

バイオセンサを用いた原水の水質監視支援

Application of Biosensor to Water Quality Monitoring

松永 是
MATSUNAGA Tadashi

藤沢 実
FUJISAWA Minoru

金子 政雄
KANEKO Masao

原口 智
HARAGUCHI Satoshi

水道原水への有害物質の混入を、高感度かつ連続的に検知できるバイオセンサ型有害物質監視支援装置を開発した。この装置は、鉄酸化細菌の呼吸活性阻害を指標にしたバイオセンサを採用しており、シアンなどの呼吸阻害毒性物質、重金属化合物、農薬、有機塩素化合物などが高感度に検出できる。従来のバイオセンサでは、他の微生物や有機物の影響により安定性を確保することが難しかったが、強酸性下で活性があり、独立栄養細菌である鉄酸化細菌の採用により、安定した連続運転性能が得られた。更に、自動洗浄、自動校正、2系統交互運転機能を備えることにより、長期にわたり無保守で連続的に原水の有害物質混入の監視ができるようになった。

We have developed a toxicity monitoring support unit equipped with a biosensor to continuously and sensitively monitor the mixing of toxicants at drinking water sources. The index of water toxicity is respiratory inhibition of iron-oxidizing bacteria. Due to the adoption of the biosensor it is possible to detect respiratory inhibiting toxicants (e.g., cyanide), agricultural chemicals, heavy metals, and chlorinated organic chemicals.

With a conventional biosensor it is difficult to maintain stable operation due to the influence of other microorganisms and organic compounds. The adoption of iron-oxidizing bacteria, which are autotrophic and can remain active even in a strongly acidic environment, improves the stability of operation. Furthermore, by equipping the unit with an automatic cleaning and calibration system and two biosensor systems, it is possible to realize continuous, maintenance-free water quality monitoring.

1 まえがき

安全な水を供給するうえで、水道原水への有害物質の混入を検知することは重要な課題である。そのため、水道原水の水質を連続的に監視する技術が必要である。また、近年の環境問題への関心の高まりとともに、各種化学物質の人体への影響及び生態系へ与える影響が懸念されている。

これらの毒物、化学物質は、現在では非常に多岐にわたっており、すべての種類の物質を個別に監視することは事実上不可能である。そこで、生物に対する毒性を総合的に評価するバイオアッセイ^{注1)}が注目されている。当社では、このバイオアッセイ技術を活用し、鉄酸化細菌を適用したバイオセンサ型有害物質監視支援装置を開発した⁽¹⁾⁻⁽⁴⁾。この装置は、無保守かつ連続的に水道原水中の有害物質監視の支援を目的とし、有害物質検出の基礎検討及び装置の試作評価を完了した。

ここでは、この鉄酸化細菌を用いたバイオセンサの測定原理、有害物質監視支援装置の構成及びその特長について述べる。

2 バイオセンサの測定原理

従来のバイオセンサでは、他の微生物の繁殖による微生物膜の劣化、サンプル水中の有機物濃度の変動による計測値が不安定となる問題があった。今回、これらを解決し、長期にわたり安定性を維持することができる鉄酸化細菌を利用したバイオセンサを開発した。

2.1 鉄酸化細菌の性質

バイオセンサは、鉄酸化細菌 *Thiobacillus ferrooxidans* (以下、*T. ferrooxidans*と略記)の呼吸活性を連続的に測定し、有害物質による呼吸活性の低下をとらえることにより毒物の流入を検出する。この *T. ferrooxidans*を図1に示す。

*T. ferrooxidans*は、鉱山などに生息する微生物であり、第一鉄イオン(Fe^{2+})を第二鉄イオン(Fe^{3+})に酸化することでエネルギーを得る化学合成細菌である。この微生物は、酸性環境で生息していることが特徴である。そのため、他の微生物の繁殖が起こりにくい。また、鉄イオン濃度だけに依存する独立栄養細菌であり、呼吸活性は試料水中の有機物濃度に依存しないことから、原水水質の変動によって測定値は変化しない。したがって、長期にわたり安定して測定することができる。

2.2 バイオセンサの構成と測定原理

バイオセンサの構成を図2に示す。

(注1) 生物試験法。動物、植物、あるいは微生物を用いて、化学物質(有害化学物質、環境汚染物質など)を与えたときの生物応答や形態変化から、化学物質による生物への影響を調べる。



図1 . *T. ferrooxidans*の電子顕微鏡写真⁽⁵⁾ pH1.3 ~ 4.5の酸性環境で生息し、鉄イオン濃度だけに依存する独立栄養細菌である。
SEM image of *T. ferrooxidans*

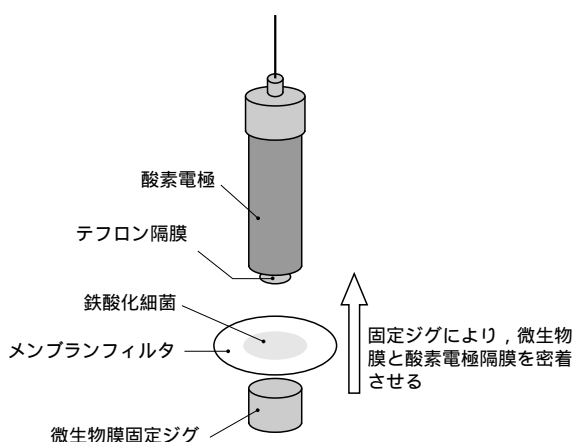


図2 . バイオセンサの構成 鉄酸化細菌をメンブランフィルタ上に固定化し、酸素電極に密着させる。
Configuration of biosensor

バイオセンサによる水質異常検出の原理を、実際の酸素電極出力(電流値)の変化と合わせて図3に示す。

バイオセンサでは、鉄酸化細菌の毒物による呼吸活性の変化を測定することにより、有害物質の混入を検出する。この呼吸活性の変化は、微生物膜を透過して酸素電極に到達する酸素量、その結果変化する酸素電極の出力である電流値に反映される。

以下に、Stage1 ~ 3の内容について述べる。

- (1) Stage1(試料水だけ) バイオセンサに試料水だけを供給した場合、鉄酸化細菌による酸素消費はごくわずかであり、試料水中の溶存酸素濃度に対応した電流値が酸素電極で測定される。
- (2) Stage2(通常運転時) 試料水に鉄酸化細菌のエネルギー源である硫酸第一鉄($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)水溶液を添加すると、鉄酸化細菌が第一鉄イオンを酸化する際に酸素を消費する。したがって、鉄酸化細菌が正常な状態では、酸素電極に到達する酸素量が減少するため、酸素電極出力(電流値)は低いレベルとなる。
- (3) Stage3(水質異常時) 硫酸第一鉄を添加した状態で、試料水中に有害物質が混入すると、鉄酸化細菌の呼吸が阻害され、酸素消費量が減少することから、酸素電極の電流値が増加する。この電流値の増加から有害物質の混入などによる水質異常を検出する。

2.3 シアン化カリウムに対する応答

急性毒性物質の代表としてシアン化カリウムが混入した場合のバイオセンサの応答について、シアン化カリウム濃度によるバイオセンサ電流値の変化を図4に示す。

電流値増加が、0.03 ppmという低濃度においても見られており、魚類の行動観察による検出方式よりも高感度かつ迅

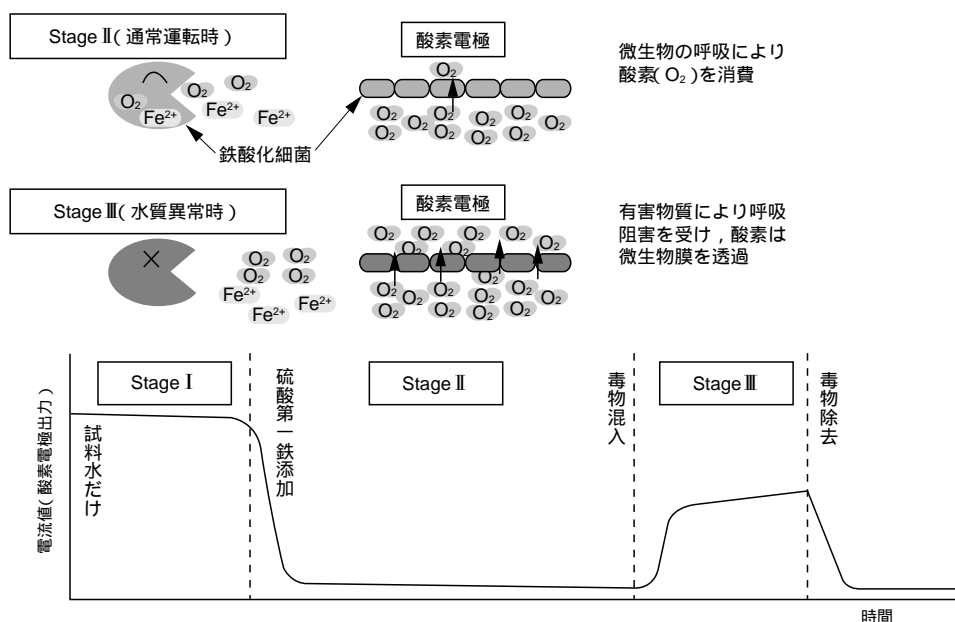


図3 . 鉄酸化細菌バイオセンサの検出原理 通常運転時、センサからの電流値は低レベルであるが(Stage2),有害物質が混入すると電流値は増加する(Stage3)。
Principle of toxicity detection with biosensor

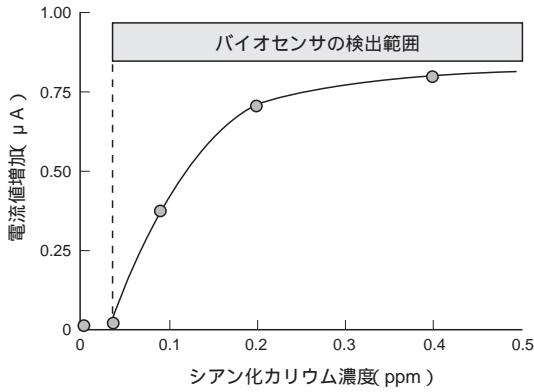


図4 . シアン化カリウム濃度に対する応答 0.03 ppm 以上で電流値が増加し , 高感度に検出ができる。

Response of biosensor to potassium cyanide



図5 . 有害物質監視支援装置 試作機 自動洗浄 , 自動校正機能を備え , 連続測定ができる。

Prototype toxicity monitoring support unit with biosensor

速に検出できる。また , シアン化カリウム濃度の増加に伴い , 電流値の増加幅は大きくなる傾向が見られることから , この濃度範囲では , バイオセンサ出力からシアン化カリウム濃度を推定することもできる。

3 バイオセンサ型有害物質監視支援装置

3.1 有害物質監視支援装置の構成

鉄酸化細菌を利用したバイオセンサを用いて , 連続測定型試作機を製作し , 実用化に向けた装置を開発した。試作機の外観を図5 に示す。また , 装置の構成を図6 に示す。

以下に , 装置の特長を記す。

- (1) 自動洗浄 長期間の安定した測定を達成するには , 汚れ対策が重要である。配管 , 微生物膜の試料水による汚れの付着や閉塞 (へいそく) のほか , 薬液として供給している鉄イオンの酸化物の析出によりバイオセンサの感度の低下を招くおそれがある。

鉄酸化細菌は強酸性環境でも生息できることから , pH1.5の硫酸で洗浄できる。タンクに保管している濃硫酸洗浄液を , 試料水で希釈して洗浄する。

- (2) 連続監視 上記の洗浄操作をしている間 , 第一鉄イオンの供給が停止するため電流値が増加し , 有害物

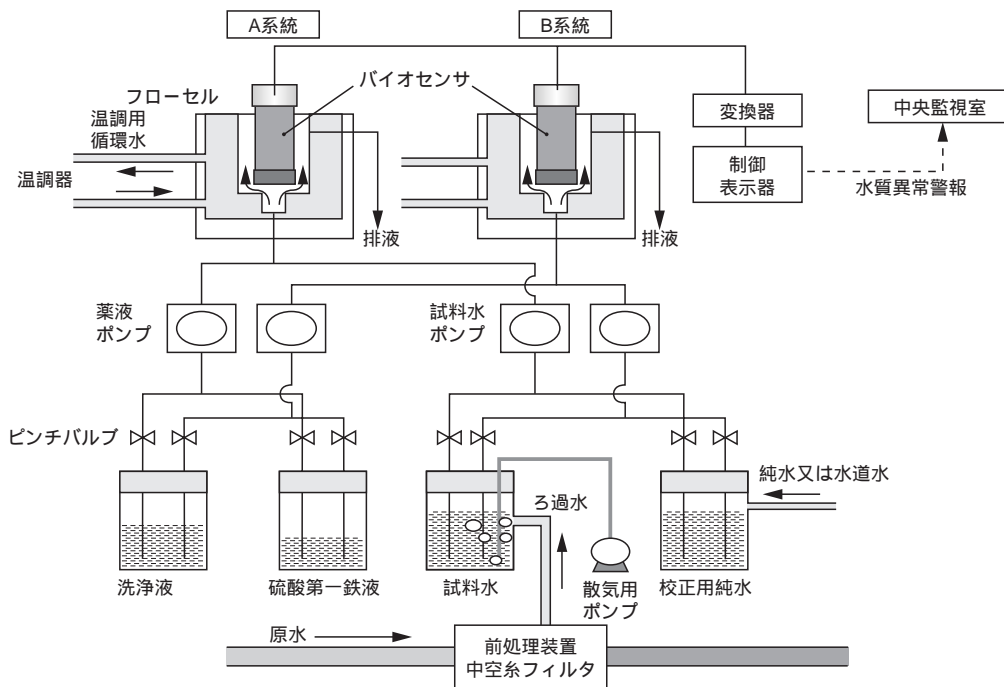


図6 . 有害物質監視支援装置の構成 バイオセンサは2系統のフローを備え , 洗浄・校正中でも交互切換えにより連続測定ができる。

Configuration of toxicity monitoring support unit

質が混入しても電流値の増加が見られず、測定できなくなる。このため、2系統のフロー(バイオセンサ、その他ポンプ、配管系統を含む)を備え、交互に運転することにより常時測定ができるようにしている。

- (3) 自動校正 洗浄を定期的に行っているものの、長期間使用しているうちに微生物膜に徐々に鉄酸化物が堆積(たいせき)するおそれがある。この場合、酸素は酸素電極への透過が減少するため、見かけ上電流値の増加幅が小さくなる。このバイオセンサの劣化を補正するため、洗浄時に合わせて自動校正する。校正用の純水を流し、鉄の供給を停止したときの電流をスパン電流、鉄を供給したときの電流をゼロ電流とし、この電流値を基準として、相対的な電流値の変化を指標にして有害物質を検出する。この校正機能により、微生物膜の変質に影響されず安定した有害物質監視ができる。

3.2 センサ警報出力

- (1) 水質異常警報 この装置では、自動校正により相対的な電流値の変化を基に有害物質を検出している。この相対的な電流変化を水質指数と呼び、以下の(1)式で求める。測定中の系において、測定した電流値から水質指数を計算し、この指数が設定した警報値を超えた場合、何らかの有害物質が混入したものと水質異常警報を出力する。

$$\text{水質指数} = \frac{\text{電流値}}{\text{スパン電流} - \text{ゼロ電流}} \quad (1)$$

スパン電流とゼロ電流は、直前の校正時の数値を用いる。

- (2) センサ異常警報 微生物膜に鉄酸化物が析出した場合、スパン電流値が低下する。また、鉄酸化細菌の活性が低下した場合は、ゼロ校正時の電流が増加してくる。いずれの場合でも、センサ異常時にはスパン電流とゼロ電流との差が小さくなることから、スパン電流とゼロ電流の差を観測することにより、センサの異常が検出できる。この場合は電流差に応じて、10段階でセンサ劣化、センサ異常警報を出力する。

3.3 バイオセンサによる検出例

各種化学物質に対するバイオセンサの応答について、その検出例を表1に示す。

対象とする化学物質は、人体・環境に悪影響を及ぼす可能性がある化学物質であり、呼吸障害毒性物質(シアン化カリウムなど)、重金属化合物(水銀化合物、カドミウムなど)、農薬、有機塩素化合物などである。

アジ化ナトリウムでは0.005 ppm、硫化ナトリウムでは0.1 ppmで電流値の増加が見られており、これらシアン化物と同様に呼吸を阻害する機構で細胞に作用する化学物質に対しては、高感度に検出できる。

表1. 各種化学物質に対するバイオセンサの応答
Response of biosensor to various chemicals

種類	化学物質名	検出可能濃度(*)
呼吸障害毒	シアン化カリウム	0.005 (0.03)
	アジ化ナトリウム	0.00007 (0.005)
	硫酸ナトリウム	0.0012 (0.1)
金属化合物	塩化メチル水銀	0.2
	塩化アンチモン	0.2
	塩化水銀	0.002
農薬	チオベンカルブ	
	馬拉チオン	
	ジラム	0.4
有機塩素化合物	P-クレゾール	0.1
	2,4ジクロロフェノール	2
	四塩化炭素	0.06
有機化合物	アニリン	
	フェノール	
	2,4ジニトロフェノール	0.1
内分泌攪乱化学物質	ビスフェノールA	1
	2,4,5トリクロロフェノキシ酢酸	0.2
	塩化トリブチルスズ	0.1

* 単位: mM (mM = m mol/L), 呼吸障害毒()内は ppm, 空欄は試験した濃度範囲(~ 数 mM)では応答が見られない物質

それ以外の化学物質では、一般的に毒性が強い水銀化合物、有機すず化合物についても、比較的低濃度で検出できる。農薬に対しては選択性があり、比較的低濃度で応答が見られるものもあるが、種類によっては応答が見られないものもある。これは、農薬が微生物に呼吸障害を生じさせないこと、及び水への溶解度が低いことによるものと考えられる。

有機化合物は、水に不溶の化学物質も多く、応答が見られないものが多いが、塩素化された有機物(特に芳香族化合物)には応答が見られる。内分泌攪乱(かくらん)作用化学物質についてはいくつかの応答が見られているが、その検出濃度は高く、今後、高感度化に対する改善が必要である。

3.4 連続運転における安定性

長期間の連続運転試験により、バイオセンサの安定性を確認した。試験開始直後のシアン化カリウム0.3 ppmに対する応答を測定し、その後1か月ごとに、6か月後まで同様に応答を確認した結果、試験開始直後の応答とほぼ同様の応答が得られた。

以上の結果から、6か月間の連続運転においても検出感度に変化が見られないので、長期間にわたり安定して測定できることが確認できた。

3.5 メンテナンス方法

バイオセンサ型有害物質監視支援装置は、基本的には自動運転ができるが、微生物膜の交換、薬液の補充など定期的にメンテナンスをする必要がある。

- (1) 薬液の補充 鉄酸化細菌のエネルギー源である硫酸第一鉄液及び洗浄液は、測定により消費されるため定期的(約3か月ごと)に補充する。
- (2) 微生物膜 微生物膜は6か月連続で使用できるが、使用中に菌体数の変動など、測定条件が変動する可能性がある。そのため、実用的には3か月に一度、微生物膜を交換することを推奨する。

交換する微生物膜は、鉄酸化細菌をメンブランフィルタ上に固定化し、保存処理を施したものをを用いる。低温で長期間保存ができ、酸素電極に装着後直ちに測定できる。

4 あとがき

鉄酸化細菌を用いたバイオセンサにより、長期間にわたり安定して高感度に水道原水中の有害物質の検出ができるようになった。ただし、バイオセンサによる測定は総合的な一次診断であり、詳細な有害物質の同定には化学分析による成分分析が必要となる。バイオセンサによる生物学的評価技術と化学分析技術とを組み合わせることで活用することにより、信頼性の高い水質監視システムを構築することができる。今後は、上水道プロセスにおける監視制御システムとも連携して、より高度な水質監視・制御システムの構築を目指していく。

また、バイオセンサの感度向上、安定性向上についてもよりいっそうの改善を進め、水道原水に限らず、広範囲に有害物質検出の可能性を検討するとともに、バイオセンサの応用展開も進めていく。

文 献

- (1) 升方 正,ほか.“微生物を用いた水質監視装置の検討”.第49回全国水道研究発表会講演集(社)日本水道協会.1998-05,p.544-545.
- (2) 原口 智,ほか.“鉄酸化細菌を利用した水質監視装置-シアンの高感度検出と長期安定性について-”.第4回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会講演要旨集.1998-09,p.41.
- (3) 原口 智,ほか.“鉄酸化細菌を用いた水質監視装置-各種化学物質に対する応答とミジンコ遊泳阻害試験-”.第5回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会講演要旨集.1999-09,p.58.
- (4) 松永 是,ほか.“エコテクノロジー”.4,5,1999,p.5-10.
- (5) 千田 信.“微生物資源工学”.コロナ社.1996-09,200p.



松永 是 MATSUNAGA Tadashi, D.Eng.

東京農工大学 工学部生命工学科教授,工博。
バイオ関連技術の研究・開発に従事。マリンバイオテクノロジー学会副会長,日本化学会委員,生物工学会理事。
Tokyo University of Agriculture & Technology



藤沢 実 FUJISAWA Minoru

情報・社会システム社 社会インフラシステム事業部 公共システム技術第二部主務。上水道プラントのシステムエンジニアリング業務に従事。
Public Use Systems Div.



金子 政雄 KANEKO Masao

電力システム社 電力・産業システム技術開発センター 社会システム開発部グループ長。上下水道プラントの水処理技術及び水質センサの開発に従事。日本分析学会会員。
Power and Industrial Systems Research and Development Center



原口 智 HARAGUCHI Satoshi

電力システム社 電力・産業システム技術開発センター 化学・絶縁材料開発部。上下水道プラントの水処理技術及び水質センサの開発に従事。
Power and Industrial Systems Research and Development Center