

令和元年5月23日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02967

研究課題名(和文) 海洋バクテリアの長期炭素隔離機能に対する海洋酸性化の影響評価

研究課題名(英文) Effect of ocean acidification on the marine bacterial microbial carbon pump

研究代表者

濱 健夫 (HAMA, Takeo)

筑波大学・生命環境系・名誉教授

研究者番号：30156385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：海洋バクテリアは、分解されやすい有機物を用いて、その一部を分解性が低い難分解性有機物に変換する機能を有する。これは、「微生物炭素ポンプ」とよばれ、炭素を有機物として長期隔離する役割を果たしている。この機能に対する海洋酸性化の影響を評価するため、バクテリアの培養実験を実施した。その結果、現在の2倍の二酸化炭素濃度における微生物炭素ポンプ効率は、現在の濃度における効率と大きな差は認められなかった。この事実は、今後100年程度の海洋酸性化は、「微生物炭素ポンプ」に対して顕著な影響を及ぼさないことを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋酸性化が生態系に与える影響に関しては、主として大型生物を対象に研究が行われてきた。一方、バクテリアに対する影響の評価は、ほとんど実施されて来ていない。特に、バクテリアが有する長期炭素隔離機能(微生物炭素ポンプ)に対する影響に関して、得られている情報は少ない。本研究において、現在の2倍の二酸化炭素濃度の条件下では、バクテリアの長期炭素隔離機能は大きな影響を受けないことを明らかにした。一方、バクテリアの群集組成は、酸性化の影響を受けて変化する結果が得られたことから、今後の詳細な研究が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Marine bacterial population produce the recalcitrant organic matter using labile organic matter. This process has been called as "Microbial carbon pump," and it can be regarded as the bacterial role isolating carbon as refractory products. In this study, bacterial culture experiment was carried out to elucidate the effect of ocean acidification on microbial carbon pump. The elevated carbon dioxide by 2 times (800 micro atm) had a minor effect on the efficiency of microbial carbon pump. This result suggests that ocean acidification coming 100 years has insignificant effect on microbial carbon pump.

研究分野：生物地球化学

キーワード：微生物炭素ポンプ 海洋酸性化 バクテリア 難分解性溶存態有機物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海洋に溶存態有機物 (DOM) として存在する炭素量は 700 PgC に達すると見積もられており、海洋 DOM は土壌有機物と並び、地球表層の有機炭素リザーバである。海洋 DOM の 90% は、微生物の分解作用に対して安定な、難分解性溶存態有機物 (R-DOM) により構成されている。近年、この R-DOM の生産者として海洋バクテリアが提唱され、バクテリアによる R-DOM 生成過程は「微生物炭素ポンプ」として認識されるに至っている。

一方、海洋は化石燃料の消費により生ずる二酸化炭素の 25% 程度を吸収しており、その影響により海水中の水素イオン濃度が増加しつつある。産業革命以前に比較して表層水の水素イオン濃度は 30% 程度増加したと推定されており、この影響により表層水の pH は 0.1 低下した。今後、海洋による大気二酸化炭素の吸収が継続した場合、今世紀末には pH が更に 0.3 程度低下すると予想されている。この「海洋酸性化」が海洋生態系および物質循環系に及ぼす影響については、この 10 年間活発な研究が実施されてきた。しかし、海洋バクテリアに対する影響に関しては、研究はほとんど進んでおらず、上述の「微生物炭素ポンプ」への影響に関してもこれまで知られていることは少ない。

2. 研究の目的

本研究では、「微生物炭素ポンプ」に対する海洋酸性化の影響を評価するため、実験的な解析を実施する。このため、二酸化炭素分圧を 400 および 800 μatm に調整したバクテリア培養系を設定し、両条件化におけるバクテリア群集組成を 16sRNA 系統解析により明らかにし、群集蘇生に対する酸性化の影響を評価する。また、炭素安定同位体 (^{13}C) で標識した植物プランクトン有機物を基質として、長期のバクテリア培養実験を実施し、残存する ^{13}C -溶存態有機炭素 (DOC) 濃度を測定することにより、「微生物炭素ポンプ」への海洋酸性化の影響を評価する。

3. 研究の方法

(1) 試料採取と明所培養

培養試料は筑波大学下田臨海実験センターにおいて採取した。採取試料を 130 L の透明培養器に移した後、光合成産物を ^{13}C で標識するため、 ^{13}C - NaHCO_3 を添加し、さらに栄養塩として KNO_3 、 KH_2PO_4 および Na_2SiO_3 (モル比として 16:1:16) を加えた。試料は屋外の自然光下において、明 (昼) - 暗 (夜) - 明 (昼) の 1.5 日間培養した。

(2) 暗所培養

明所培養で得られた試料は、酸で洗浄した 20 L のポリカーボネート瓶 6 本に分注した後、筑波大学の恒温室 (20) において、暗所培養を行った。この際、400 および 800 μatm の CO_2 を含む標準ガス ($\text{N}_2 + \text{O}_2$) を、それぞれ 3 本の培養器に通気し、培養液の pCO_2 を調整した。培養試料の採取は、0、1.5 (明所培養終了時)、3、6、12、30 および 90 日後に実施した。

(3) 試料の分析

溶存態無機炭素 (DIC) 濃度は、全炭酸・アルカリ度分析装置 (日本アンス) を用いて電量滴定法により分析した。分析値から CO_2sys プログラムを用いて、pH および pCO_2 を算出した。ガラス繊維濾紙 (ワットマン GF/F) を用いて濾過することにより、懸濁態有機物 (POM) と溶存態有機物 (DOM) に分別した。懸濁態有機炭素 (POC) および ^{13}C 同位体比は、元素分析計 - 同位体比質量分析計 (EA - IRMS) (Finnigan Delta Plus) により測定した。培養液の濾液は、電気透析法により脱塩した後、凍結乾燥機を用いて濃縮した。濃縮試料について、POM と同様に EA - IRMS を用いて測定した。

バクテリアの細胞数は SYTO BC による染色の後、フローサイトメーターを用いて測定した。バクテリア群集組成の解明のため、0.2 μm の孔径をもつスーポアフィルター上にバクテリアを捕集した後、DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出した。この DNA 試料と真正細菌の 16sRNA の V3/V4 領域を標的としたプライマーを用いて解析を行った。次世代シーケンズ解析は Illumina Miseq を用いて実施した (株式会社生物技研)。

4. 研究成果

(1) 培養における炭酸系の調整

培養期間中における CO_2 分圧および pH の変化を図 1 および 2 に示す。明所培養期間中において、 CO_2 分圧は 400 μatm 程度であった。暗所条件とした 1.5 日以降は、400 および 800 μatm の標準ガスによるバブリングを行った。このため、3 日目以降は両条件下で CO_2 分圧に違いが認められ、400 μatm 条件下において 421 - 487 μatm 、800 μatm 条件下において 815 - 874 μatm の範囲で変動した。

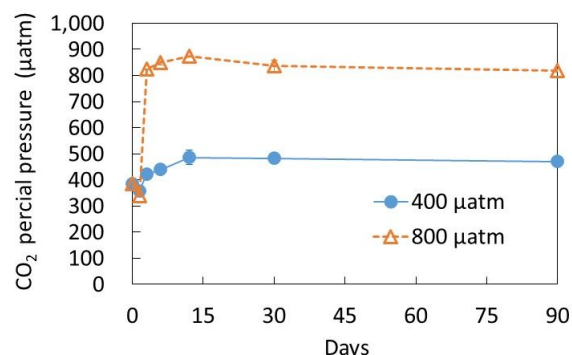


図 1 培養期間中における CO_2 分圧の変化

培養液の pH は明培養の開始時においては 8.3 であったが、標準ガスによるバブリングを開始した 3 日目以降は、両条件による差が生じた。400 μatm 条件下においては 8.00 - 8.05 であったのに対して、800 μatm 条件下においては 7.81 - 7.89 と、 CO_2 分圧の増加により pH の低下が生じていた。これらの結果は、本研究における両培養系の炭酸系の調節が、順調に進んだことを示している。また、各条件で用いた 3 本の培養瓶間の差は小さかった（相対誤差として、0 - 0.2%）。

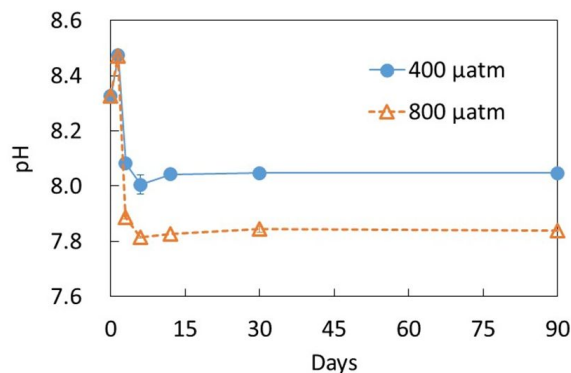


図 2 培養期間中における pH の変化

(2) バクテリア細胞数

バクテリア細胞数は、明所培養中では開始時の 4.5×10^5 細胞/mL から 8.8×10^5 細胞/mL に増加した。その後 3 日目までは $6.3 - 9.1 \times 10^5$ 細胞/mL の間で変動し、12 日目に $1.1 - 1.4 \times 10^5$ 細胞/mL と大きく減少した。

両条件下でのバクテリアの細胞数は、6 日目に比較的大きな差が認められ、通常条件下においては、酸性化条件下よりも細胞数が 25% 程度多かった。しかしながら、これを除いては、両条件の間に顕著な細胞数の差は認められなかった。

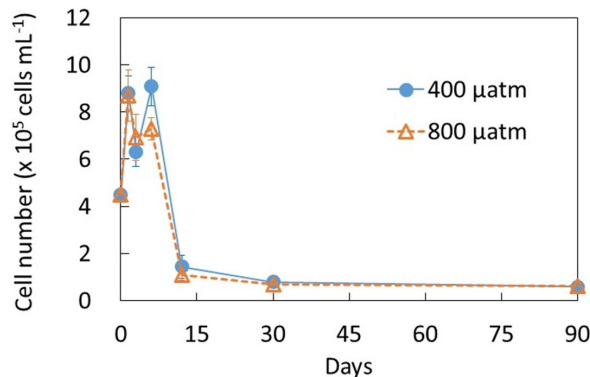


図 3 培養期間中におけるバクテリア細胞の変化

3) バクテリア群集組成

培養開始後 1.5、3、30 および 90 日後の試料を対象に実施した 16sRNA 解析の結果を図 4 に示す。培養を通して、Bacteroidetes Flavobacteria、Proteobacteria Alphaproteobacteria および Proteobacteria Gammaproteobacteria の 3 グループが主要な分類群として確認された。細菌群集の組成は、培養の進行および酸性化の状態により変化が認められた。Flavobacteria の寄与は培養初期が高く、培養が経過するに従って低下する傾向が認められた。この結果は、培養液に含まれる有機物濃度が低く、特に易分解性有機物の利用が困難な条件下では、本グループの優位性が保てないことを示唆する。一方、Gammaproteobacteria は、培養の経過に従って、その寄与が増加する傾向が認められたことから、本グループは易分解性有機物濃度が低い状況において、他のグループより増殖能力が高いことが予想される。

酸性化との関係を見ると、Flavobacteria は 30 および 90 日では、酸性化条件である 800 μatm においてその寄与が低下しており、酸性化が阻害的な影響を与えることが示唆される。一方、

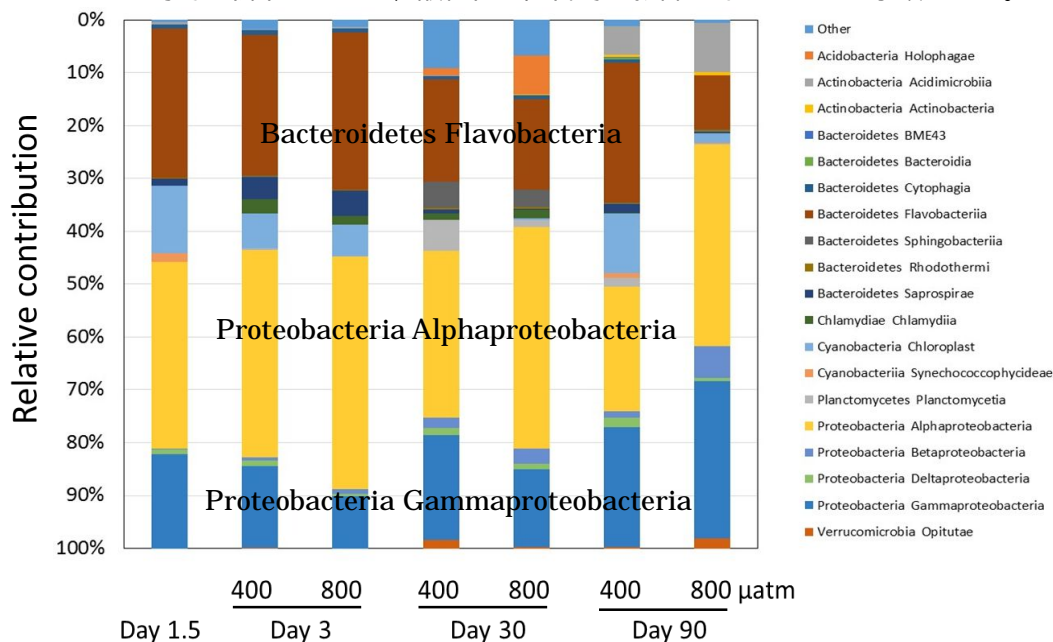


図 4 16sRNA 解析によるバクテリア群集組成

Alphaproteobacteria の寄与は酸性化条件下で高く、この傾向は培養開始ご 3 日目以降で認められた。本研究において、本グループは多くの場合に最大の寄与を示したが、酸性化が進行した場合にはその優占性は更に増加することも考えられる。

(4) 有機物の残存性

植物プランクトンの光合成で生産される懸濁態有機炭素 (^{13}C -POC) の濃度は、明所培養期間で $100 \mu\text{M-C}$ まで増加し、その後の暗所培養で急激に減少した。12 日後には最大値の 15% となった後、培養終了時まで緩やかな減少を続けた。90 日後の値は最大値の 5% であり、この間に光合成産物の 95% は無機化あるいは溶存化した。 ^{13}C -POC に対する酸性化の影響はほとんど認められず、 $800 \mu\text{atm}$ までの CO_2 分圧の上昇は、懸濁態有機炭素の分解に大きな変化を及ぼさないことが示唆される。

明所培養中に光合成起源の溶存態有機炭素 (^{13}C -DOC) の濃度は平均 $10 \mu\text{M-C}$ まで増加した。これは、 ^{13}C -POC を含めた全光合成生産量の 10% 程度に相当しており、植物プランクトン光合成産物の排出の割合としては、一般的な値である。 ^{13}C -DOC は培養期間の経過とともに減少したが、その減少速度は ^{13}C -POC と比較して低いものであった。これは、溶存化した光合成産物は、懸濁態の状態よりも、より安定であることを示唆している。一方、両条件下において、 ^{13}C -DOC の顕著な違いは認められなかった。

暗所培養期間において残存する光合成産物全体に対する ^{13}C -POC と ^{13}C -DOC の割合を比較すると、分解の進行に伴って、 ^{13}C -POC の割合は低下し、逆に ^{13}C -DOC の割合が増加した。これは、難分解性有機物が DOM として残存することを示唆しており、Amon & Benner(1996)により提唱された有機物サイズと反応性の関係に合致している。一方、両画分の残存の割合は、酸性化条件により大きな影響を受けないことが明らかとなった。このことから、今回検討した $800 \mu\text{atm}$ までの CO_2 分圧の増加は、「微生物炭素ポンプ」を含むバクテリアの代謝に対して、顕著な影響を与えないものと推察される。

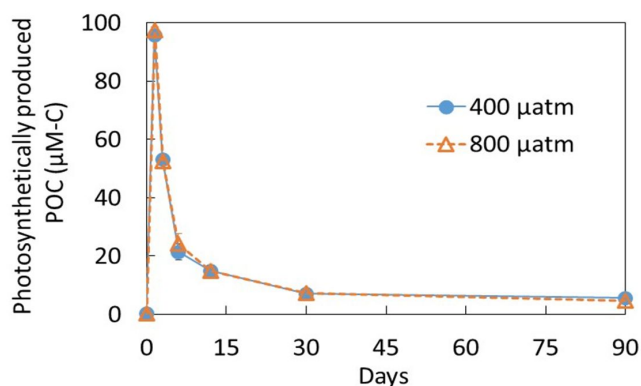


図 5 培養期間中における懸濁態光合成産物の濃度変化

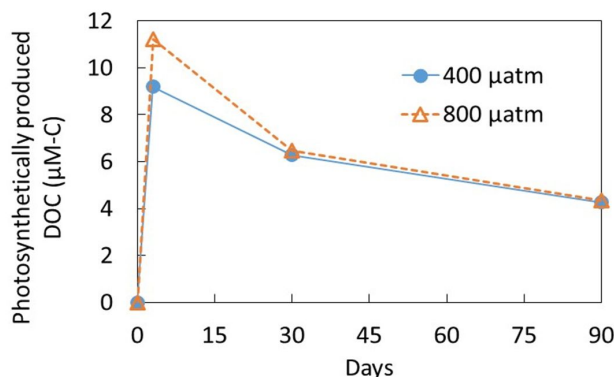


図 6 培養期間中における溶存態光合成産物の濃度変化

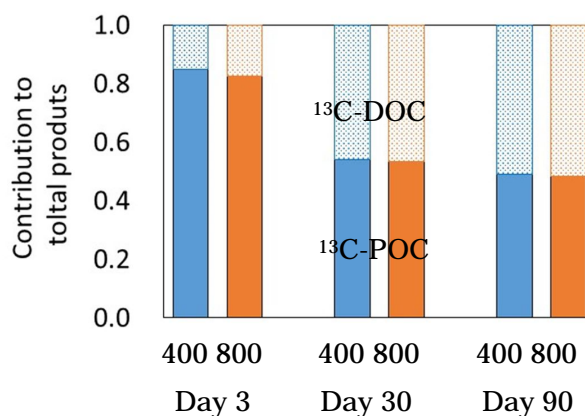


図 7 培養期間中における ^{13}C -POC と ^{13}C -DOC の寄与

< 引用文献 >

Amon, R.M.W. and R. Benner, Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, 1996, 41, 41-51.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Ken Arai, Shigeki Wada, Koichi Shimotori, Yuko Omori, Takeo Hama, Production and degradation of fluorescent dissolved organic matter derived from bacteria, *Journal of Oceanography*, 2018, 74, 39-52.

〔学会発表〕(計 6 件)

Takeo Hama, Yusuke Yoshida, Yuji Inagaki, Yuko Omori, Shigeki Wada, Effect of ocean acidification on production of the recalcitrant dissolved organic carbon, 47th Estuarine and Coastal Sciences Association, 2018

濱 健夫, 海洋酸性化 - もう一つの二酸化炭素問題、獨協大学環境共生研究所研究例会、2018

Akira Saeki, Yuko Omori, Shigeki Wada, Takeo Hama, Experimental analysis on the dynamics of humic-like fluorescence dissolved organic matter in the marine surface layer, Ocean Sciences Meeting, 2018

Eri Iwasawa, Shigeki Wada, Yuko Omori, Takeo Hama, Microbial and photochemical decomposition of dissolved organic matter collected from macroalgal bed, Ocean Sciences Meeting, 2018

濱 健夫, Effect of ocean acidification on phytoplankton community and biogeochemical cycle, JAMIO 国際シンポジウム、2016

濱 健夫, 溶存態有機物の代謝と安定性、日本地球化学会年会、2016

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：稲垣祐司

ローマ字氏名：(INAGAKI yuji)

所属研究機関名：筑波大学

部局名：計算科学研究センター

職名：教授

研究者番号(8桁)：50387958

研究分担者氏名：大森裕子

ローマ字氏名：(OMORI yuko)

所属研究機関名：筑波大学

部局名：生命環境系

職名：助教

研究者番号(8桁)：80613497

研究分担者氏名：小杉如央

ローマ字氏名：(KOSUGI naohiro)

所属研究機関名：気象庁気象研究所

部局名：気候・環境研究部

職名：研究官

研究者番号(8桁)：20553168

(2)研究協力者

研究協力者氏名：吉田悠亮

ローマ字氏名：YOSHIDA yusuke

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。