

Bacterial mineral formation of covellite in oily hot springs

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-07-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00061669

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



原油を含む温泉水における銅藍の生体鉱物化作用 *

脇元理恵 **・田崎和江 ***

Bacterial mineral formation of covellite in oily hot springs*

WAKIMOTO Rie** and TAZAKI Kazue***

Abstract The inner wall of the Tsukioka hot spring well was covered with green microbial mats which contained black crude oil. The hot spring is located in Tsukioka, Niigata, Japan. The hot spring water (pH 7.3, Eh -184 mV and 49.2°C) that was produced from a 280m in depth originated from fossil seawater. The aim of this study was to investigate of covellite biomineralization in the green microbial mats with crude oil from the Tsukioka hot spring water. Observations by optical and electron microscopy, phospholipid analysis and bacterial cultivation showed that the biomineralization of covellite (CuS) was found on the surface of crude oil droplets. ED-XRF analysis showed that the crude oil contained SO₃ (67.6wt%), CaO (24.8wt%) and Cu₂O (2.6wt%). Observations by optical and epifluorescence microscopy as well as scanning electron microscopy (SEM) showed that two morphological types of bacteria (i.e., filamentous and coccus typed bacteria) were found on crude oil droplets. Transmission electron microscopic (TEM) observations further revealed that the cell wall of the filamentous bacteria had a double membrane and was surrounded by Extracellular Polymeric Substance (EPS), which might provide the favorable nucleation sites for CuS. X-ray diffraction and electron diffraction analyses of the microbial mats showed that the materials precipitated on the surface of the oil droplets were highly crystallized covellite (CuS). FT-IR spectra of the microbial mats that contained covellite showed the appearance of C-N-H, P=O, P-O-C and N-H bands, indicating the presence of phospholipids (lecithin and phosphoric ester) in the microbial mats. Cultivation experiments, furthermore, demonstrated that the cultivated bacteria were identified as sulfate reducing bacteria (for coccus typed bacteria) and oil decomposing bacteria (for filamentous bacteria). A schematic formation model is here suggested to better understand the interaction between bacterial cells and oil droplets under anaerobic conditions in the Tsukioka hot spring water. The biomineralization of covellite described in this study might have profound implications for bioremediation of oil-contaminated site.

Key Words : biomineralization, covellite, crude oil, bacteria, phospholipids, extracellular polymeric substance, Tsukioka hot springs

はじめに

温泉や地下水中には多種多様な微生物が生息し、特有のバイオマツトを形成している (Moyer et al. 1995; Asada and Tazaki 2001). 一般にバイオマツトは、原核生物あるいは単細胞真核生物で構成される構造物で、微生物の増殖と共に厚みを増し、現地の物理化学的環境を反映しながら成長する。その内部では金属イオンの沈積と生体鉱物の生成 (バイオミネラリゼーション) が行われている (若尾 1996; 岸上ほか 1999; 田崎ほか 2002)。例えば Fe と S の鉱物である

schwertmannite の鉱物化に関して、鉄酸化細菌が形成を促進し (Kawano and Tomita 2001), また、微生物および藻類が細胞に鉄を沈着することによって短期間で鉄鉱床を形成する (Akai et al. 1999)。さらに、銅の生体鉱物化作用においては、シアノバクテリアの細胞のサイズによって woodwardite の縞模様がコントロールされる (Watanabe et al. 2003)。

日本有数の石油生産地である北海道、秋田県および新潟県では、石油掘削時に原油とともに温泉水が噴出している例が多い。微生物と石油の関係については、重油流出事故および土壌の油汚染地域の石油分解菌による汚染環境の修復 (バイ

2005 年 9 月 12 日受付。2005 年 12 月 20 日受理。

* 2004 年日本地質学会第 111 年学術大会 (千葉) にて一部発表。

** 金沢大学大学院自然科学研究科, 〒920-1192 金沢市角間町

Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Kakuma, Kanazawa 920-1192, Japan.

*** 北陸支部・金沢大学大学院自然科学研究科, 〒920-1192 金沢市角間町

Hokuriku Branch, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Kakuma, Kanazawa 920-1192, Japan.

オレメディエーション)の研究がなされている (Bragg et al. 1994; 中川・福井 2003; Chaerun et al. 2004). このような微生物による石油の分解は, 好気的環境下における好気性細菌によるものが一般的であるが, Rueter et al. (1994) は嫌氣的, 硫酸還元条件下においても微生物による原油の分解が活発化される例を報告している. しかし, 石油分解に伴われて形成される生体鉱物については, Yushkin (1998) が走査型電子顕微鏡で形態を観察しているのみである.

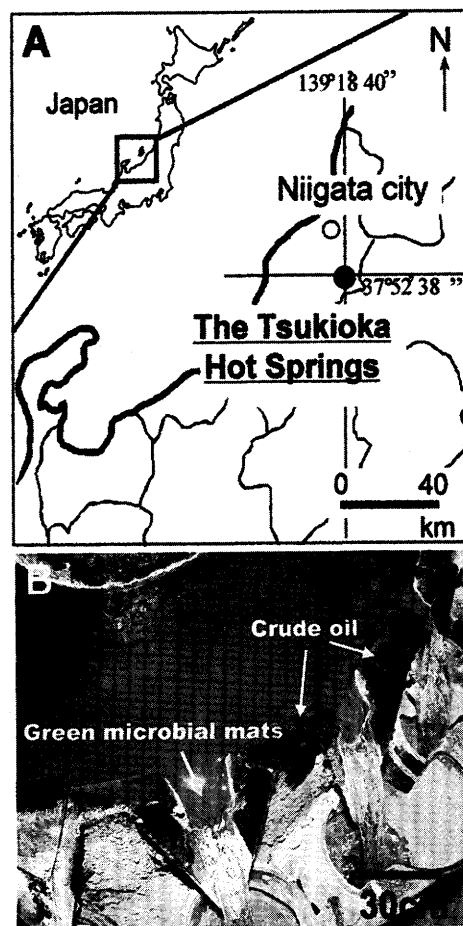
本研究では, 原油を多量に含む温泉水が噴出している新潟県新発田市月岡温泉の源泉井戸に形成する緑色バイオマット中で認められた銅藍 (covellite; CuS) の生体鉱物化作用について報告する. 一般に, 地球表層部において銅鉱物の多くは硫化銅鉱物として存在し, 中でも銅藍 (CuS) は chalcocite (Cu_2S), chalcopyrite (CuFeS_2), bornite (Cu_5FeS_4) などと共に普遍的に産出する (Dunn and Muzenda 2001). 無機化学的環境下における銅藍の形成は, 一般に $220 \sim 350^\circ\text{C}$ の熱変質作用を受けて起こる (Lusk and Bray 2002). 一方, $2 \sim 50^\circ\text{C}$ の比較的低温では, 還元環境下において Cu の飽和度は増大し, 銅藍の形成が起こると考えられている (Ehrlich et al. 2004). 従来の硫化銅鉱物に関する研究は主に無機化学的な相平衡の中で論じられてきたが, 微生物の細胞浸出液および細胞膜などの有機物が岩石中の硫化銅鉱物を積極的に溶解する例も知られており (Daubree 1862; Duff et al. 1963; Mor and Beccaria 1975; Mcneil and Little 1992), 生体鉱物学的知見からも検討を行う必要がある. また, 微生物が関与した鉱物化作用の研究は, 溶解や溶出に関する化学的データに基づく報告が主であり, 微生物の培養実験を通して得られた生体鉱物をマイクロ・サブミクロンオーダーで観察・分析した例は少ない.

そこで本研究では, 比較的低温 (49.2°C), 常圧の, 温泉-原油-微生物の三者が混合した環境系において, 緑色バイオマット中に銅藍の存在を電子顕微鏡観察で明らかにした. また, 微生物の培養実験により, 銅藍の形成に直接関与する二種類のバクテリアの存在が明らかになったので報告する.

試料および実験方法

試料採取

本研究の調査対象地域である新潟県月岡温泉は新潟平野の油田・ガス田地帯に属する. 貯留岩は新第三紀の寺泊~七谷層相当層, 特に火山岩類中に挟在する泥岩に優れた有効孔隙が確認されている (Tsuchiya 1995; Hirai et al. 1995) (Fig.1A). 月岡温泉は 1912 年, 石油掘削の為に掘られた井戸から原油と共に多量の化石海水である温泉水が噴出したことに起源を有する. 採取できる原油の量が少なかったために油田としては開発されず, 温泉として利用され現在に至っている (島津 2001). 月岡温泉 5 号井戸の源泉水は無色透明で, 440L/分 の湧出量であり, 温泉分析表によれば, 硫化水素発生量は 125.8 mg/l と非常に多い (Fig.1B).



第1図 月岡温泉の位置 (A) と源泉井戸の全体図 (B). 源泉井戸内壁には緑色バイオマット (矢印) が形成し, 原油が付着している (矢印) (C)

Fig.1 Tsukioka hot springs in Niigata Prefecture, Japan. A; Sampling location. B; Overview of the hot spring well. C; Photograph shows the green microbial mats and black crude oil along the wall of the well

2003 年 5 月に月岡温泉の源泉井戸から, 井戸の内壁に付着した黒色の原油と緑色バイオマット (Fig.1C 矢印) を採取した. バイオマット試料は, 滅菌済みのバイアル瓶とゴム製の蓋を用いて採取した. 観察用試料は 2.5% のグルタルアルデヒドで固定した. 分析用試料は温泉水と共に採取し, 4°C に冷蔵して研究室に持ち帰った. 同じく原油試料は滅菌済みのバイアル瓶とテフロン加工の蓋を用い, 冷蔵して持ち帰った. 温泉水試料は 0.2 mm のメンブランフィルターでろ過した後, 硝酸を用いて pH1 以下にして冷蔵, 運搬を行った.

実験方法

源泉の水質測定

温泉水の水質は, 現地において, pH は HORIBA カスタニー LAB pH メーター F-24 を, 酸化還元電位 (Eh) は HORIBA カスタニー ACT Eh メーター D-13 を, 電気伝導度 (EC) は HORIBA カスタニー ACT 導電率メーター ES-12 を, 溶存酸素 (DO) は HORIBA ハンディ溶存酸素メーター

OM-12 を用いてそれぞれ測定を行った。持ち帰った温泉水のうち Na, K については炎光光度法で, Ca, Mg, Total Fe, Mn についてはフレイム原子吸光光度法で, また, Cu についてはフレイムレス原子吸光光度法で定量分析を行った。また, SO_4^{2-} は分光光度法を用いて分析を行った。炎光光度法およびフレイム原子吸光光度法にはセイコー電子工業製 SAS-727 を, フレイムレス原子吸光光度法には同製社 SAS-705V を使用し, 電気金属加熱炉を併用して測定を行った。分光光度法には APEL Model PD-3 にて, 硫酸バリウムによる白濁法 (日本分析化学学会北海道支部編 1994) を用いて測定を行った。

緑色バイオマットと原油の鉱物組成および含有元素

バイオマトの鉱物組成については, 風乾したバイオマト試料を粉末にし, X 線粉末回折 (XRD) 装置を用いて同定した。分析には理学電機製 RINT1200 型 X 線回折装置を使用し, $\text{CuK } \alpha$ 線を用いて電圧 40kV, 電流 30mA で測定した。また, バイオマトおよび原油中の化学組成 (原子番号が Na 以上の元素) については, 日本電子製エネルギー分散型蛍光 X 線分析 (ED-XRF) 装置 JSM-3201 で, $\text{Rh-K } \alpha$ 線源を用い, 加速電圧 30kV で FP (ファンダメンタルパラメーター) - バルク法により半定量分析を行った。バイオマト試料は風乾し, 乳鉢で粉末にしたものをペレット状に加工し分析を行った。採取した原油試料 (Fig.1B) は 2 枚のマイラーフィルムに挟んで分析を行った。

緑色バイオマトの顕微鏡観察

持ち帰ったバイオマト試料については直ちに落射蛍光・微分干渉光学顕微鏡 (落射蛍光装置 EFD-3 および透過型微分干渉装置 NTF-2A) を用いて観察を行った。落射蛍光顕微鏡観察の際には, 微生物の存在を確認するために, DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) 染色を施し観察を行った。微生物は DAPI 染色後, 蛍光顕微鏡下で観察すると DNA が青色を呈し, 鉱物は黄色の蛍光を呈する (Kawai et al. 1999)。また, 原油は産地によって異なる色調の蛍光を示す。

バイオマト試料の微細な表面形態観察は走査型電子顕微鏡 (SEM JERO-JSM-5200LV) を用いて, 加速電圧 15 kV で行った。また, SEM に取り付けられたフィリップス製エネルギー分散型 X 線分析装置 (EDX Philips-EDAX-PV9800STD) を用いてバイオマト試料の元素分析を行った。観察の際には微生物, 鉱物および油滴の形態を保つため, Suzuki et al. (1995) の手法に基づき, 凍結乾燥法を用いた。

さらに微細な微生物の観察は透過型電子顕微鏡 (TEM JEOL-JEM-2000EX) を用いて行った。また, 微生物および鉱物の内部組織の観察を行うため, 超薄切片法を用いて厚さ 80nm の切片を作成し, TEM 観察および電子線回折分析を行った。なお, 超薄切片法ではエタノールでの脱水および有機溶剤による固定を行うため, バイオマト中の油滴は溶解・除去される。

フーリエ変換赤外分光分析とリン脂質分析

緑色バイオマトと原油の化学結合を調べるためにフーリエ変換赤外分光光度計 (JASCO FT/IR-610V) を用いて $4000 \sim 400\text{cm}^{-1}$ の範囲で測定を行った。風乾させたバイオマト試料に赤外透過材料である粉末の臭化カリウム (KBr) 10mg を混合し, 直径 3mm のペレットに整型した後測定を行った。また原油試料は液体用セルを用いて測定を行った。

一方, バイオマトに含まれるリン脂質, 特にレシチン量については Bligh-Dyer 法でクロロホルム, メタノール, KCl 溶液による抽出を行った後, 湿式分解法を用いて測定を行った。モリブデン酸アンモニウムおよび酢酸ブチルにより発色をさせ, 分光光度計 (APEL Model PD-303) を用いて検量線法により測定を行った。なお, この分析法は日本生化学会編 (1991) および日本油化学会編 (1996) の手法に従った。

緑色バイオマト中の微生物の培養実験

バイオマト中に生息する微生物の代謝様式を明らかにするために硫酸還元菌選択培地および石油分解菌選択培地を用いて微生物の培養実験を行った。硫酸還元菌の培地は溶液 1 l 中, KH_2PO_4 : 0.5g, NH_4Cl : 1g, Na_2SO_4 : 1g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 2g, Na-lactate : 1g, Yeast extract : 1g, Resazurin-Na (0.1% 溶液) : 1ml, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.2g, cysteine-HCl : 100mg, Na-ascorbate : 100mg で pH 7.2-7.4 に調節したものを使用した (上木・永井 1993)。培養には滅菌水 10 ml 中にバイオマト 25 g を懸濁させたものを原液として, 培養原液を含む 10 倍希釈溶液を 5 段階作製し, 調製した液体培地 7.5ml を入れた滅菌済み試験管 (シリコン栓付き) にそれぞれ 1ml ずつ加えた。試験管上部を窒素置換し, 嫌気パック中 (アネロパック三菱ガス化学社製) において 30°C , 暗条件下で 3 日間培養を行った。石油分解菌の培地には Bushnell Hass Mineral Salts medium (BHMS) に月岡温泉源泉井戸より採取した原油 1% を炭素源として加えたものを使用した。培地は溶液 1 l 中, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.2g, CaCl_2 : 0.02g, KH_2PO_4 : 1g, K_2HPO_4 : 1g, NH_4NO_3 : 1g, 60 % の FeCl_3 を 2 滴加え, pH を 7.2-7.4 に調節した (Chaerun et al. 2004)。培養は硫酸還元菌培養と同様の培養原液を使用し, 同様の手順で 10 日間の培養を行った。どちらの培地もオートクレーブ (121°C , 20 分) で滅菌し, 培地に加えた原油は 0.2mm のフィルターで除菌したものをを用いた。培養した微生物は落射蛍光・微分干渉光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡により, 形態観察を行った。

結 果

源泉の水質測定結果

月岡温泉水の水質測定結果を Table1 に示す。pH は 7.3 でほぼ中性であり, Eh は -184 mV と非常に還元的な環境を示した。EC は 7.3 mS/cm と比較的高く, DO は 0.8 mg/l と貧酸素環境を示し, 水温は 49.2°C であった。また, 原子吸光および分光光度分析の結果は, Na^+ が 1375.1 mg/l と非常に高く, また, Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} 濃度も 30 mg/l 以上の値を示し, 化石

pH	Eh (mV)	EC (mS/cm)	DO (mg/l)	WT (°C)	Na ⁺ (ppm)	K ⁺ (ppm)	Ca ²⁺ (ppm)	Mg ²⁺ (ppm)	Mn ²⁺ (ppm)	Total Fe (ppm)	Cu ²⁺ (ppm)	SO ₄ ²⁻ (ppm)
7.3	-184	7.3	0.8	49.2	1375.1	35.3	66.1	30.5	0.3	0.03	n.d.	526.2

n.d. ; not detected

第1表 月岡温泉の水質および化学組成

Table 1 Chemical composition of hot spring water collected from the Tsukioka hot spring well, Niigata, Japan

Component oxides (wt%)	Microbial mats (except hydrocarbon)	Crude oil (except hydrocarbon)
Na ₂ O	13.5	0.3
MgO	1.4	-
Al ₂ O ₃	0.9	-
SiO ₂	3.3	3.9
P ₂ O ₅	1.2	-
SO ₃	17.8	67.6
Cl	14.9	-
K ₂ O	0.8	0.3
CaO	3.1	24.8
CrO	0.1	-
MnO	0.1	-
Fe ₂ O ₃	4.3	0.4
Cu ₂ O	37.2	2.6
ZnO	0.6	-
PbO ₂	0.7	-
Total	99.9	99.9

- ; not detected

第2表 月岡温泉より採取した緑色バイオマットおよび原油の蛍光X線エネルギー分析結果

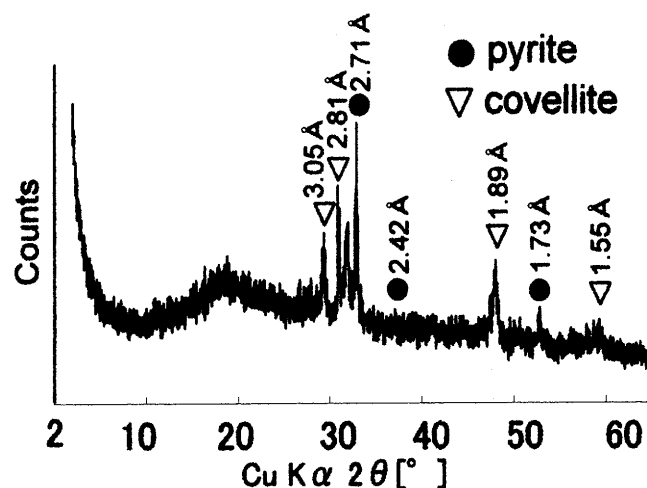
Table 2 Data of energy dispersive X-ray fluorescence analyses of microbial mats and crude oil collected from the Tsukioka hot spring well

海水の影響を示している。また、SO₄²⁻濃度も526.2mg/lと高く、この温泉水が硫酸還元状態である事を示す。しかし、Mn²⁺およびTotal Fe濃度は0.3mg/lおよび0.03mg/lと低く、Cu²⁺については検出限界以下であった。

緑色バイオマットと原油の鉱物組成および含有元素

ED-XRF分析により、緑色バイオマットには、炭化水素以外にも多量のCu₂O (37.2wt%)とSO₃ (17.8wt%)が含まれ、Na₂O (13.5wt%)とCl (14.9wt%)の含有割合も比較的高い事が明らかとなった。また、MgO、SiO₂、Fe₂O₃なども微量に含まれている (Table2)。また、緑色バイオマットと共存する黒色原油試料 (Fig.1B)ではSO₃が炭化水素以外で最も多く含まれており (67.6wt%)、CaO (24.8wt%)が次に高い含有量を示す。SiO₂は3.9wt%含まれており、バイオマット中に多量に認められたCu₂Oの含有量は2.6wt%であった。微量元素としてはNa₂O、K₂O、Fe₂O₃が含まれていた。

XRD分析結果により、バイオマット中には銅藍の反射 (2.81 Å, 1.89 Å, 3.05 Å, 2.71 Å, 1.73 Å, 1.55 Å) が認められた (Fig.2)。また、2θ=20°付近のブロードで弱い



第2図 緑色バイオマトのX線粉末回折分析結果

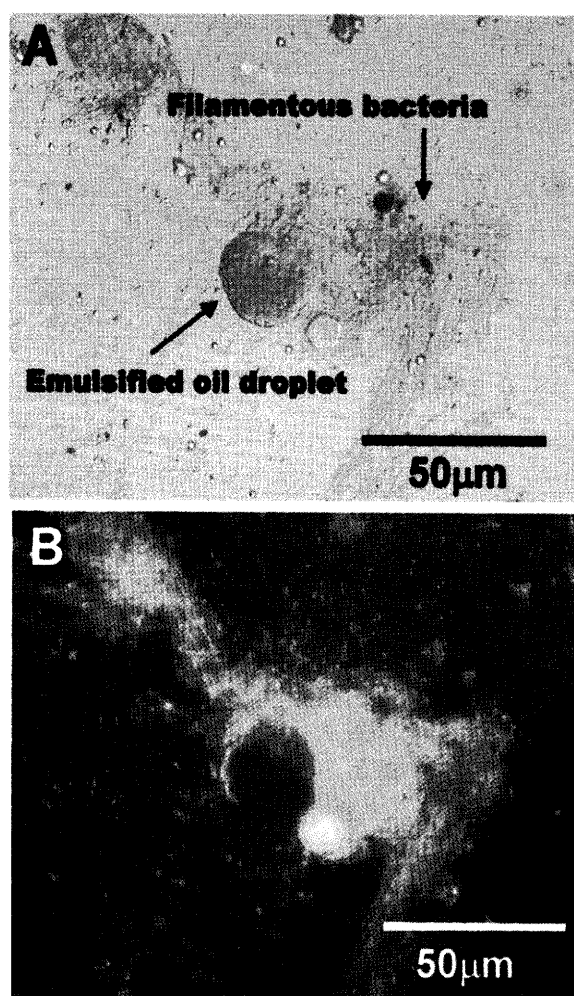
Fig.2 X-ray powder diffraction pattern of green microbial mats showing covellite peaks

反射は非晶質物質および有機物の存在を示す (田中ほか2003)。

緑色バイオマトの顕微鏡観察結果

落射蛍光・微分干渉光学顕微鏡観察の結果、バイオマット中には糸状細菌と球菌の二種類の微生物が多数認められた (Fig.3A, B)。また、バイオマットに含まれる原油は微分干渉光学顕微鏡下では茶褐色を呈し、温泉水と混じりあい、エマルジョンを形成している (Fig.3A 矢印)。一方、蛍光下では暗褐色の発色を呈する。その原油を取り囲むように糸状細菌がコロニーを形成しており (Fig.3A 矢印)、周辺には多数の球菌が散在していた (Fig.3B)。これは、糸状細菌は原油成分を利用して代謝活動を行う石油分解菌で、球菌はその生成物や温泉水中の成分を利用して代謝を行う菌である可能性を示唆している。

凍結乾燥を施したバイオマトの走査型電子顕微鏡観察において、光学顕微鏡観察でも認められた糸状細菌より構成される顕著な網状構造が認められた。バイオマットは幅約1mmの糸状細菌のコロニーによって構成されており、球状の油滴を多数含有している (Fig.4A 矢印)。油滴の大きさは直径約2~10mmと様々で、バイオマット表面に点在している。油滴表面は滑らかであり、SEM-EDX分析では顕著なSのピークと有機物を示すブロードなバックグラウンド (合志・佐藤1989) が認められた (Fig.4B 矢印aは分析点を示す)。ま



第3図 緑色バイオマットの微分干渉光学顕微鏡および落射蛍光光学顕微鏡写真。A；糸状細菌がエマルジョン化した原油に絡み合うように存在している（矢印）。B；DAPI染色を施して蛍光下で観察すると、原油は暗黄褐色を呈し、多くの糸状細菌および球菌は青色の蛍光を発し、微生物の存在が確認された

Fig.3 Optical and epifluorescence micrographs of green microbial mats. A ; Filamentous bacteria observed near brown colored, emulsified oil droplets. B ; Oil droplets show dark-orange color, whereas filamentous and coccus typed bacteria show yellow and/or blue colors under ultraviolet ray

た、油滴周辺には球菌が存在していた（Fig.4B 矢印b）。

さらにSEM観察により、バイオマットに付着した油滴が糸状細菌により取り囲まれている様子が認められた（Fig.4C）。また、微生物が作り出す薄いフィルム状物質（バイオフィーム）に周囲を囲まれた油滴も観察され（Fig.4D 矢印a）、表面のSEM-EDXパターンではP、SiおよびSが多量に検出され、微量のNa、Mg、Al、Cl、K、Ca、FeおよびCuの存在も認められた（Fig.4D 矢印bは分析点を示す）。また、数個の油滴が集まっている箇所でも同様の組織が観察され、バイオフィームが一带の油滴全体を包むように形成されていた（Fig.4E）。そして、バイオフィームで覆われた油滴には板状結晶の集合体が認められ、それらのSEM-EDX分析では、SとCuの強いピークが認められ、銅藍であることが

わかった（Fig.4F 矢印は分析点を示す）。

バイオマットの透過型電子顕微鏡観察では、幅約1mmの糸状細菌の細胞表面に細胞外多糖類（EPS；Extracellular Polymeric Substance）が認められ、そのEPS周辺には球菌も観察された（Fig.5A 矢印）。また、EPSには多数の微粒子が付着していた。バイオマットの超薄切片観察では、糸状細菌は2重構造を示す細胞膜を持つ事が明らかになった（Fig.5B 矢印）。これらの糸状細菌は、ルテニウムレッドによるEPSの染色が認められた事から、グラム陰性菌と同定された（Fig.5B 矢印）。Fig.4Fに示した油滴の表面に形成した銅藍の超薄切片を観察したところ、銅藍集合体の内部は空洞になっている様子が認められた（Fig.5C）。この事は、試料作成時にエタノール処理を施した際、油滴は溶解・除去されたが、油滴表面に形成していた銅藍は、球殻構造を保持したまま残存した事を示唆している。また、 $3.04 \text{ \AA}$ 、 $2.78 \text{ \AA}$ 、 $1.88 \text{ \AA}$ のスポット状の電子線回折パターンを示す事から、これらの集合体が高結晶度の銅藍により構成される事が明らかとなった。

フーリエ変換赤外分光分析とリン脂質分析結果

緑色バイオマットと原油のFT-IR結果をFig.6に示す。バイオマットおよび原油ともに $3200\text{--}3500\text{cm}^{-1}$ に水のO-H伸縮振動に対応する吸収が、 $3284\text{--}3300\text{cm}^{-1}$ にN-Hの吸収、 1633cm^{-1} にC=O結合の吸収が認められる。原油の存在を示す CH_2 、 CH_3 結合は 2920 、 2853cm^{-1} および 1455 、 1375cm^{-1} の吸収で、両試料中に認められた。一方、バイオマットには、 1541cm^{-1} にC-N-H結合を示す吸収が認められ、P=O結合（ 1250cm^{-1} ）および脂肪族のP-O-C結合（ 1029cm^{-1} ）を示す吸収が認められた。これらはバイオマット中の微生物の細胞膜に含まれるリン酸エステルに由来すると考えられる。

バイオマットに含まれるリン脂質、特にレシチン量の分析を行った結果、バイオマット試料2g中に $1.32 \times 106\text{mg}$ のリン量が認められた。この値を数式

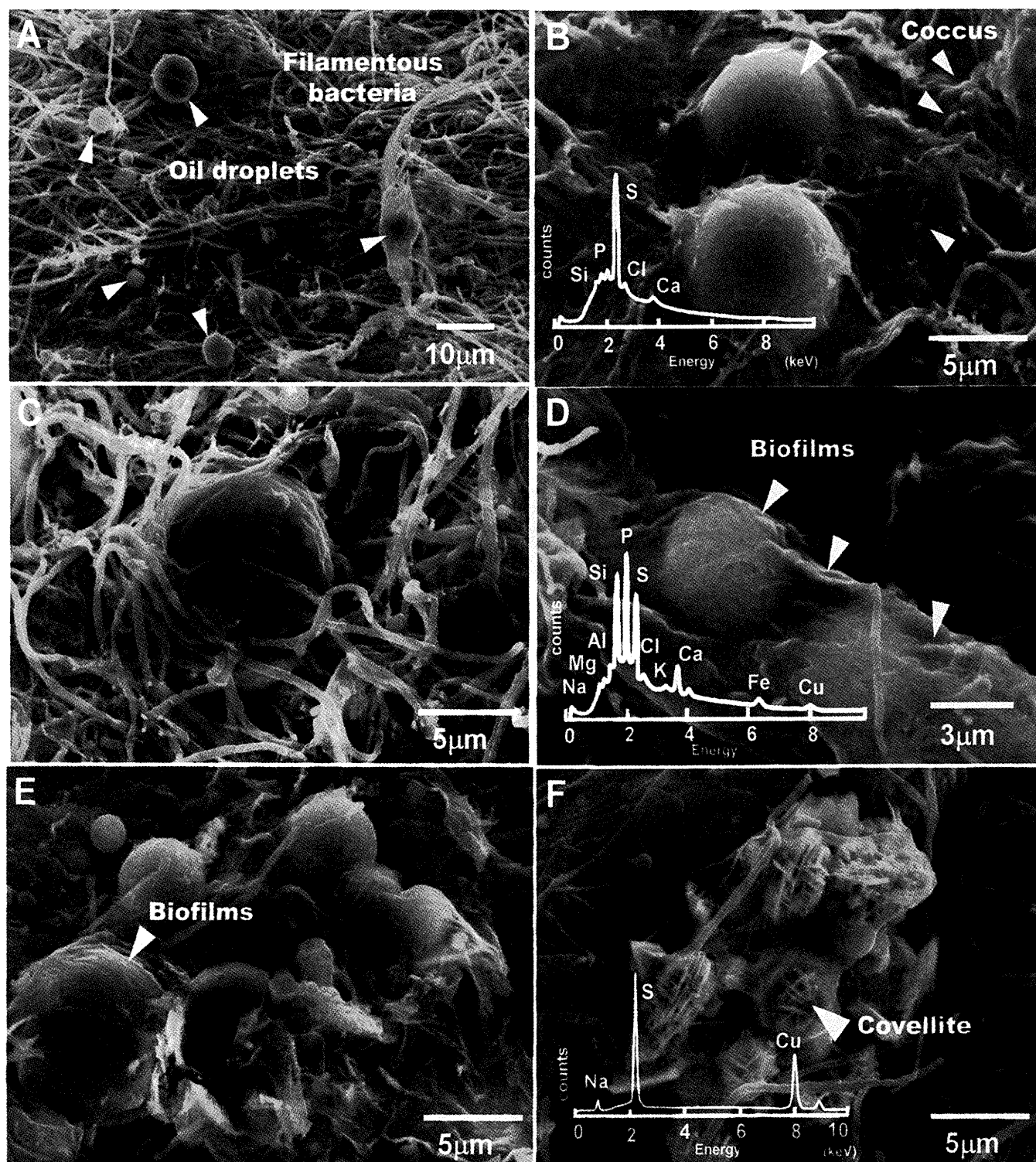
$$\text{リン (mg/g)} = A/B/1000$$

(A：検量線から求めたリン量 (mg)，B：試料採取量 (g))

を用いて計算した結果、リン量は 660mg/g となり、バイオマット全体におけるリン脂質量（特にレシチン量）の割合は約33%を占める事が明らかとなった。以上の結果は、これらの有機物を含む細胞膜表面が、生体鉱物化作用の反応の場になっている事を示唆している。

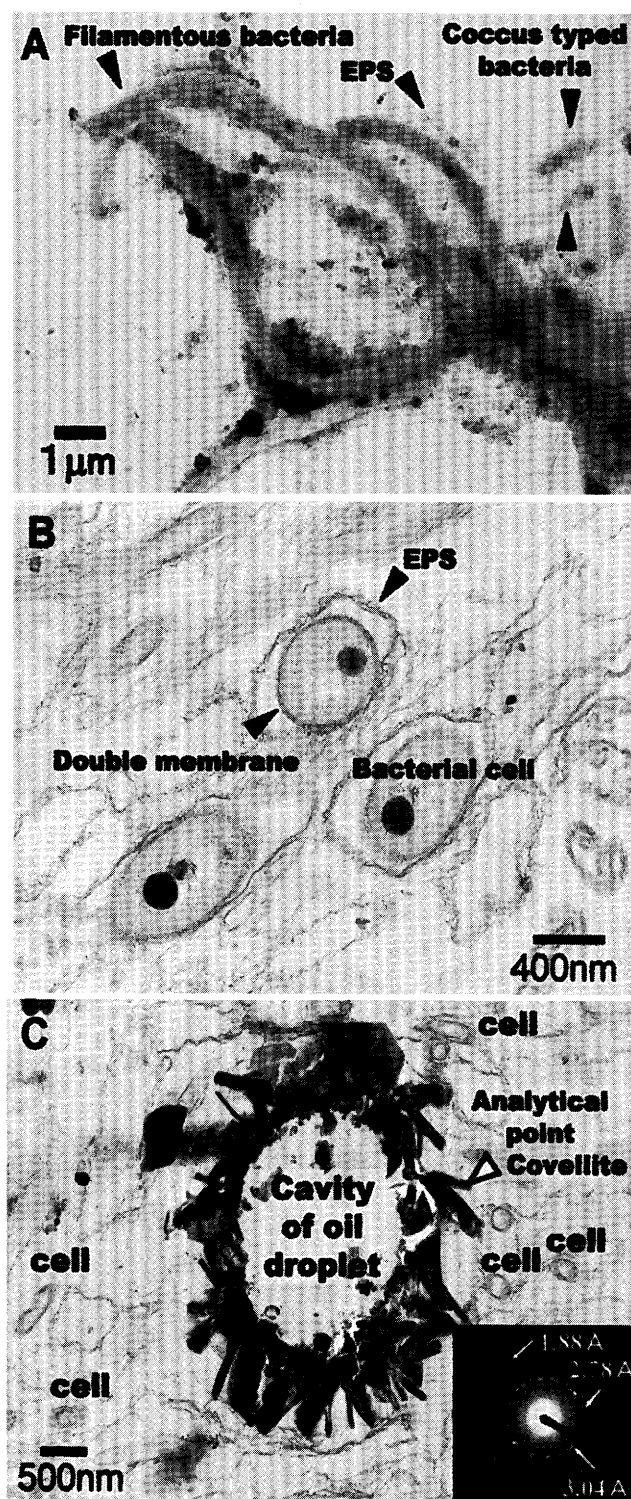
緑色バイオマット中の微生物の培養実験結果

硫酸還元菌培養実験では、培養3日後、培地に黒色沈殿が認められた。これは緑色バイオマット中に硫酸還元菌が生息する事を示している。つまり、硫酸還元菌が硫酸塩を還元して硫化水素を生成させ、それらが培地中に含まれるFeと反応してFeSの黒色沈殿を生成するためと考えられる。試験管上部の沈積物を落射蛍光・微分干渉光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて観察した結果、この硫酸還元菌選択培地にて培養された微生物は球菌である事が明らかとなった



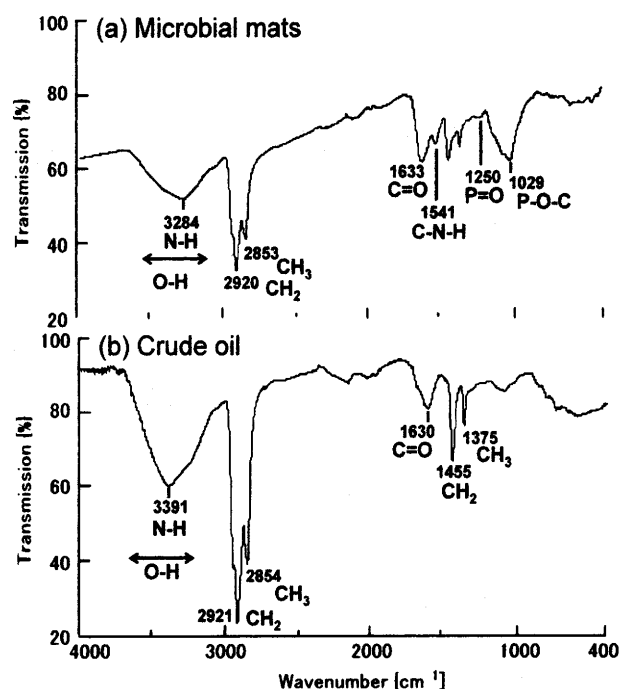
第4図 緑色バイオマットのSEM像およびEDX分析結果. バイオマット表面には多くの糸状細菌と様々な大きさの油滴が存在する(A, 矢印). 油滴の拡大像. 油滴は主にSを含み(B, 矢印a), 周囲には多数の球菌が認められる(B, 矢印b). 銅藍の形成段階をC～Fに示す. 油滴は糸状細菌に取り囲まれ(C), 糸状細菌が作り出す, おもにPを含む薄膜(バイオフィルム)により覆われる(D, 矢印a, b). バイオマット中には大小様々な油滴が存在し, 全体がバイオフィルムにより覆われる(E, 矢印). 完全にバイオフィルムで覆われた油滴表面では, 銅藍の結晶化が認められる(F, 矢印)

Fig.4 SEM micrographs and EDX analyses of green microbial mats. A ; Agglutination of filamentous bacteria with different sizes of oil droplets in microbial mats (indicated by arrows). B ; Magnified oil droplets mainly contain S (an arrow a) surrounded by coccus typed bacteria (indicated by arrows b). Formation processes of covellite mineralization in the oily hot spring water (C-F). C ; The oil droplet is surrounded by filamentous bacteria. D ; Biofilm (an arrow b) which contains P, Si and S covers the mass of filamentous bacteria and oil droplets (arrows a). E ; Wide range in size of oil droplets exists on the microbial mats which are covered with biofilms (an arrow). F ; Covellite biomaterialization has completed and the covellite was formed on the surface of oil droplets and wrapped the oil droplet in biofilms. The crystalline covellite is composed of high S and Cu with trace of Na (an arrow)



第5図 緑色バイオマット中のTEM像。A：糸状細菌の細胞周辺には細胞外多糖類 (Extracellular Polymeric Substance) が認められ (矢印)、EPS 周辺には球菌が存在している (矢印)。B：糸状細菌の超薄切片像。細胞は二重膜を持ち、広範囲にEPSが散在している (矢印)。C：銅藍の内部は、空洞になっており、かつて油滴が存在したが、エタノール処理により除去された事を示している。また、銅藍集合体の周辺にはBで示したような多くの細胞が認められる。電子線回折パターンは銅藍の2.78 Å (103), 1.88 Å (110), 3.04 Å (102) の回折が認められた

Fig.5 TEM micrographs of the green microbial mats containing filamentous bacteria and oil droplets. A ; Many of the filamentous bacterial cells (an arrow) are covered with cohesive EPS (Extracellular Polymeric Substances) (indicated by an arrow). Coccus typed bacteria are also found near the EPS (arrows). B ; Cross-section of filamentous bacteria observed in the green microbial mats. The filamentous bacteria have double membranes and the extra cellular polymeric substances (EPS) (indicated by an arrow). C ; Covellite crystals are observed around the cavity, which are formed through the dissolution of oil droplets. Covellite crystals are surrounded by a number of bacterial cells. Electron diffraction data with dotted and ring patterns are identified as a crystalline covellite (analytical point indicated by white arrow)

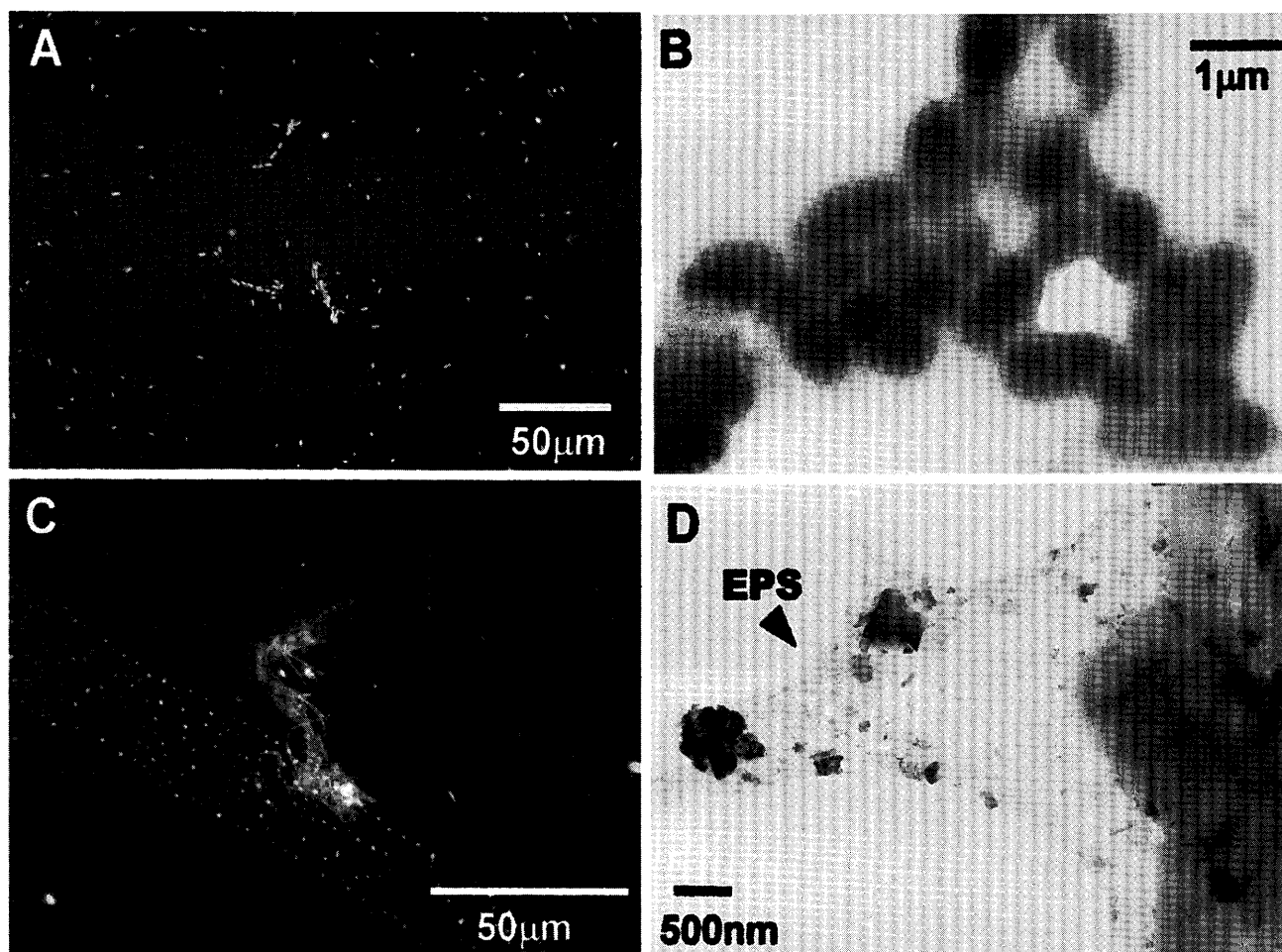


第6図 緑色バイオマット (a) および原油 (b) のFT-IR 分析結果。N-H, C=O, CH₂ および CH₃ 結合は両方の試料に認められ、リン脂質の存在を示すC-N-H, P=O, P-O-C およびN-Hの結合はバイオマット中から認められた

Fig.6 FT-IR spectra of (a) microbial mats and (b) crude oil. N-H, C=O, CH₂ and CH₃ bands are detected in both microbial mats and crude oil. C-N-H, P=O and P-O-C bands are only detected in microbial mats indicating the presence of phospholipids

型電子顕微鏡を用いて観察した結果、この硫酸還元菌選択培地にて培養された微生物は球菌である事が明らかとなった (Fig.7A, B)。球菌は直径1mmほどで (Fig.7B)、局所的にコロニーを形成していた (Fig.7A)。

一方、石油分解菌選択培地により培養された微生物の落射蛍光・微分干渉光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡観察では、バイオマット中に多数認められた糸状細菌と同一の形態を示す細菌の繁殖が認められた (Fig.7C, D)。糸状細菌は幅1mmで、培地中でコロニーを形成しており (Fig.7C)、周囲にEPSを伴う (Fig.7D 矢印)。これらの結果は、バイオマット中に認められた球菌が硫酸還元菌であり、糸状細菌が石油



第7図 硫酸還元菌および石油分解菌の落射蛍光光学顕微鏡写真およびTEM像。A；硫酸還元菌選択培地では球菌の繁殖とコロニー形成が認められた。B；球菌は密接に接触しコロニーを形成する。C；石油分解菌選択培地には糸状細菌の繁殖とコロニー形成が認められた。D；糸状細菌の拡大写真では、EPSが確認された（矢印）

Fig.7 A) Epifluorescence micrographs and TEM micrograph of sulfate reducing bacteria and oil degrading bacteria. A ; Coccus typed bacteria cultivated in sulfate reducing bacterial selective medium (EM). B ; Bacterial cells adhered to one another (TEM). C ; Oil degrading filamentous bacteria cultivated in oil degrading bacterial selective medium (EM). D ; EPS of filamentous bacteria (an arrow) (TEM)

分解菌であることを示す。すなわち、緑色バイオマット中に観察された糸状細菌および球菌はそれぞれ異なる代謝様式をもっていることが明らかとなった。

考 察

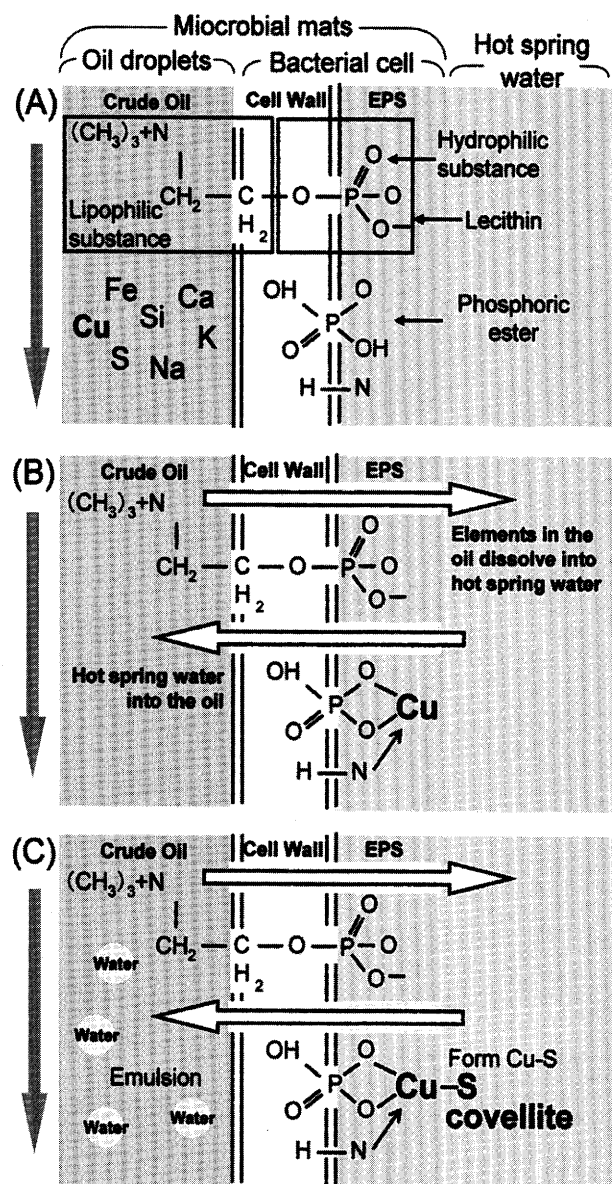
銅藍を形成するCuとSの起源

本研究によって、月岡温泉源泉井戸壁に付着するバイオマット中での銅藍の結晶化作用が明らかとなった。一般に嫌気的環境下での生体鉱物化作用は、微生物が水溶液中の NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 CO_3^{2-} などの陰イオンおよび Fe^{3+} 、 Mn^{4+} などの金属イオンを酸素の代わりに電子受容体として利用し、その結果、微生物の細胞周囲に化学的な沈殿を生じ、結晶化が起るとされている（例えば中川・福井2003）。本研究では、原子吸光分析および分光光度分析により温泉水中に化石海水の特徴を示す高濃度の Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Mg^{2+} および SO_4^{2-} が認められた。一方、温泉水中の Cu^{2+} 濃度は検出限界以下であった。しかしながら、ED-XRF分析により、緑色バイオマット中に

は37.2wt%もの Cu_2O が含まれており、さらに原油中にも2.6wt%の Cu_2O が認められた。これらの結果は銅藍のCuは温泉水由来ではなく、原油由来である事を示す。一方、S成分は温泉水、原油中ともに多量に含まれており、どちらも銅藍の生成に利用可能であると考えられる。

Cu^{2+} の水中への溶出に関する微生物の働き

光学顕微鏡観察においてバイオマット中には多量の糸状細菌および球菌が存在することを確認した（Fig.3）。また、SEM観察では、バイオマット中の糸状細菌が油滴表面を覆っている様子が認められた。この油滴表面に付着した糸状細菌が死後、溶菌して、互いに癒着すると、油滴の周囲にはバイオフィームが形成され则认为られる（Fig.4）。さらにTEM観察では微生物の細胞の外にEPSが広範囲に存在するのを確認した（Fig.5）。このEPSの存在は、微生物細胞が原油に直接触れることなく、原油中の炭素を代謝に利用している可能性を示唆している。また、FT-IR分析、分光光度法分析により、バイオマット中には多量のリン酸エステルやリン



第8図 銅藍形成メカニズムの模式図。細胞膜およびEPSには界面活性作用を持つレシチン、リン酸エステルおよびN-H結合が含まれ (A)、この界面活性作用により原油中のCu元素は温泉水中へ溶出する (B)。溶出したCuはリン酸エステルおよびN-Hと結合し、銅藍を形成する

Fig.8 A schematic mechanisms for the biomineralization of covellite. The interactions between microbial mats (oil droplets, bacteria) and hot spring water are shown in (A)-(C). (A) Phosphoric esters and N-H band are derived from bacterial cell walls and EPS. (B) Osmotic process between crude oil and hot spring water through the bacterial cell membrane. (C) Bio-accumulation process: the bacterial cell walls accumulate Cu-S bonded to phosphoric ester and N-H

脂質 (特にレシチン) が含まれる事が明らかになった (Fig.6)。リン酸エステルおよびレシチンは生物由来の界面活性物質として知られており、ともに細胞膜に含まれている (Ruggirello and Liveri 2003)。Fig.8にリン酸エステルおよびレシチンによる原油成分の溶出メカニズムを示す。レシチンを構成する2分子の脂肪酸部分は疎水性で、グリセロール、リン酸およ

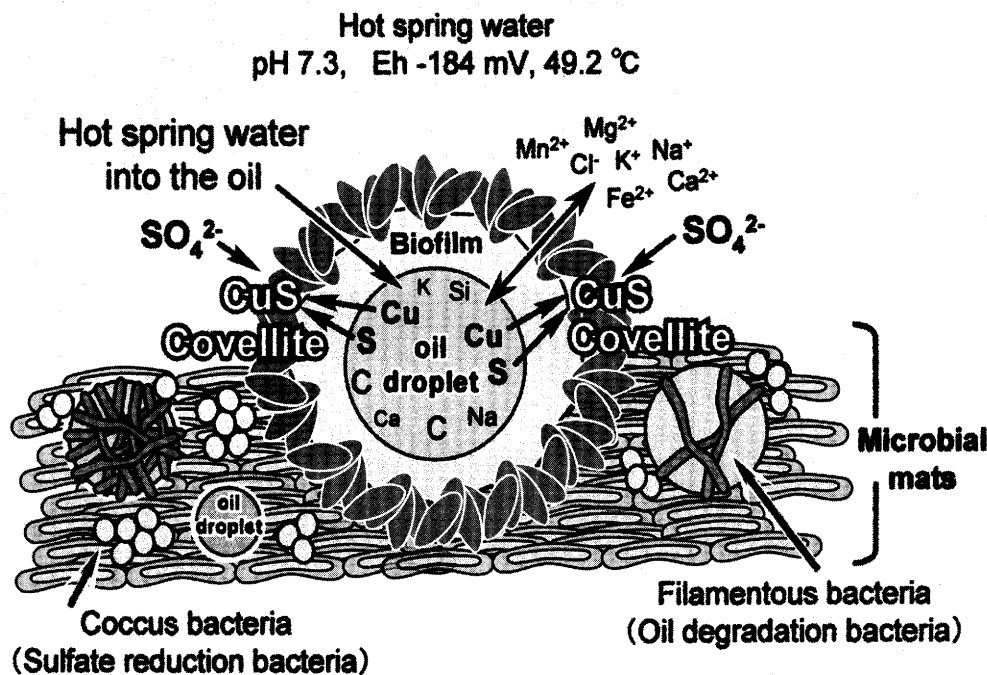
び塩基部分は親水性を示す。この性質により、レシチンは強い界面活性作用を呈する (Urum and Pekdmir 2004) (Fig.8A)。レシチンの界面活性作用により原油成分は容易に温泉水中へ溶出し、Fig.3で観察されたようなエマルジョンを形成すると思われる (Fig.8B)。Liu et al. (1999) はカルボキシル基、アミノ基、リン酸、ヒドラジド基を含むキレート樹脂を合成し、重金属とのキレート形成について研究を行った。その結果、CuイオンはP=O、P-OおよびN-Hとのキレート間で反応を起こすことを報告している。すなわち、レシチンの界面活性作用で温泉水中へ溶出したCuイオンは、P=O、P-OおよびN-Hの結合を持つ細胞膜表面へ吸着した後、細胞膜のリン酸エステルの-O-P-O-、N-HまたはC-N-Hと反応し、-O-P-O-Cu-N-H-のキレート錯体を形成する (Fig.8B)。さらに、微生物は有機物分解の際にリン酸エステルであるイノシトールリン酸を形成し、低溶解性の塩を固定する (Bolt and Bruggebwert 1980) ので、-O-P-O-Cu-N-H-結合が形成され、さらに細胞膜表面ではCu-S結合が生じると考えられる (Fig.8C)。つまり、月岡温泉源泉井戸壁面に付着するバイオマット中における銅藍形成に関しては、以下のようなメカニズムが考えられる。まず、微生物が油滴を取り囲み、後にそれらが溶菌すると油滴表面はバイオフィルムで覆われる。この時、細胞膜やEPSに含まれるリン酸エステルおよびレシチンが界面活性剤の役割をし、原油中の成分は温泉水中に溶出する。溶出したCuイオンは微生物の代謝によりもたらされた有機物と反応し、細胞膜表面にCu-S結合を作り、銅藍が形成される。

銅藍形成のメカニズムと微生物の役割

上述したように、細胞膜表面での銅藍の形成は、微生物の働きで、原油から溶出したCuイオンが温泉水中のSと結合して形成され则认为られる。Brookins (1988) は、硫化銅鉱物は常温、常圧 (25℃, 1atm) の水圏環境では、周囲のpH、Eh環境によって生成する鉱物種が異なる事を報告している。その相平衡図によると、月岡温泉の水質であるpH 7.3、Eh -184 mVの条件下ではCu²⁺とSO₄²⁻が結合してCuSを形成するとされ、本研究結果と整合的である。

なお、月岡温泉源泉中には硫酸還元菌である球菌が存在し、嫌気条件下における硫酸呼吸により、硫化水素と水を発生させていると考えられる。この事は、月岡温泉の硫化水素発生量が多い事と一致している。さらに、硫酸還元菌は単独で生育するだけでなく、他の微生物の嫌氣的分解を抑制する水素イオンの除去も行い、微生物生態系の維持および還元環境の維持に重要な役割を果たしている (上木・永井 1993)。すなわち、月岡温泉水の水質が非常に強い還元環境に保たれている事は、硫酸還元菌の働きによると考えられ、この強還元環境が銅藍の生成を促進しているといえる。

また、嫌氣的な石油分解には電子授与体として硫酸塩が必要となる (坂田 2004)。月岡温泉のバイオマット中に石油分解菌である糸状細菌と硫酸還元菌である球菌が多量に認めら



第9図 月岡温泉源泉井戸におけるバクテリアによる銅藍の生体鉱物化作用の模式図

Fig.9 A schematic model of biomineralization of covellite in the Tsukioka hot springs

れたことは、硫酸還元菌の代謝産物である硫酸塩を石油分解菌が電子授与体として使用して代謝活動を行っている事を示唆している。

温泉水と共に噴出した原油はバイオマット表面に付着すると、石油分解菌である糸状細菌が栄養源を求めて油滴周囲に集まる。また、バイオマット中の油滴周辺では、電子授与体求めて硫酸還元菌である球菌が繁殖を続ける。さらに、油滴表面に集まった糸状細菌は後に溶菌して油滴表面はバイオフィルムで完全に覆われる。その際、細胞膜およびEPSに含まれるリン脂質、特に、界面活性能力を持つレシチンおよびリン酸エステル等の働きにより原油中の成分は温泉水中に溶出し、原油はエマルジョン化する。原油から溶出したCuはリン酸エステル内の-O-P-O-および-N-H-とキレート錯体を形成し、バイオフィルムの表面に蓄積される。pH7.3およびEh -184 mVの環境ではCu-S結合反応が進み、結果として銅藍が形成される (Fig.9)。すなわち、糸状細菌の細胞膜とEPSの存在、および球菌の代謝、水質の還元化によって、銅藍の生成に適した環境が作り出されているといえる。

本研究は、還元環境下における、微生物による重金属の濃集と生体鉱物化作用、特に、微生物細胞膜起源の有機物質が密接に関与した銅藍物の形成メカニズムについて明らかにした。

まとめ

日本有数の石油資源の産地である新潟県月岡温泉の原油混じりの温泉源泉井戸壁面には緑色バイオマットが形成し、その中に顕微的な銅藍の結晶集合体の生成が認められた。源泉

に形成された緑色バイオマット中には石油分解菌である糸状細菌および硫酸還元菌の球菌が共生している。バイオフィルムで覆われた油滴の表面には銅藍の結晶集合体が電子顕微鏡により観察された。FT-IR分析およびリン脂質分析により、微生物の細胞膜および細胞外多糖類 (EPS) には界面活性作用を持つレシチンおよびリン酸エステルの存在が認められた。これらの存在により、原油成分であるCuが容易に温泉水中へ溶出し、バイオフィルム表面でSと結合する事により、銅藍 (CuS) の結晶化が起こる事が明らかとなった。本研究は、嫌気環境下で起こる、微生物による石油分解のメカニズム、および原油に含有される重金属の挙動に伴う生体鉱物化作用について明らかにした。

謝辞 本研究を行うにあたり、月岡温泉「ホテル清風苑」、専務取締役樋口一恵氏およびスタッフの方々には源泉井戸の案内および調査に関してご協力を頂き、感謝申し上げます。また、FT-IR分析の際には金沢大学自然科学研究科奥野正幸博士にご指導頂いた。なお、本研究の一部に文部科学省研究補助金 (代表、田崎和江) を使用した。

文献

- Akai J, Akai K, Ito M, Nakano S, Maki Y and Sasagawa I (1999) Biologically induced iron ore at Gunma iron mine, Japan. *American Mineralogist*, 84 : 171-182.
- Asada R and Tazaki K (2001) Silica biomineralization of unicellular microbes under strongly acidic condition. *The Canadian mineralogist*, 39 : 1-16.
- Bragg JR, Prince RC, Harner EJ and Atlas RM (1994) Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill.

- Nature, 368 : 413-418.
- Bolt GH and Bruggebwert NGH 編 (1980) 土壌の化学, 学会出版センター, 東京, 390p.
- Brookins DG (1988) Eh-pH Diagrams for Geochemistry. pringer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, N.Y., 365p.
- Chaerun SK, Tazaki K, Asada R and Kogure K (2004) Bioremediation of coastal areas 5years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. *Environment International*, 30 : 911-922.
- Daubree GA (1862) Contemporary formation of copper pyrite by the action of hot springs at Bagnes-de-Bigorre. *Bulletin de la Societe Geologique de France*, 19 : 29-32.
- Duff RB, Webley DM and Scott RD (1963) Solubilization of minerals and related materials by 2-ketogluconic acid-producing bacteria. *Soil Science*, 95 : 105-114.
- Dunn JG and Muzenda C (2001) Thermal oxidation of covellite (CuS). *Thermochimica Acta*, 369 : 117-123.
- Ehrlich S, Butler I, Halicz L, Rickard D, Oldroyd A and Matthews A (2004) Experimental study of the copper isotope fractionation between aqueous Cu (II) and covellite, CuS *Chemical Geology*, 209 : 259-269.
- 合志陽一・佐藤公隆編 (1989) エネルギー分散型X線分析—半導体検出器の使い方. 学会出版センター, 東京, 229p.
- Hirai A, Okada S, Wakamatsu S, Miyamoto Y and Yato K (1995) Relation between the crude oil and origin rock in the Niigata area approached on the organic earth science. *Journal of the Japanese Association for Petroleum Technology*, 60 : 87-97.
- Kawai M, Yamaguchi N and Nasu M (1999) Rapid Enumeration of Physiologically Active Bacteria in Purified Water Used in the Pharmaceutical Manufacturing Process. *Journal of Journal of Applied Microbiology*, 86 : 496-504.
- Kawano M and Tomita K (2001) Geochemical modeling of bacterially induced mineralization of schwertmannite and jarosite in sulfuric acid spring water. *American Mineralogist*, 86 : 1156-1165.
- 岸上佳史・桜山和美・田崎和江・上島雅人・渡辺弘明 (1999) 尾小屋鉱山における Cu と Fe の微生物による固定. *地球科学*, 53 : 19-28.
- Liu RX, Zhang BW and Tang HX (1999) Synthesis and characterization of poly(acrylamino-phosphonic-carboxyl-hydrazide) chelating fibre. *Reactive & Functional Polymers*, 39 : 71-81.
- Lusk J and Bray DM (2002) Phase relations and the electrochemical determination of sulfur fugacity for selected reaction in the Cu-Fe-S and Fe-S systems at 1 bar and temperatures between 185 and 460°C . *Chemical Geology*, 192 : 227-248.
- Meneil MB and Little BJ (1992) The use of mineralogical data in interpretation of long-term microbiological corrosion processes: sulfiding reactions. *Journal of American Institute for Conservation*, 38 : 186-199.
- Mor ED and Beccaria AM (1975) Behaviour of copper in artificial seawater containing sulphides. *British Corrosion Journal*, 110 : 33-38.
- Moyer CL, Dobbs FC and Karl DM (1995) Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, Hydrothermal vent system, Loihi seamount, Hawaii. *Appl Environ Microbial*, 61 : 1550-1562.
- 中川達功・福井 学 (2003) 海洋における原油の嫌氣的分解と分解菌モニタリング. *月刊海洋号外*, 35 : 120-128.
- 日本生化学会編 (1991) 新生化学実験講座 4 脂質 II リン脂質. 東京化学同人, 東京, 559p.
- 日本分析化学会北海道支部編 (1994) 水の分析 (第 4 版). 化学同人, 京都, 493p.
- 日本油化学会編 (1996) 基準油脂分析試験法 I . 日本油化学会, 東京, 576p.
- Rueter P, Rabus R, Wilkes H, Aeckersberg F, Rainey FA, Jannasch HW and Widdle F (1994) Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulfhate-reduction bacteria. *Nature*, 372 : 455-458.
- Ruggirello A and Liveri VT (2003) FT-IR investigation of the urea state in lecithin and sodium bis (2-ethylhexyl) phosphate reversed micelles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 258 : 123-129.
- 坂田 将 (2004) 天然ガス・石油と地下生物圏の関わり, 2004 年度堆積学会講演要旨集, 5.
- 島津光夫 (2001) 新潟温泉風土記. 野島出版, 新潟, 140p.
- Suzuki T, Shibata M, Tanaka K, Tsuchida K and Toda T (1995) A new drying method: low vacuum SEM freeze drying and its application to plankton observation. *Contribution to the Bulletin of Planktonic Society of Japan*, 42 : 53-62.
- 田中誠之・飯田芳男 (2003) 機器分析. 裳華房, 東京, 394p.
- 田崎和江・朝田隆二・池田頼正 (2002) 水面に短時間で発生する鉄生体鉱物の薄膜. *粘土科学*, 42 : 21-36.
- Tsuchiya N (1995) Late Miocene to Pliocene volcanism and reservoir formation in the Akita-Yamagata Oil Field, northeast Japan. *Bulletin of the Geological survey of Japan*, 50 : 17-25.
- 上木勝司・永井史郎 (1993) 嫌気微生物学, 養賢堂, 東京, 323p.
- Urum K and Pekdemir T (2004) Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere*, 57 : 1139-1150.
- Watanabe H, Tazaki K, Islam ABMR and Chaerun SK (2003) Copper biomineralization with banded structure at Dogamaru mine, Shimane Prefecture, Japan. In : Tazaki K (ed), *Water and Soil Environments, Microorganisms play an important role*, 93-140, 21st century COE Kanazawa University Long-and Short-term Dynamics of Pan-Japan Sea Area ; Environmental Monitoring and Prediction.
- 若尾紀夫 (1996) 酸性鉱山水中の鉄酸化バイオマット. *月刊地球*, 18 : 56-60.
- Yushkin NP (1998) Hydrocarbon crystals as protoorganisms and biological systems predecessors. Invited Paper, Part of the SPIE Conference on Instruments, Methods, and Missions for Astrobiology, 3441 : 234-241.

脇元理恵・田崎和江. 2006. 原油を含む温泉水における銅藍の生体鉱物化作用. 地球科学, 60, 275-286.
WAKIMOTO Rie and TAZAKI Kazue. 2006. Bacterial mineral formation of covellite in oily hot springs. Earth Science (Chikyu Kagaku), 60, 275-286.

要 旨

新潟県月岡温泉は、原油と共に噴出した pH7.3, Eh -184mV, 49.2℃の化石海水型の温泉で、その源泉井戸には黒色の原油と緑色バイオマットが存在する。このバイオマット中には糸状細菌および球菌が存在し、銅藍 (covellite; CuS) の鉱物化が認められた。銅藍の構成元素である Cu は原油に由来している。SEM 観察により、油滴表面での糸状細菌のコロニー形成および溶菌作用によるバイオフィルムの形成が認められ、さらに、その表面に銅藍の結晶化が認められた。微生物の培養実験により、バイオマット中には石油分解菌である糸状細菌と硫酸還元菌である球菌が同定された。さらに、有機結合およびリン脂質分析により、バイオマット中のリン脂質、特に、界面活性作用を持つレシチンおよびリン酸エステルが存在が明らかになった。また、糸状細菌は二重膜および細胞外多糖類 (EPS) を持ち、リン脂質はこの部分に含まれると考えられる。糸状細菌はバイオマット表面に付着した油滴を栄養源とし、球菌が生成した硫酸塩を電子授与体として代謝を行い、溶菌後、バイオフィルムを形成する。油滴中の Cu は温泉水中に溶出し、中性で還元的な環境下において銅藍の結晶を形成する。すなわち、本研究において、石油分解菌の細胞膜および EPS の有機界面活性作用と硫酸還元菌による水質の還元化が、油滴表面での銅藍の形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。この結果は、土壌および地下水圏の石油汚染地域における石油の分解・除去メカニズムの解明の糸口となると考えられる。