

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14869

研究課題名(和文) 不連続凍土帯のツンドラにおけるメタン動態に凍結 - 融解サイクルが及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of frizzling and thawing cycle on methane dynamics in discontinuous permafrost belt in tundra

研究代表者

犬伏 和之 (INUBUSHI, Kazuyuki)

千葉大学・大学院園芸学研究科・教授

研究者番号：00168428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：地球温暖化によりツンドラが広く分布する連続永久凍土帯の一部が融解し埋蔵メタンの放出が懸念されるがその動態は未だ不十分である。本研究ではアラスカ内陸部のクロトウヒ林で採取した凍結土壌コアを3層に分け、各層土壌を0 から10 °Cまで1週間毎に変化させメタン放出速度を測定し、0 °Cで培養した下層土壌で最大、表層および中間層でもメタン放出が観察された。5 および10 °Cでは下層のメタン放出が減少し、表層および中間層はメタン吸収を示した。嫌氣的メタン生成酸化阻害剤を添加すると吸収と放出が減少した。細菌および古細菌群集のゲノム情報は土壌の深さとともに変化したが、融解に対しては変化しなかった。

研究成果の概要(英文)：Methane (CH₄) dynamic during the thawing of frozen soils is an important process in northern ecosystems. In this study, frozen soil cores were collected in a black spruce forest of Interior Alaska, vertically grouped into three layers and incubated for 3 weeks, with the measurement of methane fluxes. During the incubation, temperature was weekly changed from 0 to 5 then 10 °C. Net CH₄ release was the greatest in bottom layer soils incubated at 0 °C, while net CH₄ release was concurrently observed with net CH₄ absorption at soils of upper two layers. At 5 and 10 °C, net CH₄ release was reduced, then net CH₄ uptake was observed in top and middle layer soils. Both net uptake and release of CH₄ were reduced by the addition of a chemical inhibitor for anaerobic methanotrophic and methanogenic activity. The genomic information of bacterial and archaeal community gradually changed along the depth, while the overall microbial community less responded to the temperature rising.

研究分野：土壤微生物学

キーワード：メタン酸化 メタン生成 永久凍土 温暖化 融解

1. 研究開始当初の背景

現在 95%のツンドラは連続永久凍土帯に分布しているが、当地域の大部分では、2100年までに気温が 3-6 上昇し、連続永久凍土帯の多くが不連続永久凍土帯になると予測されている (Callaghan et al., 2011)。近年、連続永久凍土帯では二酸化炭素の 25 倍強力な温室効果ガスであるメタンの放出が凍土の融解により増大していることが分かってきた (Hayes et al., 2014)。また、土壌の再凍結と再融解 (凍結-融解サイクル) も CH₄ 放出量に大きく影響すると懸念されている (Desyatkin, 2009; Shadel et al., 2014)。さらには、凍土のメタンの生成・酸化プロセスには融解状態が影響を与える可能性も指摘されている (Shadel et al., 2014)。しかしながら、凍結-融解サイクルが不連続永久凍土帯の CH₄ 生成・酸化プロセスに及ぼす影響は殆ど解明されておらず、拡大する不連続永久凍土帯におけるメタン動態の解明が急がれていた。特に、初期融解時のメタン大量放出、凍結-融解サイクル中のメタン生成量と酸化量、およびメタン生成菌・酸化菌の種構成、を解明することが重要であると考えられた。

本研究では、アラスカの不連続永久凍土帯 (図 1) に分布するツンドラ生態系や北方林生態系から採取した土壌について、メタン生成と酸化の両方に注目しながら、「永久凍土融解および凍結-融解サイクルが不連続永久凍土帯のメタン生成・酸化プロセスに及ぼす影響」を解明することを目指し、研究代表者 (犬伏 和之) および連携研究者 (八島 未和) が、海外協力研究者 (Yongwon Kim, アラスカ大) や国内研究協力者 (永野 博彦、千葉大) とともに研究に着手した。

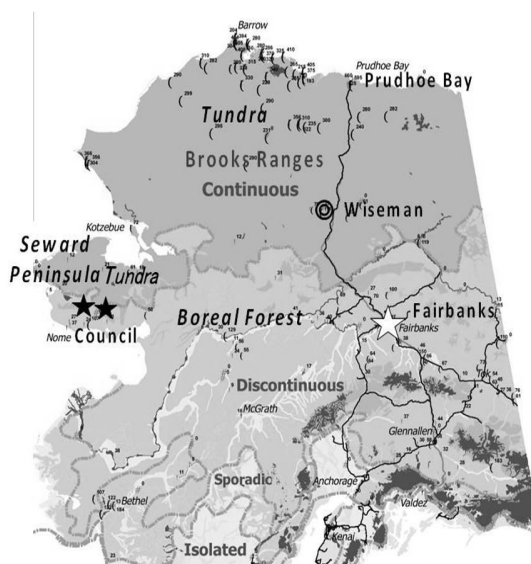


図 1. アラスカにおける連続永久凍土帯 (図中の Continuous) と不連続永久凍土帯 (図中の Discontinuous) の分布

2. 研究の目的

永久凍土および季節的に凍結した活動層の上に成立している高緯度北方生態系では、春季の始め (i.e. 凍結土壌の融解期) にメタンの一時的な放出が発生することが、多くの研究者 (e.g. Friborg et al., 1997; Kim et al., 2007; Kim et al., 2012; Tokida et al., 2007) によって観測されている。このメタンの一時的な放出は、高緯度北方生態系の年間メタン収支に大きく寄与する可能性が指摘されている (Friborg et al., 1997)。この一時的なメタン放出の原因として、凍結した活性層の土壌と永久凍土に閉じ込められたメタンの放出が考えられている (Friborg et al., 1997; Kim et al., 2007)。

また、凍結土壌の融解は、メタンだけでなく二酸化炭素も含めた温室効果ガスの生産と消費に関わる土壌微生物プロセスにも影響を与える (Kim et al., 2012)。凍結土壌が融解することで、基質の利用可能性や温度、水分、通気性などの様々な土壌環境条件が向上し (Kim et al., 2012)、微生物活性が直接的に影響される (Chen et al., 2003; Kim et al., 2012)。一般的には、融解が進むにつれ、好気的な表層では土壌有機物の分解 (二酸化炭素生成) とメタンの酸化が活発になり、より深い嫌気的な層ではメタンの生成が活発になると予想される。その結果、高緯度北方生態系の土壌が温室効果ガスの吸収源になるか放出源になるかは、土壌プロファイルに沿った微生物活性に依存する。

以上の背景を踏まえ、本研究では、内陸アラスカの不連続永久凍土帯に生育する高緯度北方生態系から採取された凍結土壌コアについて、融解に対する温室効果ガスフラックスや微生物群集構造の反応を明らかにすることを目的とした。研究を行うにあたり、地表から約 90 cm までの凍結土壌コアを融解する培養実験を行い、土壌深度 (上層、中層および下層) や融解の進行度合い (0.5 および 10%) の違いに伴う土壌二酸化炭素およびメタンフラックスの変化を比較した。さらに、PCR-DGGE 法 (Arai et al., 2014) や 16S rRNA アンプリコンの次世代シーケンシング (NGS) 技術 (Caporaso et al., 2012; Klindworth et al., 2013) を用いて、土壌細菌および古細菌の群集構造を分析し、凍結土壌融解の土壌微生物群集構造への影響を検証した。

3. 研究の方法

(0) 予備試験: 予備試験として、アラスカ内陸部の北方成熟林と火災跡地のそれぞれで採取された各土壌コアから、深さ約 20cm, 50cm, および 70cm から厚さ約 3 cm 程度のディスクを切り出し、1 週間ずつ温度を変えながら培養した。切り出し時に、0 未満に保つことが難しいことから、当初予定した -5 °C での培養は諦め、代わりに、温

度を 0 から 10 まで 5 ずつ変えながら、計 3 週間培養することが適当と考えた。培養中、定期的にメタン濃度を測定し、その経時変化を追跡した。その際、融解時の永久凍土表層からのメタン大量放出を当初計画通りに検出できた。また各試料より DNA を抽出し、PCR-DGGE 法による遺伝子解析を試みた。バンドパターンから微生物群集構造がサイトや層ごとに異なるだけでなく、培養前後でも変化する可能性が推察された。また、次年度以降用いるメタン生成阻害剤である BES (2 プロモエタンスルホン酸) の添加量は文献調査から終濃度で 20mM 程度とした。

(1) 試料および培養試験：アラスカ内陸部のフェアバンクス市近くに立地するクロトウヒ林 (図 2) で採取された凍結土壌コア (地表から永久凍土のある深さ 90cm まで) (図 3) の培養実験を行った (図 4)。当初、プロジェクトの最終目標としていた不連続凍土帯のツンドラ土壌の培養は、最終年度の研究体制や試料状態から成果の獲得が困難であると判断し、実施を見送った。北方林の凍結土壌コアを、表層、中間層、下層に分け、各層から分取した 12 土壌を 3 週間培養した。1 週間毎に培養温度を、融解開始 (0 °C)、融解状態 (+5 °C, 10 °C) の順に変化させた。この際、定期的に培養器内のメタンおよび二酸化炭素濃度を測定し、嫌氣的メタン酸化および生成の阻害剤 (BES: 2 プロモエタンスルホン酸) を添加し、凍結-融解サイクルにおけるメタン生成・酸化プロセスの変化を捉えた。



図 2 . 土壌コアを採取したクロトウヒ林

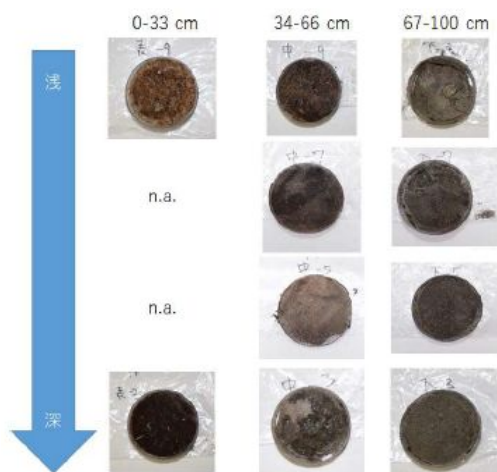


図 3 . 培養実験に使用した土壌

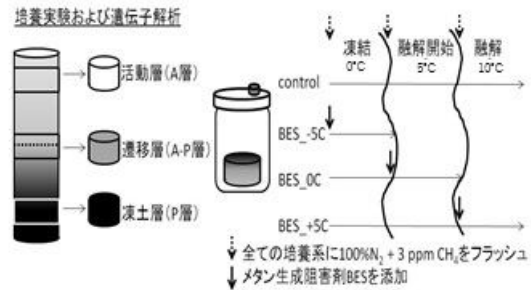


図 4 . 培養実験の基本的スキーム

(2) 遺伝子解析：阻害剤である BES を添加せずに培養した土壌試料から DNA を FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, CA, USA) で抽出し、PowerClean DNA Clean-Up Kit (Mo Bio Laboratories, CA, USA) で精製した。精製した DNA サンプルを TaKaRa Bio 社 (Shiga, Japan) に送付し、16S (V3-V4) Metagenomic Library Construction Kit for NGS (TaKaRa Bio) によって増幅・構築された 16S rRNA アンプリコンを Illumina MiSeq によって解析した。MiSeq 解析データを CD-HIT-OUT (Li et al., 2012) に照合し、最終的に 1325 の OTU (operational taxonomic unit) を得た。得られた各 OTU の相対頻度を土壌深度や融解進行度合いの違いで比較した。

4 . 研究成果

(1) 培養実験における温室効果ガスフラックス (図 5)：コア表層および中間層の 8 土壌のうち 6 土壌では、二酸化炭素放出速度が 0 よりも 5 °C で 1.5-19.2 倍大きかったが、これら 6 土壌のうち 3 土壌の放出速度は、10 °C での培養で減少した。メタン放出速度は、0 °C で培養した下層土壌で最大であった。また、0 °C で培養した表層および中間層の土壌でも、メタン放出が観察された。5 および 10 °C では、下層土壌のメタン放出が減少し、表層および中間層の土壌はメタン吸収を示した。嫌氣的メタン酸化および生成の阻害剤を添加すると、メタン吸収と放出の両方が減少した。

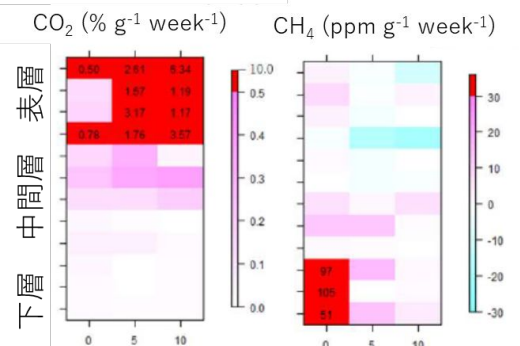


図 5 . 培養中の温室効果ガス濃度変化。左のパネルが二酸化炭素 (CO₂)、右のパネルがメタン (CH₄) の濃度変化を表す。

(2)細菌および古細菌群集の遺伝子解析(図6): 土壌の深さによって細菌および古細菌群集構造は変化した, 融解に対しては変化が見られなかった。群集の主要な構成グループは, 当該地域で行われた先行研究(Tas et al., 2014; Tripathi et al., 2018)とよく似通っていた。

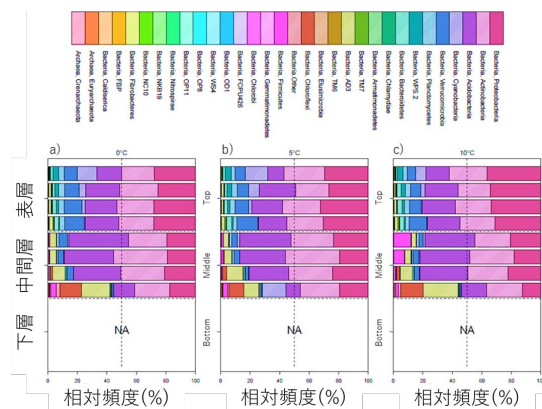


図6. 16S rRNA アンプリコンのNGS解析に基づく培養土壌の微生物群集構造

(3)まとめ

本研究により, 不連続永久凍土帯の土壌において, 温室効果ガスフラックスは融解に対して敏感かつ多様に反応する一方, 細菌および古細菌の全体的な群集構造は融解に対して安定的である可能性が示唆された。

今後, さらに多くの高緯度北方生態系土壌について検討することで, 本研究で得られた成果の高緯度北方生態系における一般性を評価できる。なお, 本研究で得られた成果を含む論文原稿を, *Soil Science and Plant Nutrition* 誌に投稿した(2018年4月現在, 査読審査中)。

<引用文献>

Arai H, Hadi A, Darung U, Limin SH, Hatano R, Inubushi K 2014: A methanotrophic community in a tropical peatland is unaffected by drainage and forest fires in a tropical peat soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 60, 577–585. doi: 10.1080/00380768.2014.922034.

Callaghan T V., Johansson M, Brown RD, et al. 2011: The Changing Face of Arctic Snow Cover: A Synthesis of Observed and Projected Changes. *Ambio*, 40, 17–31. doi: 10.1007/s13280-011-0212-y.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. 2012: Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.*, 6, 1621–1624. doi: 10.1038/ismej.2012.8.

Chen G, Zhu H, Zhang Y 2003: Soil

microbial activities and carbon and nitrogen fixation. *Res. Microbiol.*, 154, 393–398. doi: 10.1016/S0923-2508(03)00082-2.

Desyatkin AR, Takakai F, Fedorov PP, Nikolaeva MC, Desyatkin R V, Hatano R 2009: CH₄ emission from different stages of thermokarst formation in Central Yakutia, East Siberia. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 55, 558–570. doi: 10.1111/j.1747-0765.2009.00389.x.

Friborg T, Christensen TR, Søgaard H 1997: Rapid response of greenhouse gas emission to early spring thaw in a subarctic mire as shown by micrometeorological techniques. *Geophys. Res. Lett.*, 24, 3061–3064. doi: 10.1029/97GL03024.

Kim DG, Vargas R, Bond-Lamberty B, Turetsky MR 2012: Effects of soil rewetting and thawing on soil gas fluxes: A review of current literature and suggestions for future research. *Biogeosciences*, 9, 2459–2483. doi: 10.5194/bg-9-2459-2012.

Kim Y, Ueyama M, Nakagawa F, Tsunogai U, Harazono Y, Tanaka N 2007: Assessment of winter fluxes of CO₂ and CH₄ in boreal forest soils of central Alaska estimated by the profile method and the chamber method: A diagnosis of methane emission and implications for the regional carbon budget. *Tellus, Ser. B Chem. Phys. Meteorol.*, 59, 223–233. doi: 10.1111/j.1600-0889.2006.00233.x.

Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO 2013: Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.*, 41. doi: 10.1093/nar/gks808.

Li W, Fu L, Niu B, Wu S, Wooley J 2012: Ultrafast clustering algorithms for metagenomic sequence analysis. *Brief. Bioinform.*, 13, 656–668. doi: 10.1093/bib/bbs035.

Schädel C, Schuur EAG, Bracho R, Elberling B, Knoblauch C, Lee H, Luo Y, Shaver GR, Turetsky MR 2014: Circumpolar assessment of permafrost C quality and its vulnerability over time using long-term incubation data. *Glob. Chang. Biol.*, 20, 641–652. doi: 10.1111/gcb.12417.

Taş N, Prestat E, McFarland JW, Wickland KP, Knight R, Berhe AA, Jorgenson T, Waldrop MP, Jansson JK 2014: Impact of fire on active layer and permafrost microbial communities and metagenomes in an upland Alaskan boreal forest. *ISME J.*, 8, 1904–1919. doi: 10.1038/ismej.2014.36.

Tokida T, Mizoguchi M, Miyazaki T, Kagemoto A, Nagata O, Hatano R 2007: Episodic release of methane bubbles from peatland during spring thaw. *Chemosphere*, 70, 165–171. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.06.042.

Tripathi BM, Kim M, Kim Y, Byun E, Yang J-W, Ahn J, Lee YK 2018: Variations in bacterial and archaeal communities along depth profiles of Alaskan soil cores. *Sci. Rep.*, 8, 504. doi: 10.1038/s41598-017-18777-x.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

Kazuyuki Inubushi, Hirohiko Nagano, Yongwon Kim, Bang-Yong Lee, and Haruka Shigeta: An incubation experiment examining the carbon dynamics during the thawing of a frozen soil core collected in a black spruce forest, 10th Asian Symposium on Microbial Ecology, 2018.

永野博彦・重田遥・Yongwon Kim・犬伏和之：アラスカ内陸部の北方林土壌において凍結状態からの融解中に起こる温室効果ガス動態の変遷，日本土壌肥料学会仙台大会，2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

犬伏 和之 (INUBUSHI, Kazuyuki)
千葉大学・大学院園芸学研究科・教授
研究者番号：00168428

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

八島 未和 (YASHIMA, Miwa)
千葉大学・大学院園芸学研究科・講師
研究者番号：60527927

(4)研究協力者

Yongwon Kim (KIM, Yongwon)
永野 博彦 (NAGANO, Hirohiko)