

【実施課題番号】 2007B1839

【実施課題名】 XAFS 測定による微生物細胞と金属イオンの相互作用の解明に関する研究
(銀イオンのコーティングによる洗濯布の抗菌防臭メカニズムに関する研究)

【実験者所属機関および名前】

大阪府立大学大学院工学研究科 物質・化学系専攻 化学工学分野 小西康裕、斎藤範三

【使用ビームライン】 BL14B2

【担当】 大淵博宣(産業利用推進室)

【利用目的及び利用結果の概要】

銀イオンの抗菌作用に着目し、洗濯布のすすぎの段階で銀イオンをコーティングするシャープ製洗濯機が商品化されている。しかしながら、銀イオンによる抗菌メカニズムに関しては十分に解明されていない。また、洗濯布に付着しなかった銀イオンはすすぎ水とともに排出されており、排水からの銀イオンの回収は資源循環利用の立場から重要な課題である。

今回の実験は、すすぎ排水からのバイオ利用銀回収に向けて、前処理を行った微生物(細菌 A、細菌 O)の死細胞を銀イオン水と接触させた後、Ag-K 吸収端における XAFS を測定した。その結果、死細胞から銀の XANES スペクトルが検出され、還元細菌の死細胞であっても液相銀(I)イオンを捕集できることが明らかになった。さらに、死細胞に捕集された銀は、細胞の構成物質であるアミノ酸と化合して 1 価銀として存在していることがわかった。

【実験方法】

(1)XAFS 測定条件

使用ビームライン：BL14B2

分光器結晶：Si(111)

ミラー角度：1.8 mrad

測定方法：透過法、蛍光法

検出器：電離箱、19 素子ゲルマニウム半導体検出器

測定吸収端：Ag-K 25.17 ~ 27.00 keV

ステップスキャン測定

ステップ幅：25.47 ~ 25.56(XANES)：0.4 eV、25.56 ~ (EXAFS)：2 ~ 7 eV

積算時間：XANES 領域：1 秒、EXAFS 領域：2 秒

クイックスキャン測定

データ取込間隔：2.3 eV

スキャン速度：粉末試料：230 eV/s、液体試料：23 eV/s

エネルギー校正：Ag-metal スペクトルで、エッジジャンプの midpoint を 25.517 keV とした。

(2)銀および銀化合物の標準試料

・無機化合物：Ag-metal, AgCl, Ag₂S, Ag₂O

試薬粉末に窒化ホウ素約 200 mg を加え、錠剤成型した。試薬量は、吸収端後の線吸収係数が概ね 2.55 となるように調整した。Ag-metal, AgCl, Ag₂S は希薄試料(Ag = 1000 ppm)も作成し、蛍光法による測定に用いた。

- ・銀(I)水溶液： $\text{AgNO}_3(\text{aq})$

原子吸光用 1000ppm 標準液をガラス管(長さ 5 cm)に封入した。窓剤としては、食品包装用ラップフィルム(市販品)を用いた。

- ・アミノ酸-銀化合物：システイン銀、アルギニン銀、リシン銀、イミダゾール銀(ヒスチジン銀に相当)

上記の固体銀化合物と同様に、4 種のアミノ酸-銀を錠剤成型し、測定に用いた。

(3)微生物試料の調製

微生物(細菌 A または細菌 O)を 1 mM AgNO_3 水溶液に接種して、Ag(I)イオンの細菌細胞への捕集実験を行った。一部の実験では、Ag(I)イオンの還元を促進する目的で、電子供与体として乳酸ナトリウムを AgNO_3 水溶液に添加した。嫌気状態での捕集実験は、窒素ガス雰囲気下で行った。実験終了後に細菌細胞を NaNO_3 溶液で洗浄し、遠心分離機を用いて細胞懸濁液を濃縮した。濃縮後の細胞懸濁液における Ag 濃度は最大で 700 ~ 800 ppm であった。濃縮した細胞懸濁液を長さ 5cm のガラス管に封入し、冷蔵庫で保管した。また、前処理した細菌細胞を 1 mM AgNO_3 水溶液に投入して溶液中の Ag(I)イオンを細胞に捕集した後、溶液から細菌細胞を回収・洗浄し、真空乾燥機で乾燥させた細胞を錠剤成型し、XAFS 測定に供した。

【実験結果および考察】

(1)銀および銀化合物の標準試料に対する XANES スペクトル

各種の標準試料に対する銀の XAFS 測定結果を Fig. 1 に示す。基本的な銀化合物に対して、Ag-K 吸収端付近の蛍光 XAFS スペクトルを確認することができた。今回(2007B)の XAFS 測定では、クイックスキャン法による若干のスペクトルの歪みが認められるものの、前回の測定(2007A)に比べて S/N 比が向上しており、各成分の同定における信頼性が高まった。各標準試料の XANES スペクトルに対する考察を以下に示す。

- ・ Ag-metal (c.c.p.構造 12 配位)

Ag-metal の XANES スペクトルは、既往文献¹⁻³⁾のスペクトルに対してピーク・ボトムが小さいが、両者のスペクトルは一致した。クイックスキャンで測定したスペクトルはステップスキャン法で測定したスペクトルの吸収端ピーク(ホワイトライン, 25.531 keV)と一致するようにエネルギー校正した(A)。25.55 eV 付近(B)では両スペクトルはずれている。クイックスキャン法における結晶子の角度の掃引が一定速度でなかったため、スペクトルがエネルギー軸方向に歪んだと考えられる。

- ・ Ag_2O (赤銅鉱型体心立方構造 2 配位)

測定した Ag_2O スペクトルは Shibata ら³⁾のデータと概ね一致する。25.539 keV 付近の多重散乱ピークはやや不明瞭である。Sipr ら²⁾のスペクトルは異なっているが、これは、Sipr らが結晶化した Ag_2O を測定しているのに対し、今回の測定では結晶化度が低い Ag_2O 試薬を測定したためと推察される。

- ・ $\text{AgNO}_3(\text{aq})$ (アクア錯体)

25.525 keV 付近にホワイトラインが確認できる。希薄水溶液なので Ag(I)イオンは水和

していると考えられる。

・ AgCl(NaCl 型面心立方構造 6 配位)

蛍光法に用いた試料は、前回(2007A)で測定したものと同一である。2007A では 25.522 keV 付近に小さいホワイトラインが確認できた(スペクトルは示していない)。今回の測定ではステップ幅を狭く、積算時間を短くしたが、ホワイトラインは不明瞭であった。蛍光法とクイックスキャン法のスペクトルを比較すると、吸収端付近(25.51 ~ 25.53 keV)にずれが生じている(C)。ただし、25.538 keV 付近(D)より高エネルギー側では両スペクトルはほぼ一致するので、クイックスキャン法のスペクトルがエネルギー軸方向に歪んでいると考えられる。

・ Ag₂S(単斜晶系 2 配位+2 配位)

測定した Ag₂S 試薬は、低温(β)型と考えられる。蛍光法による XANES スペクトルは、Allen ら¹⁾のスペクトルに比べて吸収端の立ち上がりが緩やかであるが、両スペクトルは概ね一致する。クイックスキャンによるスペクトルは、吸収端付近からずれが生じている(25.51 ~ 25.55 keV)(E)。

・ システイン(Cys)-Ag(-SH 側鎖)

Cys-Ag のスペクトルは、XANES 領域において Ag₂S スペクトルに類似しているが、EXAFS 領域では異なっている(F)。ただし、スペクトルの凹凸が少ないため、他の Ag-S 化合物との混合物である場合には、両者の構成割合を定量的に把握することは難しい。

・ リシン(Lys)-Ag(-NH₂ 側鎖)

25.530 keV 付近にホワイトラインが確認できる。AgNO₃(aq)のホワイトラインとは 5 eV 離れており判別は容易である。

・ アルギニン(Arg)-Ag(=NH, -NH₂ 側鎖)

25.534 keV 付近に、なだらかなピークが認められる。前回(2007A)の蛍光法による測定では、吸収端の立ち上がり部分に変曲点があり、スペクトルの信頼性に疑問が残った。しかし、今回の透過法による測定では、前回の問題点が改善されたと思われる。スペクトルは平坦であるが、ピークやバレイの位置から Arg-Ag の同定は可能と考えられる。

・ イミダゾール(Imid)-Ag(=NH を含むイミダゾール環状構造)

25.537 keV 付近に、なだらかなピークが認められる。Arg-Ag に比べて、Imid-Ag の XANES スペクトルのピークとバレイ(G)が高エネルギー側に 3 eV 離れており、25.58 keV 付近にも相違が認められるため(H)、両物質の判別は可能である。

(2) 微生物試料に対する銀の XANES スペクトル

微生物(細菌 A、細菌 O)に関する全試料の XANES スペクトルを Fig. 2 に示す。細菌の種類が異なっても、XANES スペクトルの差異は認められなかった。初期 Ag 濃度 1 mM の実験における XANES スペクトルはアルギニン銀(Arg-Ag)に類似しているが、吸収端直後のバレイの位置(A)が Arg-Ag より 2 eV 程低く、Arg-Ag に比べて全体的に平滑である。

細胞試料の XANES スペクトルに対して、25.5 keV ~ 25.6 keV の範囲において、各標準試料の XANES スペクトルをフィッティングさせた結果を Table 1 に示す。すべての細菌試料に対

する XANES スペクトルは、塩基性アミノ酸銀(アルギニン銀 (Arg-Ag), イミダゾール銀 (Imid-Ag), リシン銀 (Lys-Ag)) が 70 ~ 80%、AgNO₃(aq) が 20 ~ 30%程度の組み合わせで合成したスペクトルと良好に一致した(相関係数 0.999)。初期 Ag 濃度 0.05 mol/m³の実験における XANES スペクトルは、イミダゾール銀 (Imid-Ag) に類似しているが、やはり Imid-Ag に比べて全体的に平滑であり、システイン銀 (Cys-Ag) の要素も考えられる。カーブフィッティングでは塩基性アミノ酸銀の割合が 60 ~ 90 %となっている。他の要素としては AgCl や Cys-Ag の可能性があるが、その存在割合を定量化することは難しい。

Table 1 に示すように、微生物(細菌 A、細菌 O)の細胞内に存在する塩基性アミノ酸を介して Ag(I)イオンが捕集されると考えられる。塩基性アミノ酸のなかでは、リシン(側鎖に NH₂ 基をもつ)ではなく、アルギニン(側鎖に NH₂ 基、NH 基をもつ)およびイミダゾール(NH 基をもつ)の銀化合物が生成していることから、Ag(I)イオンは主として細胞内に存在する塩基性アミノ酸の NH 基に結合していると考えられる。

Table 1 微生物(細菌 A、細菌 O)に捕集された銀の化学形態と存在割合
【Ag(0), AgNO₃, Ag₂O, Ag₂S, AgCl, Arg-Ag, Imid-Ag, Lys-Ag, Cys-Ag
の合成スペクトルによるカーブフィッティング(相関係数 0.999)】

	AgNO ₃ (aq)	AgCl	Cys-Ag	塩基性アミノ酸	塩基性アミノ酸の存在割合		
					Arg-Ag	Imid-Ag	Lys-Ag
1 mM Ag(I)水溶液, 前処理 細菌A	0.17	0.00	0.00	0.83	0.40	0.28	0.16
1 mM Ag(I)水溶液, 前処理 細菌B	0.16	0.00	0.00	0.84	0.45	0.25	0.14
0.05 mM Ag(I)水溶液, 乳酸なし, 嫌気	0.06	0.15	0.03	0.77	0.44	0.32	0.00
0.05 mM Ag(I)水溶液, 乳酸添加, 嫌気	0.09	0.00	0.33	0.58	0.20	0.31	0.08
1 mM Ag(I)水溶液, 乳酸なし, 嫌気	0.27	0.00	0.00	0.73	0.49	0.14	0.11
1 mM Ag(I)水溶液, 乳酸添加, 嫌気	0.24	0.00	0.00	0.76	0.31	0.30	0.15
0.05 mM Ag(I)水溶液, 乳酸なし, 好気	0.06	0.08	0.13	0.73	0.31	0.33	0.09
0.05 mM Ag(I)水溶液, 乳酸なし, 嫌気	0.12	0.05	0.00	0.84	0.43	0.36	0.05
0.05 mM Ag(I)水溶液, 乳酸添加, 好気	0.12	0.00	0.00	0.88	0.51	0.37	0.00
0.05 mM Ag(I)水溶液, 乳酸添加, 嫌気	0.16	0.00	0.05	0.78	0.36	0.42	0.00
1 mM Ag(I)水溶液, 乳酸なし, 嫌気	0.18	0.10	0.00	0.71	0.38	0.12	0.21
1 mM Ag(I)水溶液, 乳酸添加, 嫌気	0.22	0.00	0.00	0.78	0.52	0.18	0.07

*Ag(0), Ag₂O, Ag₂S は、すべての試料において存在しなかった。

【参考文献】

- 1) P. G. Allen, A. E. Gash, P. K. Dorhout, S. H. Strauss: XAFS Studies of Soft Heavy Metal Ion Intercalated M_xMoS₂ (M = Hg²⁺, Ag⁺) Solids, *Chem. Mater.*, 13, 2257-2265 (2001).
- 2) Siper, G. Dalba, F. Rocca: Ordered and disordered models of local structure around Ag cations in silver borate glasses based on x-ray absorption near-edge structure spectroscopy. *Phys. Rev. B*, 69, 134201 (2004).
- 3) J. Shibata, K. Shimizu, Y. Takada, A. Shichi, H. Yoshida, S. Satokawa, A. Satsuma, T. Hattori: Structure of active Ag clusters in Ag zeolites for SCR of NO by propane in the presence of hydrogen, *J. Catal.*, 227, 367-374 (2004).

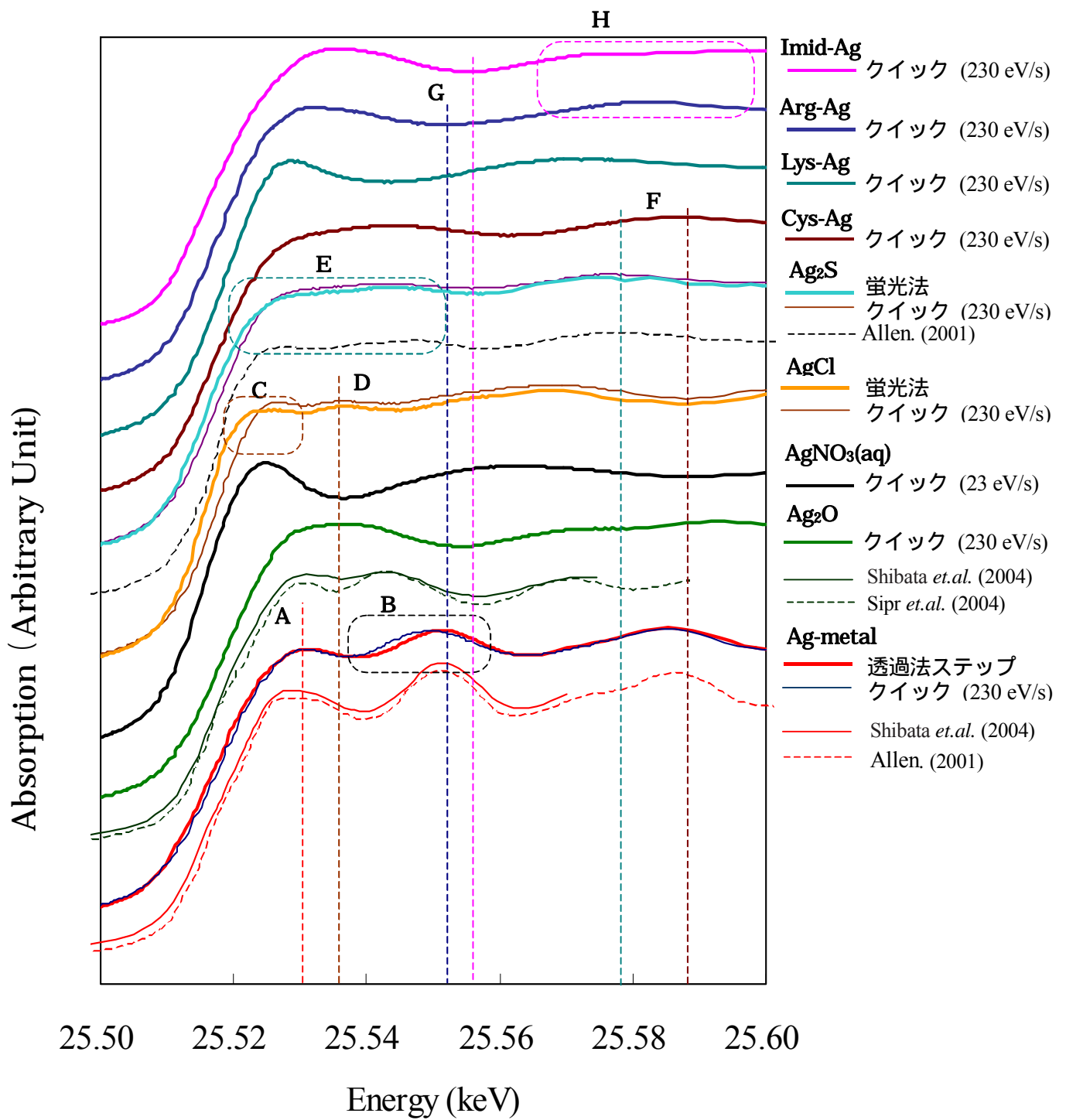


Fig.1 標準物質(銀および銀化合物)に対する銀の XANES スペクトル
 注) 既往の研究で報告されたスペクトルについては横軸方向に適宜移動した。

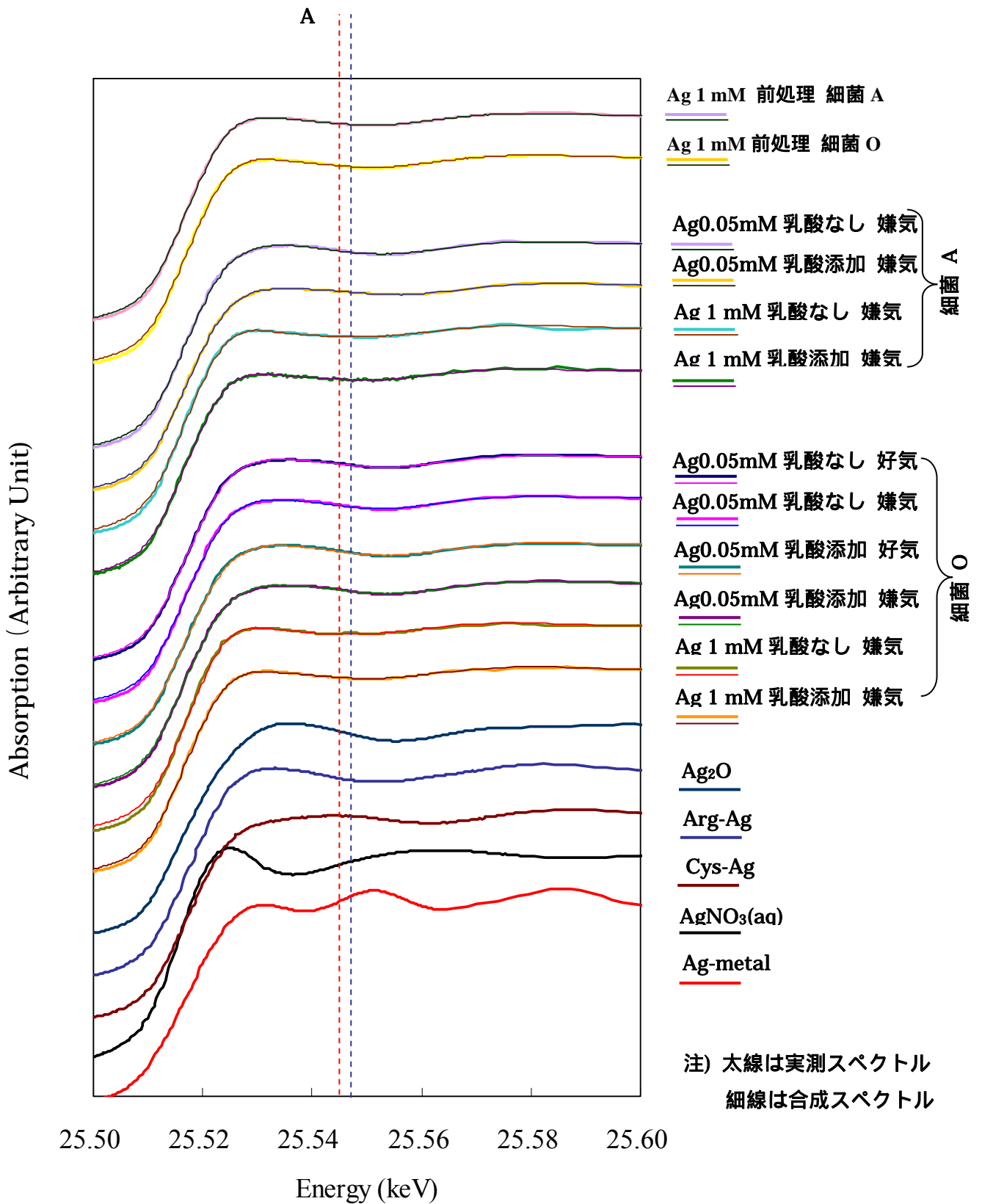


Fig.2 Ag(I)イオン捕集実験後に採取された細菌細胞に対する銀の XANES スペクトル
(前処理菌体、電子供与体の有無、嫌气的条件と好气的条件、初期 Ag イオン濃度の影響)