

炭酸塩岩と微生物

Carbonate Rock and Microorganisms

幸村 基世, 長沼 毅 *

KISE YUKIMURA and TAKESHI NAGANUMA

広島大学大学院生物圏科学研究科 〒739-8528 広島県東広島市鏡山 1-4-4

*TEL: 0824-24-7986 FAX: 0824-22-7059

*E-mail: takn@hiroshima-u.ac.jp

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Kagamiyama,

Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8528, Japan

キーワード: バクテリア, 炭酸塩, 炭素循環

Key words: bacteria, carbonate, carbon cycle

(原稿受付 2008年5月12日/原稿受理 2008年5月20日)

1. はじめに一炭酸塩を形成する微生物

微生物は地球上の炭素循環において、有機物の分解者、もしくは生産者としての役割を担っている。大気中には約0.03%の二酸化炭素が含まれており、植物などの光合成生物が光のエネルギーを使って、二酸化炭素と水から、糖やタンパクなどの有機物を作り出す。作り出された有機物は、間接的あるいは直接的に、多くの生物の炭素源やエネルギー源として利用される。取り込まれた有機物は、生物の呼吸や代謝によって、二酸化炭素として再び大気へと放出される。微生物は、動植物の遺体や排泄物由来の有機物を分解し、炭素を無機化する。また、微生物のなかには分解者としてだけでなく、化学合成独立栄養微生物である硝酸菌や硫黄細菌のように、無機化合物の酸化で生じる化学エネルギーを用いて、有機物をつくる、つまり生産者としての役割を果たすものもある。

このように、微生物が地球上の炭素循環において重要な役割を果たしていることはよく知られているが、微生物は有機物を通じた炭素循環ばかりでなく、炭酸塩などの鉱物形成を通じた炭素循環にも関与していることがわかっている。

炭酸塩からなる炭酸塩岩は全堆積岩の～20%をも占め、その質量は 10^{17} トンにもおよび、地球表層における二酸化炭素化学種の最大のプールとなっている¹⁴⁾。セメントの原料や土壌改良剤として利用される石灰石(CaCO_3)が、炭酸塩としては最も有名だろう。原始大気では液体の水になる水蒸気を除くと、二酸化炭素の量は30気圧下で97%をも占めるほど大量であったが、現在の地球大気では1気圧下で0.03%と大変小さい。この二酸化炭素量の大激減は二酸化炭素が炭酸塩として地中に固定され、大気中から除かれたことが大きな要因であると考えられている¹⁴⁾。

鉱物と聞くと、生物との関わりがないように感じる人も多いだろう。確かに鉱物は生物をつくらない。しかし生物は鉱物をつくる。炭酸塩も化学反応起源のもの、生物起源ものと2種類がある。陸上では火成岩、変成岩、熱水脈にも産出するが、海洋中の炭酸塩はほとんどが、サンゴの骨格、ウミユリ・ウニなど棘皮動物の殻、円石藻類のココリスなど、生物由来の炭酸塩であると言われて¹⁴⁾。これら生物由来の炭酸塩は長い年月をかけて海底に堆積し炭酸塩岩となる。この炭酸塩岩は、時には地殻変動により地上部へと露出することもある。

炭酸塩形成に関与する微生物としては、浮遊性の円石藻類(ココリス)や有孔虫類などの真核生物、ストロマトライト形成性の原核生物(シアノバクテリア)の影響がよく謳われてきた²⁴⁾。しかし、バクテリアも炭酸塩を形成することがわかっている。バクテリアはひとつひとつの細胞サイズこそ数 μm ($1\mu\text{m}$ は $1/1000\text{mm}$)と小さいが、土壌や海洋はもちろん、上空数十kmの成層圏²⁹⁾から地下数百mの地下生物圏²¹⁾まで、膨大な数存在し、炭素重量に換算したバイオマスは、地球上の全生物のバイオマスで最大の規模を誇る植物に匹敵するとも言われている。そのバクテリアが、一部ではあるが炭酸塩鉱物形成に関与しているのならば、これらバクテリアの炭酸塩鉱物形成を通じた、炭素循環への寄与は非常に大きなものだと考えられるだろう。

2. 炭酸塩を形成するバクテリア

Boquet *et al.* (1973) は土壌から、210株もの炭酸カルシウムを形成するバクテリアを分離し、土壌に生息するバクテリアにとって炭酸塩(炭酸カルシウム)形成は一般的な現象であると報告した³⁾。分離されたバクテリアは *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staph-*

ylcococcus aureus など、どこにでもいる普通のバクテリアであった。炭酸塩を形成するバクテリアは、炭酸塩からなる鍾乳洞⁵⁾や、水田¹¹⁾、塩湖²⁵⁾、海岸堆積物¹⁹⁾など、様々な環境からみつがっている(表1)。

このように、自然界に存在する多くのバクテリアが、炭酸塩を形成することがわかっているが、何故これらのバクテリアが炭酸塩を細胞の内や外に形成するのかは、一部のバクテリアを除き、よくわかっていない。その理由として、炭酸塩をはじめとしたバクテリアによる鉱物形成の多くが、代謝などの生物活動の結果、受動的に起こることが挙げられる¹⁷⁾。同じく生物による鉱物形成である、アサリやカキなどの軟体動物の殻(炭酸カルシウム)や脊椎動物の骨や歯(リン酸カルシウム)の形成は、それらの生物体に計画されている、すなわち遺伝子に鉱物形成という仕事が組み込まれている。しかし、バクテリアによる鉱物形成は、磁性細菌のような一部の例を除いて、遺伝子に鉱物形成という仕事は組み込まれておらず、環境要因も大きく関係してくると考えられる。遺伝子に計画された鉱物形成を能動的な鉱物形成とするならば、バクテリアによる鉱物形成の多くは受動的であると言えるだろう。

さらに、バクテリアによる炭酸塩形成とひと言でいっても、バクテリアの種により炭酸塩形成メカニズムが異なること^{6,8)}、要因と考えられるものが複数あることなどが問題となり、バクテリアによる炭酸塩形成のメカニズムは謎の部分が多い。それらを解明するために様々な培養実験が行われており、後に詳しく述べることにする。

3. バクテリアが炭酸塩を形成するメカニズム

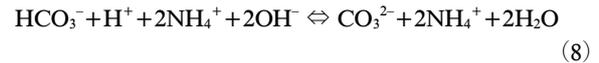
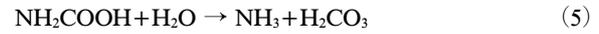
いくつかの種においては、完全にではないが、炭酸塩を形成するメカニズムがわかっている。例えば緑色硫黄細菌・紅色硫黄細菌などの光合成細菌や藍菌(藍藻)は二酸化炭素を消費し、光合成を行うが、その際、環境水に含まれる重炭酸イオンを炭素源として使用すると、OH⁻が生じ、pHが上昇する(1)。



このOH⁻が更に重炭酸イオンと反応すると、炭酸イオンが生じる(2)。この時、環境水中にカルシウムイオンが存在すると、炭酸カルシウムが沈殿する(3)²⁴⁾。

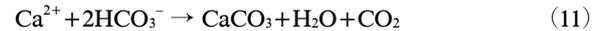
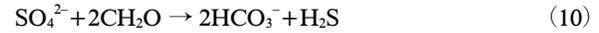


また、*Bacillus sphaericus*のような尿素分解菌は、尿素をアンモニアと炭酸に分解する(4)、(5)。その際に炭酸イオンが生じ(6)、環境水中にカルシウムイオンが存在した場合、炭酸カルシウムを沈殿させることが知られている(7)、(8)、(9)^{9,12)}。



タンパクやアミノ酸を分解することにより、アンモニアを生産するバクテリアも同じように、炭酸カルシウムを沈殿させることがある²⁷⁾。

硫酸還元菌も以下の反応により、炭酸カルシウムを沈殿させることが報告されている²³⁾(10)、(11)。



しかし、炭酸塩を形成することが知られているバクテリアの中には、これらの反応にあてはまらないものも多い。何故これらのバクテリアが炭酸塩を形成するのか、いくつか説が挙げられている。まず、バクテリアの細胞膜表面がマイナスに荷電しているため、という説がある²⁶⁾。バクテリアの細胞膜表面はマイナスに荷電しており、プラス荷電を持つカルシウムイオンやマグネシウムイオンが細胞膜に吸着し、これが炭酸塩の核になっているのでは、というのだ。また、環境中のpHの維持や¹⁵⁾、浮力の調整・走向性^{1,10)}に関与した機能なども想定されているが、どの説も決定的な証拠は得られていない。

4. バクテリアが形成する炭酸塩種

炭酸塩とひと言でいっても、様々な種類がある。例えば石灰石である炭酸カルシウム(CaCO₃)、研磨剤や滑り止めに使われる炭酸マグネシウム(MgCO₃)、菱鉄鉱であるシデライト(FeCO₃)などが、その例である¹⁸⁾。

表1. 環境中から得られた炭酸塩形成菌

サンプリング場所	得られた炭酸塩形成菌	引用文献
海岸堆積物	<i>Bacillus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Vibrio</i> spp.	McClallum and Guhathakurta 1970
土壌	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Boquet et al. 1973
水田	<i>Achromatium oxaliferum</i>	Head et al. 1996
塩湖	<i>Marinococcus albus</i> <i>Marinococcus halophilus</i>	Rivadeneira et al. 1999
鍾乳洞	<i>Kocuria varians</i> <i>Acinetobacter lwoffii</i> <i>Bacillus macroides</i>	Cacchio et al. 2004

更に炭酸カルシウム (CaCO_3) の中でも、同じ化学式をもつが結晶構造の異なるカルサイト (方解石)、アラゴナイト (霰石)、ヴァテライトなどがある (表2)。地球上に存在する炭酸塩岩ほとんどはカルサイト、アラゴナイト、そしてマグネシウムが含まれる炭酸カルシウムであるドロマイト ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) の3種で占められると言われている¹⁸⁾。環境中で無機的にどの炭酸塩種が形成されるのかは、塩分・温度・種々のイオン濃度などにより決定されることが明らかになっている¹⁴⁾。

細菌が形成する炭酸塩も、培地の塩分や培養温度⁷⁾、培地の状態が液体か固体か²⁶⁾、また菌種の違い^{7,25)}など、そのほか様々な要因により変化することがわかっている。

面白いことに、細菌が形成する炭酸塩種は、同じ環境条件で無機的に形成される炭酸塩種とは異なることがある。例えば Rivadeneyra *et al.* (2004) は芽胞を形成する中度好塩菌 *Halobacillus trueperi* を用いて、様々な塩分 (Sea Salts 濃度 (w/v)) の固体培地と液体培地でどのような炭酸塩種が形成されるかを調べた²⁶⁾。結果、Sea Salts の濃度が 2.5% の寒天培地ではカルサイト、7.5%・15%・20% ではマグネシウム含有カルサイトであるマグネシウムカルサイト (ドロマイトとは異なる) が形成された (*H. trueperi* のコロニーを図1に示す)。Sea Salts は名前のおり海水をモデルにした塩で、様々なミネラルを含んでいる。この各種ミネラルの濃度変化が形成される炭酸塩種に影響したと考えられるが、しかし地球化学解析コード PHREEQ²²⁾ で推測すると、この培養条件において無機的な炭酸塩形成による炭酸塩は、カルサイトも形成されるが、ドロマイトが最も形成されやすく、アラゴナイトも形成できるはずであると示された。細菌による炭酸塩形成には、環境要因だけでなく、やはり細菌の生物活動が関与しているのであろう。

しかし、この *Halobacillus trueperi* の増殖に最適な塩分 (ただし NaCl 濃度 (w/v)) は 10% であるが、Rivadeneyra *et al.* (2004) の実験で、最も炭酸塩形成が活発であったのは 2.5% であり、増殖曲線における定常期に炭酸塩形成が始まったことから、細胞増殖が活発であれば炭酸塩をより多く形成する、というわけでもないら

表2. 代表的な炭酸塩種とその化学式

炭酸塩種	化学式
Calcite	CaCO_3
Aragonite	CaCO_3
Verterite	CaCO_3
Dolomite	$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$
Magnesite	MgCO_3
Siderite	FeCO_3
Rhodochrosite	MnCO_3
Strontianite	SrCO_3
Witherite	BaCO_3
Monohydrocalcite	$\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Ikaite	$\text{CaCO}_3 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$

しい。

4.1. イオン濃度の影響

前述したように、どの炭酸塩種が形成されるかには、各種のイオン濃度が関わっている。イオン種の中でも、自然環境中での無機的な炭酸塩形成において、マグネシウムイオンとカルシウムイオンのモル比 ($\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ モル比) は特に重要な要因である。一般的にマグネシウム濃度の上昇と共に、つまり $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ モル比が大きくなるにつれ、カルサイトの形成は抑制されアラゴナイトの形成は増加する¹³⁾。しかし、細菌による炭酸塩形成では、この限りではない。Sanchez-Roman *et al.* (2007) は、培地に酢酸マグネシウム四水和物 ($\text{C}_4\text{H}_6\text{MgO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) と、酢酸カルシウム一水和物 ($\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) の量を変えて加えることで様々な $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ モル比をつくりだし、培養実験を行った²⁷⁾。その結果、*Halomonas aquamarina* などをはじめとしたグラム陰性の中度好塩菌 19 株は、酢酸マグネシウムを含まない培地でカルサイトを形成する一方、 $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ モル比が 1 以上 (1.63, 3.25, 7.4, 13.2) になっても、アラゴナイトを形成せずにカルサイトとマグネシウムカルサイト形成した。著者らは、その理由として細胞の膜ポンプは Ca^{2+} を細胞外に、 Mg^{2+} を細胞内に運ぶため、結果として細胞の周りの $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ モル比が低くなり、カルサイトを形成したのでは、と述べている。

4.2. その他の要因

軟体動物の殻形成など、生体反応による炭酸カルシウム鉱物の生成過程ではアスパラギン酸 (L-Asp) やグルタミン酸 (L-Glu) などの酸性アミノ酸が、その生成反応に関与することがよく知られている。酸性アミノ酸は、溶液中のカルシウムイオンと強く結合するカルボキシル基などの官能基をもつため、炭酸カルシウム鉱物の結晶核の生成とその後の結晶成長を促進すると考えられている。細菌による炭酸塩形成でも、EPS (exopolysaccharide) や L-アミノ酸 (L-Asp, L-Glu) が、形成される炭酸塩の種類や形状に影響を与えることがわかっている⁴⁾。

また、炭酸塩の形成は、細菌の細胞膜表面がマイナスに荷電していることが原因である可能性がある、と述べたが、マイナスの荷電の程度が細菌の種によって異なるため、菌種による炭酸塩形成の違いが生じているとも推察されている²⁶⁾。

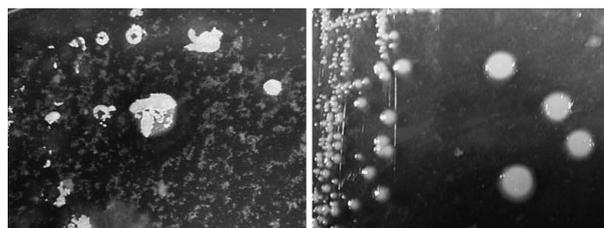


図1. 酢酸カルシウム一水和物を加えた寒天培地 (左) と通常の寒天培地 (右) で培養した *Halobacillus trueperi* のコロニーの様子。

5. 炭酸塩形成に関与する遺伝子

前述したとおり、バクテリアによる炭酸塩形成は受動的に起こるものだと考えられているため、炭酸塩形成を直接的にコントロールしている遺伝子は未だ見つからない。しかし、間接的に関与している遺伝子群は見ついている。Barabesi *et al.* (2007) は European *B. subtilis* Functional Analysis Project によって得られた 1000 株以上もの UV による遺伝子変異株を用い、炭酸塩形成に関与する遺伝子の特定を試みた²⁾。結果、*lcfA*, *ysiA*, *ysiB*, *etfB*, *etfA* という 5 つの遺伝子群が炭酸塩形成に関与していることを突き止めた。更にこの 5 つの遺伝子の中でも *etfA* (electron transfer flavoprotein alpha-subunit) という電子伝達フラボタンパク質をコードしている遺伝子が欠損している株は、炭酸塩を形成できず、この *etfA* という遺伝子が本質的な炭酸塩形成を司っているとわかった。この遺伝子群は脂肪酸の代謝に関与しており、炭酸塩形成と脂肪酸代謝には関係があるのでは、と著者らは推察している。

6. これからの炭酸塩形成微生物に関する研究

これまでに、様々な環境から炭酸塩形成菌が分離されてきた。そしてその炭酸塩形成メカニズムを明らかにするために、さまざまな培養実験が行われ、各種のイオン濃度やアミノ酸などが炭酸塩形成に関与していることがわかった。しかし、そのメカニズムは未だ謎の部分が多いままである。地球環境における、バクテリアによる炭酸塩形成を通じた炭素循環能力の評価をするためにも、そのメカニズムを明らかにすることが必要だろう。メカニズムが解明されれば、円石藻類が二酸化炭素の石灰化に利用されているように²⁸⁾、バクテリアによる炭酸塩形成も二酸化炭素の削減に利用されるかもしれない。

炭酸塩と微生物化石の関係も大変面白く、炭酸塩岩中に包埋された微生物化石が、微生物による炭酸塩岩生成のマーカーになることが報告され¹⁶⁾、これは地球上だけでなく、火星などの宇宙における微生物の存在を示すマーカーともなり得るかもしれない²⁰⁾。

また、近年、間接的にはあるが炭酸塩形成に関与する遺伝子がみつかったことから、今後この遺伝子をもとに、環境中からの核酸 (DNA) による炭酸塩形成菌の検出や、定量 PCR による定量なども行われることも考えられる。

文 献

- 1) Babenzien, H.-D. 1991. *Achromatium oxaliferum* and its ecological niche. *Microbiol. Res.* 146: 41–49.
- 2) Barabesi, C., A. Galizzi, G. Mastromei, M. Rossi, E. Tamburini, and B. Perito. 2007. *Bacillus subtilis* Gene Cluster Involved in Calcium Carbonate Biomineralization. *J. Bacteriol.* 189: 228–235.
- 3) Boquet, E., A. Boronat, and A. Ramos-Cormenzana. 1973. Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature* 246: 527–529.
- 4) Brissant, O., G. Cailleau, C. Dupraz, and E.P. Verrecchia. 2003. Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environments: the role of exopolysaccharides and amino acids. *J. Sediment Res.* 73: 485–490.
- 5) Cacchio, P., C. Ercole, G. Cappuccio, and A. Lepidi. 2003. Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolated from a limestone cave and from a loamy soil. *Geomicrobiol. J.* 20: 85–98.
- 6) Castanier, S., G. Le Metayer-Levrel, and J.-P. Perthuisot. 1999. Ca-carbonates precipitation and limestone genesis—the microbiologist point of view. *Sediment Geol.* 126: 9–23.
- 7) Ferrer, M., J. Quevedo-Sarmiento, M.A. Rivadeneyra, V. Bejar, R. Delgado, and A. Ramos-Cormenzana. 1988. Calcium carbonate precipitation by two groups of moderately halophilic microorganisms at different temperatures and salt concentrations. *Curr. Microbiol.* 17: 221–227.
- 8) Hammes, F., and W. Verstraete. 2002. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Re/Views Environ. Sci. Biotechnol.* 1: 3–7.
- 9) Hammes, F., N. Boon, J.B. Villiers, W. Verstraete, and S.D. Siciliano. 2003. Strain-Specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4901–4909.
- 10) Head, I.M., N.D. Gray, R.W. Pickup, and J.G. Jones. 1995. The biogeochemical role of *Achromatium oxaliferum*, pp.895–898. In J.O. Grimalt and C. Dorronsoro (eds.), *Organic geochemistry: developments and application to energy, climate, environment and human history. Selected papers from the 17th International Meeting on Organic Geochemistry, 4th–8th September 1995, AIGOA, Donostia-San-Sebastian, The Basque Country, Spain.*
- 11) Head, I.M., N.D. Gray, K.J. Clarke, R.W. Pickup, and J.G. Jones. 1996. The phylogenetic position and ultrastructure of the uncultured bacterium *Achromatium oxaliferum*. *Microbiology* 142: 2341–2354.
- 12) Dick, J., W.D. Windt, B.D. Graef, H. Saveyn, P.V.D. Meeren, N.D.B. Belie, and W. Verstraete. 2006. Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation* 17: 357–367.
- 13) Kitano, Y., and D.W. Hood. 1962. Calcium carbonate crystals formed from sea water by inorganic processes. *J. Ocean Soc. Jap.* 18: 208–219.
- 14) 北野 康. 1990. 炭酸塩堆積物の地球化学 生物の生存環境の形成と発展. 東海大学出版会.
- 15) La Riviere, J.W.M., and K. Schmidt. 1991. Morphologically conspicuous sulfur-oxidizing Eubacteria, pp.3934–3947. In A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer (eds.), *The prokaryotes*, 2nd ed., Fischer Verlag, New York.
- 16) Lith, Y.V., R. Warthmann, C. Vasconcelos, and J.A. McKenzie. 2003. Microbial fossilization in carbonate sediments: a result of the bacterial surface involvement in dolomite precipitation. *Sedimentol.* 50: 237–245.
- 17) Lowenstam, H.A. 1981. Mineral formed by organisms. *Science* 211: 1126–1131.
- 18) Mackenzie, F.T., and A. Lerman. 2006. Carbon in the geobiosphere—earth’s outer shell—, pp.89–121. In N.H. Landman and D.S. Jones (eds.), Springer.
- 19) McCallum, M.F., and K. Guhathakurta. 1970. The precipitation of calcium carbonate from seawater by bacteria isolated from Bahama bank sediments. *J. Appl. Bacteriol.* 33: 649–655.
- 20) McKay, D.S., E.K. Gibson Jr., K.L. Thomas-Keperta, H. Vali, C.R. Romanek, S.J. Clemett, X.D.F. Chiller, M.R. Maechling, and R.N. Zare. 1996. Search for past life on Mars: possible relic biogenic activity in Martian meteorite ALH84001. *Science* 273: 924–930.
- 21) 村上由記, 岩月輝希, 長沼 毅. 2003. 東濃地域における地下水化学と地下微生物の相互作用. *J. Geography* 112: 277–287.
- 22) Parkhurst, D.L., and C.A.J. Appelo. 1999. User’s guide to PHREEQC (Ver. 2). A computer program for speciation, batch reaction, one-dimensional transport, and inverse geochemical calculations, pp.99–4259. In *Water-Resources Investigations*

- Report, US Geological Survey, Denver.
- 23) Peckmann, J., J. Paula, and V. Thiel. 1999. Bacterially mediated formation of diagenetic aragonite and native sulfur in Zechstein carbonates (Upper Permian, Central Germany). *Sedimentary Geology* 126: 205–222.
 - 24) Riding, R.E., and S.M. Awramik. 2000. *Microbial sediments*. Springer, Berlin, Germany.
 - 25) Rivadeneyra, M.A., G. Delgado, M. Soriano, A. Ramos-Cormenzana, and R. Delgado. 1999. Biomineralization of carbonates by *Marinococcus albus* and *Marinococcus halophilus* isolated from the Salar de Atacama (Chile). *Curr. Microbiol.* 39: 53–57.
 - 26) Rivadeneyra, M.A., J. Parraga, R. Delgado, A. Ramos-Cormenzana, and G. Delgado. 2004. Biomineralization of carbonates by *Halobacillus trueperi* in solid and liquid media with different salinities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48: 39–46.
 - 27) Sanchez-Roman, M., M.A. Rivadeneyra, C. Vasconcelos, and J.A. McKenzie. 2007. Biomineralization of carbonate and phosphate by moderately halophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61: 273–284.
 - 28) 和田浩爾, 小林巖雄編著. 1996. 海洋生物の石灰化と硬組織. 東海大出版会.
 - 29) Wainwright, M., N.C. Wickramasinghe, J.V. Narlikar, and P. Rajaratnam. 2003. Microorganisms cultured from stratospheric air samples obtained at 41 km. *FEMS Microbiol. Let.* 218: 161–165.