

氏名	モハマド アブル カシエム Md. Abul Kashem
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	富生命博甲第76号
学位授与年月日	平成27年9月30日
専攻名	生体情報システム科学専攻
学位授与の要件	富山大学学位規則第3条第3項該当
学位論文題目	Low-cost integrated sensors chip for environmental monitoring (環境計測のための低コスト集積型センサチップ)
論文審査委員 (主査)	教授 鈴木 正康 教授 篠原 寛明 教授 池田 真行

学位論文内容の要旨

Low-cost integrated sensors chip for environmental monitoring (環境計測のための低コスト集積型センサチップ)

Md. Abul Kashem

Graduate School of Innovative Life Science for Education, University of Toyama, Japan.

By this study, the challenges of frequent environmental monitoring have been overcome by developing and designing a low-cost and simple optical integrated sensors chip which has the capability to effect-free monitoring of three important water quality parameters like dissolved oxygen (DO), biochemical oxygen demand (BOD) and Eco-Toxicity (E-Tox) simultaneously based on the sensitive fluorescence detection of ruthenium complex. Fluorescence as an optical property originates when ruthenium complex absorbs light of a shorter wavelength (447 nm) and emits light of a longer wavelength (604 nm) and the emitted fluorescence intensity (FI) always depends on the presence of oxygen molecules. The more of oxygen, the more of reduction of FI because the oxygen molecules act as the quencher of FI. Since, FI and oxygen bear a good relationship, by perceiving this concept, BOD and E-Tox biosensors were developed by immobilizing baker's yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) and green microalgae (*Pseudokirchneriella subcapitata*) incorporating with ruthenium complex based DO sensor chip where oxygen consumption due to respiration activity by yeasts in presence of organic substances and inhibition of oxygen generation rate (%) by photosynthetic activity of green microalgae in presence of chemicals (pesticides) were effectively investigated by forming sensing protocols.

To reach the noble goal, several features such as DO sensor (array and film) types, elimination of effects caused by environmental samples, suitable immobilization technique of yeasts and microalgae, simple chip fabrication, sensitivity in real environmental samples etc. were evaluated throughout in this study.

Firstly, DO sensors chip were developed and tested in laboratory prepared distilled water (DW) as well as in environmental samples like river water (RW), coastal sea water (CSW) by controlling DO for assessing the sensitivity. Not equal sensitivity in all types of sample was observed and hence the effects (45-50%) especially obtained by RW have been completely eliminated by shielding the oxygen sensing film (OSF) with polyethylene polypropylene (PE-PP) film which only permit to enter oxygen into it but no other substances.

Then BOD biosensor chip was developed by immobilizing yeasts within only polyvinyl alcohol-strylpyridinium (PVA-SbQ) matrix (called biofilm) and attaching the biofilm onto

previously developed PE-PP film shielded DO sensor chip (film type). Sensitivity of BOD biosensor using BOD standard solution glucose glutamic acid (GGA) (150 mg/L glucose and 150 mg/L glutamic acid equals to 220 mg/L BOD) was investigated and found good responses where the linear detection range was up to 20 mg/L GGA. The another type biofilm was also prepared by immobilizing yeasts with mixed cellulose ester (MCE) filter membrane and 8% PVA-SbQ matrix but poor sensitivity was observed compare to only PVA-SbQ matrix based biofilm.

Furthermore, the E-Tox biosensor chip was constructed by immobilizing green microalgae within black MCE and Omnipore® filter membranes as well as within only PVA-SbQ matrix and incorporating the biofilms with the DO sensor chip. The filter membranes based biofilm was incorporated with microarray type DO sensor chip and tested six pesticides (diuron, atrazine, simazine, simetryn, mefenacet and pendimethalin) and found very good sensitivity as of dose-response inhibition of photosynthetic activity or inhibition of oxygen generation rate (%) by green microalgae to four pesticides (diuron, atrazine, simazine, simetryn) but almost insensitivity was attained to mefenacet and pendimethalin pesticides. Besides, by using PVA-SbQ matrix based biofilm onto PE-PP film shielded film type DO sensor chip, diuron was also tested and found all most equal sensitivity to the filter membranes based biosensor.

Finally, three sensors were integrated and designed onto a single chip in which the DO sensor chip was protected by PE-PP film and both biofilms (yeasts and green microalgae) were prepared by using only PVA-SbQ immobilizing matrix. The developed integrated sensor performed well in real environmental samples for DO, BOD and E-Tox monitoring.

The present development covers not only low-cost but also other many other advantages including simple measurement technique, real sample applicability, disposable, micro-liter sample volume requirement, single sample for three detections, no chemical discharge into the environment etc. which were the major shortcomings of the conventional or available biosensors (electrochemical). Thus, the proposed technique could lead as the promising and prospective tool towards regular environmental quality monitoring for the protection of our environment.

In the next study, improvement of accuracy, suitable designing, portable and automation of the sensor will be conducted. This integrated approach could also be extended in other areas where oxygen monitoring is severely important like cell culture, cellular function monitoring for drug discovery, aquaculture, medical diagnosis etc.

【論文審査の結果の要旨】

当学位論文審査委員会は、申請者より提出された博士学位申請論文を綿密に査読した。また、平成28年2月9日に公聴会を開催し、詳細な質疑を行って論文の審査をした。以下に審査結果の要旨を記す。

近年、発展途上国における環境汚染が深刻化している。しかし汚染のレベルを評価するのに必要な情報が得られず有効な対策が取れずにいる。計測機器が絶対的に不足している上に計測機器を使いこなす専門家の数も充分とは言えない。したがって低コストで誰でも簡単に使える環境計測用センサの開発が強く望まれている。そこで申請者は、簡易で低コストな環境計測用集積型バイオセンサについて研究を行った。

学位申請論文の第1章では、緒論として、母国バングラデシュの例を中心に環境汚染の現状をまとめ、簡易で低コストな計測機器の必要性を述べており、その候補としてバイオセンサに着目している。その上で本研究で開発しようとしているDO（溶存酸素）、BOD（生物化学的酸素要求量）、生態毒性が計測可能な集積型環境測定チップについて述べている。

第2章では、酸素濃度によって蛍光強度が変化する蛍光色素 **Tris(1,10-phenanthroline) ruthenium(II) chloride hydrate** を用いたDOセンサの作製と環境試料水への適用について研究している。河川水では蛍光酸素センサの応答が阻害され蒸留水の約50%の応答となったが、酸素透過性に優れたポリエチレン・ポリプロピレン積層膜で蛍光酸素センサ膜を被覆することで環境試料水による影響を排除することに成功している。また基板全面に蛍光酸素センサ膜を形成したセンサと微小な蛍光酸素センサ膜のスポットをアレイ状に形成した場合で応答値の比較もしている。

第3章では、第2章で開発した蛍光酸素センサと固定化酵母膜を組み合わせたBOD（生物化学的酸素要求量）センサについて研究している。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を光架橋性樹脂に固定化した膜を用いたBODセンサは300mg/l以下のBODが測定可能で、河川水中でもリン酸緩衝液中と同等の応答が得られ、重金属イオンの影響もほとんど見られなかったとしている。

第4章では、同様に蛍光酸素センサ膜上に緑藻固定化膜を重ねた生態毒性センサについて研究している。緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata* を光架橋性樹脂や多孔性フィルタに固定化した膜を用いた生態毒性センサは農薬による緑藻の光合成能の阻害を見るもので、1ppbのDiuron、10ppbのAtrazineやShimazineの検出に成功している。また重金属イオンの共存の影響も無視できるほどであったとしている。

第5章では、本研究で開発したDOセンサ、BODセンサ、生態毒性センサを同一基板上に集積化したセンサを作製すると共に、蛍光DOセンサと市販溶存酸素電極との測定値の比較、河川水中のBOD計測や、水田及び周辺の用水等の農薬(Diuron)濃度の計測など実用的側面からの研究を行っている。

第6章では、以上の結果をまとめ、この開発した技術の将来展望について述べている。

このように申請者は、低コストな樹脂フィルムシート上に形成した蛍光酸素センサと、光架橋性樹脂に封入した酵母や緑藻の固定化膜を組み合わせることでDO、BOD及び生態毒性センサを低コストで作製し、実際にそれらを河川や農業用水などの環境試料水の測定に適用している。

この成果は、今後、センサチップの供給体制の整備と簡易な蛍光測定装置の開発が実現できれば、発展途上国の環境汚染計測に大きく貢献すると考えられ、環境汚染の防止や生態系の保全の実現につながることから、その重要性は高い。よって、当博士学位論文審査委員会は、Md. Abul Kashem 氏の博士学位申請論文が、博士（工学）の学位に十分な価値を有するものと認め、合格と判断した。