

論文

# バイオ・カオリナイトのクラスター観察

朝田隆二\*・田崎和江\*\*

\*金沢大学大学院自然科学研究科

\*\*金沢大学理学部

〒920-1192 石川県金沢市角間町

## Observation of Bio-kaolinite Clusters

Ryuji ASADA\* and Kazue TAZAKI\*\*

\*Graduate School of Natural Science and Technology,  
Kanazawa University, Kakuma, Kanazawa,  
Ishikawa 920-1192 Japan

\*\*Faculty of Science, Kanazawa University,  
Kakuma, Kanazawa, Ishikawa 920-1192 Japan

### Abstract

Microbiogenic kaolinite (bio-kaolinite) was observed on the surface of microorganisms in cultured biomat from water-soil system under natural conditions. The bio-kaolinite exhibits several different structural and micromorphological characteristics from that of usual standard kaolinite. Optical and electron microscopic observation revealed that very thin bio-kaolinite film covered on the surface of microorganisms. This kaolinite indicates almost the same XRD and EDX patterns except its high background. However, FT-IR analyses, exhibits characteristic absorptions of O-H ( $3651\text{ cm}^{-1}$ ), C-H and C-N ( $2925$ ,  $1454$  and  $1420\text{ cm}^{-1}$ ) bands indicative of organic origin. Atomic force microscopic observations also disclosed that orientated nano-meter scale bio-kaolinite formed clusters.

**Key words:** bio-kaolinite, cluster, biofilm, FT-IR, atomic force microscopy (AFM)

### 1. はじめに

粘土鉱物は岩石・鉱物が風化作用、続成作用、変質作用を受けて生成されると言われている。特に、代表的な粘土鉱物であるカオリナイトは、火

山岩の熱水変質や、雲母・長石・火山ガラスなどの風化作用で生成し、主に堆積岩、土壤中に産する<sup>1,2)</sup>。カオリナイトの生成については、主に、物理的、化学的に研究がされてきた<sup>3-9)</sup>。しかし、近年、粘土鉱物の生成に、このような物理的、化学的な側面だけでなく、微生物の関与が指摘され

るようになった<sup>10-17)</sup>。例えば、温泉、河川にみられるバイオマット中で微生物が自生鉱物として粘土鉱物を生成したり<sup>17)</sup>、自然条件下での培養実験において、桿菌や球菌のコロニーで構成されるバイオマット中で層状珪酸塩鉱物が形成されていることなどが報告されている。また、藻類の細胞壁をベントナイトが覆っていること<sup>13)</sup>や釉薬として用いられる珪石の水溶液中に生成したバイオマット中でシアノバクテリアがハロイサイトを形成している<sup>14)</sup>など、様々な環境下で、微生物と粘土鉱物の相互作用が認められている。

一方、粘土鉱物はその微細な粒子表面の吸着作用や触媒作用によって生物活動と深く関わっているため、その有用性の追求だけでなく、生命の起源や進化を探究する分野でも、生命体と粘土鉱物との相互作用について多くの研究がなされてきた<sup>18-21)</sup>。粘土は原始地球が形成された時点から存在し、その粘土と水が存在する環境下において、生命が誕生したという説がある<sup>21)</sup>。それは、生命の前駆体として粘土は鋳型の役割をし、その場で遺伝子複製が行われたという考え方である。また、グリシン水溶液にカオリナイトを加えて水とと蒸発を繰り返すことで5量体ができること、カオリナイトの存在下では、リボースなどは安定に存在すること<sup>22)</sup>など、有機物と粘土鉱物の相互作用から生命誕生へのアプローチもされている。

本研究では堆積物と水溶液を用いた自然条件下での培養実験において微生物によって生成したカオリナイトについて、その表面形態と化学結合からそのカオリナイトが明らかに微生物起源であることを確かめた。なお、本研究において、微生物が関与して生成したカオリナイトをバイオ・カオリナイトと呼び、標準試料である粉末のカオリナイトと区別した。微生物のコロニー中に生成したバイオ・カオリナイトのクラスターについて、光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡および原子間力顕微鏡を用いて観察を行った結果、クラスターの単位や配列の方向性など新しい知見を得たので報告する。

## 2. 試料および分析方法

### 2.1 試料

ブラジル、ポルトアレグレのPasso Real Damより採取した赤褐色のダム堆積物(カオリナイトを主とする)20gに北海道阿寒国立公園オンネトー湯の滝に生成する黒色の堆積物(ブーセライトと微生物を含む)1gを混合し、そこに蒸留水100mlを加えて室温に静置した。なお、自然培養実験は外部からの殺菌の混入を防ぐためフタをし、太陽光の当たる場所で行なった(Fig.1A)。混合液はすぐに凝集沈殿し、透明になりpH6.0を示した。本研究では、1998年11月9日に自然培養実験を開始し、2000年1月24日に生成されたバイオフィルムを観察した。観察時のpHは7.4であった。なお、容器の壁面、堆積物表面及びスライドガラスの表面全体に黄褐色のバイオフィルムが2~3ヶ月で生成し、日数を経過するに従って、厚くなり、約1年後には、0.01~0.1mmの厚さとなった。バイオフィルムは非破壊で、フィルムのまま、下記の分析を行った。なお、比較のために、熱湯を加え、殺菌した試料も平行して実験を行なったが、バイオフィルムの形成は認められなかった。

### 2.2 分析方法

#### 2.2.1 光学顕微鏡観察

生成したバイオフィルムをそのまま、スライドガラスにのせ微分干渉顕微鏡(Nikon OPTIPHOT-2)を用いて観察した。バイオフィルム上の微生物の存在を確かめるために、DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)で染色した試料を微分干渉顕微鏡に付属している落射蛍光装置を用いて観察した。生きている菌はDNAが青色を呈し、その存在が確認できる。

#### 2.2.2 エネルギー分散型蛍光X線分析

バイオフィルム及び培養液の化学組成を調べるために、エネルギー分散型蛍光X線分析装置(JEOL JSX-3201, Rh-K $\alpha$ 線源)を用い、加速電圧30kVでFP-バルク法により定性分析を行った。バイオフィルムは自然乾燥させ、マイラーフィルム上に貼り付け定性分析を行った。また、バイ

オフィルム生成後の培養液を数滴、マイラーフィルム上で自然乾燥させ、同様に定性分析を行った。

### 2.2.3 X線粉末回折分析

出発物質であるブラジルのダム堆積物(AG023)および自然培養実験で生成したバイオフィーム中の含有鉱物を調べるために、X線粉末回折分析(理学電機製RINT1200)を行った。ダム堆積物は粉末に蒸留水を加えスライドガラスに塗布し、バイオフィームは非破壊で、そのままスライドガラス上にすくい取り、両試料とも自然乾燥させた。試料は、Cu K $\alpha$ 線照射で $2\theta=3\sim 65^\circ$ の範囲で測定した。

### 2.2.4 走査型電子顕微鏡観察およびエネルギー分散分析

走査型電子顕微鏡(JEOL JSM-5200LV)を用いて、バイオフィームの観察を行った。試料は1)自然乾燥後、そのままカーボン蒸着して、観察、2)微生物をより詳細に観察するためにぬれた状態で凍結乾燥し、蒸着せずに観察する方法も行った。凍結乾燥の際、試料はt-ブチルアルコールでバイオフィームを表面固定し、液体窒素で凍らせて、低真空状態で観察を行った。なお、凍った試料は装置内で昇華させることにより、自然の状態が観察できる。一方、構成元素の組成は、走査型電子顕微鏡に取り付けられたエネルギー分散分析装置(PHLLIPS EDXA PV2000EX)を用い、加速電圧15 kVで定性分析した。

### 2.2.5 透過型電子顕微鏡

支持膜のないマイクログリッドにバイオフィームの薄い部分を直接載せて、自然乾燥後、無蒸着で透過型電子顕微鏡(TEM)(JEOL, JEM-2000EX, 加速電圧120kV)を用いて観察を行った。

### 2.2.6 原子間力顕微鏡観察

TEMで認められたバイオ・カオリナイトの最表面の微細形態をより詳細に調べるために、原子間力顕微鏡(AFM)(JEOL, JSTM-4200D)を用いて観察を行った。バイオフィームの薄い部分を1cm四方のシリコンウエハーの上に直接載せて自然乾燥後、走査針を試料にあてて画像を得る

コンタクトモードおよび走査針を試料にあてないで画像を得るACモードの両方で観察した。

### 2.2.7 フーリエ変換型赤外線分光分析

バイオ・カオリナイトと標準試料であるカオリナイトAPI62(Cornwall, UK)の化学結合状態を比較するために、フーリエ変換型赤外線分光光度計(FT-IR)(日本分光FT/IR-610)を用いて測定を行った。乾燥させたバイオフィームを約30  $\mu\text{g}$ と赤外透過材料の粉末臭化カリウム(KBr)10 mgをメノー乳鉢で混合し、MP-1型マイクロ錠剤成形器とMT-1型ミニプレスを用いて、直径3 mmの錠剤を作成し、400~4000  $\text{cm}^{-1}$ の波数域で測定した。

## 3. 結果

### 3.1 光学顕微鏡観察

光学顕微鏡観察の結果、Fig.1 B~Fに示すように、バイオフィーム中には、多種多様の微生物が認められた。その形態、大きさ、クロロフィルの有無により5種類に分類できる。バイオフィーム上には糸状の藻類(幅2  $\mu\text{m}$ 以上, Fig.1 ①), 球状の藻類(直径1  $\mu\text{m}$ 以上, Fig.1 ②), 数珠状になっているシアノバクテリア(短径約2  $\mu\text{m}$ , Fig.1 ③), 糸状のバクテリア(幅約1.5  $\mu\text{m}$ , Fig.1 ④), 球菌(1  $\mu\text{m}$ 以下, Fig.1 ⑤)の存在が認められる(Fig.1 B~F)。微分干渉顕微鏡観察により、バイオフィーム上には主に幅約1.5  $\mu\text{m}$ の糸状のバクテリアがほとんどすべての場所で生息しており、その中に幅約6  $\mu\text{m}$ 程の糸状の藻類、球状の藻類(直径約7  $\mu\text{m}$ )、数珠状の短径約2  $\mu\text{m}$ のシアノバクテリアが共生していることが明らかである(Fig.1 B~F)。糸状の藻類は凝集したり塊状にはならず、糸状のバクテリアの間を縫うように存在し、球状の藻類もまた、分散して存在している。

落射蛍光顕微鏡観察において、シアノバクテリアは分散しながら、一部コロニーを形成して存在し、その中には球菌も多く認められる(Fig.1 C, F)。糸状のバクテリアは510~560 nmの波長の可視光照射により、赤色の蛍光を発生し、クロロフィルの存在を示すが、糸状の藻類、シアノバクテリ

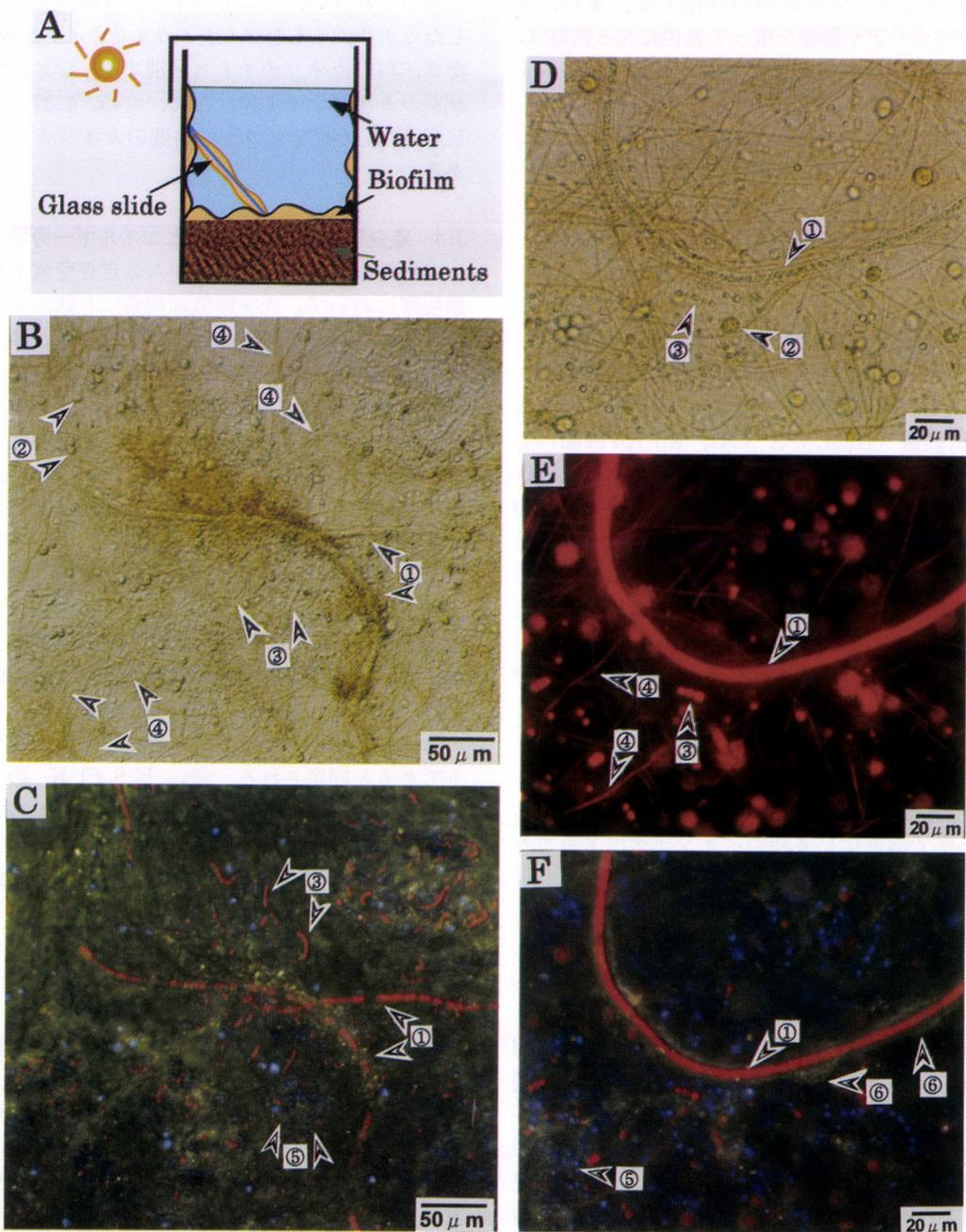


Fig.1 (A) A schematic diagram of a natural cultivation system showing a biofilm formation on a glass slide, a wall of beaker and surface of sediments. (B~F) Optical micrographs of bio-kaolinite showing mixture of microorganisms associated with kaolinite particles (arrow, ⑥). B, D; Optical micrographs of microorganisms (arrows ①-④) associated with bio-kaolinite. C, F; Epifluorescence micrographs of DAPI-stained bio-kaolinite (arrows ⑥) and cocci (arrows ⑤). E; Microorganisms excited with light from 510 to 560 nm. (Arrows ① : filamentous algae, Arrows ② : spherical algae, Arrows ③ : cyanobacteria, Arrows ④ : filamentous bacteria, Arrows ⑤ : cocci, Arrows ⑥ : bio-kaolinite)

アに比べてその蛍光は弱い(Fig.1 E)。また、糸状のバクテリアや藻類を覆って黄色に光る物質は、後述する XRD 分析結果から、バイオフィルム上で生成したカオリナイトの存在を示す(Fig.1C, F)。なお、カオリナイトは黄色の自家蛍光をもつため、カオリナイトが糸状の藻類の細胞壁にある一定の間隔を空けて生成していることが認められた(Fig.1 F)。これは細胞壁とカオリナイトの間に何らかの粘着物質があることが示唆される。

### 3.2 培養液の化学組成及び出発物質の鉱物組成

バイオフィルム形成後の無色透明の培養液について、その溶存物質をエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (JEOL JSX-3201, Rh-K $\alpha$ 線源) を用いて、定性分析を行った。培養液中には C, O, Na, Mg, Al, Si, P, S, K, Ca 及び弱い Fe の反射が認められ、特に、S の存在が顕著である(Fig.2 A)。なお、Rh のピークは分析装置由来の元素であり、試料中のものではない。培養に用いた赤褐色のダム堆積物の粉末 X 線回折分析において、石英(3.35 Å)、クリストバライト(4.05 Å)及びカオリナイト(7.23, 4.45, 4.26, 3.58, 2.49 Å)の反射が認められた(Fig.2B)。また、オンネトー湯の滴の黒色堆積物は、ブーセライトの反射(10.1, 5.0, 2.4 Å)を示した。すなわち、堆積物から pH6~7 で溶液中に多様なイオンが溶出することを示している。

### 3.3 バイオフィルムの化学組成及び鉱物組成

エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (JEOL JSX-3201, Rh-K $\alpha$ 線源) を用いて、バイオフィルムの定性分析を行った。バイオフィルムには強い Al, Si, S, K, Ca, Ti, Mn 及び Fe の他に、弱い C, O, Mg, P の反射が認められた(Fig. 3A)。特に、カオリナイトの成分である Al, Si, S, Fe の存在が顕著である。なお、前述のように、S 成分は溶液中にも多量に存在している。また、そのバイオフィルムの粉末 X 線回折分析において、カオリナイト(7.13, 4.43, 4.23, 3.55, 2.49 Å)、石英 (3.33 Å) 及びクリストバライト (4.03 Å) の反射が認められた他、4~3 Å にかけてバックグラウンドが高く、非晶質物質の存在が示唆される(Fig.3 B)。なお、S や Fe を持つ鉱物の反射

は認められない。ここでバイオフィルム上で生成したカオリナイトをバイオ・カオリナイトと呼び、標準試料のカオリナイトと区別する。なお、標準試料のカオリナイトは、7.38, 4.45, 4.37, 3.57, 1.49 Å に反射をもつ高結晶度のカオリナイトである。

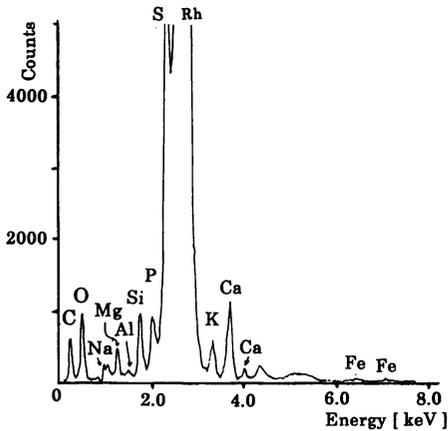
### 3.4 走査型電子顕微鏡観察とエネルギー分散分析

自然乾燥したバイオフィルム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のバクテリアで構成された網状構造が顕著である。幅約 1  $\mu\text{m}$  の糸状のバクテリアが絡まってできた網の中に、幅約 6  $\mu\text{m}$  程の糸状の藻類が縦横に存在しているのが認められる(Fig.4A)。凍結乾燥法による観察では、バイオフィルムが糸状のバクテリアによって複雑に入り組んだ網状構造を構築していく様子が明らかである(Fig.4B)。また、所々に 1  $\mu\text{m}$  以下の粒子が分散して微生物を覆っている。バクテリアの表面をエネルギー分散分析すると、強い Al と Si の反射に加え、弱い P, S, Cl, K の反射が認められた(Fig.4C, ①)。これは、前述の XRD 分析結果より、バクテリアの細胞壁に形成されたバイオ・カオリナイトであると同定される。弱い P, S, Cl, K, のピークは、バクテリアの成分から由来した元素である。なお、Fig.3 で示したバイオマット全体の化学組成やバクテリア周辺の物質(Fig.4C, ②)と比較すると、バクテリアの細胞表面には、S と Fe が極端に少ない。

### 3.5 透過型電子顕微鏡観察

糸状のバクテリア(幅約1.5  $\mu\text{m}$ )の透過型電子顕微鏡観察では、細胞表面に、約50 nm 平方の薄膜の微粒子が多数張り付くように生成しているのが認められた(Fig.5)。また、溶菌後、バクテリアの細胞表面の大部分がカオリナイトの薄膜に置きかえられているもの(Fig.5B)や細胞壁の周りに高結晶度のカオリナイトが定方位に配列して形成しており、格子像も認められる(Fig.5C, 矢印)。その面間隔は約7 Åであることから、これらの薄膜はカオリナイトであると同定できる。

**A Culture solution**



**B Sediments**

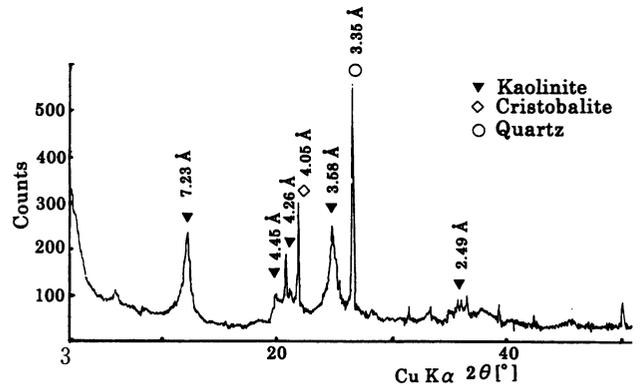
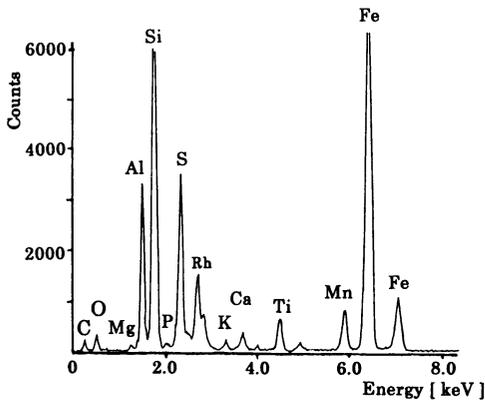


Fig.2 (A) ED-XRF analysis of a cultured solution showing contents of C, O, Na, Mg, Al, Si, P, S, K, and Ca elements. (B) A X-ray powder diffraction pattern of sediments collected from Passo Real Dam in Brazil. The sediments are mainly composed of quartz, cristobalite and kaolinite.

**A Bio-kaolinite (Biofilm)**



**B Bio-kaolinite (Biofilm)**

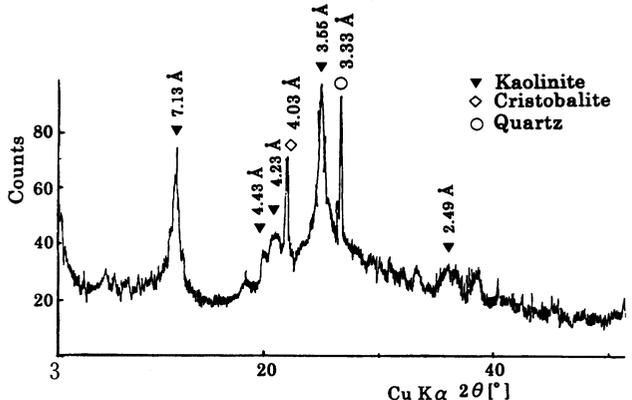


Fig.3 (A) ED-XRF analysis of a bio-kaolinite showing contents of C, O, Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, Mn and Fe elements. (B) A X-ray powder diffraction pattern of a bio-kaolinite is mainly composed of kaolinite, quartz and cristobalite.

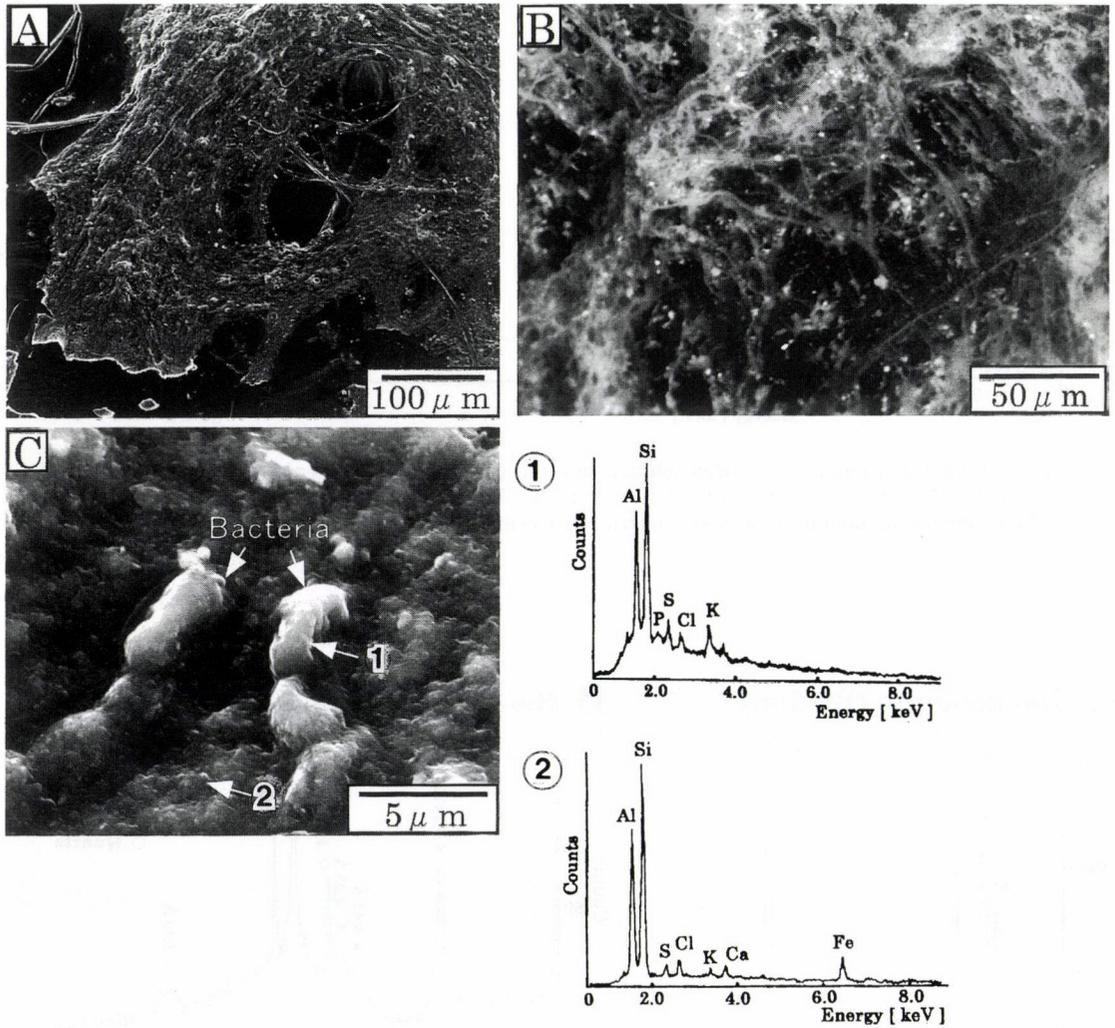


Fig.4 Scanning electron micrographs of bio-kaolinite. (A) Bio-kaolinite after drying under room temperature, (B) bio-kaolinite after freeze-drying treatment showing bacteria as the main component, (C) living bacteria with bio-kaolinite and the EDX spectrum indicate the main components of Si and Al (①). The EDX spectrum of no bacteria area indicate the components of Si, Al, S, Cl, K, Ca and Fe (②).

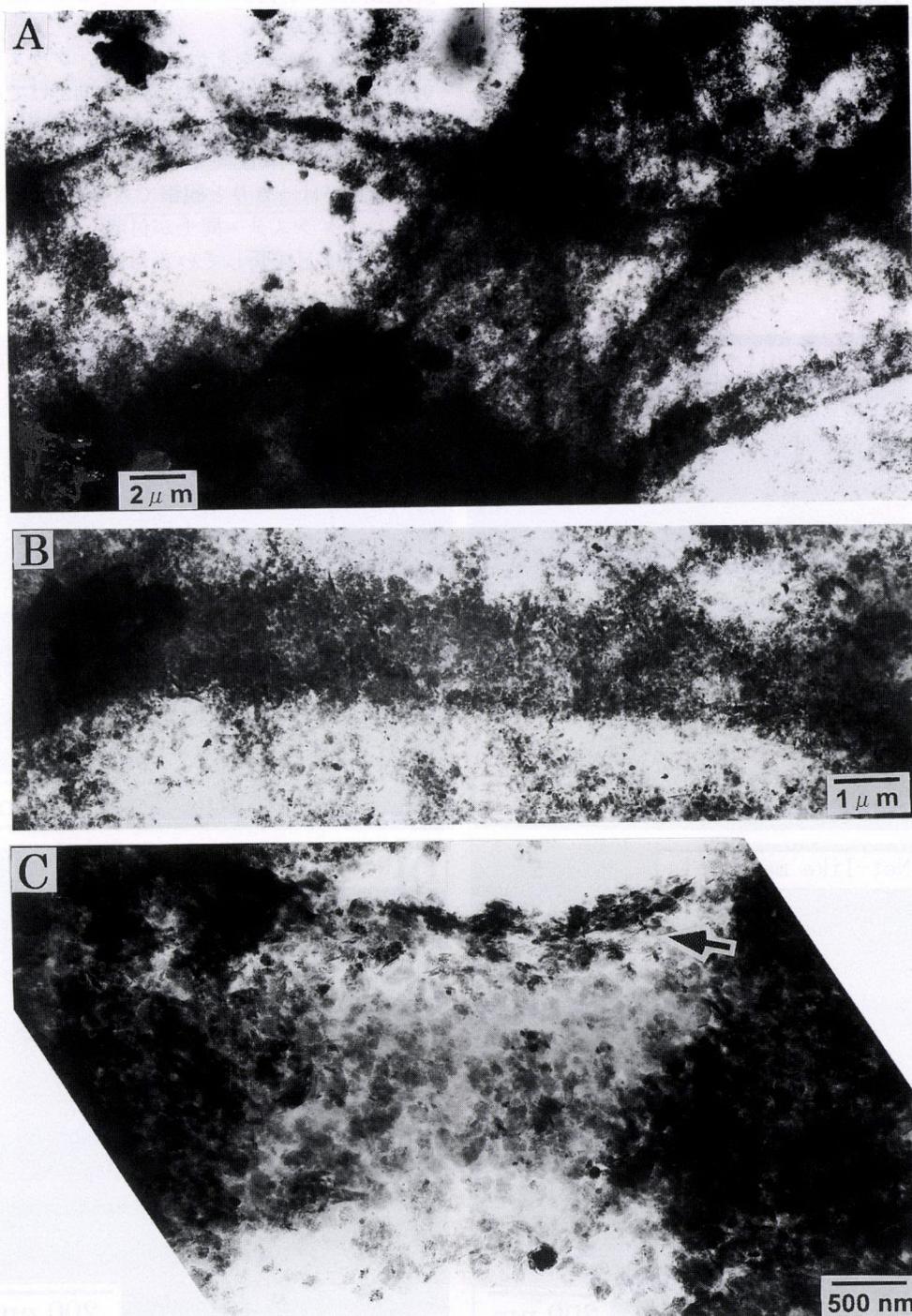


Fig.5 (A) Transmission electron micrograph of bio-kaolinite after drying under room temperature, (B) bacteria covered with kaolinite clusters, (C) kaolinite on a cell wall. The high resolution TEM image showed 0.7nm(001) spacings (arrow in C).

### 3.6 原子間力顕微鏡観察

透過型電子顕微鏡観察により、認められたバイオ・カオリナイト薄膜の最表面の微形態をより詳細に観察するために原子間力顕微鏡観察を行った。シリコンウエハー上で自然乾燥させたバイオフィルムの比較的薄い部分を観察するとクラスターが一定の方向に配向しているのが認められた (Fig.6A)。そのクラスターの大きさは50~500 nmであり (Fig.6B)、その表面には、糸状の有

機質様物質が網目状に分布しているのが認められた (Fig.6C, D)。

バイオフィルムを上から見ると、クラスターはやや楕円形をしているので高さ方向だけでなく、水平方向にも、配向している様子が観察できた。すなわち3方向に配向しているクラスターは、互いに境界がはっきりと観察できるもの (Fig.7A-1, B-1)、クラスター同士が付着して境界が区別できないほど成長しているもの (Fig.7C, D) な

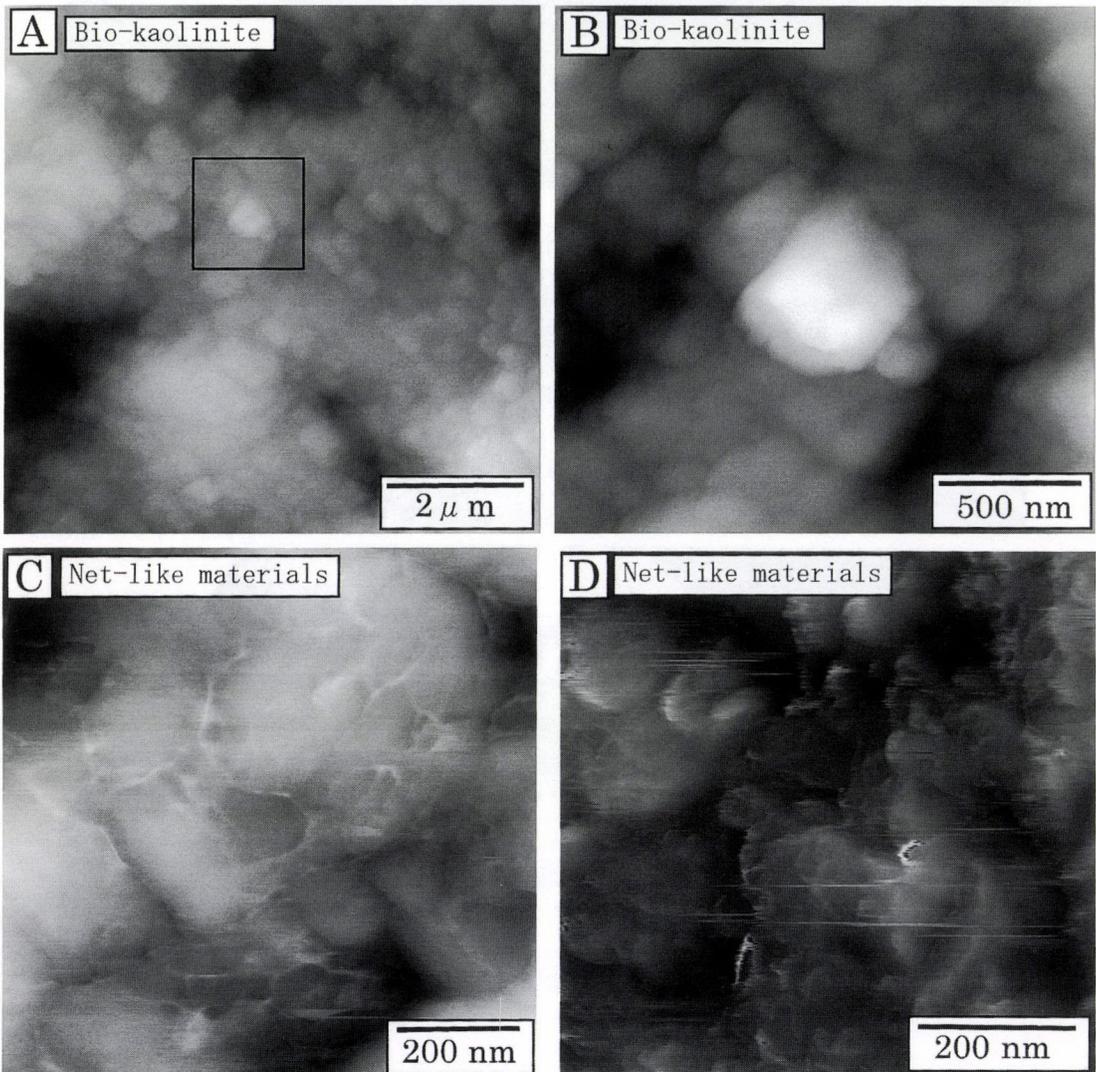


Fig.6 Atomic force micrographs using contact mode showing (A) bio-kaolinite clusters, (B) close up image of the frame on Figure 6 (A) and (C, D) net-structure of organic materials on clusters.

どが観察された。また、クラスターの厚さは2 nm (Fig.7B-2) から20 nm (Fig.7A-2) であり、バイオ・カオリナイトの成長過程を示唆している。

### 3.7 フーリエ変換型赤外分光分析

バイオ・カオリナイトと標準試料のカオリナイトの化学結合を比較するために、フーリエ変換型

赤外線分光光度計を用いて測定を行った。バイオ・カオリナイトの試料 (Fig.8A) では3697および3622  $\text{cm}^{-1}$  にカオリナイトの構造水 O-H の伸縮振動に対応するピークが、また、3405および1657  $\text{cm}^{-1}$  に吸着水などの水分子の伸縮振動および変角振動に対応するピークが認められた。さらに、2925  $\text{cm}^{-1}$  に C-H のピーク、1034  $\text{cm}^{-1}$  に Si-O の伸縮振

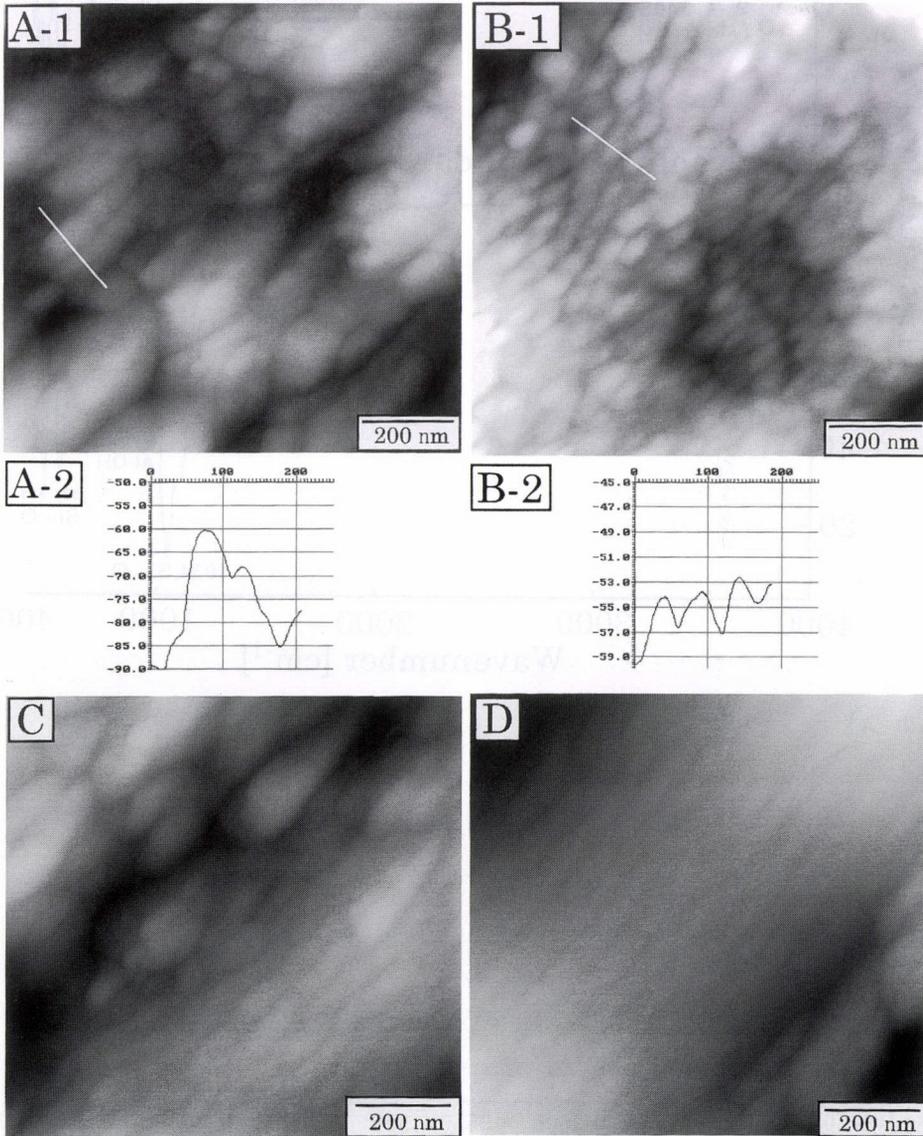


Fig.7 (A-1) and (B-1) atomic force micrographs using AC mode showing oriented bio-kaolinite clusters on silicon wafer under air condition. (A-2) and (B-2) cross sectional views along the white lines in A-1 and B-1, respectively. (C) and (D) oriented bio-kaolinite clusters adhering to each other.

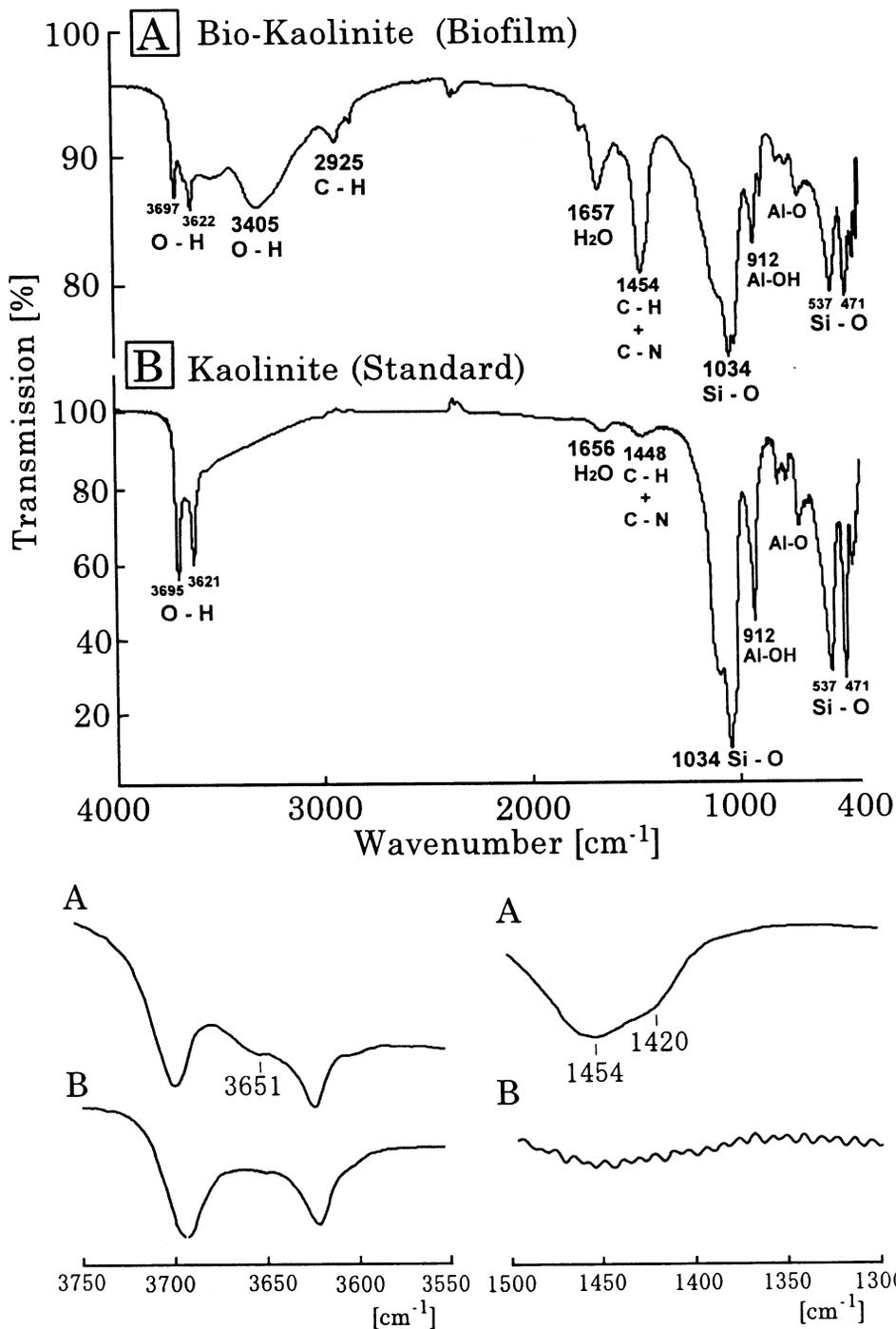


Fig.8 FT-IR spectra of bio-kaolinite (A) and standard kaolinite for reference material API62(Cornwall, UK) (B). Close-up patterns at 3750-3550 and 1500-1300 cm<sup>-1</sup> of bio-kaolinite (A) and standard kaolinite (B).

動,  $912\text{ cm}^{-1}$ に Al-OH の伸縮振動, さらに,  $537$  および  $471\text{ cm}^{-1}$ に Si-O のピークが認められた。

一方, 標準試料のカオリナイト (Fig.8B) では, バイオ・カオリナイトに認められた  $3651\text{ cm}^{-1}$  の小さい吸収ピークは認められなかった。また, バイオ・カオリナイトには,  $2925, 1454, 1420\text{ cm}^{-1}$ に顕著なピークが認められるが標準試料のカオリナイトには, ほとんど認められない差異がある。さらに, バイオ・カオリナイト (Fig.8A) の IR スペクトルは標準試料 (Fig.8B) に比べて, カオリナイトの構造水以外の水の存在を示すピークが顕著である。

#### 4. 考察

堆積物と蒸留水を入れた容器を日光の下に静置するだけで, 2~3ヶ月後にはバイオフィームが壁に形成した。この常温・常圧下で形成したバイオフィームには多種・多様の微生物が共生し, それらとともにカオリナイトの微粒子が形成した。以下に, 微生物関与で生成したバイオ・カオリナイトの特徴について考察する。

##### 4.1 バイオ・カオリナイト

バイオフィームには幅約  $1\text{ }\mu\text{m}$  程の糸状のバクテリアが密集しており, その中には球菌 (直径  $1\text{ }\mu\text{m}$  以下) の他に, 幅約  $6\text{ }\mu\text{m}$  程の糸状の藻類, 直径約  $7\text{ }\mu\text{m}$  の球状の藻類, 短径約  $2\text{ }\mu\text{m}$  のシアノバクテリアが共生している (Fig.1B~F)。落射蛍光顕微鏡下で, バイオフィーム中のカオリナイトは黄色の蛍光を発するのでその存在が確認できる。このため, Fig.1F に認められたように, カオリナイトが糸状の藻類の細胞壁に直接生成せずにある一定の間隔を空けて生成していることがわかる。これは糸状の藻類の細胞壁とカオリナイトの間に何らかの粘着物質があることが示唆される。また, カオリナイトの析出が周囲にいる糸状のバクテリアの周囲の折出より早いことが示唆される。これは, 糸状の藻類と糸状のバクテリアの粘着物質や代謝作用の違いによると考えられる。粘土鉱物が紫外線によって黄色の蛍光を発することや微生物の細胞壁と粘土鉱物間の粘着物質の存在は上島ら<sup>12,13)</sup>によっても指摘されている。一般に, バイ

オフィームは一種以上微生物で構成され, 温度, pH, 栄養, 流速, 光などの多くの要素に依存して, 複雑で多様な構造物を形成する<sup>23,24,25)</sup>。

微生物の細胞壁や粘着物質表面に形成した薄膜状のバイオ・カオリナイトの FT-IR 測定は, それぞれ  $3697, 3622\text{ cm}^{-1}$ にカオリナイトの構造水 O-H の伸縮振動に対応する 2つのピークを示した。また, カオリン鉱物の判定に使われるピーク<sup>26,27)</sup>が, バイオ・カオリナイトで  $1034, 912,$  にみられた。しかし, 吸着水などの水分子に対応する  $3405\text{ cm}^{-1}$ の顕著なピークは, 標準試料や従来報告されてきた多くのカオリナイト<sup>26,29)</sup>ではほとんど認められていない。このことはバイオ・カオリナイトが構造水とは異なる水を多く含んでいることを示唆する。さらに, バイオ・カオリナイトにおいて,  $3651, 1454, 1420\text{ cm}^{-1}$ に強い顕著なピークが認められたが,  $3651\text{ cm}^{-1}$ のピークは Bish and Johnston<sup>30)</sup>によると  $\text{OH}_2$  と  $\text{OH}_4$  のコンビネーションによる吸収と報告されている。また, Fialips et al.<sup>31)</sup>はカオリナイトの pH を変化させた熱水合成実験から, 生成したカオリナイトの  $1400\text{ cm}^{-1}$ のピークは表面に吸着した陽イオン ( $\text{NH}^+$  や  $\text{Na}^+$ ) が KBr のペレット中の  $\text{K}^+$  イオンと置換することによって生じることを報告している。その実験では, 低い pH で生成したもののほど  $3651\text{ cm}^{-1}$ のピークは大きくなり,  $1400\text{ cm}^{-1}$ のピークは逆に小さくなった。この合成実験によるカオリナイト及び本研究で用いた標準試料のカオリナイトの FT-IR スペクトルは,  $1400\text{ cm}^{-1}$ 前後に吸収ピーク (Fig.8B) がほとんど認められないのに対し, 本研究で生成したバイオ・カオリナイトで顕著であった  $1454, 1420\text{ cm}^{-1}$ の吸収ピーク (Fig.8A) はカオリナイトの構造に含まれる多量の有機物によるためであると考えられる。

##### 4.2 バイオ・カオリナイトのクラスター

$50\sim 500\text{ nm}$  サイズのバイオ・カオリナイトのクラスターが Fig.6, 7 で示したように一定の方向に配向しており, そのクラスターの表面には有機質様物質が網目状に分布している。このことは前述の FT-IR スペクトルの吸収ピーク ( $1454, 1420\text{ cm}^{-1}$ ) が有機物等に由来することと相関する。このクラスターの厚さは  $2\sim 20\text{ nm}$  であり,

観察場所によっては配向性や分布に多少の違いが認められる。

Georgia産カオリナイト(KGa-1)は原子間力顕微鏡観察<sup>32, 33, 34)</sup>において自形を示しているのに対して、本研究のバイオ・カオリナイトは自形を示さず、全体的に丸みを帯びている。また、Zbik and Smart<sup>34)</sup>はGeorgia産カオリナイト(KGa-1)とNorth Queensland産カオリナイトのアスペクト比を測定した結果、前者は比較的アスペクト比が一定しているのに対して後者はばらつきがあり、その分布の違いが試料の産状や性質の違いを示すと報告している。本研究のバイオ・カオリナイトの場合、Fig.7A-1でみられるクラスタのアスペクト比は4~8と低いものから10以上の高いものまでであるのに対して、Fig.7B-1でみられるものは、いずれもアスペクト比が10前後と一定している。これは、その生成過程において、微生物の細胞壁や粘着物質などの有機物の存在によって影響されると考えられる。一般に、2  $\mu\text{m}$ より小さく、アスペクト比が高い粒子は表面で配向する傾向がある。本研究におけるバイオ・カオリナイトのクラスタはバイオフィルムを上から見るとやや楕円形をしており、3方向に配向している。このように、クラスタが配向する原因として、微生物の細胞壁や粘着物質の表面に対して一定の方位関係を持ちながらカオリナイトのクラスタが形成されるメカニズムが考えられる。すなわち、カオリナイトの核形成において、微生物の細胞壁表面の構造や微生物が出す粘着物質と何らかの相互作用があると考えられる。

## 5. まとめ

自然培養実験においてバイオフィルム上にカオリナイト(バイオ・カオリナイト)が生成した。バイオフィルムには幅約1.5  $\mu\text{m}$ 程の糸状のバクテリアが密集しており、そのなかにシアノバクテリア(短径約2  $\mu\text{m}$ )、球菌(直径1  $\mu\text{m}$ 以下)、糸状(幅約6  $\mu\text{m}$ )および球状(直径約7  $\mu\text{m}$ )の藻類が共生している。落射蛍光顕微鏡観察において、そのバイオフィルム上でバイオ・カオリナイトは黄色の蛍光を発生し、カオリナイトが糸状の藻類の細胞壁に直接生成せずにある一定の間隔を空けて生

成している。このことから糸状の藻類の細胞壁とカオリナイトの間に何らかの粘着物質があることが示唆される。また、カオリナイトの析出が周囲にいる糸状のバクテリアの周囲より早いことも示唆される。これは、糸状の藻類と糸状のバクテリアの粘着物質や代謝作用の違いによると考えられる。バイオ・カオリナイトのFT-IRスペクトルは、OH<sub>2</sub>、OH<sub>4</sub>の吸収や構造中の有機物の存在を示した。原子間力顕微鏡によって、高さが2~20 nmであり、大きさが様々なサイズの(50~500 nm)バイオ・カオリナイトのクラスタが一定の方向に配向しているのが認められた。また、そのクラスタ表面には有機質様物質が網目状に分布している。クラスタが配向する原因として、微生物の細胞壁や粘着物質の表面と一定の方位関係をもったカオリナイトの析出が考えられる。

## 謝 辞

北海道阿寒国立公園オンネトー湯の滝における試料採取において、環境庁長官には許可を頂いた。凍結乾燥法において、日本電子ハイテック株式会社の鈴木武雄氏及び上瀧良一氏には大変お世話になった。また、金沢大学理学部地球学教室の奥野正幸博士には、フーリエ変換赤外分光光度計(Jasco, FT/IR-610)及び原子間力顕微鏡(JEOL, JSTM-4200D)を使用させて頂いた。以上の方々に感謝申し上げる。

## 文 献

- 1) Harvey, C. C. (1997) *Applied Clay Science*, **11**, 381-392.
- 2) Górnjak, K. (1997) *Applied Clay Science*, **12**, 313-328.
- 3) Jeong, G. Y. (1998) *Clays Clay Miner.*, **46**, 270-279.
- 4) Jeong, G. Y. (2000) *Clays Clay Miner.*, **48**, 196-203.
- 5) Grant, W. H. (1964) *Clays Clay miner.*, **12**, 455-463.
- 6) Kato, I. (1964) *Soil Sci. Plant Nutr.*, **10**, 258-269.

- 7) 小林祥一・坂本尚史・柿谷悟 (1993) 粘土科学, 33, 81-91.
- 8) Stoch, L. and Sikora, W. (1976) *Clays Clay Miner.*, 24, 156-162.
- 9) 馬場美幸・上原誠一郎・青木義和 (1997) 鉱物学会講演要旨 126頁
- 10) Ferris, F. G., Fyfe, W. S., and Beveridge, T. J. (1987) *Chem. Geol.*, 63, 225-232.
- 11) Tazaki, K. (1997) *Clays Clay Miner.*, 45, 203-212.
- 12) Fortin, D., Ferris, F. G. and Scott, S. D. (1998) *Am. Miner.*, 83, 1399-1408.
- 13) 上島雅人・茂木賢一・田崎和江 (2000) 粘土科学, 39, 171-183.
- 14) Ueshima, M. (1999) Doctoral thesis. 117pp.
- 15) Theng B. K. G. and Orchard V. A. (1995) Interactions of clays with microorganisms and bacterial survival in soil: A physicochemical perspective. Environmental impact of soil component interactions, P. M. Huang, J. Bertelin, J.-M. Bollag, W. B. McGill and A. L. Page (eds.), CRC press, Florida, 3, 123-139.
- 16) 田崎和江・服部竜哉・岡美登子・飯泉 滋 (1995) 地質学雑誌, 101, 87-98.
- 17) Tazaki, K. and Ishida, H. (1996) *Jour. Geol. Soc. Japan*, 102, 866-878.
- 18) Sato, M. (1999) *Clays Clay Miner.*, 47, 793-802.
- 19) Theng B. K. G. (1974) *The Chemistry of Clay-Organic Reactions*. Adam Hilger, London, 136-210.
- 20) Lahav, N. and Chang, S. (1976) *Journal of Molecular Evolution*, 8, 357-380.
- 21) Cairns-Smith, A. G. (1986) *Genetic takeover and the mineral origin of life*. Cambridge University Press, London, 477pp.
- 22) 須藤談話会編 (2000) 「粘土科学への招待」, 三共出版, 印刷中.
- 23) Sternberg, C., Christensen, B. B., Johansen T., Nielsen, A. T., Andersen J. B., Givskov, M. and Molin, A. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4108-4117.
- 24) Wolfaardt, G. M., Lawrence, J. R., Robarts, R. D., Caldwell, S. J. and Caldwell D. E. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 434-446.
- 25) Lappin-Scott, H. M. and Costerton, J. W. (1989) *Biofouling*, 1, 323-342.
- 26) 生沼 郁・児玉秀臣・小林和夫 (1963) 粘土科学, 3, 179-193.
- 27) 白水晴雄 (1988) 粘土鉱物学 朝倉書店 東京 185頁.
- 28) Sato, M. (1999) *Clays Clay Miner.*, 47, 793-802.
- 29) Komori, Y., Matsumura, A., Itagaki, T., Sugahara, Y. and Kuroda, K. (1999) *Clay Science*, 11, 47-55.
- 30) Bish, D. L. and Johnston, C. T. (1993) *Clays Clay Miner.*, 41, 297-304.
- 31) Fialips, C. I., Petit, S., Decarreau, A. and Beaufort, D. (2000) *Clays Clay Miner.*, 48, 173-184.
- 32) Bickmore, B. R., Hochella M. F. Jr., Bosbach D. and Charlet, L. (1999) *Clays Clay Miner.*, 47, 573-581.
- 33) Zbik, M. and Smart R. St. C. (1998) *Clays Clay Miner.*, 46, 153-160.
- 34) Zbik, M. and Smart R. St. C. (1997) *Clays for our future proceedings of the 11<sup>th</sup> International clay conference*. A. R. Mermut, and J. K. Torrance (eds.), H. Kodama (Editor-in-Chief). 361-366.