

平成22年 5月20日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号： 19310003

研究課題名（和文） 海洋腐植物質の動態とその海洋炭素循環における意義

研究課題名（英文） Dynamics of marine humic-like substances and their roles in marine carbon cycle

研究代表者

濱 健夫（HAMA TAKEO）

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：30156385

研究成果の概要（和文）：西部北太平洋における腐植様物質の蛍光強度は、深度の増加と共に増加する傾向が認められた。表層における太陽放射による蛍光の消失が深度分布を生む主要な要因であると考えられる。さらに、海洋の腐植様物質の分子量組成の時空間的変動においても、太陽放射の影響が大きいことが示唆された。また、バクテリアの培養実験によりバクテリアによる腐植様物質の生成を実験的に立証した。

研究成果の概要（英文）：The fluorescent intensity of marine humic-like substances was higher in mid-deep layer than surface layer, indicating that photo-bleaching is important factor controlling the vertical profile. Photo-bleaching also likely controls the molecular weight composition of humic-like substances. Microbial culture experiments revealed that humic-like substances were produced by bacterial metabolic processes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：生物地球化学・海洋環境学

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：溶存態有機物、腐植物質、海洋炭素循環、西部北太平洋、バクテリア生成物、固相抽出

## 1. 研究開始当初の背景

海洋に存在する溶存態有機物の成分として、特有の励起・蛍光波長をもつ有機物がある。この有機物グループは紫外～可視光域にも特徴的な吸収を持つことから、海水中への光の透過に対して大きな影響をもつため、その動態と海洋境との関わりに

ついて注目が集まっている。

この有機物グループはその化学的特性が陸上で知られる腐植物質と類似していることから、海洋腐植物質と呼ばれている。沿岸域に存在する腐植物質は、陸上からの流入を反映して、主に陸上腐植物質の特性を示すのに対し、外洋域の腐植物質は海洋性の特徴を示す。すなわち、一次生産者である植物プラ

ンクトンの光合成から始まる微生物物質循環系が駆動する結果、生産されることを示唆する。しかしながら、この海洋腐植物質の時空間的分布、分子量組成などの科学的特性、更に生成・および分解過程など、海洋における腐植物質の動態に関して明らかになっていることは少ない。

## 2. 研究の目的

本研究においては、気象庁が実施している西部北太平洋の東経137度線上における現場観測と、海洋微生物群集による海洋腐植物質の生成実験とを組み合わせた研究を通して、海洋腐植物質について、(1)外洋域における分布の特徴とその支配要因、(2)分子量組成の時空間的变化とその支配要因、および(3)バクテリアによる生成機構、の3点を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 西部北太平洋域における腐植物質の分布

#### ①海水試料の採取

腐植物質の時空間的分布の観測は、2006年1月から2007年4月(計6回)までの気象庁が実施した定期観測における東経137度線上北緯15~30度の4測点で行った。海水試料は深度0~1000mまでの18層において、ニスキン採水器を用いて採取した。水温、塩分、密度などのCTDデータや、栄養塩濃度、溶存酸素濃度は気象庁の観測データを使用した。

#### ②分析

海水試料に含まれる腐植物質の量を評価するために、腐植物質の蛍光強度の測定を行った。蛍光分光光度計(日立F4500)を用いて三次元励起蛍光スペクトルを測定し、励起波長(Ex)/蛍光波長(Em) = 310 / 410 nmにおける蛍光強度を海洋腐植物質の蛍光強度とした。得られた蛍光強度は、 $10 \mu\text{g L}^{-1}$  硫酸キニーネ溶液のEx / Em = 350 / 450 nmの蛍光強度を10 QSUとして相対値で示した。

腐植物質の分子量分布を測定するために、固相抽出(C18 Sep-pak, Waters)を用いて腐植物質を抽出・濃縮した。抽出した腐植物質の分子量分布は、サイズ排除クロマトグラフィーで測定し、蛍光検出器(Ex/Em = 310/410 nm)で検出した。

### (2) 微生物による腐植物質の生成に関する実験的解析

#### ①バクテリア群集による腐植物質生成実験

静岡県下田市に位置する大浦湾の表層海水を採取した。海水を孔径0.7 $\mu\text{m}$ のガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液に含まれるバクテリアをバクテリア群集として培養に用いた。培養器(20L)に人工海水を入れ、グルコース、

硝酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウムを添加した。これに、バクテリア群集を接種し、90日間、20°Cの暗条件下で培養した。培養開始から定期的に試料の一部を採取し、溶存態有機炭素(DOC)濃度、懸濁態有機炭素(POC)濃度、三次元励起・蛍光スペクトル、バクテリア数を測定した。腐植物質の分子量分布の変化は、サイズ排除クロマトグラフ(HPSEC)を用いて測定した。腐植物質の太陽光照射実験は、石英管に90日培養後の脱塩・濃縮した試料を封入後、3日間、野外で行った。

#### ②バクテリア単離株による腐植物質生成実験

静岡県下田市の大浦湾、鍋田湾の表層から海水を採取した。採水した海水は孔径0.7 $\mu\text{m}$ のガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液をMarin Broth 2216 (Difco)等の寒天培地に塗布した。発生したバクテリアのコロニーを単離し、DNA抽出物を鋳型として、16S rRNA遺伝子をPCRによって増幅し、シーケンスを行った。得られたシーケンスをGenbankのデータと比較し相同性を確認し、単離したバクテリアの同定を行った。

単離したバクテリアの中から、以下の10菌株を腐植物質生成実験に用いた。( )内は属、および、DNA Data Bank of JapanのAccession Numberを示す。

MB001 株 (*Sulfitobacter* [AB378716])、  
MB002 株 (*Thalassospira* [AB378717])、  
MB004 株 (*Alteromonas* [AB378718])、  
MB017 株 (*Thalassospira* [AB378723])、  
MB019 株 (*Pseudomonas* [AB378724])、  
MB-F 株 (*Thalassospira* [AB378715])、  
Yb-A 株 (*Marinomonas* [AB496650])、  
Yb-D 株 (*Marinomonas* [AB496653])、  
Yb-F 株 (unclassified [AB496655])、  
Yb-I 株 (*Vibrio* [AB496657])。

これらバクテリアの単離株をMarin Broth 2216:人工海水=1:250の液体培地に接種し、20°Cの暗所で7日間培養した。培養終了後、試料のDOC濃度、POC濃度、三次元励起・蛍光スペクトルを測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 西部北太平洋域における腐植物質の分布

#### ①腐植物質の時系列分布

西部北太平洋域において、腐植物質の蛍光強度は表層で小さく深度が深くなるにつれ増加する傾向が認められた(図1)。この傾向は、従来の研究によって様々な海域の観測結果と一致する。本研究ではさらに、年間を通じてこのような鉛直分布が維持されていることを確認することができた。

中緯度域(北緯25,30度)の表層において、腐植物質の分布の季節変動が確認された。

蛍光強度が低く一定な層(<0.3QSU)の深度が、冬期に深度は深くなり、夏期に浅くなる傾向を示した(図1下)。このような蛍光強度の時系列の分布に、混合層の深度の分布を対応させた結果、蛍光強度が低く一定な層と混合層の動態がほぼ一致することが示された(図1下)。このことから、表層付近では混合層による水の鉛直混合が腐植性物質の分布に強く影響していることが示唆される。

さらに、中緯度域における混合層内の蛍光強度も、夏季では冬季の約50%に減少する季節変動を示した。従来の研究から、表層の蛍光強度の減少は、太陽光照射による腐植性物質の蛍光特性の消失(光ブリーチング)であることが知られている。光ブリーチング速度は、光子量と比例しているため、海表面で最も早く、深度とともに指数関数的に減衰する。それゆえ、混合層が深い冬季(125-250 m)に比べて、混合層が浅くなる夏季(10 m)では強い光ブリーチングが起こる海表面付近で長期間腐植性物質が保持されるため、混合層内の腐植性物質が冬季よりも減少したと考えられる。以上のことから、中緯度域において表層の腐植性物質の時系列分布は、季節による混合層の深度の変化と太陽光照射によるブリーチングに強く支配されることが示唆された。

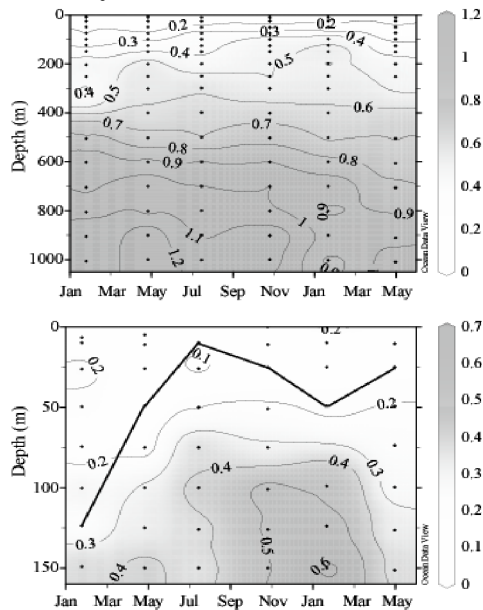


図1. 東経137度北緯25度における腐植性物質の蛍光強度の時系列変化  
上: 0-1000 m、下: 表層 0-150 m。図中の実線は混合層の深度を示す。

②腐植性物質の分子量分布とその組成の変化

固相抽出で抽出された腐植性物質は、1800 Da以下の分子量範囲に分布した。また、その分子量分布は3つのピークに大別され、保持

時間が短い高分子量側から順にA、B、およびC画分とした(図2)。3つの分子量画分の構成比(分子量組成)は、表層と中深層(500、1000m)で大きく異なり、深度が浅くなるにつれA画分の割合が減少した(図3)。本研究で示した腐植性物質の分子量組成の深度による違いは初めての知見であり、今後腐植性物質の動態を知るうえで、その構成成分の詳細な動態を明らかにする必要性を示唆するものである。

深度による分子量組成の違いを引き起こす要因として、太陽光照射が考えられる。上述したように、表層では腐植性物質に対して太陽光照射によるブリーチングの影響がある。特にA画分の割合が表層で減少していたことから、腐植性物質の中でも高分子量画分が光照射によって選択的に消失されていると考えられる。つまり、腐植性物質は光照射に対する安定性が違う物質で構成されている可能性がある。

従来の研究から、腐植性物質の一部は太陽光照射によって無機化する、またバクテリアに利用されやすい有機酸へ変化し、バクテリアの生物活動を活発にすることが報告されている。太陽光照射による腐植性物質の変化やそのメカニズムを明らかにすることは、海洋表層の炭素循環や生態系を理解する上で重要である。本研究によって、腐植性物質を構成する各分子量画分が太陽光照射に対して異なる安定性をもつことが示唆された。今後、それぞれの画分の性質や太陽光照射に対する消失のメカニズムなどを明らかにすることによって、腐植性物質が海洋物質循環に及ぼす影響や太陽光と物質循環の関わりについての理解が深まると予想される。

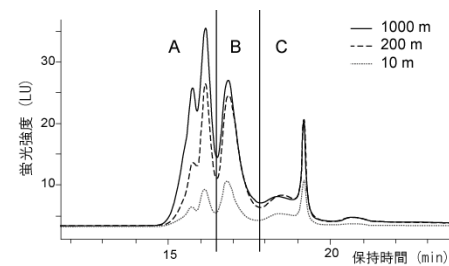


図2. 2006年6月 東経137度北緯25度の腐植性物質の分子量分布

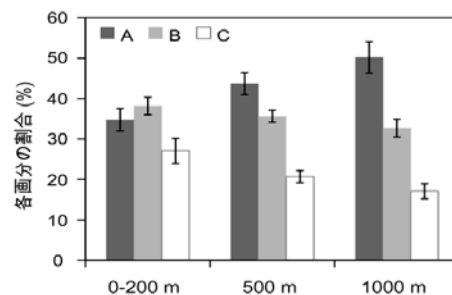


図3. 腐植性物質の分子量組成

(2) 微生物による腐植性物質の生成に関する実験的解析

① バクテリア群集による腐植性物質の生成

培養開始後 2 日目に、バクテリア数は著しい増加を示し  $2.5 \times 10^7$  cells ml<sup>-1</sup> となった (図 3)。これに伴い、DOC 濃度は、1 日目の  $1270 \mu\text{mol C l}^{-1}$  から  $486 \mu\text{mol C l}^{-1}$  へと大きく減少した。その後、DOC 濃度は減少を続け、培養 10 日目に  $33 \mu\text{mol C l}^{-1}$  となった以降、ほぼ同様の値となった。Ex/Em=335/410 の蛍光強度は、DOC の大きな減少が見られた 1 日目から 2 日目にかけて、その値が 0.1QSU から 1.0QSU まで増加した (図 4)。これら結果は、グルコースを有機物源としてバクテリア群集が増殖する際に、腐植性物質が生成されたことを明確に示している。しかし、Ex/Em=335/410 の蛍光強度の増加は、バクテリア数が減少に転じ、かつ、グルコースが存在しないと推定される培養 10 日目以降も続いていた (図 4、5)。このことから、バクテリア群集由来腐植性物質は、易分解性有機物から構成される単純な代謝産物ではない可能性が考えられる。また、蛍光強度は、培養 30 日目以後、約 3QSU で推移し培養終了まで、ほぼ一定の値をとった (図 5)。これは、バクテリア群集によって生産されたバクテリア由来腐植性物質の一部は、微生物分解に耐性を持ち、海水中に比較的長期間存在すること示唆している。

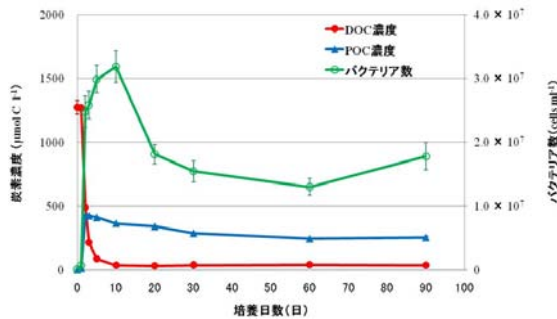


図 4. DOC・POC 濃度、バクテリア数の経時変化

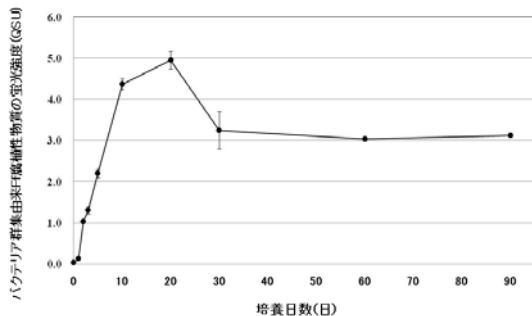


図 5. バクテリア群集由来腐植性物質の蛍光強度の経時変化

② バクテリア群集由来腐植性物質と海洋の腐植性物質との関連

培養 90 日目試料の腐植性物質の HPSEC により測定したところ、保持時間 (RT) 19.7 分 (Peak A)、RT 22.5 分 (Peak B) と RT 25.0 分 (Peak C) にピークが認められた。これら 3 本のピークはすべて 1000 Da 以下の分子量と推定され、バクテリア群集由来腐植性物質は 1000 Da 以下の 3 つの分子量グループから形成されることが明らかとなった。バクテリア群集由来腐植性物質のクロマトグラムと大浦湾表層海水のクロマトグラムを比較した結果、両者に共通するピーク (Peak A、B、C) が認められた (図 6)。しかしながら、Peak B、C の強度は大浦湾表層水のクロマトグラムでは非常に小さかった。本研究のバクテリア群集由来腐植性物質は暗所で生成したものであるのに対し自然海水は常に太陽光の影響下にある。これより、自然海水中の腐植性物質とバクテリア群集由来腐植性物質の分子量分布の差は、光分解の影響であるとの仮説を立て、バクテリア群集由来腐植性物質への太陽光の影響を調査した。

太陽光の下 1 日間放置した培養 90 日目のバクテリア群集由来腐植性物質の分子量分布を測定したところ、主要な 3 本のピーク (Peak A、B、C) 含むピーク面積の合計値は、自然光照射前の 43% に減少した。しかしながら、Peak A、B、C の各ピーク面積の残存率は、それぞれ、47、59、0% と大きな差が生じていた。この結果は、バクテリア群集由来腐植性物質は、同一の蛍光特性を持ちながらも、分子量画分により光化学的特性が異なること示唆している。一方、自然光照射後の大浦湾表層水試料の分子量分布は全体的なピーク面積の減少は見られたものの、そのクロマトグラムの形状に顕著な変化は確認できなかった。以上のことから、海洋表層ではバクテリア群集由来腐植性物質の特定の画分が残存することが推測される。

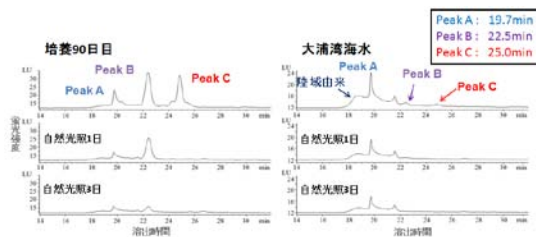
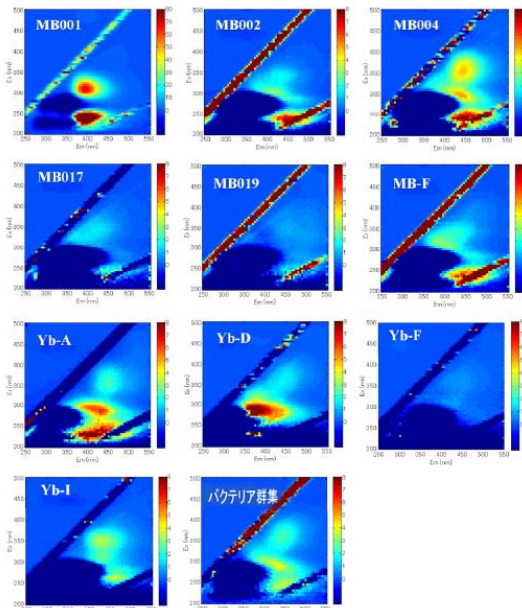


図 6. 培養 90 日目試料と大浦湾海水の腐植性物質のクロマトグラム

③ 腐植性物質の蛍光特性とバクテリア群集構造との関連

単離株培養試料の三次元励起・蛍光スペクトルを測定した (図 7)。培養を行った全ての

単離株、および、バクテリア群集で腐植性物質の存在を示す波長領域 (Ex/Em=290-310/320-460) に蛍光強度の増加が見られた。また、各バクテリアの単離株の腐植性物質の蛍光特性は大きく異なり、MB001 株の蛍光ピーク位置は Ex/Em=310/395nm、MB004 株では Ex/Em=300/430、355/445nm、Yb-I 株では Ex/Em=310/430、345/425nm となっていた。このことは、バクテリアの種類によって、生産される腐植性物質の特性が異なる可能性を示している。さらに、MB004 株などでは陸域起源の腐植様蛍光と似た蛍光ピーク (Ex/Em=355/445nm) が確認されている。このことは、従来は陸域由来とされていた腐植性物質の一部は、海洋においても自生的に生



産される可能性を示唆している。

図7. 培養試料の三次元励起・蛍光スペクトル

POC 濃度の増加量をバクテリアの細胞増加量と仮定し、バクテリアの有機物の利用効率を POC 増加 ( $\Delta$ POC) /DOC 減少 ( $\Delta$ DOC) として算出した結果、各バクテリアの炭素の利用効率は大きく異なることが明らかとなった。また各バクテリアの単離株の腐植性物質の蛍光ピーク強度の増加量を  $\Delta$ QSU として、バクテリアによる腐植性物質の生産能力を  $\Delta$ QSU /  $\Delta$ POC として求めたところ、バクテリア

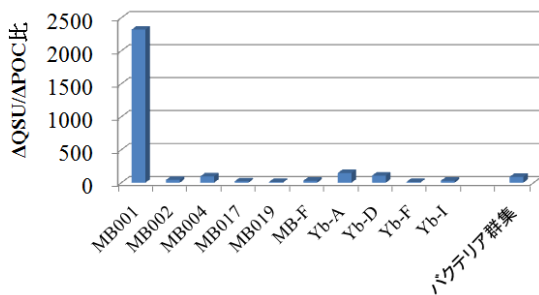


図8.  $\Delta$ QSU /  $\Delta$ POC 比

間で極めて顕著な違い有ることが明らかとなった (図7)。これらの結果から、DOC を腐植性物質へ変換するプロセスがバクテリアの種類によって異なることが推察される。また、MB001 株のような高い腐植性物質生産能力をもったバクテリアの存在から、海洋において生産される腐植性物質へのバクテリアの寄与はバクテリアの種類と関連し、特定のバクテリアのグループが腐植性物質の構成に大きく寄与している可能性が示唆される。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Y. Omori, T. Hama, M. Ishii, S. Saito (2010): Relationship between the seasonal change in fluorescent dissolved organic matter and mixed layer depth in subtropical western North Pacific. 査読有、*Journal of Geophysical Research-Ocean*, (in press)
- ② Shimotori, K., Y. Omori, T. Hama (2009) Bacterial production of marine humic-like fluorescent dissolved organic matter and its biogeochemical importance. *Aquatic Microbial Ecology*, 査読有、58, 55-66.
- ③ K. Yoshimura, T. Ogawa, T. Hama (2009) Degradation and dissolution properties of photosynthetically-produced phytoplankton lipid materials in early diagenesis. *Marine Chemistry*, 査読有、114, 11-18.
- ④ M. Ishii, H.Y. Inoue, T. Midorikawa, S. Saito, T. Tokieda, D. Sasano, A. Nakadate, K. Nemoto, N. Metzl, C.S. Wong, R.A. Feely (2009) Spatial variability and decadal trend of the oceanic CO<sub>2</sub> in the western equatorial Pacific wam/fresh water. *Deep-Sea Research II*, 査読有、56, 591-606.
- ⑤ M. Fujii, F. Chai, L. Shi, H.Y. Inoue, M. Ishii (2009) Seasonal and interannual variability of oceanic carbon cycling in the Western and Central Tropical-Subtropical Pacific: A Physical-Biogeochemical Modeling Study. *Journal of Oceanography*, 査読有、65, 689-701.
- ⑥ 石井雅男(2009) 亜熱帯モード水による大気から海洋へのCO<sub>2</sub>吸収、月刊海洋、査読無、425、725-730.
- ⑦ S. Lee, M. Ishii, S. Saito, K. Yanagi and T. Hama (2008) Spatial and temporal changes in the concentration of various phosphorus pools and their possible biogeochemical roles in the oligotrophic subtropical western North Pacific. *Journal of Geophysical Research - Ocean*, 査読有、113, C03017, doi:10.1029/2007JC004330

⑧ J. R., Christian, A. Feely, M. Ishii, R. Murtugudde, X. Wong (2008) Testing an ocean carbon model with observed sea surface pCO<sub>2</sub> and dissolved inorganic carbon in the tropical Pacific Ocean. *Journal of Geophysical Research*, 査読有, 113, C0747, doi:10.1029/2007JC004428

⑨ K. Kitayama, T. Hama and K. Yanagi (2007) Bioreactivity of peptidoglycan in seawater. *Aquatic Microbial Ecology*, 査読有, 46, 85-93.

[学会発表] (計 18 件)

① K. Shimotori, T. Hama, K. Watanabe, Bacterial production of humic-like fluorescent dissolved organic matter and variation of fluorescent properties among bacterial groups. 2010 Ocean Sciences Meeting, 2010年2月22日, ポートランド (アメリカ)

② Y. Omori, T. Hama, M. Ishii, S. Saito Effect of photoirradiation on chemical characteristics of marine humic substances-like fluorescent dissolved organic matter. 2010 Ocean Sciences Meeting, 2010年2月23日, ポートランド (アメリカ)

③ M. Ishii, Trend of DIC increase and acidification in the interior of the western North Pacific subtropical gyre. Ocean Sciences Meeting 2010, 2009年2月23日, ポートランド(アメリカ)

④ 石井雅男, 東経 137 度の海洋表層・中層における全炭酸増加と酸性化, 2009年度日本海洋学会秋季大会, 2009年9月26日, 京都大学.

⑤ 霜鳥孝一, 濱 健夫, 渡邊圭司バクテリアによる蛍光性溶存態有機物の生産. 2009年度日本海洋学会秋季大会, 2009年9月26日, 京都大学

⑥ 大森裕子, 濱 健夫, 石井雅男, 齊藤 秀 周防灘における腐植物質の分布と分子量組成, 2009年度日本海洋学会秋季大会, 2009年9月26日, 京都大学

⑦ M. Ishii, Trend of carbon increase and oxygen decrease in the interior of the western North Pacific subtropical gyre. 8<sup>th</sup> International Carbon Dioxide Conference, 2009年9月13日, イエナ(ドイツ).

⑧ M. Ishii, Trend of DIC increase in the western North Pacific subtropical gyre during 1994 – 2008 Decadal Variations of the Ocean's Interior Carbon Cycle: Synthesis and Vulnerabilities, 2009年7月13日, アスコナ(スイス).

⑨ 石井雅男, 東経 137 度における表面全炭酸濃度の増加と酸性化, 2009年度日本海洋学会春季大会, 2009年4月6日, 東京大学.

⑩ M. Ishii, Trend of oceanic CO<sub>2</sub> increase in the Pacific shallow meridional overturning circulation domain being investigated by

high-frequency observations. International Workshop on the North Pacific Ocean Observation Strategy for Carbon Cycle and Climate Chang, 2009年3月2日, 気象庁.

⑪ 石井雅男 西部北太平洋亜熱帯域表層における海洋炭酸系の季節変動・年々変動・長期変動, 東京大学海洋研究所 共同利用シンポジウム「亜熱帯海洋学の最前線」, 2008年12月11日, 東京大学.

⑫ M. Ishii Decadal and longer-term changes of the CO<sub>2</sub> in the ocean The second GEOS Asia-Pacific symposium. 2008年4月15日, 日本科学未来館.

⑬ 大森裕子・濱 健夫・石井雅男・齊藤秀, 西部北太平洋域における海洋腐植物質の蛍光強度の時空間的変動, 2008年度日本海洋学会春季大会, 2008年3月29日, 東京海洋大学.

⑭ 霜鳥孝一・濱 健夫 バクテリア由来腐植物質の光分解による分子量分布の変化, 2008年度日本海洋学会春季大会, 2008年3月29日, 東京海洋大学.

⑮ K. Shimotori, T. Hama Experimental studies on bacterial production of marine humic substances. Ocean Sciences Meeting, 2008年3月6日, オーランド(アメリカ).

⑯ Y. Omori, T. Hama, M. Ishii, S. Saito, Molecular weight composition of marine humic substances in the subtropical Western North Pacific. Ocean Sciences Meeting, 2008年3月5日, オーランド(アメリカ).

⑰ 大森裕子・濱 健夫・石井雅男・齊藤秀, 西部北太平洋域における海洋腐植物質の分子量分布の鉛直プロファイル, 2007年度日本海洋学会秋季大会, 2007年9月27日, 琉球大学.

⑱ 霜鳥孝一・濱 健夫 バクテリアによる腐植物質の生産に関する実験的解析, 2007年度日本海洋学会秋季大会, 2007年9月27日, 琉球大学.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

濱 健夫 (HAMA TAKEO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号: 30156385

### (2) 研究分担者

石井 雅男 (ISHII MASAO)

気象庁気象研究所・地球化学研究部・主任研究員

研究者番号: 70354552

### (3) 研究協力者

霜鳥 孝一 (SHIMOTORI KOUICHI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・博士課程

大森 裕子 (OMORI YUKO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・博士課程