微生物関与による淡水性マンガンノジュールの初期生成

Incipient stages of microbial manganese nodule precipitation in freshwater

Abstract

田崎和江*
服部竜哉*
岡美登子**
飯泉 滋**

Kazue Tazaki*
Tatsuya Hattori*
Mitoko Oka**
Shigeru Iizumi**

1994年6月9日受付.
1994年10月24日受理.

- * 金沢大学理学部地学科.
Department of Earth Sciences, Faculty of
Science, Kanazawa University, Kakuma,
Kanazawa, 920-11, Japan
- ** 島根大学理学部地質学科.
Department of Geology, Faculty of Science,
Shimane University, Matsue 690 Japan

Under present-day natural conditions, manganese dissolution and precipitation are primarily mediated by microorganisms. Laboratory simulation experiments showed evidences of organic involvement in the precipitation process of the manganese in freshwater systems. Within a few weeks, glass slides kept in beakers with river water and sediments became coated with brown materials. These materials were microbial manganese nodules-like doughnut-shaped holdfasts. The biological manganese mineral formation processes were traced by optical microscope, scanning electron microscope, energy dispersive X-ray analyzer, and transmission electron microscope. Under optical microscope, the most common bacterium associated with Mn deposition was *Leptothrix discophora*-like bacteria, a Mn-precipitating iron bacterium that forms filaments of adhering rods within an enclosing sheath. This manganese precipitation grew on the glass slides, cover glass and beaker walls which are similar to "Manganese nodules" reported by Robbins et al. (1992). The Mn-coated holdfasts have distinct doughnut-shape. The nodules were composed of poorly crystallized manganese minerals and ferrihydrite mixtures. The laboratory simulation results indicated that manganese nodules formed from a biogeochemical origin, rather than the inorganic origin. The inorganic origin manganese nodule grew as cubic crystalline minerals in boiled-river water system.

Key words : microbial, manganese nodule, freshwater

はじめに

マンガンは地殻中に0.12 wt.%しか含まれていない遷移元素である(Weiss, 1977; Skinner and Fitzpatrick, 1992)が、生物にとって光合成やエネルギー代謝を行う上で欠くことのできない元素である(須田, 1988; Lowenstam and Weiner, 1989; Nealson et al., 1989; Ehrlich, 1990; Dixon and Skinner, 1992; 小林, 1993). 水中におけるマンガンや鉄の濃集過程に微生物が深く関わっていることは、これまで多くの研究者によって指摘されてきたところである(Ehrlich, 1975; Beveridge and Murray, 1976; Burdige and Kepkey, 1983; Chapnick et al., 1982; 原田, 1983; 針谷・三浦, 1983; Ferris and Fyfe, 1987; Schmidt and Robbins, 1992; Robbins et al., 1992). マンガンの濃集は、深海底、地下水、湖沼、河川、湿地など自然界に広く認められている。深海底のマンガンノジュールについては、重要な金属資源として多くの研究がなされており、その成因として、化学的な沈積や微生物の関与の可能性が指摘されている(Brookins, 1988; Mann et al., 1992; Robbins et al., 1992). また、鉱山の排水溝に微生物の作用によると考えられる結晶度の高いマンガン鉱物が生成している例(Mann et al., 1992; Robbins et al.,

1992)や表層土にもバクテリアが葉片状や房状のマンガン濃集している例が報告されている(Dorn and Oberlander, 1981; Golden et al., 1992). いわゆる鉄バクテリアはその細胞壁やコロニーの表面にオンゲストロームサイズの非晶質、または低結晶性の水酸化物を生成する(Beveridge and Fyfe, 1985; Nealson and Tebo, 1980). マンガン酸化バクテリアの培養実験(Ehrlich, 1975)からは、マンガンの濃集には、バクテリアの作用とともに酸化・還元状態や水素イオン濃度などの環境条件も大きく関与していることが指摘されている(Ferris and Fyfe, 1987; Brookins, 1988).

現生の陸地で二酸化マンガンの析出を観察できる場所は極めて限定されている。従来から指摘されている<天然における二酸化マンガン析出には微生物が関与している可能性>が明確にされた例は世界的に少ない。金沢市を流れる三大河川(犀川、浅野川、金腐川)の上流から河口までの約200か所の河川水を採取してpHや化学組成など6項目について測定を行った際に、河川水の性質が周辺の地質や土壌に密接に関係していることが明らかになった。この詳しい結果については、別に報告するが、この調査から金沢市の大桑累層の分布する地域、特に金腐川周辺のゴルフ場、産業廃棄物処理場、採土場、金沢大学建設地など開発の手が入った地域の河川に

Fig. 1. Schematic explanation of laboratory experiment of the manganese precipitation which was an organic contribution in freshwater systems. Glass slides kept in a beaker with river water and sediments were coated with brown materials within a few weeks.

赤褐色のバイオマットが広範囲に生成していることに気がついた。そこで、このバイオマットを電子顕微鏡で観察したところ、高濃度のマンガンと鉄が検出された。これらの野外調査、地質調査、水質検査、微生物関与の予備実験を基礎にしてミクロからの環境地質的な研究を行うことにした。その一つが、天然試料を用いて酸化マンガンの析出に微生物が関与することを指摘する試みであり、このマンガンと鉄に富んだバイオマットが生成する過程を実験室で観察する試みである。本研究では、ビーカーの中に顕著に繁殖のみられた微生物のコロニーに着目し、微生物が淡水中でマンガンや鉄鉱物を生成する過程を観察した。本稿では、生成された物質の形態、組成、構造等を電子顕微鏡を用いて検討した結果を報告し、マンガンの濃集における微生物の果たす役割について考察する。

試料と実験方法

1. 試料

実験に用いた試料は、金沢市角間町の金沢大学調整池付近の角間川上流部および松江市黒田町の松江城内堀に流入する小川から採取した。特に、金沢市の金腐川水系とその周辺には、マンガン濃集した赤褐色のバイオマットが、数十 cm 平方から支流全体、はぎ取られた露頭全体、排水溝の川底全体、コンクリートの水抜き穴まで広く赤褐色を呈して形成されているのが認められる。このバイオマットは水を多量に含み、平滑な表面を呈し、いわゆるくぬるぬるとした状態で、数 mm から数 cm の厚さで河川の砂礫や露頭の表面を覆っている。試料採取地点は、大桑累層と呼ばれる更新世の浅海性細粒砂岩層が覆い、標高 100-150 m の丘陵地をなしている。このバイオマットの分布と環境地質については別に詳しく報告する。一方、松江市の試料採取地点の川底には、周囲の水田から流入した泥質堆積物および花崗岩起源の砂質堆積物が沈着している。それぞれの地点から、約 200 ml の最表層(川底から 0.5 cm 以内)の堆積物と 600 ml の河川水をそれ

ぞれ数個の 1000 ml ビーカーに採取した。金沢市の試料採取地点の流速は、3-5 cm/sec., 水深 10-20 cm で採取時の水温は、15-20℃, pH は 7-8 であった。松江市の試料採取地点の流速は 3 cm/sec., 水深は、8 cm であった。また試料採取時の水温は 15-20℃, pH 7-8 であった。金沢市の大桑累層とその上部の卯辰山層の湧き水や河川水の原子吸光分析も行った。湧き水は採取後、ただちに 0.45 μm の孔径フィルターで濾し、その濾液をただちに原子吸光で分析した(採水から測定まで 1 時間以内)。すなわち、この値は、<溶存態>と懸濁態の合計ではなく、<溶存態>の湧き水の化学組成である(加藤・田崎, 1994)。現地にもスライドガラスを設置してバイオマットの観察を行ったが、微生物のコロニーの種類やマンガンの粒子サイズは、ビーカーの実験に見られるものとはほぼ同じである。なお、この実験結果をまとめながら、地質環境調査を進める中で、松江や金沢以外の地域でも次々と赤褐色のバイオマットが見いだされているが、大桑累層の地下水のように高濃度のマンガンの含有量を示す例は少ない。

2. 実験方法

同一地点で試料を採取した数個のビーカーは、直射日光の当たる実験室の窓際と当たらない暗所に分けて定置した。なお、ビーカーは、現地で試料採集の際にその河川水で洗ったものと、コントロールの実験のためのガンマー線滅菌済み市販容器の両方を目的に応じて使用した。培養実験と平行して行ったコントロールの実験は、河川水のみを 3 時間煮沸して滅菌したビーカーに入れてクリーンルームに設置した。また、河川水を 0.45 μm フィルターで濾し、濾液のみを滅菌したビーカーに入れて比較した。さらに、エアーポンプにより空気を送った場合や、無機的な生成を検討するため、 $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ や $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を付加した実験も行った(吉津ほか, 1994)。

各ビーカーには、堆積物の上にスライドガラス(26 mm × 76 mm)を立てかけ、水面にはカバーガラス(24 mm × 24 mm)を数枚差し込んだ発砲スチロールを浮かせた(Fig. 1)。なお、発砲スチロールは、100℃で 1 時間煮沸し、滅菌したものを使用した。各河川水は液体クロマトグラフィー(東ソー株式会社, SC-8010 型)または原子吸光分析器(日立・Z-6100)で分析した。なお、河川水は採取後ただちに 0.45 μm 孔径のメンブランフィルターを用いてアスピレーターで吸引し、ただちにその濾液の分析を行ったので、塩酸や硝酸等の酸の添加を一切行っていない。使用した器具一式は、目的に応じて滅菌済み市販容器やオートクレーブによる滅菌処理を行い、無菌ブースやクリーンベンチで実験を行った。また、培養過程における試料の採取は、スライドガラスは無処理でただちに光学顕微鏡や走査型・透過型電子顕微鏡で観察し、終了後は再度ビーカー内にはもどしていない。分取した培養液およびコントロール液はただちに 0.45 μm のフィルターで濾過した後、ただちに<溶存態>を分析したので酸の添加は行っていない。分析後の溶液もビーカー内にはもどしていない(加藤・田崎, 1994; 吉津ほか, 1994)。

堆積物は X 線粉末回折装置(理学電機社製, RINT1200)を用いて鉱物の同定を行った。ビーカーを定置して 2 日ない

Fig. 2. Comparison of biological contribution of Mn precipitation (A) and inorganic Mn crystalline (B) added $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in boiled-river water, showing different micromorphology, size and crystallinity within one week experiments.

し3日後、ビーカーの側壁、スライドガラス、カバーガラスに暗黄褐色の付着物が生じ始める。その付着物のついたカバーガラスを位相差型偏光顕微鏡（ニコン製 X2HPD 型）で微生物を観察した。また、付着物をビーカーから削り取り、無反射板（Si 単結晶）に塗布し、風乾後に X 線粉末回折装置にかけ、電圧 30 kV、電流 10 mA で同定を行った。また、付着物の付いたカバーガラスは、そのまま試料台に固定し、湿ったままの状態とともに、風乾後、金または炭素蒸着し、走査型電子顕微鏡（日本電子製 JSM-5200 LV）で、加速電圧 15 kV の条件で観察を行った。さらに、カバーガラスに付着したまま炭素蒸着したものと、付着物を炭素両面テープに移し取り炭素蒸着したものをエネルギー分散装置により面分析を行った。なお、この装置に組み込まれている ZAF 補正プログラムによりノンスタンダード法簡易定量分析も合わせて行った。この分析には、走査型電子顕微鏡に取り付けられた Philips 社製 PV-9755-88 型検出器を用い、加速電圧 15 kV、傾斜角度 30 度で分析した。ビーカーの付着物をなるべく形態を崩さないようにして削り取り、蒸留水で懸濁させた後、その一滴をカーボンで補強したマイクログリッドにのせ、透

過型電子顕微鏡で観察した。透過型電子顕微鏡は、日本電子製の JEM-2000EX を用い、加速電圧 200 kV で観察した。

結 果

1. コントロール実験

河川水のみを3時間煮沸して、滅菌したビーカーの中に入れ、同じく滅菌した発泡スチロールにカバーガラスを差し込んだコントロール実験では、1週間後でもドーナツ型の生成物は認められなかった。また、無機生成を検討するために、 $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ や $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を付加したコントロール実験では、立方体の結晶を生成した（吉津ほか、1994）。滅菌した河川水に 0.5 モルの $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を入れ、pH6.7-6.8 の条件下では、数日でカバーガラスの上に立方体のマンガンの結晶が多数生成した（Fig. 2B）。その立方体の結晶は、一辺が 10 μm 前後の大きさで、表面は平滑であり、エネルギー分散分析ではマンガンの組成のみを示した。なお、このコントロール実験ではドーナツ型の生成物は認められなかった。一方、Fig. 2A は、煮沸・滅菌していない河川水から生成したドーナツ型のマンガンの生成物であるが、両者とも設置 1

Fig. 3. The relation among pH, temperature and time in freshwater systems under photosynthetic condition (left) and dark-cool condition (right), suggesting differences of biological activity in both systems.

Table 1. Freshwater chemistry of atomic absorption analyses from Utatsuyama Formation and Onnma Formation. The water samples were filtered through $<0.45\mu\text{m}$ filter paper.

	pH	Mn	Fe	Ca	K	
Utatsuyama F.	7.0 - 7.5	0.01	0.00	6.40	0.76	ppm
Onnma F.	6.5 - 6.8	1.03	0.25	76.00	18.00	ppm

週間後の試料であるにもかかわらず、その形態、大きさ、結晶度は著しく異なっている。

2. 水および堆積物

採取した河川水はいずれも無色透明であるが、試料採取3日後からいずれのビーカーも内壁およびカバーガラスに茶褐色の付着物が生じはじめ、日数を経るにしたがって、付着物の量は増加する。ビーカー内の堆積物中には、種々の微生物が活発に活動しており、それらの呼吸や光合成によって水のpHは7-8の中性領域で時間的に変化する。

ビーカー中の水のpHと温度は陽の当たる場所では、pH 7-8の間で時間的な変化が見られたが (Fig. 3)、日陰ではこの変化は小さい。水温が最高に達してからpHが最高に達するまで、約2時間の時間差が認められる。水中に溶存する元素は、いずれの試料においてもカルシウムが大部分で、他にNa, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Mn, Feが検出された。なお、松江市の小川の水は、汽水の影響を受け、塩素が認められる。金沢大学調整池の水の懸濁態のカルシウムは21-58 ppmで、マンガンは1-4 ppmである。小川や調整池の水の組成は周囲のさまざまな要素の総合した組成を表していると思われる

ので、特に地層による湧き水の組成の差異をみるために卯辰山層と大桑累層からの湧き水を採取し、原子吸光で分析した。これは両者のマンガンの違いを知るのみならず、懸濁態と溶存態の違いを知るためでもある。両地層から採取した湧き水は1時間以内に $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過して、その濾液をただちに原子吸光で分析した。その溶存態の分析結果をTable 1に示す。なお、この値は、5回測定した平均値であり、pHは、採水時と原子吸光分析の直前に再度測定したpHである。マンガンの含有量が、大桑累層の湧き水に比べて高い。大桑累層のマンガンの含有量は、卯辰山層の湧き水の値の100倍である。なお、金沢大学の調整池の懸濁態のマンガンの含有量が1-4 ppmであるのに対して、大桑累層の溶存態のマンガンの含有量が1.03 ppmであることは、調整池に流れ込んでいる水のマンガンのほとんどが大桑累層を起源としていること、かつバイオマットへと移行する懸濁態に濃集することを意味している。

ビーカー内のカルシウムとマンガンの濃度の関係は、カルシウム濃度が日数とともに増加の傾向があるのに対して、マンガンの濃度は横ばいからやや減少傾向が認められる (Fig. 4)。

Fig. 4. Concentrations of dissolved Ca and Mn in three freshwater systems under photosynthetic condition, indicating that Ca content increases and the Mn decreases with time. The graph suggests that microbial accumulation of Mn from the water.

堆積物のエネルギー分散分析およびX線粉末回折分析の結果は、いずれの試料もシリカとアルミニウムを主とし、数%のカリウム、カルシウム、マンガ、鉄を含む。構成鉱物は、主に石英と長石類であり、少量の粘土鉱物（スメクタイト、カオリナイト、イライト）が含まれる。マンガや鉄鉱物の存在は認められない。

3. カバーガラスの付着物

カバーガラスやビーカーの付着物を光学顕微鏡で観察すると大部分は *Leptothrix discophora* (糸状鉄細菌) の形態に類似した $0.1\text{--}0.5\mu\text{m}$ の構造物 (Fig. 5b) と茶褐色を呈するその凝集物質 (Fig. 5a) が存在し、しばしば緑藻、藍藻や珪藻類なども認められる。珪藻類にはマンガ等の付着物は認められないが、*Leptothrix discophora* の形態に類似した構造物の鞘の先端や内部には茶褐色の小さい凝集物質が認められる。この凝集物質が増加するとこのコロニーは放射状に成長し、 $10\text{--}200\mu\text{m}$ の直径を持つドーナツ型を呈する (Fig. 5a)。このコロニーの生成初期には、中央部にクレーター状の穴が見られるが、発達するにしたがって穴がふさがりボール状を呈する。Robbins et al. (1992) と Schmidt and Robbins (1992) は、これと類似の物体を“マンガノジュール”と呼んでいる。本論文でも、*Leptothrix discophora* の形態に類似した構造物を“マンガノジュール”と呼ぶ。このコロニーを直交ニコルで観察すると、結晶質の微細な粒子がコロニーに密集しているようすが観察される。このコロニーは、ノジュールへの成長過程、特に初期のミクロンサイズの核形成

を観察していると考えられる。このコロニーは数ミリのオーダーのノジュールへと次第に成長する。一方、滅菌したく溶存態>やく溶存態と懸濁態の混合>を煮沸処理したビーカーに $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ や $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を入れたコントロール実験では、同期間中にドーナツ型のコロニーの形成は認められなかった (吉津ほか, 1994)。堆積物を入れない河川水のためのビーカー内でも少量のドーナツ型のコロニーが認められるが、堆積物と河川水の両者を入れた場合の方がドーナツ型のコロニーの発達が顕著である。付着物のX線粉末回折は、いずれの付着物もカルサイトと石英の反射が顕著であり、 $10\text{ \AA}$ にイライトとおもわれる弱い反射も認められる。また、マンガや鉄の鉱物と考えられる弱い反射が $2.5\text{ \AA}$ 付近と $2.9\text{--}3.1\text{ \AA}$ 付近に認められる。 $2.5\text{ \AA}$ の反射は、 $\delta\text{-FeOOH}$ や Ferrihydrite (100) または, Birnesite (100) に相当し、 $2.9\text{--}3.1\text{ \AA}$ の反射は, Hollandite (101) および Pyrolusite (100) に相当すると考えられる。しかし、その明確な鉱物の同定はX線粉末回折のみからは困難である (Fig. 6)。

4. 付着物の電子顕微鏡観察

大型のコロニーは、 $0.1\text{--}0.5\mu\text{m}$ の球状または短棒状の物質とそれを包む網状の物質との集合体である。コロニーの生成初期は、*Leptothrix discophora* の形態に類似した構造物の数や密度は低く (Fig. 7A)、その成長とともに密度が増し、ドーム状やドーナツ型を呈する (Fig. 7B)。試料台を傾斜した観察から、よく発達したこの構造物は中央部に盛り上がりのあるクレーターの構造をしていることが明らかである。さ

Fig. 5. The brown coated materials grew into manganese nodules of doughnut-shaped holdfasts (a) within a few days. Under optical microscope, the most common bacterium associated with Mn deposition was *Leptothrix discophora*-like bacteria (b), a Mn-precipitating iron bacterium that forms filaments of adhering rods within an enclosing sheath.

らにこれが大きく成長すると中央部の穴がふさがれてボール状を呈する。

この構造物のエネルギー分散法による面分析では、多量の Mn, Fe, Si の他に Na, Mg, Al, P, S, Cl, K, Ca が認められた (Fig. 8)。松江市の試料にはしばしば塩素が多量に含まれているが、このカバーガラスを蒸留水に 3 時間浸しておいたものを同様に分析すると、塩素のピークは消える。したがってこの塩素は、穴道湖の汽水の影響を受けたためと判断された。また、これらの元素は、付着物の X 線粉末回折分析結果とよく一致しており、石英、長石類、粘土鉱物の混在を暗示している。生成の初期には、コロニーごとに含有元素比の差異がみられ、鉄に富むコロニーも認められるが、時間の経過とともに、マンガンの濃集がコロニーの成長とともに進行し、5 日目以降は、マンガンの豊富なコロニーが多くなる。この構造物の数箇所の点分析を行った結果、マンガンと鉄の反射強度が場所により異なっていることから、ミクロンオーダーでの構成物質あるいは生成過程の違いを示しているものと推定される。コロニーの中央部の穴の部分は周囲と比べ、マンガンの濃度が高く、この構造物の形成の初期には、鉄の固定作用が起き、その後にマンガンが濃集したことを暗示している。このパターンのバックグラウンドの盛り上がり (Fig.

8) は、有機物の存在に起因する。マンガンの特性 X 線濃度分布写真からも、この構造物の網目状物質にマンガンが集中していることが明らかである (Fig. 9A)。また、この構造物には、多量の塩素、シリカ、鉄も含まれる (Fig. 9B-D)。中央部は、マンガン、鉄およびいずれの元素もほとんど検出されず、頂部が空洞のドーム状またはドーナツ型をしていることが明らかである。

透過型電子顕微鏡を用いて付着物の観察を行うと、*Leptothrix discophora* の形態に類似した構造物の周囲に網状の薄膜が絡み合っている。この薄膜は幾重にも折り重なる構造をしており、微小領域電子線回折では、拡散したリング状の弱い回折が、2.76, 2.18, 1.56 Å 付近に認められる (Fig. 10)。他の部分では、面間隔の異なった弱い回折が認められ、同じコロニーの中でも場所により構造が異なる (Table 2)。これはエネルギー分散法による点分析のマンガンと鉄の元素比が少しずつ異なることに関連している。また、X 線粉末回折でも認められた δ -FeOOH や Ferrihydrite (100) または、Birnesite (100) に相当する 2.5 Å や, Hollandite (101) および Pyrolusite (100) に相当すると考えられる 2.9-3.1 Å の反射は、電子線回折でも認められた。一般に生物起源のマンガン酸化物や水酸化物の結晶は、結晶度が低く、粒子も非常に

Fig. 6. X-ray powder diffraction of manganese nodules of doughnut-shaped holdfasts of colonized microorganism from glass slides in a beaker. The X-ray powder diffractions showed contents of calcite, quartz, illite and poorly crystallized Mn and Fe oxides.

小さい (Post, 1992) が, X 線粉末回折分析や微小領域電子線回折パターンから, この網目状の付着物は, 結晶度の低いマンガ, 鉄の水酸化鉱物と同定された。

考 察

松江市および金沢市における野外環境地質調査および 200 か所の河川水の水質調査を基礎にした本研究の培養実験, 滅菌したコントロール実験などの総合的研究により, 常温常圧下の身近な河川において, 微生物の関与によりマンガや鉄の濃集が数日という短期間で容易に起こり, *Leptothrix discophora* の形態に類似した構造物 (マンガノジュール) を形成することが明らかになった。従来, マングノジュールの成因として, 石灰質ナノ化石が溶解し, 金属酸化物と置換する, 珪藻や放散虫などの珪質微化石の溶解によってドロカイトと沸石が形成する (Burns and Burns, 1979), 灌漑用水の放水路にドロカイトのノジュールが生成する (Chen, 1984), 珪藻の殻の内部にフランボイダルパイライトと一緒に磁硫鉄鉱が生成する (堀坂ほか, 1993), 鉱山排水中の珪藻が水中のマンガ, 鉄などの金属イオンを取り込み, 殻の表面に吸着する (Mann et al., 1992; Pires and Tazaki, 1993) などの報告がある。また, バクテリアとマンガノジュール形成との関連についても多くのメカニズムが提唱されている (Ehrlich, 1963, 1975; 原田, 1983; Golden et al., 1992; Schindler, 1993)。

本研究の数か月の観察結果より明らかになった *Leptothrix discophora* の形態に類似した構造物 (マンガノジュール) の生成過程は次のように考えられる。まず, 実験初期には, 球状または短桿状の *Leptothrix discophora* 様の微生物が, ガラスの表面などに繁殖しコロニーを形成する。この時, 水中に含まれるマンガを網状物質に濃集して固定する。褐色の付着物は, 実験開始後 3 日目にはすでに認められ, 日数の経過により褐色から暗褐色に変化し, 網目状の付着物の量も増し, 放射状に発達する。数か月後のよく発達した構造物は, 中央部が空洞のドーム状やドーナツ型を形成するようになる。その中央部付近には, この網状物質がより多く沈着, 濃集している。この部分は, *Leptothrix discophora* の形態に類似した構造物が初期の頃から生存していた部分で, その後, 放射状に成長していったと考えられる。しかし, この空洞が, コロニーの成長にとって必要な呼吸や代謝のためなのか, または, この部分に微生物が付着するきっかけとなった物質が存在した跡なのか明確でない。中心部に付着物が多いことから, この構造物のコロニーの成長・発達過程は, Schindler (1993) のモデルによく一致している。この構造物には, 有機物の他, 多量のマンガや鉄が含まれているが, 生成初期には, 鉄の豊富なものも認められる。日数を経過するにしたがい, マングの含有量が増加することから, 大桑累層の湧き水の化学組成が, 鉄が 0.25 ppm, マングが 1.03 ppm とマンガの含有量が卓越しているに関係していると考えら

Fig. 7. Scanning electron micrographs of manganese nodule of filaments in precursor stage (A) and well-developed doughnut-shaped holdfasts (B) of colonized microorganism.

れる。Nealson, (1983) や Ghiorse (1984) の報告によれば、マンガンの濃集は、はじめに、バクテリア細胞の周囲の陰イオンを持つ多糖質などからなる重合体と水中のマンガンが結び付き、酵素や排泄物によってマンガンが酸化されるという。そして、その表面の接触反応によって連鎖的にマンガンの酸化が起こるらしい。このとき、マンガンの酸化は、中性・酸性条件下ではともに不活発であり、微生物の作用があるとその酸化は加速されるという。このことから、生物起源の溶液や堆積物は、酸化マンガン鉱物が沈殿するのに重要な役割を果たしている (Crerar et al., 1980)。マンガン酸化物の沈殿は、 Mn^{2+} が溶解し、 Mn^{3+} と Mn^{4+} が自己触媒作用により細胞に取り込まれることによって生じるという説もある (Golden et al., 1986)。一度マンガン酸化物や水酸化物が

析出すると、表面の鉱物はより定着を促進し、沈着物の表面を活性化し、さらに、 Mn^{4+} を含む化合物は、たやすく Fe^{2+} を酸化し、 Fe^{3+} を酸化物や水酸化物として沈殿させると Golden et al. (1986, 1992) は述べている。

マンガンの酸化によって生育のためのエネルギーの一部を獲得するマンガンバクテリアは、主として土壤中に多く見いだされ、土壌酸度が弱アルカリの場合に微生物によるマンガン酸化がすみやかに生じ、2 価、3 価、4 価のマンガン酸化物が形成されるという (都留, 1971)。マンガン酸化菌としては *Aerobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* 各属のものが見いだされている。本研究は、マンガン酸化能を有するバクテリアの菌株分離とその培養については実験を行っていないが、煮沸処理による滅菌コントロール実験や現地の

Fig. 8. Energy dispersive X-ray area analyses of well-developed doughnut-shaped holdfasts of colonized microorganism (Fig. 7B) showing main components of Mn, Fe and organic materials. The other elements come from associated minerals and water components.

河川に設置した天然培養実験(吉津ほか, 1994)から、微生物の関与により生成したマンガノジュールと無機化学的に結晶成長したマンガノジュールとはFig. 2に示したように明らかに形態、大きさ、結晶度、結晶系が異なることを明らかにした。河川の淡水、汽水中において、*Leptothrix discophora*の形態に類似した構造物(マンガノジュール)は、水中の微量元素であるマンガノや鉄の収支に直接関与しながら生成していることが明らかになった。マンガノ酸化物には重金属などの汚染物質を吸着する作用もあり(Bartlett, 1988; 須藤, 1983), 微生物の活発な生命活動は、常温常圧下で、短期間で低結晶性のマンガノ・鉄鉱物を生成し、物質循環、金属イオンの固定に大きな役割を果たしている。本研究では、微生物関与によるミクロンレベルのマンガノジュールの生成初期を観察したが、長期的に観察することにより、mmまたはcmレベルのノジュールへと成長・発展すると考えられる。その成長過程は、マンガノ鉱床の成因を考える上で有効なデータを提供する。さらに、本実験は、水や堆積物中の重金属イオンの物質循環や固定に関わる微生物の浄化作用の有効性を示唆する。大桑累層のようにマンガノなどの重金属を多量に含む地層の剥離は、短期間に周囲の環境を変化させるので、水文・地質環境を考える上でも重要である。大桑累層に添って流れる金沢市の金沢川周辺の水質と環境地質については、別報で述べる。

Table 2. Different d-spacings of a well-developed doughnut-shaped holdfast of colonized microorganism deduced from the electron diffraction patterns of selected area analyses. The d-spacings suggest the presence of mixture of poorly crystallized Mn and Fe minerals.

	面間隔 (Å)		
a	2.5,	2.03,	1.48,
b	2.47,	2.03,	1.54,
c	2.5,	1.56,	
d	2.9,	1.99,	1.2,
e	2.90,	2.87,	2.03, 1.13,
f	2.10,	1.52,	1.13,

ま と め

本研究において以下の結論が導かれた。

1. 河川から採取した水と堆積物を使った培養実験で、3-5日でカバーガラス上にドーナツ型の赤褐色の付着物が生成した。
2. スライドガラスに付着した赤褐色の付着物は、*Leptothrix discophora*の形態に類似した構造物である。そのコロニーは放射状に成長し、中央部に空洞のある独特のドーム状またはドーナツ型の形態を持ち、マンガノを主成分とする。
3. *Leptothrix discophora*の形態に類似した構造物について、Robbins et al. (1992) と Schmidt and Robbins (1992) は“マンガノジュール”と呼んでいるので、本研究においても、この構造物を“マンガノジュール”と呼ぶ。
4. この構造物は、薄い膜状の物質から構成されており、低結晶度または極微粒結晶のマンガノや鉄鉱物を含んでいる。
5. この構造物の生成初期には、鉄の豊富なノジュールも認められるが、日数を経るにしたがい、マンガノの多いノジュールへと発達する。
6. *Leptothrix discophora*の形態に類似した構造物は、マンガノを選択的に濃集する作用がある。煮沸し、滅菌した河川水のコントロール実験からは、このようなドーナツ型の構造物は生成しない。
7. 滅菌した河川水に $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を付加したコントロール実験からは、無機化学的に立方体のマンガノ結晶が生成し、ドーナツ型の微生物起源との違いを明らかにした。
8. 本実験は、微生物関与のマンガノジュールの生成初期を観察した。 μm レベルのノジュールが成長・発展しmmまたはcmレベルのノジュールになる過程の長期的な観察は、マンガノ鉱床の成因を考える上で有効なデータを提供する。
9. さらに、本実験は、水や堆積物中の重金属イオンの物質循環や固定の際の微生物の関与の有効性を示唆する。
10. マンガンなど重金属を多量にふくむ地層の剥離は、水

Fig. 9. Elemental content maps of Mn (A), Fe (B), Cl (C) and Si (D) in the well-developed doughnut-shaped holdfasts of colonized microorganism.

Fig. 10. Transmission electron micrograph of a well-developed doughnut-shaped holdfast of colonized microorganism composed of thin films. The electron diffraction patterns show that the films are poorly crystallized Mn and Fe minerals.

文・地質環境を考える上でも重要である。

謝 辞

河川水の化学分析については、金沢大学理学部化学教室の本浄高治教授と研究室の皆様にお世話になった。感謝申し上げる。本研究を進めるにあたり、文部省の科学研究費補助金一般研究B (04453052, 代表者・田崎) と試験研究B (05554012, 代表者・田崎) を使用した。

文 献

- Bartlett, R.J., 1988, Manganese redox reaction and organic interaction in soils. In Graham, R.D., Hannam, R.J. and Uren, N. C., eds., *Manganese in soils and plants*. Kluwer Academic Pub. Dordrecht, The Netherlands, 59-74.
- Beveridge, T.J. and Fyfe, W.S., 1985, Metal fixation by bacterial cell walls. *Canad. Jour. Earth Sci.*, **22**, 1893-1898.
- Beveridge, T.J. and Murray, R.G.E., 1976, Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*. *Jour. Bacteriology*, **127**, 1502-1518.
- Brookins, D.G., 1988, *Eh-pH diagrams for geochemistry*. Springer-Verlag, Berlin, 401 p.
- Burdige, D.J. and Kepkay, P.E., 1983, Determination of bacterial Mn oxidation rates in sediments using an in situ dialysis technique. I. Laboratory studies. *Geochim. et Cosmochim. Acta*, **47**, 1907-1916.
- Burns, V.M. and Burns, R.G., 1979, Cell. Int. CNRS, **289**, 387-404, CNRS, Paris.
- Chapnick, S.D., Moore, W.S. and Nealson, K.H., 1982, Microbially mediated manganese oxidation in a freshwater lake. *Limnology and Oceanography*, **27**, 1004-1014.
- Chen, C.C., 1984, Electron microscopy of selected manganese oxide concretions. Proc. 42nd Annual Mtg. of Electron Microscopy Soc. Am., 410-411.
- Crerar, D.A., McCormic, R.K. and Barns, H.L., 1980, Geochemistry of manganese: an overview. In Varentsov, I.M. and Grasselly, G.Y., eds., *Geology and Geochemistry of Manganese*. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, Germany, 293-334.
- Dixon, J.B. and Skinner, H.C.W., 1992, Manganese minerals in surface environment. In Skinner, H.C.W. and Fitzpatrick, R.W. eds., *Biominingalization-Processes of iron and manganese*. Catena Supplement, **21**, 31-50.
- Dorn, R.I. and Oberlander, T.M., 1981, Microbial origin of desert Varnish. *Science*, **213**, 1245-1247.
- Ehrlich, H.L., 1963, Bacteriology of manganese nodule. I. Bacterial action on manganese in nodules enrichments. *Appl. Microbiology*, **16**, 197-202.
- Ehrlich, H.L., 1975, The formation of ores in the sedimentary environment of the deep sea with microbial participation. *Soil Sci.*, **119**, 36-41.
- Ehrlich, H.L., 1990, *Geomicrobiology*. 2nd Edition, Marcel Dekker, N.Y., 513 p.
- Ferris, F.G. and Fyfe, W.S., 1987, Manganese oxide deposition in a hot spring microbial mat. *Geomicrobiology Jour.*, **5**, 149-451.
- Ghiorse, W.C., 1984, Biology of iron- and manganese- depositing bacteria. *Ann. Rev. Microbial*, **38**, 515-550.
- Golden, D.C., Dixon, J.B. and Chen, C.C., 1986, Iron exchange thermal transformations and oxidizing property of birnessite. *Clays and Clay Min.*, **34**, 511-520.
- Golden, D.C., Zuberer, D.A. and Dixon, J.B., 1992, Manganese oxides from siderite and rhodochrosite. In Skinner, H.C.W. and Fitzpatrick, R.W., eds., *Biominingalization-processes of iron and manganese*. Catena Supplement, **21**, 161-168.
- 原田憲一, 1983, マンガンノジュール形成と生物の役割. 海洋科学, **15**, 382-390.
- 針谷 宥・三浦裕行, 1983, マンガンノジュール中のマンガン鉱物と水素同位体組成. 海洋科学, **15**, 397-400.
- 堀坂明生・田崎和江・野田修司, 1993, 生体鉱物化作用によるパイライトの生成—ケイ藻中に生成したパイライト—. 粘土科学, **33**, 36-43.
- 加藤智弘・田崎和江, 1994, 金腐川周辺に於ける水質, バクテリア, 水酸化鉄の相互関係. 第38回粘土科学討論会講演要旨集, 72-73.
- 小林達治, 1993, 光合成細菌で環境保全. 農山漁村文化協会, 東京, 215 p.
- Lowenstam, H. A. and Weiner, S., 1989, *On biomineralization*. New York, Oxford University Press, 324p.
- Mann, H., Tazaki, K., Fyfe, W.S. and Kerrich, R., 1992, Microbial accumulation of iron and manganese in different aquatic environment. An electron optical study. Catena Supplement, **21**, Crenlingen, 115-131.
- Nealson, K.H., 1983, Microbial oxidation and reduction of manganese and iron. In Westbrock, P. and de Jong, E.W., eds., *Biominingalization and biological metal accumulation*. D. Reidel Publishing Co. Dordrecht, 459-479.
- Nealson, K.H., Rosson, R. A. and Myers, C. R., 1989, Mechanisms of oxidation and reduction of manganese. In Beveridge, T. and Doyle, R., eds., *Metal iron and bacteria*. John Wiley and Sons, N.Y., 383-411.
- Nealson, K.H. and Tebo, B., 1980, Structural features of manganese precipitating bacteria. Origins of Life, **10**, 117-126.
- Post, J.E., 1992, Crystal structures of manganese oxide minerals. In Skinner, H.C.W. and Fitzpatrick, R.W., eds., *Biominingalization-Processes of iron and manganese*. Catena Supplement, **21**, 51-73.
- Pires, L.C. and Tazaki, K., 1993, A biomineralization of diatom in acidic stream sediments. *Sci. Rep. Kanazawa University*, **38**, 95-106.
- Robbins, E.I., D'Agostino, J.P., Ostwald, J., Fanning, D.S., Carter, V. and Van Hoven, R.L., 1992, Manganese nodules and microbial oxidation of manganese in the Huntley Meadows Wetland, Virginia, USA. In Skinner, H.C.W. and Fitzpatrick, R.W., eds., *Biominingalization-Processes of iron and manganese*. Catena Supplement, **21**, 179-202.
- Schindler, J., 1993, Dynamics of bacillus colony growth. *Trends of Microbiology*, **1**, 333-338.
- Schmidt, R.G. and Robbins, E.I., 1992, New evidence of an organic contribution to manganese precipitation in iron-formation and review of sedimentary conditions in the Cuyuna North Range, Minnesota. In Skinner, H.C.W. and Fitzpatrick, R.W., eds., *Biominingalization-Processes of iron and manganese*. Catena Supplement, **21**, 399-419.
- Skinner, H.C.W. and Fitzpatrick, R.W., 1992, Iron and manganese biomineralization. In Skinner, H.C.W. and Fitzpatrick, R.W., eds., *Biominingalization-Processes of iron and manganese*. Catena Supplement, **21**, 1-6.
- 須藤隆一, 1983, 環境浄化のための微生物学. 講談社, 東京, 221 p.
- 須田昭一, 1988, バイオミネラリゼーションの進化. かがくさろん, **12**, 20, 東京大学出版, 東京.
- 都留信也, 1971, マンガンバクテリア. 地学事典, 平凡社, 1055-1056.
- Weiss, S.A., 1977, *Manganese: the other uses. A study of the non-steelmaking applications of manganese*. Metal Bull., Orcester Park, 360 p.
- 吉津 研・服部竜哉・田崎和江, 1994, 淡水中における鉄, マンガンの濃集作用. 日本粘土学会第38回粘土科学討論会(岩手)講演要旨集, 154-155.

(要 旨)

田崎和江・服部竜哉・岡 美登子・飯泉 滋, 1995, 微生物関与による淡水性マンガンノジュールの初期生成. 地質雑, 101, 87-98. (Tazaki, K., Hattori, T., Oka, M. and Iizumi, S., 1995, Incipient stages of microbial manganese nodule precipitation in freshwater. *Jour. Geol. Soc. Japan*, 101, 87-98.)

マンガンの沈積に微生物が関与している事実を, 淡水を用いた実験で確認した. ビーカーの中に河川水とその堆積物を入れ, スライドガラスを定置しておくと, 3日から数週間でガラスの表面に褐色の物質が付着する. この付着物は, *Leptothrix discophora* の形態に類似した構造物であり, Robbins et al. (1992) はマンガンノジュールと呼んでいる. このドーナツ型のマンガン鉱物の生成過程を走査型電子顕微鏡, エネルギー分散分析, 透過型電子顕微鏡で検討した. 位相差偏光顕微鏡で観察すると, *Leptothrix discophora* 様の構造物がスライドガラス, カバーガラス, ビーカーの側壁に付着し, その鞘や棹にマンガンの薄膜を沈着させている. マンガンで覆われている付着物は, 独特なドーナツ型を呈する低結晶性のマンガン鉱物と水酸化鉄鉱物の混合である. この実験結果は, マンガンノジュールが無機的に沈殿したのではなく微生物の関与で生体鉱物化作用により生成したことを示している.