

## 重点産業利用課題報告書

### 【実施課題番号】

2007A1944 (受理番号: 5817)

### 【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

(申請課題: 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 (責任者)、斎藤範三

### 【使用ビームライン】

BL01B1 (割当シフト数: 3 シフト)

### 【担当】

大淵 博宣 (産業利用推進室)

### 【実験目的及び実験結果の概要】

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。

今回の実験では、“微生物を利用するすすぎ排水からの銀イオンのバイオ回収”に関する基礎的知見を得るために、微生物(細菌 O、細菌 A)に捕集された銀に対して XAFS 測定を行った。すなわち、銀イオン水(1 mmol/l AgNO<sub>3</sub>)と接触させた微生物細胞だけを濾過し、これを中性緩衝液に懸濁させた試料(ポリエチレン袋に密封)に対して Ag-K 吸収端における XAFS 測定を行い、細胞内の銀の存在状態について検討した。その結果、銀イオンは微生物細胞を構成するアミノ酸と反応し、アミノ酸銀として存在していることが明らかになった。

### 【実験方法】

#### (1) XAFS 測定条件

使用ビームライン: BL01B1

分光器結晶: Si (111)

ミラー角度: 1.8 mrad

測定方法: 蛍光法

検出器: 19 素子ゲルマニウム半導体検出器

測定吸収端: AgK 25.18~26.04 keV

ステップ幅: 25.47~25.56 (XANES 領域): 0.4 eV、25.56~ (EXAFS 領域): 2~4 eV

積算時間: XANES 領域: 1 秒、EXAFS 領域: 10~20 秒

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) 微生物試料の調製

初濃度 1 mmol/l AgNO<sub>3</sub> 水溶液に微生物(細菌 A、細菌 O)の静止細胞(または死細胞)を接種して、Ag (I) イオンの捕集実験を 60 分間行った。一部の実験では、微生物による Ag (I) イオンのバイオ還元・捕集を想定して、その電子供与体として乳酸ナトリウムを AgNO<sub>3</sub> 水溶液に添加した。また、細菌の懸濁液を高温蒸気加圧処理し、得られた死細胞による Ag (I) イオンも捕集実験した。なお、嫌気性条件下での実験は窒素ガス雰囲気で行った。

Ag (I) イオンの捕集実験の終了後に細菌細胞を NaNO<sub>3</sub> 溶液で洗浄し、遠心分離機を用い

て細胞濃度を約 10 倍に濃縮した。濃縮した細胞懸濁液をポリエチレン製バッグに封入し、冷蔵庫で保管したものを XAFS 測定に用いた。

### (3) 銀および銀化合物の標準試料

- ・ Ag (金属、以下では Ag-metal と標記), AgCl, Ag<sub>2</sub>S, Ag<sub>2</sub>O, Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, ジエチルジチオカルバミン酸銀 (以下では DETC-Ag と略記)

上記の試薬 (粉末) に窒化ホウ素約 200 mg を加え、錠剤に成型した。錠剤の Ag 濃度は概ね 1000 ppm  $\doteq$  10 mmol/kg である。

- ・ 硝酸銀水溶液

AgNO<sub>3</sub> (粉末試薬) を脱イオン水に溶解して 1 mmol/l の水溶液とし、ポリエチレン製袋に封入した。

- ・ アミノ酸-銀化合物:

- ・ システイン銀① (Cys-Ag①と略記): 0.1 mol/l AgNO<sub>3</sub> 水溶液 25 ml を 0.1 mol/l L-システイン水溶液 125 ml に攪拌しながら滴下して約 1 時間反応させ、白色のシステイン銀の沈殿物を得た。この沈殿物のイオン交換水による洗浄操作を 3 回行い (固液分離には遠心分離機を使用)、真空乾燥機で乾燥させて白色のシステイン銀粉末を調製した。

- ・ システイン銀② (Cys-Ag②と略記): 0.1 mol/l L-システイン水溶液 50 ml を 0.5 mol/l AgNO<sub>3</sub> 水溶液 50 ml に攪拌しながら滴下して約 1 時間反応させ、乳白色のシステイン銀の沈殿物を得た。この沈殿物の洗浄操作をイオン交換水によって 3 回行い、上澄み液を捨てたところ、沈殿は乳白色から淡黄色に変化していた。これを真空乾燥機で乾燥させると、黄色のシステイン銀粉末が得られた。

- ・ アルギニン銀 (Arg-Ag と略記): 0.5 mol/l L-アルギニン水溶液 50 ml を 0.5 mol/l AgNO<sub>3</sub> 水溶液 50 ml に攪拌しながら滴下して約 14 時間反応させ、白色のアルギニン銀沈殿物を得た。これを遠心分離機で集め、上澄み液を捨ててアルギニン銀 (未洗浄) 試料を採取した。さらに、残ったアルギニン銀沈殿物を 0.1 mol/l 硝酸水溶液で 1 回洗浄し、さらにイオン交換水による洗浄操作を 2 回行い、上澄み液を捨てた。その結果、沈殿量はやや少なくなったが、淡褐色生成物が得られたので、これをアルギニン銀 (洗浄済み) 試料とした。両試料とも真空乾燥機で乾燥させた。

以上のアミノ酸-銀化合物 4 試料を上記の方法によって錠剤に成型し、XAFS 測定に供した。

### 【実験結果および考察】

#### (1) 銀化合物の標準試料に対する XANES スペクトル

銀化合物の標準試料としては、無機化合物に加えて、有機化合物 (アミノ酸塩など) を対象にして、Ag-K 吸収端における XAFS 測定 (主に蛍光法) を行い、標準物質のデータベースを増やした。各種の標準試料に対する銀の XANES スペクトルを Fig.1 に示す。基本的な銀化合物に対して、Ag-K 吸収端付近における蛍光 XANES スペクトルを得ることができた。ただし、上記の標準試料のうちで、硫化銀およびアミノ酸銀の XANES スペクトルは、ホワイトラインが認められず、EXAFS 振動も弱いために、今後の測定では S/N 比をさらに高めるように工夫する (後述の「(3) XAFS 測定法の改善点」を参照)。

標準試料ごとに、測定結果に対する考察を以下に示す。

- ・ Ag-metal

本研究で測定した Ag-metal のスペクトルは、Shibata *et.al.* (2004) の測定スペクトルに対してピーク・ボトムが小さくなっている。この傾向は、2006B の測定においても同様であった。また、比較検討のために、透過法による銀の XAFS 測定も行った。透過法と蛍光法のスペクトルと比較すると、25.526keV 付近や 25.549 keV 付近で若干の差異が認められるが、今回の試料 (Ag 濃度 10 mmol/kg) では蛍光 XAFS 測定による自己吸収に

よるスペクトルの変形は小さいと考えられる。Ag-metal は h.c.p.構造 (12 配位) である。

・ Ag<sub>2</sub>O

Ag<sub>2</sub>O の測定スペクトルは、Shibata *et al.* (2004) のものと概ね一致した。25.539 keV 付近 (A) の多重散乱ピークはやや不明瞭である。Sipr *et al.* (2004) は、結晶性 Ag<sub>2</sub>O に対する銀のスペクトルを報告している。Ag<sub>2</sub>O 結晶は赤銅鉱型体心立方構造をとり、Ag に対して O は 2 配位である。

・ AgNO<sub>3</sub> 水溶液

25.525 keV 付近に吸収端ピーク (ホワイトライン) が確認できる。希薄水溶液のために Ag (I) イオンは水和していると考えられる。XAFS においては、一般に同じ配位子の化合物であれば配位数が多いほどホワイトラインが強くなる傾向がある。AgNO<sub>3</sub> 水溶液と Ag<sub>2</sub>O のスペクトルを比較すると AgNO<sub>3</sub> (aq) のホワイトラインが強い。また、Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (O6 配位) のスペクトルとも類似しており (Shibata *et al.* (2004) スペクトルは示していない)、Ag (I) イオンが 4~6 個の O 原子に囲まれている状態を反映していると推察される。

・ Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

25.525 keV 付近に吸収端ピーク (ホワイトライン) が確認できる。O 配位であるが、配位数は検索中である。

・ AgCl

25.522 keV 付近に吸収端ピーク (ホワイトライン) が確認できる。AgCl は NaCl 型面心立方構造であり、Ag に対して Cl は 6 配位である。

・ Ag<sub>2</sub>S

ホワイトラインは不明瞭である。測定した Ag<sub>2</sub>S は低温 (β) 型と考えられる。配位数は検索中であるが、Allen (2001) の EXAFS 解析によれば、配位数は 2 (1.7) である。25.546 keV 付近に多重散乱によると思われるブロードなピークが認められる (Fig.1 (B))。

・ DETC-Ag

Ag<sub>2</sub>S スペクトルにやや類似しているが、25.546 keV 付近にピークは認められない。ETC-Ag も S 配位であるので、スペクトルの類似性から配位数は 2 と推察される。

・ Cys-Ag

Cys-Ag①のスペクトルは Ag<sub>2</sub>S スペクトルに類似しているが、EXAFS 領域 (25.55 keV より高エネルギー側) では異なっている。Cys-Ag②のスペクトルは DETC-Ag スペクトルに類似しているが、Cys-Ag②の 25.52~25.55 keV 付近のスペクトルは、より直線的である (Fig.1 (C))。EXAFS 領域では異なったスペクトルである。Cys-Ag①と Cys-Ag②の XANES スペクトルに類似性があるが、単成分として両者の判別は可能である。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はその構成比を正確に決定することは難しいと思われる。

・ Arg-Ag

洗浄試料と未洗浄試料のスペクトルに差異は認められない。吸収端の立ち上がり部分で 25.516 keV 付近に変曲点がある (Fig.1 (D))。XANES 領域の平坦なスペクトルは Ag-S 25.552 keV 付近にバレイがある (Fig.1 (E))。

## (2) 微生物試料の XANES スペクトル

微生物 (細菌 O, 細菌 A) に関する全試料は、Fig.2 に示すように、Ag (I) イオンの捕集条件が異なっても同様の XANES スペクトルを示した。微生物試料に対する銀の XANES スペクトルは、標準試料アルギニン銀 (Arg-Ag) に一致した (相関係数が 0.9994)。これは、Ag (I) イオンは細胞を構成するアミノ酸と反応し、アミノ酸銀として細菌細胞に存在していることを示している。ただし、微生物試料と標準試料アルギニン銀 (Arg-Ag) に対する XANES スペクトルを厳密に比較すると、Arg-Ag の吸収端直後の形 (Fig.2 (A))、バレイの位置 (Fig.2

(B))、EXAFS 振動の振幅 (Fig.2 (C)) が異なる。この問題点は、後述するように XAFS 測定法の精度を高めて、次回の測定では解決したい。

微生物試料の XAFS スペクトルは、Ag (I) イオンが主として細菌細胞内のアミノ酸と反応していることを示唆した。アルギニンは、末端の-NH 基が Ag (I) イオンと反応することが報告されている (内田ら、2003)。アミノ酸のうちで、リシンやヒスチジンも末端に-NH 基を持っており、Ag (I) イオンと反応する可能性がある。今後はリシン銀やヒスチジン銀の XAFS 測定を行い、銀化合物の標準物質のデータベースを充実させたい。

### (3) XAFS 測定法の改善点 (透過法による EXAFS 解析)

今回の測定では、ポリエチレン製袋 (内容量 5 ml 程度) に封入した微生物試料 (Ag 濃度 10 mmol/l) の厚みが 5 mm 程度であり、透過法による XAFS 測定では十分なエッジジャンプが得られなかったために、蛍光法による XAFS 測定を実施した。Ag 濃度 10 mmol/l の試料に対して、透過法によって十分なエッジジャンプが得られる“試料厚み”を試算してみた。例えば、吸収端後の線吸収係数を最適値の 2.55 とするには、47 mm の試料厚さが必要である。この場合には、吸収端前の線吸収係数が 2.33 と高いため、S/N 比が良くても十分なエッジジャンプが得られない。吸収端後の線吸収係数を 4.00 とした場合には、吸収端前の線吸収係数が 3.64 となるが、73 mm の試料厚みが必要となる。次回の XAFS 測定では、Ag 濃度 10 mmol/l の微生物試料に対して透過法による EXAFS 解析を行うために、73 mm 程度の試料厚みを確保できる特殊容器を事前に準備する予定である。

### 【参考文献】

- P. G. Allen, A. E. Gash, P. K. Dorhout, S. H. Strauss: XAFS Studies of Soft Heavy Metal Ion Intercalated  $M_xMoS_2$  ( $M = Hg^{2+}, Ag^+$ ) Solids, *Chem. Mater.*, 13, 2257-2265 (2001).
- Sipr, 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).
- 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).
- 内田真志、山本達雄、谷口明男、中田真一、中川善兵衛：防菌防黴、31, 695-704 (2003).

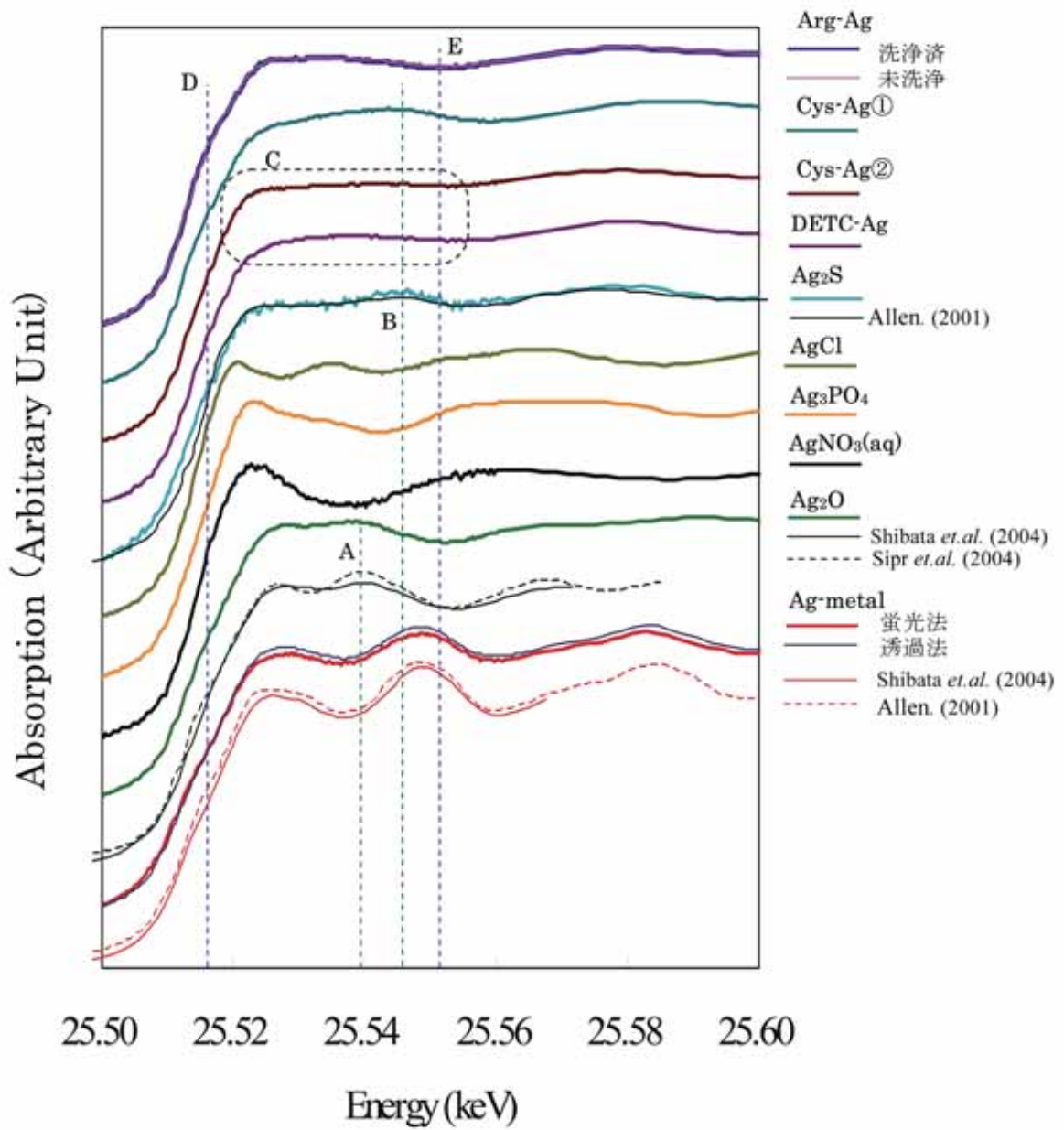


Fig.1 標準試料に対する銀の XANES スペクトル

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。

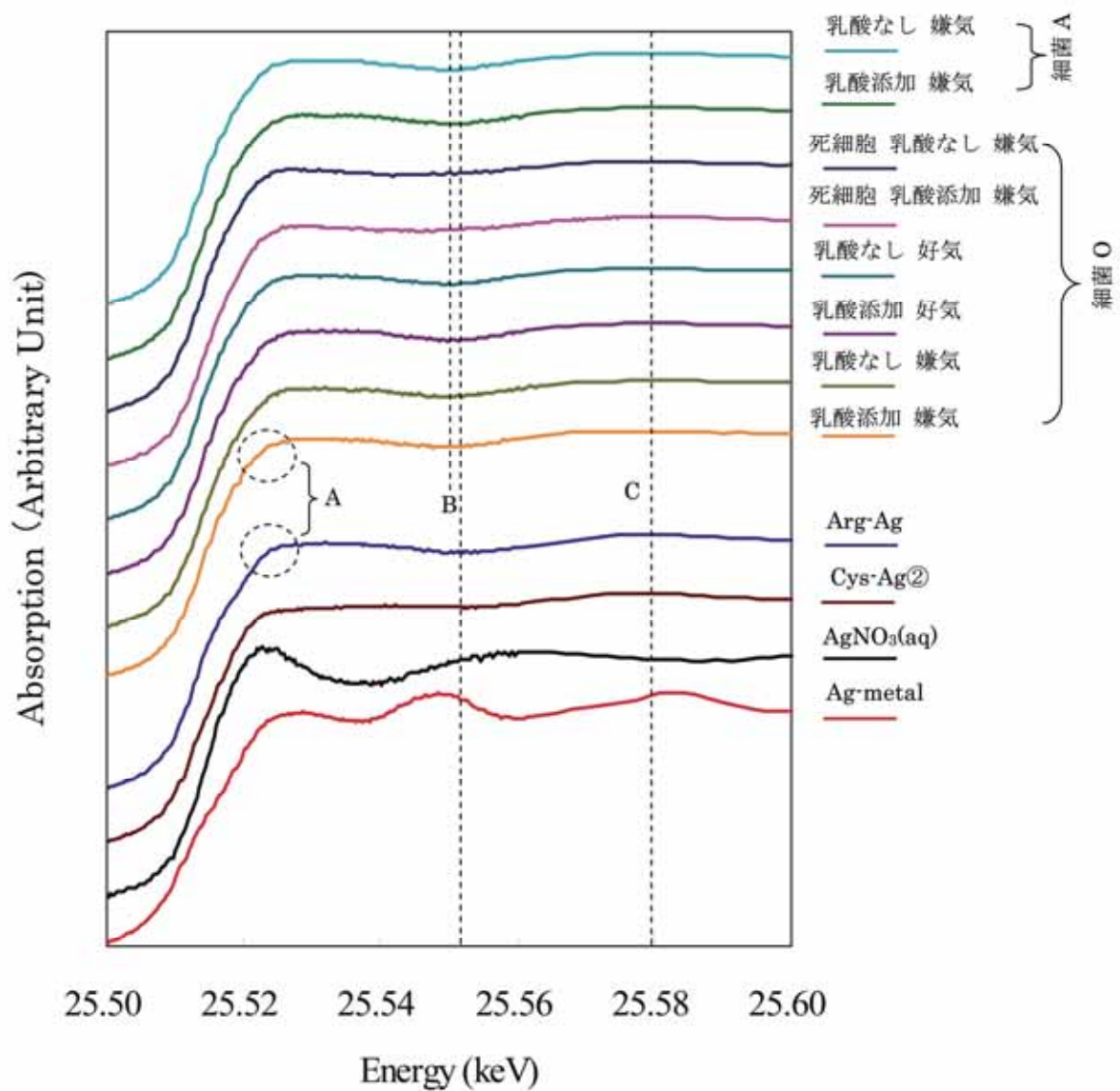


Fig. 2 Ag (I) イオン捕集実験後に採取された微生物細胞に対する銀の XANES スペクトル (電子供与体の有無、嫌气的条件と好气的条件、休止細胞と死細胞の比較)