J. Jpn. Soc. Soil Phys.
土壌の物理性
No. 141 p.49 ～ 55 (2019)

直接分析から土壌や堆積物の微生物 – 元素 – 鉱物相互作用を観察する

光延　聖[1]

Direct observation of microbe-element-mineral interaction in soils and sediments

Satoshi MITSUNOBU[1]

1. はじめに

肥沃な土壌 1 グラムには数千種，数億個の微生物（バクテリア，アーキア，真菌など）が存在しているといわれる（西尾, 1989 など）．これらの微生物は動物にはない多様な代謝反応を駆使することで，有機物分解の機能や環境保全能を土壌システムに発現させている．微生物は酵素反応で反応を進行させるため，反応速度が無機的な反応と比べてきわめて大きい．このため微生物は土壌中で起きる物質循環へ大きな影響を与えると考えられている．例えば，微生物による鉄（Fe）やマンガン（Mn）などの土壌主要金属の酸化反応速度は無菌状態の数十倍～数万倍に達することが知られる（Olson, 1991; Vera et al., 2009）．また，微生物によって生成された二次鉱物は，無機合成鉱物に比べて微小な粒径のナノ鉱物になりやすい．ナノ鉱物は高い物質吸着能をもち反応場として機能するため，様々な物質の環境動態に影響を与える鉱物となり得る（Hochella et al., 2008）．

しかし，環境微生物の大半は難培養性であり，また微生物自体のサイズが数 μm 程度と小さく，直接観察が難しい点から，土壌や堆積物など表層環境における微生物，元素，鉱物間の相互作用には未解明な点が多い．土壌中では化学条件およびそれに呼応する微生物群集がマイクロスケールで変化するため，バルク試料の分析だけでは，土壌中での微生物反応を解析することが難しい．したがって，土壌における微生物 – 元素 – 鉱物相互作用を詳細に理解するためには，新しい *in situ*（原位置）微小領域観察法が必要とされる．

我々はこれまで，放射光源 X 線を利用した X 線顕微鏡を用いて，高い空間分解能で元素の化学種を決定する手法を確立し，それを土壌や堆積物など環境試料に応用して研究を進めてきた（Mitsunobu et al., 2010; 2011 など）．SPring-8 などの放射光施設では X 線管球方式に比べて数万～百万倍も強い X 線が得られる．また得られた X 線をミラーなどで集光することで，μm～nm レベルまでビームを細くすることも可能である（Tsuji et al., 2012）．したがって，ビームを絞った X 線顕微鏡をうまく利用すれば，土壌のような複雑な組成をもつ試料であっても，または土壌濃度が数十 ppm と微量な元素であっても，標的とする（微生物 –）元素 – 鉱物相互作用を直接観察できる．放射光源 X 線を利用する X 線顕微鏡では，試料に照射する X 線のエネルギーをモノクロメーターによって自在に変えられるため，X 線吸収スペクトルである X 線吸収微細構造（XAFS）を得ることで，元素の化学状態を知ることができる．ここでいう化学状態とは，主として価数，配位環境，鉱物種を指す．XAFS は，X 線吸収端近傍構造（XANES）と広域 X 線吸収微細構造（EXAFS）から構成される（Fig. 1a）．Fig. 1b の XANES スペクトルに示すように元素の内殻電子が励起されるエネルギーは，酸化数（価数）が大きいと数 eV 高くなるため，酸化数の違いによって収端エネルギーが異なる．内殻電子が励起されるとその電子を受け入れる空軌道，バンドの位置，電子密度が変化することに起因する．この現象を利用して，試料中の対象元素の酸化数を

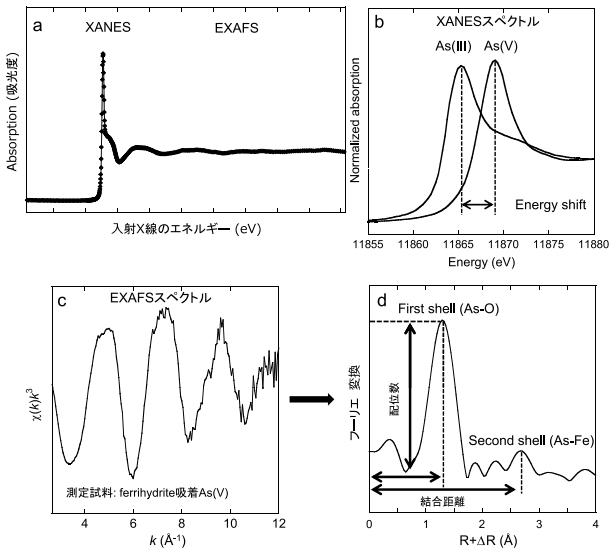


Fig. 1　(a) XAFS スペクトル，(b) XANES スペクトル，(c) EXAFS スペクトル，(d) フーリエ変換後の動径構造関数．

[1]Graduate School of Agriculture, Ehime University. Corresponding author: 光延　聖，愛媛大学大学院農学研究科.
2019 年 1 月 28 日受稿　2019 年 2 月 25 日受理

定量的に決定することが可能である．また，EXAFS 領域の解析から，価数だけでなく X 線を吸収した原子の電子構造，対象原子に配位する隣接原子の配置に関する情報も得ることができる（Fig. 1d）．EXAFS 領域の振動は，吸収原子から放出された内殻電子が隣接原子により散乱され X 線吸収係数が変化することで形成される．したがって，対象原子に隣接する原子の種類，配位数，原子間距離の情報が得られるため，EXAFS を解析することで土壌中において対象元素が取り込まれているホスト鉱物相や吸着状態（内圏 / 外圏）などを推定することが可能となる（Mitsunobu et al., 2006 など）．

また，X 線顕微鏡を利用した局所 XAFS 分析だけでなく，微生物の遺伝子可視化法や機能遺伝子定量法などの分子生物学的手法も併用することで，土壌中に存在する微生物の種類をマイクロスケールで決定することが可能となる．これらの情報を組み合わせることで，土壌中で微生物が何をしているのか（どのような反応に関与しているのか）に迫ることができると考えている．本記事では，最近の我々の研究成果 2 つを紹介しながら，直接観察に基づいて土壌中の微生物 – 元素 – 鉱物相互作用を解き明かす試みについて解説させていただく．

2. μXAFS 法と FISH 法を組み合わせた環境試料中のバイオミネラリゼーションの観察

まず，分子生物学的手法の 1 種である蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）法と X 線顕微鏡（マイクロ X 線吸収微細構造法：μXAFS 法）を組み合わせ，堆積物や土壌などの環境試料中において特定の微生物反応を高いマイクロスケールで観察する新規手法（Mitsunobu et al., 2012）について紹介する．

筆者らの研究では、この手法を土壌環境や堆積物環境でよく観察される鉄酸化バクテリアによる生物鉱化作用（バイオミネラリゼーション）へ適用した．Fig. 2a は，対象とした鉄酸化物を多く含む温泉堆積物の写真であり，Fig. 2b-c は，堆積物の 16S rRNA 遺伝子解析に基づいたバクテリア群集解析結果を示している．堆積物中には，門レベルで *β-proteobacteria* が優先しており（Fig. 2b），その中では独立栄養性の鉄酸化バクテリアである *Gallionella* 属が支配的であった（Fig. 2c）．次に，群集解析 の結果を踏まえ，FISH 法を用いて薄切した堆積物中の鉄酸化バクテリアの空間分布を調べることを試みた．FISH 法の適用には，生息する微生物の遺伝子（本研究では rRNA）情報を壊さずに薄片を作成する必要がある．筆者らの研究では，生物学分野で使われる手法を応用し，rRNA を壊さず，かつ現場の堆積環境や化学状態も保持した薄片試料作成法を確立し，この堆積物にも適用した．Fig. 3 は，鉄酸化バクテリア（*Gallionella* 属）のみを選択的に染色する核酸プローブをもちいて FISH 解析をおこなった結果を示している（Fig. 3a: 明視野像，Fig. 3b: FISH 像）．FISH 像である Fig. 3b に示すように，鉄堆積物において，ごく表面（5 – 10 μm）に鉄酸化細菌は濃集しており，微生物による鉄酸化反応は局在して存在することがわかった．

さらに，この鉄酸化バクテリア濃集領域の Fe の化学状態分析を μXAFS 法により解析し，同一試料分析から鉄酸化バクテリアが生成する鉱物の特徴を明らかにすることを試みた．鉱物中の Fe の配位環境の情報を得ることができる EXAFS スペクトルおよびその解析結果を Fig. 4b と Table 1 にそれぞれ示す．無機的に合成した水酸化鉄鉱物の EXAFS スペクトルと比較すると，微生物由来の水酸化鉄鉱物のスペクトルには $k = 7 - 8$ Å 付近にピークが観察されず Fe 配位環境が異なることを示す．EXAFS から Fe 配位環境を定量解析した結果，バクテリアによって生成された水酸化鉄鉱物の構造は，結合距離 3.1 Å の Fe-Fe_1 結合（edge-sharing）を有する Fe-O_6 八面体から主に構成されおり，無機合成水酸化鉄鉱物に通常観察される結合距離 3.4 Å の Fe-Fe_2 結合（corner-sharing）を有する Fe-O_6 八面体の割合はきわめて低い．この特徴的な Fe 配位環境は，バクテリアによって生成された水酸化鉄鉱物が，無機合成物とは異なり平面的な構造によって構成されていることを示している．この知

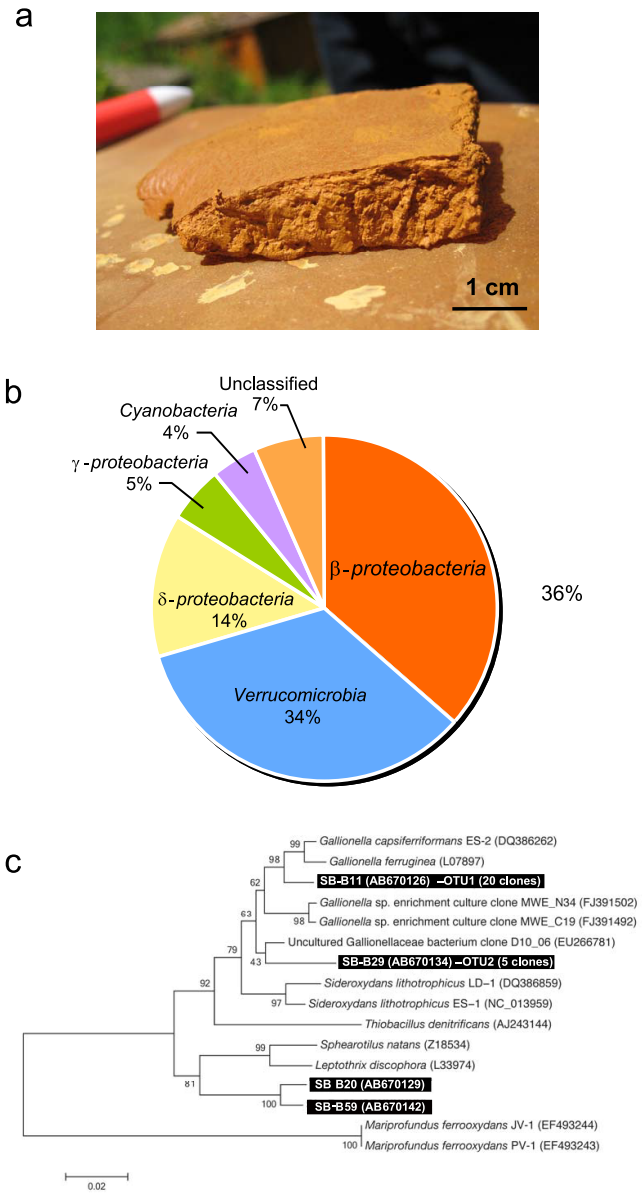


Fig. 2　(a) 堆積物鉄マットの写真，(b) 16S リボソーマル RNA 遺伝子解析に基づく温泉堆積物の微生物 （バクテリア）群集解析（c）検出された鉄酸化バクテリア（*Gallionella sp.*）の系統樹．（Mitsunobu et al., 2012）.

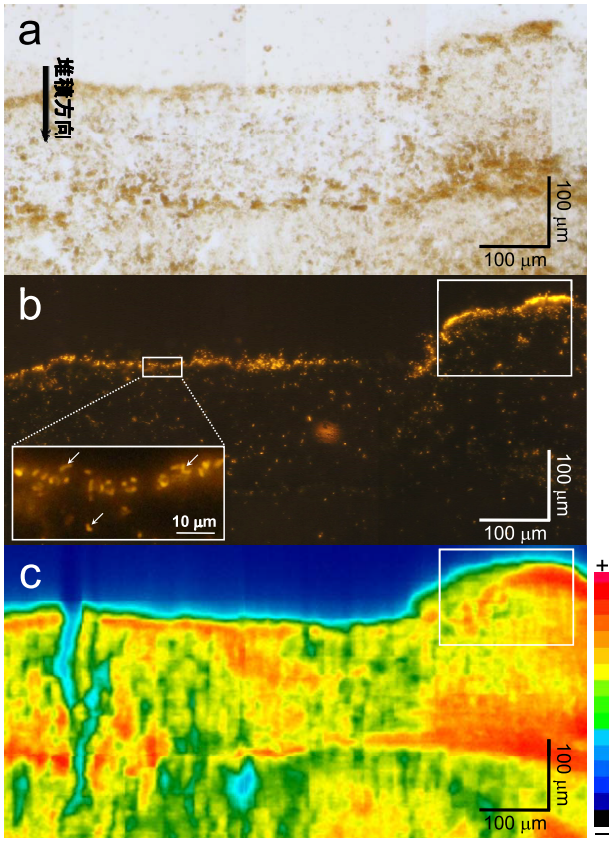


Fig. 3　(a) 可視光観察による顕微鏡 (明視野) 像，(b) 蛍光観察による蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 像．倍率 1000 倍での観察．鉄酸化バクテリアの細胞のみ蛍光色素 (黄色) で染色されている (Mitsunobu et al., 2012)．

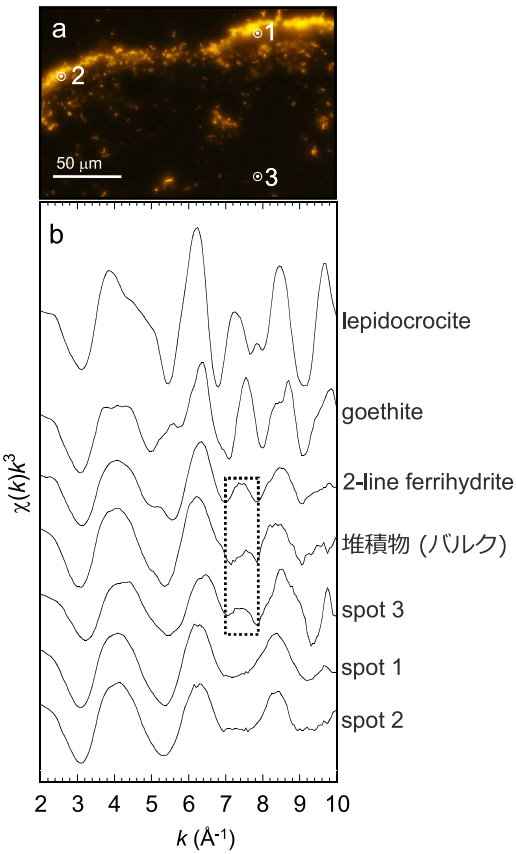


Fig. 4　(a) FISH 像 (Fig. 3b の拡大図)，(b) 鉄鉱物の標準試料と堆積物試料 (バルク試料を含む) の Fe K 端 EXAFS スペクトル．(Mitsunobu et al., 2012)．

Table 1　EXAFS シミュレーションの結果．
(CN：配位数, R：結合距離, ΔE_0：EXAFS 振動の原点補正エネルギー, σ：温度因子)

sample	shell	CN	R(Å)	ΔE_0(eV)	σ^2(Å^2)
2-line ferrihydrite	Fe-O_1	3.0 ± 0.3	1.93 ± 0.01	−4.10	0.007
	Fe-O_2	6-N	2.07 ± 0.02	-	0.006
	Fe-Fe_1	3.1 ± 0.3	3.04 ± 0.01	-	0.014
	Fe-Fe_2	1.3 ± 0.2	3.43 ± 0.01	-	0.007
spot 1	Fe-O_1	3.5 ± 0.3	1.97 ± 0.01	−4.47	0.009
	Fe-O_2	6-N	2.06 ± 0.02	-	0.006
	Fe-Fe_1	1.5 ± 0.2	3.05 ± 0.01	-	0.011

見は，鉄酸化微生物によるバイオミネラリゼーションのメカニズムを解明する上で重要な知見であり，また結晶構造が biotic/abiotic な鉱物生成を区別する指標として利用可能だと考えている．

ご紹介した研究は堆積物中のバイオミネラリゼーションに関するものであるが，この手法を土壌へ応用すれば，標的とする土壌微生物の空間分布と土壌元素の化学状態の分布をミクロスケールで直接決定することが可能となり，不明な点が多い土壌微生物 – 元素 – 鉱物相互作用を明らかにできると考えている．現在，この μXAFS-FISH 法を応用して湛水時の水田土壌に形成される酸化還元境界での微生物 – 有害元素 – 鉱物相互作用に対して研究を進めている．

3. μXAFS 法と機能遺伝子解析法を組み合わせた水田における有害元素 (ヒ素) – 元素 – 鉱物相互作用の観察

アジア稲作地域では水田土壌のヒ素 (As) 汚染が多数報告されており (Dittmar et al., 2007; Roberts et al., 2010; Saha and Ali, 2007)，水田における As 挙動の理解が重要な研究課題とされる．我々のグループでも水田土壌における As 挙動についてこれまで研究を進めてきた．最近では，μXAFS 法と機能遺伝子解析法を組み合わせて，土壌中の As 化学種と As 関連微生物の局在性や空間的な相関解析に基づいて研究を進めており，その研究についてご紹介する．土壌中で As は無機体のヒ酸 (As (V)) と亜ヒ酸 (As (III)) として主に存在し，それぞれ水溶解性，移行挙動，さらには毒性も異なる (Yamaguchi et al., 2011; Yu et al., 2003)．また，水田土壌は湛水期に表層で酸化層と還元層に分化する特徴を有するため，これらの層では局所的に異なる反応が起きていると予想される．しかし，数 mm 程度の酸化層を詳細に観察することは，従来法では困難であり，これまで研究が進んでいない．そこで筆者らの研究では，μXAFS 法，微小電極法，

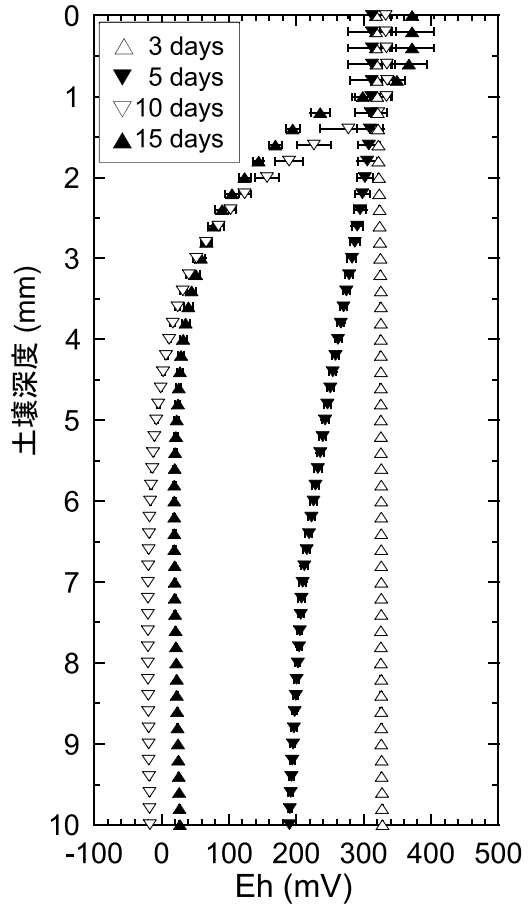


Fig. 5 微小電極測定に基づく土壌中の酸化還元電位（Eh）の深度分布．電極径（= 測定の空間分解能）は 100 μm．測定インターバルは 200 μm．未発表データ．

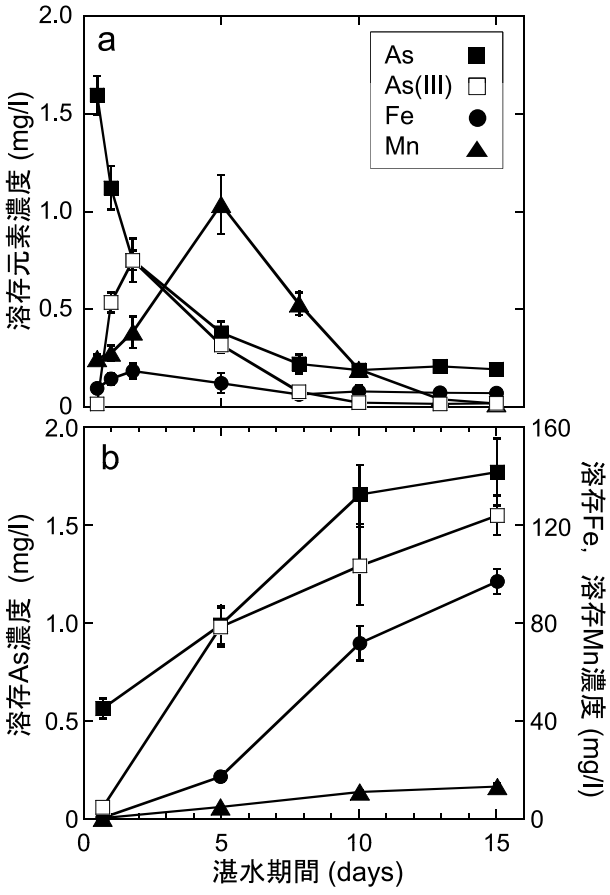


Fig. 6 （a）表面水（土壌 – 水境界面より上層部）中の溶存元素濃度，（b）土壌間隙水中の溶存元素濃度．土壌厚：約 8.5 cm，湛水深：約 5 cm．未発表データ．

深度別機能遺伝子解析を組み合わせ，土壌中の As の酸化還元反応およびその微生物影響を高い空間分解能で調べ，微生物反応を含め水田土壌系における As 挙動を考察した．実験では，As に汚染された水田土壌を湛水環境でインキュベーションすることで模擬的に水田環境を再現した．

湛水 10 日目以降，酸化還元電位の深度分布には深度 2 – 3 mm 付近に大きな低下が観察され，酸化還元境界が形成されたことが示唆された（Fig. 5a）．土壌間隙水中の As 濃度は湛水期間とともに増加したが，表面水中濃度は速やかに減少した（Fig. 6）．この溶存 As 濃度の相違は，何らかの As 吸着媒体が土壌表面に存在し，間隙水中の As が捕捉されたことを示唆する．実際に，土壌薄片の μXRF 解析をおこない表層土壌中の元素分布をマイクロスケールで調べた結果，時間経過とともに数 mm の土壌表面層に As が濃集する様子が観察され，土壌表面層が As の吸着バリアとして機能していることが示された（Fig. 7）．湛水 15 日目の As 濃集部における As と Fe の分布には高い相関がみられた（相関係数 $r = 0.60$）．また，本稿ではデータを示さないが，Fe μXAFS 分析から，濃集部で Fe は As と親和性の高い水酸化鉄（III）鉱物として存在していることがわかっており，As が土壌表面層に含まれる水酸化鉄鉱物に取り込まれていることが推測される．この推測については，As 濃集部の As EXAFS 解析からも調和的な結果が得られている．

As μXANES に基づく As 酸化数の解析結果から，土壌深部では As（III）の割合が高いが，表層の As 濃集層では全 As の約 80-90 % が As（V）であることが示唆され（Fig. 8），酸化的な表層土壌（3 mm 以浅）において As が酸化されていることを示す．As（V）は水酸化鉄鉱物などの土壌鉱物と内圏型の強い吸着錯体を形成し，外圏型の吸着錯体を形成する As（III）よりも土壌固相へ取り込まれやすい（Tufano et al., 2008 など）．この As（V）の特異的性質は，As 濃集部で As（V）が支配的であることと調和的であり，表層部（As 濃集部）での As 酸化反応が As 濃集を促進するトリガーとなることを示唆する．つまり，As は土壌深部で水溶解性の高い亜ヒ酸へ還元され上部へ拡散し，表面酸化層で鉱物親和性の高いヒ酸へ再度酸化されることで，土壌中に存在する水酸化鉄鉱物によって収着除去されると考えられる．

さらに，この As 酸化反応の生物性 / 非生物性を考察するために，微生物由来の As 酸化酵素遺伝子（*aio*A）を定量 PCR 法で土壌深度別に定量した．土壌中の *aio*A 遺伝子量を定量することで，As 酸化微生物の存在度を決定できる（Quemeneur et al., 2010）．顕著な As 濃集が観察された湛水 10 日目以降において，As 酸化酵素遺伝子濃度（=As 酸化微生物の割合）は As 濃集層の土壌表面で

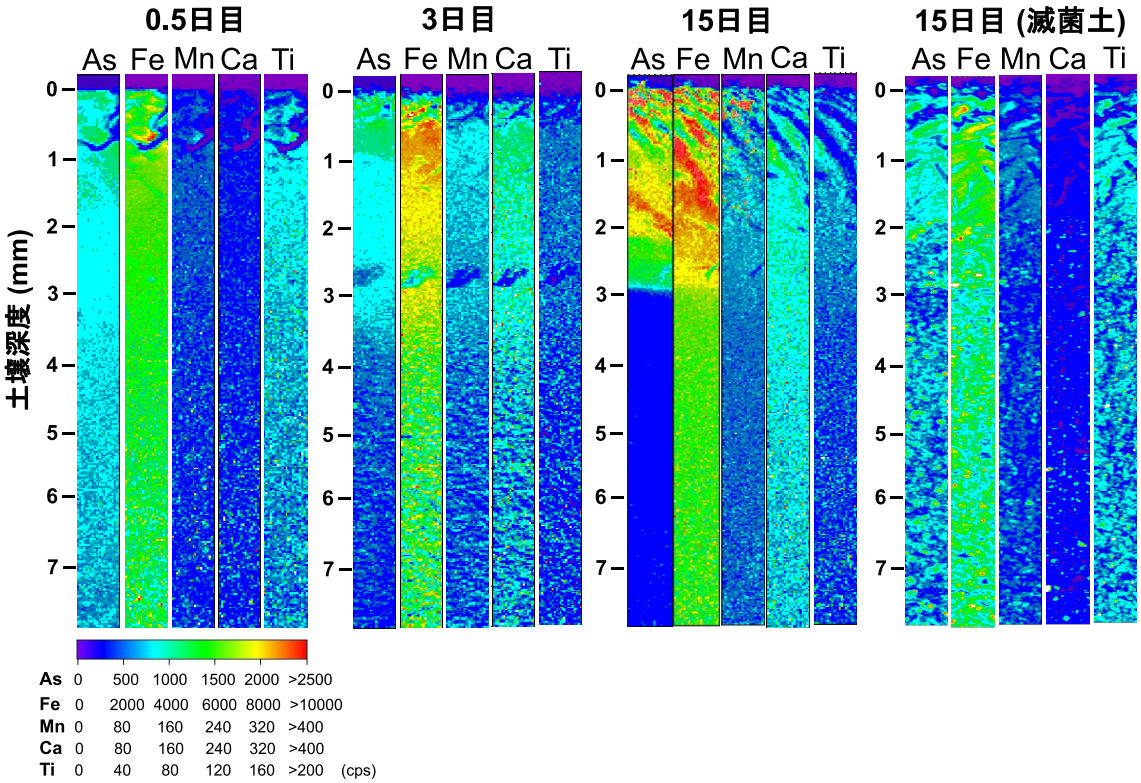


Fig. 7　μXRF 分析による水田土壌薄片中の元素イメージング．未発表データ．

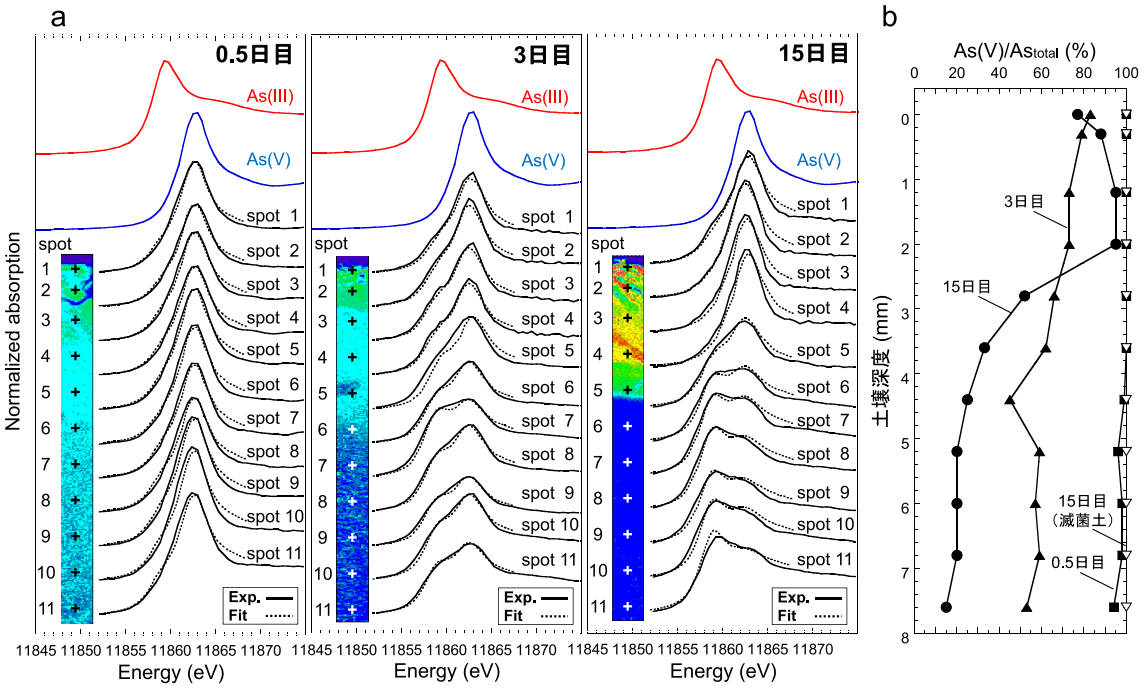


Fig. 8　（a）μXAFS 分析による土壌深度別の As K 端 XANES スペクトル，（b）標準試料を用いた XANES の最小二乗フィッティング解析に基づく深度別 As（V）/Astotal 比．未発表データ．

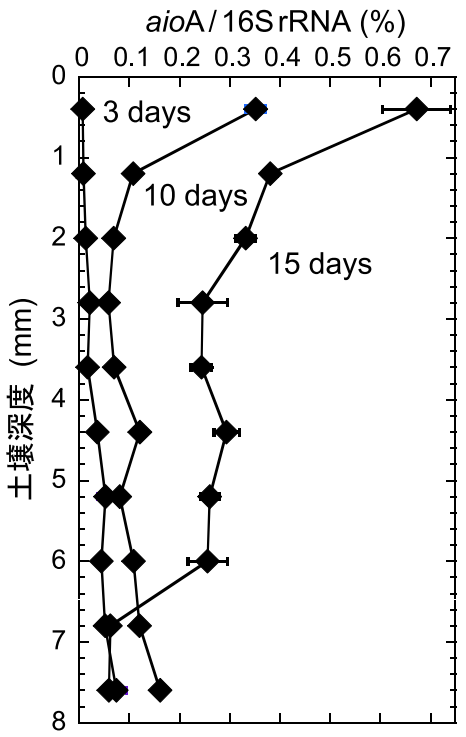


Fig. 9 定量 PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法による As（III）酸化酵素遺伝子（*aio*A）遺伝子の深度別存在度．16S rRNA 遺伝子量でノーマライズすることで，全バクテリアに占める As（III）酸化バクテリアの相対量を示す．未発表データ．

最も高い値を示し，土壌深度が深くなるにつれて減少した（Fig. 9）．As（V）が多く観察された表層の As 濃集部では，As 酸化微生物の存在割合も増加しており，表面酸化層における As の酸化反応，さらに As 酸化反応によって促進される As 濃集現象には微生物反応が寄与している可能性が高いことが示唆された．

筆者らの研究は，厚さ数 mm の土壌表面層が As 溶出をせき止める吸着バリアとして機能することを示しており，土壌全体の As 挙動における表面層の重要性だけでなく，土壌システムに備わる高い As 浄化能を示す興味深い結果といえる．μXAFS 法を利用した土壌中の元素化学種の局所分析に加えて，微生物由来の As 酸化酵素遺伝子解析による As 関連微生物の深度別解析を組み合わせることで，これまで未解明な点が多い土壌中の酸化還元境界層における微生物 – 元素 – 鉱物相互作用を分子レベルの情報に基づき理解できる．

4. おわりに

以上のように，放射光源 X 線顕微鏡を土壌や堆積物試料へ応用した 2 つの研究例を紹介した．X 線顕微鏡（μXAFS）は，非破壊分析，高い空間分解能，高い元素選択性によって，元素の化学状態（酸化数，鉱物種，配位環境など）を決定できるという他手法にはない優れた利点をもつ．土壌は固相だけみても大小さまざまな無機物，有機物，微生物等から構成されており，複雑な組成をもつ．X 線顕微鏡を利用すれば，そのような複雑な組成をもつ試料であっても直接観察できるため，土壌中の微生物 – 元素 – 鉱物相互作用について新しい知見を得ることが期待される．紹介した μXAFS 法以外にも，ナノスケールの超高空間分解能を有する透過型走査 X 線顕微鏡（STXM）が近年開発され，日本の放射光施設にも設置が進んでいる．STXM は約 50 nm の超高空間分解で局所 XAFS 分析をおこなうことができるため，微小な微生物を分析するのに魅力的な手法である（光延ら，2016）．今後も X 線顕微鏡の空間分解能の向上が見込まれ，X 線顕微鏡による微生物や土壌粒子の 1 細胞 / 粒子分析が現実的に可能となる．X 線顕微鏡を駆使し，さらに紹介した分子生物学的手法の併用も進めながら，土壌における微生物の役割や機能を明らかにしていきたいと考えている．

謝辞

本解説をまとめるにあたり，多くの方からご助言をいただいた．X 線顕微鏡測定では高エネルギー加速器研究機構 BL4A および SPring-8 BL37XU のビームラインサイエンティストの方々にご協力をいただいた．なおデータの一部は科学研究費助成金課題（課題 25610164）の支援によって取得した．ここに記して謝意を表す．

引用文献

Dittmar, J., Voegelin, A., Roberts, L.C., Hug, S.J., Saha, G.C., Ali, M.A., Badruzzaman, A.B.M. and Kretzschmar, R. (2007): Spatial distribution and temporal variability of arsenic in irrigated rice fields in Bangladesh. 2. Paddy soil. Environ. Sci. Technol., 41: 5967–5972, doi:10.1021/es0702972

Hochella, M.F., Lower, S.K., Maurice, P.A., Penn, R.L., Sahai, N., Sparks, D.L. and Twining, B.S. (2008): Nanominerals, mineral nanoparticles, and earth systems. Science, 319: 1631–1635, doi:10.1126/science.1141134

光延 聖, 菅 大輝, 高橋嘉夫 (2016): 走査型透過 X 線顕微鏡を用いて環境試料中の有機物を調べることの重要性. 放射光, 29: 294–302.

Mitsunobu, S., Harada, T. and Takahashi, Y. (2006): Comparison of antimony behavior with that of arsenic under various soil redox conditions. Environ. Sci. Technol., 40: 7270–7276, doi: 10.1021/es060694x

Mitsunobu, S., Shiraishi, F., Makita, H., Orcutt, B.N., Kikuchi, S., Jorgensen, B.B. and Takahashi, Y. (2012): Bacteriogenic Fe(III) (oxyhydr)oxides characterized by synchrotron microprobe coupled with spatially-resolved phylogenetic analysis. Environ. Sci. Technol., 46: 3304–3311, doi:10.1021/es203860m

Mitsunobu, S., Takahashi, S. and Terada, Y. (2010): μ-XANES evidence for the reduction of Sb(V) to Sb(III) in soil from Sb mine tailing. Environ. Sci. Technol., 44: 1281–1287, doi: 10.1021/es902942z

Mitsunobu, S., Takahashi, Y., Utsunomiya, S., Matthew, A.M., Terada, Y., Iwamura, T. and Sakata, M. (2011): Identification

and characterization of nanosized tripuhyite in soil near Sb mine tailing. Am. Mineral., 96: 1171–1181, doi:10.2138/am.2011.3651

西尾道徳 (1989): 土壌微生物の基礎. 農文協.

Olson, G.J. (1991): Rate of pyrite bioleaching by *Thiobacillus ferrooxidans*: results of an interlaboratory comparison. Applied Environ. Microbiol., 57: 642–644.

Quemeneur, M., Cebron, A., Billard, P., Battaglia-Brunet, F., Garrido, F., Leyval, C. and Joulian, C. (2010): Population structure and abundance of arsenite-oxidizing bacteria along an arsenic pollution gradient in waters of the upper Isle River Basin, France. Appl. Environ. Microbiol., 76: 4566–4570.

Roberts, L.C., Hug, S.J., Dittmar, J., Voegelin, A., Kretzschmar, R., Wehrli, B., Cirpka, O.A., Saha, G.C., Ali, M.A. and Badruzzaman, A.B.M. (2010): Arsenic release from paddy soils during monsoon flooding. Nature Geosci., 13: 53–59, doi:10.1038/ngeo723

Saha, G.C. and Ali, M.A. (2007): Dynamics of arsenic in agricultural soils irrigated with arsenic contaminated groundwater in Bangradesh. Sci. Total Environ., 379: 180–189, doi:10.1016/j.scitotenv.2006.08.050

Tsuji, K., Nakano, K., Takahashi, Y., Hayashi, K. and Ro, C.-U. (2012): X-ray Spectrometry. Anal. Chem., 84: 636–668, doi:10.1021/ac202871b

Tufano, K.J., Reyes, C.W., Saltikov, C.W. and Fendorf, S. (2008): Reductive processes controlling arsenic retention: Revealing the relative importance of iron and arsenic reduction. Environ. Sci. Technol., 42: 8283–8289, doi:10.1021/es801059s

Vera, M., Rowwerder, T., Bellengerg, S., Sand, W., Denis, Y. and Bonnefoy, V. (2009): Characterization of biofilm formation by the bioleaching acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* by a microarray transcriptome analysis. Adv. Mater. Res., 71–73: 175–178, doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.71-73.175

Yamaguchi, N., Nakamura, T., Dong, D., Takahashi, Y., Amachi, S. and Makino, T. (2011): Arsenic release from flooded paddy soils is influenced by speciation, Eh, pH, and iron dissolution. Chemosphere, 83: 925–932, doi:10.1016/j.chemosphere.2011.02.044.

Yu, W.H., Harvey, C.M. and Harvey C.F. (2003): Arsenic in groundwater in Bangladesh: A geostatistical and epidemiological framework for evaluating health effects and potential remedies. Water Resour. Res., 39: 1146–1162, doi:10.1029/2002WR001327

要　　旨

微生物は土壌や堆積物などの表層環境に普遍的に存在しており，様々な物質の環境動態に影響を与えている．環境微生物の大半は難培養性であり，また微生物自体のサイズが微小で直接観察が難しいことなどから，土壌など表層環境における微生物，元素，鉱物間の相互作用には未解明な点が多い．そのため，土壌における微生物 – 元素 – 鉱物相互作用を詳細に理解するためには，新しい *in situ*（原位置）微小領域観察法が必要とされる．本稿では，最近の我々の研究成果を紹介しながら，マイクロスケールの高い空間分解能で元素化学種の決定が可能な X 線顕微鏡（マイクロ X 線吸収微細構造法），遺伝子可視化法や微小電極法などを組み合わせ，土壌中の微生物 – 元素 – 鉱物反応を直接観察に基づいて解き明かす試みについて解説する．

キーワード：X 線顕微鏡，微生物，XAFS