

原著

## BOD 植種希釈水の微生物活性の安定化方法

土田 大輔・森山 紗好・志水 信弘

BOD試験に用いる植種希釈水について、微生物活性を安定化する方法を検討した。植種希釈水の活性度は、工場排水試験方法 (JIS K 0102) に示されているグルコース・グルタミン酸混合標準液 (GG標準液) のBOD ( $220 \pm 10$  mgO/L) によって評価した。秋期に採取した河川水を植種源に用いた場合、BODは目標範囲内となり、馴化期間18日までは微生物活性を維持できた。GG標準液を用いて河川水植種希釈水の馴化を行ったが、活性の向上効果は認められなかった。植種菌製剤を用いた場合、開封直後のものを使用したときに目標範囲内となった。土壌抽出液については、冬期に採取した真砂土および腐葉土を検討したが目標範囲を満たせなかった。本検討結果から、定期的にGG標準液のBOD測定を行い、植種希釈水の微生物活性を把握することの必要性が示された。

[キーワード: BOD、植種源、グルコース・グルタミン酸混合標準液、河川水、植種菌製剤、土壌抽出液]

### 1 はじめに

公共用水域や事業場排水の汚濁指標の一つである生物化学的酸素要求量 (BOD) の測定値については、有機物の種類や濃度、微生物の種類、阻害物質の有無など多くの因子が影響を及ぼす。工場排水試験方法 (JIS K 0102)<sup>1)</sup>では、試験操作を確認する方法としてグルコース・グルタミン酸混合標準液 (以下、GG標準液) のBODを測定する方法が推奨されており、BOD  $220 \pm 10$  mgO/Lからの偏差が著しい場合には、希釈水の水質や植種液の活性度等に疑問があるとされている。

BODの植種源として、JISでは下水の上澄み液、河川水、土壌抽出液等が示されているが、植種源の活性がBOD測定に及ぼす影響は大きい。環境省が実施した環境測定分析統一精度管理の調査結果<sup>2)</sup>によれば、試料のBODは植種源により異なり、市販の植種菌製剤を用いた場合の値は、他の植種源 (河川水、下水等) に比べ低いということが報告されている。同様に日暮ら<sup>3)</sup>は、植種菌製剤を用いた植種希釈水では、GG標準液のBODがJIS規定範囲に入らなかったことを報告している。また、安達ら<sup>4)</sup>によると河川水の微生物活性にも季節変動があり、7月から12月にかけて採取した河川水を植種希釈水に用いて比較したところ、12月に採水した河川水では、GG標準液のBODがJIS規定範囲外となったことを報告している。

上記のように植種源ごとの微生物活性のばらつきが大きいことから、JIS規定を満たす植種希釈水の調製方法に関する検討も行われている。前述の日暮ら<sup>3)</sup>は、工場放流

水由来の植種希釈水にGG標準液を添加して、GG標準液のBOD測定に適した微生物を繁殖させること (馴化) で、JIS規定を満たす植種希釈水が得られたと報告している。ただし、植種源の選び方については、微生物活性の違いに加えて入手のしやすさ等も考慮する必要があるため、様々な植種源に応じて活性を安定化する方法が求められる。

そこで本稿では、植種源の異なる様々な植種希釈水を対象に馴化等の操作を加えることで、GG標準液のBODがJISの示す濃度範囲 ( $220 \pm 10$  mgO/L) を満たすことができるかを検討した。

### 2 実験方法

#### 2・1 試薬および水

標準液等の調製には超純水を、それ以外は工業用精製水 (高杉製薬株式会社製) を用いた。BOD希釈水 (以下、希釈水) に加える、緩衝液pH7.2 (A液)、硫酸マグネシウム溶液 (B液)、塩化カルシウム溶液 (C液)、および塩化鉄 (III) 溶液 (D液) の調製には、和光純薬工業株式会社製または関東化学株式会社製の特級試薬を用いた。GG標準液は、和光純薬工業株式会社製試薬特級のD (+) -グルコースおよびL-グルタミン酸を103°Cで1時間乾燥し、各150 mgを超純水に溶かして1 Lとした。植種菌製剤 (以下、菌製剤と略す) には、BI-CHEM™ BOD Seed (Novozymes Biologicals, Inc.製、Lot No. D14062702、製造日2014年6月27日) を使用した。有機体炭素 (TOC) 測定用の標準物質には、和光純薬工業株式会社製 水質試験用 フタル酸水素カリウム標準液 (1 mg/mL水溶液) を用いた。

## 2・2 測定装置

BOD測定の際は、ワイエスアイ・ナノテック株式会社製溶存酸素（DO）メーターモデル57およびBOD電極5750を用いてDOを測定した。TOCの測定には株式会社島津製作所製TOC-Lを用いた。

## 2・3 測定方法

BODおよびTOCは、JIS K 0102<sup>1)</sup>の21.生物化学的酸素消費量（BOD）および22.有機体炭素（TOC）にしたがって測定した。BODの測定では、GG標準液を400 mLメスフラスコおよび8 mLホールピペットを用いて各植種希釈水で50倍希釈し、BOD測定用ふらん瓶3本に分取した。またブランクとして植種希釈水をふらん瓶2本に分取した。

植種希釈水の微生物活性は、GG標準液のBOD測定結果により評価し、JISに示された濃度範囲である220±10 mgO/Lを目標範囲とした。

## 2・4 GG標準液の保存可能期間

GG標準液を構成するグルコースやグルタミン酸は、生物分解されやすいため、予備検討としてGG標準液の保存可能期間を確認した。調製後0、2、22、29、36、44、および57日間保存したGG標準液について、BODを比較した。調製からBOD測定までの間は、ガラス製メスフラスコに入れて4°Cで冷蔵保存した。BOD測定時の植種希釈水には、GG馴化（2・5・1で後述）した河川水植種希釈水（GG添加割合0.5%vol、馴化期間3日間、採水時期11月）を用いた。

## 2・5 各植種源を用いた植種希釈水の調製方法

植種源には、河川水、菌製剤、および土壌抽出液を用いた。以下、2・5・1～2・5・3において、それぞれの植種源を用いたときの手順について述べる。

### 2・5・1 河川水

福岡県保健環境研究所（以下、当研究所と略す）近傍の御笠川水系大佐野川で採取した河川水（採取時期：10月、1月および2月）を、A液～D液を加えたBOD希釈水（以下、希釈水と略す）1 Lに対して50 mL添加し、これを植種希釈水とした。植種希釈水の調製後、原則として3～4日間は室温または20°Cで曝気培養を行い、植種菌を増殖させた。さらに、植種希釈水の微生物活性を安定させるため、以下の点について検討した。

#### (1) GG標準液を用いた馴化

既往研究<sup>2)</sup>を参考に、植種希釈水の調製時にGG標準液を添加し、グルコースやグルタミン酸の分解に適した微生物の繁殖を促した。以下では、この操作をGG馴化、得られた植種希釈水をGG馴化系と称する。GG馴化系では、植種

希釈水1Lに対しGG標準液を5mL添加した（以下、GG添加割合0.5%volと称す）。また、対照としてGG標準液を添加しない系も調製した（以下、非馴化系と称す）。

#### (2) 馴化期間の延長

植種希釈水の調製後の馴化期間を0日から最大38日間とし、微生物活性への影響を検討した。温度は室温（20～25°C）とし、馴化期間中のGG標準液の追加補充は行わなかった。

#### (3) 馴化温度およびGG添加濃度の検討

冬期に採取した河川水については、微生物活性が低下することが指摘されている<sup>4)</sup>。そのため、GG馴化時の水温を20°C、GG標準液の添加量を植種希釈水1 Lに対し0 mL、5 mLおよび10 mLとした系（GG添加割合0%vol、0.5%volおよび1.0%volと称す）と、GG馴化時の水温を35°C、GG添加割合0.5%volおよび1.0%volとした系を比較した。

## 2・5・2 菌製剤

菌製剤を用いた植種希釈水は、次のように調製した。菌製剤1カプセルの内容物を希釈水500 mLに分散させ、60分間曝気攪拌した。この植種液を、希釈水1 Lに対して10 mL添加して植種希釈水とした。さらに、以下の点について検討した。

#### (1) GG標準液を用いた馴化

植種希釈水にGG標準液を添加し、GG馴化による効果を検証した。GG添加割合は0.5%volとした。

#### (2) 馴化期間の延長

植種希釈水の調製後の馴化期間を0日から最大38日間とし、微生物活性への影響を検討した。温度は室温（20～25°C）とし、馴化期間中のGG標準液の追加補充は行わなかった。

#### (3) 容器開封後の保存期間

開封直後の菌製剤および開封後5か月間冷蔵保存した菌製剤から、それぞれ植種希釈水を調製し、微生物活性を比較検討した。

## 2・5・3 土壌抽出液

土壌抽出液を植種液として用いた植種希釈水は、次のように調製した。土壌（植物の生育している土壌）200 gを超純水2 L中に加え、スターラーで10分間攪拌、30分静置後の上澄み液（以下、土壌抽出液）を、希釈水1 Lに対し20 mL加え、これを植種希釈水とした。さらに、以下の点について検討した。

#### (1) 土壌種類

土壌の種類による活性の違いを比較するため、花壇または芝生下から採取した真砂土、および林内で採取した腐葉土の2種類を検討した。本研究で使用した土壌は、いずれも当研究所敷地内で採取した。

## (2) GG標準液を用いた馴化

植種希釈水にGG標準液を添加し、GG馴化による効果を検証した。GG添加割合は0.5%volとした。

## (3) 恒温保管

冬期に採取した土壌（腐葉土）を1週間30℃で恒温保管し、活性を向上することを試みた。採取した土壌をプラスチック製容器に入れ、30℃に設定した恒温器内で1週間保管した。保管の間は適宜水分を補充して湿潤状態を保ち、1週間保管後に植種希釈水の調製に用いた。

## 3 結果および考察

### 3・1 GG標準液の保存可能期間

表1に、0～57日間冷蔵保存したGG標準液のBOD測定結果を示す。保存期間0日～36日までのBODは、211～215 mgO/Lであり、目標範囲を満たした。しかし、保存期間44日と57日のBODは、それぞれ209および208 mgO/Lと目標範囲外となった。このことから、GG標準液は調製から1か月程度の冷蔵保存が可能と判断された。なお、以降の実験で用いたGG標準液は、全て調製後1日以内のものを使用した。

### 3・2 各植種源を用いた植種希釈水の評価

#### 3・2・1 河川水

表2に、河川水を植種源に用いた場合のGG標準液のBOD測定結果を示す。2015年10月に採取した河川水を植種源に用いた場合、馴化期間0～18日間まではGG馴化の有無によらず、BODは目標範囲内（220±10 mgO/L）であった。馴化期間38日間では、GG馴化系および非馴化系のいずれも目標範囲外となった。GG馴化による効果について考察すると、馴化期間18日目までのBODは、GG馴化系と非馴化系とで大差はなく、いずれも目標範囲内であったことから、河川水の微生物活性が十分であれば、GG馴化は必要ないと考えられた。ただし、馴化期間38日では、非馴化系のBOD 173 mgO/Lに対し、GG馴化系のBODが203 mgO/Lであり、非馴化系では微生物活性が低下した。これは、期間が長くなったことで非馴化系では微生物の増

表1 冷蔵保存したGG標準液のBOD測定結果

GG標準液 保存期間 [日]	BOD	
	平均値*±標準偏差	
	[mgO/L]	
0	215 ± 7	
2	212 ± 7	
22	216 ± 8	
29	215 ± 7	
36	215 ± 7	
44	209 ± 7	
57	208 ± 8	

\*太字は目標範囲内であったことを示す。

殖に必要な炭素源が不足し、微生物が減少したためと考えられた。

次に、2016年1、2月に採取した河川水を植種源に用い、馴化温度を20℃、GG添加割合を0、0.5、1.0%volに設定して検討を行った。その結果、非馴化系のBOD 184 mgO/Lに対し、GG馴化系のBODは194または198 mgO/Lと10 mgO/L程高いものの、GG馴化系および非馴化系ともに目標範囲外であった。そこで、馴化温度を35℃、GG添加割合を0.5および1.0%volに設定したところ、0.5%volのGG馴化系ではBODが210 mgO/Lと目標範囲内となった。しかし、馴化温度を35℃まで上げた場合には、DOの飽和濃度が低くなる。そのため、DO測定前に20℃の恒温水槽内で曝気してDO濃度を20℃の飽和量近くにする必要があり、測定時の操作が煩雑になるという弊害が生じた。

#### 3・2・2 菌製剤

表3に、菌製剤を植種源に用いた場合のGG標準液のBOD測定結果を示す。開封直後の菌製剤を使用した場合、GG馴化系および非馴化系ともに、目標範囲内であったのは馴化期間が4日間のときだけであった。馴化期間が11日以上になると、いずれの系においてもBODは低下し、目標範囲外となった。このように、菌製剤の植種希釈水に関しても、GG馴化によって微生物活性を維持できる期間の延長効果は認められなかった。また、河川水の植種希釈水に比べると、菌製剤の植種希釈水は、活性を維持できる期間が短いことが明らかになった。日暮ら<sup>3)</sup>は、工場放流水由来の植種希釈水をGG馴化した場合、活性は2～3日間維持できると報告しており、活性を維持できる馴化期間は植種源により異なると考えられる。

次に、容器開封後の経過期間による影響を確認するため、

表2 河川水の植種希釈水によるBOD測定結果

河川水の 採水時期	活性度向上方法			BOD 平均値*±標準偏差 [mgO/L]
	馴化期間 [日]	GG添加 割合 [% vol]	馴化温度 [°C]	
2015年 10月	0	0.0	室温	223 ± 16
		0.5	室温	227 ± 1
	4	0.0	室温	211 ± 26
		0.5	室温	223 ± 2
	11	0.0	室温	214 ± 1
		0.5	室温	215 ± 5
18	0.0	室温	222 ± 9	
	0.5	室温	173 ± 11	
38	0.0	室温	203 ± 3	
	0.5	室温		
2016年 1月	3	0.0	20	184 ± 30
		0.5	20	194 ± 8
2016年 2月	4	1.0	20	198 ± 0
		0.5	35	210 ± 6
	4	0.5	35	188 ± 12
		1.0	35	

\*太字は目標範囲内であったことを示す。

開封直後の菌製剤と、開封後5か月間冷蔵保存した菌製剤を比較した。その結果、開封直後の菌製剤を使用した系では215 mgO/Lと目標範囲内であったのに対し、開封後5か月の菌製剤を使用した系ではBODが201 mgO/Lと目標範囲を満たさなかった。菌製剤の使用期限は2年間と記されているが、開封後は早めに使用しなければならないことが示唆された。

### 3・2・3 土壌抽出液

表4に、土壌抽出液を植種源に用いた場合のGG標準液のBOD測定結果を示す。1月に採取した真砂土を用いた場合、非馴化系では148 mgO/L、GG馴化系では185 mgO/Lであり、GG馴化によりBODは上昇したものの目標範囲には入らなかった。

1、2月に採取した腐葉土を用いた場合も同様の結果であり、非馴化系のBODが190および195 mgO/Lであったのに対し、GG馴化系では209 mgO/Lと、GG馴化により活性の向上は認められたものの目標範囲には入らなかった。ただし、真砂土に比べ、腐葉土を用いた系のBODが高かったことから、腐葉土の方が微生物活性は高いと考えられた。

また、土壌についても河川水と同様に冬期に微生物活性が低下している可能性が考えられたため、3月に採取した腐葉土を用いて、30°Cで1週間恒温保管した後に植種液とした。結果は、恒温保管した系のBODは195 mgO/L、恒温保管していない系のBODは200 mgO/Lであり、活性を向上させることはできなかった。

## 4 まとめ

BODの測定に影響を及ぼす因子の一つである植種源の微生物活性に着目し、馴化等により微生物活性を安定化させることで、GG標準液のBODが目標範囲（220 ± 10

mgO/L）を満たすことができるかを検討した。検討した植種源のうち、秋期（10月）に採取した河川水についてはGG馴化の有無によらず目標範囲を満たすことができたが、冬期（1、2月）の河川水は活性が低かった。土壌抽出液については、冬期に採取した真砂土および腐葉土を検討したが、目標範囲を満たすことはできなかった。これらの結果から、環境中で採取した植種源を用いる場合には、定期的にGG標準液のBODを測定し、微生物活性の季節変動を把握する必要があることが示された。また、菌製剤については、GG馴化の有無によらずBODが目標範囲内であった。ただし、容器開封後は早めに使用しなければならないことが示唆されたことから、定期的なGG標準液のBOD測定は必要と考えられた。

今後の課題として、冬期に菌製剤以外の植種源を確保する方法を確立することが挙げられる。具体的な検討事項としては、秋期に採取した河川水や土壌を用いて調製した植種液に、継続的にGG標準液を添加し、微生物活性の安定した植種液を培養維持する方法等が考えられる。

## 文献

- 1) 日本工業標準調査会：工場排水試験方法JIS K 0102:2013, p.45, 日本規格協会, 2013.
- 2) 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（本編），p.55, 2012.
- 3) 日暮久敬ら：分析化学, 63, 331-337, 2014.
- 4) 安達取吾ら：生物化学的酸素要求量測定用植種液に河川水を用いた場合の有用性について, [http://www.pref.niigata.lg.jp/HTML\\_Article/38/120/08,0.pdf](http://www.pref.niigata.lg.jp/HTML_Article/38/120/08,0.pdf) (2016年6月24日アクセス)

表3 菌製剤の植種希釈水によるBOD測定結果

菌製剤の状態	活性度向上方法		BOD 平均値* ± 標準偏差 [mgO/L]
	馴化期間 [日]	GG添加 割合 [% vol]	
開封直後	4	0.0	<b>215</b> ± 2
		0.5	<b>210</b> ± 10
	11	0.0	198 ± 6
		0.5	192 ± 7
	18	0.0	205 ± 5
		0.5	197 ± 13
38	0.0	207 ± 12	
	0.5	208 ± 7	
開封後5か月	3	0.5	201 ± 2
開封直後			<b>215</b> ± 6

\*太字は目標範囲内であったことを示す。

表4 土壌抽出液の植種希釈水によるBOD測定結果

土壌の種類	土壌の 採取時期	活性度向上方法		BOD 平均値 ± 標準偏差 [mgO/L]
		GG添加 割合 [% vol]	恒温 保管	
真砂土	2016年 1月	0.0	なし	148 ± 15
		0.5	なし	185 ± 12
腐葉土	1月	0.0	なし	195 ± 9
		0.5	なし	209 ± 11
	2月	0.0	なし	190 ± 8
		0.5	なし	209 ± 11
	3月	0.0	なし	200 ± 6
		0.5	30°C×1w	195 ± 4

(英文要旨)

## **Stabilization of the Microbial Activity of Seed Solutions in a Biochemical Oxygen Demand Test**

**Daisuke TSUCHIDA, Sayo MORIYAMA and Nobuhiro SHIMIZU**

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,*

*Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

The microbial activity of seed solutions is a critical factor in the measurement of biochemical oxygen demand (BOD). The present study examined methods to stabilize the microbial activity of solutions seeded with river water, a commercial seed preparation, and soil suspensions. The degree of microbial activity was evaluated by BOD measurements of a glucose-glutamic acid standard solution (GG standard), which should have a value of  $220 \pm 10$  mg/L as described in Testing Methods for Industrial Wastewater (JIS K 0102). The BOD of the GG standard seeded with river water collected in autumn was within the range specified by JIS K 0102, and the seed solution maintained its activity for 18 days. Acclimatization was carried out by adding a small volume of GG standard to the seed solution, but this did not enhance the microbial activity. The BOD of the GG standard seeded with a commercial seed preparation was within the JIS K 0102 range when the commercial preparation was used immediately after the bottle was first opened, which suggests that the storage time affected the microbial activity. Soil suspensions of weathered granite and leaf mold, each taken in winter, were prepared as seed solutions. The measured BOD values for the GG standard seeded with these soil suspensions were outside the JIS K 0102 range. These results indicate that periodic BOD measurement of the GG standard is necessary to check the microbial activity of the seed solutions.

[Key words; BOD, seed source, glucose-glutamic acid solution, river water, soil suspension, commercial seed preparation]