B−63 環境サンプル測定のためのリン酸マイクロセンサーの開発

○谷内　翔[1]・宮崎　悠爾[1]・押木　守[1]・佐藤　久[1]*・高橋　正宏[1]・岡部　聡[1]

[1]北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門（〒060-8628 北海道札幌市北区北 13 条西 3 丁目）
＊ E-mail: *qsatoh@eng.hokudai.ac.jp*

1. はじめに

マイクロセンサーは，現在のところ最も非侵襲的に環境中に存在する生物膜内の物質濃度を定量できるツールの一つである．今までに 30 種類以上のマイクロセンサーが開発されてきた [1-3]．環境工学分野では炭素循環と窒素循環の解析が重要であるため，HCO_3^-，NH_4^+，NO_2^-，NO_3^-，N_2O，NO 等のマイクロセンサーが開発され使用されてきた．これに対し，炭素や窒素と同様に環境工学分野で重要な元素であるリンに関するマイクロセンサーの開発は遅れている．リン酸は栄養塩の一つであり，水域に過剰に流出すれば富栄養化を引き起こし，生物学的処理プロセスでは生物の増殖に影響を及ぼすため，その挙動を把握することは極めて重要である．リン酸は有機態リンの分解により生成され，一方で生物の摂取により消費される．従って，リン濃度はバイオフィルム内などのミクロな領域において時間的にも空間的にもダイナミックに変動していると考えられる．このようなミクロ領域のリン酸濃度を定量するためにはリン酸マイクロセンサーの開発が不可欠である．

Lee *et al.*[1]は，コバルト線を直径 10 μm 以下に調整した後にガラス管でコーティングし，先端のみを露出させ，露出させたコバルト線表面でリン酸の酸化還元反応を起こすことによりリン酸濃度を定量する酸化還元型リン酸マイクロセンサーを開発した．このセンサーは総リン酸（リン酸の化学種 H_3PO_4，$H_2PO_4^-$，HPO_4^{2-}，PO_4^{3-}の総和，T-PO_4と記す）に応答し，T-PO_4検出濃度範囲は 10 μM から 100 mM であった．しかしながら，このセンサーは検出原理が酸化還元反応に基づくため，溶存酸素（DO）やアルカリ度（$CaCO_3$）により妨害を受けた．DO やアルカリ度は環境サンプルの測定時に変動する可能性が高く，正確なリン酸濃度の測定のためには環境因子により妨害を受けにくいリン酸マイクロセンサーの開発が不可欠である．そこで本研究では，Lee et al.が開発したリン酸マイクロセンサーとは測定原理が異なる，イオン選択性液膜（Liquid Ion eXchanger ; LIX）を用いたリン酸マイクロセンサーを開発した [4]．LIX 型センサーは使用するイオノフォアによって大きく性能が変化する．本研究では複数のリン酸選択性イオノフォアを用いてリン酸マイクロセンサーを作製した．これらセンサーの特性（検量線の傾き，検出濃度範囲，選択性，レスポンスタイム，安定性，流速の影響，DO の影響）を既往のリン酸マイクロセンサーのものと比較した．

2. 実験方法

LIX 型リン酸マイクロセンサーは green glass と soda lime glass を用いて作製した [2,3]．green glass をバーナーで熱して細くした後，green glass と soda lime glass をバーナーで熱して融解させ結合させた．green glass の先端を熱したニクロム線で溶解させながら引き，先端径を約 10 μm に調整した．150°C のオーブンで 3 時間乾燥させた後，一晩シラン処理し，シラン溶液を除去するためにさらに数時間オーブンで乾燥させた．シリンジを用いて後部から内部液を注入した後に先端から LIX を吸引した [3]．さらに，パスツールピペットで製作したケーシングの後部からマイクロセンサーを挿入し，マイクロセンサーの先端をケーシングから約 2 cm 突出させた状態で固定した．ケーシング内には 300 mM 塩化カリウム溶液を満たし，これに遮へい電極として接地端子に接続した塩化銀被膜された銀線を挿入した．

LIX は，*o*-nitro phenyl octyl ether（(株)同仁化学研究所）にイオノフォアを添加して作製した．イオノフォアとして tributyltin chloride（和光純薬工業株式会社）（4%(w/w)）を用いた LIX を BU-4 と称する．イオノフォアとして tribenzyltin chloride（和光純薬工業株式会社）（3%(w/w)）を用いたものを BE-3 と称する [5]．BU-4 には，イオノフォアに対してモル比で 25%となるように sodium tetrakis [3,5-bis(trifluoromethyl)-phenyl]borate（Fluka）を添加した．BU-4 の内部液には 100 mM NaCl 溶液を，BE-3 の内部液には pH を 7.0 に調整した 10 mM KH_2PO_4溶液を用いた．検量線は T-PO_4濃度を 0.1 μM から 10 mM の範囲で調整したリン酸標準溶液を用いた．T-PO_4濃度は Standard Methods に従って測定した．センサーの起電力（EMF）は pH 計（pH/ION METER F-23，堀場製作所）を用いて測定した．

3. 結果および考察

Figure 1 にリン酸マイクロセンサー（BU-4 および BE-3）の検量線を示す．検量線の傾きの平均値は，BU-4 が -10 mV/log(HPO_4^{2-})，BE-3 が -24.8 mV/log(HPO_4^{2-})であり，BE-3 の方が，ネルンストの式から求められる理論値（-29 mV/log(HPO_4^{2-})）により近い値となった．検出範囲は，BU-4 が 43 μM から 2.3 mM，BE-3 が 4.4 μM から 4.6 mM であった．以上の結果から BE-3 は BU-4 よりもセンサーとしての性能が優れている事が分かった．**Figure 2** にリン酸マイクロセンサー（BE-3）の T-PO_4 濃度の時間変化に対するレスポンスを示した．リン酸マイクロセンサーを T-PO_4 濃度が 10 mM の標準液に浸し，検出電圧が定常に達するまで待った．その後，T-PO_4 濃度が異なる標準液を用いて，センサーのレスポンスを検討した（**Figure 2**）．センサーは標準液の濃度の変化に対し瞬時に反応した．この結果から，90%レスポンスタイムは 60 s であることが明らかとなった．ドリフトは約 2 mV/h であった．BU-4 の 90%レスポンスタイムは 20 s，ドリフトは約 5 mV/h であった．さらに，リン酸マイクロセンサーのライフタイムを検討するために，一定の時間間隔で検量線を作成した．マイクロセンサーは T-PO_4 濃度 10 mM の標準液中で保管した．その結果，BU-4 のライフタイムは 2 日程度，BE-3 のライフタイムは 24 時間程度であることが明らかとなった．他のイオン（pH，アンモニア等）測定用 LIX 型マイクロセンサーのライフタイムも数日であり，本研究で開発したリン酸マイクロセンサーのライフタイムは既存のマイクロセンサーと同程度である事が明らかとなった．

さらに，リン酸マイクロセンサーに及ぼす妨害イオンの影響を検討した．Milli-Q 水に陰イオン（OH^-（すなわち pH），Cl^-，NO_2^-，NO_3^-，SO_4^{2-}および HCO_3^-）を含む塩を 1 種類のみ添加し，これら妨害イオンに対する検量線を作成した．BU-4 は Cl^-，NO_3^-，NO_2^-，SO_4^{2-}の濃度が 1 mM 以下の条件ではこれらのイオンに応答しなかった．一方，OH^-および HCO_3^-イオンに応答した（**Figure 3**）．BE-3 は NO_3^-，NO_2^-，SO_4^{2-}イオンには応答しなかったが，OH^-，HCO_3^-および Cl^-イオンに応答した（**Figure 4**）．測定結果から separate solution method (SSM) II により各イオンの選択係数を算出した（**Table 1**）．これらの結果から，リン酸マイクロセンサーは OH^-イオン，すなわち pH の阻害を受けることがわかった．この事から，環境サンプル測定の際は緩衝溶液を使用しサンプルの pH を一定に保つ必要がある事が分かった．

このため，センサー（BE-3）に及ぼす緩衝溶液の影響を検討した．検討した緩衝溶液は Bis-tris，クエン酸，酢酸の三種類である．100 μM の緩衝溶液を用いてリン酸

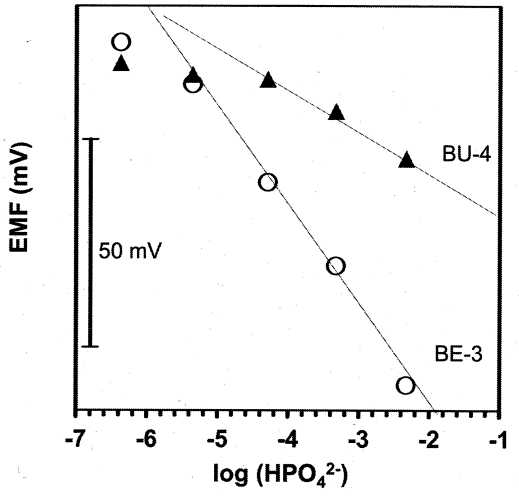

Figure 1　リン酸マイクロセンサー（BU-4 および BE-3）の検量線

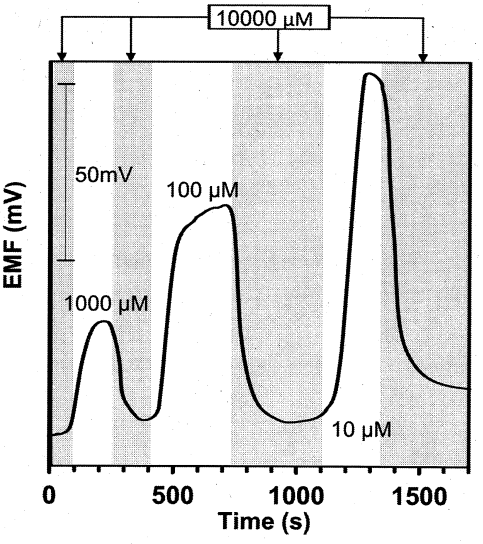

Figure 2　リン酸マイクロセンサー（BE-3）の T-PO_4 濃度の時間変化に対するレスポンス

標準溶液を作製し，検量線を作成した．Bis-tris および，クエン酸緩衝溶液を用いた場合，センサーの検量線の傾きは緩衝溶液を用いなかった場合と同様であったが，検出限界値が 100 μM 以上にまで増大した．これに対し，酢酸緩衝溶液を用いた場合，傾き，検出限界ともに緩衝溶液を用いなかった場合と同様であった．以上の結果から，酢酸緩衝溶液が最もセンサーを妨害しない緩衝溶液であることが分かった．

リン酸マイクロセンサーに及ぼす硫化水素（H_2S），溶存酸素（DO）および流速の影響についても解析した．De Beer et al.[2]は NO_2^-マイクロセンサーのイオノフォアに

は Co(III)が含まれているため，サンプルに硫化水素（H_2S）が含まれる場合，H_2S が Co(III)を還元してしまい，NO_2^-マイクロセンサーは不可逆的に阻害されることを報告している．リン酸マイクロセンサーのイオノフォアには Sn が含まれているため，H_2S がリン酸マイクロセンサーに及ぼす影響を検討した．センサー（BU-4）の検量線を作製した後，100 μM の H_2S 溶液に 10 分間センサーを浸し，その後再度検量線を作成した．H_2S の暴露により検量線の傾きは変化しなかった．以上のことから，H_2S のリン酸マイクロセンサーへの影響は小さいことが明らかになった．リン酸マイクロセンサーの適用サンプルとして，嫌気環境下のバイオフィルムや底泥が考えられる．これらのサンプル内には H_2S が蓄積している場合があるが，このようなサンプルにもリン酸マイクロセンサーは適用可能であることが示された．

Lee et al.[1]が開発したセンサーは DO により妨害を受けた．これに対し，本研究で開発した LIX 型センサーは，T-PO_4 濃度が 1.0 mM の溶液の DO が 0 mg/L の条件と 8 mg/L の条件において，ドリフトの影響を除くと EMF に差はなかった．このように LIX 型センサーはその測定原理から予想される通り，DO により全く妨害を受けなかった．

生物膜内外では著しく流速が異なるため，リン酸マイクロセンサーに及ぼす流速の影響を検討した．200 rpm で撹拌したリン酸標準液における EMF と，撹拌を停止した後の EMF には，ドリフトの影響を除くと差はなかった．撹拌を停止した後にレスポンスタイムは長くなった．これは，センサーへのリン酸の輸送が遅れたためである．

4. 結論

本研究では，異なる 2 種類のイオノフォア（BE-3 および BU-4）を用いて LIX 型リン酸マイクロセンサーを作製した．レスポンスタイムは BU-4 がより早かったが，検量線の傾きや検出限界に関しては BE-3 の方が優れていた．センサーは H_2S，DO，流速の影響を受けなかった．NO_3^-，NO_2^-，SO_4^{2-}により妨害を受けなかったが，OH^-，HCO_3^-，Cl^-により妨害を受けた．今後はイオノフォアを変更することで，センサーの性能を向上させることを試みる．

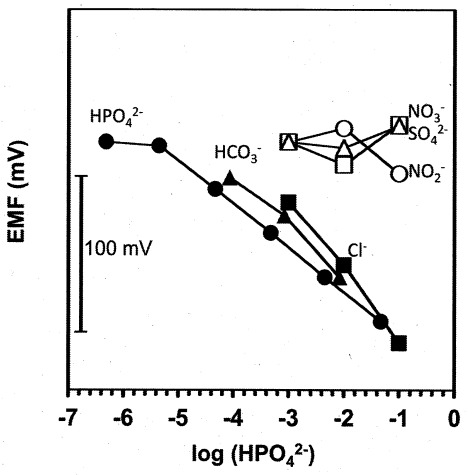

Figure 3　リン酸マイクロセンサー（BE-3）の様々なイオンに対する検量線

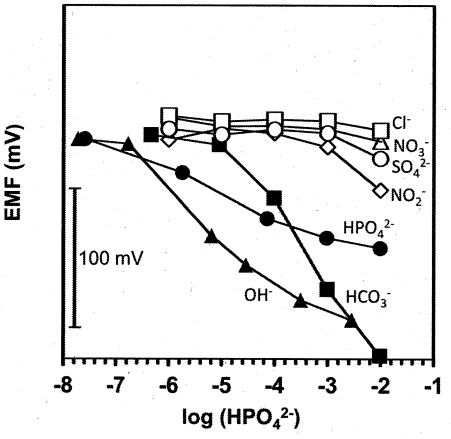

Figure 4　リン酸マイクロセンサー（BU-4）の様々なイオンに対する検量線

Table 1 各イオンに対するセンサーの選択係数（logK）

イオン	BE-3	BU-4	参考文献(5)
OH^-		+4.9	
Cl^-	+5.3	-4.0	-1.5
SO_4^{2-}	-4.5	-4.7	-2.7
HCO_3^-	+1.9	+1.7	-0.3
NO_2^-	-0.8	-1.1	-1.3
NO_3^-	-2.5	-3.5	-2.5

謝辞：本研究を遂行するにあたりCRESTの支援を受けました．ここに記し謝意を表します．

参考文献

1) Lee et al. (2009) Sensors and Actuators B,137,121-128.
2) de Beer et al. (1997) Applied and Environmental Microbiology,63,973–977.
3) Gieseke and de Beer (2004) Molecular Microbial Ecology Manual,1581-1612.
4) 宮崎ら，2010，第 47 回環境工学研究フォーラム講演集
5) Sasaki et al. (2004) Talanta,63,131-134.