



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

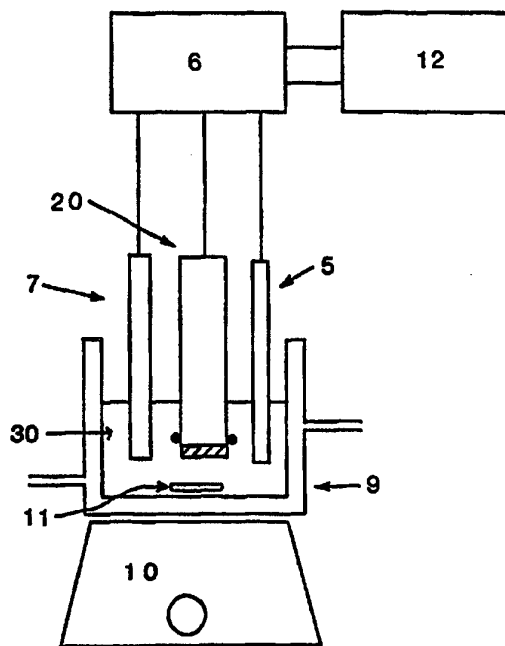
<p>(51) 国際特許分類 G01N 27/327, 27/416</p>	<p>AI</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 95/06242</p> <p>(43) 国際公開日 1995年3月2日 (02.03.95)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01418 (22) 国際出願日 1994年8月26日(26. 08. 94)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平5/211954 1993年8月26日(26. 08. 93) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 曙ブレーキ工業株式会社 (AKEBONO BRAKE INDUSTRY CO., LTD.)(JP/JP) 〒103 東京都中央区日本橋小網町19番5号 Tokyo, (JP) 株式会社 曙ブレーキ中央技術研究所 (AKEBONO RESEARCH AND DEVELOPMENT CENTRE LTD.) [JP/JP] 〒348 埼玉県羽生市東5丁目4番71号 Saitama, (JP)</p> <p>(71) 出願人; および (72) 発明者 曙部征夫 (KARUBE, Isao) [JP/JP] 〒216 神奈川県川崎市宮前区有馬2467-11 Kanagawa, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 矢野清子 (YANO, Kiyoko) [JP/JP] 〒153 東京都目黒区駒場1-36-1 目黒区駒場206 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 遠山 勉, 外 (TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54) Title : BOD SENSOR AND BOD MEASURING METHOD

(54) 発明の名称 BODセンサ及びBODの測定方法

(57) Abstract

An electrode made of a metal or carbon, a working electrode (20) in contact with this electrode and of a microorganic germ-containing thin film, a counter electrode (7), and a reference electrode (5) as necessary are immersed in an organism-containing solution (30), and the BOD of this solution is measured by determining the quantity of an electric current flowing between the working electrode (20) and counter-electrode (7) or reference electrode (5), applying a voltage between the electrodes by a potentiostat (6). By this method, the concentrations of organic compounds can be measured directly without using an oxygen electrode even when the quantity of dissolved oxygen is small.



(57) 要約

有機物を含有する溶液(30)に、金属又は炭素からなる電極並びにこの電極に当接された微生物菌体を含む薄膜からなる作用電極(20)と対極(7)と、必要に応じて参照電極(5)を浸漬し、ポテンシオスタット(6)により作用電極(20)と対極(7)若しくは参照電極(5)との間に電位差を負荷したときに両電極間に流れる電流を計測することにより、この溶液のBODを測する。

本方法により、酸素電極を用いずに直接に有機化合物濃度を測定することができ、溶存酸素量が低くても測定が可能となる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
BB	バルバドス	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BE	ベルギー	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BF	ブルキナ・ファソ	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BJ	ベナン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャード
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェッコ共和国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド		

- 1 -

明細書

BODセンサ及びBODの測定方法

技術分野

本発明は、BODセンサに関し、詳しくは、酸素電極を用いないBODセンサに関する。

背景技術

河川や産業排水の水質管理に重要な項目として、BOD（生物化学的酸素要求量）があり、国際的な有機性水質汚濁の指標とされている。有機化合物に起因する水質汚濁は、好気性微生物による酸化反応で減少、消去され、その有機物質濃度に対応して溶存酸素が消費される。この消費された酸素量を計測することで、水質汚濁が明らかになる。すなわちBODは、有機化合物濃度を、酸素量により間接的に表したものである。

日本工業規格JISでBODの測定法が規定されているが、この方法は煩雑な操作を必要とし、さらに測定に5日間を要するなどの問題点があった。そこで迅速、簡単、かつオンライン計測可能なBOD測定法が要望され、既にBODセンサが開発されており、工場排水などの測定に利用されている。

従来使用されているBODセンサは、微生物膜と酸素電極で構成されており、溶液中の溶存酸素の減少量によりBODを測定するものである。このようなセンサとして、例えば、酸素電極の隔膜とそれを覆う透析膜の間に有機物を資化し酸素を消費する微生物を封入せしめた微生物電極（特開昭54-47699号公報）が知られている。

しかしながら、上記のような溶存酸素の減少量によりBODを測定するセンサでは、溶存酸素の低い廃液では正確な値を測定することは難しいという問題がある。また、酸素電極の構造は、電極内に電解液等を内蔵するために、ある程度の大きさが必要であった。

本発明は、上記観点からなされたものであり、酸素電極を用いずに直接に有機

化合物濃度を測定することができ、溶存酸素量が低くても測定が可能なBODセンサを提供することを課題とする。

発明の開示

本発明者は、上記課題を解決するために、BODセンサを以下の構成とした。

すなわち本発明は、金属又は炭素からなる電極並びにこの電極に当接された微生物菌体を含有する薄膜からなる作用電極（微生物電極）と、対極とを有するBODセンサである。また本発明は、有機物を含有する溶液に、金属又は炭素からなる電極並びにこの電極に当接された微生物菌体を含有する薄膜からなる作用電極（微生物電極）と、対極とを有するセンサを浸漬し、微生物電極と対極との間に電位差を負荷したときに流れる電流を計測することにより、この溶液のBODを測定する方法を提供する。

また本発明は、上記構成に加えてさらに参照電極を有するBODセンサ、及び有機物を含有する溶液に、このBODセンサを浸漬し、作用電極と参照電極との間に電位差を負荷したときに流れる電流を計測することにより、この溶液のBODを測定する方法を提供する

以下、本発明を詳細に説明する。

< 1 > 本発明のBODセンサ

本発明のBODセンサは、金属又は炭素からなる電極（以下、単に「金属電極」ともいう）並びにこの金属電極に当接された微生物菌体を含む薄膜（以下、単に「微生物膜」ともいう）からなる作用電極と、対極とを有する。本発明の他の態様のBODセンサは、金属電極並びにこの金属電極に当接された微生物菌体を含む薄膜（以下、単に「微生物膜」ともいう）からなる作用電極と、対極と、さらに参照電極とを有する。

微生物を有機化合物を含む試料溶液に存在させると、微生物は有機化合物をエネルギー獲得のために代謝する。その過程において、呼吸鎖の電子伝達系に電子の移動が起こる。この際、代謝される有機物濃度と移動する電子の量には相関がある。したがって、この移動する電子の量を測定することによって微生物のまわりに存在する有機物濃度がわかり、BODを測定することができる。この電子の

移動量を直接計測することは困難であるので、本発明においては、上記構成を有するBODセンサを有機化合物含有溶液に浸漬し、センサの作用電極と対極もしくは参照電極との間に、電子が移動しやすいように一定の電位差を負荷し、両電極間に流れる電流を計測する。以下に、本発明のBODセンサの構成を説明する。

微生物膜は、微生物菌体を金属電極表面又はその近傍に存在させるためのものであり、薄膜状のものであれば、特に形態は問わない。例えば、微生物菌体を、アルギン酸ゲル膜、アガロースゲル膜、光架橋性ポリビニルアルコール膜あるいはポリアクリルアミド膜等の三次元架橋構造体中に封入したものが挙げられる。金属電極と透析膜等の微生物菌体を透過させない膜との間に微生物を膜状に封入してもよい。また、高分子膜に微生物菌体を固定してもよい。さらには、作用電極を構成する金属膜表面に、グルタルアルデヒド等を用いて微生物を膜状に固定化したものでもよい。薄膜中の微生物は生存していることが望ましい。

上記微生物としては、有機物を代謝することにより電子伝達系に電子の移動が起こるものであればよく、特に制限されない。前核微生物及び真核微生物のいずれも使用できるが、真核生物細胞内では呼吸鎖の電子伝達がミトコンドリア内で行われるため、作用電極に移動する電子の量が比較的少ないので、BOD測定感度の点では前核微生物が好ましい。前核微生物としては、例えば、大腸菌、バチルス属、アシネトバクター属、グルコノバクター属あるいはシュドモナス属に属する細菌、放線菌などの前核微生物が、真核微生物としてはトリコスポロン属に属する酵母等が挙げられる。

金属又は炭素からなる電極は、BOD測定試料中の有機物が微生物により代謝されて生じる電子を受け取る。作用電極の素材としては、安定であり、かつ、導電性が大きく、微生物に実質的に無害なものであればよく、例えば、白金、金、銀等の金属、又はグラファイト、カーボン等の炭素素材が挙げられる。また、その形状としては、特に制限はないが、棒状、筒状、シート状が挙げられる。

本発明のBODセンサを構成する作用電極は、上記金属電極に微生物膜を当接させたものである。金属電極と微生物膜との距離が離れすぎると、微生物膜で生じた電子が金属電極に移動することができない。この意味で、「当接」とは必ずしも完全に接している必要はなく、溶液中で電子が移動可能な程度に近接してい

ればよい。

上記作用電極の具体的構造としては、金属電極表面上に官能基を介して微生物を固定したもの、微生物を含むゲル膜を金属電極に接着したもの、金属電極端に透析膜を被せ、金属電極と透析膜の間に微生物を入れたものなどが挙げられる。また、微生物懸濁液をアセチルセルロース等の薄膜上で吸引濾過し、この薄膜上に微生物を膜状に集菌し、アセチルセルロース膜の外側から透析膜で覆うようにして金属電極に被せてもよい。また、金属電極の形状及び微生物膜の形状は、これらの接触面積が大きくなるようにするとよい。

本発明のBODセンサは、上記作用電極と対極とを有し、必要に応じてさらに参照電極を有する。対極の素材としては、白金、銀、金、カーボン等が挙げられる。BODセンサを測定試料液に浸漬し、作用電極と対極との間に電位差を負荷したときに、電極反応が進行するにつれて、電極表面での反応種の濃度は減少し、また生成物の濃度が増加するなどして電極電位が設定した電位からずれてしまうことがある。そこで、Ag/AgCl電極等の参照電極を試料液に浸漬し、参照電極を電位設定の基準として作用電極の電位を設定することが好ましい(3極法)。

本発明のBODセンサは、作用電極と対極及び必要に応じて参照電極とを別体としてもよいし、また一体構造としてもよい。

< 2 > BODの測定法

本発明のBODの測定法は、有機物を含有する溶液(測定試料液)に上記BODセンサを浸漬し、作用電極と対極もしくは参照電極との間に電位差を負荷したときに両電極間に流れる電流を計測することにより、この溶液のBODを測定する方法である。

具体的には、例えば、上記BODセンサを測定試料液に浸漬し、作用電極と対極との間に電位差を負荷し、両電極間に流れる電流を計測する。また、3極法においては、作用電極と参照電極との間に電位差を負荷し、両電極間に流れる電流を計測する。電位差の負荷及び電流の測定は、ポテンシオスタット等を用いるとよい。

また、試料液にメディエータを添加しておくこと、より高感度な測定が可能となるので好ましい。あるいは、微生物膜中又は微生物膜と金属電極との間にメディ

エータを含ませてもよい。

メディエータは、微生物により有機物が代謝されて生じる電子が、金属電極に移行するのを促進するものである。メディエータとしては、微生物から金属電極に電子が移行するのを促進するものであればよく、具体的には1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルスルフォネート(1-M-PMS)、2,6-ジクロロインドフェノール(DCIP)、9-ジメチルアミノベンゾ- α -フェナゾキソニウムクロライド、メチレンブルー、インジゴトリスルホン酸、フェノサフラニン、チオニン、ニューメチレンブルー、2,6-ジクロロフェノール、インドフェノール、アズレB、N, N, N', N'-テトラメチル-p-フェニレンジアミンジヒドロクロリド、レゾルフィン、サフラニン、ソディウムアントラキノン β -スルフォネート、インジゴカーミン等の色素、リボフラビン、L-アスコルビン酸、フラビンアデニンジヌクレオチド、フラビンモノヌクレオチド、ニコチンアデニンジヌクレオチド、ルミクロム、ユビキノ、ヒドロキノ、2,6-ジクロロベンゾキノ、2-メチルベンゾキノ、2,5-ジヒドロキシベンゾキノ、2-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノ、グルタチオン、パーオキシダーゼ、チトクロムC、フェレドキシン等の生体酸化還元物質又はその誘導体、その他Fe-EDTA、Mn-EDTA、Zn-EDTA、メソスルフェート、2,3,5,6-テトラメチル-p-フェニレンジアミン、フェリシアン化カリウム等が挙げられる。これらのメディエータの濃度は、40 nM以上程度が好ましい。

上記の化合物の中では、1-M-PMS、DCIP、フェリシアン化カリウム及び9-ジメチルアミノベンゾ- α -フェナゾキソニウムクロライドが好ましい。

BODの測定は、有機物を含有しない緩衝液を用いて対極若しくは参照電極と作用電極との間を流れる電流を測定し、続いて測定試料あるいは前記緩衝液で希釈した測定試料液を用いて同様に電流を測定し、これらの電流の差を、標準試料を用いたときの電流の差と比較することにより行う。

センサを流れる電流は、微生物の種類、金属電極と微生物膜との接触面積、メディエータの種類及び濃度、対極と金属電極との間に負荷する電位差、BOD濃度等に依存するので、これらは予備実験を行って適宜設定するとよい。

本発明のBODセンサを有機物含有溶液に浸漬すると、センサの微生物膜中の微生物により、有機物が代謝される。その結果、電子が電子伝達系に移動する。対極と金属電極との間に電位差を負荷すると、電子が微生物膜から金属電極に移行する。その結果、電子が発生しないときと比べて得られる電流が異なる。この電流を計測することにより、有機物濃度、すなわちBODを測定することができる。

この際、試料溶液中又は微生物膜にメディエータを添加しておくこと、微生物から電子が金属電極に移行するのを促進するので、測定感度が向上する。

図面の簡単な説明

図1は、本発明のBODセンサを構成する作用電極の一実施例を示す断面図である。

図2は、本発明のBODセンサを用いたBOD測定系の一例を示す正面図である。

図3は、負荷電圧と電流値との関係を示すグラフ図である。

図4は、緩衝液濃度と電流値との関係を示すグラフ図である。

図5は、メディエータ(DCIP)濃度と電流値との関係を示すグラフ図である。

図6は、メディエータ(1-M-PMS)濃度と電流値との関係を示すグラフ図である。

図7は、メディエータの種類を変えたときのBODと電流値との関係を示すグラフ図である。

図8は、BOD測定検量線の一例を示すグラフ図である。

図9は、溶存気体がBOD測定に与える影響を示すグラフ図である。

図10は、メディエータとして8mMフェリシアン化カリウムを使用したときのBODと電流値との関係を示すグラフ図である。

図11は、メディエータとして40nM 9-ジメチルアミノベンゾ- α -フェナゾキソニウムクロライドを使用したときのBODと電流値との関係を示すグラフ図である。

図12は、メディエータとして80 nM 1-M-PMSを使用したときのBODと電流値との関係を示すグラフ図である。

図13は、電極素材を変えたときのBODと電流値との関係を示すグラフ図である。

図14は、微生物膜の微生物として大腸菌を用いたときBODと電流値との関係を示すグラフ図である。

図15は、微生物膜の微生物としてバチルス・ステアロサーモフィルスを用いたときBODと電流値との関係を示すグラフ図である。

図16は、微生物膜の微生物としてアシネトバクター・カルコアセチカスを用いたときBODと電流値との関係を示すグラフ図である。

図17は、微生物膜の微生物としてトリコスポロン・クタネウムを用いたときBODと電流値との関係を示すグラフ図である。

図18は、微生物膜の微生物としてグルコノバクター・サブオキシダンスを用いたときBODと電流値との関係を示すグラフ図である。

図19は、微生物膜の微生物としてシュードモナス・エルギノーサを用いたときBODと電流値との関係を示すグラフ図である。

図20は、低溶存酸素がBOD測定に与える影響を示すグラフ図である。

図21は、アガロースを用いて微生物菌体を金属電極に固定したBODセンサによるBODの測定を示す図である。

図22は、光架橋性ポリビニルアルコール (PVA-SbQ: polyvinyl alcohol stilbazole quaternized) を用いて微生物菌体を金属電極に固定したBODセンサによるBODの測定を示す図である。

図23は、グルタルアルデヒドを用いて微生物菌体を金属電極に固定したBODセンサによるBODの測定を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明の実施例を説明する。

実施例1 BODセンサ

はじめに、BODセンサを構成する作用電極の一例、及びこの作用電極を有するBODセンサを用いた測定系を、図1、2に基づいて説明する。

活性汚泥からスクリーニングされたバチルス属に属する微生物（L-GL3と命名した）を、0.3% K_2HPO_4 、0.1% KH_2PO_4 、0.03% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.5%硫酸アンモニウム、0.001%L-グルタミン酸、0.1%酵母エキスを含む培地80ml（pH7.0）に植菌し、30℃で48時間、振盪培養した。培養液を遠心して菌体と培地とを分離し、菌体を緩衝液（0.05Mリン酸pH7.0）で洗滌し、同緩衝液に懸濁させた。

上記で得られた菌懸濁液を多孔性アセチルセルロース膜1a（孔径0.45 μ m）で濾過し、膜面に菌体1bを付着させた。この膜1を微生物膜とし、テフロンチューブ8を被覆することにより側面を絶縁した直径3mmの円柱状の白金電極2の一方の端部に、膜の菌体1bが付着している面が接するように被せ、その上から透析膜1cで覆い、O-リング3で固定した（図1）。電極の他方の端部には、リード線4を銀ペーストで接着することにより結線した。リード線は、クリップ等を用いて金属電極に固定してもよい。上記リード線と金属電極との接続部位は、熱収縮チューブを被覆することにより絶縁した。金属電極の側面及びリード線との接続部位の絶縁は、以下の実施例においても上記と同様にして行った。

上記のように構成された作用電極20を用いて、以下のような測定系（3極法）（図2）によりBOD測定法の検討を行った。上記作用電極と参照電極5（Ag/AgCl電極）と対極（白金電極）7とをポテンシオスタット6に接続し、緩衝液を入れた試料槽9に浸漬し、BODセンサとした。参照電極と作用電極との間に定電圧を負荷し、流れる電流を計測した。次に、BOD標準液又はL-グルタミン酸溶液を添加し、同様に電流値を測定した。BODの測定中は、マグネチックスター10を用いて試料液を攪拌した。測定値は、レコーダ12で記録した。

実施例 2 至適電位の検討

上記測定系における至適負荷電位の検討を行った。試料液 30 を 40 nM DCIP、40 nM 1-M-PMS を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) とし、これを 5 ml 入れた試料槽中に BOD センサを挿入し、負荷電位を +200 mV ~ 1 V に設定し、一定濃度の有機物 (150 mg/l L-グルタミン酸) 40 μ l を添加し、電流値の増加を測定した。結果を図 3 に示す。

この結果から、+200 mV ~ 800 mV の間でほぼ等しい応答値を示し、上記条件下においてはこの範囲で測定するのが好ましいことがわかった。

実施例 3 緩衝液の至適濃度の検討

緩衝液濃度の検討を行った。リン酸緩衝液 (pH 7.0) の濃度を 10 mM ~ 200 mM の間で変化させ、負荷電位を +400 mV に固定した以外は実施例 2 と同様にして電流値の増加を測定した。結果を図 4 に示す。

この結果から、10 mM ~ 200 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0) では等しい応答値を示し、少なくともこの範囲で測定できることがわかった。

実施例 4 至適メディエータ濃度の検討 (1)

メディエータに DCIP 及び 1-M-PMS を用い、1-M-PMS が濃度 40 nM のときの至適 DCIP 濃度の検討を行った。リン酸緩衝液 (pH 7.0) の濃度を 0.01 M とし、負荷電位を +400 mV に固定し、DCIP 濃度を 10 ~ 80 nM の間で変化させた以外は実施例 2 と同様にして電流値の増加を測定した。結果を図 5 に示す。DCIP 濃度 10 nM 以上で良い応答値が得られた。

実施例 5 至適メディエータ濃度の検討 (2)

メディエータに DCIP 及び 1-M-PMS を用い、DCIP 濃度が 40 nM のときの至適 1-M-PMS 濃度の検討を行った。DCIP 濃度を 40 nM とし、1-M-PMS 濃度を 0 ~ 80 nM の間で変化させた以外は実施例 4 と同様にして電流値の増加を計測した。結果を図 6 に示す。

この結果から10 nM以上で良い応答値が得られることがわかる。

実施例6 メディエータが電流値に与える影響の検討

0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)5ml中に、メディエータとして1-M-PMSのみ40nM、DCIPのみ40nM、あるいは1-M-PMS及びDCIPを各々40nMとなるように添加し、これらの緩衝液またはメディエータを添加していない緩衝液にBODセンサを挿入し、さらに、BOD標準液(グルコース及びL-グルタミン酸をそれぞれ150mg/l含む混合溶液(BOD 220mg/l)：以下、単に「BOD標準液」という)を加え、電流を測定した。結果を図7に示す。

高濃度のBOD標準溶液添加では、メディエータなしでも小さいながら電流値の増加が得られた。しかし、メディエータを添加した方が、大きい電流値の増加が得られた。従って、本センサは、メディエータなしでもBOD測定が可能であるが、メディエータを添加した方がより効果があることが示された。

実施例7 BOD測定用検量線の作成

40nM DCIP、40nM 1-M-PMSを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)を5ml入れた試料槽中に、BODセンサを挿入し、+400mVの電位を負荷し、BOD標準液を添加し、電流値の増加を測定した。結果を図8に示す。

この結果から明らかなように、少なくとも1500mg/ml程度までは、電流値はBOD濃度に比例して増加し、本発明の方法により、BODを正確に測定できることがわかる。

実施例8 溶存酸素の影響の検討

本発明の方法に溶存酸素が与える影響を調べた。0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)5ml中に、窒素、酸素、空気をそれぞれ30分間通気し、DCIP及び1-M-PMSを各々終濃度が40nMとなるように添加し、BODセンサを挿入し、+400mVの電位を負荷し、BOD標準液を40μl添加し、電流

値の増加を測定した。同様に気体を通気せずに測定を行った。結果を図9に示す。

各種気体の通気の有無に関わらず、電流値は一定であり、本発明のBODセンサは、溶存酸素の影響を受けずにBODを測定できた。本発明のBODセンサは、従来のセンサのように、溶存酸素の減少量によりBODを測定するものではなく、有機物が代謝されることにより生じる電子を計測することによりBODを測定するものであることを支持するものである。

実施例9 他のメディエータの検討

0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)5ml中に、1-M-PMSのみ(80nM)、フェリシアン化カリウム(8mM)あるいは9-ジメチルアミノベンゾ- α -フェナゾキソニウムクロライド(40nM)を添加し、BODセンサを挿入し、さらに、BOD標準液を加え、電流を測定した。結果を図10~12に示す。

実施例10 電極素材についての検討

白金電極と同じく、径3mmの金、銀、カーボン電極を用いてBODセンサを作製し、実施例6と同様にBODの測定を行った。但し、参照電極を使用せず、作用電極と対極との間に電位差を負荷し、両電極間に流れる電流を測定した。結果を図13に示す。この結果から明らかのように、白金、金、銀、カーボン電極とも同様の結果が得られ、安定な金属あるいはカーボンの様な導電性の物質であれば測定可能であることがわかった。

実施例11 微生物膜に用いる微生物の種類の検討

(1) エシェリヒア・コリ (Escherichia coli : 大腸菌)

エシェリヒア・コリ JM109を37℃で12時間振盪培養し、ニトロセルロース膜に固定化して、これをPt電極に装着した。得られた作用電極と対極と参照電極から構成されるBODセンサを、メディエータ(1-M-PMS、DCIP各40nM)を含む緩衝液中に挿入し、BOD標準液を添加し、上記と同様にして電流値の増加を測定した。結果を図14に示す。

(2) バチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*)

バチルス・ステアロサーモフィルス IAM11602 を 45℃ で振盪培養して同様の実験を行った。結果を図 15 に示す。

(3) アシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinitobacter calcoaceticus*)

アシネトバクター・カルコアセティカス IFO12552 を 30℃ で培養して同様の実験を行った。メディエータにはフェリシアン化カリウム (8 mM) を使用した。結果を図 16 に示す。

(4) トリコスポロン・クタネウム (*Trichosporon cutaneum*)

トリコスポロン・クタネウム IFO10466 を 30℃ で培養して同様の実験を行った。メディエータには 1-M-PMS (80 nM) を使用した。結果を図 17 に示す。

(5) グルコノバクター・サブオキシダンス (*Gluconobacter suboxydans*)

グルコノバクター・サブオキシダンス IFO3172 を 30℃ で培養して同様の実験を行った。メディエータにはフェリシアン化カリウム (10 mM) を使用した。結果を図 18 に示す。

(6) シュードモナス・エルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)

シュードモナス・エルギノーサ IFO10466 を 30℃ で培養して同様の実験を行った。メディエータにはフェリシアン化カリウム (8 mM) を使用した。結果を図 19 に示す。

以上の結果から、異なる種類の微生物を用いても、本発明の方法により BOD を測定できることが明らかである。

実施例 12 溶存酸素の低い溶液中での BOD 測定

0.01 M リン酸緩衝液に窒素ガスを 30 分間通気させた後に、5 ml 緩衝液中に最終濃度 40 nM になるように DCIP 及び 1-M-PMS を添加した。これに実施例 1 と同様の BOD センサを挿入し、+400 mV の電位差をかけ、BOD 標準液を添加した。測定中、緩衝液中の溶存酸素のない状態又は低い状態を保つために液面に窒素ガスを吹き付けながら、電流値の増加を測定した。

窒素ガスを吹き付けたものと、通常通り測定したものとではほぼ同様の結果を

得た(図20)。よって、本発明のBODセンサを用いることにより溶存酸素の低いあるいはない溶液でもBODの測定が可能であることが示された。

実施例13 BODセンサの他の実施例

実施例1と同様にして培養して得られたL-G L 3株の菌体を、直径3mmの円柱状の白金電極の金属面に、アガロース、光架橋性ポリビニルアルコール(PVA-S b Q : polyvinyl alcohol stilbazole quaternized)又はグルタルアルデヒドを用いて固定化し、作用電極を作製した。これらの作用電極と、対極及び参照電極からなるBODセンサを用いて、BODの測定を行った。

(1) アガロース

アガロースを適当な濃度(例えば2%)となるように加熱溶解し、約60℃に保持しながら、これにL-G L 3菌体をリン酸緩衝液に懸濁させた懸濁液を混合した。こうして得られた菌体を懸濁させたアガロース溶液を、直径3mmの円柱状の白金電極の一方の端面に均一に付着させ、冷却し、作用電極とした。

この作用電極、対極及び参照電極を用いて、図1と同様の測定系によりBODの測定を行った。試料には前記BOD標準液を、メディエータには100nM 1-M-PMSを用いた。結果を図21に示す。

(2) PVA-S b Q

リン酸緩衝液に懸濁したL-G L 3懸濁液に、PVA-S b Q溶液を適量混合し、これを直径3mmの円柱状の白金電極の金属面に均一に付着させ、37℃で3時間暗所でインキュベートした。この後、蛍光灯を照射し、PVA-S b Qを架橋させた。

この作用電極を用いて、(1)と同様にしてBODの測定を行った。但し、メディエータには1mMフェリシアン化カリウムを用いた。結果を図22に示す。

(3) グルタルアルデヒド

リン酸緩衝液に懸濁したL-G L 3懸濁液にウシ血清アルブミン(BSA)を適量溶解させ、直径3mmの円柱状の白金電極の金属面に均一に付着させた。これを、約25%濃度のグルタルアルデヒド水溶液の蒸気に20分曝した後、リン酸緩衝液で3回リンスした。

- 14 -

この作用電極を用いて、(1)と同様にしてBODの測定を行った。但し、メディアータには80 nM 1-M-PMSを用いた。結果を図23に示す。

以上の結果から、金属電極に菌体を固定化する方法にかかわらず、本発明のBODセンサを用いてBODを測定することができることが明らかである。

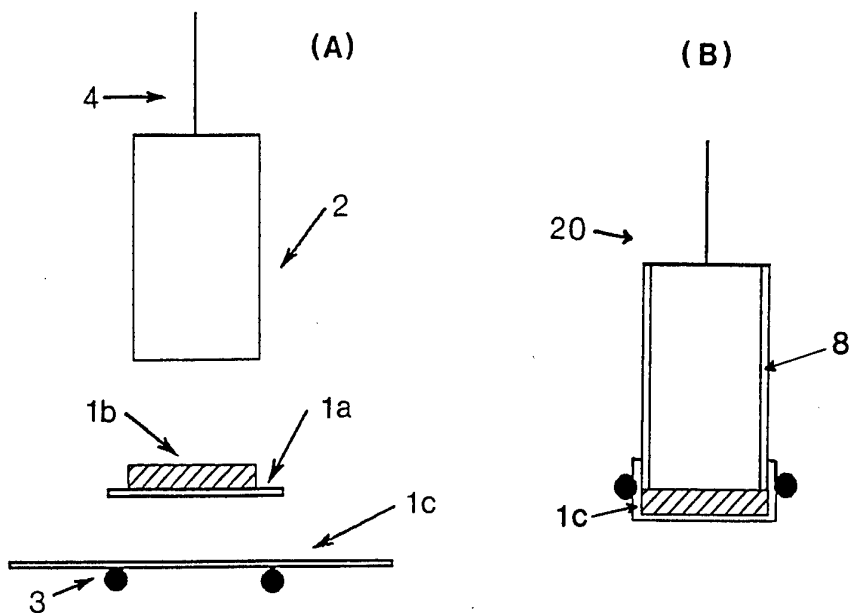
産業上の利用性

本発明のBODセンサを用いると、溶存酸素濃度に影響されることなく、BODを測定することができる。

請求の範囲

1. 金属又は炭素からなる電極並びにこの電極に当接された微生物菌体を含む有する薄膜からなる微生物電極と、対極とを有するBODセンサ。
2. さらに参照電極を有する請求項1記載のBODセンサ。
3. 前記微生物が前核生物であることを特徴とする請求項1又は2記載のBODセンサ。
4. 有機物を含有する溶液に、金属又は炭素からなる電極並びにこの電極に当接された微生物菌体を含む薄膜からなる作用電極と対極とを浸漬し、作用電極と対極との間に電位差を負荷したときに両電極間に流れる電流を計測することにより、この溶液のBODを測定する方法。
5. 請求項4において、前記溶液にさらに参照電極を浸漬し、作用電極と参照電極との間に電位差を負荷したときに両電極間に流れる電流を計測することにより、この溶液のBODを測定する方法。
6. 前記微生物が前核生物であることを特徴とする請求項4又は5に記載のBODを測定する方法。
7. 前記有機物を含有する溶液及び／又は微生物膜にメディエータを添加することを特徴とする請求項4～6のいずれか一項に記載のBODを測定する方法。
8. 前記メディエータが、1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルスルフォネート、2,6-ジクロロインドフェノール及びフェリシアン化カリウム、からなる群から選ばれることを特徴とする請求項6記載のBODを測定する方法。
9. 前記メディエータが、10nm以上の濃度範囲で添加されることを特徴とする請求項7記載のBODを測定する方法。

☒ 1



☒ 2 ✓

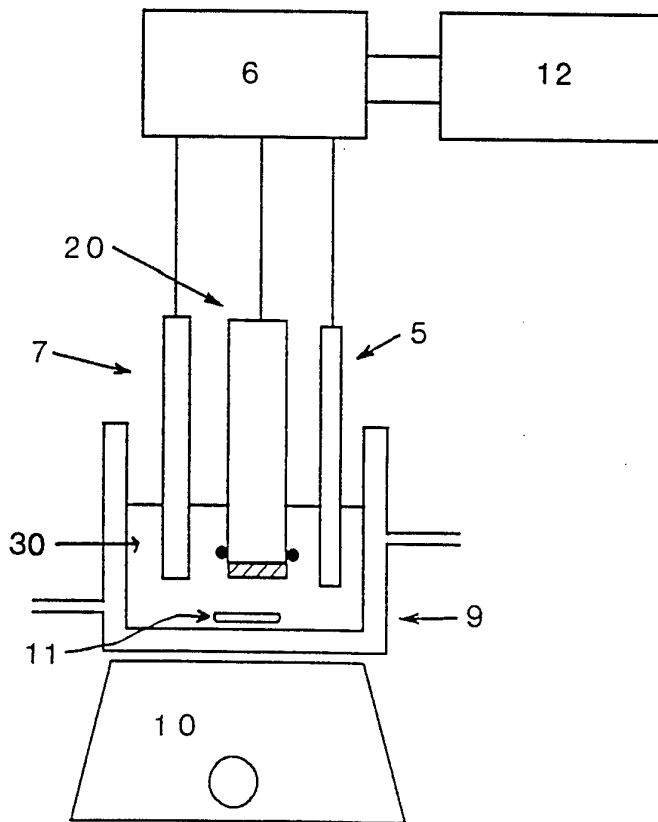


図3

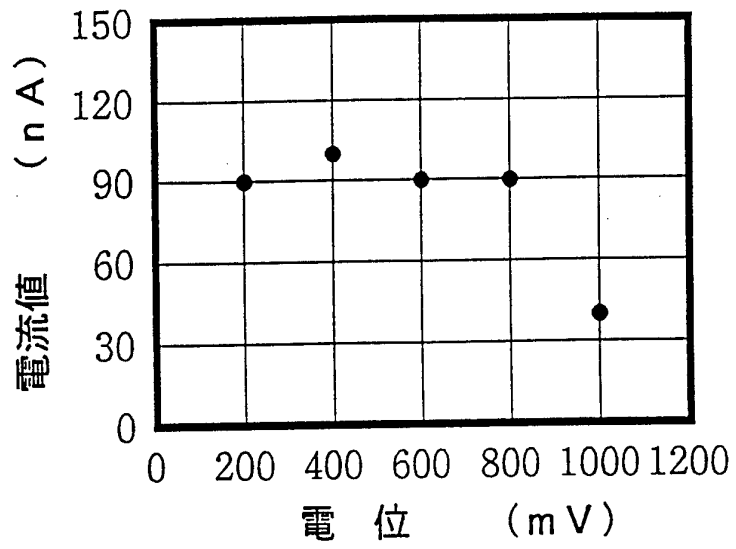
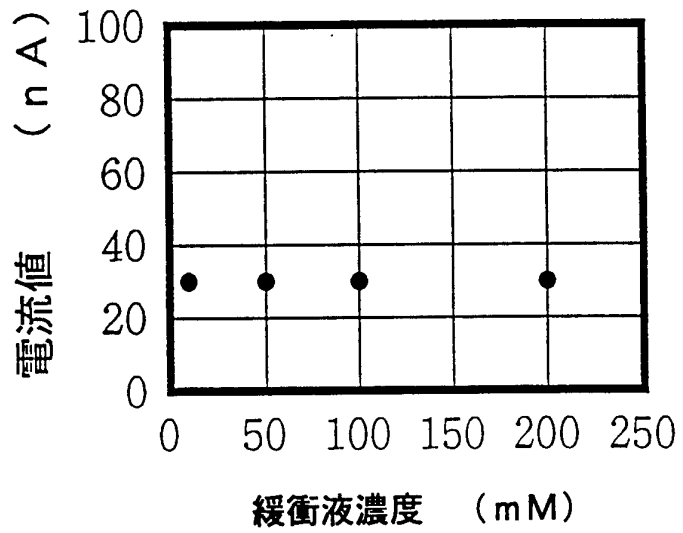


図4



3/11

図5

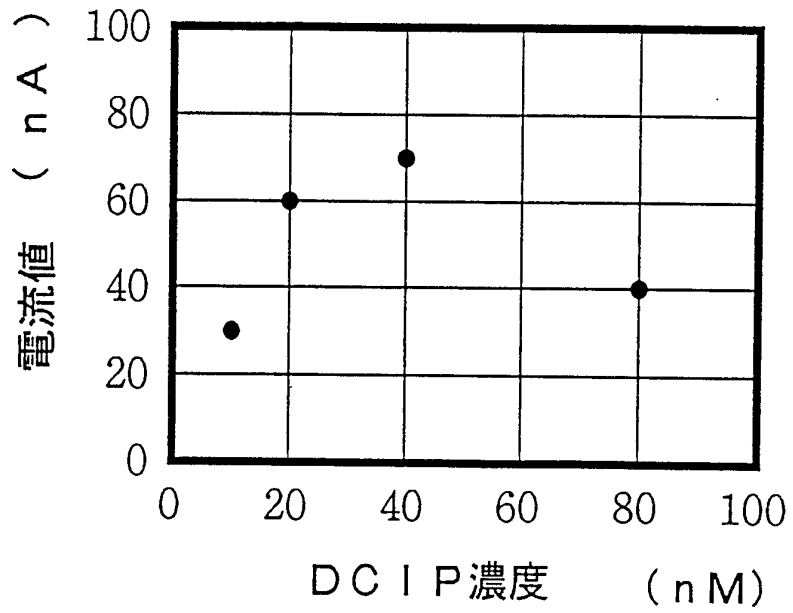
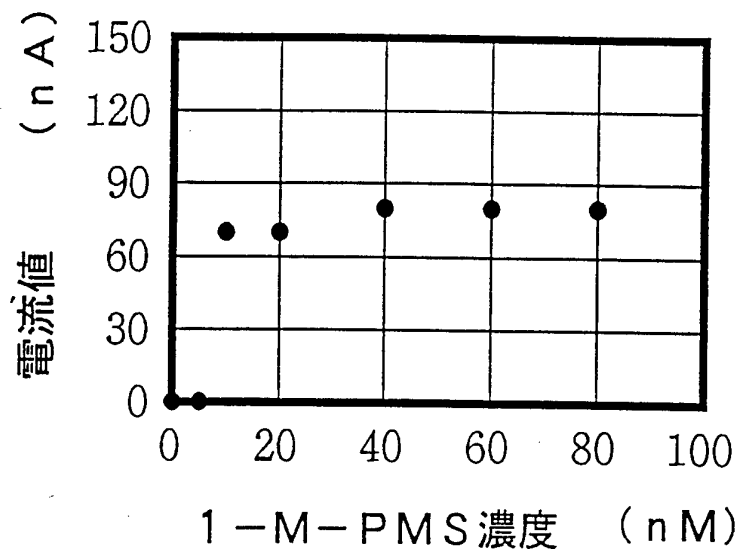


図6



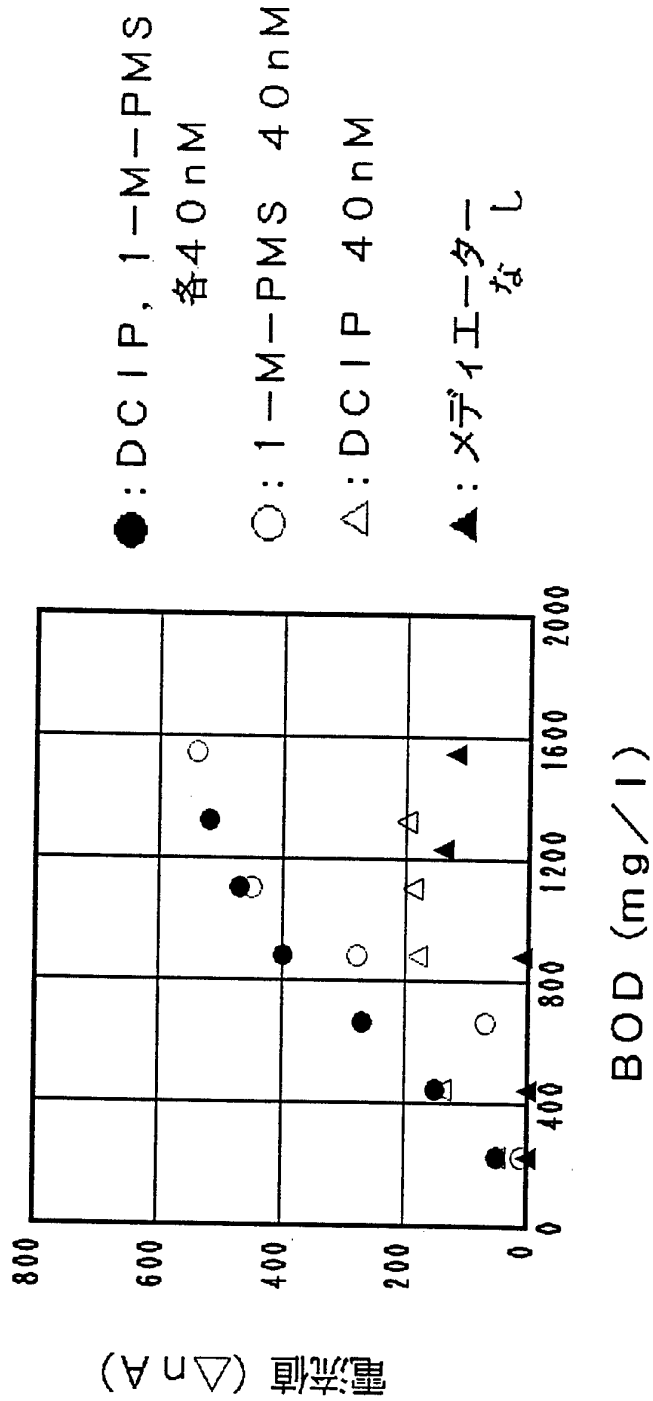


図7

図8

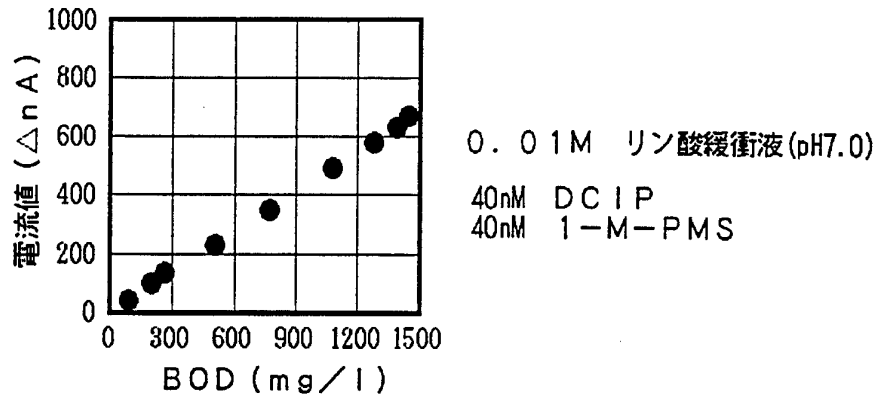


図9

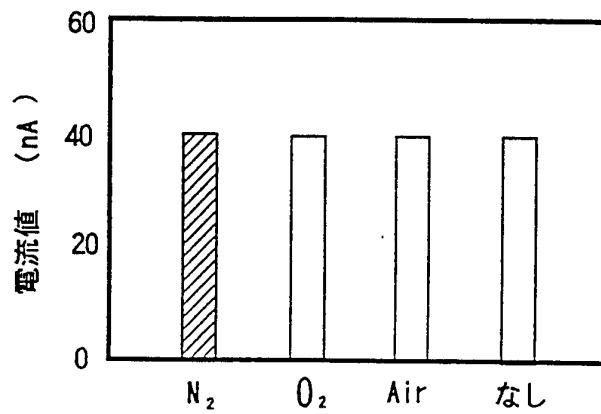


図10

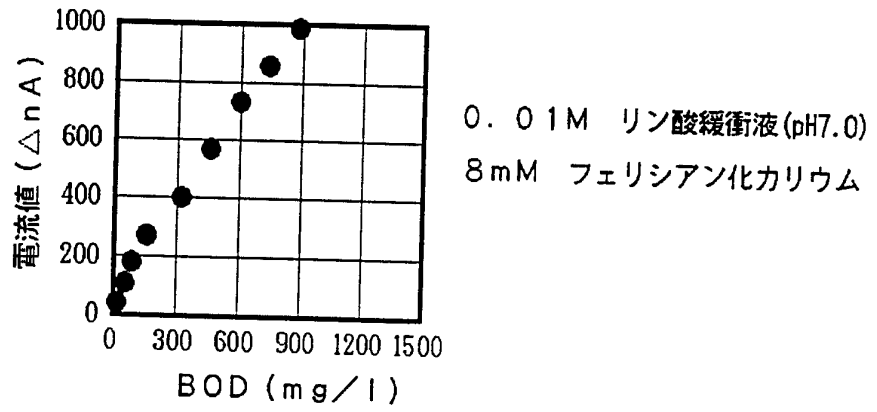


図11

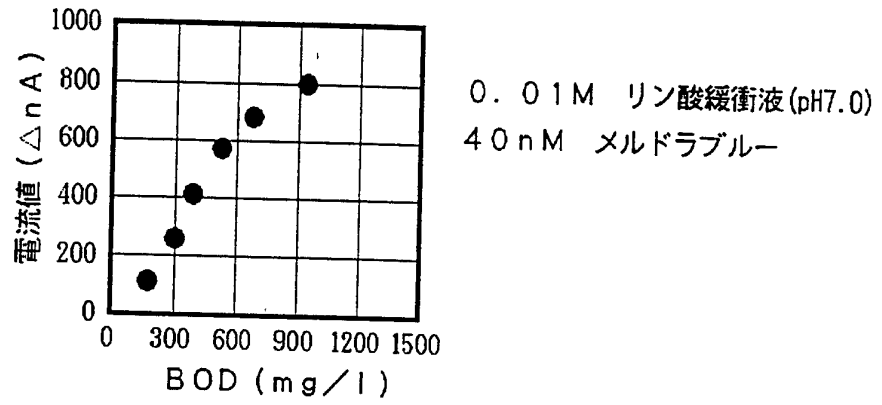


図 1 2

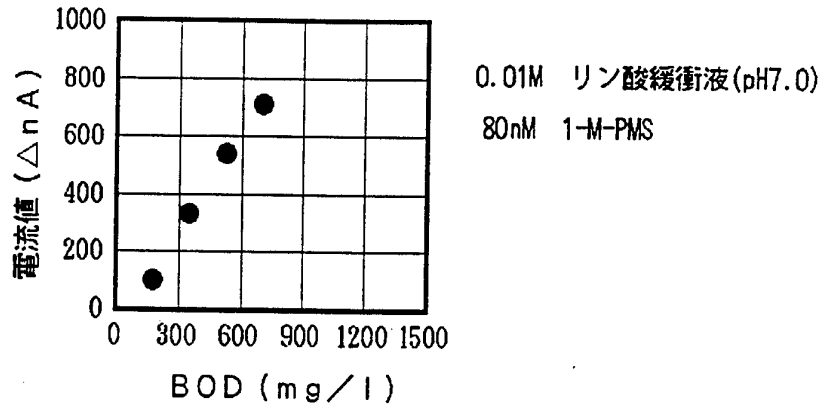


図 1 3

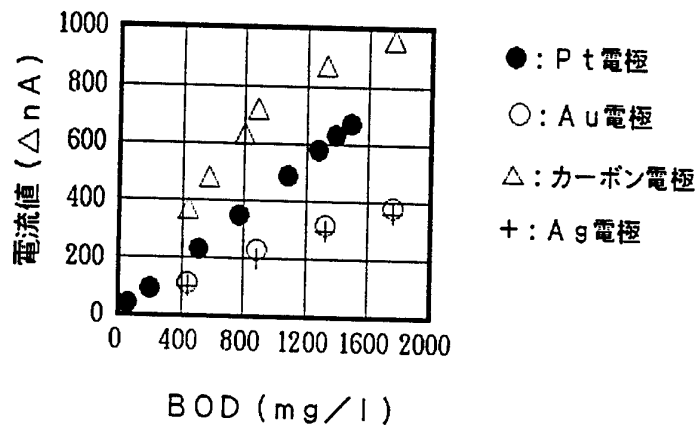


図14

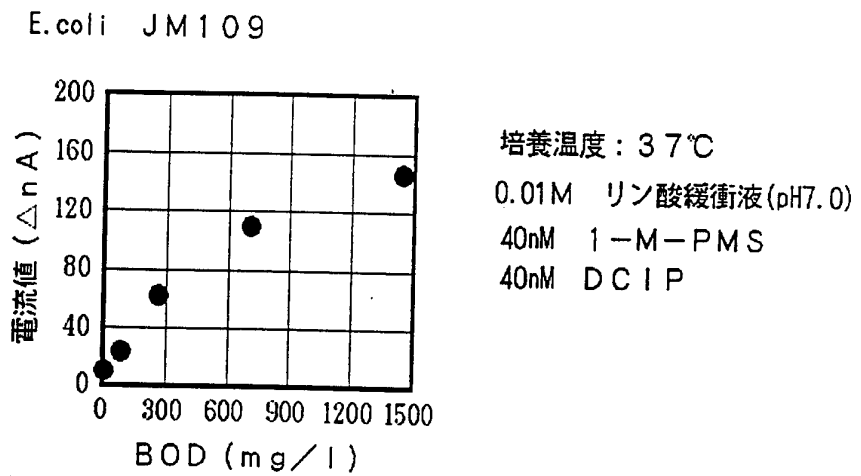


図15

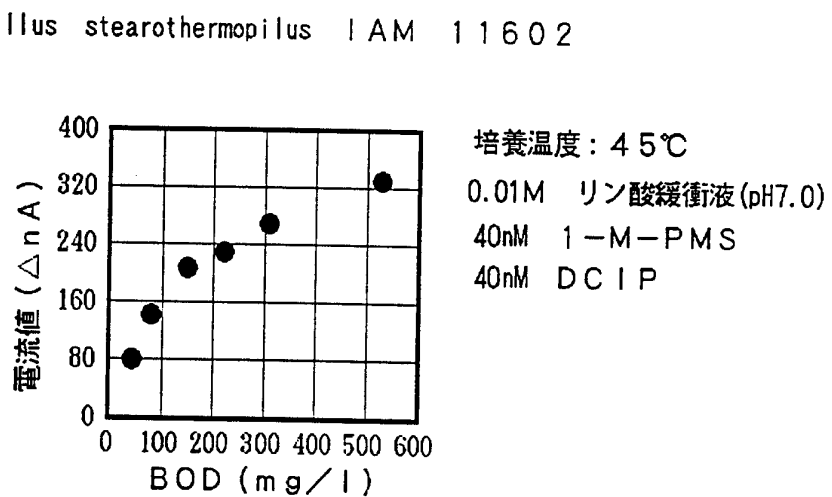
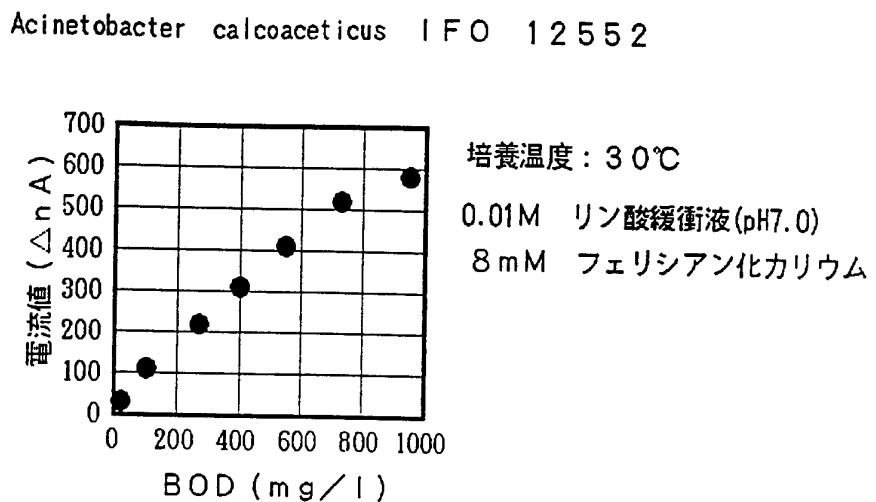
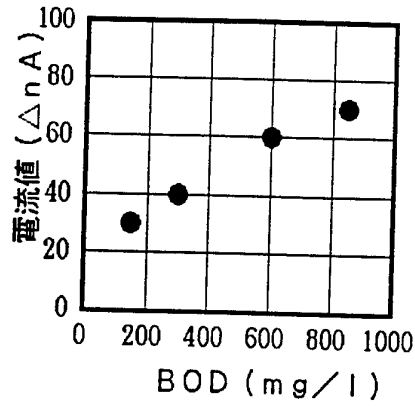


図16



Trichosporon cutaneum IFO 10466

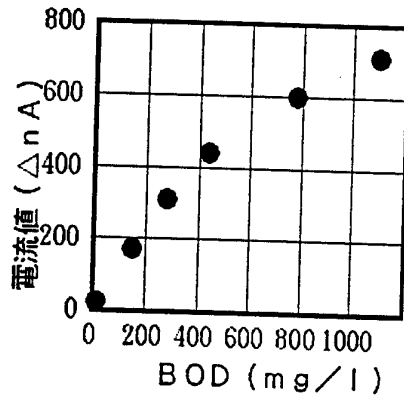
図17



培養温度: 30°C
 0.01M リン酸緩衝液 (pH7.0)
 80nM 1-M-PMS

Gluconobacter suboxydans IFO 3172

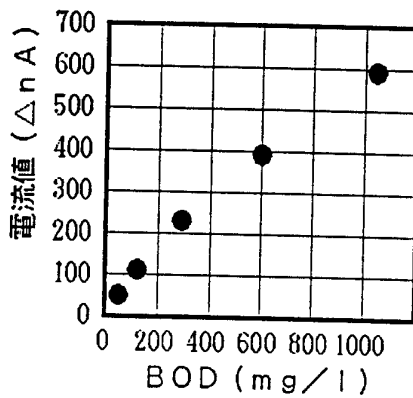
図18



培養温度: 30°C
 0.01M リン酸緩衝液 (pH7.0)
 10mM フェリシアン化カリウム

Pseudomonas aeruginosa IFO 3080

図19



培養温度: 30°C
 0.01M リン酸緩衝液 (pH7.0)
 8mM フェリシアン化カリウム

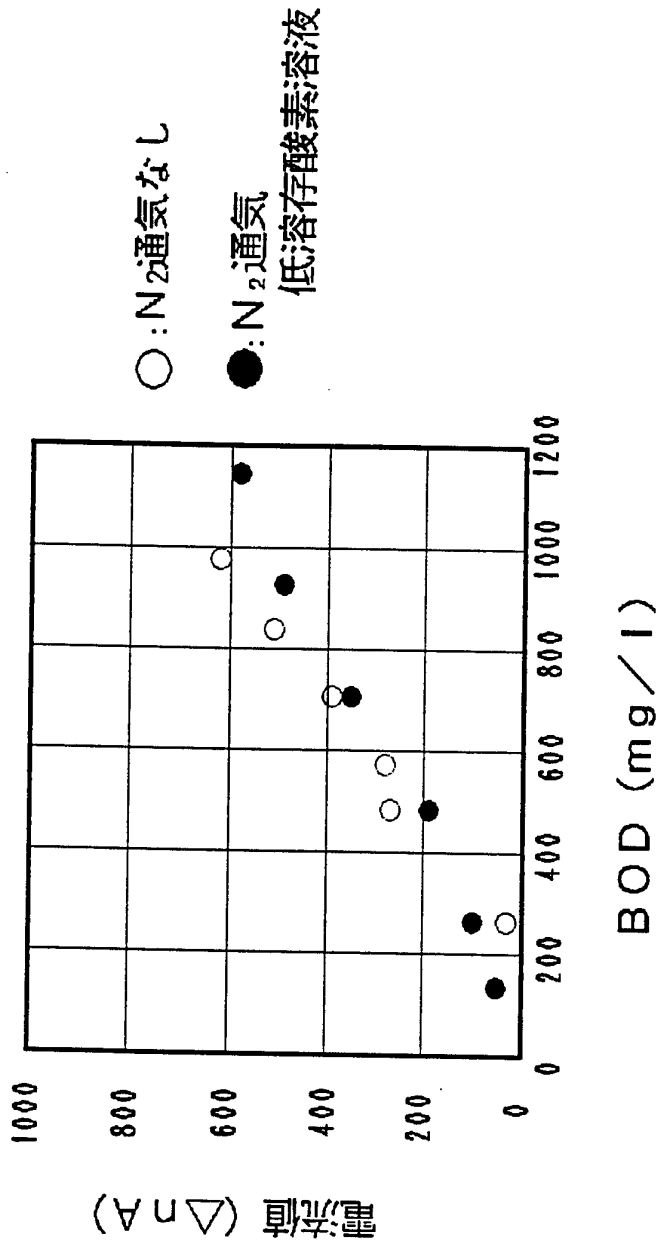


図20

図 2 1

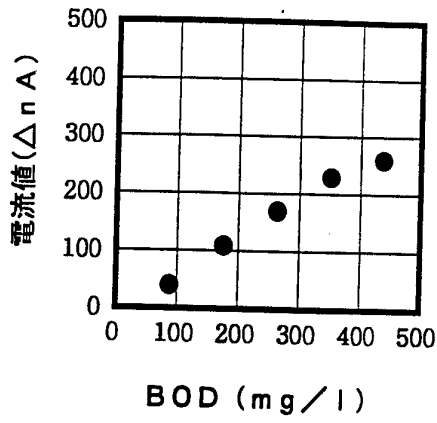


図 2 2

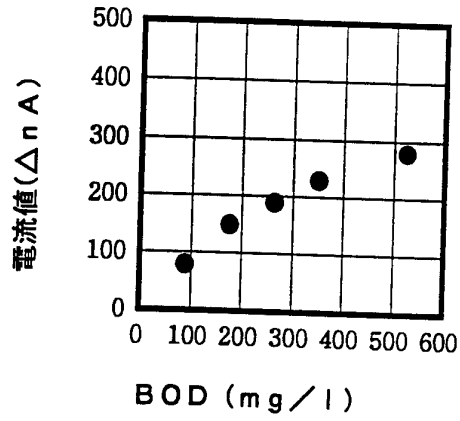
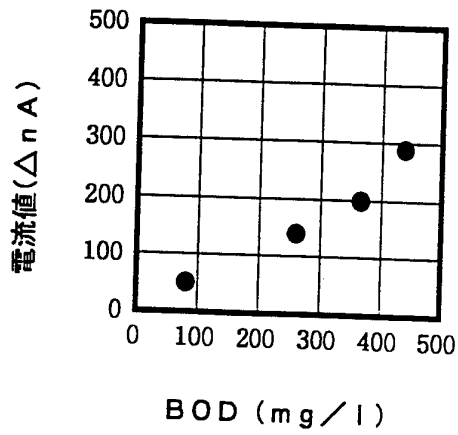


図 2 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/01418

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl ⁶ G01N27/327, G01N27/416		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int. Cl ⁵ G01N27/327, G01N27/416		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Jitsuyo Shinan Koho 1926 - 1994		
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971 - 1994		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 54-47699 (Ajinomoto Co., Inc.), April 14, 1979 (14. 04. 79), (Family: none)	1-6
A	JP, A, 4-337453 (Tamao Itsuki), November 25, 1992 (25. 11. 92), (Family: none)	1-6
A	JP, A, 4-42049 (Shinnippon Musen K.K.), February 12, 1992 (12. 02. 92), (Family: none)	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
October 7, 1994 (07. 10. 94)		October 25, 1994 (25. 10. 94)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁴ G01N27/327, G01N27/416

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁵ G01N27/327, G01N27/416

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1994年
日本国公開実用新案公報 1971-1994年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, A, 54-47699 (味の素株式会社), 14. 4月. 1979 (14. 04. 79) (ファミリーなし)	1-6
A	JP, A, 4-337453 (豊岐瑞雄), 25. 11月. 1992 (25. 11. 92) (ファミリーなし)	1-6
A	JP, A, 4-42049 (新日本無線株式会社), 12. 2月. 1992 (12. 02. 92) (ファミリーなし)	1-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 10. 94

国際調査報告の発送日

25. 10. 94

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

能 美 知 康 ㊞

2 J 9 3 1 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3250