

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 池 甲 珠

本論文は河川水の生物化学的酸素消費量（Biochemical Oxygen Demand, BOD）を測定するための高感度バイオセンサーの開発に関するものであり、7章より構成されている。

第1章は緒論であり、本研究の行われた背景について述べ、本研究の目的と意義を明らかにしている。

第2章では、難分解性有機物分解菌のスクリーニングを行っている。難分解性有機物としては、河川水に多く含まれるフミン酸、リグニン、タンニン酸、アラビアゴム、界面活性剤を用いている。それぞれの有機物に無機塩を加え5種の制限培地を調製している。この制限培地に土壌、河川水、底泥、活性汚泥などを含む35種類の試料を添加し、好気性の難分解性有機物分解菌を単離している。その結果、3種類の微生物はいずれも *Pseudomonas* 属であることを示している。

次にそれらの中で最も生育の早かった *Pseudomonas putida* SG10 の各種制限培地での増殖について調べフミン酸とリグニンのそれぞれを炭素源とした制限培地でいずれも増殖を確認している。また、既に単離・同定され保管されている菌株4種類（*P. putida* IAM1236, *P. fluorescens* IAM12022, *B. subtilis* IAM12118, *T. cutaneum* IFO10466）と *P. putida* SG10 との各炭素源を混ぜた混合培地での増殖について比較し、その結果、本研究でスクリーニングした *P. putida* SG10 が最も良い増殖を示したと述べている。

第3章では、第2章で単離した *P. putida* SG10 をセンサーの素子に用いセンサーを作製している。センサーのトランスデューサーとして、溶存酸素計測用蛍光プローブを使用している。本センサーは、微生物膜と蛍光プローブ、記録計、マルチメーター等により構成される。多孔性セルロース膜（孔径0.45 μm , 直径20 mm）に、第2章でスクリーニングされた *P. putida* SG10（60 mg wet weight）を吸着固定し、この微生物膜を蛍光プローブに装着している。微生物膜の *P. putida* SG10 は、試料中の難分解性有機物を好氣的に分解し、これに伴い溶存酸素を消費するので、その濃度変化が蛍光プローブで蛍光強度の変化として計測される。この値（センサーの応答値）から、BOD値を

算出できると述べている。

これまでBODセンサーの検量線作成用の標準溶液は、BOD5日間法の場合と同じグルコース・グルタミン酸溶液が用いられているが、これは河川水中のBOD成分とは分解性が大きく異なる。そこで本研究では、河川水のBOD原因となるフミン酸やリグニンなどの難分解性有機物を含む人工合成排水を河川水計測用の標準溶液として用いている。センサーの至適条件（pH 7.0, 30°C）で標準溶液を測定した場合、0.5-10.0 mg/LまでBOD値とセンサー応答との間に直線的な関係が得られ、15分間で測定できると述べている。

このように難分解性有機物を含む溶液のBODをセンサーで高感度に計測した例はこれが初めてであるが、センサーの応答値の再現性が十分ではないと述べている。

第4章では、第3章で作製したBODセンサーを改良するために、センサーのトランスデューサーとして酸素電極を用いている。本センサーでは、*P. putida* SG 10の有機物の分解に伴う呼吸活性の変化を、この酸素電極の電流減少値として計測し、試料のBODを算出している。

至適条件（*P. putida* SG10の固定化量40 mg wet weight, pH 7.0, 30°C）において、標準溶液添加時の電流減少値と標準溶液のBOD値の間に、0.5から10 mg/Lまで直線関係を得ていると述べている。測定時間は、15分間であり、0.5 mg/LのBODの相対標準偏差は、7%である。センサーの安定性について検討したところ、リン酸緩衝液（pH 7.0, 30°C）内で室温で保存した場合に10日間は安定であることを示している。

次は、河川水に含まれるセンサーへの妨害物質として塩化物イオンと重金属の影響について調べている。塩化物イオンは 1000 mg/Lまで、重金属（ Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+} ）は河川水中に存在する濃度範囲ではセンサー応答に影響を与えないことを示している。

次に河川水を作製したセンサーで測定し、その値（BODs）を従来法であるBOD5日間法で測定した値（BOD₅）と比較している。その結果、BODsとBOD₅との間に高い相関関係（ $n = 22$, $r = 0.91$ ）が得られ、本センサーで河川水のBODが測定できることを示している。しかし、河川水によってはBODsがBOD₅より低い場合があり、これは河川水には極めて生分解しにくい有機物が存在し、このような物質は、センサーの測定時間である15分間という短い時間内では*P. putida* SG 10に分解されないからであると述べている。

第5章では、本センサーに反応しない河川水中の難分解性有機物の分解を目的として、TiO₂/UVの前処理を検討している。

まず、人工合成排水を用いてTiO₂/UVによる有機物分解の効果について調べている。有機物に対するTiO₂/UVの前処理効果は第4章で作製したバッチ型センサーの応答

性により確認している。

TiO₂に4分間UVを照射することによりセンサーの応答は前処理なしに比べて約2倍に上昇したと述べている。次に河川の連続モニタリングのためフロー型センサーを作製し、センサーの応答性を調べている。センサーの応答は確認されたが、TiO₂の表面に有機物が吸着されることから再現性のよいセンサーの応答が得られなかったと述べている。実際の河川の連続モニタリングのためにはこの有機物の吸着を除く必要があると述べている。

第6章では、有機物の吸着による影響がないオゾンによる河川水の前処理を試みている。有機物のオゾン処理による分解はTotal Organic Carbon (TOC)残存量で確認している。人工合成排水のTOC残存量は1分間のオゾン通気を行うと顕著になり、3分間のオゾン処理ではTOCの除去率は約15%を示したと述べている。

人工合成排水を用いた場合に、有機物の分解の効果が確認されたことから、河川水のオゾン処理（オゾン濃度42.4 g/Nm³, 3分間）を検討している。オゾン処理を行った試料を約20分間攪拌することにより過剰なオゾンを除去し、このような前処理を行った試料のBODを、第4章で作製したセンサーを用いて測定している。

更に河川の連続モニタリングのためストップフロー型センサーを作製し、その応答性を調べている。人工合成排水（BOD 1 mg/L）を測定した場合、オゾン処理後の電流減少値はオゾン処理前と比較して約2倍であることを示している。また、河川水を用いた場合にも電流減少値の上昇がみられ、オゾン処理を行った場合のBODsとBOD₅の相関は処理前に比べて高くなったと述べている（n=21, 処理前：r=0.968, 処理後 r=0.989）。すなわち、BODsをオゾン処理によってBOD₅により近づけられることを示している。

第7章は結論であり、本研究で得られた結果をまとめている。

このように本論文では、河川水のBODを測定できる高感度バイオセンサー開発するために必要な基礎的性質を実験によって検討し、河川中の難分解性物質に応答するセンサーの開発に成功している。また河川水の連続測定のためストップフロー型センサーを開発し、実際に河川水のBODを測定できることを示している。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。