

微生物を用いた材料処理法*

(第2報, 鉄さびのバイオリサイクルに関する検討)

松井正仁^{*1}, 黒崎 靖^{*1}, 木村俊夫^{*2}
村井健一^{*1}, 本田泰彦^{*3}, 鈴木加那子^{*4}

Material Processing Using Microorganisms

(2nd Report, Investigation on Biorecycling of Iron Red Rust)

Masahito MATSUI^{*5}, Yasushi KUROSAKI, Toshio KIMURA,
Kenichi MURAI, Yasuhiko HONDA and Kanako SUZUKI

^{*5} Department of Physics Engineering, Mie University,
1515 Kamihama-cho, Tsu-shi, Mie, 514-8507 Japan

Based on an indication in the previous research that there is an ocean bacterium which can reduce iron red rust to magnetite extracellularly, it is attempted to develop a new recycling process employing such kind of bacteria. Two methods for producing very fine magnetite powder from red rust are presented by making up an artificial environment and shown to be successful. Bacteria participating in magnetite production are examined in detail, and are found to be microaerobic ammonia-oxidizing bacteria (coccus and bacillus), regarded as new types different from the GS-15 bacterium reported earlier. Their role is clarified and a mechanism of magnetite formation is presented.

Key Words: Production Engineering, Biological Engineering, Biomaterials, Marine Microorganisms, Iron Red Rust, Magnetite, Biorecycling

1. 結 言

バイオテクノロジーの分野では、古くからは発酵食品の生産、最近では医薬品の開発、環境浄化などに微生物が有効利用されている。しかし、金属材料を扱うことの多い生産加工分野への微生物の導入は端緒に終わったばかりであり、最近になって抗菌材料の開発やバイオマシニング^{(1),(2)}の試みがなされている。一般に、固体材料に対する微生物の作用は、①生物起源材料の生成、②体内貯蔵、③リーチング、④腐食・劣化、に分類される⁽³⁾。前報⁽⁴⁾では、海洋微生物を用いて①および④に着目した検討を行い、新しい材料加工プロセスとして、バイオマシニング、パイオデポジションおよびバイオリサイクルの可能性を提示した。本研究では、これらのうちでバイオリサイクルに焦点を絞り、さらに究明を行うことにした。すなわち、嫌気性もしくは好気性と見られる海洋微生物が細胞外で鉄腐食

生成物(赤さび, $\text{Fe}(\text{OH})_3$)を強磁性体微粒子(マグネタイト)に変換する機能を持つことを見出したので、この微生物を活用したマグネタイト生成法を考案し、生成条件、微生物の効果、関与する微生物、マグネタイト生成メカニズムなどについて検討する。そしてこの結果から、赤さびや鉄スクラップからマグネタイトを再生するプロセス開発の可能性を明らかにする。マグネタイトは、磁気記録材料として現在広く用いられている $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ よりも磁氣的性質が優れているため、これに替る材料として多方面で応用が期待されているが、従来の化学的製造法では、硫酸鉄にアンモニアガスを吹き込んで $\alpha\text{-FeOOH}$ を生成し、それを濾過・水洗の後、 400°C 以上で脱水して α フェライトにし、 350°C 以上で水素還元をして製造する。このように、化学薬品や加熱作業が必要であり、コストと環境面で問題がある。本報では、この問題に対する方策としてバイオリサイクルによる生成法を提示する。

2. 実験方法

2・1 試験海水, 材料および赤さび作成法 試験海水は伊勢湾町屋浦海岸の水深2m以下の海水中より採取し、ポリタンクに貯えた。海水の分析値(三重県水産技術センター提供, 年間平均値)を表1に示す。

* 原稿受付 2004年6月4日。

^{*1} 正員, 三重大学工学部(☎514-8507 津市上浜町1515)。

^{*2} 三重大学生物資源学部。

^{*3} 近畿工業(株)(☎673-0443 三木市別所町巴20)。

^{*4} (株)日立システムアンドサービス(☎108-8250 東京都港区港南2-18-1)。

E-mail: matsui@phen.mie-u.ac.jp

Table 1 Characteristics of tested natural seawater

Temperature	°C	16.19
Salinity	‰	27.16
DO	ppm	8.61
pH		8.51
COD	ppm	1.40
NH ₄ -N	μg-at/L	2.20
NO _{2,3} -N	μg-at/L	14.70
DIN	μg-at/L	17.0
PO ₄ -P	μg-at/L	0.19
Turb	μg-at/L	5.5

Less than 2 m deep; yearly mean values, presented by Fisheries Research Division, Mie Prefectural Science and Technology Promotion Center.

Table 2 Concentration of ions and molecules in tested natural seawater

Ion or molecule	Concentration g/kg of seawater
Na ⁺	8.356
K ⁺	0.310
Mg ²⁺	1.001
Ca ²⁺	0.320
Si ²⁺	0.0062
Cl ⁻	15.016
Br ⁻	0.052
F ⁻	0.0010
HCO ₃ ⁻	0.109
SO ₄ ²⁻	2.104
B(OH) ₃	0.020

また、塩分濃度から Dexter の式⁽⁵⁾を用いて算定したイオン濃度を表 2 に示す。

使用した材料は市販のキルド鋼板 (公称板厚 0.8mm) で、その化学成分および機械的性質を表 3 に示す。原料の赤さびは海水を入れたプラスチック水槽内にキルド鋼板を浸漬・腐食させて作成した。その後、赤さびと海水を所定の重量濃度 (以下、濃度 β と表記する) で混合調整した赤さび溶液を作成し、マグネタイト生成試験に用いた。なお、得られた赤さびについては、あらかじめ X 線回折より構造を調べた結果から Fe(OH)₃ が主成分であることを確認した。また、後述の反応助剤には、キルド鋼原板から 10×10mm の正方形板を採取して使用した。

2.2 滅菌方法 微生物の効果を比較検討する際に、赤さび溶液、反応助剤および各種器具はオートクレーブ (120°C, 2.23×10⁵ Pa, 1 時間) にて、またガラス容器類は乾熱滅菌器 (200°C, 2 時間) にて、それぞれ滅菌処理を行った。以下では、滅菌処理をしない生の赤さび溶液を用いた場合を有菌試験と称する。

2.3 マグネタイトの生成試験 前報⁽⁴⁾の微生物

Table 3 Chemical composition and mechanical properties of killed steel

Composition %				Tensile strength MPa	Total elongation %
Mn	S	Fe	P		
0.19	0.006	99.68	0.012	294*	48*

* In-plane mean value

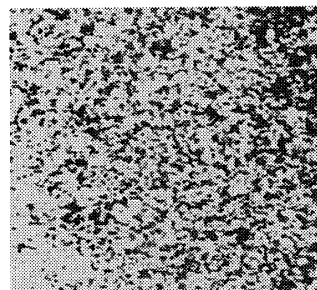


Fig. 1 Binary image of black components produced ($\alpha = 26.7\%$)

腐食の検討では、酸素供給の少ない環境の場所において微生物が赤さびをマグネタイトに変換すると推定された。そこで、本研究ではそのような環境を人工的に作ってマグネタイトを生成することをねらいとし、キルド鋼容器およびスクリー管瓶の 2 種類の容器を採用した。キルド鋼容器の場合、上述キルド鋼板から切り出した直径 90mm の円板を素板とし、これを直径 40mm の平頭ポンチを用いて張出し成形を行い、容器を作製した (深さ 10mm, 容量 12.6mL)。この容器内に所定濃度の赤さび溶液を満たし、キルド鋼板で蓋をしてステンレス製クリップで固定した後、大気と遮断するため海水を入れたポリエチレン水槽中に沈めた。また、リアクター開発の指針を得るため、ガラス瓶内に同様の環境を作り、マグネタイトを生成することを試みた。使用したガラス瓶は小型のスクリー管瓶 (容量 13.7mL) で、通常は所定濃度の赤さび溶液 12.7mL と反応助剤 (キルド鋼片) 20 枚を入れ、キャップを締めて外気と遮断した。生成実験では、同一条件につき 3 本のサンプルを準備し、これらをクリーンベンチ (クラス 10) 内で遮光した状態に置き、温度は 30±5°C とし、1 日 1 回の攪はんを行った。

赤さびからマグネタイトへの変化状況を簡便に把握する方法として、画像処理を採用した。すなわち、生成物をアルミニウム板上にできるだけ薄く伸ばしたサンプルを作成し、その金属顕微鏡拡大像に対して画像処理装置 (256 階調) を用いて 2 値化を行い、まず画像全体の面積から背景の面積を除いて生成物の占める面積 A_i を求めた。次いで生成物の像に対して 2 値化を行い、白色部 (赤さび) と黒色部 (マグネタイト) そ

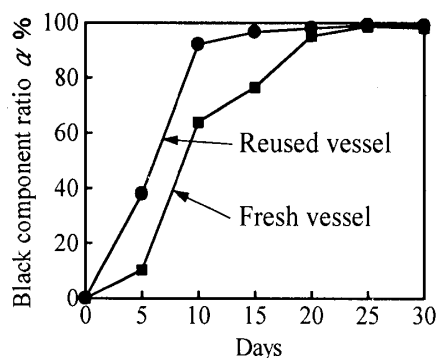


Fig. 2 Relationship between test days and black component ratio α (killed steel vessel, $\beta=0.06\%$)

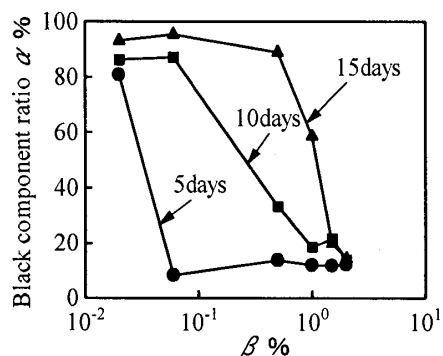


Fig. 3 Effect of red rust concentration β on α (killed steel vessel)

それぞれの占める面積を測定した。黒化率 α を次式にて定義する。

$$\alpha = A_m/A_t \times 100 \quad (\%) \quad (1)$$

ここに、 A_m はマグネタイトの占める面積である。 α の測定例を図1に示す。市販の水酸化鉄 $\text{FeO}(\text{OH})$ とマグネタイトを用いて本法の精度を調べた結果、1%程度の誤差が含まれることが分かった。

3. マグネタイト微粒子の生成挙動

3.1 キルド鋼容器による結果 赤さび濃度 $\beta = 0.06\%$ の場合について、黒化率 α と試験期間の関係を調べた結果を図2に示す。 α は10日前後から急増し、25日ではほぼ100%に達しており、提示した方法によりマグネタイトの生成が可能であることが分かった。また、図中に付記したように、容器を再利用すると黒化が促進されることも分かった。図3は α に及ぼす濃度 β の影響を示したものであるが、 β が増加するほど α は低下している。図2および図3の結果に基づいて黒化粒子の生成量(質量) M を $M = \alpha \times \text{赤さびの質量} / 100$ にて算定した結果を図4に示すが、一定の生成期間のもとでは生成質量にピークが現われ、生産性の点では β に最適値が存在すると見られる。なお、一部の条件 ($\beta = 0.3\%, 0.6\%$) で M を実測した結果、原料の

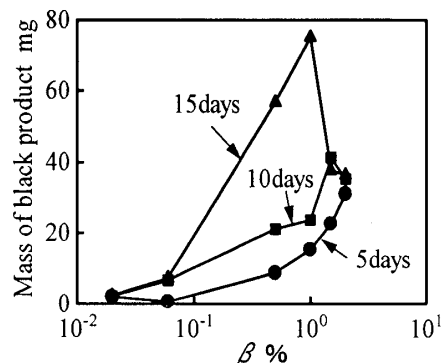
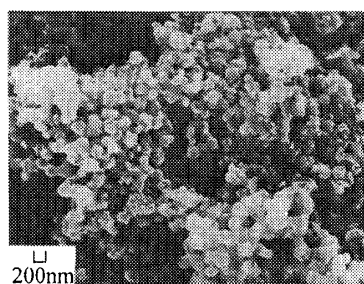
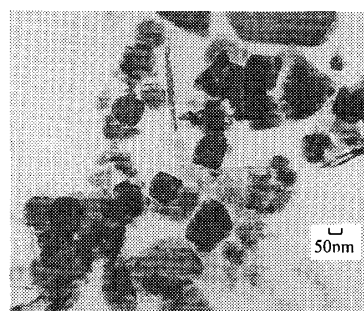


Fig. 4 Mass of black product calculated from Fig. 3



(a) SEM micrograph



(b) TEM micrograph

Fig. 5 SEM and TEM micrographs of produced black powder

赤さび質量よりも10%程度増加することが分かったが、上記計算値にはこの分は含まれていない。

生成した黒色微粒子のSEMおよびTEM写真の例を図5(a)(b)に示すが、その形状は粒状でサイズ(粒径)は約30~200 nmの範囲の分布を持つことが分かった。微粒子のX線回折結果を図6に示すが、回折角およびピークの強度は FeFe_2O_4 のものとはほぼ一致することから、微粒子はマグネタイトであることを確認した。また、生成微粒子の磁気モーメントの測定結果を図7に示すが、飽和磁化は 91.4 emu/g であり、この値は標準値 92 emu/g に近く、また現在磁気テープ等に用いられている $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ の標準値 73.5 emu/g よりもかなり大きいことが分かった。

3.2 ガラス瓶容器による結果 マグネタイト生成のためのミニリアクターをイメージしたプロセスと

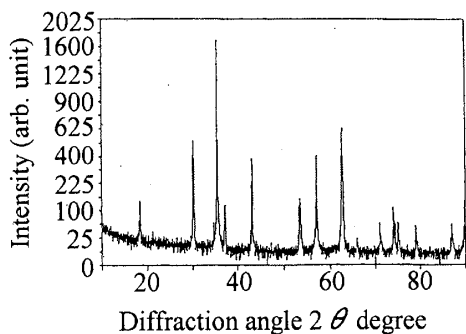


Fig. 6 X-ray diffraction pattern of black powder

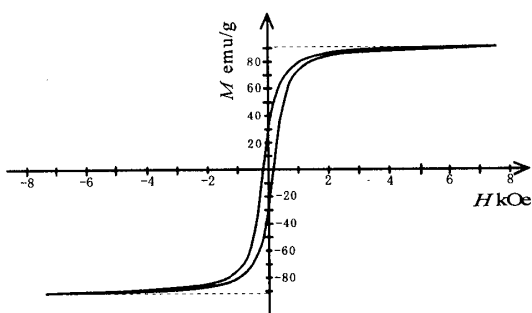
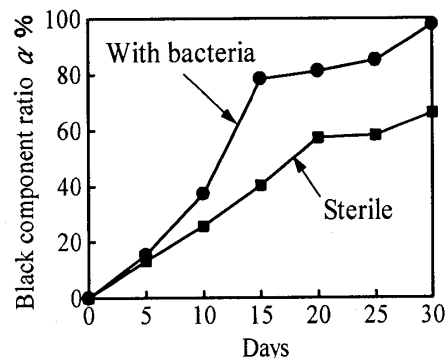
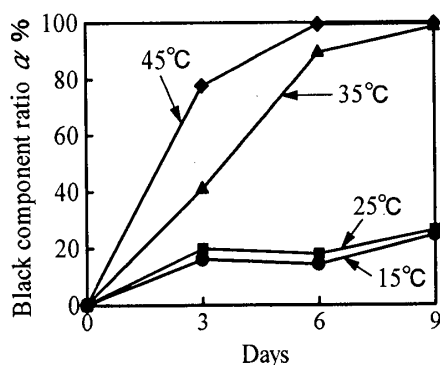


Fig. 7 Magnetic moment of produced magnetite

して、ガラス瓶容器を用いる手法の可能性についてさらに調べた。容量 13.7mL のスクルー管ガラス瓶を容器に用いて種々検討した結果、マグネタイトは赤さび溶液のみでは全く生成せず、生成に鉄イオン源が必要と考えられた。そこで、前述のキルド鋼片を挿入した結果、マグネタイト生成に成功した。よって、本報ではこのような役割を持つキルド鋼片を反応助剤と称することとし、2・3 節で述べた条件にて生成実験を行った。

赤さび濃度 $\beta=0.1\%$ のときに得られた黒化率 α と試験期間の関係を図 8 に示す。図には滅菌試験の結果も併記してある。この結果より、30 日で α はほぼ 100% となること、滅菌でも α は試験期間とともに増加し、マグネタイトを生成すること、および有菌の α の方が 15 日で約 100%、30 日でも約 35% 増加し、微生物はマグネタイト生成を促進させる効果を持つことが分かる。 α に及ぼす温度の影響を調べた結果を図 9 に示すが、対象とした温度範囲では、温度の上昇とともに α が顕著に増加することが分かる。また、 α の増加には攪はんもきわめて効果的であり、例えば振とう機を用いて攪はんしながら生成すると 24 時間で α が約 88% に達することが分かった。反応助剤については、その枚数が多いほど α が増加したが、本実験条件では 20 枚程度が実際と判断した。また、キルド鋼容器の場合と同様に、反応助剤を再利用すると α が増加することも

Fig. 8 Variation of α with test days (glass phial, $\beta=0.1\%$, no stirring)Fig. 9 Effect of temperature on magnetite production (glass phial, $\beta=0.1\%$, stirring once a day)

分かった。反応過程で発生したガスを採集し、ガスクロマトグラフィによりガス成分の分析を行った結果、主成分は N_2 : 59.5%, H_2 : 26.5%, O_2 : 10.3% であることが分かり、他に CO_2 および CH_4 が微量検出された。よって、マグネタイト生成には何らかの窒素源が関与すると考えられる。また、生成した微粒子に対してサイズ、X線回折および磁気モーメントの測定を行った結果、3・1 節に示したものとほぼ同様の結果が得られたので、生成微粒子はマグネタイトであり、ガラス瓶容器においてもマグネタイトの生成が可能と結論した。

4. マグネタイト生成に関与する微生物

前節において、微生物がマグネタイト生成を促進する効果を持つことが分かったので、本節ではどのような微生物が関与するかについて検討を行う。

4・1 生成菌の集積培養および分離抽出 一般に生成サンプル中には各種の細菌が生息すると考えられるので、その中からマグネタイト生成に関与する菌を抽出する必要がある。このため、次のような集積培養実験を行った。1 回目では、予め滅菌処理を施したガラス瓶に、滅菌した赤さび溶液 11.7mL ($\beta=0.1\%$) および反応助剤 20 枚を入れ、これに前述マグネタイト

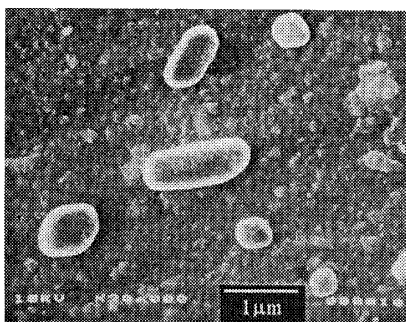


Fig. 10 Coccus and bacillus observed through enrichment culture

生成実験終了後のサンプル溶液 1mL を注入して植菌した。1日に1回振とう攪拌を行い、目視により赤さびが黒化するまで(10日前後)クリーンベンチ内に保管した。2回目以降では、植菌液は前回のサンプル液 1mL とし、反応助剤は滅菌しないで再使用した。このような操作を繰り返すと、環境に適応できない細菌は淘汰され、適合する細菌が増殖するようになる。10回の集積培養操作後のサンプル液から見出された菌の SEM 写真を図 10 に示すが、直径 $0.5\mu\text{m}$ 前後の球菌と体長約 $1\mu\text{m}$ の桿菌が観察される。また、次節で述べる方法により菌数を調べた結果、両者の比率はおおよそ 4:1 であった。

以上の結果は、これらの細菌がマグネタイト生成菌の可能性を示唆しているものの、いずれが本命か、あるいは他の菌の可能性は無いのか、といった疑問が残る。そこで、細菌の単離法として慣用されている希釈法を用いて菌の分離抽出を試みた。まず、集積培養で得られたサンプル液(菌数:約 $10^8/\text{mL}$)を滅菌海水で 1/10 に希釈し、これをさらに 1/10 に希釈した。以下、同じ要領で希釈操作を 10^9 になるまで繰り返し、こうして得られた 9 種類の希釈液を植菌液として用いた。そして、集積培養の場合と同じ要領で、滅菌処理を施したガラス瓶に滅菌した赤さび溶液 11.7mL ($\beta=0.1\%$) および反応助剤 20 枚を入れ、これに所定の植菌液 1mL を注入したサンプルを作成した。1日に1回振とう攪拌を行い、試験期間は 13 日とし、試験後に SEM にて菌の観察を行った。この結果、希釈を増すほど菌は減少し、 10^7 までの希釈サンプルには上述 2 種類以外の細菌が認められたが、 10^8 の希釈では 2 種類のみとなった。そして、 10^9 の希釈では菌が全く存在しないサンプルが主体となり、まれに球菌もしくは桿菌の存在が認められた。よって、この 2 種類の菌をマグネタイト生成菌の候補と判断し、その生成能および生成環境について以下に調べた。

4.2 菌数と黒化率の関係および生成環境 本研究で着目した細菌は、コロニーを形成せず、サンプル

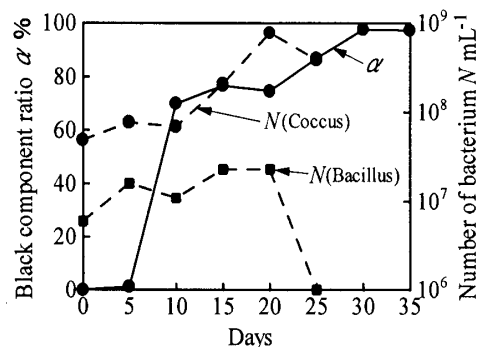


Fig. 11 Relationship between α and number of bacteria (glass phial, $\beta=0.1\%$, no stirring)

内の菌数もさほど多くないうえ、主体となる球菌のサイズが $0.5\mu\text{m}$ 前後ときわめて小さいため、光学顕微鏡を用いる血球計算盤法やルミカウンター法といった通常の菌数評価法が通用しないことが分かった。そこで、次のような SEM による直接測定という便法を採用することにした。まず、直径 4.51mm の円形プールを持つ試料台を作製し、これにサンプルの 1/20 希釈液 $20\mu\text{L}$ を注入後、乾燥させた。この試料内の 30 箇所 SEM 写真を撮影し、菌の総数 n を求めた。サンプル液 1mL 当たりの菌数 N は、 $N=nl(30 \times A) \times B \times 10^3$ (mL) にて換算した。ここに、 A は写真の撮影面積、 B は試料台プール円内の面積である。この方法による分解能は $1.3 \times 10^6/\text{mL}$ であり、これ以下の菌数は検知できない。

ガラス瓶容器を用い、天然海水、赤さび濃度 $\beta=0.1\%$ 、攪拌なしの条件のもとで、改めてマグネタイト生成実験を行い、得られた黒化率 α と菌数 N/mL の関係を図 11 に示す。菌数としては、前述の球菌および桿菌について調べた。図によれば、0~5 日と 10~20 日で両者の増殖があり、これより 5 日程度遅れて α が増加することが分かる。この理由としては、後述のように、菌の活動によって生じた NO_2^- もしくは NO_3^- イオンが副次的に赤さびを還元すること、元来この還元反応には時間を要すること、が挙げられる。また、図より菌数としては球菌が桿菌に比べてきわめて多いことが分かる。この実験では、生成サンプルの pH および溶存酸素も同時に測定した。その結果を図 12 に示すが、マグネタイト生成中に pH はほぼ一定であること、および溶存酸素はマグネタイト生成とともに減少することが分かる。

これらの結果より、上記 2 種類の細菌はいずれも、マグネタイト生成に効果があり、溶存酸素が多少あっても増殖する好気性細菌であること、したがって、天然海水中ではこれらの混合菌がマグネタイト生成に

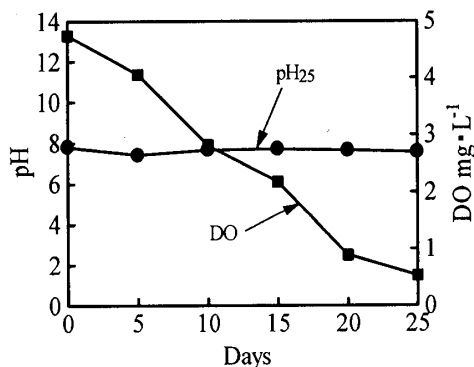


Fig. 12 Dissolved oxygen and pH measured during magnetite production (glass phial, $\beta=0.1\%$, no stirring)

関与すると結論できる。しかし、両者の役割分担については現段階では明らかでない。

4.3 見出されたマグネタイト生成菌の位置付け

磁性体に関連する微生物としては、従来から細胞内にマグネタイト微粒子を生成する走磁性細菌⁽⁶⁾が知られているが、最近になって細胞外でマグネタイトを生成する鉄還元細菌 GS-15 が発見された⁽⁷⁾。前者では収量がきわめて少ないのに対して、後者は菌体重量の約 100 倍のマグネタイト生成能力を持つとされている。しかし、GS-15 はポトマック川河口から採取された体長 1~2 μm の桿菌であるが、偏性嫌気性であるため厳重な環境管理を要することから工業的応用に向かないと思われる。一方、本研究で見出された混合菌は伊勢湾の天然海水から採取したものであるが、細胞外でマグネタイトを生成する点では GS-15 と似ているものの、生育環境は好気性であり、後述のように作用もこれと異なっている。よって本研究の混合菌は、少なくとも機能面で新しいタイプの細菌と見なすことができ、比較的容易に扱えるので工業的応用も期待できる。

5. マグネタイト生成菌の役割

5.1 人工海水による細菌の培養 本研究で見出された細菌の特性をさらに調べるため、人工海水による培養を試みた。用いた人工海水の化学成分を表 4 に示す。3.2 節で述べた分析結果から、発生ガスの中で N_2 がもっとも多くの割合を占めた点に注目し、ここでは窒素源に関わる細菌について検討した。 N_2 ガスを発生する細菌としては硝酸塩還元細菌 (脱窒菌) が知られているので、まず、人工海水に硝酸塩還元細菌用添加剤を加えた培養液を作成し、これに前述集積培養により得られた菌を植菌した。培養後の菌を観察した結果、球菌および桿菌の増殖が認められたが、マグネタイト生成実験に適用したところ全く生成せず、よって

Table 4 Chemical composition of artificial seawater (5 times enrichment)

Constituent	Mass g
NaCl	150
KCl	3.5
MgCl ₂ ·7H ₂ O	54
CaCl ₂ ·7H ₂ O	27
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	5×10^{-3}
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5×10^{-3}
MnSO ₄ ·4H ₂ O	5×10^{-3}
Deionized water	1000 mL

Table 5 Chemical composition of culture medium for ammonia-oxidizing bacteria

Constituent	Mass g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.03
CaCO ₃	7.5
Deionized water	800 mL
Artificial sea-water (5 times enriched)	200 mL

pH=7.5

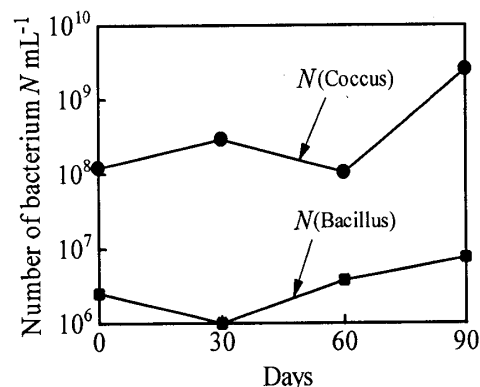


Fig. 13 Number variation of bacteria cultured in medium for ammonia-oxidizing bacteria

本研究の菌は脱窒菌でない判断した。

次に、アンモニア酸化細菌 (硝化細菌) に着目して細菌の培養を試みた。使用したアンモニア酸化細菌用培養液の化学成分を表 5 に示す。培養試験期間に伴う菌数の変化を図 13 に示すが、90 日間の培養で球菌が 1 けた以上増加し、桿菌は微増した。また、後者はわずかであり、前者が大半を占めた。同じく 90 日間の培養後における窒素に関するイオンを調べた結果、 $\text{NH}_4\text{-N}$ は 5.84mg-at/L、 $\text{NO}_2\text{-N}$ は 1.75 $\mu\text{g-at/L}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ は 2.0 $\mu\text{g-at/L}$ であった。培養初期では $\text{NH}_4\text{-N}$ は 7.58mg-at/L であり、他の 2 つはゼロであったので、この結果は、 NH_4^+ が減少し、わずかではあるが NO_2^- お

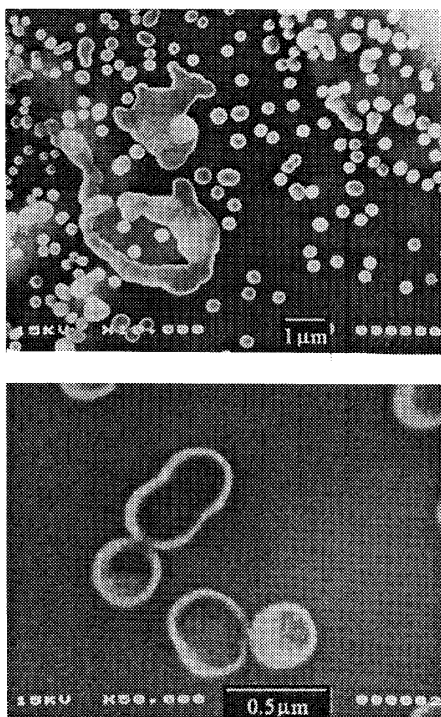
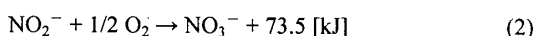
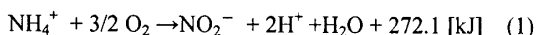


Fig. 14 SEM micrograph of cocci obtained in enrichment culture using artificial seawater and medium for ammonia-oxidizing bacteria (lower : magnified picture of upper)

よび NO_3^- が生じたことを示している。一般に、アンモニア酸化細菌は次のように、 NH_4^+ を酸化して NO_2^- および NO_3^- を生成する作用を持つことが知られている⁽⁸⁾。



上記のように、本実験で着目した細菌はアンモニア酸化細菌用培地にて増殖し、アンモニアイオンの酸化に対してプラスの反応を示すので、アンモニア酸化細菌の一種と考えられる。

5・2 マグネタイトの生成挙動 人工海水にて培養した細菌のマグネタイト生成機能についても調べた。天然海水で用いた集積培養法に準じて、人工海水の赤さび溶液 10.7mL ($\beta=0.1\%$)、アンモニア酸化細菌用培養液 1.0mL および反応助剤 20 枚を容量 13.7mL のガラス瓶に入れ (いずれも滅菌処理)、これに 90 日培養菌を含む溶液 1.0mL を植菌し、マグネタイト生成実験を行った。まず、植菌しない場合には黒化は全く生じないことが分かった。一方、植菌した場合には集積 1 回目 (試験期間 25 日) で $\alpha=5.6\%$ とわずかであるが黒化が進行し、集積 4 回目以降では 10 日程度で 90% 近くの α となり、天然海水の場合を凌ぐマグネタイト生成が可能となった。これらの結果より、培養した菌

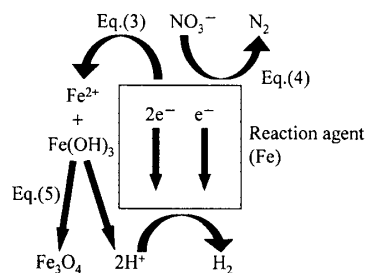


Fig. 15 Schematic explanation of magnetite formation mechanism

はマグネタイト生成機能を持つことが確認され、環境に順応して活発に増殖するようになるとその効果も顕著に現れると言える。この集積培養サンプル液中においても球菌と桿菌が観察されたが、前者が大半を占めたので、主にこの球菌がマグネタイト生成に関与したと考えられる。球菌の SEM 写真を図 14 に示す。

5・3 マグネタイト生成メカニズムの検討 5・1 節

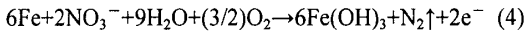
の結果より、細菌が生成する NO_2^- および NO_3^- がマグネタイト生成に関与する可能性が考えられたが、ここでは NO_3^- について検討した。海水の代わりに KNO_3 溶液を溶媒とした赤さび溶液 12mL ($\beta=0.1\%$) および反応助剤 20 枚 (いずれも滅菌処理) を容量 13.7mL のガラス瓶に入れ、化学反応のみによるマグネタイト生成実験 (試験期間 10 日) を行った。この結果、低濃度の KNO_3 溶媒であればマグネタイト生成が可能であり、濃度 0.438mol/L のとき α は 78.9% となり、天然海水を若干上回る黒化率が得られた。この場合に発生したガスを分析した結果、主成分は N_2 : 47.5%, H_2 : 45.7%, O_2 : 1.5% であった。NaNO₃ を溶媒にした場合にも同様の α が得られ、さらに人工海水による実験で KNO_3 を添加するとマグネタイト生成が促進されることも分かった。これらの結果より、 NO_3^- イオンがマグネタイト生成に関与すると結論できる。 NO_2^- については、実験で劇物薬品を扱わねばならないのでここでは控えたが、同様の効果を期待できる。上記のように化学反応のみによりマグネタイト生成は可能であるが、生成後の廃水を処理するためのプロセスが新たに必要になる。一方、微生物を用いれば、化学薬品を一切使う必要がなく、廃液は脱窒反応により浄化されているので、より低コストで環境に優しいリサイクルが可能である。

現段階では本実験におけるマグネタイト生成メカニズムの完全な説明は困難であるが、前述の結果より NO_3^- イオンに関わるメカニズムは概ね次のようなものと考えられる。その模式図を図 15 に示す。まず、反応助剤 (鉄片) の表面では次のような反応が起こる

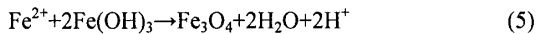
(アノード反応) .



反応助剤は NO_3^- を酸化する作用を持つ. その過程は複雑であるが, 最終的には次のような反応により N_2 を発生する (脱窒反応) .



一方, 赤さびからマグネタイトが生ずる過程は Lovley ら⁽⁹⁾によって次の反応式によって説明されている (赤さび還元反応) .



ここで生じる 2H^+ を除去する何らかの仕組みが存在すれば, 式(5)の反応が進行することになる. 本研究の場合には式(3)および(4)により生じた電子を 2H^+ が受容して H_2 として放出するカソード反応がそれに該当する. 一方, Lovley らが見出した GS-15 菌の場合には, 有機物が電子供与体になり, その酸化により生じた電子が赤さび還元反応を担うとされている⁽⁷⁾. ここで提示した生成モデルによれば, マグネタイトの生成質量が原料よりも 10%程度増加すること, 主成分ガスである N_2 および H_2 が発生すること, 溶存酸素が減少すること, NO_3^- イオンがマグネタイト生成を促進すること (電子供給の仕組みとして式(3)や海水中に NO_3^- イオンが存在すれば可能), が説明できる. 式(5)における自由エネルギー変化が $\Delta G^\circ = -90\text{kJ}^{(9)}$ と絶対値が小さく, 従って反応に相当の時間を要すると考えられる. なお, 本モデルでは O_2 ガスの発生を説明できない.

N_2 と H_2 の発生割合については, 元来, 式(4)と(5)の反応は互いに独立に起こり, 電子の伝達効率に依存して変化すると考えられるので, 単純に化学量論的には決まらないと思われる. 結局, 本研究において見出したアンモニア酸化細菌の役割は電子供与源となる NO_2^- もしくは NO_3^- を生成することであり, これらが副次的に赤さび還元反応に加担した結果, 細胞外でマグネタイト生成を促進すると結論できる. ただし, アンモニア酸化細菌でさえあればどのようなものでもマグネタイトを生成できるとは言えない. 抑制因子の有無が関わってくるからである. また, 本マグネタイト生成法には反応助剤 (鉄片) が不可欠であり, これは Fe_2^+ の供給源になると同時に電子伝達媒体の役目も担っていると考える.

6. 結 言

本研究で得られた主な結果は次の通りである.

(1) キルド鋼およびガラス瓶の容器内で微生物が機能

する人工環境を構成し, 赤さびからマグネタイト微粒子を再生することに成功した. 生成された微粒子の粒径はおよそ 30~200 nm であり, 飽和磁化は 91.4 emu/g であり磁気テープ等に用いられている $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ の標準値よりもかなり大きいことが分かった.

- (2) ガラス瓶容器の場合, 滅菌条件下でもマグネタイトを生成できるが, 菌の適用は生成を促進する効果を持ち, 本実験では 30~100%程度増加できた.
- (3) マグネタイトの生成過程において, 直径約 0.5 μm の球菌と体長約 1 μm の桿菌を見出した. 両者の数の割合はおおよそ 4:1 であった. また, 集積培養および分離抽出を行った結果から, これらの混合菌がマグネタイト生成に関与すると結論した.
- (4) 見出された細菌について種々検討した結果, 最終的に好気性のアンモニア酸化細菌と断定され, これまでに報告されている GS-15 菌と異なるタイプのマグネタイト生成菌と考えられた.
- (5) 本法におけるマグネタイト生成メカニズムのモデルを提示した. モデルでは, アンモニア酸化細菌は電子供与源となる NO_2^- もしくは NO_3^- を生成する作用を持ち, これらが副次的に赤さび還元反応に加担した結果, 細胞外でマグネタイト生成を促進すると説明された.

本研究の一部は, (財)三重県産業支援センター平成 12 年度地域研究開発促進拠点支援事業および平成 13 年度三重大学重点経費の援助により実施された.

文 献

- (1) 宇野義幸・金枝敏明・横溝精一, 機論, 59-566, C(1993), 3199-3204.
- (2) Kurosaki, Y., Matsui, M., Nakamura, Y., Katoh, H. and Yokota, J., Proc. IMMM2001, (2001), 289-294.
- (3) Decker, R. F., Metallurgical Transactions A, 17A (1986), 5-30.
- (4) 黒崎靖・松井正仁・中村裕一・村井健一・木村俊夫, 機論, 67-661, C(2001), 3013-3020.
- (5) Dexter, S. C., Metals Handbook 9th Ed., Vol. 13 Corrosion, (1987), 114-122, ASM International.
- (6) 松永是, 日本物理学会誌, 45-4(1990), 227-232.
- (7) Lovley, D. R., Stolz, J. F., Gordon, L. N. and Phillips, E. J. P., Nature, 330-19(1987), 252-254.
- (8) 今井和民, 独立栄養細菌, (1984), 52-60, 化学同人.
- (9) Lovley, D. R. and Phillips, E. J. P., Applied and Environmental Microbiology, 54-6(1988), 1472-1480.