

校庭ワカメはバイオミネラルゼーションを行っているのか

高松第一高等学校 三宅 海斗 十河 光杏 岡田 彩楽

1. 動機と目的

駐車場や公園・校庭などに生息し、群体の見た目から校庭ワカメと呼ばれているイシクラゲ (*Nostoc commune*) はシアノバクテリアの一種であり、乾燥に強く窒素固定を行うことができる原核生物である。先行研究 1 より、Wil V. Srubar IIIらがシアノバクテリアの一種で海洋に生息している *Synechococcus* 属を用いて生きたコンクリートを作製したことを知った。砂とゼラチンを主体とする混合物の中で増殖した *Synechococcus* 属はバイオミネラルゼーションという生物が鉱物を作り出す働きによって CaCO_3 を生成し、砂粒子同士をつなげるゼラチンの架橋結合の強度を高めている。私たちは身近にあるイシクラゲを用いてコンクリートを作り、そのコンクリート内でイシクラゲがバイオミネラルゼーションを行っているのかの検証を行った。

2. 実験

実験I：コンクリートは作れるのか

先行研究 1 を参考に材料を *Synechococcus* 属からイシクラゲに変更し、その他は同じ材料を使ってコンクリートの作成を試みた。

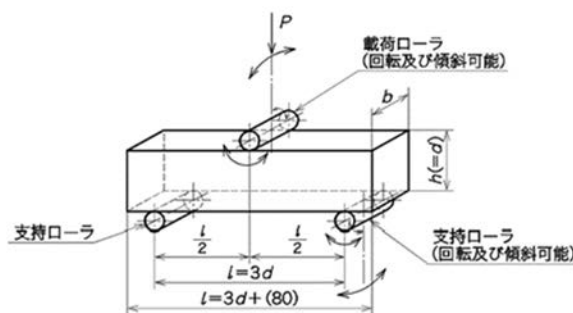
学校で採集したイシクラゲ 20g を水洗いし同量の水とミキサーにかけた。そこにさらに水を加え 20%のイシクラゲ液を作成した。次にビーカーでゼラチン 10g を 50°Cの水 100ml に溶かした。水温 40°Cになった後、 NaHCO_3 0.84g を加え、pH7.0 に調整した。その後、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.47g を加え、溶液 A を作成した。溶液 A にイシクラゲ液を 50ml 加えて、水温 37°Cで約 1 時間攪拌した後、室温 37°Cで一晩スターラーを用いて攪拌した。その後、川砂 180g を混ぜ、2cm×6cm×2cm の型に入れ、850Lux の光を当てながら 4°C の低温培養器で 1 週間乾燥させた。乾燥させたコンクリートを型から取り出し、耐圧性を調べるために密度を測り、デジタルフォースゲージ (図 1) で 3 点曲げ試験を行い曲げ強度を調べた (図 2)。先行研究 3 より曲げ強度とは物体が曲げ破壊されるときに必要なエネルギーである (図 3)。また、イシクラゲのみを無くし、他の材料を同様の割合加えイシクラゲ無しのコンクリートを作成し、イシクラゲありのコンクリート、一般的に使用されている建築用コンクリート、塗装用コンクリートと曲げ強度を比較した。



図 1 デジタルフォースゲージ



図 2 三点曲げ試験の様子



d: 供試体の断面の一边の長さの公称値

図 3 曲げ強度試験

曲げ強度の計算式

$$f_b = \frac{3pl}{2bh^2}$$

f_b : 曲げ強度 (N/mm²)

P: 試験機の示す最大荷重 (N)

l: スパン (mm)

b: 破壊断面の幅 (mm)

h: 破壊断面の高さ (mm)

〈実験Iの結果〉

コンクリートのようものが15個作製できた。密度はインクラゲありはなしより大きく(図4)、曲げ強度はインクラゲありはなしより弱かった。塗装コンクリート、建築用コンクリートに比べ曲げ強度は大きかった(図5)。

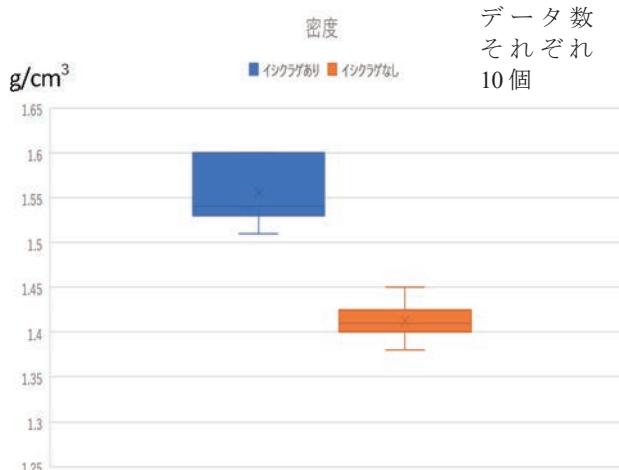


図4 作成したコンクリートの密度の比較

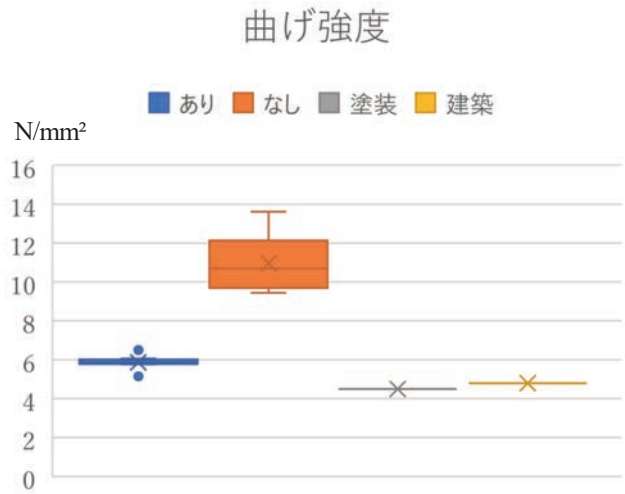


図5 作成したコンクリートと塗装コンクリートと建築用コンクリートの曲げ強度の比較

〈実験Iの考察〉

インクラゲがバイオミネラリゼーションを行いコンクリートが硬化したのではないかと考え、それを確かめるための実験IIを行った。

実験II: バイオミネラリゼーションは起っているのか

実験1の三点曲げ試験の結果からインクラゲにも *Synechococcus* 属と同じようにバイオミネラリゼーションによって CaCO_3 を合成する力があると考え、インクラゲありとなしでは CaCO_3 合成量に差があると仮説を立て実験を行った。方法は CaCO_3 と HCl が化学反応し、 CaCl_2 、 CO_2 、 H_2O が発生する ($\text{CaCO}_3 + 2\text{HCl} \rightarrow \text{CaCl}_2 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) ことを用いた。

インクラゲあり、なし両方のコンクリートを10g碎いて HCl 0.1mol/L を2mL混合して、 CO_2 の発生の有無を石灰水を用いて調べた(図6)。

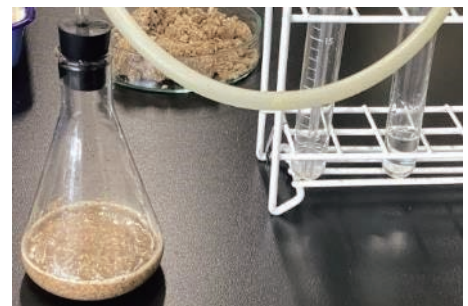


図6 実験IIの様子

〈実験IIの結果〉

「あり」と「なし」の両方で同じように、石灰水が白く濁った。インクラゲがなくても CaCO_3 の生成が確認できた(図7)。図の左は、インクラゲ無しの結果である。

〈実験IIの考察〉

インクラゲがなくても CaCO_3 の生成が確認できた。つまり、これまで使用していた NaHCO_3 と $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ が反応し CaCO_3 が生成されており、バイオミネラリゼーションによってできたものか判断できないことに気づいた。



図7 実験IIの結果

実験III：実験Iから NaHCO₃ を抜いて検証

水に CaCl₂・2H₂O のみを加え Ca²⁺がある状態にし、イシクラゲを加え振とうさせ光を当てながら 1 週間観察した (図 8)。

〈実験IIIの結果〉

生成した CaCO₃ は白く沈殿するはずだができていなかった。水にイシクラゲと CaCl₂・2H₂O を加え 1 週間振とうさせたものに HCl を加えたが反応せず、石灰水は白く濁らなかった (図 9)。

〈実験IIIの考察〉

この実験でイシクラゲは水中にあり、コンクリートを作ったときの環境と異なるので反応が見られなかったと考え、改善した実験IVを行った。

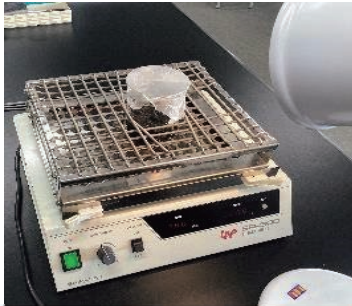


図 8 イシクラゲを振とうさせている様子



図 9 実験IIIの結果

実験IV：耐圧性と CaCO₃ の有無を調べる

4 種類のコンクリート (イシクラゲ・NaHCO₃ あり, イシクラゲあり・NaHCO₃ なし, イシクラゲなし・NaHCO₃ あり, イシクラゲなし・NaHCO₃ なし) を作成し, 三点曲げ試験により耐圧性を調べた。また, 実験IIと同様の方法で CaCO₃ の有無を調べた。

〈実験IVの結果〉

イシクラゲありの実験Iと同様に作成したコンクリートの曲げ強度は平均して 6.0N/mm²で NaHCO₃ を除いたコンクリートでは 5.0N/mm²であった。イシクラゲなしの実験Iのコンクリートの曲げ強度は 11.0N/mm²で NaHCO₃ を除いたコンクリートでは 9.0N/mm²であった(図 11)。

また, 砕いたコンクリートに HCl を加え反応を見たが反応は見られなかった (図 12)。

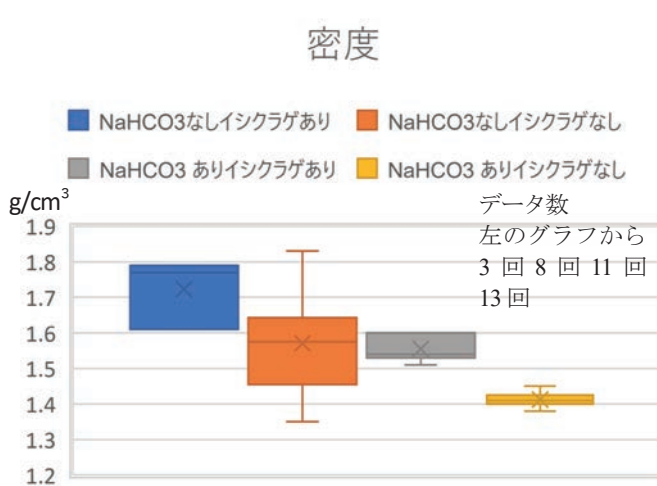


図 10 4 種のコンクリートの密度

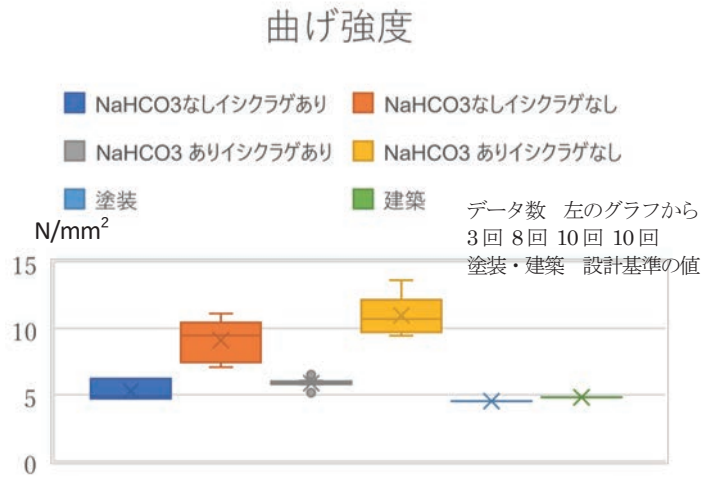


図 11 4 種のコンクリートの曲げ強度

〈実験Ⅳの考察〉

実験Ⅰのコンクリートと NaHCO_3 を除いたコンクリートの曲げ強度に差があることから、 NaHCO_3 の有無がコンクリートの強度に影響を与えており、コンクリート中に CaCO_3 が形成されているかの差につながったと考えられる。よって、材料に含まれる NaHCO_3 と $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の反応で生成される CaCO_3 がコンクリートの強度に影響を及ぼしていることが分かった。

イシクラゲありとなしで曲げ強度にかなりの差があるのはイシクラゲ自身の水分により、コンクリートが湿っていた可能性があると考えた。

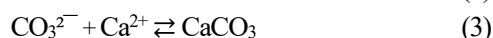
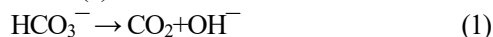
また砕いたコンクリートと塩酸の反応がなく CaCO_3 の生成が確認できなかったことから、イシクラゲの炭酸塩を出す能力はかなり低いと考えられる。実験Ⅲ、Ⅳより、イシクラゲのバイオミネラリゼーションを行う条件として水中やコンクリート内はふさわしくないと考える。イシクラゲがバ炭酸塩を作っていないことは水中でもコンクリートの中でも同じである。では、イシクラゲはバイオミネラリゼーションは行わないのだろうか。それとも、イシクラゲがバイオミネラリゼーションを行うには別の環境が必要なのだろうか。検証を行った。

実験Ⅴ: 環境水でバイオミネラリゼーションを行うのか



図 12 実験Ⅳの様子

先行研究 5 からバクテリアの HCO_3^- の生成とバイオミネラリゼーションには精製水ではなく、河川、湖、海などの公共用水域の水、地下水などの環境水が必要だということが分かった。緑色硫黄細菌・紅色硫黄細菌などの光合成細菌や藻類は、光合成の際に環境水に溶けている HCO_3^- を炭酸源として利用すると OH^- が生じる(1)。 OH^- と HCO_3^- が反応し、 CO_3^{2-} が生じる(2)。ここに Ca^{2+} が存在すると CaCO_3 が沈殿する(3)。



同様にイシクラゲのバイオミネラリゼーションにも、精製水ではなく、 HCO_3^- が溶けた環境水が必要なのではないかと考えた。そこで、 $\text{NaHCO}_3 0.84\text{m g}$ を溶かした水 100mL にイシクラゲを入れ約 1 週間振とう培養を行い、培養前後の pH を測定した。水溶液の pH が増加すれば、 CO_3^{2-} が発生するので、ここでは炭酸塩が生じていることがわかる。

〈実験Ⅴの結果〉

実験開始時の pH は 9～10 で、1 週間観察したが pH10 で変化はなかった。

〈実験Ⅴの考察〉

結果よりイシクラゲは CO_3^{2-} を生成していないと考えられる。1 週間ほど実験していたのでイシクラゲが死んでいるのではないかと思い確認したが生存していることが分かった。つまりイシクラゲは、シネココッカスと比べて、 CO_3^{2-} 生成能力が乏しいのではないだろうか。 CO_3^{2-} を生成していれば、培養液の pH は上昇すると考えていた。そこで、 NaHCO_3 水溶液の pH 理論値を求め、実際に得た pH と比較した。

炭酸水素ナトリウムを水に溶かすと、電離する (4)。電離した炭酸水素イオンは加水分解を行う (5)。



(5) から理論値の pH が 9.65 であるとわかった。実際に得た pH は 10 であったため、[OH⁻] が増えたことが分かる。炭酸イオンの加水分解の式を (6) とする。



K₁ < K₂ から (6) の反応で、[OH⁻]が増加したことが分かる。[OH⁻]が増加したということは、ルシャトリエの法則より、CO₃²⁻が増えたと言える。つまり、イシクラゲのバイオミネラリゼーションにより CO₃²⁻が生じたのではないか。ここで、[OH⁻]を実際の値と理論値と比較すると、[OH⁻] = 5.5 × 10⁻⁵ mol/L 増加しているため、生成された炭酸カルシウムは 5.5 × 10⁻⁵ mol/L であると考えられる。

3. 結論

作製したコンクリートはそれなりの耐圧性があり、改良を重ねれば花壇等の建材として利用可能ではないかと考えられる。また、生成量はわずかではあるが、イシクラゲはバイオミネラリゼーションを行っていると考えられる。イシクラゲがバイオミネラリゼーションを行う条件として、炭酸水素イオンが溶けている環境水が必要である。

4. 今後の展望

pH メーターの値が一定にならなかったので再度実験Vを行い、pH が理論値に近づくか調べたい。実験Vの結果から、溶液が平衡かつ予想される炭酸イオンの生成量において反応がわずかであったため、イシクラゲの量で炭酸塩の生成量が増えるのかどうかを調べたい。また、現在の培養時間は1週間であるが、培養時間と生成量の関係を知るために、1か月間に実験期間を伸ばしたい。実験Vでは水中で行ったため、実際に砂があるコンクリート内で行い、CaCO₃の生成の確認を元素分析機などを用いて行い、コンクリートの強度にどれくらい影響を及ぼすかを調べたい。卵の殻はバイオミネラリゼーションを行って固まっており、油分を足すことでより固まることを知った。そこで、イシクラゲにも油分を足し実験を行いたい。他の陸生シアノバクテリア (アフアニゾメノン等) でもコンクリートが作れるのか試して、バイオミネラリゼーションを行っているのか調べたい。

5. 参考・引用文献

1. Biomineralization and Successive Regeneration of Engineered Living Building Materials. Wil V. Sruar III et.al. Matter. 2(2). 481~494. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2019.11.016> (参照2023.7.12)
2. 日経クロステック 微生物が増殖させる疑似コンクリート, 米コロラド大で開発 <https://xtech.nikkei.com/atcl/nxt/column/18/00142/00673/>(参照 2024.4.30)
3. コンクリートの曲げ強度試験方法 2018 <https://kikakurui.com/a1/A1106-2018-01.html> (参照 2024.4.27)
4. 全国生コンクリート工業組合連合会 <https://www.zennama.or.jp/faq/pdf/Q-2201.pdf> (参照 2024.4.29)
5. Journal of Environmental Biotechnology (環境バイオテクノロジー学会誌) Vol.8,No.1,3-7, 2008 炭酸塩岩と微生物 Carbonate Rock and Microorganisms 幸村 基世, 長沼 毅 <https://www.jseb.jp/wordpress/wp-content/uploads/08-01-003.pdf> (参照 2024.6.21)

6. 謝辞

本研究を進めるにあたり、高松第一高等学校 教諭 大砂古 美弥先生をはじめ、その他理数系の先生方にご指導ご鞭撻を賜りました。ありがとうございました。