

多摩川底質中の硫酸還元菌による硫化鉄
化合物生成と悪臭低減に関する研究

2005年

松尾 基之

東京大学大学院総合文化研究科助教授

序 論

1-1. はしがき

多摩川河口域の底質中では、有機物を含む河水と硫酸イオンを含む海水とが混合し、堆積した有機物をエネルギー源とする微生物の働きが活発である。特に底質深層では嫌気性の硫酸還元菌の働きにより、硫酸イオンが硫化水素に還元されて悪臭の原因の一つとなっている。しかし、底質中の鉄化合物や水中の鉄イオンが、この硫化水素を硫化物として固相に固定することで、悪臭低減に寄与していると考えられる。実際に、我々のこれまでの研究により、河口域底質中からは非晶質の硫化鉄(FeS)やパイライト(FeS₂)が検出されており、特に後者は水域の酸性化にも強く、その寄与が大である。しかし、パイライトは一般に高温・高圧下で生成されるとされており、河口域のような穏和な条件下での生成メカニズムは、まだよく分かっていない。そこで本研究では、硫酸還元菌が硫酸イオンを還元していく途中に、様々な中間酸化状態の硫黄化合物を生成することに着目し、それらがどのようにパイライト化反応に関与しているかを明らかにすることを目的とする。具体的には、実際に多摩川河口域底質中から硫酸還元菌を単離して、実験室内で培養実験を行い、中間生成物中に含まれる硫化鉄化合物の化学状態を分析する。その上で、どのような化学種を経て硫化鉄がパイライトになるかを明らかにし、硫酸還元菌によるパイライト生成とそれに伴う悪臭低減メカニズムを推定する。

本研究の特色は、硫酸還元菌により生成された鉄化合物の検出に、試料の化学的前処理を全く必要とせずに鉄の化学状態の分析を行うことができる、メスパウアー分光法およびX線吸収微細構造(XAFS)法を用いることにある。鉄の酸化数の変化を追跡するだけならば、従来の湿式分析法でも可能であるが、本法を用いることにより初めて化学種まで特定することができ、初生的な非晶質の硫化鉄がパイライトになるまでの過程を非破壊で追跡することができる。また、これらの非破壊分析法を用いることは、単に試料分解の手間を省くだけでなく、溶液化に伴う試料の化学状態変化の懸念がないという点で、従来の湿式分析法にはない本質的な利点がある。

河口域底質中での硫酸還元菌の役割は、後述するように、従来その名の通り硫酸イオンを硫化物イオンあるいは中間酸化状態の硫黄化学種に還元するだけのものと思われていた。しかし、Fe²⁺とS₂²⁻からは、直接的にFeS₂は生成されず、非晶質FeSに0価の硫黄が反応してFeS₂を生成する反応も、最低でも60~85の温度が必要とされている。河口域のような穏和な条件下で、硫酸還元菌が硫酸を還元するだけにとどまらず、パイライトの生成にも直接関与していることを予測し、培養実験によりそのことを明らかにする試みは、これまでにない全く新しい独創的な発想である。硫酸還元菌によるパイライト生成とそれに伴う悪臭低減は、底質自体に自然の浄化能が備わっていることを意味すると考えることができる。本研究を通して、底質中の硫酸還元菌が「硫酸を還元する」他に、悪臭低減に役立つパイライトの生成反応にも寄与していることが解明されれば、自然の浄化能を生かすことにより、悪臭発生を未然に防ぐ手段を考える一助になるかもしれない。あるいは、

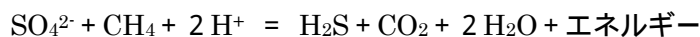
どの程度、悪臭発生に対する自然浄化能が残っているかを、実際に変化が現れる前に評価できる可能性がある。底質中の硫酸還元菌や鉄化合物は、ごく普通に存在するものなので、本研究で得られた知見は、多摩川に限らず他の河川にも広く適用されるものと思われる。また、このことは、硫酸還元菌の働きについて一種のバイオミネラリゼーションという内容が加わるわけで、このような河口域という化学反応の場における物質変換の過程に対して、新たな知見が得られる点でも本研究の意義は大きい。

1-2. 硫酸還元菌と地球環境

1-2-1. 河口域底質中における硫酸還元菌の役割

硫黄の酸化数は地球化学的循環を通じて、-2 から +6 まで幅広い変化を示す。この循環を担う要因として、酸化還元境界にすむ微生物の働きも重要である。

底質中の隙間を満たす隙間水中の硫酸イオンは酸化的な海水から隔離され、有機物に囲まれた隙間水中に閉じ込められる。このような環境では硫酸より硫化水素が化学的に安定である。仮に有機物をメタンに見立てると、次の反応によって、右に進めばエネルギーが放出されることになる。



低温の底質中で反応を右に進め、エネルギーを獲得しているのが硫酸還元菌である。反応が右に進めば、硫酸が減少し硫化水素が増加して系が平衡に達してしまう。だが隙間水中の SO_4^{2-} 濃度が低下すると、海水から SO_4^{2-} が拡散によって運ばれ補給される。逆に H_2S と CO_2 は上向きに拡散していく。また底質中には反応性の高い鉄が存在し、 H_2S を硫化鉄化合物に変換する。さらにこのような条件が続く限り、反応が平衡に達することが妨げられ、硫酸還元菌は硫化鉄を沈澱し続ける事が出来ると考えられる。

河口域底質中での反応を模式的に表すと、Fig.1-1 のようになる。硫酸還元菌の働きにより SO_4^{2-} イオンが S^{2-} にまで還元されるが、この過程で生じるさまざまな中間酸化状態の硫黄化学種と、底質中の鉄化合物や鉄イオンが反応して硫化鉄化合物が生成されている。

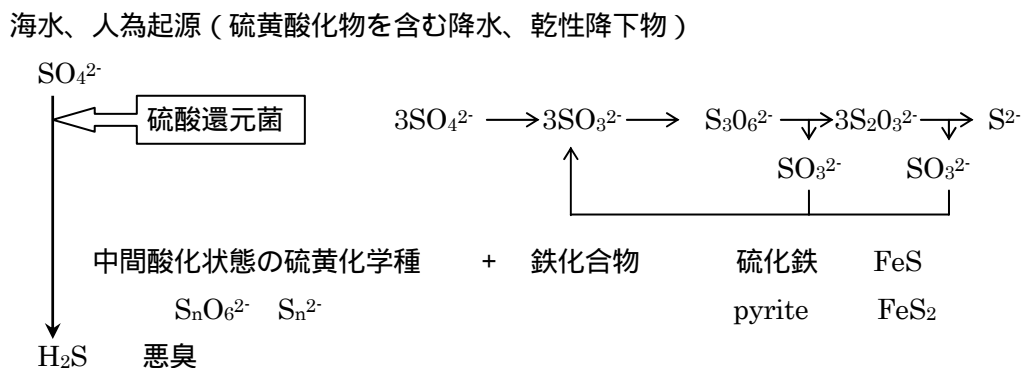


Fig.1-1 底質中における硫酸還元菌の硫酸還元過程模式図

1-2-2. 硫黄の地球化学的サイクル

硫黄は含硫アミノ酸（システイン、メチオニンなど）の構成元素として、生物にとって無くてはならない元素であり、また微生物により酸化還元をうけ、ダイナミックに水圏と大気圏を循環しており、硫黄の循環は地球化学的にも重要な意味をもつ。一方、底質中のような嫌気環境では、生成した H_2S が、好気環境で酸化されて SO_4^{2-} イオンとなり、また嫌気環境で還元されるといったマイクロな場での循環も起こっている。ここで何らかの要因で SO_4^{2-} イオンが増えた場合、溶解平衡を越えた過剰の H_2S は大気中に放出される。 H_2S は悪臭や酸性降下物の一因となり、環境汚染物質の一つといえる。しかも下記のように、近年問題視されている化石燃料の燃焼により放出される亜硫酸ガスと比べても、生物によって生成される H_2S ガスの量は多い。

生物学的に生成される H_2S ガス	約 9000 万トン / 年
火山活動によって放出される H_2S と SO_2 ガス	約 70 万トン / 年
化石燃料の燃焼により放出される SO_2 ガス	約 5000 万トン / 年 ¹⁾

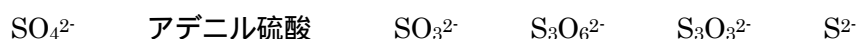
しかし硫酸還元菌の働きにより、過剰の H_2S は硫化鉄化合物として固層中に固定される。特に、 FeS より安定な pyrite (FeS_2) が検出されていることは、注目すべき点である。Pyrite は低温下の無機反応によっては生成しにくく、硫酸還元菌が特別な関与をしていると考えられる。

1-3. 硫酸還元菌の特徴および生息状況

1-3-1. 基本的性質・特徴

硫酸還元菌はすべてグラム陰性である。酸素を嫌う絶対嫌気性で、酸素存在下では発育が阻害され死滅する。乳酸、ピルビン酸等の特定の限られた有機物を電子供与体として用い、末端電子供与体として硫酸塩を利用して生育する細菌の総称である。これを異化的硫酸還元*といい、硫酸塩を多量に代謝する。畑・水田土壌・湖・沼・河川底質・海底土・石油・硫黄鉱床・反すう獣第一胃内等、自然界に広く存在している。

*異化的硫酸還元：生体内の必須元素として S を取り込むために起こる同化的硫酸還元に対し、エネルギーを得るために以下のような反応で多量の硫酸を還元することを異化的硫酸還元という。



また、硫酸還元菌という名は、硫黄化学種を異化的に還元してエネルギーを得る嫌気性菌の総称で、大きく次の 2 種類に分けられる。

・ SO_4^{2-} を還元するが S を還元しない dissimilatory sulfate-reducing bacteria

(Desulfovibrio, tomaculum など)

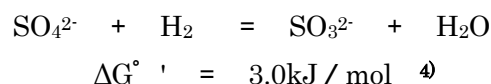
・S を還元するが SO_4^{2-} を還元しない dissimilatory sulfur-reducing bacteria
(Desulforomonas など)

本研究で用いた *Desulfovibrio.sp* は SO_4^{2-} を還元してエネルギーを得る Sulfate-reducing bacteria の一種で、硫酸還元菌の一般的な諸性質を持ち、自然界に多く分布する。Vibrio はグラム陰性の中等大の桿菌で、豆のように湾曲した形状を示すため、コンマ状桿菌とも言われる。一端に単毛性の鞭毛をもち、活発に運動する。孢子、莢膜は作らない。*Desulfovibrio* 属菌は孢子を持たず一本のべん毛を持ち、チトクローム C_3 と Desulfoviridin (亜硫酸還元酵素) を持つ。*Desulfovibrio* 属など多くの硫酸還元菌は有機物を酢酸まで分解するが、それ以上分解できない。*Desulfobacter* 属や、*Desulfotomaculum* 属の一部は酢酸も CO_2 にまで分解できる²⁾。

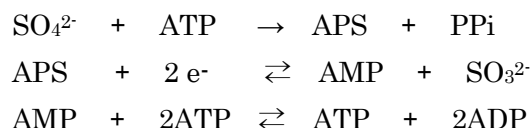
< 硫酸還元菌の呼吸 >

嫌気呼吸は発酵とは区別される。ともに嫌気性菌が行うが、発酵は有機物を有機物で酸化してエネルギーを得る方式で、基質レベルでリン酸化を行って ATP を合成する。一方呼吸の場合は有機物 (又は無機物) を無機の酸素で酸化する方式で、基質レベルでのリン酸化ではなく、酸化的リン酸化により ATPase を利用して ADP と P_i から ATP を合成する。電子伝達鎖の出口で電子を酸化する分子が遊離酸素でなく、化合物中の結合酸素であることが嫌気呼吸の特徴である³⁾。

硫酸イオンの還元で最も特徴的なことは、その第 1 段階でエネルギーを必要とすることである。硫酸の亜硫酸への還元は、



であり、吸エルゴン反応となる。従って Fig.1-2 に示すように、 SO_4^{2-} は ATP と反応して APS (アデノシンホスホスルフェート) にならないと還元されない。APS が還元されると、 SO_3^{2-} と AMP とピロリン酸塩が生じて、生じた SO_3^{2-} は亜硫酸塩還元酵素の作用により S^{2-} にまで還元されるが、AMP はリン酸化されて ATP に戻る。このためには、1mol の AMP に対して 2mol の ATP が必要となる。



生じた SO_3^{2-} を S^{2-} にまで還元するには $8e^-$ が必要であり、この間に 2mol の乳酸が酸化される必要がある²⁾。

このときに生成されるエネルギーは Table1-1 に示すように $-160.3 \text{ kJ/reaction}$ である。硫酸還元菌は SO_4^{2-} がなくても、メタン生成菌の働きなどにより水素が除去されれば、乳

酸等を発酵し基質レベルでの ATP 生成により増殖できるが、この場合に生成するエネルギーはわずかである⁵⁾。

Table1-1 硫酸還元菌とメタン生成細菌の共生培養における自由エネルギー変化と反応式

反応式	G° '(kJ / reaction)
A. $2\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HS}^- + 2\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	- 160.3
B. $2\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{HCO}_3^- + 2\text{H}^+ + 4\text{H}_2$	- 8.4
C. $4\text{H}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	- 135.6
B+C. $2\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CH}_4 + \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$	- 144.0

(R.K.Thauer et al.,1977, M.P.Bryant et al.,1977 から算出)

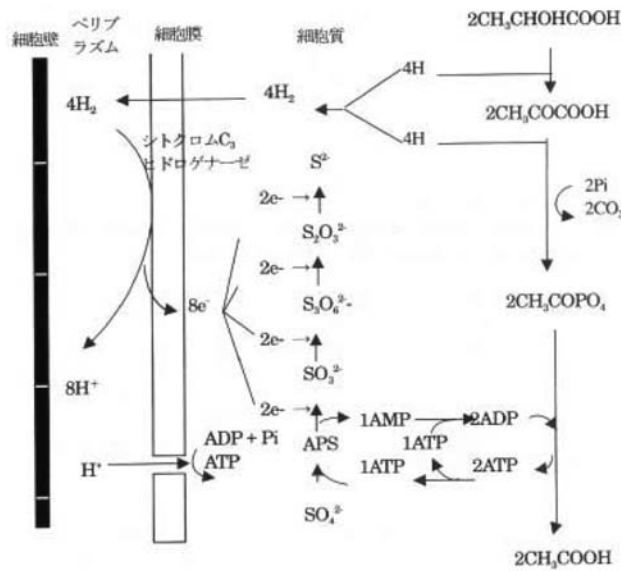


Fig.1-2 硫酸還元菌における乳酸の代謝

1-3-2. 他の微生物との相互関係

(1) 硫黄のサイクルに関わる微生物

地球環境における硫黄循環には様々な微生物が関与している。

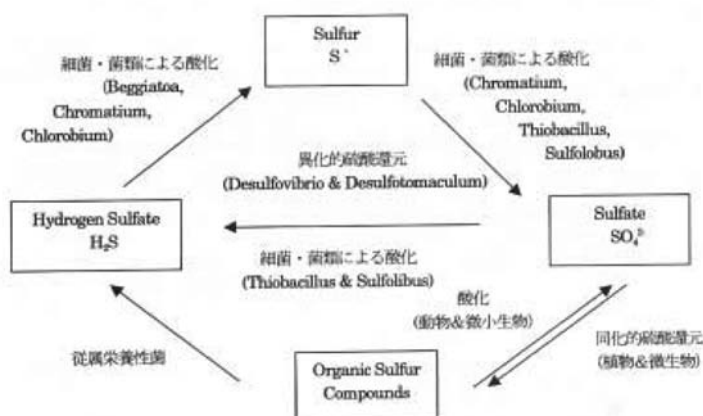


Fig.1-3 硫黄のサイクルに関与する微生物

(2) 硫酸還元菌と他の嫌気性菌との競合

嫌気環境下では、有機物は段階的に種々の微生物によって分解されて、最終的に CH₄ と CO₂ へと変換される。これらの微生物の棲み分けは、酸素圧と酸化還元電位 (Eh) によって決まってくる。

{	Eh > 0 DO = 0	硝酸還元菌
	Eh = - 100mV	硫酸還元菌
	- 100mV > Eh > - 200mV	硫酸還元菌とメタン発酵菌の競合*
	Eh < - 200mV	メタン発酵菌

*SO₄²⁻の存在下では硫酸還元菌が優先 (SO₄²⁻を電子供与体とする)

存在しないまたは少ないところでは H₂ を電子供与体とするメタン発酵菌と共生

硫酸還元菌の活性領域 Eh= - 70 ~ - 340mV、pH= 7 ~ 8.6 ⑥

嫌気的環境からのメタンの放出は、温室効果ガスの一つであるために、地球環境問題との関わりからも注目されている。しかし、少しでも SO₄²⁻があれば、SRB が優先する。つ

まり硫酸還元によってメタン生成が阻害される。それは、基質である H_2 との親和性や反応のエネルギー効率の点で、硫酸還元反応がメタン生成反応に卓越しているため⁵⁾である。

1-3-3. その他の特徴

< 同位体選択性 >

天然の硫黄化合物を構成する硫黄には、 ^{32}S と ^{34}S があり、 ^{32}S が ^{34}S の 22.21 倍多く存在する。硫酸還元菌が作用するとき、 ^{32}S を含む硫酸が ^{34}S を含む硫酸より速く還元される。それで、硫酸還元菌の作用を受けた硫酸化合物(硫酸塩)では、 ^{32}S が ^{34}S の 22.21 倍より少なく、また、そのときに生じた硫化水素からできた化合物(硫化物)では、 ^{32}S が ^{34}S の 22.21 倍より多くなっている。

したがって、種々の年代の地層の硫黄同位体比をしらべると、この菌がその時代に生息していたか知ることができる。現在までに、わかっているところでは、20 億年前には、現在と同じ程度の個体数が生息していたらしい。また、37 億年前には生息しておらず、27 億年前には現在より少ないが、すでに生息していたことがわかっている⁷⁾。

< グラム陰性 >

微生物の分類の鍵となる性質の一つに、染色性がある。グラム染色は最も基本的なもので、グラム染色性は細菌細胞壁の構造と対応する。その方法は、まず石炭酸クリスタルバイオレットで染色する。すべての細菌は青紫色に染まるが、次のアルコールによる脱色操作で、グラム陽性菌は脱色されずに青紫色を保持し、グラム陰性菌は脱色される。最後に対比染色として Pfeiffer 液などで後染色すると、グラム陰性菌は赤く染まって両者は区別される⁸⁾。

グラム陽性菌の細胞壁は、内側の電子密度の高いペプチドグリカンを中心とする層と外膜の 2 層から成る。硫酸還元菌はグラム陰性菌で、その細胞壁はグラム陽性菌に比べて複雑な多層から成る (Fig.1-2)。一般的には外膜と、細胞質膜、それらの間の Rigid 層とからなる。Rigid 層にはペプチドグリカンが含まれ、外膜と細胞質膜はともに、リン脂質の 2 層の間に疎水性リポ多糖とタンパク質を含む層状構造をなしている⁹⁾。この膜を構成する酸性リン脂質やタンパク質は、生理的条件下で負電荷を帯びていることが多く、表面電位を生じる。そのゆえ膜の表面には反対電荷のカチオンが濃縮され、電気二重層を形成している¹⁰⁾。

その他にも

- ・嫌氣的分解の最終段階だけでなく、中間代謝においても重要な位置を占める。
- ・極微量の土壌粒子に吸着しやすい。
- ・数十 μm ~ 数百 μm 程度の大きさのなんらかの凝集体として存在している。

これは超音波処理などで簡単に分散してしまうが、数分で徐々に集団を形成する。といった性質を持つ。

1-4. 硫酸還元菌と硫化鉄化合物

1-4-1. Framboidal pyrite

熱力学的には硫化鉄より pyrite のほうが安定であるが、速度論的には常温において pyrite 生成は優位な反応ではなく、pyrite の合成は一般に高温・高圧下で行われるとされている。したがって、河川底質中から発見される pyrite の生成には、微生物が特異な働きをしているものと、考えられている。特に、海底および河川底質中から検出される pyrite は、鉱山から産出される立方体の自型をとらず、framboid と言われる数 μm ~ 数十 μm のキイチゴ状の形態をしており、この形状を示すことが生物起源であることの証拠ではないかとも言われている¹¹⁾。

Table 1-2. 硫化鉄の生成自由エネルギー¹²⁾

標準生成自由エネルギー	G_f° (kcal/mol)
am.FeS	-21.3
mackinawite	-22.3
greigite	-69.4
pyrrhotite(troilite)	-24.2
pyrite	-38.3

1-4-2. 自然界の硫化鉄化合物

一般に硫化鉄と言われるものは、FeS で表され、天然には磁硫鉄鉱 (pyrrhotite) およびトロイリ鉱 (troilite) として産出される。また四硫化三鉄 greigite (Fe_3S_4) や三価の硫化鉄 () (Fe_2S_3)、二硫化鉄 FeS_2 も含めて硫化鉄とされることもある。

自然界に存在する硫化鉄鉱には以下のものが挙げられる¹³⁾。

Table 1-3 天然に産出する硫化鉄化合物¹⁴⁾

鉱物名	化学式	磁性	溶解する酸
Troilite	FeS	常磁性	HCl, HNO ₃ , HNO ₃ + H ₂ SO ₄ , HNO ₃ + HCl
-Pyrrhotite	Fe ₉ S ₁₀	強磁性	HNO ₃ + H ₂ SO ₄ , HNO ₃ + HCl
-Pyrrhotite	Fe ₇ S ₈		"
Mackinawite	FeS _{1-x}	0 < x < 0.1 は常磁性	"
Greigite	Fe ₃ S ₄		"
Pyrite	FeS ₂		"
Marcasite	FeS ₂		"

1-4-3. 本研究で標準として用いた鉱物について

本研究では、硫酸還元菌の培養によってできた生成物についてさまざまな状態分析を行っているが、その際の標準として以下のような鉱物を用いた。

Pyrite (黄鉄鉱)

金属鉱山で、ごくふつうに産する硫化鉱物である。いたる所の岩石に含まれている。温泉作用を受けて変質した岩石中、粘土や粘土質の岩石中、化石が黄鉄鉱化していることもある。五角12面体、立方体、正8面体がある。

Marcasite (白鉄鉱)

産出も少なく、資源的な意味もほとんどない。黄鉄鉱よりもさらに淡い真鍮色で、斜方系に属し、扁平などがった形をしており、集合体が多い。黄鉄鉱と同じ化学組成をもつが、原子の配列が違っている。金属鉱床中ではいちばん最後に白鉄鉱ができていたことが、広く観察されている。

Table 1-4 原子間距離、格子定数の比較

	Pyrite	Marcasite
Fe-S	2.26	2.25, 2.23
S-S	2.14	2.21
d	5.0	4.88

(ともに NaCl 型で Na⁺の代わりに Fe²⁺、Cl⁻の代わりに S₂²⁻でおきかえた構造)

Pyrrhotite (磁硫鉄鉱)

天然の産出は多くはないが、ポピュラーなほうである。化学組成を見ると、Fe_{1-x}S (x は 0.09 ~ 0.17) で、鉄と硫黄の割合が整数比ではなく、一定でもない。このことが磁性に関係しており、多くの pyrrhotite は顕著な磁性を示す。六角板状ないし柱状で、柱面に条線のある結晶の形も特徴的。接触交代鉱床柱で、黄鉄鉱、黄銅鉱などとともに産出される。通常 Fe₇S₈。純粋なものは六方晶系 NiAs 型構造を示し、As の位置を S が占め、Ni の位置には Fe があるが、Fe が欠損している構造。構造は生成条件により異なり、磁性も組成に依存する¹⁵⁾。鉄と硫黄の等モル混合物を封管中 600 °C で長時間反応させて得られる。構造は生成条件により、磁性も組成に依存する。

Vivianite (藍鉄鉱)

リン酸鉄を主成分とする鉱物はいくつかあるが、もっともふつうに産出する。特に、酸欠状態の青い粘土の中によく産出する。地中ではほとんど色が無いのに、外界に持ってくると、鉄が急速に酸化されるため、見る見る灰青色に色がついてくる。結晶の形は石膏に似ており、1 方向に完全な劈開がある。多色性を持ち、この板を光にかざすと、黄色く見えたり青く見えたりする。

Table 1-5 各鉱物の基本的特徴¹³⁾

	Pyrite (黄鉄鉱)	Marcasite (白鉄鉱)	Pyrrhotite (磁硫鉄鉱)	Vivianite (藍鉄鉱)
組成式	FeS ₂	FeS ₂	Fe _{1-x} S	Fe ₃ (PO ₄) ₂ ·8H ₂ O
結晶系	等軸晶系	斜方晶系	擬六方晶系、 単斜晶系	単斜晶系
色	淡い真鍮色、条痕は 黒色	真鍮色、表面は次第に濃色になる	ブロンズ色、条痕は暗灰黒色	暗灰青色、 緑青色
モース硬度	6 ~ 6 1/2	6 ~ 8 1/2	3 1/2 ~ 4 1/2	1 1/2 ~ 2
比重	4.82 ~ 5.02	4.88	4.58 ~ 4.65	2.65 ~ 2.69
劈開	不完全	あるが弱い	なし	完全(1方向)
結晶の形	5角12面体、立方体	板状結晶で集合体が多い。針状結晶の放射球体の集合体	6角板状ないし柱状	板柱状

1-5. 先行研究

1-5-1. 硫酸還元菌に関する先行研究

硫酸還元菌は嫌気性菌の中でも古くからよく研究されている。日本でも、チトクロームの存在が確認された (Ishimoto et al., 1954) のを始め、生化学の研究材料として、また H₂S 発生が稲作の秋落ちの原因と考えられたこともあり、微生物生態学の一つの大きなテーマとして早くから取り組まれてきた。近年は鉄パイプやコンクリートの腐食の原因となる H₂S の生成菌であるということからも、研究課題として注目され興味ある知見が得られつつある¹⁶⁾。また実際に利用されている応用例として、いろいろな悪臭物質の中で比較的分解が難しい硫黄系の化合物の分解に、硫黄酸化細菌と硫酸還元菌が組み合わせて用いられたり、水質浄化システムに代表的な嫌気性菌の一つとして組み込まれたりしている。

また硫酸還元菌の硫化鉄化合物生成、特に pyrite 生成への寄与は既に通説となっている。しかし実際にどのような過程で pyrite を生成するかということに関しては諸説あり、生化学、地球化学、微生物学とさまざまな立場からの研究がなされ、徐々に解明されつつあるものの確証は得られていない。

1-5-2. Pyrite 合成に関する先行研究

Pyrite の合成は一般には高温下で行われる。

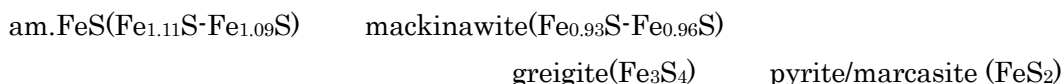
1. 鉄と硫黄を 1 : 2 に混合し、カプセルの体積 1ml あたり 1mg のヨウ素を加えて、石英管に真空封入後、620 で 5 日間加熱¹⁷⁾。
2. 硫酸鉄 () をポリ硫化アルカリとともに封管中で 165 ~ 180 加熱。
3. 硫化鉄 () と硫黄を水に懸濁させ煮沸。

4. 鉄を亜硫酸または亜硫酸アルカリと共に封管中で加熱¹⁸⁾。

比較的低温下での無機的な pyrite 合成に関する研究もいくつか報告されている。特に無機的に FeS 前駆体の硫化による FeS₂ 形成に関する研究は数多くなされてきた (Morse et al., 1987, Sweeny et al. 1973¹¹⁾, Wilkin et al. 1996¹⁹⁾)。その中でも Schoonen ら²⁰⁾は条件を変え、その際に生じる中間体を段階的に推定している。しかしいずれも条件を厳しく制限し、低温と言っても 65 ~ 100 と底質温度よりもはるかに高く、河川底質中で起こりうるノーマルな反応とは言い難い。

Schoonen & Barnes, 1991 . . .

では無機的に 65 で FeS₂ を生成する方法を論じ (3-3-4(2)参照) さらに では非結晶 FeS から pyrite や marcasite にまで熟成する条件の検討を行っている。ポリスルフィド、ポリチオン酸塩、チオ硫酸塩などの前駆体があると著しく FeS₂ 化が進み、還元電位、時間、Fe() / S() 比によっても生成過程が変わる。固体 S と Fe() 塩の水溶液の熟成実験では、65 下でおよそ以下のような過程で進み、厳しい還元下では greigite は生成しないとされている。



河川底質中では、むしろ還元的な雰囲気から pyrite が多く検出されていることから、無機的合成とは異なる反応経路で pyrite が生成しているものと考えられる。

また、本研究で主たる分析手段として用いたメスバウアー分光法を利用した先行研究²¹⁾もある。それによると、室温付近で無菌的に単に Fe²⁺ と S²⁻ を反応させても pyrite は生成せず、この生成物と培養生成物とは異なることがわかっている。またその無機的熟成過程は mackinawite (FeS_{1-x}) greigite (Fe₃S₄) と推定されており、メスバウアー分光法によっても、Schoonen らと同様の結果が得られていることになる。

一方、硫酸還元菌の培養実験による pyrite 生成に関する研究も、近年になっていくつか報告されている。Ravin²²⁾らは生物学的な見地から本研究とほぼ同様の培養実験を行い、³⁵S のトレーサーを利用して、硫酸還元菌の膜内外に二重層として微細な FeS₂ が析出するのを TEM 観察によって確認した。FeS₂ 形成の前駆体として ~ 25nm の FeS が生じること、また硫酸還元菌の放つ有機硫黄が重要な働きをしていることも推定しているが、顕微鏡観察のみのためミクロスコピックな議論にとどまり、前駆体の FeS に関する情報はなく、またこれが果たして底質中で発見されるような framboidal pyrite (~ 10 μm) にまで成長しうるのかは不明である。

1-5-3. 河口域の悪臭に関する先行研究

底質表層には河川水中の溶存酸素が接しており、また、特に潮干帯では干潮時に直接大

気が触れることもあるため、堆積した有機物をエネルギー源として好気性菌が生息している。一方、底質深層は、表層で酸素が消費されるため嫌氣的雰囲気となり、メタン生成菌や硫酸還元菌などの嫌気性菌が生息している。河口域では、海水の影響で硫酸イオン濃度が高いことから、特に硫酸還元菌の活動が活発である。このような点から、多摩川河口域における有機物の嫌氣的分解や硫酸還元について、これまでもいくつかの研究が報告されている²³⁻²⁵⁾。

河口域ではこのように、硫酸還元菌の活動により、海水や人為起源（硫黄酸化物を含む降水、乾性降下物）の硫酸イオンが硫化水素等に還元されるため、これが河口域における悪臭の原因の一つとなっているという報告がある^{26, 27)}。一方、底質や間隙水中の鉄化合物は、この硫化水素と反応して鉄の硫化物へと化学変化する。このことは、底質中の鉄化合物が硫化水素を硫化物として固相に固定することで、悪臭物質の低減に寄与していることを示す。実際に、河川底質中からはしばしば、硫化鉄(FeS)や pyrite(FeS₂) が検出されているが²⁸⁾、これらの化合物の生成過程の解明は、地球化学的に興味深いばかりでなく、悪臭防止技術に役立つと考えられる。

1-6. 本研究の目的

硫酸還元菌は地球化学的に見ると、Cの最終分解者であり、かつ中間代謝においても重要な位置を占めるうえ、Sの循環でも非常に重要な役割を果たしている。また無機的合成の困難な pyrite の生成に関しては、バイオミネラリゼーションの可能性をもつということからも興味を持たれる。さらに代表的な嫌気性菌として、水の浄化、悪臭の分解等の環境浄化技術への応用も期待されている。

このように、硫酸還元菌はさまざまな見地から興味深いサンプルであり、とくに硫化鉄化合物生成への関与については既に広く知られた事実であるのに、その生成メカニズムの詳細には諸説ありまだ確定されていない。特に自然界に近い低温下での pyrite 生成は、広く関心を集めている話題であり、合成実験も試みられている。

そこで本研究では、河口域底質中において硫酸還元菌が硫酸イオンを還元していく途中に、様々な中間酸化状態の硫黄化合物を生成することに着目し、それらがどのようにパイライト化反応に関与しているかを明らかにすることを目的とする。具体的には、実際に多摩川河口域底質中から硫酸還元菌を単離して、実験室内で培養実験を行い、中間生成物中に含まれる硫化鉄化合物の化学状態を分析する。その上で、どのような化学種を経て硫化鉄がパイライトになるかを明らかにし、硫酸還元菌によるパイライト生成とそれに伴う悪臭低減メカニズムを推定する。実際の底質中では、非常に多くの菌種が存在しているうえ、さまざまな要素が絡み合い底質中の反応は複雑になっている。本研究では多摩川河口域底質中から単離した硫酸還元菌に的を絞り、単純化したモデルを使用している点、また培養の各段階で生成物の分析を行った点、さらに種々の分析法を用いてミクロ、マクロの両面からの考察を得られた点が特徴として挙げられる。

原 理

2-1. 生成物の観察

2-1-1. 走査型電子顕微鏡 “ Scanning-Electron Microscopy (SEM) “

<SEM とは>

肉眼では見えない小さなものを、数十倍～10万倍ぐらいに拡大して観察するのに適した装置で、立体的な像を得られるのが特徴である。数 nm 径に細く絞った電子線プローブを試料上に走査照射し、各点状領域から発生する信号を次々に検出して、観察用ブラウン管上にその信号の分布像を得る。微小領域からのある信号を解析すると、試料のミクロな状態を知ることできる。

<SEM 装置概略>

電子銃から放出される電子線を、1～40kV の静電場で加速し、磁界レンズ(コンデンサーレンズ、対物レンズ)を用いて縮小した数 nm 径の電子プローブを試料上に形成する。プローブを走査コイルにより試料上で順次走査し、各点から発生する信号を対応する検出器で検出し、その信号によって輝度変調された電気信号をブラウン管で観察する。検出器の方向を向いた面から飛び出した電子は大部分検出されるので、輝度信号としては強くなりビームは白く光る。別の方向を向いた面からの電子は一部が検出されるので、輝度信号は弱く、ビームは灰色になる。ブラウン管の電気信号は試料上の電子線と同期して走査するので、試料上の位置とブラウン管の位置が対応する。倍率は試料上の走査長と観察画面の長さの比によって決まる。電子線の通過経路で余分な散乱を起こさないように、試料も含め電子線の通過部は真空中にある。試料は三次元方向の移動、回転傾斜も可能で、いろいろな方向からの試料の観察が容易に行える。

<SEM 試料作成>

SEM での観察は試料の最表面を見ることになるので、表面がきれいであればならない。破断、研磨切削で観察面をだし、表面皮膜を取り除く場合もある。また観察部位が金属試料台に電氣的に接触している必要があるため、導電性の接着剤・接着両面テープなどで固定する。試料が絶縁性の場合には、試料表面を金属や炭素などの導電性物質でコーティングすることも必要になる。これによって、電子線照射による試料のチャージアップを防ぐだけでなく、二次電子の発生を高めることにもなる²⁹⁾。

2-1-2. 透過型電子顕微鏡 “ Transmission electron microscope (TEM) “

<TEM とは>

透過型電子顕微鏡は、電子銃から発射された電子を試料に当てて、透過した電子を検出する手法である。二次電子を検出する SEM とは異なる。光学顕微鏡と同様の試料観察ができるが、電子の波長が可視光の波長よりも短いため、より高い分解能をもつ。また、電

子線はその波動性から回折現象を起こすので、結晶質の試料に対しては X 線回折法と同様の回折像を得ることができる。

< TEM 装置概要 >

第一陽極と陰極との間に強い電圧をかけると、量子力学的トンネル効果により電子が陰極より引き出される。引き出された電子は第二陽極に向かい加速し、同時に二つの陽極が作る電界のレンズ作用により収束して試料を通過する。第一集束レンズは調整時のみ可動で、ここで収束され、測定時に可動な第二収束レンズによって望みの大きさ・明るさのビームを得る。通常電子線が強いため、コンデンサー絞りをに入れて、試料に照射される電子線を減らす。試料通過後、透過波と回折波は、対物レンズにより中間像を結び、さらに投射レンズで蛍光板上に最終像を結ぶ。電子線は肉眼では見えないため、蛍光板上に投射するか乾板を感光させて観察する。中間・投影レンズの調整により、蛍光板上には像面(明視野像・暗視野像)または後焦点面(回折パターン)を結ぶことができ、試料のごく小さい部分からの回折を観察することもできる。

< 試料作成 >

TEM では、検出するのは試料を通過した(または回折した)電子であるため、電子が試料を十分に通過する必要がある。そのため、また透過しない電子によるダメージを防ぐため、試料が十分に薄い必要がある。

粉碎法は、粉碎できる試料について広く使われるもっとも簡単な試料観察法。試料をめのう乳鉢などで粉碎し、それを適当な溶媒中に分散させ、マイクログリッドと呼ばれる試料台にのせる。これを試料ホルダーに取り付ける。

< TEM による電子線回折 >

通常観察においては、像面に見られる拡大像を見ているが、回折モードでは焦点面に見られる回折パターンを見る。これは単結晶 X 線回折における回折像と同じように、2次元のデータとなる。

非晶質試料ならハローが現れる。スポットが出ていればビームを当てている領域が単結晶。単位結晶なら二次元点配列の単結晶パターンが、多結晶からは透過スポットの周りに同心円(デバイシェラーリング)が得られる²⁹⁾。2種類以上の結晶粒(または2種類以上の方位を向いた同一の結晶)があると、2種類以上のパターンが混ざって見える。

2-2. 上澄み液の分析

2-2-1. 高速液体クロマトグラフィー

“ High performance liquid chromatography (HPLC) ”

< HPLC とは >

液体クロマトグラフィーは、イオン交換樹脂などの固定相に試料を担持させ、ここに緩衝液などの液体の溶離液を移動相として流し、固定相に対する吸着力の差を利用して、物質を分離する分析法である。現在では、溶離液に高圧をかけて、高速分析を行う高速液体クロマトグラフィーが一般的である。

<装置概略>

古典的な液体クロマトグラフィーは、移動相中の試料の拡散が遅く、吸着あるいは分配平衡の成立にも時間を要するので、分離効率が悪かった。そこで粒径が小さく表面多孔性を持った充填剤にし、カラムを短く、高圧で送り込むことで移動相を流す速度を上げて性能を向上させたものが HPLC である。したがって、Fig. 2-1 に示すように、溶離液槽とカラムの間に送液ポンプがとりつけられており、ポンプとカラムの間からシリンジで試料を導入する。検出器には分光測光検出器、電気伝導率検出器、蛍光検出器などが多く用いられる。

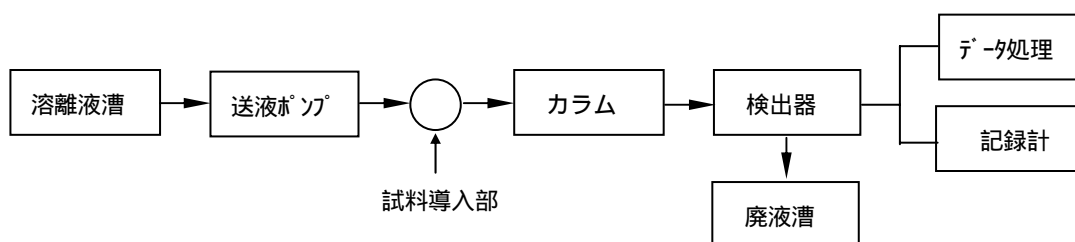


Fig. 2-1 HPLC 装置概念図

<液体クロマトグラフィーの種類>

その分離機構によって、以下のようなものに分類される。

吸着クロマトグラフィー：シリカゲル、アルミナなどの吸着剤を固定相とし、試料成分との物理的、科学的相互作用を利用して分離を行う。

分配クロマトグラフィー：固定相に液体を用いる。移動相を選ぶことにより、無極性からイオン性までの広範囲の化合物に適用できる。

イオン交換クロマトグラフィー：イオン交換体を固定相とするので、水溶液中でイオンに解離する化合物が対象。高感度で検出するために、カラムの後に移動相中の電解質を非解離性物質にする装置（サプレッサ）を取りつける³⁰⁾。

2-2-2. ICP 発光分光分析

“ Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) ”

<ICP-AES とは>

高周波誘導によって励起された誘導結合プラズマを励起源として、試料中の原子を発光

させ、その発光スペクトルを分析する方法である。溶液分析のため試料調整は煩雑だが、検出感度がよく、多元素同時定量が可能で、微量分析の手段として定着しつつある。

<原理>

誘導結合プラズマ (Inductively Coupled Plasma) は、高周波誘導によって励起されたアルゴンプラズマを指す。自由に運動する原子、イオン、電子が共存していて、全体として電氣的に中性を保っているような一部電離した気体である。プラズマを発生させるには、トーチと呼ばれる放電管に銅製の誘導コイルを巻き付け、そこに通常 27.12MHz の電流を流し誘導電場を発生させる。トーチ内に Ar ガスを導入すると、Ar 原子は加速され、衝突を繰り返して電子とイオンに分かれる。電子の発生量が消滅量より多くなると、プラズマが形成される。プラズマの温度は 6000 ~ 8000K である。ネブライザーで霧状にした溶液試料を、Ar のキャリアーガスでトーチの中心の管からプラズマ中に送り込むと、中心部の温度は周囲より低下して、ドーナツ状に穴があき、試料が効率よく導入される。原子は励起されて高い準位にあるようになるが、このような原子は低い準位に戻ろうとして光を放出する。この光の波長は元素によって異なるので、発生したスペクトルを分光し光電子増倍管で検出すると、その波長から定性、強度から定量をすることができる。

<特徴>

大部分の元素について ppt ~ ppq の高感度分析が可能

多元素を迅速に同時定量できる

検量線のダイナミックレンジが 4 ~ 5 桁と広く、主成分から微量成分まで一斉分析が可能

プラズマの温度が高いため、化学干渉やイオン化干渉の影響が少ない²⁹⁾。

2-3. 沈殿生成物の分析

2-3-1. X線吸収微細構造法 “X-ray absorption fine structure (XAFS)”

<XAFS とは>

XAFS 法とは、X線吸収スペクトルに現れる振動の微細構造から、吸収原子周辺の局所構造に関する情報を得る分析法である。固体・液体・気体、また結晶質・非晶質という試料の状態によらず適用が可能で、非破壊で分析できるという利点がある。

XANES(X-ray absorption near edge structure X線吸収端近傍構造)

吸収端近傍の X線の吸収による電子遷移

中心原子の電子構造 元素の原子価などに関する情報

EXAFS(extended X-ray absorption fine structure 広域 X線吸収微細構造)

X線を吸収する原子を中心とした局所的な物理現象

目的原子の近接原子、原子の種類、原子間距離などに関する情報

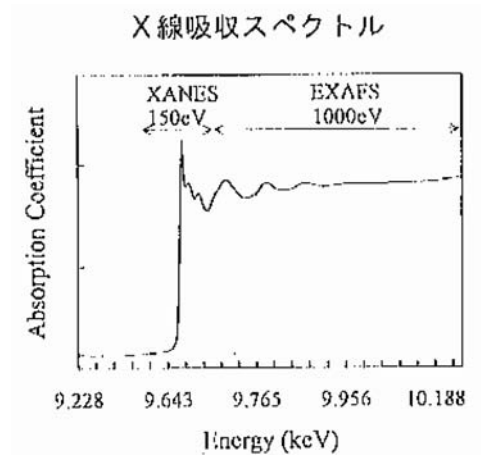


Fig. 2-2 XAFS 法における X 線吸収スペクトル

< XAFS 法原理 >

原子が X 線を吸収すると、内殻電子が光電子として飛び出す。そのため X 線吸収スペクトルは、それぞれのイオン化エネルギーに対応する固有の波長で立ち上がり（吸収端）、それより短い波長側にゆっくり減少する。一般に酸化数が高くなると、電子が原子核により強く引きつけられるため X 線吸収端の位置が高エネルギー側にシフトする。また、同じ酸化数でも、近接元素の電気陰性度が高ければ、より電子が引きつけられるので、実質的な酸化数はより大きくなり高エネルギー側にシフトする。従って、吸収端の現れる領域における振動構造からは、吸収原子の化学状態に関する情報（酸化数や配位対称性）を得ることができる。この領域を XANES 領域という。

また、これより高エネルギー側約 1000eV に現れる微細な波打ち構造を EXAFS と呼ぶ。原子が X 線を吸収する際、励起された内殻電子は光電子の波として放出される。その光電子の一部は周辺の原子により散乱を受け、中心原子から放出される光電子波との間で干渉を起こす。その結果、吸収原子周りのポテンシャルが変化し、X 線の吸収確率に影響を与え、スペクトル上に複雑な波打ち構造として現れる。この EXAFS 振動を解析することにより、中心原子周辺の局所構造（結合距離や配位元素、配位数）を知ることができる³¹⁾。

X 線吸収スペクトル...近接原子による散乱の影響が複雑に重なり合って振動構造が現れる
抽出

EXAFS 振動...吸収端より高エネルギー側に現れる。

((k)曲線) X線を吸収する原子を中心とした局所的な物理現象を反映した微細な波打ち構造。

複数散乱原子の寄与の和になっており、個々の配位数、核間距離等を知るのは困難

フーリエ変換

動径構造関数 $F(R)$...特定の散乱原子の寄与を知ることができる。

逆フーリエ変換

逆フーリエ変換により得た (k)曲線...さらに第一近接原子による振動構造のみを抽出。

この形状は近接原子種により変化することが知られている³²⁾。

2-3-2. メスバウアー分光法

<メスバウアー分光法とは>

原子核によって、線が無反跳共鳴吸収されることを、メスバウアー効果という。メスバウアー分光法では、線源にドップラー速度を与え線のエネルギーを連続的に変えて、共鳴位置を探ることにより定性分析、また吸収強度により定量分析ができる。得られた線共鳴吸収スペクトルから、中心原子の化学状態、すなわち価数や配位対称性、磁気的性質などの情報が得られる。

<原理>

原子核の基底準位と励起準位の間で起こる、線の共鳴吸収を利用した分光法である。原子核の準位間のエネルギー遷移は、光の $10^3 \sim 10^4$ 倍以上にもなるため、線を放出した原子核は大きな反跳を受けることになる。線を放出した側の原子核も、吸収する側の原子核も反跳を受けるので、放出側と吸収側の基底 - 励起準位間のエネルギー差は等しくなくなって、共鳴吸収は観測できない。しかし、固体中で原子核が強く束縛されていれば、反跳エネルギーが多数の原子に分けられて、反跳しない確率(無反跳分率)が大きくなり、線の共鳴吸収を観測できるようになる。この現象をメスバウアー効果という。

線源として用いる ^{57}Co は放射壊変して ^{57}Fe となり、14.4keVの線を放射する。試料中の ^{57}Fe 核(安定核種)はこの線を共鳴吸収する。 ^{57}Fe の化学状態の違いによって、わずかに共鳴吸収エネルギーが異なることを利用して、共鳴吸収位置から定性、吸収強度から定量を行う。線源にドップラー効果を与えることにより、線のエネルギーを連続的に変えることができる³⁰⁾。

<装置の概要>

測定装置は、線源および駆動装置、吸収体(試料)、検出器、マルチチャンネル波高分析器からなる。線源、吸収体、検出器は一直線上に設置し、鉛などのコリメーターを吸収体と検出器の間に置いてほぼ平行な線を保つようにする³³⁾。

線源から放出される 線エネルギーを連続に変えるには、線源を吸収体に対して相対速度を与え、ドップラー効果による 線エネルギーの微小変化を利用する。線源から放出された 線のエネルギーを E 、ドップラー速度を v 、線 の速度を c とすると、吸収体が吸収する 線エネルギーは E' となる。

$$E' = E(1 + v/c)$$

速度 v を変化させると 線エネルギーも変化する。そのため、測定結果は縦軸に吸収強度、横軸にドップラー速度 v をとって表される。

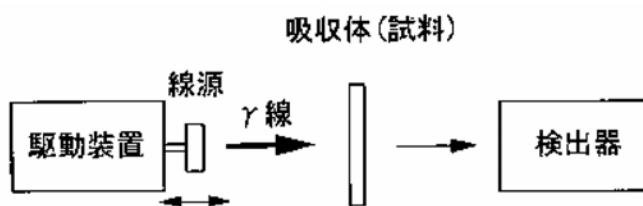


Fig.2-3 メスバウアー装置概略図

< 利用 >

目的元素の化学的環境に対して非常に鋭敏で、異なる酸化状態を容易に識別できる。非破壊状態分析の有力な手段。1cm² あたり 5 ~ 10mg 程度の Fe を含む試料が適する。Fig.2-4 にメスバウアーспекトルの例を示し、メスバウアーパラメーターについて説明する。

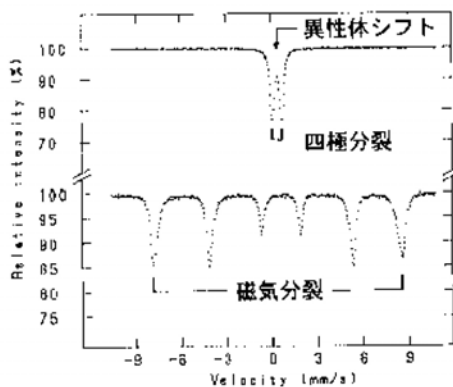


Fig.2-4 メスバウアーспекトルの例

異性体シフト(I.S., δ): 共鳴吸収ピーク中心の速度軸 0 からのずれ。基準には ^{57}Fe 箔を用いる。メスバウアー核付近の核外密度を反映するパラメーターなので、酸化状態を推定する手がかりとなる。

四極分裂(Q.S., Eq): 2 本に分裂したピークの間隔。メスバウアー核の周りの配位子やイオンの配置の偏りから生じる電場勾配の大きさを示し、近傍の構造やサイトの対称性についての情報を与える。

内部磁場(H_i): 酸化鉄などの強磁性体では、ピークが 6 本に分裂し、その最大幅が H_i の大きさで、内部磁場についての情報も得られる。

2-3-3. 蛍光 X 線分析 “X-ray fluorescence Analysis (XRF)”

< XRF とは >

強力な X 線を物質に照射すると、各元素に特有の波長をもつ特性 X 線が発生する。この X 線は蛍光 X 線と呼ばれる。その波長および強度を測定し、気体を除く物質中の元素の定性・定量を行うことを蛍光 X 線分析法という。

< XRF 原理 >

物質を構成する原子はそれぞれ固有の殻電子準位をもっている。このような物質に X 線（一次 X 線）を照射すると、蛍光 X 線とよばれる二次 X 線が発生する。その X 線のエネルギー（波長）は原子の内殻電子の準位差すなわち原子固有の殻間遷移エネルギーに等しい。したがって、蛍光 X 線の波長は元素に特有で、しかも線スペクトルとして観察できるため、この波長から定性、強度から定量分析が可能である。スペクトルの名称は電子の遷移様式によってつけられており、K、L 殻の電子の空孔を満たすときに発生する蛍光 X 線を、それぞれ K 系列、L 系列と呼ぶ。さらに各系列は電子の量子数により $1_s, 2_s, \dots, 1_p, 2_p, \dots$ などに分かれる。

XRF には波長分散方式 (WDX) と、エネルギー分散方式 (EDX) がある。WDX では、X 線管球から発生する連続 X 線（白色 X 線）を試料に照射し、発生した蛍光 X 線をソーラースリットで平行にし、分光結晶に導く。分光結晶と検出器は倍角の関係（ 2θ ）にあり、ブラッグ条件を満たす X 線だけが回折され検出器に到達する。分光結晶を回転させて分光し、特定の元素を有効に測定できる。検出器には比例計数管、シンチレーション計数管などを用いる。一方、EDX では試料から発生した X 線は、半導体検出器 (SSD) によって、入射した X 線のエネルギーに比例し波高のパルスに変換される。SSD はエネルギー分解能が極めて高いので、マルチチャンネル波高分析器とともに用いると、分光結晶なしで X 線のエネルギーと強度の関係としてスペクトルを得ることができる。

< 特徴 >

気体を除くあらゆる形状、性質の試料の元素分析が可能

非破壊な分析法である

F ~ Uの元素に対し、広い濃度範囲の分析が可能

X線スペクトルの解析が比較的容易で、かつ分析精度がよい。

実 験

3-1. 底質中の硫酸還元菌の分布

3-1-1. サンプルング地点

河口域は、河川からの有機物を含む淡水と、硫酸イオンを多く含む海水とが混じりあい、硫酸還元菌の活発な活動が予想される地域である。そこで、以下の5地域で試料を採取し、硫酸還元菌と硫化鉄化合物との分布に相関があるかを調べた。また、垂直分布を調べることで、底質中の酸化還元環境、さらに流域の人間活動の影響を反映した環境の歴史の変遷についての情報を得ることもできる。

多摩川を代表的な都市河川と考え、まず、その河口域において2地点より底質のサンプルングを行った。それらの地点は、いずれも干潮時には底質の一部が露出し、干潟になる地点である。また、多摩川からは培養実験に使う硫酸還元菌も単離した。次に、同様の都市河川として、相模川を選び、その河口域からも底質のサンプルングを行った。また、ラムサール条約（特に水鳥の生息地として国際的に重要な湿地に関する条約）に登録され、東京湾内に位置しながらも人の立ち入りが制限され、自然が保護されている干潟として、谷津干潟（千葉県習志野市）を比較対象として選んだ。一方、住宅街の中を流れ、汚染の進んだ内部河川である北十間川（東京都墨田区）についても底質のサンプルングを行った。いずれの地点も、満潮時には海水が遡上するため、海水からの硫酸イオンの供給がある点では、共通している。

サンプルングの対象とした干潟は、河川や波浪の働きにより浸食・運搬が繰り返され、長い年月をかけて砂泥が堆積してできたもので、干潮時に露出する平底のことである。特に河川の流れ込む湾部や、潮の干満の差が大きいところによく発達する。日本の干潟は戦後の乱開発による埋め立てなどで約半分が消失。現在残っているおもな干潟は37と言われている。これらの都市河川河口域との比較として、沖縄県の金武ダム湖奥でもサンプルングを行った。

(1) 多摩川：多摩川は奥多摩湖に源を発し、東京の南西に位置する全長100km、流域面積1200km²を占める代表的な都市河川である。東京、神奈川の住宅地の間を流れるため、かつては水質汚染が激しい時期もあったが、今日では改善されている。サンプルングを行った2地点の周辺図をFig. 3-1に、干潮前後の様子をFig. 3-2に示す。

E1 河口から2kmほど上流 海に近いので生物が多い

E2 E1よりさらに2km上流

サンプルの特徴としては、表層は茶がかかった灰色で砂状だが約20cmより深い層では黒く粘土状。深層部では硫化水素と思われる悪臭がする。E1で特に顕著。

(2) 相模川：その源を富士山に発し、山梨県の東部を東北に流れて神奈川県に入り、県の中央を流下して相模湾に注ぐ流域面積 1,680km²、流路延長 113km の一級河川。また水源地帯は、火山礫などで構成され透水性が良く、さらに本有数の樹林地帯であるため川に流れ込む水の量は豊富で安定しており水質も良好。この特性を生かしてその水は都市用水、農業用水、工業用水、発電用水など多目的に利用され、山梨県と神奈川県等の生活や産業の基盤となっている。サンプリングを行った下流部では河床勾配も緩やかで川幅も広い (Fig. 3-3)。

SG5 SG6、7 に比べ 10m ほど上流で、本流の中。

SG6 本流と下水処理場からの排水を含む流れが交わる場所

SG7 下水処理場の排水を含んだ流れの中。

SG5 は粗い砂状、SG6 は上層が小石で深さ 10cm あたりから泥質で多摩川河口サンプルに類似。SG7 は粘土状で下水処理場の排水の影響を受けていた。

(3) 北十間川：隅田川の支流の一つ (Fig. 3-4)。住宅街の中を流れ、交通の激しい道路がすぐ脇を走っている。悪臭を発生しており、付近住民からの苦情も出ている。干潮の影響がほとんどなく、普段はほとんど流れがないが、満潮時には水門を開けるので、海水がはいる。両岸は護岸されており、そこには海水の影響を示す貝もついていた (Fig. 3-5)。水深約 1.5m、川幅約 17m。

サンプリング地点のすぐそばには木炭循環浄化装置が川幅のほとんどをしめるように設置されていた。この浄化装置は広葉樹の活性炭を利用しているもので、孔が大きく種々の微生物が付着している。必要電力は上部にソーラーパネルを張って太陽エネルギーから得ているので、日中のみ作動 (Fig. 3-6)。

KJ1 ばっ気処理装置と揚水処理装置に挟まれた地点

KJ2 KJ1 より隅田川から離れ、処理装置の影響のないところ
サンプルは上から下まで真っ黒な泥質。KJ2 では、上層で砂、礫状。
硫化水素と思われる悪臭がする。

(4) 谷津干潟：東京湾の最奥部に残された約 40ha の干潟。有機質に富む泥質干潟で、ゴカイ・貝・カニ・魚・水鳥など多くの生き物たちが生息している。特に渡りの途中の休息地として、また冬鳥の越冬地として重要な場所になっている。日本では釧路湿原など数カ所しか指定されていない、水鳥と水鳥が生息する湿地を守るための「ラムサール条約登録湿地」でもある。

Fig. 3-7 からわかるように、海とは 2 本の細い水路でつながっている。

YH1 干潮時には、かなり広範囲にわたって水がひいて表面が

露出する。サンプリング地点は岸から約 30m の水がひききったあたり。表面は有機物のためか茶がかっているが 1 ~ 2cm すぐ下は黒い。(Fig. 3-8)

YH4 YH1 から 200m くらい離れた葦原に囲まれた地点。
(Fig. 3-9) 岸から 2m のところで試料採取。
非常に柔らかい泥質。

上層が泥質で、20cm 以深で砂質になる。ちょうどその境界付近で貝を多く含む。以前に海岸線であったが、埋め立てにより海岸線が移動して、それ以後は有機堆積物が積もったものと考えられる。

(5) 金武ダム：沖縄県の中央、太平洋に向かって流れる億首川上流の金武ダム湖。

下流にはマングローブ林が広がるが、湖近くには米軍施設や養豚施設などの汚染源がある。サンプリング地点はこの湖奥の葦原が近くにある湖中央部。(Fig. 3-10) 富栄養化を示す藻類、アオコの原因となる藻類も存在していた。

サンプルは、全体に他の河川のものに比べて水分が多く、砂を含む泥質。黒色を示す。

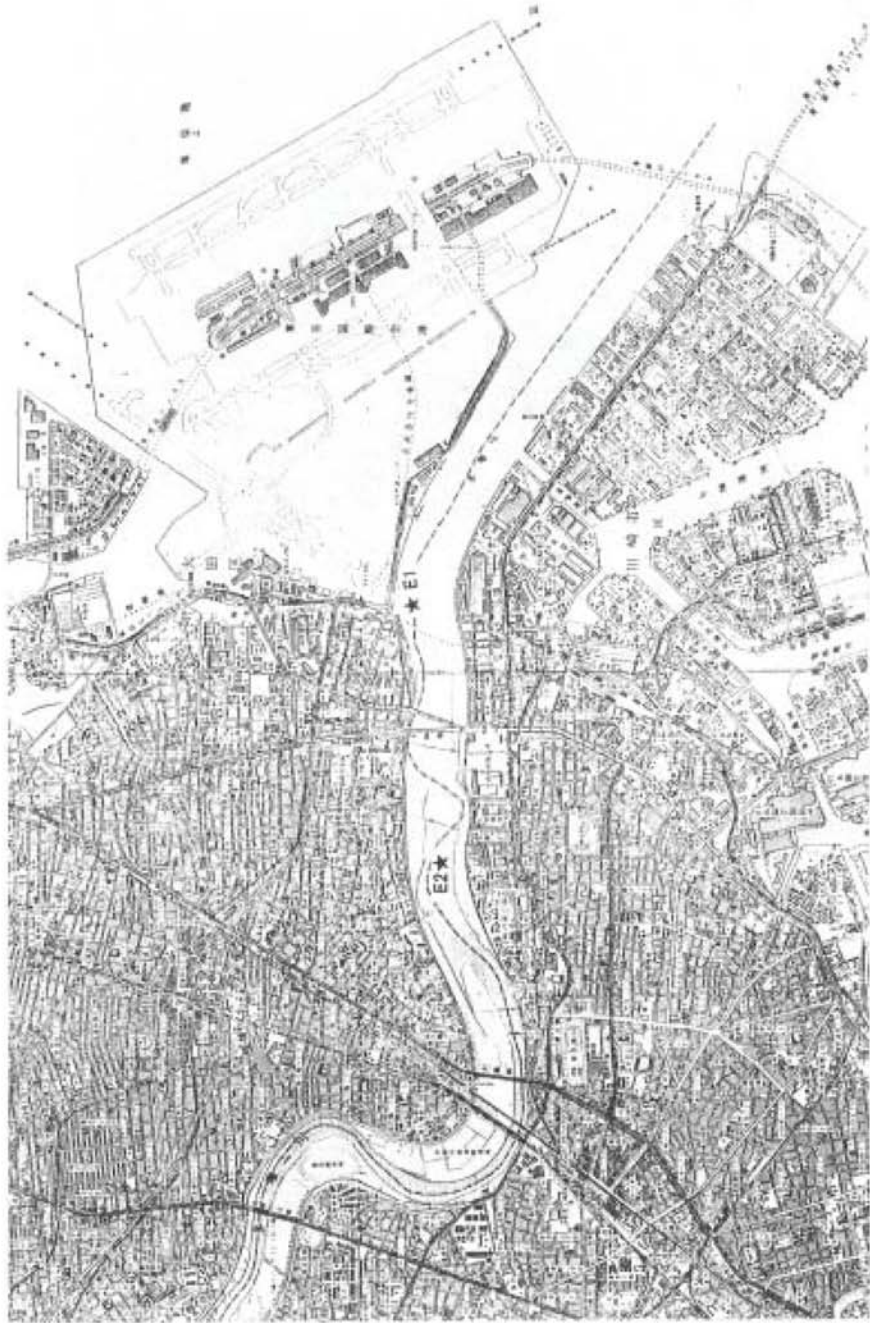


Fig.3-1 多摩川河口城周辺図



Fig.3-2 干潮前後の多摩川河口域サンプリング地点



Fig.3-3 相模川河口域周辺図



Fig.3-4 北十間川周辺図



Fig.3-5 北十間川に設置された木炭浄化システム



Fig.3-6 護岸された北十間川の川岸

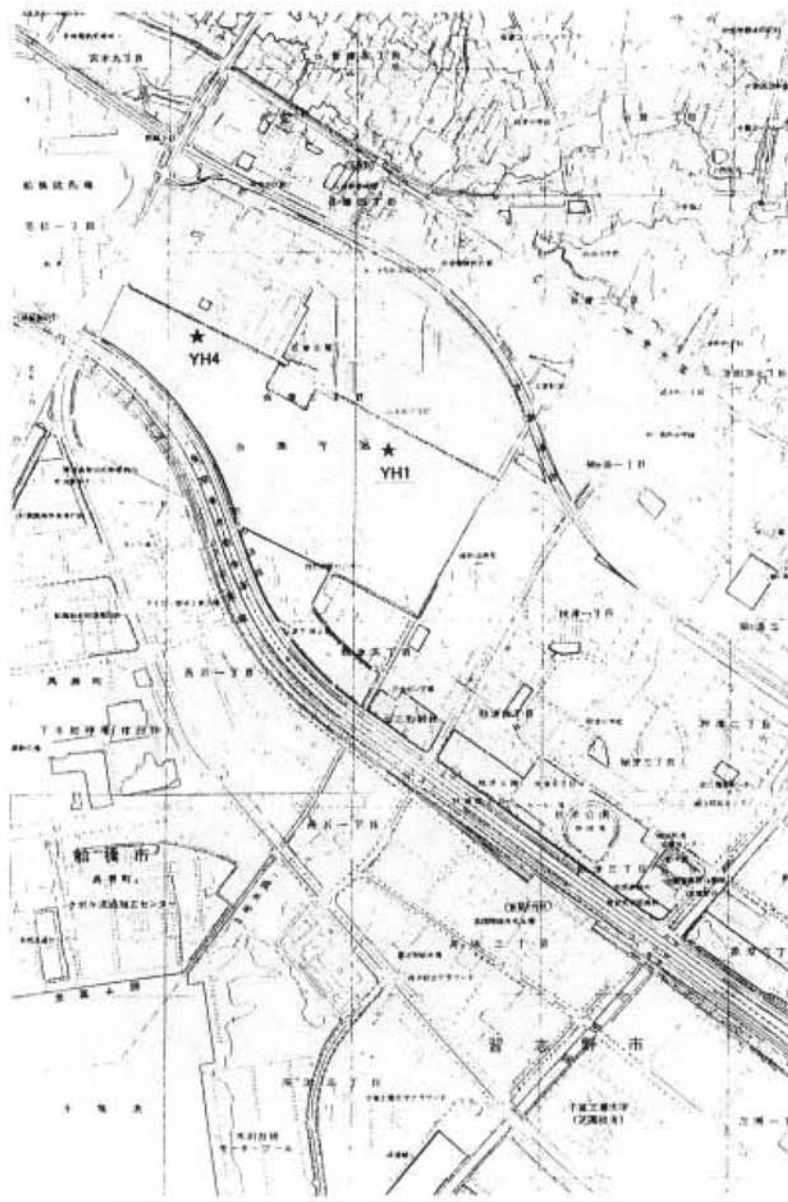


Fig.3-7 谷津干潟周辺図



Fig.3-8 広範囲にわたって干潟が現れた干潮時の谷津干潟 YH1 地点



Fig.3-9 周囲を葦原に囲まれた谷津干潟 YH4 地点

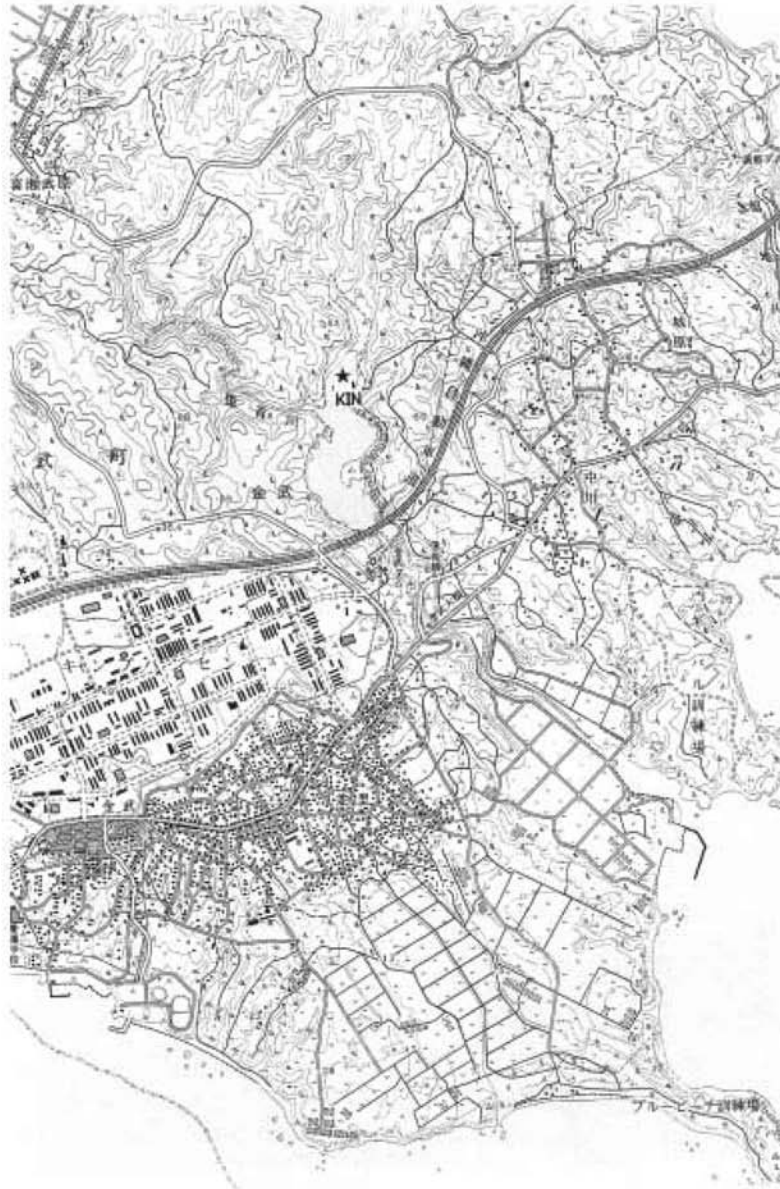


Fig.3-10 沖縄県金武ダム周辺図

3-1-2. サンプルング方法

多摩川、相模川、谷津干潟では、干満の影響が大きいところで、なおかつ大潮で潮の引きが激しい日にサンプルングを行ったので、サンプルング時には底質表層が露出していた。そこに、内径 11cm のHR型底層しめ式非攪乱柱状採泥器を直接差し込んで、深さ 50cm 程度までの試料を採取した。北十間川、金武ダムについてはサンプルング時にも満水のため、川にボートを浮かべ、内径 2.5cm、長さ 4m の細い塩化ビニール製パイプでサンプルングした。

得られた柱状堆積物 (Fig.3-11) は現地で速やかに深さ 3cm 間隔にカットし、酸化による変質を防ぐため、空気を通さないパウチ袋 (三菱ガス化学) に窒素ガスとともに封入した。研究室に持ち帰った後、微生物の活動を押さえるために 5℃ 以下で冷蔵保存した。

気温、pH、導電率、濁度、溶存酸素、水温、塩分濃度は水質チェッカーU-10 (堀場製作所) を用いて測定。

導電率 (Conductivity) : 物質中における電流の流れ安さ

濁度 (Turbidity) : 水の濁りの程度を示す。ホルマジン濁度標準液を用い NTU で表す。

溶存酸素 (Dissolved Oxygen) : 溶存酸素は有機物および無機還元物質により消費される。従って DO の多少は水の汚染状態を示す。

塩分濃度 (Salinity) : 海水の塩分濃度として表示される。



Fig.3-11 採取直後の柱状堆積物

3-1-3. 生菌数の計数

<平板培養による間接計数法>

顕微鏡を使い、直接に菌の個体数を計数する直接計数法に対し、菌がつくるコロニーの数を数えることにより、菌の個数を逆算する方法を間接計数法という。特に、硫酸還元菌では培地に鉄を入れると、硫化鉄の黒いコロニーを形成し他の菌との区別が容易なので、この方法がよく使われる。

間接法では直接法に比べて低く(10分の1以上)計数されることが多い³⁴⁾とされている。直接法は全菌数を計数するのに対し、間接法は生菌数(生きている菌だけがコロニーを作るから)を調べる³⁾ためである。本研究では単に distribution を見るだけなので、還元菌の黒いコロニーを作る特徴を利用して、分離操作せずに計数できる間接法しか行っていないが、むしろ硫化鉄生成に関与しない死菌数を除き、生菌数だけ測れる点ではよい。

<実験方法>

底質試料 0.5g に培地 (有機物を除く)5ml を加え、1 分間攪拌。これを静置したのち、上澄みを 1 倍とし、10 倍、100 倍、1000 倍に希釈したものを、それぞれ 0.1ml ずつ 2 枚の滅菌シャーレにすばやくとり、ふたをする。ここに、培地 に寒天 1.5g を加えオートクレーブにかけ、温かいうち(40 くらい)に培地 液(Table3-1)を加えたものを約 15ml 流し込み、蓋をして冷ます(Fig.3-12)。冷えて固まったら、裏返して乾燥させたあと、アネロパックとともにパウチ袋にいれて、30 のインキュベーター内にて培養した。パウチを開くと、コロニーの黒色が消えることがあるので開けずに 1 ヶ月ほど放置したのち、各シャーレに生成した黒い硫化鉄のコロニーの数を計数した(Fig.3-13)。

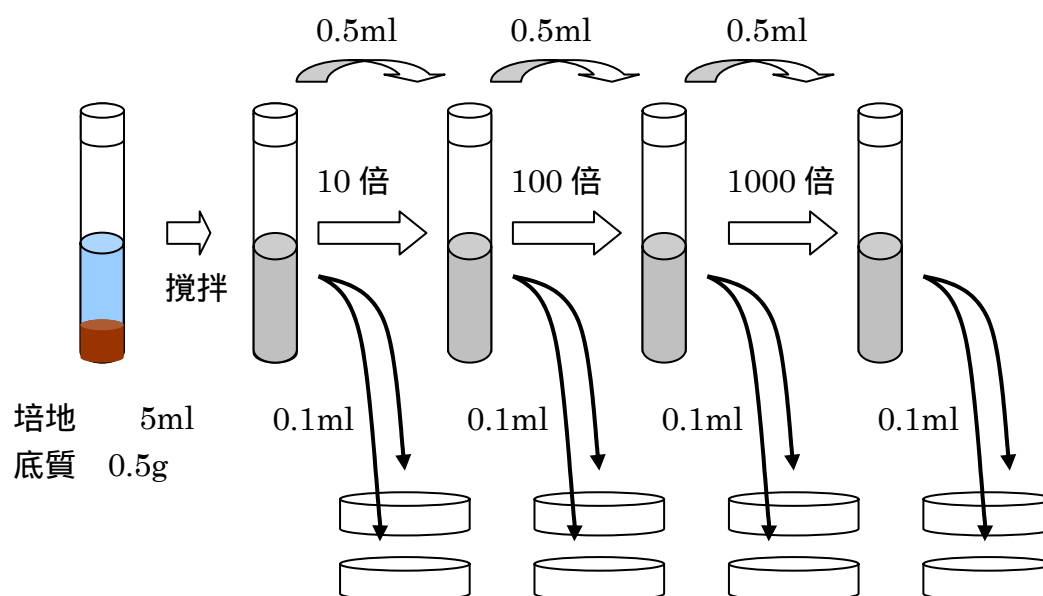


Fig.3-12 平板法を用いた生菌数計数法

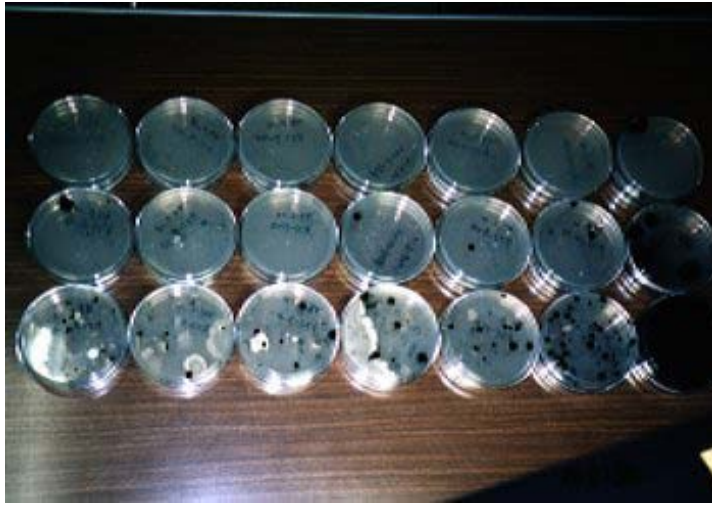


Fig.3-13 1ヶ月間の培養によりコロニーの生成したシャーレ

3-2 培養シミュレーション実験

多摩川河口域にて採取した底質中から分離・精製した硫酸還元菌 (*Desulfovibrio.sp*) 硫酸還元菌用にもっともよく使われている PE 培地 (Table 3-1) で培養した。

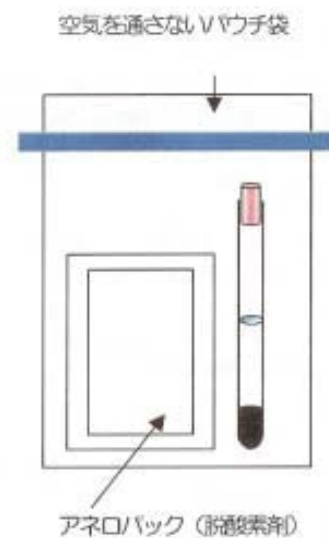
3-2-1. 培地調製

使用する器具はすべて滅菌処理をしたものを用い、操作はクリーンベンチ内でバーナーをつけた状態で行った。(ガラス瓶、試験管等はすべてオートクレーブ処理をし、ピペット、シャーレ等は滅菌処理済みのディスポーザブルを使用)

Table 3-1 硫酸還元菌用 PE 培地組成 (Postgate,1979³⁵)

溶液 (980mL)

K ₂ HPO ₄	0.5g
NH ₄ Cl	1.0g
Na ₂ SO ₄	1.0g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1g
Mg SO ₄ ·7H ₂ O	2.0g
乳酸ナトリウム	3.5g
酵母エキス	1.0g



溶液 (10mL)

Fe SO ₄ · 7H ₂ O	0.2, 0.4, 1.0g
	40,80,200ppm

溶液 (10mL)

チオグリコール酸	0.1g
ナトリウム	
アスコルビン酸	0.1g

オートクレーブ滅菌後、混合

+ +

(98mL)(1mL)(1mL) pH7.4

一般に細菌は、炭素源としてブドウ糖、窒素源としてアンモニウム塩、および Mg 塩やリン酸塩などの無機塩類を加えた簡単な培地で培養できるが、さらに複数のアミノ酸やビタミンなどを必要とするものもある。

培地 (pH7.4)

微生物の増殖には通常、炭素源とエネルギー源としての有機物と、菌体構成成分としての N と P が必要である⁹⁾。

NH₄Cl...窒素源としてのアンモニウム塩

K₂HPO₄, CaCl₂ · 2H₂O, MgSO₄ · 7H₂O, Na₂SO₄...塩類

乳酸ナトリウム...炭素源 (特に *Desulfovibrio.sp* に適する)

酵母エキス...エキスはビタミン効果、発育促進のため用いる

培地 (pH 2.0 以下 with H₂SO₄)

FeSO₄ · 7H₂O...微量の金属元素源として、また硫酸還元菌の存在を確認するために添加される。

培地 (pH7.4)

チオグリコール酸ナトリウム、アスコルビン酸...ともに還元剤

それぞれを 120、15 分間オートクレーブ滅菌⁹⁾後、液 98ml、液 1ml、液 1ml を混合。

3-2-2. 硫酸還元菌の分離・精製

硫酸還元菌は、多摩川河口域底質を同上の培地で平板培養して生じた黒いコロニーだけを取り出し、さらに培養することによって分離した。用いた培地が硫酸還元菌とくに *Desulfovibrio.sp* が電子供与体とする乳酸ナトリウムを含み、還元電位も低く押さえであることから、目的の *Desulfovibrio.sp* が選択的に培養され、また Fe²⁺の存在下で黒いコロニーすなわち硫化鉄を生じるのは硫酸還元菌だけであるから、このコロニーのみを培養することで、*Desulfovibrio.sp* を分離できる。

またこの培養生成物を電子顕微鏡観察により、Fig.3-14 に示すようにその豆状に曲がっ

た形状、鞭毛、大きさ（約 $1\mu\text{m}$ ）から *Desulfovibrio.sp* であることが確認された。さらにグラム染色陰性を示す（Fig.3-15）ことから硫酸還元菌であることがわかる。精製度は不明だが、顕微鏡で見える限り他の菌の存在は認められない。

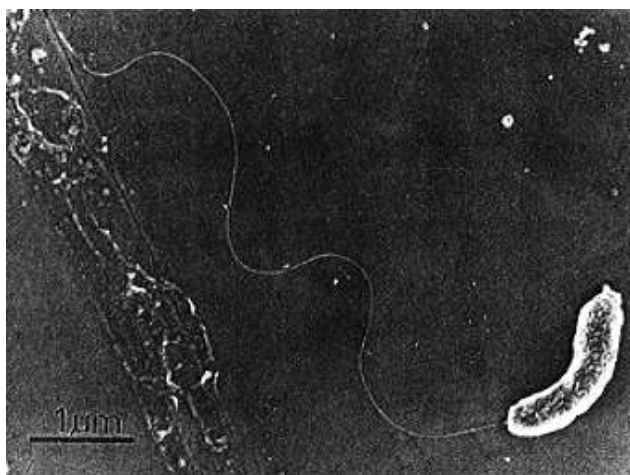


Fig.3-14 硫酸還元菌の電子顕微鏡写真



Fig.3-15 グラム染色により赤く染まった硫酸還元菌

3-2-3. 硫酸還元菌の培養

3-2-1のとおりに調整した培地を 10ml ずつ滅菌した試験管に分注し、 4×10^5 Cells/10mL になるように硫酸還元菌を添加した。硫酸還元菌は多摩川河口域から分離し、実験の直前に数回新しい培地に植え接ぎをして、十分に活性を高めておいたものを使用。試験管約 10 本を一つのパウチ袋にアネロパックと共に嫌氣的条件のまま密封し、インキュベーター内で温度を 30 に保ち、1~420 日間培養した。振とう、光等のコントロールはしていない。

生成物は、一定日数を経たのち取り出し、遠沈管に移して遠心分離 (3000rpm で 10 分間) し、培地、沈殿を分けて -80 冷凍庫で凍結保存した。

アネロパック...三菱ガス化学製。O₂ を吸収し CO₂ を発生する。

パウチ袋...酸素を通さない袋。

培養を行ったのは、Table 3-2 に示すように、条件を変えた 10 シリーズである。

硫酸還元菌用として推奨されている培養条件で、硫酸還元菌にもっともよく使われる PE 培地の を基本として、最長 420 日の培養期間を設定して培養を行った。さらに硫化鉄生成に必要な不可欠な Fe 濃度のみを 2 倍、5 倍にした、 についても 150 日まで行った。これらは、長期培養を目的としており、長期の間に雑菌でカビが生えるなどの危険性が高いため、全く同じ条件のものを一週間程度あけて 2 シリーズずつ行った。特にそのような失敗はなかったが、150 日培養のものは再現性を見るために両サンプルを分析した。

~ は ~ と同じ培地で、温度、pH などの培養条件のみを変えて短期的に行った。はメスバウアー分光法による分析の効率をあげるために行った。

Fe には 4 つの同位体があり、それらの天然存在比は

54	56	57	58
5.81%	91.7230%	2.21%	0.281%

である。このうち ⁵⁷Fe メスバウアーでは全 Fe のうちわずか 2.2% しか含まれていない ⁵⁷Fe のみを分析していることになる。本研究で、培養して得られる生成物は、一試験管あたり数 mg と少ないので ~ の測定に用いたサンプルは 2~10 本を集めている。それでも、測定時間がかかるうえ、S/N があまりよくない。そこで ⁵⁷Fe のみを培地に用いて培養を行った。⁵⁷Fe のみで作られたヘマタイト Fe₂O₃ を HCl に溶解し、これを Fe 濃度 40ppm に調整したものを使用した。培地 と同じ pH に調整し、培地 の代わりに用いた。

Table 3-2 培養実験の条件と培養日数

Fe 濃度/ppm	温度	pH	培養日数
40	30	7	1, 2, 3, 4, 5, 9, 14, 30, 66, 150, 330, 420
80	30	7	1, 3, 4, 5, 14, 30, 150
200	30	7	2, 3, 4, 5, 9, 14, 30, 150
40	30	8	2, 5, 14
80	30	8	2, 5, 14
200	30	8	2, 5, 14
40	30	8	2, 5, 14
80	20	7	2, 5, 14
200	20	7	2, 5, 14
40 (⁵⁷ Fe)	30	7	0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 10

3-3. 分析

3-3-1. 生成物の観察

(1) 生成物の外観

培地自体は酸性に近いと無色透明で底に沈殿を生成し、pH が高いほど黄白色に濁る。培養条件の中性付近では、はじめ培地は無色であるが底には黄白色の有機物 (yeast extract) の沈殿がある。培養を始めて数日経つと、黒色沈殿が生成し始める。培養条件の違いによる、この沈殿の生成時期、状態の変化について注目した。

(2) 走査型電子顕微鏡による観察

肉眼による観察で得られる情報は限られるので、数 μm 単位の立体的な像を得られる走査型電子顕微鏡による観察を行った。

<測定>

サンプルは培養生成物のうち、短期培養として5日間、長期培養のものとして1年間を経たもの。また肉眼で見て、粒状、膜状、粘性をもつ部分をピペットで分けとったもの。そして、試験管壁面に析出した部分を調べるために、試験管を割って小破片としたものをそのまま試料にした。5mm×11mm×1mm のアルミ板にカーボンテープを貼り、カーボンテープ上に試料をのせて、炭素蒸着して測定を行った。

測定に用いた装置は、

SEM 装置：日立 S-5000

付属 EDS 装置：Kevex Sigma

測定条件は、

加速電圧(Vacuum Voltage) : 5kV (像観察) 15 ~ 25kV (EDS スペクトル測定時)

エミッション電流(Emission Current) : 10 μ A

像観察には二次電子像を使用

(3) 透過型電子顕微鏡による観察

先行研究²¹⁾で X 線回折分析法を行った結果、回折ピークが現れず培養生成物は、非晶質であろうと考えられた。しかし、生成物全体を分析する X 線回折で回折ピークを示さなくても、ごく微小範囲においては結晶質である可能性もある。そこで微粒子として、非晶質なのか結晶質なのかを確かめるために、透過型電子顕微鏡を用いた。

<測定>

サンプルは培養したバクテリアと培養生成物、および EDX で組成を確かめる際に標準とした pyrite と vivianite。遠心分離した培養生成物(約一年間培養)を、窒素気流中で乾燥させて、めのう乳鉢で粉碎後、秤量瓶にとり、超音波処理して CCl₄ 中に分散させた。これを、銅メッシュの試料ホルダーに滴下して試料とした。

測定はつくば市の無機材質研究所にて行った。

測定に用いた装置は、

電子顕微鏡 : HITACHI HF-3000S

電子銃 : Cold FE(Field Emission)

測定条件は、

加速電圧 : 300kV

EDX 取り込み 20eV/ch

EELS 取り込み 0.1eV/ch



Fig.3-16 分析に用いた TEM 装置外観
(無機材料研究所)

3-3-2. 上澄み液の分析

(1) 硫酸還元菌の菌数計数

一定期間培養を行った試験管を攪拌して、上澄みと沈殿を混濁させた溶液をディスプレイピペットで 1ml とって、培地 9ml の入った試験管に入れて攪拌し、10 倍希釈液を作った。場合によっては、これをさらに同様の方法で希釈し 100 倍希釈液を作る。これらを、カバーガラスをかけた Bishchelk 計数板上で、顕微鏡を使って、菌体数を直接計数した。視野内の 1 区画 0.1mm³ に約 20 ~ 30 入るような希釈溶液で計数し、同じ日数の試験管 2 または 3 本についてそれぞれ 5 回ずつ行い、その平均をとった。

(2) 高速液体クロマトグラフィーによる SO₄²⁻濃度分析

硫化鉄化合物生成のために、消費されると考えられる SO₄²⁻の濃度変化を見るため HPLC 分析を行った。

<測定>

装置：Dionex

カラム：HPLC-AS3 DIONEX IC IonPac AS4+AG4, CMMS

溶離液：1.80 mM Na₂CO₃ / 1.70 mM NaHCO₃ after Millipore filtration.

サブレッサー：0.0125 M H₂SO₄ 水溶液

流量：2.0ml/min

温度：17

ガス圧：1140psi (10-1300)

孔径0.5 μm以下のMilliporeフィルターをつけた2.5mlのプラスチックシリンジで試料50 μLを導入した。標準には和光純薬社製のSO₄²⁻標準液を用いた。

サンプルは以下のもの。

Table 3-3 上澄み液の分析を行った試料

培地Fe濃度	培養日数
40ppm	0, 2, 3, 5, 9, 14, 30
80ppm	0, 2, 3, 5, 9, 14, 30
200ppm	0, 3, 5, 9, 14, 30

同じ条件で、同じ日数培養した試験管3本をそれぞれ取り出し、濾紙でろ過、超純水で10倍希釈したものをHPLCで測定した。測定はそれぞれの試験管につき3回以上測定し、標準偏差が数%以内におさまる3回の平均値をその試験管のデータとし、さらに同条件で培養した試験管3本の平均値を各日数のデータとして用いた。

(3) ICP 発光分光分析による Fe および他の陽イオンの濃度分析

培養が進むにつれ、硫化鉄化合物生成により消費されるであろう Fe イオンの濃度がどのように変化するかを調べるために、ICP 発光分光分析により定量分析を行った。また補足として、塩を生成して沈殿にとりこまれる可能性のある他の陽イオン (K、Na、Ca、Mg) についても定量を行った。

<測定>

装置は、卓上型プラズマ発光分光分析装置 SPS7700 (セイコー電子工業)

和光純薬製、原子吸光分析用標準液 (1000ppm) で標準液を調整し、検量線法により定量を行った。検量線、分析条件は Table 3-4 に示す。

サンプルは SO_4^{2-} の分析を行ったものと同じ (Table 3-3)。ただし、物理干渉を防ぐため、標準液、サンプルともに 0.1N HNO_3 液にして分析を行った。 SO_4^{2-} の定量の場合と同じく 3 本の試験管の平均をとった。

Table 3-4 ICP-AES 分析条件表

	分析線 / nm	積分時間 / 秒	積分回数 / 回
Fe	259	5	3
Mg	285	5	3
Ca	317	5	3
Na	589	5	3
K	766	5	3

3-3-3. 沈殿生成物の分析

(1) X線吸収微細構造法による状態分析

最終的な同定手段として用いたのはメスバウアー分光法であるが、メスバウアー分光法は、鉄原子核の電子状態や原子配置のわずかな変化に敏感な一方で、隣接原子に関する情報は直接得ることができない。そこで、生成した鉄化合物の配位元素を確定し、化合物同定の助けとするために、XAFS 法を用いた。メスバウアーパラメーターの近い物質がいくつもあり、同定が困難な場合に、鉄原子核の第一近接元素がわかれば、候補をしぼることができる。

<測定>

つくば市の高エネルギー加速器研究機構の放射光実験施設 BL-7C および 12C にて Lytle 型検出器を用いて蛍光法で行った。蛍光法は透過法に比べて感度が高く、試料がウェットであるため適している。バックグラウンドを除去するために Mn フィルターを用い

た。試料は空気を通さないパウチ袋に密封して冷凍し、アルミ製の試料ホルダーに貼り付け測定した。特に XANES の測定の際には、ホルダーの裏にドライアイス片を入れた袋を付けて冷やすことで、試料を凍ったまま固体状態で測定を行った。

測定したサンプルは Table 3-5 に示す。

Table 3-5 XAFS 法による分析を行った試料

EXAFS

Fe 濃度/ppm	温度	pH	培養日数
40	30	7	2,4,9,66

XANES

Fe 濃度/ppm	温度	pH	培養日数
40	30	7	1,2,3,4,5,9,14,150
80	30	7	1,3,4,5,14,150
200	30	7	2,3,4,5,9,14,150
40	30	8	2,5,14
80	30	8	2,5,14
200	30	8	2,5,14
40	20	7	2,5,14
80	20	7	2,5,14
200	20	7	2,5,14

standard...pyrite, pyrrhotite, marcasite, vivianite, Fe_2O_3 , FeS , $\text{Fe}_3(\text{PO}_4) \cdot 8\text{H}_2\text{O}$

(2) メスバウアー分光法による状態分析

XAFS 法により培養生成物の鉄の最近接原子がわかったが、さらにどのような鉄化合物であるかを知るために、メスバウアー分光法による測定を行った。メスバウアーは鉄の状態変化の分析法として確立されている。非晶質にも有効なので、この実験には最適な方法と言えるであろう。

<測定>

AUSTIN SCINENCE S-600 型スペクトロメーター(Fig.3-17)に、1.1GBq の $^{57}\text{Co}/\text{Rh}$ 線源。検出器は Xe- CO_2 封入した比例計数管。

メスバウアー分光法に用いる試料は、液体では無反跳分率が小さく固体状態をとっていることが必要のため、クライオスタットを用いて、液体窒素で試料を 80K に保ち測定した。また、測定は数日かかるため、この温度に保つことは、測定中に菌による反応が進行する

のを止めることにもなる。

試料の酸化を防ぐために窒素雰囲気中で、直径 16mm (2cm²) のアクリルホルダーに詰めて凍結したものを試料とし、80K で 2~7 日間測定。

スペクトル解析は、個々のピークの形状をローレンツ型として、その線形結合によるカーブフィッティングをパーソナルコンピュータにより行った³⁶⁾。

Table 3-6 メスbauer分光法に用いた試料

Fe 濃度/ppm	培養日数
40ppm	0,2,3,4,5,9,14,30,150,330,420
80ppm	0,2,5,9,30,150,
200ppm	0,2,5,9,30
-a 膜	で 150 日間培養したもののうち上層部に積もった膜状成分
-b 粒状	で 150 日間培養したもののうち下層部にたまった粒状成分
⁵⁷ Fe40ppm	0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 10
Standard	(pyrite, pyrrhotite, marcasite, vivianite, greigite, goethite, FeSO ₄ · 8H ₂ O, FeCl ₂ · 4 H ₂ O, Fe ₃ (PO ₄) · 8H ₂ O, Fe(OH) ₂)

-a,b について・・・ガラス壁面からはがれおちた膜状と底にたまった粒状という形状の違いが観察された。とくに、Fe200ppm で培養したもので特にその層序が顕著に見られたので、Fe200ppm で 150 日間培養したものを、ピペットで分けとってそれぞれ測定した。

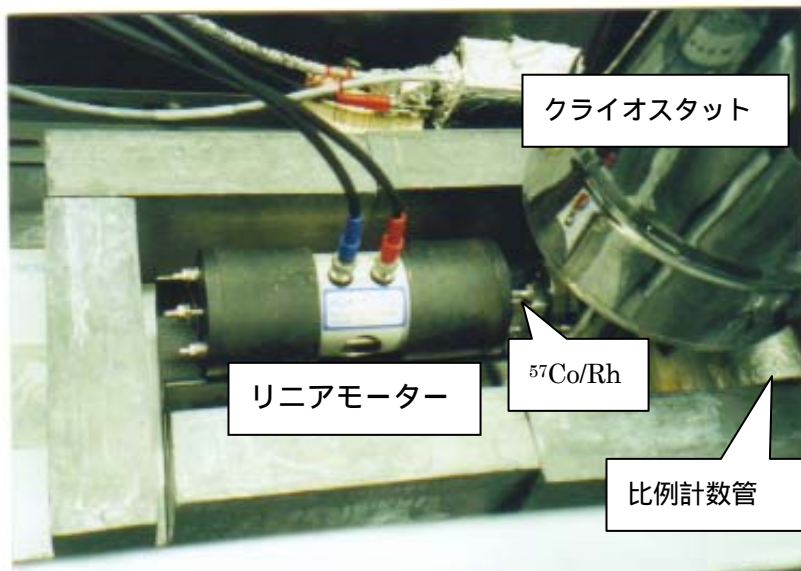


Fig.3-17 メスバウアー装置

(3) エネルギー分散型蛍光 X 線分析法による定量

Fe/S の変化を逐次分析するために、XRF 分析を行った。生成物は硫化鉄化合物のみだけでなく、リン酸鉄などもいくらか含まれている可能性があるため、単純にこの Fe/S 比をもつ化合物になったと判断することはできない。この値は参考にとどめる。

<測定>

装置は、島津製作所製 Rayny EDX-700

直径 3cm の円筒ホルダーにマイラー (C₈H₁₀O₅ 100%、層密度 1.32g/cm、厚さ 6 μm) を張り、マイラー上に数%の水分を含む試料を滴下し、約 1mm 厚さ、20mm 径になるようにしたものを用いた。

管球は Rh。

加速電圧 Na ~ Sc15kV、Ti ~ U50kV

積算時間各 200 秒 (Total400 秒)

コリメーター径 10mm

大気雰囲気にて測定。試料と同様の調整をした pyrite を標準として感度校正をし、薄膜 SFP 法で定量を行った。定量に用いた分析線は S-K , Fe-K 。

3-3-4. 補足実験

(1) 酸への溶解実験

混合物中の pyrite の定量法として、ひとつ確立された方法として湿式分析による分別溶解法がある。これは酸への可溶性の違いを利用して、順にさまざまな酸を加えて可溶成分のみを分取していき、鉄化合物の混合物中の各成分を定量するものである。Pyrite は HCl、HNO₃ 等には溶けず、酸化能をもつ王水、クロム酸等によりのみ溶ける。当研究室においては、底質サンプルにこの方法を適用する先行研究⁸⁷⁾も行われており、本研究でもこれを行うことを考え、試験的に種々の酸への溶解実験を行った。

また、硫化鉄化合物はその組成によって磁性が大きく異なることに注目して、磁性についても調べた。

<実験方法>

生成物中に含まれている可能性の高い組成を持つ鉱物や試薬、各 0.5g を試験管にとり、10ml の水、酸、アルカリ溶液、有機溶媒を加えて 30 分間放置し変化を見た。

磁性については、各試料を粉末のまま白いテフロンピーカーにとり、磁石を近づけたり、NMR の強力磁場内に置いたりして、磁力線の発生の有無を観察した。

(2) Pyrite の無菌的合成

Pyrite の合成は水熱合成など高温・高圧で行う方法が一般的に知られている。河口域底質中では、そのような条件下での反応は起こりえない。しかし、比較的低温の 65 °C で、無

菌的に pyrite の合成を行ったという先行研究²¹⁾もあり、その文献に従って、pyrite の無菌的合成を試みた。

< 実験 >

1. 65 °C 下で、1N NaOH aq.100ml に H₂S を吹き込み 飽和させた。
2. pH7.9 で平衡に達したら、これを FeSO₄ · 4H₂O70mg と斜方硫黄 500mg を入れた容器に移しかえた。
3. この容器にさらに数分間 H₂S を吹き込み、かたくシールして 2 週間恒温槽で 65 °C に保った^{17), 38)}。

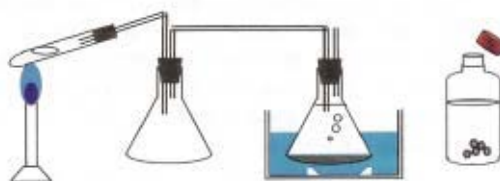


Fig.3-18 Pyrite の無菌的合成実験装置

また、Table3-7 に示すように Fe()源、S 源として、文献の FeSO₄ や斜方硫黄の他に、FeCl₂ やコロイド S なども検討した。

Table 3-7 無機合成に用いた Fe()と S を含む試薬の組み合わせ

	Fe()	S
No.1	FeSO ₄ · 7H ₂ O	crystal S
No.2	FeS	crystal S
No.3	FeSO ₄ · 7H ₂ O	colloidal S
No.4	FeCl ₂ · 4H ₂ O	colloidal S
No.5	FeSO ₄ · 7H ₂ O	powder S
No.6	FeCl ₂ · 4H ₂ O	powder S

結果および考察

4-1. 底質中の硫酸還元菌の分布

硫酸還元菌が鉄の存在下では黒いコロニーを作る性質を利用して、分離せずに計数できる間接計数法で多摩川河口域など 5ヶ所の底質中における硫酸還元菌の生菌数を計数し、深さ方向の分布を調べた結果を Table 4-1 および Fig. 4-2 ~ 4-6 に示した。

また本研究では、多摩川その他の河川河口域における鉄の化学状態の分析をメスバウアー分光法により行った。そのデータと硫酸還元菌の垂直分布を比較した結果を Fig. 4-7 ~ 4-11 に示した。

メスバウアー測定用の試料と、硫酸還元菌の生菌数の計数用試料は全く同じものであるが、試料保存法は多少異なる。メスバウアー測定用に用いられたサンプルは、窒素充填して持ち帰り 5atm の窒素圧でろ過し、5mg Fe/cm² になるよう、約 300mg の試料をサンプルホルダー（直径 16mm、厚み 1mm）にマウントした後、測定に供している³⁹⁾。

図表中の各 Fe の化学状態は、次のような鉱物の存在を意味する。

Fe³⁺(h.s.)常磁性：四極分裂の小さなダブルット 粘土鉱物

Fe²⁺(h.s.)常磁性：四極分裂の大きなダブルット ケイ酸塩鉱物

Fe²⁺(l.s.)反磁性：ダブルット pyrite(FeS₂)

Fe(mag.)強磁性：磁気分裂セクステット 酸化物(hematite -Fe₂O₃, magnetite Fe₃O₄)
鉄のオキシ水酸化物 (goethite -FeOOH など)

ただし、セクステットを示す成分同士は、強度が小さく半値幅が広いためお互いを分離することはしなかった³²⁾。

(1) 多摩川 (Fig. 4-2, 4-7)

多摩川河口域では、全体として菌量が少なく、特に底層水や底質の上方では、ほとんど見られない。サンプリング地点は、干潮時には底質が露出するような場所であるため、嫌気性の硫酸還元菌が上層部では生育しにくいと考えられる。もっとも多く分布しているのが地表面から 20 ~ 30cm の付近で、さらに深部ではまた減少している。このような分布パターンは、pyrite の分布と一致しており、相関があると言える。

pyrite の増加が見られた 20cm という深さは間隙水中の亜硫酸イオンおよびチオ硫酸イオンの濃度が急に増大し始める深さと一致しており⁴⁰⁾、その深さを越えると減少する。

また深さ 20cm 付近から、海底堆積物では多く検出される framboidal pyrite が見つかった。これは、鉱山から産出される立方体の pyrite 鉱石と異なり、キイチゴ状の特徴的な形状を示す pyrite で海底から多く検出される。海底は表層でも十分嫌気性でしかも SO₄²⁻ が多量にあるため、硫酸還元菌の個体数も河川より圧倒的に多い。海底では表層付近から硫酸還元菌も多く、framboid も多い。しかし、河川河口域では、表層は酸素にふれるため、嫌気性菌である硫酸還元菌は、表層にはほとんど存在しない。さらに海水に比べ SO₄²⁻ が

少ないため、各嫌気性菌の競争があって 20cm 付近でちょうど硫酸還元菌の活性が高くなっていると考えられる。したがって、硫酸還元菌が多いこの深さ付近で framboidal pyrite が発見されたことは、両者の相関関係を示唆するものと言えるだろう。

また、深層部ほど風化が進行していることが、機器中性子放射化分析法 (INAA) および中性子誘起即発ガンマ線分析法 (PGA) を用いた元素分析によって明らかとなっている⁴⁾が、この風化の際に起こる主な現象はケイ酸塩の加水分解である。このとき、ケイ酸塩と結びついていた Fe^{2+} が硫酸還元菌の活性が高い中層部では pyrite などとして固定されていると考えられる。より酸化還元電位の低い深層部では pyrrhotite が多く分布しているが、深層部ではメタン生成菌との競合が起こっているためか、硫酸還元菌の生菌数もいっそう少なくなっている。そのため、十分 pyrite 化が進行せずに pyrrhotite のままで一応の安定を保っているのだろう。より河口に近い E1 のほうが深さ 25cm での菌数が多いのは、より海水の影響が大きく、 SO_4^{2-} が得やすいからであろう。

(2) 相模川 (Fig. 4-3, 4-8)

相模川は多摩川より全体的に総菌数が若干多いが、傾向は多摩川とほぼ同じ。やはり表層付近、表層水中には少なく、深さ 15~30cm で最も多く、深さ 50cm では半分以下に減少している。Pyrite の分布との一致が多摩川ほど顕著でないが、サンプリングの日の天候が悪く、台風が近づいており波が荒れていたため、コアが攪乱された可能性がある。

相模川でも深さ 25cm 付近のところから、framboidal pyrite が検出された (Fig.4-1)。

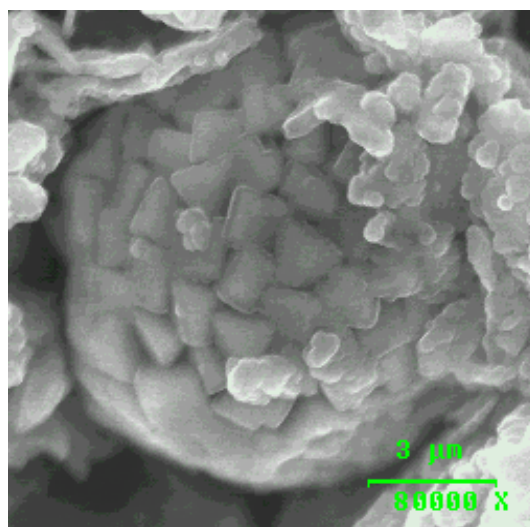


Fig. 4-1 相模川河口域から検出された framboidal pyrite
(by SEM-EDX at Science University of Tokyo)

(3) 北十間川 (Fig. 4-4, 4-4b, 4-9)

硫酸還元菌がもっとも多い深さが、多摩川・相模川では 20～30 cm 付近であるのに対して、北十間川では表面付近から多い。さらに表層水からも多く検出された。Fig.4-4b は水 1g あたりに換算したもので、北十間川は多摩川、相模川の 10 倍から 50 倍とかなり多く存在することがわかる。これは、北十間川が表層付近から還元的雰囲気になっているためであろう。多摩川・相模川は引き潮の影響が大きく、干潮時はかなり水がひいて、サンプリング時も表面は空気にさらされているが、北十間川は常に水深 1.5m くらいで、流れもほとんどない。したがって水中も常に還元的雰囲気を保っていると考えられる。

また多摩川などに比べて、ひとつひとつのコロニーが大きいことも気になった。その原因の一つはコロニーの発生場所で、完全に寒天培地の中に封じ込められたコロニーは小さく、表面付近にできたコロニーは大きい。そのため、全体にコロニー数が多いこのサンプルでは、大きいコロニーが多いのも不思議ではないが、希釈倍率の高い、すなわち数の少ないサンプルでもやはり大きいコロニーが多かった。単に生菌数だけではなく、たとえば菌の活性などもコロニーの大きさに影響してくるのかもしれない。ただし、基本的には菌の活性が高いことは、増殖速度が大きいことと同じ意味をもつので、北十間川は多摩川・相模川に比べると、表層水から硫酸還元菌が活発に増殖している河川であるといえる。

ところで、海水の影響の少ないこの河川で、硫酸還元菌が多摩川などより圧倒的に多く存在しており、また活性も高い可能性があるのはなぜか。増殖に必要な SO_4^{2-} や有機物などの供給源はどこにあるのか。おそらく付近の家庭排水、工場排水等が高濃度の有機物や SO_4^{2-} を含んだ状態で流れ込んでいるためであろう。実際に比較的高い BOD、COD 値が報告されている。 SO_4^{2-} は合成洗剤などにも多く含まれている。水中が十分還元的で、かつ有機物や SO_4^{2-} が供給されるので、表層水や表層にも多く生息するのだろう。

上層から下層まで硫酸還元菌も pyrite も多く存在していることから、現在の流路になっ
てからずっと、この水質汚染状況が続いているものと考えられる。

(4) 谷津干潟 (Fig. 4-5, 4-10)

全体に菌数が少なく、分布に目立った特徴は見られないが、泥質の YH4 地点では、深くなるにつれてわずかに増加する傾向が見られた。干潮時には水が退いて表層が空気にさらされるため、表層および表層水からは全く検出されなかった。多摩川などと異なり 20cm 以深でも少なかった。これは、非常に生き物が多いので上層は常に攪拌されて還元的にならず、また 20cm より下は埋め立て前に砂浜であったために砂質で、有機物が得にくいからであろう。谷津干潟は野鳥の保護地区として保護されており、他の地域よりも汚染が少ないということも影響しているかもしれない。

(5) 金武ダム (Fig. 4-6, 4-11)

他の河川サンプルに比べて、菌の総数が非常に多い。サンプリング地点の近くには葦原があり有機物を得やすい環境である。さらに上流の排水の影響を強く受けて下水に多く見られる細菌なども見つかり、富栄養化の傾向も見られる。したがって、北十間川と同じく、水質は汚染されているようだ。また表層付近で硫酸還元菌が多いことから、表層付近が還元的になっていると考えられる。サンプリングを行った地点は湖の中央付近、水深約 3m なので、おそらく水中に酸化還元境界が存在し、底質表層付近は完全な還元雰囲気になっているのだろう。

このサンプルに関しては、共同研究者の杉森賢司氏（東邦大学医学部）により一般細菌も計数されている。それによると、硫酸還元菌以外の嫌気性菌の分布パターンも似たような増減を示すが、20~30cm で表面付近より少なくなっていることはなく、硫酸還元菌だけがこの深さで極めて少なくなっていることは興味深い。これはまた pyrite の分布パターンと同じ増減傾向であり、ここでも硫酸還元菌と pyrite の相関を示す結果が得られた。

(6) まとめ

生菌数測定の結果は、ばらつきが大きく、コロニーが小さいと培地自体の黒変や沈殿との区別が難しく、また共雑菌により硫化物が可溶化してしまう場合もあるようだ³⁴⁾。このように、いくつかの不確実さを含んでいるものの、どのサンプルもメスバウアー分光法による Fe の分布や、サンプリング地点の特徴を考えて納得のいくものであった。

多摩川・相模川などの流域面積が広く、干潮時に表層が露出するような干潟を形成する地域では、上層では硫酸還元菌は生息できないため、20~30cm 深さでもっとも多く、それ以深では再び減少する。それに対し、北十間川、金武ダム湖のように河口付近であっても水がひかず、常に還元的雰囲気を保っているような地域では、表層付近から硫酸還元菌が多く分布する。また総菌数が多いことから、菌のエネルギー源となる有機物や SO_4^{2-} が多く、つまり水質が汚染されていると考えられる。谷津干潟のように生き物によって攪拌されて還元的雰囲気になりやすく、汚染の少ないところでは、硫酸還元菌は少ないようだ。

いずれの地点でも、硫酸還元菌と pyrite の分布パターンは類似していた。他の化学状態を示す Fe の分布とは一致せず、pyrite の分布のみが硫酸還元菌の分布と類似していたことから、両者の相関関係が示唆される。

Table4-1 底質中における硫酸還元菌の垂直分布

Sampling Point	深さ /cm	生菌数/ 底質 10mg	標準偏差	Sampling Point	深さ /cm	生菌数/ 底質 10mg	標準偏差
多摩川(E1)	0~3	4.5	0.71	北十間川(KJ1)	water	101	1.4
	12~15	2.5	3.5		0~3	48.5	13
	24~27	22.5	2.2		6~9	32.5	9.2
	36~39	9.5	4.9		12~15	38	11
多摩川(E2)	water	0			18~21	33	4.2
	0~3	5	7.1		24~27	28	1.4
	12~15	4	0		33~36	36.5	15
	27~30	10	7.1		北十間川(KJ2)	water	65
42~45	5.5	3.51	0~3			9	2.8
相模川(SG5)	water	2	-			6~9	20.5
	0~3	8.5	0.71	15~18		19.5	7.8
	9~12	2	-	24~27		13	5.7
	27~30	29	2.0	33~36	8	9.8	
相模川(SG6)	water	4.5	0.71	36~39	5	6.4	
	0~3	2	0	谷津干潟(YH1)	water	0	0
	15~18	42	1.41		0~3	0	0
	30~33	35	7.1		6~9	0.5	0.71
	45~48	20	2.81		15~18	1	1.4
相模川(SG7)	water	6			24~27	0.5	0.7
	15~18	16	4.21	33~36	0.5	0.71	
	30~33	29	9.9	36~39	1	0	
	39~42	11.5	6.4	39~42	0.5	0.7	
金武ダム	0~2.5	14	-	42~45	2	1.4	
	2.5~10	48	-	45~48	2.5	0.71	
	10~20	6.8	-	谷津干潟(YH4)	water	0	
	20~30	5	-		0~3	6.3	1.2
	30~40	56	-		6~9	2.5	1
	40~50	40	-		15~18	4.5	3
			24~27		5	3.5	
			33~36		11	15	
			36~39	9	2.8		
			39~42	5.5	2.1		
			42~45	13.5	9.8		
			45~48	11	3.6		

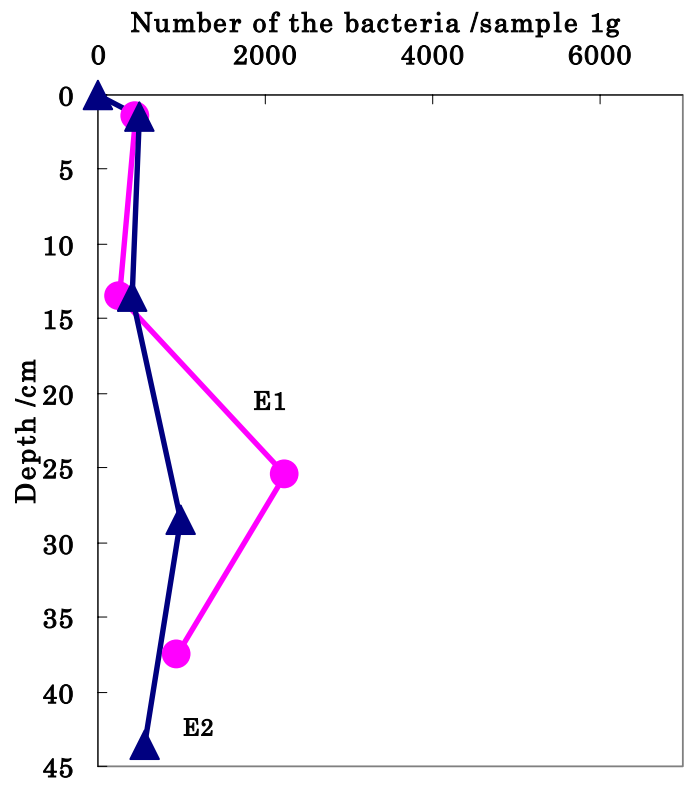


Fig. 4-2 多摩川河口域底質中の硫酸還元菌の垂直分布

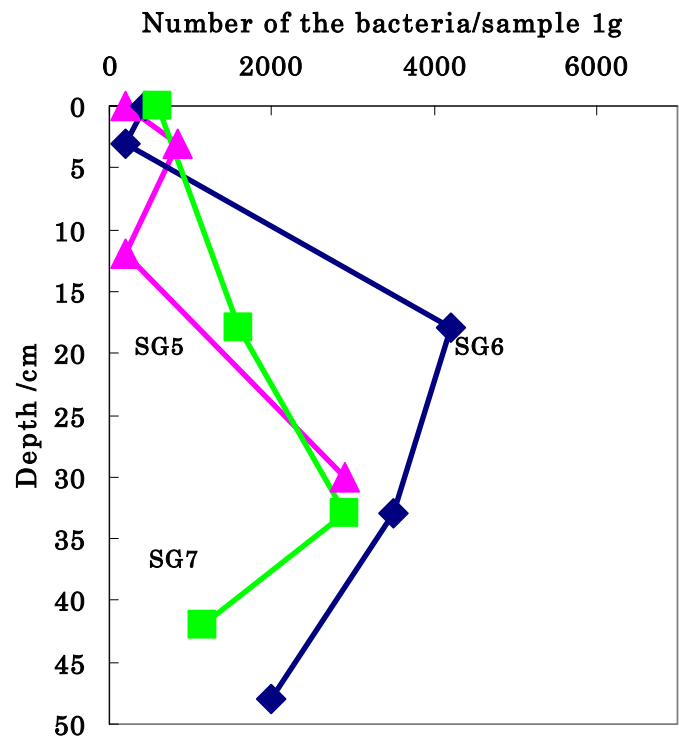


Fig. 4-3 相模川河口域底質中の硫酸還元菌の垂直分布

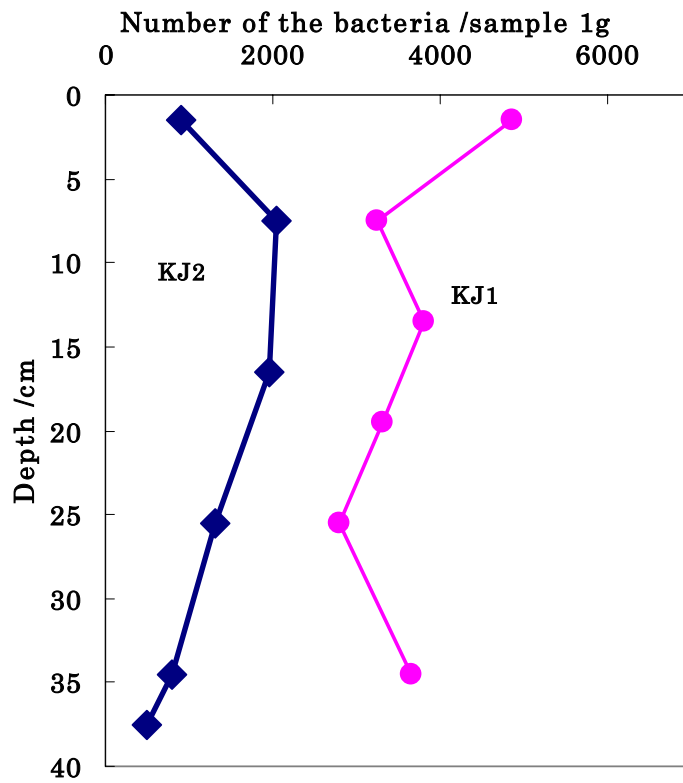


Fig. 4-4 北十間川底質中の硫酸還元菌の垂直分布

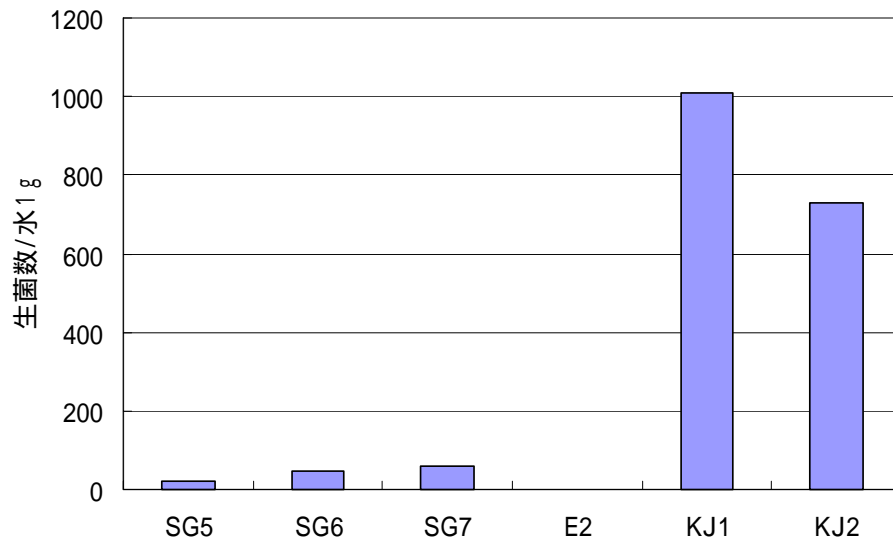


Fig. 4-4b 河口域表層水に比べて多い北十間川表層水中の硫酸還元菌数

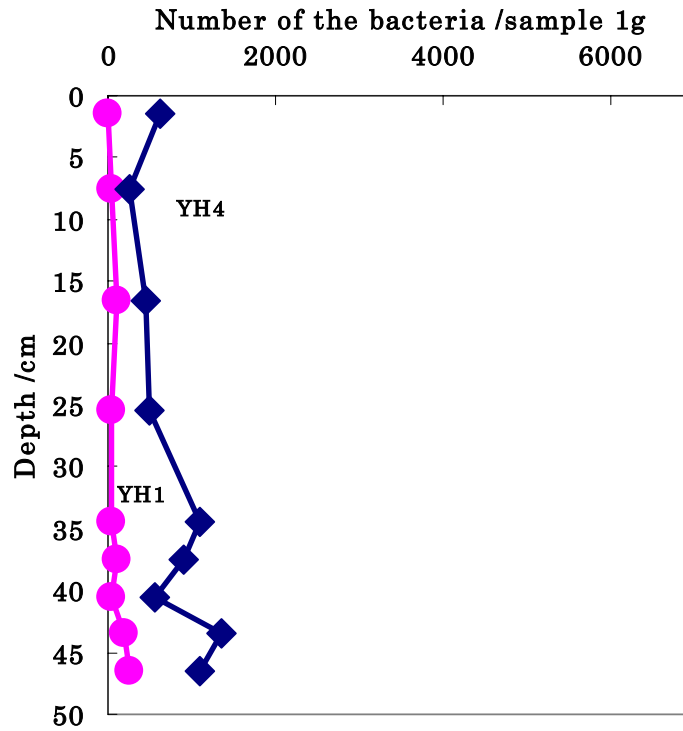


Fig. 4-5 谷津干潟底質中の硫酸還元菌の垂直分布

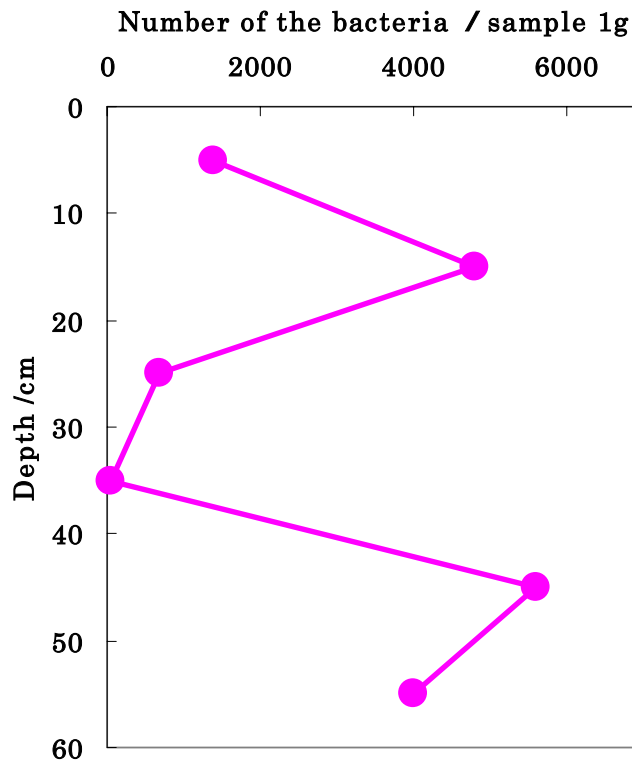


Fig. 4-6 金武ダム湖底質中の硫酸還元菌の垂直分布

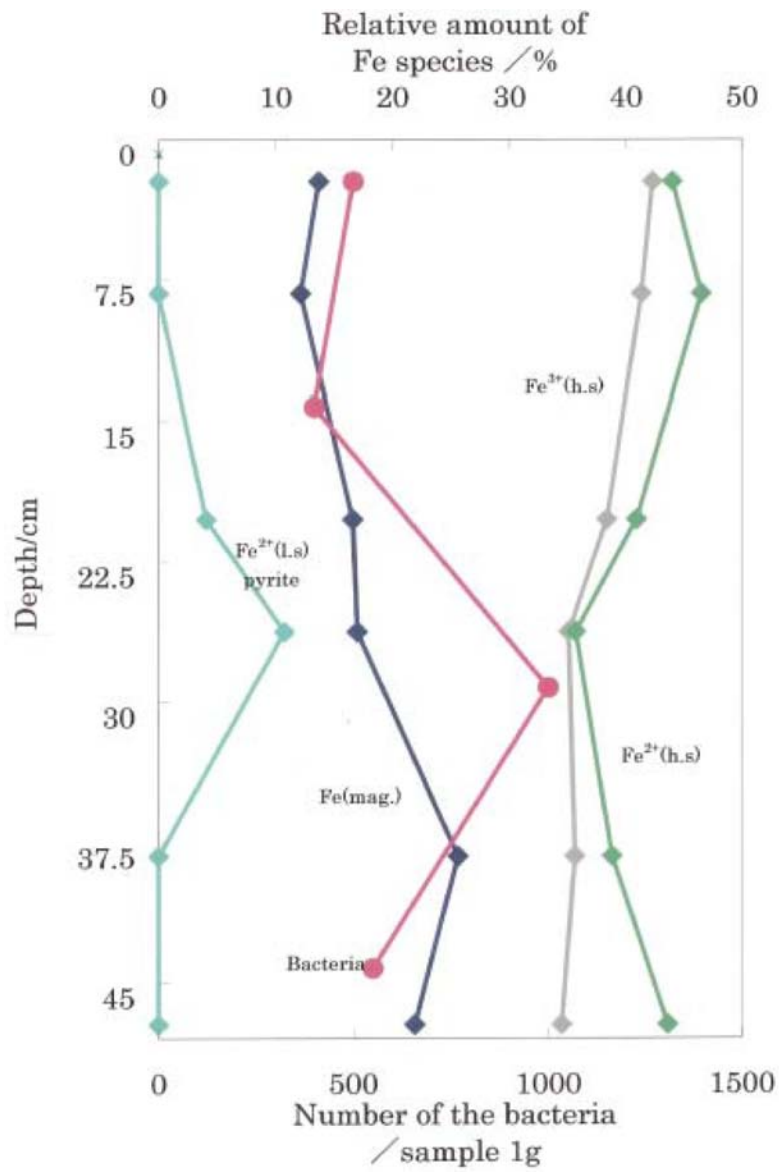


Fig. 4-7 多摩川河口域底質中における
異なる化学状態の鉄と硫酸還元菌の分布比較

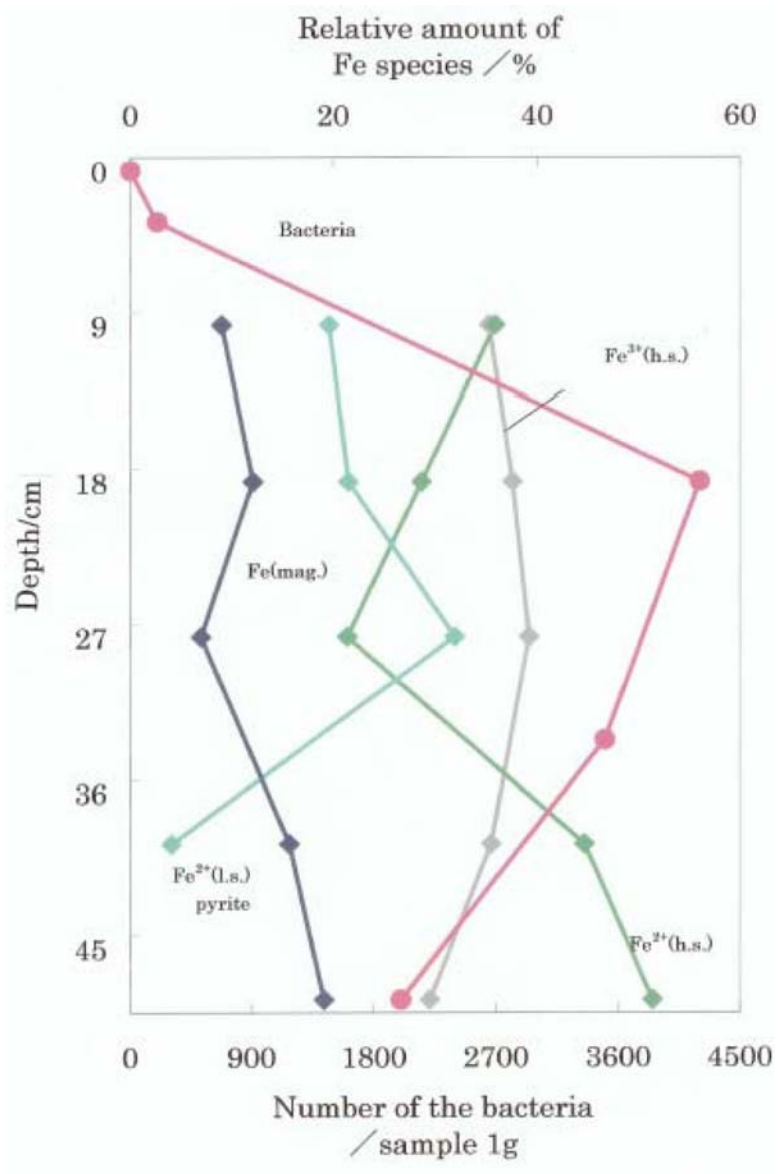


Fig. 4-8 相模川河口域底質中における異なる化学状態の鉄と硫酸還元菌の分布比較

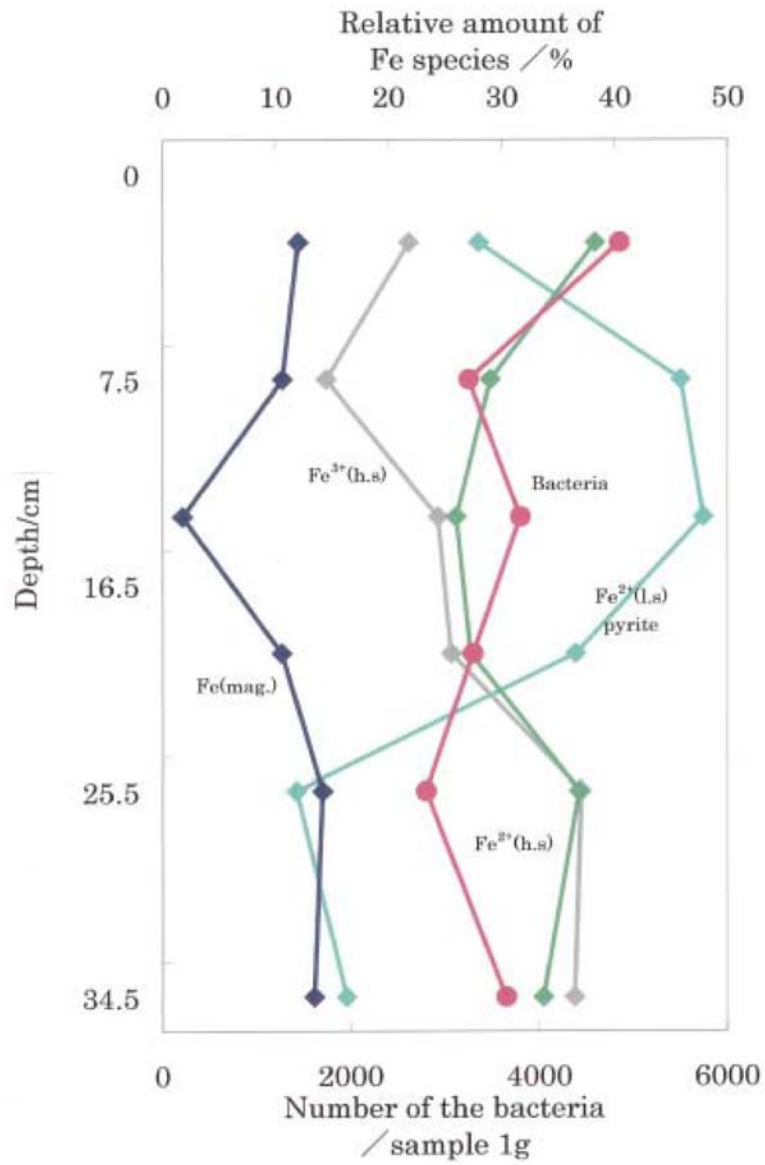


Fig. 4-9 北十間川底質中における異なる化学状態の鉄と硫酸還元菌の分布比較

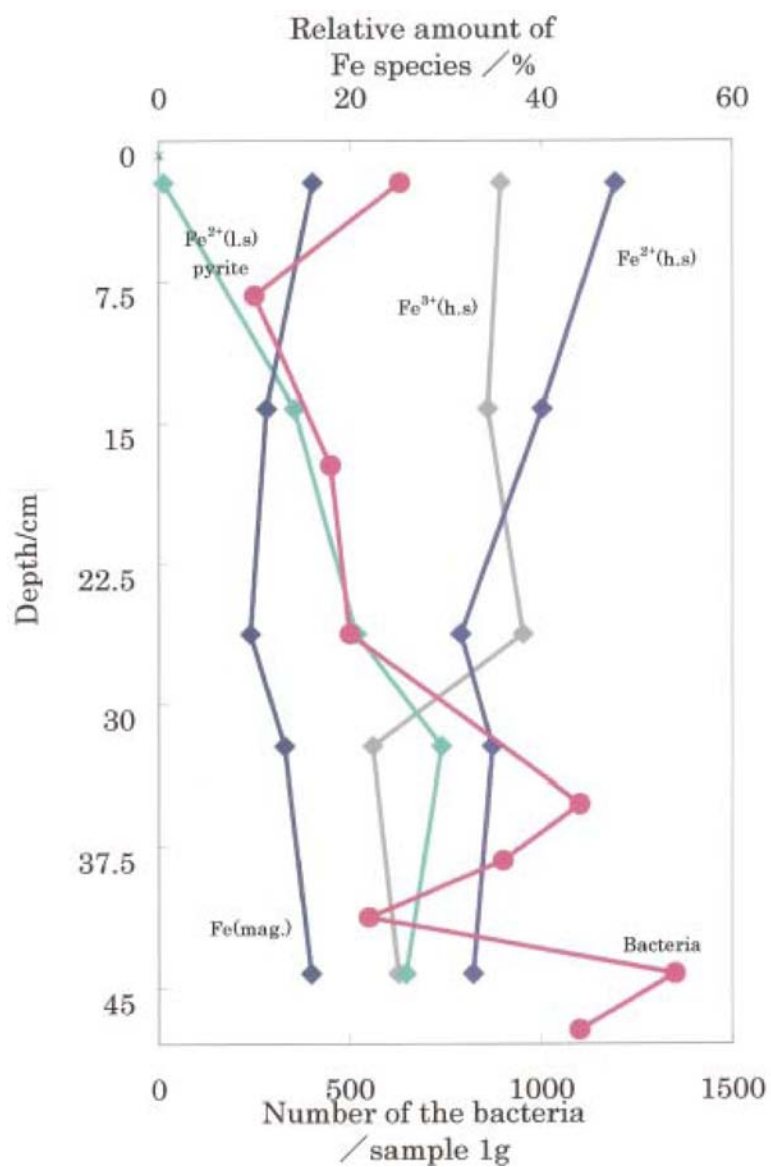


Fig. 4-10 谷津干潟底質中における
異なる化学状態の鉄と硫酸還元菌の分布比較

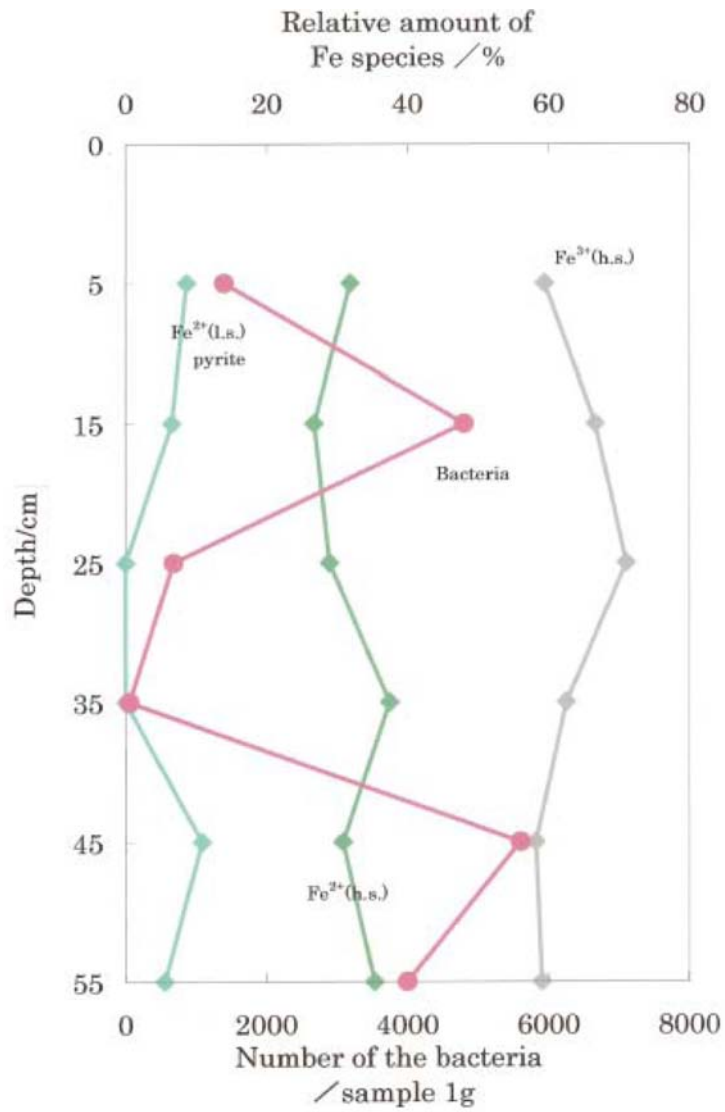


Fig. 4-11 金武ダム湖底質中における
異なる化学状態の鉄と硫酸還元菌の分布比較

4-2. 培養シミュレーション実験による生成物の分析

4-2-1. 生成物の観察

(1) 生成物の外観

培地自体は酸性に近いと、無色透明で底に沈殿を生成し、pH が高いほど黄白色に濁る。培養条件の中性付近では、はじめ培地は無色であるが、底には黄白色の有機物 (yeast extract の色) の沈殿がある。2~3 日目くらいに溶液は透明なまま沈殿の一部が黒くなり始め、5~9 日目には全体に黒くなる。一年以上培養したものは、液量が 2/3 程度に減り、沈殿は全体にくっついたようになる。同じ時間遠心分離にかけても、日が浅いものは微粒子が沈殿せずに分散して上澄みが黒く濁るが、長期培養したものの上澄みは透明になった。試験管の底にたまった状態を見ても、長期のほうが凝集しているように見え、中には粘性をもつものや 1mm くらいの硬い粒を含むものもあった。30 日あたりまでは、試験管ごとの差違はほとんどないが、半年ほど経たものは試験管によって状態が微妙に異なった。

どの培養条件においても、培養日数の浅いもののほうが粒子が細かく、次第に凝集して全体にかたまるという傾向が見られた。約 1 年間培養した生成物の外観を Fig.4-12 に示した。

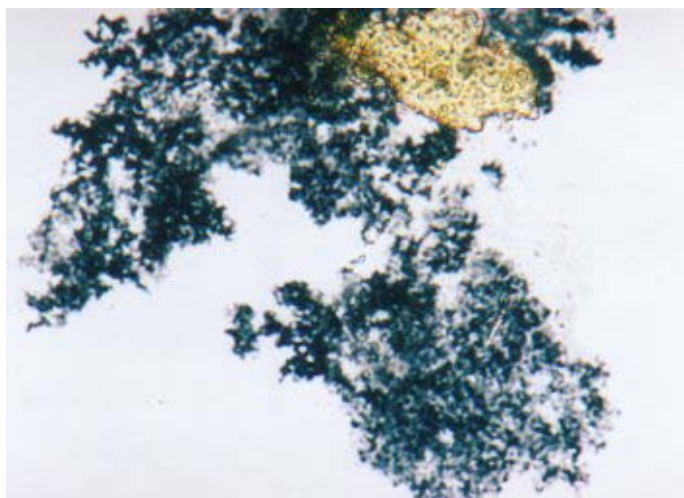


Fig.4-12 生成物の外観

< Fe 濃度による影響 >

- Fe40 ppm : *Desulfovibrio.sp* 用として一般的に使われている Postgate 培地の組成
- Fe80 ppm : Postgate 培地の 2 倍。菌の表面付近で数 μm 単位の pyrite の生成が確認された類似研究²²⁾でも用いられていた培地と同じ組成。
- Fe200ppm : Postgate 培地の 5 倍。メスバウアー分光法を適用した先行研究²¹⁾で用いられた培地と同じ組成。

生成物の量は Fe 濃度にほぼ比例して多くなる。沈殿が生成し始める時期は、Fe40ppm で 1~2 日目、80ppm で 2~3 日目、200ppm では 3 日目以降であった。つまり Fe 濃度が高くなるほど、沈殿の生成時期が遅れる。

また黒色生成物は試験管の壁面にも析出するが、かなり強固に壁面に付着していて、底にたまった粒状のものとは異なるようだ。特に、Fe 濃度 200ppm 培養試験管は、生成時期は遅いが、生成し始めると急激に真っ黒になって、壁には光沢をもったメッキのように膜状の付着物が生成し、9 日後くらいにはそれがはがれおちた。80ppm でも壁に付着物が見られたが、はがれおちるにはいたらなかった。

結晶の成長は核になるものがあると起こり易いことが知られているが、触媒の表面に溶質の新相の核が生成する方が、溶液内部での核生成（均一核生成）よりも活性化エネルギーが少なくすむからである⁴²⁾。この場合もガラス表面が擬結晶生成の場の一つとなっているようだ。最初の擬結晶の成長が進むと、生成物自身の重みで剥がれ落ちるのだろう。初期の試験管への付着は強固なので、この膜状の生成物中の結合はそれ以上でかなり強いと考えられる。

後述する菌の増加曲線（Fig. 4-32）を見ると、各 Fe 濃度で、菌が著しく増殖する時期と沈殿が生成し始める時期は一致している。このことから、硫酸還元菌の増殖にともなって、黒色沈殿が生成されることがわかった。

< pH の影響 >

通常、培地は pH7.2~7.4 の中性付近であるが、自然界では必ずしも中性ではないので、pH の影響を調べるために pH6 と pH8 でも培養実験を行った（Fig. 4-14）。

- { 酸性 : 菌が生育せず、黒沈も生成しない
(pH6)
- { アルカリ性: 培地中の Fe^{2+} が $\text{Fe}(\text{OH})_2$ の緑色コロイドとして沈殿する (Fig. 4-13)。
(pH8) この培地でも菌は生育し黒沈も生成するが、量が少なく壁面の付着もあまり多くない。

硫酸還元菌の活性領域は $E_h = -70 \sim -340\text{mV}$, pH = 7~8.6 の範囲と言われている（ E_h は酸化還元電位）。実験を行った pH8 でも生息可能であるが、pH が高くなるほど E_h が低



Fig.4-13 アルカリ性領域で緑色の $\text{Fe}(\text{OH})_2$ コロイドを生じた培地

い必要がある。したがって、単に pH をあげただけで Eh を調整していない本実験では、菌の活性が阻害されたために、生成物の量も少なかったと推測される。

つまり酸性側では菌が生育せず SO_4^{2-} の還元も起こらないため、中性以上でない沈殿は生成しない。本研究で分析を行った生成物はいずれも中性付近で生じたものである。しかし、後に述べるように本研究での生成物は非結晶が主成分であったのは、pH7 以上の中性からややアルカリ性で培養を行ったため、結晶化が進まなかったからかもしれない。Pyrite の無機合成に関する先行研究²⁰⁾では、pH の違いによって熟成生成物が異なるとされている。菌の生育には中性からややアルカリ性が適するので、この液性では前駆体は生じやすいが、その後の熟成に最適な pH は異なる可能性がある。

Schoonen ら (1991) の無機合成では、

- pH 4 以下 marcasite が優先, 2 ~ 5 μm , 明らかな結晶性 FeS_2 生成が認められる
- pH 4 ~ pH6 marcasite + pyrite,
- pH 6 以上 pyrite が優先, 0.1 ~ 2 μm , 結晶生成物はほとんどない

< 温度の影響 > (Fig. 4-15)

Desulfovibrio.sp の生育に最適な温度 30 で培養を行ったとき、沈殿が生成し始める時期は、およそ

Fe	40ppm	2日目
	80ppm	3日目
	200ppm	4日目

であったが、20 で培養したところ、およそ



Fig.4-14 pHのみ異なる場合の生成物

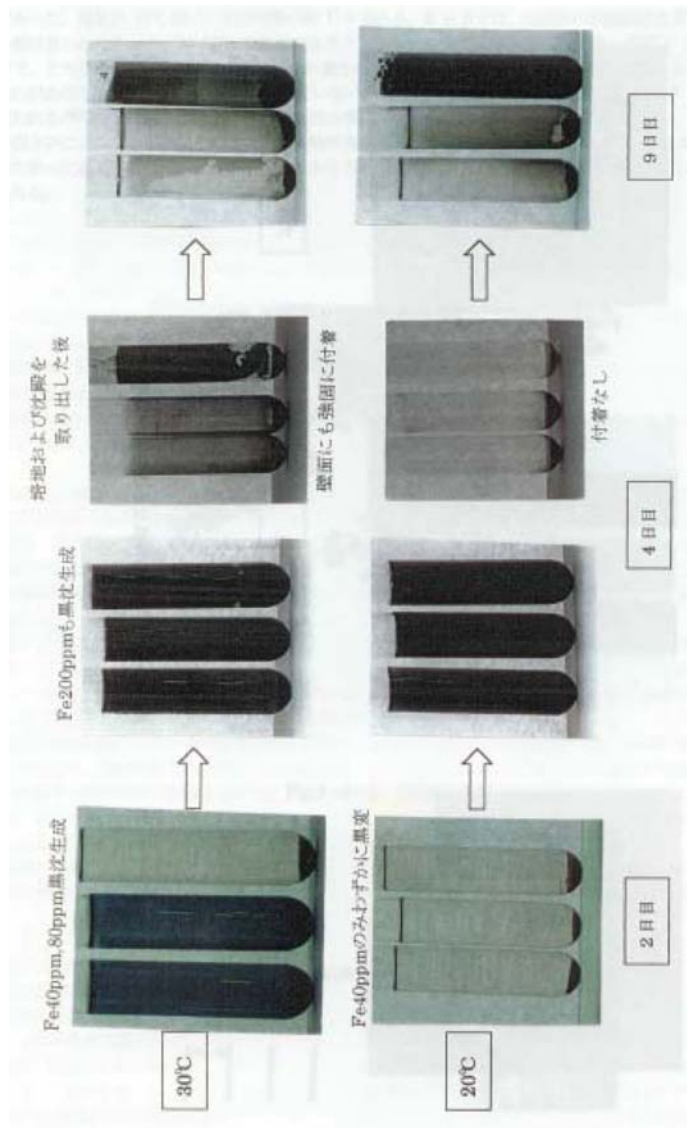


Fig.4-15 温度のみ異なる場合の生成物

Fe	40ppm	3日目
	80ppm	4日目
	200ppm	5日目

であった。温度が 10℃ 低いと生成時期が約 1 日遅れる。9 日目では、生成物の状態は見た目では温度による差は見られなかった。約 25℃ の室温で温度コントロールせずに培養をした場合、20℃ と 30℃ の中間程度で、どちらかといえば 30℃ 培養に近い日数から生成物が観察された。適温を大きく越えると死滅するおそれがあるため、30℃ 以上の培養は行っていない。通常 10℃ の温度低下は生成速度を 2~3 日遅らせると言われる⁹⁾ので、これらの結果は妥当なものと言える。

以上のことから、培養温度の違いは生成物の発生時期にのみ影響し、生成過程自体に変化はないと考えられる。したがって底質中でも反応速度は小さいであろうが、この実験での試験管内とほぼ同様の反応が進むと考えられる。

(2) 走査型電子顕微鏡による観察

肉眼による観察でも形状の違う生成物の混合であることがわかったが、 μm 単位での観察のために本法を用いた。肉眼で見られる試料の形状の違いを Fig.4-16 に示した。

その結果、顕微鏡レベルで見てもやはり明らかに異なる粒状と膜状の物質が生成していることがわかった (Fig.4-17, 4-18)。試験管の上層に積もっていた膜状の生成物は、ガラス表面の付着物がはがれ落ちたものと考えられ、SEM で見ても両者は似ている。同じ 30K 倍で観察したときに、表面が平滑でところどころに一方方向へのひだが走っているという特徴が両者で見られた。EDX による定性も行ったが、ガラスに付着したままなので Si が多く出てしまい、Fe, S, Ca, K, P なども検出されたが、試料が非常に薄く、部位によって組成がまちまちで定量は難しかった。

一方、試験管の底付近に沈殿していた生成物は粒状で、膜状のものとは違い、Fe と S を主成分とすることが EDX により明らかであった。またこの Fe と S の比は 1:1 よりもやや S が多い組成をもつことがわかった。粒径はおよそ $0.1 \sim 1 \mu\text{m}$ 。また、今回の観察では予想に反し、長期培養したもののほうが若干粒が細かった (Fig.4-19, 4-20)。短期生成物のほうが表面が不安定であるが、長期培養でより結合が強固になり小さくて固い粒になったとも考えられるが、1 回の観察では断言できない。

さらに長期培養したものの中には、粘性を持ちゾル状になったものもあり、これを SEM で観察すると、糸をひいたように見えて、粒子も球というより棒状になったものが多かった (Fig.4-21)。菌の培養でよく見られる菌膜と言われるものかもしれない。この糸の正体は明らかでないが、これによって粒子が凝集しやすくなっているとも考えられる。

Framboidal 状の生成物を期待したが、検出できなかった。しかし、底で見られた球状生成物の 10 倍くらいの大球がガラス表面ではいくつか観察された (Fig.4-22)。試験管の底では微粒子が多すぎ全体に接合したようになるが、壁面では四方から粒子が集まってき

てより大球に成長したと思われる。Framboidal pyrite では一つ一つの粒子がもっと大きいので、これが河川底質から検出された framboidal pyrite と同じものとは考えにくい。試験管中でも framboidal になるパーツはあり、またそれらは凝集する性質を持つことがわかった。

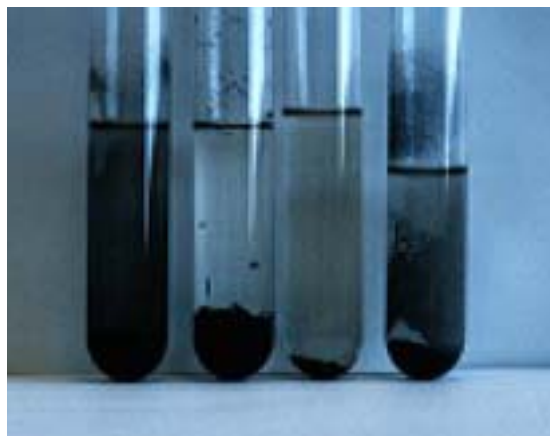


Fig.4-16 SEM に用いた試料の形状の違い

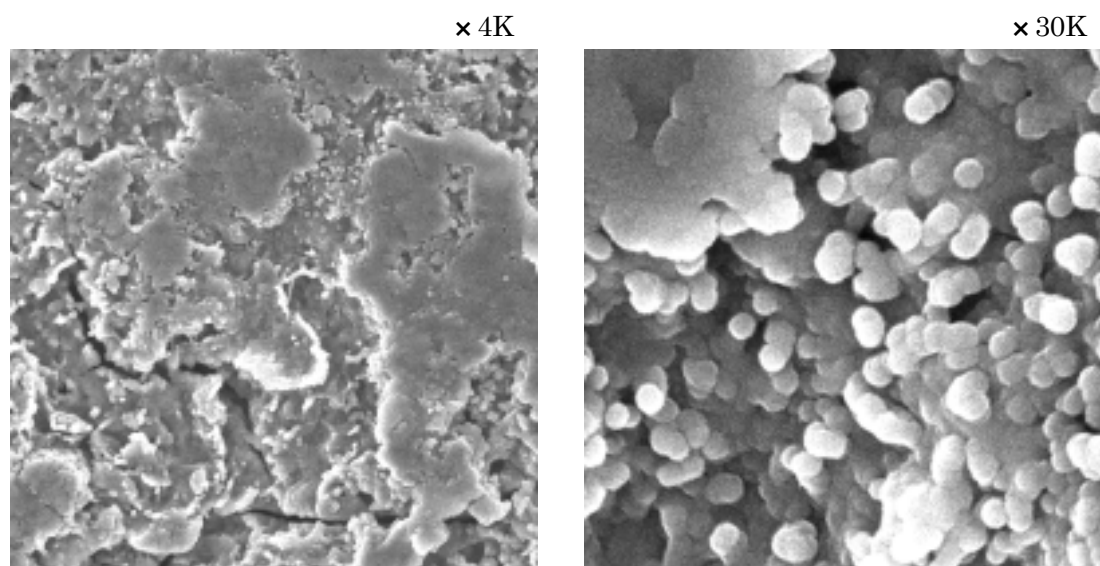
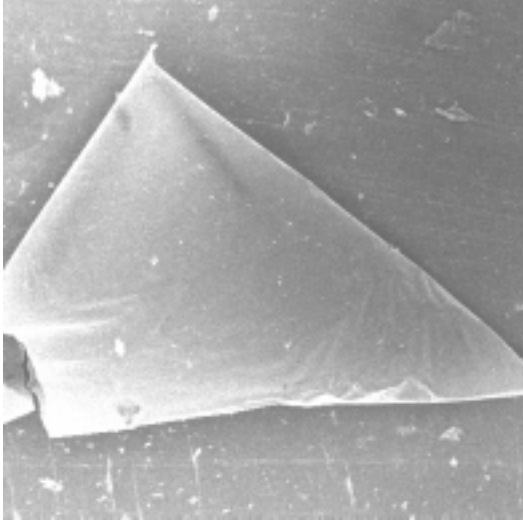


Fig.4-17 粒状生成物 SEM 像

× 150



× 1K

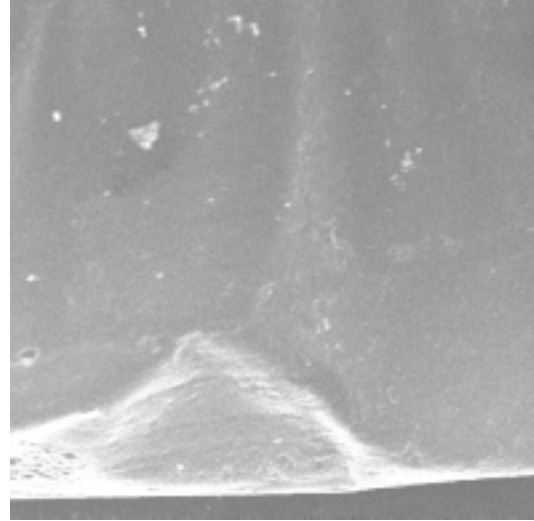
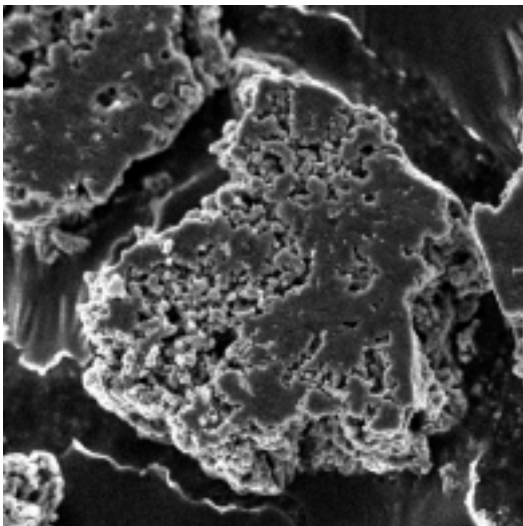


Fig.4-18 膜状生成物 SEM 像

× 4K



× 30K

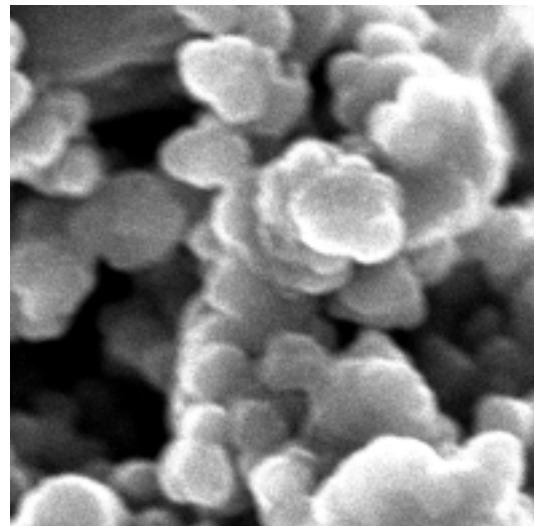


Fig.4-19 短期 (3 日) 培養生成物 SEM 像

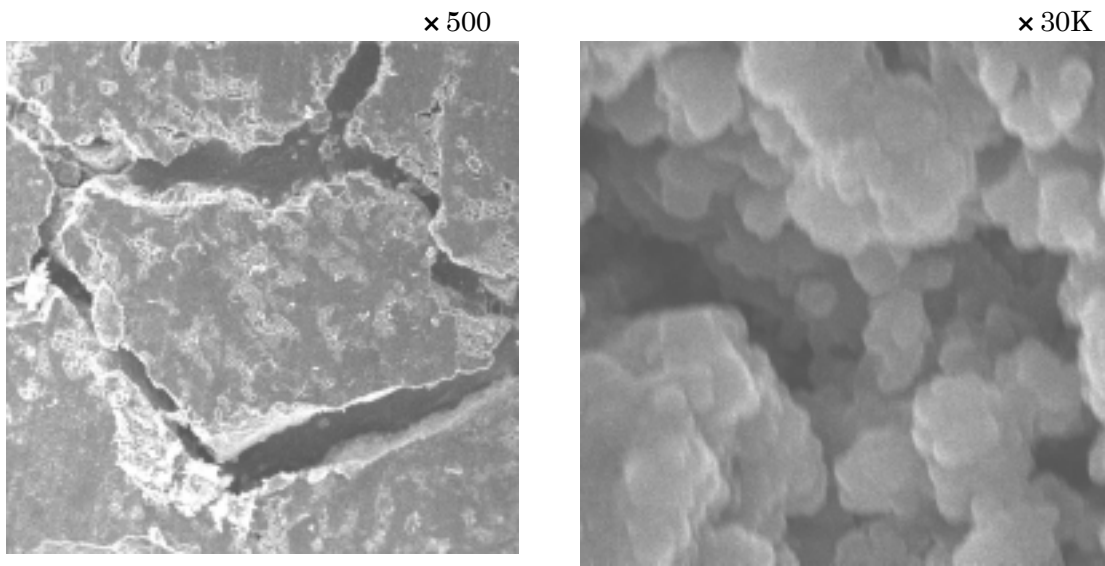


Fig.4-20 長期（約1年）培養生成物 SEM 像

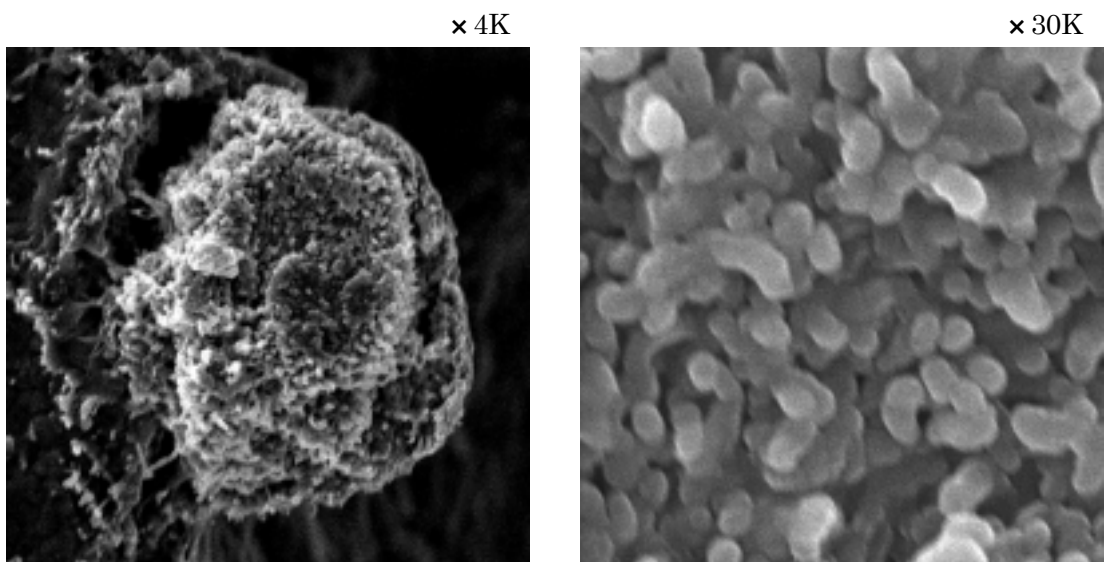


Fig.4-21 粘性を持つ生成物 SEM 像

× 1K

× 30K

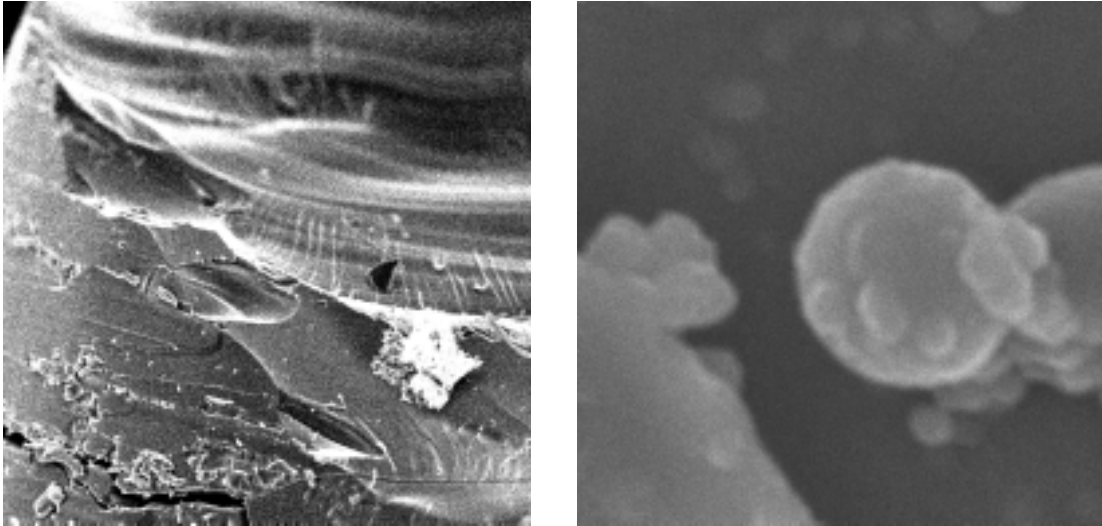


Fig.4-22 試験管壁面に析出した生成物 SEM 像

(3) 透過型電子顕微鏡による観察

生成物中からは、2種類の粒子の存在が確認された。生成物が結晶質かどうかはその回折像から、その構成元素は同時に行った EDX スペクトルからわかる。

Fig.4-23 は低倍率で観察した際に多く見られたもので、角張って比較的大きく、単結晶パターンを示す (Fig.4-24)。その構成元素は Fe, P, Mg, O であった。組成は正確に決定できないが、観察したいくつかの粒子でこの4元素の強度比はほぼ一定しており、リン酸鉄とリン酸マグネシウムの混合物というより、リン酸鉄の Fe の一部が Mg に置き換わったものであろう。培地に用いた Fe は FeSO_4 であるから Fe は 2 価で、 PO_4 イオンも存在するので、無機的に反応して沈殿した $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$ であろうと推測された。天然には ludlamite ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) と vivianite ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) が知られ、特に vivianite は Mg が不純物として含まれることがあるため、vivianite に近いものだと判断したが、後に述べるようにメスバウアースペクトルからは、3 価のリン酸鉄の存在を示す結果が得られた。3 価の鉄は用いていないが、不純物あるいは酸化によって生じたものと考えられる。従って、圧倒的に多く存在する 2 価の Fe のリン酸塩が生じる可能性も否定できないが、 FePO_4 ()の一部に Mg が Fe の代わりに配位したものと判断した。

またそれと似た (Fe, Mg) PO_4 組成を示すバクテリア状塊も観察できた (Fig.4-26 ~ 4-28)。形状、大きさとも硫酸還元菌のそれに近い。鉄還元細菌の場合であるが、グラム陰性菌の特徴であるマイナスに帯電した細胞膜表面が、リン酸鉄化合物を生成するのに有効に働くとの報告⁴⁹⁾があり、菌の膜表面はリン酸鉄の生成に格好の核になりうる上、pyrite

は選択的にリン酸鉄化合物を吸着することも知られている⁴⁴⁾。従って硫酸還元菌自体、または生成した pyrite-like 生成物がリン酸鉄を吸着し、表面をコーティングされたと考えられる。

さらにもう少し高倍率で観察すると、特定の形状を示さないもう少し小さい別の粒子も観察された(Fig. 4-29)。回折が見られないことから非晶質、構成元素は Fe, S であることがわかった(Fig. 4-30, 4-31)。これも正確な組成は不明だが、pyrite のピーク強度と比べて Fe : S は 1:2 よりは明らかに小さいが、1:1 よりやや S が多いものと考えられる。これは SEM-EDX の結果と一致する。しかし、SEM 観察の結果からの予想に反して、(Fe, Mg) PO₄ がこの硫化鉄化合物と同じかやや多く検出されたのは、硫化鉄が微粉末であるため、超音波処理によって飛び散ってしまった可能性がある。今後、実験を行う際には注意が必要であろう。

(4) まとめ

培養開始後、数日経って試験管に黒沈が生成し始めた。Fe の初期濃度 40 ~ 200ppm の間では、生成量は Fe 濃度にほぼ比例し、生成開始時期は反比例した。また最適 pH からはずれると培養生成物の生成量は減り、最適温度 30 以下では反応が遅れる。

また、生成物を SEM-EDX で観察したところ、試験管の底には粒状、試験管壁面には膜状と異なる形状を示すものが混在していることがわかった。粒状生成物は Fe と S から成り、凝集する性質を示していた。

さらに二度の TEM 観察を行い、電子顕微鏡レベルで見て生成物の主成分は結晶質のリン酸鉄と、非晶質の硫化鉄であることが明らかとなった。



Fig.4-23 培養生成物(Crystalline Metal Phosphate) TEM 像($\times 50K$, Zoom300kV)

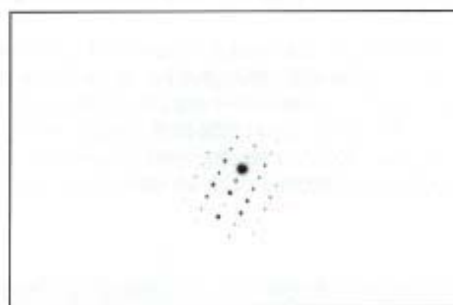


Fig.4-24 培養生成物(Crystalline Metal Phosphate) 回折像(400mA, Zoom300kV)

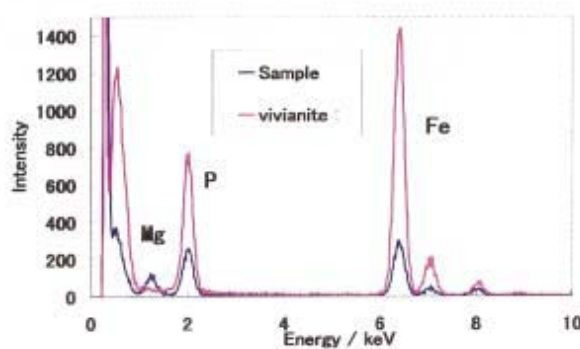


Fig.4-25 培養生成物(Crystalline Metal Phosphate) EDX スペクトル



Fig.4-26 培養生成物中から発見されたバクテリア状塊 TEM 像(× 30K, Zoom300kV)

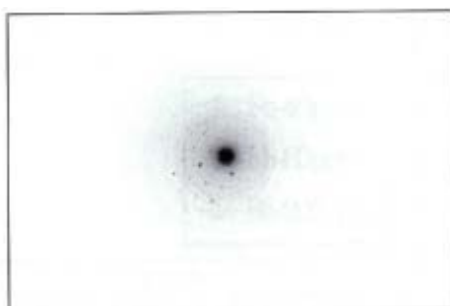


Fig.4-27 バクテリア状塊(Bacteria body) 回折像(400mA, Zoom300kV)

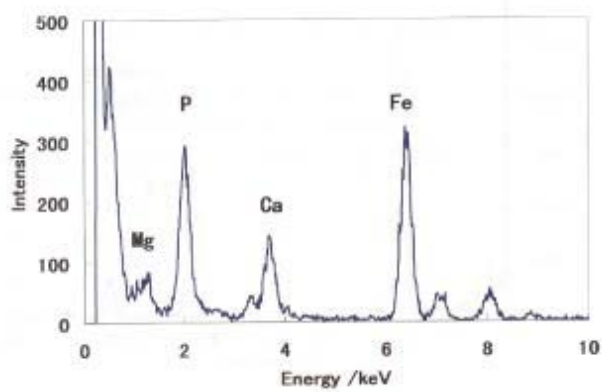


Fig.4-28 バクテリア状塊(Bacteria body) EDX スペクトル



Fig.4-29 培養生成物(Amorphous Iron Sulfides) TEM 像(× 50K, Zoom300kV)

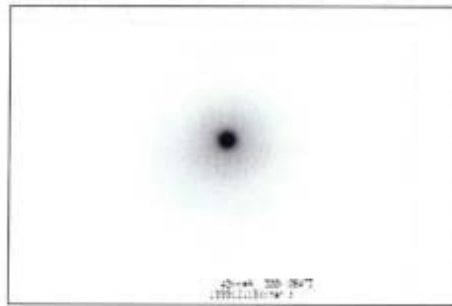


Fig.4-30 非結晶性を示す培養生成物(Amorphous Iron Sulfides) 回折像(400mA, 300kV)

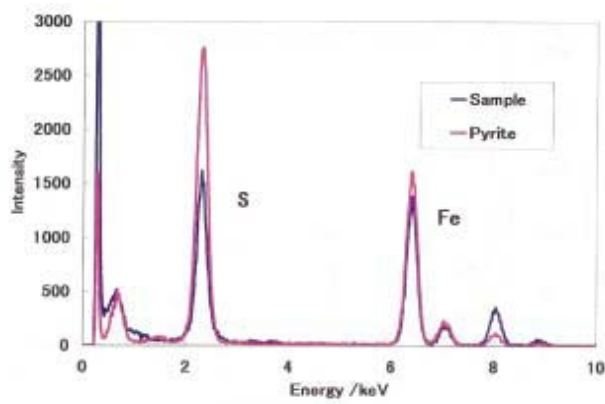


Fig.4-31 Fe, S からなる培養生成物(Amorphous Iron Sulfides) EDX スペクトル

4-2-2. 上澄み液の分析

(1) 硫酸還元菌の菌数変化

培養期間中の硫酸還元菌の個体数の変化を見るために、顕微鏡で直接計数した。結果を Fig4-32, Table4-2 に示す。培養を始めてからただちに増殖を始めるのではなく、環境に慣れるのに数日かかっている。そして、2～5日にかけて、指数関数的に増加し、その後30日前後までに徐々に一定になった。それ以降は沈殿の生成や水の蒸発により溶液の体積が減り、その変化の量が試験管によって差があるため、菌数も一定であるもの、変わらないものとばらついた。また、Feの初期濃度が低いものほど、増加し始める時期が早まっていることがわかる。しかし、培地中に存在しうる菌数の最大値はほぼ一定であった。

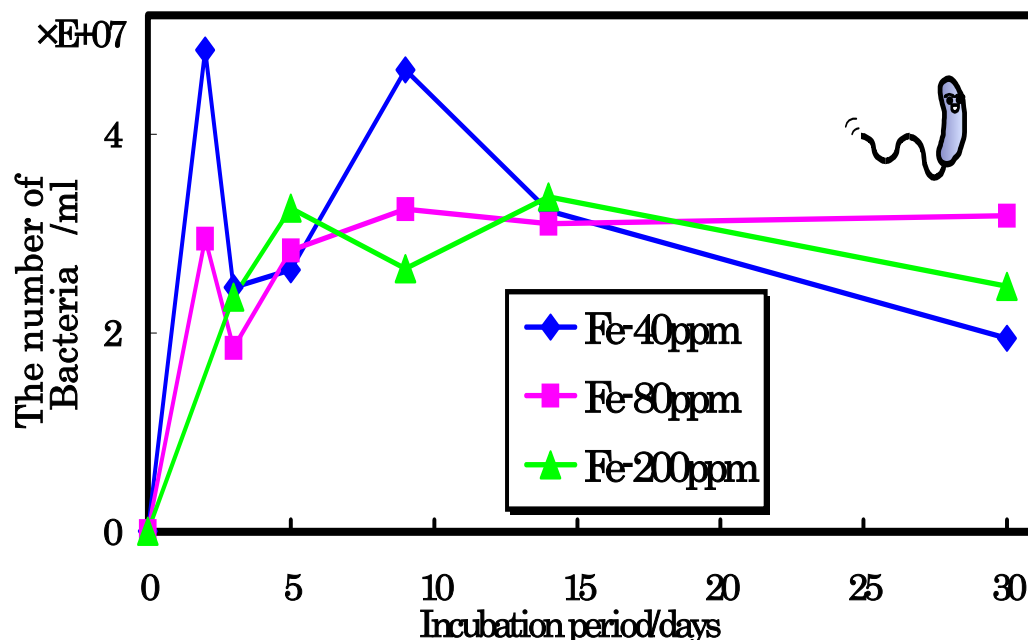


Fig.4-32 培養期間0～30日間の硫酸還元菌の菌量増加曲線

Table4-2 培養期間中0～30日間の硫酸還元菌の菌数(直接計数による)

days	培地中の菌数/0.1mm ³ (視野内)		
	Fe-40ppm	Fe-80ppm	Fe-200ppm
0	4.04	4.04	4.04
2	4850	2950	
3	2460	1850	2360
5	2640	2830	3260
9	4650	3250	2650
14	3230	3100	3370
30	1950	3180	2470

(2) 高速液体クロマトグラフィーによる SO_4^{2-} 濃度変化

Fig.4-33 に SO_4^{2-} の定量に用いた検量線を示した。培養 0~30 日の SO_4^{2-} の濃度変化を Fig.4-34 に示した。培地中の Fe 濃度が 40、80、200ppm の場合について行ったが、どの場合も共通して 0~5 日の間に徐々に SO_4^{2-} の濃度が減少している。そしてその後多少の変化はあるものの、次第に一定濃度に落ち着くことがわかった。またどの Fe 濃度の場合も、30 日には約 600ppm 程度と同じ濃度になっている。30 日を越えるものについては、培養を 30 という比較的高い温度で行っているため、培地中の水の蒸発による影響が無視できず、再び増加するもの、変わらないものと、ばらつきが大きく正確な濃度変化を見ることができなかった。

測定はそれぞれの試験管につき 3 回以上測定しているが、測定上の偏差は非常に小さかった(Table4-3)。しかし、その 3 回の平均値をその試験管のデータとし、同条件で培養した試験管 3 本の平均値を各日数のデータとして用いているのだが、この同条件の試験管 3 本の標準偏差は大きい。同時に培地調整し、同じ菌を用いて培養しているにも関わらず、試験管内での反応は個々に微妙に違ってくるようだ。特にどの Fe 濃度の培地においても、5 日目の偏差が特に大きい。つまり 4~5 日目あたりで急激な変化がまだ進んでいるものと、反応が停滞期に入るものとのがあり、個々の試験管によって数時間程度、反応の進み具合が違っていることがわかる。

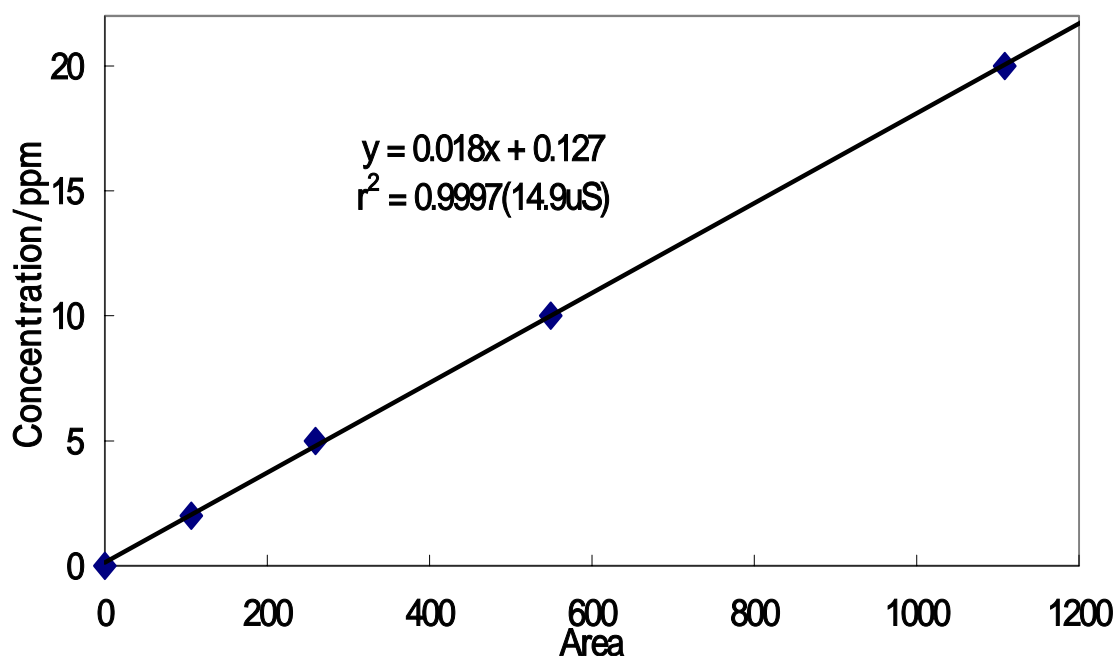


Fig.4-33 SO_4^{2-} の定量に用いた検量線 (by HPLC)

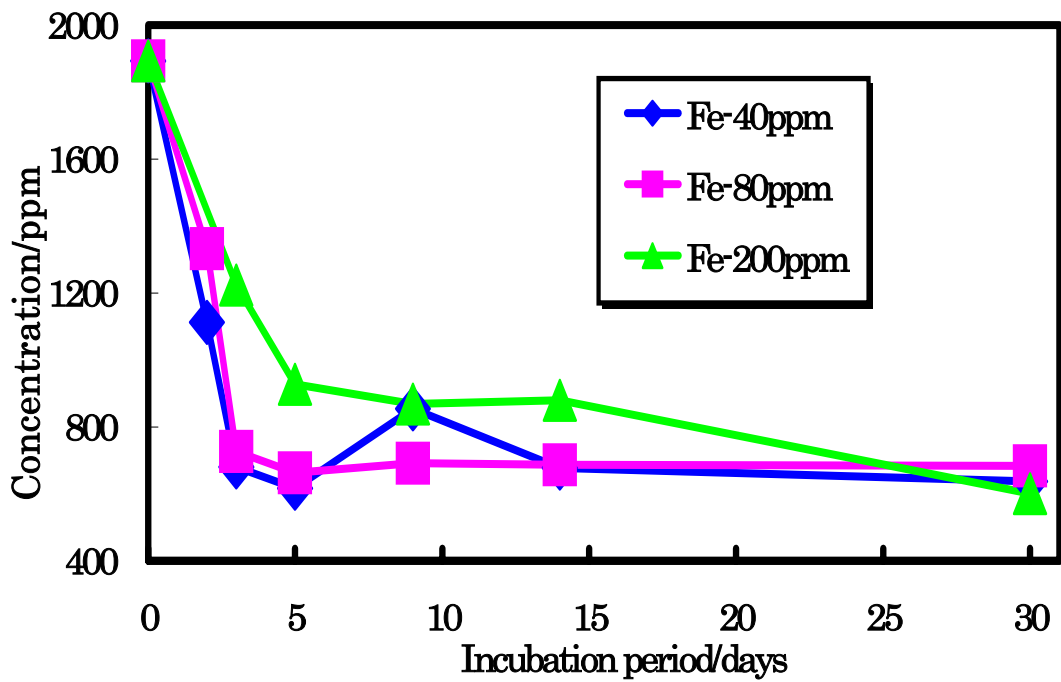


Fig.4-34 培養期間中の SO₄²⁻の濃度変化 (by HPLC)

Table4-3 SO₄²⁻の定量結果 (by HPLC)

培養日数	Fe-40ppm/ppm	Fe-80ppm/ppm	Fe-200ppm/ppm
0	1893.9 ± 9.4	1893.9 ± 9.4	1893.9 ± 9.4
2	1111.6 ± 79.1	1332.9 ± 9.7	-
3	681.3 ± 9.4	727.5 ± 8.5	1223.2 ± 14.1
5	616.7 ± 6.5	662.6 ± 24.8	927.4 ± 8.1
9	853.7 ± 26.2	691.6 ± 2.8	868.9 ± 17.9
14	676.9 ± 30.0	687.6 ± 4.4	880.2 ± 14.7
30	638.2 ± 8.2	683.6 ± 21.6	600.1 ± 8.8

(3) ICP 発光分光分析による Fe 濃度変化

Fig.4-35 に Fe^{2+} イオンの定量に用いた検量線を示した。培養 0~30 日の Fe^{2+} イオンの濃度変化を Fig.4-36 に示した。

SO_4^{2-} の分析と同じサンプルを分析したが、Fe 濃度もやはり 0~5 日で急激に減少している。しかし、その後 30 日までの間に再び増加する。鉄濃度の高い場合ほどその傾向は顕著に現れている。いったん減少したのちまた増加するのは、過冷却現象のように速度論的に一気に反応が進んだ後、溶解平衡に基づく濃度に達するからではないかと考えている。培養の初期には硫化鉄が過剰にできるが、これは以下に述べるように不安定な微粒子のためいくらか溶解する可能性がある。

そして SO_4^{2-} と同様、30 日後にはどの初期濃度のもも約 5ppm で一致する。 SO_4^{2-} の量は初期の培地中の Fe 濃度に関わらず一定量にしてある。したがって、30 日の間に消費された SO_4^{2-} の量も同じはずである。しかし、Fe はもともと入っていた量が 40, 80, 200ppm と異なるのに、30 日後に培地中の Fe 濃度が等しくなっているということは、沈殿に移動した Fe の量が異なることを意味する。つまり Fe40ppm で培養したもののほうが、生成物は同じ S 量に対して Fe が少なく、200ppm で培養したほうが Fe が多いはずである。しかし後述するように、状態分析から Fe の初期濃度が違って、生成物はほぼ同じものであった。従って、沈殿生成に直接関与する陰イオンは SO_4^{2-} でなく、 SO_3^{2-} を初めとする他の中間酸化状態の硫黄化学種であると考えられる。 SO_3^{2-} 濃度には違いが見られると推測されるが、測定していない。

(4) ICP 発光分光分析による Fe 以外の陽イオンの濃度変化

培地中に含まれている Fe 以外の陽イオンの濃度についても ICP-AES で定量した。

各陽イオンの定量に用いた検量線を Fig.4-37~4-40 に、培養 0~30 日の濃度変化を Fig.4-41~4-44 に示した。また、その値を Table4-4 に示した。

これらは、いずれも Fe 濃度の違いに関わらず一定量加えてあるが、 Na^+ 、 K^+ は Fe 濃度が高いものほど、培地中の濃度が低くなっている。また Ca^{2+} にもその傾向が見られる。菌の増加曲線では、どの Fe 濃度の時も 30 日後の菌数はほぼ等しかったことから、試験管内の菌数は、Fe 濃度にかかわらず一定となるようだ。にもかかわらず、菌の生育に不可欠なこれらの元素が、Fe 濃度が高いほど多く消費されている。従って Fe 濃度が高いほど菌の増殖は激しいが沈殿に取り込まれて死滅するため、結果として培地中の生菌数は等しくなっているものと考えられる。

しかし Mg のみは他の陽イオンより Fe 濃度に似た変化を示している。Mg はリン酸鉄とともに沈殿していることが TEM-EDX で観察された。そのため、Mg はリン酸鉄とともに、5~10 日の間に急激に沈殿し、その後平衡状態に向かうという Fe と似た挙動を取るものと推定される。

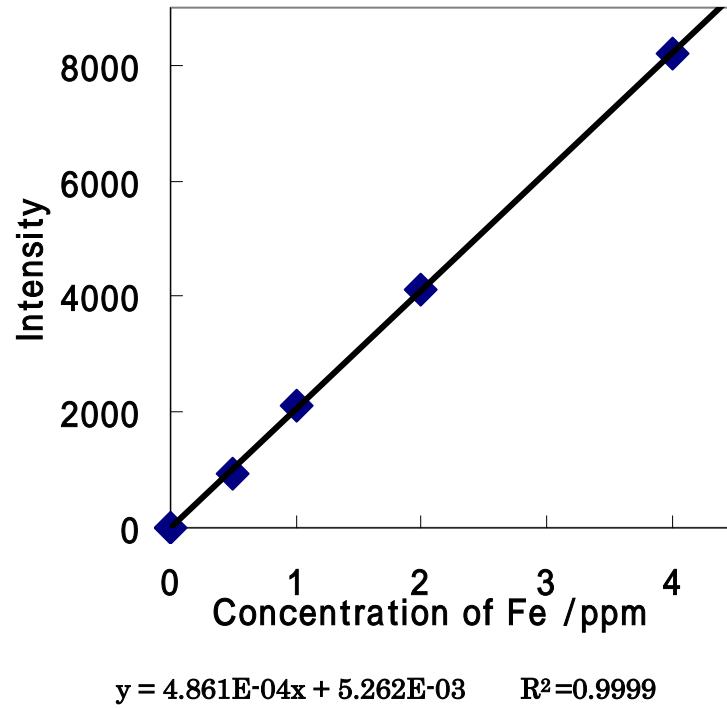


Fig.4-35 Fe²⁺イオンの定量に用いた検量線 (by ICP-AES)

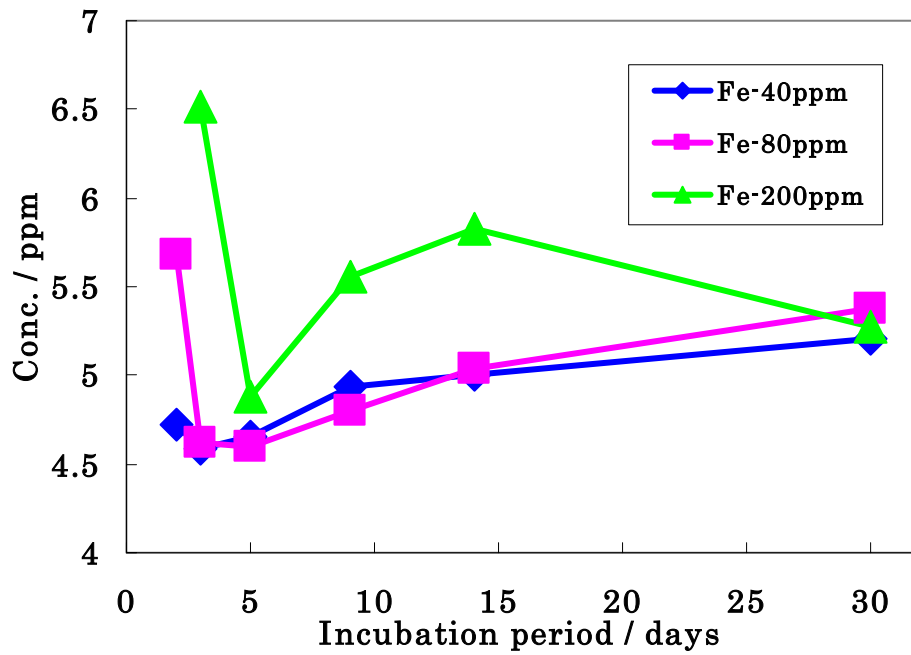
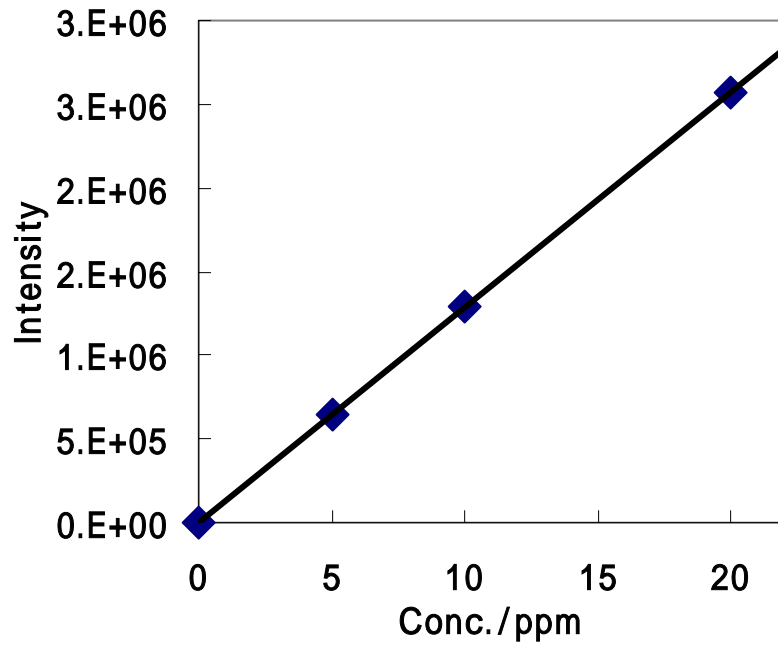
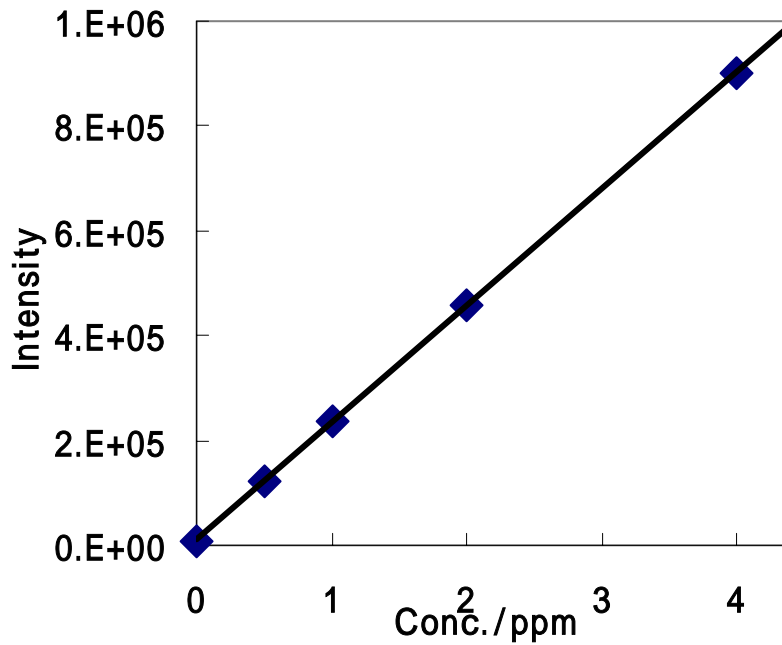


Fig.4-36 培養期間中の Fe²⁺イオンの濃度変化 (by ICP-AES)



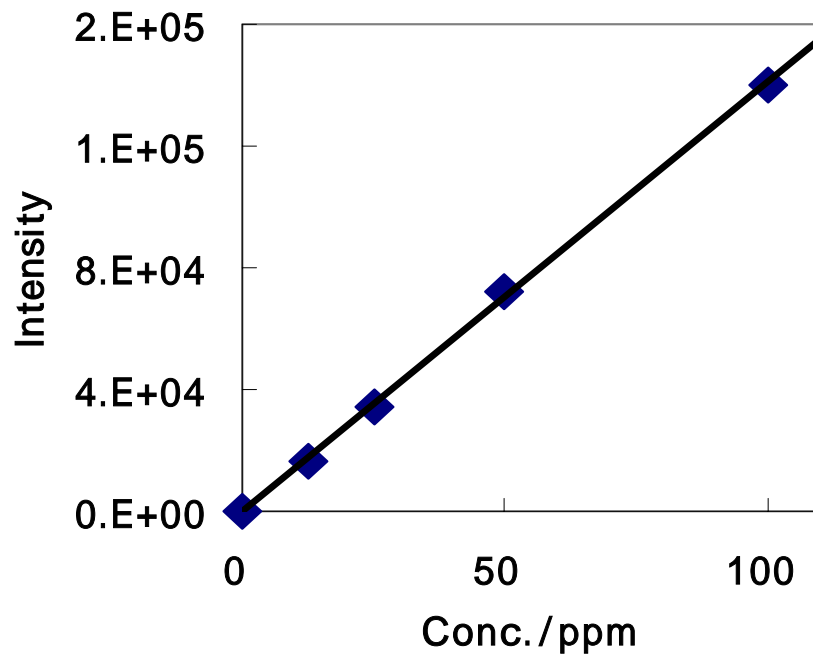
$$y = 1.286E+05x + 2.341E+03 \quad R^2 = 1.000E+00$$

Fig.4-37 Mg²⁺イオンの定量に用いた検量線 (by ICP-AES)



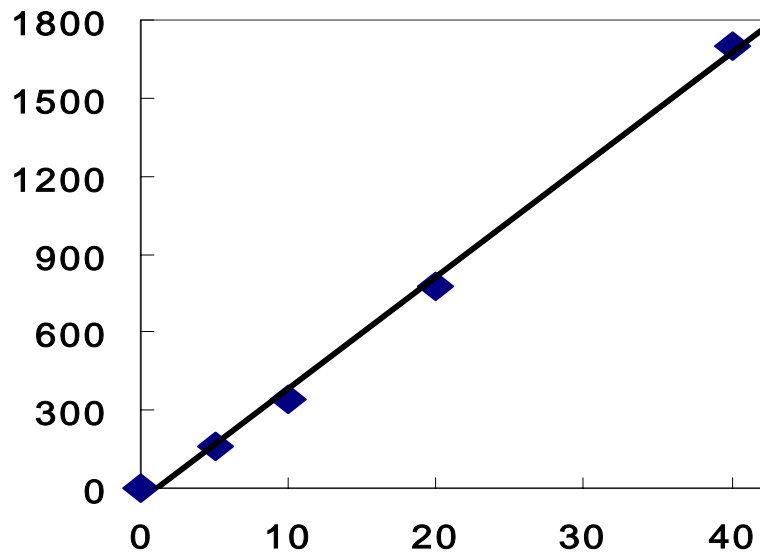
$$y = 0.0000044756 x - 0.0455494 \quad R^2 = 0.9999$$

Fig.4-38 Ca²⁺イオンの定量に用いた検量線 (by ICP-AES)



$$y = 0.00070851 x + 0.167622 \quad R^2 = 0.9996$$

Fig.4-39 Na⁺イオンの定量に用いた検量線 (by ICP-AES)



$$y = 43.101x - 49.176 \quad R^2 = 0.9969$$

Fig.4-40 K⁺イオンの定量に用いた検量線 (by ICP-AES)

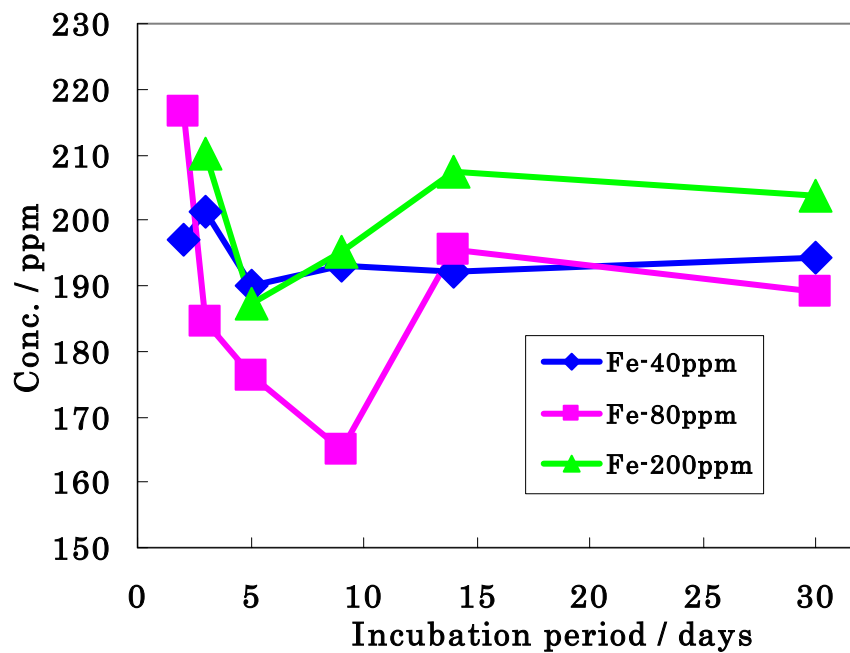


Fig.4-41 培養期間中の Mg²⁺イオンの濃度変化 (by ICP-AES)

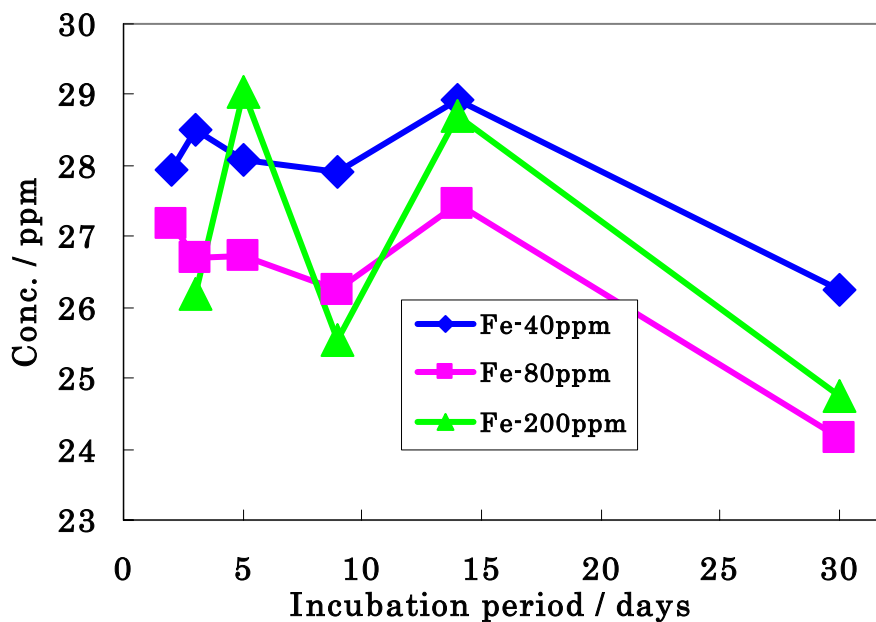


Fig.4-42 培養期間中の Ca²⁺イオンの濃度変化 (by ICP-AES)

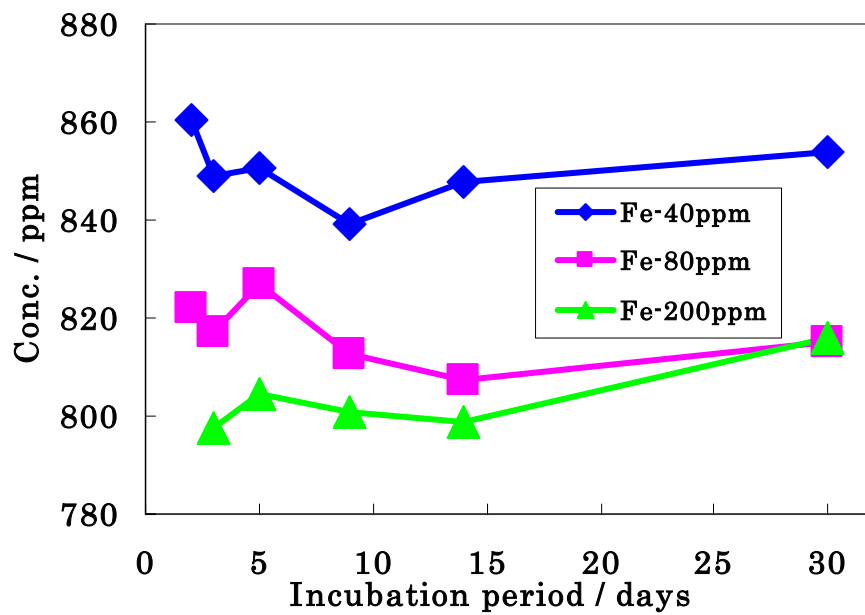


Fig.4-43 培養期間中の Na⁺イオンの濃度変化 (by ICP-AES)

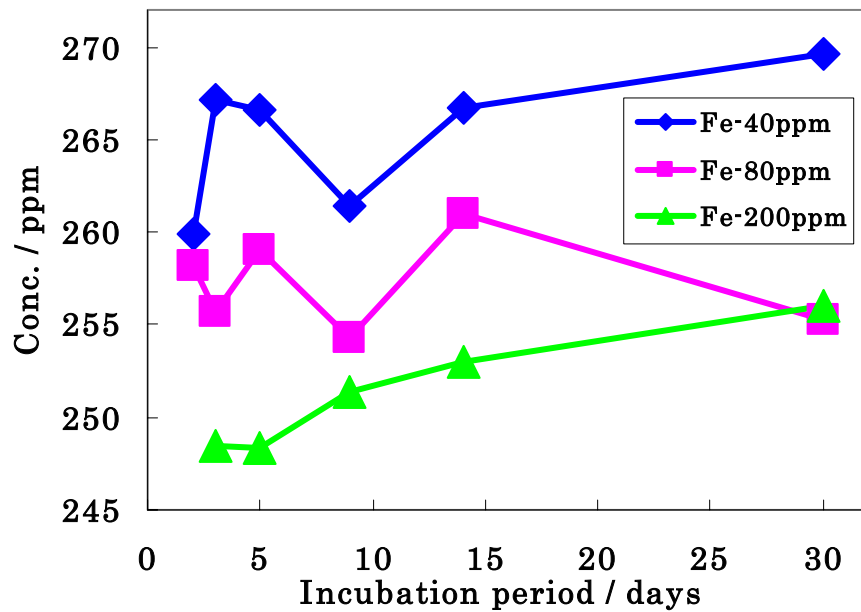


Fig.4-44 培養期間中の K⁺イオンの濃度変化 (by ICP-AES)

Table4-4 陽イオンの濃度変化 (by ICP-AES)

days	Fe		Mg		Ca		Na		K	
	conc./ppm	S.D.	conc./ppm	S.D.	conc./ppm	S.D.	conc./ppm	S.D.	conc./ppm	S.D.
Fe-40ppm										
2	4.72	0.00	197	2	27.9	0.1	861	2	260	1
3	4.59	0.00	201	1	28.5	0.1	849	1	267	0
5	4.65	0.01	190	0	28.1	0.0	851	0	267	0
9	4.94	0.01	193	0	27.9	0.1	839	1	261	0
14	5.01	0.00	192	1	28.9	0.2	848	1	267	0
30	5.21	0.01	194	0	26.2	0.2	854	2	270	1
Fe-80ppm										
2	5.68	0.04	217	1	27.2	0.0	822	1	258	0
3	4.62	0.01	184	2	26.7	0.0	817	1	256	1
5	4.60	0.00	176	0	26.7	0.1	827	0	259	0
9	4.81	0.01	165	1	26.2	0.0	813	1	254	0
14	5.04	0.02	196	1	27.5	0.1	808	1	261	0
30	5.38	0.05	189	0	24.2	0.0	815	0	255	0
Fe-200ppm										
3	6.52	0.01	210	1	26.2	0.1	798	0	248	0
5	4.88	0.02	187	0	29.0	0.0	804	1	248	0
9	5.56	0.08	195	1	25.6	0.1	801	0	251	0
14	5.83	0.07	207	0	28.7	0.0	799	0	253	1
30	5.27	0.02	204	0	24.7	0.1	816	0	256	0

(5) まとめ

上澄み液中の Fe と SO_4^{2-} の時間変化は菌量の変化と連動しており、菌の増殖時期と両イオンの減少時期は一致している。このことから、硫化鉄化合物の生成に硫酸還元菌の生育が関与していることは間違いないだろう。また両イオンの濃度は 30 日前後までに一定になり、Fe 濃度の大きいものほど沈殿相に Fe が多く移動していることわかった。また、沈殿生成に関与しているのは SO_4^{2-} ではなく、 SO_4^{2-} の還元過程で生成される中間酸化状態の硫黄化学種であると推測された。

4-2-3. 沈殿生成物の分析

(1) 広域 X 線吸収微細構造法 (EXAFS 法) による状態分析

XAFS 法により得られる X 線吸収スペクトルのうち、吸収端より高エネルギー側に現れる EXAFS 振動は、複数散乱原子の寄与の和になっており、解析によりそれぞれを分離抽出する必要がある。そこで、EXAFS 振動のみを抽出して、さらにフーリエ変換によって動径構造関数を得た。Fig.4-45 に EXAFS 振動を表す (k) 曲線を、Fig.4-46 に動径構造関数 F(R) を示した。

試料は、自然のままの温度約 25 °C で溶液を少し含むゾル状の沈殿状態と、メスパウアーと同じ凍結状態とで測定を行った。ゾル状と凍結状態でのスペクトルを比較すると、pre-edge の位置・高さは変わらないが、7.12keV 付近に見られる肩の形状などが、凍結状態のほうがより pyrite や pyrrhotite に近かったため、XANES の測定は全て凍らせた状態で行った。ただし EXAFS は測定時間が長いので、その間ずっと凍結させておくのは困難で、途中で溶け出すおそれがあるので、初めから解凍したゾル状態で測定した。

(k) 曲線を見ると、中心原子と第一近接原子との相互作用による振動に、第二、第三近接原子との相互作用による振動が重なり合って複雑な波形になっている。

動径構造関数 F(R) は、横軸が中心原子からの距離を示す。Pyrite、pyrrhotite の Fe-S 距離は 2 ~ 2.2 Å であるが、培養生成物ではこれよりやや短く 1.8 Å 程度となっている。また、比較として分析した結晶質の pyrrhotite、hematite では見られる第二、第三近接原子によるピークが見られないことから、培養生成物は高次の結晶構造を持たない、つまり非晶質であることがわかる。

さらに第一近接原子による振動構造のみを逆フーリエ変換により抽出したものを Fig.4-47 に表す。この形状は近接原子種により変化することが知られており³²⁾、標準として用いた pyrrhotite と hematite の形状の違いは、Fe と S、Fe と O の相互作用の違いを反映していると考えられる。培養生成物は 2 日目で pyrrhotite 同様、いったん増幅したのち減衰するという中央が膨らんだ形状を示す。これは 4 日、9 日とも同じだが、66 日培養生成物では、徐々に減衰する hematite に似た形状を示す。このことから、培養開始から数日間生成物の Fe の最近接原子が S であると推定され、SEM や TEM などの結果から予想された通りであった。しかし 66 日培養生成物では、この結果は最近接原子が O であることを示しているものの、他の分析法による結果と矛盾する。また、酸素を絶って培養を行っているので、66 日あたりで急に酸化物になるとは考えにくい。したがって SEM、TEM-EDX の結果も考慮して、やはり生成物の最近接原子は S であると推定した。しかし、9 日目までのものとは明らかに異なる形状を示すことから、異なる物質になったか、または何らかの混合物になったと考えられる。これまでの Fe 濃度変化、TEM による観察の結果を考慮すると、速度論的に過剰に生成した硫化鉄がこの時期に、何らかの構造変化、または溶出を起こし、リン酸鉄マグネシウムなどの別の成分による影響が顕著になった、と推測される。

EXAFS スペクトルの解析からは配位元素や結合距離などに関する情報が得られる。た

だし、混合物のスペクトルはそれぞれの成分の和になる。通常振動構造をさらに最小自乗法により理論曲線にフィットし構造パラメーターを決定するが、試料が混合物のため、実測の振動構造を抽出しその形状から鉄の最近接原子を推定するのみにとどめた。

(2) X線吸収端近傍構造法 (XANES 法) による状態分析

EXAFS 領域よりも低エネルギー側、約 150eV の範囲に現れる振動を XANES といい、この領域の振動構造は、吸収原子の化学状態により変化する。一般に酸化数が高くなると、電子が原子核に強く引きつけられるので、吸収端の位置が高エネルギー側にシフトする。同じ酸化数でも近接原子の電気陰性度が高いほうが、より電子が強く引きつけられるので、高エネルギー側にシフトする。標準として測定した鉱物で比べると、近接原子が S である pyrite などよりも、近接原子が O の hematite のほうが、高エネルギー側にシフトしている。

Fig.4-48, 4-49 に標準物質のスペクトルを、Fig.4-50 ~ 4-67 に試料のスペクトルを示した。生成物の吸収端の位置は、いずれも pyrite や pyrrhotite と同じ 7.115keV 付近にあり、培養日数が経つにつれ、やや低エネルギー側に移るが、1 年近く経ったものではやや高エネルギー側にシフトする傾向は見られたが、すべてのサンプルに共通ではなかった。また、吸収端より高エネルギー側でスペクトルが急激にジャンプする途中の 7.12keV 付近で、平らになるという pyrite、marcasite、pyrrhotite などの硫化鉄化合物に特徴的な形状が、生成物でも見られた。Control (菌を接種しない培地) と、培養 1 日目のサンプルではこれらの特徴は見られなかった。

(3) XAFS 法 (EXAFS および XANES 法) による分析結果のまとめ

EXAFS 法で得られた $\chi(k)$ 曲線の形状から、培養生成物は非晶質の硫化鉄化合物であることがわかり、TEM 観察による結果と一致する。

また、XANES 法で測定した結果、菌を接種しない Control とは異なることは明らかであったが、さまざまな条件で培養した生成物の比較では、特に目立ったシフト変化や強度変化は見られなかった。先に示したように Fe 濃度、pH、温度などが違って、生成時期が異なるだけで、生成物および生成過程は変わらないようだ。EXAFS では 66 日培養生成物の最近接原子について、やや不自然な部分もあったが、XANES の結果からは、2 日 ~ 1 年間培養したものまでいずれも鉄の化学状態は、pyrite などの硫化鉄化合物に近いことがわかった。

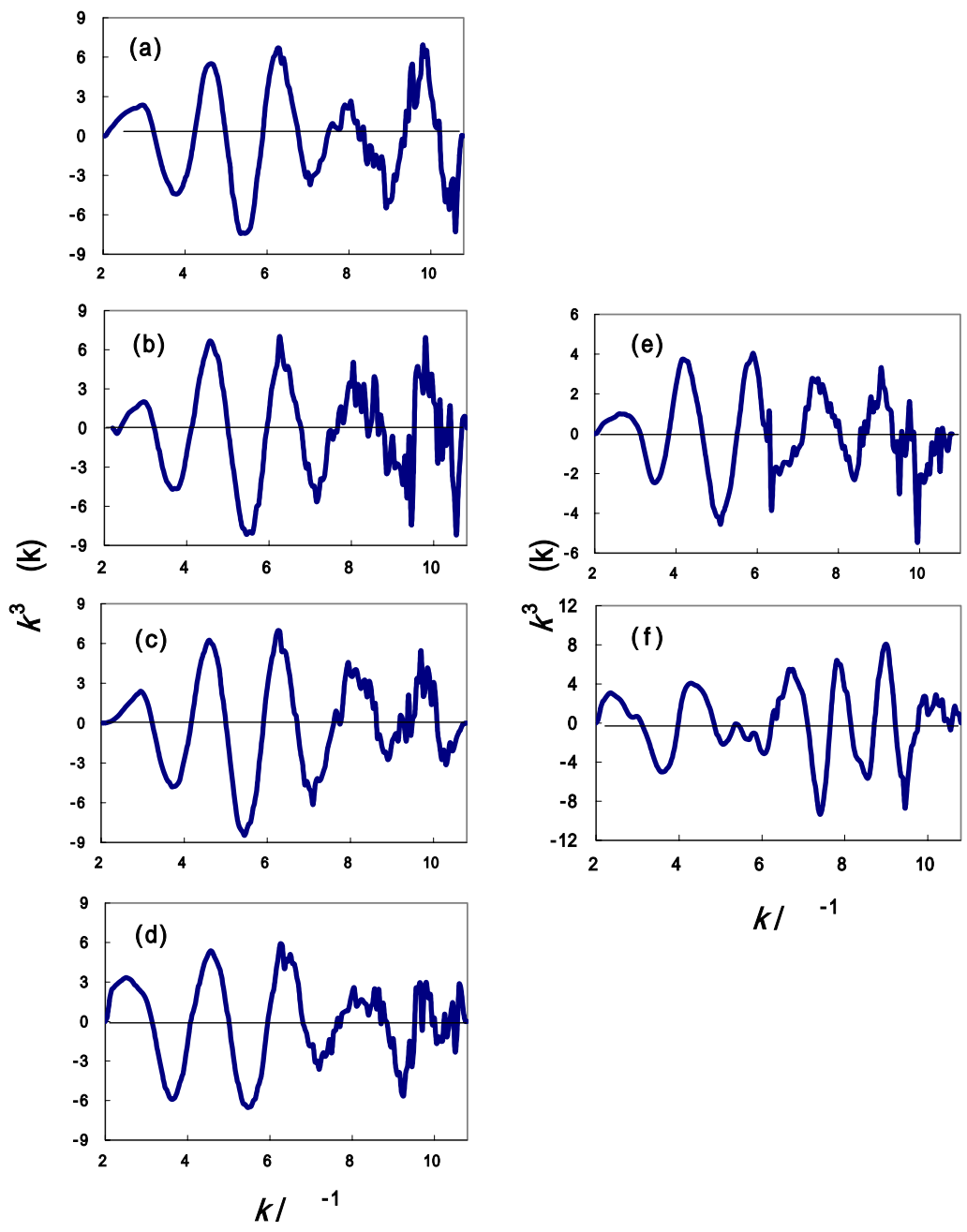


Fig.4-45 (k)曲線
 (a)2日 (b)4日 (c)9日 (d)66日 培養生成物
 (e)pyrrhotite (f)hematite

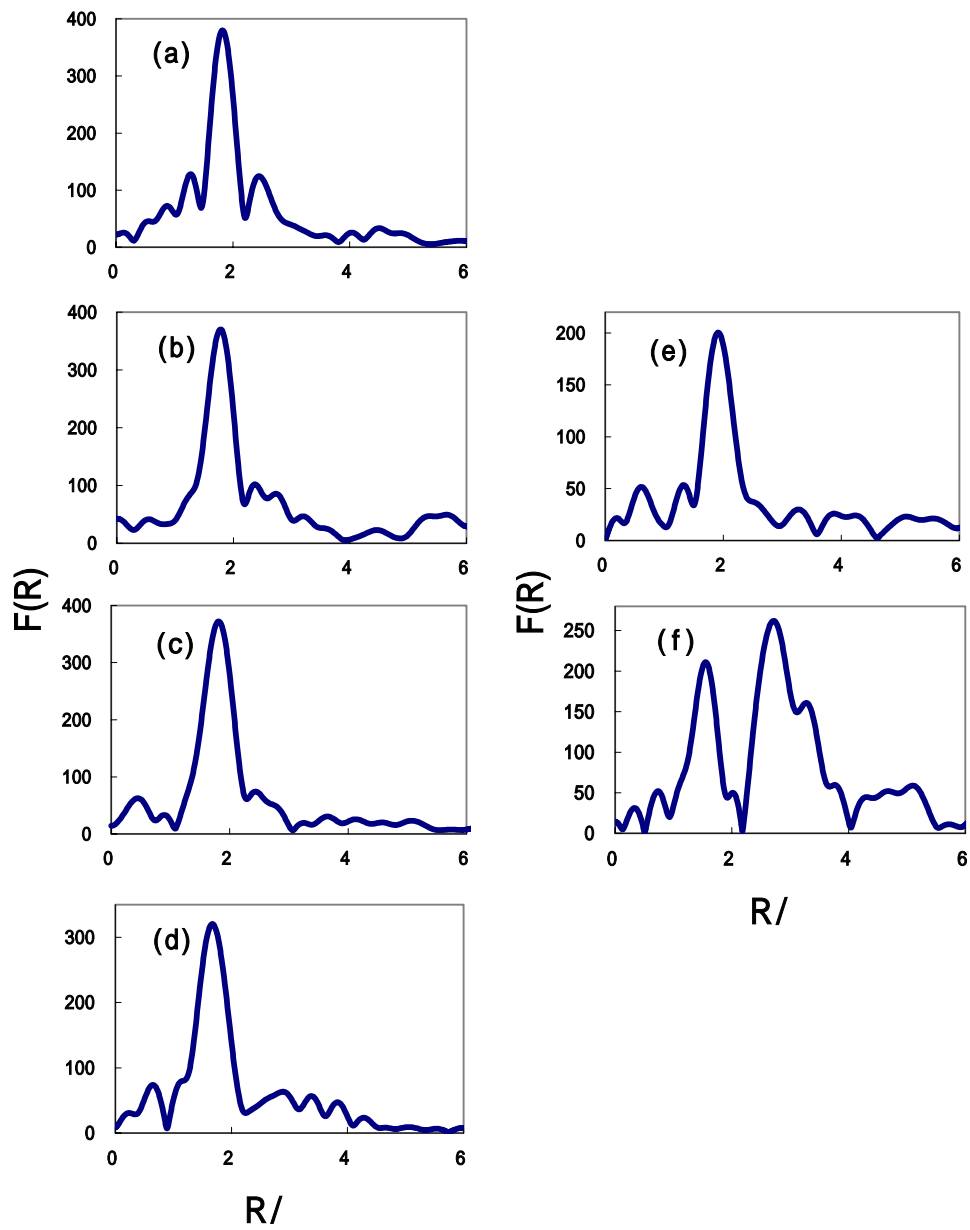


Fig.4-46 動径構造関数 $F(R)$
 (a)2日 (b)4日 (c)9日 (d)66日 培養生成物
 (e)pyrrhotite (f)hematite

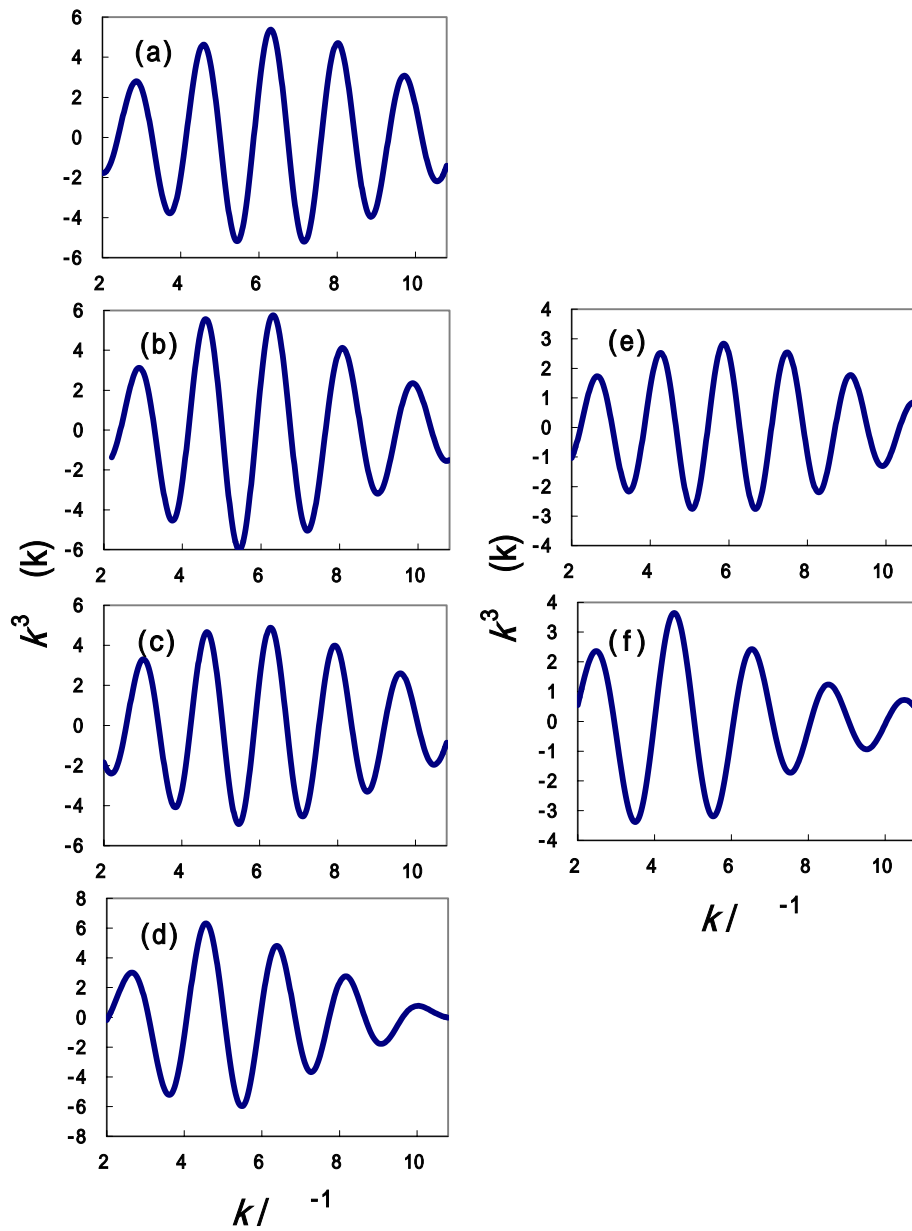


Fig.4-47 逆フーリエ変換により得た k^3 曲線
 (a)2日 (b)4日 (c)9日 (d)66日 培養生成物
 (e)pyrrhotite (f)hematite

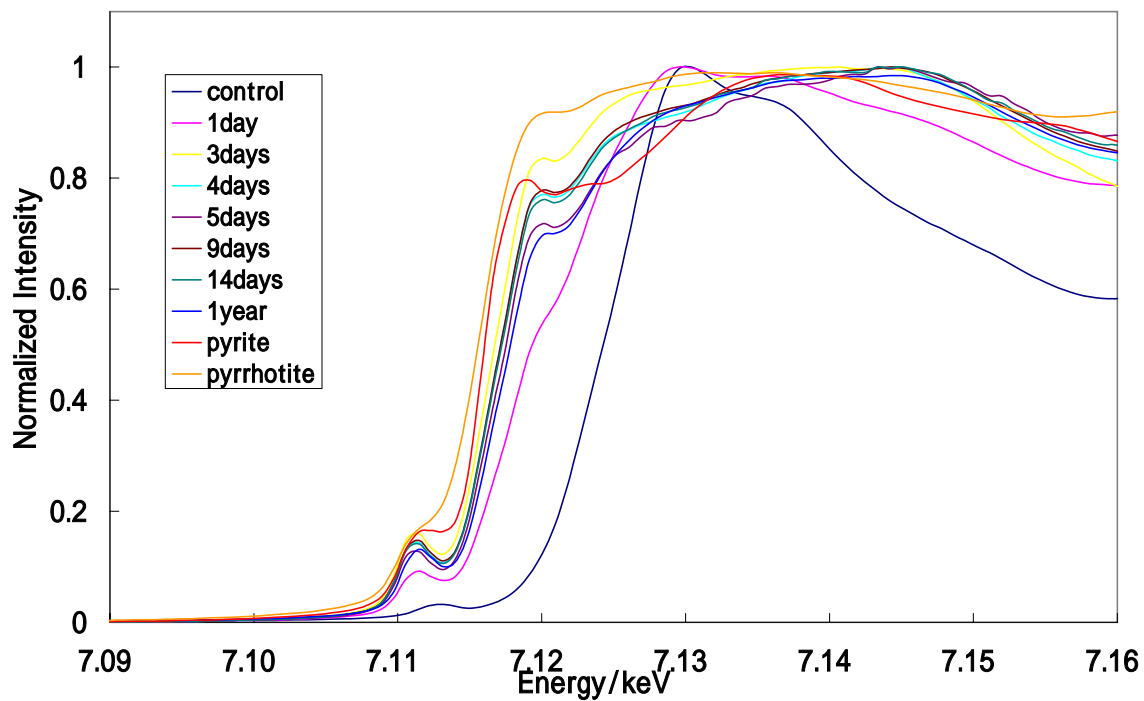


Fig.4-48 Fe40ppm で培養した生成物の XANES スペクトル (広域)

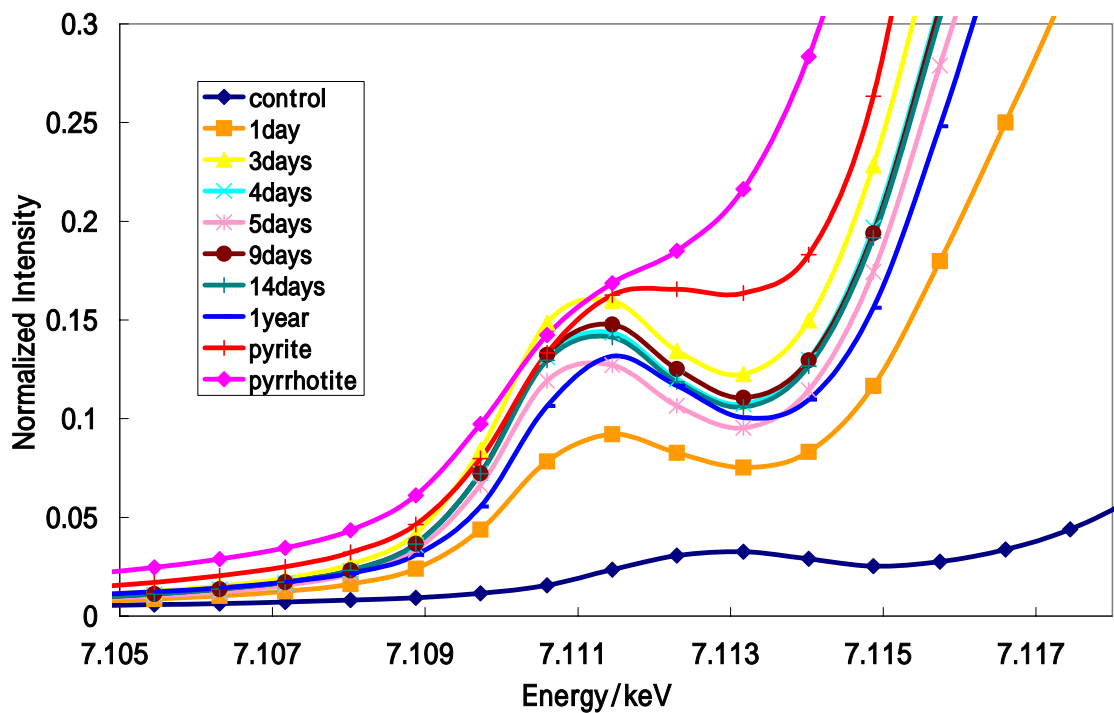


Fig.4-49 Fe40ppm で培養した生成物の XANES スペクトル (pre-edge 付近)

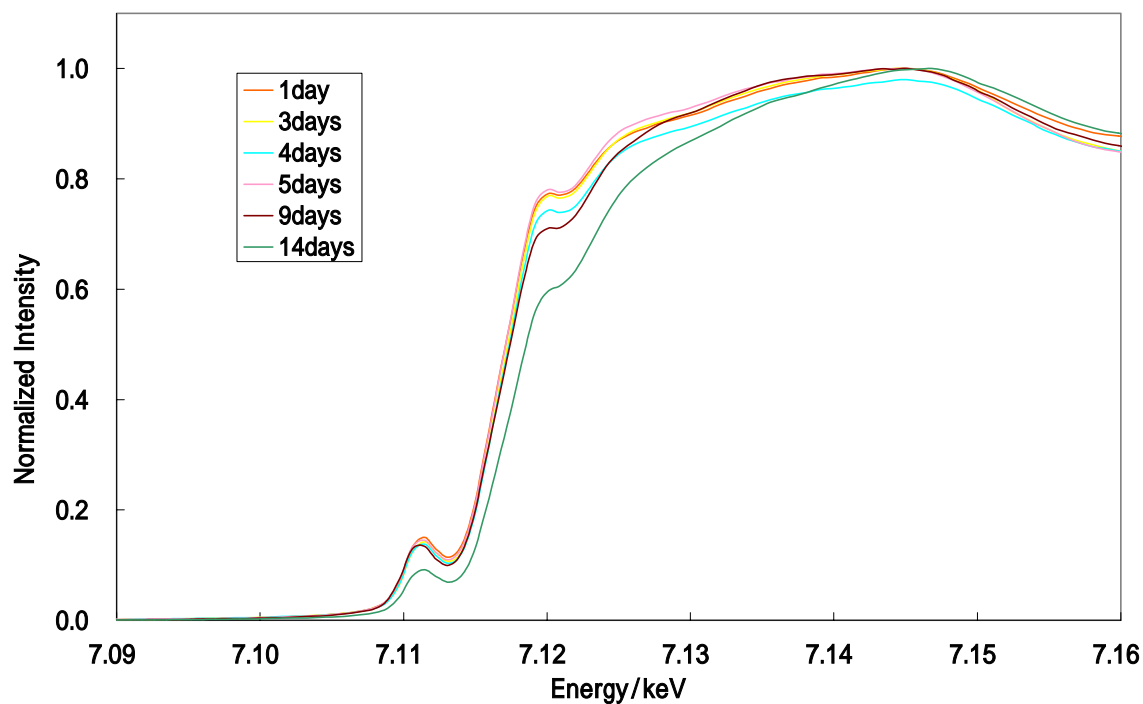


Fig.4-50 Fe80ppm で培養した生成物の XANES スペクトル (広域)

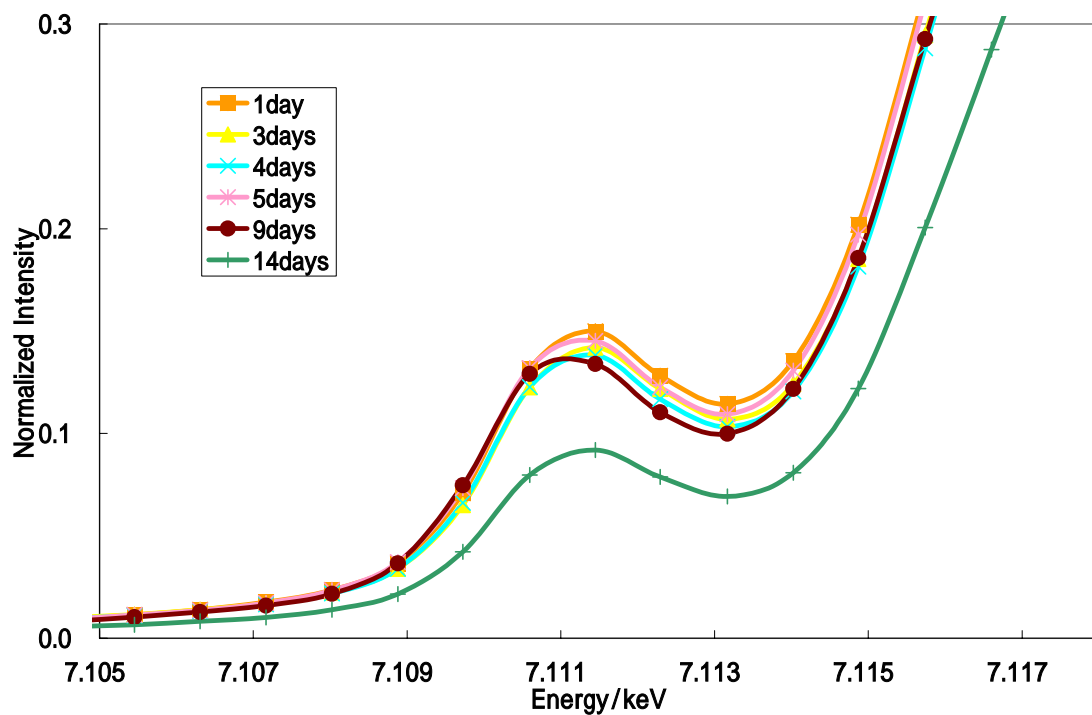


Fig.4-51 Fe80ppm で培養した生成物の XANES スペクトル (pre-edge 付近)

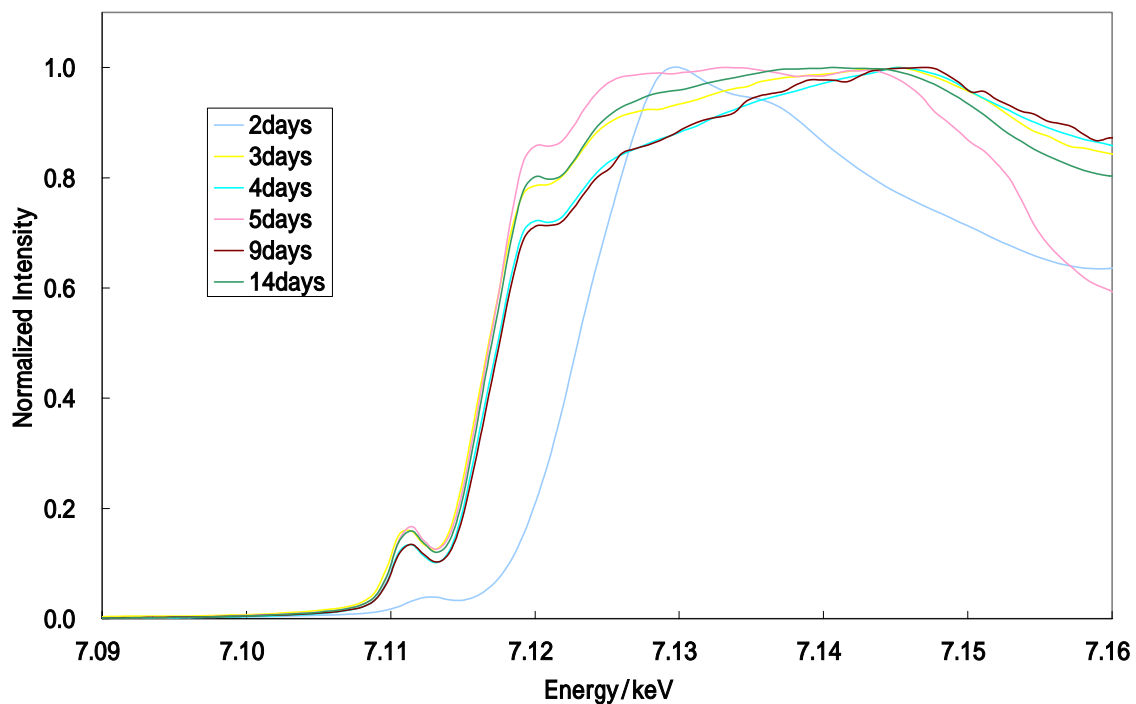


Fig.4-52 Fe200ppm で培養した生成物の XANES スペクトル (広域)

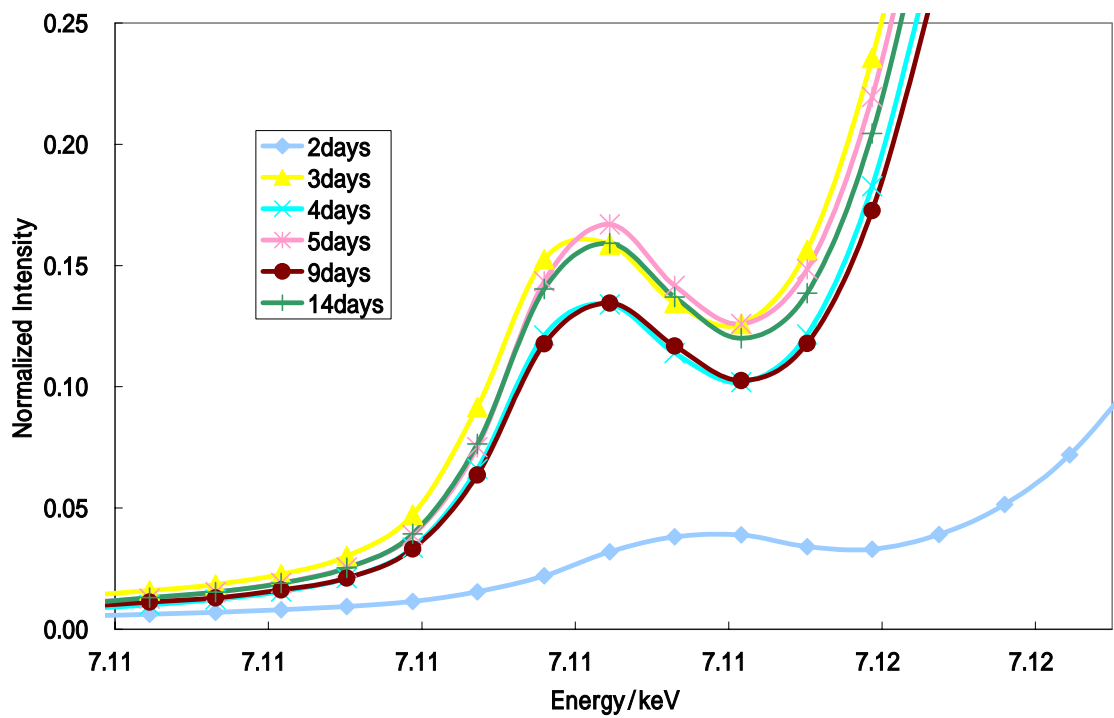


Fig.4-53 Fe200ppm で培養した生成物の XANES スペクトル (pre-edge 付近)

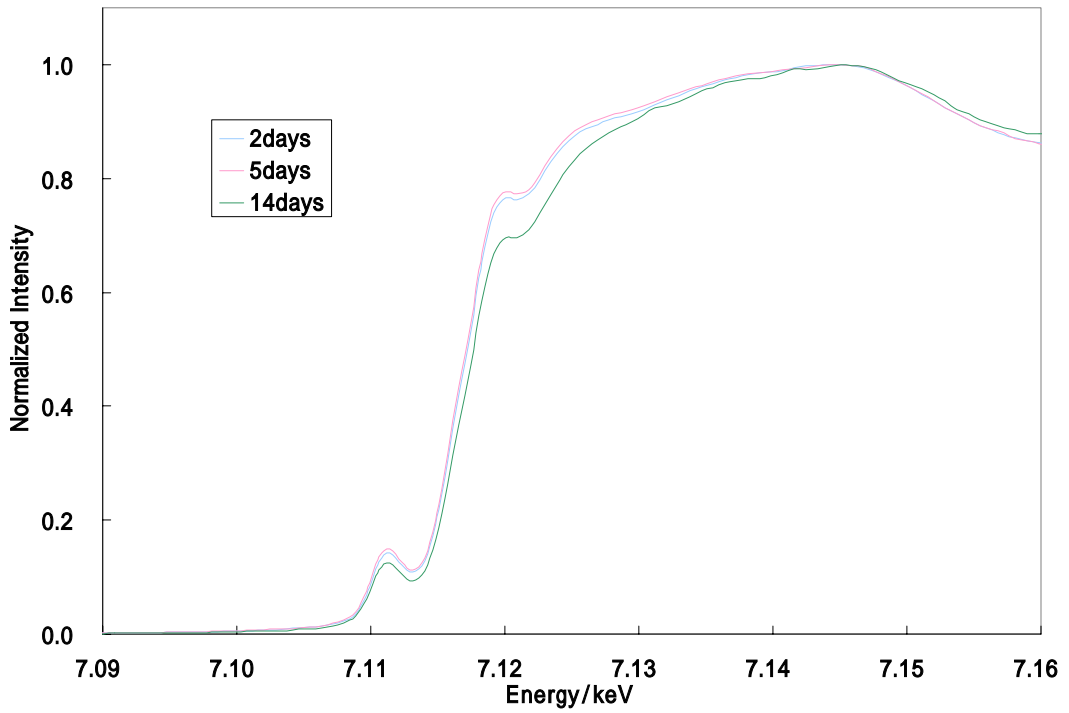


Fig.4-54 Fe40ppm,pH8 で培養した生成物の XANES スペクトル (広域)

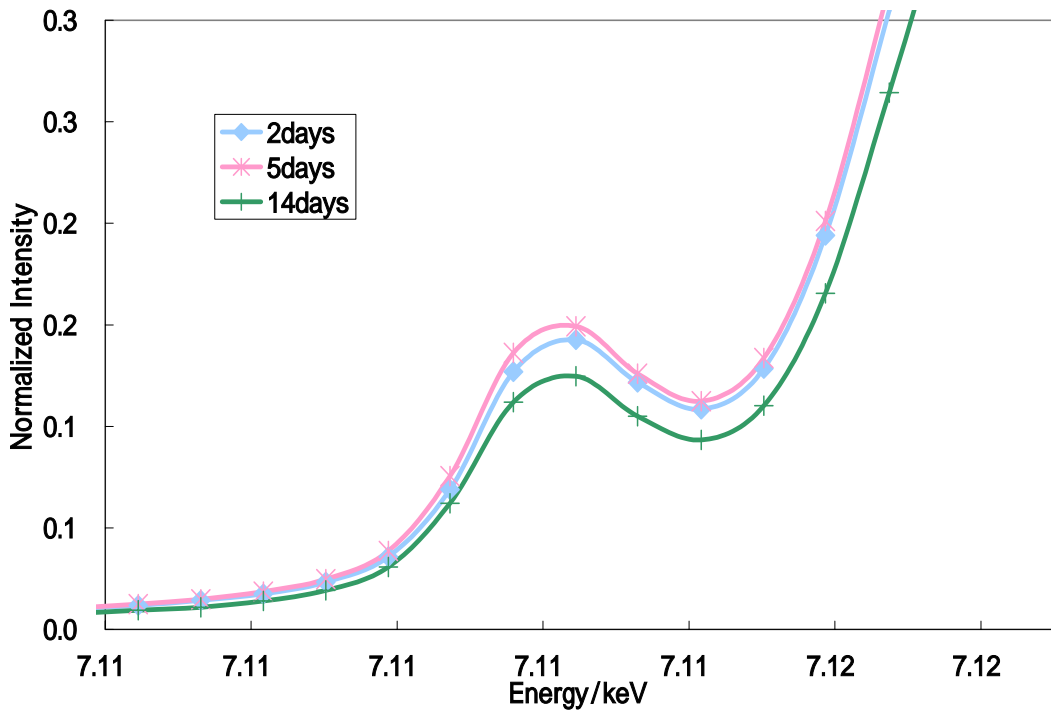


Fig.4-55 Fe40ppm,pH8 で培養した生成物の XANES スペクトル (pre-edge 付近)

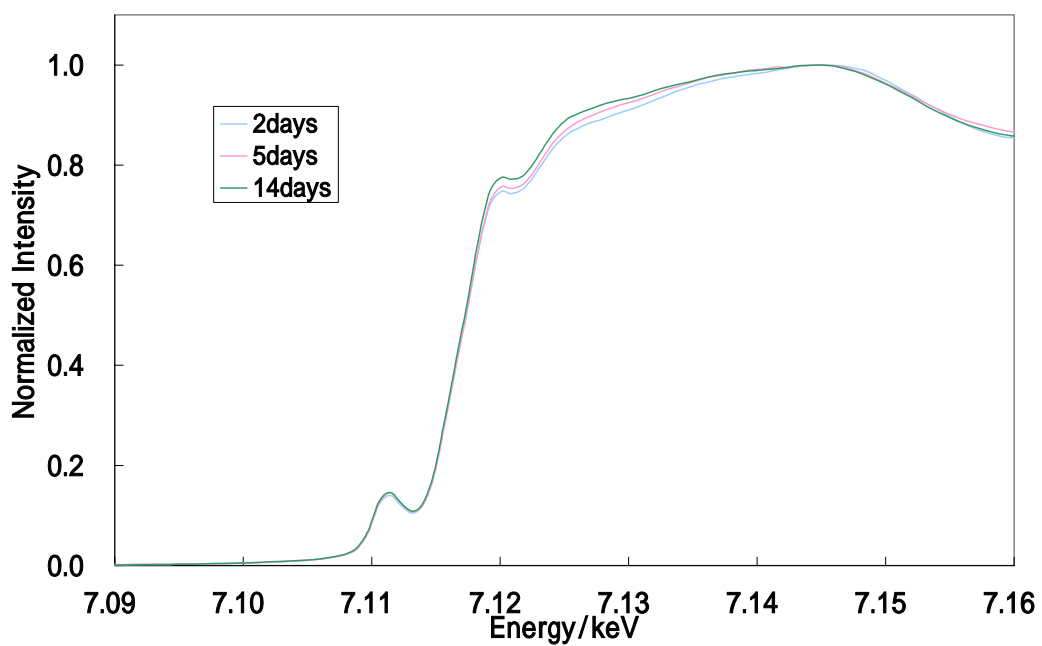


Fig.4-56 Fe80ppm,pH8 で培養した生成物の XANES スペクトル (広域)

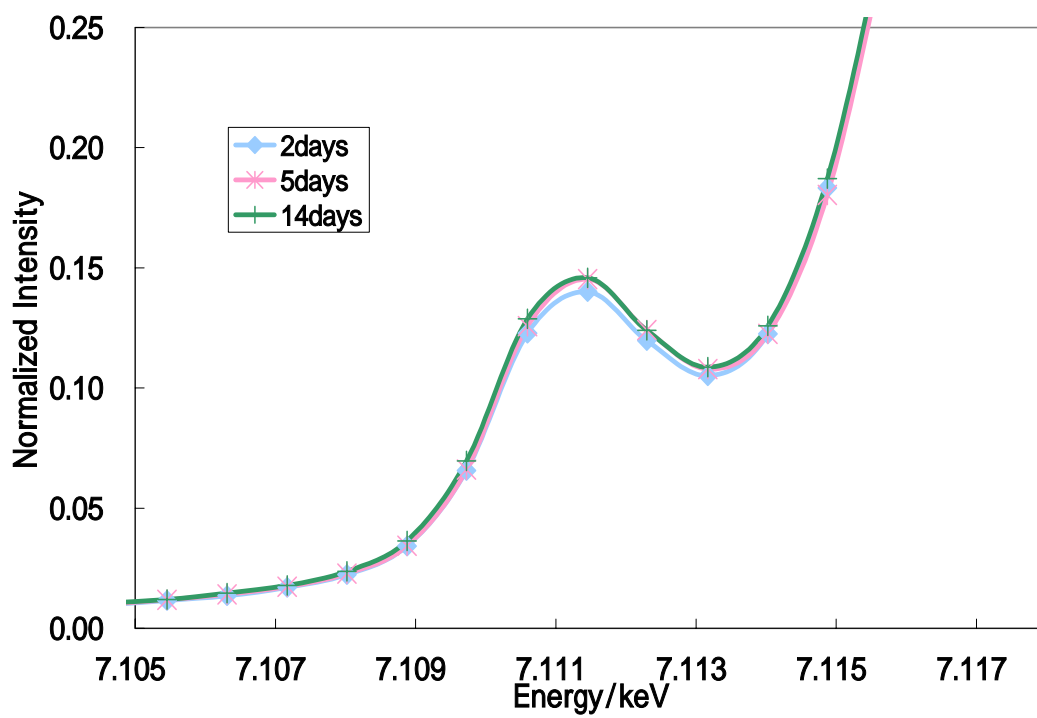


Fig.4-57 Fe80ppm,pH8 で培養した生成物の XANES スペクトル (pre-edge 付近)

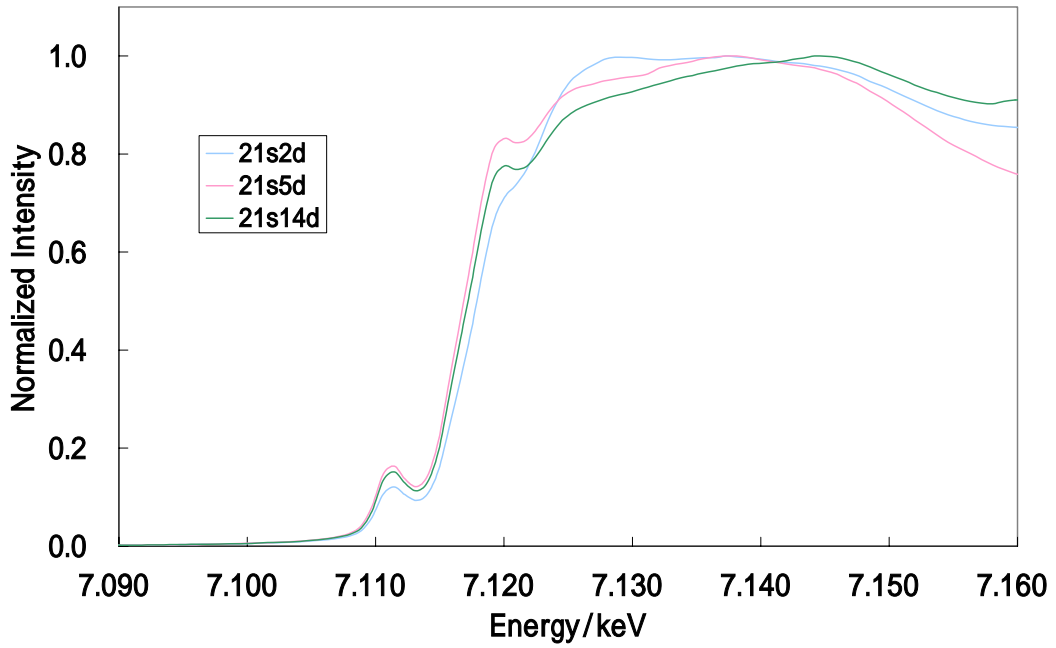


Fig.4-58 Fe200ppm,pH8 で培養した生成物の XANES スペクトル (広域)

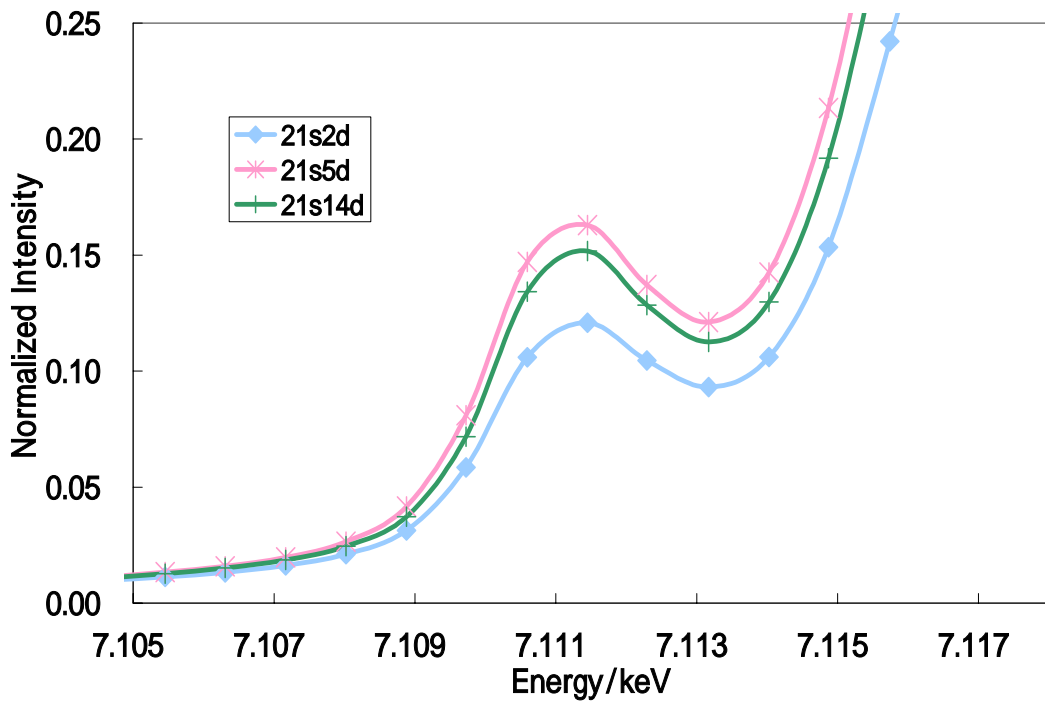


Fig.4-59 Fe200ppm,pH8 で培養した生成物の XANES スペクトル (pre-edge 付近)

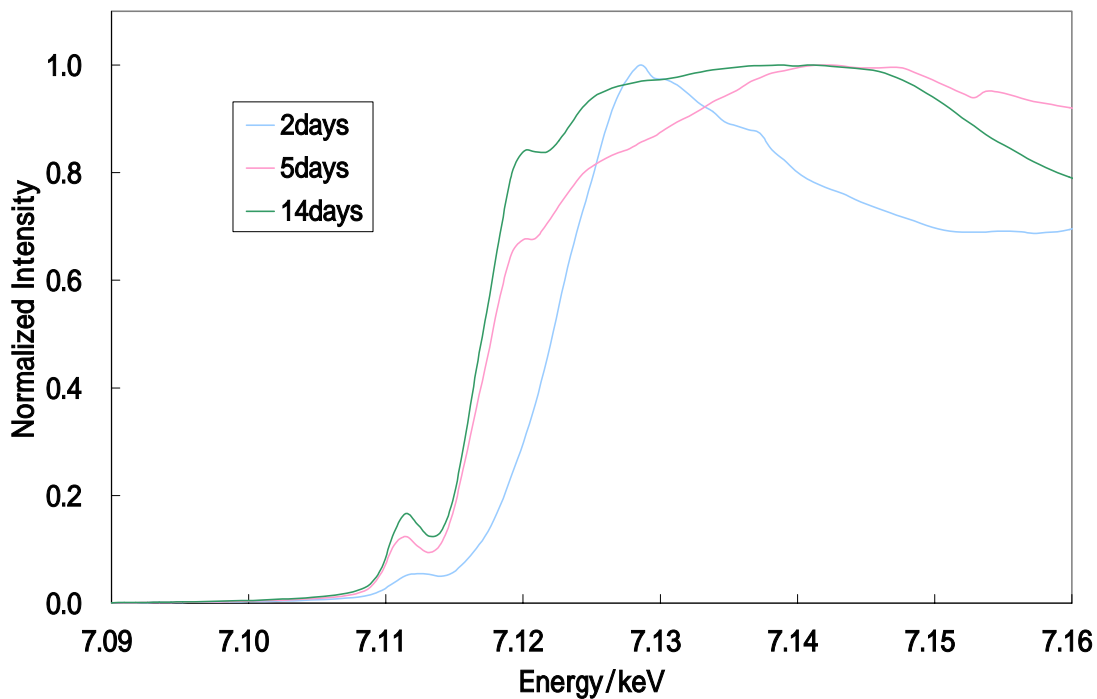


Fig.4-60 Fe40ppm,20 で培養した生成物の XANES スペクトル (広域)

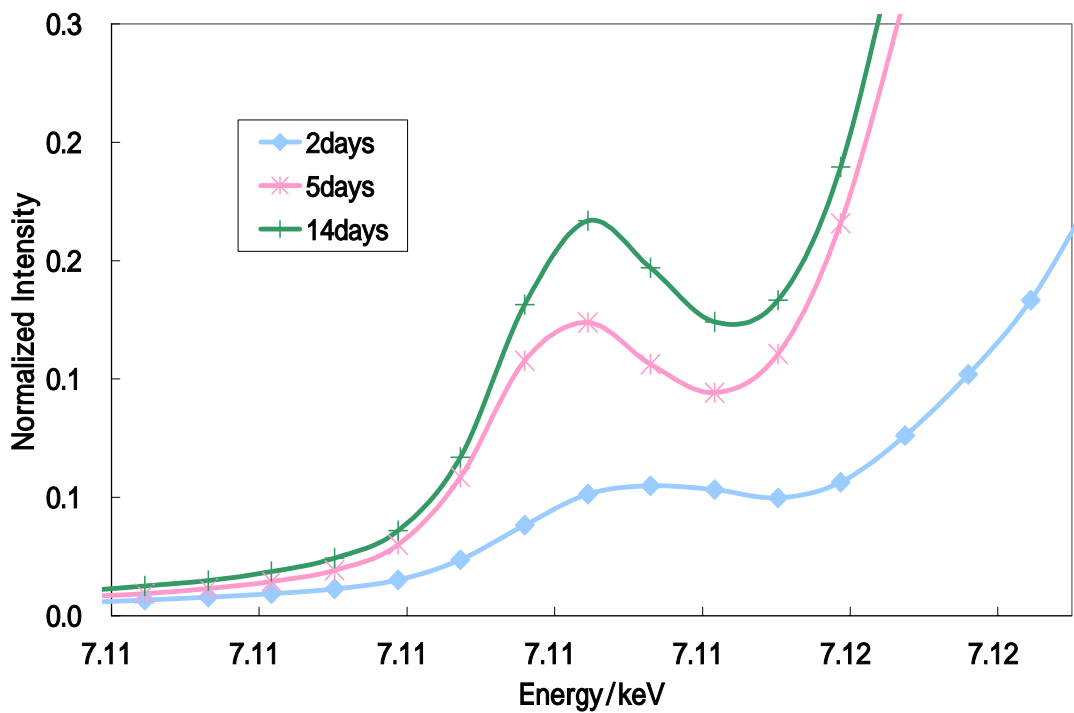


Fig.4-61 Fe40ppm,20 で培養した生成物の XANES スペクトル(pre-edge 付近)

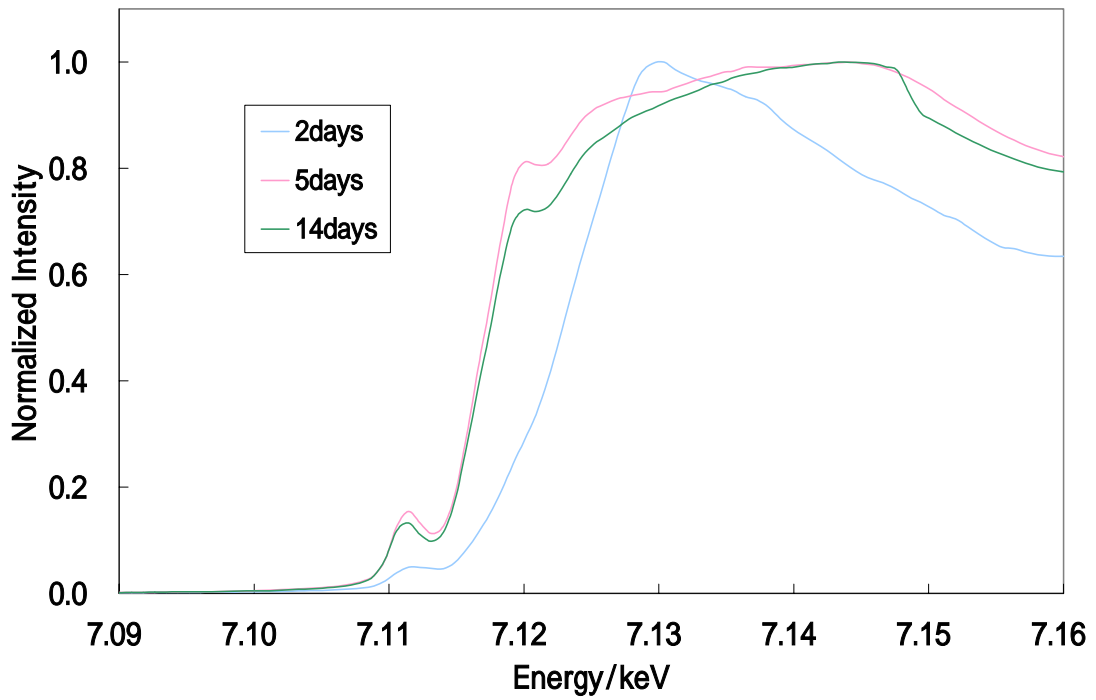


Fig.4-62 Fe80ppm, 20 で培養した生成物の XANES スペクトル (広域)

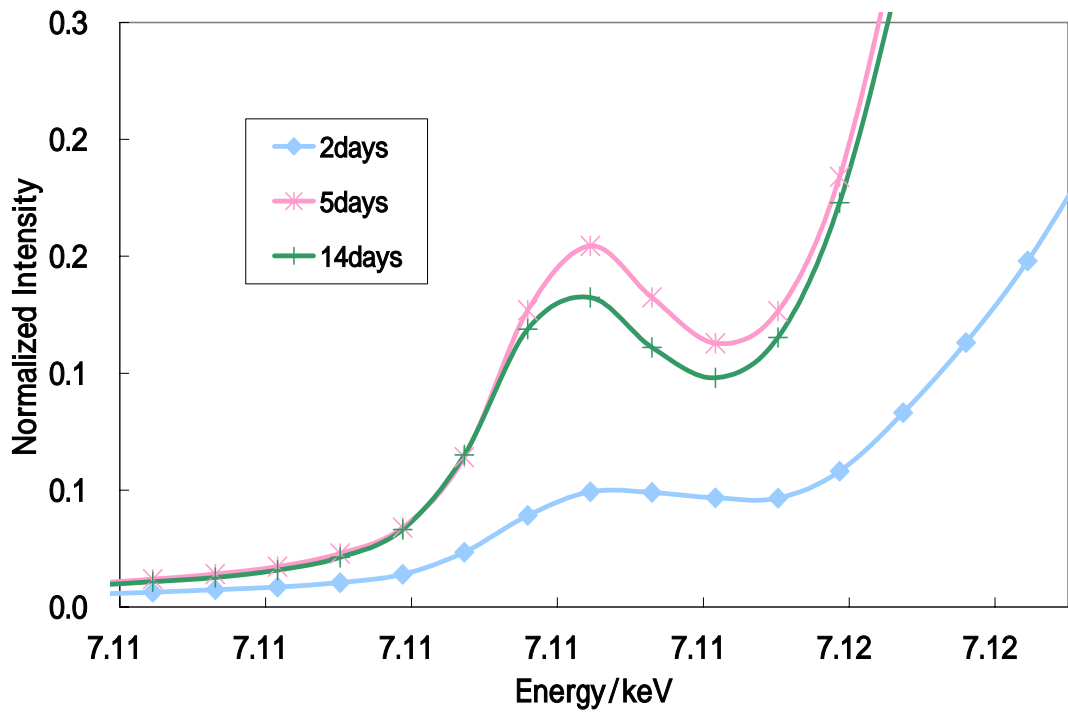


Fig.4-63 Fe80ppm, 20 で培養した生成物の XANES スペクトル (pre-edge 付近)

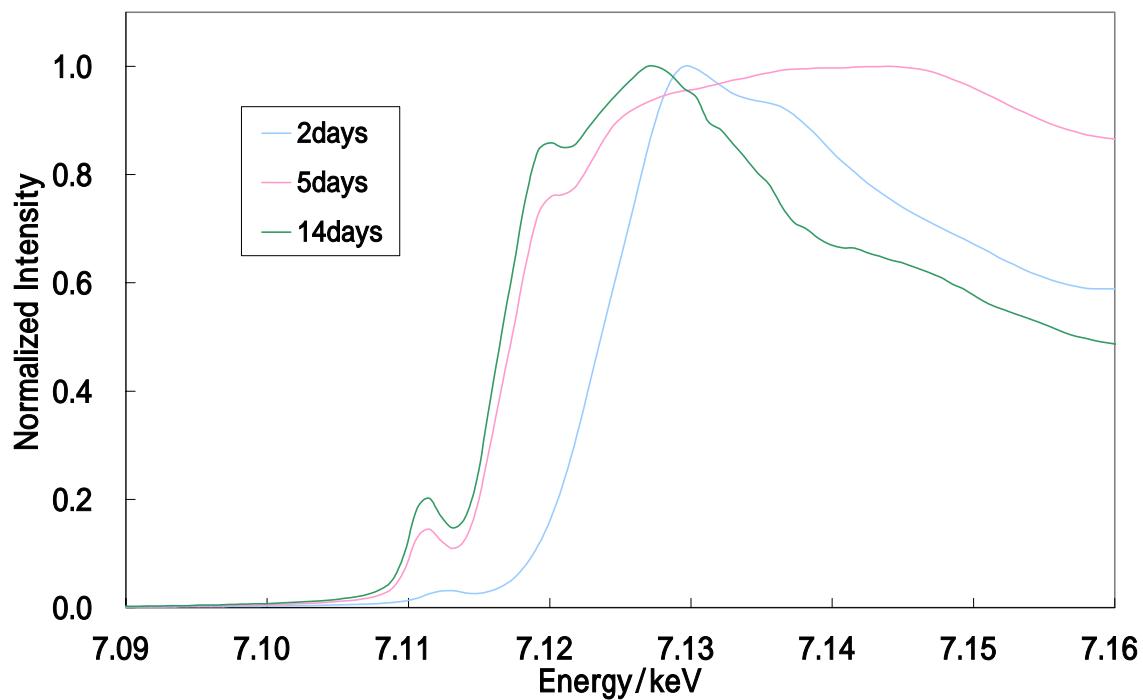


Fig.4-64 Fe200ppm 20 で培養した生成物の XANES スペクトル (広域)

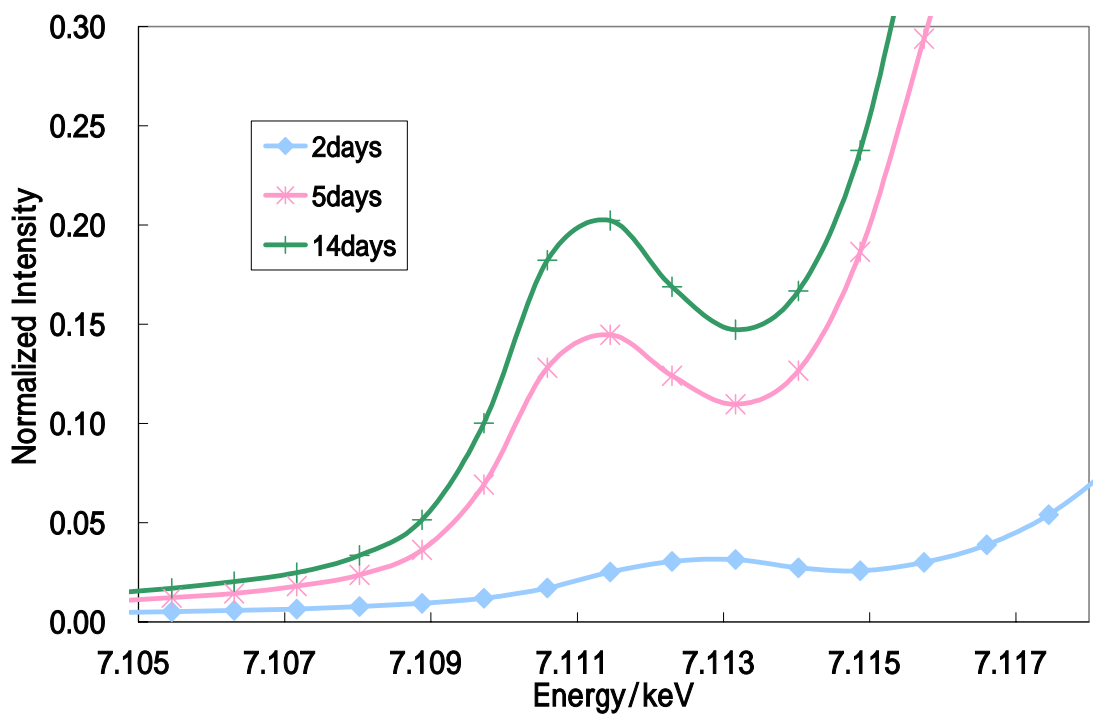


Fig.4-65 Fe200ppm 20 で培養した生成物の XANES スペクトル (pre-edge 付近)

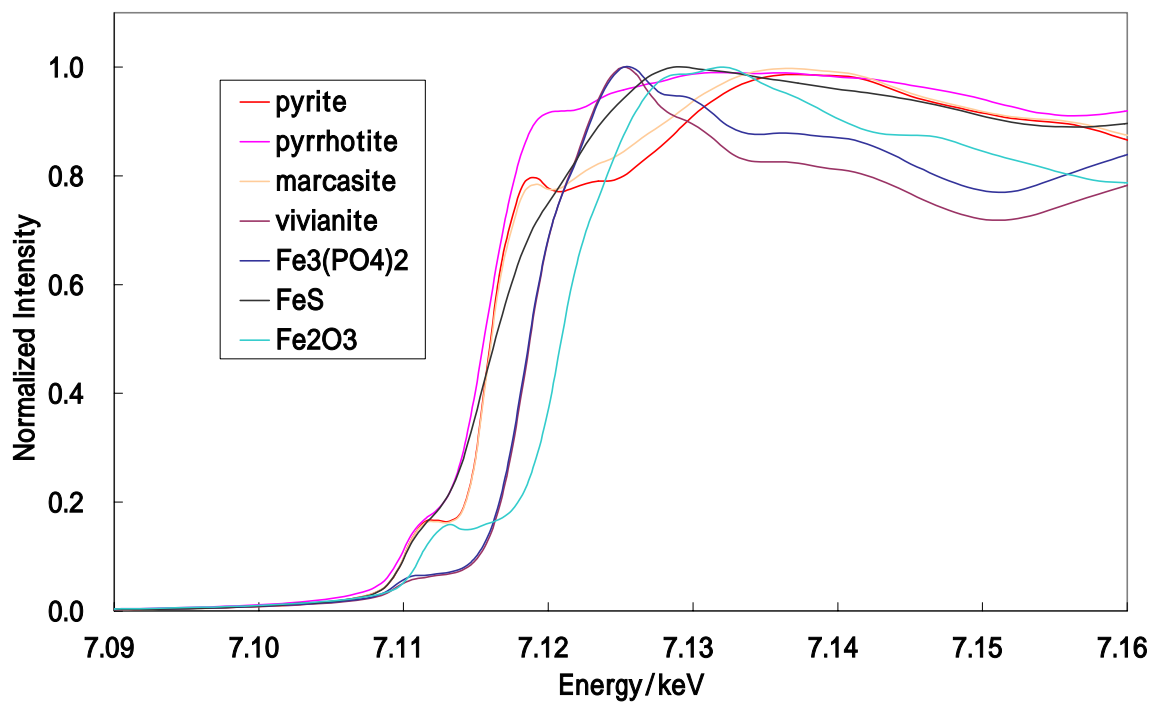


Fig.4-66 Standard Sample の XANES スペクトル (広域)

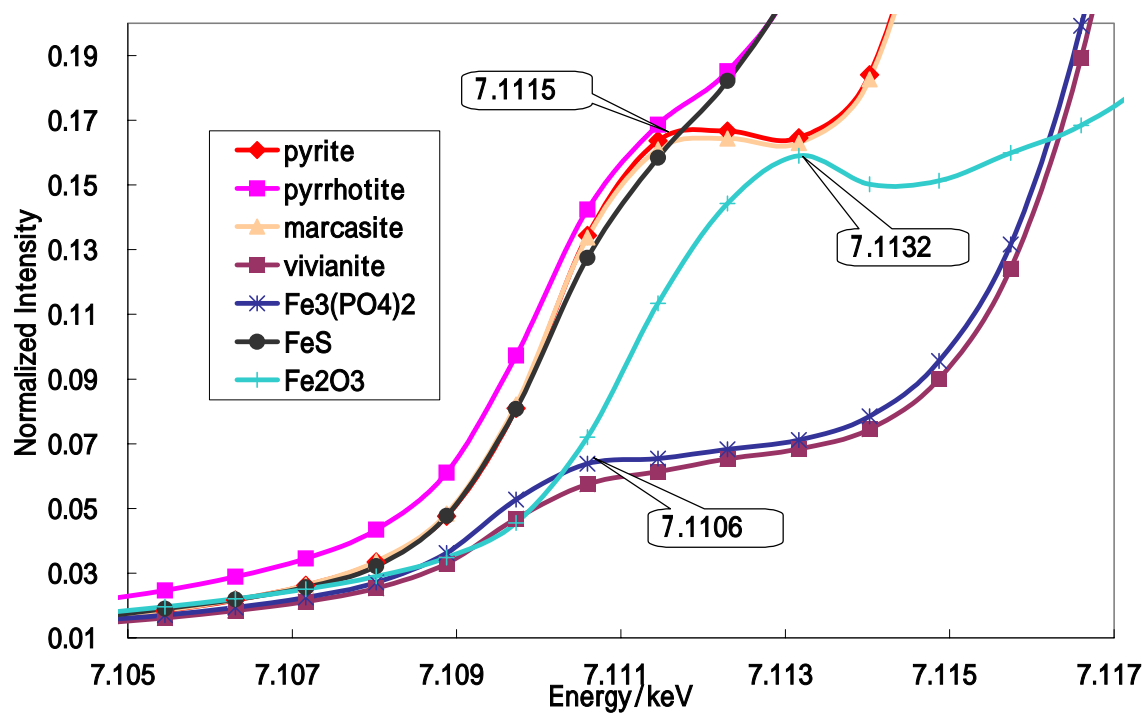


Fig.4-67 Standard Sample の XANES スペクトル (pre-edge 付近)

(4) メスbauer分光法による状態分析

得られたメスbauerスペクトルを Fig.4-68 ~ 4-78 に示した。本来、さらに解析を行ってパラメーターを算出すべきであるが、生成物は何種類かの混合物になっており、後述するように生成物の主成分と推定された pyrrhotite などは一種類でも解析が困難なスペクトルであるし、pyrite と marcasite はパラメーターが非常に近くて区別が難しい。Ferredoxin は Fe_4S_4 、 Fe_2S_2 などわずかに異なるメスbauerスペクトルを示すいくつかの型が知られていて特定できない。以上の理由から、これらを各成分に分離して各パラメーターを算出することは難しく、正確さを欠くと考えられるため、ここでは標準を同条件で測定したスペクトルと比較するのみにとどめた。また以上のような理由で、フィッティングが困難な上、生成物は完全に標準と同一ではないので、パラメーターも全く一致するわけではなかった。これは同様の実験を行った先行研究でも見られる結果で、それらの論文⁴⁶⁾で用いられた-like という表現を以下に用いた。

菌を接種しない培地および菌接種後 0 日生成物のメスbauerスペクトルは、共にダブルレットを示し、そのメスbauerパラメーターから high spin 3 価であることを表している。培地に用いたのは FeSO_4 であり、Fe は 2 価であるが、酸化された Fe^{3+} が不純物としてわずかに含まれている。この Fe^{3+} が培地中の陰イオンと無機的に反応して沈殿したものである。Cl⁻、 SO_4^{2-} との塩は水に可溶で、 FePO_4 のみが難溶であることから、この沈殿は FePO_4 と推定された。

培養生成物はこのダブルレットとは異なるスペクトルを示し、培養が進むにつれ明らかなスペクトル変化がみられた。しかも初期の Fe 濃度の違いによりその変化の仕方には差違があった。また生成物のスペクトルはいずれも幅の狭いダブルレットおよびセクステット成分を主としており、幅広のダブルレットを示す FeSO_4 や FeCl_2 とは異なることは明らかであった。このことから、菌の生育とは無関係に生じた沈殿は FePO_4 のみと判断した。

以下、各培養の系列ごとに考察を行った。

Fe40ppm での培養生成物のスペクトル変化 (Fig.4-68, 4-69)

他の培地に比べて、もっとも早く 2 日目から沈殿が生成し始める。全体に沈殿が黒変する 3 日目から測定を行ったところ幅広のダブルレットを示し、その後セクステット成分が現れ、180 日経つと再びダブルレットになるが、初めのものに比べて若干シャープになっている。330 日、420 日たつと再びセクステット成分が現れる。このセクステットの中央に見える、ダブルレット状の突出した成分はブロードで非対称である。これらのピークの形状およびメスbauerパラメーターから、最初のダブルレットは還元菌の硫酸還元過程に参与する鉄-硫黄タンパク ferredoxin (Fd)、セクステットは pyrrhotite、途中で見られるシャープなダブルレットは pyrite によるものと考えてこの変化を次のように推測した。

3日	5日	180日	330日
幅広ダブルット	セクステット	若干シャープなダブルット	再びセクステット
ferredoxin	pyrrhotite	一部が pyrite	pyrrhotite

最初に現れるピークを Fe-S タンパク ferredoxin と推定したのは、メスバウアーパラメーターが近く、硫酸還元過程に関与するタンパクであり、菌体内に非常に多く存在するからである。特に *Desulfovibrio.sp* の体内に多く含まれるため、*Desulfovibrio.sp* から抽出したフェレドキシンの構造解析にメスバウアー分光法を適用した例も多い⁴⁶⁻⁴⁹⁾。

Ferredoxin の生物学的な特徴を少し説明すると、非ヘム鉄イオウタンパクの一つで、低い酸化還元電位 ($E = \sim -0.4V$) を有する系の電子伝達体として作用する。Fe と S は Fe_4S_4 や Fe_2S_2 のようなクラスターを形成して存在し、Fe がタンパク質のシステイン残基の S ならびに無機の S と結合している。この無機の S は低い pH 下では H_2S となって遊離する²⁾。硫酸還元菌に複数見いだされ、乳酸の酸化と硫酸イオンの還元という 2 つの過程に異なるフェレドキシンが働いていると考えられる。 SO_3^{2-} から S^{2-} への $6e^-$ 還元反応における亜硫酸還元酵素の一つであるが、分子活性は他の亜硫酸還元酵素に比較して極めて低く、それが細胞中に大量に存在している原因だとも言われる。さらにヒドロゲナーゼとともに、硫酸還元菌の電子伝達タンパクとしての働きも知られる⁵⁾。フェレドキシンはピルビン酸の酸化で得られた電子の受容体であり、硫酸イオン還元の電子供与体と考えられている。従って、硫化鉄生成に関与している可能性もあると考えられる。また、今実験では、メスバウアースペクトルの文献値の得られたフェレドキシンと、スペクトルの形状およびパラメーターが近いことからフェレドキシンと推定したが、硫酸還元菌中には、他にも鉄-硫黄クラスターを持つタンパクが存在する。たとえば電子伝達タンパクのヒドロゲナーゼ (hydrogen : cytochrome C_3 oxidoreductase) は、ペリプラズム中にある分子量 6 万の水溶性タンパク質で、 $[3Fe-4S]$ と $[4Fe-4S]$ クラスターを持つ。これらのタンパクは細胞内に大量に存在し、硫酸還元過程に関与していることから、硫化鉄が生成し始める直前の菌の増殖時には、硫化鉄生成物を上回る影響をメスバウアースペクトル上に与えたと考えられる。有機 S と無機の S の両方を持つタンパクが硫化鉄化合物生成に関与しているとすれば、まさにバイオミネラリゼーションということができるであろう。しかし生物体内での鉱物化は確認できず、確証は得られなかった。

以上をまとめると、Fe40ppm では推奨培地の組成のためか、菌量の増加具合も激しく 3 日までに一気に増殖するので、菌の細胞に含まれるタンパクのピークが強く現れる。そして急激に増加した分、熟成が進まないうちに死菌数が上回り始め、増殖に伴って還元した SO_4^{2-} と Fe^{2+} が反応して pyrrhotite-like 成分が現れる (cf. Fig.4-76)。180 日経つと、3 日のものよりややシャープなダブルットになり、セクステットは消えている。このダブルットは標準の pyrite よりも Q.S. の値が大きいので、完全に pyrite になったとは考えにく

いが、pyrrhotite の常磁性成分と一部 pyrite 化したものが混合した状態だと考えられる。その後、330日、420日経つと再びセクステットが現れてくる。つまり最初に pyrrhotite-like の結晶性の低い成分を生成し、それを前駆体としてある時期までは pyrite 化が進行するものの、それを越えると、また pyrrhotite-like に戻ってしまうものと考えられる。セクステットも 30 日までの生成物と 1 年経ったものとは、対称性や内部磁場の大きさが違うので、構造が変化しているようだ。一度生成しかけた構造から、Fe が抜けたり入ったりするようなことが起きているのかもしれない。1 年以上経つと、培地自体も蒸発してかなり液量が減っているため、溶液中の平衡に変化が生じたため、または菌の活性が落ちてしまったためということが、その理由として考えられる。

Fe80ppm での培養生成物のスペクトル変化 (Fig.4-70, 4-71)

Fe80ppm では、次のような変化が見られた。

2 日目		30 日 ~ 150 日		330 日
セクステット pyrrhotite	→	ダブレットが突出 pyrrhotite + pyrite	→	対称性の良いセクステット pyrrhotite

Fe40ppm で見られた最初のブロードなダブレットは見られない。2 日目ですでにセクステットを示す。鉄が濃いので生成量が多く、菌が SO_4^{2-} を還元し始めるとただちに反応して、pyrrhotite が生成するので菌自体のタンパクは見えないのだろう。30 日目ではダブレットが現れて、150 日ではこのダブレットの Q.S. が小さくなり pyrite に近づいていた。しかし 330 日後には、また pyrrhotite-like のセクステットを示す。しかし最初のセクステットとは形状が少し異なる。Fe40ppm より変化が早くはっきりしているが、全体として推移の仕方はほぼ同じであった。

Fe200ppm での培養生成物のスペクトル変化 (Fig.4-72, 4-73)

Fe200ppm では、次のような変化が見られた。

3 日目		5 日目		330 日
半値幅が広いダブレット ferredoxin & FePO ₄		セクステットで一部シングレット pyrrhotite + ferredoxin		セクステット pyrrhotite

Fe200ppm では、鉄濃度が高すぎ、菌が環境に慣れるのに時間を要するのであろう。他に遅れて菌が増殖し始め沈殿も生成し始める。3 日目ではまだほとんど黒沈になっておらず、半値幅の広いダブレットを示す。これは菌を接種しないときに見られた FePO₄ があるいは ferredoxin との混合物であろう。5 日は底に粒状の沈殿ができ、試験管の壁面には黒いメッキのようにになっている状態。このときは下の粒状だけを集めており、底にたまった

成分の中には菌が多く含まれているので、その構成成分であるタンパクの存在を示すダブルレットが目立つ。しかし、9日目ごろにどの試験管も壁面に付着した生成物をはがれおち、14日ではこれを主としてサンプリングすることになる。すると pyrrhotite によるセクステットに隠れて、ダブルレットは見えなくなってしまった。

また 330 日目のものは、上層に浮かんだ膜状の成分と、底にたまった粒状およびゾル状の成分とを分けて測定した。その結果、膜状成分は Fe^{2+} と SO_4^{2-} から合成によって作った FeS に似たシングルレットを示し、粒状成分はブロードなダブルレットを含むセクステットを示した。膜状成分は SEM 観察によって、ガラス表面にできてはがれおちたものであることがわかっている。ガラス表面では無機的に生成した膜状の FeS を核として pyrrhotite が成長し、十分成長するとその重みではがれ落ちると考えられる。一方、底にたまった粒状のものはタンパクリッチであることから、菌を核として成長した pyrrhotite であると推測される。最近の論文でも、 μm スケールのバクテリアの表面に、 $\sim 25\text{nm}$ の薄い film として FeS 前駆体ができのち、自己溶解して sulfur を放出し細胞膜上に pyrite または marcasite が析出するとの報告²⁹⁾がある。したがって、本研究でも底にたまった粒状成分は菌の表面に pyrrhotite 様の硫化鉄が析出したもので、これが pyrite 化の前駆体となっている可能性が高い。

ここで、菌の細胞膜が反応の場になるという推測の、もう一つの根拠について説明したい。天然において、微生物の細胞壁表面は様々な反応の場となっている。微生物の体表面積は個々には非常に小さいが、菌の総数を考えれば総表面積は莫大である。特に、序に示したように硫酸還元菌のようなグラム陰性菌は、その名のとおりグラム陰性菌は体表面にはマイナスの電荷をもった部位を持つ。それゆえ膜表面に反対電荷のカチオンを捕捉し、さまざまな微粒子鉱物の核形成に重要な働きをしている⁵⁰⁾。したがって、硫酸還元菌は細胞内から硫黄化学種を放出するだけでなく、その表面に Fe イオンを引きつけ、菌体自身が結晶の発生において重要な核として働くため、硫化鉄生成をより有利にしていると考えられる。

また、200ppm では他の培地で見られたように途中でダブルレットが突出することがなかった。菌の放出できる S に比して pyrrhotite が多すぎ、一部は FeS_2 になっても、FeS または Fe_{1-x}S のままであるもののほうが多いのかもしれない。

～ の結果から、Fe 濃度の違いにより異なるスペクトル変化が見られたが、いずれの場合も混合物であり、生成物は基本的には同じものようだ。Fe 濃度の違いによって混合物の割合と発生時期が違うために、スペクトル変化もそれぞれ異なると考えられる。また、もう一点、菌の生育にも Fe 濃度が影響しているためとも考えられる。実際、 Fe^{2+} を共存させると SO_3^{2-} の還元速度が非常に増大することが知られている (Seki&Ishimoto , 1979 ; Seki ら, 1981)。これは亜硫酸塩還元酵素の一つであるフェレドキシンが鉄-硫黄クラスターを含むためであろう。硫酸イオンの還元はまず SO_4^{2-} から SO_3^{2-} への還元を第一段階とするが、その後の S^{2-} にまで還元される過程についてはいろいろ議論がある。還元過程

に $S_2O_3^{2-}$ と $S_3O_6^{2-}$ が生成することが知られている (Kobayashi ら, 1969) が、これらが正規の中間体であるか、本来の中間体(スルホキシル酸や S 単体)の副生物であるかは定かでない。また電子の供給量が多い場合にはこれらの中間体が生じずに S^{2-} が生成する (Jones&Skyring, 1975; Drake&Akagi, 1977)。したがって、Fe 濃度の違いが菌の硫酸還元過程に何らかの影響を与え、生じる中間体も異なる可能性がある。その結果、スペクトル変化に違いが生じたとも考えられるが、単に混合物との相対的な割合の違いによるものか、どちらの影響か判断できない。

^{57}Fe 40ppm での培養生成物のスペクトル変化 (Fig.4-74, 4-75)

これはメスバウアースペクトルの質を上げるために試験的に行ったものである。この Fe40ppm と多少条件が異なるためか、完全に同じ変化ではなかった。 ^{57}Fe のみの培地をつくるために ^{57}Fe のみでできた hematite を HCl に溶解していることと、 ^{57}Fe では試験管 10 本から沈殿を採取していることが、影響しているのかもしれない。 ^{57}Fe のみから成るので、試料がわずかでも短い時間で S/N のよいスペクトルが得られるため、各サンプルは 1 本分だけ用いている。試験管ごとにばらつきがあるので、1 回の測定では時間レベルでの変化を追うデータとしては心許ないので、ここでは参考にとどめたい。

しかし、培養開始から 12 時間後のスペクトルは注目に値する。これは菌を接種しない培地のダブレットとも違い、他の生成物のどのスペクトルとも異なる。内部磁場が非常に大きく、この系で生成し得るものの中で比較的近いのは goethite (Fig.4-77) である。Pyrite 化の前駆体として pyrrhotite ができていると述べたが、さらにその前段階としてごく短い時間、オキシ水酸化鉄が生成している可能性がある⁵¹⁾。

また、以上のように生成物を同定するのに用いた標準のメスバウアースペクトルを Fig.4-76 ~ 4-78 に示した。

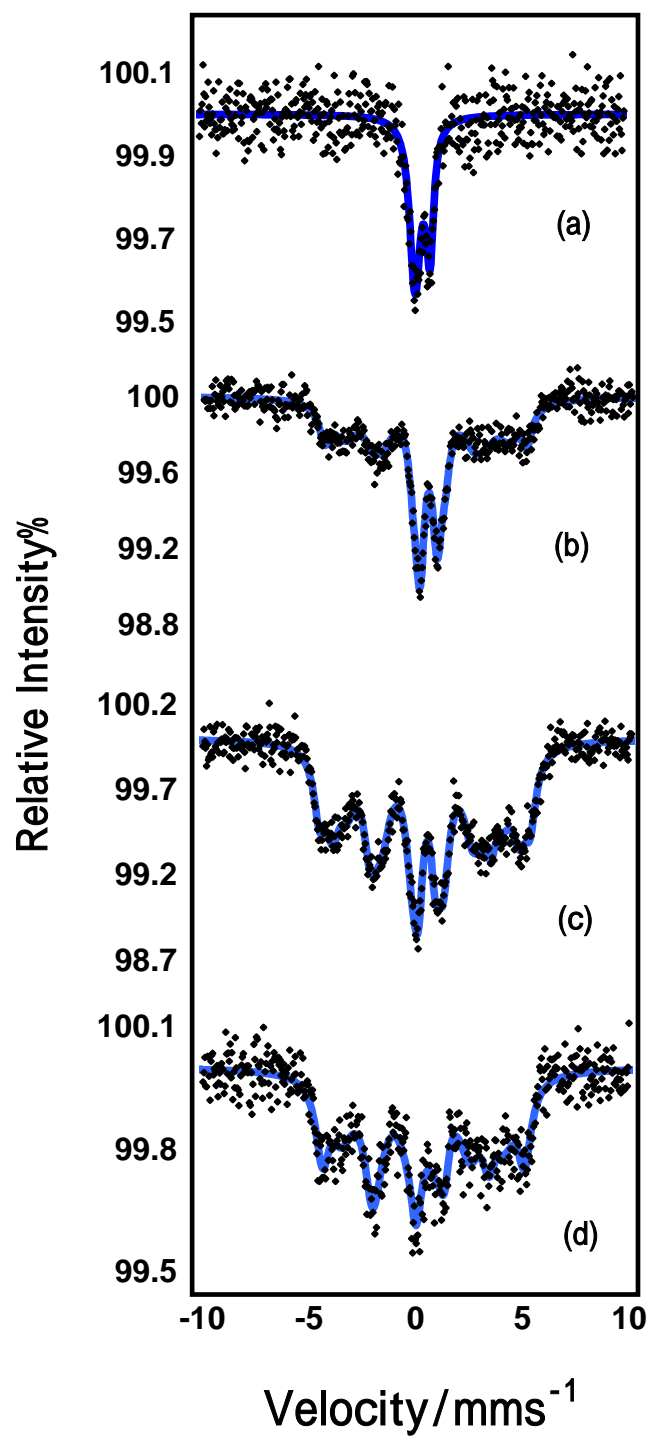


Fig.4-68 Fe40ppm培養生成物（短期）メスバウアースペクトル
 (a)0日 (b)3日 (c)5日 (d)30日

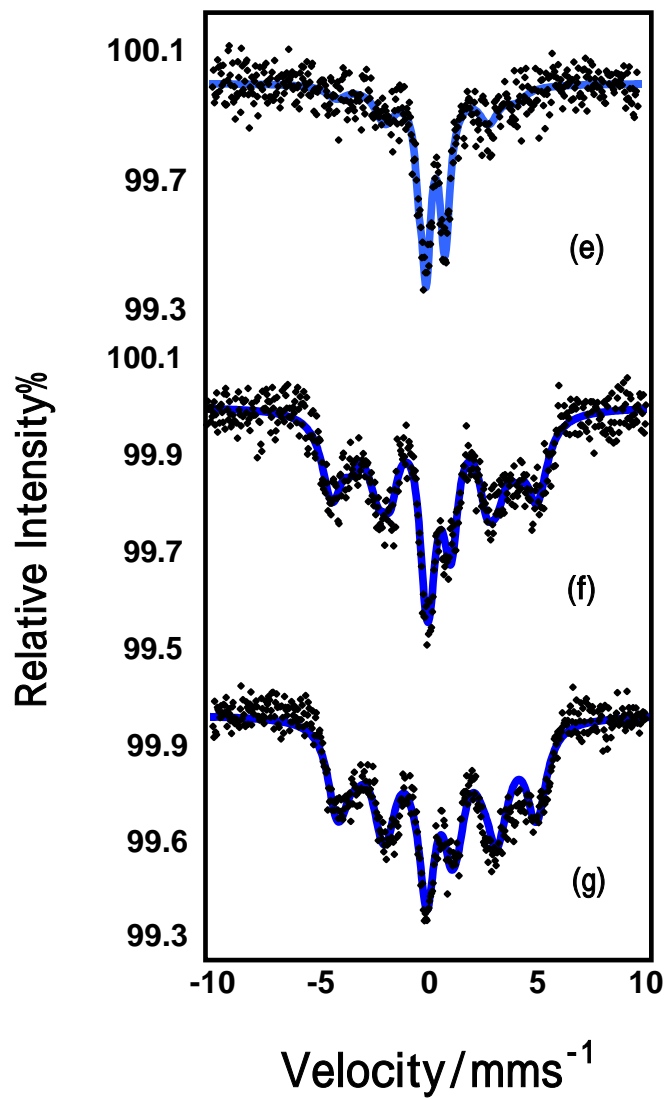


Fig.4-69 Fe40ppm培養生成物（長期）メスバウアースペクトル
 (e)180日 (f)330日 (g)420日

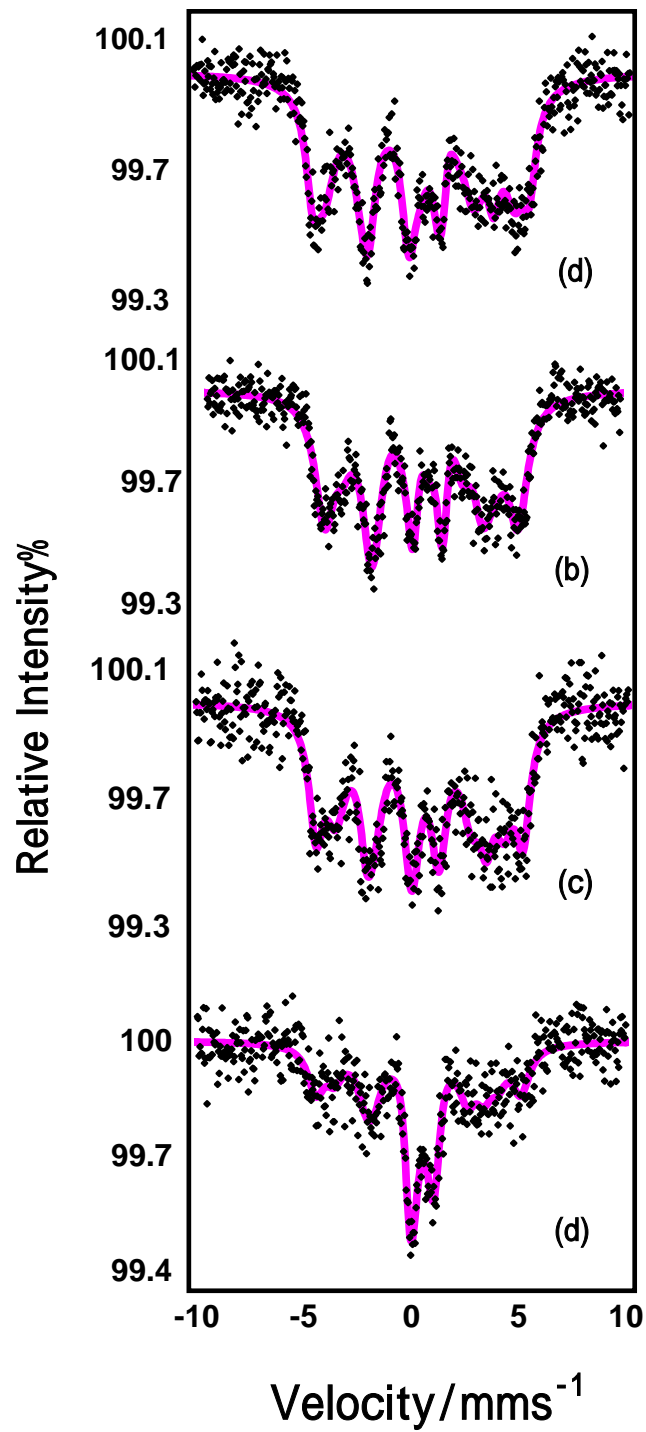


Fig.4-70 Fe80ppm培養生成物（短期）メスバウアースペクトル
 (a)2日 (b)5日 (c)14日 (d)30日

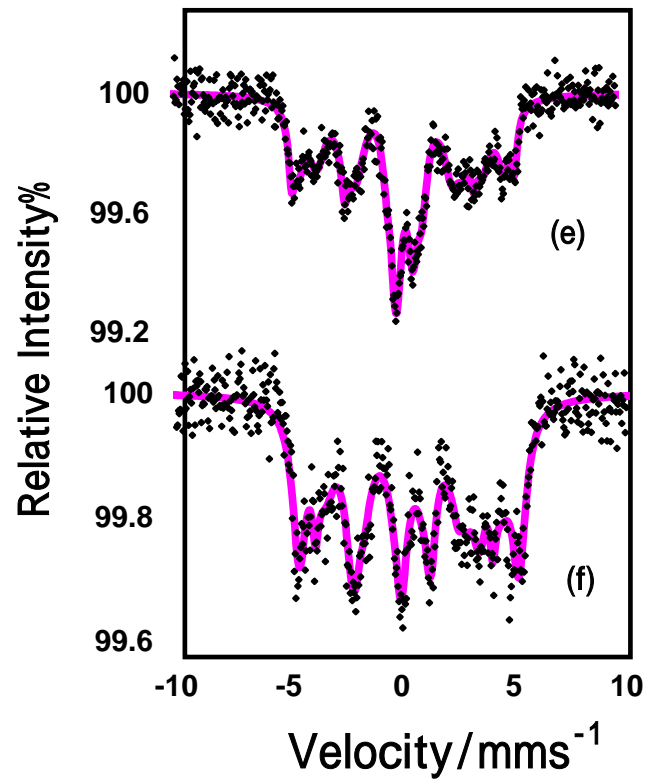


Fig.4-71 Fe80ppm培養生成物（長期）メスバウアースペクトル
(e)150日 (f)330日

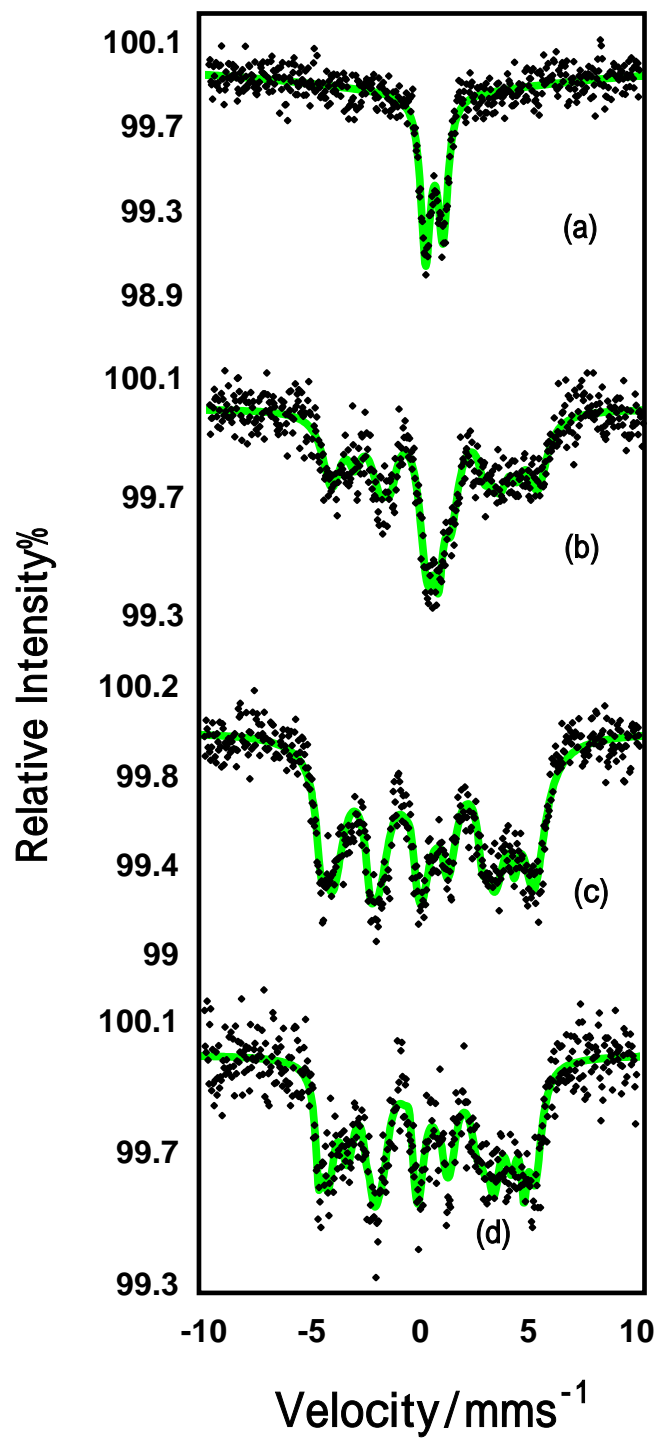


Fig. 4-72 Fe200ppm培養生成物（短期）メスバウアースペクトル
 (a)3日 (b)5日 (c)14日 (d)30日

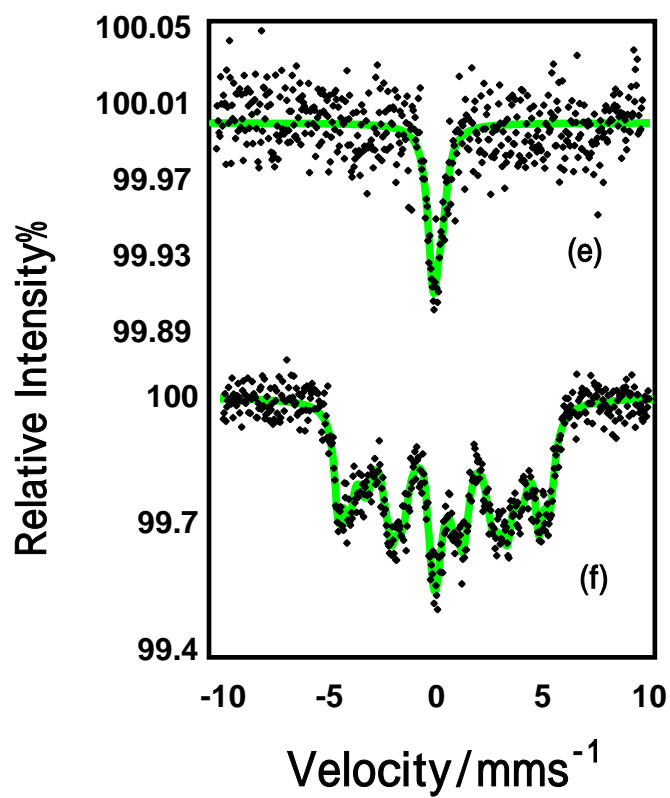


Fig.4-73 Fe200ppm培養生成物（長期）メスバウアースペクトル
 (e)330日 膜状生成物 (f)330日 粒状生成物

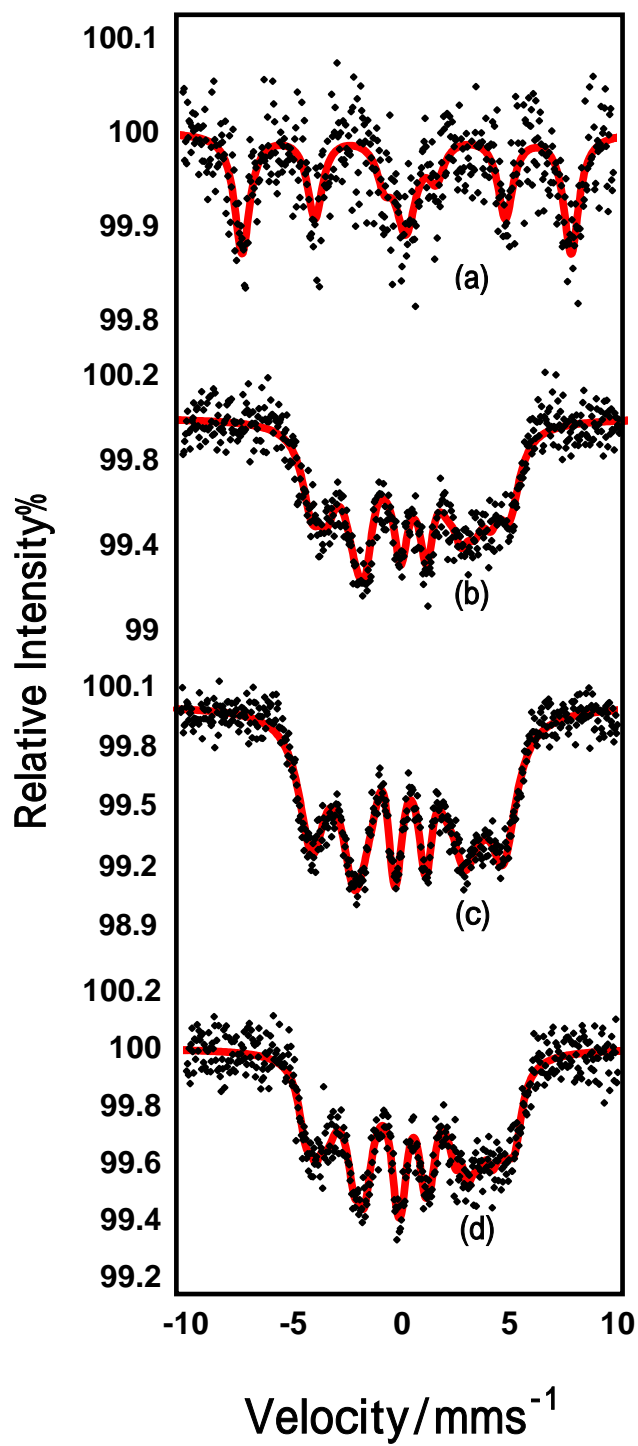


Fig.4-74 ^{57}Fe 40ppm培養生成物（短期）メスバウアースペクトル 1
 (a)0.5日 (b)1.5日 (c)1.5日 (d)2.5日

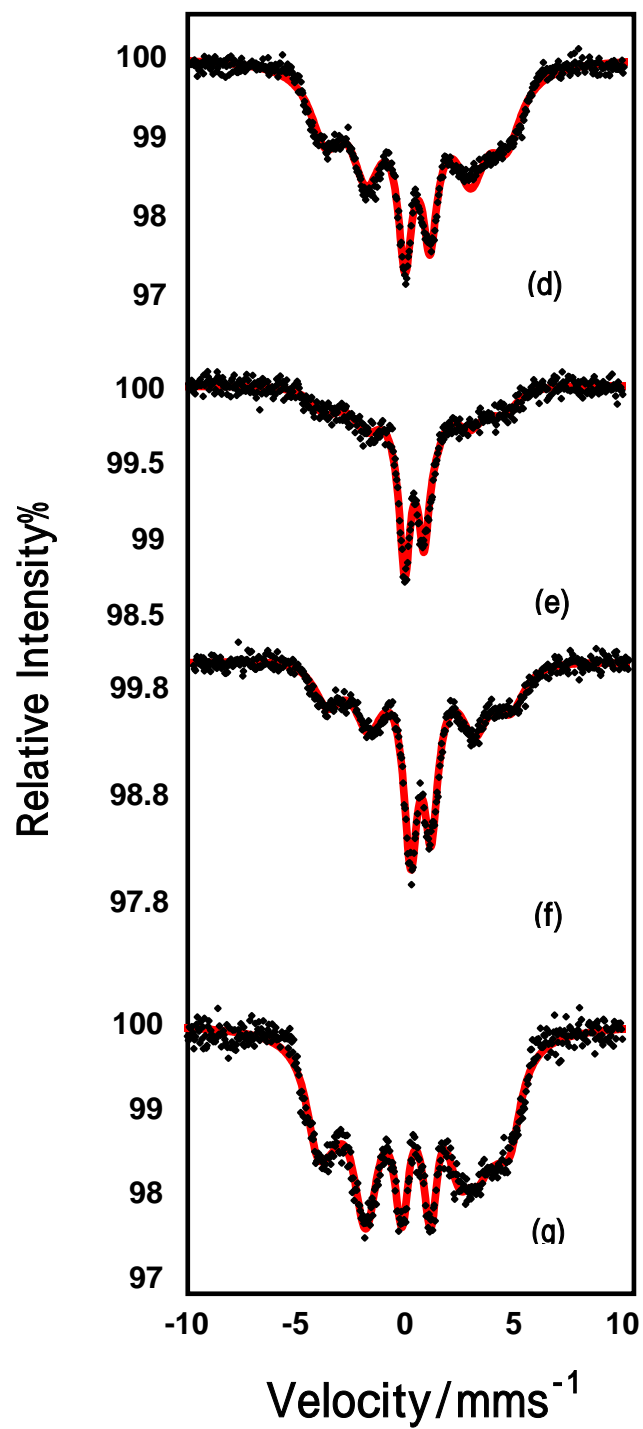


Fig.4-75 $^{57}\text{Fe}40\text{ppm}$ 培養生成物（短期）メスバウアースペクトル 2
 (e)3日 (f)4日 (g)5日 (h)10日

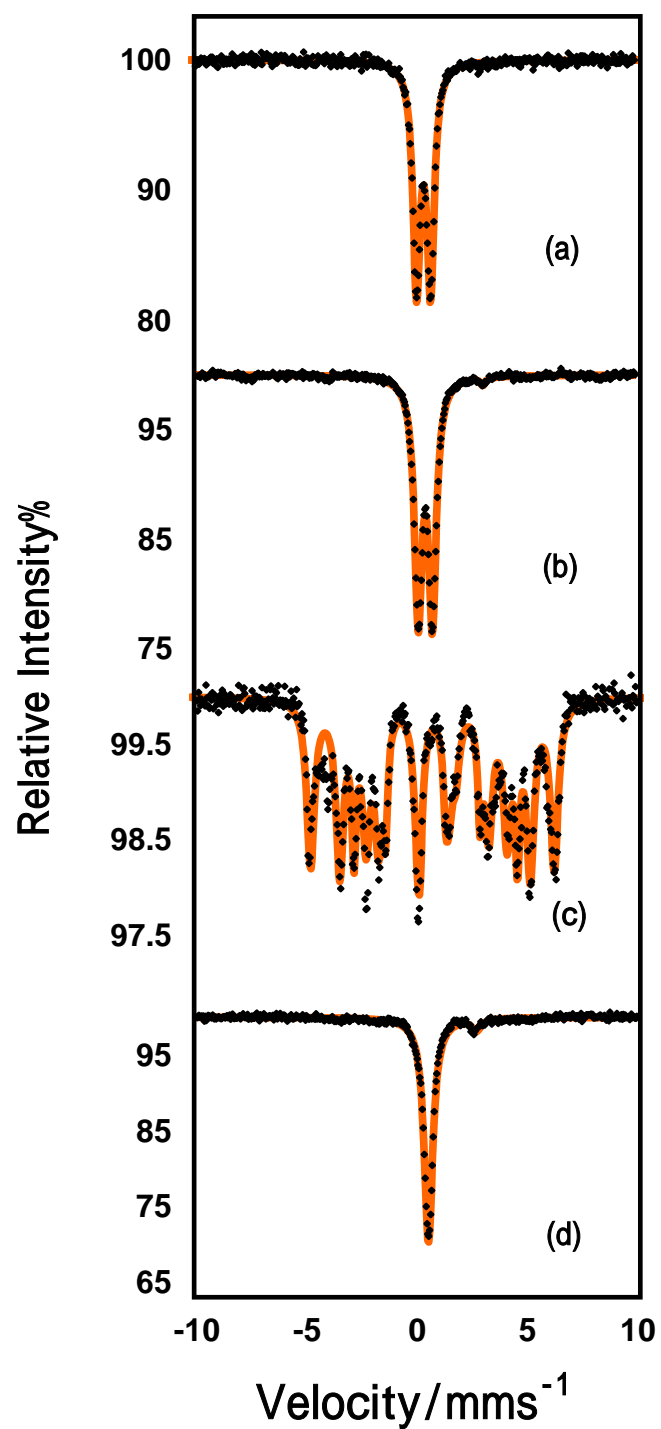


Fig.4-76 硫化鉄化合物 標準のメスバウアースペクトル
 (a)pyrite FeS₂ (b)marcasite FeS₂
 (c)pyrrhotite Fe_{1-x}S (d)synthesized FeS

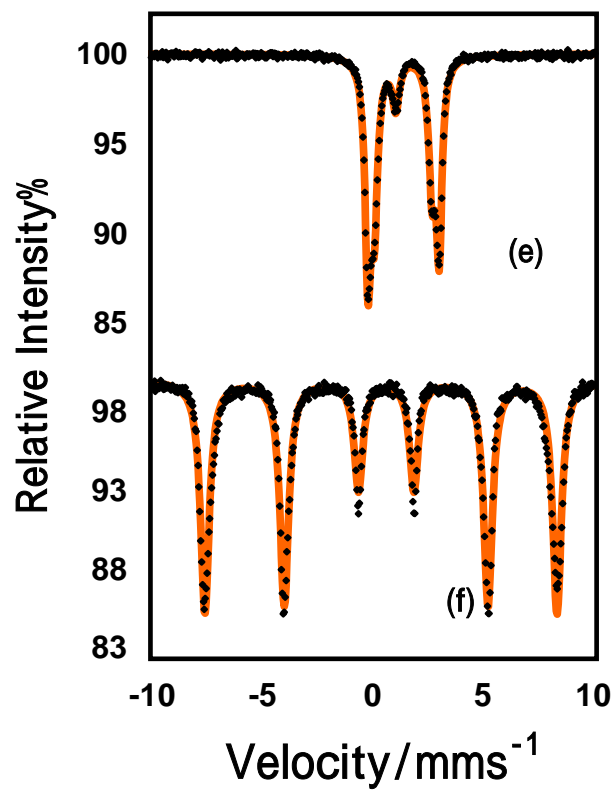


Fig.4-77 その他の標準（鉱物）のメスバウアースペクトル
 (e)vivianite $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (f)goethite $\text{FeO}(\text{OH})$

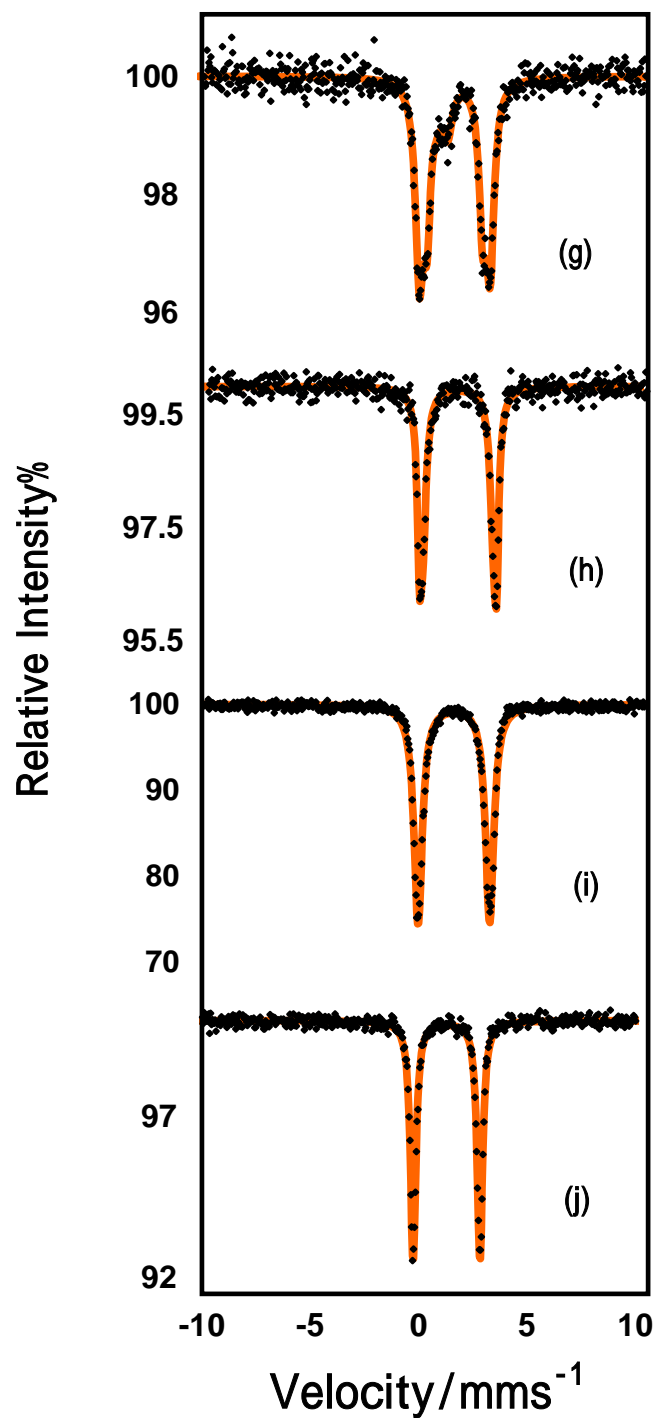


Fig.4-78 その他の標準（試薬）のメスバウースペクトル
 (g) $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (h) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 (i) $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (j) $\text{Fe}(\text{OH})_2$

(5) メスbauer分光法による分析結果のまとめ

Fe 濃度によってスペクトル変化は異なるが、まず pyrrhotite-like の硫化鉄を生成し、その後 pyrite 化が進むものの、1年近くを過ぎると再び pyrrhotite に戻ってしまうという共通した傾向が見られた。初めの pyrrhotite と後にできてくる pyrrhotite とは形状が異なるので、一度は pyrite に近づくような構造になりかけ、その後 S の遊離等によって初めとは違う構造を持った pyrrhotite になるのだと推測される。

生成物のメスbauerスペクトルから推測される反応過程を Fig.4-79 に図示した。

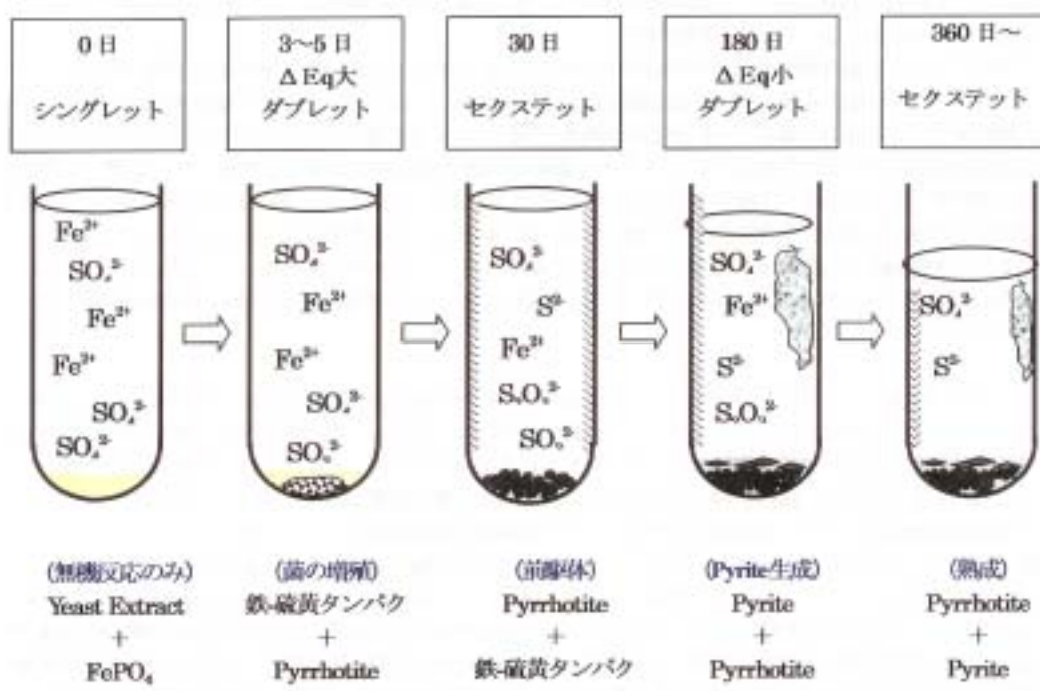


Fig.4-79 生成物のメスbauerスペクトルから推測される反応過程

(6) エネルギー分散型蛍光 X 線分析法による定量

大まかな Fe/S 比を見るために蛍光 X 線を用いて定量した結果を Fig.4-80、Table4-5 に示した。培養生成物は混合物で、それらの混合比も不明なため、これらの値は参考にとどめることにする。

Fe 濃度に関わらず、9~14日までは S/Fe 比は増加し、pyrite の理論比 1.153 に近づく。さらに 150日まで培養すると、減少するという傾向が見られた。データ数が不十分で、これ以上の考察はできないが、150日を越えたあたりで反応の方向が変わるとするのは、メスbauerの結果とも矛盾しない。

また、培養 2 日目のサンプルからは P が検出されたが、14 日目では見られなかった。メスbauer分光法によって、予想されたとおり菌の生育に伴い、培地中に初めから存在していた FePO_4 に比べて、硫化鉄が相対的に増大したことを裏付ける結果であった。

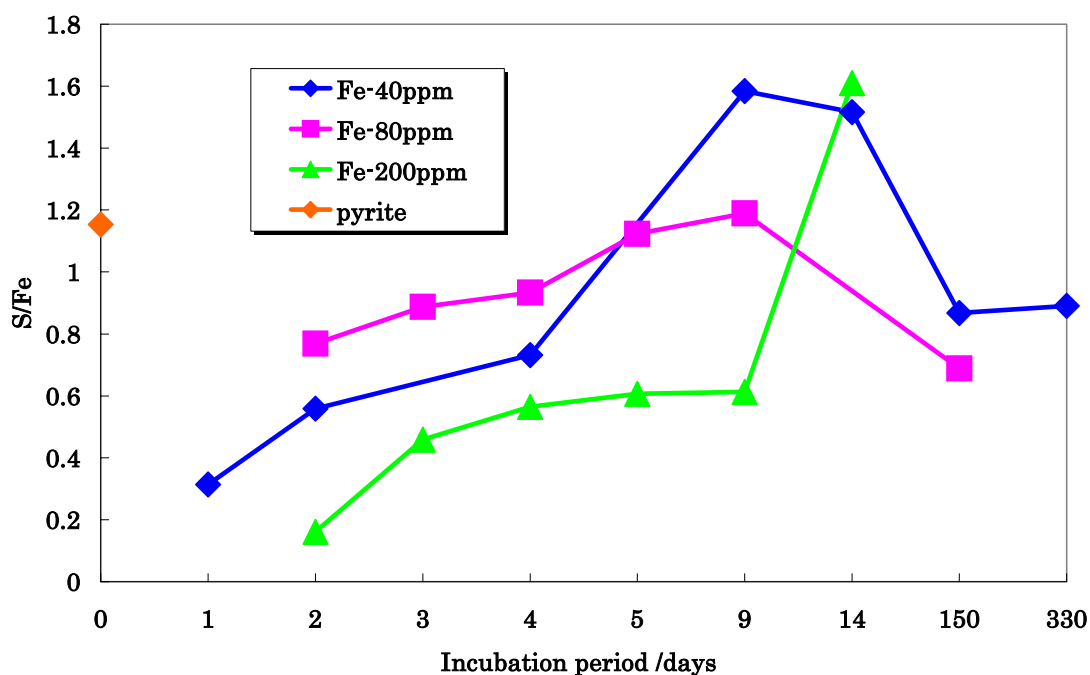


Fig.4-80 培養 0 ~ 330 日間の S/Fe 比変化 (by XRF)

Table.4-5 培養 0 ~ 330 日間の S/Fe 定量値 (by XRF)

days	Fe-40ppm		Fe-80ppm		Fe-200ppm	
	S/Fe	stdev	S/Fe	stdev	S/Fe	stdev
1	0.314	0.0074				
2	0.559	0.061	0.768	0.10	0.161	0.0062
3			0.887	0.14	0.459	0.03
4	0.731	0.066	0.934	0.126	0.565	0.067
5			1.12	0.65	0.607	0.028
9	1.58	0.17	1.19	0.18	0.613	0.017
14					1.61	0.016
150	0.867	0.039	0.688	0.47		
330	0.891	0.045				

4-2-4. 補足実験

(1) 酸への溶解実験

Table 4-6 のように、FeS は HCl に溶けるが、pyrite は HCl には溶けず王水に溶ける。これらの性質を利用して、混合物を分別溶解することを考えたが、分別溶解法は気体の捕集の際のロスが大きく誤差も大きくなりがちである。しかも、培養生成物は量が少ない上、どの酸にも大部分溶解するため、この試料を分別溶解法で分別定量することは困難であった。したがってここでは定量を目的とせず、化学的性質を調べるために酸への溶解実験を行った。その結果、この培養生成物は希酸 (HCl、HNO₃、H₂SO₄、王水) に溶けて硫化水素を発生することがわかった。それと同じ性質を示す硫化鉄鉱物および試薬は、本実験で用いた 8 種類の中では、試薬 FeS のみであった。しかし試薬の FeS は濃硫酸には溶けず、培養生成物は濃硫酸にも溶けたことから、全く同じものとは言い難い。

(2) 磁性

また磁性を示さない点でも、試薬 FeS と異なる。生成物のメスバウアースペクトルはセクステットを示し、これは強磁性または反強磁性を持つことを意味している。生成過程から考えられる硫化鉄化合物ということから、pyrrhotite であろうと推測したが、鉱物 pyrrhotite であれば magnetite など同様の磁性を示すはずである。事実、弱い磁石を近づけただけでも、鉱物 pyrrhotite の粉末は磁力線を生じた。また試薬の FeS も同様の磁性を示した。しかし培養生成物は磁石を近づけても、NMR の強力磁場内に置いても磁性を示さなかったことから pyrrhotite の中でも格子欠陥をもつ pyrrhotite $x\text{Fe}_{1-x}\text{S}$ ($0 < x < 0.125$) であると考えられる^{17), 33)}。

空孔数が最小 ($x = 0.096$) の場合、空孔の並びは全く不規則的になり反強磁性を示す。歪みのある単斜晶 NiAs 型 ($\text{Fe}_{0.881}\text{S}$ など) は、その層の空孔が長期規則性を保って配列しているためフェリ磁性。また六方晶 NiAs 型 ($\text{Fe}_{0.900}\text{S}$ など) は、単層内に規則性と不規則性が混在しており、フェリ磁性を示すことが知られている^{52), 53)}。従って、磁性を全く示さなかった pyrrhotite-like 生成物中の空孔は少なく、あっても規則性を持たない、もしくは粒子が非常に小さいため long-order の規則性を示さないと考えられる。

微生物の培養を最優先に試料調製したため、無機合成の場合のように pyrite の化学量論比になっておらず、まちまちな格子欠陥をもつものができる可能性は高い。この格子欠陥の存在により、メスバウアーのスペクトル変化に見られるように、様々な硫化鉄化合物に変化しうるとも言える。

Table4-6 酸などへの溶解実験結果

	希酸 ¹⁾				酸化力のある酸		アルカリ ²⁾	有機溶媒		磁性	
	水	希HCl	希H ₂ SO ₄	希HNO ₃	王水 ³⁾	濃H ₂ SO ₄	濃HNO ₃	濃NaOH	エタノール		アセトン
生成物(1year)	×				黄			薄青緑	×	白濁	×
pyrite	×	×	×	×	黄	×	黄	×	×	×	×
marcasite	×	×	×	×	黄	×	黄	×	×	×	×
pyrrhotite	×	×	×	×		×	×	×	×	×	
commercial FeS	×				黄	×		×	×	×	
vivianite	×					×		橙	×	×	×
Fe ₃ (PO ₄) ₂	×	薄青				×		×	×	×	×
powder Fe	×					×	×	×	×	×	×
synthesized FeS	×					×		×	×	黄	×

¹⁾ 5%水溶液

²⁾ 10N NaOH水溶液

³⁾ HCl : HNO₃ : 水 = 3 : 1 : 4

(3) 硫化鉄の無菌熟成による pyrite 合成

培養生成物と比較するために、文献に従って 65 °C での pyrite の無機的合成を試みた。

熟成前、S と Fe^{2+} を混合した時に直ちに生じる黒い沈殿をメスバウアーで測定したところ、ブロードなシングレットを示し、生成物の主成分と考えられる pyrrhotite (セクステットを示す)とは異なることがわかった。これは FeS_{1-x} で表される Fe 過剰の mackinawite である可能性が高い。Mackinawite は比較的容易に無機的合成でき、メスバウアースペクトルはシングレットを示すことが確認されている。しかし、はじめは黒い沈殿であったのが 2 週間熟成する間に赤茶色の酸化鉄になってしまい pyrite の生成には至らなかった。使用する純水中の溶存酸素を抜く工夫をしたが、やはり酸化鉄が生じた。これについては実験法を検討する余地があるが、この方法で pyrite を生成できたとしても、65 °C は底質温度に比べて高く、底質中での pyrite 生成に硫酸還元菌が寄与しているという推定を覆すものではないだろう。



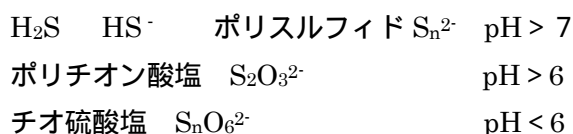
Fig.4-81 アルカリ溶液中で Fe^{2+} と S の無機反応により生成した硫化鉄の熟成

4-3. 培養生成物の分析結果について

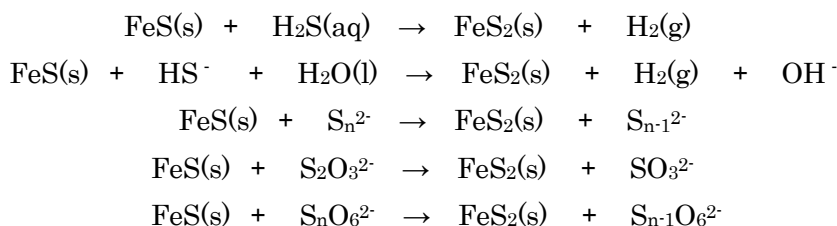
いずれの分析からも生成物は混合物で、主成分は非晶質の pyrrhotite であるが、一部 pyrite 化が進行しているという結果が得られた。

メスバウアーや XAFS 法では、結晶質の pyrrhotite や pyrite に似たスペクトルを示すが、TEM 観察では非結晶を示し、化学的性質・物理的性質も結晶質のそれとは異なることから、結晶性を示すほどの長期的秩序を持たないが、ごく微小領域においては pyrrhotite や pyrite に似た構造をした微粒子とすることができるであろう。ただし、硫酸還元菌が積極的に硫化鉄化合物を生成するというよりも、下に示すようにさまざまな中間酸化状態の硫黄化学種を、硫酸還元菌が反応に適した速度で提供し、さらにその反応の場も提供するのだと考えている。マイナス電荷を帯びた硫酸還元菌の膜外に吸着されやすい Fe^{2+} と、菌の内側から放出された硫黄源が、膜を介して局所的に過剰な濃度となるため、低温下では起こりにくい反応が起き、pyrite 生成を可能にしていると推測される。

pH によって安定な硫黄化学種は異なり (Arnston et al. 1960)、



それぞれ以下のような反応によって FeS_2 生成に寄与するとも言われている²⁰⁾。



しかし半年くらいまでに pyrrhotite-like および pyrite-like の微粒子が生成するが、その後は閉じた系での長期培養により以下のような弊害が生じ、むしろ pyrite 化が後退していく兆候が見られた。メスバウアースペクトル以外で見られた長期培養することによる弊害と、考えられるその理由としては、

1. SEM、TEM で沈殿相から菌がほとんど検出されない
顕微鏡で観察すると菌の活性が落ちていた
菌の自己溶出 (autolysis)、不活性化
2. 生成物は非結晶で、酸化力の強い酸にしか溶けない完全な結晶質の pyrite や pyrrhotite とは異なり、ほとんどの酸に溶解する。
このことから、不安定で溶解しやすい微粒子であることがわかる
擬 pyrite、擬 pyrrhotite の溶解
3. 水の蒸発、菌の増殖に伴う有機物やイオンの消費
濃度や液性の変化

したがって、この系でこれ以上の長期培養を行っても河川底質中から検出されているような framboidal pyrite にまで成長する見込みは少ないと考えられる。

4-4. 底質中の培養条件との比較

培養実験では framboidal pyrite は生成されなかったが、底質中では実際に framboidal pyrite が検出されていることから、試験管の中にはない、底質中の何らかの環境要素が pyrite 生成には必要なのかもしれない。考えられる底質環境との違いを列挙した。

1. 酸化還元電位

Pyrite の無機合成では、marcasite から greigite が生成し、これが pyrite の前駆体となることが無機実験で確認されているが、本研究のような完全な還元雰囲気下では greigite は生じにくい。したがって、本研究の培養実験で生成するのは greigite ではなく pyrrhotite であり、これを前駆体として擬 pyrite 粒子に成長すると推定される。つまり無機合成とは異なる過程で pyrite に似た微粒子が生成することになる。しかし、greigite は凝集しやすく、framboidal greigite から framboidal pyrite になるのではないとも言われていることから、greigite を前駆体としなかったため、この系では一年経っても framboidal を形成しなかったとも考えられる。

底質中のように、部分的でも酸化的雰囲気になるところがあれば、還元菌の働きで生じた pyrrhotite から mackinawite→greigite と無機合成に似た反応が進行する可能性がある。

2. 球形を作る物理的要因

培養は静置した状態で行ったが、底質中では生物による攪乱や水の流れによる物理的に球形をつくる要因が働くと予想される。培養実験でも振とうなどの刺激を加えることで少なくとも SEM 等で観察される形状は違ったものになったであろう。

3. 硫酸還元菌の菌種

硫酸還元菌でも他の菌種のほうが pyrite 生成に適している可能性がある。他の類似実験で用いられていた *Desulfotomaculum*.sp などらせん形状のため表面積が大きく、体長も大きい。硫酸還元過程も若干異なる。他の菌種への応用は今後の課題としたい。

4. 他の微生物の影響

序に示したように、底質中にはさまざまな微生物が存在し、S の循環に関わるものだけでも、硫酸還元菌の異化的硫酸還元のほか、同化的硫酸還元を行うもの、 SO_4^{2-} は還元しないが S を還元する硫黄還元菌、また硫黄酸化細菌などが存在する。これらの微生物が直接あるいは間接的に関与することで、pyrite 生成が促進されることも考えられる。

結 論

本研究では、底質中の硫酸還元菌が、鉄 - 硫黄系の反応機構にどのような働きをしているかを解明し、パイライト(FeS_2)生成による悪臭低減メカニズムを明らかにするために、多摩川河口域を中心に各地で採取した底質中の硫酸還元菌と鉄化合物の垂直分布の検討を行った。鉄化合物の垂直分布の検討には、非破壊で鉄の化学状態の分析が可能な ^{57}Fe メスバウアー分光法を用いた。その結果、底質中の一定深さごとの生菌数と、パイライト量の分布が比較的よく一致することがわかった。このことから、パイライト生成に硫酸還元菌が何らかの関与をしていることが示唆された。

また、多摩川河口域底質中から単離した硫酸還元菌 (*Desulfovibrio* sp.) を、硫化鉄生成に必要な Fe^{2+} イオン (40ppm, 80ppm, 200ppm の3種類の濃度を設定) と SO_4^{2-} イオンを含む培地中で嫌氣的条件下、30℃にて培養実験を行った。培養期間がそれぞれ数日～420日間の各段階で、培養液中に生成した沈澱を遠心分離後、凍結して生物活性を止めた。この固体試料を、空気を通さないパウチ袋に密封し、液体窒素温度における ^{57}Fe メスバウアースペクトルを測定した。その結果、培養する際の鉄濃度が生成物の状態変化に影響することが分かり、単に還元のプロセスで生成される硫黄化学種と Fe^{2+} が反応する以上の、複雑な反応が起こっていることが推測された。この培養実験においては、もともと framboidal pyrite を作ることを一つの目標として、いくつかの培養条件を試したが、完全な framboidal pyrite の生成には至らなかった。従って、本培養実験での議論の中心は、鉄 - 硫黄を含む水溶液中で硫酸還元菌の存在によって、どのような生成物が生じ、420日間という長期培養の間にどう変化したかということになっている。

培養実験では、硫酸還元菌の生育に伴って黒色沈殿が生成し、得られた生成物は非晶質の硫化鉄化合物を主成分としていることが、電子顕微鏡レベルでも、XAFS によるバルク分析でも明らかであった。そして、メスバウアー分光法によるスペクトル変化の考察から、その生成過程は熱力学的にも比較的安定な非晶質 pyrrhotite を生成し、これを前駆体として pyrite を生成するものと考えられた。また、pyrrhotite 生成に関し、マイナス電荷を帯びた硫酸還元菌の膜外に吸着されやすい Fe^{2+} と、菌の内側から放出される種々の中間酸化状態の硫黄化学種が硫酸還元菌の体表面付近で反応し、硫酸還元菌の体表面に pyrrhotite-like 生成物を析出する。余剰の硫黄化学種が、試験管の壁面を核として Fe^{2+} と反応して生成したものは、無機的合成で生成する mackinawite と似た性質をもつ。そして、菌の体表面付近に生成した pyrrhotite-like 生成物は、菌体内のおそらくは鉄 - 硫黄タンパクと考えられるものから、不足する S を供給され、pyrite-like の球状生成物へ成長していくと推測

された。膜を介して局所的に過剰な濃度となるため、無機合成では起こりえない低温での反応が起こるものと考えられた。また、こうして硫酸還元菌をくすみ込み、粒子が集まって凝集体を作っていく傾向も見られた。

培養実験の結果からは、菌が生育するために積極的に硫化鉄化合物を作るかどうかは不明だが、菌が pyrite 生成に有利な反応物および反応の場を供給していることは明らかで、広義のバイオミネラリゼーション^{54), 55)}ということができるであろう。いずれにせよ、無菌的に生成した硫化鉄は、これらの生成物とは全く異なるスペクトルを示し、パイライトの生成およびそれに伴う悪臭低減に硫酸還元菌が関与していることが明らかとなった。

硫酸還元菌は、河口や下流域の嫌気的環境下で活動が活発になり、硫酸イオンを硫化水素に還元する。そのため、本来は、悪臭発生や魚介類の弊死などの問題を招く可能性がある。しかし、本研究で着目したように、底質中の鉄化合物や水中の鉄イオンは、この硫化水素を硫化物として固相に固定することで悪臭低減に寄与している。このことは、底質自体に自然の浄化能が備わっていることを意味すると考えることができる。本研究を通して、底質中の硫酸還元菌が「硫酸を還元する」他に、悪臭低減に役立つパイライトの生成反応にも寄与していることが明らかとなった。今後、さらに検討を重ねることにより、自然の浄化能を生かし、悪臭発生を未然に防ぐ手段を考案することが可能となることが期待される。あるいは、どの程度、悪臭発生に対する自然浄化能が残っているかを、実際に変化が現れる前に評価できる可能性もある。底質中の硫酸還元菌や鉄化合物は、ごく普通に存在するものなので、本研究で得られた知見は、多摩川に限らず他の河川にも広く適用されるものと思われる。また、このことは、硫酸還元菌の働きについて一種のバイオミネラリゼーションという内容が加わるわけで、このような河口域という化学反応の場における物質変換の過程に対して、新たな知見が得られる点でも本研究の意義は大きい。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、硫酸還元菌の培養実験、結果の解析など主要な仕事を仕上げる上で精力的に働いてくださった、東京大学大学院総合文化研究科大学院生小野島直子さんに深く感謝致します。また、共同研究者としてこの研究に加わり、試料採取や各種の分析にご協力いただいた東京大学大学院総合文化研究科 久野章仁助手に厚く御礼申し上げます。同じく共同研究者の東邦大学医学部 杉森賢司講師には、培養実験の遂行に当たり、全面的にご協力いただき、深く感謝しております。東京大学名誉教授の高野穆一郎先生には、研究の要所で貴重なご助言をいただき、厚く御礼申し上げます。東京大学大学院総合文化研究科大学院生 田中佑人君には、相模川および北十間川の試料、東京大学大学院理学系研究科大学院生 片岡正樹君には、谷津干潟の試料をそれぞれ分析していただきました。また、底質のサンプリングに当たっては、研究室に所属する多くの学生にご協力いただきました。ここに感謝の意を表します。

東邦大学医学部の高柳進之輔教授には、クリーンベンチなど培養実験に必要な機材をお貸しいただきました。東京理科大学の中井泉教授には、電子顕微鏡をお貸しいただいた他、XAFS 等に関するアドバイスをいただきました。また、白石洋平氏には、つくば市の無機材料研究所にての透過型顕微鏡の使用に際し、全面的にご協力いただきました。株式会社東洋エコ・リサーチの安部賢策氏には、北十間川のサンプリングの際にお世話になりました。皆様に心から感謝いたします。

とうきゅう環境浄化財団には、この研究遂行のための費用をご援助いただいたばかりでなく、報告書のとりまとめについて、忍耐強い寛容を持って励まして頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 山口辰良：“一般微生物学”，技報堂, p30, p210, (1969)
- 2) 山中健生：“微生物のエネルギー代謝”，学会出版センター
- 3) 中村和憲：“環境と微生物 - 環境浄化と微生物共存のメカニズム - ”，産業図書, p72
- 4) Ishimoto, M. and D.Fujimoto: *J. Biochem*, **50**, 299-304 (1961)
- 5) 上木勝司：“嫌気微生物学”，養賢堂, (1993)
- 6) “Handbook of Geochemistry”，16-L-2
- 7) 山中健生：“無機物だけで生きてゆける細菌”，共立出版, p63, (1987)
- 8) “微生物学実習概要 第2版”，東京大学医科学研究所学友会編, 丸善株式会社, p24, (1998)
- 9) 川西信彦：“最新 微生物学”，講談社サイエンティフィク, (1978)
- 10) 葛西道生：“生体膜 生命の基本形を形づくるもの”，吉岡書店, p24, (1996)
- 11) R.E.Sweeny, I.R.Kaplan:“Pyrite Framboid Formation:Laboratory Synthesis and Marine Sediments”，*Econ. Geol.*, **68**, 618-634 (1973)
- 12) Berner R.A.:“Thermodynamic stability of sedimentary iron sulfides”，*Am. J. Sci.*, **265**, 773-785 (1967)
- 13) 堀秀道：“楽しい鉱物図鑑”，草思社, (1992)
- 14) “分析化学便覧”，p807
- 15) “化学事典”，東京化学同人, (1994)
- 16) 上木厚子：“生物科学 第40巻 第1号”，(1998)
- 17) 日本化学会編：“新実験化学講座8 無機化合物の合成”，丸善, (1976)
- 18) “化学大辞典”，共立出版, p666, (1964)
- 19) R.T. Wilkin and H.L.Barnes:“Pyrite formation by reactions of iron monosulfides with dissolved inorganic and organic sulfur species”，*Geochim.et Cosmochim. Acta*, **60** (21), 4167-4179 (1996)
- 20) Schoonen M.A.A., et al:“Reactions forming pyrite and marcasite from solution . Via FeS precursors below 100 °C”，*Geochim.Cosmochim. Acta*, **55**, 1505-1514 (1991)
- 21) 川上美也子：“メスバウアー分光法を用いた硫酸還元菌による鉄化合物の状態変化に関する研究”，東京大学大学院理学系研究科化学専攻修士論文, (1996)
- 22) Ravin Donald, Gordon Southam:“Low temperature anaerobic bacteria diagenesis of ferrous monosulfide to pyrite”，*Geochemica et Cosmochimica Acta*, **63**, 2019-2023 (1999)
- 23) 滝井進：“多摩川下流域における有機物の嫌氣的分解”，(財)とうきゅう環境浄化財団研究助成報告書, No. 91, (1986)
- 24) S. Takii:“Methanogenesis in Sediments of the Polluted Lower Reaches of the

- Tama River ”, *Jpn. J. Limnol.*, **50**, 235-246 (1989)
- 25) S. Takii, M. Fukui : “ Relative Importance of Methanogenesis, Sulfate Reduction and Denitrification in Sediments of the Lower Tama River ”, *Bull. Jpn. Soc. Microb. Ecol.*, **6**, 9-17 (1991)
 - 26) 北野康 : “ 地球環境化学 ”, 裳華房, (1984)
 - 27) 高野穆一郎 : “ 多摩川河口域における悪臭発生機構に関する基礎研究 - 特に底泥における硫黄起源の悪臭物質について - ”, (財)とうきゅう環境浄化財団研究助成報告書, No.146, (1993)
 - 28) B. Meyer : “ Sulfur Cycles, Sulfur, Energy, and Environment ”, 142-168 (1977), (Elsevier/North-Holland Inc., New York)
 - 29) 塩川二郎 : “ 第2版 機器分析のてびき(3) ”, 化学同人, p43, p112, (1996)
 - 30) 一國雅巳 : “ 物質の科学・分析 - 化学分析入門 - ”, 放送大学 教材, (1999)
 - 31) 宇田川康夫 : “ X線吸収微細構造 - XAFS の測定と解析 - ”, 学会出版センター東京, (1993)
 - 32) 松尾基之 : “ 多摩川底質中に含まれる鉄の化学状態を指標とした環境特性評価に関する研究 ”, (財)とうきゅう環境浄化財団研究助成報告書, (1997)
 - 33) 佐野博敏, 片田元己 : “ メスバウアー分光学 - 基礎と応用 ”, 学会出版センター, (1996)
 - 34) 須藤隆一 : “ 環境微生物実験法 ”, 講談社サイエンティフィック, (1998)
 - 35) Noel R. Krieg et al. : *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, **1** (7), 667
 - 36) 松尾基之 : “ 月刊 地球 号外 ”, **18**, (1997)
 - 37) 三瓶和己 : “ メスバウアー分光法による底質中パイライト鉄の分析法に関する研究 ”, 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻修士論文, (1998)
 - 38) R.A. Berner : *Econ. Geol.*, **64**, 383, (1969)
 - 39) A.Kuno, M.Matsuo, B.Takano : “ Mössbauer spectroscopic study on vertical distribution of iron components in estuarine sediments collected from Tama river in Tokyo ”, *Hyperfine Interactions*, **C3**, 328-331 (1998)
 - 40) 加藤拓弥 : “ 河口域堆積物中の硫酸還元に関する研究 ”, 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻修士論文, (1997)
 - 41) 久野章仁 : “ 河口域堆積物中に含まれる元素の化学状態と垂直分布 ”, 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻修士論文, (1996)
 - 42) 日本化学会編 : “ 化学総説 NO.9 固体の関与する無機反応 ”, 学会出版センター, (1975)
 - 43) D. Ann Brown : “ Precipitation of iron minerals by a natural microbial consortium ”, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **63** (15), 2163-2169 (1999)
 - 44) Joakim Bebie, et al : “ Pyrite and phosphate in anoxia and an origin-of-life hypothesis ”, *Earth and Planetary Science Letters*, **171**, 1-5 (1999)
 - 45) V. S. Rusakov et al : “ Mössbauer study of Crystallization process of amorphous water-containing iron sulfide ”, *Phys. Stat. Sol. (a)*, **144**, K45 (1994)

- 46) C.L.Thompson : “ Mössbauer effect in the eight-iron ferredoxin from *Clostridium pasteurianum* ~ Evidence for the state of the iron atoms ” , *Biochem. J.*, **139**, 97-103 (1974)
- 47) Zhengguo Hu, et al : “ Mössbauer and EPR Studies of *Azobacter vinelandii* Ferredoxin ” , *Biochemistry*, **33**, 14475-14485 (1994)
- 48) Anjos L. Macedo, et al : “ Thiol/Disulfide formation associated with the redox activity of the [Fe₃S₄] Cluster of *Desulfovibrio gigas* Ferredoxin ” , *The J. Biological Chem* , 18, **269** (11) , 8052-8058 (1994)
- 49) Yu.N.Kaurov, et al : “ Inorganic Fe²⁺ formation upon Fe-S protein thermodestruction in the membranes of thermophilic cyanobacteria : Mössbauer spectroscopy study ” , *FEBS letters* , **450**, 135-138, (1999)
- 50) S.Schultze-Lam, et al : “ Mineralization of bacterial surfaces ” , *Chem. Geol.*, **132**, 171-181 (1996)
- 51) James K Fredrickson et al : “ Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium ” , *Geochemica et Cosmochimica Acta*, **62**, 3239-3257 (1996)
- 52) N.S. Ovanesyan et al : “ Vacancy distribution and magnetic ordering in iron sulfides ” , *Soviet Phys. JETP* , **33** (6) , 1193-1197 (1971)
- 53) J.W.A. Kondoro : “ Mössbauer study of vacancies in natural pyrrhotite ” , *J. Alloys and Compounds* , **289**, 36-41 (1999)
- 54) Stephen Mann et al. : “ Biomineralization of ferrimagnetic greigite (Fe₃S₄) and iron pyrite(FeS₂) in a magnetotactic bacterium ” , *Nature*, **343** (18) , (1990)
- 55) 渡部哲光 : “ バイオミネラリゼーション ” , 東海大学出版会, p8, p151

「^{た ま がわていしつちゆう}多摩川底質中^{りゅうさんかんげんきん}の硫酸還元菌^{りゅうかてつかごうぶつせいせい}による硫化鉄化合物生成と

「^{あくしゅうていげん}悪臭低減^{かん}に関する^{けんきゅう}研究」

(研究助成・学術研究 VOL. 34-N0. 250)

著 者 ^{まつお}松尾 ^{もとゆき}基之

発行日 2006年3月31日

発行者 財団法人 とうきゅう環境浄化財団

〒150-0002

東京都渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03) 3400-9142

FAX (03) 3400-9141