

# 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

光延 聖<sup>1</sup>, 菅 大暉<sup>2</sup>, 高橋嘉夫<sup>3</sup>

<sup>1</sup>愛媛大学農学部生物環境学科 〒790-8566 松山市樽味 3-5-7

<sup>2</sup>広島大学大学院理学研究科地球惑星システム学専攻 〒739-8526 東広島市鏡山 1-3-1

<sup>3</sup>東京大学大学院理学系研究科地球惑星科学専攻 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

要旨

フレネルゾーンプレート (Fresnel Zone Plate; FZP) による集光系を備えた走査型透過 X 線顕微鏡 (STXM) は、30 nm 程度の空間分解能で多種の元素の化学種解析を行うことができる。特に軟 X 線領域に吸収端がある炭素、窒素、酸素などの官能基別のマッピングが可能なのは、他の手法にはない特徴である。一方、有機物は環境中に普遍的に見出される物質であるため、STXM は環境化学・地球化学分野において不可欠な手法になりつつある。本稿では、このような STXM を用いた環境化学の研究の例を 2 つ示した。最初の例では、有用金属元素を多量に含む硫化鉄を微生物で効率的に溶解できる機構の解明に STXM を適用した。その結果、微生物が分泌する酸性多糖類と鉄の錯生成が、硫化鉄の溶解を促進することが明らかになった。2 つ目の例では、放射性セシウムの水圏での水-懸濁粒子間の分配に与える有機物の影響を STXM で調べた。その結果、環境水中の懸濁粒子を腐植物質が被覆することで、放射性セシウムが溶存態として存在し易くなることが示された。これらの研究例から、STXM を利用した有機物の官能基マッピングは、環境中の物質循環における化学的素過程を解明する上で重要な役割を果たすことがお分かり頂けるであろう。

## 1. はじめに

放射光源を用いた XAFS 法による元素の化学種解析 (スペシエーション) は、天然の岩石、鉱物、土壌、エアロゾルなどに含まれる様々な元素が受けた化学素過程を明らかにするため、地球や環境で起きている現象を化学的に解明する上で不可欠な手法となってきた<sup>1-3)</sup>。これまで硬 X 線を用いた XAFS は、様々な元素を対象にし、環境化学分野において多彩な研究成果を生み出してきた。特に近年では、K-B ミラーを用いて得た  $\mu\text{m}$  程度の X 線を用いた局所領域での元素のスペシエーションが、多くのビームラインで行えるようになってきている。通常の岩石や土壌を相手にした場合、 $10 \mu\text{m}$  程度の大きさは 1 次鉱物を分析する上では十分な空間分解能であり、環境化学・地球化学的な研究に広く利用されている。しかし、さらに小さな二次鉱物 (粘土鉱物など) や微生物を相手にするには、 $\mu\text{m}$  程度レベルの空間分解能は必ずしも十分ではない。

一方、硬 X 線領域の XAFS を用いたスペシエーションは、実験的な制約が小さい原子番号の大きな元素 (例えばカルシウム以上) について多く用いられてきた。しかし、天然物を調べる場合に重要な炭素などの軽元素は、実験的な制約の大きな軟 X 線領域に吸収端があるため、その重要性にも関わらず、XAFS を用いた環境化学的研究は多くない。

これらのことから、より高い空間分解能で、より軽い元

素を、というのが XAFS を用いた地球化学・環境化学において重要な課題となってきた。これらの要請に応えられる手法の 1 つが、本特集号の主題である STXM である。筆者の一人 (高橋) は、2004 年の Chan らの「微生物が作る酸化鉄」に関する論文<sup>4)</sup>で STXM の存在と有用性を知り、その国内への導入の必要性をいくつかの機会でも強調してきた<sup>5)</sup>。こうした中で、2012 年になってようやく UVSOR<sup>6)</sup>で、続いて PF で STXM<sup>7)</sup>が稼動するに至った。世界的にみても、STXM のマシンタイムはどこでも窮乏しているのが実状で、日本で 2 台の STXM が稼動し始めたことは特筆すべきことであり、本特集号で触れられている関連分野の発展に大きく貢献するものと期待される。

本稿では、STXM を環境化学的研究に応用した例を示す。上述のように、環境化学ではより高い空間分解能でより軽い元素をみるのが有効であり、それが活かされた 2 つの研究例 (「STXM をもちいた微生物による鉱物溶解現象 (バイオリーチング) の直接観察」と「放射性セシウムの粘土鉱物への吸着に及ぼす腐植物質の影響」) について、以下で解説したい。

## 2. STXM をもちいた微生物による鉱物溶解現象 (バイオリーチング) の直接観察

バイオリーチング (bioleaching) とは、バクテリアなどの微生物の代謝活性による各種鉱物の溶解作用および鉱

物に含まれる金属浸出作用を意味する。これまでに、種々の有価金属（銅、亜鉛、鉄、金、ウラン等）を含む鉱物が微生物の作用で溶解されることが報告されている<sup>8)</sup>。バイオリーチングの歴史は古く、紀元前から地中海沿岸では鉱山の排水中に銅が存在することが経験的に知られていた。鉱物溶解に微生物が密接に関与していることが科学的に証明されたのは比較的新しく、1947年に Colmer らが米国の炭坑の酸性鉱廃水から鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* を単離したことによる<sup>9)</sup>。チリやオーストラリアの銅鉱床では、バイオリーチングによる金属製錬が実用化されており、現在、世界の銅生産量の約20%がバイオリーチング法により生産されている<sup>8)</sup>。

バイオリーチング作用の大きな特徴として高い鉱物溶解速度が挙げられる。無菌状態で非生物的な反応によってのみ硫化鉄の酸化反応が進む場合、酸性溶液中での  $\text{Fe}^{2+}$  の酸化反応速度は小さいことが知られているが、酸化反応に微生物が関与するとその反応速度は一変する。これまでの研究では、*A. ferrooxidans* 等の微生物の存在によって、反応速度が無菌状態の数十倍から数万倍速くなることが報告されている<sup>10,11)</sup>。

それでは、微生物はどのような機構によって鉱物溶解速度を加速させているのだろうか。微生物は鉱物に含まれる還元態鉄など無機元素の酸化反応によってエネルギーを獲得している。固体である鉱物中の元素を利用するには一旦溶解させる必要があり、微生物は不溶性鉱物を効率よく溶解するための種々の戦略を持つと考えられる。この戦略として、単純な細胞膜タンパクを介した電子伝達反応だけでなく、微生物が金属溶出や酸化還元反応を促進する生体外物質を能動的に産生することなどが推測されている（例えば、金属錯生成能をもつ有機酸、導電性物質等の産生）。しかし、どのような物質、機構によって微生物が鉱物を溶解しているのかについては未解明な点が多く、バイオリーチングの実用化や高効率化の妨げとなっている。未解明な点が多い最大の理由は、分析上の問題点に起因する。バイオリーチングは微生物-鉱物付着面という数100 nm 程度の局所領域で起きており、直接分析がきわめて難しい。加えて、バイオリーチングは金属と有機物が絡んだ代謝反応であり、反応機構が複雑であることも一因である。

これらの問題に対して、前述の STXM は高空間分解能 (<50 nm) や元素汎用性・元素選択性が高く、金属と有機物の同時分析が可能なことに加えて、測定チャンパー内で高真空を必要とせず、生体試料のような水を含む分析にも応用できる、などの優れた利点を有する。これらの STXM の利点は、上に述べたバイオリーチング研究における分析上の問題点を打開できる可能性がある。とくに、空間分解能が50 nm 程度と高いため、数  $\mu\text{m}$  という微生物細胞サイズを考慮しても、十分に反応場（微生物-鉱物付着面）の直接分析が可能であり、不明な点が多いバイオリーチング機構を直接的に解明できる。本稿では、硫化鉄

鉱物のバイオリーチング機構解明に STXM を応用した我々の研究をもとに、新たに明らかになった機構の一端を紹介する。

## 2.1 STXM による微生物-鉱物境界面における生体分子種の特定

本研究では、代表的なリーチングバクテリアである *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 23270株) による黄鉄鉱 (pyrite,  $\text{FeS}_2$ ) の酸化溶解実験に着目している。*A. ferrooxidans* は、好気性化学独立栄養バクテリアであり、pyrite に含まれる 2 価鉄を酸素で酸化してエネルギーを得る鉄酸化バクテリアである。STXM 分析は、UVSOR BL-4U および Photon Factory BL-13A にて実施した。STXM 分析用試料は、窒化ケイ素の薄膜 (50~100 nm) に滴下した微生物試料を乾燥させて作製した。

Fig. 1 は、バイオリーチング実験前 (a) と実験後 (b) における pyrite 表面の電子顕微鏡 (SEM) 写真である。リーチング実験後の pyrite 表面には、析出物だけでなく、細胞サイズの窪みが複数個所で観察される。この窪みはエッチピット (etching pit) と呼ばれ、*A. ferrooxidans* による硫化鉄リーチングでは、頻繁に観察される腐食孔である<sup>12)</sup>。pyrite 付着面で鉱物溶解することで生成される。このことは、本実験でも、*A. ferrooxidans* が pyrite 表面に付着し、その場で鉱物を溶解する直接的な酸化機構が存在することを支持する。

Fig. 2b には、微生物細胞の生体分子と考えられるタンパク質 (protein)、酸性多糖類 (alginate)、中性多糖類 (agarose)、核酸 (DNA)、脂質 (lipid) の炭素 K 吸収端 XANES スペクトルを示している。各標準物質間でピークエネルギーが変化することから (ピークエネルギーに対応する官能基と電子遷移は Table 1 参照)、炭素 K 吸収端 XANES スペクトルを用いることで微生物由来の有機物種を同定できる。また Fig. 2 は、リーチング30日目の固相試料に含まれる pyrite 粒子に付着した *A. ferrooxidans* 細胞の炭素イメージングおよび XANES スペクトルを示している。下部の黒い部分は pyrite 粒子であり、その上方中央の白く抜けた部分は pyrite 粒子の表面に付着した *A.*

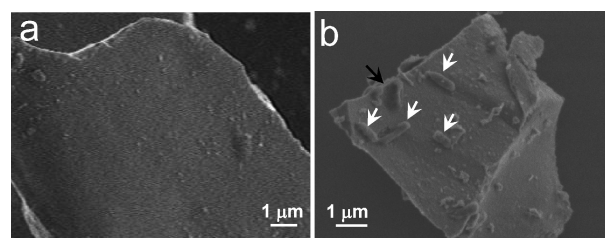
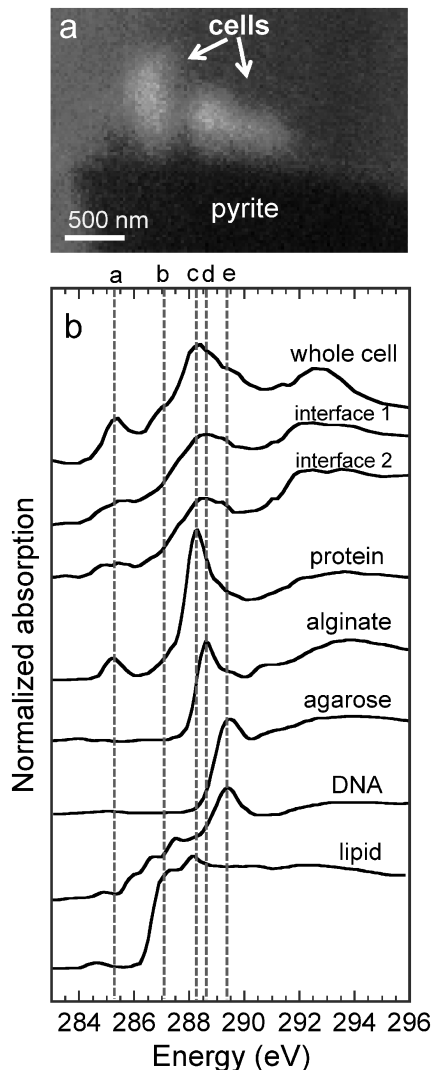


Fig. 1 SEM images of pyrite particles after 4 weeks incubation without *A. ferrooxidans* (a) and with *A. ferrooxidans* (b). Black and white arrows in images (b) stand for rod-shaped pits and *A. ferrooxidans* cells on the pyrite surface, respectively<sup>17)</sup>.

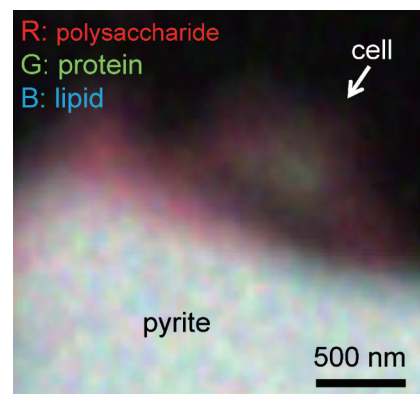


**Fig. 2** STXM-based C image and C K-edge XANES spectra of model compounds and *A. ferrooxidans* cells on the pyrite in 2 weeks incubation samples. Absorption edge peaks were identified as aromatic C at 285.2 eV (a), aliphatic C at 287.3 eV (b), amide C at 288.2 eV (c), carboxylic C at 288.6 eV (d), and O-alkyl C at 289.3 eV (e)<sup>17)</sup>.

*ferrooxidans* 細胞が観察される。全細胞領域の XANES では (Fig. 2b の whole cell), aromatic (芳香族) 285.2 eV (a), aliphatic (脂肪族) 287.3 eV (b), peptide (ペプチド) 288.2 eV (c), carboxyl (カルボキシル) 288.6 eV (d) のピークが観察され、標準試料との類似性も考慮すると、タンパク質、多糖類、脂質、核酸が *A. ferrooxidans* 細胞に含まれていることがわかる。これは、バクテリア (大腸菌 *E. coli*) の炭素 XANES 分析をおこなった既往研究とも調和的な結果である<sup>13)</sup>。これに対して、pyrite-細胞付着面および細胞外縁部の炭素 XANES スペクトル (Fig. 2b の interface 1 と interface 2) は、主に酸性多糖類に由来するピークが卓越していた。この結果は、*A. ferrooxidans* が付着面で酸性多糖類に富む細胞外有機物を産生している

**Table 1** Major organic functional groups present in model compounds and samples (summarized data from Keilueit et al.<sup>6)</sup>)

peak	Energy (eV)	Transition	Functional group
a	285.2	1 s→π <sub>C=C</sub> *	aromatic C
b	287.3	1 s→3p/σ*	aliphatic C
c	288.2	1 s→π <sub>C=O</sub> *	amide C (peptide bond)
d	288.6	1 s→π <sub>C=O</sub> *	carboxyl C (acidic polysaccharide)
e	289.3	1 s→3p/σ*	O-alkyl C



**Fig. 3** (Color online) Color-coded compositional image. Images collected at each specific absorption edge (polysaccharide: 288.6 eV, protein: 288.2 eV, lipid: 287.3 eV) were merged in the image<sup>14)</sup>.

ことを示唆する。

微生物-鉱物付着面の生体分子種イメージングを RGB (red, green, blue) に色分けして示した結果が Fig. 3 である。その結果、タンパク質 (green) および脂質 (blue) は細胞中心部に多く観察され、多糖類 (red) は細胞外縁部と pyrite 粒子表面に多く存在することが示された。これは、XANES スペクトルで得られた結果と調和的であり、やはり細胞-鉱物付着面で有機物種には局在性があり、*A. ferrooxidans* の付着面で多糖類に富む細胞外有機物を産生していることを示している<sup>14)</sup>。またイメージング結果から、多糖類に富む領域の厚みは 150–200 nm 程度であり、この領域が *A. ferrooxidans* による pyrite 溶解の反応場であると考えられる。Mangold らは、原子間力顕微鏡 (AFM) をもちいて、*A. ferrooxidans* が pyrite 表面に生成する細胞外有機物を可視化している<sup>15)</sup>。彼らの研究では細胞外有機物の厚みが 150 nm 程度であることを報告しており、本研究で得られた観察結果とも調和的である。

## 2.2 STXM による微生物-鉱物境界面における鉄化学種の特定

炭素の STXM 分析から、*A. ferrooxidans* による酸性多糖類に富む細胞外有機物の産生が示された。一般的に酸性

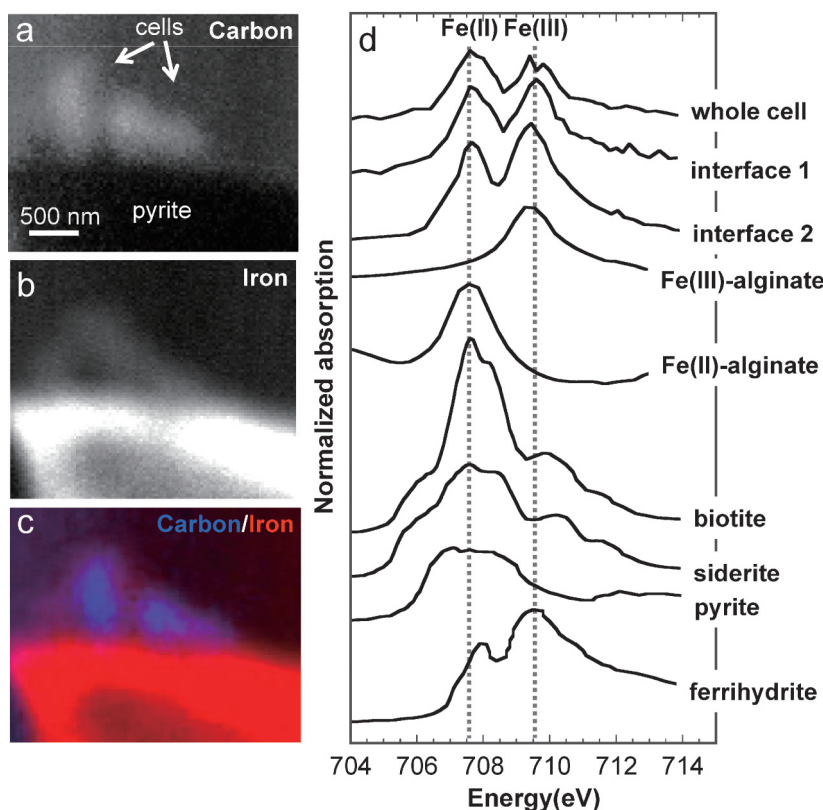


多糖類は金属錯生成能が高いため、細胞外有機物の役割として pyrite の水溶解性を増加させることが予想される。この仮説を明らかにするために、STXM による微生物-鉱物付着面における鉄の化学種分析をおこなった。鉱物付着面に存在する鉄が有機錯体として存在していれば、*A. ferrooxidans* が産生する細胞外多糖類に錯生成能があることを示す証拠となる。標準試料およびバイオリッチ試料の鉄 L 端 XANES スペクトルを Fig. 4d に示す。標準試料のうち、2 価鉄と 3 価鉄のピークトップエネルギーはそれぞれ 707.5 eV, 709.1 eV であった。酸素配位の鉄の場合、価数を反映してピークトップのエネルギーがシフトすることを示している。Pyrite のような硫化鉄や緑泥石 (chlorite) のようなケイ酸塩鉱物に鉄が取り込まれている場合は、2 価鉄であっても若干のエネルギーシフトが観察され、純粋な酸素配位の 2 価鉄とは異なるエネルギーにピークトップが観察されることが報告されている<sup>16)</sup>。一方、鉄-有機錯体の標準試料として選択したアルギン酸鉄 (2 価および 3 価) のスペクトルでは、酸素配位の 2 価鉄と 3 価鉄と同じエネルギー位置にピークトップがあることも明らかとなった (Fig. 4d)。*A. ferrooxidans* 細胞領域の鉄 XANES スペクトルには、2 つのピークが観察され、それらのエネルギーは酸素配位の 2 価と 3 価の鉄と同じエネルギー位置に観察された。また、細胞領域の鉄

XANES スペクトルは、pyrite とは異なるスペクトル形状を有し、硫化物態の 2 価鉄は含まれていないと考えられる。これらの結果から、*A. ferrooxidans* 細胞には、酸素配位の 2 価と 3 価の両方の価数が含まれていることが示唆された。また、*A. ferrooxidans* 細胞のスペクトルは、鉄-有機錯体の標準試料であるアルギン酸鉄のスペクトルと類似しており、細胞中に含まれる鉄の大部分は、酸性多糖を配位子とした有機錯体として存在していることを示している。このことは、*A. ferrooxidans* が産生する細胞外有機物が鉄と錯生成能を有することを強く支持する。また、pyrite 付着細胞の鉄のイメージングの結果、鉄は細胞外有機物に富んだ細胞-pyrite 境界面に濃集していることも、細胞外有機物 (酸性多糖類) による鉄の有機錯体生成および pyrite に含まれる鉄の溶解性増加を示唆している (Fig. 4c)。したがって、STXM による鉄 L 端 XANES とイメージング結果から、*A. ferrooxidans* が金属錯生成能をもち、鉱物溶解と金属浸出を加速する生体分子 (酸性多糖類) を鉱物表面で生成することが示された<sup>17)</sup>。

### 2.3 *A. ferrooxidans* の pyrite 溶解モデル

これらの結果からバイオリッチングのモデル微生物である *A. ferrooxidans* による pyrite 溶解反応の解明を試みた。微生物-鉱物境界面における炭素、鉄の局所化学種分



**Fig. 4** (Color online) STXM-based Fe image and Fe  $L_{2,3}$  XANES spectra of model compounds and *A. ferrooxidans* cells on the pyrite. Vertical lines were displayed to show the specific Fe(II) and Fe(III) peaks at 707.5 eV and 709.1 eV, respectively<sup>17)</sup>.

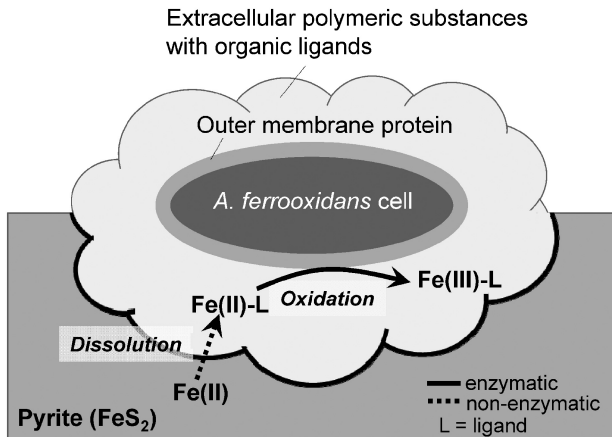


Fig. 5 Schematic representation of possible chemical and biological interactions at *A. ferrooxidans* cell-pyrite interface within a contact leaching process.

析によって、次のような *A. ferrooxidans* によるバイオリーチングモデルが提唱できる (Fig. 5)。 *A. ferrooxidans* は pyrite に付着し、錯生成能を有する酸性多糖類を細胞外に産生する。産生された酸性多糖類は、pyrite 中に含まれる鉄との錯生成反応によってみかけ上 pyrite の溶解度を上昇させる。pyrite からの鉄の溶出過程は、バイオリーチング微生物による鉄酸化反応の律速段階であるため<sup>18)</sup>、細胞外多糖類の産生が鉄酸化反応および鉱物溶解反応全体の速度を増加させることに繋がる。

この成果は、バイオリーチングの反応場である微生物-鉱物境界面において、鉱物溶解を促進する有機配位子の存在を実証した初めての知見であり、高空間分解能で化学種解析が可能な STXM による反応場の直接分析によってのみ明らかにできた知見といえる。細胞外有機物の新たな機能“鉱物中の鉄との錯生成能”を有機物および鉄の化学種分析によって分子レベルで実証した点は重要であり、本研究によって複雑なバイオリーチング機構の一端を明らかにできた。また、バイオリーチングの実用化をさらに進めるには、金属浸出効率の向上が不可欠とされており、本研究成果は遺伝子組み換え技術による多糖類産生能を強化したリーチング微生物の開発など今後のバイオリーチングの高効率化に資する知見と言える。

### 3. 放射性セシウムの粘土鉱物への吸着に及ぼす腐植物質の影響

東京電力福島第一原子力発電所（以後、福島原発と略）の事故によって、大量の放射性物質が主に大気経由で放出・輸送され、重大な環境汚染を引き起こした<sup>19,20)</sup>。今回の事故で放出された放射性核種で比較的半減期が長いのは放射性セシウム（主に <sup>137</sup>Cs および <sup>134</sup>Cs）であり、多くの研究がなされている。事故直後に沈着した放射性セシウム

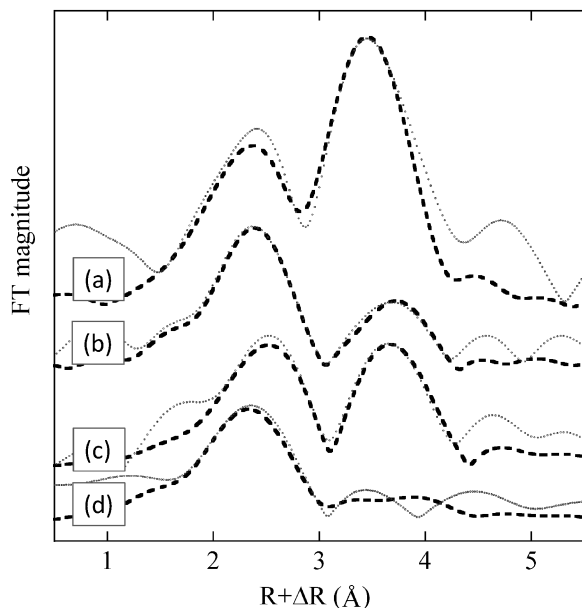
の各地の放射能は、物理的減衰を超えて減少する一方、福島県や宮城県太平洋岸の河川の河口域などで空間線量率の増加が認められる。これらは、粒子に吸着した放射性セシウムが河川により運搬されたことを示唆している。こうした元素の環境中での挙動は、突き詰めれば原子・分子レベルの化学種や化学的素過程に左右されており、その把握なしに今回の事故による放射性核種の移行挙動の正しい理解や将来予測はできない。このような観点から、本節では水圏での放射性セシウムの挙動を支配する化学プロセス、特に腐植物質の影響について、STXM を用いて行った研究を紹介したい。

#### 3.1 放射性セシウムの層状ケイ酸塩への吸着

今回の福島第一原発の事故において、放射性セシウムは主にエアロゾルとなって大気中を拡散したと考えられる。このエアロゾル中のセシウム (Cs) の化学形態として、放射性セシウムを高濃度に濃縮したシリカに富む粒子が存在することが分かっている<sup>21-23)</sup>。この粒子からの放射性セシウムの溶出割合は低いと考えられているが、一方で事故当時に採取されたエアロゾルフィルターに捕集された放射性セシウムは、その50-90%が水溶性であった<sup>24)</sup>。したがって、地表に沈着後の放射性セシウムの挙動は、主に水に溶けるか、環境中の固相表面に吸着するかのいずれかのプロセスに支配されると予想される。

セシウムはアルカリ金属で、そのイオンは水に溶け易い性質を持つ一方で、雲母や2:1型粘土鉱物などの層状ケイ酸塩に特異的に安定に吸着されることが知られている。それは、最も大きな陽イオンであるセシウムイオンが、層状ケイ酸塩が形成するケイ酸塩4面体シートが層間側に形成する6員環にサイズの的に適合し、ケイ酸塩4面体シートと直接結合を持つ（内圏錯体）ためと説明される<sup>25-27)</sup>。実際に福島地域の土壌や河川堆積物を懸濁した溶液にセシウム溶液を添加し、得られた土壌や河川堆積物中のセシウムのEXAFSスペクトルを測定すると、第2近接原子の寄与が観察され、このような内圏錯体が形成されていることが分かる (Fig. 6)<sup>26,27)</sup>。

このような吸着態が安定であることは、これまで数多く報告されている土壌中の放射性セシウムの鉛直分布において、沈着した放射性セシウムの90%以上が表層5 cm以内に存在しており、その傾向は梅雨などの多雨な時期を経ても変化しなかったことから理解される<sup>28,29)</sup>。こうして土壌表層に固定された放射性セシウムは、浸食をうけて河川に流入し海洋に運ばれる。河川水を様々な孔径のメンブランフィルターでろ過し、ろ液に残った放射性セシウムを定量すると、おおよそ70%以上の放射性セシウムが0.45 μm以上の懸濁粒子中に存在した<sup>30)</sup>。つまり福島において放射性セシウムは、河川水中の微小な懸濁粒子に吸着されたまま移動していると考えられる。



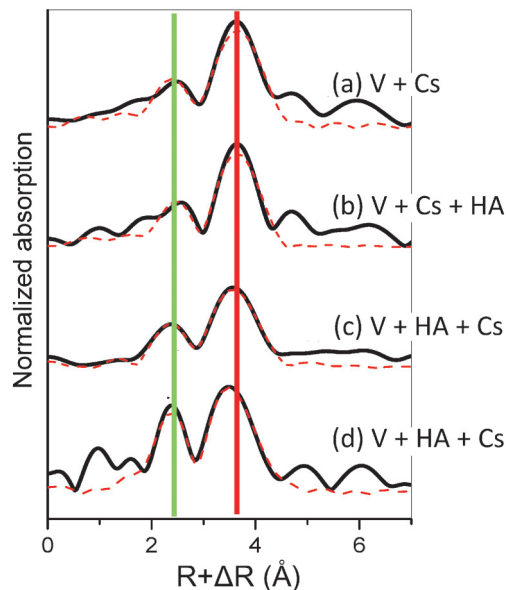
**Fig. 6** Radial structural function (RSF; phase shift uncorrected) of cesium  $L_3$ -edge EXAFS spectra of hydrated Cs ion in water (a) and Cs adsorbed on vermiculite (b), on soil in Fukushima (c), and on sediment in Fukushima (d). Solid lines are spectra obtained by experiments and dotted lines are fitted spectra by curve-fitting analysis<sup>26,27</sup>.

### 3.2 放射性セシウムの層状ケイ酸塩への吸着に及ぼす有機物の影響

一方、1986年のチェルノブイリ原発事故の際に、原発のそばを流れるプリピャチ川中の放射性セシウムは70%以上が溶存態であり、福島とは正反対の傾向を示した<sup>31</sup>。この地域の周辺土壌は泥炭地であり、プリピャチ川に含まれる溶存有機物濃度は20 mg/L程度と、福島地域の阿武隈川などのおおよそ5~10倍以上であった。このような場合、分子量の大きな溶存有機物が懸濁粒子を覆い、放射性セシウムの吸着を阻害する可能性がある<sup>32</sup>。

そこで我々は、まず室内のモデル実験として、セシウムを安定に吸着する代表的な層状ケイ酸塩であるパーミキュライトを水に懸濁させ、セシウムを添加した二元系の実験に加えて、天然有機物の主成分と考えられる腐植物質（ここではフミン酸）の存在下でセシウムの吸着挙動がどのように変わるかを調べた<sup>27,33</sup>。その結果、二元系に比べると、層状ケイ酸塩にフミン酸を添加後にセシウムを加えた三元系では、セシウムの吸着率が減少した。これは、層状ケイ酸塩層間へのセシウムイオンの侵入がフミン酸によって阻害されたことによる可能性がある。そこでセシウム  $L_3$  吸収端 EXAFS を調べた結果、三元系では内圏錯体の生成を示すピークの強度が相対的に減少した。これは、フミン酸が層状ケイ酸塩を覆ったために、層間に取り込まれて内圏錯体を形成するセシウムの割合が減少したことを示す (Fig. 7)<sup>27,33</sup>。

このような腐植物質によるセシウム吸着の阻害効果は、



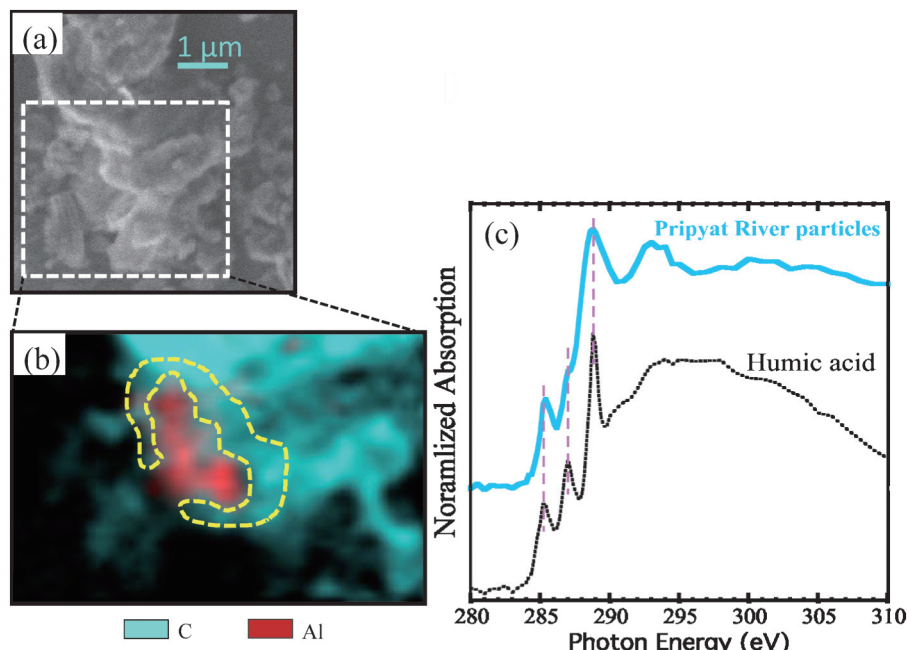
**Fig. 7** (Color online) RSF of cesium  $L_3$ -edge EXAFS adsorbed on vermiculite (V) in the absence or presence of humic acid (HA). (a) Cs adsorbed on vermiculite (Cs concentration 72.1 mg/g), (b) Cs adsorbed on vermiculite (Cs concentration: 54.1 mg/g) when Cs was added before addition of humic acid in the solution (HA concentration: 80 mg/L), (c) Cs adsorbed on vermiculite after addition of humic acid (Cs concentration: 35.8 mg/g; HA concentration: 80 mg/L), and (d) Cs adsorbed on vermiculite with addition of a larger amount of humic acid after adsorption of Cs (Cs concentration: 54.1 mg; HA concentration: 500 mg/L)<sup>27,33</sup>.

プリピャチ川で懸濁粒子へのセシウムの吸着が弱いことの原因と考えられる。そこで、プリピャチ川で採取された懸濁粒子にセシウムを添加し、上と同様にして得た  $L_3$  吸収端 EXAFS では、外圏錯体が優勢であることが分かり (Fig. 6)、層状ケイ酸塩は存在するものの、内圏錯体の生成は顕著にはみられないことが分かった。しかし、この懸濁粒子から過酸化水素処理で有機物を除去した試料にセシウムを吸着させると、内圏錯体の割合が増加した。これは、腐植物質などの天然有機物が懸濁粒子中に存在することで、プリピャチ川の懸濁粒子に対するセシウムの内圏錯体の生成が阻害されることを示している。放射性セシウムは、こうした有機-無機複合体である懸濁粒子が天然で生成した後に人為的に系に加わったと考えられ、この阻害効果の影響を受ける。その結果、プリピャチ川において放射性セシウムの溶存態の割合が高くなったと考えられる。

### 3.3 粘土鉱物-有機物複合体の STXM 観察

このような有機-無機複合体が実際に生成しているかを確かめる上で、無機物も有機物も同時に高い空間分解能で観察できる STXM は、理想的な手法である。実際 STXM は、海洋中の物質循環において大きな役割を果たしている沈降粒子（やはり有機-無機複合体）のキャラクタリゼーションにも活躍している<sup>34</sup>。今回の研究では、プリピャ





**Fig. 8** (Color online) (a) SEM (secondary electron) image of particulate matters collected from the Pripyat River; (b) Color-coded chemical composite map, derived from cSTXM images (blue: C; red: Al) in the squared area of (a); (c) Carbon K-edge XANES spectrum in the area designated by yellow broken line in (b) and that of humid acid (the Suwanee River Humic Acid) as a reference material<sup>33)</sup>

チ川で採取された懸濁粒中の炭素、アルミニウム、カリウムをSTXMで観察した。STXM分析用試料は、河川懸濁粒子を超音波洗浄器で水中に十分に分散させた懸濁液を窒化ケイ素の薄膜(50~100 nm)やTEM用銅メッシュに滴下し、乾燥させて作製した。その結果、層状ケイ酸塩に多く含まれるアルミニウムやカリウムを取り囲むように炭素が存在していることが分かった(Fig. 8)<sup>33)</sup>。またこの炭素のK端XANESを測定したところ、腐植物質とほぼ同様のスペクトルを示した。比較として示したフミン酸のスペクトルと比較すると、プリピャッチ川の試料では287 eV付近のピークが相対的に弱かった。これはフェノール基に含まれる炭素のピークであり、この寄与が小さいものは、腐植物質のうちフミン酸よりも水に溶解易いフルボ酸成分のスペクトルに類似している。いずれにしてもこれらの結果は、プリピャッチ川中の懸濁粒子は、層状ケイ酸塩である無機の微細粒子を腐植物質という有機物が覆っている形態を示し、それが放射性セシウムの吸着挙動に影響を与えていると解釈できる。

#### 4. 今後に向けて

本稿では、STXMを用いて環境物質中の有機化合物の官能基分布を50 nm程度の空間分解能で調べることで、微生物による鉱物溶解や放射性セシウムの水への溶解などの素過程を解明した研究を紹介した。環境中の多くの物質は、様々な無機物や有機物がサブミクロンやそれ以下のス

ケールで混合した不均質な物質である。こうした物質を特定の元素に着目して調べられるXAFS法の利点はそのままで、高空間分解能で有機物の官能基分布まで調べられるのがSTXMである。STXM以上に高空間分解能な透過型電子顕微鏡(TEM)は、エネルギー損失分光(EELS)を用いれば化学種解析が可能ではあるが、有機物を対象にした場合、電子線による損傷の影響を免れない。そのため、STXMを用いた局所的(かつ他手法に比べて非破壊で損傷の影響が小さい)な有機物のキャラクタリゼーションは、環境化学の様々な研究において今後活躍していくであろう。

ただし、STXMにおいても利用するX線が試料に与える損傷は無視できない。こうした試料損傷への対応や、試料の前処理・作製法の向上は、STXMの利点を活かすためにも、重要な技術的課題である。試料損傷への対策としては、クライオ技術が利用されているが<sup>35)</sup>、有機物や生物試料などではクライオ法を用いても損傷(測定中のXANESの変化などで検知される)がみられる場合も多い。このような場合、どの程度のX線の照射量で試料の変質が起きるかを調べ、それ以下のX線照射量で分析を行うことが推奨される<sup>36)</sup>。

また、試料作製法においては、STXMは主に透過法によるため、試料の厚さの調整が必要である。本稿で紹介した試料は元々微小な粒子なのでほぼそのまま観察できたが、例えば固体の岩石・鉱物試料の場合には試料加工が必要になる。その場合、TEMで用いられる手法が参考にな

り、固体試料では収束イオンビーム (FIB) を用いた薄膜試料の作製が有効である。ただし、FIB の利用に当たっても、試料に対するダメージを極力小さくする必要がある<sup>37)</sup>。一方で、厚さの制約が小さい検出法として、透過法以外に蛍光法や電子収量法の利用も今後重要になるだろう。

これらの技術的な課題を解決しながら STXM の環境試料への応用を進展させることは、21世紀において益々重要になる環境科学への放射光の利用を進める上で、大きな貢献をするであろう。

### 参考文献

- 1) 太田俊明: X 線吸収分光法—XAFS とその応用 (アイビーシー, 東京, 2002).
- 2) 佐野有司, 高橋嘉夫: 地球化学 (共立, 東京, 2013).
- 3) 高橋嘉夫: 放射光 **21**, 204 (2008).
- 4) C. S. Chan, G. Stasio, S. A. Welch, M. Girasole, B. H. Frazier, M. V. Nesterova, S. Fakra and J. F. Banfield: *Science* **303**, 1656 (2004).
- 5) 高橋嘉夫: 化学 **50**, 61 (2005).
- 6) T. Ohigashi, H. Arai, T. Araki, N. Kondo, E. Shigemasa, A. Ito, N. Kosugi and M. Katoh: *J. Phys.: Conf. Ser.* **463**, 012006 (2013).
- 7) Y. Takeichi, N. Inami, H. Suga, C. Miyamoto, T. Ueno, K. Mase, Y. Takahashi and K. Ono: *Rev. Sci. Instrum.* **87**, 013704 (2016).
- 8) 小西康裕: 金属資源レポート **91**, 852 (2007).
- 9) A. R. Colmer and M. E. Hinkle: *Science* **19**, 253 (1947).
- 10) G. J. Olson: *Applied Environ. Microbiol.* **57**, 642 (1991)
- 11) M. Vera, T. Rowwerder, S. Bellenger, W. Sand, Y. Denis and V. Bonnefoy: *Adv. Material Res.* **175**, 71 (2009).
- 12) X. Lu and H. Wang: *Elements* **8**, 119 (2015).
- 13) M. Keilweit, J. J. Bougourre, L. H. Zeglin, D. D. Myrold, P. K. Weber, J. Pett-Ridge, M. Klever and P. S. Nico: *Geochim. Cosmochim. Acta* **95**, 213 (2012).
- 14) S. Mitsunobu, M. Zhu, Y. Takeichi, T. Ohigashi, H. Suga, H. Makita, M. Sakata, K. Ono, K. Mase and Y. Takahashi: *Chemistry Letters* **44**, 91 (2015).
- 15) S. Mangold, M. Laxander, K. Harneit, T. Rohwerder, G. Claus and W. Sand: *Hydrometallurgy* **94**, 127 (2008).
- 16) B. Toner, S. C. Fakra, S. J. Manganini, C. M. Santelli, M. A. Marcus, J. W. Moffett, O. Rouxel, G. R. German and K. J. Edwards: *Nature Geosci.* **2**, 197 (2009).
- 17) S. Mitsunobu, M. Zhu, Y. Takeichi, T. Ohigashi, H. Suga, M. Jinno, H. Makita, M. Sakata, K. Ono and Y. Takahashi: *Microbes Environ.* **31**, 63 (2016).
- 18) T. Gehrke, J. Telegdi, D. Thierry and W. Sand: *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2743 (1998).
- 19) N. Yoshida and Y. Takahashi: *Elements* **8**, 201 (2012).
- 20) 中島映至, 大原利真, 植松光夫, 恩田裕一, 原発事故環境汚染 福島第一原発事故の地球科学的側面, 東大出版会, 2014.
- 21) K. Adachi, M. Kajino, Y. Zaizen and Y. Igarashi: *Sci. Rep.* **3**, 2554 (2013).
- 22) Y. Abe, Y. Iizaki, Y. Terada, K. Adachi, Y. Igarashi and I. Nakai, *Anal. Chem.* **86**, 8521 (2014).
- 23) T. Kogure, N. Yamaguchi, H. Segawa H. Mukai, S. Motai, K. Hasegawa, M. Mitome, T. Hara and T. Yaita: *Microscopy*, (2016) in press.
- 24) K. Tanaka, A. Sakaguchi, Y. Kanai, H. Tsuruta, A. Shinohara and Y. Takahashi: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **295**, 1927 (2013).
- 25) 山口紀子, 高田裕介, 林 健太郎, 石川 寛, 倉俣正人, 江口定夫, 吉川省子, 坂口 敦, 朝田 景, 和穎朗太, 牧野知之, 赤羽幾子, 平舘俊太郎: 農環研報 **31**, 75 (2012).
- 26) H. Qin, Y. Yokoyama, Q. Fan, H. Iwatani, K. Tanaka, A. Sakaguchi, Y. Kanai, J. Zhu, Y. Onda and Y. Takahashi: *Geochim. J.* **46**, 355 (2012).
- 27) Q.H. Fan, M. Tanaka, K. Tanaka, A. Sakaguchi and Y. Takahashi: *Geochim. Cosmochim. Acta* **135**, 49 (2014).
- 28) K. Tanaka, Y. Takahashi, A. Sakaguchi, M. Umeo, S. Hayakawa, H. Tanida, T. Saito and Y. Kanai: *Geochim. J.* **46**, 73 (2011).
- 29) T. Matsunaga, J. Koarashi, M. Atarashi-Andoh, S. Nagao, T. Sato and H. Nagai: *Sci. Total Environ.* **447**, 301 (2013).
- 30) A. Sakaguchi, K. Tanaka, H. Iwatani, H. Chiga, Q. Fan, Y. Onda and Y. Takahashi: *J. Environ. Radioactivity* **139**, 379 (2015).
- 31) U. Sansone, M. Belli, O. V. Voitesekovitch and V. V. Kanivets: *Sci. Total Environ.* **186**, 257 (1996).
- 32) Y. Takahashi, Y. Minai, S. Ambe, Y. Makide and F. Ambe: *Geochim. Cosmochim. Acta* **63**, 815 (1999).
- 33) H. Suga, Q. Fan, Y. Takeichi, K. Tanaka, H. Kondo, V. V. Kanivets, A. Sakaguchi, K. Kato, N. Inami, K. Mase, K. Ono and Y. Takahashi: *Chem. Lett.* **43**, 1128 (2014).
- 34) J. A. Brandes, C. Lee, S. Wakeham, M. Peterson, C. Jacobsen, S. Wirick and G. Cody: *Mar. Chem.* **92**, 107 (2004).
- 35) T. Beetz and C. Jacobsen: *J. Synchrotron Rad.* **10**, 280 (2003).
- 36) J. Wang, C. Morin, L. Li, A. P. Hitchcock, A. Scholl and A. Doran: *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **170**, 25 (2009).
- 37) N.D. Bassim, B. T. de Gregorio, A. L. D. Kilcoyne, K. Scott, T. Chou, S. Wirick, G. Cody and R. M. Stroud: *J. Microscopy* **245**, 288 (2012).



## 著者紹介



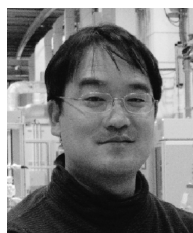
### 光延 聖

愛媛大学農学部生物環境学科 准教授  
E-mail: mitsunobu.satoshi.dy @ ehime-u.  
ac.jp

専門：環境地球化学

#### 【略歴】

2006年広島大学大学院理学研究科地球惑星システム学専攻博士後期課程修了，博士（理学）。2008年日本学術振興会特別研究員。2008年静岡県立大学環境科学研究科，助教。2015年より現職。



### 高橋嘉夫

東京大学大学院理学系研究科地球惑星科学  
専攻 教授

E-mail: ytakaha@eps.s.u-tokyo.ac.jp  
専門：地球化学，環境化学，放射化学

#### 【略歴】

1992年東京大学大学院理学系研究科博士課程修了，1998年広島大学助手，2000年広島大学助教授，2009年広島大学教授，2014年より現職。



### 菅 大暉

広島大学大学院理学研究科地球惑星システム学専攻 博士課程 2年

E-mail: hiro-suga@hiroshima-u.ac.jp

専門：STXM を使った天然試料分析

#### 【略歴】

2013年広島大学理学部地球惑星システム学科卒業。2013年広島大学大学院理学研究科進学，現在同在学中（日本学術振興会特別研究員 DC1）。

# Importance of characterization of organic matter in environmental samples using scanning transmission X-ray microscopy

**Satoshi MITSUNOBU** Faculty of Agriculture, Ehime University, Matsuyama, Ehime 790-8566, Japan

**Hiroki SUGA** Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8526, Japan

**Yoshio TAKAHASHI** Graduate School of Science, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

**Abstract** Scanning Transmission X-ray Microscopy (STXM) has become an essential tool for environmental chemistry. The method allows us to obtain mapping of various elements coupled with speciation of the element based on X-ray absorption spectroscopy. The method has various unique characteristics such as high spatial resolution (ca. 30 nm), elemental selectivity, and its applicability for the mapping not only for each element but also for chemical species. In particular, STXM enables us to obtain mapping of each functional group in organic matter. This review showed two examples of environmental studies using STXM. First study on the direct detection of Fe(II) in extracellular polymeric substances (EPS) at the mineral-microbe interface in bacterial pyrite leaching, where STXM revealed presence of iron complex with EPS, which can accelerate dissolution of pyrite. Second study showed the presence of coating of humic substances matters around particulate particles in river water by STXM, which in turn inhibits adsorption of radiocesium in the land water. This effect showed that humic substances affect migration of radiocesium in environment. These results showed that characterization of organic matter by STXM is important to understand various chemical processes in environment.