取り扱いが便利であることが分かった。

##### ② センサ応答

前述のように、試料水を流したときの電流値の変化量から BOD を測定するため、縦軸を電流値の変化量、横軸を BOD 濃度としたグラフ (図 2) から応答を比較した。応答は二つのグラフ上に載っている直線の傾きが大きいほど試料水を流した時の電流値の変化量が大きく、応答がよいことを示しているため、グラフから候補菌株 A のほうが応答がよいということがわかった。

##### ③ 低濃度 BOD 標準液での濃度依存性

BOD 標準液の低濃度 (1-10 mg/L) での濃度依存性の比較も図 2 に示す。二つのグラフ上

に載っている  $R^2$  が大きいほど濃度依存性が高いことを示しているので、グラフから候補菌株 A のほうが低濃度での濃度依存性が高いということがわかった。

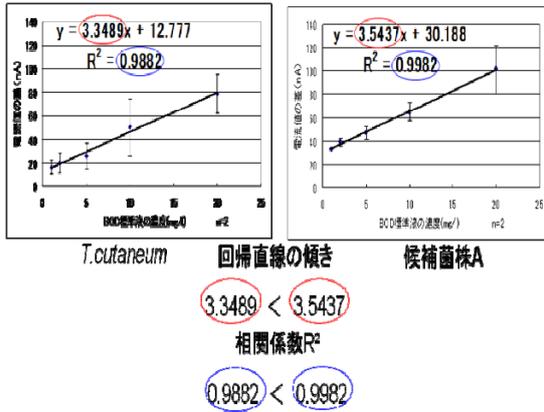


図2 センサ応答と濃度依存性の比較

これらの結果、取り扱いやすさ、センサ応答、低濃度での濃度依存性の3つの点で従来の菌株 *T. cutaneum* より候補菌株 A のほうが優位であることがわかった。このことから、BOD濃度の低い試料水の測定には従来の菌株 *T. cutaneum* より候補菌株 A のほうが向いていると思われる。

(5) 温度による測定値の影響

温度がセンサ応答値に与える影響を検討したところ、20°C、25°C、30°Cの中では30°Cで一番高いセンサ応答が得られた。図3は20 mg/LのBOD標準液を20°C、25°C、30°Cの3つの温度に設定して測定した結果をまとめたものである。この測定結果から温度が高くなるにつれ高い応答値を示すことがわかった。つまり20°C-30°Cの間であれば温度が高いほど低濃度のBOD値の試料水を測定できると考えられる。

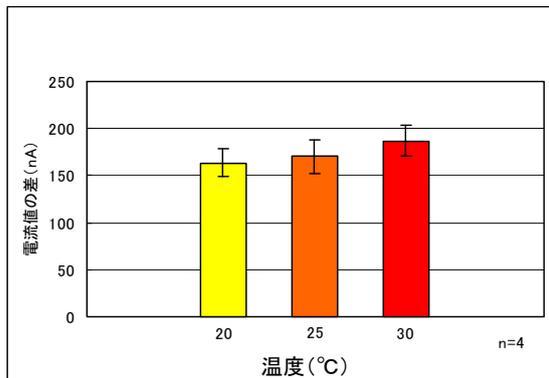


図3 温度がセンサ応答値に与える影響

(6) 擬似河川水の測定

最終的に候補菌株を用いて作製したBODセンサにより擬似河川水の測定を行ったとこ

ろ、擬似河川水にもセンサ応答があり、難分解性の有機物組成成分にもセンサ応答が得られた。

図4に使用した模擬河川水の組成を示す。模擬河川水の組成は赤い文字の有機物、青い文字の無機塩からなっている。これらの組成で調製した模擬河川水の測定を行い、さらにはどの成分にセンサが応答をしているか調べるために各成分ごとの測定を行った。図4の結果からもわかるようにBOD標準液だけではなく、模擬河川水に応答を示し、特に難分解性有機物に応答があった。しかし、無機塩にも応答が見られることがわかった。

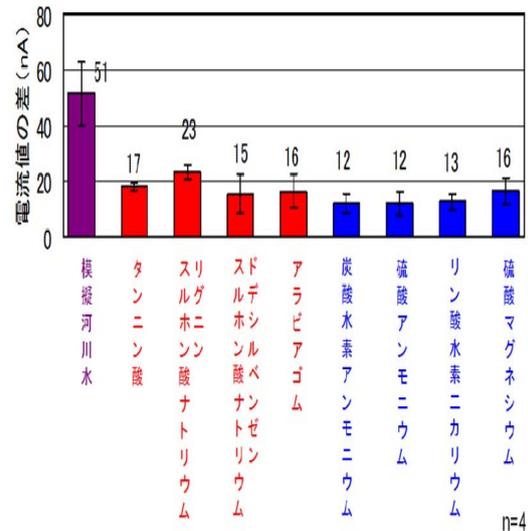


図4 模擬河川水の測定

以上のことから、BOD濃度の低い試料水の測定には従来の菌株 *T. cutaneum* より候補菌株 A のほうが向いており、新規のBODセンサの開発に向けて極めて重要な成果を得ることができた。しかし、作製したセンサによるBOD標準液の測定結果にばらつきが出たことや擬似河川水の測定値がBOD5日間法の値と異なっていたこと、有機物以外の組成にも応答したことから、実際の河川水試料を測定するには装置全体を適温になるように制御し、同様に有機物・無機塩に反応するか確認する必要性が明らかとなった。したがって、ナノ膜固定化微生物を利用した新規の多目的BODセンサの開発に向けて大変意義のある成果を得ることができた。

本研究で開発したセンサは、難分解性有機物の分解能に優れた微生物を用いた新しいBODセンサである。これによって従来のBODセンサでは測定できなかったBOD濃度の低い排水処理後の水や河川水などのBODを短時間で測定できるようになり、実用化が実現すれば、国内中の下水処理施設の出口や河川への設置という大きな市場を抱えた将来性のあるセンサになると考えられる。

ナノ膜固定化微生物を利用した新規の多目的BODセンサの開発を行うことは、排水処理による環境改善及びバイオセンサを環境分析技術の向上に応用することを目指したものであり、これらは環境諸問題の対策を前進させるものであり、ひいては環境科学の分野に貢献するものであると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[図書] (計1件)

- ①Y. Nomura, M. Shimomura-shimizu, I. Karube, John Wiley & Sons, U.K., *Handbook of Biosensors and Biochips*, (2007), 1175-1180, Environmental Biochemical Oxygen Demand and Related Measurement

[雑誌論文] (計3件)

- ①M. Shimomura-Shimizu, I. Karube, Yeast based sensors, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 無, 117, (2010), 1-19
- ②M. Shimomura-Shimizu, I. Karube, Applications of microbial cell sensors, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 無, 118, (2010), 1-30
- ③H. Nakamura, M. Shimomura-Shimizu, I. Karube, Development of microbial sensor and their application, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 無, 109, (2008), 351-394

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

志水 美文 (下村 美文)

(SHIMIZU MIFUMI (SHIMOMURA MIFUMI))

東京工科大学・応用生物学部・助教

研究者番号: 30396759