

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24681002

研究課題名(和文) 海洋溶存有機物プールの消長を決定づける微生物炭素ポンプのメカニズムと効率の解明

研究課題名(英文) Evaluation of microbial carbon pump in relation to dynamics of dissolved organic matter pool in the ocean

研究代表者

山下 洋平 (Yamashita, Youhei)

北海道大学・地球環境科学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50432224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：海洋に存在する生物に難分解な溶存有機物は、地球表層における最大級の有機炭素プールを構成し炭素循環と密接に関わっているが、その生成機構は良く分かっていない。近年、海洋細菌による難分解性溶存有機物の生成機構として微生物炭素ポンプという新しい概念が提唱されたが、そのメカニズム解明および定量的評価には至っていない。

そこで、海洋細菌が生成する腐植様物質に着目し、本研究を実施した。その結果、生物に難分解な腐植様物質が海洋中深層に蓄積している可能性を示唆した。また、微生物炭素ポンプの定量的評価が可能な培養実験を確立・提案した。

研究成果の概要(英文)：Dissolved organic matter (DOM) in the ocean constitutes one of the largest reduced carbon pools in the global carbon cycle. Bio-refractory components of DOM (RDOM) are major fraction of DOM, however, the sources/production mechanisms of RDOM have not been clarified. Recently, importance of microbial RDOM production has been pointed out, and this process has been defined as the microbial carbon pump (MCP). However, the mechanism of MCP has not been well documented.

In this study, we focused humic-like substances in DOM as a MCP product. We determined spatial distribution of humic-like substances in the open ocean and found that humic-like substances are possibly accumulated in the deep ocean. In addition, we established the microbial incubation technique for evaluating microbial RDOM production. The technique would be useful for quantitative evaluation of MCP.

研究分野：生物地球化学

キーワード：海洋科学 生物地球化学 溶存有機物 微生物炭素ポンプ

1. 研究開始当初の背景

海中には孔径 0.2~0.7 μm の濾紙を通過する画分に含まれる非生物体有機物が存在し、それらは溶存有機物と称される。海洋に存在する溶存有機物は全量で 680 PgC (Pg = 10¹⁵g) と大気中二酸化炭素量に匹敵し、地球表層における最大級の還元型炭素プールを構成する。海洋における溶存有機物は陸上における土壌有機物に相当する。土壌有機物に関しては、近年の温暖化に伴い分解が促進され、温暖化に正のフィードバックを与えるなど、環境変動とその有機物プールの応答、有機物プールの変動が気候変動に与える影響が議論されている。一方、土壌有機物プールの 1/3 程度の大きさを有する海洋溶存有機物プールに関しては、現時点で、定常状態にあるのか、あるいは非定常状態にあるのか全く不明である。

近年、始新世の温暖化が海洋溶存有機物の大規模な分解に起因するなど、過去の気候変動と海洋溶存有機物プールの消長に関する仮説がいくつか提唱されている (e.g., Sexton et al., 2011, *Nature*, 471, 349-352)。すなわち、海洋溶存有機物プールは外的要因により消長し、その変動は炭素循環・気候変動に影響を与える事が考えられる。このように、海洋溶存有機物プールの挙動に関する知見は炭素循環の変動を理解・予測する上で必須である。

海洋溶存有機物の 90%以上は生物学的に難分解であり (Ogawa and Tanoue, 2003, *J. Oceanogr.*, 59, 129-147)、難分解性成分が海洋溶存有機物プールの挙動を支配する。しかし、難分解性成分の化学的実体は不明であり、その生成メカニズム及び分解速度に関する知見は著しく限られている。近年、海洋溶存有機物および微生物に関する研究をまとめ、Jiao らは“Microbial Carbon Pump (微生物炭素ポンプ)”という新しい概念を提唱した (Jiao et al., 2010, *Nature Reveals Microbiology*, 8, 593-599)。微生物炭素ポンプとは、海洋細菌が易分解性有機物を難分解性溶存有機物へと変換し (図 1)、それらは長時間 (~数千年) 分解されずに海水中に留まり、炭素循環から隔離されるという機構である。しかし、微生物炭素ポンプはまだそのプロセスが提示されたのみであり、この機構による難分解性溶存有機物の生成メカニズム及びフラックス、またこの機構により難分解性溶存有機物が海洋に蓄積しているか否か、は明らかでなかった。

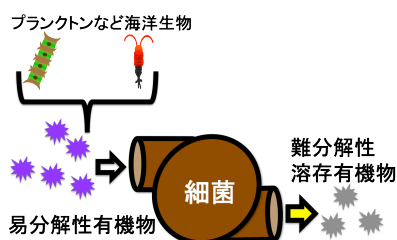


図1. 微生物炭素ポンプの概念図

2. 研究の目的

微生物炭素ポンプにより生成される難分解性溶存有機物の大部分は分子として同定できない分子的未同定成分であるが、分光学的に評価可能な腐植様蛍光物質は微生物炭素ポンプの生成物であると考えられている (Yamashita and Tanoue, 2008, *Nature Geosci.*, 1, 579-582)。

そこで本申請研究では、腐植様蛍光物質に着目し、微生物炭素ポンプの生成メカニズム及びフラックスの解明を目指し、①腐植様蛍光物質が海洋に普遍的に存在し海洋内部に蓄積しているか否かを評価する事、②培養実験により微生物炭素ポンプを定量的に評価する事、を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腐植様蛍光物質の普遍的存在

① 本申請研究では、微生物炭素ポンプの生成物として腐植様蛍光物質に着目した。そこで、海洋において分光学的に同質な腐植様蛍光物質の普遍的存在性を評価した。分光学的手法として蛍光光度法を用い、3次元蛍光スペクトル (EEM) を得た。また統計学的に EEM をいくつかの蛍光成分へと分解可能な Parallel Factor Analysis (PARAFAC) を適用し、沿岸域および外洋域における腐植様蛍光物質の組成を比較した。沿岸域に関しては、湿地やフィヨルドなど様々なフィールドを対象とし、外洋域の試料に関しては白鳳丸 (海洋研究開発機構/東京大学大気海洋研究所) やおしよろ丸 (北海道大学水産学部) により実施された研究航海に乗船および参画し、南北太平洋 (KH-12-3, KH-13-7, KH-14-次航海など)、北極海 (OS25 次航海など) および日本海 (OS253 次航海など) から試料を得た。

② 腐植様蛍光物質は微生物の酸素消費に伴い生成し、生成後は難分解である事が、海洋内部における見かけの酸素消費量 (AOU) と腐植様蛍光物質との間の直線関係から示唆されていた (Yamashita and Tanoue, 2008, *Nature Geosci.*, 1, 579-582)。本申請研究では、その現象の普遍性を確認するために、腐植様蛍光物質の高解像度分布を評価可能な in situ 蛍光センサー (ECO-FL(RT)D, Wetlabs) を世界で初めて外洋域に適用した。また、センサー値に対する校正や温度効果補正の方法を検討した。

(2) 培養実験による微生物炭素ポンプを定量的に評価

本申請研究では、難分解性溶存有機物の生成効率を評価するために、海洋細菌単離株を用いた培養実験を実施した。単離株として、海洋に広く分布する *Alteromonas macleodii* を用いた。培地には栄養塩を加えた有機物フリーな人工海水を用い、基質としてグルコースを使用した。培養は暗所・25℃で7日間行い、培養期間中に8回試料

を採取し、細胞密度、全有機炭素 (TOC) 濃度、溶存有機炭素 (DOC) 濃度、紫外-可視吸収スペクトル、EEM 分析に供した。

4. 研究成果

(1) ① EEM-PARAFAC 法を用いて様々な沿岸域における腐植様蛍光物質の組成を評価した。その結果、どの沿岸域においても塩分の増加に伴い、腐植様蛍光物質の組成が変化する事が明らかとなった (雑誌論文-①, ②, ④, ⑥, ⑧, ⑩)。これらの事は、河川由来 (陸上土壌由来) の腐植様蛍光物質と海洋細菌に生成される腐植様蛍光物質の組成が異なる事を示す。すなわち、外洋域において腐植様蛍光物質の組成を明らかにする事により、陸起源および海洋細菌起源を区別する事が可能であり、また海洋細菌起源の腐植様蛍光物質組成の普遍性についても評価できる事が分かった。

EEM-PARAFAC 法を外洋試料 (太平洋) に適用した結果、腐植様蛍光物質の組成は表層と深層では異なる事が明らかになった。表層では、腐植様蛍光物質組成は緯度帯により異なっており、太陽光による光分解により海洋細菌由来の腐植様蛍光物質組成が変化すると推察された。この事は、分光光度法を用いた観測結果からも指示された (雑誌論文-⑦)。一方、太陽光の届かない深層では腐植様蛍光物質の組成に大きな変化は見られなかった。この事より、深層においては、海域を問わず、同質な腐植様蛍光物質が海洋細菌により生成され、普遍的に存在する事が明らかとなった。

また、腐植様蛍光物質が海洋内部に蓄積しているか否かを評価する為に、日本海と太平洋の腐植様蛍光物質の存在量及び組成を比較した (雑誌論文-③, 学会発表-②, ③)。日本海は他の海と隣接する海峡の水深が浅いた

め、深層水 (日本海固有水) は日本海内で生成し、孤立した水塊として分布している。日本海固有水の年齢は太平洋深層水と比較すると若く、その溶存酸素濃度は太平洋深層水よりも高い。また、日本海固有水は冬季に生成し、生成時に酸素は供給されるが、冬季の弱い日射のため腐植様蛍光物質の光分解は制限される事が考えられる。すなわち、太平洋深層水と比較すると、日本海固有水は溶存酸素濃度が高く、溶存酸素濃度で規格化した腐植様蛍光物質の存在量が高い事が仮説として挙げられる。

本申請研究で得られた日本海および西部北太平洋の EEM に PARAFAC を適用した結果、2 つの腐植様蛍光成分 ($FDOM_{H-1}$ 、 $FDOM_{H-2}$) が得られた。図 2 に日本海および西部北太平洋における AOU と $FDOM_{H-1}$ の鉛直分布を示す。1000 m 以深の深層において、AOU は太平洋の方が日本海よりも高いが、 $FDOM_{H-1}$ 存在量は日本海の方が太平洋よりも高い事が分かった。近年、全海洋において、AOU と腐植様蛍光物質の存在量の間には基本的に正の直線関係がある事が明らかにされており (Catalá et al., 2015, *Nature Comm.*, 6, 9586)、日本海固有水中では、他の外洋深層と比較して、陸起源もしくは海洋細菌起源の腐植様蛍光物質の存在量が高い事が考えられた。

そこで、腐植様蛍光物質の組成 ($FDOM_{H-1}$ と $FDOM_{H-2}$ の比) を日本海固有水と太平洋深層水で比較した結果、両者で違いは無かった。前述したが、陸起源と海洋細菌起源では腐植様蛍光物質の組成は異なる。すなわち、仮説通りに、日本海固有水中では海洋細菌由来の腐植様蛍光物質が蓄積している事が明らかとなった。海洋細菌による有機物分解 (酸素消費) は酸素がある水塊では普遍的現象である事から、海洋深層において微生物炭素ポンプの生成物である腐植様蛍光物質が蓄積している可能性を示した。

(1) ② AOU と腐植様蛍光物質の関係をより高解像度に評価する為に、本申請研究では in situ 蛍光センサーの外洋域への適用を試みた。センサー使用の実用化に向けて、センサーの校正や温度効果補正の方法を検討した (*Marine Chemistry* 誌に投稿中)。

センサー値と海水試料をベンチトップ型蛍光光度計により測定した蛍光強度とを比較した。その結果、深層において、センサーとベンチトップ型蛍光光度計で得られた値の間に比較的大きな差があり、温度効果の補正が必要である事が分かった。温度効果実験の結果、温度の増加に対してセンサー値 (蛍光強度) は直線的に減少した。そこで、Watras et al. (2011, *Limnol. Oceanogr.: Methods*, 9, 296-301) に従い温度係数 (ρ) を算出した結果、 $\rho = -0.006$ であった。得られた ρ を用い、センサー値を補正したところ、深層におけるセンサー値とベンチトップ型蛍光光度計か

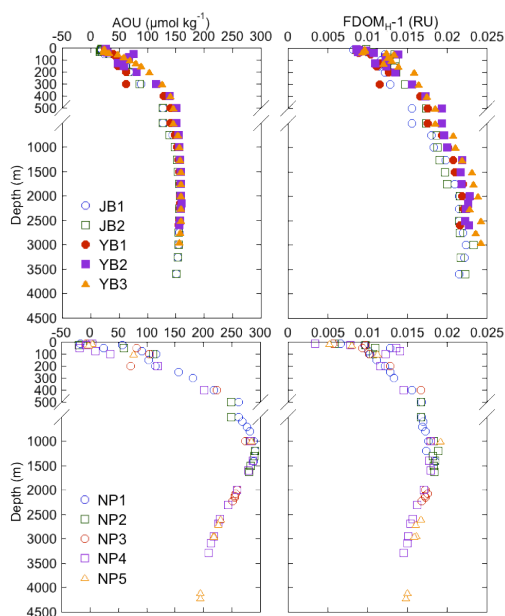


図2. 日本海 (上段) および西部北太平洋 (下段) における見かけの酸素消費量 (AOU, 右) と腐植様蛍光物質 ($FDOM_{H-1}$, 左) の鉛直分布。

ら得られた蛍光強度の間でみられた差は無くなった。

また、水温や塩分データの補正計算などを行うソフトウェア (Seasave V7) の window filter を用いセンサー値の低い S/N 比の改善を行ったところ、S/N 比は酸素センサー値と比較可能な程度まで改善された。

これらの事より、適切な補正を行う事により、in situ 蛍光センサーを用い、外洋域における腐植様蛍光物質の高解像度分布を得られる事が明らかとなった。

(2) 培養実験による微生物炭素ポンプを定量的に評価

海洋細菌による難分解性溶存有機物の生成に関しては、天然細菌群集を用いた培養実験により評価されている。本申請研究により徹底的な文献調査を実施した結果、過去に実施された培養実験から得られた微生物炭素ポンプの変換効率 (すなわち、易分解性基質から培養実験後に残存する難分解性と考えられる有機物への変換効率) は 3-8% と比較的狭い範囲に収まる事が分かった。この変換効率と全海洋における 1 次生産から微生物ループを経由する有機炭素フラックス (25 PgC yr^{-1}) を用いる事により、微生物炭素ポンプによる難分解性溶存有機物の生成フラックスを $0.8\text{-}2 \text{ PgC yr}^{-1}$ と見積もる事ができた。しかし、天然細菌群集を用いた培養実験では、それぞれの細菌群の活性が分からず、残存した有機物が難分解であるか否かを評価する事は難しい。すなわち、見積もった生成フラックスに関してもその妥当性は不明である。

そこで本申請研究では、海洋細菌単離株 (*Alteromonas macleodii*) を用い、難分解性と考えられる溶存有機物の生成実験を行った (学会発表-①, 投稿準備中)。ここで、海洋細菌単離株を用いる事により明確な微生物学的情報 (増殖期) を得る事ができ、EEM 分析による腐植様蛍光物質の変化から難分解と考えられる有機物の生成を確認できる。

7 日間の培養実験の結果、培養 1 日目までが対数増殖期、1-7 日は定常期である事が分かった。DOC 濃度の変化から基質として加えたグルコースは対数増殖期に消費されたと考えられた。一方、培養 1 日目以降 DOC 濃度は大きく変化せず、7 日目にも DOC が残存していた。これらの事より、培養 7 日目に残存した DOC は、*Alteromonas macleodii* 由来の難分解性溶存有機物であると考えられた。*Alteromonas macleodii* による難分解性溶存有機物の生成効率は 4% であると算出され、この値は前述した先行研究で得られた範囲内に収まった。一方、腐植様蛍光物質は、対数増殖期に対数的に増加し、定常期に至っても増加し続けた。この結果は、DOC 濃度に変化の見られなかった 1 日目以降も *Alteromonas macleodii* は難分解性溶存有機物を生成していた事を示す。すなわち、本実験で得られた生成効率は過大評価である可能性が考えら

れた。

本実験結果は、文献調査の結果得られた微生物炭素ポンプの生成フラックスに関しても過大評価である事を示唆する。一方、本申請研究で用いた培養実験方法に関して培養期間を長くするなど改良を加える事により、将来、難分解性溶存有機物の生成効率を正確に見積もる事が可能になると考えられる。従って、本申請研究により培養実験手法を確立し、それを提案できた意義は極めて大きい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Yamashita, Y., L.S. McCallister, B.P. Koch, M. Gonsior, and R. Jaffé (2015) Dynamics of dissolved organic matter in fjord ecosystems: Contributions of terrestrial dissolved organic matter in the deep layer. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 159, 37-49. doi:10.1016/j.ecss.2015.03.024 (査読有)
- ② Lu, Y., J.W. Edmonds, Y. Yamashita, B. Zhou, A. Jaegge, and M. Baxley (2015) Spatial Variation in the Origin and Reactivity of Dissolved Organic Matter in Oregon-Washington Coastal Waters. *Ocean Dynamics*, 65, 17-32. doi:10.1007/s10236-014-0793-7 (査読有)
- ③ Tanaka, K., K. Kuma, K. Hamasaki, and Y. Yamashita (2014) Accumulation of humic-like fluorescent dissolved organic matter in the Japan Sea. *Scientific Reports*, 4, 5292. doi:10.1038/srep05292 (査読有)
- ④ Maie, N., S. Sekiguchi, A. Watanabe, K. Tsutsuki, Y. Yamashita, L. Melling, K. Cawley, E. Shima, R. Jaffé (2014) Dissolved organic matter dynamics in the oligo/meso-haline zone of wetland-influenced coastal rivers. *Journal of Sea Research*, 91, 58-69. doi:10.1016/j.seares.2014.02.016 (査読有)
- ⑤ Romera-Castillo, C., M. Chen, Y. Yamashita, and R. Jaffé (2014) Fluorescence characteristics of size-fractionated dissolved organic matter: Implications for a molecular assembly based structure? *Water Research*, 55, 40-51. doi:10.1016/j.watres.2014.02.017 (査読有)
- ⑥ Cawley, K.M., Y. Yamashita, N. Maie, and R. Jaffé (2014) Using Optical Properties to Quantify Fringe Mangrove Inputs to the Dissolved Organic Matter (DOM) Pool in a Subtropical Estuary. *Estuaries and Coasts*, 37, 399-410. doi:10.1007/s12237-013-9681-5 (査読有)
- ⑦ Yamashita, Y., Y. Nosaka, K. Suzuki, H. Ogawa, K. Takahashi, and H. Saito (2013) Photobleaching as a factor controlling spectral characteristics of chromophoric dissolved organic matter in open ocean. *Biogeosciences*, 10, 7207-7217.

- doi:10.5194/bg-10-7207-2013 (査読有)
- ⑧ Yamashita, Y., J.N. Boyer, and R. Jaffé (2013) Evaluating the distribution of terrestrial dissolved organic matter in a complex coastal ecosystem using fluorescence spectroscopy. *Continental Shelf Research*, 66, 136-144.
doi:10.1016/j.csr.2013.06.010 (査読有)
- ⑨ 神田穰太, 石井雅男, 小川浩史, 小埜恒夫, 小畑元, 川合美千代, 鈴木昌弘, 本多牧生, 山下洋平, 渡邊豊 (2013) 海洋学の10年展望 (II) -日本海洋学会将来構想委員会化学サブグループの議論から- *海の研究*, 22, 219-251. (査読有)
- ⑩ 山下洋平 (2012) 太平洋における溶存腐植様蛍光物質の分布 -北太平洋中層水による陸起源腐植物質輸送の可能性- *月刊海洋*, 44, 486-491. (査読無)
- ⑪ Maie, N., Y. Yamashita, R.M. Cory, J.N. Boyer, and R. Jaffé (2012) Application of excitation emission matrix fluorescence monitoring in the assessment of spatial and seasonal drivers of dissolved organic matter composition: Sources and physical disturbance controls. *Applied Geochemistry*, 27 917-929.
doi:10.1016/j.apgeochem.2011.12.021 (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 後藤周史, 多田雄哉, 鈴木光次, 山下洋平 (2015) 海洋細菌単離株による溶存有機物の生成に関する研究. *日本海洋学会 2015 年度春季大会*, 2015 年 3 月 21-25 日, 東京海洋大学 (東京都).
- ② Tanaka, K., K. Kuma, K. Hamasaki, T. Nagata, and Y. Yamashita (2013) Accumulation of humic-like fluorescent dissolved organic matter in the Japan Sea Proper Water. *The 6th China-Japan-Korea IMBER symposium*, 3-4 October 2013, The University of Tokyo (Tokyo, JAPAN).
- ③ 田中和樹, 久万健志, 浜崎恒二, 永田俊, 山下洋平 (2013) 日本海における蛍光性溶存有機物の分布. *日本海洋学会 2013 年度秋季大会*, 2013 年 9 月 13-17 日, 北海道大学 (札幌市).

[図書] (計 1 件)

- ① Jaffé, R., K.M. Cawley, and Y. Yamashita (2014) Applications of Excitation Emission Matrix Fluorescence with Parallel Factor Analysis (EEM-PARAFAC) in Assessing Environmental Dynamics of Natural Dissolved Organic Matter (DOM) in Aquatic Environments: A Review. *Advances in the Physicochemical Characterization of Dissolved Organic Matter: Impact on Natural and Engineered Systems*, Fernando Rosario-Ortiz ed, ACS Symposium Series,

Vol. 1160, American Chemical Society, 27-73. doi:10.1021/bk-2014-1160.ch003 (査読有)

[その他]

ホームページ等

<http://geos.ees.hokudai.ac.jp/yamashita/homu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 洋平 (YAMASHITA, Youhei)

北海道大学・大学院地球環境科学研究所・准教授

研究者番号 : 50432224