

## 温泉バイオマット中の微生物にコントロールされる方解石の結晶成長

Crystal growth of calcite in microbial mats in hot springs is controlled by microorganisms

### Abstract

安多 剛\* 加藤裕将\*  
 田崎和江\*

*Takeshi Yasuda\*, Hiromasa Kato\*  
 and Kazue Tazaki\**

1999年6月14日受付.  
 2000年4月10日受理.

\* 金沢大学理学部地球学教室  
 Department of Earth Sciences, Faculty of  
 Science, Kanazawa University, Kakuma,  
 Kanazawa 920-1192, Japan

Japan, acknowledged as a country with many volcanic activities, has various hot springs associated with colorful microbial mats (biomats). Biomineralization of calcite at Ogawa hot springs in Toyama Prefecture and Chugu hot springs in Ishikawa Prefecture have been investigated. Microbial calcite is formed in the both hot springs. Microbial calcite is covered with cyanobacteria to form thread-ball structure, so-called "Itodemari-structure". In the case of Ogawa hot springs, biomats appear with black and green stripes along the flow of hot spring water. Cyanobacteria are  $2.7\mu\text{m}$  wide and those living in the black biomats, contain abundant S and Ca with traces of Al, Si and P while those in the green biomats are  $1.1\mu\text{m}$  wide contain abundant S and Ca with traces of Si, P and Cl. Cyanobacteria living in the green biomats of Chugu hot springs are  $0.9\mu\text{m}$  wide and contained abundant Si, P, S, Cl, K, Ca and Fe.

The color of the biomats is considered to reflect the size of the cyanobacteria. Under each biomat, calcite of different size was recognized. The mean diameter of calcite was  $67.6\mu\text{m}$  under the black and  $38.0\mu\text{m}$  under the green biomats, respectively. This phenomenon is also considered to be correlated with the size of the cyanobacteria. Light irradiated experiments showed that the fluctuation patterns of pH values are different between these biomats, due to the difference in the potential of photosynthesis. Further TEM observations showed that a number of spherical calcite are formed in bacterial adhesive, which suggests that bacteria in hot springs, play an important role for the nucleation of calcite under photosynthetic conditions, and control the crystal growth of calcite in forming thread-ball structure.

Key words : microbial mats in hot springs, biomineralization of calcite, cyanobacteria, photosynthesis, thread-ball structure

### はじめに

炭酸塩の形成は、 $\text{CO}_2$ を固定し、地球上の $\text{CO}_2$ の減少に関して重要な役割を持っていると一般的に考えられている。原始大気の組成については、連続脱ガス説や過剰揮発性物質の存在などさまざまな説が提唱されているが、未だ明らかにされていない(平ほか, 1998)。しかしながら、原始地球の大気は現在の地球大気中の $\text{CO}_2$ (1気圧, 0.03%)に比べれば非常に $\text{CO}_2$ に富んだ環境であることは確かであり、生命進化の間、莫大な量の $\text{CO}_2$ が炭酸塩堆積物として固定されてきたと考えられている。炭酸塩堆積物の形成は、主として海洋における生物性炭酸カルシウムの堆積の結果と考えられており、海洋における生物性炭酸カルシウムには低Mg方解石、高Mg方解石、アラレ石の三種が存在する(北野, 1997)。地球

の大気中の二酸化炭素濃度は、同じ惑星の金星や火星の大気中の $\text{CO}_2$ 濃度(約96%)(北野, 1988)に比べると極端に低い。これは、原始大気中の $\text{CO}_2$ が地球のみに存在する液体の水に溶解し、最初是非生物的過程によって炭酸カルシウム( $\text{CaCO}_3$ )になり、その後、生物学的過程によって有機物や $\text{CaCO}_3$ に固定されたためだと考えられている(北野, 1988)。無機的に作られた方解石と生物の関与によって作られた方解石は漸移している場合が多く、その違いを区別することは非常に難しい。無機的な方解石の沈殿は、一般に $\text{CO}_2$ の脱ガスにより炭酸カルシウムの過飽和が進行して起こるが、生物の関与による方解石の形成は海洋生物、特に貝、サンゴなどの大型生物による石灰化作用によって起こる。海洋生物の石灰化作用における $\text{CO}_2$ の収支計算は多くの研究者によってなされてきたが、地球上のあらゆる所に生息する微生物は、現

在に至る地球環境の変遷に大きな影響を与えてきたにも関わらず、ほとんど CO<sub>2</sub> の収支計算に考慮されてこなかった。微生物関与による石灰化は、始生代から完新世にかけて堆積した地層中にシアノバクテリアや緑藻に似た生物の化石が見つかることから示唆されてきた (Awramik, 1991; Barattolo, 1991)。

一方、微生物がさまざまな物質の表面に固着し、増殖した膜状の構造物 (バイオマット; microbial mats) は、あらゆる環境条件 (温泉, 排水溝, 歯など) で形成されている (田崎ほか, 1996)。その中では微生物が外界よりイオンを摂取し、細胞の外内に沈着あるいは化学反応を起こし、細胞に鉱物を析出, 生成, 集積, 残留させることが知られている。湖沼や温泉において、微生物が関与してできる方解石についてはいくつかの報告がある (e.g., Thompson and Ferris, 1990)。しかし、微生物が温泉という高温環境下で、どのように物質循環に関与し、どのようにして CO<sub>2</sub> を固定し、炭酸塩堆積物を形成していくかについては不明な点が多い。

そこで本研究では、二か所の温泉バイオマット中に生成する方解石を例にとり、微生物による炭酸同化作用と方解石の形成過程およびそのメカニズムについて検討した。その結果、方解石の結晶成長は微生物によりコントロールされることが明らかになったので報告する。

## 試 料

本研究で用いた試料は富山県下新川郡朝日町の小川温泉の露天風呂のバイオマットと石川県石川郡吉野谷村の中宮温泉の排水溝のバイオマットである (Fig. 1)。

小川温泉は北緯 36° 50', 東経 137° 40' に位置している。原山ほか (1996) によれば、小川温泉周辺は主に白亜紀前期の礫岩・砂岩・頁岩からなる水上谷層, 黒菱山層および相当層が分布している。小川温泉の露天風呂周辺には石灰華が分布しており、昭和 51 年に町の天然記念物に指定されている。その規模は、露天風呂を中心に幅 18 m, 高さ 20 m, 奥行き 10 数 m にも及んでいる。坂本ほか (1957), および富山衛生研究所 (1988) によれば、小川温泉はナトリウム塩化物・炭酸水素塩泉 (低張性, 中性, 高塩泉) に属し、毎分 350 l の湯が湧出しており、石英斑岩を母岩として、その割れ目を通路として自然湧出している。この温泉水の化学組成を Table 1 に示す。この露天風呂の温泉水の噴出口付近には、バイオマットを伴わない茶色の固結した堆積物が存在しているが噴出口から約 1 m 程離れた辺りから、黒色と緑色のバイオマットが温泉水の流れ落ちる壁面に、帯状に分布している (Fig. 2A)。また、バイオマットの直下には茶色の堆積物が見られる。現地において、バイオマットの表面を流れる温泉水 (Fig. 2A の矢印の地点) について水質測定 (Table 2) をした後、バイオマットの試料採取を 1997 年 6 月 6 日, 同年 7 月 20 日, 11 月 24 日, 12 月 6 日, 1999 年 9 月 23 日の計 5 回行い検討した。また、1999 年 9 月 23 日には、直径約 1 cm のプラスチック製の透明な円筒を用いて、小川温泉の緑色バイオマットとその下の堆積物をボーリングし、約 2 cm のコアを採取した。コアサンプルは深さによって 5 mm ごとに区切

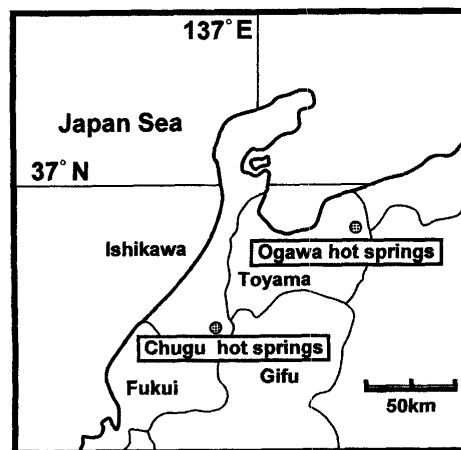


Fig. 1. Location map of Ogawa and Chugu hot springs in Japan.

Table 1. Chemical compositions of Ogawa and Chugu hot springs water.

	Cation (mg/kg)				Anion (mg/kg)		
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Ogawa hot springs	309.0	12.4	47.3	3.2	349.0	33.0	361.0
Chugu hot springs	821.5	83.7	90.3	6.6	1026.0	85.4	697.1

(Toyama sanitary research, 1988 ;Ishikawa environmental health center, 1993)

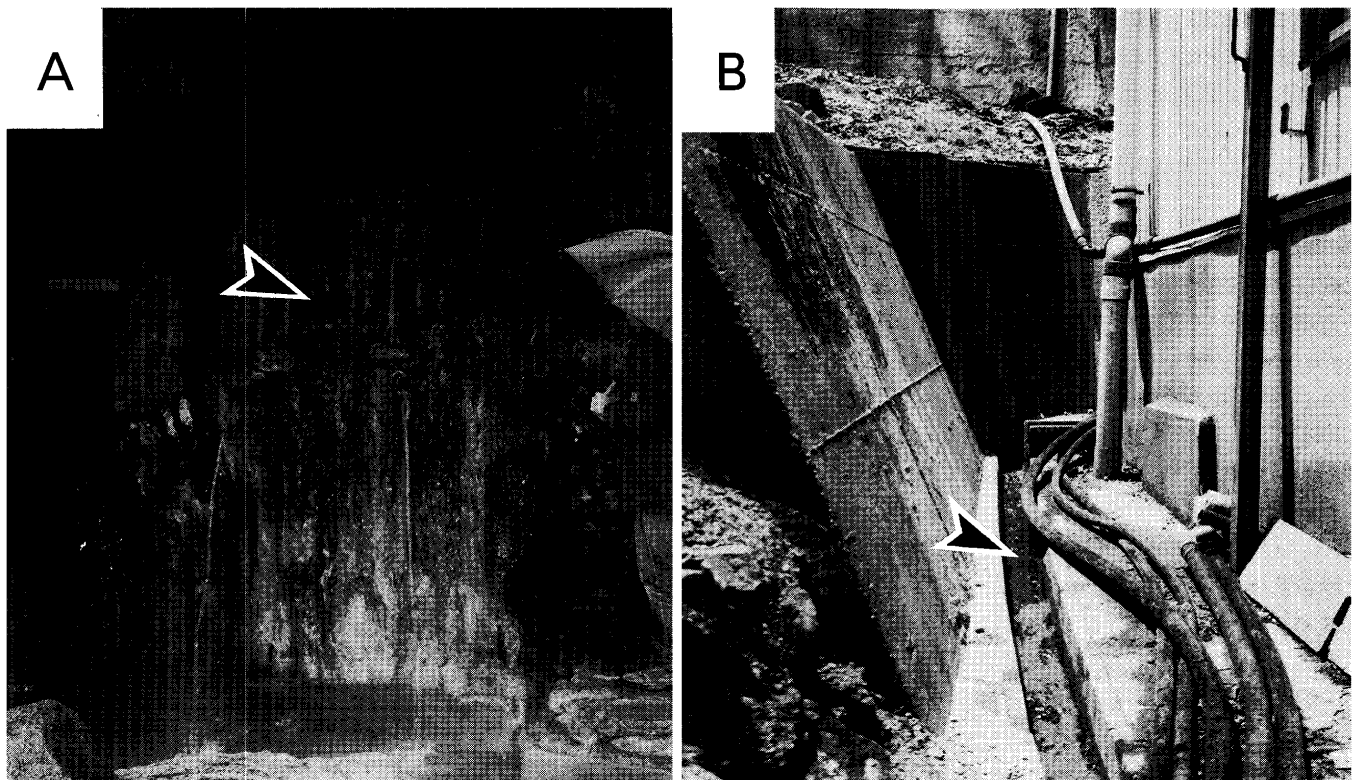
Table 2. Physical property of Ogawa and Chugu hot springs water.

	pH	Eh(mV)	EC(mS/cm)	DO(mg/l)	WT(°C)
Ogawa hot springs	8.3	65.0	1.5	9.0	43.0
Chugu hot springs	8.1	25.0	4.5	9.4	42.0

(measurement day, Ogawa hot springs ; 1997.7.20., Chugu hot springs ; 1997. 5.19.)

り、バイオマット表面から深さ 5 mm までを BM・A (BioMats・A), 深さ 5 mm から深さ 10 mm までを BM・B, 深さ 10 mm から深さ 15 mm までを BM・C, 深さ 15 mm から深さ 20 mm までを BM・D とした。コアサンプルはバイオマット表面のみが緑色を呈し、ほとんどの部分は茶色の堆積物で構成されている。

中宮温泉は北緯 36° 15', 東経 136° 46' に位置しており、中宮温泉周辺の地質は後期白亜紀から古第三紀にかけての濃飛流紋岩類である火砕岩および火山岩で構成されている (紘野, 1993)。泉質は含重曹・弱食塩泉である。この温泉水の化学組成を Table 1 に示す。ここでは幅約 20 cm 長さ約 5 m の排水溝に緑色のバイオマットが存在している (Fig. 2 B)。このバイオマットの直下には小川温泉と同じく茶色の堆積物が見られる。小川温泉と同様にバイオマット表面を流れる温泉水 (Fig. 2B の矢印の地点) について水質測定 (Table 2) をした後、バイオマットの試料採取を 1997 年 5 月 19 日と 1998 年 11 月 8 日の計 2 回行い検討した。



**Fig. 2.** Belt-like green and black biomats are observed on the surfaces of the walls over which the hot spring water flows of Ogawa hot springs (A). Green biomats occur along drainage ways of Chugu hot springs (B). Arrows show sampling point and water measurement point of physical property of hot springs water.

### 実験方法

バイオマットの鉱物組成を知るために、室温乾燥させたバイオマットを粉末にしてガラス板に塗布し、X線粉末回折分析(XRD: Rigaku-RINT1200)を行った。測定はCuK $\alpha$ 線を用いて、加速電圧40kV、電流30mAで測定を行った。

また、湿ったままのバイオマットの表面を微分干渉および落射蛍光顕微鏡(Nikon-OPTIPHOT2)で観察を行ったほか、バイオマットが付着した部分の堆積物についても観察した。バイオマット試料はDAPI(4, 6-diamido-2-phenylindole)で染色し、紫外線下で観察することによりDNAやクロロフィルの有無を確認した。

また、バイオマットの微細な構造を観察するために走査型電子顕微鏡(SEM; JEOL-JSM-5200LV)を用いて加速電圧10–15kVで微細構造を観察し、SEMに取り付けられたフィリップス製エネルギー分散型X線分析装置(EDX; Philips-EDAX-PV9800STD)を用いて、元素分析を行った。これらの試料をカーボンテープを貼った真鍮、もしくはアルミニウムの試料台に固定し、炭素蒸着を行い観察、分析した。

さらに、微生物の細胞内の観察のためにバイオマットの表層を剥ぎ取り、蒸留水中に懸濁させ、その1~2滴をマイクログリッドにのせ、透過型電子顕微鏡(TEM; JEOL-JEM-200EX)を用いて、加速電圧200kVで観察した。

また、バイオマット中の微生物の光合成時の挙動を調べるためにピーカーに100mlの温泉水と約2cm角に切断したバイオマットを入れ、暗室において60Wの蛍光灯を点灯・消

灯することによるpHの変化を調べた。pH測定にはHORIBA-D-12を使用した。なお、Shiraiwa et al. (1993)が単細胞シアノバクテリア類*Chlorella vulgaris*を用いて、光照射下でpHが10分以内に著しく上昇することを明らかにしたことを踏まえ、蛍光灯は15分ごとに点灯し、pHは5分ごとに記録した。この測定は120分間連続して行った。

小川温泉の緑色バイオマットとその直下の堆積物の化学結合を調べるために、試料を約2分間超音波洗浄した後に蛍石(Fluorite)のディスクにのせ、フーリエ変換赤外分光光度計(JASCO FT/IR-610V)を用いて4000~400cm<sup>-1</sup>の範囲で顕微測定(MICRO-20)を行った。またソフトウェア(JUSCO-SADTLER IR Mentor Pro)を用いて、化学結合の同定を行った。

小川温泉の緑色バイオマットのボーリングコアサンプルを、0.2wt.%ヘキサメタリン酸ナトリウム水溶液を分散剤として用い、5分間超音波洗浄器により粒子を分散した後、レーザー回折式粒度分布測定装置SALD-2000J(SHIMADZU)を用いて測定を行った。

### 結果

#### 1. X線粉末回折分析

小川温泉の緑色(Fig. 3A)および黒色バイオマット(Fig. 3B)と中宮温泉の緑色バイオマット(Fig. 3C)にはそれぞれ方解石(3.0Å [104], 2.3Å [113], 2.1Å [202])の強い反射が認められる。緑色バイオマットの3.0Å [104]の反射は黒色バイオマットに比べて弱い。また、バイオマット直下の茶

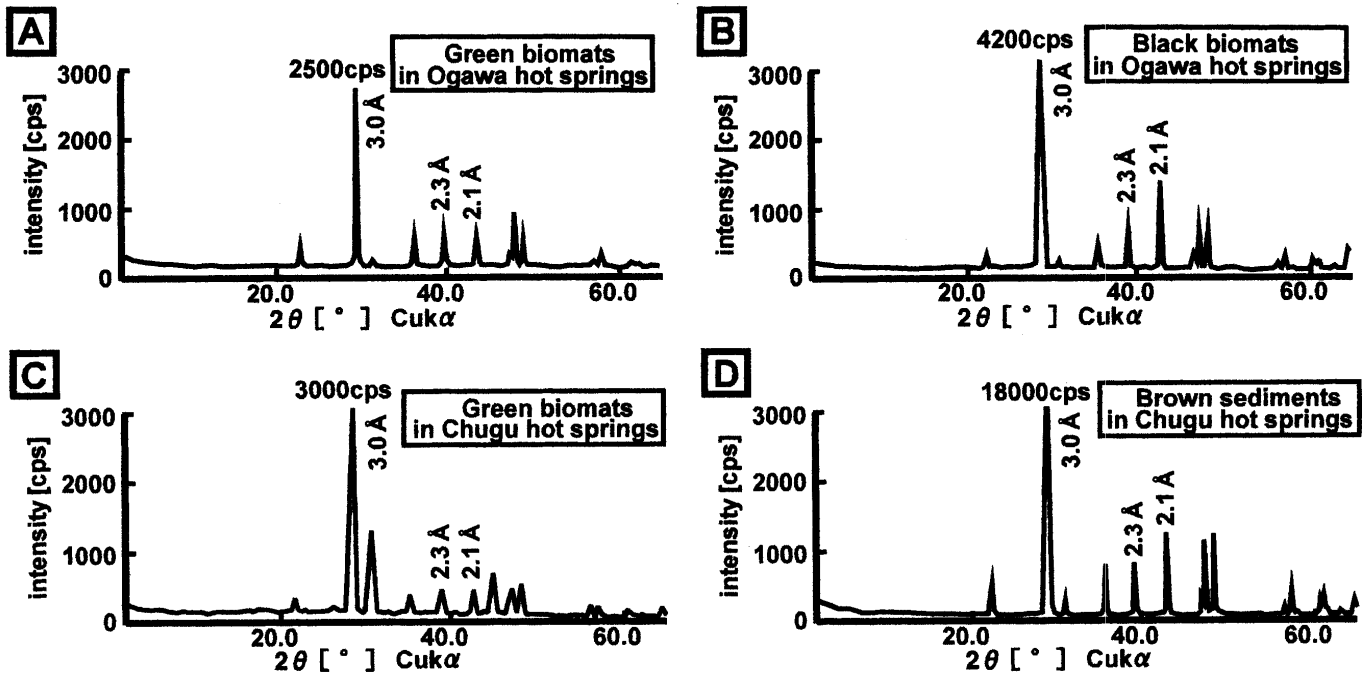


Fig. 3. X-ray powder diffraction analyses of biomats from green biomats in Ogawa (A), black biomats in Ogawa (B), green biomats in Chugu (C) and brown sediments in Chugu (D).

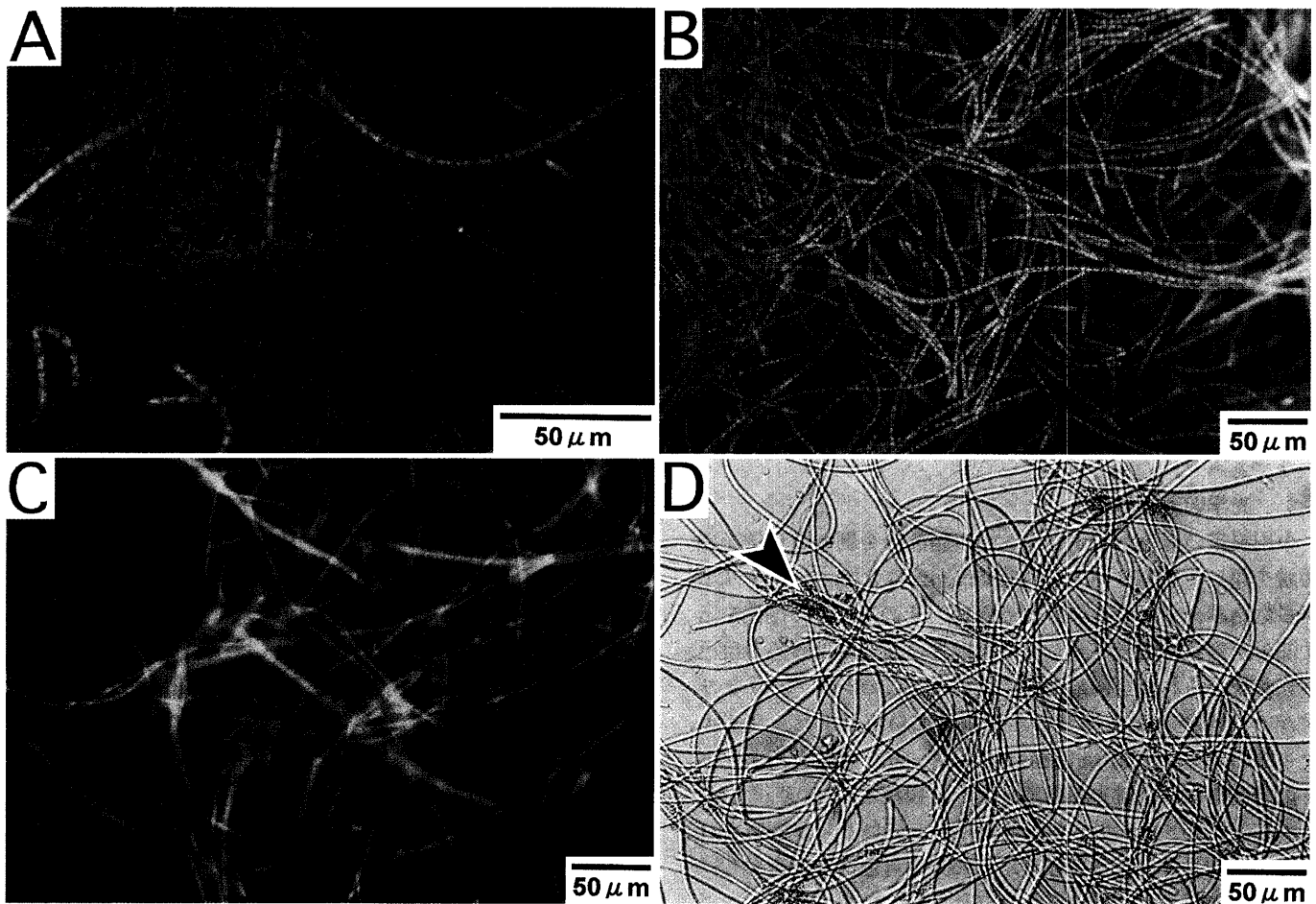
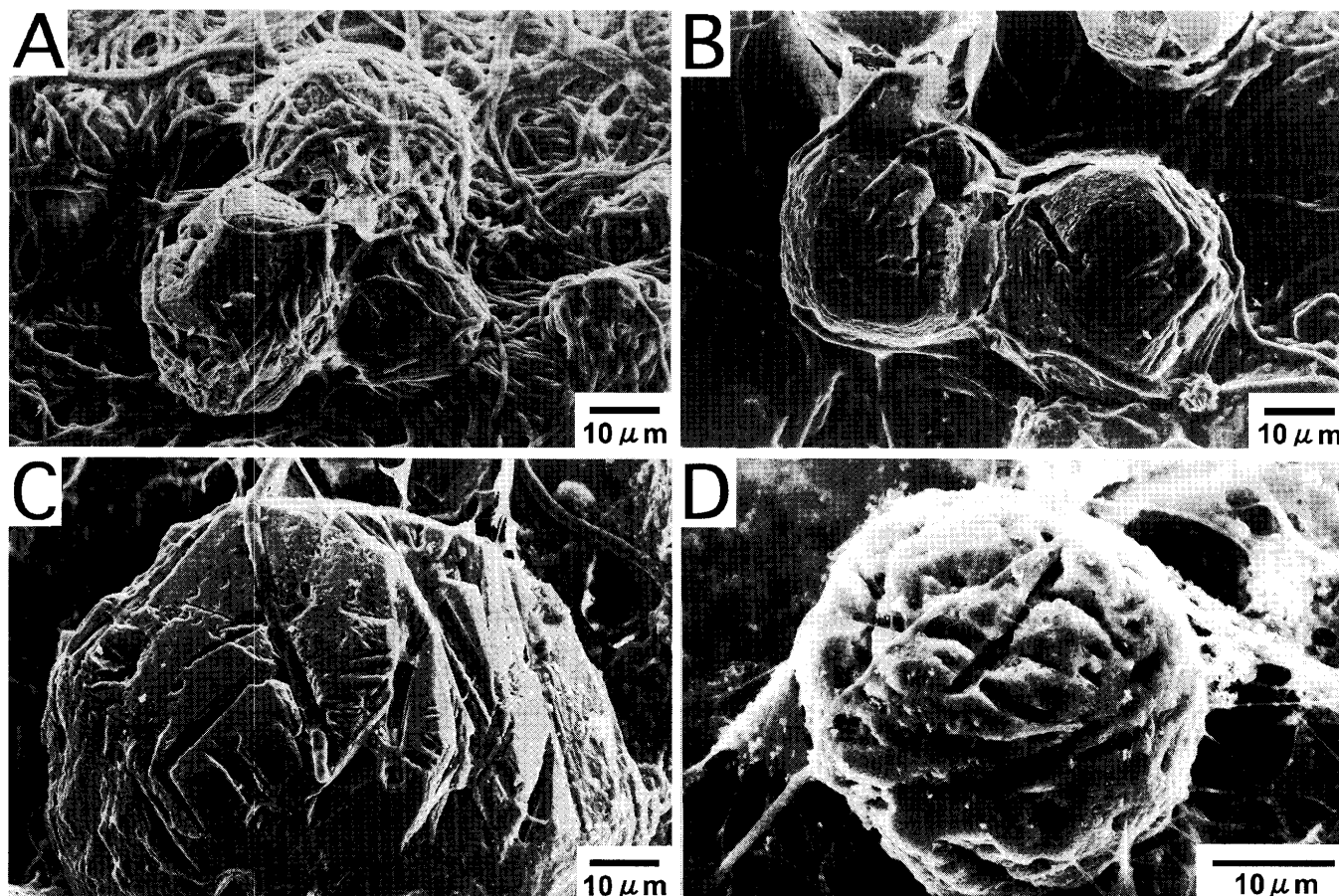


Fig. 4. Fluorescence micrographs of biomats. A : green biomats in Ogawa, B : black biomats in Ogawa, C : green biomats in Chugu, D : optical micrograph of green biomats in Chugu. Arrow indicates granular particles.



**Fig. 5.** Scanning electron micrographs of calcite within biomats. A : thread-ball structure, so-called Itodemari structure, in green biomats in Ogawa, B : green biomats in Ogawa, C : black biomats in Ogawa, D : green biomats in Chugu. A : surface, B~D : under the biomats.

色の堆積物の主成分も方解石であり (Fig. 3D), バイオマットとその直下の堆積物との強度を比べた場合, 後者の方解石の反射は約7~8倍強い反射を示す。また,  $3.0 \text{ \AA}$  の反射において, 半値幅を  $W$ , ピークトップとバックグラウンドの差を  $H$  とし,  $H \div W$  の値を求めたところ, 小川温泉の緑色バイオマットとその直下の堆積物の比は9:1であり, 小川温泉の黒色バイオマットとその直下の堆積物の比は6:1であった。中宮温泉の緑色バイオマットとその直下の堆積物との比は7:1であった。

## 2. 光学顕微鏡観察

小川温泉の緑色バイオマットの表層部分を剥ぎ取り蛍光顕微鏡を用いて観察すると, 直径約  $1 \mu\text{m}$  のシアノバクテリアが多数絡み合っているのが認められ, そのDNAの存在を示す部分が青色に蛍光を発生し, それ以外の部分では赤色の自己蛍光が認められた (Fig. 4A)。これは, このシアノバクテリアがクロロフィルを持つことを示している。また, バイオマットの厚みは  $100 \mu\text{m}$  前後である。一方, 黒色バイオマットの表面を剥いで蛍光顕微鏡を用いて観察すると, 直径2~3  $\mu\text{m}$  のシアノバクテリアが多数絡み合っているのが観察される (Fig. 4B)。DNAの存在を示す部分は青色の蛍光を発生し, それ以外の部分では蛋白質が存在しないことを示すオレンジ色の蛍光が認められた。先端小胞の部分は, 特に青色が顕著である。このバイオマットの厚みも  $100 \mu\text{m}$  前後である。

さらに, 中宮温泉の緑色バイオマットの表層部分を剥ぎ取り蛍光顕微鏡を用いて観察すると, 直径約  $1 \mu\text{m}$  のシアノバクテリアが多数絡み合っているのが確認され, 赤色の自己蛍光が認められた (Fig. 4C)。このことから, このシアノバクテリアはクロロフィルを持つ。また, このシアノバクテリアを光学顕微鏡で観察すると表面に微細な粒子が附着しているのが認められる (Fig. 4D)。また, バイオマットの厚みは  $100 \mu\text{m}$  前後である。

## 3. 走査型電子顕微鏡観察とエネルギー分散分析

光学顕微鏡では明らかにできなかった微生物や微粒子の微細形態がSEM観察により明らかになった。小川温泉の緑色バイオマットの表面では, 方解石にシアノバクテリアが絡み合うことによって「糸手鞠構造」(田崎ほか, 1996)を形成しているのが認められた (Fig. 5A)。糸手鞠構造はシアノバクテリアを手鞠の表面の糸に見立て, 方解石を手鞠の芯に見立てて名づけたものである。シアノバクテリアに巻き付かれた方解石は球状を呈しており, その大きさは  $10 \sim 30 \mu\text{m}$  である。バイオマット直下には, 表面で見られたシアノバクテリアがわずかに確認される程度で, 方解石の粒径は  $25 \sim 55 \mu\text{m}$  と大きくなるのが認められた (Fig. 5B)。この方解石の表面には多くの溝や孔が認められ, その大きさは絡み付いていたシアノバクテリアのサイズとほぼ同じである。小川温泉の黒色バイオマットの表面にも, シアノバクテリアが多数絡み

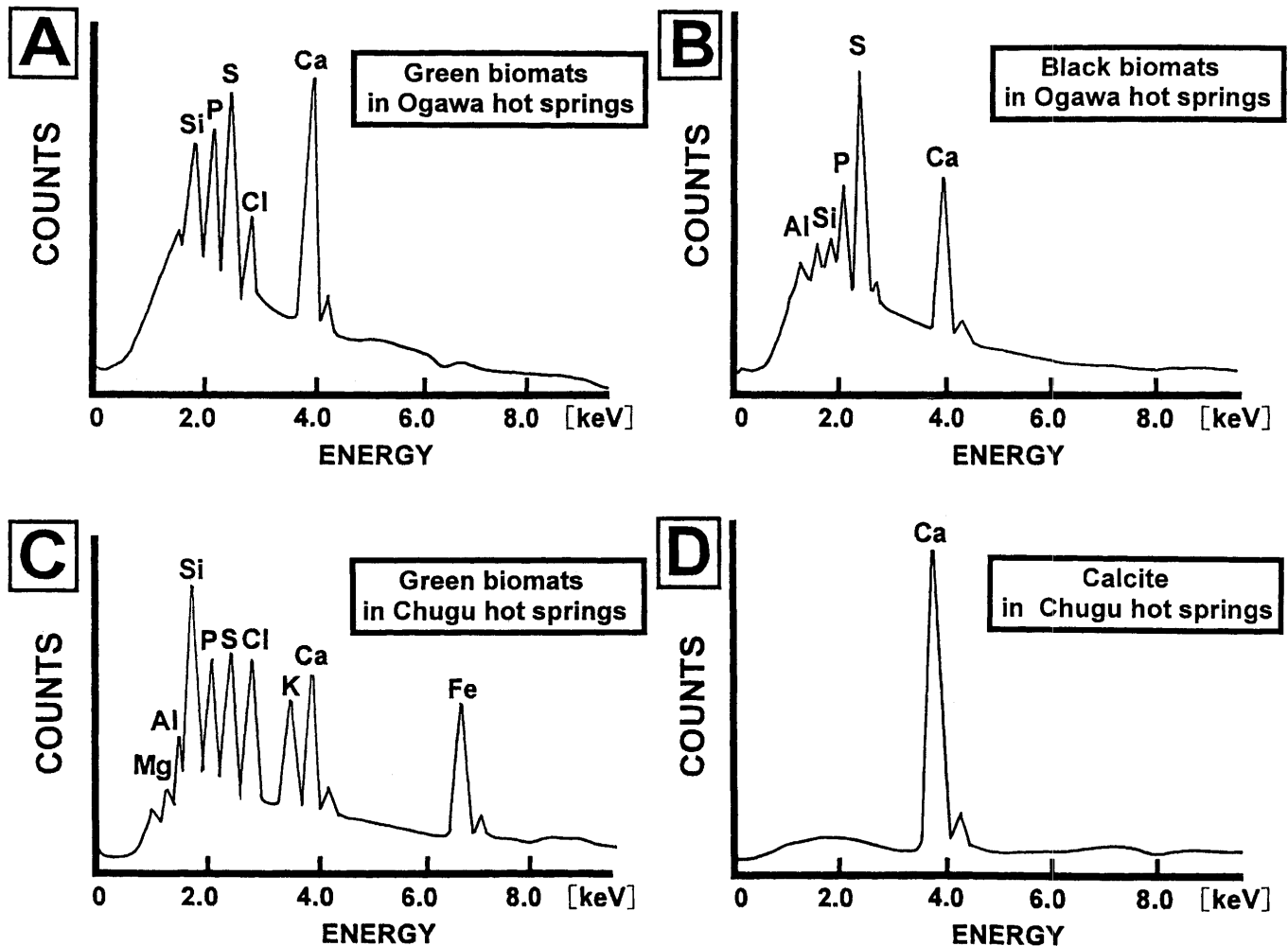


Fig. 6. Energy dispersive X-ray analyses of cyanobacteria in each biomats. A : green biomats in Ogawa, B : black biomats in Ogawa, C : green biomats in Chugu, D : calcite in green biomats in Ogawa.

合っているのが認められ、また糸手鞠構造を形成している。シアノバクテリアに巻き付かれた方解石の大きさは  $30\sim 75\ \mu\text{m}$  である。バイオマット直下では、表面で観察されたシアノバクテリアの数は少なく、粒径  $40\sim 135\ \mu\text{m}$  の球状の方解石のみが存在する (Fig. 5C)。この方解石結晶の表面には多くの溝や孔が認められ、その大きさは絡み付いているシアノバクテリアのサイズとほぼ同じである。中宮温泉の緑色バイオマットの表面にも、シアノバクテリアが絡み合い糸手鞠構造を形成しているのが認められた。シアノバクテリアに巻き付かれた方解石の大きさは  $5\sim 30\ \mu\text{m}$  である。バイオマット直下には表面に存在するシアノバクテリアはほとんど見られず、粒径が  $10\sim 70\ \mu\text{m}$  の球状の方解石が認められる (Fig. 5D)。この方解石の表面には多くの溝や孔が認められ、その大きさは絡み付いているシアノバクテリアのサイズとほぼ同じである。小川温泉の緑色・黒色バイオマットと中宮温泉の緑色バイオマットの表面で認められる糸手鞠構造中の方解石の結晶径はそれぞれのバイオマット直下で観察される孔や溝を持つ方解石よりも小さい。

また、それぞれのバイオマット直下で見られた方解石の粒径の特徴を知るために、それぞれ 130 個の方解石の粒径を SEM 写真と画像ファイリング装置 SEM afore を用いて測定

した。その結果、小川温泉の緑色バイオマット直下の方解石の平均粒径は  $37.8\ \mu\text{m}$ 、標準偏差は 4.06 であり、小川温泉の黒色バイオマット直下の方解石の平均粒径は  $67.6\ \mu\text{m}$ 、標準偏差は 15.4 であった。一方、中宮温泉の緑色バイオマット直下の方解石の平均粒径は  $38.0\ \mu\text{m}$  で標準偏差は 11.5 であった。したがって、小川温泉の緑色バイオマット直下の方解石が最も大きさが均一であることが明らかであり、小川温泉の黒色バイオマット直下の方解石は他の二つと比較し、約 2 倍のサイズを持つことが特徴である (Fig. 7)。また、各々のバイオマットを構成するシアノバクテリアの太さを 10 個体ずつ調べたところ、小川温泉の緑色バイオマットは平均  $1.1\ \mu\text{m}$  で黒色は平均  $2.7\ \mu\text{m}$ 、中宮温泉は平均  $0.9\ \mu\text{m}$  であり、シアノバクテリアの太さも小川温泉の黒色バイオマットが約 2 倍以上大きいことが明らかである。すなわち、小川温泉の黒色バイオマット中に生息するシアノバクテリアの太さと方解石のサイズはいずれも他の二つと比較し、約 2 倍大きいことが特徴である (Table 3)。

EDX 分析の結果、小川温泉の緑色バイオマット中のシアノバクテリアは多量の S, Ca のほか、Si, P, Cl を (Fig. 6A)、黒色バイオマット中のシアノバクテリアは多量の S, Ca のほか、少量の Al, Si, P を (Fig. 6B)、中宮温泉の緑色バイオ

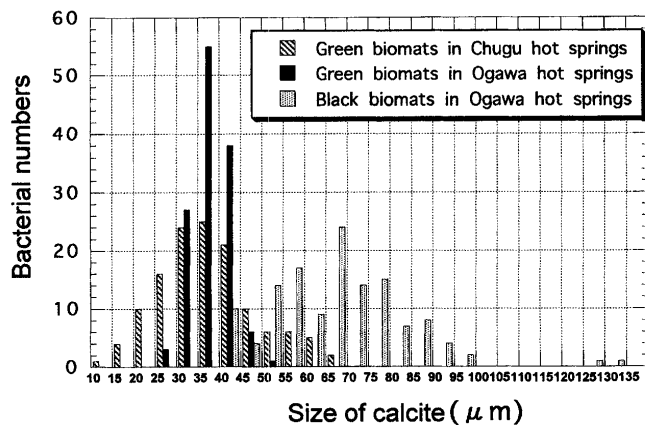


Fig. 7. The statistics of size of calcite vs. bacterial numbers in Chugu and Ogawa hot springs, showing wide and narrow distribution, respectively.

Table 3. Averages of calcite size and bacterial size in biomats.

	Color	Bacterial size	Size of calcite	Averages of calcite size
Ogawa hot springs	Green	1.1 μm	25-55 μm	37.8 μm
Ogawa hot springs	Black	2.7 μm	40-135 μm	67.6 μm
Chugu hot springs	Green	0.9 μm	10-70 μm	38.0 μm

マット中のシアノバクテリアは多量の Si, P, S, Cl, K, Ca, Fe のほかに、少量の Mg, Al を (Fig. 6C) それぞれ含有していることが明らかになった。また、黒色バイオマットの直下に存在する方解石を EDX 分析すると Ca のピークのみが認められ、また、他のバイオマット直下の方解石にも同様の Ca のピークのみが認められた (Fig. 6D)。

#### 4. 透過型電子顕微鏡観察

小川温泉の緑色バイオマット中に見られる直径約 1 μm のシアノバクテリアの表面には、粘着物質に包まれた形で粒径 100~200 nm の球状物質が存在していた。この球状物質を電子線回折すると、3.0 Å と 2.3 Å にブロードなリングが存在し、微小な方解石粒子であると考えられる (Fig. 8A)。小川温泉の黒色バイオマット中のシアノバクテリアの細胞の内外にも 100~200 nm の球状物質が存在していた。この物質を電子線回折すると、同様に 3.0 Å と 2.3 Å にブロードなリングが存在し、微小な方解石粒子であると考えられる (Fig. 8B)。

#### 5. 光照射実験

シアノバクテリアと方解石形成における光の影響を見るために蛍光灯を用いて光照射実験を行った結果を Fig. 9 に示す。三試料は光の照射により顕著な pH 変化を示し、その変化パターンに違いが認められ ①15 分間の光照射により pH が連続的に上昇および下降するもの (小川温泉・緑)、②15 分間の光照射により pH がゆっくりと上昇するもの (小川温泉・黒)、③15 分間の光照射により pH が加速的に上昇するもの (中宮温泉・緑) が観察された。これは光に対する応答性を示し、黒色バイオマットを構成するシアノバクテリアは緑色バイオマットを構成するシアノバクテリアに比べ、光に対する反応が鈍いことが明らかになった。

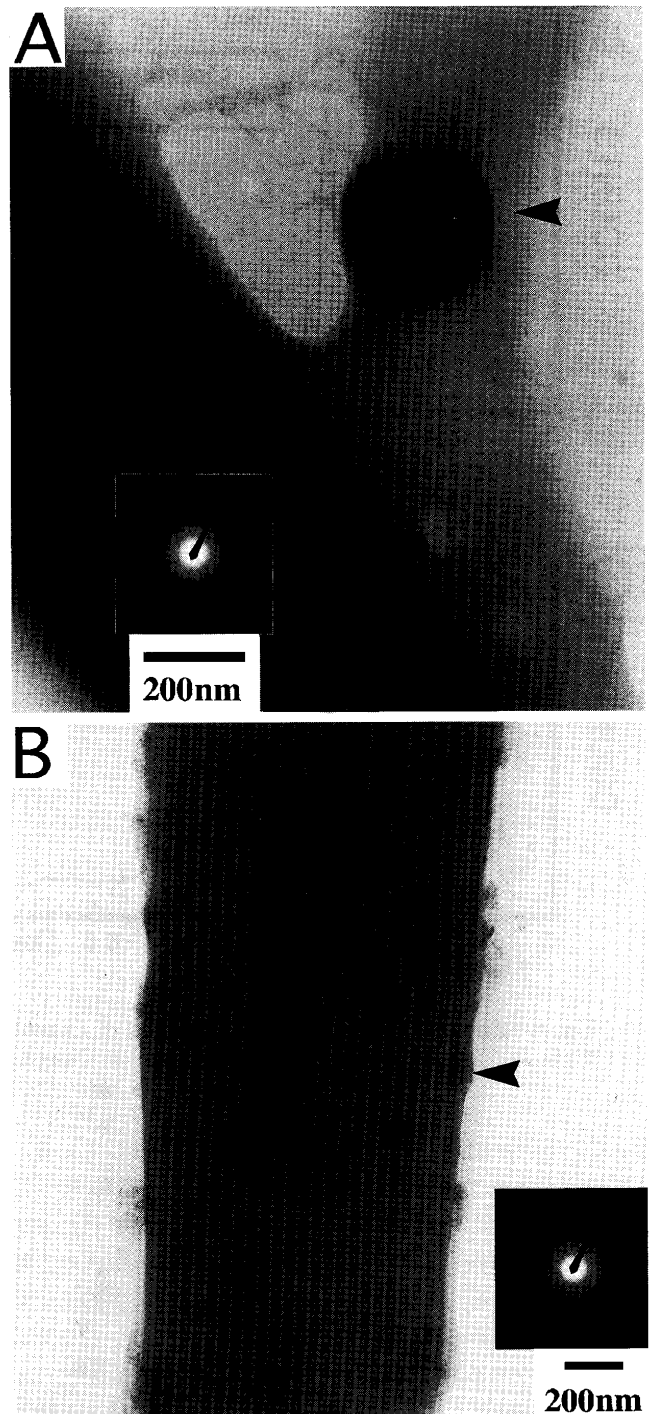


Fig. 8. Transmission electron micrographs of cyanobacteria in green biomats (A) and cyanobacteria in black biomats (B). (A) granular calcite crystal (arrow) packed in membrane can be growth as nucleation. (B) irregularly formed calcite crystals (arrow) are accumulated in/on the cell wall of cyanobacteria. Both electron diffraction patterns show diffuse rings at 3.0 and 2.1 Å.

小川温泉の緑色バイオマットを入れた温泉水の pH は、光を照射した 15 分間で約 0.30 上昇し、照射しない 15 分間で約 0.30 下降するサイクルを示した。一方、小川温泉の黒色バイオマットを入れた温泉水の pH は、光を照射した 15 分間では pH が約 0.05 上昇し、照射しない 15 分間で約 0.02 下降す

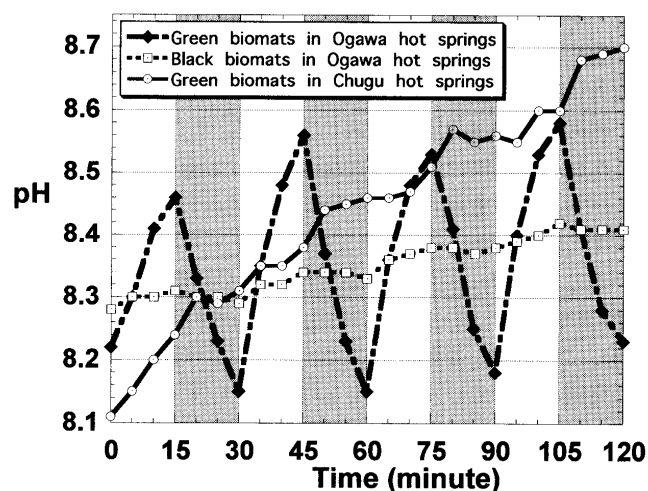


Fig. 9. Light irradiation test of black and green biomats in Ogawa, and green in Chugu hot springs showing pH value variation vs. light timing. Light on : 0, 30, 60, 90 minutes. Light off : 15, 45, 75, 105 minutes.

るサイクルが認められた。このことから、DAPI染色による光学顕微鏡観察で確認できなかったクロロフィルの存在が確認された。

また、中宮温泉の緑色バイオマットを入れた温泉水の pH は光を照射した 15 分間で約 0.15 上昇し、照射しない直後の 5 分後に著しく上昇し、照射しない 5~10 分間は pH は停滞している。

#### 6. フーリエ変換赤外分光光度計

小川温泉の緑色バイオマットを分析したところ、 $3366\text{ cm}^{-1}$  に O-H 結合、 $2876$ ,  $1793$ ,  $875\text{ cm}^{-1}$  に C-H 結合、 $2508\text{ cm}^{-1}$  に N-H 結合、 $2360$ ,  $2342\text{ cm}^{-1}$  に  $\text{CO}_2$ 、 $1421\text{ cm}^{-1}$  に C-N 結合もしくは C-H 結合が認められた (Fig. 10A)。一方、

緑色のバイオマット直下の堆積物を分析したところ、 $3354\text{ cm}^{-1}$  に O-H 結合、 $2932$ ,  $1793$ ,  $875\text{ cm}^{-1}$  に C-H 結合、 $2511\text{ cm}^{-1}$  に N-H 結合、 $2359$ ,  $2342\text{ cm}^{-1}$  に  $\text{CO}_2$ 、 $1647\text{ cm}^{-1}$  に C=C 結合、 $1233\text{ cm}^{-1}$  に C=O 結合、 $1036\text{ cm}^{-1}$  に Si-O 結合、 $1420\text{ cm}^{-1}$  に C-H 結合もしくは C-N 結合が認められた (Fig. 10B)。緑色バイオマットには C-H ( $2876\text{ cm}^{-1}$ ,  $1421\text{ cm}^{-1}$ ) 結合が顕著であり、一方、堆積物には C-N ( $2932\text{ cm}^{-1}$ ) 結合と C=C ( $1647\text{ cm}^{-1}$ ) 結合が認められるのが特徴である。

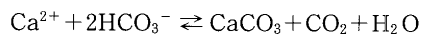
#### 7. 粒度分析

BM・A における方解石の平均粒径は  $35\mu\text{m}$  で  $27.5\mu\text{m}$  にピークが、BM・B の平均粒径は  $32\mu\text{m}$  で  $2.5\mu\text{m}$  にピークが、BM・C の平均粒径は  $38\mu\text{m}$  で  $27.5\mu\text{m}$  にピークが、BM・D の平均粒径は  $43\mu\text{m}$  で  $32.5\mu\text{m}$  にピークが認められた。このことは下方に行くに従って方解石の結晶径が大きくなることを示している (Fig. 11)。

### 考 察

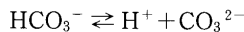
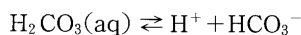
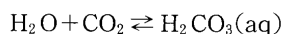
#### 1. 方解石の初期形成

炭酸カルシウムの沈殿生成は、



で示される。化学反応は右に進むことで炭酸カルシウムの沈殿が起こるが、微生物が関与することでさらに複雑な反応が考えられる。

$\text{CO}_2$  は水に溶けて



の化学反応が起こる。これらの化学反応速度は大きく、化学平衡に達しやすい。水溶液内では  $\text{H}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ 、 $\text{HCO}_3^-$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$  の 3 種類の溶存種が共存する。そして、これらの溶存種の相対的な濃度変化は pH および  $\text{PCO}_2$  ( $\text{CO}_2$  分圧) の関数

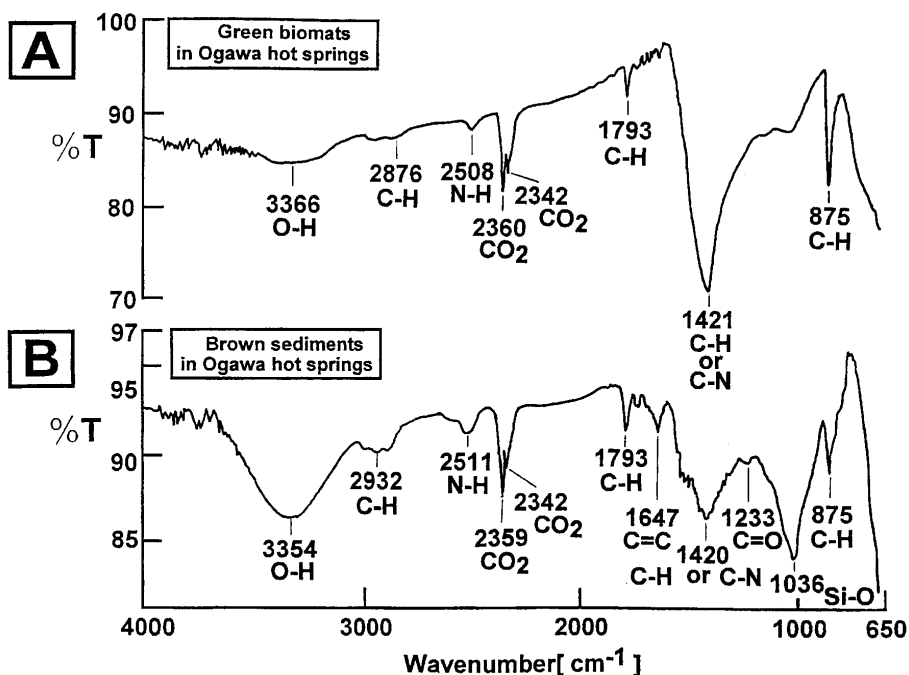


Fig. 10. FT-IR spectrum of green biomats (A) and sediments (B) in Ogawa hot springs.



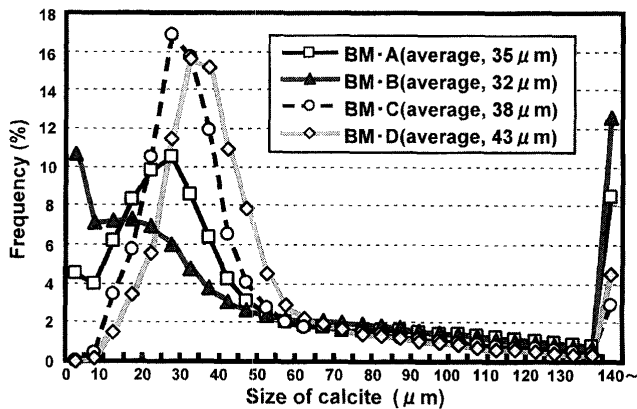
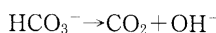
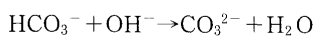


Fig. 11. The frequency of size of calcite in proportion to depth of boring core sample at green biomat in Ogawa hot springs.

となる (Stumm and Morgan, 1981). Table 2 より, 小川温泉の pH は約 8.3, 中宮温泉の pH は約 8.1 であり, そのほとんどが  $\text{HCO}_3^-$  として存在していると考えられ, 実際に,  $\text{HCO}_3^-$  は小川温泉で 361.0 mg/kg, 中宮温泉では 697.1 mg/kg であり  $\text{HCO}_3^-$  が多量に温泉水中に溶け込んでいる (Table 1). 光照射実験で, 光照射直後に見られた pH の上昇は光合成活性による  $\text{CO}_2$  吸収が呼吸による  $\text{CO}_2$  放出を上回っていること示している. シアノバクテリアの光合成活動による方解石の形成については狩野 (1997) が検討を行っており, 本研究にもその考えは適用できる. シアノバクテリアの光合成は他の植物と基本的には同じであり, 吸収した光エネルギーは化学エネルギーとして NADPH や ATP 中で貯蓄される. この化学エネルギーにより, さまざまな有機物が作られ, 有機物の合成はリブローズ-1,5-二リン酸への二酸化炭素付着で開始し, RUBISCO カルボキシル化酵素により触媒される. シアノバクテリアの RUBISCO は二酸化炭素に対する親和力が小さいという特徴を持ち (Ravan and Lucas, 1985), 植物に比べ二酸化炭素の濃度が低い時にも光合成を行うことが可能である. 光合成では  $\text{CO}_2$  が選択的に利用されるが, pH が高いときには  $\text{HCO}_3^-$  も取り込まれる (Miller and Colman, 1980). しかし, 最終的に二リン酸のカルボキシル化に用いられるのは二酸化炭素だけである.  $\text{HCO}_3^-$  は電荷を持つため膜を通りにくく, 細胞壁や細胞膜に存在する CA (炭酸脱水酵素) が,  $\text{HCO}_3^-$  から  $\text{CO}_2$  への変換を促進する働きをし, その際に生成する  $\text{OH}^-$  イオンは細胞外に放出され細胞付近の pH が上昇する (Price and Badger, 1989). この時の細胞近傍での系を考えると



となる. その結果



の反応で  $\text{CO}_3^{2-}$  イオン濃度の増加が起こり, 温泉水中に多量に溶け込んでいる  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{CO}_3^{2-}$  が反応し石灰化が起きる. この際の  $\text{CO}_2$  は有機物として固定される (Shiraiwa et al., 1993; Sekino and Shiraiwa, 1994). また, 田崎 (1995) によれば, 微生物の細胞壁は電気的に陰性であり, 水中の可溶性

の陽イオンが細胞壁に容易に結合, 集積, 固定する性質があり, 微生物は陽イオンの核形成場を与えた後, 鉱物を細胞壁の内外に成長させることが報告されている. EDX の結果から, どの微生物の表面も Ca に富んでいることが明らかになったが, 微生物の出す粘着物質によってそこには特殊な閉鎖系ができると考えられる. 特殊な閉鎖された空間の存在は石灰化の素材である  $\text{Ca}^{2+}$  や  $\text{CO}_3^{2-}$  イオンの高濃度濃縮が容易であり, 実際に関連する細胞組織で Ca 輸送ポンプや CA (炭酸脱水酵素) などの高い活性が検出されている (伊佐, 1995). このため, 細胞周辺では, 周りの水に比べ,  $\text{Ca}^{2+}$  に富んだ環境になっていると考えられる. FT-IR 結果からも, バイオマット中には C-H 結合が顕著であるのに対して堆積物にはむしろ C-N 結合や C=C 結合が認められることから微生物による石灰化の産物の存在が示唆される.

## 2. 光合成による方解石の形成

蛍光灯による光照射実験から, 黒色および緑色のバイオマットを入れた温泉水で, 微生物が光合成することにより pH が上昇することを示した. このような pH の上昇により細胞周辺の  $\text{CO}_3^{2-}$  が増加し,  $\text{Ca}^{2+}$  が  $\text{CO}_3^{2-}$  と結びついて方解石を形成している. つまり, 光合成することによって pH が上昇し方解石が生成されやすい環境になっていると思われる. したがって, バイオマット直下の方解石の表面に認められる孔や溝は, シアノバクテリアが方解石の表面を溶かして形成されたものではなく, シアノバクテリアの周りに方解石が形成されたために生じたと考えられる. Rosen (1987) によれば, 細胞内のカルシウムを低濃度に維持するためにバクテリア細胞から  $\text{Ca}^{2+}$  が排出されるので, バクテリア細胞周辺には  $\text{Ca}^{2+}$  に富む環境が作り出されるという. したがって, 細胞外部での方解石の形成は内部に比べ沈着が起りやすいと思われる. しかし, 黒色バイオマットを構成するシアノバクテリアは, 内部にも方解石を形成していること (Fig. 8B) から, このメカニズムのみで方解石を形成しているとは考えにくい. シアノバクテリアは細胞内部の溶存無機炭酸 (DIC) を周囲の水に比べて 1000 倍の濃度に高めることができる (Lucas, 1983) ことが知られており, 何らかの作用で細胞内の  $\text{HCO}_3^-$  が  $\text{CO}_3^{2-}$  で置き換わった可能性が示唆される. この時  $\text{H}^+$  が細胞外に放出されても CA (炭酸脱水酵素) により放出される  $\text{OH}^-$  の方がはるかに多いので, 細胞周辺の pH が上昇すると考えられる. 吉村ほか (1995) によれば, 非常に高い過飽和の条件では多くの結晶核が生じて, 急激に沈殿生成が起こり, 得られた方解石は微結晶となることが報告されている. 本研究において, Fig. 8 に示した観察事実のように細胞周辺で形成された方解石は微結晶であることから, 微生物周辺の粘着物質 (膜) の中は周囲の水に比べ非常に高い過飽和状態になっていると考えられる. 過飽和溶液中で微細な粒子を投入することにより瞬間的に結晶が成長することはよく知られた事実である.

## 3. 糸状構造から球状方解石へ

X 線粉末回折分析の結果から, 方解石の結晶がバイオマット中から堆積物へと移行する際に, 結晶の程度が良くなっていることから, ここに棲息するシアノバクテリアの代謝活動

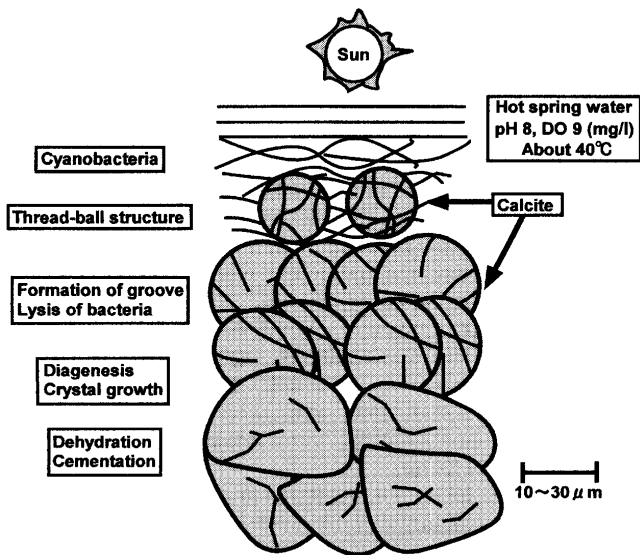


Fig. 12. Schematic cross-section of hardened biomats showing biological calcite formation. On the top of surface, cyanobacteria can actively photosynthesis and form thread-ball structure. Underneath calcite can be grown to high crystallinity.

が方解石の結晶成長を促進した可能性が指摘される。光学顕微鏡観察や SEM 観察によって認められた糸手鞠構造はバイオマットの表面のみに認められ、バイオマット直下には糸手鞠構造は認められず、シアノバクテリアが絡まっていた痕跡である溝や孔が多数認められる球状の方解石が存在する。バイオマット直下の方解石表面に認められる孔や溝はシアノバクテリアの溶菌によりシアノバクテリアが存在した所のみがシアノバクテリアの粘着物質（ムコ多糖類・酸性多糖）によってエッチングされたことを示し、シアノバクテリアが溶菌した後に孔や溝が残ったと考えられる。このことから、表面で認められるシアノバクテリアの糸手鞠構造中の方解石がバイオマット直下の球状方解石へと移行すると考えられる。また小川温泉の黒色・緑色バイオマット直下に認められる方解石の大きさには漸移が認められず、非常に均一な標準偏差値を示すことから、サイズの異なるシアノバクテリアが関与して、各々サイズの異なる方解石を形成していることが明らかになった (Fig. 7)。

光合成は石灰化を促進するが、本研究では光合成（代謝活動）が活発なものは小さい方解石を、代謝活動が活発ではないものが大きい方解石を形成していた。これには、動脈硬化や尿路結石と同じような要因が考えられる。尿路結石を改善する方法としては、水を多量に飲む方法が一般的である。すなわち、新陳代謝を高める方法である。したがって、代謝活動が活発であるとエネルギーとして取り込んだ  $\text{Ca}^{2+}$  はすぐに放出され、石灰化は進行しにくく、代謝活動が活発ではないものはエネルギーとして取り込んだ  $\text{Ca}^{2+}$  が消費されにくく  $\text{Ca}^{2+}$  が淀みやすい。したがって、石灰化が進行すると考えられる。Fig. 8 の観察結果からも、代謝活動が活発な小川温泉の緑色バイオマット中のシアノバクテリアに比べ、代謝活動が活発でない小川温泉の黒色バイオマット中のシア

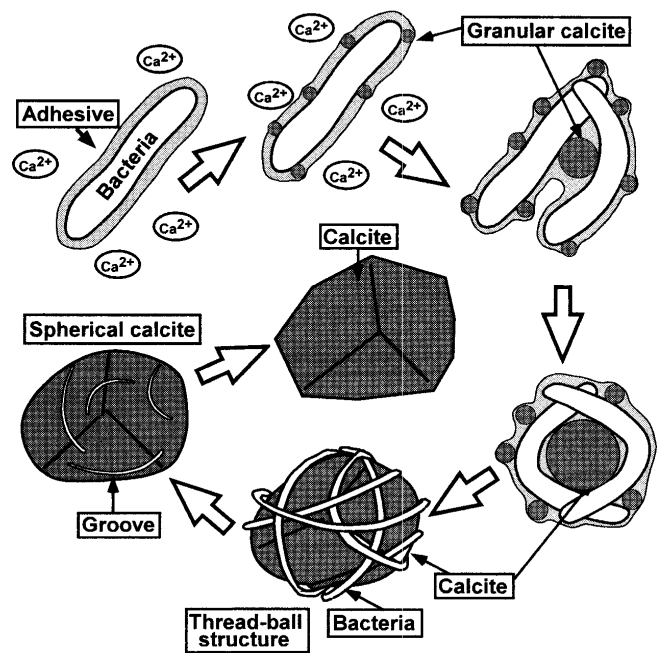


Fig. 13. Schematic formation processes of spherical calcite through thread-ball structure of both black and green biomats. Cyanobacteria bind calcium ion and carbon dioxide at adhesive and form granular calcite. Size of calcite become big and high crystalline by crystal growth.

ノバクテリアの周辺に方解石の微粒子が多く認められている。

シアノバクテリアはより光合成しやすいバイオマットの表面へと這い上がり、蓄積した方解石は堆積物へと移行していく。粒度分析 (Fig. 11.) の結果、下方に行くに従って方解石の粒径が増大することが明らかになったが、バイオマットの厚さが  $100\mu$  前後であることを考えると、糸手鞠構造中から堆積物に移した方解石はシアノバクテリアの代謝活動の影響を受けず、無機的作用によって結晶成長が進行すると考えられる。したがって、堆積物中では下方に行けば行くほど球状ではなく結晶面が発達した方解石が観察されると予測される。Chafetz and Folk (1984) は、続成作用により方解石の沈殿物は微細孔を満たすことを報告しているが、バイオマット直下で観察された方解石は、堆積後の時間的経過が短く、溝や孔のセメンティングは進んでいないと考えられる。

#### 4. 粘着物質の役割

緑色バイオマット・黒色バイオマットを構成するシアノバクテリアが形成する方解石の微粒子は、形成初期にシアノバクテリアの粘着物質を核形成の場として利用していると考えられる。シアノバクテリアは、その粘着物質によって絡まり合い、ボール状になり、次第に糸手鞠構造を形成する。そして、ボール状になったシアノバクテリア自体は溶菌し、その粘着物質の中で形成された方解石のみが残り、球状方解石を形成すると考えられる。以上のことを考えると Fig. 12, 13 のような方解石形成のモデルが考えられる。

微生物は自発的に絡まる性質を持つことが報告されている (Amato, 1992; Potera, 1997) が、本研究で使用したバイオ

マットは、温泉水が絶えず流れ落ちる壁面や、排水溝などに形成されており、微生物は水に流されないように粘着物質で絡まり合い、安定性を増していると考えられる。すなわち、シアノバクテリアの細胞を覆っている粘着物質は、水の流れに抗するためや絶えず流れている新鮮な温泉水中から CO<sub>2</sub> を積極的に取り込む役目を行い、CO<sub>2</sub> が粘着物質中で Ca<sup>2+</sup> と結びつくことにより石灰化が起こり方解石が形成される。粘着物質は水酸化鉄物質（田代・田崎，1999）のみならず、炭酸塩鉱物の形成場ともなっている。シアノバクテリアは光合成により取り込んだ CO<sub>2</sub> を粘着物質内でエネルギーに変換し、不要となった過剰の Ca を CO<sub>2</sub> と結合させて、細胞外部に排出する。この代謝活動の産物として方解石が形成されると考える。

### ま と め

小川温泉と中宮温泉は水質、泉質が似た環境であり、そこに生息するバクテリアの形状もよく似ている。しかし、小川温泉で見られるように同じ環境下であっても緑色と黒色のバイオマットでは細胞のサイズが異なるシアノバクテリアが存在している。また、中宮温泉の緑色バイオマット中のシアノバクテリアのサイズは小川温泉の緑色バイオマットの物と非常によく似ている。すなわち、バイオマットの色はこれを構成しているバクテリア細胞のサイズを反映している。光照射実験の結果、サイズの異なる三種のシアノバクテリアの光合成能力（光応答性）に違いが認められた。バクテリア細胞の体サイズと光合成能力の差異はバイオマット中で生成される方解石の粒径の差異と相関している。すなわち、サイズの小さいバクテリアの見られる所では、小さい方解石の粒子が形成される。黒色バイオマット中のシアノバクテリアは太く、形成される方解石も平均で 67.6 μm と大きい。シアノバクテリアの代謝活動の違いが方解石の大きさの違いを生じさせており、シアノバクテリアが方解石の結晶成長をコントロールしていることが示唆された。また細胞を取り囲む粘着物質は流れに抗しながら互いに細胞同士を結合し合い、ボール状になりながら外部からの CO<sub>2</sub> と Ca を結合し方解石を形成し、過剰な Ca を排出させる場を提供している。

### 謝 辞

本研究を行うにあたり、富山県下新川郡朝日町教育委員会より天然記念物に指定されている石灰華の研究を行う許認可をいただいた。また「ホテル小川」、「西山旅館」には試料採取の折にお世話になった。豊順鉱業株式会社の古賀 慎様にはさまざまな方解石を提供していただいた。査読者の鹿園直建氏のコメントは本論文を改善する上で非常に有益であった。FT-IR 分析の際には金沢大学理学部の奥野正幸先生に、粒度分析の際には金沢大学理学部の柏谷健二先生にお世話になった。田崎研究室の院生、学生の方々には調査、実験にご協力いただいた。以下の方々に厚く御礼申し上げる。

### 文 献

Amato, I., 1992, Catching the rhythm of the bacterial twist. *Sci-*

- ence*, **255**, 3 January, 32-33.
- Awramik, S. M., 1991, Archean and Proterozoic stromatolites. In Riding, R., ed., *Calcareous algae and stromatolites*, Springer-Verlag, New York, 289-304.
- Barattolo, F., 1991, Mesozoic and Cenozoic marine benthic calcareous algae with particular regard to Mesozoic Dasycladaleans. In Riding, R., ed., *Calcareous algae and stromatolites*, Springer-Verlag, New York, 504-540.
- Chafez, H. S. and Folk, R. L., 1984, Travertines: Depositional morphology and the bacterially constructed constituents. *Jour. Sediment. Petrol.*, **54**, 289-316.
- 原山 智・滝沢文教・加藤 碩一・駒沢正夫・広島俊男・須藤定久, 1996, 富山県 20 万分の 1 地質図幅. 地質調査所.
- 伊佐英信, 1995, サンゴの石灰沈着現象. 月刊地球, **17**, 694-699.
- 石川県保健環境センター, 1993, 温泉分析表.
- 狩野彰宏, 1997, 淡水成炭酸塩トッフャの特徴と成因: レビュー. 地球科学, **51**, 177-187.
- 粕野義夫, 1993, 新版・石川県地質図 (10 万分の 1 図幅). 石川県.
- 北野 康, 1988, 炭酸塩堆積物の私の研究遍歴—温泉の石灰華から海の炭酸塩まで. 温泉科学誌, **38**, 163-174.
- 北野 康, 1997, 地球環境における炭酸塩物質に関する研究. 地球化学, **31**, 211-226.
- Lucas, W. J., 1983, Photosynthetic assimilation of exogenous HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> by aquatic plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **34**, 71-104.
- Miller, A. G. and Colman, B., 1980, Evidence for HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport by the blue-green alga (cyanobacteria) *Coccochloris penicystis*. *Plant. Physiol.*, **65**, 397-402.
- Potera, C., 1997, Physics, Biology meet in self-assembling bacterial fibers. *Science*, **276**, 1499-1500.
- Price, G. D. and Badger, R. M., 1989, Isolation and characterization of high CO<sub>2</sub><sup>-</sup> requiring-mutans of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. Two phenotypes that accumulate inorganic carbon but are apparently unable to generate CO<sub>2</sub><sup>-</sup> within the carbxyosome. *Plant. Physiol.*, **91**, 514-525.
- Ravan, J. A. and Lucas, W. J., 1985, Energy costs of carbon acquisition. In Lucas, W. J. and Berry, J. A., ed., *Inorganic carbon uptake by aquatic photosynthetic organisms*, Amer. Soc. Plant. Physiol., Rockville., 305-325.
- Rosen, B. P., 1987, Bacterial calcium transport. *Biochemica. et. Biophysica. Acta.*, **906**, 101-110.
- 坂本 亨・磯見 博・野沢 保・河合正虎・井上正昭・角 靖夫, 1997, 富山県地質図説明書. 工業技術院地質調査書編, 富山県, 97-99.
- Sekino, K. and Shiraiwa, Y., 1994, Accumulation and utilization of dissolved inorganic carbon by a marine unicellular coccolithophorid, *Emiliania huxleyi*. *Plant. Cell. Physiol.*, **35**, 353-361.
- Shiraiwa, Y., Goyal, A. and Tolbert, E. N., 1993, Alkalization of the medium by unicellular green algae during uptake of dissolved inorganic carbon. *Plant. Cell. Physiol.*, **34**, 649-657.
- Stumm, W. and Morgan, J. J., 1981, ed., *Aquatic chemistry. An introduction emphasizing chemical equilibria in natural water.*, 2nd ed., Wiley Interscience, New York, 780p.
- 平 朝彦・阿部 豊・川上紳一・清川昌一・有馬 眞・田辺英一・箕浦幸治, 1998, 岩波講座・地球惑星科学 13. 「地球進化論」, 303-312.
- 田崎和江, 1995, 微生物が作る鉱物. 地質ニュース, no. 489, 17-30.
- 田崎和江・山村 健・長井広恭・小岩崎浩一, 1996, バクテリアがびっくりだす編模様. 月刊地球, **18**, 9-16.
- 田代陽子・田崎和江, 1999, 水酸化鉄を主成分とするバイオマットの初期形成について. 地球科学, **53**, 29-37.
- Thompson, J. and Ferris, F., 1990, Cyanobacterial precipitation of gypsum, calcite, magnesite from natural alkaline lake water. *Geology*, **18**, 995-998.
- 富山衛生研究所, 1988, 小川温泉の成分, 禁忌症, 適応症および入浴状の注意.
- 吉村和久・染谷 孝・浦田健作, 1995, 陸域における炭酸塩の無機沈殿とそれに及ぼす生物作用. 月刊地球, **17**, 677-682.

## (要 旨)

安多 剛・加藤裕将・田崎和江, 2000, 温泉バイオマット中の微生物にコントロールされる方解石の結晶成長. 地質雑, 106, 548-559. (Yasuda, T., Kato, H. and Tazaki, K., 2000, Crystal growth of calcite in microbial mats in hot springs is controlled by microorganisms. *Jour. Geol. Soc. Japan*, 106, 548-559.)

富山県の小川温泉と石川県の中宮温泉には緑色と黒色のバイオマットが存在し, シアノバクテリアの関与によって方解石が形成されている. バイオマット中ではシアノバクテリアが方解石に巻き付くことによって糸手鞠構造が形成され, その方解石は球状を呈する. バイオマットの色はバクテリアの大きさを反映しており, バクテリア細胞の体サイズと光合成能力(光応答性)の差異はバイオマット中で生成される方解石のサイズと相関している. 代謝活動(光合成能力)が活発なものは小さい方解石を形成し, 活発でないものは大きな方解石を形成する. このことから, 微生物が方解石のサイズをコントロールしていることが示唆された.