

# 生物化学的酸素要求量の分析に係る植種液の活性に関する研究

水環境部

平山 大輔<sup>1</sup> 佐々木 貞幸 齋藤 康司<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 現工業振興課 <sup>2</sup> 現都市整備課)

## 要旨

生物化学的酸素要求量の分析において、植種源として市販の植種菌製剤であるBI-CHEM™ BOD SEED (Novozymes Biologicals社製) が広く用いられているが、当該試薬を用いた場合に、JISに規定されるグルコース・グルタミン酸混合標準液の測定結果が、目標値を下回るケースが報告されている。当部の測定においてもこの傾向が見られたことから、十分な活性度を持つ植種液の調製条件を検討し、BOD試験の正確性の向上を目指し、本研究を行った。BOD SEEDを用いて植種液を調製する際の希釈水温度と攪拌時間を検討した結果、20℃で1時間攪拌する条件が適当であると考えられた。また、製造日から9ヶ月経過したBOD SEEDを用いた場合、目標値より低値を示す傾向が見られ、製造後の時間経過によりBOD SEEDの活性が低下する可能性が示唆された。

**キーワード**：生物化学的酸素要求量、BOD、植種液、活性

## 1 はじめに

生物化学的酸素要求量(以下、BODという。)は、水質の有機汚濁指標の1つであり、公共用水域の常時監視や水質汚濁防止法における事業場排水の基準としても用いられている。BODは検水中に含まれる微生物による5日間の酸素消費量により求められるため、微生物の存在が不可欠であり、これが不十分である場合、植種と呼ばれる検水に微生物を添加する操作が必要となる。

試験操作の確認方法として、JIS K 0102 でグルコース・グルタミン酸混合標準液(以下、GG標準液という。)を測定する方法が示されている。この標準液は220 mg/L±10 mg/Lであり、この値からの偏差が著しい場合には、希釈水の水質、植種液の活性度などに疑問があるとされている。当部では、植種にBOD SEEDを用いているが、平成29(2017)年度に実施された環境省主催の環境測定分析統一精度管理調査において、良好な結果が得られなかった。平成23(2011)年度及び平成29(2017)年度に実施された同精度管理調査結果<sup>1)2)</sup>を見ると、植種源として市販品を用いた場合は、それ以外を用いた場合よりも低値を示す傾向にあり、日暮ら<sup>3)</sup>の調査結果においても、市販品を用いた場合、JIS規格を達成できなかった旨報告がなされている。

そこで、BOD SEEDを用いて十分な活性度を持つ植種液を調製する条件を検討し、BOD試験の正確性向上を目的として、調査を実施した。

## 2 調査内容

### 2.1 調査期間

平成30(2018)年7月～平成31(2019)年2月

### 2.2 試薬

(1) BI-CHEM™ BOD SEED (Novozymes Biologicals

社、Lot No.D18012601、製造日：平成30(2018)年1月26日)

(2) A液(関東化学(株))

(3) B液(関東化学(株))

(4) C液(関東化学(株))

(5) D液(関東化学(株))

(6) D(+)-グルコース(和光純薬工業(株)\*)

(7) L-グルタミン酸(和光純薬工業(株)\*)

\*現：富士フィルム和光純薬工業(株)

### 2.3 測定機器

(1) 溶存酸素計 B-100BTi(飯島電子工業(株))

(2) DOプローブ BTP-01(飯島電子工業(株))

### 2.4 測定方法

JIS K 0102 の21.生物化学的酸素要求量(BOD)に従って試験した。

試験結果は、GG標準液のBOD測定値である220±10 mg/Lを目標値とし、この範囲に入るかどうかで評価した。なお、GG標準液は全て試験実施日に調整し、試験に供した。

### 2.5 検討内容

#### 2.5.1 BOD SEED 攪拌操作における温度及び時間

BOD SEED は、カプセル状の容器に微生物が着床したブランが内容された状態で販売されている。日暮ら<sup>3)</sup>の調査によると、BOD SEED から作成した植種液中の主たる微生物は *Bacillus amyloliquefaciens* 及び *Bacillus pumilus* であり、BOD SEED に含まれる菌は芽胞を持つ菌種が主となっていると考えられる。

これらの菌が発芽するのは、BOD SEED の内容を希釈水500 mLに分散させて攪拌する工程と考えられるが、BOD SEED の取り扱い説明書では、本操作における温度条件は記載がない。攪拌につ

いては、「1時間攪拌をした後、攪拌を継続し6時間位内に使用する」と記載してあり、時間に幅がある。そのため、温度条件を20℃及び30℃、攪拌時間を1時間及び5時間とし、各条件で調整した植種液を用いてGG標準液の測定を行った。

2.5.2 BOD SEED 保存温度及び保存期間

BOD SEED の取り扱い説明書では、冷暗所(5～15℃、可能であれば5℃)で保管するとなつてはいるが、BOD SEED に含まれる菌種が芽胞を持つ菌種が主であるとすれば、カプセル中では芽胞状態にあると考えられるため、ある程度の保存環境には耐えられると考えられた。本調査では、冷蔵庫と常温での保存により、品質に差が現れるかを確認した。なお、冷蔵庫の温度は4℃であり、常温保管の方法は室温を想定し、20℃の恒温槽で保存した。

2.5.3 植種無しの場合及び河川水との比較

通常のBOD SEED を用いた試験と並行して、植種を行わない場合の試験を行った。これにより、BOD SEED の添加により、微生物活性がどの程度向上しているかを考察する。

また、JIS K 0102 では、植種源として河川水を用いることができる旨記載されている。植種源による測定結果の差を確認するため、河川水とBOD SEED をそれぞれ用いて並行試験を行い、結果の比較を行った。河川水は、利根川水系の一級河川である田川(横山橋上流付近)で試験当日に採水したものをを用いた。

なお、これらの試験は、攪拌温度20℃、攪拌時間1時間の条件で実施した。

2.5.4 BOD SEED の加熱による発芽誘発効果の検証

枯草菌の芽胞は、熱ショックにより発芽が誘発されることが知られている<sup>4)</sup>。そこで、活性が不足しているBOD SEED に熱ショックを与えることで、活性の向上が見込まれると考え、検証を行った。

検証方法は、まず、1Lの三角フラスコに超純水500mLを量り取り、BOD SEED 内のブランをこの中に分散させたものを、70～80℃の水浴で30分間加熱した。その後、A～D液を添加し、20℃で1時間攪拌し植種液とした。

3 結果及び考察

3.1 BOD SEED攪拌操作における温度及び時間

調査結果を表1に示す。GG標準液のBOD測定値が概ね目標範囲(220±10 mg/L)であったのは、20℃、1時間攪拌の条件であった。

まず、温度による影響を比較すると、1時間攪拌した場合は、20℃より30℃の方がBODが低くなる傾向が見られたが、攪拌時間が5時間の場合

は、20℃、30℃ともに同程度に目標値より低いBOD値を示し、温度による明確な傾向は確認できなかった。

次に、攪拌時間による影響を比較すると、20℃では5時間攪拌した方が、1時間攪拌よりBODが低くなる傾向が見られたが、30℃ではこの傾向が見られなかった。

また、この時の植種液のBOD測定値を表2に示す。植種液のBODは、20℃及び30℃ともに、攪拌時間1時間より5時間の方が高い値であった。このことから、20℃において攪拌時間を延長した場合にBODが減少した理由として、植種液のBODが高くなることにより、植種補正值の影響が大きくなったと考えられた。攪拌時間の延長により植種液のBODが高くなる理由は明確ではないが、植種液中の有機物を分解しやすい微生物が、植種液中に優占しやすくなったものと推察された。

表1 BOD SEED攪拌操作において温度及び時間を変化させた際のGG標準液のBOD測定値 (mg/L)

調査日	20℃		30℃	
	1時間※	5時間※	1時間※	5時間※
7月13日	216.5	173.0	204.9	217.5
8月23日	224.9	209.9	194.2	173.2
9月20日	234.6	197.1	152.1	202.4
平均	225.3	193.3	183.7	197.7

※攪拌時間

表2 BOD SEED攪拌操作において温度及び時間を変化させた際の植種液のBOD測定値 (mg/L)

調査日	20℃		30℃	
	1時間※	5時間※	1時間※	5時間※
7月13日	107.4	206.1	162.9	177.6
8月23日	83.8	108.2	98.8	108.8
9月20日	71.8	129.6	86.0	132.9
平均	87.7	148.0	115.9	139.8

※攪拌時間

3.2 BOD SEED 保存温度及び保存期間

平成30(2018)年7月～平成31(2019)年2月までに実施したGG標準液の測定結果(攪拌温度20℃、攪拌時間1時間)を図1に示す。

結果として、BOD SEEDを4℃及び20℃で保存した場合の、保存温度の差による測定結果への影響は見られなかったが、保存期間により大きな影響が見られた。10月以前の試験結果は過半数(4/7)が適切な範囲に入っていたが、11月以降の試験

結果は全て低値を示しており、植種液の活性の低下が示唆された。11月以降に低値を示し始めたことから、希釈時の試験室の気温による影響も考えたが、使用したBOD SEEDの製造ロットナンバーは違うものの、前年度の環境測定分析統一精度管理調査において低値となった時期は9月であり、気温や季節による影響以外の要因が考えられた。当該BOD SEEDは平成30年の6月29日に開封したものであり、開封後4ヶ月経過したものである。

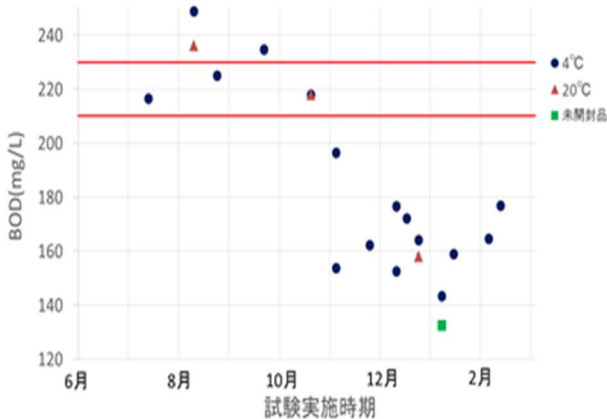


図1 BOD SEED保存条件及び保存期間によるGG標準液のBOD測定値の変化（攪拌温度20℃、攪拌時間1時間）

一方、平成31（2019）年1月に同ロットナンバーの未開封の新品を使用したところ、同様に低値を示した。本調査で用いたBOD SEEDは、製造日が平成30（2018）年1月26日であり、約9ヶ月経過していたことから、開封の有無に係わらず、製造後の時間経過による影響が示唆された。

3.3 植種無しの場合及び河川水との比較

BOD SEEDにより植種した場合、植種を行わない場合、植種源に河川水を用いた場合のGG標準液の比較結果を表3に示す。

BOD SEEDを植種に用いた場合と植種を行わない場合の平均値を比較すると、それぞれ166.7 mg/L及び160.1 mg/Lと大きな差はなく、BOD SEEDを添加しても植種液の活性がほとんど向上していないことが示唆された。

また、これらの試験と並行して、植種源に宇都宮市田川の河川水を用いて試験したところ、目標範囲内（210～230 mg/L）の数値であった。このことから、BOD SEEDによる測定値が低値を示したのは、試験操作によるものではないことが推察された。

3.4 BOD SEEDの加熱による発芽促進効果の検証

調査結果を表3に示す。芽胞の発芽を促すため、

70～80℃の水浴で30分間加熱し熱ショックを与えたが、GG標準液のBODは134.3 mg/Lと、本調査の各種条件の中で最も低い測定結果となった。

なお、この時の植種液のBODは、BOD SEEDを加熱しない場合は77.0 mg/L、加熱した場合は153.7 mg/Lであった。このことから、加熱した場合は植種液自体のBODが大きく上昇したことで、最終的にBODを算出する際の植種補正值が大きくなり、非加熱の場合の176.7mg/Lと比較して低値を示したと考えられた。

表3 各種条件によるGG標準液のBOD測定結果 (mg/L)

調査日	BOD SEED	植種無し	河川水	BOD SEED 加熱
1月11日	158.8	178.5	-	-
2月1日	164.5	155.2	-	-
2月8日	176.7	146.7	211.0	134.3
平均	166.7	160.1	211.0	134.3

4 まとめ

本調査により得られた結果は、以下のとおりである。

- (1) BOD SEEDの攪拌操作時の適正条件は20℃、1時間攪拌である。
- (2) BOD SEED は、製造後の時間経過により品質が低下するおそれがあり、保証期限に関わらず、未開封であっても早めに使用する必要がある。
- (3) 植種源に河川水を用いた場合、良好な結果が得られる可能性がある。
- (4) BOD SEED の発芽促進のため熱ショックを与えたが、効果は認められなかった。

5 参考文献

- 1) 環境省水・大気環境局総務課環境管理技術室、平成23年度環境測定分析統一精度管理調査結果、2012
- 2) 環境省水・大気環境局総務課環境管理技術室、平成29年度環境測定分析統一精度管理調査結果、2018
- 3) 日暮久敬他、高精度BOD測定のための希釈水の水質及び植種の活性向上の検討、分析化学 Vol.63, No. 4, 331-337, 2014
- 4) 桑名利津子、加熱処理による細菌芽胞の発芽に関与するタンパク質の機能解析、東洋食品研究所研究報告書、30、105-106、2014