

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21854

研究課題名（和文）ナノスケールでの細菌によるカルサイト分解現象から切り開く水産業の持続的発展

研究課題名（英文）Nano-Scale observation of the decomposition in bacteria inhabit environment toward for sustainable development of fisheries industry

研究代表者

小畠 秀和（Kobatake, Hidekazu）

同志社大学・研究開発推進機構・教授

研究者番号：10400425

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：方解石の分解に対する細菌の役割を調べるために、方解石の劈開面を切り出し単離した細菌の培養液に浸漬させることで、方解石の溶解プロセスの違いを調べた。実験後に培養液中のCaイオン濃度測定と、方解石の結晶表面の観察を行った。4日間の実験後、pHに大きな変化がないにも関わらず、Streptomycesの培養液中のCaイオン濃度は、Escherichia coli DH5やコントロールの培養液中の濃度に比べて1/3程度まで減少することが分かった。このStreptomycesの培養液中に浸漬された方解石表面には多数のピットが形成されており、この細菌の活動によって溶解が促進されたことが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

養殖などで大量に発生する貝殻を生物活動で安価に分解する技術は、わが国の水産業の持続的発展にとって必要な技術である。特殊な細菌が自然環境において無機結晶の成長を促進することは良く知られており、様々な研究が行われてきたが、どのように生物活動により溶解が促進されるのかそのメカニズムには不明な点が多かった。今回、細菌による方解石の分解プロセスを詳細に観察することによって細菌の方解石に対する分解メカニズムの一端が明らかになった。この結果は貝殻処理の低コスト化につながるだけでなく、石灰岩が分解されアルカリ土壌が形成されるメカニズムについても、新しい知見を得た。

研究成果の概要（英文）：The cleavage surface of the calcite was exposed to the culture fluid of the bacteria for 4 days to investigate the effect of bacteria on the calcite dissolution kinetics. The surface morphology of the calcite was investigated using an optical microscope and scanning electron microscope after the dissolution experiment in the culture fluid with bacteria. The calcium ion concentration in the culture fluid of Streptomyces was one-third of control, Escherichia coli DH5alpha. Meanwhile, the calcite surface, which has been exposed in the culture fluid of bacteria shows the etch pits, which were formed during the dissolution process. These etch pits were formed accompanied by the bacteria colony, which were formed along the cleavage step on the calcite surface. These observations infer that the inhabitation of the bacteria enhance the dissolution of the calcite and also promoted the precipitation of calcium ion. The coupling of these effects promoted the dissolution process of calcite.

研究分野：結晶成長

キーワード：細菌 溶解 結晶表面

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、天然資源に漁獲を左右される不安定な海面漁業から、比較的生産が安定する養殖への転換が進んでいる。しかし、養殖漁業では網に付着する貝殻など大量の水産廃棄物が生じる。これらの一部は肥料や飼料、土壌改良剤、地撒きホタテガイやマナマコ発生場などの漁場造成に利用されているが、大部分の貝殻は利活用されことなく一般廃棄物として焼却処分される。この焼却は 1200°C以上の温度で大量の燃料と費用を用いて行われ、水産業において大きな経済的負担となっている。

我々は、生物固有の多孔質な微細組織により、従来考えられていた温度よりも低い温度で焼成が進むこと、新規に貝殻の分解(微細化)を促進する細菌を発見し、上記の問題を解決する突破口を見出した。そこで本研究では、バクテリアの活動など生物由来の組織を利用して投入するエネルギーを格段に低減した、貝殻の分解・焼成技術の可能性を検証するため実験的研究を試みた。また、本研究での貝殻の焼成によって得られる酸化カルシウムは、水との反応熱を利用した蓄熱材料として注目されている。そこで本研究の成果によって、生物活動によって得られる微細組織を生かした高性能エネルギー貯蔵材料にも応用できると考え、貝殻などの材料の熱エネルギー貯蔵材料としての性能評価を試みた。

### 2. 研究の目的

本研究では、生物由来の物質の熱エネルギー材用としての評価を行うとともに、細菌の活動が炭酸カルシウムの分解に与える影響を明らかにすることが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

#### 3-(1) 貝殻の熱分解挙動

貝殻などの水産廃棄物の熱分解挙動を明らかにするために、試葉のカルサイトとホタテ貝(Mizuhopectenyoensis)、牡蠣殻(Crassostrea gigas)、ウニ(Mesocentrotus nudus)の棘を用いて、これらの熱分解挙動の違いを調べた。試料を洗浄した後粉碎し 63-125 μm に粒径をそろえた試料を準備した。またホタテ貝の貝殻については粒径を 125 - 500 μm、500 - 2000 μm にそろえた試料も準備し、粒径が貝殻の熱分解に与える影響も調べた。大気雰囲気下にて電気炉を用いて 773K で 2 時間加熱して貝殻などの表面に付着した有機物などを除去した。

試料の比表面積は 77K において N<sub>2</sub> ガスを用いた BET 測定を行うことで測定した。試料のそれぞれの結晶相は XRD 分析で決定した。貝殻などに含まれる不純物が熱分解挙動に与える影響を評価するために、それぞれの試料のバルク組成が重用である。そこで、準備した試料を 20.3 から 33.9 mg 硝酸に溶解させ蒸留水で希釈した後イオンクロマトグラフィーを用いて Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, および Ca<sup>2+</sup> イオンの濃度を決定し、ICP を用いて Sr<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup> イオン濃度を求めた。また、粉碎した試料をアルミナ容器(φ= 5 mm, h = 2.5 mm)に封入し、示差走査熱量計(Differential Scanning Calorimetry: Seiko Instrument Inc. DSC6300)を用いて熱分解挙動を調べた。それぞれの試料は Ar(純度: 99.9999%, 流速 30 mL min<sup>-1</sup>)の雰囲気下で一定の昇温速度で加熱した。それぞれの方解石の熱分解における活性化エネルギーを決定するために、昇温速度を実験ごとに 5 から to 40 K min<sup>-1</sup>の範囲で変化させ、それぞれの昇温速度における熱分解温度を求めた。測定に用いた DSC の温度は Al および Ag の融点を用いて校正した。

それぞれの試料の熱分解反応が終了する温度を昇温速度毎に決定した。温度が変化する条件での熱分解速度を Ozawa によって提案されたモデル[1,2]で決定した。昇温速度の対数log(∂T/∂t)と特徴温度(T<sub>cha</sub>)との間には、以下のような関係が存在する。

$$\log\left(\frac{\partial T}{\partial t}\right) = A - 0.434 \cdot \frac{E_A}{R \cdot T_{cha}}$$

ここで E<sub>A</sub> は熱分解の活性化エネルギーであり、A は分子の衝突速度に対応する頻度因子を示しており、今回の熱分解反応では試料表面からの熱分解の結果カルサイト表面から放出される CO<sub>2</sub> ガスのフラックスに相当すると考えられる。この関係式に基づいて、熱分解反応が終了するおんど TRC の昇温速度依存性から、熱分解の活性化エネルギーと頻度因子を実験的に求めた。

#### 3-(2) 細菌の活動によるカルサイトの分解挙動

特殊な細菌が自然環境において無機結晶の成長を促進することは良く知られており、様々な研究が行われてきた。一方、水産系廃棄物の主成分でもある方解石の表面に生息する細菌の活動によって、方解石の溶解を促進するピットが形成されることが指摘されている[3]。我々は土壌から抽出した細菌の中からカルサイトの分解を促進する細菌群を発見したので、これらの細菌を単離し、細菌の方解石に対する分解活性を調べた。その分解メカニズムを明らかにするために詳細な組織観察を行った。

### 4. 研究成果

#### 4-(1) カルサイトの熱分解挙動

この項目は Eco-Engineering(2022)において掲載された論文からの引用である。図 1 に XRD 分析の結果を示す。いずれの試料においてもカルサイト由来する XRD ピークが確認された。カルサイトの他にもグラファイトに起因するピークも存在する。これは XRD 測定前に試料に付着する有機物を除去するために行った熱処理(773 K において 2 時間)により分解された有機物がグラファイトとして残っているものであると考えられる。また、わずかに CaO および Ca(OH)<sub>2</sub> のピークも確認された。これは 773 K という低温においてもわずかにカルサイトの熱分解が進み CaO が形成された可能性を示唆している。また Ca(OH)<sub>2</sub> は熱分解によって形成された CaO が大気中の水蒸気と反応することで形成されたものであると考えられる。炭酸カルシウムにはカルサイトの他にアラゴナイト、バテライト相が存在することが知られているが、本研究で用いた試料にはこれらの相の存在は確認できなかった。

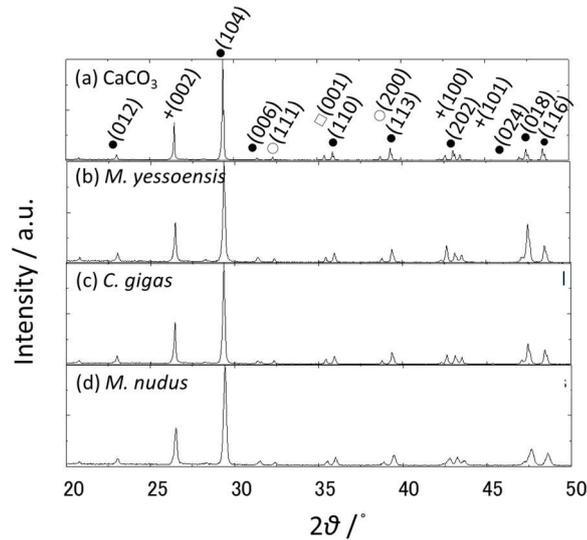


図 1 XRD 測定結果 (a) CaCO<sub>3</sub> reagent, (b) *M. yessoensis*, (c) *C. gigas*, (d) *M. nudus*. XRD それぞれのピークは(●) calcite, (○) CaO, (□) Ca(OH)<sub>2</sub> (+) グラファイトに対応する

表 1 に測定に用いた試料の化学組成を示す。化学組成分析における測定不確かさは 1.1%以下である。Sr や Na のようにイオン半径が 0.97 から 1.2 Åイオンはアラゴナイトに、Mg や Fe のようにイオン半径が 0.97 Å以下のイオンはカルサイトに取り込まれやすいことが知られている。[4]. これらのイオンは貝殻やウニの棘に含まれているが、微量であった。比較的多く含まれている不純物はカルサイト相に取り込まれる傾向のある Mg であり、この結果は今回 XRD で測定した貝殻やウニの棘は主にカルサイトであったという結果と一致する。今回用いた試料では、全て CaCO<sub>3</sub> の濃度は 94%以上であった。カルサイト試薬およびホタテ貝殻が、CaCO<sub>3</sub> 純度は 99%以上であり、カキ殻は約 97%、ウニの棘が最も低く CaCO<sub>3</sub> 濃度が約 94%あった。

Table. 1 Chemical composition of the samples in weight percent

Sample	CaO	MgO	K <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> O	NH <sub>4</sub>	SrO	BaO	MnO	FeO	CO <sub>2</sub>	CaCO <sub>3</sub> wt. %
CaCO <sub>3</sub> reagent	55.62	0.08	0.12	0.26	0.10	0.01	0.01	0.01	0.02	43.77	99.27
<i>M. yessoensis</i>	55.07	0.21	0.08	0.88	0.03	0.02	0.01	0.01	0.15	43.55	98.28
<i>C. gigas</i>	54.40	0.35	0.11	1.79	0.05	0.10	0.01	0.01	0.02	43.15	97.10
<i>M. nudus</i>	52.67	1.63	0.32	1.79	0.07	0.20	0.01	0.02	0.03	43.24	94.01

図 2 にホタテ貝殻を熱分解した時の DSC 測定結果の一例を示す。カルサイトの熱分解反応は吸熱反応のため、DSC 測定において負のピークが生じる。さらに温度が上昇して熱分解反応が終了すると、この DSC のピークが消失する。この時の温度を熱分解反応が終了した温度 T<sub>RC</sub> として、この温度の昇温速度依存性を調べた。図 3 に熱分解が終了する温度の逆数(1 / T<sub>RC</sub>)と昇温速度の対数 log (dT/dt), の関係を示す。測定に用いた CaCO<sub>3</sub> 試薬, ホタテ(*M. yessoensis*) 貝殻, カキ(*C. gigas*) 殻, ウニ(*M. nudus*) の棘のサイズは 63 - 125 μm, である。図に示されるように反応終了温度と昇温速度の間には直線関係が得られており、アレニウス型の反応であることが分かる。また、直線的な関係であることから、反応律速過程は測定中に変わっていないことが示唆される。この結果から、反応速度はウニの棘、カキ殻、ホタテガイ貝殻、カルサイト試薬の順に遅くなる事が分かる。

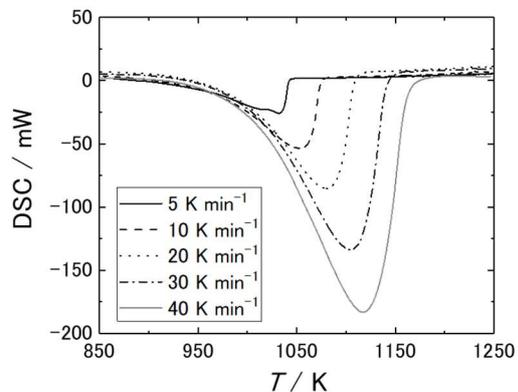


図 2 ホタテガイ貝殻に対する DSC 測定結果の一例.

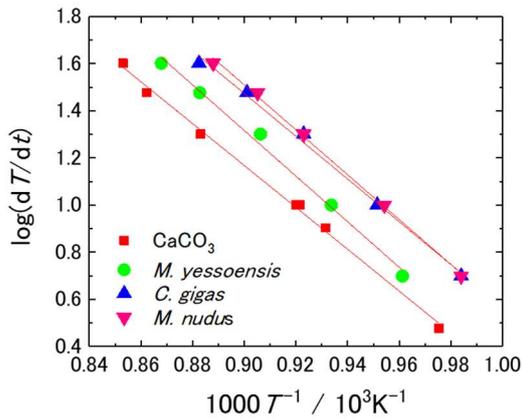


図 3 昇温速度と熱分解終了温度との相関。(■)CaCO<sub>3</sub> 試薬 reagent, (●)ホタテガイ, *M. yessoensis*, 貝殻 (▲)カキ *C. gigas* 殻, (▼)ウニ, *M. nudus* の棘. 分析に用いた試料サイズは 63 から 125  $\mu\text{m}$  である.

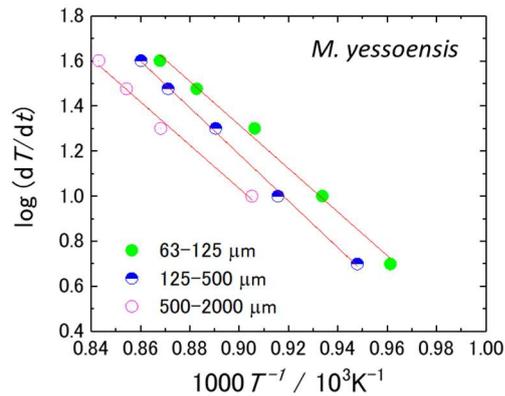


図 4 試料サイズを変えた時の昇温速度と熱分解終了温度との相関. 分析に用いた試料サイズは(●)63-125  $\mu\text{m}$ , (●) 125-500  $\mu\text{m}$ , and (○) 500-2000  $\mu\text{m}$ . であり, ホタテガイ *M. yessoensis*, 貝殻を用いた.

図 4 に熱分解速度のサイズ依存性を示す。試料にはホタテガイ貝殻を用いた。サイズが変わっても  $T_{RC}$  の逆数と  $\log(dT/dt)$  の間に直線的な関係が得られ、サイズが大きくなるに従い反応速度が遅くなることが分かった。いずれの試料においても、熱分解の活性化エネルギーは  $160 - 190 \text{ kJ mol}^{-1}$  とほぼ変わらないことが分かる。このことから、これら貝殻などの熱分解の反応速度の違いは活性化エネルギーではなく、CO<sub>2</sub> ガスのフラックスを支配する頻度因子に起因するものであるという事が分かった。この頻度因子の違いがどのような要因によって引き起こされるかについては引き続き今後の検討が必要である。

#### 4-(2) 細菌の活動によるカルサイトの分解挙動

方解石の分解に対する細菌の役割を調べるために、方解石の劈開面を切り出し単離した細菌の培養液に浸漬させることで、方解石の溶解プロセスの違いを調べた。実験後に培養液中の Ca イオン濃度測定と、方解石の結晶表面の観察を行った。4 日間の実験後、pH に大きな変化がないにもかかわらず、*Streptomyces* の培養液中の Ca イオン濃度は、*Escherichia coli* DH5 やコントロールの培養液中の濃度に比べて 1/3 程度まで減少することが分かった。この *Streptomyces* の培養液中に浸漬された方解石表面には多数のピットが形成されており、この細菌の活動によって溶解が促進されたことが示唆される。

#### 参考文献

- [1] T. Ozawa, Bull. Chem. Soc. Jpn. 38:1881-1886 (1965).
- [2] T. Ozawa, J. Therm. Anal. 2:301-324 (1970).
- [3] A. Luettge and P.G. Conrad, App. Env. Micr., 70:1627-1632 (2004).
- [4] F. Masuda, M. Hirano, Sci Rep Inst Geosci Univ Tsukuba Sec B 1:163-177 (1980).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Juergen Brillo, Johanna Wessing, Hidekazu Kobatake, Hiroyuki Fukuyama	4. 巻 51
2. 論文標題 Molar heat capacity of liquid Ti, Al <sub>20</sub> Ti <sub>80</sub> and Al <sub>50</sub> Ti <sub>50</sub> measured in electromagnetic levitation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 High Temperatures-High Pressures	6. 最初と最後の頁 145-164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zaka Ruhma, Masayoshi Adachi, Hidekazu Kobatake, Hiroyuki Fukuyama	4. 巻 281
2. 論文標題 Phase relation in Ga-Al-N <sub>2</sub> systems and nitrogen solubilities in Ga-Al melts equilibrated with aluminum nitride	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Materials Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 115747-115747
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hidekazu Kobatake, Akira Akahira, Seiichiro Ioka, Shinji Kirihara	4. 巻 34
2. 論文標題 Thermal decomposition kinetics of synthesized calcite and fishery wastes such as shell of bivalves, and spines of a sea urchin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Eco-Engineering	6. 最初と最後の頁 24-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masayoshi Adachi, Keigo Fujiwara, Ryuta Sekiya, Hidekazu Kobatake, Makoto Ohtsuka, Hiroyuki Fukuyama	4. 巻 142
2. 論文標題 In situ observations of the dissolution of an AlN film into liquid Al using a high-temperature microscope	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Materials Science in Semiconductor Processing	6. 最初と最後の頁 106469-106469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小島秀和, 小澤俊平, 杉岡健一, 白鳥英, 織田裕久, 猿渡英樹, 小山千尋, 石川毅彦
2. 発表標題 「きぼう」での静電浮遊炉を利用した熱エネルギー貯蔵材料開発に向けて
3. 学会等名 JpGu
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島秀和, 石川正道, 後藤琢也
2. 発表標題 宇宙惑星居住実現に向けた熱エネルギー貯蔵
3. 学会等名 JASMAC
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島秀和
2. 発表標題 熱エネルギー貯蔵材料開発に向けた無容器での非平衡溶融合金の熱物性計測
3. 学会等名 蓄熱発電と高温蓄熱・太陽熱利用の技術開発動向セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島秀和, 安達正芳, 大塚誠, 福山博之
2. 発表標題 放射率に依存しない高速2次元温度分布計測に向けて
3. 学会等名 日本熱物性シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島秀和
2. 発表標題 エネルギー貯蔵と温度計測
3. 学会等名 産業計測第36委員会 温度計測分科会 第82回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島秀和, 小澤俊平, 清宮優作, 殿岡和己, 伊藤輝, 杉岡健一, 白鳥英, 下西里奈, 小山千尋, 織田裕久, 石川毅彦
2. 発表標題 「きぼう」での静電浮遊炉を利用した非平衡溶融合金の熱物性計測に向けて
3. 学会等名 宇宙環境利用シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小島秀和, 杉岡健一, 安達正芳, 福山博之
2. 発表標題 密閉型ガスジェット浮遊装置を用いた液滴振動法による熔融金属の粘性測定
3. 学会等名 第183回日本鉄鋼協会春季講演大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	井上 晴彦  (Inoue Haruhiko)  (10435612)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員    (82111)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	塚本 勝男  (Tsukamoto Katsuo)  (60125614)	大阪大学・大学院工学研究科・招へい教授    (14401)	
研究分担者	桐原 慎二  (Kirihara Shinji)  (60519594)	弘前大学・地域戦略研究所・教授    (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関