

## 海水の BOD 測定に使用する好気性菌の活性度

堺市衛生研究所

松本 憲一 間宮 孝子 大橋 人士  
西谷 謙二 中島 邦夫

大阪市立環境科学研究所

鶴 保 謙 四 郎

(平成 3 年 7 月 8 日受付)

(平成 3 年 7 月 30 日受理)

---

Key words: biochemical oxygen demand, seawater,  
adenosine triphosphate

---

## 要 旨

堺市における臨海地域のある種の企業では、海水を機械の冷却水として取り入れている。そして、排出する際には、大阪府の公害防止条例（昭和49年改正）により Biochemical Oxygen Demand（生物化学的酸素要求量）規制の適用を受けている。しかし、海水を含む試料の BOD 測定法は、いまだ確立されていない。

そこで、我々は、その測定法を確立するため、使用する植種水中の好気性菌の活性度の強さと希釈水の検討を行った。

その結果、植種水には、一般細菌数が $10^3$ 個/ml 以上、Adenosin triphosphate が $0.50\mu\text{g/l}$  以上の値をそれぞれ示す活性のある培養海水を、また希釈水には人工海水をそれぞれ使用すれば良いことがわかった。

## I. 緒 言

海水を含む試料の BOD (Biochemical Oxygen Demand: 生物化学的酸素要求量 以下 BOD と略す) 測定法は、多くの問題点があるにもかかわらずその研究例は少なく、また文献も若干見られるだけである。さらに工場排水試験方法 (JISK0102-1986<sup>1)</sup>; 以下 JIS 法と略す) としては、まだ確立された測定方法が見つかっていないのが現状である。しかし、当所では、このような試料の BOD 測定の検査依頼がときにみられるため、より正確な BOD 測定方法を確立する必要がある。

海水を含む試料の BOD 測定においては、まず

適切な条件の植種水、希釈水を使用しなければならない。

今回、1 年間を通じて安定した BOD 値を得るために、検討を加え使用する植種水中の好気性菌及びその活性度の強さを調査し、また、希釈水として人工海水（アクアマリン）を常時使用することを試みた。

その結果、海水を含む試料の BOD 測定に良好な結果を得たので報告する。

## II. 材料と方法

## 1. 実験材料

BOD 標準物質<sup>1)</sup>: 和光純薬（株）製のブドウ糖（無水）及び L-グルタミン酸の各 $150\text{mg/l}$  に調整した混合溶液を使用した。JIS 法で測定したこの溶液の BOD 値は、 $220 \pm 10\text{mg/l}$  を示した。

---

別刷請求先: (〒590) 堺市甲斐町東 3 丁目 2 番 8 号  
堺市衛生研究所 中島 邦夫

平成 4 年 1 月 20 日

植種水：天然海水及び河川水を使用した。河川水としては、大和川の河川水を用いた。天然海水としては、堺市の石津漁港（塩素イオン濃度が17,000mg/l以上）の海水を用いた。

生海水：天然海水を JIS No. 1ろ紙でろ過したものを使用した。

人工海水：和光純薬（株）製のアクアマリンを使用した。

培養海水：和光純薬（株）製のブドウ糖（無水）、和光純薬（株）製のポリペプトン各0.27gを生海水3lに溶解し、さらに JIS No. 1ろ紙でろ過した河川水300mlを加え、その後20℃恒温槽内において、エアポンプで酸素が飽和状態になるようにばっ気を行い放置したものを用いた。

トリス緩衝液：和光純薬（株）製のトリスヒドロキシメチルアミノメタンの特級2.95gを蒸留水に溶解し、塩酸で pH 値を7.74に調整して1lとした。

Firefly Lantern Extract 溶液：シグマ社製の FLE-50をトリス緩衝液10mlに溶解し、3時間放置後上澄み液を使用した。

Adenosine Triphosphate（アデノシン-3-リン酸、以下 ATP と略す）標準液：和光純薬（株）製のアデノシン-3-リン酸 2 ナトリウム、2 水和物、生化学用1.0gを使用時トリス緩衝液で溶解した。

## 2. 実験方法

BOD 測定法：JIS 法に準じて行った。

一般細菌数の測定：上水試験法<sup>2)</sup>に従って行った。培地は、標準寒天培地を蒸留水及び生海水でそれぞれ溶解したものを用いた。

ATP の測定<sup>3)</sup>：培養海水を適量取り、ミリポアフィルター（0.45μm）によってゆっくりろ過し、吸引し過ぎないように注意する。その後、少量の蒸留水で洗浄する。次に沸騰したトリス緩衝液10 mlの中へ、ミリポアフィルターを5分間浸漬し ATP を抽出する。直ちに氷水で冷却後10ml用スピッツグラスに移し入れ、トリス緩衝液を加え正確に10mlとした後、遠心分離（3,000回転、5分間）を行った。その後、上澄み液を別の小試験管に移し、測定時まで凍庫（-20℃）中に保存した。

測定に際しては、硬質ガラス製の測定容器に Firefly Lantern Extract 溶液 1ml を入れ、次に冷

凍庫から取り出し解凍したものを1mlすばやく投入し、作成した暗箱に入れフタをする。ストップウォッチを用い10秒後フォトカウンター（浜松ホトニクス社製の C-1230）のスイッチを押しカウントを開始する。

生物発光の測定は、フォトカウンターを使用して10秒間の計数値の平均を1秒間当たりのカウント数で表示する。ATP 標準液についても同様に操作し、両対数用紙に検量線を作成し、試料濃度を求めた。

## 3. 実験期間

BOD 測定及び一般細菌数の測定は、昭和62年から平成2年の4年間のうち特に夏期と冬期に分けて実施した。

次に、ATP 測定は平成元年から平成2年の2年間に夏期と冬期に分けて実施した。

## III. 成 績

海水を含む試料の BOD 測定は、適切な条件の植種水、希釈水を使用しなければならない。そのため、以下の方法で検討を行った。

1. 天然海水を植種水とし、人工海水を希釈水とした場合の BOD 測定

堺市内の石津漁港の天然海水を植種水とし、人工海水を希釈水として、1年間のうち夏期と冬期に分けて BOD 測定を行った。また、天然海水の一般細菌数の検査も行い、その結果を Table 1 に示した。

夏期（8月、9月）では、天然海水の BOD 値が

Table 1 Biochemical Oxygen Demand value and the general bacteria count of natural Seawater and Biochemical Oxygen Demand value of the standard substance in the summer and winter season

		BOD		BOD of standard substance (mg/l)	General bacteria count (cells/ml)
		(mg/l)	Volume of sample (ml)		
Summer	Aug.	4.1	250	229	1.9×10 <sup>5</sup>
	Sept.	2.1	250	216	2.3×10 <sup>5</sup>
Winter	Feb.	0.9	250	243	1.0×10 <sup>4</sup>
	Mar.	0.8	250	237	1.0×10 <sup>5</sup>

4.1mg/l, 2.1mg/l となり, 一般細菌数がそれぞれ  $1.9 \times 10^5$  個/ml,  $2.3 \times 10^5$  個/ml であった。また, そのときの標準物質の BOD 値がそれぞれ 229 mg/l, 216mg/l となり, JIS 法の規定する BOD 値  $220 \pm 10$ mg/l の範囲内であった。

冬期(2月, 3月)では, 天然海水の BOD 値が 0.9mg/l, 0.8mg/l となり, 一般細菌数がそれぞれ  $1.0 \times 10^4$  個/ml,  $1.5 \times 10^3$  個/ml であった。そのときの標準物質の BOD 値がそれぞれ 243mg/l, 237mg/l となり, JIS 法の規定する BOD 値  $220 \pm 10$ mg/l の範囲内には入らなかった。

そこで, 冬期でも植種水として使用可能にするため, 天然海水中の細菌を培養することを試みた。

天然海水を JIS No. 1ろ紙でろ過したもの3lに, 栄養源としてブドウ糖, ポリペプトンをそれぞれ検討した結果, 至適濃度として 0.27g 加え溶解し, さらに JIS No. 1ろ紙でろ過した河川水 300 ml を加えた後, 温度(20℃), pH 値(7.2), エアerpンプで充分ばっ気を行い, 酸素飽和の状態にして連続培養を行った。このようにして植種水としての培養海水が得られた。

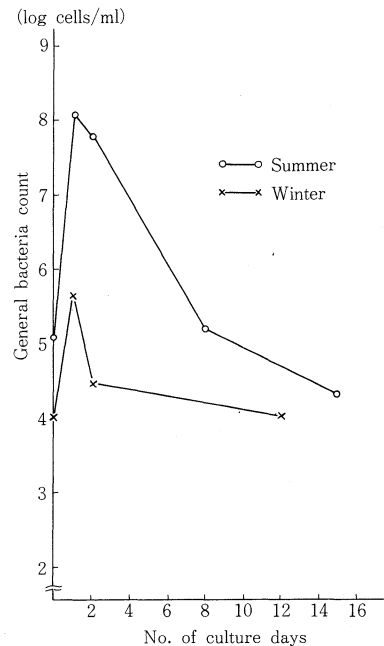
## 2. 培養海水を植種水とし, 人工海水を希釈水とした場合の BOD 測定

植種水中の好気性微生物のうち特に細菌の影響を知るため, 培養海水中の一般細菌数の経日変化を調査し Fig. 1 に示した。

培養 1 日目において一般細菌数が最も多く, その後少しずつ減少する傾向があった。Fig. 1 より, 細菌の活性があるのは, 一般細菌数が多い状態つまり培養 1 日目以降ではないかと推測した。

次に, 夏期, 冬期における培養中の培養海水を植種水として BOD 測定を行った結果, Table 2

Fig. 1 A change with the passage of day of the general bacteria count in the incubation Sea-water.



に示す成績となった。即ち, 標準物質の BOD 値は培養 1 日目以後のものが殆ど  $220 \pm 10$ mg/l の範囲内に入った。

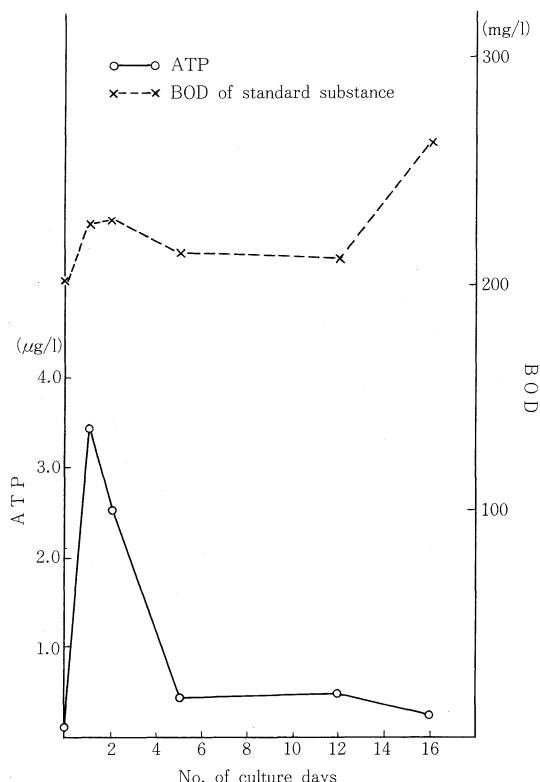
植種水としては培養 1 日目以後の培養海水, 希釈水としては人工海水をそれぞれ用いることにより, JIS 法に規定されている標準物質の BOD 値が  $220 \pm 10$ mg/l の範囲内に入ることが確認できた。

冬期では, 培養期間の長い培養海水を植種水としたときには, 標準物質の BOD 値が  $220 \pm 10$ mg/l の範囲内に入らなかった。その原因は, 細菌の活

Table 2 The relation between (Biochemical Oxygen Demand)<sub>s</sub> value of the standard substance and the number of culture days of the incubation Sea-water as the culture solution

		No. of culture days					
Summer	Original	1	2	5	8	15	
	BOD <sub>s</sub> (mg/l)	188	210	217	223	212	211
Winter	Original	1	2	5	12	16	
	BOD <sub>s</sub> (mg/l)	200	227	229	214	211	262

Fig. 2 The relation between the number of culture day and ATP of incubation Seawater and (Biochemical Oxygen Demand)<sub>5</sub> value of the standard substance.



性によるものと考えられるため細菌の活性について調査した。

### 3. 細菌の活性について

培養海水中的の細菌の活性について調査するため、特に冬期において検討を試みた。

そのため、生細胞中にのみ存在する化学物質であり、細胞が死滅すると迅速に分解する ATP 量を測定すれば良いと考えた。

培養海水中的の ATP 量の経日変化を測定し、またそのときの標準物質の BOD<sub>5</sub> (5 日間の BOD 値)を測定したので、その結果を Fig. 2 に示した。Fig. 2 において、培養海水中的の ATP 量は、培養 1 日目が最も多く、その後減少する傾向がみられた。

## IV. 考 察

BOD 測定は、通常、植種水に河川水、希釈水に蒸留水とイオン交換水の混合したものに栄養源及

び pH 緩衝液を加えたものを使用して行っている。しかし、海水を含む試料の BOD 測定は、適切な条件の植種水、希釈水が必要となる。

竹本ら<sup>4)</sup>は、植種水、希釈水に検討を加え、良好な BOD 結果を得たことを報告している。しかし、現実にはその成果の可否について確認する必要がある。このことに関し、1 年間のうち夏期、冬期において植種水として使用できるためには、植種水中の好気性微生物のうち特に細菌が BOD 測定に関与<sup>5)</sup>すると言われている。

我々は、植種水として使用する好気性菌の活性度の強さ及び希釈水として使用する人工海水についての検討を行った。

植種水としては、天然海水 (塩素イオン濃度の高い堺市の石津漁港の海水) を用い、希釈水として塩素イオン濃度を一定にするため、人工海水を用い 1 年間のうち夏期、冬期において BOD 測定を行った。

植種水として使用する天然海水は、夏期 (8 月、9 月) では、一般細菌数が  $10^5$  個/ml 程度とかなり多く、これを使用しての標準物質の BOD 値が JIS 法の規定範囲内であった。

冬期 (2 月、3 月) では、一般細菌数が  $10^1$  個  $\sim 10^3$  個/ml 程度と少なく、これを使用しての標準物質の BOD 値は JIS 法の規定範囲内に入らなかった。

その結果、冬期では、天然海水をそのまま植種水として用いることができないと判断した。

冬期でも植種水として使用可能にするためには、天然海水中的の細菌が BOD 値に大きく関与<sup>5)</sup>していると言われており、その細菌を培養することを考えた。天然海水に分解されやすくしかも有機物量の少ない栄養源を加えることにより培養海水を調整した。

したがって、植種水としては培養海水を、希釈水としては人工海水をそれぞれ使用して BOD 測定を行った。その結果、JIS 法に規定されている標準物質の BOD 値は、 $220 \pm 10 \text{ mg/l}$  の範囲内に入った。

通常、植種水として使用している河川水は、一般細菌数が培養海水よりも少ないときもあるにも

にかかわらず、標準物質の BOD 値が JIS 法に規定されている  $220 \pm 10 \text{ mg/l}$  を示した。

このことは、植種水中の細菌の活性に関係すると考えられ、細菌が活性のある状態のものを植種水として使用し、BOD 測定を行えば良いと考えた。

したがって、培養海水中の細菌の活性を調査するには、生細胞中にのみ存在する化学物質であり、細胞が死滅すると迅速に分解する ATP 量を測定すれば良いと考えた。一細胞あたりの ATP 量は、種々の微生物についてほぼ一定 ( $\text{約 } 0.5 \times 10^{-15} \text{ g ATP/cell}$ ) であり、バクテリアの生物量及び活性の間接指標として用いられている。

次に、培養海水中の ATP 量の経日変化と標準物質の  $\text{BOD}_5$  値との関係をみれば、培養 1 日目から 12 日目までは、JIS 法に規定されている標準物質の  $\text{BOD}_5$  値  $220 \pm 10 \text{ mg/l}$  の範囲内に入っているが、培養初日と培養 16 日目は、 $\text{BOD}_5$  値  $220 \pm 10 \text{ mg/l}$  の範囲内に入っていなかった。

JIS 法で規定されている標準物質の BOD 値を示すには、培養海水を植種水として使用する場合、ATP 量が  $0.50 \mu\text{g/l}$  以上必要と考えられた。

今回調査した結果、ATP 量は  $0.50 \mu\text{g/l}$  以上であり、そのときの一般細菌数は  $10^3$  個/ml 以上であれば、JIS 法に規定されている標準物質の BOD 値  $220 \pm 10 \text{ mg/l}$  を示した。

以上のような条件を満たした植種水を用いることにより、より正確な BOD 値を得ることが可能となった。

今後我が国において、この測定方法により瀬戸内海等の海水の汚濁の指標として、COD (Chemical Oxygen Demand: 化学的酸素要求量) と同様 BOD も汚濁の指標として採用可能であると思われる。

本稿を終えるにあたり、ご指導、ご協力を頂いた竹本修明氏(大阪府立消防学校、前大阪府公害監視センター)、山本康次氏、中野 仁氏(大阪府立公衆衛生研究所)、愛川幸平氏、原 嘉造氏(前、堺市衛生研究所)をはじめ堺市衛生研究所の微生物担当の方々に深謝いたします。

本研究は、昭和63年度財団法人「大同生命厚生事業団」の第15回医学研究助成金の援助を受けた。

#### 文 献

- 1) 工場排水試験方法: JIS-KO102, BOD, p. 47—51, 1986.
- 2) 上水試験方法: 日本水道協会, 一般細菌, p. 605—606, 1985.
- 3) 竹本修明, 田中秀穂, 望月京司, 杉前昭好, 中本雅雄: 各種試料中の ATP 分析について, 大阪府公害監視センター調査研究編, No. 7, p. 110—115, 1984.
- 4) 竹本修明, 三谷悦朗, 松下千明, 田吹伸朗, 久下芳生, 浅田真吾: 海水を含む工場排水の BOD について, 公害と対策, 14(9): 77—85, 1978.
- 5) 萩原耕一: BOD 試験法解説(改訂版), p. 68, 續文堂, 1977.

### Activation of Aerobic Bacteria Used as BOD Measurement of Seawater

Kenichi MATSUMOTO, Takako MAMIYA, Hitoshi ÔHASHI,  
Kenji NISHITANI & Kunio NAKAJIMA  
Sakai City Institute of Public Health  
Kenshirou TSURUHO

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences

Waste of seawater used for cooling water for machines in some kinds of industries in a littoral district in Sakai City, comes under the application of BOD control of the pollution control ordinance in Osaka Prefecture. But unfortunately the BOD measurement method of seawater sample has not been established.

In order to establish the measurement method, we studied the strength of activation of aerobic bacteria in the incubation water used and the dilution water.

From our results it was proved that we can use the incubation seawater consisting of more than  $10^3$  cells/ml general bacteria count and more than  $0.50 \mu\text{g/l}$  ATP (Adenosin triphosphate) as the incubation water and the artificial seawater as the dilution water.